

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ROK PETRIČ

**ANALOGI PREHODNEGA STANJA ENCIMA MURD NA OSNOVI
IZOTIAZOLIDIN-3-ON-1,1-DIOKSIDA**

**ANALOGUES OF THE TRANSITIONAL STAGE OF THE MURD ENZYME ON
THE BASIS OF ISOTHIAZOLIDINE-3-ONE-1,1-DIOXIDE**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Marka Anderluha, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani in Nacionalnem centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Marku Anderluhu, mag. farm. za strokovno pomoč, vzpodbudo pri delu ter za pridobljeno znanje in izkušnje. Posebna zahvala gre mojima staršema in Katarini, ki so mi stali ob strani, me vzpodbjali in podpirali vsa leta mojega študija.

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom doc. dr. Marka Anderluha, mag. farm.

Člani komisije:

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

Član komisije: doc. dr. Bojan Doljak, mag. farm.

POVZETEK

Porast bakterijske rezistenca na do sedaj odkrite antibiotike je povzročila nujno potrebo po odkrivanju novih, učinkovitejših protibakterijskih učinkovin, katere bi delovale na drugačne tarče kot do sedaj odkriti antibiotiki. Eno najbolj znanih in najbolj raznovrstnih tarč za antibakterijsko terapijo je encimski sistem, odgovoren za biosintezo peptidoglikana. Peptidoglikan je bistven polimer celične stene, ki daje potrebno trdnost, fleksibilnost in togost za obstoj bakterijske celice v hipotoničnem okolju. Večina antibiotikov stare generacije je delovala na končne stopnje sinteze peptidoglikana, danes pa se raziskave nagibajo k iskanju tarč v začetnih stopnjah. Raziskovalci iz različnih držav poskušajo z inhibitorji delovati na generacijo Mur encimov, ki so vključeni v začetne stopnje sinteze peptidoglikana.

Naš cilj je bil usmerjen v iskanje inhibitorja encima MurD, ključnega encima v biosintezi peptidoglikana. Izhajali smo iz strukture naravnega produkta encimske reakcije (UMAG) oziroma njegovega prehodnega stanja, ki smo ga želeli posnemati z načrtovanjem naših inhibitorjev.

Encim MurD je visoko specifičen za D-Glu kot substrat, zato smo ga tudi mi vključili v našo strukturo. Dioksidirano žveplo v izotiazolidin-3-onskem skeletu predvidoma oponaša tetraedrični ogljikov atom prehodnega stanja encimske reakcije. Sam cikel daje spojini trdnost in rigidnost. Z analogi benzena smo tvorili amino in amidno vez ter s tem pripravili del, ki se predvidoma umešča v lipofilno območje proti uridin-vezavnemu mestu.

ABSTRACT

The increase of bacterial resistance to the antibiotics that have been discovered so far, has caused the necessity for the discovery of new, more efficient antibacterial agents, which would act against different targets compared to the already known antibiotics. One of the most known and diverse targets for antibacterial therapy is the enzyme system responsible for peptidoglycan biosynthesis. Peptidoglycan is an essential polymer of the cell wall, which provides the necessary strength, flexibility and rigidity for the existence of the bacterial cell in a hypotonic environment. The majority of old generation antibiotics act against the final phase of peptidoglycan synthesis, while today research is more focused towards finding targets in initial phases. Researchers from different countries are using inhibitors to try and act against the generation of Mur enzymes, which catalyze the initial steps of peptidoglycan synthesis.

Our goal was oriented towards the search of the MurD enzyme inhibitor, which is one of the key enzyme in peptidoglycan biosynthesis. The starting point for design of MurD inhibitors was the structure of the natural product of the enzyme reaction (UMAG) or its previous transition state,.

The MurD enzyme is highly specific for D-Glu as a substrate, which is why we included it in the structure of potential new MurD inhibitors. We anticipate that dioxidized sulphur in an isothiazolin-3-one scaffold imitates the tetrahedral carbon atom of the transitional stage of the enzyme reaction. The cycle itself provides the strength and rigidity of the compound. By benzene analogues we created amino and amide linkage and thus prepared a compound which is likely to occupy a position in the lipophilic area towards the uridine binding site.

SEZNAM OKRAJŠAV

AcCoA – acetilkoencim A
ADP – adenozindifosfat
Ala – alanin
Asp – asparaginska kislina
ATP – adenozintrifosfat
 $(\text{Boc})_2\text{O}$ – diterc-butil-dikarbonat
Bz – benzoilna skupina
DKM – diklormetan
Cys – cistein
c – koncentracija
d – dublet
dd – dublet dubleta
DMF – *N,N*-dimetilformamid
DMSO – dimetilsulfoksid
DNK – deoksiribonukleinska kislina
E. coli – Escherichia coli
EDC – 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarbodiimid hidroklorid
 Et_3N – trietilamin
EtOH – etanol
FAB – fast atom bombardment (obstreljevanje s hitrimi atomi)
FAD – flavin-adenin-dinukleotid
G- – po Grammu negativne bakterije
G+ – po Grammu pozitivne bakterije
Glu – glutaminska kislina
GluNAc – *N*-acetilglukozamin
Gly – glicin
HOEt – *N*-hidroksibenzotriazol
His – histidin
HTS – high throughput screening (rešetanje visoke zmogljivosti)
 IC_{50} – koncentracija inhibitorja, ki zmanjša aktivnost na polovico
IR – infrardeča spektroskopija
J – sklopitvena konstanta

Lys – lizin

m – multiplet

M – molarnost (mol/l)

mDAP – meso-diaminopimelinska kislina

Me – metilna skupina

MeOH – metanol

MF – mobilna faza

MRSA – na meticilin odporen *Staphylococcus aureus*

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-meso-diaminopimelat ligaza

MurF – UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamoil-meso-diaminopimelat-D-alanin-D-alanin ligaza

MurG – *N*-acetilglukozamin transferaza

MurNAc – *N*-acetilmuraminska kislina

MW – mikrovalovi

NADP+ – nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat

NADPH – nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfohidrid (ali bolje reducirana NADP)

nm – nanometer

NMM – *N*-metilmorfolin

NMR – nuklearna magnetna resonanca

Pd/C – paladij na aktivnem oglju

PEP – fosfoenolpiruvat

Ph – fenilna skupina

Ph₃P – trifenilfosfin

Pi – anorganski fosfat (pirofosfat)

q – kvartet

Rf – retencijski faktor

s – singlet

t – triplet

T – temperatura

TDAP – tris-(dimetilamino)fosfin

TLC – tankoplastna kromatografija

UDP – uridindifosfat

UDP-GlcNAc – UDP-*N*-acetilglukozamin

UDP-MurNAc – UDP-*N*-acetilmuraminska kislina

UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu – UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutaminska kislina

UMA – UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanin

UMAG – UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutaminska kislina

UNAM – UDP-*N*-acetilmuraminska kislina

δ – kemijski premik

KAZALO

1 UVOD	1
1.1 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE	1
1.2 ODPORNOST BAKTERIJ NA PROTIMIKROBNE UČINKOVINE	2
1.3 BAKTERIJSKA CELIČNA STENA	3
1.3.1 CELIČNA STENA PO GRAMU POZITIVNIH BAKTERIJ	4
1.3.2 CELIČNA STENA PO GRAMU NEGATIVNIH BAKTERIJ	4
1.4 PEPTIDOGLIKAN	5
1.4.1 BIOSINTEZA PEPTIDOGLIKANOV	6
1.5 MUR ENCIMI	11
1.5.1 MurD	13
2 NAČRT ZA DELO	18
2.1 NAČRTOVANJE ANALOGOV PREHODNEGA STANJA ENCIMA MURD ...	18
2.2 SINTEZNI NAČRT	19
3 MATERIALI IN METODE	24
4 SINTEZNI POSTOPKI IN REZULTATI ANALIZ.....	27
4.1 Sinteza etil cimetata (spojina 1) (38).....	27
4.2 Sinteza 3-etoksi-3-okso-1-fenilpropan-1-sulfonske kisline (spojina 2) (39)	28
4.3 Sinteza etil-3-(klorosulfonil)-3-fenil propanoata (spojina 3)	29
4.4 Sinteza terc-butil 4-fenilbut-2-en-oata (spojina 4) (28)	30
4.5 Sinteza 4-fenil-3-sulfo-butanojske kisline (spojina 5)	31
4.6 Sinteza 3-(klorosulfonil)-4-fenilbutanoil klorida (spojina 6)	32
4.7 Sinteza 3,3'-disulfanediilbis(2-(terc-butoksiamino)propanojske kisline) = Boc-L-cistina (spojina 7)	33
4.8 Sinteza dimetil-D-glutamata (spojina 8) (38).....	34
4.9 Sinteza N,N-di-(terc-butoksikarbonilamino)-L-cistinil-di-glutamil-di-metilnega estra (spojina 9)	35
4.10 Sinteza dimetil 2-(4-(terc-butoksikarbonilamino)-izotiazolidin-3-on-2-il) pentan-di-oata (spojina 10)	37
4.11 Sinteza dimetil 2-(4-(terc-butoksikarbonilamino)-izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentandioata (spojina 11)	40
4.12 Sinteza dimetil 2-(4-amino-izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentandioata (spojina 12).....	41
4.12.1 Odščita Boc-a 1	41
4.12.2 Odščita Boc-a 2	41
4.12.3 Odščita Boc-a 3	42
4.13 Sinteza dimetil 2-(4-(benzilamino)-izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentandioat (spojina 13).....	43
4.14 Sinteza dimetil 2-(4-benzil-(terc-butoksikarbonil)-amino)-izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentandioata (spojina 14)	44
4.15 Sinteza 2-(4-(benzil-(terc-butoksikarbonil)amino)-izotiazolidin-3-on-2-il) pentandiojske kisline (spojina 15).....	46
4.16 Sinteza dimetil 2-(4-fenilacetamido)izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentandioata (spojina 16)	46

4.17	Sinteza dimetil 2-(4-benzamido-izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentandioata (spojina 17).....	49
4.18	Sinteza 2-(4-benzamido-izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentandiojske kisline (spojina 18).....	50
4.19	Sinteza dibenzil 2-(4-amino-izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentandioata (spojina 19).....	51
4.20	Sinteza dibenzil 2-(4-benzamido-izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentandioata (spojina 20).....	53
4.21	Sinteza 2-(4-benzamido-izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentandiojske kisline (spojina 21).....	55
5	RAZPRAVA	57
5.1	RAZPRAVA O SINTEZAH.....	57
5.1.1	Sinteza metilnega/etilnega estra s kislinsko katalizirano esterifikacijo	57
5.1.2	Nastanek alkena iz aldehida in fosforana po Wittigu.....	58
5.1.3	Elektrofilna adicija z nastankom vezi C-S	59
5.1.4	Odstranitev terc-butilne zaščite	59
5.1.5	Reakcija halogeniranja – nukleofilna substitucija.....	60
5.1.6	Zaščita amino skupine L-cistina z di-terc-butil dikarbonatom.....	61
5.1.7	Priprava amidov	62
5.1.8	Ciklizacija z bromom	64
5.1.9	Oksidacija sulfida do sulfona	65
5.1.10	Odščita Boca iz amino skupine s plinasto klorovodikovo kislinou.....	65
5.1.11	Sinteza aminov	66
5.1.12	Alkalna hidroliza metilnih estrov	67
5.1.13	Katalitsko hidrogeniranje – hidrogenoliza	68
5.2	REZULTATI BIOLOŠKEGA TESTIRANJA	70
6	SKLEP	71
7	LITERATURA	72

1 UVOD

Integriteta strukture celične stene je za bakterije ključnega pomena. Bakterije za to poskrbijo s sintezo rigidne strukture imenovane peptidoglikan. Peptidoglikan obdaja bakterijsko citoplazemsko membrano, zgrajen je iz sladkornih in peptidnih molekul, najdemo pa ga le v prokarionskih celicah.(1) Zaradi tega je poseganje v mehanizem biosinteze peptidoglikana ena izmed najbolj poznanih in tudi najbolj uspešnih strategij za razvoj protibakterijskih učinkovin.(2) Za uspešno načrtovanje novih inhibitorjev biosinteze peptidoglikana in študij njihovega delovanja je zatorej nujno potrebno dobro poznavanje zgradbe peptidoglikana, mehanizma njegove biosinteze z vsemi vključenimi encimi, kemijske strukture encimskih substratov in navsezadnje tudi njegove vloge v bakterijski celici. Do sedaj je bilo odkritih že mnogo antibiotikov (predvsem beta-laktamov in glikopeptidov), ki inhibirajo končne stopnje biosinteze peptidoglikana. V zadnjem času pa se je znatno povečalo število odpornih sevov bakterij na tovrstne antibiotike. Trend, ki se zato razvija v farmacevtski stroki je usmerjen v odkrivanje vedno novih tarč za razvoj novih antibiotikov in kemoterapeutikov.(2) V zadnjem desetletju se je predvsem povečalo zanimanje za zgodnejše faze biosinteze peptidoglikana, saj le-te odpirajo nove, še neraziskane možnosti za razvoj protibakterijskih učinkovin. Ena izmed pomembnih tarč pri načrtovanju novih kemoterapeutikov so tudi Mur encimi, ki sodelujejo v citoplazemskih stopnjah biosinteze prekurzorjev peptidoglikana in imajo zaradi strukturne podobnosti med posameznimi bakterijskimi vrstami, inhibitorji le-teh, širok spekter delovanja.(3)

1.1 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE

Antibiotiki so v ožjem pomenu sekundarni metaboliti bakterij, gliv in aktinomicet, ki delujejo bakteriostatično (zavirajo rast) in/ali baktericidno (povzročajo smrt) na druge mikroorganizme. V širšem pomenu se ta izraz uporablja za protimikrobne učinkovine naravnega izvora in njihove polsintezne derivate (npr. peniciline, cefalosporine), medtem ko spojine popolnoma sinteznega izvora (npr. kinolone, sulfonamide) uvrščamo med kemoterapeutike.(4)

Ena najpomembnejših lastnosti dobrega antibiotika je selektivna toksičnost, kar pomeni sposobnost zaviranja rasti in povzročanja smrti mikroorganizmov brez resnega toksičnega učinka na gostitelja.(4)

Na osnovi novih spoznanj v kemiji in farmaciji so z modifikacijami osnovne molekule pri mnogih naravnih antibiotikih dosegli boljše lastnosti, kot so: širši spekter delovanja, močnejše delovanje, manjša toksičnost, primernejši način aplikacije, administracije, izboljšanje farmakokinetične in farmakodinamske lastnosti, itd.(5)

Glede na mehanizem delovanja in kemijsko strukturi ločimo protimikrobne učinkovine, ki:

- inhibirajo sintezo bakterijske celične stene (mednje sodijo β -laktami, cikloserini, bacitracin, vankomicin, fosfomicin);
- spremenijo permeabilnost celične membrane (mednje sodijo polimiksin, nistatin, amfotericin B);
- zavirajo sintezo proteinov (mednje sodijo tetraciklini, kloramfenikol, makrolidi, aminoglikozidi);
- zavirajo metabolizem nukleinskih kislin (mednje sodijo kinoloni in rifamicini);
- delujejo kot antimetaboliti (mednje sodijo sulfonamidi in trimetoprim).(6)

1.2 ODPORNOST BAKTERIJ NA PROTIMIKROBNE UČINKOVINE

Besedna zveza bakterijska rezistenca pomeni izgubo učinka protimikrobnih učinkovin na mikroorganizme. Vzrok za njen nastanek je selekcijski pritisk protimikrobnih učinkovin na mikroorganizme. Slednji se genetsko prilagodijo na spremembe v okolju v smeri evolucijske prilagoditve, ki omogoča preživetje v spremenjenem okolju.(7)

Bakterijska rezistenca na antibiotike lahko poteka po različnih mehanizmih:

- proizvajanje encimov, ki antibiotik razgradijo (npr. β -laktamaze, acetiltransferaze, kinaze);
- aktivno izločanje antibiotika iz bakterije z membranskimi črpalkami (npr. tetraciklini);
- zmanjšan privzem učinkovine v bakterijo (sprememba prepustnosti celične membrane);
- sprememba vezavnega mesta za antibiotik (zmanjšana afiniteta, število receptorjev),
- sprememba presnovne poti, ki jo antibiotik zavira.

Do razvoja rezistence pride s točkovnimi mutacijami, insercijami, delecijami, inverzijami, duplikacijami ali s pridobitvijo tuje DNK s plazmidi (krožne izvenkromosomske verige DNK,

ki se nahajajo v citoplazmi in se lahko podvajajo neodvisno od kromosomov) in bakteriofagi (bakterijski virusi). Plazmidi se lahko prenašajo med bakterijami s konjugacijo (prenos skozi spolni pilus), transdukциjo (prenos z bakteriofagi) ali s transformacijo (privzem gole DNK, ki jo je izločila druga bakterija).(5)

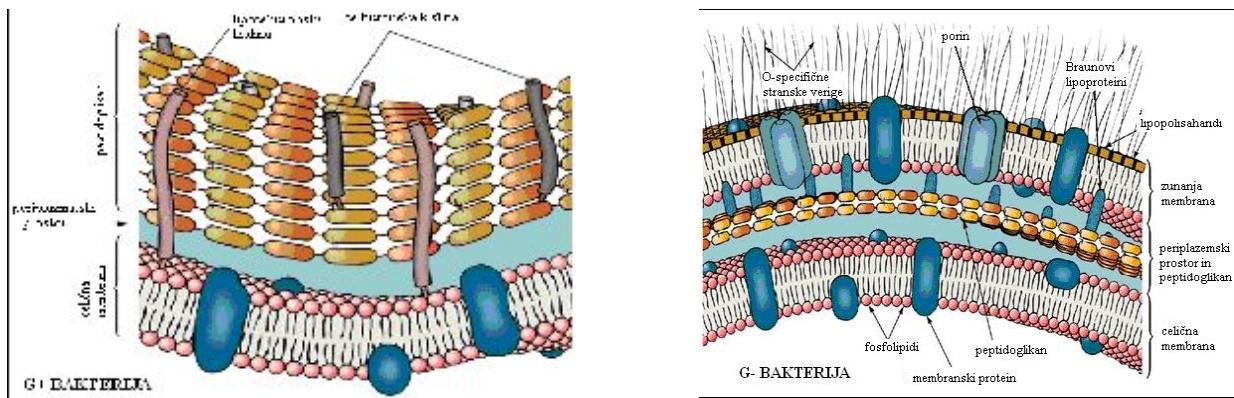
Razumevanje mehanizmov rezistence na protimikrobne učinkovine je pomembno za racionalno uporabo le-teh v klinični praksi in za razvoj novih protimikrobnih učinkovin, pri katerih bi preprečili razvoj odpornosti. S pomočjo racionalnega načrtovanja spojin, molekularne biologije, molekulskega modeliranja, genetike, kombinatorne kemije in bioinformatike je potrebno podrobno spoznati mehanizme rezistence ter iskati nova prijemališča in nove učinkovine kot potencialne kemoterapevtike.(8)

1.3 BAKTERIJSKA CELIČNA STENA

Bakterijska celična stena je toga, visoko strukturirana in mehansko zelo močna makromolekularna 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);
- sodeluje pri rasti in delitvi celice in
- preprečuje prebavo z gostiteljevimi encimi.(9)

Njen najpomembnejši sestavni del je peptidoglikan ali murein, ki s svojo trdnostjo zagotavlja preživetje celice v močno hipotoničnem okolju. Zaradi edinstvene zgradbe je peptidoglikan najprimernejša tarča protibakterijskih učinkovin. Od strukture celične stene je odvisno barvanje po Gramu, kar je najpogosteje uporabljena metoda za hitro karakterizacijo bakterij. Vobarvanem preparatu se po Gramu pozitivne bakterije (G+) obarvajo modrovijolično, po Gramu negativne bakterije (G-) pa rdeče.(3)



Slika 1: Razlika v zgradbi bakterijske celične stene med G+ in G- bakterijami. (preurejeno po (13))

1.3.1 CELIČNA STENA PO GRAMU POZITIVNIH BAKTERIJ

Celična stena G+ bakterij je preprostejša od celične stene G- bakterij. Zaradi višega osmotskega tlaka v notranjosti imajo precej debelejšo mureinsko ovojnico.(10) Sestavni deli kompleksne makromolekule so večplastni peptidoglikani ter anionski polimeri tehojske in teihuronske kisline. Večino celične stene sestavlja več plasti peptidoglikanov. Plasti je od 40 do 100, vendar je prepustnost snovi preko celične stene G+ bakterij zelo dobra. Tehojska kislina je anionski polimer, sestavljen iz enot glicerol fosfata ali ribitol fosfata, ki je kovalentno povezan na eni strani s plazemskega membrano in na drugi s peptidoglikani. Tak negativno nabit polimer deluje kot neke vrste dobavitelj magnezijevih ionov plazemski membrani.(3) Plast kislih polisaharidov (tehojska in teihuronska kislina) na mureinski ovojnici skupaj s proteini tvorijo antigenske determinante in omogočajo bakteriji pritrjevanje na različne tarčne celice.(5)

1.3.2 CELIČNA STENA PO GRAMU NEGATIVNIH BAKTERIJ

Celična stena G- bakterij je bolj kompleksna in lipidna. Od citoplazemske membrane navzven je sestavljena iz:

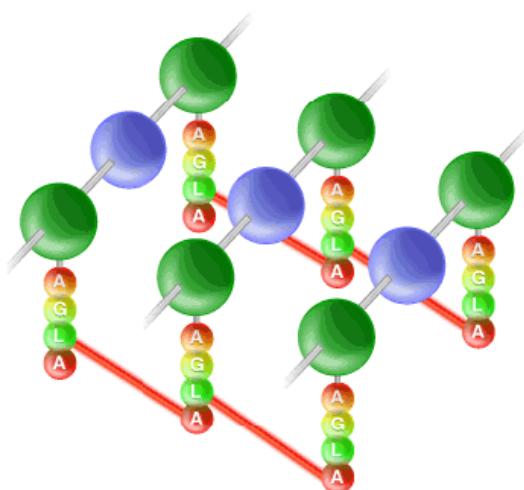
- periplazemskega prostora, ki vsebuje številne vezavne proteine in encime (β -laktamaze, ki inaktivirajo β -laktamske antibiotike);
- enojne ali dvojne plasti peptidoglikana povezane z lipoproteinskimi molekulami usmerjenimi navzven;
- zunanje ovojnica zgrajene iz fosfolipidnega dvosloja, ki vsebuje porine (transmembranske proteinske kanalčke). Ovojnica je na notranji strani povezana preko lipoproteinskih molekul s peptidoglikanom in

- kompleksnih lipopolisaharidov, ki so pritrjeni na zunanjo površino celice in predstavljajo glavno antigensko determinanto, ki sproži imunski odgovor gostitelja.(7)

Zaradi zunanje membrane je v primerjavi z G+ bakterijami prepustnost celične stene G-bakterij zelo zmanjšana. Če lahko skozi celično steno G+ bakterij prehajajo spojine z molsko maso 70000 in več, pa pri G- bakterijah skozi 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)

1.4 PEPTIDOGLIKAN

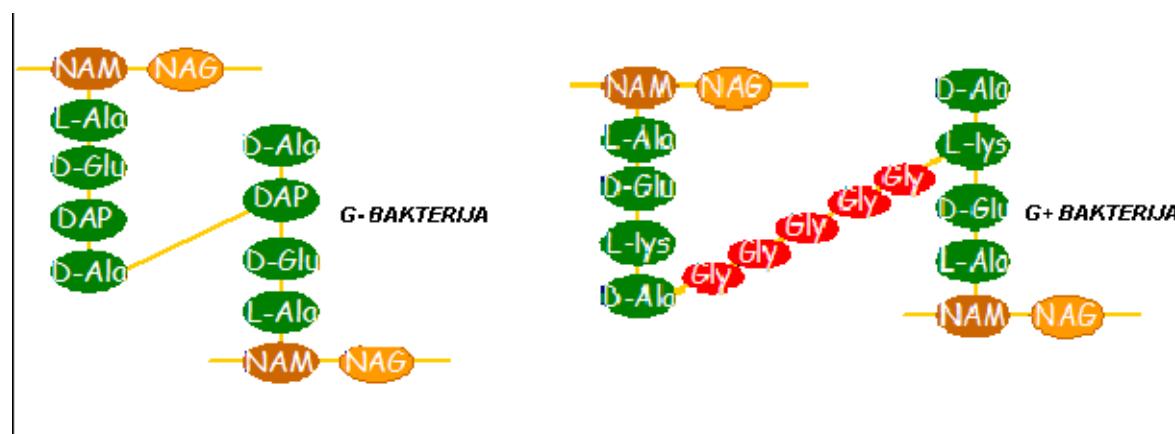
Peptidoglikan je kovalentni linearni glikanski polimer, sestavljen iz izmenjujočih se enot *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminske kisline (MurNAc), ki so med seboj povezane z 1,4- β glikozidno vezjo. *N*-acetilmuramska kislina je derivat *N*-acetilglukozamina (GlcNAc), ki ima na C-3 atomu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



Slika 2: Struktura bakterijskega peptidoglikana; N-acetilglukozamin predstavlja zelena kroglica, N-acetilmuramsko kislino pa modra kroglica; A: L-alanin, G: D-glutaminska kislina, L:L-lizin. (preurejeno po (15))

Na karboksilno skupino vsakega ostanka muraminske kisline je s peptidno vezjo pripeta veriga štirih aminokisel: L-alanina (L-Ala), D-glutaminske kisline (D-Glu), mezo-diaminopimelinske kisline (mDAP) ali L-lizina (L-Lys), D-alanina (D-Ala). Tetrapeptidne verige na sosednjih glikanskih vlaknih so medsebojno povezane in tvorijo prečno povezan

polimer. D-aminokisline so v naravi redke in se nahajajo večinoma le v peptidoglikanih.(3) Posledica je velika odpornost peptidoglikanov na hidrolizo z gostiteljivimi peptidazami. Med posameznimi vrstami bakterij obstajajo strukturne in kemijske razlike v zgradbi peptidoglikana, predvsem v sestavi peptidne verige. Pri G+ bakterijah je na tretjem mestu v peptidni verigi večinoma aminokislina L-lizin, medtem ko pri G- bakterijah na tem mestu večinoma prevladuje mezo-diaminopimelinska kislina (m-DAP).(11) Razlike nastajajo tudi v prečnih povezavah med sosednjimi glikanskimi verigami. Pri večini G- bakterij so prečne povezave sestavljene iz neposredne peptidne vezi med karboksilno skupino četrte aminokisline (D-alanina) ene glikanske verige in prosto amino skupino tretje aminokisline sosednje glikanske verige. V primeru G+ bakterij pa terminalno karboksilno skupino D-alanina ene verige in prosto amino skupino tretje aminokisline v drugi verigi povezuje most iz petih glicinskih ostankov.(2)



Slika 3: Razlika med prečnimi povezavami peptidoglikanskih vlaken G+ in G- bakterij; z NAM je označena N-acetilmuraminska kislina, z NAG pa N-acetylglukozamin.(preurejeno po (16))

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 %. (2)

1.4.1 BIOSINTEZA PEPTIDOGLIKANOV

Za normalno rast in razmnoževanje bakterij je ključnega pomena nemotena funkcija celične stene, katere glavni sestavni del je makromolekula peptidoglikana. Z zaviranjem biosinteze peptidoglikana lahko odločilno prizadenemo njegovo strukturo in s tem vplivamo na preživetje celotne bakterije. Čeprav pri G+ in G- bakterijah obstajajo razlike v strukturi in

sestavi peptidoglikanov, so številne študije o sintezi peptidoglikanov pokazale, da obstaja enaka biosintezna pot pri vseh evbakterijah (npr. *Escherichia coli*).

Biosinteza peptidoglikana je kompleksen proces sestavljen iz treh stopnj:

- sinteza prekurzorjev v citoplazmi;
- prenos prekurzorjev do lipidnega nosilca, ki jih prenese čez citoplazemskega membrano in
- prehod prekurzorjev v celično steno ter njihova vgradnja v peptidoglikan.(3)

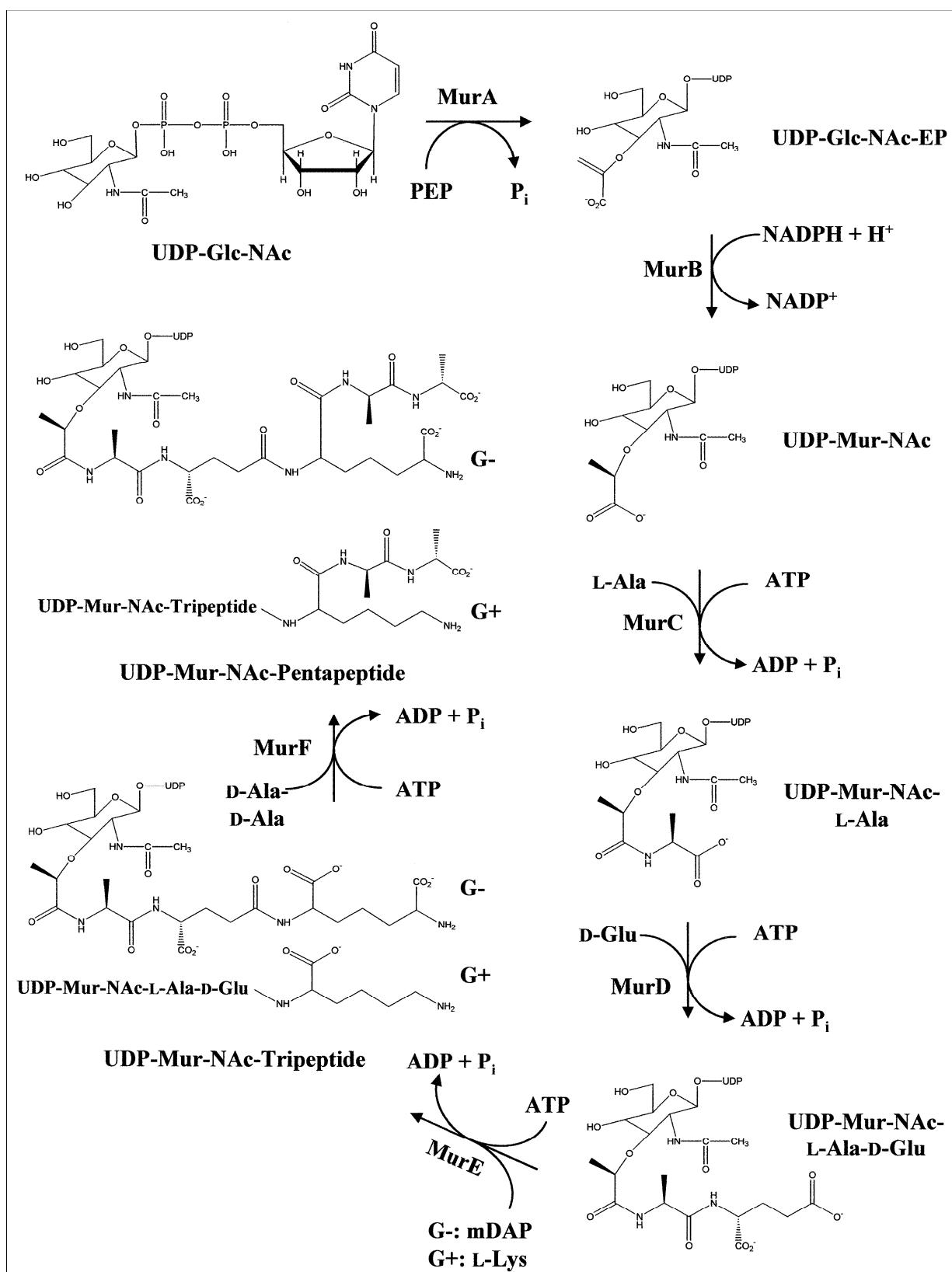
Sinteza prekurzorjev v citoplazmi

Prvi korak sinteze peptidoglikanov je nastanek glukozamin-1-fosfata iz primarnega metabolita fruktoze-6-fosfata v treh stopnjah. Sledi mu nastanek uridin difosfata *N*-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc) s pomočjo encima GlmU (*N*-acetil-1-fosfat glukozamin uridiltransferaza). Sinteza UDP-GlcNAc iz glukozamin-1-fosfata vključuje prenos acetilne skupine in uridina ob prisotnosti koencima A (AcCoA) in UTP. UDP-GlcNAc je potreben tudi za sintezo lipopolisaharidov pri G- bakterijah, zato je GlmU zanimiva tarča za antibiotično terapijo, a zaenkrat še ne poznamo nobenega specifičnega zaviralca tega encima.

V naslednjih dveh stopnjah bakterije pretvorijo UDP-GlcNAc v UDP-*N*-acetilmuraminsko kislino (UDP-MurNAc). Najprej encim MurA (UDP-GlcNAc enolpiruvat transferaza) katalizira prenos enolpiruvata iz fosfoenolpiruvata (PEP) na 3'-hidroksi skupino UDP-GlcNAc preko tetraedričnega intermediata in tako nastane UDP-GlcNAc enolpiruvat.

Nadalje encim MurB (*N*-acetilenolpiruvilglukozamin reduktaza), ob prisotnosti kofaktorja flavoproteina (FAD) in nikotinamida (NADPH), katalizira redukcijo enolpiruvatne skupine UDP-GlcNAc-enolpiruvata do D-laktoilne, s čimer nastane UDP-MurNAc.(11)

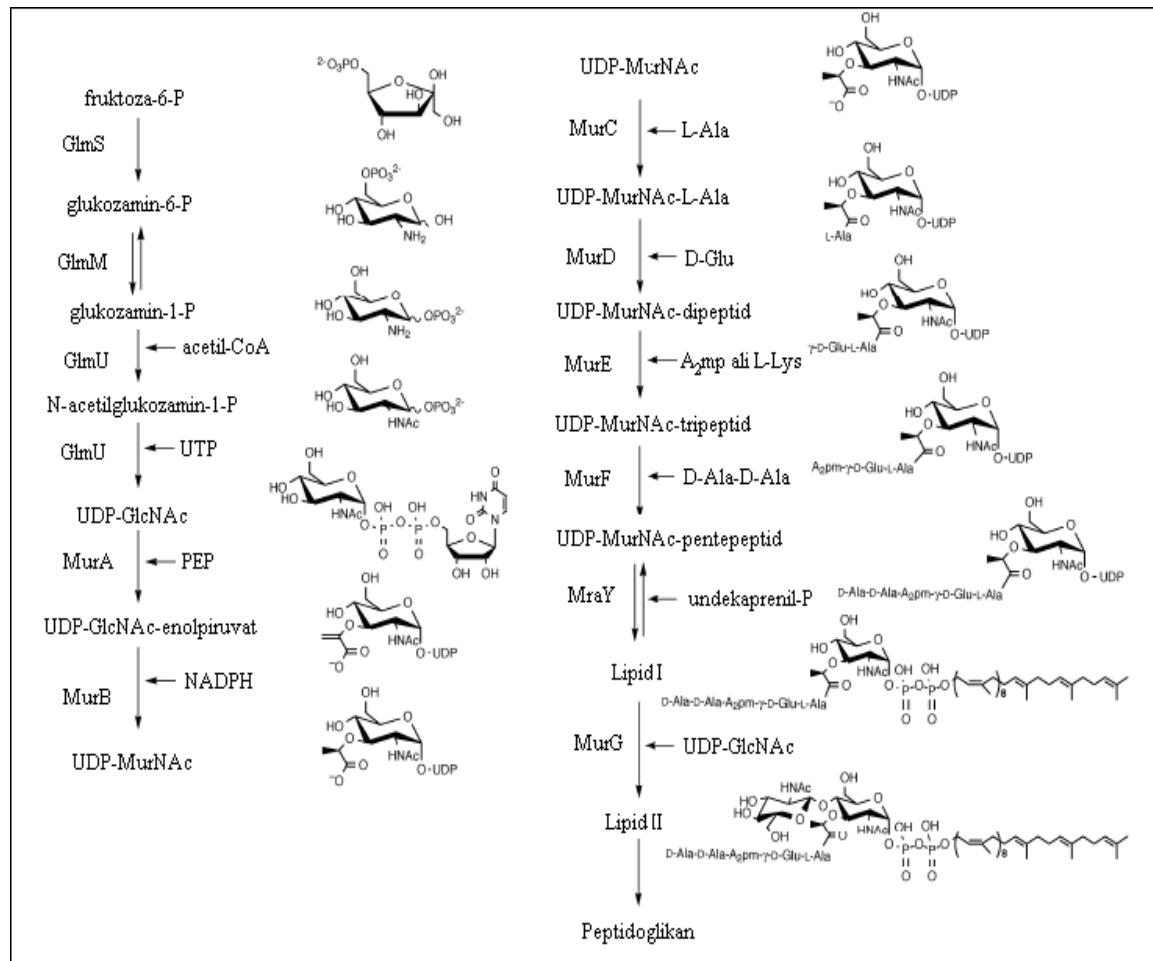
Končni citoplazemski prekursor biosinteze peptidoglikana je UDP-MurNAc-pentapeptid, nastane pa tako, da se na prosto karboksilno skupino UDP-*N*-acetilmuraminske kislino preko amidne vezi postopoma vežejo L-alanin (reakcijo katalizira MurC), D-glutaminska kislina (s pomočjo encima MurD) in *mezo*-diaminopimelinska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



Slika 4: Sinteza nukleotidnih citoplazemskih prekurzorjev peptidoglikana.(2)

Prenos prekurzorjev do lipidnega nosilca, ki jih prenese čez citoplazemsko membrano

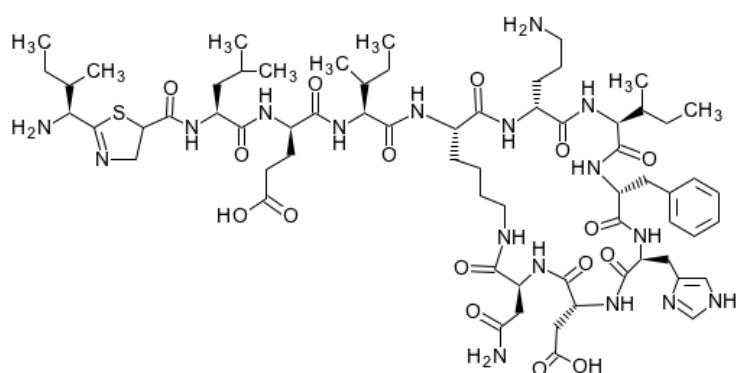
V prvi stopnji se UDP-MurNAc-pentapeptid najprej poveže s fosforiliranim lipidnim nosilcem undekaprenil fosfatom imenovanim tudi C55-izoprenoid fosfat, pri čemer se sprosti molekula UMP.(11) Reakcijo katalizira membranski encim MraY (fosfo-MurNAc-pentapeptid translokaza), inhibirajo pa jo antibiotiki amfomicin, moenomicin in mureidomicin. Na nastalo strukturo imenovano tudi lipid I se s pomočjo membranskega encima MurG (GlcNAc transferaza) z 1,4- β glikozidno vezjo pripne GlcNAc iz UDP-GlcNAc. Pri reakciji se zopet sprosti UMP. Nastali prekurzor imenujemo lipid II. Disaharid pentapeptid se nato prenese na zunanjou stran bakterijske membrane. Mehanizem te translokacije zaenkrat še ni poznan.(3)



Slika 5: Biosinteza peptidoglikana.(preurejeno po (12))

Vgradnja prekurzorjev v peptidoglikan

Vključevanje prenesenega gradnika v obstoječe peptidoglikane se začne s povezovanjem sladkornih enot. Reakcijo transglikozilacije katalizira GlcNAc-pentapeptid transglikozilaza. Ker so rastoči peptidoglikani v procesu transglikozilacije že povezani z lipidnim nosilcem, se v tej stopnji ena molekula lipidnega nosilca odcepi in obnovi z defosforilizacijo v obliki pirofosfata, kar katalizira membranski encim undekaprenil pirofosfat fosfataza. Obnova lipidnega nosilca inhibira ciklični polipeptidni antibiotik bacitracin A, ki tvori z lipidnim nosilcem obstojne komplekse.



C15482

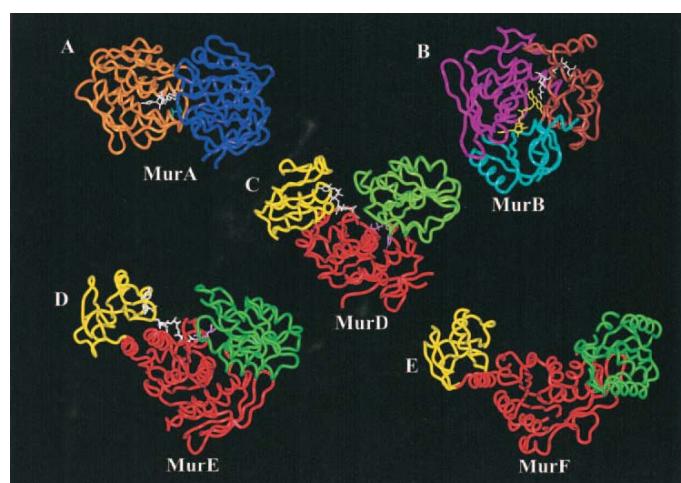
Slika 6: Bacitracin A (preurejeno po (14)).

V zadnji stopnji biosinteze peptidoglikanov nastanejo prečne povezave med peptidnimi verigami na sosednjih glikanskih vlaknih, zbranih na lipidnem nosilcu na zunanji strani citoplazemske membrane.(3) Ključno vlogo pri tem procesu ima D-Ala-D-ala enota pentapeptidne verige, kamor se veže transpeptidaza.(11) Hidroksilna skupina serinskega preostanka v aktivnem mestu transpeptidaze kot nukleofil napade amidno vez med obema D-alaninoma, pri čemer se tvori aktiviran acilni intermedijat. Pri tem se odcepi terminalni D-Ala. Sledi nastanek amidne vezi z nukleofilnim napadom proste ϵ -amino skupine mezo-diaminopimelinske kisline ali pentaglicinskega mostu sosednje glikanske verige na acilni intermedijat, pri čemer se encim regenerira.(5)

Najpomembnejši inhibitorji transpeptidaz so β -laktamski antibiotiki, ki delujejo kot mimetiki dipeptida D-Ala-D-Ala terminalnega dela MurNAc-pentapeptida. Ti tvorijo stabilnejši acilni kompleks s transpeptidazo, kot ga ta tvori s peptidoglikanom, zato zelo učinkovito in ireverzibilno inhibirajo transpeptidacijo.(11)

1.5 MUR ENCIMI

Mur encimi so bistvenega pomena za preživetje bakterije. Kakršnakoli okvara na enem od encimov ustavi sintezo peptidoglikanov, kar vodi v propad celice. Razen naravnega antibiotika fosfonomicina, ki ireverzibilno inhibira encim MurA, ni znan še noben terapevtsko uporaben inhibitor, ki bi inhibiral katero od citoplazemskih stopenj biosinteze peptidoglikanov. Glede na splošno razširjenost peptidoglikana v bakterijskem svetu in veliko strukturno podobnost teh encimov med vrstami lahko pričakujemo, da bi bil potencialni inhibitor Mur ligaz širokospektralen in baktericiden.(17)



Slika 7: Mur encimi. (2)

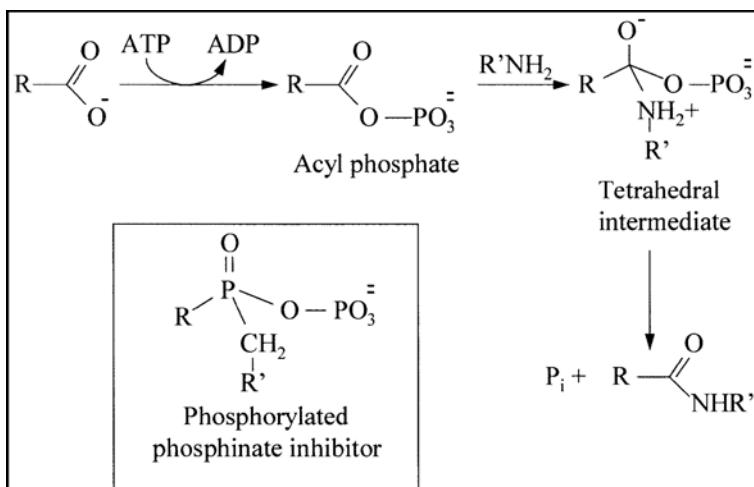
Vse Mur ligaze so zgrajene iz treh domen:

- N-terminalna domena je odgovorna za vezavo UDP dela UDP-*N*-acetilmuraminske kisline;
- centralna domena je odgovorna za vezavo ATP-ja;
- C-terminalna domena pa veže vstopajočo aminokislino.(17)

Do sedaj znane kristalne strukture ligaz kažejo na veliko medsebojno podobnost, predvsem pri vezavnih mestih za ATP, ki je substrat vseh Mur ligaz. Mur ligaze spadajo v skupino od ATP-ja odvisnih encimov (MurC-MurF), ki s pomočjo adenozin trifosfata (ATP) aktivirajo karboksilno skupino substrata. Ligaze, ki so odvisne od ATP-ja, lahko izvedejo njegovo hidrolizo ATP-ja na dva različna načina:

- ATP razpade na adenozin difosfat (ADP) in anorganski fosfat (Pi);
- ATP se hidrolizira do AMP in anorganskega pirofosfata (PPi).(17)

Ligaze MurC do MurF katalizirajo neribosomalni nastanek peptidne vezi vezi ob sočasni razgradnji ATP-ja v ADP in anorganski fosfat (Pi). Encim najprej fosforilira karboksilno skupino UDP-*N*-acetilmuraminske kisline (UNAM) ali UNAM peptida s pripetjem γ -fosfatne skupine ATP in tako nastane acilni intermediat. Tako aktivirano karboksilno skupino napade nukleofilna amino skupina vstopajoče aminokisline in tvori tetraedrično prehodno stanje, ki predstavlja izhodišče za načrtovanje inhibitorjev Mur ligaz.(18) Po teoriji encimske katalize imajo encimi (peptidaze, ligaze) največjo afiniteto ravno do prehodnega stanja. Zato se mimetiki prehodnega stanja, torej stabilne spojine, ki posnemajo prostorsko razporeditev funkcionalnih skupin in naboja v sicer kratkoživih prehodnih stanjih, uspešno uporabljajo pri načrtovanju encimskih inhibitorjev.(37) Po odcepitvi fosfata nastane nova peptidna vez. Biokemijske študije potrjujejo nastanek acilfosfatnega intermediata in učinkovitost fosfinatnih inhibitorjev v posnemanju tetraedričnega prehodnega stanja.(18)



Slika 8: Prikaz tetraedričnega prehodnega stanja in fosforiliranega fosfinatnega inhibitorja.(2)

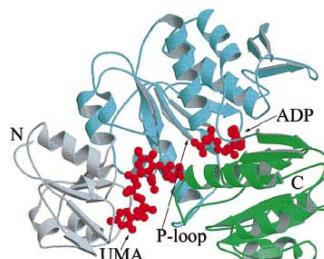
Največje razlike v aminokislinskem zaporedju in strukturi med Mur ligazami predstavlja N-terminalna domena. MurC in MurD imata podobno strukturo N-terminalne domene, medtem ko imata MurE in MurF popolnoma drugačno strukturo. Razlike v tej domeni lahko povezujemo z različno velikostjo substrata vsakega encima. Razdalje med ATP vezavnim mestom in UDP vezavnim mestom se od MurC-ja do MurE-ja postopno večajo skladno z daljšanjem substrata. UDP vezavno mesto v MurD-ju ima homologno strukturo z isto domeno v MurC-ju, vendar je prva domena glede na drugo domeno premaknjena za približno 50°. Podobno se verjetno z rotacijo prve domene glede na drugo domeno omogoči vezava še daljšega substrata MurF.(18)

1.5.1 MurD

Mur D je od ATP odvisna ligaza, ki katalizira pripenjanje D-glutaminske kisline na UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanin. Mehanizem nastanka peptidne vezi je podoben mehanizmu reakcij drugih Mur sintetaz. S fosforilacijo karboksilne skupine UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanina nastane acilfosfatni intermedijat, katerega v naslednji stopnji nukleofilno napade amino skupino D-glutaminske kisline. Pri tem nastane tetraedrično prehodno stanje, ki razпадa na UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutaminsko kislino, ADP in anorganski fosfat. Zanimanje za to Mur ligazo je še posebej veliko, saj je L-Ala-D-Glu povezava prisotna v peptidoglikanih vseh evbakterij. Najbolje je preučen encim iz *E. coli*.(19)

Sestava Mur D

Sestavljen je iz treh globularnih domen. Aktivno mesto se nahaja v kotanji, obdani z vsemi tremi domenami. N-terminalna domena je odgovorna za vezavo uridinfosfatnega dela substrata UDP-MurNAc-L-ala, centralna domena veže ATP in preostali del substrata UDP-MurNAc-L-Ala, C-terminalna domena pa veže D-glutamatni ostanek produkta UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu.(20)

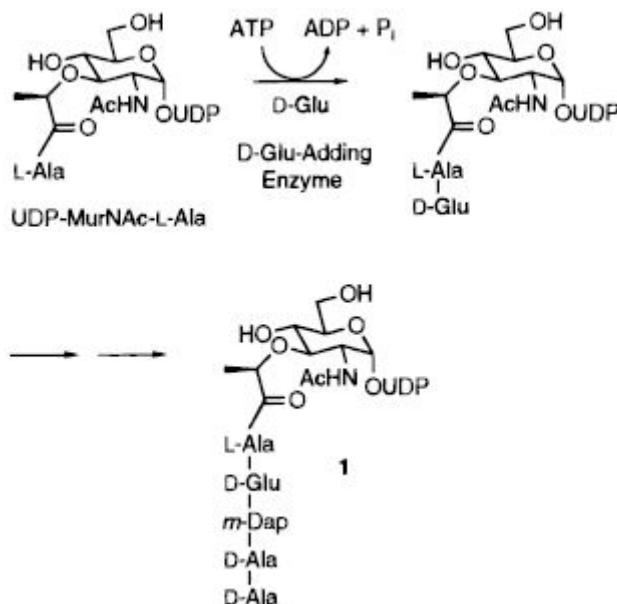


Slika 9: Prikaz vezave UMA in ADP na encim MurD. (20)

Za uspešno ligacijo UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanina (UMA) in D-glutaminske kisline (D-Glu) mora encim MurD zblizati substrata UMA in ATP, da nastane acil-fosfatni intermedijat in orientirati D-Glu za nukleofilni napad ter stabilizirati tetraedrični intermedijat, s čimer zniža aktivacijsko energijo za uspešen potek reakcije.(20)

Inhibitorji MurD

Leta 1995 so M. E. Tanner in sodelavci sintetizirali prve fosfinatne inhibitorje MurD kot analoge tetraedričnega prehodnega stanja.



Slika 10: Struktura UDP-MurNAc pentapeptida 1 in reakcija katalizirana z encimom, ki vsebuje D-glutaminsko kislino.(prirejeno po 21)

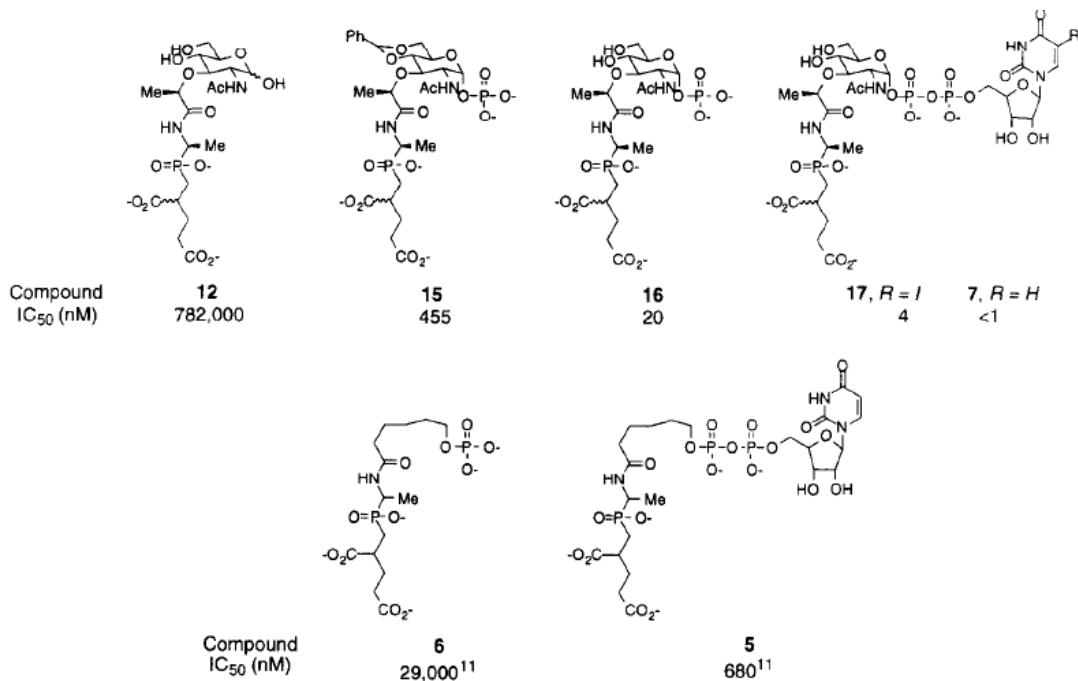
Stabilne spojine, ki posnemajo strukturne in elektronske pojave prehodnega stanja oziroma visoko-energijskega intermediata, imenujemo analogi prehodnega stanja. Te spojine posnemajo specifične interakcije med substratom in encimom. Interakcije substrata z aminokislinskimi ostanki v aktivnem mestu encima omogočijo pravilno umestitev substrata na aktivnem mestu in znižajo aktivacijsko energijo reakcije ter tako omogočijo lažji nastanek prehodnega stanja, ki nato razпадa v produkte.(17)

Fosfinatni inhibitorji se v aktivnem mestu encima s pomočjo ATP-ja fosforilirajo, nastala fosforil fosfinatna struktura pa je zelo dober mimetik tetraedričnega intermediata, ki se tvori pri normalnem poteku reakcije. Podobna elektronska struktura omogoča, da se tesno veže z encimom, zato so analogi prehodnega stanja zelo močni inhibitorji encimov.

Kompleks fosforiliran inhibitor – encim je bil potrjen z rentgensko difrakcijsko analizo pri ATP-odvisnih ligazah D-Ala-D-Ala ligazi in glutation sintetazi; pričakuje se enak način inhibicije pri MurC-F encimih.

Spojine so pripravili s posnemanjem UDP-NAc-Mur-L-Ala-D-Glu (UMAG), pri čemer so uporabili fosfinatno skupino, ki je derivat ustrezno substituirane fosfinske kisline, kot analog dipeptida in analog prehodnega stanja ter zamenjali *N*-acetil-muraminsko kislino s pentametilensko verigo.(21)

Leta 1997 so pri družbi *Merck* (Gegenas in sodelavci) z uporabo fosfinatnega analoga prehodnega stanja pripravili spojino z IC_{50} manjšo od 1 nM. V UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu so zamenjali le peptidno vez med L-Ala in D-Glu s fosfinatno skupino.



Slika 11: Fosfinatni inhibitorji družbe Merck in Tannerja (prirejeno po 22)

Ugotovili so da vključitev muraminske kisline in resolucija enega stereoselektivnega centra znatno poveča učinkovitost, celo za 3 velikostne razrede. Povečana učinkovitost je razvidna, če primerjamo Tannerjev inhibitor 6 (29000 nM) in njihov inhibitor 16 (20 nM), primerjava njihovega uridinskega inhibitorja 7 (<1 nM) in Tannerjevega uridinskega inhibitorja 5 (680 nM). V primeru da od njihovega fosfatnega inhibitorja 16 odvzamemo fosfatno skupino 12 (ostane prosta hidroksilna skupina) se zveča IC_{50} iz 20 nM pri spojini 16 na 782000 nM pri spojini 12. Od tod je sledil sklep, da je tudi fosfatna skupina izrednega pomena za samo inhibitorno delovanje.(22)

Leta 2005 so na *Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani* (Štrancar in sodelavci) sintetizirali serijo fosfinatnih inhibitorjev. Ugotovili so, da imata največje inhibitorno delovanje spojina 12g ($95\pm15\mu M$) ter spojina 12c ($78\pm19\mu M$). (23)

Compound	R ⁴	RA (%) ^a
12g		8 ± 1 (78 ± 19 µM)
22		100 ± 5
12c		17 ± 1 (95 ± 15 µM)
21		91 ± 1
8a		40 ± 2
23		92 ± 1

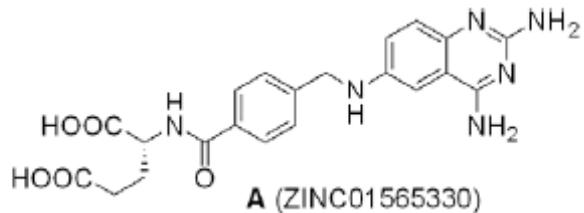
Slika 12: Fosfinatni inhibitorji sintetizirani na fakulteti za farmacijo, Ljubljana.(prirejeno po 23)

Raziskovalna skupina Univerze v Leedsu je z računalniškim modeliranjem odkrila nov razred MurD inhibitorjev, ki temeljijo na ciklični peptidni strukturi. Pri podrobнем pregledu aktivnega mesta znotraj rentgenske kristalne strukture encima MurD z vezavnim substratom so odkrili hidrofobno regijo znotraj vezavnega mesta, ki je naravni substrat ob vezavi ne zavzame. Ugotovili so, da lahko povečajo vezavo poenostavljenega analoga substrata z vezavo alkilnih skupin v hidrofobni regiji. Tako je nastala ideja o makrociklu, v katerem je L-Ala ostanek povezan z N-acetilno skupino MurNAc preko verige metilenskih skupin. Pri analizi inhibitornih koncentracij sintetiziranih spojin so ugotovili, da imajo boljšo zaviralno delovanje R konformeri eksociklične karboksilne skupine.(24)

n	konformacija	X	IC ₅₀ (µM)
2	S	-H	5,1
2	R	-H	1,5
3	S	-H	3,2
3	R	-H	1,5
2	S	-OH	2,3
2	R	-OH	0,7
2	S	-OtBu	9,0

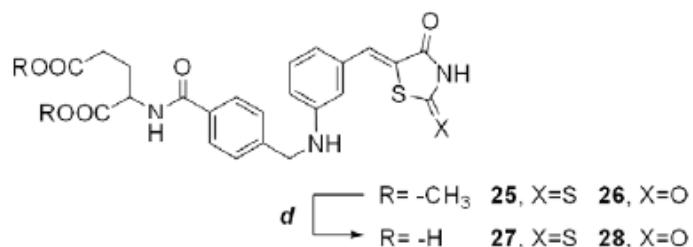
Slika 13: Makrociklični tip inhibitorja.(24)

Leta 2008 so na Fakulteti za farmacijo (Tomašić in sodelavci) objavili nov potencialni inhibitor MurD, ki so ga pridobili z virtualnim rešetanjem z uporabo FlexX programske opreme za sidranje.



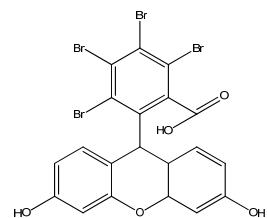
Slika 14: Najvišje razvrščena spojina v virtualnem rešetanju.(25)

Na podlagi virtualnega rešetanja so poskušali pridobiti nove potencialne inhibitorje. Objavili so sintezne poti in inhibitorno aktivnost seriji čistih enantiomerov, ki v svoji strukturi vsebujejo L- ali D- glutaminsko kislino. Delovali naj bi kot inhibitorji encima MurD v *E. coli*. Največjo inhibitorno aktivnost na encimu MurD sta izkazovali spojini (R)-27 (174 µM) in (S)-27 (206 µM), ki vsebujeta v svoji strukturi 5-benzilidenrodanin.(25)



Slika 15: Spojini 27 sta izkazovali največjo inhibitorno aktivnost.(25)

Istega leta so na *Fakulteti za farmacijo* v Ljubljani (Turk s sodelavci) s pomočjo virtualnega screeninga odkrili nove inhibitorje encimov MurD in MurF. Izmed 50 najboljših spojin iz screeninga so za vsak encim posebej ovrednotili biokemično aktivnost. Za nadaljnjo raziskovanje so bile zanimive štiri spojine z delovanjem na encim MurD (10 µM) in ena spojina z delovanjem na encim MurF (63 µM).(26)



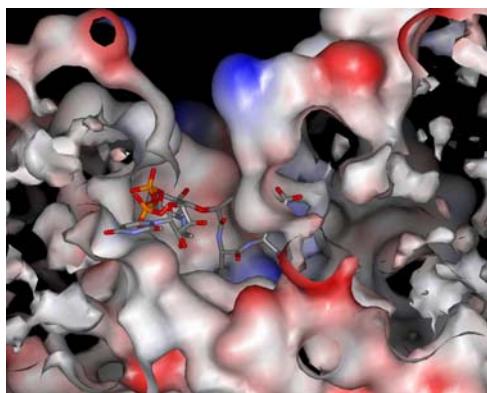
Slika 16: Spojina 119889 z inhibitornim delovanjem na MurD.(preurejeno po 26)

2 NAČRT ZA DELO

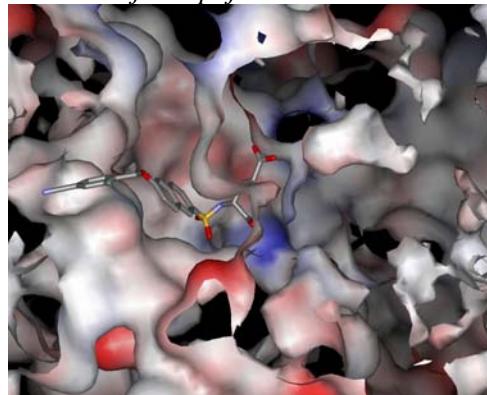
2.1 NAČRTOVANJE ANALOGOV PREHODNEGA STANJA ENCIMA MURD

Glavni cilj je bil iskanje novega inhibitorja encima MurD, ključnega encima v biosintezi peptidoglikana. Izhajali smo iz strukture naravnega produkta encimske reakcije (UMAG), oziroma njegovega prehodnega stanja, ki smo ga želeli posnemati z načrtovanjem naših inhibitorjev.

Z našimi spojinami smo ciljali na vezavni mesti za D-Glu in uridin v nativnem ligandu. Ta povezava gre preko sladkorne enote (NAcMan) ter difosfata. Zaradi razmeroma prostega vezavnega mesta, lahko gradimo molekulo z direktno povezavo med D-Glu mimetikom in mimetikom uridina (slika 18), v primerjavi s Tannerjevimi spojinami, pri katerih povezava ni direktna (slika 17). Vmes je lipofilno območje, zato vse kaže na to, da je fenilni substituent ravno pravšnji za to povezavo.



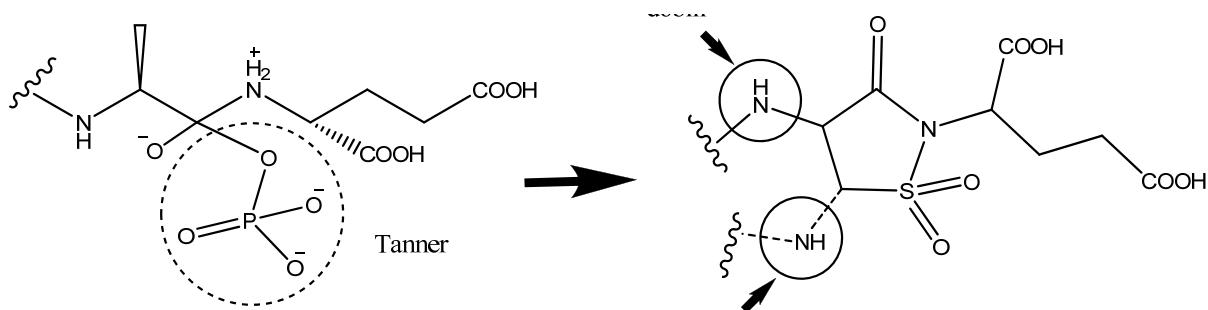
Slika 17: Umetitev Tannerjeve spojine v aktivno mesto encima MurD (21)



Slika 18: Direktna povezava med D-Glu mimetikom in mimetikom uridina v aktivno mesto encima MurD (40)

Iz predhodnih raziskav je bilo ugotovljeno, da je encim MurD visoko specifičen za D-Glu kot substrat, zato smo ga tudi mi vključili v našo strukturo. Dioksidirano žveplo v izotiazolidin-3-onskem skeletu predvidoma oponaša tetraedrični ogljikov atom prehodnega stanja encimske reakcije. Sam cikel daje naši spojini večjo stabilnost in rigidnost. V primeru »zamrznitve« pravilne konformacije lahko na ta način zmanjšamo entropijske izgube pri vezavi potencialnega inhibitorja v vezavno mesto in zato dosežemo višjo afiniteto spojin do encima in močnejše delovanje.

2.2 SINTEZNI NAČRT

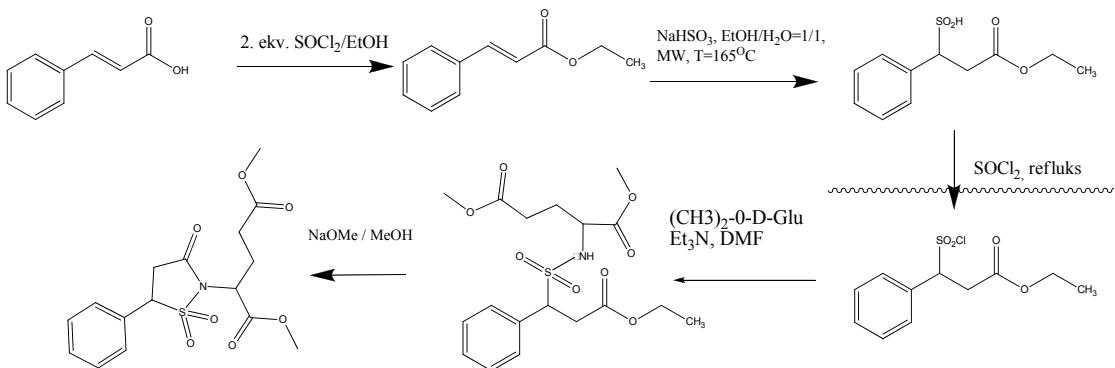


Slika 19: Nastanek stabilnega analoga peptidne vezi

V prvem delu našega raziskovanja bomo poskušali po dveh različnih sinteznih poteh pripraviti izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid, ki bi predstavljal stabilni analog peptidne vezi, hkrati pa bi omogočal posnemanje tetraedrične strukture prehodnega stanja. Na mestu 2 naj bi imel vezano glutaminsko kislino, na mestu 5 pa amino ali amidno skupino.

Shema 1:

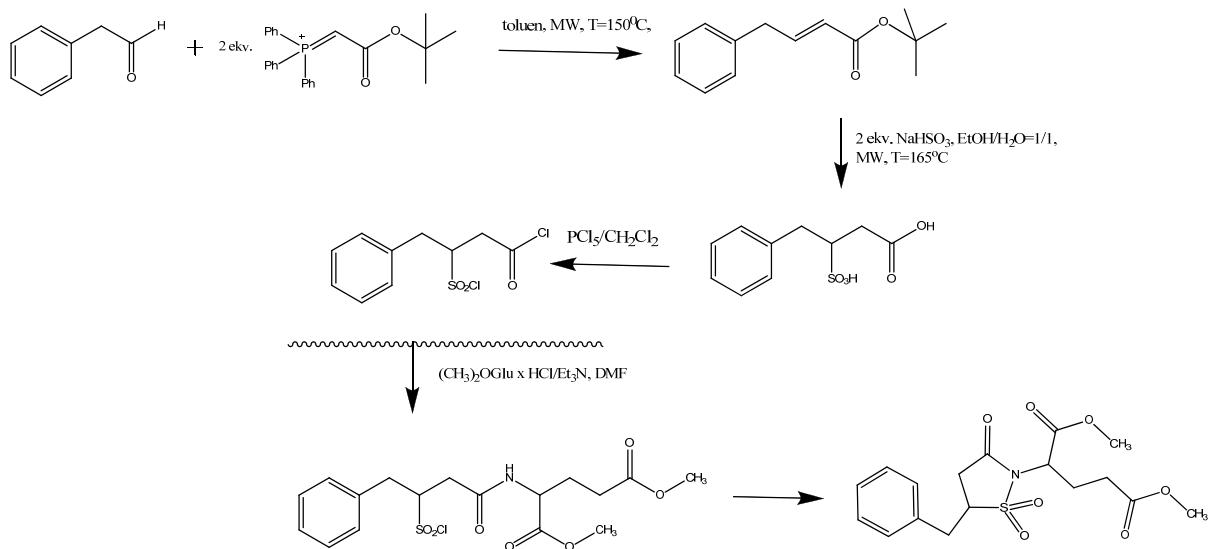
Kot začetni substrat bomo uporabili cimetno kislino, katero bomo s tionilkloridom pretvorili v kislinski klorid in nato zaščitili z etanolom. Na dvojno vez bomo z Michaelovo 1,4 adicijo vezali sulfonsko skupino, jo klorirali s tionilkloridom ter s tem pridobili bolj reaktivno spojino, ki bo nato kot elektrofil reagirala z amino skupino D-glutaminske kisline.



Slika 20: Shema 1

Shema 2:

V prvi stopnji bomo z Wittigovo reakcijo iz aldehida in fosforana pripravili ustrezni alken, na katerega bomo z elektrofilno adicijo vezali sulfonsko skupino. Pod pogoji v mikrovalovnem reaktorju poleg elektrofilne adicije poteka tudi odščita terc-butilne zaščite ter s tem nastanek proste karboksilne skupine. V naslednji stopnji sledi kloriranje s fosforjevim pentakloridom.



Slika 21: Shema 2

V shemi tri je prikazana sintezna pot priprave izotiazolidin-3-on-1,1-dioksida, ki naj bi oponašal tetraedrični ogljikov atom prehodnega stanja encimske reakcije. Na mestu 2 naj bi imel vezano glutaminsko kislino, na mestu 4 pa amino ali amido skupino.

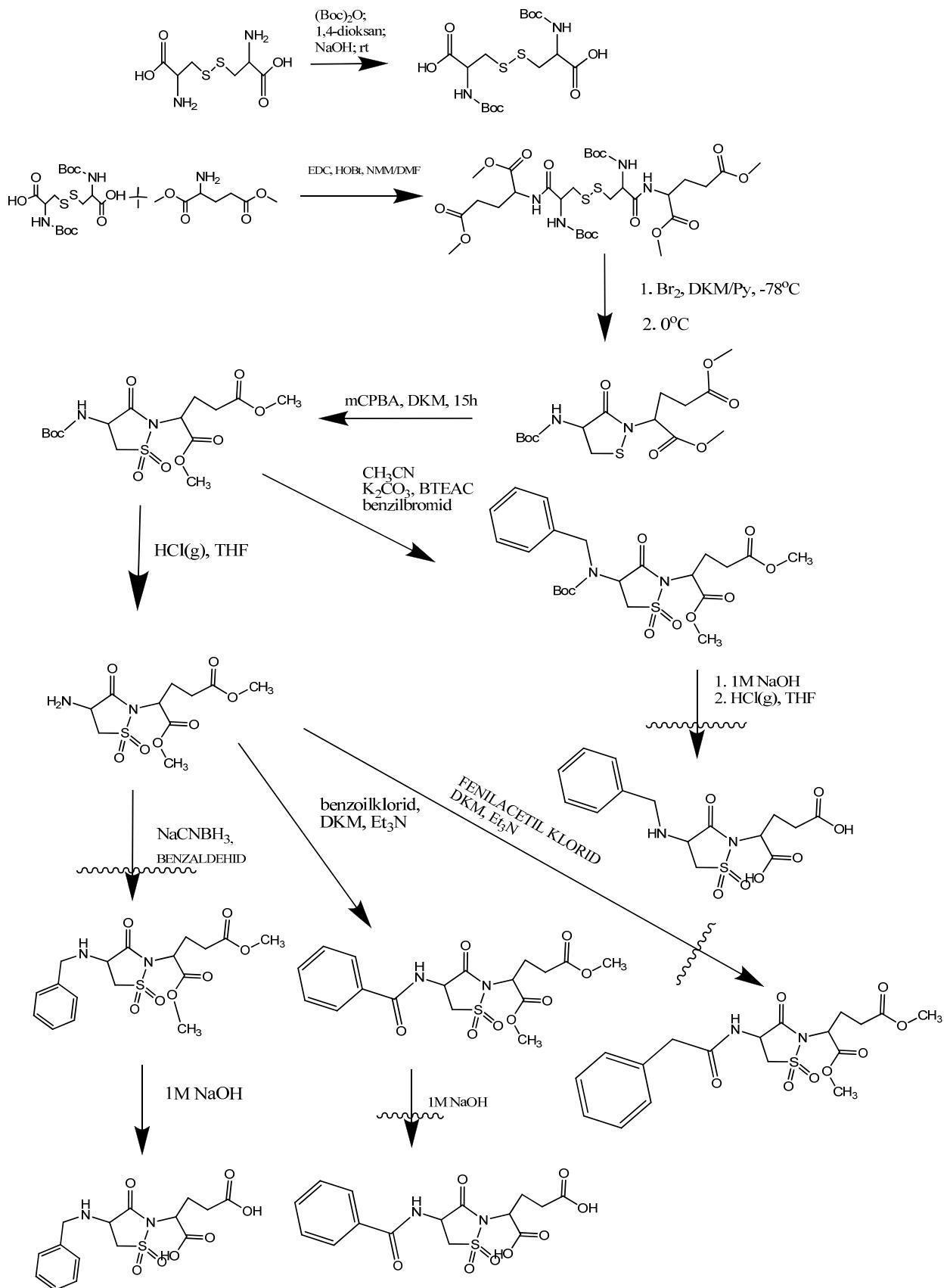
Shema 3:

Kot začetni substrat bomo uporabili L-cistin, katerega oba amina bomo v prvi stopnji zaščitili z di-terc-butil dikarbonatom (Boc_2O) (spojina 7). Kot drugi substrat bomo uporabili D-

glutaminsko kislino, pri kateri bomo s tionilkloridom in metanolom tvorili metilne estre na obeh karboksilnih skupinah (spojina 8). Med prosto karboksilno skupino spojine 7 in prosto amino skupino spojine 8 bomo nato z metodo EDC/HOBt tvorili amidno vez. V naslednji stopnji bomo z Br₂ pod nizkim temperaturnimi pogoji (-78° C) izvedli ciklizacijo ter s tem pridobili izotiazolidin-3-on, katerega sulfid bomo v naslednji stopnji oksidirali do dioksida (spojina 11).

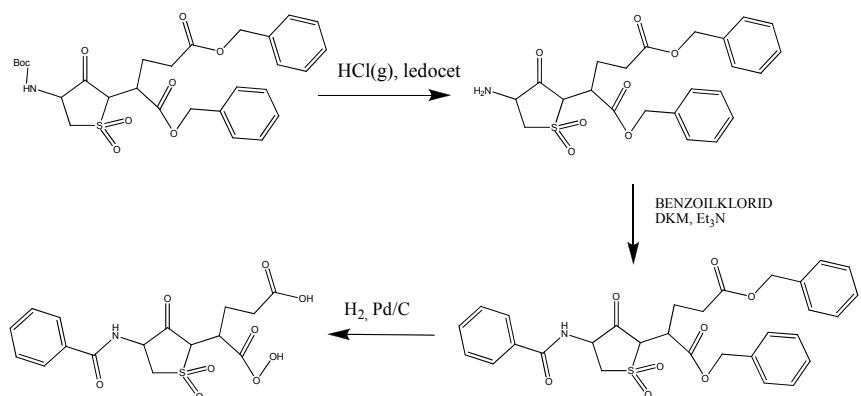
V drugem delu našega raziskovanja bomo poskušali z analogi benzena tvoriti amino in amidno vez ter s tem pripraviti del, ki se predvidoma umešča v lipofilno območje proti uridin-vezavnemu mestu. S tem bomo zmanjšali hidrofilne lastnosti, ki jih ima UMAG.

1. Na spojini 11 z nukleofilno substitucijo izvedemo *N*-alkiliranje z benzilbromidom. V naslednji stopnji smo želeli z alkalno hidrolizo odpraviti metilni zaščiti na karboksilni skupini.
2. Na spojini 11 bomo z vpihanjem plinastega HCl odpravili Boc zaščito ter s tem pridobili prosto amino skupino (spojina 12).
3. Na spojino 12 bomo z reduktivnim aminiranjem (katalizator natrijev cianborhidrid) uvedli benzaldehid (spojina 13).
4. Z reakcijo kislinskih kloridov (fenilacetil klorid in benzoil klorid) in spojine 12 bomo poskušali tvoriti amidno vez (spojina 16, 17). V naslednji stopnji bomo z alkalno hidrolizo poskušali odpraviti metilne estre (spojina 18).



Slika 22: Shema 3

V tretjem delu našega raziskovanja pa bomo poskušali ugotoviti, če se lahko z uporabo drugačne zaščite (benzilni ester) na karboksilnih skupinah izognemu odprtju izotiazolidin-3-on-1,1-dioksida.



Slika23: Shema 4

3 MATERIALI IN METODE

Reagenti in topila

Pri izdelavi diplomske naloge smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev:

Acros Organics

Aldrich

Merck

Risanje struktur

Za risanje in poimenovanje enostavnejših struktur, napovedovanje ^1H spektrov in analizo strukture smo uporabljali računalniški program *ChemDraw Ultra*, proizvajalca *CambridgeSoft*.

Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC)

Kromatografijo te vrste smo uporabljali kot analizno metodo, pri kateri smo spremljali potek reakcij ter izolacijo naših spojin. Uporabljali smo *Kieselgel 60 P₂₅₄* plošče izdelovalca *Merck*. Sestava plošče: na aluminijastem nosilcu je 0,2 mm nanos silikagela.

Spojine smo detektirali z: UV svetilko ($\lambda = 254$ nm) in orositvenimi reagenti: ninhidrin, bromkrezol zeleno, vanilin v 10% raztopini H_2SO_4 .

Kolonska kromatografija (flash)

Uporabljali smo jo kot preparativno metodo za čiščenje zmesi spojin ter s tem pridobitev čistih spojin. Uporabljali smo steklene kolone različnih velikosti (glede na količino spojine), kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel velikosti od 0,04–0,063 mm (količino silikagela preračunamo kot 50-kratno količino glede na količino spojine), ki ga izdeluje *Merck*.

Isolera™ (Biotage)

Isolera je nov, inteligenten in hiter preparativni kromatografski sistem, ki na enostaven način omogoči doseganje boljše kromatografske ločitve. Analiza frakcij po koloni deluje na osnovi prepoznavanja UV svetlobe, ki jo absorbirajo različne spojine pri različnih valovnih dolžinah. Uporabili smo jo kot preperativno metodo za čiščenje zmesi spojin. Lastnik *Isolere* je *Fakulteta za farmacijo, Ljubljana*.

Hladilna naprava Julabo FT 901

Napravo smo uporabili pri reakciji ciklizacije z elementarnim bromom, kjer je bilo potrebno reakcijsko zmes ohladiti na -40^oC. Lastnik je fakulteta za farmacijo, Ljubljana.

Mikrovalovni reaktor

Za izvajanje nekaterih reakcij smo uporabljali mikrovalovni reaktor *CEM Discover* z IR in optičnim načinom merjenja temperature, ki je povezan z računalnikom. Lastnik je *Fakulteta za farmacijo*, Ljubljana.

Tališče

Temperaturo tališč naših spojin smo določali na mikroskopu z ogrevalno mizico znamke *Leica*.

IR (infrardeča) spektroskopija

IR spektre naših spojin so posneli na spektrofotometrih *Nicolet Nexus FT-IR* in *Perkin Elmer 1600 FT-IR*.

Jedrska magnetna resonanca

NMR spektre so snemali v *Nacionalnem centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti* v Ljubljani. Spektri so bili posneti na spektrometru *Bruker Avance DPX 300*, kot interni standard je uporabljen TMS.

Spektre smo procesirali na računalniku s programom *MasterReC 4.8.6.0.*, proizvajalca *MasterLab Research Sl.*

Masna spektroskopija

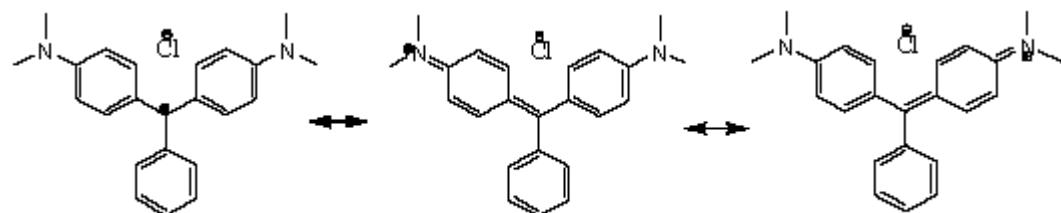
Masne spektre so posneli na *Inštitutu Jožefa Štefan*, posneti pa so bili na spektrometru *Varian-MAT 311 A* s HR-MS, EI, ESI tehnikami.

Biološko testiranje

Encim MurC (MurD) katalizira reakcijo med med UNAM (UMA) in L-Ala (D-Glu) ob prisotnosti ATP, ki pri tem razpade na ADP in fosfat. Nastanek fosfata določamo spektrofotometrično pri 650 nm posredno preko tvorbeobarvanega kompleksa z malahitno zelenim. Katalitična aktivnost se ovrednoti na podlagi množine nastalega fosfata. Ob dodatku inhibitorja se katalitična aktivnost encima zniža, zato je množina nastalega fosfata manjša v

primerjavi s kontrolo brez inhibitorja. Učinkovitost inhibitorja izrazimo z rezidualno aktivnostjo (RA), ki predstavlja razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti inhibitorja in aktivnostjo encima brez navzočnosti inhibitorja.

Struktura barvila malahitno zeleno(MG)

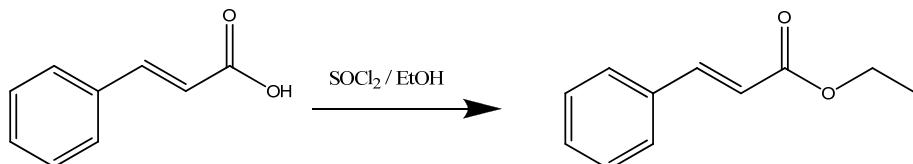


Molibdofosfatni anion tvori v kislem agregate z malahitnim zelenim (MG).



4 SINTEZNI POSTOPKI IN REZULTATI ANALIZ

4.1 Sinteza etil cimetata (spojina 1) (38)



Postopek:

33,7 mmol (5 g) cimetne kisline raztopimo v 35 ml absolutnega etanola ter reakcijsko zmes mešamo na ledeni kopeli. Nato počasi po kapljicah dodamo 2 ekv. sulfuril diklorida (SOCl_2), ki mu dodamo 10 ml absolutnega etanola. Na koncu odmaknemo ledeno kopel in pustimo teči reakcijo pri sobni temperaturi en dan.

Reakcija poteče kvantitativno.

Izolacija:

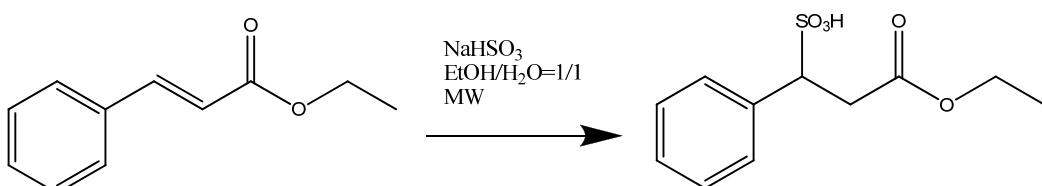
Z rotavaporjem odparimo topilo ter prebitni sulfuril diklorid. Zaostanek raztopimo v 40 ml etra ter prenesemo v lij ločnik. Organsko fazo spiramo 3x z 20 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata (NaHCO_3) ter 1x z 20 ml nasičene raztopine natrijevega klorida (NaCl).

Naša spojina ostaja v organski fazi, ki jo sušimo z natrijevim sulfatom, odfiltriramo ter posušeno eterno disperzijo rotavapiram do oljnatega zaostanka. Oljnat produkt postavimo v eksikator ter ga sušimo pri znižanem tlaku.

Rezultati analiz:

IZGLED	Brezbarvno olje
IZKORISTEK	100 %
RETENCIJSKI FAKTOR	MF = DKM/MeOH = 9/1, Rf = 0,83
1H-NMR (300 MHz) (δ [ppm])	1,29-1,39 (m, 3H, -CH ₃); 4,22-4,29 (m, 2H, CH ₃ -CH ₂ -); 6,4 (d, J = 8,01 Hz, 1H, =CH-), 7,35-7,70 (m, 6H, ArH + =CH-)
MASNA SPEKTROSKOPIJA	177 [M+H] ⁺
IR [cm^{-1}]	3028,85 (-COO-), 2981,7 (-C=C-); 1712,8 (-CO-); 1578,47 (-C=C-Ar)
TALIŠČE	/

4.2 Sinteza 3-etoksi-3-okso-1-fenilpropan-1-sulfonske kisline (spojina 2) (39)



Postopek:

3 mmol-a (529 mg) etil cimetata (predhodno raztopljenega v 2 ml absolutnem etanolu), 2 ekvivalenta (624 mg) natrijega hidogensulfonata (predhodno raztopljenega v 2 ml vode) zatehtamo v 10 ml vialo ter dodamo magnetek. Vse skupaj postavimo v mikrovalovni reaktor.
(39)

Pogoji v mikrovalovnem reaktorju:

- moč: 5 W
- tlak: 20 bar
- temperatura: 165° C
- čas segrevanja: 5 min
- čas poteka reakcije: 30 min

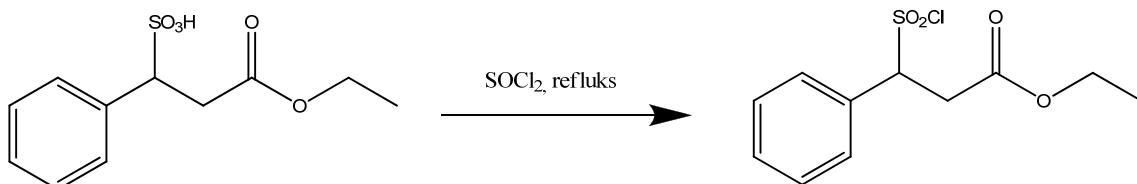
Izolacija:

Reakcijsko zmes prelijemo v bučko ter odrotavapiramo topilo. Dodamo 50 ml H₂O in reakcijsko zmes naalkalimo z 1M natrijevim hidroksidom do pH = 7-8. Prelijemo v lij ločnik in ekstrahiramo 3x s 25 ml etra (v organski fazi ostane etil cimetat). Vodno fazo z 1 M klorovodikove kisline nakisamo do pH = 2-3. Vodno fazo uparimo. Na suho oborino zlijemo 15ml etanola in stresamo z ultrazvokom. Supernatant odfiltriramo in oborino še enkrat speremo z etanolom. Etanolne frakcije odparimo pod znižanim tlakom.

Rezultati analiz:

IZGLED	Beli kristali
IZKORISTEK	91 %
RETENCIJSKI FAKTOR	MF: DKM/MeOH = 4/1, R _f = 0,24
1H NMR (300 MHZ) (δ [ppm])	1,0 (t, J = 7,2 Hz, 3H, -CH ₃); 2,8 (t, J = 1,8 Hz, 1H, R-CH ₂ -CO-), 3,1 (dd, J = 11,4 Hz, 1H, R-CH ₂ -CO-); 3,86-3,97 (m, 3H, -O-CH ₂ -CH ₃ + -CH-SO ₃ H); 7,17-7,31 (m, 5H, ArH)
MASNA SPEKTROSKOPIJA	257 [M-H] ⁻
IR [cm^{-1}]	3476,62; 2979,35 (-COO-); 1717,57 (-CO-); 1617,36 (-C=C-Ar);
TALIŠČE	191-193°C

4.3 Sinteza etil-3-(klorosulfonil)-3-fenil propanoata (spojina 3)



Postopek:

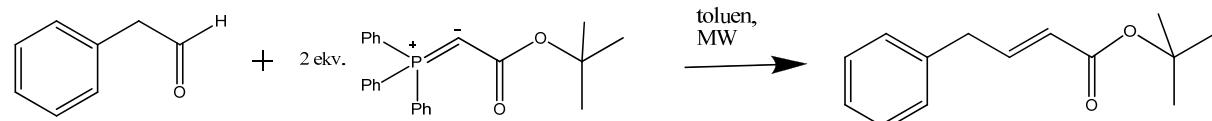
7,75 mmol-a (2 g) spojine 2 raztopimo v 5 ml tionil klorida (SOCl₂) ter postavimo na oljno kopel, dodamo hladilnik in klorkalcijevu cevko, pustimo da reflktuirja 5 ur.

Izolacija:

Tionil klorid izparimo pod znižanim tlakom. Suhi zaostanek raztopimo v 20 ml etilacetata (EtOAc) ter prelijemo v lij ločnik. Spiramo 2x s 30 ml vode, 2x s 30 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata (NaHCO_3) ter 1x s 30 ml nasičene raztopine natrijevega klorida (NaCl). Organsko fazo odparimo pod znižanim tlakom.

Opomba: Potekla je retro-Michaelova reakcija in dobili smo nazaj etil cimetat ter nezreagirano izhodno spojino, zato smo prekinili sintezno pot.

4.4 Sinteza terc-butil 4-fenilbut-2-en-oata (spojina 4) (28)



Postopek:

1,08 mmol-a (130 mg) fenilacetaldehyda in 2 ekvivalenta (815 mg) (terc-butoksikarbonilmetyl) trifenilfosforana zatehtamo v 10 ml vialo in dodamo 4 ml toluena. Reakcijsko zmes prepihamo z argonom ter postavimo v mikrovalovni reaktor.

Pogoji v mikrovalovnem reaktorju:

- moč: 100 W
- tlak: 20 bar
- temperatura: 150°C
- čas segrevanja: 3 min
- čas poteka reakcije: 15 min

Izolacija:

Flash kromatografija

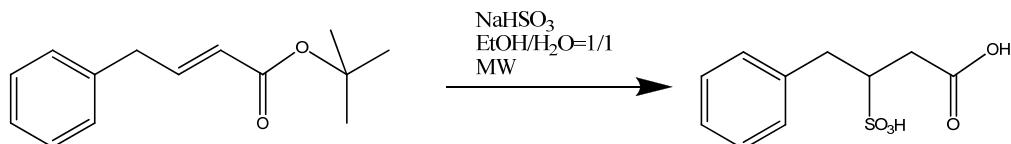
MF: EtOAc/nHex=1/5

Spojina se v mobilni fazi ne raztoplajala, zato naše rumene kristale raztopimo v manjši količini etilacetata ter dodamo 1 g silikagela. Vse skupaj postavimo na rotavapor ter izparevamo pod znižanim tlakom, da nastane suh silikagel z adsorbirano zmesjo za ločevanje.

Rezultati analiz:

IZGLED	Rumena smola
IZKORISTEK	98,3 %
RETENCIJSKI FAKTOR	MF: EtOAc/nHex = 1/5, Rf = 0,51
1H NMR (300 MHZ) (δ [ppm])	1,3 (s, 9H, 3x -CH ₃); 3,1 (d, 1H, J = 2,4 Hz, =CH-), 3,3 (d, J = 3,53 Hz, 2H, Ar-CH ₂ -); 3,5 (dd, J = 5,64 Hz, 1H, -CH=); 5,68-5,75 (m, 1H, ArH); 6,85-7,35 (m, 4H, ArH)
MASNA SPEKTROSKOPIJA	218 [M]
IR [cm^{-1}]	2978,25 (-COO-); 1731,31 (-CO-); 1655,67 (-C=C-Ar); 1147,86
TALIŠČE	/

4.5 Sinteza 4-fenil-3-sulfo-butanojske kisline (spojina 5)



Potek:

1,06 mmol-a (231 mg) spojine 4 (predhodno raztopljene v 2 ml etanola), 2 ekvivalenta (221 mg) natrijevega hidrogensulfonata (predhodno raztopljenega v 2 ml vode) zatehtamo v 10 ml vialo, dodamo magnetek in postavimo v mikrovalovni reaktor.

Pogoji v mikrovalovnem reaktorju:

- moč: 5 W
- tlak: 20 bar
- temperatura: 165°C
- čas segrevanja: 5 min
- čas poteka reakcije: 30 min

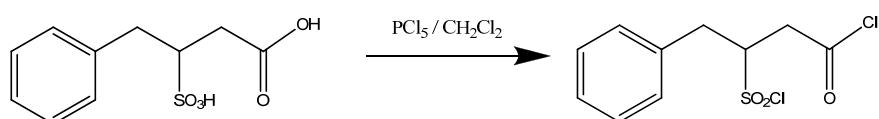
Izolacija:

Reakcijsko zmes iz mikrovalovnega reaktorja prenesemo v bučko in izparimo etanol pod znižanim tlakom. Dodamo 50 ml vode in vse skupaj naalkalimo z 1 M natrijevim hidroksidom do pH = 7-8. Reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik in ekstrahiramo 3x z 25 ml etra (v organski fazi ostane izhodna spojina). Vodno fazo nato nakisamo z 1 M klorovodikovo kislino do pH = 2-3, vodo odparimo pod znižanim tlakom. Suhi produkt prelijemo z etanolom in stresamo na ultrazvoku. Supernatant odfiltriramo in oborino še 1-2x speremo z etanolom. Združene etanolne frakcije odparevamo pod znižanim tlakom.

Rezultati analiz:

IZGLED	Beli kristali
IZKORISTEK	56 %
RETENCIJSKI FAKTOR	MF: EtOAc/nHex = 1/1, Rf = 0,66
1H NMR (300 MHZ) (δ [ppm])	2,1 (dd, J = 11,3 Hz, 1H, R-CH ₂ -CO-); 3,2 (dd, J = 6,18 Hz, 1H, R-CH ₂ -CO-); 3,29-3,46 (m, 1H, -CH ₂ -CHSO ₃ H-CH ₂ -); 3,7-3,77 (m, 1H, Ph-CH ₂ -); 3,93-4,03 (m, 1H, Ph-CH ₂ -); 5,0 (d, J = 2,7Hz, -SO ₃ H); 7,16-7,42 (m, 5H, ArH); 12,1 (s, 1H, -COOH)
MASNA SPEKTROSKOPIJA	243,0 [M-H] ⁻
IR [cm ⁻¹]	3456,65 (-COOH); 1711,62 (-CO-); 1410,52; 1211,03
TALIŠČE	155-158°C

4.6 Sinteza 3-(klorosulfonil)-4-fenilbutanoil klorida (spojina 6)



Postopek:

0,56 mmol-a (168 mg) spojine 5 raztopimo v 2 ml diklormetana (CH₂Cl₂) ter dodamo 2 ekvivalenta (233 mg) fosforjevega pentaklorida (PCl₅). Reakcijo pustimo teči na sobni temperaturi 16 ur.

Na reakcijsko zmes počasi dokapavamo nasičeno raztopino natrijevega hidrogenkarbonata. Spremljamo pH (najprej pade, nato se zvišuje). S TLC kromatografijo spremljamo potek reakcije.

Izolacija:

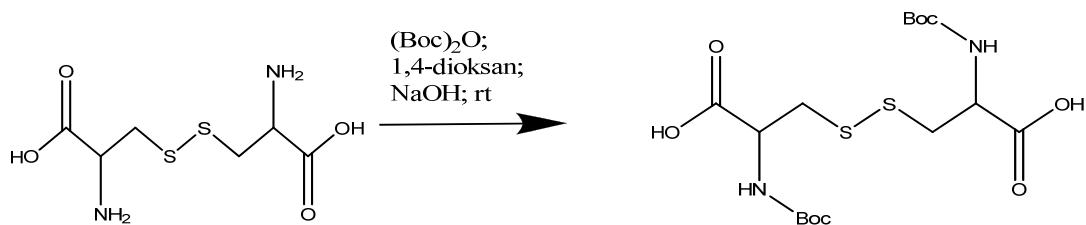
Ločimo organsko in vodno fazo. Organsko fazo speremo z nasičeno raztopino natrijevega klorida ter ji dodamo sušilno sredstvo.

Opomba: – Zaradi nizkega izkoristka smo prekinili sintezno pot.

Rezultati analiz:

IZGLED	Rumeni kristali
IZKORISTEK	18 %
RETENCIJSKI FAKTOR	MF: EtOAc/Hex = 1/1, Rf = 0,47
1H NMR (300 MHZ) (δ [ppm])	1,25-1,31 (m, 2H, R-CH ₂ -CO-); 3,2 (dd, J = 11,3 Hz, 1H, Ph-CH ₂ -); 4,1 (q, 1H, Ph-CH ₂ -); 6,38-6,51 (m, 1H, -CH ₂ -CHSO ₃ H-CH ₂ -); 7,18-7,38 (m, 5H, ArH)
MASNA SPEKTROSKOPIJA	303 [M+Na] ⁺
IR [cm^{-1}]	3028,51; 1708,64 (-CO-); 1495,38 (-C=C-Ar);
TALIŠČE	110-112°C

4.7 Sinteza 3,3'-disulfanediilbis(2-(terc-butoksiamino)propanojske kisline) = Boc-L-cistina (spojina 7)



Postopek:

Zatehtamo 5 g (20,83 mmola) L-cistina v 250 ml bučko ter dodamo 35 ml 1,4-dioksana, 15 ml prečiščene vode in 41,6 ml 1M natrijevega hidroksida. Bučko postavimo na ultrazvočno

kopel, da se L-cistin v celoti raztopi. Reakcijsko zmes ohladimo na ledeni kopeli na 10° C ter v času 30 min dokapavamo v 1,4-dioksan raztopljen (Boc)₂O. Reakcijo pustimo teči 4 ure pri sobni temperaturi. Skozi celoten potek pri reakciji spremljamo spremembo pH-ja, ki mora biti med 8 in 9. Po potrebi dokapavamo 1 M natrijev hidroksid.

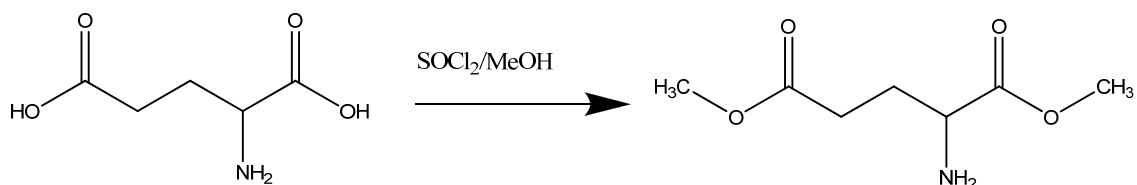
Izolacija:

Reakcijski zmesi dodamo 60 ml vode ter na ledeni kopeli dokapavamo 1 M klorovodikovo kislino do pH = 2-3. V enem trenutku izpade bela sluzasta oborina, ki jo odfiltriramo z odsesavanjem, speremo s prečiščeno vodo. Oborino prenesemo v petrijevko in postavimo v sušilnik ($T_{max} = 60\text{-}70^\circ\text{C}$).

Rezultati analiz:

IZGLED	Beli kristali
IZKORISTEK	83 %
RETENCIJSKI FAKTOR	MF: H ₂ O : MeOH : CH ₃ CN = 1 : 1 : 3 (hitra peptidna mobilna faza - HP), R _f = 0,7
¹ H NMR (300 MHZ) (δ[ppm])	1,3 (s, 18H, 2x –C(CH ₃) ₃); 2,9 (dd, J = 8,4 Hz, 2αH, -S-CH ₂ -R); 3,1 (dd, J = 9,3 Hz, 2βH, -S-CH ₂ -R); 4,01-4,24 (m, 2H, 2x –CH(NHR)-)
MASNA SPEKTROSKOPIJA	439,1 [M-H] ⁻
IR [cm ⁻¹]	3392,17 (-NH-); 2982,84 (-COOH); 1689,44 (-CONH-);
TALIŠČE	130-133°C

4.8 Sinteza dimetil-D-glutamata (spojina 8) (38)



Postopek:

V 100 ml bučko odmerimo 50 ml brezvodnega metanola (predhodno sušenega nad siti 3Å), prepipamo z argonom in namestimo lij kapalnik (kapalnik pokrijemo s septumom in reakcijsko zmes prepipamo z argonom). Bučko damo za 30 minut postavimo v ledeno kopel. V lij kapalnik s pomočjo brizge dodamo 2,2 ekvivalenta (5,4 ml) tionilklorida (SOCl_2) ter ga počasi v roku 30 minut dokapavamo v brezvodni metanol. Odstranimo lij kapalnik in dodamo 1 ekvivalent (33,9 mmol) D-glutaminske kisline. Reakcijo pustimo teči še 1 uro na ledeni kopeli, nato kopel odstranimo in pustimo, da reakcija poteka na sobni temperaturi čez noč (približno 15 ur). Reakcija poteka kvantitativno.

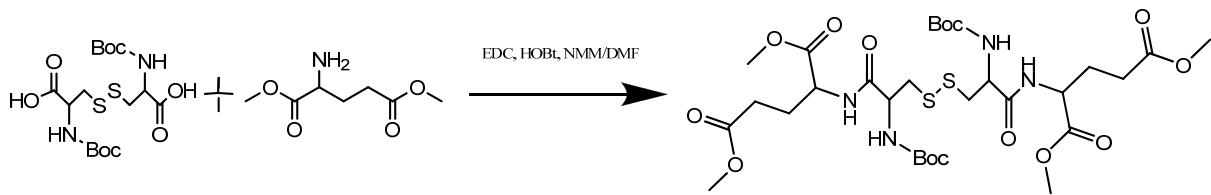
Izolacija:

Topilo odparimo na rotavaporju ter dodamo 25 ml etilacetata. Dodamo magnetek in pustimo da se vse skupaj meša, dokler v nekem trenutku ne izpadajo beli kristali, kateri so izredno hidroskopni. Kristale filtriramo z odsesavanjem in damo v sušilnik, da se posušijo. Hranimo jih na suhem.

Rezultati analiz:

IZGLED	Beli kristali
IZKORISTEK	100 %
RETENCIJSKI FAKTOR	MF: DKM/MeOH = 4/1, $R_f = 0,32$
^1H NMR (300 MHZ) (δ [ppm])	2,1 (m, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -CH(NH ₂)-); 2,49-2,58 (m, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -CH(NH ₂)-); 3,6 (s, 3H, -CH ₃); 3,7 (s, 3H, -CH ₃); 4,0 (t, $J = 3,33$ Hz, 1H, -CH ₂ -CH(NH ₂)-); 8,7 (s, 2H, -NH ₂)
MASNA SPEKTROSKOPIJA	176,1 [M+H] ⁺
IR [cm^{-1}]	3447,73 (-NH ₂); 2960,7 (-COO-); 1727,84 (-CO-); 1500,15
TALIŠČE	87-89°C

4.9 Sinteza N,N-di-(terc-butoksikarbonilamino)-L-cistinil-di-glutamil-di-metilnega estra (spojina 9)



Postopek:

2 ekvivalenta (1,9 g) dimetilnega estra D-glutaminske kisline zatehtamo v 100 ml bučko. Dodamo 60 ml suhega dimetil formamida ter na ledu ohladimo na 0° C. Dodamo 2,4 ekvivalenta (1,65 g) HOBr-a, 2 g (4,5 mmol) Boc-L-cistina, 8,1 ekvivalentov (3,8 ml) N-metil morfolina ter 2,6 ekvivalenta (2,2 g) EDC-ja. Reakcijsko zmes prepihamo z argonom ter pustimo mešati na sobni temperaturi od 15-20 ur. Potek reakcije spremljamo s TLC kromatografijo.

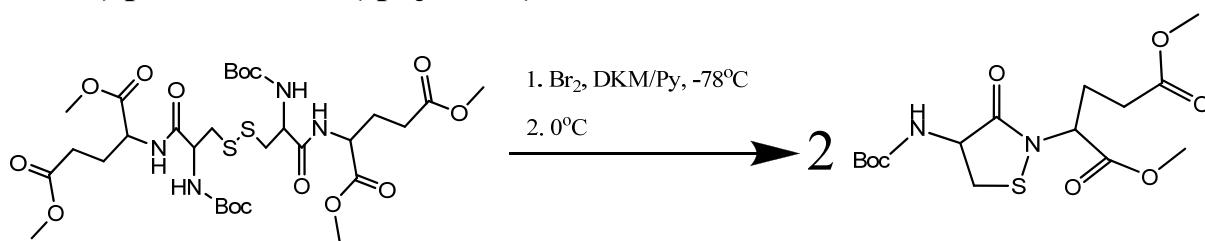
Izolacija:

Topilo odparimo ter zaostanek raztopimo v 120 ml etilacetata (EtOAc). Dodamo 60 ml 0,1 M klorovodikove kisline ter vse skupaj prenesemo v lij ločnik. Organsko fazo spiramo 1x z 60 ml 0,1 M klorovodikove kisline, 1x z 60 ml 1 M klorovodikove kisline, 3x z 60 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata (NaHCO_3) ter 1x z nasičeno raztopino natrijevega klorida (NaCl). Organski fazi dodamo sušilno sredstvo (natrijev sulfat (Na_2SO_4)). Raztopino prefiltriramo in topilo odparimo. Produkt sušimo z membransko črpalko in sušimo še 2 uri v eksikatorju nad natrijevim hidroksidom (NaOH).

Rezultati analiz:

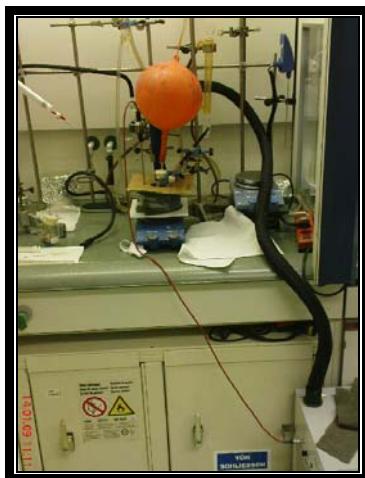
IZGLED	Bledo rumeni kristali
IZKORISTEK	64,7 %
RETENCIJSKI FAKTOR	MF: HP; Rf = 0,77
1H NMR (300 MHZ) (δ [ppm])	1,4 (s, 18H, 2x -C(CH ₃) ₃); 1,96-2,04 (m, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -CO-); 2,24-2,23 (m, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -CO-); 2,4 (t, J = 6,9 Hz, 4H, , 2x -CH ₂ -CH ₂ -CO-); 2,88-3,07 (m, 4H, 2x -S-CH ₂ -R); 3,6 (s, 6H, 2x -CH ₃); 3,7 (s, 6H, 2x -CH ₃); 4,1 (q, 4H, 4x -CH ₂ -CH(NHBoc)-); 5,5 (d, J = 4,5 Hz, 2H, 2x -CH(NH-Boc)-); 7,89-7,92 (m, 2H, 2x -CO-NH-CH(COOCH ₃)-)
HRMS	Dobljen: 755,2847 Izračunan: 755,2843
MASNA SPEKTROSKOPIJA	755,3 [M+H] ⁺ , 777,3 [M+Na] ⁺
IR [cm ⁻¹]	3411,02 (-NH-); 2982,22 (-COO-); 1742,5 (-CO-); 1663,28 (-CONH-); 1438,21
TALIŠČE	114-116°C

4.10 Sinteza dimetil 2-(4-(terc-butoksikarbonilamino)-izotiazolidin-3-on-2-il) pentan-di-oat (spojina 10)



Postopek:

3 g (3,97 mmol) spojine 9 postavimo v 100 ml suho dvovratno bučko ter namestimo septume. Sistem prepihamo z argonom. Dodamo brezvodni diklormetan (60 ml) ter prečiščen piridin (Py) (6 ml). Celoten sistem ohladimo na -78°C za 15 min. Nato dodamo 2,5 ekvivalenta (9,93 ml) 1 M raztopino Br₂ v diklormetanu v času 30 min. Odklopimo hladilnik in pustimo reakcijsko zmes, da se segreje na ledu do 0°C (približno 2 uri).



Slika 24: Aparatura

Izolacija:

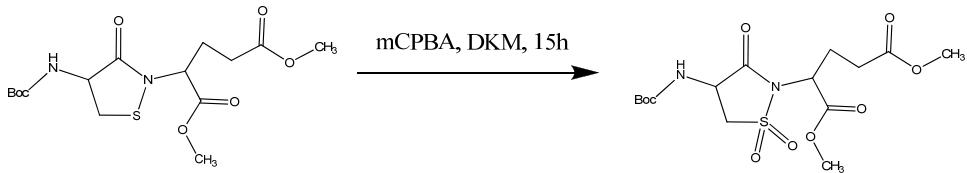
Dodamo 25 ml 10 mM raztopine natrijevega tiosulfata (Na₂S₂O₃). Reakcijsko zmes prenesemo v ljiljan ločnik. Ločimo organsko fazo od vodne faze. Organsko fazo spiramo 3x z 80 ml natrijevim hidrogen sulfatom (NaHSO₄), 1x z 80 ml natrijevega klorida (NaCl). Organsko fazo sušimo z natrijevim sulfatom (Na₂SO₄), filtriramo ter topilo odparimo.

Rezultati analiz:

IZGLED	Temno oranžno olje
IZKORISTEK	47 %
RETENCIJSKI FAKTOR	MF: HP, Rf = 0,79
1H NMR (300 MHZ) (δ [ppm])	1,4 (s, 9H, -C(CH ₃) ₃); 2,14-2,19 (m, 1H, -CH ₂ -CH ₂ -); 2,28-2,37 (m, 3H, -CH ₂ -CH ₂ -); 3,3 (t, J = 11,5 Hz, 1H, -CH ₂ -S-); 3,6 (s, 3H, -CH ₃); 3,7 (s, 3H, -CH ₃); 3,9 (t, J = 7,11 Hz, 1H, -NH-CH(COOCH ₃)-CH ₂ -); 4,52-4,61 (q, 1H, -CH ₂ -S-); 5,3 (s, 1H, -NH-Boc)
HRMS	Dobljen: 377,1380

	Izračunan: 377,1369
MASNA SPEKTROSKOPIJA	377,2 [M+H] ⁺ , 399 [M+Na ⁺] ⁺
IR [cm ⁻¹]	3339 (-NH-); 2955,05 (-COO-); 1734,96 (-CO-); 1438,19
TALIŠČE	/

4.11 Sinteza dimetil 2-(4-(terc-butoksikarbonilamino)-izotazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentadioata (spojina 11)



Postopek:

1 ekvivalent (3,68 mmol) spojine 10 zatehtamo v 50 ml bučko, dodamo magnetek, 2,2 ekvivalenta (8,11 mmol) *m*-kloroperoksibenzojske kisline (mCPBA) (vsebnost je 77 %) in 30 ml diklormetana. Reakcijo pustimo teči na sobni temperaturi 15 ur.

Izolacija:

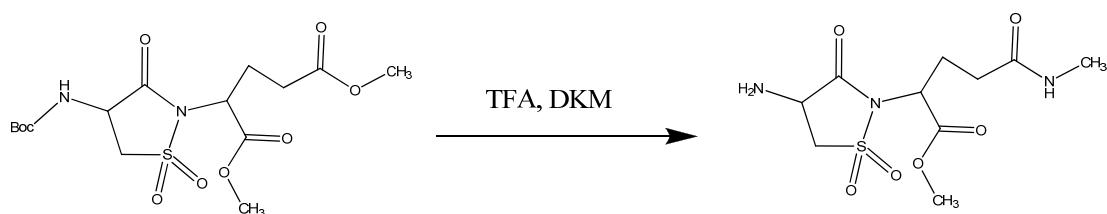
Na rotavaporju odparimo diklormetan. Zaostanek raztopimo v 40 ml etilacetata. Zmes prenesemo v lij ločnik ter organsko fazo spiramo 3x s 30 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata, 3x s 30 ml 0,1M raztopine klorovodikove kisline, 3x s 30 ml 0,1 M natrijevega hidroksida ter 1x s 40 ml nasičene raztopine natrijevega klorida.

Rezultati analiz:

IZGLED	Rumeno-beli kristali
IZKORISTEK	76,6 %
RETENCIJSKI FAKTOR	MF: HP, Rf = 0,85
1H NMR (300 MHZ) (δ [ppm])	1,4 (s, 9H, -C(CH ₃) ₃); 2,44-2,53 (m, 4H, -CH ₂ -CH ₂ -); 3,7 (s, 3H, -CH ₃); 3,8 (s, 3H, -CH ₃); 3,6 (d, J=1,8Hz, 1H, -CH ₂ -obročni); 4,08-4,15 (m, 1H, -CH ₂ -obročni); 4,62-4,68 (m, 1H, -CH(COOCH ₃)-); 4,84-4,95 (m, 1H, -CH-obročni); 5,3 (s, 1H, -NH-)
HRMS	Dobljen: 431,1090
	Izračunan: 431,1100
MASNA SPEKTROSKOPIJA	431,1 [M+Na ⁺] ⁺
IR [cm ⁻¹]	3415,85 (-NH-); 2963,93 (-COO-); 1758,11 (-CO-); 1696,1 (-CONH-); 1438,05
TALIŠČE	97-100°C

4.12 Sinteza dimetil 2-(4-amino-izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentadioata (spojina 12)

4.12.1 Odščita Boc-a 1



Postopek:

0,84 mola spojine 11 zatehtamo v bučko, raztopimo v 30ml diklormetana, dodamo 50 ekvivalentov (42 mmol) trifluorocetne kisline ter pustimo da se reakcijska zmes meša pri sobni temperaturi približno 30 minut. S TLC kromatogrami preverjamo potek reakcije. Ko reakcija poteče do konca ustavimo mešanje. Naš produkt se nahaja v obliki soli.

Izolacija:

Organsko fazo smo sprali z 0,1 M natrijevim hidroksidom (pazimo, da pH ne naraste nad 11, ker lahko pride do odščite metilnih estrov D-glutaminske kisline). Zaradi polarnosti celotna spojina preide v vodno fazo. Ko zmes odparimo pod znižanim tlakom, nastane zmes naše odščitene skupine in trden natrijev hidroksid.

Komentar.

Zaradi prevelike količine trdnega natrijevega hidroksida, ki nastane, smo se poslužili drugačnega postopka odščite Boc skupine.

4.12.2 Odščita Boc-a 2

Postopek:

0,84 mola spojine 11 zatehtamo v bučko ter ga raztopimo v brezvodnem metanolu. Sistem prenesemo v digestorij, kjer mu vpihujemo plinasto klorovodikovo kislino. Vpihovanje traja

okrog 30 minut. Potek odščite spremljamo s TLC kromatografijo, dokler reakcija ni končana. Dobimo našo spojino v obliki soli (klorida).

Komentar: Po pregledu NMR ugotovimo, da nastaja racemat.

4.12.3 Odščita Boc-a 3

Postopek:

0,84 mola spojine **11** zatehtamo v bučko ter ga raztopimo v brezvodnem tetrahidrofurantu (10 ml/g). Sistem prenesemo v digestorij, kjer mu vpihujemo plinasto HCl. Vpihovanje traja okrog 45 minut. Potek odščite spremljamo s TLC kromatografijo, dokler reakcija ni končana. Dobimo našo spojino v obliki soli (klorida), ki izpada iz tetrahidrofurana.

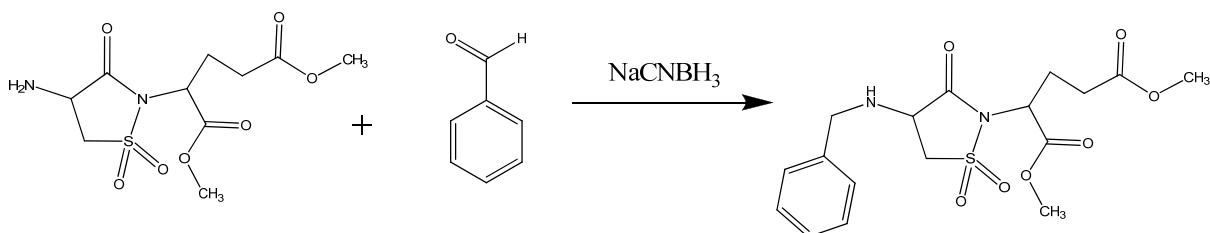
Izolacija:

Reakcijsko zmes prelijemo z absolutnim dietilnim etrom, da spojina izпадne kvantitativno. Oborina ima obliko finih malih kristalov, ki jih odnučamo (uporabimo fini filter papir) in speremo z etrom (pri delu moramo biti previdnost, saj je v reakcijski zmesi še klorovodikova kislina). Kristale sušimo z membransko črpalko ali v sušilniku s suhim zrakom pri temperaturi 40° C.

Rezultati analiz:

IZGLED	Beli kristali
IZKORISTEK	74,8 %
RETENCIJSKI FAKTOR	MF: DKM/MeOH = 9/1, Rf = 0,42
1H NMR (300 MHZ) (δ [ppm])	2,17-2,45 (m, 4H, -CH ₂ -CH ₂ -); 3,6 (s, 3H, -CH ₃); 3,7 (s, 3H, -CH ₃); 4,0 (t, J = 11,1 Hz, 1H, -CH ₂ -obročni); 4,5 (q, 1H, -CH ₂ -obročni); 4,8 (m, 1H, -CH(COOCH ₃)-); 5,0 (t, J = 9,0 Hz, 1H, -CH-obročni); 9,0 (s, 2H, -NH ₂)
HRMS	Dobljen: 309,0758
	Izračunan: 309,0756
MASNA SPEKTROSKOPIJA	331,1 [M+Na] ⁺
IR [cm^{-1}]	3420,05 (-NH ₂); 1744,43 (-CO-); 1438,66
TALIŠČE	163-166°C

4.13 Sinteza dimetil 2-(4-(benzilamino)-izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentadioata(spojina 13)



Postopek:

1 ekvivalent (1,375 mmol) spojine 12 zatehtamo v 25 ml bučko in dodamo magnet. Pokrijemo s septumom in prepihamo z argonom. Dodamo brezvodni metanol (0,4 M aldehyd), da se amin v njem raztopi. Preverimo pH, ki mora biti 6 (z vodo omočimo reagenčni trak in nato po njem povlečemo našo reakcijsko zmes). S pomočjo brizge dodamo 1 ekvivalent (140 µl) benzaldehida in pustimo, da se zmes meša 2 uri pri sobni temperaturi. Medtem časom v majhni količini brezvodnega metanola raztopimo 0,6 ekvivalenta (51,6 mg) natrijevega cianborhidrida (NaCNBH₃). Po preteku 2 ur ga z brizgo počasi dodamo v reakcijsko zmes. Reakcijsko zmes pustimo, da se meša pri sobni temperaturi od 12-48 ur. Potek reakcije spremljamo s TLC kromatografijo.

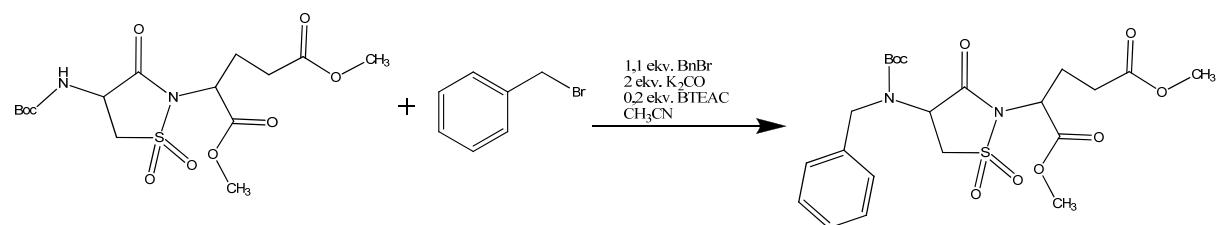
Izolacija:

Na rotavaporju odparimo brezvodni metanol. Zaostanek suhe zmesi raztopimo v nasičeni raztopini natrijevega hidrogenkarbonata (NaHCO₃). Vse skupaj prelijemo v lij ločnik in vodno fazo spiramo vsaj 5x z 10 ml etilacetata. Naša spojina prehaja v organsko fazo. Združene organske faze sušimo nad natrijevim sulfatom (Na₂SO₄). Raztopino filtriramo in koncentriramo na rotavaporju. Po potrebi čistimo spojino s flash kromatografijo.

Rezultati analiz:

IZGLED	Rumeno olje
IZKORISTEK	27,8 %
RETENCIJSKI FAKTOR	MF: DKM/MeOH = 5/1, Rf = 0,84
1H NMR (300 MHZ) (δ [ppm])	2,21-2,34 (m, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -); 2,33-2,44 (m, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -); 3,3 (s, 2H, Ph-CH ₂ -NH-); 3,5 (s, 3H, -CH ₃); 3,7 (s, 3H, -CH ₃); 4,03-4,13 (m, 1H, -CH ₂ -obročni); 4,04-4,52 (m, 1H, -CH ₂ -obročni); 4,76-4,81 (m, 1H, -CH(COOCH ₃)-); 5,0 (t, J = 6,60 Hz, -CH-obročni); 7,3 (t, J = 2,70 Hz, 1H, -NH-); 7,47-7,55 (m, 3H, ArH); 7,8 (dd, J = 3,90 Hz, 2H, ArH)
HRMS	Dobljen: 399,1218 Izračunan: 399,1226
MASNA SPEKTROSKOPIJA	399 [M+H] ⁺
IR [cm ⁻¹]	1385,26 (-NH-); 2956,08 (-COO-); 1735,51 (-CO-); 1342,29
TALIŠČE	/

4.14 Sinteza dimetil 2-(4-benzil-(terc-butoksikarbonil)-amino)-izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il pentadioata (spojina 14)



Postopek:

V 25 ml bučko zatehtamo 300 mg (0,735 mmol) Boc zaščitenega amina, 2 ekvivalenta (1,47 mmol) kalijevega karbonata (K₂CO₃), 0,2 ekvivalenta (0,147 mmol) benzil trietilamonijevega klorida (BTEAC). Dodamo magnetek ter raztopimo v 15 ml acetonitrila (CH₃CN). Prepihamo z argonom in namestimo povratni hladilnik, ki ga na vrhu zamašimo s septumom. Cel potek reakcije držimo pod argonovo atmosfero. Po eni uri mešanja na sobni temperaturi dodamo 1,1

ekvivalenta (0,808 mmol) benzil bromida (BnBr). Reakcijsko zmes segrejemo, da začne refluktirati (temperatura vrlišča acetonitrila je 81° C). Pustimo, da reakcija teče čez noč. Potek reakcije spremljamo s TLC kromatogrami.

Izolacija:

Z rotavaporjem izparimo acetonitril do suhega. Suho spojino raztopimo v 30 ml etilacetata ter dodamo 30 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata. Vse skupaj prelijemo v lij ločnik in ekstrahiramo še 3x s 30 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata, 3x s 30 ml 0,01 M klorovodikovo kislino ter 1x s 30 ml nasičene raztopine natrijevega klorida.

Z rotavaporjem izparimo acetonitril do suhega. Suho spojino raztopimo v 40 ml diklormetana ter dodamo 30 ml vode. Vse skupaj prenesemo v lij ločnik in ekstrahiramo 3x s 30 ml vode. Količino 0,01 M klorovodikove kisline preračunamo na količino uporabljenega benzil trietilamonijevega klorida, ekstrahiramo 3x s 60 ml 0,01 M raztopino klorovodikove kisline ter 1x s 30 ml nasičene raztopine natrijevega klorida.

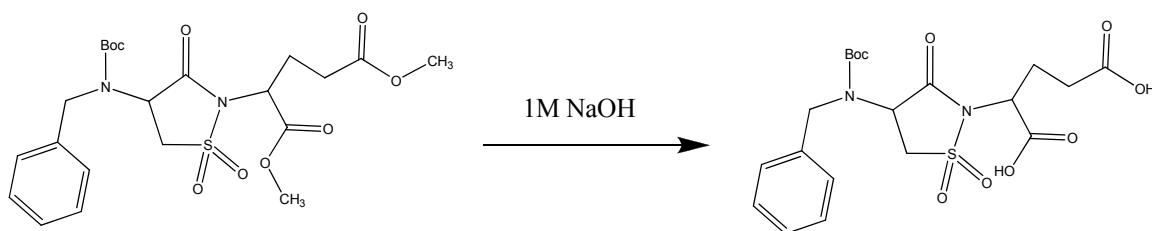
Kolonska kromatografija:

Mobilna faza: EtOAc/Hex = 1/1

Rezultati analiz:

IZGLED	Svetlo rumeno olje
IZKORISTEK	20 %
RETENCIJSKI FAKTOR	MF: EtOAc/Hex = 1/1, Rf = 0,43
1H NMR (300 MHZ) (δ [ppm])	1,2 (q, 2H, Ph-CH ₂ -); 1,5 (s, 9H, -Boc); 2,03-2,15 (m, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -); 2,40-2,47 (m, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -); 3,6 (s, 3H, -CH ₃); 3,7 (s, 3H, -CH ₃); 4,1 (q, 1H, -CH ₂ -obročni); 4,60-4,70 (m, 1H, -CH ₂ -obročni); 5,3 (t, J = 1,5 Hz, 1H, -CH-obročni); 7,0-7,4 (m, 5H, ArH)
MASNA SPEKTROSKOPIJA	499,17 [M+H] ⁺
IR [cm^{-1}]	2978,49 (-COO-); 1736,22 (-CO-); 1501,42 (-C=C-Ar); 1347,06
TALIŠČE	/

4.15 Sinteza 2-(4-(benzil-(terc-butoksikarbonil)amino)-izotiazolidin-3-on-2-il) pentadiojske kisline (spojina 15)



Postopek:

0,146 mmol-a (71 mg) spojine 15 raztopimo v etanolu, dodamo magnetek ter postavimo na ledeno kopel. Počasi dodajamo 8 ekvivalentov (1,17 ml) 1 M raztopine natrijevega hidroksida. Potek reakcije spremljamo s TLC kromatografijo.

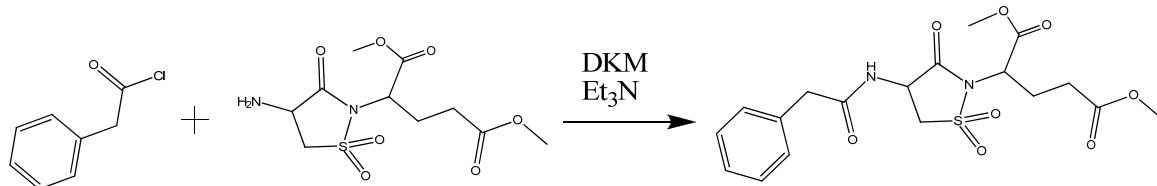
Izolacija:

Ekstrakcija:

Raztopino prelijemo v ljubiločnik in napravimo ekstrakcijo s 3x 20 ml etilacetata. Naša spojina preide v organsko fazo.

Opomba: Po pregledu NMR-ja ugotovimo, da odpade benzilni fragment in obe metilni skupini.

4.16 Sinteza dimetil 2-(4-fenilacetamido)izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentadioata (spojina 16)



Postopek:

V 25 ml bučko zatehtamo 1 ekvivalent (0,984 mmol) spojine 12, 10 ml diklorometana kot topilo ter magnetek. Vse skupaj preprihamo z argonom in postavimo na ledeno kopel. Dodamo 3 ekvivalente (453 μl) trietilamina, 0,1 ekvivalent 4-dimetilaminopiridin (4-DMAP).

V dveh odmerkih po 0,5 ekvivalenta (65,5 μl) po kapljicah dodamo fenilacetil klorid. Pustimo še nekaj časa na ledeni kopeli, nato odstavimo in pustimo mešati pri sobni temperaturi čez noč.

OPOMBA: Reakcija ne poteče do konca, v reakcijski zmes ostajata oba izhodna produkta.

Izolacija:

1. Ekstrakcija:

Dodamo 20 ml diklormetana ter reakcijsko zmes prelijemo v lij ločnik. Spiramo 3x z 20 ml 0,1 M raztopine klorovodikove kisline (preračunano na ekvivalent trietilamina), 1x z 20 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata ter 1x s 30 ml nasičene raztopine natrijevega klorida.

2. Isolera:

- Priprava ustrezne mobilne faze za izvajanje kromatografije. Odločili smo se za mobilno fazo DKM/MeOH = 50/1;
- vzamemo 25 g kolono, v katero vsujemo silikagel velikosti od 0,04 – 0,063 nm, med vsuvanjem v kolono stalno udarjamo ob trdno površino, da se silikagel zbije;
- nanos vzorca na kolono; pustimo, da se vzorec posuši;
- kalibracija isolere;
- zbiranje frakcij na podlagi UV-ja.

OPOMBA: Po kromatografiji na Isoleri smo še vedno dobili tri lise, ki se med sabo niso ustreznno ločile.

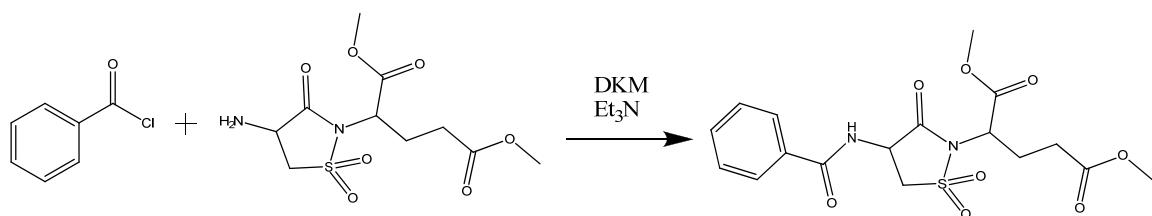


Slika 25: Isolera™ FLASH

Rezultati analiz:

IZGLED	Rumeno olje
IZKORISTEK	44,5 % (tri lise, ki se ne ločijo med sabo)
RETENCIJSKI FAKTOR	MF: DKM/MeOH = 50/1, Rf ₁ = 0,17, Rf ₂ = 0,09, Rf ₃ = 0,06
1H NMR (300 MHZ) (δ [ppm])	2,14-2,38 (m, 4H, -CH ₂ -CH ₂ -); 3,5 (s, 3H, -CH ₃); 3,6 (s, 3H, -CH ₃); 3,71-3,74 (m, 2H, --CH ₂ -obročna); 4,23-4,32 (m, 1H, -CH-obročni); 4,66-4,94 (m, 1H, -CH(COOCH ₃)-); 5,7 (s, 2H, Ph-CH ₂ -); 7,19-7,36 (m, 5H, ArH); 8,8 (d, J = 3,72 Hz, 0,5H, -NH-)
HRMS	Dobljen: 427,1173 Izračunan: 427,1175
MASNA SPEKTROSKOPIJA	427,1 [M+H ⁺] ⁺ ; 449,1 [M+Na ⁺] ⁺
IR [cm^{-1}]	3366,02 (-NH-); 2955,09 (-COO-); 1739,1 (-CO-); 1673,91 (-CONH-); 1520,08 (-C=C-Ar)
TALIŠČE	/

4.17 Sinteza dimetil 2-(4-benzamido-izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentadioata (spojina 17)



Postopek:

V 25 ml bučko zatehtamo 1 ekvivalent (0,85 mmol) amina, 10 ml diklormetana kot topilo ter magnetek. Vse skupaj prepihamo z argonom in postavimo na ledeno kopel ter dodamo 3 ekvivalente (390 µl) trietylamina.

V dveh odmerkih po 0,55 ekvivalenta (54 µl) po kapljicah dodamo benzoilklorid. Pustimo še nekaj časa na ledeni kopeli, nato odstavimo in pustimo mešati pri sobni temperaturi čez noč.

Izolacija:

1. Ekstrakcija:

Dodamo 20 ml diklormetana ter reakcijsko zmes prelijemo v lij ločnik. Spiramo 3x z 20 ml 0,1 M raztopine klorovodikove kisline (preračunano na ekvivalent trietylamina), 1x z 20 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata ter 1x s 30 ml nasičene raztopine natrijevega klorida.

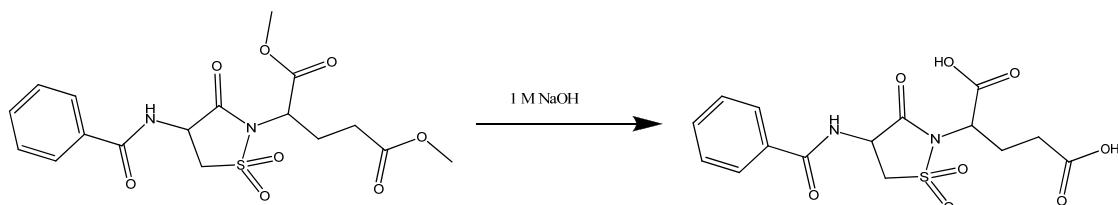
2. kolonska kromatografija (flash)

Mobilna faza: DKM/MeOH = 20/1

Rezultati analiz:

IZGLED	Svetlo rumeno olje
IZKORISTEK	42 %
RETENCIJSKI FAKTOR	MF: DKM/MeOH = 20/1, Rf1 = 0,43, Rf2 = 0,35
1H NMR (300 MHZ) (δ [ppm])	2,48-2,64 (m, 4H, -CH ₂ -CH ₂ -); 3,7 (s, 3H, -CH ₃); 3,80-3,91 (m, 4H, -CH ₃ + -CH ₂ -obročni); 4,1 (dd, J = 7,89Hz, 1H, -CH ₂ -obročni); 4,6 (t, J = 3,54 Hz, 1H, CH(COOCH ₃)-); 5,16-5,30 (m, 1H, -CH-obročni); 7,41-7,56 (m, 4H, ArH); 7,8 (d, J = 3,7 Hz, 2H, ArH + -NH-)
HRMS	Dobljen: 413,1009 Izračunan: 413,1019
MASNA SPEKTROSKOPIJA	413,1 [M+H ⁺] ⁺
IR [cm ⁻¹]	3385,39 (-NH-); 2955,84 (-COO-); 2362,79; 1739,84 (-CO-); 1661,81 (-CONH-); 1527,89 (-C=C-Ar)
TALIŠČE	/

4.18 Sinteza 2-(4-benzamido-izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentandiojske kisline (spojina 18)



Postopek:

0,11 mmol-a (45 mg) spojine 17 raztopimo v manjši količine absolutnega etanola in postavimo na ledeno kopel. Počasi dokapavamo 8 ekvivalentov (874 μ l) 1 M raztopino natrijevega hidroksida.

Izolacija:

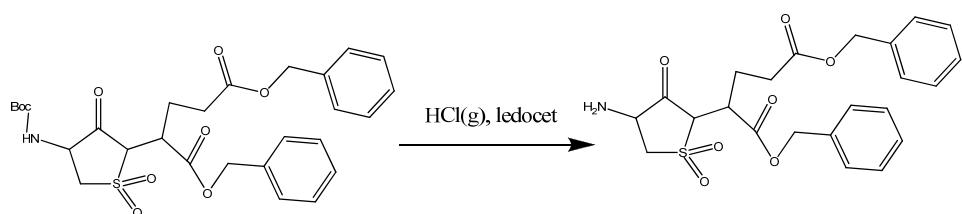
Na rotavaporju odrotavapiramo absolutni etanol. Dodamo 10 ml vode in raztopino nakisamo do pH = 2-3. Reakcijsko zmes prelijemo v lij ločnik in spiramo vodno fazo 3x z 10 ml diklormetana. Združene organske faze sušimo s sušilnim sredstvom, odfiltriramo in celoten sistem postavimo na rotavapor.

Opomba: Odpre se obroč.

Rezultati analiz:

IZGLED	Beli kristali
IZKORISTEK	42,9 %
RETENCIJSKI FAKTOR	MF: HP, Rf = 0,73
1H NMR (300 MHZ) (δ [ppm])	1,95-2,31 (m, 4H, -CH ₂ -CH ₂ -); 3,3 (t, J = 6,87 Hz, 1H, CH(COOCH ₃)-); 3,6 (d, J = 3,33 Hz, 1H, -CH ₂ -obročni); 3,9 (d, J = 3,57 Hz, 1H, -CH ₂ -obročni); 4,08-4,21 (m, 1H, -CH-obročni); 4,8 (s, 1H, -NH-); 7,41-7,54 (m, 2,5H, ArH); 7,85 (t, J = 8,22 Hz; 2,5H, ArH); 12,6 (s, 1H, -SO ₂ -OH)
HRMS	Dobljen: 401,0670 Izračunan: 401,0655
MASNA SPEKTROSKOPIJA	401,1 [M-H] ⁻
IR [cm^{-1}]	3367,98 (-NH-); 1720,11 (-C=O); 1341,12 (-CONH-); 1243,31
TALIŠČE	169-172°C

4.19 Sinteza dibenzil 2-(4-amino-izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentadioata (spojina 19)



Postopek:

200 mg (0,356 mmol) dibenzil 2-(4-(terc-butoksikarbonilamino)-izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentandioata (spojina 21) raztopimo v 10 ml brezvodnega ledoceta. Sistem prenesemo v digestorij, kjer mu vpihujemo plinasto klorovodikovu kislino. Vpihovanje traja okrog 60 minut. Potek odščite spremljamo s TLC kromatogrami, dokler reakcija ni končana. Dobimo našo spojino v obliki soli (klorida), ki ostane raztopljena v ledocetu.

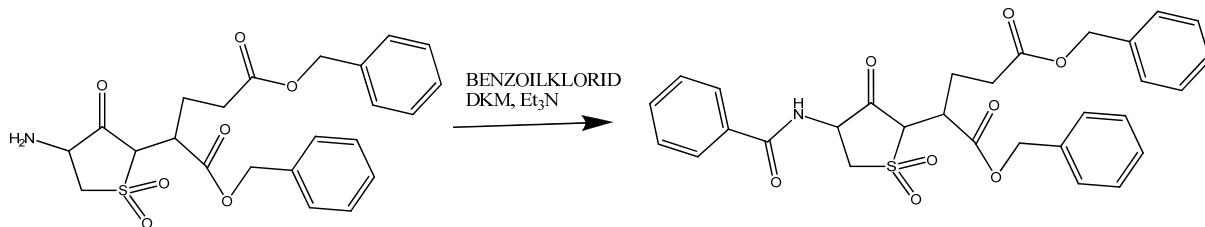
Izolacija:

Reakcijsko zmes postavimo na rotavapor, da celoten ledocet in klorovodikova kislina izhlapita. Celoten sistem postavimo na membransko črpalko.

Rezultati analiz:

IZGLED	Rumena smola
IZKORISTEK	95 %
RETENCIJSKI FAKTOR	MF: DKM/MeOH = 4/1 + 1%AcOH, Rf = 0,87
1H NMR (300 MHZ) (δ [ppm])	2,32-2,42 (m, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -); 2,9 (t, J = 4,42 Hz, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -); 3,3 (s, 1H, -NH-); 4,0 (t, J = 9,51 Hz, 1H, -CH ₂ -obročni); 4,5 (t, J = 8,37 Hz, 1H, -CH(COOCH ₃)-); 4,9 (t, J = 8,44 Hz, 1H, -CH ₂ -obročni); 5,3 (d, J = 6,32 Hz, -CH-obročni); 7,33-7,38 (m, 10H, ArH)
HRMS	Dobljen: 461,1390 Izračunan: 461,1382
MASNA SPEKTROSKOPIJA	461,1 [M+H] ⁺ , 483,1 [M+Na] ⁺
IR [cm^{-1}]	3389,96 (-NH ₂); 2951,59 (-COO-); 1960,78; 1738,16 (-CO-); 1359,59;
TALIŠČE	/

4.20 Sinteza dibenzil 2-(4-benzamido-izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentadioata (spojina 20)



Postopek:

135 mg (0,293 mmol) spojine 20 raztopimo v 5 ml diklorometana ter dodamo 4 ekvivalente (1,17 mmol) trietylamina. Dodamo magnetek in pokrijemo s septumom. Sistem prepihamo z argonom in postavimo na ledeno kopel. Ko se reakcijska zmes ohladi, po kapljicah dodamo 1,1 ekvivalent (0,32 mmol) benzoilklorida.

Izolacija:

1. Ekstrakcija

V reakcijsko zmes dolijemo 10 ml diklormetana (of) ter vse skupaj prelijemo v lij ločnik. Spiramo: 3x z 20 ml 0,1 M klorovodikove kisline, 3x z 20 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata ter 1x z 20 ml nasičene raztopine natrijevega klorida.

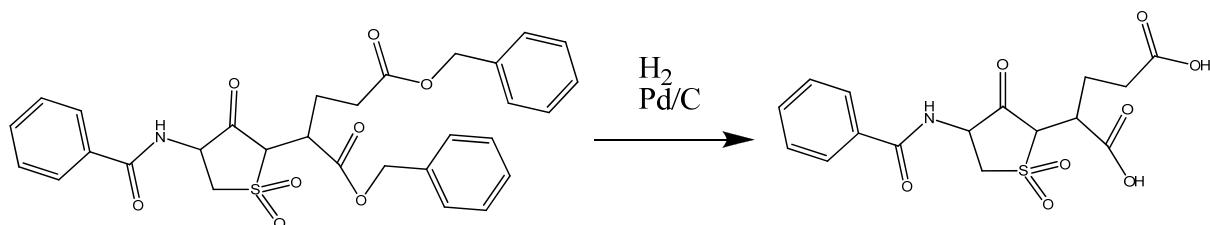
2. Flash kromatografija

MF: kloroform(K)/metanol = 50/1

Rezultati analiz:

IZGLED	Oranžno olje
IZKORISTEK	66 %
RETENCIJSKI FAKTOR	MF: K/MeOH=50/1, Rf1 = 0,15, Rf2 = 0,08
1H NMR (300 MHZ) (δ [ppm])	2,50-2,70 (m, 4H, -CH ₂ -CH ₂ -); 4,0-4,2 (m, 1H, -CH ₂ -obročni); 4,7 (t, J = 6,15 Hz, 1H, -CH(COOCH ₃)-); 4,9 (q, 1H, -CH ₂ -obročni); 5,0 (s, 2H, -O-CH ₂ -Ph); 5,07-5,15 (m, 3H, -CH-obročni + -O-CH ₂ -Ph); 5,2 (d, J = 8,28 Hz, 1H, -NH-); 7,1 (d, J = 2,94 Hz, 0,5H, ArH); 7,3 (d, J = 8,28 Hz, 12H, ArH); 7,4 (t, J = 5,61 Hz, 1H, ArH); 7,54-7,59 (m, 0,5H, ArH); 7,71-7,81 (m, 1H, ArH)
HRMS	Dobljen: 565,1650 Izračunan: 565,1645
MASNA SPEKTROSKOPIJA	565,2 [M+H ⁺] ⁺ , 587,1 [M+Na ⁺] ⁺
IR [cm ⁻¹]	3379,66 (-NH-); 2956,58 (-COO-); 1736,49 (-CO-); 1663,86 (-CONH-); 1528,83 (-C=C-Ar)
TALIŠČE	/

4.21 Sinteza 2-(4-benzamido-izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid-2-il) pentandiojske kisline (spojina 21)



Postopek.

V 25 ml dvovratno bučko zatehtamo 150 mg (0,23 mmol) spojine 21, dodamo 10 ml brezvodnega etanola. Kot katalizator uporabimo Pd/C (15 mg), dodamo magnetek in en vrat pokrijemo s septumom, na drugega pa damo ventil, preko katerega bomo kasneje priklopili membransko črpalko. Sistem dobro prepihamo z argonom. Previdno priklopimo na membransko črpalko. Čez čas membransko črpalko odklopimo. V sistem preko balona uvajamo plinasti vodik. Reakcijo pustimo teči 24 ur.

Opozorilo: Pri delu s katalizatorjem je potrebna previdnost, saj se na zraku lahko vžge.

Izolacija:

Reakcijsko zmes odfiltriramo preko guča. Katalizator, ki ostane na guču vsaj 4x speremo z etanolom. Filtrat uparimo na rotavaporju. Pd/C pospravimo v vsebnik z odpadnim katalizatorjem.

Rezultati analiz.

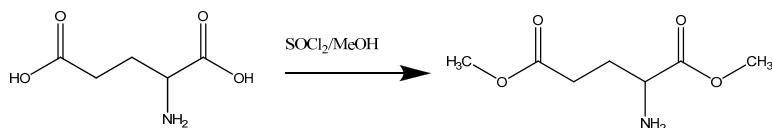
IZGLED	Beli kristali
IZKORISTEK	94 %
RETENCIJSKI FAKTOR	MF: DKM/MeOH = 4/1 + 1%AcOH, Rf = 0,16
1H NMR (300 MHZ) (δ [ppm])	1,88-2,21 (m, 4H, -CH ₂ -CH ₂ -); 3,41-3,45 (m, 2H, CH(COOCH ₃ + CH ₂ -obročni); 3,85-3,94 (m, 1H, -CH ₂ -obročni); 4,08-4,21 (m, 1H, -CH-obročni); 4,52-4,55 (m, 1H, -NH-); 7,41-7,54 (m, 2,5H, ArH); 7,85-7,89 (m, 2,5H, ArH); 9,3 (q, J = 9,68 Hz, 1H, -COOH)
HRMS	Dobljen: 383,0552 Izračunan: 383,0549
MASNA SPEKTROSKOPIJA	383 [M-H] ⁻
IR [cm^{-1}]	3367,98 (-NH-); 1720,11 (-C=O); 1341,12 (-CONH-); 1243,31
TALIŠČE	125°C

5 RAZPRAVA

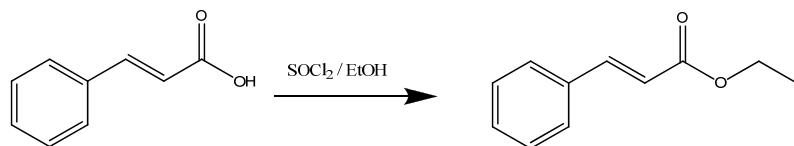
5.1 RAZPRAVA O SINTEZAH

5.1.1 Sinteza metilnega/etilnega estra s kislinsko katalizirano esterifikacijo

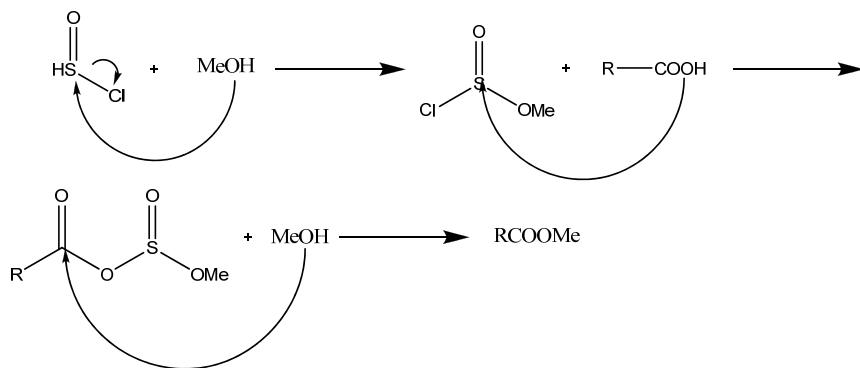
Estre karboksilnih kislin smo pripravili po sledeči reakcijski shemi.



Slika 26: Reakcijska shema priprave metilnega estra D-glutaminske kisline



Slika 27: Reakcijska shema priprave etilnega estra cimetne kisline



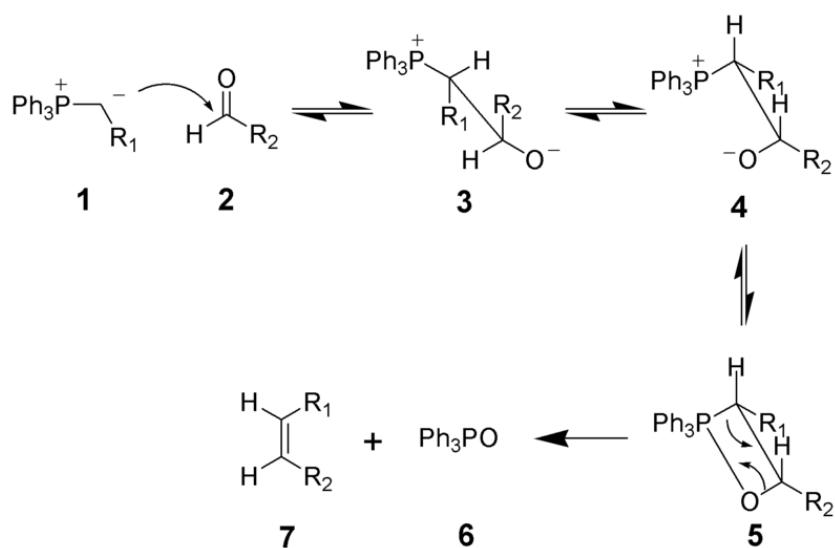
Slika 28: Nastanek metilnega estra

Za sintezo metilnega/etilnega estra smo uporabili tionil klorid, ki je donor klorida. V prvi stopnji torej dobimo metil sulfinil klorid in Cl^- , ki v naslednji stopnji reagira s kislino do mešanega sulfinskega anhidrida, ta pa reagira z alkoholom (metanol/etanol) do nastanka ustreznega estra (slika 26).

Nastanek spojine 1 in spojine 8 je kvantitativnen.

5.1.2 Nastanek alkena iz aldehida in fosforana po Wittigu

Wittigova reakcija – adicija s sledečo eliminacijo na sp₂ hibridiziranem atomu; pretvorba. Negativni sterični center stabiliziranega ilida (1) nukleofilno napade sp₂ hibridiziran ogljikov atom (2). Ta del reakcije je tudi najpočasnejši del. V naslednji stopnji pride zaradi sterične stabilizacije do rotacije okrog vezi C-C (4). Negativno nabit kisikov atom v naslednji stopnji napade pozitivni center fosforana in pride do tvorbe oksofosfatana (5). V zadnji stopnji poteče eliminacija, kjer dobimo Z-alken (7) in trifenilfosfin oksid (6). (28)



Slika 29: Mehanizem Wittigove reakcije (prirejeno po 28)

Reakcijo smo izvajali v mikrovalovnem reaktorju. Mikrovalovi ($\lambda = 1 \text{ mm}-1 \text{ m}$) imajo dovolj visoko energijo, da povzročajo večjo gibeljivost molekule, s tem je verjetnost za uspešen trk večja, hkrati pa ne povzročajo cepitve vezi in spinskih prehodov. Poglavitna lastnost mikrovalov, ki je omogočila njihovo uporabo v sintezni kemiji, je sposobnost učinkovitega in pravilno usmerjenega segrevanja reakcijske zmesi, kar lahko pospeši reakcijo, vpliva na njihovo boljšo ponovljivost in poveča izkoristke. Absorpcija energije mikrovalov poteka z rotacijo dipolov in ionsko kondukcijo. Energijo mikrovalov absorbirajo in pretvorijo v toplotno in kinetično energijo le dielektrične snovi ter ioni, kot so različna topila in tudi nekateri reagenti, kar je vzrok za selektivno segrevanje snovi. Toplotna energija topila se nato porabi za potek reakcije. Uporaba mikrovalovnega reaktorja je tudi racionalna, saj je čas potreben za potek reakcije znatno nižji. (27)

Sinteza spojine 4 je potekala kvantitativno. Poleg našega produkta dobimo še ostale izhodne produkte, ki smo jih odpravili z uporabo flash kromatografije.

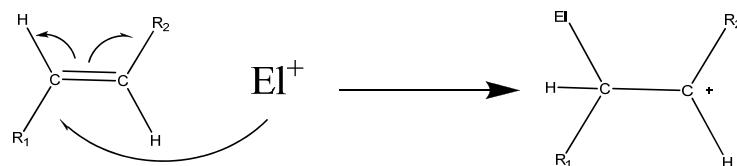
5.1.3 Elektrofilna adicija z nastankom vezi C-S

V prvi stopnji pride do vezave elektrofila (E), reakcijo pa zaključi nukleofil (Nu). Elektrofilne adicije potekajo predvsem na nepolarnih dvojnih oziroma trojnih vezeh.

Splošen mehanizem reakcije:

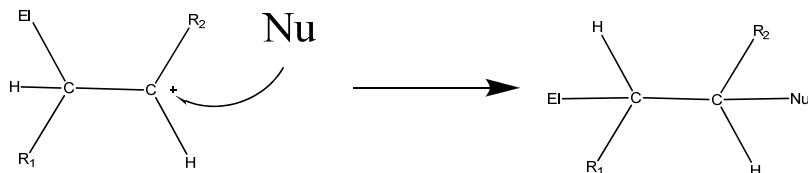
1. stopnja – vezava elektrofila na multiplo vez

Elektrofil napade dvojno vez v alkenu, ki se razpre in omogoči vezavo elektrofila. Nastane karbokation.



Slika 30: Mehanizem vezave elektrofila na multiplo vez

2. stopnja – vezava nukleofila na karbokation



Slika 31: Vezava nukleofila na karbokation

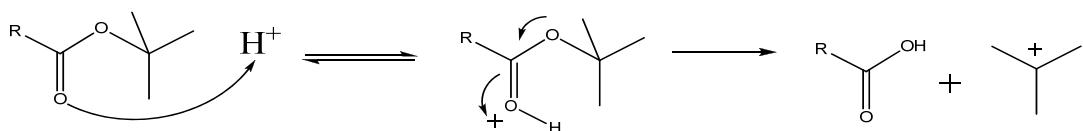
Elektrofilno adicijo smo uporabili pri sintezi spojine **2** in spojine **5**, pri obeh dobimo natrijevo sol sulfonske kisline.

Tudi pri poteku te reakcije smo uporabili mikrovalovni reaktor.

Pri nastanku spojine **2** je bil potek reakcije skoraj kvantitativen in smo dobili želeni produkt z 91 % izkoristkom. Izolacije smo se lotili z ekstrakcijo, s čemer smo se znebili bazičnih in kislih snovi, ki so vodotopne.

Pri spojini **5** je bil izkoristek relativno slab in sicer 56 %. Potrebno je bilo tudi čiščenje s flash kromatografijo. Po pregledu NMR in masnih spektrov je bilo ugotovljeno, da je poleg elektrofilne adicije potekla tudi odstranitev terc-butilne zaščite iz karboksline skupine.

5.1.4 Odstranitev terc-butilne zaščite:



Slika 32: Mehanizem odstranitve terc-butilnega estra

Karbonilni kisikov atom se protonira v prisotnosti kisline ter nastane nestabilen intermediat. Pozitivni naboje je lociran na karbonilnem kisikovem atomu. Ta nestabilen intermediat razpade do proste karboksilne kisline in terc-butilnega kationa.

5.1.5 Reakcija halogeniranja – nukleofilna substitucija

Za sulfonsko skupino

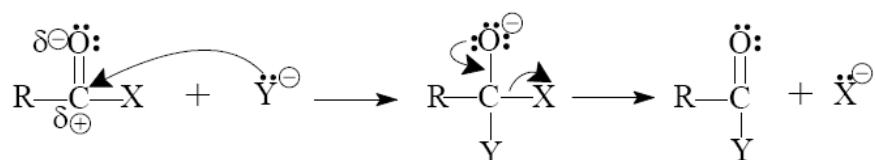


Slika 33: Mehanizem S_N1

Reakcija poteka v dveh stopnjah po mehanizmu S_N1 . Najprej se v počasni stopnji, ki določa hitrost, odcepi izstopajoča skupina $-\text{OH}$ in nastane kation (planaren sp^2 hibridiziran), ki nato v drugi, zelo hitri stopnji reagira z nukleofilom Cl^- . Nukleofil, ki napada, lahko reagira z njim tako iz ene kot iz druge strani (spojina 3 in spojina 5). (31)

Reakcijo smo izvajali na oljni kopeli pod refluksom približno 5 ur. Po končani reakciji smo topilo izparili in suh zaostanek ponovno raztopili v etilacetatu. Nato smo izvajali ekstrakcijo z bazično vodno raztopino, da smo se odpravili kislino.

Za karboksilno skupino



Slika 34: Mehanizem S_N2

Reakcija poteka po mehanizmu S_N2. V eni stopnji poteka vezava nukleofila (Cl-) na substrat ter odcep iztopajoče skupine (-OH). V prehodnem stanju je na centralni C-atom vezanih pet skupin. Pri tem pride do inverzne konfiguracije (Waldenov obrat) (spojina 5). (31)

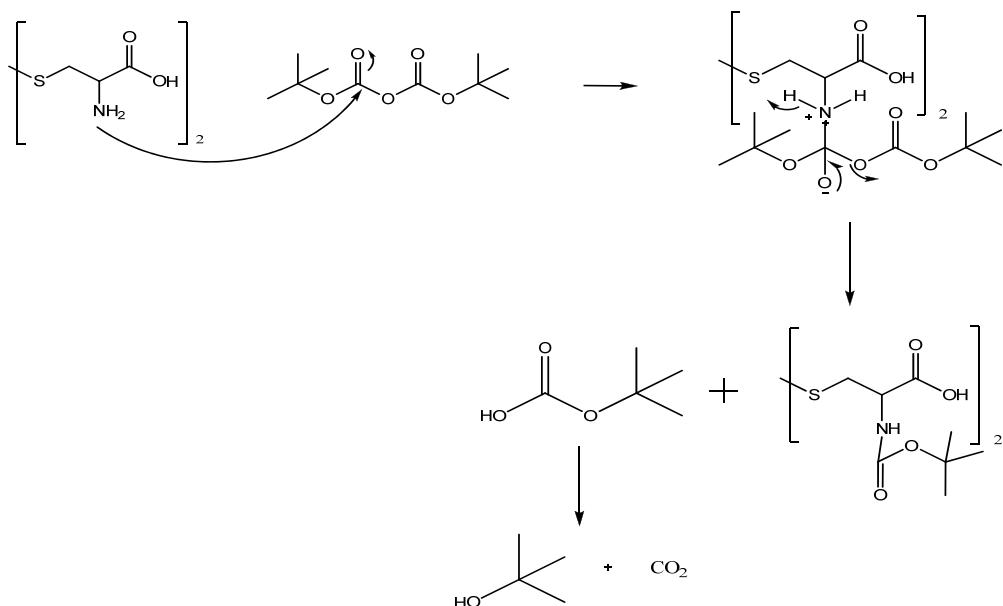
Pri spojini 3 poteče retro-Michaelova reakcija nazaj do etil cimetata. Izkoristek pri sintezi spojine 5 je že na stopnji elektrofilne adicije nizek. Po nukleofilni substituciji sicer dobimo ustrezen produkt, vendar je izkoristek le 18 %, zato tudi to sintezno pot opustimo.

5.1.6 Zaščita amino skupine L-cistina z di-terc-butil dikarbonatom

Obe aminski skupini v L-cistinu smo zaščitili z uporabo Boc₂O (di-terc-butil dikarbonat). Zaščita obih aminskih skupin je pomembna zato, da bodo reakcije v poznejših stopnjah (ciklizacija) potekale selektivno.

Reakcija zaščite amino skupine poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije na karboksilni skupini. Reakcija poteka preko tetraedričnega intermediata. Prosti elektronski par amino skupine cistina nukleofilno napade enega izmed dveh karboksilnih ogljikovih atomov di-terc-butil dikarbonata. Pride do nastanka intermediata, ki razpade do končnega produkta (spojina 7) in terc-butil karbonata, ta pa dalje razpade do terc-butanola in ogljikovega dioksida. (34)

Potek reakcije je dober. Reakcija poteka selektivno z dobrim izkoristkom 83 %.

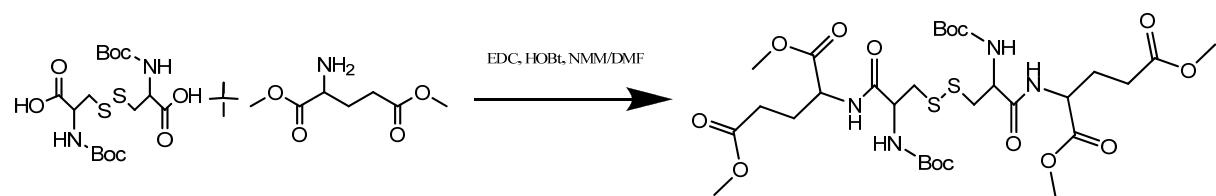


Slika 35: Reakcijski mehanizem zaščite amino skupine z di-terc-butil dikarbonatom

5.1.7 Priprava amidov

Amide smo pripravljali po dveh različnih postopkih, in sicer z metodo EDC/HOBt (spojina **9**) in z metodo kislinskih kloridov (spojine **16**, **17**, **20**).

Metoda EDC/HOBt

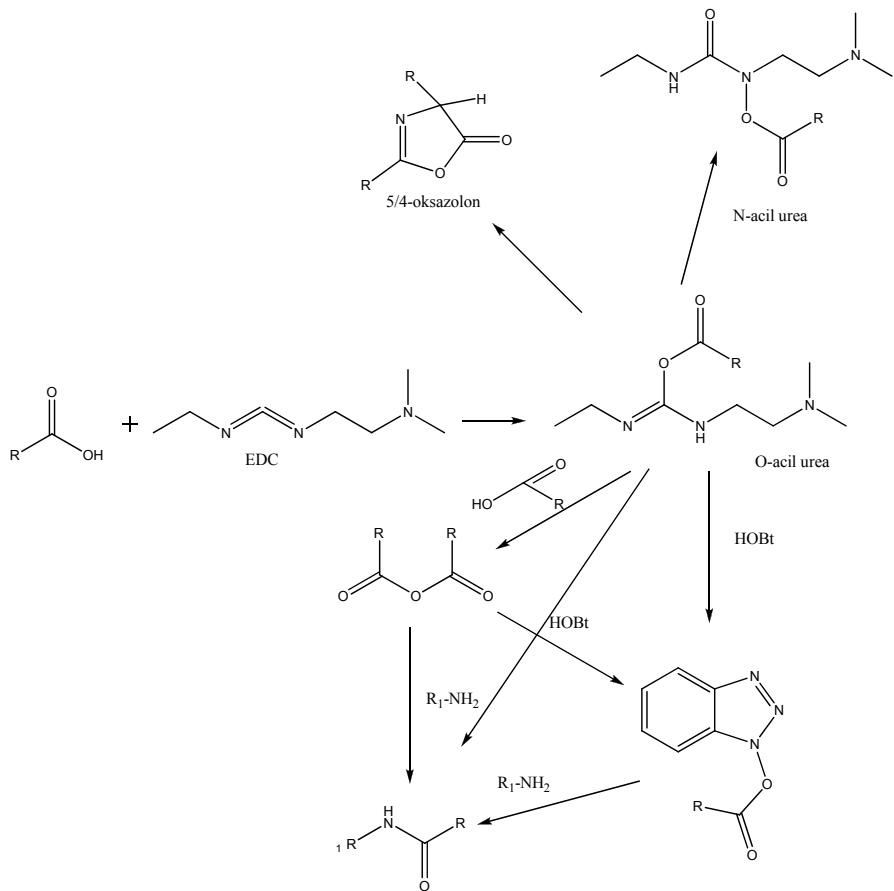


Slika 36: reakcijska shema nastanka spojine 9

Prosta karboksilna skupina L-cistina tvori z EDC ustrezno O-acil sečnino, v kateri je karbonilni ogljikov atom močnejši elektrofil od tistega v prosti karboksilni kislini in je zaradi tega dovetnejši za napade nukleofilov. (35)

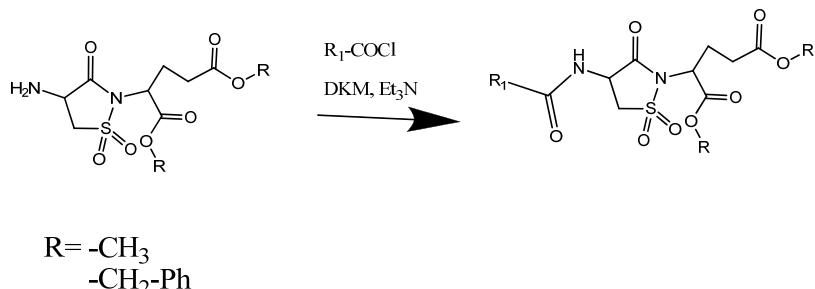
Sam amid lahko potem nastane po dveh možnih poteh. O-acil sečnina reagira z aminom do amida ali pa iz O-acil sečnine in še enega ekvivalenta izhodne karboksilne kisline nastane reaktivni anhidrid, ki reagira z aminom do amida. Glede na to, da iz O-acil sečnine lahko nastanejo tudi N-acil sečnine ali pa 4/5H-oksazoloni, reakcijam tvorbe amidne vezi z EDC dodajamo HOBt. Ta reagira kot nukleofil z O-acil sečnino oziroma anhidridom do manj aktivnih estrov. (35) Nastali estri pa so kljub temu še vedno dovolj reaktivni, da z aminom reagirajo do amidov, iz njih pa ne nastajajo stranski produkti. Derivat sečnine (nastane iz O-acil sečnine) je topen v kislem vodnem mediju in ga odstranimo z ekstrakcijo. (32)

Izkoristek reakcije (spojina **9**) je srednje dober 64 %. Kot razlog bi lahko navedli nastanek stranskih produktov in izgube pri čiščenju.



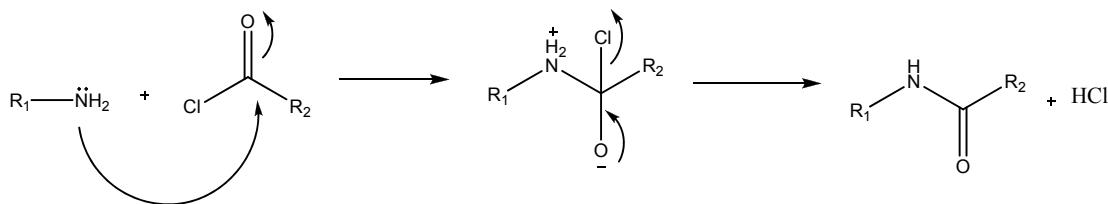
Slika 37: Reakcijski mehanizem nastanka amidne vezi z metodo EDC/HOBt

Metoda kislinskih kloridov



Slika 38: reakcija tvorbe amidne vezi z metodo kislinskih kloridov

Reakcija je nukleofilna substitucija. Amid s svojim prostim elektronskim parom napade karboksilni ogljikov atom kislinskega klorida. pride do nastanka tetraedričnega intermediata. Po razpadu intermediata pride do nastanka amida. (31)



Slika 39: Mehanizem nastanka amidne vezi z metodo kislinskih kloridov

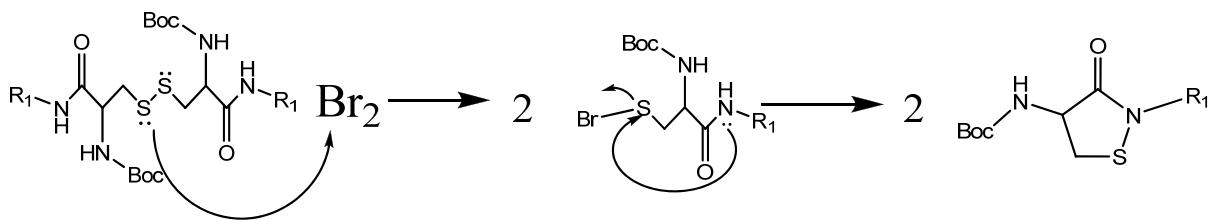
Reakcijo z metodo kislinskih kloridov smo izvajali z dodatkom trietyl amina, katerega funkcija je bila, da pretvori pretvori amonijevo sol v prosto obliko ter nevtralizira iztopajočo klorovodikovo kislino. Reakcijo smo izvajali z dvema različnima kislinskima kloridoma, in sicer s fenilacetil kloridom in benzoil kloridom ter z dvema aminoma, ki sta se razlikovala v zaščitni skupini na karboksilni skupini (bezilna (spojina 19) in metilna zaščita (spojina 12)). Reakcija, kjer sta reagirala spojina 12 in fenilacetil klorid ni pod nobenimi pogoji potekla do konca. V reakcijski zmesi sta ostajali obe izhodni spojini. Nastali produkt smo kljub temu poskušali izolirati iz zmesi s pomočjo izolere, vendar so nastale tri lise, ki se med sabo niso ločile. Reakcijsko pot smo prekinili.

Reakcija kjer smo uporabili spojino 12 in benzoil klorid je sicer potekla, vendar so izkoristki razmeroma slabi (44%). Poleg tega nastajata racemata (4 diastereomeri), ki se na TLC kromatogramu kažeta kot dve lisi, ki se med seboj ne ločita, na NMR-ju pa kot podvajajoči se piki. Slab izkoristek bi lahko pripisali tudi izgubam med izolacijo produkta in nepopolnemu poteku reakcije.

Reakcija, kjer smo uporabili spojino 19 in benzoil klorid, je potekla z nekoliko boljšimi izkoristki (66 %). Tudi v tem primeru nastaja racemna zmes, ki jo lahko opazimo na TLC kromatogramu in NMR-ju. Tudi tukaj bi izgube lahko pripisali izolaciji in nepopolnemu poteku reakcije.

5.1.8 Ciklizacija z bromom

V prvi stopnji poteče nukleofilni napad prostega elektronskega para na žveplu v disulfidnem mostičku na elementarni brom.. Disulfidni mostiček se na tej stopnji odpre in dobimo dva tiola na katera se veže elementarni brom in nastane sulfenil halid. V drugi stopnji dušik s svojim prostim elektronskim parom izvede nukleofilni napad na žveplo in pride do nastanka izotiazolidin-3-onskega cikla in HBr na katerega se veže v reakcijo dodan piridin.

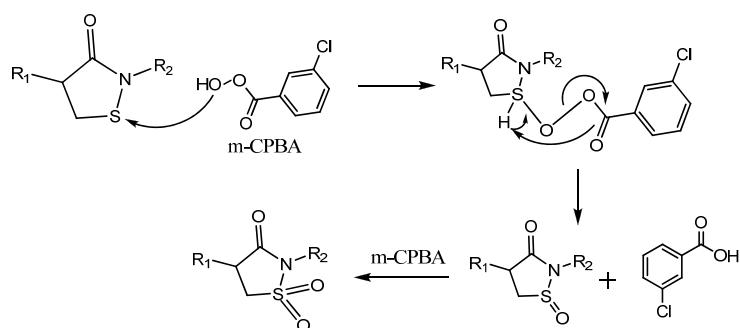


Slika 40: Mehanizem ciklizacije

Reakcija ciklizacije (spojina **10**) je potekala z relativno slabim izkoristkom (47 %). Sama izvedba je bila dolgotrajna, saj je najprej potrebno raztopino ohladiti na -40° C. Celotna aparatura mora biti med potekom reakcije pod argonovo atmosfero (slika 39). Po dodatku bromu v diklorometanu pa se mora reakcijska zmes segreti na sobno temperaturo. Slab izkoristek reakcije bi lahko pripisali nepopolnemu poteku reakcije ali nastanku stranskih produktov.

5.1.9 Oksidacija sulfida do sulfona

Za potek reakcije potrebujemo 2 ekvivalenta metakloroperoksi benzojske kislino, saj se reakcija ponovi dvakrat. Kot produkt oksidacije dobimo dioksid in meta-klorobenzojsko kislino. Žveplov atom lahko obdaja več kot osem valenčnih elektronov. Za nastanek sulfona potrebujemo oksidant, kot je npr. meta-kloroperoksibenzojska kislina. Kot produkt smo dobili rumeno-bele kristale (spojina **11**). Reakcija je potekla s 76,6 % izkoristkom. Kot stranski produkt lahko nastaja sulfoksid.

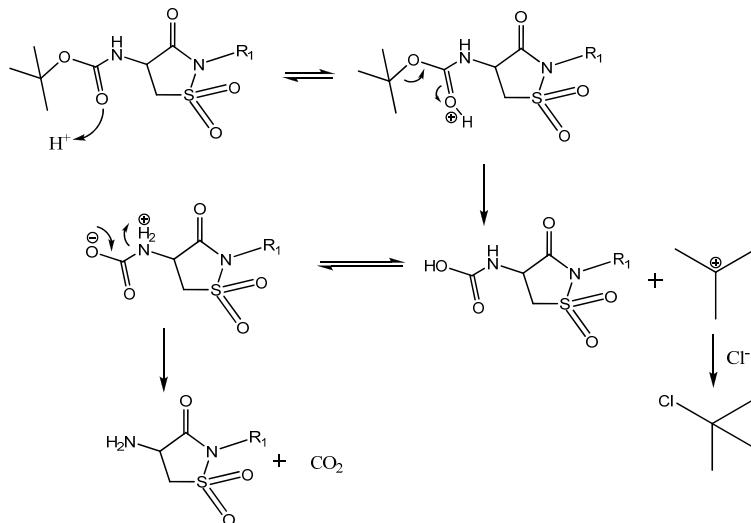


Slika 41: Mehanizem oksidacije z m-CPBA (prirejeno po 36)

5.1.10 Odščita Boca iz amino skupine s plinasto klorovodikovo kislino

V prvi stopnji poteka nukleofilni napad karbonilnega kisikovega atoma karbamatne skupine na proton, ki izvira iz plinaste klorovodikove kislino. pride do nastanka nestabilnega

intermediata, ki takoj razpade do karboksilne kisline in terc-butilnega karbokationa. Proton iz OH skupine karboksilne kisline se premakne na dušikov atom in dobimo ion dvojček, ki nato razpade do N-odščitnega produkta in ogljikovega dioksida. Terc-butilni karbokation reagira s Cl^- ionom in tvori terc-butil klorid.



Slika 42: Mehanizem odščite Boc-a s HCl

Pri nastanku spojine **12** smo kot topilo uporabljali tetrahidrofuran, zato je naš odščiten produkt izpadel iz THF-a. Reakcijsko zmes smo prelili z etrom in topili odparili. Nastanejo čisti beli kristali s 74 % izkoristkom.

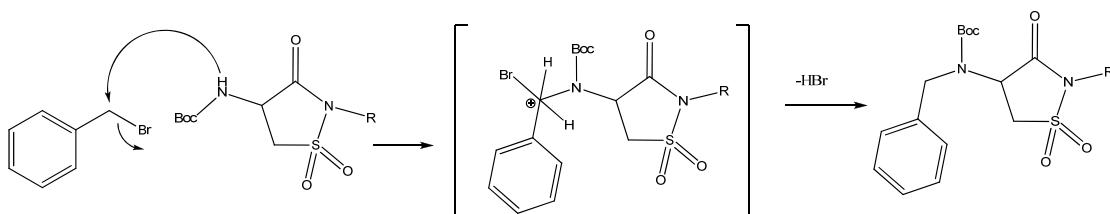
Pri nastanku spojine **19** pa smo kot topilo uporabili ocetno kislino, zato naša spojina ni izpadla iz topila. Reakcijsko zmes smo postavili na rotavapor in izparili topilo in prebitno klorovodikovo kislino. Nastala je rumena smolnata snov.

5.1.11 Sinteza aminov

Natanek amino vezi smo izvajali po dveh postopkih: alkiliranje in reduktivno aminiranje. Izkoristki obeh reakcij so zelo slabi.

Alkiliranje na dušikovem atomu

Dušikov atom s prostim elektronskim parom nukleofilno napade ogljikov atom metilenske skupine benzilbromida. Reakcija je nukleofilna substitucija in poteka po $\text{S}_{\text{N}}2$ reakcijskem mehanizmu, torej z nastankom nove vezi istočasno poteka cepitev stare vezi. Pri reakciji nastaja HBr , katerega nevtraliziramo z dodatkom baze (K_2CO_3).

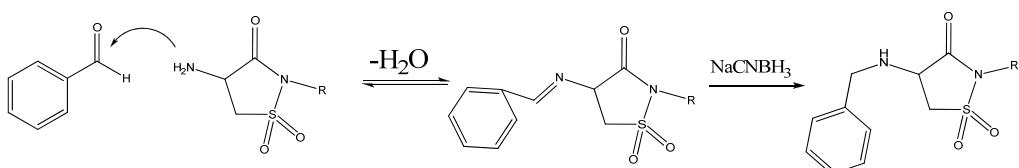


Slik 43: Mehanizem alkiliranja na dušikovem atomu

Alkiliranje na dušikovem atomu smo izvedli z benzilbromidom kot alkilirnim reagentom. Reakcijo smo izvajali v acetonitrilu pod refluksom in v argonovi atmosferi. Kot bazo smo uporabili kalijev karbonat in kot katalizator benzil trietilamonijev klorid. Reakcija poteče po 24 urah oziroma potek spremljamo s TLC kromatografijo. Izkoristek reakcije je slab. Spojina **14** nastane z 20 % izkoristkom, kar je vzrok nepopolnega poteka alkiliranja in tudi izgube pri izolaciji čistega produkta.

Reduktivno aminiranje

V prvi stopnji poteče nukleofilna adicija na C=O skupino benzaldehida. Kot produkt te reakcije nastane odgovarjajoči imin, ki se v naslednji stopnji z natrijevim cianborhidridom reducira do amina. (29)

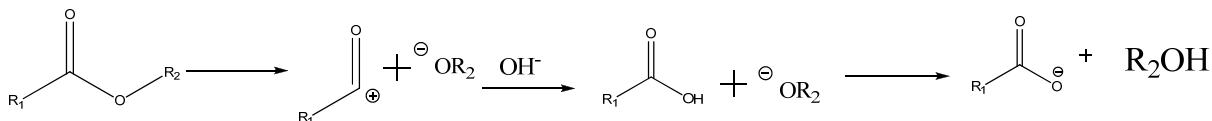


Slik 44: Mehanizem reduktivnega aminiranja

Reduktivno aminiranje na dušikovem atomu smo izvajali z benzaldehidom in dodatkom natrijevega cianborhidrida kot reduktivnim sredstvom. Reduktivno aminiranje izvajamo v argonovi atmosferi, kot topilo smo uporabili brezvodni metanol. Reakcijo pustimo teči od 12 do 48 ur. Potek reakcije spremljamo s TLC kromatografijo. Kot produkt dobimo spojino **13** z nizkim izkoristkom, kar je posledica slabo potekle reakcije in izgub pri izolaciji.

5.1.12 Alkalna hidroliza metilnih estrov

Alkalna hidroliza lahko poteče po več različnih mehanizmih. Običajen potek pa je preko mehanizma tipa B_{AC}^2 . Ta mehanizem se imenuje klasifikacija po Ingoldu, kjer poteka bimolekularna reakcija s cepitvijo acilne skupine. (32)



Slika 45: Mehanizem alkalne hidrolize estra

Metilne estre karboksilnih kislin smo odstranjevali z alkalno hidrolizo. Kot vir OH⁻ ionov smo uporabili 8 ekvivalentov 1 M raztopino natrijevega hidroksida. Izkoristek reakcije je relativno slab in sicer 43 % pri spojini **18** in 54 % pri spojini **15**.

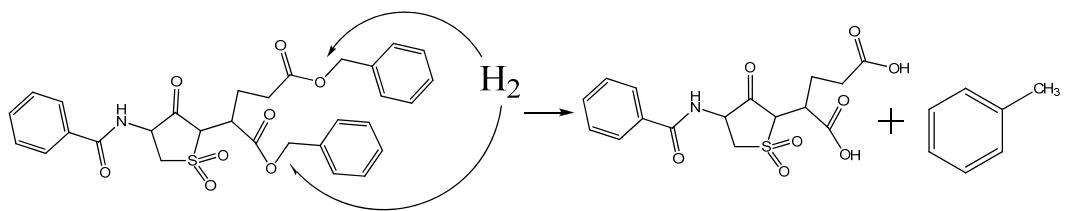
Pri spojini **18** je poleg odcepa metilnih skupin prišlo tudi do cepitve obroča in s tem nastanka sulfonske skupine. Problem, ki se pojavi pri izolaciji je, da je spojina dobro topna v vodnih raztopinah, zato smo morali izvajati ekstrakcijo, kjer je naša spojina prešla v vodno fazo. Poleg naše spojine v vodno fazo preide tudi natrijev hidroksid. Vodo smo zato izpareli in suho oborino prelili z etanolom, v katerem se spojina topi, natrijev hidroksid pa ostane neraztopljen.

Pri spojini **15** je po dodatku natrijevega hidroksida prišlo do odcepa benzilne skupine in razpada enega metilnega estra. Na to kažejo tudi NMR in masna analiza vzorca.

5.1.13 Katalitsko hidrogeniranje - hidrogenoliza

Reakcija organskih spojin z vodikom v prisotnosti katalizatorja - katalitsko hidrogeniranje omogoča enostavno in preprosto metodo pretvorbe v ustrezne spojine. Kot katalizatorje uporabljamo aktivne substance z visoko katalizersko sposobnostjo ter dolgo življensko dobo. Na katalitski učinek vplivajo: kristalna mreža aktivnih spojin, velikost zrn (čim bolj je drobnozrnat, tem bolj je učinkovit), čim večja specifična površina, mehanska odpornost.

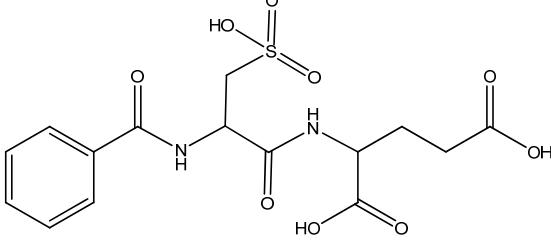
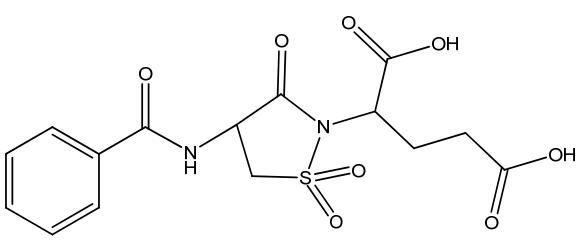
Ponavadi takšne katalizatorje vežemo na nosilce, s katerimi dosežemo enakomerno porazdelitev po veliki površini, s tem pa lahko tudi povečajo aktivnost. To so lahko različni silikati, karbonati ali aktivno oglje. Mi smo kot katalizator uporabili žlahtno kovino Pd (paladij), ki je vezan na aktivno oglje.



Slika 46: Reakcija katalitskega hidrogeniranja

Kot produkt dobimo končno spojino **21**, ki nastane z zelo dobrim izkoristkom 94 %. Vse analize so nam potrdile nastanek naše končne spojine.

5.2 REZULTATI BIOLOŠKEGA TESTIRANJA

Struktura in oznaka spojine	c [μ M]	MurD, RA %
 (18)	500	94
 (21)	500	88

V zgornji tabeli sta prikazana rezultata biološkega testiranja dveh sintetiziranih končnih spojin. Končnima spojinama **18** in **21** smo določili rezidualno aktivnost na encimu MurD. Iz dobljenih rezultatov smo ugotovili, da nobena od spojin ne kaže posebne biološke aktivnosti na encimu MurD, tudi v primerjavi z določenimi fosfinatnimi inhibitorji MurD z enostavno strukturo (Štrancar in sod.) Kljub vsemu se kaže trend inhibicije MurD, saj ima spojina **21** pri 0,5 mM koncentraciji 12% inhibicijo encimske aktivnosti. Na osnovi tega lahko zaključimo, da je na fenilni obroč spojine **21** potrebno pripeti dodatne substituente, ki bodo omogočili dodatne interakcije z aktivnim mestom encima. V primerjavi s Tannerjevimi spojinami imajo naše spojine manjšo molsko maso, nimajo posnetka sladkorne enote (*N*-Ac Mur) in niso mimetiki fosfata, zato je tudi njihova rezidualna aktivnost manjša. Po Tannerju je mimetik fosfata ključen, saj ima brez njega inhibitor s fosfinatnim fragmentom IC₅₀ le 782 μ M, kar je po naši oceni v istem velikostnem razredu kot spojina **21**. (21)

6 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo izpeljali načrt in sinteze potencialnih inhibitorjev na encimu MurD. Kot izhodišče smo vzeli strukturo UMAG, ki je produkt encimske reakcije MurD, oziroma njegovega prehodnega stanja, ki smo ga želeli posnemati z načrtovanjem potencialnih inhibitorjev.

Z našimi spojinami smo ciljali na vezavni mesti za D-Glu in uridin v nativnem ligandu. Ta povezava gre preko sladkorne enote (NAcMan) ter difosfata. Zaradi razmeroma prostega vezavnega mesta lahko gradimo molekulo z direktno povezavo med D-Glu mimetikom in mimetikom uridina.

V prvem delu smo poskušali po večih sinteznih poteh priti do izotiazolidin-3-on-1,1-dioksida, ki bi predstavljal stabilni analog peptidne vezi in bi na mestu 5 imel pripeto amino skupino. Uspešno nam je uspelo napraviti izotiazolidin-3-on-1,1-dioksid, ki ima amino skupino pripeto na mestu 4. V takem stanju so naše spojine mimetiki tetraedričnega ogljikovega atoma prehodnega stanja encimske reakcije in lahko tvorijo vodikove vezi s topilom, kar je ugodno.

V drugem delu nam je uspelo na mimetik L-Ala-D-Glu z amidno vezjo pripeti le fenilni obroč. Uspešno smo sintetizirali spojini **18** in **21**.

V nadaljevanju bi bilo smiselno podaljšati molekulo proti vezavnemu mestu za uridin. S tem bi se po vsej verjetnosti povečala tudi biološka aktivnost novih potencialnih inhibitorjev.

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, Levesque RC: 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. Goodman & Gilman's: The Pharmacological basis of therapeutics 10th Ed, The McGraw-Hill Companies, 2001: 1141-1170
5. Williams Da, Lemke TL; Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 819-864
6. Goodman & Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics 10th Ed., The McGrawHill Companies, New York, 2001; 1143-1146
7. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK: Pharmacology, 5th Ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, 2003: 620-652
8. Setti EL, Micetich RG: New trends in antimicrobial development, *Curr Med Chem*, 1998; 5: 101-113
9. Hammond SM, Lambert PA, Rycoft AN: The bacterial cell surface, Croom Helm, London & Sydney, Kapitan Szabo publishers, Washington DC, 1984; 1-28
10. Auterhoff H., Knabe J., Hoeltje HD: Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1999: 672-673.

11. Green DW: The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opin. Ther. Targets* 2002; 6: 1-19
12. Van Heijenoort J: Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit, *Nat Prod Rep*, 2001; 503–519
13. www.biologycorner.com/resources/gram_bacteria.jpg
14. www.genome.ad.jp/kegg/compound/cpd_antibio4.html
15. www.scq.ubc.ca/.../2006/08/peptidoglycan.gif
16. microvet.arizona.edu/.../image005.gif
17. Hirataje J: Enzyme Inhibitors as Chemical Tools to Study Enzyme Catalysis: Rational design, Synthesis and Applications, *Chem. Rec.*, 2005; 209-228
18. Deva T., Baker EN, Squire CJ, Smith C.A.: Structure of Escherichia coli UDP-N-acetylmuramoyl:L-alanine ligase (MurC). *Acta Crystallogr* 2006; 1466-1474
19. Bertrand JA, Auger G., Martin L.: Crystal structure of UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine:D-glutamate ligase from Escherichia coli. *EMBO J* 1997; 16; 3416-3425.
20. Bertrand JA, Auger G., Martin L., Fanchon E., Blanot D., Le Beller D., van Heijenoort J., Dideberg O.: Determination of the MurD Mechanism Through Crystallographic Analysis of Enzyme Complexes. *J Mol Biol* 1999; 289: 579-590.
21. Tanner ME., Vaganay S., van Heijenoort J., Blanot D., Phosphinate Inhibitors of the D-Glutamic Acid-Adding Enzyme of Peptidoglycan Biosynthesis. *J Org Chem* 1996; 61: 1756-1760.
22. Gegnas LD., Waddell ST., Chabin RM, Reddy S., Wong KK.; Inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurD. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters* 1998; 8: 1643-1648

23. Štrancar K., Blanot D., Gobec S., Design, synthesis and structure-acitivity relationship of new phosphinate inhibitors of MurD., Bioorg Med Chem Lett 2006; 16: 343-348.
24. Vicini P., Geronikaki A., Anastasia K., Incerti M., Zani F.: Synthesis and antimicrobial activity of novel 2-thiazolylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2006; 14: 3859-3864.
25. Tomašić T., Zidar N., Rupnik V., Kovač A., Blanot D., Gobec S., Kikelj D., Peterlin Mašič L.: Synthesis and biological evaluation of new glutamic acid-based inhibitors of MurD ligase. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2009; 19: 153–157.
26. Turk S., Kovač A., Boniface A., Bostock JM., Chopra I., Blanot D., Gobec S.: Discovery of new inhibitors of the bacterial peptidoglycan biosynthesis enzymes MurD and MurF by structure-based virtual screening. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2009.
27. <http://www.chemsynthesis.com/>.
28. http://en.wikipedia.org/wiki/Wittig_reaction
29. http://en.wikipedia.org/wiki/Reductive_amination
30. March J, Smith MB: March`s advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure, 5th Ed., 2001
31. Tišler M.: Organska kemija, tretja izdaja, 1991
32. Smith MB, March J: March s Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanism and Structure, 5thEd: John Wiley & Sons, Inc. 2001.
33. Hu Y, Helm JS, Chen L, Ginsberg C, Gross B, Kraybil B, Tiyanont K, Wu T, Walker S: Identification of Selective Inhibitors for the Glucosyltransferase MurG via High-Throughput Screening. Chemistry & Biology 2004; 11: 703-711.
34. Clayden J, Greeves N, Warren S, Wothers P: Organic Chemistry. Oxford

University Press 2001.

35. Bodanszky, M: Principle of Peptide Synthesis, Springer Verlag Berlin 1994.
36. Kim J., Rhee H.,: Conversion of Cyclic Acetals to Hydroxy Esters by MCPBA Oxidation; J. Korean Chem. Soc., 2002, 46, 479 – 483.
37. Anderluh M, Gobec S: Načrtovanje in sinteza novih mimetikov UDP-Nacetilmuraminske kisline kot osnova za inhibitorje MurD ligaze: Slovenski kemijski dnevi 2005
38. Balasubramanian, Deepak; European journal of Medicinal chemistry, 2004, 39, 827 – 834.
39. Matthew L. Crawley; Organic letters, 2005, vol 7, no 22, 5067 – 5069
40. Humljan J., Kotnik M., Blanot D.: Novel Naphthalene-N-sulfonyl-D-glutamic Acid Derivates as Inhibitors of MurD, a Key Peptidoglycan Biosynthesis Enzyme: Journal of Medicinal Chemistry, 2008, 51 (23); 7486 - 7494