

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJ PRUDNIKOV

**SINTEZA PREKURZORJEV KATEHOLNIH SIDEROFOROV KOT
GRADNIKOV ZA IZBOLJŠANJE PROTIBAKTERIJSKEGA
DELOVANJA ZAVIRALCEV BAKTERIJSKIH ENCIMOV**

SYNTHESIS OF CATECHOL SIDEROPHORE PRECURSORS AS
BUILDING BLOCKS FOR IMPROVEMENT OF ANTIBACTERIAL
ACTIVITY OF BACTERIAL ENZYME INHIBITORS

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani in Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. *In vitro* testiranja na encimih MurD in MurE so izvedli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, mikrobiološko vrednotenje pa na Inštitutu za mikrobiologijo v Ljubljani. Testiranja inhibitorne aktivnosti spojine **15** so bila opravljena na Univ Paris-Sud, Laboratoire des Enveloppes Bactériennes et Antibiotiques, Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire (Orsay, Francija).

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm. za strokovnost, potrpežljivost in pomoč, brez katerih te naloge ne bi bilo. Prav tako bi se rad zahvalil staršem Alini in Milanu za vso izkazano podporo skozi vsa leta mojega izobraževanja in dekletu Maji, ki mi je ves čas stala ob strani, verjela vame in me spodbujala.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

Andrej Prudnikov

KAZALO

POVZETEK	1
ABSTRACT	2
SEZNAM OKRAJŠAV	3
1. UVOD.....	6
1.1 ŽELEZO V MIKROORGANIZMIH	6
1.1.1 Možnosti privzema železa v bakterijsko celico.....	6
1.1.2 Bakterijski siderofori in mehanizem njihovega delovanja.....	7
1.1.3 Izkoriščanje sideroforov za zdravljenje bakterijskih okužb.....	10
1.2 POMEN, STRUKTURA IN BIOSINTEZA PEPTIDOGLIKANA	13
1.2.1 Biosinteza peptidoglikana – citoplazemski del	14
1.2.2 Nastanek UDP-MurNAc-pentapeptida	15
1.2.3 Zaviralci ligaz Mur.....	16
2. NAMEN DELA	21
3. MATERIALI IN METODE	22
3.1 MATERIALI	22
3.1.1. Reagenti in topila	22
3.2 METODE.....	22
3.2.1 Kromatografske metode	22
3.2.2 Spektroskopske metode.....	22
3.2.3 Določanje tališč	23
3.2.4 Poimenovanje in risanje spojin	23
3.2.5 Iskanje sinteznih postopkov	23
3.2.6 Mikrovalovni reaktor.....	23
3.2.7 Določanje inhibitorne aktivnosti spojin na encimih MurD in MurE	23
3.2.8 Določanje protibakterijske aktivnosti.....	25

4. EKSPERIMENTALNO DELO	27
4.1 SINTEZA ZAVIRALCEV LIGAZE MurD	27
4.1.1 Uvedba dioksolanske zaščitne skupine na aldehid.....	27
4.1.2 Reduktivno aminiranje s 3-aminobenzojsko kislino	28
4.1.3 Reakcija odstranitve dioksolanske zaščitne skupine.....	29
4.1.4 Knoevenagelova kondenzacija 5-členskega obroča na aldehidno funkcionalno skupino	30
4.1.5 Reakcija tvorbe amidne vezi z dimetilnim estrom D-Glu.....	32
4.1.6 Tvorba amidne vezi na sekundarnem aminu.....	34
4.1.7 Alkalna hidroliza metilnih estrov	36
4.2 SINTEZA PREKURZORJEV SIDEROFOROV IN NJIHOVIH KONJUGATOV Z MOLEKULAMI UČINKOVIN	38
4.2.1 Uvedba acetatnih estrov na aromatskih hidroksilnih skupinah.....	38
4.2.2 Redukcija aldehidne funkcionalne skupine.....	39
4.2.3 Appelova reakcija (bromiranje primarnega alkohola)	40
4.2.4 Uvedba BOC-zaščitne skupine na D-Glu.....	40
4.2.5 Kondenzacija spojine 21 na z BOC-skupino zaščiteno D-Glu	41
4.2.6 Odstranitev BOC zaščitne skupine.....	42
4.3 NEUSPELA VEZAVA PREKURZORJA SIDEROFORA NA MOLEKULO PREKURZORJA ZAVIRALCA MurD	43
4.4 NEUSPELA SINTEZA KONJUGATA SIDEROFOR-UČINKOVINA	44
4.5 SINTEZA SIDEROFORA – SPOJINA 32.....	45
4.5.1 Sinteza 2,3-diacetoksibenzojske kisline (30)	45
4.5.2 Sinteza 3-(klorokarbonil)-1,2-fenilen diacetata (31).....	46
4.5.3 Sinteza 3,5-bis(2,3-diacetoksibenzamido)benzojske kisline (32).....	46
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	48
5.1 KOMENTAR K SINTEZNIH POSTOPKOM	48

5.1.1 Zaščita aldehidne skupine z 1,3-dioksolansko zaščitno skupino	48
5.1.2 Reduktivno aminiranje	48
5.1.3 Knoevenagelova kondenzacija.....	48
5.1.4 Alkalna hidroliza estrov	49
5.1.5 Tvorba estrov na aromatskih hidroksilnih skupinah	50
5.1.6 Redukcija aldehida	50
5.1.7 Appelova reakcija bromiranja primarnega alkohola	50
5.1.8 Zaščita aminske skupine D-Glu z BOC zaščitno skupino.....	51
5.1.9 Kondenzacija spojine 21 na BOC-D-Glu.....	51
5.1.10 Sklopitvena reakcija karboksilne kisline in amina ter posledična tvorba amidne vezi	52
5.1.11 Neuspela dvostopenjska sinteza konjugata siderofor-učinkovina.....	53
5.1.12 Sinteza spojine 32.....	54
5.2 REZULTATI BIOKEMIJSKEGA IN MIKROBIOLOŠKEGA VREDNOTENJA SPOJIN	54
5.2.1 Rezultati merjenja inhibitorne aktivnosti spojin na encimu MurD	54
5.2.2 Rezultati določanja inhibitorne aktivnosti spojine 15 na encimu MurE	55
5.2.3 Rezultati določanja protibakterijskega delovanja spojin 15, 16 in 17.....	56
6. SKLEP	57
7. LITERATURA	59

POVZETEK

Rezistenca mikroorganizmov proti protimikrobnim učinkovinam je v zadnjih desetletjih postala eden večjih svetovnih zdravstvenih problemov, ki ga poskušamo rešiti z iskanjem novih tarč za nove protimikrobne učinkovine. Precej obetavna je skupina encimov, ki katalizirajo začetno fazo biosinteze peptidoglikana – ligaze Mur. Danes poznamo že veliko spojin, ki zavirajo te encime *in vitro*, zelo redke izmed njih pa delujejo protibakterijsko. Predvideva se, da je poglavitni razlog za to nezmožnost prehoda teh molekul skozi celično steno bakterij do njihovega mesta delovanja.

Bakterije proizvajajo posebne strukturne elemente, siderofore, ki zaznajo prisotnost železovih ionov v okolici njihovih celic in jih prenašajo v njeno notranjost. S pomočjo mimetika teh struktur, kovalentno vezanega na molekulo zaviralca bakterijskih encimov, bi lahko izkoriščali bakterijski transportni sistem za železo. Na ta način bi bistveno izboljšali dostavo zaviralca v notranjost bakterijske celice do potencialnega mesta delovanja.

V okviru te naloge smo želeli pripraviti močan zaviralec encima MurD in spojino, ki s svojo strukturo posnema strukturo bakterijskih sideroforov. Obe spojini smo želeli nato združiti v eno v upanju, da bo nastali konjugat siderofor-zaviralec izboljšal dostavo zaviralca v bakterijsko celico in na ta način bistveno izboljšal njegovo protibakterijsko delovanje.

Tekom eksperimentalnega dela smo pripravili 3 spojine (**15**, **16** in **17**), ki so se izkazale za močne zaviralce ligaze MurD iz *Escherichia coli*, niso pa imele protibakterijskega delovanja. Pripravili smo spojini **24** in **32**, ki sta mimetika bakterijskih sideroforov. Ker nam ni uspelo konjugirati pripravljenih zaviralcev ligaz MurD in pripravljenih mimetikov sideroforov, smo poskusili vezati spojino **24** na 2 molekuli znanih zaviralcev ligaze MurD (spojini **25** in **28**), s čimer bi preizkusili, ali ta vezava izboljša protibakterijsko delovanje teh dveh spojin. Na žalost priprava konjugatov ni uspela, zato njihovega protibakterijskega delovanja nismo mogli ovrednotiti.

Ključne besede: ligaze Mur, siderofor, konjugat, železo, encimski zaviralec

ABSTRACT

Antibiotic resistance has become one of the major health problems in the world during the last decades. We try to solve it by searching for new targets for new antibacterial drugs. A particular group of enzymes, which catalyze intracellular steps of peptidoglycan biosynthesis, appears to be very promising – a family of Mur ligases. Today, lots of compounds are known to inhibit these enzymes *in vitro*. However, very few of them possess antibacterial activity. There are speculations of low cell-wall permeability for these agents and thus inability to reach their target as one of the main reasons.

Bacteria synthesize special molecules that perceive a presence of iron in bacterial environment and transport it into their cytoplasm. These molecules are termed siderophores. There is a possibility to use a structural mimetic of these molecules covalently bound to an enzyme inhibitor in order to take advantage of bacterial iron transport mechanism. This way we would significantly improve delivery of this agent to the site of action.

In this thesis we attempted to synthesize a potent MurD inhibitor and a structural mimetic of bacterial siderophores. We tried to combine both molecules to synthesize a siderophore-inhibitor conjugate aiming to improve delivery of the inhibitor into bacterial cell and consequently improving its antibacterial activity significantly, as well.

During our experimental work we synthesized 3 final compounds (**15**, **16** in **17**), which were found to be potent inhibitors of MurD ligase from *Escherichia coli* but did not possess antibacterial activity. Additionally, we synthesized compounds **24** and **32** which are structural mimetics of bacterial siderophores. Since we failed to conjugate our synthesized MurD ligase inhibitors and our synthesized structural siderophore mimetics, we tried to bind compound **24** to compounds **25** and **28**, which were known to inhibit MurD ligase in order to test, whether any antibacterial activity improvements of compounds **25** and **28** would be achieved. Unfortunately, our attempts to synthesize these conjugates were not successful, therefore no antibacterial activity tests could be performed.

Keywords: Mur ligases, siderophore, conjugate, iron, inhibitor

SEZNAM OKRAJŠAV

ABC	ATP-vezavna kasetna (ATP-binding cassette)
ADP	adenozin difosfat
Ala	alanin
Alr	alanin racemaza, ki jo kodira <i>alr</i> gen
ATP	adenozin trifosfat
BOC	<i>terc</i> -butiloksokarbonilna zaščitna skupina
CFU	število enot, ki tvori kolonijo (colony forming units)
CoA	koencim A
d	dublet
DA	diaminokislina
DadX	alanin racemaza, ki jo kodira <i>dadX</i> gen
dd	dublet dubleta
Ddl	D-alanin-D-alanin ligaza
DMF	dimetil formamid
DMSO	dimetil sulfoksid
EI	elektronska ionizacija
ESI	elektrozapršilna ionizacija (electrospray ionisation)
FecA	Fe ³⁺ -dicitratni receptor
FepA	Fe ³⁺ -enterobaktinski receptor
FhuA	Fe ³⁺ -hidroksamatni receptor
FptA	Fe ³⁺ -piokelinski receptor
FpvA	Fe ³⁺ -pioverdinski receptor
G-	po Gramu negativne (bakterije)
G+	po Gramu pozitivne (bakterije)
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
GlmM	fosfoglukozamin mutaza
GlmS	glukozamin-6-fosfat sintaza
GlmU	glukozamin-1-fosfat acetiltransferaza/ <i>N</i> -acetilglukozamin-1-fosfat uridiltransferaza (bifunkcionalni encim)
Gln	glutamin
Glu	glutaminska kislina

HATU	2-(7-aza-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilaminijev heksafluorofosfat
HRMS	masna spektroskopija visoke ločljivosti (high resolution mass spectroscopy)
IC₅₀	srednja inhibitorna koncentracija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
Lac	laktat
LbpA	laktoferin vezoči protein A (lactoferrin-binding protein A)
LbpB	laktoferin vezoči protein B (lactoferrin-binding protein B)
Lys	lizin
m	multiplet
<i>mezo-A₂pm</i>	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (minimum inhibitory concentration)
MRSA	proti meticilinu odporni <i>Staphylococcus aureus</i> (methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
<i>m_s</i>	masa spojine
MS	masna spektrometrija
MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruvat transferaza
MurB	UDP- <i>N</i> -acetilenolpiruvilglukozamin reduktaza
MurC	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat:L-alanin ligaza
MurD	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin:D-glutamat ligaza
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat: <i>mezo</i> -diaminopimelat ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin- <i>mezo</i> -diaminopimelat:D-alanin-D- alanin ligaza
MurI	glutamat racemaza
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
Mw	relativna molekulska masa
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NMR	jedrska magnetna resonanca (nuclear magnetic resonance)
PBP	periplazemski vezavni protein (periplasmic binding protein)
PEP	fosfoenol piruvat

<i>p</i>-TsOH	toluen-4-sulfonska kislina
RA	rezidualna aktivnost
q	kvartet
s	singlet
Ser	serin
Sid	siderofor
t	triplet
TbpA	transferin vezoči protein A (transferrin-binding protein A)
TbpB	transferin vezoči protein B (transferrin-binding protein B)
TBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev tetrafluoroborat
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija (thin layer chromatography)
UDP	uridin difosfat
UTP	uridin trifosfat
UMA	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-L-alanin
UMAG	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-L-alanin- <i>D</i> -glutamat
zu	zdravilna učinkovina
δ	kemijski premik
λ	valovna dolžina

1. UVOD

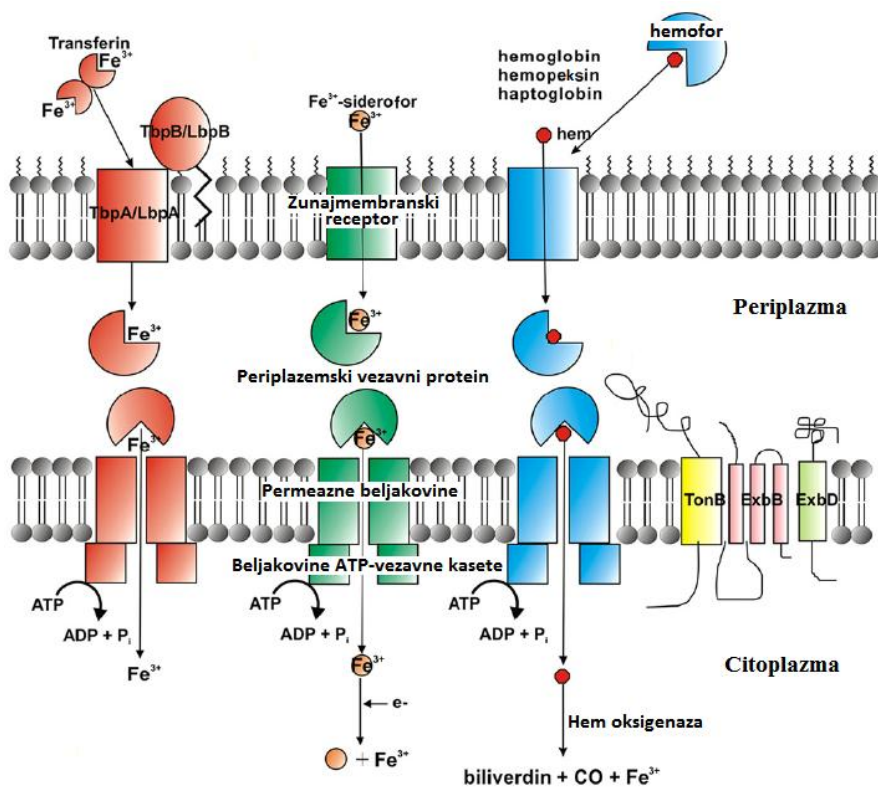
1.1 ŽELEZO V MIKROORGANIZMIH

Železo za svojo nemoteno rast in razmnoževanje potrebuje skoraj vsi mikroorganizmi [1]–[6] razen bakterije *Borrelia burgdorferi* [4], [7] in laktobacilov [4], [8]. Predstavlja pomemben element za življenje mikroorganizma, saj sodeluje pri različnih biokemijskih procesih v njih. Najpogosteje ima vlogo kofaktorja v encimih in lahko med encimskimi reakcijami prenaša elektrone, saj je lahko prisotno v dveh oblikah: Fe^{2+} in Fe^{3+} [7]. Ker je železo element, ki vstopa v Fentonovo reakcijo, katere produkt so reaktivne kisikove zvrsti, in ker je slabo topno v telesnih tekočinah, je v veliki večini vezano na beljakovine. Z njimi mora mikroorganizem tekmovati za železo, če ga želi porabiti za svoje biokemijske procese, saj je koncentracija prostega železa v telesnih tekočinah prenizka. Tako je železo v človeškem telesu vezano na transferin (prenašalna beljakovina za železo v plazmi, limfi in cerebrospinalni tekočini), laktoferin (prenašalna beljakovina za železo v izločkih sluznic), feritin (skladiščna beljakovina za železo v telesu), največ (78%) pa je železa v hemu, ki je strukturni element hemoglobina in mioglobina [2], [6], [7].

1.1.1 Možnosti privzema železa v bakterijsko celico

Tako G+ kot tudi G- bakterije lahko pridobivajo železo za svoje potrebe iz teh beljakovin. To lahko storijo na tri načine (slika 1):

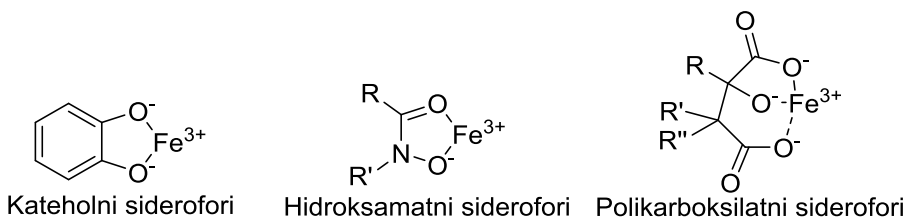
1. Transferin ali laktoferin z vezanim železom se veže na specifičen receptor na zunanji membrani bakterije (npr. receptor TbpA/LbpA ali TbpB/LbpB), čemur nato sledi prenos železa z beljakovine v citoplazmo bakterije.
2. Za privzem železa, vezanega v hemu, sta na voljo dve možnosti:
 - Vezava hema na transporter na zunanji membrani, čemur sledi neposreden privzem hema v celico.
 - Celice lahko izločajo hemofores. To so molekule, ki lahko odcepijo železo iz hema in ga dostavijo v celico.
3. Privzem železa s pomočjo molekul, ki jim pravimo siderofori.



Slika 1. Različni načini privzema železovih ionov v bakterijsko citoplazmo pri G-bakterijah. Privzem lahko poteče s pomočjo transferina (rdeča barva), sideroforov (zelena barva) ali hema (modra barva) (povzeto po [8]).

1.1.2 Bakterijski siderofori in mehanizem njihovega delovanja

Siderofori so spojine z nizko molekularno maso, ki nastajajo v bakteriji in jih ta izloča v svojo okolico [2]–[11]. Delujejo kot kelatorji železovih ionov (Fe^{3+}) [6], [11] in z njimi tvorijo komplekse v razmerju siderofor : $\text{Fe}^{3+} = 1 : 1$ [11]. Čeprav so si strukturno te spojine lahko zelo različne, jih lahko razdelimo glede na strukturni fragment, ki je zadolžen za tvorbo kompleksa z Fe^{3+} ionom, na **kateholne**, **hidroksamatne** in **polikarboksilatne** siderofore (imenovani tudi **α -hidroksikarboksilatni**) (slika 2) [2]–[4], [11], [12]. Obstajajo tudi mešani tipi sideroforov, ki spadajo v več teh skupin [9].



Slika 2. Trije najpogostejši tipi sideroforov.

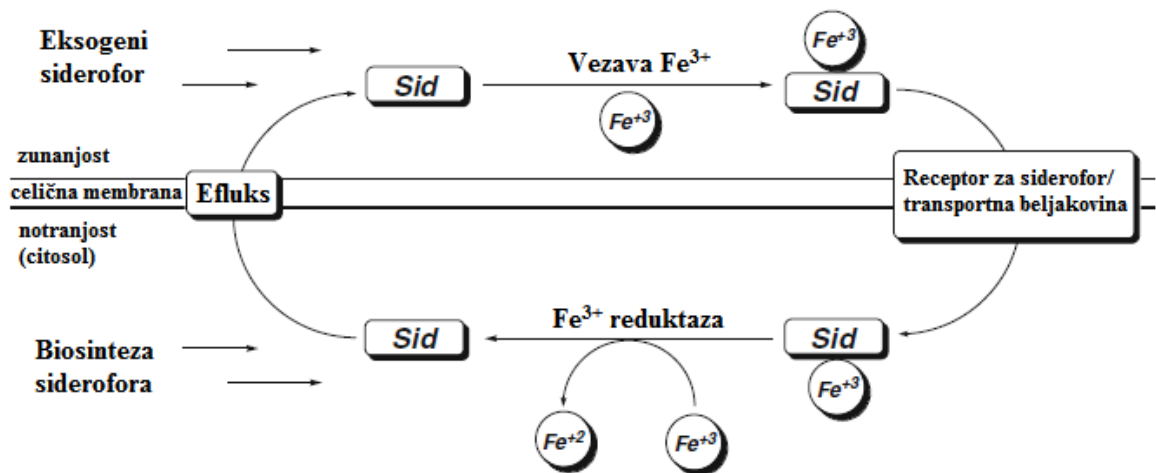
Sistem privzema železa s pomočjo sideroforov pride najbolj do izraza, kadar je bakterija v okolju, kjer je izrazito pomanjkanje železa, na primer pri invaziji gostitelja [1]–[3], [13]. Takrat tudi pride do večjega izražanja genov za beljakovine, ki sodelujejo pri sintezi sideroforov. Ker sinteza sideroforov bakteriji pomaga pri premostitvi problema pomanjkanja železa, ji na ta način olajša bivanje v telesu gostitelja in je zato pomemben virulenčni dejavnik [1], [2], [5], [14].

Mehanizem privzema Fe^{3+} v bakterijsko celico je shematsko prikazan na sliki 1 in sliki 3. Po sprostitvi siderofora v okolico bakterije ta najprej veže Fe^{3+} , ki je bodisi v prosti obliki, lahko pa siderofor tudi odcepi Fe^{3+} s prej omenjenih beljakovin, ker je večina Fe^{3+} v telesu gostitelja vezana [3]. Siderofor mora imeti večjo afiniteto do železa kot te beljakovine, da lahko uspešno veže Fe^{3+} [2], [12]. Po vezavi železa na siderofor nastane kompleks siderofor- Fe^{3+} , ki se mora vezati na zanj specifičen receptor na bakterijski zunanji membrani [3], [5], [8], [9], [12]. Primeri takšnih receptorjev so FhuA, FecA in FepA na zunanji membrani *Escherichia coli* ter FpvA in FptA na membrani *Pseudomonas aeruginosa*. Praviloma posamezni receptorji za siderofore na zunanji membrani lahko specifično vežejo le en določen siderofor, lahko pa se zgodi, da nekateri receptorji specifično prepoznajo in vežejo različne siderofore [5]. Bakterije imajo lahko na svoji zunanji membrani tudi receptorje za siderofore, ki jih same sicer ne proizvajajo, izločajo pa jih druge bakterije v njeni okolici. Pravimo jim ksenosiderofori. Tako lahko te bakterije vežejo komplekse ksenosiderofor- Fe^{3+} in z njihovo pomočjo pridobivajo železo, kar zanje pomeni pomembno prilagoditev in večjo možnost preživetja [3], [14].

Zunajmembranski receptorji so zgrajeni iz značilne strukture β -sodčka in N-končne globularne domene, ki ima vlogo "zamaška" in zapira odprtino β -sodčka. Ta je zgrajen iz 10 krajših periplazemskih zank, 22 antiparalelnih β -trakov in 11 zunajceličnih zank. Slednje so pomembne, saj se ravno nanje specifično veže kompleks siderofor- Fe^{3+} , poleg tega pa preprečujejo vezavo in vstop neželenih snovi v bakterijo. Po vezavi kompleksa siderofor- Fe^{3+} pride do konformacijske spremembe in zaprtja zunajceličnih zank, kar prepreči sprostitev vezanega kompleksa nazaj v okolico. Informacija, da se je kompleks vezal, se nato preko vmesnih signalnih zaporedij prenese na citoplazemsko membrano in aktivira se proces pridobivanja energije v obliki ATP, ki služi za prenos vezanega kompleksa v periplazmo bakterije [6]–[9], [15].

Po sprostitvi kompleksa siderofor- Fe^{3+} v periplazemski prostor pride do njegove vezave na transportni protein, s katerim se ta kompleks prenese do citoplazemske membrane bakterije. Temu proteinu pravimo periplazemski vezavni protein (PBP). Različne bakterije imajo različne PBP. Posamezni PBP lahko vežejo in prenašajo samo en tip sideroforov. Ne more torej ena taka beljakovina prenašati siderofore tako kateholnega, kot tudi hidroksamatnega ali polikarboksilatnega tipa. Ko PBP pride do citoplazemske membrane, se veže na prenašalec z ATP-vezavno kaseto, ki mu pravimo tudi ABC-prenašalec [7], [8], [11], [16]. To je beljakovina, ki sodeluje pri zadnjem koraku prenosa kompleksa siderofor- Fe^{3+} v citoplazmo bakterije. Prenos kompleksa skozi citoplazemsko membrano se izvrši s pomočjo energije v obliki ATP [6], [8], [11].

Po prihodu kompleksa siderofor- Fe^{3+} v citoplazmo bakterije pride pod vplivom ferisiderofornih reduktaz, ki nastajajo v večini mikrobov, največkrat do encimske redukcije Fe^{3+} v Fe^{2+} . Slednji ima precej manjšo afiniteto do siderofora in zaradi tega zapusti kompleks ter je na voljo za biokemijske procese, sam siderofor pa se pogosto lahko ponovno sprosti v okolico bakterije in je spet na voljo za vezavo Fe^{3+} [1], [3], [8], [9], [11]. Nekatere bakterije tvorijo encime, ki kompleks siderofor- Fe^{3+} hidrolizirajo in tako drastično zmanjšajo moč vezave železa v njem. Temu sledi sprostitvev Fe^{3+} , ki se po tem reducira v Fe^{2+} [9].



Slika 3. Privzem železa v bakterijsko celico s pomočjo sideroforov (povzeto po [1]). Sid – siderofor.

Opisan proces privzema železa s pomočjo sideroforov je precej splošen in velja za G- bakterije. G+ se od njih razlikujejo v tem, da zunanje membrane nimajo in tako mora

kompleks siderofor-Fe³⁺ preiti le eno membrano, zato se tudi ta proces pri njih nekoliko razlikuje, vključuje pa določene podobnosti. Tako ima G⁺ bakterija *Staphylococcus aureus* za transport železa skozi svojo membrano PBP in ABC-prenašalec, ki imata enaki vlogi, kot ju imata pri G⁻ bakterijah. Ker pa je to bakterija z le eno membrano, nima strukturnih elementov (receptor na zunanji membrani), ki jih imajo G⁻ bakterije za prenos kompleksa siderofor-Fe³⁺ skozi svojo zunanjo membrano [11].

Vsaka bakterija nima vseh treh elementov prenosa železa (receptor na zunanji membrani, PBP in ABC-prenašalec), lahko pa ima več različnih elementov (npr. več različnih PBP za vezavo sideroforov različnih tipov) [8]. Kot je že bilo omenjeno, se mikroorganizmi med okužbo gostitelja pogosto znajdejo v okolju, kjer je prostega železa zelo malo, zato ima večina bakterij na svoji zunanji membrani več različnih receptorjev za siderofore, da lahko čim bolj učinkovito privzemajo čim večje število različnih sideroforov [7].

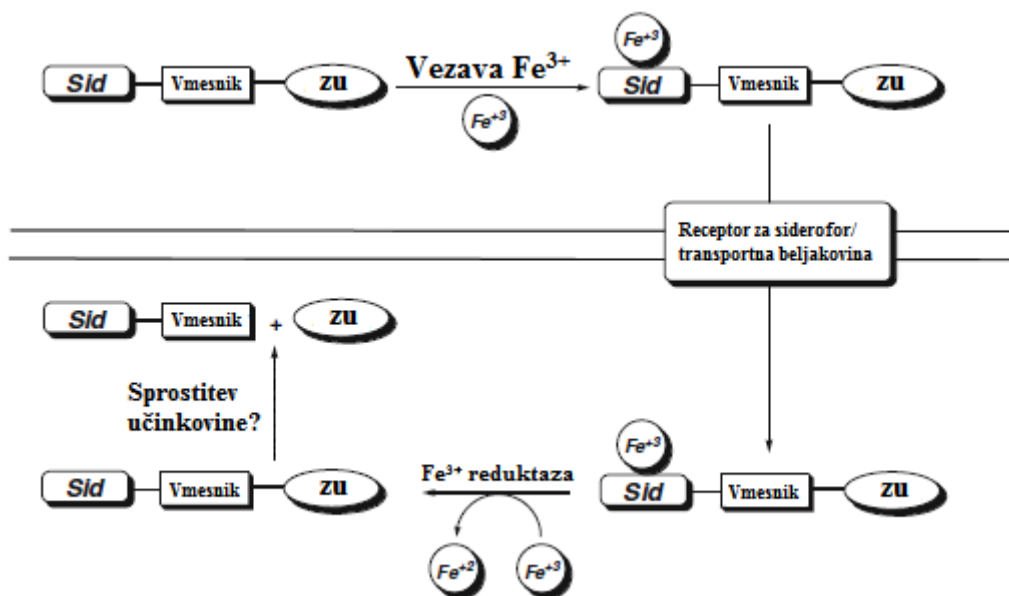
1.1.3 Izkoriščanje sideroforov za zdravljenje bakterijskih okužb

Za večino bakterij je torej privzem železa s pomočjo sideroforov življenjskega pomena, zato imamo nekaj potencialnih terapevtskih pristopov k zdravljenju bakterijskih okužb, ki to dejstvo izkoriščajo [1], [3]:

- sinteza spojin, ki kompetitivno vežejo železo in tako onemogočijo sideroforom, da ga vežejo in prenašajo v bakterijsko celico
- inhibicija biosinteze sideroforov
- s siderofori posredovana dostava spojine na mesto delovanja (strategija "trojanskega konja")

V nadaljnjem besedilu se bomo osredotočili predvsem na strategijo "trojanskega konja" (slika 4). Spojino s protibakterijskim delovanjem vežemo na strukturo, ki jo bakterija uporablja kot siderofor in jo specifično veže na receptor na zunanji membrani. Nastali konjugat spojina-siderofor lahko izkorišča zgoraj opisan mehanizem privzema kompleksa siderofor-Fe³⁺ in z njegovo pomočjo aktivno prehaja v bakterijsko citoplazmo, posledica česar je večja količina protimikrobne spojine v bakterijski celici in uspešnejša protimikrobna terapija [1]–[3], [11], [13], [17]. Seveda je potrebno najprej eksperimentalno ugotoviti, ali lahko bakterija določen siderofor, ki ga želimo uporabiti v konjugatu s

spojino s protibakterijskim delovanjem, sploh izkorišča za privzem železa. Dokazati moramo torej prisotnost receptorja za ta siderofor na zunanji membrani.



Slika 4. Dostava spojine s protibakterijskim delovanjem s pomočjo bakterijskega sistema privzema železa s pomočjo sideroforov (strategija "trojanskega konja") (povzeto po [1]).

Uporaba sinteznih konjugatov siderofor-protibakterijska spojina je bila v preteklosti predmet številnih raziskav. Izkazalo se je, da so najugodnejše učinkovine za vezavo na siderofor betalaktamski antibiotiki, saj so tudi pri uporabi teh spojin ugotovili največjo učinkovitost [11]–[13], [15], [17]–[23]. Pri takih konjugatih so izmerili zelo nizke vrednosti MIC (v območju nekaj nM) [21], [23], [24]. To je verjetno posledica tega, da se tarča teh učinkovin nahaja v periplazmi (penicilin vezoči protein), kar pomeni, da je konjugatu učinkovina-siderofor potrebno preiti le skozi zunanjo membrano G- bakterije [2], [21]. Kot siderofori se pri teh konjugatih večinoma uporabljajo kateholne strukture. Kljub omenjenim raziskavam se uporaba konjugatov siderofor-učinkovina v terapiji bakterijskih okužb šele uveljavlja. Ena zdravilna učinkovina iz skupine monobaktamov v konjugatu s sideroforom kateholnega tipa (BAL30072) je trenutno v fazi 1 kliničnih študij [12], [25], [26].

Rezistenca proti protimikrobnim učinkovinom je pogosto posledica pridobljene zmanjšane prepustnosti bakterijske membrane za take učinkovine, zato lahko s takšnim pristopom premostimo to vrsto rezistence, saj ne gre za prehod učinkovine skozi membrano s

pomočjo difuzije, temveč za aktivni transport prek nje s pomočjo bakterijskega transportnega sistema [1], [2], [11], [13], [17].

Strukturno konjugate siderofor-učinkovina sestavljajo trije deli (slika 5): **siderofor**, **zdravilna učinkovina** s protimikrobnim učinkom in **vmesnik**, ki ta dva dela povezuje [1], [3], [7], [11]. Ali se mora zdravilna učinkovina odcepiti od preostalih delov konjugata, preden lahko deluje, je odvisno od njene strukture in mehanizma delovanja, medtem ko je od vmesnika odvisno, ali do te odcepitve sploh lahko pride. Ta mora biti namreč dovolj labilen, da omogoča cepitev učinkovine in siderofora po redukciji železa, vezanega na konjugat [1], [27]. Če ima konjugat vmesnik, ki je preveč stabilen, se lahko zgodi, da do protimikrobnega učinka ne pride, saj se učinkovina ne more odcepiti od preostalega dela konjugata [28]. Po drugi strani pa večkrat niti ni potrebno, da do te cepitve pride, saj ima lahko že sam konjugat protimikroben učinek. Primer učinkovin, ki to dokazujejo, so že omenjeni betalaktamski antibiotiki. Razlog, zakaj lahko že sam konjugat deluje protimikrobno, je po vsej verjetnosti v tem, da v njem siderofor preko vmesnika na učinkovino ni vezan na mestu, ki je bistvenega pomena za njen mehanizem delovanja. To je pri tej vrsti učinkovin amidna vez na betalaktamskem obroču. Ker je ta del učinkovine nedotaknjen, se lahko konjugat nemoteno veže na penicilin vezoče beljakovine [2].



Slika 5. Shema strukture konjugata siderofor-učinkovina (povzeto po [11]).

Obstajajo poskusi vezave dveh različnih sideroforov na eno molekulo zdravilne učinkovine (ti. "mixed ligand" konjugati [3], [10], [13], [21], [23], [24]). Taki konjugati so lahko še bolj učinkoviti pri zaviranju rasti mikrobov, saj se lahko na bakterijski zunanji membrani vežejo na dva različna sideroforna receptorja in v bakterijo tako pridejo po dveh različnih poteh. Imajo tudi precej širši spekter delovanja. Po drugi strani lahko na eno molekulo siderofora vežemo več molekul protimikrobne učinkovine ("multiwarhead" konjugati [29]), s čimer lahko v enakem času dostavimo v bakterijsko celico še toliko večjo količino učinkovine.

Kot je že bilo zgoraj omenjeno, pridejo poti privzema železa v bakterijo s pomočjo sideroforov najbolj do izraza, kadar je v okolici pomanjkanje prostega železa (zelo pogosto

stanje pri infekcijah). Tako je tudi protimikrobna učinkovitost konjugatov siderofor-
učinkovina običajno večja, kadar so bakterije izpostavljene pogojem s pomanjkanjem
železa, kar so potrdile tudi nekatere raziskave [2], [23].

1.2 POMEN, STRUKTURA IN BIOSINTEZA PEPTIDOGLIKANA

Peptidoglikan je za bakterije življenjsko pomemben polimer in je sestavni del bakterijske
celične stene. Nahaja se v periplazemskem prostoru. Ohranja osmotsko ravnovesje med
zunanostjo bakterijske celice in citoplazmo ter na ta način ohranja obliko bakterijske
celice in njeno celovitost [30]–[33].

Strukturno je sestavljen iz dveh sladkornih komponent, ki si zaporedoma sledita. To sta *N*-
acetilglukozamin in *N*-acetilmuraminska kislina. Med njimi so kovalentne povezave tako
vzdolžno kot tudi prečno, kar utrdi celotno strukturo, da lahko služi svojemu namenu.
Glede na strukturo celične stene razlikujemo G⁺ bakterije z debelim slojem peptidoglikana
(do 40 plasti, več kot 50% celične stene [11]) in G⁻, ki ga imajo le nekaj plasti (5-10%
celične stene). Postopek, s katerim ločujemo med različnima skupinama bakterij, se
imenuje diferencialno barvanje po Gramu. To je osnovno barvanje v mikrobiologiji, ki
nam da prve podatke o tem, za kakšno okužbo gre in kako jo zdravimo [34].

Biosinteza peptidoglikana je zapleten proces, ki je sestavljen iz treh delov [32], [33], [35]:

1. sinteza nukleotidnih prekurzorjev v citoplazmi [36]
2. vezava produktov citoplazemskega dela na lipidni nosilec in prenos skozi
citoplazemsko membrano
3. zaključna faza nastanka peptidoglikana, ki zajema polimerizacijo prekurzorjev in
njihovo vezavo na nastajajoči polimer

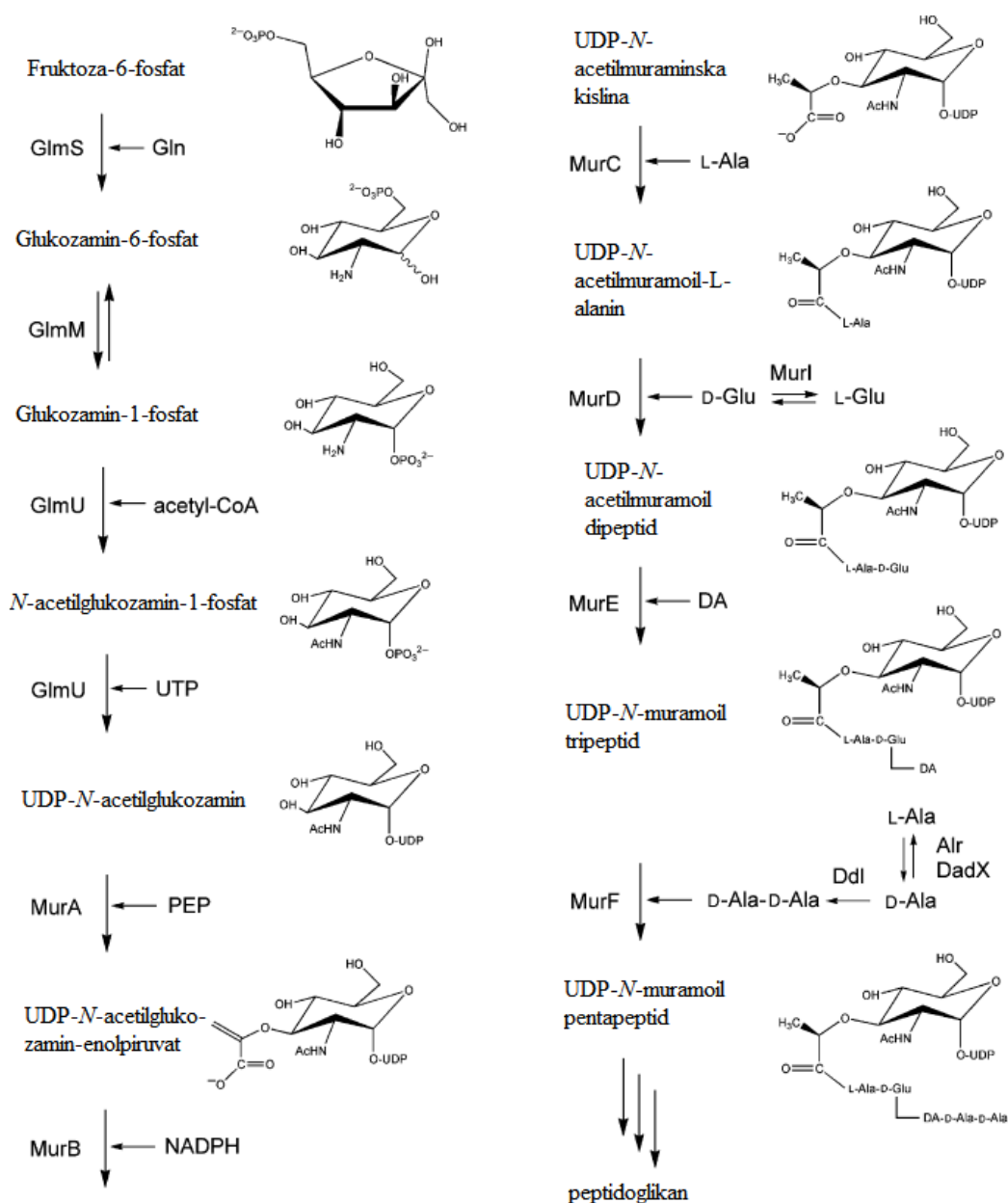
Veliko protibakterijskih zdravilnih učinkovin deluje tako, da na eni od stopenj zavirajo
biosintezo peptidoglikana (betalaktamski antibiotiki, vankomicin) [35]. Ta je sestavni del
bakterijskih celic, ne pa tudi človeških, zato imamo na tem mestu odlično možnost doseči
selektivno toksičen učinek zdravilne učinkovine le na bakterijsko celico [33].

V nadaljevanju se bomo osredotočili predvsem na prvi del biosinteze peptidoglikana.

1.2.1 Biosinteza peptidoglikana – citoplazemski del

Citoplazemske stopnje biosinteze peptidoglikana lahko razdelimo na 4 sklope reakcij [36]:

- 1) Sinteza UDP-GlcNAc iz fruktoza-6-fosfata
- 2) Sinteza UDP-MurNAc iz UDP-GlcNAc
- 3) Nastanek UDP-MurNAc-pentapeptida
- 4) Stranske poti sinteze posameznih gradnikov, kot so dipeptid D-Ala-D-Ala in D-Glu



Slika 6. Citoplazemski del biosinteze peptidoglikana (povzeto po [36]).

Prve tri stopnje si sledijo zaporedno, vmes pa v sintezo vstopajo še produkti stranskih poti (slika 6). V nadaljnjem besedilu se bomo osredotočili na nastanek UDP-MurNAc-pentapeptida.

1.2.2 Nastanek UDP-MurNAc-pentapeptida

Biosinteza UDP-MurNAc-pentapeptida je sestavljena iz štirih zaporednih reakcij. Pri vsaki od prvih treh pride do vezave ene aminokislina, pri zadnji pa do vezave dipeptida D-Ala-D-Ala. Tekom tega dela biosinteze pride torej do tvorbe peptidne verige in končni produkt je UDP-MurNAc-pentapeptid, ki nato vstopa v nadaljnje reakcije biosinteze peptidoglikana na bakterijski membrani [37].

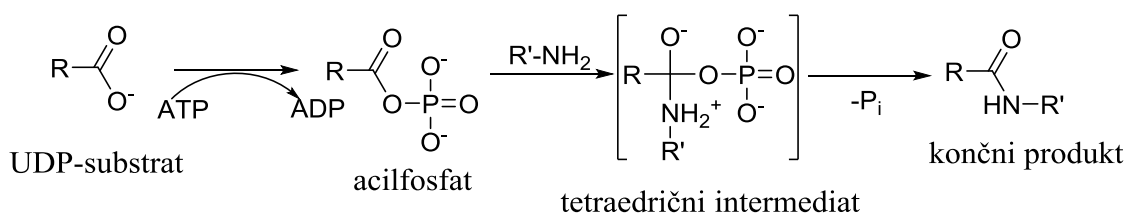
Reakcije, ki potekajo v tem delu biosinteze, katalizirajo štiri encimi iz skupine ligaz Mur (MurC, MurD, MurE in MurF) (slika 8). Z njihovo pomočjo se med vsako od štirih reakcijskih stopenj tvori ena peptidna vez, hkrati pa iz ATP nastane ADP in fosfat [38]. Pri reakciji sodeluje tudi dvovalenten kation, ki je Mg^{2+} ali Mn^{2+} [36].

Ligaze Mur imajo nekaj skupnih značilnosti [36]:

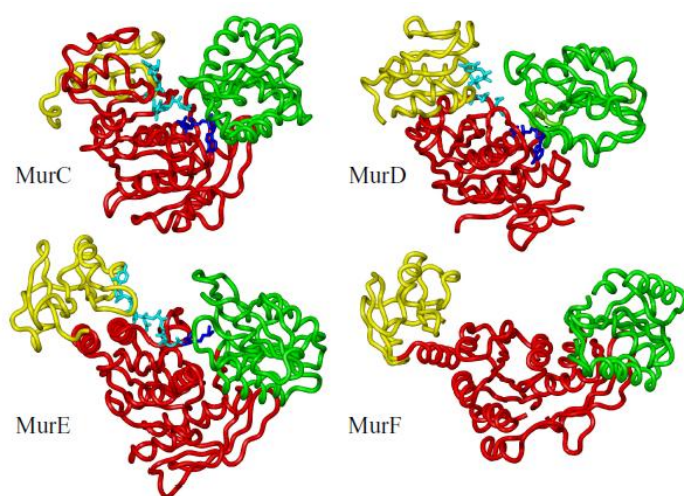
- 1) Reakcijo, pri kateri sodelujejo, katalizirajo po enakem mehanizmu (slika 7). Na začetku pride do vezave molekule ATP na prost encim in nato do vezave UDP-substrata. Sledi fosforilacija karboksilne skupine molekule UDP-substrata. Na ta način se karboksilna skupina aktivira in nastane acilfosfat. Aktivirano karboksilno skupino nato nukleofilno napade aminska skupina vezoče se aminokislina ali dipeptida. Posledično nastane tetraedrični intermediat, ki se nato z odcepom fosfatne skupine pretvori v končni produkt [30], [32], [33], [36], [37], [39].
- 2) 10-20% celotnega aminokislinskega zaporedja ligaz Mur je enako [40]. Prav tako je enako zaporedje aminokislinskih preostankov v delu, kamor se med reakcijo veže molekula ATP (centralni del) [36], [37], [40], [41]. Večje razlike v strukturi teh encimov so prisotne le v N-končnem delu [37]. Odkritje ravno teh značilnosti je dobrih 20 let nazaj botrovalo karakterizaciji ligaz Mur kot nove družine encimov [41].
- 3) Sestavljene so iz treh domen, ki imajo enako prostorsko razporeditev (slika 8). N-končni del veže UDP-substrat, C-končni del veže aminokislino ali dipeptid, ki v reakcijo vstopa, vmesni del pa je zadolžen za vezavo molekule ATP [30]–[33],

[36], [39], [42]. Ligaze Mur obstajajo v odprti ali zaprti konformaciji. Predvideva se, da zaprtje konformacije sproži vezava liganda [36].

- 4) Struktura UDP-substrata, na katerega posamezne ligaze Mur pripenjajo aminokislino, je enaka za vse 4 ligaze Mur – sestavljena je iz UDP in sladkornega dela. Razlike so le v številu pripetih aminokislin. Zaradi tega lahko zaviralci, ki so zasnovani tako, da UDP-substrat posnemajo, zavirajo več ligaz Mur hkrati [42]. Rezistenca proti takim zaviralcem se veliko težje razvije, saj je potrebnih več mutacij genskega zapisa mikroorganizma tekom ene delitve [37].



Slika 7. Mehanizem delovanja ligaz Mur.



Slika 8. 3D-struktura ligaz Mur. Rumena barva – N-končni del, rdeča barva – centralni del, zelena barva – C-končni del, sv. modra barva – UDP-substrat, temno modra barva – aminokislina ali dipeptid, ki vstopa v reakcijo (povzeto po [40]).

1.2.3 Zaviralci ligaz Mur

1.2.3.1 MurC in zaviralci

Ligaza MurC je prvi encim v zaporedju ligaz Mur. Katalizira reakcijo vezave aminokislino L-alanin na substrat UDP-MurNAc. Produkt te stopnje biosinteze peptidoglikana je UDP-

MurNac-L-Ala. V redkih primerih se namesto L-alanina veže glicin ali L-serin. Predvsem na encimu MurC iz *Escherichia coli* je bilo v preteklosti opravljenih precej raziskav. Ugotovljeno je bilo zaporedje, po katerem se posamezne spojine, ki v reakcijo vstopajo, vežejo na encim. Najprej se na centralno domeno encima veže ATP, nato se na N-končni del veže UDP-MurNac in na koncu še L-alanin na C-končni del. Reakcija je reverzibilna, ugotovljeno pa je bilo, da je ligaza MurC strogo stereospecifičen encim, saj D-alanin v reakcijo ne more vstopiti [36].

Že v začetku 90. let so bile pripravljene spojine, ki so bile strukturno povezane z L-alaninom in so znane kot zaviralci ligaze MurC iz *Escherichia coli*. Kasneje so bile pripravljene tudi spojine benziliden rodaninskega tipa, ki so bile aktivne proti MurC iz MRSA ($IC_{50} = 12-27 \mu M$) in neaktivne proti *Escherichia coli* [36]. Za najboljši zaviralec MurC se je izkazala spojina **1** (slika 10). Njena IC_{50} vrednost inhibicije encima MurC iz *Escherichia coli* je 12 nM, IC_{50} vrednost inhibicije encima MurC iz *Pseudomonas aeruginosa* pa 0,7 nM [43].

1.2.3.2 MurD in zaviralci

MurD je encim, ki katalizira naslednjo reakcijo v zaporedju biosinteze peptidoglikana, in sicer vezavo D-Glu na UDP-MurNac-L-Ala (UMA). Končni produkt te stopnje je UDP-MurNac-L-Ala-D-Glu (UMAG) [30], [31], [36], [38], [39]. Tudi tu je največ raziskav bilo opravljenih na MurD iz *Escherichia coli* in potrjeno je bilo, da je D-Glu praktično edini substrat, ki lahko vstopa v to reakcijo. Zaradi stroge stereospecifičnosti ligaze MurD lahko v reakcijo vstopa le D-Glu, ne pa tudi L-Glu. Povsem drugače je pri UDP-substratih, ki vstopajo v to reakcijo, saj je do njih ligaza MurD precej manj specifična, kar je tudi pomembna razlika med ligazo MurD in ostalimi tremi encimi te skupine. Tako je lahko tudi spojina 1-fosfo-MurNac-L-Ala substrat za ligazo MurD [36].

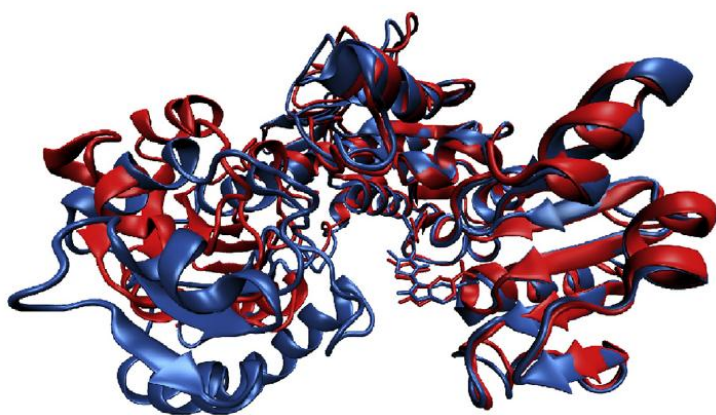
Že 20 let nazaj so bile raziskane strukturne zahteve, ki jim morajo zadoščati tisti zaviralci encima MurD, ki se vežejo v del vezavnega mesta, kamor se veže D-Glu [44]:

1. imeti mora D- konfiguracijo
2. na koncu stranske verige mora biti anionska funkcionalna skupina
3. imeti mora dve kisli funkcionalni skupini, ki morata biti na razdalji treh C-atomov

Prvi močnejši zaviralci ligaze MurD so bili fosfinatnega tipa [42]. Pojavili so se v 90. letih in so bili sintetizirani na osnovi strukturne podobnosti z D-Glu [32]. Najmočnejši zaviralci encima MurD, ki delujejo na ta način, so bili pripravljeni nekaj let nazaj. Njihove vrednosti IC_{50} za inhibicijo MurD iz *Escherichia coli* so 3-7 μM [45].

Precej močni so zaviralci sulfonamidnega tipa, ki se delijo na zaviralce prve in druge generacije. Spojine prve generacije imajo fleksibilen strukturni element, ki je podoben D-Glu, medtem ko je na spojinah druge generacije ta element rigidiziran, kar pripomore k izboljšanju inhibitorne aktivnosti teh spojin. Spojine prve in druge generacije imajo enak način vezave na ligazo MurD. Strukturni element, ki posnema D-Glu, se veže na del vezavnega mesta, ki je namenjen vezavi D-Glu na C-končnem delu encima, osrednji del molekule tvori interakcije s centralnim delom encima, preostanek molekule pa tvori interakcije s hidrofobnim delom v N-končnem delu, kamor se veže UDP-substrat [42].

Ugotovljeno je bilo, da posamezne domene prostega encima MurD niso povsem statične, temveč je njihova struktura fleksibilna (slika 9). Pride lahko do premika C-končnega dela stran od preostalih dveh, zato se lahko razdalja med N- in C-končnim delom s časom nekoliko spremeni. Posledično je lahko vezava zaviralcev, ki se vežejo na obe domeni problematična, kar lahko vodi tudi v slabšo inhibitorno aktivnost takih zaviralcev [33], [42].



Slika 9. Fleksibilnost ligaze MurD. Modra barva – konformacija, kjer je med N- in C-končnim delom najmanjša razdalja. Rdeča barva – konformacija, kjer je med N- in C-končnim delom največja razdalja (povzeto po [42]).

V zadnjem času se določene raziskave usmerjajo v razvoj zaviralcev, ki se vežejo na centralni del MurD, kamor se tudi veže ATP. Razlike v tem delu so med štirimi ligazami

Mur minimalne in obstaja večja verjetnost, da bo zaviralec MurD, ki se veže tu, deloval tudi na ostale ligaze Mur [33].

Kot najmočnejši zaviralec ligaze MurD se je izkazala spojina, ki je strukturni analog tetraedričnega intermediata in je njen $IC_{50} = 20$ nM (slika 10, spojina **2**) [36].

1.2.3.3 MurE in zaviralci

Ligaza MurE katalizira reakcijo pripajanja ene aminokislina na UDP-MurNac-dipeptid in tako nastanek UDP-MurNac-tripeptida. To je lahko bodisi *mezo*-A₂pm pri večini G-bakterij in bakterij v razredu *Bacilli*, ali pa L-Lys pri večini G+ bakterij. Pri določenih bakterijah lahko v reakcijo vstopajo tudi druge aminokislina. Kljub tem razlikam med posameznimi bakterijami je sam encim MurE običajno zelo specifičen za vezavo tiste aminokislina, ki je za bakterijo značilna. Pri vezavi napačne aminokislina pride do propada mikroorganizma [36].

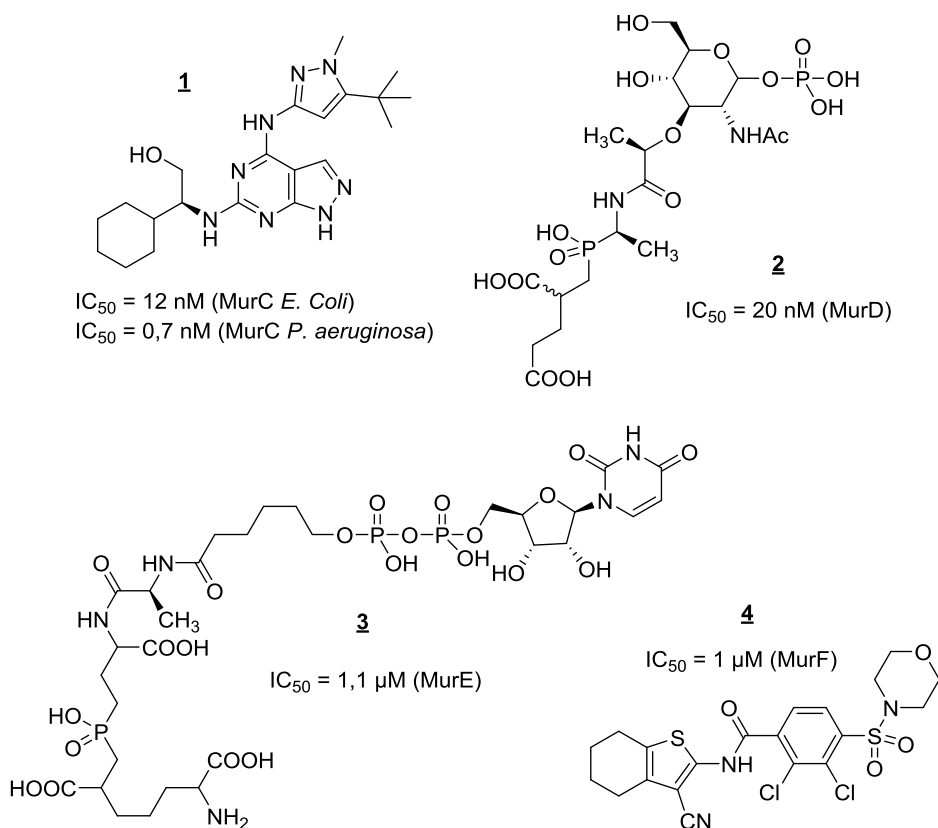
Podobno kot pri MurC in MurD so najprej poskušali pripraviti zaviralce ligaze MurE na osnovi strukture aminokislina, ki jo ta pripaja na UDP-substrat. Strukturni analogi *mezo*-A₂pm so precej učinkoviti (90% inhibicija pri koncentraciji 5 mM), še boljši pa so analogi intermediata, ki zavirajo MurE iz *Escherichia coli* v mikromolarnem območju. Najboljše spojine so fosfinatnega tipa, ker je njihov $IC_{50} = 1,1$ μ M (slika 10, spojina **3**) [36]. Omembe vredni so tudi alkaloidi z aporfinsko strukturo, ki jih najdemo v naravi in so učinkoviti zaviralci ligaze MurE z vrednostjo IC_{50} manj kot 100 μ M [46].

1.2.3.4 MurF in zaviralci

Biosintezo UDP-MurNac-pentapeptida zaključi reakcija pripajanja dipeptida D-Ala-D-Ala na UDP-MurNac-tripeptid, ki jo katalizira ligaza MurF [36], [47], [48]. Poleg tega dipeptida sta možni še kombinaciji D-Ala-D-Ser in D-Ala-D-Lac pri proti vankomicinu odpornih sevih [36]. Ravno zaradi te razlike v zadnji aminokislini je preprečena vezava vankomicina, zato je bakterija odporna proti temu antibiotiku.

V preteklosti se je več skupin spojin izkazalo za precej učinkovite zaviralce ligaze MurF. To so spojine, ki so analogi ATP, analogi fosfinatnega prehodnega stanja, sulfonamidi, tiazolilaminopirimidini ali 8-hidroksikinolini. Obstaja tudi zaviralec encima MurF peptidnega tipa, sestavljen iz 12 aminokislina [49]. Prvi zaviralci ligaze MurF s protibakterijskim delovanjem so bili derivati 4-fenilpiperidina z vrednostjo MIC = 8

$\mu\text{g/mL}$ (*Escherichia coli*) [50], nekoliko kasneje so jim sledile spojine diarilkinolinskega tipa s podobnimi vrednostmi MIC [48]. Eden najmočnejših zaviralcev ligaze MurF je spojina **4** (slika 10), z vrednostjo $\text{IC}_{50} = 1 \mu\text{M}$ (MurF iz *Streptococcus pneumoniae*) [47], obstajajo pa tudi spojine z vrednostmi IC_{50} med 22 in 70 nM [35].



Slika 10. Nekaj najmočnejših zaviralcev ligaz Mur (povzeto po [36] in [43]).

Zgoraj omenjeni zaviralci ligaz Mur imajo zelo dobro inhibitorno aktivnost, zelo redki zaviralci pa imajo tudi protibakterijsko aktivnost [30], [42], kar predstavlja največji problem pri razvoju protibakterijskih zdravilnih učinkovin, ki bi na te encime delovale. Verjetno so razlogi za tako nizko protibakterijsko aktivnost v slabem prehajanju teh spojin skozi bakterijsko celično steno [32], [35].

2. NAMEN DELA

Ligazi MurD in MurE katalizirata reakciji biosinteze UDP-MurNAc-pentapeptida, ki si zaporedoma sledita, zato je smiselno poskusiti pripraviti zaviralec, ki bi lahko deloval na oba encima, ker bi bil strukturni analog tako produkta ligaze MurD, kot tudi substrata ligaze MurE [37]. Poznamo več spojin, ki zavirajo oba encima [30]–[32].

Tekom eksperimentalnega dela bomo glede na strukturne zahteve, navedene v poglavju 1.2.3.2, poskušali pripraviti potencialne zaviralce MurD, ki jih bomo testirali na ligazah MurD različnih mikroorganizmov, prav tako pa bomo njihovo aktivnosti testirali še na ligazi MurE in jim določili morebitno protibakterijsko aktivnost.

Kot je že bilo omenjeno, danes poznamo veliko različnih spojin, ki zavirajo enega ali več encimov iz skupine ligaz Mur, zelo malo pa jih je terapevtsko uporabnih, saj nimajo protibakterijskega delovanja. Več avtorjev navaja, da bi lahko problem bil v slabšem prehajanju bakterijske celične stene in posledično nizki koncentraciji zaviralca v citoplazmi mikroorganizma, kjer se nahaja tarča [32], [37]. Eksperimentalno bomo poskušali rešiti ta problem tako, da bomo pripravili več strukturnih mimetikov bakterijskih sideroforov kateholnega tipa, na katere bodo v prihodnosti raziskovalci na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo lahko kovalentno vezali različne zaviralce bakterijskih encimov, ki jim je bila dokazana sposobnost zaviranja encima, ne pa tudi protibakterijska aktivnost. Nastali konjugati siderofor-zaviralec bodo lahko izkoriščali transportni sistem bakterije za dostavo železa v citoplazmo in s pomočjo strategije "trojanskega konja" v večji meri dostavljali zaviralec na mesto delovanja, kar bi lahko občutno izboljšalo protibakterijsko delovanje teh spojin.

Če se bodo naši potencialni zaviralci ligaz MurD in MurE po testiranju na encimih izkazali za aktivne, jih bomo poskušali konjugirati z mimetiki bakterijskih sideroforov, ki jih bomo pripravili in tako preizkusili, ali s to konjugacijo vplivamo na izboljšanje njihovega protibakterijskega delovanja.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1. Reagenti in topila

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

3.2 METODE

3.2.1 Kromatografske metode

Potek reakcij smo spremljali s tankoplastno kromatografijo (TLC), pri čemer smo uporabljali plošče Merck Silica Gel 60 F₂₅₄ z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Uporabljali smo več različnih zmesi topil v različnih razmerjih, ki so navedene kot mobilne faze pri vsaki spojini posebej v poglavju 4. Eksperimentalni del. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah po njihovem razvitju v določeni mobilni fazi smo uporabljali UV-svetilko ($\lambda = 254 \text{ nm}$ ali 366 nm) in orositvene reagente.

Čiščenje surovega produkta po koncu posameznih stopenj reakcij smo pogosto izvajali s "flash" kolonsko kromatografijo s pomočjo različno velikih steklenih kolon. Kot stacionarno fazo smo uporabljali silikagel Silica Gel 60 proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,040 – 0,063 mm. Mobilne faze so bile zmesi topil različnih sestav, ki so navedene pri posameznih spojinah v poglavju 4. Eksperimentalni del.

3.2.2 Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca (NMR) – ¹H NMR spektri končnih in vmesnih produktov reakcij so bili posneti na spektrometru Bruker Avance DPX 300 v Nacionalnem centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo in na Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo. Kot interni standard je bil uporabljan tetrametilsilan (TMS), vzorci pa so bili raztopljeni v devteriranem dimetilsulfoksidu (DMSO-*d*₆) ali pa devteriranem kloroformu (CDCl₃) (navedeno pri posameznih spojinah v poglavju Eksperimentalni del). Za obdelavo posnetih spektrov smo uporabljali računalniški program MestRe-C 4.8.6. proizvajalca Mestrelab Research S.L.

Infrardeča spektroskopija (IR) – IR-spektri so bili posneti na spektrofotometru Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR na Fakulteti za farmacijo.

Masna spektrometrija (MS) – masni spektri so bili posneti na spektrometru Autospec (VG-Analytical) z EI, ESI in HRMS tehnikami v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

3.2.3 Določanje tališč

Talilni intervali spojin so bili določeni s Koflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica.

3.2.4 Poimenovanje in risanje spojin

Za risanje strukturnih formul spojin in njihovo poimenovanje po nomenklaturi IUPAC smo uporabljali računalniški program ChemBioDraw Ultra 15.0 podjetja CambridgeSoft.

3.2.5 Iskanje sinteznih postopkov

Za iskanje sinteznih postopkov po podatkovnih bazah smo uporabljali program SciFinder Scholar.

3.2.6 Mikrovalovni reaktor

Za nekatere sinteze smo uporabili mikrovalovni reaktor CEM Discover z IR načinom merjenja temperature.

3.2.7 Določanje inhibitorne aktivnosti spojin na encimih MurD in MurE

Inhibitorne aktivnosti spojin **15**, **16** in **17** so bile testirane na encimu MurD iz *E. coli*. Testiranje so opravili raziskovalci na Fakulteti za farmacijo. Fosfat, ki se tvori med encimsko reakcijo, je bil detektiran s pomočjo metode z barvilom malahitno zeleno. Količina raztopine, ki je bila testirana, je bila 50 µL, vsebovala pa je 50 mM Hepes (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina) (pH = 8,0), 5 mM MgCl₂, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Triton X-100, 80 µM UDP-MurNAc-L-Ala, 100 µM D-Glu, 400 µM ATP, MurD, izoliran iz *E. coli* (razredčen z 20 mM Hepes (pH = 8,0), 1 mM ditiotritol) in 500 µM testirane spojine, raztopljene v DMSO. Koncentracija DMSO v končni raztopini je bila 5% (v/v). Encimska reakcija je v taki raztopini potekala 15 minut pri 37 °C in nato bila prekinjena s 100 µL reagenta Biomol[®]. Po 5 minutah je bila izmerjena absorbanca pri 650 nm. Rezidualna aktivnost (RA) je bila izračunana relativno glede na kontrolni poskus v

DMSO. Vrednosti IC_{50} s 95% intervali zaupanja so bile izračunane iz rezultatov merjenja RA pri sedmih različnih koncentracijah posamezne testirane spojine.

Rezultati določanja inhibitornih aktivnosti na encimu MurD so prikazani v poglavju 5.2.1.

Inhibitorna aktivnost spojine **15** je bila testirana tudi na encimih MurD in MurE iz *E. coli* ter *S. aureus*. Testiranja so opravili raziskovalci na Univ Paris-Sud, Laboratoire des Enveloppes Bactériennes et Antibiotiques, Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire (Orsay, Francija). Po izvedbi encimske reakcije z radioaktivno označenim substratom je bila izmerjena količina nastalega radioaktivnega produkta. Volumen posamezne zmesi za izvedbo poskusa je bil 40 μ L, sestave pa so naslednje:

Za testiranje na MurD iz *E. coli*: 100 mM Tris-HCl, pH 8,6, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 7,5 μ M UDP-MurNAc-L- (^{14}C) Ala, 55 μ M D-Glu, 30 μ M Tween-20, 5% DMSO, MurD iz *E. coli* (18 μ L, razredčenega z 20 mM raztopino kalijevega fosfata, pH 7,2, 1 mM ditionitrola, 1 mg/mL BSA) in inhibitor.

Za testiranje na MurD iz *S. aureus*: 100 mM Tris-HCl, pH 8,6, 15 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 40 μ M UDP-MurNAc-L- (^{14}C) Ala, 140 μ M D-Glu, 30 μ M Tween-20, 5% DMSO, MurD iz *S. aureus* (18 μ L, razredčenega z 20 mM raztopino kalijevega fosfata, pH 7,2, 1 mM ditionitrola) in inhibitor.

Za testiranje na MurE iz *E. coli*: 100 mM Tris-HCl, pH 8,6, 40 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 40 μ M UDP-MurNAc-L-Ala-D- (^{14}C) Glu, 80 μ M *meso*-A₂pm, 30 μ M Tween-20, 5% DMSO, MurE iz *E. coli* (10 μ L, razredčenega z 20 mM raztopino kalijevega fosfata, pH 7,2, 1 mM ditionitrola) in inhibitor.

Za testiranje na MurE iz *S. aureus*: 100 mM Tris-HCl, pH 8,6, 15 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 100 μ M UDP-MurNAc-L-Ala-D- (^{14}C) Glu, 500 μ M L-Lys, 30 μ M Tween-20, 5% DMSO, MurE iz *S. aureus* (10 μ L, razredčenega z 20 mM raztopino kalijevega fosfata, pH 7,2, 1 mM ditionitrola) in inhibitor.

Pri vseh testiranjih so encimske reakcije v zmesih potekale 30 minut pri 37 °C, nato pa je bila reakcija prekinjena z dodatkom 8 μ L ledoceta, sledila pa je liofilizacija. Radioaktivni substrat in produkt sta bila ločena s pomočjo HPLC na koloni Nucleosil 100C18 5U (150 x 4,6 mm; Alltech France) z uporabo 50 mM amonijevega fosfata, pH 3,9 (MurD iz *E. coli* in *S. aureus*, MurE iz *E. coli*), oz. 50 mM natrijevega fosfata in 7,2 mM natrijevega

heksanfosfonata, pH 2,5/acetonitril (98,5:1,5, v/v) (MurE iz *S. aureus*). Hitrost pretoka mobilne faze je bila 0,6 mL/min. Radioaktivnost je bila detektirana s pomočjo pretočnega detektorja (LB506-C1, Berthold) s pomočjo Quicksafe Flow 2 scintilatorja (Zinsser Analytic) pri 0,6 mL/min. Vrednotenje je bilo izvedeno s pomočjo Radiostar software-a (Berthold). Vrednosti IC₅₀ s 95% intervali zaupanja so bile izračunane iz rezultatov merjenja RA pri sedmih različnih koncentracijah posamezne testirane spojine.

Rezultati določanja inhibitorne aktivnosti spojine **15** na encimu MurE so prikazani v poglavju 5.2.2.

3.2.8 Določanje protibakterijske aktivnosti

Občutljivosti štirih bakterijskih sevov (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in *Escherichia coli* ATCC 25922) na spojine **15**, **16** in **17** so bile preskušene s pomočjo makrodilucijske metode. Testiranja so opravili raziskovalci na Inštitutu za mikrobiologijo v Ljubljani.

Najprej je bila pripravljena osnovna raztopina s koncentracijo 2 mg/mL tako, da je bilo 5 mg posamezne spojine raztopljene v 2,5 mL DMSO. Delovne raztopine so bile pripravljene z zaporednim razredčevanjem osnovne raztopine v kationsko naravnani Mueller-Hinton zmesi (CAMHB). 34 mL CAMHB je bilo dodano k 5 mL osnovne raztopine, da je nastala raztopina s koncentracijo 256 µg/mL, ki je bila sterilizirana s filtracijo in zaporedno redčena. Na ta način je bilo pripravljenih 14 razredčitev te raztopine (koncentracija najbolj razredčene raztopine je bila 0,031 µg/mL), ki so nato bile zamrznjene največ 2 tedna. Pred bakterijsko vcepitvijo je bilo 0,5 mL posamezne razredčitve odpipetirano v epruvete (velikosti 13 x 100 mm) s pokrovom.

Kulture posameznih sevov bakterij so bile vzgojene na neselektivnih gojiščih z agarjem. 4 kolonije so bile odvzete z gojišča in vnešene v fiziološko raztopino. Končna gostota je bila 10⁸ CFU/mL (0,5 McFarlandov standard). Del take raztopine je bil 1000-krat razredčen (dobljena koncentracija je torej znašala 10⁵ CFU/mL). 0,5 mL tako pripravljene raztopine je bilo v roku največ 30 minut dodano v vsako od 14 epruvet z 0,5 mL prej omenjene testne raztopine. Sledila je 18 do 24-urna inkubacija epruвет pri 35 °C. Ker je po dodatku inokuluma prišlo do 2-kratnega redčenja raztopin testirane spojine, so koncentracije posameznih razredčitev po novem znašale od 0,016 do 128 µg/mL. Pripravljena je bila tudi epruveta s kontrolnim vzorcem, kjer je bila zmes CAMHB brez testiranih spojin, v katero

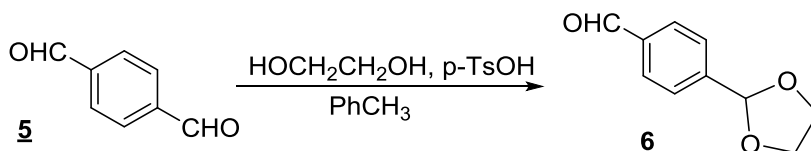
so bile vnešene kolonije z enako količino CFU/mL. Najmanjša koncentracija testirane spojine, pri kateri ni bilo vidnih znakov rasti mikroorganizmov, je bila minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Kontrola kakovosti metode je bila izvedena s pomočjo testiranja *S. aureus* ATCC 29213 in gentamicina. Razredčitve antibiotika so bile narejene po enakem postopku, kot za testirane spojine, izmerjene koncentracije MIC pa so bile v območju, ki ga določa Inštitut za standarde v kliničnih laboratorijih.

Rezultati merjenja protibakterijske aktivnosti so prikazane v poglavju 5.2.3.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 SINTEZA ZAVIRALCEV LIGAZE MurD

4.1.1 Uvedba dioksolanske zaščitne skupine na aldehyd



Slika 11. Reakcijska shema vezave dioksolanske zaščitne skupine na eno od aromatskih aldehydskih skupin.

Sintezni postopek

V suspenzijo izhodne spojine (740 mmol) v toluenu (250 mL) smo dodali etilenglikol (740 mmol) in *p*-toluensulfonsko kislino (5,3 mmol). Reakcijsko zmes v bučki z okroglim dnom smo opremili z Dean-Starkovo napravo in pustili mešati 3 dni.

Po ohladitvi reakcijske zmesi na sobno temperaturo smo odparili topilo, preostanek pa ekstrahirali z diklorometanom (150 mL), ki smo ga nato sprali še z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 x 100 mL), sušili nad Na₂SO₄ in filtrirali. Diklorometan smo uparili pod znižanim tlakom in zmes poskušali kristalizirati iz etilacetata, kar se je izkazalo za neuspešno.

Produkt reakcije iz zmesi smo zato čistili s pomočjo "flash" kolonske kromatografije. Na začetku smo uporabili mobilno fazo CH₂Cl₂ : petroleter = 2 : 1, nato pa CH₂Cl₂ : metanol = 20 : 1.

4-(1,3-dioksolan-2-il)benzaldehyd (**6**)

M_r: 178,06

Izgled: rumeno olje

Izkoristek reakcije: 59,2%

Retencijski faktor: 0,12 (CH₂Cl₂ : petroleter = 2 : 1)

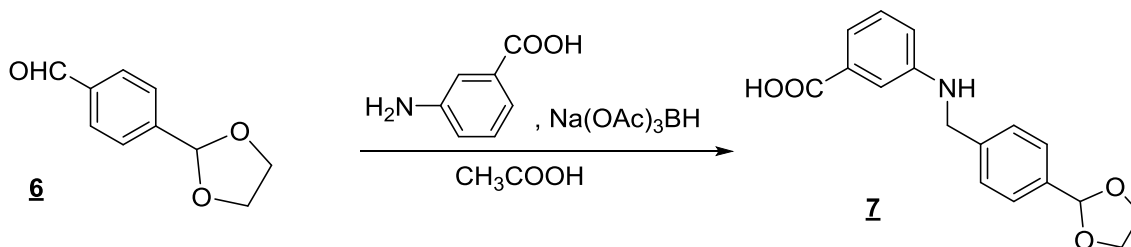
Temperatura tališča: 110-112 °C

MS (ESI): $m/z = 179 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 4,17\text{-}4,03$ (m, 4 H, 2 x CH_2), 5,90 (s, 1 H, OCHO), 7,67 (d, 2 H, $J = 8,4$ Hz, ArH), 7,92 (d, 2 H, $J = 8,4$ Hz, ArH), 10,05 (s, 1 H, CHO) ppm.

IR (KBr): 3365, 2865, 1945, 1694, 1576, 1500, 1430, 1386, 1369, 1302, 1199, 1096, 1014, 815, 773, 730, 685, 523, 475 cm^{-1}

4.1.2 Reduktivno aminiranje s 3-aminobenzojsko kislino



Slika 12. Reakcijska shema reduktivnega aminiranja izhodne spojine **6** s 3-aminobenzojsko kislino.

Sintezni postopek

Pripravljeni raztopini z dioksolansko skupino zaščenega aldehida (1 mmol) in 3-aminobenzojske kisline (1 mmol) v THF (10 mL) smo dodali očetno kislino (1 mmol) in po 15 minutah mešanja še reducent $\text{Na(OAc)}_3\text{BH}$ (1,5 mmol). Zmes smo pri sobni temperaturi mešali čez noč.

Reakcijski zmesi smo odparili topilo, preostanek raztopili v destilirani vodi (10 mL) in z 1 M NaOH naalkalili do $\text{pH} = 12\text{-}13$. Izvedli smo ekstrakcijo z etilacetatom (2 x 10 mL). Vodno fazo po ekstrakciji smo nakisali do $\text{pH} = 5$, pri čemer je izpadla oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem.

3-(4-(1,3-dioksolan-2-il)benzilamino)benzojska kislina (**7**)

M_r : 299,12

Izgled: bela oborina

Izkoristek reakcije: 61,1%

Retencijski faktor: 0,40 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 30 : 1$)

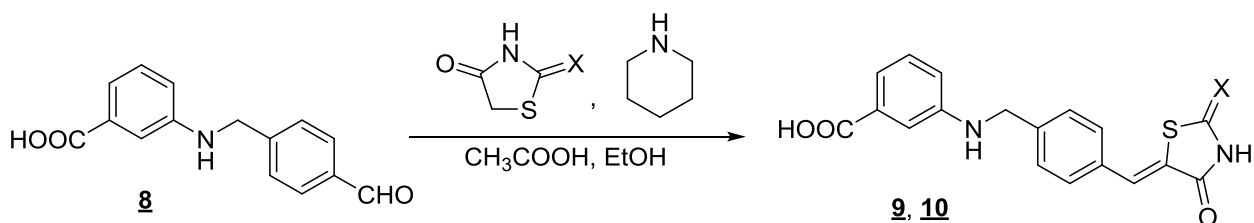
MS (ESI): $m/z = 256 [M+H]^+$, $278 [M+Na]^+$

HRMS ($m/z = 256$) za $C_{15}H_{14}NO_3$: izračunan = 256,0974, izmerjen = 256,0976

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 4,43$ (d, 2 H, $J = 5,8$ Hz, CH_2NH), $6,70$ (t, 1 H, $J = 6,1$ Hz, CH_2NH), $6,79$ - $6,76$ (m, 1 H, ArH), $7,18$ - $7,11$ (m, 3 H, ArH), $7,58$ (d, 2 H, $J = 8,1$ Hz, ArH), $7,87$ (d, 2 H, $J = 8,3$ Hz, ArH), $9,97$ (s, 1 H, CHO), $12,65$ (s, 1 H, COOH) ppm.

IR (KBr): 3371, 2850, 2360, 1682, 1603, 1519, 1480, 1436, 1295, 1208, 1167, 1096, 1016, 989, 942, 862, 832, 796, 757, 687, 559 cm^{-1}

4.1.4 Knoevenagelova kondenzacija 5-členskega obroča na aldehidno funkcionalno skupino



Slika 14. Reakcijska shema Knoevenagelove kondenzacije tiazolidin-2,4-dionskega/2-tioksotiazolidin-4-onskega obroča na aldehidno funkcionalno skupino ob prisotnosti piperidina kot šibko bazičnega katalizatorja.

Preglednica I. Struktura dveh posameznih produktov reakcije.

Oznaka produkta	X
<u>9</u>	O
<u>10</u>	S

Sintezni postopek

Izhodni spojini (5,8 mmol) smo dodali absolutni etanol (5 mL) in vse ostale reagente – piperidin (0,58 mmol), očetno kislino (0,58 mmol), tiazolidin-2,4-dion (oz. 2-tioksotiazolidin-4-on) (5,8 mmol). Reakcijo smo izvedli v mikrovalovnem reaktorju pri temperaturi 140 °C, tlaku 16 barov in moči 40 W približno 40 minut.

Reakcijsko zmes po končani reakciji smo pustili čez noč v hladilniku, izpadlo oborino produkta filtrirali z odsesavanjem in spirali z nekaj etanola. Matičnici smo odparili topilo

(EtOH), ji dodali metanol in iz nje kristalizirali končni produkt. Nastale kristale skupaj z matičnico smo pustili 2 dni v hladilniku in jih nato odfiltrirali s presesavanjem.

Reakcijo sinteze spojine **9** smo v mikrovalovnem reaktorju poskusili izvesti na dva načina. Podrobnosti so opisane v poglavju 5.1.3 Knoevenagelova kondenzacija.

(Z)-3-(4-((2,4-dioksotiazolidin-5-iliden)metil)benzilamino)benzojska kislina (9**)**

M_r: 354,07

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek reakcije: 46,5%

Retencijski faktor: 0,28 (CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1)

MS (ESI): m/z = 353 [M-H]⁻

HRMS (m/z = 353) za C₁₈H₁₃N₂O₄S: izračunan = 353,0596, izmerjen = 353,0600

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 4,37 (d, 2 H, *J* = 5,2, NHCH₂), 6,65 (t, 1 H, *J* = 6,0, NHCH₂), 6,79-6,77 (m, 1 H, ArH), 7,17-7,11 (m, 3 H, ArH), 7,58-7,49 (m, 4 H, ArH), 7,76 (s, 1 H, -CH=), 12,65 (s, 2 H, COOH, CONHCO) ppm.

(Z)-3-(4-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-ilidene)metil)benzilamino)benzojska kislina

(10)

M_r: 370,04

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek reakcije: 35,4%

Retencijski faktor: 0,40 (CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1)

Temperatura tališča: 220-221 °C

MS (ESI): m/z = 369 [M-H]⁻

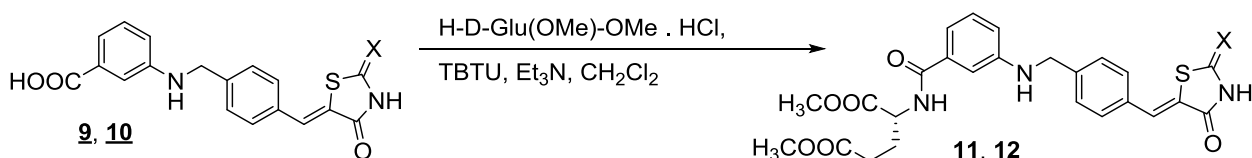
HRMS (m/z = 369) za C₁₈H₁₃N₂O₃S₂: izračunan = 369,0368, izmerjen = 369,0384

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 4,37 (s, 2 H, CH₂NH), 6,63 (s, 1 H, CH₂NH), 6,80-6,76 (m, 1 H, ArH), 7,18-7,10 (m, 3 H, ArH), 7,52 (d, 2 H, *J* = 8,4 Hz, ArH), 7,57 (d, 2 H,

$J = 8.4 \text{ Hz, ArH}$), 7,62 (s, 1 H, $\text{C}=\underline{\text{CH}}$), 12,60 (s, 1 H, $\text{COO}\underline{\text{H}}$), 13,83 (s, 1 H, $\text{CONH}\underline{\text{CS}}$) ppm.

IR (KBr): 3432, 2864, 2365, 1686, 1589, 1420, 1335, 1315, 1285, 1240, 1194, 1076, 1014, 861, 809, 757, 685, 596, 551 cm^{-1}

4.1.5 Reakcija tvorbe amidne vezi z dimetilnim estrom D-Glu



Slika 15. Reakcijska shema tvorbe amidne vezi med izhodno spojino in dimetilnim estrom D-Glu. TBTU – sklopitveni reagent.

Preglednica II. Struktura dveh posameznih produktov reakcije.

Oznaka produkta	X
<u>11</u>	O
<u>12</u>	S

Sintezni postopek

Suspenziji izhodne spojine (2,6 mmol) v diklorometanu (60 mL) smo med mešanjem dodajali trietilamin (7,9 mmol) in TBTU (2,9 mmol). Zmes smo mešali še 15 minut, nato dodali še trietilamin (2,6 mmol) in H-D-Glu(OMe)-OMe·HCl (2,6 mmol). Pri sintezi spojine **11** smo reakcijsko zmes mešali še 5 ur pri sobni temperaturi, pri sintezi spojine **12** pa 2 dni.

Reakcijsko zmes smo nato spirali z destilirano vodo (2 x 40 mL), 2 M HCl (2 x 40 mL), nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2 x 40 mL) in nasičeno raztopino NaCl (40 mL). Odparili smo topilo in zmes nato čistili s "flash" kolonsko kromatografijo z mobilno fazo CH₂Cl₂ : MeOH = 30 : 1.

(R,Z)-dimetil 2-(3-(4-((2,4-dioksotiazolidin-5-iliden)metil)benzilamino)benzamido)pentandioat (11)

M_r: 511,14

Izgled: rumena trdna snov

Izkoristek reakcije: 42,1%

Retencijski faktor: 0,34 (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1)

MS (ESI): m/z = 512 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 512) za C₂₅H₂₆N₃O₇S: izračunan = 512,1491, izmerjen = 512,1496

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2,15-1,94 (m, 2 H, CH₂CH₂COOCH₃), 2,46-2,39 (m, 2 H, CH₂COOCH₃), 3,58 (s, 3 H, COOCH₃), 3,63 (s, 3 H, COOCH₃), 4,44-4,38 (m, 3 H, CH₃COOCHNHCO, NHCH₂), 6,59 (t, 1 H, *J* = 5,3 Hz, NHCH₂), 6,71 (d, 1 H, *J* = 6,9 Hz, ArH), 7,15-7,03 (m, 3 H, ArH), 7,58-7,50 (m, 4 H, ArH), 7,77 (s, 1 H, -CH=), 8,57 (d, 1 H, *J* = 7,4 Hz, CONH), 12,61 (s, 1 H, CONHCO) ppm.

(R,Z)-dimetil 2-(3-(4-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-iliden)metil)benzilamino)benzamido)pentandioat (12)

M_r: 527,12

Izgled: oranžna trdna snov

Izkoristek reakcije: 69,1%

Retencijski faktor: 0,22 (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1)

Temperatura tališča: 89-91 °C

MS (ESI): m/z = 526 [M-H]⁻

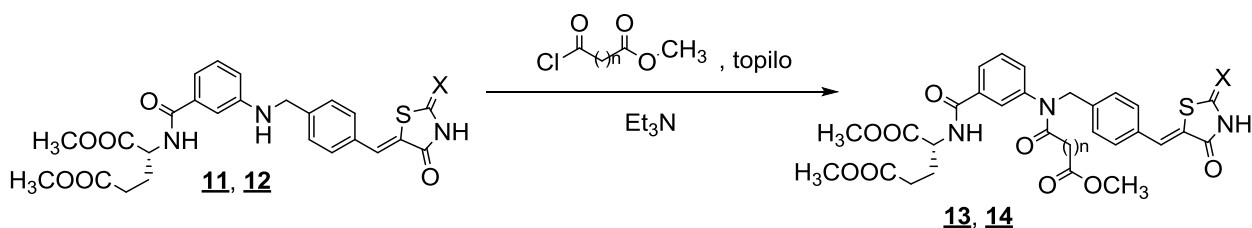
HRMS (m/z = 526) za C₂₅H₂₄N₃O₆S₂: izračunan = 526,1107, izmerjen = 526,1101

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2,19-1,92 (m, 2 H, CHCH₂CH₂), 2,42 (t, 2 H, *J* = 7,4 Hz, CHCH₂CH₂), 3,58 (s, 3 H, CH₃), 3,63 (s, 3 H, CH₃), 4,45-4,38 (m, 3 H, CH₂NH, CHCH₂CH₂), 5,75 (s, 1 H, CH₂NH), 6,71 (d, 1 H, *J* = 7,7 Hz, ArH), 7,06-7,03 (m, 2 H, ArH), 7,13 (t, 1 H, *J* = 7,7 Hz, ArH), 7,52 (d, 2 H, *J* = 8,2 Hz, ArH), 7,57 (d, 2 H, *J* = 8,2

Hz, ArH), 7,62 (s, 1 H, C=CH), 8,53 (d, 1 H, J = 7,5 Hz, CONH), 13,82 (s, 1 H, CONHCS) ppm.

IR (KBr): 3391, 2950, 2849, 2358, 1732, 1600, 1538, 1436, 1234, 1193, 1061, 1006, 809, 750, 681, 589, 544 cm⁻¹

4.1.6 Tvorba amidne vezi na sekundarnem aminu



Slika 16. Reakcijska shema vezave reagenta na sekundarni amin in tvorbe amidne vezi.

Preglednica III. Struktura dveh posameznih produktov reakcije in topilo, ki smo ga pri posamezni reakciji uporabili.

Produkt	X	n	Topilo
<u>13</u>	O	1	THF
<u>14</u>	S	0	CH ₂ Cl ₂

Sintezni postopek

Izhodno spojino (0,58 mmol) smo raztopili v približno 10 mL topila, ji dodali trietilamin (5,8 mmol) in v približno 5 mL topila raztopljen metil malonil klorid (1,8 mmol). Na ledu smo mešali 15 minut, nato odstavili ledeno kopel, mešali še 3 dni pri sobni temperaturi, nato dodali še metil malonil klorid (1,2 mmol) in pustili mešati še 2 dni.

Reakcijski zmesi smo odparili topilo, preostanek suspendirali v etilacetatu (20 mL) in spirali z 10% citrsko kislino (2 x 20 mL) ter nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 x 20 mL). Na koncu smo zmes posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in čistili s kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze CH₂Cl₂ : MeOH = 30 : 1 (v primeru sinteze 14 CH₂Cl₂ : MeOH = 50 : 1).

(R,Z)-dimetil 2-(3-(N-(4-((2,4-dioksotiazolidin-5-iliden)metil)benzil)-3-metoksi-3-oksopropanamido)benzamido)pentandioat (13)

M_r: 611,16

Izgled: rumena trdna snov

Izkoristek reakcije: 24,3%

Retencijski faktor: 0,28 (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1)

MS (ESI): m/z = 612 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 612) za C₂₉H₃₀N₃O₁₀S: izračunan = 612,1646, izmerjen = 612,1649

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2,37-2,12 (m, 2 H, CH₂CH₂COO), 2,59-2,43 (m, 2 H, CH₂CH₂COO), 3,69 (s, 3 H, CH₃COO), 3,72 (s, 3 H, CH₃COO), 3,77 (s, 2 H, COCH₂COO), 3,81 (s, 3 H, CH₃COO), 4,81-4,76 (m, 1 H, CH₃COOCHNHCO), 5,00 (s, 2 H, -N-CH₂), 7,24 (ddd, 1H, J = 7,9, 2,1, 1,0 Hz, ArH), 7,32 (d, 1 H, J = 7,3 Hz, CONH), 7,38 (d, 2 H, J = 8,2 Hz, ArH), 7,45 (d, 2 H, J = 8,2 Hz, ArH), 7,50-7,47 (m, 1 H, ArH), 7,79 (s, 1 H, C=CH), 7,69 (t, 1 H, J = 1,8 Hz, ArH), 7,85-7,81 (m, 1 H, ArH) ppm.

(R,Z)-dimetil 2-(3-(2-etoksi-2-okso-N-(4-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-iliden)metil)benzil)acetamido)benzamido)pentandioat (14)

M_r: 627,13

Izgled: rumena trdna snov

Izkoristek reakcije: 23,8%

Retencijski faktor: 0,14 (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1)

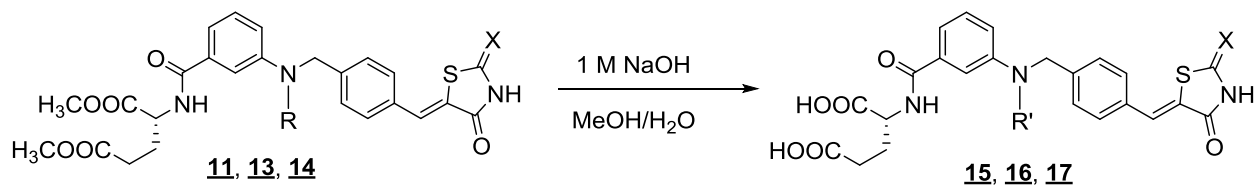
MS (ESI): m/z = 628 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 628) za C₂₉H₃₀N₃O₉S₂: izračunan = 628,1423, izmerjen = 628,1435

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,02 (m, 3 H, CH₂CH₃), 2,34-2,11 (m, 2 H, CH₂CH₂COO), 2,56-2,41 (m, 2 H, CH₂CH₂COO), 3,67 (s, 3 H, CH₃COO), 3,79 (s, 3 H, CH₃COO), 4,06 (q, 2 H, J = 7,1 Hz, CH₂CH₃), 4,79-4,74 (m, 1 H, CH₃COOCHNHCO), 5,03 (s, 2 H, -N-CH₂), 7,24-7,21 (m, 2 H, ArH), 7,44-7,36 (m, 5 H, ArH), 7,59 (s, 1 H, -

$\underline{\text{CH}}$ =), 7,70 (t, 1 H, $J = 1,8$ Hz, $\underline{\text{NHCO}}$), 7,79-7,76 (m, 1 H, $\underline{\text{ArH}}$), 12,55 (s, 1 H, $\underline{\text{CONHCO}}$) ppm.

4.1.7 Alkalna hidroliza metilnih estrov



Slika 17. Reakcijska shema z bazo katalizirane hidrolize estrskih funkcionalnih skupin

Preglednica IV. Struktura treh izhodnih spojin in produktov posameznih reakcij hidrolize.

Izhodna spojina	Produkt	X	R	R'
<u>11</u>	<u>15</u>	O	H	H
<u>13</u>	<u>16</u>	O	COCH ₂ COOCH ₃	COCH ₂ COOH
<u>14</u>	<u>17</u>	S	COCOOCH ₂ CH ₃	COCOOH

Sintezni postopek

Izhodno spojino (0,40 mmol) smo raztopili v zmesi MeOH : H₂O = 1 : 1 (10 mL) in dodali 1 M NaOH (2,8 mmol). Reakcijsko zmes smo nato 4 ure mešali pri sobni temperaturi.

Po končanem mešanju smo reakcijsko zmes nevtralizirali s približno 1 M HCl (1,5 mL) in ji odparili MeOH. Preostalo zmes smo nakisali do pH = 2 z 1 M HCl in jo ekstrahirali z etilacetatom (3 x 15 mL). Organsko fazo po ekstrakciji smo sprali s koncentrirano raztopino NaCl (20 mL) in jo sušili nad Na₂SO₄, prefiltrirali ter odparili etilacetat.

(*R,Z*)-2-(3-(4-((2,4-dioksotiazolidin-5-iliden)metil)benzilamino)benzamido)pentandiojska kislina (15)

M_r : 483,11

Izgled: rumena trdna snov

Izkoristek reakcije: 44,3%

Retencijski faktor: 0,32 (CH₃CN : MeOH : H₂O = 10 : 1 : 1)

Temperatura tališča: 142-144 °C

MS (ESI): $m/z = 482$ [M-H]⁻

HRMS ($m/z = 482$) za C₂₃H₂₀N₃O₇S: izračunan = 482,1022, izmerjen = 482,1007

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 2,08-1,90$ (m, 2 H, HOOCCH₂CH₂), 2,33 (t, 2 H, $J = 7,5$ Hz, HOOCCH₂CH₂), 4,35 (s, 2 H, NHCH₂), 4,37 (t, 1 H, $J = 5,6$ Hz, HOOCCHNHCO), 6,58 (t, 1 H, $J = 6,0$ Hz, NHCH₂), 6,70 (dd, 1 H, $J_1 = 1,5$ Hz, $J_2 = 8,1$ Hz, ArH), 7,15-7,03 (m, 3 H, ArH), 7,52 (d, 2 H, $J = 8,3$ Hz, ArH), 7,57 (d, 2 H, $J = 8,3$ Hz, ArH), 7,76 (s, 1 H, -CH=), 8,41 (d, 1 H, $J = 7,6$ Hz, NHCO), 12,32 (s, 2 H, 2 x COOH), 12,61 (s, 1 H, CONHCO) ppm.

(*R,Z*)-2-(3-(2-karboksi-N-(4-((2,4-dioksotiazolidin-5-iliden)metil)benzil)acetamido)benzamido)pentandiojska kislina (16)

M_r: 569,11

Izgled: rumena trdna snov

Izkoristek reakcije: 69,0%

Retencijski faktor: 0 (CH₂Cl₂ : MeOH : CH₃COOH = 9 : 1 : 0,1)

MS (ESI): $m/z = 568$ [M-H]⁻

HRMS ($m/z = 568$) za C₂₆H₂₂N₃O₁₀S: izračunan = 568,1026, izmerjen = 568,1028

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 2,13-1,92$ (m, 2 H, HOOCCH₂CH₂), 2,38-2,33 (m, 2 H, HOOCCH₂CH₂), 3,22 (s, 2 H, COCH₂COOH), 4,42-4,37 (m, 1 H, HOOCCHNHCO), 5,03-4,94 (m, 2 H, NCH₂), 7,38-7,35 (m, 1 H, ArH), 7,41 (d, 2 H, $J = 8,3$ Hz, ArH), 7,49 (t, 1 H, $J = 7,8$ Hz, ArH), 7,54 (d, 2 H, $J = 8,3$ Hz, ArH), 7,77 (s, 1 H, -CH=), 7,82 (s, 1 H, ArH), 7,86 (d, 1 H, $J = 7,6$ Hz, ArH), 8,69 (d, 1 H, $J = 7,6$ Hz, NHCO), 12,42 (s, 3 H, COCH₂COOH, 2 x COOH), 12,61 (s, 1 H, CONHCO) ppm.

(*R,Z*)-2-(3-(karboksi-N-(4-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-iliden)metil)benzil)formamido)benzamido)pentandiojska kislina (17)

M_r: 571,07

Izgled: oranžna trdna snov

Izkoristek reakcije: 64,9%

Retencijski faktor: 0 (CH₂Cl₂ : MeOH : CH₃COOH = 9 : 1 : 0,1)

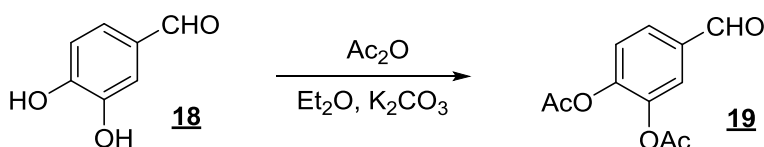
MS (ESI): m/z = 570 [M-H]⁻

HRMS (m/z = 570) za C₂₅H₂₀N₃O₉S₂: izračunan = 570,0641, izmerjen = 570,0645

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2,11-1,92 (m, 2 H, HOOCCH₂CH₂), 2,37-2,33 (m, 2 H, HOOCCH₂CH₂), 4,40-4,36 (m, 1 H, HOOCCHNHCO), 5,07 (s, 2 H, NCH₂), 7,41-7,36 (m, 3 H, ArH), 7,49 (t, 1 H, *J* = 7,9 Hz, ArH), 7,58 (d, 2 H, *J* = 8,3 Hz, ArH), 7,61 (s, 1 H, -CH=), 7,88-7,84 (m, 2 H, ArH), 8,72 (d, 1 H, *J* = 7,6 Hz, NHCO), 12,22 (s, 2 H, 2 x COOH), 12,69 (s, 1 H, COCOOH), 13,86 (s, 1 H, CONHCS) ppm.

4.2 SINTEZA PREKURZORJEV SIDEROFOROV IN NJIHOVIH KONJUGATOV Z MOLEKULAMI UČINKOVIN

4.2.1 Uvedba acetatnih estrov na aromatskih hidroksilnih skupinah



Slika 18. Reakcijska shema uvedbe acetatnih zaščitnih skupin na kateholni OH-skupini.

Sintezni postopek

Izhodno spojino (26,8 mmol) smo suspendirali v dietil etru (150 mL) in dodali K₂CO₃ (72,4 mmol). Počasi smo dokapavali acetanhidrid (160,8 mmol) in nato pri sobni temperaturi mešali približno 1 uro. Po končani reakciji smo dodali etilacetat (100 mL) in destilirano vodo (100 mL) ter ločili fazi. Vodno fazo smo še enkrat ekstrahirali z etilacetatom (100 mL). Organski fazi smo združili in ju spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 x 150 mL), nasičeno raztopino NaCl (1 x 150 mL) in nato še sušili nad Na₂SO₄, filtrirali ter odparili topilo.

4-formil-1,2-fenilen diacetat (19)

M_r: 222,05

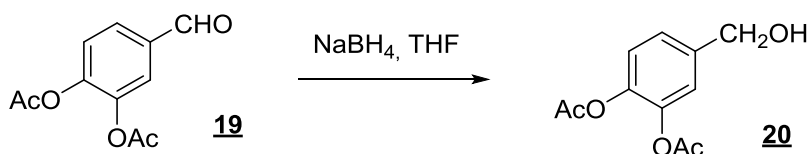
Izgled: rumeno olje

Izkoristek reakcije: 100%

Retencijski faktor: 0,72 (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2,33 (s, 6 H, 2 x OCOCH₃), 7,39 (d, 1 H, *J* = 8,3 Hz, ArH), 7,74 (d, 1 H, *J* = 1,8 Hz, ArH), 7,79 (dd, 1 H, *J*₁ = 8,3 Hz, *J*₂ = 2,0 Hz, ArH), 9,96 (s, 1 H, CHO) ppm.

4.2.2 Redukcija aldehydne funkcionalne skupine



Slika 19. Reakcijska shema redukcije aldehydne funkcionalne skupine do primarnega alkohola.

Sintezni postopek

Izhodno spojino (36,2 mmol) smo raztopili v THF (150 mL) in med mešanjem dodali NaBH₄ (41,7 mmol). Mešali smo približno 6 ur pri sobni temperaturi, nato reakcijsko zmes ohladili na ledu. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 1 M HCl (30 mL). Ko se je zmes nehala peniti, smo odstavili ledeno kopel. Pri znižanem tlaku smo odparili THF in ekstrahirali z etilacetatom (2 x 50 mL). Združeni organski fazi smo spirali še z nasičeno vodno raztopino NaCl, sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in pri znižanem tlaku odparili etilacetat.

4-(hidroksimetil)-1,2-fenilendiacetat (**20**)

M_r: 224,07

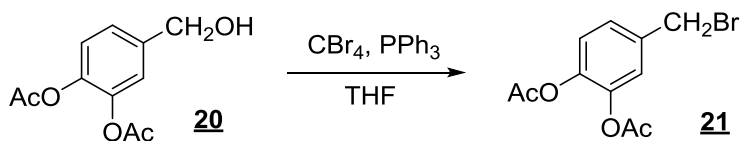
Izgled: rumeno olje

Izkoristek reakcije: 67,4%

Retencijski faktor: 0,3 (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 2,31 (s, 6 H, 2 x OCOCH₃), 4,69 (s, 2 H, CH₂), 7,18 (d, 1 H, *J* = 8,2 Hz, ArH), 7,22-7,23 (m, 1 H, ArH), 7,25 (tdd, 1 H, *J*₁ = 8,2 Hz, *J*₂ = 2,0 Hz, *J*₃ = 0,7 Hz, ArH) ppm.

4.2.3 Appelova reakcija (bromiranje primarnega alkohola)



Slika 20. Reakcijska shema zamenjave hidroksilne skupine primarnega alkohola z bromom.

Sintezni postopek

Izhodno spojino (16,9 mmol) smo raztopili v THF (150 mL) in dodali CBr_4 (25,4 mmol) ter PPh_3 (25,4 mmol). Pri sobni temperaturi smo mešali 4 dni. Izpadlo oborino smo filtrirali s presesavanjem, matičnici odparili topilo in čistili s "flash" kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze heksan : etilacetat = 4 : 1.

4-(bromometil)-1,2-fenilen diacetat (21)

M_r : 285,98

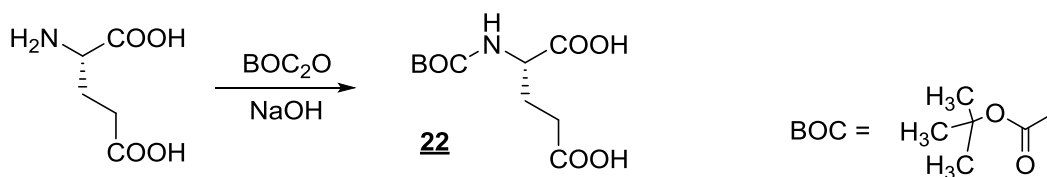
Izgled: rumeno olje

Izkoristek reakcije: 100%

Retencijski faktor: 0,75 (etilacetat : heksan = 1 : 1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 2,28 (s, 6 H, 2 x OCOCH_3), 4,73 (s, 2 H, CH_2), 7,27 (d, 1 H, J = 8,2 Hz, ArH), 7,41-7,37 (m, 2 H, 2 x ArH) ppm.

4.2.4 Uvedba BOC-zaščitne skupine na D-Glu



Slika 21. Reakcijska shema zaščite aminske funkcionalne skupine z BOC-zaščitno skupino.

Sintezni postopek

D-Glu (24 mmol) smo raztopili v zmesi 1 M NaOH (100 mL), vode (50 mL) in 1,4-dioksana (100 mL). Raztopino smo ohladili na 0 °C in dodali v 50 mL dioksana raztopljen BOC₂O. Pri sobni temperaturi smo mešali 24 ur.

Odparili smo dioksan in ekstrahirali vodno fazo z 2 x 150 mL etilacetata. Vodno fazo smo z 1 M HCl nakisali do pH = 3 in jo ekstrahirali z 2 x 200 mL etilacetata. Združili smo organski fazi, ju sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in odparili etilacetat.

(R)-2-(2-*tert*-butoksi-2-oksoetil)pentandiojska kislina (**22**)

M_r: 246,11

Izgled: bela trdna snov

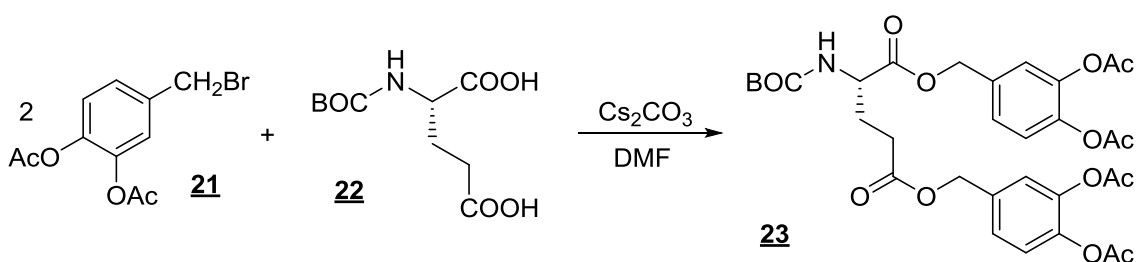
Izkoristek reakcije: 75,3%

Retencijski faktor: 0,56 (CH₃CN : MeOH : H₂O = 10 : 1 : 1)

Temperatura tališča: 110-112 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1,38 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1,95-1,68 (m, 2 H, HOOCCH₂CH₂), 2,30-2,26 (m, 2 H, HOOCCH₂CH₂), 3,93-3,88 (m, 1H, CH), 7,11 (d, 1 H, J = 8,1 Hz, NHBOC), 12,33 (s, 2 H, 2 x COOH) ppm.

4.2.5 Kondenzacija spojine **21** na z BOC-skupino zaščiteno D-Glu



Slika 22. Reakcijska shema vezave dveh molekul spojine **21** na posamezni karboksilni skupini Boc zaščitene D-Glu.

Sintezni postopek

BOC-D-Glu (2 mmol) smo raztopili v brezvodnem DMF (15 mL). Med mešanjem nastale raztopine smo dodali še Cs₂CO₃ (4 mmol) in spojino **21** (4 mmol). Pri sobni temperaturi in

čim bolj brezvodnih pogojih (problem hidrolize acetatnih skupin) smo mešali približno 5 ur.

Reakcijski zmesi smo po končani reakciji s presesavanjem odfiltrirali Cs_2CO_3 , matičnici dodali 5% raztopino citronske kisline in ekstrahirali z etilacetatom (2 x 40 mL). Združeni organski fazi smo sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in odparili etilacetat.

(R)-bis(3,4-diacetoksibenzil) 2-(tert-butoksikarbonilamino)pentandioat (23)

M_r : 659,22

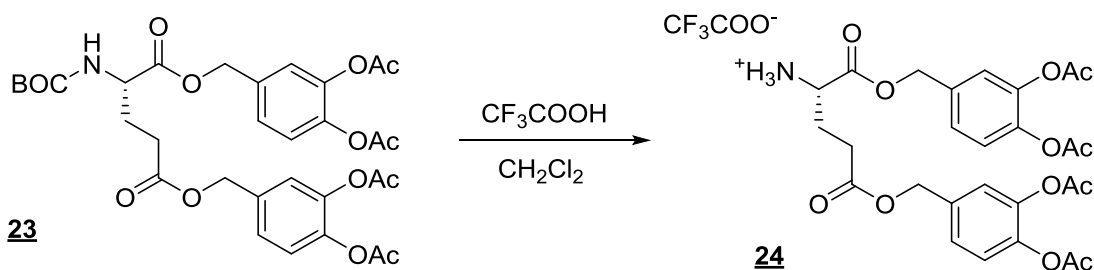
Izgled: svetlorumeno olje

Izkoristek reakcije: 79,0%

Retencijski faktor: 0,2 (etilacetat : heksan = 1 : 1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 1,37 (s, 9 H, 3 x CH_3), 2,05-1,85 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 2,29-2,27 (m, 14 H, 4 x OCOCH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 4,09-4,08 (m, 1 H, BOCNHCH), 5,09 (s, 2 H, COOCH_2Ph), 5,13 (s, 2 H, COOCH_2Ph), 7,30-7,21 (m, 6 H, ArH), 7,40 (d, 1 H, $J = 7,8$ Hz, BOCNH) ppm.

4.2.6 Odstranitev BOC zaščitne skupine



Slika 23. Reakcijska shema odstranitve zaščitne skupine BOC.

Sintezni postopek

Izhodno spojino (0,152 mmol) smo raztopili v CH_2Cl_2 (20 mL). Nastalo raztopino smo ohladili na 0°C in dodali CF_3COOH (2,3 mmol). Pri sobni temperaturi smo mešali čez noč in nato dodali še enkrat enako količino CF_3COOH . Po nadaljnjem 7-urnem mešanju smo odparili CH_2Cl_2 .

(R)-bis(3,4-diacetoksibenzil) 2-aminopentandioat (24)

M_r : 559,17

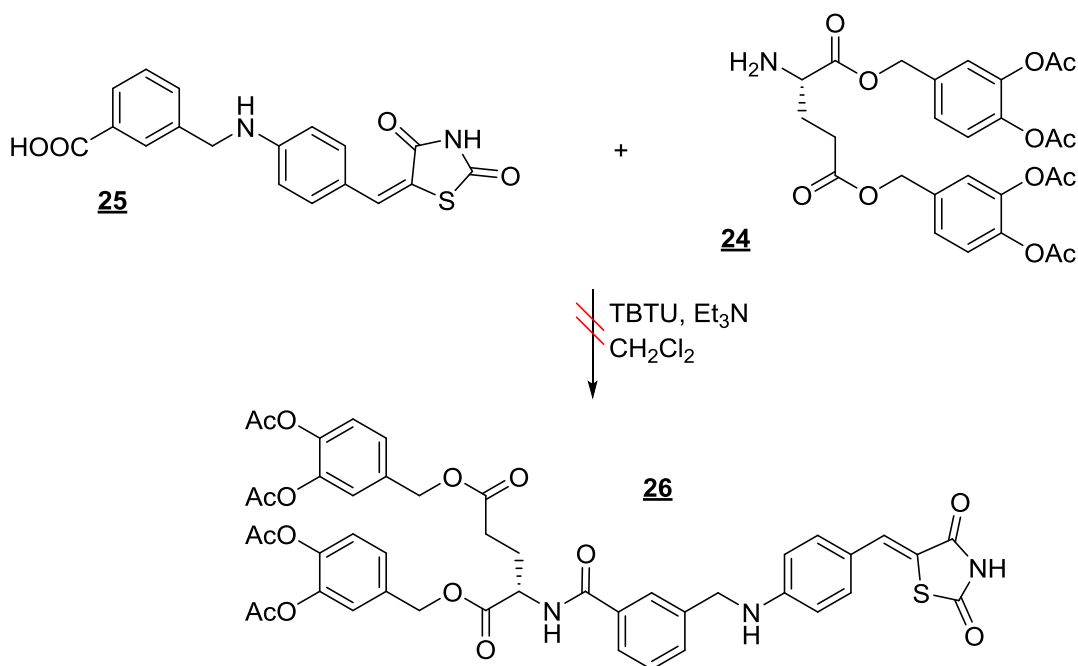
Izgled: rumeno olje

Izkoristek reakcije: 98,8%

Retencijski faktor: 0,2 (CH_2Cl_2 : MeOH = 20 : 1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 1,93-1,66 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 2,29-2,27 (m, 14 H, 4 x OCOCH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 3,36-3,26 (m, 1 H, CH), 5,17-4,94 (m, 4 H, 2 x COOCH_2Ph), 7,31-7,21 (m, 6 H, ArH) ppm.

4.3 NEUSPELA VEZAVA PREKURZORJA SIDEROFORA NA MOLEKULO PREKURZORJA ZAVIRALCA MurD



Slika 24. Reakcijska shema reakcije sklopitve prekurzorja siderofora (spojina **24**) in molekule prekurzorja zaviralca MurD (**25**).

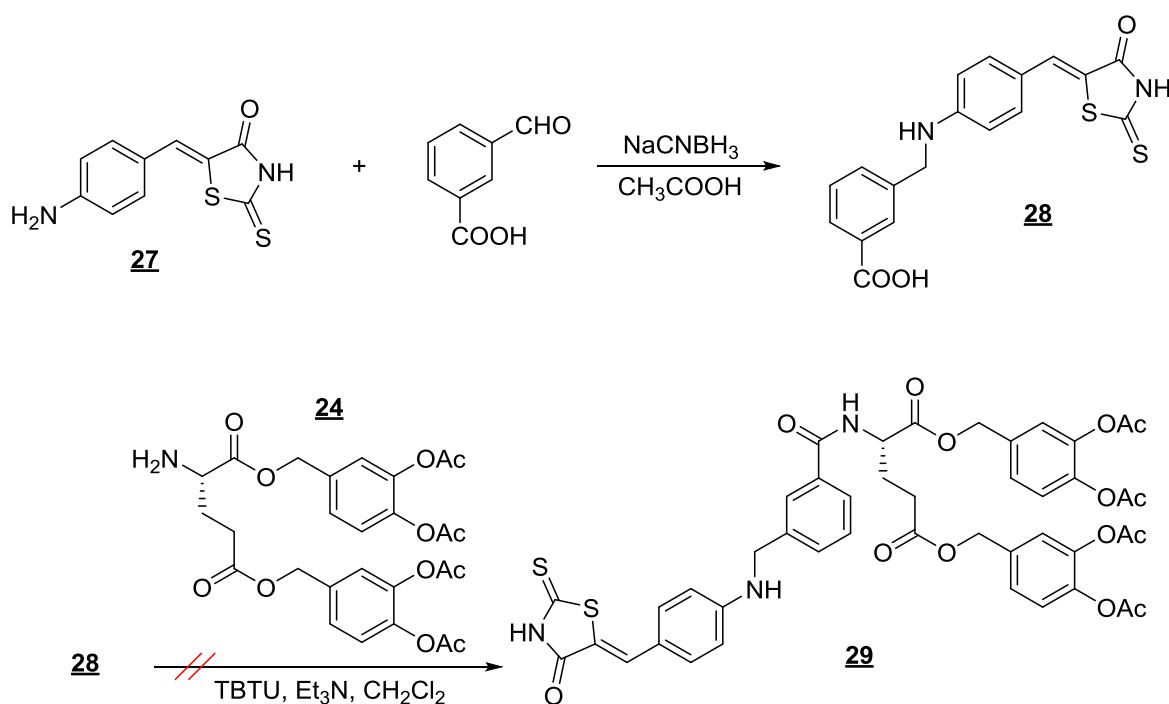
Sintezni postopek

Spojino **25** (0,28 mmol) smo raztopili v CH_2Cl_2 (17 mL), dodali TBTU (0,31 mmol) in trietilamin (0,56 mmol). Mešali smo pri sobni temperaturi še 30 min, nato dodali v nekaj

mL CH₂Cl₂ raztopljeno spojino **24** (0,28 mmol) in še enkrat trietilamin (0,28 mmol). Mešali smo 3 ure pri sobni temperaturi.

Reakcijski zmesi smo odparili topilo, dodali 50 mL CH₂Cl₂ in spirali z destilirano vodo (1 x 25 mL) ter zaporedoma spirali še s 5% citrsko kislino (2 x 25 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (1 x 25 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 x 25 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in odparili CH₂Cl₂ ter surov produkt čistili s "flash" kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1. Ko smo posneli NMR spektre čistih frakcij, nismo potrdili strukture želenega produkta, torej sklepamo, da reakcija ni uspela.

4.4 NEUSPELA SINTEZA KONJUGATA SIDEROFOR-UČINKOVINA



Slika 25. Reakcijska shema neuspelega poskusa dvostopenjske sinteze konjugata siderofor-učinkovina.

Sintezni postopek – 1. stopnja

Izhodno spojino (3,45 mmol) in 3-karboksibenzaldehid (3,45 mmol) smo suspendirali v 100 mL metanola, dodali nekaj kapljic očetne kisline in 1 uro segrevali pri temperaturi refluxa (80 °C), da je nastal imin. Ohladili smo na sobno temperaturo, dodali NaCNBH₃ (4,49 mmol) in 1 dan mešali pri sobni temperaturi.

Reakcijsko zmes smo filtrirali s presesavanjem, matičnici odparili topilo in jo prekrizalizirali iz metanola. Produkt – oranžni kristali.

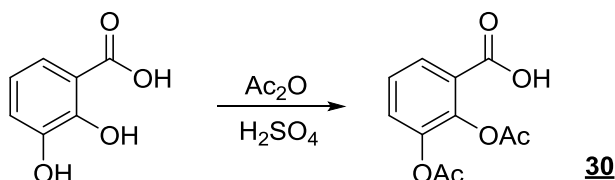
Sintezni postopek – 2. stopnja

Spojino **28** (0,127 mmol) smo raztopili v 5 mL diklorometana in dodali trietilamin (0,254 mmol) ter TBTU (0,140 mmol). Mešali smo pri sobni temperaturi 20 minut, nato dodali v 5 mL diklorometana raztopljeno spojino **24** (0,127 mmol) in še nekaj trietilamina (0,127 mmol). Pri sobni temperaturi smo mešali čez noč.

Reakcijski zmesi smo dodali še 10 mL diklorometana in nato zaporedno spirali z 2 x 10 mL 1 M HCl, 2 x 10 mL nasičene raztopine NH₄Cl, 2 x 10 mL nasičene raztopine NaHCO₃ ter 1 x 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organski fazi smo odparili topilo in dodali zmes CH₂Cl₂ : MeOH = 40 : 1. Izpadlo sol smo odfiltrirali s presesavanjem. Matičnici smo odparilo topilo in jo čistili s "flash" kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze CH₂Cl₂ : MeOH = 40 : 1, kar se je izkazalo za neuspešno, saj nismo uspeli izolirati želenega produkta.

4.5 SINTEZA SIDEROFORA – SPOJINA **32**

4.5.1 Sinteza 2,3-diacetoksibenzojske kisline (**30**)



Slika 26. Acetiliranje hidroksilnih funkcionalnih skupin izhodne spojine.

Sintezni postopek

2,3-Dihidroksibenzojsko kislino (1,546 g, 10,0 mmol) smo raztopili v acetanhidridu (2,85 mL, 30,0 mmol) in dodali nekaj kapljic žveplove(VI) kisline. Reakcijsko zmes smo segrevali 2 h pri 100 °C, jo nato ohladili in dodali 5 mL ledeno mrzle vode. Izpadlo oborino smo filtrirali z odsesavanjem, jo nato raztopili v diklorometanu (100 mL) in jo sprali z destilirano vodo (100 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in odparili topilo pod nižanim tlakom.

2,3-diacetoksibenzojska kislina (**30**)

M_r : 238,20

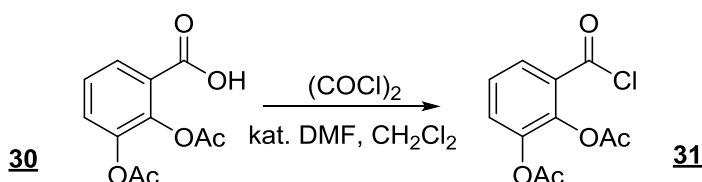
Izgled: bela trdna snov

Izkoristek reakcije: 82,4%

Retencijski faktor: 0,32 (CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2,35 (s, 3 H, OCOCH₃), 2,37 (s, 3 H, OCOCH₃), 7,38 (d, 1 H, J = 7,9 Hz, ArH), 7,46 (dd, 1 H, J_1 = 7,9 Hz, J_2 = 1,7 Hz, ArH), 8,01 (dd, 1 H, J_1 = 7,9 Hz, J_2 = 1,7 Hz, ArH) ppm.

4.5.2 Sinteza 3-(klorokarbonil)-1,2-fenilen diacetata (**31**)

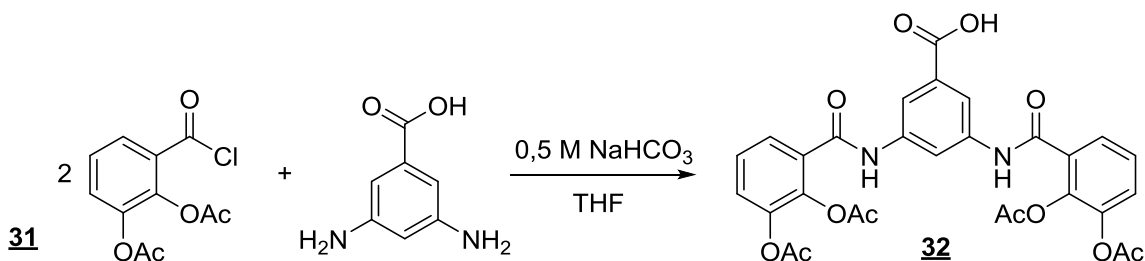


Slika 27. Aktivacija karboksilne funkcionalne skupine spojine **30**.

Sintezni postopek

Spojino **30** (2,380 g, 10,0 mmol) smo raztopili v diklorometanu (50 mL), dodali kapljico *N,N*-dimetilformamida, ohladili na 0 °C na ledeni kopeli in prepihali z argonom. Ohlajeni raztopini smo počasi dokapavali oksalil klorid (1,72 mL, 20,0 mmol). Po 15 min smo odstavili ledeno kopel in nato mešali pri sobni temperaturi še 1 h. Reakcijsko zmes smo nato uparili do suhega in jo takoj uporabili v naslednji stopnji.

4.5.3 Sinteza 3,5-bis(2,3-diacetoksibenzamido)benzojske kisline (**32**)



Slika 28. Sinteza končnega produkta (spojina **32**).

Sintezni postopek

3,5-diaminobenzojsko kislino (0,761 g, 5,0 mmol) smo raztopili v 0,5 M NaHCO₃ (30 mL), ohladili na 0 °C na ledeni kopeli in nato počasi dokapavali spojino **31** (10,0 mmol) raztopljeno v tetrahidrofuranu (50 mL). Reakcijsko zmes smo pri 0 °C mešali še 0,5 h, nato pa z 2 M HCl nakisali do pH 2, odparili THF in preostalo vodno fazo ekstrahirali z etilacetatom (4 x 50 mL). Združene organske faze smo sušili še nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo.

3,5-bis(2,3-diacetoksibenzamido)benzojska kislina (**32**)

M_r: 592,51

Izgled: roza oborina

Izkoristek reakcije: 78,3%

Retencijski faktor: 0,22 (CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2,23 (s, 6 H, 2 x OCOCH₃), 2,32 (s, 6 H, 2 x OCOCH₃), 7,46-7,44 (m, 4 H, ArH), 7,62 (dd, 2 H, *J*₁ = 6,1 Hz, *J*₂ = 3,2 Hz, ArH), 8,08 (d, 2 H, *J* = 2,0 Hz, ArH), 8,34 (t, 1 H, *J* = 1,9 Hz, ArH), 10,70 (s, 2 H, 2 x CONH), 13,05 (s, 1 H, COOH) ppm.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 KOMENTAR K SINTEZNYM POSTOPKOM

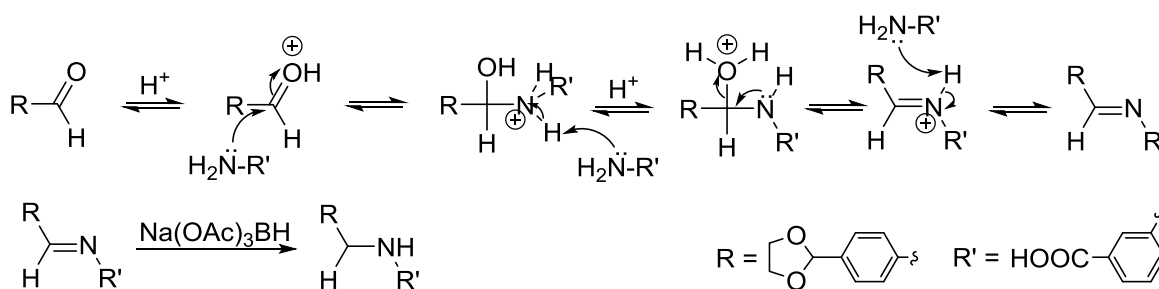
5.1.1 Zaščita aldehydne skupine z 1,3-dioksolanomsko zaščitno skupino

Za zaščito aromatske aldehydne skupine izhodne spojine **5** smo uporabili 1,3-dioksolanomsko zaščitno skupino (slika 11). Uvedli smo jo s pomočjo etilenglikola in katalizatorja *p*-toluensulfonske kisline [51]. Uporabili smo tudi Dean-Starkovo past, s katero smo odvajali vodo, ki je med reakcijo nastajala, saj bi zaradi ravnotežne reakcije lahko voda reagirala s končnim produktom in bi povzročila ponovno nastanek izhodne spojine.

Zaščitno skupino smo kasneje odstranili v vodnem mediju s pomočjo katalizatorja piridinijevega tozilata (slika 13).

5.1.2 Reduktivno aminiranje

Spojini z eno zaščiten aldehydno skupino smo na drugo vezali aromatski amin s pomočjo reakcije reaktivnega aminiranja, pri čemer smo kot reducent uporabili natrijev triacetoksiborhidrid, očetno kislino kot katalizator in tetrahidrofuran (THF) kot topilo (slika 12). V njem najprej raztopimo amin in aldehyd, pri čemer nastane imin, ki ga nato z reducentom reduciramo v sekundarni amin.

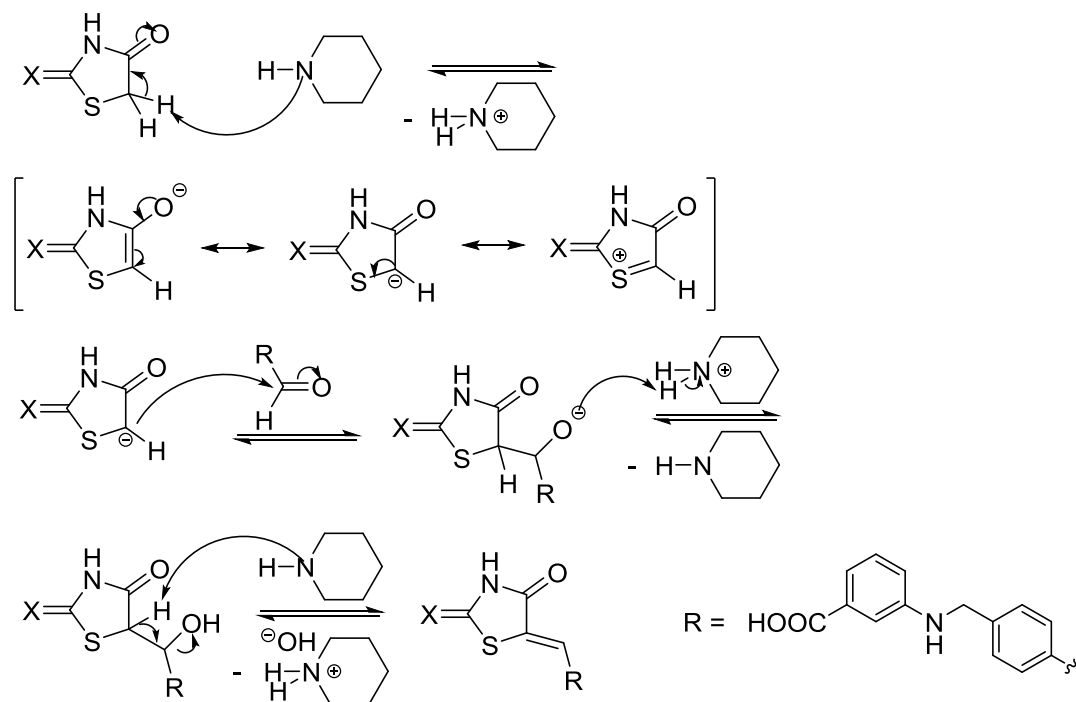


Slika 29. Mehanizem reaktivnega aminiranja.

5.1.3 Knoevenagelova kondenzacija

Vezava tiazolidin-2,4-dionskega ali 2-tioksotiazolidin-4-onskega obroča na spojino **8** je Knoevenagelova kondenzacija (slika 14). To je reakcija aldehyda (tudi ketona) in spojine z aktivirano metilensko skupino, ki se nahaja med dvema elektronprivlačnima skupinama. Zaradi slednjih je kislost dveh H-atomov, vezanih na C-atom, ki je vmes med tema dvema skupinama, povečana. Za potek reakcije potrebujemo tudi bazičen amin (piridin, piperidin,

primarni amini, amonijev acetat) kot katalizator, ki odcepi enega od prej omenjenih H-atomov (slika 30) [52], [53].

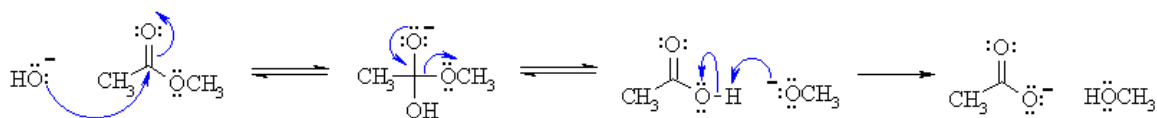


Slika 30. Mehanizem Knoevenagelove kondenzacije.

Reakcijo sinteze spojine **9** smo poskusili izvesti na dva načina. V obeh primerih smo jo izvedli v mikrovalovnem reaktorju. Najprej smo reakcijo izvedli s celotno reakcijsko zmesjo ($T = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 16\text{ bar}$, $P = 30\text{ W}$, $t = 35\text{ min}$), kasneje smo jo izvedli še tako, da smo celotno zmes razdelili na 4 paralelke in delali z vsako posebej pri nekoliko spremenjenih pogojih ($T = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 16\text{ bar}$, $P = 40\text{ W}$, $t = 40\text{ min}$). Izkoristek reakcije je bil v prvem primeru 44,4%, v drugem pa po končani reakciji 64,6%. V prvem primeru smo produkt lahko na koncu odfiltrirali, v drugem pa smo pred filtracijo izvedli še prekrizalzacijo, kar je končni izkoristek reakcije zmanjšalo na 46,5% in sta oba postopka tako primerljiva.

5.1.4 Alkalna hidroliza estrov

Spojine **15**, **16** in **17**, ki jim je bila testirana zaviralna aktivnost na bakterijskih encimih, smo pridobili s pomočjo reakcij alkalne hidrolize estrov ustreznih spojin (slika 17).



Slika 31. Mehanizem alkalne hidrolize estrov (povzeto po [54]).

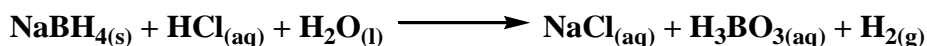
5.1.5 Tvorba estrov na aromatskih hidroksilnih skupinah

3,4-Dihidroksibenzaldehidu smo obe aromatski hidroksilni skupini zaestrili z uporabo acetanhidrida, ki je reaktivnejši pri esterifikacijah kot očetna kislina (slika 18). Reakcijo izvajamo v dietil etru in ob prisotnosti kalijevega karbonata, ki deluje kot baza, ki z odcepom protona iz fenolne OH skupine poveča njeno nukleofilnost ter na ta način omogoča boljši in hitrejši potek reakcije. Končni izkoristek reakcije je tako praktično 100%.

Acetiliranje kateholnih OH-skupin z acetanhidridom smo izvajali tudi pri sintezi spojine **30** (slika 26). Sintezni postopek smo nekoliko spremenili, saj smo izvajali kislinsko katalizirano esterifikacijo. Uporabili smo acetanhidrid, ki je služil kot reagent in topilo, in katalizator žveplovo(VI) kislino, izkazalo pa se je, da je imela ta reakcija nekoliko nižji izkoristek kot sinteza spojine **19**.

5.1.6 Redukcija aldehida

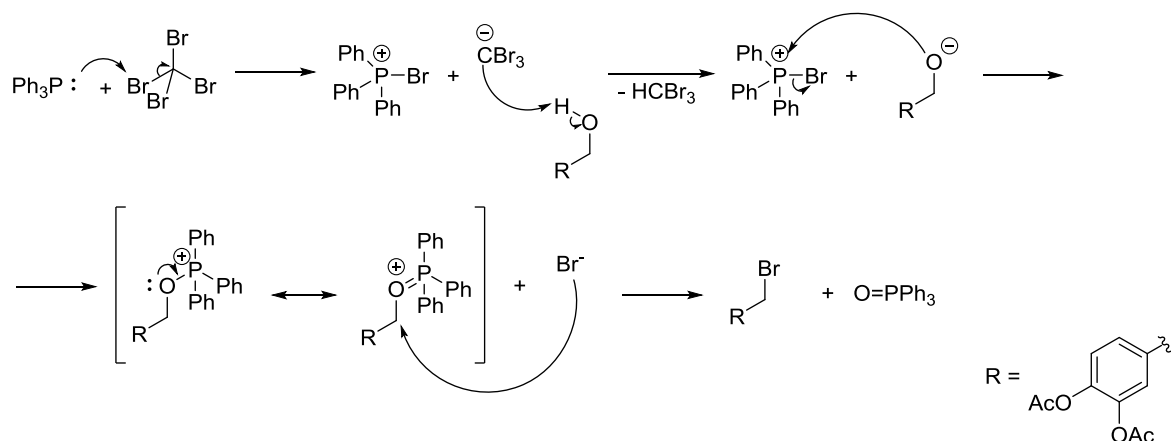
Izvedli smo redukcijo aldehida s pomočjo NaBH_4 , pri čemer smo dobili primarni alkohol (spojina **20**) (slika 19). Reakcijo smo spremljali s TLC in, ko smo ugotovili, da produkt ne nastaja več, smo reakcijo ustavili z dodatkom HCl. Pri tem poteče sledeča reakcija:



Iz reakcijske zmesi izhaja vodik, zaradi česar se je ob dodajanju HCl reakcijska zmes penila, zato je bilo potrebno HCl dokapavati previdno. Ko se je zmes nehala peniti, je bil to znak, da v njej ni bilo več nezreagirane reducenta in smo lahko začeli z ekstrakcijo produkta.

5.1.7 Appelova reakcija bromiranja primarnega alkohola

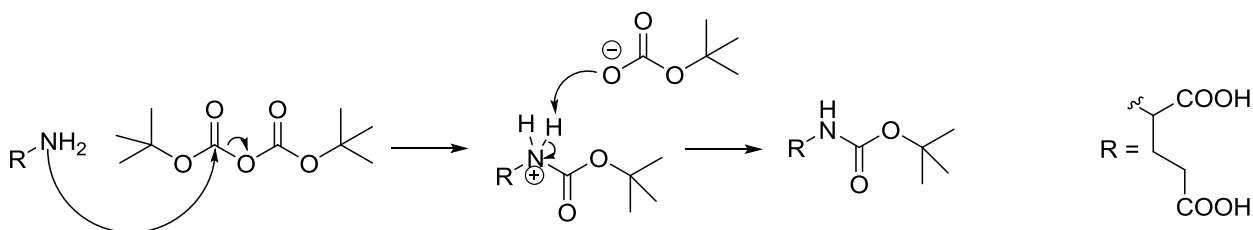
Spojino **21** smo pridobili z bromiranjem primarnega alkohola **20** s pomočjo Appelove reakcije (slika 20). Uporabili smo CBr_4 in PPh_3 kot katalizatorja [55]. Izkoristki teh reakcij so običajno zelo visoki. Tudi v našem primeru je tako, saj je bil izkoristek praktično 100%.



Slika 32. Mehanizem Appelove reakcije (povzeto po [55]).

5.1.8 Zaščita aminske skupine D-Glu z BOC zaščitno skupino

Spojino D-Glu smo najprej morali zaščititi na amski funkcionalni skupini, da ne bi ta kot kompetitivni nukleofil vstopala v naslednjo reakcijo. Za zaščito smo izbrali *tert*-butiloksikarbonilno (BOC)-zaščitno skupino, saj se enostavno veže na amine (slika 21) s pomočjo BOC-anhidrida v bazičnem, odstrani pa se jo enostavno v kislih pogojih s CF_3COOH (slika 23). Reakcija vezave BOC-funkcionalne skupine je nukleofilna substitucija (slika 33).



Slika 33. Mehanizem vezave BOC-zaščitne skupine (povzeto po [56])

5.1.9 Kondenzacija spojine **21** na BOC-D-Glu

Izvedli smo reakcijo kondenzacije dveh molekul spojine **21** na eno molekulo zaščitene D-Glu (slika 22).

Ta reakcija se je izkazala za precej problematično, saj smo jo večkrat neuspešno poskušali izvesti, dokler nismo ugotovili optimalnih pogojev za njen potek. Zagotoviti je bilo potrebno brezvodne pogoje, saj smo le tako lahko zmanjšali možnosti hidrolize acetatnih estrov spojine **21**. Brezvodne pogoje smo zagotovili tako, da smo reakcijsko zmes pred izvedbo reakcije prepihali z argonom in uporabili brezvodno topilo.

Reakcijo smo najprej poskusili izvesti v diklorometanu ob prisotnosti katalizatorja K_2CO_3 in 24-urnem mešanju pri sobni temperaturi, vendar ni potekla. Vzrok je po vsej verjetnosti v preslabi topnosti enega od reagentov v diklorometanu. Posledično smo topilo zamenjali z acetonitrilom, kot katalizator pa smo uporabili Cs_2CO_3 . Po 3-dnevnem mešanju pri sobni temperaturi je reakcija potekla, vendar je bilo produkta zanemarljivo malo, prisotne pa je bilo še veliko izhodne spojine **21**. Zvišali smo temperaturo na $50\text{ }^\circ\text{C}$ in reakcijsko zmes pri tej temperaturi mešali še nadaljnjih 24 ur. Opazili smo, da je reakcijska zmes postala temnejša, kar je bil po vsej verjetnosti znak hidrolize acetatnih estrov spojine **21** in posledične oksidacije fenolnih OH skupin.

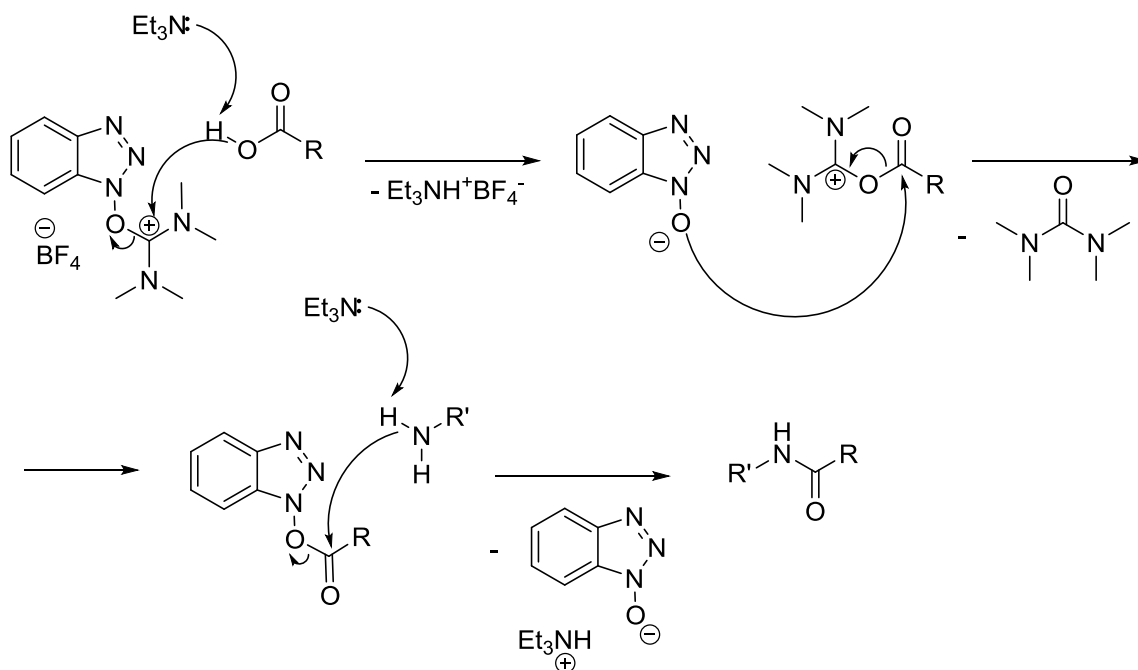
Reakcijo smo nato poskusili izvesti v brezvodnem DMF in 6-urnem mešanju pri $40\text{ }^\circ\text{C}$. Reakcija je potekla s 17,6% izkoristkom, potrebno pa je bilo tudi čiščenje produkta s pomočjo kolonske kromatografije. Kasneje se je izkazalo, da je v roku 6-urnega mešanja pri tej temperaturi veliko acetatnega estra hidroliziralo, kar je razlog za tako nizek izkoristek reakcije. Ko smo čas mešanja skrajšali na 1 uro, se je izkoristek reakcije zvišal skoraj 2-krat (32,7%). Glede na opisane ugotovitve smo se odločili poskusiti izvesti reakcijo tako, da smo podaljšali čas mešanja na 5 ur, temperaturo mešanja pa smo znižali nazaj na sobno, kar se je izkazalo za zelo dobro potezo, saj smo s tem uspeli izkoristek reakcije povečati na 79,0%, poleg tega nam ni bilo potrebno izvajati kolonske kromatografije za izolacijo produkta iz reakcijske zmesi.

5.1.10 Sklopitvena reakcija karboksilne kisline in amina ter posledična tvorba amidne vezi

Izvedli smo vezavo diestra D-Glu na karboksilno funkcionalno skupino in pridobili spojini **11** in **12** (slika 15). Postopek izvedbe reakcije je bil za sintezo obeh spojin enak. Izhodno karboksilno kislino smo najprej raztopili v diklorometanu, dodali bazo trietilamin in sklopitveni reagent (TBTU), nato je bilo potrebno reakcijsko zmes nekaj časa mešati pri sobni temperaturi, da je potekla aktivacija izhodne karboksilne kisline. Šele nato smo dodali amin ob ponovnem dodatku trietilamina.

Enak postopek smo uporabili tudi pri sintezi konjugata siderofor-zaviralec (spojina **26**) (slika 24), vendar sinteza te spojine ni potekla, kar je bilo razvidno tudi iz NMR spektra. Razlog bi lahko bil v strukturi izhodnih spojin. Spojina **24** je amin, ki vstopa v sklopitveno reakcijo sinteze konjugata **26**. Njena struktura obsega dve daljši verigi z aromatskimi hidroksilnimi skupinami, ki so še naprej zaesterene z acetati. Taka struktura lahko

predstavlja precejšnjo sterično oviro za potek sklopitvene reakcije. Tako sintezi spojin **11** in **12**, kot tudi sinteza spojine **26** potekajo ob prisotnosti trietilamina, ki ustvari šibko bazične pogoje v reakcijski zmesi, zaradi česar lahko v večji meri pride do hidrolize acetatnih estrov (oz. metilnih estrov v primeru sintez spojin **11** in **12**), kar lahko posledično zniža izkoristke teh sklopitvenih reakcij.



Slika 34. Mehanizem sklopitvene reakcije med karboksilno kislino in aminom s pomočjo sklopitvenega reagenta TBTU ob prisotnosti baze (povzeto po [57]).

5.1.11 Neuspela dvostopenjska sinteza konjugata siderofor-učinkovina

Poskusili smo pripraviti še en konjugat med mimetikom siderofora in spojino **24**, vendar je bila 2. stopnja sinteze izvedena neuspešno.

1. stopnja je bila reduktivno aminiranje (mehanizem – slika 29) z uporabo NaCNBH₃ kot reducenta in oetne kisline kot katalizatorja. Reakcija je potekla, saj smo izolirali produkt (spojina **28**), kar je bilo razvidno iz kromatograma. Izkoristek reakcije je bil 50,2%.

2. stopnja sinteze je bila tvorba amidne vezi s sklopitveno reakcijo med karboksilno kislino (spojina **28**) in aminom (spojina **24**) (mehanizem – slika 34) ob dodatku baze trietilamina in sklopitvenega reagenta (TBTU). Iz kromatograma, s pomočjo katerega smo spremljali potek reakcije, je bilo razvidno, da smo po koncu reakcije dobili večkomponentno zmes, kjer sta bili obe izhodni spojini, nekaj domnevnega produkta in produkti stranskih reakcij (hidroliza estrov spojin **24** in **29**). Poskušali smo ekstrahirati produkt (postopek – poglavje

4.4) in ga izolirati s pomočjo čiščenja s "flash" kolonsko kromatografijo, kar se je izkazalo za neuspešno, saj se reakcijska zmes na koloni ni ločila na posamezne komponente in s pomočjo NMR spektroskopije nismo uspeli potrditi strukture zelenega produkta.

Morebitna vzroka za neuspešno izvedbo reakcije gre iskati v strukturi reagentov 2. stopnje sinteze (predvsem spojina **24**) in dejstvu, da reakcija poteka pri bazičnih pogojih. Kot je že bilo omenjeno (nizek izkoristek sklopitvene reakcije sinteze spojine **26**) predstavljata oba strukturna elementa, s katerima je D-Glu v tej spojini zaestrena precejšnje sterično oviro, kar je kot kaže precej otežilo vezavo amina na sklopitveni reagent in nato na karboksilno kislino. Poleg tega reakcija poteka ob prisotnosti trietilamina, ki ustvarja šibko bazične pogoje, pri katerih lahko v precej večji meri pride do hidrolize acetatnih estrov.

5.1.12 Sinteza spojine **32**

Sinteza spojine **32** je potekala tako, da smo najprej izhodno karboksilno kislino (spojino **30**) aktivirali – pripravili smo kislinski klorid. Pri tem smo uporabili oksalil klorid. Reakcijska zmes je med reakcijo morala biti v argonovi atmosferi, saj smo za potek reakcije morali zagotoviti brezvodne pogoje. Produkt reakcije smo takoj morali uporabiti v reakciji sinteze spojine **32**, saj je precej nestabilen in bi se pod vplivom zračne vlage lahko pretvoril nazaj v karboksilno kislino.

Spojino **32** smo pripravili tako, da smo na vsako aaminsko skupino 3,5-diaminobenzojske kisline vezali po eno spojino **31**. Pri tem je nastajala HCl, ki smo jo nevtralizirali z NaHCO₃, ker bi nam lahko v nasprotnem primeru protonirala aminske funkcionalne skupine, ki bi tako postale premalo nukleofilne za potek reakcije. Ker je reakcija nevtralizacije HCl z NaHCO₃ eksotermna, moramo reakcijsko zmes hladiti.

5.2 REZULTATI BIOKEMIJSKEGA IN MIKROBIOLOŠKEGA VREDNOTENJA SPOJIN

5.2.1 Rezultati merjenja inhibitorne aktivnosti spojin na encimu MurD

Inhibitorne aktivnosti končnih spojin **15**, **16** in **17** so bile testirane na encimu MurD iz *E. coli* (preglednica V). Kot najmočnejši zaviralec MurD se je izkazala **17** z vrednostjo IC₅₀ = 2,9 μM. Za zelo dobra zaviralca encima MurD sta se izkazali tudi drugi dve spojini s sicer nekoliko višjima vrednostma IC₅₀. Za primerjavo je v preglednico vnesena spojina **33**, ki je znan dvojni inhibitor encimov MurD in MurE iz *E. coli* in *S. aureus* [31].

Preglednica V. Rezultati testiranja inhibitorne aktivnosti spojin **15**, **16** in **17** na encimu MurD iz *E. coli*.

Oznaka	Struktura	IC ₅₀ (μM)
15		36 ± 5
16		25 ± 2.5
17		2.9 ± 0.3
33		8.2 ± 0.6

5.2.2 Rezultati določanja inhibitorne aktivnosti spojine **15** na encimu MurE

Iz rezultatov merjenja vrednosti IC₅₀ spojine **15** (preglednica VI) je razvidno, da je ta spojina zaviralec encima MurD (močnejši pri *E. coli* in šibkejši pri *S. aureus*), ne pa tudi encima MurE. Določena je bila tudi rezidualna aktivnost encima MurE iz (*E. coli*) ob dodatku 200 μM spojine **15**, ki je znašala 51 ± 2%, kar nakazuje, da nekaj inhibitorne aktivnosti spojine na tem encimu obstaja, medtem ko omembe vredne inhibitorne aktivnosti te spojine na ligazi MurE iz *S. aureus* ni bilo.

Preglednica VI. Rezultati merjenja inhibitorne aktivnosti spojine **15** na encimih MurD in MurE iz *E. coli* in *S. aureus*. Za primerjavo so v tabelo vneseni rezultati merjenja inhibitorne aktivnosti spojine **33**, ki je znan dvojni inhibitor obeh encimov [31].

Encim	IC ₅₀ (μM)	
	33	15
MurD ligaza (<i>E. coli</i>)	8.2 ± 0.6	36 ± 5
MurD ligaza (<i>S. aureus</i>)	6.4 ± 1.0	100 ± 5
MurE ligaza (<i>E. coli</i>)	180 ± 60	~ 200
MurE ligaza (<i>S. aureus</i>)	17 ± 1.5	> 200

5.2.3 Rezultati določanja protibakterijskega delovanja spojin **15**, **16** in **17**

Rezultati določanja MIC in baktericidnosti treh spojin, ki smo jih med eksperimentalnim delom pripravili (preglednica VII), kažejo, da nobena od teh treh spojin nima protibakterijskega delovanja proti testiranim G+ in G- bakterijam.

Preglednica VII. Rezultati določanja protibakterijske aktivnosti spojin **15**, **16** in **17** proti dvem G+ (*S. aureus* in *P. aeruginosa*) in dvem G- (*E. faecalis* in *E. coli*) bakterijam.

Oznaka	Sev	MIC (μg/mL)	Baktericidnost (μg/mL)
15	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	> 128	> 128
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 128	> 128
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	> 128	> 128
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	> 128	> 128
16	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	> 128	> 128
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 128	> 128
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	> 128	> 128
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	> 128	> 128
17	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	> 128	> 128
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 128	> 128
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	> 128	> 128
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	> 128	> 128

6. SKLEP

V okviru diplomske naloge smo pripravili 3 končne spojine, ki ustrezajo strukturnim zahtevam za zaviralce ligaze MurD (poglavje 1.2.3.2), in jim dokazali inhibitorno aktivnost na ligazi MurD iz *E. coli*. Spojina z najmočnejšim inhibitornim delovanjem na tem encimu je **17** z vrednostjo $IC_{50} = 2,9 \mu\text{M} \pm 0,3 \mu\text{M}$. S pomočjo rezultatov, ki jih prikazuje preglednica V, lahko za tip spojin, predstavnike katerih smo tekom te naloge pripravili, dopolnimo strukturne zahteve za zaviralce ligaze MurD, navedene v poglavju 1.2.3.2. Kot vse kaže, zamenjava tiazolidin-2,4-dionskega obroča z 2-tioksotiazolidin-4-onskim (rodaninskim) zniža vrednosti IC_{50} (primerjava spojin **15** in **33**). Na inhibitorno aktivnost teh spojin vpliva tudi vezava različnih verig na sekundarni amin. Tvorba amida z oksalno kislino na sekundarnem aminu je 2,8-krat povečala inhibitorno aktivnost spojine (primerjava **17** in **33**).

Spojina **15** se ni izkazala kot zaviralec ligaze MurE, saj ne zavira encima MurE iz *S. aureus*, inhibitorna aktivnost te spojine na ligazi MurE iz *E. coli* pa je bila zelo šibka. Pri nadaljnjih raziskavah bi lahko poskušali na obeh encimih testirati še preostale spojine, vendar se zaradi strukturnih podobnosti med njimi in testirano spojino **15** omembe vredna inhibitorna aktivnost ne pričakuje.

Rezultati testiranja spojin na protibakterijsko aktivnost so pokazali, da so spojine **15**, **16** in **17** neaktivne proti izbranim sevom G+ in G- bakterij. Kot je že bilo omenjeno, je po vsej verjetnosti razlog v nezmožnosti prehajanja teh spojin skozi bakterijsko celično steno do citoplazme, kjer je njihovo mesto delovanja.

Pripravili smo spojino **24**, ki je mimetik strukture bakterijskih sideroforov. Kot je že bilo omenjeno v poglavju 2. Namen dela, smo načrtovali pripravo konjugata med našimi zaviralci ligaze MurD in našimi mimetiki bakterijskih sideroforov, da bi tako izboljšali protibakterijsko aktivnost zaviralcev bakterijskih encimov. Na žalost nam to ni uspelo, zato smo prvoten namen dela preusmerili v preskušanje pripravljenega mimetika sideroforov (spojina **24**) na že znanem zaviralcu ligaze MurD (spojina **25**). Poskusili smo torej pripraviti konjugat med spojinama **24** in **25** (sinteza spojine **26**, poglavje 4.3), na žalost pa ga nismo mogli izolirati in testirati, ker se je izkazal za zelo nestabilnega, saj je

predvidoma že zelo kmalu potekla hidroliza acetatnih estrov na kateholnih hidroksilnih skupinah.

Sintetizirati nam je uspelo tudi spojino **32**, ki je prav tako prekurzor siderofora kateholnega tipa in je bil uspešno konjugiran z zaviralci DNA giraze, ne pa tudi z zaviralci ligaz Mur. Nastali konjugat je imel tudi protibakterijsko delovanje na *E. coli* [58].

V nadaljnjih raziskavah bi se lahko osredotočili na pripravo analogov spojine **24**, s katerimi bi lahko pripravili stabilnejše konjugate z encimskimi zaviralci (zamenjava acetatnih skupin z drugimi strukturnimi elementi), in njihovo vezavo na spojino **17**, za katero smo dokazali inhibitorno aktivnost na encimu MurD, ne pa tudi protibakterijskega delovanja. Prav tako bi lahko nadaljevali raziskave s spojino **32**, ki se je izkazala za učinkovito v konjugatih z zaviralci DNA giraze. Lahko bi jo poskušali konjugirati z zaviralci ligaz Mur, pa tudi z drugimi zaviralci bakterijskih encimov, kar bi lahko vodilo v nove konjugate s potencialnim protibakterijskim učinkom.

7. LITERATURA

- [1] T. A. Wencewicz, U. Möllmann, T. E. Long, and M. J. Miller, “Is drug release necessary for antimicrobial activity of siderophore-drug conjugates? Syntheses and biological studies of the naturally occurring salmycin ‘Trojan Horse’ antibiotics and synthetic desferridanoxamine-antibiotic conjugates,” *Biometals*, vol. 22, no. 4, pp. 633–648, 2009.
- [2] U. Möllmann, L. Heinisch, A. Bauernfeind, T. Köhler, and D. Ankel-Fuchs, “Siderophores as drug delivery agents: application of the ‘Trojan Horse’ strategy,” *Biometals*, vol. 22, pp. 615–624, 2009.
- [3] M. J. Miller, H. Zhu, Y. Xu, C. Wu, A. J. Walz, A. Vergne, J. M. Roosenberg, G. Moraski, A. A. Minnick, J. McKee-Dolence, J. Hu, K. Fennell, E. K. Dolence, L. Dong, S. Franzblau, F. Malouin, and U. Möllmann, “Utilization of microbial iron assimilation processes for the development of new antibiotics and inspiration for the design of new anticancer agents,” *Biometals*, vol. 22, pp. 61–75, 2009.
- [4] E. D. Weinberg, “Iron availability and infection,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1790, no. 7, pp. 600–605, 2009.
- [5] H. Naikare, J. Butcher, A. Flint, J. Xu, K. N. Raymond, and A. Stintzi, “Campylobacter jejuni ferric-enterobactin receptor CfrA is TonB3 dependent and mediates iron acquisition from structurally different catechol siderophores,” *Metallomics*, pp. 988–996, 2013.
- [6] K. N. Raymond, E. A. Dertz, and S. S. Kim, “Enterobactin: An archetype for microbial iron transport,” *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, vol. 100, pp. 3584–3588, 2003.
- [7] V. Braun, “Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria,” *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 79, pp. 67–79, 2001.
- [8] K. D. Krewulak and H. J. Vogel, “Structural biology of bacterial iron uptake,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1778, pp. 1781–1804, 2008.
- [9] M. Miethke and M. A. Marahiel, “Siderophore-Based Iron Acquisition and

- Pathogen Control,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 71, pp. 413–451, 2007.
- [10] A. Ghosh, M. Ghosh, C. Niu, F. Malouin, U. Moellmann, and M. J. Miller, “Iron transport-mediated drug delivery using mixed-ligand siderophore- β -lactam conjugates,” *Chem. Biol.*, vol. 3, pp. 1011–1019, 1996.
- [11] A. Gorska, A. Sloderbach, and M. P. Marszałł, “Siderophore – drug complexes: potential medicinal applications of the ‘Trojan horse’ strategy,” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 35, no. 9, pp. 442–449, 2014.
- [12] M. G. P. Page, “Siderophore conjugates,” *Antimicrob. Ther. Rev.*, vol. 1277, pp. 115–126, 2013.
- [13] C. Ji, P. A. Miller, and M. J. Miller, “Iron Transport-Mediated Drug Delivery: Practical Syntheses and In Vitro Antibacterial Studies of Tris-Catecholate Siderophore– Aminopenicillin Conjugates Reveals Selectively Potent Antipseudomonal Activity,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, pp. 9898–9901, 2012.
- [14] G. Schumann and U. Möllmann, “Screening System for Xenosiderophores as Potential Drug Delivery Agents in Mycobacteria,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, no. 5, pp. 1317–1322, 2001.
- [15] V. Braun, A. Pramanik, T. Gwinner, M. Köberle, and E. Bohn, “Sideromycins: tools and antibiotics,” *Biometals*, vol. 22, pp. 3–13, 2009.
- [16] A. M. Zawadzka, R. J. Abergel, R. Nichiporuk, U. N. Andersen, and K. N. Raymond, “Siderophore-Mediated Iron Acquisition Systems in *Bacillus cereus*: Identification of Receptors for Anthrax Virulence-Associated Petrobactin,” *Biochemistry*, vol. 48, pp. 3645–3657, 2009.
- [17] T. Zheng and E. M. Nolan, “Enterobactin-Mediated Delivery of β -Lactam Antibiotics Enhances Antibacterial Activity against Pathogenic *Escherichia coli*,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, pp. 9677–9691, 2014.
- [18] A. P. Tomaras, J. L. Crandon, C. J. McPherson, and D. P. Nicolau, “Potentiation of Antibacterial Activity of the MB-1 Siderophore-Monobactam Conjugate Using an Efflux Pump Inhibitor,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, no. 4, pp. 2439–2442, 2015.

- [19] H. S. Kim, W. Y. Song, and H. J. Kim, "Development of a novel fluorescence probe capable of assessing the cytoplasmic entry of siderophore-based conjugates," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 13, pp. 73–76, 2015.
- [20] W. Li, T. Cui, L. Hu, Z. Wang, Z. Li, and Z. He, "Cyclic diguanylate monophosphate directly binds to human siderocalin and inhibits its antibacterial activity," *Nat. Commun.*, vol. 6, pp. 1–9, 2015.
- [21] T. A. Wencewicz and M. J. Miller, "Biscatecholate–Monohydroxamate Mixed Ligand Siderophore– Carbacephalosporin Conjugates are Selective Sideromycin Antibiotics that Target *Acinetobacter baumannii*," *J. Med. Chem.*, vol. 56, pp. 4044–4052, 2013.
- [22] A. Brochu, N. Brochu, T. I. Nicas, T. R. Parr, A. A. Minnick, E. K. Dolence, J. A. McKee, M. J. Miller, M. C. Lavoie, and F. Malouin, "Modes of Action and Inhibitory Activities of New Siderophore- β -Lactam Conjugates That Use Specific Iron Uptake Pathways for Entry into Bacteria," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 36, no. 10, pp. 2166–2175, 1992.
- [23] L. Heinisch, S. Wittmann, T. Stoiber, A. Berg, D. Ankel-Fuchs, and U. Möllmann, "Highly Antibacterial Active Aminoacyl Penicillin Conjugates with Acylated Bis-Catecholate Siderophores Based on Secondary Diamino Acids and Related Compounds," *J. Med. Chem.*, vol. 45, pp. 3032–3040, 2002.
- [24] S. Wittmann, M. Schnabelrauch, I. Scherlitz-Hofmann, U. Möllmann, D. Ankel-Fuchs, and L. Heinisch, "New Synthetic Siderophores and Their β -Lactam Conjugates Based on Diamino Acids and Dipeptides," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 10, pp. 1659–1670, 2002.
- [25] <http://finance.yahoo.com/news/extensive-data-presented-basileas-anti-051701965.html>. [Dostopano: 02.01.2016].
- [26] <http://www.marketwired.com/press-release/basilea-awarded-contract-barda-up-usd-89-million-development-its-novel-antibiotic-bal30072-pinksheets-bpmuf-1805200.htm>. [Dostopano: 02.01.2016].
- [27] J. M. Roosenberg and M. J. Miller, "Total Synthesis of the Siderophore

- Danoxamine,” *J. Org. Chem.*, vol. 65, no. 16, pp. 4833–4838, 2000.
- [28] F. Rivault, C. Liebert, A. Burger, F. Hoegy, M. A. Abdallah, I. J. Schalk, and G. L. A. Mislin, “Synthesis of pyochelin-norfloxacin conjugates,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 17, pp. 640–644, 2007.
- [29] Y. Lu and M. J. Miller, “Syntheses and Studies of Multiwarhead Siderophore-5-fluorouridine Conjugates,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 7, pp. 3025–3038, 1999.
- [30] T. Tomašić, N. Zidar, R. Šink, A. Kovač, D. Blanot, C. Contreras-Martel, A. Dessen, M. Müller-Premru, A. Zega, S. Gobec, D. Kikelj, and L. Peterlin Mašič, “Structure-Based Design of a New Series of D-Glutamic Acid Based Inhibitors of Bacterial UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine:D-glutamate Ligase (MurD),” *J. Med. Chem.*, vol. 54, pp. 4600–4610, 2011.
- [31] T. Tomašić, R. Šink, N. Zidar, A. Fic, C. Contreras-Martel, A. Dessen, D. Patin, D. Blanot, M. Müller-Premru, S. Gobec, A. Zega, D. Kikelj, and L. Peterlin Mašič, “Dual Inhibitor of MurD and MurE Ligases from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*,” *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 3, pp. 626–630, 2012.
- [32] A. Perdih, M. Hrast, K. Pureber, H. Barreteau, S. Golič Grdadolnik, D. Kocjan, S. Gobec, T. Solmajer, and G. Wolber, “Furan-based benzene mono- and dicarboxylic acid derivatives as multiple inhibitors of the bacterial Mur ligases (MurC – MurF): experimental and computational characterization,” *J Comput Aided Mol Des*, vol. 29, pp. 541–560, 2015.
- [33] A. Perdih, M. Hrast, H. Barreteau, S. Gobec, G. Wolber, and T. Solmajer, “Inhibitor Design Strategy Based on an Enzyme Structural Flexibility: A Case of Bacterial MurD Ligase,” *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 54, pp. 1451–1466, 2014.
- [34] T. J. Beveridge, “Use of the Gram stain in microbiology,” *Biotech Histochem*, vol. 76, pp. 111–118, 2001.
- [35] T. D. H. Bugg, D. Braddick, C. G. Dowson, and D. I. Roper, “Bacterial cell wall assembly: still an attractive antibacterial target,” *Trends Biotechnol.*, vol. 29, no. 4, pp. 167–173, 2011.
- [36] H. Barreteau, A. Kovač, A. Boniface, M. Sova, S. Gobec, and D. Blanot,

- “Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis,” *FEMS Microbiol Rev*, vol. 32, pp. 168–207, 2008.
- [37] T. Tomašić, R. Šink, N. Zidar, A. Fic, and C. Contreras-Martel, “Dual Inhibitor of MurD and MurE Ligases from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*,” pp. 1–15.
- [38] J. A. Bertrand, G. Auger, L. Martin, E. Fanchon, D. Blanot, D. Le Beller, J. van Heijenoort, and O. Dideberg, “Determination of the MurD Mechanism Through Crystallographic Analysis of Enzyme Complexes,” *J. Mol. Biol.*, vol. 289, pp. 579–590, 1999.
- [39] A. Arvind, V. Kumar, P. Saravanan, and C. G. Mohan, “Homology Modeling, Molecular Dynamics and Inhibitor Binding Study on MurD Ligase of *Mycobacterium Tuberculosis*,” *Interdiscip Sci Comput Life Sci*, vol. 4, pp. 223–238, 2012.
- [40] I. Kouidmi, R. C. Levesque, and C. Paradis-Bleau, “The biology of Mur ligases as an antibacterial target,” *Mol. Microbiol.*, vol. 94, pp. 242–253, 2014.
- [41] A. Bouhss, D. Mengin-Lecreulx, D. Blanot, J. van Heijenoort, and C. Parquet, “Invariant amino acids in the Mur peptide synthetases of bacterial peptidoglycan synthesis and their modification by site-directed mutagenesis in the UDP-MurNAc:L-alanine ligase from *Escherichia coli*,” *Biochemistry*, vol. 36 (39), pp. 11556–11563, 1997.
- [42] M. Simčič, K. Pureber, K. Kristan, U. Urleb, D. Kocjan, and S. Golič Grdadolnik, “A novel 2-oxoindolinylidene inhibitor of bacterial MurD ligase: Enzyme kinetics, protein-inhibitor binding by NMR and a molecular dynamics study,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 83, pp. 92–101, 2014.
- [43] V. Humnabadkar, K. R. Prabhakar, A. Narayan, S. Sharma, S. Guptha, P. Manjrekar, M. Chinnapattu, V. Ramachandran, S. P. Hameed, S. Ravishankar, and M. Chatterji, “UDP-N-Acetylmuramic Acid L-Alanine Ligase (MurC) Inhibition in a tolC Mutant *Escherichia coli* Strain Leads to Cell Death,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, pp. 6165–6171, 2014.

- [44] F. Pratviel-Sosa, F. Acher, F. Trigalo, D. Blanot, R. Azerad, and J. van Heijenoort, "Effect of various analogues of D-glutamic acid on the D-glutamate-adding enzyme from *Escherichia coli*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 115, no. 2–3, pp. 223–228, 1994.
- [45] T. Tomašić, N. Zidar, R. Šink, D. Blanot, and C. Contreras, "Structure-Based Design of a New Series of D-Glutamic Acid-Based Inhibitors of Bacterial UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine : D-glutamate Ligase (MurD)," pp. 1–34.
- [46] J. D. Guzman, A. Gupta, D. Evangelopoulos, C. Basavannacharya, L. C. Pabon, E. A. Plazas, D. R. Muñoz, W. A. Delgado, L. E. Cuca, W. Ribon, S. Gibbons, and S. Bhakta, "Anti-tubercular screening of natural products from Colombian plants: 3-methoxynordomesticine, an inhibitor of MurE ligase of *Mycobacterium tuberculosis*," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 65, pp. 2101–2107, 2010.
- [47] S. Turk, M. Hrast, I. Sosič, H. Barreteau, D. Mengin-Lecreulx, D. Blanot, and S. Gobec, "Biochemical Characterization of MurF from *Streptococcus pneumoniae* and the Identification of a New MurF Inhibitor Through Ligand-based Virtual Screening," *Acta Chim. Slov.*, vol. 60, no. 2, pp. 294–299, 2013.
- [48] E. Z. Baum, S. M. Crespo-Carbone, B. D. Foleno, L. D. Simon, J. Guillemont, M. Macielag, and K. Bush, "MurF Inhibitors with Antibacterial Activity: Effect on Muropeptide Levels," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 8, pp. 3240–3247, 2009.
- [49] C. Paradis-Bleau, A. Lloyd, F. Sanschagrín, T. Clarke, A. Blewett, T. D. Bugg, and R. C. Levesque, "Phage display-derived inhibitor of the essential cell wall biosynthesis enzyme MurF," *BMC Biochem.*, vol. 9, 2008.
- [50] E. Z. Baum, S. M. Crespo-Carbone, A. Klinger, B. D. Foleno, I. Turchi, M. Macielag, and K. Bush, "A MurF Inhibitor That Disrupts Cell Wall Biosynthesis in *Escherichia coli*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 51, no. 12, pp. 4420–4426, 2007.
- [51] <http://www.organic-chemistry.org/protectivegroups/carbonyl/dioxanes-dioxolanes.htm>. [Dostopano: 07.01.2016].

- [52] M. Tišler, *Organska kemija*. DZS, 1988.
- [53] <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/knoevenagel-condensation.shtm>. [Dostopano: 07.01.2016].
- [54] <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/350/Carey5th/Ch20/ch20-3-3-1.html>. [Dostopano: 07.01.2016].
- [55] <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/appel-reaction.shtm>. [Dostopano: 08.01.2016].
- [56] http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_Mech.htm. [Dostopano: 10.01.2016].
- [57] http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Amine_to_Amide_Coupling/Amine_to_Amide_Coupling_HATU_Mech.htm. [Dostopano: 10.01.2016].
- [58] S. Kolenko, "Sinteza novih 4,5-dibromopirrolamidnih zaviralcev DNA giraze B in njihovih konjugatov s siderofori." Magistrsko delo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2016.