

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BERNARDA GREŠAK

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA BENZENSULFONAMIDOV
KOT POTENCIALNIH ZAVIRALCEV BAKTERIJSKEGA
ENCIMA MurF**

THE DESIGN AND SYNTHESIS OF BENZENSULFONAMIDES AS
POTENTIAL INHIBITORS OF BACTERIAL
MurF ENZYME

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Izidorja Sosiča, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo in Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. *In vitro* testiranja na encimu MurF so izvedli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Zahvala

*Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Stanislavu Gobcu, mag. farm. za usmerjanje raziskovalnega dela in strokovni pregled diplomske naloge. Posebno velika zahvala gre somentorju asist. dr. Izidorju Sosiču, mag. farm. za vso potrpežljivost, trud, nasvete, vzpodbudo in podarjeno znanje ter izkušnje tekom izdelave diplomske naloge. Zahvaljujem se asist. dr. Samotu Turku, mag. farm. za izvedbo računalniških metod in Martini Hrast, mag. farm. za izvedeno *in vitro* testiranje spojin.*

Velika zahvala gre mojim staršem, sestri in bratu za vso vzpodbudo in pomoč tekom študija ter mojemu Alešu, ki je verjel vame in v to, da bo ta diplomska naloga dobila zadnjo piko.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Izidorja Sosiča, mag. farm.

Bernarda Grešak

KAZALO

POVZETEK	1
ABSTRACT	2
SEZNAM OKRAJŠAV	3
1. UVOD	6
1.1 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE.....	6
1.2 RAZVOJ REZISTENCE	8
1.3 BAKTERIJSKA CELIČNA STENA	10
1.3.1 Struktura peptidoglikana	12
1.3.2 Biosinteza peptidoglikana	13
1.3.2.1 Sinteza nukleotidnih prekurzorjev peptidoglikana v citoplazmi	14
1.3.2.2 Vezava prekurzorjev na lipidni nosilec in prenos skozi citoplazemsko membrano	14
1.3.2.3 Polimerizacija prekurzorjev in pripenjanje na obstoječi peptidoglikan	15
1.4 Ligaze Mur	16
1.4.1 Ligaza MurC.....	18
1.4.1.1 Inhibitorji ligaze MurC.....	18
1.4.2 Ligaza MurD	19
1.4.2.1 Inhibitorji ligaze MurD.....	19
1.4.3 Ligaza MurE.....	19
1.4.3.1 Inhibitorji ligaze MurE	20
1.4.4 Ligaza MurF	20
1.4.4.1 Inhibitorji ligaze MurF	22
2. NAČRT DELA	25
3. MATERIALI IN METODE	27
4. EKSPERIMENTALNO DELO	31
4.1 UVEDBA SULFONIL KLORIDA NA BENZENOV OBROČ	31
4.2 TVORBA SULFONAMIDA	33
4.3 TVORBA AMIDNE VEZI	37
4.4 TVORBA ESTRSKE VEZI	47

5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	49
5.1	KOMENTAR K SINTEZNIM POSTOPKOM.....	49
5.1.1	Uvedba sulfonil klorida na benzenov obroč.....	49
5.1.2	Tvorba sulfonamida	50
5.1.3	Tvorba amida.....	52
5.1.4	Presenetljiva tvorba estra	54
5.2	REZULTATI BIOKEMIJSKEGA VREDNOTENJA.....	56
6.	SKLEP	61
7.	LITERATURA	62

POVZETEK

Pojav multirezistentnih bakterijskih sevov, ki so odporni na več protibakterijskih učinkovin hkrati, predstavlja velik javno-zdravstveni problem. Zmanjkuje nam antibiotikov, s katerimi bi lahko uspešno zdravili infekcije. Razlog za to je predvsem v preveliki in pogosto neutemeljeni uporabi antibiotikov. Zaradi tega je nujno odkrivanje novih tarč in spojin z novimi mehanizmi delovanja. Odlična tarča so encimi, ki sodelujejo v biosintezi peptidoglikana, gradnika bakterijske celične stene. Imajo ga samo prokariotske celice, zato lahko dosežemo tudi selektivno toksičnost.

Prve stopnje biosinteze peptidoglikana potekajo v citoplazmi in jih katalizirajo od ATP odvisne ligaze Mur (MurC-F), ki v štirih zaprednih stopnjah iz UDP-MurNAc sintetizirajo UDP-MurNAc-pentapeptid, ki se nato prenese na zunanj stran membrane in vgradi v obstoječi peptidoglikan. Trenutno na tržišču še ni terapevtsko uporabnega zaviralca ligaz Mur. Tarča, za katero smo iskali potencialne zaviralce v okviru diplomske naloge, je encim MurF. Encim MurF katalizira pripenjanje dipeptida D-Ala-D-Ala in tako zaključi zadnjo stopnjo biosinteze UDP-MurNAc-pentapeptida.

Osnova za načrtovanje naših spojin je bila spojina, ki so jo odkrili pri družbi Abbott. Sintetizirali smo 13 spojin benzensulfonamidnega tipa. Vse spojine, razen ene, vsebujejo ciano (CN) skupino, ki je potrebna za zaviranje encima. CN skupina je vezana na aromatski obroč na amidni strani molekule.

Spojinam, ki smo jih sintetizirali, smo *in vitro* izmerili zaviralno aktivnost na encimu MurF, izoliranem iz bakterije *Escherichia coli*. Kot najbolj učinkovita se je izkazala spojina 2-aminofenetil 2-bromo-5-(4-metilpiperidin-1-ilsulfonil)benzoat (**19**).

ABSTRACT

Multi-resistant bacterial strains that are resistant to more antibacterial substances simultaneously present a significant threat to public health. We are running out of antibiotics, which could be used to successfully treat infections. The reason lies mainly in the irrational use of antibiotics and their overuse. Hence, it is necessary to find new targets and compounds with novel mechanisms of action. Suitable targets are enzymes, involved in the biosynthesis of peptidoglycan, which forms the bacterial cell wall. As it is only found in prokaryotic cells, the selective toxicity criterion would be achieved.

First stages of the peptidoglycan biosynthesis occur in the bacterial cytoplasm and are catalysed by ATP-dependent Mur ligases (MurC-F), which synthesise UDP-MurNAc-pentapeptide from UDP-MurNAc in four consecutive stages. UDP-MurNAc-pentapeptide is then transported to the outer side of the membrane and incorporated into the peptidoglycan. At present time, there are no therapeutically useful Mur ligase inhibitors. In this thesis, we were searching for potential inhibitors of the MurF enzyme. It catalyzes addition of D-Ala-D-Ala dipeptide and thus finishes the last stage of UDP-MurNAc-pentapeptide biosynthesis.

The structural basis for the synthesis of our derivatives was a compound discovered by the Abbott company. 13 compounds of the benzenesulphonamide type have been synthesized. All compounds, except for one, possess the cyano (CN) group that is a prerequisite for the inhibition of the enzyme. CN group is linked to the aromatic ring on the amide side of the molecule.

The inhibitory activities of the newly synthesized compounds were measured *in vitro* on the MurF enzyme isolated from *Escherichia coli*. 2-Aminophenethyl 2-bromo-5-(4-methylpiperidin-1-ylsulfonyl)benzoate (**19**) proved to be the most effective among the synthesized compounds.

SEZNAM OKRAJŠAV

ADP	adenozin-5'-difosfat
Ala	alanin
Alr	alanina racemaza
ATP	adenozin-5'-trifosfat
d	dublet
dd	dublet dubleta
Ddl	D-alanin:D-alanin ligaza
DMF	dimetilformamid
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EI	ionizacija z elektronskimi trki (electron impact)
ESI	elektrorazpršilna ionizacija (electrospray ionisation)
G-	po Gramu negativne (bakterije)
G+	po Gramu pozitivne (bakterije)
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
GlmM	fosfoglukozamin mutaza
GlmS	L-glutamin:D-fruktoza-6-fosfat amidotransferaza
GlmU	bifunkcionalen encim, ki vključuje <i>N</i> -acetilglukozamin-1-fosfat uridiltransferazo in glukozamin-1-fosfat- <i>N</i> -acil-transferazo
Glu	glutaminska kislina
Gly	glicin
Hepes	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
HOEt	hidroksibenzotriazol
HRMS	masna spektroskopija visoke ločljivosti
HTS	rešetanje visoke zmogljivosti (high throughput screening)
IC₅₀	srednja inhibitorna koncentracija
IR	infrardeča spektroskopija
J	sklopitvena konstanta
lipid I	undekaprenil-pirofosforil-MurNAc-pentapeptid
lipid II	undekaprenil-pirofosforil-MurNAc-(pentapeptid)-GlcNAc
Lys	lizin
m	multiplet

mDAP	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
MDR	rezistenca na več učinkovin (multi-drug resistance)
<i>mezo</i>-A₂pm	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
MraY	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-pentapeptid fosfotransferaza
MRSA	proti meticilinu odporni <i>Staphylococcus aureus</i> (methycillin-resistant <i>S. aureus</i>)
MS	masna spektroskopija
MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin-enolpiruvil transferaza
MurB	UDP- <i>N</i> -acetilenolpiruvil-glukozamin reduktaza
MurC	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat:L-alanin ligaza
MurD	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin:D-glutamat ligaza
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat: <i>mezo</i> -diaminopimelat ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin- <i>mezo</i> -diaminopimelat:D-alanin-D-alanin ligaza
MurG	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin: <i>N</i> -acetilmuramoil-(pentapeptid)-pirofosforil-undekaprenol- <i>N</i> -acetilglukozamin transferaza
MurI	glutamat racemaza
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
NMR	nuklearna magnetna resonanca
PBP	penicilin vezovi proteini (penicillin-binding protein)
PDB	podatkovna zbirka struktur proteinov (protein data bank)
PEP	fosfoenolpiruvat
QSAR	kvantitativni odnos med strukturo in delovanjem (quantitative structure-activity relationship)
RA	rezidualna aktivnost
s	singlet
Ser	serin
t	triplet
td	triplet dubletov
TLC	tankoplastna kromatografija
TMS	trimetilsilan
UDP	uridin difosfat
UMA	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin

UMAG	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat
UMP	uridin monofosfat
δ	kemijski premik
λ	valovna dolžina

1. UVOD

Danes so v uporabi številne protimikrobne učinkovine, vendar mnoge niso več učinkovite proti patogenim bakterijam. Že od uvedbe prvih protibakterijskih spojin so bakterije začele razvijati rezistenco, ki je vedno večji problem. V zadnjih desetih letih je v klinično uporabo prišlo 20 novih protibakterijskih učinkovin, vendar vse z že znanim mehanizmom delovanja. Za uspešen boj proti patogenim bakterijam tako potrebujemo nove tarče in nove učinkovine.

1.1 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE

Protimikrobne učinkovine delimo v dve skupini, na antibiotike in sintezne kemoterapevtike. Antibiotiki so metaboliti različnih vrst mikroorganizmov (bakterije, glive, lišaji in tudi višje rastline). V širšem pomenu mednje uvrščamo tudi njihove polysintezne derivate, ki jih pridobimo s kemično modifikacijo z namenom izboljšanja farmakokinetičnih in farmakodinamičnih lastnosti. Antibiotiki že v nizkih koncentracijah povzročijo smrt bakterij (baktericidno delovanje) ali pa zavrejo njihovo rast (bakteriostatično delovanje) [1]. Mehanizem delovanja antibiotikov temelji na principu selektivne toksičnosti, kar pomeni, da so sposobni uničiti patogene organizme, ne poškodujejo pa gostitelja [1, 2].

Človeštvo se že od vsega začetka bori proti okužbam z bakterijami. Zdravljenje je vse do odkritja prve učinkovine, penicilina leta 1928, temeljilo na principih tradicionalne medicine z uporabo rastlin in živalskih pripravkov, soje, skute in plesnivega kruha. Z odkritjem bakterij pred 300 leti in kasnejšim odkritjem njihove vloge pri okužbah, se je lahko začel razvoj protibakterijskih učinkovin [1]. Prvi pomemben korak pri iskanju uspešne terapije proti infekcijskim boleznim sta postavila Robert Koch in Louis Pasteur v drugi polovici 19. stoletja, ko sta postavila teorijo, da so za nalezljive bolezni krivi mikroorganizmi [3]. K sistematičnemu raziskovanju protimikrobnih učinkovin je prvi pristopil Paul Ehrlich, ki je tudi postavil teorijo selektivne toksičnosti. Začel je s sistematičnim rešetanjem organoarzenovih spojin na bakterijskih kulturah in odkril salvarzan, ki so ga uporabljali za zdravljenje sifilisa, vendar je bila njegova selektivna toksičnost relativno nizka [4]. Naslednji pomemben mejnik je leto 1928, ko je Alexander Fleming po naključju odkril penicilin. Ugotovil je, da je rast *Staphylococcus aureus* (*S.*

aureus) inhibirana na območju, ki je bilo kontaminirano s plesnijo *Penicillium genus*, in iz tega sklepal, da lahko mikroorganizmi proizvajajo snovi, ki zaustavijo rast bakterij. Izolirano snov je poimenoval penicilin in je v klinično uporabo prišel leta 1940. Temu je sledila zlata doba odkrivanja protibakterijskih učinkovin [5]. Do leta 1968 so bile odkrite vse danes znane skupine antibiotičnih učinkovin, sulfonamidi, kloramfenikol, aminoglikozidi in glikopeptidni antibiotiki, tetraciklini, makrolidi, cefalosporini [1, 3, 6]. Po letu 1970 se je farmacevtska industrija usmerila v razvoj že znanih antibiotičnih učinkovin z namenom razširitve spektra njihovega delovanja ter zmanjšanja neželenih učinkov in rezistence [6, 7]. Na trg pa so prišle samo tri učinkovine z novim mehanizmom delovanja: linezolid (oksazolidinon), daptomicin (lipopeptidni antibiotik) in retapamulin (topikalno uporabni antibiotik pleuromutilinskega tipa) [7, 8]. Od leta 2000 je na trg prišlo 20 novih antibiotikov, od katerih jih je 11 derivatov naravnih produktov (večina je derivatov β -laktamov), 9 pa je sinteznih derivatov [8]. Umik farmacevtske industrije iz razvoja antibiotičnih učinkovin, vedno strožje regulatorne zahteve pri razvoju protimikrobnih učinkovin ter dejstvo, da je večina tarč, ki omogočajo selektivno toksičnost, že odkritih, in manjši zaslužek zaradi omejevanja predpisovanj antibiotikov, so glavni razlogi za manjšanje števila novih protimikrobnih učinkovin na trgu [9-11].

Če natančneje pogledamo, kako je potekal razvoj protibakterijskih učinkovin, lahko vidimo, da je potekal v več valovih. Najprej imamo val razvoja širokospektralnih antibiotikov, na katere so bakterije razvile rezistenco. Temu sledi razvoj učinkovin z ožjim spektrom delovanja, ki so bolj usmerjene proti po Gramu negativnim bakterijam (npr. MRSA). Zaradi pojava po Gramu negativnih multirezistentnih bakterij že primanjkuje ozkospektalnih učinkovin, s katerimi bi se lahko uspešno borili proti njim. Tako se nekatera farmacevtska podjetja vračajo nazaj k razvoju protibakterijskih učinkovin. Razvoj pa je dandanes usmerjen k odkrivanju učinkovin za zdravljenje infekcij, ki jih povzročajo po Gramu negativne multirezistentne bakterije [11].

Glede na mehanizem delovanja protimikrobnih učinkovin jih delimo v štiri glavne skupine [2, 12]:

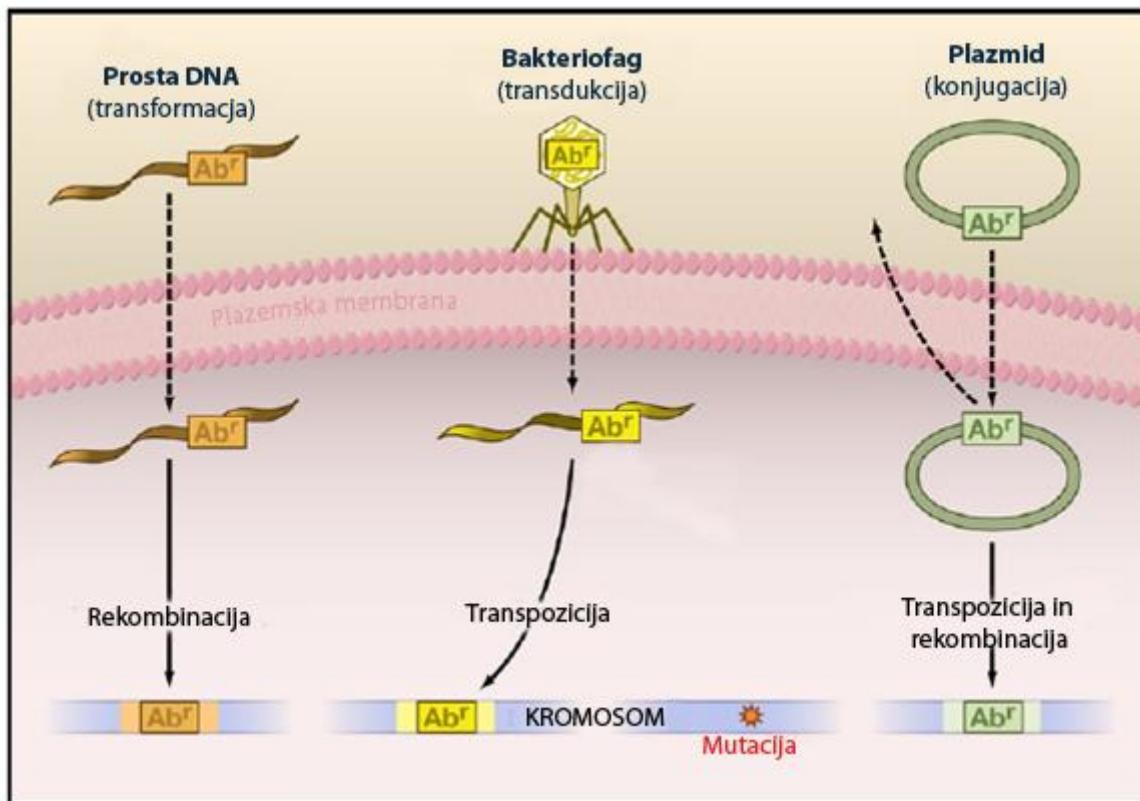
- i. **Učinkovine, ki delujejo neposredno na celično membrano** in vplivajo na spremembo permeabilnosti celične membrane ali aktivni transport skozi celično membrano (polimiksini, dodekadepsopeptidi – valinomycin, gramicidin, daptomicin – lipopeptidi).

- ii. **Inhibitorji biosinteze celične stene** (penicilini, cefalosporini, monobaktami, karbapenemi, glikopeptidi, bacitracin, D-cikloserin, fosfomicin).
- iii. **Inhibitorji biosinteze bakterijskih proteinov** (aminoglikozidi, tetraciklini, makrolidi, linkozamidi, kloramfenikol, oksazolidinoni, fusidična kislina, streptogramini, pleuromutilini).
- iv. **Inhibitorji biosinteze in funkcije nukleinskih kislin** (kinoloni, sulfonamidi, sulfoni, trimetoprim, rifamicin, nitroimidazol).

1.2 RAZVOJ REZISTENCE

Odkritje in uporaba protimikrobnih zdravil sta pomenili eno največjih pridobitev sodobne medicine v boju proti infekcijskim boleznim. Z nepravilno in prekomerno uporabo antibiotičnih učinkovin pa smo povzročili, da je prišlo do razvoja odpornosti določenih bakterijskih sevov na enega ali več razredov antibiotikov. S protimikrobnou terapijo smo na bakterijah izvajali selekcijski pritisk in tako so preživele bakterije z ugodnimi genskimi spremembami. Te spremembe so se lahko zaradi hitrega razmnoževanja in mehanizmov, ki omogočajo prenos genskega materiala, hitro razširile [13].

S terminom rezistenca označujemo neprekinjeno rast mikroorganizmov v prisotnosti citotoksičnih koncentracij protibakterijskih učinkovin [1]. Za razvoj rezistence so odgovorni številni biokemični in fiziološki mehanizmi [14]. Ločimo dva tipa rezistence, prirojeno (intrinzično) in pridobljeno. Prva je posledica mutacij v bakterijskem genomu, ki so že naravno prisotne na bakterijskem kromosomu. Intrinzična rezistenca se pojavlja redkeje zaradi prisotnosti mehanizmov, ki popravljajo poškodovano DNA. Pridobljena rezistenca pa je pogostejša in je posledica vertikalnega prenosa genov pri delitvi bakterije ali vertikalnega prenosa genskega materiala med različnimi bakterijskimi sevi. Prenos genskega materiala lahko poteka preko več različnih mehanizmov (slika 1): s **plazmidi**, ki imajo vključen gen za rezistenco (konjugacija), z **bakteriofagi** (transdukcija), z **vključevanjem proste DNA v kromosom** (transformacija) in z **mobilizacijo DNA znotraj genoma** (transpozicija). Kombinacija selekcije, mutacij in mehanizmov izmenjave genskih elementov ter hitrega razmnoževanja omogoča bakterijam, da se hitro prilagodijo na neugodne razmere v okolju [15-17].



Slika 1. Načini vnosa tuge DNA v bakterijsko celico (povzeto po [17]).

Bakterije so razvile različne biokemijske mehanizme rezistence na protimikrobnne učinkovine [18-20]:

- Zmanjšana prepustnost ali neprepustnost zunanje celične membrane bakterij.
- Aktivno črpanje antibiotika iz celice s pomočjo membranskih iztočnih črpalk. Rezistenza je pogosto povezana s povečano sintezo proteinov, ki sestavljajo membransko črpalko.
- Inaktivacija ali sprememba vezavnega mesta in posledično manjša afiniteta antibiotika do tarčnega mesta.
- Ekspresija encimov, ki kemično spremenijo ali razgradijo protimikrobeno učinkovino (primer so β -laktamaze, ki hidrolizirajo peniciline in cefalosporine).
- S spremembo metabolne poti ali sintezo alternativnega encima.

Rezistenza je prisotna že vse od uvedbe protibakterijskih učinkovin [14, 21]. Danes pa je velik klinični in socialno-ekonomski problem [18] predvsem zaradi pojava multirezistentnih sevov bakterij (MDR) oziroma t.i. **superbakterij**, ki so odporne na več razredov protimikrobnih učinkovin hkrati [14, 22]. Sevi, ki povzročajo največ težav, so

Enterococcus faecium, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) in *Enterobacter spp.* Označuje jih kratica ESKAPE in so razvili več mehanizmov odpornosti. Dejstvo je, da se pojavljajo novi sevi, ki so že razvili odpornost na znane protibakterijske učinkovine, hkrati pa se pojavljajo tudi encimi, ki lahko razgrajujejo protibakterijske učinkovine različnih razredov (NMD-1 – metalo β -laktamaza) [23]. Potrebujemo nove terapevtske opcije za boj proti po Gramu negativnim multirezistentnim bakterijam. Razvoj novih protibakterijskih učinkovin je usmerjen v iskanje novih tarč in novih mehanizmov delovanja [11]. Pomembno mesto za iskanje novih tarč je bakterijska celična stena, ki predstavlja bistveno razliko med človeškimi in bakterijskimi celicami. Protibakterijske učinkovine, ki posegajo v sintezo bakterijske celične stene, so selektivno toksične (delujejo le v bakterijskih celicah).

1.3 BAKTERIJSKA CELIČNA STENA

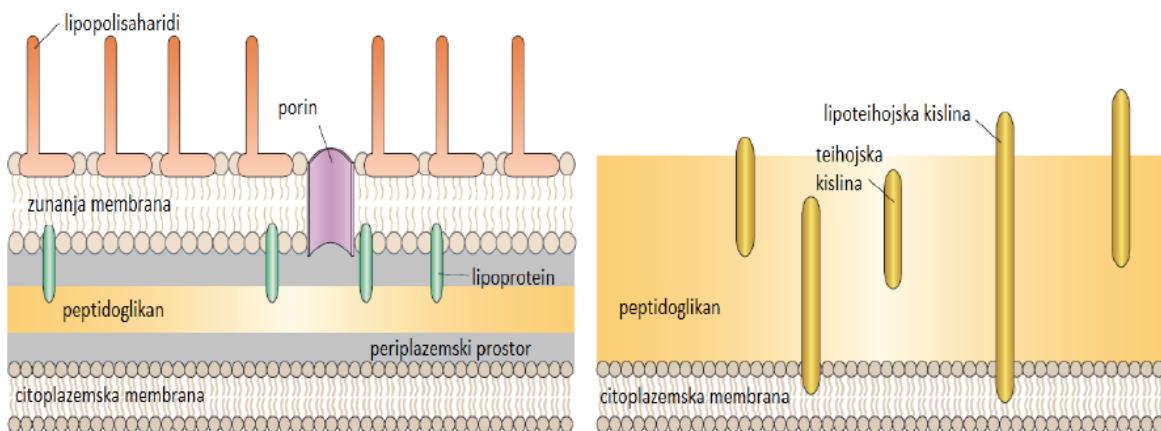
Za opis in klasifikacijo bakterij je bil sprva najpomembnejši kriterij morfološka oblika celice, tako so po obliku celice poimenovali koke, bacile in spirohete. Mnogo let kasneje je postalo jasno, da je bakterijska celična stena pomemben element, ki daje celici obliko, jo naredi rigidno in mehansko trdno ter omogoča vzdrževanje notranjega osmotskega pritiska. Celico varuje pred lizo in vplivi okolja [24, 25]. Deluje kot polprepustna membrana in omogoča prehod le želenim snovem v celico. Zaradi vseh teh funkcij je pomembno vzdrževanje integritete celične stene. Nahaja se na zunanji strani citoplazemske membrane in je vključen v proces celične delitve in rasti [26, 27]. Celično steno najdemo pri vseh vrstah bakterij, razen pri mikoplazmah, nekaterih rikecijah in klamidijah, čeprav pri slednjih geni za biosintezo obstajajo [27].

Glede na strukturo bakterijske celične stene ločimo dva razreda, ki jih je prvi razlikoval Hans Christian Gram. Razlikovanje temelji na različnem barvanju bakterij z barvilom kristal vijolično. Bakterije, ki se po Gramu barvajo modrovijolično, imenujemo po Gramu pozitivne (G+), rdeče obarvane pa po Gramu negativne (G-) bakterije. Ključni gradnik pri obeh vrstah bakterij je **peptidoglikan** [24].

Razlika med G+ in G- bakterijami je v strukturi celične stene (slika 2). G+ bakterije sestavlja do 40 plasti peptidoglikana, kar predstavlja približno 50% mase celične stene, debela pa je 15-50 nm. Kisli anionski polimeri (tejhojska in lipotejhojska kislina [24])

predstavljajo 40-45% celične stene, ostalih 5-10% pa sestavljajo proteini in polisaharidi. Močno polarna polimerna plast je ovira za prehod ioniziranih molekul, favoriziran je prehod pozitivno nabitih molekul [2]. Tejhojska kislina je polimer glicerol fosfata in ribitol fosfata in je kovalentno vezana na peptidoglikan G+ bakterij. V primeru lipotejhojske kisline pa imamo polimer z vezanim lipidom, ki omogoča interakcijo s citoplazemsko membrano [24].

Celična stena G- bakterij je tanjša (1-7 nm) in bolj kompleksno sestavljena. Med citoplazemsko membrano in peptidoglikanom je najprej periplazemski prostor, ki vsebuje encime in druge komponente. Nato sledi plast peptidoglikana, ki predstavlja 5% mase celične stene, in je preboden z molekulami lipoproteinov. Zunanjo membrano predstavlja lipidni dvosloj in je podobna citoplazemski membrani, sestavlja jo porini in lipoproteini. Slednji povezujejo peptidoglikan in zunanjou membrano. Porini pa so transmembranski proteini, ki predstavljajo kanalčke, preko katerih lahko v celico vstopajo hidrofilne molekule, med njimi tudi hidrofilni antibiotiki. Pomembna komponenta zunanjega dela so tudi lipopolisaharidi, ki so vir endotoksinov in preko aktivacije komplementa sprožijo vnetni proces in povisano temperaturo [2].



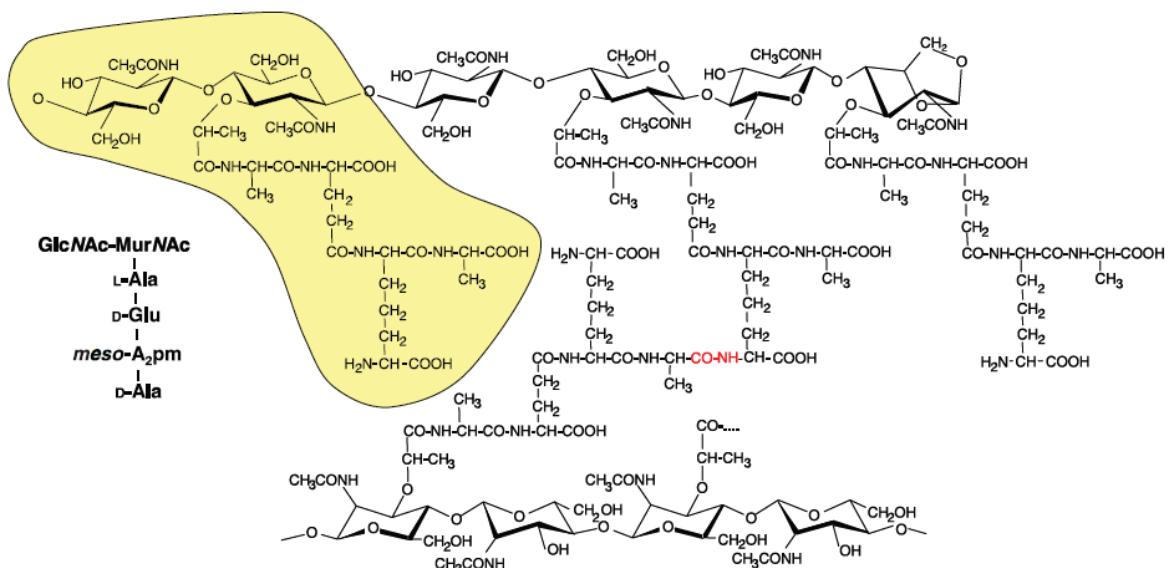
Slika 2. Shematski prikaz zgradbe bakterijske celične stene pri po Gramu negativnih (levo) in po Gramu pozitivnih (desno) bakterijah (povzeto po [24]).

Različna sestava G- in G+ bakterij je verjetno vzrok za manjšo aktivnost antibiotikov proti G- bakterijam. Zunanja membrana G- bakterij namreč močno zmanjša prepustnost celične stene [2].

1.3.1 Struktura peptidoglikana

Moč in rigidnost bakterijske celične stene sta rezultat ene ali več plasti peptidoglikana, ki je kovalentna makromolekularna struktura togih sladkornih verig, ki so med seboj povezane s fleksibilnim peptidnim mostom [24, 27]. Kemijska sestava peptidoglikana je skupna G- in G+ bakterijam, razlika med njima je v tem, da ima celična stena G+ bakterij več peptidnih mostov in je debelejša kot pri G- bakterijah [25].

Glikanske verige so sestavljene iz izmenjujočih se enot aminosladkorjev *N*-acetilglukozamina (*GlcNAc*) in *N*-acetilmuramiske kisline (*MurNAc*), ki so med seboj povezane z β -1 \rightarrow 4 glikozidno vezjo (slika 3). Karboksilna skupina vsakega *MurNAc* ostanka je substituirana s peptidno verigo, ki v zaporedju najpogosteje vključuje L-alanin (L-Ala), γ -D-glutaminsko kislino (γ -D-Glu), mezo-diaminopimelinsko kislino (mDAP) ali L-lizin (L-Lys) in dipeptid D-alanin-D-alanin (D-Ala-D-Ala). Pri vključevanju osnovne enote v že obstoječi peptidoglikan se zadnja molekula D-Ala odstrani [26-28].



Slika 3. Struktura peptidoglikana iz *E. coli*. Z oranžno obarvanim poljem je označena osnovna enota, monomer (povzeto po [27]).

Med posameznimi bakterijami so razlike v sestavi peptidne verige, dolžini glikanskih verig in v mestu ter načinu premreženja. Glikansko verigo lahko sestavlja tudi do 250 disaharidnih enot v dolžino. Povprečna dolžina glikanske verige ni odvisna od debeline peptidoglikanske plasti. Dolge in kratke verige najdemo tako pri G+ kot pri G- bakterijah. Možne so sekundarne modifikacije na sladkorjih, kot so *N*-deacetiliranje, *O*-acetiliranje in *N*-glikoliliranje. Sestava peptidne verige je odvisna od specifičnosti **ligaz Mur**, ki so odgovorne za njeno sintezo, in od reakcij, ki potekajo v kasnejših stopnjah biosinteze peptidoglikana (amidiranje, hidroksiliranje, acetiliranje, dodajanje aminokislin in drugih skupin). Encimi, ki sodelujejo v teh pretvorbah, so še vedno neznani [27].

Ločimo dva tipa prečnega premreženja. Preko karboksilne skupine D-Ala na četrtem mestu ene peptidne verige z amino skupino diaminokisline na tretjem mestu druge peptidne verige (premreženje 3-4), lahko direktno ali preko kratkega peptida (interpeptidni most, ki ga sestavlja od ene do sedem aminokislinskih ostankov, npr. Gly, L-Ala, L- ali D-Ser, in L- ali D-Glu). Drugi, manj pogost način premreženja najdemo predvsem pri korinebakterijah, pri katerih poteče med α -karboksilno skupino D-Glu na drugem mestu ene peptidne verige in karboksilno skupino D-Ala na četrtem mestu (premreženje 2-4). Prečno premreženje je katalizirano s transpeptidazno domeno penicilin vezičnih proteinov (PBP) [27].

Kljub vsem podatkom, ki jih imamo o strukturi peptidoglikana, pa tridimenzionalna struktura oziroma orientiranost peptidnih in slatkornih verig glede na membrano še vedno ni povsem pojasnjena. Pojavljata se dve teoriji; prva pravi, da glikanske verige potekajo vzporedno z bakterijsko citoplazemskega membrano, druga pa, da so verige ortogonalno glede na membrano [29, 30].

1.3.2 Biosinteza peptidoglikana

Biosinteza peptidoglikana je večstopenjski proces, ki vključuje približno 20 encimsko kataliziranih reakcij (slika 4). Te potekajo v citoplazmi ter na notranji in zunanji strani citoplazemske membrane in jih lahko razdelimo v tri faze:

- i. sinteza nukleotidnih prekurzorjev peptidoglikana v citoplazmi [31],
- ii. vezava citoplazemskih prekurzorjev na lipidni nosilec in prenos skozi citoplazemskega membrano [32, 33] in
- iii. polimerizacija peptidoglikanskih prekurzorjev in pripenjanje na obstoječi peptidoglikan [34, 35].

1.3.2.1 Sinteza nukleotidnih prekurzorjev peptidoglikana v citoplazmi

Citoplazemsko fazo sinteze peptidoglikana lahko razdelimo v štiri sklope reakcij [31]:

- i. Sinteza UDP-*N*-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc) iz fruktoze-6-fosfata. Ta stopnja vključuje štiri zaporedne encimske reakcije. Začne se s sintezo glukozamin-6-fosfata iz fruktoze-6-fosfata, ki jo katalizira glukozamin-6-fosfat sintetaza (GlmS). Izomerizacijo v glukozamin-1-fosfat katalizira fosfoglukozamin mutaza (GlmM), zadnji dve stopnji, v katerih iz glukozamin-1-fosfata dobimo UDP-GlcNAc, pa katalizira bifunkcionalni encim glukozamin-1-fosfat acetiltransferaza in *N*-acetilgluklozamin-1-fosfat uridiltransferaza (GlmU).
- ii. Za nastanek UDP-*N*-acetilmuraminske kisline (UDP-MurNAc) iz UDP-GlcNAc sta potrebni dve stopnji. Najprej encim MurA katalizira prenos enolpiruvata s fosfoenolpiruvata (PEP) na 3'-hidroksilno skupino UDP-MurNAc, temu pa sledi reakcija pretvorbe enolpiruvata do D-laktata z encimom MurB.
- iii. Sinteza UDP-*N*-acetilmuramil-pentapeptida (UDP-MurNAc-pentapeptid) iz UDP-MurNAc katalizirajo širje esencialni encimi poznani kot ligaze Mur (MurC, D, E in F). Na prosto karboksilno skupino D-laktata v UDP-MurNAc, se pripne veriga petih aminokislin, s pomočjo od ATP odvisnih encimov ligaz Mur. Ligaze Mur (MurC, D, E in F) katalizirajo tvorbo amidne vezi med posameznimi aminokislinskimi, da dobimo verigo L-Ala- D-Glu-*mDAP(L-Lys)*- D-Ala- D-Ala.
- iv. Stranske reakcije: nastanek D-Glu iz L-Glu z glutamatno racemazo (MurI) in D-Ala iz L-Ala z alanin racemazo (Alr) ter sinteza dipeptida D-Ala- D-Ala, ki jo katalizira D-alanin:D-alanin ligaza (Ddl).

1.3.2.2 Vezava prekurzorjev na lipidni nosilec in prenos skozi citoplazemsko membrano

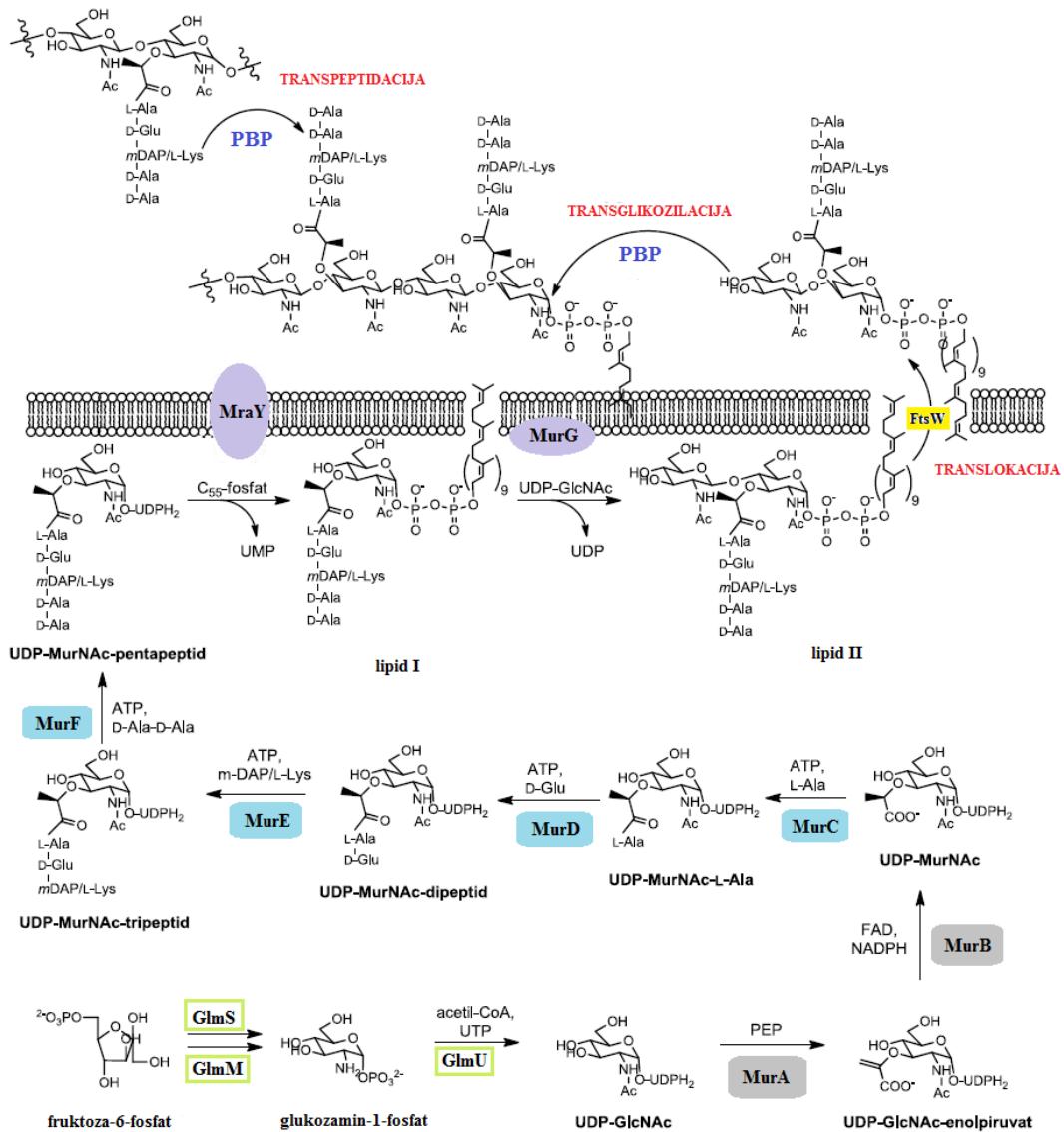
Reakcije te stopnje potekajo na citoplazemski strani bakterijske membrane. UDP-MurNAc-pentapeptid se najprej poveže z membranskim akceptorjem undekaprenil fosfatom (fosforiliran lipidni nosilec) in nastaneta undekaprenil-pirofosforil-MurNAc-pentapeptid (lipid I) in UMP. Prenos katalizira integralni membranski encim fosfo-MurNAc pentapeptid translokaza (MraY). Nato sledi pripenjanje GlcNAc iz UDP-GlcNAc na C4 hidroksilno skupino preko β -1→4 glikozidne vezi na lipidu I in nastane undekaprenil-pirofosforil-MurNAc-(pentapeptid)-GlcNAc (lipid II), ki je zadnji znotrajcelični produkt v sintezi peptidoglikana. Tvorbo glikozidne vezi katalizira UDP-GlcNAc-(pentapeptid)-

pirofosforil-undekaprenol-GlcNAc transferaza (MurG). [32, 33]. Prenos lipida II na zunanjo stran celične membrane pa omogoči encim FtsW [32, 34].

1.3.2.3 Polimerizacija prekurzorjev in pripajanje na obstoječi peptidoglikan

Zadnja, tretja faza sinteze peptidoglikana poteka na zunani strani bakterijske membrane, kjer pride do vključevanja gradnikov v že obstoječi peptidoglikan. Zunajcelične stopnje katalizirajo encimi, imenovani penicilin vezovi proteini (PBP). Delimo jih na PBP z visoko in PBP z nizko molekulsko maso. PBP z visoko molekulsko maso delimo v dva razreda, in sicer na bifunkcionalne (razred A, imajo transglikozilacijsko in traspeptidazno aktivnost) in monofunkcionalne (razred B, imajo samo transpeptidazno aktivnost) [34].

Najprej pride do povezovanja slatkornih enot v daljša glikanska vlakna (transglikozilacija) tako, da se tvori β -1 \rightarrow 4 glikozidna vez med GlcNAc-MurNAc-pentapeptidom, ki je vezan na lipidni nosilec, ter obstoječo verigo glikana. Pri tem se sprosti molekula undekaprenil-pirofosfata, ki se regenerira v prvotno obliko (prenese se na notranjo stran membrane, kjer se defosforilira). V zadnji stopnji poteče še prečno premreženje (transpeptidacija) med novimi glikanskimi vlakni in obstoječim peptidoglikanom. Transpeptidazna domena PBP prepozna D-Ala-D-Ala fragment pentapeptidne verige, se nanjo veže in odcepi terminalni D-Ala. Peptidna vez se nato tvori med preostalim D-Ala na četrtem mestu, ki reagira z ϵ -amino skupino mDAP ali L-Lys na tretjem mestu sosednje glikanske verige. Tako dobimo prečno povezano med dvema sosednjima glikanskima verigama [34, 35].



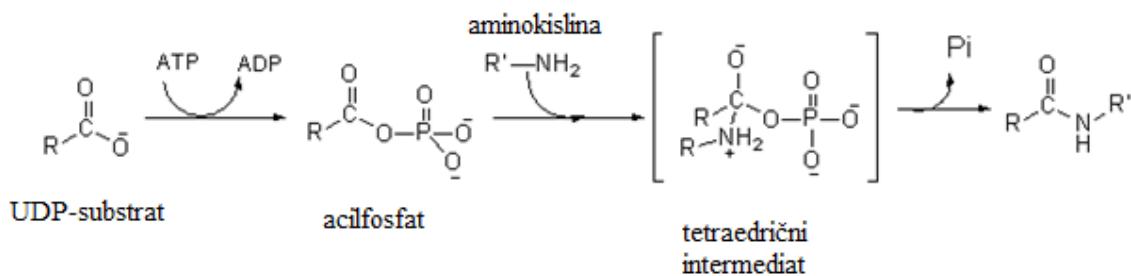
Slika 4. Shematski prikaz biosinteze peptidoglikana.

1.4 Ligaze Mur

Skupina encimov, imenovanih ligaze Mur (MurC, MurD, MurE in MurF), so esencialni bakterijski encimi, ki sodelujejo v citoplazemski stopnji sinteze peptidoglikanskega gradnika UDP-MurNAc-pentapeptida. So od ATP odvisni encimi, ki pripenjajo posamezne aminokisline ali dipeptid na UDP-MurNAc [36], za svoje delovanje pa potrebujejo tudi magnezijeve ali manganove ione [31, 37].

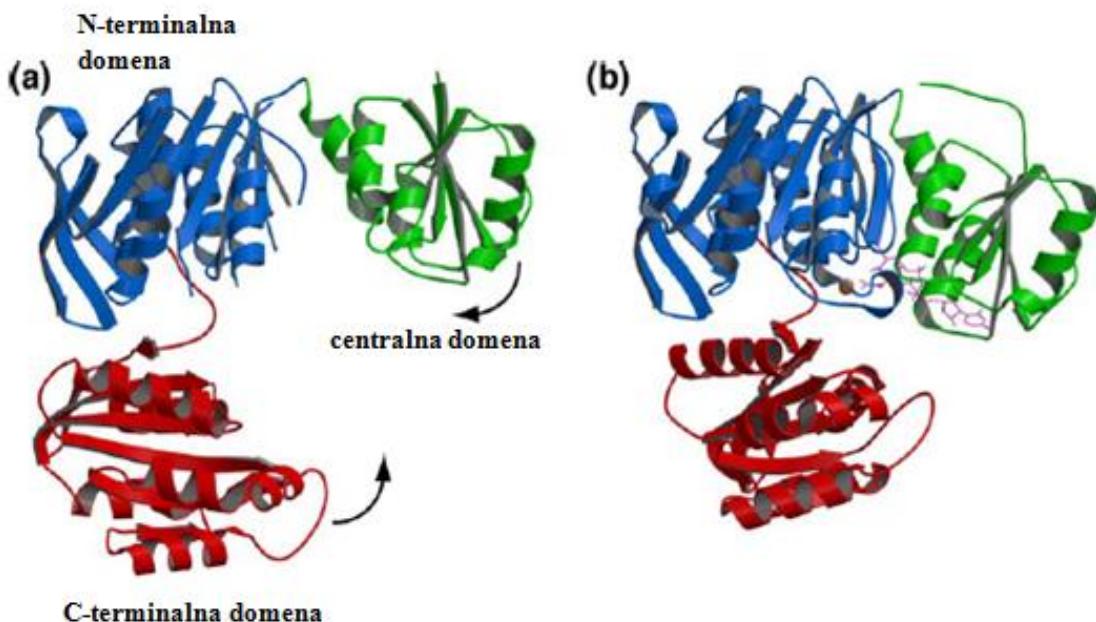
Vse štiri ligaze imajo podoben mehanizem delovanja (slika 5). V prvi stopnji pride do aktivacije karboksilne skupine nukleotidnega UDP substrata preko γ -fosfatne skupine iz

molekule ATP v obliki acilfosfata. Ta nato reagira z nukleofilno amino skupino aminokisline ali dipeptida, ki ga ustrezna ligaza Mur pripenja na obstoječi UDP substrat, do nestabilnega tetraedričnega prehodnega stanja. Po odcepitvi organskega fosfata nastane nova amidna ali peptidna vez [37].



Slika 5. Reakcijski mehanizem ligaz Mur (povzeto po [31]).

Vsi širje encimi imajo podobno tridimenzionalno strukturo in so sestavljeni iz treh strukturnih domen (slika 6). N-terminalna domena je primarno odgovorna za vezavo UDP-MurNAc-substrata, centralna domena veže ATP, C-terminalna domena pa veže pripenjajočo se aminokislino ali dipeptid [25, 31, 36, 38, 39]. S preučevanjem kristalnih struktur teh encimov so ugotovili, da so topologije centralnih in C-terminalnih domen vseh ligaz Mur podobne, več strukturnih razlik pa obstaja v strukturi N-terminalne domene. Slednja se pri encimih MurC in MurD bistveno razlikuje od strukture pri encimih MurE in MurF zaradi naraščajoče dolžine nukleotidnega substrata (z vsako stopnjo je daljši za eno aminokislino [40]). Ugotovili so tudi, da so encimi v dveh konformacijah, kajti ob vezavi liganda pride do rotacije C-terminalne domene in s tem do preklopa iz odprte v zaprto obliko [25, 31].



Slika 6. Tridimenzionalna struktura ligaze MurC (PDB koda: 1GGY) v odprti (a) in zaprti (PDB koda: 1P3D) (b) konformaciji. Črni puščici na sliki (a) prikazujeta gibanje centralne in C-terminalne domene po vezavi liganda (povzeto po [25]).

1.4.1 Ligaza MurC

Ligaza MurC (UDP-MurNAc:L-alanin ligaza) pripenja prvo aminokislino v peptidno verigo. Pri večini bakterij je to L-alanin, v redkih primerih se pojavlja tudi L-serin. L-alanin se pripne na D-laktoilno skupino UDP-MurNAc in nastane UDP-MurNAc-L-Ala (UMA) [31, 39]. Izolirani in okarakterizirali so encim MurC iz *Escherichiae coli* (*E. coli*), *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *P. aeruginosa* in *Chlamydia trachomatis*. Razrešene so bile kristalne strukture iz sevov *Haemophilus influenzae*, *Thermotoga maritima* in *E. coli*. Encim je stereospecifičen, D-alanin ni možen substrat [31].

1.4.1.1 Inhibitorji ligaze MurC

Odkriti so bili fosfinatni analogi tetraedričnega prehodnega stanja, benzilidenrodaninski inhibitorji (bili so aktivni proti meticilinu rezistentnemu *S. aureus* (MRSA), ne pa proti *E. coli*), benzofuran acilsulfonamidi in pulvinoni [31]. Z metodo fagnega prikaza sta bila

odkrita tudi dva peptidna inhibitorja encima MurC [31, 41]. Razviti so bili tudi *N*-benzilidensulfonohidrazidni inhibitorji [42] in derivati 2-fenil-5,6-dihidro-2*H*-tieno[3,2-c]pirazol-3-ola [31].

1.4.2 Ligaza MurD

Ligaza MurD (UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanin:D-glutamat ligaza) je drugi encim v seriji bakterijskih ligaz Mur in katalizira pripenjanje D-glutaminske kisline na karboksilno skupino citoplazemskega intermediata UMA, končni produkt je UDP-*N*-acetil-muramoil-L-alanin-D-glutamat (UMAG) [37, 43]. Ligaza MurD je bila prva izmed ligaz Mur z razrešeno kristalno strukturo. Izolirali so jo iz *E. coli* v kompleksu z UDP-MurNAc-L-Ala. Molekula encima MurD vsebuje dva magnezijeva iona; prvi je vključen pri vezavi ATP, drugi pa pri formaciji acilfosfata. Magnezijev ion je koordiniran z dvema molekulama vode, ki sta z vodikovimi vezmi vezani na karbamoiliran aminokislinski ostanek lizina [31].

1.4.2.1 Inhibitorji ligaze MurD

Do danes so razvili že kar nekaj inhibitorjev encima MurD. Najprej so bili razviti fosfinatni in sulfonamidni inhibitorji tetraedričnega prehodnega stanja [40, 44, 45]. Kasneje so odkrili še deriveate pulvinona, pirazola in peptidne inhibitorje [40, 44], spojine z *N*-acetilhidrazonskim fragmentom [40] ter makrociklične [44] zaviralce. Novejši so 5-benzilidenrodaninski, 5-benzilidentiazolidin-2,4-dionski [46] in 2-tiooksotiazolidin-4-onski [45] inhibitorji. Za iskanje novih inhibitorjev uporabljajo različne metode: virtualno rešetanje, *de novo* strukturno podprto načrtovanje, rešetanje knjižnic fagnega prikaza, HTS z uporabo fluorimetričnega testa [40, 45].

1.4.3 Ligaza MurE

Tretjo aminokislino, ki je pri G+ bakterijah mDAP, pri G- bakterijah L-lizin, pri nekaterih vrstah pa lahko najdemo tudi druge aminokisline (L-ornitin, mezo-lantionin, L-homoserin), pripne ligaza MurE (UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu:L-Lys/mezo-A₂pm ligaza) [31, 47]. Pri mnogih organizmih je tretji aminokislinski ostanek udeležen pri prečnem povezovanju, zato mora encim MurE izbrati pravo aminokislino, ker v nasprotnem primeru pride do lize celice [47]. Razrešili so kristalni strukturi encima MurE iz *Mycobacterium tuberculosis* [38] in *E. coli* [47].

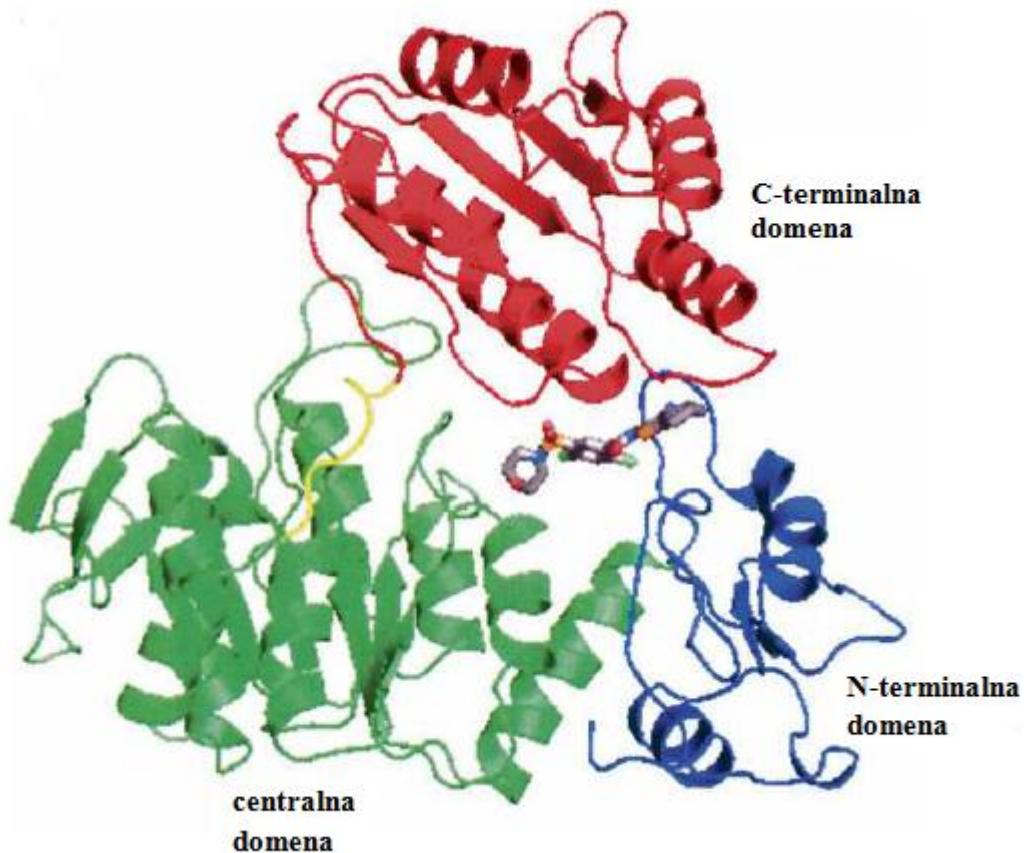
1.4.3.1 Inhibitorji ligaze MurE

Razviti so bili tudi inhibitorji ligaze MurE: analogi mDAP, nekateri *N*-acildipeptidni derivati in fosfinatni analogi tetraedričnega prehodnega stanja [31], sulfonamidi [48], peptidni zaviralci [49] in benzen 1,3-dikarboksilne kisline, ki so jih odkrili s pomočjo virtualnega rešetanja [50]. Iz kolumbijske rastline so izolirali 3-metoksinordomesticin, ki je naraven inhibitor encima MurE in izkazuje protituberkulozno aktivnost [51].

1.4.4 Ligaza MurF

Zadnji encim v sintezi citoplazemskega prekurzorja, UDP-MurNAc-pentapeptida, je encim MurF (UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-L-Lys/mezo-A₂pm:D-Ala-D-Ala ligaza). Z njim se konča prva faza biosinteze peptidoglikana [31, 52]. Razrešili so kristalno strukturo apoencima MurF iz *E. coli*, ki je v odprtji konformaciji [53] in pripravili kristalne strukture encima iz *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) v kompleksu s sulfonamidnimi inhibitorji (slika 7), kjer je encim v zaprti konformaciji [52, 54, 55]. Tako kot ostali encimi Mur je tudi encim MurF sestavljen iz treh domen:

- i. N-terminalna domena obsega aminokislinske ostanke od 1 do 81, je zgrajena iz petih β -struktur in jih obdajajo tri vijačnice (dva α -heliksa in en 3_{10} -heliks). Vsebuje pa še dve kraši antiparalelni β -strukture, ki potekata pravokotno na prvih pet β -struktur.
- ii. Centralna domena obsega aminokislinske ostanke od 82 do 310. Sestavlja jo šest paralelnih in tri antiparalelne β -strukture, ki so obdane z osmimi α -heliks vijačnicami.
- iii. C-terminalno domeno sestavljajo aminokislinski ostanki od 311 do 447. Zgrajena je iz šestih β -struktur in petih α -heliksov, vsebuje tudi dinukleotidno vezavno mesto, znano kot Rossmanovo zvitje [53].



Slika 7. Encim MurF v kompleksu s sulfonamidnim inhibitorjem (povzeto po [54]).

Dipeptid D-Ala-D-Ala, ki ga vgradi encim MurF, nastane v stranski reakciji biosinteze peptidoglikana. D-Ala je prisoten v lipotejhojski kislini G- bakterij in nastane iz L-Ala s pomočjo alanin racemaze, katere kofaktor je piridoksal-5-fosfat. Dve molekuli D-Ala nato med seboj poveže od ATP odvisen encim D-Ala:D-Ala ligaza (Ddl). Reakcija se začne z vezavo γ -fosfatne skupine ATP na prvi D-Ala, nastane acilfosfat. Acilfosfat napade amino skupina drugega D-Ala in tvori se tetraedrično prehodno stanje, od katerega se odcepi organski fosfat in dobimo dipeptid D-Ala-D-Ala. Vidimo, da je sam mehanizem reakcije močno podoben reakcijam ligaz Mur, vendar encima Ddl, ne uvrščamo med ligaze Mur. Ugotovili so, da sta sekvenčno ujemanje in kristalna struktura encima Ddl podobna encimom, ki jih uvrščamo v zelo raznoliko družino ATP-vezočih encimov, ki katalizirajo od ATP odvisno vezavo karboksilne skupine na aminski ali iminski dušik, hidroksilni kisik ali na žveplo tiolne skupine [31].

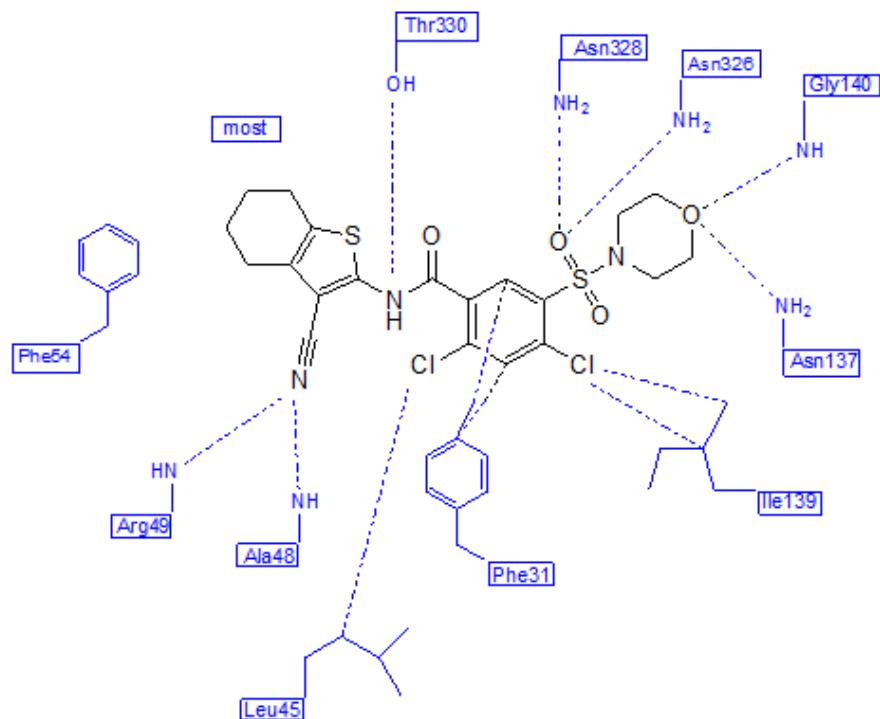
1.4.4.1 Inhibitorji ligaze MurF

Tako kot ostali encimi Mur, je tudi encim MurF potencialna tarča protibakterijskih učinkovin. Ker je prisoten samo v bakterijskih celicah in je nujno potreben za sintezo bakterijske celične stene in s tem preživetje bakterij, nam omogoča visoko selektivnost [52]. Odkritih je bilo že nekaj inhibitorjev MurF, vendar še nobeden ni klinično uporaben. V preglednici I so predstavniki glavnih strukturnih razredov, ki inhibirajo encim MurF in njihove inhibitorne koncentracije. Prvi inhibitorji so bili pseudo-tripeptidne in pseudo-tetrapeptidne aminoalkilfosfinske kisline, ki so bile sintetizirane kot inhibitorji tetraedričnega prehodnega stanja. Njihova splošna struktura je x-Lys- Ψ (PO₂H)-Gly-Ala [31, 56] in delujejo kot reverzibilni kompetitivni inhibitorji encima MurF izoliranega iz *E. coli* [55]. Pri družbi Abbott so z virtualnim rešetanjem prišli do sulfonamidnih inhibitorjev [54, 57]. Pripravili so tudi serijo 8-hidroksikinolinskih derivatov, ki inhibirajo encim MurF. Glede na farmakoforni model, ki izvira iz serije 8-hidroksikinolinov, so konstruirali spojino s 4-fenilpiperidinskim fragmentom, ki prav tako inhibira encim MurF [58]. Znani inhibitorji encima MurF so tudi tiazolilaminopirimidini [59] in 1,3,5-triazinski derivat, ki so ga našli s pomočjo virtualnega rešetanja [60]. S pomočjo farmakofornega modeliranja in QSAR študij so prišli do strukturno zelo različnih inhibitorjev, najboljša spojina je imela IC₅₀ 125 μM, nobena izmed spojin pa ni izkazala protibakterijskega delovanja [61]. Z uporabo fagnega prikaza je bil razvit tudi peptidni inhibitor MurFp1, ki inhibira vezavo D-Ala-D-Ala. IC₅₀ vrednost so izmerili na encimu MurF izoliranem iz *P. aeruginosa* in znaša 250 μM [62].

Preglednica I. Predstavniki glavnih strukturnih razredov inhibitorjev encima MurF.

Strukturna formula inhibitorja	IC ₅₀ ^a	Encim MurF	Referenca
	200 μM	<i>E. coli</i>	[56]

^a 50-odstotna inhibitorna koncentracija



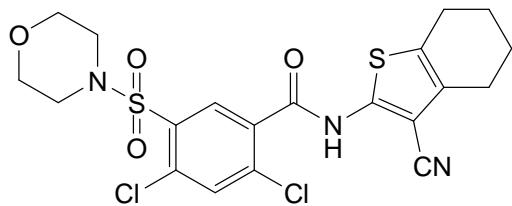
Slika 8. Shematski prikaz interakcij med molekulo inhibitorja in aminokislinskimi ostanki v aktivnem mestu encima MurF. Črtkane črtice predstavljajo vodikovo vez ali van der Waalsove interakcije (povzeto po [52]).

Trenutno še ne poznamo terapevtsko uporabnega inhibitorja ligaz Mur. Imamo več spojin, ki učinkovito inhibirajo izoliran encim, nimajo pa ustreznega protibakterijskega delovanja. Vzroki za to so lahko v slabi permeabilnosti oziroma nezmožnosti aktivnega ali pasivnega prehajanja spojin v citoplazmo, v nespecifični vezavi spojin na druge proteine, aktivnem izčrpavanju s pomočjo membranskih iztočnih črpalk [57, 63]. Glede na strukturo encimov iz družine Mur, ki jo sedaj že dobro poznamo, vidimo, da so podobnosti v vezavnih mestih med encimoma MurC/MurD in MurE/MurF. Tu lahko najdemos možnost za načrtovanje dualnih inhibitorjev teh encimov. Na drugi strani pa vidimo, da imajo vse ligaze Mur enak kemijski mehanizem delovanja in na podoben način vežejo ATP, zato bi lahko iskali spojine, ki bi delovale na tem mestu in bi lahko inhibirale več encimov hkrati [25].

2. NAČRT DELA

Naraščanje rezistentnih sevov proti večini danes znanih protibakterijskih učinkovin predstavlja resen zdravstveni problem, zato se kaže potreba po iskanju novih protibakterijskih učinkovin z novim mehanizmom delovanja. V okviru diplomskega dela bomo najprej s pomočjo virtualnih računalniških metod poskušali poiskati nove inhibitorje bakterijskega encima MurF, s katerimi bi preprečili biosintezo citoplazemskih prekurzorjev, ki so gradniki peptidoglikana. V drugem delu bomo te spojine sintetizirali in testirali njihovo učinkovitost na encimu MurF, izoliranem iz *E. coli*.

V literaturi smo našli spojino 1, ki inhibira encim MurF, in na podlagi njene strukture bomo načrtovali nove spojine. Spojino so našli in objavili v družbi Abbott, mi pa bomo pripravili spojine s podobno strukturo z namenom, da bi obširneje raziskali kemijski prostor. Poskušali bomo ugotoviti, kako na aktivnost spojine vpliva različen položaj določenih funkcionalnih skupin. Zamenjali bomo nekatere fragmente (obroče) in preverili, kako te zamenjave vplivajo na aktivnost spojine. V strukturi spojine 1 vidimo, da sta na osrednji benzenov obroč vezana dva klorja. Klorova atoma bomo zamenjali z drugim halogenom, da bi ugotovili, ali ima njuna zamenjava vpliv na aktivnost.



Spojina 1 ($IC_{50} = 1 \mu M$)

Pri spojinah bomo ohranili osrednji benzenov obroč z dvema kloroma in iskali zamenjave na sulfonamidni in amidni strani molekule. Za iskanje zamenjav bomo uporabili programa ROCS in ReCore. Izdelali bomo še serijo spojin, ki imajo v osrednjem delu benzenov obroč substituiran samo z enim bromom. Sintezo bomo izvedli tako, da bomo najprej pripravili sulfonamid in v naslednji stopnji še amid z aromatskim aminom. Sulfonamid bomo pripravili tako, da bomo v predstopnji na benzenov obroč uvedli klorsulfonsko

skupino in nato z ustreznim aminom pripravili sulfonamid. Amid bomo sintetizirati z uporabo sklopitvenih reagentov in preko tvorbe kislinskega klorida.

Na amidno stran molekule bomo uvedli orto, meta in para cianobenzenov obroč. S tem bomo poskušali ugotoviti, ali različen položaj ciano skupine vpliva na aktivnost spojine. Benezenov obroč v tem delu molekule bomo zamenjali še z dvema drugima aromatoma, s 3-ciano-4,5-dimetil-1*H*-pirolovim in 3-cianotiofenskim obročem.

S sintetiziranimi spojinami bomo raziskali, kako vpliva položaj ciano skupine, ki je vezana na benzenov obroč, na aktivnost spojine in kako vpliva zamenjava benzenovega obroča z drugimi aromatskimi obroči. Poskušali bomo pripraviti tudi spojine, ki imajo na sulfonamidnem dušiku vezane različne derivate piperidina.

3. MATERIALI IN METODE

1. MATERIALI

Reagenti in topila

Pri eksperimentalnem delu diplomske naloge smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Fluka, Merck, Sigma-Aldric.

2. METODE

Kromatografske metode

Za tankoplastno kromatografijo (TLC), s katero smo spremljali potek reakcij in postopkov čiščenja, smo uporabljali plošče Merck Silica Gel 60 F₂₅₄ z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščicah smo uporabljali UV svetilko (valovna dolžina $\lambda = 254$ nm ali 366 nm) in orositvene reagente bromkrezol zeleno (detekcija karboksilnih skupin), ninhidrin (detekcija aminov) in FeCl₃ (detekcija fenolov). Mobilne faze so bile različne in so navedene pri vsaki spojni posebej.

Za kolonsko kromatografijo smo uporabljali različno velike (odvisno od količine spojine) steklene kolone. Za stacionarno fazo smo uporabljali silikagel Silica Gel 60 proizvajalca Merck z velikostjo delcev med 0,063 in 0,200 mm.

Spektroskopske metode

Masni spektri spojin so bili posneti na spektrofotometru Autospec (VG-Analytical) z EI, ESI in HRMS tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

¹H spektre spojin so posneli na spektrometu Bruker Avance DPX 300 v Nacionalnem centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo in na Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo. Kot interni standard smo uporabili TMS, vzorce pa smo raztopili v devteriranih topilih DMSO-d₆ in (CD₃)₂CO. Za reševanje spektrov smo uporabljali računalniški program MestRe-C 4.8.6. proizvajalca Mesterlab Research S. L.

IR spektre smo posneli na spektrofotometru Perkin Elmer 1600 FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Določanje tališč

Talilne intervale spojin smo določali s Koflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica in so nekorigirana.

Poimenovanje in risanje spojin

Za poimenovanje in risanje spojin smo uporabljali računalniški program ChemBioDraw Ultra 12.0 podjetja CambridgeSoft. Za iskanje sinteznih postopkov po podatkovnih bazah smo uporabljali program SciFinder Scholar.

Določanje inhibitorne aktivnosti spojin na encimu MurF

Spojine smo testirali preko inhibicije dodajanje dipeptida D-Ala-D-Ala na UMtri-mDAP, ki ga katalizira encim MurF. Uporabili smo encim MurF, izoliran iz *E. coli*. Volumen končne zmesi je bil 50 µl in je vseboval 50 mM Hepes (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina), 50 mM MgCl₂, 0.005% Triton X-1114, 600 µM D-Ala-D-Ala, 100 µM UMtri-mDAP, 500 µM ATP, izoliran encim MurF in 5% DMSO. Inhibitorno aktivnost na encimu MurF smo določali pri pH = 8.0.

Reakcijsko zmes smo 15 minut inkubirali pri temperaturi 37 °C in ohladili z dodatkom 100 µl reagenta Biomol®. Po 5 minutah smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 650 nm. Vse eksperimente smo izvajali v dveh paralelah. Encim MurF potrebuje za potek reakcije ATP, ki se pretvorji v ADP in fosfat. Pri 650 nm spektrofotometrično določimo fosfat, ki z malahitno zelenim (Biomol®) tvoriobarvan kompleks. Katalitično aktivnost encima MurF smo ovrednotili na podlagi množine nastalega fosfatnega kompleksa pri reakciji. Vzporedno smo naredili še kontrolo brez dodanega inhibitorja. Ob dodatku inhibitorja je v primerjavi s kontrolo množina nastalega fosfatnega kompleksa manjša, saj se katalitična aktivnost encima zniža. Rezidualno aktivnost (RA) smo izračunali glede na kontrolni test. IC₅₀ vrednost pa smo določili z merjenjem RA pri sedmih različnih koncentracijah. Testi so bili izvedeni na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

3. RAČUNALNIŠKE METODE

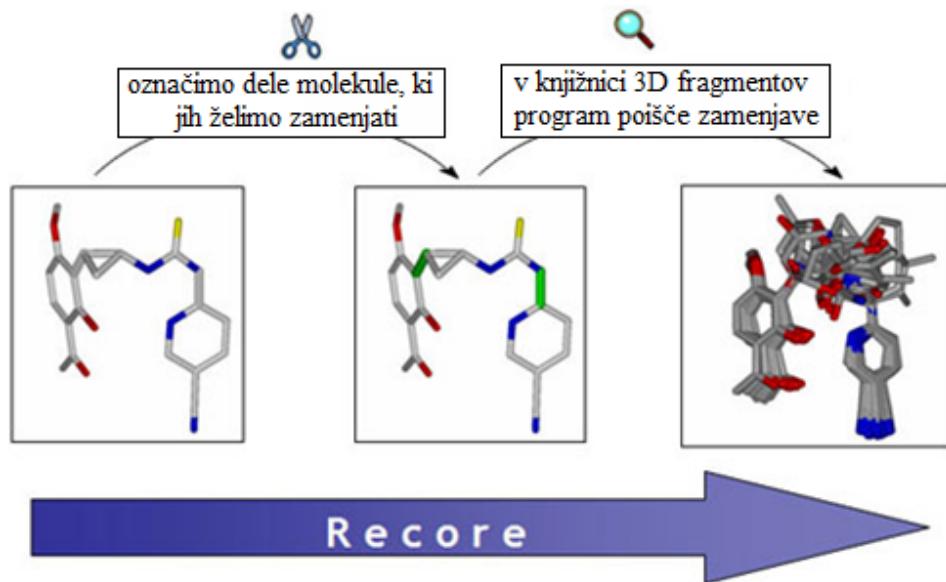
ROCS

ROCS (Rapid Overlay of Chemical Structures) je aplikacija, s katero lahko med seboj hitro primerjamo molekule. Temelji na ideji, da imajo molekule podobno obliko, če se njihov volumen dobro prekriva. Za predstavitev volumna molekule program uporablja Gaussovo funkcijo [64]. ROCS je orodje, ki se uporablja pri virtualnem rešetanju knjižnice spojin. Z njim lahko hitro najdemo potencialno aktivne spojine, ki imajo podobno obliko in volumen kot spojina vodnica [65, 66]. Rezultati, ki ji dobimo, temeljijo na podlagi ujemanja 3D strukture molekule in kemijskega ujemanja, ki temelji na ujemaju polja kemijskih sil, ki jih določi uporabnik. Sam program uporablja princip superpozicije in lahko obdela 20 do 40 spojin na sekundo na centralno procesno enoto. Program uporablja Tanimotovo cenilno funkcijo, na podlagi katere nam vrne rezultate [67].

ReCore

S programom ReCore lahko zamenjamo posamezne fragmente v znani aktivni molekul. V molekuli označimo dele, ki jih želimo ohraniti in izrežemo del, ki ga želimo zamenjati z drugimi fragmenti (slika 9). Program išče najboljše zamenjave iz znane baze 3D molekul. Princip z ReCore je sestavljen iz dveh faz. V predprocesni fazi bazo 3D spojin spremenimo v fragmente na podlagi pravil, ki jih postavi uporabnik in delujejo kot filter pri iskanju novih fragmentov. V naslednji fazi program sestavi molekulo z novimi in ohranjenimi fragmenti iz znane spojine [68, 69].

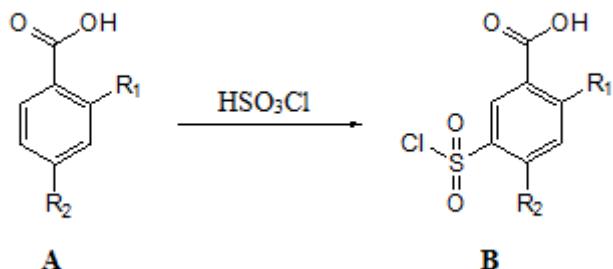
Nato se bomo odločili, kateri izmed fragmentov, ki jih je predlagal program, bi bili lahko sestavnici deli naših molekul.



Slika 9. Shematski prikaz delovanja aplikacije ReCore (povzeto po [68]).

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 UVEDBA SULFONIL KLORIDA NA BENZENOV OBROČ



Slika 10. Reakcijska shema tvorbe sulfonilklorida (A - izhodna spojina, B – produkt reakcije).

Preglednica II. Določa fragmente in strukturo posameznega produkta B iz slike 10.

Oznaka produkta B	R ₁	R ₂
1	-Cl	-Cl
2	-Br	-H

Sintezni postopek

V suho bučko smo odmerili 36,0 mmol klorsulfonske kisline in jo na ledeni kopeli ohladili na 0 °C in nato počasi dodajali ustrezni derivat benzojske kisline (spojina A na sliki 10; 4,8 mmol). Po vsem dodatku spojine A smo odstranili ledeno kopel in bučko obrisali do suhega. Nato smo jo opremili s povratnim hladilnikom, na katerega smo namestili klorkalcijev cevko. Na oljni kopeli smo reakcijsko zmes segrevali 24 ur pri temperaturi 130 °C. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes ohladili in jo nato počasi v tankem curku zlili na led. Izpadla je bela oborina (produkt **1**, **2**), ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem in v sušilniku posušili do suhega.

2,4-dikloro-5-(klorosulfonil)benzojska kislina (1)

M_r: 287,88

Izgled: bela trdna amorfna snov

Izkoristek reakcije: 81%

Retencijski faktor: 0,51 (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 5 : 1 : 0,1)

Temperatura tališča: 124,-126,5 °C

MS (ESI): m/z = 289 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 289) za C₇H₃Cl₃O₄S: izračunan 289,8788 in izmerjen 289,8829

¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 7,97 (s, 2H); manjka signal za COOH

IR (KBr): 3414, 3234, 3098, 2992, 2874, 1717, 1693, 1580, 1375, 1300, 1267, 1180, 1079, 908, 604, 564 cm⁻¹

2-bromo-5-(klorosulfonil)benzojska kislina (2)

M_r: 297,87

Izgled: bela trdna amorfna snov

Izkoristek reakcije: 88%

Retencijski faktor: 0,53 (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 5 : 1 : 0,1)

Temperatura tališča: 130,1-133,9 °C

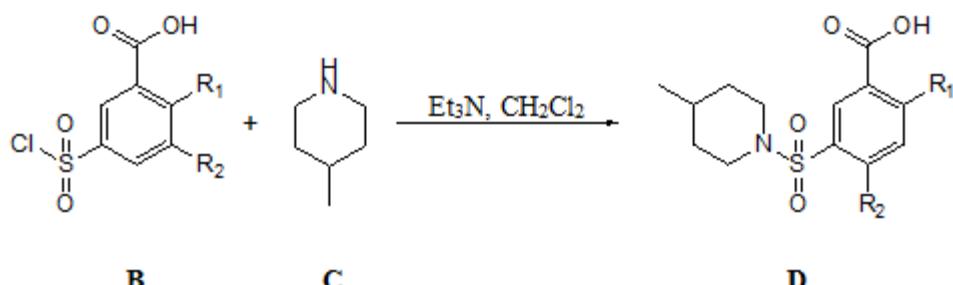
MS (ESI): m/z = 299 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 299) za C₇H₄BrClO₄S: izračunan 299,8673 in izmerjen 299,6715

¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 7,59 (dd, J₁ = 3,5 Hz, J₂ = 9,2 Hz, 1H); 7,67 (d, J = 9,2 Hz, 1H); 7,92 (d, J = 3,5 Hz, 1H); manjka signal za COOH

IR (KBr): 3102, 3103, 2992, 2880, 1713, 1583, 1462, 1372, 13303, 1179, 1030, 917, 860, 829, 735, 659, 592, 497 cm⁻¹

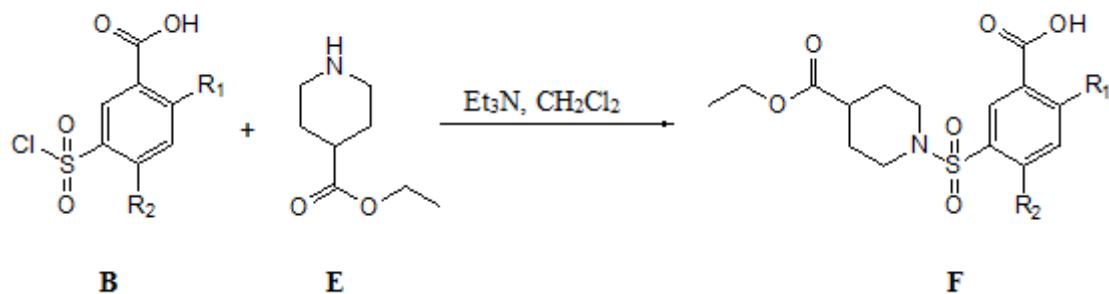
4.2 TVORBA SULFONAMIDA



Slika 11. Reakcijska shema tvorbe sulfonamida s 4-metilpiperidinom (C) (B - produkt reakcije na sliki 10, D - produkt reakcije).

Preglednica III. Določa fragmente in strukturo posameznega produkta D slike 11.

Oznaka produkta D	R ₁	R ₂
3	-Cl	-Cl
4	-Br	-H



Slika 12. Reakcijska shema tvorbe sulfonamida z etil piperidin-4-karboksilatom (E) (B – produkt reakcije na sliki 10, F – produkt reakcije).

Preglednica IV. Določa fragmente in strukturo posameznega produkta **F** s slike 12.

Oznaka produkta F	R ₁	R ₂
<u>5</u>	-Cl	-Cl
<u>6</u>	-Br	-H

Sintezni postopek

Derivat klorosulfonilbenzojske kislina (spojina **1** ali **2**) smo natehtali v suho bučko (1,2 mmol) in raztopili v diklorometanu (10 mL), dodali 4-metilpiperidin (spojina **C**, 1,3 mmol) ali etil 4-piperidinkarboksilat (spojina **E**, 1,3 mmol) in 3,0 mmol trietilamina (Et₃N). Reakcijsko zmes smo pustili 24 ur mešati na sobni temperaturi. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo. Preostanku smo dodali 20 mL 1M HCl in nato ekstrahirali z diklorometanom (3 x 20 mL). Organske faze smo združili in jih sprali s 30 mL nasičene vodne raztopine NaCl, sušili z Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltriramo in odparimo topilo pod znižanim tlakom. Produkt (**3-4**) smo po potrebi očistili s kolonsko kromatografijo.

2,4-dikloro-5-(4-metilpiperidin-1-sulfonil)benzojska kislina (**3**)

M_r: 351,01

Izgled: bela trdna amorfna snov

Izkoristek reakcije: 63%

Retencijski faktor: 0,67 (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 5 : 1 : 0,1)

Temperatura tališča: 142,3-144,9 °C

MS (ESI): m/z = 352 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 352) za C₁₃H₁₅Cl₂NO₄S: izračunan 352,0132 in izmerjen 352,0165

¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 0,87 (d, J = 6,5 Hz, 3H); 1,01-1,15 (m, 2H); 1,45 (m, 1H); 1,65 (d, J = 10,9 Hz, 2H); 2,73 (td, J₁ = 2,1 Hz, J₂ = 12,0 Hz, 2H); 3,66 (d, J = 12,5 Hz, 2H); 5,75 (s, 1H); 8,02 (s, 1H); 8,31 (s, 1H); manjka signal za COOH

IR (KBr): 3420, 3100, 2934, 2878, 2648, 2541, 2039, 1698, 1639, 1539, 1411, 1351, 1261, 1166, 1122, 1052, 994, 952, 728, 594, 503 cm⁻¹

2-bromo-5-(4-metilpiperidin-1-sulfonil)benzojska kislina (4)

M_r: 360,99

Izgled: bela amorfna trdna snov

Izkoristek reakcije: 49%

Retencijski faktor: 0,67 (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 5 : 1 : 0,1)

Temperatura tališča: 147,1-150,0 °C

MS (ESI): m/z = 362 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 362) za: C₁₃H₁₆BrNO₄S: izračunan 362,0017 in izmerjen 362,0056

¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 0,84 (d, J = 8,7 Hz, 3H); 1,13-1,18 (m, 2H); 1,33 (m, 1H); 1,63 (d, 2H); 2,27 (td, 2H); 3,63 (d, 2H); 5,75 (s, 1H); 7,73 (d, J = 8,4 Hz, 1H); 7,97 (dd, J₁ = 4,2 Hz, J₂ = 8,4 Hz, 1H); 8,05 (d, J = 4,2 Hz, 1H); manjka signal za COOH

IR (KBr): 3415, 2924, 2366, 2031, 1714, 1638, 1618, 1414, 1361, 1289, 1253, 1223, 1169, 1091, 1027, 995, 924, 858, 796, 736, 620, 595, 530 cm⁻¹

2,4-dikloro-5-(4-etoksikarbonil)piperidin-1-ilsulfonil)benzojska kislina (5)

M_r: 409,02

Izgled: bela amorfna trdna snov

Izkoristek reakcije: 36%

Retencijski faktor: 0,69 (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 7 : 1 : 0,1)

Temperatura tališča: 114,8-117,3 °C

MS (ESI): m/z = 410 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 410) za C₁₅H₁₇Cl₂NO₆S: izračunan 410,0187 in izmerjen 410,0222

¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 0,98 (t, J = 14,7 Hz, 3H); 1,73 (m, 4H); 2,45 (m, 1H); 2,86 (t, J = 15,0 Hz, 4H), 4,19 (m, 2H); 8,06 (s, 1H); 8,31 (s, 1H); manjka signal za COOH

IR (KBr): 3420, 2348, 1700, 1650, 1530, 1255, 1411, 1373, 1315, 1220, 1170, 1019, 922, 862, 826, 725, 498 cm⁻¹

2-bromo-5-(4-etoksikarbonil)piperidin-1-ilsulfonil)benzojska kislina (6)

M_r: 419,00

Izgled: bela amorfna trdna snov

Izkoristek reakcije: 30%

Retencijski faktor: 0,69 (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 7 : 1 : 0,1)

Temperatura tališča: 118,3-122,2 °C

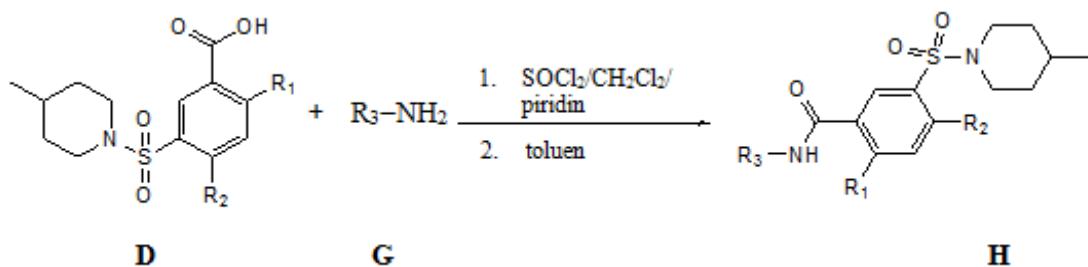
MS (ESI): m/z = 420 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 420) za C₁₅H₁₈BrNO₆S: izračunan 420,0072 in izmerjen 420,0113

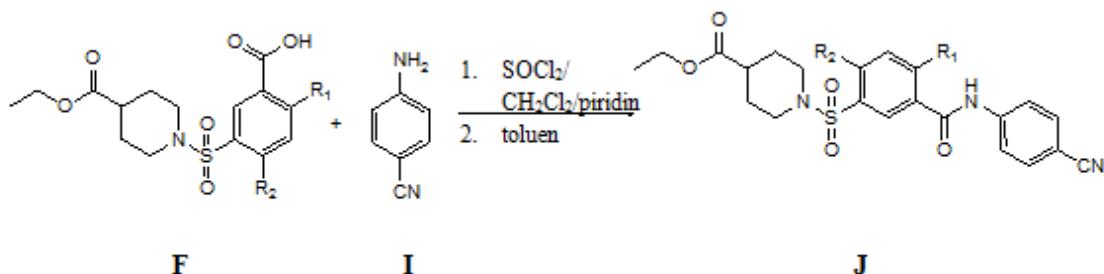
¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 0,97 (t, J = 14,5 Hz, 3H); 1,70 (m, 4H); 2,35 (m, 1H); 2,80 (t, J = 14,5 Hz, 4H); 4,17 (m, 2H); 7,74 (dd, J₁ = 3,9 Hz, J₂ = 9,1 Hz, 1H); 8,00 (dd, J₁ = 3,9 Hz, J₂ = 9,1 Hz, 2H); manjka signal za COOH

IR (KBr): 3415, 2344, 2222, 1710, 1515, 1401, 1345, 1300, 1220, 1156, 1011, 902, 872, 799, 717, 699, 595, 502 cm⁻¹

4.3 TVORBA AMIDNE VEZI



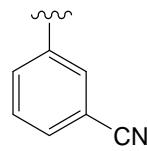
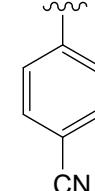
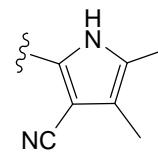
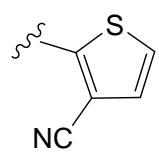
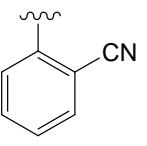
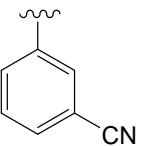
Slika 13. Reakcijska shema tvorbe amidne vezi (**D** – produkt reakcije na sliki 11, **G** – reagent, **H** - produkt reakcije v preglednici V).



Slika 14. Reakcijska shema tvorbe amidne vezi s 4-aminobenzonitrilom (**I**) (**F** – produkt reakcije na sliki 12, **J** – produkt reakcije).

Preglednica V. Določa fragmente in strukturo posameznega produkta **H** s slike 13.

Oznaka produkta H	R ₁	R ₂	R ₃
7	-Cl	-Cl	

8	-Cl	-Cl	
9	-Cl	-Cl	
10	-Cl	-Cl	
11	-Cl	-Cl	
12	-Br	-H	
13	-Br	-H	
14	-Br	-H	

15	-Br	-H	
16	-Br	-H	

Preglednica VI. Določa fragmente in strukturo posameznega produkta **J** s slike 14.

Oznaka produkta J	R ₁	R ₂
17	-Cl	-Cl
18	-Br	-H

Sintezni postopek

V suho bučko smo natehtali spojino **3** ali **4** (1 mmol) in jo raztopili v diklorometanu (5 mL), dodali tionil klorid (6,7 mmol) in piridin (1,24 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 2 uri pri temperaturi 45 °C. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in nato reakcijsko zmes spirali s toluenom (3 x 2 mL). Preostanek smo raztopili v toluenu (5 mL) in dodali eno od spojin **G** ali **I** (1,2 mmol) in mešali 3 ure pri temperaturi 110 °C. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo in suhemu preostanku dodali etilacetat in spirali s 5% vodno raztopino Na₂CO₃ (3 x 10 mL). Organsko fazo smo spirali še z nasičeno vodno raztopino NaCl (3 x 10 mL), posušili z Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo.

2,4-dikloro-N-(2-cianofenil)-5-(4-metilpiperidin-1-ilsulfonil)benzamid (7)

M_r: 451,05

Izgled: beli igličasti kristali

Izkoristek reakcije: 24%

Retencijski faktor: 0,61 (etilacetat : heksan = 1 : 1)

Temperatura tališča: 168,2-171,4 °C

MS (ESI): m/z = 452 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 452) za C₂₀H₁₉Cl₂N₃O₃S: izračunan 452,0558 in izmerjen 452,0603

¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 0,90 (d *J* = 8,7 Hz, 3H); 1,04-1,18 (m, 2H); 1,67 (m, 1H); 1,66 (dd, *J*₁ = 2,6 Hz, *J*₂ = 15,6 Hz, 2H); 3,71 (d, *J* = 16,6 Hz, 2H); 7,47 (td, *J*₁ = 4,2 Hz, *J*₂ = 9,6 Hz, 1H); 7,69-7,81 (m, 2H); 7,90 (d, *J*₁ = 3,9 Hz, *J*₂ = 8,2 Hz, 1H); 8,10 (s, 1H); 8,15 (s, 1H); 10,97 (s, 1H)

IR (KBr): 3417, 3276, 3087, 3039, 2996, 2918, 2846, 2367, 2066, 1678, 1581, 1525, 1446, 1363, 1306, 1153, 1072, 1052, 941, 825, 757, 719, 626, 586, 500 cm⁻¹

2,4-dikloro-N-(3-cianofenil)-5-(4-metilpiperidin-1-ilsulfonil)benzamid (8)

M_r: 451,05

Izgled: bela amorfna trdna snov

Izkoristek reakcije: 6%

Retencijski faktor: 0,61 (etilacetat : heksan = 1 : 1)

Temperatura tališča: 172,3-175,0 °C

MS (ESI): m/z = 452 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 452) za C₂₀H₁₉Cl₂N₃O₃S: izračunan 452,0558 in izmerjen 452,0603

¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 0,90 (d, J = 8,7 Hz, 3H); 1,07-1,14 (m, 2H); 1,47 (m, 1H); 1,67(dd, J₁ = 2,7 Hz, J₂ = 15,6 Hz, 2H); 2,77 (td, J₁ = 2,2 Hz, J₂ = 12,3 Hz, 2H); 3,70 (d, J = 12,4 Hz, 2H); 7,62 (m, 2H); 7,90 (m, 1H); 8,11 (s, 2H); 11,02 (s, 1H)

IR (KBr): 3420, 3256, 3084, 3003, 2910, 2366, 2231, 1660, 1591, 1542, 1457, 1430, 1359, 1252, 1151, 1121, 1077, 1052, 954, 936, 886, 834, 739, 721, 586, 501 cm⁻¹

2,4-dikloro-N-(4-cianofenil)-5-(4-metilpiperidin-1-sulfonil)benzamid (9)

M_r: 451,05

Izgled: svetlo rumena amorfna trdna snov

Izkoristek reakcije: 13%

Retencijski faktor: 0,61 (etilacetat : heksan = 1 : 1)

Temperatura tališča: 158,1-161,9 °C

MS (ESI): m/z = 452 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 452) za: C₂₀H₁₉Cl₂N₃O₃S: izračunan 452,0558 in izmerjen 452,0576

¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 0,89 (d, J = 8,7 Hz, 3H); 1,07-1,16 (m, 2H); 1,50 (m, 1H); 1,66 (dd, J₁ = 2,7 Hz, J₂ = 15,4 Hz, 2H); 2,77 (dt, J₁ = 2,7 Hz, J₂ = 15,9 Hz 2H); 3,71 (d, J = 15,0 Hz, 2H); 7,86 (s, 4H); 8,10 (s, 1H); 8,15 (s, 1H); 11,07 (s, 1H)

IR (KBr): 3371, 3082, 2927, 2858, 2346, 2224, 1701, 1588, 1513, 1457, 1409, 1323, 1250, 1150, 1119, 1070, 996, 937, 845, 818, 761, 717, 657, 620, 583, 548, 502 cm⁻¹

2,4-dikloro-N-(3-ciano-4,5-dimetil-1H-pirol-2-il)-5-(4-metilpiperidin-1-ilsulfonil)benzamid (10)

M_r: 468,08

Izgled: rumena amorfna trdna snov

Izkoristek reakcije: 2%

Retencijski faktor: 0,67 (etilacetat : heksan = 1 : 1)

Temperatura tališča: 197,1-200,1 °C

MS (ESI): m/z = 469 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 469) za C₂₀H₂₂Cl₂N₄O₃S: izračunan 469,0823 in izmerjen 469,0868

¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 0,90 (d, *J* = 8,2 Hz, 3H); 1,03-1,13 (m, 2H); 1,48 (m, 1H); 1,67 (m, 2H); 1,98 (d, *J* = 2,2 Hz, 3H); 2,09 (s, 3H); 2,76 (td, *J*₁ = 2,5 Hz, *J*₂ = 12,4 Hz 2H); 3,69 (d, *J* = 12,4 Hz, 2H); 8,05 (s, 1H); 8,09 (s, 1H); 11,09 (s, 1H); 11,46 (s, 1H)

IR (KBr): 3422, 3302, 3039, 2915, 2365, 2215, 1670, 1618, 1450, 1346, 1259, 1174, 1080, 936, 874, 723, 670, 606, 501 cm⁻¹

2,4-dikloro-N-(3-cianotiofen-2-il)-5-(4-metilpiperidin-1-ilsulfonil)benzamid (11)

M_r: 457,01

Izgled: sivi igličasti kristali

Izkoristek reakcije: 28%

Retencijski faktor: 0,68 (etilacetat : heksan = 1 : 1)

Temperatura tališča: 185,1-187,7 °C

MS (ESI): m/z = 458 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 458) za C₁₈H₁₇Cl₂N₃O₃S₂: izračunan 458,0122 in izmerjen 458,0167

¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 1,07 (d, *J* = 8,6 Hz, 3H); 1,11 (m, 2H); 1,48 (m, 1H); 2,74 (td, *J*₁ = 2,3 Hz, *J*₂ = 12,3 Hz, 2H); 3,71 (d, *J* = 12,4 Hz, 2H); 7, (d, *J* = 8,8 Hz, 1H); 7, (d, *J* = 8,8 Hz, 1H); 8,11 (s, 1H); 8,18 (s, 1H); 12,50 s, 1H)

IR (KBr): 3412, 2928, 2367, 1700, 1674, 2582, 1561, 1501, 1338, 1174, 1076, 1052, 988, 932, 877, 809, 739, 719, 647, 613, 563, 497, 471 cm⁻¹

2-bromo-N-(2-cianofenil)-5-(4-metilpiperidin-1-ilsulfonil)benzamid (12)

M_r: 461,05

Izgled: svetlo rumena amorfna trdna snov

Izkoristek reakcije: 17%

Retencijski faktor: 0,57 (etilacetat : heksan = 1 : 1)

Temperatura tališča: 164,3-167,9 °C

MS (ESI): m/z = 462 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 462) za C₂₀H₂₀BrN₃O₃S: izračunan 462,0442 in izmerjen 462,0487

¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 0,87 (d, *J* = 8,6 Hz, 3H); 1,13-1,21 (m, 2H); 1,33 (m, 1H); 1,67 (m, 2H); 2,30 (m, 2H); 3,63 (d, *J* = 11,4 Hz, 2H); 7,47 (td, *J*₁ = 4,1 Hz, *J*₂ = 7,9 Hz, 1H); 7,75 (m, 3H); 7,88 (td, *J*₁ = 1,5 Hz, *J*₂ = 9,0 Hz, 2H); 8,03 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H); 10,97 (s, 1H)

IR (KBr): 3414, 2921, 2846, 2366, 2228, 1677, 1605, 1582, 1525, 1447, 1341, 1307, 1250, 1159, 1099, 1048, 1027, 928, 823, 800, 771, 719, 636, 599, 504, 458 cm⁻¹

2-bromo-N-(3-cianofenil)-5-(4-metilpiperidin-1-ilsulfonil)benzamid (13)

M_r: 461,04

Izgled: bela amorfna trdna snov

Izkoristek reakcije: 5%

Retencijski faktor: 0,59 (etilacetat : heksan = 1 : 1)

Temperatura tališča: 168,0-170,5 °C

MS (ESI): m/z = 462 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 462) za C₂₀H₂₀BrN₃O₃S: izračunan 462,0442 in izmerjen 462,0487

¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 0,87 (d, J = 6,5 Hz, 3H); 1,11-1,33 (m, 2H); 1,66 (m, 2H); 2,24-2,34 (m, 2H); 3,64 (dd, J₁ = 2,5 Hz, J₂ = 9,5 Hz, 2H); 7,60 (m, 2H); 7,75 (dd, J₁ = 3,3 Hz, J₂ = 8,4 Hz, 1H); 7,91 (m, 2H); 8,02 (d, J = 8,4 Hz, 1H); 8,17 (d, J = 2,4 Hz, 1H); 11,00 (s, 1H)

IR (KBr): 3420, 3314, 3149, 3098, 2950, 2847, 2231, 1689, 1591, 1562, 1431, 1333, 1304, 1249, 1167, 1086, 1030, 927, 798, 720, 682, 636, 598, 494, 475 cm⁻¹

2-bromo-N-(4-cianofenil)-5-(4-metilpiperidin-1-ilsulfonil)benzamid (14)

M_r: 461,05

Izgled: beli igličasti kristali

Izkoristek reakcije: 18%

Retencijski faktor: 0,57 (etilacetat : heksan = 1 : 1)

Temperatura tališča: 160,6-163,6 °C

MS (ESI): m/z = 462 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 462) za C₂₀H₂₀BrN₃O₃S: izračunan 462,0442 in izmerjen 462,0487

¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 0,87 (d, J = 8,5 Hz, 3H); 1,11-1,21 (m, 2H); 1,67 (m, 2H); 2,30 (m, 2H); 3,63 (d, J = 15,0 Hz, 2H); 7,74 (dd, J₁ = 3,0 Hz, J₂ = 11,2 Hz, 1H); 7,83-7,90 (m, 5H); 8,02 (d, J = 11,2 Hz, 1H); 10,97 (s, 1H)

IR (KBr): 3422, 3300, 3110, 2923, 2839, 2373, 2225, 1676, 1597, 1535, 1460, 1409, 1325, 1256, 1168, 1109, 1052, 1030, 934, 858, 718, 617, 590, 554, 498 cm⁻¹

2-bromo-N-(3-ciano-4,5-dimetil-1H-pirol-2-il)-5-(4-metilpiperidin-1-ilsulfonil)benzamid (15)

M_r: 478,07

Izgled: svetlo rjava amorfna trdna snov

Izkoristek reakcije: 20%

Retencijski faktor: 0,64 (etilacetat : heksan = 1 : 1)

Temperatura tališča: 210,9-214,0 °C

MS (ESI): m/z = 479 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 479) za C₂₀H₂₃BrN₄O₃S: izračunan 479,0708 in izmerjen 479,0752

¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 0,89 (s, 1H); 1,06-1,33 (m, 2H); 1,11 (m, 1H); 1,66 (m, 2H); 1,98 (s, 3H); 2,10 (s, 3H); 2,31 (m, 2H); 3,62 (d, J = 11,1 Hz, 2H); 7,75 (m, 2H); 8,00 (d, J = 8,3 Hz, 1H); 11,12 (s, 1H); 11,43 (s, 1H)

IR (KBr): 3418, 3239, 2958, 2916, 2345, 2214, 1666, 1615, 1458, 1360, 1290, 1171, 1101, 993, 924, 798, 720, 603, 594, 497 cm⁻¹

2-bromo-N-(3-cianotiofen-2-il)-5-(4-metilpiperidin-1-ilsulfonil)benzamid (16)

M_r: 467,00

Izgled: siva amorfna trdna snov

Izkoristek reakcije: 13%

Retencijski faktor: 0,65 (etilacetat : heksan = 1 : 1)

Temperatura tališča: 172,8-176,0 °C

MS (ESI): m/z = 468 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 468) za C₁₈H₁₈BrN₃O₃S₂: izračunan 468,0007 in izmerjen 468,0051

¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 0,86 (d, J = 6,5 Hz, 3H); 1,10-1,20 (m, 2H); 1,33 (m, 1H); 1,66 (m, 2H); 2,23-2,33 (m, 2H); 3,63 (m, 2H); 7,25 (d, J = 5,8 Hz, 1H); 7,31 (d, J = 5,8 Hz, 1H); 7,76 (dd, J₁ = 2,9 Hz, J₂ = 8,4 Hz, 1H); 7,93 (d, J = 2,9 Hz, 1H); 8,01 (d, J = 8,4 Hz, 1H); 12,55 (s, 1H)

IR (KBr): 3413, 3264, 3092, 2946, 2291, 1682, 1560, 1384, 1337, 1287, 1168, 928, 886, 836, 776, 720, 668, 613, 596, 498 cm⁻¹

Etil 1-(2,4-dikloro-5-(4-cianofenilkarbamoil)fenilsulfonil)piperidin-4-karboksilat (17)

M_r: 509,06

Izgled: bela amorfna trdna snov

Izkoristek reakcije: 19%

Retencijski faktor: 0,54 (etilacetat : heksan = 1 : 1)

Temperatura tališča: 117,3 – 119,2 °C

MS (ESI): m/z = 510 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 510) za C₂₂H₂₁Cl₂N₃O₅S: izračunan 510,0613 in izmerjen 520,1005

¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 1,16 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H); 1,46-1,58 (m, 4H); 1,92 (m, 1H); 2,66 (m, 4H); 4,01 (m, 2H); 7,50 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H); 7,72 (s, 1H); 7,82 (d, *J* = 9,3 Hz, 2H); 8,53 (s, 1H); 12,01 (s, 1H)

IR (KBr): 3418, 2928, 2344, 2362, 2233, 1733, 1638, 1518, 1411, 1384, 1302, 1160, 1042, 934, 837, 723, 610, 550, 496 cm⁻¹

Etil 1-(2-bromo-5-(4-cianofenilkarbamoil)fenilsulfonil)piperidin-4-karboksilat (18)

M_r: 519,05

Izgled: bela amorfna trdna snov

Izkoristek reakcije: 15%

Retencijski faktor: 0,50 (etilacetat : heksan = 1 : 1)

Temperatura tališča: 119,0-121,2 °C

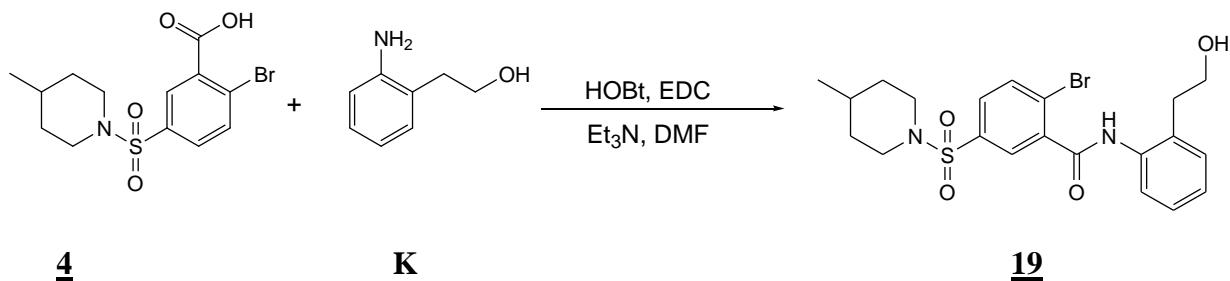
MS (ESI): m/z = 520 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 520) za C₂₂H₂₂BrN₃O₅S: izračunan 520,0497 in izmerjen 520,0539

¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 0,99 (t, J = 6,7 Hz, 3H); 1,52 (m, 4H); 1,99 (m, 1H); 2,60 (m, 4H); 4,09 (m, 2H); 7,38 (d, J = 5,9 Hz, 2H); 7,75 (dd, J = 9,7 Hz, 2H); 7,89 (dd, J = 9,3 Hz, 1H); 8,36 (d, J = 5,3 Hz, 1H); 11,31 (s, 1H)

IR (KBr): 3418, 2352, 2225, 1729, 1671, 1534, 1255, 1409, 1384, 1320, 1254, 1168, 1030, 929, 857, 827, 787, 722, 593, 554 cm⁻¹

4.4 TVORBA ESTRSKE VEZI



Slika 15. Reakcijska shema tvorbe estrske vezi pri spojini **4** z metodo sklopitvenih reagentov (**4** – izhodna spojina, **K** – reagent, **19** – produkt).

Sintezni postopek

V suho bučko smo natehtali spojini **4** (1,72 mmol) in **K** (1,81 mmol) ter ju raztopili v brezvodnem dimetilformamidu (3 mL). Zmes smo na ledeni kopeli ohladili na 0 °C in dodali HOEt (1,12 mmol), počakali, da se je raztopil in nato dodali še Et₃N (2,79 mmol). Zmes smo mešali 5 minut in nato dodali še EDC (1,21 mmol). Na ledeni kopeli smo reakcijsko zmes mešali še eno uro in nato še 12 ur na sobni temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili v lij ločnik in dodali etilacetat (30 mL). Organsko fazo smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (3 x 30 mL) in nato še z nasičeno vodno raztopino NaCl (1 x 10 mL). Nato smo organske faze združili in posušili z Na₂SO₄. Sušilno sredstvo smo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo.

2-aminofenetil 2-bromo-5-(4-metilpiperidin-1-ilsulfonil)benzoat (19)

M_r: 480,07

Izgled: bela amorfna trdna snov

Izkoristek reakcije: 8%

Retencijski faktor: 0,59 (etilacetat : heksan = 1 : 1)

Temperatura tališča: 103,8-106,2 °C

MS (ESI): m/z = 481 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 481) za C₂₁H₂₅BrN₂O₄S: izračunan 481,0752 in izmerjen 481,0797

¹H-NMR (MHz, DMSO): δ (ppm) = 0,86 (d, J = 8,5 Hz, 3H); 1,07-1,20 (m, 2H); 1,33 (m, 1H); 1,65 (m, 2H); 2,25 (td, J₁ = 2,6 Hz, J₂ = 15,6 Hz, 2H); 2,93 (t, J = 9,0 Hz, 2H); 3,59 (d, J = 15,4 Hz, 2H); 4,47 (t, J = 9,0 Hz, 2H); 4,98 (s, 2H); 6,48 (td, J₁ = 3,0 Hz, J₂ = 9,8 Hz, 1H); 6,63 (d, J = 9,8 Hz, 1H); 6,95 (m, 2H); 7,76 (dd, J = 3,0 Hz, J₂ = 9,8 Hz, 1H); 8,00 (m, 2H)

IR (KBr): 3471, 3379, 3091, 3029, 1929, 2867, 2844, 1891, 1735, 1619, 1581, 1500, 1464, 1445, 1375, 1360, 1343, 1294, 1253, 1168, 1108, 1029, 923, 793 cm⁻¹

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 KOMENTAR K SINTEZNIM POSTOPKOM

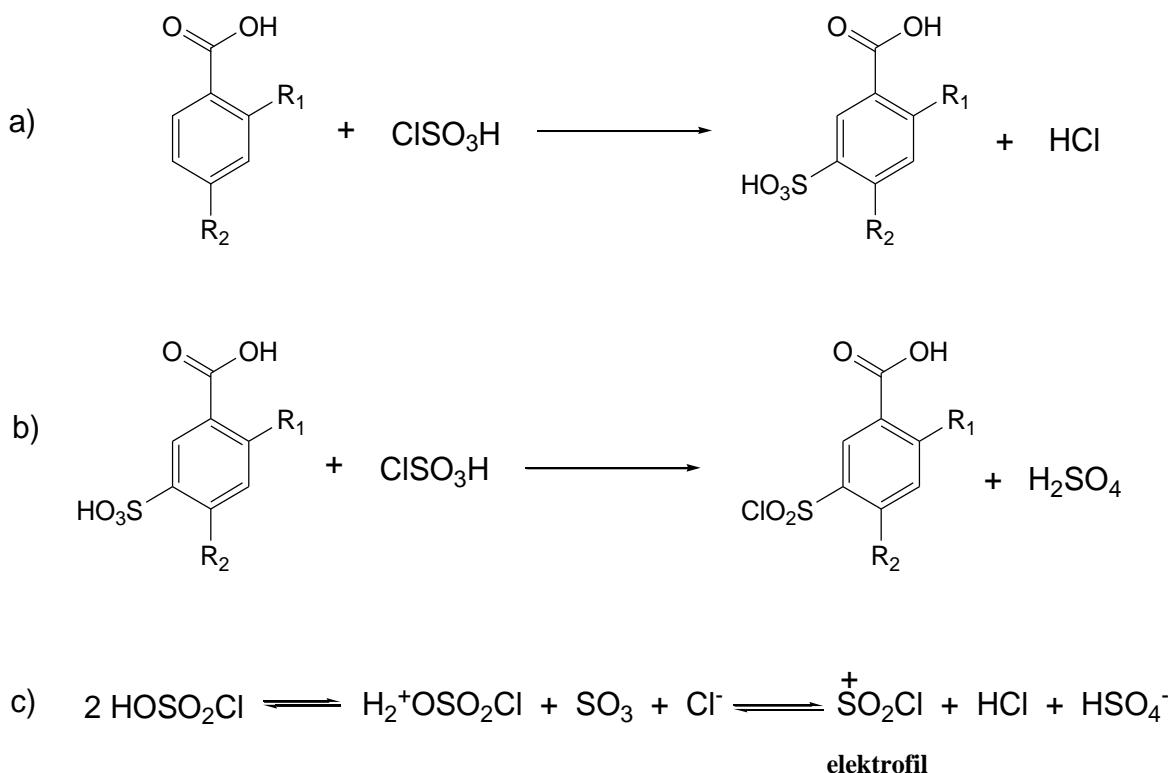
5.1.1 Uvedba sulfonil klorida na benzenov obroč

Sulfonil klorid na benzenov obroč uvedemo s klorsulfonsko kislino. To je ena najmočnejših organskih kislin, zato moramo biti pri delu z njo zelo previdni, obvezna je uporaba rokavic in očal. Paziti moramo, da ne pride v stik z vodo, ker je reakcija burna in hitra. Pri reakciji z vodo nastaneta HCl in H_2SO_4 .

Na kateri položaj na benzenovem obroču se bo pripela klorsulfonska skupina, je odvisno od usmerjanja že obstoječih funkcionalnih skupin na obroču. Reakcija poteka po mehanizmu elektrofilne aromatske substitucije. V našem primeru imamo na benzenovem obroču pripeto karboksilno skupino, ki usmerja na meta položaj, in klor ali brom, ki usmerjata orto/para. Glede na položaj skupin na obroču lahko vidimo, da bomo dobili pretežno produkt, ki bo imel klorsulfonsko skupino pripeto na mestu 5 benzenovega obroča.

Reakcija poteče v dveh stopnjah (slika 16): najprej nastane sulfonska kislina, ki v drugi stopnji reagira z novo molekulo klorsulfonske kisline in nastane sulfonil klorid. Zaradi takšnega mehanizma smo morali vzeti vsaj dvakratni prebitek klorsulfonske kisline. V prvem delu reakcije smo reakcijsko zmes hladili na vodni kopeli, da smo zmanjšali reaktivnost kisline, v drugem delu pa segrevali, da smo pospešili reakcijo.

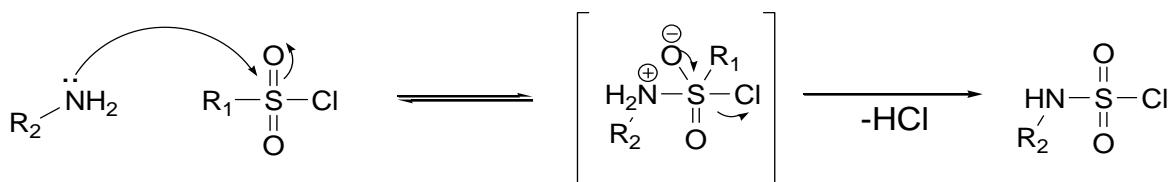
Nastali sulfonil klorid smo izolirali tako, da smo reakcijsko zmes počasi zlili na led. Prebitna klorsulfonska kislina hidrolizira z vodo v HCl in žveplovo(VI) kislino. Reakcija je močno eksotermna, sproščena toplota pa se porabi za taljenje ledu.



Slika 16. Mehanizem tvorbe sulfonil klorida v dveh stopnjah, kjer najprej nastane sulfonska kislina (a) in s prebitkom klorsulfonske kisline nato sulfonil klorid (b). Na sliki (c) je prikazan nastanek elektrofila, ki reagira v reakciji.

5.1.2 Tvorba sulfonamida

Sulfonamid smo tvorili s klorsulfonsko skupino, ki smo jo uvedli v prvi stopnji sinteze. Sulfonil klorid reagira s primarnimi in sekundarnimi amini do sulfonamida. Tekom reakcije nastaja HCl, zato moramo za njegovo nevtralizacijo dodati presežek reagirajočega amina ali pa kakšno drugo bazo. HCl, ki nastaja, lahko protonira aminsko skupino in jo s tem pretvori v sol in posledično nastane šibkejši nukleofil. Mi smo uporabili Et₃N. Reakcija tvorbe sulfonamida poteče po mehanizmu nukleofilne substitucije.

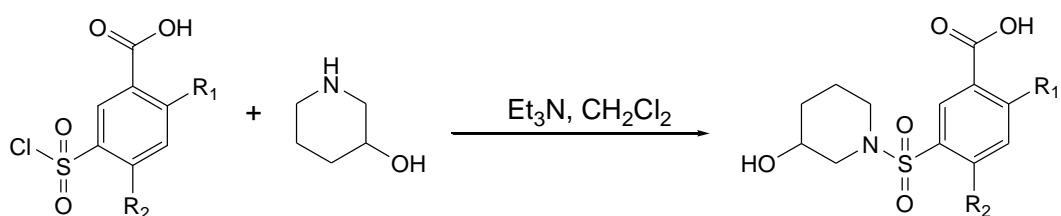


Slika 17. Mehanizem tvorbe sulfonamidne vezi. Reakcija poteče med aminom in sulfonilkloridom.

Pri sintezi derivatov, kjer smo kot amin uporabili 4-metilpiperidin, nismo imeli problemov s sintezo in izolacijo. Reakcija je potekla z dobrom izkoristkom in že po izolaciji z ekstrakcijo smo dobili čist produkt, tako da ni bilo potrebnega nadaljnjega čiščenja s kolonsko kromatografijo.

Reakcija z etil 4-piperidinkarboksilatom je potekala počasneje, reakcijsko zmes smo morali na sobni temperaturi pustiti mešati dlje časa. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Produkt, ki smo ga dobili po izolaciji z ekstrakcijo, ni bil čist, na TLC ploščici je bilo poleg izhodne spojine vidnih več produktov, zato smo morali produkt očistiti s kolonsko kromatografijo. Pri tem smo imeli veliko težav. Zaradi proste karboksilne skupine na benzenovem obroču smo morali uporabiti kislo mobilno fazo (MF). Dodali smo 1% ocetne kisline v zmes diklorometana in metanola. Kisline moramo dodati, da premaknemo ravnotežje med protonirano in neprotonirano obliko kisline v smer protonirane oblike in s tem preprečimo tvorbo repa (efekt, ko se nam spojina zaradi izmenjevanja ravnotežja razvleče skozi kolono). Izkoristek reakcije je bil slab (manj kot 50%). Po končani koloni smo morali odstraniti topila, ki smo jih uporabili z MF. Diklorometan in metanol smo odstranili z odparevanjem pod znižanim tlakom, ocetna kislina pa je ostala. To smo potem odstranili z dodatnim sušenjem z vakuumom.

Pripraviti smo želeli tudi derivate, ki bi imeli vezan 3-hidroksipiperidinski obroč (slika 18). Ta reakcija je potekala najpočasneje. Da smo izboljšali izkoristek reakcije, smo reakcijsko zmes mešali na sobni temperaturi 72 ur. Po izolaciji z ekstrakcijo smo dobili čist produkt. V naslednji stopnji nam s tem derivatom žal ni uspelo pripraviti amida.

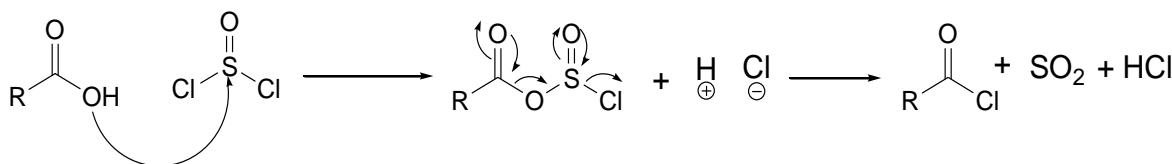


Slika 18. Shema tvorbe sulfonamida s 3-hidroksipiperidinom.

5.1.3 Tvorba amida

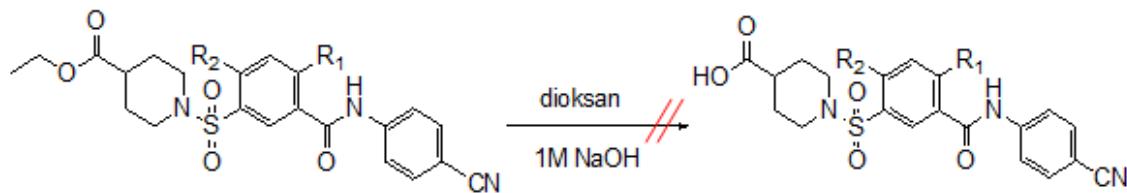
Tvorbo amida lahko izvedemo po različnih postopkih. Najprej smo poskušali z uporabo sklopitvenih reagentov, vendar reakcija ni potekla, kot smo pričakovali. S tankoplastno kromatografijo, ki smo jo izvedli po končani reakciji, smo v reakcijski zmesi detektirali več produktov, ki smo jih nato poskušali ločiti s kolonsko kromatografijo. Dobili smo zelo malo produkta in z ¹H NMR spektrom videli, da ni popolnoma čist. Ker z uporabo sklopitvenih reagentov pri tvorbi amidne vezi nismo bili uspešni, smo se odločili, da uporabimo metodo s tvorbo kislinskega klorida. Če želimo pripraviti derivate karboksilnih kislin (estre, amide, anhidride), moramo karboksilno skupino najprej pretvoriti v bolj reaktivni derivat. Eden izmed njih je tudi kislinski klorid.

Karboksilno skupino v prvi stopnji s tionil kloridom pretvorimo v bolj reaktivni kislinski klorid (slika 19). Atom klora, ki je vezan na karbonilni ogljikov atom (-C=O), zmanjša elektronsko gostoto na karbonilnem ogljikovem atomu in tako olajša napad nukleofila. Klor pa je tudi dobra izstopajoča skupina [69]. V reakcijsko zmes smo dodali bazo za nevtralizacijo sproščenega HCl in tako omogočili potek reakcije. Prisotna organska baza (v našem primeru piridin) vzdržuje bazičen pH skozi celoten potek reakcije [70]. Po končani reakciji smo morali produkt očistiti s kolonsko kromatografijo.



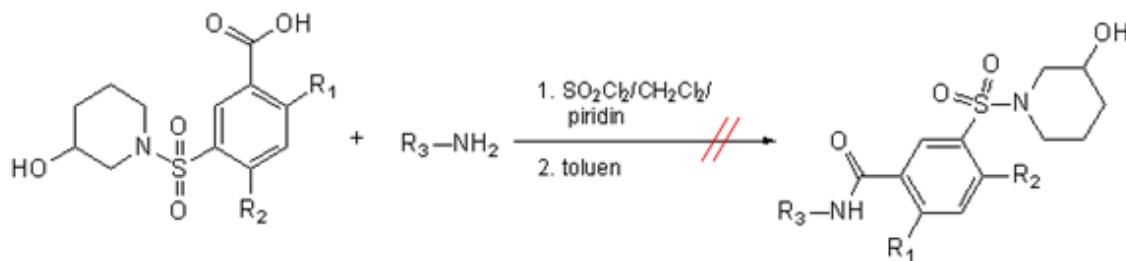
Slika 19. Mehanizem tvorbe kislinskega klorida z uporabo tionil klorida.

Pri spojinah **17** in **18** smo želeli po tvorbi amida narediti še hidrolizo etilnega estra (slika 20), vezanega na piperidinski obroč. Reakcijo hidrolize smo izvedli v dioksanu, dodali 1M NaOH in mešali pri sobni temperaturi 3 ure. Po izolaciji prese netljivo nismo dobili čistega produkta. Najprej po vsej verjetnosti pride do hidrolize estra, vendar lahko poteče tudi hidroliza amida, če reakcijo pustimo potekati dlje časa. V prvem poskusu je prišlo do hidrolize tako estra kot amida, v drugem pa smo potek reakcije spremljali s tankoplastno kromatografijo, da bi preprečili neželeno hidrolizo amida. Reakcijo smo ustavili, ko na TLC ploščici nismo imeli več lise izhodne spojine. Produkt, ki smo ga dobili po izolaciji, ni bil čist, zato ga nismo uporabili pri biokemijskem vrednotenju spojin.



Slika 20. Shema neuspele reakcije hidrolize estra.

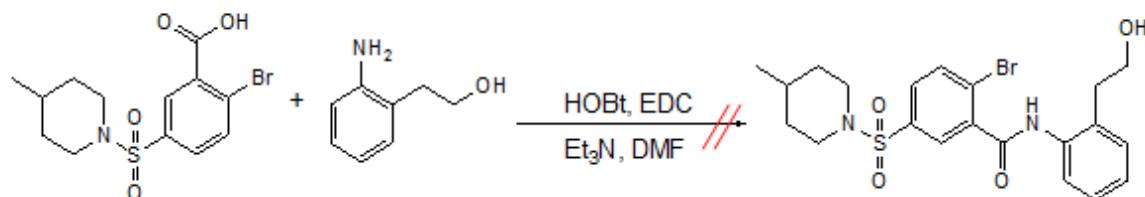
Prudkt reakcije na sliki 18 smo želeli uporabiti za serijo spojin, ki bi imele na sulfonamidni strani vezan 3-hidroksipiperidinski obroč, vendar reakcije tvorbe amida (slika 21) žal niso potekle. Amidno vez smo poskušali tvoriti preko kislinskega klorida. V fazi tvorbe kislinskega klorida s tionil kloridom verjetno pride do substitucije hidroksilne skupine na piperidinskem obroču s klorom in v drugi fazi do reakcije z aminsko skupino, s katero smo želeli tvoriti amid. Na TLC ploščici smo dobili veliko število produktov. Reakcijske zmesi ni bilo možno očistiti, ker smo dobili temno obarvan lepljiv produkt, ki ni bil topen v številnih organskih topilih. Da bi reakcija uspešno potekla, bi morali najprej zaščititi hidroksilno skupino na piperidinskem obroču in v naslednji stopnji le-to odstraniti. Uporabili bi lahko benzilni ester, ki bi ga nato odstranili s katalitskim hidrogeniranjem.



Slika 21. Shema neuspešne tvorbe amidne vezi.

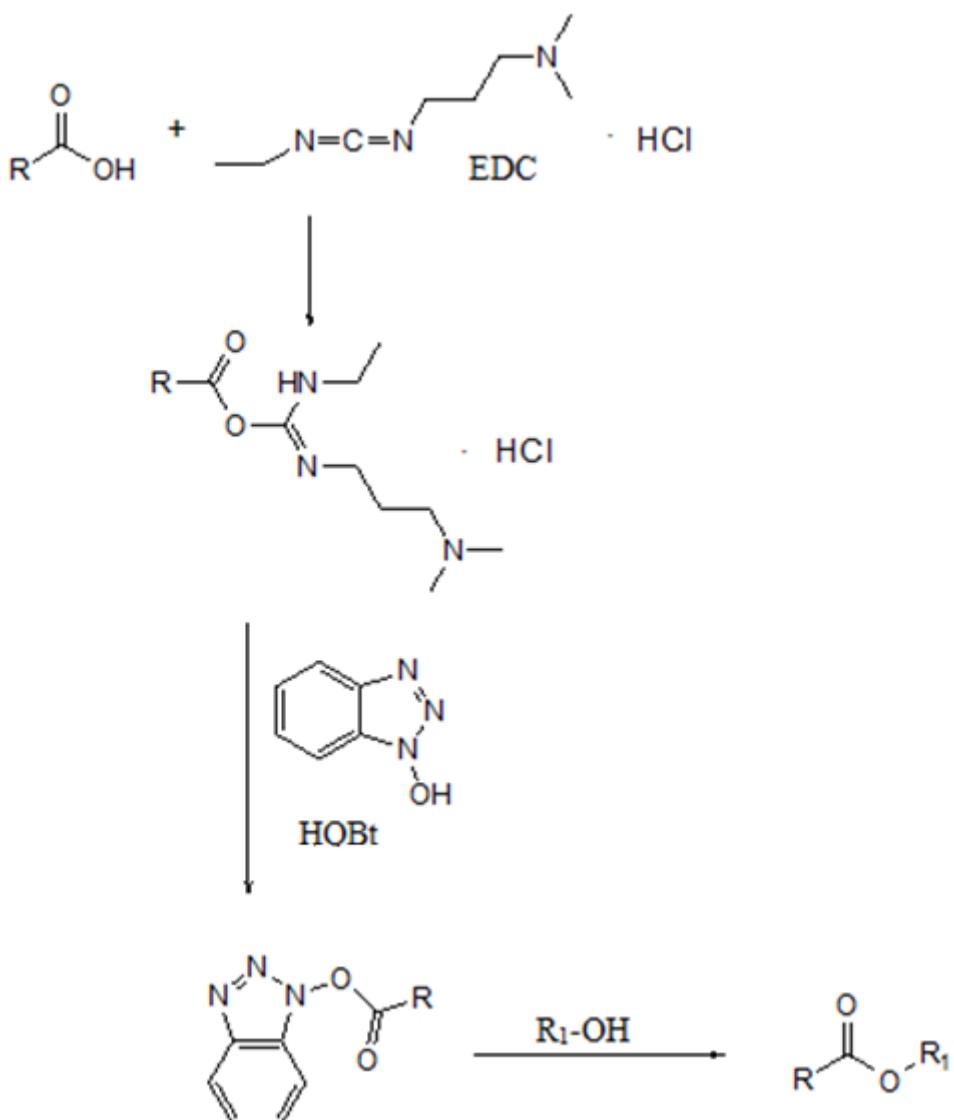
5.1.4 Presenetljiva tvorba estra

S sklopitvenim reagentom smo želeli pripraviti amid (slika 22), vendar smo po obdelavi ^1H NMR spektra ugotovili, da je produkt reakcije med spojino **4** in reagentom **K** (2-(2-aminofenetil)etanol) ester. Razlog za to najverjetneje leži v manži reaktivnosti aromatske amino skupine v primerjavi z alkilno hidroksilno, ki je posledica negativnega induktivnega efekta benzenovega obroča in sterične oviranosti, ki jo povzroča alkilna veriga na orto položaju glede na aminsko.



Slika 22. Shema neuspešne tvorbe amidne vezi s kombinacijo sklopitvenih reagentov EDC/HOBt.

Estrsko vez smo tvorili s kombinacijo reagentov HOBt in EDC (slika 23). Z EDC smo povečali nukleofilnost karbonilnega ogljikovega atoma preko tvorbe aktiviranega estra. HOBt je pomožni reagent, ki poveča izkoristek reakcije [71]. Kot topilo smo v reakciji uporabili DMF.



Slika 23. Shema tvorbe estrske vezi z uporabo EDC/HOBt sklopitvenih reagentov.

Želeli smo pripraviti spojini z dikloro- in bromo- benzenovim obročem, vendar smo dobili samo bromobenzenov derivat. Reakcija je potekla z zelo slabim izkoristkom (8%), kar je lahko posledica sterične oviranosti na orto položaju glede na karboksilno skupino na benzenovem obroču. Po reakciji smo morali produkt morali očistiti s kolonsko kromatografijo. Pri diklorobenzenovem derivatu se nam pri prvem čiščenju s kolonsko kromatografijo spojina ni eluirala, zato smo kolono sprali z metanolom in dobili z nekaj izgube dobili izhodno zmes produktov. Pri drugem čiščenju s kolonsko kromatografijo smo spremenili mobilno fazo, dobili nekaj produkta, vendar le-ta ni bil čist. Pod znižanim

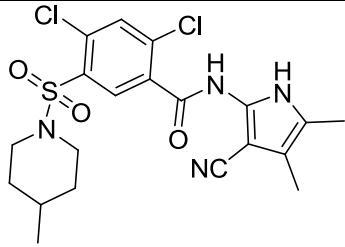
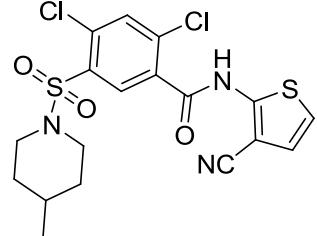
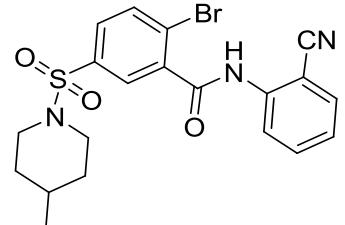
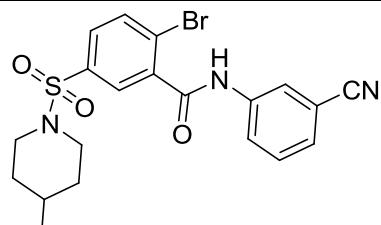
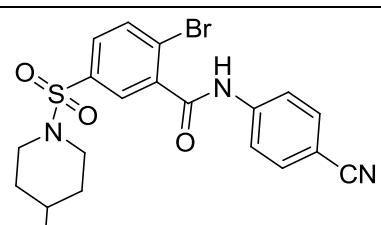
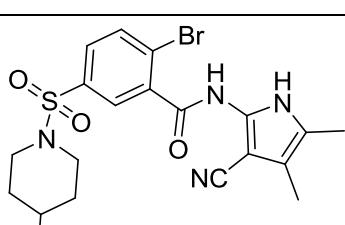
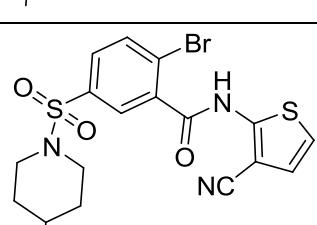
tlakom smo odparili MF in poskusili produkt očistiti s kristalizacijo. Za kristalizacijo smo uporabili različna topila, vendar nam z nobenim ni uspelo dobiti čistega produkta.

5.2 REZULTATI BIOKEMIJSKEGA VREDNOTENJA

Sintetizirane končne spojine smo biokemijsko ovrednotili na encimu MurF, izoliranem iz bakterije *E. coli*. Rezultati testiranja so zbrani v preglednici VII. Razmerje katalitičnih aktivnosti encima z inhibitorjem in brez inhibitorja je rezidualna aktivnost encima (RA) in je merilo učinkovitosti inhibitorja. Izrazimo jo v odstotkih.

Preglednica VII. Rezultati biološkega testiranja sintetiziranih spojin na encimu MurF, izoliranem iz *E. coli*.

Oznaka	Struktura	RA v [%] pri 100 µM
7		101
8		122
9		96

<u>10</u>		105
<u>11</u>		111
<u>12</u>		99
<u>13</u>		115
<u>14</u>		105
<u>15</u>		107
<u>16</u>		109

<u>17</u>		96
<u>18</u>		94
<u>19</u>		53 $IC_{50} = 253 \mu M$

Na podlagi RA vrednosti smo ovrednotili rezultate biokemijskega vrednotenja. Iz teh podatkov smo dobili informacijo o jakosti in odnosu med strukturo in delovanjem sintetiziranih spojin. Manjša kot je RA vrednost, počasnejša je reakcija, ki jo katalizira dani encim.

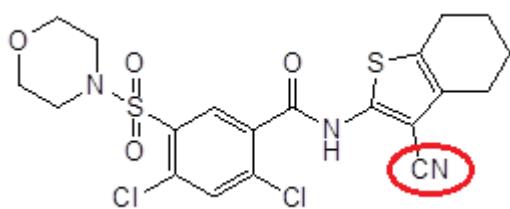
Najbolj aktivna spojina, ki smo jo sintetizirali, je bila spojina **19** (RA = 53% pri 100 µM, $IC_{50} = 253 \mu M$). Ostale sintetizirane spojine ne izkazujejo nobene inhibitorne aktivnosti, saj je RA v vseh primerih zelo visok, višji od 90%. Vidimo, da ni bistvene razlike v inhibiciji med dikloro- in bromo-substituiranimi spojinami (spojine **7-9** in **12-14**). Vidimo pa lahko, da imajo spojine z bromom nekoliko nižje RA vrednosti. Prav tako ni velike razlike v stopnji inhibicije glede na položaj ciano skupine na benzenovem obroču. Glede na RA vrednosti ima tako pri dikloro- kot pri bromo-substituiranih derivatih najnižjo vrednost spojina, ki ima ciano skupino vezano na para mestu, nato spojina z orto substitucijo in kot najslabša derivata z meta substitucijo. Zamenjava cianobenzenovega

obroča s 3-ciano-4,5-dimetil-1*H*-pirolovim (spojini **10** in **15**) ali 3-cianotiofenskim (spojini **11** in **16**) obročem ni izboljšala inhibitornega delovanja na encim. Z etilnim estrom na mestu 4 na piperidinskem obroču (spojini **17** in **18**), s katerim smo povečali molekulo na sulfonamidni strani, prav tako nismo izboljšali delovanja na encim MurF. 4-Metilpiperidin verjetno ni najboljša zamenjava za morfolinski obroč glede na prvotno Abbottovo spojino. Potrebovali bi fragment, ki bi imel funkcionalne skupine, preko katerih bi se lahko tvorile dodatne interakcije med spojino in aktivnim mestom encima.

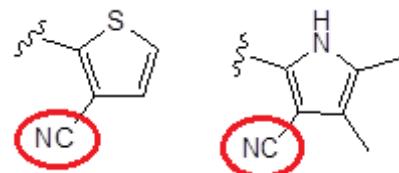
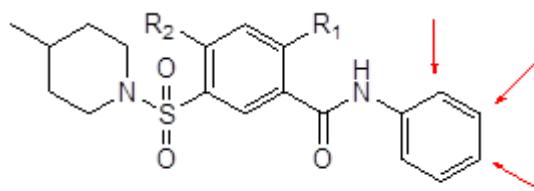
Spojina **19**, ki je bila najbolj aktivna, po svoji strukturi ni amid, ampak ester. Če jo primerjamo z ostalimi sintetiziranimi spojinami, vidimo, da imamo med obema benzenovima obročema dodatno verigo dveh ogljikovih atomov, s čimer smo molekulo povečali. Iz tega lahko sklepamo, da bi za boljšo aktivnost spojin morali spojino povečati na strani amida. V molekuli spojine tudi nimamo ciano skupine. Gui Gu in sodelavci so leta 2004 [57] ugotovili, da je ciano skupina nujno potrebna za inhibitorno delovanje na encim MurF. Torej lahko sklepamo, da bi z uvedbo ciano skupine na ustrezeno mesto na spojini lahko še dodatno izboljšali inhibitorno aktivnost.

V zgoraj omenjenem članku iz leta 2004 so tudi ugotovili, da je za aktivnost molekule pomemben halogen, ki je na osrednjem aromatskem obroču vezan na orto položaju glede na amidno vez. Le-ta namreč povzroči, da se fenilni obroč postavi v nekoplanarno pozicijo glede na amidno vez. To ima potem tudi vpliv na orientacijo obroča z vezano ciano skupino. Za inhibitorno aktivnost je pomembno, kako je obrnjena ciano skupina. Spojine **10**, **11**, **15** in **16** imajo na amidni strani vezan drug aromatski obroč (ne derivat benzena). S to modifikacijo nismo izboljšali inhibitornega delovanja. Verjetno aromatski obroč z vezano ciano skupino ne pride v pravilno konformacijo za vezavo v aktivno mesto encima.

Na sliki 24 je zgoraj prikazana Abbottova spojina in splošna struktura naših sintetiziranih spojin. Zamenjali smo morfolinski obroč s 4-metilpiperidinskim in obroč, ki ima vezano ciano skupino. Osrednji fenilni obroč z vezanimi halogeni je pomemben za orientacijo amidne vezi in s tem posledično ciano skupine. Naše spojine imajo podobno strukturo, vendar konformacija ciano skupine ni pravilna, zato so posledično naše spojine neaktivne. Pri vezavi v aktivno mesto encima ima verjetno vlogo tudi prikondenziran cikloalifatski obroč. Naše spojine pa tega obroča nimajo.



Spojina 1 (Abbott)



Slika 24. Primerjava Abbotove spojine (zgoraj), kjer je z rdečim krogcem označen položaj ciano skupine. V sredini je splošna shema naših sintetiziranih spojin. Z rdečimi puščicami so označena mesta, kjer je pripeta ciano skupina. Spodaj sta prikazani zamenjavi za cianobenzenski obroč (z rdečim krogcem sta označena položaja ciano skupine).

6. SKLEP

V okviru diplomske naloge smo načrtovali in sintetizirali 13 novih benzensulfonamidnih spojin kot potencialnih zaviralcev bakterijskega encima MurF. Končnim spojinam smo z encimskim testom določili inhibitorno aktivnost na encimu MurF, izoliranem iz *E. coli*. Spojini z najboljšo inhibitorno aktivnostjo smo določili tudi protibakterijsko učinkovitost.

Spojine smo sintetizirali v več stopnjah. V prvi smo najprej pripravili sulfonil klorid, v drugi z ustreznim aminom sulfonamid in v tretji še amid z aromatskim aminom. Največ težav smo imeli v zadnji stopnji, torej pri tvorbi amidne vezi. Najprej smo poskušali reakcijo izvesti s sklopitvenimi reagenti, vendar reakcije niso potekle. Tvorbo amidne vezi smo nato izvedli preko kislinskega klorida. Izolacijo in čiščenje smo izvedli s kolonsko kromatografijo. Spojine se med seboj razlikujejo po fragmentu ob amidni vezi in načinu substitucije s halogeni na osrednjem benzenovem obroču. Na aromatskem obroču, ki je del amidne vezi, imajo vse spojine, razen spojine **19**, vezano ciano skupino. Razlikujejo se po tem, na katerem položaju, glede na amidno vez, imajo vezano ciano skupino. Ugotovili smo, da pri naši spojinah različen položaj ciano skupine ni imel bistvenega vpliva na aktivnost.

Spojine, ki smo jih sintetizirali, ne izkazujejo protibakterijske učinkovitosti oziroma ne zavirajo delovanje encima MurF. Vse spojine, razen spojine **19**, imajo RA vrednosti višje od 90%. Vzroke za neaktivnost naših spojin lahko najdemo v nepravilni orientiranosti ciano skupine, nepravilni substituciji s halogenom na osrednjem benzenovem obroču, zmanjšanem številu interakcija zaradi zamenjave morfolinskega obroča s 4-metilpiperidinskim. Naše spojine nimajo k obroču, ki ima vezano ciano skupino, prikondenziranega cikloalkilnega obroča. Za boljšo aktivnost spojin bi morali spojine povečati na amidni strani, da zapolnimo aktivno mesto encima.

Rezultati encimskega testa so pokazali, da spojine niso najboljši zaviralci encima MurF. Najboljša je bila spojina **19**, ki smo ji določili tudi IC₅₀ vrednost 235 µM.

7. LITERATURA

1. Williams, D. A.; Foye, W. O.; Lemke, T. L. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 6th ed.; Lippincott Williams & Wilkins, 2008; 1028-1082.
2. Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. Rang and Dale's *Pharmacology*, Sixth Edition, Churchill Livingstone, 2007: 645–691.
3. Lederberg J: Infectious History. *Science* 2000; 288: 287–293.
4. Bosch, F., Rosich, L. The Contributions of Paul Ehrlich to Pharmacology: A Tribute on the Occasion of the Centenary of His Nobel Prize. *Pharmacology* 2008; 82: 171-179.
5. Saga, T.; Yamaguchi, K. History of Antimicrobial Agents and Resistant Bacteria. *JMAJ* 2009; 52: 103-108.
6. Overbye, K. M.; Barrett, J. F. Antibiotics: where did we go wrong? *DDT* 2005; 10: 45-52.
7. Walsh, C. Where will new antibiotics come from? *Nature Reviews Microbiology* 2003; 1: 65-70.
8. Butler, M. S.; Cooper, A. M. Antibiotics in the clinical pipeline in 2011. *The Journal of Antibiotics* 2011; 64: 413-425.
9. Projan, S. J. Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Current Opinion in Microbiology* 2003; 6: 427-430.
10. Moellering, R. C. Discovering new antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2011; 37: 2-9.
11. Theuretzbacher, U. Future antibiotics scenarios: is the tide starting to turn? *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009; 34: 15-20.
12. Kohanski, M. A.; Dwyer, D. J.; Collins, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology* 2010; 8: 423-435.
13. Walsh, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 2000; 406: 775-781.
14. Davies, J.; Davies, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2010; 74: 417-433.
15. Tenover, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine* 2006; 119: S3-S10.

16. Andersson, D. I.; Hughes, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology* 2010; 8: 260-271.
17. Alekshun, M. N.; Levy, S. B. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Leading Edge Review* 2007; 128: 1037-1050.
18. Normark, B. H.; Normark, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine* 2002; 252: 91-106.
19. Criswell, D. The Evolution of Antibiotic Resistance. *Impact* 2004; 378: 1-4.
20. Wright, G. D. Mechanisms of resistance to antibiotics: *Current Opinion in Chemical Biology* 2003; 7: 563-569.
21. Wright, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Reviews* 2007; 5: 175-186.
22. Brötz-Oesterhelt, H.; Sass, P. Postgenomic strategies in antibacterial drug discovery. *Future Microbiology* 2010; 5: 1553-1579.
23. Moellering, R. C. NMD-1-A causes for worldwide concern. *The New England Journal of Medicine* 2010; 25: 2377-1379.
24. Cabeen, M. T.; Jacobs-Wagner, C. Bacterial cell shape. *Nature Reviews Reviews* 2005; 3: 601-610.
25. Smith, C. A. Structure, Function and Dynamics in the *mur* Family of Bacterial Cell Wall Ligases. *Journal of Molecular Biology* 2006; 362: 640-655.
26. Von Heijenoort, J. Formation of glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* 2001; 11: 25R-36R.
27. Vollmer, W.; Blanot, D.; de Pedro, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 149-167.
28. Fisher, J. F.; Mobashery, S. Host-Guest Chemistry of the Peptidoglycan. *Journal of Medicinal Chemistry* 2010; 53: 4813-4829.
29. Vollmer, W.; Seligman, S. J. Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends in Microbiology* 2009; 18: 59-66.
30. Meroueh, S. O.; Bencze, K. Z.; Hesek, D.; Lee, M.; Fisher, J. F.; Stemmler, T. L.; Mobashery, S. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *PNAS* 2006; 103: 4404-4409.
31. Berreteau, H.; Kovač, A.; Boniface, A.; Sova, M.; Gobec, S.; Blanot, D. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 168-207.

32. Mohammadi, T.; van Dam, V.; Sijbrandi, R.; Vernet, T.; Zapun, A.; Bouhss, A.; Diepeveen-de Bruin, M.; Nguyen-Disteche, M.; de Kruijff, B.; Breukink, E. Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *The EMBO Journal* 2011; 39: 1425-1432.
33. Bouhss, A.; Trunkfield, A. E. Bugg, T. D. H.; Mening-Lecreux, D. The peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 208-233.
34. Macheboeuf, P.; Cotreras-Martel, C.; Job, V.; Dideberg, O.; Dessen, A. Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance process. *FEMS Microbiol Rev* 2006; 30: 673-691.
35. Sauvage, E.; Kerff, F.; Terrak, M.; Ayala. J. A.; Charlier, P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 234-258.
36. Zeeby, A. E.; Sanscharin, F., Levesque, R. C. Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Molecular Microbiology* 2003; 47: 1-12.
37. Perdih, A.; Hodoscek, M.; Solmajer, T. MurD ligase from *E. coli*: Tetrahedral intermediate formation study by hybrid quantum mechanical/molecular mechanical replica path method. *Proteins* 2009, 74: 744-759.
38. Basavannacharya, C.; Moody, P. R.; Munshi, T.; Cronin, N.; Keep, N. H.; Bhakta, S. Essential residues for the enzyme activity of ATP-dependent MurE ligase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Cell* 2010; 1: 1011-1022.
39. Spraggon, G.; Schwarzenbacher, R.; Kreusch, A.; Lee, C. C.; Abdubek, P.; Ambing, E.; Biorac, T.; Brinen, L. S.; Canaves, J. M.; Cambell, J.; Chiu, H.-J.; Dai, K.; Deacon, A. M.; DiDonato, M.; Elsliger, M. A.; Eshagi, S.; Floyd, R.; Godzik, A.; Grittini, C.; Grzechnik, S. K.; Hampton, E.; Jaroszewski, L.; Karlak, C.; Klock, H. E.; Koesema, E.; Kovarik, J. S.; Kuhn, P.; Levin, I.; McMullan, D.; McPhilips, T. M.; Miller, M. D.; Morse, A.; Moy, K.; Ouyang, J.; Page, R.; Quijano, K.; Robb, A.; Stevens, R. C.; van den Bedem, H.; Velasquez, J.; Vincent, J.; von Delft, F.; Wang, X.; West, B.; Wolf, G. Crystal structure of an Udp-n-acetylmuramate-alanine Ligase MurC (TM0231) from *Thermotoga maritima* at 2.3 Å Resolution. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 2004; 55: 1078-1081.
40. Sosič, I.; Berreteau, H.; Simčič, M.; Šink, R.; Cesar, J.; Zega, A.; Golič Grdadolnik, S.; Contreras-Martel, C.; Dessen, A.; Amoros, A.; Joris, B.; Blanot, D.; Gobec, S. Second-generation sulfonamide inhibitors of D-glutamic acid-adding enzyme:

- Activity optimisation with conformationally rigid analogues of D.glutamic acid. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2011; 46: 2880-2894.
41. El Zoeiby, A.; Sanschagrin, F.; Darveau, A.; Brisson, J. R.; Levesque, R. C. Identification of novel inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* MurC enzyme derived from phage-displayed peptide libraries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 51: 531-543.
42. Frlan, R.; Kovač, A.; Blanot, D.; Gobec, S.; Pečar, S.; Obreza, A. Design and Synthesis of novel *N*-benzylidenesulfonohydrazide Inhibitors of MurC and MurD as Potential Antibacterial Agents. *Molecules* 2008; 13: 11-30.
43. Perhih, A.; Kotnik, M.; Hodoscek, M.; Solmajer, T. Targeted Molecular Dynamics Simulation Studies of Binding and Conformational Changes in *E. coli* MurD. *Proteins: Structure, Function and Biotransformatics* 2007; 68: 243-254.
44. Humljan, J.; Kotnik, M.; Contreras-Martel, C.; Blanot, D.; Urleb, U.; Dessen, A.; Šolmajer, T.; Gobec, S. Novel Naphthalene-*N*-sulfonyl-D-glutamic Acid Derivates as Inhibitors of MurD, a Key peptidoglycan Biosynthesis Enzyme. *J. Med. Chem.* 2008; 51: 7486-7494.
45. Tomašić, T.; Kovač, A.; Simčič, M.; Blanot, D.; Golič Grdadolnik, S.; Gobec, S.; Kikelj, D.; Peterlin Mašič, L. Novel 2.thioxothiazolidin-4-one inhibitors of bacterial MurD ligase targeting D-Glu- and diphosphate-binding sites. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2011; 46: 3964-3975.
46. Zidar, N.; Tomašić, T.; Šink, R.; Kovač, A.; Patin, D.; Blanot, D.; Contreras-Martel, C.; Dessen, A.; Müller-Premru, M.; Zega, A.; Gobec, S.; Peterlin Mašič, L.; Kikelj, D. new 5-benzylidenethiazolidin-4-one inhibitors of bacterial MurD ligase: Design, synthesis, crystal structures and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2011; 46: 5512-5523.
47. Boniface, A.; Bouhss, A.; Meningin-Lecreux, D.; Blanot, D. The MurE Synthetase from *Thermotoga maritima* Is Endowed with an Ususla D-Lysine Adding Activity. *The Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 15680-15686.
48. Humljan, J.; Kotnik, M.; Boniface, A.; Šolmajer, T.; Urleb, U.; Blanot, D.; Gobec, S. A new approach towards peptidosulfonamides: synthesis of potential inhibitors of bacterial peptidoglycan biosynthesis enzyme MurD and MurE. *Tetrahedron* 2006; 62: 10980-10998.

49. Paradis-Bleau, C.; Lloyd, A.; Sanschagrin, F.; Maaroufi, H.; Clarke, T.; Blewett, A.; Dowson, C.; Roper, D. I.; Bugg, T. D. H.; Levesque, R. C. *Pseudomonas aeruginosa* MurE ligase: enzyme kinetics and peptide inhibitor. *Biochem J* 2009; 421: 263-272.
50. Perdih, A.; Kovač, A.; Wolber, G.; Blanot, D.; Gobec, S.; Solmajer, T. Discovery of novel benzene 1,3-dicarboxylic acid inhibitors of bacterial MurD and MurE ligases by structure-based virtual screening approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2009; 19: 2668-2673.
51. Bugg, T. D. H.; Braddick, D.; Dowson, C. G.; Roper, D. I. Bacterial cell wall assembly; still an attractive antibacterial target. *Trends in Biotechnology* 2011; 29: 167-173.
52. Stamper, G. F.; Longenecker, K. L.; Fry, E. H.; Jakob, C. G.; Florjancic, A. S.; Gu, Y.-G.; Anderson, D. D.; Cooper, C. S.; Zhang, T.; Clark, R. F.; Cai, Y.; Black-Schaefer, C. L.; McCall, J. O.; Lerner, C. G.; Hajduk, P. J.; Beutel, B. A.; Stoll, V. S. Structure-based optimization of MurF inhibitors. *Chem Biol Drug Des* 2006; 67: 58-65.
53. Yan, Y.; Munshi, S.; Leiting, B.; Anderson, M. S.; Chrzas, J.; Chen, Z. Crystal structure of *Escherichia coli* UDPMurNAc-tripeptide D-alanyl-D-alanine-adding enzyme (MurF) at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 2000; 304: 435-445.
54. Longenecker K. L.; Stamper, G. F.; Hajduk, P. J.; Fry, E. H.; Jakob, C. G.; Harlan J. E.; Edalji R.; Bartley, D. M.; Walter K. A.; Solomon, L. R.; Holzman T. F.; Gu, Y. G.; Lerner C. G.; Beutel B. A.; Stoll, V. S. Structure of MurF from *Streptococcus pneumonia* co-crystallized with a small molecule inhibitor exhibits interdomain closure. *Protein Science* 2005; 14: 3039-3047.
55. Khedkar, S. A.; Malde, A. K.; Coutinho E. C. Design of inhibitors of the MurF enzyme of *Streptococcus pneumonia* using docking 3D-QSAR, and de novo design. *J. Chem. Inf. Model.* 2007; 47: 1839-1846.
56. Miller, D. J.; Hammond S. M.; Anderluzzi, D.; Bugg, T. D. H. Aminoalkylphosphinate inhibitors of D-Ala-D-Ala adding enzyme. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* 1988; 29: 131-142.
57. Gu, Y. G.; Florjancic A. S.; Clark, R. F.; Zhang, T.; Cooper C. S.; Anderson, D. D.; Lerner, C. G.; McCall, J. O.; Cai, Y.; Black-Schaefer, C. L.; Stamper, G. F.;

- Hajduk, P. J.; Beutel, B. A. Structure-activity relationship of novel potent MurF inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2004; 14: 267-270.
58. Baum, E. Z.; Crespo-Carbone, S. M.; Klinger, A.; Foleno, B.; D.; Turchi, I.; Macielag, M.; Bush, K. A MurF inhibitor that disrupts cell wall biosynthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007; 51: 4420-4426.
59. Baum, E. Z.; Crespo-Carbone, S. M.; Abbanat, D.; Foleno, B.; Maden, A.; Goldschmidt, R.; Bush, K. Utility of muropeptide ligase for identification of inhibitors of the cell wall biosynthesis enzyme MurF. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 50: 230-236.
60. Turk, S.; Kovač, A.; Boniface, A.; Bostock J. M.; Chopra, I.; Blanot, D.; Gobec, S. Discovery of new inhibitors of the bacterial peptidoglycan biosynthesis enzyme MurD and MurF by structure-based virtual screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009; 17: 1884-1889.
61. Taha, M. O.; Atallah, N.; Al-Bakri, A. G.; Paradis-Bleau, C.; Zalloum, H.; Younis K. S.; Levesque R. C. Discovery of new MurF inhibitors via pharmacophore modelling and QSAR analysis followed by in-silico screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008; 16: 1218-1235.
62. Paradis-Bleau, C.; Lloyd, A.; Sanschagrin, F.; Clarke, T.; Blewett, A.; Bugg, T. D. H.; Levesque, R. C. Phage display-derived inhibitor of the essential cell wall biosynthesis enzyme MurF. *BMC Biochemistry* 2008; 9: 1-11.
63. Silver, L. L. Novel inhibitors of bacterial cell wall synthesis. *Current Opinion in Microbiology* 2003; 6: 431-438.
64. Grant, J. A.; Gallardo, M. A.; Pickup, B. T. A fast method of molecular shape comparison: A simple application of Gaussian Description of Molecular Shape. *Journal of Computational Chemistry* 1996; 17: 1653-1666.
65. Rush III, T. S.; Grant J. A.; Mosyak, L.; Nicholls, A. Shape-Based 3-d scaffold hopping method and its application to a bacterial protein-protein interaction. *Journal of Medicinal Chemistry* 2005; 48: 1489-1495.
66. Venhorst, J. Nunez, S.; Terpstra J. W.; Kruse, C. G. Assessment of scaffold hopping efficiency by use of molecular interaction fingerprints. *Journal of Medicinal Chemistry* 2008; 51: 3222-3229.
67. <http://www.eyesopen.com/rocs> (november 2012)

68. Maass, P.; Schulz-Gasch, T.; Stahl, M.; Rarey, M. A fast and Versatile Method for Scaffold hopping based on small molecule crystal structure conformations. *J. Chem. Inf. Model.* 2007; 47: 390-399.
69. Volhard, K.; Peter, C. Organic chemistry: structure and function, 6th ed.; W. H. Freeman and Company, 2009; 221-226.
70. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*. 2005; 61: 10827-10852.
71. Pu, Y. J.; Vaid, R. K.; Boini, S. K.; Towsley, R. W.; Doecke, C. W.; Mitchell, D. *Organic Process Research & Development*. 2009; 13: 310-314.