

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

DEJAN ŠMALC

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

LJUBLJANA, 2010

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

DEJAN ŠMALC

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA REDUCIRANIH DIPEPTIDOV KOT
POTENCIJALNIH INHIBITORJEV BAKTERIJSKIH TRANSPEPTIDAZ**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF REDUCED DIPEPTIDES AS POTENTIAL
INHIBITORS OF BACTERIAL TRANSPEPTIDASES**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko naložilo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom izr. prof. Stanislava Gobca, mag. farm., in somentorstvom Mateja Živca, mag. farm.

Zahvala:

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. Stanislavu Gobcu, mag. farm. in somentorju Mateju Živcu, mag. farm. za pomoč in spodbudo, ki sta mi nudila pri praktičnem delu in pisanju diplomske naloge. Ravno tako se bi zahvalil vsem zaposlenim na katedri za farmacevtsko kemijo za prijetno vzdušje ter koristne nasvete pri delu v laboratoriju.

Rad bi se zahvalil še svoji družini, ki mi je stala ob strani, ko se mi je bilo najtežje spraviti k delu in sem imel pomanjkanje motivacije.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko naložilo samostojno izdelal pod mentorstvom izr. prof. Stanislava Gobca, mag. farm., in somentorstvom Mateja Živca, mag. farm.

Dejan Šmalc

Ljubljana, september 2010

KAZALO

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV	III
1. BAKTERIJSKA REZISTENCA	1
1.1. PROBLEM REZISTENCE	1
1.2. STRATEGIJE BOJA PROTI REZISTENCI	4
1.2.1. RACIONALNA UPORABA PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN (4,10)	4
1.2.2. NOVE PROTIMIKROBNE UČINKOVINE	4
1.2.3. TARČNA MESTA ZA DELOVANJE PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN	5
2. BAKTERIJSKA CELIČNA STENA IN PEPTIDOGLIKAN	7
2.1. BIOSINTEZA PEPTIDOGLIKANA (18)	8
2.2. BAKTERIJSKE TRANSGLIKOZILAZE IN TRANSPEPTIDAZE KOT TARČE PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN (18,19,20)	10
3. PEPTIDOMIMETIKI	11
3.1. BIOIZOSTERIJA PEPTIDNE VEZI (21,22,23)	11
3.2. REDUCIRANI AMIDI KOT MIMETIKI PREHODNEGA STANJA (24,25)	12
4. EKSPERIMENTALNO DELO	14
4.1. NAČRT DELA	14
4.2 MATERIALI IN METODE	17
4.3 SINTEZNI POSTOPKI IN REZULTATI ANALIZ	19
4.3.1. PRIPRAVA REAGENTOV ZA REDUKTIVNO AMINIRANJE	19
4.3.1.1 <i>Sinteza (R)-2-(terc-butoksikarbonilamino)propanojske kisline (2)</i>	19
4.3.1.2 <i>Sinteza (R)-terc-butil 1-(metoksi(metil)amino)-1-oksopropan-2-ilkarbamata (4)</i>	20
4.3.1.3 <i>Sinteza (R)-terc-butil 1-oksopropan-2-ilkarbamata (5)</i>	22
4.3.1.4 <i>Sinteza soli (R)-benzil 2-aminopropanoata s pTsOH (6)</i>	23
4.3.1.5 <i>Sinteza soli (R)-benzil 2-amino-3-metilbutanoata s pTsOH (8)</i>	24
4.3.1.6 <i>Sinteza soli (R)-benzil 2-amino-4-metilpentanoata s pTsOH (10)</i>	25
4.3.2 PRIPRAVA DIPEPTIDOV Z REDUCIRANO AMIDNO VEZJO	26
4.3.2.1 <i>Sinteza (R)-benzil 2-((R)-2-(terc-butoksikarbonilamino)propilamino)propanoata (12)</i>	26
4.3.2.2 <i>Sinteza (R)-benzil 2-((R)-2-(terc-butoksikarbonilamino)propilamino)-3-metilbutanoata (14)</i>	28
4.3.2.3 <i>Sinteza (R)-benzil 2-((R)-2-(terc-butoksikarbonilamino)propilamino)-4-metilpentanoata (16)</i>	30
4.3.3 PRIPAJANJE DIMETOKSI BENZOJSKE KISLINE NA C-TERMINALNI DEL REDUCIRANEGA DIPEPTIDA	32
4.3.3.1 <i>Sinteza (R)-benzil 2-((R)-2-(2,4-dimetoksibenzamido)propilamino)propanoata (19)</i>	32

4.3.3.2 <i>Sinteza (R)-benzil 2-((R)-2-(2,6-dimetoksibenzamido)propilamino)propanoata (21)</i>	34
4.3.3.3 <i>Poizkus sinteze (R)-benzil 2-((R)-2-(2,6-dimetoksibenzamido)propilamino)-3-metilbutanoata (23)</i>	36
4.3.3.4. <i>Poizkus sinteze (R)-benzil 2-((R)-2-(2,6-dimetoksibenzamido)propilamino)-4-metilpentanoata (25)</i>	38
4.3.4 ODSTRANITEV ZAŠČITE S KONČNIH PRODUKTOV	40
4.3.4.1 <i>Poizkus sinteze (R)-2-((R)-2-(2,4-dimetoksibenzamido)propilamino)propanojske kisline (26)</i>	40
4.3.4.2 <i>Sinteza (R)-2-((R)-2-(2,6-dimetoksibenzamido)propilamino)propanojske kisline (27)</i>	41
5. RAZPRAVA	43
5.1. PRIPRAVA REAGENTOV ZA REDUKTIVNO AMINIRANJE	43
5.2. PRIPRAVA DIPEPTIDOV Z REDUCIRANO AMIDNO VEZJO	45
5.3. PRIPAJANJE DIMETOKSI BENZOJSKE KISLINE NA C-TERMINALNI DEL REDUCIRANEGA DIPEPTIDA	46
5.4. ODSTRANITEV ZAŠČITE S KONČNIH PRODUKTOV	46
5.5. RAZLAGA K SINTEZNEMU DELU	47
5.6. REZULTATI TESTIRANJA KONČNIH SPOJIN NA ENCIMIH PBP R39, DdlB IN MurF	47
6. ZAKLJUČEK	48
7. LITERATURA	50

POVZETEK

V zadnjem času potreba po novih protibakterijskih učinkovinah zelo narašča. Nesmotrna in prekomerna uporaba antibiotikov je privedla do razvoja vedno bolj odpornih bakterij, ki so odporne na vsaj enega izmed antibiotikov trenutno v uporabi. Med najbolj bogatimi viri encimskih tarč za razvoj novih protibakterijskih učinkovin je sinteza peptidoglikana. Med temi encimi so tudi encimi iz skupine PBP, ki katalizirajo transglikozilacijo, karboksipeptidacijo in transpeptidacijo peptidoglikana. Vsi ti procesi potekajo izven celice, zaradi česar so še posebej zanimivi za razvoj inhibitorjev. Dosedanji inhibitorji delujejo večinoma preko mehanizma irreverzibilne vezave v aktivno mesto encima.

V okviru diplomske naloge smo načrtovali in sintetizirali dipeptide z reducirano peptidno vezjo za pripravo potencialnih reverzibilnih inhibitorjev transpeptidaznih PBP. Spojine so bile načrtovane kot mimetiki tetraedričnega prehodnega stanja transpeptidazne reakcije. Uporabili smo že ustaljene postopke sinteze reduciranih dipeptidov. Izhajali pa smo iz prostih D-aminokislin (alanin, levcin, valin), njihov N-terminalni smo zaščitili z BOC skupino ter nato pripravili Weinrebov amid, ki smo ga z LiAlH_4 reducirali do aldehyda. C-terminalne dele aminokislin smo zaščitili z benzilno zaščitno skupino. Reducirane amide smo nato pripravili z reduktivnim aminiranjem. Za boljše oponašanje substrata pa smo na N-terminalno aminokislino pripeli 2,6-dimetoksi benzojsko kislino. Za pripravo amidne vezi smo tukaj uporabili kombinacijo reagentov EDC, HOBT in TEA v DMF.

S pomočjo encimskih testov smo testirali še inhibitorno aktivnost sintetiziranih spojin na PBP R39, Ddl B in Mur F. Sintetizirane spojine niso imele inhibitornega delovanja na testne encime.

Ključne besede: PBP, transpeptidaze, reducirani dipeptidi, 2,6-dimetoksi benzojska kislina

ABSTRACT

Lately the need for novel antimicrobial drugs is on the rise. Uncontrolled and excessive use of antibiotics has led to the development of bacteria resistant to at least one of the antibiotics currently in use. Mostly used source of enzyme targets for the development of novel antimicrobial drugs is the synthesis path of peptidoglycan. Enzymes that catalyze transglycosylation, carboxypeptidation and transpeptidation of peptidoglycan are together called PBP's. All processes catalyzed by these enzymes take place outside bacterial cell wall, which makes them more interesting as targets for development of novel inhibitors. Recent inhibitors act mostly by a mechanism of irreversible binding to the active site of the enzyme.

In our work we designed and synthesized dipeptides with reduced peptide bond to develop reversible inhibitors of transpeptidase PBP's. The compounds were planed as mimetics of tetraedric transition state in the transpeptidase reaction. We used common protocols for the synthesis of reduced dipeptides. The starting molecules were free D-aminoacids (Alanine, Leucin, Valine). We protected their N-terminal end with BOC protection group and prepared Weinreb amide, which we reduced to aldehyde in the next step. C-terminal ends of aminoacids were protected with benzyl protective group. Reduced amides were then prepared by reductive amination. To better mimic the substrate, 2,6-dimetoxybenzoic acid was attached to the N-terminal end of the reduced dipeptide. For synthesis of amid bond the following reagents were used: EDC, HOBr and TEA in DMF.

The inhibitory activity of our synthesized molecules was tested on enzymes PBP R39, Ddl B and Mur F. Our molecules did not inhibit the selected test enzymes.

Key words: PBP, transpeptidases, reduced dipeptides, 2,6-dimetoxy benzoic acid.

SEZNAM OKRAJŠAV

d	dublet
D-Ala	D-alanin
D-Ala-D-Ala	D-alanil-D-alanin
D-Ala-D-Leu	D-alanil-D-leucin
D-Ala-D-Val	D-alanil-D-valin
D-Leu	D-leucin
D-Val	D-valin
dd	dublet dubleta
Ddl	D-alanil-D-alanin ligaza
D-Glu	D-glutaminska kislina
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dt	dublet tripla
EI	elektronska ionizacija (electron ionisation)
ESI	elektrosprej ionizacija (electrospray ionization)
FAB	obstreljevanje s hitrimi atomi (fast atom bombardment)
FDA	ameriški vladni urad za zdravila in prehrano (Food and Drug Administration)
GlcNAc	N-acetil-glukozamin
J	sklopitvena konstanta
L-Lys	L-lizin
m	multiplet
Mf	mobilna faza
M_r	relativna molekulska masa
MS	masna spektroskopija
Mur A	UDP-N-acetylglukozamin enolpiruviltransferaza
Mur B	UDP-N-acetilenolpiruvilglukozamin reduktaza
Mur C	UDP-N-acetilmuramoil L-alanin ligaza
Mur D	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat ligaza
Mur E	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat: mezo-diaminopimelinat ligaza
Mur F	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat-mezo-diaminopimelat ligaza
MurNAc	N-acetilmuraminska kislina
NMR	nuklearna magnetna resonanca

nNOS	nevronska NO sintaza
PBP	penicilin vezovi proteini (Penicillin-binding proteins)
q	kvartet
Rf	retencijski faktor
RNK	ribonukleinska kislina
s	singlet
SAR	razmerje med strukturo in delovanjem (Structure-Activity Relationship)
t	triplet
TLC	tankoplastna kromatografija
λ	valovna dolžina

1. BAKTERIJSKA REZISTENCA

1.1. PROBLEM REZISTENCE

Protibakterijska zdravila so že več kot 60 let glavno orožje proti infekcijskim boleznim, ki jih povzročajo bakterije in ostali mikrobi, vendar je zaradi naglega širjenja rezistence njihova klinična uporabnost ogrožena. Prvi pojavi rezistence segajo že v leto 1946, kmalu po uvedbi prvih penicilinskih antibiotikov. Seleksijski pritisk na bakterije, kot posledica široke uporabe protibakterijskih zdravil v humani in veterinarski medicini ter kmetijstvu, je povzročil razvoj številnih mehanizmov odpornosti in širjenje rezistentnih bakterijskih sevov (1). Danes je že približno 70 % bolnišničnih patogenih bakterij rezistentnih na vsaj eno od protimikrobnih zdravil, ki se najbolj uporablajo za zdravljenje infekcij (1). V Franciji, Romuniji in Španiji so penicilini že zastareli, v Grčiji pa že obstajajo bakterije, ki se širijo v sistemu zdravstvenega varstva in so popolnoma odporne na trenutno obstoječa protimikrobnna zdravila (2). Pojav rezistence na antibiotike je neizogiben spremljevalec uvajanja novih antibiotikov. Začetna stopnja rezistentnih bakterij pri novih antibiotikih je velikostnega razreda 1 % (1). Klinično signifikantna rezistenca se lahko pojavi že po nekaj mesecih ali pa šele po nekaj letih uporabe protimikrobnih zdravil (3). Pri rezistenci ni vprašanje, ali bo do nje prišlo, temveč, kdaj se bo pojavila (3). Za penicilin so ugotovili prve primere rezistence po dveh letih uporabe, pri vankomicinu pa je poteklo 29 let od začetka uporabe do klinično pomembne rezistence na zdravilo (3).

Rezistenca se lahko razvije na več načinov. Raziskave so pokazale, da se rezistenca lahko prenaša ne le znotraj posamezne vrste bakterij, temveč tudi med različnimi vrstami. Pridobljena rezistenca je lahko posledica mutacij v genih bakterij, ki jih ciljajo zdravila ali pa prenos determinant rezistence s plazmidi, bakteriofagi, transpozoni ali ostalim mobilnim genskim materialom (3). Prenos zapisa za rezistenco preko bakteriofagov poteka preko transdukcije, pri prenosu s plazmidi in konjugiranimi transpozoni pa se prenese genski zapis s konjugacijo. Prenos genskega zapisa lahko poteče tudi preko transformacije, pri čemer se vgradi kromosomska DNK, DNK plazmidov ali DNK odmrlih organizmov v kromosomsko DNK bakterije (3).

Obrambne mehanizme bakterij lahko razdelimo v štiri večje skupine, katere so spodaj tudi predstavljene, prve tri skupine le-teh pa so grafično predstavljene na sliki 1 (1,4,5):

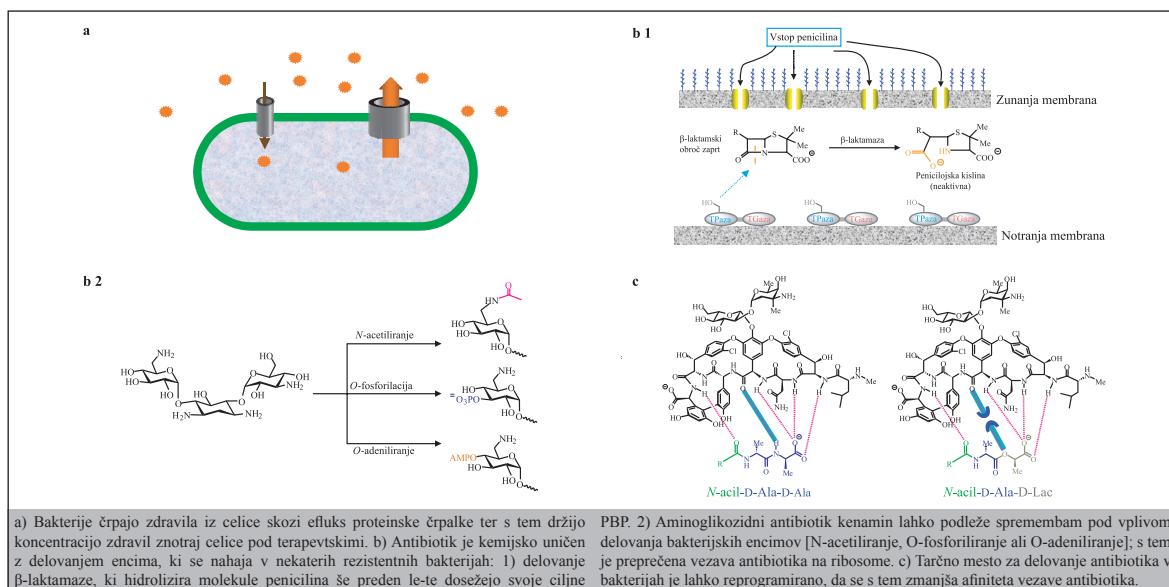
a) Črpanje antibiotika iz celice (efluks antibiotika) (1,4,5):

V primerih, ko je mesto delovanja antibiotika v celičnem jedru ali pa v citoplazmi, mora

le-ta prehajati celično membrano ter se v jedru ali citoplazmi akumulirati v zadostni koncentraciji. Bakterije za obrambo prekomerno proizvajajo membranske proteine (efluksi črpalki), ki služijo za črpanje antibiotikov iz celice v nespremenjeni obliki. S tem preprečujejo, da bi koncentracija antibiotika v notranjosti doseglja terapevtsko. Tak primer je obrambni mehanizem proti tetraciklinom in kloramfenikolu.

b) Encimska deaktivacija antibiotika (1,4):

Druga oblika obrambnega mehanizma je encimska deaktivacija antibiotika. Najbolj tipični primer so encimi β -laktamaze, ki odpirajo laktamski obroč, ter s tem deaktivirajo β -laktamske antibiotike. Njihova učinkovitost je zelo visoka, saj lahko 1 molekula encima deaktivira 1000 molekul β -laktamov na sekundo. Drugi primer deaktivacije pa je bil opažen pri aminoglikozidih, kjer bakterijski encimi spremenijo površino aminoglikozida ter tako preprečijo povezavo s tarčno RNK v ribosomih oziroma zmanjšajo afiniteto do vezave z njimi. To bakterije dosežejo z encimskim N-acetiliranjem, O-fosforiliranjem ali O-adeniliranjem ter tako zmanjšajo možnost prečnih povezav med učinkovino in bakterijskimi ribosomi. Ravno tako pa se s tem mehanizmom branijo bakterije tudi pred kloramfenikolom.



a) Bakterije črpajo zdravila iz celice skozi efluki proteinske črpalke ter s tem držijo koncentracijo zdravil znatno nižjo celice pod terapevtskimi. b) Antibiotik je kemijsko uničen z delovanjem encima, ki se nahaja v nekaterih rezistentnih bakterijah: 1) delovanje β -laktamaze, ki hidrolizira molekule penicilina še preden le-te dosežejo svoje ciljne

PBP. 2) Aminoglikozidni antibiotik kenamin lahko podleže spremembam pod vplivom delovanja bakterijskih encimov [N-acetiliranje, O-fosforiliranje ali O-adeniliranje], s tem je preprečena vezava antibiotika na ribosome. c) Tarčno mesto za delovanje antibiotika v bakterijah je lahko reprogramirano, da se s tem zmanjša afiniteta vezave antibiotika.

Slika 1: Primeri bakterijske rezistence (1,4,5)

c) Sprememba prijemališča protimikrobnih učinkovin v bakteriji (4):

Naslednja izmed oblik zaščite bakterij pred protimikrobnimi učinkovinami je usmerjena v spremembo tarčnega mesta delovanja protimikrobnih učinkovin. Primer je rezistenca na vankomicin, kjer je spremenjeno vezavno mesto za vankomicin. Zamenjava terminalnega D-Ala z laktatom zmanjša afiniteto vezave za 1000-krat in s tem omogoči razrast

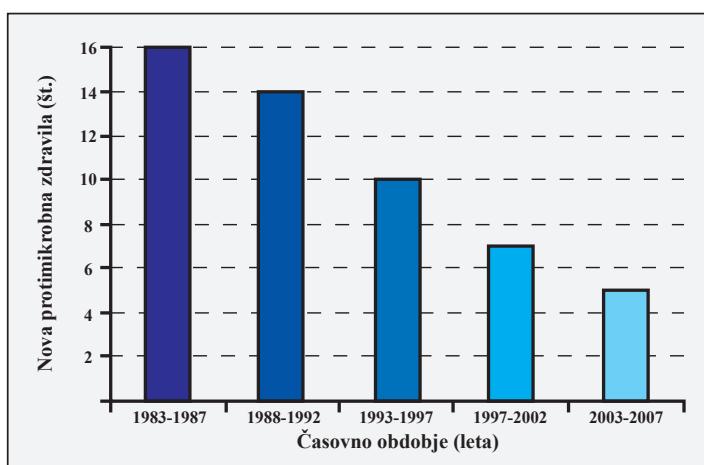
rezistentnih sevov bakterij.

d) Močno povečanje sinteze tarčnega mesta antibiotika (titracija) (6):

Bakterije se branijo s prekomernim proizvajanjem encimov. Lep primer so bakterije odporne proti trimetoprimu, le-te namreč prekomerno proizvajajo dihidrofolat reduktazo ter se s tem izognejo tekmovanju z antibiotikom.

V zadnjem času so problematične bakterije, ki jih skupno imenujejo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsella pneumoniae*, *Acinetobacter baumanii*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Enterobacter spp.*). Le-te so rezistentne na vsaj eno protibakterijsko zdravilo (7). Najnovejše poročilo Evropske unije navaja, da v Evropi samo večkratno odporne bakterije povzročijo 25 000 smrti vsako leto (2).

Sočasno z naraščanjem števila rezistentnih sevov bakterij v preteklih 25 letih je število protimikrobnih zdravil, ki pridejo skozi klinični del raziskav močno upadlo. V letih 1983 do 2007 je bil upad novo registriranih protimikrobnih zdravil pri FDA za 75%, kar je prikazano na sliki 2 (7).



Slika 2: Upad novo registriranih protimikrobnih zdravil pri FDA (7)

V zadnjih 30 letih sta edini resnično novi učinkovini, ki sta bili izdani na trg zdravil, linezolid (Pharmacia in Pfizer) in daptomicin (Cubist). Sočasno z razvojem teh novih zdravil je prišlo do zmanjšanja števila analogov klasičnih antibiotikov, pretežno penicilinov, karbapenemov, cefalosporinov, tetraciklinov, makrolidov in kinolonov (8). Napovedi za zamenjavo sedanjih protimikrobnih zdravil pa so zelo slabe. Od leta 2006 je bilo v ZDA odobreno samo eno novo protibakterijsko zdravilo (doripenem). Nedavno poročilo EU je izpostavilo, da je trenutno samo 15 zdravil v fazi razvoja, ki kažejo potencialno izboljšavo obstoječih protimikrobnih zdravil, in le pet izmed njih je do zdaj doseglo tretjo fazo kliničnih raziskav (9).

Poglavitni razlogi za upad zanimanja za razvoj protimikrobnih zdravil so predvsem v

konkurenči generikov, segmentaciji trga, povečanih ovirah v regulativi, povrnitvi stroškov razvoja ter preusmeritvi sredstev v zdravila za zdravljenje kroničnih bolezni. Protimikrobná zdravila so edinstvena tudi v tem, da široka klinična raba vodi v neizogiben upad dobička tako za posamezno zdravilo kot tudi celotno skupino zdravil (8).

1.2. STRATEGIJE BOJA PROTI REZISTENCI

Za uspešen boj s problemom rezistence moramo razmišljati tako kratkoročno kot tudi dolgoročno. V prvem primeru to lahko storimo tako, da začnemo bolj racionalno uporabljati obstoječe protimikrobne učinkovine, dolgoročno pa potrebujemo nova zdravila, ki bodo lahko nadomestila obstoječa, na katera so bakterije že razvile rezistenco (10).

1.2.1. RACIONALNA UPORABA PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN (4,10)

Pomembno je, da so zdravniki podrobno seznanjeni z obstoječimi mikroorganizmi ter uporabo primernih protimikrobnih zdravil (najprej uporaba ozkospikalnih zdravil). Med predlogi za izboljšanje stanja so izobraževanje predpisovalcev zdravil o protimikrobnem zdravljenju, ker so dostikrat lahko že zdravila prve izbire potencialno nevarna. Težave, ki se pojavljajo pri zdravljenju bi morali obravnavati bolj izkušeni zdravniki, ker je pomembna predvsem izbira pravega zdravila. Z izbiro ustreznegra zdravila in intervala zdravljenja bi le-to skrajšali ter onemogočili razvoj rezistenc zaradi neustreznega zdravljenja. Ob uporabi širokospikalnih zdravil se pojavi težava, ko bakterije razvijejo rezistenco nanje in potem ni več ustrezne izbire zdravil s širšim spektrom. Eden od praktičnih primerov za podaljšanje življenske dobe antibiotikov, so smernice za smotrno rabo antibiotikov v bolnišnicah v ZDA, ki so predstavljene v tabeli 1.

Smernice za podaljšanje življenske dobe protibakterijskih zdravil

- Optimalna raba vseh protibakterijskih zdravil
- Selektivno odstranjevanje, nadzor ali omejevanje protimikrobnih zdravil ali njihovih kombinacij
- Rotacija ali ciklična raba protimikrobnih zdravil
- Raba kombinirane protimikrobne terapije za preprečitev pojava rezistence

Tabela 1: Smernice za smotrno uporabo protibakterijskih zdravil v bolnišnicah v ZDA (4)

1.2.2. NOVE PROTIMIKROBNE UČINKOVINE

V zadnjem času je bil opazen predvsem napredok pri sekvencioniranju bakterijskih genov, kar je dalo vpogled v organizacijo bakterijskih biosintezih mehanizmov in njihovo regulacijo. Rezultat je bil skrčenje seznama bakterijskih genov, ki so pomembni za virulenco in preživetje. Posledično pa je zdaj mogoče razvijati molekule, ki so še bolj selektivne in

specifične (4).

Poleg odkrivanja novih tarč za nove antibiotike v bakterijah je šel razvoj tudi v smeri odkrivanja novih strukturnih skupin, izključno sintezno pripravljenih molekul s širokim spektrom delovanja in sprejemljivo jakostjo (npr. oksazolidindioni) (4).

Nekatere skupine raziskovalcev menijo, da je najbolje razvijati nova protimikrobnna zdravila z delovanjem na že preizkušene tarče (podvajanje DNK, biosinteza proteinov in celične stene) namesto iskanja popolnoma novih tarč (11).

Trenutne razmere v zdravstvu kažejo na izredno potrebo po povečanju novih protibakterijskih zdravil. Pomanjkanje je predvsem po zdravilih proti po Gramu negativnim bakterijam. Ker na tem področju ni trenutno opaznega napredka, lahko računamo, da bo do uporabe protibakterijskih zdravil s popolnoma novim mehanizmom delovanja na po Gramu negativne bakterije preteklo še nekaj časa (11).

1.2.3. TARČNA MESTA ZA DELOVANJE PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN

Tarčna mesta lahko razdelimo na 4 večje skupine:

a) Biosinteza celične stene (4):

Transglikozilaze in transpeptidaze so encimi, ki sodelujejo pri premreževanju peptidoglikana. Ti encimi so tarčna mesta za delovanje penicilinov in cefalosporinov, ki delujejo kot psevdosubstrati in acilirajo aktivno mesto na transpeptidazah.

Vankomicinska družina glikopeptidnih antibiotikov ravno tako deluje na nivoju peptidoglikana. Veže se na terminalni fragment D-Ala-D-Ala, ki ga zajame v svoj žep in prepreči vezavo transpeptidazam. Ker delujejo β -laktami in vankomicin na zaporednih stopnjah sinteze celične stene, ob sočasni uporabi kažejo sinergistično delovanje, če jih uporabimo v kombinaciji.

b) Sinteza beljakovin (translacija) (4):

Med protimikrobne učinkovine, ki vplivajo na sintezo beljakovin sodijo makrolidi, tetraciklini, oksazolidindioni in aminoglikozidi. Delujejo tako, da se vežejo na različne podenote bakterijskega ribosoma ter tako preprečujejo sintezo beljakovin.

c) Prepisovanje in popravljanje DNK (transkripcija) (4):

Fluorokinoloni so antibiotiki, ki delujejo na encim DNK girazo, ki je zadolžena za razvijanje dvovijačne bakterijske DNK po vsakem ciklu replikacije DNK. DNK giraza spada v skupino topoizomeraz tipa II. Kinoloni delujejo kot inhibitorji DNK-giraze tako, da tvorijo kompleks z encimom in dvovijačno DNK, ki potem sproži obrambni mehanizem

bakterije, ki posledično razgradi kompleks ter vodi v celično smrt.

d) Inhibicija metabolnih poti (12):

Protimikrobine učinkovine, ki inhibirajo metabolne poti, izkoriščajo odvisnost večine bakterij od sinteze folne kisline. Sem spadajo sulfonamidi in trimetoprim. Sulfonamidi inhibirajo encim dihidropteroat sintaza, trimetoprim pa inhibira dihidrofolat reduktazo. Oba encima sodelujeta pri sintezi tetrahidrofolne kisline. S svojim delovanjem zavirajo razmnoževanje bakterij, zato je njihovo delovanje bakteriostatično.

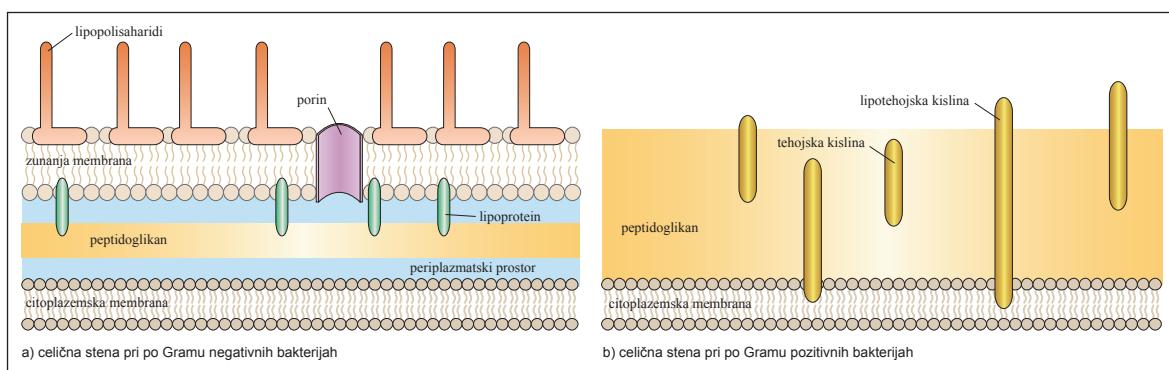
V vseh prikazanih primerih protibakterijske učinkovine izkoriščajo biokemične razlike med prokarionskimi in evkarionskimi celicami ter tako dosegajo selektivnost.

2. BAKTERIJSKA CELIČNA STENA IN PEPTIDOGLIKAN

Bakterijska celična stena je kompleksna struktura, sestavljena iz makromolekul, ki jih pri drugih živih bitjih ne najdemo. Obdaja citoplazemske membrano in je odgovorna za ohranitev oblike in enovitosti celice. Najpomembnejši del predstavlja peptidoglikan, ki je zgrajen iz mreže linearnih polisaharidnih verig prečno povezanih s kratkimi peptidnimi fragmenti. Njegova sestava je edinstvena za evbakterije in predstavlja primerno tarčo za delovanje protibakterijskih učinkovin (12).

Po Gramu negativne in po Gramu pozitivne bakterije se med seboj razlikujejo v zgradbi celične stene (slika 3). Celična stena po Gramu pozitivnih bakterij je sestavljena iz debelega večslojnega peptidoglikana. V celični steni so vstavljeni tehojske in lipotehojske kisline, ki prebadajo peptidoglikanski sloj ter se povezujejo s celično membrano. Debelina celične stene je približno od 15 do 50 nm (13).

Po Gramu negativne bakterije imajo celično steno sestavljeno iz zunanje celične membrane, ki je z lipoproteini povezana na, v večini primerov, enoslojni peptidoglikan. Le-ta se nahaja v periplazmatskem prostoru med zunanjim in notranjim celično membrano. V zunani membrani se nahajajo porini (proteinski kanali), ki omogočajo manjšim hidrofilnim molekulam prehod preko membrane. Na zunani strani celične stene so lipopolisaharidi, ki se iztegujejo v izvencelični prostor ter odbijajo hidrofobne spojine. Debelina celične stene je približno 2 nm (13).



Slika 3: Zgradba celične stene pri po Gramu pozitivnih in negativnih bakterijah (13)

Ker ima peptidoglikan edinstveno zgradbo, je primerna tarča za delovanje protibakterijskih učinkovin (14). Linearne polisaharidne verige so sestavljene iz izmenjujočih se enot N-acetilglukozamina in N-acetilmuraminske kisline, ki so med seboj povezane z 1,4- β -glikozidno vezjo. N-acetilmuraminska kislina je N-acetilglukozamin, ki ima na C-3 mestu z etersko vezjo pripeto D-laktoilno skupino (14). Na karboksilno verigo vsakega ostanka muraminske kisline pa je pripeta veriga štirih aminokislin, ki so povezane z peptidno

vezjo. Aminokisline si sledijo v naslednjem vrstnem redu: L-alanin, D-glutaminska kislina, mezo-diaminopimelinska kislina in D-alanin (12).

Podrobne raziskave so pokazale, da obstajajo razlike v kemijski zgradbi aminokislinskega dela peptidoglikana med po Gramu negativnimi in pozitivnimi bakterijami. Glavna razlika je v aminokislini na mestu 3 v peptidni verigi. Pri po Gramu negativnih bakterijah je najbolj zastopana mezo-diaminopimelinska kislina (*E. coli*), pri po Gramu pozitivnih bakterijah pa je najpogostejsa L-lizin (*S. aureus*). Bolj poredko pa se v nekaterih bakterijah pojavljajo na tem mestu tudi L-ornitin, L-aminobutanojska kislina, L-homoserin ali L-lantioin (15).

Pomembna razlika med po Gramu negativnimi in pozitivnimi bakterijami je tudi stopnja premreženosti peptidoglikana, ki poteka med prosto amino skupino aminokisline na tretjem mestu in terminalno karboksilno skupino D-alanina na četrtem mestu sosednjega glikanskega vlakna (16). Pri po Gramu pozitivnih bakterijah je prečno povezanih okoli 90 % vseh peptidoglikanskih verig (*S. aureus*), medtem ko je ta stopnja premreženosti pri po Gramu negativnih bakterijah le okoli 20 % (*E. coli*) (17).

2.1. BIOSINTEZA PEPTIDOGLIKANA (18)

Za ohranitev celične oblike in integritete mora celoten potek sinteze peptidoglikana potekati nadzorovano. Prva stopnja izgradnje poteka v citoplazmi, po prenosu citoplazemskih hidrofilnih prekurzorjev preko celične membrane pa poteka vgradnja le-teh v že obstoječi peptidoglikan.

Biosintezo peptidoglikana lahko razdelimo na tri glavne stopnje:

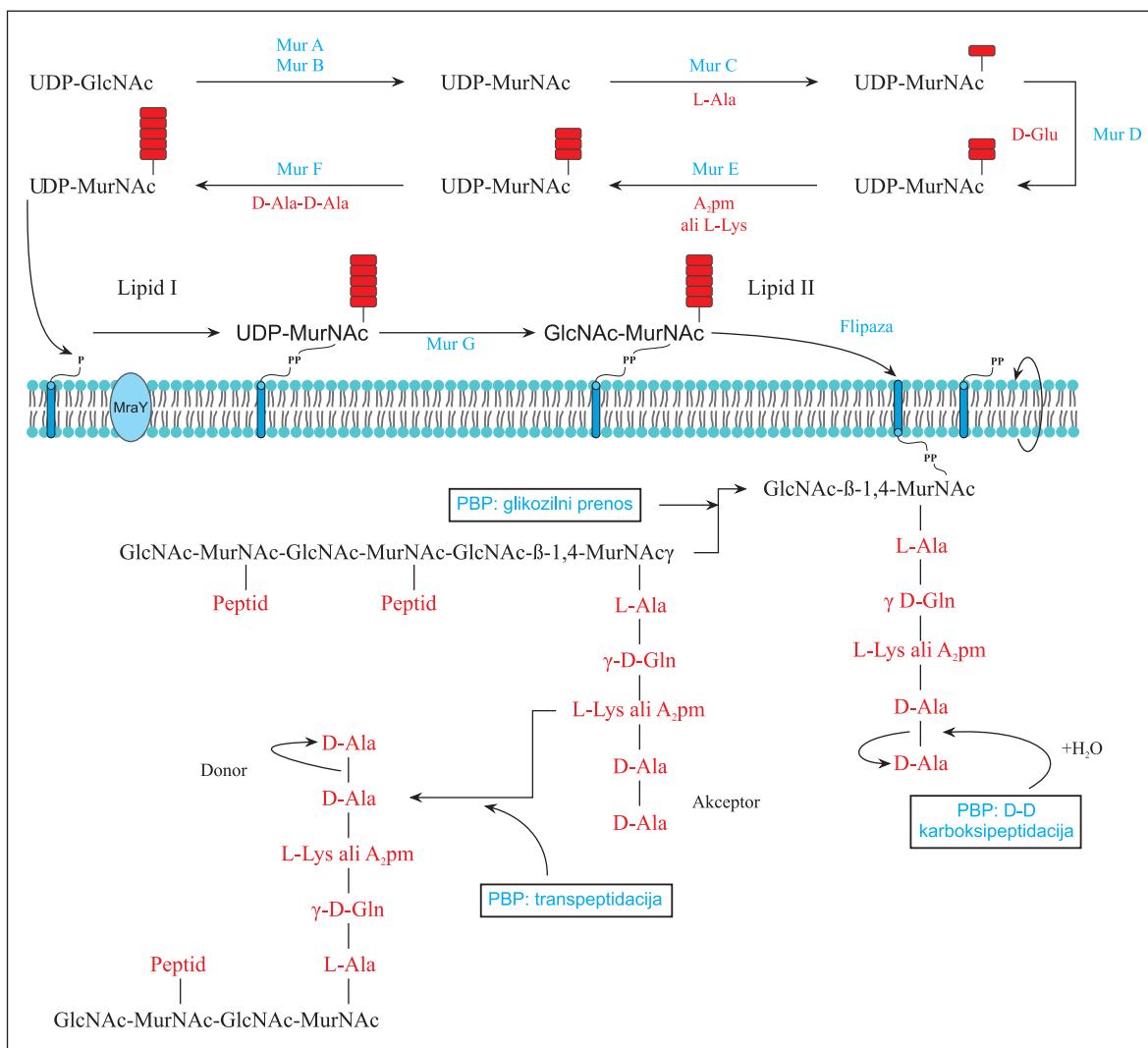
1. sinteza prekurzorjev peptidoglikana v citoplazmi
2. prenos prekurzorjev do membranskega lipidnega nosilca, ki jih prenese preko citoplazemske membrane
3. polimerizacija peptidoglikanskih prekurzorjev in njihova vgradnja v že obstoječi peptidoglikan

Začetni del sintezne poti peptidoglikana poteka v citoplazmi bakterijske celice. Bakterije v tej stopnji izvedejo sintezo iz primarnega metabolita fruktoze-6-fosfata do prekurzorja UDP-N-acetyl-muramil-pentapeptida.

V naslednji stopnji izgradnjo katalizirajo membranski encimi. V prvi stopnji se UDP-N-acetyl-pentapeptid veže na fosforiliran lipidni nosilec (lipid I), kjer ostane vezan do konca lipidnega cikla, sprosti pa se UMP. Na molekulo undekaprenil difosfo-MurNAc-pentapeptida se nato pripne še N-acetiglukozaminska enota, združena

struktura (lipid II) pa se nato prenese preko bakterijske membrane na zunanjo stran celice. Zadnji del sinteze poti poteka na zunanji strani celične membrane. Vključevanje prenesenega gradnika v obstoječi peptidoglikan se začne s povezovanjem slatkornih enot. Transglikozilaza katalizira tvorbo glikanskih verig peptidoglikana pri čemer se ena molekula lipidnega nosilca najprej reciklira v obliki pirofosfata in zatem še defosforilizira. V tem koraku se linearni glikani, zbrani na lipidnem nosilcu na zunanji strani citoplazemske membrane, vgradijo v celično steno. V naslednji stopnji poteče premreževanje peptidnih delov posameznih peptidoglikanskih verig. Reakcijo imenujemo transpeptidacija, pri njej pa sodelujejo encimi transpeptidaze.

Proces biosinteze peptidoglikana je grafično predstavljen na sliki 4 (18).



Slika 4: Sinteza peptidoglikana (18)

2.2. BAKTERIJSKE TRANSGLIKOSILAZE IN TRANSPEPTIDAZE KOT TARČE PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN (18,19,20)

Bakterijske transglukozilaze in transpeptidaze katalizirajo zadnji stopnji sinteze peptidoglikana. Karboksipeptidaze so encimi, ki katalizirajo reakcijo, ki je nasprotna delovanju transpeptidaz. Zaradi sposobnosti vezave penicilinov vse te encime imenujemo PBP (penicillin binding proteins).

V bakterijah obstaja več različnih vrst PBP. Glavna delitev je glede na velikost encima in sicer na PBP z visoko molekulsko maso (HMM) in PBP z nizko molekulsko maso (LMM). V skupini HMM PBP so zajeti encimi, ki so vezani na celično membrano. Dodatno pa jih delimo glede na število reakcij, katere katalizirajo: bifunkcionalni (razred A), ki katalizirajo tako transglukozilacijo kot transpeptidacijo in monofunkcionalni (razred B), ki katalizirajo samo transpeptidacijo. V skupini LMM so zajeti encimi, ki imajo DD-karboksipeptidazno aktivnost in se prosto gibljejo na zunanjih strani celične membrane.

Transglukozilaze po prehodu lipida II na zunanjou stran celične membrane katalizirajo povezovanje glikanskih verig. Transpeptidaza katalizira tvorbo prečne povezave med peptidnimi verigami na sosednjih glikanskih vlaknih. Veže se na terminalno D-alanil-D-alaninsko enoto verige in cepi peptidno vez med D-alaninskima ostankoma. Energijski potres, ki se pri tem sprosti se porabi za tvorbo vezi s prosto amino skupino stranske verige aminokislinskega preostanka na 3. mestu sosednje verige. Stopnjo premreženosti peptidoglikana uravnava karboksipeptidaze, ki katalizirajo odcep terminalnega D-ala, lahko pa tudi obeh D-alaninskih ostankov. S tem odstranijo vezavno mesto za transpeptidaze. Encimi endopeptidaze imajo delovanje nasprotno transpeptidazam in so sposobni razgraditi prečne povezave peptidoglikana. Posledično verjetno omogočajo nastanek mest, kjer se lahko vgradijo nova glikanska vlakna. S svojim delovanjem torej omogočajo širjenje peptidoglikana in s tem rast celične stene bakterije.

PBP igrajo pomembno vlogo pri rezistenci po Gramu pozitivnih bakterij na β -laktame. Tako so v rezistentnih sevih našli PBP-je, ki lahko prevzamejo transpeptidazno vlogo vseh ostalih PBP v celici ter imajo znižano afiniteto do β -laktamov (npr.: PBP2a v *Staphylococcus aureus* in PBP5 v *Enterococcus faecium*). Z mutacijami in mozaičnim genskim prenosom se je rezistenca razvila tudi pri *Neisseria gonorrhoeae* (PBP1 in PBP2), *Helicobacter pylori* (PBP1a), *Streptococcus pneumoniae* (PBP2b, PBP2x in PBP1a) in *Bacteroides fragilis*. Skupina transpeptidaznih encimov bi lahko bila zanimiva za razvoj novih protimikrobnih

zdravil, ki ne bodo zasnovana na osnovi β -laktamov. Poleg tega pa je možnost tudi v razvoju zdravil z delovanjem na glikozil-transferazno aktivnost PBP-jev, ker imajo zelo malo podobnosti z transpeptidaznimi PBP.

3. PEPTIDOMIMETIKI

Peptidomimetiki so spojine, katerih glavni elementi (farmakofori), posnemajo naravni peptid ali protein v tridimenzionalnem prostoru in ohranjajo sposobnost povezovanja z biološko tarčo ter sprožijo enak biološki odziv. Z uporabo peptidomimetikov se izognemo težavam kot je odpornost na razgradnjo z encimi in slabo biološko razpoložljivostjo (21). Od dobrega peptidomimetika pričakujemo ustrezne farmakokinetične lastnosti (zadostno absorbcijo, izboljšano metabolično stabilnost, ...) kot tudi ohranjeno učinkovitost ter selektivnost (22). Postopek razvoja peptidomimetika se začne z razvojem SAR, ki nam pomaga definirati minimalno aktivno sekvenco večjega peptida ter identificirati farmakofore, ki so odgovorni za biološki odziv. V naslednjem koraku se usmerimo v strukturne omejitve, da zagotovimo primerno 3D sestavo našega peptidomimetika (21). Največji problem pri razvoju peptidomimetikov predstavlja fleksibilnost oziroma nepoznavanje konformacije ob vezavi na encim (21).

Spremembe na peptidnih molekulah lahko razdelimo na štiri osnovne skupine:

1. Spremembe dolžine peptidne verige

Da ohranimo aktivnost številnih endogenih peptidov ne potrebujemo celotnega aminokislinskega zaporedja. Dovolj je farmakofor, ki je sestavljen le iz nekaj aminokislinskih ostankov. Morebitna učinkovina je torej lahko precej krajsi peptid.

2. Spremembe stranskih skupin posameznih aminokislin.

3. Spremembra peptidne vezi.

4. Kompleksne spremembe (dipeptidne izostere, mimetiki zavojev β in γ).

3.1. BIOIZOSTERIJA PEPTIDNE VEZI (21,22,23)

Ena od široko uporabljenih metod za pripravo peptidomimetikov je modificiranje strukture amidne vezi ter uporaba izosterov, ki so po strukturi podobni peptidni vezi. V glavnem ti izosteri ne omejujejo splošne konformacije temveč imajo vpliv le na sekundarno strukturo preko sprememb v povezavah z vodikovimi vezmi ter z dolžino verige. Najpogostejši izosteri so predstavljeni v tabeli 2.

	PEPTID		RETROPEPTID		AMINOMETILENSKI ANALOG		TIOMETILENSKI ANALOG
	KETOMETILENSKI ANALOG		DEPSIPEPTID		OKSOMETILENSKI ANALOG		HIDROKSIETILENSKI ANALOG
	ALKILIDENPEPTID		KARBA ANALOG				

Tabela 2: primeri bioizosterov peptidne vezi

3.2. REDUCIRANI AMIDI KOT MIMETIKI PREHODNEGA STANJA

(24.25)

Reducirani amidi so dobri pri oponašanju tetraedričnega prehodnega stanja v reakciji hidrolize peptidne vezi, zato so zanimivi kot potencialni encimski inhibitorji. Zanimanje po reduciranih amidih je predvsem zaradi odpornosti vezi na hidrolizo s serumskimi peptidazami.

Najbolj pogosta metoda pridobivanja reduciranih peptidov je z reduktivnim aminiranjem. Le-ta poteka med aldehidom N α -zaščitene aminokisline ter prosto aminsko skupino aminokisline, zaščitene na C α -atomu. In situ nastali imin reduciramo z NaBH₃CN pri čemer nastane metilenamino skupina. Ključne začetne aminokislinske aldehyde lahko pripravimo iz prekurzorjev z redukcijo ali oksidacijo. Pri reduktivnih metodah ponavadi najprej pripravimo aktivirane amide, ker se pri uporabi acil halidov ali estrov pogosto pojavlja težava prekomerne redukcije pri pripravi aldehyda. Oksidativne metode pa večinoma potekajo preko predhodno pripravljenih β -amino alkoholov, ki jih v zadnji stopnji oksidiramo do aldehidov.

Uporaba reduciranih amidov se je izkazala za smotrno tako pri analogih endogenih peptidov, imunoterapiji in cepivih, inhibiciji encimov, kot tudi pri protibakterijskih zdravilih. V zadnjem času se je pojavilo veliko zanimanje za uporabo reduciranih amidov pri oponašanju tetraedričnega prehodnega stanja, ki nastane v reakciji hidrolize peptidne vezi (inhibitorji HIV-1 proteaze, β -sekretaze, ...).

Poznanih je že več različnih postopkov pridobivanja reduciranih peptidov. V zadnjem času je pospešen razvoj viden predvsem pri sintezi na trdnih nosileh.

Veliko truda je bilo vloženega pri razvijanju selektivnih inhibitorjev nNOS. Sinteza reduciranih amidnih analogov nitroargini-dipeptidov je dala visoko aktivne kot tudi selektivne analoge. Ravno tako so bile obširne raziskave opravljene pri inhibitorjih proteaze HIV-1. Sinteza teh analogov je bila izvedena na podlagi rentgenske strukture encima. Rezultat so bile močno aktivne spojine z enako močnim delovanjem na proteaze HIV-1 in HIV-2.

Koncept zamenjave nativne peptidne vezi z izostero reducirane amina je bil uporabljen tudi pri razvoju nekaterih citolitičnih protibakterijskih peptidov. Z uvedbo reducirane amidne

vezi se namreč močno poveča prepoznavnost za bakterijske celice v primerjavi s sesalskimi brez zmanjšanja jakosti protibakterijskega delovanja. Poleg tega pa zaradi vedno večje odpornosti na kovalentne β -laktamske antibiotike (penicilini, cefalosporini in karbapenemi) gredo razvoj in raziskave v smeri nekovalentnih inhibitorjev. Ker se vežejo nekovalentno v aktivno mesto encima (PBP) in ne tvorijo kovalentnih vez z encimom, je tudi manjša potreba po konformacijskih spremembah, ki nastanejo pri vezavi. Razen tega pa lahko tudi upamo, da bodo zaradi svoje drugačne strukture odporni proti β -laktamazam.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. NAČRT DELA

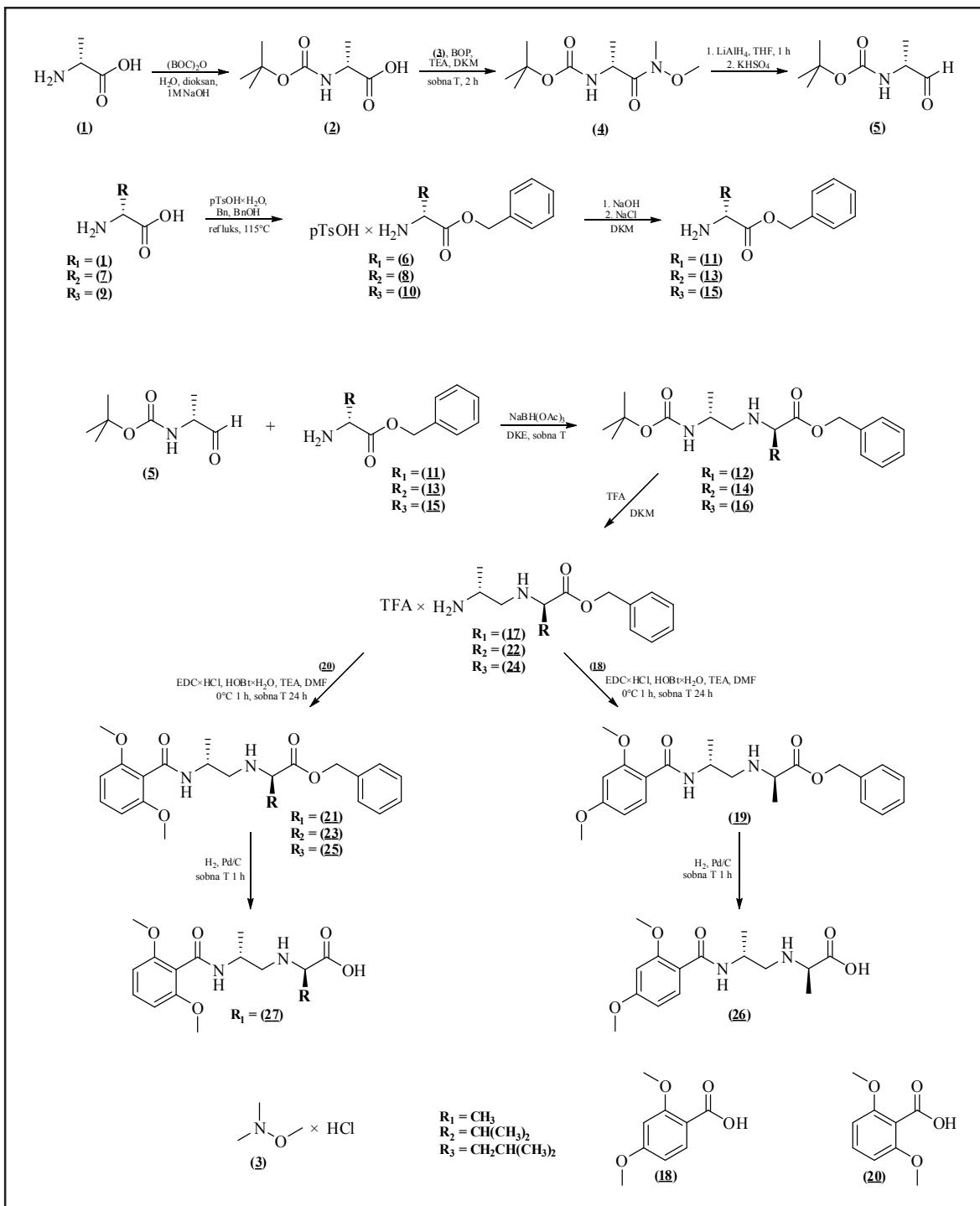
Namen diplomskega dela je sintetizirati analoge dipeptida D-Ala-D-Ala z reducirano peptidno vezjo, ki bodo lahko osnova za razvoj potencialnih inhibitorjev transpeptidaznih PBP. Inhibitorji bodo zaradi strukturne podobnosti z substratom D-Ala-D-Ala omogočili oponašanje tetraedričnega prehodnega stanja, ki nastane med reakcijo transpeptidacije. Na N-terminalni del reduciranih dipeptidov bomo pripeli substituente, ki bodo omogočili večjo afiniteto inhibitorjev do aktivnega mesta PBP. Poleg tega pa bomo s spremenjanjem velikosti C-terminalne aminokisline določiti, katera kombinacija reduciranega dipeptida je najbolj primerna za najmočnejše interakcije z encimom PBP. Na podlagi tega načrt načrtimo pripraviti reducirani dipeptid z naslednjimi lastnostmi:

- na N-terminalnem delu bomo pripeli dimetoksi benzojsko kislino (2,6 ali 2,4) ter s tem preverili, katera kombinacija je bolj primerna za inhibicijo PBP;
- C-terminalno aminokislino bomo spreminali (D-Ala, D-Leu, D-Val), da ugotovimo, katera najbolje prispeva k inhibiciji;
- peptidno vez med aminokislinama bomo zamenjali z aminometilenskim analogom, s čimer bomo oponašali tetraedrično prehodno stanje in izljučili možnost delovanja β -laktamaze na spojino;
- na C-terminalnem delu bomo ohranili karboksilni konec za tvorbo vodikovih vezi.

Sinteza bo potekala tako, da bomo najprej zaščitili N-terminalni D-Ala z BOC zaščitno skupino. Karboksilno skupino bomo najprej pretvorili v Weinrebov amid (4), ki je najboljši intermedijat za sintezo aldehidov. Z reducentom LiAlH_4 bomo pri čim nižji temperaturi pripravili aldehid, da so izognemo morebitni racemizaciji aminokisline. Na drugi strani pa bomo C-terminalno aminokislino zaščitili z benzilnim estrom z uporabo pTsOH . Za reduktivno aminiranje bomo uporabili neprotonirano obliko benzilnega estra aminokisline. Reduktivno aminiranje bomo izvajali s šibkim reducentom $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$. Nato bomo odstranili zaščito BOC z dodatkom TFA. Na N-terminalni del reduciranega dipeptida bomo nato pripeli še dimetoksi benzojsko kislino ter tvorili amidno vez z uporabo reagentov EDC in HOBT. V zadnji fazi pa bomo odstranili še C-terminalno zaščito s katalitskim hidrogeniranjem. Končne spojine, ki jih bomo sintetizirali, so predstavljene v tabeli 3. Sintezna pot je predstavljena na sliki 5.

<p>(26)</p>	<p>(R)-2-((R)-2-(2,4-dimethoxybenzamido) propilamino)propanojska kislina</p>
<p>(27)</p>	<p>(R)-2-((R)-2-(2,6-dimethoxybenzamido) propilamino)propanojska kislina</p>
<p>(28)</p>	<p>(R)-2-((R)-2-(2,6-dimethoxybenzamido) propilamino)-3-metilbutanojska kislina</p>
<p>(29)</p>	<p>(R)-2-((R)-2-(2,6-dimethoxybenzamido) propilamino)-4-metilpentanojska kislina</p>

Tabela 3. Načrtovane končne spojine sinteze



Slika 5. Shema sinteze reduciranih dipeptidov

4.2 MATERIALI IN METODE

Reagenti in topila

- Pri praktičnem delu diplomske naloge smo uporabljali reagente in topila naslednjih proizvajalcev: Kemika, Fluka, Aldrich, Across Organics, Merck.

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 F₂₅₄ plošče izdelovalca Merck. Sestava plošče: 0,20 mm nanos silikagela na aluminijastem nosilcu.

Spojine smo detektirali z UV svetilko ($\lambda=254$ nm) in orositvenimi reagenti ninhidrin, 2,4-dinitrofenilhidrazin in bromkrezol zeleno.

- Kolonska kromatografija*

Uporabljali smo jo kot preparativno metodo za čiščenje zmesi spojin ter s tem pridobitev čistih spojin (produktov). Uporabljali smo steklene kolone različnih velikosti (glede na količino spojine), kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel z delci velikosti od 0,063 do 0,200 mm (količino silikagela preračunamo kot 50-kratno količino glede na količino zmesi spojin), ki ga izdeluje Merck.

- IsoleraTM (Biotage)*

Isolera je nov, inteligenčen 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 preparativno metodo za čiščenje zmesi spojin. Lastnik Isolere je Fakulteta za farmacijo, Ljubljana.

- Mobilne faze uporabljene za TLC in kolonsko kromatografijo:

Mf (1): CH₃CN / MeOH / H₂O = 3 / 1 / 1

Mf (2): DKM / MeOH = 15 / 1

Mf (3): EtOAc / heksan = 1 / 1

Mf (4): DKM / MeOH = 9 / 1

Mf (5): EtOAc

Določanje tališč

- Temperaturo tališč naših spojin smo določali na mikroskopu z ogrevalno mizico znamke Leica. Tališča niso bila korigirana.

Spektroskopske metode

- *Masna spektroskopija*

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

- *IR (infrardeča) spektroskopija*

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

- *¹H-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. Vzorce so raztopili v devteriranih topilih DMSO-d₆ ali CDCl₃ na Fakulteti za farmacijo. Kot interni standard je bil uporabljen TMS. Spektre so snemali pri temperaturi 302K. Spektre smo procesirali na računalniku s programom MasterReC 4.8.6.0., proizvajalca MasterLab Research Sl.

Elementne analize

- Elementne analize novih spojin za elemente ogljik, vodik in dušik so opravili na inštrumentu Perkin Elmer 2400 CHN na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana.

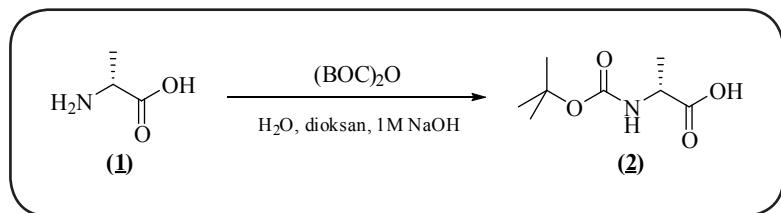
Poimenovanje in risanje spojin

- Pri poimenovanju in risanju spojin smo uporabljali računalniški program ChemBioDraw podjetja CambridgeSoft.

4.3 SINTEZNI POSTOPKI IN REZULTATI ANALIZ

4.3.1. PRIPRAVA REAGENTOV ZA REDUKTIVNO AMINIRANJE

4.3.1.1 Sintesa (*R*)-2-(terc-butoksikarbonilamino)propanojske kisline (2)



Sintezni postopek:

D-alanin (1) (4.455 g, 50 mmol) suspendiramo v 80 mL mešanice topil H₂O/dioksan = 1:1 ter dodamo 1M NaOH (40 mL). Reakcijski zmesi med mešanjem na magnetnem mešalu po kapljicah dodamo v dioksanu (40 mL) raztopljeni (BOC)₂O (13.095 g, 60 mmol). Pri sobni temperaturi mešamo še dve uri, nato pa odparimo dioksan, ostanku dodamo vodo (40 mL) in z 1M HCl nakisamo do pH 2. Sledi ekstrakcija z EtOAc (4 × 40 mL) ter spiranje združenih faz EtOAc z nasičeno vodno raztopino NaCl (2 × 50 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltriramo in topilo odparimo pod znižanim tlakom. Produkt (2) so kristali bele barve.

Izkoristek reakcije: 71 % (literatura: 80 %) (26)

Rf: 0.70, **Mf:** (1), orositveni reagent: ninhidrin

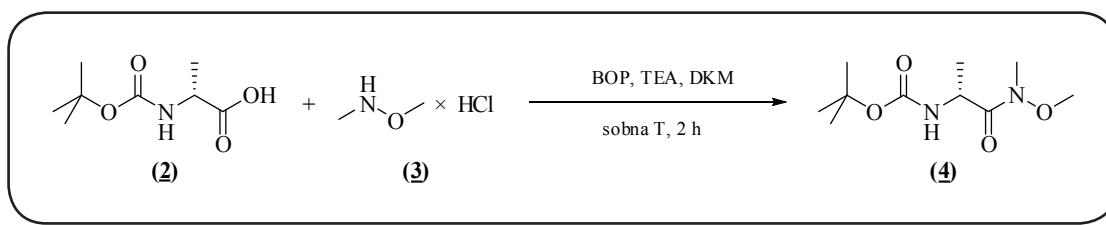
Tališče: 80 – 82°C (literatura: 83 – 84°C) (27)

M_r: 189.10

IR (KBr, cm⁻¹): 3386, 1686, 1522, 1458, 1374, 1346, 1295, 1234, 1163, 1070, 1020, 867, 832, 785, 576, 466

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 1.22 (d, J = 7.5 Hz, 3H, CH₃CH), 1.38 (s, 9H, (CH₃)₃C), 3.87 – 3.99 (m, 1H, CH₃CH), 7.06 (d, J = 7.5 Hz, 1H, NHCH), 12.40 (s, 1H, COOH)

4.3.1.2 Sinteza (R)-terc-butil 1-(metoksi(metil)amino)-1-oksopropan-2-ilkarbamata (4)



Prvi sintezni postopek:

(R)-2-(tert-butylcarbamoyl)propanojsko kislino (2) (4.919 g, 26 mmol) raztopimo v DKM (100 mL) in med mešanjem dodamo TEA (3.6 mL, 26 mmol) in BOP (11.480 g, 26 mmol). Po 10 minutah dodamo N,O-dimetilhidroksilamin hidroklorid (3) (2.790 g, 28.6 mmol) in TEA (3.98 mL, 28.6 mmol) ter uravnamo pH vrednost na približno 8. Po končani reakciji reakcijsko zmes razredčimo z DKM (100 mL) in temeljito spiramo z 1 M HCl (3×50 mL), z nasičeno vodno raztopino NaHCO_3 (3×50 mL) in z nasičeno vodno raztopino NaCl (3×50 mL). Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 . Sušilno sredstvo odfiltriramo in topilo odparimo pod znižanim tlakom. Po prekristalizaciji iz EtOAc dobimo produkt (4) v obliki belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 78 % (literatura: 85 %) (28)

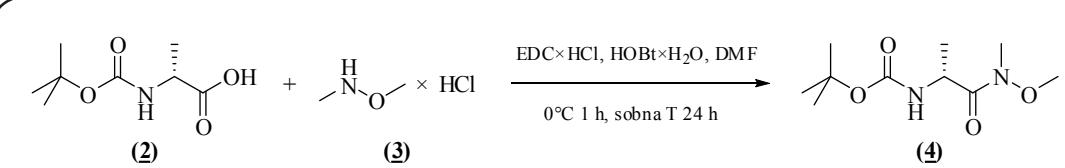
Rf: 0.66, Mf (2), orositveni reagent: ninhidrin

Tališče: 150 – 152°C (literatura: 150°C) (28)

M_r: 232.28

IR (KBr, cm⁻¹): 3299, 2984, 1661, 1542, 1363, 1297, 1187, 1067, 983, 869, 753, 570

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 1.15 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_3CH), 1.37 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CH}$), 3.10 (s, 3H, NCH_3), 3.72 (s, 3H, NOCH_3), 4.33 – 4.46 (m, 1H, CH_3CH), 7.01 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH)



Drugi sintezni postopek:

(R)-2-(terc-butoksikarbonilamino) propanojsko kislino (**2**) (1.899 g, 10 mmol) in N,O-dimetilhidroksilamin hidroklorid (**3**) (1.073 g, 11 mmol) raztopimo v minimalni količini brezvodnega DMF, ohladimo na 0 °C, dodamo HOBt × H₂O (1.621 g, 12 mmol) ter TEA (5.5 mL, 40 mmol). Po 5 minutah dodamo EDC × HCl (2.492 g, 13 mmol) in pustimo mešati na ledeni kopeli 1 uro ter nato še 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji v reakcijsko zmes dodamo DKM (100 mL) ter spiramo z 1M HCl (4 × 30 mL), z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (3 × 30 mL) in z nasičeno vodno raztopino NaCl (3 × 30 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄. Sušilno sredstvo nato odfiltriramo, topilo pa odparimo pod znižanim tlakom. Po prekristalizaciji iz EtOAc dobimo produkt (**4**) v obliki belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 71 %

Rf: 0.78, Mf (1), orositveni reagent: ninhidrin

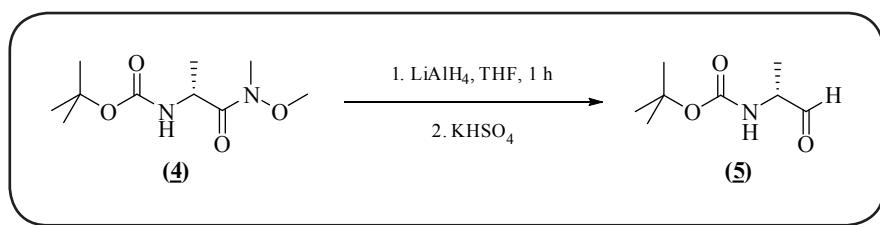
Tališče: 150 – 152°C (literatura: 150°C) (28)

M_r: 232.28

IR (KBr, cm⁻¹): 3299, 2984, 1661, 1542, 1363, 1297, 1187, 1067, 983, 869, 753, 570

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 1.15 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃CH), 1.37 (s, 9H, (CH₃)₃CH), 3.10 (s, 3H, NCH₃), 3.72 (s, 3H, NOCH₃), 4.33 – 4.46 (m, 1H, CH₃CH), 7.01 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH)

4.3.1.3 Sinteza (R)-terc-butil 1-oksopropan-2-ilkarbamata (5)



Sintezni postopek:

(R)-terc-butil 1-(metoksi(metil)amino)-1-oksopropan-2-ilkarbamat (**4**) (8.212 g, 35.35 mmol) raztopimo v brezvodnem THF (200 mL) in prepihamo z argonom. Raztopini, ki jo mešamo na ledeni kopeli (-20 do -10 °C), počasi dodajamo LiAlH₄ (1.676 g, 44 mmol). Reakcijsko zmes pustimo mešati na ledeni kopeli 1 uro. Potek reakcije spremljamo s TLC. Zmes hidroliziramo z raztopino KHSO₄ (8.43 g, 61.86 mmol) v vodi (175 mL) in ekstrahiramo z etrom (1 × 100 mL, 3 × 20 mL). Organske faze združimo in spiramo z 1M HCl (3 × 70 mL), nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (3 × 60 mL) in z nasičeno vodno raztopino NaCl (3 × 60 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltriramo in topilo odparimo pod znižanim tlakom. Produkt (**5**) so beli kristali, ki jih shranimo nad argonom, da preprečimo razpad oziroma racemizacijo.

Izkoristek reakcije: 80 % (literatura: 88 %) (28)

Rf: 0.40, Mf (3), orositveni reagent: ninhidrin

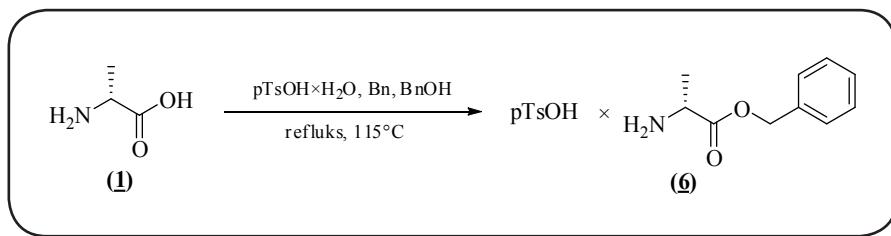
Tališče: 87 – 89°C (literatura: 88 – 89°C) (28)

M_r: 173.21

IR (KBr, cm⁻¹): 3420, 2364, 1700, 1458, 1369, 1315, 1252, 1170, 871, 830, 781, 760, 624

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 1.13 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₃CH), 1.40 (s, 9H, (CH₃)₃CH), 3.77 – 3.96 (m, 1H, CH₃CH), 7.31 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH), 9.43 (s, 1H, CHCHO)

4.3.1.4 Sinteza soli (*R*)-benzil 2-aminopropanoata s pTsOH (6)



Sintezni postopek: (29)

D-alanin (1) (4.455 g, 50 mmol) in pTsOH × H₂O (14.26 g, 75 mmol) raztopimo v zmesi benzena (15 mL) in sveže destiliranega benzilnega alkohola (50 mL). Reakcijsko zmes refluktiramo 48 ur (temperatura oljne kopeli 115 °C) in vodo, ki nastaja pri reakciji, azeotropno odstranjujemo s pomočjo Dean-Starkove pasti. Ko vsa voda oddestilira, reakcijsko zmes ohladimo na sobno temperaturo, razredčimo z etrom (100 mL) in hladimo na ledu. Produkt (6) izпадa v obliki belih kristalov, ki jih odfiltriramo z odsesavanjem, spiramo z etrom, posušimo v sušilniku pri 50 °C ter čistimo s prekristalizacijo iz etra.

Izkoristek reakcije: 67 %

Rf: 0.57, Mf (4)

Tališče: 108 – 111 °C

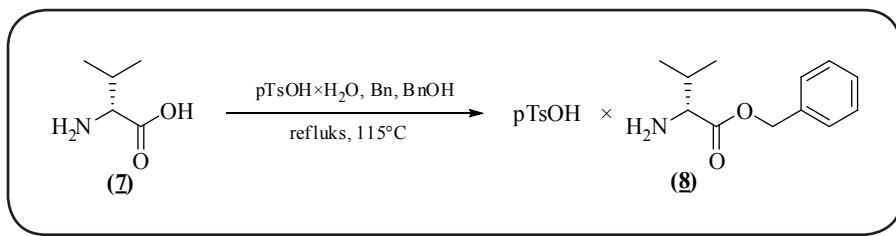
M_r: 179.22 (brez soli); 351.42 (sol s pTsOH)

IR (KBr, cm⁻¹): 3032, 2009, 1738, 1616, 1535, 1454, 1211, 1127, 1039, 814, 680, 566

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 1.41 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃CH), 2.29 (s, 3H, Ar-CH₃) – PTSA, 4.18 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, CHCH₃), 5.24 (s, 2H, COOCH₂Ph), 7.11 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ar-H) – PTSA, 7.32 – 7.44 (m, 5H, COOCH₂Ph), 7.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ar-H) – PTSA, 8.31 (s, 3H, NH₃⁺)

¹³C-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 16.6, 21.7, 48.8, 67.9, 126.4, 128.9, 129.0, 129.3, 129.4, 136.1, 138.5, 146.5, 170.7

4.3.1.5 Sinteza soli (*R*)-benzil 2-amino-3-metilbutanoata s pTsOH (8)



Sintezni postopek: (30)

D-valin (7) (666 mg, 5.68 mmol) in pTsOH × H₂O (1.189 g, 6.25 mmol) raztopimo v zmesi benzena (8 mL) in sveže destiliranega benzilnega alkohola (20 mL). Reakcijsko zmes refluktiramo 24 ur (temperatura oljne kopeli 115 °C) in vodo, ki nastaja pri reakciji, azeotropno odstranjujemo s pomočjo Dean-Starkove pasti. Ko vsa voda oddestilira, reakcijsko zmes ohladimo na sobno temperaturo, razredčimo z etrom (120 mL) in hladimo na ledu. Izpade produkt (8) v obliki belih kristalov, ki jih odfiltriramo z odsesavanjem, spiramo z etrom, posušimo v sušilniku pri 50 °C ter čistimo s prekristalizacijo iz etra.

Izkoristek reakcije: 79 % (literatura: 78 %) (30)

Rf: 0.44, Mf (4)

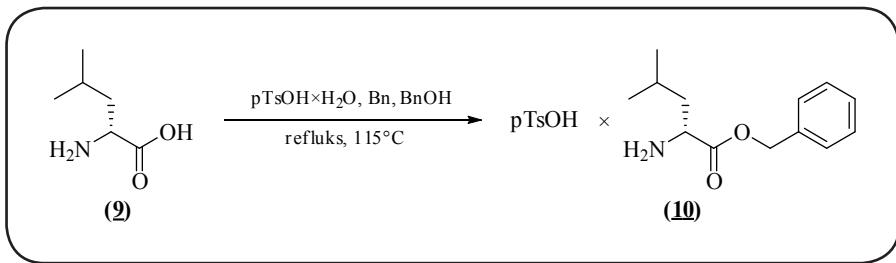
Tališče: 135 – 138°C (literatura: 157 – 158°C) (30)

M_r: 207.27 (brez soli); 379.47 (sol s pTsOH)

IR (KBr, cm⁻¹): 3468, 2968, 1750, 1618, 1525, 1455, 1298, 1179, 1127, 1038, 1014, 814, 741, 679, 569

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 0.89 – 1.00 (m, 6H, CH(CH₃)₂), 2.09 – 2.22 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.29 (s, 3H, Ar-CH₃) – PTSA, 3.98 (d, J = 4.5 Hz, 1H, CHNH₂), 5.23 in 5.28 (AB, J_{AB} = 12.5 Hz, 2H, COOCH₂Ph), 7.11 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ar-H) – PTSA, 7.32 – 7.46 (m, 5H, CH₂Ph), 7.49 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ar-H) – PTSA, 8.32 (s, 3H, NH₃⁺)

4.3.1.6 Sinteza soli (*R*)-benzil 2-amino-4-metilpentanoata s pTsOH (10)



Sintezni postopek: (30)

D-leucin (2) (1.312 g, 10 mmol) in pTsOH · H₂O (2.092 g, 11 mmol) raztopimo v zmesi benzena (20 mL) in sveže destiliranega benzilnega alkohola (10 mL). Reakcijsko zmes reflektiramo 24 ur (temperatura oljne kopeli 115 °C) in vodo, ki nastaja pri reakciji, azeotropno odstranjujemo s pomočjo Dean-Starkove pasti. Ko vsa voda oddestilira, reakcijsko zmes ohladimo na sobno temperaturo, razredčimo z etrom (50 mL) in hladimo na ledu. Izpade produkt (10) v obliki belih kristalov, ki jih odfiltriramo z odsesavanjem, spiramo z etrom, posušimo v sušilniku pri 50 °C ter čistimo s prekrstalizacijo iz etra.

Izkoristek reakcije: 91 % (literatura: 75 %) (30)

Rf: 0.67, Mf (4)

Tališče: 148 – 151 °C (literatura: 155 – 156 °C) (30)

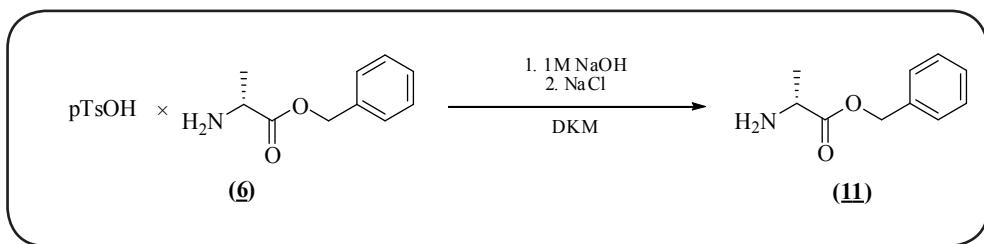
M_r: 221.30 (brez soli); 393.50 (sol s pTsOH)

IR (KBr, cm⁻¹): 3488, 2958, 1756, 1618, 1544, 1464, 1398, 1288, 1215, 1126, 1034, 1011, 846, 815, 740, 678, 568

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 0.83 – 0.91 (m, 6H, CH(CH₃)₂), 1.54 – 1.68 (m, 2H, NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(O)), 1.68 – 1.79 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.29 (s, 3H, Ar-CH₃) – PTSA, 4.07 (t, J = 6.5 Hz, 1H, CHNH₂), 5.24 (s, 2H, COOCH₂Ph), 7.11 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ar-H) – PTSA, 7.33 – 7.45 (m, 5H, CH₂Ph), 7.48 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ar-H) – PTSA, 8.33 (s, 3H, NH₃⁺)

4.3.2 PRIPRAVA DIPEPTIDOV Z REDUCIRANO AMIDNO VEZJO

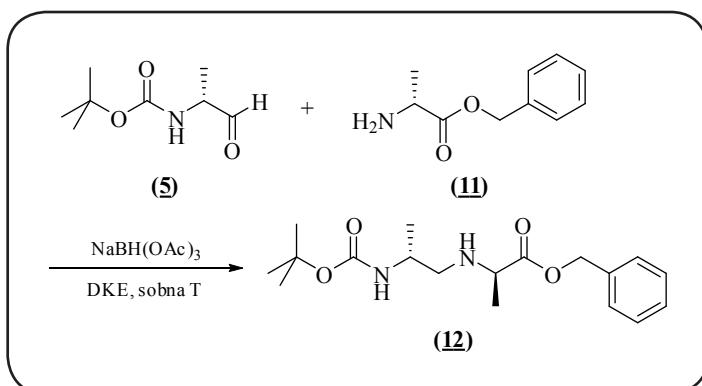
4.3.2.1 Sinteza (*R*)-benzil 2-((*R*)-2-(terc-butoksikarbonilamino)propilamino)propanoata (12)



Sintezni postopek: (31)

1. Priprava (*R*-benzil 2-aminopropanoata (11):

Sol (*R*-benzil 2-aminopropanoat s pTsOH (6) (1.756 g, 5 mmol) raztopimo v DCM (50 mL) in spiramo z 1M NaOH (3×15 mL) ter z nasičeno vodno raztopino NaCl (3×10 mL). Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , topilo odparimo pod znižanim tlakom in oljnat zaostanek sušimo na membranski črpalki ter takoj nadaljujemo z reakcijo.



2. Sinteza reduciranega dipeptida (12):

(R)-benzil 2-aminopropanoat (11) (806 mg, 4.5 mmol) raztopimo v DKE (25 mL) in dodamo (R)-terc-butil 1-oksopropan-2-ilkarbamat (5) (779 mg, 4.5 mmol). Dodamo NaBH(OAc)₃ (1.335 g, 6.3 mmol) in zmes pustimo 24 ur, da reakcija reduktivnega aminiranja poteče. Reakcijsko zmes po končani reakciji spiramo z nasičeno vodno raztopino NaHCO_3 (3×30 mL). Združene vodne frakcije pa spiramo še z EtOAc (3×30 mL). Vse organske frakcije združimo in sušimo z Na_2SO_4 . Sušilno sredstvo odfiltriramo in topilo odstranimo pri znižanem tlaku. Produkt (12) je brezbarvno viskozno olje, ki ga čistimo s kolonsko kromatografijo.

Izkoristek reakcije: 75 %

Rf: 0.51, Mf (5), orositveni reagent: ninhidrin

M_r: 336.43

MS (ESI): 337.2 (MH⁺)

IR (NaCl, cm⁻¹): 3353, 2976, 1709, 1498, 1456, 1390, 1366, 1247, 1169, 1058, 751, 698

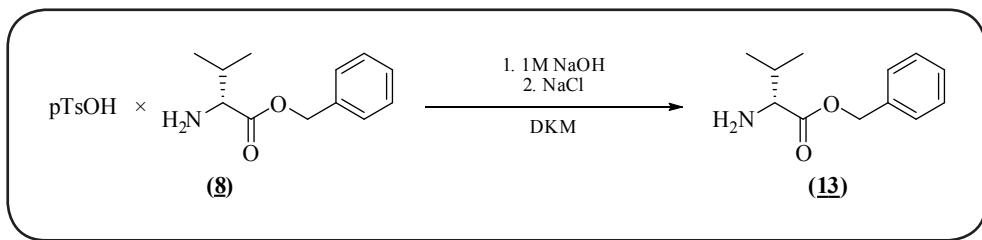
¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 0.98 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, NHCH(CH₃)COO), 1.18 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 1.37 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.01 (s, 1H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 2.37 – 2.47 (m, 2H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 3.28 – 3.38 (m, 1H, NHCH(CH₃)COO), 3.40 – 3.52 (m, 1H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 5.12 (s, 2H, COOCH₂Ph), 6.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 7.18 – 7.41 (m, 5H, COOCH₂Ph)

Elementna analiza:

	izračunana	izmerjena
% C	63.12	63.57
% H	8.27	7.99
% N	8.09	8.23

Rezultati elementne analize so bili preračunani na prisotni 0,1 mol DKE.

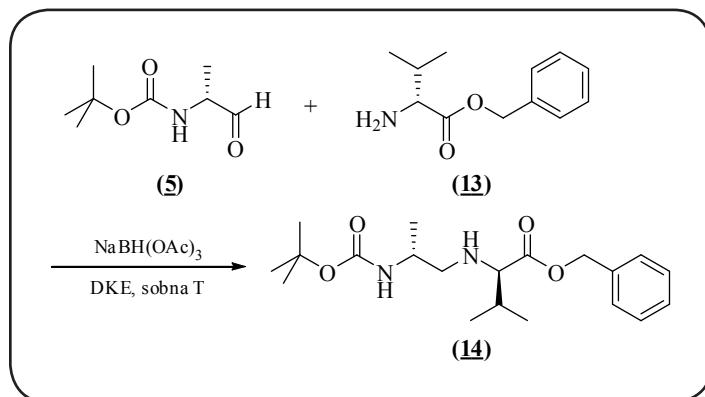
4.3.2.2 Sinteza (R)-benzil 2-((R)-2-(terc-butoksikarbonilamino)propilamino)-3-metilbutanoata (14)



Sintezni postopek: (31)

1. Priprava (R)-benzil 2-amino-3-metilbutanoata (13):

Sol (R)-benzil 2-amino-3-metilbutanoata s pTsOH (**8**) (1.707 g, 4.50 mmol) raztopimo v DCM (50 mL) in spiramo z 1M NaOH (3×20 mL) ter nasičeno vodno raztopino NaCl (2×10 mL). Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , topilo odparimo pod znižanim tlakom in oljnat zaostanek sušimo na membranski črpalki ter takoj nadaljujemo z reakcijo.



2. Sinteza reducirane dipeptida (14):

(R)-benzil 2-amino-3-metilbutanoat (**13**) (932 mg, 4.50 mmol) raztopimo v DKE in dodamo (R)-terc-butil 1-oksopropan-2-ilkarbamat (**5**) (0.779 g, 4.50 mmol). Nato dodamo $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (1.907 g, 9 mmol) in zmes pustimo 24 ur, da reakcija reduktivnega aminiranja poteče. Reakcijsko zmes po končani reakciji spiramo z nasičeno vodno raztopino NaHCO_3 (3×30 mL). Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 . Sušilno sredstvo odfiltriramo in topilo odstranimo pri znižanem tlakom. Produkt (**14**) je trden in je bele barve.

Izkoristek reakcije: 59 %

Rf: 0.67, Mf (5), orositveni reagent: ninhidrin

Tališče: 61 – 64°C

M_r: 364.48

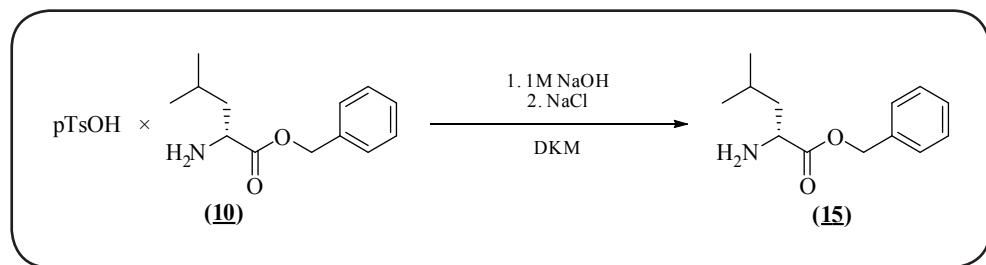
MS (ESI): 365.2 (MH⁺)

IR (KBr, cm⁻¹): 3372, 2970, 2364, 1727, 1685, 1525, 1458, 1369, 1334, 1255, 1158, 1063, 940, 890, 848, 780, 748, 698, 606

¹H-NMR (300MHz, DMSO): δ(ppm) = 0.85 (dd, *J* = 7.0, 4.0 Hz, 6H, NHCH(CH(CH₃)₂))COO), 0.99 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 1.37 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.81 (dt, *J* = 13.0, 13.0, 6.5 Hz, 1H, NHCH(CH(CH₃)₂))COO), 1.90 (s, 1H, NHCH(CH(CH₃)₂))COO), 2.26 – 2.48 (m, 2H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 2.93 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, NHCH(CH(CH₃)₂))COO), 3.40 – 3.53 (m, 1H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 5.10 in 5.15 (AB, *J*_{AB} = 12.5 Hz, 2H, COOCH₂Ph), 6.60 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 7.29 – 7.41 (m, 5H, COOCH₂Ph)

Elementna analiza:	izračunana	izmerjena
% C	65.91	66.08
% H	8.85	9.09
% N	7.69	7.73

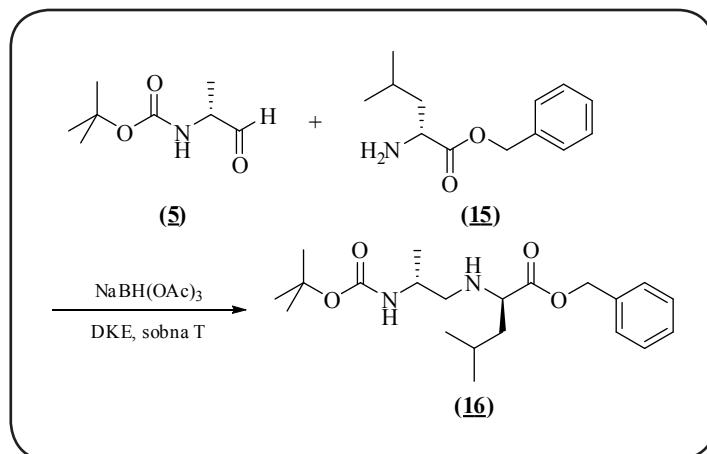
4.3.2.3 Sinteza (R)-benzil 2-((R)-2-(terc-butoksikarbonilamino)propilamino)-4-metilpentanoata (16)



Sintezni postopek: (31)

1. Priprava (R)-benzil 2-amino-4-metilpentanoata (15):

Sol (R)-benzil 2-amino-4-metilpentanoat s pTsOH (10) (3.580 g, 9.10 mmol) raztopimo v DCM (50 mL) in spiramo z 1M NaOH (3×20 mL) ter nasičeno vodno raztopino NaCl (2×10 mL). Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , topilo odparimo pri znižanem tlaku in oljnat zaostanek sušimo na membranski črpalki ter takoj nadaljujemo z reakcijo.



2. Sinteza reducirane dipeptida (16):

(R)-benzil 2-amino-4-metilpentanoat (15) (2.014 g, 9.10 mmol) raztopimo v DKE in dodamo (R)-terc-butil 1-oksopropan-2-ilkarbamat (5) (1.576 g, 9.1 mmol). Nato dodamo NaBH(OAc)_3 (3.857 g, 18.20 mmol) in zmes pustimo 24 ur, da reakcija reduktivnega aminiranja poteče. Reakcijsko zmes po končani reakciji spiramo z nasičeno vodno raztopino NaHCO_3 (3×30 mL). Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 . Sušilno sredstvo odfiltriramo in topilo odstranimo pri znižanem tlaku. Produkt (16) čistimo s kolonsko kromatografijo (Isolera), topilo pa nato odstranimo pri znižanem tlaku. Produkt (16) je brezbarvna viskozna tekočina.

Izkoristek reakcije: 47 %

Rf: 0.69, Mf(5), orositveni reagent: ninhidrin

Tališče: /

M_r: 378.51

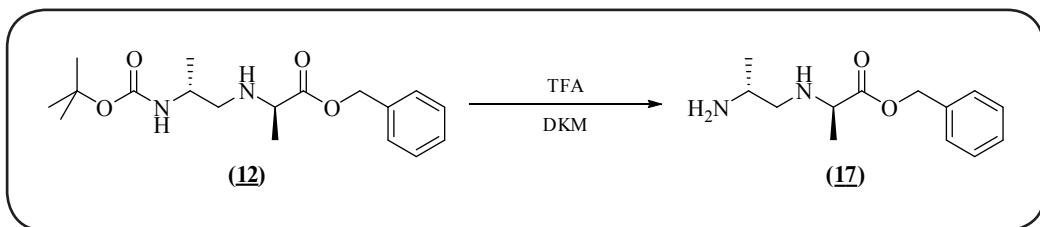
MS (ESI): 379.3 (MH⁺)

IR (KBr, cm⁻¹): 3358, 2959, 2361, 1952, 1714, 1498, 1455, 1366, 1248, 1170, 1066, 966, 848, 751, 698

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 0.80 – 0.89 (m, 6H, NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))COO), 0.98 (dd, *J* = 6.5, 4.0 Hz, 3H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 1.37 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.36 – 1.44 (m, 2H, NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))COO), 1.67 (dt, *J* = 14.0, 14.0, 7.0 Hz, 1H, NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))COO), 1.92 (s, 1H, NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))COO), 2.29 – 2.49 (m, 2H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 3.22 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))COO), 3.46 (s, 1H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 5.10 in 5.15 (AB, *J_{AB}* = 12.0 Hz, 2H, COOCH₂Ph), 6.51 (dd, *J* = 31.0, 7.5 Hz, 1H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 7.29 – 7.43 (m, 5H, COOCH₂Ph)

4.3.3 PRIPAJANJE DIMETOKSI BENZOJSKE KISLINE NA C-TERMINALNI DEL REDUCIRANEGA DIPEPTIDA

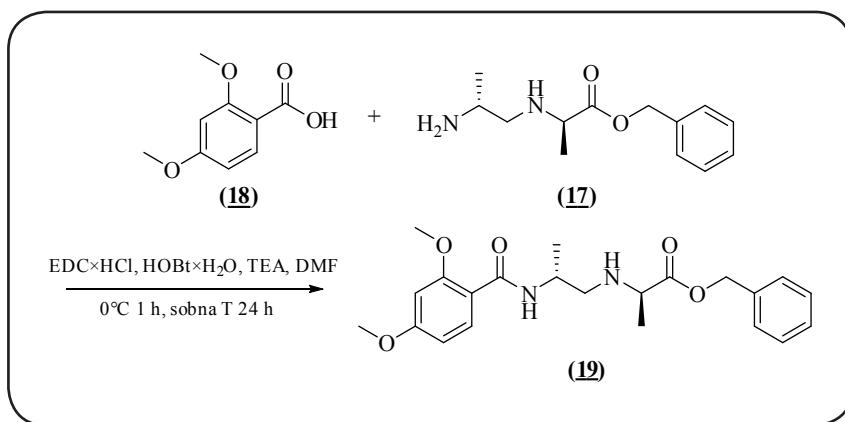
4.3.3.1 Sinteza (*R*)-benzil 2-((*R*)-2-(2,4-dimetoksibenzamido)propilamino)propanoata (19)



Sintezni postopek: (32)

1. Odstranitev zaščite z N-terminalnega dela reduciranega dipeptida

(R)-benzil 2-((R)-2-(terc-butoksikarbonilamino)propilamino)propanoat (12) (1.044 g, 4.01 mmol) raztopimo v DKM (60 mL) in dodamo TFA (20 mL). Reakcijsko zmes pustimo na magnetnem mešalu 1 uro pri sobni T. Topilo odparimo pri znižanem tlaku.



2. Pripajanje kisline na N-terminalni del reduciranega dipeptida

Po odparevanju topila oljnatemu preostanku (17) dodamo 2,4-dimetoksibenzojsko kislino (18) (638 mg, 3.5 mmol) ter oboje raztopimo v DMF (10 mL). V reakcijsko zmes dodamo TEA (2.18 ml, 15.75 mmol) in ohladimo na 0 °C. Dodamo HOBr × H₂O (643 mg, 4.2 mmol) in po 10 minutah še EDC × HCl (872 mg, 4.55 mmol). Pustimo 1 uro na ledu in nato še 24 ur pri sobni temperaturi. Po poteku reakcije dodamo EtOAc (100 mL). Izvedemo ekstrakcijo z 1M HCl (3 × 30 mL), nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (3 × 30 mL) in nasičeno vodno raztopino NaCl (40 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄. Sušilno sredstvo

odfiltriramo in organsko topilo odstranimo pri znižanem tlaku. Produkt (19) čistimo s kolonsko kromatografijo. Produkt (19) je brezbarvno olje.

Izkoristek reakcije: 8 %

Rf: 0.19, Mf (5), orositveni reagent: ninhidrin

M_r: 400.47

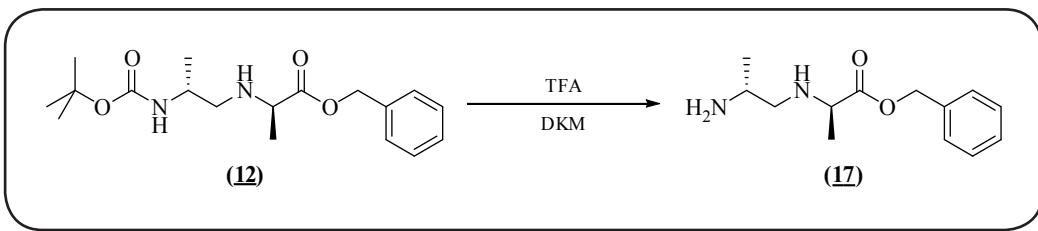
MS (ESI): 401.21 (MH⁺)

IR (KBr, cm⁻¹): 3391, 2970, 2840, 2361, 1734, 1645, 1606, 1527, 1498, 1456, 1369, 1262, 1210, 1167, 1112, 1028, 836, 751, 699

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 1.12 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 1.23 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, NHCH(CH₃)COO), 1.99 (s, 1H, CH₂NHCH(CH₃)COO), 2.55 – 2.64 (m, 2H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 3.41 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, NHCH(CH₃)COO), 3.81 (s, 6H, Ar(OCH₃)) - 4-metoksi, 3.87 (s, 3H, Ar(OCH₃)) - 2-metoksi, 3.93 – 3.99 (m, 1H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 5.14 (s, 2H, COOCH₂Ph), 6.59 – 6.63 (m, 2H, Ar-H) - substituenta 5 in 6, 7.30 – 7.36 (m, 5H, COOCH₂Ph), 7.80 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, Ar-H) substitent 3, 7.98 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, ArC(O)NHCH(CH₃))

Elementna analiza:	izračunana	izmerjena
% C	65,98	65,99
% H	7,21	7,21
% N	6,90	6,90

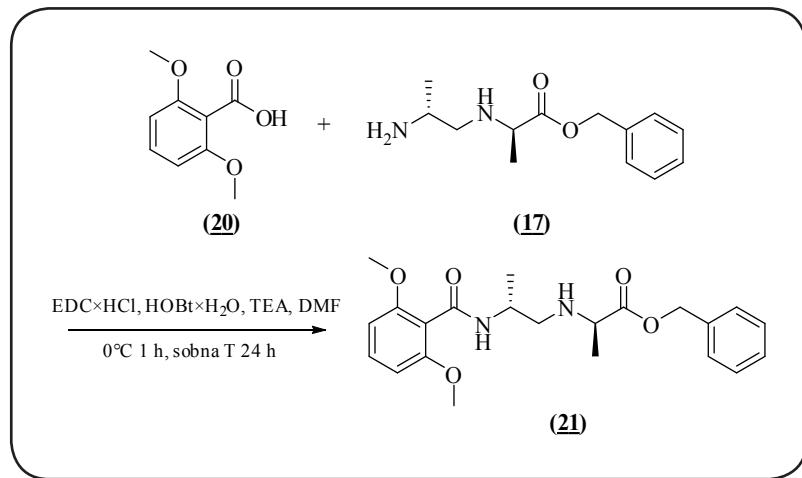
4.3.3.2 Sinteză (*R*)-benzil 2-((*R*)-2-(2,6-dimetoksibenzamido)propilamino)propanoata (21)



Sintezni postopek: (32)

1. Odstranitev zaščite z N-terminalnega dela reduciranega dipeptida

(R)-benzil 2-((R)-2-(terc-butoksikarbonilamino)propilamino)propanoat (**12**) (2.262 g, 8.69 mmol) raztopimo v DKM (100 mL) in dodamo TFA (30 mL). Reakcijsko zmes pustimo na magnetnem mešalu 1 uro pri sobni T. Topilo odparimo pri znižanem tlaku.



2. Pripajanje kisline na N-terminalni del reduciranega dipeptida

Po odparevanju topila oljnatemu preostanku (**17**) dodamo 2,6-dimetoksi benzojsko kislino (**20**) (1.583 g, 8.69 mmol) ter oboje raztopimo v DMF (10 mL). Raztopino ohladimo na 0 °C in dodamo HOBr × H₂O (1.409 g, 10.43 mmol) ter TEA (5.33 mL, 38.47 mmol). Po 10 minutah dodamo še EDC × HCl (2.166 g, 11.30 mmol). Reakcijsko zmes pustimo na ledeni kopeli še eno uro in nato še 24 ur pri sobni temperaturi na magnetnem mešalu. Po poteku reakcije dodamo EtOAc (100 mL) in stresamo. Organsko fazo ekstrahiramo z 1M HCl (3 × 30 mL), nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (3 × 30 mL) in nasičeno vodno raztopino NaCl (3 × 30 mL). Organsko fazo nato sušimo z Na₂SO₄. Sušilno sredstvo odfiltriramo, organsko

fazo odparimo pri znižanem tlaku, produkt (**21**) pa očistimo s kolonsko kromatografijo. Produkt (**21**) je brezbarvno olje.

Izkoristek reakcije: 8 %

Rf: 0.11, Mf (5), orositveni reagent: ninhidrin

M_r: 400.47

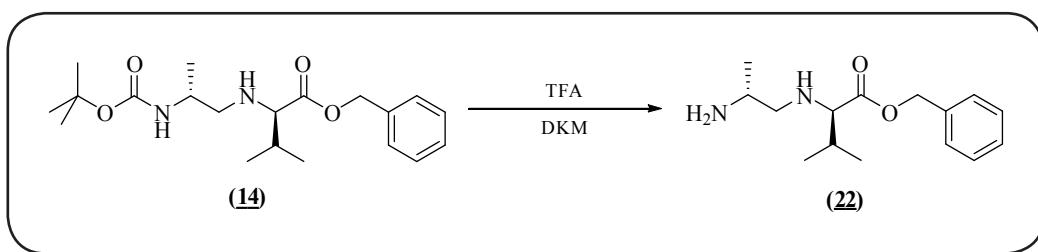
MS (ESI): 401.21 (MH⁺)

IR (KBr, cm⁻¹): 3316, 2970, 2936, 2839, 1733, 1652, 1596, 1520, 1473, 1306, 1253, 1157, 1112, 1030, 960, 785, 737, 700

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 1.06 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, NHCH(CH₃)CH₂), 1.21 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, NHCH(CH₃)COO), 1.99 (s, 1H, CH₂NHCH(CH₃)), 2.51 – 2.62 (m, 2H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 3.34 – 3.44 (m, 1H, NHCH(CH₃)COO), 3.70 (s, 6H, Ar(OCH₃)₂), 3.88 – 3.98 (m, 1H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 5.13 (s, 2H, COOCH₂Ph), 6.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar-H) - substituenta 3,5, 7.26 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar-H) - substituent 4, 7.30 – 7.39 (m, 5H, COOCH₂Ph), 7.77 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArC(O)NHCH)

Elementna analiza:	izračunana	izmerjena
% C	65,98	65,76
% H	7,05	6,77
% N	7,00	7,05

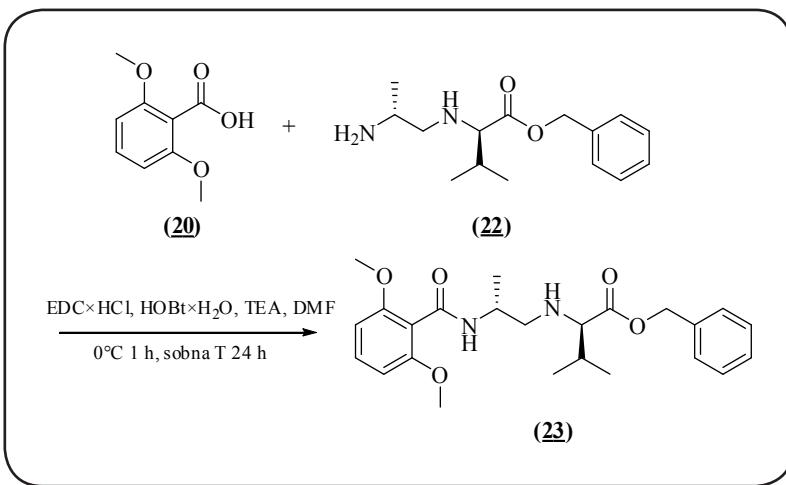
4.3.3.3 Poizkus sinteze (R)-benzil 2-((R)-2-(2,6-dimetoksibenzamido)propilamino)-3-metilbutanoata (23)



Sintezni postopek: (32)

1. Odstranitev zaščite z N-terminalnega dela reduciranega dipeptida

(R)-benzil 2-((R)-2-(terc-butoksikarbonilamino)propilamino)-3-metilbutanoat (**14**) (1.223 g, 8.69 mmol) raztopimo v DKM (100 mL) in dodamo TFA (3 mL). Reakcijsko zmes pustimo na magnetnem mešalu 24 ur. Organsko fazo ekstrahiramo z 1M NaOH (70 mL) za odstranitev prebitne TFA. Topilo odparimo pri znižanem tlaku.

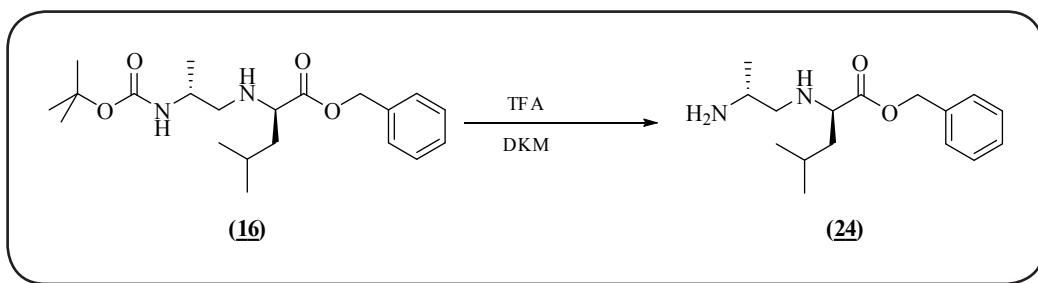


2. Pripajanje kisline na N-terminalni del reduciranega dipeptida

Po odparevanju topila oljnatemu preostanku (**22**) dodamo 2,6-dimetoksi benzojsko kislino (**20**) (585 mg, 3.21 mmol) ter oboje raztopimo v DMF (10 mL). Raztopino ohladimo na 0 °C in dodamo HOBr × H₂O (520 mg, 3.85 mmol) ter TEA (1.56 mL, 11.24 mmol). Po 10 minutah dodamo še EDC × HCl (800 mg, 4.17 mmol). Reakcijsko zmes pustimo na ledeni kopeli še eno uro in nato še 24 ur pri sobni temperaturi. Po poteku reakcije dodamo EtOAc (100 mL) in stresamo. Organsko fazo ekstrahiramo z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (3 × 30 mL) in nasičeno vodno raztopino NaCl (2 × 30 mL). Organsko fazo nato

sušimo z Na_2SO_4 . Sušilno sredstvo odfiltriramo, organsko fazo odparimo pri znižanem tlaku, produkt očistimo s kolonsko kromatografijo. Produktna zmes (**23**) je olje.

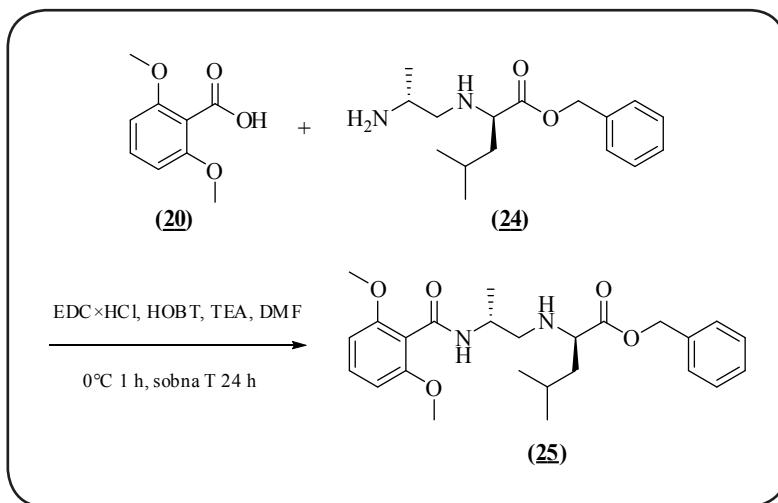
4.3.3.4. Poizkus sinteze (R)-benzil 2-((R)-2-(2,6-dimetoksibenzamido)propilamino)-4-metilpentanoata (25)



Sintezni postopek: (32)

1. Odstranitev zaščite z N-terminalnega dela reduciranega dipeptida

(R)-benzil 2-((R)-2-(terc-butoksikarbonilamino)propilamino)-4-metilpentanoat (**16**) (1.553 g, 8.69 mmol) raztopimo v DKM (100 mL) in dodamo TFA (3 mL). Reakcijsko zmes pustimo na magnetnem mešalu 1 uro pri sobni T. Organsko fazo ekstrahiramo z 1M NaOH (120 mL) za odstranitev prebitne TFA. Topilo odparimo pri znižanem tlaku.



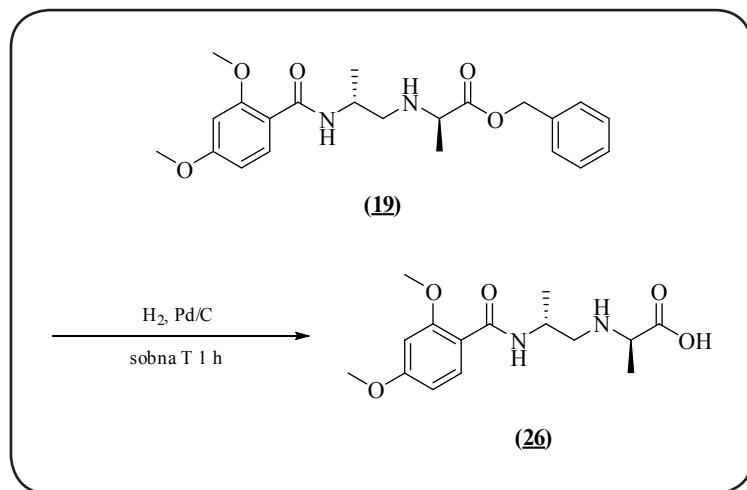
2. Pripajanje kisline na N-terminalni del reduciranega dipeptida

Po odparevanju topila oljnatemu preostanku (**24**) dodamo 2,6-dimetoksi benzojsko kislino (**20**) (1.062 g, 5.83 mmol) ter oboje raztopimo v minimalni količini DMF (10 mL). Raztopino ohladimo na 0 °C in dodamo HOBr × H₂O (945 mg, 7.00 mmol) ter TEA (2.83 mL, 20.40 mmol). Po 10 minutah dodamo še EDC × HCl (1.453 g, 7.58 mmol). Reakcijsko zmes pustimo na ledeni kopeli še eno uro in nato še 24 ur pri sobni temperaturi na magnetnem mešalu. Po poteku reakcije dodamo EtOAc (100 mL) in stresamo. Organsko

fazo ekstrahiramo z 1M HCl (3×30 mL), nasičeno vodno raztopino NaHCO_3 (3×30 mL) in nasičeno vodno raztopino NaCl (50 mL). Organsko fazo nato sušimo z Na_2SO_4 . Sušilno sredstvo odfiltriramo, organsko fazo odparimo pri znižanem tlaku, produkt (**25**) pa očistimo s kolonsko kromatografijo. Produktna zmes (**25**) je brezbarvno olje.

4.3.4 ODSTRANITEV ZAŠČITE S KONČNIH PRODUKTOV

4.3.4.1 Poizkus sinteze (*(R*)-2-((*R*)-2-(2,4-dimetoksibenzamido)propilamino)propanojske kisline (26)

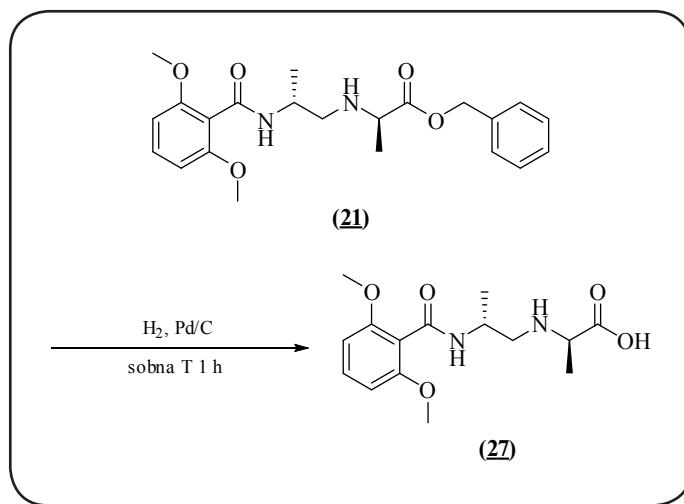


Sintezni postopek: (26)

(R)-benzil 2-((R)-2-(2,6-dimetoksibenzamido)propilamino)propanoat (**21**) (123 mg, 0.307 mmol) raztopimo v brezvodnem EtOH (5 mL). Po prepihavanju z argonom v raztopino dodamo Pd/C (15 mg). Med mešanjem reakcijsko zmes prepihavamo z H₂. Reakcijsko zmes pustimo nad vodikom čez noč. Po končanem katalitskem hidrogeniranju, kar preverimo z TLC, odfiltriramo Pd/C z odsesavanjem, topilo pa odparimo pri znižanem tlaku. Produkt (**26**) je prašek rjavkaste barve.

Količina vzorca ni bila zadostna za izdelavo analiz.

4.3.4.2 Sinteza (R)-2-((R)-2-(2,6-dimetoksibenzamido)propilamino)propanojske kisline (27)



Sintezni postopek: (26)

(R)-benzil 2-((R)-2-(2,6-dimetoksibenzamido)propilamino)propanoat (**21**) (172 mg, 0.429 mmol) raztopimo v brezvodnem EtOH (10 mL). Po prepihavanju z argonom v raztopino dodamo Pd/C (20 mg). Med mešanjem reakcijsko zmes prepihavamo z H_2 . Reakcijsko zmes pustimo nad vodikom čez noč. Po končanem katalitskem hidrogeniranju, kar preverimo z TLC, odfiltriramo Pd/C z odsesavanjem, topilo pa odparimo pri znižanem tlaku. Produkt (**27**) je prašek rjavkaste barve.

Izkoristek reakcije: 75 %

Rf: Mf (3), spojina je ostala na začeku, orositvena reagenta: ninhidrin, bromkrezol zeleno

Tališče: 130 – 132°C

M_r: 310.35

MS (ESI): 311.16 (MH⁺)

IR (KBr, cm⁻¹): 3419, 2980, 2349, 2286, 1649, 1598, 1516, 1474, 1432, 1388, 1357, 1310, 1252, 1164, 1112, 1050, 964, 840, 794, 757, 716, 627, 561, 513, 493

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 1.16 (dd, J = 7.0, 3.0 Hz, 6H, NHCH(CH₃)CH₂NHCH(CH₃)COOH), 2.49 – 2.62 (m, 2H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 3.11 (q, J = 7.0 Hz, 1H, NHCH(CH₃)COOH), 3.75 (s, 6H, Ar(OCH₃)₂), 3.78 (d, J = 2.0 Hz, 1H, NHCH(CH₃)COOH), 4.00 – 4.13 (m, 1H, NHCH(CH₃)CH₂NH), 6.69 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.35 (t, J = 8.5 Hz, 1H, Ar-H),

¹³C-NMR (300 MHz, D₂O, MeOH): δ (ppm) = 16.9, 17.2, 45.0, 50.6, 55.4, 57.8, 104.1,

113.8, 130.9, 155.8, 167.3, 182.1

HMQC

16.9, 17.2, 45.0, 50.6, 55.4, 57.8, 104.1, 130.9

DEPT 90°

45,0, 57.8, 104.1, 130.9

Elementna analiza:	izračunana	izmerjena
% C	58,05	57,72
% H	7,15	7,15
% N	9,03	8,79

5. RAZPRAVA

V sklopu diplomske naloge smo izvedli več različnih reakcij, kot so npr. esterifikacija, redukcija, reduktivno aminiranje, acidoliza, tvorba amidov in katalitsko hidrogeniranje.

Pri sintezi amidov, ki potekajo med kislino in aminom pri sobni temperaturi, moramo predhodno zaščititi preostale funkcionalne skupine, ki bi lahko reagirale v reakciji. Poglavitnega pomena je aktiviranje izhodne karboksilne kisline, ki je sama premalo reaktivna za reakcijo z aminom. Za kondenzacijo je najbolj primerno, če karbonilni C-atom predhodno aktiviramo. To lahko naredimo tako, da vežemo neposredno (-Cl, -N₃) ali preko esterske vezi (p-nitrofenol, tozil) na karbonilni ogljikov atom elektron privlačno skupino, ki prispeva k polarizaciji karbonilne skupine. Amidna vez nastane po adiciji nukleofila, ki ji sledi še eliminacija. V našem primeru smo zaradi priprave reducirane amidne vezi izhajali iz aldehida namesto iz kisline.

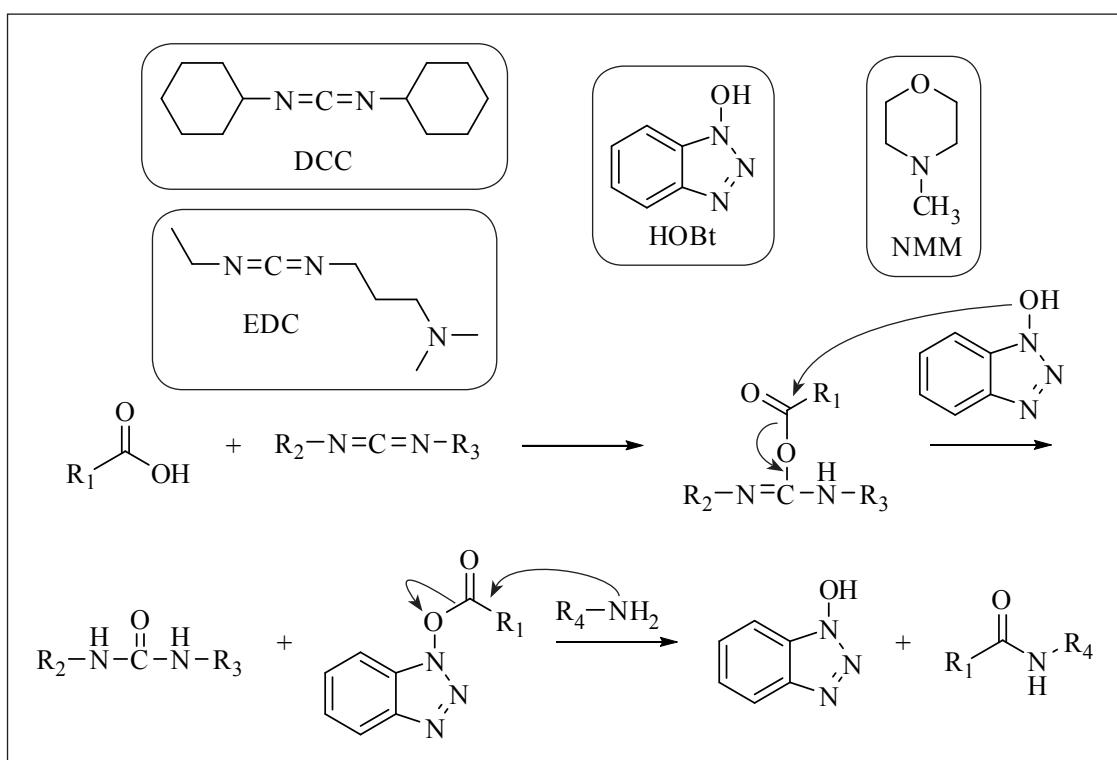
Pri sintezi reduciranih dipeptidov (D-Ala-D-Ala) smo na začetku izvedli celoten postopek na L-alaninu zaradi cenejše izhodne spojine. Pri tem smo se bolj seznanili tudi s samimi mehanizmi in deloma optimizirali oziroma prilagodili postopke reakcij. Ker pa smo imeli v stopnji acidolize pred tvorbo amidne vezi z 2,6-dimetoksi benzojsko kislino težave zaradi uporabe metilnega estra kot zaščite C-terminalne karboksilne skupine, smo pri D-izomerih uporabili za zaščito ester z benzilnim alkoholom.

5.1. PRIPRAVA REAGENTOV ZA REDUKTIVNO AMINIRANJE

Za N-terminalno aminokislino smo vedno izhajali iz D-alanina, ki smo ga najprej zaščitili tako, da smo ga pretvorili v N-(tercbutoksikarbonil)alanin. S tem smo aminsko skupino zaščitili in s tem preprečili potek stranskih reakcij, hkrati pa smo uvedli nepolarno skupino, kar nam je omogočilo uporabo kromatografije za čiščenje produktov. Terc-butilkarbamatna zaščita je obstojna v alkalnih pogojih in inertna za večino nukleofilov, s katerim potekajo reakcije v naslednjih stopnjah sinteze. Poleg tega jo lahko odstranimo v kislih pogojih HCl/CH₃COOH ali CH₃COOH/CH₂Cl₂. BOC-D-Ala smo nato pretvorili v Weinrebov amid. Kot reagenta smo najprej uporabili BOP/TEA in drugič EDC/HOBt×H₂O/TEA. Izkoristek in čas poteka reakcije sta bila v prvem primeru boljša. Zaradi visoke molekulske mase BOP je kljub relativno nizkim množinam reagentov poraba velika, s tem pa ekonomsko gledano neugodna, zato smo iskali nadomestni reagent, kar je bila v našem primeru kombinacija EDC/HOBt×H₂O/TEA.

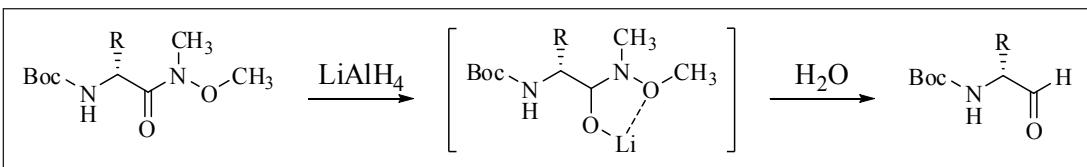
Mehanizem, po katerem poteka reakcija z reagentoma EDC/HOBt × H₂O, je prikazan na

sliki 7. Karboksilna skupina tvori z EDC intermedijat, ki reagira z nukelofili. Dodani HOBr × H₂O kot nukleofil reagira z aktivirano O-acilizosečnino v reakciji transesterifikacije pri čemer nastane še bolj aktiviran ester. Ta reagira z aminom in tvori željeni amid ter vodotopno sečnino. Vloga TEA je v nevtralizaciji izhodnih reagentov, ki so v obliki soli (EDC×HCl, amin) ter v odtegnitvi protona COOH skupini in s tem povečanju njene nukleofilnosti. Prednost aktivacije skupine COOH z EDC pred DCC je v tem, da nastane v reakciji vodotopna sečnina, ki jo lahko ekstrahiramo v vodno fazo. Na drugi strani pa ob aktivaciji z DCC nastane dicikloheksilsečnina, ki jo zaradi slabe topnosti v organskih topilih odfiltriramo. Ločba s filtracijo ni tako učinkovita, ker nekaj dicikloheksilsečnine še vedno ostane raztopljljene v organskem topilu.



Slika 7: Mehanizem tvorbe Weinrebovega amida in amidne vezi

Po tvorbi Weinrebovega amina smo reducirali amid do aldehyda z LiAlH₄ v brezvodnem THF. THF smo uporabili, ker Weinrebov amid BOC-D-alanina ni topen v dietiletru. Reakcija redukcije poteka preko intermediata v obliki litijevega kompleksa (slika 8), katerega je potrebno do aldehyda hidrolizirati z vodno raztopino KHSO₄. Aldehydi so zelo nestabilni in racemizirajo, zato smo reakcijo izvajali pri -15 °C, samo hidrolizo pa na ledeni kopeli pri temperaturi 0 °C neposredno pred reakcijo reduktivnega aminiranja, preostanek pa smo sušili pri znižanem tlaku ter shranili v hladilniku pod argonom.

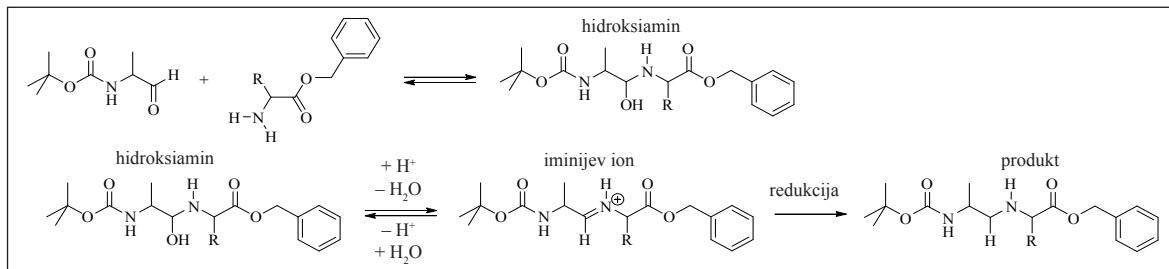


Slika 8: Mehanizem redukcije Weinrebovega amida BOC-D-Ala do aldehida

Vzporedno s pripravo aldehida smo pripravili soli benzilnih estrov D-Ala, D-Leu ter D-Val s pTsOH. Pri sintezi smo uporabili Dean-Starkov nastavek za odstranjevanje vode. Pri delu z L-Ala smo ugotovili, da je izredno pomembna uporaba sveže predestiliranega benzilnega alkohola ter uporaba zadostne količine benzena za tvorbo azeotropne zmesi z vodo. Raba nedestiliranega alkohola ni primerna, ker vsebuje aldehidne razpadne produkte, ki motijo reakcijo in se kažejo v rumenkasti obarvanosti raztopine med destiliranjem. Kristale nastale po prelivanju z dietiletrom je potrebno temeljito sprati z etrom, da se znebimo benzilnega alkohola, ki ovira prekristalizacijo iz etra in kasneje tudi čiščenje sintetiziranega amida (D-Leu). Pri sintezi benzilnih estrov je imel vpliv na izkoristek reakcije velikost substituenta na α C-atomu; z naraščanjem velikosti substituenta na tem mestu je padal izkoristek pri pripravi benzilnega estra (D-Ala > D-Val > D-Leu).

5.2. PRIPRAVA DIPEPTIDOV Z REDUCIRANO AMIDNO VEZJO

V tej stopnji smo sintetizirali dipeptide z reducirano amidno vezjo, ki so bili na N-terminalnem koncu zaščiteni z tercbutilkarbamatom, na C-terminalni karboksilni skupini pa z benzilnim estrom. Pred nastavitvijo reakcije smo morali aminokislini, zaščiteni z benzilno zaščitno skupino, najprej odstraniti pTsOH z dodatkom vodne raztopine NaOH. Pri pripravi reduciranih dipeptidov smo uporabili metodo reduktivnega aminiranja s natrijevim triacetoksiborhidridom, pri čemer pa nismo uporabili kislih pogojev, ker aldehydi reagirajo že brez dodajanja kisline. Mehanizem reakcije je predstavljen na sliki 9.



Slika 9. Mehanizem reduktivnega aminiranja s triacetoksiborhidridom

Produkti reduktivnega aminiranja so imeli namesto karbonilnega atoma sedaj tetraedrični ogljikov atom, ki posnema tetraedrično prehodno stanje reakcije, ki jo katalizirajo PBP.

Sicer smo pripravili tudi homologa z D-Val in D-Leu na C-terminalnem delu dipeptida, da bi lahko preizkusili prileganje končnih produktov v aktivno mesto bakterijskih encimov. S tem smo želeli pripraviti potencialne inhibitorje, s pomočjo katerih bi ugotovili vpliv spremenjanja velikosti substituentov na α C-atomu. Tudi pri tej stopnji sinteze je bil vpliv velikosti substituenta na izkoristek reakcije (D-Ala > D-Val > D-Leu). Produkti reduktivnega aminiranja so bili dovolj nepolarni, da nismo potrebovali EtOAc za ekstrakcijo, saj so ostali v DKE po spiranju z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃. Čiščenje produktov smo izvedli s kolonsko kromatografijo.

5.3. PRIPAJANJE DIMETOKSI BENZOJSKE KISLINE NA C-TERMINALNI DEL REDUCIRANEGA DIPEPTIDA

Najprej smo izvedli acidolizo reduciranega dipeptida, da smo odstranili BOC zaščito z N-terminalnega dela. Reakcija je sicer potekla hitro in z visokim izkoristkom, vendar je bila težava v odstranitvi prebitne trifloroacetne kisline.

Del reduciranega dipeptida D-Ala-D-Ala s prosto aminske skupino smo uporabili za pripravo amida z 2,4-dimetoksibenzojsko kislino. Izkoristek je bil prenizek, zaradi česar nam produkta ni ostalo dovolj, da bi opravili analize.

Odščitene amine (D-Ala-D-Ala, D-Ala-D-Val in D-Ala-D-Leu) in 2,6-dimetoksibenzojsko kislino smo nato uporabili za sintezo amidov. Pri reakciji D-Ala-D-Ala z 2,6-dimetoksi benzojsko kislino smo ugotovili, da neaktivirana karboksilna kislina slabo reagira z aminom, kar se je pokazalo z zelo nizkim izkoristkom reakcije.

Na podlagi tega lahko sklepamo, da je karbonilna skupina močno sterično ovirana z metoksi skupinama na fenilnem obroču molekule. Enake težave smo imeli tudi pri sintezah amida iz D-Val in D-Leu. Iz tega smo zaključili, da bi bilo bolje uporabiti aktivirano kislino (kislinski klorid) ali pa bi vrstni red sinteze spremenili in najprej sintetizirali amidno vez med 2,6-dimetoksi benzojsko kislino in N-terminalnim delom D-Ala in šele nato pripravili reducirani amid.

Produkt te stopnje reakcije smo čistili s kolonsko kromatografijo, ker po odstranitvi zaščite na C-terminalnem delu produkta nastane prosta kislina in jo je težje čistiti.

5.4. ODSTRANITEV ZAŠČITE S KONČNIH PRODUKTOV

Za sintezo končnega produkta smo morali izvesti še katalitsko hidrogeniranje za odstranitev benzilne zaščite. Le-to je poteklo kvantitativno in hitro. Za potrditev identitete končnega

produkta smo opravili elementno analizo, katere rezultati so bili znotraj zahtevanih meja. Žal so nam pri sintezi reduciranega dipeptida D-Ala-D-Leu nastali stranski produkti, in sicer se je kislina vezala na EDC, poleg tega pa navkljub kolonski kromatografiji nismo uspeli popolnoma ločiti produkta, kar smo lahko razbrali iz rezultatov analize z NMR. Poizkusili smo tudi z uporabo različnih mobilnih faz za kolonsko kromatografijo, vendar nam ni uspelo zagotoviti dovolj visoke razlike v retencijskem faktorju med spojinami v heterogeni zmesi produktov.

5.5. RAZLAGA K SINTEZNEMU DELU

V načrtovanju sintezne poti smo najprej preizkusili sintezne postopke na L-alaninu, da bi prilagodili pogoje za čim boljše izkoristke in ugotovili ali vse načrtovane reakcije potečejo. Po uspešni sintezi z uporabo L-alanina smo prenesli sintezne postopke na D-alanin. Izkoristki sintez pa so bili nižji, predvsem v zadnjih korakih sinteze. Pri uporabi D-Val in D-Leu pa so bile največje težave v zadnji stopnji pripajanja, ker sta molekuli večji od D-Ala. Na podlagi NMR spektra smo lahko razbrali, da produkt je nastal, vendar je bilo v produktni zmesi preveč nečistoč, da nismo mogli izolirati samega produkta niti s standardno kolonsko kromatografijo niti z uporabo Isolere.

5.6. REZULTATI TESTIRANJA KONČNIH SPOJIN NA ENCIMIH PBP R39, DdlB IN MurF

Kljub temu, da nam je uspelo sintetizirati le enega (27) od treh načrtovanih reduciranih dipeptidov, smo le-tega uporabili za testiranje na treh različnih encimih: PBP R39, Ddl B (*E. coli*) in Mur F (*E. coli*).

Testiranje inhibitornega delovanja na encim PBP R39 so izvedli v University of Liège, Belgija. Meritve aktivnosti delovanja končnih spojin na encima Ddl B in Mur F so bile izvedene na Fakulteti za farmacijo, izvedla jih je Andreja Kovač, mag. farm.

Encim PBP R39 katalizira cepitev peptidne vezi terminalnega D-Ala-D-Ala fragmenta na bakterijskem peptidoglikanu. Za testiranje uporabimo raztopimo inhibitor v raztopini natrijevega fosfata ter po 20 min inkubaciji na 37 °C dodamo tripeptidni substrat Na_nNe-diacetyl-L-lizil-D-alanil-D-alanin, reakcijo pa prekinemo z dodatkom penicilina G. Količino nastalega D-alanina kvantificiramo s pomočjo D-aminokislinskega oksidaznega testa (33,34).

Ddl katalizira nastajanje dipeptida D-Ala-D-Ala iz D-Ala ob prisotnosti ATP, ki pri tem

razpade na ADP in fosfat. Nastanek fosfata določamo spektrofotometrično pri 650 nm posredno preko tvorbe zeleno obarvanega kompleksa z malahitno zelenim. Katalitično aktivnost encima Ddl ovrednotimo na podlagi množine fosfata, ki nastane pri reakciji. Ob dodatku inhibitorja se katalitična aktivnost encima Ddl 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. Jakost spojin izrazimo z IC_{50} . To je tista koncentracija, ki zmanjša aktivnost encima za 50% (35). V vse testirane vzorce je bil dodan še solubilizator (Triton X-114), ki prepreči tvorbo agregatov inhibitorja in s tem nespecifične interakcije inhibitorja z encimom (36). Encim Mur F pripne D-Ala-D-Ala dipeptid na UDP-N-acetilmuramilripeptid. Tudi ta reakcija potrebuje za potek ATP, ki pri tem razpade na ADP in fosfat. Katalitično aktivnost encima Mur F določamo z določanjem nastanek fostata spektrofotometrično posredno preko tvorbe zeleno obarvanega kompleksa z malahitno zelenim (37). Učinkovitost inhibitorja izrazimo z rezidualno aktivnostjo (RA), ki predstavlja razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti inhibitorja in aktivnostjo encima brez navzočnosti inhibitorja.

Rezultati testiranja so bili pri vseh encimih negativni. S tem smo ovrgli naša predvidevanja, da bo naša spojina zaradi podobnosti v strukturi z D-Ala-D-Ala kompetitivno zasedla aktivno mesto v encimu ter inhibirala delovanje le-tega.

6. ZAKLJUČEK

Načrtovali in sintetizirali smo nove reducirane analoge dipeptida D-Ala-D-Ala. Uporabili smo standardne postopke za sintezo reduciranih dipeptidov, ki so na primeru reduciranega dipeptida L-Ala-L-Ala potekali brez posebnosti. Ugotovili smo, da N-aciliranje reduciranega dipeptida s "coupling" reagenti poteka z zelo nizkimi izkoristki in bi ga bilo potrebno še optimizirati. Največjo težavo je predstavljala zadnja stopnja pripenjanja 2,6-dimetoksi benzojske kisline na N-terminalni del reduciranega dipeptida. Razlog za to lahko iščemo v sferičnem oviranju tako obeh metoksi skupin na fenilnem obroču kisline, kot tudi v sami velikosti dipeptida, ki pa ima poleg tega na mestu peptidnega C-atoma sp^3 hibridiziran C-atom, zaradi česar ima manj togo strukturo. Zato bi bilo boljše začeti sintezno pot s sintezo amidne vezi med 2,6-dimetoksi benzojsko kislino in D-alaninom in šele nato izvesti reduktivno aminiranje na C-terminalnem delu.

Uspeli smo sintetizirati končno spojino (R)-2-((R)-2-(2,6-dimetoksibenzamido)

propilamino)propanojsko kislino (**27**), ki pa ni imela delovanja na PBP R39, Ddl B (E. coli) in Mur F (E. coli). Glede na rezultate testiranja končnih produktov na encimih PBP R39, DdlB in MurF lahko sklepamo, da fragment 2,6-dimetoksi benzojske kisline na C-terminalnem delu ni pripomogel k boljšemu ujemanju z aktivnim mestom v encimu. Zato bi bilo potrebno na tem mestu pripeti kakšno drugo lipofilno skupino, ki bi pripomogla k temu in se bolje prilegala.

7. LITERATURA

1. <http://www.textbookofbacteriology.net/resantimicrobial.html>.
2. Burki T: Prospective antibacterial pipeline running dry. *The Lancet* 2009; 9: 661.
3. Alekshun MN, Levy SB: Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* 2007; 128: 1037-1050.
4. Walsh C: Molecular mechanisms that confer antibacterial resistance. *Nature* 2000; 406: 775-781.
5. George AM, Hall RM: Efflux of chloramphenicol by the CmlA1 protein. *FEMS Microbiology Letters* 2002; 209: 209-213.
6. Hardy SP: Human microbiology. Taylor & Francis, 2002: 251.
7. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J: Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *CID* 2009; 48: 1-12.
8. Overbye KM, Barrett JF: Antibiotics: Where did we go wrong? *DDT* 2005; 10: 45-52.
9. Editorial: Urgently needed: new antibiotics. *The Lancet* 2009; 374: 1868.
10. Dancer SJ: How antibiotics can make us sick: the less obvious adverse effect of antimicrobial chemotherapy. *The Lancet* 2004; 4: 611-618.
11. Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pommelano DL: Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature Reviews Microbiology* 2007; 6: 29-40.
12. Auterhoff H, Knabe J, Höltje HD: Lehrbuch der Pharmaceutischen Chemie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1999: 671-767.
13. Cabeen MT, Jacobs-Wagner C: Bacterial Cell shape. *Nature Reviews Microbiology* 2005; 3: 601-610.
14. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA: Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 149-167.
15. Heijnen J: Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat Prod Rep* 2001; 18: 503-519.
16. Navarre WW, Schneewind O: Surface Proteins of Gram-Positive bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. *Microbiology and molecular biology reviews* 1999; 63: 174-229.
17. Green DW: The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opin Ther Targets* 2002; 6(1): 1-19.
18. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T: Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS* 2008; 32: 361-385.

19. Macheboeuf P: Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev* 2006; 30: 673-691.
20. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P: The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 234-258.
21. Vagner J, Qu H, Hruby VJ: Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology* 2008; 12: 292-296.
22. Marc G, Pečar S: Bioizosterija in načrtovanje peptidomimetikov. *Farm. vestn.*, 1993; 43: 3-22.
23. Tišler M: Organska kemija, tretja izdaja, DZS, Ljubljana, 2002: 373-383.
24. Živec M, Jakopin Ž, Gobec S: Recent Advances in the Synthesis and Applications of Reduced Amide Pseudopeptides. *Current Medicinal Chemistry* 2009; 16: 2289-2304.
25. Burger A: *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 5th ed., New York, John Wiley & Sons, 1995: 773-782, 838-846.
26. Bodanszky M: *Peptide Chemistry*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 1988.
27. Sollner M, Pečar S: *Vaje iz farmacevtske kemije III*, druga izdaja. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2000: 15.
28. Fehrentz JA, Castro B: An efficient synthesis of optically active α -(t-butoxicarbonilamino)-aldehydes from α -amino acids. *Synthesis* 1983: 676-678.
29. Brimble MA, Trotter NS, Harris PWR, Sieg F: Synthesis and pharmacological evaluation of side chain modified glutamic acid analogues of the neuroprotective agent glycyl-L-prolyl-glutamic acid (GPE). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005; 13: 519-532.
30. Noda K, Okai H, Kato T, Izumiya N: Studies on separation of amino acids and related compounds. III. Separation of diastereoisomers of leucyl dipeptides by ion-exchange chromatography. *Bulletin of the chemical society of Japan* 1968; 41: 401-407.
31. Abdel-Magid AF, Carson KG, Harris BD, Maryanoff CA, Shah RD: Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. *J Org Chem* 1996; 61, 3849-3862.
32. Han SY, Kim YA: Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* 2004; 60: 2447-2467.
33. Zervosen A, Lu W-P, Chen Z, White RE, Demuth TP, Frère J-M: Interactions between Penicillin-Binding Proteins (PBPs) and Two Novel Classes of PBP Inhibitors, Arylalkylidene Rhodanines and Arylalkylidene Iminothiazolidin-4-ones. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48 (3): 961-969.

34. Granier B, Jamin M, Adam M, Galleni M, Lakaye B, Zorzi W, Grandchamps J, Wilkin J-M, Fraipont C, Joris B, Duez C, M. Nguyen-Distèche, Coyette J, Leyh-Bouille M, Dusart J, Christiaens L, Frère J-M, Ghysen J-M: Serine-type D-Ala-D-Ala peptidases and penicillinbinding proteins. *Methods Enzymol* 1994; 244:249–267.
35. Kovač A, Majce V, Lenaršič R, Bombek S, Bostock JM, Chopra I, Polanc S, Gobec: Diazenedicarboxamides as inhibitors od D-alanine-D-alanine ligase (Ddl). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007; 17: 2047-2054.
36. McGovern SL, Caselli E, Grorieff N, Shoicet BK: A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and High-Throughput Screening. *J Med Chem* 2002; 45: 1712-1722.
37. Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia O: An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* 1979; 100: 95-97.