

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA ŠIMUNOVIĆ

**SINTEZA DERIVATOV 2,4-DIHIDROKSIBENZOJSKE KISLINE KOT
POTENCIALNIH ZAVIRALCEV LIGAZE D-ALA-D-ALA.**

**SYNTHESIS OF 2,4-DIHIDROKSIBENZOIC ACID DERIVATIVES AS POTENTIAL
INHIBITORS OF D-ALA-D-ALA LIGASE.**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm. in so-mentorstvom asist. dr. Roka Frlana, mag. farm.

Zahvala

Najprej bi se zahvalila mentorju izr. prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. za potrpežljivost in spodbudne besede in pohvale. Zahvala gre tudi somentorju asist. dr. Roku Frlanu, mag. farm. za strokovno pomoč pri delu v laboratoriju, za strokovno svetovanje, za potrpežljivost. Iskrena zahvala pa gre tudi mojemu življenjskemu sopotniku Mateju, ki me je bodril in podpiral skozi celoten študij.

Magistrsko nalogo posvečam sinu Patriku, saj se mi je pridružil pri zadnjem letniku študija. Študij z njim je dobil večji pomen, sedenje za knjigo je dobilo smisel.

Izjava

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

Eva Šimunović

Predsednik komisije:

Izr.prof. dr. Marija Bogataj

Član komisije:

Asist.dr. Ilija Ilić

VSEBINA

POVZETEK	5
1. UVOD	9
1.1. Bakterijska celična stena in peptidoglikan	11
1.1.1 Po Gramu pozitivne bakterije.....	12
1.1.2 Po Gramu negativne bakterije.....	14
1.2. Zgradba peptidoglikana	15
1.3 Biosinteza peptidoglikana.....	16
1.4 D-alanil-D-alanin ligaza	20
2. NAMEN DELA	23
2.1. Prva sintezna pot	23
2.2. Druga sintezna pot.....	25
3. MATERIALI IN METODE.....	26
3.1. Materiali.....	26
3.2. Aparature	26
3.3. Metode	26
4. EKSPERIMENTALNO DELO	29
4.1. PRVA SINTEZNA POT	29
4.1.1. Sinteza metil 2,4-dihidroksibenzoata (2).....	29
4.1.2. Sinteza metil 4-(benziloksi)-2-hidroksibenzoata (3).....	30
4.1.3. Sinteza 4-(benziloksi)-2-hidroksibenzohidrazida (4).....	31
4.1.4. Sinteza metil 4-(benziloksi)-2-(<i>terc</i> -butoksi)-2-oksoetoksi)benzoata (6).....	32
4.1.5. Sinteza 2-(5-(benziloksi)-2-(metoksikarbonil)fenoksi)ocetne kisline (5).....	33
4.1.6. Sinteza 4-(benziloksi)-2-(karboksimetoksi)benzojske kisline (7).....	34
4.2. DRUGA SINTEZNA POT	35
4.2.1. Sinteza <i>terc</i> -butil (S)-(1-amino-1-oksopropan-2-il)karbamata (9).....	35
4.2.2. Sinteza <i>terc</i> -butil (S)-(1-cianoetil)karbamata (10).....	36
4.2.3. Sinteza <i>terc</i> - butil (S,Z)-(1-amino-1-(hidroksiimino)propan-2-il)karbamata (11).....	36
4.2.4. Sinteza <i>terc</i> -butil (S)-(1-(5-okso-4,5-dihidro-1,2,4-oksadiazol-3-il)etil)karbamata (12).....	37
5. RAZPRAVA IN REZULTATI.....	39

5.1.	Rezultati.....	39
5.2.	Razprava o prvi sintezni poti	42
5.2.1.	Sinteza metil-2,4-dihidroksibenzoata (2).....	42
5.2.2.	Sinteza metil 4-(benziloksi)-2-hidroksibenzoata (3).....	43
5.2.3.	Sinteza 4-(benziloksi)-2-hidroksibenzohidrazida (4).....	43
5.2.4.	Sinteza 2-(5-(benziloksi)-2-(metoksikarbonil)fenoksi)ocetne kisline (5).....	44
5.2.5.	Sinteza metil 4-(benziloksi)-2-(2-(<i>terc</i> -butoksi)-2-oksoetoksi)benzoata (6)....	44
5.2.6.	Sinteza 4-(benziloksi)-2-(karboksimetoksi)benzojske kisline (7).....	45
5.3.	Razprava o drugi sintezni poti	46
5.3.1.	Sinteza <i>terc</i> -butil (S)-(1-amino-1-oksopropan-2-il)karbamata (9).....	47
5.3.2.	Sinteza <i>terc</i> -butil (S)-(1-cianoetil)karbamata (10).....	48
5.3.3.	Sinteza <i>terc</i> -butil (S,Z)-(1-amino-1-(hidroksiimino)propan-2-il)karbamata (11).....	50
5.3.4.	Sinteza <i>terc</i> -butil (S)-(1-(5-okso-4,5-dihidro-1,2,4-oksadiazol-3- il)etil)karbamata (12).....	50
6.	SKLEP	51
7.	LITERATURA	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Prokariontska celica ().	10
Slika 2: Razlika v zgradbi bakterijske celične stene med po Gramu pozitivno in po Gramu negativno bakterijo ().	12
Slika 3: Zgradba peptidoglikana pri po Gram-pozitivnih bakterijah ().	13
Slika 4: Zgradba peptidoglikana pri po Gramu negativnih bakterijah (16).	15
Slika 5: Razlika med prečnimi povezavami peptidoglikanskih vlaken pri po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij (21).	16
Slika 6: Sinteza peptidoglikana pri <i>E.coli</i> z navedenimi zaviralci posameznih encimov (25).	18
Slika 7: Shematski prikaz biosinteze peptidoglikana ().	19
Slika 8: Sinteza dipeptida D-Ala-D-Ala (32).	20
Slika 9: Struktura a) vankomicin, b) kloeremomicin in c) teikoplanin (36).	21
Slika 10: Kristalna struktura DdlB iz <i>E. coli</i> v kompleksu z ADP in fosforil fosfatnim inhibitorjem ().	22
Slika 11: Tvorba 4-(benziloksi)-2-hidroksibenzohidrazida (4), 2-(5-(benziloksi)-2-(metoksikarbonil)fenoksi)ocetne kisline (5) in 4-(benziloksi)-2-(karboksimetoksi)benzojske kisline (7).	24
Slika 12: Mehanizem nastanka oksadiazol 12.	25
Slika 13: Shematski prikaz estrenja.	42
Slika 14: Prikaz bazičnih lastnosti.	44
Slika 15: Shematski prikaz alkiliranja spojine 3s <i>terc</i> butilnim estrom bromocetne kisline in nadaljna hidroliza do spojine 7.	46
Slika 16: Druga sintezna pot, tvorba 1,2,4-oksadazola 12.	47
Slika 17: Tvorba amidne vezi z reagentoma EDC in HOBt.	48
Slika 18: Shematski prikaz tvorbe kislinskih kloridov iz karboksilnih kislin s pomočjo cianur klorida.	49
Slika 19: Shematski prikaz reakcije boc-piperazina s cianur kloridom.	49

KAZALO TABEL

Tabela 1: <i>Delitev protibakterijskih učinkovin glede na mehanizem delovanja</i> .	11
---	----

POVZETEK

Bakterijska rezistenca nas sili v odkrivanje novih protibakterijskih učinkovin, ki bodo delovale selektivno in ciljano, kot tudi v odkrivanje novih širokospektralnih protibakterijskih učinkovin, ki bodo namenjene zdravljenju infekcij, povzročenih z najbolj rezistentnimi sevi. Pri identifikaciji novih potencialnih tarč protibakterijskih učinkovin je najpomembnejša strukturna razlika med človeškimi in bakterijskimi celicami mehansko močna celična stena, katere glavni gradniki so molekule peptidoglikana.

Specifično delovanje na peptidoglikan je trenutno le delno izkoriščeno, zato lahko razmišljamo o novih možnostih za razvoj protibakterijskih učinkovin, ki bi povzročile poškodbe celične stene. Encimi, vključeni v zgodnje citoplazemske stopnje biosinteze peptidoglikana postajajo čedalje bolj zanimive tarče za sintezo protimikrobnih učinkovin. Mednje spada tudi ligaza D-Ala-D-Ala.

Pri načrtovanju naših spojin smo v okviru magistrske naloge uporabili 2,4-dihidroksibenzojsko kislino, kot ogrodje, ki nam omogoča primerno prostorsko razporeditev funkcionalnih skupin končnih spojin. Sinteza končnih spojin je večstopenjska, zato je v okviru magistrske naloge pripravljena tudi sintezna strategija. Glavni namen je bila sinteza treh intermediatov, ki bi jih lahko uporabili pri sintezi končnih spojin, in sicer oksadiazolnega derivata L-Ala, 5-(benziloksi)-2-(karboksimetoksi)benzojske kisline, in 5-(benziloksi)-2-hidroksibenzohidrazida.

Sinteza vseh treh derivatov se je izkazala za enostavno in učinkovito. Izkoristek posameznih reakcijskih stopenj je bil večinoma večji od 50 %, pri čemer smo v večini primerov spojine uspeli očistiti s prekrystalizacijo, kar je pomembno predvsem z ekonomskega vidika. Vse dobljene spojine so bile identificirane s pomočjo sodobnih analiznih tehnik, kot so NMR, IR, MS in HPLC, s katerimi smo tudi potrdili ustrezno čistost produktov.

Magistrska naloga predstavlja pomemben prispevek k širitvi znanja tako na področju sintezne kemije kot tudi na področju načrtovanja in sinteze protimikrobnih učinkovin.

ABSTRACT

Bacterial resistance is a driving force in the discovery of new selective antibacterial drugs that will act on validated targets, as well as for the discovery of new broad-spectrum antibacterial drugs that will be used for treating infections caused by the most resistant strains. In the identification of new potential targets for antibacterial drugs, the most important difference between human and bacterial cells is the mechanically strong cell wall. Peptidoglycan molecules are its main building blocks.

Specific action on the peptidoglycan is still only partially utilized so we can think about new opportunities in the development of antibacterial drugs that could cause damages to the bacterial cell wall. The enzymes involved in the early cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis are increasingly becoming interesting targets for the design and synthesis of new antimicrobial drugs. D-Ala-D-Ala ligase is one of those targets.

In the context of the master's thesis we constructed our compounds using 2,4-dihydroxybenzoic acid as a scaffold, which allows appropriate spatial distribution of functional groups in the final compounds. Within the master's thesis we prepared the synthetic strategy for a multi-step synthesis of three intermediates, that may be used in the synthesis of the final compounds, i.e. an oxadiazole derivatives of the amino acids L-Ala and L-Asp, 5-(benzyloxy)-2-(carboxymethoxy)benzoic acid and ethyl 5-benzoyl-2-*tert*-butoxycarbonylbenzoate and 5-(benzyloxy)-2-hydroxybenzohydrazide.

The synthesis of all three derivatives was found to be very efficient. The yields of most individual reaction steps were above 50%. Noteworthy, the majority of compounds was purified by means of crystallization, which is important from the economical viewpoint. All compounds were identified with the help of modern analytical techniques such as NMR, IR, MS and HPLC. All compounds were of appropriate purity according to the modern standards.

Our study represents a major contribution to the knowledge in the field of synthetic chemistry and the design and synthesis of new antibacterial drugs.

SEZNAM OKRAJŠAV

LPS	lipopolisaharidi
MDR	veš stopenjska rezistenca na zdravilo (Multiple drug resistance)
MRSA	na metilcilin odporni <i>Staphylococcus aureus</i>
VRE	na vankomicin odporni <i>Enterococcus faecium</i> in <i>faecalis</i>
ADP	adenozindifosfat
ATP	adenzintrifosfat
BOC	<i>terc</i> -butiloksikarbonil
HOBt	1-hidroksibenzotriazol hidrat
DMF	N,N-dimetilformamid
THF	tetrahidrofuran
CDCl ₃	devteriran kloroform
d	dublet (NMR)
dd	dublet dubleta (NMR)
m	multiplet (NMR)
s	singlet(NMR)
t	triplet(NMR)
DMSO-d ₆	devteriran dimetilsulfoksid
MS	masna spektrometrija
IR	infrardeča spektroskopija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta (NMR)
R _f	retencijski faktor

M	molska masa
MF	mobilna faza
TLC	tankoplastna kromatografija
ESI	elektronska ionizacija (Electron Spray Ionization) (MS)
NMR	jedrska magnetna resonanca
D-Ala-D-Ala	D-alanin-D-alanin
Glc-NAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
MurNac	<i>N</i> -acetilmuraminska kisline
MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruvat-transferaza
MurB	UDP- <i>N</i> -acetenolpiruvilglukozamin-reduktaza
MurC	UDP- <i>N</i> -acetilmuraminska kislina: L-alanin-ligaza
MurD	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin: D-glutamat-ligaza
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-Dglutamat: mezodiaminopimelinat-ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat-mezodiaminopimelinat D-alanin-D-alanin ligaza
MurG	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin-transferaza
MurNac	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
PTSA	<i>p</i> -toluensulfonska kislina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidijevklorid

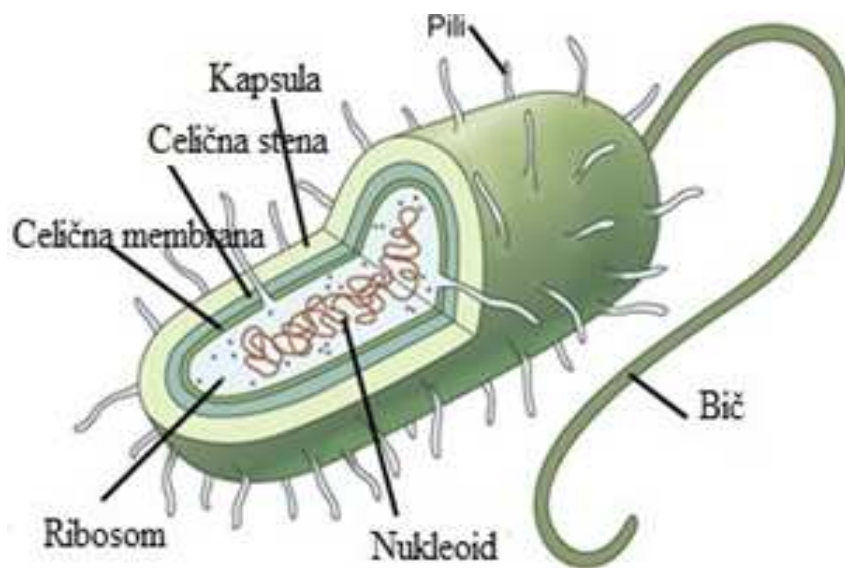
1. UVOD

Boj proti bakterijskim infekcijam s pomočjo sodobnih protimikrobnih učinkovin traja že več kot 70 let. Mnoge patogene bakterije, kot je *Staphylococcus aureus*, so v tem času razvile delno ali popolno rezistenco na večino antibiotikov. Iskanje novih protimikrobnih učinkovin se zato nikoli ne konča. Umrljivost zaradi bakterijskih okužb je v razvitem svetu v 20. stoletju sicer močna upadla, hkrati pa lahko trdimo, da so prav bakterijske okužbe še vedno eden glavnih krivcev za umrljivost (1) (2).

Bakterije, ki jih lahko štejemo med MDR seve so, še *Enterococcus faecalis* (VRE), ki izkazuje rezistenco na vankomicin, *Staphylococcus aureus* (MRSA), ki je rezistentna na meticilin, *Actinobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Streptococcus pneumoniae*, ki so rezistentne na penicilin in makrolidne antibiotike ter mnoge druge (2) (3). Rezistenca na antibiotike se razvija predvsem zaradi povečanega obsega in nepravilne uporabe antibiotikov, poseben primer pa predstavljajo imunsko oslabljeni bolniki, pri katerih je nevarnost za razvoj rezistentnih bakterij močno povečana (3) (4).

Bakterijska rezistenca nas tako sili v odkrivanje novih protibakterijskih učinkovin, ki bodo delovale ciljano, kot tudi v odkrivanje novih širokospektralnih protibakterijskih učinkovin, ki bodo namenjene najbolj rezistentnim sevom (2). Vemo, da je razvoj novih zdravilnih učinkovin zelo drag in dolg postopek. Za prodor protibakterijske učinkovine na tržišče je potrebno 8 do 12 let. Farmacevtska industrija se zaradi manjšega zaslužka umika s področja razvoja novih protibakterijskih učinkovin, saj je tako zdravljenje kratkotrajno v primerjavi z učinkovinami, ki jih uporabljamo pri kroničnih boleznih (5).

Pri identifikaciji novih potencialnih tarč protibakterijskih učinkovin je treba biti pozoren na selektivno toksičnost. Osredotočiti se je treba na bistvene razlike med celicami mikroorganizmov in človeškimi celicami. Najpomembnejša razlika med človeškimi in bakterijskimi celicami je mehansko močna celična stena, katere glavni gradniki so molekule peptidoglikana. Specifično delovanje antibiotikov na peptidoglikan (celično steno) še ni v popolnosti izkoriščeno, zato lahko razmišljamo o novih možnostih za razvoj protibakterijskih učinkovin, ki bi povzročile poškodbe v celični steni.



Slika 1: Prokariontska celica (6).

Nekateri antibiotiki, kot so penicilini, zavirajo sintezo peptidoglikana, saj se vežejo na encime, imenovane penicilin vežoče beljakovine ali transpeptidaze (7). Ti encimi omogočajo prečno premreženje oligopeptidnih verig. Mutacije v genih za transpeptidaze lahko povzročijo manjšo učinkovitost antibiotikov oziroma odpornost proti njim. Penicilini delujejo ciljno na bakterijske celice, saj živalske (in s tem človeške) celice ne vsebujejo celične stene (1).

Antibiotiki predstavljajo raznoliko skupino zdravilnih učinkovin in jih lahko delimo po različnih kriterijih:

- ✓ glede na mehanizem delovanja,
- ✓ glede na izvor,
- ✓ glede na spekter delovanja,
- ✓ glede na način aplikacije,
- ✓ glede na kemijsko strukturo.

Tabela 1: Delitev protibakterijskih učinkovin glede na mehanizem delovanja (8) (9).

TARČNO MESTO V BAKTERIJI	VRSTA PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE
SINTEZA CELIČNE STENE	PENICILINI, CEFALOSPORINI, KARBAPENEMI, MONOBAKTAMI, VANKOMICIN, FOSFOMICIN, CIKLOSERIN
SINTEZA PROTEINOV	MAKROLIDI, TETRACIKLINI, AMINOGLIKOZIDI, KLORAMFENIKOL
SINTEZA IN METABOLIZEM NUKLEINSKIH KISLIN	KINOLONI, RIFAMPICIN
METABOLIZEM FOLNE KISLINE	SULFONAMIDI, TRIMETOPRIM

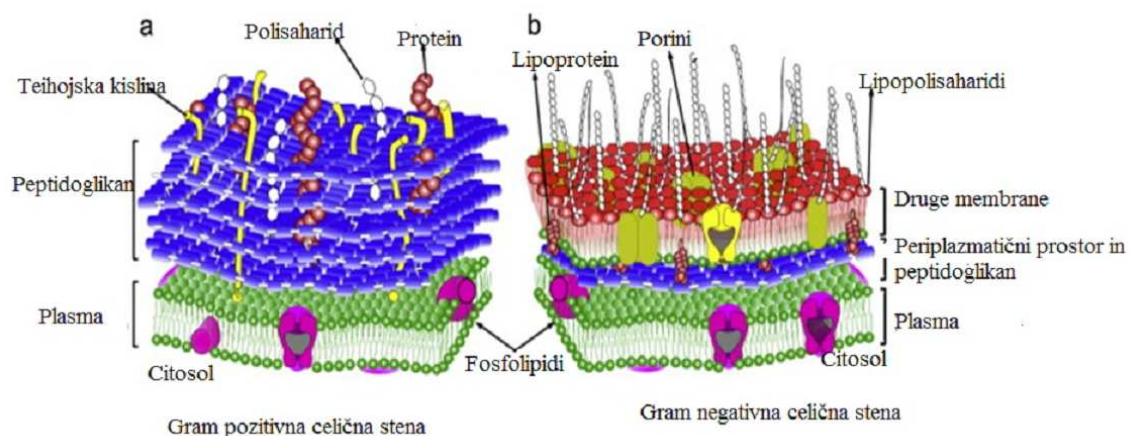
1.1. Bakterijska celična stena in peptidoglikan

Bakterijska celica je sestavljena iz celične membrane, celične stene in citoplazme, medtem ko je živalska celica sestavljena samo iz celične membrane in citoplazme. Celična membrana in celična stena sta zelo pomembni za preživetje bakterijske celice, saj vzdržujeta karakteristično obliko celice (10) (1). Bakterija mora biti za preživetje prilagojena na različne okoljske pogoje (npr. spremembo okoljskega tlaka), kar ji zagotavlja polprepustna membrana, ki omogoča prehod le nekaterim snovem, sodeluje pri rasti in delitvi celice in preprečuje prebavo z gostiteljevimi encimi (11). Toge celične stene, ki ščitijo bakterije, so močne mrežaste strukture, zgrajene predvsem iz nerazvejanih heteropolimerov *N*- acetilglukozamina in *N*-acetilmuraminske kisline (12).

Bakterijo lahko okarakteriziramo s tehniko barvanja po Gramu, s pomočjo katere ločimo po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije. Omenjena tehnika vključuje

dodajanje barvila metilno vijolično, ki ga spiramo z raztopino joda. Ob stiku barvila z raztopino joda se tvorijo kristali metilno vijoličnega, odvečno topilo pa nato speremo z zmesjo acetona in etanola. Bakterija z debelejšo celično steno (20 – 40 nm) absorbira barvilo in ostane vijolične barve, definiramo jo kot po Gramu pozitivno. Bakterija s tanko celično steno (2 – 7 nm) absorbira le zelo majhno količino barvila, ki jo aceton spere. Ta bakterija se obarva rožnato le za kratek čas (nekaj sekund) in jo označimo kot po Gramu negativno bakterijo (1).

Razlika v celični steni in membrani ima ključno vlogo pri dovzetnosti po Gramu pozitivnih ali po Gramu negativnih bakterij za posamezne protibakterijske učinkovine (1).



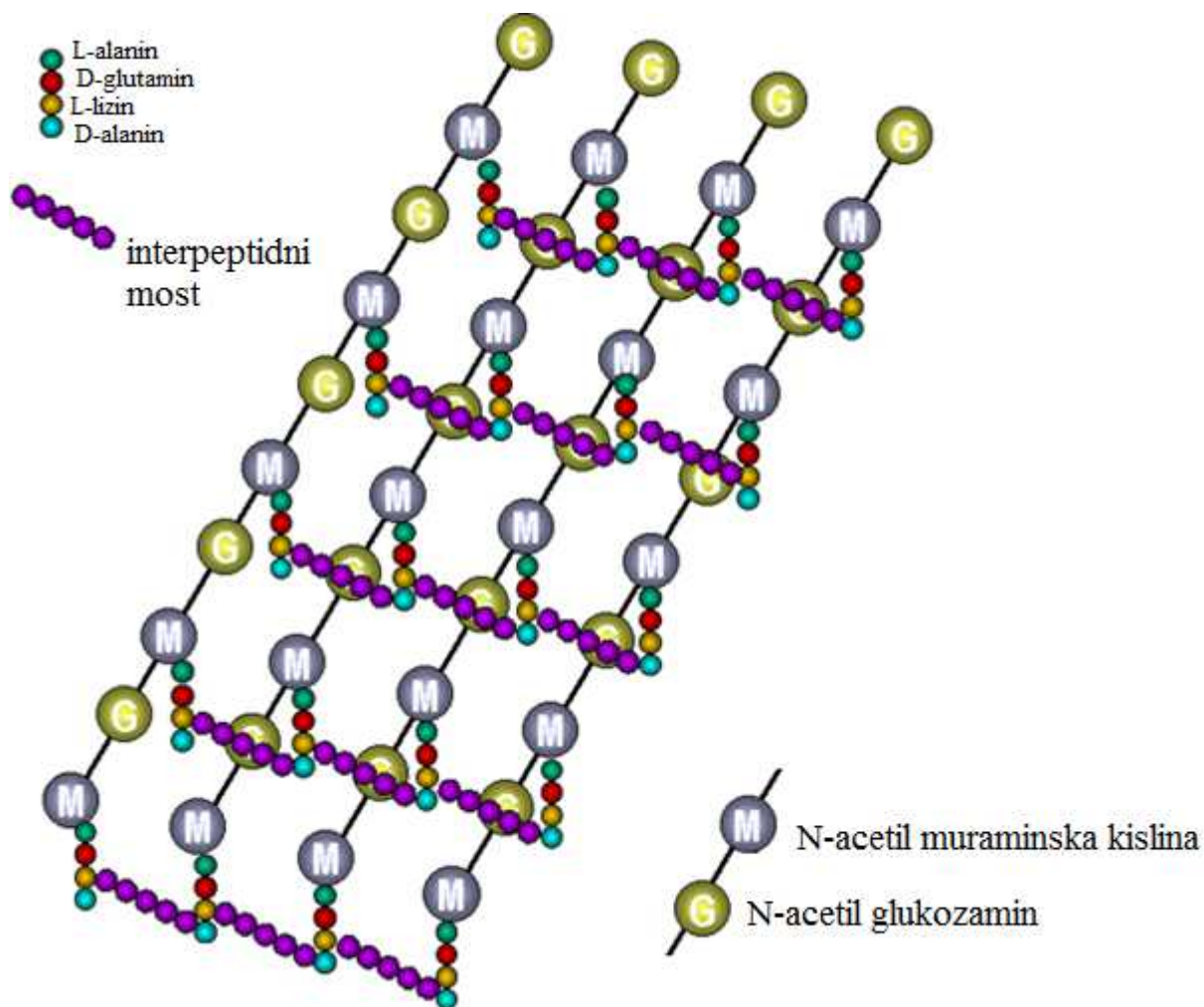
Slika 2: Razlika v zgradbi bakterijske celične stene med po Gramu pozitivno in po Gramu negativno bakterijo (13).

1.1.1 Po Gramu pozitivne bakterije

Po Gramu pozitivne so bakterije, ki imajo debelo in večplastno celično steno (40 plasti) iz peptidoglikana (150-500 Å), ki obdaja citoplazemsko membrano. Peptidoglikan ima bistven pomen za strukturo bakterij in njihovo delitev ter za preživetje v težkih pogojih, v katerih le-te rastejo. Razgradimo ga lahko z lizocimom, človeškim encimom, ki ga najdemo v izločkih, kot so solze, mleko in sluz. Proizvajajo ga tudi bakterije in drugi

organizmi. Lizocim katalizira hidrolizo 1,4- β glikozidne vezi med *N*-acetilmuraminsko kislino in *N*-acetil-D-glukozaminom, ki sta osnovna monomerna gradnika peptidoglikana.

Celična stena po Gramu pozitivnih bakterij vsebuje poleg peptidoglikana še manjše količine anionskih polimerov, kot sta teihojska in teihuronska kislina. Teihojska kislina je vodotopen polisaharid, ki je kovalentno povezan s peptidoglikanom. Teihuronska kislina (lipoteihojska kislina) je sestavljena iz maščobnih kislin, ki so zasidrane v citoplazemski membrani. Gre za anionske polimere, ki so sestavljeni iz fosfatnih, hidroksilnih in aaminskih skupin in predstavlja ionsko izmenjevalni sistem, ki uravnava koncentracijo magnezijevih ionov v celici. Ti so pomembni za pravilno delovanje določenih encimov, ki so vključeni v biosintezo peptidoglikana (14) (15).

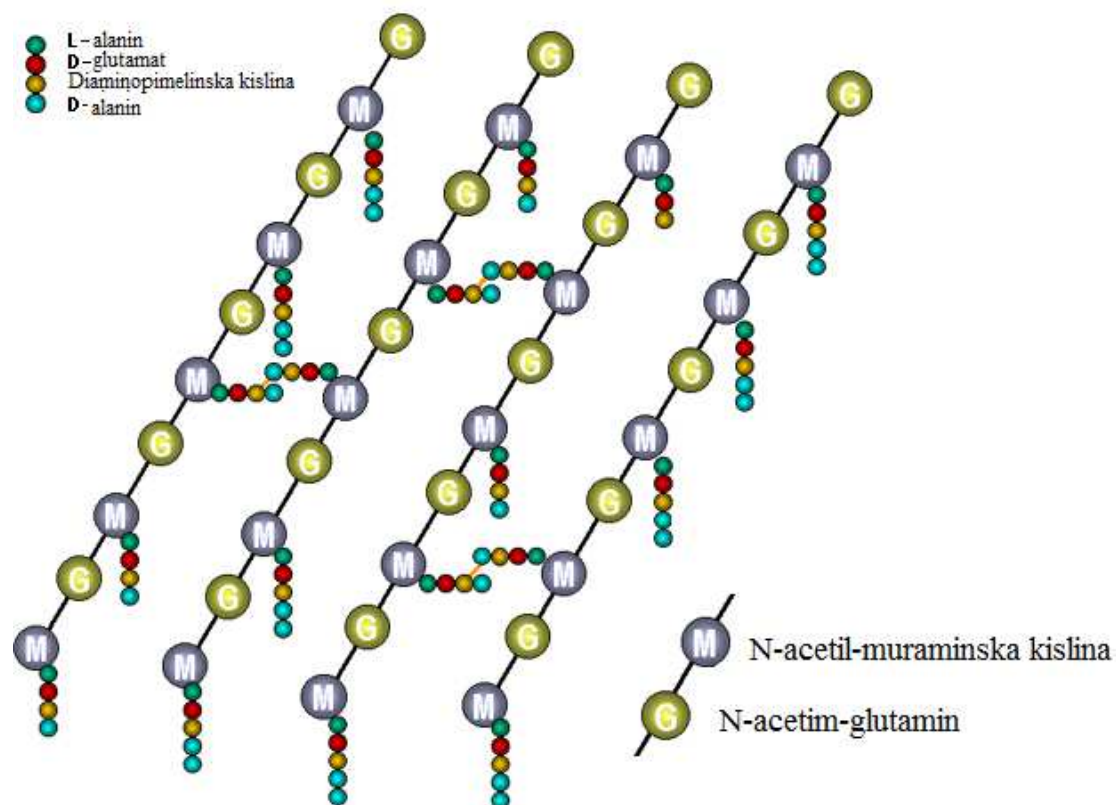


Slika 3: Zgradba peptidoglikana pri po Gram-pozitivnih bakterijah (16).

1.1.2 Po Gramu negativne bakterije

Zgradba celične stene po Gramu negativnih bakterij je bolj kompleksna od zgradbe celične stene po Gramu pozitivnih bakterij. Sestavljena je iz dveh plasti peptidoglikana, ki predstavlja 5-10 % mase bakterijske celične stene. Za razliko od po Gramu pozitivnih bakterij v po Gramu negativnih bakterijah ni teihoske in teihuronske kisline. Območje med zunanjo površino citoplazemske membrane in notranjo površino zunanje membrane se imenuje periplazemski prostor. Ta prostor je predel, ki vsebuje različne hidrolitične encime, kot so proteaze, lipaze, fosfataze, nukleaze in glikozidaze, ki so pomembni pri presnovi velikih makromolekul (16, 17).

Kot smo že omenili, imajo po Gramu negativne bakterije edinstveno strukturo, saj imajo poleg notranje membrane še čvrsto zunanjo membrano, sestavljeno iz lipopolisaharidov, fosfolipidov in proteinov. Zgrajena je kot asimetrični lipidni dvosloj kar pomeni, da je notranji sloj iz fosfolipidov, zunanji sloj pa iz lipopolisaharidov, v katerega so ujeti različni proteini. Lipopolisaharidi (LPS) so značilni samo za ta tip bakterij, pogosto jih imenujemo tudi endotoksini, saj so močan stimulator imunskega odziva. LPS aktivirajo celice B in inducirajo makrofage ter druge celice imunskega sistema, ki sprostijo interleukin-1 in interleukin-6 ter nekatere druge mediatorje. LPS povzročajo vročino in v nekaterih primerih tudi šok. Številni proteini prebadajo celotni dvoplastni lipidni sloj, imenujemo jih transmembranski proteini oz. porini. Ti so zelo pomembni saj tvorijo pore, ki omogočajo prehajanje različnih snovi skozi membrano. Večina porinov, ki so v zunanji membrani po Gramu negativnih bakterij, je sestavljena iz treh enakih podenot, v sredini tvorijo odprtino, ki meri okoli 1 nm v premeru. Skoznje lahko prehajajo snovi po principu difuzije. Pore se lahko odpirajo in zapirajo, kar je ključnega pomena za odpornost proti antibiotikom (18). Zunanja membrana in porinski kanali omogočajo prehod metabolitov in majhnih hidrofilnih antibiotikov. Vendar pa zunanja membrana hkrati predstavlja oviro za velike molekule oz. hidrofobne antibiotike in proteine (15).



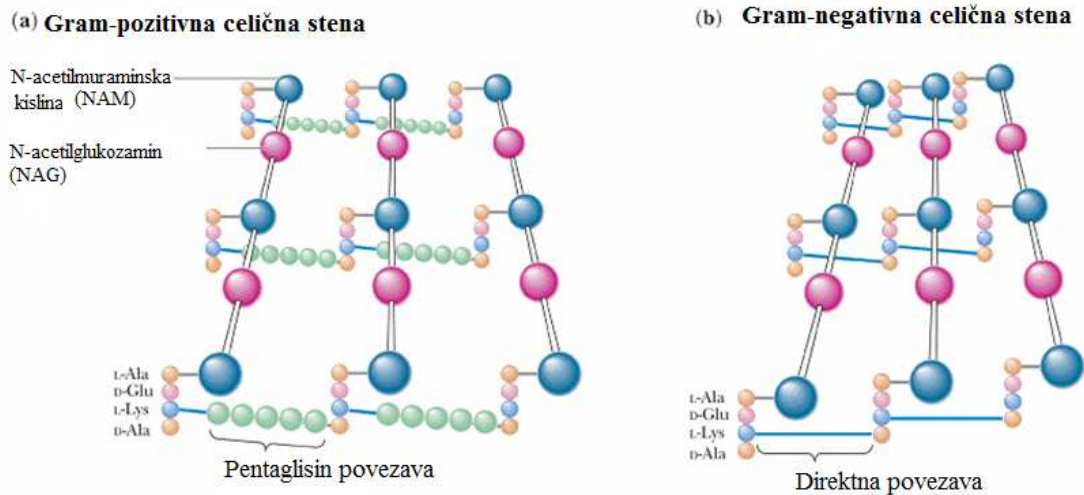
Slika 4: Zgradba peptidoglikana pri po Gramu negativnih bakterijah (16).

1.2. Zgradba peptidoglikana

Peptidoglikan ali murein je polimer, zgrajen iz sladkornih komponent in peptidnih verig, ki skupaj tvorijo linearne glikanske polimere na zunanji strani citoplazemske membrane. Taka struktura daje bakterijski celični steni obliko in trdnost ter preprečuje, da bi bakterija počila v okolju z nižjim osmotskim tlakom kot je tlak v notranjosti bakterije (19). Peptidoglikan je vključen tudi v delitev bakterijskih celic v času razmnoževanja. Najdemo ga samo v bakterijah, evkariontske celice ga nimajo. Peptidoglikan zato predstavlja idealno tarčo za protimikrobne učinkovine (15).

Sladkorne komponente so izmenično povezane z β -(1,4) glikozidnimi vezmi, sestavljene so iz ponavljajočih se ostankov *N*-acetilglukozamina (Glc-NAc) in *N*-acetilmuraminske kisline (MurNAc). *N*-acetilmuraminska kislina je derivat *N*-acetilglukozamina, ki ima na C-3 atomu z etrsko vezjo pripeto mlečno kislino (20). Aminokisline, ki sestavljajo

tetrapeptide, imajo L in D konfiguracijo (D-aminokisline so v naravi redke, večinoma jih najdemo v peptidoglikanu), njihovo zaporedje je: L-alanin, D-glutaminska kislina, *mezo*-diaminopimelinska kislina in D-alanin (običajno pri po Gramu negativnih bakterija) oz. L-lizin (pri po Gramu pozitivnih bakterijah) in D-alanin (21).



Slika 5: Razlika med prečnimi povezavami peptidoglikanskih vlaken pri po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij (21).

Peptidoglikan je pri po Gramu pozitivnih bakterijah debelejši za 20 do 80 nm od peptidoglikana po Gramu negativnih bakterij, kjer ima debelino 7-8 nm. Pri po Gramu negativnih bakterijah je prečno premreženih samo 20 % vseh peptidnih verig peptidoglikana, pri po Gramu pozitivnih pa lahko tudi več kot 90 %.

1.3 Biosinteza peptidoglikana

Biosinteza peptidoglikana je kompleksen proces, sestavljen približno iz 20 reakcij, ki jih lahko razdelimo v tri stopnje:

- ✓ Sinteza prekurzorjev v citoplazmi (8)
- ✓ Prenos prekurzorjev do lipidnega nosilca, ki jih prenese čez membrano (22)
- ✓ Prehod prekurzorjev v celično steno in vgraditev v že obstoječi peptidoglikan (23).

Biosinteza peptidoglikana je večstopenjski proces. V prvi sintezni fazi, ki poteka v citoplazmi, se najprej sintetizira UDP-*N*-acetilglukozamin in UDP-*N*-acetilmuramilpentapeptid v štirih stopnjah iz fruktoze-6-fosfata (24). Prva sintezna pot je prenos enolpiruvata na položaj 3 UDP-*N*-acetilglukozamina s pomočjo encima MurA. Temu sledi redukcija s pomočjo encima MurB, pri kateri pride do pretvorbe enolpiruvatnega dela do D-laktata, pri čemer nastane UDP-*N*-acetilmuraminat. Niz od ATP odvisnih aminokislinskih ligaz (MurC, MurD, Mure in MurF) sintetizira končni citoplazemski prekurzor UDP-MurNAc-pentapeptid (23).

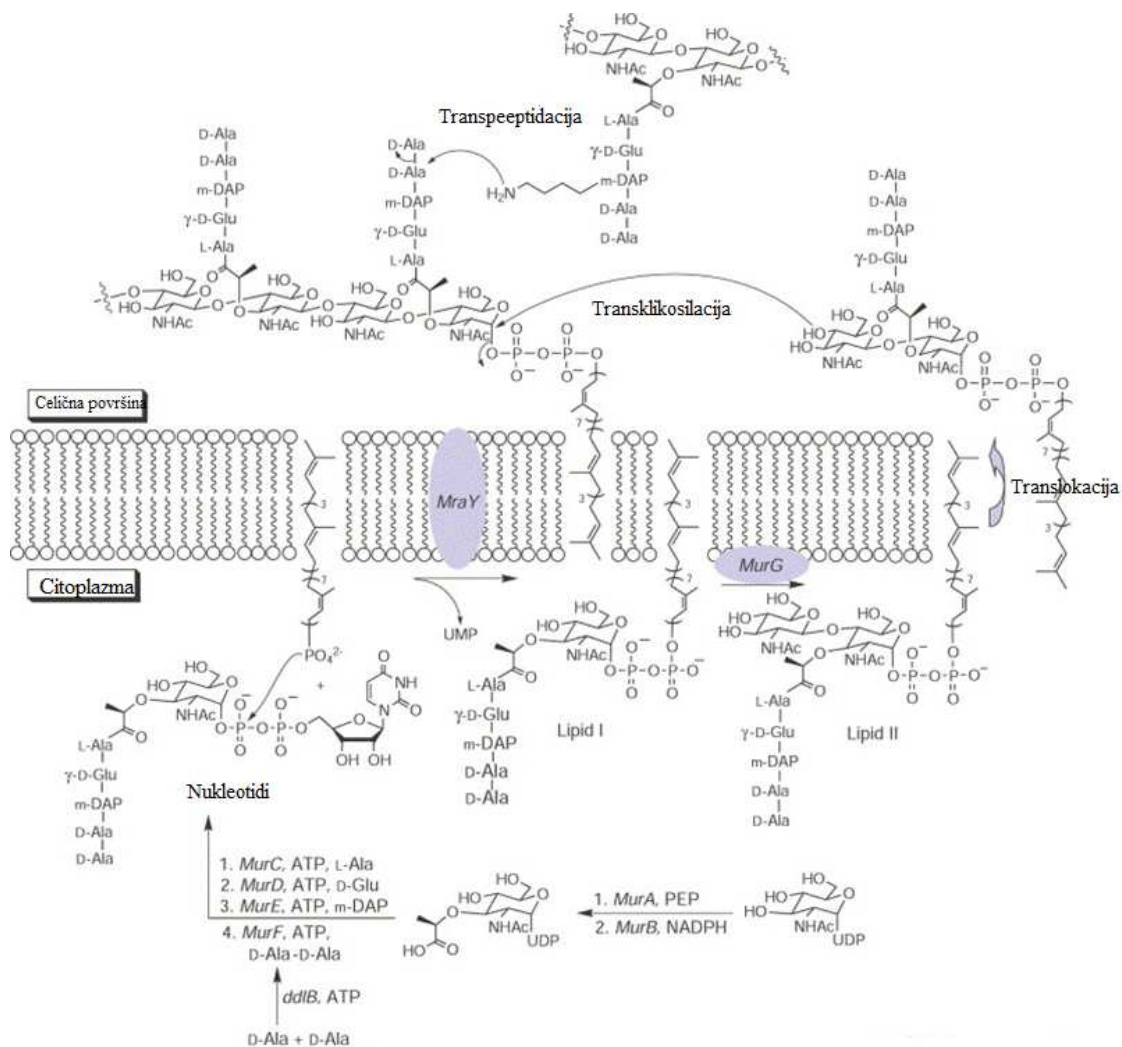
Preko amidne vezi se na prosto karboksilno skupino laktoilnega etra UDP-MurNAc zaporedoma vežejo L-alanin (MurC), D-glutaminska kislina (MurD), mezo-diaminopimelinska kislina ali L-lizin (MurE) in dipeptid D-Ala-D-Ala (MurF). V bakterijski celici istočasno poteka sinteza D-aminokislin, ki jih najdemo le v prokariontskih celicah. Le-te sintetizirajo D-aminokislino na dva načina oz. po dveh biosinteznih poteh:

1. Racemizacija na α -C atomu L-aminokislin s pomočjo ustrezne aminokislinske racemaze. Tako nastaneta D-Ala in D-Glu s pomočjo glutamat-racemaze (MurI).
2. Po drugi poti lahko v bakterijski celici nastane D-Glu, in sicer preko stereoselektivne redukcije β -ketokislin. D-aminokislinska aminotransferaza (D-AAT) pretvori β -ketoglutarat v D-glutamat in istočasno pretvori piruvat v D-alanin (11, 23,25,26).

Preostala dva aminokislinska ostanka (D-Ala-D-Ala) se s pomočjo encima MurF pripneta na tretjo aminokislino, kot že prej tvorjen dipeptid D-alanin-D-alanin. Omenjeni peptid nastane z racemizacijo, kjer se L-alanin pretvori v D-alanin, nato pa D-alanil-D-alanil-ligaza (Ddl) katalizira nastanek dipeptida D-Ala-D-Ala (11) (23).

Encimi MurC, MurD, MurE in MurF so specifični za sintezo prekurzorjev peptidoglikana, ki je prikazana na Sliki 6 (25).

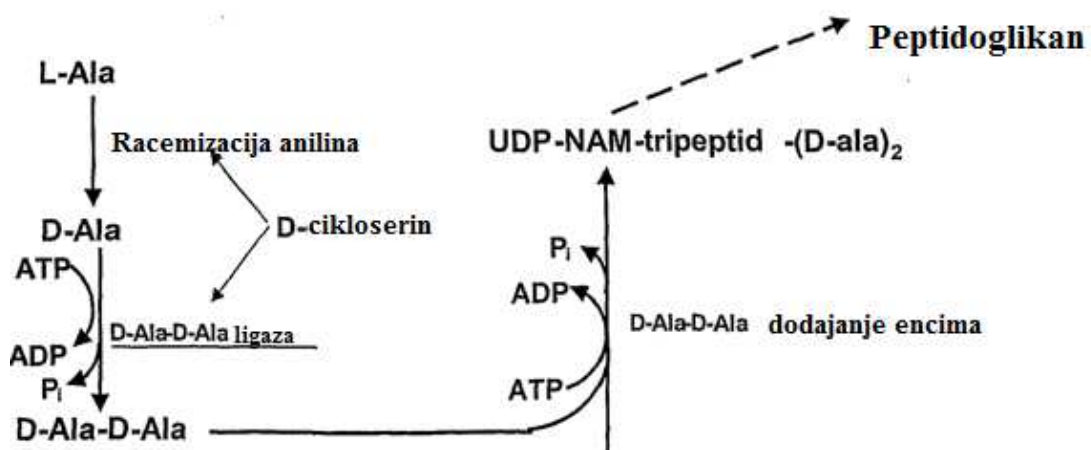
encimom se katalizira odcep terminalnega D-alanina v peptidni verigi, kar prepreči prečno povezavo. Transpeptidaza za svoje delovanje potrebuje D-alanin-D-alanin na koncu pentapeptidne verige (Slika 7) (28) (22) (29).



Slika 7: Shematski prikaz biosinteze peptidoglikana (30).

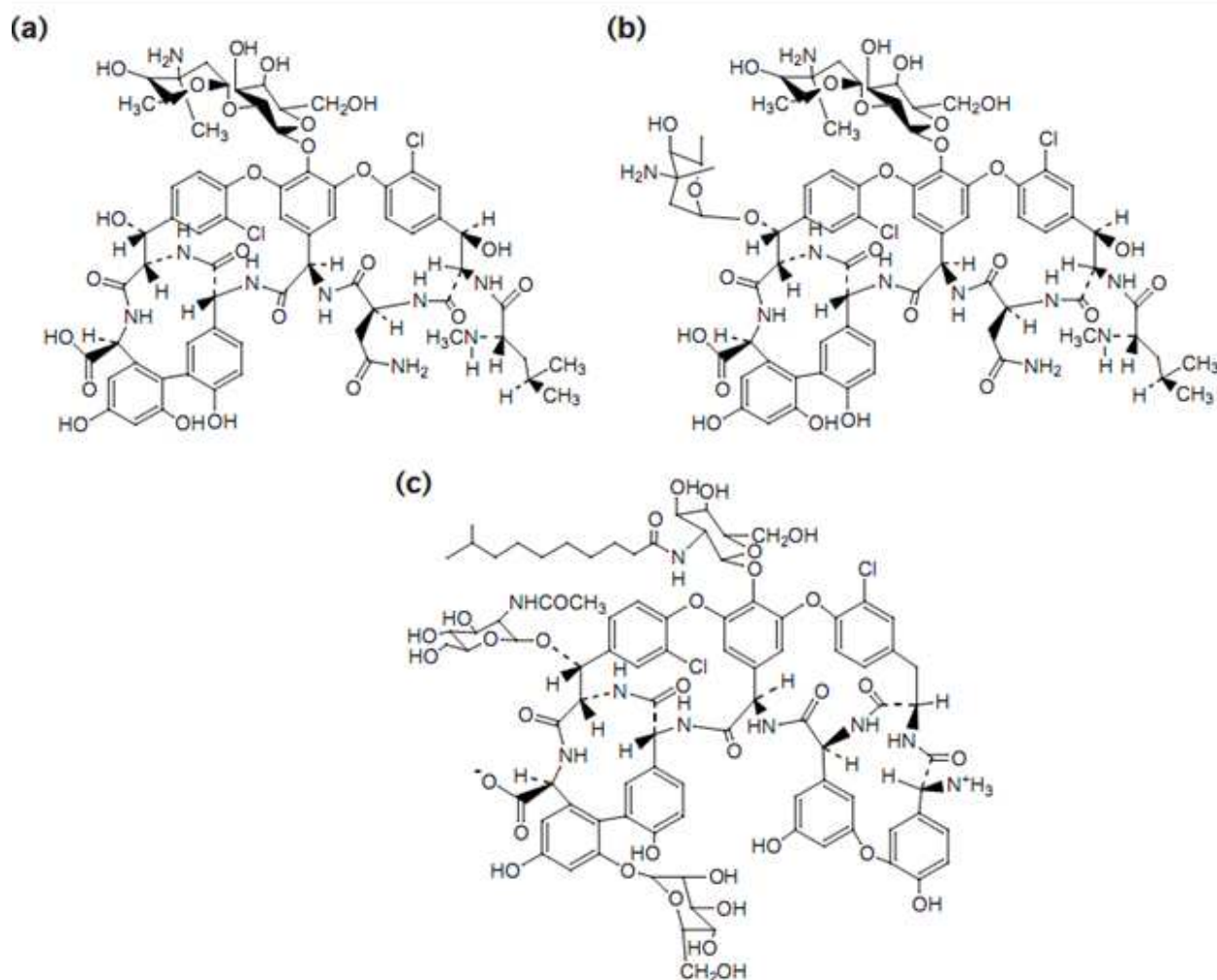
1.4 D-alanil-D-alanin ligaza

Kot je predstavljeno na sliki 8 ima D-Ala-D-Ala pomembno vlogo pri biosintezi bakterijske celične stene. Preko omenjenega dipeptida namreč poteka premreženje pentapeptidnih verig(31) (32). Na terminalni del UDP-MurNAc-pentapeptidnega prekursorja pripne dipeptid D-Ala-D-Ala ligaza Mur F (11).



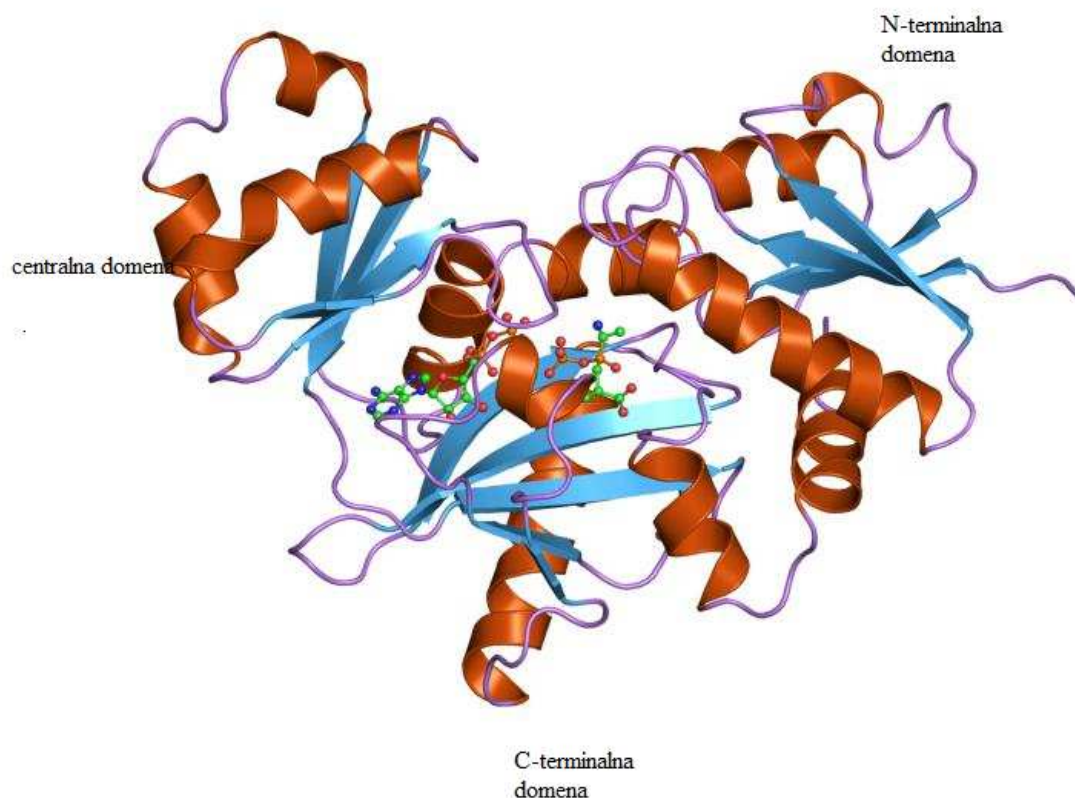
Slika 8: Sinteza dipeptida D-Ala-D-Ala (32) .

Vankomicin spada v skupino glikopeptidnih antibiotikov, ki so učinkoviti proti po Gramu pozitivnim in nekaterim po Gramu negativnim bakterijam. Nekatere po Gramu negativne bakterije so odporne na glikopeptidne antibiotike zaradi njihove neprepustne zunanje membrane. Glikopeptidni antibiotiki so sestavljeni iz osrednjega heptapeptida, ki je substituiran s 5-7 aromatskimi obroči in različnimi sladkornimi komponentami. V nasprotju s penicilini, ki se vežejo neposredno v aktivno mesto transpeptidaze, se vankomicin veže na D-Ala-D-Ala, ki je substrat encima. S to vezavo ciljno preprečimo nadaljnje delovanje transpeptidaz in transglikozilaz (33).



Slika 9: Struktura a) vankomicin, b) kloroeremomicin in c) teikoplanin (36).

Analiza dipeptidnih substratov ligaz D-Ala-D- $\times$ (kjer je $\times$ =alanin, serin ali laktat) je pokazala, da naddružino bakterijskih ligaz, sestavlja pet poddružin: dve D-Ala-D-Ala ligazi; dve D-Ala-D-Lac ligazi in D-Ala-D-Ser ligaza (32). DdLB je gen, ki je bil uspešno kloniran iz *Escherichia coli*, in ki so mu določili aminokislinsko zaporedje, ki ga ta gen kodira (34). Dokazano je bilo, da je gen DdlB esencialen za preživetje bakterij in spada v družino Ddl, D-Ala-D-Ala in D-Ala-D-Ser ligaz (VanC).



Slika 10: Kristalna struktura DdlB iz *E. coli* v kompleksu z ADP in fosforil fosfatnim inhibitorjem (35)

Zaradi svoje esencialnosti je raziskana DdlB izomorfna oblika. Molekulska masa omenjenega encima, ki obstaja kot dimer, je 63-65 kDa. Sestavljen je iz treh domen in sicer iz N-terminalne, centralne in C-terminalne domene. V njegovi strukturi pa najdemo še ATP-vezavno področje (Slika 10) (36).

2. NAMEN DELA

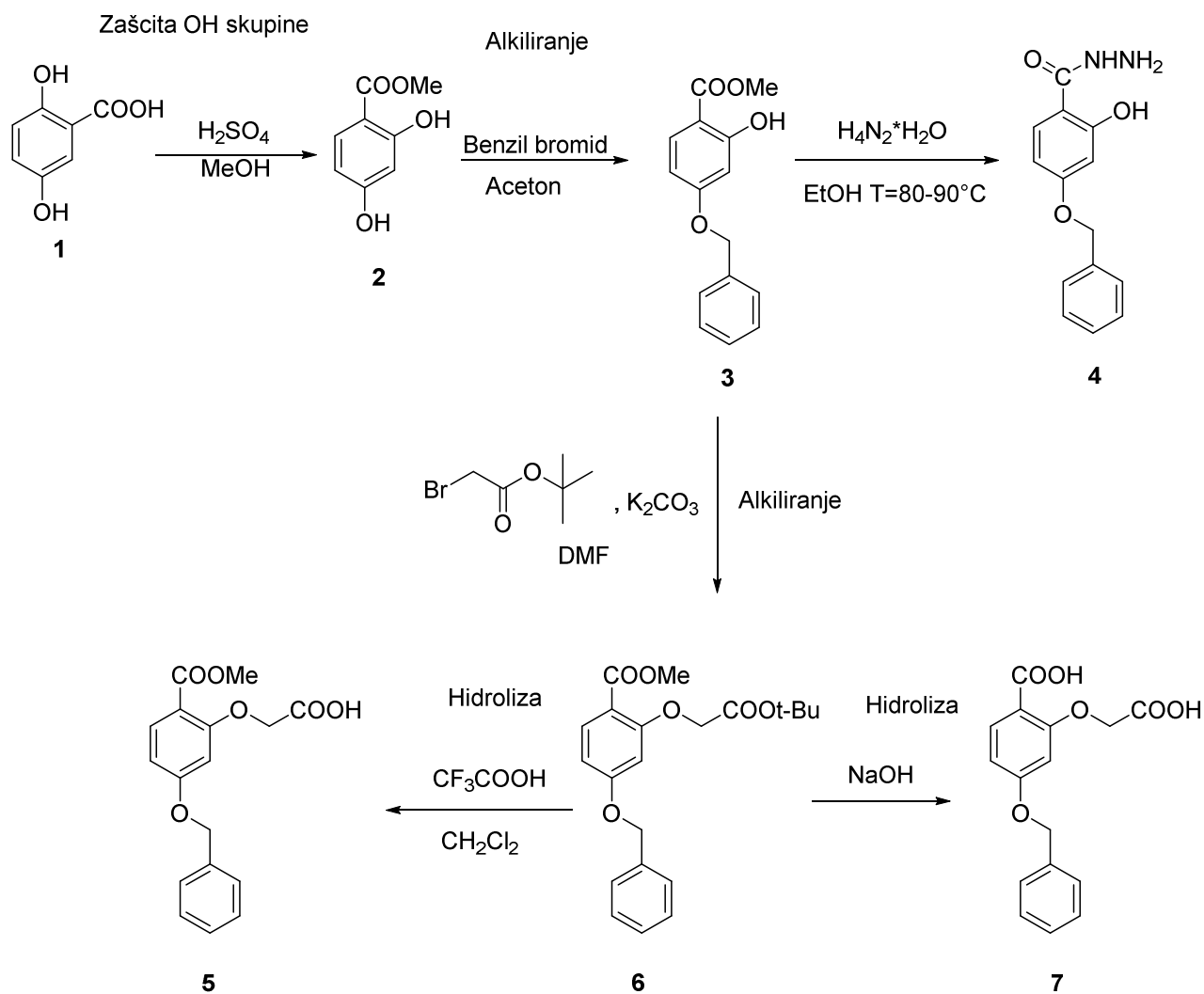
Namen magistrske naloge je sinteza novih potencialnih zaviralcev encima ligaze D-Ala-D-Ala. Encimi, vključeni v zgodnje, citoplazemske stopnje biosinteze peptidoglikana postajajo čedalje bolj zanimive tarče za sintezo protimikrobnih učinkovin. Mednje sodi tudi ligaza D-Ala-D-Ala. Pri načrtovanju naših spojin bomo kot ogrodje uporabili 2,4-dihidroksibenzojsko kislino (**1**, Slika 11), ki nam omogoča primerno prostorsko razporeditev funkcionalnih skupin končnih spojin. Sinteza končnih spojin bo večstopenjska, zato je v okviru magistrske naloge pripravljena tudi sintezna strategija.

Glavni namen našega raziskovalnega dela je sinteza štirih intermediatov, ki bi jih lahko uporabili pri sintezi končnih spojin, in sicer 4-(benziloksi)-2-hidroksibenzohidrazida (**4**), 2-(5-(benziloksi)-2-(metoksikarbonil)fenoksi)ocetne kisline (**5**) in 4-(benziloksi)-2-(karboksimetoksi)benzojske kisline (**7**, prva sintezna pot) ter sinteza oksadiazolnega derivata aminokisline L-Ala (**12**, druga sintezna pot).

2.1. Prva sintezna pot

Pri prvi sintezni poti bomo izhajali iz 2,4-dihidroksibenzojske kisline (**1**), pri kateri bomo najprej selektivno zaščitili posamezne funkcionalne skupine, ki bi lahko ovirale nadaljnjo sintezo. Reakcijo želimo izvajati na sterično ovirani in manj reaktivni fenolni -OH skupini, zato moramo predhodno zaščititi fenolno skupino na mestu 4 in karboksilno skupino.

Karboksilno skupino bomo pretvorili v metilni ester in alkilirali sterično manj ovirano fenolno skupino metil 2,4-dihidroksibenzoata (**2**) z benzilbromidom. Šele nato bomo izvedli alkiliranje s tercbutilnim estrom bromocetne kisline na preostali fenolni skupini. Estrski skupini uvrščamo v različna ortogonalna seta zaščitnih skupin, zato bomo posamezni estrski skupini lahko selektivno hidrolizirali, nakar bo v zadnji stopnji sledila še tvorba amidov oziroma hidrazidov.

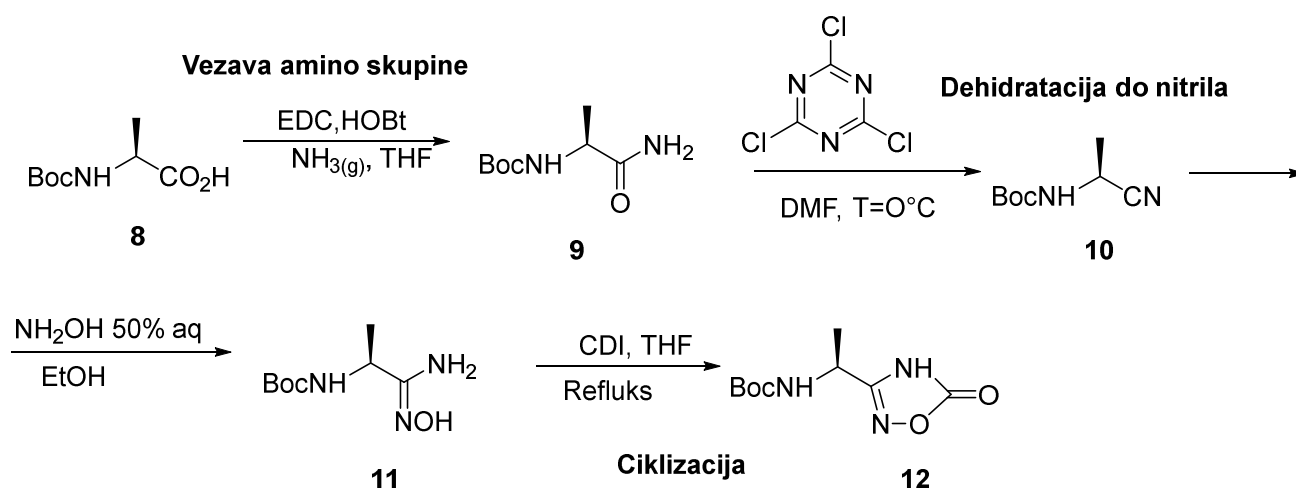


Slika 11: Tvorba 4-(benziloksi)-2-hidroksibenzohidrazida (4), 2-(5-(benziloksi)-2-(metoksikarbonil)fenoksi)ocetne kisline (5) in 4-(benziloksi)-2-(karboksimetoksi)benzojske kisline (7)

2.2. Druga sintezna pot

Namen druge sintezne poti (**Slika 12**) je sinteza oksadiazolov na aminokislinskih derivatih. Optično čiste α -amino-4*H*-(1,2,4)oksadiazol-5-one bomo pripravili iz α -aminokislin v petih sinteznih stopnjah. Oksadiazol se sicer uporablja tudi kot bioizosterna zamenjava za karboksilno skupino. V našem primeru ga bomo uporabili kot zaščiten prekurzor amidinske funkcionalne skupine, ki se ga da enostavno odstraniti s katalitskim hidrogeniranjem.

Da bi zaščitili karboksilno skupino, bomo le-to pretvorili v amid z amoniakom. Nastali amid bomo z dehidracijo pretvorili v nitril z uporabo klorida cianurične kisline v DMF. S hidroksilaminom v etanolu in vodi bodo nitrili reagirali do amidoksimov, ki jih bomo pretvorili v končne produkte z uporabo karbonildiimidazola v THF.



Slika 12: Mehanizem nastanka oksadiazol 12

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

Uporabili smo reagente in topila proizvajalcev Acros, Aldrich, Alkaloid, Fluka, Janssen, Kemika in Merck.

3.2. Aparature

Uporabljali smo standardno laboratorijsko opremo: rotavapor, laboratorijsko tehtnico, UV-lučko, magnetni mešalnik, eksikator, mikrovalovni reaktor

3.3. Metode

Tankoplastna kromatografija (TLC)

Uporabljali smo plošče Merck DC Fertigplatten Kieselgel 60 GF₂₅₄ z nanosom silikagela debeline 0,25 mm na aluminijskem nosilcu. Spojine smo detektirali s pomočjo UV svetilke z valovno dolžino $\lambda = 254$ nm in z orositvenimi reagenti: ninhidrin, bromkrezolno zeleno, FeCl₃ in fosfomolibdenska kislina.

Kolonska kromatografija pod povišanim tlakom (FLASH)

Nekatere spojine smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije. Za stacionarno fazo smo uporabili silikagel proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,04– 0,063 mm ali 0,063- 0,200 mm. Kot mobilne faze smo uporabili naslednja topila in mešanice topil:

Mobilna faza	Oznaka
heksan/etilacetat 1:1	MF(1)
heksan/etilacetat 2:1	MF(2)
Etilacetat	MF(3)
diklorometan/metanol 9:1	MF(4)
diklorometan/metanol 40:1	MF(5)
Diklorometan	MF(6)
heksan/etilacetat 5:1	MF(7)
heksan/etilacetat 10:1	MF(8)
diklorometan/metanol 7:1	MF(9)
heksan/etilacetat 6:1	MF(10)
heksan/etilacetat 4:1	MF(11)
diklorometan/metanol 7:1 + 1% očetne kisline	MF(12)
diklorometan/metanol 1:1 + 1% očetne kisline	MF(13)

Jedrska magnetna resonanca (NMR)

^1H NMR spektri so bili posneti z instrumentom Brunker Avance DP $\times_{400}$ na Fakulteti za farmacijo, ki deluje v okviru Centra za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti. Kot topilo smo uporabljali DMSO- d_6 , CDCl_3 . Spektri so bili posneti pri 400 MHz.

Masna spektrometrija (MS)

Masne spektre so nam posneli na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani s pomočjo spektrometra Varian- MAT 311 A z EI, ESI tehniko.

Tekočinska kromatografija (HPLC)

Spojine smo analizirali tudi z metodo HPLC na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani s pomočjo HPLC sistema Agilent Series 1100 (kolona Agilent EclipsePlus C18, 150×4.6 mm, pretok 1.0 ml/min, Vinj 5 ul, 25 °C, 220 in 254 nm).

Reakcijske sheme in posamezne strukture so narisane s pomočjo računalniškega programa Symyx Draw 4.0.

IR spektroskopija (IR)

IR spektri so bili posneti s spektrometrom Perkin Elmer 1600 FT-IR na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

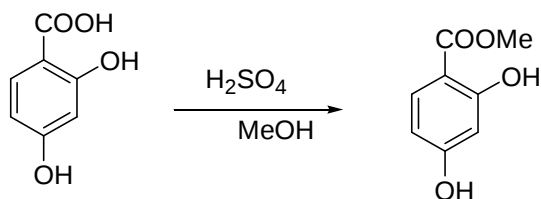
Tališče

Tališče spojin smo določevali s Koflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. PRVA SINTEZNA POT

4.1.1. Sinteza metil 2,4-dihidroksibenzoata (2)



12,0 g 2,4-dihidroksibenzojske kisline smo raztopili v 60 mL MeOH, dodali 5 mL H_2SO_4 ter segrevali pri temperaturi vrenja 24 h. Ko smo vsebino bučke zlili na ledeno kopel, so nastali beli kristali, ki smo jih odfiltrirali s presesavanjem in posušili na zraku..

Izkoristek: 76%

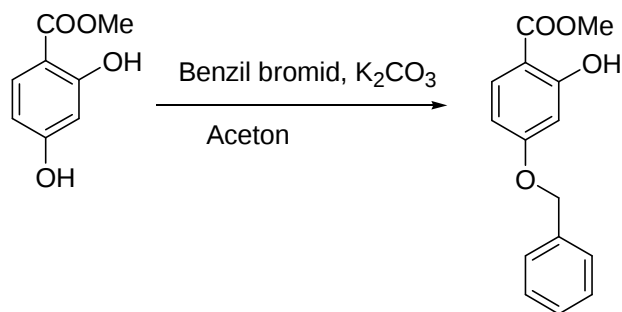
Elementna sestava: $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$

M = 168,15 g/mol

R_f = 0,44 (MF 1)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.85 (s, 3H, CH_3), 6.30 (d, J = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 6.37 (dd, J = 8.7, 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.64 (d, J = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 10.48 (s, 1H, OH), 10.72 (s, 1H, OH) ppm.

4.1.2. Sinteza metil 4-(benziloksi)-2-hidroksibenzoata (3)



10,3 g (61,2 mmol) metil 2,4-dihidroksibenzoata (2) smo raztopili v 56 mL acetona in dodali 12,0 g (61,0 mmol) K_2CO_3 ter bučko prepihali z Ar. Pri 0 °C smo nato po kapljicah dodali 7,3 mL benzilbromida. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odstranili odvečno topilo. Surovo reakcijsko zmes smo raztopili v 120 mL EtOAc in sprali s 70 mL destilirane H_2O . Vodno fazo smo nato ekstrahirali z EtOAc (5×40 mL) ter sprali združene organske frakcije z 20 mL nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko topilo smo nato sušili z brezvodnim Na_2SO_4 in pod znižanim tlakom sušili do suhega. Bučko z vsebino smo ohladili na vodni kopeli, kjer nastanejo beli kristali.

Izkoristek: 69%

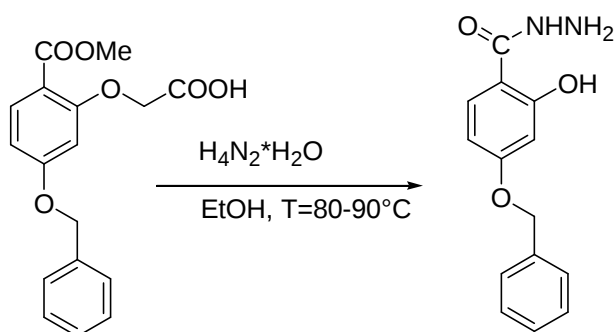
Elementna sestava: $C_{15}H_{14}O_4$

M = 258,27 g/mol

R_f = 0,14 (MF 7)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.94 (s, 3H, CH_3), 5.11 (s, 2H, CH_2), 6.57-6.54 (m, 2H, Ar-H), 7.46-7.34 (m, 5H, Ar-H), 7.77 (dd, J = 8.6, 0.6 Hz, 1H, Ar-H), 10.99 (s, 1H, OH) ppm.

4.1.3. Sinteza 4-(benziloksi)-2-hidroksibenzohidrazida (4)



100 mg (0,268 mmol) 2-(5-(benziloksi)-2-(metoksikarbonil)fenoksi)ocetne kisline (5) smo raztopili v 5 mL brezvodnega EtOH in počasi dokapavali 0,1 mL (2 mmol) hidrazin hidrata. Reakcijo smo izvajali pod refluxom pri $T=80-90^\circ\text{C}$. Po končani reakciji smo odfiltrirali nastale kristale in jih posušili na zraku.

Izkoristek: 15%

Elementna sestava: $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$

M_r = 258,27 g/mol

R_f = 0,71 (MF 13)

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 4.54 (s, 1H, Ar-H), 5.12 (s, 2H, Ar-H), 6.52-6.50 (d, 2H, CH_2), 7.74-7.32 (m, 5H, Ar-H), 9.89 (dd, 1H, OH), 10.17 (s, 1H, NH), 13.32 (s, 1H, NH_2) ppm.

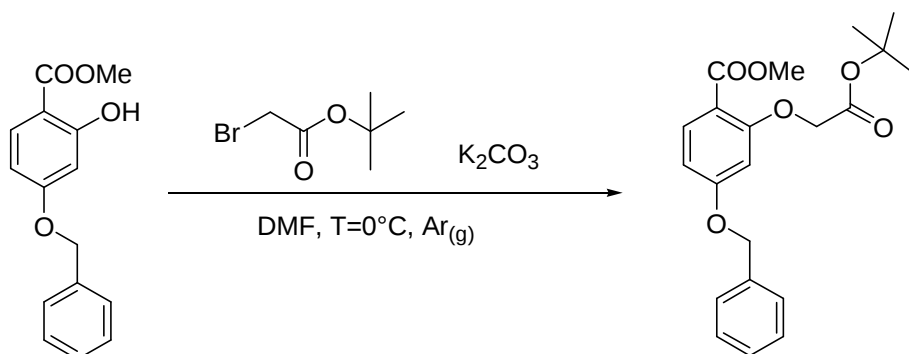
MS (ESI): 258 (M^+H , 100)

IR: 2979, 1759, 1633, 1600, 1572, 1128, 1009, 817, 750, 697 cm^{-1}

Tališče: 190-195 $^\circ\text{C}$

HPLC: 93% čistost, $\lambda=220\text{nm}$, $t_r=5,1$ min ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, gradient 40% CH_3CN do 90% CH_3CN v 15 min, CH_3CN na 95% v 17,5 min, post time 6 min).

4.1.4. Sinteza metil 4-(benziloksi)-2-(2-(*tert*-butoksi)-2-oksoetoksi)benzoata (6)



Natehtali smo 4,0 g (15,5 mmol) 4-(benziloksi)-2-hidroksibenzoata (**3**) in dodali 2,4 g (17 mmol) K_2CO_3 . Po 3 minutah prepihovanja bučke z $Ar_{(g)}$ na ledeni kopeli smo dodali 36 mL DMF in počasi dokapavali 2,5 mL (1,1 ekv.) *tert*-butilbromoacetata ter pustili, da se je reakcijska zmes med mešanjem v 24 urah segrela do sobne temperature. Po končani reakciji je sledila ekstrakcija. V bučko smo dodali 200 mL EtOAc, in sprali z 20 mL destilirane H_2O , 2×20 mL 10% citronske kisline in z 20 mL nasičene raztopine NaCl. Po sušenju organske faze z brezvodnim Na_2SO_4 smo bučko z vsebino hladili na vodni kopeli, odfiltrirali nastale majhne bele kristale s presesavanjem in jih posušili na zraku.

Izkoristek: 85%

Elementna sestava: $C_{21}H_{24}O_6$

M= 372,41 g/mol

R_f = 0,20 (MF 8)

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.42 (s, 9H, Boc), 3.75 (s, 3H, CH_3), 4.76 (s, 2H, CH_2), 5.16 (s, 2H, CH_2), 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.

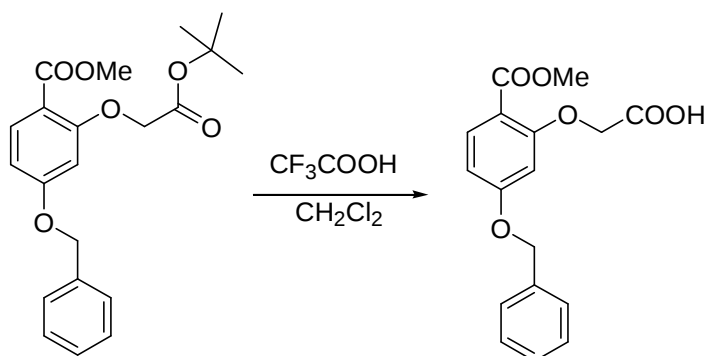
MS (ESI): m/z (%) 372 ($M+H$, 100)

IR: 1759, 1693, 1600 1298, 1200, 1127, 750, 699 cm^{-1}

Tališče: 68-70 $^\circ C$

HPLC: 95% čistost, $\lambda=220$ nm, $t_r=14,9$ min (CH_3CN/H_2O , gradient 20% CH_3CN do 90% CH_3CN v 15 min, CH_3CN na 95% v 17,5 min, post time 6 min)

4.1.5. Sinteza 2-(5-(benziloksi)-2-(metoksikarbonil)fenoksi)ocetne kisline (5)



Natehtali smo 100 mg (0,268 mmol) metil 4-(benziloksi)-2-(2-(*tert*-butoksi)-2-oksoetoksi)benzoata (**4**) in dodali 6 mL CH_2Cl_2 in 2 mL CF_3COOH (volumsko razmerje 3:1). Po končani reakciji smo odparili topilo in izvedli prekrizalizacijo iz EtOAc. Nastali so svetlo rumeni kristali.

Izkoristek: 93%

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

M= 316,31 g/mol

R_f = 0,81 (MF 4)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.72 (s, 3H, CH_3), 4.78 (s, 2H, CH_2), 5.14 (s, 2H, CH_2), 6.63 (d, J = 2.27 Hz, 1H, Ar-H), 6.72 (dd, J = 8.7, 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.33-7.49 (m, 5H, Ar-H), 7.72 (d, J = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 12.9 (br, 1H, COOH) ppm.

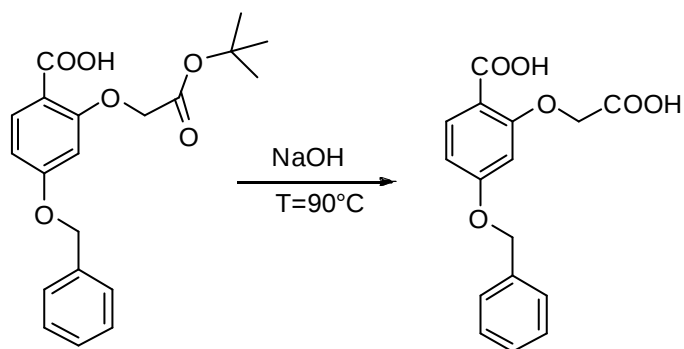
MS (ESI): m/z (%) 316 ($\text{M}+\text{H}$, 100)

IR: 2949, 1747, 1709, 1601, 1577, 1508, 1241, 1136, 1092, 1006, 817, 772, 704 cm^{-1}

Tališče: 110-120 $^\circ\text{C}$

HPLC: 96% čistost, $\lambda=220\text{nm}$, $t_r=5,1$ min ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, gradient 40% CH_3CN do 90% CH_3CN v 15 min, CH_3CN na 95% v 17,5 min, post time 6 min).

4.1.6. Sinteza 4-(benziloksi)-2-(karboksimetoksi)benzojske kisline (7)



100 mg (0,268 mmol) metil 4-(benziloksi)-2- (2-(*terc*-butoksi)-2-oksoetoksi)benzoata (**4**) smo raztopili v 2 mL 1M NaOH in segrevali čez noč pod refluxom pri $T = 90^{\circ}\text{C}$. Po končani reakciji smo dodali 10 mL H₂O in sprali z 2×20 mL EtOAc. Vodno fazo smo nato nakisali z 1M HCl, do pH = 1. Oborino, ki ob tem nastane smo prefiltrirali in sušili v sušilniku.

Izkoristek: 53%

Elementna sestava: C₁₆H₁₄O₆

M= 302,28g/mol

R_f = 0,417 (MF1)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.81 (s, 2H, CH₂), 5.15 (s, 2H, CH₂), 6.65 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, Ar-H), 6.72 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 1H, Ar-H), 7.33-7.49- (m, 5H, CH₂), 7.74 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, Ar), 11.5-14.0 (s, 2H, COOH) ppm.

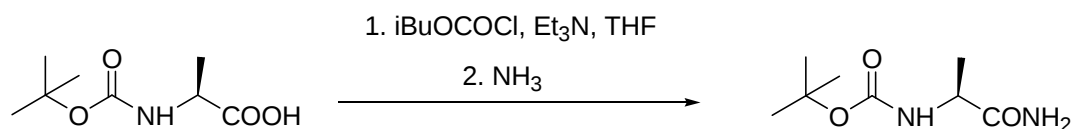
MS (ESI): m/z (%) 302 (M+H, 100)

IR: 3342, 1795, 1738, 1682, 1515, 1296, 948, 750, 627 cm⁻¹

Tališče: 155-160 °C

4.2. DRUGA SINTEZNA POT

4.2.1. Sinteza *tert*-butil (S)-(1-amino-1-oksopropan-2-il)karbamata (9)



10,00 g (58,3 mmol) Boc-L-alanina (**8**) in 8,0 mL (60 mmol) Et_3N smo raztopili v 200 mL brezvodnega THF in prepihali z Ar pri $-10\text{ }^\circ\text{C}$. K ohlajeni raztopini smo nato po kapljicah med mešanjem dodali $i\text{BuOCCl}$ in po 1 uri začeli z uvajanjem plinastega NH_3 . Po 20 minutah smo vsebino bučke prenesli v lij ločnik, dodali 200 mL EtOAc in sprali z $2 \times 50\text{ mL}$ 10% citronske kisline, $2 \times 50\text{ mL}$ NaHCO_3 in 50 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z brezvodnim Na_2SO_4 in po filtraciji odparili topilo pod znižanim tlakom, da smo dobili bele kristale.

Izkoristek: 40%

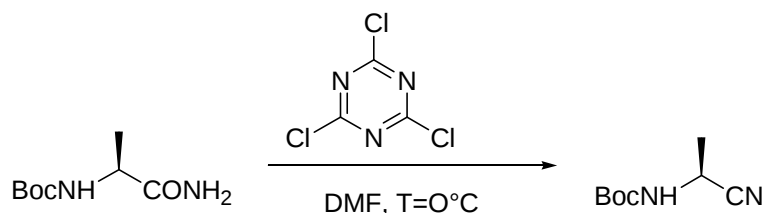
Elementna analiza: $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$

M = 188,22 g/mol

R_f = 0,27 (MF 3)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.16 (d, $J = 7.2\text{ Hz}$, 3H, CH_3), 1.38 (s, 9H, t-Bu), 3.88 (qd, $J = 7.2\text{ Hz}$, 7.7 Hz, 1H, CH), 6.78 (d, $J = 7.7\text{ Hz}$, 1H, NH), 6.92 (s, 1H, NH_2), 7.22 (s, 1H, NH_2) ppm.

4.2.2. Sinteza *tert*-butil (S)-(1-cianoetil)karbamata (10)



1,05 g amida (9) smo raztopili v 30 mL brezvodnega DMF in bučko prepihali z Ar. Nato smo na 0 °C postopoma dodali 1,37 g (5,31 mmol) klorida cianurične kisline. Po 1h mešanja smo dodali 100 mL 0,5 M NaOH in izvedli ekstrakcijo. Vodno fazo smo spirali s 3×50 mL EtOAc in sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Odvečno topilo smo odparili in izvedli prekrizalizacijo. Nastali so beli igličasti kristali.

Izkoristek: 96%

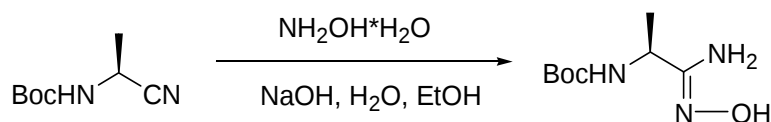
Elementna analiza: C₈H₁₄N₂O₂

M = 170,21 g/mol

R_f = 0,67 (MF 3)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.47 (s, 1H, Boc), 1.55 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 4.63 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, CH), 4.80 (s, 1H, NH) ppm.

4.2.3. Sinteza *tert*-butil (S,Z)-(1-amino-1-(hidroksiimino)propan-2-il)karbamata (11)



200 mg (1,17 mmol) *tert*-butil (S)-(1-cianoetil)karbamata (10) smo raztopili v 2,6 mL EtOH, ohladili na ledeni kopeli in dodali 0,4 mL (7,4 mmol) raztopine hidroksilamina. Po končani reakciji smo odvečno topilo odparili pod znižanim tlakom in dobili bele kristale, ki smo jih raztopili v 25 mL vode. Spojino smo nato ekstrahirali s spiranjem s 5×20 mL EtOAc,

združene organske frakcije pa smo nato sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Po filtraciji smo topilo odstranili pod znižanim tlakom, ob čemer so nastali beli kristali

Izkoristek: 14%

Elementna sestava: C₈H₁₇N₃O₄

M = 204,13 g/mol

R_f = 0,61 (MF 9)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ1.18 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 1.37 (s, 9H, BOC), 4.03 (dq, *J* = 9.0, 7.1 Hz 1H, CH), 5.24 (s, 2H, NH₂), 6.81 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, NH), 8.94 (s, 1H, OH) ppm.

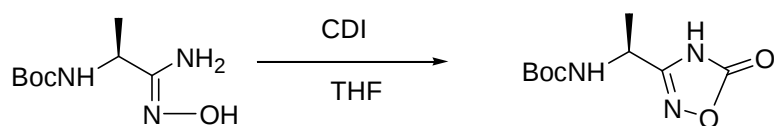
MS (ESI): m/z (%) 204 (M⁺, 100)

IR: 3342, 1797, 1739, 1682, 1515, 1297, 753 cm⁻¹

Tališče: 140-150°C

HPLC: 97% čistost, λ = 220nm, t_r = 10,2 min (CH₃CN/H₂O, gradient 30% CH₃CN do 50% CH₃CN v 15 min, 95% CH₃CN v 17 min, post time 6 min)

4.2.4. Sinteza *tert*-butil (S)-(1-(5-okso-4,5-dihidro-1,2,4-oksadiazol-3-il)etil)karbamata (12)



50 mg (0,25 mmol) *tert*-butil-S-(1-amino-1-(hidroksiimino)propan-2-il)karbamata (**11**) smo raztopili v 4,7 mL (0,32 mmol) brezvodnega THF, dodali 78 mg (0,48 mmol) CDI in nato reakcijsko zmes segrevali pri temperaturi vrenja 24ur. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes raztopili v 30 mL EtOAc, ekstrahirali z 2×20 mL 1M NaOH in združene vodne frakcije nakisali z 1M HCl do pH=3-4. Vodno fazo smo nato ekstrahirali z 2×20 mL EtOAc in nato združene organske frakcije sprali z 20 mL nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo

smo sušili z brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in izvedli prekristalizacijo s petroletrom. Bučko smo dali v zmrzovalnik, kjer so začeli nastajati svetlorumeni kristali, ki smo jih prefiltrirali.

Izkoristek: 29%

Elementna sestava: C₉H₁₅N₃O₄

M = 229,23 g/mol

R_f = 0,65 (MF 9)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.33 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 1.40 (s, 9H, Boc), 4.53 (dq, *J* = 7.5, 7.0 Hz 1H, CH), 7.44 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH), 12.34, 11.98 (s, 1H, OH) ppm.

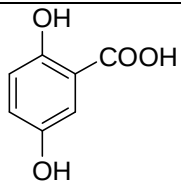
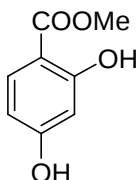
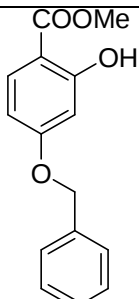
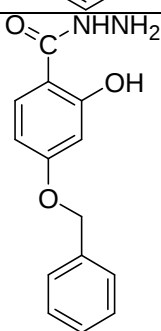
MS ESI: *m/z* (%) 228 (M-H, 100).

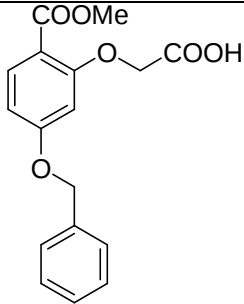
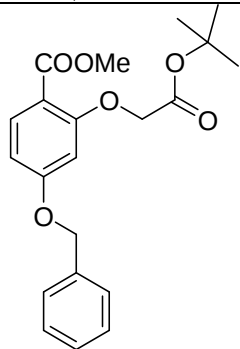
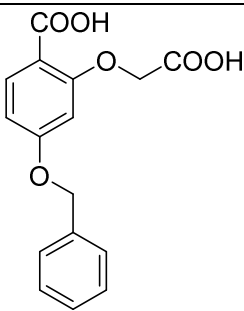
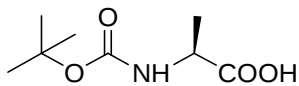
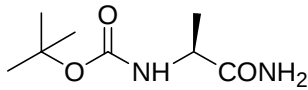
HPLC: 95% čistost, λ=220nm, t_r= 5,1 min (CH₃CN/H₂O , gradient 40% CH₃CN do 90% CH₃CN v 15 min, CH₃CN na 95% v 17,5 min, post time 6 min).

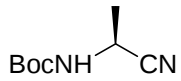
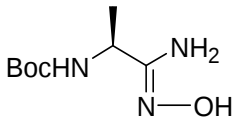
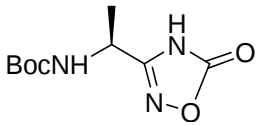
5. RAZPRAVA IN REZULTATI

5.1. Rezultati

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali naslednje spojine:

STRUKTURA SPOJINE	ŠTEVILKA SPOJINE
	1
	2
	3
	4

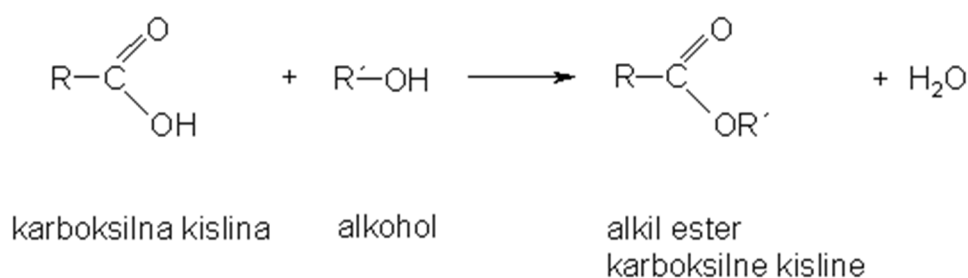
	5
	6
	7
	8
	9

	10
	11
	12

5.2. Razprava o prvi sintezni poti

5.2.1. Sinteza metil-2,4-dihidroksibenzoata (2)

Začetna stopnja sinteze je estrenje 2,4-dihidroksibenzojske kisline. Ester je kemijska spojina, za katero je značilna --COO-- funkcionalna skupina, ki nastane ob reakciji alkoholov in karboksilnih kislin. Pri reakciji, ki je reverzibilna in kislinsko katalizirana, poleg estra nastaja tudi voda (**Slika 13**). Hitrost, s katero se vzpostavi ravnotežje, je odvisna tako od strukture uporabljene kisline kot od alkohola. Kot pri vseh ravnotežnih reakcijah lahko tudi tu pomaknemo ravnotežje proti desni z uporabo prebitka alkohola ali z odstranjevanjem produktov iz reakcijske zmesi. Zato smo spojino raztopili v večji količini MeOH in počasi dodajali H_2SO_4 , ki deluje kot katalizator. Ob raztapljanju H_2SO_4 v MeOH se temperatura reakcijske zmesi dvigne, saj je reakcija solvatacije H_2SO_4 eksotermna. Bučko, ki smo jo opremili s povratim hladilnikom, smo prepihovali z argonom 15 minut, da bi odstranili prisotno vlago in kisik. Vsebinsko v bučki smo mešali pod refluxom in pustili, da reakcija poteče v času 24 ur. Spojino smo izolirali tako, da smo reakcijsko zmes počasi ob mešanju zlili na led, ki je zaradi svoje nizke temperature upočasnil morebitno hidrolizo v kislem vodnem mediju. Nastali so kristali, ki smo jih odfiltrirali s presesavanjem in sušili pod znižanim tlakom. Izkoristek te reakcije je 76%.



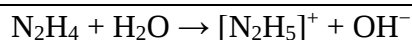
Slika 13: Shematski prikaz estrenja

5.2.2. Sinteza metil 4-(benziloksi)-2-hidroksibenzoata (3)

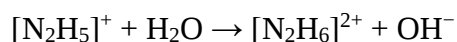
Nadaljnja sintezna stopnja prikazuje sintezno pot iz metilnega estra 2,4-dihidroksibenzojske kisline (2) v metilni ester 4-benzil-2-hidroksibenzojske kisline (3). Reakcija poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije. Izhodno spojino (2) smo raztopili v acetonu, kjer se je dobro raztapljala. Zato, da smo iz raztopine odstranili vlago, ki bi lahko reagirala z benzilbromidom, smo pred nadaljevanjem naslednje sintezne stopnje reakcijsko zmes preprihovali z argonom 15 minut. Zaradi tvorbe HBr med reakcijo smo za nevtralizacijo dodali bazo K_2CO_3 . Ker smo želeli, da reakcija poteče samo z $-OH$ skupino na mestu 4 in ne na sterično oviranem mestu 2, smo reakcijo izvajali na ledeni kopeli. Nastanek produkta smo preverjali s TLC, po končani reakciji pa smo vsebino v bučki sušili pod znižanim tlakom. Posušen vzorec (nastalo oborino) smo nato raztopili v EtOAc in organsko fazo spirali z 10 % raztopino citronske kisline, da je prišlo do nevtralizacije K_2CO_3 , ki se ni porabila pri reakciji. EtOAc smo nato spirali z nasičeno raztopino $NaHCO_3$, da smo nevtralizirali ostanke citronske kisline in nato še z nasičeno raztopino NaCl, s pomočjo katere smo odstranili vodo v organski fazi. S sušenjem organske faze z brezvodnim Na_2SO_4 smo nato vodo odstranili še kvantitativno. Produkt metil 4-(benziloksi)-2-hidroksibenzoat (**spojina 3**), ki smo ga dobili na zgoraj opisan način, je bil dovolj čist, da smo ga lahko brez nadaljnjega čiščenja uporabili v naslednji sintezni stopnji. Izkoristek te sintezne stopnje je bil 69 %.

5.2.3. Sinteza 4-(benziloksi)-2-hidroksibenzohidrazida (4)

4-(benziloksi)-2-hidroksibenzohidrazid (**4**) sintetiziramo iz 2-(5-(benziloksi)-2-(metoksikarbonil)fenoksi)ocetne kisline (3), ki smo jo raztopili v brezvodnem EtOH in počasi dokopavali 5 ekvivalentov hidrazin hidrata. Gre za strupeno (kancerogeno) brezbarvno oljno tekočino bazičnega značaja, ki ima vonj po amoniaku. Spada v kemijsko skupino diaminov. Čisti hidrazin je brezbarvna tekočina, ki vre pri 113,5 °C in pri 250 °C razpade na amoniak in dušik. V kislih raztopinah deluje kot oksidant v bazičnih pa kot reducent. Z aldehidi in ketoni daje kristalinične hidrazone, ki so slabo topni. Ker se v vodi dobro topi, ga uporabljamo v vodni raztopi kot hidrazin hidrat ($N_2H_4 \times H_2O$). V farmacevtski industriji se ga uporablja kot prekurzor različnih reagentov. Hidrazin ima bazične lastnosti, ki so primerljive z lastnostmi amoniaka.



Hidrazin se s težavo diprotonira.



Slika 14: Prikaz bazičnih lastnosti

Reakcijo smo zaradi strupenosti hidrazin hidrata izvajali previdno pod refluksom pri 80—90 °C, pri čemer smo pazili, da reagent ne uhaja iz bučke. Mehanizem reakcije je nukelofilna adicija z nadaljnjo eliminacijo. Ker smo ob analizi rezultatov TLC v reakcijski zmesi še vedno opazili znatne količine izhodne spojine, smo po 24 urah mešanja pri temperaturi vrenja dodali še 5 ekvivalentov hidrazin hidrata in nadaljevali z mešanjem pri temperaturi vrenja nadaljnjih 24 ur. Ko je reakcija potekla smo dodali majhno količino H_2O , da so se tvorili kristali, ki smo jih nato filtrirali. Izkoristek te sintezne poti je bil 69 %.

5.2.4. Sinteza 2-(5-(benziloksi)-2-(metoksikarbonil)fenoksi)ocetne kisline (5)

Sintezo nadaljujemo iz metil 4-(benziloksi)-2-(2-(*tert*-butoksi)-2-oksoetoksi)benzoata (**6**), ki smo ga raztopili v CH_2Cl_2 , kjer je reakcijska zmes dobro topna. Po kapljicah smo dodajali CF_3COOH v razmerju $\text{V}(\text{CF}_3\text{COOH}):\text{V}(\text{CH}_2\text{Cl}_2)=1:3$. Trifluorocetna kislina je zelo močna kislina in jo uporabljamo za odstranjevanje *tert*-butilne skupine, kot jo prikazuje **slika 11** (sintezna pot iz **spojine 4** v **spojino 5**). Reakcijska zmes se je mešala nekaj ur, sam potek reakcije pa smo preverjali s TLC. Po odstranjevanju topila smo dodali EtOAc, ki povzroči izpadanje kristalov, ki smo jih filtrirali in spirali s hladnim EtOAc. Prekristalizacijo smo nato ponovili tako, da smo matičnico ponovno dali v zamrzovalnik. Na ta način smo izboljšali končni izkoristek reakcije, ki je bil 93 %.

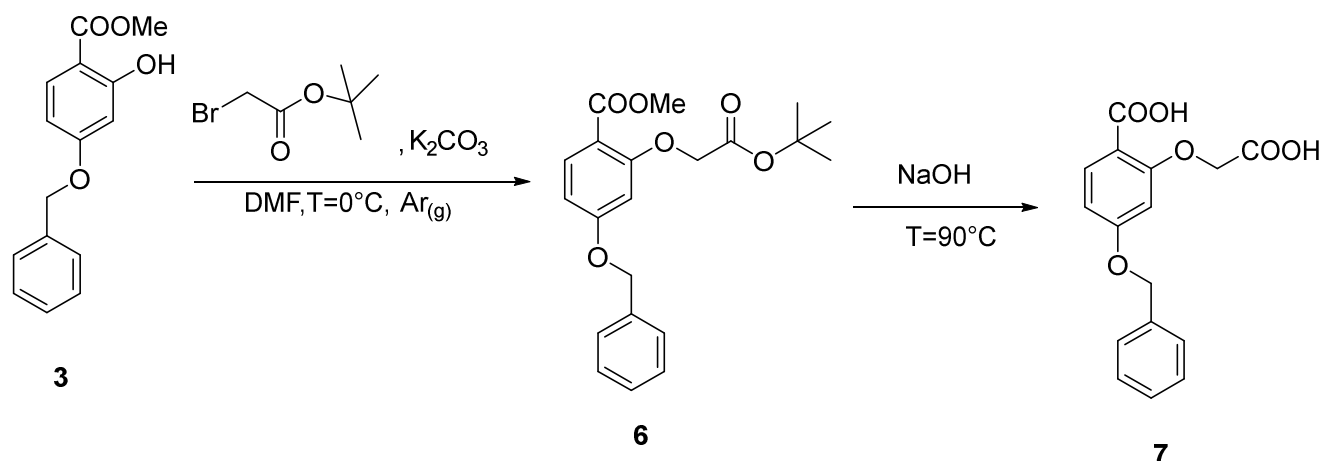
5.2.5. Sinteza metil 4-(benziloksi)-2-(2-(*tert*-butoksi)-2-oksoetoksi)benzoata (6)

Sinteza pot poteka iz metil 4-(benziloksi)-2-hidroksibenzoata (**3**). Bučko smo najprej prepihali z argonom 15 minut, da smo odstranili kisik in vlago, ter dodali 1,1 ekvivalenta K_2CO_3 kot bazo, da nevtraliziramo HBr, ki nastaja pri sintezi. Po dodani bazi smo bučko ponovno

prepihali z argonom in dodali topilo DMF. *Terc*-butilbromoacetat smo dodajali postopoma po kapljicah pri temperaturi 0 °C, saj je reakcija zaradi nevtralizacije baze lahko zelo burna. Mehanizem reakcije je nukleofilna substitucija. Po končani reakciji smo nastalo oborino posušili do suhega z rotavaporjem in jo raztopili v EtOAc. Suhi ostanek v bučki in organsko fazo smo spirali z 10 % raztopino citronske kisline, da je prišlo do nevtralizacije K₂CO₃, ki se ni porabil pri reakciji. EtOAc smo nato spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃, da smo nevtralizirali ostanke citronske kisline in nato še z nasičeno vodno raztopino NaCl, s pomočjo katere smo odstranili vodo v organski fazi. S sušenjem organske faze z brezvodnim Na₂SO₄ smo vodo iz organske faze odstranili še kvantitativno. Produkt metil 4-(benziloksi)-2-(2-(*terc*-butoksi)-2-oksoetoksi)benzoat (**6**), ki smo ga dobili na zgoraj opisan način, je bil dovolj čist, da smo ga brez nadaljnjega čiščenja lahko uporabili v naslednji sintezni stopnji. Izkoristek te sintezne stopnje je bil 85 %.

5.2.6. Sinteza 4-(benziloksi)-2-(karboksimetoksi)benzojske kisline (**7**)

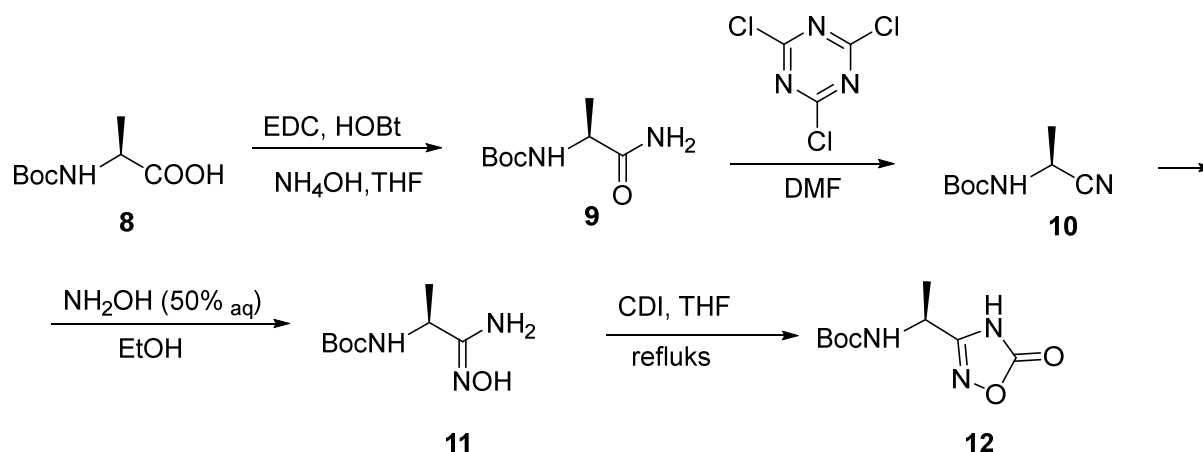
Sintezo smo nadaljevali iz metil 4-(benziloksi)-2-(2-(*terc*-butoksi)-2-oksoetoksi)benzoata (**6**), ki smo ga raztopili v 1M NaOH in raztopino segrevali 24h pri refluxu. Baza NaOH sproži hidrolizo obeh estrskih skupin, metilne in *terc*-butilne, do dikarboksilne kisline. Po koncu reakcije smo izvedli delno ekstrakcijo. Zaradi majhnega začetnega volumna smo dodali vodo, kar nam je olajšalo ekstrakcijo. Naša spojina je v obliki soli bolj polarna in bolj vodotopna kot izhodna spojina, zato ob spiranju z etilacetatom izhodna spojina preide v organsko fazo, produkt pa ostane v vodni fazi. Vodno fazo smo nato nakisali s HCl do pH=1, s tem smo produkt pretvorili v neionizirano obliko, ki je slabše topna v vodi in izpade v obliki suspenzije. Po filtraciji smo matičnico še dodatno ekstrahirali z EtOAc saj je del produkta po filtraciji še vedno ostal raztopljen v vodi. Delce, ki so nastali po obeh postopkih izolacije smo prefiltrirali in sušili 1h v sušilniku. Izkoristek reakcije je bil 59 % (**Slika 15**).



Slika 15: Shematski prikaz alkiliranja spojine 3s *tert* butilnim estrom bromocetne kisline in nadaljnja hidroliza do spojine 7

5.3. Razprava o drugi sintezni poti

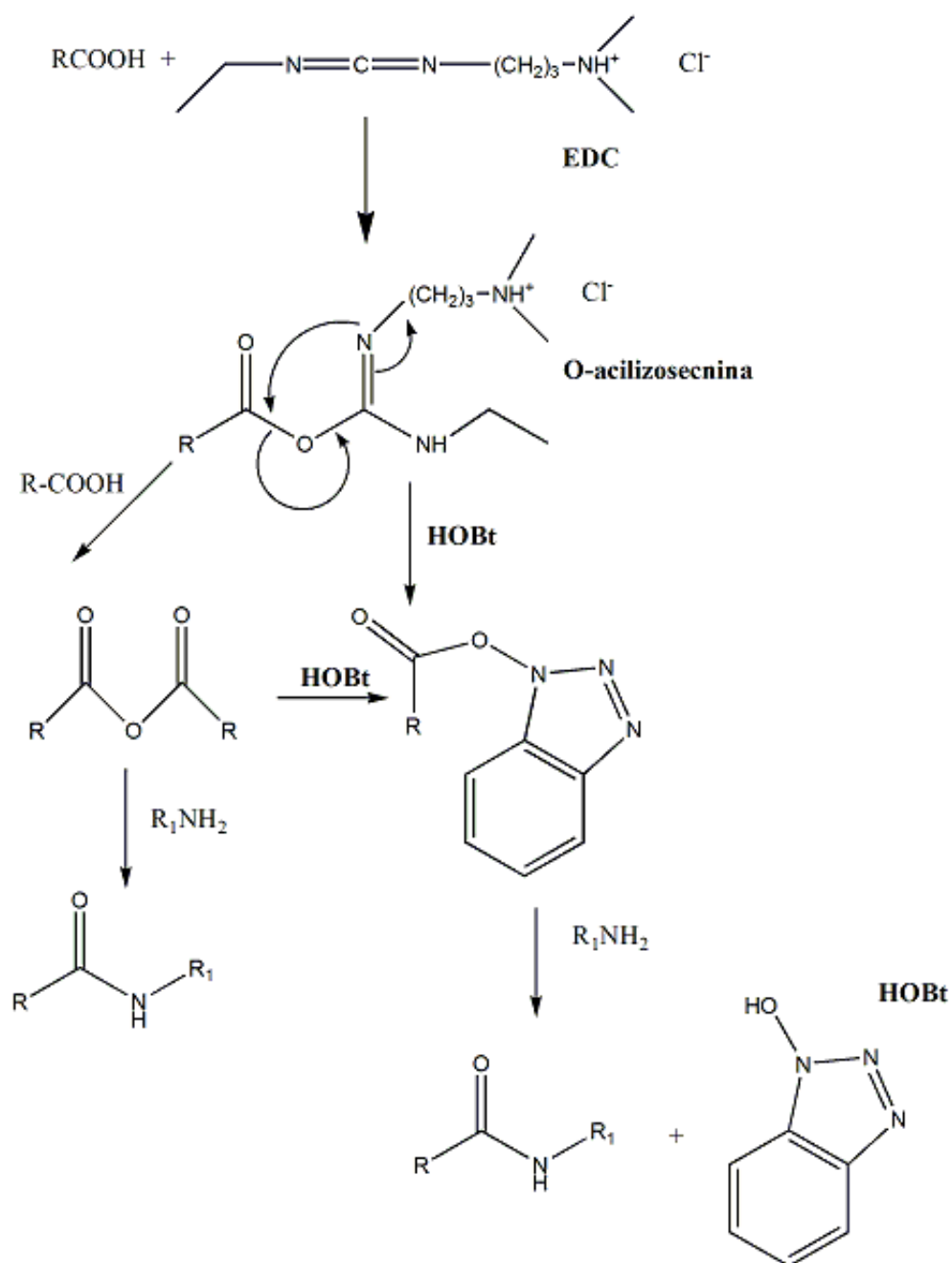
Razvili smo splošno sintezno pot, ki je predstavljena na **sliki 16**. S *tert*-butil karbamatom zaščiteno aminokislino **8** smo s pomočjo EDC in HOBT pretvorili v amid **9**, ki smo ga nato s pomočjo klorida cianurične kisline dehidrirali v nitril **10**. Ta pot oz. postopek je relativno enostaven, poleg tega med samo sintezo tudi ne pride do racemizacije na α -C atomu aminokislinskih derivatov. Po reakciji nitrila **10** s 50 % etanolno raztopino hidroksilamina nastane hidroksiamidin **11**, ki smo ga nato v nadaljevanju s pomočjo karbonildiimidazola pretvorili v 1,2,4-oksadiazol **12**. *Tert*-butoksikarbonilna zaščitna skupina v spojini **12** nam omogoča enostavno odščito s HCl v dietiletru, kjer pride do nastanka α -amino 4*H*-(1,2,4)oksadiazol-5-on klorida. Za oksidiazolonijeve kloride je bilo ugotovljeno, da so stabilni v obliki soli tudi dlje časa. Celota pot, ki je prikazana na **sliki 16**, je učinkovita in enostavna, v mnogih primerih smo lahko intermediate očistili samo s prekrizalizacijo.



Slika 16: Druga sintezna pot, tvorba 1,2,4-oksadazola 12

5.3.1. Sinteza *terc*-butil (S)-(1-amino-1-oksopropan-2-il)karbamata (9)

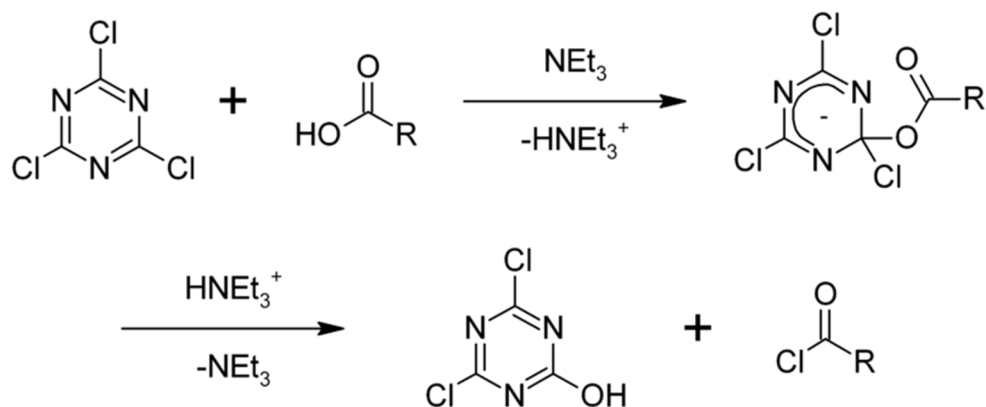
Pri tvorbi amidne vezi smo uporabljali karbodiimidno metodo (**Slika 17**), kjer z uporabo karbodiimida (npr. EDC, DCC ipd.) povečamo reaktivnost šibko elektrofilnega karbonilnega centra karboksilne skupine. Pri tej reakciji karboksilat v obliki aniona reagira s karbodiimidom, pri čemer pride do nastanka reaktivnega intermedata (O-aciloizosečnine). Ta nato reagira s prosto amino skupino, kjer nastane amid in derivat sečnine, ki je v primeru uporabe EDC vodotopen in ga po reakciji odstranimo z vodo. Kot nukleofil lahko deluje tudi karboksilna kislina, ki napade O-aciloizosečnino, pri čemer nastane simetrični anhidrid, ki lahko reagira s prosto amino skupino in zopet nastane amid. Slaba lastnost karbodiimidne metode je ta, da pri reakciji velikokrat pride do nastanka nekaterih stranskih produktov kot posledice racemizacije ali tvorbe *N*-acilsečnine. Da bi preprečili omenjeni stranski reakciji, uporabimo reagent HOBt, ki tvori z O-aciloizosečnino bolj reaktiven ester, kar močno poveča hitrost nastanka amidne vezi in posledično zavrže obseg racemizacije.



Slika 17: Tvorba amidne vezi z reagentoma EDC in HOBt

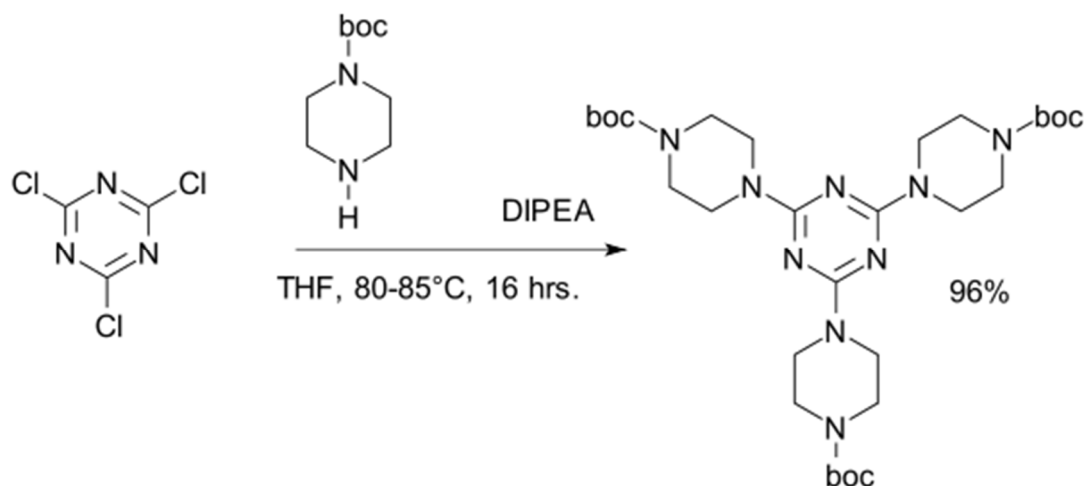
5.3.2. Sinteza *terc*-butil (S)-(1-cianoetil)karbamata (10)

Reagent cianur klorid (**Slika 18**) je zelo pogosto uporabljen reagent v organski sintezi za pretvorbo alkoholne ali karboksilne skupine v alkil in acetilklorid, kot reagent za premreženje spojin ali kot prekurzor pri sintezi nekaterih barvil.



Slika 18: Shematski prikaz tvorbe kislinskih kloridov iz karboksilnih kislin s pomočjo cianur klorida

Uporabljamo ga lahko za aktivacijo karboksilne skupine, ki jo nato reduciramo do alkoholov. Z uporabo DMF pri višjih temperaturah dobimo Goldonov reagent $\text{Me}_2\text{NCH}=\text{NCH}=\text{NMe}_2^+\text{Cl}$ s pomočjo katerega pride do aminoalkiliranja in nastanka heterocikličnih spojin. Sam klorid lahko reagira z amini, ob tem dobimo derivate melamina, kar uporabljajo pri sintezi dendrimerov. V naši reakciji smo ga uporabili kot reagent za dehidratacijo.



Slika 19: Shematski prikaz reakcije boc-piperazina s cianur kloridom

5.3.3. Sinteza *tert*-butil (S,Z)-(1-amino-1-(hidroksiimino)propan-2-il)karbamata (11)

Raztopini nitrila **10** v EtOH smo dodali hidroksilamin na ledeni kopeli in mešali 24 h. V reakciji hidroksilamin kot močan nukleofil z amino skupino napade ogljik v ciano skupini. Nato smo organsko topilo odstranili pri znižanem tlaku in spojino prekristalizirali iz EtOAc. Nastali so beli kristali, izkoristek reakcije je bil 17%.

5.3.4. Sinteza *tert*-butil (S)-(1-(5-okso-4,5-dihidro-1,2,4-oksadiazol-3-il)etil)karbamata (12)

Sintezo smo nadaljevali tako, da smo *tert*-butil (S)-(1-amino-1-(hidroksiimino)propan-2-il)karbamata (**11**) raztopili v brezvodnem THF. Bučko smo nato prepihali z argonom, dodali 1,5 ekvivalentov CDI in refluktirali 24 ur pri temperaturi 90°C. CDI je aktivacijski reagent, ki ga uporabljamo za pripenjanje aminokislin na karboksilne kisline. V našem primeru smo CDI uporabili kot donor karbonilne skupine, ki nam omogoči ciklizacijo hidroksamidina do 1,2,4-oksadiazola-5(4*H*)-ona.

Produkt ima kisle lastnosti, zato smo po končani reakciji reakcijsko zmes raztopili v EtOAc, kjer je naš produkt večinoma dobro topen in nato spojino ekstrahirali v NaOH. Vodno fazo smo nato nakisali z 1M HCl do pH=3-4, s tem smo produkt pretvorili v neionizirano obliko in ga nato iz vode ekstrahirali v CH₂Cl₂ ter organsko frakcijo spirali z nasičeno vodno raztopino NaCl. Organsko fazo smo sušili z brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in sušili pri znižanem tlaku. Izkoristek reakcije je bil 43 %.

6. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo razvili dve sintezni poti. Obe sta bili večstopenjski, zato smo prikazali tudi učinkovito sintezno strategijo. Pri prvi sintezni poti smo izhajali iz 2,4-dihidroksibenzojske kisline, ki smo jo s pomočjo uveljavljenih sinteznih principov organske kemije pretvorili do načrtovanih intermediatov 4-(benziloksi)-2-(karboksimetoksi)benzojske kisline (**7**) in 4-(benziloksi)-2-hidroksibenzohidrazida (**6**).

Ugotovimo lahko, da smo razvili učinkovito in enostavno sintezno pot. Izkoristki večine reakcijskih stopenj so relativno visoki, kar nam bo v prihodnosti omogočalo sintezo večjih količin intermediatov. Poleg tega smo uspeli večino spojin očistiti s prekristalizacijo, kjer je poraba topil bistveno manjša kot pri čiščenju reakcijskih produktov s kolonsko kromatografijo. Produkti, ki jih dobimo na ta način, so praviloma tudi bolj čisti, kot če bi jih čistili s kolonsko kromatografijo.

Po drugi sintezni poti smo sintetizirali derivat L-Ala z 1,2,4-oksadiazolno funkcionalno skupino. Izkoristki te sintezne poti so bistveno slabši. Kljub vsemu je sintezna pot enostavna in hitra. Tudi tu smo večinoma spojine očistili s prekristalizacijo, potrebno pa je tudi omeniti, da je večina uporabljenih reagentov poceni in lahko komercialno dostopnih.

Zaradi enostavne, poceni in hitre sintezne strategije lahko zaključimo, da bo naša magistrska naloga osnova za hiter razvoj večjega števila novih potencialnih zaviralcev encima ligaza D-Ala-D-Ala.

7. LITERATURA

1. Graham LP : An Introduction to Medicinal Chemistry, Fourth edition Oxford 2009, 19: 422-474.
2. Payne D, Tomazs A: The challenge of antibiotic resistant bacterial pathogens: The medical need, the market and prospects for new antimicrobial agents. *Cur. Opin. Microbiol.* 2004, 7: 435-438.
3. Livermore DM: Minimising antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis.* 2005, 5: 450-59.
4. Walsh FM, Amyes SG.B: Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens. *Cur Opin Microbiol.* 2004, 7: 439-444.
5. Thomson CJ, Power E, Ruebsamen-Waigmann H, Labischinski H: Antibacterial research and development in the 21st Century – an industry perspective of the challenges. *Cur. Opin. Microbiol.* 2004, 7: 445-450.
6. <http://cnx.org/content/m44406/latest/?collection=col11448/latest>. (Dostop 16.08.2013).
7. Salton MRJ, Kim KS: Structure In: *Baron's Medical Microbiology* (Barron S et al., eds.) (4th izd.). Univ of Texas Medical Branch 1996.
8. Yoneyama H, Katsumata R: Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development, *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006; 70: 1060-1075.
9. Williams DA, Lemke T L: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2002: 759-802.
10. Barreteau H, Kovac A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008, 32, 168-207.
11. Vollmer W, Blanot D, De Pedro MA: Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008, 32, 149-167.
12. Boyer R: *Temelji Biokemije, Skripta*, John Wiley & Sons, Inc. 2002, 8: 198-199.
13. Tripathi P, Beaussar A, Andre G, Rolain T, Lebeer S, Vanderleyden J, Hols P, Dufrêne YF: Towards a nanoscale view of lactic acid bacteria. *Micron* 2012, 12, 1323-1330.
14. <http://micro.digitalproteus.com/morphology2.php> (Dostop 14.8.2013).
15. Battistuzzi F, Feijao A, Hedges SB: A genomic timescale of prokaryote evolution: Insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BCM Evol. Biol.* 2004, 4, 44.
16. <http://www.microbiologybook.org/fox/sa-pep.jpg> (dostop 14.08.2013)

-
17. Di Giulio M: The universal ancestor and the ancestor of bacteria werw hyperthermophiles. *J. Mol.Evol.* 2003, 57, 721-730.
 18. <http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Porini> (dostop 10.09.2013)
 19. Cooper GM: *The cell; A Molecular Approach*. ASM Press, Washington, D.C., Siuauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 1997: 501-502.
 20. Heijenoort Van J: Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *NPR* 2001.
 21. <http://mecriticalcare.net/downloads/lectures/MechanismsofAction.pdf> (dostop 14.08.2013)
 22. Bouhss A, Trunkfield AE, Bugg TDH, Mening-Lecreulx D: The biosyntethesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008, 32, 208-233.
 23. Sauvage E, Kreff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P: Thr penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008, 32, 234-258.
 24. Zoeiby AE, Sanschagrín F, Levesque RC: Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol. Microbiol.* 2003, 47, 1–12.
 25. Gobec S, Urleb U: Inhibitorji biosinteze peptidoglikana. *Farmaceutski vestnik* 1999, 183-193.
 26. Silver LL: Novel inhibitors of bacterial cell wall synthesis. *ElSeviar. Cur. Opin. Microbiol.* 2003, 6, 431-438.
 27. Boyle DS, Donachie WD: *MraY* is Essential Gene for Cell Growth in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 1998, 23, 6429-6432.
 28. Typas A, Banzhaf M, Gross CA, Vollmer W: From the regulation of peptidoglycan syntesis to bacterial growth and morphology. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012, 10, 123-136.
 29. Mainardi JL, Villet R, Bugg TD, Mayer C, Artur M: Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* 2008, 32, 386-408.
 30. Lazar K, Walker S: Substrate analognes to stady cell-wall biosynthesis and inhibition. *Cur. Opti. Chem. Biol.* 2002, 6, 786-793.
 31. Chakravarty PK, Greenlee WJ, Parson WH, Patchett AA, Combs P, Roth A, Busch RD, Mellin TN: (3-Amino-2-oxoalkyl) phosphonic Acids and their Anlognes as Novel Inhibitorsod D-Alanine-D AlanineLigaze. *J.Med. Chem.* 1989, 32, 1886-1890.
 32. <http://www.google.com/patents/WO2003001887A2?cl=en> (Dostop 23.08.2013).

-
33. Healy VL, Lessard IAD, Roper DI, Knox JR, Walsh CT: Vancomycin resistance in enterococci: reprogramming of the D-Ala-D-Ala ligases in bacterial peptidoglycan biosynthesis. *Science* 2000, 7, 109-119.
34. Robinson AC, Kenan DJ, Sweeney J, Donachie WD: Further evidence for overlapping transcriptional units in an *Escherichia coli* cell envelope-cell division gene cluster: DNA sequence and transcriptional organization of the *ddl ftsQ* region. *J. Bacteriol* 1986, 167, 809-817.
35. http://en.wikipedia.org/wiki/File:PDB_1iow_EBI.jpg (dostop 30.08.2013).
36. Zawadzke LE, Bugg TD, Walsh CT: Existence of two D-alanine: D-alanine ligases in *Escherichia coli*: cloning and sequencing of the *ddlA* gene and purification and characterization of the *ddlA* and *DdlB* enzymes. *Biochem.* 1991, 30, 1673-1682.