

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASMINA HORVAT

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJA

SINTEZA TIOPIRANO[2,3-*d*]TIAZOLOV IN UPORABA VIRTUALNEGA
REŠETANJA PRI ODKRIVANJU NOVIH ZAVIRALCEV LIGAZE MURD

SYNTHESIS OF THIOPYRANO[2,3-*d*]THIAZOLES AND THE USE OF VIRTUAL
SCREENING FOR DISCOVERY OF NEW MURD LIGASE INHIBITORS

Ljubljana, 2013

Diplomsko naložbo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašića, mag. farm.

Zahvala:

Iskreno se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Luciji Peterlin Mašič, mag. farm. in somentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiću, mag. farm. za pomoč, svetovanje in potrežljivost pri izdelavi diplomske naloge.

Hvala vsem kolegom in kolegicam s Fakultete za farmacijo, s katerimi sem preživila nepozabna študijska leta.

Hvala vsem prijateljem in prijateljicam, da me sprejemate takšno kot sem.

Posebej se zahvaljujem svoji družini in Leonu, ki me podpirajo in mi vedno stojijo ob strani.

Izjava:

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašića, mag. farm.

Jasmina Horvat

Ljubljana, 2013

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	1
1.1. Protimikrobne učinkovine in bakterijska rezistenca	1
1.2. Bakterijska celična stena in biosinteza peptidoglikana.....	3
1.3. Inhibitorji ligaz Mur predstavljajo kandidate za nove protibakterijske učinkovine	6
1.4. Računalniške metode pri načrtovanju novih učinkovin	7
1.4.1. Računalniški zapisi kemijskih struktur	8
1.4.2. Priprava kemijskih knjižnic in filtriranje s pomočjo osnovnih deskriptorjev	8
1.4.3. Virtualno rešetanje na osnovi liganda	9
1.4.4. Strukturno podprtvo virtualno rešetanje – sidranje (docking)	9
1.5. Načrtovanje in razvoj inhibitorjev ligaz MurD	10
2. NAMEN DELA.....	14
2.1. Strukturno podprtvo načrtovanje potencialnih tiopirano[2,3-<i>d</i>]tiazolnih zaviralcev ligaze MurD	14
2.2. Strukturno podprtvo virtualno rešetanje knjižnice heterocikličnih spojin	14
3. MATERIALI IN METODE	16
3.1. Materiali	16
3.2. Sintezne metode	16
3.3. Računalniške metode.....	16
3.4. Biološko testiranje	17
4. EKSPERIMENTALNO DELO	18
4.1. Sinteza aldehidov in sidranje končnih ligandov v aktivno mesto encima MurD	18
4.1.1. Potek sinteznih reakcij in reakcijske sheme	18
4.2.2. Sidranje potencialnih tiopirano[2,3- <i>d</i>]tiazolnih zaviralcev ligaze MurD.....	23

4.2. Virtualno rešetanje knjižnice heterocikličnih spojin	24
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	26
 5.1. Rezultati in razprava struktурno podprtega načrtovanja tiopirano[2,3-d]tiazolov	26
5.1.1. Rezultati sinteze aldehidov.....	26
5.1.2. Rezultati sidranja načrtovanih tiopirano[2,3-d]tiazolov.....	28
5.1.3. Razprava.....	32
 5.2. Rezultati rešetanja knjižnice heterocikličnih spojin in razprava	34
5.2.1. Rezultati sidranja knjižnice spojin	34
5.2.2. Komentar rezultatov testiranja spojin	36
6. SKLEP	40
7. LITERATURA	42

KAZALO SLIK

Slika 1 Zgradba peptidoglikana pri po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijah (prirejeno po ⁷⁰).	4
Slika 2 Reakcija, ki jo katalizira ligaza MurD.	7
Slika 3 Znani inhibitorji ligaz MurD, ki vsebujejo tiazolidin-2,4-dionski (I) ali rodaninski (II) obroč (prirejeno po ^{23, 46}).	11
Slika 4 Kristalna struktura proteina v kompleksu z inhibitorjem III (PDB: 2Y66).	12
Slika 5 Kristalna struktura inhibitorja III v aktivnem mestu ligaze MurD iz <i>E. coli</i> . Vodikove vezi, ki jih ligand tvori z aminokislinskimi ostanki, so predstavljene z zeleno prekinjeno črto.....	13
Slika 6 Reagenti in pogoji. a) TBTU, Et ₃ N, CH ₂ Cl ₂ , sobna T, 24h.....	18
Slika 7 Reagenti in pogoji. a) K ₂ CO ₃ , KI, CH ₃ CN, 70°C, 5h; b) 2M NaOH, 1,4-dioksan:metanol:H ₂ O = 1:1:1, sobna T, 4 h; c) H-D-Glu(OMe)OMe·HCl, TBTU, Et ₃ N, CH ₂ Cl ₂ , sobna T, 24 h.	20
Slika 8 Mehanizem tvorbe amidne vezi v prisotnosti sklopitevnega reagenta TBTU.	26

Slika 9 Prikazane so vodikove vezi (označene z zeleno črtkano črto), ki jih tvori spojina 3 z aminokislinskimi ostanki (označeni z modro) v aktivnem mestu encima MurD iz <i>E. coli</i> ter prekrivanje spojine 3 in liganda (inhibitor III , označen z rumeno) iz kristalne strukture.	30
Slika 10 Modifikacija 5-aryliden-4-tiazolidinona do 7-arliotipirano[2,3- <i>d</i>]tiazola.	33
Slika 11 Prikazane so vodikove vezi (označene z zeleno črtkano črto), ki jih tvori spojina 21 z aminokislinskimi ostanki (označeni z modro) v aktivnem mestu encima MurD iz <i>E. coli</i> ter prekrivanje spojine 21 in liganda (inhibitor III , označen z rumeno) iz kristalne strukture.	35
Slika 12 Prikazane so vodikove vezi (označene z zeleno črtkano črto), ki jih tvori spojina 27 z aminokislinskimi ostanki (označeni z modro) v aktivnem mestu encima MurD iz <i>E. coli</i> (levo) ter prekrivanje spojine 27 in liganda (inhibitor III , označen z rumeno) iz kristalne strukture (desno).	36

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I Osnovni mehanizmi bakterijske rezistence (prirejeno po ⁷¹)	3
Preglednica II Spojine, ki ustrezajo "drug-like" oz. "lead-like" konceptu, imajo enake ali nižje vrednosti parametrov od tistih, ki so navedeni v preglednici.	9
Preglednica III Strukture sintetiziranih aldehidov	28
Preglednica IV Končne strukture načrtovanih tiopirano[2,3- <i>d</i>]tiazolov	31
Preglednica V Spojine iz knjižnice, ki smo jim določali inhibitorno aktivnost. Koncentracija testiranih spojin je bila 100 µM (* spojina 24 se je oborila pri merjeni koncentraciji)	38

POVZETEK

Bakterijske infekcije so s protibakterijskimi učinkovinami začeli zdraviti v tridesetih letih dvajsetega stoletja, kar predstavlja enega največjih uspehov tega stoletja. Zlati časi razvoja novih učinkovin so segali do sedemdesetih let, saj so od takrat naprej na novo odkrili le štiri skupine protibakterijskih učinkovin. Ker se pojavlja odpornost na praktično vse protibakterijske učinkovine, je dejstvo, da je potrebno razvijati nove spojine z drugačnim mehanizmom delovanja, neizogibno. Pri iskanju novih tarč se odpirajo možnosti, da delujemo na encime, ki so ključnega pomena pri biosintezi peptidoglikana, ki je gradnik celične stene bakterij. Ena od pomembnih tarč je encim ligaza MurD, ki je udeležen v znotrajcelični stopnji biosinteze peptidoglikana.

Nove zaviralce ligaze MurD smo iskali s pomočjo struktурno podprtga načrtovanja spojin. VIRTUALNO rešetanje knjižnic spojin nam omogoča obogatitev knjižnice in identifikacijo zadetkov. Računalniške metode so z razvojem rentgenske kristalografije, programske opreme in razrešenimi strukturami tarčnih proteinov postale dobro orodje za načrtovanje novih spojin.

Pri načrtovanju in sintezi tiopirano[2,3-*d*]tiazolov kot novih inhibitorjev ligaze MurD, smo sintetizirali štiri različne aldehyde, ki vključujejo enega ali dva fenilna obroča ter D-Glu in bodo služili kot gradniki tiopirano[2,3-*d*]tiazolnih analogov tiazolidin-4-onskih inhibitorjev ligaze MurD. Energijsko minimizirane 3D strukture načrtovanih ligandov smo sidrali v aktivno mesto ligaze MurD iz bakterije *Escherichia coli*. Za sintezo in določanje zaviralne aktivnosti smo izbrali spojine z enim fenilnim obročem v strukturi, ker se glede na rezultate sidranja bolje prilegajo v aktivno mesto encima. Končne spojine bodo sintetizirali na Danylo Halytsky Lviv National Medical University v Ukrajini.

Izvedli smo tudi virtualno rešetanje knjižnice 4610 heterocikličnih spojin, ki so jih sintetizirali na omenjeni univerzi. Začetno knjižnico smo filtrirali po pravilih Lipinskega in jo zmanjšali na 2358 spojin. Te spojine smo nato s programom GOLD sidrali v vezavno mesto za nukleotidni substrat encima MurD iz *E.coli*. Izmed 30 najboljših zadetkov so nam iz omenjene univerze poslali 15 spojin, ki smo jim določili odstotek inhibicije encima. Nobena od testiranih spojin žal ni bila aktivna (odstotek inhibicije višji od 50%) pri koncentraciji 100 μM , kar je lahko posledica neustreznega izbora knjižnice spojin, majhnega števila testiranih spojin ali metode virtualnega rešetanja.

KLJUČNE BESEDE:

tiopirano[2,3-*d*]tiazol
knjižnica heterocikličnih spojin
MurD ligaza
biosinteza peptidoglikana
inhibitor
virtualno rešetanje

ABSTRACT

The treatment of bacterial infections with antibacterial agents, introduced in the 1930's, has been one of the biggest achievements of the twentieth century. The golden era of the development of new agents, however, was followed by a standstill period, as only four new groups of antibacterial agents have been discovered since the 1970's. The occurrence of the resistance to practically all known antibacterial agents is forcing us to develop new compounds which will act upon new targets. Some of these targets are the enzymes which participate in the peptidoglycan biosynthesis, the constituent element of the bacterial cell-wall. One of them is the enzyme MurD ligase, participating in the intracellular stage of the peptidoglycan biosynthesis.

We were searching for new inhibitors of MurD ligase using structure-based design. Virtual screening of the compound libraries enables us to enrich the library and to identify the hits. By upgrading the software, the X-ray crystallography and the increasing number of released protein structures, the computer-assisted methods present an excellent tool for designing novel inhibitors.

We synthesized four different aldehydes, which included one or two phenyl rings and D-Glu, and will serve as building blocks for the synthesis of tiopiran[2,3-*d*]thiazole-based analogues of the thiazolidin-4-one-based MurD ligase inhibitors. The energy minimized 3D structures of the designed ligands were docked into the active site of MurD ligase from *Escherichia coli*. The compounds with one phenyl ring in the structure were selected for the synthesis and evaluation of their MurD inhibitory activity, because of their better fit into the MurD active site as calculated by docking. The final compounds will be synthesized at the Danylo Halytsky Lviv National Medical University in Ukraine.

We have also performed virtual screening of the library of 4,610 heterocyclic compounds, which were synthesized at the Lviv University. The initial library was filtered by the rules of Lipinski and in this way reduced to 2,358 compounds. These compounds were then docked using GOLD into the binding site for the nucleotide substrate of the MurD from *E. coli*. We obtained 15 compounds from Lviv University, selected out of the best ranked 30 hits, for which the percentage of inhibition of the enzyme was determined. Unfortunately, none of the tested compounds was active (percentage of inhibition higher than 50%) at 100 µM, which could be the consequence of an inadequate selection of the compound library, a low number of tested compounds, or the method of virtual screening.

KEYWORDS:

thiopyrano[2,3-*d*]thiazole

library of heterocyclic compounds

MurD ligase

peptidoglycan biosynthesis

inhibitor

virtual screening

SEZNAM OKRAJŠAV

2D	dvodimenzionalen
3D	tridimenzionalen
Å	angstrom
ADP	adenozin-5'-difosfat
ATP	adenozin-5'-trifosfat
Ddl	D-alanin:D-alanin ligaza
GluNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
HTS	rešetanje visoke zmogljivosti (high throughput screening)
IC ₅₀	koncentracija zaviralca, pri kateri je aktivnost encima zmanjšana za 50%
IR	infrardeča spektroskopija
lipid I	MurNAc-(pentapeptid)-pirofosforil undekaprenol
lipid II	GlcNAc-MurNAc-(pentapeptid)-pirofosforil undekaprenol
logP	porazdelitveni koeficient
<i>mezo</i> -A2pm	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
MRSA	proti meticilinu odporni <i>Staphylococcus aureus</i> (methicillin-resistant <i>S. aureus</i>)
MS	masna spektrometrija
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-D-glutamat- <i>mezo</i> -diaminopimelat:D-alanil-D-alanin ligaza
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
NMR	nuklearna magnetna resonanca
PDB	podatkovna zbirka struktur proteinov (protein data bank)
RA	rezidualna aktivnost encima
RMSD	root-mean square distance
SBVS	strukturno podprt virtualno rešetanje (Structure-based Virtual Screening)
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry System
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronijev tetrafluoroborat

UDP	uridindifosfat
UMA	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin
UMAG	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanyl-D-glutamat
VRE	proti vankomicinu odporni enterokoki (vancomycin-resistant enterococci)
VS	virtualno rešetanje

1. UVOD

1.1. Protimikrobne učinkovine in bakterijska rezistenca

Infekcijske bolezni so skozi zgodovinski razvoj vedno predstavljale velik zdravstveni problem zaradi nezmožnosti učinkovitega zdravljenja. K razvoju protimikrobnih učinkovin sta pomembno vplivala mikrobiologa Robert Koch in Louis Pasteur, ki sta proti koncu 19. stoletja razkrila, da infekcijske bolezni povzročajo različni mikroorganizmi, med katere spadajo tudi bakterije (1). Kasneje je Paul Ehrlich na podlagi svojih raziskovanj trdil, da obstajajo snovi, ki lahko uničijo bakterijske celice, ne da bi pri tem poškodovale človeške celice (2,3).

Leta 1928 je Alexander Fleming z odkritjem penicilina pomembno vplival na zdravljenje infekcijskih bolezni. Ugotovil je, da sekundarni metaboliti nekaterih mikroorganizmov (npr. glive *Penicillium notatum*) delujejo protimikrobno. Leta 1935 je patolog Gerhard Domagk odkril prvi terapevtsko uporabni kemoterapeutik *prontozil*, za katerega so ugotovili, da se v telesu metabolizira do sulfanilamida (1,2). V moderni dobi zdravljenja bakterijskih infekcij so z novejšimi pristopi, kot so testiranja naravnih produktov in izvlečkov mikroorganizmov, odkrivali nove protimikrobne učinkovine. Do leta 1945 so odkrili *actinomycin*, *gramicidin*, *streptomycin* in *bacitracin*. Obdobje med letoma 1945 in 1960 velja za zlato dobo protibakterijskih učinkovin, saj se jih večina še vedno uporablja pri zdravljenju bakterijskih infekcij. To so *cefalosporini*, *tetraciklini*, *polimiksini*, *kloramfenikol* ter *makrolidni*, *aminoglikozidni* in *glikopeptidni* antibiotiki (4).

Kasneje se je odkrivanje novih protibakterijskih učinkovin zmanjšalo, saj so se farmacevtska podjetja usmerila v modifikacijo že znanih spojin iz več razlogov: zmanjšati pojav neželenih učinkov in pojav rezistence ter razširiti spekter delovanja. Rezultat tovrstnega raziskovanja sta bili novi protibakterijski učinkovini lipopeptid *daptomicin* in *linezolid*, ki spada v skupino oksazolidinonov (5,6). Vzrok za zmanjšanje razvoja novih protibakterijskih učinkovin sta bila manjši donos in relativno hiter razvoj rezistence. Med letoma 1970 in 1990 je bil v ospredju razvoj širokospikalnih protibakterijskih učinkovin. Kasneje so zaradi pojava rezistentnih sevov razvijali protibakterijske učinkovine z ozkim spektrom delovanja, ki bi uničevale predvsem po Gramu pozitivne bakterije.

V zadnjih letih pa so se farmacevtska podjetja zaradi pojava multirezistentnih po Gramu negativnih bakterij usmerila v razvoj učinkovin za zdravljenje infekcij, ki jih povzročajo tovrstne bakterije, saj za boj proti njim že primanjkuje učinkovitih protibakterijskih učinkovin (7-11).

Protibakterijske učinkovine delujejo na različne tarče v bakterijski celici in jih zato glede na različen mehanizem delovanja razdelimo v več skupin. Nekatere vplivajo na sintezo celične stene bakterij, kot so *betalaktami*, *glikopeptidi*, *fosfomicin*, *bacitracin*, *D-cikloserin*, nekatere delujejo na bakterijski celični metabolizem, to so *sulfonamid* in *trimetoprim*, nekatere vplivajo sintezo bakterijskih beljakovin, to so *tetraciklini*, *aminoglikozidi*, *streptogramini*, *oksazolidinoni* in *kloramfenikol*, nekatere se vmešavajo v sintezo in delovanje plazemske membrane, to so *polimiksini*, *ciklični lipopeptidi*, *gramicidin A*, nekatere pa zavirajo sintezo dednega materiala, to so *kinoloni*, *aminoakridini*, *rifamicini* in *nitroimidazoli* (23). Preko teh mehanizmov učinkovine povzročijo celično smrt bakterije (12). To pa lahko povzročijo še preko nespecifičnega mehanizma delovanja, kjer pride do tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti (13). Proti oksidativnemu stresu pa se bakterije borijo s pomočjo bakterijskih NO-sintetaz, ki producira dušikov (II) oksid (14).

Bakterije so zelo prilagodljiva skupina organizmov in hitro postanejo odporne na protibakterijske učinkovine. Bakterijska rezistenca se nanaša na to, da protibakterijske učinkovine v citotoksičnih koncentracijah več ne morejo ustaviti razmnoževanja bakterij. Rezistenca je lahko intrinzična (prirojena) ali pridobljena. Prva se je pojavljala že pred odkritjem antibiotikov zaradi strukturnih, fizioloških ali genetskih lastnosti mikroorganizmov in jo lahko vnaprej predvidevamo. Pridobljena rezistenca je nepredvidljiva, nastane pa zaradi spremenjene celične strukture in fiziologije, ki sta rezultat genetskih sprememb mikroorganizma. Pri posameznih celicah določene bakterijske vrste pride do spremembe genetske informacije zaradi transformacije in genskega prenosa ali pa plazmidni oz kromosomski geni spontano mutirajo (71). Poznamo pet osnovnih mehanizmov bakterijske rezistence (Preglednica I).

Preglednica I Osnovni mehanizmi bakterijske rezistence (prirejeno po ⁷¹).

Osnovni mehanizmi	Primer
Encimska razgradnja učinkovine	Razgradnja betalaktamskih antibiotikov z encimi betalaktamaze
Sprememba prijemališča oz. tarčnega mesta učinkovine	Sprememba beljakovin, ki so odgovorne za vezavo penicilina
Zmanjšana prehodnost oz. neprehodnost celične membrane za učinkovine	Spremenjeni porini v celični steni pri po Gramu negativnih bakterijah zmanjšujejo prehodnost betalaktamskih antibiotikov
Sprememba presnove, ki je tarča za učinkovine	Sprememba gena za dihidrofolatno reduktazo na bakterijskem plazmidu povzroči odpornost proti trimetoprimu
Membranske črpalke črpajo učinkovine iz bakterijske celice	Odpornost določenih bakterij proti tetraciklinom

Pojav rezistence pri bakterijah je poznan že od začetka odkrivanja protimikrobnih učinkovin, vse večje težave pa nastajajo v zadnjem času zaradi bakterij, ki so odporne proti vsem učinkovinam, ki se uporablajo pri zdravljenju infekcijskih bolezni. Takšne bakterije se imenujejo **multirezistentne bakterije ali "superbakterije"**. Delimo jih na klasične in oportunistične bakterije (15-17). Med prve štejemo enterobakteriji *Escherichia coli* in VRE (proti *vankomicinu* odporni enterokoki) ter MRSA (proti *meticilinu* odporni *Staphylococcus aureus*). Te bakterije so sorodne tistim, ki so prisotne v človeškem organizmu in so del črevesne flore, razlikujejo se po tem, da so pridobile gene za rezistenco proti protimikrobnim učinkovinam. Med oportunistične bakterije pa štejemo *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia* in *Stenotrophomonas maltophilia*. Te povzročajo infekcije le pri bolnikih s hudimi boleznimi in oslabljenim imunskim sistemom in so normalno prisotne v okolju (18).

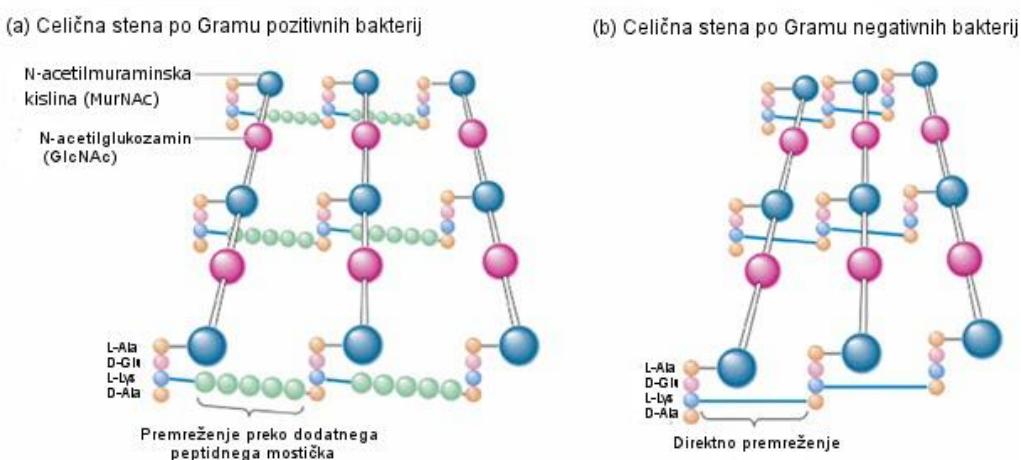
1.2. Bakterijska celična stena in biosinteza peptidoglikana

Bakterije uvrščamo med enocelične mikroorganizme, ki so živi in jih najdemo povsod v človeškem okolju. Glede na osnovno strukturo celic so to prokarioti, ki se od evkariontov razlikujejo po tem, da ne vsebujejo celičnih organelov in da celice ne vsebujejo jedra (prokariotska celica ali "predjedrna"). Bakterijsko celico obdaja **celična stena**, ki jo sestavlja polimer z veliko molekulsko maso in se imenuje **peptidoglikan**. Citoplazemska membrana opravlja delo organelov, torej celično dihanje in sintezo celične stene ter

pritrditev DNA molekule na membrano med cepitvijo. Dedno snov bakterij predstavlja molekula DNA, ki je zvita v klobčič in predstavlja krožni kromosom ter manjše molekule DNA zunaj krožnega kromosoma, ki se imenujejo plazmidi. Bakterije se razmnožujejo z delitvijo oz. cepitvijo.

Presnova bakterij je raznolika, nekatere so odvisne od kisika v okolju, druge pa ne. Glede na to jih delimo med aerobne, anaerobne, fakultativno anaerobne in mikroaerofilne. Razlikujejo se tudi po načinu prehranjevanja. Večina bakterij je heterotrofnih, odvisnih od prehranskih snovi v okolju. Glede na obliko bakterij jih delimo v tri skupine: bacili so paličaste oblike, koki so okrogle oblike (diplokoki, streptokoki, stafilocoki) in spirohete so vijačno zvite bakterije. Barvanje po Gramu omogoča delitev bakterij zaradi različne zgradbe celične stene, tako se po Gramu negativne bakterije obarvajo rdeče, po Gramu pozitivne pa se obarvajo modrovijolično.

Celična stena bakterij daje celici obliko in trdnost, jo ščiti pred osmotskim tlakom v citoplazmi, ima pa tudi vlogo pri celični delitvi. Ključna polimerna struktura celične stene je **peptidoglikan** (drugo ime zanj je tudi murein) (19-22). Sestavlja ga **glikan**, ki je linearni polimer ponavljajočega zaporedja dveh izmenjujočih amino sladkorjev: *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminske kisline (MurNAc), ki ju povezuje 1,4- β glikozidna vez in **peptidne enote** (23). Na ta način se monomerne enote povezujejo v iztegnjene verige (glikan), ki jih prečno povezujejo kratki peptidi. Tako se tvori močna mrežasta struktura (21, 22, 24).



Slika 1 Zgradba peptidoglikana pri po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijah (prirejeno po ⁷⁰).

Zgradba peptidoglikana je med bakterijami različna (Slika 1). Razlikujejo se v aminokislinski sestavi in zaporedju peptidov, v dolžini glikanskih verig ter glede na premreženje polimera. Sestavo peptidnih verig določajo specifični encimi, imenovani ligaze Mur, ki sodelujejo pri sintezi teh verig in reakcije kasnejših stopenj biosinteze. Pri večini bakterij je premreženje 3-4 (pri nekaterih bakterijah so opazili tudi 2-4 in 3-3 premreženje). Med bakterijami se zelo razlikuje tudi stopnja premreženosti peptidoglikana. Orientacija peptidnih in glikanskih verig glede na celično površino še ni popolnoma pojasnjena (21, 24, 25).

Celično steno po Gramu pozitivnih bakterij sestavlja do štirideset plasti peptidoglikana, debeline 20-80 nm, kar znaša približno 50% mase celične stene. Po Gramu negativne bakterije pa vsebujejo eno do dve plasti peptidoglikana, ki ga obdaja zunana membrana, sestavljena iz lipopolisaharidno-fosfolipidnega dvosloja ter številnih vmesnih lipoproteinov, ki so pomembni za prehod snovi skozi membrano. Debelina peptidoglikana je 1-7 nm in predstavlja okrog 10% mase celične stene. Celična stena po Gramu negativnih bakterij je manj prepustna zaradi prisotnosti zunane membrane, kot pri po Gramu pozitivnih bakterijah. To pomeni da je težje najti učinkovine, ki bi prehajale celično steno po Gramu negativnih bakterij (20, 22).

Sinteza peptidoglikana je zapleten proces in poteka v več stopnjah v različnih delih bakterijske celice (citoplazma, celična membrana), pri čemer se zvrsti okrog 20 encimskih reakcij (23).

Biosintezo lahko opišemo v treh korakih:

Prvi korak je sinteza nukleotidnih prekurzorjev v citoplazmi, to so uridindifosfat-*N*-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc), uridindifosfat-*N*-acetilmuraminska kislina (UDP-MurNAc) in **UDP-MurNAc-pentapeptid**. Za sintezo slednjega je ključna skupina od ATP odvisnih encimov, ki se imenujejo ligaze Mur. Prva v zaporedju reakcij je ligaza **MurC**, ki katalizira pripenjanje L-Ala, naslednja je ligaza **MurD**, ki katalizira pripenjanje D-Glu, nato **MurE** katalizira pripenjanje diaminokisline L-Lys ali *mezo*-A2pm in na koncu **MurF** pripne D-Ala-D-Ala dipeptid, ki ga predhodno sintetizira D-alanin:D-alanin ligaza (Ddl) (23, 26, 27).

Drugi korak je vezava citoplazemskih prekurzorjev na lipidni nosilec, pri čemer nastaneta lipid I in lipid II in prenos skozi citoplazemske membrano (28).

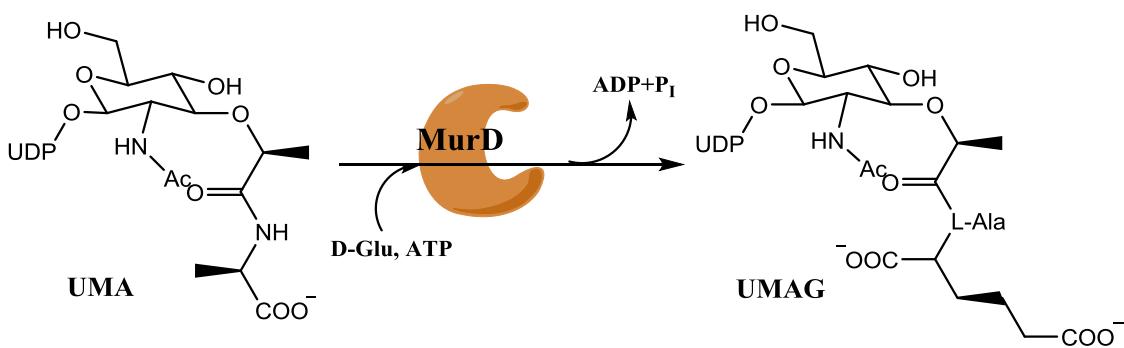
Zadnji korak je prehod lipida II v celično steno in pripenjanje na obstoječi peptidoglikan (30).

1.3. Inhibitorji ligaz Mur predstavljajo kandidate za nove protibakterijske učinkovine

Ligaze MurC-F so skupina encimov, ki so udeleženi pri biosintezi nukleotidnega prekurzorja peptidoglikana **UDP-MurNAc-pentapeptida**, tako da katalizirajo pripenjanje aminokisline ali dipeptida na **UDP-MurNAc** ob uporabi energije, ki se sprosti ob hidrolizi ATP (31-33). Ligaze MurC-MurF torej katalizirajo reakcije nastanka amidne (MurC) ali peptidne (MurD-F) vez. Poleg strukturne podobnosti ligaz Mur, imajo podobno tudi aminokislinsko zaporedje v okolini vezavnega mesta, še posebej v vezavnem mestu za ATP ter katalizirajo reakcije po podobnem kemijskem in kinetičnem mehanizmu (33, 34). Sestavljeni so iz treh domen, to so N-terminalna domena, v katero se veže ustrezni nukleotidni substrat, centralna domena, ki je odgovorna za vezavo molekule ATP in C-terminalna domena, v katero se veže ustrezna aminokislina ali dipeptid (23, 34, 35-42). Struktura centralnih in C-terminalnih domen je podobna, N-terminalne domene pri ligazah Mur pa se razlikujejo v dolžini nukleotidnih substratov (26). Na podlagi preučevanja kristalnih struktur encimov MurD domnevajo, da ob vezavi molekule ATP pride do toge rotacije C-terminalne domene, pri čemer se spremeni konformacija encima iz odprte v zaprto obliko (23, 43-45).

Pri reakciji, ki jo katalizirajo ligaze Mur, se najprej vežeta molekuli ATP in nukleotidni UDP substrat v svoji vezavni mesti (23). Nato pride do aktivacije karboksilne skupine C-terminalne aminokisline nukleotidnega substrata, ki se zgodi ob prenosu γ -fosfatne skupine iz ATP (fosforilacija) (23). S pomočjo ustrezne ligaze Mur se na nastali acilfosfatni intermediat veže nukleofilna amino skupina določene aminokisline ali dipeptida do nastanka tetraedričnega prehodnega stanja (23, 46). Sledi eliminacija ortofosfata in nastane amidna ali peptidna vez.

Ligaza MurD (ligaza UDP-MurNAc-L-alanin:D-glutamat), pripenja aminokislino na karboksilno skupino substrata UDPMurNAc-L-Ala (UMA), ki je pri večini bakterij D-glutaminska kislina, pri čemer nastane UDPMurNAc-L-Ala-D-Glu (UMAG) (23, 46) (Slika 2).



Slika 2 Reakcija, ki jo katalizira ligaza MurD.

1.4. Računalniške metode pri načrtovanju novih učinkovin

Računalniške metode postajajo vedno pomembnejši del načrtovanja učinkovin za napovedovanje interakcij med receptorjem in ligandom. Farmacevtska podjetja v glavnem iščejo nove učinkovine s pomočjo rešetanja visokih zmogljivosti (HTS), kar pa ni ugodno, ker zahteva veliko razvojnega časa in stroškov (47, 48).

Z namenom izboljšanja farmacevtskih raziskav, produktivnosti in razvoja ter zniževanja razvojnega časa in stroškov so se usmerili v racionalno načrtovanje novih učinkovin. Pri tem uporabljamo virtualne in fizične knjižnice, ki vsebujejo ogromno število spojin tudi nekaj milijonov, med katerimi iščemo potencialne zadetke (49).

Virtualno rešetanje (Virtual screening-VS) spada med *in silico* metode načrtovanja učinkovin. Pri tej metodi preiskujemo knjižnice spojin, ki so dostopne na tržišču. Namen tega je, da najdemo spojine, ki so primerne za biološko testiranje, kjer preverjamo aktivnost učinkovine na določeno tarčo. Razreševanje struktur tarč je posledica razvoja in določevanja 3D strukture proteinov ter izboljšane visoko zmogljive rentgenske kristalografije (50-52).

Ustrezna priprava knjižnice spojin pri virtualnem rešetjanju je zelo pomembna. To pomeni, da na začetku odstranimo vse neprimerne spojine, ki bi obremenjevale kasnejšo izbiro ustreznih zadetkov. Začetno knjižnico z ustrezнимi postopki zmanjšamo in tako pridobimo skrčen nabor spojin, med katerimi lahko z večjo verjetnostjo najdemo potencialno aktivno spojino. Temu rečemo obogatitev knjižnic (47, 53).

S pomočjo računalniških metod so bile odkrite že nekatere učinkovine, ki so uspešno prišle na trg, med katerimi velja omeniti inhibitorje HIV proteaze (*amprenavir, lopinavir* in

nelfinavir), inhibitorje nevraminidaze (*oseltamivir* in *zanamivir*), inhibitorje trombina (*dabigatran* in *ksimelagatran*) in zdravilno učinkovino za zdravljenje mieloidne levkemije, *imatinib* (54).

1.4.1. Računalniški zapisi kemijskih struktur

Pri računalniško podprtih načrtovanju učinkov in uporabljam programi, ki nam omogočajo zapis spojin v ustrezni obliki, da lahko izvajamo želene operacije. Različne oblike zapisa spojin lahko hierarhično opišemo. Najenostavnnejši in največkrat uporabljen je format **SMILES** (Simplified Molecular Input Line Entry System), ki je enovrstični zapis strukture spojine, kjer so definirani samo tipi atomov in povezave med njimi (55). 2D zapis predstavlja molekulo z racionalno ali strukturno formulo in grafično prikaže, kako so zgrajeni in razporejeni atomi ter kemijske vezi v molekulah. 3D zapisi kot najkompleksnejši (sdf, mol2, pdb) imajo zapisane koordinate za posamezne atome v prostoru in povezave med njimi.

1.4.2. Priprava kemijskih knjižnic in filtriranje s pomočjo osnovnih deskriptorjev

Pomen priprave knjižnice spojin so se zavedali, ko so ugotovili, da je nekatere spojine, ki so se izkazale za aktivne, težko optimizirati. Pojavilo se je več konceptov načrtovanja knjižnice spojin. Prvi se je imenoval "drug-like" koncept, ki ga je osnoval Christopher A. Lipinski. Koncept so pripravili s pomočjo analize zdravilnih učinkov na trgu in temelji na pravilu petice (56) (Razpredelnica II). Ko optimiziramo strukture, se v večini primerov povečajo parametri, ki ustrezajo "drug-like" konceptu, zato le-ta ni optimalen. Kasneje je Tudor I. Oprea ugotovil, da so spojine vodnici manj kompleksne, imajo nižje vrednosti parametrov kot so določene pri "drug-like" konceptu, zato je osnoval "lead-like" koncept (57) (Razpredelnica II).

Knjižnice spojin so večinoma zelo velike (do nekaj milijonov spojin), zato je običajno prva stopnja filtriranje knjižnic, kjer s prilagajanjem filtra na podlagi preprostih deskriptorjev pripravimo knjižnico, v kateri ohranimo le tiste spojine, ki nam ustrezajo glede fizikalno-kemijskih lastnosti (53).

Preglednica II Spojine, ki ustrezano "drug-like" oz. "lead-like" konceptu, imajo enake ali nižje vrednosti parametrov od tistih, ki so navedeni v preglednici.

	"drug-like"	"lead-like"
Molekulska masa	500	450
logP	5	4,5
Donorji H-vezi	5	4
Akceptorji H-vezi	10	10
Število obročev	5	4

1.4.3. Virtualno rešetanje na osnovi liganda

Namen te metode je iskanje spojin, ki so podobne izhodni spojini ob predpostavki, da imajo spojine s podobno strukturo podobno aktivnost. Izhodna spojina je znani ligand, ki se veže v izbrano tarčo (npr. inhibitor, substrat, agonist, antagonist). Strukture tarčnega proteina ne potrebujemo, kar je glavna prednost te metode.

Programi za rešetanje na osnovi 2D podobnosti temeljijo na tem, da so lastnosti spojin (določeni strukturni elementi) predstavljene kot tako imenovani prstni odtisi, na podlagi katerih program primerja strukture spojin med sabo (49, 59). Kot rezultat poda indeks podobnosti, pri čemer dosežejo največjo vrednost tiste spojine, ki so najbolj podobne znanemu ligandu (49, 58).

Programi za rešetanje na osnovi 3D podobnosti temeljijo na tem, da so spojine shranjene v 3D obliku. Pretvorba iz 2D v 3D je običajno narejena s pomočjo molekulske dinamike (minimizacija). Obstaja več vrst rešetanja, najbolj običajno je **rešetanje na osnovi farmakofora**. Farmakoforne točke je potrebno predhodno definirati, nato program preišče knjižnico spojin, pri čemer najde spojine, ki imajo skladno razporeditev farmakofornih točk (60, 61).

1.4.4. Struktурno podprtvo virtualno rešetanje – sidranje (docking)

Glavni pogoj pri struktурno podprtrem virtualnem rešetjanju (SBVS, Structure-based Virtual Screening) je **znana 3D struktura tarče**. Tarča je izbrana biološka molekula, ki je udeležena pri nekem patološkem procesu (encim, receptor, DNA,...). 3D strukturo tarče določamo z metodo rentgenske kristalografije, ki je za te namene najboj uporabna ali pa z metodo NMR spektroskopije. Če pa poznamo aminokislinsko zaporedje določenega proteina, lahko 3D strukturo tega proteina napovemo s pomočjo računalniške metode, ki se

imenuje homologno modeliranje. SBVS uporablja metodo sidranja, ki na podlagi ocene vezavnih interakcij s pomočjo cenilne funkcije razvrsti spojine iz knjižnice spojin od najboljše do najslabše. Poleg 3D strukture tarče moramo vedeti tudi, kje na/v tarči se nahaja aktivno mesto (49).

Sidranje (docking) je proces, ki na podlagi izračuna napove ugodno konformacijo liganda v vezavnem mestu tarčnega proteina (posing) ter oceni njegovo aktivnost. Sidranje poteka v dveh delih, najprej program postavlja ligand v vezavno mesto tarčnega proteina (sidranje), nato pa cenilna funkcija (scoring funktion) oceni vezavno energijo konformacije liganda. Pri sidranju moramo upoštevati fleksibilnost liganda in tarče. Glede na to obstajajo tri vrste sidranja, in sicer rigidno, semi-fleksibilno in fleksibilno sidranje. Večina programov obravnava ligand kot fleksibilen, tarčo pa kot rigidno (semi-fleksibilno sidranje). Različni programi sidranja kot so **simulacijski**, **naključni** oz. stohastični in **sistematični**, različno upoštevajo fleksibilnost liganda. Pogosto uporabljamo naključne programe, ki umestijo ligand v vezavno mesto, nato pa naključno spremenijo konformacijo liganda (algoritem Monte Carlo, genetski algoritmi - Gold, Dock ipd.) (62, 63).

Po končanem sidranju program poda najbolj ugodne konformacije liganda v aktivnem mestu. Sposobnost ujemanja izračunane konformacije liganda z eksperimentalno določeno konformacijo liganda v vezavnem mestu proteina je pomemben kriterij za vrednotenje algoritma (23). Ujemanje ocenjujemo z RMSD vrednostjo (enota je Å).

Po vezavi liganda v aktivno mesto, cenilna funkcija oceni vezavno energijo. Najprej glede na kakovost razvršča različne poze istega liganda, nato te sidrane poze pravilno rangira glede na poze ostalih ligandov v knjižnici spojin. Vendar cenilne funkcije velikokrat ne uspejo pravilno razvrstiti ligandov in zato napačno napovejo njihovo biološko aktivnost. Vzrok za to so številne poenostavitve in uporaba približkov (62).

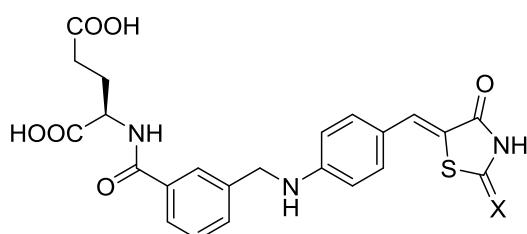
Obstajajo številne cenilne funkcije, ki so sestavni del procesa sidranja, delimo jih v tri skupine, to so **cenilne funkcije, ki temeljijo na polju sil** (**force field-based**), **empirične cenilne funkcije** (**empirical**) in **cenilne funkcije, ki so dobljene s pomočjo statistične mehanike** (**knowledge-based**) (62).

1.5. Načrtovanje in razvoj inhibitorjev ligaz MurD

Ligaza MurD katalizira reakcijo adicije D-glutaminske kisline na karboksilno skupino substrata UDPMurNAc-L-Ala (UMA) do nastanka UDPMurNAc-L-Ala-D-Glu (UMAG)

(23, 46) (Slika 2). Inhibitorje ligaze MurD lahko načrtujemo kot mimetike UMAG, ki oponašajo strukturo produkta omenjene encimske reakcije.

Najbolj znani inhibitorji ligaz MurD vsebujejo D-glutaminsko kislino in kažejo, da je le-ta ključni strukturni element pri načrtovanju aktivnih inhibitorjev. Pomembni potencialni inhibitorji, ki so jih raziskovali do sedaj, so tudi različno substituirani derivati 5-iliden-4-tiazolidinona. Za najuspešnejše potencialne inhibitorje ligaz MurD z največjo inhibitorno aktivnostjo so se izkazale spojine z različno substituiranim 5-benzilidenrodaninom oziroma 5-benzilidentiazolidin-2,4-dionom (65, 66) (Slika 3).



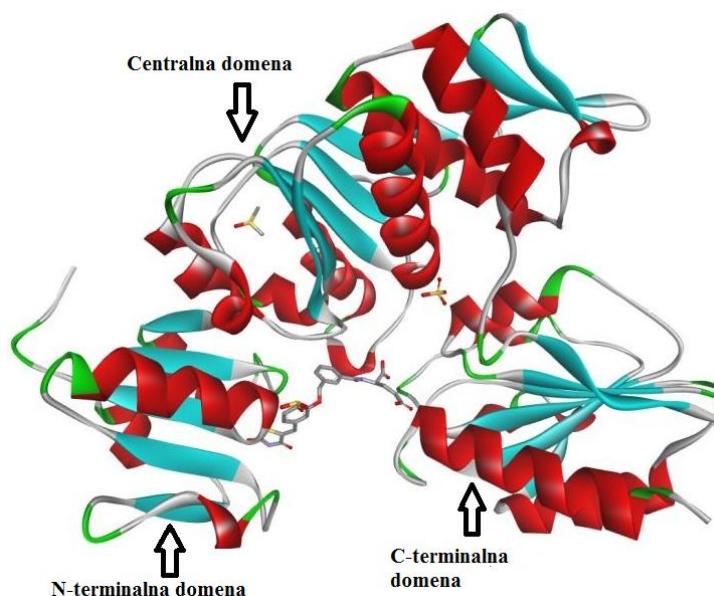
I, X=O $IC_{50}(\text{MurD}) = 85 \mu\text{M}$

II, X=S $IC_{50}(\text{MurD}) = 45 \mu\text{M}$

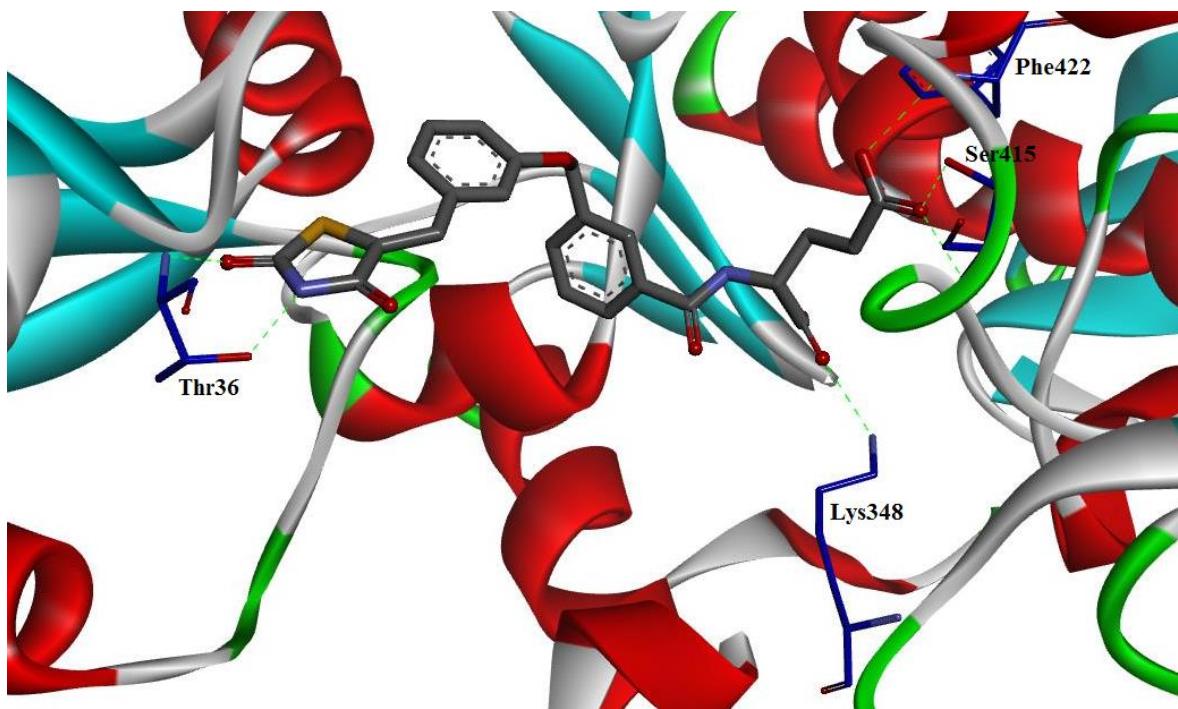
Slika 3 Znani inhibitorji ligaz MurD, ki vsebujejo tiazolidin-2,4-dionski (**I**) ali rodaninski (**II**) obroč (prirejeno po ^{23, 46}).

Pri strukturno podprttem načrtovanju iščemo nove inhibitorje ligaz MurD na osnovi kristalne strukture proteina, ki ga pridobimo v kompleksu z znanim inhibitorjem. Kristalna struktura takega kompleksa omogoča, da ugotovimo način vezave liganda v aktivno mesto encima. Kristalno strukturo kompleksa protein-ligand določamo z metodo rentgenske kristalografije. Na tak način so določili strukturo ligaze MurD iz bakterije *E. coli* v kompleksu s tiazolidin-2,4-dionskim inhibitorjem **III** (v nadaljevanju inhibitor **III**) (PDB oznaka: 2Y66). Ta protein bomo uporabili pri virtualnem rešetjanju potencialnih inhibitorjev MurD (Slika 4). Inhibitor **III** se s tiazolidin-2,4-dionskim delom spojine veže v vezavno mesto za nukleotidni substrat proteina (UMAG), D-glutaminski del spojine pa se veže v D-Glu žep proteina in tvori določene interakcije z aminokislinskimi ostanki proteina. Tiazolidin-2,4-dionski obroč inhibitorja **III** tvori vodikove vezi med obročnim dušikom in hidroksilno skupino Thr36. Vodikove vezi se tvorijo tudi med karbonilnim kisikom na mestu 2 tiazolidin-2,4-dionskega obroča in NH skupino Thr36. Pri 4-

oksibenzilidenskem delu se tvorijo hidrofobne interakcije med prvim fenilnim obročem in Gly73, pri drugem fenilnem obroču pa z Leu416 ter π - π interakcije s Phe161 (46). α -COOH interagira z NH skupino Lys348 in W36, ki interagira še z Asp182 in Thr32 (46). γ -Karboksilna skupina D-glutaminskega dela liganda tvori vodikove vezi s kisikom in NH skupino Ser415 in prav tako z NH skupino Phe422 ter z W371. γ -COOH interagira še z Glu423 in sicer preko W371 ter W150. Metilenski skupini D-glutaminskega dela inhibitorja **III** prav tako tvorita hidrofobne interakcije z Leu416 (46) (Slika 5).



Slika 4 Kristalna struktura proteina v kompleksu z inhibitorjem **III** (PDB: 2Y66).



Slika 5 Kristalna struktura inhibitorja **III** v aktivnem mestu ligaze MurD iz *E. coli*. Vodikove vezi, ki jih ligand tvori z aminokislinskimi ostanki, so predstavljene z zeleno prekinjeno črto.

2. NAMEN DELA

Zaradi naraščajoče rezistence bakterij na protimikrobne učinkovine in s tem vse težjim zdravljenjem infekcijskih bolezni je potreben razvoj novih učinkovin z novim mehanizmom delovanja. V okviru diplomske naloge se bomo usmerili na iskanje potencialnih zaviralcev ligaze MurD, s katerimi bi preprečili sintezo osnovnih gradnikov peptidoglikana, ki sestavlja celično steno bakterij. Zavrtje sinteze celične stene pomeni propad bakterije, kar je cilj delovanja protibakterijskih učinkovin.

2.1. Struktурno podprt načrtovanje potencialnih tiopirano[2,3-*d*]tiazolnih zaviralcev ligaze MurD

V prvem delu bomo sintetizirali aldehyde, gradnike potencialnih tiopirano[2,3-*d*]tiazolnih zaviralcev ligaze MurD, ki v strukturi vsebujejo D-glutaminsko kislino, ki oponaša produkt encimske reakcije ligaze MurD. Sintezo gradnikov bomo izvedli z običajnimi postopki organske sinteze. Strukturo sintetiziranih aldehydov bomo določili z analizno metodo NMR. Sestavljeni končni strukture (potencialne tiopirano[2,3-*d*]tiazolnih zaviralcev ligaze MurD) bomo iz 2D oblike s pomočjo molekulske dinamike s programom OpenBabel, pretvorili v 3D obliko. Tako pripravljene ligande bomo s programom GOLD sidrali v aktivno mesto encima. Uporabili bomo kristalno strukturo encima ligaze MurD, z vezanim inhibitorjem **III**, izolirano iz *E. coli* (PDB: 2Y66). S pomočjo farmakofornih zahtev bomo definirali, kam naj se D-Glu liganda veže.

2.2. Struktурno podprt virtualno rešetanje knjižnice heterocikličnih spojin

Nove potencialne zaviralce ligaze MurD bomo iskali z metodo virtualnega rešetanja. Izvedli bomo struktурno podprt virtualno rešetanje knjižnice heterocikličnih spojin, ki so jo pripravili na Danylo Halytsky Lviv National Medical University v Ukrajini. Knjižnico 4610 spojin bomo najprej prefiltrirali s programom FILTER po pravilih Lipinskega. Spojine iz tako pripravljene knjižnice spojin bomo s programom GOLD sidrali v aktivno mesto encima. Uporabili bomo kristalno strukturo ligaze MurD iz *E. coli*, z vezanim inhibitorjem **III** (PDB: 2Y66). Na ta način bomo iskali spojine, ki so mimetiki produkta encimske reakcije, ki jo katalizira ligaza MurD, to je UDPMurNAc-L-Ala-D-Glu

Jasmina Horvat: Sinteza tiopiranato[2,3-*d*]tiazolov in uporaba virtualnega rešetanja pri odkrivanju novih zaviralcev ligaze MurD

(UMAG). Na podlagi rezultatov rangiranja ligandov iz knjižnice spojin, bomo 15 spojinam z najvišjo oceno cenzilne funkcije določili zaviralno aktivnost na ligazo MurD.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev (Acros, Aldrich, Fluka, Kemika, Merck).

3.2. Sintezne metode

Določevanje tališča

Tališča smo določali s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica in so nekorigirana.

Kromatografske metode

Za izvedbo tankoplastne kromatografije smo uporabljali TPK plošče Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Nemčija) z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem in različne mobilne faze. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko pri valovni dolžini 254 nm.

Za čiščenje produktov s flash kolonsko kromatografijo smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm (Merck, Nemčija) in različne mobilne faze.

Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca (NMR)

NMR spektri so bili posneti na Bruker Advance III spektrometu pri 400 MHz v DMSO-*d*₆ in CDCl₃ s TMS kot internim standardom na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

3.3. Računalniške metode

Računalniška oprema

Programi, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu, delujejo na računalniku z naslednjimi komponentami:

Procesor: štirikrat osemjedrnimi AMD Opteron CPU

Trdi disk: 16 GB RAM, 2 × 750 GB

Operacijski sistem: 64-bitni Scientific Linux 6.0

Knjižnica spojin

Knjižnico spojin v elektronski obliki smo pridobili od prof. dr. Romana Lesyka iz Danylo Halytsky Lviv National Medical University v Ukrajini. Knjižnica vsebuje 4610 heterocikličnih spojin, ki so na voljo za biološko vrednotenje.

Programska oprema

Risanje struktur načrtovanih molekul in reakcijskih schem, in za poimenovanje spojin po IUPAC nomenklaturi: ChemBioDraw Ultra 13.0, ChemBioOffice 2012

Energijsko minimiziranje 3D struktur: Program ChemBio3D Ultra 13.0, ChemBioOffice 2012

Pretvorba zapisa molekul iz 2D v 3D: Program OpenBabel 2.3.0

Filtriranje knjižnice spojin: Program Filter, OpenEye Scientific Inc.

Sidranje molekul: Program GOLD Suite 5.1

Pregledovanje rezultatov in izdelava slik: Program Accelrys Discovery Studio Visualizer 3.5.

3.4. Biološko testiranje

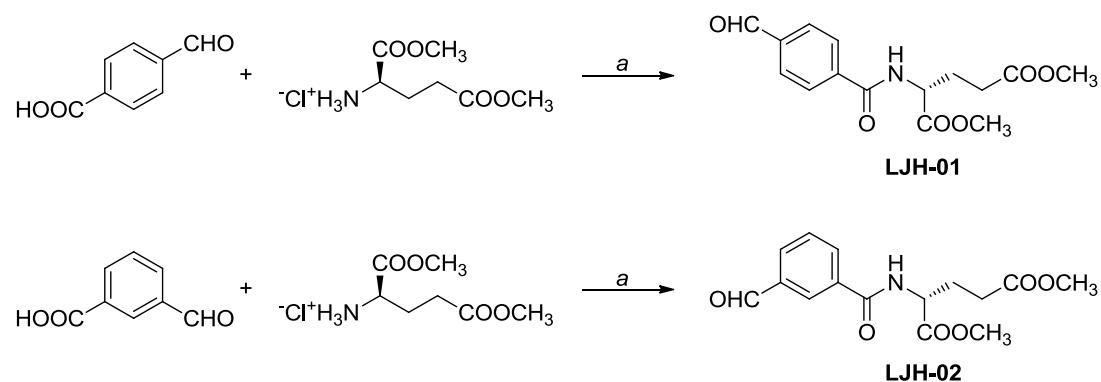
Encim MurD katalizira reakcijo med UMA in D-Glu ob prisotnosti ATP, ki pri tem razpade na ADP in fosfat. Nastanek fosfata določamo spektrofotometrično pri 650 nm posredno preko tvorbe obarvanega kompleksa z malahitno zelenim. Katalitično aktivnost encimov ovrednotimo na podlagi množine fosfata, ki nastane pri reakciji, pri čemer mora biti množina nastalega fosfata v linearjem območju umeritvene krivulje za fosfat. Ob dodatku inhibitorja se katalitična aktivnost encima zniža, zato je množina nastalega fosfata manjša v primerjavi s kontrolo brez inhibitorja. Učinkovitost inhibitorja izrazimo z rezidualno aktivnostjo (RA), ki predstavlja razmerje med aktivnostjo encima ob prisotnosti inhibitorja in aktivnostjo encima brez navzočnosti inhibitorja (66). Odstotek inhibicije encima izračunamo po formuli $100\% - RA$. Spojine je testirala asist. dr. Martina Hrast na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. Sinteza aldehidov in sidranje končnih ligandov v aktivno mesto encima MurD

Sintetizirali smo štiri različne gradnike potencialnih tiopirano[2,3-*d*]tiazolnih zaviralcev ligaze MurD, ki v strukturi vsebujejo D-glutaminsko kislino. Spojine imajo naslednje oznake: **LJH-01**, **LJH-02**, **LJH-06** in **LJH-08**.

4.1.1. Potek sinteznih reakcij in reakcijske sheme



Slika 6 Reagenti in pogoji. a) TBTU, Et₃N, CH₂Cl₂, sobna T, 24h.

Sinteza LJH-01 (N. Zidar et al. / *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 6584-6594)

4-karboksibenzaldehid (1,50 g; 10 mmol) smo raztopili v diklorometanu (40 mL). Raztopini smo dodali trietylamin (2,78 mL; 20 mmol) in TBTU (3,53 g; 11 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 15 minut, nato smo dodali trietylamin (1,39 mL; 10 mmol) in H-D-Glu(OMe)OMe·HCl (2,11 g; 10 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Na koncu smo jo spirali zapored z vodo (2 x 50 mL), z 1M HCl (2 x 50 mL), z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2 x 50 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (50 mL). Vodno fazo (1M HCl) smo še enkrat ekstrahirali z diklorometanom (20 mL). Produkt **LJH-01** smo sušili z Na₂SO₄, filtrirali in topilo odparili pri znižanem tlaku. Produkt smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije. Kot mobilno fazo smo uporabili etilacetat:heksan=1:1.

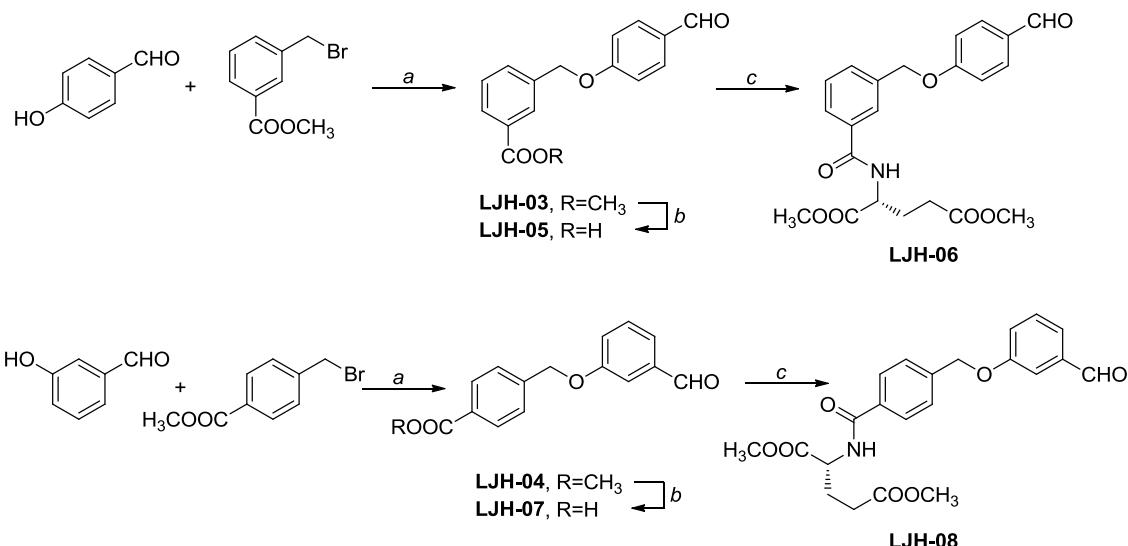
¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1.97-2.20 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 2.43-2.50 (2H, CHCH₂CH₂), signal se prekriva s signalom za DMSO-*d*₅), 4.47-4.54 (m, 1H, CH), 3.59 (s, 3H, CH₃), 3.66 (s, 3H, CH₃), 8.02 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, Ar-H-2,6/3,5), 8.07 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, Ar-H-2,6/3,5), 8.98 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, NH), 10.10 (s, 1H, CHO).

Sinteza LJH-02 (N. Zidar et al. / *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 6584-6594)

3-karboksibenzaldehid (1,50 g; 10 mmol) smo raztopili v diklorometanu (40 mL). Raztopini smo dodali trietilamin (2,78 mL; 20 mmol) in TBTU (3,53 g; 11 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 15 minut, nato smo dodali trietilamin (1,39 mL; 10 mmol) in H-D-Glu(OMe)OMe·HCl (2,11 g; 10 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Na koncu smo jo spirali zaporedoma z vodo (2 x 50 mL), z 1M HCl (2 x 50 mL), z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2 x 50 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (50 mL). Vodni fazi (1M HCl in nasičena raztopina NaCl) smo še enkrat ekstrahirali z diklorometanom (2 x 20 mL). Produkt **LJH-02** smo sušili z Na₂SO₄, filtrirali in topilo odparili pri znižanem tlaku. Produkt smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije. Kot mobilno fazo smo uporabili etilacetat.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1.97-2.21 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 2.48 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, CHCH₂CH₂), 3.59 (s, 3H, CH₃), 3.66 (s, 3H, CH₃), 4.48-4.55 (m, 1H, CH), 7.73 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-5), 8.10 (dt, 1H, ³*J* = 7.7 Hz, ⁴*J* = 1.4 Hz, Ar-H-4/6), 8.19 (dt, 1H, ³*J* = 7.7 Hz, ⁴*J* = 1.4 Hz, Ar-H-4/6), 8.42 (t, 1H, *J* = 1.4 Hz, Ar-H-2), 9.01 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, NH), 10.09 (s, 1H, CHO).

Stopnje sinteze do končnega aldehida **LJH-06**



Slika 7 Reagenti in pogoji. a) K_2CO_3 , KI , CH_3CN , $70^\circ C$, 5 h; b) 2M $NaOH$, 1,4-dioksan:metanol: H_2O = 1:1:1, sobna T, 4 h; c) H-D-Glu(OMe)OMe·HCl, TBTU, Et_3N , CH_2Cl_2 , sobna T, 24 h.

Sinteza LJH-03 (N. Zidar et al. / *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 5512-5523)

Metil-3-bromometilbenzoat (3,00 g; 13,1 mmol) in 4-hidroksibenzaldehid (1,6 g; 13,1 mmol) smo suspendirali v acetonitrilu (100 mL). Dodali smo 0,5 ekvivalenta kalijevega jodida (1,087 g) in 2 ekvivalenta kalijevega karbonata (3,62 g). Reakcija je potekla pri $70^\circ C$ v 5 urah. Acetonitril smo odparili pri znižanem tlaku in produkt raztopili v etilacetatu (80 mL). Nato smo ga zapored spirali z nasičeno raztopino $NaHCO_3$ (2 x 50 mL) in z nasičeno raztopino $NaCl$ (50 mL). Produkt smo sušili z Na_2SO_4 in etilacetat odparili pri znižanem tlaku. Vodno fazo $NaHCO_3$ smo še enkrat ekstrahirali z 20 mL etilacetata. Po odparevanju topila smo produkt oborili z dodajanjem dietiletra. Oborino **LJH-03** smo na koncu odnučali.

1H NMR ($CDCl_3$) δ 3.95 (s, 3H, CH_3), 5.21 (s, 2H, CH_2), 7.10 (d, 2H, $^3J = 9.0$ Hz, Ar-H-2',6'), 7.50 (t, 1H, $^3J = 7.8$ Hz, Ar-H-5), 7.65 (d, 1H, $^3J = 7.8$ Hz, Ar-H-4), 7.86 (d, 2H, $^3J = 9.0$ Hz, Ar-H-3',5'), 8.07 (d, 1H, $^3J = 7.8$ Hz, Ar-H-6), 8.14 (s, 1H, Ar-H-2), 9.91 (s, 1H, CHO).

Sinteza LJH-05 (N. Zidar et al. / *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 5512-5523)

Spojino **LJH-03** (1,50 g; 5,5 mmol) smo raztopili v 1,4-dioksan:metanol:H₂O=1:1:1 (30 mL). Po kapljicah smo dodali 2M NaOH (5,5 mL). Zaradi slabe topnosti spojine smo dodali še 1,4-dioksan (10 mL). Reakcijsko snov smo mešali 1 ura, nato smo spojino **LJH-03** dokončno raztopili s pomočjo ultrazvočne kadičke. Reakcija je potekla v 4 urah. Reakcijsko zmes smo nakisali z 1M HCl do pH=3, pri čemer se je produkt oboril. Produkt **LJH-05** smo filtrirali in odparili topilo pri nizkem tlaku. Matičnico smo ekstrahirali z etliacetatom (50 mL) in spirali z 10% citronsko kislino (2 x 20 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (2 x 15 mL). Po pregledu kromatograma smo zavrgli organsko fazo, ker ni vsebovala nič produkta.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 5.33 (s, 2H, CH₂), 7.23 (d, 2H, ³*J* = 8.7 Hz, Ar-H-2',6'), 7.55 (t, 1H, ³*J* = 7.8 Hz, Ar-H-5), 7.72 (d, 1H, ³*J* = 7.8 Hz, Ar-H-4), 7.87–7.94 (m, 3H, Ar-H-3',5',6), 8.05 (s, 1H, Ar-H-2), 9.88 (s, 1H, CHO), 13.01 (br s, 1H, COOH).

Sinteza LJH-06 (N. Zidar et al. / *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 5512-5523)

Spojino **LJH-05** (1,22 g; 4,8 mmol) smo raztopili v diklorometanu (40 mL). Raztopini smo dodali trietilamin (1,33 mL; 9,54 mmol) in TBTU (1,69 g; 5,25 mmol). Raztopino smo mešali 15 minut, nato smo dodali trietilamin (0,66 mL; 4,8 mmol) in H-D-Glu(OMe)OMe·HCl (1,01 g; 4,8 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 48 ur pri sobni temperaturi. Nato smo reakcijsko zmes zaporedoma spirali z vodo (2 x 50 mL), z 1M HCl (2 x 50 mL) z NH₄Cl (3 x 50 mL) z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 x 50 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (50 mL). Organsko fazo s produktom **LJH-06** smo sušili z Na₂SO₄, filtrirali in odparili topilo pri znižanem tlaku. Produkt smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije. Kot mobilno fazo smo uporabili etilacetat:heksan=1:1.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.96–2.20 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 2.47 (t, 2H, ³*J* = 7.5 Hz, CHCH₂CH₂), 3.59 (s, 3H, CH₃), 3.65 (s, 3H, CH₃), 4.45–4.52 (m, 1H, CHCH₂CH₂), 5.30 (s, 2H, CH₂), 7.24 (d, 2H, ³*J* = 8.7 Hz, Ar-H-2',6'), 7.53 (t, 1H, ³*J* = 7.8 Hz, Ar-H-5), 7.66

(d, 1H, $^3J = 7.8$ Hz, Ar-H-4), 7.86–7.91 (m, 3H, Ar-H-3',5',6), 7.99 (s, 1H, Ar-H-2), 8.81 (d, 1H, $^3J = 7.5$ Hz, NH), 9.88 (s, 1H, CHO).

Stopnje sinteze do končnega aldehida LJH-08

Sinteza LJH-04 (N. Zidar et al. / *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 5512-5523)

Metil-4-bromometilbenzoat (3,00 g; 13,1 mmol) in 3-hidroksibenzaldehid (1,60 g; 13,1 mmol) smo suspendirali v acetonitrilu (100 mL). Dodali smo 0,5 ekvivalenta kalijevega jodida (1,087 g) in 2 ekvivalenta kalijevega karbonata (3,62 g). Reakcija je potekla pri 70° C v 24 urah. Odparili smo acetonitril pri znižanem tlaku in produkt **LJH-04** raztopili v etilacetatu (80 mL). Nato smo ga zapored spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 x 50 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (50 mL). Produkt smo sušili na Na₂SO₄ in odparili etilacetat pri znižanem tlaku.

¹H NMR (CDCl₃) δ 3.95 (s, 3H, CH₃), 5.21 (s, 2H, CH₂), 7.25–7.29 (m, 1H, Ar-H), 7.46–7.55 (m, 5H, Ar-H), 8.09 (d, 2H, $^3J = 6.6$ Hz, Ar-H-2,6), 10.00 (s, 1H, CHO).

Sinteza LJH-07 (N. Zidar et al. / *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 5512-5523)

Spojino **LJH-04** (1,5 g; 5,5 mmol) smo raztopili v 1,4-dioksan:metanol:H₂O=1:1:1 (30 mL). Po kapljicah smo dodali 2M NaOH (5,5 mL). Zaradi slabe topnosti spojine **LJH-04** smo dodali še 1,4-dioksan (10 mL). Reakcijsko zmes smo mešali 1 uro, nato smo spojino **LJH-04** dokončno raztopili s pomočjo ultrazvočne kadičke. Reakcija je potekla v 4 urah. Reakcijsko zmes smo nakisali z 1M HCl do pH=3. Produkt **LJH-07** se je oboril, nato smo ga filtrirali in odparili topilo pri nizkem taku. Matičnico smo posušili pri nizkem tlaku in produkta združili.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 5.30 (s, 2H, CH₂), 7.36–7.40 (m, 1H, Ar-H), 7.52–7.61 (m, 5H, Ar-H), 7.98 (d, 2H, $^3J = 8.4$ Hz, Ar-H-2,6), 9.98 (s, 1H, CHO), 12.95 (br s, 1H, COOH).

Sinteza LJH-08 (N. Zidar et al. / *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 5512-5523)

Spojino **LJH-07** (1,40 g; 5,1 mmol) smo raztopili v diklorometanu (60 mL). Raztopini smo dodali trietilamin (1,42 mL; 10 mmol) in TBTU (1,69 g; 5,6 mmol). Raztopino smo mešali 15 minut, nato smo dodali trietilamin (0,71 mL; 5,1 mmol) in H-D-Glu(OMe)OMe·HCl

(1,077 g; 5,1 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Nato smo reakcijsko zmes zapored spirali z vodo (2 x 50 mL), z 1M HCl (2 x 50 mL) z NH₄Cl (3 x 50 mL) z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 x 50 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (50 mL). Organsko fazo s produktom **LJH-08** smo sušili z Na₂SO₄, filtrirali in odparili topilo pri znižanem tlaku. Produkt smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije. Kot mobilno fazo smo uporabili etilacetat:heksan=1:1.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.95–2.19 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 2.46 (t, 2H, ³*J* = 7.5 Hz, CHCH₂CH₂), 3.59 (s, 3H, CH₃), 3.65 (s, 3H, CH₃), 4.44–4.51 (m, 1H, CHCH₂CH₂), 5.29 (s, 2H, CH₂), 7.36–7.41 (m, 1H, Ar-H), 7.52–7.59 (m, 5H, Ar-H), 7.91 (d, 2H, ³*J* = 8.4 Hz, Ar-H-2,6), 8.76 (d, 1H, ³*J* = 7.5 Hz, NH), 9.98 (s, 1H, CHO).

4.2.2. Sidranje potencialnih tiopirano[2,3-*d*]tiazolnih zaviralcev ligaze MurD

i. Priprava končnih struktur načrtovanih ligandov

Končne strukture načrtovanih ligandov (Preglednica IV) smo sestavili tako, da smo različno kombinirali heterociklični del, to je 7-ariliotipirano[2,3-*d*]tiazol (Preglednica IV; a)) in spojine **LJH-01**, **LJH-02**, **LJH-06** ter **LJH-08**, ki vsebujejo D-Glu (Preglednica III). 2D strukture, narisane s pomočjo ChemBioDraw Ultra 13.0, smo pretvorili v 3D strukture. Generirane 3D strukture molekul smo nato geometrijsko minimizirali s pomočjo molekulske mehanike z uporabo polja sil MM2. Dobljene strukture smo še naprej energijsko minimizirali s semiempirično metodo PM3 s pomočjo programa GAMESS v ChemBio3D Ultra 13.0. Tako pripravljene ligande smo shranili v obliki *.mol2 formata, ki vključuje zapis koordinat atomov (x,y,z), vezi med njimi, tipe atomov in vezi.

ii. Priprava proteina

Protein smo pridobili v banki proteinov z oznako PDB: 2Y66, ki je v kristalni strukturi imel vezan inhibitor **III**. Protein smo pripravili s pomočjo grafičnega vmesnika programa GOLD, tako da smo mu dodali manjkajoče vodikove atome, izbrisali molekule vode in prisotne ligande iz kristalne strukture. Vezavno mesto za sidranje smo definirali kot aminokislinske ostanke v razdalji 10 Å okrog inhibitorja iz kristalne strukture.

iii. Sidranje načrtovanih ligandov

Pripravljeno datoteko s tridimenzionalnimi, energijsko minimiziranimi strukturami načrtovanih ligandov smo sidrali v prej določeno vezavno mesto pripravljenega proteina. Kot cenilno funkcijo smo uporabili GOLDSCORE s privzetimi nastavitevami genetskega algoritma (učinkovitost iskanja: 100%), ki ga je program ponovil stokrat za vsak ligand. Ker imajo ligandi v svoji strukturi D-Glu, za katero je poznano njeno vezavno mesto iz kristalnih struktur, smo s pomočjo farmakofornih zahtev definirali, kam naj se D-Glu liganda veže (*constraints → scaffold*). Program je tako bolje ocenil tiste ugodne konformacije, ki so imele pravilno izračunan položaj D-Glu. Tako smo dobili 100 različnih rešitev, torej izračunanih poz ligandov v vezavnem mestu, ki so se razlikovale tako po konformaciji kot tudi po njihovem položaju in orientaciji v vezavnem mestu.

4.2. Virtualno rešetanje knjižnice heterocikličnih spojin

i. Priprava knjižnice spojin za sidranje

Knjižnico spojin v elektronski obliki smo pridobili od prof. dr. Romana Lesyka iz Danylo Halytsky Lviv National Medical University v Ukrajini. Knjižnica vsebuje 4610 heterocikličnih spojin, ki so na voljo za biološko vrednotenje.

Program OpenBabel smo uporabili za pretvorbo zapisa molekul iz 2D v 3D, pri čemer je program dodal manjkajoče vodikove atome in generiral 3D koordinate molekul.

ukaz: `babel -isdf Lesyk_library.sdf -omol2 Lesyk_library_3D.mol2 -h --gen3d`
-isdf - vstopna datoteka z zapisom molekul v *sdf* obliki
-omol2 – izstopna datoteka z zapisom molekul v *mol2* obliki
-h – doda vodikove atome
--gen3d – generira 3D koordinate

Program Filter smo uporabili za filtriranje knjižnice spojin po pravilih, ki jih je postavil Lipinski, in veljajo za večino zdravilnih učinkovin.

ukaz: `filter -in Lesyk_library_3D.mol2 -out Lesyk_library_3D_filtered.mol2 -filter filter.txt`

Pravila za filtriranje so bila zapisana v datoteki *filter.txt*.

V knjižnici spojin smo tako ohranili ligande, ki so imeli molsko maso med 200 in 500, med 15 in 35 težkih atomov (vsi atomi razen H), največ 5 obročev, največ 20 vrtljivih vezi, največ 35 rigidnih vezi, največ 5 donorjev in največ 10 akceptorjev vodikovih vezi in maksimalno izračunano logP vrednost 5.0. Knjižnico spojin smo tako zmanjšali na 2358 molekul, ki niso kršile omenjenih pravil več kot enkrat. Te spojine smo nato uporabili za virtualno rešetanje.

ii. Priprava proteina

Protein smo pridobili v banki proteinov z oznako PDB: 2Y66, ki je v kristalni strukturi imel vezan inhibitor **III**. Najprej smo pripravili protein s pomočjo grafičnega vmesnika programa GOLD, tako da smo mu dodali manjkajoče vodikove atome, izbrisali molekule vode in prisotne ligande iz kristalne strukture. Vezavno mesto za sidranje smo definirali kot aminokislinske ostanke v razdalji 6 Å okrog inhibitorja iz kristalne strukture.

iii. Sidranje spojin v aktivno mesto encima ligaze MurD

Pripravljeno, filtrirano knjižnico spojin smo sidrali s programom GOLD v predhodno pripravljen protein (PDB koda: 2Y66), ki smo ga uporabili že za sidranje načrtovanih tiopirano[2,3-*d*]tiazolov, tokrat brez določenih farmakofornih zahtev. Molekule smo sidrali v vezavno mesto za nukleotidni substrat encima ligaze MurD iz bakterije *Escherichia coli*, ki smo ga predhodno določili. Uporabili smo cenilno funkcijo CHEMPLP in privzete parametre genetskega algoritma za virtualno rešetanje (učinkovitost iskanja: 30%), ki ga je program ponovil desetkrat za vsak ligand. Za pregled rezultatov smo shranili samo najboljše ocenjeno ugodno konformacijo vsakega liganda. Vizualno smo pregledali 30 najbolje rangiranih spojin. Od pregledanih spojin so nam iz Danylo Halytsky LNMU, kjer smo pridobili knjižnico spojin, poslali 15 spojin, ki so jih izbrali glede na rangiranje in razpoložljivost spojin.

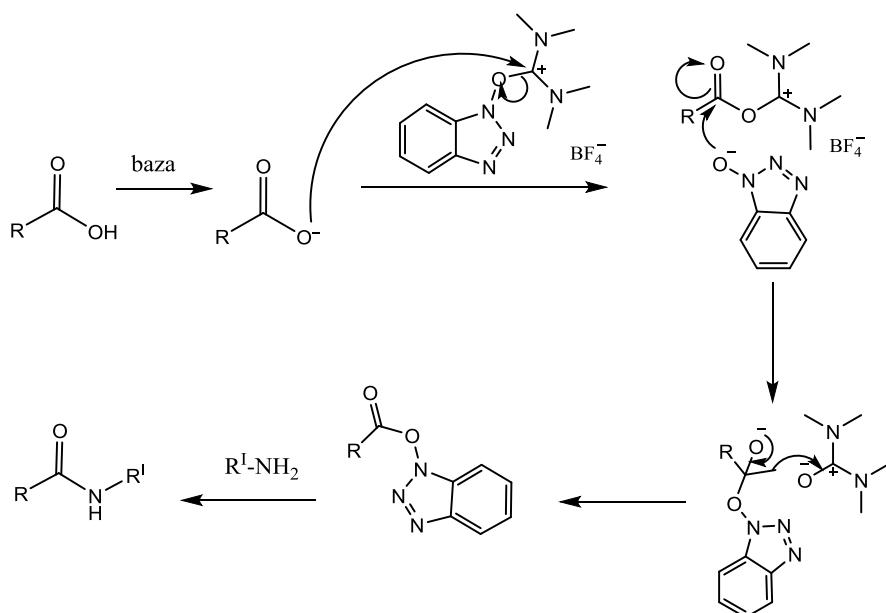
5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. Rezultati in razprava strukturno podprtega načrtovanja tiopiran[2,3-*d*]tiazolov

5.1.1. Rezultati sinteze aldehidov

- Sinteza spojin **LJH-01** in **LJH-02** je potekla v eni stopnji (Slika 6):

Izvedli smo tvorbo amidne vezi s sklopitvenim reagentom TBTU (Slika 8). TBTU je pri sobni temperaturi, ob prisotnosti trietylamina, aktiviral karboksilno skupino *para*- oz *meta*-karboksi substituiranega benzaldehyda. Pri tem je nastal intermedijat, ki je v nadaljevanju reagiral z amino skupino dimetilnega estra D-glutaminske kisline.



Slika 8 Mehanizem tvorbe amidne vezi v prisotnosti sklopitvenega reagenta TBTU.

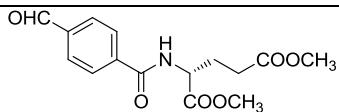
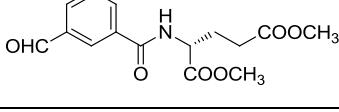
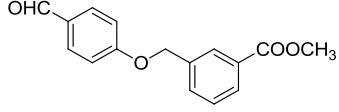
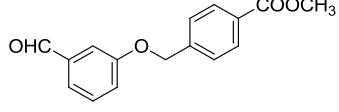
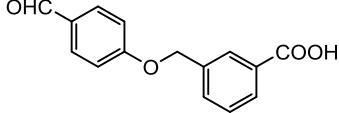
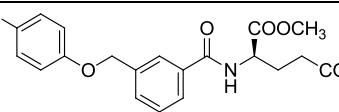
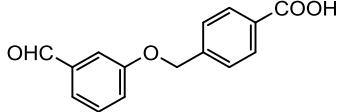
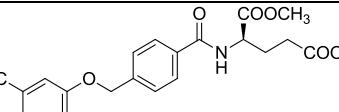
- Sinteza spojin **LJH-06** in **LJH-08** je potekla v večih stopnjah (Slika 7):

V prvi stopnji je potekla Williamsova sinteza etrov, pri kateri je kalijev karbonat kot baza odcepil proton iz $-\text{OH}$ skupine hidroksibenzaldehyda, kalijev jodid pa je preko nukleofilne substitucije bromometilbenzoata do jodometylbenzoata povečal elektrofilnost $-\text{CH}_2$ skupine. Potekla je nukleofilna substitucija med bromo- oz jodo- metilbenzoatom in karboksibenzaldehydom, pri čemer sta nastali spojini **LJH-03** in **LJH-04**.

V drugi stopnji smo odščitili zaščito karboksilne skupine, pri čemer je potekla alkalna hidroliza estrov. Po hidrolizi z NaOH je najprej nastala natrijeva sol karboksilne skupine, ki smo jo s HCl pretvorili v nedisociirano obliko. Dobili smo spojini **LJH-05** in **LJH-07**. V zadnji stopnji smo izvedli tvorbo amidne vezi s sklopitvenim reagentom TBTU. Spojinam **LJH-05** in **LJH-07** smo dodali dimetilni ester D-glutaminske kisline. Mehanizem reakcije je opisan zgoraj. Produkta reakcije sta spojini **LJH-06** in **LJH-08**.

Preglednica III Strukture sintetiziranih aldehidov.

***LJH-01, LJH-02** (mobilna faza je etilacetat); **LJH-03** do **LJH-08** (mobilna faza je etilacetat/heksan=1/1)

Oznaka	Struktura	Molska masa [g/mol]	Masa [g]	Izkoristek [%]	Rf*
LJH-01		307,30	2,20	64,27	0,58
LJH-02		307,30	1,68	49,05	0,16
LJH-03		270,28	2,90	81,98	0,43
LJH-04		270,28	2,99	84,32	0,51
LJH-05		256,25	1,27	84,44	0,07
LJH-06		413,42	0,60	30,49	0,17
LJH-07		256,25	1,40	98,80	0,09
LJH-08		413,42	0,81	35,79	0,18

5.1.2. Rezultati sidranja načrtovanih tiopirano[2,3-*d*]tiazolov

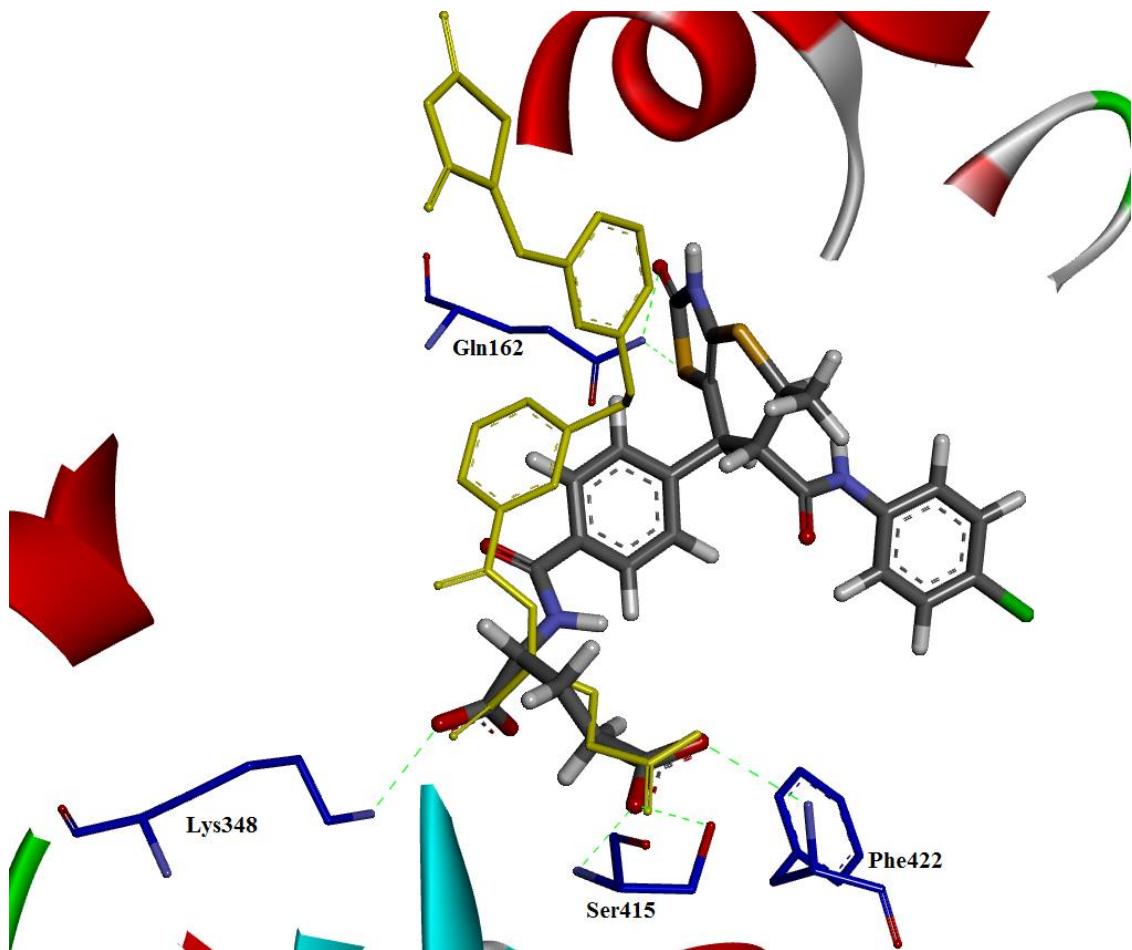
Po končanem sidranju 20 spojin v vezavno mesto ligaze MurD iz *E. coli* (PDB: 2Y66) in izračunu cenilne funkcije za vsako ugodno konformacijo, smo pregledali 10 najboljše ocenjenih ugodnih konformacij vsakega liganda.

Program GOLD je pri sidranju spojin v vezavno mesto proteina upošteval naslednje aminokislinske ostanke: Ile11, Gly12, Leu13, Gly14, Thr16, Gly17, Met34, Asp35, Thr36, Arg37, Pro40, Pro41, Leu57, Ser71, Pro72, Gly73, Ile74, Lys115, Asn138, Ser159, Phe161, Gln162, Asp182, His183, Arg186, Ser318, Lys319, Thr321, Asn322, Asp346, Lys348, Cys413, Ala414, Ser415, Leu416, Phe419, Lys420, Asn421, Glu423, Arg425.

Kot smo opisali, je program GOLD ob uporabi cenilne funkcije GOLDSCORE na podlagi predhodno določenih farmakofornih zahtev, bolje ocenil tiste poze, ki so imele pravilno izračunan položaj D-Glu v vezavnem mestu. Glede na predhodne nastavitve programa, se D-Glu del vseh načrtovanih spojin veže v vezavno mesto za D-Glu.

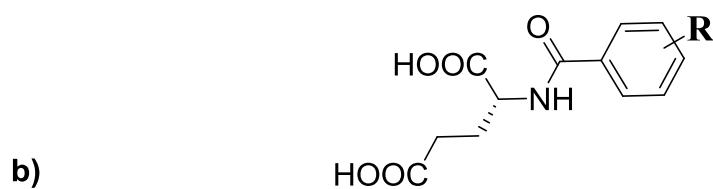
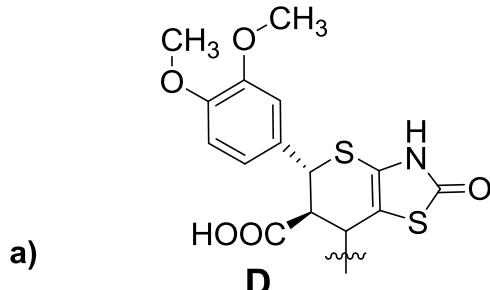
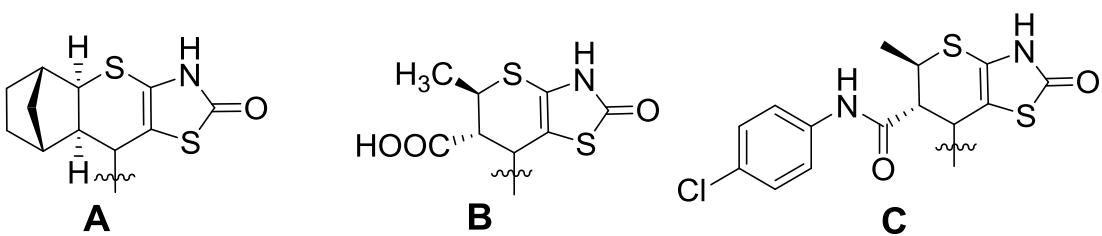
Največje vrednosti cenilne funkcije imajo spojine **11 – 20** (Preglednica IV, c)) z dvema fenilnima obročema. Te spojine vključujejo daljše aldehyde (**LJH-06** in **LJH-08**), vendar so na podlagi rezultatov sidranja in predhodnih raziskav potencialnih inhibitorjev MurD takšne spojine predolge za optimalno prileganje v aktivno mesto encima. Prav tako imajo te spojine veliko molsko maso, kar ima lahko za posledico neprimerne ADME lastnosti. Primernejše za biološko vrednotenje se nam zdijo spojine, ki vključujejo aldehyde z enim fenilnim obročem (**LJH-01** in **LJH-02**) (Preglednica IV, b)) in se glede na rezultate sidranja bolje prilegajo v vezavno mesto encima MurD. Med temi spojinami ima največjo vrednost cenilne funkcije spojina **3** (Slika 9). Program je izračunal, da spojina **3** v aktivnem mestu tvori vodikove vezi z Lys348, s Phe422 in s Ser415 v D-Glu žepu. Vodikovo vez z Gln162 pa tvori heterociklični del spojine v vezavnem mestu za nukleotidni substrat. Spojina se slabo prilega z eksperimentalno določeno konformacijo tiazolidin-2,4-dionskega inhibitorja **III**. Razlog so verjetno sterične ovire, ker spojina **3** vsebuje dodatni 4-klorofenilni obroč v heterocikličnem delu spojine. Najbolj se inhibitorju **III** prilega spojina **10**. Glede na vrednosti cenilne funkcije so uspešnejše spojine z 1,3 substitucijo fenilnega obroča (Razpredelnica IV, b))

Za določanje inhibitorne aktivnosti na ligazi MurD iz *E. coli*, smo izbrali ligande **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9** in **10**.

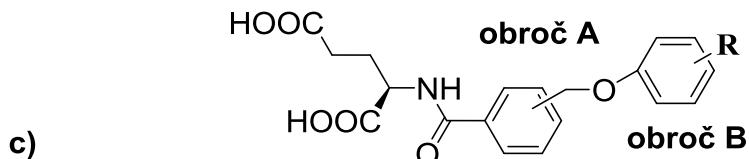


Slika 9 Prikazane so vodikove vezi (označene z zeleno črtkano črto), ki jih tvori spojina **3** z aminokislinskimi ostanki (označeni z modro) v aktivnem mestu encima MurD iz *E. coli* ter prekrivanje spojine **3** in liganda (inhibitor **III**, označen z rumeno) iz kristalne strukture.

Preglednica IV Končne strukture načrtovanih tiopirano[2,3-*d*]tiazolov.



Spojina	R	Substitucija	Molska masa [g/mol]	Vrednost cenilne funkcije (GOLDSCORE)
1	A	1,4	488,11	55,70
2	B	1,4	480,07	59,87
3	C	1,4	589,07	70,19
4	D	1,4	602,10	69,09
5	E	1,4	550,05	64,19
6	A	1,3	488,11	60,69
7	B	1,3	496,10	63,54
8	C	1,3	605,11	68,18
9	D	1,3	602,10	65,51
10	E	1,3	566,08	63,93



Spojina	R	Substitucija		Molska masa [g/mol]	Vrednost cenilne funkcije (GOLDSCORE)
		Obroč A	Obroč B		
<u>11</u>	A	1,3	1,4	578,17	70,23
<u>12</u>	B	1,3	1,4	586,11	79,74
<u>13</u>	C	1,3	1,4	695,12	80,56
<u>14</u>	D	1,3	1,4	724,18	82,43
<u>15</u>	E	1,3	1,4	656,09	81,75
<u>16</u>	A	1,4	1,3	580,19	75,32
<u>17</u>	B	1,4	1,3	572,09	71,55
<u>18</u>	C	1,4	1,3	697,13	71,70
<u>19</u>	D	1,4	1,3	710,16	82,12
<u>20</u>	E	1,4	1,3	642,08	72,91

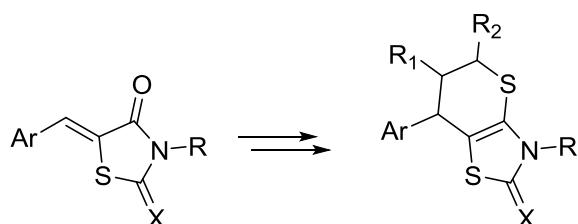
5.1.3. Razprava

Načrtovanje in sinteza tiopirano[2,3-*d*]tiazolov kot novih protibakterijskih in protitumornih spojin je del projekta z raziskovalci iz Danylo Halytsky Lviv National Medical University iz Ukrajine.

Potencialne tiopirano[2,3-*d*]tiazolne zaviralce ligaze MurD smo načrtovali na podlagi derivatov 4-tiazolidinona, ki so znan razred biološko aktivnih spojin, pri čemer je predvsem izraženo njihovo protibakterijsko, protitumorno in protivirusno delovanje (68).

V predhodnih raziskavah ukrajinskih partnerjev so odkrili, da imajo tudi tiopirano[2,3-*d*]tiazoli različno farmakološko delovanje (69). Spojine tega strukturnega tipa lahko obravnavamo kot rigidizirane tiazolidinone v kondenziranem heterocikličnem sistemu. 5-Iilden-4-tiazolidinoni, ki smo jih predstavili v uvodu, so zaradi eksociklične dvojne vezi elektrofilni in potencialno reaktivni, saj se lahko preko Michaelove adicije na omenjeno dvojno vez vežejo nukleofilni aminokislinski ostanki proteinov. Zaradi te neželene lastnosti 5-iliden-4-tiazolidinonov so spojine tega tipa pogosto zadetki rešetanja spojin na različne biološke tarče in jih moramo kot take kritično vrednotiti v procesu odkrivanja novih učinkovin, saj so lahko reaktivne in ne izkazujejo zadostne selektivnosti napram

drugim tarčam. Tako lahko tiopirano[2,3-*d*]tiazoli predstavljajo ciklične izosterne mimetike njihovih sinteznih prekurzorjev 5-Iilden-4-tiazolidinonov (Slika 10), ki zaradi odsotnosti eksociklične dvojne vezi niso več podvrženi Michaelovi adiciji in so zato manj reaktivni ter potencialno bolj selektivni. Ker so derivati 4-tiazolidinonov in tiopirano[2,3-*d*]tiazolov spojine z različnim farmakološkim delovanjem, jih je smiselno vgrajevati tudi v spojine s potencialnim protibakterijskim delovanjem.



Slika 10 Modifikacija 5-aryliden-4-tiazolidinona do 7-aryltiopirano[2,3-*d*]tiazola.

Cilj načrtovanja in sinteze tiopirano[2,3-*d*]tiazolov je raziskati protibakterijsko delovanje heterociklov (Preglednica IV, a)) na tarči ligazi MurD iz *E. coli*. V ta namen smo uporabili znane strukturne fragmente, ki vključujejo D-Glu. Aldehydi, ki smo jih sintetizirali (**LJH-01, LJH-02, LJH-06 in LJH-08**), so bili že predhodno načrtovani in vgrajeni v spojine, ki so derivati rodaninskih in tiazolidin-2,4-dionskih inhibitorjev ligaz MurD.

Na podlagi predhodnih raziskav ter po pregledu spojin, sidranih v aktivno mesto encima, smo ugotovili, da so spojine **11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 in 20** z dvema fenilnima obročema predolge za optimalno prileganje v aktivno mesto encima in jim zato ne bodo odločali inhibitorne aktivnosti na ligazi MurD iz *E. coli*. Sintetizirali jih bodo, ker bo vrednotenje farmakološkega delovanja načrtovanih tiopirano[2,3-*d*]tiazolov med drugim potekalo tudi na National Cancer Institute (ZDA), kjer bodo ugotavljeni njihovo protitumorno delovanje.

Končnih struktur načrtovanih tiopirano[2,3-*d*]tiazolnih zaviralcev ligaz MurD še nismo uspeli sintetizirati, zato jih nismo mogli biološko ovrednotiti oziroma določiti inhibitorno aktivnost na ligazi MurD.

5.2. Rezultati rešetanja knjižnice heterocikličnih spojin in razprava

5.2.1. Rezultati sidranja knjižnice spojin

Najprej smo filtrirali knjižnico 4610 heterocikličnih spojin, ki smo jo pridobili iz Danylo Halytsky LNMU. S programom Filter smo jo skrčili na 2358, pri čemer smo odstranili spojine, ki niso ustrezale pravilom Lipinskega, ki so značilne za zdravilne učinkovine. Te spojine smo uporabili za virtualno rešetanje. S programom GOLD smo jih sidrali v vezavno mesto za nukleotidni substrat encima MurD iz *E. coli*. S programom Accelrys Discovery Studio smo pregledali 30 najboljših zadetkov. Raziskovalci iz Ukrajine, od katerih smo pridobili knjižnico heterocikličnih spojin, so nam glede na razpoložljivost poslali 15 od 30 izbranih spojin. Testirali smo jih *in vitro* na encimu MurD iz *E. coli*. Največji odstotek inhibicije encima pri koncentraciji 100 µM je dosegla spojina **27**, in sicer 22%.

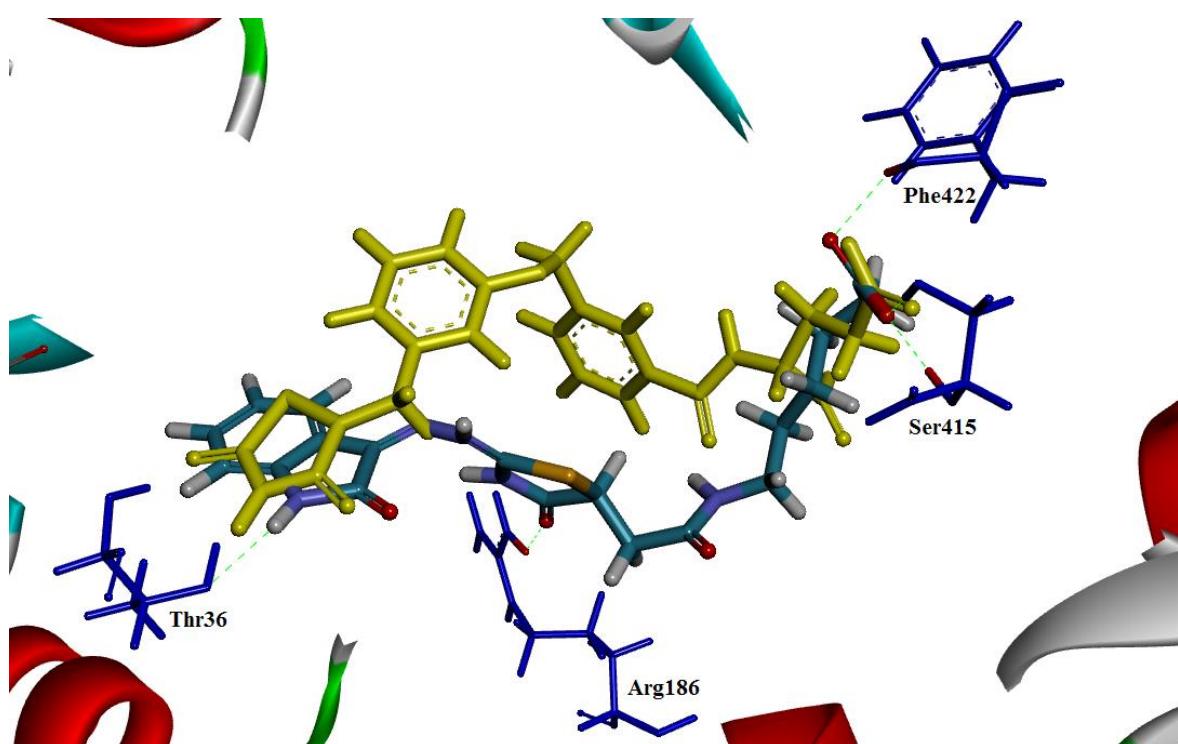
Kristalna struktura encima (PDB koda: 2Y66) ima vezan inhibitor **III** (način vezave v aktivnem mestu smo opisali v uvodu), kar nam je pomagalo pri vrednotenju načina vezave sidranih spojin v aktivnem mestu.

Najvišjo vrednost cnilne funkcije ima spojina **21** (Preglednica V), kar lahko pojasnimo s podobno tvorbo vodikovih vezi (Slika 11), kot pri inhibitorju **III** (Slika 5). Spojina v vezavnem mestu tvori vodikove vezi s Phe422, s Ser415, z Arg186 in s Thr36. Če analiziramo prileganje spojine **21** glede na inhibitor **III**, vidimo, da se spojina relativno dobro prilega s polarnim heterocikličnim delom v vezavnem mestu za nukleotidni substrat in s kislinskim delom v vezavnem mestu za D-Glu, kar lahko razložimo s strukturno podobnostjo tega dela spojine. Osrednji del spojine **21**, ki je bolj polaren, ne tvori hidrofobnih interakcij in se zaradi tega verjetno ne prilega z inhibitorjem **III**, ki vsebuje dva fenilna obroča.

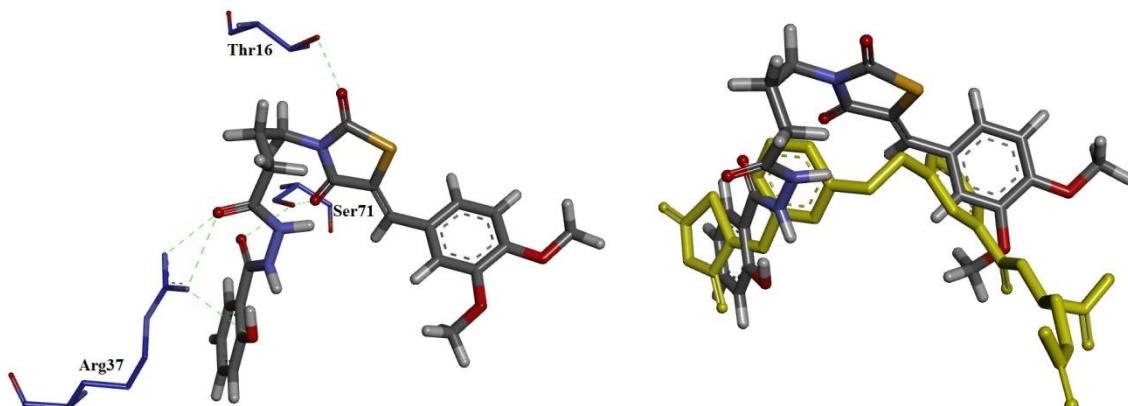
Najvišji odstotek inhibicije je dosegla spojina **27** (Preglednica V), kar pa se ne sklada z vrednostjo cnilne funkcije. V vezavnem mestu tvori vodikove vezi z Arg37, s Ser71 in s Thr16 (Slika 12). Spojina tvori vodikove vezi le v osrednjem delu strukture, ki vsebuje polarni tiazolidin-2,4-dionski obroč. V strukturi nima kislinskega dela, zato v vezavnem mestu za D-Glu ne tvori vodikovih vezi. Če primerjamo spojino z inhibitorjem **III**, ne opazimo strukturnih podobnosti, zato ne moremo trditi, da se spojini prilegata.

Spojine **25**, **28** in **34** so se nam glede na strukturo zdele najbolj obetavne, ker imajo v svoji strukturi D-Glu del, ki velja za ključni fragment pri do sedaj raziskanih inhibitorjih MurD.

Vse tri spojine se dobro prilegajo samo v vezavno mesto za D-Glu, kjer tvorijo podobne interakcije kot inhibitor **III**. Te spojine so krajše in strukturno različne glede na inhibitor **III**, kar je verjeten razlog, da se ostali deli spojin ne prilegajo v vezavno mesto encima in ne tvorijo ustreznih interakcij z aminokislinskimi ostanki proteina.



Slika 11 Prikazane so vodikove vezi (označene z zeleno črtkano črto), ki jih tvori spojina **21** z aminokislinskimi ostanki (označeni z modro) v aktivnem mestu encima MurD iz *E. coli* ter prekrivanje spojine **21** in liganda (inhibitor **III**, označen z rumeno) iz kristalne strukture.



Slika 12 Prikazane so vodikove vezi (označene z zeleno črtkano črto), ki jih tvori spojina **27** z aminokislinskimi ostanki (označeni z modro) v aktivnem mestu encima MurD iz *E. coli* (levo) ter prekrivanje spojine **27** in liganda (inhibitor **III**, označen z rumeno) iz kristalne strukture (desno).

5.2.2. Komentar rezultatov testiranja spojin

V okviru projekta z Danylo Halytsky LNMU smo dobili priložnost uporabe knjižnice različnih heterociklov, ki vsebujejo žveplo in dušik, sintetizirane na omenjeni univerzi, za virtualno rešetanje napram protibakterijskim terčam. Po končanem sidranju knjižnice heterocikličnih spojin in pregledu 30 najvišje rangiranih spojin smo pridobili 15 spojin, ki so jim določili inhibitorno aktivnost *in vitro* na encimu MurD iz *E. coli*.

Spojine so zaradi svojih fizikalno-kemijskih lastnosti oteževale testiranje. Nekatere so se obarvale pri raztpljanju v topilu, nekatere pa so se obarjale že pri nizki koncentraciji, zato so bile spojine testirane pri koncentraciji 100 μM . Spojina **24** se je pri merjeni koncentraciji že oborila, zato je bilo testiranje te spojine onemogočeno. Rezultati so pokazali, da nobena od testiranih spojin ne izkazuje dobre inhibitorne aktivnosti (Preglednica V), saj nobena ne dosega več kot 50% inhibicijo poteka encimske reakcije. Rezultate smo podali kot % inhibicije (% inhibicije = 100% - RA).

Če primerjamo inhibitorne vrednosti testiranih spojin in rezultate sidranja spojin v aktivno mesto encima MurD, ugotovimo, da se le-ti ne skladajo. Najboljšo inhibitorno vrednost je dosegla spojina **27** in znaša 22%. Pri spojinah **25**, **28** in **34**, ki v svoji strukturi vsebujejo D-Glu del, smo pričakovali največjo inhibitorno aktivnost, vendar so se izkazale za neaktivne, najvišja vrednost inhibicije znaša 5%. Inhibitorne aktivnosti v tem primeru ne moremo pojasniti s sidranjem spojin v vezavno mesto encima.

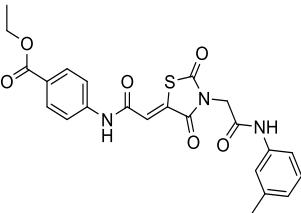
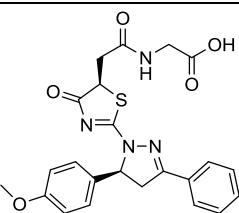
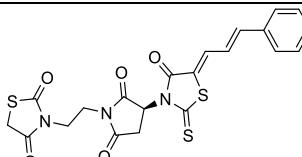
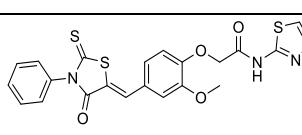
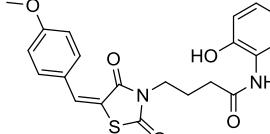
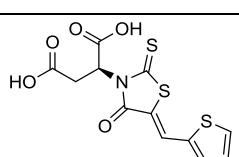
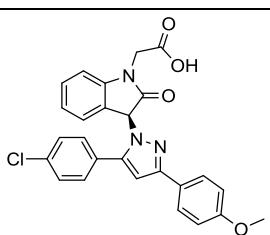
Eden od razlogov za neaktivnost spojin kot inhibitorjev ligaze MurD so velike strukturne razlike med spojinami in inhibitorjem **III**. Kot smo v uvodu opisali, poteka načrtovanje inhibitorjev ligaze MurD v smeri iskanja mimetikov produkta encimske reakcije, to je UDPMurNAc-L-Ala-D-Glu (UMAG). Za najuspešnejše so se izkazali tiazolidin-2,4-dionski in rodaninski derivati, ki se s heterocikličnim delom vežejo v vezavno mesto za nukleotidni substrat, z D-Glu delom spojine pa v D-Glu žep encima. Predvsem prisotnost D-Glu v strukturi inhibitorjev se zdi ključna za inhibitorno delovanje, saj je znanih le malo inhibitorjev MurD, ki nimajo tega strukturnega elementa. Vmesnik med strukturnima deloma vsebuje dva fenilna obroča in tvori hidrofobne interakcije v aktivnem mestu. Določene testirane spojine, kot so **25**, **28** in **34** imajo omenjene strukturne fragmente, vendar ne ustrezajo strukturnim zahtevam, ki so bile ugotovljene pri razreševanju različnih kristalnih struktur encimov ligaz MurD z vezanimi ligandi v aktivnem mestu. Druga slabost testiranih spojin je tudi velika molekulska masa, ki večinoma ne ustreza "lead-like" oziroma "drug-like" lastnostim, zato je te spojine težko optimizirati.

Pridobljene inhibitorne vrednosti, ki smo jih pridobili z rešetanjem knjižnice heterocikličnih spojin, niso primerljive z želenimi vrednostmi, ki se nahajajo v nizkem mikromolarnem koncentracijskem območju. Nobeni raziskovalni skupini, ki se ukvarja z iskanjem inhibitorjev ligaze MurD še ni uspelo sestaviti spojine, ki bi bila primerna za klinično testiranje (66), zato so dobrodošli vsakršni novi rezultati iz tega področja.

Vzrok za neuspelo virtualno rešetanje je verjetno več. Med njimi je zagotovo izbor knjižnice za rešetanje, saj lahko knjižnica ne vsebuje nobene aktivne spojine. Z virtualnim rešetanjem smo poskusili znižati stroške testiranja, ki bi nastali pri testiranju celotne knjižnice, tako da smo izbrali le nekaj spojin, za katere obstaja večja verjetnost, da bodo aktivne. Drugi vzrok je seveda lahko neprimeren protokol virtualnega rešetanja. Izbrali smo program GOLD, ki se je v preteklosti izkazal kot primeren program za predvidevanje vezave inhibitorjev v aktivno mesto ligaze MurD. Uporabljena cenilna funkcija sicer pravilno napove vezavno konformacijo znanih inhibitorjev MurD, vendar jih ne uspe pravilno razvrstiti glede na jakost inhibicije. Do podobnega problema je lahko prišlo tudi v našem primeru, torej cenilna funkcija ni uspela pravilno rangirati spojin v knjižnici in tako so bile vse testirane spojine neaktivne pri $100 \mu\text{M}$.

Preglednica V Spojine iz knjižnice, ki smo jim določali inhibitorno aktivnost. Koncentracija testiranih spojin je bila 100 µM (* spojina **24** se je oborila pri merjeni koncentraciji).

Oznaka	Struktura	M [g/mol]	Vrednost cenilne funkcije (CHEMPLP)	Inhibicija [%]
21		437,47	79,14	2
22		492,56	75,18	11
23		457,56	73,57	7
24		445,49	73,36	*
25		411,44	72,43	7
26		357,38	70,64	13
27		485,51	70,57	22
28		381,42	70,37	4

29		467,50	70,15	6
30		466,51	70,07	12
31		487,56	69,96	12
32		483,58	69,44	10
33		412,46	69,11	9
34		343,39	69,08	5
35		473,91	69,91	2

6. SKLEP

Potencialne inhibitorje ligaz MurD smo iskali s strukturno podprtим načrtovanjem tiopirano[2,3-*d*]tiazolov in s pomočjo virtualnega rešetanja knjižnice heterocikličnih spojin.

Pri sintezi potencialnih tiopirano[2,3-*d*]tiazolnih inhibitorjev ligaze MurD bodo za biološko testiranje na encimu MurD uporabili spojine **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9** in **10**, ki vključujejo dva od štirih sintetiziranih aldehydov, to sta **LJH-01** in **LJH-02**. Te spojine se bolje prilegajo v aktivno mesto encima od tistih, ki vključujejo aldehyda **LJH-06** in **LJH-08**.

Po pripravi in sidranju končnih ligandov v aktivno mesto encima MurD iz *E. coli* smo ugotovili, da je cenilna funkcija bolje ocenila ligande, ki vsebujejo dva fenilna obroča. Po vizualnem pregledu spojin in glede na prejšnje raziskave sklepamo, da so primernejši kandidati za *in vitro* testiranje tiste spojine, ki vsebujejo vmesnik z enim fenilnim obročem. Krajše spojine se namreč bolje prilegajo v vezavno mesto encima MurD.

Z virtualnim rešetanjem knjižnice heterocikličnih spojin nismo odkrili novih zaviralcev encima MurD iz *E. coli*. Z ustrezno pripravljeno knjižnico spojin in sidranjem v aktivno mesto encima smo izmed 30 najvišje rangiranih spojin 15 le-teh testirali *in vitro* pri koncentraciji 100 µM. Najvišji odstotek inhibicije je dosegla spojina **27**, ki znaša 22%.

Med testiranimi spojinami so tri vsebovale D-Glu del, ki velja za ključni element inhibitorjev ligaze MurD. Glede na pretekle študije mora struktura inhibitorja vsebovati D-glutaminsko kislino, ki je potrebna za vezavo v D-Glu žep in heterociklični del, s katerim se ligand veže v vezavno mesto za nukleotidni substrat encima ligaze MurD. Vmesni del strukture je hidrofobni, vsebuje fenilni obroč in je namenjen opitmizaciji. Iz naših rezultatov je razvidno, da sta tako D-Glu kot tudi ustrezni heterociklični del inhibitorja ključna za inhibitorno aktivnost. Spojine **25**, **28** in **34**, ki vsebujejo Glu v svoji strukturi in nimajo primerenega preostalega dela molekule, niso izkazovale aktivnosti. Podobno velja na primer za spojino **21**, ki glede na sidrano ugodno konformacijo tvori vodikove vezi v vezavnem mestu za UDP del nukleotidnega substrata, podobno kot inhibitor **III**, vendar ne vsebuje D-Glu in je bila prav tako neaktivna. Očitno sta za vezavo pomembni obe

Jasmina Horvat: Sinteza tiopiranato[2,3-*d*]tiazolov in uporaba virtualnega rešetanja pri odkrivanju novih zaviralcev ligaze MurD

karboksilni skupini D-Glu, saj samo ena, kot pri spojnini **21**, ni dovolj za želeno inhibitorno aktivnost.

7. LITERATURA

1. Lederberg J: Infectious history. *Science* **2000**, 288, 287-93.
2. Moellering RC: Jr. Past, present, and future of antimicrobial agents. *Am. J. Med.* **1995**, 99, 11S-18S.
3. Winau F, Westphal O, Winau R: Paul Ehrlich—in search of the magic bullet. *Microbes Infect.* **2004**, 6, 786-9.
4. Fernandes P: Antibacterial discovery and development—the failure of success? *Nat. Biotechnol.* **2006**, 24, 1497-503.
5. Walsh C: Where will new antibiotics come from? *Nat. Rev. Microbiol.* **2003**, 1, 65-70.
6. Projan SJ, Bradford PA: Late stage antibacterial drugs in the clinical pipeline. *Curr. Opin. Microbiol.* **2007**, 10, 441-6.
7. Projan SJ: Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, 6, 427-30.
8. So AD, Gupta N: Cars, O. Tackling antibiotic resistance. *BMJ* **2010**, 340, c2071.
9. Theuretzbacher U: Future antibiotics scenarios: is the tide starting to turn? *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, 34, 15-20.
10. Theuretzbacher U: Antibiotics: derivative drugs, novel compounds and the need for effective resistance strategies. *Future Microbiol.* **2009**, 4, 1243-7.
11. Moellering RC: Jr. Discovering new antimicrobial agents. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, 37, 2-9.
12. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ: How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, 8, 423-35.
13. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ: A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* **2007**, 130, 797-810.
14. Gusarov I, Shatalin K, Starodubtseva M, Nudler E: Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science* **2009**, 325, 1380-4.
15. Wright GD: The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, 5, 175-86.
16. Livermore DM: The need for new antibiotics. *Clin. Microbiol. Infect.* **2004**, 10 Suppl 4, 1-9.

17. Nordmann P, Naas T, Fortineau N, Poirel L: Superbugs in the coming new decade; multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.* and *Pseudomonas aeruginosa* in 2010. *Curr. Opin. Microbiol.* **2007**, 10, 436-40.
18. Rice LB: Unmet medical needs in antibacterial therapy. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 71, 991-5.
19. Patrick GL: An introduction to medicinal chemistry. 3rd ed.; Oxford university press inc., New York, **2005**; pp 41–65, pp 379–439.
20. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM: Medical microbiology, 10th ed.; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**, pp 146-228.
21. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA: Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, 32, 149-167.
22. Cabeen MT, Jacobs-Wagner C: Bacterial cell shape. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3, 601-10.
23. Tomašić T: Računalniško podprto načrtovanje in sinteza novih heterocikličnih zaviralcev ligaz Mur = Computer-aided design and synthesis of novel heterocyclic inhibitors of Mur ligases : doktorska disertacija. Ljubljana : [T. Tomašić], **2011**, 262
24. Fisher JF, Mobashery S: Host-guest chemistry of the peptidoglycan. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 4813-29.
25. Meroueh SO, Bencze KZ, Hesek D, Lee M, Fisher JF, Stemmler TL, Mobashery S: Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 4404-9.
26. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, 32, 168-207.
27. van Heijenoort J: Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 503-19.
28. Bouhss A, Trunkfield AE, Bugg TD, Mengin-Lecreux D: The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, 32, 208-33.
29. Bugg TD, Braddick D, Dowson CG, Roper DI: Bacterial cell wall assembly: still an attractive antibacterial target. *Trends Biotechnol.* **2011**.

30. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P: The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, 32, 234-58.
31. Eveland SS, Pompliano DL, Anderson MS: Conditionally lethal *Escherichia coli* murein mutants contain point defects that map to regions conserved among murein and foyl poly-gamma-glutamate ligases: identification of a ligase superfamily. *Biochemistry* **1997**, 36, 6223-9.
32. Bouhss A, Dementin S, Parquet C, Mengin-Lecreux D, Bertrand JA, Le Beller D, Dideberg O, van Heijenoort J, Blanot D: Role of the ortholog and paralog amino acid invariants in the active site of the UDP-MurNAc-L-alanine:D-glutamate ligase (MurD). *Biochemistry* **1999**, 38, 12240-7.
33. Bouhss A, Mengin-Lecreux D, Blanot D, van Heijenoort J, Parquet C: Invariant amino acids in the Mur peptide synthetases of bacterial peptidoglycan synthesis and their modification by site-directed mutagenesis in the UDP-MurNAc:L-alanine ligase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **1997**, 36, 11556-63.
34. Mol CD, Brooun A, Dougan DR, Hilgers MT, Tari LW, Wijnands RA, Knuth MW, McRee DE, Swanson RV: Crystal structures of active fully assembled substrate- and product-bound complexes of UDP-*N*-acetylmuramic acid:L- alanine ligase (MurC) from *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* **2003**, 185, 4152-62.
35. Bertrand JA, Auger G, Martin L, Fanchon E, Blanot D, Le Beller D, van Heijenoort J, Dideberg O: Determination of the MurD mechanism through crystallographic analysis of enzyme complexes. *J. Mol. Biol.* **1999**, 289, 579-90.
36. Bertrand JA, Auger G, Fanchon E, Martin L, Blanot D, van Heijenoort J, Dideberg O: Crystal structure of UDP-*N*-acetylmuramoyl-L-alanine:D-glutamate ligase from *Escherichia coli*. *EMBO J.* **1997**, 16, 3416-25.
37. Deva T, Baker EN, Squire CJ, Smith CA: Structure of *Escherichia coli* UDP-*N*-acetylmuramoyl:L-alanine ligase (MurC). *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2006**, 62, 1466-74.
38. Spraggon G, Schwarzenbacher R, Kreusch A, Lee CC, Abdubek P, Ambing E, Biorac T, Brinen LS, Canaves JM, Cambell J, Chiu HJ, Dai X, Deacon AM, DiDonato M, Elsliger MA, Eshagi S, Floyd R, Godzik A, Grittini C, Grzechnik SK, Hampton E, Jaroszewski L, Karlak C, Klock HE, Koesema E, Kovarik JS, Kuhn P, Levin I,

- McMullan D, McPhillips TM, Miller MD, Morse A, Moy K, Ouyang J, Page R, Quijano K, Robb A, Stevens RC, van den Bedem H, Velasquez J, Vincent J, von Delft F, Wang X, West, B, Wolf G, Xu Q, Hodgson KO, Wooley J, Lesley SA, Wilson IA: Crystal structure of an UDP-*N*-acetylmuramate-alanine ligase MurC (TM0231) from *Thermotoga maritima* at 2.3 Å resolution. *Proteins* **2004**, 55, 1078-81.
39. Basavannacharya C, Moody PR, Munshi T, Cronin N, Keep NH, Bhakta S: Essential residues for the enzyme activity of ATP-dependent MurE ligase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Cell* **2010**, 1, 1011-22.
40. Basavannacharya C, Robertson G, Munshi T, Keep NH, Bhakta S: ATP-dependent MurE ligase in *Mycobacterium tuberculosis*: biochemical and structural characterisation. *Tuberculosis (Edinb)* **2010**, 90, 16-24.
41. Gordon E, Flouret B, Chantalat L, van Heijenoort J, Mengin-Lecreux, D, Dideberg O: Crystal structure of UDP-*N*-acetyl muramoyl-L-alanyl-D-glutamate:meso-diaminopimelate ligase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 10999-1006.
42. Yan Y, Munshi S, Leiting B, Anderson MS, Chrzas J, Chen Z: Crystal structure of *Escherichia coli* UDP-MurNAc-tripeptide D-alanyl-D-alanine-adding enzyme (MurF) at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **2000**, 304, 435-45.
43. Bertrand JA, Fanchon E, Martin L, Chantalat L, Auger G, Blanot D, van Heijenoort J, Dideberg O: "Open" structures of MurD: domain movements and structural similarities with folylpolyglutamate synthetase. *J. Mol. Biol.* **2000**, 301, 1257-66.
44. Smith CA: Structure, function and dynamics in the mur family of bacterial cell wall ligases. *J. Mol. Biol.* **2006**, 362, 640-55.
45. Perdih A, Kotnik M, Hodosček M, Šolmajer T: Targeted molecular dynamics simulation studies of binding and conformational changes in *E. coli* MurD. *Proteins* **2007**, 68, 243-54.
46. Zidar N, Tomašić T, Šink R, Patin D, Blanot D, Contreras-Martel C, Dessen A, Premru MM, Zega A, Gobec S, Mašič PL, Kikelj D: New 5-benzylidenethiazolidin-4-one inhibitors of bacterial MurD ligase: Design, synthesis, crystal structures and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 5512-5523.
47. Klebe G: Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discov. Today* **2006**, 11, 580-94.
48. Shoichet BK.: Virtual screening of chemical librares. *Nature* **2004**, 432, 862-5.

49. Guido RVC, Oliva G; Andricopulo AD: Virtual screening and its intergration with modern drug design technologies. *Curr. Med. Chem.* **2008**, 15, 37-46.
50. Tang YT, Marshall GR: Virtual screening for lead discovery. *Methods Mol. Biol.* **2011**, 716, 1-22.
51. Davis AM, Teague SJ, Kleywegt GJ: Application and limitations of X-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, 42, 2718-36.
52. Santiago DN, Pevzner Y, Durand AA, Tran M, Scheerer RR, Daniel K, et al: Virtual target screening: validation using kinase inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52, 2192-203.
53. Bajorath J: Integraton of virtual and high-throughput screening. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 882-94.
54. Congreve M, Murray CW, Blundell TL: Keynote review: Structural biology and drug discovery. *Drug Discov. Today* **2005**, 10, 895-907.
55. <http://www.daylight.com/smiles/> Dostopano: oktober **2013**
56. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, 23, 3-25.
57. Oprea TI, Davis AM, Teague SJ, Leeson PD: Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, 41, 1308-15.
58. Nicholls A, McGaughey GB, Sheridan RP, Good AC, Warren G, Mathieu M, et al: Molecular shape and medicinal chemistry: a perspective. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 3862-86.
59. Miller MA: Chemical database techniques in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 220-7.
60. Mason JS, Goog AC, Martin EJ: 3-D Pharmacophores in Drug Discovery. *Curr. Pharm. Des.* **2001**, 7, 567-97.
61. Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendoloski JJ. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *J. Comb. Chem.* **1999**, 1, 55-68.

62. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J: Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 935-49.
63. Lyne PD: Structure-based virtual screening: an overview. *Drug Discov. Today* **2002**, 7, 1047-55.
64. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE: The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 235- 42.
65. Tomašić T, Zidar N, Šink R, Kovač A, Blanot D, Contreras-Martel C, Dessen A, Premru MM, Zega A, Gobec S, Kikelj D in Mašić PL: Structure-Based Design of a New Series of D-Glutamic Acid Based Inhibitors of Bacterial UDP-*N*-acetylmuramoyl-L-alanine:D-glutamate Ligase (Mur D). *J. Med. Chem.*, **2011**, 54, 4600-4610
66. Zidar N, Tomašić T, Šink R, Rupnik V, Kovač A, Turk S, Patin D, Blanot D, Contreras-Martel C, Dessen A, Premru MM, Zega A, Gobec S, Mašić PL, Kikelj D: Discovery of novel 5-benzylidenerhodanine and 5-benzylidenethiazolidine-2,4-dione inhibitors of MurD ligase. *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 6584-6594.
67. Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia O: An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* **1979**, 100, 95-97.
68. Tomašić T, Mašić PL: Rhodanine as a scaffold in drug discovery: a critical review of its biological activities and mechanisms of target modulation. *Expert Opin. Drug Discov.* **2012**, 7, 549-60.
69. Lesyk R, Zimenkovsky B, Atamanyuk D, Jensen F, Kiec-kononowicz K, Gzella A: *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 5230-5240.
70. http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Ders_Notlari/Karbon hidratlar.html Dostopano: oktober **2013**
71. <http://www.zzv-go.si/fileadmin/pdfdoc/OdpornostMikro.pdf> Dostopano: november **2013**