UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA BIRJUKOV

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA BIRJUKOV

SINTEZA KONJUGATOV 4,5,6,7-TETRAHIDROBENZOTIAZOLNIH ZAVIRALCEV DNA-GIRAZE S SIDEROFORI

SYNTHESIS OF 4,5,6,7-TETRAHYDROBENZOTHIAZOLE-BASED DNA GYRASE INHIBITOR - SIDEROPHORE CONJUGATES

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm. Spektroskopske meritve in ostale analize so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in na Institutu Jožef Stefan.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem svojem mentorju izr. prof. dr. Tihomirju Tomašiču za vso predano znanje, vodenje skozi eksperimentalno delo in kasnejše usmerjanje pri pisanju magistrske naloge.
Zahvale gredo tudi mojim staršem in sestri za vso podporo in spodbujanje med študijem in pisanjem magistrske naloge.
Na koncu pa bi se zahvalila še Lari in vsem ostalim prijateljicam in sošolkam, ki so mi tekom študija stale ob strani in naredile moje študijsko obdobje še veliko bolj zanimivo.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

Anja Birjukov

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.
Član diplomske komisije: asist. dr. Nejc Horvat, mag. farm.

KAZALO

KAZALO SLIK ..... **IV**

KAZALO TABEL ..... **IV**

Povzetek ..... **V**

Abstract ..... **VII**

Seznam okrajšav ..... **VIII**

1 Uvod **1**
1.1 Bakterijska rezistenca **1**
1.2 Topoizomeraze **2**
1.2.1 DNA-giraza 5
1.3 Siderofori **9**
1.3.1 Struktura sideroforov 10
1.3.2 Transport kompleksa železo-siderofor v po Gramu negativno bakterijo 10
1.3.3 Strategija trojanskega konja 11
1.3.4 Naravni in sintezni kompleksi siderofor-učinkovina 12

2 Namen in potek dela **13**
2.1 Sinteza zaviralcev DNA-giraze **13**
2.2 Sinteza sideroforov **14**
2.3 Sinteza konjugatov siderofor – zaviralec DNA-giraze **15**

3 Materiali in metode **16**
3.1 Reagenti in topila **16**
3.2 Metode **16**
3.2.1 Kromatografske metode 16
3.2.2 Spektroskopske metode 16
3.2.3 Tališča 17
3.2.4 Nomenklatura in risanje 17
3.2.5 Protibakterijska aktivnost 17
3.2.6 Encimski testi 17

4 Eksperimentalno delo **18**
4.1 Sinteza zaviralcev DNA-giraze **18**
4.1.1 Sinteza *terc*-butil (*S*)-(2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil) karbamata 18
4.1.2 Sinteza (*S*)-2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetan-1-aminijevega klorida 19
4.1.3 Sinteza metil (*S*)-3-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata 20
4.1.4 Sinteza (*S*)-3-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanojske kisline 21
4.2 Sinteza mimetikov sideroforov **22**
4.2.1 Sinteza 2-(hidroksimetil)-5-((4-metoksibenzil)oksi)-4*H*-piran-4-ona 22
4.2.2 Sinteza 5-((4-metoksibenzil)oksi)-4-okso-4*H*-piran-2-karboksilne kisline 23
4.2.3 Sinteza 5-((4-metoksibenzil)oksi)-4-okso-1,4-dihidropiridin-2-karboksilne kisline 24
4.2.4 Sinteza 2-(hidroksimetil)-5-((4-metoksibenzil)oksi)piridin-4(1*H*)-ona 25
4.2.5 Sinteza 4-metoksibenzil 4,5-bis((4-metoksibenzil)oksi)pikolinata 26
4.2.6 Sinteza (4,5-bis((4-metoksibenzil)oksi)piridin-2-il)metanola 27
4.3 Sinteza konjugatov **29**

4.3.1 Sinteza (*S*)-*N*-(2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)-5-((4-metoksibenzil)oksi)-4-okso-1,4-dihidropiridin-2-karboksamida ... 29
4.3.2 Sinteza (*S*)-3,4-dikloro-*N*-(2-(2-(3,4-dihidroksibenzamido)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-6-il)-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamida ... 31
4.3.3 Sinteza (*S*)-3,4-dikloro-*N*-(2-(2-(2,3-dihidroksibenzamido)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-6-il)-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamida ... 32
4.3.4 Sinteza (*S*)-*N*-(2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)-5-hidroksi-4-okso-1,4-dihidropiridin-2-karboksamida ... 34
4.3.5 Sinteza (*S*)-N^1-(benziloksi)-N^3-(6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)malonamida ... 36

5 Rezultati in razprava ... 38
5.1 Komentar sinteznih postopkov ... 38
5.1.1 Sinteza sideroforov iz kojične kisline ... 38
5.1.2 Uvedba distančnika zaščitenega s *terc*-butil karbamatom ... 39
5.1.3 Alkalna hidroliza estra ... 40
5.1.4 Sinteza amidov s sklopitvenimi reagenti ... 41
5.2 Rezultati bioloških testiranj ... 42
5.2.1 Protibakterijsko delovanje ... 42
5.2.2 Encimski testi ... 44

6 Sklep ... 46

7 Literatura ... 48

KAZALO SLIK

Slika 1: Kovalentna vezava med segmentom DNA in tirozinom encima topoizomeraze I....4
Slika 2: Mehanizem delovanja topoizomeraz II....5
Slika 3: Mehanizem delovanja DNA-giraze....6
Slika 4: Struktura encima. Na sliki je razvidno vezavno mesto za ATP na podenoti GyrB. Na podenoti GyrA je vidno vezavno mesto za DNA....7
Slika 5: Najpomembnejši strukturni tipi sideroforov, ki kompleksirajo železo....10
Slika 6: Shematski prikaz prenosa kompleksa Fe^{3+}-siderofor v bakterijo....11
Slika 7: Shematska predstavitev konjugata siderofor-protibakterijska učinkovina....12
Slika 8: Načrtovana sinteza novega zaviralca DNA-giraze....13
Slika 9: Načrtovana sinteza mimetikov sideroforov....14
Slika 10: Načrtovana sinteza konjugatov učinkovina-siderofor....15
Slika 11: Mehanizem uvedbe zaščite PMB na kojično kislino....38
Slika 12: Nastanek Jonesovega reagenta....39
Slika 13: Mehanizem oksidacije s Jonesovim reagentom....39
Slika 14: Mehanizem odstranitve zaščitne skupine Boc z uporabo klorovodikove kisline....40
Slika 15: Mehanizem alkalne hidrolize estra....40
Slika 16: Mehanizem nastanka amidne vezi z uporabo sklopitvenih reagentov....41

KAZALO TABEL

Preglednica 1: *Delitev topoizomeraz*....3
Preglednica 2: *Nizkomolekularni zaviralci DNA-giraze*....9
***Preglednica 3**: Rezultati vrednotenja protibakterijskega delovanja*....42
***Preglednica 4**: Rezultati testiranja MIK (µM) pri najučinkovitejših spojinah.*....44
***Preglednica 5**: Rezultati encimskih testov izraženih kot rezidualna aktivnost pri različnih koncentracijah in vrednost IC_{50}.*....44
***Preglednica 6**: Rezultati zaviralne jakosti in IC_{50} spojin na DNA-girazi in topoizomerazi iz E. coli in S. aureus.*....45

Povzetek

Zaradi prekomerne uporabe protibakterijskih učinkovin v zadnjih desetletjih se je začela pojavljati rezistenca bakterij proti tem učinkovinam zato je ključnega pomena odkrivanje novih učinkovin, ki bodo delovale na nove tarče, in učinkovin, ki bodo delovale na že obstoječe tarče, vendar z drugačnim mehanizmom delovanja.

DNA-giraza je encim, ki ga uvrščamo med topoizomeraze tipa IIa. Delovanje DNA-giraze temelji na njeni vlogi pri reguliranju topoloških sprememb v molekuli DNA. Sestavljena je iz dveh podenot (GyrA in GyrB), ki tvorijo kompleks A_2B_2.

Eden najpogostejših razlogov za rezistenco bakterij proti protibakterijskim učinkovinam je nezmožnost učinkovin za prehajanje bakterijske celične stene in posledično zmanjšana znotrajcelična koncentracija na tarči učinkovine. Da bi se izognili omenjeni težavi, lahko uporabimo princip »trojanskega konja«, ki temelji na uporabi nizkomolekularnih organskih spojin imenovanih siderofori. Bakterije jih sintetizirajo in sprostijo v okolje ob pomanjkanju železa, kjer kompleksirajo železo iz okolice z visoko afiniteto in nato vstopijo nazaj v celico s specifičnim transportnim mehanizmom. Ob tvorbi kompleksa med sideroforom in učinkovino lahko izkoristimo omenjeni transportni mehanizem in se izognemo mehanizmu rezistence, ki temelji na slabi permeabilnosti skozi bakterijsko celično steno.

V okviru magistrske naloge smo zato načrtovali in sintetizirali nove konjugate med mimetiki sideroforov in zaviralci DNA-giraze. Najprej smo se lotili sinteze zaviralcev, na katere smo v naslednji stopnji pripeli distančnike, katerih naloga je povezovanje zaviralca DNA-giraze in mimetika siderofora. Nato je sledila sinteza mimetikov sideroforov, za katere smo uporabili kojično kislino kot izhodno spojino. V zadnji stopnji je sledila tvorba konjugatov. Predpostavili smo, da za delovanje znotraj bakterije ni potrebna odcepitev mimetika siderofora, saj smo slednjega vezali na terminalni del zaviralca DNA-giraze, ki je usmerjen proti topilu. Sintetizirali smo tri končne spojine, ki smo jim ovrednotili protibakterijsko delovanje in zaviralno aktivnost v encimskem testu. Najboljšo zavirano aktivnost na encimu sta imeli spojini **17** in **19**. Glede na rezultate protibakterijskega delovanja lahko zaključimo, da so spojine imele močnejše delovanje proti Gramu pozitivnim bakterijam in šibko delovanje proti Gramu negativnim bakterijam.

Ključne besede: DNA-giraza, siderofor, zaviralec, princip »trojanskega konja«, konjugati, bakterijska odpornost, protibakterijske učinkovine.

Abstract

Wide use of antibacterial agents in the last decade has led to increase in bacterial resistance. Therefore, the discovery of new drugs that act on new targets or already known targets, but with a different mechanism of action, is of great importance.

DNA gyrase is an enzyme belonging to the class of type IIa topoisomerases. It controls the topological changes of the DNA molecule during replication and translation. It is composed of two subunits (GyrA and GyrB) that make a complex A_2B_2.

One of the most common reasons for bacterial resistance is the inability of drugs to penetrate the bacterial cell wall, which lowers their concentration at the target. To try to surpass the mentioned problem we can use the »Trojan horse« approach. It is based on the use of small organic compounds called siderophores. These are synthesized inside the bacteria and are released into the extracellular environment, when they create complex with free iron with high affinity. The complex is then transported into the cell with specific transport mechanisms. By creating a conjugates between sidefophores and drugs we can use the mentioned transport system and therefore avoid the resistance of drugs that is based on low permeability through bacterial membrane.

In the context of this thesis we developed and synthesized conjugates between siderophore mimetics and inhibitors of DNA gyrase. The first step was to synthesise the inhibitors to which we then attached linkers, which enabled us to attach DNA gyrase inhibitors to siderophore mimetics. The next step was to synthesise siderophore mimetics from kojic acid. The final step of the synthesis was the formation of the conjugates. We made the assumption that for the activity inside the bacterial cell there was no need for cleavage of the siderophore mimetic, because it was bound to the terminal part of the inhibitor (directed to towards the solvent). We synthesized three final compounds, which we tested for their antibacterial and enzyme activity. Compounds **17** and **19** had the best enzyme activity. All synthesized final compounds exhibited stronger antibacterial activity against Gram-positive bacteria and weak antibacterial activity against Gram-negative bacteria.

Keywords: DNA gyrase, inhibitor, siderophore, »Trojan horse« principle, conjugates, bacterial resistance, antibacterial drugs.

Seznam okrajšav

ATP	adenozin-5'-trifosfat
ADPNP	5'-adenilil-β,γ-imidodifosfat
AK	aminokislina
BOC	*terc*-butiloksikarbonil
BOC-Gly	*N*-(*terc*-butiloksikarbonil) glicin
d	dublet
DDQ	2,3-dikloro-5,6-diciano-1,4-benzokinon
DMF	*N*,*N*-dimetilformamid
DKM	diklorometan
DMSO-d_6	devteriran dimetil sulfoksid
EDC	*N*-(3-(dietilamino)prop-1-il)-*N*'-etilkarbodiimid hidroklorid
EtOAc	etilacetat
G+ bakterija	po Gramu pozitivna bakterija
G- bakterija	po Gramu negativna bakterija
GyrA	podenota A DNA-giraze
GyrB	podenota B DNA-giraze
HOBt	1-hidroksibenzotriazol hidrat
IC_{50}	srednja inhibitorna koncentracija
J	sklopitvena konstanta
m	multiplet
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MS	masna spektrometrija
NMM	*N*-metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
OMR	receptorji na zunanji strani membrane (angl. outer membrane receptors)
PMBCL	4-metoksibenzil klorid
RA	rezidualna aktivnost
R_f	retencijski faktor
s	singlet

t	triplet
TFA	trifluoroocetna kislina
TLC	tankoplastna kromatografija
δ	kemijski premik

1 Uvod

Odkritje protibakterijskih učinkovin je imelo drastičen vpliv na razvoj medicine v boju proti številnim infekcijam in predstavlja eno ključnih odkritij sodobne medicine (1).

Protibakterijske učinkovine lahko delujejo na bakterije na dva načina. Lahko jih ubijejo in s tem delujejo baktericidno, lahko pa samo zavrejo njihovo rast in tako delujejo bakteriostatično. Prvi antibiotiki v terapevtski uporabi so bili naravnega izvora, proizvedeni s strani različnih bakterij in gliv. Skozi čas so začeli razvijati polsintezne antibiotike, ki so jih pridobili z modifikacijo naravnih antibiotikov (2).

Protibakterijske učinkovine delujejo v bakterijah na tri glavne tarče, ki so:

- Biosinteza bakterijske celične stene (antibiotiki, ki delujejo na to stopnjo, so β-laktami in vankomicin). Mehanizem delovanja temelji na zaviranju encima transpeptidaze, katerega naloga je sinteza polipeptidnega ogrodja bakterijske celične stene (β-laktami). Drugi mehanizem delovanja pa temelji na preprečevanju vgrajevanja gradnikov v polipeptidno verigo celične stene (vankomicin).
- Sinteza proteinov (antibiotiki, ki delujejo na to stopnjo, so makrolidi, tetraciklini, aminoglikozidi). Mehanizem delovanja temelji na zaviranju sinteze proteinov z delovanjem na peptidiltransferazo.
- DNA-replikacija (protibakterijske učinkovine, ki delujejo na to stopnjo, so fluorokinoloni). Mehanizem delovanja temelji na zaviranju replikacije DNA z delovanjem na DNA-girazo (2).

1.1 Bakterijska rezistenca

Vsi živi organizmi stremimo k preživetju, kar nas pelje k prilagajanju na vplive iz okolja. To velja tudi za bakterije, ki so v boju za preživetje razvile rezistenco proti protibakterijskim učinkovinam. Prvotno se je bakterijska rezistenca pojavljala le v bolnišničnem okolju, kajti tam je največje število imunsko najšibkejših posameznikov in največja poraba protibakterijskih učinkovin, kasneje pa se je rezistenca začela širiti tudi izven bolnišnic (3).

Do rezistence pride zaradi spremembe v genskem zapisu prej nerezistentnih bakterij zaradi mutacije ali vnosa novega genskega materiala. Rezistenca je lahko naravna ali

pridobljena. Naravna rezistenca proti protibakterijskim učinkovinam ni posledica njihove uporabe in je običajno značilna za celotno vrsto ali rod ter je posledica genetskih in strukturnih lastnosti bakterij. Na drugi strani pa je pridobljena rezistenca posledica bodisi genetskih mutacij bodisi pridobitve novega genskega zapisa od drugega (mikro)organizma. Prenos genske informacije lahko poteka na več načinov, kot so:

Konjugacija: temelji na stiku med celicami in posledičnem prenosu informacij.

Transdukcija: temelji na uporabi vektorja (virusa) za prenos informacij.

Transformacija: genske informacije so pridobljene iz okolja. Običajno so ostanki že mrtve bakterije, katerih ostanki so razpršeni v okolici bakterije, ki lahko prevzame gensko informacijo (3, 4).

Biološki mehanizmi rezistence proti protibakterijskim učinkovinam:

- Bakterije lahko proizvajajo iztočne črpalke, ki z aktivnim transportom prenašajo protibakterijske učinkovine iz celice, kar preprečuje njihovo akumulacijo v bakteriji in s tem tudi delovanje na tarči, še posebej, če se ta nahaja v citoplazmi. Na ta način so bakterije rezistentne proti tetraciklinom.
- Protibakterijske učinkovine so lahko kemijsko modificirane z encimi, ki jih proizvaja rezistentna bakterija. Primer take rezistence je pri β-laktamskih in cefalosporinskih antibiotikih. V periplazmi pride do encimske hidrolize β-laktamskega obroča in nastanka penicilojske kisline, le ta pa ni zmožna kovalentne vezave s tarčo in posledično antibotik ni več učinkovit.
- Protibakterijska učinkovina je lahko znotraj celice encimsko modificirana do te stopnje, da je afiniteta učinkovine do tarče močno zmanjšana. Primer so aminoglikozidni antibiotiki, ki jih lahko modificirajo trije različni encimi na treh različnih mestih, kar drastično zniža afiniteto do RNA.
- Do rezistence lahko pride tudi z modifikacijo strukture tarče do te mere, da se zniža afiniteta učinkovine (2).

1.2 Topoizomeraze

Topoizomeraze so celični encimi, katerih naloga je reguliranje topoloških sprememb v molekuli DNA. Da bi lahko DNA prenesla informacije, ki jih shranjuje, se mora najprej odviti in razcepiti. To je lahko bodisi začasno v primeru transkripcije bodisi

trajno v primeru replikacije. DNA je običajno v obliki dodatno zvite vijačnice z namenom, da bi zasedala čim manjši prostor znotraj celice. Ob prenosu informacij pa je zato potrebno odvitje. Ob odvijanju pride do povečanja napetosti v verigi, pri čemer nastopi delovanje topoizomeraz, ki zmanjšajo napetost v dvovijačnici in s tem olajšajo separacijo verig (relaksirajo dodatne zavoje v verigi DNA). Prisotne so v vseh celicah, tako pri prokariontih kot tudi pri evkariontih (Preglednica 1) (5, 6).

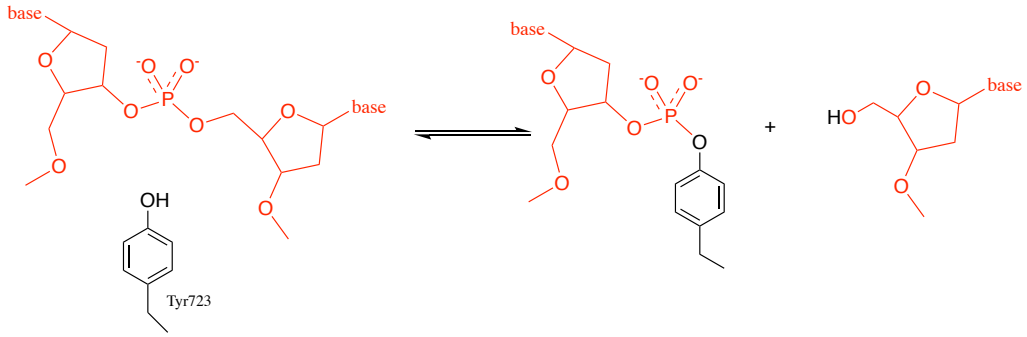
Preglednica 1: *Delitev topoizomeraz. Povzeto po (7).*

DRUŽINA	TOPOIZOMERAZA	IZOLIRANA IZ
Ia	Bakterijska topoizomeraza I	*Escherichia coli*
	Bakterijska topoizomeraza III	*Escherichia coli*
	DNA-topoizomeraza IIIα iz kvasovk	*Saccharomyces cerevisiae*
	Človeška DNA-topoizomeraza IIIα	*Homo sapiens*
	Človeška DNA-topoizomeraza IIIβ	*Homo sapiens*
	Bakterijska in arhejska reverzna DNA-giraza	*Sulfolobus acidocaldarius*
	Bakterijska reverzna DNA-giraza	*Methanopyrus kandleri*
Ib	Evkariontska DNA-topoizomeraza I	*Homo sapiens*
	Poksivirusna DNA-topoizomeraza	*Vaccinia*
	Bakterijska DNA-topoizomeraza V	*Methanopyrus kandleri*
Ic	Arhejska DNA-topoizomeraza V	*Methanopyrus kandleri*
IIa	Bakterijska DNA-giraza	*Escherichia coli*
	Bakterijska DNA-topoizomeraza IV	*Escherichia coli*
	Kvasovkina DNA-topoizomeraza II	*Saccharomyces cerevisiae*
	Človeška DNA-topoizomeraza IIα	*Homo sapiens*
	Človeška DNA-topoizomeraza IIβ	*Homo sapiens*
IIb	Arhejska DNA-topoizomeraza VI	*Sulfolobus sihbatae*
	Rastlinska DNA-topoizomeraza VI	*Arabidopsis thaliana*

Delitev topoizomeraz:

- Tip I: v to skupino uvrščamo topoizomeraze, ki cepijo le eno verigo DNA (Slika 1). Mehanizem delovanja se prične z vezavo ene verige DNA na encim. Kovalentna vez se vzpostavi med tirozinskim ostankom encima in fosfatno skupino verige DNA. Posledica nastanka te kovalentne vezi je cepitev verige DNA. Cepljena veriga se sedaj lahko rotira okoli druge verige, rotacijo pa kontrolira encim. Prosta OH skupina na drugem koncu prekinjene verige nato

napade prej nastalo vez med encimom in DNA in encim se odcepi. DNA se nato ponovno poveže (8).



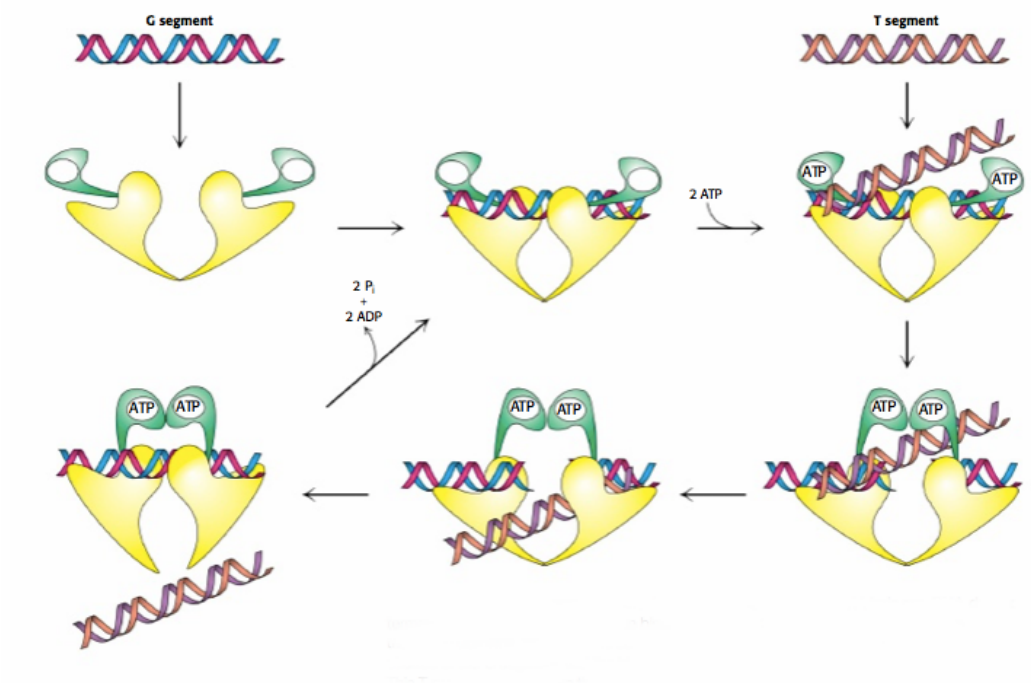
Slika 1: Kovalentna vezava med segmentom DNA in tirozinom encima topoizomeraze I. Povzeto po (8).

Topoizomeraze te skupine se delijo dodatno še na podskupine:

- Ia: encimi znotraj te skupine se vežejo na DNA preko 5'-fosfodiesterske vezi. Za delovanje je potreben ion Mg^{2+}. Prav tako imajo vsi encimi te skupine vezavno mesto za Zn^{2+}. Zmožni so relaksirati samo negativne dodatne zavoje znotraj molekule DNA (6).
- Ib: encimi te skupine lahko relaksirajo tako negativne kot tudi pozitivne dodatne zavoje v molekuli DNA. Encimi delujejo preko tvorbe kovalentne vezi z DNA preko 3'-fosfodiesterske vezi. Encimi te skupine ne vsebujejo vezavnega mesta za ione. Prav tako za delovanje ni potreben Mg^{2+} (6).
- Ic: v to skupino uvrščamo topoizomerazo V. Tako kot skupina Ib se veže na encim s tvorbo 3'-fosfodiesterske vezi, lahko relaksira tako negativne kot tudi pozitivne dodatne zavoje v molekuli DNA in za delovanje ne potrebuje Mg^{2+} in ATP. Kljub temu pa nima nobenih strukturnih podobnosti s ostalimi topoizomerazami. Poleg njihove sposobnosti pri uvajanju topoloških sprememb so sposobne tudi popravljanja DNA. N-končni del encima je odgovoren za uvajanje topoloških sprememb, C-končni del pa za popravljanje DNA (9).

- Tip II: topoizomeraze, ki spadajo v to skupino so sestavljene iz dveh podenot (dimerni encimi). Od tipa I se ločijo po tem, da cepijo obe verigi dvoverižne DNA. Njihov mehanizem delovanja se prične z vezavo enega segmenta

dvojne vijačnice (veriga G) na encim (Slika 2). Veriga G se postavi ob tirozinske ostanke, kar omogoči tvorbo kovalentnih vezi. Sledi vezava še drugega segmenta dvoverižne DNA (veriga T). Naslednji korak je vezava dveh molekul ATP na vezavna mesta na encimu. Posledica vezave ATP so konformacijske spremembe, ki privedejo do cepitve dvoverižne verige G. Veriga T nato preide skozi nastalo luknjo v votlino encima, iz katerega se nato sprosti. Veriga G se zopet poveže. Hidroliza ATP privede do sprostitve dveh molekul ADP. Encim se zopet postavi v prvotno konformacijo, kar privede do možnosti vezave nove verige T in ponovnega cikla. V to skupino topoizomeraz spada tudi bakterijska DNA-giraza, ki je edina, ki lahko izkorišča hidrolizo ATP za uvajanje dodatnega negativnega zavoja v molekulo DNA. (5, 8).



Slika 2: Mehanizem delovanja topoizomeraz II. Povzeto po (8).

1.2.1 DNA-giraza

DNA-giraza je encim, ki spada v skupino encimov topoizomeraze tipa II. Ostali encimi te skupine so zmožni le relaksacije DNA, DNA-giraza pa je zmožna tudi uvajanja dodatnih negativnih zavojev v molekulo DNA. Sestavljena je iz dveh podenot GyrA in GyrB, ki tvorijo kompleks A_2B_2. Kompleks predstavlja aktivno obliko encima. GyrA je sestavljena iz N-konca, ki je odgovoren za cepitev in ponovno

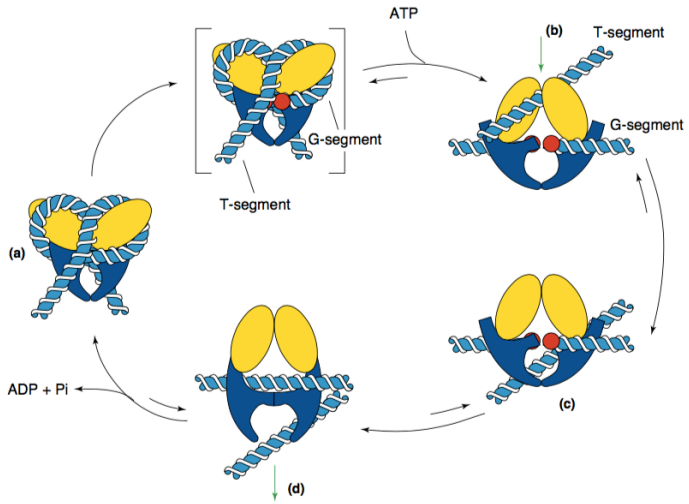
združitev verige DNA in C-konca, ki je odgovoren za interakcijo encima z DNA. GyrB je sestavljena iz N-konca, ki je odgovoren za vezavo ATP ter C-konca, ki je odgovoren za vezavo z GyrA in DNA. (6, 10)

Poleg uvajanja dodatnih zavojev je DNA-giraza sposobna tudi relaksacije le teh ob odsotnosti ATP. Aktivnost sproščanja zavojev je 20× do 40× manjša v primerjavi z možnostjo uvajanja (10).

Postopek uvajanja dodatnih zavojev v molekulo DNA (Slika 3):

- Prvi korak pri uvajanju dodatnega zavoja je vezava segmenta DNA na encim. Podenoti GyrA in GyrB vežeta segment DNA v pozitivni zavoj.
- Sledi vezava dveh molekul ATP na encim (podenota GyrB), kar privede do konformacijskih sprememb.
- GyrB zajame segment T, istočasno se segment G razcepi. Fosfatni deli obeh koncev segmenta G se kovalentno vežejo na Tyr122 encima.
- Zajeti segment T nato preide skozi nastalo luknjo v segmentu G v votlino GyrA.
- Sledi sprostitev segmenta T iz votline zaradi kratkotrajno nastalega prehoda med obema dimeroma GyrA in ponovno vezavo segmenta G.
- Hidroliza ATP omogoča, da se encim regenerira v prvotno konformacijsko stanje in je tako pripravljen na nov cikel.

V vsakem ciklu nastaneta dva dodatna negativna zavoja v verigi DNA (11).



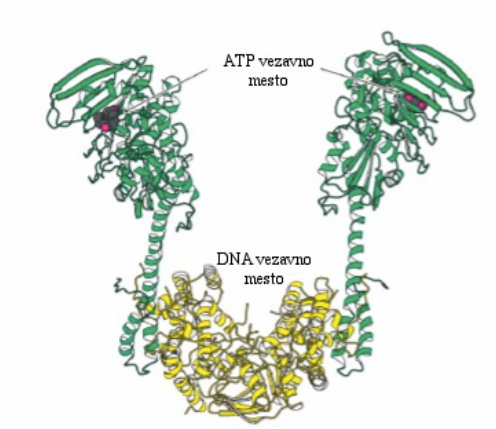
Slika 3: Mehanizem delovanja DNA-giraze. Povzeto po (11).

Topoizomeraza IV, tako kot DNA-giraza, spada med topoizomeraze tipa II. Njena funkcija je nadzor nad topološkimi spremembami v molekuli DNA in odvijanju

hčerinskih verig po končani replikaciji. Tako kot DNA-giraza je sestavljena iz dveh podenot, in sicer ParC in ParE, ki tvorita kompleks C_2E_2. Podenota ParC je odgovorna za vezavo encima na molekulo DNA, podenota ParE pa vsebuje vezavno mesto za ATP. (12)

1.2.1.1 ATP vezavno mesto DNA-giraze

Vezava dveh molekul ATP je ključnega pomena za delovanje DNA-giraze. Prvo odkritje strukture ATP vezavnega mesta DNA-giraze je predstavljal 43 kDa velik fragment N-končne domene GyrB iz bakterije *Escherichia coli*, na katerega je bila vezana molekula ADPNP (nehidrolizirajoči analog ATP) (Slika 4). Ob vezavi molekule ATP ali ADPNP v vezavno mesto pride do konformacijskih sprememb. Samo vezavno mesto je sestavljeno iz dveh domen. Domena I je sestavljena iz osmih β-struktur in petih α-vijačnic, medtem ko je domena II sestavljena iz štirih β-struktur in štirih α-vijačnic. ATP se veže na domeno I, in sicer predvsem preko tvorbe vodikovih vezi (bodisi direktno ali pa indirektno s pomočjo molekul vode). Poleg vodikovih so pa prisotne tudi hidrofobne interakcije med molekulo ATP in aminokislinskimi ostanki encima (13).



Slika 4: Struktura encima. Na sliki je razvidno vezavno mesto za ATP na podenoti GyrB. Na podenoti GyrA je vidno vezavno mesto za DNA. Povzeto po (8).

1.2.1.2 Pregled dosedanjih zaviralcev DNA-giraze

DNA-giraza je specifična za prokarionte, kar jo uvršča med primerne tarče številnih protibakterijskih učinkovin. Delovanje učinkovin, katerih tarča je DNA-giraza, lahko

razvrstimo v dve skupini, in sicer na učinkovine, ki delujejo kot encimski zaviralci, in učinkovine, ki delujejo kot stabilizatorji kovalentne vezi med encimom in DNA (girazni strupi). Najpogosteje uporabljene in najučinkovitejše so tiste, ki delujejo kot girazni strupi (stabilizirajo kompleks DNA-encim), med katere uvrščamo fluorokinolone, v skupino encimskih zaviralcev pa uvrščamo aminokumarinske antibiotike (14).

- **fluorokinoloni**: predstavljajo skupino najpogosteje uporabljanih učinkovin, katerih tarča je DNA-giraza. Prva učinkovina te skupine je bila nalidiksna kislina, vendar je bila njeno protibakterijsko delovanje šibko. Sledile so številne druge generacije z močnejšim protibakterijskim učinkom. Danes so terapevtsko uporabne učinkovine iz te skupine fluorokinoloni, ki imajo tako baktericidno kot tudi bakteriostatično delovanje (14).

  Mehanizem delovanja temelji na interakciji z dvema encimoma, in sicer DNA-girazo in topoizomerazo IV. Oba encima sta prisotna samo v bakterijah, kar omogoča veliko specifičnost fluorokinolonov. Vežejo se na kompleks bakterijske DNA bodisi z DNA-girazo bodisi s topoizomerazo IV. Z vezavo na kompleks preprečijo nadaljevanje cikla, kar posledično privede do bakterijske smrti. Za prve generacije je bilo značilno, da so se vezale le na enega od zgoraj omenjenih encimov (v G+ bakterijah na topoizomerazo IV, v G- bakterijah na DNA-girazo). Novejše generacije pa imajo dvojno delovanje, kar pomeni, da se vežejo na oba encima v bakteriji. (15)
- **aminokumarini**: so naravni antibiotiki izolirani iz družine *Streptomycetes*. Mehanizem delovanja temelji na zaviranju ATPazne aktivnosti DNA-giraze. Aminokumarini tekmujejo z ATP za vezavo na podenoto GyrB. Ob vezavi aminokumarinov pride do delnega prekrivanja z vezavnim mestom za ATP, s čimer je onemogočena vezava ATP in s tem delovanje encima. Naravni aminokumarini, pridobljeni z biosintezo, so novobiocin, klorobiocin in kumermicin A_1. Zaradi slabih farmakokinetičnih lastnosti, slabe topnosti, nizke permeabilnosti v G- bakterije in toksičnosti se danes v terapiji ne uporabljajo več (14, 16).
- **ostali nizkomolekularni zaviralci**: v zadnjem obdobju so razvili veliko število novih zaviralcev DNA-giraze, ki delujejo v različnih stopnjah

katalitičnega cikla. V Preglednici 2 so predstavljene znane skupine nizkomolekularnih zaviralcev DNA-giraze (14).

Preglednica 2: *Nizkomolekularni zaviralci DNA-giraze. Povzeto po (14, 17,18,19, 20, 21).*

Izvor	**Strukturni razred**	**Mehanizem delovanja**
Streptomyces filipinensis	Ciklotialidini	Vezava na GyrB - zavira ATPazno aktivnost
Nocardia	Kinodini	Zavirajo sintezo DNA in uvajanje dodatnih zavojev v strukturo DNA
Oidiodendron truncatum	Klerocidini	Stimulirajo cepitev DNA, ki se ne more ponovno povezati
Xanthomanas albilineans	Albicidini	Mehanizem ni znan. Najverjetneje je tarča GyrA, preko katere stabilizirajo kompleks DNA-encim.
Nove sintezne spojine	pirolamidi	Vežejo se v vezavno mesto za ATP na podenoti GyrB DNA-giraze. S tem preprečijo podvajanje DNA, kar privede do celične smrti.
	etilsečnine	
	pirazolopiridini	
	GSK-299423	Tarča je GyrA. Veže se na nastali kompleks DNA-encim pred cepitvijo DNA verig in s tem prepreči nadaljevanje cikla.
	NXL-101	Vežejo se na kompleks bakterijske DNA bodisi z DNA-girazo bodisi s topoizomerazo IV. Z vezavo na kompleks preprečijo nadaljevanje cikla.
	GSK-2140944 (gepotidacin)	Edinstvene interakcije s GyrA (DNA-giraze) in ParC (topoizomeraze IV), ki privedejo do celične smrti.

1.3 Siderofori

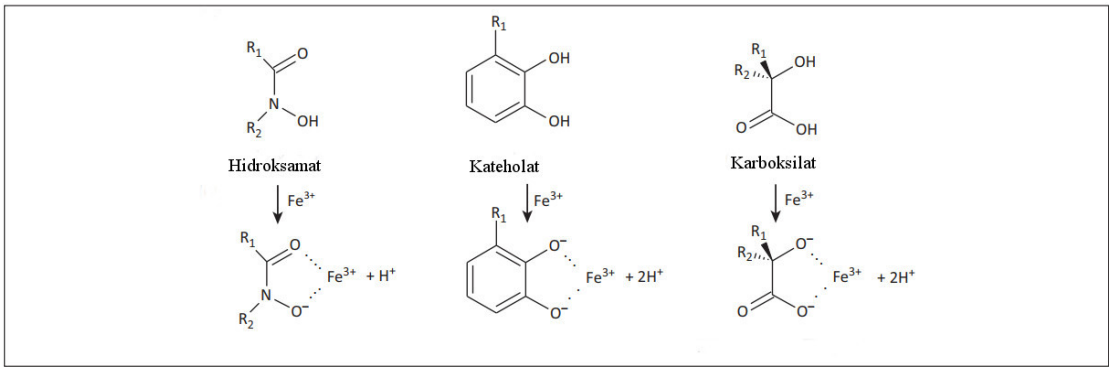
Železo je eden ključnih elementov za normalno delovanje organizma, tudi za bakterije, saj je kot ko-faktor vključen v številne procese. Ker ga bakterije nimajo na zalogi, je ključno, da ga pridobijo od gostitelja. V človeškem organizmu je malo železa v prosti obliki, saj ga je večina vezanega na transportne in shranjevalne proteine. Dodatno zaščito pred patogeni ob okužbi zagotovi imunski sistem, ki

zmanjša absorpcijo železa iz prebavnega trakta in s tem še dodatno zmanjša koncentracijo prostega železa, ki je na voljo bakterijam (22, 23).

Prav zaradi majhne količine razpoložljivega železa so bakterije razvile dva mehanizma pridobivanja železa. Prvi se aktivira ob zmernem pomanjkanju, ko je koncentracija v bakterijah $>10^{-5}$ M, in temelji na difuziji železa skozi membrane. Ob hujšem pomanjkanju železa ($< 10^{-5}$M) se aktivira drugi mehanizem, ki temelji na sintezi nizkomolekularnih organskih spojin - sideroforov (150-2000 Da), katerih naloga je keliranje prostega železa. Ob vezavi nastane kompleks, ki se nato z aktivnim transportom prenese v bakterijo (24).

1.3.1 Struktura sideroforov

Siderofori predstavljajo zelo raznoliko skupino spojin. Kljub temu pa lahko najpogosteje zastopane razdelimo v tri skupine glede na funkcionalno skupino, ki je odgovorna za kelacijo železa. Te tri skupine so hidroksamati, kateholati in karboksilati (Slika 5) (23).



Slika 5: Najpomembnejši strukturni tipi sideroforov, ki kompleksirajo železo. Povzeto po (23).

Siderofori kompleskirajo Fe^{3+} v razmerju 1:1. Nastane kompleks Fe^{3+}-siderofor. Poleg železa imajo siderofori visoko afiniteto tudi do drugih težkih kovin, kot so Al^{3+}, Zn^{2+}, Ga^{3+}, Cr^{3+}, Pu^{3+} in Pu^{4+} (23).

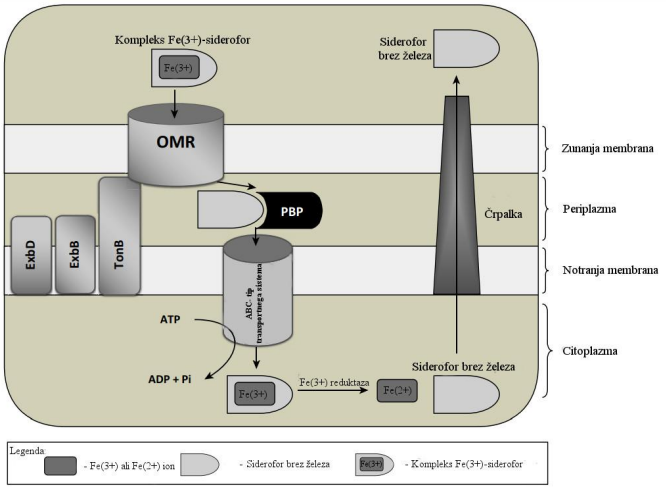
1.3.2 Transport kompleksa železo-siderofor v po Gramu negativno bakterijo

Vnos kompleksa železo-siderofor je odvisen od številnih faktorjev, ki so udeleženi v proces transporta (Slika 6).

V prvi stopnji vnosa so vključeni receptorji na zunanji strani membrane (OMR), katerih vloga je prepoznavanje in vezava kompleksa. Naslednja stopnja je prenos v periplazmo z aktivnim transportom, za katerega je potrebna zadostna količina energije pridobljena s strani kompleksa TonB (sestavljen je iz TonB, ExbB in ExbD) (23).

Ko kompleks enkrat vstopi v periplazmo, ga prepoznajo specifični proteini (angl. periplasmic binding proteins, PBP) s pomočjo katerih se nato prenese v citoplazmo. Prenos skozi notranjo membrano poteka s transportnim sistemom ABC, ki za delovanje potrebuje ATP (23).

Zadnja stopnja prenosa je sprostitev železa, ki lahko poteka na dva načina. Prvi način sprostitve poteka s hidrolizo, za katero je potrebno delovanje specifičnih encimov. Drugi in tudi bolj pogost način pa je s pomočjo Fe^{3+}-reduktaze. Kompleks Fe^{3+}-siderofor se reducira do prostega Fe^{2+}in siderofora. Železo se nato prenese do različnih akceptorskih mest znotraj bakterije, prosti siderofor pa se s pomočjo črpalke zopet sprosti v okolje bakterije (23).



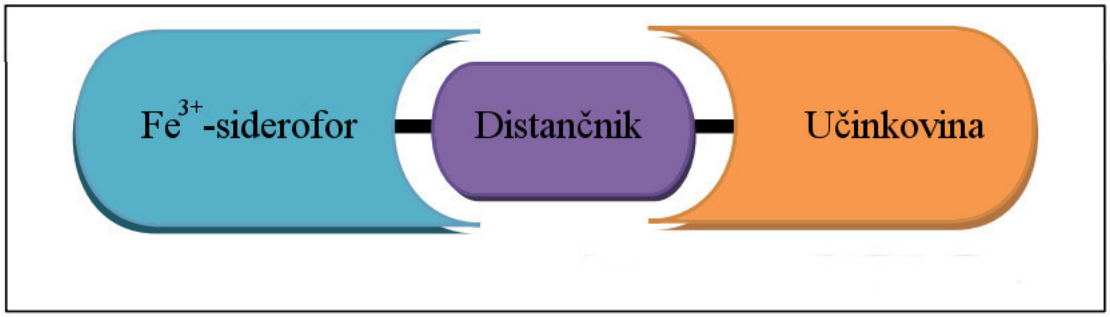
Slika 6: Shematski prikaz prenosa kompleksa Fe^{3+}-siderofor v bakterijo. Povzeto po (23).

1.3.3 Strategija trojanskega konja

Eden glavnih problemov današnje uporabe protibakterijskih učinkovin je vse pogostejši razvoj rezistence. Med glavnimi razlogi je oviran prehod učinkovin skozi celično steno bakterij, zaradi česar se je pojavila potreba po novih dostavnih mehanizmih. Kot ena od možnosti za povečanje prehoda protibakterijskih učinkovin skozi celično steno bakterij je uporaba bakterijam lastne spojine – siderofora - kot dostavnega sistema. S tvorbo konjugata med protibakterijsko učinkovino in

sideroforom bi lahko za vnos učinkovine izkoristili transporterje za siderofore, s čimer bi povečali koncentracijo učinkovine na mestu delovanja (26).

Nastali konjugat je sestavljen iz treh ključnih enot (Slika 7). Prvi del predstavlja siderofor ali njegov mimetik, katerega vloga je vezava železa in kasnejše omogočanje prehajanja konjugata s pomočjo transportnega sistema za železo. Drugi del predstavlja distančnik, katerega naloga je povezava siderofora in učinkovine. Ob vstopu v bakterijo je odgovoren za sprostitev učinkovine, če je to potrebno za delovanje. Tretji del kompleksa pa predstavlja protibakterijska učinkovina (23, 25, 26).



Slika 7: Shematska predstavitev konjugata siderofor-protibakterijska učinkovina. Povzeto po (23).

1.3.4 Naravni in sintezni kompleksi siderofor-učinkovina

Med naravne komplekse siderofor-učinkovina uvrščamo sideromicine. To je skupina antibiotikov, ki so s kovalentnimi vezmi vezani na siderofore. Mednje uvrščamo albomicin, salmicin in druge (23).

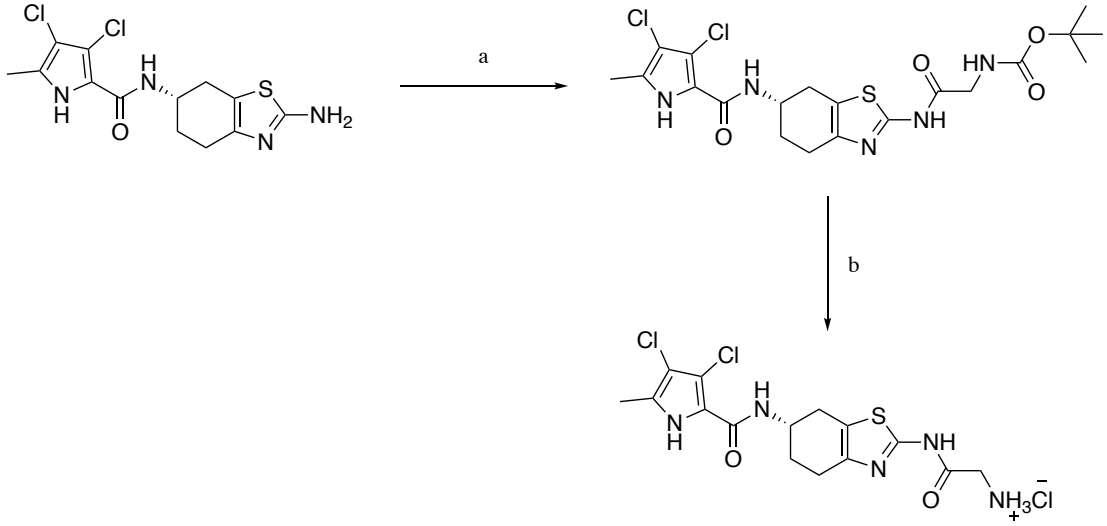
Sintezni kompleksi siderofor-učinkovina izkoriščajo transportni sistem za siderofore, da bi vnesli učinkovino v bakterijo. S tem se učinkovito izognemo težavam rezistence zaradi zmanjšane permeabilnosti membrane, encimske inaktivacije učinkovine, ovirane difuzije itd. V sinteznih kompleksih je najpogostejša funkcionalna skupina sideroforov hidroksamat ali kateholat, v nekaterih primerih pa tudi kombinacija obeh. Siderofor služi kot vektor, ki omogoča vnos konjugata. Ko enkrat konjugat vstopi v celico, lahko pride do cepitve siderofora, lahko pa le ta ostane vezan na učinkovino (23).

2 Namen in potek dela

V okviru magistrske naloge bomo načrtovali in sintetizirali aminske derivate znanega ATP-kompetitivnega zaviralca DNA-giraze B, odkritega in sintetiziranega na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani. Na zaviralce bomo nato pripeli različne siderofore in s tem poskušali izboljšati njihovo protibakterijsko delovanje. Predpostavili bomo, da cepitev sintetiziranega konjugata zaviralec-siderofor ni potrebna, saj bomo siderofor vezali na končni del zaviralca DNA-giraze, ki je usmerjen proti topilu. Sintetiziranim spojinam bomo nato ovrednotili zaviralno aktivnost na rekombinantnem encimu in protibakterijsko aktivnost na po Gramu pozitivnih in negativnih sevih.

2.1 Sinteza zaviralcev DNA-giraze

Prvi korak pri sintezi končnih spojin bo sinteza aminskega derivata zaviralcev DNA-giraze B (Slika 8).



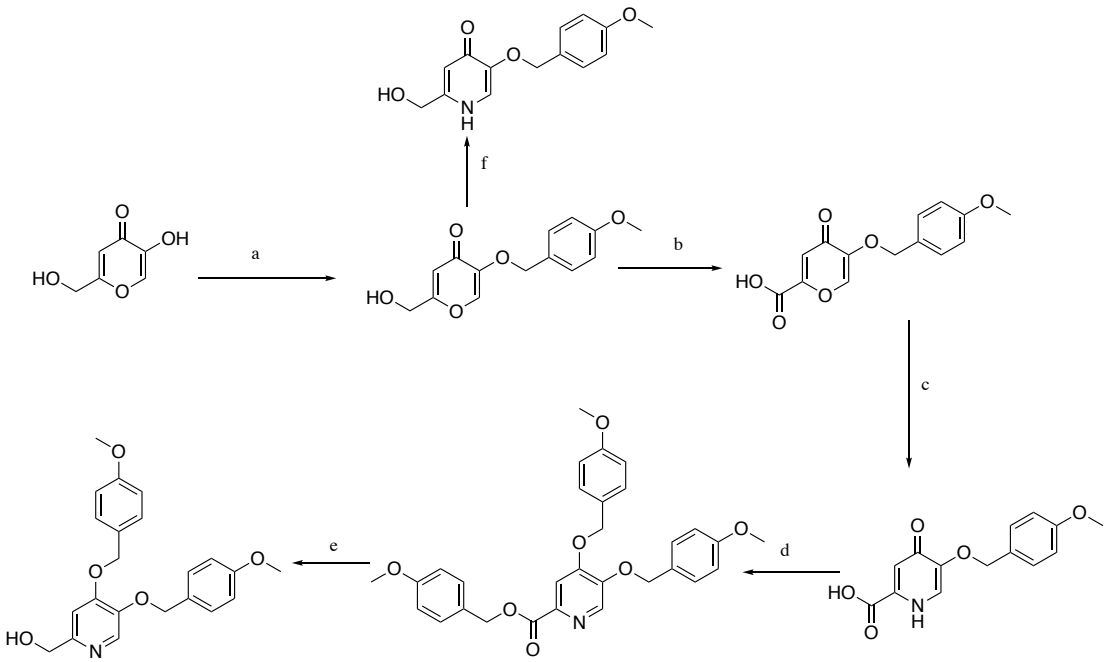
Slika 8: Načrtovana sinteza novega zaviralca DNA-giraze. Reagenti in pogoji a) Boc-Gly, EDC, HOBt, NMM, DMF, sobna T, 12 h; b) $HCl_{(g)}$, MeOH, sobna T, 18 h.

Pri prvi stopnji sinteze bomo na že znani zaviralec DNA-giraze pripeli zaščiten glicin. Glicin bo v strukturi predstavljal distančnik, medtem ko bo zaščita amina v obliki *tert*-butilkarbamata (Boc) omogočala selektivno tvorbo amidne vezi na 2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzotiazolu (Slika 8, a). V drugi stopnji sinteze bo sledila odstranitev zaščitne skupine Boc, kar bomo izvedli s pomočjo acidolize. Dobili bomo

zaviralec DNA-giraze, ki ga bomo v kasnejših stopnjah uporabili za sintezo konjugatov s siderofori.

2.2 Sinteza sideroforov

Na sintetiziran zaviralec bomo konjugirali siderofore, ki bodo predvidoma pripomogli k večji protibakterijski aktivnosti.

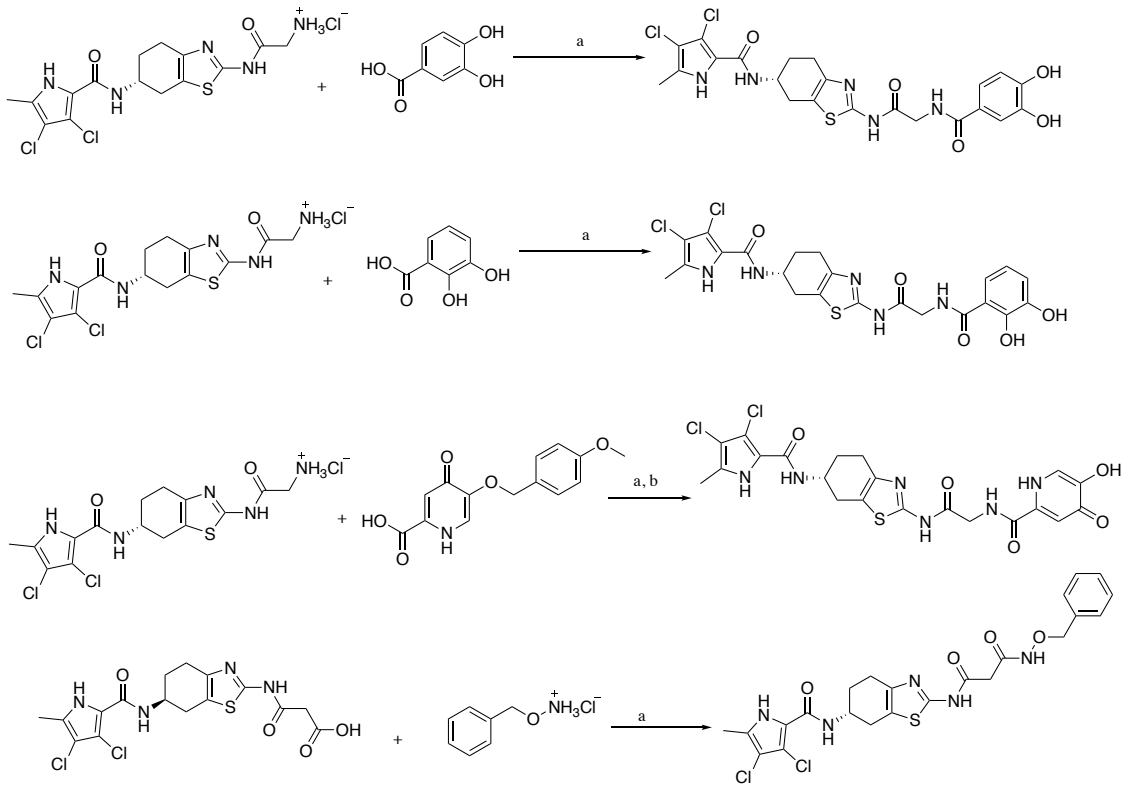


Slika 9: Načrtovana sinteza mimetikov sideroforov. Reagenti in pogoji: a) PMBCL, K_2CO_3, DMF, 50 °C; b) CrO_3, H_2SO_4, voda/aceton, -5 °C do sobne temperature; c) $NH_{3(aq)}$, voda, 80 °C; d) PMBCL, K_2CO_3, DMF, 80 °C; e) etanol, $NaBH_4$, 1M NaOH, 0 °C do sobne temperature; f) NH_3(25%), 96% etanol, 90 °C.

Izhodna spojina pri sintezi mimetikov sideroforov bo kojična kislina (Slika 9). V prvem koraku bomo uvedli *para*-metoksi benzilno zaščito za hidroksilno skupino na mestu 5. Sledila bo oksidacija do karboksilne kisline na mestu 2. Naslednji korak bo substitucija obročnega kisika s dušikom. Nato bomo uvedli *para*-metoksi benzilno zaščito na karboksilno kislino (mesto 2), kot tudi na mesto 4. V zadnjem koraku bomo odstranili zaščitno skupino na karboksilni kislini (mesto 2). Poleg omenjene sintezne poti bomo poskusili še dodatno sintezno pot, pri kateri bomo izhajali iz zaščitene kojične kisline. Zamenjali bomo obročni kisik z dušikom.

2.3 Sinteza konjugatov siderofor – zaviralec DNA-giraze

Ko bomo imeli sintetizirane siderofore in zaviralce DNA-giraze B, bo sledila njihova konjugacija (Slika 10). Sintetiziranim končnim spojinam bomo vrednotili zaviranje encimske reakcije in protibakterijsko delovanje.



Slika 10: Načrtovana sinteza konjugatov učinkovina-siderofor. Reagenti in pogoji: a) EDC, HOBt, NMM, DMF, sobna temperatura; b) 1M HCl/ocetna k., ocetna k., sobna temperatura.

3 Materiali in metode

3.1 Reagenti in topila

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge smo uporabili reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Fluka, Merck, Sigma-Aldrich in TCI. Reagenti in topila so bila takšne čistote, kot jo je navajal proizvajalec.

3.2 Metode

3.2.1 Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC): Potek reakcij in uspešnost čiščenja spojin s kolonsko kromatografijo smo ugotavljali s pomočjo tankoplastne kromatografije. Kot stacionarno fazo smo uporabili Merck Silica Gel 60 F254 z 0,2 mm nanosom silikagela. Kot mobilno fazo smo uporabljali organska topila v različnih razmerjih. Spojine smo nato detektirali iz kromatografske plošče s pomočjo UV lučke (valovna dolžina 254 nm). Po potrebi smo za identifikacijo uporabili tudi orositvene reagente.

»Flash« kolonska kromatografija: Pri določenih spojinah je bilo potrebno izvesti čiščenje surovega produkta. Za to smo uporabili »flash« kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili Merck Silica Gel 60. Velikost delcev je bila med 0,040-0,063 mm. Kot mobilno fazo smo uporabili organska topila v različnih razmerjih, ki so navedena pri posameznih sinteznih postopkih. Uporabili smo steklene kolone različnih velikosti.

3.2.2 Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca (NMR): NMR spektre smo posneli na spektrometru Bruker Avance DPX400 na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Kot topilo smo uporabili $CDCl_3$ in DMSO-d_6, ki so imela dodan tetrametilsilan kot standard.

Masna spektrometrija: Masne spektre spojin smo posneli na spektrometru Q-Tof Premier s tehniko ESI v Centru za masno spektrometrijo na Institutu Jožefa Stefana v Ljubljani.

3.2.3 Tališča

Tališča spojin smo določili s Koflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica.

3.2.4 Nomenklatura in risanje

Za risanje struktur in njihovo nomenklaturo smo uporabili program ChemDraw Professional 16.0 podjetja CambridgeSoft.

3.2.5 Protibakterijska aktivnost

Protibakterijsko delovanje so testirali v raziskovalni skupini dr. Päivi Tammela na Univerzi v Helsinkih na Finskem z mikrodilucijsko metodo (27).

3.2.6 Encimski testi

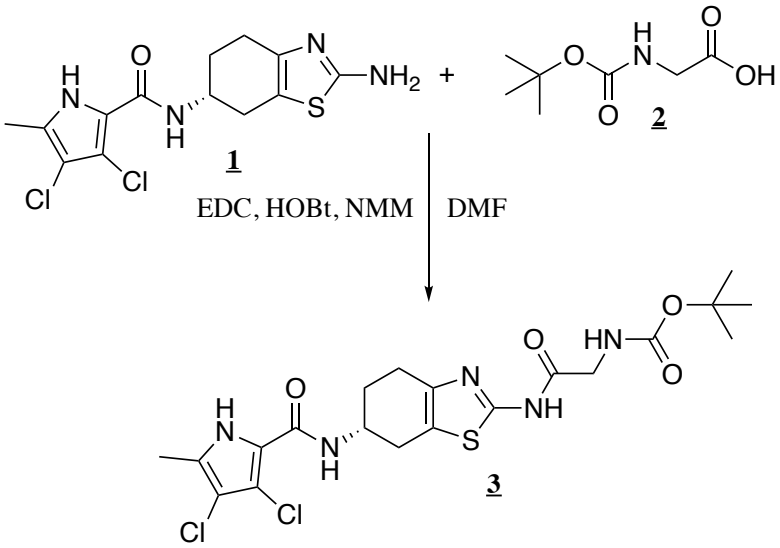
Encimske teste na rekombinantni DNA-girazi iz bakterije *Escherichia coli* je izvedel doktorand Žiga Skok, mag. farm., na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani (27).

4 Eksperimentalno delo

Gre za nadaljevanje že izvedene magistrske naloge Nastje Marinčič (28).

4.1 Sinteza zaviralcev DNA-giraze

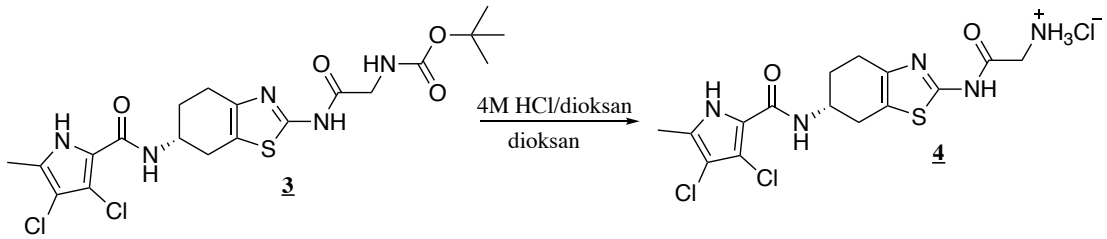
4.1.1 Sinteza *terc*-butil (*S*)-(2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil) karbamata



N-(*terc*-butiloksikarbonil)glicin (Boc-Gly, **2**, 0,753 g, 4,298 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 20 mL *N*,*N*-dimetilformamida (DMF). Dodali smo *N*-(3-(dietilamino)prop-1-il)-*N'*-etilkarbodiimidijev klorid (EDC, 0,989 g, 5,158 mmol, 1,2 ekv.), 1-hidroksibenzotriazol hidrat (HOBt, 0,755 g, 5,587 mmol, 1,3 ekv.) in na koncu še *N*-metilmorfolin (NMM, 0,945 mL, 8,597 mmol, 2 ekv.), s katerim smo dosegli pH 8. Reakcijsko zmes smo pustili mešati na ledeni kopeli 20 minut, nato smo dodali še spojino **1** (1,484 g, 4,298 mmol, 1 ekv.). Reakcijsko zmes smo odstranili iz ledene kopeli in mešali še 4 dni pri sobni temperaturi. S pomočjo TLC smo odkrili, da reakcija še ni potekla, zato smo dodali spojino **1** (0,445 g, 1,289 mmol, 0,30 ekv.) in segrevali 1 uro pri 50 °C. Po končanem segrevanju smo se odločili, da bomo izvedli izolacijo produkta. Reakcijski zmesi smo dodali 100 mL etilacetata. Dobljeno raztopino smo najprej spirali z 2 × 50 mL 1% citronske kisline, nato z 2 × 50 mL nasičeno raztopine natrijevega hidrogenkarbonata ($NaHCO_3$) in na koncu še z 50 mL nasičene raztopine natrijevega klorida (NaCl). Organsko fazo smo sušili nad brezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirali, filtratu pa uparili topilo (etilacetat) pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,644 g spojine **3**.

terc-Butil (*S*)-(2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoethil)karbamat	
Kemijska formula	$C_{20}H_{25}Cl_2N_5O_4S$
Opis	Svetlo rumeni kristali
M_r	502,41 g/mol
Izkoristek	29,8%
R_f	0,43 (DKM:MeOH = 9:1)
Tališče	218-220 °C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)	δ 1,39 (s, 9H, C(C**H**$_3$)$_3$), 1,92-2,06 (m, 2H, **H**-7), 2,19 (s, 3H, C**H**$_3$), 2,64-2,79 (m, 3H, **H**$_A$-4, **H**-5), 3,02 (dd, 1H, J_1 = 15,8 Hz, J_2 = 5,3 Hz, **H**$_B$-4), 3,81 (d, 2H, J = 6,1 Hz, COC**H**$_2$NH), 4,21-4,31 (m, 1H, **H**-6), 7,14 (t, 1H, J = 6,1 Hz ,N**H**COO), 7,34 (d, 1H, J = 7,8 Hz, CON**H**), 11,99 (s, 2H, pirol-N**H**, -tiazol-N**H**) ppm.

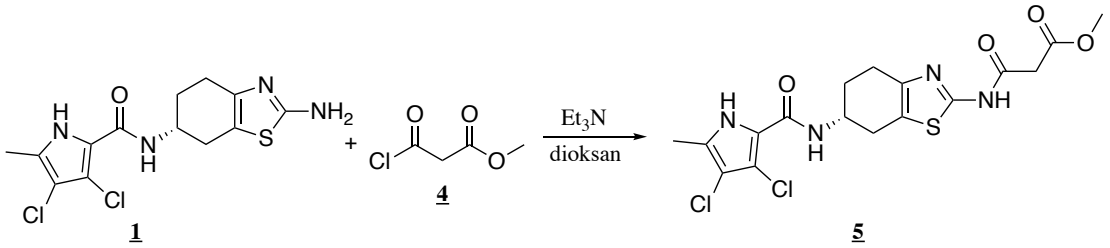
4.1.2 Sinteza (*S*)-2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetan-1-aminijevega klorida



Spojino **3** (0,624 g, 1,242 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 30 mL 1,4-dioksana. Raztopino smo nato ohladili na ledeni kopeli. Bučko smo zaprli s septumom in po kapljicah z iglo med stalnim mešanjem dodali 4 M HCl v dioksanu (3,1 mL, 12,40 mmol, 10 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. S pomočjo TLC smo ugotovili, da reakcija še ni potekla do konca, zato smo dodali še 10 ekv 4 M HCl v dioksanu (3,105 mL, 12,420 mmol) ter ponovno pustili mešati pri sobni temperaturi 24 ur. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes odfiltrirali s pomočjo odsesavanja. Oborino smo posušili v sušilniku in dobili 0,488 g spojine **4**.

(*S*)-2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetan-1-aminijev klorid	
Kemijska formula	$C_{15}H_{18}Cl_3N_5O_2S$
Opis	Svetlo rumeni kristali
M_r	438,75 g/mol
Izkoristek	90,0 %
R_f	0,38 (DKM:MeOH = 9:1)
Tališče	192-195 °C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)	δ 1,88-1,97 (m, 1H, $\mathbf{H_A}$-7), 1,98-2,07 (m, 1H, $\mathbf{H_B}$-7), 2,19 (s, 3H, C$\mathbf{H_3}$), 2,68-2,83 (m, 3H, $\mathbf{H_A}$-4, **H**-5), 3,03 (dd, 1H, J_1 = 15,8 Hz, J_2 = 5,3 Hz, $\mathbf{H_B}$-4), 3,87 (q, 2H, J = 5,7 Hz, COC$\mathbf{H_2}$NH$_3^+$), 4,20-4,30 (m, 1H, N**H**CO), 7,60 (d, 1H, J= 7,7 Hz, CON**H**), 8,35 (s, 3H, N$\mathbf{H_3}^+$), 12,27 (s, 1H, N**H**) ppm

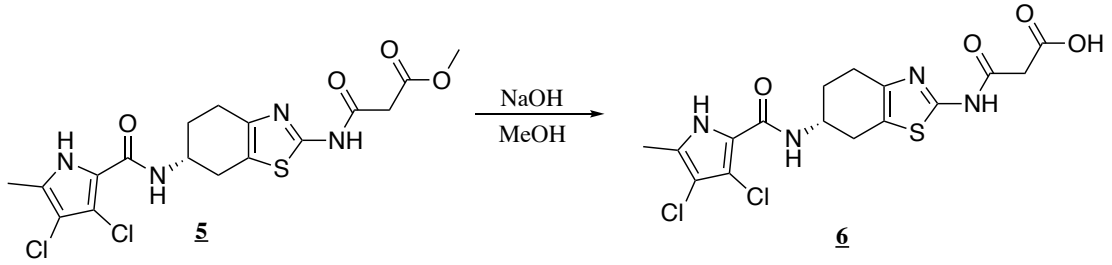
4.1.3 Sinteza metil (*S*)-3-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata



Spojino **1** (0,420 g, 1,217 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 1,4-dioksanu (20 mL). Dodali smo trietilamin (Et_3N, 0,220 mL, 1,582 mmol, 1,3 ekv.). Bučko smo zaprli s septumom in po kapljicah dodali spojino **4** (metilmalonilklorid, 0,195 mL, 1,825 mmol, 1,5 ekv.). Bučko smo ohladili na ledeni kopeli (10 °C) ter nato pustili mešati pri sobni temperaturi čez noč. Naslednji dan smo začeli uparili 1,4-dioksan pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 50 mL etilacetata. Sledilo je spiranje z 25 mL 10% citronske kisline, 20 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in 20 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. Organsko fazo smo nato sušili nad natrijevim sulfatom, filtrirali in filtratu smo uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,279 g spojine **5**.

metil (*S*)-3-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoat	
Kemijska formula	$C_{17}H_{18}Cl_2N_4O_4S$
Opis	Rjavo rumeni kristali
M_r	445,32 g/mol
Izkoristek	39,2 %
R_f	0,42 (DKM:MeOH = 9:1)
Tališče	182-185 °C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)	δ 1,90-2,04 (m, 2H, **H**-7), 2,19 (s, 3H, C**H$_3$**), 2,64-2,80 (m, 3H, H-5, **H$_A$**-4), 3,02 (dd, 1H, J_1 = 15,8 Hz, J_2 = 5,2 Hz, **H$_B$**-4), 3,58 (s, 2H, COC**H$_2$**CO), 3,66 (s, 3H, COOC**H$_3$**), 4,20-4,30 (m, 1H, **H**-6), 7,34 (d, 1H, J = 7,7 Hz, CON**H**), 11,98-12,20 (br s, 2H, pirol-N**H**, tiazol-N**H**) ppm.

4.1.4 Sinteza (*S*)-3-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanojske kisline

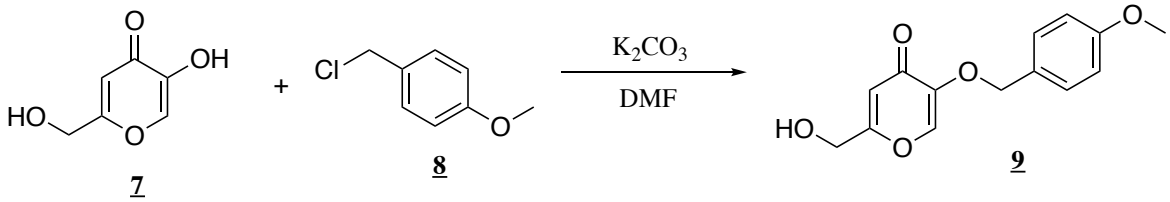


Spojino **5** (0,400 g, 0,897 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v metanolu (MeOH, 20 mL). Nato smo dodali še natrijev hidroksid (2 M, 1,794 mL, 3,588 mmol, 4 ekv.). Reakcijo smo pustili mešati pri sobni temperaturi čez noč. Naslednji dan smo dodali dodatno količino natrijevega hidroksida (6 ekv.) ter pustili reakcijo mešati čez noč. Po končani reakciji smo najprej uparili metanol in preostanku dodali 15 mL vode. Vodno fazo smo ekstrahirali z 20 mL EtOAc. Vodno fazo smo nato nakisali z 1 M HCl do pH 1. Nastala je oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem in pustili, da se posuši. Dobili smo 0,360 g spojine **6**.

(*S*)-3-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanojska kislina	
Kemijska formula	$C_{16}H_{15}Cl_2N_4NaO_4S$
Opis	Rjavo rumeni kristali
M_r	453,27 g/mol
Izkoristek	88,46 %
R_f	0,04 (DKM:MeOH = 9:1)
Tališče	230-234 °C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)	δ 1,99-2,05 (m, 1H, $\mathbf{H_B}$-7), 2,19 (s, 3H, C$\mathbf{H_3}$), 2,67-2,79 (m, 3H, **H**-5, $\mathbf{H_A}$-4), 3,01 (dd, 1H, J_1 = 15,7 Hz, J_2 = 5,4 Hz, $\mathbf{H_B}$-4), 3,45 (s, 2H, C$\mathbf{H_2}$), 4,20-4,30 (m, 1H, **H**-6), 7,56 (d, 1H, J = 7,7 Hz, CON**H**), 12,23 (s, 2H, 2 × N**H**) ppm.

4.2 Sinteza mimetikov sideroforov

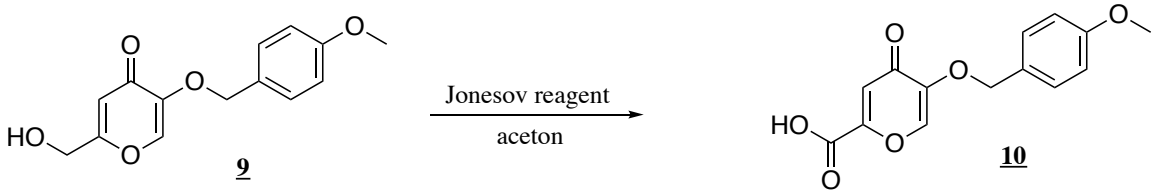
4.2.1 Sinteza 2-(hidroksimetil)-5-((4-metoksibenzil)oksi)-4*H*-piran-4-ona



Kojično kislino (**7**, 5,005 g, 35,222 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 50 mL *N*,*N*-dimetilformamida (DMF). Dodali smo kalijev karbonat (K_2CO_3, 10,709 g, 77,488 mmol, 2,2 ekv.). Bučko smo zaprli s septumom in z iglo po kapljicah dodali *para*-metoksibenzilklorid (PMBCL, **8**, 5,253 mL, 38,744 mmol, 1,1 ekv.). Reakcijsko zmes smo segrevali pri 50 °C 24 ur. Po končanem segrevanju smo reakcijsko zmes ohladili in dodali 200 mL vode. Bučko z reakcijsko zmesjo smo za 5 minut postavili na ledeno kopel, pri čemer se je začel produkt obarjati. Oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in posušili. Dobili smo 5,753 g spojine **9**.

2-(hidroksimetil)-5-((4-metoksibenzil)oksi)-4*H*-piran-4-on	
Kemijska formula	$C_{14}H_{14}O_5$
Opis	Svetlo rumeni kristali
M_r	262,26 g/mol
Izkoristek	63,4%
R_f	0,32 (DKM:MeOH = 9:1)
Tališče	114-116 °C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)	δ 3,37 (s, 3H, OC**H$_3$**), 4,30 (d, 2H, *J* = 4,0 Hz, C**H$_2$**OH), 4,86 (s, 2H, OC**H$_2$**), 5,70 (s, 1H, O**H**), 6,31 (t, 1H, *J* = 0,9 Hz, piran-**H**), 6,92-6,99 (m, 2H, 2 × Ar**H**), 7,31-7,39 (m, 2H, 2 × Ar**H**), 8,16 (s, 1H, piran-**H**) ppm.
HRMS (ESI$^+$) $C_{14}H_{15}O_5$ ([M+H]$^+$)	Izračunana masa: 263,0921; Izmerjena masa: 263,0919

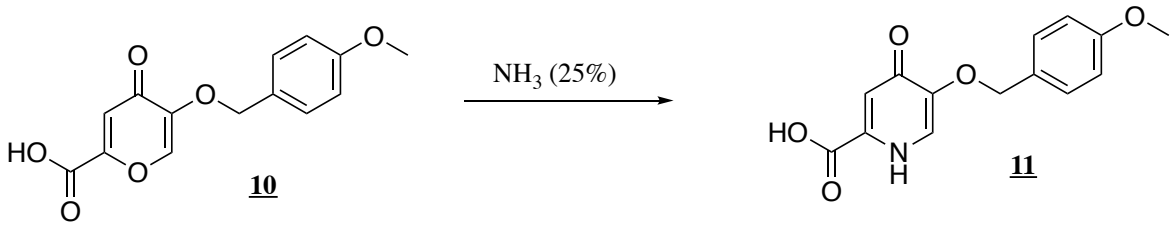
4.2.2 Sinteza 5-((4-metoksibenzil)oksi)-4-okso-4*H*-piran-2-karboksilne kisline



Najprej smo pripravili Jonesov reagent, in sicer tako, da smo žveplovo(VI) kislino (H_2SO_4, 2,75 mL) dodali k 8,7 mL H_2O in CrO_3 (3,120 g, 15,752 mmol). Spojino **9** (2,050 g, 7,817 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 150 mL acetona s pomočjo segrevanja pod zračnim hladilnikom. Bučko smo postavili na ledeno kopel, da se je raztopina ohladila na 0 °C. S pomočjo kapalnika smo počasi po kapljicah dodali Jonesov reagent in nato pustili reakcijsko zmes mešati še 2 uri na ledeni kopeli. Po končani reakciji smo najprej odfiltrirali nastalo oborino in nato uparili topilo. Suhi preostanek smo raztopili v 30 mL vode in segreli do temperature vrelišča. Vroče smo prefiltrirali in dobili oborino. Enak postopek smo ponovili s prvo oborino. Ker oborina ni bila čista, smo postopek ponovili še dvakrat, le da smo namesto vode uporabili 30 mL MeOH. Dobljeno matičnico smo pustili stati čez noč in naslednji dan odfiltrirali nastalo oborino. Skupno smo dobili 0,980 g spojine **10**.

5-((4-metoksibenzil)oksi)-4-okso-4*H*-piran-2-karboksilna kislina	
Kemijska formula	$C_{14}H_{12}O_6$
Opis	Svetlo rumeni kristali
M_r	276,24 g/mol
Izkoristek	19,6 %
R_f	0,07 (DKM:MeOH = 9:1 + CH_3COOH)
Tališče	165-167°C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)	δ 3,77 (s, 3H, OC**H$_3$**), 4,90 (s, 2H, OC**H$_2$**), 6,93 (s, 1H, -O**H**); 6,94-7,00 (m, 2H, 2 × Ar**H**), 7,32-7,41 (m, 2H, 2 × Ar**H**), 8,35 (s, 1H, piran-**H**) ppm
HRMS (ESI$^-$) $C_{14}H_{11}O_6$ ([M-H]$^-$)	Izračunana masa: 275,0562; Izmerjena masa: 275,0556

4.2.3 Sinteza 5-((4-metoksibenzil)oksi)-4-okso-1,4-dihidropiridin-2-karboksilne kisline

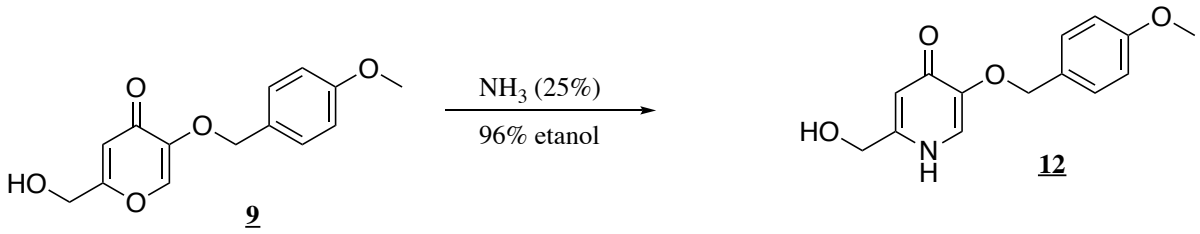


Spojino **10** (0,415 g, 1,502 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v vodni raztopini amonijaka (25% NH_3(aq), 19 mL). Med stalnim mešanjem smo reakcijsko zmes postavili na oljno kopel in pod refluksom segrevali 4 ure. Konec reakcije smo potrdili s pomočjo TLC. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes skoncentrirali na približno 5 mL ter jo nakisali do pH 2 s pomočjo koncentrirane HCl. Nastala je oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem. Dobili smo 0,258 g spojine **11** .

5-((4-metoksibenzil)oksi)-4-okso-1,4-dihidropiridin-2-karboksilna kislina	
Kemijska formula	$C_{14}H_{13}NO_5$
Opis	Bež kristali
M_r	276,24 g/mol
Izkoristek	62,3%
R_f	0,06 (DKM:MeOH = 4:1 + CH_3COOH)

Tališče	124-126 °C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)	Δ 3,80 (s, 3H, OC**H$_3$**), 5,13 (s, 2H, OC**H$_2$**), 6,96 (m, 2H, J = 8,3 Hz, 2 × Ar**H**), 7,26 (s, 1H, piran-**H**), 7,39 (d, 2H, J = 8,3 Hz, 2 × Ar**H**), 7,96 (s, 1H, piran-**H**) ppm, signalov za NH in COOH v spektru ne vidimo
HRMS (ESI$^-$) $C_{14}H_{12}NO_5$ ([M-H]$^-$)	Izračunana masa: 274,0723; Izmerjena masa: 274,0715

4.2.4 Sinteza 2-(hidroksimetil)-5-((4-metoksibenzil)oksi)piridin-4(1*H*)-ona

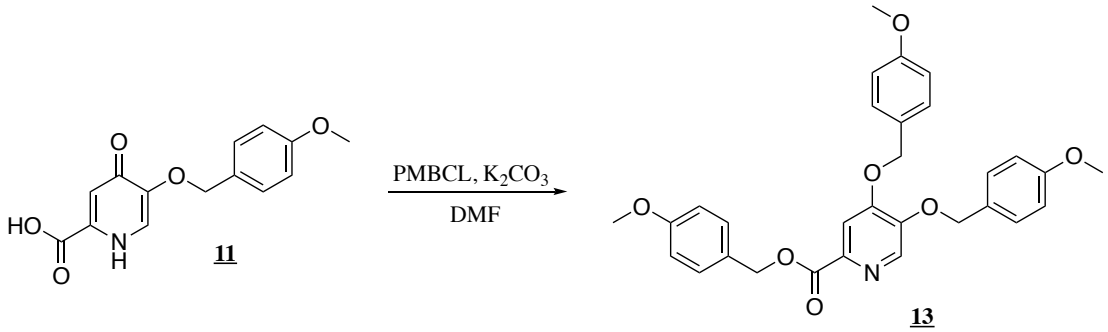


Spojino **9** (5,010 g, 19,103 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 75 mL vodne raztopine amonijaka (25%). Nato smo dodali še 15 mL 96% etanola. Bučko smo nato segrevali pod refluksom pri 90 °C. Pustili smo mešati čez noč. Konec reakcije smo potrdili s pomočjo TLC. Bučko smo odstranili iz oljne kopeli in pustili, da se ohladi (najprej na sobni temperaturi in nato še na ledeni kopeli). Nastalo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in posušili. Dobili smo 3,512 g produkta **12.**

2-(hidroksimetil)-5-((4-metoksibenzil)oksi)piridin-4(1*H*)-on	
Kemijska formula	$C_{14}H_{15}NO_4$
Opis	Svetlo rumeni kristali
M_r	261,28 g/mol
Izkoristek	70,3 %
R_f	0,06 (DKM:MeOH = 9:1)

Tališče	201-204 °C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)	δ 3,75 (s, 3H, OC**H$_3$**), 4,33 (d, 2H, J = 5,2 Hz, C**H$_2$**OH), 4,91 (s, 2H, OC**H$_2$**), 5,59 (s, 1H, -O**H**), 6,07 (s, 1H, piridinon-**H**), 6,90-6,98 (m, 2H, 2 × Ar**H**), 7,26 (s, 1H, piridinon-**H**), 7,33 (d, 2H, J = 8,2 Hz, 2 × Ar**H**), 11,09 (s, 1H, N**H**) ppm
HRMS (ESI$^+$) $C_{14}H_{16}NO_5$ ([M+H]$^+$)	Izračunana masa: 262,1083; Izmerjena masa: 262,1079

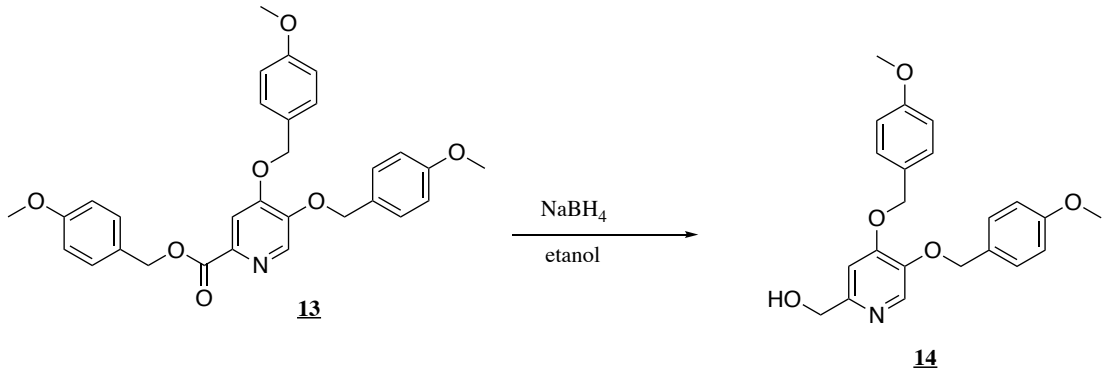
4.2.5 Sinteza 4-metoksibenzil 4,5-bis((4-metoksibenzil)oksi)pikolinata



Spojino **11** (0,894 g, 3,248 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 18 mL *N*,*N*-dimetilformamida (DMF) in dodali kalijev karbonat (K_2CO_3, 1,975 g, 14,291 mmol, 4,4 ekv.). Bučko smo zaprli s septumom in z iglo po kapljicah dodali *p*-metoksibenzilklorid (PMBCL, 0,969 mL, 7,145 mmol, 2,2 ekv.). Reakcijsko zmes smo nato segrevali pod refluksom pri 80 °C še 3 ure. Konec reakcije smo potrdili s pomočjo TLC. Reakcijsko zmes smo najprej ohladili na sobno temperaturo in nato po kapljicah dodali 25 mL 1% citronske kisline. Vodno fazo smo ekstrahirali z 2 × 80 mL EtOAc. Združene organske faze smo nato spirali še z 2 × 50 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in z 50 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. Organsko fazo smo nato posušili nad brezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirali in filtratu uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 1,970 g spojine **13**, ki pa ni bila povsem čista. Spojino smo zato dodatno čistili s kolonsko kromatografijo z mobilno fazo etilacetat/heksan = 1:1. Dobili smo 0,939 g produkta **13**.

4-metoksibenzil 4,5-bis((4-metoksibenzil)oksi)pikolinat	
Kemijska formula	$C_{30}H_{31}NO_7$
Opis	Rumeni kristali
M_r	517,58 g/mol
Izkoristek	55,82 %
R_f	0,72 (DKM:MeOH = 9:1)
Tališče	100-103 °C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)	δ 3,74 (s, 3H, OC**H$_3$**), 3,75 (s, 3H, OC**H$_3$**), 3,77 (s, 3H, OC**H$_3$**), 5,21 (s, 4H, 2 × OC**H$_2$**), 5,26 (s, 2H, C**H$_2$**O), 6,91-7,01 (m, 6H, 6 × Ar**H**), 7,33-7,42 (m, 6H, 6 × Ar**H**), 7,73 (s, 1H, piridin-**H**), 8,35 (s, 1H, piridin-**H**) ppm
HRMS (ESI$^+$) $C_{30}H_{30}NO_7$ ($[M+H]^+$)	Izračunana masa: 516,2026; Izmerjena masa: 516,2022

4.2.6 Sinteza (4,5-bis((4-metoksibenzil)oksi)piridin-2-il)metanola

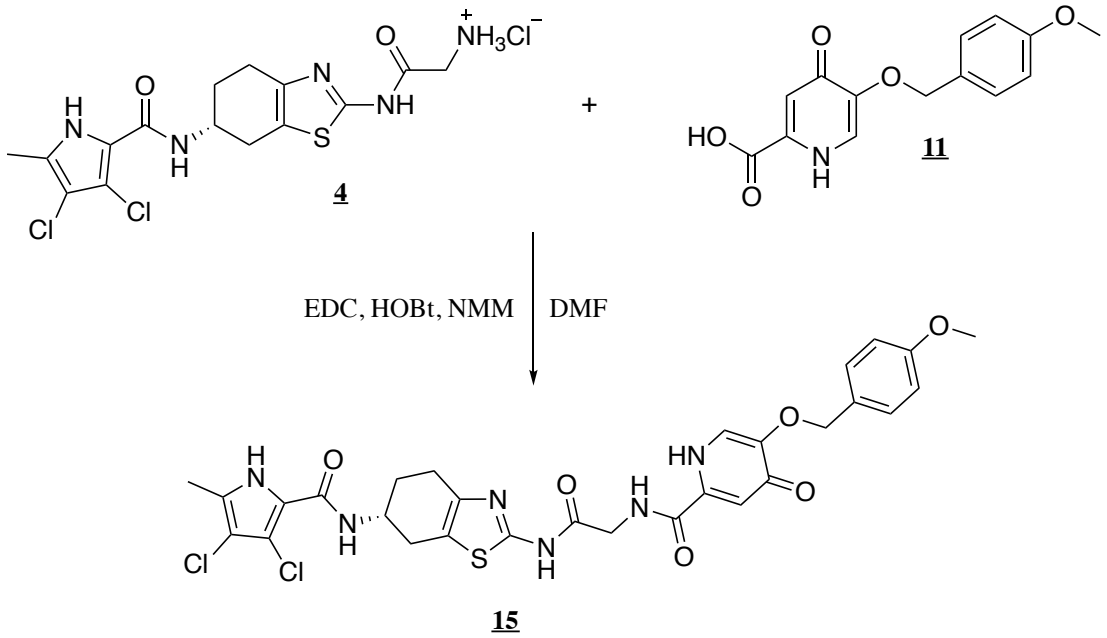


Spojino **13** (0,390 g, 0,754 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v absolutnem etanolu (6 mL). Raztopino smo ohladili na 0 °C na ledeni kopeli in nato postopoma dodali natrijev borhidrid (0,286 g, 7,535 mmol, 10 ekv.). Pustili smo mešati pri sobni temperaturi 24 ur. Nato smo najprej dodali 1 M NaOH (6 mL) in dobljeno raztopino skoncentrirali pri znižanem tlaku. Preostanku smo dodali 15 mL vode in dobljeno vodno fazo ekstrahirali z 2 × 30 mL DKM. Združene organske faze smo posušili nad natrijevim sulfatom, filtrirali in filtratu uparili topilo. Dobili smo 0,370 g spojine, ki pa ni bila povsem čista, zato smo jo čistili s kolonsko kromatografijo z mobilno fazo diklorometan/metanol = 9/1. Dobili smo 0,106 g spojine **14**.

(4,5-bis((4-metoksibenzil)oksi)piridin-2-il)metanola	
Kemijska formula	$C_{22}H_{25}NO_5$
Opis	Rumeni kristali
M_r	383,44 g/mol
Izkoristek	36,55 %
R_f	0,19 (DKM:MeOH = 20:1)
Tališče	96-98 °C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)	δ 3,75 (s, 3H, OC**H$_3$**), 3,77 (s, 3H, OC**H$_3$**), 4,44 (d, *J* = 5,6 Hz, C**H$_2$**OH), 5,06 (s, 1H, OC**H$_2$**), 5,13 (s, 1H, OC**H$_2$**), 5,34 (t, 1H, *J* = 5,6 Hz, CH$_2$O**H**), 6,89-6,93 (m, 2H, 2 × Ar**H**), 6,94-7,01 (m, 2H, 2 × Ar**H**), 7,19 (s, 1H, piridin-**H**), 7,29-7,36 (m, 2H, 2 × Ar**H**), 7,37-7,43 (m, 2H, 2 × Ar**H**), 8,09 (s, 1H, piridin-**H**) ppm
HRMS (ESI$^+$) $C_{22}H_{24}NO_5$ ([M+H]$^+$)	Izračunana masa: 382,1655; Izmerjena masa: 382,1654

4.3 Sinteza konjugatov

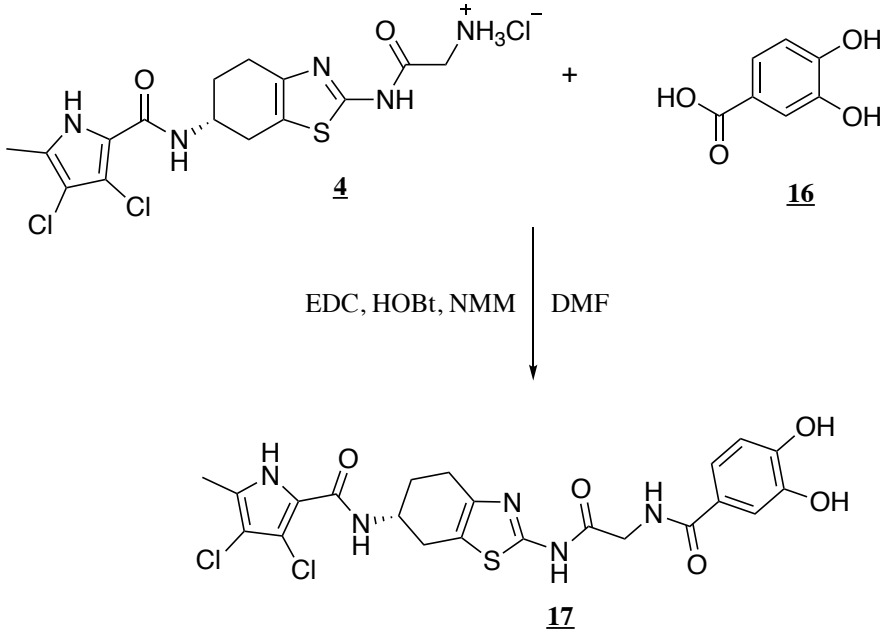
4.3.1 Sinteza (*S*)-*N*-(2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)-5-((4-metoksibenzil)oksi)-4-okso-1,4-dihidropiridin-2-karboksamida



Spojino **4** (0,080 g, 0,182 mmol, 1 ekv.) in spojino **11** (0,050 g, 0,182 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 3 mL *N*,*N*-dimetilformamida (DMF). Dodali smo *N*-(3-(dietilamino)prop-1-il)-*N'*-etilkarbodiimidijev klorid (EDC, 0,0418 g, 0,218 mmol, 1,2 ekv.), 1-hidroksibenzotriazol hidrat (HOBt, 0,032g, 0,236 mmol, 1,3 ekv.) in na koncu še *N*-metilmorfolin (NMM, 0,109 mL, 0,363 mmol, 2 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili mešati na ledeni kopeli 20 minut, nato pa smo jo pustili mešati 3 dni pri sobni temperaturi. Izolacijo smo izvedli tako, da smo v reakcijsko zmes dodali 30 mL etilacetata, nato pa smo dobljeno organsko fazo spirali najprej z 10 mL 1% citronske kisline, nato z 2 × 10 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in na koncu še z 10 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. Združene organske faze smo posušili nad brezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirali, organsko topilo uparili in dobili trden produkt **15** (0,0644 g).

(*S*)-*N*-(2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)-5-((4-metoksibenzil)oksi)-4-okso-1,4-dihidroporidin-2-karboksamid	
Kemijska formula	$C_{29}H_{28}Cl_2N_6O_6S$
Opis	Svetlo rumeni kristali
M_r	659,54 g/mol
Izkoristek	53,8%
R_f	0,26 (DKM:MeOH = 9:1)
Tališče	167-170 °C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)	δ 1,90-2,05 (m, 2H, **H**-7), 2,18 (s, 3H, pirol-C**H$_3$**), 2,65-2,75 (m, 3H, **H$_A$**-4, **H**-5), 3,02 (dd, 1H, J_1 = 15,8 Hz, J_2 = 5,1 Hz, **H$_B$**-4), 3,76 (s, 3H, OC**H$_3$**), 4,15 (d, 2H, J = 6,0 Hz, COC**H$_2$**NH), 4,22-4,32 (m, 1H, **H**-6), 5,19 (s, 2H, OC**H$_2$**), 6,92-7,01 (m, 2H, 2 × Ar**H**), 7,33 (d, 1H, J = 7,7 Hz, N**H**CO), 7,37-7,45 (m, 2H, 2 × Ar**H**), 7,49 (s, 1H, piridinon-**H**), 8,23 (s, 1H, piridinon-**H**), 8,81 (t, 1H, J = 6,0 Hz, COCH$_2$N**H**), 10,82 (s, 1H, N**H**), 12,02 (s, 1H, N**H**), 12,08 (s, 1H, N**H**) ppm
HRMS (ESI$^-$) $C_{25}H_{27}Cl_2N_6O_9S$ ([M-H]$^-$)	Izračunana masa: 657,0937; Izmerjena masa: 657,0937

4.3.2 Sinteza (*S*)-3,4-dikloro-*N*-(2-(2-(3,4-dihidroksibenzamido)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-6-il)-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamida

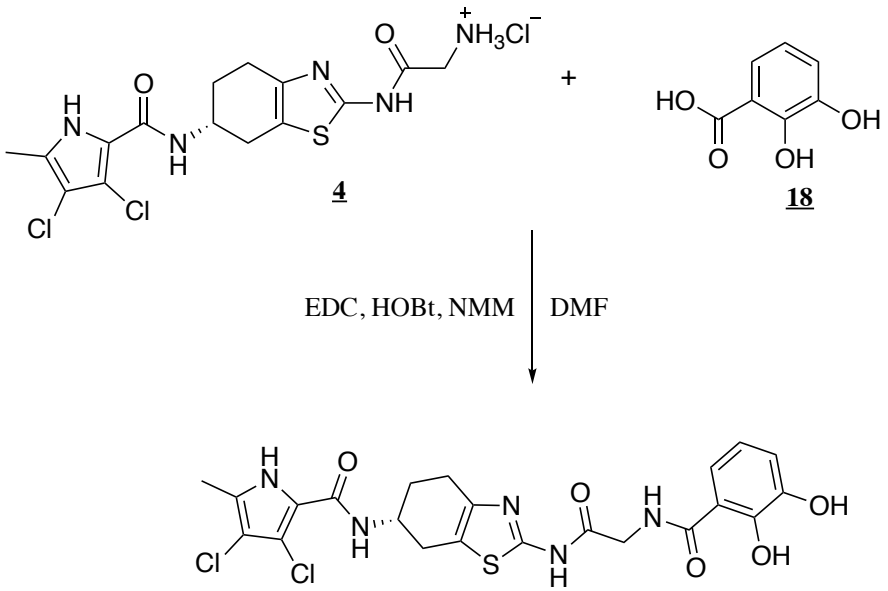


Spojino **4** (0,142 g, 0,324 mmol, 1 ekv.) in spojino **16** (0,050 g, 0,324 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 3 mL *N*,*N*-dimetliformamida (DMF). Dodali smo *N*-(3-(dietilamino)prop-1-il)-*N'*-etilkarbodiimidijev klorid (EDC, 0,0418 g, 0,218 mmol, 1,2 ekv.), 1-hidroksibenzotriazol hidrat (HOBt, 0,032g, 0,236 mmol, 1,3 ekv.) in na koncu še *N*-metilmorfolin (NMM, 0,109 mL, 0,649 mmol, 2 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili mešati na ledeni kopeli 20 minut in nato še 24 ur pri sobni temperaturi. Izolacijo smo izvedli tako, da smo reakcijski zmesi dodali 30 mL etilacetata in dobljeno organsko fazo spirali najprej z 2 × 10 mL 1% citronske kisline, nato z 5 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in na koncu še z 5 mL natrijevega klorida. Organsko fazo smo nato posušili nad natrijevim sulfatom, filtrirali in filtratu uparili topilo. Dobili smo 0,100 g spojine **17**.

(*S*)-3,4-dikloro-*N*-(2-(2-(3,4-dihidroksibenzamido)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-6-il)-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamid	
Kemijska formula	$C_{22}H_{21}Cl_2N_5O_5S$
Opis	Rjavo rumeni kristali
M_r	538,40 g/mol
Izkoristek	57,3%
R_f	0,12 (DKM:MeOH = 9:1)

Tališče	203-205 °C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)	δ 1,91-1,97 (m, 1H, $\mathbf{H_A}$-7), 1,99-2,03 (m, 1H, $\mathbf{H_B}$-7), 2,18 (s, 3H, pirol-C$\mathbf{H_3}$), 2,67-2,74 (m, 3H, **H**-4, $\mathbf{H_A}$-5), 3,01 (dd, 1H, J_1 = 15,7 Hz, J_2 = 5,2 Hz, $\mathbf{H_B}$-4), 4,04-4,10 (m, 2H, COC$\mathbf{H_2}$NH), 4,21-4,30 (m, 1H, **H**-6), 6,77 (d, 1H, J = 8,2 Hz, CON**H**), 7,23 (dd, 1H, J_1 = 8,3 Hz, J_2 = 2,2 Hz, Ar**H**), 7,29-7,37 (m, 2H, 2 × Ar**H**), 8,54 (t, 1H, J = 5,9 Hz, CH_2N**H**CO), 9,18 (s, 1H, O**H**), 9,53 (s, 1H, O**H**), 12,03 (2 × s, 2H, 2 × N**H**) ppm
HRMS (ESI$^-$) $C_{22}H_{20}Cl_2N_5O_5S$ ([M-H]$^-$)	Izračunana masa: 536,0555; Izmerjena masa: 536,0549

4.3.3 Sinteza (*S*)-3,4-dikloro-*N*-(2-(2-(2,3-dihidroksibenzamido)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-6-il)-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamida

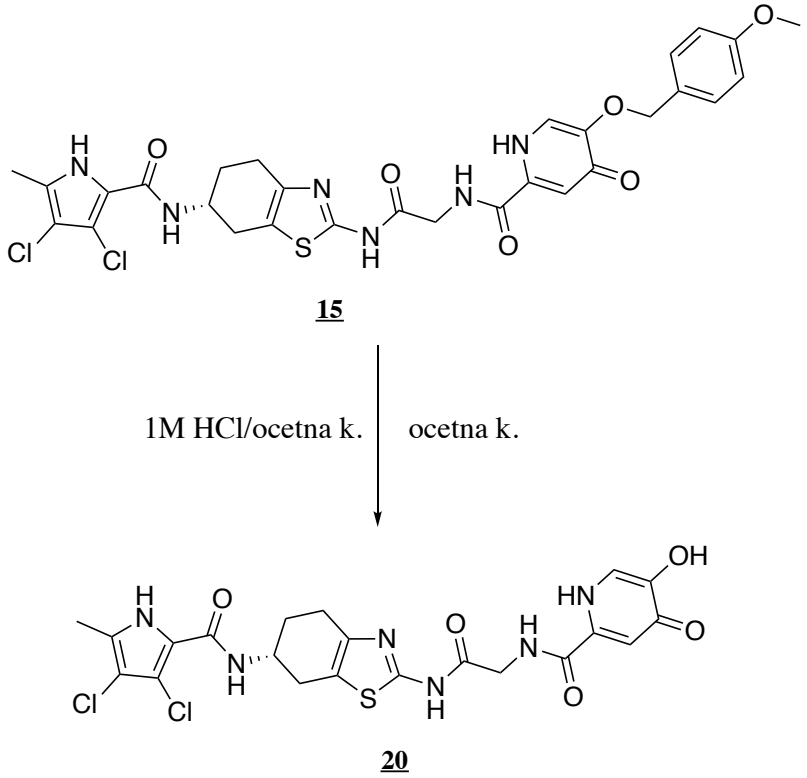


Spojino **4** (0,142 g, 0,324 mmol, 1 ekv.) in spojino **18** (0,050 g, 0,324 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 3 mL *N*,*N*-dimetliformamida (DMF). Dodali smo *N*-(3-(dietilamino)prop-1-il)-*N'*-etilkarbodiimidijev klorid (EDC, 0,048 g, 0,218 mmol, 1,2 ekv.), 1-hidroksibenzotriazol hidrat (HOBt, 0,032g, 0,236 mmol, 1,3 ekv.) in *N*-metilmorfolin (NMM, 0,10 mL, 0,648 mmol, 2 ekv.). Pustili smo mešati na ledeni kopeli 20 minut. Reakcijsko zmes smo nato odstranili z ledene kopeli. Po 24 urah mešanja pri sobni temperaturi smo konec reakcije ugotovili s TLC. Izolacijo smo

izvedli tako, da smo reakcijski zmesi dodali 30 mL etilacetata. Dobljeno organsko fazo smo najprej spirali z 2 × 10 mL 1% citronske kisline, nato z 2 × 5 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in na koncu še 10 mL z nasičene raztopine natrijevega klorida. Organsko fazo smo nato posušili nad natrijevim sulfatom, filtrirali in filtratu uparili topilo. Dobili smo 0,055 g spojine **19**.

(*S*)-3,4-dikloro-*N*-(2-(2-(2,3-dihidroksibenzamido)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-6-il)-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamid	
Kemijska formula	$C_{22}H_{21}Cl_2N_5O_5S$
Opis	Rjavo rumeni kristali
M_r	538,40 g/mol
Izkoristek	31,6%
R_f	0,27 (DKM:MeOH = 9:1)
Tališče	172-175 °C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)	δ 1,89-2,06 (m, 2H, H-7), 2,18 (s, 3H, pirol-C**H$_3$**), 2,55-2,73 (m, 3H, **H**-4, **H$_A$**-5), 3,01 (dd, 1H, J_1 = 15,7 Hz, J_2 = 5,2 Hz, **H$_B$**-4), 4,18 (d, 2H, J = 5,6 Hz, COC**H$_2$**NH), 4,21-4,30 (m, 1H, **H**-6), 6,69 (t, 1H, J = 8,0 Hz, CH$_2$N**H**CO), 6,93 (dd, 1H, J_1 = 7,8 Hz, J_2 = 1,5 Hz, Ar**H**), 7,29-7,36 (m, 2H, 2 × Ar**H**), 9,27 (s, 1H, O**H**), 12,01 (s, 1H, N**H**), 12,15 (s, 1H, N**H**) ppm
HRMS (ESI$^-$) $C_{22}H_{20}Cl_2N_5O_5S$ ([M-H]$^-$)	Izračunana masa: 536,0556; Izmerjena masa: 536,0562

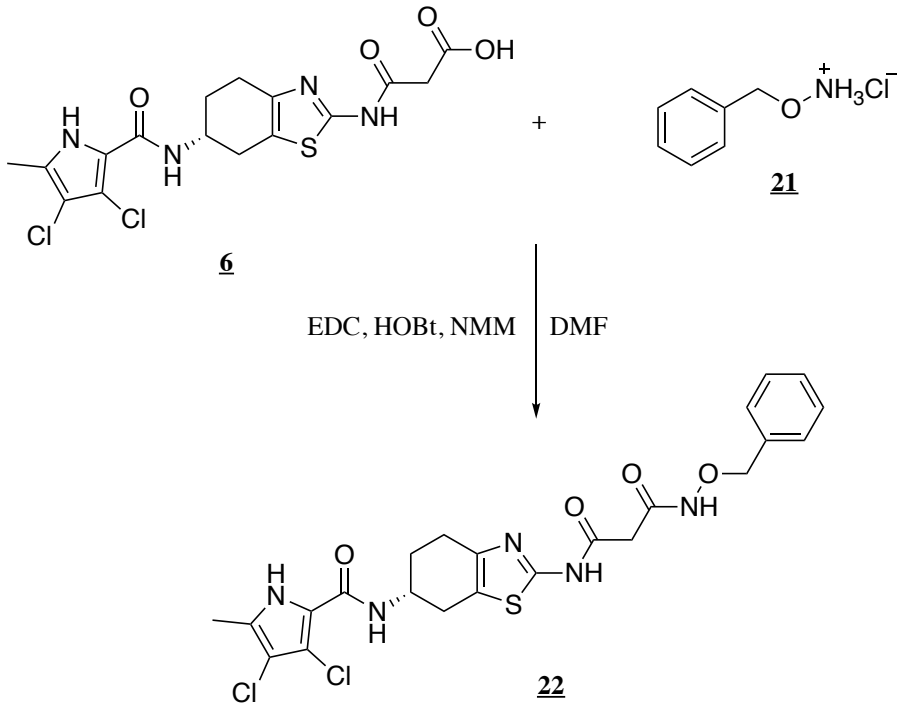
4.3.4 Sinteza (*S*)-*N*-(2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)-5-hidroksi-4-okso-1,4-dihidropiridin-2-karboksamida



Spojino **15** (0,030 g, 0,0455 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v mešanici 1,4-dioksana (0,5 mL) in ocetne kisline (3 mL). Reakcijsko zmes smo ohladili na 10 °C na ledeni kopeli in nato pa smo po kapljicah z iglo preko septuma dodali 1 M HCl v ocetni kislini (0,0152 mL, 0,455 mol, 10 ekv.). Raztopino smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. S pomočjo TLC smo ugotovili, da reakcija še ni potekla do konca, zato smo dodali dodatno količino 1 M HCl v ocetni kislini (0,00759 mL, 0,226 mmol, 5 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili potekati še 2 uri in nato uparili ocetno kislino pod znižanim tlakom. Suhi preostanek smo raztopili v 20 mL dietiletra. Nastala je oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem in dobili 0,0218 g spojine **20**.

(*S*)-*N*-(2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)-5-hidroksi-4-okso-1,4-dihidropiridin-2-karboksamid	
Kemijska formula	$C_{21}H_{20}Cl_2N_6O_5S$
Opis	Roza rdeči kristali
M_r	539,39 g/mol
Izkoristek	88,9%
R_f	0,02 (DKM:MeOH = 9:1)
Tališče	> 300 °C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)	δ 1,93-2,07 (m, 2H, **H**-7), 2,18 (s, 3H, pirol-C**H$_3$**) 2,66-2,76 (m, 3H, **H**-4, **H$_A$**-5), 3,01 (dd, 1H, J_1 = 15,8 Hz, J_2 = 5,2 Hz, **H$_B$**-4), 4,18 (d, 2H, J = 5,7 Hz, COC**H$_2$**NH), 4,22-4,29 (m, 1H, **H**-6), 7,42 (d, 1H, J = 7,6 Hz, CON**H**), 7,64 (s, 1H, piridin-**H$_A$**), 8,05 (s, 1H, piridin-**H$_B$**), 9,25 (s, 1H, O**H**), 12,07-12,20 (m, 2H, 2 × N**H**) ppm
HRMS (ESI$^-$) $C_{21}H_{19}Cl_2N_6O_5S$ ([M-H]$^-$)	Izračunana masa: 537,0518; Izmerjena masa: 537,0515

4.3.5 Sinteza (*S*)-*N*1-(benziloksi)-*N*3-(6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)malonamida



Spojino **19** (0,100 g, 0,221 mmol, 1 ekv.) in spojino **20** (0,0352 g, 0,221 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 5 mL *N*,*N*-dimetliformamida (DMF). Dodali smo *N*-(3-(dietilamino)prop-1-il)-*N'*-etilkarbodiimidijev klorid (EDC, 0,051 g, 0,265 mmol, 1,2 ekv.), 1-hidroksibenzotriazol hidrat (HOBt, 0,0390g, 0,287 mmol, 1,3 ekv.) in *N*-metilmorfolin (NMM, 0,049 mL, 2 ekv.). Pustili smo mešati na ledeni kopeli 20 minut, potem pa smo reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi 24 h. Izolacijo smo izvedli tako, da smo reakcijski zmesi najprej dodali 30 mL etilacetata in dobljeno organsko fazo spirali najprej z 2 × 10 mL 10 % citronske kisline, nato 2 × 10 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in na koncu še z 10 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. Organsko fazo smo nato sušili nad natrijevim sulfatom, filtrirali in filtratu uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,072 g spojine **20**.

(*S*)-*N*1-(benziloksi)-*N*3-(6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)malonamid	
Kemijska formula	$C_{23}H_{23}Cl_2N_5O_4S$
Opis	Rumeno oranžni kristali
M_r	536,43g/mol
Izkoristek	60,73 %
R_f	0,40 (DKM:MeOH = 9:1)
Tališče	159-162 °C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)	δ 1,90-2,07 (m, 2H, **H**-7), 2,19 (s, 3H, pirol-C**H$_3$**), 2,68-2,79 (m, 3H, **H$_A$**-4, **H**-5), 3,01 (dd, 1H, J_1 = 15,8 Hz, J_2 = 5,2 Hz, **H$_B$**-4), 3,24 (s, 2H, COC**H$_2$**CO), 4,21-4,34 (m, 1H, **H**-6), 4,82 (s, 2H, OC**H$_2$**Ph), 7,30-7,45 (m, 6H, **Ph**, CON**H**), 11,27 (s, 1H, CON**H**O), 12,02 (s, 1H, N**H**), 12,06 (s, 1H, N**H**) ppm
HRMS (ESI$^-$) $C_{23}H_{22}Cl_2N_5O_4S$ ([M-H]$^-$)	Izračunana masa: 534,0780; Izmerjena masa: 534,0770

5 Rezultati in razprava

5.1 Komentar sinteznih postopkov

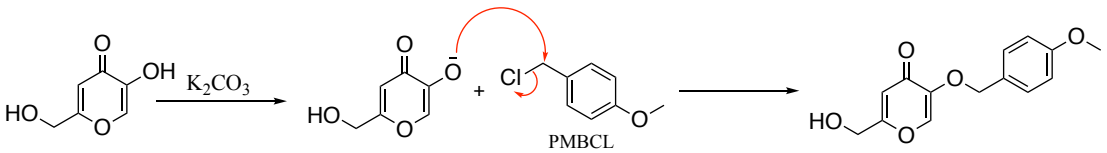
5.1.1 Sinteza sideroforov iz kojične kisline

Izhodna spojina za sintezo mimetikov sideroforov je bila kojična kislina. V prvi stopnji sinteze je bilo potrebno uvesti *para*-metoksibenzilno (PMB) zaščitno skupino na OH skupino na mestu 3.

5.1.1.1 Uporaba zaščite PMB

Zaščita PMB se uporablja predvsem za zaščito hidroksilnih skupin. V našem primeru smo pri sintezi sideroforov iz kojične kisline v prvi stopnji morali zaščititi hidroksilno skupino na mestu 3. S tem smo lahko zagotovili, da je v naslednjih stopnjah sinteze reakcija potekala samo v želeni smeri.

Zaščito PMB smo uporabili pri sintezi mimetikov sideroforov **9** in **13**. Za uvedbo zaščite smo potrebovali bazo K_2CO_3, saj princip uvedbe zaščite temelji na osnovi Williamsove sinteze etrov. Vloga baze je bila deprotonacija alkohola, da ta lahko v naslednji stopnji reagira s *para*-metoksibenzil kloridom, pri čemer nastane ustrezni eter. Reakcija je po mehanizmu nukleofilna substitucija (Slika 11).



Slika 11: Mehanizem uvedbe zaščite PMB na kojično kislino.

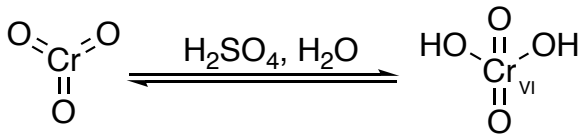
Uvedeno zaščitno skupino PMB smo ohranili skozi vse stopnje sinteze mimetika siderofora in tudi med sklopitvijo mimetika siderofora z zaviralcem DNA-giraze (spojina **15**).

Zadnjo stopnjo sinteze končne spojine **20** je predstavljala odstranitev zaščite PMB. Najpogostejša metoda odstranitve zaščitne skupine PMB je uporaba acidolize (npr, trifluoroocetna kislina, TFA), DDQ ali uporaba Lewisovih kislin. V našem primeru smo uporabili klorovodikovo kislino v ocetni kislini. Odstranitev zaščitne skupine z

acidolizo je možna in poteče kvantitativno, ker metoksi skupina stabilizira pri acidolizi nastali karbokation.

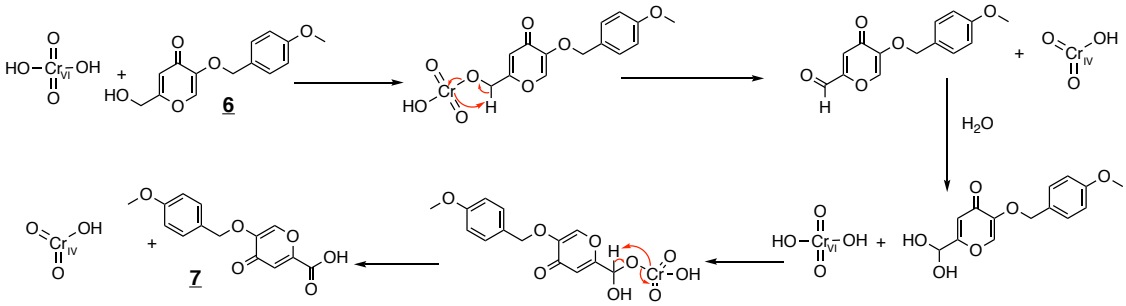
5.1.1.2 Oksidacija s uporabo Jonesovega reagenta

Naslednji korak je bila oksidacija spojine **10**, ki smo jo izvedli z uporabo Jonesovega reagenta, ki smo ga predhodno pripravili iz kromovega(VI) oksida in razredčene žveplove(VI) kisline, pri čemer je nastala kromova(VI) kislina (Slika 12). Jonesov reagent se primarno uporablja za oksidacijo primarnih alkoholov do karboksilnih kislin. Lahko ga uporabimo tudi za pretvorbo sekundarnih alkoholov v ketone.



Slika 12: Nastanek Jonesovega reagenta (povzeto po 29).

Jonesov reagent tvori s hidroksilno skupino kromov ester, ki nato reagira intramolekularno do tvorbe karbonilne skupine. V našem primeru pride do nastanka aldehida. Ob prisotnosti vode pride do nastanka hidratov, ki se nato dodatno oksidirajo s pomočjo Jonesovega regenta, pri čemer nastane karboksilna kislina (Slika 13).

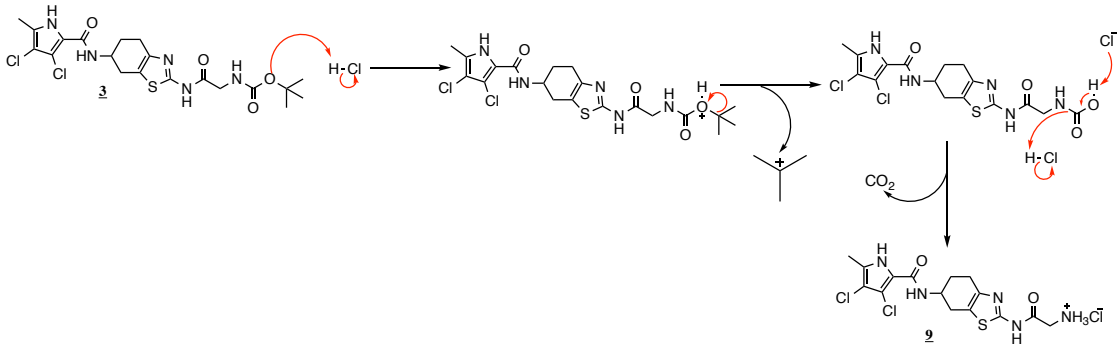


Slika 13: Mehanizem oksidacije s Jonesovim reagentom (povzeto po 29)

5.1.2 Uvedba distančnika zaščitenega s *terc*-butil karbamatom

Zaviralcu smo pred sklopitvijo z mimetikom siderofora dodali distančnik (spojina **3**). V našem primeru smo kot distančnik uporabili aminokislino glicin. Da bi reakcija potekla na mestu, kjer smo želeli, smo morali uporabiti glicin, ki je bil predhodno

zaščiten v obliki *terc*-butil karbamata. Po uvedbi distančnika je sledila konjugacija z mimetiki sideroforov. Da pa smo lahko konjugacijo izvedli, je bilo najprej potrebno odstraniti zaščitno skupino Boc, ki jo odstranjujemo s pomočjo acidolize. Najpogosteje uporabljena reagenta sta klorovodikova kislina v ocetni kislini in trifluoroocetna kislina. Za odstranitev zaščitne skupine smo uporabili klorovodikovo kislino v 1,4-dioksanu. Mehanizem odstranitve zaščitne skupine je prikazan na Sliki 14.

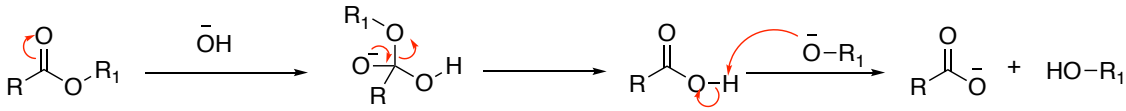


Slika 14: Mehanizem odstranitve zaščitne skupine Boc z uporabo klorovodikove kisline.

5.1.3 Alkalna hidroliza estra

Estri so zelo pogoste funkcionalne skupine prisotne v številnih učinkovinah in naravnih spojinah. So zelo pogoste zaščitne skupine za karboksilne in hidroksilne skupine. Hidroliza estrov lahko poteka na več načinov. V sklopu eksperimentalnega dela magistrske naloge smo se poslužili alkalne hidrolize estrov (saponifikacija).

Reakcija saponifikacije najpogosteje poteka ob prisotnosti vode in organskega topila ter ustrezne baze (KOH, NaOH, LiOH) (Slika 15) (30).



Slika 15: Mehanizem alkalne hidrolize estra. Povzeto po (31).

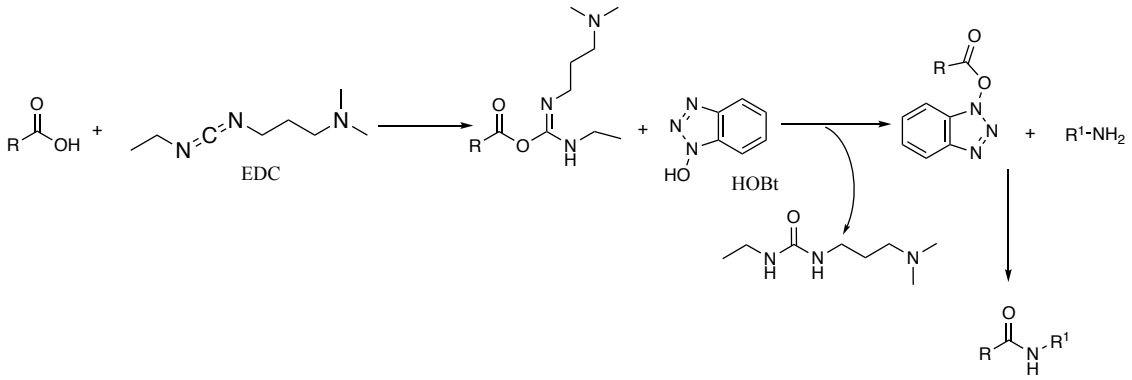
Hidrolizo estra smo izvedli pri sintezi vmesnega produkta **6**. Ester **5** smo raztopili v MeOH in nato dodali 2 M NaOH ter pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo dobili sol karboksilne kisline in alkohol. Pri izolaciji smo najprej

uparili metanol, nato pa vodno fazo ekstrahirali z EtOAc, s čimer smo se znebili nečistot. Vodno fazo smo nato nakisali s 1 M HCl do pH 1. S tem smo dosegli, da se je naš produkt protoniral, zaradi česar se mu je zmanjšala topnost v vodi in se je zato oboril.

5.1.4 Sinteza amidov s sklopitvenimi reagenti

Za uspešno sintezo zaviralcev DNA-giraze B je bila potrebna tvorba kompleksa med zaviralcem s pripetim distančnikom in mimetikom siderofora. Omenjena sklopitev je potekala s tvorbo amidne vezi med primarnim aminom in karboksilno kislino, pri čemer je bila potrebna uporaba sklopitvenih reagentov.

Prvi korak pri tvorbi amidne vezi je bila aktivacija karboksilne kisline (bolj natančno aktivacija karbonilnega C atoma), kar smo dosegli z uporabo sklopitvenega reagenta EDC, pri čemer je nastal aktiviran ester (Slika 16). V naslednji stopnji reakcije je aktiviran ester reagiral z aminom in nastala je amidna vez. V tej stopnji smo uporabili tudi reagent HOBt, ki kot pomožni nukleofil pospeši reakcijo (32).



Slika 16: Mehanizem nastanka amidne vezi z uporabo sklopitvenih reagentov.

Izolacijo sintetiziranih amidov smo izvedli s pomočjo ekstrakcije. Najprej smo reakcijski zmesi dodali EtOAc. Organsko fazo smo najprej sprali z 1% citronsko kislino, s katero smo se znebili prebitnega sklopitvenega reagenta EDC, derivata sečnine, ki nastane pri reakciji in ostalih bazičnih spojin (*N*-metilmorfolin, izhodni amin). Nato smo spirali z nasičeno raztopino $NaHCO_3$, s čimer smo se znebili nezreagirane karboksilne kisline in HOBt. Na koncu smo spirali še z nasičeno raztopino NaCl, s čimer smo se znebili večine vode v organski fazi. Organsko fazo smo dodatno sušili še nad brezvodnim Na_2SO_4.

5.2 Rezultati bioloških testiranj

5.2.1 Protibakterijsko delovanje

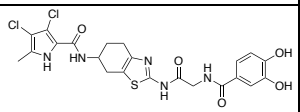
Protibakterijsko delovanje so določili spojinam **17**, **19** in **20** na Univerzi v Helsinkih na Finskem. Aktivnost so določali na dveh po Gramu pozitivnih sevih (*Enterococcus faecalis ATCC 29212* in *Staphylococcus aureus ATCC 25923*) in dveh po Gramu negativnih sevih (*Escherichia coli ATCC 25922* in *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853*).

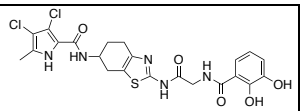
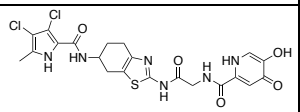
Poleg omenjenih štirih bakterijskih sevov je bila aktivnost določena tudi na dveh mutiranih sevih bakterije *Escherichia coli* (JW5503 in JD17464). Sev JW5503 je sev brez gena za *tolC*, ki je odgovoren za sintezo proteinov, ki so sestavni del iztočnih črpalk na zunanji membrani bakterije *E. coli*. Slednje so odgovorne za aktivni transport manjših molekul (predvsem toksinov) iz citoplazme in periplazemskega prostora bakterij v zunajcelično okolje, kar zmanjšuje tudi koncentracijo spojin s protibakterijskim delovanjem na mestu delovanja in vodi do rezistence bakterij proti tem spojinam. Z odstranitvijo omenjenega gena postanejo bakterije bolj občutljive na protibakterijske spojine (33, 34, 35).

Pri drugem mutiranem sevu pa gre za odstranitev gena *lpxC*, ki je odgovoren za biosintezo lipidov A, ki so gradniki lipoproteinov. Z odstranitvijo omenjenega gena pride do oslabitve zunanje membrane, kar poveča vstop zaviralcev v bakterijo, s čimer predvidoma dosežemo večjo koncentracijo na mestu delovanja. Z določanjem aktivnosti na tem sevu smo želeli ugotoviti, ali na delovanje naših spojin vpliva povečana prehodnost zunanje membrane bakterij (21).

Rezultati vrednotenja protibakterijskega delovanja so podani v Preglednici 3 kot odstotki zaviranja rasti v primerjavi s kontrolo (ciprofloksacin) po 24 h pri 50 μM koncentraciji testirane spojine.

***Preglednica 3**: Rezultati vrednotenja protibakterijskega delovanja*

spojina	struktura	*E. faecalis ATCC 29212*	*S. aureus ATCC 25923*	*E. coli ATCC 25922*	*P. aeruginosa ATCC 27853*	*E. coli*[a] *JW5503*	*E. coli*[b] *JD17464*
17		**103%**	32%	12%	46%	**101%**	8%

19		**86%**	62%	7%	42%	**96%**	4%
20		53%	-7%	23%	18%	31%	41%
[a] bakterija z mutiranim genom *tolC* [b] bakterija z mutiranim genom *lpxC*							

Glede na rezultate v zgornji preglednici lahko povzamemo, da so spojine imele boljše delovanje proti po Gramu pozitivnim bakterijam (predvsem *E. faecalis*). Najmočnejše delovanje sta imeli spojini **17** in **19**. Spojina **17** je zavrla rast bakterije *E. faecalis* 100%, medtem ko je spojina **19** zavrla rast za 85% pri 50 μM. Spojina **20** je izražala šibkejše delovanje proti po Gramu pozitivnim bakterijam in je zavrla rast bakterije *E. faecalis* le za 50%. Vse testirane spojine so imele izrazito slabše delovanje pri testiranju na *S. aureus*. Delno delovanje je izražala le spojina **19** (61%).

Pri po Gramu negativnih bakterijah je odstotek zaviranja rasti pri 50 μM precej manjši. Razlog za to je najverjetneje slabše prehajanje celične stene in tudi sposobnost bakterij za izločanje spojin s pomočjo črpalk. Izkazalo se je, da imajo sintetizirane spojine močnejše delovanje na *P. aeruginosa*, vendar tudi to delovanje ne zavira rasti bakterij za več kot 50%, medtem ko je pri *E. coli* odstotek še nižji (zaviranje rasti ne presega 25%). Drugačne rezultate smo dobili pri sevih *E. coli* z mutiranim genom *tolC*. Spojina **17** je v tem primeru 100% zavrla rast bakterije, medtem ko je spojina **19** zavrla rast za 96%. Le v primeru spojine **20** ni prišlo do večjega porasta v protibakterijskem delovanju. To dejstvo potrjuje, da je glavni razlog za neučinkovitost spojin proti po Gramu negativnim bakterijam ekskrecija spojin preko iztočnih črpalk, katerih gradniki so proteini kodirani v genu *tolC*. Pri sevih *E. coli* z mutiranim genom *lpxC* pa ni prišlo do izboljšanja protibakterijskega delovanja spojin, kar nakazuje, da je glavni razlog za šibko protibakterijsko delovanje posledica iztočnih črpalk in ne slabšega prehajanja celične stene (31).

Spojinam z odstotkom inhibicije večjim od 80 % je bila določena tudi minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). To je najnižja koncentracija spojine, ki zavre rast bakterij za več kot 90%. Testiranje je bilo izvedeno na sevu *E. faecalis* (ATCC 29212) in *E. coli* (JW5503), kot pozitivna kontrola pa je bil uporabljen ciprofloksacin (Preglednica 4).

Pri spojinah **17** in **19** smo za sev *E. coli* z okvarjeno izlivno črpalko določili enako vrednost MIK v vrednosti 25 μM, kar še vedno spada v nizko mikromolekularno območje. Pri testiranju spojin na Gram pozitivno bakterijo *E. faecalis* je bila določena višja vrednost MIK. Pri spojini **19** je ta znašala 75 μM, pri spojini **17**, pa je bila ta večja od 75 μM, ki predstavlja zgornjo vrednost intervala za določanje. Rezultata nakazujeta na dejstvo, da spojini delujeta samo v visokih koncentracijah.

***Preglednica 4**: Rezultati testiranja MIK (μM) pri najučinkovitejših spojinah.*

Spojina	*E. faecalis ATCC 29212*	*E. coli JW5503*
17	> 75	25
19	75	25
ciprofloksacin	3,02	0,005

5.2.2 Encimski testi

Tri končne spojine (spojine **17**, **19** in **20**) so bile testirane tudi na encimu DNA-giraza iz bakterije *E. coli*. Merili smo zaviralno aktivnost pri različnih koncentracijah spojin (10 μM, 1 μM in 0,1 μM). Poleg tega smo spojinam določili tudi srednjo zaviralno koncentracijo (IC_{50}). IC_{50} predstavlja koncentracijo spojine, ki zmanjša delovanje encima za 50% (Preglednica 5).

Rezultate smo podali kot rezidualno aktivnost (RA), ki nam pove kakšno aktivnost je ohranil encim v prisotnosti zaviralca pri določeni koncentraciji in je izražena v odstotkih. Manjši kot je odstotek, močnejše je delovanje zaviralca.

RA [%] = 100% - % zaviranja encima

***Preglednica 5**: Rezultati encimskih testov izraženih kot rezidualna aktivnost pri različnih koncentracijah in vrednost IC_{50}.*

Spojina	RA (10 μM) [%]	RA (1 μM) [%]	RA (0,1 μM) [%]	IC_{50} [μM]
17	1	6	72	0,3
19	1	10	93	0,8
20	32	56	/	1

Vse tri končne spojine (**17**, **19**, **20**) so si strukturno zelo podobne. Razlikujejo se le v strukturi siderofora vezanega na terminalni del spojine. Iz rezultatov o rezidualni aktivnosti spojin prikazanih v preglednici 5 lahko razvidimo, da imata zaviralno delovanje proti DNA-girazi močneje izraženo le spojini **17** in **19** (pri 1 μM ima spojina **17** RA = 6%, spojina **19** pa RA = 10%, pri spojini **20** je RA > 50%). Pri spojinah **17** in **19** je struktura siderofora dihidroksibenzojska kislina. Spojini se razlikujeta le v položaju hidroksilnih skupin na aromatskem obroču siderofora (pri spojini **17** sta le ti vezani na mestih *meta* in *para*, pri spojini **19** pa sta vezani na mestih *orto* in *meta*). Spojina **17** je glede na rezultate IC_{50} imela najmočnejše zaviralno delovanje (IC_{50} = 0,3 μM).

Vsem trem končnim spojinam je skupen 4,5,6,7-tetrahidrobenzotiazolni skelet, na katerega je preko amidne vezi vezan 3,4-dikloro-5-metilpirol. Ta ima ključno vlogo pri vezavi spojine na encim. NH skupina pirolnega obroča je odgovorna za tvorbo vodikovih vezi med AK ostankom Asp73 in molekulo vode. Vloga klorov in metilne skupine je tvorba hidrofobnih interakcij z AK ostanki znotraj hidrofobnega žepa v encimu.

Spojini **19** smo nato določili tudi zaviralno aktivnost na DNA-girazi iz bakterije *S. aureus* in zaviralno aktivnost na encimu topoizomeraza IV iz *E. coli* in *S. aureus* (Preglednica 6).

***Preglednica 6**: Rezultati zaviralne jakosti in IC_{50} spojin na DNA-girazi in topoizomerazi iz E. coli in S. aureus.*

Spojina	DNA-giraza				Topoizomeraza IV			
	E. coli		*S. aureus*		*E. coli*		*S. aureus*	
	RA (10 μM) [%]	IC_{50} [μM]	RA (10 μM) [%]	IC_{50} [μM]	RA (10 μM) [%]	IC_{50} [μM]	RA (10 μM) [%]	IC_{50} [μM]
19	99	0,8	46	10	55	10	-10	60

6 Sklep

DNA-giraza je encim, ki je odgovoren za uvajanje negativnih dodatnih zavojev v dvovijačno DNA. Prisotna je samo v prokariontih, zato predstavlja odlično tarčo protibakterijskim učinkovinam z vidika selektivne toksičnosti. Z uporabo principa »trojanskega konja« se lahko potencialno izognemo težavam slabe permeabilnosti spojin preko bakterijske celične stene. Princip temelji na konjugaciji zaviralcev bakterijskih encimov s siderofori ali njihovimi mimetiki in izkoriščanju bakterijskih transporterjev za kompleks siderofor-železo. Tako se lahko s tvorbo konjugatov med zaviralcem in sideroforom izognemo težavam z dostavo zaviralca do ciljane tarče.

V okviru magistrske naloge smo tako načrtovali, sintetizirali in ovrednotili nove konjugate med zaviralci DNA-giraze in mimetiki sideroforov. Sintetizirali smo zaviralce DNA-giraze s 4,5,6,7-tetrahidrobenzotiazolnim skeletom (spojini **4** in **6**) in mimetike sideroforov (spojine **11**, **12**, **14**). Po končani sintezi mimetikov sideroforov in zaviralcev je sledila še konjugacija, s čimer nam je uspelo sintetizirati 3 končne spojine (**17**, **19** in **20**), ki smo jim preverili tudi protibakterijsko delovanje in zaviralno aktivnost v encimskem testu. Delovanje proti G+ bakterijam sta izkazali spojini **17** in **19**, katerim je bila določena tudi MIK za sev *E. faecalis ATCC29212* (spojina **17**: MIK > 75 μM, spojina **19**: MIK = 75 μM). Proti G- bakterijam ni bilo razvidnega močnejšega delovanja. Le-ta pa se je pokazal proti G- bakterijam z odstranjenim genom *tolC*, ki je odgovoren za sintezo iztočnih črpalk (spojinam **17** in **19** je bil določen MIK = 25 μM, testiran na sevu *E. coli JW5503*). To nakazuje na dejstvo, da se naše spojine izločajo iz bakterij z omenjenimi iztočnimi črpalkami, kar zmanjšuje njihovo protibakterijsko delovanje.

Pri določanju encimske aktivnosti se je najmočnejše delovanje izrazilo pri spojini **17** in **19**. Vrednosti IC_{50}, določena na DNA-girazi iz *E. coli* je znašala 0,3 μM za spojino **17** in 0,8 μM za spojino **19**. Kljub temu, da sta spojini imeli najbolj izrazito zaviralno delovanje na encim iz bakterije *E. coli*, pa na isto bakterijo nista izražali protibakterijskega delovanja. Ta se je pokazala šele ob odstranitvi gena, ki kodira gen za iztočno črpalko tolC. Dejstvo je, da za protibakterijsko delovanje ni ključno samo delovanje na encim, ampak tudi fizikalno-kemijske lastnosti spojin, ki so ključne pri nadaljnji optimizaciji tega strukturnega tipa spojin..

Vseeno pa rezultati pridobljeni od sintetiziranih spojin zagotavljajo pomembne informacije za odkrivanje novih in izboljšanih zaviralcev DNA-giraze. Ti so namreč

ključnega pomena v boju proti vse večjemu številu rezistentnih bakterij proti že obstoječim protibakterijskim učinkovinam.

7 Literatura

1. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews 2010; 74: 417-433.
2. Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature 2000; 406: 775-781.
3. Alanis AJ. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? Archives of Medical Research 2005; 36: 697-705.
4. Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. International Journal of Medical Microbiology 2013; 303: 287-292.
5. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. Annual Review of Biochemistry 2001; 70: 369-413.
6. Maxwell A. DNA gyrase as a drug target. Trends in Microbiology 1997; 5: 102-109.
7. Pogorelčnik B, Janežič M, Perdih A. Zaviralci DNA topoizomeraze IIa-pomembne tarče protirakavih učinkovin. Farmacevtski vestnik 2015; 66: 326-333.
8. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry 6th edition. W. H. Freeman and Company 2006; 788-792
9. Baker NM, Rajan R, Mondragón A. Structural studies of type I topoisomerases. *Nucleic Acids Research* 2009; 37: 693-701.
10. Reece RJ, Maxwell A. DNA gyrase: structure and function. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 1991; 26: 335-375.
11. Couturier M, Bahassi el-M, Van Melderen L. Bacterial death by DNA gyrase poisoning. Trends in Microbiology 1998; 6: 269-275.
12. Tomašič T, Mašič LP. Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. Current Topics in Medicinal Chemistry 2014; 14: 130-151.
13. Oblak M, Kotnik M, Solmajer T. Discovery and development of ATPase inhibitors of DNA gyrase as antibacterial agents. Current Medicinal Chemistry 2007; 14: 2033-2047.

14. Collin F, Karkare S, Maxwell A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011; 92: 479-497.
15. Blondeau JM. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. Survey of Ophthalmology 2004; 49: S73-S78.
16. Lawson DM, Stevenson CE. Structural and functional dissection of aminocoumarin antibiotic biosynthesis: a review. Journal of Structural and Functional Genomics 2012; 13: 125-133.
17. Nickelson MU, Blodgett A, Kamp H, Eakin A, Sherer B, Green O. Novel DNA gyrase inhibitors: Microbiological characterisation of pyrrolamides. International Journal of Antimicrobial Agents 2013; 41: 28-35.
18. Widdowson K, Hennessy A. Advances in structure-based drug design of novel bacterial topoisomerase inhibitors. Future Medicinal Chemistry2010; 2: 1619-1622.
19. Black MT, Stachyra T, Platel D, Girard AM, Claudon M, Bruneau JM, Miossec C. Mechanism of Action of the Antibiotic NXL101, a Novel Nonfluoroquinolone Inhibitor of Bacterial Type II Topoisomerases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2008; 52: 3339-3349.
20. O'Riordan W, Tiffany C, Scangarella-Oman N, Perry C, Hossain M, Ashton T, Dumont E. Efficacy, Safety, and Tolerability of Gepotidacin (GSK2140944) in the Treatment of Patients with Suspected or Confirmed Gram-Positive Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2017; 61: e02095-16.
21. Tomašič T, Barančoková M, Zidar N, Ilaš J, Tammela P, Kikelj D. Design, synthesis, and biological evaluation of 1-ethyl-3-(thiazol-2-yl)urea derivatives as *Escherichia coli* DNA gyrase inhibitors. Archiv der Pharmazie 2018; 351.
22. Mislin GL, Schalk IJ. Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic Trojan horse strategies against *Pseudomonas aeruginosa*. Metallomics 2014; 6: 408-420.
23. Page MG. Siderophore conjugates. Annals of the New York Academy of Sciences 2013; 1277: 115-126.

24. Górska A, Sloderbach A, Marszałł MP. Siderophore-drug complexes: potential medicinal applications of the 'Trojan horse' strategy. Trends in Pharmacological Science 2014; 35: 442-449.
25. De Carvalho CCCR, Fernandes P. Siderophores as “Trojan Horses”: tackling multidrug resistance? *Frontiers in Microbiology* 2014; 5; 290.
26. Ji C, Miller PA, Miller MJ. Iron Transport-Mediated Drug Delivery: Practical Syntheses and In Vitro Antibacterial Studies of *Tris*-catecholate Siderophore-Aminopenicillin Conjugates Reveals Selectively Potent Anti-Pseudomonal Activity. *Journal of the American Chemical Society* 2012; 134: 9898-9901.
27. Tomašič T, Katsamakas S, Hodnik Ž, Ilaš J, Brvar M, Solmajer T, Montalvão S. Tammela P, Banjanac M, Ergovič G, Anderluh M, Peterlin Mašič L, Kikelj D. Discovery of 4,5,6,7-Tetrahydrobenzo[1,2-*d*]thiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors Targeting the ATP-Binding Site. Journal of Medicinal Chemistry 2015; 58: 5501-5521.
28. Marinčič N (2015). Sinteza sideroforov in konjugatov siderofor-zaviralec DNA-giraze B. Magistrsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
29. https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/jones-oxidation.shtm (dostopano 12.5.2018).
30. Theodorus V, Skobridis K, Tzakos AG, Ragoussis V. A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. Tetrahedron Letters 2007; 48: 8230-8233.
31. https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Organic_Chemistry)/Esters/Reactivity_of_Esters/Saponification (dostopano 12.5.2018).
32. Montalbetti CAGN, Falque V. Amide bond formation and peptide coupling. Tetrahedron 2005; 61: 10827-10852.
33. Feriancikova L, Bardy SL, Wang L, Li J, Xu S. Effects of Outer Membrane Protein *TolC* on the Transport of *Escherichia coli* within Saturated Quartz Sands. *Environmental science & technology* 2013; 47: 5720-5728.
34. Zgurskaya HI, Krishnamoorthy G, Ntreh A, Lu S. Mechanism and Function of the Outer Membrane Channel TolC in Multidrug Resistance and Physiology of Enterobacteria. *Frontiers in Microbiology* 2011; 2: 189.
35. Guo X, Murray M, Xiong C, Zhu SH. Treatment of Escherichia coli BW 25113 with Subinhibitory Levels of Kanamycin Results in Antibiotic Cross-

Resistance and TolC Upregulation. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* 2013; 17: 19-23.