

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**ANŽE RUPNIK**

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA DERIVATOV AZETIDIN-2-  
ONA KOT POTENCIALNIH ZAVIRALCEV PENICILIN  
VEZOČIH PROTEINOV IZ REZISTENTNIH SEVOV**

**DIPLOMSKA NALOGA**

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**ANŽE RUPNIK**

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA DERIVATOV AZETIDIN-2-  
ONA KOT POTENCIALNIH ZAVIRALCEV PENICILIN  
VEZOČIH PROTEINOV IZ REZISTENTNIH SEVOV**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF AZETIDIN-2-ONE DERIVATIVES AS  
POTENTIAL INHIBITORS OF PENICILLIN-BINDING PROTEINS FROM  
RESISTANT STRAINS**

**DIPLOMSKA NALOGA**

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Izidorja Sosiča, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Stanislavu Gobcu za dodelitev teme diplomske naloge in njegovo pomoč pri pisanju le-te.

Za pregled diplomske naloge se zahvaljujem predsednici komisije prof. dr. Mariji Bogataj in članici komisije asist. dr. Meti Kokalj.

Posebna zahvala gre somentorju asist. dr. Izidorju Sosiču za njegov trud, pomoč in vzpodbudo pri raziskovalnem delu ter pri pisanju naloge.

Ob tem se zahvaljujem tudi naslednjim raziskovalcem na katedri za farmacevtsko kemijo za vse njihove nasvete povezane z laboratorijskim delom: Urban Košak, asist. dr. Matej Živec, Aleš Žula, doc. dr. Žiga Jakopin, asist. dr. Roman Šink, Žiga Hodnik in doc. dr. Nace Zidar.

Posebna zahvala gre tudi mojemu dekletu Niki, moji družini in prijateljem za vso podporo pri pisanju diplomske naloge.

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorja asist. dr. Izidorja Sosiča, mag. farm.

Ljubljana, 2014

Anže Rupnik

## KAZALO VSEBINE

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1	BAKTERIJSKE OKUŽBE .....	1
1.2	BAKTERIJSKA REZISTENCA .....	1
1.3	RAZDELITEV PROTIBAKTERIJSKIH UČINKOVIN GLEDE NA NJIHOVE TARČE .....	4
1.3.1	Protibakterijske učinkovine, ki motijo biosintezo ali delovanje folata .....	4
1.3.2	Protibakterijske učinkovine, ki zavirajo biosintezo bakterijskih proteinov .....	4
1.3.3	Protibakterijske učinkovine, ki zavirajo prevajanje in podvajanje bakterijske DNA .....	5
1.3.4	Protibakterijske učinkovine, ki motijo biosintezo celične stene .....	5
1.4	BAKTERIJSKA CELIČNA STENA .....	6
1.5	PEPTIDOGLIKAN .....	8
1.6	PENICILIN VEZOČI PROTEINI (PBP, PENICILLIN-BINDING PROTEINS). 10	
1.6.1	PBP iz rezistentnih sevov .....	13
1.7	$\beta$ -LAKTAMSKI ANTIBIOTIKI.....	14
1.8	MONOBAKTAMI.....	16
<b>2</b>	<b>NAMEN IN NAČRT DELA</b> .....	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>19</b>
3.1	MATERIALI.....	19
3.2	METODE.....	20
<b>4</b>	<b>EKSPERIMENTALNO DELO</b> .....	<b>22</b>
4.1	SINTEZA 2-(( <i>TERC</i> -BUTOKSIKARBONIL)AMINO)-3-HIDROKSI- PROPANOJSKE KISLINE (1) .....	22
4.2	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL (1-((BENZILOKSI)AMINO)-3-HIDROKSI-1- OKSOPROPAN-2-IL)KARBAMATA (2).....	23
4.3	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL (1-(BENZILOKSI)-2-OKSOAZETIDIN-3- IL)KARBAMATA (3).....	24
4.4	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL (2-OKSOAZETIDIN-3-IL)KARBAMATA (4) .....	25
4.5	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL BENZIL(1-BENZIL-2-OKSOAZETIDIN-3- IL)KARBAMATA (5).....	26

4.6	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL BENZIL(1-BENZIL-2-OKSOAZETIDIN-3-IL)KARBAMATA (5) IN <i>TERC</i> -BUTIL (1-BENZIL-2-OKSOAZETIDIN-3-IL)KARBAMATA (6).....	27
4.7	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL 3-FLUOROBENZIL(1-(3-FLUOROBENZIL)-2-OKSOAZETIDIN-3-IL)KARBAMATA (7).....	29
4.8	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL 3-FLUOROBENZIL(1-(3-FLUOROBENZIL)-2-OKSOAZE- TIDIN-3-IL)KARBAMATA (7) IN <i>TERC</i> -BUTIL (1-(3-FLUOROBENZIL)-2-OKSOAZETIDIN-3-IL)KARBAMATA (8) .....	30
	ODSTRANITEV <i>TERC</i> -BUTILNE ZAŠČITNE SKUPINE .....	31
4.9	ODŠČITA 1-BENZIL-3-(BENZILAMINO)AZETIDIN-2-ONA (9) .....	31
4.10	ODŠČITA 3-AMINO-1-BENZILAZETIDIN-2-ONA (10) .....	32
4.11	ODŠČITA 1-(3-FLUOROBENZIL)-3-((3-FLUOROBENZIL)AMINO)-AZETIDIN-2-ONA (11) .....	33
4.12	ODŠČITA 3-AMINO-1-(3-FLUOROBENZIL)AZETIDIN-2-ONA (12) .....	34
5	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	36
5.1	<b>KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV</b> .....	36
5.1.1	Sinteza 2-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-3-hidroksipropanojske kisline (1) .....	36
5.1.2	Sinteza <i>terc</i> -butil (1-((benziloksi)amino)-3-hidroksi-1-oksopropan-2-il)karbamata (2) .....	37
5.1.3	Sinteza <i>terc</i> -butil (1-(benziloksi)-2-oksoazetidin-3-il)karbamata (3) .....	40
5.1.4	Sinteza <i>terc</i> -butil (2-oksoazetidin-3-il)karbamata (4).....	43
5.1.5	Sinteza končnih s <i>t</i> -butil karbonatom zaščiteneh spojin (spojine 5-8) .....	43
5.1.6	Sinteza končnih odščiteneh spojin (spojine 9-12) .....	46
5.1.7	Neuspešen poskus sinteze nekaterih končnih spojin .....	46
5.2	<b>BIOKEMIJSKO VREDNOTENJE PRIPRAVLJENIH SPOJIN NA REZISTENTNIH PBP</b> .....	48
6	<b>SKLEP</b> .....	50
7	<b>VIRI</b> .....	51

## KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz zgradbe celične stene po Gramu pozitivnih (levo) in po Gramu negativnih (desno) bakterij. Povzeto po [3].....	7
Slika 2: Shematski prikaz dveh najpogostejših tipov zgradbe peptidoglikana. Prikazano je tudi prečno premreženje pri <i>E. coli</i> (levo) in pri <i>S. aureus</i> (desno). Povzeto po [12].....	9
Slika 3: Razdelitev $\beta$ -laktamskih antibiotikov. Označen je $\beta$ -laktamski obroč (azetidin-2-on), ki je skupen fragment vsem $\beta$ -laktamskim antibiotikom. Povzeto po [17].....	14
Slika 4: Prikaz transpeptidazne aktivnosti PBP v sintezi peptidoglikana (Shema 1) in principa inhibicije PBP z $\beta$ -laktamskim antibiotikom (Shema 2). Povzeto po [18]. ....	15
Slika 5: Aztreonam .....	16
Slika 6: Spojina BAL30072.....	17
Slika 7: Shematski prikaz načrta dela.....	18
Slika 8: Sinteza amidne vezi ob prisotnosti karbodiimida (A) in sinteza amidne vezi ob prisotnosti karbodiimida in HOBt (B). Povzeto po [25]. ....	38
Slika 9: TBTU .....	39
Slika 10: Mehanizem tvorbe amidne vezi ob prisotnosti sklopitvenega reagenta TBTU. Povzeto po [25].....	39
Slika 11: Mehanizem Mitsunobujeve reakcije. Prirejeno po [30].....	41
Slika 12: Mitsunobujeva reakcija poteka v zaprtem sistemu v inertni atmosferi.....	42
Slika 13: Mehanizem odstranitve Boc zaščitne skupine s $\text{CF}_3\text{COOH}$ . Povzeto po [35].....	46
Slika 14: Primer neuspešnih poskusov sinteze končnih spojin. ....	47
Slika 15: Spojini 7 in 11, ki sta pokazali največ zaviralnega potenciala. ....	49

## KAZALO TABEL

Tabela I: PBP razreda A desetih najbolj pomembnih in najbolj preučevanih bakterij. Povzeto po [8].....	11
Tabela II: PBP razreda B desetih najbolj pomembnih in najbolj preučevanih bakterij. Povzeto po [8].....	12
Tabela III: PBP razreda C desetih najbolj pomembnih in najbolj preučevanih bakterij. Povzeto po [8].....	12
Tabela IV: Želene sintetizirane končne spojine. $\text{R}^1$ in $\text{R}^2$ predstavljata fragmente sintetiziranih spojin. ....	18

Tabela V: Uporabljeni reagenti in produkti, ki smo jih tudi želeli poleg uspešno sintetiziranih produktov sintetizirati z uporabo baz NaH ali Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> . .....	45
Tabela VI: Uporabljeni reagenti in pričakovana produkta, ki smo ju želeli sintetizirati s postopkom predstavljenim v podpoglavju 5.1.7.....	47
Tabela VII: Rezidualne aktivnosti sintetiziranih spojin, izražene v %.....	49

## **POVZETEK**

Protibakterijske učinkovine so pomembna skupina zdravil, ki nam zagotavlja obrambo pred bakterijskimi okužbami. Pomembne tarče protibakterijskih učinkovin predstavljajo številni encimi udeleženi v biosintezi bakterijske celične stene oz. njenega sestavnega dela, peptidoglikana. Najbolj poznani encimi, ki sodelujejo v ključnih korakih biosinteze peptidoglikana, so makromolekule, imenovane penicilin vezoči proteini oz. PBP (penicillin-binding proteins). Ti so že več desetletij tarča  $\beta$ -laktamskih antibiotikov, ki posnemajo naravni substrat teh encimov. Ob vezavi v aktivno mesto encima le-tega ireverzibilno zavrejo in posledično preprečijo biosintezo in popravilo peptidoglikana, zaradi česar je bakterijska celica podvržena lizi in celični smrti. Zaradi povečanega širjenja bakterijske odpornosti na številne protibakterijske učinkovine se v zadnjem času išče nove učinkovine, ki bi lahko premostile to, vse bolj perečo težavo zdravljenja bakterijskih okužb.

V diplomskem delu smo se posvetili načrtovanju in sintezi novih  $\beta$ -laktamskih protibakterijskih učinkovin s potencialom zaviranja PBP iz na antibiotike odpornih sevov. Odločili smo se za derivate azetidin-2-ona, ki so monobaktamski tip  $\beta$ -laktamskih antibiotikov, saj so zaradi svoje majhne in preproste strukture sintezno zanimivi. Pripravili smo osem derivatov azetidin-2-ona in jih tudi biokemijsko ovrednotili z določitvijo rezidualne aktivnosti treh PBP, dveh iz rezistentnih sevov in enega iz nerezistentega seva, po inkubaciji s pripravljenimi spojinami.

## **KLJUČNE BESEDE**

Bakterijska odpornost, azetidin-2-on, PBP,  $\beta$ -laktamski antibiotiki, peptidoglikan.



## **ABSTRACT**

Antibacterial agents represent very important group of medicines, which provide us with the defence against bacterial infections. Highly important targets of antibacterial drugs are numerous enzymes involved in the biosynthesis of peptidoglycan, the most important component of bacterial cell wall. The most relevant enzymes that are involved in the key steps of peptidoglycan biosynthesis are macromolecules called penicillin-binding proteins (PBPs). They have been the target of  $\beta$ -lactam antibiotics for many decades. These compounds mimic their natural substrate and upon binding into the active site of PBPs they cause irreversible inhibition of the enzyme. Thus, the biosynthesis and repair of peptidoglycan is prevented and these events lead to bacterial cell lysis and eventually its death. Due to the increased spread of bacterial resistance to a number of antibacterial agents, efforts to find new active ingredients have been undertaken. Hopefully, novel compounds could overcome the ever more pressing problem of the treatment of bacterial infections.

In this diploma thesis, we focused on the design and synthesis of new  $\beta$ -lactam antibacterial agents with the potential to inhibit PBPs from resistant strains. We prepared azetidin-2-one derivatives that are monobactam-type  $\beta$ -lactam antibiotics. Owing to their simple structure and available synthesis the compounds of this structural type represent very interesting antibacterial scaffolds. We prepared eight derivatives of azetidin-2-one that were also biochemically evaluated by determining the residual activities of the three PBPs after incubation with the synthesised compounds. Two PBPs were isolated from resistant strains and one was isolated from penicillin-sensitive strain.

## **KEY WORDS**

Bacterial resistance, azetidin-2-one, PBP,  $\beta$ -lactam antibiotics, peptidoglycan.

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>Ala</b>	alanin
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -butiloksikarbonil
<b>Boc<sub>2</sub>O</b>	di- <i>tert</i> -butil dikarbonat
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	diklorometan
<b>CH<sub>3</sub>CN</b>	acetonitril
<b>d</b>	dublet
<b>dd</b>	dublet dubleta
<b>DEAD</b>	dietil azodikarboksilat
<b>DIAD</b>	diizopropil azodikarboksilat
<b>DMAP</b>	4-dimetilaminopiridin
<b>DMF</b>	dimetilformamid
<b>DMSO-<i>d</i><sub>6</sub></b>	devteriran dimetil sulfoksid
<b>EDC</b>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
<b>ESI</b>	elektrozpršilna ionizacija (ang. electrospray ionisation)
<b>Et<sub>2</sub>O</b>	dietileter
<b>Et<sub>3</sub>N</b>	triethylamin
<b>EtOAc</b>	etilacetat
<b>G-</b>	po Gramu negativne (bakterije)
<b>G+</b>	po Gramu pozitivne (bakterije)
<b>GlcNAc</b>	<i>N</i> -acetilglukozamin
<b>Glu</b>	glutaminska kislina
<b>Gly</b>	glicin
<b>HOBt</b>	hidroksibenzotriazol

<b>HRMS</b>	masna spektroskopija visoke ločljivosti
<b><i>J</i></b>	sklopitvena konstanta
<b>Lys</b>	lizin
<b>m</b>	multiplet
<b>mDAP</b>	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
<b>MeOH</b>	metanol
<b>MRSA</b>	na meticilin odporni <i>Staphylococcus aureus</i> (methicillin-resistant <i>S. aureus</i> )
<b>MS</b>	masna spektroskopija
<b>MurNAc</b>	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
<b>NMR</b>	nuklearna magnetna resonanca
<b>Orn</b>	ornitin
<b>PBP</b>	penicilin vezoči protein (penicillin-binding protein)
<b>Ph<sub>3</sub>P</b>	trifenil fosfin
<b>RA</b>	rezidualna aktivnost
<b>rd</b>	razširjeni dublet
<b>rs</b>	razširjeni singlet
<b>s</b>	singlet
<b>TBTU</b>	<i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronium tetrafluoroborat
<b>THF</b>	tetrahidrofuran
<b>t</b>	triplet
<b>TLC</b>	tankoplastna kromatografija
<b>δ</b>	kemijski premik
<b>λ</b>	valovna dolžina

# 1 UVOD

## 1.1 BAKTERIJSKE OKUŽBE

Bakterijske okužbe so pereča problematika, s katero se človek srečuje že od pradavnine. Skozi zgodovino je človek v bitki z bakterijami dolgo časa stal na strani poražencev, saj ni poznal svojega sovražnika, še več ni ga niti videl. Da je temu res tako, lahko skozi zgodovino vidimo v izbruhu različnih večjih pandemij, kot je na primer izbruh bubonske kuge v 14. stoletju, ki so terjale precej življenj in znatno zmanjšale svetovno populacijo ob izbruhih. Z razvojem znanosti pa se je človeštvo naučilo soočiti s sovražnikom in ga premagati. Sprva je človek spoznal, da mu v boju z bakterijami lahko pomaga narava sama. Odkril je naravne protibakterijske učinkovine, ki jih imenujemo antibiotiki in ki so se izkazali kot odlično orožje v bitki z bakterijami. Z nadaljnjim razvojem znanosti in novimi spoznanji na področju kemije in biologije je človek nato odkril, kako še izboljšati učinkovitost in varnost antibiotikov, in tako sintetiziral prve sintezne protibakterijske učinkovine. Vendar pa so bakterije vedno uspele najti odgovor na to človekovo orožje zoper njih in to počnejo še danes. Tem bakterijskim obrambnim mehanizmom pravimo bakterijska rezistenca oz. odpornost in njen razvoj ves čas ravnovesje tehtnice bitke človeka in bakterijskih okužb preveša na stran slednjih.

## 1.2 BAKTERIJSKA REZISTENCA

Bakterijska odpornost na protibakterijske učinkovine pomeni neuspeh slednjih, da uničijo mikroorganizme oz. zavrejo njihovo razmnoževanje. Lahko je ali intrinzična, kar pomeni, da je prisotna že pred izpostavitvijo učinkovini, ali pa pridobljena, kar pomeni, da se razvije pri izpostavitvi protibakterijski učinkovini.[1] Bakterijska odpornost na antibiotike se lahko širi na tri načine. Lahko se širi preko prenosa rezistentnih sevov bakterij med ljudmi, preko prenosa genov za rezistenco med bakterijami (po navadi na plazmidu) in preko prenosa genov za rezistenco med genetskimi elementi znotraj bakterije (na transpozonih).[2]

Osnova za nastanek bakterijske odpornosti je sprememba genetskega materiala bakterije. Do tega lahko pride preko več mehanizmov:

- 1) Točkovne mutacije gena so spontan pojav pri bakterijah, vendar pa so bolj redke in tudi verjetnost, da se zgodijo v določenem genu in sprožijo odpornost na antibiotik, je zelo majhna. Vendar pa se ta verjetnost drastično poveča ob infekciji, saj takrat naraste število bakterijskih celic in s tem število mutacij. Kljub temu pa prisotnost nekaj mutiranih celic po navadi ni dovolj za razvoj odpornosti, saj človeški imunski odziv ob pomoči antibiotika lahko premaga okužbo. Težava pa se pojavi, če okužbo povzroči na antibiotik odporen sev bakterij.[2,3]
- 2) Sandegren in sodelavci so ugotovili, da je podvajanje gena (duplikacija) pomemben mehanizem rezistence. Antibiotik namreč lahko sproži povečano število kopij že obstoječih genov za rezistenco in s tem število encimov, ki uničijo antibiotik, in črpalk, ki iz bakterije odstranjujejo antibiotik.[4]
- 3) Poleg kromosoma samega pa bakterijske celice lahko vsebujejo tudi več majhnih krožnih molekul DNA, imenovanih plazmidi, ki lahko vsebujejo enega, ali pa več sto genov. Tudi ti so del genetskega materiala bakterijske celice in so zmožni neodvisnega razmnoževanja. Plazmide, ki nosijo gene za rezistenco za antibiotike, imenujemo tudi R plazmidi. Ti lahko nosijo DNA za več različnih encimov, ki so sposobni uničiti strukturno različne antibiotike. Odseki plazmidne DNA lahko migrirajo znotraj bakterijske celice od plazmida do plazmida ali pa od plazmida na kromosom v procesu imenovanem transpozicija, te odseke pa imenujemo transpozoni. V tem procesu se transpozoni lahko vgradijo v akceptorsko DNA. Transpozoni nosijo enega ali več genov za rezistenco in lahko potujejo s plazmidom tudi v drugo bakterijo. Znotraj nje se lahko transpozon vgradi v gostiteljski kromosom ali njene plazmide in tako prenese gene za rezistenco.[2]
- 4) Odpornost oz. odpornost na veliko število strukturno različnih antibiotikov (ang. multi-drug resistance) pa se med bakterijami lahko širi tudi preko genskih kaset. Te so zgrajene iz gena (lahko tudi gena za rezistenco), pripetega na majhno prepoznavno mesto. Več kaset lahko tvori kasetno zbirko, vgrajeno v večjo mobilno DNA enoto, imenovano integron, ki se lahko nahaja na transpozonu. Integron vsebuje gen za encim integrazo (rekombinazo), ki te kasete vgradi na točno določeno mesto na integronu. Preko tega sistema transpozon-integron-kasetna zbirka z multirezistenco se lahko odpornost na veliko število strukturno različnih antibiotikov prenaša zelo učinkovito med genskimi elementi tako znotraj bakterije kakor tudi med bakterijami.[2]

- 5) Bakterije lahko genski material in s tem gene za rezistenco prenašajo tudi med drugimi bakterijami iste in tudi druge vrste s konjugacijo (prenos genetskega materiala med dvema bakterijama preko mostička oz. pilusa), ki je najbolj pogost način, in pa tudi z manj pogostima transdukcijo (prenos genetskega materiala preko virusnega vektorja – bakteriofaga) in transformacijo (ena celica izloči molekulo DNA, ki jo nato privzame druga celica).[1-3,5]

Bakterijska odpornost se na biokemijskem nivoju lahko pokaže preko naslednjih mehanizmov:

- spremenjena celična stena, ki zmanjša ali prepreči vstop antibiotiku v celico,
- aktivno črpanje protibakterijske učinkovine iz celice,
- bakterijska sinteza encimov, ki razgradijo protibakterijsko učinkovino,
- sprememba celične tarče protibakterijske učinkovine, s čimer se spremeni afiniteta le-te do tarče; bakterija lahko celo izrazi dodatno tarčo, s čimer zmanjša oz. izniči učinek protibakterijske učinkovine,
- povečana sinteza tarče protibakterijske učinkovine,
- razvoj poti, ki obide z antibiotikom zavrte biokemijske reakcije.[1-3,5,6]

Dandanes je razvoj bakterijske odpornosti vse bolj agresiven, kar dokazujejo številne opuščene protibakterijske učinkovine, ki niso bile več učinkovite v bitki z bakterijskimi okužbami. Razloge za širjenje bakterijske odpornosti lahko iščemo zlasti v pretirani in neučinkoviti rabi protibakterijskih učinkovin. Pogosto se dogajajo napake, da zdravniki predpisujejo protibakterijske učinkovine pri virusnih obolenjih, da je predpisan napačen antibiotik ali pa je predpisan prenizek odmerek protibakterijske učinkovine, ki bi zagotovil uničenje patogena. Prav tako je en od pglavitnih vzrokov bakterijske odpornosti, da pacienti zdravil za bakterijske okužbe ne jemljejo v skladu navodili. Pogosto se namreč dogaja, da pacienti protibakterijskih zdravil ne jemljejo v predpisanih časovnih intervalih, ali pa enostavno pozabijo vzeti antibiotik. Pogosto se tudi dogaja, da pacienti niti ne dokončajo predpisane terapije. Poleg do sedaj naštetih dejavnikov pa so Bower in sodelavci prepoznali tudi zdravljenje živali z antibiotiki kot pomemben dejavnik širjenja bakterijske odpornosti. Terapija bolnih živali sama po sebi niti ni tako pomembna pri razvoju odpornosti, pač pa subterapevtski odmerki protibakterijskih učinkovin, ki se dodajajo prehrani gojenim živalim, zaradi česar živali bolj učinkovito pridobivajo na masi

in ostajajo dalj časa zdrave, manj pa jih tudi podleže boleznim. To je vodilo do naravne selekcije na antibiotike odpornih mikroorganizmov, živali s takšnimi terapijami pa predstavljajo rezervoar za širjenje bakterijske odpornosti.[3,5,6]

### 1.3 RAZDELITEV PROTIBAKTERIJSKIH UČINKOVIN GLEDE NA NJIHOVE TARČE

Protibakterijske učinkovine lahko glede na mehanizem delovanja oz. tarče razdelimo na naslednje skupine:

- protibakterijske učinkovine, ki motijo biosintezo ali delovanje folata,
- protibakterijske učinkovine, ki motijo biosintezo celične stene,
- protibakterijske učinkovine, ki zavirajo biosintezo bakterijskih proteinov,
- protibakterijske učinkovine, ki zavirajo prevajanje in podvajanje bakterijske DNA.[1,2,3]

#### **1.3.1 Protibakterijske učinkovine, ki motijo biosintezo ali delovanje folata**

V tej skupini najdemo sulfonamide, ki so strukturni analogi *p*-aminobenzojske kisline (PABA, *p*-aminobenzoic acid). PABA je glavni prekurzor pri biosintezi folne kisline, ki jo bakterija potrebuje za sintezo DNA in RNA. Sulfonamidi tekmujejo s PABA za encim dihidropteroat sintetazo, ki sodeluje v sintezi DNA in RNA, in tako zavirajo to sintezo. Iz te skupine protibakterijskih učinkovin se danes v klinični praksi še uporabljajo sulfametoksazol, sulfasalazin in sulfadiazin.

Poleg sulfonamidov v to skupino uvrščamo še trimetoprim, ki je antagonist folata. Strukturno je zelo podoben pteridinskemu delu folata, zaradi česar je sposoben preslepiti in zavreti bakterijsko dihidrofolat reduktazo, pomemben encim v sintezi bakterijske DNA in RNA.[1,2]

#### **1.3.2 Protibakterijske učinkovine, ki zavirajo biosintezo bakterijskih proteinov**

Sem uvrščamo pet širokih skupin protibakterijskih učinkovin. Tetraciklini, ki imajo bakteriostatičen učinek, po privzemu v mikroorganizem z aktivnim transportom tekmujejo

s tRNA za vezavo na ribosom in s tem preprečujejo sintezo bakterijskih proteinov. Predstavniki te skupine so tetraciklin, doksiciklin, oksitetraciklin,...

Naslednja skupina so amfenikoli s kloramfenikolom kot glavnim predstavnikom. Sintezo bakterijskih proteinov zavirajo tako, da se vežejo na 50S podenoto ribosoma, ki je odgovoren za sintezo proteinov, in jo blokirajo. Tudi amfenikoli imajo bakteriostatičen učinek.

Aminoglikozidi, ki imajo v nasprotju s prejšnjima dvema skupinama baktericidni učinek, sintezo bakterijskih proteinov zavirajo tako, da blokirajo njeno iniciacijo. Pomembnejši predstavniki te skupine so gentamicin, tobramicin, neomicin in streptomycin.

Zadnjo pomembnejšo skupino predstavljajo makrolidi, ki imajo tako bakteriostatični kot tudi baktericidni učinek. Bakterijsko sintezo proteinov zavirajo tako, da blokirajo 50S podenoto ribosoma. Glavni predstavniki te skupine so eritromicin, azitromicin in klaritromicin.

Novejša skupina protibakterijskih učinkovin so oksazolidinoni. Sintezo bakterijskih proteinov zavirajo tako, da zavirajo vezavo *N*-formilmethionil-tRNA na 70S ribosom bakterije. Prva učinkovina iz te skupine, ki je bila uvedena na tržišče, je bila linezolid.[1,2]

### **1.3.3 Protibakterijske učinkovine, ki zavirajo prevajanje in podvajanje bakterijske DNA**

Sem uvrščamo kinolone, ki motijo prevajanje in podvajanje bakterijske DNA tako, da zavirajo pomemben encim topoisomerozo II, ki je bakterijska DNA giraza. Ta sicer povzroči negativno superzvitje DNA, s čimer omogoči prepisovanje DNA ali njeno replikacijo. Pomembnejši predstavniki te skupine, ki se uporabljajo v klinični praksi, so ciprofloksacin, levofloksacin, norfloksacin in nalidiksna kislina.[1,2]

### **1.3.4 Protibakterijske učinkovine, ki motijo biosintezo celične stene**

Preko tega mehanizma delovanja delujejo pravzaprav vsi  $\beta$ -laktamski antibiotiki. Glavni princip je motenje biosinteze peptidoglikana, ene poglobitnih komponent celične stene.  $\beta$ -laktamski antibiotiki se vežejo na penicilin vezoče proteine (PBP, penicillin-binding protein) v bakteriji, s čimer zavrejo proces transpeptidacije, tj. premreženje peptidne verige, pripete na hrbtenico peptidoglikana. Vse to vodi do inaktivacije zaviralca avtolitičnih encimov v celični steni, kar vodi do lize bakterijske celice.  $\beta$ -laktamski



antibiotiki so zelo široka skupina protibakterijskih učinkovin, kamor zaradi istega strukturnega fragmenta, tj.  $\beta$ -laktamskega obroča, uvrščamo peniciline, cefalosporine, karbapeneme in monobaktame. Poleg  $\beta$ -laktamskih antibiotikov v to skupino protibakterijskih učinkovin uvrščamo še glikopeptide, katerih glavni predstavnik je vankomicin, in pa glikolipodepsipeptide, katerih predstavniki so bacitracin, D-cikloserin, ramoplanin,...[1-3] V diplomski nalogi bomo posebno pozornost namenili temu mehanizmu delovanja protibakterijskih učinkovin in v nadaljevanju bolj podrobno predstavili  $\beta$ -laktamske antibiotike in še posebej lastnosti in delovanje monobaktamov.

#### 1.4 BAKTERIJSKA CELIČNA STENA

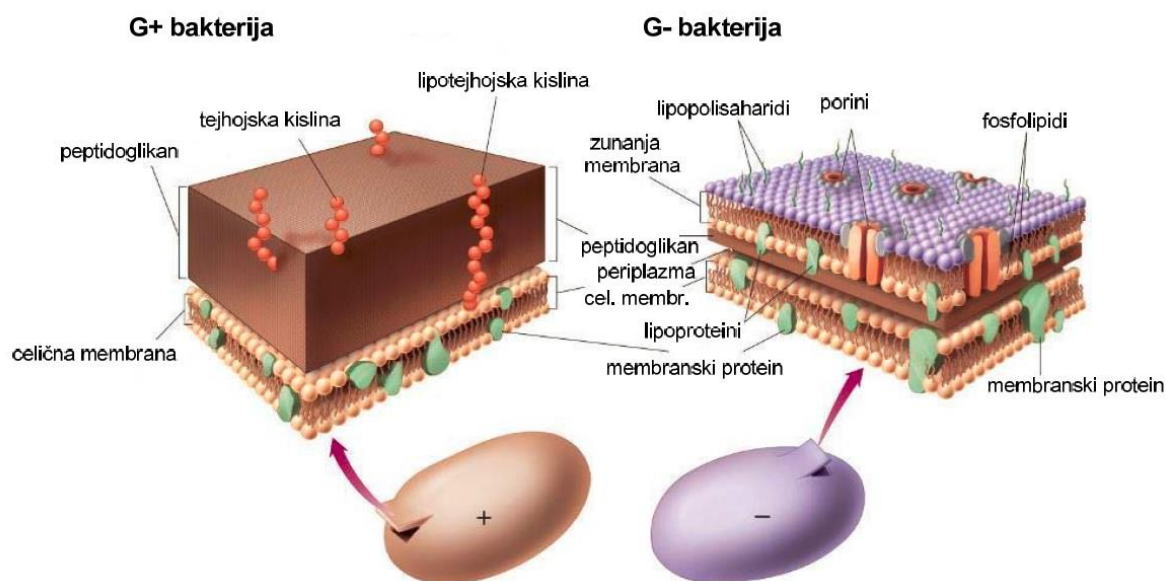
Bakterijska celična stena se bistveno razlikuje od zunanjih slojev sesalskih celic tako po strukturi kot tudi po funkciji, to razliko pa lahko izkoristimo za bolj selektivno terapijo bakterijskih okužb.[1] Glavne naloge bakterijske celične stene so:

- zagotoviti polprepustno bariero med celico in okolico, preko katere lahko prehajajo samo želene substance,
- zagotoviti potrebno trdnost te bariere, da bakterijska celica ostane zaščitena pred spremembami v osmotskem pritisku okolice,
- preprečiti encimom gostitelja, da bi uničil bakterijsko celico.[1]

Bakterije lahko glede na njihovo celično steno v splošnem delimo na dve značilni skupini, in sicer po Gramu pozitivne (G+) in po Gramu negativne (G-) bakterije.

Bakterijska celična stena G+ bakterij je navkljub svoji kompleksnosti bolj preprosta kot pri G- bakterijah (Slika 1). Povsem na zunanjem delu celice so prisotni značilni ogljikovi hidrati in proteini, ki skupaj predstavljajo antigenske determinante, po katerih se ločijo posamezne vrste bakterij med sabo in s katerimi se lahko bakterijska celica veže na določene tarčne celice.[1] Naslednji del celične stene predstavlja do 40 plasti peptidoglikana, tj. kovalentna makromolekularna struktura, ki je sestavljena iz linearnih sladkornih verig medsebojno prečno premreženih s kratkimi peptidnimi verigami. Peptidoglikan je poglavitni gradbeni element bakterijske celične stene tako G+ kot G- bakterij in ga bomo pozneje zaradi njegove pomembnosti bolj podrobno opisali. Plast peptidoglikana prebadata tejhojska in tejhuronska kislina, ki sta kislja anionska polimera in predstavljata 40-45% mase celične stene. Pod plastjo peptidoglikana se nahaja lipidna citoplazemska celična membrana, ki pri G+ bakterijah predstavlja glavno bariero, ki

preprečuje vstop antibiotikom v celico. V lipidnem dvosloju celične membrane plavajo številne zelo pomembne proteinske molekule. Med njimi najdemo  $\beta$ -laktamske receptorje, encime bolj poznane kot penicilin vezoče proteine (PBP, penicillin-binding protein). Ti imajo glavno vlogo v sintezi in popravilu celične stene in so zato glavna tarča številnih protimikrobnih učinkovin, med katerimi so najbolj uporabljeni  $\beta$ -laktamski antibiotiki.[1,3] Tako PBP kot  $\beta$ -laktamske antibiotike bomo bolj podrobno opisali kasneje v diplomski nalogi. G<sup>+</sup> bakterije zunaj svoje celične stene izločajo tudi encime  $\beta$ -laktamaze, katerih vloga je razgradnja in s tem inaktivacija  $\beta$ -laktamskih antibiotikov.[1]



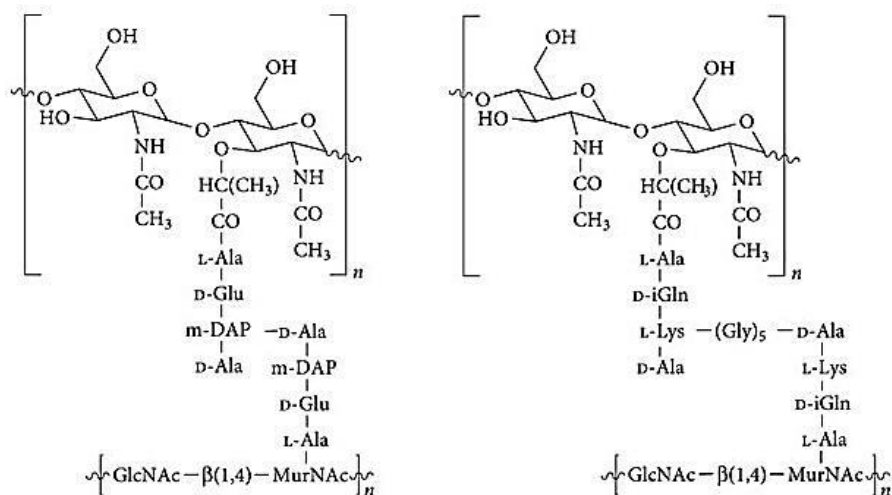
**Slika 1: Shematski prikaz zgradbe celične stene po Gramu pozitivnih (levo) in po Gramu negativnih (desno) bakterij. Povzeto po [3].**

Celična stena G<sup>-</sup> bakterij pa je tanjša, a bolj kompleksna in bolj lipidna kot pri G<sup>+</sup> (Slika 1). G<sup>-</sup> bakterije imajo navadno še eno, dodatno zunanjo membrano, ki vsebuje kompleksne lipopolisaharide s sposobnostjo kodiranja antigeneskega odziva in povzročitve septičnega šoka (bakterijski endotoksini) ter vpliva na morfologijo bakterijske celice. Poleg njih tu najdemo še različne encime in izključevalne proteine, kot so na primer porini. To so transmembranski proteini, preko katerih lahko prehajajo različne molekule glede na njihovo velikost, obliko in lipofilnost ter zato predstavljajo pomembno oviro protimikrobnim učinkovinam in njihovemu vstopu v bakterijsko celico.[1,3] Hidrofilne molekule lahko namreč prosto difundirajo skozi, številne protimikrobne učinkovine pa so preveč lipofilne ali pa prevelike, da bi lahko prečkale to oviro.[3] Pod to dodatno

zunanjjo membrano leži le od ene do dve plasti debel sloj peptidoglikana, kateremu sledi periplazemski prostor, kjer se nahajajo encimi  $\beta$ -laktamaze. Poleg naštetih strukturnih elementov pa celično steno G- bakterij sestavlja še s fosfolipidi bogata citoplazemska membrana, kjer med drugimi značilnimi proteini plavajo tudi PBP, katerih naloge so enake kot pri G+ bakterijah, torej sinteza in popravilo celične stene bakterije.[1,3]

## 1.5 PEPTIDOGLIKAN

Peptidoglikan je pomemben del celične stene tako G+ kot G- bakterij, ki ga sicer ne najdemo pri evkariontih.[2] Vloga peptidoglikana v bakterijski celici je zelo pomembna, saj varuje bakterijsko celico pred osmotskim šokom, določa obliko celice, nanj se lahko vežejo različni virulentni faktorji in adhezini ter sodeluje pri morfoloških transformacijah bakterije kot odgovor na različne stresne dejavnike, s katerimi se sooča bakterijska celica. Vsaka nestabilnost v njegovi strukturi lahko vodi do lize ali pa celo smrti celice.[7,8] Peptidoglikan je makromolekularna struktura, zgrajena iz  $\beta$ -1,4-povezanih izmenjujočih polisaharidnih verig *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminske (MurNAc) kisline.[1-3,7,9] Na karboksilne dele prostih mlečnih kislin *N*-acetilmuraminske kisline so preko amidne vezi pritrjene tetrapeptidne verige, med katerimi je najpogostejše zaporedje aminokislin L-alanin (L-Ala) - D-glutaminska kislina (D-Glu) - L-lizin (L-Lys) - D-alanin (D-Ala) (takšno zaporedje je prisotno pri večini G+ bakterij).[1,3] Skoraj vse G- bakterije, večina cianobakterij in nekatere G+ bakterije pa imajo na mestu 3 namesto L-Lys prisotno *mezo*-diaminopimelinsko kislino (mDAP). Nekatere bakterije, sicer redkeje, pa imajo lahko na tem metu tudi kakšno drugo aminokislino (npr. L-Ala, L-Gly, L-Orn...), poznani pa so tudi primeri drugačnih aminokislin na prvem ali pa terminalnem mestu.[3] Preko teh peptidnih verig so polisaharidne verige peptidoglikana prečno povezane, zaradi česar je peptidoglikan trdna polimerna rešetka, sposobna kljubovanja visokemu notranjemu osmotskemu pritisku.[1,2,7] Druga pomembna lastnost teh tetrapeptidov pa je D-stereokemijska narava D-Glu in terminalnega D-Ala, ki preprečuje hidrolizo peptidoglikana s strani gostiteljevih peptidaz, zlasti v gastrointestinalnem traktu.[1] Zgradba peptidoglikana je prikazana na Sliki 2.



**Slika 2:** Shematski prikaz dveh najpogostejših tipov zgradbe peptidoglikana. Prikazano je tudi prečno premreženje pri *E. coli* (levo) in pri *S. aureus* (desno). Povzeto po [12].

Biosinteza peptidoglikana se začne v citoplazmi bakterijske celice s pomočjo šestih Mur encimov (MurA-MurF), njihova naloga pa je kataliziranje nastanka uridin difosfat (UDP)-MurNAc iz UDP-GlcNAc prekursorja in nadaljnjega dodatka zgoraj opisanega tetrapeptida, ki je na začetku pravzaprav pentapeptid, saj je podaljšan za D-Ala.[3,7] Molekula UDP-MurNAc-pentapeptid se veže na 55 ogljikov dolg fosfolipidni nosilec, skupaj pa tvorijo molekulo, ki jo poimenujemo Lipid I. Encim Mur G, ki je po svoji funkciji transferaza, na to molekulo doda UDP-GlcNAc skupino in tako tvori Lipid II, ki predstavlja disaharidni prekurzor biosinteze peptidoglikana in substrat za PBP.[2,7] Lipid II se nato prenese na zunanjo stran membrane, kjer pride do odcepa 55 ogljikov dolgega nosilca, preostanek pa se encimsko doda k nastajajočemu peptidoglikanu.[2] To se zgodi tako, da se v procesu transglikozilacije, za katero je odgovorna transglikozilazna domena PBP, najprej med seboj povežejo sladkorne enote, in sicer z  $\beta$ -1,4 vezjo.[3] Nato pa v zadnji stopnji biosinteze peptidoglikana pride še do prečnega premreževanja v procesu transpeptidacije in tudi v njej sodelujejo encimi PBP.[10] Reakcija transpeptidacije poteka po tristopenjskemu mehanizmu. V prvi stopnji pride do hitrega in reverzibilnega nastanka nekovalentnega Henri-Michaelisovega kompleksa med encimom in delom osnovnega peptidoglikanskega gradnika (pentapeptid). Temu sledi napad aktivirane aminokislina serina encima na karbonilni ogljikov atom C-terminalne D-Ala-D-Ala peptidne vezi, kar vodi do nastanka intermediata acilnega kompleksa in sočasne sprostitve C-terminalnega D-Ala, za katerega se tako skrajša osnovni peptidoglikanski gradnik, pentapeptid. Zadnja

stopnja mehanizma je deaciliranje, pri čemer pride bodisi do hidrolize s sprostitevjo skrajšanega peptida (karboksipeptidacija) bodisi do nastanka prečne povezave med terminalnim (mesto 4) D-Ala donorskega tetrapeptida in L-Lys (oz. mDAP, ki leži na mestu 3 tetrapeptida) drugega, akceptorskega tetrapeptida (transpeptidacija).[1,3,8,11] Med omenjenima aminokislinama pa se pri nekaterih G+ bakterijah pojavlja še krajši peptidni mostiček, ki je npr. pri *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) sestavljen iz petih glicinov (Slika 2).[3] Kot bomo kasneje videli, z  $\beta$ -laktamskimi antibiotiki dosežemo baktericidni učinek ravno preko motenja zadnje, najpomembnejše stopnje biosinteze peptidoglikana. Ti namreč s svojo strukturo posnemajo ključni D-Ala-D-Ala del pentapeptida in s PBP tvorijo kovalentne vezi, s čimer preprečijo njihovo transpeptidazno aktivnost. Slednje vodi do napak in krhkosti v strukturi peptidoglikana, posledica tega pa je smrt bakterijske celice.[7]

## 1.6 PENICILIN VEZOČI PROTEINI (PBP, PENICILLIN-BINDING PROTEINS)

PBP so izjemno pomembni encimi, ki sodelujejo v najpomembnejših fazah biosinteze peptidoglikana, saj katalizirajo procesa polimerizacije sladkornih verig (transglikozilacija) in njihovega prečnega premreženja (transpeptidacija).[3,8] Nekateri PBP imajo tudi sposobnost hidroliziranja zadnje aminokislina D-Ala osnovnega peptidoglikanskega gradnika. Temu procesu pravimo tudi D,D-karboksipeptidacija. Nekateri PBP pa lahko v procesu imenovanem endopeptidacija, ki je obratni proces transpeptidacije, hidrolizirajo tudi peptidno vez, ki povezuje dve sladkorni verigi. Vsi ti zgoraj omenjeni procesi so bistvenega pomena v biosintezi in popravilu peptidoglikana, s čimer njegova struktura ostaja dovolj trdna in sposobna opravljanja zgoraj naštetih nalog.[8]

PBP so serinske acetiltransferaze in jih lahko razdelimo na dve glavni skupini, in sicer na visokomolekularne in nizkomolekularne PBP.[3,7-9] Visokomolekularni PBP so odgovorni za polimerizacijo peptidoglikana in vgradnjo v že obstoječi peptidoglikan.[13] Delimo jih na visokomolekularne PBP razreda A in B. Oboji so zgrajeni iz citoplazemskega repa in dveh domen. Medtem ko ima C-terminalna domena obeh razredov transpeptidazno aktivnost, pa ima samo N-terminalna domena razreda A tudi transglikozilazno aktivnost. N-terminalna domena razreda B naj bi sodelovala pri procesu morfogeneze celice.[3,7-9] Nizkomolekularne PBP, ki so D,D-karboksipeptidaze, uvrščamo v razred C, njihova naloga pa je hidroliza terminalne D-Ala, s čimer preprečijo nadaljnjo

Anže Rupnik: *Načrtovanje in sinteza derivatov azetidin-2-ona kot potencialnih zaviralcev penicilin vezočih proteinov iz rezistentnih sevov*

prečno premreženje peptidoglikana in tako le-to regulirajo.[3,7,9] Na Tabelah I, II in III so predstavljeni PBP 10 najbolj preučevanih bakterij.

Tabela I: PBP razreda A desetih najbolj pomembnih in najbolj preučevanih bakterij. Povzeto po [8].

Razred A									
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7		
Gram -									
Escherichia coli K12	PBP1a <i>ponA</i>	PBP1b <i>ponA</i>					PBP1c <i>pbpC</i>		MGT <i>mgt</i>
Neisseria gonorrhoeae FA 1090	PBP1 <i>ponA</i>								
Gram +									
Bacillus subtilis 168			PBP1a <i>ponA</i>	PBP2c <i>pbpF</i>	PBP4 <i>pbpD</i>		PBP2d <i>pbpG</i>		
Staphylococcus aureus MRSA252			PBP2 <i>pbp2</i>						MGT <i>mgt</i>
Listeria monocytogenes 4b F238			PBP1 <i>lmo1682</i>	PBP4 <i>lmo2228</i>					
Enterococcus faecalis V583			PBP1a <i>EF_1148</i>	PBP2a <i>EF_0680</i>	PBP1b <i>EF_1740</i>				
Streptococcus pneumoniae R6			PBP1a <i>pbpA</i>	PBP2a <i>pbp28</i>	PBP1b <i>pbp1b</i>				
Actinomycetes									
Streptomyces coelicolor A3(2)								3 PBP-A <i>sco3901</i> <i>sco2897</i> <i>sco5039</i>	
Mycobacterium tuberculosis H37Rv				PBP1 <i>ponA1</i>				PBP1A (r) <i>ponA2</i>	
Cyanobacteria									
Anabaena species PCC7120	PBP1 <i>a02952</i>	3-4-5-6 <i>atr4579</i> <i>atr5324</i> <i>atr5326</i> <i>atr2981</i>					PBP2 <i>atr5101</i>		

Anže Rupnik: *Načrtovanje in sinteza derivatov azetidin-2-ona kot potencialnih zaviralcev penicilin vezočih proteinov iz rezistentnih sevov*

Tabela II: PBP razreda B desetih najbolj pomembnih in najbolj preučevanih bakterij. Povzeto po [8].

Razred B										
	B1	B2	B3	B4	B5	B5	B6	B-podoben I	B-podoben II	B-podoben III
Gram -										
<i>Escherichia coli</i> K12		PBP2 <i>pbpA</i>	PBP3 <i>ftsI</i>							
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> FA 1090			PBP2 <i>ftsI</i>							
Gram +										
<i>Bacillus subtilis</i> 168	PBP3 <i>pbpC</i>		SpoVD <i>spoVD</i>	PBP2b <i>pbpB</i>	PBP2a <i>pbpA</i>	PbpH <i>pbpH</i>	PBP4b <i>ynR</i>			
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA252	PBP2a <i>mecA</i>			PBP1 <i>pbpA</i>	PBP3 <i>pbp3</i>					
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b F238	PBP <i>lmo0441</i>			PBP2 <i>lmo2039</i>	PBP3 <i>lmo1438</i>					
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	PBP4 <i>EF_2478</i>			PBP2 <i>EF_0991</i>	PBP2b <i>EF_2857</i>					
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6				PBP2x <i>pbpX</i>	PBP2b <i>pbp2b</i>					
Actinomycetes										
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)		PBP2 <i>sco2608</i>	PBP3 <i>sco2090</i>					4 PBP-B <i>sco3771</i> <i>sco3156</i> <i>sco4013</i> <i>sco3847</i>		3PBP-B <i>sco3157</i> <i>sco3771</i> <i>sco3156</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	PBPA <i>pbpA</i>		PBP2 <i>pbpB</i>						PBP-lipo <i>Rv2864c</i>	
Cyanobacteria										
<i>Anabaena</i> species PCC7120		PBP7 <i>alr5045</i>	PBP8 <i>alr0718</i>							

Tabela III: PBP razreda C desetih najbolj pomembnih in najbolj preučevanih bakterij. Povzeto po [8].

Razred C										
	Tip-4	Tip-5			Tip-7		Tip-AmpH			
Gram -										
<i>Escherichia coli</i> K12	PBP4 <i>dacB</i>		PBP5 <i>dacA</i>	PBP6 <i>dacC</i>	PBP6b <i>dacD</i>	PBP7 <i>pbpG</i>			PBP4b <i>yefw</i>	AmpH <i>ampH</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> FA 1090	PBP3 <i>pbp3</i>					PBP4 <i>pbp4</i>				
Gram +										
<i>Bacillus subtilis</i> 168	PBP4a <i>dacC</i>		DacF <i>dacF</i>	PBP5 <i>dacA</i>	PBP5* <i>dacB</i>				PBP4* <i>pbpE</i>	PBPX <i>pbpX</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA252			PBP4 <i>pbp4</i>							
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b F238			PBP5 <i>lmo2754</i>							PBP <i>lmo0540</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> V583			DacF <i>EF_3129</i>							PBP <i>EF_0746</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6			PBP3 <i>pbp3</i>							
Actinomycetes										
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	PBP4 <i>sco3408</i>	PBP4 <i>sco6131</i>	PBP <i>sco4439</i>			PBP7 <i>sco3811</i>	PBP <i>sco4847</i> <i>sco7050</i>	PBP <i>sco0830</i>	PBP <i>sco7561</i>	PBP <i>sco2283</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	PBP4 <i>Rv3627</i>		PBP5 <i>dacB1</i>			PBP7 <i>dacB2</i>		PBP <i>Rv0907</i>	PBP	PBP <i>Rv1367c</i>
Cyanobacteria										
<i>Anabaena</i> species PCC7120	PBP10 <i>alr1666</i>	PBP11 <i>alr0054</i>							PBP9 <i>alr0153</i>	PBP12 <i>alr2656</i>

### 1.6.1 PBP iz rezistentnih sevov

Kot je že bilo podrobno opisano, je bakterijska odpornost težava, s katero se danes vse bolj srečujemo. Bakterije so skozi evolucijo bile prisiljene razviti učinkovite mehanizme obrambe pred protibakterijskimi učinkovinami. Ena izmed takih prilagoditev bakterije je mutacijska sprememba PBP, tarče  $\beta$ -laktamskih antibiotikov.[3,7] Danes poznamo številne na antibiotike neobčutljive PBP.

Zelo dolgo poznana je odpornost na več strukturno različnih antibiotikov nekaterih sevov *S. aureus*. Ti so bili sposobni od še nepoznanih vrst bakterij pridobiti gen *mecA*, ki je odgovoren za nastanek visoko rezistentnega PBP2a (uvrščamo ga v razred B PBP). Ta encim najdemo v na meticilin odpornemu sevu *S. aureus* (MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*).[7] PBP2a je zelo unikatna obrambna rešitev pred  $\beta$ -laktamskimi antibiotiki. MRSA namesto modificiranja svojih drugih za biosintezo peptidoglikana pomembnih PBP lahko proizvaja eksogeni PBP2a. Ta je sposoben prevzeti naloge ostalih PBP, ko so ti inhibirani z  $\beta$ -laktamskimi antibiotiki. Tako lahko proces transpeptidacije teče naprej, kar omogoča nemoteno biosintezo peptidoglikana.[7] Posebnost PBP2a je tudi, da opisano vlogo prevzame samo takrat, ko so ostali PBP inaktivirani, sicer pa je neaktiven.[14]

Drug reprezentativen primer na  $\beta$ -laktamske antibiotike odpornih bakterij je naravna odpornost enterokokov na številne peniciline zaradi določenih PBP, izmed katerih je najbolj znan encim PBP5fm iz *Enterococcus faecium*. [7] Zorzi in sodelavci so v svojem delu ugotovili, da lahko točkovne mutacije v encimu PBP5fm ali pa njegova pretirano povečana produkcija povzročita visoko odpornost tega seva bakterije na številne antibiotike.[15] PBP5fm namreč ob prisotnosti  $\beta$ -laktamskega antibiotika, ki zavre ostale PBP bakterije, prevzame katalitično aktivnost slednjih in tako proces biosinteze peptidoglikana lahko poteka nemoteno dalje.[7]

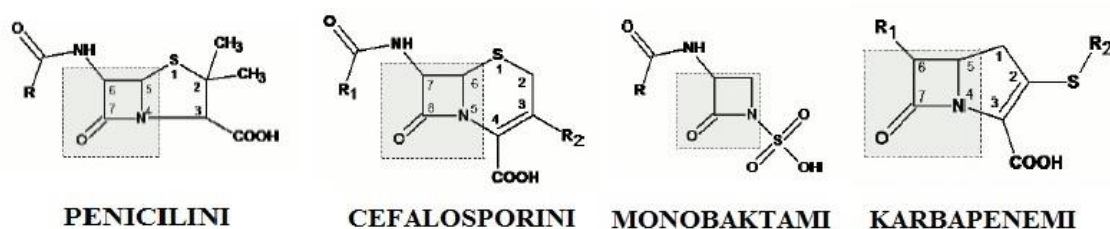
Zelo dobro pa je tudi poznana težava bakterijske odpornosti streptokoka *Streptococcus pneumoniae*, ki je sposoben preko medvrstne homologne rekombinacije pridobiti številne gene iz različnih na antibiotike odpornih vrst. Tako lahko razvije različne PBP s tudi do 100 mutacijami. Slednje je odličen pokazatelj, kako zapletena in trdovratna je težava bakterijske odpornosti, saj sta si že dva 'enaka' PBP lahko tako bistveno različna.[9,16] Poznamo vsaj tri na  $\beta$ -laktamske antibiotike različno odporne PBP iz tega seva: PBP2x, PBP2b in PBP1a. Prvi, PBP2x, ki sodi v razred B PBP, vsebuje kar 92 mutacij, če ga primerjamo z na antibiotike občutljivim tipom in predstavlja zelo pomembno težavo v boju proti bakterijski odpornosti. Vse te mutacije namreč spremenijo obliko in lastnosti teh



PBP, zaradi česar se  $\beta$ -laktamski antibiotiki nanje več ne morejo vezati, ali pa je encim kljub vezavi antibiotika sposoben dalje opravljati svojo katalitično funkcijo.[7,9]

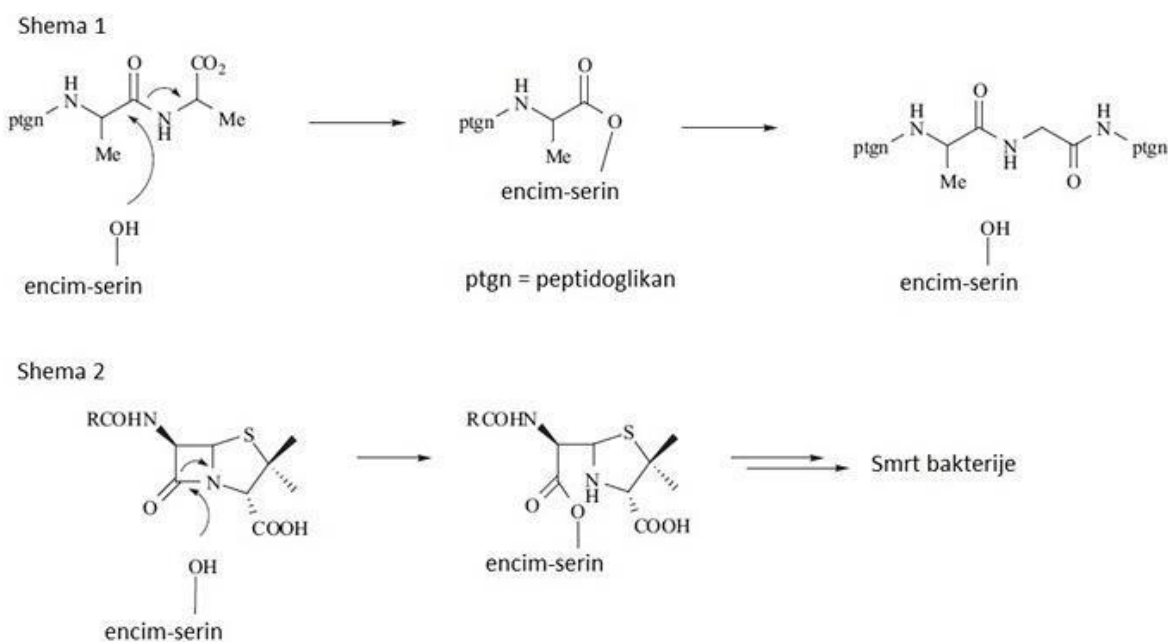
## 1.7 $\beta$ -LAKTAMSKI ANTIBIOTIKI

$\beta$ -laktamski antibiotiki so zelo pomembna in široka skupina protibakterijskih učinkovin, ki jo naprej delimo še na peniciline, cefalosporine, karbapeneme in monobaktame (Slika 3).[2,3]



Slika 3: Razdelitev  $\beta$ -laktamskih antibiotikov. Označen je  $\beta$ -laktamski obroč (azetidin-2-on), ki je skupen fragment vsem  $\beta$ -laktamskim antibiotikom. Povzeto po [17].

Med seboj se lahko precej razlikujejo, vsem pa sta skupni dve lastnosti. Prva je ta, da imajo vsi v svoji strukturi  $\beta$ -laktamski obroč oz. azetidin-2-on (Slika 3). Ta je zaradi svoje strukture zelo reaktiven in zelo občutljiv na nukleofilni napad katalitične serinske OH skupine PBP.[1] Druga pomembna skupna lastnost pa je, da s svojo strukturo (azetidin-2-on je osrednji fragment) posnemajo aminokislini D-Ala-D-Ala, terminalni dipeptid osnovnega peptidoglikanskega gradnika. Tako lahko, podobno kot substrat, reagirajo s serinsko OH skupino v aktivnem mestu transpeptidazne domene PBP in z njo tvorijo kovalentno vez, pri čimer se encim acilira, kar povzroči njegovo ireverzibilno inhibicijo (Slika 4).[3,7,8,11]



**Slika 4: Prikaz transpeptidazne aktivnosti PBP v sintezi peptidoglikana (Shema 1) in principa inhibicije PBP z  $\beta$ -laktamskim antibiotikom (Shema 2). Povzeto po [18].**

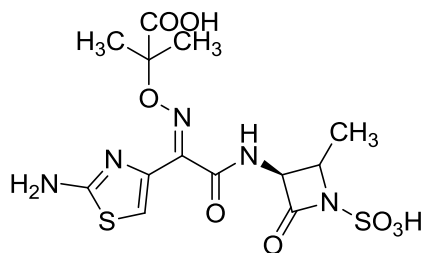
Bakterije so zaradi pretirane in agresivne rabe  $\beta$ -laktamskih antibiotikov razvile načine, kako se ubraniti pred tovrstnimi protibakterijskimi učinkovinami. Kot smo že opisali v podpoglavju o rezistentnih sevih, je eden od načinov obrambe bakterije takšen, da pride do genetsko pogojenih sprememb na tarčah  $\beta$ -laktamskih antibiotikov, torej na PBP, ki so po mutaciji neobčutljivi na vezavo številnih  $\beta$ -laktamskih antibiotikov.[3,7]

Večina G- bakterij lahko v periplazemski prostor sprošča encime, imenovane  $\beta$ -laktamaze. Tudi ti imajo kot katalitično aminokislino v aktivnem mestu serin (ti encimi so namreč neposredni strukturni potomci PBP).[7] Zaradi te strukturne podobnosti jih  $\beta$ -laktamski antibiotiki prepoznajo kot tarčo,  $\beta$ -laktamaze pa so sposobne hidrolizirati njihov  $\beta$ -laktamski obroč in jih inaktivirati.[2,7,18] Bakterijska prilagoditev na nevarnost, ki jim preti s strani  $\beta$ -laktamskih antibiotikov, pa vključuje še en izjemno učinkovit obrambni mehanizem. Bakterije lahko preprečijo dostop do njihovih tarč s pomočjo iztočnih črpalk, ki črpajo protibakterijske učinkovine iz bakterijske celice. Takšna črpalka je npr. MexA,B-OprM, ki jo lahko najdemo pri različnih sevih rodu bakterije *Pseudomonas*. [7]

## 1.8 MONOBAKTAMI

Monobaktami so na prvi pogled strukturno najbolj preprosti  $\beta$ -laktamski antibiotiki, saj so sestavljeni zgolj iz  $\beta$ -laktamskega obroča in različnih substituent, pripetih na obroč. Odkrili so jih pravzaprav že v poznih 70-ih letih 20. stoletja s fermentacijo mikroorganizmov, a ti naravno prisotni se niso izkazali za zelo učinkovite, tako da se je kasnejši razvoj pri tej skupini  $\beta$ -laktamskih antibiotikov razvijal povsem na osnovi sintezne kemije.[1,18,19] Odkritje monobaktamov je bil pomemben korak pri razvoju  $\beta$ -laktamskih antibiotikov, saj so ugotovili, da konformacijsko omejene biciklične strukture niso nujno bistvene za protibakterijski učinek  $\beta$ -laktamskih antibiotikov.[18]

Najbolj znana učinkovina iz te skupine, ki je kot prva prišla v klinično prakso in se danes še vedno uporablja, je aztreonam (Slika 5). Uporablja se ga skoraj izključno za zdravljenje bakterijskih infekcij, ki jih povzročajo G- aerobni bacili, kot so pseudomonadi, *Neisseria meningitidis* in *Haemophilus influenzae*, izkazuje tudi odpornost na večino  $\beta$ -laktamaz, nemočen pa je proti G+ bakterijam ali anaerobom.[1,2]

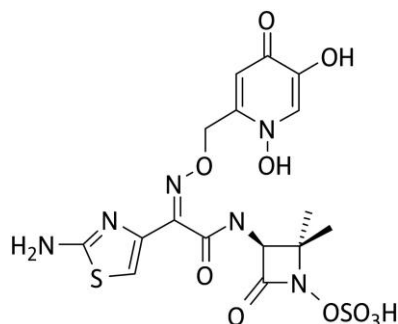


Slika 5: Aztreonam

Zaradi pojava novih oblik odpornosti na  $\beta$ -laktamske antibiotike in preproste strukture monobaktamov so ti zelo zanimivi za razvoj in sintezo novih zaviralcev PBP, zaradi česar se v zadnjih letih ponovno obujajo.[18] Kot primer lahko navedem raziskavo Guanta in sodelavcev, ki so sintetizirali nove derivate cis-monobaktamov s sulfamoiloksimetilno ali *N*-alkil-sulfamoiloksimetilno skupino, ki so izkazovali določeno zaviralno aktivnost na PBP.[20]

Trenutno kot eno najbolj pomembnih monobaktamskih spojin velja omeniti spojino, poimenovano BAL30072 (Slika 6), ki je bila zasnovana v podjetju Basilea Pharmaceutica. BAL30072 je monosulfaktam, ki vsebuje siderofor (to je majhna molekula z veliko afiniteto keliranja železa) in deluje po principu trojanskega konja. Zaradi prisotnosti

siderofora lahko namreč vstopi v bakterijsko celico G- bakterij, tako da izkoristi transportni sistem bakterije za privzem železa. Po vstopu v celico pa se sulfaktam veže na PBP, jih zavre in tako povzroči celično smrt.[21]



Slika 6: Spojina BAL30072

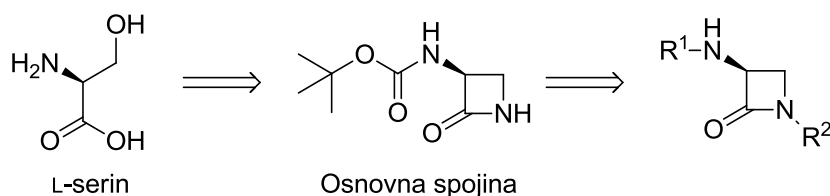
V splošnem velja, da se razvoj monobaktamskih antibiotikov usmerja v vključevanje sideroforov v strukturo, saj so se slednji izkazali za zelo pomembne strukturne fragmente v boju proti bakterijski odpornosti.[21]

## 2 NAMEN IN NAČRT DELA

Namen diplomskega dela je pripraviti različne monosubstituirane in disubstituirane derivate azetidin-2-ona s potencialom zaviranja penicilin vezočih proteinov (PBP).

Sintetizirali bomo različne monosubstituirane in disubstituirane derivate azetidin-2-ona s fragmenti končnih spojin, ki so predstavljeni v Tabeli IV. Po sintezi in čiščenju bomo natančno določili njihove fizikalno-kemijske in spektroskopske lastnosti, pri čemer bomo uporabili NMR spektroskopijo, masno spektroskopijo in tankoplastno kromatografijo, ter jim določili izgled in talilni interval. Sintetizirane spojine bomo na koncu tudi biokemijsko ovrednotili, in sicer jim bomo določili zaviralno aktivnost na PBP iz treh bakterijskih sevov, dveh rezistentnih in enega nerezistentnega bakterijskega seva.

Osnovno spojino, (*S*)-*terc*-butil (2-oksoazetidin-3-il)karbamat, bomo sintetizirali iz aminokislina L-serina preko štiristopenjske sinteze. Medtem ko bo drugi del diplomskega dela namenjen sintezi končnih potencialnih zaviralcev PBP, pa bo prvi del namenjen optimizaciji teh štirih sinteznih stopenj. Namen optimizacije sinteze bo dobiti čim bolj čiste vmesne produkte s čim manj nečistočami, ki bi motile naslednje reakcijske stopnje. Tako bomo osnovni azetidin-2-on pripravili s čim boljšim izkoristkom, minimalno porabo reagentov in topil ter s tem zmanjšanim vplivom na okolje.



Slika 7: Shematski prikaz načrta dela.

Tabela IV: Želene sintetizirane končne spojine.  $R^1$  in  $R^2$  predstavljata fragmente sintetiziranih spojin.

$R^1$						
$R^2$						

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 1 Reagenti in topila

Pri eksperimentalnem delu v laboratoriju smo uporabljali kemikalije in topila naslednjih proizvajalcev: Acros Organics (Belgija), Carlo Erba (Italija), Fluka (Švica), Janssen (ZDA), Merck (Nemčija), Panreac (Španija) ter Sigma-Aldrich (ZDA)

Uporabljeni reagenti so bili: L-serin, Boc<sub>2</sub>O, NaOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, *O*-benzilhidroksilamonijev klorid, EDC, DMAP, Et<sub>3</sub>N, nasičena raztopina citronske kisline, nasičena raztopina NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Ph<sub>3</sub>P, DEAD, DIAD, HOBt, Raney-Ni, benzil klorid, 3-fluorobenzil klorid, CF<sub>3</sub>COOH, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaH, KI.

Za sintezo in izolacijo pa smo uporabljali naslednja topila: dioksan, Et<sub>2</sub>O, EtOAc, DMF, *n*-heksan, MeOH, aceton, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, THF, CH<sub>3</sub>CN, voda.

##### 2 Laboratorijska oprema

- magnetno mešalo z grelnikom: IKA RCT basic
- rotavapor: Büchi rotavapor RE-121
- tehtnica: Mettler PM400
- UV svetilka: CAMAG UV Cabinet 254/366 nm
- žarilna pištola: Skil 8003 heat gun
- sušilnik: BINDER FD series

##### 3 Nomenklatura in risanje spojin

Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 12.0 iz programskega sklopa ChemBioOffice 2010, proizvajalca CambridgeSoft.

### 3.2 METODE

#### **Kromatografske metode:**

##### ▪ **Tankoplastna kromatografija**

Tankoplastno kromatografijo smo izvajali na ploščicah Silica gel 60 F245, ki je imela 0.22 mm debel nanos silikagela na aluminijastem nosilcu velikosti 20 × 20 cm, proizvajalca Merck (Nemčija). Celo ploščo smo razrezali na posamezne ploščice, dolge 6.7 cm in široke glede na količino želenih nanosov. Za mobilno fazo smo uporabljali različne kombinacije topil. S tankoplastno kromatografijo smo lahko pri eksperimentalnem delu spremljali potek reakcij, tako med samo reakcijo kot tudi po pričakovanem koncu reakcije. Prav tako smo jo uporabljali med postopkom izolacije želenih spojin iz reakcijske zmesi (npr. pri kolonski kromatografiji). Za detekcijo spojin na TLC ploščicah smo uporabljali UV svetilko z valovno dolžino  $\lambda = 254$  nm in orositveni reagent ninhidrin, s pomočjo katerega smo lahko zaznali amine in karbamate ter po močnem segrevanju tudi amide.

##### ▪ **Kolonska kromatografija**

Kolonsko kromatografijo smo izvajali v steklenih kolonah različnih velikosti in mobilnimi fazami, sestavljenimi iz različnih kombinacij topil. Kot stacionarno fazo smo uporabljali Silikagel 60 (Kieselgel 60), s premerom delcev od 0.040 do 0.063 mm (flash silikagel), proizvajalca Merck (Nemčija). Poleg tega smo pri kolonski kromatografiji uporabljali tudi pesek proizvajalca Sigma-Aldrich (ZDA) ter vato.

##### ▪ **Mobilne faze (MF):**

Pri kolonski in tankoplastno kromatografiji smo uporabljali naslednje mobilne faze:

MF 1: CH<sub>3</sub>CN : MeOH : voda = 3 : 1 : 1

MF 2: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 5 : 1

MF 3: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 9 : 1

MF 4: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 15 : 1

MF 5: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 20 : 1

MF 6: EtOAc

MF 7: EtOAc : *n*-heksan = 1 : 1

MF 8: EtOAc : *n*-heksan = 2 : 3

MF 9: EtOAc : *n*-heksan = 1 : 2

MF 10: EtOAc : *n*-heksan = 1 : 4

### **Spektroskopske metode:**

- **Jedrska magnetna resonanca (NMR):** NMR spektre spojin smo posneli na Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo. Vzorce smo posneli v devteriranih topilih DMSO-*d*<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub> in s tetrametilsilanom (TMS) kot internim standardom. Spektre smo analizirali z računalniškim programom MestRe-C 4.7.0.4
- **Masna spektrometrija (MS):** Masni spektri spojin so bili posneti na spektrofotometru Autospec (VG-Analytical) z EI, ESI in HRMS tehniko na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

### **Določevanje tališča**

Določanje talilnih intervalov je potekalo s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico proizvajalca Leica.

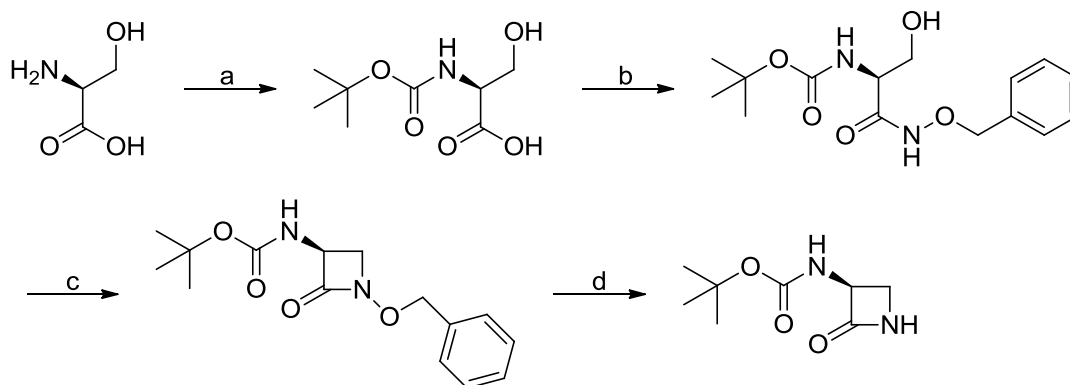
### **Biokemijsko vrednotenje spojin na PBP iz rezistentnih sevov**

Detekcijo in kvantifikacijo RA so opravili raziskovalci Centra za proteinski inženiring v Liege (Belgija) z opremo Molecular Image FX in programsko opremo Quantity One (BioRad, Hercules, CA, USA).



## 4 EKSPERIMENTALNO DELO

PREGLED SINTEZNE POTI:



a: Boc<sub>2</sub>O, 1 M NaOH, dioksan

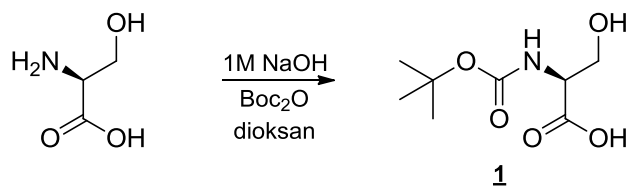
b: *O*-benzilhidroksilamonijev klorid, DMAP, EDC, DMF, Et<sub>3</sub>N

c: DEAD, Ph<sub>3</sub>P, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

d: H<sub>2</sub>, Raney-Ni, MeOH

### 4.1 SINTEZA 2-((*TERC*-BUTOKSIKARBONIL)AMINO)-3-HIDROKSI-PROPANOJSKE KISLINE (1)

Reakcija:



Sintezni postopek:

V 250 mL bučko smo zatehtali 4.0 g (37.80 mmol) L-serina in ga suspendirali v 60 mL dioksana. Med mešanjem smo nato v bučko dodali 80 mL 1 M NaOH, da se je vsebina dobro raztopila. Reakcijsko zmes smo nato na ledeni kopeli ohladili na 0 °C in s kapalko počasi dodali v 20 mL dioksana raztopljenih 9.892 g (45.30 mmol) Boc<sub>2</sub>O. Bučko smo nato zaprli s plastičnim zamaškom in na sobni temperaturi (20 °C) mešali čez noč (14 ur). Po končani reakciji (preverjeno s TLC) smo pod znižanim pritiskom odpareli večino

dioksana. Vodnemu preostanku smo dodali 200 mL Et<sub>2</sub>O in ekstrahirali. Vodno fazo smo nato nakisali z 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> do pH = 3, jo ekstrahirali z EtOAc (5 × 50mL), zbrane organske faze posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ter odpareli topilo pod znižanim pritiskom.

### **Rezultati:**

**Izgled:** brezbarvno olje

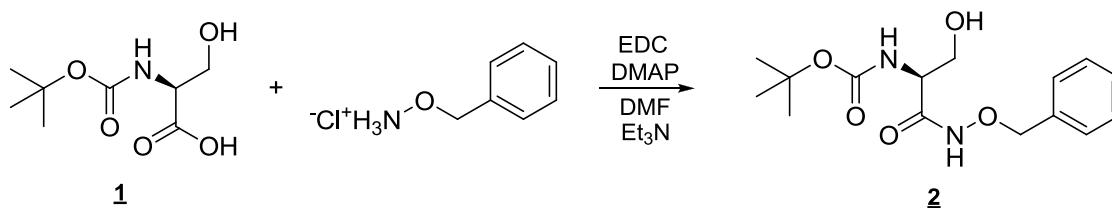
**Izkoristek:** 94% (7.347 g)

**R<sub>f</sub>:** 0.64 (MF: CH<sub>3</sub>CN : MeOH : voda = 3 : 1 : 1)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm]= 1.44 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.80-3.89 (m, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>OH), 3.98-4.08 (m, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>OH), 4.19-4.40 (m, 1H, NHCHCH<sub>2</sub>), 5.86 (rd, *J* = 7.5 Hz, 1H, NHCOO), 6.80 (rs, 2H, OH in COOH).

## 4.2 SINTEZA TERC-BUTIL (1-((BENZILOKSI)AMINO)-3-HIDROKSI-1-OKSOPROPAN-2-IL)KARBAMATA (2)

Reakcija:



Sintezni postopek:

V 250 mL bučko smo zatehtali 7.25 g (35.20 mmol) spojine **1** in 6.46 g (40.50 mmol) *O*-benzilhidroksilamonijevega klorida in ju raztopili v 50 mL DMF. Nato smo reakcijsko zmes ohladili na ledeni kopeli na 0 °C in po 5 minutah med mešanjem dodali 10.2 mL (73.90 mmol) Et<sub>3</sub>N in 0.215 g (1.76 mmol) DMAP. Nazadnje smo dodali še 8.77 g (45.76 mmol) EDC in potem odstavili reakcijsko zmes z ledu ter jo na sobni temperaturi (20 °C) mešali čez noč (16 ur). Pod znižanim pritiskom smo odparili večino topila in preostanku dodali 150 mL nasičene vodne raztopine citronske kisline. Vodno fazo smo ekstrahirali z EtOAc (5 × 50 mL), združene organske faze sprali s 50 mL nasičene vodne raztopine NaCl, posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odfiltrirali sušilno sredstvo in nato pod znižanim pritiskom odpareli topilo. Produkt **2** smo nato oborili iz zmesi topil EtOAc in *n*-heksan oborino odnučali in posušili na zraku.

**Rezultati:**

**Izgled:** beli kristali

**Izkoristek:** 45% (4.950 g)

**R<sub>f</sub>:** 0.67 (MF: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 5 : 1)

**T<sub>tališča</sub>:** 127.0–129.0 °C (130–131 °C [22])

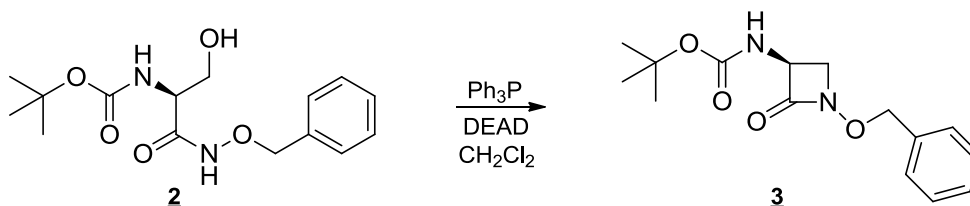
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 1.42 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.17 (rs, 1H, OH), 3.61 (dd, *J*<sub>1</sub> = 11.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>OH), 3.96-4.11 (m, 2H, 1H od CH<sub>2</sub>OH in NHCH<sub>2</sub>), 4.91 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 5.54 (rd, *J* = 5.0 Hz, 1H, NHCOO), 7.36-7.39 (m, 5H, Ar-H), 9.28 (rs, 1H, NHOCH<sub>2</sub>).

**ESI-MS [M-H]<sup>-</sup>:** m/z = 309

**HRMS** (m/z = 309) za C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: izračunan 309.1450 in izmerjen 309.1451

**4.3 SINTEZA TERC-BUTIL (1-(BENZILOKSI)-2-OKSOAZETIDIN-3-IL)KARBAMATA (3)**

Reakcija:



Sintezni postopek:

V dvoigrlo 50 mL bučko smo zatehtali 0.845 g (2.72 mmol) spojine **2** in 0.972 g (3.71 mmol) Ph<sub>3</sub>P, jo zaprli s septo, prepihali z argonom ter dodali 25 mL brezvodnega CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Ločeno smo v 10 mL z argonom prepihano in s septo zaprto bučko dodali 1.61 mL (3.54 mmol) DEAD in vsebino razredčili s 5 mL brezvodnega CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Vsebinsko manjše bučke smo v inertni atmosferi dodali v k zmesi spojine **2** in Ph<sub>3</sub>P. Reakcijsko zmes smo tri dni pustili pri 50 °C. Po tem času smo s TLC pokazali, da je reakcija potekla, zato smo pod znižanim pritiskom odpareli topilo in produkt **3** očistili s kolonsko kromatografijo v mobilni fazi MF= EtOAc : *n*-heksan = 1 : 2.

**Rezultati:**

**Izgled:** bela amorfna snov

**Izkoristek:** 86% (0.685 g)

**R<sub>f</sub>:** 0.45 (MF: EtOAc : *n*-heksan = 1 : 1)

**T<sub>tališča</sub>:** 86.0–91.0 °C (91.5–92.0 °C[22])

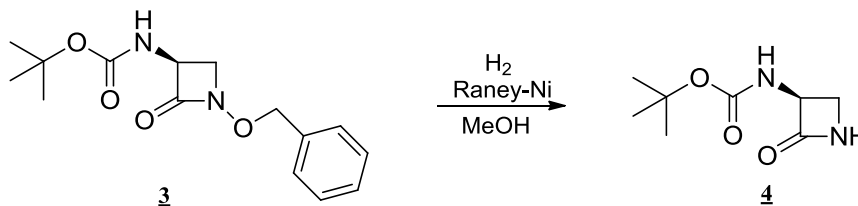
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 1.42 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.21 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.0 Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>), 3.51 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>), 4.50-4.56 (m, 1H, CH), 4.97 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 7.36-7.44 (m, 5H, Ar-H), manjka signal za NHCOO.

**ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>:** *m/z* = 293

**HRMS** (*m/z* = 293) za C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: izračunan 293.1501 in izmerjen 293.1505

#### 4.4 SINTEZA TERC-BUTIL (2-OKSOAZETIDIN-3-IL)KARBAMATA (4)

Reakcija:



Sintezni postopek:

V troglo z argonom preprihano 100 mL bučko smo prenesli 0.685 g (2.34 mmol) spojine **3** in jo raztopili v MeOH. Bučko smo še enkrat preprihali z argonom, nato v inertni atmosferi raztopino razplinili in dodali 1 g katalizatorja Raney-Ni pripravljenega tako, da smo vodno raztopino Raney-Ni filtrirali s presesavanjem in katalizator večkrat sprali z MeOH. Nato smo med mešanjem reakcijske zmesi v raztopino uvajali vodik in reakcijsko zmes pustili mešati čez noč (14 ur) nad nadtlakom vodika. TLC je pokazal, da je reakcija uspešno potekla. Ker je bilo prisotne še nekaj nezreagirane izhodne spojine **3**, smo spojino **4** očistili s pomočjo kolonske kromatografije z MF = EtOAc.

**Rezultati:**

**Izgled:** bela amorfna snov

**Izkoristek:** 68% (296 mg)

**R<sub>f</sub>:** 0.40 (MF: EtOAc)

**T<sub>tališča</sub>:** 170.0–173.0 °C (173.0–175.0 °C [22])

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 1.45 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.34 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.5 Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>), 3.62 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.5 Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>), 4.78-4.86 (m, 1H, CH), 5.18 (rd, *J* = 5.5 Hz, 1H, NHCOO), 5.87 (rs, 1H, NH).

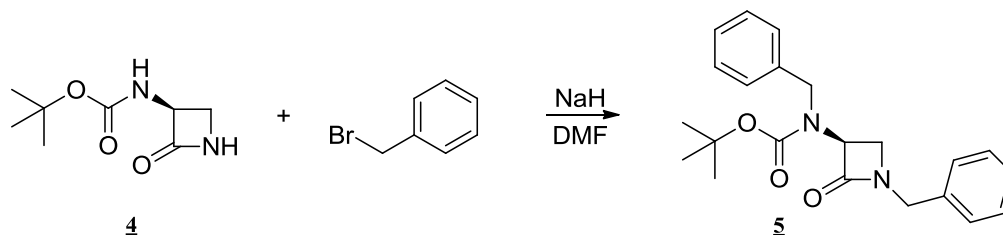
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 28.23, 44.99, 58.91, 80.49, 154.86, 168.33.

**ESI-MS [M+Na]<sup>+</sup>:** m/z = 209

**HRMS (m/z = 209)** za C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Na: izračunan 209.0902 in izmerjen 209.0903

**4.5 SINTEZA TERC-BUTIL BENZIL(1-BENZIL-2-OKSOAZETIDIN-3-IL)KARBAMATA (5)**

Reakcija:



Sintezni postopek:

V 50 mL z argonom prepihano bučko smo zatehtali 100 mg (0.54 mmol) spojine **4** in jo raztopili v 15 mL DMF. Vsebino bučke smo ohladili na 0 °C in dodali 43 mg (1.07 mmol) 60% (w/w) raztopine NaH v mineralnem olju. Po 30 minutah smo dodali 143 μL (1.18 mmol) benzil bromida in med mešanjem pustili, da se vsebina počasi segreje na sobno temperaturo. Reakcijsko zmes smo mešali čez noč (24 ur), nato mes ohladili na 0 °C, dodali 10 mL vode in 10 mL nasičene vodne raztopine NaCl ter ekstrahirali z EtOAc (3 × 30 mL). Zbrane organske faze smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in pod znižanim tlakom odparili topilo. Spojino **5** smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: EtOAc : *n*-heksan = 1 : 2).

**Rezultati:**

**Izgled:** brezbarvno olje

**Izkoristek:** 26% (52 mg)

**R<sub>f</sub>:** 0.44 (MF: EtOAc : *n*-heksan = 2 : 3)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 1.45 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.03 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.5 Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>), 3.17 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>), 3.95-4.13 in 4.97-5.11 (m, 1H, CH), 4.30-4.62 (m, 4H, 2 × CH<sub>2</sub>Ph), 7.10-7.35 (m, 10H, Ar-H).

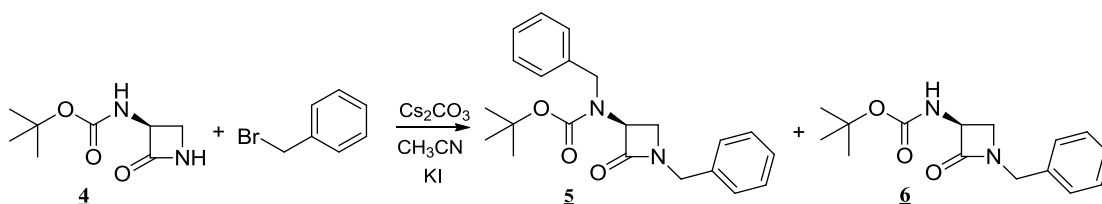
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 28.21, 45.82, 46.67, 50.44, 63.07, 81.11, 126.87, 127.27, 127.69, 128.13, 128.50, 128.71, 135.02, 138.18, 154.75, 166.63.

**ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>:** m/z = 367

**HRMS (m/z = 367)** za C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: izračunan 367.2022 in izmerjen 367.2032

**4.6 SINTEZA TERC-BUTIL BENZIL(1-BENZIL-2-OKSOAZETIDIN-3-IL)KARBAMATA (5) IN TERC-BUTIL (1-BENZIL-2-OKSOAZETIDIN-3-IL)KARBAMATA (6)**

Reakcija:



Sintezni postopek:

V 50 mL z argonom preprihano bučko smo zatehtali 100 mg (0.54 mmol) spojine **4** in jo raztopili v 10 mL CH<sub>3</sub>CN. Reakcijsko zmes smo segreli na 50 °C, dodali 211 mg (0.64 mmol) Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 96 μL (0.81 mmol) benzil bromida ter nazadnje še 8.9 mg (0.06 mmol) KI. Reakcijsko zmes smo 30 ur pustili mešati pri 50 °C. Nato smo dodali 15 mL vode in ekstrahirali z EtOAc (3 × 30 mL). Zbrane organske faze smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in pod znižanim tlakom odparili topilo. Spojini **5** in **6** smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc : *n*-heksan = 2 : 3).

**Rezultati:**

***Terc*-butil benzil(1-benzil-2-oksoazetidin-3-il)karbamat – spojina 5**

**Izgled:** brezbarvno olje

**Izkoristek:** 10% (20 mg)

**R<sub>f</sub>:** 0.44 (MF: EtOAc : *n*-heksan = 2 : 3)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 1.45 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.03 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.5 Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>), 3.17 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>), 3.95-4.13 in 4.97-5.11 (m, 1H, CH), 4.30-4.62 (m, 4H, 2 × CH<sub>2</sub>Ph), 7.10-7.35 (m, 10H, Ar-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 28.21, 45.82, 46.67, 50.44, 63.07, 81.11, 126.87, 127.27, 127.69, 128.13, 128.50, 128.71, 135.02, 138.18, 154.75, 166.63.

**ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>:** *m/z* = 367

**HRMS** (*m/z* = 367) za C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: izračunan 367.2022 in izmerjen 367.2032

***Terc*-butil (1-benzil-2-oksoazetidin-3-il)karbamat – spojina 6**

**Izgled:** bela amorfna snov

**Izkoristek:** 18% (27 mg)

**R<sub>f</sub>:** 0.22 (MF: EtOAc : *n*-heksan = 2 : 3)

**T<sub>tališča</sub>:** 128.0–129.5 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 1.42 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.12 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.5 Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>), 3.44 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.5 Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>), 4.36 in 4.44 (AB, *J* = 14.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.75-4.84 (m, 1H, CH), 5.29 (rd, *J*<sub>1</sub> = 5.5 Hz, 1H, NHCOO), 7.21-7.37 (m, 5H, Ar-H).

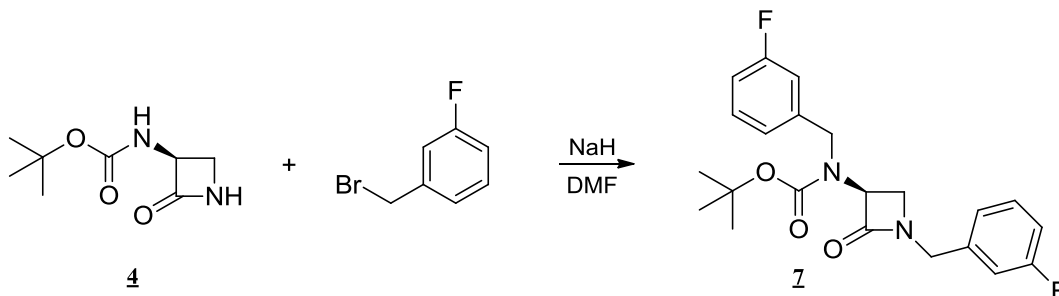
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 28.23, 45.99, 48.62, 57.33, 90.40, 127.88, 128.19, 128.86, 134.99, 154.80, 166.80.

**ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>:** *m/z* = 277

**HRMS** (*m/z* = 277) za C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: izračunan 277.1552 in izmerjen 277.1558

#### 4.7 SINTEZA TERC-BUTIL 3-FLUOROBENZIL(1-(3-FLUOROBENZIL)-2- OKSOAZETIDIN-3-IL)KARBAMATA (7)

Reakcija:



Sintezni postopek:

V 50 mL z argonom prepihano bučko smo natehtali 186.21 mg (1.00 mmol) spojine **4** in jo raztopili v 15 mL DMF. Vsebino bučke smo ohladili na 0 °C in dodali 80 mg (2.00 mmol) 60 % (w/w) raztopine NaH v mineralnem olju. Po 30 minutah smo dodali 270  $\mu$ L (2.20 mmol) 1-(bromometil)-3-fluorobenzena in reakcijsko zmes mešali čez noč (24 ur) na sobni temperaturi. Spojino smo izolirali tako, da smo reakcijsko zmes ohladili na 0 °C, dodali 10 mL vode in 10 mL nasičene vodne raztopine NaCl ter ekstrahirali z EtOAc (3  $\times$  30 mL). Zbrane organske faze smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in pod znižanim tlakom odparili topilo. Spojino **7** očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: EtOAc : *n*-heksan = 1 : 4).

#### Rezultati:

**Izgled:** brezbarvno olje

**Izkoristek:** 25% (101 mg)

**R<sub>f</sub>:** 0.27 (MF: EtOAc : *n*-heksan = 1 : 4)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 1.45 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.09 (dd,  $J_1 = 5.5$  Hz,  $J_2 = 3.0$  Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>), 3.24 (dd,  $J_1 = 5.5$  Hz,  $J_2 = 5.5$  Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>), 4.02-4.10 in 4.95-5.03 (m, 1H, CH), 4.25-4.64 (m, 4H, 2  $\times$  CH<sub>2</sub>Ph), 6.85-7.04 (m, 6H, Ar-H), 7.22-7.32 (m, 2H, Ar-H).

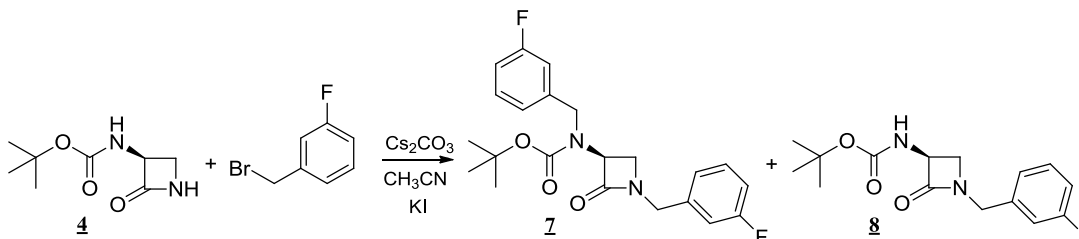
**ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>:** m/z = 403

**HRMS** (m/z = 403) za C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>F<sub>2</sub>: izračunan 403.1833 in izmerjen 403.1841



#### 4.8 SINTEZA TERC-BUTIL 3-FLUOROBENZIL(1-(3-FLUOROBENZIL)-2-OKSOAZE-TIDIN-3-IL)KARBAMATA (7) IN TERC-BUTIL (1-(3-FLUOROBENZIL)-2-OKSOAZETIDIN-3-IL)KARBAMATA (8)

Reakcija:



Sintezni postopek:

V 50 mL z argonom preprihano bučko smo zatehtali 186 mg (1.00 mmol) spojine **4** in jo raztopili v 15 mL CH<sub>3</sub>CN. Reakcijsko zmes smo segreli na 50 °C, dodali 391 mg (1.20 mmol) Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 183 µL (1.50 mmol) benzil bromida. Po nekaj minutah smo v reakcijsko zmes dodali še 16.6 mg (0.10 mmol) kalijevega jodida. Reakcijsko zmes smo 24 ur pustili mešati pri 50 °C. Nato smo dodali 15 mL vode in ekstrahirali z EtOAc (3 × 30 mL). Zbrane organske faze smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in pod znižanim tlakom odparili topilo. Spojini **7** in **8** smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc : *n*-heksan = 1 : 4).

#### **Rezultati:**

**Terc-butil 3-fluorobenzil(1-(3-fluorobenzil)-2-oksoazetidid-3-il)karbamata - spojina **7****

**Izgled:** brezbarvno olje

**Izkoristek:** 13% (51 mg)

**R<sub>f</sub>:** 0.70 (MF: EtOAc : *n*-heksan = 2 : 3)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm]= 1.45 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.09 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 3.0 Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>), 3.24 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.5 Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>), 4.02-4.10 in 4.95-5.03 (m, 1H, CH), 4.25-4.64 (m, 4H, 2 × CH<sub>2</sub>Ph), 6.85-7.04 (m, 6H, Ar-H), 7.22-7.32 (m, 2H, Ar-H).

**ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>:** *m/z* = 403

**HRMS** (*m/z* = 403) za C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>F<sub>2</sub>: izračunan 403.1833 in izmerjen 403.1841

### **Terc-butil (1-(3-fluorobenzil)-2-oksoazetidin-3-il)karbamat - spojina 8**

**Izgled:** bela amorfna snov

**Izkoristek:** 20% (58 mg)

**R<sub>f</sub>:** 0.50 (MF: EtOAc : *n*-heksan = 2 : 3)

**T<sub>tališča</sub>:** 121.0–122.5 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm]= 1.44 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.18 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.5 Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>), 3.47 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.5 Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>), 4.36 in 4.46 (AB, *J* = 14.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.77-4.85 (m, 1H, CH), 5.07 (rd, *J*<sub>1</sub> = 5.5 Hz, 1H, NHCOO), 6.95-7.07 (m, 3H, Ar-H), 7.23-7.35 (m, 1H, Ar-H).

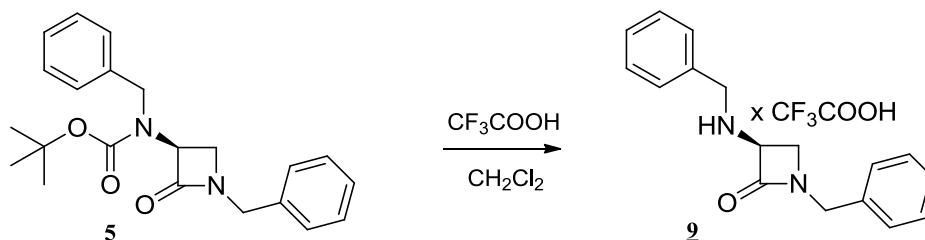
**ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>:** *m/z* = 295

**HRMS** (*m/z* = 295) za C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>F: izračunan 295.1458 in izmerjen 295.1460

## **ODSTRANITEV TERC-BUTILNE ZAŠČITNE SKUPINE**

### **4.9 ODŠČITA 1-BENZIL-3-(BENZILAMINO)AZETIDIN-2-ONA (9)**

Reakcija:



Sintezni postopek:

V 25 mL bučko smo zatehtali 52 mg (0.14 mmol) spojine **5**, bučko prepihali z argonom in dodali 5 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, da se je spojina lepo raztopila. Reakcijsko zmes smo ohladili na 0 °C in dodali 217 μL (2.84 mmol) CF<sub>3</sub>COOH in pustili mešati na sobni temperaturi 30 minut. S TLC smo preverili, da je reakcija potekla, in nato pod znižanim tlakom odparili topilo. Nato smo dodali 10 mL Et<sub>2</sub>O in ponovno pod znižanim tlakom odparili topilo in preostanek prebitne CF<sub>3</sub>COOH. Produkt **9** smo oborili iz Et<sub>2</sub>O in ga odfiltrirali s presesavanjem.

**Rezultati:**

**Izgled:** bela amorfna snov

**Izkoristek:** 58% (22 mg)

**R<sub>f</sub>:** 0 (MF: EtOAc : *n*-heksan = 1 : 1)

**T<sub>tališča</sub>:** 144.0–146.0 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ [ppm]= 3.14 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.56 (dd, *J*<sub>1</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.5 Hz, 1H, CH), 3.87 in 4.04 (AB, *J* = 13.0 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>Ph), 4.15 in 4.22 (AB, *J* = 13.0 Hz, 2H, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 7.31-7.50 (m, 10H, Ar-H), manjka signal za NH<sub>2</sub><sup>+</sup>.

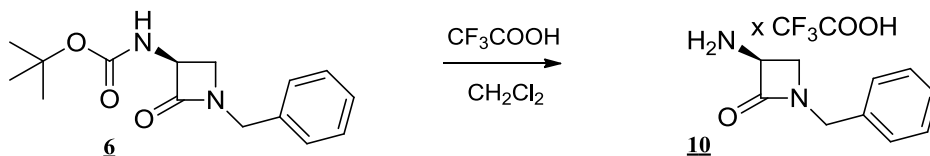
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 45.33, 49.88, 50.01, 55.23, 117.40 (q, <sup>1</sup>*J* = 298 Hz, CF<sub>3</sub>COO), 127.94, 128.44, 128.76, 128.97 (2C), 129.85, 131.98, 135.80, 158.10 (q, <sup>2</sup>*J* = 31 Hz, CF<sub>3</sub>COO), 170.17.

**ESI-MS [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>:** *m/z* = 285

**HRMS (*m/z* = 285)** za C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: izračunan 285.1841 in izmerjen 285.1844

#### 4.10 ODŠČITA 3-AMINO-1-BENZILAZETIDIN-2-ONA (**10**)

Reakcija:



Sintezni postopek:

V 25 mL bučko smo zatehtali 40 mg (0.15 mmol) spojine **6**, bučko prepihali z argonom in dodali 5 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, da se je spojina raztopila. Nato smo reakcijsko zmes ohladili na 0 °C in dodali 222 μL (2.90 mmol) CF<sub>3</sub>COOH in pustili mešati na sobni temperaturi 30 minut. S TLC smo preverili, da je reakcija potekla, in nato pod znižanim tlakom odparili topilo. Nato smo dodali 10 mL Et<sub>2</sub>O in ponovno pod znižanim tlakom odparili topilo in preostanek prebitne CF<sub>3</sub>COOH. Produkt **10** smo nazadnje oborili iz Et<sub>2</sub>O ga odfiltrirali s presesavanjem.

**Rezultati:**

**Izgled:** brezbarvno olje

**Izkoristek:** 47% (12 mg)

**R<sub>f</sub>**: 0 (MF: EtOAc : *n*-heksan = 1 : 1)

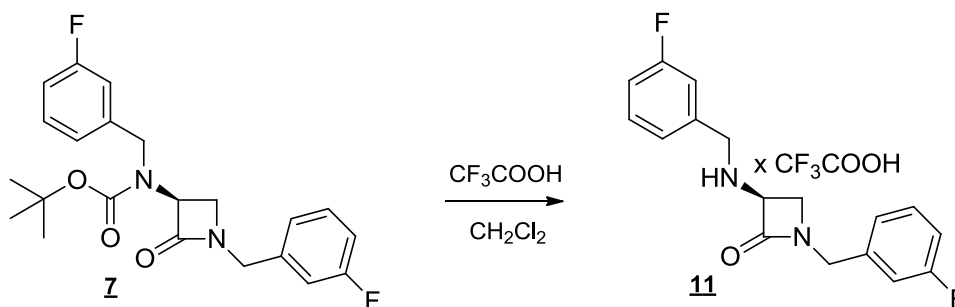
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm]= 3.20 (dd,  $J_1 = 6.0$  Hz,  $J_2 = 2.5$  Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>), 3.47 (dd,  $J_1 = 6.0$  Hz,  $J_2 = 5.0$  Hz, 1H, 1H od CH<sub>2</sub>), 4.20 in 4.43 (AB,  $J = 15.0$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.50-4.58 (m, 1H, CH), 7.18-7.23 (m, 2H, Ar-H), 7.29-7.36 (m, 3H, Ar-H), manjka signal za NH<sub>3</sub><sup>+</sup>.

**ESI-MS [M]<sup>+</sup>:**  $m/z = 177$

**HRMS** ( $m/z = 177$ ) za C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O: izračunan 177.1028 in izmerjen 177.1025

#### 4.11 ODŠČITA 1-(3-FLUOROBENZIL)-3-((3-FLUOROBENZIL)AMINO)-AZETIDIN-2-ONA (11)

Reakcija:



Sintezni postopek:

V 25 mL bučko smo zatehtali 51 mg (0.13 mmol) spojine **7**, bučko prepihali z argonom in dodali 5 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, da se je spojina lepo raztopila. Nato smo reakcijsko zmes ohladili na 0 °C in dodali 194  $\mu$ L (2.53 mmol) CF<sub>3</sub>COOH in pustili mešati na sobni temperaturi 30 minut. S TLC smo preverili, da je reakcija potekla, in nato pod znižanim tlakom odparili topilo. Nato smo dodali 10 mL Et<sub>2</sub>O in ponovno pod znižanim tlakom odparili topilo in preostanek prebitne CF<sub>3</sub>COOH. Produkt **11** smo nazadnje oborili v Et<sub>2</sub>O in ga odfiltrirali s presesavanjem.

**Rezultati:**

**Izgled:** bela amorfna snov

**Izkoristek:** 31% (12 mg)

**R<sub>f</sub>:** 0 (MF: EtOAc : *n*-heksan = 1 : 1)

**T<sub>tališča</sub>:** 141.0–143.0 °C

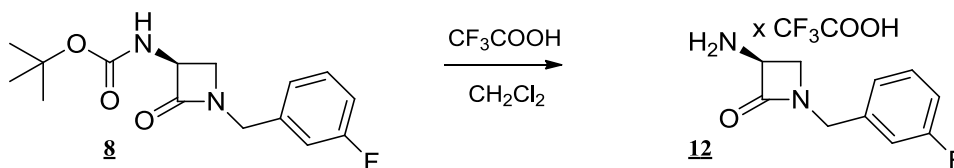
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO):** δ [ppm]= 3.04-3.20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.51-3.57 (m, 1H, CH), 3.79 in 4.00 (AB, *J* = 13.5 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>Ph), 4.18 in 4.23 (AB, *J* = 13.5 Hz, 2H, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 7.09-7.15 (m, 1H, Ar-H), 7.20-7.24 (m, 1H, Ar-H), 7.24-7.42 (m, 5H, Ar-H), 7.46-7.53 (m, 1H, Ar-H), 8.57 (rs, 2H, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>).

**ESI-MS [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>:** m/z = 321

**HRMS (m/z = 321)** za C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>OF<sub>2</sub>: izračunan 321.1653 in izmerjen 321.1675

**4.12 ODŠČITA 3-AMINO-1-(3-FLUOROBENZIL)AZETIDIN-2-ONA (**12**)**

Reakcija:



Sintezni postopek:

V 25 mL bučko smo zatehtali 40 mg (0.14 mmol) spojine **8**, bučko prepihali z argonom in dodali 5 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, da se je spojina lepo raztopila. Nato smo reakcijsko zmes ohladili na 0 °C in dodali 208 μL (2.72 mmol) CF<sub>3</sub>COOH in pustili mešati na sobni temperaturi 30 minut. S TLC smo preverili, da je reakcija potekla, in nato pod znižanim tlakom odparili topilo. Nato smo dodali 10 mL Et<sub>2</sub>O in ponovno pod znižanim tlakom odparili topilo in preostanek prebitne CF<sub>3</sub>COOH. Produkt **12** smo nazadnje oborili iz Et<sub>2</sub>O in ga odfiltrirali s presesavanjem.

**Rezultati:**

**Izgled:** brezbarvno olje

**Izkoristek:** 49% (13 mg)

**R<sub>f</sub>:** 0 (MF: EtOAc : *n*-heksan = 1 : 1)

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm]**= 3.23 (dd,  $J_1 = 6.5$  Hz,  $J_2 = 2.5$  Hz, 1H, 1H od  $\text{CH}_2$ ), 3.52 (dd,  $J_1 = 6.5$  Hz,  $J_2 = 5.5$  Hz, 1H, 1H od  $\text{CH}_2$ ), 4.40 in 4.47 (AB,  $J = 15.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.58 (dd,  $J_1 = 5.5$  Hz,  $J_2 = 2.5$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ ), 7.12-7.23 (m, 3H, Ar- $\text{H}$ ), 7.40-7.46 (m, 1H, Ar- $\text{H}$ ), 8.72 (rs, 3H,  $\text{NH}_3^+$ ).

**ESI-MS**  $[\text{M}]^+$ :  $m/z = 195$

**HRMS** ( $m/z = 195$ ) za  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OF}$ : izračunan 195.0934 in izmerjen 195.0937

## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

#### 5.1.1 **Sinteza 2-((*terc*-butoksikarbonil)amino)-3-hidroksipropanojske kisline**

(1)

Za zaščito amino skupine smo se odločili, ker smo morali preprečiti, da bi ta reagirala v katerokoli stopnji sinteze derivatov azetidin-2-ona in nam s tem povzročala težave. Amine se največkrat zaščiti v obliki karbamatov, amidov oz. drugače *N*-substituiranih derivatov (iminov, imidov).[23] Mi smo se odločili za splošno najbolj uporabljeni način, to je v obliki karbamatov, kar smo dosegli z uporabo Boc<sub>2</sub>O v bazičnih pogojih. Reakcijo smo izvedli v mešanici topil dioksan/voda, saj je Boc<sub>2</sub>O topen v dioksanu, aminokislina pa v bazični vodni raztopini. Ker se ti dve topili med seboj dobro mešata, smo tako dosegli dober stik med reagentoma in dober potek reakcije. Pri izolaciji produkta je bilo potrebno odpariti večino dioksana, sicer lahko pride zaradi težav pri ekstrakciji do zmanjšane izkoristka sinteze. Prav tako smo ugotovili, da je bilo potrebno pred ekstrakcijo z EtOAc vodno fazo, ki je ostala po odparitvi dioksana, nakisati do pH = 2, da se je karboksilna skupina produkta protonirala in tako lahko prešla v organsko fazo (EtOAc) med ekstrakcijo. Če smo nakisali manj, je bil izkoristek sinteze slabši, saj se je več spojine porazdelilo v vodno fazo. Ob nakisanju je potrebno pozorno delo, saj lahko pride pri nizki pH vrednosti zmesi do cepitve karbamatne vezi in s tem odščite produkta, kar bi tudi zmanjšalo izkoristek sinteze.

Prednost uporabljene zaščitne skupine (Boc zaščita) je tudi v tem, da se jo zlahka selektivno odstrani, npr. s prebitkom CF<sub>3</sub>COOH. Mehanizem te reakcije je opisan pod točko 5.5 komentarja sinteznih postopkov.[23]

### 5.1.2 Sinteza *terc*-butil (1-((benziloksi)amino)-3-hidroksi-1-oksopro-pan-2-il)karbamata (2)

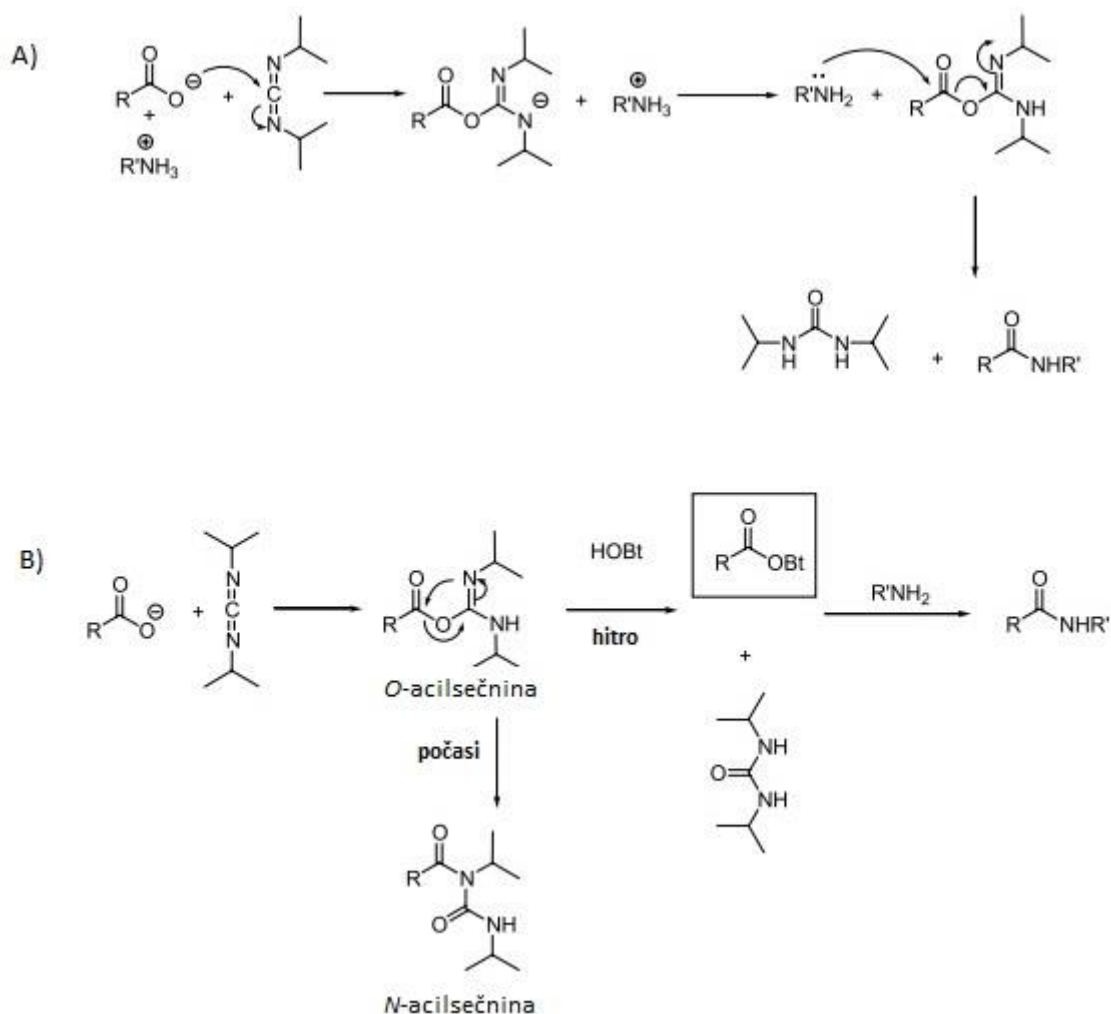
V tej stopnji sinteze smo želeli pretvoriti karboksilno kislino izhodne spojine v amid oz. ustrezeni tip spojine, ki bo imel amidno vez (ki bo kasneje osnova za laktam). To smo poskušali narediti z več postopki, a uspešno le z v podpoglavju 4.2 opisanim postopkom, katerega so v svojem delu za enako sintezno pretvorbo implementirali tudi Sliwa in soavtorji.[24]

Po tej sintezni poti, katere reakcijski mehanizem je predstavljen na sliki 8, moramo najprej povečati elektrofilnost karboksilne skupine. Uporabili smo EDC, ki je v vodi topen karbodiimid in deluje kot sklopitveni reagent. Negativno nabiti kisikov atom karboksilne skupine (z Et<sub>3</sub>N kot bazo zagotovimo odcep protona s kisika) deluje kot nukleofil, ki napade centralni ogljik EDC-ja tako, da nastane zelo reaktiven intermediat - *O*-acilsečnina. Ta nato lažje reagira z amino skupino reagenta (*O*-benzilhidroksilamina); z EDC smo torej povečali učinkovitost nukleofilnega napada ustreznega reagenta na karbonilni ogljikov atom karboksilne skupine. Nastaneta želeni amid in sečninski stranski produkt, ki je pravzaprav gonilna sila te reakcije.[25,26]

Pogosto so pri temu tipu tvorbe amidne vezi kot stranske reakcije opazili racemizacijo izhodne spojine zaradi prevelike reaktivnosti karbodiimov in prenos acilne skupine, kar vodi do nastanka stabilne in nereaktivne *N*-acilsečnine. Tej stranski reakciji se precej uspešno izognemo, če reakcija med izhodno spojino in EDC poteka pri 0 °C. Možnost racemizacije (in tudi nastanek *N*-acilsečnine) zmanjšamo z uporabo DMAP. Slednji deluje kot nukleofilni katalizator in ga v reakcijsko zmes dodamo v katalitičnih količinah. Stranske reakcije prepreči zato, ker z aktiviranim estrom (*O*-acilsečnina) reagira precej hitreje kakor pride do prenosa acilne skupine. Pri reakciji med DMAP in *O*-acilsečnino nastaja intermediat, ki je še vedno dovolj aktiven, da se sklopi z aminom (Slika 8).[25]

Zanimivo je, da smo kljub upoštevanju vseh empiričnih ugotovitev za zagotavljanje dobrega poteka reakcije dosegli le povprečen izkoristek (45%). Razlog za to je najbolj verjetno v naravi uporabljenega primarnega amina, ki je pravzaprav derivat hidroksilamina. Tudi Kokare in sodelavci so pri svojem delu, pri katerem so sintetizirali več spojin s sklapljanjem *O*-benzilhidroksilamina z različno *N*-zaščitenimi aminokislinami, dobili podobne rezultate.[27]





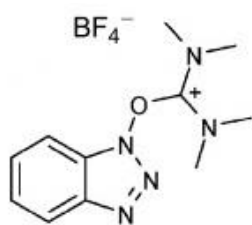
Slika 8: Sinteza amidne vezi ob prisotnosti karbodiimida (A) in sinteza amidne vezi ob prisotnosti karbodiimida in HOBt (B). Povzeto po [25].

Želeni produkt **2** smo poskušali pripraviti še po dveh poteh, in sicer smo v prvi sintezi uporabili enake reagente in sintezni postopek, le namesto DMAP smo uporabili HOBt. Predpostavljeni mehanizem reakcije je predstavljen na Sliki 8. Vloga HOBt je pravzaprav enaka DMAP. Deluje kot nukleofil in preprečuje nastanek nereaktivne *N*-acilsečnine, tako da reagira z *O*-acilsečnino hitreje kot pa poteka prenos acilne skupine.[25,26]

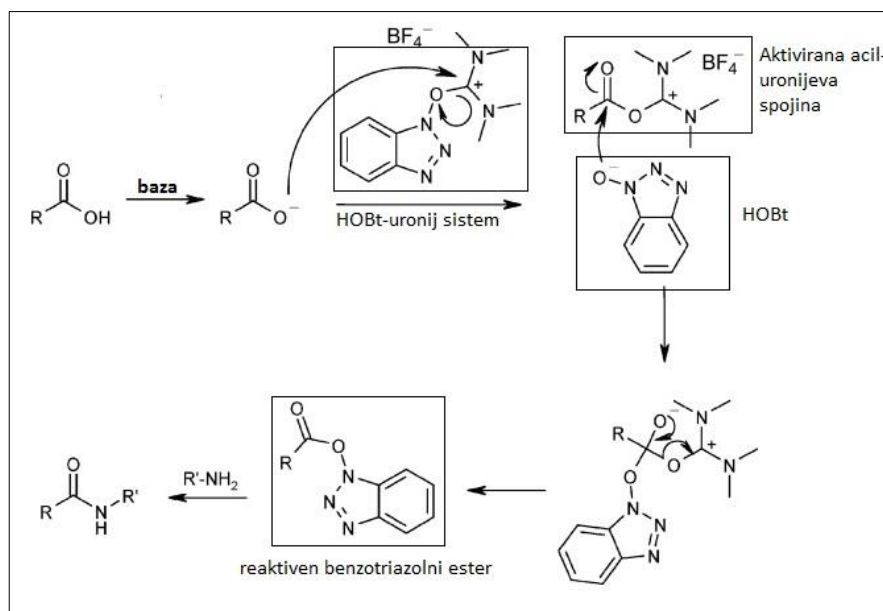
Vendar pa ta sintezna pot ni dala takšnih rezultatov kot pa zgoraj opisana reakcija z DMAP. Reakcija je sicer v določeni meri potekla, vendar pa smo naleteli na večje število težav. Prvo težavo sintezne poti je predstavljal že izkoristek reakcije, ki je bil zelo slab, zgodilo pa se je tudi, da reakcija sploh ni potekla (naredili smo več ponovitev sinteze). Produkt smo poskušali po izolaciji očistiti z obarjanjem iz zmesi topil EtOAc/*n*-heksan, pri čemer se je pojavila naslednja težava. Oborila sta se bodisi samo reagent HOBt bodisi

želeni produkt skupaj s HOBt, ki se ga ob nadaljnjih poskusih prekristalizacije ni dalo odstraniti. Zaostali HOBt pa nam je potem delal težave v naslednji sintezni stopnji, saj je reagiral z uporabljenimi reagenti namesto želenega produkta te sintezne stopnje in tako onemogočil tvorbo produkta **3**.

Produkt **2** pa smo poskušali sintetizirati še na tretji način, in sicer je sintezni postopek enak zgoraj opisanemu, le DMAP in EDC smo zamenjali s TBTU. To je novejši pristop v sintezi amidne vezi, pri katerem se popolnoma opusti uporaba karbodiimidov kot sklopitvenih reagentov. TBTU je sklopitveni reagent osnovan na HOBt sistemu in uronijevi soli (Slika 9). Mehanizem reakcije je podrobneje predstavljen na Sliki 10. Dodatek baze (v našem primeru  $\text{Et}_3\text{N}$ ) povzroči deprotonacijo karboksilnega dela izhodne spojine, ta pa zreagira s TBTU, da nastaneta aktivirana aciluronijeva spojina in HOBt. Slednji nato zreagira z aktiviranim karboksilnim delom, da nastane reaktiven benzotriazolni ester, ki naposled reagira z aminom do tvorbe amidne vezi.[25,26] Ugotovili so, da je vloga protiiona (tetrafluoroborata) pravzaprav nepomembna za sam rezultat sklopitvene reakcije, glavno vlogo odigra HOBt-uronij sistem (Slika 10). Pri tej sintezi lahko pogosto pride do stranske reakcije, namreč amin lahko reagira s sklopitvenim reagentom do nastanka gvanidinskega stranskega produkta, zato je zelo pomemben vrstni red in čas dodajanja reagentov.[25,26]



Slika 9: TBTU



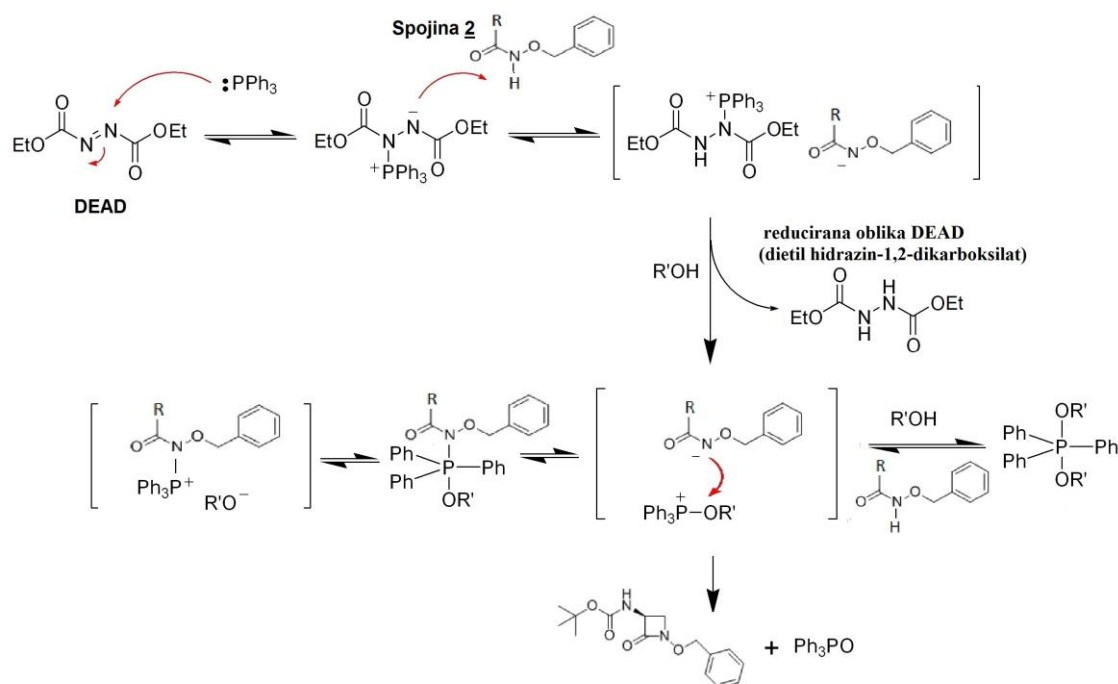
Slika 10: Mehanizem tvorbe amidne vezi ob prisotnosti sklopitvenega reagenta TBTU. Povzeto po [25].

Žal uporaba teh reakcijskih pogojev v našem primeru ni vodila do vzpodbudnih rezultatov, saj nam ni uspelo sintetizirati končne spojine. Vzrok bi lahko iskali v tem, da v času (pet min), kolikor je v našem primeru preteklo med dodatkom TBTU in našega amina (*O*-benzilhidroksilamin), TBTU ni zreagiriral z izhodno spojino, ampak je po dodatku amina reagiral v večji meri z njim.

### 5.1.3 Sinteza *terc*-butil (1-(benziloksi)-2-oksoazetidin-3-il)karbamata (3)

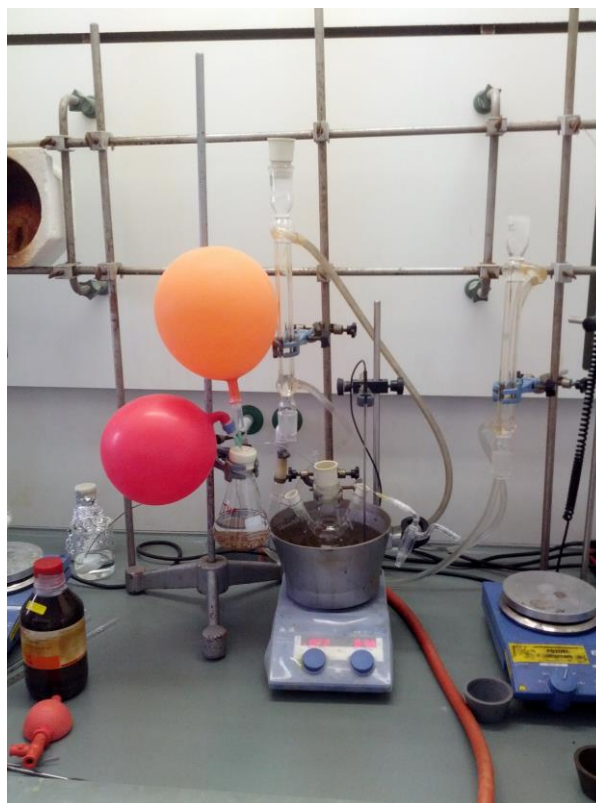
V tej stopnji smo spojino **2** pretvorili v azetidin-2-onski obroč. Pri tem smo se poslužili Mitsunobujeve reakcije, katere reakcijski mehanizem je precej kompleksen. Slednji je podrobneje opisan spodaj in prikazan na Sliki 11:

Sprva  $\text{PH}_3\text{P}$  kot nukleofil napade dietil azodikarboksilat (DEAD), pri čemer nastane Morrison-Brunn-Huisgenov (MBH) ion dvojček, tj. intermediat, ki deprotonira hidroksamatni fragment izhodne spojine **2**. Pride do hitrega nastanka intermedjata, ionskega para med pozitivno nabitim aduktom  $\text{PH}_3\text{P-DEAD}$  in negativno nabitim deprotoniranim nukleofilnim hidroksamatom. V naslednji stopnji se  $\text{PH}_3\text{P}^+$  skupina prenese na alkoholni del izhodne spojine **2**, da nastane oksifosfonijeve sol in stranski produkt, reducirani DEAD (reducira se do dietil hidrazin-1,2-dikarboksilata). Nato deprotonirani hidroksamatni nukleofil reagira z alkoksifosfonijevo soljo preko  $\text{Sn}^2$  mehanizma do nastanka azetidin-2-onskega in stranskega produkta trifenilfosfin oksida.[28-30] Po drugi poti pa lahko zgoraj omenjeni MBH ion dvojček najprej reagira z alkoholnim delom (odvisno od vrstnega reda dodajanja reagentov v reakcijsko zmes) do pentakoordiniranega fosforana, ki pa prav tako po reakciji z DEAD in karbamatom vodi do nastanka alkoksifosfonijeve soli in nato preko  $\text{Sn}^2$  mehanizma do nastanka azetidin-2-onskega obroča in trifenilfosfin oksida kot stranskega produkta.[30]



Slika 11: Mehanizem Mitsunobujeve reakcije. Prirejeno po [30].

Ugotovili smo, da smo preko Mitsunobujeve reakcije dobili želeni produkt z dokaj solidnim izkoristkom (86%) ob precej lahko dostopnih in poceni reagentih, ob tem pa se kljub temu srečali z nekaterimi težavami. Sprva smo reakcijo izvajali v THF, saj so Hughes in sodelavci ter Kumara Swamy in sodelavci ugotovili, da daje reakcija v tem topilu najboljši izkoristek. Vendar pa se je pri nas izkazalo, da reakcija v tem topilu sploh ni potekla. Pri ponovitvi reakcije smo zato zamenjali topilo in namesto THF uporabili  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , ki ga kot možno topilo (a s slabšim izkoristkom v primerjavi s THF) navajajo že prej omenjeni avtorji, in reakcija nam je v njem z različnim izkoristkom potekla v praktično vseh ponovitvah. Naslednja težava, na katero smo naleteli ob nekaterih ponovitvah reakcije, je bila možna prisotnost kisika v reakcijski zmesi. Namreč kisik lahko oksidira  $\text{Ph}_3\text{P}$ , s čimer ga naredi neuporabnega za Mitsunobujevo reakcijo. Prav tako je v prisotnem zraku lahko tudi voda (vlaga), ki prav tako moti želeno reakcijo. Zato je ves sistem zaprt in reakcija celoten čas poteka v inertni atmosferi (Slika 12).



Slika 12: Mitsunobujeva reakcija poteka v zaprtem sistemu v inertni atmosferi.

Naslednjo težavo pri izvajanju te reakcije je predstavljala tudi izolacija produkta. Kot stranska produkta nastajata trifenilfosfin oksid in dietil hidrazin-1,2-dikarboksilat (reducirana oblika DEAD), ob tem pa sta v reakcijski zmesi lahko prisotna še nezreagirani  $\text{Ph}_3\text{P}$  in DEAD. Zaradi vseh navedenih razlogov smo morali produkt vedno čistiti z zahtevno kolonsko kromatografijo.

Želeni produkt smo sprva poskušali sintetizirati še z DIAD namesto DEAD po istem sinteznem postopku. DIAD je diizopropilni analog DEAD in se na splošno sicer več uporablja, saj je manj toksičen in delo z njim je bolj varno.[31] Hughes in soavtorji so tudi ugotovili, da je dober reagent za Mitsunobujevo reakcijo in da daje podobne izkoristke. Skladno z njihovimi ugotovitvami smo tudi mi potrdili, da sinteza poteče do zelenega produkta tudi ob uporabi DIAD, vendar pa smo se tu poleg zgoraj opisanih težav pri uporabi DEAD srečali še z nekaterimi. Poleg slabšega izkoristka tudi pri tej reakciji pride do redukcije reagenta, pri čemer nastane diizopropil hidrazin-1,2-dikarboksilat, ki pa je še bolj motil čiščenje produkta **3**, saj smo morali spojino očistiti s kolonsko kromatografijo dvakrat, najprej v MF = EtOAc : *n*-heksan = 1 : 2 in nato še v MF =  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH = 20 : 1, saj sta se pri prvi ločbi reducirani DIAD in produkt zelo slabo ločila.

#### 5.1.4 Sinteza *terc*-butil (2-oksoazetidin-3-il)karbamata (**4**)

V tej stopnji sinteze gre za katalitsko hidrogeniranje produkta **3**, pri čemer nastane laktamski skelet in benzilni alkohol kot stranski produkt. Ob prisotnosti Raneyevega niklja se molekula vodika na njem pretvori do atomov vodika, ki hidrogenirata N-O vez do končnega produkta **4**. Literatura navaja, da naj bi ta stopnja sinteze potekla s 100% izkoristkom že pri zelo milih pogojih (nizek tlak vodika in majhen prebitek katalizatorja).[32] Drugi literaturni podatki pa so izpostavili, da mora katalitsko hidrogeniranje z Raneyevim nikljem potekati pri močno povišanem tlaku (tudi 60 in več atmosfer).[33] Allen in soavtorji navajajo tudi, da je v določenih primerih reakcijsko zmes za boljši potek reakcije potrebno segreti.[33] Kljub upoštevanju vseh priporočil iz literature (segrevanje reakcijske zmesi) smo kljub večkratni ponovitvi sinteze dosegli maksimalni izkoristek 68%. Najbolj verjetno bi morali za doseganje še boljšega izkoristka reakcijo izvesti v reaktorju pri povišanem tlaku vodika.

#### 5.1.5 Sinteza končnih s *terc*-butil karbonatom zaščitenih spojin (spojine **5-8**)

Spojine **5-8** smo uspešno sintetizirali na dva načina:

Po principu sintezne poti, ki so jo pri svojem delu uporabili Sliwa in soavtorji, smo najprej z močno bazo NaH v brezvodnem DMF odcepili proton na laktamskem skeletu, tako da je slednji postal dovolj reaktiven za reakcijo z elektrofilnim reagentom. Nato smo dodali 2.2 ekvivalenta ustreznega reagenta (benzil bromid ali 3-fluorobenzil bromid), pri čemer je potekla nukleofilna substitucija in nastala sta ustrezna produkta, spojini **5** in **7**. [32] Z uporabo NaH kot baze smo uspeli pripraviti samo disubstituirane produkte; namreč NaH je tako močna baza, da je prišlo do odcepa tako protona z dušikovega atoma na laktamskem obroču, kakor tudi na karbamatnem dušikovem atomu. Tako je nukleofilna substitucija potekla na dveh mestih. Po sinteznem postopku, ki ga predlagajo Sliwa in soavtorji, sta za reakcijo predpisana dva ekvivalenta NaH. Po prvi sintezi z uporabo NaH kot baze smo sklepali, da so Sliwa in soavtorji želeli pripraviti disubstituirane produkte, zato smo reakcijo izvedli samo z enim ekvivalentom NaH, saj smo pričakovali, da bo do odcepa protona prišlo samo na laktamskem dušiku, ki je bolj kisel kot proton na karbamatnem N-atomu. Naš primarni cilj je bil namreč sintetizirati različne monosubstituirane produkte.

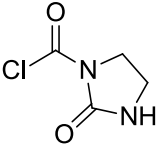
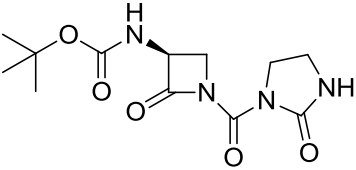
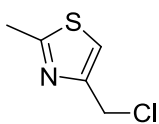
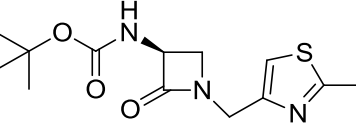
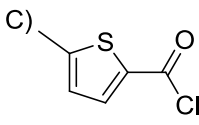
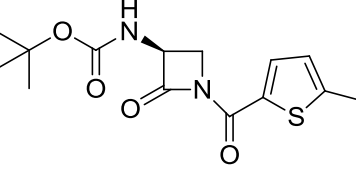
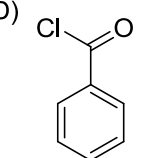
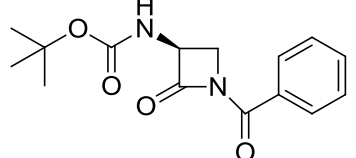
Vendar pa smo ugotovili, da tudi ob uporabi le enega ekvivalenta NaH pride do odcepa protona na obeh dušikih in posledično do nastanka disubstituiranega produkta. Kot so navajali že podatki v literaturi, je tudi nam ta reakcija dala slabe izkoristke in sicer 26% za sintezo dibenziliranega produkta in 25% za sintezo di-3-fluorobenziliranega produkta.[32]

Po drugem sinteznem postopku smo prav tako uporabili močno bazo za odcep protona z laktamskega dušika. Namesto NaH smo uporabili  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  in brezvodni  $\text{CH}_3\text{CN}$  kot topilo. Pri tej sintezi smo prišli do zanimive ugotovitve, saj je  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  odcepil delno samo proton na laktamskem dušiku, delno pa oba protona. Tako smo z uporabo teh pogojev dobili dva različna produkta. Prvi je bil disubstituiran, kakršnega smo dobili tudi pri sinteznem postopku z NaH kot bazo, drugi produkt pa je bil monosubstituiran. Odgovor na vprašanje, zakaj smo dobili dva produkta namesto enega, bi lahko iskali v tem, da je  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  malo šibkejša baza kot NaH in je bil zato favoriziran odcep protona z laktamskega dušika, ki je bolj kisel. To se je v določeni meri izkazalo tudi pri izkoristku reakcije, ki je bil višji za monosubstituiran produkt. Pri tem sinteznem postopku smo prišli do podobne ugotovitve kot pri postopku z NaH, namreč izkoristek reakcije je tudi tu zelo slab. Monosubstituiran produkt je nastal z izkoristkom reakcije 18% za benziliran in 20% za 3-fluorobenziliran produkt, disubstituiran produkt pa z 10% za dibenziliran in 13% za di-3-fluorobenziliran produkt. Po pregledu literature smo ugotovili, da so pri podobnih reakcijah izkoristki slabi, npr. Palomo in soavtorji so dobili podobne rezultate z uporabo zgoraj opisanega sinteznega postopka (40% izkoristek).[34]

V sklopu te reakcije velja omeniti tudi dejstvo, da smo v reakcijsko zmes dodajali tudi katalitično količino KI. To smo storili zato, da bi še povečali reaktivnost elektrofilnega reagenta in s tem uspešnost reakcije. Namreč  $\text{I}^-$ , ki je boljše izstopajoča skupina kot  $\text{Br}^-$ , je zamenjal  $\text{Br}^-$  in tako povečal elektrofilne lastnosti reagenta in olajšal nukleofilni napad laktamskega dušikovega atoma.

Po enakem ali podobnih sinteznih postopkih (namesto NaH ali  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  smo sprva poizkušali tudi s šibkejšo bazo piridinom) smo poizkušali sintetizirati tudi druge različne na laktamskem dušiku monosubstituirane produkte. V Tabeli V so prikazani uporabljeni reagenti in produkti, ki smo jih želeli sintetizirati.

Tabela V: Uporabljeni reagenti in produkti, ki smo jih tudi želeli poleg uspešno sintetiziranih produktov sintetizirati z uporabo baz NaH ali Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Reagent	Pričakovani produkt
A) 	
B) 	
C) 	
D) 	

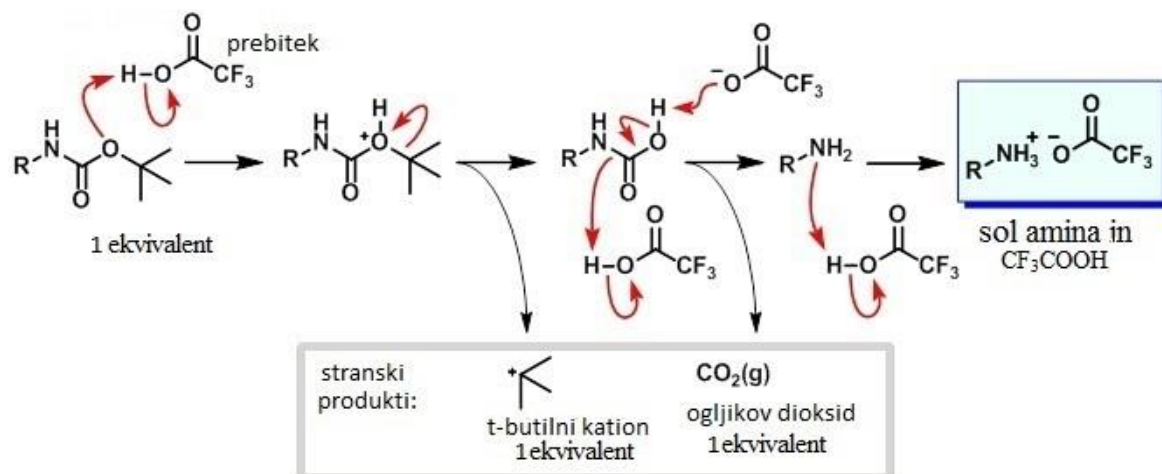
Žal z v Tabeli V naštetimi reagenti nismo uspeli sintetizirati produkta po zgoraj opisanih postopkih, saj reakcije niso potekle.

Pri reagentu B) sklepamo, da je težava najverjetneje v tem, da je reagent alkil klorid, ki vsebuje šibkejšo izstopajočo skupino kot alkil bromidi in je tako verjetno premalo reaktiven za uspešen potek reakcije. Tudi dodatek KI ni pripomogel k temu, da bi reakcija potekla. Tudi pri reagentih A), C) in D) smo prišli do podobnih sklepov, zakaj reakcije ne potečejo. Najbolj verjetno so bili uporabljeni kislinski kloridi premalo reaktivni za uspešno tvorbo amidne vezi z izhodno spojino.



### 5.1.6 Sinteza končnih odščitnih spojin (spojine 9-12)

Spojine 9-12 smo sintetizirali iz spojin 5-8, ki so bile zaščitene z Boc, katerega mehanizem odstranitve je predstavljen na Sliki 13.



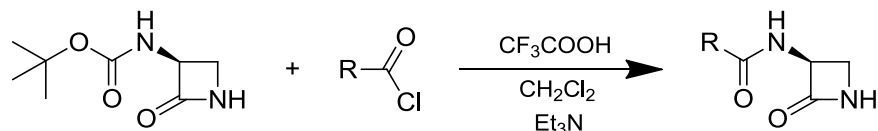
Slika 13: Mehanizem odstranitve Boc zaščitne skupine s CF<sub>3</sub>COOH. Povzeto po [35]

Boc zaščito smo odstranili s CF<sub>3</sub>COOH, pri čemer nastane sol med aminom in CF<sub>3</sub>COOH. Stranskih produktov reakcije se znebimo zelo enostavno, saj nastaneta CO<sub>2</sub> in *tert*-butilni kation, ki se pretvori do plina izobutilena. CF<sub>3</sub>COOH najprej protonira *tert*-butil karbamat, pri čemer izstopi *tert*-butilni kation in nastane karbaminska kislina. Prisotnost CF<sub>3</sub>COOH vodi v dekarboksilacijo karbaminske kisline, pri čemer nastane prosti amin. Zaradi prisotnosti CF<sub>3</sub>COOH in posledično kislih pogojev, se amin protonira in tako nastane sol med aminom in CF<sub>3</sub>COOH.[36]

### 5.1.7 Neuspešen poskus sinteze nekaterih končnih spojin

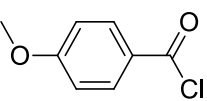
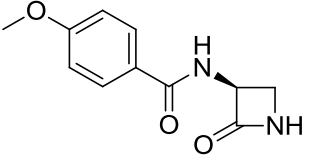
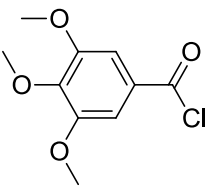
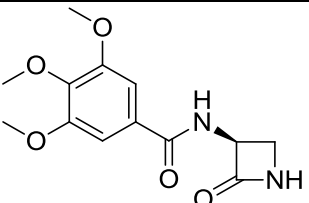
Tekom našega eksperimentalnega dela smo poskušali sintetizirati tudi samo na karbamatnem dušiku substituirane produkte (ustrezne amide). To smo poskušali narediti po postopku, ki ga v svojem delu predlagajo Sliwa in soavtorji (Slika 14).[24] Postopek je v prvem delu pravzaprav enak v 5.1.6 poglavju opisanemu postopku odstranitve Boc zaščite. Edina razlika je, da smo v tem primeru imeli osnovni monobaktam na aminu zaščiten z Boc skupino, laktamski dušik pa je bil prost. Sliwa in soavtorji so najprej s CF<sub>3</sub>COOH odstranili Boc zaščitno skupino, nato so dobro odparili preostalo topilo in preostanek

CF<sub>3</sub>COOH, nato pa nastali viskozni produkt raztopili v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in dodali tri ekvivalente Et<sub>3</sub>N kot baze, ki nevtralizira možni preostanek CF<sub>3</sub>COOH in deprotoniraaminsko skupino. Ta nato zreagira z ustreznim reagentom (predstavljeni so v Tabeli VI).[24]



Slika 14: Primer neuspešnih poskusov sinteze končnih spojin.

Tabela VI: Uporabljena reagentna in pričakovana produkta, ki smo ju želeli sintetizirati s postopkom predstavljenim v podpoglavju 5.1.7.

Reagent	Pričakovani produkt
A) 	
B) 	

Noben od reagentov nam žal ni dal želenega produkta. S TLC smo ugotovili, da odstranitev Boc zaščitne skupine sicer poteče, reakcija med reagentom in izhodno spojino v naslednji stopnji pa ne. Sklepamo, da sta možna razloga za neuspeh lahko dva: ali je Et<sub>3</sub>N prešibka baza, da bi deprotoniralaaminsko skupino in jo s tem aktivirala, ali pa sta reagentna, ki sta po svojih kemijskih lastnostih kislinska klorida, premalo reaktivna za to reakcijo.

## 5.2 BIOKEMIJSKO VREDNOTENJE PRIPRAVLJENIH SPOJIN NA REZISTENTNIH PBP

V diplomskem delu smo sintetiziranim spojinam določili zaviralno aktivnost na različnih PBP in s tem preverili njihovo učinkovitost. Uporabili smo dva encima, izolirana iz rezistentnih sevov (PBP5fm iz *Enterococcus faecium* D63r in PBP2a iz na meticilin odpornega *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA)), ter enega, ki je bil izoliran iz nerezistentnega seva R39 (na penicilin občutljiva D,D-karboksipeptidaza iz *Actynomadura*).

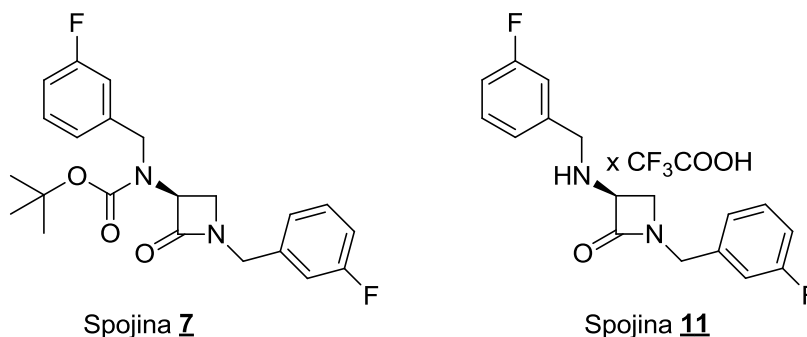
Biokemijsko vrednotenje spojin je bilo opravljeno v sodelovanju z raziskovalci Centra za proteinski inženiring v Liegu. Zaviralno aktivnost smo preverili tako, da smo vsak PBP določene koncentracije (2.5  $\mu$ M) inkubirali štiri ure pri 30 °C z vsako izmed testiranih spojin (koncentracija 1 mM) v fosfatnem pufru (c = 100 mM) in dodanim 0.01% Triton X-100 pri pH = 7. Nato smo dodali 25  $\mu$ M s fluoresceinom označenega ampicilina za detekcijo rezidualne penicilin vezavne aktivnosti. Vzorce smo nadalje 30 minut inkubirali pri 37 °C v končnem volumnu 20  $\mu$ L. Potem smo dodali denaturacijski pufer (0.1 M Tris/HCl, pH 6.8, ki vsebuje 25% glicerola, 2% SDS, 20%  $\beta$ -merkaptotetanol in 0.02% bromfenola modro) in vzorce segrevali 1 minuto pri 100 °C. Vzorce smo nato nanegli na 10% SDS-akrilamid gel (10  $\times$  7 cm) in izvedli elektroforezo, ki je trajala 45 minut pri 180 V (12 mA). Detekcijo in kvantifikacijo rezidualnih aktivnosti (RA) smo opravili z opremo Molecular Image FX in programsko opremo Quantity One (BioRad, Hercules, CA, USA). Za vsako spojino smo izvedli 3 neodvisne eksperimente.

Rezidualno penicilin vezavno aktivnost izrazimo v % in predstavlja preostalo aktivnost encima po inhibiciji z našo spojino. Čim nižja je rezidualna aktivnost encima, boljše zaviralno delovanje ima spojina. V Tabeli VII so prikazani rezultati biokemijskega vrednotenja pripravljenih spojin na omenjenih PBP.

Tabela VII: Rezidualne aktivnosti sintetiziranih spojin, izražene v %.

Oznaka spojine	% RA PBP2a	% RA PBP5f	% RA R39
<u>3</u>	86	88	92
<u>4</u>	74	78	100
<u>5</u>	96	100	82
<u>6</u>	98	100	80
<u>7</u>	69	79	100
<u>8</u>	70	100	91
<u>9</u>	88	98	82
<u>10</u>	78	86	82
<u>11</u>	67	81	92
<u>12</u>	100	100	88

Iz eksperimentalnih podatkov, prikazanih v Tabeli VII, lahko ugotovimo, da naše sintetizirane spojine žal izkazujejo slabo izraženo zaviralno delovanje na vseh testiranih PBP. Še največ zaviralnega potenciala je pokazala spojina 7 (Slika 15), ki je povzročila 69% rezidualno aktivnost PBP2a iz na meticilin odpornega *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 in 79% PBP5f iz *Enterococcus faecium* D63r. Tudi spojina 11 (Slika 15), ki je povzročila 67% rezidualno aktivnost PBP2a ter 81% rezidualno aktivnost PBP5f, je zanimiva, vendar še vedno daleč od zelenih zaviralnih koncentracij. Dejstvo je, da zaviralne aktivnosti spojin, predstavljene v tem diplomskem delu, niso najboljše, so pa dober pokazatelj in korak naprej k razumevanju strukturnih zahtev, ki jih moramo izpolniti z namenom doseči dobro zaviralno delovanje na PBP tako iz rezistentnih sevov kakor tudi iz nerezistentnih.



Slika 15: Spojini 7 in 11, ki sta pokazali največ zaviralnega potenciala.

## 6 SKLEP

V okviru diplomskega dela smo se posvetili dvema glavnima nalogama. Najprej smo optimizirali štiristopenjsko sintezo spojine **4** ((*S*)-*terc*-butil (2-oksoazetidin-3-il)karbamat), ki je služila kot osnovna spojina za drugi del diplomske naloge. V tem smo sintetizirali in kemijsko okarakterizirali osem novih spojin kot potencialnih zaviralcev PBP iz rezistentnih sevov. Na laktamski dušik (*S*)-*terc*-butil (2-oksoazetidin-3-il)karbamata smo uvedli bodisi benzilni fragment z uporabo benzil bromida bodisi 3-fluorobenzilni fragment z uporabo 3-fluorobenzil bromida. Z uporabo modificiranih pogojev smo uspeli poleg monosubstituiranih pripraviti tudi disubstituirane derivate azetidin-2-ona; slednji so imeli substituirana oba dušikova atoma, in sicer tako laktamskega kakor tudi karbamatnega. Nazadnje smo vsem štirim derivatom zaščitene azetidin-2-ona odstranili Boc zaščitno skupino. Vsem pripravljenim spojinam smo določili zaviralno aktivnost na treh različnih PBP in s tem preverili njihovo učinkovitost. Dva encima sta bila izolirana iz rezistentnih sevov (PBP5fm iz *Enterococcus faecium* D63r in PBP2a iz na meticilin odpornega *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA)), en pa je bil izoliran iz nerezistentnega seva R39 (na penicilin občutljiva D,D-karboksipeptidaza iz *Actynomadura*). Kljub dejstvu, da vse sintetizirane spojine izkazujejo šibko zaviralno delovanje na ovrednotenih PBP, pa nam pridobljeni strukturni podatki služijo kot vodilo za nadaljnje načrtovanje potencialnih zaviralcev PBP tako iz rezistentnih kakor tudi iz nerezistentnih sevov.

## 7 VIRI

1. Williams D. A.; Lemke, T. L.; Roche, V. F.; Zito, S. W. Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5<sup>th</sup> edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 819-864.
2. Rang, H. P.; Dale M. M.; Ritter J.M.; Flower, R.J.; Henderson, G. Rang and Dale's Pharmacology, 7<sup>th</sup> edition. New York: Churchill Livingstone, 2012: 609-637.
3. Sosič, I. Strukturno podprto načrtovanje in sinteza encimskih inhibitorjev s potencialnim protibakterijskim in protitumoromnim delovanjem: doktorska disertacija, Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2012.
4. Sandegren, L.; Andersson, D.I. Bacterial gene amplification: implications for the evolution of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 578-588.
5. Alanis, A. J. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Arch Med Res* 2005; 36 (6): 697-705.
6. Bower, C. K.; Daeschel, M. A. Resistance responses of microorganisms in food environments. *Int J Food Microbiol* 1999; 50: 33-44.
7. Macheboeuf, P.; Contreras-Martel, C.; Job, V.; Dideberg, O.; Dessem, A. Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *Microbiol Rev* 2006; 30: 673-691.
8. Sauvage, E.; Kerff, F.; Terrak, M.; Ayala, J. A.; Charlier, P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *Microbiol Rev* 2008; 32: 234-258.
9. Contreras-Martel, C.; Dahout-Gonzalez, C.; Dos Santos Martins, A.; Kotnik, M.; Dessen, A. PBP Active Site Flexibility as the Key Mechanism for  $\beta$ -Lactam Resistance in Pneumococci. *J Mol Biol* 2009; 387: 899-909.
10. Sliwa, A.; Dive, G.; Zervosen, A.; Verlaine, O.; Sauvage, E.; Marchand-Brynaert, J. Unprecedented inhibition of resistant penicillin binding proteins by bis-2-oxoazetidinyll macrocycles. *Med Chem Commun* 2012; 3: 344-351.
11. Lovering, A. L.; Gretes, M. C.; Safadi, S. S.; Danel, F.; de Castro, L.; Page, M. G. P.; Strynadka, N. C. J. Structural Insights into the Anti-methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Activity of Ceftobiprole. *J Biol Chem* 2012; 287 (38): 32096-32102.

12. Royet, J.; Dziarski, R. Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 264-277.
13. Goffin, C.; Ghuysen, J. M. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol R* 1998; 62: 1079-1093.
14. Pinho, M. G.; de Lencastre, H.; Tomasz, A.; An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10886-10891.
15. Zorzi, W.; Zhou, X. Y.; Dardenne, O.; Lamotte, J.; Raze, D.; Pierre, J.; Gutmann, L.; Coyette, J. Structure of the low-affinity penicillin-binding protein 5 PBP5fm in wild type and highly penicillin-resistant strains of *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol* 1996; 178: 4948-4957.
16. Spratt, B. G. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 1994; 264: 388-393.
17. Rubtsova, M. Yu.; Ulyashova, M. M.; Bachmann, T. T.; Schmid, R. D.; Egorov, A. M. Multiparametric determination of genes and their point mutations for identification of beta-lactamases. *Biochemistry* 2010; 75 (13): 1628-1649.
18. Singh, G. S.  $\beta$ -Lactams in the New Millennium. Part-I: Monobactams and Carbapenems. *Mini-Rev Med Chem* 2004; 4: 69-92.
19. Georgopapadakou, N. H.; Smith, S. A.; Cimarusti, C. M.; Sykes, R. B. Binding of Monobactams to Penicillin-Binding Proteins of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: Relation to Antibacterial Activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 23 (1): 98-104.
20. Guanti, G.; Riva, R.; Cascio, G.; Manghisi, E.; Morandotti, G.; Satta, G.; Sperning, R. A new class of cis-monobactam derivatives bearing a sulfamoyloxymethyl or an N-alkylsulfamoyloxymethyl group at position 4: synthesis and antibacterial activity. *Farmaco* 1998; 53: 173-180.
21. Bush, K.; Pucci, M. J. New antimicrobial agents on the horizon. *Biochem Pharmacol* 2011; 82: 1528-1539.
22. Mattingly, P. G.; Miller, M. J. Titanium trichloride reduction of substituted N-hydroxy-2-azetidínones and other hydroxamic acids. *J Org Chem* 1980; 45 (3): 410-415.

23. Pečar, S.; Sollner Dolenc, M. Vaje iz farmacevtske kemije III, 2. dopolnjena izdaja; Univerza v Ljubljani, fakulteta za farmacijo, 2000: 88-90.
24. Sliwa, A.; Dive, G.; Habib Jiwana, J.-L.; Marchand-Brynaert, J. Cyclodimerization by ring-closing metathesis: synthesis, computational, and biological evaluation of novel bis-azetidiny-macrocycles. *Tetrahedron* 2010; 66: 9519-9527.
25. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* 2005; 61: 10827-10852.
26. Valeur E.; Bradley M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem Soc Rev* 2009; 38: 606-631.
27. Kokare, N. D.; Nagawade, R. R.; Ranea, V. P.; Shindea, D. B. Design, synthesis and utilization of a novel coupling reagent for the preparation of O-alkyl hydroxamic acids. *Tetrahedron Lett* 2007; 48: 4437-4440.
28. Hughes, D. L. Organic reactions, 42<sup>th</sup> edition. ZDA: Wiley, 2004: 335-395.
29. Hughes, D. L. Progress in the Mitsunobu reaction. A review. *Org Prep Proced Int* 1996; 28(2): 127-164.
30. Kumara Swamy, K. C.; Bhuvan Kumar, N. N.; Balaraman, E.; Pavan Kumar, K. V. P. Mitsunobu and related reactions: advances and applications. *Chem Rev* 2009; 109: 2551-2651.
31. Barrett, G. C. Amino acid derivatives: a practical approach. *Oxford University Press* 1999: 119.
32. Sliwa, A.; Dive, G.; Marchand-Brynaert, J. 12- to 22-membered bridged  $\beta$ -lactams as potential penicillin-binding protein inhibitors. *Chem Asian J* 2012; 7: 425-434.
33. Allen, C. F. H.; VanAllan, J. m-tolylbenzylamine. *Org Synth* 1955; 3: 827.
34. Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Benito, A.; Miranda, I.; Fratila, R. M.; Matute, C.; Linden, A. Development of a New Family of Conformationally Restricted Peptides as Potent Nucleators of  $\beta$ -Turns. Design, Synthesis, Structure and Biological Evaluation of a  $\beta$ -Lactam Peptide Analogue of Melanostatin. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 16243-16260.
35. Common organic chemistry. Boc Protection. [http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn\\_Pages/Boc\\_Protection/Boc\\_Protection\\_TFA\\_Mech](http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_TFA_Mech). Dostop: 15-2-2014.
36. Wuts, P. G. M.; Greene T. W. Greene's protective groups in organic synthesis. 4th ed. ZDA: Wiley, 2007: 758.