

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATIC MIKEC

MAGISTRSKO DELO

Univerzitetni program farmacije

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATIC MIKEC

**SINTEZA DIHIDROKSIBENZAMIDNIH ZAVIRALCEV
BIOSINTEZE PEPTIDOGLIKANA**

**SYNTHESIS OF DIHYDROXYBENZAMIDE
INHIBITORS OF PEPTIDOGLYCAN BIOSYNTHESIS**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Roka Frlana, mag. farm. NMR spektri so bili posneti na Fakulteti za farmacijo. Masni spektri so bili posneti na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. in somentorju asist. dr. Roku Frlanu, mag. farm. Slednjemu bi se še posebej zahvalil za ves trud in pomoč pri delu. Najlepša hvala tudi vsem ostalim, ki so mi stali ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelal samostojno pod mentorstvom prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Roka Frlana, mag. farm.

Matic Mikec

Predsednik komisije:

Prof. dr. Janko Kos

Član komisije:

Asist. dr. Zoran Lavrič

1. VSEBINA

1. VSEBINA.....	3
2. POVZETEK	5
3. SEZNAM OKRAJŠAV.....	6
4. UVOD	8
4.1 ANTIBIOTIKI IN KEMOTERAPEVTIKI	8
4.2 BAKTERIJSKA CELIČNA STENA IN SINTEZA PEPTIDOGLIKANA	9
4.3 Ligaza MurF.....	11
4.3.1 Splošno o encimu.....	11
4.3.2 Mehanizem encimske reakcije	12
4.3.3 Zaviralci.....	13
4.4 D-alanin:D-alanin ligaza (Ddl).....	14
4.4.1 Splošno o encimu.....	14
4.4.2 Mehanizem encimske reakcije	15
4.4.3 Zaviralci.....	15
5. NAČRT DELA	16
5.1 REAKCIJSKE SCHEME	18
5.1.1 SINTEZNA POT ZAŠČITENIH HIDROKSAMSKIH KISLIN	18
5.1.2 SINTEZNA POT ZAŠČITENIH KARBOKSILNIH KISLIN	19
5.1.3 SINTEZNA POT AMINOKISLINSKEGA DERIVATA.....	20
5.1.4 KATALITSKO HIDROGENIRANJE ZAŠČITENIH SPOJIN	20
5.1.5 SINTEZA HIDROKSAMSKÉ KISLINE PO ALTERNATIVNI POTI	21
6. MATERIALI IN METODE	21
6.1. MATERIALI	21
6.2. METODE.....	22
6.2.1. KROMATOGRFSKE METODE	22
6.2.2. SPEKTROSKOPSKE METODE	22
6.2.3. DOLOČEVANJE TALIŠČA	22
6.2.4. OPTIČNA SUČNOST	23
6.2.5. BIOLOŠKA TESTIRANJA.....	23
6.3. APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA	23
7. EKSPERIMENTALNO DELO.....	24
7.1 Sinteza metil 2,4-dihidroksibenzoata (1)	24
7.2 Sinteza metil 4-benziloksi-2-hidroksibenzoata (2)	25
7.3 Sinteza metil 4-benziloksi-2-(2-etoksi-2-oksoetoksi)benzoata (3)	26

7.4 Sinteza 4-benziloksi-2-karboksimetoksibenzojske kisline (4)	27
7.5 Sinteza metil 4-benziloksi-2-terc-butiloksikarbonilmetoksibenzoata (5).....	28
7.6 Sinteza (S)-terc-butil (1-amino-1-oksopropan-2-il)karbamata (6).....	29
7.7 Sinteza (S)-terc-butil (1-cianoetil)karbamata (7)	29
7.8 Sinteza metil 4-benziloksi-2-karboksimetoksibenzoata (8)	30
7.9 Sinteza metil 4-benziloksi-2-(benziloksikarbamoilmetoksi)benzoata (9).....	32
7.10 Sinteza 4-benziloksi-2-(benziloksikarbamoilmetoksi)benzojske kisline (10)	33
7.11 Sinteza benzil 4-[4-benziloksi-2-(benziloksikarbamoilmetoksi)benzoil]-piperazin-1-karboksilata (11).....	34
7.12 Sinteza 4-benziloksi-2-(benziloksikarbonilmetoksi)benzojske kisline (12)	35
7.13 Sinteza (S)-terc-butil[1-amino-1-(hidroksiamino)propan-2-il]karbamata (13)	36
7.14 Sinteza benzil 4-(4-benziloksi-2-benziloksikarbonilmetoksibenzoil)-piperazin-1-karboksilata (14)	37
7.15 Sinteza benzil[5-benziloksi-2-(2-(benziloksikarbonilamino)etilkarbamoil)-fenoksi]acetata (15)	38
7.16 Sinteza (S)-terc-butil[1-(5-okso-4,5-dihidro-[1,2,4]oksadiazol-3-il)-etil]karbamata (16).....	39
7.17 Sinteza benzil{2-[4-benziloksi-2-(benziloksikarbamoilmetoksi)benzoilamino]etil}karbamata (17)	40
7.18 Sinteza 4-(benziloksi)-2-(2-((benziloksi)amino)-2-oksoetoksi)-N-(2-hidroksietil)benzamida (18).....	41
7.19 Sinteza 2-(2-((2-aminoetil)karbamoil)-5-hidroksifenoksi)ocetne kisline (19).....	42
7.20 Sinteza N-hidroksi-2-(5-hidroksi-2-(piperazin-1-karbonil)fenoksi)acetamida (20).....	43
7.21 Sinteza 4-hidroksi-2-(2-(hidroksiamino)-2-oksoetoksi)-N-(2-hidroksietil)benzamida (21)	45
7.22 Sinteza N-(2-aminoetil)-4-hidroksi-2-(2-(hidroksiamino)-2-oksoetoksi)benzamida (22).....	46
7.23 Sinteza (R)-1-(5-okso-4,5-dihidro-1,2,4-oksadiazol-3-il)-etanamin trifluoroacetata (23).....	47
7.24 Sinteza 2-(5-hidroksi-2-(piperazin-1-karbonil)fenoksi)ocetne kisline (24)	48
7.25 Sinteza (R)-benzil-2-(5-(benziloksi)-2-((1-(5-okso-4,5-dihidro-1,2,4-oksadiazol-3-il)etil)karbamoil)fenoksi)acetata (25)	49
7.26 Sinteza (R)-1-amino-2-(2-(karboksimetoksi)-4-hidroksibenzamido)propan-1-iminijevega acetata (26)	50
7.27 Sinteza (R)-metil 2-(5-(benziloksi)-2-((1-(5-okso-4,5-dihidro-1,2,4-oksadiazol-3-il)etil)karbamoil)fenoksi)acetata (27)	51
7.28 Sinteza (R)-1-amino-2-(4-hidroksi-2-(2-metoksi-2-oksoetoksi)benzamido)propan-1-iminijevega acetata (28)	52
7.29 Sinteza (R)-N-(1-amino-1-iminopropan-2-il)-4-hidroksi-2-(2-(hidroksiamino)-2-oksoetoksi)benzamida (29)	53
8. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	54
8.1 RAZPRAVA O SINTEZAH SPOJIN.....	54
8.1.1 Zaščita karboksilne skupine v obliki metilnega estra (1)	54
8.1.2 Selektivna zaščita p-hidroksi skupine (2)	55
8.1.3 Uvajanje alkilne verige v molekulo (3, 5)	56
8.1.4 Odstranitev zaščite v obliki estrov (4, 10).....	56
8.1.5 Tvorba amida iz Boc zaščitene aminokisline (6)	57

8.1.6 Dehidracija amida do nitrila s kloridom cianurične kisline (7)	58
8.1.7 Odstranitev <i>terc</i> -butiloksikarbonilne zaščite (8, 23)	58
8.1.8 Tvorba amidne vezi z reagenti EDC, HOBt in DMAP	59
8.1.9 Selektivno uvajanje benzilne zaščite na karboksilno skupino (12)	60
8.1.10 Hidroksiaminiranje ciano skupine (13)	61
8.1.11 Odstranitev benzilnih zaščit in tvorba amidina z metodo katalitskega hidrogeniranja	61
8.1.12 Tvorba oksadiazolnega obroča z reagentom CDI (16)	62
8.1.13 Tvorba hidroksamske kisline (29)	63
8.2 REZULTATI IN RAZPRAVA BIOKEMIJSKEGA TESTIRANJA SINTETIZIRANIH SPOJIN	64
9. SKLEP	67
10. LITERATURA	68

2. POVZETEK

Bakterijske celice imajo za razliko od človeških zelo togo in mehansko zelo odporno celično steno, katere glavni gradnik je makromolekula peptidoglikan. Z zaviranjem biosinteze peptidoglikana lahko močno oslabimo integriteto celične stene in s tem vplivamo na preživetje bakterije. Pri sintezi osnovnega gradnika peptidoglikana sodelujeta tudi encima MurF in Ddl, ki sta del fuzijskega encima MurC-Ddl. Ligaze, ki sestavljajo MurC-Ddl, predstavljajo tarče za razvoj novih kemoterapevtikov. Zaradi vse hitrejšega razvoja rezistence bakterij na obstoječe antibiotike je pridobivanje novih protimikrobnih učinkovin, usmerjenih proti novim tarčam, nujno.

V okviru diplomskega dela smo sintetizirali osem končnih spojin, ki so potencialni zaviralci encimov Ddl in MurF. Izhajali smo iz 2,4-dihidroksibenzojske kisline, na katero smo uvedli funkcionalne skupine, ki posnemajo prijemališča substratov encima. Aminske funkcionalne skupine oponašajo *N*-terminalni del substratov, karboksilne in hidroksamske skupine pa *C*-terminalni del.

Končne spojine smo testirali *in vitro* na izoliranih encimih MurF in Ddl, vendar nobena od spojin ni bila učinkovit zaviralec omenjenih encimov.

ABSTRACT

One of the most important differences that distinguishes the bacterial cell from the human cell is its thick and mechanically very rigid cell wall and the macromolecule of peptidoglycan as its key component. Through interfering with the biosynthetic pathway of peptidoglycan we can alter its structure and weaken the integrity of the cell wall and thus, influence the survival rate of the whole bacteria. The biosynthesis of the monomeric peptidoglycan unit is catalyzed by a group of enzymes called Mur-ligases, which are potential targets of new chemotherapeutics. Amongst others, the group contains enzymes MurF and Ddl, which are a part of the fusion enzyme MurC-Ddl and play an essential role in the synthesis of peptidoglycan. Nowadays it is necessary to acquire new antimicrobial agents which are directed towards new targets because of rapidly developing resistance of microbes to current antibiotics.

In our work, we designed and synthesized 8 new potential inhibitors of MurF and Ddl. We derived our compounds from 2,4-dihydroxybenzoic acid, on which we introduced functional groups, that mimic substrates of these enzymes. The amino functional groups mimic the *N*-terminal end and the carboxy and hydroxamic groups mimic the *C*-terminal end of the substrates.

We performed the *in vitro* tests of our synthesized compounds on isolated MurF and Ddl enzymes and unfortunately none of them turned out to be an effective inhibitor of these enzymes.

3. SEZNAM OKRAJŠAV

ACN	acetonitril
ADP	adenozindifosfat
ATP	adenozintrifosfat
BOC	<i>terc</i> -butiloksikarbonil
d	dublet (NMR)
dd	dublet dubleta (NMR)
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DMSO -d ₆	devteriran dimetilsulfoksid

EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
Ekv	ekvivalent
ESI	elektrosprej ionizacija (MS)
GlcNAc	N-acetilglukozamin
HOBt	1-hidroksibenzotriazol hidrat
HPLC	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti
J	sklopitvena konstanta (NMR)
Kp/s	kapljice na sekundo
Mr	molekulska masa (brez enot) ali molska masa (g/mol)
m	multiplet (NMR)
MeOD	devteriran metanol
Mf	mobilna faza
MurF	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat-mezodiaminopimelinat D-alanin-D-alanin-ligaza
MurNAc	N-acetilmuraminska kislina
MS	masna spektrometrija
NMM	N-metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
Pd/C	katalizator paladij, adsorbiran na aktivnem oglju
RA	rezidualna aktivnost
Rf	retencijski faktor
s	singlet (NMR)
t	triplet (NMR)
THF	tetrahidrofur
TLC	tankoplastna kromatografija

4. UVOD

4.1 ANTIBIOTIKI IN KEMOTERAPEVTIKI

Antibiotiki in kemoterapevtiki so spojine, ki zavirajo rast in razvoj oziroma povzročijo smrt mikroorganizmov. Antibiotiki so naravni proizvod različnih vrst bakterij, gliv, aktinomicet, alg in lišajev, medtem ko je izraz kemoterapevtik uporabljen za sintezno pridobljene protimikrobne, protiglivične, protivirusne in protitumorske učinkovine.

Znanih je več različnih skupin in mehanizmov delovanja protimikrobnih spojin. Najbolj razširjena skupina so zaviralci sinteze bakterijske celične stene, v katero spadajo strukturno podobni penicilini in cefalosporini, nekatere strukturno različne spojine, kot so D-cikloserin, vankomicin, bacitracin in imidazolne protiglivične učinkovine. Te spojine posredno ali neposredno zavirajo esencialne encime v kaskadi sinteze celične stene in tako porušijo njeno integriteto, celica pa nato zaradi osmotskega pritiska propade.

Drugi mehanizmi delovanja protimikrobnih snovi so še: povečevanje prepustnosti celične membrane, vezava na ribosomske podenote v celici in posledično zaviranje sinteze beljakovin, ter zaviranje delitve dednega materiala celice.(1)

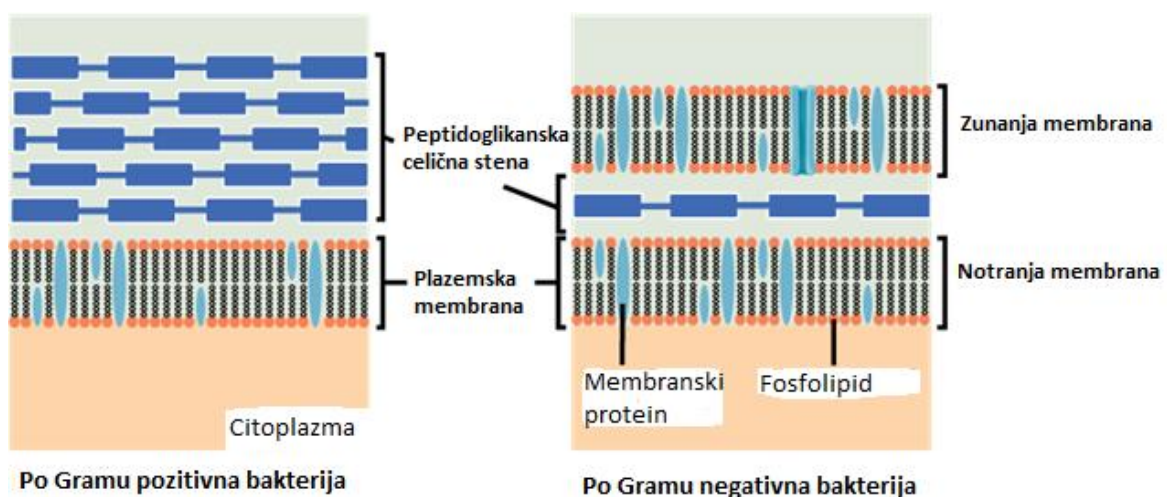
Zaradi splošne razširjenosti teh zdravil, pomanjkanja učinkovitega nadzora njihovega predpisovanja in uporabe ter bakterijske sposobnosti prilagajanja lastnega genoma učinkom iz okolja se pojavlja vedno več odpornih sevov, proti katerim so zgoraj opisane spojine neučinkovite. Zato se je v svetu pojavila potreba po novih, nizkomolekularnih učinkovinah, ki ciljajo na specifične tarče, odgovorne za rast in razvoj mikroorganizmov. Za protimikrobne učinkovine je poleg učinkovitega zaviranja tarčnega encima zelo pomembna tudi selektivna toksičnost. To pomeni, da zavirajo biokemijske procese v mikrobnih celici brez zaviranja delovanja gostiteljeve celice. Zato so najpomembnejše tarče pri načrtovanju novih protimikrobnih učinkovin encimi, ki sodelujejo pri sintezi bakterijske celične stene, ki je pri živalskih celicah ni. Najpomembnejša družina encimov pri sintezi gradnikov celične stene so ligaze Mur. Pred kratkim so bile odkrite kristalne strukture teh encimov v različnih konformacijah, kar omogoča molekulsko modeliranje novih spojin za te specifične tarče. (2, 3, 4, 11)

4.2 BAKTERIJSKA CELIČNA STENA IN SINTEZA PEPTIDOGLIKANA

Bakterijska celična stena je sestavljena iz peptidoglikana, ki daje celici trdnost, obliko in zaščito pred škodljivimi zunanjimi vplivi. Njena polprepustnost omogoča bakteriji selektivno izmenjavo hranilnih snovi z okolico. Sodeluje pri rasti in delitvi bakterijske celice, zato je njena sinteza in razgradnja dinamičen proces, ki poteka neprenehoma.(5)

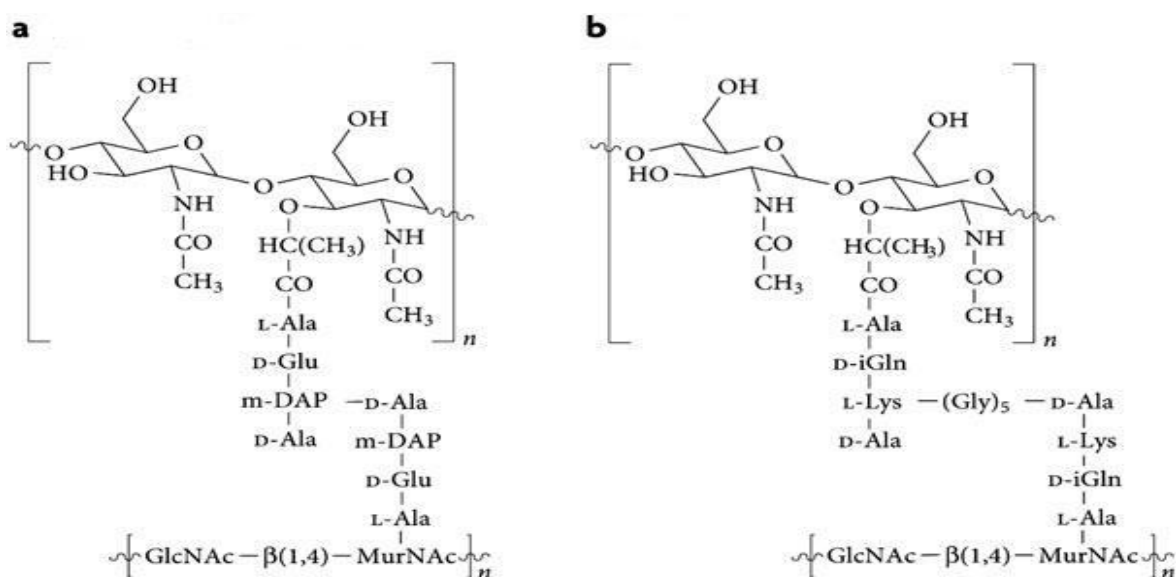
Glede na to ali se bakterijska celica pri barvanju po Gramu obarva vijolično ali rdeče, lahko bakterije delimo na po Gramu pozitivne in po Gramu negativne. Celična stena prvih je enoplastna in ima debelejši sloj peptidoglikana, ki ga prebadajo anionski polimeri (tehojska in teihuronska kislina). Te kisline vsebujejo fosfatne, hidroksilne in amino skupine in delujejo kot ionsko izmenjevalni sistem za uravnavanje koncentracije magnezijevih ionov, ki so nujni za delovanje številnih bakterijskih encimov.(5, 6)

Celična stena drugih pa ima dodatno zunanjo membrano ter veliko tanjši peptidoglikanski sloj. Med notranjo membrano in peptidoglikanskim slojem je periplazemski prostor, v katerem je veliko encimov in proteinov. Peptidoglikan obdaja še dodatna zunanja membrana sestavljena iz lipopolisaharidov, lipidov in proteinov, ki s svojo razporeditvijo določajo prepustnost celične stene. Lipopolisaharidi pritrjeni na zunanji membrani služijo tudi kot glavna antigenska determinanta, na katero se običajno odzove imunski sistem gostitelja (slika 1). (6,7)



Slika 1: Shematični prikaz strukture celične stene po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij.

Peptidoglikan oziroma murein je heteropolimer sestavljen iz dolgih glikanskih verig, ki so povezane s kratkimi peptidnimi verigami. Glikanske verige sestavljajo ponavljajoče se disaharidne enote N-acetilglukozamina in N-acetilmuraminske kisline, povezane z 1,4- β glikozidno vezjo, povezovalne tetrapeptidne verige pa so sestavljene iz L-alanina, D-glutaminske kisline, mezo-diaminopimelinske kisline ali L-lizina in D-alanina v navedenem vrstnem redu (slika 2).

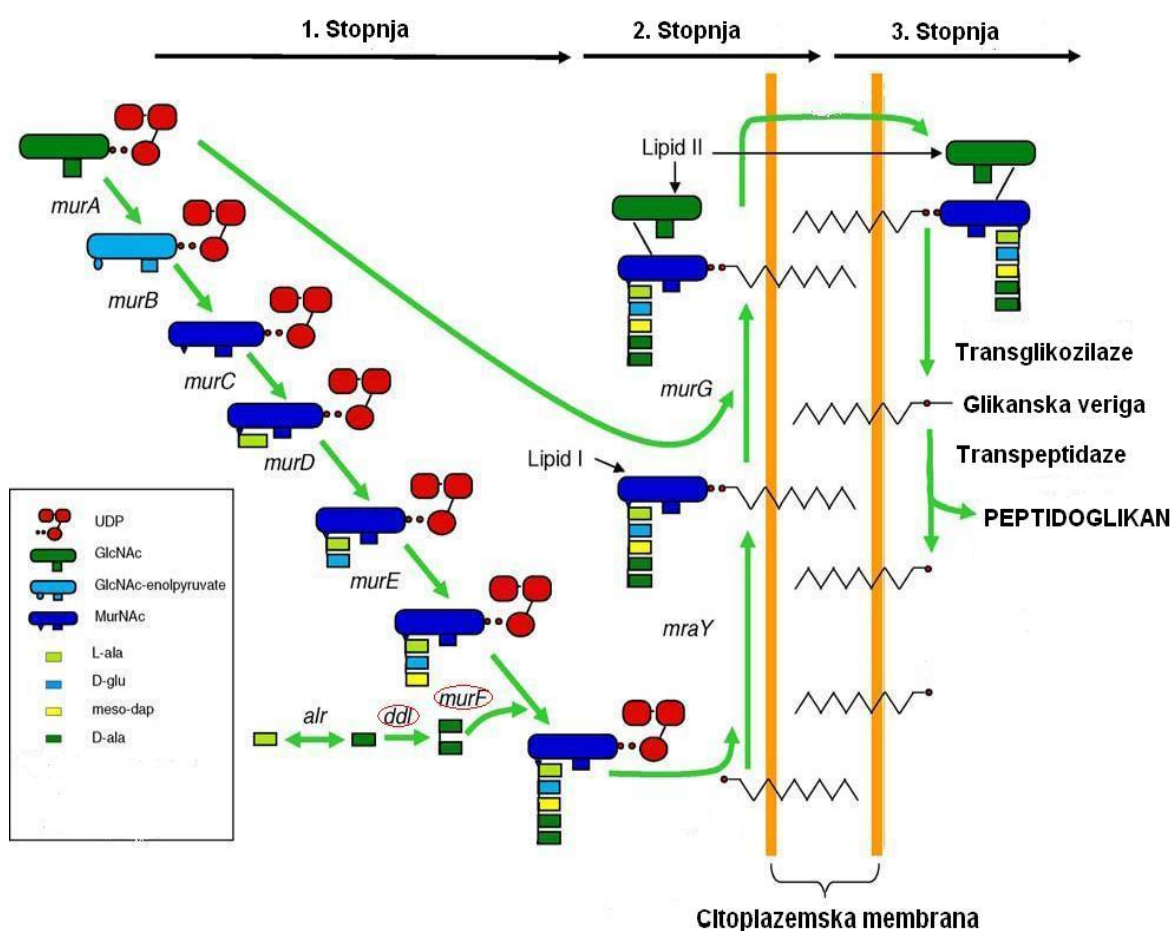


Slika 2: Molekulska zgradba peptidoglikana. **a:** peptidoglikan mezo-diaminopimelinskega tipa. **b:** peptidoglikan L-lizinskega tipa.

Biosinteza peptidoglikana poteka preko približno dvajsetih encimsko kataliziranih reakcij, ki potekajo v citoplazmi (1. stopnja) ter na notranji (2. stopnja) in zunanji (3. stopnja) strani celične membrane (slika 3).

V citoplazmi poteka sinteza prekursorjev. Iz primarnega metabolita fruktoze-6-fosfata v štirih stopnjah pod vplivom encimov GlmS, GlmM ter GlmU, najprej nastane UDP-N-acetilglukozamin. V naslednjih dveh stopnjah se ta pretvori v UDP-N-acetilmuraminsko kislino pod vplivom encimov MurA in MurB. Sledijo reakcije pripenjanja petih aminokislin (D-Ala, L-Glu, mDAP(L-Lys), D-Ala, D-Ala) na UDP-N-acetilmuraminsko kislino, ki jih katalizirajo MurC, MurD, MurE in MurF. Izkazalo se je, da so ti štirje od ATP odvisni encimi skupaj z encimom Ddl funkcijsko združeni v fuzijski protein MurC-Ddl. Produkt enega encima takoj vstopa v nadaljnjo reakcijo kot substrat naslednjega, kar zagotavlja učinkovito selektivno štiristopenjsko biosintezo pentapeptidne verige UDP-MurNAc-pentapeptida. (7)

UDP-MurNAc-pentapeptid se nato s pomočjo membranskega encima *MraY* pripne na lipidni prenašalec in s pomočjo encima *MurG* še na N-acetilglukozamin. Ta osnovni gradnik peptidoglikana se nato s pomočjo lipidnega prenašalca prenese na zunanjo stran membrane, kjer se s procesom transglikozilacije in transpeptidacije vgradi v celično steno. Encimi transglikozilaze katalizirajo povezovanje sladkornih enot v daljša glikanska vlakna, transpeptidaze pa povežejo še proste peptidne verige in tako se biosinteza peptidoglikana zaključi. Ključno vlogo pri transpeptidaciji ima D-Ala-D-Ala enota pentapeptida, saj služi kot vezavno mesto za transpeptidaze. (7)



Slika 3: Shematični prikaz sinteze peptidoglikana iz GlcNAc.

4.3 Ligaza MurF

4.3.1 Splošno o encimu

MurF spada v skupino ligaz in je del fuzijskega proteina MurC-Ddl. Je esencialen encim pri sintezi peptidoglikana in zadnji v vrsti ligaz Mur. Nahaja se v citoplazmi bakterijskih

celic in katalizira vezavo D-Ala-D-Ala dipeptida na UDP-MurNac-tripeptid, zadnjo stopnjo sinteze UDP-MurNac-pentapeptida (slika 3).

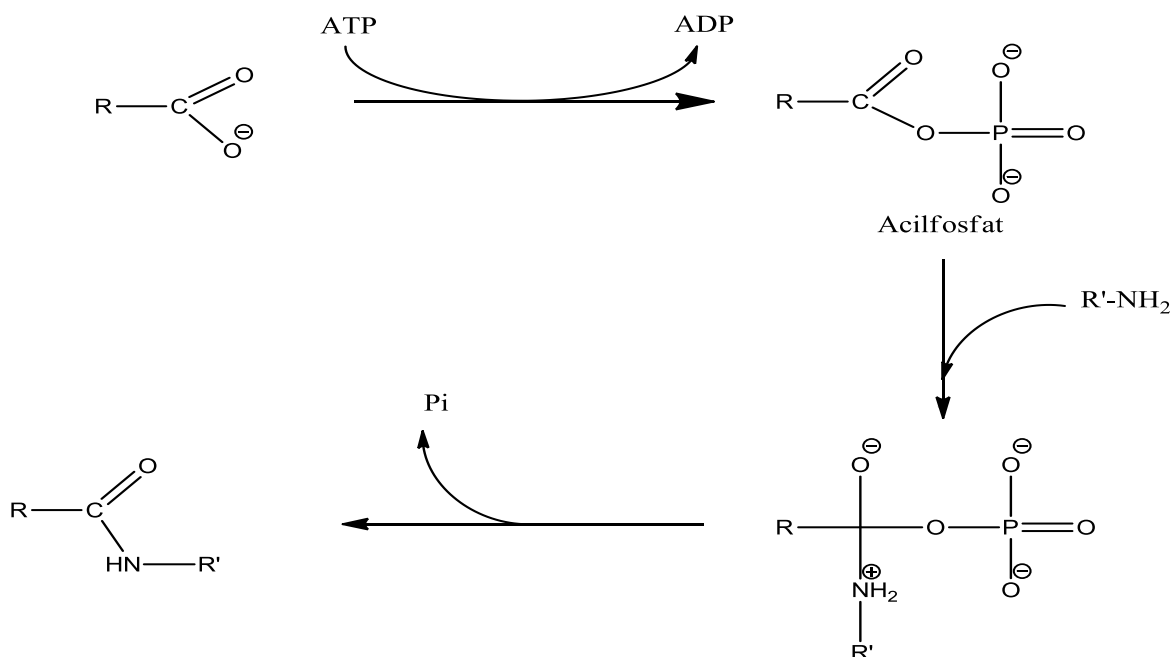
Znane so kristalne strukture apoencima v različnih konformacijah in z različnimi substrati. Kot vse ostale ligaze Mur tudi MurF potrebuje za svoje delovanje molekulo ATP in prisotnost dvovalentnih kationov. Encim ima tri domene, osrednja in C-terminalna sta povezani s povezovalnim peptidom (slika 4). N-terminalna domena ima vezavno mesto za UDP-MurNac-tripeptid, osrednja domena veže molekulo ATP, C-terminalna domena pa ima vezavno mesto za dipeptid, največkrat D-Ala-D-Ala, v sevih odpornih na vankomicin pa D-Ala-D-Ser ali D-Ala-D-Lac. (3, 8, 10)



Slika 4: Shematični prikaz kristalne strukture encima MurF izoliranega iz bakterije *Streptococcus pneumoniae* z vezanim kompetitivnim zaviralcem. N-terminalna domena je obarvana modro, osrednja domena zeleno in C-terminalna domena rdeče. Povezovalni peptid je obarvan rumeno.

4.3.2 Mehanizem encimske reakcije

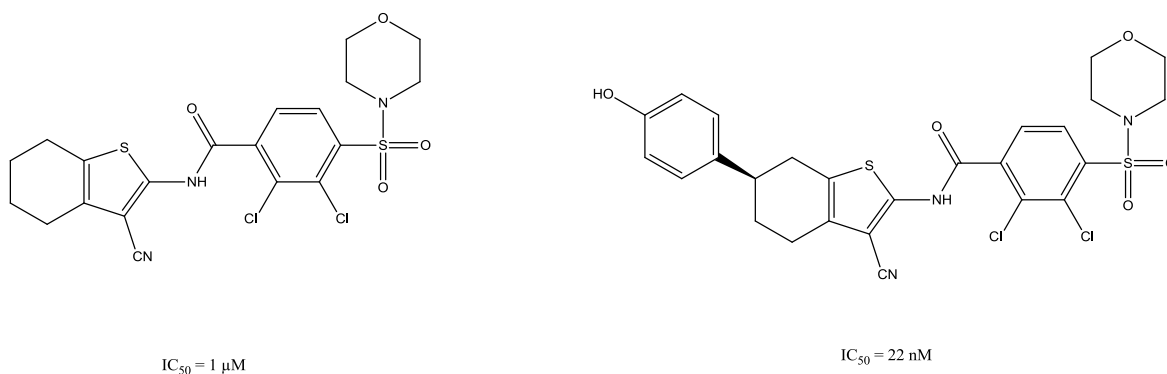
UDP-MurNac-tripeptid se veže na N-terminalno domeno encima, kjer se s pomočjo ATP na karboksilni skupini fosforilira do acilfosfata, ob tem pa nastane prvi stranski produkt reakcije ADP. Aminska skupina D-Ala-D-Ala nato napade aktivirano karboksilno skupino UDP-MurNac-tripeptida in tvori visokoenergijski tetraedrični intermediat. Po izmenjavi protona iz dušika na izstopajoči fosfat nastane glavni produkt reakcije UDP-MurNac-pentapeptid in drugi stranski produkt anorganski fosfat. (9)



Slika 5: Mehanizem reakcije, ki jo katalizirajo ligaze Mur.

4.3.3 Zaviralci

Prvi kompetitivni zaviralci MurF so bile psevdotripeptidne in psevdotetrapeptidne aminoalkilfosfinske kisline, ki se vežejo v aktivno mesto encima in ga stabilizirajo v prehodnem stanju. Odkrili so tudi skupino tiazolaminopiridinskih derivatov, ki se vežejo na N-terminalno domeno MurF, povzročijo zaprtje domene in tako kompetitivno zavrejo delovanje encima. Z metodo afinitetno-selektivnega rešetanja so odkrili tudi dve manjši molekuli, ki encim zavreta na enak način (slika 6). Kljub nizkim IC₅₀ vrednostim teh spojin pa tudi z uporabo pospeševalcev membranske permeabilnosti nobena od njih ni imela protibakterijskega učinka. (3, 10)



Slika 6: Kompetitivna zaviralca encima MurF.

4.4 D-alanin:D-alanin ligaza (Ddl)

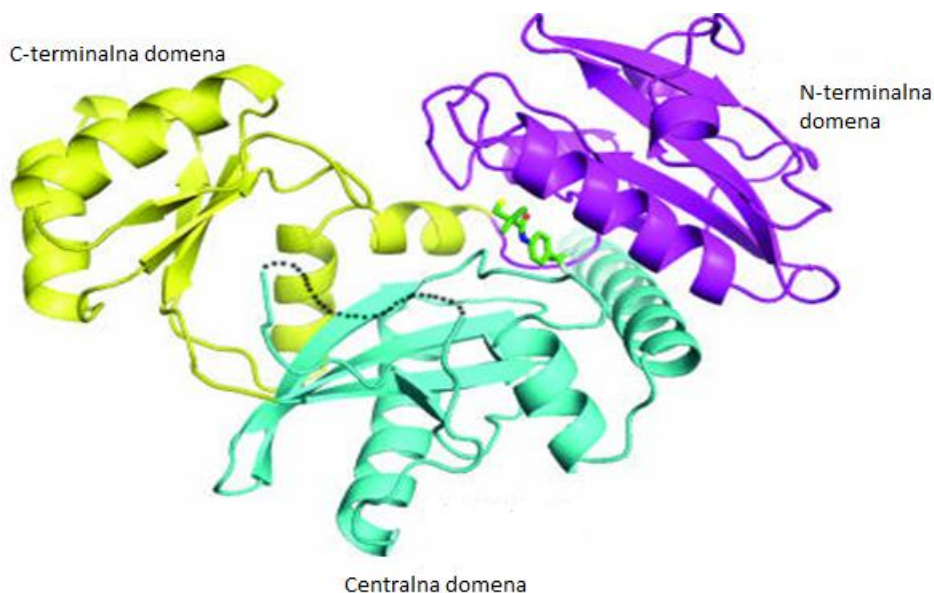
4.4.1 Splošno o encimu

Ddl je esencialen encim v kaskadi sinteze bakterijske celične stene. Spada v skupino ligaz in v družino od ATP odvisnih encimov. Encimi iz te družine katalizirajo od ATP odvisno ligacijo karboksilne skupine na aaminski ali iminski dušik, kisik v hidroksilni ali žveplo v tiolni skupini.(14)

Nahaja se v citoplazmi bakterij in katalizira dimerizacijo D-alanina v dipeptid D-alanin-D-alanin (slika 8). Ta dipeptid nato vstopi v nadaljnjo reakcijo sinteze UDP-MurNAC-pentapeptida, ki jo katalizira MurF (slika 3).

Za svoje delovanje potrebuje eno molekulo ATP in prisotnost dveh dvovalentnih kationov Mg^{2+} ali Mn^{2+} . Za delovanje encima je potrebna tudi prostorska bližina MurC domene, kar kaže na to, da je Ddl del fuzijskega proteina MurC-Ddl.(20)

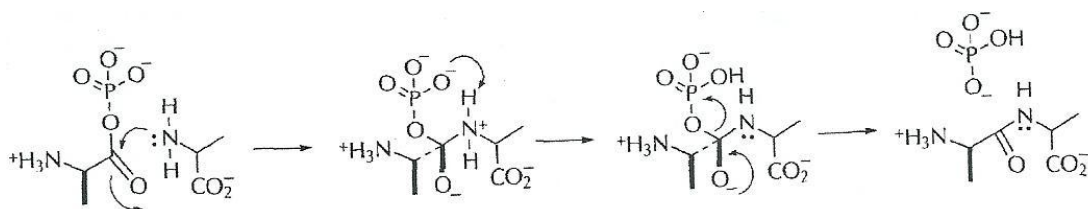
Znane so kristalne strukture apoencima Ddl v različnih konformacijah in z različnimi zaviralci, kar omogoča *in silico* načrtovanje novih spojin, ki se lahko vežejo v aktivno mesto (slika 7). Encim ima tri domene in dve D-alanin vezavni mesti, ki se razlikujeta v specifičnosti in Michaelisovih konstantah. Prvo vezavno mesto je visoko specifično za D-alanin, medtem ko je drugo manj specifično in lahko sprejme tudi nekatere druge molekule, kot sta D-serin in D-laktat. Nizka specifičnost tega mesta je tudi razlog za pojav rezistence na vankomicin. Vankomicin se veže reverzibilno na D-Ala-D-Ala terminalni del UDP-MurNAC-pentapeptida in tako prepreči proces transpeptidacije. Če je namesto D-alanina na terminalnem mestu UDP-MurNAC-pentapeptida D-laktat, se vankomicin nanj ne bo vezal in transpeptidacija bo potekla neovirano.(12, 13, 20)



Slika 7: Shematični prikaz kristalne strukture encima Ddl izoliranega iz bakterije *Staphylococcus aureus* z vezanim alosteričnim zaviralcem.

4.4.2 Mehanizem encimske reakcije

Prvi D-alanin se veže na vezavno mesto prvega substrata kot ion dvojček in se s pomočjo ATP na karboksilni skupini fosforilira do acilfosfata. Drugi D-alanin vstopa v reakcijo v obliki aniona na karboksilni skupini. Njegov amski del napade aktivirano karboksilno skupino prvega D-Ala, ob tem pa nastane visokoenergijski tetrahedralni intermediat. Po izmenjavi protona iz dušika na izstopajoč fosfat, ki poteče brez pomoči encima, nastane glavni produkt reakcije D-alanin-D-alanin, ki močno zavira encim Ddl. Stranska produkta reakcije sta ADP in anorganski fosfat.(13)



Slika 8: Mehanizem reakcije, ki jo katalizira encim Ddl.

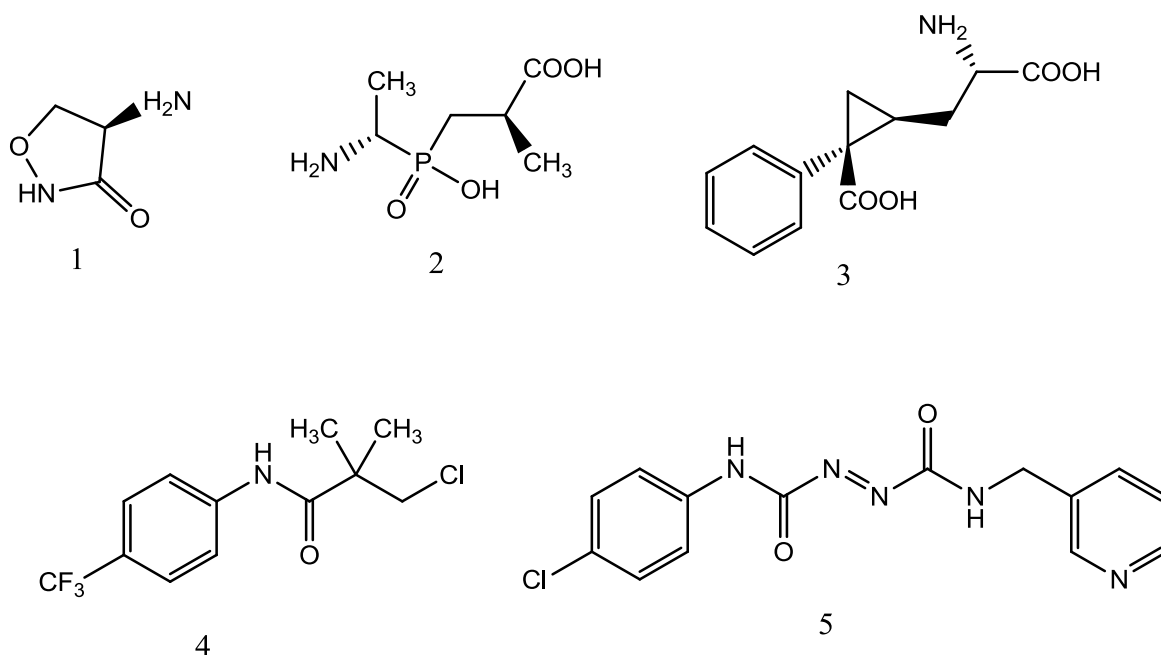
4.4.3 Zaviralci

Najpomembnejši zaviralec encima Ddl je D-cikloserin (slika 9-1), ki je tudi prvi med predstavniki mimetikov prehodnega stanja encima. Ti se v aktivnem mestu fosforilirajo,

stabilizirajo encim v prehodnem stanju in ga tako reverzibilno kompetitivno zavirajo. Drugi predstavniki te skupine zaviralcev so še fosfinati (slika 9-2), fosfonati, fosfoamidati in derivati ciklopropana (slika 9-3).^(15, 16, 17)

Kompetitivni zaviralci encima Ddl so tudi nekateri diazendikarboksamidi (slika 9-5), vendar natančen mehanizem njihove vezave na encim še ni poznan.⁽¹⁹⁾

Poznamo pa tudi nekatere alosterične zaviralce encima Ddl (slika 9-4), ki se s šibkimi hidrofobnimi interakcijami vežejo v prostor med prvo in tretjo domeno encima, in s tem spremenijo konformacijo aktivnega mesta, kar povzroči zmanjšano aktivnost encima.⁽¹⁸⁾



Slika 9: Zaviralci encima Ddl.

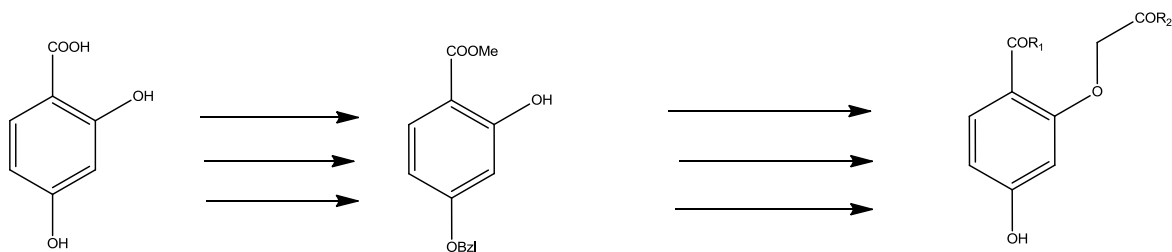
5. NAČRT DELA

V okviru diplomske naloge bomo s posnemanjem strukture substratov in produktov encimskih reakcij, ki jih katalizirata encima MurF in Ddl, sintetizirali več novih dihidroksibenzamidnih derivatov, ki so potencialni zaviralci teh encimov. Strukture spojin lahko v grobem delimo na tri dele, pri čemer posamezen del molekule oponaša strukturne ali vezavne dele naravnih substratov encimov MurF in Ddl. *N*-acetilmuraminsko kislino bomo posnemali s togim benzenovim obročem, *N*-terminalni del substratov z različnimi amskimi derivati in *C*-terminalni del substratov s karboksilnimi oziroma hidroksamskimi skupinami. Nastale verige bodo vsebovale skupine, ki bodo sposobne tvorbe vodikovih

vezi, lahko ionizirajo in so posledično sposobne tvoriti interakcije z aktivnima mestoma encimov.

Za sintetizirane spojine pričakujemo, da bodo strukturni analogi naravnih substratov teh encimov in da bodo sposobne interagirati z aktivnim mestom encima in ga posledično inhibirati.

Izhajali bomo iz 2,4-dihidroksibenzojske kisline, ki jo bomo zaščitili na mestu 1 in 4, ter alkilirali na mestu 2. Na alkilnih verigah na mestu 2 bomo nato tvorili zaščitene karboksilne in hidroksamske skupine, na mestu 1 pa izvedli sklopitvene reakcije z različnimi zaščitnimi verigami, ki vsebujejo amin. Največ si obetamo odaminskega fragmenta (*R*)-2-aminopropanimidamida, ki ga bomo predhodno sintetizirali iz Boc-L-alanina. Na koncu bomo v eni stopnji odstranili zaščite s katalitskim hidrogeniranjem in dobili želene karboksilne, hidroksamske inaminske skupine (slika 11).

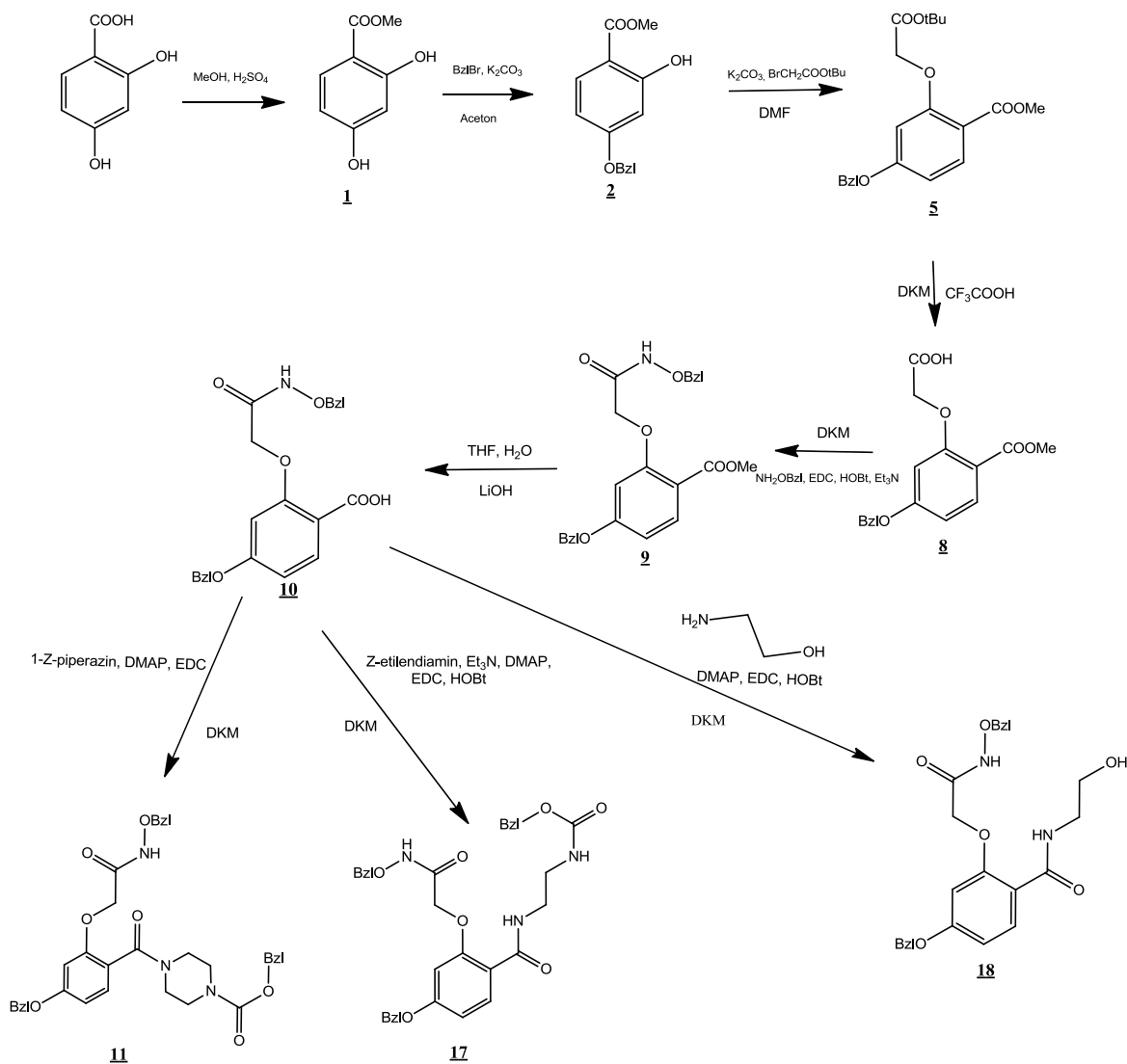


R1				
R2	-OH	-NHOH		

Slika 10: Shema razvoja končnih spojin.

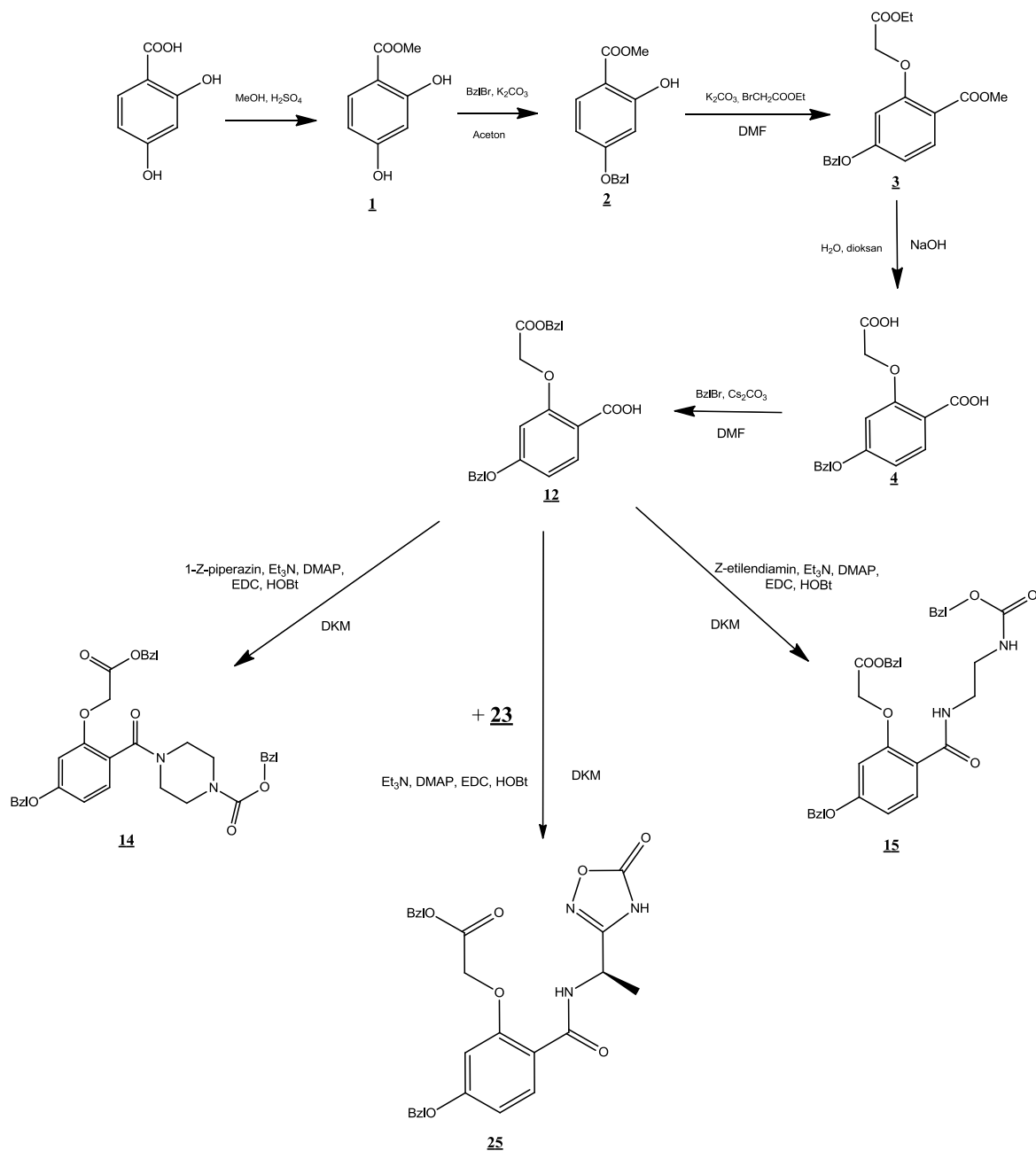
5.1 REAKCIJSKE SCHEME

5.1.1 SINTEZNA POT ZAŠČITENIH HIDROKSAMSKIH KISLIN



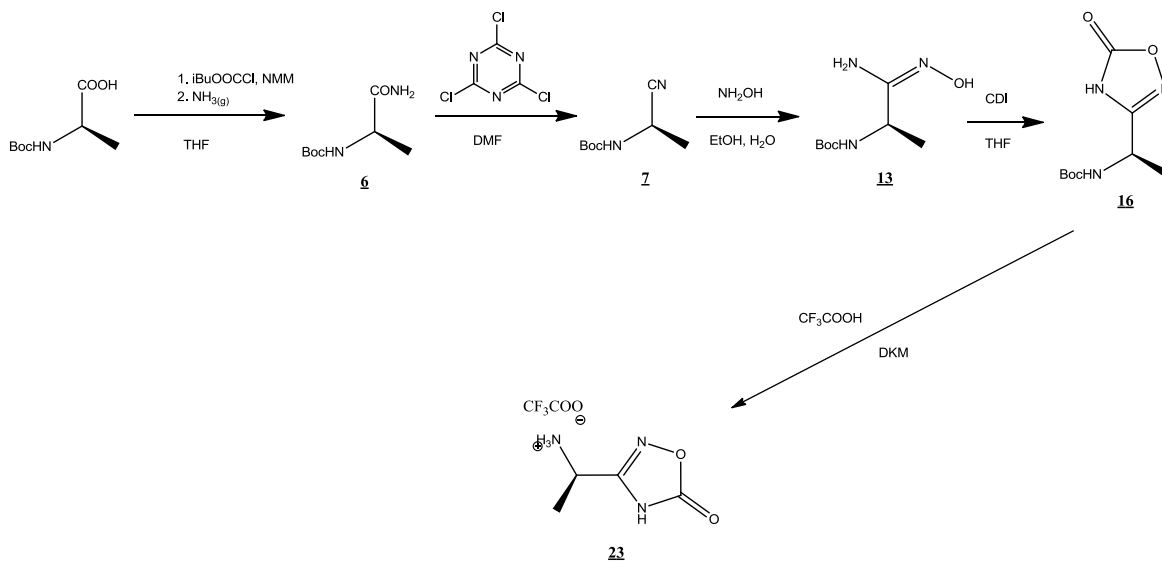
Slika 11: Reakcijske sheme od izhodne spojine do zaščiteneh derivatov hidroksamskih kislin.

5.1.2 SINTEZNA POT ZAŠČITENIH KARBOKSILNIH KISLIN



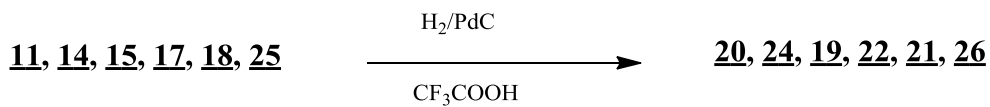
Slika 12: Reakcijske sheme od izhodne spojine do zaščiteneh derivatov karboksilnih kislin.

5.1.3 SINTEZNA POT AMINOKISLINSKEGA DERIVATA



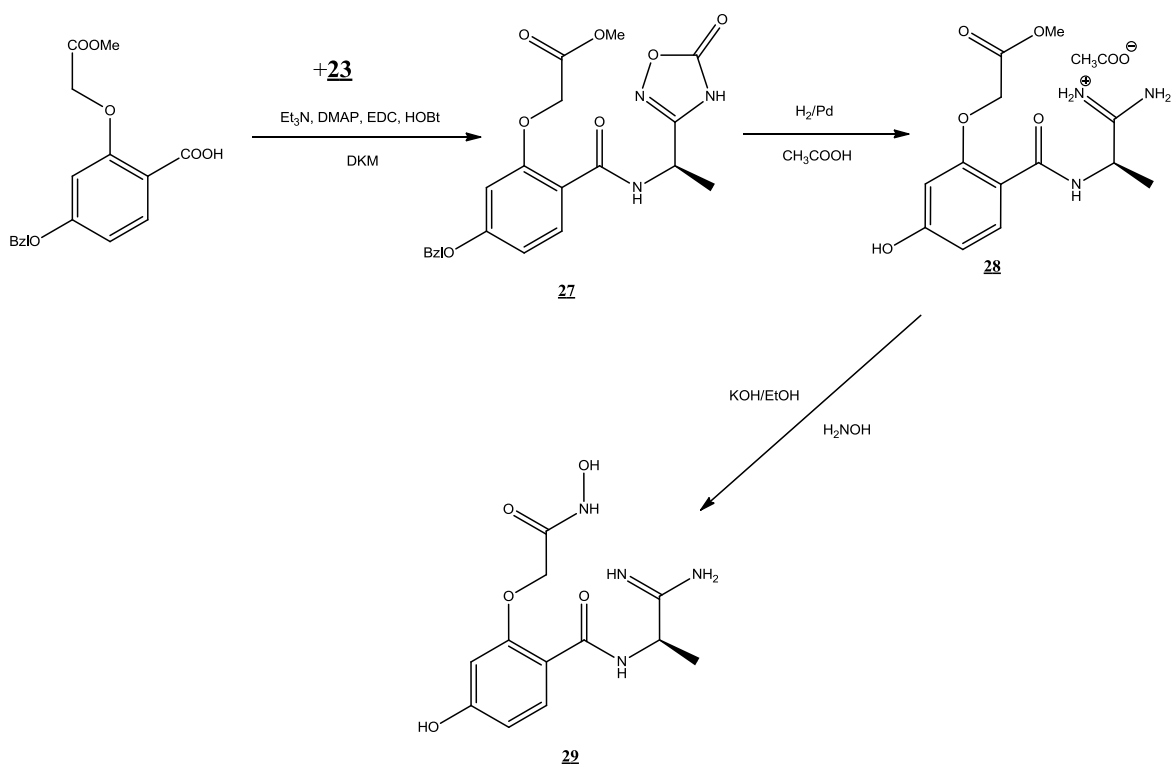
Slika 13: Reakcijske sheme od Boc-zaščitenega L-alanina do sklopitvenega reaktanta

5.1.4 KATALITSKO HIDROGENIRANJE ZAŠČITENIH SPOJIN



Slika 14: Pregled spojin, katerih zaščite smo odstranili s katalitskim hidrogeniranjem.

5.1.5 SINTEZA HIDROKSAMSKE KISLINE PO ALTERNATIVNI POTI



Slika 15: Sinteza derivata hidroksamske kisline s predhodnim katalitskim hidrogeniranjem.

6. MATERIALI IN METODE

Za poimenovanje in risanje struktur smo uporabili program ChemDraw Ultra 12.0 podjetja CambridgeSoft. Pri iskanju spojin in sinteznih postopkov v podatkovnih bazah smo si pomagali s programom SciFinder-Scholar. Za obdelavo NMR spektrov smo uporabili program NMR-Notebook podjetja NMRTEC.

6.1. MATERIALI

Pri delu smo uporabljali kemikalije in topila proizvajalcev Acros Organics, Aldrich, Fluka, Merck in Kemika.

6.2. METODE

6.2.1. KROMATOGRAFSKE METODE

Za tankoplastno kromatografijo (TLC) smo uporabljali plošče Kieselgel 60 F₂₅₄ izdelovalca Merck z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Uporabljene mobilne faze so navedene pri vsaki spojini posebej. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko ($\lambda=254$ nm) in različne orositvene reagente, ki so navedeni za vsako spojino posebej.

Za kolonsko kromatografijo smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel z velikostjo 0,063 – 0,20 nm izdelovalca Merck in različne mobilne faze.

Za reverznofazno kromatografijo smo kot stacionarno fazo uporabljali slikikagel z velikostjo delcev 0,040 – 0,063 nm izdelovalca Merck in različne mobilne faze.

HPLC smo izvajali na koloni Agilent EclipsePlus C18 z injekcijskim volumnom 5 μ L, pretokom 1 mL/min pri temperaturi 25°C. Detekcijo smo izvajali pri svetlobi valovne dolžine 220 in 254 nm. Uporabili smo tri različne metode:

Metoda 1: 30 % MeOH/H₂O + 0.1 % CF₃COOH do 95 % MeOH/H₂O + 0.1 % CF₃COOH v 15 min, nato 2,5 min pri 95 % MeOH/H₂O + 0.1 % CF₃COOH in 5 min do 30 % MeOH/H₂O + 0.1 % CF₃COOH

Metoda 2: 40 % ACN/H₂O do 90 % ACN/H₂O v 15 min, nato 2,5 min pri 90 % ACN/H₂O in 6 min do 40 % ACN/H₂O

Metoda 3: 5 % ACN/H₂O do 20 % ACN/H₂O v 10 min, nato v 15 min do 90 % ACN/H₂O in 6 min do 5 % ACN/H₂O

6.2.2. SPEKTROSKOPSKE METODE

NMR spektri so bili posneti z instrumentom Bruker Avance 400 MHz na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Za ¹H-NMR spektre smo kot topilo uporabljali DMSO-d₆ in CDCl₃, za C¹³-NMR spektre pa tudi devteriran metanol (MeOD). Spektri so bili posneti pri 400 MHz s TMS kot internim standardom.

Masni spektri so bili posneti na spektrometru Varian-MAT 311 A, Q-TOF Premier z ESI tehniko na Inštitutu Jožefa Stefana v Ljubljani.

6.2.3. DOLOČEVANJE TALIŠČA

Temperatura tališča je bila izmerjena z Polytherm A Heintsch mikroskopom podjetja Wagner & Munz z ogrevalno mizico.

6.2.4. OPTIČNA SUČNOST

Optična sučnost spojin je bila izmerjena s polarimetrom Perkin – Elmer 1241MC na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo, in sicer pri valovni dolžini 589,3 nm v kiveti dolžine 10 cm.

6.2.5. BIOLOŠKA TESTIRANJA

Spojine, ki smo jih sintetizirali, so bile testirane na inhibitorno aktivnost na encimih Ddl in MurF s testom z malahitnim zelenim. Test se izvaja na mikrotitrski ploščici s pripravljenimi raztopinami encima, substrata in testiranih spojin. Osnova testa je tvorba fosfomolibdatnega kompleksa med fosfatom, ki nastane pri hidrolizi ATP, in barvilom malahitnim zelenim. Kompleks lahko kvantificiramo spektrofotometrično pri valovni dolžini 650 nm. Katalitično aktivnost encimov Ddl in MurF ovrednotimo na podlagi množine fosfata, ki nastane pri reakciji. Ob dodatku zaviralca se katalitična aktivnost zniža, zato je množina nastalega fosfata manjša v primerjavi s kontrolo brez zaviralca.

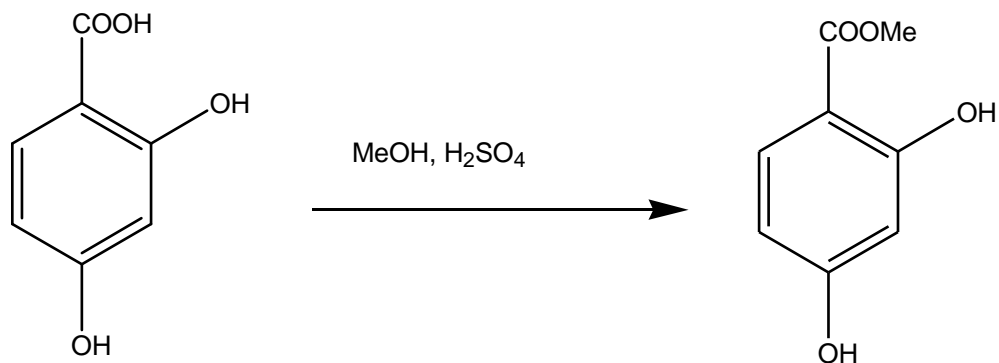
Testi so bili izvedeni na Katedri za farmacevtsko kemijo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani.

6.3. APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA

Pri delu smo uporabljali standardno laboratorijsko opremo ter naslednje aparature: odstranjevalec topil pod znižanim tlakom (rotavapor) Buchi, magnetni mešalnik, laboratorijska tehtnica Mettler Toledo, analitska tehtnica Mettler Toledo.

7. EKSPERIMENTALNO DELO

7.1 Sinteza metil 2,4-dihidroksibenzoata (**1**)



Spojino **1** smo sintetizirali po postopku iz članka (21).

Raztopino 22,484 g (146 mmol) 2,4-dihidroksibenzojske kisline in 12 ml koncentrirane H₂SO₄ v 145 ml brezvodnega metanola smo segrevali 24 ur pri temperaturi vrenja v argonovi atmosferi.

Po končani reakciji smo reakcijsko zmes raztopili v 300 mL etilacetata, sprali s 50 mL vode, z 2 × 50 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃ in s 50 mL nasičene vodne raztopine NaCl ter sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Raztopino smo filtrirali in topilo odparili pod nižanim tlakom. Dobili smo 19,6 g (117 mmol) belega prahu.

Izkoristek reakcije: 80 %

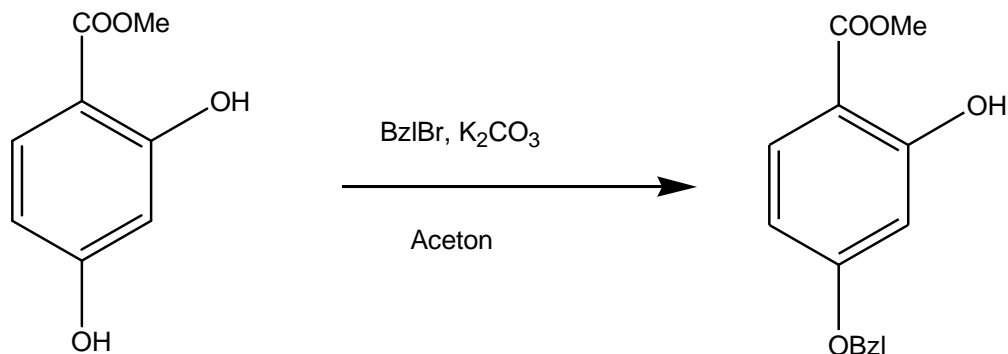
Elementna sestava: C₈H₈O₄

Mr = 168,15

R_f (etilacetat) = 0,67

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 3.85 (s, 3H, CH₃), 6.30 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 6.37 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.64 (d, *J* = 8.61 Hz, 1H, Ar-H), 10.48 (s, 1H, OH), 10.72 (s, 1H, OH) ppm.

7.2 Sinteza metil 4-benziloksi-2-hidroksibenzoata (**2**)



Spojino **2** smo sintetizirali po postopku iz članka (22).

19,4 g (115 mmol) spojine **1** smo natehtali v bučko, dodali 17,5 g K_2CO_3 (1,1 ekv; 127 mmol), zmes prepihali z argonom in raztopili v 250 mL acetona. Zmes smo nato postavili na ledeno kopel ($T = -10\text{ }^\circ\text{C}$) in s kapalnikom dodali 15,1 mL (1,1 ekv; 127 mmol) benzil bromida (1kp/s).

Po 24 urah smo aceton uparili pod znižanim tlakom, ostanek raztopili v 300 mL etilacetata, sprali s 50 mL vode, $2 \times 50\text{ mL}$ nasičene vodne raztopine $NaHCO_3$, s 50 mL nasičene vodne raztopine $NaCl$ ter sušili z brezvodnim Na_2SO_4 . Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in izvedli prekrizalizacijo iz dietiletra. Dobili smo 17,34 g (67 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 58 %

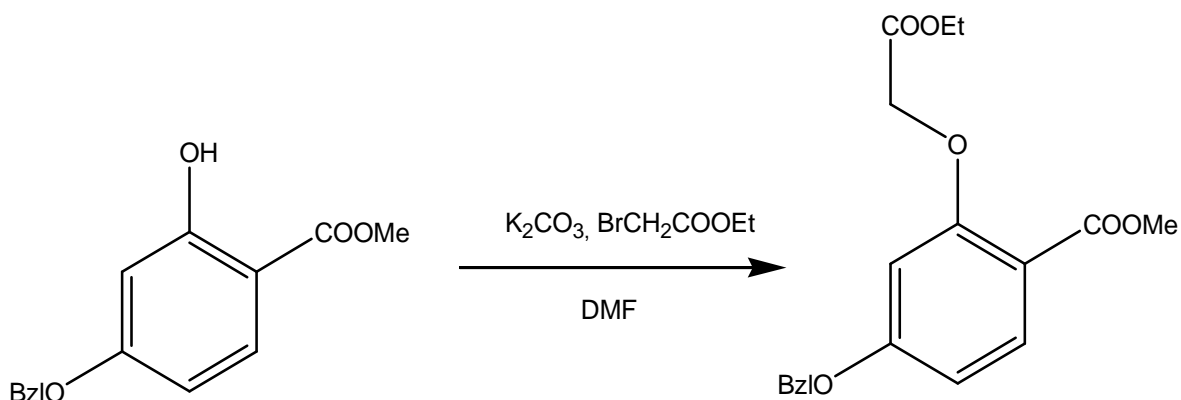
Elementna sestava: $C_{15}H_{14}O_4$

Mr = 258,27

R_f (heksan/etilacetat = 3:1) = 0,45

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 3.90$ (s, 3H, CH_3), 5.06 (s, 2H, CH_2), 6.48-6.52 (m, 2H, Ar-H), 7.33-7.39 (m, 5H, Ar-H), 7.73 (d, $J = 8,7\text{ Hz}$, 1H, Ar-H), 10.97 (s, 1H, OH) ppm.

7.3 Sinteza metil 4-benziloksi-2-(2-etoksi-2-oksoetoksi)benzoata (3)



10,0 g (39 mmol) spojine **2** smo natehtali v bučko, dodali 5,9 g (1,1 ekv; 43 mmol) K_2CO_3 in bučko prepihali z argonom. Zmes smo raztopili v 100 mL brezvodnega DMF in postavili na ledeno kopel ($T = 0\text{ }^\circ\text{C}$). Ohlajeni zmesi smo s kapalnikom dodali 4,72 mL (1,1 ekv; 43 mmol) etilbromoacetata (0,5 kp/s). Reakcija je potekala 24 ur na ledeni kopeli pod argonovo atmosfero.

Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili DMF, ostanek raztopili v 300 mL etilacetata, sprali s 40 mL vode in s 40 mL nasičene vodne raztopine NaCl ter sušili z brezvodnim Na_2SO_4 . Organsko fazo smo filtrirali, uparili etilacetat in izvedli prekristalizacijo iz dietiletra. Dobili smo 11,95 g (35 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 90 %

Elementna sestava: $C_{19}H_{20}O_6$

Mr = 344,36

R_f (heksan/etilacetat = 1:1) = 0,57

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.31 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_2-CH_3), 3.89 (s, 3H, CH_3), 4.28 (q, J = 8 Hz, 2H, CH_2-CH_3), 4.70 (s, 2H, Ph- CH_2), 5.10 (s, 2H, Et-CO-O- CH_2), 6.49 (d, J = 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.66 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.32-7.44 (m, 5H, Ar-H), 7.9 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ar-H) ppm.

^{13}C -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 41.1, 51.5, 61.3, 65.3, 70.8, 101.3, 106.5, 112.8, 127.1, 127.1, 127.6, 128.9, 129.0, 131.9, 136.7, 162.1, 165.9, 166.2, 169.2 ppm.

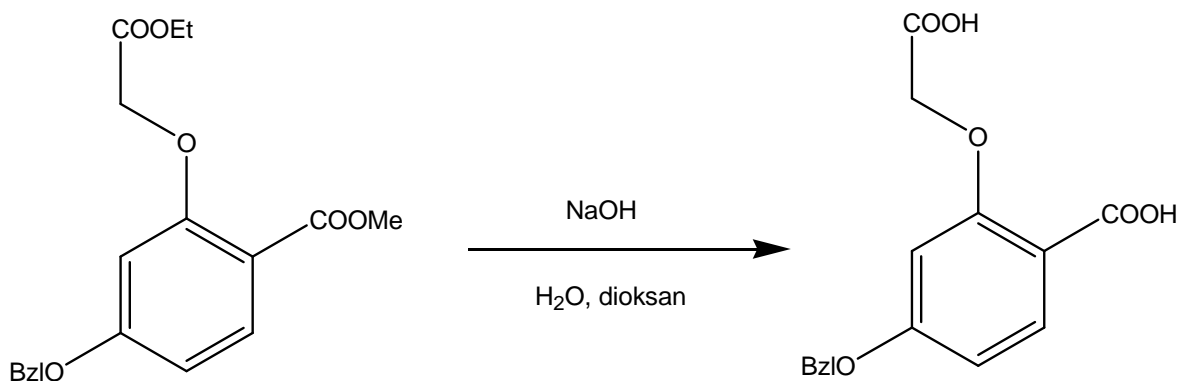
T_{tališča}: 71-73 $^\circ\text{C}$

MS (ESI): 345,2 ($M+H^+$, 100), 367,2 ($M+Na^+$, 60)

HR-MS: 345,1337 (izračunana za $C_{19}H_{21}O_6$: 345,1338)

HPLC: 97,3 % čistost pri 220 nm, 98,2 % čistost pri 254 nm (metoda 1)

7.4 Sinteza 4-benziloksi-2-karboksimetoksibenzojske kisline (**4**)



V bučko smo odmerili 118 mL (4 ekv; 116 mmol) 1M vodne raztopine NaOH, jo opremili s kapalnikom in povratnim hladilnikom, ter jo segreli do vrelišča. V 100 mL dioksana smo nato raztopili 10,07g (29,0 mmol) spojine **3** in to raztopino po kapljicah (1kp/s) dodali v segreto raztopino NaOH.

Po 24 urah smo odparili dioksan, zmesi dodali 200 mL vode in jo nakisali do pH = 1. Spojino smo ekstrahirali s spiranjem vodne faze s 3 × 100 mL etilacetata, združene organske frakcije pa smo nato sprali še s 60 mL nasičene vodne raztopine NaCl in sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Raztopino smo filtrirali, odparili večino etilacetata in ohladili na -18 °C. Izpadlo je 5,05 g belih kristalov. Matičnici smo dodali še 10 mL dietiletra in jo zopet ohladili na -18 °C. Izpadlo je še 3,34 g belih kristalov. Po dveh prekrizacijah smo tako dobili 8,39 g (28 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 96 %

Elementna sestava: C₁₆H₁₄O₆

Mr = 302,28

R_f (heksan/etilacetat = 1:1 + 0,1 % očetne kisline) = 0,12

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 4.81 (s, 2H, Ph-CH₂), 5.15 (s, 2H, CH₂-COOH), 6.65 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.71 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.33-7.47 (m, 5H, Ar-H), 7.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 12.69 (s, 2H, 2 × COOH) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 67.5, 70.8, 101.3, 106.5, 110.2, 127.3 (2 signala), 127.6, 130.1 (2 signala), 132.3, 136.7, 162.5, 166.6, 166.8, 169.9 ppm.

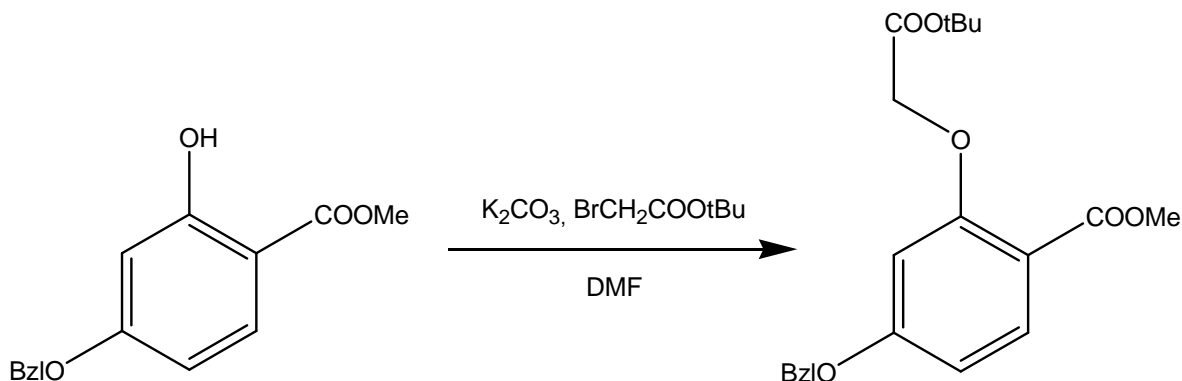
T_{tališča}: 182-186 °C

MS (ESI): 301,1 (M-H⁻, 100)

HR-MS: 301,0706 (izračunana za C₁₆H₁₃O₆: 301,0712)

HPLC: 98,6 % čistost pri 220 nm, 99,1 % čistost pri 254 nm (metoda 2)

7.5 Sinteza metil 4-benziloksi-2-*tert*-butiloksikarbonilmetoksibenzoata (**5**)



2,26 g (9 mmol) spojine **2** smo natehtali v bučko, dodali 1,33 g (1,1 ekv; 10 mmol) K₂CO₃ in bučko prepihali z argonom. Zmes smo raztopili v 20 mL brezvodnega DMF in pri 0 °C s kapalnikom dodali 1,4 mL (1,1 ekv; 10 mmol) *tert*-butilbromoacetata (0,5 kp/s).

Po 24 urah smo pod znižanim tlakom uparili DMF, ostanek raztopili v 60 mL etilacetata, sprali z 10 mL vode, z 10 mL nasičene vodne raztopine NaCl in sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Organsko fazo smo filtrirali, uparili etilacetat in izvedli prekrizalzacijo iz dietiletra. Dobili smo 2,25 g (6 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 67 %

Elementna sestava: C₂₁H₂₄O₆

Mr = 372,41

R_f (heksan/etilacetat = 1:1) = 0,63

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.42 (s, 9H, *t*-Bu), 3.75 (s, 3H, CH₃), 4.76 (s, 2H, Ph-CH₂), 5.16 (s, 2H, CH₂-CO-O-*t*-Bu), 6.61 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 6.71 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.30-7.50 (m, 5H, Ar-H), 7.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar-H) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 40.1, 40.1, 40.2, 51.5, 65.9, 70.8, 82.1, 101.3, 106.5, 112.9, 127.0 (2 signala), 127.6, 130.5 (2 signala), 131.1, 136.7, 162.1, 165.9, 166.2, 169.2 ppm.

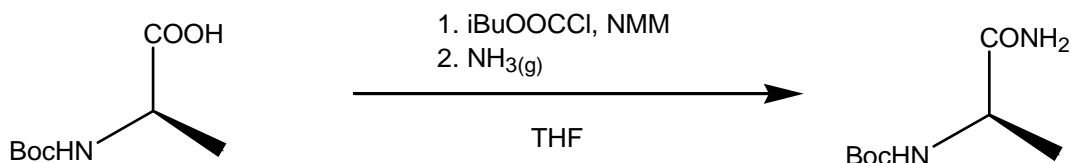
T_{tališča}: 67-69 °C

MS (ESI): 373,2 (M+H⁺, 100), 395,1 (M+Na⁺, 100), 411,1 (M+K⁺, 80)

HR-MS: 373,1655 (izračunana za C₂₁H₂₅O₆: 373,1651)

HPLC: 97,6 % čistost pri 220 nm, 98,4 % čistost pri 254 nm (metoda 1)

7.6 Sinteza (*S*)-*tert*-butil (1-amino-1-oksopropan-2-il)karbamata (**6**)



Spojino **6** smo sintetizirali po postopku iz članka (24).

17,78 g (94 mmol) Boc-L-alanina smo natehtali v bučko, raztopili v 100 mL brezvodnega THF, previdno dodali 14,4 mL (1,1 ekv; 103 mmol) NMM in jo v argonovi atmosferi ohladili na -10 °C. V ohlajeno raztopino smo nato s kapalnikom dodali 13,6 mL (1,1 ekv; 103 mmol) izobutilkloroformata (2 kp/s) in pustili mešati 30 minut. Raztopino smo nato z amoniakom prepihovali 1 uro.

Po končani reakciji smo uparili THF, ostanek raztopili v 300 mL etilacetata, sprali z 2 × 50 mL 10% citronske kisline, 2 × 50 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃ in 50 mL nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in odparili etilacetat do približno 50 mL. Dodali smo heksan in izvedli prekrizalizacijo iz zmesi etilacetata in heksana v razmerju 3:8. Dobili smo 16,31g (87 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 93 %

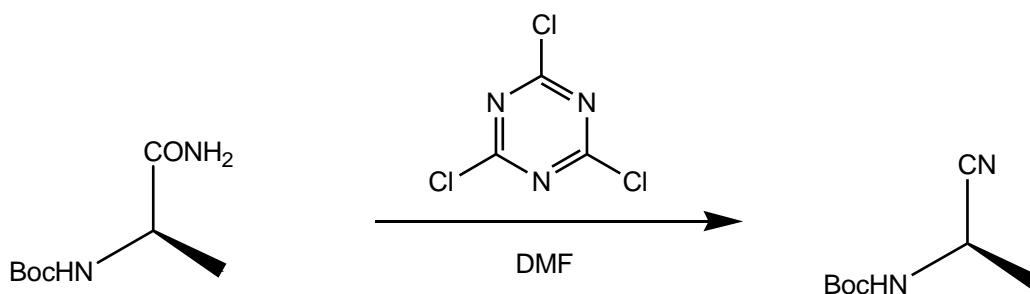
Elementna sestava: C₈H₁₆N₂O₃

Mr = 188,22

R_f (diklorometan/metanol = 40:1, oroševanje z ninhidrinom) = 0,12

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.17 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃), 1.38 (s, 9H, t-Bu), 3.88 (q, *J* = 7.2, 7.7 Hz, 1H, CH), 6.78 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, NH), 6.92 (s, 1H, NH₂), 7.22 (s, 1H, NH₂) ppm.

7.7 Sinteza (*S*)-*tert*-butil (1-cianoetil)karbamata (**7**)



Spojino **7** smo sintetizirali po postopku iz članka (23).

18,45g (98 mmol) spojine **6** smo natehtali v bučko, raztopili v 200 mL brezvodnega DMF in prepihali z argonom. Raztopini smo dodali 36,15 g (2 ekv; 196 mmol) klorida cianurične kisline in reakcijsko zmes pustili mešati 1 uro pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes nevtralizirali s 100 mL 0,5 M raztopine NaOH.

Spojino **7** smo izolirali tako, da smo vodno fazo sprali s 5×100 mL etilacetata, nato pa smo združene organske frakcije sprali z 2×50 mL 10% citronske kisline, 2×50 mL vode in 50 mL nasičene vodne raztopine NaCl. Raztopino smo sušili z brezvodnim Na_2SO_4 , filtrirali in odparili etilacetat do približno 100 mL. Dodali smo heksan in izvedli prekristalizacijo iz zmesi etilacetata in heksana v razmerju 1:4. Po prvi prekristalizaciji smo dobili 2,98 g (18 mmol) velikih prosojnih igličastih kristalov. Matičnico smo delno uparili in ponovno izvedli prekristalizacijo iz zmesi dietiletra in petroletra v razmerju 1:4. Po drugi prekristalizaciji smo dobili 4,65 g (27 mmol) igličastih kristalov.

Izkoristek reakcije: 46 %

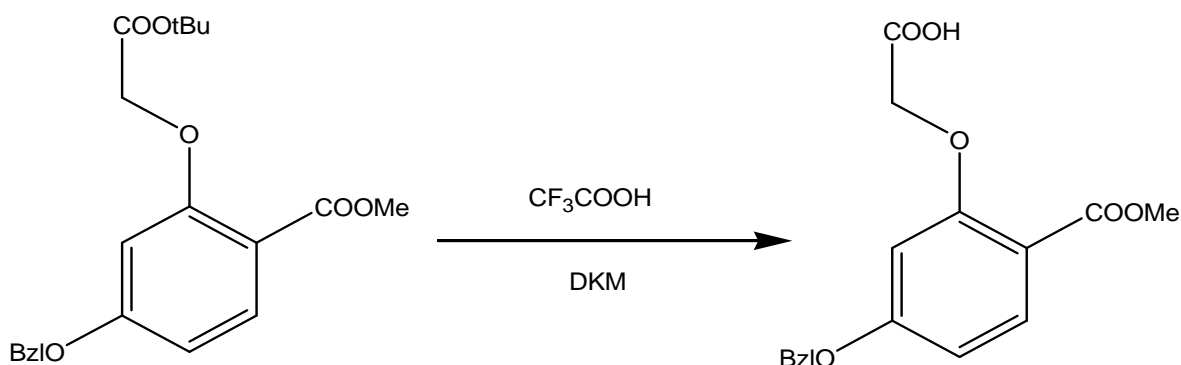
Elementna sestava: $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$

Mr = 170,21

R_f (diklorometan/metanol = 40:1, oroševanje z ninhidrinom) = 0,63

¹H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.48 (s, 9H, *t*-Bu), 1.56 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3), 4.53 (d, J = 7.1 Hz, 1H, CH), 4.93 (s, 1H, NH) ppm.

7.8 Sinteza metil 4-benziloksi-2-karboksimetoksibenzoata (**8**)



1,01 g (2,7 mmol) spojine **5** smo natehtali v bučko, raztopili v 30 mL DKM, postavili na ledeno kopel ($T = 0\text{ }^{\circ}\text{C}$) in dodali 10 mL trifluoroacetne kisline za 1 uro.

Izolacijo spojine **8** smo izvedli tako, da smo topilo odparili do suhega in prekrystalizirali iz dietiletra. Dobili smo 0,76 g (2,4 mmol) belih igličastih kristalov.

Izkoristek reakcije: 89 %

Elementna sestava: $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$

Mr = 316,31

R_f (heksan/etilacetat = 1:1 + 0,1 % oetne kisline) = 0,35

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 3.74$ (s, 3H, CH₃), 4.78 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.14 (s, 2H, CH₂-COOH), 6.62 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, Ar-H), 6.71 (d, $J = 8$ Hz, 1H, Ar-H), 7.35-7.47 (m, 5H, Ar-H), 7.71 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, Ar-H), 13.04 (s, 1H, COOH) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 51.5, 67.5, 70.8, 101.3, 106.5, 112.9, 127.3$ (2 signala), 127.6, 128.9, 129.7, 131.9, 136.7, 162.1, 165.9, 166.2, 169.9 ppm.

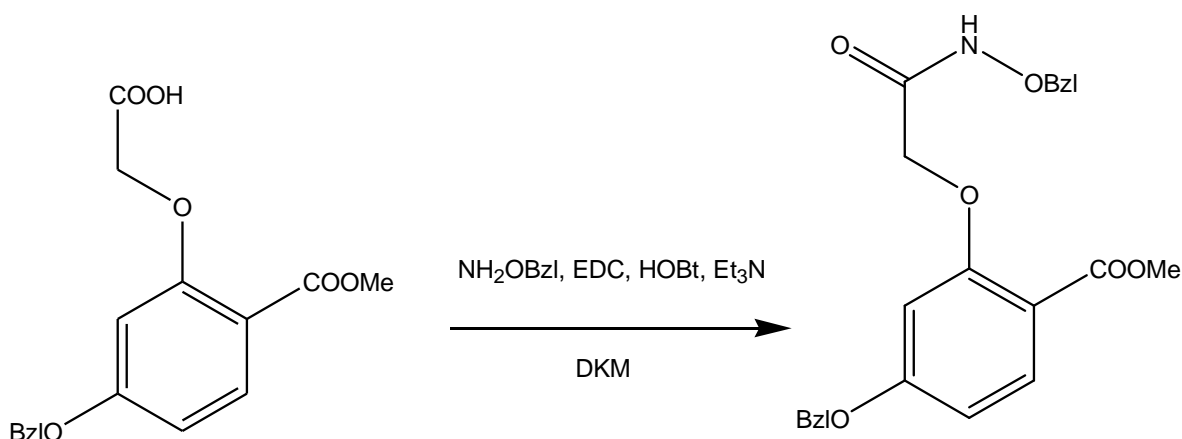
T_{tališča}: 127-129 °C

MS (ESI): 315,1 (M-H⁻, 100)

HR-MS: 315,0861 (izračunana za $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_6$: 315,0869)

HPLC: 99,4 % čistost pri 220 nm, 99,8 % čistost pri 254 nm (metoda 2)

7.9 Sinteza metil 4-benziloksi-2-(benziloksikarbamoilmetoksi)benzoata (9)



1,33 g (4,2 mmol) spojine **8** in 0,57 g (1 ekv; 4,2 mmol) HOBt smo raztopili v 60 mL diklorometana. K raztopini smo dodali 0,81 g (1,2 ekv; 5 mmol) *O*-benzil-hidroksilamina in 2,9 mL (5 ekv; 21 mmol) trietilamina ter pri 0 °C dodali še 0,97 g (1,2 ekv; 5 mmol) reagenta EDC.

Po 24 urah smo zmesi dodali 50 mL DKM, sprali z 2 × 40 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃, z 2 × 40 mL 10% citronske kisline in s 40 mL nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo smo filtrirali, sušili z brezvodnim Na₂SO₄ in delno odparili topilo do približno 5 mL. Nato smo dolili dietileter in izvedli prekrizalizacijo. Dobili smo 1,01 g (2,4 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 57 %

Elementna sestava: C₂₄H₂₃NO₆

Mr = 421,44

R_f (diklorometan/metanol = 40:1 + 0,1 % očetne kisline) = 0,64

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.77 (s, 3H, CH₃), 4.61 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.02 (s, 2H, NH-O-CH₂-Ph), 5.13 (s, 2H, O-CH₂-CO-NH), 6.46 (s, 1H, Ar-H), 6.64 (d, *J* = 8 Hz, 1H, Ar-H), 7.36-7.48 (m, 10H, Ar-H), 7.88 (d, *J* = 8 Hz, 1H, Ar-H), 11.05 (s, 1H, NH) ppm.

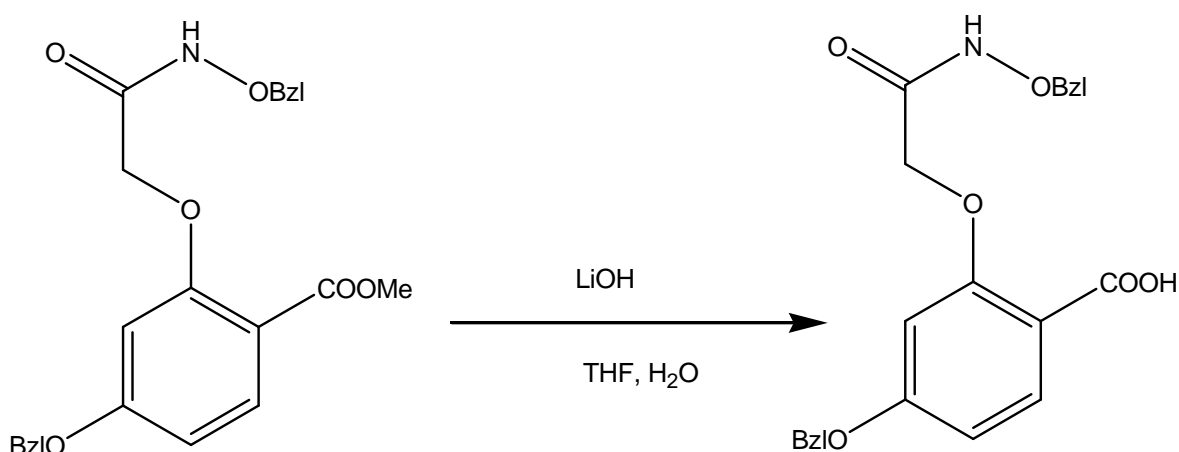
T_{tališča}: 115-117 °C

MS (ESI): 422,2 (M+H⁺, 100)

HR-MS: 422,1595 (izračunana za C₂₄H₂₄NO₆ : 422,1604)

HPLC: 97,1 % čistost pri 220 nm, 98,0 % čistost pri 254 nm (metoda 1)

7.10 Sinteza 4-benziloksi-2-(benziloksikarbamoilmetoksi)benzojske kisline (**10**)



1,33 g (3,1 mmol) spojine **9** smo raztopili v 120 mL tetrahidrofurana in dodali 80 mL vode ter 0,38 g (5 ekv; 15,5 mmol) litijevega hidroksida.

Po 24 urah smo v reakcijsko zmes dolili 50 mL vode, jo s koncentrirano HCl nakisali do pH = 3 in sprali z 2 × 100 mL etilacetata. Združeni organski frakciji smo nato sprali s 50 mL nasičene vodne raztopine NaCl, sušili z brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo. Nato smo izvedli prekrystalizacijo iz dietiletra in dobili 0,96 g (2,4 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 77 %

Elementna sestava: C₂₃H₂₁NO₆

Mr = 407,42

R_f (heksan/etilacetat = 1:1 + 0,1 % oetne kisline) = 0,52

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 4.65 (s, 2H, Ph-CH₂-O), 5.01 (s, 2H, Ph-CH₂-O-NH), 5.17 (s, 2H, O-CH₂-CO), 6.48 (s, 1H, NH), 6.70 (d, J = 8 Hz, 1H, Ar-H), 7.28 (s, 1H, Ar-H), 7.32-7.49 (m, 10H, Ar-H), 8.02 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar-H), 10.62 (s, 1H, COOH) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 63.3, 70.8, 78.5, 101.3, 106.5, 110.2, 127.0(4 signali), 127.6 (2 signala), 128.8 (4 signali), 132.3, 136.5, 136.7, 162.5, 166.0, 166.6, 166.8 ppm.

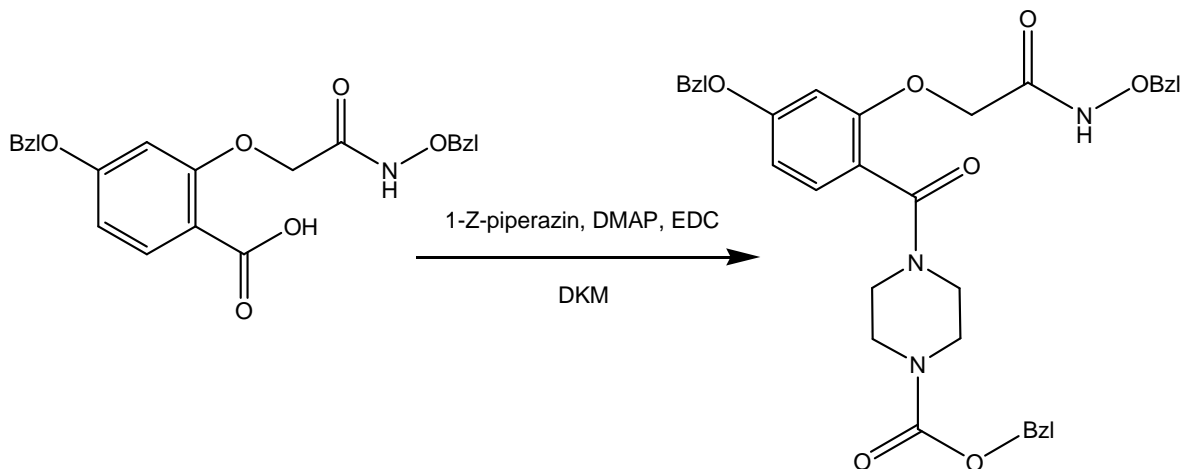
T_{tališča}: 181-183 °C

MS (ESI): 406,1 (M-H⁻, 100)

HR-MS: 406,1289 (izračunana za C₂₃H₂₀NO₆: 406,1291)

HPLC: 98,6 % čistost pri 220 nm, 98,3 % čistost pri 254 nm (metoda 2)

7.11 Sinteza benzil 4-[4-benziloksi-2-(benziloksikarbamoilmetoksi)benzoil]-piperazin-1-karboksilata (11**)**



150 mg (0,37 mmol) spojine **10** smo natehtali v reakcijsko vialo, dodali 9,0 mg (0,2 ekv.; 0,07 mmol) DMAP in raztopili v 4 mL diklorometana. Nato smo k raztopini dodali še 284 μ L (4 ekv.; 1,5 mmol) 1-benziloksikarbonil-piperazina, 141 mg (2 ekv.; 0,74 mmol) EDC in reakcijsko zmes segrevali v mikrovalovnem reaktorju 2 uri pri 60 °C.

Izolacijo spojine **11** smo izvedli tako, da smo zmesi dodali 20 mL diklorometana in raztopino sprali z 2×10 mL 1M HCl, 2×10 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃ in z 10 mL nasičene raztopine NaCl ter organsko fazo sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Raztopino smo filtrirali in uparili topilo do suhega. Dobili smo 200 mg (0,33 mmol) brezbarvne viskozne oljnate tekočine.

Izkoristek reakcije: 89%

Elementna sestava: C₃₅H₃₅N₃O₇

Mr = 609,67

R_f (diklorometan/metanol = 40:1 + 0,1 % Et₃N) = 0,45

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.38-3.70 (m, 8H, piperazin), 4.68 (s, 2H, Ph-CH₂-O), 4.90 (s, 2H, Ph-CH₂-O-NH), 5.08 (s, 2H, O-CH₂-CO-NH), 5.18 (s, 2H, Ph-CH₂-O-CO), 6.62 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 6.65 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.05 (d, J = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.30-7.46 (m, 15H, Ar-H), 11.16 (s, 1H, CH₂-CO-NH) ppm.

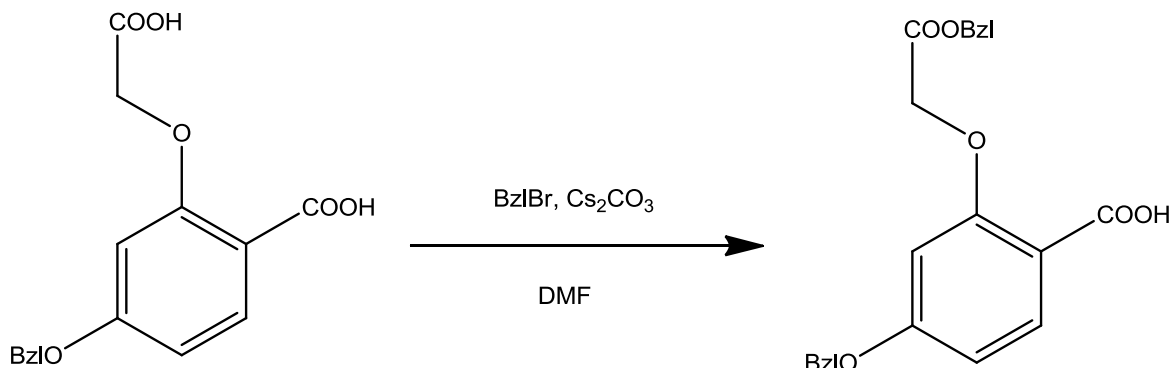
¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 49.8, 49.8, 50.9, 50.9, 62.9, 67.1, 70.8, 78.5, 101.2, 106.4, 111.5, 128.1 (4 signali), 127.3 (2 signala), 127.6 (3 signali), 129.2, 130.3 (6 signalov), 136.1, 136.5, 136.7, 151.5, 159.4, 162.6, 166.0, 168.9 ppm.

MS (ESI): 610,3 (M+H⁺, 100)

HR-MS: 610,2560 (izračunana za $C_{35}H_{36}N_3O_7$: 610,2553)

HPLC: 98,8 % čistost pri 220 nm, 98,2 % čistost pri 254 nm (metoda 2)

7.12 Sinteza 4-benziloksi-2-(benziloksikarbonilmetoksi)benzojske kisline (**12**)



5,28 g (17,5 mmol) spojine **4** smo natehtali v bučko, dodali 2,02 g Cs₂CO₃ (0,6 ekv.; 10,5 mmol), raztopili v 100 mL DMF in prepihali z argonom. Bučko smo postavili na ledeno kopel (T = 0 °C) in z avtomatskim kapalnikom tekom 5 ur dodali 2,5 mL (1,2 ekv.; 21 mmol) benzilbromida. Reakcija je potekala 24 ur.

Izolacijo spojine **12** smo izvedli tako, da smo uparili DMF in izvedli ločbo s kolonsko kromatografijo, po kateri smo dobili 4,8 g (12,2 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 70 %

Elementna sestava: C₂₃H₂₀O₆

Mr = 392,40

R_f (heksan/etilacetat = 1:1 + 0,1 % oetne kisline) = 0,44

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 4.97 (s, 2H, Ph-CH₂-O), 5.10 (s, 2H, OCH₂-CO-O), 5.19 (s, 2H, Ph-CH₂-O-CO), 6.62 (d, J = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 6.70 (dd, J = 8.7, 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.29-7.45 (m, 10H, Ar-H), 7.73 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar-H), 12.25 (s, 1H, COOH) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 65.2, 66.4, 70.8, 101.2, 106.5, 110.1, 126.9 (4 signali), 127.6 (2 signala), 128.8 (4 signali), 132.3, 136.0, 136.7, 162.5, 166.5, 166.8, 169.1 ppm.

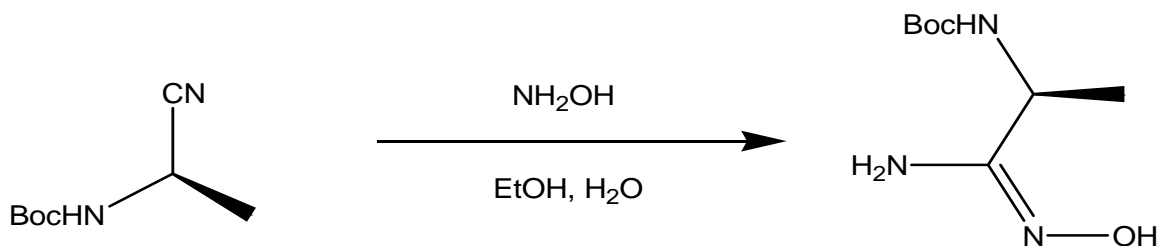
T_{tališča}: 129-131 °C

MS (ESI): 391,1 (M-H, 100)

HR-MS: 391,1179 (izračunana za C₂₃H₁₉O₆: 391,1182)

HPLC: 97,8 % čistost pri 220 nm, 98,1 % čistost pri 254 nm (metoda 1)

7.13 Sinteza (S)-terc-butil[1-amino-1-(hidroksiimino)propan-2-il]karbamata (**13**)



Spojino **13** smo sintetizirali po postopku iz članka (23).

2,18 g (12,8 mmol) spojine **7** smo raztopili v 51,2 mL etanola in dodali 1,7 mL (4 ekv.; 51,2 mmol) 50% w/w vodne raztopine hidroksilamina. Reakcija je potekala 24 ur v argonovi atmosferi pri sobni temperaturi.

Po končani reakciji smo topilo uparili, ostanek suspendirali v 10 mL vode in sprali s 3×10 mL dietiletra. Združene organske frakcije smo sprali z 10 mL nasičene raztopine NaCl, sušili z brezvodnim Na_2SO_4 , filtrirali ter uparili topilo. Dobili smo 2,09 g (10,2 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 80 %

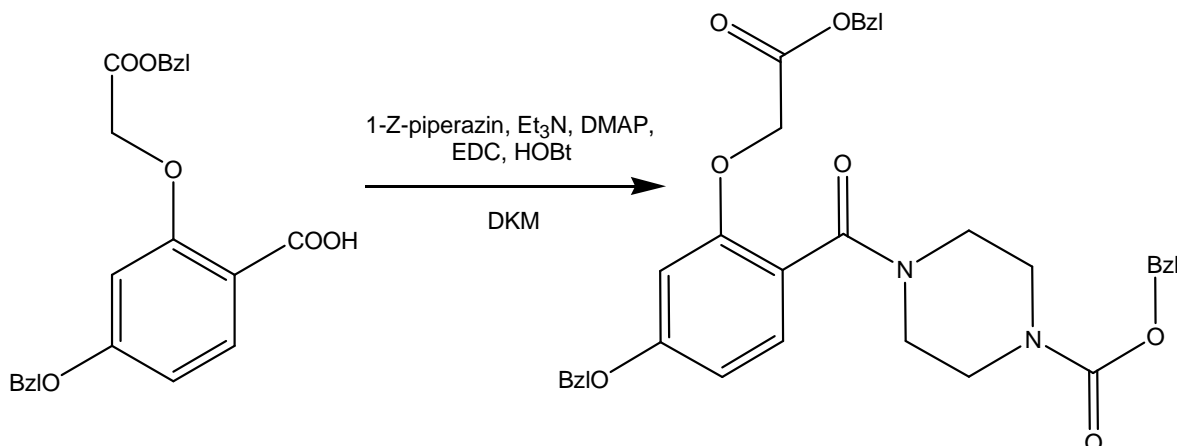
Elementna sestava: $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$

Mr = 203,24

R_f (heksan/etilacetat = 1:1 + 0,1 % očetne kisline, oroševanje z ninhidrinom) = 0,37

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.19 (d, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 1.38 (s, 9H, *t*-Bu), 4.04 (q, J = 7.2, 7.7 Hz, 1H, CH), 5.28 (s, 2H, NH₂), 6.82 (d, J = 7.8 Hz, 1H, BocNH), 8.97 (s, 1H, OH) ppm.

7.14 Sinteza *benzil 4-(4-benziloksi-2-benziloksikarbonilmetoksibenzoil)-piperazin-1-karboksilata* (**14**)



150 mg (0,38 mmol) spojine **12** smo natehtali v reakcijsko vialo, dodali 9,3 mg (0,2 ekv.; 0,07 mmol) DMAP, 10,3 mg (0,2 ekv.; 0,07 mmol) HOBt ter raztopili v 5 mL diklorometana. Dodali smo še 210 μ L (4 ekv.; 1,5 mmol) Et_3N , 74 μ L (1 ekv.; 0,38 mmol) 1-Z-piperazina ter 87,7 mg (1,2 ekv.; 0,46 mmol) EDC. Reakcijsko zmes smo segrevali v mikrovalovnem reaktorju 1 uro pri 60 °C.

Po končani reakciji smo reakcijsko zmes razredčili s 50 mL diklorometana, jo sprali z 2 \times 20 mL 10% citronske kisline, 2 \times 20 mL nasičene vodne raztopine NaHCO_3 in z 20 mL nasičene vodne raztopine NaCl ter sušili z brezvodnim Na_2SO_4 . Organsko fazo smo filtrirali, topilo odparili in izvedli ločbo s kolonsko kromatografijo. Dobili smo 125 mg (0,2 mmol) rumene viskozne oljnate tekočine.

Izkoristek reakcije: 53 %

Elementna sestava: $\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_7$

Mr = 594,65

R_f (heksan/etilacetat = 1:1) = 0,17

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 3.17-3.86 (m, 8H, piperazin), 4.67 (s, 2H, Ph- $\underline{\text{CH}_2}$), 5.02 (s, 2H, $\underline{\text{OCH}_2}$ -CO-O), 5.17 (s, 2H, Ph- $\underline{\text{CH}_2}$ -O-CO), 5.19 (s, 2H, Ph- $\underline{\text{CH}_2}$ -O-CO-N), 6.36 (d, J = 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 6.66 (dd, J = 8.4, 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.24 (d, J = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.28-7.42 (m, 15H, Ar-H), ppm.

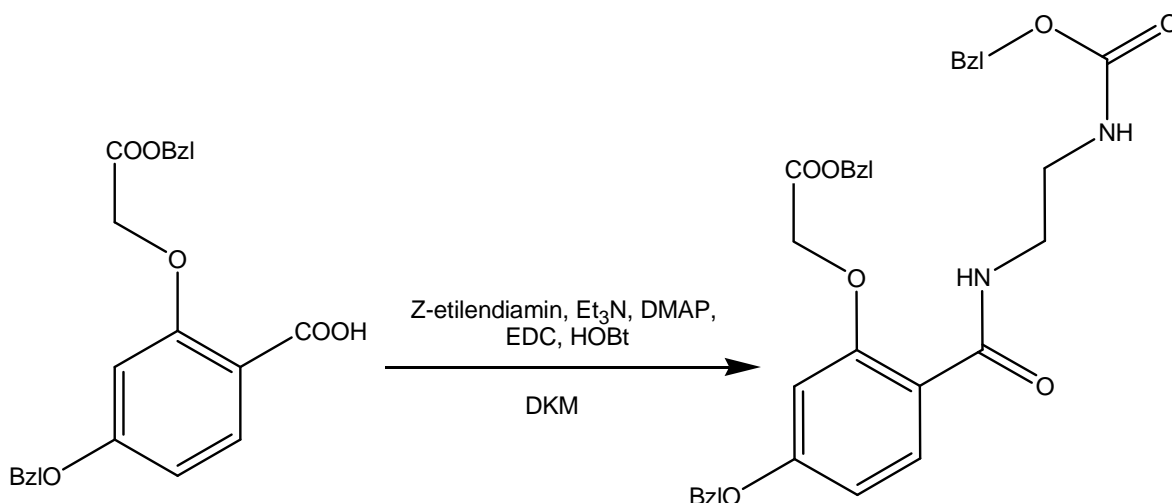
^{13}C -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 49.7, 49.7, 50.8, 52.8, 64.9, 66.4, 67.1, 70.7, 101.2, 106.4, 111.5, 127.0 (4 signali), 127.2 (2 signala), 127.6 (3 signali), 128.7 (3 signali), 128.9 (3 signali), 129.2, 136.1 (2 signala), 136.6, 151.5, 159.4, 162.2, 168.9, 169.2 ppm.

MS (ESI): 595,4 ($M+H^+$, 100)

HR-MS: 595,4268 (izračunana za $C_{35}H_{35}N_2O_7$: 595,4264)

HPLC: 98,5 % čistost pri 220 nm, 98,0 % čistost pri 254 nm (metoda 2)

7.15 Sinteza benzil[5-benziloksi-2-(2-(benziloksikarbonilamino)etilkarbamoil)-fenoksi]acetata (15**)**



150 mg (0,38 mmol) spojine **12** smo natehtali v reakcijsko vialo, dodali 9,3 mg (0,2 ekv.; 0,07 mmol) DMAP, 10,3 mg (0,2 ekv.; 0,07 mmol) HOBt ter raztopili v 5 mL diklorometana. Dodali smo še 210 μ L (4 ekv.; 1,5 mmol) Et_3N , 82 mg (1,1 ekv.; 0,42 mmol) *Z*-etilendiamina in 87,7 mg (1,2 ekv.; 0,46 mmol) EDC. Reakcijsko zmes smo segrevali v mikrovalovnem reaktorju 1 uro pri 60 °C.

Po končani reakciji smo reakcijsko zmes razredčili z 50 mL diklorometana, jo sprali z 2 \times 20 mL 10% citronske kisline, 2 \times 20 mL nasičene vodne raztopine $NaHCO_3$ in z 20 mL nasičene vodne raztopine $NaCl$ ter sušili z brezvodnim Na_2SO_4 . Organsko fazo smo filtrirali, topilo odparili in izvedli prekrizalzacijo iz dietiletra. Dobili smo 160 mg (0,28 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 74 %

Elementna sestava: $C_{33}H_{32}N_2O_7$

Mr = 568,62

R_f (heksan/etilacetat = 1:1 + 0,1 % Et_3N) = 0,22

¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.71 (s, 2H, Ph-CH₂), 5.10 (s, 2H, Ph-CH₂-O-CO), 5.12 (s, 2H, Ph-CH₂-O-CO-N), 5.23 (s, 2H, O-CH₂-COO), 6.41 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 6.73

(dd, $J = 8.4, 2.3$ Hz, 1H, Ar-H), 7.28 (s, 4H, NH-CH₂-CH₂-NH), 7.30 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, Ar-H), 7.34-7.43 (m, 15H, Ar-H), 8.21 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H CONH), 8.55 (t, 1H, NH-CO-O-Bzl) ppm.

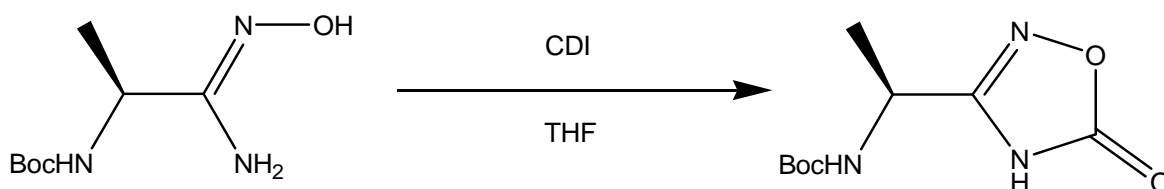
T_{tališča}: 89-91 °C

MS (ESI): 569,2 (M+H⁺, 100)

HR-MS: 569,2275 (izračunana za C₃₃H₃₃N₂O₇: 569,2288)

HPLC: 100 % čistost pri 220 nm, 100 % čistost pri 254 nm (metoda 1)

7.16 Sinteza (S)-terc-butil[1-(5-Okso-4,5-dihidro-[1,2,4]oksadiazol-3-il)-etil]karbamata (**16**)



Spojino **16** smo sintetizirali po postopku iz članka (23).

1,59 g (7,8 mmol) spojine **13** smo natehtali v bučko, prepihali z argonom, raztopili v 60 mL THF ter dodali 1,91 mg (1,5 ekv.; 11,7 mmol) CDI. Reakcija je potekala 24 ur pri temperaturi vrenja pod argonovo atmosfero.

Izolacijo spojine **16** smo izvedli tako, da smo topilo odparili pod znižanim tlakom, ostanek raztopili v 50 mL etilacetata ter ekstrahirali s 50 mL 1M raztopine NaOH. Na ledeni kopeli smo vodno fazo nakisali do pH = 3 in spojino ekstrahirali s 3 × 30 mL diklorometana. Združene organske frakcije smo nato sprali z 20 mL nasičene vodne raztopine NaCl, sušili z brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo do suhega. Dobili smo 567 mg (2,5 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 32 %

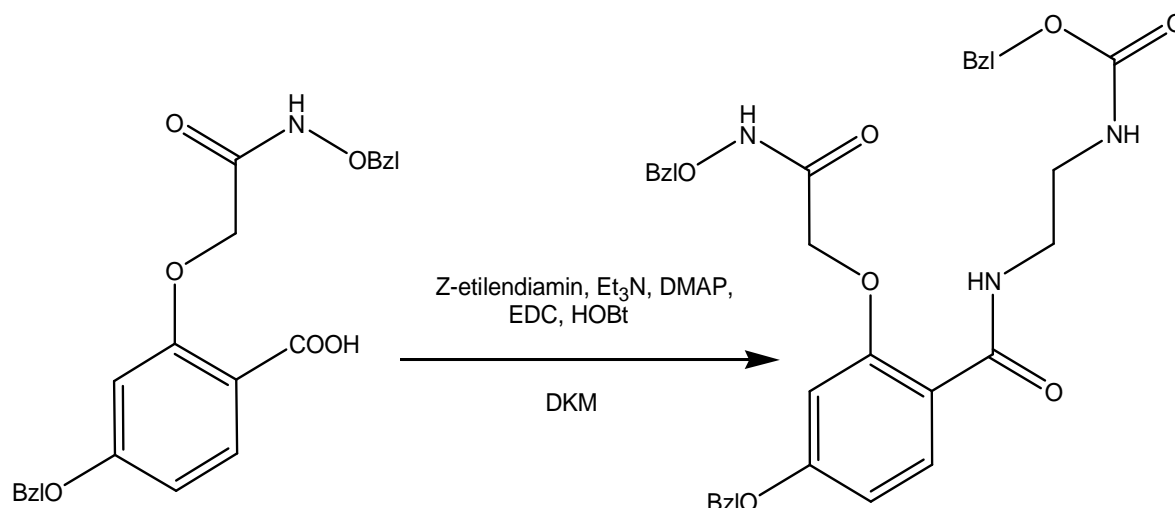
Elementna sestava: C₉H₁₅N₃O₄

Mr = 229,23

R_f (heksan/etilacetat = 1:1 + 0,1 % očetne kisline, oroševanje z ninhidrinom) = 0,14

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.33 (d, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 1.40 (s, 9H, *t*-Bu), 4.53 (q, J = 7.5, 7.0 Hz, 1H, CH), 7.44 (d, J = 7.5 Hz, 1H, BocNH), 11.98 (s, 1H, NH) ppm.

7.17 Sinteza benzil{2-[4-benziloksi-2-(benziloksikarbamoilmetoksi)benzoilamino]etil}karbamata (17**)**



150 mg (0,37 mmol) spojine **10** smo natehtali v reakcijsko vialo, dodali 9,0 mg (0,2 ekv.; 0,07 mmol) DMAP, 10,0 mg (0,2 ekv.; 0,07 mmol) HOBt ter raztopili v 5 mL diklorometana. Dodali smo še 152 μL (3 ekv.; 1,11 mmol) Et₃N, 107 mg (1,5 ekv.; 0,56 mmol) Z-etilendiamina in 106 mg (1,5 ekv.; 0,56 mmol) EDC. Reakcijsko zmes smo segrevali v mikrovalovnem reaktorju 1 uro pri 60 °C.

Po končani reakciji smo reakcijsko zmes razredčili s 50 mL diklorometana, jo sprali z 2 \times 20 mL 10% citronske kisline, 2 \times 20 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃, z 20 mL slanice in sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Organsko fazo smo filtrirali, topilo odparili in izvedli prekristalizacijo iz dietiletra. Dobili smo 188 mg (0,32 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 86 %

Elementna sestava: C₃₃H₃₃N₃O₇

Mr = 583,63

R_f (heksan/etilacetat = 1:1 + 0,1 % oetne kisline) = 0,55

^1H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.01 (s, 2H, Ph-CH₂-O), 2.04 (s, 2H, Ph-CH₂-O-CO), 3.32 (s, 2H, Ph-CH₂-O-NH), 3.47 (s, 2H, CO-CH₂-O), 4.48 (d, J = 7.6 Hz, 2H, NH-CH₂-CH₂), 4.91 (d, J = 8 Hz, 2H, NH-CH₂-CH₂), 6.45 (s, 1H, Ar-H), 6.62 (d, J = 8.3 Hz, 1H,

Ar-H), 7.17-7.38 (m, 15H, Ar-H), 7.63 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, Ar-H), 8.12 (t, $J = 7.1, 7.1$ Hz, 1H, CO-NH-CH₂), 8.18 (t, $J = 7.1, 7.0$ Hz, 1H, CH₂-NH-CO), 10.80 (s, 1H, CO-NH-O) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 40.8, 40.9, 60.4, 66.9, 67.5, 70.3, 78.2, 100.6, 107.7, 115.6, 127.5, 127.8, 128.1, 128.7, 129.0$ (2 signala), 129.1, 129.2, 129.3, 129.5, 129.5, 129.6, 132.8, 135.1, 136.0, 136.2, 156.9, 157.7, 162.4, 165.2, 166.2, 171.2, 175.1 ppm.

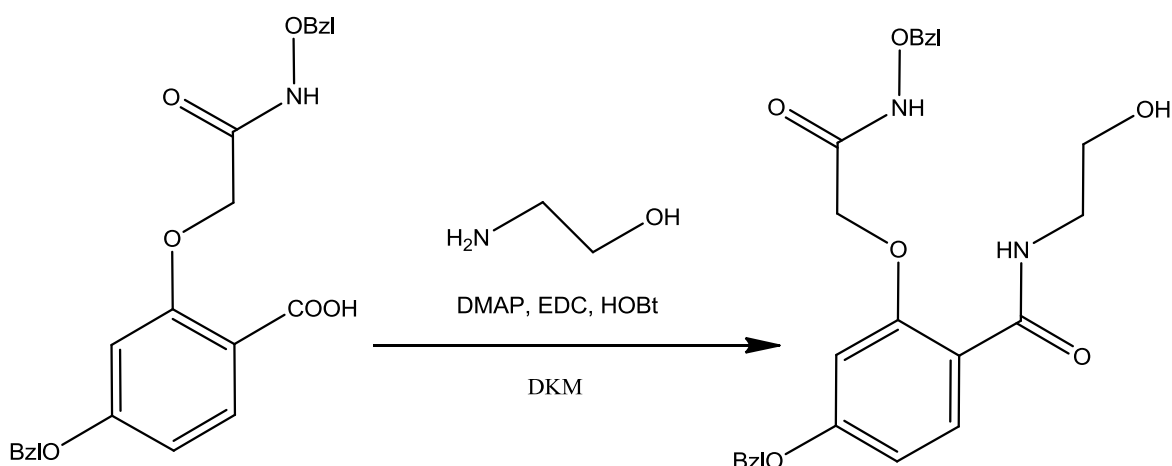
T_{tališča}: 79-81 °C

MS (ESI): 584,3 (M+H⁺, 100)

HR-MS: 584,2388 (izračunana za C₃₃H₃₄N₃O₇: 584,2397)

HPLC: 98,7 % čistost pri 220 nm, 98,3 % čistost pri 254 nm (metoda 1)

7.18 Sinteza 4-(benziloksi)-2-(2-((benziloksi)amino)-2-oksoetoksi)-N-(2-hidroksietil)benzamida (**18**)



150 mg (0,37 mmol) spojine **10** smo natehtali v reakcijsko vialo, dodali 9,0 mg (0,2 ekv.; 0,07 mmol) DMAP, 10,0 mg (0,2 ekv.; 0,07 mmol) HOBt ter raztopili v 5 mL diklorometana. Dodali smo še 67,5 mg (3 EKV; 1,1 mmol) etanolamina in 106 mg (1,5 ekv.; 0,56 mmol) EDC. Reakcijsko zmes smo segrevali v mikrovalovnem reaktorju 1 uro pri 60 °C.

Po končani reakciji smo reakcijsko zmes razredčili z 20 mL diklorometana, jo sprali z 2 × 20 mL 1M HCl, 2 × 20 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃, z 20 mL nasičene vodne raztopine NaCl in sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Organsko fazo smo filtrirali, topilo odparili in dolili 10 mL dietiletra. Kristali niso izpadli, smo pa dobili 113 mg (0,25 mmol) rumenkastega olja.

Izkoristek reakcije: 68 %

Elementna sestava: C₂₅H₂₆N₂O₆

Mr = 450,48

R_f (heksan/etilacetat = 1:1 + 0,1 % oetne kisline) = 0,22

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.53 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, OH), 4.49 (s, 2H, Ph-CH₂), 4.58 (s, 2H, Ph-CH₂), 4.88 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, OH-CH₂-CH₂), 4.95 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, OH-CH₂-CH₂), 5.32 (s, 2H, O-CH₂-CO), 6.46 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 6.66 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.24 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.28-7.46 (m, 10H, Ar-H), 7.85 (t, *J* = 7.1, 7.1 Hz, 1H, CO-NH-CH₂), 8.17 (s, 1H, CO-NH-O)

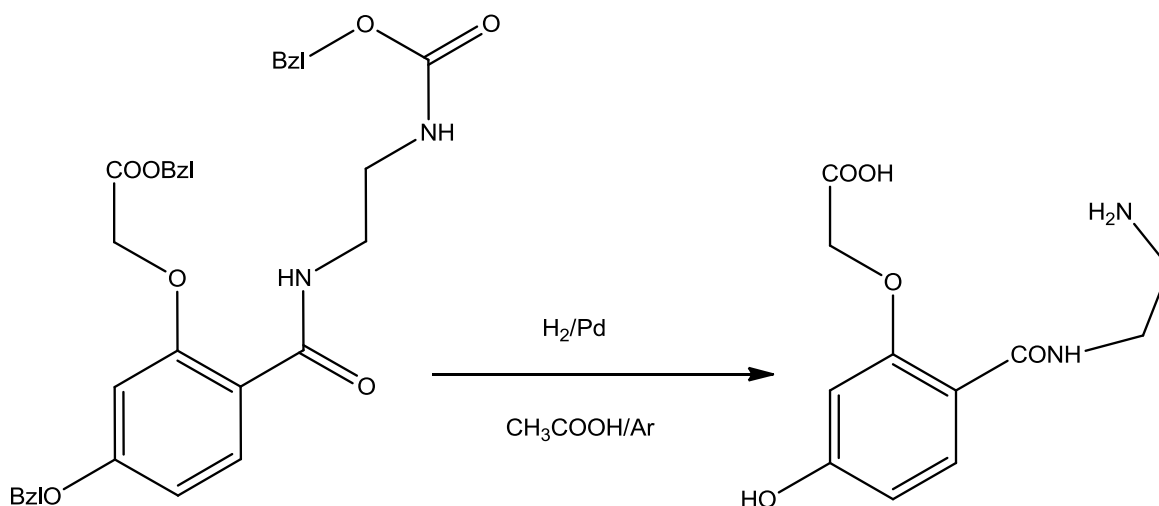
¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 53.1, 61.0, 62.9, 70.8, 78.4, 101.5, 106.7, 119.0, 126.7 (4 signali), 127.6 (2 signala), 129.2 (4 signali), 132.1, 136.5, 136.7, 159.7, 165.0, 165.6, 166.0 ppm.

MS (ESI): 451,1 (M+H⁺, 100)

HR-MS: 451,1288 (izračunana za C₂₅H₂₇N₂O₆: 451,1652)

HPLC: 96,7 % čistost pri 220 nm, 97,3 % čistost pri 254 nm (metoda 1)

7.19 Sinteza 2-(2-((2-aminoetil)karbamoil)-5-hidroksifenoksi)ocetne kisline (**19**)



Vse reakcije katalitskega hidrogeniranja smo izvajali po enakem postopku. 95 mg (0,17 mmol) spojine **15** smo raztopili v 4 mL brezvodne oetne kisline, prepivali z argonom in dodali za konico spatule paladija na aktiviranem oglju. Nato smo raztopino ob mešanju prepivali s H₂ 15 minut in jo pustili v vodikovi atmosferi še 1 uro.

Po končani reakciji smo reakcijsko zmes filtrirali in odstranili očetno kislino pod znižanim tlakom. Surovi produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo na reverznofaznem silikagelu z uporabo mobilne faze sestavljene iz vode, acetonitrila in 0.1 % CF₃COOH, s tem da smo povečevali gradient vode iz 5 % do 90 %. Izolirane frakcije smo združili in odstranili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 40 mg (0,16 mmol) belega prahu.

Izkoristek reakcije: 94 %

Elementna sestava: C₁₁H₁₄N₂O₅

Mr = 254,24

R_f (diklorometan/metanol = 7:1 +0,1 % očetne kisline) = 0,1

¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 3.22 (t, 2H, NH₂-CH₂-CH₂), 3.71 (t, 2H, NH₂-CH₂-CH₂), 4.51 (s, 2H, CH₂-COOH), 5.31 (t, *J* = 7.1, 7.0 Hz, 2H, NH₂), 6.45 (s, 1H, OH), 6.50 (t, *J* = 7.1, 7.1 Hz, 1H, CO-NH-CH₂), 6.66 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 6.70 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.88 (s, 1H, COOH) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 51.6, 62.0, 67.1, 102.1, 111.2, 119.3, 129.2, 160.2, 163.0, 165.6, 169.9 ppm.

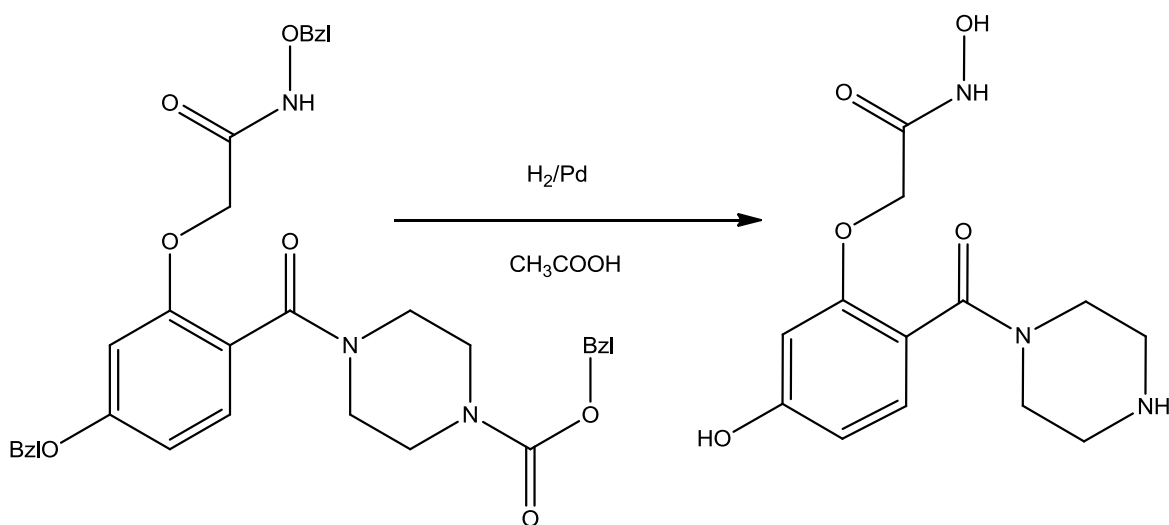
T_{tališča}: 118-123 °C

MS (ESI): 255,1 (M+H⁺, 100)

HR-MS: 255,0987 (izračunana za C₁₁H₁₅N₂O₅: 255,0981)

HPLC: 98,9 % čistost pri 220 nm, 98,7 % čistost pri 254 nm (metoda 1)

7.20 Sinteza *N*-hidroksi-2-(5-hidroksi-2-(piperazin-1-karbonil)fenoksi)acetamida (20)



Reakcijo smo izvedli s 121 mg (0,20 mmol) spojine **11** po postopku opisanem v sintezi 7.19.

Po končani reakciji smo reakcijsko zmes filtrirali in odstranili očetno kislino pod znižanim tlakom. Surovi produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo na reverznofaznem silikagelu in z uporabo mobilne faze sestavljene iz vode, acetonitrila in 0.1 % Et₃N, s tem da smo povečevali gradient vode iz 5 % do 90 %. Izolirane frakcije smo združili in odstranili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 53 mg (0,18 mmol) trde smole.

Izkoristek reakcije: 90 %

Elementna sestava: C₁₃H₁₇N₃O₅

Mr = 295,29

R_f (diklorometan/metanol = 7:1 +0,1 % Et₃N) = 0,12

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.14 (dd, J = 7.4, 2.8 Hz, 1H, piperazinski-NH), 2.58-2.77 (m, 8H, piperazin), 3.19 (s, 2H, O-CH₂-CO), 3.34 (s, 1H, OH), 4.22 (d, J = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 4.50 (dd, J = 8.7, 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 4.80 (d, J = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 6.84 (d, J = 2.0 Hz, 1H, OH-NH), 7.00 (d, J = 2.3 Hz, 1H, OH-NH) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 45.9, 46.5, 48.4, 49.6, 67.6, 101.5, 109.9, 117.0, 130.3, 156.9, 161.8, 167.4, 170.6 ppm.

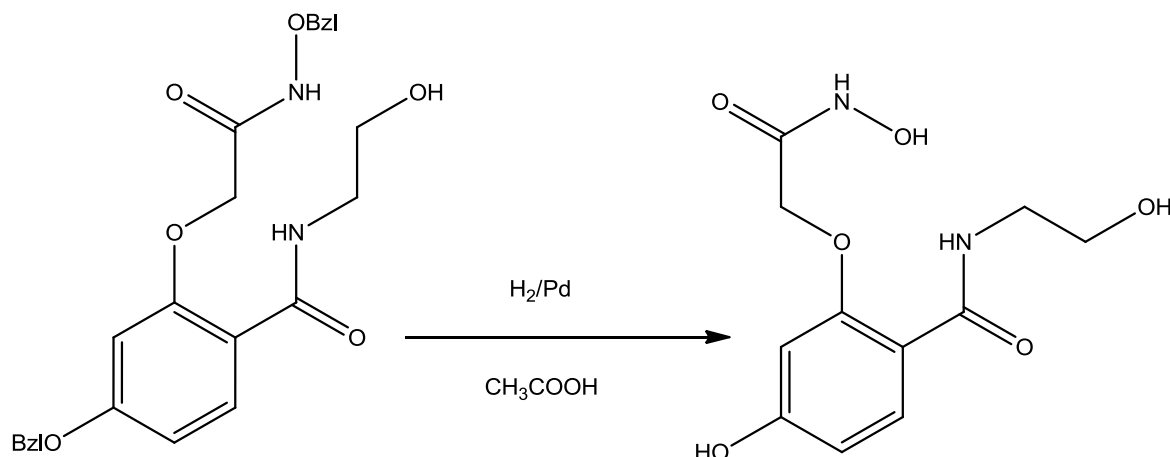
T_{tališča}: 145-150 °C

MS (ESI): 294,1 (M-H⁻, 100)

HR-MS: 294,1098 (izračunana za C₁₃H₁₆N₃O₅: 294,1090)

HPLC: 97,8 % čistost pri 220 nm, 96,7 % čistost pri 254 nm (metoda 1)

7.21 Sinteza 4-hidroksi-2-(2-(hidroksiamino)-2-oksoetoksi)-N-(2-hidroksietil)benzamida (21)



Reakcijo smo izvedli z 80 mg (0,18 mmol) spojine **18** po postopku opisanem v sintezi 7.19.

Po končani reakciji smo reakcijsko zmes filtrirali in odstranili očetno kislino pod znižanim tlakom. Surovi produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo na reverznofaznem silikagelu in z uporabo mobilne faze sestavljene iz vode, acetonitrila in 0.1 % Et_3N , s tem da smo povečevali gradient vode iz 5 % do 90 %. Izolirane frakcije smo združili in odstranili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 30 mg (0,11 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 61 %

Elementna sestava: $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6$

Mr = 270,24

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 7:1 + 0,1\% \text{Et}_3\text{N}$) = 0,19

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 3.22$ (s, 2H, O-CH₂-CO), 3.38 (s, 1H, OH), 3.53 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, OH-CH₂), 3.88 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, OH-CH₂-CH₂), 3.95 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, OH-CH₂-CH₂), 4.22 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, Ar-H), 4.50 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 1H, Ar-H), 4.80 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, Ar-H), 6.75 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, OH-NH), 7.12 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, OH-NH), 7.23 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, CO-NH-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, MeOD): $\delta = 61.4, 61.6, 67.5, 68.8, 101.5, 110.0, 115.2, 133.7, 159.1, 163.3, 168.5$ ppm.

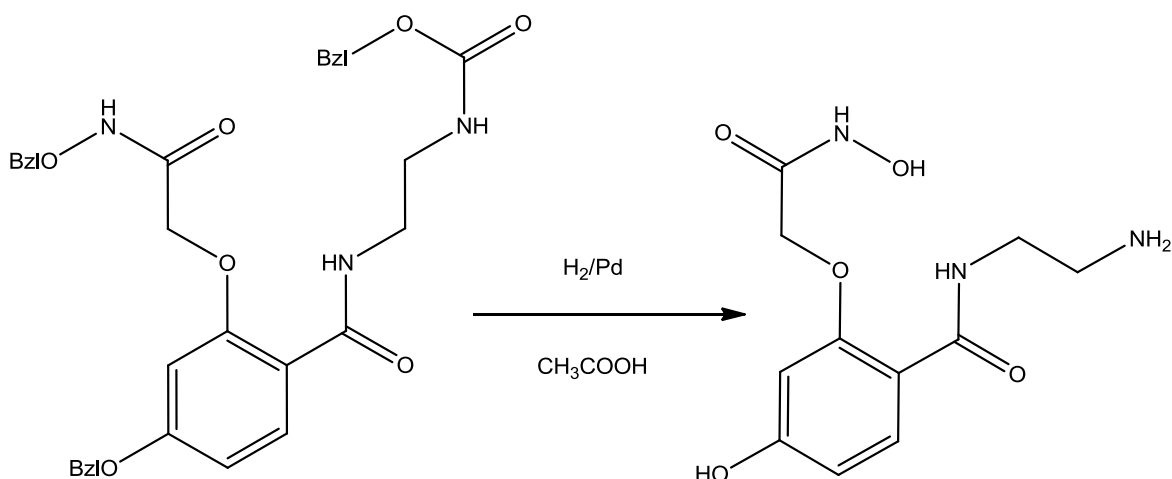
T_{tališča}: 88-90 °C

MS (ESI): 269,1 (M-H⁻, 100)

HR-MS: 269,0780 (izračunana za $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_6$: 269,0774)

HPLC: 98,8 % čistost pri 220 nm, 97,9 % čistost pri 254 nm (metoda 1)

7.22 Sinteza *N*-(2-aminoetil)-4-hidroksi-2-(2-(hidroksiamino)-2-oksoetoksi)benzamida (22**)**



Reakcijo smo izvedli z 101 mg (0,17 mmol) spojine **17** po postopku opisanem v sintezi 7.19.

Po končani reakciji smo reakcijsko zmes filtrirali in odstranili očetno kislino pod znižanim tlakom. Surovi produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo na reverznofaznem silikagelu in z uporabo mobilne faze sestavljene iz vode, acetonitrila in 0.1 % Et_3N , s tem da smo povečevali gradient vode iz 5 % do 90 %. Izolirane frakcije smo združili in odstranili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 25 mg (0,09 mmol) belega prahu.

Izkoristek reakcije: 53 %

Elementna sestava: $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_5$

Mr = 269,25

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ = 7:1 +0,1 % Et_3N) = 0,1

^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 4.20 (s, 2H, O-CH₂-CO), 4.31 (s, 1H, OH), 5.10 (d, J = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.40 (d, J = 4.5 Hz, 2H, NH₂-CH₂) 5.74 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.19 (d, J = 8.7, 1H, Ar-H), 8.28 (d, J = 2.4 Hz, 1H, OH-NH), 8.50 (dd, J = 8.3, 4.1 Hz, 2H, NH-CH₂-CH₂), 8.60 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂), 9.43 (d, J = 4.5 Hz, 1H, OH-NH), 9.51 (t, 1H, NH-CH₂-CH₂) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, MeOD): $\delta = 59.3, 60.4, 64.5, 67.8, 102.1, 109.1, 114.1, 132.6, 160.2, 162.3, 166.5$ ppm.

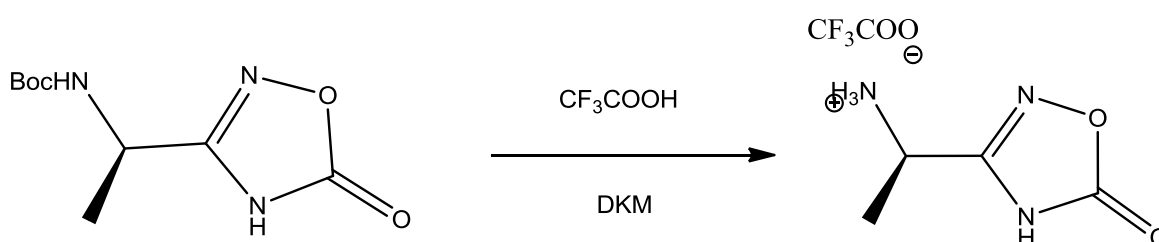
T_{taliska} : 85-87 °C

MS (ESI): 270,1 ($M+H^+$, 100)

HR-MS: 270,0981 (izračunana za $C_{11}H_{16}N_3O_5$: 270,0976)

HPLC: 97,9 % čistost pri 220 nm, 97,7 % čistost pri 254 nm (metoda 1)

7.23 Sinteza (R)-1-(5-okso-4,5-dihidro-1,2,4-oksadiazol-3-il)-etanamin trifluoroacetata (**23**)



554 mg (2,4 mmol) spojine **16** smo natehtali v bučko, raztopili v 30 mL diklorometana ter dodali 10 mL trifluoroacetne kisline in pustili mešati 1 uro pri sobni temperaturi.

Po končani reakciji smo odparili diklorometan in prebitno trifluoroacetno kislino. Dobili smo olje, kateremu smo dolili 8 mL dietiletra. Izpadlo je 579 mg (2,38 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 99 %

Elementna sestava: $C_6H_8F_3N_3O_4$

$M_r = 243,14$

R_f (heksan/etilacetat = 1:1) = 0,53

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 1.43$ (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3), 4.59 (q, $J = 7.5, 6.8$ Hz, 1H, CH), 7.44 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H, NH_3^+), 11.86 (s, 1H, NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 44.5, 48.8, 131.2, 158.1, 166.0, 175.4$ ppm.

T_{taliska} : 128-130 °C

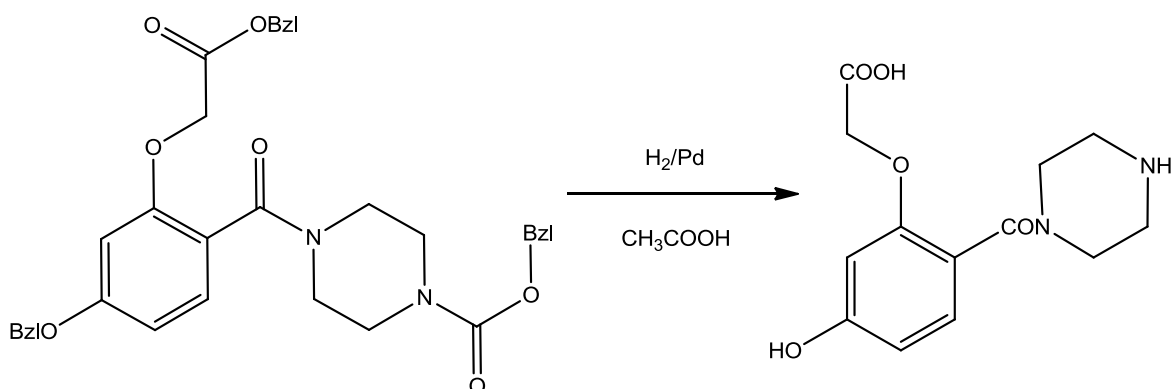
MS (ESI): 244,0 ($M+H^+$, 100)

HR-MS: 244,0551 (izračunana za $C_6H_9F_3N_3O_4$: 244,0545)

HPLC: 98,9 % čistost pri 220 nm, 98,2 % čistost pri 254 nm (metoda 2)

Specifična sučnost: $[\alpha]_D^{20} = -12,7^\circ$ (0,403, MeOH)

7.24 Sinteza 2-(5-hidroksi-2-(piperazin-1-karbonil)fenoksi)ocetne kisline (**24**)



Reakcijo smo izvedli z 80 mg (0,13 mmol) spojine **14** po postopku opisanem v sintezi 7.19.

Po končani reakciji smo reakcijsko zmes filtrirali in odparili očetno kislino. Izolacijo smo izvedli na reverznofazni koloni z mobilno fazo acetonitril/voda = 1:19, kjer smo delež acetonitrila gradientno povečevali do 90 %. Izolirane frakcije smo združili, odparili topilo in dobili 35 mg (0,12 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 96 %

Elementna sestava: C₁₃H₁₆N₂O₅

Mr = 280,28

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.22 (dd, J = 7.4, 2.8 Hz, 1H, piperazinski-NH), 2.57-2.74 (m, 8H, piperazin), 3.36 (s, 2H, O-CH₂-COOH), 3.40 (s, 1H, OH), 4.24 (d, J = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 4.58 (dd, J = 8.7, 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 4.86 (d, J = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 8.43 (s, 1H, COOH) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 46.3, 46.5, 49.4, 49.6, 67.4, 101.8, 110.6, 116.1, 129.6, 158.1, 161.6, 166.8, 170.3 ppm.

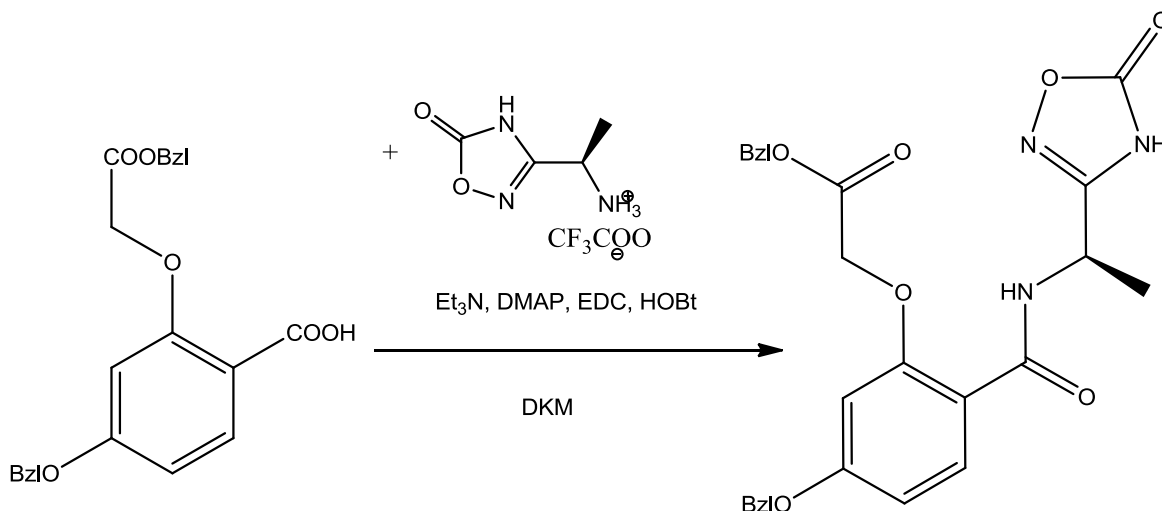
T_{tališča}: 186-189 °C

MS (ESI): 281,1 (M+H⁺, 100)

HR-MS: 281,1142 (izračunana za C₁₃H₁₇N₂O₅: 281,1137)

HPLC: 99,1 % čistost pri 220 nm, 98,9 % čistost pri 254 nm (metoda 1)

7.25 Sinteza (R)-benzil-2-(5-(benziloksi)-2-((1-(5-okso-4,5-dihidro-1,2,4-oksadiazol-3-il)etil)karbamoi)fenoksi)acetata (25)



200 mg (0,51 mmol) spojine 12 smo natehtali v reakcijsko vialo, dodali 12,4 mg (0,2 ekv.; 0,1 mmol) DMAP, 13,6 mg (0,2 ekv.; 0,1 mmol) HOBT ter raztopili v 6 mL diklorometana. Dodali smo še 204 mg (4 EKV; 2,0 mmol) trietilamina, 186 mg (1,5 ekv.; 0,77 mmol) spojine 23 in 117 mg (1,2 ekv.; 0,61 mmol) EDC. Reakcijsko zmes smo segrevali v mikrovalovnem reaktorju 1,5 ur pri 60 °C.

Po končani reakciji smo reakcijsko zmes razredčili z 60 mL diklorometana, jo sprali z 2 × 20 mL 10% citronske kisline, 2 × 20 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃, z 20 mL nasičene vodne raztopine NaCl in sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Organsko fazo smo filtrirali, odparili topilo in izvedli ločbo s kolonsko kromatografijo (MF: heksan/etilacetat=1,5:1 +0,1% očetne kisline). Dobili smo 130 mg (0,26 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 51 %

Elementna sestava: C₂₇H₂₅N₃O₇

Mr = 503,50

R_f (heksan/etilacetat = 1,5:1 +0,1 % očetne kisline) = 0,71

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.50 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 3.41 (s, 2H, Ph-CH₂), 3.88 (s, 2H, Ph-CH₂-O-CO), 5.01 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NH-CH), 5.07 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 5.17 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 5.23 (s, 2H, O-CH₂-COO), 5.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.34-7.47 (m, 10H, Ar-H), 7.91 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, NH-CH), 10.76 (s, 1H, oksadiazolni NH) ppm.

^{13}C -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 48.2, 52.4, 64.9, 66.4, 70.8, 101.5, 106.7, 119.0, 127.1$ (4 signali), 127.6 (2 signala), 128.8 (4 signali), $132.1, 136.1, 136.7, 158.0, 159.7, 164.9, 166.0, 169.2, 169.8$ ppm.

T_{taliska} : 161-163 °C

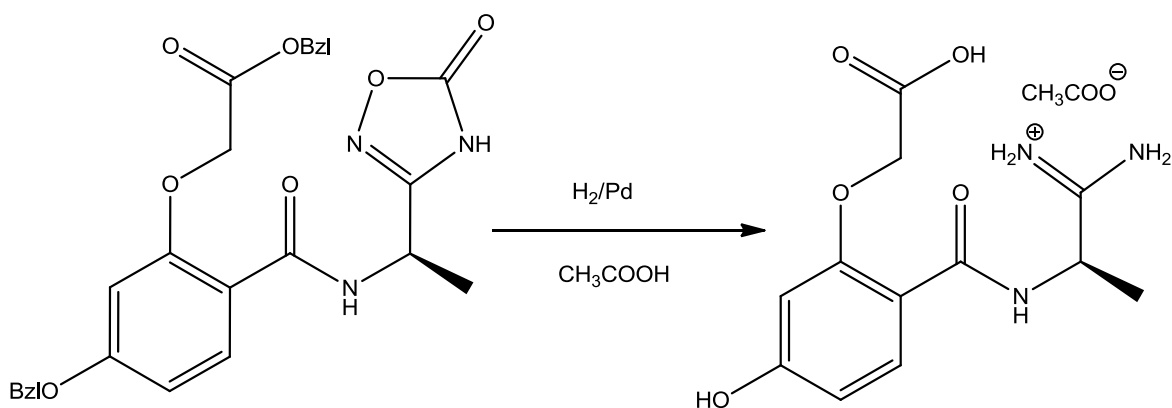
MS (ESI): 504,2 ($M+H^+$, 100)

HR-MS: 504,1779 (izračunana za $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_7$: 504,1771)

HPLC: 97,8 % čistost pri 220 nm, 97,3 % čistost pri 254 nm (metoda 1)

Specifična sučnost: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +34,1^\circ$ (0,247, DMSO)

7.26 Sinteza (*R*)-1-amino-2-(2-(karboksimetoksi)-4-hidroksibenzamido)propan-1-iminijevega acetata (**26**)



Reakcijo smo izvedli s 108 mg (0,21 mmol) spojine **25** po postopku opisanem v sintezi 7.19.

Po končani reakciji smo reakcijsko zmes filtrirali in odparili očetno kislino. Čiščenje smo izvedli na reverznofazni koloni z mobilno fazo acetonitril/voda = 1:19, kjer smo delež acetonitrila gradientno povečevali do 90 %. Izolirane frakcije smo združili, odparili topilo in dobili 46 mg (0,16 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 76 %

Elementna sestava: $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_7$

Mr = 341,32

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 1.47$ (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, $\underline{\text{CH}}_3\text{-CH}$), 3.35 (s, 1H, OH), 4.41 (s, 2H, CH_2), 4.93 (m, 1H, $\underline{\text{CH}}\text{-CH}_3$), 6.42 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, Ar-H), 6.48 (dd, $J =$

8.8, 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.66 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 8.97 (s, 2H, NH₂), 9.35 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NH-CH), 10.23 (s, 1H, COOH), 10.69 (s, 2H, NH₂⁺) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 42.3, 44.7, 55.8, 67.1, 102.4, 111.3, 119.3, 129.9, 160.1, 162.9, 169.8, 169.9, 174.4, 178.2$ ppm.

T_{tališča}: 252-255 °C

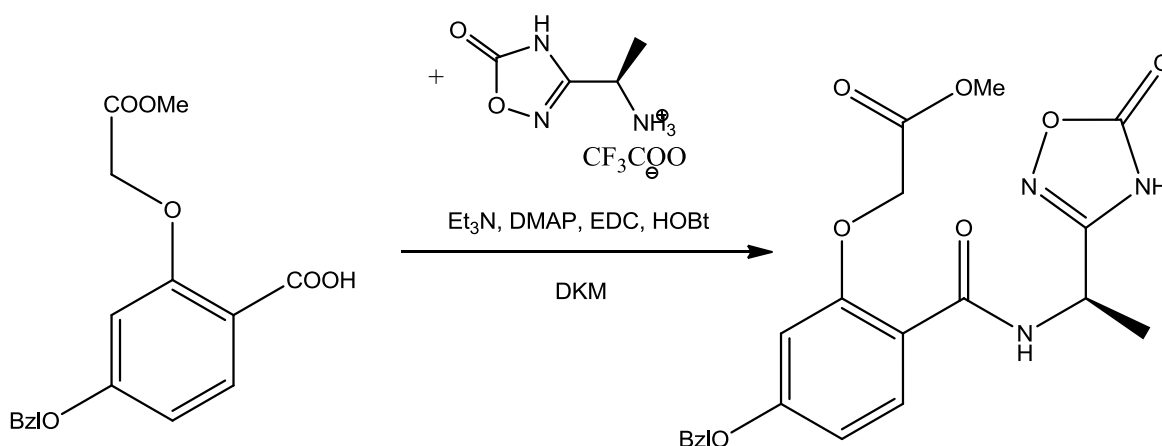
MS (ESI): 342,1 (M+H⁺, 100)

HR-MS: 342,1309 (izračunana za C₁₄H₂₀N₃O₇: 342,1301)

HPLC: 98,8 % čistost pri 220 nm, 98,3 % čistost pri 254 nm (metoda 2)

Specifična sučnost: $[\alpha]_D^{20} = +14,7^\circ$ (0,300, DMSO)

7.27 Sinteza (R)-metil 2-(5-(benziloksi)-2-((1-(5-okso-4,5-dihidro-1,2,4-oksadiazol-3-il)etil)karbamoi)fenoksi)acetata (**27**)



130 mg (0,41 mmol) spojine **OAE3** smo natehtali v reakcijsko vialo, dodali 10,0 mg (0,2 ekv.; 0,08 mmol) DMAP, 11,0 mg (0,2 ekv.; 0,08 mmol) HOBt ter raztopili v 5 mL diklorometana. Dodali smo še 167 mg (4 ekv.; 1,64 mmol) trietilamina, 110 mg (1,1 ekv.; 0,45 mmol) spojine **23** in 95 mg (1,2 ekv.; 0,49 mmol) EDC. Reakcijsko zmes smo segrevali v mikrovalovnem reaktorju 1 uro pri 60 °C.

Po končani reakciji smo reakcijsko zmes razredčili z 50 mL diklorometana, jo sprali z 2 × 20 mL 10% citronske kisline, 2 × 20 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃, z 20 mL nasičene vodne raztopine NaCl in sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Organsko fazo smo filtrirali, topilo odparili in izvedli ločbo s kolonsko kromatografijo (MF: heksan/etilacetat=1,5:1 +0,1% očetne kisline). Dobili smo 75 mg (0,18 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 44 %

Elementna sestava: C₂₁H₂₁N₃O₇

Mr = 427,31

R_f (heksan/etilacetat = 1,5:1 +0,1 % očetne kisline) = 0,41

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.53 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃-CH), 3.75 (s, 3H, CH₃-O-CO), 4.99 (s, 2H, Ph-CH₂), 5.05 (m, 1H, CH-NH), 5.18 (s, 2H, O-CH₂-CO), 6.78 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.81 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.36-7.50 (m, 5H, Ar-H), 7.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.74 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH-CH), 12.37 (s, 1H, oksadiazolni NH) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 44.6, 51.9, 52.4, 64.2, 70.8, 101.5, 107.6, 119.0, 125.1 (2 signala), 127.6, 128.5 (2 signala), 132.1, 136.7, 158.0, 159.7, 165.0, 166.0, 169.2, 169.8 ppm.

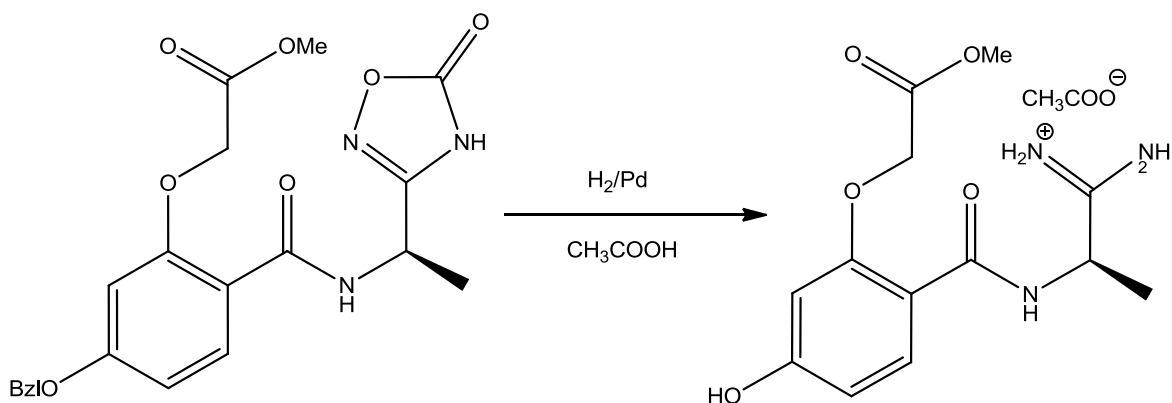
T_{tališča}: 182-184 °C

MS (ESI): 428,1 (M+H⁺, 100)

HR-MS: 428,1466 (izračunana za C₂₁H₂₂N₃O₇: 428,1458)

HPLC: 98,5 % čistost pri 220 nm, 98,1 % čistost pri 254 nm (metoda 1)

7.28 Sinteza (R)-1-amino-2-(4-hidroksi-2-(2-metoksi-2-oksoetoksi)benzamido)propan-1-iminijevega acetata (28)



Reakcijo smo izvedli s 75 mg (0,18 mmol) spojine **27** po postopku opisanem v sintezi 7.19. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes filtrirali in odparili očetno kislino. Dobili smo 40 mg (0,14 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 78 %

Elementna sestava: C₁₅H₂₁N₃O₇

Mr = 355,34

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.50 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃-CH), 3.77 (s, 3H, CH₃-O-CO), 3.38 (s, 1H, OH), 4.50 (m, 1H, CH-NH), 5.77 (s, 2H, O-CH₂-CO), 6.51 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.91 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 8.03 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.22 (s, 2H, NH₂), 8.64 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH-CH), 11.22 (s, 2H, NH₂⁺) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 42.2, 44.2, 51.4, 56.0, 67.0, 102.3, 111.2, 119.2, 130.0, 159.9, 162.8, 169.8, 170.0, 174.2, 178.1 ppm.

T_{tališča}: 153-156 °C

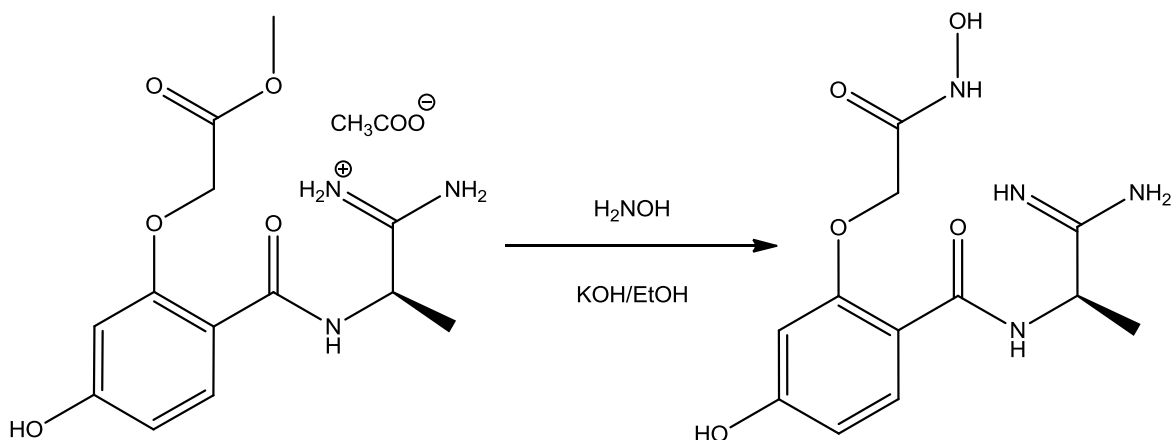
MS (ESI): 356,1 (M+H⁺, 100)

HR-MS: 356,1467 (izračunana za C₂₁H₂₂N₃O₇: 356,1458)

HPLC: 99,2 % čistost pri 220 nm, 98,9 % čistost pri 254 nm (metoda 1)

Specifična sučnost: [α]_D²⁰ = +85,4° (0,144, MeOH)

7.29 Sinteza (*R*)-*N*-(1-amino-1-iminopropan-2-il)-4-hidroksi-2-(2-(hidroksiamino)-2-oksoetoksi)benzamida (29)



23 mg (6 ekv.; 0,42 mmol) KOH smo raztopili v 3 ml etanola, zmes prepihali z argonom ter dodali 14,1 mg (3 ekv.; 0,21 mmol) H₂NOH·HCl. V to raztopino smo nato dodali 20 mg (0,07 mmol) izhodne spojine in reakcijo pustili potekati 24 ur pri sobni temperaturi.

Po končani reakciji smo topilo odparili pod znižanim tlakom in čistili s kolono na reverznofaznem silikagelu z mobilno fazo H₂O/MeOH = 70 %. Izolirane frakcije smo združili, topilo odstranili pod znižanim tlakom in dobili 11 mg (0,04 mmol) brezbarvnega olja.

Izkoristek reakcije: 57 %

Elementna sestava: C₁₂H₁₆N₄O₅

Mr = 296,28

R_f (diklormetan/metanol = 7:1) = 0,31

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.55 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃-CH), 3.43 (s, 1H, OH), 4.52 (m, 1H, CH-NH), 5.79 (s, 2H, O-CH₂-CO), 6.54 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.98 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 8.11 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.31 (s, 2H, NH₂), 8.43 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, OH-NH), 8.59 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH-CH), 9.55 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, OH-NH), 10.85 (s, 1H, NH) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 44.1, 51.4, 62.6, 111.2, 119.2, 130.0, 159.8, 162.8, 169.7, 169.9, 174.0, 178.0 ppm.

MS (ESI): 297,1 (M+H⁺, 100)

HR-MS: 297,1125 (izračunana za C₁₂H₁₇N₄O₅: 297,1121)

HPLC: 98,8 % čistost pri 220 nm, 98,3 % čistost pri 254 nm (metoda 1)

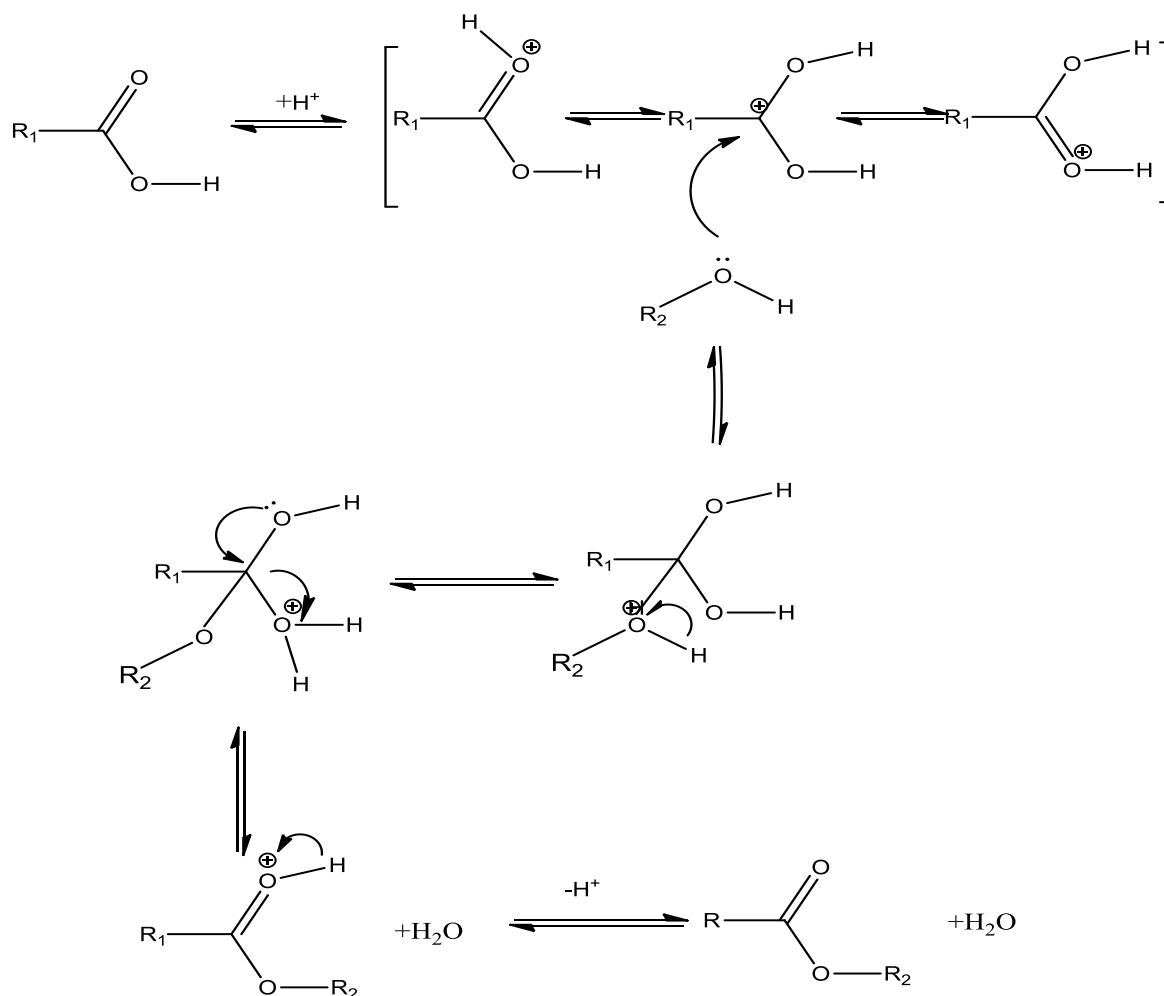
Specifična sučnost: [α]_D²⁰ = +88,4° (0,063, MeOH)

8. REZULTATI IN RAZPRAVA

8.1 RAZPRAVA O SINTEZAH SPOJIN

8.1.1 Zaščita karboksilne skupine v obliki metilnega estra (**1**)

Karboksilno skupino naše izhodne spojine smo zaradi potencialne reaktivnosti v nadaljnjih reakcijah zaščitili v obliki metilnega estra. Pri esterifikaciji v kislem (Fischerjeva esterifikacija) je prišlo do nukleofilnega napada alkoholne –OH skupine na aktiviran karbonilni ogljik in tvorbe tetraedričnega intermedijata. Protonski premik je nato privedel do eliminacije vode in nastanka estra. Nastali produkt smo izolirali z raztapljanjem v etilacetatu in spiranjem z nasičeno raztopino NaHCO₃, saj je bolj lipofilen kot izhodna spojina in je ostal v organski fazi, nezreagirana kislina pa se je v bazičnem ionizirala in prešla v vodno fazo.

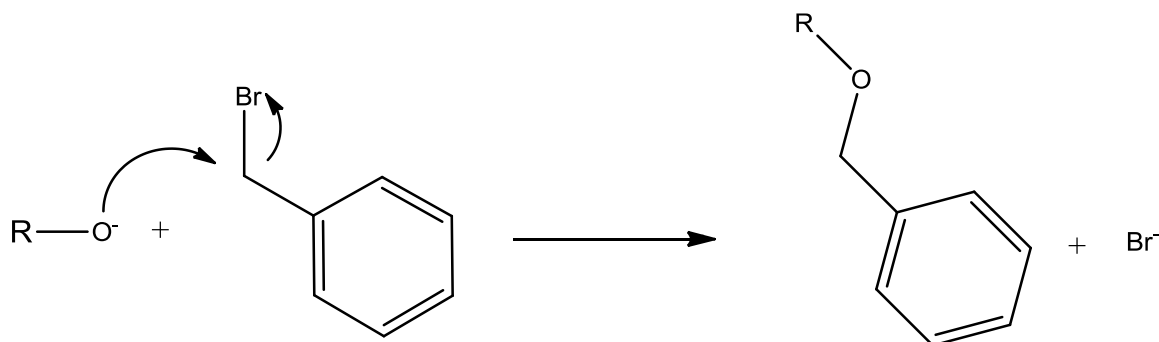


Slika 16: Mehanizem kislinsko katalizirane esterifikacije (Fischerjeva esterifikacija).

8.1.2 Selektivna zaščita p-hidroksi skupine (2)

p-Hidroksi skupino spojine **1** smo zaščitili z benzilno skupino, saj smo želeli preprečiti morebitni nastanek dialkilnih produktov v nadaljnjih reakcijah alkiliranja o-hidroksi skupine. Reakcija je nukleofilna S_N2 substitucija na benzilnem ogljiku. Aktivirana p-hidroksi skupina, ki je močnejši nukleofil kot Br^- , napade elektrofilen benzilni ogljikov atom in poteče zamenjava nukleofilov. Stereoselektivnost smo v tem primeru dosegli z uporabo šibke baze kot aktivatorja hidroksi skupine, z dodajanjem benzilbromida po kapljicah in s tem, da smo reakcijo izvajali na ledeni kopeli. Za optimalen potek reakcije in večji izkoristek smo reakcijo izvedli v polarnem aprotičnem topilu (acetonu).

Produkt je bolj lipofilen kot izhodna spojina, zato smo ga izolirali tako, da smo ga raztopili v etilacetatu in sprali z nasičeno raztopino $NaHCO_3$. Stranski produkt reakcije HBr in morebitni ostanki ionizirane izhodne spojine so ob tem prešli v vodno fazo.



Slika 17: Mehanizem bazično kataliziranega benziliranja z benzilbromidom.

8.1.3 Uvajanje alkilne verige v molekulo (3, 5)

Reakcija je nukleofilna S_N2 substitucija na alifatskem ogljiku, ki je elektrofilni center. S šibko bazo smo aktivirali aromatsko hidroksi skupino, ki je napadla elektrofilni ogljikov atom na alifatski verigi. Pri vezavi hidroksi skupine na elektrofil se brom odcepi, ker je dobro izstopajoča skupina.

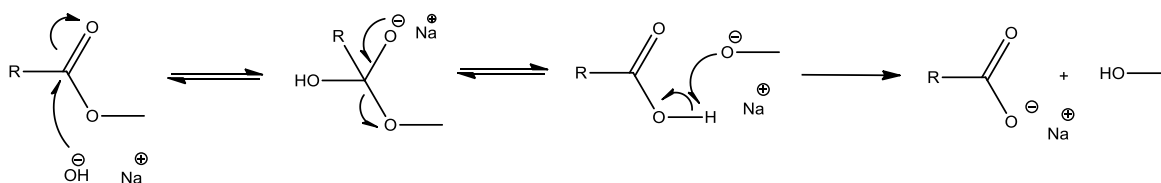
Reakcijo smo izvajali na ledeni kopeli in v brezvodnem DMF, saj smo želeli preprečiti morebitne cepitve estrov v molekuli ob prisotnosti vode in v bazičnih pogojih. Pri ekstrakciji smo produkte raztopili v etilacetatu in sprali z vodo, da smo se znebili karbonata in morebitnih ostankov izhodne spojine.

8.1.4 Odstranitev zaščite v obliki estrov (4, 10)

Estre v spojinah 3 in 9 smo odstranili z bazično hidrolizo. Pri spojini 3 smo v dioksanu raztopljeno izhodno spojino kapljali v segreto 1M raztopino NaOH, da smo se čim bolj izognili obarjanju produkta, saj je le-ta dikislina in tvori dinatrijevo sol, ki ni topna v organskih topilih. Reakcija je potekala 24 ur pri refluxu. Dioksan smo uparili in pred ekstrakcijo z etilacetatom produkt raztopili v 100 mL vode. Vodno raztopino smo nato nakisali z 1M HCl do $\text{pH} = 1$, s čimer smo produkt pretvorili v nedisocirano obliko, ki je bolj topna v organskih topilih. Produkt smo nato ekstrahirali z 3×50 mL etilacetata, pri tem pa smo vseskozi bili pozorni na pH vodne faze, saj se ta tekom ekstrakcije zvišuje.

Pri spojini 9 smo hidrolizo estra izvedli pri milejših pogojih, saj je bila v molekuli prisotna še amidna vez, ki bi pri ostrejših pogojih prav tako hidrolizirala. Kot bazo smo uporabili LiOH, ki je šibkejša baza kot NaOH. Reakcijo smo izvajali pri sobni temperaturi 24 ur v topilu THF. Po končani reakciji smo THF uparili in preostalo vodno raztopino nakisali do

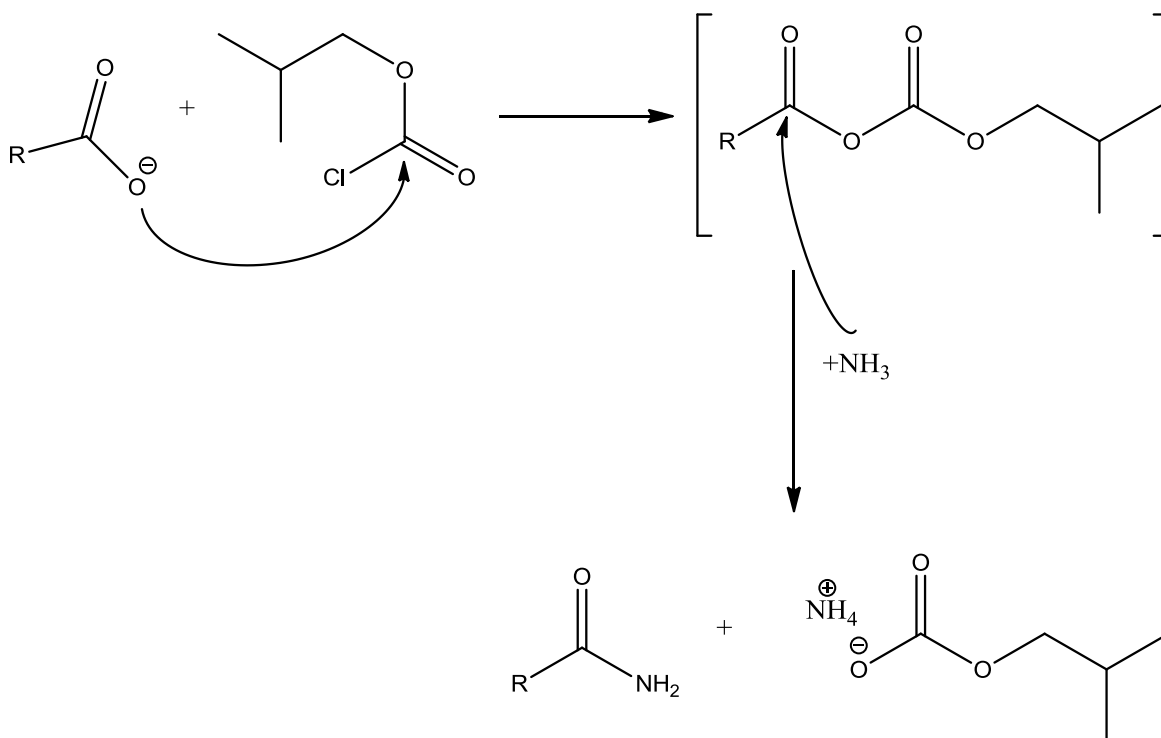
pH = 3, da smo pretvorili karboksilno skupino produkta v nedisociirano obliko, ki je boljše topna v organskih topilih. Produkt smo nato ekstrahirali z 2×100 mL etilacetata.



Slika 18: Mehanizem bazično katalizirane hidrolize esterske vezi.

8.1.5 Tvorba amida iz Boc zaščitene aminokisljine (6)

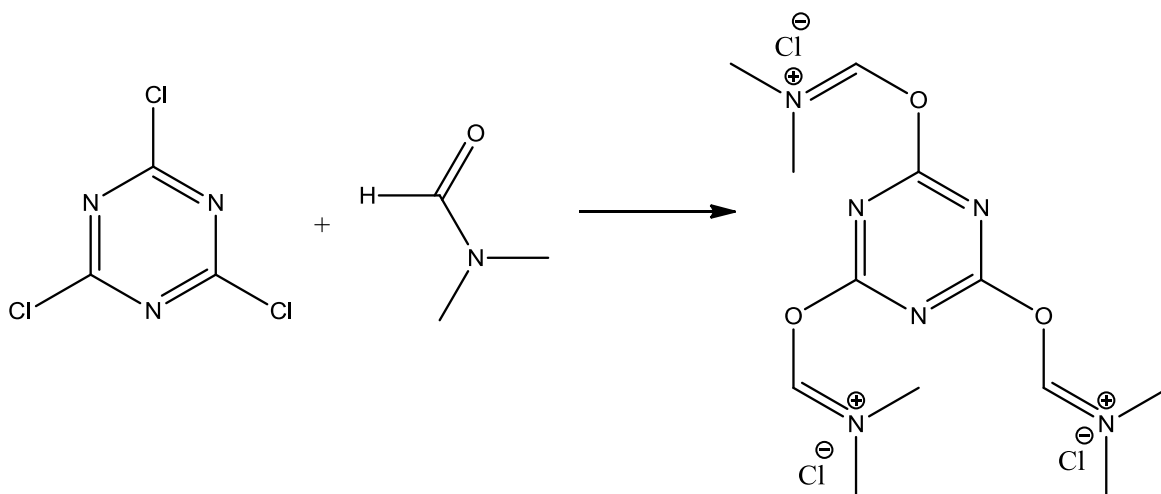
Sinteza amida iz karboksilne skupine aminokisljine je potekala v dveh stopnjah. V prvi stopnji smo z izobutilkloroformatom tvorili anhidrid, ki je zelo reaktiven, zato smo reakcijo izvajali na ledeni kopeli pri -10°C na argonovi atmosferi. Druga stopnja reakcije pa je nukleofilni napad amoniaka (NH_3) na elektrofilni center anhidrida (karbonilni ogljik). Amoniak smo v plinasti obliki uvajali 4 ure v prebitku, saj tvori sol z izstopajočo karboksilno skupino in se tako porablja.



Slika 19: Reakcijska shema nastanka amida z izobutilkloroformatom in amoniakom.

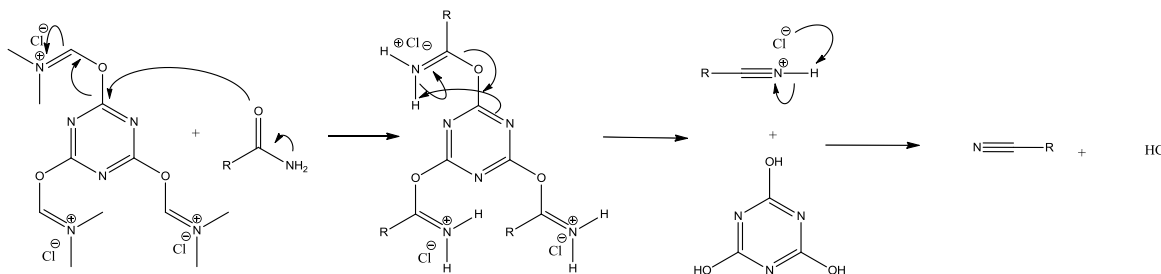
8.1.6 Dehidracija amida do nitrila s kloridom cianurične kisline (7)

Reakcija poteka v dveh fazah. V prvi fazi se med kloridom cianurične kisline in dimetilformamidom (DMF) tvori reaktiven intermediat.



Slika 20: Tvorba reaktivnega intermedijata med kloridom cianurične kisline in DMF.

V drugi fazi nato amid aminokislina nukleofilno napade aktivirano cianurično kislino. Pride do redukcije amida in nastanka cianurične kisline ter HCl, ki ju pred ekstrakcijo nitrila nevtraliziramo z dodatkom 0,5M NaOH.



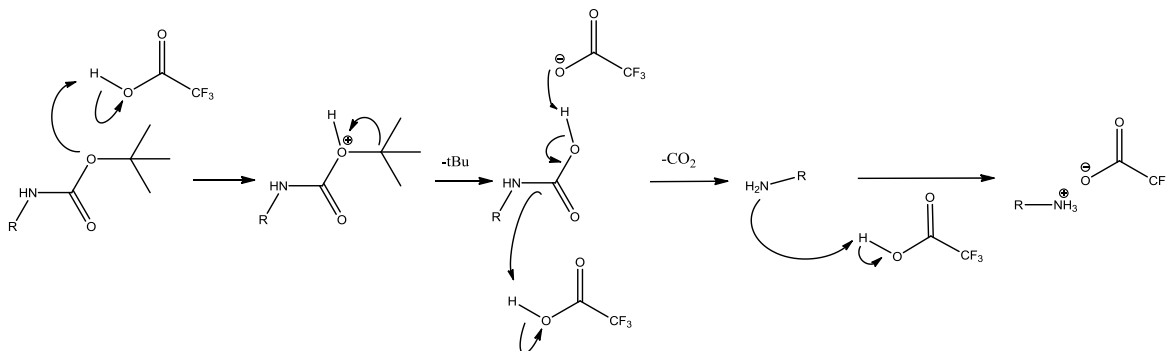
Slika 21: Reakcijska shema nukleofilnega napada amida na aktivirano cianurično kislino s sledečo eliminacijo nitrila.

8.1.7 Odstranitev *tert*-butiloksikarbonilne zaščite (8, 23)

Boc zaščito na spojinah **8** in **23** smo odstranili v kislem z uporabo trifluorocetne kisline. Reakcija se začne s protoniranjem *tert*-butil karbamata s trifluorocetno kislino, kar privede do odcepitve *tert*-butil karbokationa $^+C(CH_3)_3$, ki je stabiliziran s pozitivnim induktivnim učinkom metilnih skupin, in nastanka karbamske kisline, ki je pri naših pogojih protonirana.

Karbamska kislina je nestabilna in pri naših pogojih dekarboksilira, pri tem pa se sprošča CO_2 , zato reakcijo izvajamo v odprtem sistemu. Prosta amino skupina, ki nastane pri tem,

se v kislih pogojih protonira, kar pomeni, da je naš produkt v obliki soli trifluoroacetata. Po končani reakciji smo topilo in morebitni nastali *t*-butanol odparili pod znižanim tlakom in produkt prekristalizirali iz dietiletra.



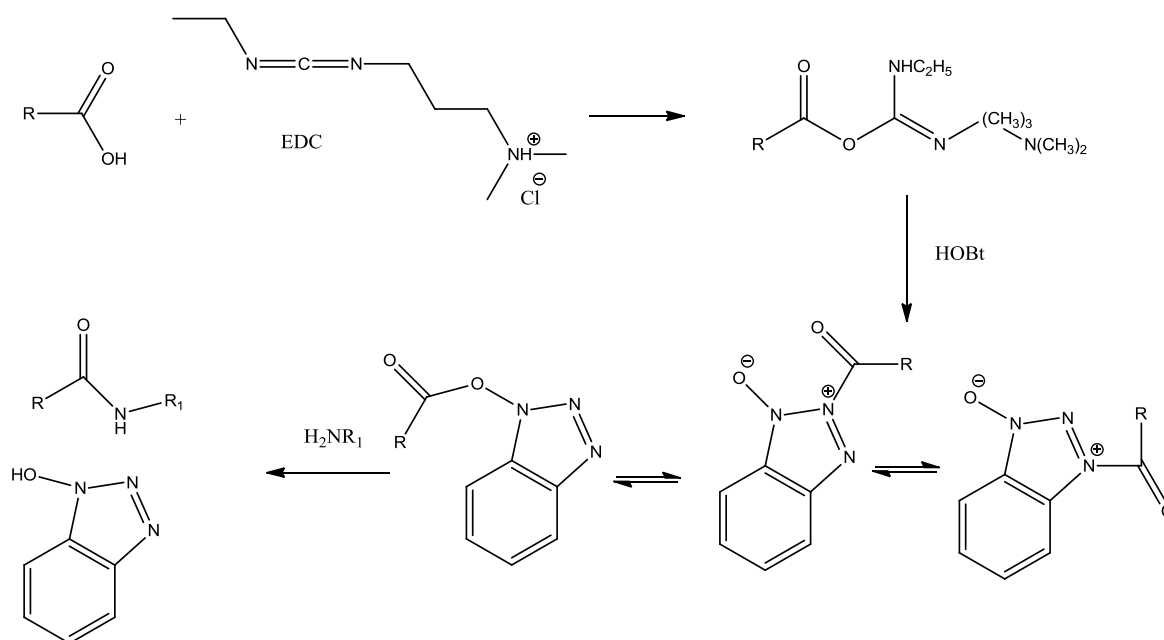
Slika 22: Reakcijska shema odstranitve Boc zaščite.

8.1.8 Tvorba amidne vezi z reagenti EDC, HOBt in DMAP

Za tvorbo amidne vezi smo uporabili karbodiimidno metodo, pri čemer smo amidno vez tvorili med prosto karboksilno skupino spojin **8**, **10**, **12** in amino skupino različnih sklopitvenih reagentov. Princip reakcije je nukleofilna substitucija na karbonilnem C-atomu. Reakcijo smo izvajali v alkalnem mediju, da smo omogočili ionizacijo kisline, ki tako lažje napade ogljikov atom karbodiimida.

Karboksilna skupina ni dovolj reaktivna za reakcijo, zato jo aktiviramo z reagentom EDC (1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)karbodiimidijev klorid). Karboksilatni anion reagira z EDC, pri čemer nastane zelo reaktivna *O*-acilizosečnina. Ta reagira z amino skupino drugega reaktanta, nastane peptid in vodotopen derivat sečnine, ki ga pri ekstrakciji z vodo enostavno odstranimo.

Neželena reakcija pri karbodiimidni metodi je premestitev acilne skupine iz O na N pri *O*-acilizosečnini. Nastane *N*-acilizosečnina, pri kateri aminoliza ne poteče. To preprečimo tako, da v reakcijsko zmes dodamo reagent HOBt (1-hidroksibenzotriazol), ki tvori z *O*-acilizosečnino aktivirane benzotriazolne estre, pri katerih poteče aminoliza veliko hitreje. Tako znatno zmanjšamo obseg neželenih racemizacij, ciklizacij in premestitev, izkoristek reakcije pa je posledično večji.



Slika 23: Mehanizem tvorbe amidne vezi z uporabo reagentov EDC in HOBt.

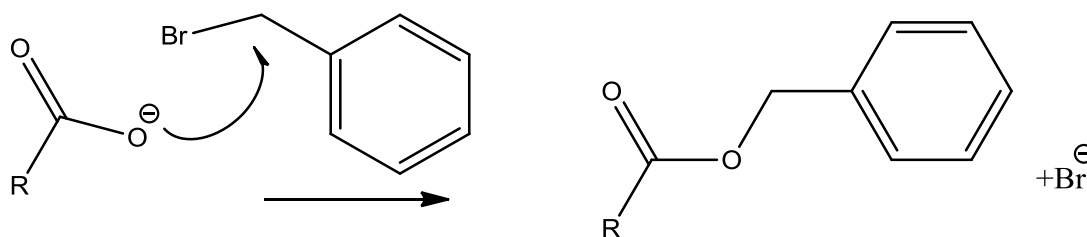
O-acilizosečnina lahko napade drugi karboksilat, ob tem nastane simetrični anhidrid, ki je prav tako aktiviran za reakcijo z amsko skupino. Tako se tudi v tem primeru tvori amidna vez.

8.1.9 Selektivno uvajanje benzilne zaščite na karboksilno skupino (12)

Na spojino **4** smo selektivno uvedli benzilno zaščito na karboksimetoksi skupino z uporabo reagenta benzilbromid. Reakcijo smo izvajali v rahlo bazičnem mediju, da smo omogočili deprotoniranje karboksilne skupine, ki v tej obliki reagira kot nukleofil z benzilbromidom. Reakcija je nukleofilna S_N2 substitucija.

Karboksi skupina na mestu 1 je tudi dovzetna za reakcijo z benzilbromidom, vendar pa je sterično ovirana, zato smo reakcijo izvajali na ledeni kopeli in dodajali reagent benzilbromid po kapljicah (2 kp/s). S tem smo reakcijo upočasnili in jo tako usmerili na bolj reaktivno karboksi skupino. Kot bazo smo namesto natrijevega karbonata uporabili cezijev karbonat (Cs_2CO_3). Cezijev ion je večji od natrijevega, zato je ionska vez s karboksi skupino šibkejša in ta lažje vstopa v reakcijo. Stranski produkt reakcije je CsBr, ki smo ga enostavno odstranili z ekstrakcijo.

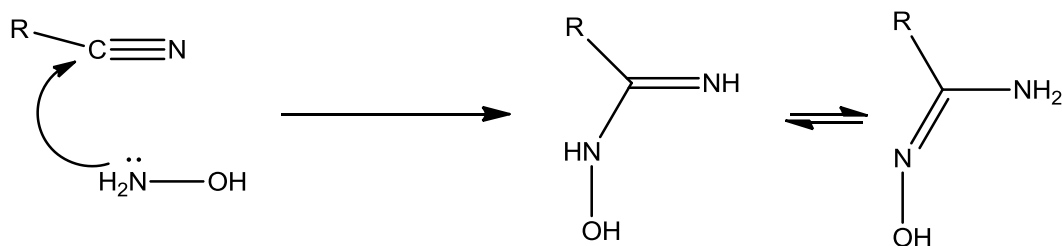
Po končani reakciji je bil v reakcijski zmesi vseeno prisoten tudi dibenziliran produkt, ki smo ga odstranili z ločbo s kolonsko kromatografijo s postopnim povečevanjem polarosti mobilne faze kolone.



Slika 24: Mehanizem reakcije benzilhalida z aktivirano karboksi skupino.

8.1.10 Hidroksiaminiranje ciano skupine (13)

Ciano skupina spojine **7** je zelo dovzetna za nukleofilne adicije. Pri adicijah s šibkimi nukleofili je potrebno ciano skupino pred reakcijo aktivirati (protonirati) s kislino. Mi smo reakcijo izvajali z močnim nukleofilom hidroksilaminom (NH_2OH), zato aktivacija ni bila potrebna. Hidroksilamin je v prosti molekularni obliki zdravju škodljiv in pri povišani temperaturi celo eksploziven, zato ga hranimo v hladilniku. Mi smo uporabili bolj stabilno obliko hidroksilamina v obliki soli s HCl in prost reagent pripravili *in situ* in sicer v etanolni raztopini.



Slika 25: Shema nukleofilne adicije na nitrilni ogljik.

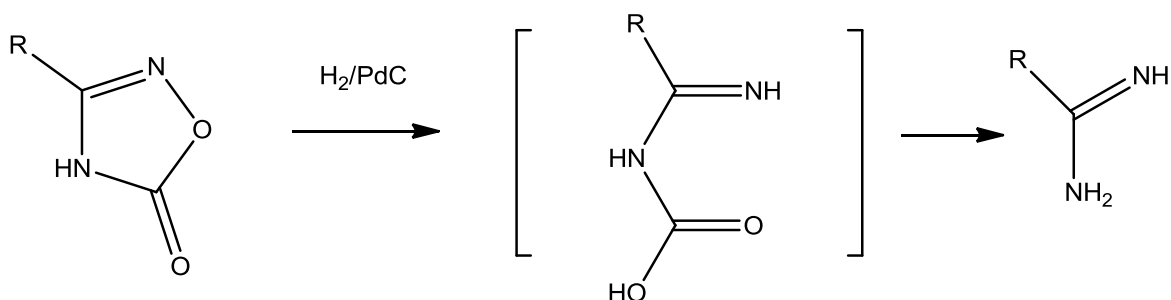
8.1.11 Odstranitev benzilnih zaščit in tvorba amidina z metodo katalitskega hidrogeniranja

Benzilno zaščito zaščiteneh derivatov hidroksilnih, karboksilnih in hidroksamskih skupin smo odstranili s plinastim vodikom in katalizatorjem Pd/C. Katalizator je znižal aktivacijsko energijo kompleksa, da je lahko prišlo do cepitve vezi.

Reakcije smo izvajali v očetni kislini, kjer smo izhodne spojine raztopili in prepihali z argonom, dodali katalizator in ponovno prepihali z argonom. Tako smo odstranili prisoten kisik, ki bi lahko povzročil vžig reakcijske zmesi, saj je Pd/C na zraku zelo reaktiven. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes filtrirali, da smo se znebili katalizatorja in topilo odparili pod znižanim tlakom.

Naši produkti so zelo polarni, zato čiščenje s klasično kolonsko kromatografijo ni prišlo v poštev. Čiščenje smo izvajali z metodo reverznofazne kromatografije na *isoleri* s postopnim povečevanjem polarnosti mobilne faze.

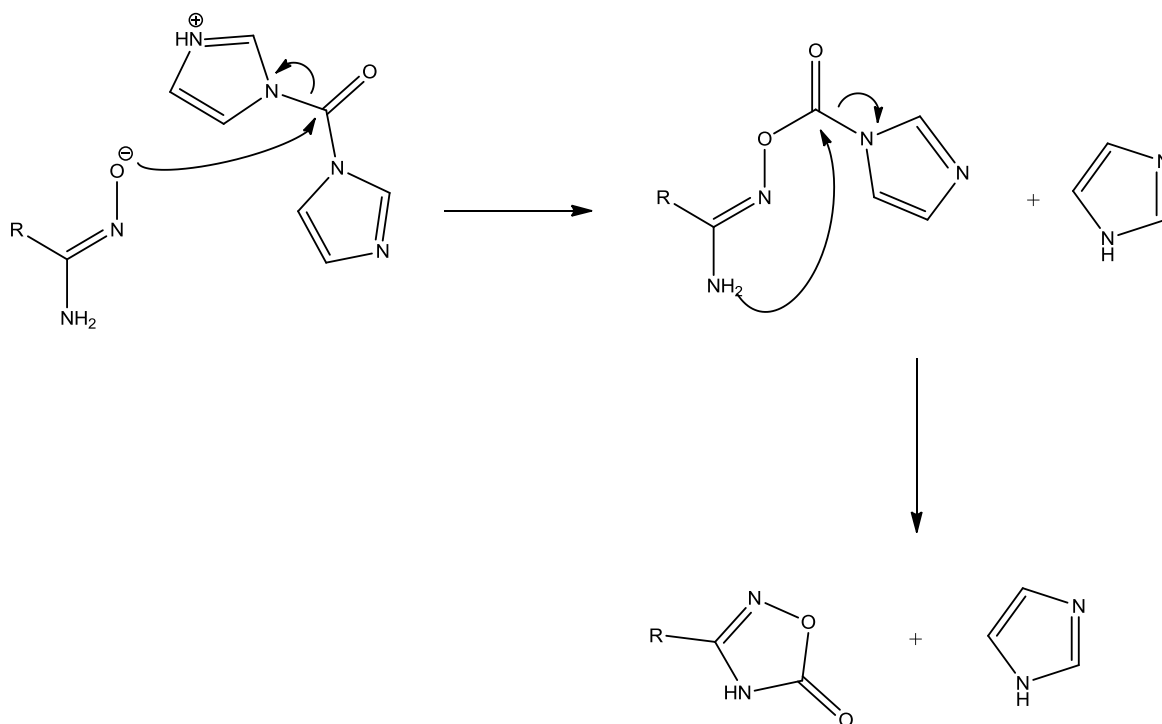
Pri spojinah **26** in **28** smo s to metodo poleg odstranitve benzilnih zaščit reaktivno cepili tudi 1,2,4-oksadiazolni obroč in na ta način tvorili amidin. Ob napadu vodika na oksadiazolni obroč pride do cepitve obroča in nastanka karboksamidinske skupine, ki hitro hidrolizira do amidina.



Slika 26: Shema cepitve in razpada oksadiazolnega obroča in nastanek amidina.

8.1.12 Tvorba oksadiazolnega obroča z reagentom CDI (**16**)

Oksadiazolni obroč na spojini **16** smo sintetizirali z reagentom 1,1'-karbonildiimidazolom (CDI), ki služi kot donor karbonylne skupine. Reakcija poteče v dveh fazah. V prvi fazi z imidazolom aktivirana -OH skupina napade karbonylni ogljik in pride do odcepitev enega imidazolnega obroča. V drugi fazi pride še do druge nukleofilne substitucije in posledično ciklizacije, ko amski dušik intramolekularno napade isti karbonylni ogljik in se odcepi še drugi imidazolni obroč.



Slika 27: Reakcijska shema sinteze oksadiazolnega obroča z reagentom CDI.

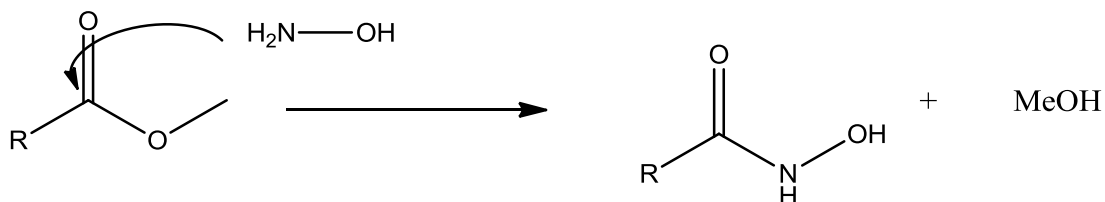
Po končani reakciji smo topilo odparili pod znižanim tlakom, preostanek raztopili v etilacetatu in produkte ekstrahirali z 1M raztopino NaOH. Tako smo se znebili imidazolov, saj so ti pri bazičnih pogojih v neprotonirani obliki in ostanejo v organski fazi, naš produkt pa je kisel, v vodni bazični raztopini disociira in se raztopi. Vodni fazi smo nato dodali 10 mL diklorometana in jo počasi nakisali do pH 3. Tako smo produkt pretvorili nazaj v protonirano obliko in ga ekstrahirali v organsko fazo.

8.1.13 Tvorba hidroksamske kisline (**29**)

V primeru sinteze spojine **29** smo hidroksamsko skupino tvorili direktno z uporabo hidroksilamina v bazičnem mediju. Hidroksilamin nukleofilno napade predhodno aktivirano karboksilno skupino (v našem primeru je v obliki metilnega estra) in sicer na karbonilnem ogljiku, odcepi se metanol in nastane hidroksamska kislina.

Hidroksamske kisline obstajajo v več tautomernih oblikah, katerih stabilnost je odvisna od narave medija. Njihova raznolikost je predvsem posledica možnosti tvorbe intramolekularnih vodikovih vezi, ki je v našem primeru še večja, saj imamo na molekuli v neposredni bližini hidroksamske tudi imino in amino skupino. Zaradi bližine amino skupine je kot stranska reakcija možna tudi intramolekularna ciklizacija. Posledično smo

po ekstrakciji in izolaciji spojine **29** dobili več manjših frakcij in eno večjo (naš produkt). Ena od manjših frakcij je bila po spiranju s kolone obarvana močno rdeče, kar je posledica sposobnosti hidroksamskih kislin, da kelirajo težke kovine (v našem primeru železo, ki je bilo verjetno v sledovih prisotno na koloni in da kompleksu rdečo barvo).

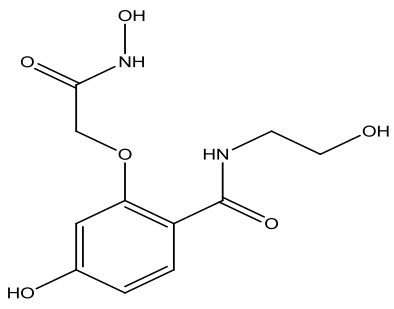
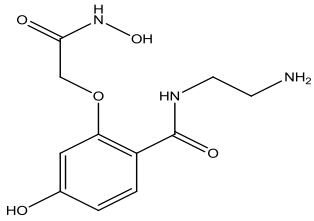
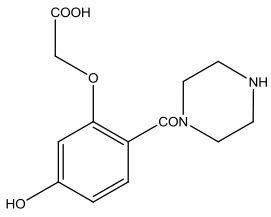
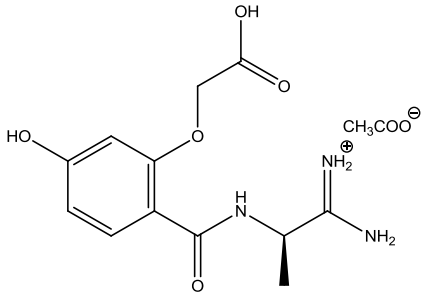
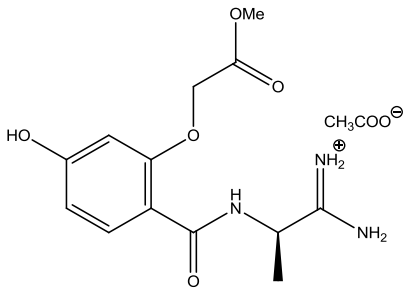


Slika 28: Reakcijska shema nastanka hidroksamske kisline s hidroksilaminom.

8.2 REZULTATI IN RAZPRAVA BIOKEMIJSKEGA TESTIRANJA SINTETIZIRANIH SPOJIN

Sintetizirane dihidroksibenzamidne derivate smo testirali na encimih DdlB in MurF.

OZNAKA	FORMULA	c (μM)	RA% DdlB	RA% MurF
19		250	98	119
20		250	95	123

OZNAKA	FORMULA	c (μM)	RA% DdIB	RA% MurF
21		250	95	116
22		250	89	126
24		250	93	120
26		250	92	108
28		250	93	75

OZNAKA	FORMULA	c (μM)	RA% DdlB	RA% MurF
29		250	92	63

Preglednica: Rezultati testiranja inhibitorne aktivnosti na encima DdlB in MurF.

Rezidualna aktivnost encima (RA) je razmerje med katalitično aktivnostjo encima ob prisotnosti zaviralca in aktivnostjo encima brez dodanega zaviralca. Izrazimo jo v odstotkih in je merilo za učinkovitost zaviralca. Aktivnost smo določali z metodo z malahitnim zelenim. Pri tej metodi določamo fosfat, ki nastane pri encimskih reakcijah testiranih encimov. Manjša kot je RA, v večji meri zaviralec pri dani koncentraciji upočasni encimsko katalizirano reakcijo. Vrednosti RA med 80%-100% so v mejah eksperimentalne napake, zato spojine s takšno aktivnostjo opredelimo kot neaktivne. (25)

Rezultati so pokazali, da nobena od naših spojin ni bila aktivna na DdlB, saj so bile vse vrednosti rezidualne aktivnosti za DdlB 89 – 100%. Rezidualne aktivnosti spojin za MurF so pri šestih spojinah presegle 100%, kar pripisujem tako eksperimentalni napaki kot tudi njihovi neučinkovitosti. Rezidualni aktivnosti spojin **28** in **29** sta pri 250 mikromolarni koncentraciji bili 75% in 63%, pri nižjih koncentracijah pa učinek izgine. Iz rezultatov lahko sklepamo, da nobena od naših uvedenih funkcionalnih skupin ni primerna za vezavo molekule v aktivno mesto encima.

9. SKLEP

V okviru diplomskega dela smo na osnovi strukture substratov in poznavanja zgradbe aktivnega mesta encimov Ddl in MurF sintetizirali serijo novih potencialnih zaviralcev. Pri tem smo izhajali iz 2,4-dihidroksibenzojske kisline, na katero smo uvedli različne funkcionalne skupine, ki posnemajo prijemališča substratov teh encimov.

Sintetizirali smo osem novih spojin. Najprej smo sintetizirali različno zaščitene derivate 2-(karboksimetoksi)-4-hidroksibenzojske kisline, na kateri smo s karbodiimidno metodo tvorili amidno vez z različnimi zaščitnimi aminskimi fragmenti. Sledilo je katalitsko hidrogeniranje in odstranitev benzilnih zaščit ter pri spojinah **26**, **28** in **29** tvorba 1-amino-1-iminopropanske skupine.

Spojino **12** smo najprej poskusili sintetizirati z uporabo Na_2CO_3 , vendar se je izkazalo, da pri tem monobenziliran produkt nastaja v premajhni meri, tudi ob dodatku katalizatorja faznega prenosa. Kaže, da je natrijeva sol z dikislino preveč stabilna za optimalen vstop karboksilne skupine v reakcijo. Bazo smo zato zamenjali s Cs_2CO_3 in s tem zmanjšali energijo ionske vezi, saj je cezijev kation veliko večji od natrijevega. Izkazalo se je, da je zamenjava natrija s cezijem primerna in da reakcija monobenziliranja poteče v veliko večji meri, vseeno pa še vedno nastane nekaj dibenziliranega produkta.

V primeru sintez hidroksamskih kislin smo pri reakcijah katalitskega hidrogeniranja dobili nižje izkoristke od pričakovanih in pri čiščenju ugotovili več frakcij produktov. Hidroksamska skupina je dovzetna za razpad in cepitev vezi CO-NH-OH, kar se je verjetno zgodilo pri reakciji katalitskega hidrogeniranja, lahko pa tudi med samim čiščenjem.

Z ustreznimi analiznimi postopki smo dokazali strukturno ustreznost in čistost sintetiziranih spojin. Izvedli smo tudi test na encimsko aktivnost, vendar pa končne spojine niso bile aktivne na MurF in Ddl, saj so bile vrednosti rezidualne aktivnosti encimov previsoke že pri koncentraciji 250 μM . Glede na rezultate lahko sklepamo, da kombinacije funkcionalnih skupin v naših spojinah niso primerne za vezavo v aktivno mesto encima, lahko pa nam nudijo smernice pri nadaljnjem razvoju dihidroksibenzamidnih protimikrobnih učinkovin. Rezultati našega dela širijo znanje na področju sintezne kemije in usmerjajo nadaljnji razvoj novih protimikrobnih učinkovin.

10. LITERATURA

1. Goodman L, Gilman A: *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 9th Ed. The McGraw-Hill Health Professions Division, New York, Sydney, 1996, 1029-1033.
2. Livermore D: Minimising antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 2005, 5, 450-459.
3. Gu YG, Florjančič AS, Clark RF, Zhang T, Cooper CS, Anderson DD, Lerner CG, McCall JO, Cai Y, Black-Schaefer CL, Stamper GF, Hajduk PJ, Beutel BA: Structure-activity relationships of novel potent MurF inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2004, 14, 267-270.
4. Williams DA, Lemke TL: *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 5th Ed. Lippincott Williams&Wilkins, 2002, 759-802.
5. Green DW: The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opin Ther Tar* 2002, 6, 1-19.
6. Yoneyama H, Katsumata R: Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development, *Biosci Biotech Bioch* 2006, 70,1060-1075.
7. Heijenoort J: Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat Prod Rep* 2001, 18, 503-519.
8. Healy VL, Lessard IA, Roper DI, Knox JR, Walsh CT: Vancomycin resistance in enterococci: reprogramming of the D-Ala-D-Ala ligases in bacterial peptidoglycan biosynthesis. *Chem Bio* 2000a, 7, R109-R119.
9. Bouhss A, Dementin S, van Heijenoort J, Parquet C, Blanot D: MurC and MurD synthetases of peptidoglycan biosynthesis: borohydride trapping of acyl-phosphate intermediates. *Method Enzymol* 2002, 354, 189-196.
10. Longenecker K, Stamper GF, Hajduk PJ, Fry EH, Jakob CG, Harlan JE, Edalji R, Bartley DM, Walter KA, Solomon LR, Holzman TF, Gu YG, Lerner CG, Beutel BA, Stoll VS: Structure of MurF from *Streptococcus pneumoniae* co-crystallized with a small molecule inhibitor exhibits interdomain closure. *Protein Sci* 2005, 14, 3039-3047.
11. Katz H, Caufield E: Structure-based design approaches to cell wall biosynthesis inhibitors. *Curr Pharm Design* 2003, 9, 857-866.
12. McCoy AJ, Maurelli AT: Characterization of *Chlamidia* MurC-Ddl, a fusion protein exhibiting D-alanyl-D-alanine ligase activity involved in peptidoglycan synthesis and D-cycloserine sensitivity. *Mol Microbiol* 2005, 57, 41-52.

13. Mullins LS, Zawadzke LE, Walsh CT, Raushel FM: Kinetic evidence for the formation of D-alanyl phosphate in the mechanism of D-alanyl-D-alanine ligase. *Biol Chem* 1990, 265, 8993-8998.
14. Galperin MY, Koonin EV: A diverse superfamily of enzymes with ATP-dependent carboxylate-amine/thiol ligase activity. *Protein Sci* 1997, 6, 2639-2643.
15. Neuhaus FC, Lynch JL: The enzymatic synthesis of D-alanyl-D-alanine. III. On the inhibition of D-alanyl-D-alanine synthetase by the antibiotic D-cycloserine. *Biochemistry –US* 1964, 3, 471-480.
16. Ellsworth BA, Tom NJ, Bartlett PA: Synthesis and evaluation of inhibitors of bacterial D-alanine:D-alanine ligases. *Chem Bio* 1996, 3, 37-44.
17. Besong GE, Bostock JM, Stubbings W, Chopra I, Roper DI, Lloyd AJ, Fishwick CW, Johnson AP: A *de novo* designed inhibitor of D-Ala-D-Ala ligase from *E. coli*. *Angew Chem Int Edit* 2005, 44, 6403-6406.
18. Liu S, Chang JS, Herberg JT, Horng MM, Tomich PK, Lin AH, Marotti KR: Allosteric inhibition of *Staphylococcus aureus* D-alanine:D-alanine ligase revealed by crystallographic studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103, 15178-15183.
19. Kovač A, Majce V, Lenaršič R, Bombek S, Bostock JM, Chopra I, Polanc S, Gobec S: Diazenedicarboxamides as inhibitors of D-alanine-D-alanine ligase (Ddl). *Bioorg Med Chem Lett* 2007, 17, 2047-2054.
20. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S & Blanot D: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2008, 32, 168-207.
21. Piao YZ, Kim YJ, Kim YA, Lee HS, Hammock BD, Lee YT: Development of ELISAs for the class-specific determination of organophosphorus pesticides. *J Agric Food Chem* 2009, 57, 10004–10013.
22. Daniele Giallombardo, Adam C Nevin, William Lewis, Christopher C Nawrat, Russell RA Kitson, Christopher J Moody: Synthesis of toxylloxanthone B. *Tetrahedron* 2014, 70, 1283-1288.
23. Mangette JE, Johnson MR, Le VL, Shenoy RA, Roark H, Stier M, Belliotti T, Capiris T, Guzzo PR: The preparation of optically active α -amino 4H-[1,2,4]oxadiazol-5-ones from optically active α -amino acids. *Tetrahedron* 2009, 65, 9536-9541.
24. Sureshbabu VV, Naik SA, Nagendra G: Synthesis of Boc-Amino Tetrazoles Derived from α -Amino Acids. *Synthetic Commun* 2009, 39, 395-406.

25. Baykov AA, Evtushenko OA, Avaeva SM: A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal Biochem* 1988, 171, 266-270.