

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VESNA BREŠČAK

**SINTEZA IN VREDNOTENJE DERIVATOV OKSAZOLA  
KOT POTENCIALNIH INHIBITORJEV D-ALANIL-D-ALANIN  
LIGAZE**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF OXAZOL DERIVATIVES AS  
POTENTIAL INHIBITORS OF D-ALANYL-D-ALANIN LIGASE**

**DIPLOMSKA NALOGA**

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo na Katedri za organsko kemijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Stanislava Gobca in somentorstvom doc. dr. Bogdana Štefane.  $^1\text{H-NMR}$  in  $^{13}\text{C-NMR}$  so posneli v Centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti v Ljubljani in masne spektre na Inštitutu Jožefa Stefana v Ljubljani.

### **Zahvala**

Mentorju izr. prof. dr. Stanislavu Gobcu in somentorju doc. dr. Bogdanu Štefane se iskreno zahvaljujem za vso pomoč in strokovne nasvete pri načrtovanju raziskovalnega dela ter za skrben pregled naloge.

Hvala gospem Tončki Kozamernik za posnete NMR spektre in Zdenki Kadunc za oskrbo s kemikalijami in drugimi potrebščinami.

Zahvaljujem pa se tudi vsem svojim sodelavcem za pomoč in ustvarjanje prijetnega delovnega vzdušja v laboratoriju 425. Hvala Aniti, Jasmini in Karmen. Iskrena zahvala za vso pomoč tudi Krištofu, Juretu, Nenadu, Bojanu, Borisu in ostalim.

Posebna zahvala pa gre mojim najbližjim, ki so mi vedno, ne le v času študija, stali ob strani z vzpodbudnimi besedami, vsestransko podporo in razumevanjem.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Stanislava Gobca in somantorja doc. dr. Bogdana Štefane.

Vesna Breščak

Ljubljana, januar 2008

# KAZALO VSEBINE

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. BAKTERIJSKA CELIČNA STENA.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Celična stena po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij .....	1
1.1.2. Zgradba peptidoglikana .....	2
1.1.3. Biosinteza peptidoglikana .....	6
<b>1.2. D-ALANIL-D-ALANIN LIGAZA .....</b>	<b>9</b>
1.2.1. Katalitični mehanizem Ddl.....	9
1.2.2. Vezavna mesta na Ddl .....	10
1.2.3. Inhibitorji Ddl.....	10
1.2.4. Določanje encimske aktivnosti in učinkovitosti inhibitorjev .....	14
<b>1.3. OKSAZOLI.....</b>	<b>16</b>
1.3.1. KEMIJSKE IN FIZIKALNE LASTNOSTI.....	16
1.3.2. BIOLOŠKO POMEMBNI OKSAZOLI .....	16
<b>2. NAMEN DELA .....</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>21</b>
<b>4. EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1. ACIKLIČNI DERIVATI L-SERINA .....</b>	<b>23</b>
4.1.1. Sinteza metil 3-hidroksi-2-(4-metilfenilsulfonilamido)propanoata (2).....	23
4.1.2. Sinteza metil 3-bromo-2-(tozilamino)propanoata (3).....	24
4.1.3. Sinteza metil 3-kloro-(4-metilfenilsulfonamido)propanoata (4) .....	25
4.1.4. Sinteza metil 2-benzamido-3-hidroksipropanoata (5) .....	26
4.1.5. Sinteza 3-hidroksi-2-(tozilamino)propanojske kisline (6).....	27
4.1.6. Sinteza 2-benzamido-3-hidroksipropanojske kisline (7).....	28
<b>4.2. OKSAZOLI IN IZOKSAZOLI.....</b>	<b>29</b>
4.2.1. Sinteza metil 2-fenil-4,5-dihidrooksazol-4-karboksilata (8) .....	29
4.2.2. Sinteza 2-fenil-4,5-dihidrooksazol-4-karboksilne kisline (9).....	30
4.2.3. Sinteza 3-metil-5-fenilizoksazola (11) .....	31
<b>4.3. SEČNINSKI DERIVATI .....</b>	<b>32</b>
4.3.1. Sinteza etil 2-(3-(klorometil)ureido)-3-fenilpropanoata (13).....	32
4.3.2. Sinteza 2-(2-kloroetilimino)-4-benziloksazolidin-5-ona (14) .....	33
<b>5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>34</b>

<b>5.1. RAZLAGA SINTEZNIH POSTOPKOV</b> .....	<b>34</b>
5.1.1. Sinteza acikličnih derivatov L-serina .....	34
5.1.2. Sinteza oksazolov in izoksazolov .....	37
5.1.3. Sinteza sečninskih derivatov .....	39
5.1.4. Razlaga rezultatov analiz.....	40
<b>5.2. REZULTATI BIOLOŠKEGA TESTIRANJA SPOJIN</b> .....	<b>41</b>
<b>6. ZAKLJUČEK</b> .....	<b>44</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>45</b>

## POVZETEK

Antibiotiki so zdravilne učinkovine, ki so ključnega pomena v boju proti infekcijskim boleznim, ki jih povzročajo bakterije. Zaradi množične in mnogokrat nekritične uporabe antibiotikov je vse več bakterijskih sevov odpornih (rezistentnih) proti posameznim ali več različnim antibiotikom. Razvoj rezistence narekuje potrebo po iskanju novih in učinkovitejših protibakterijskih učinkovinah. Pri sintezi peptidoglikana, ki gradi bakterijsko steno, sodeluje mnogo encimov, ki so potencialne tarče za nove antibiotike. Med te encime sodi tudi D-alanil-D-alanin ligaza, ki katalizira nastanek dipeptida D-alanil-D-alanina. Preko dipeptida pride do prečnega premreženja med sosednjima glikanskima verigama peptidoglikana. Edini znani inhibitor Ddl, ki se uporablja tudi v terapiji, je D-cikloserin.

V okviru diplomske naloge smo sintetizirali serijo acikličnih derivatov L-serina: **2**, **3**, **4**, **5**, **6** in **7**, derivata oksazola: **8** in **9**, izoksazol **11** ter sečninska derivata **13** in **14**. Te spojine so strukturni analogi DCS. Pri sintezi acikličnih derivatov L-serina smo izhajali iz hidroklorida metilnega estra L-serina in aminske skupino najprej zaščitili s tozilno, v nadaljevanju pa z benzoilno zaščito. Tako pripravljenim spojinam smo hidroksilno skupino zamenjali z bromo oz. kloro substituentom. Sledila je še alkalna hidroliza spojin **2** in **5**. Postopek sinteze oksazola **8** je v literaturi dobro opisan. Izhajali smo iz metil 2-benzamido-3-hidroksipropanoata (**5**) in ga s pomočjo DAST-a ciklizirali v metil 2-fenil-4,5-dihidrooksazol-4-karboksilat (**8**), čemur je sledila alkalna hidroliza spojine **8** do 2-fenil-4,5-dihidrooksazol-4-karboksilne kisline (**9**). Izoksazol **11** smo pripravili po literaturnem postopku iz benzoilacetona in hidroksilamina hidroklorida raztopljenima v piridinu. Sečninski derivat **13** smo sintetizirali iz hidroklorida etilnega estra L-fenilalanina, ki smo mu dodali 2-kloroetilizocianat. V prisotnosti natrijevega hidroksida in metanola je spojina **13** ciklizirala v spojino **14**.

Sintetiziranim spojinam smo določili njihovo inhibitorno aktivnost na DdlB iz *E. coli*. Samo spojina **9** je imela šibko inhibitorno aktivnost (85%), vrednosti RA za ostale sintetizirane spojine pa so bile višje od 93%.

## SEZNAM OKRAJŠAV

ADP	adenozindifosfat
Ala	alanin
ATP	adenozintrifosfat
Bz	benzilna skupina
CDI	karbodiimid
d	dublet
DAP	mezo-diaminopimelinska kislina
DAST	dietilaminožveplov trifluorid
DCC	dicikloheksilkarbodiimid
dd	dublet dubleta
ddd	dublet dubletovega dubleta
dt	dublet tripleta
DCS	D-cikloserin
Ddl	D-alanil-D-alanin ligaza
DCM	diklorometan
DMF	N,N-dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DTT	ditiotriol
E. coli	Escherichia coli
EtOAc	etilacetat
G <sup>-</sup>	po Gramu negativne bakterije
G <sup>+</sup>	po Gramu pozitivne bakterije
Glu	glutaminska kislina
GluNAc	N-acetilglukozamin
Gly	glicin
His	histidin
Hz	Herz
IC50	srednja inhibitorna koncentracija
IR	infrardeča spektroskopija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
Lyz	lizin

M	molarnost (mol/L)
mDAP	diaminopimelinska kislina
Me	metilna skupina
MeCN	acetonitril
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MraY	UDP-N-acetilmuramoil-pentapeptid fosfotransferaza
MS	masna spektrometrija
MurA	UDP-N-acetilglukozamin enolpiruviltransferaza
MurB	UDP-N-acetilenolpiruvilglukozamin reduktaza
MurC	UDP-N-acetilmuramat L-alanin ligaza
MurD	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin D-glutamat ligaza
MurE	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin D-glutamat diaminopimelat ligaza
MurF	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin D-glutamat diaminopimelat D-alanil-D-alanin ligaza
MurG	N-acetilglukozamin transferaza
MurNAc	N-acetilmuraminska kislina
NMR	nuklearna magnetna resonanca
PEP	fosfoenolpiruvat
Ph	fenilna skupina
Pi	anorganski fosfat
Rf	retencijski faktor
s	singlet
TEA	triethylamin
THF	tetrahidrofuran
Tyr	tirozin
TLC	tankoplastna kromatografija
TP	tetrapeptid
Ts	tozilna skupina
Ttal	temperatura tališča
UDP	uridindifosfat
UMP	uridinmonofosfat
$\delta$	kemijski premik

# 1. UVOD

## 1.1. BAKTERIJSKA CELIČNA STENA

Bakterijsko citoplazmo obdaja rigidna, močno strukturirana in mehansko zelo močna plast, ki sestavlja bakterijsko steno. Njen najpomembnejši sestavni del je makromolekula peptidoglikan, ki daje bakterijski steni trdnost in omogoča preživetje celice v močno hipotoničnem okolju. Bakterijska stena je odgovorna za ohranitev oblike in celične enovitosti (1). Ščiti celico pred spremembami osmotskega tlaka v okolju, predstavlja semipermeabilno membrano in varuje celico pred razgradnimi encimi gostitelja (2).

Bakterije delimo v dve veliki skupini glede na to, kako se obarvajo z Gramovim barvilom. Tiste, ki se obarvajo modrovijolično imenujemo grampozitivne, rdeče obarvane pa gramnegativne bakterije (3).

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

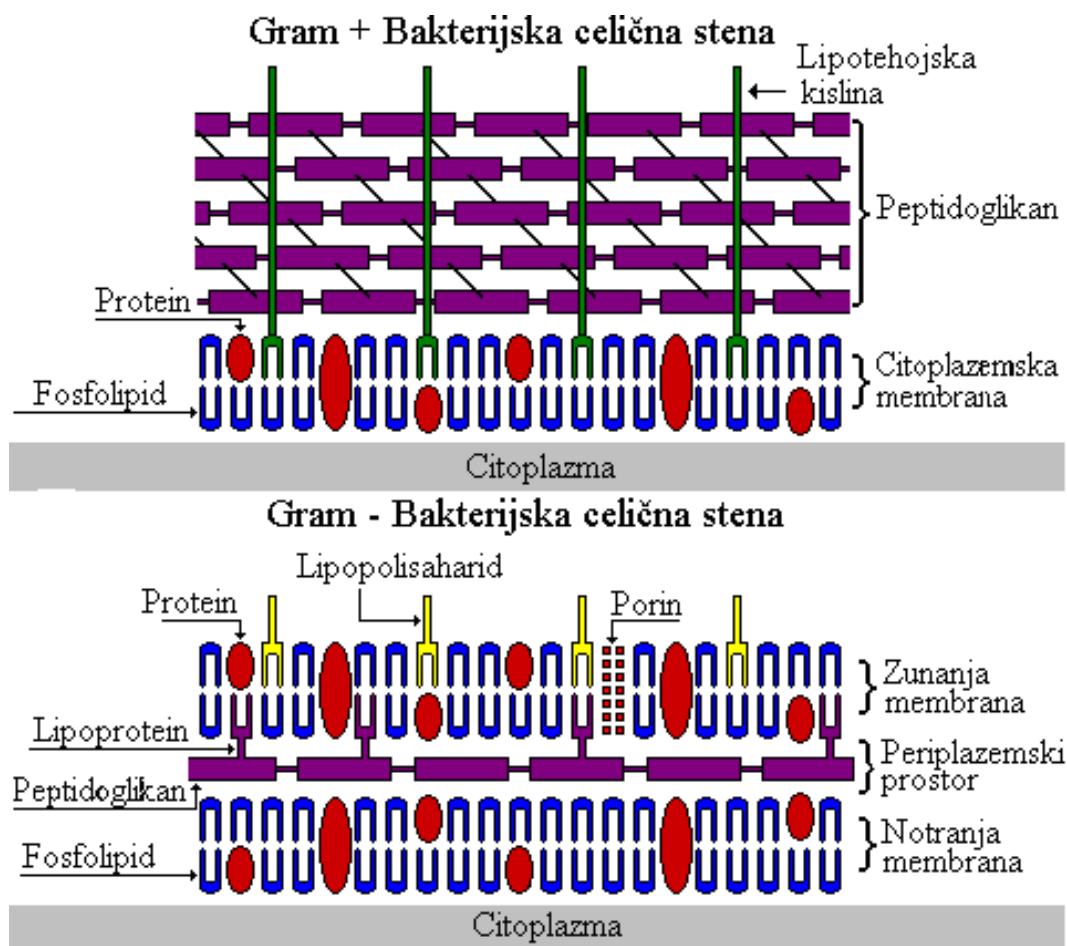
Celična stena G<sup>+</sup> bakterij (Slika 1) je preprosta struktura debeline 15–50 nm. Sestavlja jo do 40 plasti peptidoglikana, ki predstavlja 50% mase celične stene, 40–45% je kislinskih anionskih polimerov (tehojska, lipotehojska in teihuronska kislina) in 5–10% proteinov in polisaharidov. Kislinski polimeri so vzrok visoke polarnosti in negativnega naboja površine celične stene G<sup>+</sup> bakterij. To vpliva na permeabilnost celične stene za ionizirane molekule in olajša prehod pozitivno nabitim. To lastnost celične stene G<sup>+</sup> bakterij izkoriščamo pri prehajanju pozitivno nabitih antibiotikov (streptomycin) v bakterijsko celico.

G<sup>-</sup> bakterije (Slika 1) imajo kompleksnejšo sestavo celične stene. Celično membrano bakterijske celice obdaja stena sestavljena iz:

- periplazemskega prostora, ki vsebuje vezavne proteine in encime
- enojne ali dvojne peptidoglikanske plasti debeline 2 nm, ki predstavlja 5% mase celične stene in je pogosto povezana z lipoproteinskim slojem na površini
- zunanje membrane, ki jo gradi fosfolipidni dvosloj in vsebuje transmembranske proteinske kanalčke (porine), na notranji strani pa je lipoproteinska plast povezana s peptidoglikanom
- kompleksnih polisaharidov, ki so glavna antigenska determinanta organizma



Kompleksnost sestave celične stene G<sup>-</sup> bakterij je vzrok za oteženo prehajanje antibiotikov v samo celico in posledično neučinkovitost nekaterih zdravil pri zdravljenju infekcij, ki jih povzročajo G<sup>-</sup> bakterije (4).



Slika 1: Zgradba bakterijske celične stene (5)

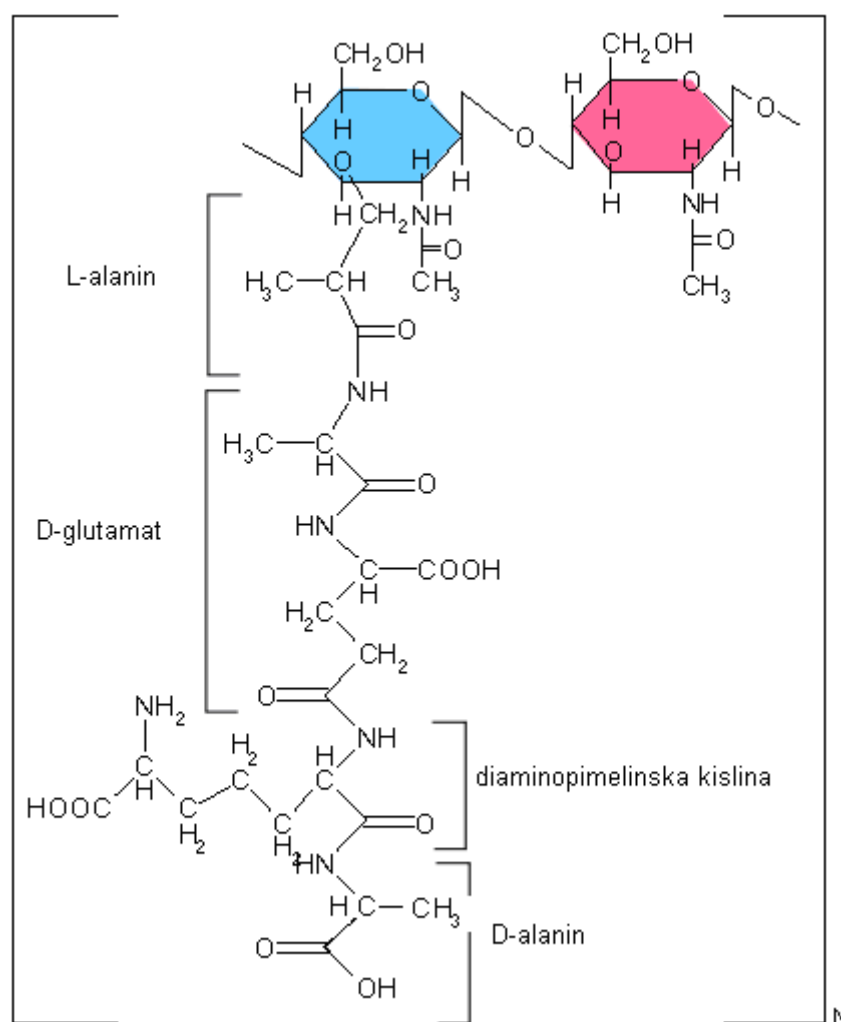
### 1.1.2. Zgradba peptidoglikana

Osnovna sestavina celične stene tako G<sup>+</sup>, kot G<sup>-</sup> bakterij je makromolekula peptidoglikan (murein). Sestavljajo ga glikanske verige, kjer se izmenjujeta dve sladkorni komponenti: *N*-acetilglukozamin (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminska kislina (MurNAc), povezani z 1,4- $\beta$  glikozidno vezjo. V peptidoglikanu je tako povezanih disaharidnih enot do 200, vendar same glikozidne vezi še ne omogočajo togosti celične stene v vseh smereh. Popolna rigidnost peptidoglikana se ustvari šele s prečnim povezovanjem preko tetrapeptidov (TP), vezanih na MurNAc (Slika 2). Zaporedje in sestava aminokislin TP ter delež prečnih povezav so odvisni

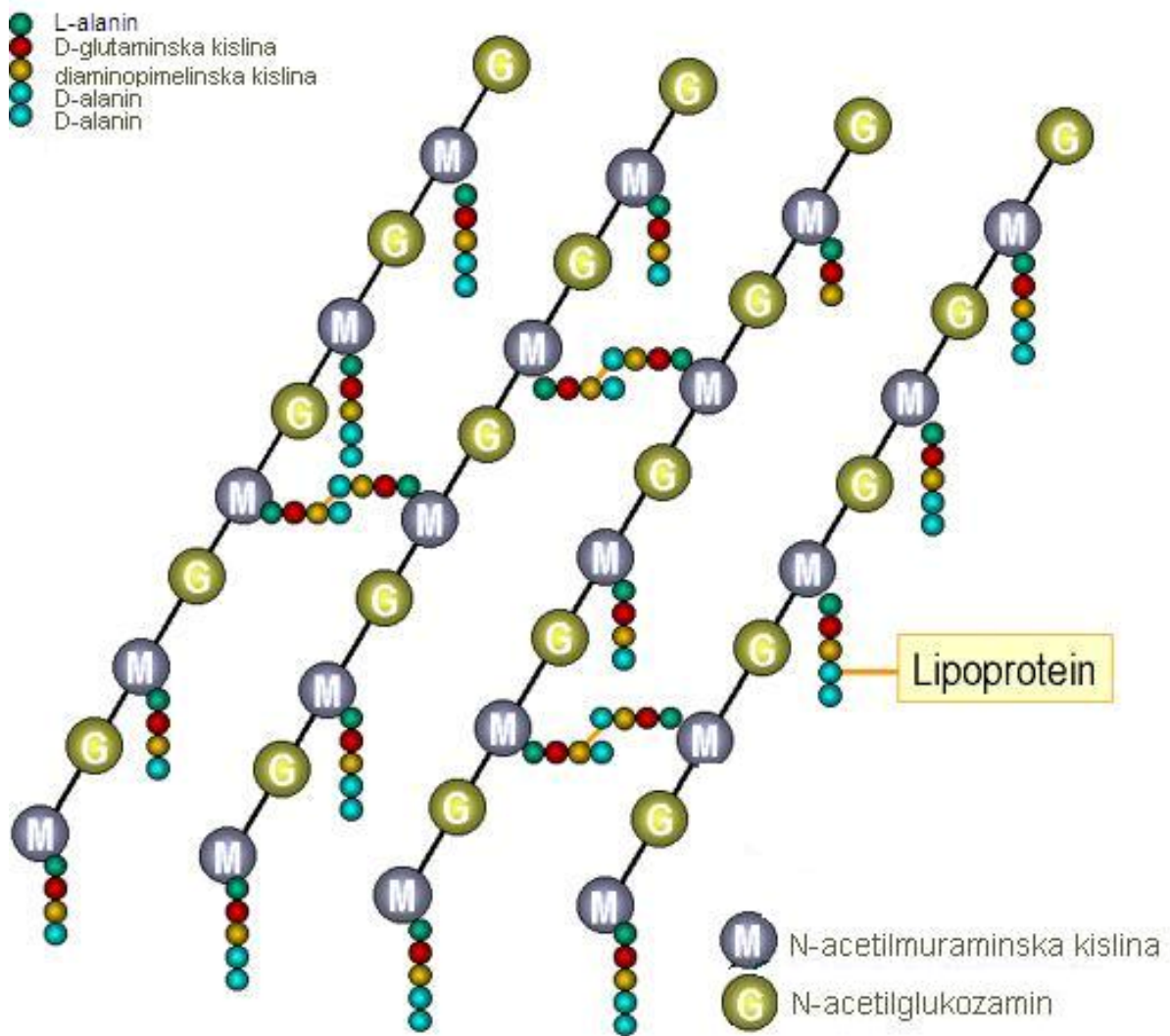
od vrste bakterije. Najpogosteje najdemo v tetrapeptidu L-Ala, D-Ala, D-Glu in L-Lys ter diaminopimelinsko kislino (DAP). DAP najdemo v vseh G<sup>-</sup> bakterijah (Slika 3), vendar ima večina G<sup>+</sup> bakterij namesto DAP ima L-Lys ali kakšno drugo aminokislino (Slika 4).

V G<sup>-</sup> bakterijah prečno premreženje TP poteka preko direktnega peptidnega spajanja aminske skupine DAP s karbonilno skupino terminalnega D-Ala (delež premreženih TP je 20%). Pri G<sup>+</sup> bakterijah se prečno premreženje TP vrši preko pentaglicinskega mostička med D-Ala enega TP in L-Lys drugega TP (delež prečnih povezav je 90%).

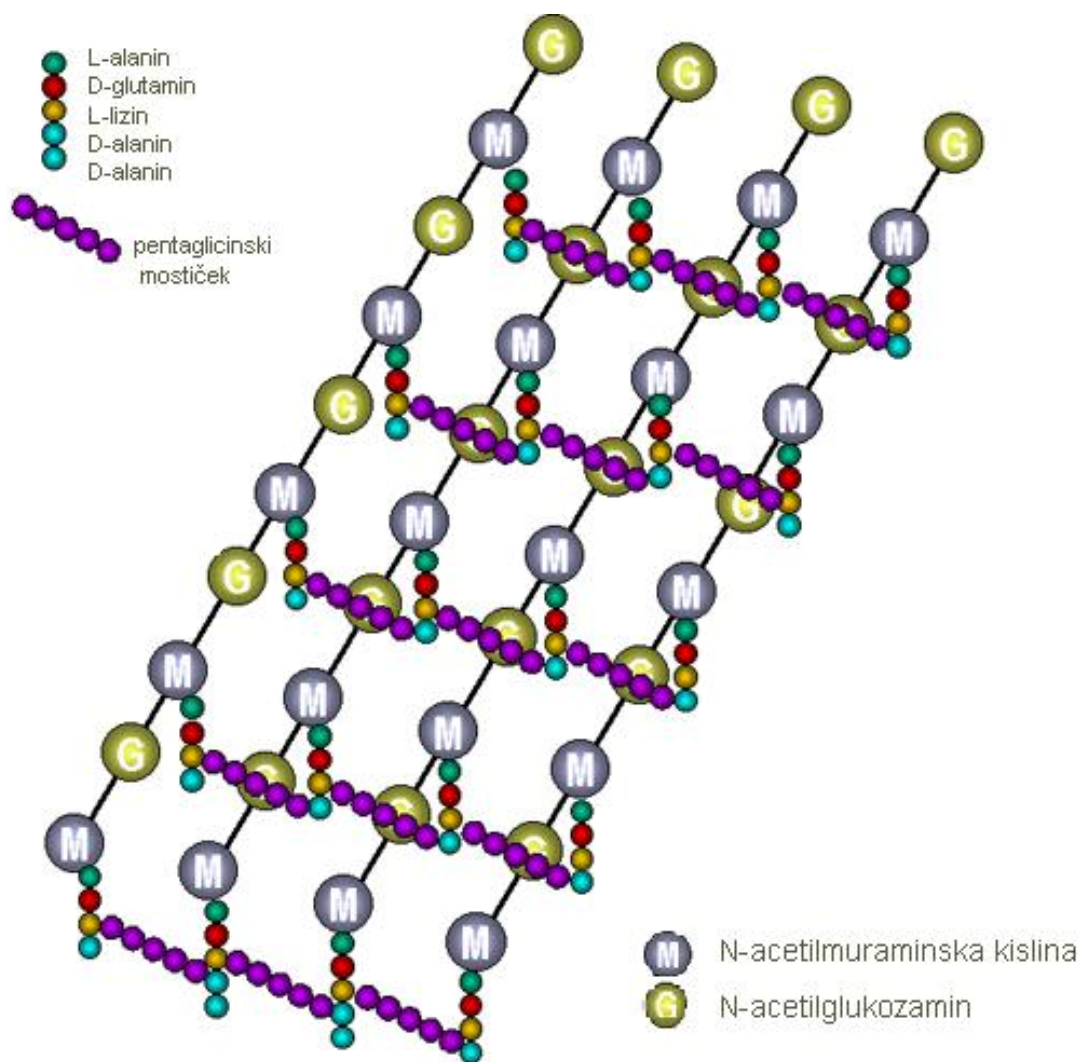
D-aminokislino so v naravi redke in jih najdemo večinoma le v peptidoglikanu, zato so encimi, ki jih bakterije uporabljajo (D-alanin-racemaza, D-alanil-D-alanin-ligaza), odlična tarča za protimikrobne učinkovine. Sesalske celice teh encimov namreč nimajo (3).



**Slika 2:** Zgradba *N*-acetilmuramil-*N*-acetilglukozamin-tetrapeptidnega monomera (6)



Slika 3: Struktura peptidoglikana po Gramu negativne bakterije *E. coli* (7)



**Slika 4:** Struktura peptidoglikana po Gramu pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus* (8)

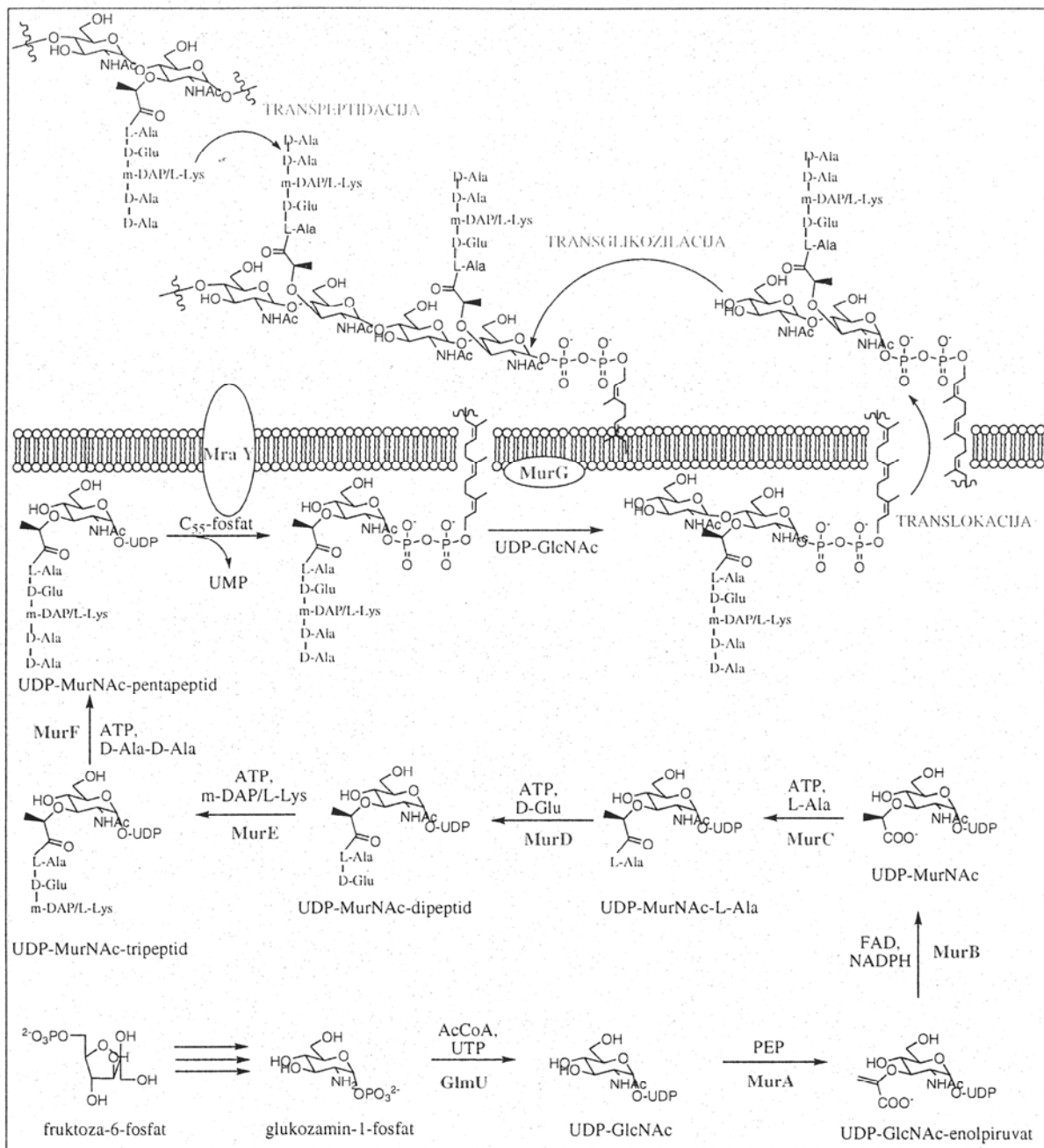
### 1.1.3. Biosinteza peptidoglikana

Da se oblika in integriteta celic ohranita, mora podaljševanje peptidoglikanskega matriksa potekati kontinuirano. Biosintezo peptidoglikana lahko razdelimo v tri dele:

1. Sinteza nukleotidnih prekurzorjev v citoplazmi.
2. Prenos prekurzorjev do lipidnega nosilca, ki jih prenese čez plazemsko membrano.
3. Prehod prekurzorjev v celično steno in pritrnitev na že obstoječi peptidoglikan.

#### 1.1.3.1. Sinteza nukleotidnih prekurzorjev v citoplazmi (Slika 5)

Bakterije sintetizirajo aminosladkorni nukleotid UDP-*N*-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc) iz primarnega metabolita fruktoze-6-fosfata v štirih stopnjah. V naslednjih dveh stopnjah sledi pretvorba v *N*-acetilmuraminsko kislino. V prvi fazi encim MurA prenese enolpiruvat iz fosfoenolpiruvata (PEP) na 3'-hidroksilno skupino UDP-*N*-acetilglukozamina. V drugi stopnji pa sledi redukcija enolpiruvata do D-laktata z encimom MurB. Sledi vezava petih aminokislin na prosto karboksilno skupino D-laktata nastale UDP-*N*-acetilmuraminske kisline in nastanek končnega citoplazemskega prekurzorja biosinteze peptidoglikana uridin difosfat-MurNAc-pentapetida. Prve tri aminokislino (L-Ala, D-Glu, DAP ali L-Lys) se pripnejo postopoma na UDP-*N*-acetilmuraminsko kislino s pomočjo specifičnih encimov (MurC, MurD in MurE). Preostala dva D-alaninska ostanka se dodata s pomočjo MurF kot že prej tvorjen dipetid, D-alanil-D-alanin. Ta dipeptid nastane iz L-Ala s pomočjo alaninske racemaze, ki pretvori L-Ala v D-Ala, nato pa D-alanil-D-alanin ligaza katalizira nastanek dipeptida D-Ala-D-Ala. Terminalni del UDP-MurNAc-pentapetida (D-Ala-D-Ala) igra odločilno vlogo v končni fazi peptidoglikanske sinteze, t.j. prečnem premreževanju (1).



Slika 5: Biosinteza peptidoglikana (9)

### 1.1.3.2. Prenos prekurzorjev prek plazemske membrane

V prvi stopnji se UDP-MurNAc-pentapeptid poveže z undekaprenilfosfat lipidnim nosilcem, s katerim ostane povezan do konca lipidnega cikla, ob tem se sprostí UMP. Nastanek undekaprenil difosfo-MurNAc-pentapeptida katalizira encim fosfo-MurNAc-pentapeptid translokaza (MurY). To stopnjo inhibirajo mnogi antibiotiki: moenomycin, amfomicin, mureidomicin.

V naslednji stopnji se z encimom MurG k molekuli undekaprenil difosfo-MurNAc-pentapeptida pripne še *N*-acetilglukozaminska enota in pri tem nastane 1,4- $\beta$  glikozidna vez. Nastali disaharid-pentapeptid se nato po mehanizmu, ki še ni znan, prenese na zunanjo stran bakterijske membrane. Tam membranski encim GlcNAc-pentapeptid transglikozilaza katalizira vključevanje gradnika (*transglikozilacijo*) v obstoječi peptidoglikan, pri čemer se ena molekula lipidnega nosilca reciklira v obliki pirofosfata. Sledi defosforilacija lipidnega nosilca, kar katalizira membranski encim undekaprenil pirofosfat fosfataza. To stopnjo inhibira antibiotik bacitracin A (ciklični polipeptid), ki tvori obstojne komplekse z undekaprenil pirofosfatom in tako močno spremeni prepustnost plazemske membrane (1).

#### 1.1.3.3. Prehod prekursorjev v celično steno in pritrditev na obstoječi peptidoglikan

Zadnja stopnja sinteze peptidoglikana predstavlja premreženje (*transpeptidacijo*), ko se tvorijo prečne povezave med peptidnimi verigami sosednjih glikanskih vlaken na zunanji strani citoplazemske membrane. Pri tem sodeluje encim transpeptidaza, ki se veže na D-Ala-D-Ala konec pentapeptida. Hidroksilna skupina serina v aktivnem mestu transpeptidaze nukleofilno napade amidno vez med obema D-alaninoma, tvori se aktiviran acilni intermediat in odcepi se terminalni D-Ala. Nato prosta aminska skupina DAP (ali pentaglicinski most sosednje glikanske verige pri G<sup>+</sup> bakterijah), nukleofilno napade intermediat in poteče premreženje, encim pa se regenerira.

Stopnja prečne povezanosti peptidoglikana pri G<sup>+</sup> in G<sup>-</sup> bakterijah je različna. Uravnavajo jo karboksipeptidaze, ki odcepijo terminalni D-Ala ali pa kar oba D-alaninska ostanka. Tako je preprečeno povezovanje, saj je odstranjeno vezavno mesto za encim transpeptidazo. Za ustrezen delež prečnih povezav mora biti aktivnost obeh encimov usklajena. Nasprotno delovanje od transpeptidaze ima endopeptidaza, ki je sposobna razgraditi prečne povezave peptidoglikana. Verjetno omogoča nastanek mest, kjer se vgradijo nova glikanska vlakna.

Najpomembnejši inhibitorji transpeptidaz in karboksipeptidaz so  $\beta$ -laktamski antibiotiki, ki so strukturni analogi Acil-D-Ala-D-Ala, terminalnega dela *N*-acetilmuramil-pentapeptida. V reakciji s serinsko hidroksilno skupino se v aktivnem mestu tvori stabilen acilni kompleks, ki ireverzibilno inhibira encim (1).

## 1.2. D-ALANIL-D-ALANIN LIGAZA

D-alanil-D-alanin ligaza (Ddl) je esencialen encim, ki je vključen v prvo stopnjo sinteze peptidoglikana. V zgodnjih šestdesetih letih dvajsetega stoletja so ga odkrili tako v G<sup>-</sup> bakterijah, kot v G<sup>+</sup> bakterijah. Neuhaus ga je izoliral iz *E. faecali*, Robinson pa je leta 1986 gen *ddl* kloniral in določil aminokislinsko zaporedje encima, ki ga *ddl* gen kodira v *E. coli* (10, 11). Izkazalo se je, da je ta gen pomemben za preživetje organizma. Imenuje se *ddlB* gen in zapisuje protein s 306 aminokisljinami in molekulsko maso 32 kDa (12). Pozneje so odkrili še gen za neesencialno ligazo in ga poimenovali *ddlA* gen. Aktivna oblika proteina DdlB je dimer z molekulsko maso 63-65 kDa. Izomorfni obliki Ddl, ki ju najdemo pri *E. coli*, sta DdlA in DdlB. Med njima je le 35% homologija aminokislinskega zaporedja, vendar imata oba encima podobno katalitično aktivnost in substratno specifičnost. Encima DdlA in DdlB katalizirata nastanek dipeptida D-Ala-D-Ala (Slika 6), ki je ključen intermediat pri nastanku UDP-MurNAC-pentapeptida, potrebnega za premreženje peptidoglikana (13).



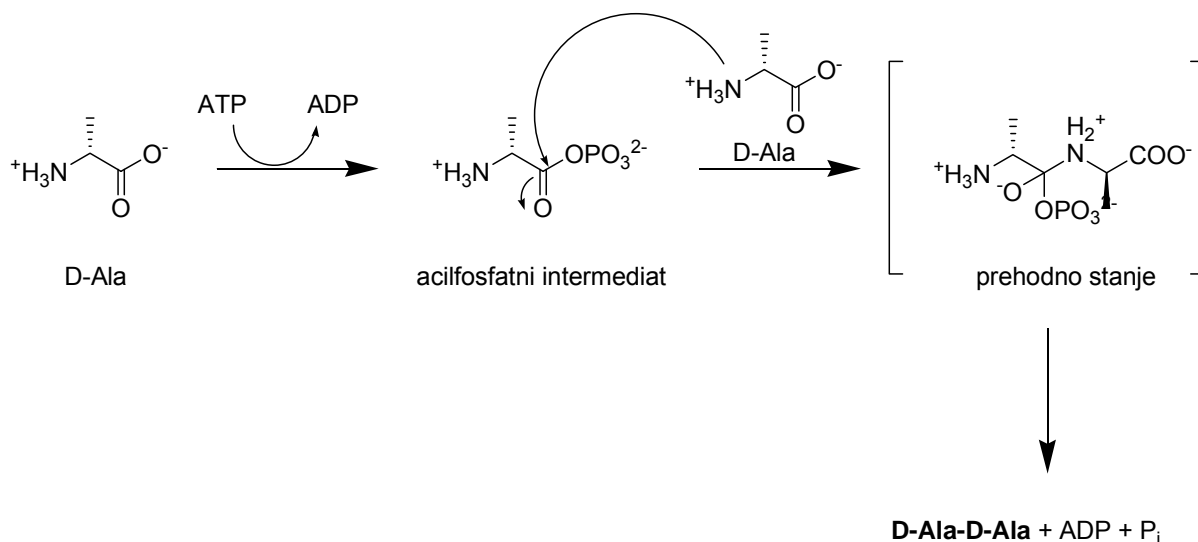
**Slika 6:** Sinteza dipeptida D-alanil-D-alanina

### 1.2.1. Katalitični mehanizem Ddl

Za svoje delovanje encim D-alanil-D-alanin ligaza (Ddl) nujno potrebuje ATP. Mehanizem katalitične reakcije (Slika 7) se začne s fosforilacijo karboksilne skupine prvega D-Ala. Nastane acilfosfatni intermediat, katerega karbonilno skupino nukleofilno napade aminska skupina drugega D-Ala. Nastane tetraedrično prehodno stanje in po izstopu fosfata dobimo dipeptid D-alanil-D-alanin (14).

Encim Ddl potrebuje za aktivnost kofaktor  $\text{Mg}^{2+}$ , ki usmerja pravilno umeščanje substrata v aktivno mesto, ureja naboj v aktivnem mestu in tako stabilizira kompleks substrat-encim (15).





**Slika 7:** Katalitični mehanizem D-alanil-D-alanin ligaze

### 1.2.2. Vezavna mesta na Ddl

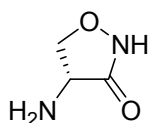
Kristalna struktura Ddl je pokazala, da encim sestavljajo tri  $\alpha/\beta$  domene: N-terminalna, centralna in C-terminalna. Preko kinetičnih študij so določili dve različni vezavni mesti za D-Ala na encimu Ddl. Na N-terminalnem koncu je donorsko, na C-terminalnem koncu pa akceptorsko vezavno mesto. N-terminalno vezavno mesto je strogo specifično za D-Ala, manj specifično pa je C-terminalno mesto, kamor se vežejo različne aminokisljine. Vezavno mesto za ATP je med centralno in C-terminalno domeno, za D-Ala pa med centralno in N-terminalno (16).

### 1.2.3. Inhibitorji Ddl

Do nedavnega so bili ključni antibiotiki, ki so se uporabljali v klinični rabi,  $\beta$ -laktami in glikopeptidi. Osnova njihovega delovanja je zaviranje sinteze bakterijske stene. Naraščajoča bakterijska odpornost na znane učinkovine zmanjšuje njihovo učinkovitost. Povečuje se potreba po iskanju novih encimskih tarč, ki so vključene v biosintezo bakterijske celične stene. Tako tarčo predstavlja encim Ddl, saj je ključnega pomena za preživetje bakterijske celice in je strogo ohranjen pri različnih vrstah bakterij, najpomembnejše pa je, da ga ne najdemo v celicah sesalcev. Inhibitorji tega encima bi posledično lahko imeli baktericidni učinek in širok spekter delovanja (17).

### 1.2.3.1. D-cikloserin (Slika 8)

D-cikloserin (DCS) je naravni produkt *Streptomyces orchidaceus*. Je edini antibiotik, ki se uporablja proti Ddl za terapevtske namene (kot tuberkulostatik). Inhibira tudi encim alanin racemazo, ki je ključni encim pri pretvarjanju L-Ala v D-Ala, ki je substrat za Ddl. DCS je ciklični analog D-Ala, ki kot kompetitivni inhibitor tekmuje z L-Ala za vezavo v aktivno mesto alanin racemaze in z D-Ala za vezavo v aktivno mesto Ddl. Veže se v N-terminalno vezavno mesto z  $K_i$  22  $\mu\text{M}$  (18).



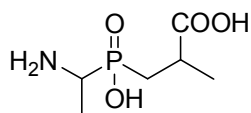
**Slika 8:** D-cikloserin

### 1.2.3.2. Mimetiki prehodnega stanja

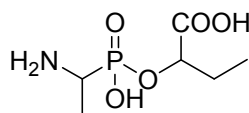
- **Fosfinatni in fosfonatni analogi dipeptida D-Ala-D-Ala (Slika 9)**

Fosfonatni in fosfinatni dipeptidi so bodisi mimetiki tetraedričnega prehodnega stanja bodisi analogi  $\text{D-Ala-PO}_3^{2-}$ . So reverzibilni in kompetitivni inhibitorji Ddl. Mehanizem vezave v aktivno mesto Ddl je sestavljen iz dveh korakov. Najprej poteče hitra, reverzibilna in močna vezava inhibitorja v aktivno mesto Ddl, ki se nato fosforilira z ATP. Sledi počasna stopnja disociacije kompleksa med encimom in inhibitorjem, ki je termično in hidrolitično nestabilen. Zadnja stopnja določa hitrost celotne reakcije, zato so to inhibitorji s počasno vezavo.

Zaradi slabega transporta teh spojin v bakterijsko celico imajo le-te šibko protibakterijsko aktivnost. V splošnem so fosfinati boljši inhibitorji kot fosfonati (19).



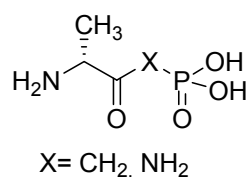
**Slika 9:** Fosfinat



Fosfonat

- **Analogi (3-amino-2-oksoalkil)fosfonske kisline** (Slika 10)

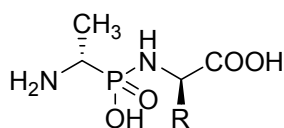
So mimetiki prehodnega stanja in tako inhibitorno delujejo na Ddl. Vežejo se na donorsko N-terminalno vezavno mesto za D-Ala. Najboljša inhibitorja Ddl med vsemi sintetiziranimi analogi sta ((*R*)-3-amino-2-oksobutil)fosfonska kislina in njen aza analog. Zaradi slabega transporta teh spojin v bakterijsko celico nima nobena izmed njih značilnega protibakterijskega učinka (20).



**Slika 10:** Analogi (3-amino-2-oksoalkil)fosfonske kisline

- **$\alpha$ -amino fosfonamidne kisline** (Slika 11)

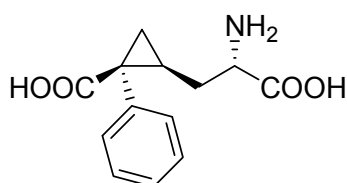
Mehanizem inaktivacije Ddl je posledica fosforilacije spojin, ki so mimetiki prehodnega stanja dipeptida D-Ala-D-Ala. So nekompetitivni inhibitorji z izredno počasno disociacijo nastalega kompleksa encim-inhibitor. Z večanjem substituenta R se večja inhibitorna vrednost ( $K_i$ ) teh spojin (obratno je pri fosfinodipeptidih). Konfiguracija na obeh stereogenih centrih mora biti D. Spojine ne izkazujejo nobenega protibakterijskega ali protiglivičnega učinka ( $MIC > 100$  mg/L), kar je posledica neprehodnosti bakterijske stene za te učinkovine (21).



**Slika 11:** Derivati  $\alpha$ -amino fosfonamidne kisline

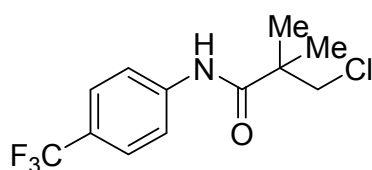
### 1.2.3.3. Novejši inhibitorji Ddl

V želji po načrtovanju novih učinkovitih inhibitorjev Ddl je Besong s sodelavci leta 2005 v ta namen uporabil program za »de novo« načrtovanje molekul (SPROUT). Pripravili so ciklopropilni derivat alanina (Slika 12), ki je inhibitor DdlB iz *E. coli*. Z aminokislinskimi preostanki encima tvori vse potrebne interakcije za uspešen potek katalizirane reakcije v aktivnem mestu DdlB. S pomočjo omenjenega programa je bil odkrit tudi hidrofobni žep na DdlB, ki ga tvorita fenolni obroč Tyr 216 in alkilna veriga Lys 282. Hidrofobni žep omogoča še dodatne interakcije inhibitorja z encimom (22).



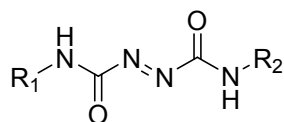
**Slika 12:** Ciklopropilni derivat alanina

Leta 2006 je bil odkrit inhibitor 3-kloro-2,2-dimetil-*N*-[4-(triflorometil)fenil]propanamid (Slika 13), ki je bil testiran na Ddl iz *Staphylococcus aureus*. Veže se v hidrofobni žep, oblikovan iz aminokislinskih preostankov lociranih na meji med prvo in tretjo domeno. Je nekompetitivni alosterični inhibitor. Ker interagira le z aminokislinskimi preostanki prvega D-Ala, lahko inhibitorji s podobnimi strukturami premagajo rezistenco na vankomicin (23).



**Slika 13:** 3-kloro-2,2-dimetil-*N*-[4-(triflorometil)fenil]propanamid

Diazendikarboksamidi (Slika 14) so učinkovine, pri katerih so opazili inhibicijo encima DdlB, izoliranega iz sevov *E. coli*. So zelo močni inhibitorji, nekateri celo do 30-krat močnejši od DCS. Kot najmočnejši inhibitorji so se izkazale spojine, kjer sta oba substituenta aromatska. Ni pa dokazana korelacija med inhibitorno učinkovitostjo na DdlB in protibakterijskim delovanjem *in vitro*. Ker so diazendikarboksamidi strukturno različni od ADP in D-Ala, sklepajo na nov način vezave teh spojin v aktivno mesto DdlB (24).



**Slika 14:** Diazendikarboksamidi

#### 1.2.4. Določanje encimske aktivnosti in učinkovitosti inhibitorjev

Encimsko aktivnost Ddl lahko spremljamo neposredno z merjenjem absorpcije peptidne vezi nastalega dipeptida D-Ala-D-Ala pri 200 nm. Slabost tega načina določanja aktivnosti je nezanesljivost metode, ker v tem območju absorbirajo tudi druge snovi, ki jih potrebujemo za izvedbo tega testa (ditiotreitol).

Aktivnost encima tako raje določamo posredno preko določanja koncentracije nastalih produktov tekom reakcije; ADP in Pi:

- S spektrofotometrično metodo posredno določamo ADP preko upadanja višine vrha NADH pri 340 nm. Upadanje koncentracije NADH je posledica redukcije do NAD preko sistema piruvat-kinaza : laktat-dehidrogenaza (16).
- Kolorimetrična metoda z malahitno zelenim temelji na spektrofotometričnem določanju nastanka obarvanega kompleksa med fosfatom in malahitno zelenim pri 650 nm. Fosfat se sprošča pri reakciji nastanka D-Ala-D-Ala z encimom Ddl. Uporablja se tudi stabilnejša različica malahitno zelenega z dodanim amonijevim molibdatom (reagent Biomol Green) (25).

Katalitično aktivnost encima Ddl določamo na podlagi množine pri reakciji sproščenega fosfata. Ob dodatku inhibitorja se katalitična aktivnost encima zmanjša in nastalega fosfata je manj, kot v kontrolnem vzorcu brez inhibitorja.

Učinkovitost inhibitorja izražamo s preostalo aktivnostjo (RA, ang. Residual activity) in jo izračunamo po enačbi:

$$RA = \frac{\text{aktivnost encima z inhibitorjem}}{\text{aktivnost encima brez inhibitorja}} \cdot 100\%$$

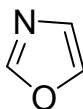
#### Enačba 1

Nizka vrednost RA pomeni, da imamo opravka z učinkovitim inhibitorjem. V takih primerih je smiselno za inhibitor določiti še vrednost  $IC_{50}$  (ang. inhibitory concentration). Ta pove, kolikšna koncentracija spojine je potrebna *in vitro*, da se aktivnost encima razpolovi. Predstavlja merilo afinitete spojine do encima.  $IC_{50}$  dobimo z merjenjem RA pri različnih koncentracijah inhibitorja. Graf vrednosti RA v odvisnosti od koncentracije inhibitorja ima padajočo sigmoidno obliko, v prevoju (RA je enak 50%) pa je  $IC_{50}$ .

Slabost ocenjevanja učinkovitosti inhibitorja z vrednostjo  $IC_{50}$  je njena odvisnost od pogojev merjenja. Na njeno vrednost vpliva koncentracija substrata (še posebej pri kompetitivni inhibiciji; povišanje koncentracije substrata zviša  $IC_{50}$ ), encima (poviša pretvorbo substrata in navidezno zniža  $IC_{50}$ ) in ATP (pri ATP odvisnih encimih). Zato je potrebno izbrati optimalne pogoje merjenja za realno  $IC_{50}$  (26).

Najprimernejši način določanja učinkovitosti in mehanizma delovanja nekega inhibitorja nam podaja njegova konstanta inhibicije ( $K_i$ ). Izračunamo jo na podlagi kinetičnih testov na sistemu encim-inhibitor. Takega načina določanja učinkovitosti inhibitorja se redko poslužujemo, saj je tak komercialno dostopen optimiziran test za Ddl zelo drag.

## 1.3. OKSAZOLI



Slika 15: Oksazol

### 1.3.1. KEMIJSKE IN FIZIKALNE LASTNOSTI

Pri poimenovanju derivatov oksazola (Slika 15) začnemo oksazole številčiti pri kisiku in nadaljujemo po celotnem obroču ter jih označimo kot 1,3-oksazole, da nakažemo položaj heteroatomov v obroču. Kislost protonov v oksazolu je bila teoretično izračunana in eksperimentalno določena. Reaktivnost oksazolov nakazuje, da kislost vodikovih atomov pada po naslednjem vrstnem redu  $C(2) > C(5) > C(4)$ . To velja v večini primerov, obstajajo pa tudi izjeme zaradi različne substitucije obroča. Kislost vodika na C(2) atomu ocenjujejo na  $pK_a = 20$ , dušikov atom v oksazolu pa ima vrednost  $pK_b = 1$ . Oksazoli kažejo karakteristične absorpcije tako v  $^1\text{H-NMR}$ , kot tudi v  $^{13}\text{C-NMR}$  spektru. Osnovni oksazoli kažejo resonanco med 7.00 in 8.00 ppm v  $^1\text{H-NMR}$  spektru, prisotnost substituentov na obroču pa lahko spremeni kemijski premik do 1 ppm.

Oksazoli v IR spektru absorbirajo pri valovnih dolžinah 1537, 1498, 1326 (vibracije obroča), 1257 (C–H nihanja in planarne deformacije), 1143 in 1080 (C–C nihanja) in  $1054\text{ cm}^{-1}$ .

Položaj  $\lambda_{\text{max}}$  oksazola v UV spektru je močno odvisen od substitucije samega oksazola. V metanolu ima osnovni oksazol položaj  $\lambda_{\text{max}} = 205\text{ nm}$  (27).

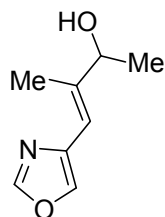
### 1.3.2. BIOLOŠKO POMEMBNI OKSAZOLI

Oksazoli, oksazoloni in oksazolini so pomembni petčlenski heterociklični sistemi, ki jih najdemo v biologiji, kot tudi v medicini in kemiji. Predstavljajo tautomerni derivat dobro znanega azlaktona (prvič omenjenega l. 1883), so lahko ciklični derivati aminokislin (npr. DCS) ali njihovi dehidroanalogi. Kot taki so lahko sestavni del mnogih biološko aktivnih naravnih produktov.

Oksazoli imajo pomembno vlogo v sintezni kemiji kot prekursorji sinteze zdravilnih učinkovin in v agrokemiji. Veliko naravnih produktov, predvsem tistih iz morskih organizmov, vsebuje vsaj en oksazolni obroč v svoji strukturi. Te spojine imajo potencialen terapevtski učinek; so antibakterijske učinkovine, periferni analgetiki, inhibitorji herpes simplex virusa tipa 1 (HSV-1), protitumorne, antilevkemične, protivirusne, protiglivične učinkovine in visoko selektivni serin-treonin fosfatazni inhibitorji.

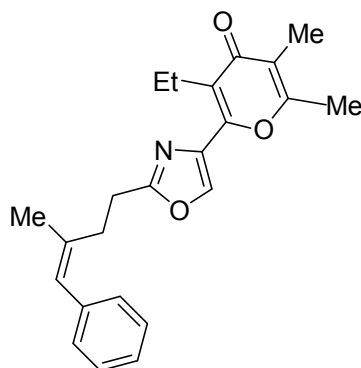
#### 1.3.2.1. Aktivne substance z enim oksazolnim obročem

**Melanoksazal** (Slika 16) je inhibitor biosinteze melanina v insektih. Spada med 4-alkenil oksazole in se pridobiva s fermentacijo gliv.



**Slika 16:** Melanoksazal

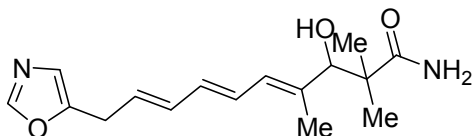
**Fenoksan** (Slika 17) spada med oksazol-4*H*-piran-4-one. Ima močan citotoksični učinek in je inhibitor NADH ubikinon oksidoreduktaze.



**Slika 17:** Fenoksan



**Ftaloksazolin 1177** (Slika 18) spada med oksazol-trien antibiotike in je bil izoliran iz *Streptomyces sp.* Protiglivični učinek je posledica konfiguracije stranske verige. Kot antimikotik se uporablja predvsem proti glivi *Phytophthora parasitica*

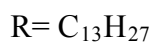
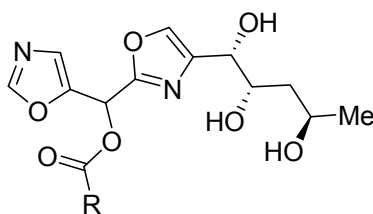


**Slika 18:** Ftaloksazolin 1177

#### 1.3.2.2. Aktivne substance z dvema oksazolnima obročema

Pri bis-oksazolih sta dva oksazolna obroča vgrajena v strukturo naravnih produktov.

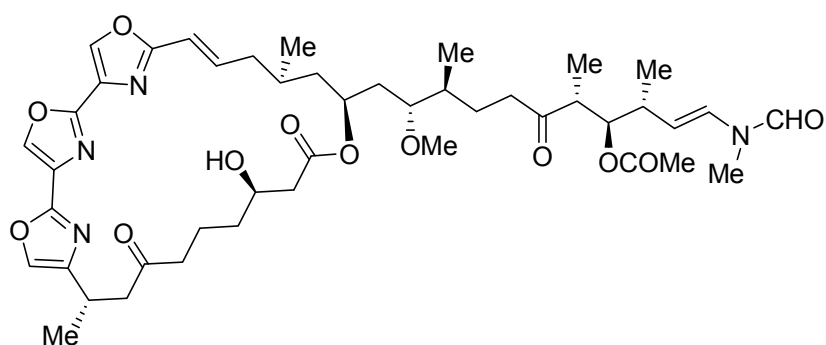
**Bengazoli** (Slika 19) so metilen bis-oksazoli. Pridobivajo jih iz gliv vrste *Astrophorida*. Bengazol je sestavljen je iz dveh oksazolov, poliolne stranske verige in estra maščobne kisline. Ima močan antihelmetični učinek.



**Slika 19:** Bengazol 1190a

### 1.3.2.3. Aktivne substance s tremi ali štirimi oksazolnimi obroči

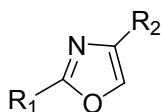
**Ulapualidi** (Slika 20) so skupina sekundarnih metabolitov, izoliranih iz gliv (sponges). Med te metabolite spadajo halinkodramidi, kabiramidi in mikalolidi. Vsi imajo enotno strukturo sestavljeno iz treh zaporednih oksazolov, ki je vgrajena v makrolidno laktonsko strukturo, pripeto na stransko verigo enajstih ogljikovih atomov. Verigo pa zaključuje *N*-metil-*N*-formilenamin. Strukturne razlike med ulapualidi zajemajo razlike v oksidacijski stopnji in tipu substitucije na alkilni verigi (27).



**Slika 20:** Ulapualid A

## 2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil sintetizirati derivate oksazola kot potencialne inhibitorje D-alanil-D-alanin ligaze (Ddl). Derivati oksazola so ciklični strukturni analogi DCS, ki je znan inhibitor Ddl. Sklepali smo, da bodo tudi naše spojine izkazovale inhibitorno aktivnost na encim Ddl, ki je pomemben encim v biosintezi bakterijskega peptidoglikana in pomembna tarča pri iskanju novih protimikrobnih učinkovin.



**Slika 21:** Derivati oksazolov

### 3. MATERIALI IN METODE

- **reagenti in topila**

Reagenti in topila, ki smo jih pri delu uporabljali, so komercialno dostopni (Fluka, Aldrich, Merck, Alfa Aesar). Uporabljali smo topila brez dodatnega sušenja, razen tedaj, ko so to zahtevali reakcijski pogoji.

- **kromatografske metode**

Potek reakcij smo spremljali s tankoplastno kromatografijo (Thin Layer Chromatography, TLC) na ploščah Fluka Silica Gel F-254 nm, za identifikacijo pa smo uporabljali obsevanje z UV svetlobo valovne dolžine 254 nm.

- **določevanje tališč**

Tališča smo določili na Koflerjevem mikroskopu z ogrevalno mizico in so nekorrigirana.

- **infrardeča spektroskopija**

IR spektri so bili posneti s spektrometrom Bio-Rad FTS 3000MX na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

- **jedrska magnetna resonanca**

NMR spektri so bili posneti na 300 MHz spektrometru Bruker Avance DPX pri 302 K,  $^1\text{H}$  spektri pri 300,13 MHz,  $^{13}\text{C}$  spektri pa pri 75,5 MHz. Kemijski premiki na  $\delta$  skali so podani v ppm, kot standard je uporabljen TMS, kot topilo pa DMSO- $d_6$  in  $\text{CDCl}_3$ .

- **masna spektroskopija**

Masni spektri in meritve so bili opravljeni na VG-Analytical AutospecQ spektrometru Instituta Jožefa Stefana v Ljubljani.

- **poimenovanje in risanje spojin**

Za poimenovanje in risanje spojin smo uporabili računalniški program ChemDraw Ultra 8.0, proizvajalca CambridgeSoft.

- **testiranje inhibitorne aktivnosti sintetiziranih spojin na Ddl**

Testiranje inhibitorne aktivnosti sintetiziranih spojin na Ddl smo opravili na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, meritve je izvedla Andreja Kovač, mag. farm.. Princip kolorimetrične metode z malahitno zelenim, s katero smo določali aktivnost encima DdlB, je opisan v poglavju 1.2.4.

Pri testiranju spojin smo kot pozitivno kontrolo uporabili DCS, znan kompetitivni inhibitor Ddl, kot negativno kontrolo pa DMSO.

Test smo izvedli pri 37 °C v reakcijski mešanici s končnim volumnom 50 µL in pH 8.0, ki vsebuje:

- 38.5 mM Hepes,
- 3.25 mM MgCl<sub>2</sub>,
- 6.5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,
- 0.005 % Triton X-114,
- 700 µM D-alanin,
- 500 µM ATP,
- 500 µM testne spojine v DMSO (negativna kontrola vsebuje samo DMSO, pozitivna kontrola pa 500 µM DCS), koncentracija pa ne sme presegati topnosti,
- encim DdlB (redčen v 20 mM Hepes s pH = 7.2, 1 mM ditioneitolu).

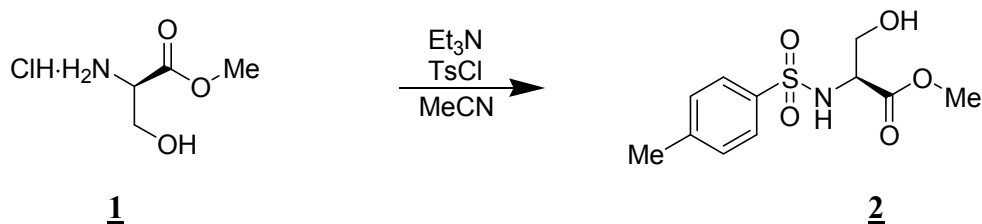
Po 30 minutah inkubacije reakcijo prekinemo z dodatkom 100 µL reagenta Biomol (reagent z malahitno zelenim) in po 5 minutah izmerili absorbanco pri 650 nm. Vsi testi so bili izvedeni v dveh paralelkah.

## 4. EKSPERIMENTALNI DEL

### 4.1. ACIKLIČNI DERIVATI L-SERINA

#### 4.1.1. Sinteza metil 3-hidroksi-2-(4-metilfenilsulfonilamido)propanoata (**2**) (28)

##### REAKCIJA:



##### Sintezni postopek:

Raztopini hidroklorida metilnega estra L-serina (**1**) (2.003 g, 12.87 mmol) v acetonitrilu smo dodali trietilamin (3.9 ml, 28.28 mmol) in tozil klorid (2.721 g, 14.27 mmol) in mešali pri sobni temperaturi 24 h. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom. Reakcijo prekinili z dodatkom vode (50 ml) in ekstrahirali z diklorometanom (3 × 50 ml), združene organske faze smo posušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo nato prekrizalizirali iz mešanice topil dietil eter/diklorometan in izpadle kristale odnučali.

**Opis:** beli kristali.

**Masa produkta** = 1.386 g.

**Izkoristek reakcije** = 58%.

**TLC** (metanol:diklorometan = 1:10): R<sub>f</sub> = 0.55.

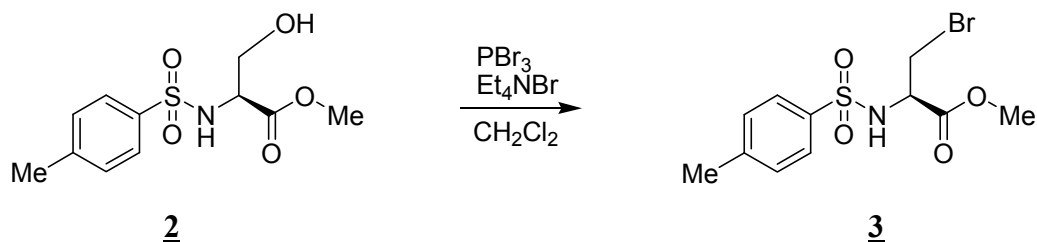
**Tališče:** 85–87 °C (lit. vrednost (28): 92–93 °C).

**IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3496, 3271, 2941, 1750, 1436, 1331, 1212, 1163, 1132, 1063, 1025, 820, 687.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) = 2.44 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.90 (dd, J = 6.5, 3.8 Hz, 2H), 4.01 (dt, J = 7.5, 3.8 Hz, 1H), 5.70 (d, J = 7.5, 1H), 7.30 in 7.76 (AA'XX', J = 8.5 Hz, 4H).

#### 4.1.2. Sinteza metil 3-bromo-2-(4-metilsulfonamido)propanoata (**3**)

##### REAKCIJA:



##### Sintezni postopek:

Raztopini metil 3-hidroksi-2-(4-metilsulfonamido)propanoata (**2**) (600 mg, 2.2 mmol) v diklorometanu (12 ml) smo dodali tetraetilamonijev bromid (925 mg, 4.4 mmol). Reakcijsko mešanico smo ohladili na ledeni kopeli in med mešanjem dokapavali fosforjev(III) bromid (0.45 ml, 4.62 mmol). Reakcijo smo pustili potekati 1 h pri 0 °C, nato pa še 24 h pri sobni temperaturi. Reakcijo smo prekinili z dodatkom vode (20 ml) in ekstrahirali z diklorometanom (3 × 20 ml), združene organske faze smo posušili z brezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , topilo odstranili pod znižanim tlakom in preostanek očistili s kolonsko kromatografijo (MF: petroleter:etil acetat = 1:3), pri čemer smo izolirali spojino **3**.

**Opis:** beli kristali.

**Masa produkta** = 387 mg.

**Izkoristek reakcije** = 52%.

**TLC** (petroleter:etil acetat = 1:3):  $R_f$  = 0.19.

**Tališče:** 76.0–78.6 °C.

**IR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) = 3274, 3037, 2959, 2922, 2872, 2741, 1740, 1599, 1441, 1342, 1306, 1235, 1161, 1091, 1012, 970, 906, 847, 819, 772, 677.

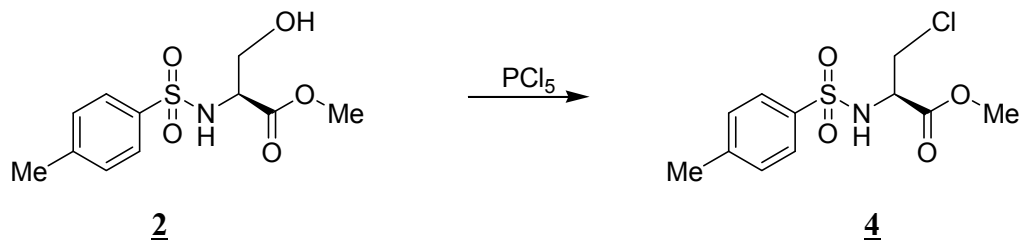
**EI-MS:** ( $m/z$ , %) = 336 ( $\text{MH}^+$ , 3), 91 (100).

**HRMS** za  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{BrNO}_4\text{S}$ : izračunan 335.9905 in izmerjen: 335.9910.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 2.43 (s, 3H), 3.59 (dd,  $J$  = 10.5, 4.0 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.74 (dd,  $J$  = 10.5, 3.5 Hz, 1H), 4.40 (dt,  $J$  = 8.0, 3.5 Hz, 1H), 5.49 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1 H), 7.31 in 7.76 (AA'XX',  $J$  = 8.5 Hz, 4H).

### 4.1.3. Sinteza metil 3-kloro-(4-metilfenilsulfonamido)propanoata (**4**) (29)

#### REAKCIJA:



#### Sintezni postopek:

Zmes metil 3-hidroksi-2-(4-metilsulfonamido)propanoata (**2**) (1000 mg, 3.65 mmol) in fosforjevega(V) klorida (5.0 mg, 18.25 mmol) smo mešali pri sobni temperaturi 24 h. Reakcijsko zmes smo razredčili s kloroformom (15 ml) in segrevali na vodni kopeli, da je odparel ves kloroform. Reakcijo smo prekinili z dodatkom vode (7.5 ml) in ekstrahirali z diklorometanom (3 × 25 ml), združene organske faze smo posušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in topilo odstranili pod znižanim tlakom.

Produkt smo prekristalizirali iz mešanice topil dietil eter/kloroform pri čemer smo izolirali 625 mg belih kristalov spojine **4**.

**Opis:** beli kristali.

**Masa produkta** = 625 mg.

**Izkoristek reakcije** = 59%.

**TLC** (metanol:diklorometan = 1:10); R<sub>f</sub> = 0.74.

**Tališče:** 76.4–78.8 °C (lit. vrednost (29): 80–84 °C).

**IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3558, 3479, 3414, 3272, 2963, 1746, 1617, 1445, 1314, 1315, 1223, 1163, 1092, 1022, 972, 855, 817.

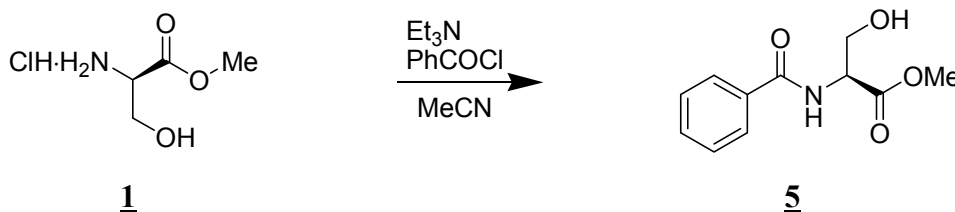
**EI-MS:** (m/z, %) = 292 (MH<sup>+</sup>, 1), 91(100).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) = 2.42 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.73 (dd, J = 11.0, 4.0 Hz, 1H), 3.87 (dd, J = 11.0, 3.5 Hz, 1H), 4.5 (razš. t, J = 3.5 Hz, 1H), 5.71 (razš. s, 1H), 7.30 in 7.74 (AA'XX', J = 8.0 Hz, 4H).



#### 4.1.4. Sinteza metil 2-benzamido-3-hidroksipropanoata (**5**) (30)

##### REAKCIJA:



##### Sintezni postopek:

Raztopini hidroklorida metilnega estra L-serina (**1**) (2.0 g, 12.85 mmol) v acetonitrilu (100 ml) smo dodali trietilamin (3.56 ml, 25.7 mmol) in med mešanjem počasi dokapavali benzoil klorid (1.57 ml, 13.5 mmol). Po 30 min mešanja reakcijske zmesi pri sobni temperaturi smo topilo odparili pod znižanim tlakom in preostanku dodali vodo (100 ml) in ekstrahirali z etil acetatom (3 × 100 ml). Združene organske faze smo posušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo prekrystalizirali iz mešanice topil dietil eter/diklorometan in izpadle kristale odfiltrirali pri čemer smo izolirali 1.883 g čiste spojine **5**.

**Opis:** beli kristali.

**Masa produkta** = 1.883 g.

**Izkoristek reakcije** = 66%.

**TLC** (metanol:diklorometan = 1:10); R<sub>f</sub> = 0.37.

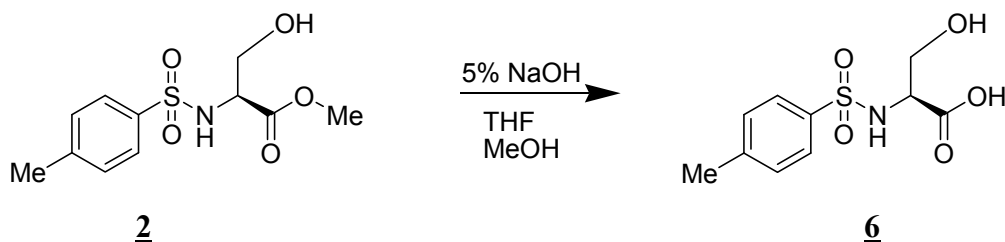
**Tališče:** 81.3–83.7 °C (lit. vrednost (30): 84–85 °C).

**IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3522, 3437, 3322, 3009, 2951, 2880, 2845, 1753, 1629, 1542, 1436, 1371, 1267, 1212, 1111, 1057, 979, 916, 835, 802, 719.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) = 3.83 (s, 3H), 4.08 (m, 2H), 4.88 (dt, *J* = 7.5, 3.5 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 6.50 Hz, 1H), 7.48 (m, 3H), 7.84 (m, 2H).

#### 4.1.5. Sinteza 3-hidroksi-2-(tozilamino)propanojske kisline (**6**) (31)

##### REAKCIJA:



##### Sintezni postopek:

Raztopini spojine **2** (100 mg, 0.3 mmol), v zmesi topil THF (1 ml) in MeOH (1 ml), smo med mešanjem počasi dokapavali 5% vodno raztopino NaOH (0.47 ml, 0.59 mmol). Po 4 h smo reakcijo prekinili z dodatkom vode (10 ml) in reakcijsko mešanico nakisali z 1M HCl do pH = 2. Izpadlo belo oborino smo odnučali pri čemer smo izolirali 70 mg spojine **6**.

**Opis:** beli kristali.

**Masa produkta** = 70 mg.

**Izkoristek reakcije** = 73%.

**TLC** (metanol:diklorometan = 1:10);  $R_f = 0$ .

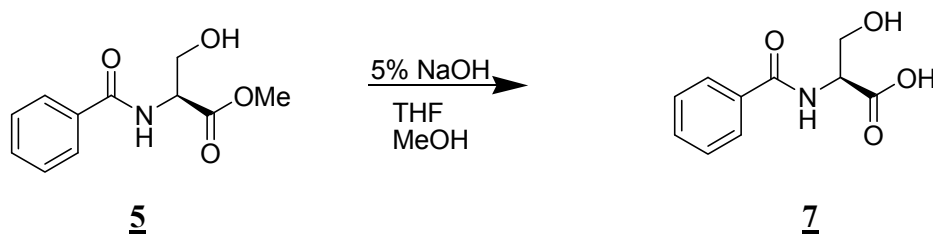
**Tališče:** 229–236 °C (lit. vrednost (31): 230–232 °C).

**IR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) = 3411, 3282, 2960, 1735, 1600, 1468, 1406, 1317, 1278, 1196, 1161, 1117, 1092, 1024, 970, 849, 820.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz, DMSO):  $\delta(\text{ppm}) = 2.35$  (s, 3H), 3.47 (m, 2H), 3.76 (dt,  $J = 8.5, 4.5$  Hz, 1H), 7.33 in 7.65 (AA'XX',  $J = 8.0$  Hz, 4H), 7.82 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H).

#### 4.1.6. Sinteza 2-benzamido-3-hidroksipropanojske kisline (**7**) (32)

##### REAKCIJA:



##### Sintezni postopek:

Raztopini spojine **5** (100 mg, 0.45 mmol), v zmesi topil THF (1 ml) in MeOH (1 ml), smo med mešanjem počasi dokapavali 5% vodno raztopino NaOH (13.6 ml, 17.1 mmol). Po 4 h smo reakcijo prekinili z dodatkom vode (10 ml) in reakcijsko mešanico nakisali z 1M HCl do pH = 2 ter ekstrahirali z etil acetatom (3 × 20 ml). Združene organske faze smo posušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in topilo odstranili pod znižanim tlakom. Nastalemu produktu smo dodali vodo in ga odnučali pri čemer smo izolirali 70 mg spojine **7**.

**Opis:** beli kristali.

**Masa produkta** = 70 mg.

**Izkoristek reakcije** = 74%.

**TLC** (metanol:diklorometan = 1:10); R<sub>f</sub> = 0.

**Tališče:** 139–142 °C (lit. vrednost (32): 146–147 °C).

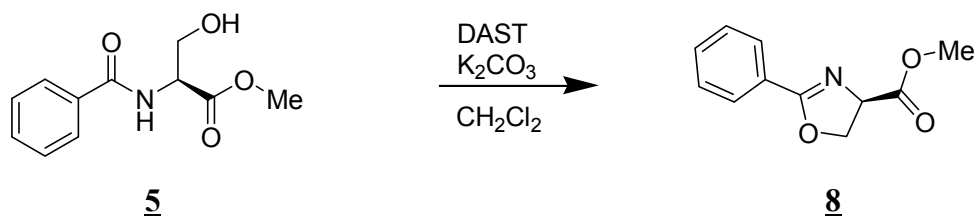
**IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3527, 3316, 3069, 2898, 2604, 2543, 1740, 1716, 1633, 1572, 1545, 1488, 1428, 1343, 1277, 1203, 1059, 889, 710, 669, 648.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) = 3.78 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 4.45 (dt, J = 7.8, 5.5 Hz, 1H), 7.49 (m, 3H), 7.87 (m, 2H), 8.34 (d, J = 7.8 Hz, 1H).

## 4.2. OKSAZOLI IN IZOKSAZOLI

### 4.2.1. Sinteza metil 2-fenil-4,5-dihidrooksaazol-4-karboksilata (**8**) (33)

#### REAKCIJA:



#### Sintezni postopek:

Raztopino metil 2-benzamido-3-hidroksipropanoata (**5**) (2.000 g, 9 mmol) v diklorometanu (40 ml) smo pod inertno atmosfero ohladili na  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  in tako ohlajeni reakcijski zmesi počasi dokapavali DAST (1.3 ml, 9.9 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati 1 h pri  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  v inertni atmosferi. Reakcijo smo prekinili z dodatkom brezvodnega  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.863 g, 13.5 mmol) in pustili, da se je reakcijska zmes segrela na sobno temperaturo, nato smo dodali nasičeno vodno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  (80 ml) in ekstrahirali z diklorometanom ( $3 \times 40$  ml). Združene organske faze smo posušili z brezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in topilo odstranili pod znižanim tlakom. Izolirali smo 1.750 g čistega produkta **8**.

**Opis:** rumeno-rjavo olje.

**Masa produkta** = 1.750 g.

**Izkoristek reakcije** = 95%.

**TLC** (petroleter:etil acetat = 1 : 3);  $R_f$  = 0.17.

**Tališče:** lit. vrednost (33):  $29.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**IR** ( $\text{KBr}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) = 2954, 1742, 1641, 1580, 1491, 1437, 1362, 1269, 1209, 1090, 1065, 1026, 971, 697.

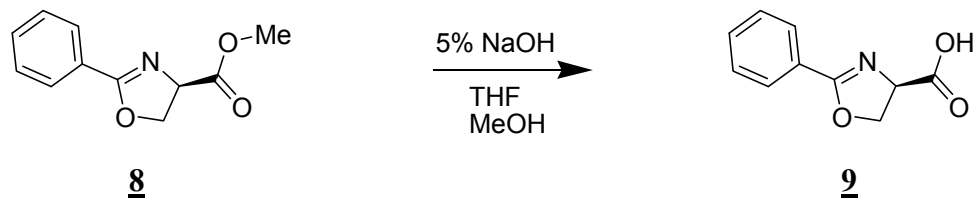
**ESI-MS:** ( $m/z$ , %) = 206 ( $\text{MH}^+$ , 100).

**HRMS** za  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NO}_3$ : izračunan: 206.0817 in izmerjen: 206.0822.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ (ppm) = 3.82 (s, 3H), 4.59 (dd,  $J$  = 10.5, 8.5 Hz, 1H), 4.59 (dd,  $J$  = 10.5, 8.0 Hz, 1H), 4.69 (dd,  $J$  = 8.5, 8.0 Hz, 1H), 7.41 (m, 2H), 7.50 (m, 1H), 7.98 (m, 2H).

#### 4.2.2. Sinteza 2-fenil-4,5-dihidrooksazol-4-karboksilne kisline (**9**) (34)

##### REAKCIJA:



##### Sintezni postopek:

Raztopini spojine (**8**) (1.750 g, 8.54 mmol), v zmesi topil THF (15 ml) in MeOH (45 ml), smo med mešanjem pri sobni temperaturi počasi dokapavali 5% vodno raztopino NaOH (13.6 ml, 17.1 mmol). Po 15 min smo reakcijo prekinili z dodatkom vode (60 ml) in reakcijsko mešanico nakisali z 1M HCl do pH = 2 ter ekstrahirali z etil acetatom (3 × 100 ml). Združene organske faze smo posušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in topilo odstranili pod znižanim tlakom. Nastalemu produktu smo dodali vodo in ga odučali pri čemer smo dobili 1.304 g spojine **9**.

**Opis:** rumeni kristali.

**Masa produkta** = 1.304 g.

**Izkoristek reakcije** = 80%.

**TLC** (metanol:diklorometan = 1:10); R<sub>f</sub> = 0.

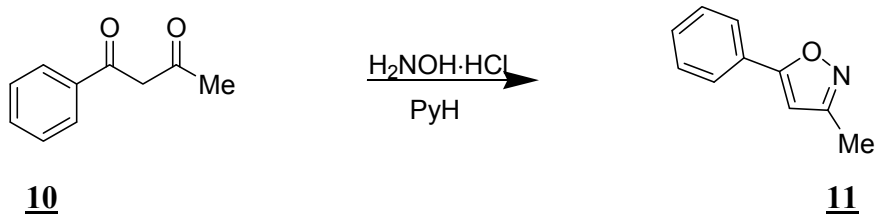
**Tališče:** 118–123 °C (lit. vrednost (34): 125–126 °C).

**IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3485, 3462, 3246, 3130, 3035, 2538, 2459, 2363, 2056, 1707, 1630, 1501, 1458, 1403, 1373, 1323, 1279, 1153, 1071, 1015, 945, 828, 709.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO): δ(ppm) = 3.70 (dd, *J* = 7.0, 3.0 Hz, 1H), 4.36 (dd, *J* = 12.0, 3.0 Hz, 1H), 4.54 (dd, *J* = 12.0, 3.0 Hz, 1H), 7.45 (m, 2H), 7.59 (m, 1H), 7.98 (m, 2H).

### 4.2.3. Sinteza 3-metil-5-fenilizoksazola (**11**) (35)

#### REAKCIJA:



#### Sintezni postopek:

Raztopini benzoilacetona (**10**) (1.622 g, 10 mmol) v piridinu (0.81 ml, 10 mmol) smo po kapljicah dodali nasičeno vodno raztopino hidrosilamina hidroklorida (764 mg, 11 mmol) in mešali 90 min pri temperaturi 50 °C. Izpadli produkt **11** smo odnučali in ga sprali z vodo (20 ml).

**Opis:** beli kristali.

**Masa produkta** = 1.548 g.

**Izkoristek reakcije** = 97%.

**TLC** (petroleter:etil acetat = 1:5);  $R_f$  = 0.36.

**Tališče:** 61.7– 62.5 °C (lit. vrednost (35): 67–68 °C).

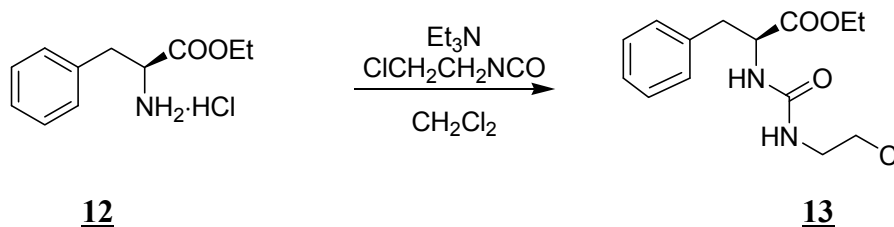
**IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3131, 3059, 2926, 1611, 1570, 1490, 1477, 1439, 1414, 1020, 897, 800, 767, 687, 488.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ (ppm) = 2.37 (s, 3H), 6.37 (s, 1H), 7.46 (m, 3H), 7.77 (m, 2H)

## 4.3. SEČNINSKI DERIVATI

### 4.3.1. Sinteza etil 2-(3-(klorometil)ureido)-3-fenilpropanoata (**13**) (36)

#### REAKCIJA:



#### Sintezni postopek:

Raztopini hidroklorida etilnega estra L-fenilalanina (**12**) (1.148 g, 5 mmol) v DMF (4 ml) smo med mešanjem na ledeni kopeli dodali trietilamin (0.69 ml, 5 mmol) in 2-kloroetilizocianat (0.52 ml, 5.75 mmol) ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi 20 h. Po končani reakciji smo topilo odstranili pod znižanim tlakom, preostanku dodali vodo (20 ml) in ekstrahirali z dietil etrom (3 × 20 ml). Združene organske faze smo posušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in topilo odstranili pod znižanim tlakom pri čemer smo izolirali 1.012 g čistega produkta **13**.

**Opis:** beli kristali.

**Masa produkta** = 1.012 g.

**Izkoristek reakcije** = 68%.

**TLC** (metanol:diklorometan = 1:10); R<sub>f</sub> = 0.64.

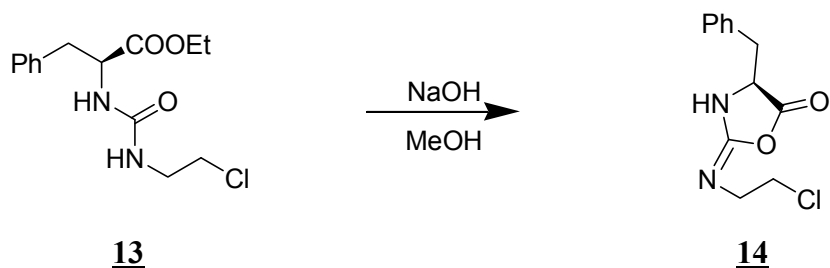
**Tališče:** 52.6–54.4 °C.

**IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3346, 3030, 2980, 2936, 2390, 2280, 1957, 1739, 1697, 1646, 1565, 1450, 1373, 1344, 1255, 1195, 1099, 1028, 948, 860.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) = 1.26 (t, J = 7.0 Hz, 3H), 3.07 (m, 2H), 3.54 (m, 4H), 4.17 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 4.75 (m, 1H), 5.18 (m, 2H), 7.14 (m, 2H), 7.28 (m, 3H).

### 4.3.2. Sinteza 2-(2-kloroetilimino)-4-benziloksazolidin-5-ona (**14**) (36)

#### REAKCIJA:



#### Sintezni postopek:

Raztopini etil 2-(3-(klorometil)ureido)-3-fenilpropanoata (**13**) (322 mg, 1 mmol) v metanolu (5 ml), smo dodali vodno raztopino NaOH (0.5 ml, 2 M) in reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi 24 h. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in preostanku dodali vodo (5ml), izpadli produkt smo odnučali in ga prekristalizirali iz zmesi topil dietil eter/diklorometan.

**Opis:** beli kristali.

**Masa produkta** = 119 mg.

**Izkoristek reakcije** = 47%.

**TLC** (petroleter:etil acetat = 3:5):  $R_f$  = 0.24.

**Tališče:** 137–140 °C.

**IR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) = 3447, 3262, 2922, 1773, 1720, 1555, 1458, 1437, 1348, 1255, 1194, 1134, 1032, 972, 749.

**EI-MS:** ( $m/z$ , %) = 252 ( $\text{MH}^+$ , 7), 91 (100).

**HRMS** za  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2$ : izračunan: 252.0665 in izmerjen: 252.0672.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta(\text{ppm})$  = 2.92 (dd,  $J$  = 14.0, 8.5 Hz, 1H), 3.36 (dd,  $J$  = 14.0, 3.5 Hz, 1H), 3.66 (m, 2H), 3.86 (m, 2H) 4.34 (ddd,  $J$  = 9.0, 4.0, 1.5 Hz, 1H), 5.42 (razš. s, 1H), 7.45 (m, 2H), 7.59 (m, 1H), 7.98 (m, 2H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta(\text{ppm})$  = 38.0, 39.9, 40.0, 58.3, 127.5, 128.9, 129.2, 135.0, 156.3, 172.7.

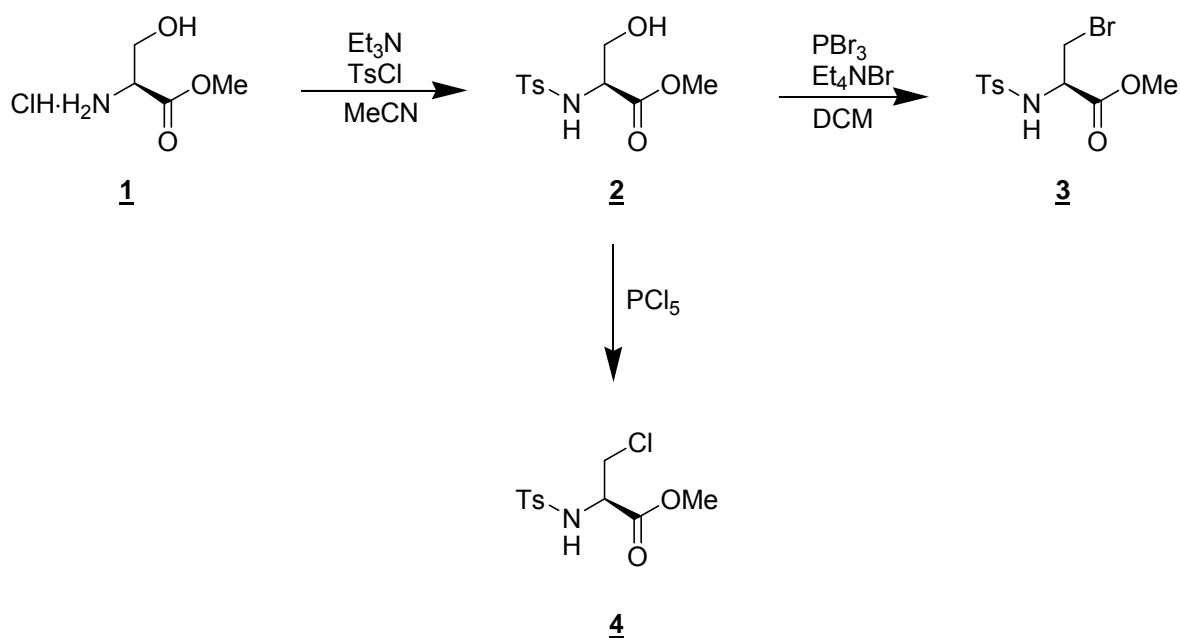


## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1. RAZLAGA SINTEZNIH POSTOPKOV

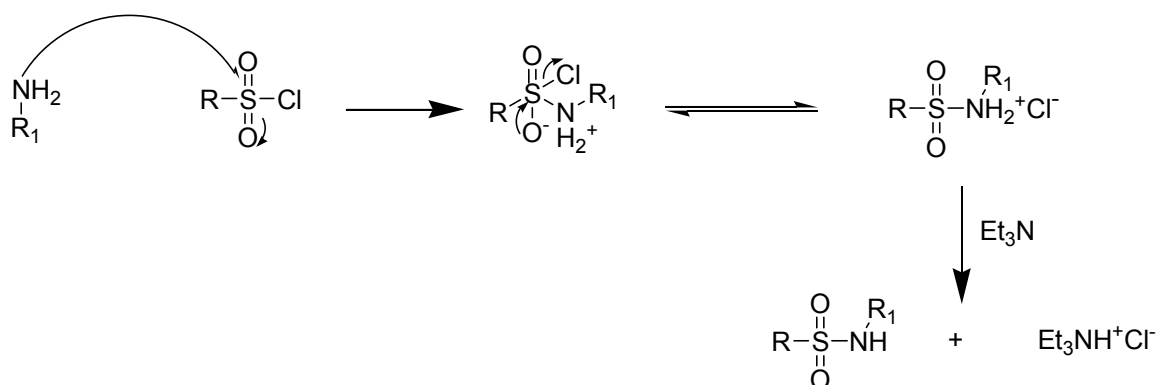
#### 5.1.1. Sinteza acikličnih derivatov L-serina

V prvi stopnji sinteze oksazolov in izoksazolov kot potencialnih inhibitorjev Ddl smo kot izhodno spojino uporabili hidroklorid metilnega estra L-serina (**1**) (Shema 1).



**Shema 1:** Sinteza acikličnih derivatov L-serina

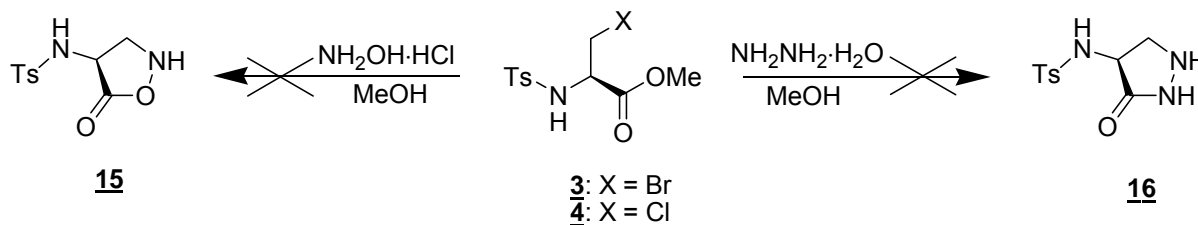
V tem primeru je karboksilna skupina aminokislina (L-serin) že zaščitena v obliki metilnega estra. Pred nadaljevanjem sinteze heterociklov smo zaščitili še reaktivno aminske skupino v spojini **1** s tozilno zaščito. Kot reagent smo uporabili tozil klorid ob prisotnosti trietilamina, reakcijo pa smo izvajali v acetonitrilu. Pri reakciji izhodne spojine **1** s tozil kloridom nastane produkt **2**, ki vsebuje sulfonamidno vez (Shema 2). Trietilamin nevtralizira vodikov klorid, ki nastaja kot eden od produktov pri reakciji.



**Shema 2:** Sinteza sulfonamidne vezi med aminom in TsCl

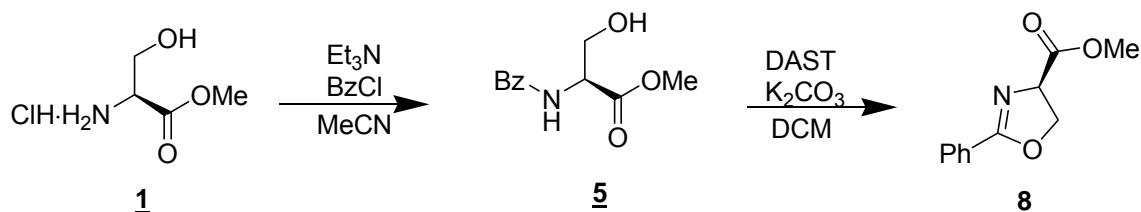
Ker je hidroksilna skupina v spojini **2** slaba izstopajoča skupina, smo se odločili, da jo zamenjamo z bromo substituentom. Spojini **2**, raztopljeni v diklorometanu, smo dodali tetraetilamonijev bromid in na ledu ohlajeni reakcijski mešanici počasi dodali še fosforjev(III) bromid. Hidroksilna skupina spojine **2** nukleofilno napade elektrofilni center v fosforjevem(III) bromidu pri čemer nastane aktiviran kompleks. Sledi nukleofilna substitucija z bromidnim anionom in nastanek spojine **3**. Ker je bil izkoristek reakcije po izolaciji s kolonsko kromatografijo relativno nizek (52%), smo namesto uvedbe bromo substituenta poskusili povečati reaktivnost spojine **2** tako, da smo hidroksilno skupino zamenjali s klorom. Pričakovali smo namreč boljši izkoristek take reakcije. Kloro substituent je sicer slabše izstopajoča skupina kot bromo, vendar pa je sinteza kloro spojine enostavnejša, saj pri izolaciji produkta ni potrebna kolonska kromatografija. Za uvedbo kloro substituenta smo spojini **2** dodali fosforjev(V) klorid in reakcijo pustili potekati v heterogenem sistemu trdno/trdno 24 h. Nastala je poltekoča reakcijska zmes, ki smo ji po recepturi dodali kloroform in jo nato segrevali na vodni kopeli, da je kloroform počasi odparil (30). Reakcijsko zmes smo nato razredčili z dodatkom vode in produkt ekstrahirali v diklorometan. Po odstranitvi topila smo izolirali produkt **4** z nekoliko višjim izkoristkom (59%) kot pri bromiranju. Mehanizem reakcije je podoben, saj tudi tu poteka nukleofilna substitucija aktivirane hidroksilne skupine s halogenidnim anionom. Produkta **3** in **4** smo nato poskušali ciklizirati s hidrazin hidratom oziroma hidroksilamin hidrokloridom v metanolu, pri čemer bi morda dobili zelene heterociklične produkte **15** in **16** (Shema 3). Predvidevali smo, da bo v obeh primerih potekla nukleofilna substitucija med eno aaminsko skupino hidrazina (hidroksilamina hidroklorida) in halogenskim substituentom v spojini **3** oz. **4**. Druga aaminska skupina hidrazina pa naj bi tvorila obroč preko ciklizacije s karbonilnim ogljikovim atomom

esterske funkcionalne skupine spojine **3** oz. **4**. Pri izvedbi omenjene reakcije pa je žal prišlo do cepitve TsN–C vezi v spojini **3** in **4**. Tako se je tozilna zaščita aminske skupine izkazala kot neprimerna za nadaljnje izvajanje reakcij ciklizacij z nukleofili.



**Shema 3:** Poskus sinteze cikličnih derivatov L-serina

Kot novo zaščito aminske skupine smo zato uvedli benzoilno zaščito. Tudi v tem primeru smo izhajali iz spojine **1**, ki smo jo suspendirali v acetonitrilu, dodali trietilamin in nato počasi še benzoil klorid. Po odstranitvi topila in ekstrakciji smo dobili produkt **5**, ki vsebuje amidno vez (Shema 4).



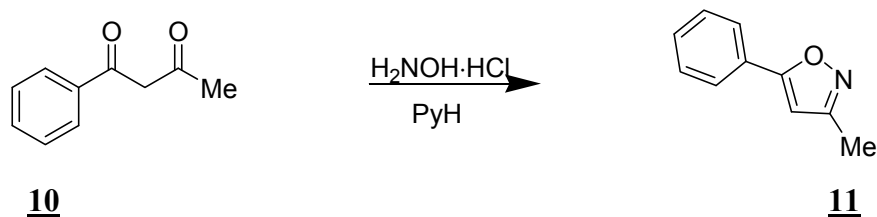
**Shema 4:** Sinteza metil 2-fenil-4,5-dihidrooksazol-4-karboksilata (**8**)

Spojino **5** smo uporabili za nadaljnje ciklizacije, saj je bila v danih pogojih obstojnejša od sintetiziranih sulfonamidov **3** in **4**. Izkoristki so bili nekoliko višji (66%), kot pri tvorbi sulfonamidov (58%). Da bi povečali topnost spojin v vodnem mediju, kar je pomembno pri testiranju le-teh, smo izvedli še alkalno hidrolizo metilnih estrov spojin **2** in **5** (Shema 5). V obeh primerih smo raztopini **2** oz. **5** v mešanici topil THF in metanola v razmerju 1:1 počasi dodali 5% vodno raztopino natrijevega hidroksida. Po 4 h smo reakcijo prekinili z dodatkom vode in 1M HCl. Kisel medij omogoča nastanek protonirane oblike spojine **6** in **7**. Pri pripravi spojine **6** je pri tem izpadla bela oborina, spojino **7** pa smo po nakisanju ekstrahirali v etil acetat in po uparitvi topila izolirali belo oborino, katere spektroskopska analiza je potrdila ujemanje s podatki iz literature (32).





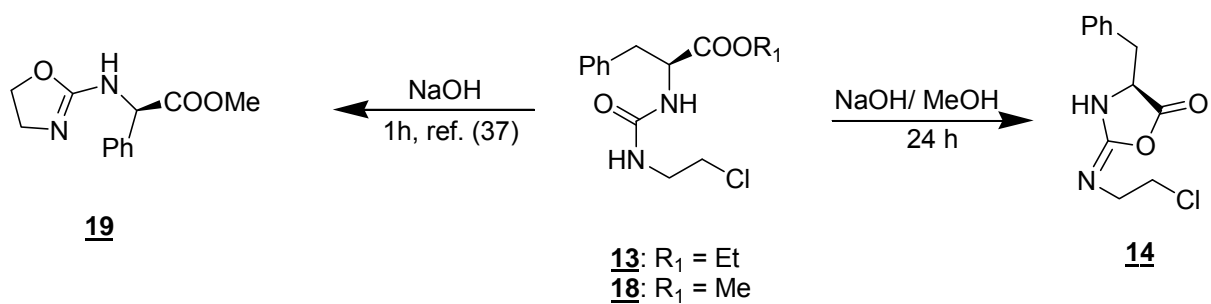
Sintetizirali smo tudi izoksazol **11**, ki je sorodna spojina predhodno sintetiziranim oksazolom **8**, **9** in **14**. Pri sintezi smo kot 1,3-diketon uporabili benzoilaceton (**10**) raztopljen v piridinu, kateremu smo dodajali nasičeno vodno raztopino hidroksilamina hidroklorida. Po 90 min mešanja pri 50 °C je izpadel kristalinični produkt **11** (Shema 8). Piridin ima vlogo baze, ki nevtralizira pri reakciji sproščen vodikov klorid. Izkoristek omenjene reakcije je visok (97%).



**Shema 8:** Sinteza 3-metil-5-fenilizoksazola (**11**)

### 5.1.3. Sinteza sečninskih derivatov

Tudi pri spojini **14** najdemo strukturni element relativno podoben cikloserinskemu. Pri sintezi oksazolona **14** smo izhajali iz acikličnega sečninskega derivata **13**. V prvi stopnji sinteze smo raztopino hidroklorida etilnega estra L-fenilalanina (**12**) v DMF ohladili na ledeni kopeli in ji dodali trietilamin ter 2-kloroetilizocianat. Po 20 h mešanja reakcijske zmesi pri sobni temperaturi smo produkt **13** ekstrahirali v dietil eter. Mehanizem reakcije med spojino **12** in 2-kloroetilizocianatom je nukleofilna adicija amina na heterogene multiple vezi. Pri tem nastane sečninski derivat **13**, ki je strukturni analog spojine **18**. V literaturi je namreč opisana ciklizacija spojine **18** v prisotnosti natrijevega hidroksida kot baze do etil 2-(4,5-dihidrooksazol-2-ilamino)-3-fenilpropanoata (**19**) (36). Ciklizacijo naše spojine **13** smo izvedli po nekoliko spremenjeni recepturi od tiste, ki je opisana v literaturi (36). Podaljšali smo reakcijski čas in kot topilo uporabili metanol. Pri tem smo izolirali spojino **14**, ki pa je drugačna od spojine **19**, kot navaja literatura (Shema 9). Zato sklepamo, da je ciklizacija potekala drugače, kot navaja vir. V sečninskem delu spojine **13** je možna laktam-laktim tautomerija in ciklizacija lahko poteče preko karbonilnega kisika na ogljik v estrski funkcionalni skupini spojine **13**. Izolirano spojino **14** (47%) smo prekrizalizirali iz mešanice topil dietil eter/diklorometan.

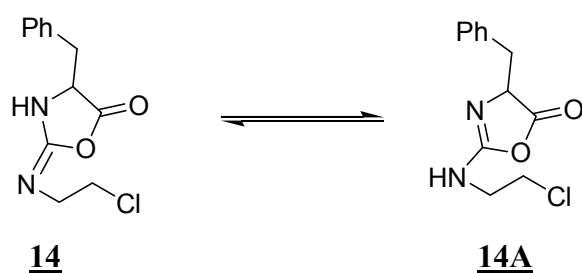


**Shema 9:** Sinteza sečninskih derivatov **14** in **19**

#### 5.1.4. Razlaga rezultatov analiz

V <sup>1</sup>H-NMR spektrih spojin **2**, **5**, **6**, **7** in **8** nismo opazili resonanc za vodik hidroksilne skupine. V protonski spektrih omenjenih spojin opazimo resonance za ostale protone, ki jih vsebujejo te spojine. Končno strukturo spojin smo določili še z ostalimi analiznimi metodami (MS, IR, T<sub>tal</sub>), ki so prav tako potrdile domnevno strukturo omenjenih spojin.

Med spojinama **14** in **14A** obstaja amidin-amidin tautomerija (Shema 10). Pri določanju pravilne strukture smo se oprli na <sup>1</sup>H-NMR spekter, v katerem vidimo za proton na metinskem ogljiku signal oblike ddd. Na podlagi tega smo sklepali, da naši spojini ustreza struktura **14**. Posneli smo še COSY45 in HMBC spektra, vendar nam te analize niso dale dodatnih odgovorov o prevladujoči tautomerni obliki.

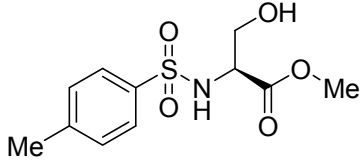
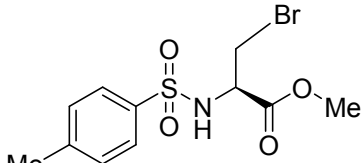
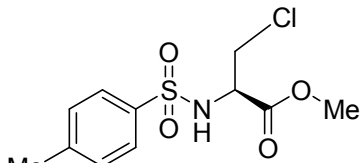
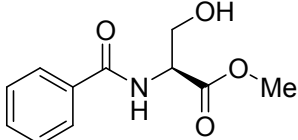


**Shema 10:** Amidin-amidin tautomerija spojine **14**

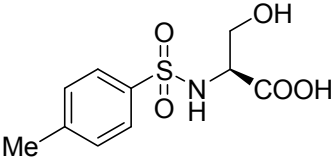
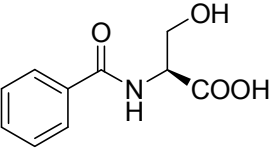
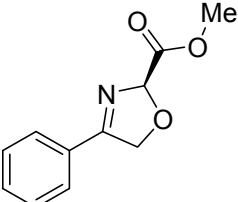
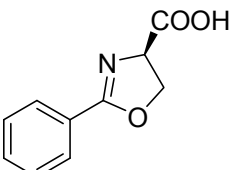
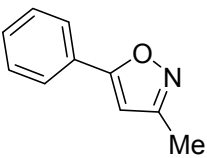
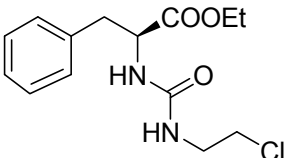
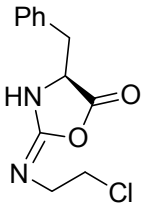
## 5.2. REZULTATI BIOLOŠKEGA TESTIRANJA SPOJIN

V okviru diplomske naloge smo sintetizirali 11 spojin (2–9, 11, 13 in 14), ki smo jih ovrednotili kot potencialne inhibitorje encima DdlB iz *E. coli*. Rezultati so podani kot rezidualna aktivnost (RA) encima v prisotnosti različnih koncentracij inhibitorja in so zbrani v tabeli 1. Vrednosti RA so merjene po takojšnji iniciaciji encimske reakcije z dodatkom substratov (D-Ala, ATP).

**Preglednica I:** RA vrednosti spojin testiranih na DdlB iz *E. coli*

SPOJINA	STRUKTURA	MOLSKA MASA (g/mol)	c (μM)	RA %
<u>2</u>		273	500	97
<u>3</u>		336	500	98
<u>4</u>		291	500	Interakcije s testom
<u>5</u>		223	500	98



<u>6</u>		259	500	<b>98</b>
<u>7</u>		209	500	<b>94</b>
<u>8</u>		205	500	<b>97</b>
<u>9</u>		191	500	<b>85</b>
<u>11</u>		159	500	<b>100</b>
<u>13</u>		298	500	<b>100</b>
<u>14</u>		252	500	<b>94</b>

Vse spojine testirane v prisotnosti Tritona X-114 (0.005%- končna)

Inhibitorno aktivnost spojine izrazimo z RA, ki predstavlja razmerje med katalitično aktivnostjo encima v prisotnosti inhibitorja in brez inhibitorja. Manjša je rezidualna aktivnost, bolj inhibitor pri dani koncentraciji upočasni reakcijo.

Pri reakciji, ki jo katalizira Ddl, nastanejo trije produkti: dipeptid D-Ala-D-Ala, ADP in fosfat. Aktivnost encima DdlB je bila merjena preko detekcije sproščenega fosfata po kolorimetrični metodi z malahitno zelenim, kot so jo opisali A. Walsh in sodelavci (36). Med fosfatom in malahitno zelenim pride do tvorbe zeleno obarvanega kompleksa. Kot reagent smo uporabili Biomol Green (stabilnejša različica malahitno zelenega z dodanim amonijevim molibdatom). Ob dodatku inhibitorja v mešanico se katalitična aktivnost encima zmanjša v primerjavi z negativno kontrolo in sprosti se manj fosfata (padec  $A_{650}$ ).

Najprej smo pri 500  $\mu\text{M}$  končni koncentraciji inhibitorjev v reakcijski mešanici izmerili RA. Nobena izmed sintetiziranih spojin se ni izkazala kot inhibitor DdlB iz *E. coli*. Vrednosti RA so bile nad 93%, le v primeru spojine **9** je bila RA nekoliko nižja (85%). Pri acikličnih derivatih L-serina (spojine **2**, **3** in **4**) se je RA vrednost gibala med 97 in 98%, pri čemer smo pri spojini **4** opazili interakcije testa s spojino. Zaradi nespecifične vezave spojine **4** na indikator malahitno zeleno je prišlo do povečanje absorbance pri 650 nm že pri samem merjenju ozadja, še preden smo v reakcijsko mešanico dodali encim Ddl. Zaradi takih interakcij spojine s testnim sistemom ne morem zanesljivo trditi, da so rezultati meritev točni in RA vrednosti za take spojine ne podajamo.

Predvidevali smo, da bo hidroliza metilnih estrov spojin **2** in **5** pripomogla k izboljšanju inhibicije. Prosta karboksilna kislina, ki ob tem nastane, lahko tvori vodikove vezi z aktivnim mestom encima DdlB in tako povečuje možnost nastanka močnejših interakcij med inhibitorjem in encimom. RA vrednosti spojin **6** in **7** niso potrdile naših domnev, saj je bila RA za prvo spojino 98% za drugo pa 94%. Pri testiranju oksazolov (**8**, **9** in **14**) smo opazili, da ima nekoliko višjo inhibitorno vrednost spojina **14** (RA = 94%), ki ima na dušik v obroču vezan vodik, ki omogoča tvorbo vodikovih vezi z aktivnim mestom encima. Spojina z najnižjim RA je **9** (85%), ki ima na oksazolni obroč vezano karboksilno skupino. Testirani izoksazol **11** in spojina **13** pa nista izkazovala nikakršne inhibicije encima DdlB.

## 6. ZAKLJUČEK

V okviru diplomske naloge smo sintetizirali serijo acikličnih derivatov L-serina (**2**, **3**, **4**, **5**), sečninskih derivatov (**13**, **14**), oksazolov (**8**, **9**) in izooksazol (**11**) ter jih preizkusili kot inhibitorje esencialnega bakterijskega encima DdlB iz *E. coli*. Izkazalo se je, da sintetizirane spojine nimajo inhibitorne aktivnosti na DdlB, šibko inhibitorno aktivnost je izkazovala le spojina **9** (RA = 85% v 500  $\mu$ L). Vzrok je verjetno oksazolna struktura, ki je podobna izooksazolni DCS, znanemu inhibitorju encima DdlB. Prosta karboksilna kislina verjetno tvori dodatne vodikove vezi v hidrofobnem žepu encima in pripomore k večji inhibitorni aktivnosti spojine **9**. Zanimiva je tudi do sedaj v literaturi neopisana spojina **14**, ki zaradi vodika, vezanega na obročni dušik, lahko tvori dodatne vezi v aktivnem mestu DdlB. Morda bi večjo inhibitorno aktivnost izkazovala spojina, ki bi imela oksazolni obroč, na mestu 2 prosto aminske skupino in na mestu 4 prosto karboksilno skupino. Pri eksperimentalnem delu smo sintetizirali spojino **9**, ki pa je bila slabo topna v topilih THF in EtOAc, ki smo jih uporabili v nadaljnjih poskusih sinteze spojine **17**. Predpostavljam, da bi ob uporabi ustreznega topila, uspešno tvorili amidno vez med spojino **9** in metilnim estrom L-alanina. Nastali amid **17** bi imel vezan L-alanin, s čemer bi morda povečali afiniteto vezave spojine **17** tako v aktivno mesto DdlB, kot tudi alanin racemaze.

## 7. LITERATURA

1. Gobec S, Urleb U: Inhibitorji biosinteze peptidoglikana. *Farm. Vestn.* 1990; 50: 183–193.
2. Williams DA, Lemke TL: *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 5<sup>th</sup> Ed, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2002; 819–864.
3. Medigan MT, Martinko JM, Parker J: *Brock biology of microorganisms*, 10<sup>th</sup> Ed, Pearson Education, New Jersey, 2003.
4. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK: *Pharmacology* 5<sup>th</sup> Ed, Churchill Livingstone, 2003; 620–652.
5. *Shema prirejena po*: [www.cehs.sin.edu/fix/medmicro/pix/walls.gif](http://www.cehs.sin.edu/fix/medmicro/pix/walls.gif) (oktober 2007)
6. *Shema prirejena po*: [www.bact.wisc.edu/Microtextbook/images/book\\_4/chapter\\_2/2-39.gif](http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/images/book_4/chapter_2/2-39.gif) (oktober 2007)
7. *Shema prirejena po*: <http://pathmicro.med.sc.edu/fox/sa-pep.jpg> (oktober 2007)
8. *Shema prirejena po*: <http://pathmicro.med.sc.edu/fox/sa-pep.jpg> (oktober 2007)
9. Lazar K, Walker S: Substrate analogues to study cell wall biosynthesis and its inhibition. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002; 6: 786–793.
10. Neuhaus FC: The enzymatic synthesis of D-alanyl-D-alanine. I. Purification and properties of D-alanyl-D-alanine synthetase. *J. Biol. Chem.* 1962; 237: 778-786.
11. Robinson AC, Kenan DJ, Sweeney J, Donachie WD: Further evidence for overlapping transcriptional units in an *Escherichia coli* cell envelope-cell division gene cluster: DNA sequence and transcriptional organization of the *ddl ftsQ* region. *J. Bacteriol.* 1986; 167: 809–817.
12. Al-Bar OAM, O'Connor CD, Giles IG, Akhtar M: D-Alanyl-D-Alanine ligase of *Escherichia coli*; Expression, purification and inhibitory studies on the cloned enzyme. *Biochem J.* 1992; 282: 747–752.
13. Mullins LS, Zawadzke LE, Walsh CT, Raushel FM: Kinetic evidence for the formation of D-alanyl phosphate in the mechanism of D-alanyl-D-alanine ligase. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 8993–8998.
14. Walsh CT: Enzymes in the D-Alanine Branch of Bacterial Cell Wall Peptidoglycan Assembly. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 2393–2396.
15. Fan C, Park IS, Walsh CT, Knox JR: D-Alanyl-D-Alanine Ligase: Phosphonate and Phosphinate Intermediates with Wild Type and the Y216F Mutant. *Biochemistry* 1997; 36: 2531–2538.

16. Neuhaus FC: The Enzymatic Synthesis of D-Alanyl-D-alanine. II. KINETIC STUDIES OF D-ALANYL-D-ALANINE SYNTHETASE. *J. Biol. Chem.* 1962; 237: 3128–3135.
17. El Zoeiby A, Sanschagrín F, Levesque RC: Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol. Microbiol.* 2003; 47: 1–12.
18. Neuhaus FC, Lynch JL: The Enzymatic Synthesis of D-Alanyl-D-alanine. III. On the Inhibition of D-Alanyl-D-alanine Synthetase by Antibiotic D-Cycloserine. *Biochemistry* 1964; 3: 471–480.
19. Ellsworth BA, Tom NJ, Bartlett PA: Synthesis and evolution of inhibitors of bacterial D-alanine: D-alanine ligase. *Chemistry & Biology* 1996; 3: 37–44.
20. Chakravarty PK, Greenlee WJ, Parsons WH, Patchett AA, Combs P, Roth A, Busch RD, Mellin TN: (3-Amino-2-oxoalkyl)phosphonic Acids and Their Analogues as Novel Inhibitors of D-Alanine: D-alanine ligase. *J. Med. Chem.* 1989; 32: 1886–1890.
21. Lacoste AM, Chollet-Gravey AM, Vo Quang L, Vo Quang Y, Le Goffic F: Time-dependent inhibition of *Streptococcus faecalis* D-alanine: D-alanine ligase by  $\alpha$ -aminophosphomimetic acids. *Eur. J. Med. Chem.* 1991; 26: 255–260.
22. Besong GE, Bostock JM, Stubbings W, Chopra I, Roper DI, Lloyd AJ, Fishwick CWG, Johnson AP: A De Novo Designed Inhibitor of D-Ala-D-Ala Ligase from *E. coli*. *Angew. Chem. Int. Ed* 2005; 44: 2–6.
23. Liu S, Chang JS, Herberg JT, Tomich PK: Allosteric inhibition of *Staphylococcus aureus* D-alanine:D-alanine ligase revealed by crystallographic studies. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 15178–15183.
24. Kovač A, Majce V, Lenaršič R, Bombek S, Bostock JM, Chopra I, Polanc S, Gobec S: Diazenedicarboxamides as inhibitors of D-alanine-D-alanine ligase (Ddl). *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 2007; 17: 2047–2054.
25. Walsh AW, Falk PJ, Thanassi J, Discotto L, Pucci MJ, Ho HT: Comparison of the D-Glutamate-Adding Enzymes from Selected Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *J. Bacteriol.* 1999; 181: 5395–5401.
26. Medmrežje: [www.ncgc.nih.gov/guidance/section4/html](http://www.ncgc.nih.gov/guidance/section4/html) (zadnji popravek 2005).
27. Palmer DC: Chemistry of Heterocyclic compounds, John Wiley & Sons, New Jersey, 2003; 255–264.
28. Stoll A, Petrzilka T: Versuche zur Synthese des Peptidteils der Mutterkornalkaloide I. *Helv. Chim. Acta* 1952; 35: 589–602.

29. Hardegger E, Sazabo F, Liechti P, Rostetter C, Zankowska-Jasinska W: Withered substances for synthesis of compounds of lycoramine series from glycine and L-serine. *Helv. Chim. Acta*; 1968; 51: 78–85.
30. Watanabe Y, Fuji T, Hioki K, Tani S: Development of a Simple System for Dehydrocondensation Using Solid-Phase Adsorption of a Water-Soluble Dehydrocondensing Reagent (DMT-MM). *Chem. & Pharm. Bull.* 2004; 52: 1223–1226.
31. McChesney EW, Swann WK: The identification of the Amino Acids: p-Toluensulfonyl Chloride as a Reagent. *J. Am. Soc.* 1937; 59: 1116–1121.
32. Kameda Y, Toyura E, Kimura Y, Kanaya Y: Acylase activities and microorganisms VII. Enzymatic resolution of serine, threonine, allothreonine, 2,4-diaminobutyric acid, and ornithine. *Yakugaku Zasshi*; 1958; 78: 769–772.
33. Fry EM: Oxazolines. *J. Org. Chem.* 1949; 14: 887–891.
34. Fry EM: Syntheses of cystine. *J. Org. Chem.* 1959; 15: 438–441.
35. Kato T, Yamakana H, Yasuda N: Hydrolysis of Pyrimidine N-Oxides to Give Ixoxazoles Derivatives. *J. Org. Chem.* 1967; 32: 3593–3601.
36. Vargha HS, Medzihradszky-Schweinger H, Ruff F, Medzihradszky K: Cyclization reactions of N-(2-chloroethylcarbamoyl) amino acids. *Tetrahedron* 1983; 39: 2255–2258.