

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALJA GRLICA

NOVI PIPERIDINSKI INHIBITORJI MUR LIGAZ

NEW PIPERIDINE INHIBITORS OF MUR LIGASES

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

VSEBINA

VSEBINA	2
POVZETEK	4
ABSTRACT	5
SEZNAM OKRAJŠAV	6
1. UVOD	8
1.1. REZISTENCA BAKTERIJ NA PROTIMIKROBNE UČINKOVINE	9
1.2. BAKTERIJSKA CELIČNA STENA	12
1.2.1. Celična stena po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij	12
1.3. ZGRADBA BAKTERIJSKEGA PEPTIDOGLIKANA	14
1.3.1. Biosinteza peptidoglikana	15
1.4. MUR LIGAZE	18
1.4.1. MurC ligaza	19
1.4.2. MurD ligaza	21
1.5. INHIBITORJI AMINOKISLINSKIH LIGAZ	23
1.5.1. Inhibitorji MurC	23
1.5.2. Inhibitorji MurD	25
2. NAČRT ZA DELO	28
3. MATERIALI IN METODE	32
3.1. MATERIALI	32
3.2. METODE	32
3.2.1. Kromatografske metode	32
3.2.2. Spektroskopske metode	32
3.2.3. Tališče	33
3.2.4. Biokemijska testiranja	33
3.2.5. Nomenklatura in risanje spojin	34
4. EKSPERIMENTALNO DELO	35
4.1. SINTEZA DERIVATOV 3-HIDROKSIPIPERIDINA	35
4.1.1. Sinteza terc-butil-3-hidroksipiperidin-1-karboksilata (OAG 11)	35
4.1.2. Sinteza 2-(1-(terc-butoksikarbonil)piperidin-3-iloksi) propanojske kisline (OAG 29)	36
4.1.3. Sinteza terc-butil 3-(1-(1-etoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)piperidin-1-karboksilata (OAG 38)	37
4.1.4. Sinteza 3-(1-(1-etoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)-piperidinijevega klorida (OAG 41)	38
4.1.5. Sinteza etil 2-(2-(1-(fenilsulfonil)piperidin-3-iloksi) propanamido) propanoata (OAG 5)	39

4.1.6. Sinteza 2-(2-(1-(fenilsulfonyl)piperidin-3-iloksi)propanamido) propanojske kisline (OAG 6)	40
4.1.7. Sinteza metil 3-(3-(1-(1-etoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)-piperidin-1-il)-3-oksopropanoata (OAG 52)	41
4.1.8. Sinteza 3-(3-(1-(1-karboksietilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)piperidin-1-il)-3-oksopropanojske kisline (OAG 61)	42
4.1.9. Sinteza metil 4-(3-(1-(1-etoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)-piperidin-1-il)-4-oksobutanoata (OAG 53).....	43
4.1.10. Sinteza metil 4-(3-(1-(1-karboksietilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)-piperidin-1-il)-4-oksobutanojske kisline (OAG 62).....	44
4.1.11. Sinteza etil 2-(2-(1-(4-acetamidofenilsulfonyl)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanoata (OAG 54)	45
4.1.12. Sinteza etil 2-(2-(1-(4-acetamidofenilsulfonyl)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanojske kisline (OAG 64)	46
4.1.13. Sinteza etil 2-(2-(1-(3,5-dikloro-2-hidroksifenilsulfonyl)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanoata (OAG 55)	48
4.1.14. Sinteza 2-(2-(1-(3,5-dikloro-2-hidroksifenilsulfonyl)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanojske kisline (OAG 66).....	49
4.1.15. Sinteza etil 2-(2-(1-(4-metoksifenilsulfonyl)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanoata (OAG 56).....	50
4.1.16. Sinteza 2-(2-(1-(4-metoksifenilsulfonyl)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanojske kisline (OAG 65)	51
4.1.17. Sinteza etil 2-(2-(1-(4-nitrofenilkarbamoil)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanoata (OAG 57).....	52
4.1.18. Sinteza 2-(2-(1-(4-nitrofenilkarbamoil)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanojske kisline (OAG 67)	54
5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	56
5.1. RAZPRAVA O SINTEZAH SPOJIN	56
5.1.1. Zaščita hidroksilne skupine 3-hidroksipiperidina.....	56
5.1.2. Pripenjanje 2-kloropropionske kisline.....	57
5.1.3. Tvorba amidne vezi z EDC/Hobt metodo.....	58
5.1.4. Odstranitev terc-butiloksikarbonilne (BOC) zaščite.....	59
5.1.5. Uvajanje substituentov na aminski dušik	60
5.1.6. Alkalna hidroliza estrov.....	62
5.2. SEZNAM VSEH SINTETIZIRANIH SPOJIN	63
5.3. REZULTATI BIOKEMIJSKEGA TESTIRANJA IN DISKUSIJA.....	65
6. SKLEP.....	70
7. LITERATURA	71

POVZETEK

Vse pogosteje se pojavljajo sevi bakterij, rezistentni na večino antibiotikov, ki so trenutno na tržišču, zato je nujen razvoj novih protimikrobnih učinkovin usmerjenih proti novim tarčam. Ena najboljše poznanih in preučevanih tarč je kompleksna biosinteza peptidoglikana. Peptidoglikan je esencialna komponenta bakterijske celične stene, ki zagotavlja mehansko odpornost in vzdržuje celično obliko. Pri njegovi biosintezi sodelujejo mnogi encimi, med drugim tudi Mur ligaze, ki so esencialne za obstoj bakterij, so zelo specifične in prisotne zgolj v celicah prokariontov. Mednje spadata tudi encima MurC (UDP-*N*-acetilmuraminska kislina: L-alanin-ligaza) in MurD (UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanin: D-glutamat-ligaza). MurC katalizira pripenjanje L-alanina na UDP-*N*-acetilmuraminsko kislino, medtem ko MurD katalizira tvorbo amidne vezi med D-glutatom in UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alaninom.

Na osnovi poznavanja mehanizmov reakcij, ki jih katalizirata MurC in MurD, smo v okviru diplomske naloge sintetizirali sedem končnih spojin, ki bi lahko delovale kot potencialni inhibitorji omenjenih encimov. Izhajali smo iz 3-hidroksipiperidina, ki je predstavljal del skeleta molekule, ki oponaša *N*-acetil-D-glukozaminski del UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanina. Slednji je produkt encima MurC in hkrati substrat za MurD. Njegov laktoil-alaninski fragment smo ohranili pri naših končnih spojinah.

Končnim spojinam smo izmerili inhibitorno aktivnost na encima MurC in MurD. Ena izmed spojin je izkazovala dokaj dobro rezidualno aktivnost za encim MurC, zato bomo to spojino poslali na dodatne teste, kjer ji bodo izmerili minimalno inhibitorno koncentracijo. Ostale testirane spojine so se izkazale za neaktivne.

Rezultati naših raziskav širijo znanje o načrtovanju, sintezi in SAR inhibitorjev sinteze bakterijske celične stene. Ponujajo pa tudi iztočnice za nadaljnji razvoj in odkritja novih protimikrobnih učinkovin.

ABSTRACT

The widespread emergence of bacterial strains that are resistant to the variety of antibiotics currently available on the market has generated an urgent need for the development of novel antimicrobial agents active against previously unexploited targets. One of the best known and most studied targets is the complex biosynthesis of peptidoglycan. Peptidoglycan is an essential component of the bacterial cell wall, conferring mechanical resistance and maintaining a defined cell shape. Among many enzymes involved in the synthesis of peptidoglycan, there are also Mur ligases, enzymes that are essential for bacteria, highly specific and occur only in prokaryotic cells. Two critical enzymes called UDP-*N*-acetylmuramic acid: L-alanine ligase (MurC) and UDP-*N*-acetylmuramoyl-L-alanine: D-glutamate ligase (MurD) catalyzes the addition of L-alanine to UDP-*N*-acetylmuramic acid and the formation of the peptide bond between UDP-*N*-acetylmuramoyl-L-alanine and D-glutamate, respectively.

Based on reaction mechanisms of MurC and MurD we synthesized seven compounds that could be potential inhibitors of both enzymes. All of the synthesized compounds were derived from 3-hydroxypiperidine, which represents part of the structure, that imitates the *N*-acetyl-D-glucosamine part of the UDP-*N*-acetylmuramoyl-L-alanine. UMA is the product of MurC and also a substrate for MurD. Its lactoyl-alanine fragment could be found in our final compounds.

We measured the ability of synthesized compounds to inhibit MurC and MurD enzyme. The results demonstrated good inhibitory activity for one of the compounds which we are going to send on additional testing for antibacterial activity. Other compounds did not show any inhibitory activity.

The results of our study broaden the knowledge about design, synthesis and SAR of inhibitors of bacterial cell wall synthesis and leave an open ground for further development of the antimicrobial agents.

SEZNAM OKRAJŠAV

ADP	adenozin difosfat
AK	aminokislina, aminokislinski(a)
AMPPNP	nehidrolizirajoči analog ATP
ATP	adenozin trifosfat
BOC	<i>tert</i> -butiloksikarbonil
(BOC) ₂ O	di- <i>tert</i> -butildikarbonat
CDCl ₃	devteriran kloroform
d	dublet (NMR)
dd	dublet dubleta (NMR)
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EI	elektronska ionizacija (Electron Impact) (MS)
ESI	elektrosprej ionizacija (Electron Spray Ionization) (MS)
Et ₃ N	trietilamin
FAB	obstreljevanje s hitrimi elektroni (fast atom bombardment) (MS)
G ⁺	po Gramu pozitivne bakterije
G ⁻	po Gramu negativne bakterije
Hobt	1-hidroksibenzotriazol hidrat
IC ₅₀	srednja inhibitorna koncentracija
IR	infrardeča spektroskopija
J	sklopitvena konstanta (NMR)
m	multiplet (NMR)
M	molekulska masa
mDAP	mezo-diaminopimelinska kislina
MF	mobilna faza
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MRSA	na meticilin odporni <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	masna spektrometrija
MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruvat transferaza

MurB	UDP- <i>N</i> -acetilenolpiruvilglukozamin 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-D-glutamat: mezodiaminopimelinat-ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat- mezodiaminopimelinat D-alanin-D-alanin-ligaza
MurG	<i>N</i> -acetilglukozamin transferaza
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
NADPH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
NMR	jedrska magnetna resonanca
OAG	oznaka sintetizirane spojine
Pa	fiziki enota za merjenje tlaka
PBP	penicillin binding protein (protein, na katerega se veže penicilin)
PEP	fosfoenol piruvat
Pi	anorganski fosfat
RA	rezidualna aktivnost
s	singlet (NMR)
SAR	odnos med strukturo in aktivnostjo
t	triplet (NMR)
TLC	tankoplastna kromatografija
UDP	uridin difosfat
UDP-Glc-NAc	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin
UDP-Glc-NAc-EP	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruvat
UDP-Mur-NAc	UDP- <i>N</i> -acetilmuraminska kislina
UMP	uridin monofosfat
UMA	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin
UMAG	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat
UNAM	UDP- <i>N</i> -actilmuraminska kislina
VRE	na vankomicin odporna <i>Enterococcus faecium</i> in <i>faecalis</i>

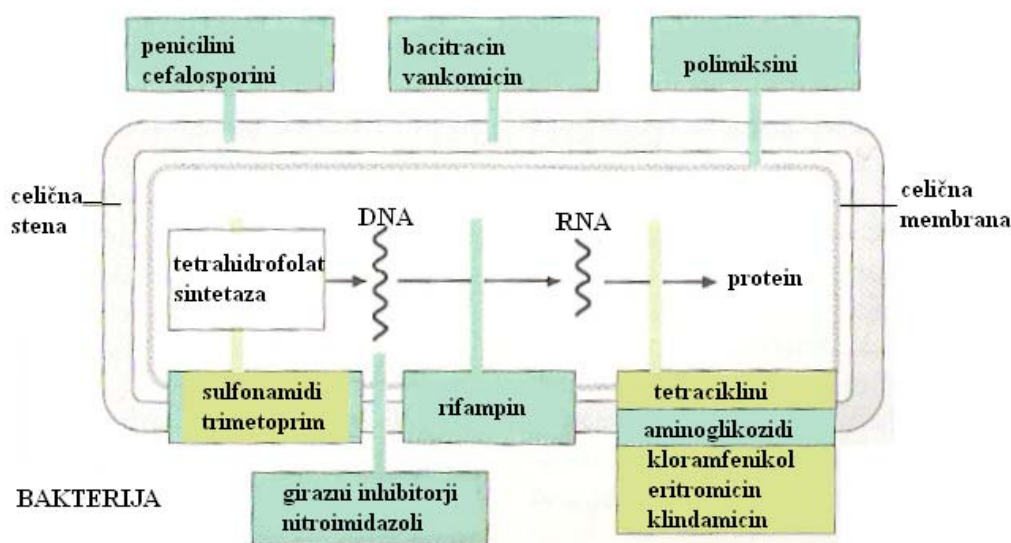
1. UVOD

Protimikrobne učinkovine so spojine naravnega ali sinteznega izvora z bakteriostatičnim ali baktericidnim delovanjem, ki delujejo toksično na patogene organizme, medtem ko gostitelju ne povzročajo škode. To sposobnost protimikrobnih učinkovin imenujemo selektivna toksičnost in temelji na biokemijskih razlikah med bakterijo in gostiteljem (1).

Antibiotiki so sekundarni metaboliti različnih vrst mikroorganizmov (bakterij, gliv, aktinomicet, alg, lišajev), ki zavirajo rast ali pa povzročijo smrt drugih mikroorganizmov brez resne toksičnosti za gostitelja. V širšem pomenu mednje štejemo tudi polysintezne derivate antibiotikov (npr. polysintezne peniciline), ki jih pridobimo s kemično modifikacijo naravnih antibiotikov, s tem pa lahko razširimo spekter delovanja, povečamo učinkovitost, zmanjšamo toksičnost ali izboljšamo farmakokinetične lastnosti (2).

Glede na mehanizem delovanja lahko protimikrobne učinkovine razdelimo na (slika 1):

- inhibitorje biosinteze bakterijske celične stene (β -laktamski in glikopeptidni antibiotiki itd.);
- inhibitorje biosinteze proteinov (aminoglikozidni in makrolidni antibiotiki, tetraciklini, kloramfenikol);
- inhibitorje sinteze nukleinskih kislin (sulfonamidi, trimetoprim, kinoloni);
- antibiotike s vplivom na funkcijo celične membrane (polimiksini) (1, 2).



Slika 1: Shematski prikaz mehanizma posameznih protimikrobnih učinkovin na bakterijo

V zadnjih šestdesetih letih je odkritje in razvoj protimikrobnih učinkovin revolucionarno spremenilo zdravljenje mikrobnih okužb in obolenj. Obolevnost in predvsem smrtnost zaradi mikrobnih bolezni sta se drastično zmanjšala. Vendar je narava poskrbela, da so se tudi mikrobi začeli uspešno braniti proti učinkovinam - osnovni princip evolucije, po katerem se organizmi prilagajajo spremembam v okolju. To jim omogoča lastnost, da se zelo hitro delijo. Ena delitev traja okoli 20 minut, tako lahko v samo nekaj urah nastane veliko novih generacij in s tem tudi veliko možnosti za evolucijske prilagoditve-mutacije. Tako se je razvila tudi rezistenca mikrobov na protimikrobne učinkovine (1, 2).

1.1. REZISTENCA BAKTERIJ NA PROTIMIKROBNE UČINKOVINE

Rezistenca je sposobnost mikroorganizmov, da v prisotnosti antibiotika preživijo oz. se še naprej razmnožujejo. Rezistenca je lahko intrinzična (prisotna pred izpostavitvijo učinkovini) ali ekstrinzična (se razvije kot posledica izpostavitve učinkovini).

Rezistenca bakterij na toksične učinke protimikrobnih učinkovin in na antibiotike se zlahkoto razvija tako v laboratorijih kot na klinikah in predstavlja naraščajočo nevarnost za zdravje ljudi (2).

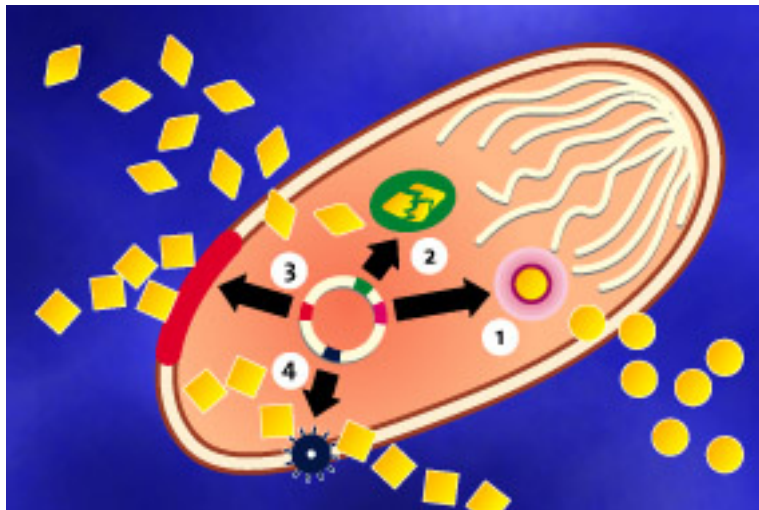
Pri bakterijah se rezistenca na antibiotike širi na treh nivojih:

- * s prenosom bakterij med ljudmi,
- * s prenosom genov za rezistenco med bakterijami (ponavadi na plazmidih),
- * s prenosom genov za rezistenco med genetskimi elementi znotraj bakterije, na transpozonih (1).

Na nivoju biokemijskih mehanizmov je razvoj rezistence posledica:

- o tvorbe encimov, ki hidrolizirajo (slika 2; mehanizem 1) ali spremenijo (slika 2; mehanizem 1) antibiotik (β -laktamaze inaktivirajo peniciline, acetiltransferaze kloramfenikol, fosforilaze aminoglikozide),
- o spremembe encima, ki ga protimikrobna učinkovina inhibira (npr.: posledica spremembe dihidrofolat reduktaze je izguba afinitete do trimetoprima),
- o zmanjšanega vnosa antibiotika v celico (posledica inhibicije tvorbe porinov je zmanjšan vnos hidrofilnih antibiotikov) (slika 2; mehanizem 3) ali zmanjšane akumulacije antibiotika v bakteriji. Bakterija lahko izčrpava protimikrobno

- učinkovino iz celice (aktivni transport tetraciklinov iz bakterij) (slika 2, mehanizem 4),
- o spremembe vezavnega mesta za antibiotik (npr.: zaradi mutacije se spremeni vezavno mesto za peniciline (PBP)).



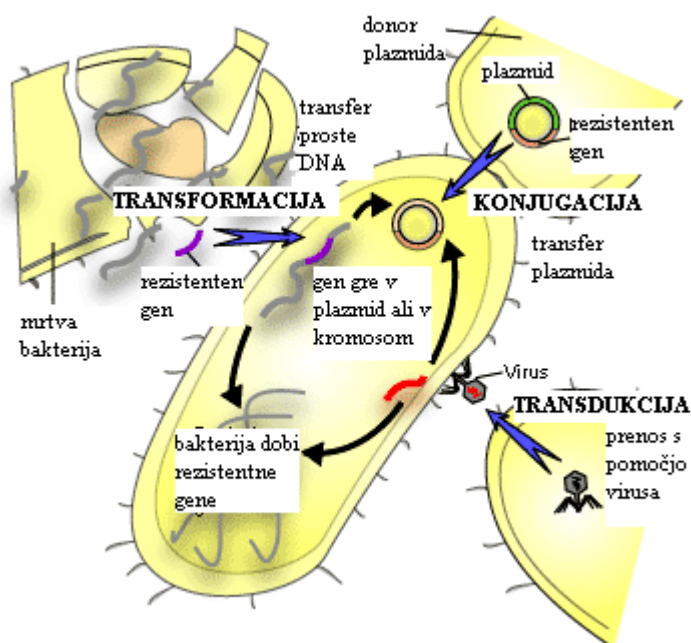
Slika 2: Biokemijski mehanizmi rezistence na antibiotike (številke so mehanizmi, razloženi v besedilu)

Genetske osnove rezistence predstavljajo kromosomske determinante, mutacije in izvenkromosomske determinante, plazmidi. Spontane mutacije na kateremkoli bakterijskem genu so zelo redke, ob delitvi bo mutirala le ena od 10^6 - 10^8 celic. Vendar moramo upoštevati dejstvo, da je lahko na mestu okužbe prisotnih veliko več bakterij, tako da je verjetnost mutacije, ki bi povzročila spremenjeno učinkovitost protimikrobne učinkovine pri nekaterih vrstah bakterij, relativno velika. Nekaj takšnih mutantov sicer ni dovolj za rezistenco, a v prisotnosti protimikrobnih učinkovin imajo ti mutanti zelo veliko selektivno prednost. Kljub vsemu rezistenca, ki je posledica mutacije na kromosomu, največkrat nima kliničnega pomena. Poseben primer oziroma izjema je pojav meticilin rezistentnih sevov *Staphylococcus aureus* (MRSA) (1,2).

Mnoge bakterije nosijo s seboj še izvenkromosonski dedni material – plazmide. To so krožne verige DNA, ki prosto plavajo v citoplazmi in se lahko od kromosomov neodvisno pomnožujejo. Med seboj so si plazmidi različni tako po številu prisotnih kopij, kakor tudi po velikosti in številu genov, ki jih nosijo (od nekaj pa do 500). Nekateri plazmidi nosijo gene, ki so odgovorni za rezistenco. Tak plazmid imenujemo R-plazmid, gen pa podobno R-gen. Med plazmidi oz. med plazmidi in kromosomom se geni lahko prenašajo s transposoni, ki lahko vsebujejo enega ali več R-genov (3).

Prenos rezistentnih genov med bakterijami lahko poteka po več načinih: konjugacija, transdukcija in transformacija (slika 3).

1. Konjugacija zajema nastanek fizičnega kontakta »sex pili« med dvema celicama in prenos dednega materiala preko tega mostišča. Sposobnost konjugacije je zapisana na posebnih genih na konjugativnih plazmidih, mnogi med njimi vsebujejo tudi R-gene. Konjugacija je poglavitni način širjenja rezistence.
2. Transdukcija je prenos dednega materiala med bakterijami z bakteriofagi (virusi, ki napadajo bakterije) in razen pri stafilokokih in streptokokih nima večjega kliničnega pomena.
3. Transformacija je prenos proste DNA iz okolice v celico in njena umestitev v kromosomsko DNA pri normalnih pogojih. Ta način nima večjega pomena pri kliničnem problemu rezistence (2).



Slika 3: Mehanizmi (konjugacija, transdukcija, transformacija) prenosa rezistentnih genov med bakterijami

Podatek, da so nekateri sevi rodov *Staphylococcus* in *Enterococcus* odporni praktično na vse antibiotike, dokazuje resnost situacije. Ukrepi regulatornih oblasti zajemajo programe za nadzor bolnišničnih okužb, smotrnejšo uporabo kemoterapevtikov v medicini in tudi v veterini ter pospešeno iskanje novih učinkovitih protimikrobnih učinkovin. Prav zadnji ukrep je zelo pomemben, saj pri velikih farmacevtskih podjetjih opažamo trend prenosa

razvoja s področja novih protimikrobnih učinkovin na druga ekonomsko bolj zanimiva področja. Vzrokov je več: v nasprotju s kroničnimi boleznimi zdravljenje bakterijske okužbe traja načeloma kratek čas, bojazen pred hitrim razvojem rezistence na novo razvito protimikrobno učinkovino oz. bojazen pred omejitvijo uporabe protimikrobne učinkovine le za najresnejše primere, če bi se izkazalo, da se rezistenca ne pojavlja. Ti in mnogi drugi razlogi botrujejo temu, da postaja razvoj protimikrobnih učinkovin v velikih farmacevtskih podjetjih omejen na modifikacijo že znanih učinkovin z namenom povečanja spektra delovanja ali učinkovitosti. Če se želimo uspešno spoprijeti z bakterijskimi okužbami in pojavom rezistence v prihodnosti, je nujno potrebno iskati in razvijati nove učinkovine, ki ciljajo na povsem nova prijemališča znotraj bakterije (4, 5).

1.2. BAKTERIJSKA CELIČNA STENA

Bakterijska celična stena se po strukturi in funkciji izredno razlikuje od zunanjih plasti celice sesalcev, kar poveča število možnih tarčnih mest za selektivno zdravljenje bakterijskih infekcij. Glavne funkcije celične stene so:

- zagotavljanje selektivne prepustnosti (semipermeabilnosti),
- zaščita pred spremembami osmotskega tlaka v okolju,
- zaščita notranjosti pred encimi gostitelja (2).

Po zgradbi je bakterijska celična stena kompleksna struktura, sestavljena iz makromolekul in obdaja citoplazemsko membrano. Je toga, mehansko zelo močna plast in je odgovorna za ohranitev oblike in enovitosti celice. Njen osnovni gradnik so prečno povezane polimerne molekule peptidoglikana. Slednji s svojo trdnostjo zagotavlja preživetje celice v močno hipotoničnem okolju. Notranji osmotski tlak v bakterijski celici je $0,5 \cdot 10^6 - 2,5 \cdot 10^6$ Paskala (Pa), zato bi odsotnost peptidoglikana v hipotoničnem mediju pomenila nabrekanje in posledično lizo bakterijske celice (6, 7).

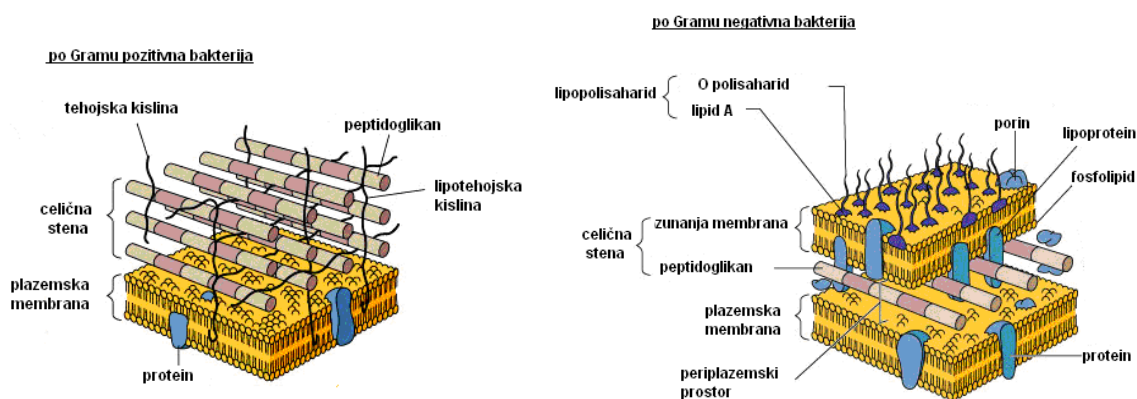
1.2.1. Celična stena po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij

Metoda barvanja po Gramu je najpogosteje uporabljena metoda za hitro karakterizacijo bakterij. V preparatu modrovijolično obarvane bakterije imenujemo po Gramu pozitivne,

rdeče pa po Gramu negativne. Ta različna obarvanost je posledica različne strukture celične stene bakterij dovzetnih na barvanje.

Celična stena po Gramu pozitivnih bakterij je preprosto zgrajena (slika 4). Zunanjo plast sestavlja skupek karakterističnih ogljikovih hidratov in proteinov, ki skupaj tvorijo antigenske determinante. Temu sledi plast peptidoglikanov. Teh plasti je lahko do 40 (2). Celična stena vsebuje tudi anionske polimere; tehojsko in teihuronsko kislino. Slednje prebadajo peptidoglikan in so mestoma kovalentno pritrjeni na celično membrano. Tehojska kislina sestoji iz enot glicerol fosfata ali ribitol fosfata, teihuronska kislina pa je polimer s heksuronskimi kisljinami. Oba tipa anionskih polimerov vsebujeta fosfatne, hidroksilne in amino skupine in delujeta kot ionsko izmenjevalni sistem (6).

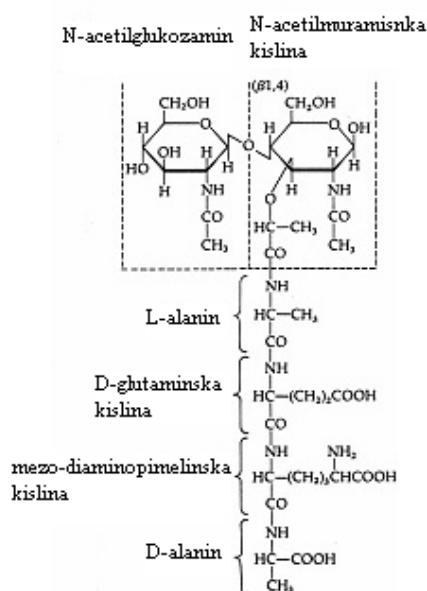
Celična stena po Gramu negativnih organizmov je kompleksnejša in vsebuje več lipidov (slika 4). Ponavadi imajo celice še dodatno, zunanjo membrano. Zunanji sloj vsebuje kompleksne lipopolisaharide, ki predstavljajo antigenske determinante, poleg tega pa se tukaj nahajajo tudi številni encimi in proteini, med katerimi so pomembni porini. To so transmembranski proteini, ki lahko prepuščajo mnoge majhne molekule, ali pa vsebujejo specifične receptorje, in tako v celico spustijo le določene molekule. Zaradi zunanje membrane je prepustnost bakterijske stene zelo zmanjšana. Membrane ne morejo prehajati hidrofilne nenabite molekule z molekulsko maso 600-900 pa tudi zelo lipofilne spojine, kot so barvila, maščobne kisline, detergenti, antibiotiki. Pod tem zunanjim slojem leži plast peptidoglikana, ki mu sledi periplazemski prostor, v katerem se nahajajo β -laktamaze. Sledi s fosfolipidi bogata citoplazemska membrana, v kateri plavajo številni karakteristični proteini z različnimi funkcijami (2, 6).



Slika 4: Primerjava zgradbe celične stene po Gramu pozitivnih in negativnih bakterij.

1.3. ZGRADBA BAKTERIJSKEGA PEPTIDOGLIKANA

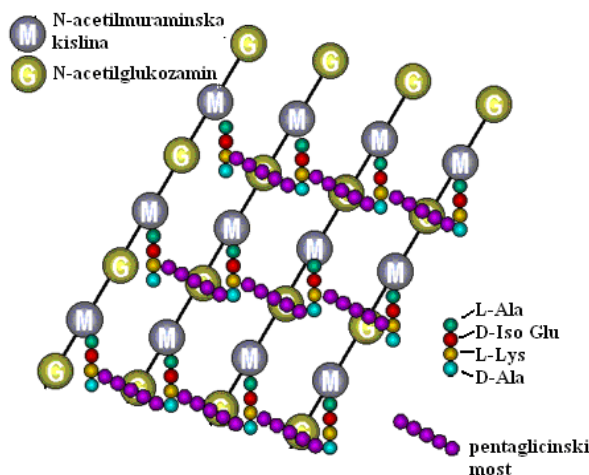
Makromolekula peptidoglikana je sestavljena iz mreže linearnih polisaharidnih verig (glikanskih vlaken), ki so prečno povezane s kratkimi peptidnimi verigami. Glikanska vlakna sestojijo iz izmenjujočih se sladkorjev *N*-acetilglukozamina in *N*-acetilmuraminske kisline, ki se med seboj povezujejo preko 1,4- β vezi v dolgo verigo. *N*-acetilmuraminska kislina je derivat *N*-acetilglukozamina, ki ima na tretjem ogljikovem atomu glukozaminskega skeleta z etrsko vezjo pripet D-laktilni ostanek. Na karboksilno skupino vsakega ostanka muraminske kisline je vezan tetrapeptid z naslednjim zaporedjem aminokislin: L-alanin (L-Ala), D-glutaminska kislina (D-Glu), mezo-diaminopimelinska kislina (mDAP) ali L-lizin (L-Lys) in D-alanin (D-Ala) (slika 5).



Slika 5: Zgradba N-acetilmuramil-*N*-acetilglukozamin-tetrapeptid monomera

Prečne povezave linearnih molekul se tvorijo s peptidno vezjo med tretjo aminokislino (mezo-diaminopimelinska kislina) ene polisaharidne verige in četrto aminokislino (D-alanin) druge polisaharidne verige (slika 6). Pri po Gramu pozitivnih bakterijah je prečno povezanih okoli devetdeset odstotkov vseh peptidoglikanskih verig, medtem ko je delež teh prečni povezav pri po Gramu negativnih bakterijah le okoli dvajset odstotkov. Primerjave zgradbe peptidoglikanov med različnimi bakterijami so pokazale, da obstajajo razlike predvsem v aminokislinah na mestu 3 v peptidni verigi, pripeti na tretji ogljikov atom *N*-acetilmuraminske kisline. Čeprav je mezo-diaminopimelinska kislina najbolj zastopana AK na tem mestu, lahko najdemo tudi L-lizin, L-ornitin, L-diaminobutanojsko

kislino ali L-homoserin. Razlike so tudi v prostih karboksilnih skupinah D-glutaminske kisline in mezo-diaminopimelinske kisline, ki sta lahko nesubstituirani ali v obliki amida. Pri po Gramu pozitivnih organizmih je terminalna D-alanilna enota preko pentaglicilnega mostička dodatno povezana z lizilno enoto sosednje tetrapeptidne verige (2, 6).



Slika 6: Prečne povezave peptidoglikanskih vlaken.

1.3.1. Biosinteza peptidoglikana

Biosintezo peptidoglikana lahko razdelimo na tri dele:

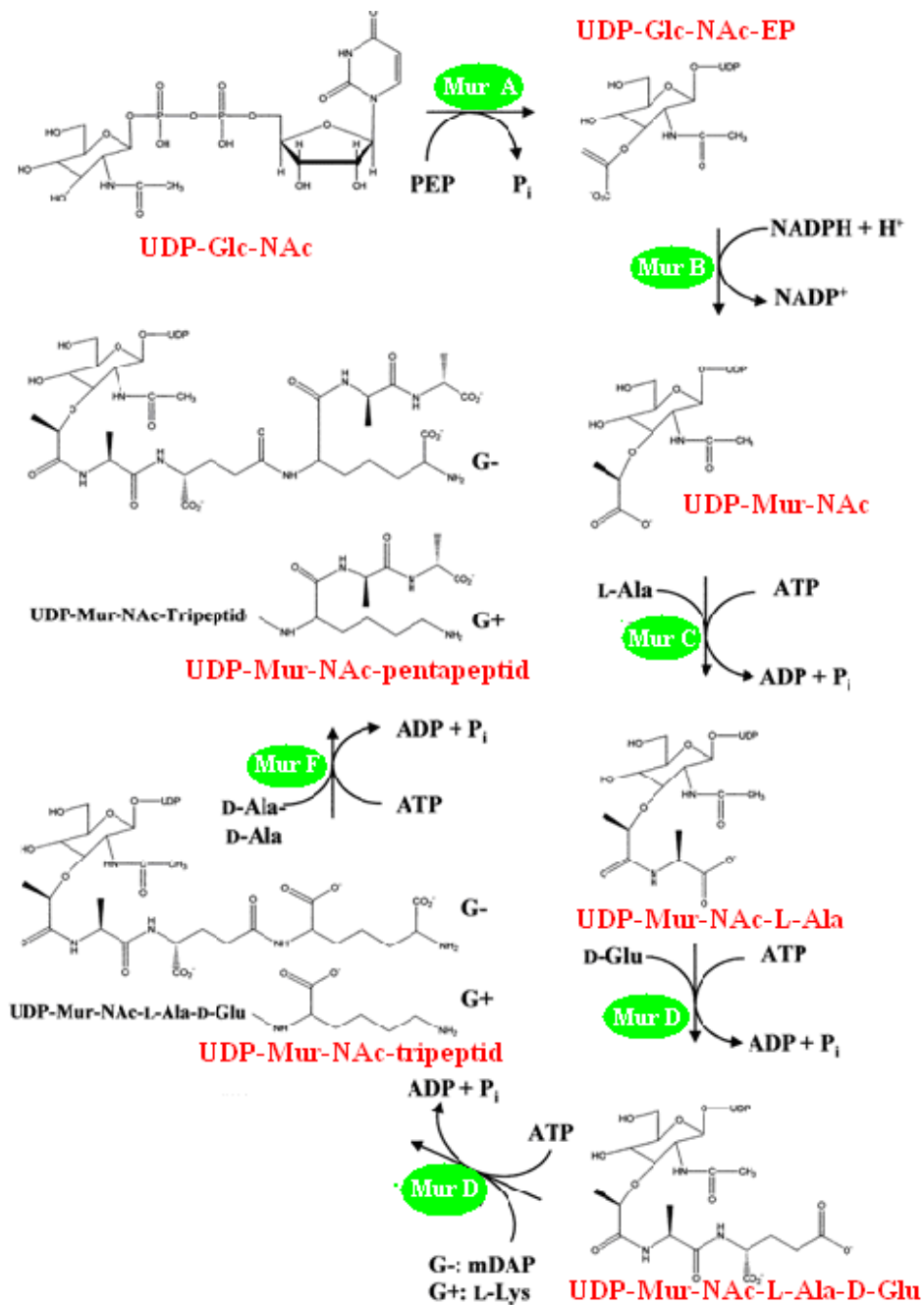
1. Sinteza prekurzorjev v citoplazmi
2. Prenos prekurzorjev do lipidnega nosilca, ki jih prenese skozi plazemsko membrano
3. Prehod prekurzorjev v celično steno in pripenjanje na že obstoječi peptidoglikan

Za ohranjanje oblike in integritete bakterijske celice mora biosinteza peptidoglikana potekati kontrolirano. Mnogi zelo pomembni antibiotiki delujejo zaviralno na biosintezo peptidoglikana, zato je poznavanje posameznih stopenj biosinteze ključnega pomena pri načrtovanju in sintezi novih protimikrobnih učinkovin.

1.3.1.1. Sinteza prekurzorjev

Končna produkta znotrajcelične sinteze nukleotidnih prekurzorjev peptidoglikana sta UDP-*N*-acetilglukozamin in UDP-*N*-acetilmuramilpentapeptid (slika 7). Bakterije sintetizirajo UDP-*N*-acetilglukozamin (UDP-GluNAc) iz primarnega metabolita fruktoze-6-fosfata v štirih stopnjah. Sinteza *N*-acetilmuraminske kisline (UDP-MurNAc) poteka v dveh stopnjah. V prvi stopnji pride do prenosa fosfoenol piruvata, ki ga katalizira encim UDP-GluNAc enolpiruvil transferaza ali MurA. Temu pa sledi redukcija enola do laktoilne

skupine, kar katalizira encim MurB, ki je po svojem mehanizmu reduktaza. Nato se na prosto karboksilno skupino laktilnega etra UDP-MurNAc z amidno vezjo veže skupina petih aminokislin. Prve tri aminokisliline se na UDP-*N*-acetilmuraminsko kislino pripenjajo postopoma s pomočjo specifičnih encimov MurC, MurD in MurE, ki za vir energije uporabljajo ATP. Pripenjanje preostalih dveh D-alaninskih ostankov pa katalizira encim MurF. Slednja se namreč dodata kot že prej tvorjen dipeptid D-alanil-D-alanin, ki nastane iz L-Ala s pomočjo encima alaninske racemaze, ki katalizira pretvorbo L-Ala v D-alanin in encima D-alanil-D-alanin-ligaze, ki katalizira nastanek dipeptida D-alanin-D-alanin (6, 8).



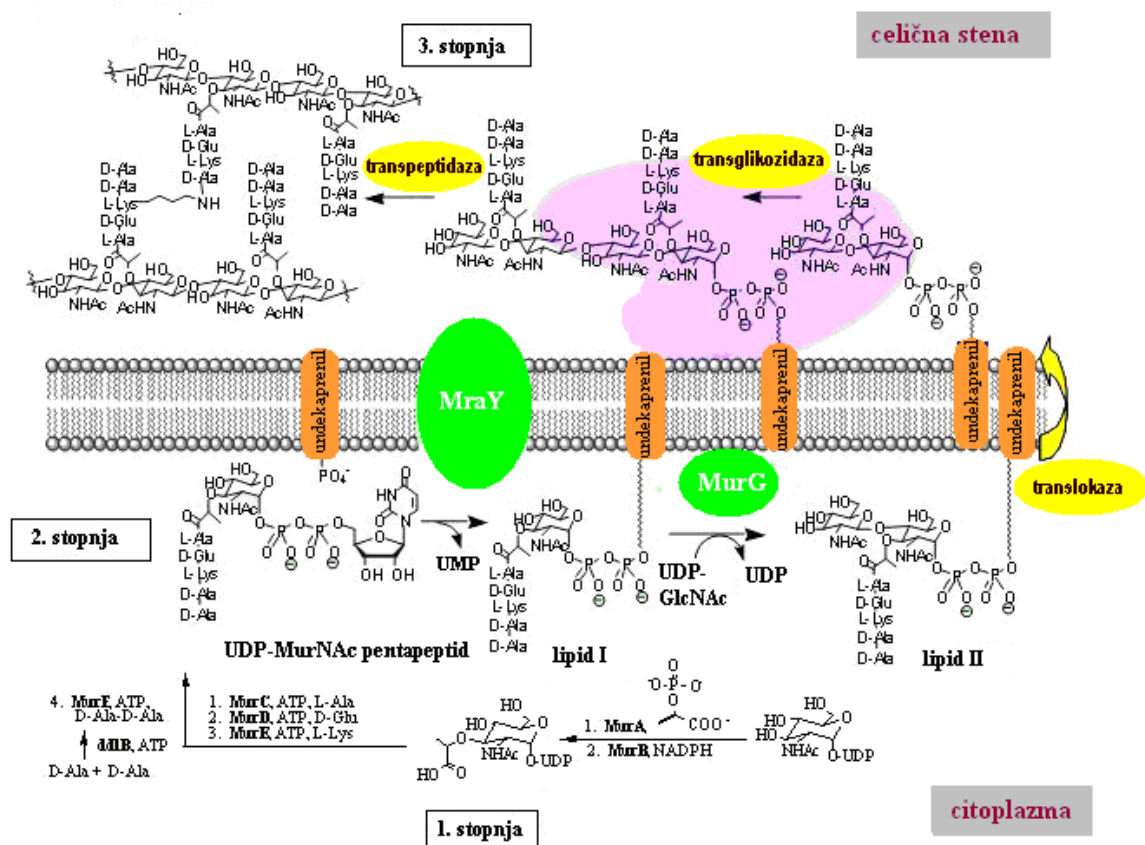
Slika 7: Sinteza UDP-*N*-acetilmuramil pentapeptida

1.3.1.2. Krog lipidnega nosilca

Naslednje stopnje v sintezi peptidoglikana katalizirajo membranski encimi (slika 8). V prvi stopnji se UDP-MurNAc-pentapeptid poveže s fosforiliranim lipidnim nosilcem, s katerim ostane povezan do konca lipidnega cikla, sprost se UMP. Nato se k nastli molekuli undekaprenil difosfo-MurNAc-pentapeptida pripne še *N*-acetilglukozaminska enota, kar katalizira encim *N*-acetilglukozamin transferaza. Disaharid pentapeptid se nato prenese na zunanjo stran bakterijske membrane. Vključevanje prenešenega gradnika v že obstoječi peptidoglikan se začne s povezovanjem sladkornih enot - transglikozilacijo, pri čemer se ena molekula lipidnega nosilca najprej sprost v obliki pirofosfata in zatem še defosforilizira (6).

1.3.1.3. Prehod prekursorjev v celično steno in pritrditev na peptidoglikan

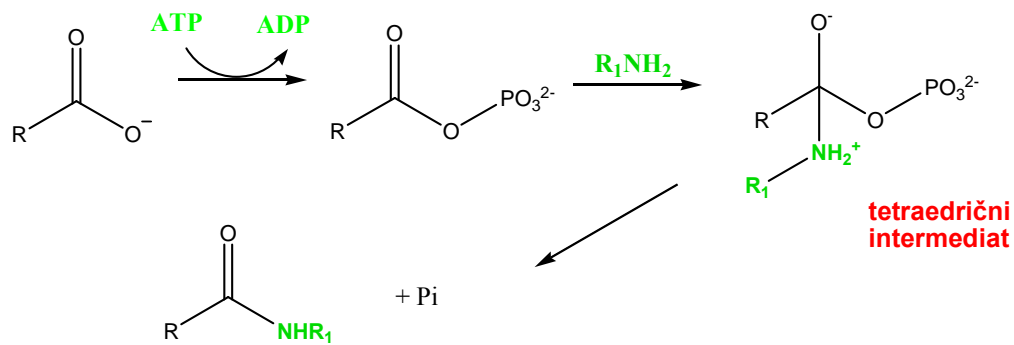
V tej stopnji se linearni glikani, ki so zbrani na lipidnem nosilcu na zunanji strani citoplazemske membrane, vgradijo v celično steno (slika 8). S pomočjo encimov imenovanih transpeptidaze se med novonastalimi glikanskimi vlakni in že obstoječimi peptidoglikani v celični steni tvorijo kovalentne vezi. To reakcijo imenujemo transpeptidacija. Transpeptidaza se najprej veže na D-alanil-D-alaninsko enoto pentapeptidne verige, ki je vezana na muraminsko kislino na nastajajočem glikanskem vlaknu. Peptidna vez med D-alaninskima ostankoma se prekine in odcepi se terminalni D-alanin. Pri tem se sprost energija, ki se porabi za tvorbo prečne vezi. Med karboksilno skupino preostalega alanina in končno ϵ -amino skupino na ostanku diaminopimelinske kisline sosednje regije peptidoglikana nastane nova peptidna vez. Tako se nastajajoči glikan poveže s peptidoglikanom celične stene. Stopnja prečne povezanosti peptidoglikana je lahko različna, kar uravnavajo encimi karboksipeptidaze, ki povzročijo odcep terminalnega D-alanina, sledi pa lahko tudi cepitev predzadnjega alaninskega ostanka. Karboksipeptidaze s tem preprečijo delovanje transpeptidaz, kajti slednje za svoje delovanje zahtevajo D-Ala-D-Ala konec pentapeptida. Nasprotno delovanje od tranpeptidaze ima endopeptidaza, ki lahko razgradi prečne povezave peptidoglikana. Tako nastanejo mesta, kjer se vgradijo nova glikanska vlakna (6).



Slika 8: Biosinteza peptidoglikana.

1.4. MUR LIGAZE

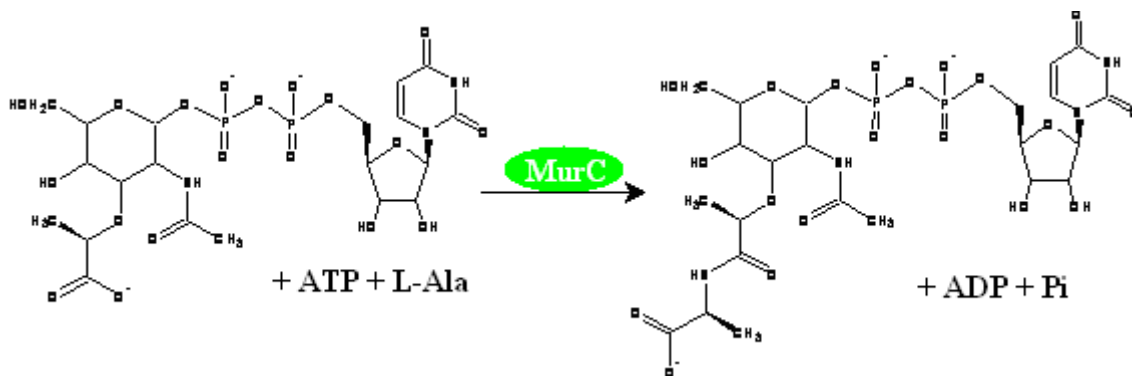
Biosinteza osnovnega peptidoglikanskega gradnika v citoplazmi je kot tarča za protibakterijske učinkovine še zelo slabo izkoriščena. Za nobenega od encimov vpletenih v te stopnje, razen naravnega antibiotika fosfomicina kot inhibitorja MurA, še ne poznamo terapevtsko uporabnih inhibitorjev. Mur ligaze so od ATP odvisni, visoko specifični encimi, ki so prisotni samo v bakterijah. Mur encimi izkazujejo med posameznimi bakterijskimi vrstami visoko stopnjo podobnosti v aminokislinskem zaporedju. Iz tega razloga lahko pričakujemo, da bo imel dober inhibitor Mur encimov širok spekter delovanja. Vse Mur ligaze katalizirajo reakcije po enakem mehanizmu. Najprej aktivirajo karboksilno skupino nukleotidnega substrata, tako da nanjo prenesejo γ -fosfatno skupino ATP, in tako tvorijo acilfosfatni intermediat. Sledi nukleofilni napad aminske skupine aminokislina. Nastane tetraedrični intermediat, ki se razcepi na amid (peptid) in anorganski fosfat (slika 9) (6, 8, 9, 10).



Slika 9: Tvorba peptidne vezi preko tetraedričnega intermedeia

1.4.1. MurC ligaza

Encim MurC ali UDP-*N*-acetilmuraminska kislina: L-alanin ligaza katalizira pripenjanje L-alanina na UDP-*N*-acetilmuraminsko kislino (UDP-MurNAc) (slika 10).

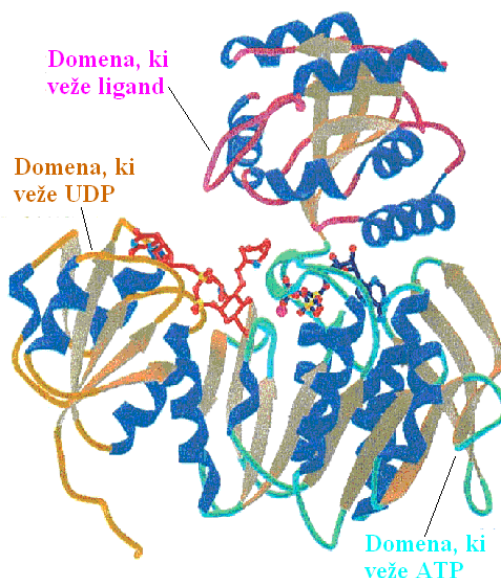


Slika 10: Reakcija, ki jo katalizira MurC

Znane so kristalne strukture MurC iz *Haemophilus influenzae* v kompleksu s substratom UNAM in Mg^{2+} ter kristalna struktura MurC v kompleksu s produktom UMA, nehidrolizirajočim analogom ATP (AMPPNP) in Mn^{2+} . Encim je sestavljen iz treh domen. Prva domena je N-terminalna domena in sestoji iz petih centralnih paralelnih β -struktur obdanih s štirimi α -vijačnicami. Vanjo se veže UDP nukleotidni del substrata UDP-MurNAc.

Druga, centralna domena, je največja in je odgovorna za vezavo ATP. Na sredini ima sedem paralelnih β -struktur, okrog njih pa je razporejenih pet α -vijačnih fragmentov in tri antiparalelne β -strukture. Tretja pa je C-terminalna domena. Sestoji iz petih paralelnih in

ene antiparalelne β -strukture, katere obdaja pet α -vijačnic. Nanjo se veže ligand (slika 11) (11, 12).



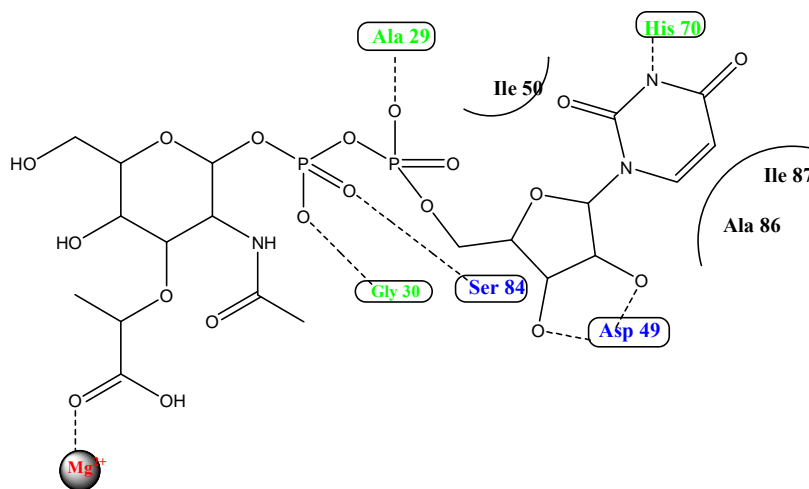
Slika 11: Prostorski prikaz strukture MurC pri *Haemophilus influenzae*

1.4.1.1. MurC v kompleksu z UNAM in ATP

MurC veže UDP del UNAM substrata v iztegnjeni konformaciji z uracilnim obročem v anti konformaciji, pri čemer je uracilni obroč umeščen med Ile 50 na eni strani in Ala 86 ter Ile 87 na drugi strani. Med N1 atomom uracila in aminokislinskim preostankom His 70 se tvori vodikova vez. Riboza tvori dve vodikovi vezi, in sicer med O2' in O3' atomoma riboze ter kisikovima atomoma v stranski verigi Asp 49. α -fosfatna skupina UDP tvori vodikovo vez preko fosfatnega kisika do dušikovega atoma Ala 29, ki se nahaja v glavni verigi, medtem ko kisika β -fosfatne skupine UDP tvorita dve vodikovi vezi, in sicer z dušikovim atomom Gly 30 in OH v stranski verigi Ser 84. *N*-acetilmuraminska kislina UNAM substrata je raztegnjena v zanko, ki poteka skozi vse tri domene MurC. Samo eden od karboksilatnih atomov *N*-acetilmuraminske kisline tvori povezavo s kovinskim ionom v aktivnem centru MurC:UNAM kompleksa (slika 12).

Pri vezavi ATP na MurC pride do aktivacije encima. Vezavno mesto za ATP leži med drugo, t.j. centralno, in tretjo, t.j. C-terminalno domeno. Adeninski obroč iz AMPPNP se vgradi v žep med Gly 128 in stransko verigo His 291 ter tvori dve vodikovi vezi med N7 in

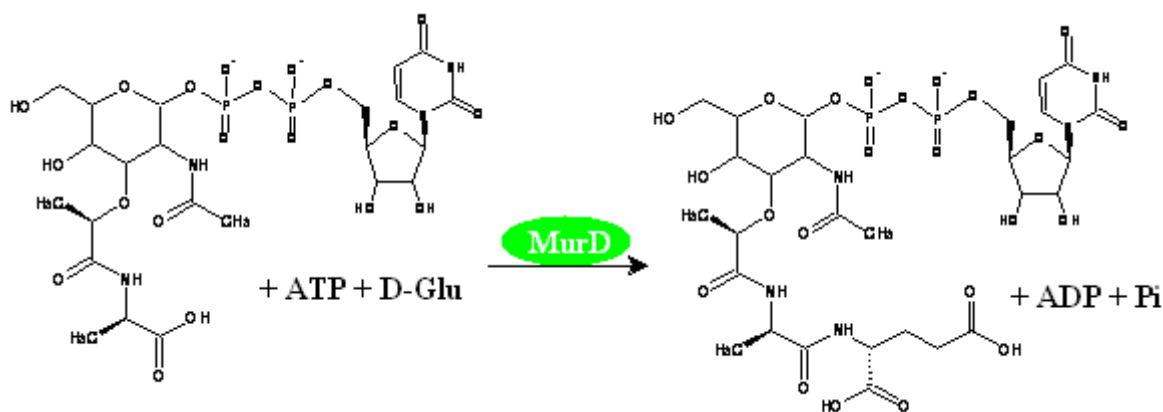
eksocikličnim N6 atomom adenina ter N82 in O81 atomoma stranske verige Asn 295. Domena, ki veže ligand, pa tvori z AMPPNP tri specifične interakcije (12).



Slika 12: Interakcije UNAM z MurC

1.4.2. MurD ligaza

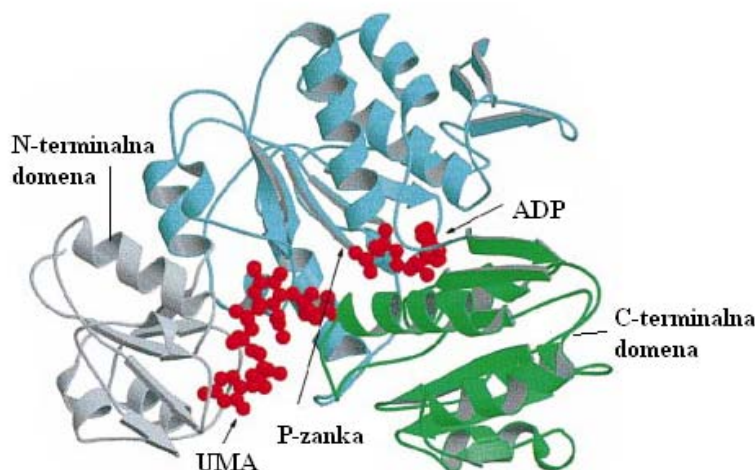
MurD (*N*-acetilmuramoil-L-alanin:D-glutamat-ligaza) katalizira tvorbo peptidne vezi med UDP- *N*-acetilmuramoil-L-alaninom (UMA) in D-glutamatom (slika 13).



Slika 13: Reakcija, ki jo katalizira MurD

Znane so kristalne strukture kompleksov MurD iz *Escherichie coli*, na podlagi katerih so tudi predpostavili mehanizem delovanja tega encima. Kristalna struktura MurD*UMA razkriva tri globularne domene. Aktivno mesto se nahaja v notranjosti in je obdano z vsemi domenami. N-terminalna domena je odgovorna za vezavo UDP dela substrata UDP-MurNAc-L-Ala in sestoji iz petih paralelnih β -struktur, ki jo obdajajo štiri α -vijačnice.

Centralna domena je odgovorna za vezavo ATP in preostalega del substrata in je sestavljena iz šest paralelnih β -struktur, ki jih obdaja sedem α -vijačnic ter tri majhne antiparalelne β -strukture. C-terminalna domena pa je odgovorna za vezavo D-glutaminskega ostanka produkta UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu. Sestoji iz šestih β -struktur, ki so sestavljene iz petih paralelnih verig in ene antiparalelne verige, obdanih s petimi α -vijačnicami (slika 14) (13,14,15).

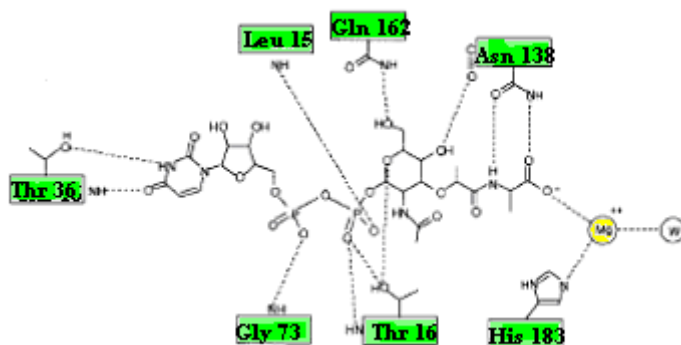


Slika 14: Prostorski prikaz strukture MurC

1.4.2.1. MurD v kompleksu z UMA in ATP

Za vezavo substrata v aktivno mesto so nujne interakcije z aminokislinski preostanki, ki tvorijo vodikove vezi z UDP delom substrata (Leu 15, Thr 16, Thr 36 in Gly 73) nadalje s tistimi, ki so pomembni pri interakcijah z *N*-acetilmuraminsko kislino (Thr 16, Gln 162 in Asn 138) ter s tistimi, ki z H-vezmi vežejo L-alaninski del substrata (Asn 138 in His 183). S tem delom substrata tvori interakcije tudi magnezijev ion (slika 15) (12).

Celotna molekula ATP se veže v žep med centralno in C-terminalno domeno. Žep, kamor se veže adeninski obroč, tvorita na eni strani Asn 113 in Gly 114, na drugi strani His 267 in na vrhu Asn 271. Za specifičnost encima MurD za adeninski obroč sta odgovorni dve vodikovi vezi z aminokislinskim preostankom Asn 271. Ribozni obroč sega tudi v centralno domeno in tvori hidrofobne interakcije s Ser 325 ter vodikove vezi s stransko verigo Asp 317 in molekulo vode. α -fosfat tvori interakcije z Gly 114, Lys 115 in Arg 302, β -fosfat pa z Gly 114, Lys 115, Ser 116 in enim izmed magnezijevih ionov (11).



Slika 15: Vezavno mesto za UMA na MurD

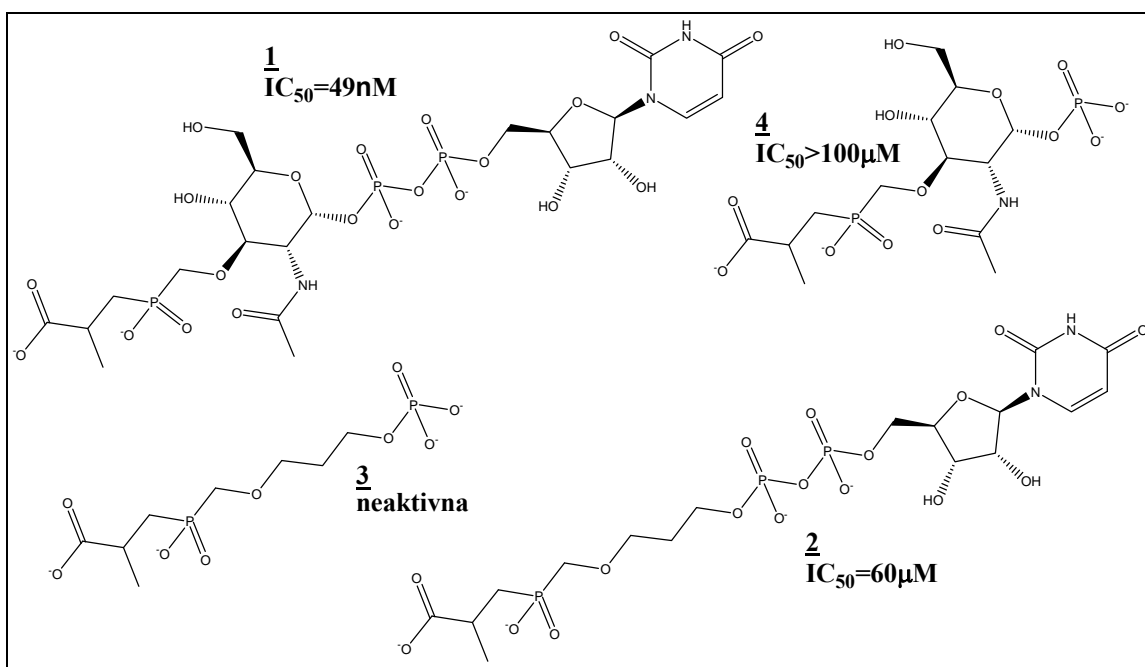
1.5. INHIBITORJI AMINOKISLINSKIH LIGAZ

1.5.1. Inhibitorji MurC

Prve inhibitorje tega encima so odkrili pri preučevanju specifičnosti encima MurC (*E.coli*) za L-alanin. Analogi L-alanina s spremenjeno stransko skupino (haloalanin, nenasičene amino kisline, glicin, serin) so do določene mere (26% - 89%) zavirali encim pri koncentraciji 10 mM (16).

Najučinkovitejši in najbolj znani inhibitorji aminokislinskih ligaz so fosfinati, ki so derivati fosfinske kisline. Ugotovili so, da encimi, ki katalizirajo tvorbo amidne vezi s sočasno hidrolizo ATP, pospešijo prenos γ -fosfatne skupine ATP na fosfinatni anion, pri čemer nastaneta ADP in fosforiliran inhibitor. Nastala fosforil fosfinatna struktura pa je zelo dober mimetik tetraedričnega intermedijata, ki nastane pri reakcijah kataliziranih z Mur ligazami. Zaradi podobnosti tega mehanizma pri vseh štirih ligazah fosfinati kot analogi prehodnega stanja inhibirajo vse štiri ligaze (8, 14).

Prvi v literaturi objavljen izredno učinkovit inhibitor encima MurC (*E.coli*) je fosfinatni analog prehodnega stanja z $IC_{50} = 49$ nM, ki je bil tudi biološko ovrednoten (spojina **1**) (16). V sintezo spojine niso vključili metilne skupine mlečne kisline, uporabili pa so racemni alanin. Pri spojini **2**, ki ima slabše inhibitorno delovanje ($IC_{50} = 60$ μ M), pa so muraminsko kislino zamenjali z 1,3-propandiolnim distančnikom. Spojina **3** nima inhibitornega delovanja, spojina **4** pa ima IC_{50} večjo od 100 μ M (slika 16).



Slika 16: Fosfinatni inhibitorji, ki so bili testirani na MurC

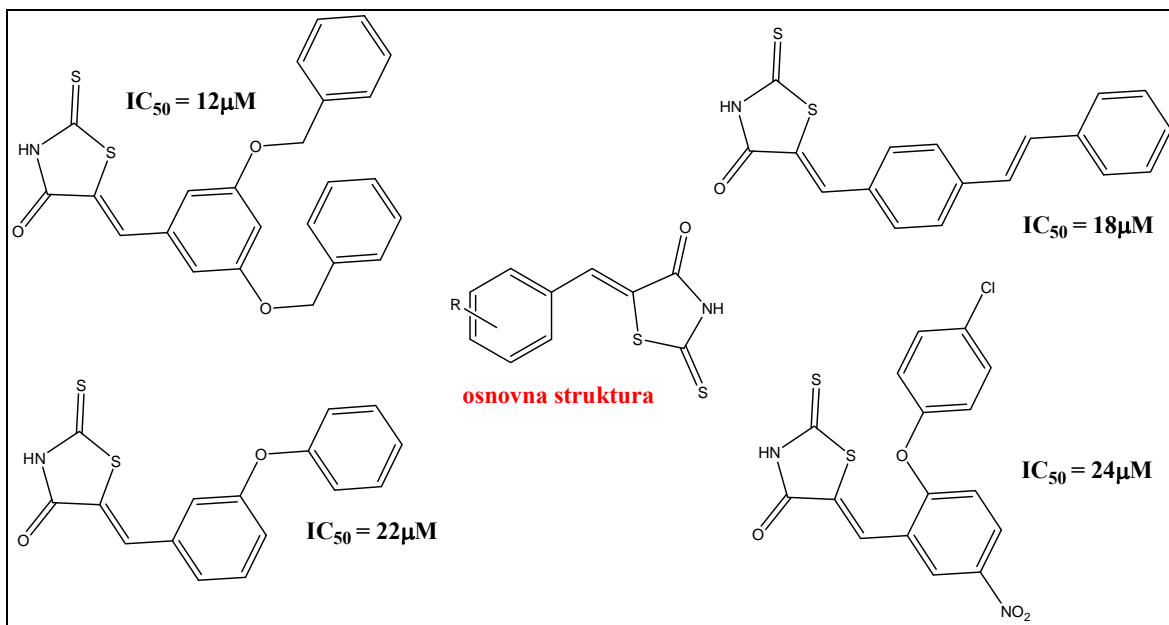
Rezultati testov so pokazali, da:

- zamenjava muraminske kisline (spojina **1**) s fleksibilnim 1,3-propandiolom (spojina **3**) zmanjša inhibitorno delovanje za 1000-krat,
- UDP del je nujno potreben za inhibitorno delovanje (spojini **3** in **4**), kar kaže na dejstvo, da že manjše poenostavitve spojine **1** privedejo do praktično neučinkovitih derivatov (16).

Vse te spojine vsebujejo etersko vez na α -mestu fosfata, kar otežuje sintezo, saj je taka struktura zelo nestabilna. Prav tako pa do sedaj še ni bilo nobenega poročila o protimikrobni aktivnosti fosfinatnih inhibitorjev. Vzrok za to je verjetno neuspešen transport teh molekul v citoplazmo bakterij, saj so zaradi anionske strukture preveč polarne, da bi prehajale (14).

Novo skupino inhibitorjev MurC imenovanih benziliden rodanini so identificirali s pomočjo naključnega rešetanja kemijske knjižnice velikega števila spojin. Benziliden rodanini so zgrajeni iz osnovnega rodaninskega skeleta (2-tioksotiazolidin-4-on), ki ima na mestu 5 pripeto fenoksi-, benziloksi-, fenilsulfanil- ali benzilsulfanil- substituirano benzilidensko skupino. Na osnovi poznavanja osnovne strukture so pripravili še približno

40 analogov, od katerih so bili le redki učinkoviti. S substitucijo N-3 skupine je inhibično delovanje izginilo, iz česar so sklepali, da je prosta NH skupina verjetno potrebna za tvorbo vodikove vezi v aktivnem mestu encima (slika 17).



Slika 17: Benziliden rodanini-osnovna struktura in štiri predstavniki te skupine

Ključna prednost benziliden rodaninskih inhibitorjev pred fosfinatnimi je, da kljub slabšemu zaviranju encima, izkazujejo tudi zmerno protibakterijsko delovanje proti po Gramu pozitivnim bakterijam in po Gramu negativnim bakterijam. Zaradi enostavnosti priprave in lahke dostopnosti osnovnih reagentov, predstavljajo obetavne spojine vodnice za razvoj novih, učinkovitejših inhibitorjev (17).

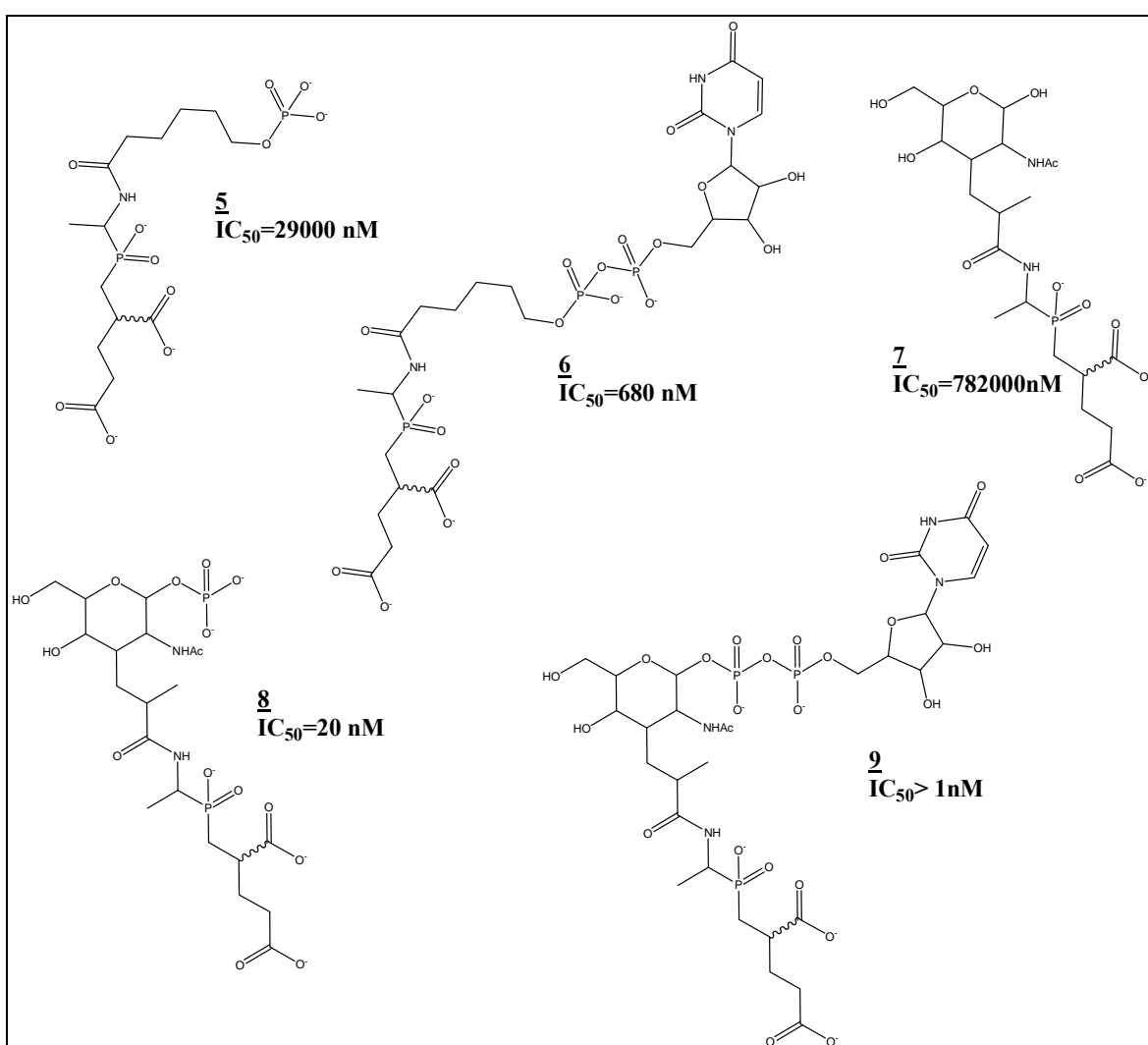
1.5.2. Inhibitorji MurD

Prve učinkovite inhibitorje MurD je na podlagi poznavanja mehanizma katalize objavila skupina pod vodstvom Martina Tannerja (slika 18). Najučinkovitejši analog iz te skupine je nekoliko poenostavljen fosfinatni analog ($IC_{50}=680$ nM) prehodnega stanja z ohranjenim UDP segmentom, ki je preko lipofilnega mostu povezan s peptidnim delom. Iz primerjave struktur spojin **5-9** lahko ugotovimo:

- najbolj učinkoviti so inhibitorji, ki so strukturno najbolj podobni naravnemu prehodnemu stanju encima (**9**),

- vgraditev *N*-acetilmuraminske kisline namesto hidrofobnega distančnika in upoštevanje stereokemije naravnega substrata v dipeptidnem izosteru poveča inhibitorno aktivnost za več kot 1000 krat (primerjava **5** in **8**),
- fosfatna skupina na anomerni –OH skupini poveča inhibitorno aktivnost za približno 40.000 krat (primerjava **7** in **8**),
- manj pomembna je prisotnost UDP dela, ki poveča inhibitorno aktivnost za približno 50 krat (primerjava **5** in **6** ali **8** in **9**) (18).

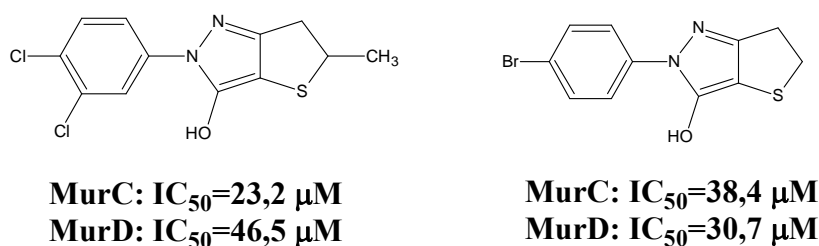
Na osnovi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da manjše spremembe v strukturi inhibitorja na aktivnost nimajo takšnega vpliva kot pri MurC.



Slika 18: Fosfinatni inhibitorji MurD

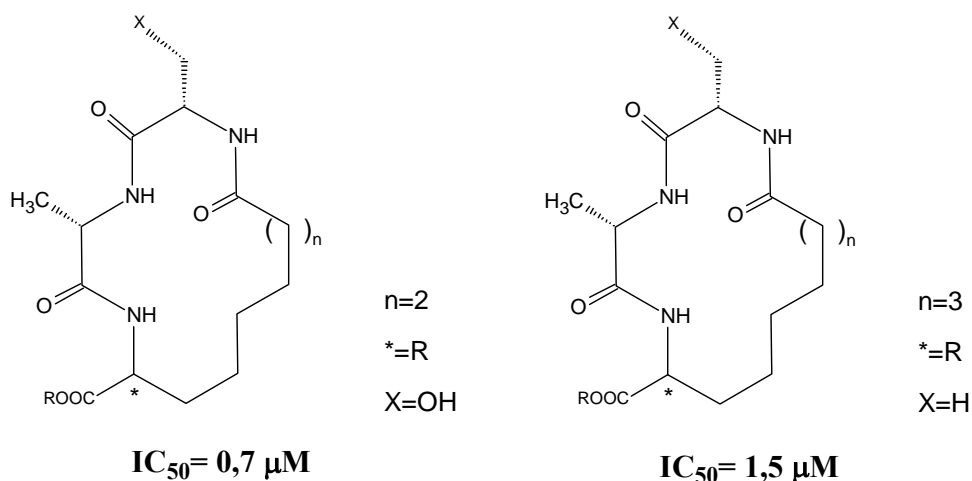
Leta 2003 so poročali o sintezi derivatov 2-fenil-5,6-dihidro-2H-tieno[3,2-c]pirazol-3-ola, ki so se izkazali kot dobri inhibitorji encimov MurB, MurC in MurD (slika 19), in sicer z

dobro protimikrobno aktivnostjo ($MIC=0,25-32 \mu\text{g/mL}$) proti *S. aureus* in drugim G+ bakterijam, vključno z MRSA, VRE ter na penicilin rezistentnim *Staphylococcus pneumoniae* (PRSP). Njihova slabost je le, da imajo veliko afiniteto do plazemskih proteinov, saj se je MIC v prisotnosti 4% albuminov iz govejega seruma zvišala na več kot $128 \mu\text{g/mL}$ (19).



Slika 19: Dva primera derivatov 2-fenil-5,6-dihidro-2H-tieno[3,2-c]pirazol-3-ola

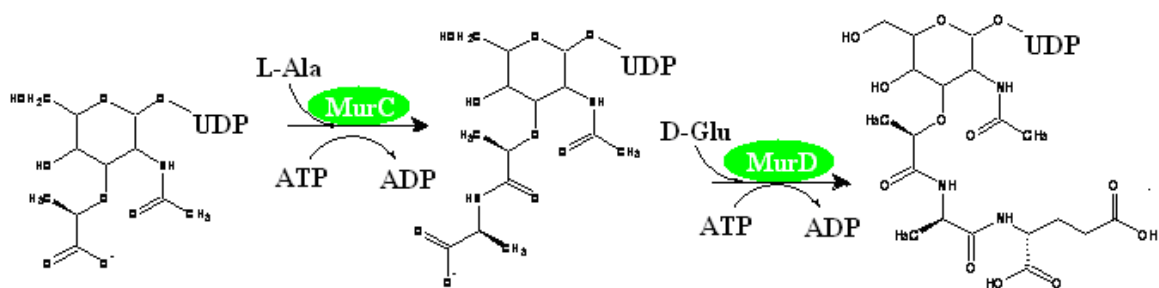
V letu 2003 so s pomočjo molekulskega modeliranja razvili serijo makrocikličnih inhibitorjev encima MurD (slika 20), ki se vežejo na hidrofobni predel znotraj aktivnega mesta encima, kjer interakcij ne tvori naravni substrat UMA. Ugotovili so, da je mogoče izpustiti precejšnji del sladkornega dela in obenem ohraniti inhibicijo (20).



Slika 20: Dva primera makrocikličnih inhibitorjev

2. NAČRT ZA DELO

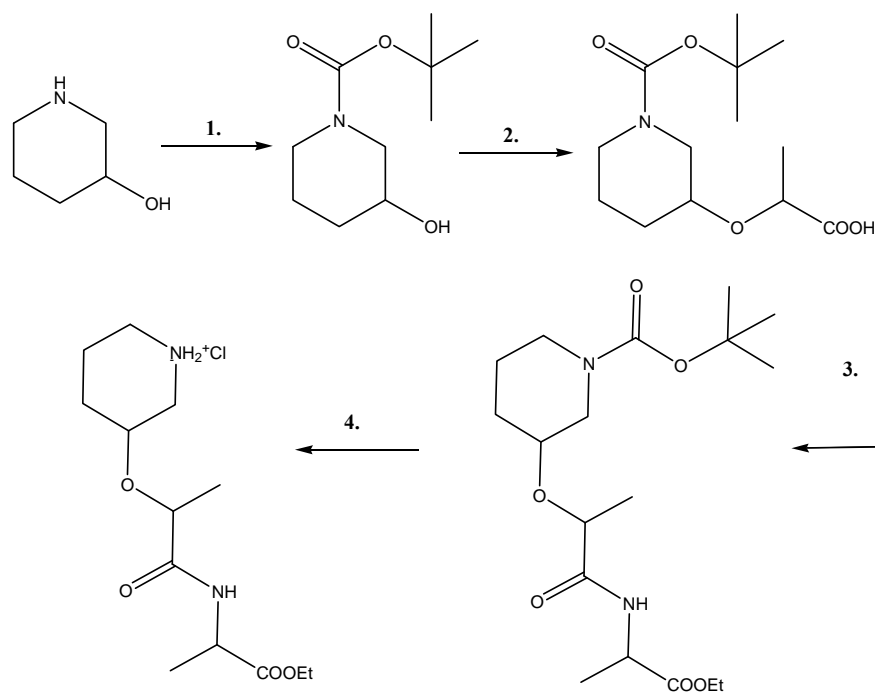
Namen diplomske naloge bo sintetizirati nove nizkomolekularne inhibitorje encimov MurC in MurD. Pri sami sintezi spojin bomo izhajali iz že poznanih mehanizmov reakcij, ki jih katalizirata omenjena encima. UDP-*N*-acetilmuraminska kislina: L-alanin-ligaza (MurC) sodeluje v adiciji prve aminokislina na citoplazemski prekursor peptidoglikana, pri čemer nastane produkt UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanin (UMA). Slednji predstavlja substrat za encim UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanin: D-glutamat-ligazo (MurD), ki pa katalizira adicijo D-glutamata na omenjen nukleotidni prekursor (slika 21).



Slika 21: Potek reakcij, ki ju katalizirata encima MurC in MurD

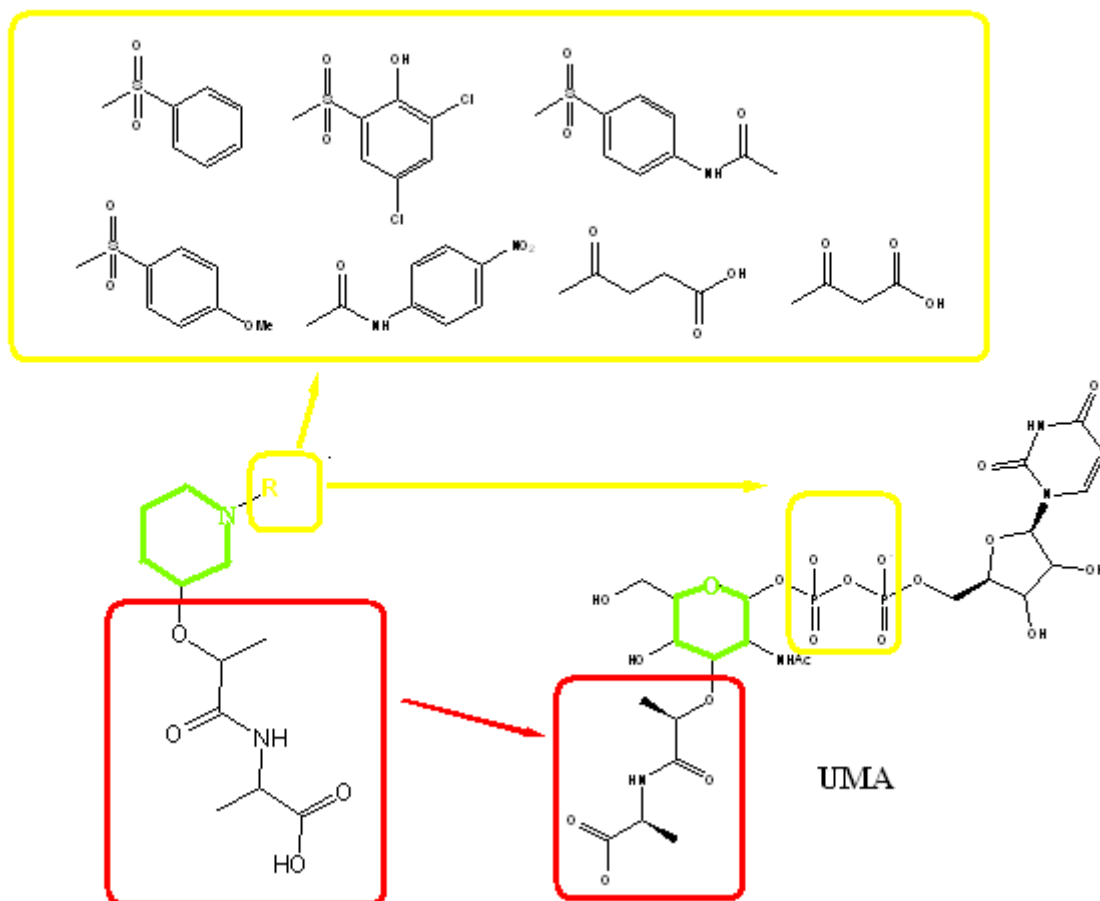
Za spojine, ki jih bomo sintetizirali, pričakujemo, da bodo analogi produkta MurC in da bodo zaradi same podobnosti z dejanskim produktom (UMA) sposobne interagirati z encimom ter ga posledično tudi inhibirati. Hkrati pričakujemo, da bodo naše spojine kot analogi substrata za MurD tudi z njim interagirale in ga tako inhibirale.

Kot osnovno spojino bomo pripravili spojino etil 2-(2-(piperidin-3-iloksi)propanamido)-propanoat (OAG **41**), ki jo bomo sintetizirali iz 3-hidroksipiperidina. Najprej bomo z (BOC)₂O zaščitili aminsko skupino piperidina in nato na hidroksilno skupino pripeli propanoilno skupino. V naslednji stopnji bomo na tem mestu tvorili amidno vez z etilnim estrom L-alanina. Sledila bo še odstranitev *tert*-butiloksikarbonilne zaščite v kislem (slika 22).



Slika 22: Reakcijska shema sinteze spojine OAG 41 (etil 2-(2-(piperidin-3-iloksi)propanamido)propanoata) (1: $(\text{BOC})_2\text{O}/\text{NaOH}$; 2: $\text{Cl}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COOH}/\text{NaH}$; 3: $\text{NH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COOEt}$, EDC, Hobt, Et_3N ; 4: $\text{HCl}_{(\text{g})}$).

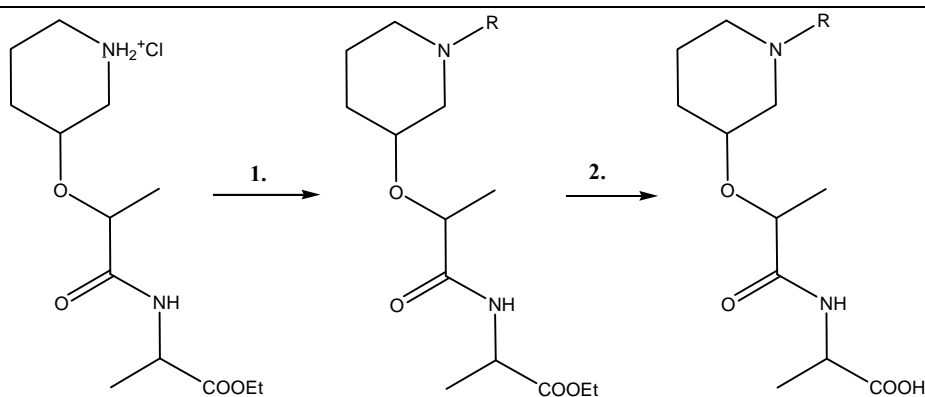
Na prosto amino skupino osnovne strukture bomo nato pripeli različne substituentne in tako dobili strukturo, ki oponaša UDP- *N*-acetilmuramoil-L-alanin (slika 23).



Slika 23: Primerjava strukture UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanina (UMA) z derivati 3-hidroksipiperidina.

Za uvedbo substituentov na aminske skupine piperidina bomo uporabili različne kislinske kloride, različne sulfonilkloride in 4-nitrofenilizocianat. Na koncu bomo izvedli še hidrolizo etilnega estra alanina in ostalih prisotnih esterskih skupin. Proste karboksilne skupine so namreč potrebne za tvorbo vodikovih vezi in ionskih interakcij. Končne spojine bodo tako derivati 2-(2-(piperidin-3-iloksi)propanamido)propanojske kisline (slika 24).

Vse spojine, ki jih bomo sintetizirali, bomo na koncu tudi *in vitro* testirali na encimih MurC in MurD.



Slika 24: Reakcijska shema sinteze derivatov 2-(2-(piperidin-3-iloksi)propanamido)propanojske kisline (1: Cl-CO-R, Cl-SO₂R₁, R₂C₆H₄-NCO/Et₃N; 2: NaOH).

Pri sintezi naših končnih spojin bomo oponašali strukturo naravnih substratov za omenjene encime. Strukture lahko v grobem razdelimo na peptidni del, sladkorni del in uridindifosfatni del (UDP). *N*-acetilmuraminsko kislino bomo zamenjali s piperidinskim obročem. Ta del produkta UMA z encimom MurC ne tvori pomembnejših specifičnih interakcij, zato domnevamo, da lahko na tem mestu poenostavimo strukturo. Peptidni del bomo pustili enak in s tem omogočili nastanek vodikovih vezi, ki drugače nastanejo med L-alaninskim delom substrata in MurD. UDP oz. njegovo fosfatno skupino pa bomo poskušali posnemati z acilnimi, sulfonilnimi in sečninskimi derivati pripetimi na aminsko skupino piperidina, ki bodo sposobne tvorbe vodikovih vezi. Obe fosfatni skupini namreč tvorita vodikove vezi z aminokislinskimi ostanki MurC in MurD.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Uporabljali smo reagente in topila različnih proizvajalcev (Acros, Aldrich, Fluka, Merck, Kemika).

3.2. METODE

3.2.1. Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija

Uporabljali smo plošče Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV lučko z valovno dolžino 254 nm.

Uporabljali smo naslednje mobilne faze: etilacetat; etilacetat : metanol (1:1), (5:2), (1:2); etilacetat : petroleter (1:1); etilacetat : heksan (1:2).

Kot orositveni reagent smo uporabili bromkrezol zeleno.

Kolonska kromatografija in kolonska kromatografija pod pritiskom

Pri kolonski kromatografiji smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel Kieselgel 60 z velikostjo delcev 0,063-0,200 mm (Merck, Darmstadt, Nemčija) in različne mobilne faze.

Pri kolonski kromatografiji pod pritiskom pa smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm (Merck, Darmstadt, Nemčija) in različne mobilne faze.

3.2.2. Spektroskopske metode

Jedrsko magnetna resonanca (NMR)

¹H NMR spektri so bili posneti z instrumentom Bruker Avance DPX₃₀₀ na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, ki deluje v okviru Centra za jedrsko magnetno resonanco

visoke ločljivosti. Spektri so bili posneti pri 300,12 MHz s TMS kot internim standardom. Kot topilo smo uporabljali DMSO-d₆ in CDCl₃.

Masna spektrometrija (MS)

Masni spektri so bili posneti na spektrometru Varian-MAT 311 A z EI, FAB ali ESI tehniko na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Posneli smo tudi HR-MS spektre kot nadomestek elementne analize spojin.

Infrardeča spektroskopija (IR)

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

Elementna analiza

Vsebnosti elementov C, H, N so bile izmerjene z analizatorjem Perkin Elmer 2400 CHN na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani. Namesto elementne analize smo posneli HR-MS spektre, ki nam prikažejo možno kombinacijo vsebnosti posameznega elementa v spojini glede na dano molekulsko maso.

3.2.3. Tališče

Temperaturo tališča smo določali s Politherm A Heiztisch mikroskopom z ogrevalno mizico proizvajalca Wagner&Munz. Tališča spojin nismo korigirali.

3.2.4. Biokemijska testiranja

Spojine, ki smo jih sintetizirali, so bile testirane na inhibitorno aktivnost na encimu MurC in MurD s testom z malahitnim zelenim. Test se izvaja na mikrotitrski ploščici s pripravljenimi raztopinami encima (izoliran iz seva *E.coli* JM83 ter popolnoma očiščen), substrata in testiranih spojin. Osnova testa je hidroliza ATP, ki ga oba encima potrebujeta za potek reakcije, na ADP in fosfat ter nastanek kompleksa med slednjim in barvilom malahitnim zelenim (uporabili smo stabilnejšo obliko z dodanim amonijevim molibdatom – reagent Biomol GreenTM; slika 14). Nastali kompleks lahko kvantitativno določimo z merjenjem absorpcijskega maksimuma pri 650 nm. Tako lahko posredno določimo

množino fosfata, ki nastaja pri reakciji in sklepamo na katalitično aktivnost encimov MurC in MurD. V primeru prisotnosti encimskega inhibitorja se katalitična aktivnost encima zniža, kar je razvidno iz manjše množine nastalega fosfata v primerjavi s kontrolo brez inhibitorja (21).

Testi so bili izvedeni na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

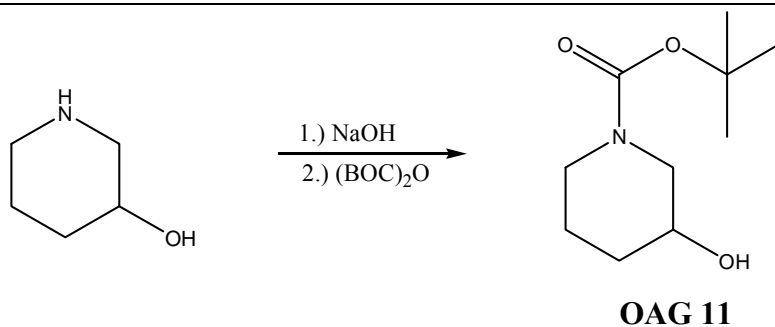
3.2.5. Nomenklatura in risanje spojin

Pri poimenovanju spojin in risanju strukturnih formul smo uporabljali računalniški program ChemDraw, verzija 11.0, podjetja CambridgeSoft.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. SINTEZA DERIVATOV 3-HIDROKSIPIPERIDINA

4.1.1. Sinteza *tert*-butil-3-hidroksipiperidin-1-karboksilata (OAG 11)



V bučko smo natehtali 2,00 g (19,8 mmol) 3-hidroksipiperidina in dodali 20 ml dioksana, 20 ml vode ter 20 ml 1M NaOH. Tako pripravljeno reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli in ji po kapljicah ob mešanju dodajali 4,75 g (21,7 mmol) di-*tert*-butildikarbonata ((BOC)₂O) raztopljenega v 20 ml dioksana. Nato smo mešali 2 uri pri sobni temperaturi. Izpadla je oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem in nadaljevali delo z matičnico. Dioksan smo uparili pod znižanim tlakom. Preostanku v bučki smo dodali 50 ml vode in vsebino nato še nakisali z 1M HCl (do pH 1-2). Sledila je ekstrakcija iz vodne faze z dvakrat po 25 ml diklorometana. Združene organske faze smo sprali s 25 ml 1M NaOH in s 25 ml nasičene vodne raztopine NaCl ter sušili 15 minut z Na₂SO₄. Po odparitvi topila pod znižanim tlakom smo dobili 3,57 g (17,7 mmol, 90 %) brezbarvnega olja.

Izkoristek: 90 %

Elementna sestava: C₁₀H₁₉N₁O₃

M= 201,26 g/mol

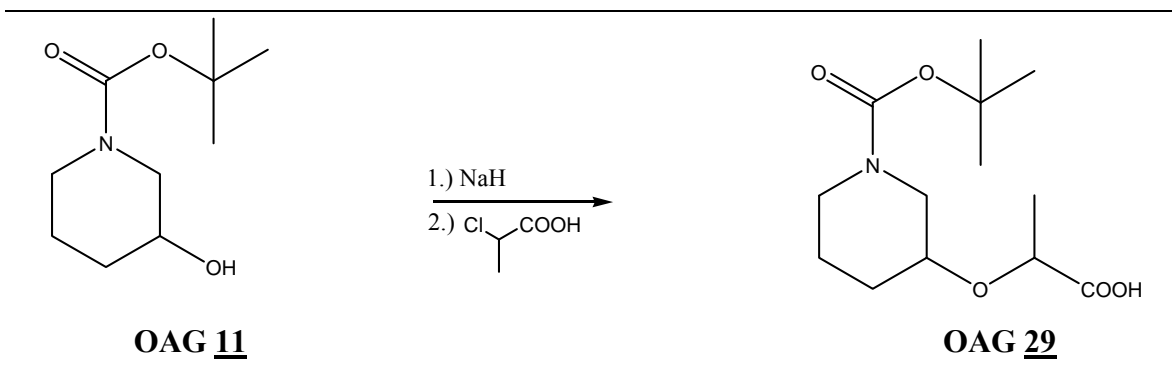
Opis: brezbarvno olje

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 1,41 -1,54 (m, 11H, C(CH₃)₃, CH₂), 1,67-1,79 (m, 1H, CH₂), 1,80-1,93 (m, 1H, CH₂), 3,03-3,17 (m, 2H, CH₂), 3,52-3,57 (m, 1H, CH-O), 3,71-3,78 (m, 2H, CH₂), 4,81 (s, 1H, OH) ppm.

MS (ESI): m/z(%): 202 (MH⁺, 22), 57 (100).

IR (KBr): ν 3467, 2943, 1670, 1436, 1366, 1259, 1167, 1071, 874 cm^{-1} .

4.1.2. Sinteza 2-(1-(terc-butoksikarbonil)piperidin-3-iloksi) propanojske kisline (OAG 29)



V suho bučko smo natehtali 2,98 g (74,5 mmol) 60 % NaH, jo pokrili s klorokalcijevo cevko in postavili na ledeno kopel. Postopoma smo med mešanjem dodajali brezvodni dioksan. Dodali smo ga toliko, da se je NaH raztopil. Nato smo k reakcijski zmesi po kapljicah dodajali v brezvodnem dioksanu suspendirane 3g (14,9 mmol) terc-butyl-3-hidroksipiperidin-1-karboksilata (OAG **11**). Po vsem dodatku izhodne spojine smo reakcijsko zmes mešali dve uri pri sobni temperaturi. Po kapljicah ob mešanju smo dodali 1,78 g (16,4 mmol) 2-kloropropionske kisline ter reakcijsko zmes mešali 24 ur pri temperaturi 80°C.

Po 24 urah mešanja smo bučko z reakcijsko zmesjo postavili na ledeno kopel in vanjo počasi dodajali koščke ledu, s čimer smo dosegli, da se je prebitni NaH pretvoril v NaOH. Dioksan smo nato odparili pod znižanim tlakom, preostanek v bučki pa smo nakisali z 1M HCl ter trikrat ekstrahirali s 30 ml diklorometana. Združene organske faze smo najprej sprali s 30 ml vode, nato s 30 ml NaCl ter nato še sušili z Na_2SO_4 . Diklorometan smo odparili pod znižanim tlakom, pri čemer je nastalo rumenooranžno olje. Dobili smo 1,64 g (6,00 mmol, 41 %) produkta.

Izkoristek: 41 %

Elementna sestava: $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_5$

M=273,33 g/mol

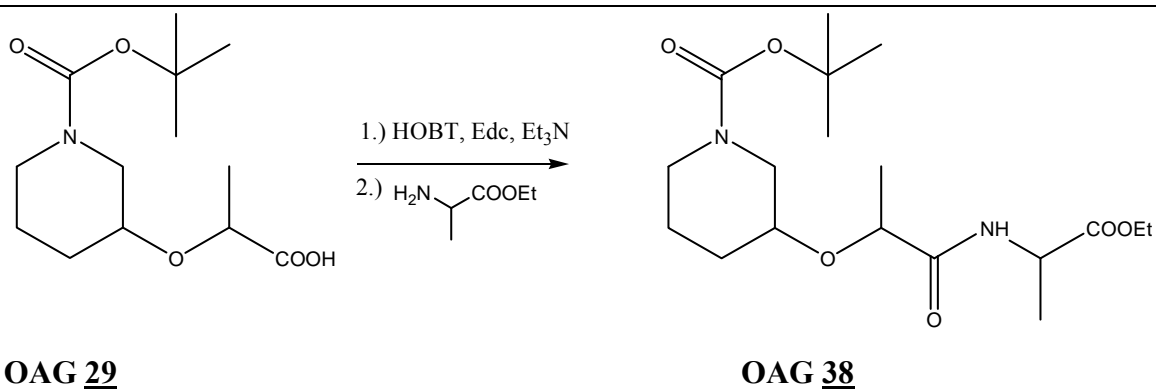
Opis: rumenooranžno olje

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6): δ 1,24-1,40 (m, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, O-CH- CH_3), 1,60-1,65 (m, 2H, CH_2), 1,72-1,76 (m, 2H, CH_2), 2,87-2,93 (m, 1H, CH-O), 3,36-3,49 (m, 2H, CH_2), 3,65-3,73 (m, 2H, CH_2), 4,05 (q, 1H, $J=6,72$ Hz, O-CH- CH_3), 12,51 (s, 1H, COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z(\%)$: 296,1 (MNa^+ , 100)

IR(NaCl): ν 2926, 1742, 1693, 1431, 1366, 1242, 1153, 1072, 872 cm^{-1} .

4.1.3. Sinteza terc-butil 3-(1-(1-etoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)piperidin-1-karboksilata (OAG 38)



1,00g (3,66 mmol) 2-(1-(terc-butoksikarbonil)piperidin-3-iloksi)propanojske kisline (OAG 29) smo raztopili v 10 ml diklorometana ter v bučko dodali še 495 mg (3,7 mmol) Hobt, 702 mg (3,66 mmol) EDC in 2 ml trietilamina. Reakcijsko zmes smo mešali eno uro pri sobni temperaturi, nakar smo dodali še 857 mg (7,33 mmol) etilnega estra L-alanina in v pokriti bučki reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi 24 ur. Po tem času smo reakcijsko zmes razredčili z 20 ml diklorometana in jo dvakrat sprali s 15 ml 10% vodne raztopine citronske kisline in dvakrat s 15 ml nasičene vodne raztopine NaHCO_3 , nato s 15 ml vode in na koncu še s 15 ml nasičene vodne raztopine NaCl . Organsko fazo smo sušili z Na_2SO_4 , sušilno sredstvo odfiltrirali ter iz preostanka odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 630 mg (1,69 mmol) rumeno-oranžnega olja. Produkt smo nato očistili s kolonsko kromatografijo (SF: silikagel, MF: etilacetat) in dobili 401 mg (1,08 mmol, 22%) rumenega olja.

Izkoristek: 22 %

Elementna sestava: $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_6$

M=372,46 g/mol

Opis: rumeno olje

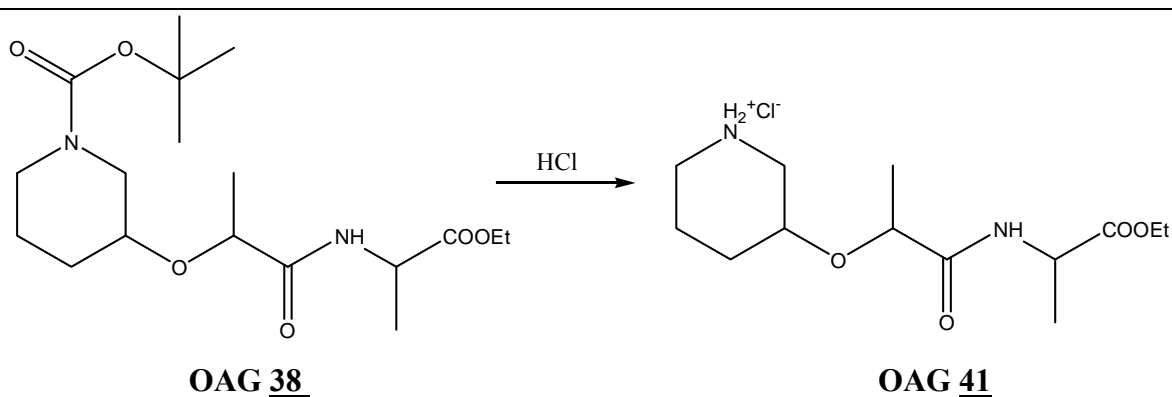
$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ 1,23-1,34 (m, 3H, COO-CH-CH_3), 1,36-1,49 (m, 17H, $\text{C(CH}_3)_3$, CH_2 , , NH-CH-CH_3 , $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), 1,74-1,77 (m, 2H, CH_2), 3,11-3,20 (m, 3H, CH-O , CH_2), 3,39-3,43 (m, 2H, CH_2), 3,98 (q, 1H, $J=7,19$ Hz, O-CH-CH_3), 4,18 (q, 2H, $J=7,10$ Hz, $\text{COO-CH}_2\text{-CH}_3$), 4,47-4,57 (m, 1H, NH-CH-CH_3), 7,38 (s, 1H, CONH) ppm.

MS (ESI): $m/z(\%)$: 373,2 (MH^+ , 55), 395,2 (MNa^+ , 95), 317,2 (100)

IR (NaCl): ν 3410, 2978, 1739, 1689, 1517, 1424, 1365, 1240, 1155, 1105, 1017, 864, 768 cm^{-1} .

Elementna analiza: izračunano za $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_6$ (M=372,46 g/mol): 57,90% C; 8,92% H; 7,89% N. **Izračunano:** 58,05% C; 8,66% H; 7,52% N.

4.1.4. Sinteza 3-(1-(1-etoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)-piperidinijevega klorida (OAG 41)



1,00 g (2,68 mmol) terc-butyl 3-(1-(1-metoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)piperidin-1-karboksilata (OAG 38) smo raztopili v 25 ml etilacetata in nato v bučko pol ure uvajali plinasti HCl. Raztopino v bučki smo nato pustili stati pri sobni temperaturi dve uri. Po tem času smo vsebino prepihali z argonom, da smo odstranili raztopljen HCl in nato pod znižanim tlakom odparili etilacetat. Nastalo je rumeno olje, ki smo ga v zamašeni bučki postavili v hladilnik.

Po približno 24 urah se je olje strdilo, nastalo je 896 mg (3,29 mmol, 100%) viskoznega rumenega produkta.

Izkoristek: 100 %

Elementna sestava: C₁₃H₂₄N₂O₄

M=272,34 g/mol

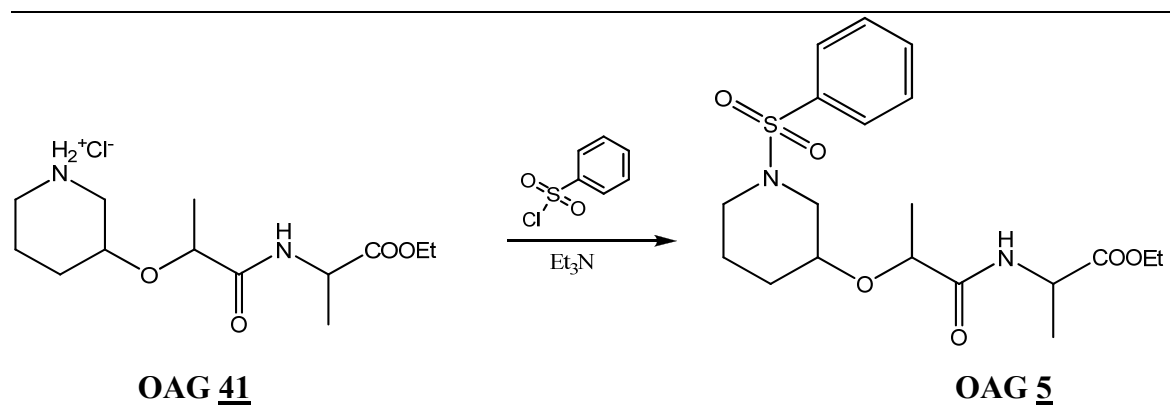
Opis: rumena viskozna tekočina

¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ 1,15-1,23 (m, 3H, COO-CH₂-CH₃), 1,28-1,34 (m, 6H, CH₃-CH-O, CH₃-CH-NH), 1,51-1,87 (m, 4H, CH₂, CH₂), 1,97 (s, 1H, CH₂-NH-CH₂), 2,96-3,13 (m, 5H, CH₂, CH-O, CH₂), 3,99-4,09 (m, 3H, COOCH₂CH₃, O-CH-CH₃), 4,25-4,35 (m, 1H, NH-CH-CH₃), 8,32 (s, 1H, CONH) ppm.

MS (ESI): m/z(%): 273 (MH⁺, 90), 83 (100)

IR(NaCl):v 3398, 2983, 1731, 1652, 1537, 1452, 1217, 1156, 1120, 996 cm⁻¹.

4.1.5. Sinteza etil 2-(2-(1-(fenilsulfonil)piperidin-3-iloksi) propanamido) propanoata (OAG 5)



200 mg (0,73 mmol) 3-(1-(1-etoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)-piperidinijevega klorida (OAG 41) smo raztopili v 20 ml diklorometana, dodali 0,2 ml trietilamina in 126 mg (0,71mmol) benzensulfonilklorida. Reakcijsko zmes smo v pokriti bučki pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Raztopino smo najprej razredčili z etilacetatom in nato organsko fazo spirali s 15 ml 1M HCl, 15 ml nasičene vodne raztopine NaHCO₃, 15 ml vode in na koncu še s 15 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄, nato pa etilacetat odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 213 mg (0,52 mmol, 70 %) produkta v obliki rumenega olja. Slednjega smo nato očistili s kolonsko kromatografijo pod pritiskom (SF:silikagel, MF: etilacetat:petroleter (1:1)) in dobili 161 mg (0,39 mmol, 53 %) rumenega olja.

Izkoristek: 53 %

Elementna sestava: C₁₉H₂₈N₂O₆S

M= 412,50 g/mol

Opis: rumeno gosto olje

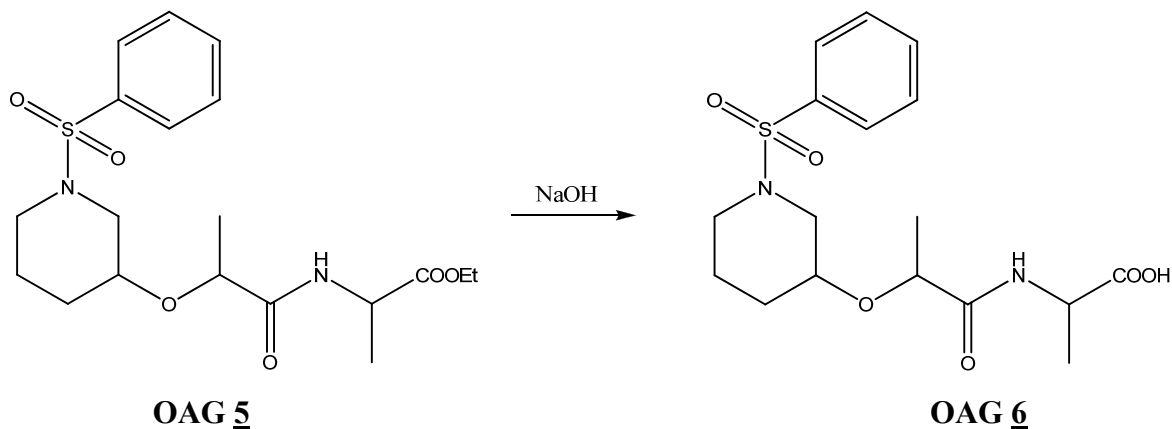
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1,16-1,24 (m, 3H, COO-CH₂-CH₃), 1,28-1,34 (m, 6H, CH₃-CH-O, NH-CH-CH₃), 1,39-1,43 (m, 2H, CH₂), 1,75-1,78 (m, 2H, CH₂), 2,56-2,6 (m, 3H, CH-O, CH₂), 3,13-3,16 (m, 2H, CH₂), 3,99-4,12 (m, 3H, CH₃-CH-O, COO-CH₂-CH₃), 4,26-4,32 (m, 1H, NH-CH-CH₃), 7,65 (t, 2H, J=6,90Hz, Ar-H), 7,74 (t, 1H, J=7,02Hz, Ar-H), 8,01 (d, 2H, J=7,56Hz, Ar-H), 8,08 (s, 1H, CONH) ppm

MS (ESI): m/z(%): 413 (MH⁺, 85), 223 (100)

HR-MS: m/z: MH⁺ 413,1740 (izračunano za C₁₉H₂₉N₂O₆S: 413,1746)

IR(NaCl):ν 3401, 2937, 1735, 1673, 1591, 1492, 1263, 1163, 1092, 1026, 964, 802, 741 cm⁻¹.

4.1.6. Sinteza 2-(2-(1-(fenilsulfonil)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanojske kisline (OAG 6)



100 mg (0,24 mmol) etil 2-(2-(1-(fenilsulfonil)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanoata (OAG 5) smo raztopili v 20 ml dioksana, dodali 2 ml 2M NaOH ter reakcijsko zmes pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Dioksan smo odparili pod znižanim tlakom (P=120±15 mmHg, T= 55±5°C). Preostalo vodno fazo smo nakisali z 1M HCl in jo nato odparili pod znižanim tlakom (P=110±15 mmHg, T= 55±5°C). Ostanek v bučki smo raztopili v metanolu ter nastali NaCl, ki je v metanolu netopen, odfiltrirali s presesavanjem. Postopek smo nadaljevali z matičnico. Metanol smo odparili pod znižanim tlakom in dobili 60,0 mg

(0,16 mmol, 64 %) produkta v obliki belih kristalčkov. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo pod pritiskom (SF:silikagel, MF: eilacetat:petroleter (1:1)) in dobili 40 mg (0,10 mmol, 43 %) končnega produkta v obliki belih kristalčkov.

Izkoristek: 43 %

Elementna sestava: C₁₇H₂₄N₂O₆S

M= 384,45 g/mol

Opis: beli kristalčki

T_{tališča}: 114-117 °C

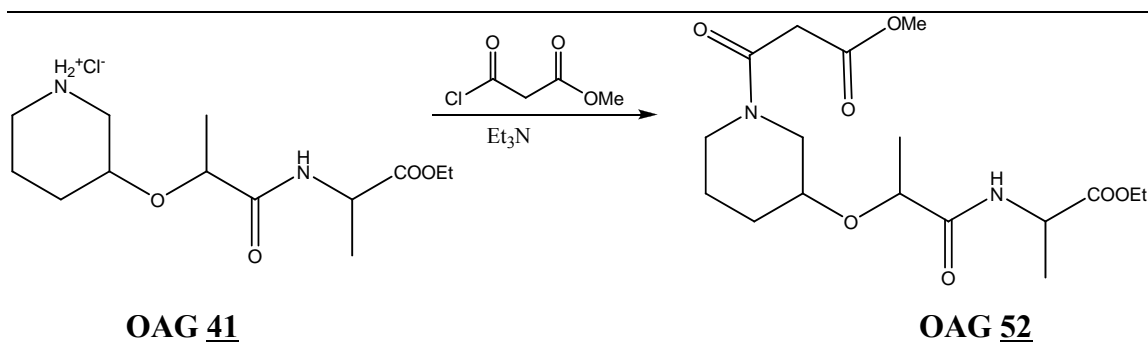
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1,27-1,34 (m, 3H, O-CH-CH₃), 1,38-1,48 (m, 5H, CH₂, NH-CH-CH₃), 1,71-1,77 (m, 2H, CH₂), 2,57-2,68 (m, 1H, CH-O), 3,13-3,16 (m, 2H, CH₂), 3,34-3,44 (m, 2H, CH₂), 3,88-3,93 (m, 1H, CH₃-CH-O), 4,29-4,35 (m, 1H, NH-CH-CH₃), 7,66 (t, 2H, J=7,31Hz, Ar-H), 7,72 (t, 1H, J=7,10Hz, Ar-H), 7,93 (d, 2H, J=7,06Hz, Ar-H), 8,12 (s, 1H, CONH), 12,65 (s, 1H, CHCOOH) ppm

MS (ESI): m/z(%): 385,1 (MH⁺, 62), 236,1 (100)

HR-MS: m/z: MH⁺ 385,1448 (izračunano za C₁₇H₂₅N₂O₆S: 385,1433)

IR(NaCl):v 3360, 2928, 1716, 1669, 1582, 1491,1168, 1086, 1017, 953, 736 cm⁻¹.

4.1.7. Sinteza metil 3-(3-(1-(1-etoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)-piperidin-1-il)-3-oksopropanoata (OAG 52)



200 mg (0,73 mmol) 3-(1-(1-etoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)-piperidinijevega klorida (OAG 41) smo raztopili v 20 ml diklorometana, dodali 0,2 ml trietilamina in 96,9 mg (0,71mmol) metilmalonilklorida. Reakcijsko zmes smo v pokriti bučki pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Raztopino smo najprej razredčili z etilacetatom in nato organsko fazo spirali s 15 ml 1M HCl, 15 ml nasičene vodne raztopine

NaHCO₃, 15 ml vode in na koncu še s 15 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄, nato pa etilacetat odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 110 mg (0,29 mmol, 40 %) rumenorjavega olja.

Izkoristek: 40 %

Elementna sestava: C₁₇H₂₈N₂O₇

M=372,41 g/mol

Opis: rumenorjavo olje

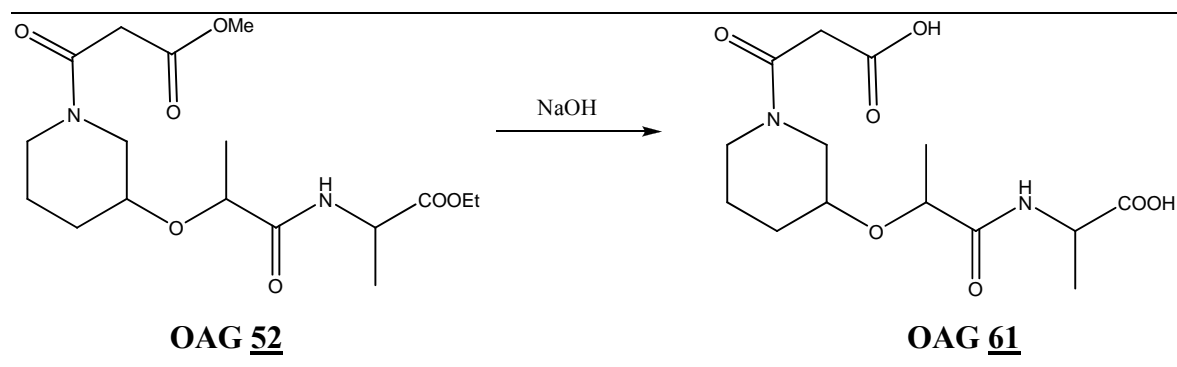
¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ 1,29-1,33 (m, 6H, COO-CH-CH₃, O-CH-CH₃), 1,40-1,51 (m, 5H, CH₂, NH-CH-CH₃), 1,59-1,76 (m, 2H, CH₂), 1,83-1,88 (m, 2H, CH₂), 2,45-2,80 (m, 1H, CH-O), 3,34-3,42 (m, 2H, CH₂) 3,53-3,65 (m, 5H, CH₃-O, CH₂), 3,96-4,13 (m, 3H, O-CH-CH₃, COO-CH₂-CH₃), 4,29-4,31 (m, 1H, NH-CH-CH₃), 8,04 (s, 1H, CONH) ppm.

MS (ESI): m/z(%): 373,2 (MH⁺, 86), 395,2 (MNa⁺, 100)

HR-MS: m/z: MH⁺ 373,1981 (izračunano za C₁₇H₂₅N₂O₆S: 373,1976)

IR(NaCl):v 3408, 2941, 1739,1645, 1449, 1522, 1449, 1205, 1160, 1112, 1020, 859 cm⁻¹.

4.1.8. Sinteza 3-(3-(1-(1-karboksietilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)piperidin-1-il)-3-oksopropanojske kisline (OAG 61)



105 mg (0,28 mmol) metil 3-(3-(1-(1-etoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)-piperidin-1-il)-3-oksopropanoata (OAG 52) smo raztopili v 20 ml dioksana, dodali 4 ml 2M NaOH ter reakcijsko zmes pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Dioksan smo odparili pod znižanim tlakom (P=120±15 mmHg, T= 55±5°C). Preostalo vodno fazo smo nakisali z 1M HCl in jo nato odparili pod znižanim tlakom (P=110±15 mmHg, T=

55±5°C). Ostanek v bučki smo raztopili v metanolu ter nastali NaCl, ki je v metanolu netopen, odfiltrirali s presesavanjem. Postopek smo nadaljevali z matičnico. Metanol smo odparili pod znižanim tlakom in dobili 77,0 mg (0,23 mmol, 83 %) produkta v obliki rumenkih kristalčkov.

Izkoristek: 83%

Elementna sestava: C₁₄H₂₂N₂O₇

M=330,33 g/mol

Opis: rumeni kristalčki

T_{tališča}: > 350 °C

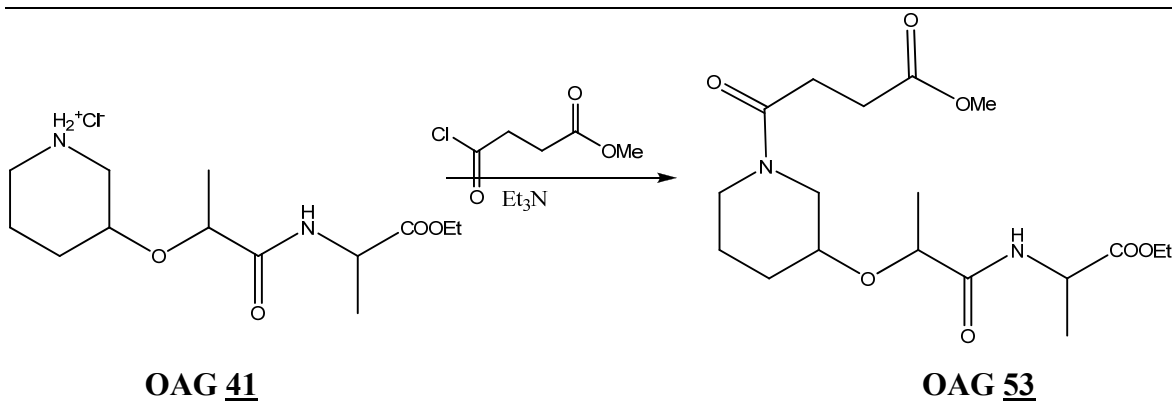
¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ 1,24-1,25 (d, 3H, J=6,79Hz, O-CH-CH₃), 1,40-1,51 (m, 5H, CH₂, NH-CH-CH₃), 1,59-1,82 (m, 4H, CH₂, CH₂), 2,94-2,96 (m, 1H, CH-O), 3,56-3,66 (m, 4H, CH₂, CH₂), 4,03-4,07 (m, 1H, O-CH-CH₃), 4,29-4,49 (m, 1H, NH-CH-CH₃), 8,16 (s, 1H, CONH), 9,38-9,54 (m, 2H, CHCOOH, CH₂COOH) ppm.

MS (ESI): m/z(%): 329 (MH⁻, 25), 343 (100)

HR-MS: m/z: MH⁻ 329,1360 (izračunano za C₁₄H₂₁N₂O₇:329,1349)

IR(KBr):ν 3432, 1738, 1634, 1540,1457,1222, 1162, 1002, 640 cm⁻¹.

4.1.9. Sinteza metil 4-(3-(1-(1-etoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)-piperidin-1-il)-4-oksobutanoata (OAG 53)



250 mg (0,92 mmol) 3-(1-(1-etoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)-piperidinijevega klorida (OAG 41) smo raztopili v 20 ml diklorometana, dodali 0,2 ml trietilamina in 133 mg (0,89 mmol) metilsukcinilklorida. Reakcijsko zmes smo v pokriti bučki pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Raztopino smo najprej razredčili z

etilacetatom in nato organsko fazo spirali s 15 ml 1M HCl, 15 ml nasičene vodne raztopine NaHCO₃, 15 ml vode in na koncu še s 15 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄, nato pa etilacetat odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 143 mg (0,37 mmol, 40 %) rumenorjavega olja.

Izkoristek: 40%

Elementna sestava: C₁₈H₃₀N₂O₇

M=386,44 g/mol

Opis: rumenorjavo olje

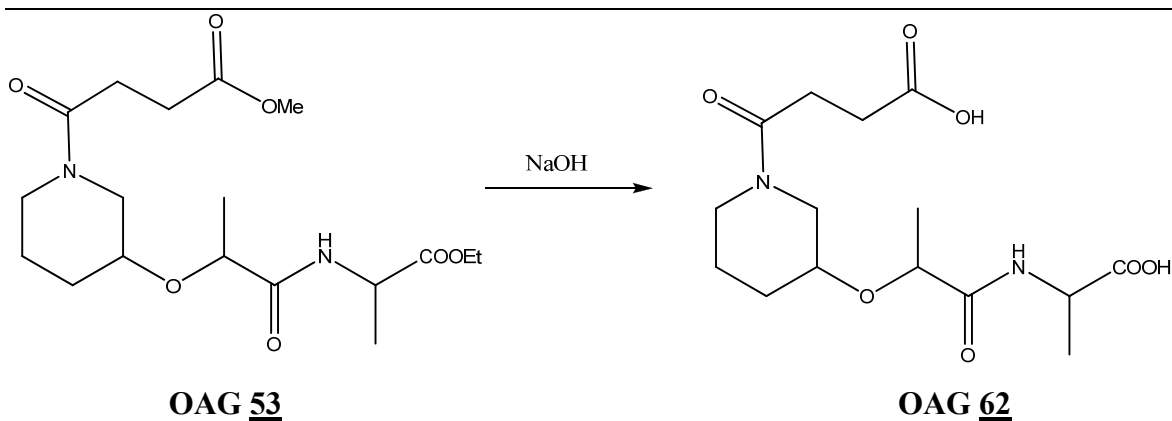
¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆):δ 1,29-1,33 (m, 6H, COO-CH-CH₃, O-CH-CH₃), 1,36-1,51 (m, 5H, CH₂, NH-CH-CH₃), 1,59-1,76 (m, 2H, CH₂), 2,54-2,61 (m, 4H, CO-CH₂CH₂-CO), 2,73-2,81 (m, 1H, CH-O), 3,56-3,62 (m, 7H, CH₂, CH₂, CH₂COOCH₃), 3,99-4,09 (m, 3H, O-CH-CH₃, COO-CH₂-CH₃), 4,23-4,34 (m, 1H, NH-CH-CH₃), 8,02 (s, 1H, CONH) ppm.

MS (ESI): m/z(%): 387,2 (MH⁺, 100)

HR-MS: m/z: MH⁺ 387,2132 (izračunano za C₁₇H₂₅N₂O₆S: 373,2126)

IR(NaCl):ν 3407, 2951, 1735, 1636, 1522, 1438, 1369,1165, 849 cm⁻¹.

4.1.10. Sinteza metil 4-(3-(1-(1-karboksietilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)-piperidin-1-il)-4-oksobutanojske kisline (OAG 62)



160 mg (0,41 mmol) metil 4-(3-(1-(1-etoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)-piperidin-1-il)-4-oksobutanoata (OAG 53) smo raztopili v 20 ml dioksana, dodali 4 ml 2M NaOH ter reakcijsko zmes pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Dioksan smo odparili pod znižanim tlakom (P=120±15 mmHg, T= 55±5°C). Preostalo vodno fazo smo

nakisali z 1M HCl in jo nato odparili pod znižanim tlakom ($P=110\pm 15$ mmHg, $T=55\pm 5^\circ\text{C}$). Ostanek v bučki smo raztopili v metanolu ter nastali NaCl, ki je v metanolu netopen, odfiltrirali s presesavanjem. Postopek smo nadaljevali z matičnico. Metanol smo odparili pod znižanim tlakom in dobili 139 mg (0,40 mmol) produkta v obliki rumenorjavega olja. Produkt smo nato očistili še s kolonsko kromatografijo pod pritiskom (SF: silikagel, MF: etilacetat) in dobili 103 mg (0,30 mmol, 72 %) rumenorjavega olja.

Izkoristek: 72 %

Elementna sestava: $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_7$

M=344,36 g/mol

Opis: rumenorjavo olje

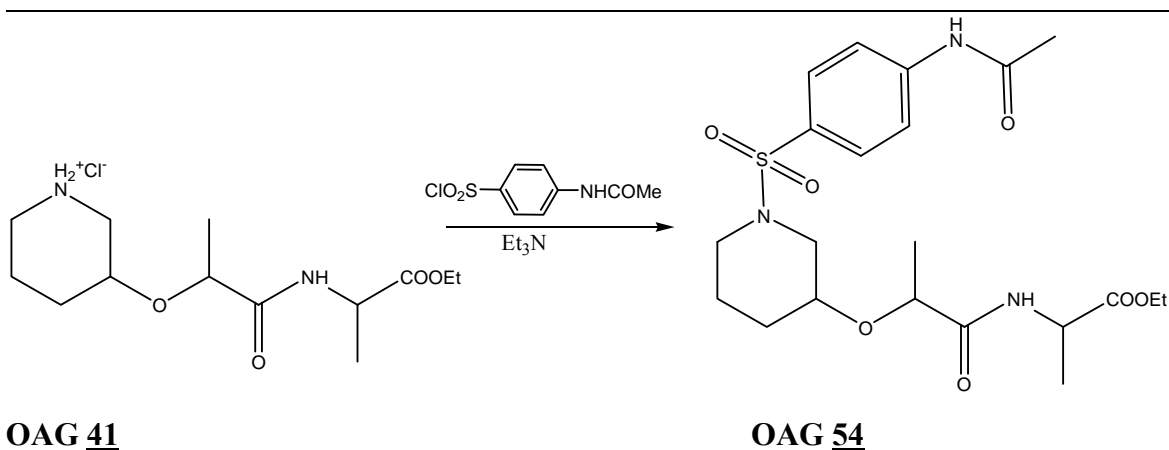
^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6): δ 1,19-1,32 (m, 6H, O-CH-CH₃, NH-CH-CH₃), 1,53-1,71 (m, 2H, CH₂), 1,76-1,89 (m, 2H, CH₂), 2,29-2,45 (m, 4H, CO-CH₂CH₂-CO), 2,94-3,08 (m, 1H, CH-O), 3,54-3,65 (m, 4H, CH₂, CH₂), 4,00-4,05 (m, 1H, O-CH-CH₃), 4,27-4,38 (m, 1H, NH-CH-CH₃), 8,35 (s, 1H, CONH), 9,27-9,52 (m, 2H, COOH, COOH) ppm.

MS (ESI): m/z(%): 343 (MH⁻, 19), 243 (100)

HR-MS: m/z: MH⁻ 343,1519 (izračunano za $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_7$: 343,1505)

IR(NaCl):v 3050, 1729, 1702, 1591, 1535, 1315, 1157, 1094, 847, 619 cm^{-1} .

4.1.11. Sinteza etil 2-(2-(1-(4-acetamidofenilsulfonil)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanoata (OAG 54)



200 mg (0,73 mmol) 3-(1-(1-etoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)-piperidinijevega klorida (OAG 41) smo raztopili v 20 ml diklorometana, dodali 0,2 ml

trietilamina in 167 mg (0,71mmol) N-acetilsulfanilklorida. Reakcijsko zmes smo v pokriti bučki pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Raztopino smo najprej razredčili z etilacetatom in nato organsko fazo spirali s 15 ml 1M HCl, 15 ml nasičene vodne raztopine NaHCO₃, 15 ml vode in na koncu še s 15 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄, nato pa etilacetat odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 241 mg (0,51 mmol, 70 %) rumenega olja.

Izkoristek: 70 %

Elementna sestava: C₂₁H₃₁N₃O₇S

M= 469,55 g/mol

Opis: rumeno olje

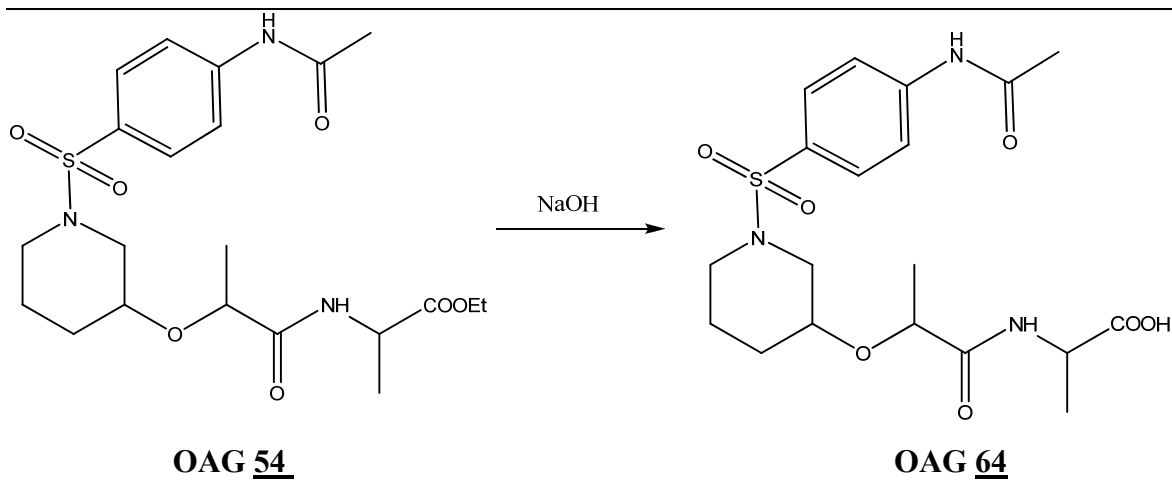
¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ 1,14-1,24 (m, 6H, COO-CH-CH₃, O-CH-CH₃), 1,28-1,34 (m, 3H, CH₂ NH-CH-CH₃), 1,39-1,48 (m, 2H, CH₂), 1,72-1,77 (m, 2H, CH₂), 2,09 (s, 3H, NH-CO-CH₃), 3,09-3,17 (m, 5H, CH-O, CH₂, CH₂), 3,99-4,12 (m, 3H, O-CH-CH₃, COO-CH₂-CH₃), 4,23-4,33 (m, 1H, NH-CH-CH₃), 7,68 (dd, 2H, J₁=8,47Hz, J₂=1,95Hz Ar-H), 7,81 (d, 2H, J=7,69Hz, Ar-H), 8,05 (s, 2H, CONH, NHCOCH₃) ppm.

MS (ESI): m/z(%): 470,2 (MH⁺, 82), 492,2 (MNa⁺, 100)

HR-MS: m/z: MH⁺ 470,1949 (izračunano za C₁₇H₂₅N₂O₆S: 470,1956)

IR(NaCl):v 3317, 2983, 2936, 2361, 1735, 1663, 1591, 1532, 1450, 1338, 1314, 1164, 1092, 1063, 942, 839, 753, 616 cm⁻¹.

4.1.12. Sinteza etil 2-(2-(1-(4-acetamidofenilsulfonil)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanojske kisline (OAG 64)



200 mg (0,43 mmol) etil 2-(2-(1-(4-acetamidofenilsulfonil)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanoata (OAG **54**) smo raztopili v 20 ml dioksana, dodali 4 ml 2M NaOH ter reakcijsko zmes pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Dioksan smo odparili pod nižanim tlakom ($P=120\pm 15$ mmHg, $T= 55\pm 5^{\circ}\text{C}$). Preostalo vodno fazo smo nakisali z 1M HCl in jo nato odparili pod nižanim tlakom ($P=110\pm 15$ mmHg, $T= 55\pm 5^{\circ}\text{C}$). Ostanek v bučki smo raztopili v metanolu ter nastali NaCl, ki je v metanolu netopen, odfiltrirali s presesavanjem. Postopek smo nadaljevali z matičnico. Metanol smo odparili pod nižanim tlakom in dobili 202 mg (0,49 mmol) produkta v obliki rumenorjavih kristalčkov. Produkt smo nato očistili še s kolonsko kromatografijo pod pritiskom (SF: silikagel, MF: etilacetat) in dobili 102 mg (0,23 mmol, 54 %) produkta, prav tako v obliki rumenorjavih kristalčkov.

Izkoristek: 54 %

Elementna sestava: $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$

M= 441,50g/mol

Opis: rumenorjavi kristalčki

T_{tališča}: > 350 °C

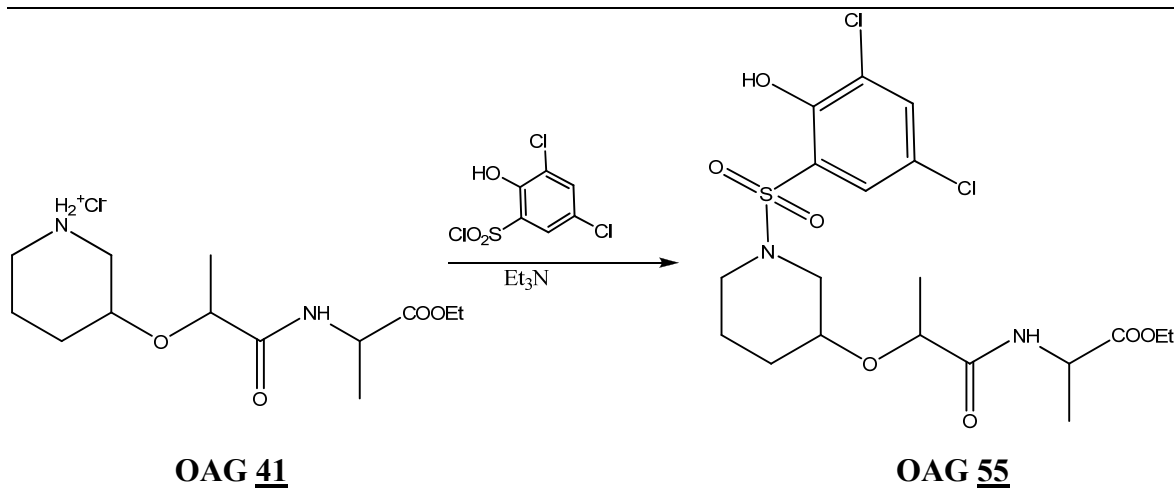
¹H NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 1,27-1,33 (m, 6H, NH-CH-CH₃, O-CH-CH₃), 1,40-1,48 (m, 2H, CH₂), 1,69-1,76 (m, 2H, CH₂), 2,02 (s, 3H, NH-CO-CH₃), 3,09-3,14 (m, 1H, CH-O), 3,28-3,30 (m, 2H, CH₂), 3,44-3,45 (m, 2H, CH₂), 3,99-4,12 (m, 1H, O-CH-CH₃), 4,18-4,27 (m, 1H, NH-CH-CH₃), 7,38 (dd, 2H, $J_1=8,47\text{Hz}$, $J_2=2,40\text{Hz}$, Ar-H), 7,67 (dd, 2H, $J_1=7,69\text{Hz}$, $J_2=2,03\text{Hz}$, Ar-H), 7,83 (s, 1H, NHCOCH₃), 7,96 (s, 1H, CONH), 10,57 (s, 1H, COOH) ppm.

MS (ESI): m/z(%): 440,2 (MH^- , 23), 398,1 (100)

HR-MS: m/z: MH^- 440,150 (izračunano za $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$: 440,1491)

IR(KBr): ν 3430, 2279, 1596, 1449, 1320, 1162, 943, 836, 752, 553 cm^{-1} .

4.1.13. Sinteza etil 2-(2-(1-(3,5-dikloro-2-hidroksifenilsulfonyl)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanoata (OAG 55)



200 mg (0,73 mmol) 3-(1-(1-etoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)-piperidinijevega klorida (OAG 41) smo raztopili v 20 ml diklorometana, dodali 0,2 ml trietilamina in 186 mg (0,71 mmol) 3,5-dikloro-2-hidroksibenzensulfonilklorida. Reakcijsko zmes smo v pokriti bučki pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Raztopino smo najprej razredčili z etilacetatom in nato organsko fazo spirali s 15 ml 1M HCl, 15 ml nasičene vodne raztopine NaHCO₃, 15 ml vode in na koncu še s 15 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄, nato pa etilacetat odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 237 mg (0,48 mmol, 65 %) rumenega olja.

Izkoristek: 65 %

Elementna sestava: C₁₉H₂₆N₂O₇SCl₂

M= 497,39 g/mol

Opis: rumeno olje

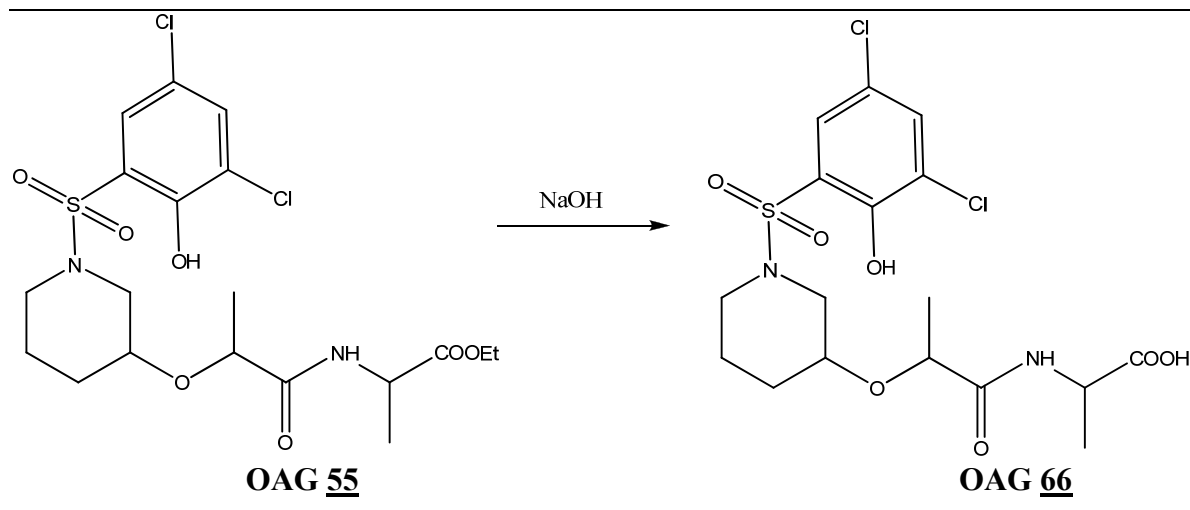
¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆): δ 1,15-1,22 (m, 6H, COO-CH₂-CH₃, O-CH-CH₃), 1,30 (d, 3H, J= 7,27Hz, NH-CH-CH₃), 1,39-1,45 (m, 2H, CH₂), 1,74-1,84 (m, 2H, CH₂), 2,91-3,00 (m, 3H, CH-O, CH₂), 3,45-3,49 (m, 2H, CH₂), 3,98-4,11 (m, 3H, COO-CH₂-CH₃, O-CH-CH₃), 4,21-4,32 (m, 1H, NH-CH-CH₃), 5,58 (s, 1H, Ar-OH), 7,60-7,64 (m, 1H, Ar-H), 7,86 (d, 1H, J=2,30Hz, Ar-H), 8,04 (s, 1H, CONH) ppm.

MS (ESI): m/z(%): 497,1 (MH⁺, 100)

HR-MS: m/z: MH⁺ 497,0914 (izračunano za C₁₉H₂₇N₂O₇SCl₂: 497,0916)

IR(NaCl):v 3398, 2982, 2936, 2360, 1736, 1664, 1523, 1465, 1336, 1237, 1155, 1004, 944, 866, 804, 732, 572 cm^{-1} .

4.1.14. Sinteza 2-(2-(1-(3,5dikloro-2-hidroksifenilsulfonyl)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanojske kisline (OAG 66)



180 mg (0,36 mmol) etil 2-(2-(1-(3,5dikloro-2-hidroksifenilsulfonyl)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanoata (OAG 55) smo raztopili v 20 ml dioksana, dodali 4 ml 2M NaOH ter reakcijsko zmes pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Dioksan smo odparili pod znižanim tlakom ($P=120\pm 15$ mmHg, $T= 55\pm 5^\circ\text{C}$). Preostalo vodno fazo smo nakisali z 1M HCl in jo nato odparili pod znižanim tlakom ($P=110\pm 15$ mmHg, $T= 55\pm 5^\circ\text{C}$). Ostanek v bučki smo raztopili v metanolu ter nastali NaCl, ki je v metanolu netopen, odfiltrirali s presesavanjem. Postopek smo nadaljevali z matičnico. Metanol smo odparili pod znižanim tlakom in dobili 220 mg (0,47 mmol) produkta v obliki belih kristalov. Produkt smo nato očistili še s kolonsko kromatografijo pod pritiskom (SF: silikagel, MF: etilacetat) in dobili 163 mg (0,35 mmol, 96 %) belih kristalov.

Izkoristek: 96 %

Elementna sestava: $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_7\text{Cl}_2$

M= 469,34 g/mol

Opis: beli kristali

T_{tališča}: 184-188 °C

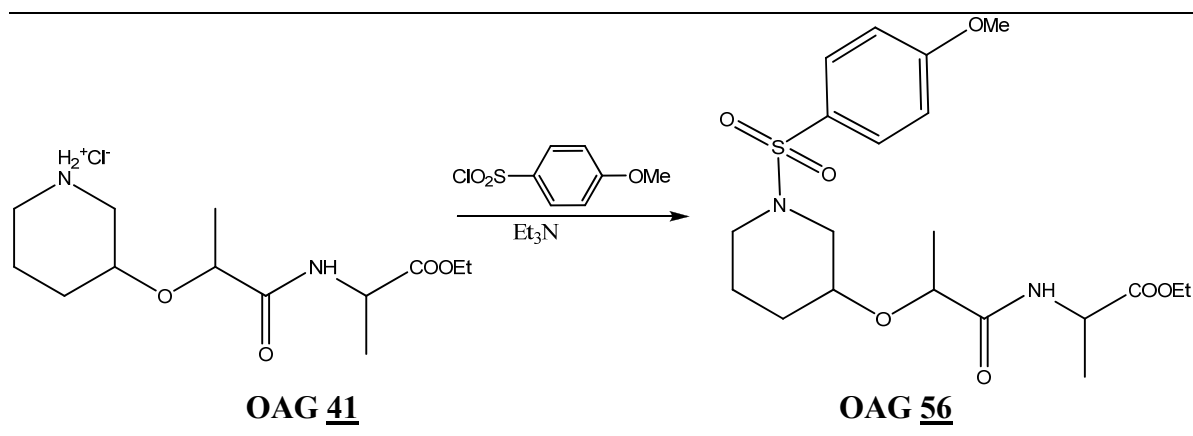
$^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6): δ 1,16-1,33 (m, 6H, O-CH-CH $_3$, NH-CH-CH $_3$), 1,39-1,45 (m, 2H, CH $_2$), 1,64-1,78 (m, 2H, CH $_2$), 2,91-3,00 (m, 3H, CH-O, CH $_2$), 3,22-3,29 (m, 2H, CH $_2$), 3,98-4,05 (m, 1H, O-CH-CH $_3$), 4,22-4,35 (m, 1H, NH-CH-CH $_3$), 5,67 (s, 1H, Ar-OH), 7,58-7,62 (m, 1H, Ar-H), 7,89 (d, 1H, J=2,27Hz, Ar-H), 8,09 (s, 1H, CONH), 9,39 (s, 1H, COOH) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 469,0 (MH $^+$, 58), 467 (100)

HR-MS: m/z: MH $^+$ 469,0600 (izračunano za C $_{17}$ H $_{23}$ N $_2$ O $_7$ SCl $_2$: 469,0603)

IR(NaCl):v 3397, 2936, 1654, 1534, 1465, 1320, 1139, 1004, 943, 867, 803, 746, 584cm $^{-1}$.

4.1.15. Sinteza etil 2-(2-(1-(4-metoksifenilsulfonil)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanoata (OAG 56)



200 mg (0,73 mmol) 3-(1-(1-etoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)-piperidinijevega klorida (OAG 41) smo raztopili v 20 ml diklorometana, dodali 0,2 ml trietilamina in 147 mg (0,71mmol) 4-metoksibenzensulfonilklorida. Reakcijsko zmes smo v pokriti bučki pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Raztopino smo najprej razredčili z etilacetatom in nato organsko fazo spirali s 15 ml 1M HCl, 15 ml nasičene vodne raztopine NaHCO $_3$, 15 ml vode in na koncu še s 15 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z Na $_2$ SO $_4$, nato pa etilacetat odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 210 mg (0,47 mmol, 65 %) produkta v obliki rumenega olja, ki smo ga nato še očistili s kolonsko kromatografijo pod pritiskom (SF: silikagel, MF: etilacetat:petroleter (1:1)) in dobili 130 mg (0,29mmol, 40 %) produkta, prav tako v obliki rumenega olja.

Izkoristek: 40 %

Elementna sestava: C₂₀H₃₀N₂O₇S

M= 442,53 g/mol

Opis: rumeno olje

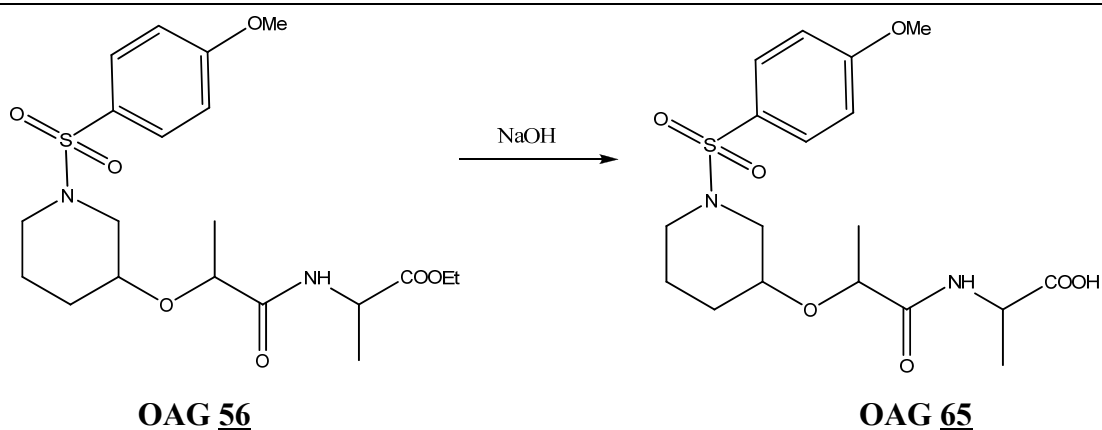
¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ 1,15-1,24 (m, 6H, COO-CH-CH₃, O-CH-CH₃), 1,28-1,34 (m, 3H, CH₂, NH-CH-CH₃), 1,41-1,45 (m, 2H, CH₂), 1,72-1,77 (m, 2H, CH₂), 2,69-2,73 (m, 1H, CH-O), 3,10-3,13 (m, 2H, CH₂), 3,41-3,46 (m, 2H, CH₂), 3,86 (s, 3H, OCH₃), 3,99-4,12 (m, 3H, O-CH-CH₃, COO-CH₂-CH₃), 4,26-4,32 (m, 1H, NH-CH-CH₃), 7,15 (dd, 2H, J₁=8,78Hz, J₂=1,22Hz, Ar-H), 7,68 (d, 2H, J₁=8,82Hz, J₂=1,17Hz Ar-H), 8,02 (s, 1H, CONH) ppm.

MS (ESI): m/z(%): 443,2 (MH⁺, 100), 465,2 (MNa⁺, 75), 481,2 (MK⁺, 98)

HR-MS: m/z: MH⁺ 443,1849 (izračunano za C₁₇H₂₅N₂O₆S: 443,1844)

IR(NaCl):ν 3405, 2935, 1735, 1670,1595, 1498, 1458, 1339, 1260, 1162, 1093, 1023, 942, 838, 804, 742 cm⁻¹.

4.1.16. Sinteza 2-(2-(1-(4-metoksifenilsulfonyl)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanojske kisline (OAG 65)



130 mg (0,29 mmol) etil 2-(2-(1-(4-metoksifenilsulfonyl)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanoata (OAG 56) smo raztopili v 20 ml dioksana, dodali 4 ml 2M NaOH ter reakcijsko zmes pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Dioksan smo odparili pod znižanim tlakom (P=120±15 mmHg, T= 55±5°C). Preostalo vodno fazo smo nakisali z 1M HCl in jo nato odparili pod znižanim tlakom (P=110±15 mmHg, T= 55±5°C). Ostanek v bučki smo raztopili v metanolu ter nastali NaCl, ki je v metanolu netopen, odfiltrirali s presesavanjem. Postopek smo nadaljevali z matičnico. Metanol smo odparili pod znižanim

tlakom in dobili 200 mg (0,48 mmol) produkta v obliki belih kristalov. Produkt smo nato očistili še s kolonsko kromatografijo pod pritiskom (SF: silikagel, MF: etilacetat) in dobili 74 mg (0,18 mmol, 61 %) belih kristalov.

Izkoristek: 61 %

Elementna sestava: C₁₈H₂₆N₂O₇S

M= 414,47 g/mol

Opis: beli kristali

T_{tališča}: > 350 °C

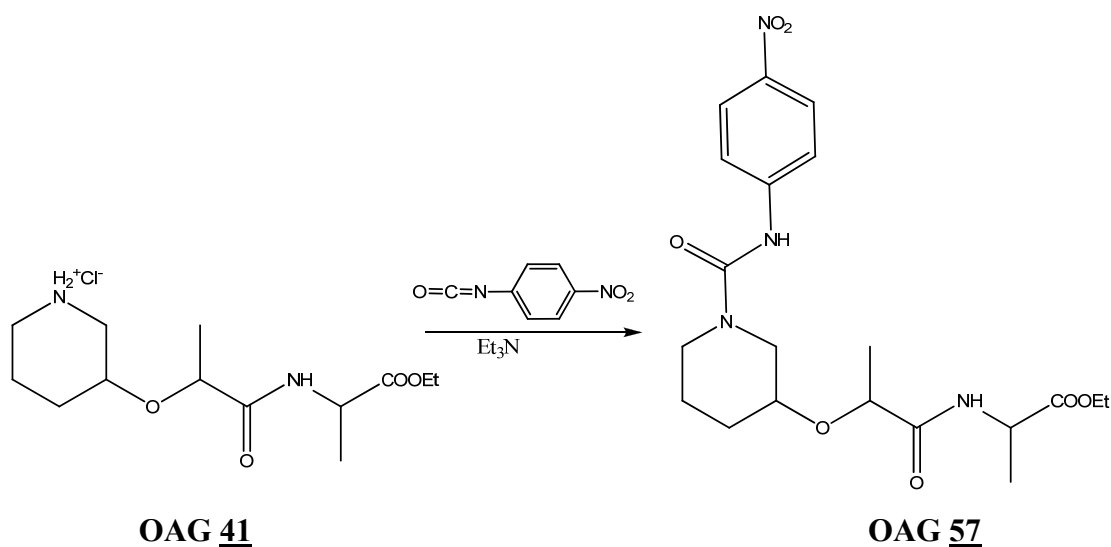
¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆): δ 1,15-1,24 (m, 3H, O-CH-CH₃), 1,28-1,34 (m, 3H, CH₂-NH-CH-CH₃), 1,40-1,44 (m, 2H, CH₂), 1,71-1,77 (m, 2H, CH₂), 2,72-2,74 (m, 1H, CH-O), 3,13-3,19 (m, 2H, CH₂), 3,43-3,49 (m, 2H, CH₂), 3,86 (s, 3H, OCH₃), 3,99-4,08 (m, 1H, O-CH-CH₃), 4,23-4,30 (m, 1H, NH-CH-CH₃), 7,15 (dd, 2H, J₁=8,78Hz, J₂=1,20Hz, Ar-H), 7,69 (d, 2H, J₁=8,70Hz, J₂=2,7Hz Ar-H), 8,06 (s, 1H, CONH), 10,51 (s, 1H, COOH) ppm.

MS (ESI):m/z(%): 413,1 (MH⁻, 100)

HR-MS: m/z: MH⁻ 413,1387 (izračunano za C₁₈H₂₅N₂O₇S: 413,1382)

IR(NaCl):ν 3384, 2933, 1594,1452, 1330, 1257, 1158, 1088, 1016, 938, 831, 799 cm⁻¹.

4.1.17. Sinteza etil 2-(2-(1-(4-nitrofenilkarbamoi)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanoata (OAG 57)



200 mg (0,73 mmol) 3-(1-(1-etoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)-piperidinijevega klorida (OAG **41**) smo raztopili v 20 ml diklorometana, dodali 0,2 ml trietilamina in 117 mg (0,71mmol) 4-nitrofenilizocianata. Reakcijsko zmes smo v pokriti bučki pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Raztopino smo najprej razredčili z etilacetatom in nato organsko fazo spirali s 15 ml 1M HCl, 15 ml nasičene vodne raztopine NaHCO₃, 15 ml vode in na koncu še s 15 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄, nato pa etilacetat odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 266 mg (0,61mmol) produkta v obliki gostega rumenega olja, ki smo ga nato očistili s kolonsko kromatografijo pod pritiskom (SF: silikagel, MF: etilacetat:petroleter (1:1)) in dobili 164 mg (0,38 mmol, 51 %) produkta, prav tako v obliki rumenega olja.

Izkoristek: 51 %

Elementna sestava: C₂₀H₂₈N₄O₇

M= 436,46 g/mol

Opis: rumeno olje

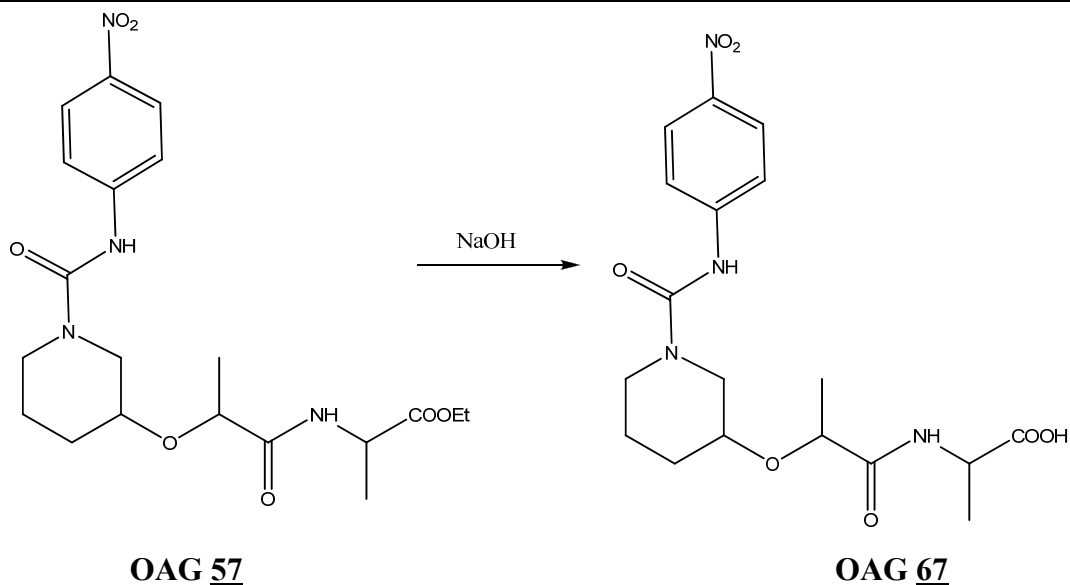
¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ 1,12-1,24 (m, 6H, COO-CH-CH₃, O-CH-CH₃), 1,28-1,31 (m, 3H, CH₂ NH-CH-CH₃), 1,39-1,45 (m, 2H, CH₂), 1,72-1,75 (m, 2H, CH₂), 2,72-2,76 (m, 1H, CH-O), 3,38-3,46 (m, 2H, CH₂), 3,63-3,74 (m, 2H, CH₂), 3,99-4,08 (m, 3H, O-CH-CH₃, COO-CH₂-CH₃), 4,24-4,32 (m, 1H, NH-CH-CH₃), 6,69 (s, 1H, CONH-Ar), 7,74 (dd, 2H, J₁=7,15Hz, J₂=2,03Hz, Ar-H), 8,01 (s, 1H, CONH), 8,14 (dd, 2H, J₁=7,24Hz, J₂=2,06Hz, Ar-H)ppm.

MS (ESI): m/z(%): 437,2 (MH⁺, 100), 459,2 (MNa⁺, 22), 475,2 (MK⁺, 11)

HR-MS: m/z: MH⁺ 437,2041 (izračunano za C₂₀H₂₉N₄O₇: 437,2036)

IR(NaCl):v 3296, 2928, 1738, 1658, 1547, 1503, 1425, 1329, 1245, 1111, 1061, 852, 751, 692 cm⁻¹.

4.1.18. Sinteza 2-(2-(1-(4-nitrofenilkarbamoil)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanojske kisline (OAG 67)



140 mg (0,32 mmol) etil 2-(2-(1-(4-nitrofenilkarbamoil)piperidin-3-iloksi)propanamido)propanoata (OAG 57) smo raztopili v 20 ml dioksana, dodali 4 ml 2M NaOH ter reakcijsko zmes pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Dioksan smo odparili pod znižanim tlakom ($P=120\pm 15$ mmHg, $T= 55\pm 5^\circ\text{C}$). Preostalo vodno fazo smo nakisali z 1M HCl in jo nato odparili pod znižanim tlakom ($P=110\pm 15$ mmHg, $T= 55\pm 5^\circ\text{C}$). Ostanek v bučki smo raztopili v metanolu ter nastali NaCl, ki je v metanolu netopen, odfiltrirali s presesavanjem. Postopek smo nadaljevali z matičnico. Metanol smo odparili pod znižanim tlakom in dobili 127 mg (0,31 mmol) produkta v obliki rumenih kristalčkov. Produkt smo nato očistili še s kolonsko kromatografijo pod pritiskom (SF: silikagel, MF: etilacetat) in dobili 101 mg (0,24 mmol, 77 %) rumenih kristalčkov.

Izkoristek: 77 %

Elementna sestava: $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_7$

M= 408,41 g/mol

Opis: rumeni kristalčki

T_{tališča}: > 350 °C

¹H NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 1,21-1,30 (m, 6H, O-CH- $\underline{\text{CH}}_3$, NH-CH- $\underline{\text{CH}}_3$), 1,39-1,43 (m, 2H, $\underline{\text{CH}}_2$), 1,70-1,76 (m, 2H, $\underline{\text{CH}}_2$), 2,71-2,76 (m, 1H, $\underline{\text{CH}}-\text{O}$), 3,38-3,46 (m, 2H, $\underline{\text{CH}}_2$), 3,60-3,62 (m, 2H, $\underline{\text{CH}}_2$), 4,07-4,08 (m, 1H, O- $\underline{\text{CH}}-\text{CH}_3$), 4,18-4,26 (m, 1H, NH- $\underline{\text{CH}}-\text{CH}_3$),

6,65 (s, 1H, CONH-Ar), 7,69-7,76 (m, 2H, Ar-H), 8,06 (s, 1H, CONH), 8,14 (dd, 2H, $J_1=7,69\text{Hz}$, $J_2=2,36\text{Hz}$, Ar-H), 9,31 (s, 1H, COOH) ppm.

MS (ESI): m/z(%): 407,2 (MH⁻, 100)

HR-MS: m/z: MH⁻ 407,1563 (izračunano za C₁₈H₂₃N₄O₇S: 407,1567)

IR(NaCl): ν 3295, 2926, 1651, 1501, 1331, 1246, 1107, 1008, 856, 757, 687 cm⁻¹.

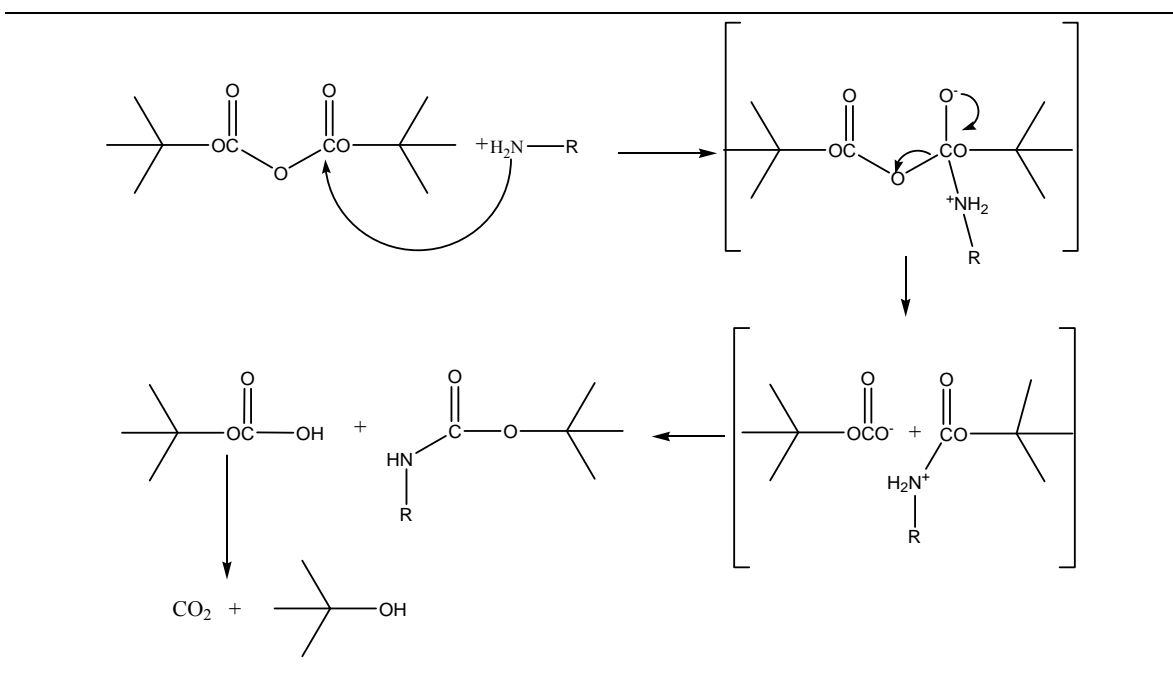
5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. RAZPRAVA O SINTEZAH SPOJIN

5.1.1. Zaščita hidroksilne skupine 3-hidroksipiperidina

V prvi stopnji sinteze piperidinskih inhibitorjev Mur ligaz smo amsko skupino 3-hidroksipiperidena zaščitili z uporabo di-*terc*-butildikarbonata ((BOC)₂O) kot reagenta. Z njim smo na amsko skupino uvedli *terc*-butiloksikarbonilno skupino. Pri tem je potekla nukleofilna adicija s sledečo eliminacijo (slika 25).

V molekuli 3-hidroksipiperidina smo imeli dve nukleofilni skupini (NH, OH), ki bi lahko reagirali z (BOC)₂O. Zaščita amske skupine je potrebna, saj je amska skupina močnejši nukleofil kot hidroksilna in bi lahko vplivala na potek nadaljnjih reakcij. Z izbiro primernih reakcijskih pogojev (voda/dioksan kot topilo, kontrolirana nižja temperatura) smo usmerili reakcijo pretežno v nastajanje N-aciliranega produkta.



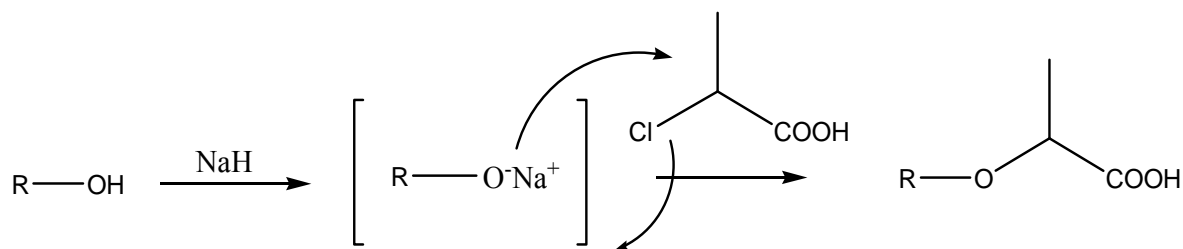
Slika 25: Mehanizem uvedbe *terc*-butiloksikarbonilne zaščite na amsko skupino.

Izhodno spojino 3-hidroksipiperidin smo raztopili v vodi in dioksanu. Slednjega smo dodali zato, da smo izboljšali topnost (BOC)₂O in končnega produkta. Nato smo dodali

raztopino 1M NaOH ter s tem ohranili aminske skupine v neionizirani obliki, ki je bolj nukleofilna. Hidrolizo (BOC)₂O pa smo preprečili s tem, da smo reakcijo izvajali na ledeni kopeli. Po dveh urah mešanja pri sobni temperaturi smo dioksan odparili pod znižanim tlakom, saj se ta dobro meša z vodo in nepolarnimi topili in bi lahko motil sledečo ekstrakcijo. Ostanek v bučki smo najprej razredčili z vodo in nato nakisali z 1M HCl. Produkt smo tako prevedli v neionizirano obliko, ki je pri ekstrakciji z diklorometanom prehajala v organsko fazo, medtem ko se je morebitna preostala izhodna spojina protonirala in tako ostala v vodni fazi. Združene organske faze smo sprali z 1M raztopino NaOH in tako odstranili prisotne kisline, nato še z nasičeno vodno raztopino NaCl, ki veže vodo. Na koncu smo morebitno vodo iz organske faze odstranili še s sušilnim sredstvom Na₂SO₄, nato pa topilo odparili pod znižanim tlakom. Pri reakciji je nastajal CO₂, ki je izhajal iz reakcijske zmesi, in *tert*-butanol, ki smo ga odparili pod znižanim tlakom skupaj z dioksanom.

5.1.2. Pripenjanje 2-kloropropionske kisline

V drugi stopnji smo tvorili eterno povezavo med *tert*-butil 3-hidroksipiperidin-1-karboksilat (OAG **11**) in 2-kloropropionsko kislino. Gre za Williamsonovo sintezo etrov. Ta vključuje reakcijo, pri kateri se halogen, sulfonilna ali sulfatna skupina zamenjajo z alkoksidnim ionom, ki ga pripravimo z reakcijo hidroksilne skupine s kovino, kot je natrij ali njegov hidrid (NaH). Nastali alkoxid deluje potem kot nukleofil, ki napade elektrofilni ogljikov atom alkilhalogenida, pri čemer se tvori eter preko S_N2 mehanizma (bimolekularna nukleofilna substitucija) (slika 26).



Slika 26: Mehanizem nastanka etra med alkoholom in 2-kloropropionsko kislino.

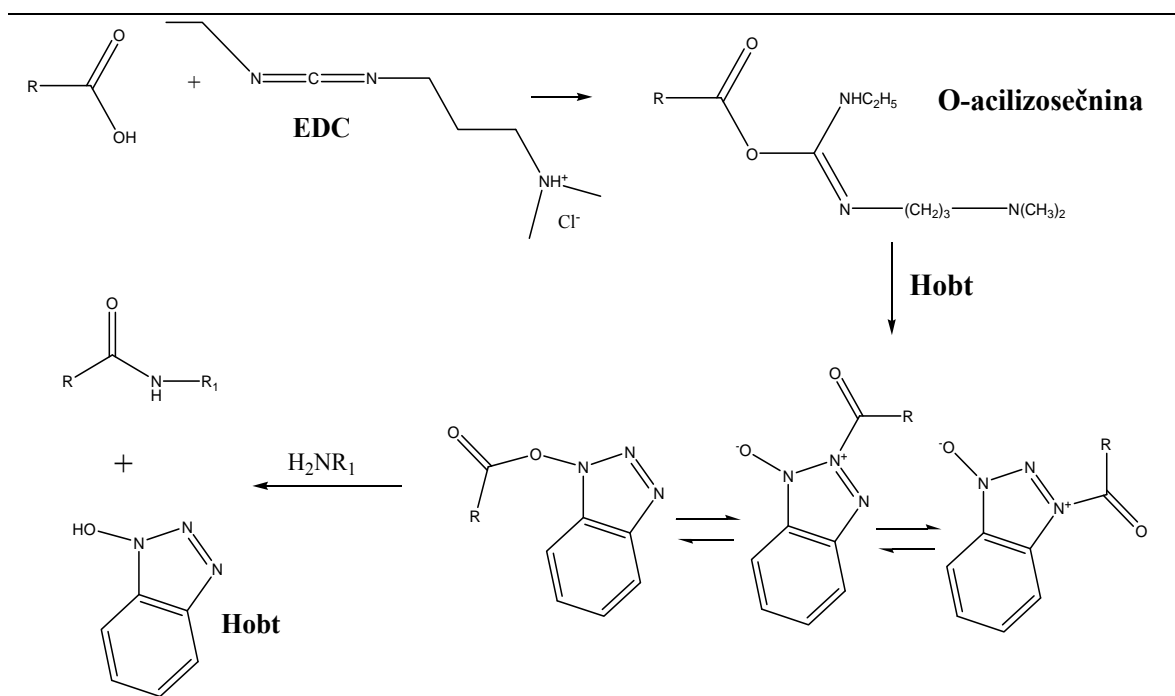
Reakcijo smo izvedli v brezvodnih pogojih, saj NaH z vodo burno reagira in nastaja vodik, ki se lahko zaradi eksotermne reakcije vžge. Reakcijo smo končali tako, da smo v bučko na

ledeni kopeli postopoma dodajali koščke ledu in s tem nevtralizirali NaH. NaH je reagiral z vodo. Pri tem je nastajal vodik, ki je iz zmesi izhajal in povzročil intenzivno penjenje. Spojino smo nato očistili z ekstrakcijami.

5.1.3. Tvorba amidne vezi z EDC/Hobt metodo

V tej stopnji smo tvorili amidno vez med prosto karboksilno skupino spojine **OAG 29** in amsko skupino etilnega estra L-alanina. Za tvorbo amidne vezi smo uporabili karbodiimidno metodo. Princip reakcije je nukleofilna substitucija na karbonilnem C-atomu. Ker karboksilna kislina ni dovolj reaktivna za reakcijo, jo moramo aktivirati. Za aktivacijo smo uporabili 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)karbodiimidijev klorid (EDC). Karboksilatni anion se veže na protoniran karbodiimid, nastane zelo reaktivna O-acilizosečnina. Ta reagira z amsko skupino, nastane peptid in derivat sečnine. Slednji ima v strukturi terciarno amsko skupino, ki izboljša vodotopnost sečnine in omogoča odstranitev z ekstrakcijo iz reakcijske zmesi.

O-acilizosečnina lahko alternativno napade drug karboksilat, nastane simetrični anhidrid, ki je aktiviran za reakcijo z amsko skupino. Tako se tudi v tem primeru tvori amidna vez. Neželena reakcija pri karbodiimidni metodi je premestitev acilne skupine iz O na N pri O-acilizosečnini. Nastane N-acilizosečnina, pri kateri aminoliza ne poteče. Tvorbo tega stranskega produkta preprečimo z dodatkom 1-hidroksibenzotriazola (HOBT) v reakcijsko zmes. HOBT tvori z O-acilizosečnino aktivirane benzotriazolne estre, pri katerih poteče aminoliza veliko hitreje. Tako zmanjšamo obseg neželenih premestitev, ciklizacij, racemizacij in tvorbe simetričnih anhidridov. Posledično je izkoristek reakcije večji (slika 27) (22, 23).

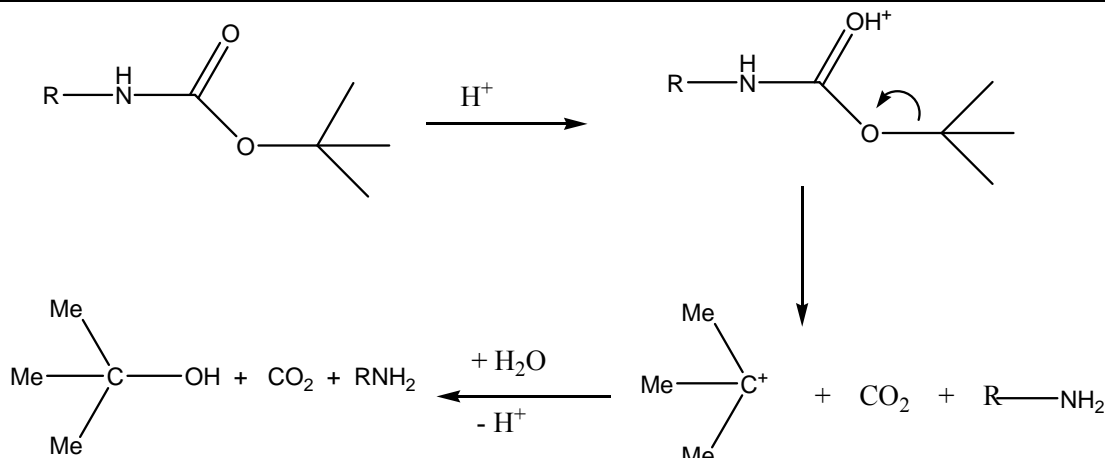


Slika 27: Mehanizem tvorbe amidne vezi s pomočjo EDC in Hobt.

Sinteza je potekala tako, da smo **OAG 29** raztopili v diklorometanu, dodali enako množino EDC, HOBT in trietilamin. Trietilamin je baza in povzroči pretvorbo OH skupine karboksilne skupine v karboksilatni anion, ki je potreben za reakcijo.

5.1.4. Odstranitev *tert*-butiloksikarbonilne (BOC) zaščite

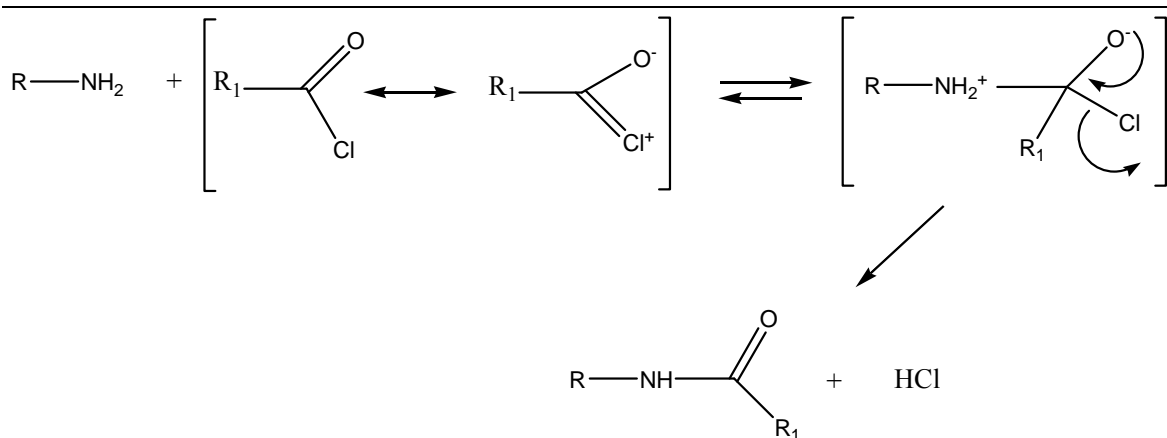
Tert-butiloksikarbonilno (Boc) zaščitno skupino smo odstranili tako, da smo **OAG 38** raztopili v EtOAc, nato pa smo raztopino prepihavali s plinastim HCl. BOC zaščita je namreč obstojna v pH intervalu 4-12. V kislem pa se Boc zaščitna skupina odstrani, pri čemer izhaja CO_2 in nastane 2-metil-2-propanol. Pri odstranjevanju nastane karbokation $^+C(CH_3)_3$, ki je stabiliziran zaradi pozitivnega induktivnega efekta metilnih skupin (slika 28).



Slika 28: Hidroliza terc-butil karbamata pod vplivom kisline.

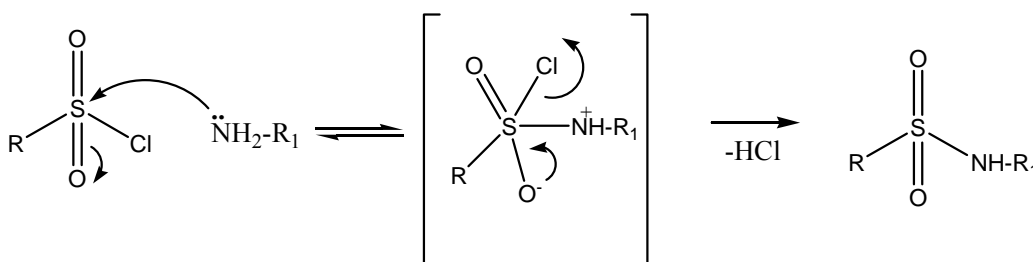
5.1.5. Uvajanje substituentov na aminski dušik

Po odstranitvi zaščite z aminske skupine smo na njo pripenjali različne substituentne. Pri spojinah OAG **52** in OAG **53** smo kot reagente uporabili kislinske kloride (metilmalonil klorid in metilsukcinil klorid), ki sodijo med najbolj reaktivne derivate karboksilnih kislin. Z njihovo pomočjo smo tako tvorili amidno vez na osnovi aciliranja aminske skupine. Zaradi izredno velike reaktivnosti kislinskih kloridov amidna vez tudi izredno hitro nastane. Reakcijo po mehanizmu uvrščamo med nukleofilne substitucije (slika 29) (24).



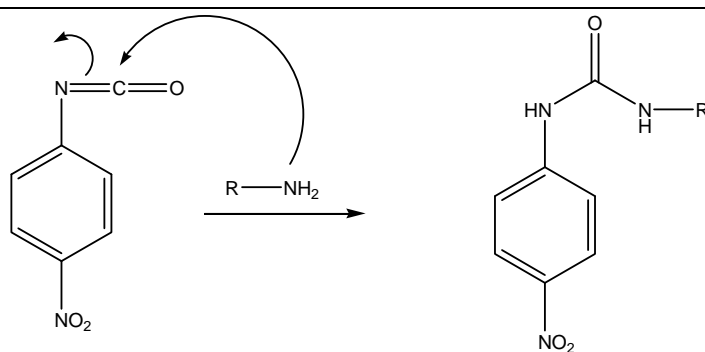
Slika 29: Mehanizem tvorbe amidne vezi na osnovi aciliranja aminske skupine s kislinskim kloridom

Pri sintezi spojin OAG **5**, OAG **54**, OAG **55** in OAG **56** smo kot reagente uporabili derivate sulfonilkloridov (benzensulfonilklorid, N-acetilsulfonilklorid, 3,5-dikloro-2-hidroksibenzensulfonilklorid, metoksibenzensulfonilklorid). Mehanizem reakcije je prav tako nukleofilna substitucija, le da je zaradi nekoliko manjše reaktivnosti sulfonilkloridov nekoliko počasnejš (slika30) (24).



Slika 30: Mehanizem tvorbe sulfonilamidov

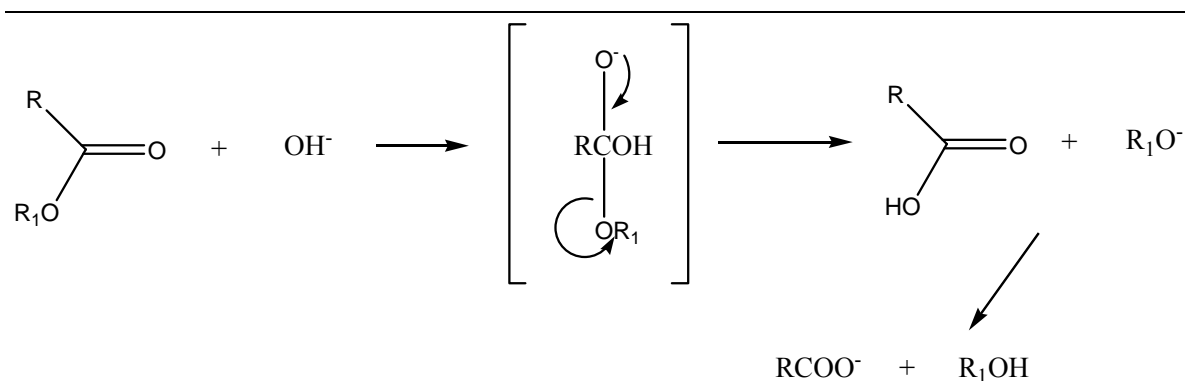
Sinteza spojine OAG **57**, ki smo jo izvedli med 3-(1-(1-etoksi-1-oksopropan-2-ilamino)-1-oksopropan-2-iloksi)-piperidinijevega klorida (OAG **41**) in 4-nitrofenilizocianatom pa je potekla po drugačnem reakcijskem mehanizmu. Reakcija, ki smo jo izvedli, spada med adicije na kumulirane sisteme. Piperidinska aminska skupina deluje kot nukleofil, ki napade ogljikov atom izocianata, rezultat reakcije je spojina z ureidno skupino (slika 31).



Slika 31: Reakcija med 4-nitrofenilizocianatom in aminske skupino.

5.1.6. Alkalna hidroliza estrov

V zadnji stopnji smo izvedli alkalno hidrolizo etilnega estra na alaninskem delu molekule, hkrati pa je hidroliza potekla tudi na preostalih esterskih skupinah, ki smo jih v molekulo uvedli s pripajanjem substituent na obročni dušik. Ker je hidroliza estrov v kislem reverzibilen proces, v bazičnem pa ireverzibilen, smo za hidrolizo uporabili bazo (2M raztopino NaOH). Reakcija je bimolekularna. V prvi stopnji baza kot nukleofil napade karbonilni ogljik estra. Pri tem nastaneta kislina in alkoholat, ki se zaradi velike razlike v kislosti pretvorita v karboksilatni ion in alkohol (slika 32) (24).

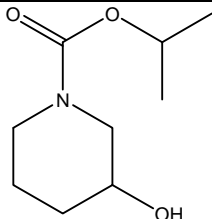
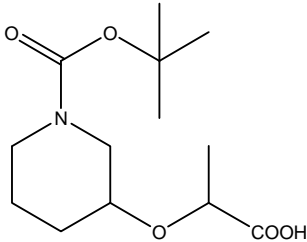
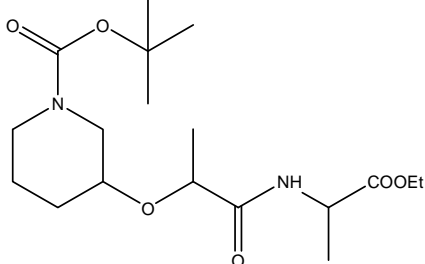
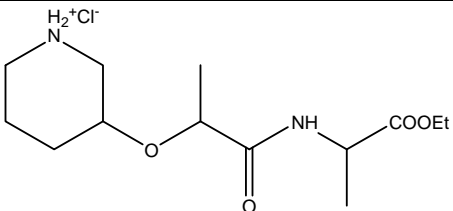


Slika 32: Alkalna hidroliza

5.2. SEZNAM VSEH SINTETIZIRANIH SPOJIN

Tekom diplomskega dela smo sintetizirali 18 spojin, od tega 7 končnih. Za boljšo predstavbo in primerjavo substituent spojin so v tabeli I in tabeli II predstavljene strukture vseh sintetiziranih spojin, vključno s stranjo v diplomski nalogi, kjer se nahaja sintezna pot spojine.

Tabela I: Seznam sintetiziranih derivatov 3-hidroksipiperidina

Oznaka spojine	Strukturna formula	Stran sinteze spojine
OAG <u>11</u>		35
OAG <u>29</u>		36
OAG <u>38</u>		37
OAG <u>41</u>		38

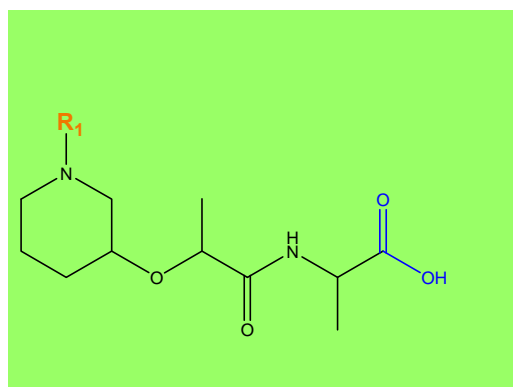
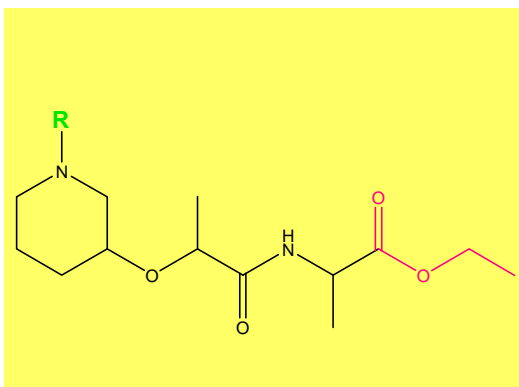
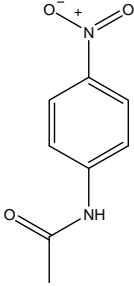
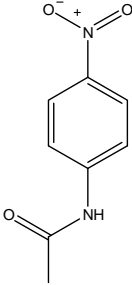


Tabela II: Seznam sintetiziranih spojin

Oznaka spojine	R	Stran sinteze spojine	Oznaka spojine	R1	Stran sinteze spojine
OAG <u>5</u>		39	OAG <u>6</u>		40
OAG <u>52</u>		41	OAG <u>61</u>		42
OAG <u>53</u>		43	OAG <u>62</u>		44
OAG <u>54</u>		45	OAG <u>64</u>		46
OAG <u>55</u>		48	OAG <u>66</u>		49
OAG <u>56</u>		50	OAG <u>65</u>		51

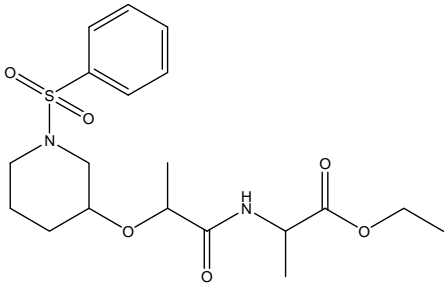
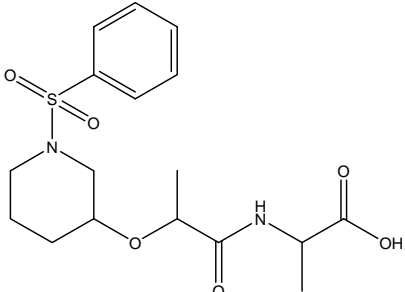
OAG <u>57</u>		52	OAG <u>67</u>		54
--------------------------------	---	----	--------------------------------	---	----

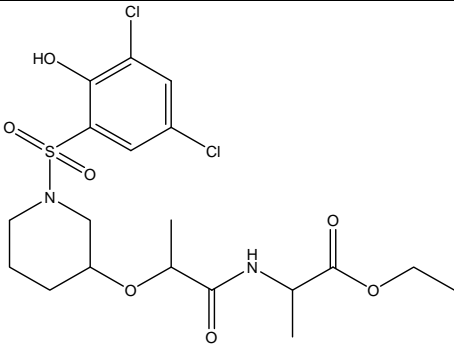
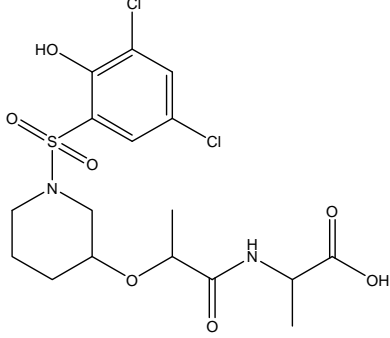
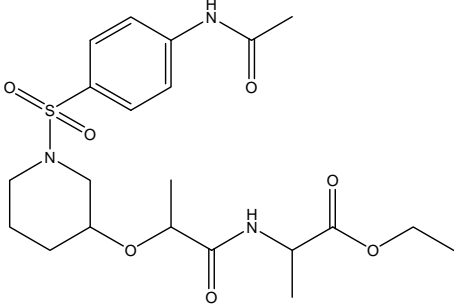
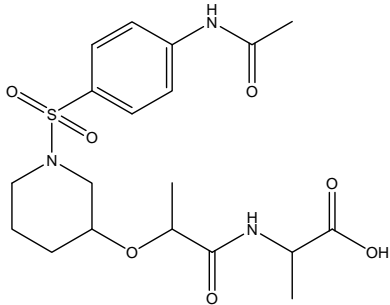
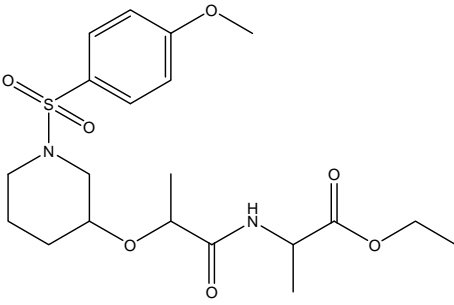
5.3. REZULTATI BIOKEMIJSKEGA TESTIRANJA IN DISKUSIJA

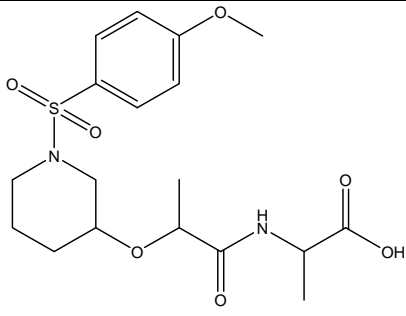
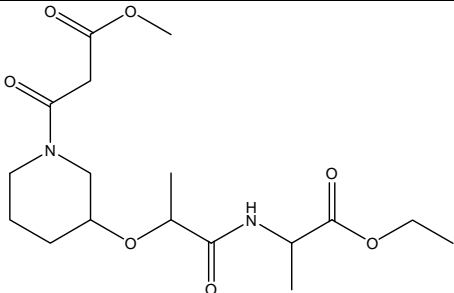
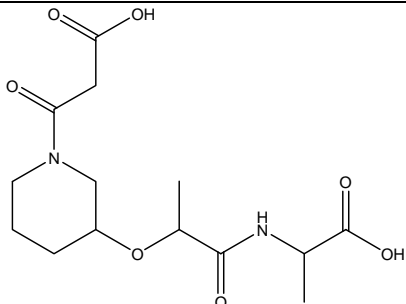
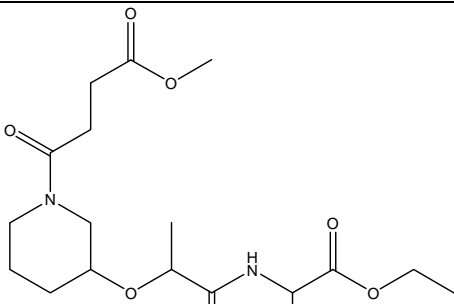
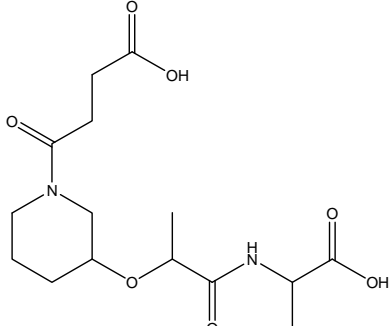
Sintetizirane končne spojine so biokemijsko testirali na encimih MurC in MurD. Rezultati testiranja so zbrani v tabeli III.

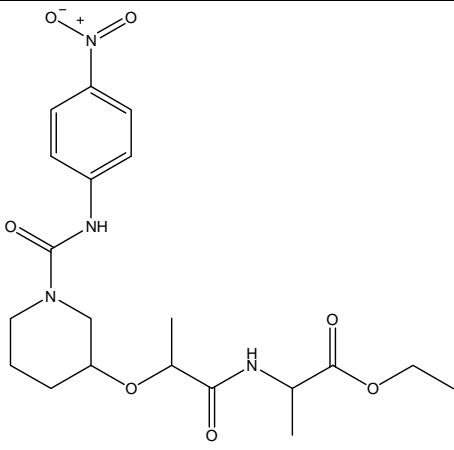
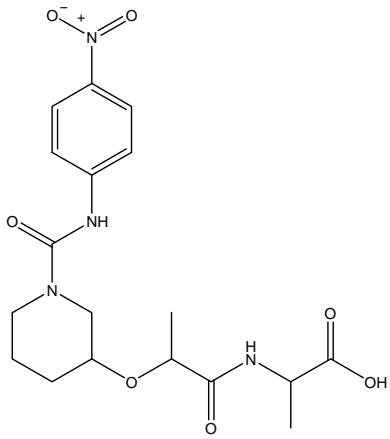
Rezidualna aktivnost encima (RA) je razmerje katalitičnih aktivnosti encima z inhibitorjem in brez inhibitorja. Izrazimo jo v odstotkih in je merilo za učinkovitost inhibitorja. Primerjava RA spojin nam poda razlike med učinkovitostjo spojin ter informacije o odnosu med strukturo in delovanjem. Manjša kot je RA, v večji meri inhibitor pri dani koncentraciji upočasni encimsko katalizirano reakcijo. Vrednosti RA od 80 – 100% so v mejah eksperimentalne napake, zato spojine s takšno aktivnostjo označimo za neaktivne.

Tabela III: Rezultati biokemijskega testiranja sintetiziranih spojin

Oznaka spojine	Struktura	M (g/mol)	C (μM)	RA %	
				MurC	MurD
OAG <u>5</u>		412,501	500	102	96
OAG <u>6</u>		384,448	500	97	99

OAG <u>55</u>		497,390	500	14	92
			100	31	/
OAG <u>66</u>		469,337	500	86	91
OAG <u>54</u>		469,533	500	104	90
OAG <u>64</u>		441,500	500	105	83
OAG <u>56</u>		442,527	500	87	91

OAG <u>65</u>		414,474	500	100	105
OAG <u>52</u>		372,413	500	102	108
OAG <u>61</u>		330,334	500	108	99
OAG <u>53</u>		386,440	500	89	98
OAG <u>62</u>		344,360	500	77	108

OAG 57		436,459	500	94	38
			100	/	96
OAG 67		408,406	500	84	104

Testirano s 0,005% Tritona X-114

Aktivnost spojin smo preverili z določitvijo rezidualne aktivnosti encima MurC in MurD. RA je bila izmerjena pri koncentraciji spojin 500 μ M. Vseh sedem končnih spojin je bilo neaktivnih, rezidualna aktivnost encima MurC in MurD se je namreč gibala med 77 in 100%, kar je v mejah eksperimentalne napake.

Za sintetizirane končne spojine smo pričakovali, da bodo kot analogi produkta MurC zaradi podobnosti z dejanskim produktom (UMA) interagirale z MurC in ga tako inhibirale, hkrati pa da bodo kot analogi substrata za MurD interagirale tudi z njim in ga posledično inhibirale. Vzroke za neaktivnost sintetiziranih spojin lahko iščemo v sami strukturi spojin.

UDP del substrata oz. natančneje njegovo fosfatno skupino smo poskušali posnemati z acilnimi, sulfonilnimi in sečninskimi derivati pripetimi na aminsko skupino piperidina, ki naj bi bile sposobne tvorbe vodikovih vezi. Obe fosfatni skupini namreč tvorita vodikove vezi z aminokislinskimi ostanki encimov MurC in MurD. Ker pa naše končne spojine niso

vsebovale uridinskega dela substrata, je to lahko privedlo do tega, da encima spojin kot produktov oz. substratov nista prepoznala, oz. se te niso mogle dovolj dobro umestiti v njegovo aktivno mesto. Možno je tudi, da sta za umestitev substrata oz. za interakcije z aminokislinskimi ostanki aktivnega mesta encima pomembna tudi uracilni obroč in riboza. Ta segment sintetiziranih spojin se je najbolj razlikoval od naravnega substrata.

N-acetilmuraminski kislini del produkta UMA, ki smo ga zamenjali s piperidinskim obročem, z encimom MurC ne tvori pomembnejših specifičnih interakcij. Iz kompleksa UMA:MurD pa je bilo ugotovljeno, da *N*-acetilmuraminska kislina tvori vodikove vezi z določenimi aminokislinskimi ostanki encima. Za piperidinski obroč velja, da po velikosti ustreza *N*-acetilmuraminski kislini. Ker pa nanj ni pripeta hidroksilna skupina in ker je obročni dušik substituiran, spojine ne morejo tvoriti omenjenih vodikovih vezi, kar najverjetneje prispeva k neaktivnosti sintetiziranih spojin.

Peptidni del UMA smo pustili enak, zato da bi s tem omogočili nastanek vodikovih vezi, ki drugače nastanejo med L-alaninskim delom substrata in MurD.

Poleg končnih spojin smo rezidualno aktivnost za encima MurC in MurD določili tudi spojinam, ki še niso bile podvržene alkalni hidrolizi in so tako še bile v obliki estrov. Od sedmih testiranih spojin pri koncentraciji 500 μ M imata dve spojini dobro rezidualno aktivnost. In sicer, OAG **55**, katere RA za inhibicijo encima MurC znaša 14% ter OAG **57**, katere RA za inhibicijo encima MurD je 38%. Testiranje smo ponovili pri koncentraciji 100 μ M. Pri tej koncentraciji pa je ohranila inhibitorno aktivnost samo spojina OAG **55** (RA=31%). Iz strukture spojine OAG **55** lahko sklepamo, da 3,5-dikloro-2-hidroksibezensulfonilna skupina pripeta na aminske skupino piperidinskega obroča izredno dobro posnema fosfatno skupino UDP dela substrata, kar privede do tvorbe dodatnih vodikovih vezi oz. se spojina dovolj dobro umešča v aktivno mesto encima. Od končnih spojin pa se razlikuje tudi v peptidnem delu, saj ima karboksilno skupino zaščiteno v obliki etilnega estra, kar je še verjetnejši razlog za visoko RA za encim. Etilni ester najverjetneje pripomore k temu, da spojina zavzame takšno prostorsko ureditev, ki ustreza umestitvi v aktivno mesto encima.

Za nadaljnje zaključke bi bilo potrebno izvesti še meritev IC_{50} ter nato še MIC na raznih bakterijskih sevih. Ker pa v času izdelave naše diplomske naloge testiranje na Fakulteti za farmacijo niso izvajali, žal, teh podatkov nimamo.

6. SKLEP

V okviru diplomske naloge smo sintetizirali sedem končnih spojin (OAG 6, 61, 62, 64, 65, 66, 67). V prvem delu smo sintetizirali njihovo osnovno strukturo 2-(1-(terc-butoksikarbonil)piperidin-3-iloksi)propanojsko kislino, ki smo ji v nadaljevanju odstranili terc-butiloksikarbonilno (Boc)zaščito. V nadaljevanju smo na amino skupino vezali različne substituyente ter v zadnji stopnji izvedli še alkalno hidrolizo. Z ustreznimi analiznimi postopki smo nato dokazali strukturno ustreznost in čistost spojin in jim z encimsko metodo določili inhibitorno aktivnost na encima MurC in MurD.

Nobena od sintetiziranih končnih spojin se ni izkazala kot učinkovit inhibitor encimov MurC in MurD. Ob primerjavi struktur končnih spojin in njihovih rezidualnih aktivnosti smo prišli do zaključka, da naše spojine strukturno ne posnemajo dovolj dobro UDP-N-acetilmuramoil-L-alaninskega (UMA) dela produkta encima MurC, prav tako pa tudi ne uridindifosfatnega (UDP) ali pa sladkornega dela substrata za MurD. Posledično ni prišlo do nastanka interakcij, ki so nujne pri vezavi produkta ali substrata v aktivno mesto encimov.

Poleg končnih spojin pa smo testirali tudi spojine, ki so predstopnja v sintezi končnih spojin. Samo ena od teh spojin (OAG 55) se je izkazala kot dober inhibitor encima MurC z RA 31% merjeni pri koncentraciji 100 μ M.

V nadaljevanju bi bilo potrebno izvesti še meritev IC_{50} ter nato še MIC na raznih bakterijskih sevih za spojino (OAG 55).

7. LITERATURA

1. Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M., Moore P. K.: Pharmacology, 5th Ed., Edinburgh, Churchill Livingstone, 2003; 620-652.
2. Williams D.A., Lemke T.L.: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2002; 819-825.
3. Southgate R, Osborne NF, Pearson MJ, Burton G: Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, 5th Ed., Vol. 4, New York, John Wiley&Sons, 1995: 277-364
4. Payne D, Tomazs A: The challenge of antibiotic resistant bacterial pathogens: the medical need, the market and prospects for new antimicrobial agents. Current Opinion in Microbiology 2004; 7: 435-438
5. Thomas CJ, Power E, Ruebsamen-Waigmann H: Antibacterial research and development in the 21st Century- an industry perspective of the challenges. Current Opinon in Microbiology 2004; 7: 445-450
6. Gobec S, Urleb U: Inhibitorji sinteze peptidoglikana. Farm. vestn., 1999; 50: 183-193
7. Green DW: The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. Expert Opin Ther Targets 2002; 6: 1-19.
8. El Zoeiby A, Sanschagrín F, Levescque GC: Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. Molecular Microbiology 2003; 47(1): 1-12
9. Silver LL: Novel inhibitors of bacterial cell wall synthesis. Current Opinion in Microbiology 2003; 6: 431-438.
10. Hiratake J: Enzyme Inhibitors as Chemical Tools to Study Enzyme Catalysis: Rational Design, Synthesis, and Applications. The Chemical Record, 2005, 5: 209-228.
11. Bouhss A, Dementin S, Van Heijenroot J, Parquet C, Blanot D: Formaton of adenosine 5'-tetrphosphate from the acyl phosphate intermediate: a difference between the MurC and MurD synthetases of *Escherichia coli*. FEBS Microbiology Letters, 1999; 453: 15-19.
12. Mol CD, Brooun A, Dougan DR, Hilgers MT, Tari LW, Wijnands RA, Knuth MW, McRee DE, Swanson RV: Crystal Structures of Active Fully Assembled Substrat-

- and Product-Bound Complexes of UDP-N-Acetylmuramic Acid:L-Alanine Ligase (MurC) from *Haemophilus Influenzae*. *Journal of Bacteriology* 2003, 185: 4152-4162.
13. Bertrand JA, Auger G, Martin L, Fanchon E, Blanot D, Le Beller D, Van Heijenoort J, Dideberg O: Determination of the MurD Mechanism Through Crystallographic Analysis of Enzyme Complexes. *Journal of Molecular Biology* 1999; 289: 579-590
 14. Bertrand JA, Auger G, Martin L: Crystal structure of UDP- N-acetylmuramoyl-L-alanine:D-glutamate ligase from *Escherichia coli*. *The EMBO Journal* 1997; 16: 3416–3425
 15. Van Hijenoort J: Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Natural Product Reports* 2001; 18: 503–519
 16. Reck F, Marmor S, Fisher S, Wuonola MA: Inhibitors of the Bacterial Cell Wall Biosynthesis Enzyme MurC. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2001, 11: 1451-1454.
 17. Sim MM, Ng SB, Buss AD, Crasta SC, Goh KL, Lee SK: Benzylidene Rhodanines as Novel Inhibitors of UDP-N-Acetylmuramoyl/L-Alanine Ligase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2002, 12: 697-699.
 18. Gegnas LD, Waddell ST, Chabin RM, Reddy S, Wong KK: Inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurD. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1998; 8: 1643-8.
 19. Li Z et al.: 2-phenyl-5,6-dihydro-2H-thieno[3,2-c]pyrazol-3-ol derivatives as new inhibitors of bacterial cell wall biosynthesis. *Bioorg Med Chem Lett* 2003; 13: 2591-2594
 20. Horton JR, Bostock JM, Chopra I et al.: Macrocyclic Inhibitors of the Bacterial Cell Wall Biosynthesis Enzyme Mur D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003; 13: 1557-1560.
 21. Kuhelj R., Renko M., Dolenc I., Jerala R.: *Biokemija v praksi: načela in tehnike*, 2. izdaja, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2001: 50-62
 22. Sewald N, Jakubke HD: *Peptides: chemistry and Biology*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim 2002, 148-150, 184-205.
 23. Hanson JR: *Functional group chemistry*. The Royal Society of Chemistry, 2001:79-91.

24. Tišler M: Organska kemija, tretja izdaja. Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1991: 211-214, 239, 241-242