

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**MARTIN BANOVEC**

**DIPLOMSKA NALOGA**

**UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

Ljubljana, 2008

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**MARTIN BANOVEC**

**SINTEZA ANALOGOVSUBSTRATA MUREIN PEPTIDNE LIGAZE  
(Mpl)**

**SYNTHESIS OF SUBSTRATE ANALOGS OF MUREIN PEPTIDE LIGASE  
(Mpl)**

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom Andreje Kovač, mag. farm. Spektroskopske in elementne analize so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo ter Inštitutu Jožef Štefan.

Ob tej priložnosti bi se rad zahvalilizr. prof. dr. Stanislavu Gobcu, mag. farm. in Andreji Kovač, mag. farm. za posredovano strokovno pomoč in koristne nasvete pri izdelavi diplomskega dela.

Najlepša hvala tudi vsem ostalim, ki so mi med izdelavo diplomskega dela kakorkoli pomagali, še posebej gospe Damjani Zalar za pomoč v laboratoriju, Marku Trohi za računalniške nasvete ter vsem asistentom zaposlenim na katedri, ki so mi vedno pomagali kadar sem ji prosil za pomoč. Hvaležen pa sem tudi Veroniki Rupnik, Gašperju Čadezu, Katri Kolšek in Samu Turku za prijetne in lepe trenutke, ki smo jih preživeli skupaj med opravljanjem dela v laboratoriju.

Na koncu pa bi se rad zahvalil še svojim skrbnim staršem, ki so me spremljali in podpirali ves čas mojega izobraževanja.

### **Izjava**

**Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelal samostojno pod mentorstvomizr. prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom Andreje Kovač, mag. farm.**

Martin Banovec

Ljubljana, maj 2008

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

Član komisije:izr. prof. dr. Vojko Kmetec, mag. farm.

# VSEBINA

<b>KAZALO SLIK</b> .....	<b>7</b>
<b>POVZETEK</b> .....	<b>8</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1. DELOVANJE PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2. BAKTERIJSKA CELIČNA STENA IN PEPTIDOGLIKAN</b> .....	<b>13</b>
1.2.1. Celična stena po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij .....	13
1.2.2. Zgradba peptidoglikana .....	15
<b>1.3. BIOSINTEZA PEPTIDOGLIKANA</b> .....	<b>17</b>
1.3.1. Sinteza nukleotidnih prekurzorjev v citoplazmi .....	17
1.3.2. Prenos prekurzorjev skozi citoplazemsko membrano .....	18
1.3.3. Vgradnja prekurzorjev v peptidoglikan .....	19
<b>1.4. MUREIN PEPTIDNA LIGAZA ( MPL)</b> .....	<b>19</b>
1.4.1. Razgradnja peptidoglikana in vloga Mpl .....	19
1.4.2. Lastnosti encima Mpl.....	21
<b>1.5. STRUKTURNI ANALOGI OZIROMA ANTIMETABOLITI</b> .....	<b>21</b>
1.5.1.1. Antagonisti folne kisline.....	22
1.5.1.2. Analogi purinov .....	22
1.5.1.3. Analogi pirimidinov .....	23
1.5.1.4. Analogi PABA .....	24
<b>2. NAČRT DELA</b> .....	<b>25</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1. MATERIALI</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2. METODE</b> .....	<b>28</b>
3.2.1. Kromatografske metode.....	28
3.2.2. Spektroskopske metode.....	29
<b>4. EKSPERIMENTALNI DEL</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1. REAKCIJSKE SCHEME</b> .....	<b>30</b>
4.1.1. Substitucija in zaščita aminokislin.....	30
4.1.2. Sinteza tripeptidov.....	31
<b>4.2. KEMIJSKE REAKCIJE</b> .....	<b>32</b>
4.2.1. Sinteza (S)-benzil 2-aminobutanoata (2) .....	32
4.2.2. Sinteza (S)-benzil 2-aminopentanoata (3) .....	33
4.2.3. Sinteza (S)benzil 2-aminoheksanoata (4) .....	34

4.2.4.	Sinteza (S)-benzil 2-aminoheptanoata (5) .....	35
4.2.5.	Sinteza PTSA soli (S)-6-amino-7-(benziloksi)-7-oksoheptanojske kisline (6).....	36
4.2.6.	Sinteza (S)-2-amino-4-(benziloksikarbonilamino) butanojske kisline (7).....	37
4.2.7.	Sinteza (S)-2-amino-5-(benziloksikarbonil) pentanojske kisline (8).....	38
4.2.8.	Sinteza (S)-benzil 2-amino-4-(metoksikarbonilamino) butanoata (9) .....	39
4.2.9.	Sinteza (S)-metil 2-amino-5-(benziloksikarbonilamino) pentanoata (10) .....	40
4.2.10.	Sinteza (R)-2-amino-3-(2-karboksietiltio) propanojske kisline (11) .....	41
4.2.11.	Sinteza (R)-2-amino-3-merkaptopropanojske kisline (12).....	42
4.2.12.	Sinteza (R)-metil 2-amino-3-(3-metoksi-3-oksopropiltio) propanoata (13).....	43
4.2.13.	Sinteza (R)-metil 2-amino-3-(3-metoksi-3-oksoetiltio) propanoata (14) .....	44
4.2.14.	Sinteza (S)-2,5-dioksopirolidin-1-il2-(benziloksikarbonilamino)propanoata (15) .....	45
4.2.15.	Sinteza (R)-5-(benzoioksi)-4-((S)-2-(benziloksikarbonilamino)propanamido)-5-oksopentanojske kisline (16) .....	46
4.2.16.	Sinteza benzo (5S,8R,13S)-13-etil-5-metil-3,6,11,14-tetraokso-1,16-difenil-2,15-dioksa-4,7,12-triazaheksadekan-8-karboksianhidrida (17).....	47
4.2.17.	Sinteza benzo (5S,8R,13S)-5-metil-3,6,11,14-tetraokso-1,16-difenil-13-propil-2,15-dioksa-4,7,12-triazaheksadekan-8-karboksianhidrida (18).....	48
4.2.18.	Sinteza benzo (5S,8R,13S)-13-butil-3,6,11,14-tetraokso-1,16-difenil-2,15-dioksa-4,7,12-triazaheksadekan-8-karboksianhidrida (19) .....	49
4.2.19.	Sinteza benzo (5S,8R,13S)-5-metil-3,6,11,14-tetraokso-13-pentil-1,16-difenil-2,15-dioksa-4,7,12-triazaheksadekan-8-karboksianhidrida (20).....	50
4.2.20.	Sinteza benzo (5S,8R,13S)-13-(benziloksikarbonil)-5-metil-3,6,11,18-tetraokso-1,20-difenil-2,19-dioksa-4,7,12-triazaheksadekan-8-karboksianhidrida (21) .....	52
4.2.21.	Sinteza (5R,8R,14S)-8-benzil 14,17-dimetil 5-metil-3,6,11-trikso-1-fenil-2-oksa-16-tia-4,7,12-triazaheptadekan-8,14,17-trikarboksilata (22).....	53
4.2.22.	Sinteza (5R,8R,14S)-8-benzil 14,18-dimetil 5-metil-3,6,11-trikso-1-fenil-2-oksa-16-tia-4,7,12-triazaoktadekan-8,14,18-trikarboksilata (23).....	54
4.2.23.	Sinteza (5S,8R,13S)-metil 8-(benziloksikarbonil)-13-(2-(benziloksikarbonilamino)etil)-5-metil-3,6,11-triokso-1-fenil-2-oksa-4,7,12-triazatetradekan-14-oata (24) .....	56
4.2.24.	Sinteza (5S,8R,13S)-metil 8-(benziloksikarbonil)-13-(3-(benziloksikarbonilamino)propil)-5-metil-3,6,11-triokso-1-fenil-2-oksa-4,7,12-triazatetradekan-14-oata (25) .....	58
4.2.25.	Sinteza (S)-1-((R)-1-karboksi-4-((R)-1-karboksipropilamino)-4-oksobutilamino)-1-oksopropan-2-amonijevega acetata (26) .....	60
4.2.26.	Sinteza (S)-1-((R)-1-karboksi-4-((R)-1-karboksibutilamino)-4-oksobutilamino)-1-oksopropan-2-amonijevega acetata (27) .....	61
4.2.27.	Sinteza (S)-1-((R)-1-karboksi-4-((R)-1-karboksipentilamino)-4-oksobutilamino)-1-oksopropan-2-amonijevega acetata (28) .....	62
4.2.28.	Sinteza (S)-1-((R)-1-karboksi-4-((R)-1-karboksiheksilamino)-4-oksobutilamino)-1-oksopropan-2-amonijevega acetata (29) .....	63

4.2.29.	<i>Sinteza (S)-1-((R)-1-karboksi-4-((R)-1,5-dikarboksipentilamino)-4-oksobutilamino)-1-oksopropan-2-amonijevega acetata (30)</i> .....	64
4.2.30.	<i>Sinteza (S)-1-((R)-1-karboksi-2-(karboksimetiltio)etilamino)-4-oksobutilamino)-1-oksopropan-2-amonijevega acetata (31)</i> .....	65
4.2.31.	<i>Sinteza (S)-1-((R)-1-karboksi-4-((R)-1-karboksi-2-(karboksietiltio)etilamino)-1-oksopropan-2-amonijevega acetata (32)</i> .....	66
4.2.32.	<i>Sinteza (S)-1-((R)-4-amino-1-karboksibpropilamino)-1-karboksi-4-oksobutilamino)-1-oksopropan-2-amonijevega acetata (33)</i> .....	67
4.2.33.	<i>Sinteza (S)-1-((R)-4-amino-1-karboksibutililamino)-1-karboksi-4-oksobutilamino)-1-oksopropan-2-amonijevega acetata (34)</i> .....	68
<b>5.</b>	<b>RAZPRAVA IN RAZLAGA SINTEZNIH POSTOPKOV</b> .....	<b>69</b>
5.1.	<b>IZBOR IN UTEMELJITEV USTREZNEGA AMINOKISLINSKEGA MOTIVA S TENDENCO ZA VEZAVO V AKTIVNO MESTO ENCIMA MPL.</b> .....	<b>69</b>
5.2.	<b>RAZLAGA SINTEZNIH POSTOPKOV</b> .....	<b>71</b>
5.2.1.	<i>Sinteza benzilnih estrov aminokislin ( spojine 2, 3, 4, 5, 6 )</i> .....	71
5.2.2.	<i>Zaščita terminalne amino skupine pri L-Dab in L-Orn (spojini 7, 8)</i> .....	72
5.2.3.	<i>Sinteza spojin 11 in 12</i> .....	73
5.2.4.	<i>Sinteza spojin 9, 10, 13, 14 (tvorba metilnih estrov)</i> .....	73
5.2.5.	<i>Sinteza spojine 16</i> .....	74
5.2.6.	<i>Tvorba amidne vezi z EDC/HOBt metodo</i> .....	74
5.2.7.	<i>Odstranitev zaščitnih skupin</i> .....	75
5.2.7.1.	<i>Odstranitev benzilne zaščite</i> .....	75
5.2.7.2.	<i>Odstranitev metilne zaščite</i> .....	75
5.2.8.	<i>Komentar k rezultatom analiz</i> .....	76
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČEK</b> .....	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>78</b>

## KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Razlika v zgradbi bakterijske celične stene med G<sup>+</sup> in G<sup>-</sup> bakterijami</i> .....	14
<i>Slika 2: Struktura bakterijskega peptidoglikana; N-acetilglukozamin predstavlja zelena kroglica, N-acetilmuraminsko kislina pa modra kroglica</i> .....	15
<i>Slika 3: Razlika med prečnimi povezavami peptidoglikanskih vlaken G<sup>+</sup> in G<sup>-</sup> bakterij; z NAM je označena N-acetilmuraminska kislina, z NAG pa N-acetilglukozamin</i> .....	16
<i>Slika 4: Biosinteza peptidoglikana</i> .....	18
<i>Slika 5: Vključitev Mpl encima v proces recikliranja peptidoglikanskih prekurzorjev</i> .....	20
<i>Slika 6: Delovanje antagonistov folne kisline</i> .....	22
<i>Slika 7: Primerjava analogov purinov</i> .....	22
<i>Slika 8: Alopurinol in azatioprin</i> .....	23
<i>Slika 9: Primerjava analogov pirimidina</i> .....	24
<i>Slika 10: Primerjava PABA in sulfonamidov kot antimetabolitov</i> .....	24
<i>Slika 11: Splošna struktura tripeptidov</i> .....	25
<i>Slika 12: Primeri različno substituiranih aminokislin v primerjavi z L-Lys</i> .....	26
<i>Slika 13: Splošna shema za uvedbo benzilne zaščite</i> .....	26
<i>Slika 14: Splošna shema za uvedbo metilne zaščite</i> .....	27
<i>Slika 15: Splošna shema za tvorbo amidne vezi</i> .....	27
<i>Slika 16: Splošna struktura tripeptidov</i> .....	68
<i>Slika 17: Prečna povezava peptidoglikanskih verig pri G<sup>+</sup> bakterijah</i> .....	69
<i>Slika 18: Prečna povezava peptidoglikanskih verig pri G<sup>-</sup> bakterijah</i> .....	69
<i>Slika 19: Mehanizem nastanka benzilnega estra</i> .....	70
<i>Slika 20: Bakrov kompleks z L-Dab</i> .....	71
<i>Slika 21: S<sub>N</sub>2 mehanizem nukleofilne substitucije</i> .....	72
<i>Slika 22: Aktivacija karboksilne kisline z EDC</i> .....	73
<i>Slika 23: Alkalna hidroliza estra</i> .....	75

## POVZETEK

Odkritje antibiotikov pomeni enega najpomembnejših mejnikov v razvoju in napredku medicine. Zdravljenje bakterijskih infekcij je dolgo časa temeljilo predvsem na uporabi široko spektralnih antibiotikov, ki so jih razvili iz naravnih produktov. Vendar pa so se zaradi naravne selekcije, mutacij in tudi nekritične uporabe pojavile zelo odporne bakterije, ki so razvile različne načine odpornosti na antibiotike in kemoterapevtike. Zato danes obstaja stalna potreba po razvoju novih protimikrobnih učinkovin. Za bakterije specifičen peptidoglikan predstavlja tisti del celične stene, ki je odgovoren za njeno trdnost in zaščito pred lizo. Največkrat so tarče zdravilnih učinkovin encimi, ki katalizirajo sintezo bakterijske celične stene. Murein peptidna ligaza (Mpl) je encim prisoten pri nekaterih G-bakterijah, ki z direktnim vgrajevanjem tripeptida L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*mezo*-L-A<sub>2</sub>pm na nukleotidni prekurzor UDP-MurNAc skrbi za energetsko varčno obnavljanje peptidoglikana. Ker prečno premreževanje peptidoglikana poteka ravno preko tretje aminokislinskega peptida, bi z vgrajevanjem tripeptidov (lažnih substratov), ki na tem mestu ne omogočajo prečnega premreženja, porušili stabilnost in odpornost bakterijske stene ter posledično povzročili bakterijsko smrt.

Lažni substrati predstavljajo serijo tripeptidov z motivom L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-Xaa, ki bi jih Mpl vezal na UDP-MurNAc in bi se na ta način vgradili v celično steno, ter tako motili prečno premreženje peptidoglikana. Raziskave so pokazale, da Mpl poleg substrata L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*mezo*-L-A<sub>2</sub>pm z veliko afiniteto veže na UDP-MurNAc tudi tripeptid L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lys, ki je prisoten pri G<sup>+</sup> bakterijah. Na osnovi tega dejstva smo v okviru diplomskega dela sintetizirali serijo tripeptidov, kjer Xaa predstavlja različne aminokislinske, ki v primerjavi z L-Lys variirajo bodisi v dolžini verige ali pa v drugačni substituiranosti stranske verige.

Ker sta prvi dve aminokislini pri vseh končnih spojinah enaki, smo najprej sintetizirali večjo količino osnovnega dipeptida L-Ala-D-Glu, na katerega smo v nadaljevanju vezali različne aminokislinske, ki smo jih pred tem ustrezno substituirali in zaščitili. Sledila je sinteza amidne vezi med drugo in tretjo aminokislino z EDC/HOBt metodo. Na ta način smo dobili serijo zaščitene tripeptidov, ki smo jim v zadnji stopnji odstranili še zaščitne skupine. Reakcije smo izvedli s katalitskim hidrogeniranjem (odstranitev benzilnih zaščit), oziroma z alkalno hidrolizo (odstranitev metilne zaščite).



Ker je murein peptidna ligaza na novo odkrit encim obstaja še veliko neznank na področju njegovega delovanja. Dosedanje raziskave so med drugim pokazale, da v svoje aktivno mesto sprejme poleg tripeptidov tudi tetra- in pentapeptide in ravno tako široka substratna nespecifičnost je pomemben podatek za načrtovanje novih protibakterijskih zdravilnih učinkovin.

## Seznam okrajšav

<b>Ac</b>	acetil
<b>AcOH</b>	ocetna kislina
<b>ADP</b>	adenozin difosfat
<b>AmpD</b>	1,6-dehidro- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin amidaza
<b>A<sub>2</sub>pm</b>	diaminopimelinska kislina
<b>Ar</b>	aromatski
<b>ATP</b>	adenozin trifosfat
<b>Bn</b>	benzil
<b>Cbz</b>	benziloksikarbonil
<b>d</b>	dublet (NMR)
<b>dd</b>	dublet dubleta (NMR)
<b>DKM</b>	diklorometan
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -dimetilformamid
<b>DMSO</b>	dimetilsulfoksid
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDC</b>	1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)karbodiimidijev klorid
<b>Et<sub>3</sub>N</b>	triethylamin
<b>EtOAc</b>	etilacetat
<b>EtOH</b>	etanol
<b>G-</b>	po Gramu negativne (bakterije)
<b>G+</b>	po Gramu pozitivne (bakterije)
<b>GlcNAc</b>	<i>N</i> -acetilglukozamin
<b>HOBt</b>	<i>N</i> -hidroksibenzotriazol
<b>IC<sub>50</sub></b>	koncentracija zaviralca, pri kateri je aktivnost encima znižana za 50%
<b>IR</b>	infrardeča spektroskopija
<b>J</b>	sklopitvena konstanta (NMR)
<b>K</b>	kloroform
<b>LdcA</b>	L, D-karboksipeptidaza
<b>Lipid I</b>	MurNAc-(pentapeptid)-pirofosforil undekaprenol
<b>Lipid II</b>	GlcNAc-MurNAc-(pentapeptid)- pirofosforil undekaprenol

<b>M</b>	multiplet (NMR)
<b>Mr</b>	molekulska masa
<b>MeOH</b>	metanol
<b>MF</b>	mobilna faza
<b>MS</b>	masna spektrometrija
<b>MurA</b>	UDP- <i>N</i> -acetilglukozaminolpiruvil transferaza
<b>MurB</b>	UDP- <i>N</i> -acetilenolpiruvilglukozamin reduktaza
<b>MurC</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat:L-Ala ligaza
<b>MurD</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-L-Ala:D-Glu ligaza
<b>MurE</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu:L-Lys ligaza
<b>MurF</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu- <i>mezo</i> -A <sub>2</sub> pm: D-Ala-D-Ala ligaza
<b>MurG</b>	UDP- <i>N</i> -glukozamin- <i>N</i> -acetilmuramil-pentapeptid-pirofosforil-undekaprenol- <i>N</i> -acetilglukozamin transferaza
<b>MurNAc</b>	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
<b>Mpl</b>	L-Alanil- $\gamma$ -D-Glutamil- <i>mezo</i> -diaminopimelat ligaza
<b>NagZ</b>	$\beta$ - <i>N</i> -acetilglukozaminidaza
<b>NMM</b>	<i>N</i> -metilmorfolin
<b>NMR</b>	jedrska magnetna resonanca
<b>Ph</b>	fenil
<b>P<sub>i</sub></b>	anorganski fosfat
<b>S</b>	singlet (NMR)
<b>SF</b>	stacionarna faza
<b>S. aureus</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>t</b>	triplet (NMR)
<b>T</b>	temperatura
<b>TLC</b>	tankoplastna kromatografija
<b>TMS</b>	tetrametilsilan (NMR)
<b>UDP</b>	uridin difosfat
<b>UMA</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-L-alanin
<b>UMAG</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-L-alanil- $\gamma$ -D-glutaminska kislina

## 1. UVOD

Rezistenca patogenih bakterij na antibiotike oz. kemoterapevtike danes predstavlja resen problem na področju javnega zdravstva, za farmacevtsko industrijo pa pomeni velik izziv za iskanje novih tarč in razvoj novih protibakterijskih učinkovin (1). Ena izmed najbolj poznanih in tudi najbolj uspešnih tarč je prav gotovo biosinteza peptidoglikana (2).

Peptidoglikan je nujen sestavni del bakterijske celične stene, ki je značilen le za prokariotske celice in zato vpliv na njegovo biosintezo omogoča selektivno poseganje v življenjske procese mikrobov. Za uspešno načrtovanje novih inhibitorjev in preučevanje njihovega delovanja je nujno potrebno dobro poznavanje zgradbe peptidoglikana, njegove biosinteze, vseh encimov ter encimskih substratov, ki pri tem sodelujejo in navsezadnje tudi njegove vloge v bakterijski celici. Do sedaj je bilo odkritih že veliko antibiotikov oz. kemoterapevtikov (predvsem  $\beta$ -laktamov in glikopeptidov), ki inhibirajo končne stopnje biosinteze peptidoglikana, v zadnjem desetletju pa se je zanimanje preusmerilo na zgodnejše faze biosinteze, kjer se odpirajo nove, še neraziskane možnosti za razvoj (3).

### 1.1. Delovanje protimikrobnih učinkovin

Protimikrobne učinkovine so snovi, ki preprečujejo razvoj patogenih mikroorganizmov v človeškem organizmu in pri tem ne škodijo gostitelju. Osnovni koncept pri tem je selektivna toksičnost, njihova uporaba v terapiji pa je zelo izboljšala potek in prognozo mnogih infekcijskih bolezni (4).

Antibiotiki so v ožjem pomenu sekundarni metaboliti različnih vrst mikroorganizmov (bakterije, glive ...), ki delujejo bakteriostatično (zavirajo rast drugih mikroorganizmov) ali pa baktericidno (povzročijo smrt drugih mikroorganizmov). Ta izraz lahko širše uporabimo tudi za polysintezne derivate (penicilini, cefalosporini), spojine popolnoma sinteznega izvora (kinoloni, sulfonamidi) pa uvrščamo med kemoterapevtike (5).

Protimikrobne učinkovine delujejo protibakterijsko na različne načine:

- zavirajo sintezo celične stene bakterij;
- spremenijo permeabilnost celične membrane;
- spremenijo sintezo proteinov (vežejo se na ribosomsko podenoto in s tem povzročijo celično smrt, ali prizadenejo funkcijo ene ribosomske podenote in povzročijo reverzibilno inhibicijo sinteze proteinov);
- zavrejo metabolizem bakterijskih nukleinskih kislin;
- delujejo kot antimetaboliti (5).

## 1.2. Bakterijska celična stena in peptidoglikan

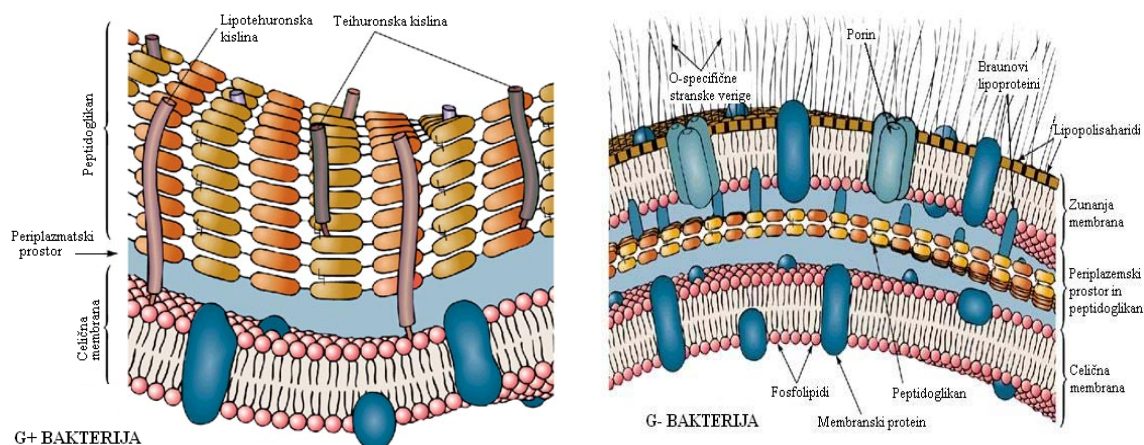
Bakterijska celična stena je zelo močna, rigidna in kompleksna struktura, ki obdaja celično membrano bakterij. Čeprav je ne najdemo v vseh bakterijah, je zelo pomembna celična struktura z več različnimi funkcijami:

- vzdržuje karakteristično obliko celice (kompenzira fleksibilnost fosfolipidne membrane);
- ščiti bakterijo pred vplivi okolja (npr. pred spremembo okoliškega tlaka);
- kot semipermeabilna bariera omogoča prehod le nekaterim snovem;
- sodeluje pri rasti in delitvi celice in
- preprečuje prebavo z gostiteljevimi encimi .

Pri večini bakterij daje celični steni trdnost peptidoglikan ali murein, ki bakteriji zagotavlja preživetje v močno hipotoničnem okolju, saj bi v nasprotnem mediju prišlo do nabrekanja in lize celice (6).

### 1.2.1. Celična stena po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij

Osnovna sestavina celične stene tako G<sup>+</sup> kot G<sup>-</sup> bakterij je makromolekula peptidoglikan. Le-tega sestavljajo verige ponavljajočih se disaharidnih enot *N*-acetil glukozamina (GlcNAc) in *N*-acetil muraminske kisline (MurNAc), medsebojno premrežene s kratkimi peptidnimi verigami (7). Glede na razlike v kemijski zgradbi celične stene ločimo dve skupini bakterij: G<sup>+</sup> in G<sup>-</sup> bakterije (3) (*slika 1*).



Slika 1: Razlika v zgradbi bakterijske celične stene med G+ in G- bakterijami (29).

### G+ bakterije

Celična stena G+ bakterij je debela 15-50 nm in je po svoji strukturi preprostejša od stene G- bakterij. Sestavlja jo do 40 plasti peptidoglikana, poleg tega pa celična stena vsebuje še anionske polimere, in sicer tehojsko in teihuronsko kislino. Tehojska kislina je anionski polimer, sestavljen iz glicerol fosfata ali ribitol fosfata in je na eni strani povezan s peptidoglikanom, na drugi pa s plazemsko membrano. Teihuronska kislina pa je anionski polimer s heksuronskimi kisljinami. Anionski polimeri so zaradi fosfatnih,aminskih in hidroksilnih skupin vgrajeni v ionsko-izmenjevalni sistem, ki skrbi za uravnavanje koncentracije magnezija v celicah; magnezijevi ioni so namreč pomembni za pravilno delovanje določenih encimov, ki so vključeni v biosintezo peptidoglikana. Peptidoglikan in anionski polimeri niso ločene strukture ampak skupaj sestavljajo kompleksne makromolekule. Pri G+ bakterijah predstavlja citoplazemska membrana glavno bariero za privzem antibiotikov v celico (3).

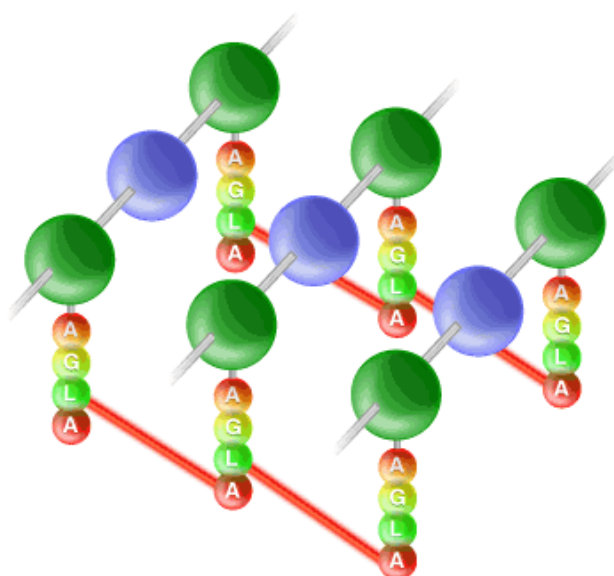
### G- bakterije

Celična stena G- bakterij je mnogo bolj kompleksna. Vsebuje le eno plast peptidoglikana, ki ga obdaja čvrsta zunanja membrana, sestavljena iz lipopolisaharidov, fosfolipidov in proteinov. Zaradi zunanje membrane je v primerjavi z G+ bakterijami prepustnost celične stene G- bakterij zelo zmanjšana. Če lahko celično steno G+ bakterij prehajajo spojine z molsko maso 70000 in več, pa pri G- bakterijah zunanje membrane ne morejo prehajati ionizirane, hidrofilne molekule z molsko maso od 600 do 900 in zelo

lipofilne spojine (barvila, maščobne kisline, detergenti, nekatere protimikrobne učinkovine) (3).

### 1.2.2. Zgradba peptidoglikana

Peptidoglikan je kovalentni linearni glikanski polimer, sestavljen iz alternirajočih enot *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminske kisline (MurNAc), ki so med sabo povezane z 1,4- $\beta$  glikozidno vezjo. *N*-acetilmuraminska kislina je derivat *N*-acetilglukozamina, ki ima na C-3 atomu z etrsko vezjo pripeto mlečno kislino. Karboksilne skupine vseh ostankov *N*-acetilmuraminske kisline so substituirane s tetrapeptidi, ki prečno povezujejo glikanska vlakna v rigidno makromolekularno mrežo (2) (slika 2).

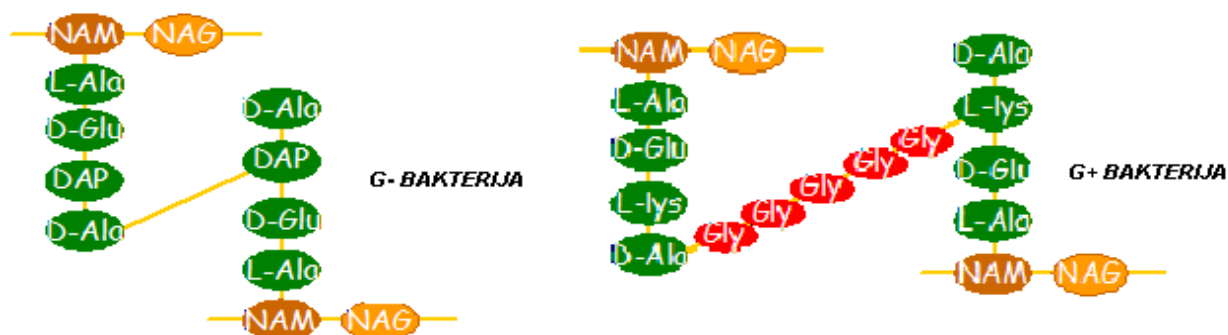


Slika 2: Struktura bakterijskega peptidoglikana; *N*-acetilglukozamin predstavlja modra kroglica, *N*-acetilmuraminsko kislino pa zelena kroglica (30).

Aminokislina, ki sestavljajo tetrapeptide, imajo L in D konfiguracijo (D-aminokislina so v naravi redke; večinoma jih najdemo le v peptidoglikanu), njihovo zaporedje pa je: L-alanin, D-glutaminska kislina, *mezo*-diaminopimelinska kislina, D-alanin. Tudi *mezo*-diaminopimelinska kislina, ki je simetrična molekula z dvema kiralnima centroma s konfiguracijo D in L, se v naravi nahaja le v peptidoglikanu (1). Čeprav je daleč najbolj zastopana aminokislina na tretjem mestu, so v veliko bakterijah na tem mestu našli tudi L-lizin (*S. aureus*, *M. luteis* ...), v nekaterih pa tudi L-ornitin, L-diaminobutanojsko kislino ali L-homoserin. Razlike med bakterijami se lahko pojavijo tudi

v D-glutaminskem fragmentu muramil tetrapeptida, ki ima lahko karboksilno skupino prosto ali v obliki amida, in v strukturi same muraminske kisline (mesto 6 je lahko O-acetilirano, kar povzroči neobčutljivost peptidoglikana na razgradnjo z lizocimi) (3).

Tetrapeptidne verige na sosednjih glikanskih vlaknih so medsebojno povezane v prečno povezan polimer, število verig, ki sodelujejo pri tej povezavi, pa je lahko različno. Pri G- mikroorganizmih jih je samo 20 %, pri G+ pa lahko tudi več kot 90 %. Pri večini G- bakterij so prečne povezave sestavljene iz direktne peptidne vezi med karboksilno skupino četrte aminokislina (D-alanina) ene glikanske verige in prosto amino skupino tretje aminokislina sosednje glikanske verige. V primeru G+ bakterij pa terminalno karboksilno skupino D-alanina ene verige in prosto amino skupino tretje aminokislina v drugi verigi povezuje pentaglicinski most (2) (slika 3).



Slika 3: Razlika med prečnimi povezavami peptidoglikanskih vlaken G+ in G- bakterij; z NAM je označena N-acetilmuraminska kislina, z NAG pa N-acetilglukozamin (31).



### 1.3. Biosinteza peptidoglikana

Biosinteza peptidoglikana je kompleksen proces, sestavljen iz treh stopenj:

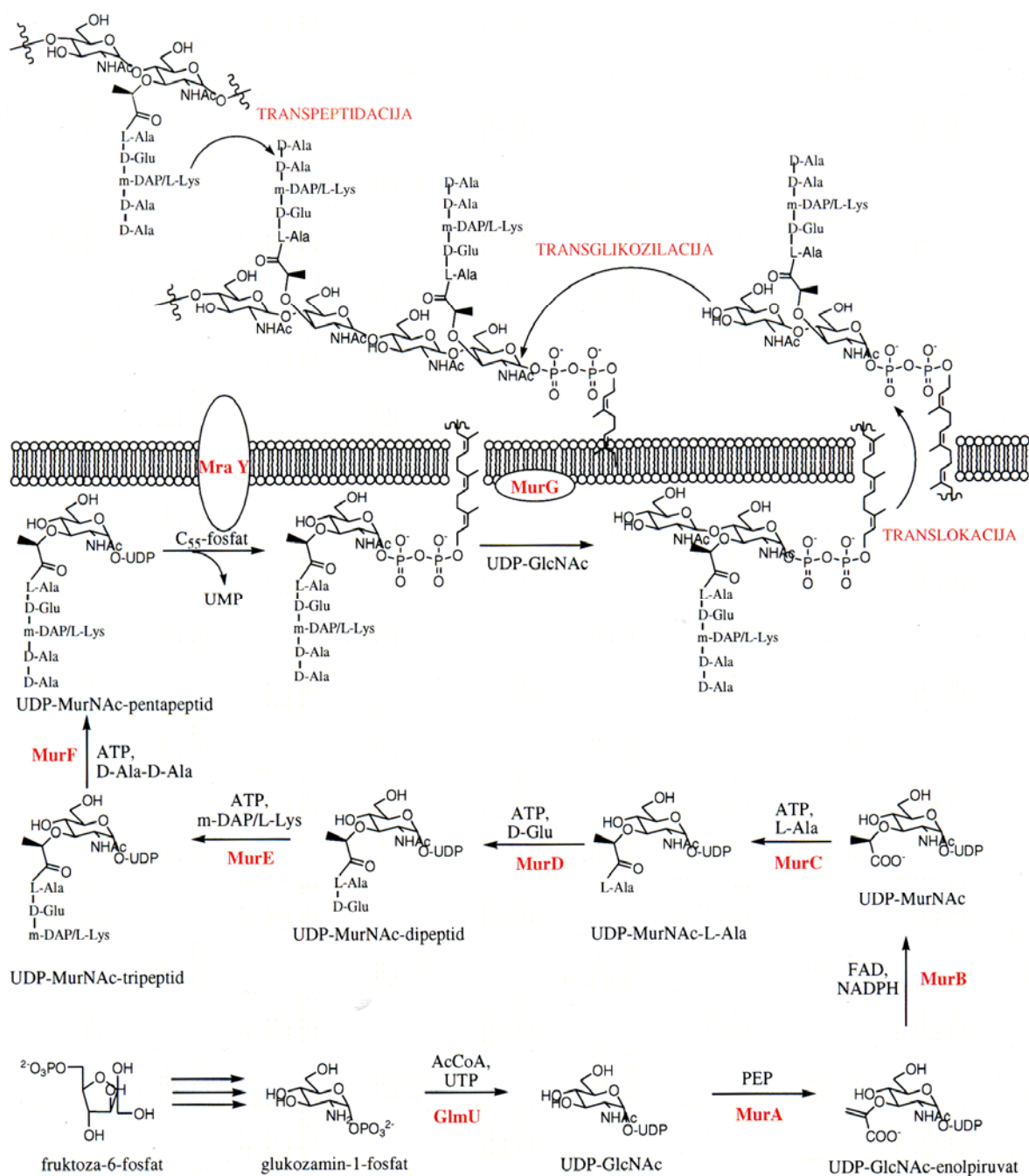
- sinteza prekurzorjev v citoplazmi;
- prenos prekurzorjev do lipidnega nosilca, ki jih prenese čez membrano;
- prehod prekurzorjev v celično steno in vgraditev v že obstoječi peptidoglikan (3).

#### 1.3.1. Sinteza nukleotidnih prekurzorjev v citoplazmi

V prvem delu biosinteze se v citoplazmi sintetizirata UDP-*N*-acetilglukozamin in UDP-*N*-acetilmuramilpentapeptid. Bakterije iz primarnega metabolita fruktoze-6-fosfata v štirih stopnjah sintetizirajo *N*-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc), v naslednjih dveh stopnjah pa se sintetizira *N*-acetilmuraminska kislina (UDP-MurNAc). Prvo stopnjo, pri kateri pride do prenosa fosfoenol piruvata, katalizira encim MurA, sledi pa ji redukcija enola do laktoilne skupine, katere katalizator je encim MurB (2).

Istočasno poteka sinteza D-aminokislin, ki jih najdemo le v prokariontih. Bakterije sintetizirajo D-aminokislino po dveh biosintezni poteh: pri prvi pride do racemizacije  $\alpha$ -ogljikovega atoma L-aminokislino, ki jo katalizira ustrezna aminokislinska racemaza, druga pa gre preko stereoselektivne redukcije  $\beta$ -keto kisline. Na enega od načinov se sintetizirajo D-alanin, D-glutamat in mezo-diaminopimelat (3).

UDP-MurNAc je končni citoplazemski prekurzor biosinteze peptidoglikana, nastane pa tako, da se na prosto karboksilno skupino UDP-*N*-acetiluraminske kisline preko amidne vezi postopoma vežejo L-alanin (reakcijo katalizira MurC), D-glutaminska kislina (s pomočjo encima MurD) in mezo-diaminopimelinska kislina (katalizator reakcije je encim MurE). Encimi MurC, MurD in MurE so specifične sintetaze prekurzorjev peptidoglikana, ki kot vir energije uporabljajo ATP. Preostala dva aminokislinska preostanka (D-Ala-D-Ala) se pripneta kot že prej tvorjen dipeptid D-alanil-D-alanin s pomočjo encima MurF. Ta dipeptid nastane iz L-alanina s pomočjo alanin racemaze, ki L-alanin pretvori v D-alanin, nato pa D-alanin:D-alanin ligaza (Ddl) katalizira nastanek dipeptida D-Ala-D-Ala (2) (slika 4).



Slika 4: Biosinteza peptidoglikana (32)

### 1.3.2. Prenos prekurzorjev skozi citoplazemsko membrano

V tej stopnji se celična prekurzorja UDP-GlcNAc in UDP-MurNAc-pentapeptid povežeta z glikozidno vezjo, nato pa se nastali disaharid pentapeptid, vezan na lipidni nosilec undekaprenilfosfat (imenovan tudi 55-izoprenoid fosfat), prenese skozi celično

membrano in se na zunanji strani membrane s pomočjo transglikozilacije in transpeptidacije vključi v nastajajoči peptidoglikan (3).

### 1.3.3. Vgradnja prekurzorjev v peptidoglikan

V zadnjem delu biosinteze peptidoglikana se linearni glikani, zbrani na lipidnem nosilcu na zunanji strani citoplazemske membrane, v procesu transpeptidacije vgradijo v celično steno. V reakciji sodeluje encim transpeptidaza, ki se najprej veže na D-Ala-D-Ala enoto pentapeptidne verige. Peptidna vez med D-alaninskima ostankoma se pretrga; odcepi se terminalni D-alanin. Energija, ki se pri tem sprosti, se porabi za nastanek prečne povezave. Med karboksilno kislino preostalega alanina in prosto  $\epsilon$ -amino skupino diaminopimelinske kisline oz. L-lizina na sosednji glikanski verigi nastane peptidna vez. Tako se novo nastali glikan poveže s peptidoglikanom celične stene. Podobno se povežejo še ostala glikanska vlakna in nastane čvrsto povezana mreža.

Stopnja prečne premreženosti peptidoglikana je pri G<sup>+</sup> in G-bakterijah različna in jo uravnavajo encimi karboksipeptidaze, ki katalizirajo odcep terminalnega D-alanina, odcepi pa se lahko tudi predzadnji D-alanin. Tako ti encimi preprečijo prečno povezavo, saj transpeptidaza za svoje delovanje zahteva D-alanil-D-alanin na koncu pentapeptidne verige (3)

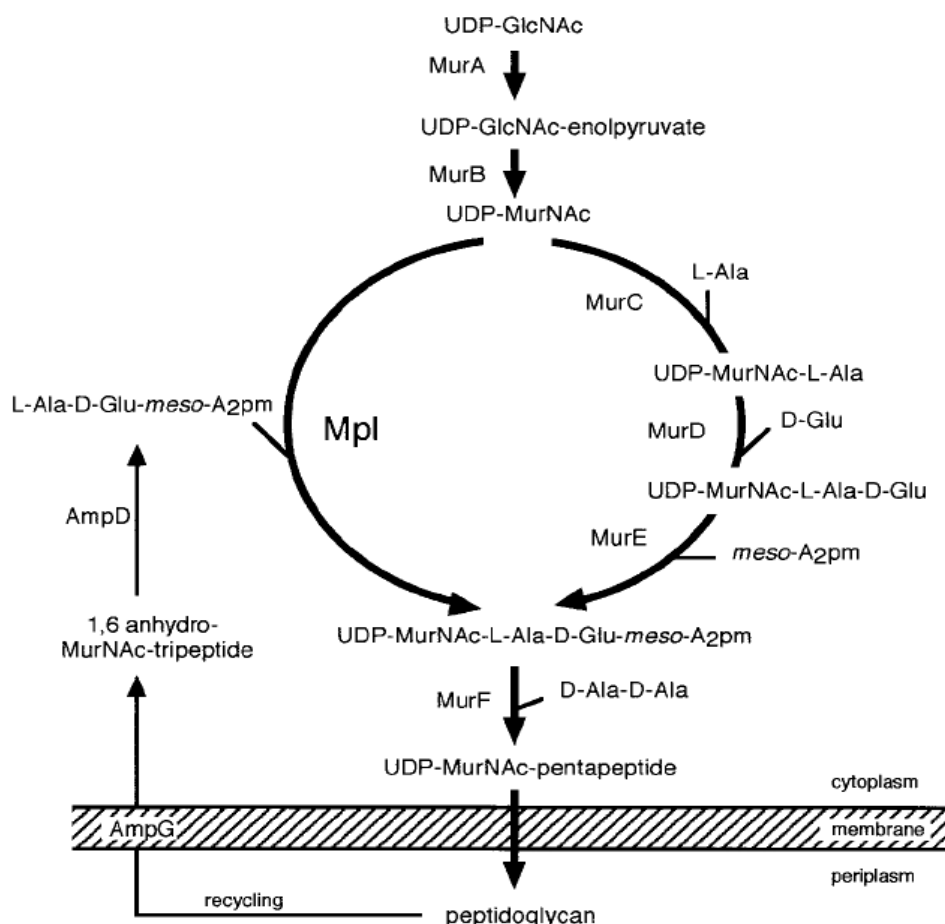
## 1.4. Murein peptidna ligaza ( Mpl)

### 1.4.1. Razgradnja peptidoglikana in vloga Mpl

Sinteza in razgradnja celične stene sta dinamična procesa, ki pri bakterijah neprestano potekata. Sintezo omogočajo predvsem Mur encimi, ki katalizirajo nastanek glavnega gradnika celične stene (UDP-MurNAc-pentapeptida), razgradnja peptidoglikana pa je posledica delovanja številnih mureinskih hidrolaz. Proces razgradnje se začne z delovanjem litičnih transglikolaz, endopeptidaz in L,D-karboksipeptidaz, ki razgradijo peptidoglikan do GcNAc-MurNAc(1,6-dehidro)-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*mezo*-A<sub>2</sub>pm-D-Ala (8).

Po delovanje hidrolaz, se nastali disaharid-tetrapeptid GlcNAc-MurNAc(1,6-dehidro)-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*mezo*-A<sub>2</sub>pm-D-Ala s pomočjo specifične permeaze AmpG

prenese preko membrane v citoplazmo, kjer po delovanju encimov AmpD, NagZ in LdcA nastane tripeptid L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*mezo*-A<sub>2</sub>pm, D-Ala in dehidro-MurNac. Tripeptid L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*mezo*-A<sub>2</sub>pm se nato lahko razgradi še do aminokislin, v večini primerov pa vstopi v t.i. «proces recikliranja», kjer se s pomočjo encima Mpl direktno veže na UDP-MurNac.



Slika 5: Vključitev Mpl encima v proces recikliranja peptidoglikanskih prekurzorjev (9).

Tako nastane UDP-MurNac-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*mezo*-A<sub>2</sub>pm, ki ponovno vstopi v biosintezo celične stene (slika 5). Opisan proces je za celico tudi iz energijskega stališča zelo ugoden, saj celica na ta način porabi veliko manj energetske bogatih ATP molekul, kot pa če sinteza peptidoglikana poteka od začetka preko vseh stopenj, ki jih katalizirajo Mur encimi. Raziskave so tudi pokazale, da se s procesom recikliranja lahko ponovno uporabi okoli 40 % tri-, tetra- in pentapeptidov, ki nastanejo ob razgradnji peptidoglikana (9).

### 1.4.2. Lastnosti encima Mpl

Mpl je neesencialen encim, ki je prisoten pri nekaterih bakterijah in je bil najprej izoliran iz *E.coli*. Vloga, ki jo opravlja Mpl je bila sprva pripisana MurC ligazi, ki katalizira vezavo L-alanina na nukleotidni pekursor, vendar je bila ta hipoteza kasneje kmalu zavrnjena, saj so poskusi na celicah, katerim so eliminirali MurC encim pokazali, da vezava tripeptida L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*mezo*-A<sub>2</sub>pm na UDP-MurNAc kljub temu poteka. Tako so znanstveniki predvidevali da obstaja neka nova ligaza, ki so jo nato pri raziskavi gena, ki kodira za MurC encim tudi odkrili. Opazili so namreč veliko podobnost v aminokislinskem zaporedju MurC in Mpl encima, saj je približno 30% baznih parov na odprtem bralnem okvirju popolnoma enakih. Tako velika homologija obeh genov je bila po eni strani tudi pričakovana, saj imata oba encima podobno ligazno aktivnost (9).

Encim murein peptidna ligaza, ki omogoča vezavo L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*mezo*-A<sub>2</sub>pm na UDP-MurNAc ni omejen le na tripeptide, ampak lahko v svoje aktivno mesto sprejme tudi tetra- in pentapeptide. Kljub temu, da je bil encim Mpl relativno pozno odkrit, da še ne poznamo njegove kristalne strukture in da je še veliko neznank v zvezi z njegovim delovanjem, pa velika substratna nespecifičnost kaže na to, da je encim lahko dobra potencialna tarča za nove protibakterijske učinkovine.

### 1.5. Strukturni analogi oziroma antimetaboliti

Antimetaboliti so strukturni analogi znanih esencialnih celičnih metabolitov; npr. folne kisline, purina, pirimidina in p-aminobenzojske kisline. Ker so po kemijski strukturi zelo podobni naravnim metabolitom, delujejo tako, da se namesto njih vežejo v aktivno mesto encima. Posledice vezave so:

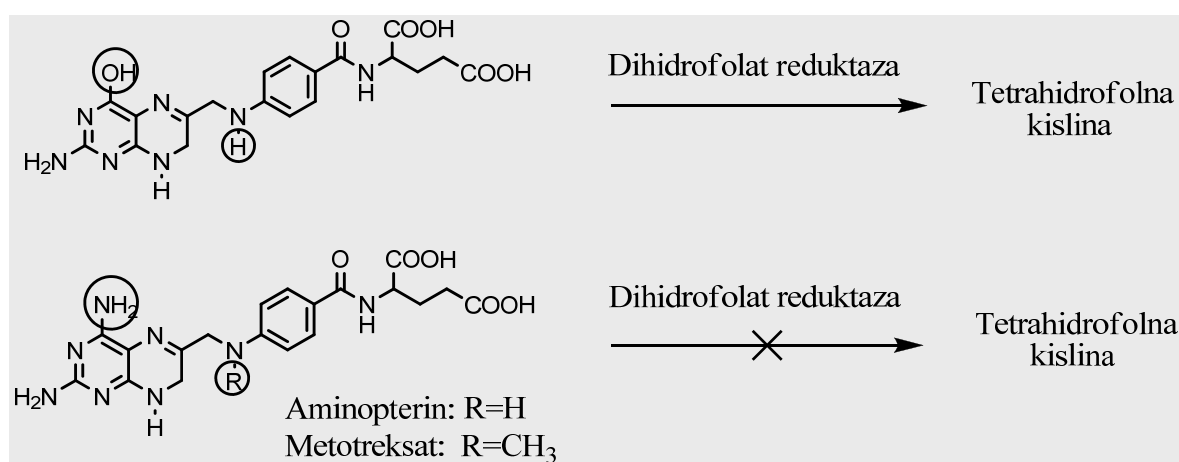
- nenormalno delovanje in rast celice;
- motena sinteza celičnih gradnikov in DNA verige;
- zmanjšana aktivnost encima;
- smrt celice (4).

Antimetaboliti se veliko uporabljajo v terapiji raka, saj specifično delujejo na faze celičnega cikla in tako zmanjšajo rast in proliferacijo malignih celic.

### 1.5.1. Pomembne skupine antimetabolitov

#### 1.5.1.1. Antagonisti folne kisline

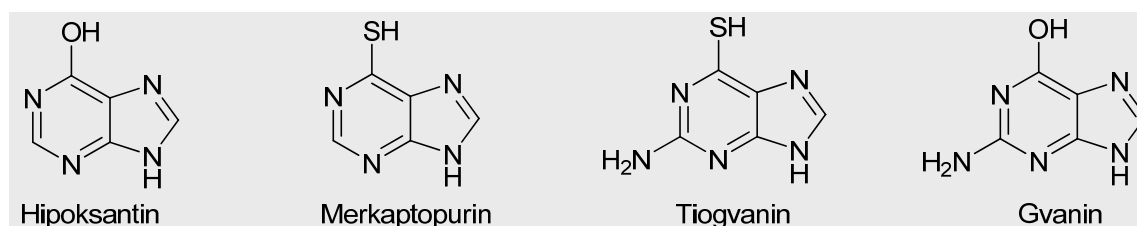
Najpomembnejša predstavnika te skupine sta metotreksat in aminopteridin. Mehanizem delovanja antagonistov folne kisline je inhibicija encima dihidrofolat reduktaze, ki katalizira pretvorbo folne v tetrahidrofolno kislino (TH<sub>4</sub>), kar vodi do inhibicije biosinteze nukleinskih kislin in posledično do zaustavitve rasti malignih celic (slika 6).



Slika 6: Delovanje antagonistov folne kisline (10)

#### 1.5.1.2. Analogi purinov

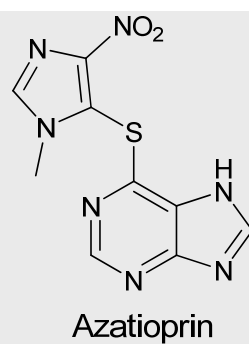
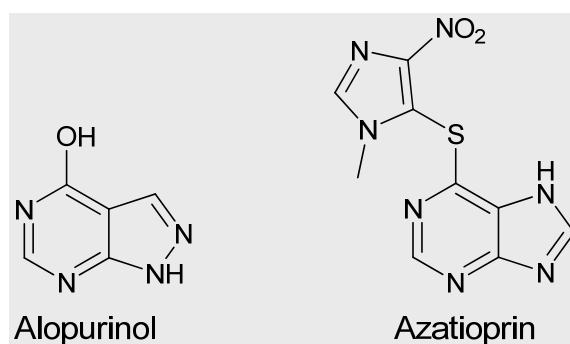
Merkaptopurin in tiogvanin sta najpomembnejša predstavnika te skupine (slika 7). Merkaptopurin je strukturni analog hipoksantina in se v organizmu po delovanju encima pirofosforilaze transformira v ribonukleotid tioinozinsko kislino, ki v naslednjih korakih kompetitivno antagonizira delovanje encimov od katerih zavisi biosinteza adenina in ksantinskih ribonukleotidov.



Slika 7: Primerjava analogov purinov (4)

Drugi pomembni predstavnik iz te skupine pa je tiogvanin, strukturni analog gvanina, ki je pomemben del in gradnik DNA molekule. V organizmu se tiogvanin metabolizira v ribonukleotid, ki nato namesto gvanina vstopi v procese biosinteze nukleinskih kislin. Na ta način se sintetizirajo »lažni« polinukleotidi, ki blokirajo sintezo DNA (9).

Poleg že omenjenih analogov purinov, pa spadata v to skupino še alopurinol in azatioprin (slika 8).



Slika 8: Alopurinol in azatioprin (4)

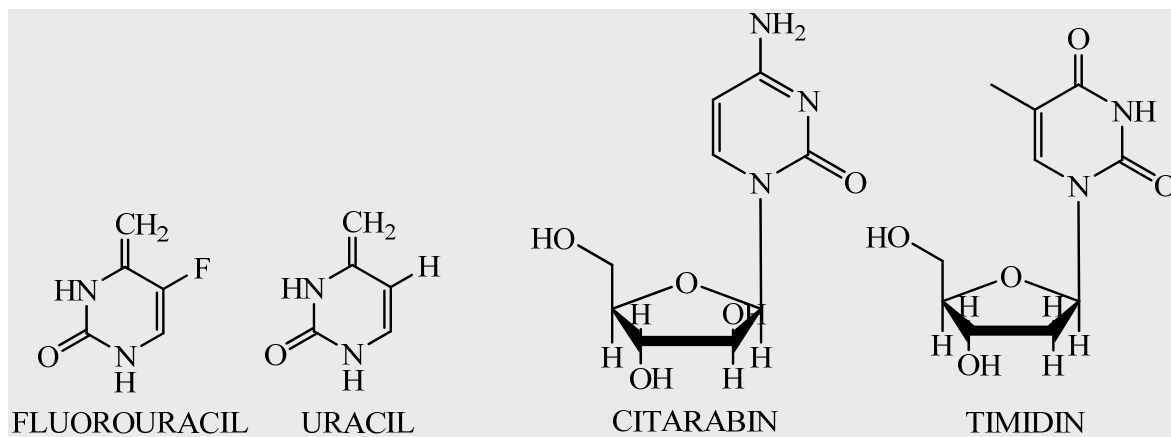
Alopurinol je enako kot merkaptopurin strukturni analog hipoksantina in se pogosto uporablja v terapiji malignih tumorjev, čeprav ni citostatik. Deluje kompetitivno z drugimi purini za katalitična mesta na ksantinoksidazi in na ta način preprečuje oksidacijo purina do purinske kisline. Alopurinol zelo potencira delovanje merkaptopurina, saj preko inhibicije ksantinske oksidaze onemogoča metaboliziranje merkaptopurina, kar ob sočasnem jemanju obeh lahko vodi do toksičnih učinkov na zdrave celice.

Azatioprin pa je imidazolski derivat merkaptopurina in se uporablja predvsem kot imunosupresiv (10).

### 1.5.1.3. Analogi pirimidinov

Pomembna predstavnika sta fluorouracil in citabarin. Fluorouracil se po biotransformaciji do ribozil in deoksiribozil nukleotidnih derivatov kovalentno veže na encim timidilat sintetazo in na kofaktor metilen-tetrahidrofolat, kar zaustavi sintezo DNA. Poleg tega se fluorouracil vgrajuje tudi v RNA in moti njeno normalno delovanje.

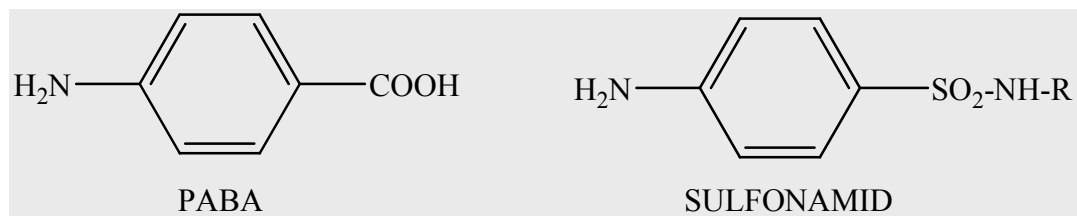
Citabarin pa je primer učinkovine, ki deluje specifično na S-fazo celičnega cikla, saj zavira vgraditev timidin trifosfata v DNA. Zaradi tega dejstva je učinkovit le na celice, ki se aktivno delijo, na ostale, ki so pa v fazi mirovanja, pa nima učinka (*slika 9*).



*Slika 9: Primerjava analogov pirimidina (10)*

#### 1.5.1.4. Analogi PABA

Druga velika skupina učinkovin, ki delujejo kot antimetaboliti, pa so poleg citostatikov še sulfonamidi. Gre za strukturne analoge p-aminobenzojske kisline (9).



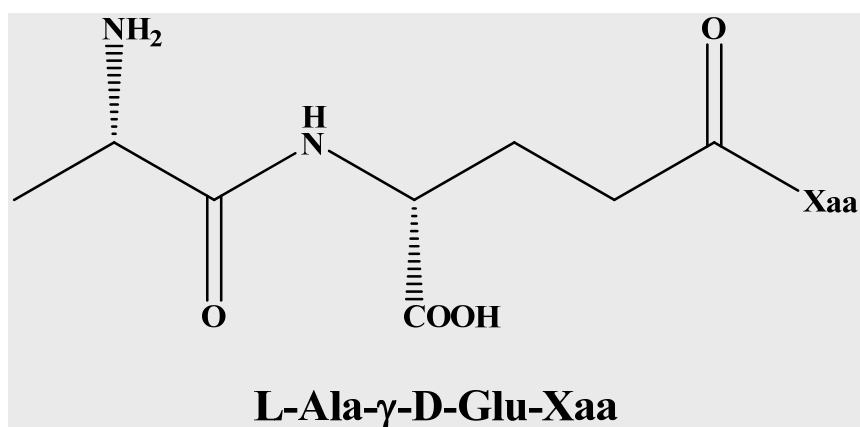
*Slika 10: Primerjava PABA in sulfonamidov kot antimetabolitov*

PABA je nujno potrebna za sintezo folne kisline, ki je potrebna za rast in razmnoževanje bakterij (*slika 10*). Sulfonamidi kompetitivno tekmujejo s PABA za vezavno mesto na encimu, kar vodi do nastanka nefunkcionalnih analogov folne kisline. Posledica tega je zmanjšana produkcija purinov in sinteza nukleinskih kislin. Bakteriostatično delovanje sulfonamidov prizadane le bakterije, ki same proizvajajo folno kislino, medtem ko na gostitelje, ki jo dobijo s hrano, nimajo vpliva (10).



## 2. NAČRT DELA

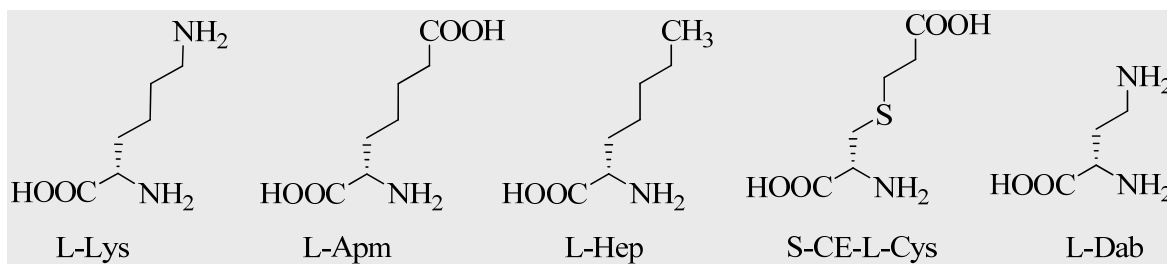
Namen eksperimentalnega dela diplomske naloge je sintetizirati strukturne analoge substrata murein peptidne ligaze (Mpl) kot potencialne nove protibakterijske učinkovine. Splošna struktura spojin, ki jih bomo pripravili, je prikazana na spodnji sliki.



Slika 11: Splošna struktura tripeptidov

Prvi dve aminokislini sta enaki kot pri substratu za Mpl, to sta L-alanin in D-glutaminska kislina. Tretja aminokislina, ki je na *sliki 11* označena z Xaa, pa predstavlja različne substituirane in nesubstituirane aminokislino, ki so strukturno podobne L-lizinu. Raziskave so namreč pokazale, da čeprav je substrat za Mpl tripeptid L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-mezo-A<sub>2</sub>pm, encim v svoje aktivno mesto sprejme tudi tripeptid, ki ima namesto mezo-A<sub>2</sub>pm vezan L-Lys in ga veže na UDP-MurNAc. Polipeptidi z L-Lys na tretjem mestu, so značilni za G<sup>+</sup> bakterije (*S.aureus*).

Iz *slike 12* je razvidno, da aminokislino v primerjavi z L-Lys variirajo bodisi v dolžini ali sestavi lipofilne verige, bodisi v funkcionalni skupini, ki je vezana na  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> skupino stranske verige aminokislino. Ker je prosta terminalna NH<sub>2</sub>- skupina pri L-Lys zelo pomembna pri prečnem premreževanju celične stene, je cilj zamenjav in variacij na tretji aminokislini ravno drugačna pozicija amino skupine, oziroma njena odsotnost. Takšna sprememba bi nato ob morebitni vezavi tripeptida na UDP-MurNAc blokirala prečno premreženje celične stene. Na *sliki 12* je prikazanih nekaj strukturnih analogov L-lizina, ki jih bomo pripravili.



Slika 12: Primeri različno substituiranih aminokislin v primerjavi z L-Lys

### Načrt sinteze:

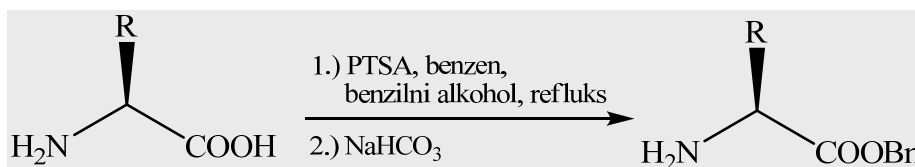
Sintezo tripeptidov smo načrtovali tako, da bomo najprej ustrezno substituirali in zaščitili aminokislino, sledila bo sinteza dipeptida Cbz-L-Ala-D-Glu, zadnja dva koraka pa bosta sinteza tripeptidov (»coupling«) in odstranitev zaščitnih skupin.

### Priprava in zaščita aminokislin:

Aminokislino bomo zaščitili na dva načina:

- 1.) nesubstituirane v obliki benzilnih estrov
- 2.) substituirane pa v obliki metilnih estrov

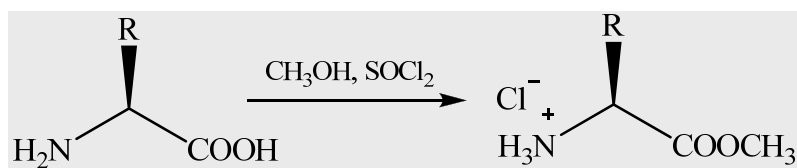
1.) Aminokislino bomo dodali ustrezno količino p-toluensulfonske kisline ter ju raztopili v enakih količinah benzilnega alkohola in benzena. Nato bomo reakcijsko zmes segrevali ob refluxu in vodo, ki nastaja pri reakciji lovili s pomočjo Dean-Starkovega nastavka. Na koncu bomo benzen uparili, zaostanek pa prelili z brezvodnim etrom in pustili na ledu, da izpadejo kristali.



Slika 13: Splošna shema za uvedbo benzilne zaščite

2.) Ustrezno substituirane aminokislino bomo raztopili v metanolu in raztopino na ledeni kopeli ohladili na 0° C. Ob mešanju bomo zelo počasi dokapavali SOCl<sub>2</sub>, ter zmes

eno uro mešali pri 0° C, ter še 24 nadaljnih ur pri sobni T. Nato bomo topilo uparili na rotavaporju, produkt spirali z etrom in posušili na vakumski črpalki (slika 14).

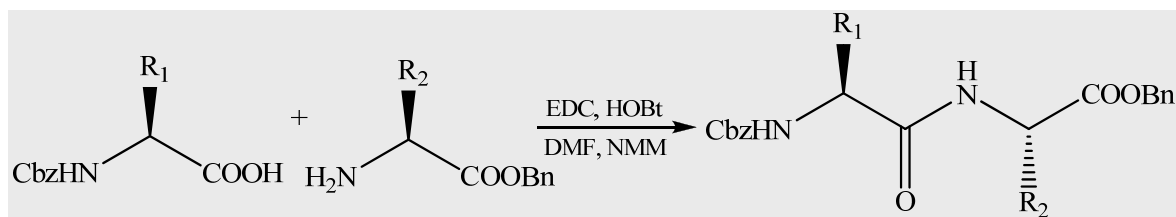


Slika 14: Splošna shema za uvedbo metilne zaščite

### Sinteza tripeptidov:

Najprej bomo pripravili osnovni dipeptid Cbz-L-Ala-D-Glu, ki je enak pri vseh končnih tripeptidih. Prva stopnja bo aktivacija karboksilne kisline Cbz-L-Alanina z *N*-hidroksisukcinimidom, ki mu bomo nato dodali D-Glu, ter zmes raztopili v brezvodnem dioksanu. Po 10-ih urah bomo dioksan uparili na rotavaporju, dodali etilacetat in trikrat spirali z 1M HCl.

Tako pripravljenemu dipeptidu bomo v nadaljevanju dodajali zaščitene aminokisliline, jih raztopili v DMF z NMM uravnali pH na 8 ter dodali še ustrezne količine HOBt-a in EDC-ja.



Slika 15: Splošna shema za tvorbo amidne vezi

### Odščita tripeptidov:

Odstranitev zaščitnih skupin bo zadnja stopnja pri sintezi končnih tripeptidov. Benzilne zaščite bomo odstranili s katalitskim hidrogeniranjem, metilne estre pa z alkalno hidrolizo.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. Materiali

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev (Acros, Aldrich, Fluka, Kemika, Merck).

#### 3.2. Metode

##### Določevanje tališča

Tališča smo določali s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica in so nekorrigirana.

##### 3.2.1. Kromatografske metode

Za izvedbo tankoplastne kromatografije smo uporabljali TLC plošče Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt, Nemčija) z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem in različne mobilne faze.

Mobilne faze za TLC so bile:

MF-1: acetonitril / voda / metanol = 3:1:1

MF-2: etilacetat / heksan = 2:1

MF-3: etilacetat / heksan = 1:2

MF-4: PrOH / H<sub>2</sub>O / NH<sub>4</sub>OH = 6:1:3

MF-5: etilacetat / heksan = 3:1

MF-6: diklorometan / heksan = 15:1

Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko (valovna dolžina  $\lambda = 254$  nm).

Za čiščenje produktov s kolonsko kromatografijo smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel z velikostjo delcev 0,063-0,200 mm (Merck, Darmstadt, Nemčija) in različne mobilne faze.

Za čiščenje produktov s »flash« kromatografijo smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm (Merck, Darmstadt, Nemčija) in različne mobilne faze.

### 3.2.2. Spektroskopske metode

#### Jedrska magnetna resonanca (NMR)

NMR spektre smo posneli na Bruker Advance DPX<sub>300</sub> spektrometru pri 300,13 MHz, s TMS kot internim standardom v Centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani. Kot topila smo uporabljali DMSO-d<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub> in D<sub>2</sub>O.

#### Masna spektrometrija (MS)

Masni spektri so bili posneti na spektrometru Varian-MAT 311 A z EI, FAB ali ESI tehniko na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

#### Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektre smo posneli na spektrofotometru Perkin Elmer 1600 FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

#### Elementna analiza

Elementne analize ogljika, vodika in dušika so bile opravljene z analizatorjem Perkin Elmer 240 C na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

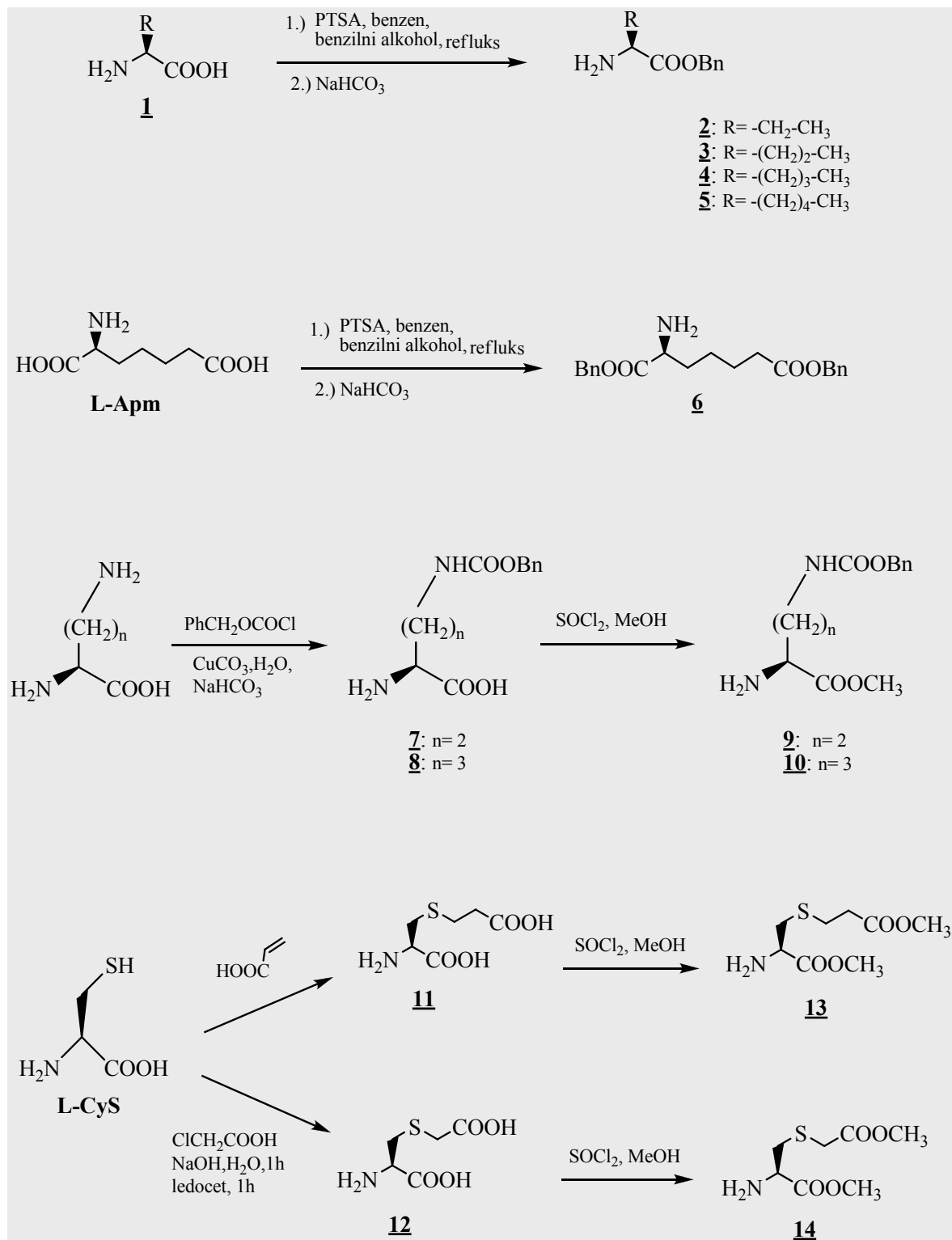
#### Nomenklatura in risanje spojin

Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabljali računalniški program ChemDraw Ultra 11.0, proizvajalca CambridgeSoft.

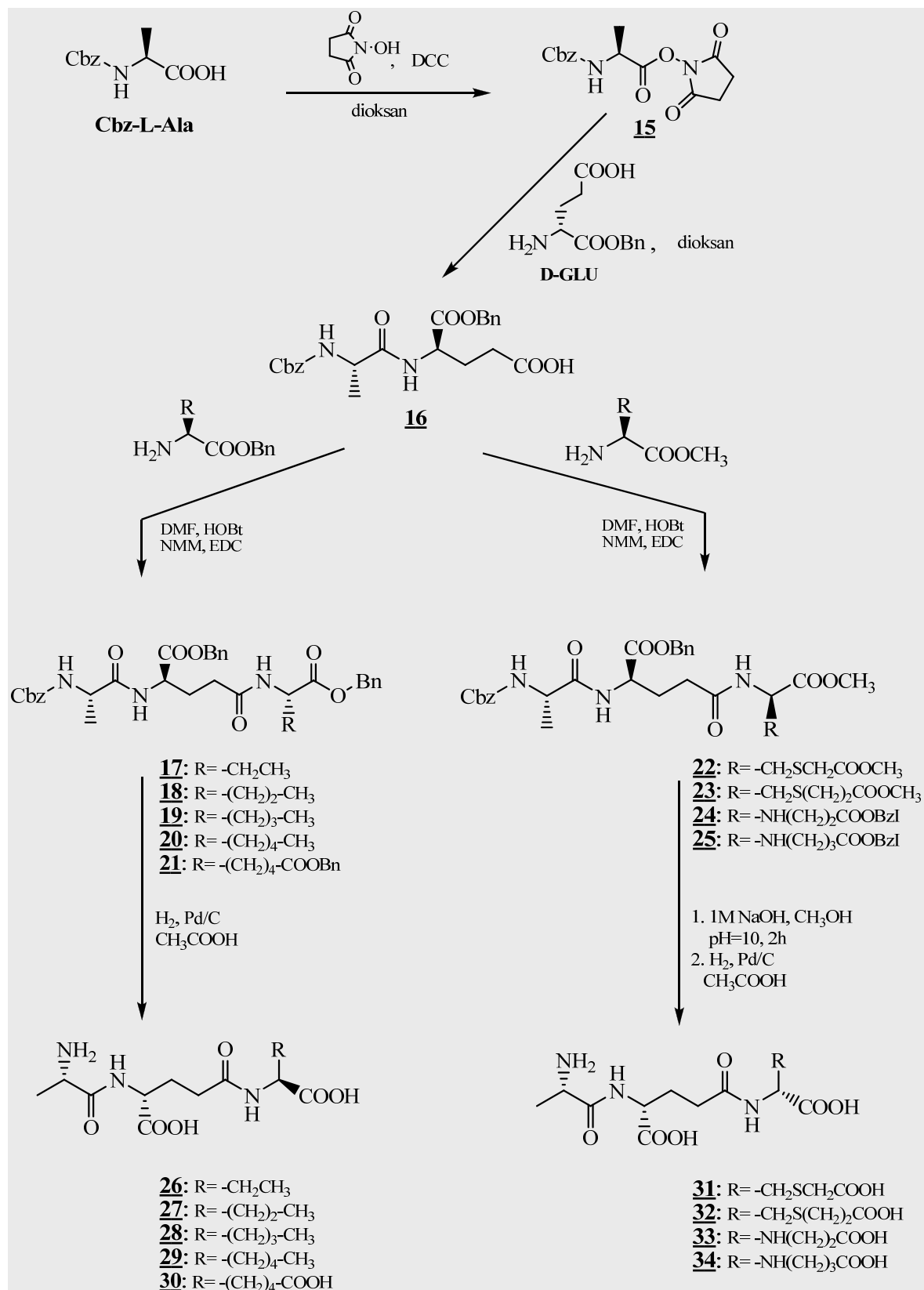
## 4. EKSPERIMENTALNI DEL

### 4.1. Reakcijske sheme

#### 4.1.1. Substitucija in zaščita aminokislin

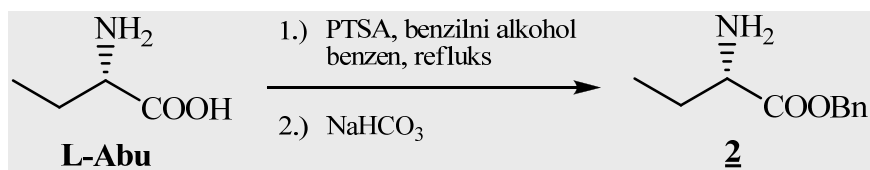


## 4.1.2. Sinteza tripeptidov



## 4.2. Kemijske reakcije

### 4.2.1. Sinteza (S)-benzil 2-aminobutanoata (2)

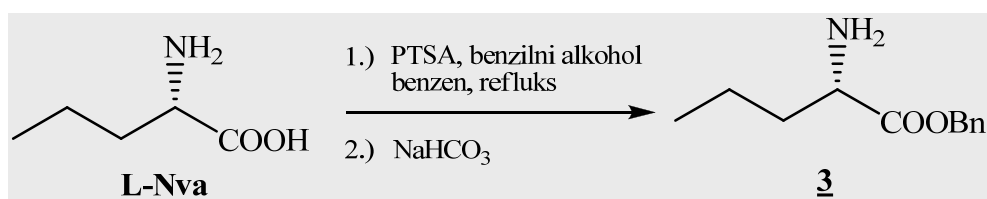


#### Sintezni postopek (20):

V 100 ml bučko natehtamo L-aminobutirno kislino (3,0 g, 29,1 mmol) in p-toluensulfonsko kislino, ki je v obliki monohidrata (6,03 g, 29,01 mmol) ter ju raztopimo v 24 ml sveže predestiliranega benzilnega alkohola in 24 ml benzena. Reakcijsko zmes segrevamo ob refluxu in vodo, ki nastaja pri reakciji, lovimo s pomočjo Dean-Starkovega nastavka. Ko vsa voda oddestilira, uparimo benzen, zaostanku pa dodamo 40 ml etra in pustimo na ledu. Izpadejo kristali, ki jih nato odnučamo, raztopimo v etilacetatu in 3-krat spiramo z 30 ml nasičene raztopine  $\text{NaHCO}_3$ , da se znebimo PTSA.

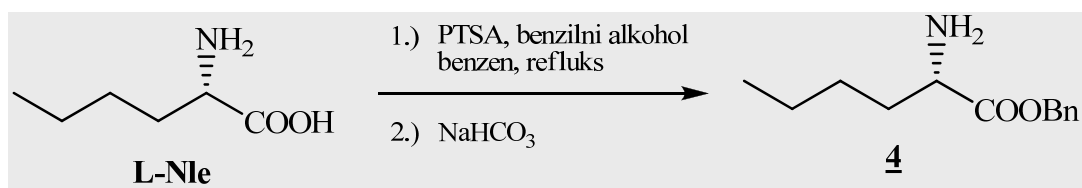
Elementna sestava	$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N O}_2$	$M = 193,11 \text{ g/mol}$
Opis	bela kristalinična spojina	
Masa produkta	4,77 g	
izkoristek	85 %	
Rf	0,75; MF-1	
Tališče	122-125° C	tališče po literaturi (11): 125-128° C



4.2.2. Sinteza (S)-benzil 2-aminopentanoata (**3**)

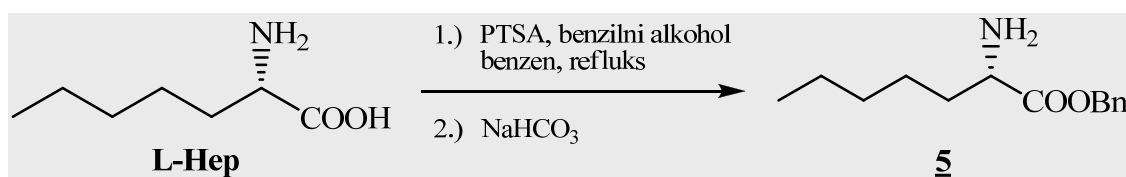
V 100 ml bučko natehtamo (3,0 g, 25,8 mmol) L-norvalina in p-toluensulfonsko kislino, ki je v obliki monohidrata (5,36 g, 25,8 mmol) ter ju raztopimo v 24 ml sveže predestiliranega benzilnega alkohola in 24 ml benzena. Reakcijsko zmes segrevamo ob refluksu in vodo, ki nastaja pri reakciji, lovimo s pomočjo Dean-Starkovega nastavka. Ko vsa voda oddestilira, uparimo benzen, zaostanku pa dodamo 40 ml etra in pustimo na ledu. Izpadejo kristali, ki jih nato odnučamo, raztopimo v etilacetatu in 3-krat spiramo z 30 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, da se znebimo PTSA.

Elementna sestava	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	M = 207,13 g/mol
Opis	bela kristalinična spojina	
Masa produkta	3,95 g	
Izkoristek	74 %	
Rf	0,63; MF-1	
Tališče	177–179° C	tališče po literaturi (12) : 180-182

4.2.3. Sinteza (S)benzil 2-aminoheksanoata (4)

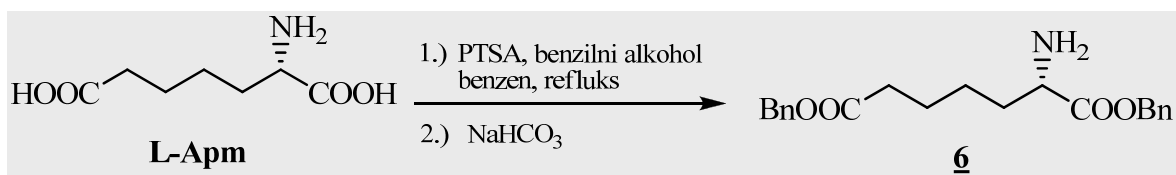
V bučko natehtamo 2,0 g (15,2 mmol) L-norlevcina in 2,90 g (15,2 mmol) PTSA ter zmesi dodamo 7,8 ml (77,5 mmol) benzilnega alkohola in 7,8 ml benzena. Reakcijsko zmes refluktiramo 24 ur in vodo, ki nastaja pri reakciji lovimo s pomočjo Dean Starkovega nastanka. Ko vsa voda oddestilira, uparimo benzen, zaostanku pa dodamo 40 ml etra in pustimo na ledu. Izpadejo kristali, ki jih nato odnučamo, raztopimo v etilacetatu in 3-krat spiramo z 30 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, da se znebimo PTSA.

Elementna sestava	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>2</sub>	M = 221,14 g/mol
Opis	bela kristalinična spojina	
Masa produkta	2,8g	
Izkoristek	84 %	
R <sub>f</sub>	0.85; MF-1	
Tališče	168-170° C	tališče po literaturi (12): 166-169

4.2.4. Sinteza (*S*)-benzil 2-aminoheptanoata (5)

V bučko natehtamo 1,5 g (10,3 mmol) L-heptanojske kisline in 1,96 g (10,3 mmol) PTSA ter zmesi dodamo 5,3 ml (51,15 mmol) benzilnega alkohola in 5,3 ml benzena. Reakcijsko zmes refluktiramo 24 ur in vodo, ki nastaja pri reakciji lovimo s pomočjo Dean Starkovega nastavka. Ko vsa voda oddestilira, uparimo benzen, zaostanku pa dodamo 40 ml etra in pustimo na ledu. Izpadejo kristali, ki jih nato odnučamo, raztopimo v etilacetatu in 3-krat spiramo z 30 ml nasičene raztopine  $\text{NaHCO}_3$ , da se znebimo PTSA.

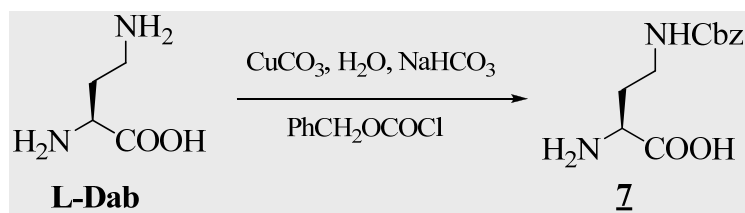
Elementna sestava	$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_2$	$M = 235,16 \text{ g/mol}$		
Opis	bela kristalinična spojina			
Masa produkta	2,06 g			
Izkoristek	85 %			
$R_f$	0.88; MF-1			
Tališče	96–99° C			
MS (FAB)	$m/z$ (%) = 236 ( $\text{MH}^+$ , 100,), 190 (85)			
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ )	$\delta$ [ppm] = 0.84 (t, 3H, $J = 6.8 \text{ Hz}$ , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.11-1.19 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.8, (m, 2H, $\alpha\text{-CHCH}_2$ ), 3.34-3.38 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$ ), 5.12-5.14 (d, 2H, $J = 5.6 \text{ Hz}$ , $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 7.34-7.39 (m, 5H, Ar-5H)			
Elementna analiza		%C	%H	%N
$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_2$	izračunano	71,46 %	8,99 %	5,95%
	ugotovljeno	71,90 %	9,24 %	6,32 %

4.2.5. Sinteza PTSA soli (S)-6-amino-7-(benziloksi)-7-oksoheptanojske kisline (**6**)

V bučko natehtamo 3,0 g (17,9 mmol) L-aminopimelinske kisline in 3,4 g (17,9 mmol) PTSA ter zmesi dodamo 18,54 ml (179 mmol) benzilnega alkohola in 18,54 ml benzena. Reakcijsko zmes refluktiramo 24 ur in vodo, ki nastaja pri reakciji lovimo s pomočjo Dean Starkovega nastavka. Ko vsa voda oddestilira, uparimo benzen, zaostanku pa dodamo 40 ml etra in pustimo na ledu. Izpadejo kristali, ki jih nato odnučamo, raztopimo v etilacetatu in 3-krat spiramo z 30 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, da se znebimo PTSA.

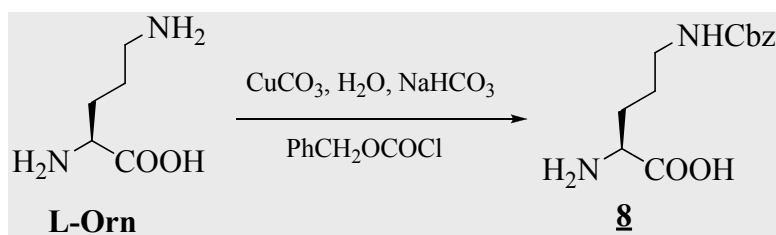
Elementna sestava	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	M = 265,13 g/mol
Opis	bela kristalinična spojina	
Masa produkta	3,42 g	
Izkoristek	72 %	
R <sub>f</sub>	0.30; MF-6	
Tališče	74-77° C	

## 4.2.6. Sinteza (S)-2-amino-4-(benziloksikarbonilamino) butanojske kisline (7)

**Sintezni postopek** (21):

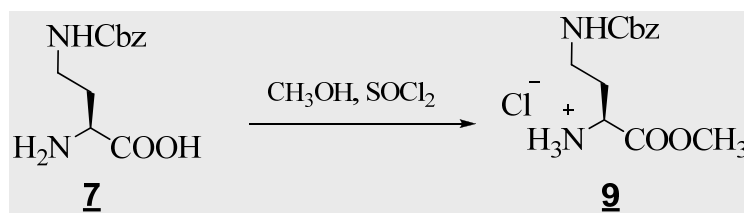
L-diaminobutirno kislino (2,7 g; 17,8 mmol) raztopimo v 30 ml vode in segrejemo na 80-90° C na oljni kopeli. K tej raztopini postopoma v roku 3 minut dodamo CuCO<sub>3</sub> (2,2 g; 17,8 mmol). Toplo reakcijsko zmes nato filtriramo z presesavanjem in speremo z vročo vodo (3x10ml), ter zbrane vodne frakcije ohladimo na sobno T. Tem nato dodamo NaHCO<sub>3</sub> (5,1 g; 60,5 mmol), sledi pa še dodatek benzilchloroformiata (4,3 g; 25 mmol) v 30 ml dioksana po kapljicah v roku 3 min. Reakcijsko zmes pustimo da se meša 24 ur, nato jo filtriramo in 3-krat speremo z 10 ml vode.

Elementna sestava	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	M = 252,11 g/mol
Opis	Svetlo modra kristalinična spojina	
Masa produkta	2,02g	
Izkoristek	45 %	
R <sub>f</sub>	0,1; MF-1	
Tališče	230-233° C	tališče po literaturi (13): 233-235°C
MS (EI)	m/z (%) = 253,12 (MH <sup>+</sup> ,65), 214 (58), 158 (70), 141 (88).	

4.2.7. Sinteza (S)-2-amino-5-( benziloksikarbonil ) pentanojske kisline (**8**)

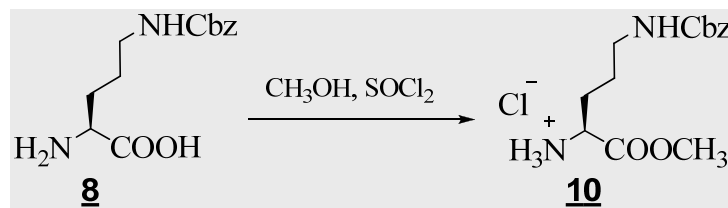
L-ornitin (3,0 g; 17,8 mmol) raztopimo v 30 ml vode in segrejemo na 80-90° C na oljni kopeli. K tej raztopini postopoma v roku 3 minut dodamo CuCO<sub>3</sub> (2,2 g; 17,8 mmol). Toplo reakcijsko zmes nato filtriramo z presesavanjem in speremo z vročo vodo (3x10ml), ter zbrane vodne frakcije ohladimo na sobno T. Tem nato dodamo NaHCO<sub>3</sub> (5,1 g; 60,5 mmol), sledi pa še dodatek benzilchloroformiata (4,3 g; 25 mmol) v 30 ml dioksana po kapljicah v roku 3 min. Reakcijsko zmes pustimo da se meša 24 ur, nato jo filtriramo in 3-krat speremo z 10 ml vode.

Elementna sestava	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	M = 266,13 g/mol
Opis	Svetlo modra kristalinična spojina	
Masa produkta	1,89 g	
Izkoristek	40 %	
R <sub>f</sub>	0,1; MF-1	
Tališče	243-246° C	tališče po literaturi(14): 245-248°C

4.2.8. Sinteza (*S*)-benzil 2-amino-4-(metoksikarbonilamino) butanoata (**9**)**Sintezni postopek** (22):

Spojino **7** (1,34g; 5,3mmol) raztopimo v 20 ml metanola in ohladimo na  $-10^{\circ}\text{C}$ . Nato po kapljicah previdno dodajamo  $\text{SOCl}_2$  (0,85 ml; 11,66 mmol) in mešano pol ure pri  $-10^{\circ}\text{C}$ , potem počasi segrejemo ter mešamo še pol ure pri sobni T. Na koncu raztopino segrejemo do refluxa in refluktiramo 2 uri. Reakcijsko zmes nato uparimo na rotavaporju, prelijemo z etrom in nastale kristale odfiltriramo.

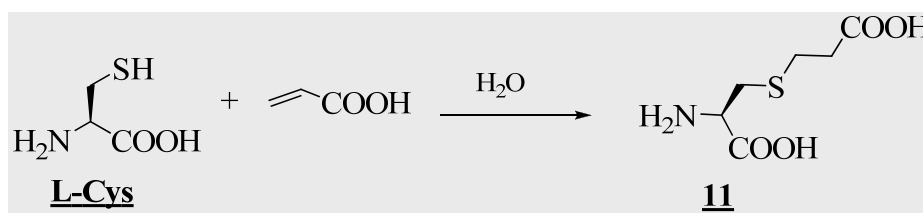
Elementna sestava	$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$	$M = 266,13 \text{ g/mol}$
Opis	rjava kristalinična spojina	
Masa produkta	987mg	
Izkoristek	70 %	
Rf	0.78; MF-1	
Tališče	162-165° C	tališče po literaturi (15) 165-167
MS (FAB)	$m/z$ (%) = 267 ( $\text{MH}^+$ , 100), 158 (50), 141 (92)	

4.2.9. Sinteza (*S*)-metil 2-amino-5-(benziloksikarbonilamino) pentanoata (**10**)**Sintezni postopek** (22):

Spojino **8** (1,4 g; 5,26 mmol) raztopimo v 20 ml metanola in ohladimo na  $-10^{\circ}\text{C}$ . Nato po kapljicah previdno dodajamo  $\text{SOCl}_2$  (0,91 ml; 11,57 mmol) in mešano pol ure pri  $-10^{\circ}\text{C}$ , potem počasi segrejemo ter mešamo še pol ure pri sobni T. Na koncu raztopino segrejemo do refluxa in refluktiramo 2 uri. Reakcijsko zmes nato uparimo na rotavaporju, prelijemo z etrom in nastale kristale odfiltriramo.

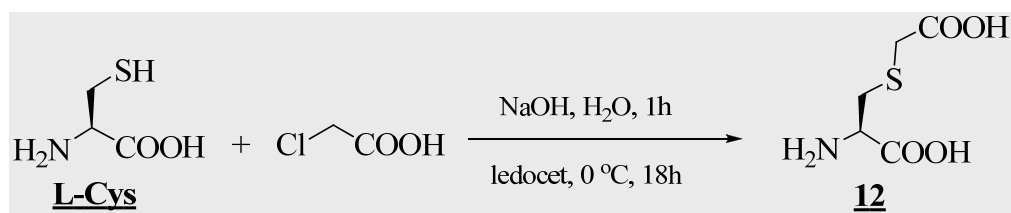
Elementna sestava	$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$	$M = 280,14\text{ g/mol}$
Opis	Zeleno-rjavi kristali	
Masa produkta	810mg	
Izkoristek	55 %	
Tališče	135–137°C                      tališče po literaturi (16); 133-136)	
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ )	$\delta$ [ppm] = 1.52 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.84 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.06, (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.7, (s, 3H, O- $\text{CH}_3$ ), 4.08 (m, 1H, $\alpha$ - $\text{CH}$ ), 5.1 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 7.4 (m, 5H, Ar- $\text{H}$ ), 8.04 (m, 1H, $\text{NHCO}$ ), 8.5 (m, 2H, $\text{NH}_2$ )	
MS (FAB)	$m/z$ (%) = 281 ( $\text{MH}^+$ , 100)	



4.2.10. Sinteza (*R*)-2-amino-3-(2-karboksietiltio) propanojske kisline (**11**)**Sintezni postopek** (23):

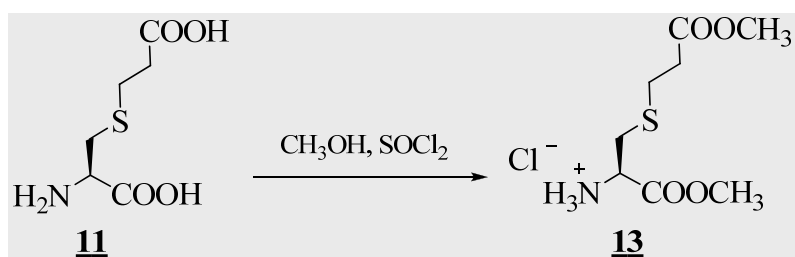
L-Cys (3,0 g; 24,8 mmol) in propenojsko kislino (1,79 g; 24,8 mmol) raztopimo v vodi (25 ml) in pustimo stati 6 ur pri sobni T, nato pa še čez noč v hladilniku. Nastali precipitat odfiltriramo, speremo z MeOH in sušimo. Matičnico skoncentriramo na rotavaporju in pustimo še 3 dni v hladilniku, da nastane še več precipitata, ki ga na koncu ponovno odfiltriramo, speremo z MeOH in posušimo.

Elementna sestava	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub> S	M = 193,04 g/mol
Opis	bela kristalinična spojina	
Masa produkta	2,87g	
Izkoristek	60 %	
Rf	0.35; MF-4	
Tališče	210-214° C	

4.2.11. Sinteza (*R*)-2-amino-3-merkaptopropanojske kisline (**12**)**Sintezni postopek** (24):

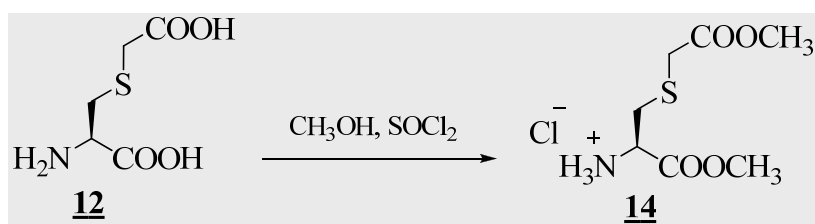
2-kloroacetni kislini (1,95 g; 20,07 mmol) in L-Cys (3,0 g; 24,8 mmol) v 30 ml vode dodamo po kapljicah v roku 20 min 25 ml 7M NaOH. Mešanico pustimo, da eno uro stoji na sobni T, nato pa dodamo 100 ml brezvodne oetne kisline. Po 18-ih urah pri 0° C dobimo fine kristale, ki jih speremo z ledeno vodo in EtOH. Produkt na koncu prekristaliziramo iz vroče vode in posušimo v vakumu.

Elementna sestava	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub> S	M = 179,03 g/mol
Opis	bela kristalinična spojina	
Masa produkta	4,08g	
Izkoristek	92 %	
Rf	0.75; MF-4	
Tališče	183-187° C	tališče po literaturi (17) 185-188

4.2.12. Sinteza (*R*)-metil 2-amino-3-(3-metoksi-3-oksopropiltio) propanoata (**13**)**Sintezni postopek** (22):

Spojino **11** (900 mg; 4,66 mmol) raztopimo v 20 ml metanola in ohladimo na  $-10^\circ\text{C}$ . Nato po kapljicah previdno dodajamo  $\text{SOCl}_2$  (0,75 ml; 10,26 mmol) in mešano pol ure pri  $-10^\circ\text{C}$ , potem počasi segrejemo ter mešamo še pol ure pri sobni T. Na koncu raztopino segrejemo do refluxa in refluktiramo 2 uri. Reakcijsko zmes nato uparimo na rotavaporju, prelijemo z etrom in nastale kristale odfiltriramo.

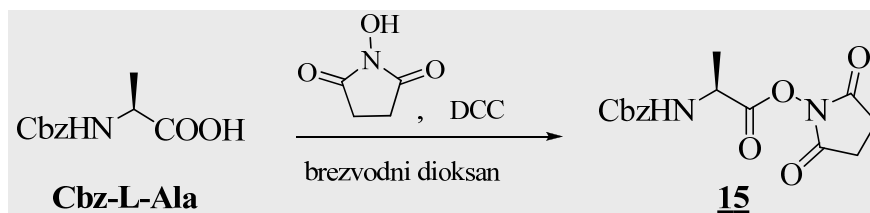
Elementna sestava	$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$	$M = 221,07 \text{ g/mol}$
Opis	bela kristalinična spojina	
Masa produkta	906,3mg	
Izkoristek	88 %	
Rf	0.82; MF 1	
Tališče	$47-50^\circ\text{C}$	
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ )	$\delta$ [ppm] = 2.6 (m, 2H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.8 (m, 2H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.04 (m, 2H, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{S}$ ), 3.6 (s, 3H, $\text{O-CH}_3$ ), 3.7(s, 3H, $\text{O-CH}_3$ ), 4.3 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$ ), 8.6 (razširjen s, 2H, $\text{NH}_2$ ).	

4.2.13. Sinteza (*R*)-metil 2-amino-3-(3-metoksi-3-oksoetil)io) propanoata (**14**)**Sintezni postopek** (22):

Spojino **12** (800 mg; 4,47 mmol) raztopimo v 20 ml metanola in ohladimo na  $-10^\circ\text{C}$ . Nato po kapljicah previdno dodajamo  $\text{SOCl}_2$  (0,72 ml; 9,83 mmol) in mešano pol ure pri  $-10^\circ\text{C}$ , potem pa počasi segrejemo ter mešamo še pol ure pri sobni T. Na koncu raztopino segrejemo do refluxa in refluktiramo 2 uri. Reakcijsko zmes nato uparimo na rotavaporju, prelijemo z etrom in nastale kristale odfiltriramo.

Elementna sestava	$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$	$M = 207,06 \text{ g/mol}$
Opis	bela kristalinična spojina	
Masa produkta	823,1 mg	
Izkoristek	89 %	
Rf	0.78; MF-1	
Tališče	$85-88^\circ\text{C}$	
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ )	$\delta$ [ppm] = 3.13 (m, 2H, $\text{SCH}_2\text{CO}$ ), 3.5 (d, 2H, $J=5.5 \text{ Hz}$ , $\alpha\text{-CHCH}_2\text{S}$ ), 2.74 (s, 3H, $\text{O-CH}_3$ ), 3.76 (s, 3H, $\text{O-CH}_3$ ), 4.3 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$ ), 8.7 (razširjen s, 2H, $\text{NH}_2$ ).	
MS (EI)	$m/z$ (%) = 208 ( $\text{MH}^+$ , 100), 191 (82), 158 (52), 141 (25).	

#### 4.2.14. Sinteza (S)-2,5-dioxoprolidin-1-il-2-(benziloksikarbonilamino)propanoata (15)

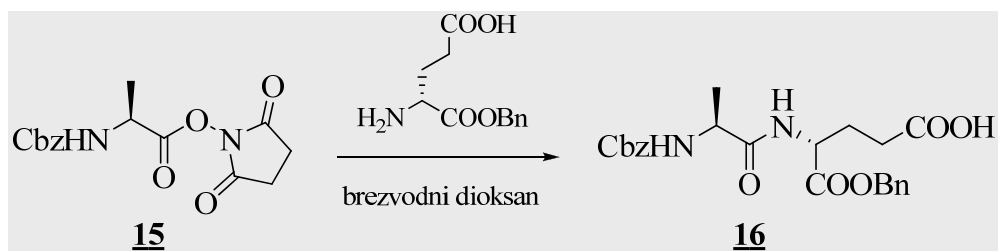


#### Sintezni postopek (25):

Zaščiten L-alanin (5,0 g; 22,4 mmol) raztopimo v minimalni količini brezvodnega dioksana, dodamo *N*-hidroksisukcinimid (2,58 g; 22,4 mmol) in postavimo na ledeno kopel. Nato zatehtamo še DCC (4,62 g; 22,4 mmol), ga dodamo v reakcijsko zmes in pustimo da se raztopina meša 24 ur na ledeni kopeli. Na koncu odfiltriramo nastalo *N,N*-dicikloheksilsečnino, filtrat pa uparimo ter prekrizaliziramo iz heksana.

Elementna sestava	$C_{15}H_{16}N_2O_6$	$M = 320,10 \text{ g/mol}$
Opis	bela kristalinična spojina	
Masa produkta	6,09g	
Izkoristek	85 %	
Rf	0.92; MF-1	
Tališče	115-117° C	tališče po literaturi (18); 118-121° C

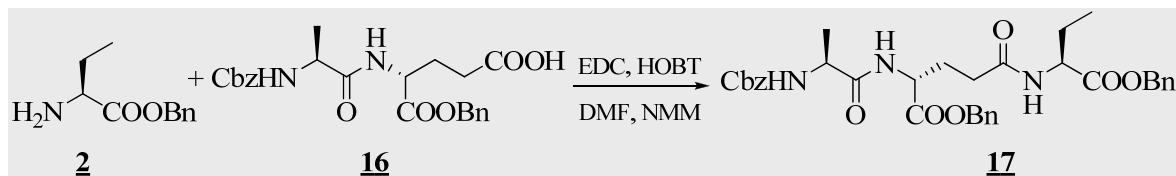
#### 4.2.15. Sinteza (*R*)-5-(benzoioksi)-4-((*S*)-2-(benziloksikarbonilamino)propanamido)-5-oksopentanojske kisline (**16**)



Spojini **15** (5,0 g; 15,6 mmol) dodamo H-D-Glu-OBn (3,71 g; 15,6 mmol), raztopimo v brezvodnem dioksanu in pustimo da se meša pri sobni temperaturi 24 ur. Naslednji dan odparimo topilo in ostanek raztopimo v etilacetatu ter spiramo 3-krat z 30 ml 1M HCl in 1-krat z 50ml nasičene raztopine NaCl. Na koncu organsko fazo sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtriramo in topilo odparimo pod znižanim tlakom.

Elementna sestava	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	M = 442,17 g/mol
Opis	bela kristalinična spojina	
Masa produkta	5,93g	
Izkoristek	86 %	
Rf	0.91; MF-1	
Tališče	96-98° C	tališče po literaturi (19); 98-100° C
MS (EI)	m/z (%) = 443 (MH <sup>+</sup> , 100), 399 (95).	

#### 4.2.16. Sinteza benzo (5*S*,8*R*,13*S*)-13-etil-5-metil-3,6,11,14-tetraokso-1,16-difenil-2,15-dioksa-4,7,12-triazaheksadekan-8-karboksianhidrida (**17**)

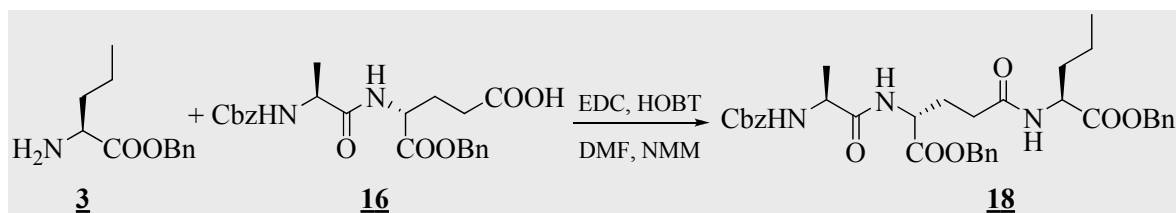


#### Sintezni postopek (26):

Natehtali smo 376 mg (1,95 mmol) spojine **2** in 575 mg (1,3 mmol) spojine **16**, ter ju raztopili v brezvodnem DMF. Dodali smo 239 mg (1,56 mmol) HOBT-a in z *N*-metilmorfolinom uravnali pH raztopine na 8. Nato smo dodali še 274 mg (1,43 mmol) EDC-ja in zmes mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo topilo odparili pod znižanim tlakom, suhi preostanek pa smo raztopili v 150 mL etilacetata ter spirali z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (3×50 mL), z 1M raztopino HCl (3×50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1×70 mL). Organsko fazo sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom.

Elementna sestava	C <sub>34</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	M = 617.3 g/mol		
Opis	Bela kristalinična spojina			
Masa produkta	601,8 mg			
Izkoristek	75 %			
Rf	0.43: MF-2			
Tališče	134-136° C			
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 0.82-0,87 (t, 3H <i>J</i> =7.4 Hz, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.20-1.22 (d, 3H, <i>J</i> =7.1 Hz, α-CH(CH <sub>3</sub> )CO), 1.53-1.76 (m, 2H, α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 1.8-1.91 (m, 1H, α-CHCH <sub>2</sub> ), 1.91-2.08 (m, 1H, α-CHCH <sub>2</sub> ) 2.19-2.27 (m, 2H, α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 4.09-4.16 (m, 1H, α-CH), 4.17-4.23 (m, 1H, α-CH), 4.26-4.33 (m, 1H, α-CH), 4.97-5.07 (m, 2H, CH <sub>2</sub> Ar), 5.1-5.16 (m, 4H, CH <sub>2</sub> Ar + CH <sub>2</sub> Ar), 7.34 (m, 15H; Ar-H), 8.22-8.24 (d, 1H, <i>J</i> =7.3 Hz, CONH), 8.30-8.32 (d, 2H, <i>J</i> =7.7 Hz, CONH).			
MS (ESI)	m/z (%) = 618,3 (100, MH <sup>+</sup> ), 640.3 (55, MNa <sup>+</sup> ).			
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3296, 2971, 1734, 1653, 1537, 1498, 1458, 1388, 1324, 1260, 1194, 1168, 1052, 852, 822, 736, 697, 696.			
Elementna analiza		%C	%H	%N
C <sub>34</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O	izračunano	66,11 %	6,36 %	6,80 %
	ugotovljeno	66,29 %	6,48 %	6,76 %

#### 4.2.17. Sinteza benzo (5*S*,8*R*,13*S*)-5-metil-3,6,11,14-tetraokso-1,16-difenil-13-propil-2,15-dioksa-4,7,12-triazaheksadekan-8-karboksianhidrida (**18**)

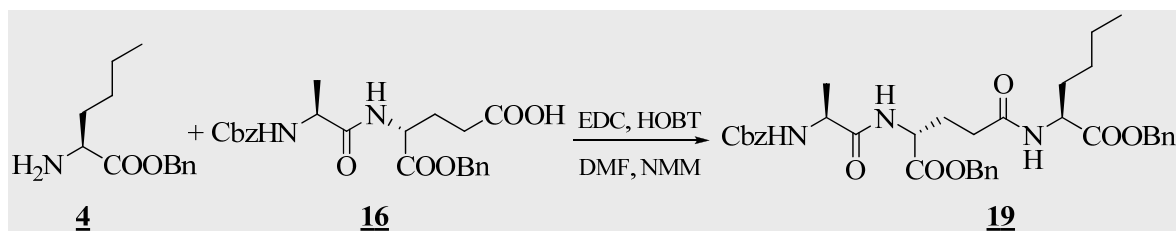


Natehtali smo 351 mg (1,70 mmol) spojine **3** in 500 mg (1,13 mmol) spojine **16**, ter ju raztopili v brezvodnem DMF. Dodali smo 208 mg (1,36 mmol) HOBT-a in z *N*-metilmorfolinom uravnali pH raztopine na 8. Nato smo dodali še 238 mg (1,24 mmol) EDC-ja in zmes mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo topilo odparili pod znižanim tlakom, suhi preostanek pa smo raztopili v 150 mL etilacetata ter spirali z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (3×50 mL), z 1M raztopino HCl (3×50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1×70 mL). Organsko fazo sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom.

Elementna sestava	C <sub>35</sub> H <sub>41</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	M = 631,29g/mol		
Opis	bela kristalinična spojina			
Masa produkta	513,6 mg			
Izkoristek	72 %			
Rf	0.51: MF-2			
Tališče	139-142° C			
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 0.87-0.92 (t, 3H <i>J</i> =7.3 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.22-1.34 (m, 2H CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.35-1.37 (d, 3H, <i>J</i> = 7.4 Hz, α-CH(CH <sub>3</sub> )CO), 1.64-1.86 (m, 1H, α-CHCH <sub>2</sub> + 1H, α-CHCH <sub>2</sub> ) 2.09-2.25 (m, 4H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO), 4.18-4.27 (m, 1H, α-CH), 4.45-4.47 (m, 1H, α-CH), 4.54-4.61 (m, 1H, α-CH), 5.05-5.11 (m, 2H CH <sub>2</sub> Ar), 5.15-5.20 (m, 4H, CH <sub>2</sub> Ar + CH <sub>2</sub> Ar), 5.27-5.29 (m, 1H, CONH), 6.75-6.78 (m, 1H, CONH), 7.33 (m, 15H; Ar-H).			
MS (EI)	m/z (%) = 632,3 (100, MH <sup>+</sup> ), 653.3 (40, MNa <sup>+</sup> ).			
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3298, 2958, 1738, 1693, 1654, 1537, 1453, 1266, 1052, 730, 695.			
Elementna analiza		%C	%H	%N
C <sub>35</sub> H <sub>41</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	izračunano	66,54 %	6,54 %	6,65 %
	ugotovljeno	66,64 %	6,77 %	6,73 %



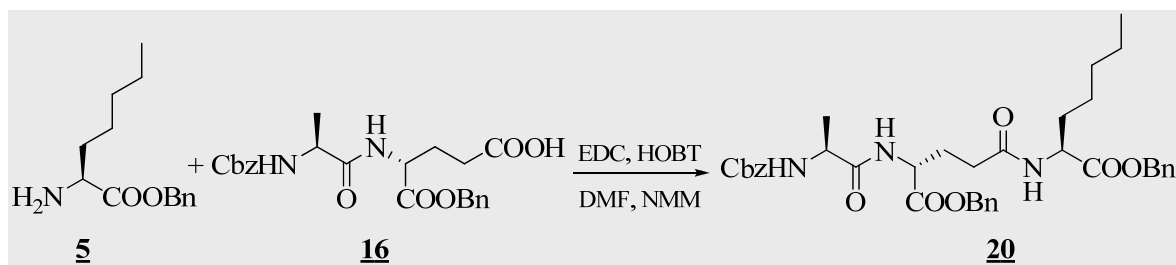
#### 4.2.18. Sinteza benzo (5*S*,8*R*,13*S*)-13-butyl-3,6,11,14-tetraokso-1,16-difenil-2,15-dioksa-4,7,12-triazaheksadekan-8-karboksianhidrida (**19**)



Natehtali smo 325 mg (1,47 mmol) spojine **4** in 500 mg (1,13 mmol) spojine **16**, ter ju raztopili v brezvodnem DMF. Dodali smo 208 mg (1,36 mmol) HOBt-a in z *N*-metilmorfolinom uravnali pH raztopine na 8. Nato smo dodali še 238 mg (1,24 mmol) EDC-ja in zmes mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo topilo odparili pod znižanim tlakom, suhi preostanek pa smo raztopili v 150 mL etilacetata ter spirali z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (3×50 mL), z 1M raztopino HCl (3×50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1×70 mL). Organsko fazo sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom.

Elementna sestava	C <sub>36</sub> H <sub>43</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	M = 645,31 g/mol		
Opis	bela kristalinična spojina			
Masa produkta	452,1 mg			
Izkoristek	62 %			
Rf	0.55; MF-2			
Tališče	90-92° C			
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 0.81-0,87 (m, 3H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.21-1.29 (m, 4H, CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 1.35-1.38 (m, 3H; α-CH(CH <sub>3</sub> )CO) 1.64-1.84 (m, 1H, α-CHCH <sub>2</sub> +1H α-CHCH <sub>2</sub> ), 2.1-2.26 (m, 4H; CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> + α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO ), 4.18-4.27 (m, 1H, α-CH), 4.43-4.51 (m, 1H, α-CH), 4.52-4.62 (m, 1H, α-CH), 4.69 (razširjen s, 1H CONH), 5.09-5.11 (d, 2H J= 3.3, CH <sub>2</sub> Ar), 5.14-5.21 (m, 4H, CH <sub>2</sub> Ar + CH <sub>2</sub> Ar), 5.27-5.29 (m, 1H, CONH), 7.33-7.37 (m, 15H; Ar-H)			
MS (ESI)	m/z (%) = 646,3 (100, M <sup>+</sup> )			
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3303, 2957, 1734, 1689, 1653, 1541, 1451, 1264,1050, 751, 696.			
Elementna analiza		%C	%H	%N
C <sub>36</sub> H <sub>43</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	izračunano	67,96 %	6,91 %	6,51 %
	ugotovljeno	67,90 %	7,29 %	6,55 %

**4.2.19. Sinteza benzo (5*S*,8*R*,13*S*)-5-metil-3,6,11,14-tetraokso-13-pentil-1,16-difenil-2,15-dioksa-4,7,12-triazaheksadekan-8-karboksianhidrida (**20**)**

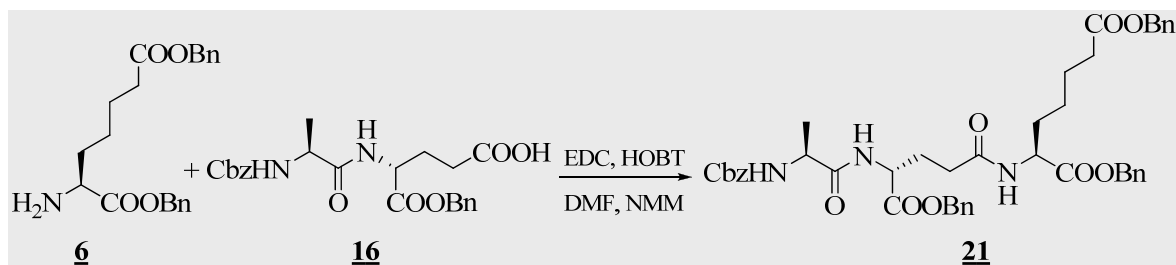


Natehtali smo 415 mg (1,76 mmol) spojine **5** in 600 mg (1,35 mmol) spojine **16**, ter ju raztopili v brezvodnem DMF. Dodali smo 249 mg (1,62 mmol) HOBt-a in z *N*-metilmorfolinom uravnali pH raztopine na 8. Nato smo dodali še 258 mg (1,49 mmol) EDC-ja in zmes mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo topilo odparili pod znižanim tlakom, suhi preostanek pa smo raztopili v 150 mL etilacetata ter spirali z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (3×50 mL), z 1M raztopino HCl (3×50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1×70 mL). Organsko fazo sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom.

Elementna sestava	C <sub>37</sub> H <sub>45</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	M = 659,32 g/mol
Opis	bela kristalinična spojina	
Masa produkta	400,5 mg	
Izkoristek	45 %	
Rf	0.62; MF-2	
Tališče	93-96° C	
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 0.82-0,88 (m, 3H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.22-1.25 (m, 6H; CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.35-1.39 (m, 3H, α-CH(CH <sub>3</sub> )CO) 1.63-1.80 (m, 1H, α-CHCH <sub>2</sub> + 1H α-CHCH <sub>2</sub> ), 1.93-2.23 (m, 4H, α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO + CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 4.18-4.27 (m, 1H, α-CH), 4.46-4.51 (m, 1H, α-CH), 4.52-4.62 (m, 1H, α-CH), 5.05-5.11 (s, 2H, CH <sub>2</sub> Ar), 5.14-5.21 (m, 4H, CH <sub>2</sub> Ar + CH <sub>2</sub> Ar), 5.27 (s, 1H, CONH), 7.33 (m, 15H; Ar-H).	
MS (ESI)	m/z (%) = 660 (M <sup>+</sup> , 80), 682 (MNa <sup>+</sup> 55), 325 (100), 311 (65).	
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3297, 2929, 1735, 1653, 1540, 1264, 1051, 908, 750, 696, 584.	
Elementna analiza		
	izračunano	%C      %H      %N 67.36 %    6.47 %    6.57 %

$C_{37}H_{33}N_3O_6S$	ugotovljeno	67.80 %	6.17 %	6.94 %
-----------------------	-------------	---------	--------	--------

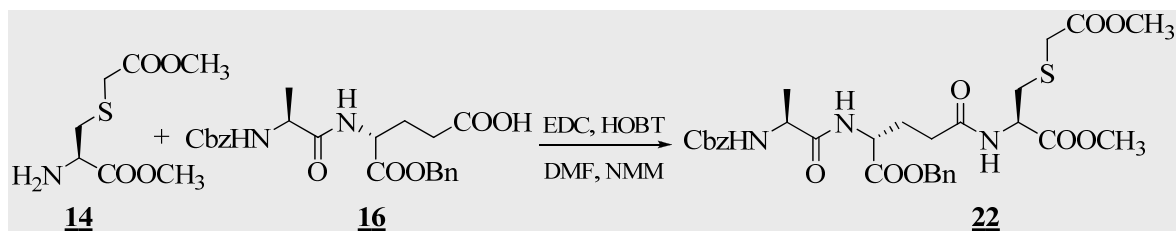
#### 4.2.20. Sinteza benzo (5*S*,8*R*,13*S*)-13-(benziloksikarbonil)-5-metil-3,6,11,18-tetraokso-1,20-difenil-2,19-dioksa-4,7,12-triazaheksadekan-8-karboksianhidrida (**21**)



Natehtali smo 718 mg (2,02 mmol) spojine **6** in 600 mg (1,35 mmol) spojine **16**, ter ju raztopili v brezvodnem DMF. Dodali smo 249 mg (1,62 mmol) HOBT-a in z *N*-metilmorfolinom uravnali pH raztopine na 8. Nato smo dodali še 258 mg (1,49 mmol) EDC-ja in zmes mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo topilo odparili pod znižanim tlakom, suhi preostanek pa smo raztopili v 150 mL etilacetata ter spirali z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (3×50 mL), z 1M raztopino HCl (3×50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1×70 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in topilo uparili.

Elementna sestava	C <sub>44</sub> H <sub>49</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub>	M = 779,34 g/mol		
Opis	bela kristalinična spojina			
Masa produkta	473,3 mg			
Izkoristek	45 %			
Rf	0.35; MF-2			
Tališče	72-74° C			
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 1,01-1,30 (m, 2H, α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO ), 1.35-1.39 (d, 3H, J=2.8Hz, α-CH(CH <sub>3</sub> )CO), 1.61-1.2.20 (m, 8H, α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO + α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO), 2,20-2,31 (m, 2H, α-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO ), 4.17-4.28 (m, 1H, α-CH), 4.47-4.51 (m, 1H, α-CH), 4.52-4.61 (m, 1H, α-CH), 5,08 (s, 2H, CH <sub>2</sub> Ar ), 5.01-5.11 (m, 2H, CH <sub>2</sub> Ar), 5.13-5.13 (d, 2H, J= 2,4, CH <sub>2</sub> Ar ), 5,15-5.16 (d, 2H, J= 1,4, CH <sub>2</sub> Ar), 7.33 (m, 20H; Ar-H).			
MS (ESI)	m/z (%) = 780 (45, MH <sup>+</sup> ), 350 (100), 352 (78), 524 (90), 538 (75).			
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3302, 3032, 2929, 1734, 1654, 1542, 1458, 1264, 1050, 902, 751, 696.			
Elementna analiza		%C	%H	%N
C <sub>44</sub> H <sub>49</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub>	izračunano	67.76 %	6.33 %	5.39 %
	ugotovljeno	66.97 %	6.45 %	5.69 %

#### 4.2.21. Sinteza (5*R*,8*R*,14*S*)-8-benzil 14,17-dimetil 5-metil-3,6,11-trikso-1-fenil-2-oksa-16-tia-4,7,12-triazaheptadekan-8,14,17-trikarboksilata (**22**)

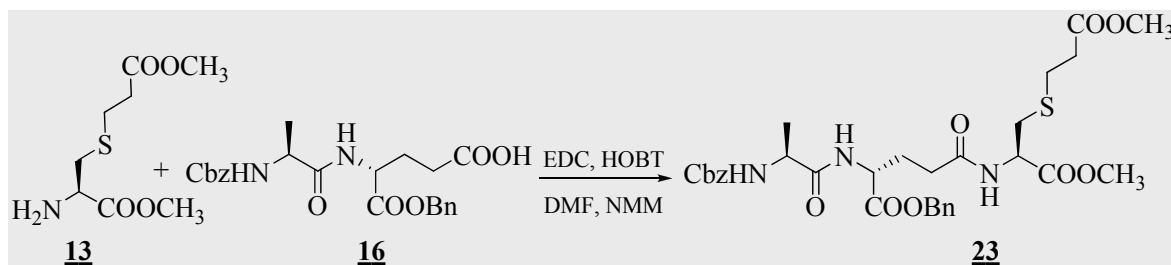


##### Sintezni postopek (26):

Natehtali smo 492 mg (2,37 mmol) spojine **14** in 700 mg (1,58 mmol) spojine **16**, ter ju raztopili v brezvodnem DMF. Dodali smo 290 mg (1,90 mmol) HOBt-a in z N-metilmorfolinom uravnali pH raztopine na 8. Nato smo dodali še 333 mg (1,74 mmol) EDC-ja in zmes mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo topilo odparili pod znižanim tlakom, suhi preostanek pa smo raztopili v 150 mL etilacetata ter spirali z 5% raztopino NaHCO<sub>3</sub> (3×50 mL), z 1M raztopino HCl (3×50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1×70 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in topilo uparili.

Elementna sestava	C <sub>30</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S	M = 631,2 g/mol
Opis	Rumeno-bela kristalinična spojina	
Masa produkta	349 mg	
Izkoristek	35 %	
Rf	0.25; MF-1	
Tališče	100-102° C	
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 1.37-1.39 (d, 3H, <i>J</i> = 10.1Hz, α-CH(CH <sub>3</sub> )CO), 2.03-2.12 (m, 1H, α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO), 2.25 (m, 2H, α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO + 1H, α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO), 3.053-3.086 (dd, 2H, <i>J</i> = 7.7 Hz, α-CHCH <sub>2</sub> S), 3.25 (s, 1H, SCH <sub>2</sub> COO), 3.92 (s, 1H, SCH <sub>2</sub> COO), 3.73 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.74 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 4.23-4.31 (m, 1H, α-CH), 4.51-4.58 (m, 1H, α-CH), 4.76-4.82 (m, 1H, α-CH), 5.11-5.12 (d, 2H <i>J</i> = 1.6 Hz, CH <sub>2</sub> Ar), 5.16-5.17 (d, 2H, <i>J</i> = 1.8Hz, CH <sub>2</sub> Ar), 5.29 (s, 1H, CONH), 7.35 (m, 10H; Ar-H).	
MS (ESI)	m/z (%) = 632 (100, MH <sup>+</sup> ).	
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3314, 2952, 2365, 1740, 1688, 1647, 1539, 1436, 1212, 1048, 998, 909, 754, 699, 580, 520, 487.	
Elementna analiza		%C      %H      %N
C <sub>30</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S	izračunano	57.04 %    5.90 %    6.65 %
	ugotovljeno	56,89 %    6.09 %    6.65 %

#### 4.2.22. Sinteza (5*R*,8*R*,14*S*)-8-benzil 14,18-dimetil 5-metil-3,6,11-trikso-1-fenil-2-oksa-16-tia-4,7,12-triazaoktadekan-8,14,18-trikarboksilata (**23**)



Natehtali smo 526 mg (2,37 mmol) spojine **13** in 700 mg (1,58 mmol) spojine **16**, ter ju raztopili v brezvodnem DMF. Dodali smo 290 mg (1,90 mmol) HOBt-a in z *N*-metilmorfolinom uravnali pH raztopine na 8. Nato smo dodali še 333 mg (1,74 mmol) EDC-ja in zmes mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo topilo odparili pod znižanim tlakom, suhi preostanek pa smo raztopili v 150 mL etilacetata ter spirali z 5% raztopino NaHCO<sub>3</sub> (3×50 mL), z 1M raztopino HCl (3×50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1×70 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo oljnato spojino, ki smo jo očistili s cirkularno kromatografijo in pri tem uporabili MF-5.

Elementna sestava	C <sub>31</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S	M = 645,2 g/mol
Opis	Rumeno-bela kristalinična spojina	
Masa produkta	326 mg	
Izkoristek	32 %	
Rf	0.30; MF-5	
Tališče	97-100° C	
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ [ppm] = 1.37-1.39 (d, 3H, $J$ = 7.07 Hz, $\alpha$ -CH( <u>CH</u> <sub>3</sub> )CO), 2.02-2.10 (m, 1H, $\alpha$ -CH <u>CH</u> <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO), 2.25 (m, 2H, $\alpha$ -CHCH <sub>2</sub> <u>CH</u> <sub>2</sub> CO + 1H, $\alpha$ -CH <u>CH</u> <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO), 2.56-2.61 (t, 2H, $J$ = 7.1 Hz, SCH <sub>2</sub> <u>CH</u> <sub>2</sub> COOMe), 2.77-2.82 (t, 2H, $J$ = 7.3 Hz, SCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOMe), 2.97-2.99 (d, 2H, $J$ = 5.0 Hz, $\alpha$ -CH <u>CH</u> <sub>2</sub> S), 3.68 (s, 3H, O <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 3.7 (s, 3H, O <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 4.24-4.31 (m, 1H, $\alpha$ - <u>CH</u> ), 4.52-4.58 (m, 1H, $\alpha$ - <u>CH</u> ), 4.76-4.81 (m, 1H, $\alpha$ - <u>CH</u> ), 5.11-5.12 (d, 2H, $J$ = 1.9, <u>CH</u> <sub>2</sub> Ar), 5.16-5.17 (d, 2H, $J$ = 1.8 Hz, <u>CH</u> <sub>2</sub> Ar) 5.27-5.3 (m, 1H, CON <u>H</u> ), 6.88-6.94 (m, 1H, CON <u>H</u> ), 7.34 (m, 10H; Ar- <u>H</u> ).	
MS (ESI)	m/z (%) = 646 (100, MH <sup>+</sup> ), 141 (96).	

IR (KBr)	v [cm <sup>-1</sup> ] = 3314, 2948, 1653, 1541, 1438, 1364, 1205, 1050, 907, 830, 739, 696.			
Elementna analiza		%C	%H	%N
C <sub>31</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S	izračunano	57.66 %	6.09 %	6.51 %
	ugotovljeno	57.92 %	6.27 %	6.50 %

**4.2.23. Sinteza (5*S*,8*R*,13*S*)-metil 8-(benziloksikarbonil)-13-(2-(benziloksikarbonilamino)etil)-5-metil-3,6,11-triokso-1-fenil-2-oksa-4,7,12-triazatetradekan-14-oata (**24**)**



**Sintezni postopek (26):**

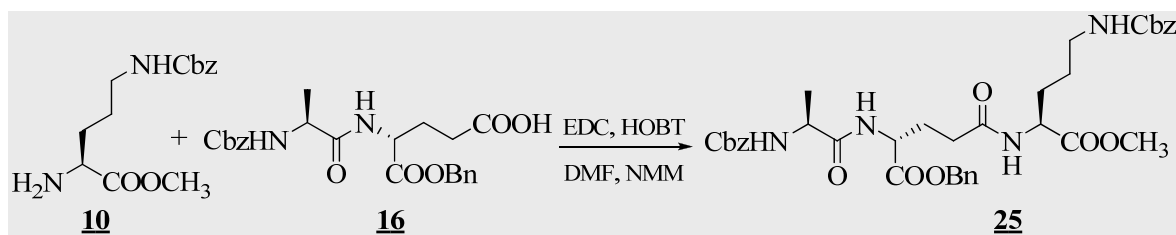
Natehtali smo 700 mg (2,63 mmol) spojine **9** in 775 mg (1,83 mmol) spojine **16**, ter ju raztopili v brezvodnem DMF. Dodali smo 336 mg (2,19 mmol) HOBt-a in z *N*-metilmorfolinom uravnali pH raztopine na 8. Nato smo dodali še 384 mg (2,01 mmol) EDC-ja in zmes mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo topilo odparili pod znižanim tlakom, suhi preostanek pa smo raztopili v 150 mL etilacetata ter spirali z 5% raztopino NaHCO<sub>3</sub> (3×50 mL), z 1M raztopino HCl (3×50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1×70 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo oljnato spojino, ki smo jo očistili s cirkularno kromatografijo in pri tem uporabili MF-5.

Elementna sestava	C <sub>35</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub>	M = 690,3 g/mol
Opis	Rumeno-bela kristalinična spojina	
Masa produkta	442 mg	
Izkoristek	35 %	
Rf	0.25; MF-5	
Tališče	145-148° C	
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 1.20-1.23 (d, 3H, <i>J</i> = 9.2 Hz, α-CH(CH <sub>3</sub> )CO), 1.67-1.75 (m, 1H, α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO), 1,76-1.92 (m, 2H, α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH+1H, α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO ), 1.92-2.04 (m, 1H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH), 2.14-2.28 (m, 2H,-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO), 3.02-3.05 (m, 2H, α-CH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH ), 3.59 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 4.09-4.13 (m, 1H, α-CH), 4.24-4.30, (m, 2H, 2× α-CH), 4.99 (s, 2H, CH <sub>2</sub> Ph), 5.03 (s, 2H, CH <sub>2</sub> Ar), 5.12 (s, 2H, CH <sub>2</sub> Ar ), 7.34 (m, 15H, Ar-H), 8.23-8.25 (d, 1H, <i>J</i> =2.3 Hz, NHCO ), 8.29-8.32 (d, 1H, <i>J</i> =2.2 Hz, NHCO ).	
MS (ESI)	m/z (%) = 691 (65, MH <sup>+</sup> ), 300 (70), 225 (55), 141 (100).	



IR (KBr)	$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3587, 3307, 3065, 2951, 2344, 1735, 1648, 1534, 1452, 1260, 1051, 908, 843, 752, 696, 578.			
Elementna analiza		%C	%H	%N
$\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_{10}$	izračunano	62.02 %	5.96 %	8.28 %
	ugotovljeno	62.29 %	6.25 %	8.08 %

**4.2.24. Sinteza (5*S*,8*R*,13*S*)-metil 8-(benziloksikarbonil)-13-(3-(benziloksikarbonilamino)propil)-5-metil-3,6,11-triokso-1-fenil-2-oksa-4,7,12-triazatetradekan-14-oata (25)**



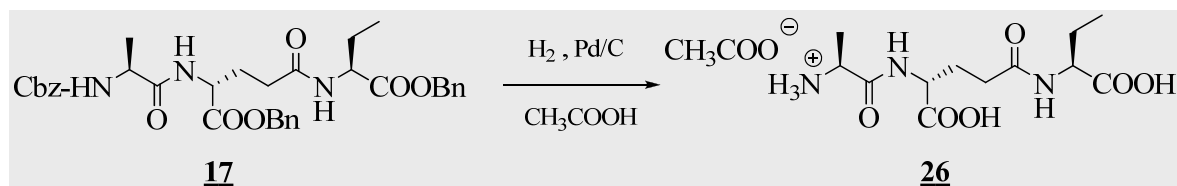
**Sintezni postopek (26):**

Natehtali smo 475 mg (1,69 mmol) spojine **10** in 500 mg (1,13 mmol) spojine **16**, ter ju raztopili v brezvodnem DMF. Dodali smo 208 mg (1,36 mmol) HOBt-a in z *N*-metilmorfolinom uravnali pH raztopine na 8. Nato smo dodali še 238 mg (1,24 mmol) EDC-ja in zmes mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo topilo odparili pod znižanim tlakom, suhi preostanek pa smo raztopili v 150 mL etilacetata ter spirali z 5% raztopino NaHCO<sub>3</sub> (3×50 mL), z 1M raztopino HCl (3×50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1×70 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo oljnato spojino, ki smo jo očistili s cirkularno kromatografijo in pri tem uporabili MF-2.

Elementna sestava	C <sub>37</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub>	M = 704,3 g/mol
Opis	Rumeno-bela kristalinična spojina	
Masa produkta	270 mg	
Izkoristek	34 %	
Rf	0.10; MF-2	
Tališče	110-112° C	
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 1.32-1.34 (m, 5H, α-CH(CH <sub>3</sub> )CO + α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHCO), 1.63-1.77 (m, 1H α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHCO), 1,7801.96 (m, 1H, α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHCO), 2.01-2.09 (m, 2H, α-CH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO), 2.12-2.28 (m, 4H, α-CH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO + α-CH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO), 3.17-3.23 (m, 2H, α-CH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH ), 3.70 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 4.19-4.25 (m, 1H, α-CH), 4.48-4.56, (m, 2H, 2 × α-CH), 5.07-5.09 (d, 4H, J= 6.2 Hz , 2 × CH <sub>2</sub> Ar), 5.17 (s, 2H, CH <sub>2</sub> Ar ), 5.22-5.26 (m, 1H, NHCO ), 7.02-7.08 (m, 1H, NHCO ), 7.33 (m, 15H, Ar-H).	
MS (ESI)	m/z (%) = 705 (61, MH <sup>+</sup> ), 381 (100), 312 (65).	

IR (KBr)	$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3314, 1653, 1540, 1449, 1261, 736, 696.			
Elementna analiza		%C	%H	%N
$\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_{10}$	izračunano	63.06 %	6.29 %	7.95 %
	ugotovljeno	62.95 %	6.40 %	7.78 %

#### 4.2.25. Sinteza (S)-1-((R)-1-karboksi-4-((R)-1-karboksipropilamino)-4-oksobutilamino)-1-oksopropan-2-amonijevega acetata (**26**)

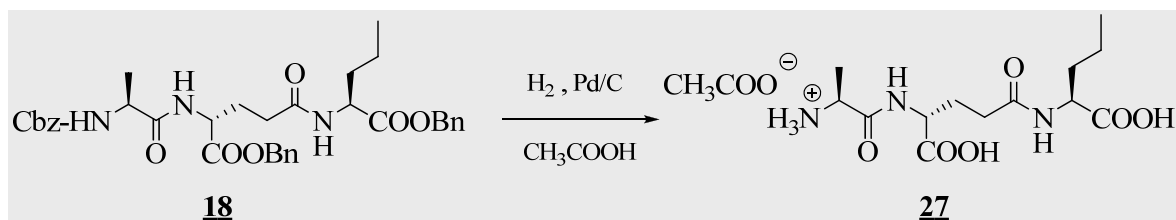


#### Sintezni postopek (27):

Spojino **15** (500 mg, 0,81 mmol) raztopimo v 20ml ledoceta in preprihomo z argonom. Nato dodamo 10 ut % katalizatorja-paladija na ogljiku (Pd/C), ter ob mešanju pri sobni temperaturi uvajamo vodik. Delamo v dvogrli bučki, ki jo opremimo z balonom, napoljenim z vodikom. Po končani reakciji katalizator odfiltriramo s presesavanjem in matičnico uparimo pod znižanim tlakom. Prudukt večkrat spiramo z etrom in posušimo v vakumski pištoli.

Elementna sestava	$\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_6$	$M = 303,14 \text{ g/mol}$		
Opis	bela kristalinična spojina			
Masa produkta	221,2 mg			
Izkoristek	90 %			
Rf	0.32; MF-4			
Tališče	138-141° C			
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ )	$\delta$ [ppm] = 0.86-0,91 (t, 3H $J=7.4$ Hz, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.48-1.51 (d, 3H, $J = 7.1$ Hz, $\alpha\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{CO}$ ), 1.63-1.85 (m, 2H, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.93-2.00 (m, 1H, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.10-.2.19 (m, 1H, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.33-2.37 (t, 2H, $J = 7.04$ Hz, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 4.04-4.11 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$ ), 4.13-4.17 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$ ), 4.22-4.27 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$ ).			
MS (EI)	$m/z$ (%) = 304 (100, $\text{MH}^+$ ).			
IR (KBr)	$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3420, 1548, 1392, 1262, 797.			
Elementna analiza		%C	%H	%N
$\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_6 \times \text{CH}_3\text{COOH}$	izračunano	46.28 %	6.93 %	11.56 %
	ugotovljeno	45.94 %	7.23 %	11.76 %

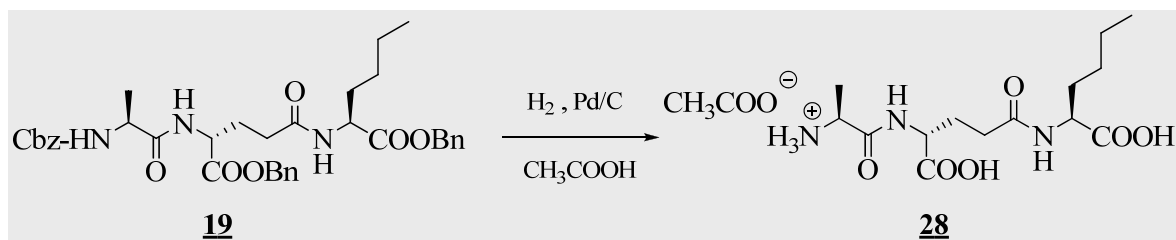
**4.2.26. Sinteza (S)-1-((R)-1-karboksi-4-((R)-1-karboksibutiilamino)-4-oksobutilamino)-1-oksopropan-2-amonijevega acetata (**27**)**



Delamo po sinteznem postopku opisanem v poglavju 4.2.25. Izhajamo iz 325 mg izhodne spojine **18**.

Elementna sestava	$\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6$	$M = 317,3 \text{ g/mol}$			
Opis	bela kristalinična spojina				
Masa produkta	143,21 mg				
Izkoristek	88 %				
Rf	0.29: MF-4				
Tališče	152-154° C				
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ )	$\delta$ [ppm] = 0.87-0,92 (t, 3H $J=7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.29-1.41 (m, 5H, $\alpha\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{CO} + \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.53-1.62 (m, 1H, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.62-1.73 (1H, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.16-2.25 (m, 4H, $\alpha\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.84-3.87 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$ ), 4.13-4.19 (m, 2H, $2 \times \alpha\text{-CH}$ ), 8.01-8.04 (m, 1H, $\text{CONH}$ ), 8.37 (s, 1H, $\text{CONH}$ ).				
MS (ESI)	$m/z$ (%) = 318 ( $\text{M}^+$ , 100), 247 (35), 158 (22), 141 (48).				
IR (KBr)	$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3304, 2962, 1560, 1400, 1263, 831, 737.				
Elementna analiza		%C	%H	%N	
$\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6 \times$	2	izračunano	45.49 %	6.68 %	9.95 %
$\text{CH}_3\text{COOH}$		ugotovljeno	45.94 %	6.60 %	10.11 %

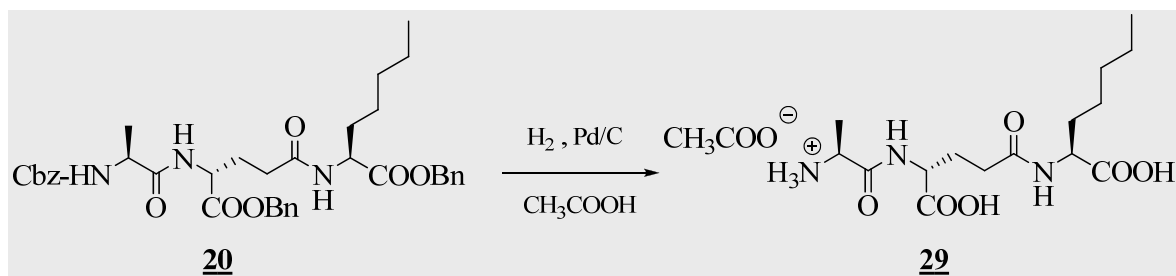
**4.2.27. Sinteza (S)-1-((R)-1-karboksi-4-((R)-1-karboksipentilamino)-4-oksobutilamino)-1-oksopropan-2-amonijevega acetata (**28**)**



Delamo po sinteznem postopku opisanem v poglavju 4.2.25. Izhajamo iz 300 mg izhodne spojine **19**.

Elementna sestava	$\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$	$M = 359,17 \text{ g/mol}$		
Opis	Rumeno-bela kristalinična spojina			
Masa produkta	120,2 mg			
Izkoristek	72 %			
Rf	0.62: MF-4			
Tališče	108-110° C			
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ )	$\delta$ [ppm] = 0.83-0.93 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.03-1.09 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.23-1.32 (m, 3H, $\alpha\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{CO}$ ), 1.53-1.68 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.76- 1.84 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.06-2.21 (m, 4H, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 4.06-4.16 (m, 2H, $2 \times \alpha\text{-CH}$ ), 4.36-4.5 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$ ), 7.89-7.92 (d, 1H, $J = 7.4 \text{ Hz}$ , CONH), 7.98-8.06 (m, 2H, CHNH <sub>2</sub> ).			
MS (ESI)	$m/z$ (%) = 560 (97, $\text{M}^+$ ), 214 (40), 158 (52), 141 (60).			
IR (KBr)	$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3420, 2959, 1661, 1388, 1250, 669.			
Elementna analiza		%C	%H	%N
$\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6 \times \text{CH}_3\text{COOH}$	izračunano	49.10 %	7.47 %	10.74 %
	ugotovljeno	49.34 %	7.74 %	11.16 %

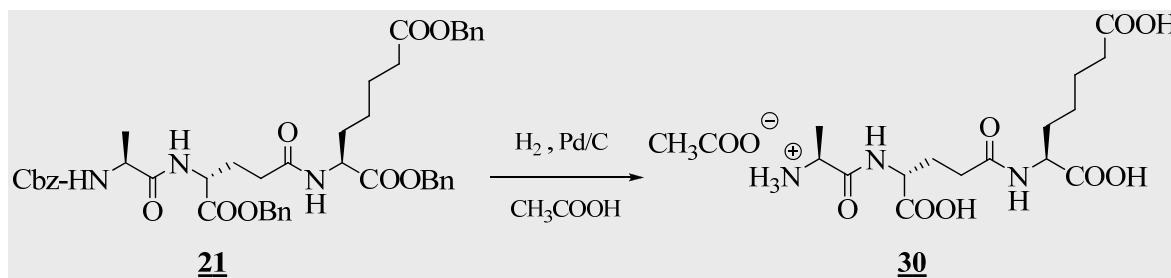
**4.2.28. Sinteza (S)-1-((R)-1-karboksi-4-((R)-1-karboksiheksilamino)-4-oksobutilamino)-1-oksopropan-2-amonijevega acetata (29)**



Delamo po sinteznem postopku opisanem v poglavju 4.2.25. Izhajamo iz 315 mg izhodne spojine 20.

Elementna sestava	$\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6$	$M = 345,19 \text{ g/mol}$		
Opis	bela kristalinična spojina			
Masa produkta	112 mg			
Izkoristek	68 %			
Rf	0.46, MF-4			
Tališče	124-126° C			
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ )	$\delta$ [ppm] = 0.83-0,87 (t, 3H, $J = 6.4 \text{ Hz}$ , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.24-1.28 (m, 9H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3 + \alpha\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{CO}$ ), 1.55-1.64 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.69-1.83 (m, 2H, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.12-2.17 (m, 2H, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.69-3.76 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$ ), 4.07-4.09 (m, 2H, $2 \times \alpha\text{-CH}$ ), 8.03-8.08 (m, 1H, $\text{CONH}$ ), 8.27-8.32 (m, 2H, $\text{CONH}$ ).			
MS (ESI)	$m/z$ (%) = 346 ( $\text{MH}^+$ 90), 214 (50), 158 (80), 141 (100).			
IR (KBr)	$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3376, 2931, 2229, 1651, 1560, 1388, 1204, 831.			
Elementna analiza		%C	%H	%N
$\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6 \times 0.5\text{CH}_3\text{COO}$ H	izračunano	51.93 %	7.90 %	11.35 %
	ugotovljeno	51.20 %	8.17 %	10.86 %

**4.2.29. Sinteza (S)-1-((R)-1-karboksi-4-((R)-1,5-dikarboksipentilamino)-4-oksobutilamino)-1-oksopropan-2-amonijevega acetata (**30**)**

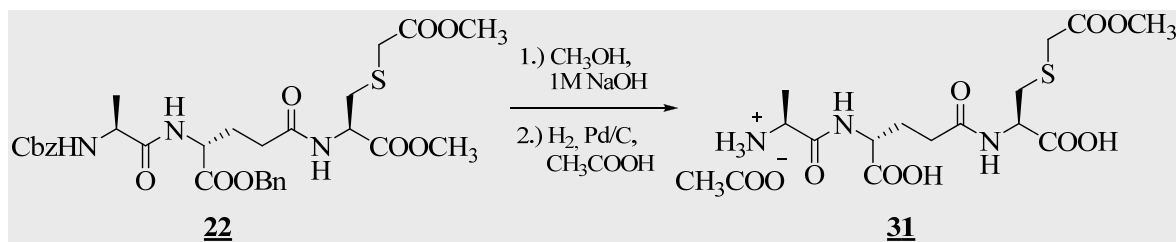


Delamo po sinteznem postopku opisanem v poglavju 4.2.25. Izhajamo iz 350 mg izhodne spojine **21**.

Elementna sestava	$\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_8$	$M = 375,16 \text{ g/mol}$		
Opis	bela kristalinična spojina			
Masa produkta	126 mg			
Izkoristek	75 %			
Rf	0.52; MF-4			
Tališče	104-106°C			
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ )	$\delta$ [ppm] = 1.21-1.31 (m, 5H, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ + $\alpha\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{CO}$ ), 1.46-1.58 (m, 2H, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 1.58-1.63 (m, 2H, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 1.66-1.74 (m, 1H, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{CH}_2$ ), 1.74-1.85 (m 1H, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{CH}_2$ ), 2,12-2,20 (m, 2H, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{CH}_2$ + 2H $\alpha\text{-CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.74-3.80 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$ ), 4.10-4.13 (m, 2H, $2 \times \alpha\text{-CH}$ ), 7.98-8.04 (m, 1H, $\text{NHCO}$ ), 8.20-8.27 (m, 1H, $\text{NHCO}$ ).			
MS (ESI)	$m/z$ (%) = 376 ( $\text{M}^+$ , 100), 305 (32), 225 (63), 141 (28).			
IR (KBr)	$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3381, 1681, 1387, 1203, 829, 738, 547.			
Elementna analiza		%C	%H	%N
$\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_8 \times \text{CH}_3\text{COOH}$	izračunano	49.05 %	6.84 %	9.09 %
	ugotovljeno	49.07 %	7.10 %	8.64 %



#### 4.2.30. Sinteza (S)-1-((R)-1-karboksi-2-(karboksimetiltio)etilamino)-4-oksobutilamino)-1-oksopropan-2-amonijevega acetata (**31**)

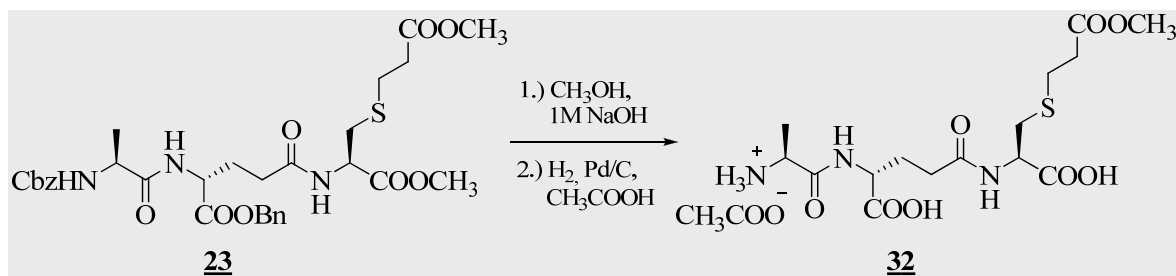


#### Sintezni postopek (27, 28)

Spojino **22** (339 mg, 0,54 mmol), raztopimo v metanolu (10 ml), z 1M NaOH uravnamo pH na 10,5 in postavimo na ledeno kopel da se meša. Po treh urah odparimo metanol pod znižanim tlakom, ostanek pa raztopimo v 50 ml etilacetata in 3-krat spiramo z 30 ml 1M HCl (**28**). Organsko fazo nato sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in topilo uparimo na rotavaporju. V drugem koraku pa nastale kristale raztopimo v 20 ml ledoceta, preprihamo z argonom, ter dodamo 10 ut % katalizatorja-paladija na ogljiku (Pd/C). Delamo v dvogrlji bučki, ki jo opremimo z balonom, napolnjenim z vodikom. Po končani reakciji katalizator odfiltriramo s presesavanjem in matičnico uparimo pod znižanim tlakom. Prdukt večkrat spiramo z etrom in posušimo v vakumski pištoli.

Elementna sestava	C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>	M = 379,10 g/mol
Opis	rumena kristalinična spojina	
Masa produkta	62 mg	
Izkoristek	32 %	
Rf	0.45; MF-4	
Tališče	86-89 °C	
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, -D <sub>2</sub> O)	δ [ppm] = 1.28-1.42 (d, 3H, J = 9.2 Hz, α-CH(CH <sub>3</sub> )CO), 1.87-1.91 (m, 1H, α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.14-2.21 (m, 2H, α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.37-2.41 (m, 1H, α-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 3.3-3.54 (m, 2H, α-CHCH <sub>2</sub> S), 3.6-3.7 (m, 2H, S CH <sub>2</sub> COOH), 3.75 (m, 2H, -OCH <sub>3</sub> ), 4.09-4.15 (m, 1H, α-CH), 4.32-4.37 (m, 1H, α-CH), 4.52-4.57 (m, 1H, α-CH), 5.08-5.12 (m, 2H, CH <sub>2</sub> Ar), 7.38 (m, 5H, Ar-H).	
MS (ESI)	m/z (%) = 380 (M <sup>+</sup> , 54), 394 (58).	
IR (KBr)	[ν <sub>cm<sup>-1</sup></sub> ] = 3373, 1724, 1663, 1529, 1227, 672.	

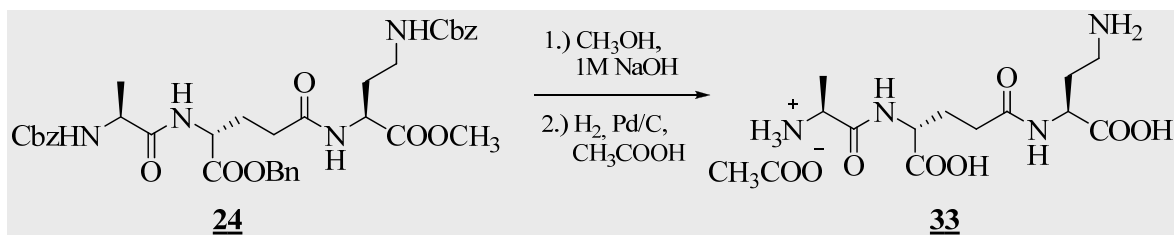
#### 4.2.31. Sinteza (S)-1-((R)-1-karboksi-4-((R)-1-karboksi-2-(karboksietiltilio)etilamino)-1-oksopropan-2-amonijevega acetata (**32**)



Delamo po sinteznem postopku opisanem v poglavju 4.2.30. Izhajamo iz 300 mg izhodne spojine **23**.

Elementna sestava	$\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}_2$	$M = 325,5 \text{ g/mol}$
Opis	Belo-rumena kristalinična spojina	
Masa produkta	62.5 mg	
Izkoristek	40 %	
Rf	0.43; MF-4	
Tališče	88-91° C	
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ )	$\delta$ [ppm] = 1.33-1.56 (m, 3H, $\alpha\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{CO}$ ), 1.99-2.02 (m, 1H, $\alpha\text{-CH-CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.15-2.21 (m, 1H, $\alpha\text{-CH-CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.37-2.41 (m, 2H, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.77-2.89- (m, 4H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 3.54-3.59 (m, 2H, $\alpha\text{-CHCH}_2\text{S}$ ), 3.71 (m, 2H, $-\text{OCH}_3$ ), 3.83-3.87 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$ ), 4.35-4.47 (m, 2H, $2\times\alpha\text{-CH}$ ).	
MS (ESI)	$m/z$ (%) = 326 ( $\text{MH}^+$ , 45), 340 (100).	
IR (KBr)	$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3392, 2365, 2229, 1694, 1387, 1203, 1121, 828, 737, 546.	

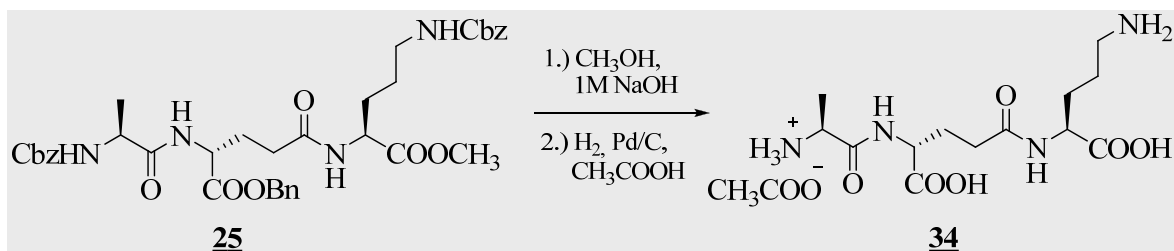
**4.2.32. Sinteza (S)-1-((R)-4-amino-1-karboksipropilamino)-1-karboksi-4-oksobutilamino)-1-oksopropan-2-amonijevega acetata (**33**)**



Delamo po sinteznem postopku opisanem v poglavju 4.2.30. Izhajamo iz 430 mg izhodne spojine **24**.

Elementna sestava	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_6$	$M = 318,15 \text{ g/mol}$		
Opis	bela kristalinična spojina			
Masa produkta	93,1 mg			
Izkoristek	47 %			
Rf	0.53; MF-4			
Tališče	180-184° C			
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, D <sub>2</sub> O)	$\delta$ [ppm] = 1.47-1.51 (d, 3H, $J = 9.2 \text{ Hz}$ , $\alpha\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{CO}$ ), 1.93-2.03 (m, 1H, $\alpha\text{-CH-CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ) + (1H, $\alpha\text{-CH-CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 2.08-2.16 (m, 1H, $\alpha\text{-CH-CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ) + (1H, $\alpha\text{-CH-CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 2.31-2.36 (m, 2H, $\alpha\text{-CH-CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.02- (t, 2H, $J = 7.1 \text{ Hz}$ , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 4.06-4.08 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$ ), 4.18-4.23 (m, 2H, $2 \times \alpha\text{-CH}$ ).			
MS (ESI)	$m/z$ (%) = 319 ( $\text{MH}^+$ , 100), 333 (62), 301 (49), 230 (40).			
IR (KBr)	$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] 3528, 1663, 1226.			
Elementna analiza		%C	%H	%N
$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_6 \times$	Izračunano	44,69 %	6.94 %	15.63 %
$4/5\text{CH}_3\text{COOH}$	Ugotovljeno	44.61 %	6.71 %	15.40 %

**4.2.33. Sinteza (S)-1-((R)-4-amino-1-karboksibutililamino)-1-karboksi-4-oksobutilamino)-1-oksopropan-2-amonijevega acetata (**34**)**



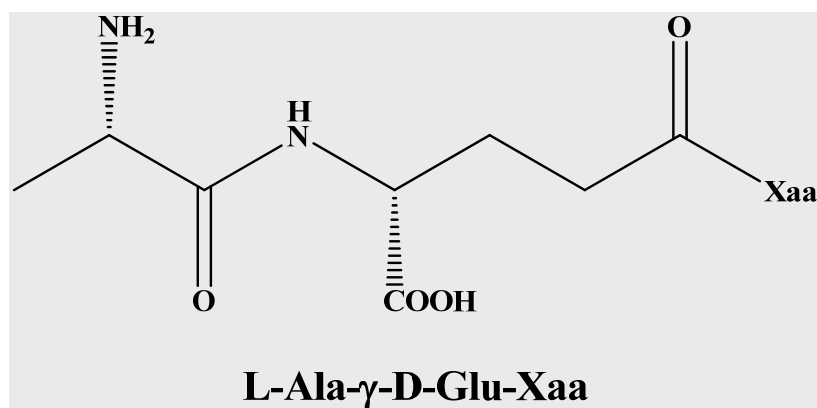
Delamo po sinteznem postopku opisanem v poglavju 4.2.30. Izhajamo iz 250 mg izhodne spojine **25**.

Elementna sestava	$\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_6$	$M = 346,17 \text{ g/mol}$		
Opis	bela kristalinična spojina			
Masa produkta	71,3 mg			
Izkoristek	58 %			
Rf	0.53; MF-4			
Tališče	112-116° C			
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, D <sub>2</sub> O)	$\delta$ [ppm] = 1.22-1.24 (m, 3H, $\alpha$ -CH(CH <sub>3</sub> )CO), 1.59-1.63 (m, 1H, $\alpha$ -CH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO) + (1H, $\alpha$ -CH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ), 1.64-1.78 (m, 1H, $\alpha$ -CH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO) + (1H, $\alpha$ -CH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ), 2.11-2.18 (m, 2H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ), 2.27-2.36- (m, 2H, $\alpha$ -CH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO), 2.72-2.74 (m, 2H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ), 3.89-3.95 (m, 1H, $\alpha$ -CH), 3.97-4.03 (m, H, $\alpha$ -CH), 4.2-4.32 (m, 1H, $\alpha$ -CH), 7.9-8.1 (m, 1H, NHCO), 8.35-8.39 (m, 1H, NHCO).			
MS (ESI)	$m/z$ (%) = 347 (MH <sup>+</sup> , 100), 361 (68), 315 (32).			
IR (KBr)	$\nu$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3420, 2368, 2229, 1687, 1387, 1296, 1203, 829, 737, 546.			
Elementna analiza		%C	%H	%N
$\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_6 \times 1/5$	Izračunano	46.74 %	7.26 %	16.27 %
CH <sub>3</sub> COOH	Ugotovljeno	46.98 %	7.28 %	16.68 %

## 5. RAZPRAVA IN RAZLAGA SINTEZNIH POSTOPKOV

### 5.1. Izbor in utemeljitev ustreznega aminokislinskega motiva s tendenco za vezavo v aktivno mesto encima Mpl.

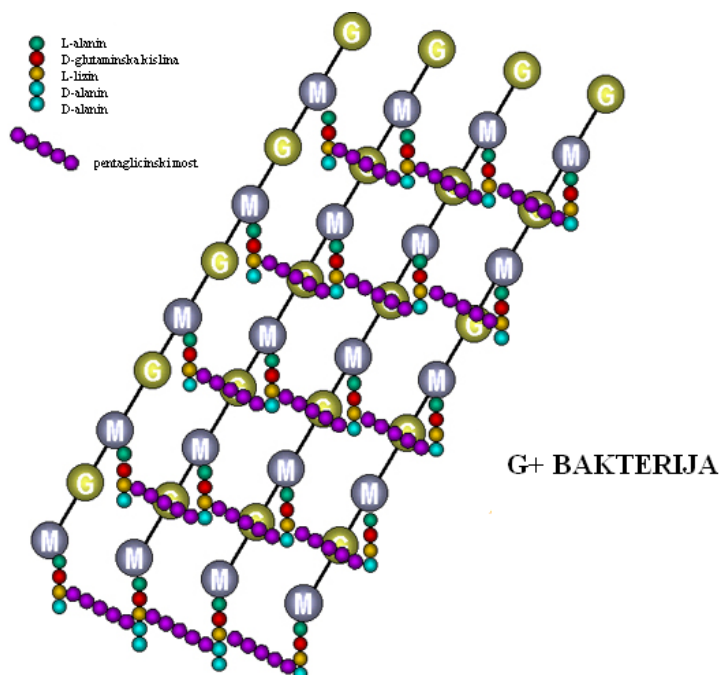
Murein peptidna ligaza (Mpl) je encim, ki omogoča da se tripeptid L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*mezo*-A<sub>2</sub>pm, ki nastaja ob razgradnji celične stene in je značilen za G- bakterije, veže na UDP-MurNAc in tako ponovno vstopi v cikel sinteze peptidoglikana. Na osnovi substrata L-Ala-  $\gamma$ -D-Glu-L-Lys smo najprej določili glavni motiv oz. splošno shemo spojin, ki smo jih nato v okviru diplomske naloge tudi sintetizirali. Pri tem smo upoštevali različna dejstva in podatke o encimu Mpl, ki so bila na voljo. Kmalu po izolaciji encima iz *E. coli* je bilo dokazano, da Mpl poleg tripeptida L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*mezo*-A<sub>2</sub>pm, sprejme v vezavno mesto tudi tripeptid L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lys, ki je značilen za G<sup>+</sup> bakterije (*S.aureus*). Poleg tega so ugotovili tudi, da encim ni omejen le na tripeptide, ampak da kaže afiniteto tudi do tetra- in pentapeptidov, ki prav tako nastanejo ob razgradnji celične stene. Na osnovi naštetih dejstev je bila določena splošna struktura spojin, ki smo jih nato tudi sintetizirali (slika 16).



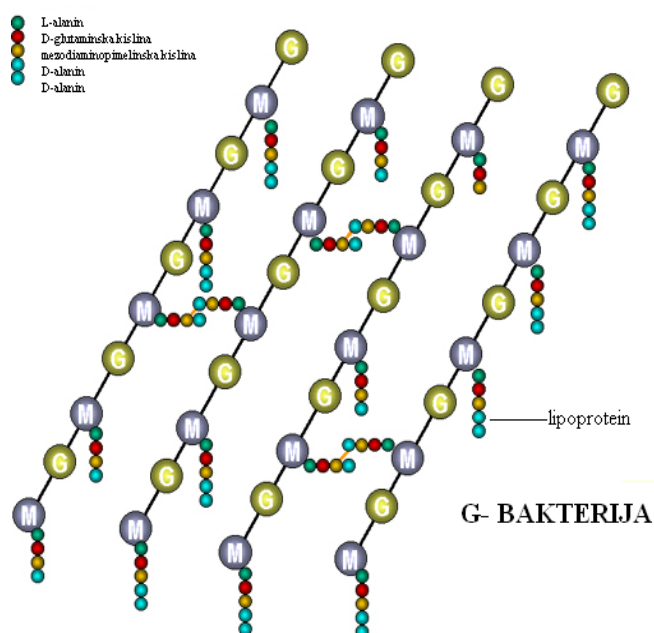
Slika 16: Splošna struktura tripeptidov

Xaa na sliki 16 predstavlja različne aminokisliline, ki v primerjavi z L-lizinom variirajo bodisi v dolžini, bodisi v različni substituiranosti aminokislinskega preostanka.

Ker je prosta terminalna  $\text{NH}_2$ - skupina pri L-Lys zelo pomembna pri prečnem premreževanju celične stene, je cilj zamenjav in variacij na tretji aminokislini ravno drugačna pozicija amino skupine oziroma njena odsotnost.



Slika 17: Prečna povezava peptidoglikanskih verig pri G+ bakterijah



Slika 18: Prečna povezava peptidoglikanskih verig pri G- bakterijah

Pri večini G- bakterijah so prečne povezave sestavljene iz direktne peptidne vezi med karboksilno skupino četrte aminokislina (D-alanina) enega glikanskega vlakna in prosto amino skupino tretje aminokislina sosednje glikanske verige. V primeru G+ bakterij

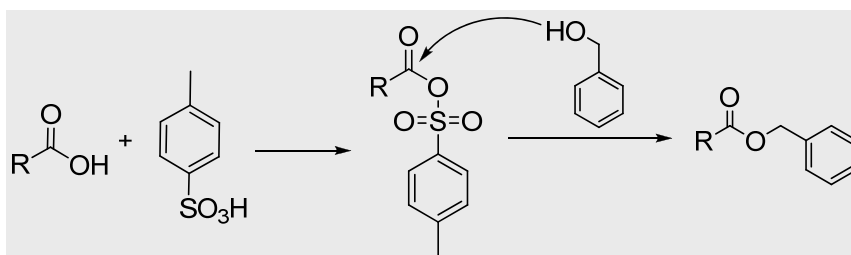
pa terminalno karboksilno skupino D-alanina ene verige in prosto amino skupino tretje aminokislina v drugi verigi povezuje most iz petih glicinskih ostankov (2) (slika 17). Zaradi tako pomembne vloge, ki jo ima prosta terminalna amino skupina, so variacije tretje aminokislina sintetiziranih tripeptidov smiselne in utemeljene. Vgrajevanje takšnih tripeptidov, ki ne omogočajo prečnega premreženja celične stene, oslabi njeno trdnost in stabilnost, kar posledično lahko vodi do propada bakterije.

## 5.2. Razlaga sinteznih postopkov

Ker sta prvi dve aminokislini pri vseh končnih spojinah enaki, smo najprej sintetizirali večjo količino osnovnega dipeptida L-Ala-D-Glu, na katerega smo v nadaljevanju vezali različne aminokislina, ki smo jih pred tem ustrezno substituivali in zaščitili. Zadnji korak pri sintezi končnih spojin pa je bila odstranitev zaščitnih skupin.

### 5.2.1. Sinteza benzilnih estrov aminokislina ( spojine 2, 3, 4, 5, 6 )

Aminokislina imajo v svoji strukturi najmanj dve funkcionalni skupini ( $-NH_2$  in  $COOH$ ), ki lahko reagirajo bodisi med seboj (tvorba cikličnega peptida ali peptidov), bodisi s kakšno drugo spojino. Da bi reakcija selektivno potekla le na določeni amino skupini, je bilo potrebno ostale skupine ustrezno zaščititi. V okviru diplomskega dela smo vse karboksilne skupine aminokislina, ki niso zahtevale dodatne substitucije, zaščitili v obliki benzilnega estra (slika 19). Gre za kislinsko katalizirano esterifikacijo, kjer neposredno reagirata karboksilna skupina aminokislina in hidroksi skupina benzilnega alkohola. Reakcija je reverzibilna in jo katalizirajo kisline. Kot katalizator smo uporabili PTSA monohidrat, ki po protoniranju poveča reaktivnost karbonilne skupine za napad nukleofila (benzilnega alkohola) (33).

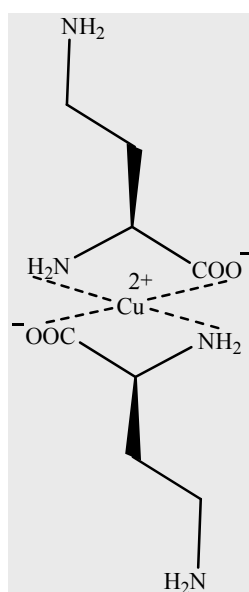


Slika 19: Mehanizem nastanka benzilnega estra

Kot pri vseh ravnotežnih reakcijah lahko tudi tukaj pomaknemo ravnotežje v desno, bodisi z uporabo prebitka alkohola, bodisi z odstranjevanjem produktov iz reakcijske zmesi. Za boljši izkoristek reakcije smo uporabili prebitek benzilnega alkohola, nastalo vodo pa smo odstranjevali s pomočjo Dean-Starkovega nastavka. Ko je reakcija potekla, smo benzen uparili ter dolili brezvodni eter. Ob tem so izpadli beli kristali, ki smo jih odnučali in na ta način odstranili še nezreagirani benzilni alkohol. Ker je bil produkt v obliki soli, smo ga na koncu raztopili v etilacetatu in spirali z 1M raztopino NaOH. Na ta način smo poleg PTSA odstranili tudi morebitne nezreagirane izhodne aminokisliline.

### 5.2.2. Zaščita terminalne amino skupine pri L-Dab in L-Orn (spojini **7**, **8**)

L-Dab in L-Orn sta aminokislini, ki imata dve prosti amino skupini, ki lahko reagirata, zato je nujno, da eno  $\text{NH}_2$  skupino ustrezno zaščitimo. Aminokislini smo najprej raztopili v vodi, dodali  $\text{CuCO}_3$  ter refluktirali 20 min. Pri tem se tvori bakrov kompleks (slika 20), ki v nadaljevanju omogoča, da reakcija poteče selektivno na prosti terminalni  $\text{NH}_2$  skupini aminokisliline. Reakcijsko zmes smo nato ohladili, naalkalili z  $\text{NaHCO}_3$  ter dodali benzilkloroformiat. Z bazičnim medijem olajšamo nukleofilni napad amino skupine na aktiviran kislinski klorid, poleg tega pa z nizko temperaturo preprečujemo nastanek stranskih produktov ( $\alpha\text{-NH-Cbz}$ ). Na ta način smo v obliki karbamata (Cbz-zaščita) selektivno zaščitili prosto  $\gamma\text{-NH}_2$  skupino L-Dab in  $\delta\text{-NH}_2$  skupino L-Orn.



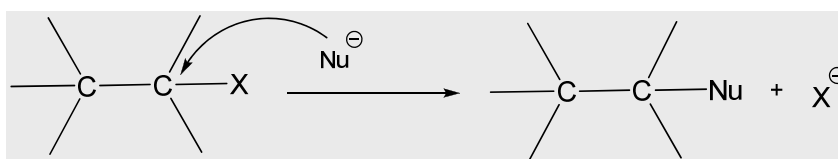
Slika 20: Bakrov kompleks z L-Dab



### 5.2.3. Sinteza spojin 11 in 12

Spojino 11 smo pripravili tako, da smo aminokislino L-cistein raztopili v vodi ter dodali propenojsko kislino. Pri tem pride do konjugativne (1,4) adicije na dvojno vez. Reakcija ne potrebuje dodatnega katalizatorja saj je –SH skupina dovolj reaktivna da reakcija poteče z velikim izkoristkom. Nato smo reakcijsko zmes postavili še v hladilnik, kjer so po nekaj urah izpadli lepi kristali, ki smo jih odnučali, sprali z metanolom in jih posušili v eksikatorju.

Tudi pri spojini 12 smo izhajali iz L-cisteina, ki smo ga prav tako najprej raztopili v vodi, nato pa dodali 2-kloroaceto kislino, NaOH ter pustili na sobni temperaturi. Med mešanjem poteka nukleofilna substitucija, kjer žveplov atom kot močan nukleofil napade elektrofilen C-atom in se namesto klora veže nanj. Reakcija je enostopenjska in poteka po S<sub>N</sub>2 mehanizmu, saj imamo prisoten močan nukleofil, na drugi strani pa še COOH skupino, ki s svojim negativnim indukcijskim učinkom olajša substitucijo klora z žveplom.



Slika 21: S<sub>N</sub>2 mehanizem nukleofilne substitucije

Ko je reakcija potekla smo dodali še ledocet in reakcijsko zmes postavili v hladilnik, kjer so po 18 urah izpadli beli kristalčki. Sledila je še izolacija, ki je enaka kot pri spojini 11.

### 5.2.4. Sinteza spojin 9, 10, 13, 14 (tvorba metilnih estrov)

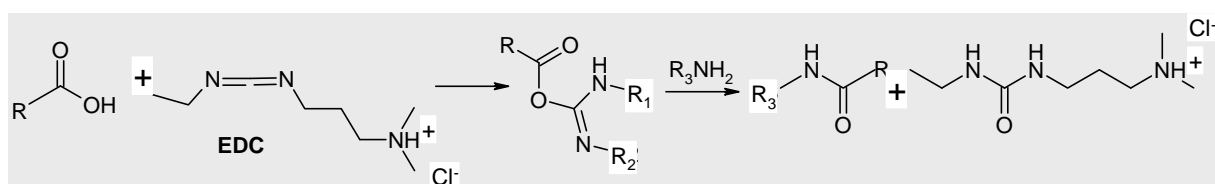
Metilni estri se poleg benzilnih pogosto uporabljajo za zaščito karboksilne kisline. Reakcijo izvajamo tako, da izhodno spojino raztopimo v metanolu, zmes ohladimo na 0°C in počasi dodajamo SOCl<sub>2</sub>. Pri tem najprej nastane dimetilni sulfat, pri čemer sulfatni del predstavlja dobro izstopajočo skupino. V naslednji stopnji pa hidroksilni kisik karboksilne skupine nukleofilno napade ogljik metilne skupine. Na ta način izstopi preostali sulfatni del in nastane metilni ester izhodne karboksilne kisline. Omenjena reakcija daje visoke izkoristke in čiste produkte, ki se nahajajo v obliki soli s klorovodikovo kislino.

### 5.2.5. Sinteza spojine **16**

Spojina **16** predstavlja ustrezno zaščiten dipeptid Cbz-L-Ala-D-Glu-Bn, ki je pripravljen za sintezo amidne vezi na  $\gamma$  mestu. Izhajali smo iz Cbz-L-alanina, ki smo ga raztopili v dioksanu in aktivirali z *N*-hidroksisukcinimidom. Pri reakciji se tvori aktiviran ester, ki reagira z amino skupino D-glutaminske kisline, pri tem pa se kot dobra iztopajoča skupina odcepi *N*-hidroksisukcinimid. Tako nastane osnovni dipeptid s prosto  $\gamma$ -COOH skupino, kjer se v nadaljevanju tvori amidna vez tripeptidov.

### 5.2.6. Tvorba amidne vezi z EDC/HOBt metodo

Sinteza amidne vezi z uporabo EDC in HOBt je najpogostejša metoda za pripravo amida. Ker karboksilna kislina ni dovolj reaktivna za potek reakcije, jo moramo aktivirati, to pa naredimo s 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil) karbodiimidijevim kloridom (EDC), ki s karboksilno kislino tvori aktiviran ester in s tem poveča elektrofilnost karbonilne skupine ter olajša nukleofilni napad (*slika 22*). Pri reakciji nastane vodotopen derivat sečnine, ki ga pri ekstrakciji z vodo enostavno odstranimo (prednost pred uporabo DCC, kjer moramo stranske produkte odstraniti s filtriranjem). V reakcijsko zmes dodamo tudi HOBt, saj le-ta zmanjša nastanek stranskih produktov (predvsem *N*-acilsečnine) ter prepreči racemizacijo. Pomemben faktor pri sintezi amidne vezi je tudi pH, ki ga z *N*-metilmorfolinom uravnamo na vrednost 8 in s tem preprečimo, da bi se zaradi prevelike bazičnosti odcepil proton od  $\alpha$ -CH skupine, kar bi lahko povzročilo racemizacijo.



Slika 22: Aktivacija karboksilne kisline z EDC

Poudarimo lahko, da so vsi zaščiteni tripeptidi, ki smo jih sintetizirali v tej stopnji (**17**, **18**, **19**, **20**, **21**, **22**, **23**, **24**, **25**) kemijsko nove spojine, kar je zahtevalo podrobnejše analize spojin (NMR, MS, IR, tališče, elementna analiza). Zato smo morali na te mestu skoraj pri vseh tripeptidih uporabiti kolonsko oziroma cirkularno kromatografijo, da smo

spojine popolnoma očistili. Ko so vse analize ustrezale smo naredili še zadnjo stopnjo, to je odstranitev zaščitnih skupin.

## 5.2.7. Odstranitev zaščitnih skupin

### 5.2.7.1. Odstranitev benzilne zaščite

Estrsko benzilno zaščito smo odstranjevali v ledoctu s hidrogeniranjem v prisotnosti Pd/C (10 ut %) kot katalizatorja. Paladij na ogljiku spada v skupino heterogenih katalizatorjev. Na drobno uprašenem ogljiku je paladij adsorbiran, kar zelo poveča samo površino paladija, katalizator pa je zato bolj reaktiven. Reakcija poteka po radikalskem mehanizmu, kjer se na površino paladija fizično adsorbira vodik in pri tem se tvori skupek paladijev hidrid-Pd<sup>2+</sup> (H)<sub>2</sub>. Benzilni fragment spojine na površini paladijevega klastra sprejme elektron, se ionizira in tvori anionski radikal. Ta nato povzroči disproporcionacijo dveh atomov Pd<sup>0</sup> na Pd<sup>+</sup> in Pd<sup>2+</sup>. V tej stopnji se benzilni fragment loči od ostale spojine v obliki toluena, Pd<sup>2+</sup> pa se reducira nazaj v Pd<sup>0</sup> v reakciji z enim molom H<sub>2</sub> (27).

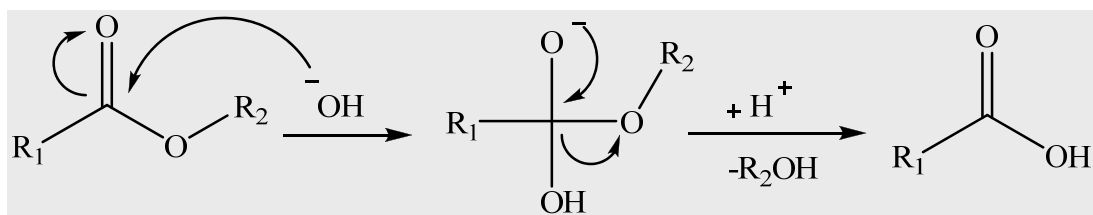
Katalitsko hidrogeniranje je uveljavljen postopek, ki normalno poteka z visokimi izkoristki in je najpogostejši način za odstranitev benzilne zaščite.

### 5.2.7.2. Odstranitev metilne zaščite

Odstranitev metilne zaščite smo izvedli s hidrolizo estrske skupine pod alkalnimi pogoji. Pri tem ester raztopimo oz. suspendiramo v metanolu ali dioksanu, dodamo 1,5-2 ekv. 1M NaOH ter mešamo pri sobni temperaturi. Potek reakcije ves čas spremljamo s tankoplastno kromatografijo.

Hidroliza se začne z nukleofilnim napadom hidroksilnega iona na karbonilno skupino estra (*slika 23*). Pri tem se elektronski par prenese na karbonilni kisik, in se v naslednji stopnji vrne v vez med kisikom in ogljikom, pri čemer izstopi alkoholna komponenta estra kot boljša izstopajoča skupina v primerjavi s hidroksilno. Po koncu reakcije je treba zmes nakisati, saj se produkt nahaja v obliki soli z natrijem.

Reakcija daje različno visoke izkoristke (20-70 %), pomembno pa je, da pH ni previsok, saj bi v tem primeru lahko prišlo do hidrolize tudi kakšne druge vezi, npr. amidne.



Slika 23: Alkalna hidroliza estra

### 5.2.8. Komentar k rezultatom analiz

V okviru diplomske naloge smo sintetizirali 18 novih spojin, za katere smo morali opraviti tudi vse predpisane analize. Rezultati so pri večini spojin ustrezni, odstopajo pa pri dveh končnih tripeptidih (**31**, **32**). Gre za tripeptide z derivatom cisteina kot tretje aminokisliline, kjer odstranitev zaščitnih skupin po več poskusih ni potekla do konca. Iz NMR in masnega spektra lahko vidimo, da imamo pri obeh spojinah še nekaj metilnega estra poleg produkta. Zato seveda tudi elementni analizi obeh dveh spojin odstopata od teoretičnih vrednosti.

Pri večimi posnetih NMR spektrov zaradi devterične izmenjave protonov z vodo nismo videli pikov za  $\text{NH}$  in  $\text{OH}$  protone, poleg tega pa smo pri kiralnih centrih v spojini dobili razcepljene vrhove protonov, ki pa so se drugače večinoma normalno integrirali.

Poudarimo lahko še, da smo kot topilo pri katalitskem hidrogeniranju uporabili očetno kislino, ki pa jo je bilo na koncu zelo težko odstraniti iz produkta. Zato smo poleg sušenja v eksikatorju z NaOH, končne tripeptide tudi liofilizirali.

## 6. ZAKLJUČEK

V okviru diplomskega dela smo želeli pripraviti nove potencialne substrate za encim murein peptidno ligazo (Mpl). Gre za serijo različnih tripeptidov, ki bi se s pomočjo Mpl encima vezali na UDP-MurNAc in tako povzročili motnje v sintezi in prečnem premreženju celične stene.

Sinteze novih spojin smo se lotili sistematično. Najprej je bil določen osnovni dipeptid, na katerega smo nato dodajali različne aminokislino, ki smo jih pred tem ustrezno substituirali in zaščitili. Tretja aminokislina je namreč pri bakterijah zelo pomembna, saj preko proste terminalne amino skupine poteka prečno premreženje glikanskih verig, kar daje celici trdnost in odpornost pred zunanjimi vplivi. Na osnovi tega dejstva smo tretjo aminokislino substituirali tako, da smo bodisi zamenjali amino skupino s kakšno drugo, bodisi spremenili dolžino verige, ali pa vzeli takšne aminokislino, ki proste terminalne amino skupine sploh nimajo.

Uvedba benzilne zaščite je potekla hitro in z visokimi izkoristki pri aminokislinah, kjer smo izhajali vsaj iz dveh oziroma treh gramov izhodne spojine. Pri ostalih, kjer smo pa imeli manj kot 1 g vzorca, pa uvedba benzilne zaščite ni potekla, zato smo namesto nje uporabili metilno zaščito. Prednost tripeptidov, ki so imeli le benzilne zaščite je ta, da pri njih poteče odstranitev zaščitnih skupin s enostopenjsko katalitskim hidrogeniranjem, kar daje visoke izkoriske. Pri ostalih, ki pa so imeli poleg benzilne še metilno zaščito pa smo morali uporabiti dve stopnji. Najprej smo z alkalno hidrolizo odstranili metilno zaščito, nato pa še s katalitskim hidrogeniranjem benzilno zaščito. Posledica dveh stopenj je seveda manjši izkoristek.

V okviru eksperimentalnega dela smo pripravili 9 končnih tripeptidov kot potencialnih lažnih substratov za Mpl encim in spojine poslali tudi na testiranja. Rezultati bodo pokazali morebitno aktivnost spojin in na osnovi teh, bomo lahko določili in predlagali nadaljne sintezne korake pri iskanju novih lažnih substratov za Mpl encim.

## 7. LITERATURA

1. Katz AH, Caufield CE. Structure-based design approaches to cell wall biosynthesis inhibitors, *Current Pharmaceutical Design* 2003; 9: 857-866.
2. El Zoelby A, Sanschagrin F, Levesgue R.C. Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol Microbiol* 2003; 47: 1-12.
3. Gobec S, Urleb U. Inhibitorji biosinteze peptidoglikana. *Farm Vestn* 1999; 50: 183-193.
4. Varagič VM., Milošević MP. *Farmakologija. Elit – Medica*, Beograd 2001; 595-609, 718-722.
5. Goodman & Gilman. *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 10<sup>th</sup> Ed. The McGrawHill Companies. New York 2001; 1143-1146.
6. Hammond SM., Lambert PA, Rycraft AN. *The bacterial cell surface*. Croom Helm, London & Sydney, Kapitan Szabo publishers, Washington DC 1984; 1-28.
7. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Pharmacology* 5<sup>th</sup> Ed, Churchill Livingstone 2003; 620-52.
8. Herve M, Boniface A, Gobec S, Blanot D, Mengin-Lecreulx D. Biochemical characterization and physiological properties of *Escherichia coli* UDP-N-Acetylmuramate: L-alanil- $\gamma$ -D-Glutamil-meso-diaminopimelat ligase. 2007; 1-3.
9. Mengin-Lecreulx D, Van Heijenoort J, Park JT. Identification of Mpl gene Encoding UDP-N-Acetylmuramate: L-alanil- $\gamma$ -D-Glutamil-meso-diaminopimelat ligase in *Escherichia coli* and its role in recycling of cell wall peptidoglican. 1996; 1-5.

10. Foye WO. Principles of medicinal chemistry .1981; 713-724.
11. Margaret A, Brimble N, Trotter S, Harris PWR, Sieg F. Synthesis and Pharmacological evaluation of side modified glutamic acid analogues of neuroprotective agent glycyl-L-prolyl-L-Glutamic acid (GPE). 1997.
12. Shui-Tein Chen, Wen-Hong Huang, Kung Tsung. Resolution of amino acids in a mixture of 2-methyl-2-propanoate catalyzed by Alcalase via in situ racemization of one antipode mediated by pyridoxal 5-phosphate. Taiwan 1998.
13. Kuwata S, Watanabe H. The removal of Copper from Copper complex of  $\omega$ -acylamino Acid with EDTA. 1964; 2-4.
14. Koenig KH. Liebigs Annalen der Chemie 1987; (12): 1115-16.
15. Nouvet A, Blinard M, Lamaty F, Martinez J, Lazaro R. Synthesis of perhydrodiatepinones as new putative peptidomimetics. 1993; 11-16.
16. Rosowsky A. Journal of Medicinal Chemistry 1991; 34(4): 1447-54.
17. Effenberger F. Chemie Berichte 1998; 121(12): 2209-23.
18. Detsi A, Screttas M, Igglessi-Markopoulou O. Synthesis of N-alkoxycarbonyl-3-substituted acids and functionalized enols via C-acylation reactions of active methylene compounds with N-hydroxysuccinimide esters of n-alkoxycarbonyl- $\alpha$ -amino acids. 1998; 112-115.
19. Katrizky AR, Cusido E, Angrish J, Shestopalov P. Selective peptide chain extension at N-terminus of aspartic and glutamic acids utilizing 1-(N-protected-  $\alpha$ -aminoacyl)benzotriazoles. 2006; 74-78.
20. Brimble MA, Trotter NS, Harris PWR, Sieg F. Synthesis and pharmacological evaluation of side chain modified glutamic acid analogues of the neuroprotective

- agent glycyl-L-prolyl-L-glutamic acid (GPE). *Bioorgani & Medicinal Chemistry* 2005; 13: 519-532.
21. Adamczyk M, Jonhson DD, Reddy RE. Bone collagen cross-links: an efficient one-pot synthesis of (+)-pyridonoline and (+)-deoxypyridinoline. 2002; 2292-2293.
22. Wuts PGM, Green TW. *Greene`s protective groups in organic synthesis*. Fourth Ed. 539.
23. Hiraiwa T, Kubo M, Watanabe M, Nakatani H, Ohkubo M, Kurokawa H. Optical resolution by Preferential Crystallization of (RS)-2-amino-3-(2-carboxyethylthio)propanoic acid. 1997; 819-820.
24. Kenzo Y, Chikahiko E, Koji KA. Asymetric synthesis of s-carboxymethyl-L-Cysteine by a chemicoenzymic method.; *Cent. Res. Lab, Ajinomoto Co., Kawasaki, Japan. Agricultural and Biological Chemistry*. 1998; 52(9): 2376-8.
25. Wallen EAA, Christiaans JAM, Jahro EM, Forsberg MM, Vinalainen JI, Mannisto PT, Gynther J. New prolyl oligopeptidase inhibitirs developed from dicarboxylic acid bis (l-prolyl-pyrrolidine) amides. 1994; 4548.
26. Harbeson SL, Abelleira SM, Akiyama A, Barret R, Carroll RM, Straub JA, Tkacz JN, Musso GF. Stereospecific sythesis of peptidyl  $\alpha$ -keto amides a inhibitors of calpain. *J.Med.Chem.* 1994; 37: 2918-2929.
27. March J, Smith MB. *March`s advanced organic chemistry, Reactions, mechanisms and structure*, 6<sup>th</sup> Ed; A Wiley Interscience Publivation. New York 2007; 947, 1054-1055, 1169-1179.
28. Bodanszky M, Bodanszky A. *The practise of peptide synthesis*. 1994; 148.
29. [www.biologycorner.com/resources/gram\\_bacteria.jpg](http://www.biologycorner.com/resources/gram_bacteria.jpg).



30. [www.scq.ubc.ca/.../2006/08/peptidoglycan.gif](http://www.scq.ubc.ca/.../2006/08/peptidoglycan.gif).
31. [microvet.arizona.edu/.../image005.gif](http://microvet.arizona.edu/.../image005.gif).
32. Ajd M. Sinteza in vrednotenje hidrosimetilkarbonilnih analogov prehodnega stanja kot potencialnih inhibitorjev D-alanil-Dalanin ligaze. Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo. 2007; 7.
33. Bodanszky M, Bodanszky A. The practise of peptide synthesis. 1994; 52.