

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VIKA KOBOLA

SINTEZA ANALOGOVS PUMIGINOV KOT POTENCIALNIH
ANTITROMBOTIČNIH UČINKOVIN

THE SYNTHESIS OF SPUMIGINES ANALOGUES AS POTENTIAL
ANTITHROMBOTIC AGENTS

DIPLOMSKA NALOGA
Univerzitetni program farmacija

Ljubljana, 2013

Vika Kobola: Sinteza analogov spumiginov kot potencialnih antitrombotičnih učinkovin

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Janeza Ilaša, mag.farm.

Iskreno se zahvaljujem doc.dr. Janezu Ilašu, mag. farm., ki me je spremljal in usmerjal pri pisanju diplomske naloge in Alešu Žuli, mag. farm. za vso pomoč in nasvete pri praktičnemu delu diplomske naloge.

Hvala mami Magdi, atu Viktorju in sestri Bernardi za vso podporo tekom študija. Sošolki Sandri Kos, cimri Klavdiji Zalokar in prijateljici Kristini Huč pa se zahvaljujem za vse spodbude in druženje pri študijskih in obštudijskih dejavnostih. Hvala Davidu Novaku za njegovo potrpežljivost v zadnjih dneh pisanja diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Janeza Ilaša, mag.farm.

VSEBINA

VSEBINA	III
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD	1
1.1 MEDNARODNI RAZISKOVALNI PROJEKT MAREX	1
1.2 SPUŽVE	2
1.3 AERUGINOSINI IN SPUMIGINI	4
1.3.1 AERUGINOSINI	4
1.3.2 SPUMIGINI	6
1.4 PROTEAZE	7
1.4.1 SERINSKE PROTEAZE	8
1.5 ZAVIRALCI PROTEAZ	9
1.5.1 SERPINI – ZAVIRALCI SERINSKIH PROTEAZ	9
1.6 HEMOSTAZA	11
1.6.1 SEKUNDARNA HEMOSTAZA	12
1.7 SINTEZNI ANALOGI AERUGINOSINOV IN SPUMIGINOV	13
2 NAČRT ZA DELO	16
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 MATERIALI	19
3.2 METODE	19
3.2.1 KROMATOGRFSKE METODE	19
3.2.2 SPEKTROSKOPSKE METODE	19
3.2.3 NOMENKLATURA IN RISANJE SPOJIN	19

4	<u>EKSPERIMENTALNO DELO</u>	20
4.1	SINTEZA PREKURZORJA P1-P2	20
4.1.1	SINTEZA ESTRA	20
4.1.2	ZAŠČITA GVANIDINSKEGA DELA Z BOC ₂ O	22
4.1.3	ODSTRANJEVANJE BENZIL KARBAMATNE ZAŠČITE S KATALITSKIM HIDROGENIRANJEM	25
4.1.4	AKTIVIRANJE INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE	27
4.1.5	PRIPAJANJE DERIVATA ARGININA NA AKTIVIRANO INDOL-2-KARBOKSILNO KISLINO	31
4.2	SINTEZA PREKURZORJA P3	35
4.2.1	SINTEZA SPOJINE 23 IZ FENILMLEČNE KISLINE	36
4.2.2	SINTEZA METILNEGA ESTRA FENILALANINA	39
4.2.3	PRIPAJANJE SPOJINE 23 NA SPOJINO 19	39
4.2.4	HIDROLIZA SPOJINE 24	40
4.2.5	SINTEZA KISLINSKEGA KLORIDA SPOJINE 25	42
4.2.6	PRIPAJANJE SPOJINE 26 NA METILNI ESTER INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE	43
4.3	SINTEZA DIPEPTIDA IZ BOC-D-PHE IN METILNEGA ESTRA INDOL-2- KARBOKSILNE KISLINE	44
4.3.1	SINTEZA KISLINSKEGA KLORIDA IZ BOC-D-PHE-OH	44
4.3.2	PRIPAJANJE AKTIVIRANEGA BOC-D-PHE NA METILNI ESTER INDOL-2- KARBOKSILNE KISLINE	45
4.4	PREVERJANJE NASTANKA KISLINSKEGA KLORIDA S TVORBO ESTRA	46
5	<u>REZULTATI IN RAZPRAVA</u>	47
5.1	SINTEZA PREKURZORJA P1-P2	47
5.2	SINTEZA PREKURZORJA P3	49
5.3	SINTEZA DIPEPTIDA IZ BOC-D-PHE IN METILNEGA ESTRA INDOL-2- KARBOKSILNE KISLINE	50
5.4	PREVERJANJE NASTANKA KISLINSKEGA KLORIDA S TVORBO ESTRA	51
6	<u>SKLEP</u>	52
7	<u>LITERATURA</u>	53

POVZETEK

Ljudje že stoletja s svojo radovednostjo odkrivamo, da je podvodni svet neizmeren vir raznovrstnih živali, rastlin, mikroorganizmov in spojin, ki jih lahko uporabimo za okrasje, hrano, kozmetične pripravke in zdravila. Tudi morski nevretenčarji, ki jih proučujejo pri mednarodnem projektu MAREX, so bogat vir spojin, katere človeštvo izkorišča za zdravljenje ali nadzorovanje nekaterih bolezni, kot je na primer motnja strjevanja krvi. Pri sekundarni hemostazi sodeluje veliko število spojin, med katerimi sta najpomembnejša serinska proteaza trombin in inhibitor serinske proteaze antitrombin. Ker serinske proteaze in njihove inhibitorje, kot so aeruginosini in spumigini, najdemo tudi pri morskih bakteriospužvah, so le-te postale predmet preučevanja in izvor spojin vodnic za sintezne analoge. Z odkritjem spojine PPACK (*D*-Phe-Pro-Arg-klorometilketon), ki je prototip sinteznega inhibitorja trombina, se je začela sinteza različnih analogov aeruginosinov in spumiginov, ki imajo boljšo aktivnost in selektivnost za trombin kot naravne spojine.

Bistvena struktura spumiginov je amidna povezava jedra, ki je *L*-prolin ali (*2S,4S*)-4-metilprolin, z derivatom arginina na P1 mestu (C-konec terapeptida) in dipeptidom iz *D*-hidroksifenilmlečne kisline in ene nepolarne (ne)navadne aminokisline na P3 mestu (N-konec tetrapeptida). Pri diplomski nalogi smo za sintezni analog spumiginov vzeli indolin (2,3-dihidro-1*H*-indol) kot jedro, na katerega smo pripajali derivate arginina in dipeptid iz fenilalanina in fenilmlečne kisline.

KLJUČNE BESEDE:

Spumigini, sintezni analogi, serin proteazni inhibitorji, serin proteaze, spužve.

ABSTRACT

For centuries people with their curiosity were discovering that the underwater world is a rich source of diverse animals, plants, microorganisms and compounds, which can be used as decorations, food, cosmetics and medicines. Mainly marine invertebrates, which are also a topic of research in the international project MAREX, are a rich source of compounds that we use in the treatment or the control of certain diseases like a hemostasis disorders. A large number of compounds, among which serine protease thrombin and serine protease inhibitor antithrombin are the most important, participate in the secondary hemostasis. Serine proteases and their inhibitors, such as aeruginosins and spumigins, can also be found in the marine bacteriosponges, so they became a target of a research and a source of lead compounds for synthetic analogues. Synthesis of various analogs of aeruginosins and spumigins, which have higher activity and selectivity for thrombin as a natural compound, has started with the discovery of a prototype synthetic thrombin inhibitor PPACK (*D*-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone).

The main structure of spumigins is an amide link between *L*-proline or (*2S*, *4S*)-4-methylproline core and derivate of arginine on the P1 site (the C-end of tetrapeptide) and dipeptide of *D*-hydroxyphenyllactic acid and one nonpolar (un)usual amino acid on the P3 site (the N-end of the tetrapeptide). For our synthesis of an analogues of spumigins we were coupling arginine and dipeptide of phenylalanine and phenyllactic acid on an indoline (2,3-dihydro-1*H*-indole) core.

KEY WORDS:

Spumigins, synthetic analogues, serine protease inhibitors, serine proteases, sponges.

SEZNAM OKRAJŠAV

AA	očetna kislina
Adc	aminoetil 1- <i>N</i> -amidino-3- Δ -pirolin
Agm	agmatin
Argal	argininal
Argol	argininol
Asp	aspartat
AT	antitrombin
BnBr	benzil bromid
Boc	terc-butoksikarbonilna skupina
Boc- <i>D</i> -Phe	<i>D</i> -fenilalanin z Boc zaščito na NH ₂ skupini
Boc ₂ O	Boc anhidrid (di-terc-butil dikarbonat)
CC	cianurični klorid
Choi	<i>L</i> -2-karboksi-6-hidroksioktahidroindol
d	dublet
DDC	dietil 1,4-dihidro-2,4,6-trimetil-3,5-piridindikarboksilat
DIC	<i>N, N'</i> -diizopropilkarbodiimid
DIPEA	diizopropiletilamin
DKM	diklorometan
DMAP	dimetilaminopiridin
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetil sulfoksid
EA	etilacetat
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
Glu	glutaminska kislina
Gly	glicin
GP	glikoprotein
HEK	heksan
His	histidin
HOBt	1-hidroksibenzotriazol
Hph	homofenilalanin
Hpla	hidroksifenilmlečna kislina (2-hidroksi-3-(4-hidroksifenil)propanojska kislina)

Vika Kobola: Sinteza analogov spumiginov kot potencialnih antitrombotičnih učinkovin

Hpla(Ac)	2-acetoksi-3-(4-hidroksifenil)propanojska kislina
Hty	homotirozin
IC ₅₀	50 % inhibitorna koncentracija
Ile	izolevcin
KK	kislinski klorid
Leu	levcin
Lys	lizin
m	multiplet
MeOH	metanol
mPro	(2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4-metilprolin
Mr	molska masa
NCS	<i>N</i> -klorosukcinimid
NMR	jedrna magnetna resonanca
Phe	fenilalanin
PPACK	<i>D</i> -Phe-Pro-Arg-klorometilketon
Pro	prolin
q	kvartet
Rf	retencijski faktor
s	singlet
Ser	serin
t	triplet
TBAI	tetrabutilamonijev jodid
TBTU	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil- <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)uronium tetrafluoroborat
TEA	trietilamin
TF	tkivni faktor
THF	tetrahidrofuran
TLC	tanko plastna kromatografija
TMSCHN ₂	(diazometil)trimetilsilan
Trp	triptofan
Tyr	tirozin
Z-Arg	arginin z benziloksikarbonilno (<i>Z</i>) zaščito na NH ₂ skupini

1 UVOD

Kontrola koagulacijskega sistema je potrebna, da se prepreči neprimerno, prekomerno ali napačno lokalizirano strjevanje krvi, s čimer se prepreči kardiovaskularne bolezni (1). Napake v strjevanju krvi lahko vodijo do resnih bolezenskih zapletov kot sta globoka venska tromboza in pljučni embolizem. Glavni učinkovini za zdravljenje teh bolezni sta heparin in varfarin, ki pa imata določene omejitve (2). Zadnjih trideset let se potencialne antitrombotične učinkovine odkriva med drugim tudi v sekundarnih metabolitih morskih nevretenčarjev in bakterijah, ki inhibirajo serinske proteaze kot sta trombin in tripsin. Z optimizacijo sekundarnih metabolitov kot spojine vodnice, poskušajo pridobiti selektivne in bolj aktivne analoge. Z načrtovanjem in sintezo inhibitorjev serinskih proteaz se ukvarjajo tudi pri mednarodnem projektu MAREX, pri katerem sodeluje tudi Fakulteta za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

1.1 MEDNARODNI RAZISKOVALNI PROJEKT MAREX

MAREX: Raziskovanje morskih virov za bioaktivne spojine: od odkritja do trajne uporabe in industrijske aplikacije 2010-2014 je mednarodni projekt, ki traja 4 leta in pri katerem sodeluje 19 akademskih, raziskovalnih ustanov in industrijskih partnerjev iz 13 držav. Ukvarjajo se z zbiranjem, izolacijo in klasifikacijo morskih organizmov iz treh oceanov (Pacifik, Atlantik in Indijski ocean) in treh morij (Sredozemsko morje, Baltsko morje in Arabsko morje). Proučujejo več terapevtskih in industrijsko pomembnih bioloških aktivnosti izvlečkov in prečiščenih spojin morskih organizmov (antikancerogena, antiinflamatorna, antivirusna in antikoagulantna aktivnost ter modulacija ionskih kanalov/receptorjev in uravnavanja rasti rastlin). Razvijajo metode kultivacije obetajočih organizmov, biotehnološke procese izbranih spojin in biosenzorje za monitoring tarčnih spojin. Izvajajo tudi organske sinteze izbranih aktivnih spojin, derivatov in razvoj spojine vodnice (3). V okviru projekta MAREX smo na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani, načrtovali in sintetizirali antitrombotične učinkovine oziroma sintezne analoge spumiginov, inhibitorjev serinskih proteaz.

1.2 SPUŽVE

Porifera ali spužve so preprosti mnogocelični nevretenčarji, brez pravih tkiv, organov ali delov telesa. Njihovo telo, ki je podobno rastlinam in pritrjeno na trdo podlago, je sestavljeno iz trdega skeleta, ki je porozen (izvor imena debla Porifera). Živijo v vodi, ki jo precejajo skozi majhne pore in ki jim prinaša hranila ter odnaša odpadne snovi (4). Prve spužve so se pojavile v Neoproteozoiku, ki je trajal pred 1000 do 542 milijoni let in danes naseljujejo vse vode (5, 6). Njihovemu preživetju do danes je pripomogel trdni skelet in simbioza z mikroorganizmi. Zaradi njihove raznolikosti in lepote so jih začeli zgodaj proučevati in prvi opisi segajo v leto 1558, ko je Conrad Gesner v svojem delu *Historiae animalium* ilustriral prvo spužvo (*Tethya lyncurium*) (5). Z razvojem tehnologije je bilo mogoče bolj natančno proučiti in opredeliti posamezne vrste. Danes jih delimo glede na zgradbo skeleta v štiri razrede:

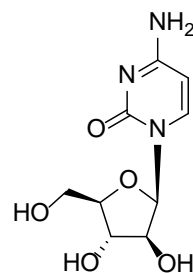
- Calcarea – skelet je iz apnenca in jih imenujemo tudi apnenčaste spužve.
- Demospongiae – skelet je iz kremenca ali iz kremenca in apnenca ali pa imajo posebno elastično proteinsko tkivo (spongin). Imenujemo jih tudi kremenaste spužve ali spužve roženjače.
- Hexactinellida – skelet je iz silicija (amorfni opal, $\text{SiO}_2 \times n \text{H}_2\text{O}$) in jih imenujemo tudi spužve steklenjače.
- Homoscleromorpha – včasih podrazred Demospongiae, vendar je od januarja 2012 samostojni razred (4, 5, 7, 8).

Spužve so tudi svoj edinstven ekosistem, saj so gostitelji za mnoge mikroorganizme, ki živijo v simbiozi ali endosimbiozi s spužvo. Ti mikroorganizmi, ki lahko predstavljajo tudi do 60 % biomase spužve, so lahko bakterije (Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chlamydiae, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes, Verrucomicrobia), arheje, enocelične alge (npr. zelene alge) in glive (9, 10, 11). (Endo)simbioza z mikroorganizmi zagotavlja spužvi več hrane, stabilizacijo skeleta in obrambo pred plenilci in tekmeci (10). Kljub temu, da imajo spužve prirojen imunski sistem (citokini in fagocitoza tujih snovi), pa za obrambo pred plenilci in tekmeci potrebujejo pomoč mikroorganizmov (12). Predvsem bakterije izdelujejo (same ali skupaj s spužvo) bioaktivne snovi, ki jih imenujemo sekundarni metaboliti in so kemična obramba spužve. Sekundarni metaboliti lahko odženejo plenilce, zavirajo rast patogenov in zavirajo razrast okoliških rastlin in živali (6, 13). V zadnjih tridesetih letih, odkar se je povečalo

zanimanje za sekundarne metabolite morskih spužev, so predvsem spužve, ki gostijo bakterije (bakteriospužve), postale najpomembnejši morski organizmi za pridobivanje bioaktivnih spojin (14, 15). Odkrili so, da sekundarni metaboliti spadajo med alkaloide, terpene, tanine, saponine, flavonoide, nenavadne nukleotide, encime (lipaze, fosfolipaze, fosfolipazi A2 podoben encim, amilaze, karboksimetilcelulaze, proteaze, celulaze in celo ureaze) in imajo raznovrstno bioaktivno delovanje (citotoksično, nevrotoksično, hemolitično, protitumorno, antifungalno, antibakterijsko, antivirusno (tudi proti virusu HIV), antimalarično, protivnetno, imunosupresivno in antioksidativno delovanje) (6, 10, 16, 17, 18, 19). Prva antikancerogena učinkovina, pridobljena na podlagi sekundarnega metabolita morske spužve *Tectitethya crypta* (slika 1) leta 1959, je Ara-C (citarabin) (slika 2), ki se še danes uporablja pri krvnih rakih (levkemija, limfom) (7, 19).



Slika 1: *Tectitethya crypta*

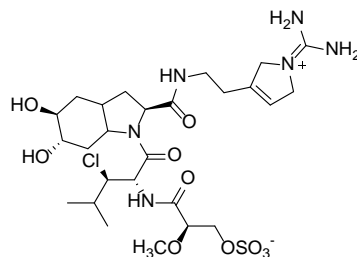


Slika 2: Struktura citarabina

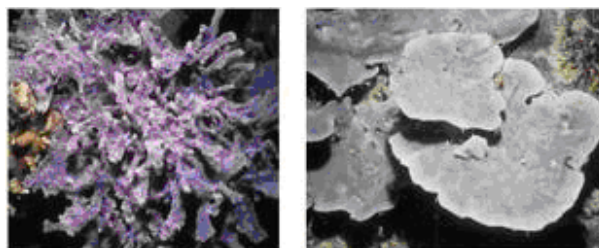
Danes je iz spužev izoliranih preko 7,400 spojin in vsako leto se izolira še okoli 200 novih (18). Kljub temu, da se je izboljšala izolacija in čiščenje, pa se iz spužev še vedno pridobi premajhna količina sekundarnih metabolitov, zato so spužve poizkusili gojiti. Vendar se je izkazalo, da je gojenje spužev za pridobivanje sekundarnih metabolitov težavno, saj je okolje v katerem živijo zapleteno in odvisno od mnogih faktorjev kot so temperatura, pH, slanost, vodni tok, količina raztopljenega kisika, koncentracija silicija ... (20). Na spremembe v okolju so občutljive predvsem bakteriospužve, saj s časom bakterije v umetnem okolju prenehajo izločati želeno snov ali pa odmrejo (9, 10, 21). Zato je nujen pristop sinteznega razvoja spojin, kjer nam bioaktivni metaboliti izolirani iz spužev služijo kot modeli za razvoj spojine vodnice. Ena skupina takih modelnih učinkovin so tudi zaviralci proteaz, kot so miraziridin A in aeruginosini. Izolirani so bili iz spužev razreda Demospongiae (*Theonella* sp. (slika 3) in družine Dysideidae) (18, 22). Prva totalna sinteza, ki je bila enantioselektivna, je bila sinteza aeruginosina klorodisinosina A (slika 4), ki je sekundarni metabolit morskih spužev iz družine Dysideidae (slika 5) (23).



Slika 3: *Theonella Swinhoei*



Slika 4: Struktura klorodisinosina A

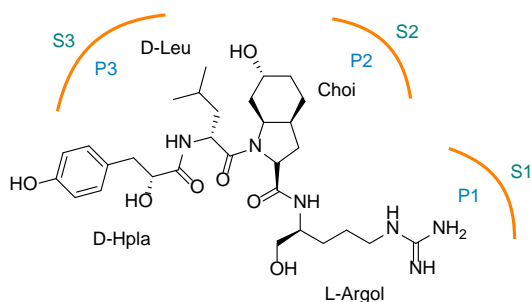


Slika 5: Spužvi iz družine Dysideidae; *Lamellodysidea chlorea* (levo) in *Lamellodysidea herbacea* (desno)

1.3 AERUGINOSINI IN SPUMIGINI

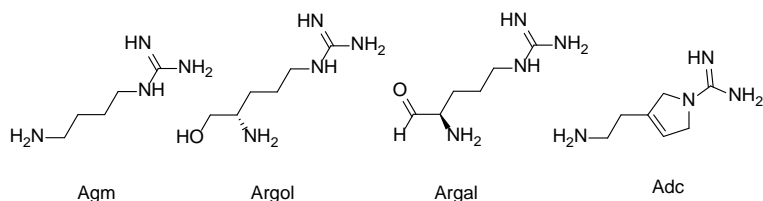
1.3.1 AERUGINOSINI

Prvi aeruginosini so bili izolirani v začetku devetdesetih let dvajsetega stoletja iz sladkovodne cianobakterije *Microcystis aeruginosa* (22). V naslednjem desetletju so aeruginosine izolirali še iz cianobakterij *Microcystis viridis* in *Oscillatoria* sp. ter iz spužev družine Dysideidae (razred Demospongiae) (22, 24, 25). Med letoma 1994 in 2008 je bilo izoliranih 21 aeruginosinov in narejenih 7 totalnih sintez (aeruginosin 298A in 298B, mikrocin SF608, aeruginosin EI461, disinosin A, oscillarin in klorodisinosin A) (22, 23). Prvi aeruginosin, ki je bil izoliran leta 1994, je aeruginosin 298A (slika 6) in je sestavljen iz *D*-3-(4-hidroksifenil)mlečne kisline (*D*-Hpla), *D*-levcina, *L*-2-karboksi-6-hidroksioktahidroindola (Choi) in reduciranega *L*-arginina (*L*-Argol) (2, 22). Skoraj deset let po izolaciji je bila narejena enantioselektivna sinteza aeruginosina 298A in nekaterih njegovih analogov z asimetrično katalizo faznega prenosa in epoksidacijo (24).



Slika 6: Struktura aeruginosina 298A in mesta vezave v serinski proteazi

Aeruginosini so naravni oligopeptidni produkti vodnih organizmov, ki imajo linearno tetrapeptidno strukturo s 4 aminokislinskimi ostanki: na N-koncu hidroksi ali karboksilno skupino in veliko hidrofobno aminokislino (Phe, Leu, Ile) (P3), biciklično aminokislinsko 2-karboksiperhidroindolno jedro (P2) ter na C-koncu gvanidinsko skupino oziroma argininski derivat (P1) (2, 23, 24, 25). N-konec, ki je najpogosteje hidroksifenilmlečna kislina, je pogosto kloriran, bromiran ali sulfatiran (25). Večina aeruginosinov inhibira serinske proteaze kot so trombin, faktorja koagulacije Xa in VIIa ter tripsin (2, 22, 23). Te serinske proteaze cepijo peptidno vez za aminokislinskim ostankom s pozitivnim nabojem (Arg ali Lys). Aeruginosini se z bazičnim C-koncem (derivatom arginina) umestijo v aktivno mesto S1 serinske proteaze, ki je posledično inhibirana (22). Tako je za biološko aktivnost pomembna močno bazična gvanidinska skupina argininskega ostanka, ki se veže z vodikovimi vezmi na aspartatni ostanek serinskih proteaz (2, 24). V naravnih produktih se pojavljajo štiri derivati arginina (slika 7) (2).



Slika 7: Derivati arginina, ki se pojavljajo v naravnih produktih; Agm (agmatin), Argol (argininol), Argal (argininal) in Adc (aminoetil 1-N-amidino-3-Δ-pirolin)

Podobno kemijsko zgradbo, katera namesto Choi najpogosteje vsebuje prolin ali (2*S*,4*S*)-4-metilprolin (mPro), imajo tudi spumigini. Zaradi strukturne podobnosti jih uvrščamo v strukturni podrazred aeruginosinov. S preverjanjem genskih klastrov (za adenilacijske, ketoreduktazne in epimerazne domene) pa so ugotovili, da aeruginosini in spumigini nimajo istega prednika (25).

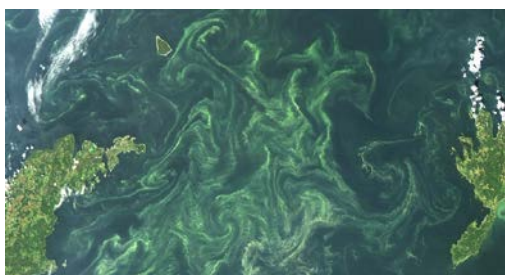
1.3.2 SPUMIGINI

Kmalu za prvimi aeruginosini so bili izolirani še spumigini, ki se od aeruginosinov razlikujejo po prisotnosti (2*S*,4*S*)-4-metilprolina ali *L*-prolina, ki nadomestita Choi ostanek. Izolirani so bili iz cianobakterije *Nodularia spumigena* (slika 8), ki povzroča cvetenje brakičnih morij (mesto, kjer se mešata morska in sladka voda) in slanih jezer v Evropi, Avstraliji, Novi Zelandiji, Severni Ameriki in Južni Afriki (slika 9) (25, 26).

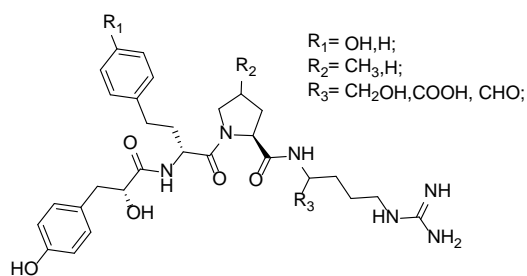


Slika 8: *Nodularia spumigena*

Spumigini, tako kot aeruginosini, inhibirajo serinske proteaze, saj vsebujejo na C-koncu derivat arginina, ki je nujen za inhibicijsko delovanje spojin. So linearni tetrapeptidi sestavljeni iz *D*-hidroksifenilmlečne kisline na N-koncu, nenavadne aminokisline (*D*-homotirozina ali homofenilalanina) ali pa tirozina oziroma levcina, (2*S*,4*S*)-4-metilprolina ali *L*-prolina in na C-koncu arginina ali derivata arginina (slika 10). Do leta 2009 je bilo opisanih 8 različnih spumiginov, pred kratkim pa je bilo odkritih še 10 novih (preglednica I) (25, 26).



Slika 9: Cvetenje Baltskega morja julija 2003



Slika 10: Struktura spumiginov

Preglednica I: Struktura spumiginov

ime spojine	strukturne enote			
	1	2	3	4
Spumigin A	Hpla	Hty	mPro	Argol
Spumigin B	Hpla	Hty	mPro	Arg
Spumigin C	Hpla	Hty	Pro	Arg
Spumigin D	Hpla	Hty	Pro	Argol
Spumigin E	Hpla	Hty	mPro	Argal
Spumigin F	Hpla	Hty	mPro	Argal
Spumigin G	Hpla	Hph	mPro	Argal
Spumigin H	Hpla	Hph	mPro	Argal
Spumigin I	Hpla	Leu	mPro	Argol

ime spojine	strukturne enote			
	1	2	3	4
ni imena	Hpla(Ac)	Hty	Pro	Arg
ni imena	Hpla(Ac)	Hty	mPro	Argal
ni imena	Hpla(Ac)	Hty	Pro	Argol
ni imena	Hpla(Ac)	Hty	Pro	Argal
ni imena	Hpla	Tyr	Pro	Argal
ni imena	Hpla	Hty	mPro	Agm
ni imena	Hpla(Ac)	Leu	Pro	Argal
ni imena	Hpla	Hty	mPro	NH ₂
ni imena	Hpla	Hty	Pro	OH

Druga strukturna enota spumiginov je najbolj variabilna in največkrat zasedena s homotirozinom. Najdemo pa tudi homofenilalanin, levcin in tirozin. Približno 60 % spumiginov vsebuje *L*-prolin, ostali pa (*2S,4S*)-4-metilprolin (26). V 80 % se spumigini iz peptidne sintetaze encimskega kompleksa sprostijo kot peptidni aldehidi (Argal). S spontano redukcijo se nekaj argininala pretvori v argininol. Med čiščenjem spojine lahko pride še do oksidacije argininala v arginin. Tripsin na mikromolarni stopnji inhibirata Spumigin B in Spumigin A, le-ta inhibira tudi plazmin. Spumigin E, ki je aldehyd, inhibira tripsin na nanomolarni stopnji, inhibicija pa je časovno odvisna in je lahko tudi ireverzibilna (25).

Spumigine izdelujejo večinoma le planktonske vrste rodu *Nodularia*. *Nodularia spumigena*, ki jo najdemo lebdečo do 30 m pod gladino morja, poleg spumiginov izloča še aeruginosine, nodulapeptine in toksični ciklični pentapeptid nodularin, ki je zaviralec evkariontske protein fosfataze in deluje hepatotoksično (25, 26). *Nodularia sphaerocarpa*, ki jo najdemo na morskem dnu, izdeluje le visoko modificiran glikopeptid suomilid, ki je tudi zaviralec serinske proteaze (25).

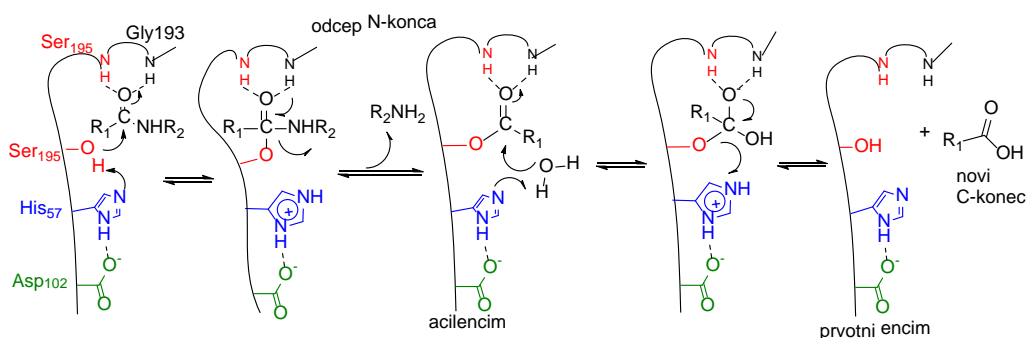
1.4 PROTEAZE

Proteaze ali peptidaze, ki jim pogovorno rečemo tudi proteinaze, so proteolitični encimi, ki delujejo na peptidno vez tako, da jo hidrolizirajo, in so nujne za življenje vseh bitij (virusov, mikroorganizmov, rastlin in vseh živali) (27, 40). Sodelujejo pri aktivaciji, sintezi in razgradnji vseh proteinov ter tako nadzorujejo večino fizioloških procesov kot so spočetje, rojstvo, prebava, rast, odraščanje/dozorevanje, staranje in smrt. Nujne so tudi za repliciranje virusov, razmnoževanje bakterij in parazitov ter za razširjanje, posredovanje in vzdrževanje bolezni (27). Delimo jih v eksopeptidaze, ki delujejo na koncih polipeptidnih verig in endopeptidaze, ki delujejo znotraj polipeptidne verige (40). Razdelimo jih tudi glede na kemično skupino, ki je odgovorna za katalizo hidrolize peptidne vezi (aspartatni, cisteinski, glutaminski, kovinski, serinski, treoninski in mešani katalitični tip) (29).

Po zadnjih podatkih podatkovne baze MEROPS je znanih 4147 proteaz, ki so jih razdelili v 245 družin in 61 klanov. 41 % proteaz pa lahko uvrstimo med serinske proteaze. Pri človeku 2 % genov kodira 703 proteaz, od katerih je največ (32 %) serinskega katalitičnega tipa. V raziskovanju je, kot tarče učinkovin, 14 % človeških proteaz (29, 30, 31).

1.4.1 SERINSKE PROTEAZE

Serinske proteaze imajo v aktivnem mestu serinski ostanek, ki sestavlja katalitično triado. Katalitično triado najpogosteje sestavljajo Asp-His-Ser, najdemo pa tudi katalitične triade kot so Ser-His-Glu, Ser-Lys/His ali His-Ser-His. Trije aminokislinski ostanki (Asp in dva Gly) tvorijo negativno nabito S1 mesto, kamor se veže substrat s P1 mestom Arg ali Lys aminokislinskega ostanka (41). Cepitev peptidne vezi (slika 11) temelji na nukleofilnem napadu hidroksilne skupine Ser na karbonski ogljik peptidne vezi. Pri tem se zmanjša resonančna stabilnost peptidne vezi in, po odcepu novega N-konec razcepljenega polipeptida, nastane intermediat acilencim, ki se z vodo razcepi in dobimo novi C-konec razcepljenega polipeptida ter prvotni aktivni encim. Serinske proteaze hidrolizirajo tudi anilide, estre in tioestre (41, 42).



Slika 11: Shema mehanizma cepitve peptidne vezi

Serinske proteaze so v telesu vpletene v mnoge fiziološke procese, med katere spada tudi hemostaza, kjer sodelujejo faktorji strjevanja krvi. Skoraj polovica faktorjev strjevanja krvi spada med serinske proteaze (faktor IIa, faktor VII, faktor IX, faktor X, faktor XI in faktor XII) (41).

Med pomembnejšimi faktorji strjevanja krvi je faktor IIa ali trombin, ki ga inhibirajo številne spojine, med katerimi so najbolj znane hirudin in haemadin (oba izolirana iz pijavk), heparin kofaktor II, protein C inhibitor in antitrombin (1, 35). Med serinske proteaze spada tudi tripsin, ki je prebavni encim in je strukturno podoben trombinu, faktorju Xa in faktorju VIIa, zato je pri učinkovinah pomembna selektivnost v izogib neželenim učinkom (2).

1.5 ZAVIRALCI PROTEAZ

Zaviralci proteaz nadzorujejo delovanje proteaz in jim preprečujejo, da bi delovale prekomerno ali tam, kjer ni potrebno, tako da zaustavijo regulativno vlogo proteaz (27). Tako imajo zaviralci proteaz kot modulatorji pomembno vlogo pri mnogih bioloških procesih, kjer so prisotne proteaze (pri spočetju, rojstvu, razvoju, rasti in zorenju, prebavi, staranju, bolezni, apoptozi, koagulaciji, oksidazni aktivnosti, sistemu komplementa, pri metamorfozi, obrambi pred vdorom mikroorganizmov ali obrambi proti gostiteljskim obrambnim proteazam in zaviranju rasti bakterij) (28). Število znanih zaviralcev proteaz kot tudi proteaz, narašča iz leta v leto. Po zadnjih podatkih podatkovne baze MEROPS je znanih 652 zaviralcev proteaz in njihovih homologov (snovi, ki niso peptidi, vendar inhibirajo proteaze), ki so jih razdelili v 76 družin in 39 klanov (29, 30, 31).

Terapevtska učinkovitost in potencial zaviralcev proteaz so vidni že pri zdravljenju okužb z virusom HIV, pri vnetjih, imunskih in respiratornih boleznih ter kardiovaskularnih in nevrodegenerativnih boleznih kot so kap, srčni infarkt, Alzheimerjeva bolezen, artritis, osteoporoza, rak, sladkorna bolezen in povišan krvni tlak (27, 28, 32). Leta 1980 se je povečalo zanimanje za zaviralce proteaz, ki inhibirajo serinske proteaze, predvsem trombin (33). Izoliranih in sintetiziranih je bilo že veliko potencialnih zaviralcev serinskih proteaz.

1.5.1 SERPINI – ZAVIRALCI SERINSKIH PROTEAZ

Serpine (**serine protease inhibitors**) – zaviralce serinskih proteaz najdemo v virusih, mikroorganizmih, rastlinah ter v kopenskih in morskih živalih (28, 33). Strukturno so si serpini podobni, vendar so funkcionalno različni proteini, ki nadzorujejo esencialne proteolitične poti v vseh organizmih (34). V človeškem genomu serpine kodira 36 genov in predstavljajo 2 % celotnih plazemskih proteinov v krvi. S serpini je pri človeku povezanih več kot 90 bolezni (33, 34).

Splošni mehanizem delovanja je sprememba konformacije serpinov, ki prepreči zaključek katalize preko acil intermediata in ki jo sproži cepitev interne peptidne vezi v serpinu (35). Struktura encima in katalitičnega mesta se s tem poruši, kataliza encima pa poteče le do nastanka acilencima in sprostitev C-konca encima. Tako ne pride do hidrolize acilencima in kovalentni kompleks ostaja. Ta način delovanja imenujemo mehanizem samomorilnega substrata, saj nastane kovalentna vez s serpinom, za katerega je reakcija ireverzibilna inaktivacijska. Reakcija je specifična za proteaze, ki tvorijo acilencime, to so serinske in cisteinske proteaze (1, 35). Serpin-encim kompleks se odstrani iz obtoka z receptorji, ki

prepoznajo inhibicijsko konformacijo serpina (35). Sprememba konformacije serpina, ki je ključna za delovanje, pa lahko poveča dovzetnost za mutacije, ki spremenijo zvijanje serpina in vodijo v pomanjkljivosti in bolezni (33). Najpogostejše bolezni povezane z okvarami serpinov so demenca, ciroza, emfizem in motnje strjevanja krvi (34).

Pri strjevanju krvi ali koagulaciji sodeluje veliko serinskih proteaz, ki jih prištevamo med faktorje strjevanja krvi ali faktorje koagulacije. Pozitivno povratno zanko koagulacije zaustavijo antikoagulacijski procesi, med katere spada tudi delovanje serpinov, ki inhibirajo nekatere faktorje strjevanja krvi. Brez antikoagulacijskih procesov bi se celotna kri v organizmu strdila že v nekaj minutah (36). Eden pomembnejših serpinov je antitrombin (AT), ki preprečuje razširitev procesa koagulacije iz mesta poškodbe (1). Pri pomanjkanju AT ali pa pri njegovi nezadostni aktivaciji pride do trombofilije ali tromboze. Kot antikoagulant se AT uporablja v dveh primerih, in sicer kadar je povečano tveganje strjevanja krvi in kadar heparin ni varen, ker bi povečal tveganje za krvavitev (težke operacije, travme in porod) (39).

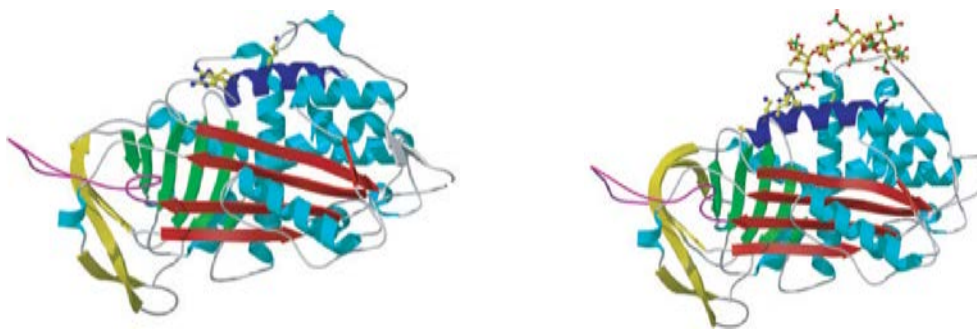
1.5.1.1 ANTITROMBIN

Antitrombin (slika 12) je, kot glavni inhibitor koagulacije, nujen za preživetje; homozigoti (mutacija obeh genov za AT) umrejo *in utero*, heterozigoti (mutacija enega gena za AT) pa imajo za 50 % nižje koncentracije AT v krvi in imajo predispozicijo za trombotične zaplete (1, 36, 38). AT poimenujemo še antitrombin III ali heparin kofaktor I in je glikoprotein s 432 aminokislinami in molsko maso 58 kDa (1, 38, 39). Večinoma se sintetizira v jetrih kot α_2 -globulin, nekaj ga izločajo tudi endoteljske celice in v normalnih okoliščinah kroži v krvi s koncentracijo od 112 $\mu\text{g/mL}$ do 140 $\mu\text{g/mL}$ (1, 36, 37, 38). Poleg trombina (faktor IIa) inhibira še faktor Xa in v manjši meri faktorje IXa, XIa in XIIa, tkivni plazminogeni aktivator, urokinazo, tripsin, plazmin in kalikrein (38). Glavni učinek AT je inhibicija trombina in faktorja Xa, ki pa ne poteka, ko sta faktorja že vezana v strdek. Zato je vloga AT bolj omejevanje in preprečevanje prekomernega razširjanja strjevanja krvi kot pa ustavitev samega strjevanja krvi na mestu poškodbe (1). Višje koncentracije AT v krvi od normalne ($>140 \mu\text{g/mL}$) nimajo terapevtskega pomena, medtem ko se pri nižjih koncentracijah pojavi nagnjenost k strjevanju krvi, kar lahko vodi do (venskih) tromboz (39). Do pomanjkanja AT pride zaradi zmanjšane sinteze AT pri odpovedi jeter (ciroza), povečane izgube AT pri nefrotskem sindromu in enteropatijah z izgubo proteinov, heparinske terapije in kemoterapije z *L*-asparaginazo ter povečane porabe AT pri infekcijah

krvi (sepsa), hudih travmah in opeklinah, trombotičnih mikroangiopatijah, metastaznih tumorjih ... (38, 39).

V krvi se AT nahaja v dveh oblikah: 90–95 % je α – AT in v manjši meri (5–10%) β – AT, ki pa ima večjo afiniteto do heparina (38). Glikozaminoglikani, kot sta heparan sulfat, ki ga najdemo na površini endotelijskih celic in heparin, ki ni naravno prisoten v telesu, imajo pomembno vlogo pri lokaliziranju delovanja serpinov ter pri pospeševanju interakcij med serpini in serinskimi proteaznimi faktorji strjevanja krvi (1, 36). Posebno heparin in njemu podobni glikozaminoglikani povečajo učinek AT tudi za 1000-krat (38). Primer encimske aktivnosti AT brez in ob prisotnosti heparin pentasaharida:

- razpolovni čas encimske aktivnosti brez prisotnosti heparin pentasaharida je 133 s,
- razpolovni čas encimske aktivnosti v prisotnosti heparin pentasaharida je 1,33 s (1).



Slika 12: Struktura AT (levo) in kompleks AT/heparin pentasaharida (desno); β -strukture so rdeče, zeleno in rumeno obarvane, reaktivna zanka roza in D-vijačnica temno modro. S skeletno-krogličnim modelom so prikazani pozitivno nabiti aminokislinski ostanki na D-vijačnici in heparin pentasaharid.

Vezava heparina na AT (slika 11) povzroči spremembo konformacije AT, ki pospeši inhibicijo faktorja Xa. Za inhibicijo trombina pa je potrebna vezava heparina na AT in trombin, da se tvori terciarni mostni kompleks. Poleg antikoagulantnega učinka ima AT še protivnetni učinek, ki pa je izražen le kadar se AT veže na heparan sulfat, ki je na endoteliju žil (38).

1.6 HEMOSTAZA

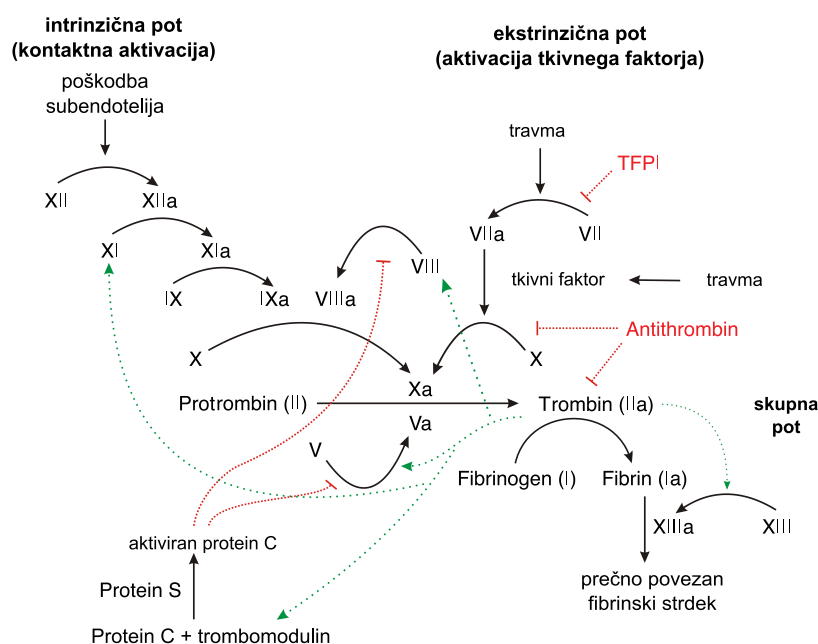
Hemostaza je za življenje nujen proces, ki prepreči izgubo krvi iz poškodovane žile, obnovi poškodovani endotelij žil in ohranja kri tekočo. Sistem hemostaze tako vzdržuje ravnotežje med prokoagulantnimi procesi (adhezija in agregacija trombocitov ter tvorba

fibrinskega čepa) in antikoagulantnimi procesi (naravna inhibicija koagulacije z inhibitorji in fibrinoliza) (43, 44). Hemostazo delimo na dve fazi, ki se začneta istočasno, vendar potekata različno hitro. Ko pride do vazokonstrikcije in nastanka trombocitnega čepa na mestu poškodbe žile, govorimo o primarni hemostazi ali žilni in trombocitni fazi. Pri sekundarni hemostazi nastaja fibrin po zaporedju encimskih reakcij, ki jim pravimo koagulacija krvi. Hkrati pa poteka razgradnja fibrina, zato sekundarni hemostazi pravimo tudi faza strjevanja krvi (koagulacija krvi) in fibrinoliza (37, 45).

1.6.1 SEKUNDARNA HEMOSTAZA

Pri sekundarni hemostazi sodelujejo faktorji strjevanja krvi, ki so beljakovine, kalcijevi ioni in fosfolipidi z negativno nabito površino (37). Večina faktorjev strjevanja krvi se sintetizira v jetrih, nekaj pa tudi v makrofagih, megakariocitih, trombocitih in endoteljskih celicah. Neaktivni faktorji strjevanja krvi se nahajajo v krvnem obtoku, razen tkivnega faktorja (TF), ki je na površini celic, ki niso v stiku s krvjo. Aktivni faktorji strjevanja krvi se odstranjujejo s krvnim obtokom v jetrih (37).

Koagulacija krvi se lahko sproži po intrinzični ali ekstrinzični poti, obe pa pripeljeta do aktivacije faktorja X (slika 13). Kompleks faktorjev Xa/Va pretvori protrombin v trombin, ki je multifunkcionalen encim in pretvarja topni fibrinogen v netopni fibrin. Pod vplivom faktorja XIIIa, katerega aktivira tudi trombin, in kalcijevih ionov se polimerni fibrin prečno poveže in fibrinski strdek postane bolj trden (37, 44).



Slika 13: Shema strjevanja krvi: zelene puščice = aktivacija, rdeče puščice = inhibicija

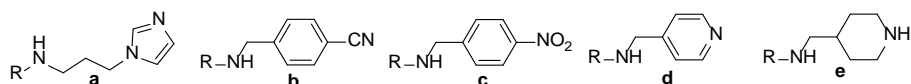
Nastanek fibrina *in vivo* poteka po ekstrinzični poti ali aktivaciji TF, ki aktivira faktor IX in faktor X preko kompleksa TF/VIIa. Komplex TF/VIIa nastane, ko se na površini celic razkrije TF (pri poškodbah tkiva ali žile) na katerega se veže faktor VIIa, ki se nahaja v krvi (37). Intrinzična pot ali kontaktna faza se sproži, ko pride kri v stik s hrapavo površino z negativnim električnim nabojem (subendotelij, steklo, kaolin, celit) ali pod vplivom trombina, ki aktivira faktor XI (36, 45). Faktor XIa aktivira faktor IX, ki v kompleksu s faktorjem VIIIa aktivira faktor X (22). Intrinzična pot je tako pospeševalec reakcij ekstrinzične poti (36).

Hkrati z nastajanjem fibrina se začne tudi njegova razgradnja ali fibrinoliza, ki je pomembna za ponovno vzpostavitev prehodnosti žil (36). Glavno vlogo pri tem ima plazmin, ki nastane iz plazminogena in hidrolizira fibrinsko mrežo v topne produkte (37, 36). Zunaj strdka v normalnih razmerah plazmin ne more hidrolizirati fibrinogena, faktorjev strjevanja krvi in drugih beljakovin, ker ga inaktivira α_2 -antiplazmin (37).

1.7 SINTEZNI ANALOGI AERUGINOSINOV IN SPUMIGINOV

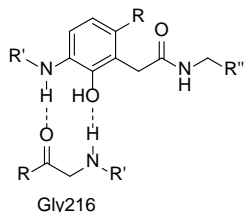
Na uravnavanje hemostaze, predvsem sekundarne hemostaze, vplivamo tudi z antitrombotičnimi učinkovinami, s katerimi preprečujemo delovanje trombina. Trombin, ki je sestavljen iz dveh polipeptidnih verig A (36 aminokislin) in B (259 aminokislin), povezanih z disulfidnimi vezmi, ima na polipeptidni verigi B tri žepe (S1, S2 in S3) kamor se umestijo inhibitorji tripsinu podobnih serinskih proteaz. Med žepoma S1 in S2 se nahajata še oksianionska luknja (amidni NH skupini Ser195 in Gly193) ter katalitična triada (His57-Asp102-Ser195). Zelo podobna vezavna mesta ima tudi prebavni encim tripsin, zato je težko doseči selektivnost med trombinom in tripsinom.

S1 žep trombina se od S1 žepa tripsina razlikuje na mestu 190, kjer ima trombin Ala in tripsin Ser (22). Oba encima pa tvorita vodikovo vez med Asp189 v S1 žepu serinske proteaze in gvanidinsko skupino na P1 mestu aeruginosinov in spumiginov (2, 22). Ker ima močno bazična skupina slabo biološko razpoložljivost in *in vivo* aktivnost, so poskušali najti nevtralno ali manj bazično P1 skupino in hkrati povečati selektivnost za trombin. Ugotovili so, da skupine propil imidazol, cianobenzil, nitrobenzil, 4-piridinil-metil in 4-piperidinil-metil (slika 14) na mestu P1 enakovredno ali močnejše inhibirajo trombin kot aeruginosin 298A, medtem ko inhibicija tripsina ni izražena ali pa se pojavi nad koncentracijo 100 $\mu\text{g/mL}$ tripsina (2).

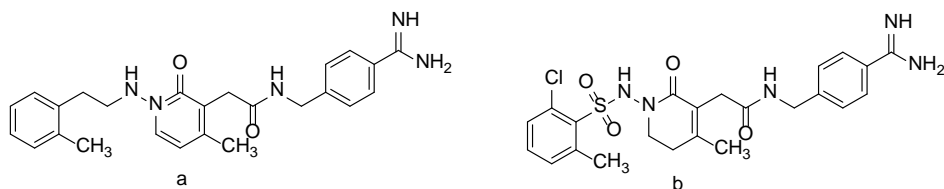


Slika 14: P1 skupine, ki enakovredno ali močnejše inhibirajo trombin kot derivat arginina: (a) propil imidazol, (b) cianobenzil, (c) nitrobenzil, (d) 4-piridinil-metil in (e) 4-piperidinil-metil

S2 žep je hidrofobni žep, ki ga tvorita Tyr83 in Trp86, katera sta del zanke Tyr60a-Pro60b-Pro60c-Trp60d. Pri tripsinu je žep S2 nekoliko večji. Nasproti S2 žepa so Ser214-Trp215-Gly216, ki tvorijo (predvsem Gly216) z inhibitorjem vsaj eno vodikovo vez in pripomorejo k inhibiciji (2, 22). Aeruginosini in spumigini se v S2 žep umestijo z delom molekule P2, ki je jedro in je najmanj variabilni del molekule. Za sintezne analoge aeruginosinov so uporabili *L*-Pro, ki je sintezno manj zahteven od Choi, in derivat *o*-aminofenola (slika 15), ki simulira vodikovo vez z Gly216 (22, 46). Selektivnost za trombin se poveča tudi s spremembo stereokemije Choi (2). Kot jedro so uporabili še *N*-amino-piridin-2-on in *N*-amino-dihidropiridin-2-on na katera so pripeli na mesto P1 benzamidinsko skupino in na mesto P3 arilsulfonamidno ali ariletilno skupino (slika 16). Te spojine imajo izvrstno selektivnost za trombin in IC_{50} v nanomolarnih koncentracijah (46).



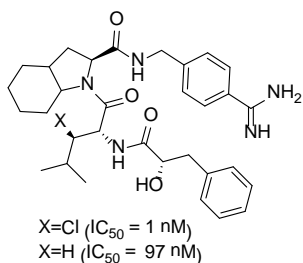
Slika 15: Derivat *o*-aminofenola in vodikovi vezi z Gly216



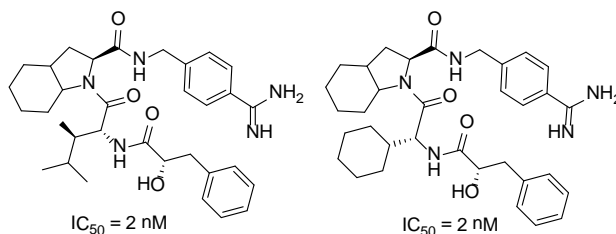
Slika 16: Spojini z (a) *N*-amino-piridin-2-onskim in (b) *N*-amino-dihidropiridin-2-onskim jedrom, ki inhibirata trombin v nanomolarnih koncentracijah; IC_{50} je 23 nM (a) in 3 nM (b)

Oddaljeni S3 žep je prav tako hidrofoben, vendar večji kot S2 in ga tvorijo stranske verige Leu99, Ile174 in Trp215 (22). Zamenjava *D*-levcina s klorolevcinom značilno poveča aktivnost inhibitorja, saj »kloro« učinek pripomore k hidrofobnemu efektu z izključitvijo vode in povečanjem entropije (slika 17). Hidrofobne in prostorsko primerne substituentne na

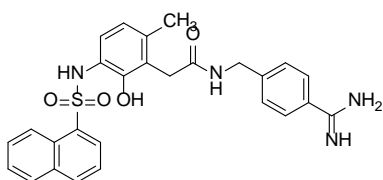
mestu P3 med *D*-Pla in hidroindolnim jedrom prispevajo k večjemu inhibitornemu učinku. Takšni substituenti sta *D*-izolevcil in 3-cikloheksillevcil (slika 18) (22, 46). Dobra P3 skupina je tudi naftalenska skupina naftalen sulfonamida (slika 19), ki tvori hidrofozne interakcije v S3 žepu. Pri indolizidinonskih analogih (slika 20) na mestu P3 igra pomembno vlogo stereokemija benzilnega in primarnega amina ali hidroksilne skupine (46).



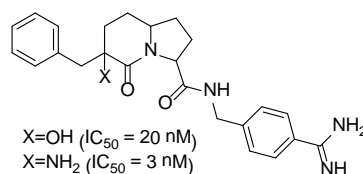
Slika 17: Vpliv klora



Slika 18: *D*-izolevcilni analog (levo) in 3-cikloheksillevcilni analog (desno)

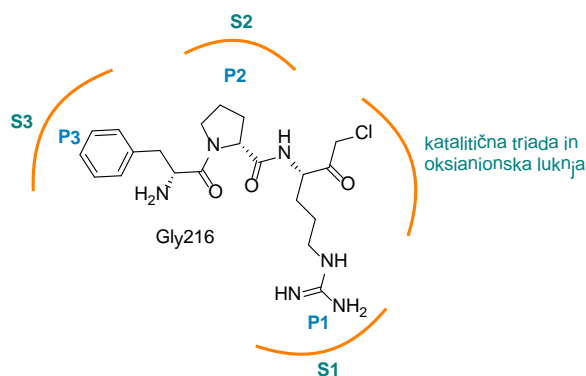


Slika 19: Naftilsulfonamidni fenolni analog



Slika 20: Indolizidinonska analoga

Prototip sinteznega zaviralca trombina je spojina PPACK (*D*-Phe-Pro-Arg-klorometilketon) (slika 21), ki ima močno inhibitorno aktivnost za trombin ($IC_{50} = 0,003 \mu\text{g/mL}$), kar je posledica ključnih interakcij z S1, S2, S3 žepi in Ser iz katalitične triade. Na podlagi PPACK so sintetizirali številne zaviralce serinskih proteaz (46).

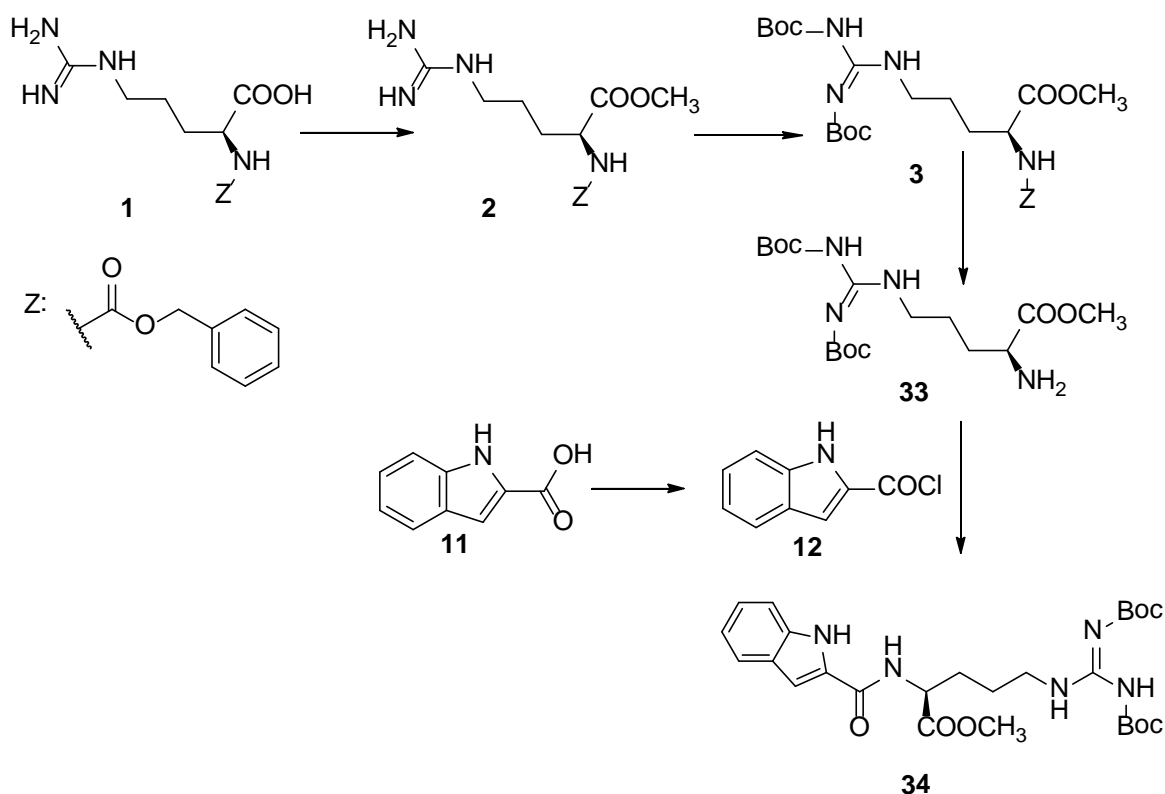


Slika 21: Struktura *D*-Phe-Pro-Arg-klorometilketona (PPACK) in mesta vezave v serinski proteazi

2 NAČRT ZA DELO

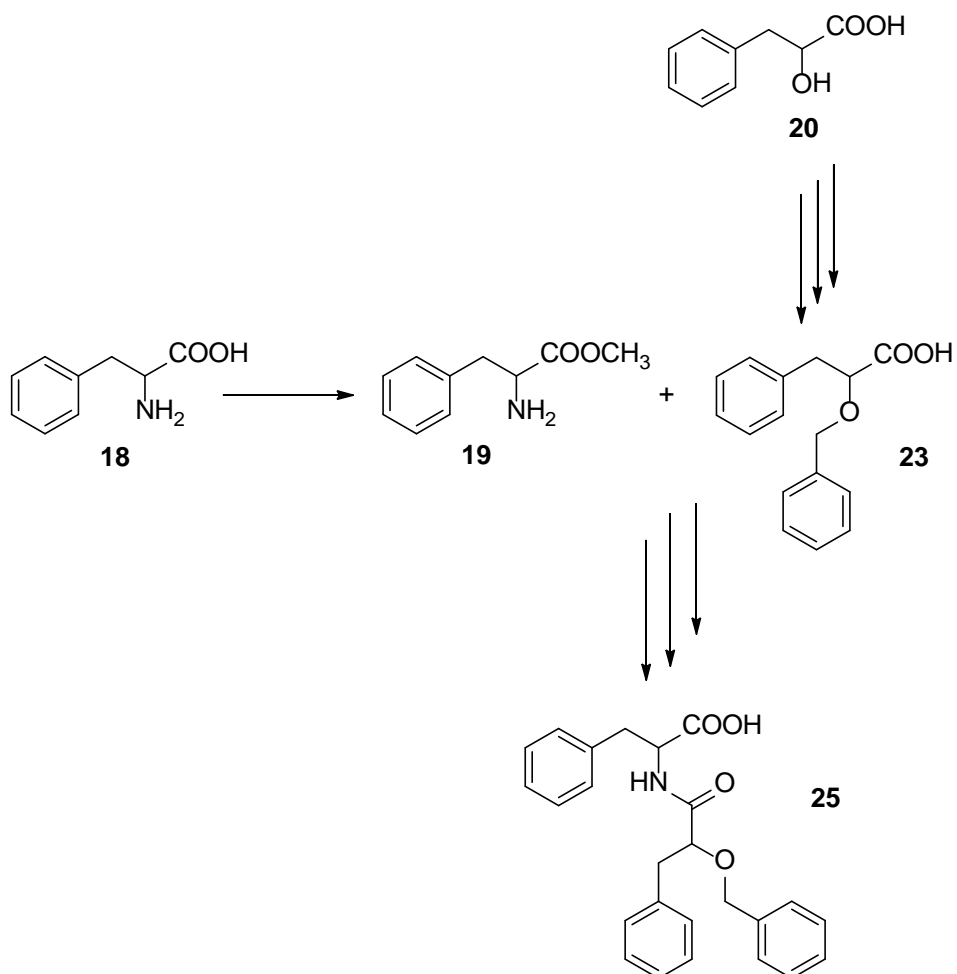
Pri eksperimentalnem delu te diplomske naloge smo v okviru mednarodnega projekta MAREX na Katedri za farmaceutsko kemijo naredili naslednji načrt za delo sinteze analogov spumiginov, ki bodo potencialni zaviralci serinske proteaze trombina. Kot jedro molekule (P2 mesto) bomo vzeli indolin (2,3-dihidro-1*H*-indol), ki se bo umestil v S2 žep encima. Najprej bomo na indol-2-karboksilno kislino, ki bo jedro (mesto P2), pripeli preko karbnilne skupine arginin (P1 mesto), ki se bo umestil v specifični S1 žep encima in tvoril vodikovi vezi z Asp189 (gvanidinski del) in His57 (karboksilna skupina). Nato bomo na NH skupino indol-2-karboksilne kisline pripeli dipeptid iz nepolarnega fenilalanina in fenilmlečne kisline (P3 mesto), ki se bosta umestila v oddaljeni hidrofobni S3 žep encima.

Prekursor P1-P2 bomo sintetizirali iz *Z*-arginina (**1**) in indol-2-karboksilne kisline (**11**). Najprej bomo *Z*-arginin spremenili v metilni ester (zaščita COOH skupine), dodatno zaščitili še gvanidinski del z Boc zaščito in odstranili *Z* zaščito s katalitskim hidrogeniranjem. Sledilo bo pripajanje aktivirane indol-2-karboksilne kisline v obliki kislinskega klorida (slika 22).



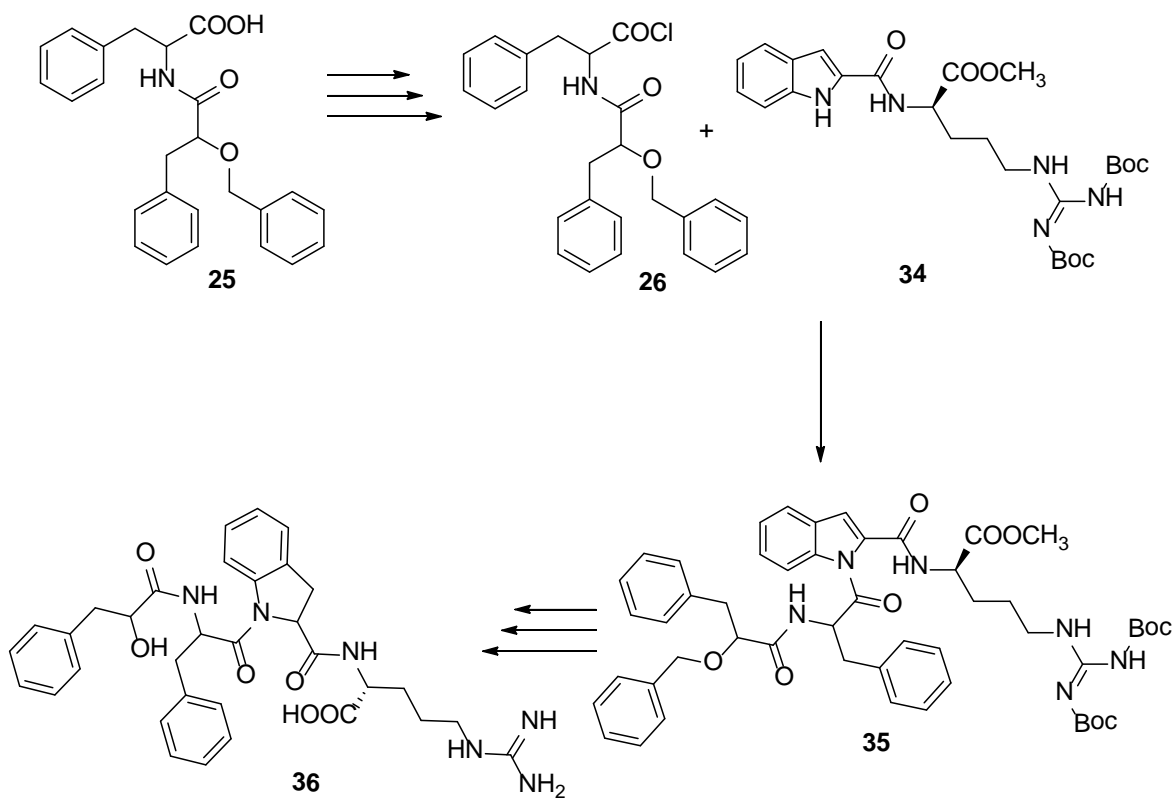
Slika 22: Shema sinteze prekursorja P1-P2 iz *Z*-arginina in indol-2-karboksilne kisline

Prekurzor P3 (**25**) bomo sintetizirali iz fenilalanina (**18**), ki ga bomo predhodno spremenili v metilni ester (zaščita COOH skupine) in fenilmlečne kisline (**20**), kateri bomo predhodno zaščitili OH skupino z benzilno zaščito (slika 23).



Slika 23: Shema sinteze prkurzorja P3 iz fenilalanina in fenilmlečne kisline

Zadnji del sinteze bo pripajanje prekurzorja P1-P2 s kislinskim kloridom prekurzorja P3 (**26**). Na koncu bomo odstranili še vse zaščite (Boc, metilni ester in benzil) in delno hidrogenirali indolni obroč, da bomo dobili indolin (slika 24). Uspešnost reakcij bomo preverjali s TLC in NMR.



Slika 24: Shema sinteze končne spojine iz prekurzorja P1-P2 in prekurzorja P3

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Uporabljali smo reagente proizvajalcev Acros Organics, Bachem, Merck in Sigma-Aldrich ter topila proizvajalcev Carlo Erba Reagent, Merck, Panreac in Sigma-Aldrich.

3.2 METODE

3.2.1 KROMATOGRFSKE METODE

TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA (TLC)

Uporabljali smo plošče Silica gel 60 F254 (Merck) z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV lučko z valovno dolžino 254 nm in 366 nm ter orositveni reagent ninhidrin.

KOLONSKA FLASH KROMATOGRAFIJA

Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel Kieselgel 60 z velikostjo delcev 0,040–0,063 mm.

3.2.2 SPEKTROSKOPSKE METODE

JEDERNA MAGNETNA REZONANCA (NMR)

¹H NMR spektre smo posneli z instrumentom Bruker Avance 400. Kot topilo smo uporabili DMSO-d₆. Spektri so bili posneti pri 400 MHz.

3.2.3 NOMENKLATURA IN RISANJE SPOJIN

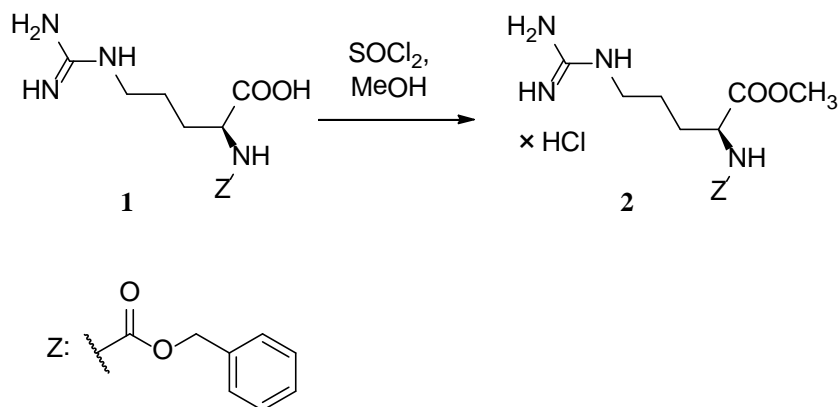
Za risanje strukturnih formul in poimenovanje spojin smo uporabili računalniški program ChemDraw, verzija 12.0, podjetja CambridgeSoft.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 SINTEZA PREKURZORJA P1-P2

4.1.1 SINTEZA ESTRA

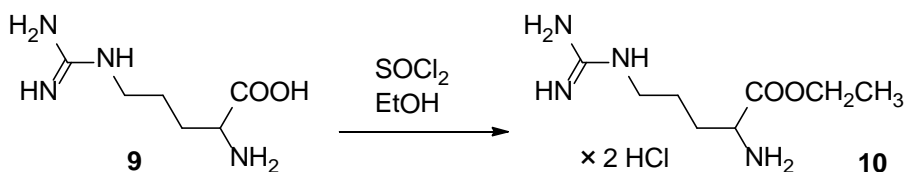
a) SINTEZA METILNEGA ESTRA Z-ARGININA



Zatehti Z-Arg (**1**) (1,013 g; 3,29 mmol) v bučki smo dodali metanol (15 mL), bučko postavili na zmes ledu in vode ter ob mešanju preko kapalnika z metanolom (10 mL) dodali SOCl_2 (0,72 mL; 9,86 mmol). Ko se je vsa spojina **1** raztopila, smo reakcijsko zmes mešali še 15 minut pri 0 °C. Nato smo prestavili bučko v oljno kopel in segrevali pri 65 °C ter ob mešanju pustili reakcijo potekati še 24 ur. Naslednji dan smo odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem in sprali vsebino bučke z etrom (3 × 5 mL). Eter smo odlili in preostanek odparili pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Dobili smo 1,238 g brezbarvne oljnate spojine **2**.

Izkoristek reakcije: 105 % (ker je spojina v obliki hidroklorida, ta veže vodo)

(S)-metil 2-(((benziloksi)karbonil)amino)-5-gvanidinopentanoat		Mr = 322,4
izgled	brezbarvno olje	
analiza ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)	δ [ppm] = 1,52 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, -C- <u>CH₂</u> -CH ₂ -C); 1,60 - 1,73 (m, 2H, -C-CH ₂ - <u>CH₂</u> -C); 3,09 (d, 2H, $J = 6,8$ Hz, N- <u>CH₂</u> -CH ₂ -CH ₂ -C); 3,64 (s, 3H, -OCH ₃); 4,03 - 4,08 (m, 1H, -CH ₂ - <u>CH</u> (-CO)-N); 5,05 (s, 2H, -O-CH ₂ -Ar); 7,33 - 7,39 (m, 6H, <u>H</u> -Ar in -CH- <u>NH</u> -CO); 7,10 (s, 2H, -NH ₂); 7,82 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, H ₂ N-C(=NH)- <u>NH</u> -C); 8,67 (s, 1H, H ₂ N-C(= <u>NH</u>)-NH-C)	

b) SINTEZA ETILNEGA ESTRA ARGININA

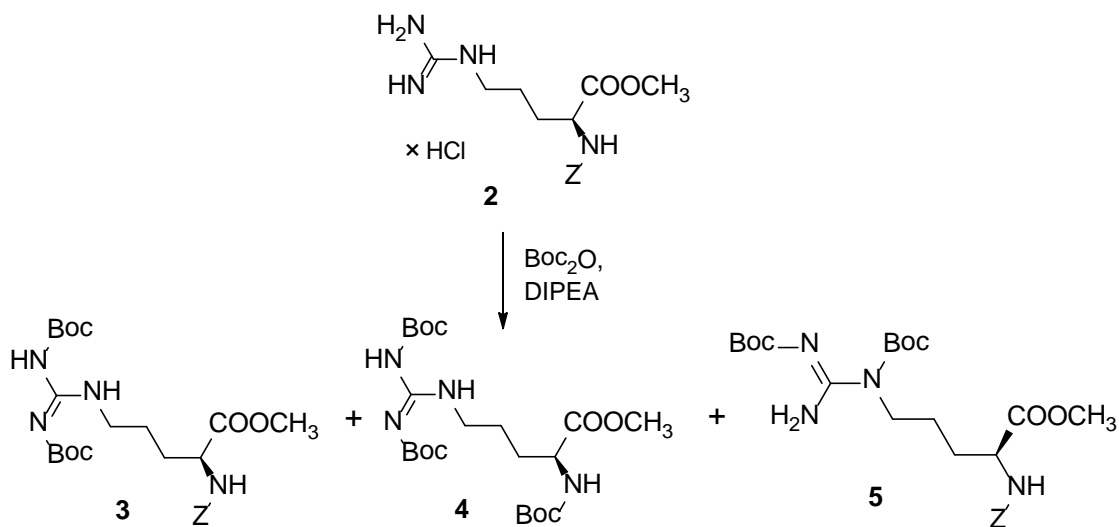
Argininu (**9**) (1,0 g; 5,75 mmol) smo dodali etanol (15mL), bučko postavili na zmes ledu in vode ter ob mešanju preko kapalnika z etanolom (10 mL) dodali SOCl_2 (1,25 mL; 17,25 mmol). Ko se je raztopila vsa spojina **9**, smo reakcijsko zmes mešali pri 0 °C še 15 minut, nato pa prestavili bučko v oljno kopel in dvignili temperaturo na 65 °C ter ob mešanju pustili reakcijo potekati še 24 ur. Naslednji dan smo odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem in sprali vsebino bučke z etrom (3 x 5 mL). Eter smo odlili in preostanek odparili pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Dobili smo 1,970 g spojine **10**.

Izkoristek: 125 % (ker je spojina v obliki hidroklorida, ta veže vodo)

etil 2-amino-5-gvanidinopentanoat		Mr = 202,3
izgled	rumenkasto olje	
analiza ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)	δ [ppm] = 1,06 (t, 3H, $J = 7$ Hz, -O-CH ₂ -CH ₃); 1,47 - 1,67 (m, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂); 1,81 - 1,85 (m, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -CH-); 3,14 (d, 2H, $J = 6$ Hz, -CH ₂ -NH-C=N); 3,44 (q, 2H, $J = 6,9$ HZ, -O-CH ₂ -CH ₃); 4,00 - 4,04 (m, 1H, -CH ₂ -CH(-CO)-NH ₂); 7,15 (s, 2H, -CH-NH ₂); 7,50 (s, 2H, HN=C-NH ₂); 7,97 (t, 1H, $J = 6$ Hz, H ₂ N-C(=NH)-NH-C); 8,66 (s, 1H, H ₂ N-C(=NH)-NH-C)	

4.1.2 ZAŠČITA GVANIDINSKEGA DELA Z BOC₂O

a) ZAŠČITA GVANIDINSKEGA DELA METILNEGA ESTRA Z-ARGININA



Spojino **2** (3,35 g; 9,34 mmol) smo raztopili v acetonitrilu (130 mL), prepihali z argonom in ob mešanju dodali bazo DIPEA (4,8 mL; 28 mmol) in BOC₂O (6,3 g; 28 mmol). Reakcijo smo pustili potekati pri sobni temperaturi in ob mešanju v inertni atmosferi 24 ur. Potek reakcije smo spremljali preko TLC (EA:HEK = 2:5) in naslednji dan, po odparitvi topila pod znižanim tlakom z rotavaporjem, smo dobljeno reakcijsko zmes raztopili v DKM (100 mL) in sprali z 1M HCl (3 × 30 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 × 30 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 × 30 mL). Zbrali smo organsko fazo, h kateri smo dodali sušilno sredstvo Na₂SO₄, jo filtrirali, odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem in ostanek očistili s flash kolono (EA:HEK = 3:8) ter dobili spojine: **3** (203 mg), **4** (351 mg) in **5** (3,916 g).

Izkoristek reakcije (skupni): 84,5 %

Izkoristek reakcije (spojina **3**): 4,16 %

R_f (EA:HEK = 2:5) = 0,21

(S)-metil 2-(((benziloksi)karbonil)amino)-5-(2,3-bis(terc-butoksikarbonil)gvanidino) pentanoat		Mr = 522,6
izgled	motno olje	
analiza ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)	δ [ppm] = 1,39 (s, 9H, Boc-); 1,48 (s, 9H, Boc-); 1,53 - 1,69 (m, 4H, -CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -); 3,28 (q, 2H, $J = 6,4$ Hz, -NH-CH ₂ -CH ₂ -); 3,65 (s, 3H, -O-CH ₃); 4,03 - 4,10 (m, 1H, -CO-(CH ₂)-CH-N); 5,04 (s, 2H, -O-CH ₂ -Ar); 7,30 - 7,40 (m, 5H, H-Ar); 7,79 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, -CH-NH-CO-); 8,30 (t, 1H, $J = 5,4$ Hz, -CH ₂ -NH-CN-); 11,50 (s, 1H, -CO-NH-CN-)	

Izkoristek reakcije (spojina **4**): 7,69 %

R_f (EA:HEK = 2:5) = 0,34

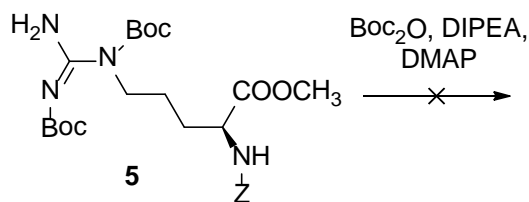
(S)-metil 5-(2,3-bis(terc-butoksikarbonil)gvanidino)-2-(((terc-butoksikarbonil)amino) pentanoat		Mr = 488,6
izgled	motno olje	
analiza ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)	δ [ppm] = 1,38 (s, 9H, Boc-); 1,41 (s, 9H, Boc-); 1,49 (s, 9H, Boc-); 3,62 (s, 3H, -OCH ₃); 3,75 - 3,80 (m, 2H, -CO-N-CH ₂ -CH ₂ -); 3,95 - 3,99 (m, 1H, -CO-(CH ₂)-CH-N); 7,29 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, -CH-NH-CO-); 9,07 (s, 2H, -CN-NH ₂)	

Izkoristek reakcije (spojina **5**): 80,3 %

R_f (EA:HEK = 2:5) = 0,29

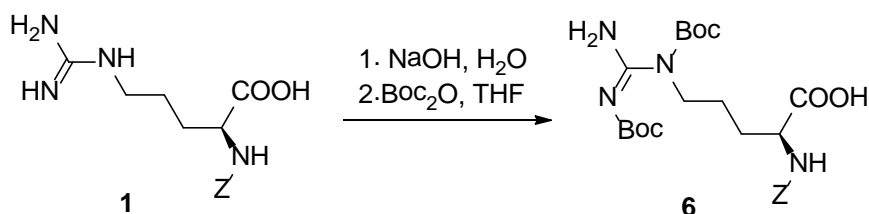
(S)-metil 2-(((benziloksi)karbonil)amino)-5-(1,2-bis(terc-butoksikarbonil)gvanidino) pentanoat		Mr = 522,6
izgled	motno olje	
analiza ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)	δ [ppm] = 1,38 (s, 9H, Boc-); 1,48 (s, 9H, Boc-); 3,63 (s, 3H, -COOCH ₃); 3,76 - 3,82 (m, 2H, -CO-N-CH ₂ -CH ₂ -); 4,08 - 4,10 (m, 1H, -CO-(CH ₂)-CH-N); 7,32 - 7,38 (m, 5H, H-Ar); 7,79 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, -CH-NH-CO-); 9,08 (s, 2H, -CN-NH ₂)	

PREVERJANJE AKTIVNOSTI AMINO SKUPINE PRI SPOJINI 5



Spojino **5** (127 mg; 0,24 mmol) smo raztopili v acetonitrilu (10 mL), prepihali z argonom in ob mešanju dodali DIPEA (42 μL ; 0,24 mmol), DMAP (3,0 mg; 24,3 μmol) ter Boc_2O (55 mg; 0,24 mmol) raztopljenega v 1 mL acetonitrila. Po 30 minutah mešanja na sobni temperaturi smo naredili TLC (EA:HEK = 2:5) in pustili reakcijo mešati na sobni temperaturi še tri dni. Reakcija ni potekla.

b) ZAŠČITA GVANIDINSKEGA DELA Z-ARGININA V DVOFAZNEM SISTEMU



Zatehti spojine **1** (1,00 g; 3,24 mmol) smo dodali vodo (15 mL) in NaOH (3,3 mL; 6,81 mmol), ki smo ga pripravili kot 2M raztopino. V THF (15 mL) smo raztopili Boc_2O (1,53 g; 6,81 mmol) in ga ob mešanju dodali preko kapalnika k reakcijski zmesi. Po 48 urah smo odparili topilo THF pod znižanim tlakom z rotavaporjem, vodno raztopino pa nakisali do pH 4 z 1M HCl in sprali z DKM (3 \times 30 mL). Zbrali smo organsko fazo, ki smo ji dodali Na_2SO_4 , jo filtrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Ostanek smo očistili s flash kolono (DKM:MeOH + 1 % AA = 32:1 + 1 % AA) in dobili 280 mg spojine **6**.

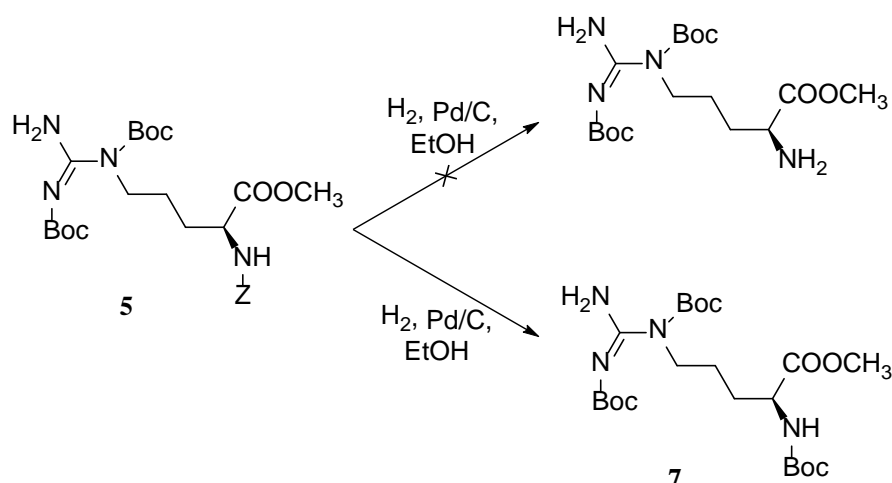
Izkoristek reakcije: 17 %

R_f (EA + 1% AA) = 0,42

(S)-2-(((benziloksi)karbonil)amino)-5-(1,2-bis(terc-butoksikarbonil)gvanidino)pentanonska kislina		Mr = 508,6
izgled	brezbarvno olje	
analiza ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)	δ[ppm] = 1,40 (s, 9H, Boc-); 1,47 (s, 9H, Boc-); 3,78 (t, 2H, <i>J</i> = 0,6 Hz, -CO-N-CH ₂ -CH ₂ -); 3,96 - 3,99 (m, 1H, -CO-(CH ₂)-CH-N); 7,30 - 7,39 (m, 5H, H-Ar); 7,63 (d, 1H, <i>J</i> = 8,0 Hz, -CH-NH-CO-); 9,08 (s, 2H, -CN-NH ₂); 12,38 (s, 1H, -COOH)	

4.1.3 ODSTRANJEVANJE BENZIL KARBAMATNE ZAŠČITE S KATALITSKIM HIDROGENIRANJEM

4.1.3.1 KATALITSKO HIDROGENIRANJE V NEVTRALNIH POGOJIH

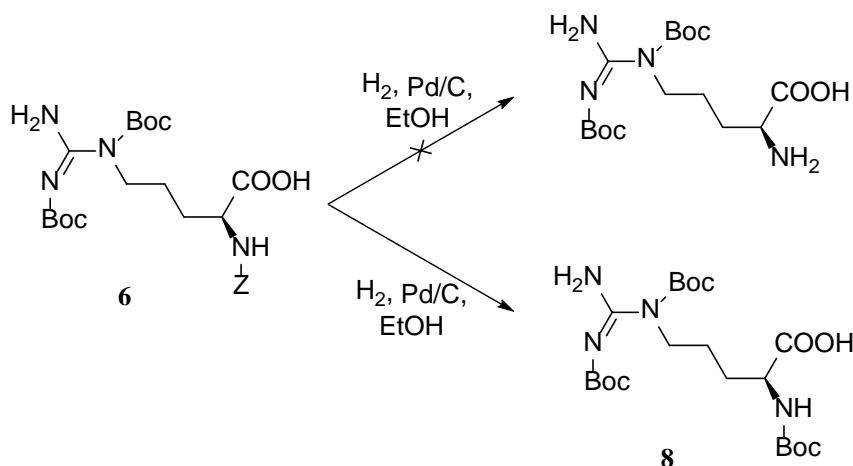


a) Spojino **5** (2,8 g; 5,4 mmol) smo raztopili v brezvodnem etanolu (20 mL), prepihali z argonom in dodali 10 % paladija na ogljiku (280 mg). Reakcijsko zmes smo ob mešanju prepihovali z vodikom. Po 30 minutah smo preverili potek reakcije s TLC (EA:HEK = 1:1) in po potrebi pustili dlje (do 1 ure). Nato smo reakcijsko zmes filtrirali preko diatomejske zemlje in vate, odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem in ostanek očistili s flash kolono (EA:HEK = 1:5). Dobili smo 0,719 g spojine **7**, ki smo jo takoj uporabili za pripajanje aktivirane indol-2-karboksilne kisline. Kasneje se je izkazalo, da smo dobili spojino **7**, namesto pričakovane spojine.

Izkoristek reakcije: 27,3 %

R_f (EA:HEK=1:3) = 0,44

(S)-metil 5-(1,2-bis(terc-butoksikarbonil)gvanidino)-2-((terc-butoksikarbonil)amino) pentanoat		Mr = 488,6
izgled	brezbarvno olje	
analiza ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)	δ[ppm] = 1,38 (s, 9H, Boc-); 1,41 (s, 9H, Boc-); 1,49 (s, 9H, Boc-); 1,56 (t, 4H, J = 8,0 Hz, -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH=); 3,62 (s, 3H, -O-CH ₃); 3,77 (d, 2H, J = 6,0 Hz, =N-CH ₂ -); 3,97 – 3,99 (m, 1H, =CH-); 7,30 (d, 1H, J = 8,0 Hz, -CO-NH-CH=); 9,8 (s, 2H, -NH ₂)	

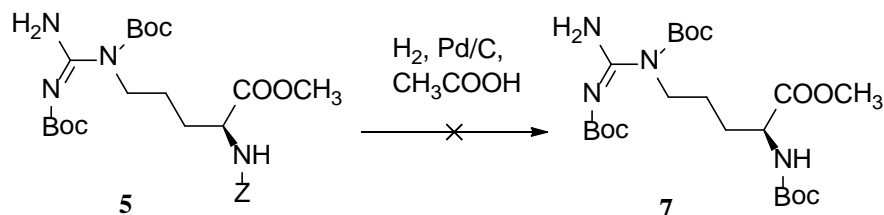


b) Spojino **6** (107 mg; 0,21 mmol) smo raztopili v brezvodnem etanolu (10 mL), prepihali z argonom in dodali 10 % paladija na ogljiku (11 mg). Reakcijsko zmes smo ob mešanju prepihovali z vodikom. Po 30 minutah smo preverili potek reakcije s TLC (EA in 1 % AA). Ko je hidrogeniranje poteklo, smo reakcijsko zmes filtrirali preko diatomejske zemlje in vate ter odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Dobili smo 59 mg spojine, ki smo jo takoj uporabili za pripajanje aktivirane indol-2-karboksilne kisline. Kasneje se je izkazalo, da smo dobili spojino **8**, namesto pričakovane spojine.

Izkoristek: 76,2 %

R_f (EA+1 % AA) = 0

4.1.3.2 KATALITSKO HIDROGENIRANJE V KISLIH POGOJIH

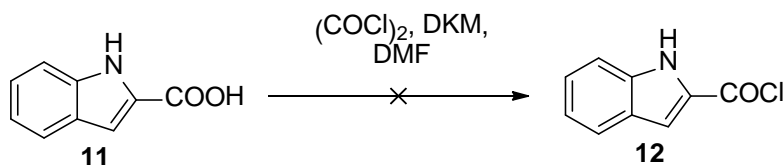


Spojino **5** (117 mg; 0,22 mmol) smo raztopili v brezvodnem etanolu (15 mL), dodali očetno kislino (77 μ L; 1,34 mmol), prepihali z argonom in dodali 10 % paladija na ogljiku (12 mg). Reakcijsko zmes smo prepihovali 1 uro z vodikom. Nato smo reakcijsko zmes filtrirali preko diatomejske zemlje in vate, odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem in ostanek očistili s flash kolono (EA:HEK = 1:1). Dobili smo 60 mg spojine, ki pa je nismo uspeli identificirati z 1H NMR:

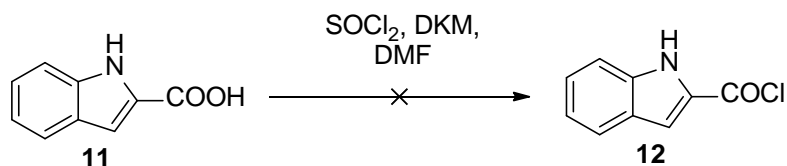
Rf (EA:HEK=1:1) = 0,59

4.1.4 AKTIVIRANJE INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE

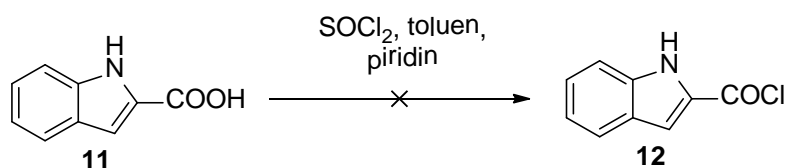
4.1.4.1 SINTEZA KISLINSKEGA KLORIDA



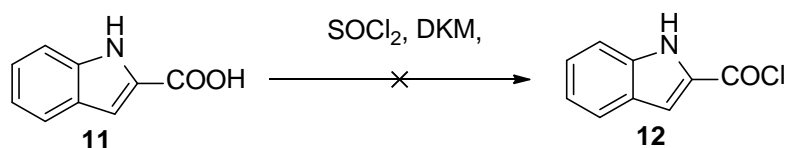
a) Zatehti indol-2-karboksilne kisline (**11**) (0,166 g; 1,03 mmol) smo dodali brezvodni DKM (20 mL), bučko postavili na zmes ledu in vode ter prepihali z argonom. Med mešanjem smo dodali 2 kapljici katalizatorja DMF in preko kapalnika z brezvodnim DKM (5 mL) dodali $(COCl)_2$ (108 μ L; 1,24 mmol). Po 1 uri mešanja na sobni temperaturi, smo odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem, ostanek sprali z etrom, ki smo ga odlili in ostanek odparili pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Dobljeno spojino (rumeni kristali) smo takoj uporabili za nadaljno reakcijo pripajanja.



b) Spojino **11** (81 mg; 0,50 mmol) smo raztopili v brezvodnem DKM (10 mL), bučko postavili na zmes ledu in vode ter prepihali z argonom. Med mešanjem smo dodali 2 kapljici katalizatorja DMF in preko kapalnika z brezvodnim DKM (5 mL) dodali SOCl_2 (55 μL ; 0,75 mmol). Bučko smo nato prenesli v oljno kopel in refluktirali reakcijsko zmes pri 50 °C 1 uro. Nato smo odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem, ostanek sprali z etrom, ki smo ga odlili in ostanek odparili pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Dobljeno spojino smo takoj uporabili za nadaljno reakcijo pripajanja.



c) Spojini **11** (81 mg; 0,50 mmol) smo dodali toluen (15 mL), bučko postavili na zmes ledu in vode, med mešanjem dodali piridin (40,5 μL ; 0,50 mmol), prepihali z argonom in dodali preko kapalnika s toluenom (5 mL) SOCl_2 (73 μL ; 1,00 mmol). Nato smo bučko prestavili v oljno kopel in dvignili temperaturo reakcijske zmesi na 100 °C. Nastala je črna snov.



d) Spojini **11** (81 mg; 0,50 mmol) smo dodali 3 do 5 mL brezvodnega DKM, prepihali z argonom in med mešanjem dodali preko kapalnika z brezvodnim DKM (do 5 mL) SOCl_2 (73 μL ; 1,00 mmol). Bučko smo prestavili v oljno kopel in med mešanjem segrevali reakcijsko zmes pri 70 °C 2 uri. Nato smo odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem, ostanek sprali z etrom, ki smo ga odlili in ostanek odparili pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Dobili smo 98,3 mg spojine, ki smo jo takoj uporabili za nadaljno reakcijo pripajanja.

4.1.4.2 SINTEZA ANHIDRIDA



Spojini **11** (52 mg; 0,32 mmol) smo dodali do 5 mL brezvodnega DKM, bučko postavili na zmes ledu in vode ter prepihali z argonom. Med mešanjem smo dodali DIC (252 μ L; 1,61 mmol) in mešali še 1 uro pri sobni temperaturi. Nato smo vsebino bučke filtrirali, odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem in ostanek sprali z etrom, ki smo ga odlili in ostanek odparili pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Dobili smo 38 mg spojine, katero smo takoj uporabili za nadaljno reakcijo pripajanja.

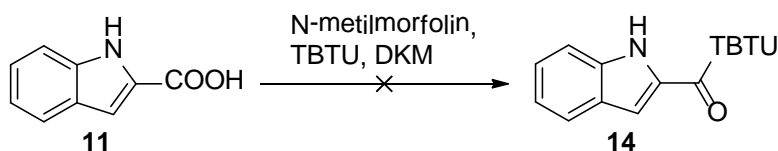
Izkoristek reakcije: 78 %

Rf (DKM:MeOH=9:1) = 0,84

4.1.4.3 AKTIVACIJA S TBTU



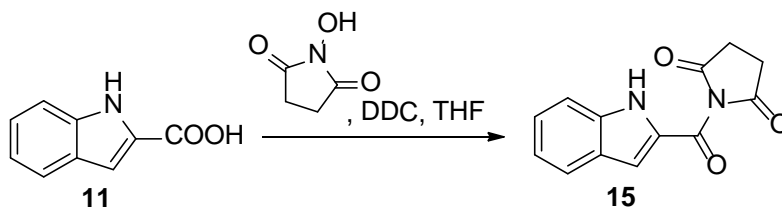
a) Spojinu **11** (37 mg; 0,23 mmol) smo dodali brezvodni DMF, prepihali z argonom in med mešanjem dodali *N*-metilmorfolin (50 μ L; 0,45 mmol) ter TBTU (84 mg; 0,26 mmol). Reakcijsko zmes smo pri sobni temperaturi mešali še 1 uro, nato smo odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem in vsebino bučke takoj uporabili naprej za reakcijo pripajanja.



b) Spojini **11** (31 mg; 0,19 mmol) smo dodali brezvodni DKM (5 mL), prepihali z argonom in med mešanjem dodali *N*-metilmorfolin (42 μ L; 0,38 mmol) ter TBTU (71 mg; 0,22 mmol). Reakcijsko zmes smo pri sobni temperaturi mešali še 1 uro, nato smo vsebino bučke takoj uporabili naprej za reakcijo pripajanja.

R_f (DKM:MeOH=9:1) = 0,19

4.1.4.4 AKTIVACIJA Z *N*-HIDROKSISUKCINIMIDOM



Spojini **11** (105 mg; 0,65 mmol) smo dodali THF (3 mL), bučko postavili na zmes ledu in vode, med mešanjem dodali *N*-hidroksisukcinimid (80 mg; 0,68 mmol) in DDC (141 mg; 0,68 mmol). Po 10 minutah smo dvignili temperaturo na sobno temperaturo in pustili mešati še 24 ur. Nato smo odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem, ostanek očistili s flash kolono (EA:HEK = 5:1) in dobili 85 mg spojine **15**.

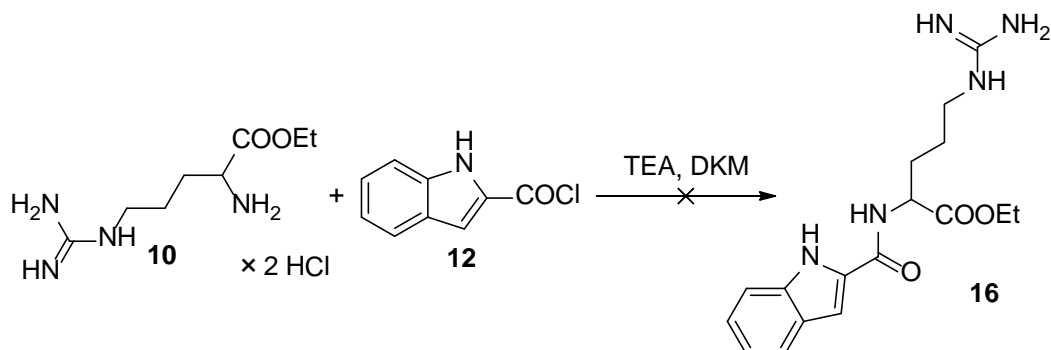
Izkoristek: 53,8 %

R_f (EA:HEK = 5:1) = 0,23

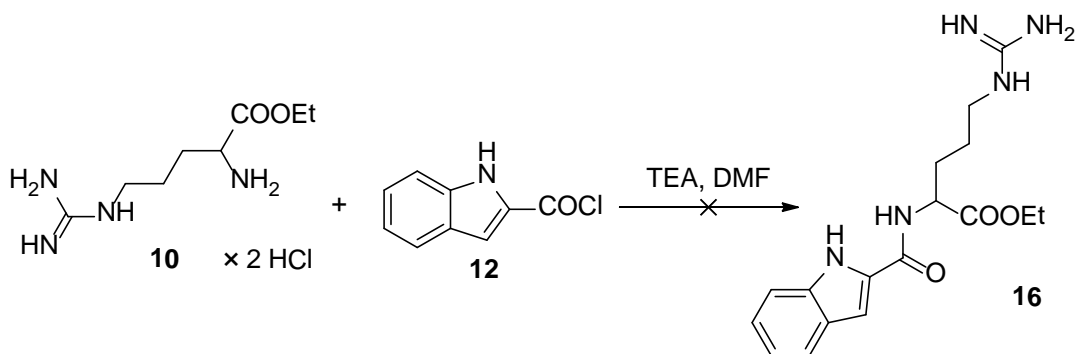
1-(1<i>H</i>-indol-2-karbonil)pirolidin-2,5-dion		Mr = 242,2
izgled	beli kristali	
analiza ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)	δ [ppm] = 2,92 (s, 4H, -CO- <u>CH₂</u> - <u>CH₂</u> -CO-); 7,15 - 7,77 (m, 5H, H-Ar in H-C ³ indol-2-karboksil-); 12,43 (s, 1H, C- <u>NH</u> -C)	

4.1.5 PRIPAJANJE DERIVATA ARGININA NA AKTIVIRANO INDOL-2-KARBOKSILNO KISLINO

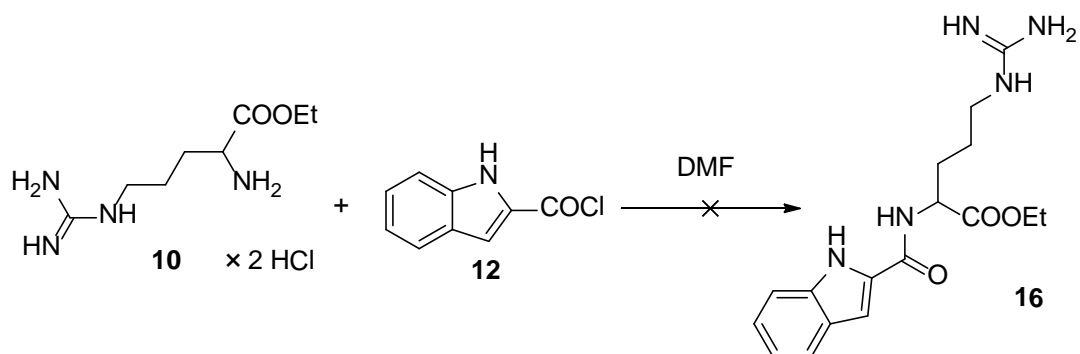
4.1.5.1 SINTEZA SPOJINE **16** IZ ETILNEGA ESTRA ARGININA IN KISLINSKEGA KLORIDA SPOJINE **11**



a) Spojino **10** (246 mg; 1,0 mmol) smo raztopili v brezvodnem DKM (20 mL), bučko postavili na zmes ledu in vode, prepihali z argonom ter med mešanjem dodali TEA (416 μ L; 3,0 mmol) in počasi dokapavali spojino **12** (1,0 mmol) raztopljeno v brezvodnem DKM (1 mL). V inertni atmosferi smo reakcijo pustili mešati še 24 ur in njen potek spremljali preko TLC (DKM:MeOH = 19:1). Nastala je bela oborina.

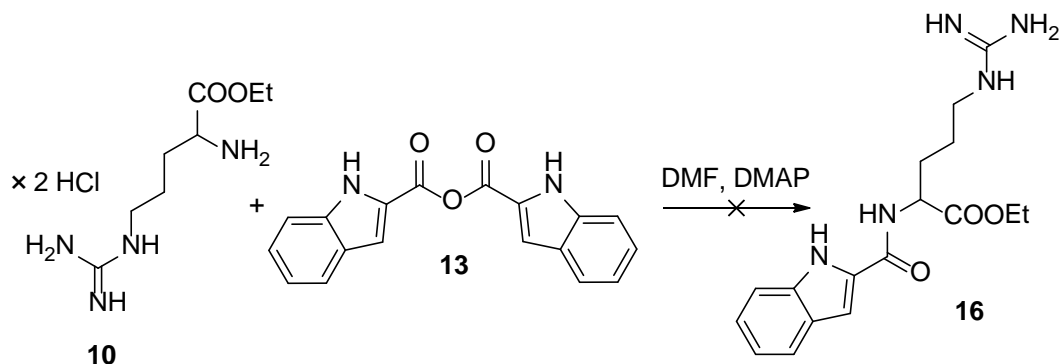


b) Spojino **10** (69 mg; 0,25 mmol) smo raztopili v brezvodnem DMF (10 mL), bučko postavili na zmes ledu in vode, prepihali z argonom ter med mešanjem dodali TEA (69 μ L; 0,5 mmol) in počasi dokapavali spojino **12** (0,25 mmol) raztopljeno v brezvodnem DMF (1 mL). V inertni atmosferi smo reakcijo pustili mešati še 24 ur in njen potek spremljali preko TLC (DKM:MeOH = 19:1).



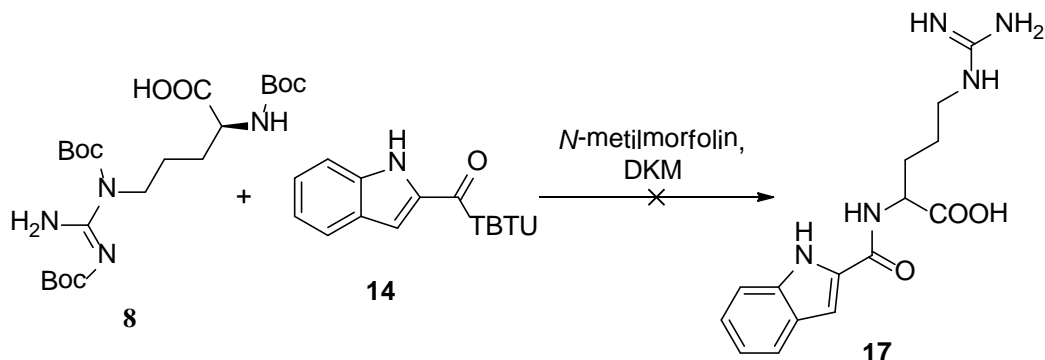
c) Spojino **10** (138 mg; 0,50 mmol) smo raztopili v brezvodnem DMF (1 mL), bučko postavili na zmes ledu in vode, prepihali z argonom ter med mešanjem počasi dokapavali spojino **12** (0,40 mmol) raztopljeno v brezvodnem DMF (1 mL). V inertni atmosferi smo reakcijo pustili mešati še 24 ur in njen potek spremljali preko TLC (DKM:MeOH = 5:1).

4.1.5.2 ETILNI ESTER ARGININA IN ANHIDRID SPOJINE **11**

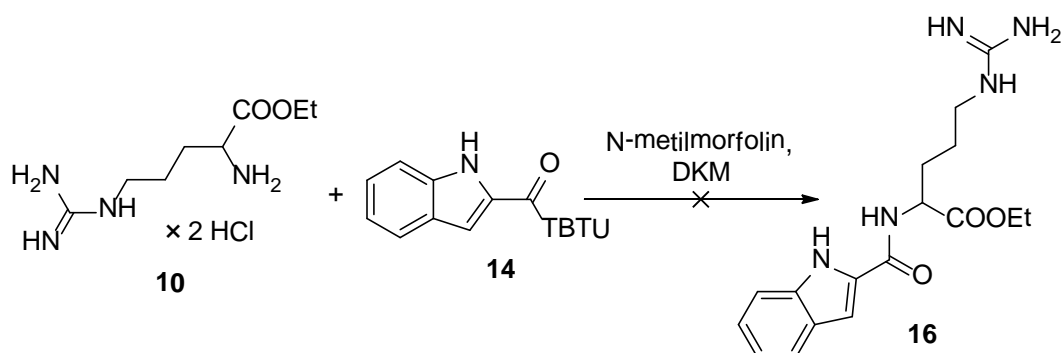


Spojino **10** (25 mg; 0,09 mmol) smo raztopili v brezvodnem DMF (1 mL), bučko postavili na zmes ledu in vode, prepihali z argonom in dodali spojino **13** (0,18 mmol). Nato smo temperaturo reakcijske zmesi dvignili na sobno temperaturo in po nekaj minutah (10 min) dodali kristal DMAP. Reakcijo smo ob mešanju na sobni temperaturi pustili še 24 ur in njen potek spremljali preko TLC (DKM:MeOH = 9:1).

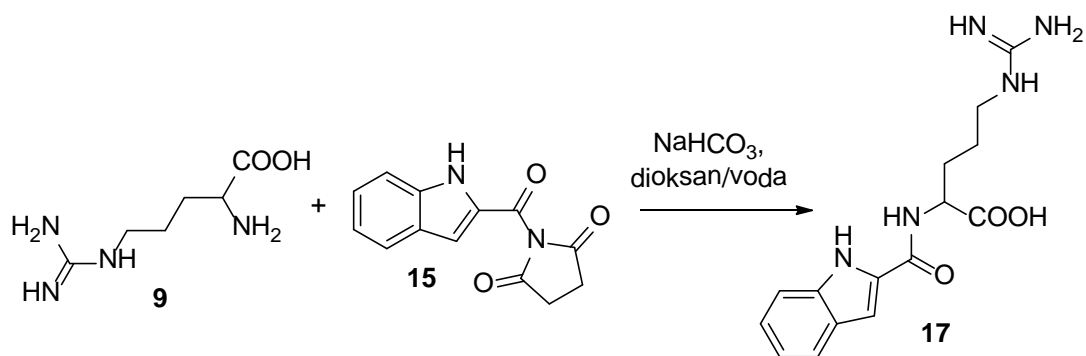
4.1.5.3 DERIVAT ARGININA IN AKTIVIRANA SPOJINA 11 S TBTU



a) Spojino **8** (59 mg; 0,16 mmol) smo raztopili v brezvodnem DKM (1 mL), prepihali z argonom, med mešanjem dodali *N*-metilmorfolin (17 μ L; 0,16 mmol) in počasi preko kapalnika dodali spojino **14** (0,23 mmol) raztopljeno v DKM. Po 24 urah mešanja na sobni temperaturi in v inertni atmosferi smo odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem, sprali zmes z etrom, ki smo ga odlili in ostanek odparili pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Vsebino bučke smo očistili s flash kolono (DKM:MeOH + 1 % AA = 9,2:0,8 + 1 % AA) in dobili 28 mg belih kristalov, ki niso bili želena spojina.



b) Spojino **10** (62 mg; 0,22 mmol) smo raztopili v brezvodnem DKM (10 mL), prepihali z argonom, med mešanjem dodali *N*-metilmorfolin (50 μ L; 0,45 mmol) in počasi dokapavali spojino **14** (0,23 mmol) raztopljeno v DKM. Po odparitvi topila pod znižanim tlakom z rotavaporjem, smo ostanek sprali z etrom, ki smo ga odlili in ostanek odparili pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Vsebino bučke pa smo očistili s flash kolono (DKM:MeOH = 9:1) in ločili dve spojini (31 mg in 78 mg).

4.1.5.4 ARGININ IN SPOJINA 15

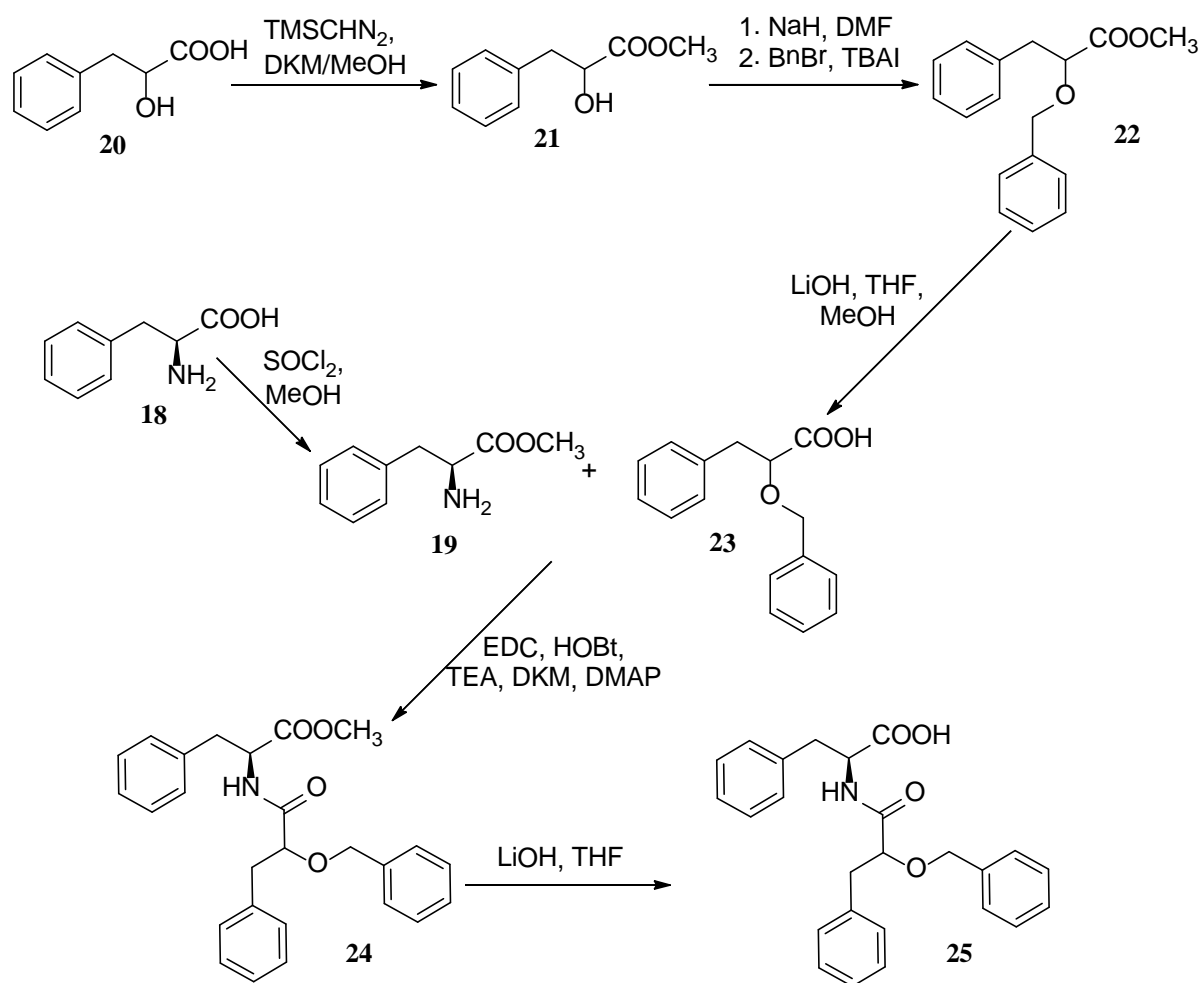
Arginin (**9**) (56 mg; 0,32 mmol) smo raztopili v 2 mL zmesi dioksan/voda (1/1), med mešanjem dodali NaHCO₃ (40 mg; 0,48 mmol) in spojino **15** (85 mg; 0,35 mmol). Po 24 urah mešanja na sobni temperaturi smo odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem, nakisali vodno fazo s KHSO₄ do pH = 4 in spirali z EA (3 × 30 mL). Zbrali smo vodno fazo in oborino ter odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Ostanek v bučki smo raztopili v metanolu (2 mL), ga očistili s flash kolono (MeOH:EA=2:1) in dobili 33 mg spojine **17**.

Izkoristek reakcije: 32,5 %

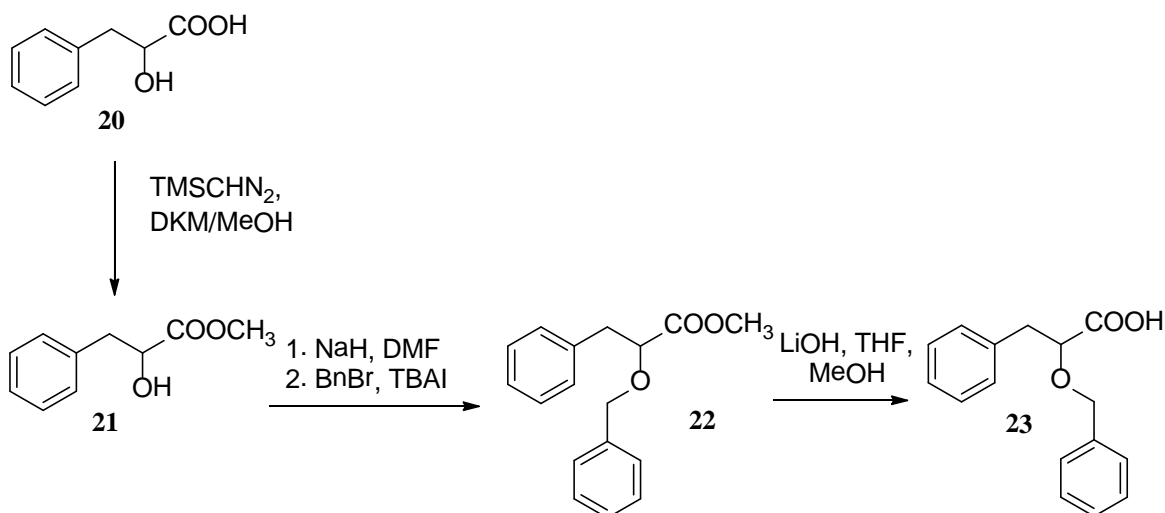
R_f (MeOH:EA = 3:1) = 0,24

5-gvanidino-2-(1H-indol-2-karboksamido)pentanojska kislina		Mr = 317,3
izgled	brezbarvno olje	
analiza 1H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)	δ[ppm] = 1,51 – 1,66 (m, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -); 1,72 - 1,94 (m, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -CH=); 3,10 (t, 2H, J = 3,8 Hz, -N-CH ₂ -CH ₂ -); 4,24 - 4,29 (m, 1H, -CO-(CH ₂)-CH-N-); 6,96 -7,53 (m, 5H, H-Ar in H-C ³ -indol-2-karboksil); 7,90 (s, 2H, -NH ₂); 8,38 (d, 1H, J = 7,6 Hz, -NH-CH ₂ -); 9,31 (s, 1H, HN=C=); 11,58 (s, 1H, -COOH)	

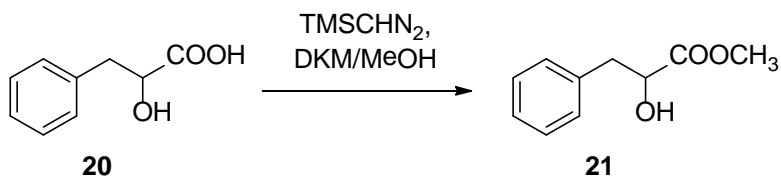
4.2 SINTEZA PREKURZORJA P3



4.2.1 SINTEZA SPOJINE **23** IZ FENILMLEČNE KISLINE



4.2.1.1 SINTEZA METILNEGA ESTRA



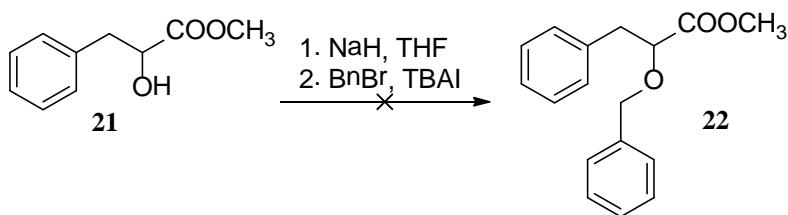
Fenilmlečno kislino (**20**) (1,05 mg; 6,30 mmol) smo raztopili v zmesi diklorometan/voda (3:1, 28 mL), bučko postavili na zmes ledu in vode ter med mešanjem dodali TMSCHN₂ (4,7 mL; 9,48 mmol). Temperaturo smo dvignili na sobno temperaturo in po 15 minutah mešanja reakcijsko zmes odstavili, odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem in ostanek očistili s flash kolono (EA:HEK = 1:2). Dobili smo 1,09 g spojine **21**.

Izkoristek: 95,8 %

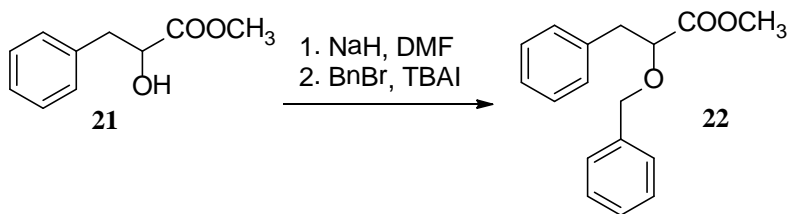
R_f (EA:HEK = 1:2) = 0,37

metil 2-hidroksi-3-fenilpropanoat		Mr = 180,2
izgled	brezbarvno olje	
analiza ¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	δ[ppm] = 2,78 - 2,97 (m, 2H, Ar-CH ₂ -); 3,61 (s, 3H, -O-CH ₃); 4,22 - 4,26 (m, 1H, HO-CH=); 7,20 - 7,29 (m, 5H, Ar-H)	

4.2.1.2 UVEDBA BENZILNE ZAŠČITE



a) NaH (167 mg; 6,62 mmol) smo raztopili v THF (25 mL), bučko postavili na zmes ledu in vode, prepihali z argonom ter med mešanjem dodali v THF (20 mL) raztopljeno spojino **21** (994 mg; 5,52 mmol). Po 15 minutah mešanja pri 0 °C in v inertni atmosferi smo dodali BnBr (736 μ L; 6,07 mmol) ter TBAI (208 mg; 0,55 mmol). Reakcijo smo, po uri in pol mešanja v inertni atmosferi in pri 0°C, ustavili s pufrom pH 6 do 7. Vodno fazo smo nato spirali z EA (3 \times 30 mL) in zbrani organski fazi dodali Na₂SO₄, jo filtrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Nismo uspeli izolirati zelenega produkta.

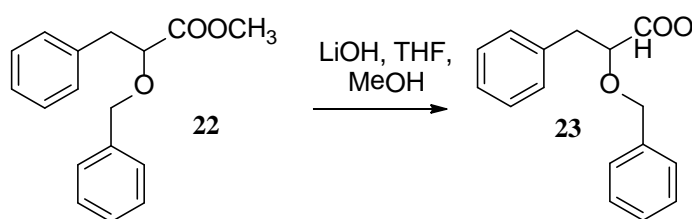


b) NaH (290 mg; 7,25 mmol) smo raztopili v DMF (25 mL), bučko postavili na zmes ledu in vode, prepihali z argonom ter med mešanjem dodali v DMF (10 mL) raztopljeno spojino **21** (1,09 mg; 6,04 mmol). Po 15 minutah mešanja pri 0 °C in v inertni atmosferi smo dodali BnBr (805 μ L; 6,64 mmol) ter TBAI (228 mg; 0,60 mmol), dvignili temperaturo na sobno temperaturo za 1 uro in nato na 40 °C za 24 ur. Naslednji dan smo reakcijo ustavili s pufrom pH 6 do 7 in vodno fazo spirali z EA (3 \times 30 mL). Zbrani organski fazi smo dodali Na₂SO₄, jo filtrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Ostanek v bučki smo očistili s flash kolono (EA:HEK = 1:8,5) in dobili 733 mg spojine **22**.

Izkoristek: 44,9 %

R_f (EA:HEK = 1:8,5) = 0,21

metil 2-(benziloksi)-3-fenilpropanoat		Mr = 270,3
izgled	brezbarvno olje	
analiza ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)	δ[ppm] = 2,94 - 3,05 (m, 2H, Ar-CH ₂ -); 3,65 (s, 3H, -O-CH ₃); 4,26 (t, 1H, J = 6,6 Hz, -CH ₂ -(O)CH-CO-); 4,48 (q, 2H, J = 12 Hz, Ar-CH ₂ -O-); 7,17 - 7,30 (m, 10H, 2 × Ar-H)	

4.2.1.3 HIDROLIZA METILNEGA ESTRA

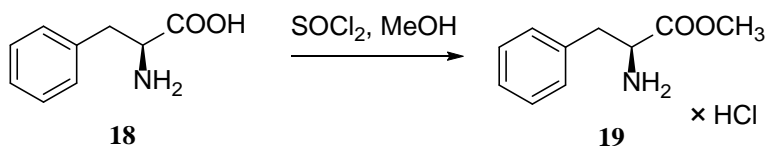
Spojino **22** (725 mg; 2,68 mmol) smo raztopili v THF (15 mL), med mešanjem dodali LiOH (257 mg; 10,7 mmol), ki smo ga predhodno raztopili v vodi (3 mL), in do razbistritve dodali MeOH. Reakcijo smo po 3 urah mešanja pri sobni temperatur ustavili s pufrom pH 6 do 7, uravnali pH s HCl na 5 in spirali z etrom (3 × 30 mL). Zbrani organski fazi smo dodali Na₂SO₄, jo filtrirali in odparili eter pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Dobili smo 670 mg spojine **23**.

Izkoristek: 97,6 %

R_f (EA:HEK = 1:2) = 0,25

2-(benziloksi)-3-fenilpropanojska kislina		Mr = 256,3
izgled	drobni beli kristali	
analiza ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)	δ[ppm] = 2,95 - 3,04 (m, 2H, Ar-CH ₂ -); 4,14 (q, 1H, J = 4,3 Hz, -CH ₂ -(O)CH-CO-); 4,48 (q, 2H, J = 12 Hz, Ar-CH ₂ -O-); 7,18 - 7,29 (m, 10H, 2 × Ar-H); 12,84 (s, 1H, -COOH)	

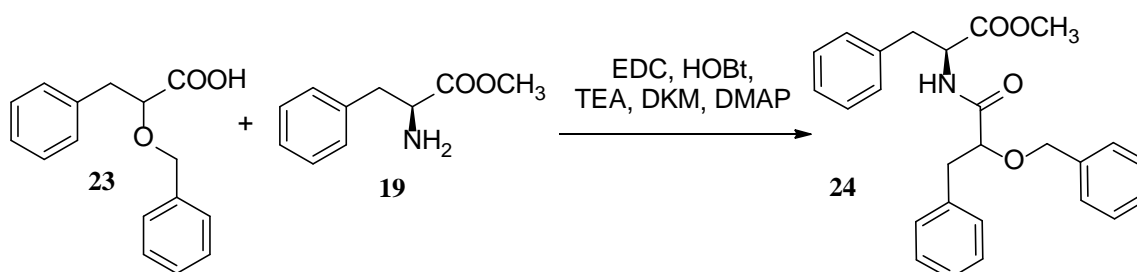
4.2.2 SINTEZA METILNEGA ESTRA FENILALANINA



Fenilalanin (**18**) (1,00 mg; 6,09 mmol) smo raztopili v metanolu (15 mL), bučko postavili na zmes ledu in vode ter med mešanjem dodali SOCl_2 (1,33 mL; 18,27 mmol). Po dodatku SOCl_2 smo temperaturo dvignili na 60 °C za 24 ur. Naslednji dan smo odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem in dobili bele kristale, ki smo jih sprali z etrom in filtrirali. Dobili smo 1,29 g spojine **19**.

Izkoristek: 98,2 %

(S)-metil 2-amino-3-fenilpropanoat		Mr = 215,7
izgled	drobni beli kristali	
analiza ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)	$\delta[\text{ppm}] = 3,08 - 3,23$ (m, 2H, Ar-CH ₂ -); 3,66 (s, 3H, -O-CH ₃); 4,24 - 4,27 (m, 1H, -C-(CO)CH-NH ₂); 7,24 - 7,36 (m, 5H, H-Ar); 8,75 (s, 2H, -NH ₂)	

4.2.3 PRIPAJANJE SPOJINE **23** NA SPOJINO **19**

Spojino **23** (687 mg; 2,68 mmol) smo raztopili v brezvodnem DKM (43 mL), med mešanjem dodali spojino **19** (577 mg; 3,22 mmol), EDC (617 mg; 3,22 mmol), HOBt (444 mg; 3,22 mmol), TEA (930 μL ; 6,71 mmol) in nekaj kristalov DMAP. Na sobni temperaturi smo reakcijsko zmes mešali še 24 ur, nato smo odparili topilo pod znižanim

tlakom z rotavaporjem in ostanek očistili s flash kolono (EA:HEK = 2:5). Dobili smo dve spojini mase 208 mg (**24a**) in 290 mg (**24b**).

Izkoristek reakcije: 44,5 %

Izkoristek reakcije (spojina **24a**): 18,6 %

R_f (EA:HEK = 1:2) = 0,32

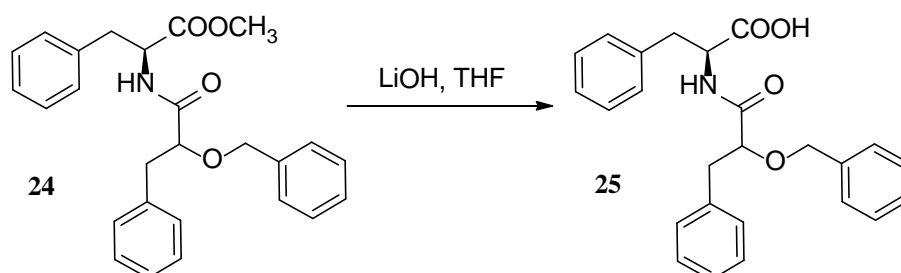
2-metil 2-(2-(benziloksi)-3-fenilpropanamido)-3-fenilpropanoat		Mr = 417,5
izgled	drobni beli kristali	
analiza ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)	δ[ppm] = 2,75 - 2,88 (m, 2H, Ar-CH ₂ -CH(NH)-CO-); 2,98 - 3,15 (m, 2H, Ar-CH ₂ -CH(O)-CO-); 3,66 (s, 3H, -O-CH ₃); 3,93 (q, 1H, J = 4,3 Hz, -CH ₂ -CH(O)-CO-); 4,23 (q, 2H, J = 12 Hz, Ar-CH ₂ -O-); 4,61 (m, 1H, -CH ₂ -(N)CH-CO-); 7,02 - 7,32 (m, 15H, 3 × Ar-H); 8,34 (d, 1H, J = 8,4 Hz, -CO-NH-)	

Izkoristek reakcije (spojina **24b**): 26 %

R_f (EA:HEK = 1:2) = 0,25

2-metil 2-(2-(benziloksi)-3-fenilpropanamido)-3-fenilpropanoat		Mr = 417,5
izgled	drobni beli kristali	
analiza ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)	δ[ppm] = 2,77 - 2,81 (m, 2H, Ar-CH ₂ -CH(NH)-CO-); 2,97 - 3,12 (m, 2H, Ar-CH ₂ -CH(O)-CO-); 3,65 (s, 3H, -O-CH ₃); 3,95 (q, 1H, J = 5,2 Hz, -CH ₂ -CH(O)-CO-); 4,26 (q, 2H, J = 11,8 Hz, Ar-CH ₂ -O-); 4,66 (m, 1H, -CH ₂ -(N)CH-CO-); 7,06 - 7,28 (m, 15H, 3 × Ar-H); 8,28 (d, 1H, J = 8,4 Hz, -CO-NH-)	

4.2.4 HIDROLIZA SPOJINE **24**



Spojino **24b** (120 mg; 0,29 mmol) smo raztopili v THF (4 mL) in med mešanjem dodali LiOH (28 mg; 1,15 mmol), ki smo ga predhodno raztopili v vodi (2 mL). Po 30 minutah

Vika Kobola: Sinteza analogov spumiginov kot potencialnih antitrombotičnih učinkovin

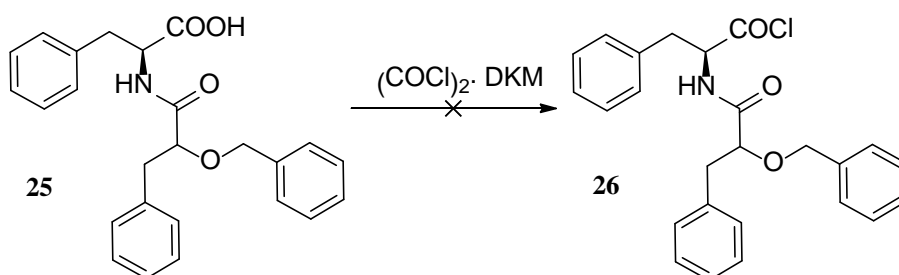
mešanja na sobni temperaturi smo reakcijo ustavili s pufrom pH 6 do 7 (10 mL), uravnali pH s 1M HCl na 5 in spirali z etrom (3 × 30 mL). Zbrani organski fazi smo dodali Na₂SO₄, jo filtrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Dobili smo 110 mg spojine **25**.

Izkoristek: 95 %

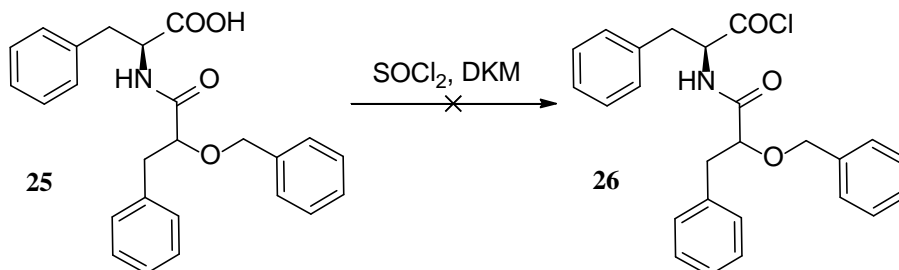
R_f (EA:HEK=1:2,5) = 0,71

(2S)-2-(2-(benziloksi)-3-fenilpropanamido)-3-fenilpropanojska kislina		Mr = 403,5
izgled	brezbarvno olje	
analiza ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)	δ[ppm] = 2,77 - 2,83 (m, 2H, Ar- <u>CH</u> ₂ -CH(NH)-CO-); 2,99 - 3,08 (m, 2H, Ar- <u>CH</u> ₂ -CH(O)-CO); 3,95 (q, 1H, J = 4,4 Hz, -CH ₂ - <u>CH</u> (O)-CO-); 4,27 (2 d, 2H, J = 12 Hz, Ar-CH ₂ -O-); 4,60 (m, 1H, -CH ₂ -(N) <u>CH</u> -CO-); 7,13 - 7,27 (m, 15H, 3*Ar-H); 8,07 (d, 1H, J = 8,8 Hz, -CO-NH-); 12,89 (s, 1H, -COOH)	

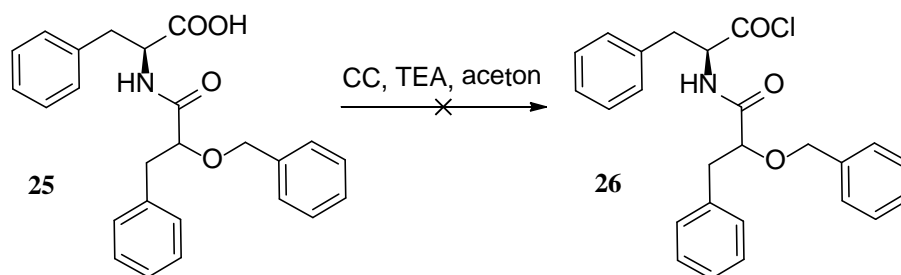
4.2.5 SINTEZA KISLINSKEGA KLORIDA SPOJINE 25



a) Spojino **25** (105 mg; 0,26 mmol) smo raztopili v brezvodnem DKM (7 mL), bučko postavili na zmes ledu in vode, prepihali z argonom in med mešanjem dodali smo TEA (38 μL ; 0,27 mmol), 2 kapljici brezvodnega DMF ter s kapalnikom dodali $(\text{COCl})_2$ (54 μL ; 0,60 mmol) v brezvodnem DKM (5 mL). Reakcijsko zmes smo mešali še 30 minut pri 45 °C, nato pa odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem, sprali vsebino bučke z etrom, filtrirali in eter odparili pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Dobljeno spojino smo takoj uporabili za reakcijo pripajanja spojine **29**.

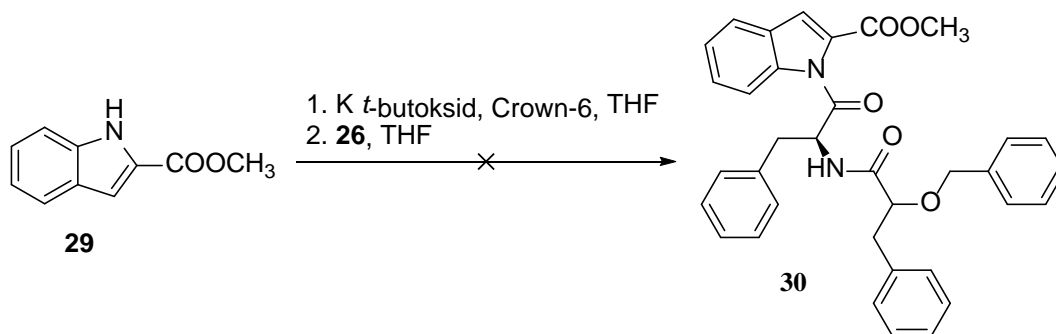


b) Spojino **25** (93 mg; 0,23 mmol) smo raztopili v brezvodnem DKM (10 mL), bučko postavili na zmes ledu in vode, prepihali z argonom in med mešanjem s kapalnikom dodali SOCl_2 (44 μL ; 0,60 mmol) v brezvodnem DKM (5 mL). Bučko smo prenesli v oljno kopel, kjer smo reakcijsko zmes refluktirali pri 45 °C 1 uro. Dobljeno spojino smo takoj uporabili za reakcijo pripajanja spojine **29**.



c) Spojino **25** (76 mg; 0,19 mmol) smo raztopili v brezvodnem acetonu (3 mL), prepihali z argonom, med mešanjem dodali cianurični klorid (CC) (18 mg; 0,09 mmol) in TEA (26 μ L; 0,19 mmol). Po 2 urah mešanja na sobni temperaturi smo reakcijsko zmes filtrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Dobljeno spojino smo takoj uporabili za reakcijo priprave spojine **29**.

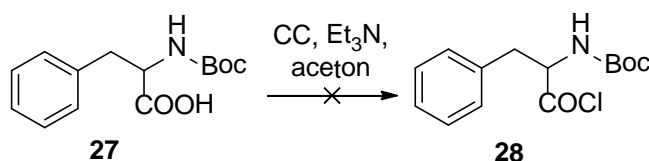
4.2.6 PRIPAJANJE SPOJINE **26** NA METILNI ESTER INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE



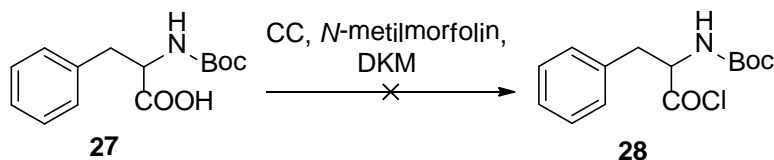
Metilni ester indol-2-karboksilne kisline (**29**) (34 mg; 0,20 mmol) smo raztopili v brezvodnem THF (2 mL), bučko postavili na zmes ledu in vode, prepihali z argonom in med mešanjem dodali kalijev terc-butoksid (27 mg; 0,22 mmol), predhodno raztopljen v THF (1 mL), in Crown-6 (16 mg; 0,06 mmol). Spojino **26** (0,26 mmol) smo raztopili v brezvodnem THF (2 mL) in počasi dokapavali k aktivirani spojini **29**. Po 24 urah mešanja na sobni temperaturi smo odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem.

4.3 SINTEZA DIPEPTIDA IZ BOC-*D*-PHE IN METILNEGA ESTRA INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE

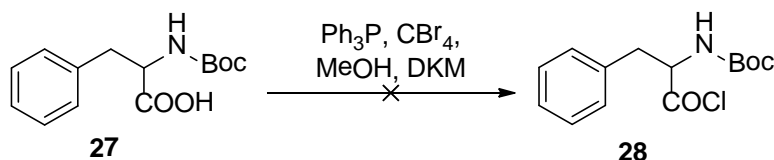
4.3.1 SINTEZA KISLINSKEGA KLORIDA IZ BOC-*D*-PHE-OH



a) BOC-*D*-Phe (**27**) (133 mg; 0,50 mmol) smo raztopili v brezvodnem acetonu (8 mL), prepihali z argonom in med mešanjem dodali CCl₄ (93mg; 0,50 mmol) ter TEA (70 μ L; 0,50 mmol). Po 3 urah mešanja na sobni temperaturi smo reakcijsko zmes filtrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Dobljeno spojino smo takoj uporabili za reakcijo pripajanja spojine **29**.

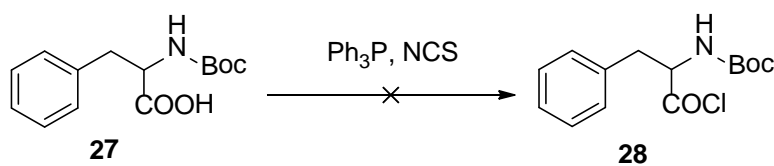


b) CCl₄ (92 mg; 0,50 mmol) smo raztopili v brezvodnem DKM (3 mL), bučko postavili na zmes ledu in vode, prepihali z argonom, med mešanjem dodali *N*-metilmorfolin (165 μ L; 1,50 mmol) in po nastanku suspenzije smo dodali v DKM (1 mL) raztopljeno spojino **27** (398 mg; 1,50 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali še 3 ure pri 0 °C in dobljeno spojino takoj uporabili za reakcijo pripajanja spojine **29**.



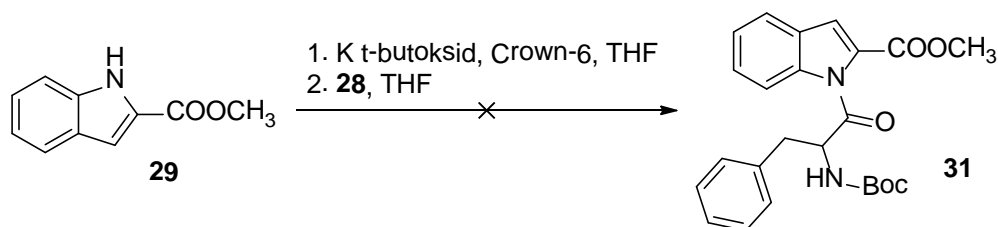
c) Spojino **27** (265 mg; 1,00 mmol) smo raztopili v brezvodnem DKM (15 mL), prepihali z argonom in med mešanjem dodali Ph₃P (289 mg; 1,10 mmol) ter CBr₄ (372 mg; 1,10 mmol). Po 10 minutah mešanja pri 0 °C smo dvignili temperaturo na 40 °C, dodali metanol

in mešali na sobni temperaturi še 24 ur. Dobljeno spojino smo takoj uporabili za reakcijo pripajanja spojine **29**.



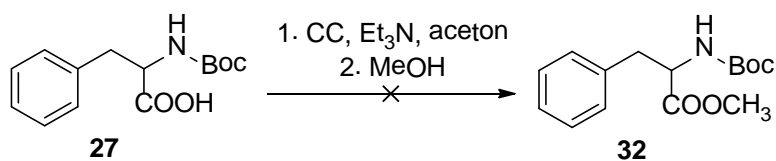
d) Spojino **27** (265 mg; 1,00 mmol) smo raztopili v brezvodnem DKM (10 mL), prepihali z argonom, med mešanjem dodali Ph_3P (262 mg; 1,00 mmol) in NCS (150 mg; 1,10 mmol) ter mešali na sobni temperaturi še 24 ur. Dobljeno spojino smo takoj uporabili za reakcijo pripajanja spojine **29**.

4.3.2 PRIPAJANJE AKTIVIRANEGA BOC-D-PHE NA METILNI ESTER INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE



Spojino **29** (149 mg; 0,85 mmol) smo raztopili v brezvodnem THF (8 mL), bučko postavili na zmes ledu in vode, prepihali z argonom in med mešanjem dodali kalijev terc-butoksid (116 mg; 0,98 mmol), predhodno raztopljen v THF (1 mL), in Crown-6 (68 mg; 0,26 mmol). Nato smo mešali še 15 minut pri 0 °C in potem počasi dokapavali spojino **28** (1,70 mmol) raztopljeno v brezvodnem THF (13 mL). Temperaturo smo dvignili na sobno temperaturo za 24 ur, potem pa še na 45 °C za 24 ur. Po odparitvi topila pod znižanim tlakom z rotavaporjem smo ostanek v bučki očistili s flash kolono (DKM:MeOH = 15:1).

4.4 PREVERJANJE NASTANKA KISLINSKEGA KLORIDA S TVORBO ESTRA



Spojino **27** (1 g; 3,77 mmol) smo raztopili v brezvodnem acetonu (38 mL), prepihali z argonom in med mešanjem dodali CC (556 mg; 3,02 mmol) ter TEA (522 μ L; 3,77 mmol). Po 2 urah mešanja na sobni temperaturi smo dodali metanol (10 mL) in pustili mešati na sobni temperaturi še 24 ur. Naslednji dan smo odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem, dodali brezvodni DKM (20 mL) in spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 \times 30 mL). Zbrano organsko fazo smo sprali še z nasičeno raztopino NaCl (30 mL), ji dodali Na₂SO₄, filtrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Ostanek v bučki smo očistili s flash kolono (EA:EK = 2:5) in dobili 130 mg spojine, ki jo nismo uspeli identificirati.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 SINTEZA PREKURZORJA P1-P2

Kot izhodno spojino smo vzeli *Z*-arginin, kateremu smo najprej zaščitili dve funkcionalni skupini, in sicer karboksilno skupino s tvorbo metilnega estra z metanolom in SOCl_2 ter gvanidinski del s tvorbo karbamatov z Boc_2O . Pri reakciji z Boc_2O smo dobili tri spojine (**3**, **4** in **5**), ki so se razlikovale glede na vezavo Boc skupine. Največ je nastalo spojine **5** (80,3 %), pri kateri je bila NH_2 skupina gvanidinskega dela prosta (brez Boc zaščite). Zato smo se odločili, da preverimo reaktivnost NH_2 skupine, s čimer smo potrdili našo domnevo, da ta skupina ni dovolj reaktivna, saj se Boc skupina tudi po treh dneh v prisotnosti DMAP ni vezala na prosto NH_2 skupino. Tudi v dvofaznem sistemu ščitenja gvanidinskega dela z Boc_2O ostane NH_2 skupina prosta (spojina **6**), kar zopet dokazuje njeno nereaktivnost.

Pri odstranjevanju *Z* zaščite spojine **5** s katalitskim hidrogeniranjem je nastala spojina **7**, pri kateri je prišlo do vezave Boc skupine na NH_2 skupino na mesto *Z*-zaščite. Glede na to, da reakcija pripajanja med spojino **8** in aktivirano indol-2-karboksilno kislino ni potekla, lahko predvidevamo, da je do vezave Boc skupine na prosto NH_2 skupino prišlo tudi pri katalitskem hidrogeniranju spojine **6**. Poizkusili smo narediti tudi katalitsko hidrogeniranje spojine **5** v kislih pogojih, vendar reakcija ni potekla v redu, saj smo dobili spojino, ki je nismo mogli določiti z analizo NMR.

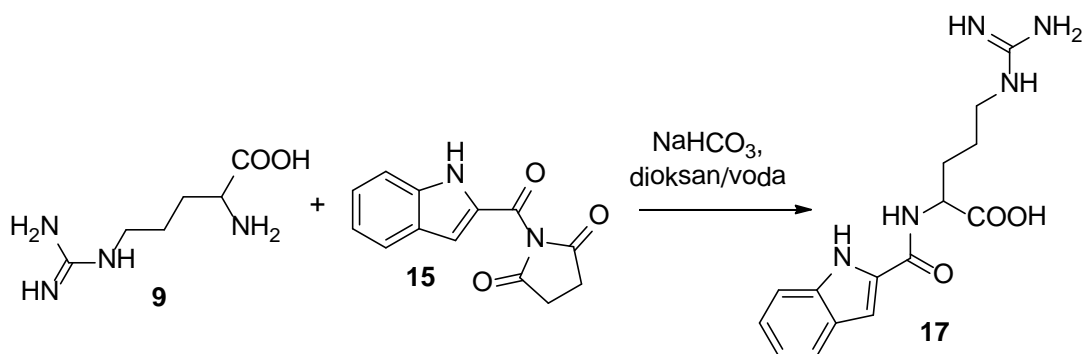
Indol-2-karboksilno kislino smo poskusili aktivirati na več načinov (v obliki kislinskega klorida (KK), anhidrida, s pomočjo TBTU in *N*-hidroksisukcinimidom) (preglednica II), vendar je bilo aktiviranje uspešno le z *N*-hidroksisukcinimidom, kjer smo dobili spojino **15** z dobrim izkoristkom (53,8 %). Da je sinteza KK, anhidrida in aktivacija s TBTU problematična, smo ugotovili, ko smo izvedli reakcije pripajanja z derivati arginina. Ker so KK karboksilnih kislin najbolj reaktivni in s tem nestabilni, predvidevamo, da so razpadli predno bi jih lahko uporabili v nadaljnjih reakcijah ali pa niso nastali. Zato smo se odločili, da nastanek KK na koncu preverimo s pomočjo sinteze estra Boc-*D*-Phe.

Preglednica II: Reagenti, topila, baze oziroma katalizatorji, ki smo jih uporabili za aktivacijo indol-2-karboksilne kisline

način aktivacije	reagent	topilo	baza/katalizator
kislinski klorid	(COCl) ₂	DKM	DMF
	SOCl ₂	DKM	DMF
	SOCl ₂	toluen	piridin
	SOCl ₂	DKM	/
anhidrid	indol-2-karboksilna kislina	DKM	DIC
derivat TBTU	TBTU	DMF	N-metilmorfolin
	TBTU	DKM	N-metilmorfolin
derivat sukcinimida	<i>N</i> -hidroksisukcinimid	THF	/

Reakcijo pripajanja derivata arginina in aktivirane indol-2-karboksilne kisline s TBTU smo najprej izvedli s spojino **8**, za katero predvidevamo (na podlagi spojine **7**), da ni zreagirala zaradi vezave Boc skupine pri katalitskem hidrogeniranju na NH₂ skupino. Zato smo reakcijo ponovili z etilnim estrom arginina (spojina **10**), kjer tudi nismo dobili želenega produkta. Na podlagi reakcije pripajanja spojine **10** in aktivirane indol-2-karboksilne kisline s TBTU sklepamo, da aktivacija indol-2-karboksilne kisline s TBTU ni uspela.

Glede na vse dobljene rezultate smo se odločili, da izvedemo reakcijo pripajanja še z nezaščitenim argininom (spojina **9**) in aktivirano indol-2-karboksilno kislino z *N*-hidroksisukcinimidom, ki je dala želeni produkt prekursor P1-P2 (spojina **17**) (slika 25). Ugotovili smo, da funkcionalnih skupin arginina ni potrebno zaščititi, saj sta gvanidinski del in karboksilna skupina dovolj nereaktivna, da ne vstopata v reakcijo pripajanja z aktivirano indol-2-karboksilno kislino. Tudi izkoristek reakcije je dober (32,5 %).



Slika 25: Sinteza prekursorja P1-P2

5.2 SINTEZA PREKURZORJA P3

Izhodni spojini za sintezo prekursorja P3 sta bili fenilmlečna kislina in fenilalanin. Najprej smo pripravili spojino **23**. Sintezna pot spojine **23** je vključevala zaščito COOH skupine v obliki metilnega estra (spojina **21**), nato zaščito proste OH skupine z benzilno zaščito (spojina **22**) in hidrolizo metilnega estra spojine **22**.(47) Pri uvedbi benzilne zaščite smo za topilo uporabili DMF, ker je pri reakciji, kjer smo uporabili topilo THF nastal gel v katerem reakcija ni potekla.

Sledilo je pripajanje spojine **23** na fenilalanin z zaščiteno COOH skupino v obliki metilnega estra (spojina **19**), ki smo ga pripravili po uveljavljenem postopku s SOCl₂ in metanolom. Spojina **23** in EDC tvorita intermediat *O*-acilisoureo, ki reagira z amsko skupino spojine **19** in po odcepu derivata sečnine nastane spojina **24**. Za zmanjšanje racemizacije in povečanje izkoristka smo dodali HOBt. Dobili smo dve spojini, in sicer spojino **24a** in spojino **24b**, ki sta stereoizomeri in imata podobne vrednosti NMR analize in različna R_f (spojina **24a** 0,32 in spojina **24b** 0,25). Stranska produkta, ki lahko nastaneta pri tej reakciji sta kislinski anhidrid, ki ni problematičen, saj reagira z aminom in nastane zeleni amidni produkt (spojina **24**) in pa stabilna *N*-acilurea, ki nastane po premestitvi nestabilnega intermedjata *O*-acilisouree. Premestitev lahko zmanjšamo z uporabo topil z nizko dielektrično konstanto, zato smo uporabili DKM. (48, 49)

Spojino **24b** smo brez težav hidrolizirali z LiOH v THF z visokim izkoristkom (95 %) in dobili spojino **25**, ki smo jo želeli pretvoriti v KK. Tu smo zopet naleteli na problem, ki ga z zamenjavo reagentov in topil (preglednica III) nismo uspeli rešiti, zato tudi nismo sintetizirali končnega produkta.

Preglednica III: Uporabljeni reagenti, topila, baze, katalizatorji in temperatura/čas segrevanja za tvorbo KK iz spojine **25**

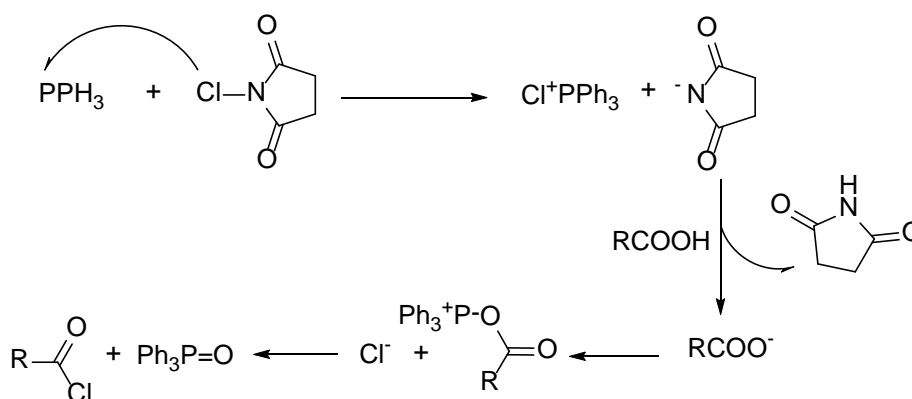
reagent	topilo	baza/katalizator	temperature/čas
(COCl) ₂	DKM	TEA/DMF	45°C/30 min
SOCl ₂	DKM	/	45°C/1 uro
CC	aceton	TEA	sobna temperatura/2 uri

5.3 SINTEZA DIPEPTIDA IZ BOC-*D*-PHE IN METILNEGA ESTRA INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE

Ker nam ni uspelo tvoriti KK na spojini **25**, smo se odločil, da naredimo dipeptid iz Boc-*D*-Phe in metilnega estra indol-2-karboksilne kisline, na katerega bi nato pripajali fenilmlečno kislino in arginin. Začeli smo s sintezo KK iz Boc-*D*-Phe, na katerega bi nato pripajali metilni ester indol-2-karboksilne kisline. KK smo tvorili z različnimi reagenti in topili ob dodatku baze ali katalizatorja (preglednica IV), vendar so bili vsi poskusi neuspešni. Tudi tvorba KK s Ph_3P in NCS, ki poteka po znanem mehanizmu (slika 25), ni prinesla želenih rezultatov. Nastanek KK smo ugotavljali posredno z reakcijo pripajanja metilnega estra indol-2-karboksilne kisline. Reakcijo pripajanja KK in amina smo izvedli s kalijevim terc-butoksidom, kateremu smo povečali bazičnost z dodatkom kronskega etra, ki je vezal kalij in povečal bazičnost terc-butoksidu, vendar želenega produkta (spojine **30**) nismo dobili.

Preglednica IV: Reagenti, topila, baze/katalizatorji, uporabljeni za tvorbo KK Boc-*D*-Phe

reagent	topilo	baza/katalizator
CC	aceton	TEA
CC	DKM	N-metilmorfolin
Ph_3P	DKM	CBr_4
Ph_3P	DKM	NCS



Slika 25: Mehanizem sinteze KK s Ph_3P in NCS

5.4 PREVERJANJE NASTANKA KISLINSKEGA KLORIDA S TVORBO ESTRA

Zaradi mnogih neuspešnih reakcij pripajanj, smo se odločili, da preverimo ali KK nastane pri sintezi s CC kot reagentom in bazo TEA. CC je znan reagent za tvorbo KK, ki se uporablja tudi namesto oksalil klorida pri Swernovi oksidaciji. Bazo TEA pa smo uporabili za odtegnitev protona. Razpadu KK smo se izognili tako, da smo delali v inertni atmosferi in metanol dodali neposredno v reakcijsko zmes brez odparitve topila pod znižanim tlakom z rotavaporjem. Po pričakovanju bi moral nastati metilni ester Boc-*D*-Arg (spojina **32**), ki pa ga pri izolaciji s flash kolono nismo dobili. S tem smo potrdili, da je nastanek KK problematičen in je potrebno sintezo načrtovati po drugih poteh.

6 SKLEP

Sinteza prekursorja P1-P2 (spojina **17**) ni problematična. Tvorimo ga neposredno iz arginina in aktivirane indol-2-karboksilne kisline z *N*-hidroksisukcinimidom, saj se je NH₂ skupina gvanidinskega dela, kot tudi celoten gvanidinski del molekule, izkazala za dovolj stabilno strukturo pri pripajanju na aktivirano indol-2-karboksilno kislino. Prav tako smo uspešno sintetizirali prekursor P3 (spojina **25**) iz fenilmlečne kisline in fenilalanina, kljub temu, da sintezna pot vključuje več korakov, zaradi zaščite in odščite funkcionalnih skupin. Pripajanje prekursorja P1-P2 in prekursorja P3 pa je problematično, saj ne moremo tvorit kislinskega klorida iz prekursorja P3 pod takimi pogoji, da bi že obstoječa amidna vez ostala stabilna. Kljub nedokončani sintezi, ki smo si jo zastavili pri diplomski nalogi, pa smo uspeli pridobiti dele ciljne molekule, kot sta spojini **17** in **25**, ki so stabilni in uporabni za druge sintezne poti antitrombotičnih učinkovin.

Sinteza analogov spumiginov, kot potencialnih antitrombotičnih, učinkovin se je tako izkazala za zelo zahtevno, saj na pogled preprosta struktura tetrapeptida v sebi skriva sintezno zelo zahtevni skelet molekule.

7 LITERATURA

- 1 Pike RN, Buckle AM, le Bonniec BF, Church FC: Control of the coagulation system by serpins. Getting by with a little help from glycosaminoglycans. *FEBS Journal* 2005; 272: 4842-4851
- 2 Wang G, Goyal N, Hopkinson B: Preparation of L-proline based aeruginosin 298-A analogs: Optimization of the P₁-moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2009; 19: 3798-3803
- 3 <http://www.marex.fi/> (Dostopano 1. 09. 2013)
- 4 Burke WA: Cutaneous reactions to marine sponges and bryozoans. *Dermatologic Therapy* 2002; 15: 26-29
- 5 Müller WEG, Wang X, Cui FZ, Jochum KP, Tremel W, Bill J, Schröder, Natalio F, Schloßmacher U, Wiens M: Sponge spicules as blueprints for the biofabrication of inorganic-organic composites and biomaterials. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009; 83: 39-413
- 6 Clavico EEG, Muricy G, da Gama BAP, Batista D, Ventura CRR, Pereira RC: Ecological roles of natural products from the marine sponge *Geodia corticostylifera*. *Marine Biology* 2006; 148: 479-488
- 7 <http://www.marinespecies.org/porifera/porifera.php?p=browser&id=164811&expand=false#ct> (Dostopano 1. 09. 2013)
- 8 http://www.svarog.si/biologija/index.php?page_id=7772 (Dostopano 1. 09. 2013)
- 9 Selvin J, Kennedy J, Lejon DPH, Kiran G S, Dobson ADW: Isolation identification and biochemical characterization of a novel halo-tolerant lipase from the metagenome of the marine sponge *Haliclona simulans*. *Microbial Cell Factories* 2012; 11: 72
- 10 Selvin J, Ninawe AS, Kiran GS, Lipton AP: Sponge-microbial interactions: Ecological implications and bioprospecting avenues. *Critical Reviews in Microbiology* 2010; 36: 82-90
- 11 Xi L, Ruan J, Huang Y: Diversity and Biosynthetic Potential of Culturable Actinomycetes Associated with Marine Sponges in the China Seas. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13: 5917-5932
- 12 Webster NS: Sponge disease: a global threat?. *Environmental Microbiology* 2007; 9: 1363-1375

- 13 Rateb ME, Houssen WE, Legrave NM, Clements C, Jaspars M, Ebel R: Dibenzofurans from the marine sponge-derived ascomycete Super1F1-09. *Botanica Marina* 2010; 53: 499-506
- 14 Mollica A, Locatelli M, Stefanucci A, Pinnen F: Synthesis and Bioactivity of Secondary Metabolites from Marine Sponges Containing Dibrominated Indolic Systems. *Molecules* 2012; 17: 6083-6099
- 15 Phelan RW, O'Halloran JA, Kennedy J, Morrissey JP, Dobson ADW, O'Gara F, Barbosa TM: Diversity and bioactive potential of endospore-forming bacteria cultured from the marine sponge *Haliclona simulans*. *Journal of Applied Microbiology* 2011; 112: 65-78
- 16 Rivera AP, Uy MM: In Vitro Antioxidant and Cytotoxic Activities of Some Marine Sponges Collected off Misamis Oriental Coast, Philippines. *E-Jurnal of Chemistry* 2012; 9: 354-358
- 17 O'Keefe BR, Beutler JA, Cardellina II JH, Gulakowski RJ, Krepps BL, McMahon JB, Sowder II RC, Henderson LE, Pannell LK, Pomponi SA, Boyd MR: Isolation and characterization of niphatevirin, a human-immunodeficiency-virus-inhibitory glycoprotein from the marine sponge *Niphates erecta*. *Eur. J. Biochem.* 1997; 245: 47-53
- 18 Tabares P, Degel B, Schaschke N, Hentschel U, Schirmeister T: Identification of the protease inhibitor miraziridine A in the Red sea sponge *Theonella swinhoei*. *Phcog Res* 2012; 4: 63-66
- 19 Sipkema D, Franssen MCR, Osinga R, Tramper J, Wijffels RH: Marine Sponges as Pharmacy. *Marine Biotechnology* 2005; 7: 142-162
- 20 Klöppel A, Pfannkuchen M, Putz A, Proksch P, Brümmer F: Ex situ cultivation of *Aplysina aerophoba* close to in situ conditions: ecological, biochemical and histological aspects. *Marine Ecology* 2008; 29: 259-272
- 21 Cebrian E, Uriz MJ, Garrabou J, Ballesteros E: Spong Mass Mortalities in a Warming Mediterranean Sea: Are Cyanobacteria-Harboring Species Worse Off?. *PLoS ONE* 2011; 6: 1-13
- 22 Ersmark K, Del Valle JR, Hanessian S: Chemistry and Biology of the Aeruginosin Family of Serine Protease Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008; 47: 1202-1223
- 23 Hanessian S, Del Valle JR, Xue Y, Blomberg N: Total Synthesis and Structural Confirmation of Chlorodysinosin A. *J Am Chem Soc* 2006; 128: 10491-10495

- 24 Fukuta Y, Ohshima T, Gnanadesikan V, Shibuguchi T, Nemoto T, Kisugi T, Okino T, Shibasaki M: Enantioselective syntheses and biological studies of aeruginosin 298-A and its analogs: Application of catalytic asymmetric phase-transfer reaction. *PNAS* 2004; 101: 5433-5438
- 25 Fewer DP, Jokela J, Rouhiainen L, Wahlsten M, Koskenniemi K, Stal LJ, Sivonen K: The non-ribosomal assembly and frequent occurrence of the protease inhibitors spumigins in the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Molecular Microbiology* 2009; 73: 924-937
- 26 Mazur-Marzec H, Kaczkowska MJ, Blaszczyk A, Akcaalan R, Spoof L, Meriluoto J: Diversity of Peptides Produced by *Nodularia spumigena* from Various Geographical Regions. *Mar. Drugs* 2013; 11: 1-19
- 27 <http://www.protease.net.au/index.php> Australina Protease Network (APN) (Dostopano 1. 09. 2013)
- 28 Donpuksa S, Tassanakajon A, Rimphanitchayakit V: Domain inhibitory and bacteriostatic activities of the five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology* 2009; 33: 481-488
- 29 <http://merops.sanger.ac.uk/whatsnew.shtml> (Dostopano 1. 09. 2013)
- 30 Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ: MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 2008; 36: 320-325
- 31 Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A: MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research* 2012; 40: 343-350
- 32 González- González Y, Gil D, Alonso-del-Rivero M, Besada V, Gil J, Araujo MS, Tanaka AS, Pons T, Chavez M: Novel protease inhibitors active against human neutrophil elastase and plasma kallikrein with therapeutic potentialities: Structure-function relationships. *Bioteconología Aplicada* 2010; 27: 310-313
- 33 Huntington JA: Serpin structure, function and dysfunction. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 26-34
- 34 Mulenga A, Khumthong R, Chalaire KC: *Ixodes scapularis* tick serine proteinase inhibitor (serpin) gene family; annotation and transcriptional analysis. *BMC Genomics* 2009; 10: 217
- 35 Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ: Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* 2004; 378: 705-716

- 36 Ribarič S: Temelji patološke fiziologije, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2009: 151-159
- 37 Košnik M et al.: Interna medicina, 4. izdaja, Littera Picta, Ljubljana, 2011: 1360-1365
- 38 Patnaik MM, Moll S: Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia* 2008; 14: 1229-1239
- 39 <http://www.stoptheclot.org/News/article138.htm> (Dostopano 1. 09. 2013)
- 40 <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/intro.html#2> (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)) (Dostopano 1. 09. 2013)
- 41 Hedstrom L: Serin Protease Mechanism and Specificity. *Chem. Rev.* 2002; 102: 4501-4523
- 42 http://biochem.slu.edu/services/serprodb/ser_pro_overview.html (Dostopano 1. 09. 2013)
- 43 Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G: Rang and Dale's Pharmacology, 7th ed., Elsevier Inc., Spain, 2012: 294-307
- 44 Fauci AS et al.: Harrison's principles of internal medicine, 17th ed., McGraw-Hill, USA, 2008: 363-369
- 45 Bohinjec J: Temelji klinične hematologije, DDU Univerzum, Ljubljana, 1983: 149-154
- 46 Hanessian S: Structure-based synthesis: From natural products to drug prototypes. *Pure Appl. Chem.* 2009; 81: 1085-1091
- 47 Članek C – sinteza spojine 23
- 48 <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/steglich-esterification.shtm> (Dostopano 1. 09. 2013)
- 49 <http://en.wikipedia.org/wiki/Carbodiimide> (Dostopano 1. 09. 2013)