

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NASTJA MARINČIČ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NASTJA MARINČIČ

SINTEZA SIDEROFOROV IN KONJUGATOV SIDEROFOR-ZAVIRALEC DNA-GIRAZE B

**SYNTHESIS OF SIDEROPHORES AND SIDEROPHORE-DNA GYRASE B
INHIBITOR CONJUGATES**

Ljubljana, 2015

Magistrsko naložko sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze 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.

Zahvala

Zahvaljujem se doc. dr. Tihomirju Tomašiču, za vso potrpežljivost in predano znanje, tako pri laboratorijskem delu, kot pri pisanju te magistrske naloge.

Zahvala gre tudi mojim staršem in zaročencu Igorju, ki so me ves čas mojega študija podpirali in spodbujali.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

Nastja Marinčič

Ljubljana, 2015

VSEBINA

POVZETEK	v
ABSTRACT	vii
SEZNAM OKRAJŠAV	ix
1. UVOD	1
1.1 BAKTERIJSKI SIDEROFORI	3
1.1.1 Privzem železa v bakterijske celice	3
1.1.2 Možnosti uporabe sideroforov	5
1.2 DNA-GIRAZA	6
1.2.1 Struktura DNA-giraze	7
1.2.2 Zaviralci DNA-giraze	8
1.3 KONJUGATI SIDEROFOR–PROTIBAKTERIJSKA UČINKOVINA	11
1.3.1 Struktura konjugatov	12
1.3.2 Konjugati v naravi	12
1.3.3 Učinkovitost konjugatov na tarčnem mestu	13
2. NAČRT DELA	15
2.1 SINTEZA ZAVIRALCEV DNA-GIRAZE B	15
2.2 SINTEZA SIDEROFOROV IZ KOJIČNE KISLINE	16
2.3 SINTEZA KONJUGATOV SIDEROFOR – ZAVIRALEC DNA-GIRAZE B	17
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIALI	18
3.1.1 Reagenti in topila	18
3.2 METODE	18
3.2.1 Kromatografske metode	18
3.2.2 Spektroskopske metode	19
3.2.3 Nomenklatura in risanje spojin	19
3.2.4 Določanje tališča	19
4. EKSPERIMENTALNI DEL	20
4.1 POSTOPEK SINTEZE IZHODNE KISLINE (3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilne kisline)	20
4.1.1 Sinteza 2-metil-1 <i>H</i> -pirola	20

4.1.2 Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-il)etan-1-ona	21
4.1.3 Sinteza etil 5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilata	22
4.1.4 Sinteza etil 3,4-dikloro-5-(klorometil)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilata	23
4.1.5 Sinteza etil 3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilata	23
4.1.6 Sinteza 3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilne kisline	24
4.2 POSTOPEK SINTEZE ZAVIRALCEV DNA GIRAZE B	25
4.2.1 Splošni sintezni postopek 1	25
4.2.2 Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida.....	26
4.2.3 Sintezaterc-butil (<i>S</i>)-(2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)karbamata	27
4.2.4 Sinteza (<i>S</i>)-2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetan-1-aminijevega klorida(Zaviralec 1).....	28
4.2.5 Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-(2-acetamidoacetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida (Zaviralec 2)	29
4.3 SINTEZA SIDEROFOROV IZ KOJIČNE KISLINE.....	30
4.3.1 Sinteza 5-(benziloksi)-2-(hidroksimetil)-4 <i>H</i> -piran-4-ona	30
4.3.2 Splošni sintezni postopek 2	31
4.3.3 Sinteza 5-(benziloksi)-4-okso-4 <i>H</i> -piran-2-karboksilne kisline (Siderofor 1)	32
4.3.4 Sinteza 5-(benziloksi)-1-hidroksi-2-(hidroksimetil)piridin-4(1 <i>H</i>)-ona.....	33
4.3.5 Sinteza 1,5-bis(benziloksi)-2-(hidroksimetil)piridin-4(1 <i>H</i>)-ona	34
4.3.6 Poskus sinteze 1,5-bis(benziloksi)-4-okso-1,4-dihidropiridin-2-karboksilne kisline (Siderofor 2).....	35
4.4 SINTEZA KONJUGATOV	35
4.4.1 Poskus sinteze (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-(5-(benziloksi)-4-okso-4 <i>H</i> -piran-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-3,4-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida (Konjugat 1).....	37
4.4.2 Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-(2-(5-(benziloksi)-4-okso-4 <i>H</i> -piran-2-karboksamido)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida	38

4.4.3 Poskus sinteze (<i>S</i>)-3,4-dikloro- <i>N</i> -(2-(2-(5-hidroksi-4-okso-4 <i>H</i> -piran-2-karboksamido)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida (Konjugat 2)	39
4.4.4 Splošni sintezni postopek 1a.....	39
4.4.5 Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-((<i>S</i>)-6-(3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)-2-(2-hidroksifenil)-4,5-dihidrotiazol-5-karboksamida(Konjugat 4)	40
4.4.6 Sinteza (<i>S</i>)- <i>N,N'</i> -(5-((2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)karbamoil)-1,3-fenilen)bis(2,3-dihidroksibenzamida) (Konjugat 5)	41
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	43
5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV	43
5.1.1 Sinteza izhodne kisline	43
5.1.2 Sinteza zaviralcev DNA-giraze B.....	45
5.1.3 Sinteza sideroforov iz kojične kisline.....	46
5.1.4 Sinteza konjugatov	47
6. SKLEP	49
7. LITERATURA	50

POVZETEK

Pojav bakterijskih sevov, odpornih proti več protibakterijskim učinkovinam, predstavlja vedno večji problem, saj nam začenja primanjkovati učinkovin proti takim mikroorganizmom. Potreba po novih učinkovinah, ki bi zmanjšale možnost razvoja odpornosti in hkrati premostile že obstoječe mehanizme odpornosti, je tako zelo velika.

Železo je esencialen element za vse žive organizme, saj sodeluje v različnih procesih v celicah, je pa tudi sestavni del pomembnih encimov. Pri bakterijah vpliva na njihovo virulentnost v okuženem gostitelju, ampak ker je železo v naravi v trivalentni obliku, ki je hkrati tudi slabo topna in zato problematična za pridobivanje, so bakterije razvile siderofore, molekule z visoko afiniteto za železo. Siderofori so nizkomolekularne spojine, ki jih bakterije proizvajajo same, nato pa izločajo v svoje okolje, kjer kompleksirajo železo. Posebni prenašalni proteini na površini bakterij nato prepoznavajo nastale komplekse in jih z aktivnim transportom prenesejo v celico.

DNA-giraza je encim, katerega glavna naloga je manjšanje torzijske napetosti med podvajanjem DNA. Sestavljena je iz štirih podenot–dveh podenot giraze A, ki uvajata negativne zavoje v DNA vijačnico, in dveh podenot giraze B, ki z ATP-azno aktivnostjo proizvajata energijo za uvajanje zavojev. Ta encim se ne pojavlja v sesalskih celicah, tako da z vidika selektivne toksičnosti predstavlja dobro tarčo za razvoj protibakterijskih učinkovin. Glavni problem pri odpornih bakterijah je dostava učinkovine do aktivnega mesta, kar bi lahko rešili z uporabo principa »Trojanskega konja«. Če na zaviralec DNA-giraze pripnemo siderofor, ki je še vedno sposoben kompleksacije železa, bo bakterija prepoznala kompleks in ga privzela v celico. Tako bi se lahko izognili mehanizmom odpornosti, kot je zmanjšana prepustnost bakterijske membrane.

V okviru te magistrske naloge smo se lotili sinteze konjugatov siderofor-zaviralec DNA-giraze. Najprej smo sintetizirali nov zaviralec DNA-giraze iz skupine pirolamidov, nato pa nanj pripeli distančnik, ki povezuje zaviralec in siderofor. Sintetizirali smo tudi siderofore iz kojične kisline. Pri prvem nismo imeli problemov s sinteznim postopkom, pri drugem pa končna oksidacija ni potekla, tako da ga nismo uporabili pri nadaljnji tvorbi konjugatov, saj za sklopitveno reakcijo potrebujemo karboksilno skupino. Nato smo tvorili konjugate, ob predpostavki, da odcep siderofora v bakterijski celici ni potreben, saj smo

konjugate načrtovali tako, da se zaviralec veže v vezavno mesto za ATP, siderofor pa te vezave ne ovira, saj ostane zunaj vezavnega mesta. Uporabili smo siderofor, ki smo ga sintetizirali v okviru naloge in druge, ki so bili sintetizirani na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani.

Vse konjugate bomo tudi testirali za njihovo aktivnost na izoliranem encimu DNA-girazi iz bakterije *Escherichia coli* in protibakterijsko aktivnost proti različnim po Gramu pozitivnim in negativnim bakterijam.

Ključne besede: DNA-giraza, konjugat siderofor-protibakterijska učinkovina, princip »Trojanskega konja«, siderofor, zaviralec.

ABSTRACT

The emergence of multi-drug resistant bacteria is becoming a wide-spread problem, since there are less and less antibacterial agents that are effective against them. New active substances that are not subjected to existing resistance mechanisms and have little chance of resistance occurring against them, are dearly needed.

Iron is an essential element in all living organisms, because it plays an important role in different processes in the cells and is also an integral part of different enzymes. It influences the virulence of bacteria in the infected host, but since iron in the nature is found in ferric form, which is insoluble in most solvents and therefore hard to acquire, bacteria developed high affinity molecules for iron acquisition, called siderophores. Siderophores are low-molecular-weight substances, created by bacteria and secreted in the environment, where they chelate iron. The transport proteins recognize these siderophores that are then actively taken up by the cell.

DNA gyrase is an enzyme that lessens torsional tension during the replication of DNA. It consists of four subunits – two gyrase A subunits, which introduce negative supercoils in the DNA helix, and two gyrase B subunits, which have an ATP-ase activity and generate energy for introducing negative supercoils. DNA gyrase is absent in mammal organisms, so it is a good target from selective toxicity point of view. Getting the antibacterial agent to the site of action in the bacterial cell presents the biggest problem, which could be overcome by using the “Trojan horse” approach. Attaching a siderophore that can still chelate iron, on the effective DNA gyrase inhibitor would make the bacterial transporting proteins uptake the whole molecule into the cell. This way, we could avoid the resistance mechanisms, such as reduced permeability of bacterial membrane.

In the context of our thesis, we synthesized siderophore-DNA gyrase inhibitor conjugates. We started with the synthesis of new pyrrolamide-based DNA gyrase inhibitor on which we attached a linker that will connect the active agent and the siderophore. In parallel we synthesized siderophores from kojic acid. With the first one, we had no problems, but the oxidation of alcohol in the last step of synthesis of the second siderophore, was not successful. Therefore, the second siderophore could not be used in the next step of the conjugate synthesis, because a carboxylic acid, not alcohol, was needed.

We used the siderophore that we synthesized and a few others that were synthesized at the Chair for pharmaceutical chemistry at the Faculty of pharmacy of University of Ljubljana.

All the synthesized conjugates will be tested for their inhibitory activity on *Escherichia coli* DNA gyrase and for their antibacterial activity against selected Gram positive and Gram negative bacterial strains.

Keywords: DNA gyrase, inhibitor, siderophore, siderophore-antibacterial agent conjugate, »Trojan horse« principle.

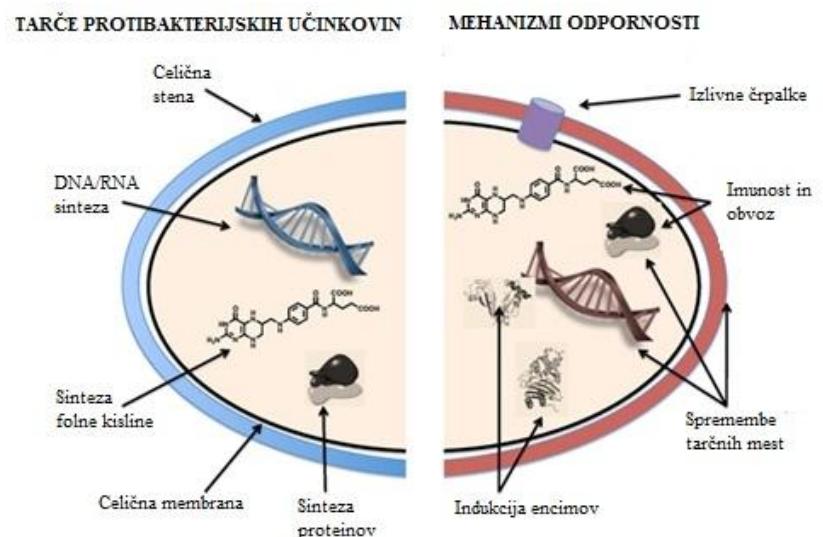
SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	adenozin-5'-trifosfat
Boc-Gly	N-(terc-butiloksikarbonil) glicin
Cr ₂ O ₃	kromov(III) oksid
DKM	diklorometan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EA	etyl acetat
EDC	3-(((etilimino)methilen)amino)- <i>N,N</i> -dimetilpropan-1-amonijev klorid
FDA	Zvezni urad za hrano in zdravila (ang. United States Food and Drug Administration)
Fe ²⁺	dvovalentno železo
Fe ³⁺	trivalentno železo
Fe (III)	trivalentno železo
GyrA	podenota A encima DNA-giraze
GyrB	podenota B encima DNA-giraze (DNA-giraza B)
H ₂ SO ₄	žveplova(VI) kislina
HEX	heksan
HOBr	1-hidroksibenzotriazol
K ₂ CO ₃	kalijev karbonat
K _{sp}	konstanta topnognega produkta (ang. solubility product constant)
MeOH	metanol
MRSA	proti meticilinu odporni <i>Staphylococcus aureus</i> (ang. methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
PBP	penicilin vezovi proteini (ang. penicillin-binding proteins)
Sid	siderofor

1. UVOD

Odpornost proti protibakterijskim učinkovinam se razvija zaskrbljujoče hitro in primeri odpornih sevov so znani proti vsem protibakterijskim učinkovinam, ki se uporabljajo v klinični praksi. Stalno naraščanje bakterijske odpornosti in padec v številu na novo odkritih kemoterapeutikov predstavlja veliko potrebo po novih protimikrobnih učinkovinah, ki zmanjšajo možnost razvoja odpornosti in hkrati premostijo že obstoječe mehanizme odpornosti. Resen problem za zdravje ljudi predstavlja razvoj mikroorganizmov odpornih proti več učinkovinam, predvsem med po Gramu negativnimi bakterijami. Skrb vzbujajoče je, da se okužbe z odpornimi sevi, ki so bile nekoč omejene samo na bolnišnice, zdaj širijo tudi v izven-bolnišnično okolje (1-3).

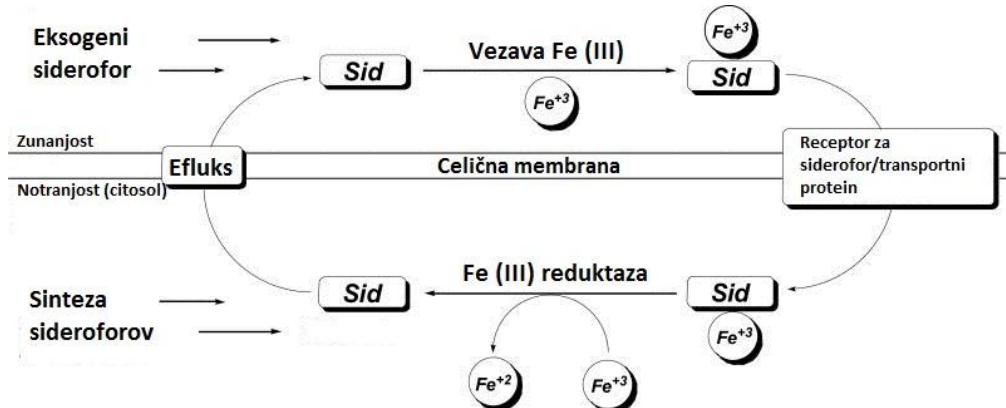
Čeprav je razvoj odpornosti mikroorganizmov s časom neizogiben, je eden od primarnih razlogov za tako hitrost prekomerna raba protibakterijskih učinkovin. Problem se, predvsem pri po Gramu negativnih bakterijah, kaže kot zmanjšanje prepustnosti bakterijske membrane, spremembe na aktivnih vezavnih mestih učinkovin, indukcija in biosinteza encimov, ki razgrajujejo protimikrobne učinkovine, kot so npr. β -laktamaze, ter indukcija izlivnih črpalk, ki aktivno črpajo protimikrobne učinkovine iz celice, preden lahko le-ti povzročijo nepopravljivo škodo (slika 1). Vsi ti procesi zmanjšujejo učinkovitost protibakterijske terapije (2, 4, 5).



Slika 1: Tarče protibakterijskih učinkovin in mehanizmi odpornosti v bakterijah (prirejeno po 6).

Poseben izziv predstavlja okužbe s t.i. »ESKAPE« patogeni (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* in vrsta *Enterobacter*), ki so dobro poznani po svoji sposobnosti razvoja odpornosti po terapiji s protibakterijskimi učinkovinami. Pomemben faktor odpornosti pri teh patogenih je ravno zmanjšana prepustnost zunanje membrane, ki predstavlja prvo oviro za vstop učinkovine v celico, hkrati pa tudi potencira ostale mehanizme odpornosti in njihov razvoj. Na ta način se odpornost bakterijskih celic drastično poveča, končna koncentracija učinkovin na mestu delovanja pa močno zmanjša. Za učinkovito zdravljenje teh okužb, ki predstavljajo čedalje večjo skrb v javnosti, potrebujemo nove razrede protibakterijskih učinkovin in nove pristope k povečanju njihove učinkovitosti (5, 7).

Železo igra pomembno vlogo v različnih encimih in bioloških funkcijah v celicah, po drugi strani pa je prevelika količina železa lahko toksična za organizem, zato je homeostaza tega elementa zelo občutljiv in dobro reguliran proces v vseh živih organizmih. Železo je bistveno za preživetje celice in tako vpliva tudi na virulentnost bakterije v okuženem gostitelju. Ena od možnih strategij, da se izognemo odpornosti zaradi zmanjšane prepustnosti zunanje membrane, je uporaba bakteriji lastnih transportnih sistemov, med katerimi je najbolj obetaven prav transport železa (slika 2) (5, 8).



Slika2: Model privzema železa s siderofori v bakterijah (prijejeno po 1). Sid – siderofor.

Ker je transport železa tako pomemben za bakterijske celice in s tem primerna potencialna tarča za razvoj novih razredov protibakterijskih učinkovin, na tem področju potekajo številne raziskave. Pristopi, ki jih preučujejo, so kompetitivna kelacija in s tem

»stradanje z železom«, inhibicija biosinteze bakterijskih sideroforov ter dostava učinkovin z vezavo na siderofore v celico (princip »Trojanskega konja«) (1).

1.1 BAKTERIJSKI SIDEROFORI

Bakterije za svojo rast potrebujejo najmanj 10^{-6} M koncentracijo železa, medtem ko je običajna koncentracija v serumu in tkivih 10^{-24} M (5). Prevladujoča oblika železa v naravi je oblika Fe^{3+} , ki pa je slabo topna ($K_{\text{sp}} = 1 \times 10^{-39}$) in zato težko dostopna (10). Zanimivo je, da mikrobi največkrat potrebujejo ravno to obliko železa, čeprav je netopna v vodnih in organskih medijih, posledično tudi v lipidih in membranah. Nedostopnost železa je pri bakterijah vodila v razvoj visokoafinitetnih poti za oskrbo z njim (4).

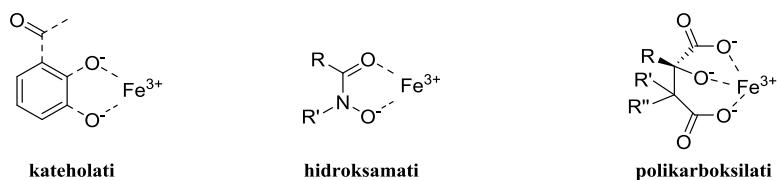
1.1.1 Privzem železa v bakterijske celice

Mikroorganizmi pridobivajo železo s tremi glavnimi mehanizmi:

- kelacija in aktivni transport s siderofori,
- nizkoafinitetni prenos železa direktno iz gostiteljevih virov ali
- redukcija trivalentnega železa v dvovalentno obliko pred transportom v celico (4).

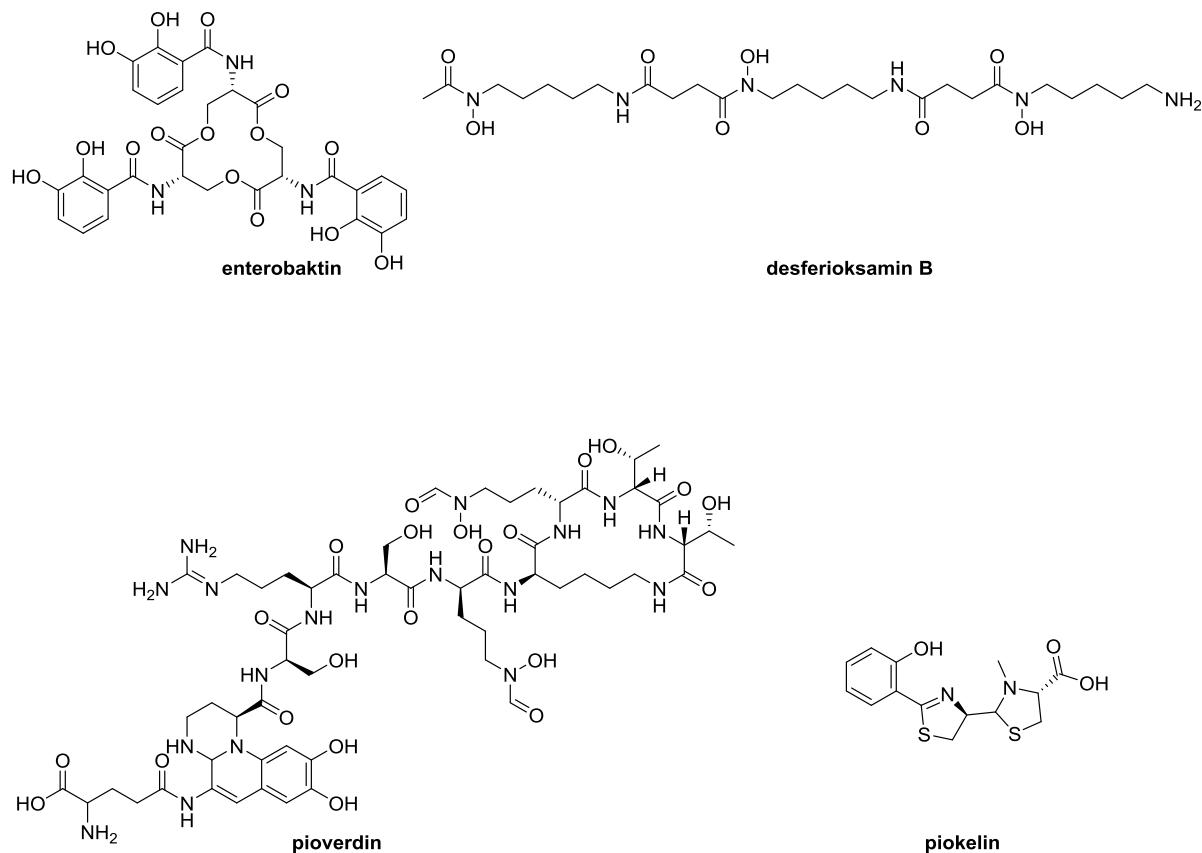
Pri prvem mehanizmu bakterijske celice izločajo visokoafinitetne, nizkomolekularne molekule, imenovane siderofori, v svojo okolico, kjer le-ti kompleksirajo trivalentne železove ione, ko jih v bakteriji primanjkuje (slika 2). Do take situacije pride v vnetnih tkivih, ko bakterija okuži gostitelja. Nastali kompleks nato prepoznajo membranski receptorji in ga prenesejo v notranjost celice. Železo se v celici sprosti z delovanjem encimov, reducira v dvovalentno obliko in uporabi v različnih proteinih oz. procesih v celici (slika 2).

Glavni strukturni tipi sideroforov so kateholati, hidroksamati in polikarboksilati (slika 3)(5, 10).



Slika 3: Glavni strukturni tipi sideroforov (prirejeno po 5).

Primer naravnega siderofora s kateholatno strukturo je enterobaktin (slika 4), ki je tudi najmočnejši in najbolje opisan predstavnik te skupine. Proizvajajo ga enterobakterije, kot sta *Escherichia coli* ali *Salmonella*. Primer hidroksamatov so desferioksamini (slika 4), ki jih proizvajajo bakterije vrste *Streptomyces*. Pioverdin (Slika 4) je posebnost med naravnimi siderofori, saj je sestavljen iz kombinacije kateholatnih in hidroksamatnih vezavnih skupin. Proizvaja ga bakterija *P. aeruginosa*, ki proizvaja tudi siderofor piokelin (slika 4). Ta ima sicer nižjo afiniteto do železa kot pioverdin, ampak lahko kompleksira tudi druge kovinske ione, kot sta Zn^{2+} in Cu^{2+} (1, 5, 8, 11).



Slika 4: Primeri sideroforov, ki se pojavljajo v naravi (prirejeno po 1, 5, 11).

Tekmovanje za železo med bakterijo in gostiteljem je eden pomembnejših faktorjev, ki odloča, kako bo okužba potekala. V okuženem gostitelju bakterijske celice tekmujejo za redko železo s človeškimi proteini, kot sta transferin in lakoferin. Preživijo lahko le, če imajo siderofori, ki jih proizvajajo, večjo afiniteto do železa kot gostiteljevi proteini. Dokazano je bilo tudi, da ima veliko bakterijskih sideroforov zmožnost privzema železa iz transferina in lakoferina. Poleg tega so bakterije razvile mehanizme, ki prepoznajo in z

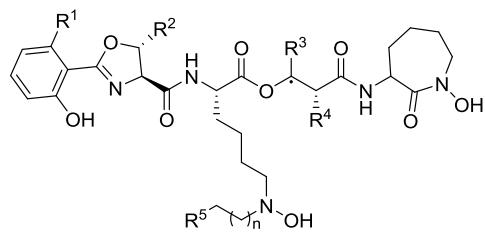
aktivnim transportom v celico prenesejo siderofore, ki jih proizvajajo drugi sevi bakterij ali celo druge vrste mikroorganizmov. Po drugi strani pa nekatere raziskave kažejo, da siderofori enega tipa mikroorganizmov lahko celo zavirajo rast drugega tipa mikroorganizmov. S tem je omogočena kompetitivna rast bakterij (1, 4, 5).

1.1.2 Možnosti uporabe sideroforov

Ker so siderofori tako selektivni in imajo visoko afiniteto do železa, so uporabni v številnih terapijah. Ena od možnosti uporabe je pri preveliki količini tega elementa v telesu, kot je čezmerno kopičenje železa pri transfuzijskih terapijah. Do tega pride, ker pri človeku ni dodatnih mehanizmov za izločanje odvečnega železa iz telesa. V takih primerih je v transfuzijsko terapijo že dodan kelator železa, ki omogoči, da se odvečni delež izloči. Idealni terapevtski kelator bi moral biti dostopen oz. preprost za sintezo, selektiven za železo, nizko toksičen ter tvoriti inertni in termodinamično stabilen kompleks z železom. Tem zahtevam ustrezajo siderofori (8, 9).

Kot kelatorji, lahko siderofori delujejo tudi protibakterijsko. Biološko neaktivni kelatorji, ki jih celica ne privzame, lahko kompetitivno vežejo prosto železo v okolini bakterije in s tem učinkovito zmanjšajo njegovo koncentracijo. Bakterija tako ne more dobiti esencialnih hranil, pride do stradanja z železom in posledično izgube virulentnosti. Alternativni princip uporabe sideroforov je uporaba neaktivne spojine, ki se veže na membranski receptor in ga inhibira, ali uporaba siderofora, ki veže kovino z nizko oz. brez metabolne aktivnosti (8).

Zbiranje železa je esencialno tudi za patogenost mikobakterij, kar ponuja potencialno tarčo za protituberkulozne učinkovine. Kritična odvisnost rasti in virulentnosti mikobakterij od železa, vključujuč *Mycobacterium tuberculosis*, predstavlja »ahilovo peto« za razvoj novih protituberkuloznih učinkovin. Mikobaktini so lipofilni, v vodi netopni, membranski siderofori, s konstantno tvorbo kompleksa z železom $\approx 10^{36}$, ki so bili odkriti v skoraj vseh tipih mikobakterij. Najprej je veljalo prepričanje, da so mikobaktini produkt mikobakterij, ampak pred kratkim so izolirali analoge mikobaktinov tudi iz drugih mikrobov. Različni sevi mikobakterij proizvajajo mikobaktine z različnimi strukturnimi elementi, ampak vsi imajo enako osnovno strukturo (slika 5). Dodatni terapevtski potencial za mikobaktine je, da so antagonisti rasti enega od bakterijskih sevov lahko prisotni v drugih sevih in s tem tvorijo naravne protituberkulozne spojine. (4).



Slika5: Osnovna struktura mikobaktinov (prirejeno po 3).

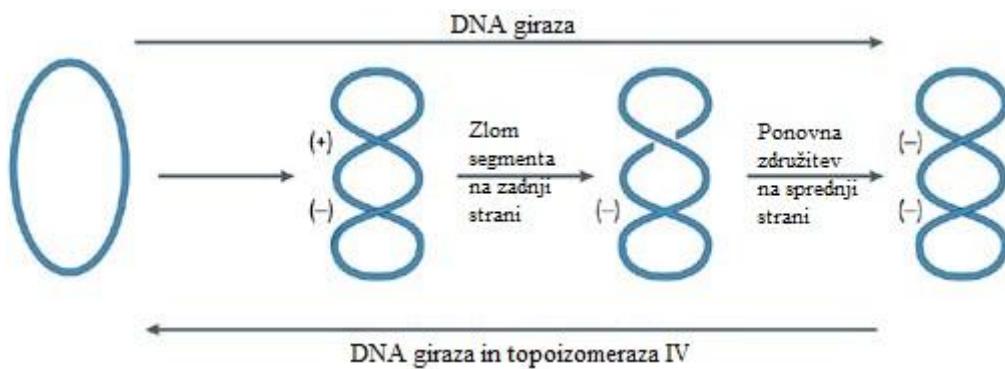
Raziskave so pokazale, da lahko mikobaktini inhibirajo oksidativne poškodbe pri sesalcih. Vodikov peroksid in superoksidni radikal lahko začneta Fentonovo reakcijo, ki lahko posledično povzroči reperfuzijske poškodbe organov. Nekateri mikobaktini in drugi siderofori dokazano inhibirajo take poškodbe s kelacijo železovih ionov, ki so potrebni za Fentonovo reakcijo. Nekateri mikobaktini kažejo tudi protitumorno aktivnost, tako da imajo te spojine velik terapevtski potencial, ki je šele v fazi raziskav (4, 9).

1.2 DNA-GIRAZA

DNA je nukleinska kislina, ki nosi genetski zapis za razvoj in delovanje živih organizmov. Lahko se nahaja v sproščeni ali v zviti obliki in kadar je zvita kot vrv, govorimo o dodatno zviti obliki. Ločimo pozitivno dodatno zvitost, kjer so si bazni pari bližje, dvojna vijačnica pa je bolj napeta, in negativno dodatno zvitost, kjer se bazni pari lažje razklenejo, zato je napetost manjša. Zaradi prisotnosti topoizomeraz se DNA-veriga običajno nahaja v negativno dodatno zviti obliki (12). Bakterijske topoizomeraze so encimi, ki katalizirajo spremembe v topologiji DNA-verige. Te spremembe so pomembne pri procesih podvojevanja in popravljanja verige in s tem esencialne za preživetje celice. Kompleksnost reakcij pri podvajanju DNA ponuja veliko možnosti za terapevtsko intervencijo (13).

Bakterijska DNA-giraza je encim iz družine GHKL (giraza, Hsp 90, histidin kinaza, MutL), in sicer je topoizomeraza tipa IIA, tako kot topoizomeraza IV. Njena glavna naloga je uvajanje negativnih zavojev v bakterijsko krožno molekulo DNA pri procesu podvajanja, s čimer zmanjša torzijsko napetost (slika 6). DNA-giraza sklaplja hidrolizo ATP z zvijanjem vijačnice, kar je potrebno za pravilno topologijo DNA v procesu podvajanja. Ta encim je trenutno ena najbolj raziskovanih tarč za razvoj novih protibakterijskih učinkovin, saj inhibicija povzroči motnjo sinteze DNA in posledično celično smrt. Poleg tega ta encim

ni prisoten v organizmu sesalcev, igra pa ključno vlogo v bakterijski celici in je tako iz vidika principa selektivne toksičnosti zelo obetavna tarča (14, 15).

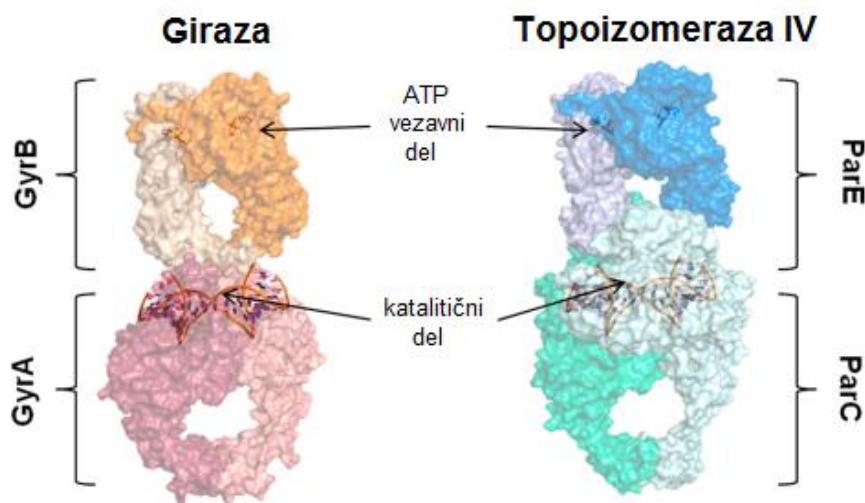
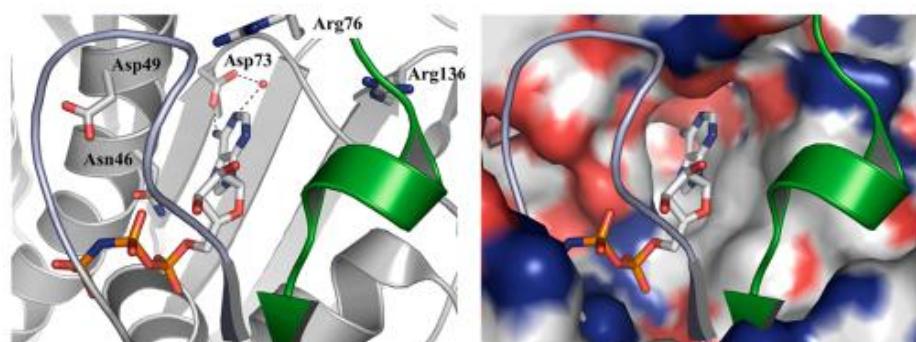


Slika 6: Uvajanje negativnih zavojev v DNA-vijačnico z DNA-girazo in topoizomerazo IV (prirejeno po 21).

1.2.1 Struktura DNA-giraze

DNA-giraza je heterotetramerni protein, sestavljen iz dveh podenot A (GyrA) in dveh podenot B (GyrB), ki v aktivnem encimu tvorijo kompleks A_2B_2 (slika 7). Vloga podenote A je ločitev in ponovna združitev dvojne vijačnice DNA, pri čemer nastajajo negativni zavoji, vloga podenote B pa je hidroliza ATP, ki zagotavlja dovolj energije za zvijanje vijačnice. Ker ima DNA-giraza B tako pomembno funkcijo v bakterijski celici, je iskanje zaviralcev tega encima kot potencialnih protibakterijskih učinkovin zelo intenzivno področje raziskav (14, 16, 17).

Do danes še ni bila objavljena celotna kristalna struktura DNA-giraze, določeni pa so bili posamezni deli tetramera (slika 7). Te strukture so v kombinaciji s kristalno strukturo homologne človeške topoizomeraze II omogočile odkritje treh vrat: N-, DNA- in C-vrat. N-vrata sestavljata obe GyrB podenoti, ki vezeta ATP, DNA- in C-vrata pa sestavlja N-končni del posamezne GyrA podenote. Ta vrata se zaporedoma odpirajo in zapirajo ter tako dovoljujejo prehod DNA verigi v specifičnih stopnjah katalitičnega cikla (6).

A.**B.**

Slika 7: (A) Model bakterijske DNA-giraze (levo) in topoizomeraze IV (desno). (B) ATP vezavno mesto giraze B iz *E. coli* v kompleksu z nehidrolizirajočim analogom ATP, ADPNP (adenosin-5'-(β,γ -imido)trifosfat) (prijejeno po 22).

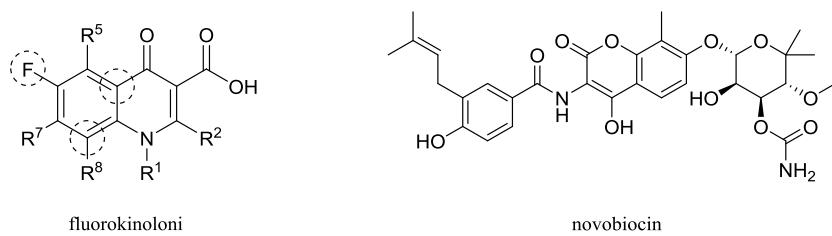
1.2.2 Zaviralci DNA-giraze

Protibakterijska terapija temelji na razlikah med mikroorganizmi in človeškim organizmom. Uspešnost terapije je torej odvisna od selektivne toksičnosti – delovanje in uničenje bakterijskih celic, medtem ko človeške celice ostanejo nepoškodovane. V večini primerov selektivna toksičnost ni absolutna, ampak je odvisna od odmerka protimikrobne učinkovine (18). Bakterijska topoizomeraza tipa IIA je strukturni homolog človeške topoizomeraze II, ki je tarča za razvoj protitumornih učinkovin. Poleg tega ta encim uporablja hidrolizo ATP kot vir energije, prav tako kot veliko človeških encimov

(npr. proteinske kinaze). Pri razvoju novih zaviralcev je tako potrebna previdnost, saj morajo učinkovine izkazovati selektivnost samo za bakterijske encime (7).

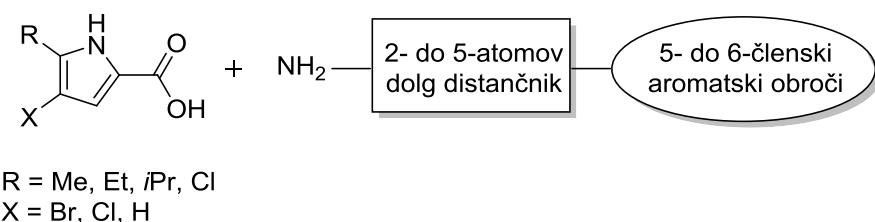
Zaviralci bakterijskih topoizomeraz tipa IIA običajno delujejo na dveh tarčnih encimih – na DNA-girazi in na topoizomerazi IV. Afiniteta do posameznega encima je odvisna od kemijskega razreda zaviralca in bakterijskega seva. Take učinkovine imajo velik potencial v boju z bakterijami, saj bi se morale pojaviti mutacije na vsaj dveh različnih genih v isti generaciji, da bi se razvila odpornost. Prav tako imajo različni sevi bakterij podobne strukture teh dveh encimov, kar pomeni, da sta to primerni tarči za razvoj širokospektralnih protibakterijskih učinkovin (6, 11).

Trenutno so edini zaviralci DNA-giraze v klinični praksi fluorokinoloni (slika 8), pomemben razred protibakterijskih učinkovin, ki interagirajo s podenoto GyrA in stabilizirajo kompleks DNA-encim. Problem predstavlja razvoj rezistence pri fluorokinolonih, kar omejuje njihovo terapevtsko uporabnost, zato poteka iskanje novih razredov zaviralcev, ki imajo druga tarčna mesta. Z odkritjem novih učinkovin, ki bi delovale na podenoto DNA-giraze GyrB, bi se tako lahko izognili navzkrižni odpornosti s patogeni, odpornimi proti fluorokinolonom. Drug razred protibakterijskih učinkovin, katerih tarča je prav tako DNA-giraza, so aminokumarini. Ti interagirajo s podenoto GyrB, tako da tekmujejo za vezavo v encim z molekulo ATP in s tem blokirajo funkcijo encima. Primer aminokumarinske protibakterijske učinkovine je novobiocin (slika 8), ki pa je ne uporabljamo več v klinični praksi zaradi slabih farmakokinetičnih lastnosti in vprašljive varnosti (13-15).



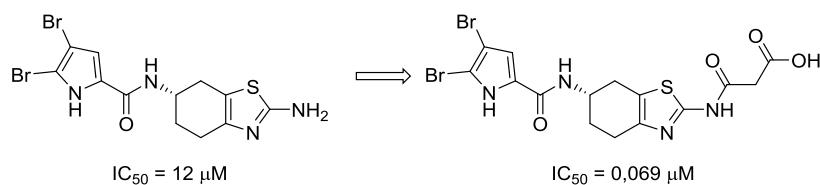
Slika 8: Levo, osnovna struktura fluorokinolonov. Črka R označuje mesta, kjer so možne spremembe strukture, prav tako so možne spremembe na mestih, ki so obkrožena (prirejeno po 19). Desno, struktura novobiocina (prirejeno po 20).

Nedavno so raziskovalci pri podjetju AstraZeneca razvili serijo novih zaviralcev DNA-giraze, ki so derivati pirol-2-karboksilne kisline. Ti pirolamidi izkazujejo delovanje na GyrB, imajo ustrezne farmakokinetične lastnosti in visoko jakost inhibicije encima ter protibakterijsko aktivnost, predvsem na po Gramu pozitivne bakterije. Izkazujejo tudi delovanje proti sevom, ki so odporni proti protibakterijskim učinkovinam, trenutno uporabljenim v klinični praksi (npr. MRSA). Nekatere spojine iz te skupine so trenutno že v fazi kliničnih testiranj, na tem področju pa še vedno poteka veliko raziskav (14, 15, 17).



Shema 1: Osnovna shema za razvoj serije zaviralcev DNA-giraze, ki vsebujejo pirolamidni fragment (prirejeno po 15).

Nedavno so na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani sintetizirali knjižnico analogov morskih alkaloidov klatrodina, oroidina in himenidina. Le-ti delujejo kot modulatorji napetostno odvisnih natrijevih kanalov, izkazujejo protibakterijsko aktivnost, inhibicijo tvorbe bakterijskih biofilmov in inducirajo apoptozo v določenih celičnih linijah (23, 24). Nekateri od teh analogov, ki vsebujejo 4,5-dibromo-1*H*-pirolni obroč in so tako strukturno sorodni prej omenjenim pirolamidom, so se izkazali tudi kot zaviralci DNA-giraze. Testiranja so pokazala, da pomembno vlogo igra ravno substituiranost pirolnega obroča s hidrofobnimi substituenti, saj 4,5-dibromo analogi izkazujejo visoko aktivnost, medtem ko 4-bromo analogi izkazujejo samo šibko zaviralno aktivnost. S strukturno podprtjo optimizacijo osnovne spojine so odkrili nov strukturni tip zaviralcev DNA-giraze z delovanjem v nizkem nanomolarnem območju (slika 9)(13). Sinteze derivatov teh spojin in pripenjanja le-teh na siderofore se bomo lotili v okviru te magistrske naloge.

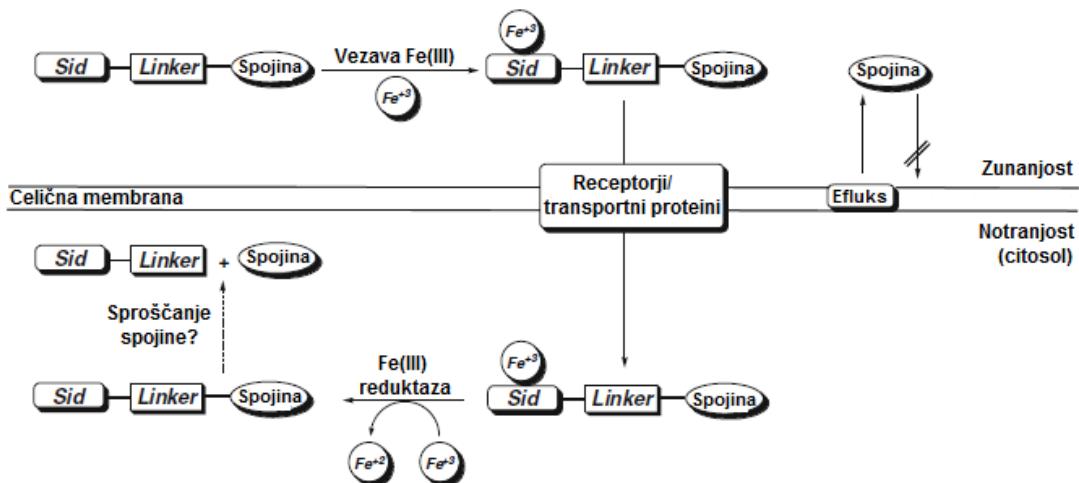


Slika 9: Primer zaviralca DNA-giraze z 4,5-dibromo-1*H*-pirolamidnim strukturnim fragmentom (levo) in optimiziran inhibitor z močnejšo inhibicijo DNA-giraze (desno) (prirejeno po 13).

1.3 KONJUGATI SIDEROFOR–PROTIBAKTERIJSKA UČINKOVINA

Bakterijski mehanizmi za privzem železa so bistveni za preživetje bakterije in pomembni za virulentnost. Izguba biosinteze sideroforov tako močno vpliva na virulentnost bakterije, uporaba te poti za dostavo protibakterijskih učinkovin pa predstavlja idealno tarčo za delovanje po principu »Trojanskega konja« (5).

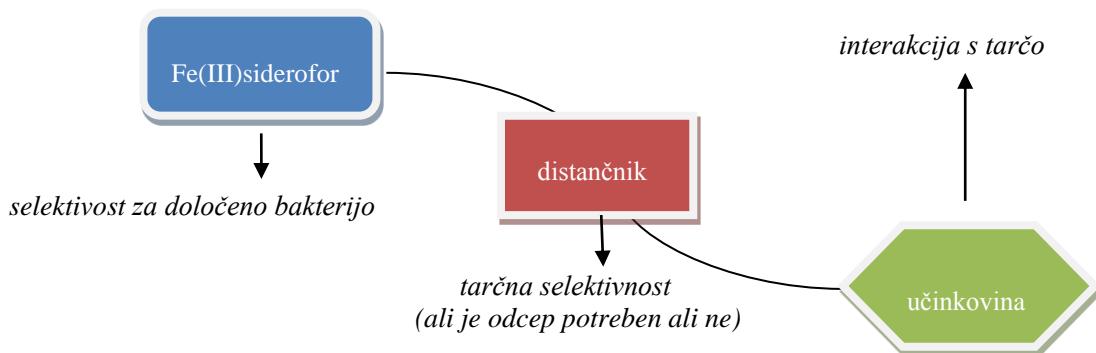
Že Stari Grki so vedeli, da se vseh bitk ne da dobiti brez prevare. Tako so se skrili v skulpturo velikega lesenega konja, ki so ga Trojanci nevede sprejeli kot daritev bogovom. Enkrat za vrati trdnjave, pa so se Grki razkrili in napadli ter tako uspešno zavzeli mesto (25). Prav tak pristop lahko uporabimo tudi v terapiji. Učinkovino, ki ne more učinkovito preiti bakterijske membrane, lahko kovalentno povežemo s sideroforom, ki ima ohranljeno sposobnost kompleksacije železa. Tak kompleks prepoznajo receptorji na membrani in siderofor s pripeto učinkovino z aktivnim transportom prenesejo v celico (slika 10). Tako se učinkovina izogne mehanizmu odpornosti zaradi zmanjšanje prepustnosti membrane in uspešno doseže svojo tarčo (5).



Slika 10: Model privzema kompleksov siderofor-spojina v bakterijsko celico (prirejeno po 1).

1.3.1 Struktura konjugatov

Konjugati siderofor-aktivna spojina so trikomponentni sistemi, ki jih sestavlja siderofor, sposoben kompleksacije železa, distančnik, ki povezuje oba funkcionalna dela med seboj, in nato še aktivna spojina, odgovorna za protibakterijsko delovanje. Taka struktura oz. mehanizem dostave lahko potencialno zmanjša neželene učinke, saj učinkovina uspešno pride do vezavnega mesta in ni potrebe po visokih zunajceličnih koncentracijah (1, 8).

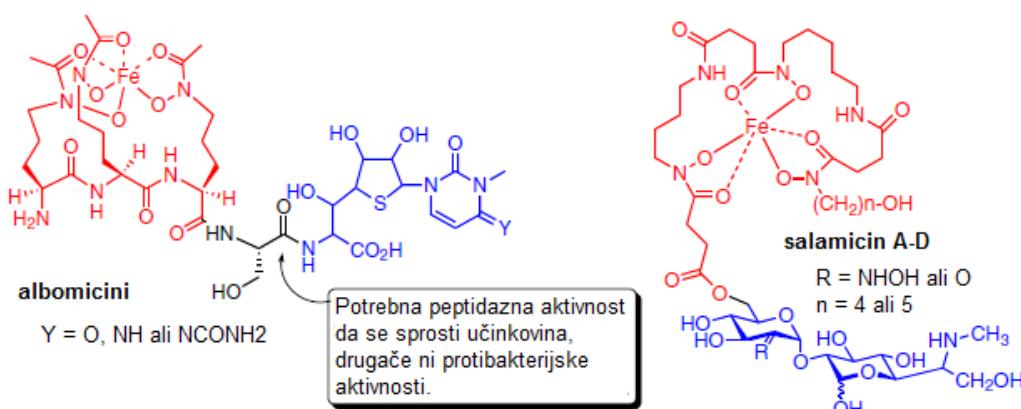


Shema 2: Generalizirana struktura potencialnih siderofornih protibakterijskih učinkovin (prijejeno po 4).

1.3.2 Konjugati v naravi

Da bi si bakterije zagotovile dodatno prednost pred drugimi mikroorganizmi, so se naučile izrabljati sistem prenosa železa s pripenjanjem škodljivih substanc na siderofore. V naravi se že pojavljajo konjugati s siderofori, imenovani sideromicini, in sicer:

- albomicin (proizvaja *Actinomyces subtropicus*) (Slika 11),
- microcini,
- danomicini,
- ferimicini (proizvaja *Streptomyces griseoflavus*) in
- salmicin (proizvaja *Streptomyces violaceus*) (slika 11) (1, 5).



Slika11: Struktura albomicinov in salmicinov (prirejeno po 4).

Tako je že narava ustvarila nov razred antibiotikov na principu »Trojanskega konja«. Albomicini so v celico privzeti z aktivnim transportom, saj membranski receptorji prepoznajo siderofor, ki kelira železo. V notranjosti celice, se siderofor odcepi z delovanjem serinske proteaze in dobimo zelo močno učinkovino, aktivno tako proti po Gramu pozitivnim, kot proti po Gramu negativnim bakterijam. Pri salmicinu pride v celici do hidrolize heksopiranognega dela, da se sprosti učinkovina (1, 4).

V raziskavi, kjer so primerjali učinkovitost med albomicinom in salmicini, so ugotovili, da so salmicini primarno aktivni samo proti po Gramu pozitivnim mikroorganizmom (razen proti *K. pneumoniae*), v nasprotju z albomicinom, ki je aktivен tako proti po Gramu pozitivnim kot proti po Gramu negativnim mikroorganizmom. Ampak proti sevom MRSA so salmicini pokazali večjo aktivnost kot pa albomicin, ki je bil neaktiv. Različne skupine sideromicinov so tako učinkovite proti specifičnim vrstam bakterij, kar odpira možnosti za nadaljnje raziskave odvisnosti med strukturo in aktivnostjo teh konjugatov (1).

Čeprav ti naravni antibiotiki kažejo močno protibakterijsko aktivnost, se niso uveljavili v terapiji. Razlogi za to so, da niso lahko dostopni, mehanizem njihovega delovanja ni popolnoma znan in bakterije hitro razvijejo odpornost proti njim, zato njihova učinkovitost ni najboljša (8).

1.3.3 Učinkovitost konjugatov na tarčnem mestu

Da bi bila učinkovina aktivna v boju proti bakterijam, mora po vstopu v celico še vedno doseči svojo tarčo. Ali je potrebno, da se konjugat siderofor-aktivna spojina cepi ali

je sam konjugat lahko že aktivna snov? Izbrana učinkovina odloča, ali je odcep potreben glede na tarčo, na katero deluje, in kakšen je odnos med strukturo in aktivnostjo. Distančnik pa odloča, ali je odcep v celici sploh mogoč.

Raziskave so pokazale, da se konjugati z β -laktamskimi protimikrobnimi učinkovinami, katerih tarča so penicilin-vezoči proteini (PBP), lahko vežejo v vezavno mesto brez odcepa siderofora in tako potrebujejo samo transport do svoje tarče, kar olajša načrtovanje in sintezo. Ampak večina raziskav kaže, da imajo taki konjugati zmanjšano aktivnost v primerjavi s prosto učinkovino. Potrebne bi bile še nadaljnje raziskave in optimizacija konjugatov, tako da bi dosegli enako ali celo boljšo aktivnost (1).

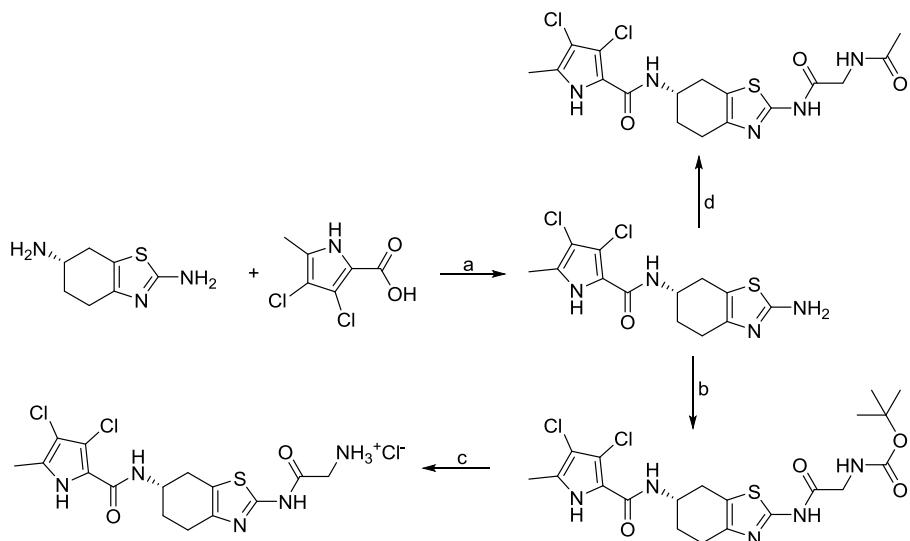
V laboratorijih Basilea Pharmaceutica International AG v Švici so sintetizirali spojino z imenom BAL30072. Ta spojina je sulfaktam z dihidropiridonom, ki kompleksira železo in izkazuje dobro aktivnost proti po Gramu negativnim bakterijam (26).

2. NAČRT DELA

Cilj magistrske naloge je sinteza novih potencialnih zaviralcev DNA-giraze B, sinteza sideroforov in sinteza konjugatov siderofor-zaviralec DNA-giraze B. Sintetiziranim spojinam bomo ovrednotili inhibitorno aktivnost na izoliranem encimu, DNA-girazi iz bakterije *Escherichia coli* in protibakterijsko aktivnost na izbranih po Gramu pozitivnih in negativnih sevih.

2.1 SINTEZA ZAVIRALCEV DNA-GIRAZE B

Tekom eksperimentalnega dela bomo načrtovali in sintetizirali aminski derivat znanega ATP-kompetitivnega zaviralca DNA-giraze B (shema 3), ki je bil pred kratkim odkrit in sintetiziran na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani.

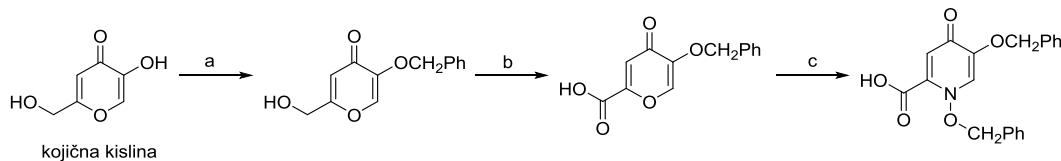


Shema 3: Reagenti in pogoji. a) EDC, HOBr, NMM, DMF, sobna T, 12 h; b) Boc-Gly, EDC, HOBr, NMM, DMF, sobna T, 12 h; c) HCl_(g), MeOH, sobna T, 18 h; d) CH₃CONHCH₂COOH, EDC, HOBr, NMM, DMF, sobna T, 24 h.

V prvi stopnji bomo izvedli sklopitev izhodnega amina in izhodne kisline, da dobimo že predhodno sintetiziran zaviralec DNA-giraze (shema 3, a). Nato bomo na prosto aminsko skupino pripeli Boc-glicin, ki po eni strani iga vlogo distančnika, po drugi strani pa interagira z vezavnim mestom za ATP DNA-giraze B (shema 3, b). V zadnji stopnji bomo izvedli acidolizo (shema 3, c), da dobimo nov potencialni zaviralec DNA-giraze in s tem spojino, ki jo bomo kasneje uporabili za sintezo konjugatov s siderofori. Sintetizirali bomo tudi derivat z *N*-acetilglicinom (shema 3, d) kot nov potencialni zaviralec DNA-giraze, s katerim želimo preveriti, ali karbonilna skupina amidne skupine pomembno doprinese k zaviralni aktivnosti.

2.2 SINTEZA SIDEROFOROV IZ KOJIČNE KISLINE

Na zaviralec DNA-giraze B bomo pripeli različne siderofore za izboljšanje protibakterijske aktivnosti. Izhodna spojina za sintezo našega siderofora bo kojična kislina (5-hidroksi-2-(hidroksimetil)-4*H*-piran-4-on).

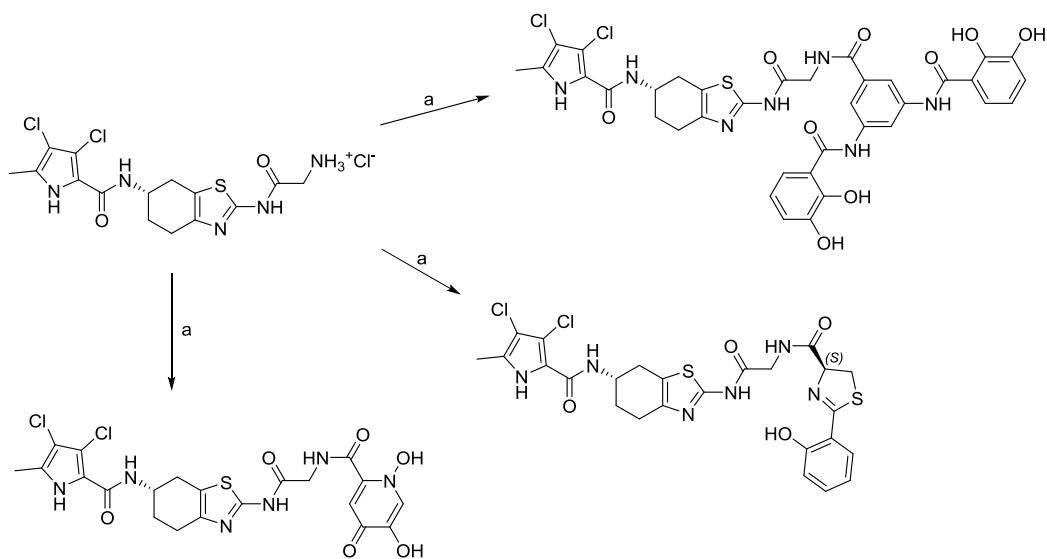


Shema 4: Reagenti in pogoji. a) benzil klorid, K_2CO_3 , DMF; b) CrO_3 , H_2SO_4 , voda/aceton, -5°C do sobne T; c) *O*-benzilhidrosilamin, voda, 80°C .

Sintezni postopek bomo začeli z zaščito hidroksilne skupine na mestu 5 (shema 4, a), nato pa bomo oksidirali hidroksimetilno skupino na mestu 2 do karboksilne kisline (shema 4, b). V zadnji stopnji bomo substituirali obročni kisik z zaščitenim hidrosilaminom (shema 4, c). Na ta način bomo sintetizirali dihidropiridonski siderofor, ki je enak tistemu iz spojine BAL30072, ki uspešno deluje proti po Gramu-negativnim bakterijam.

2.3 SINTEZA KONJUGATOV SIDEROFOR – ZAVIRALEC DNA-GIRAZE B

Sintetizirali bomo različne konjugate siderofor-zaviralec DNA-giraze B (shema 5), s čimer želimo izboljšati protibakterijsko aktivnost zaviralca DNA-giraze. Predpostavljamo, da cepitev konjugata v bakterijski celici ni potrebna, saj bomo sintetizirane siderofore vezali na končni del zaviralca, ki je v vezavnem mestu usmerjen proti topilu. Izvedli bomo sklopitev z našim zavircem DNA-giraze B in ustreznimi siderofori (shema 5, a).



Shema 5: Reagenti in pogoji. a) ustrezna kislina, EDC, HOBr, NMM, DMF, r.t., 12 h.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti in topila

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Fluka, Merck, Sigma-Aldrich in TCI.

3.2 METODE

3.2.1 Kromatografske metode

➤ *Tankoplastna kromatografija*

Poteke reakcij in ustreznost mobilne faze za čiščenje spojin s kolonsko kromatografijo smo spremljali s tankoplastno kromatografijo (TLC). Kot mobilno fazo smo uporabljali različna organska topila v različnih razmerjih, ki so navedena v sinteznih postopkih posameznih spojin, kot stacionarno fazo pa smo uporabljali plošče Merck Silica Gel 60 F254 z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Spojine na kromatografskih ploščah smo detektirali s pomočjo UV lučke z valovno dolžino 254 nm in orositvenimi reagenti.

➤ *»Flash« kolonska kromatografija*

Za čiščenje spojin smo pogosto uporabljali »flash« kolonsko kromatografijo. Od deleža nečistot je bila odvisna izbira ustrezne steklene kolone, ki so se med seboj razlikovale po velikosti in premeru. Kot mobilno fazo smo uporabljali različna organska topila, ki so navedena v sinteznih postopkih posameznih spojin, kot stacionarno fazo pa smo uporabljali silikagel Silica Gel 60 proizvajalca Merck z velikostjo delcev med 0,040 - 0,063 mm. Pretok mobilnih faz smo pospešili z uvajanjem zračnega nadtlaka.

3.2.2 Spektroskopske metode

➤ ***Infrardeča spektroskopija (IR)***

IR-spektre smo posneli na spektrofotometru Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

➤ ***Jedrska magnetna resonanca (NMR)***

^1H NMR spektre smo posneli na spektrometru Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v devteriranih topilih dimetilsulfoksid (DMSO)- d_6 in kloroform (CDCl_3). S pomočjo računalniškega programa MestRe-C 4.8.6. proizvajalca Mesterlab Research S. L. smo procesirali spektre.

➤ ***Masna spektrometrija (MS)***

Masne spektre smo posneli na spektrometru Autospec (VG – Analytical) z ESI tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

3.2.3 Nomenklatura in risanje spojin

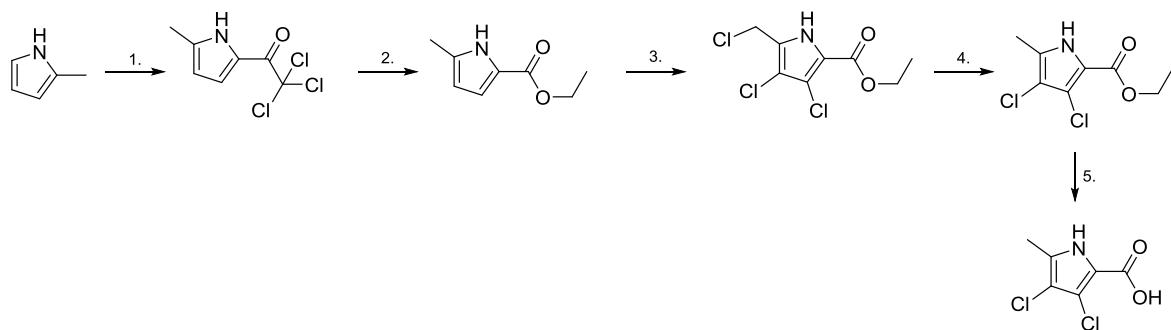
Program ChemBioDraw Ultra 14.0 podjetja CambridgeSoft smo uporabili za risanje strukturnih formul spojin in poimenovanje po nomenklaturi IUPAC. Za iskanje sinteznih postopkov po podatkovnih bazah smo uporabljali program SciFinder Scholar.

3.2.4 Določanje tališča

S Koflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica smo določali tališče sintetiziranih spojin.

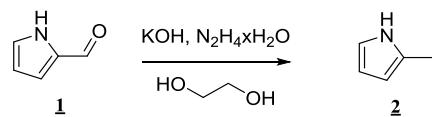
4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 POSTOPEK SINTEZE IZHODNE KISLINE (3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline)



Shema 6: Shema sinteze izhodne kisline.

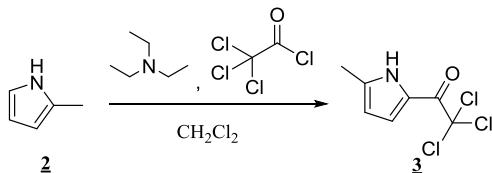
4.1.1 Sinteza 2-metil-1*H*-pirola



Spojino **1** (20,0g, 210,11 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 200 mL etilen glikola in po kapljicah dodali hidrazin hidrat (22,56 mL, 252,13 mmol, 1,2 ekv.) v roku 30 min. Reakcijsko zmes smo pustili mešati na oljni kopeli (90°C) 1 uro, nato smo dodali kalijev hidroksid (20,04 g, 357,2 mmol, 1,7 ekv.), počakali, da se raztopi in mešali na oljni kopeli pri 190°C čez noč. Naslednji dan smo reakcijsko zmes ohladili na sobno temperaturo in jo ekstrahirali z dietil etrom (50 mL). Organsko fazo smo nato spirali z nasičeno raztopino natrijevega klorida (20 mL) in sušili z natrijevim sulfatom, ki smo ga odfiltrirali, preden smo uparili topilo. Dobili smo 10,878 g spojine **2**.

2-metil-1H-pirol		
Elementna sestava	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₃	M _r = 238,29
Izgled spojine	Rumena tekočina	
Izkoristek	63,8%	
Retencijski faktor (R_f)	0,26 (DKM : MeOH = 20 : 1)	
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ 2.34 (s, 3H, CH ₃), 5.97 (tdt, 1H, J ₁ = 3.1 Hz, J ₂ = 1.7 Hz, J ₃ = 0.8 Hz, Ar-H ₃), 6.19 (dd, 1H, J ₁ = 5.8 Hz, J ₂ = 2.9 Hz, Ar-H ₄), 6.71 (dt, 1H, J ₁ = 4.2, J ₂ = 2.6 Hz, Ar-H ₅), 7.93 (br s, 1H, NH) ppm	

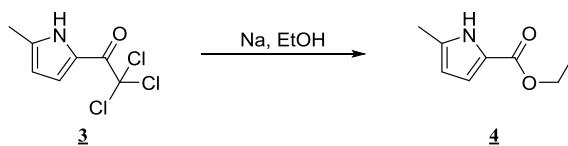
4.1.2 Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(5-metil-1H-pirol-2-il)etan-1-ona



Spojino **2**(10,878 g, 134,10 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v trietilaminu (22,43 mL, 160,92 mmol, 1,2 ekv.) in diklorometanu (150 mL). Na ledeni kopeli (0°C) smo reakcijski zmesi po kapljicah dodajali trikloroacetil klorid (22,45 mL, 201,15 mmol, 1,5 ekv.). Pustili smo, da se meša približno eno uro, konec reakcije pa smo določili s tankoplastno kromatografijo. Reakcijsko zmes smo najprej spirali z nasičeno raztopino natrijevega hidrogenkarbonata (2 x 100 mL), nato z nasičeno raztopino natrijevega klorida (1 x 100 mL) in na koncu sušili z natrijevim sulfatom. Uparili smo topilo in dobili 27,523 g spojine **3**.

2,2,2-trikloro-1-(5-metil-1H-pirol-2-il)etan-1-on		
Elementna sestava	C ₇ H ₆ Cl ₃ NO	M _r = 226,48
Izgled spojine	Rjava oborina	
Izkoristek	90,6%	
Retencijski faktor (R_f)	0,61 (EA : HEX = 1 : 2)	
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ 2.30 (s, 3H, CH ₃), 6.12 (ddd, 1H, J ₁ = 4.0 Hz, J ₂ = 2.4 Hz, J ₃ = 0.6 Hz, Ar-H ₄), 7.24 (dd, 1H, J ₁ = 4.0 Hz, J ₂ = 2.5 Hz, J ₃ = 0.4 Hz, Ar-H ₃), 12.21 (s, 1H, NH) ppm	

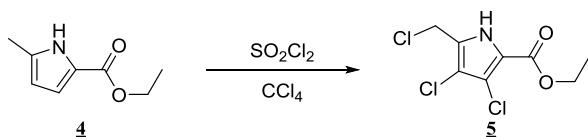
4.1.3 Sinteza etil 5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilata



Natrij (3,308 g, 143,90 mmol, 1,2 ekv.) smo postopoma raztopili v 300 mL etanola, na bučko namestili povratni hladilnik s klor-kalcijevim cevkom in počakali 30 min, da je natrij reagiral z etanolom. Nato smo dodali spojino **3** (27,153 g, 119,91 mmol, 1 ekv.) v treh delih. S tankoplastno kromatografijo smo določili konec reakcije in izolirali produkt. Najprej smo reakcijski zmesi uparili topilo, ostanek raztopili v destilirani vodi (80 mL) in nakisali z 1M HCl do pH = 3 (cca. 80 mL). Pojavila se je oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem in po sušenju v sušilniku (40°C) dobili 16,459 g spojine **4**. Vodno fazo smo dodatno ekstrahirali z etil acetatom (2 x 100 mL), združene organske faze pa smo nato spirali z nasičeno raztopino natrijevega klorida (1 x 100 mL). Po sušenju z natrijevim sulfatom smo odparili topilo in dobili še 0,012 g spojine **4**.

etil 5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilat		
Elementna sestava	C ₈ H ₁₁ NO ₂	M _r = 153,18
Izgled spojine	Rjava oborina	
Izkoristek	89,7%	
Retencijski faktor (R_f)	0,08 (EA : HEX = 1 : 2)	
Tališče	87 – 89 °C	
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 1.26 (t, 3H, <i>J</i> = 7.1 Hz, CH ₂ CH ₃), 2.21 (s, 3H, C _{CH₃}), 4.20 (q, 2H, <i>J</i> = 7.1 Hz, CH ₂ CH ₃), 5.86–5.88 (m, 1H, Ar-H ₄), 6.66 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 3.3 Hz, <i>J</i> ₂ = 2.6 Hz, Ar-H ₃), 11.58 (s, 1H, NH) ppm	
IR (ATR)	ν 3283, 1666, 1530, 1495, 1479, 1462, 1392, 1374, 1321, 1265, 1220, 1152, 1112, 1039, 1025, 988, 965, 867, 801, 773, 659, 574 cm ⁻¹	

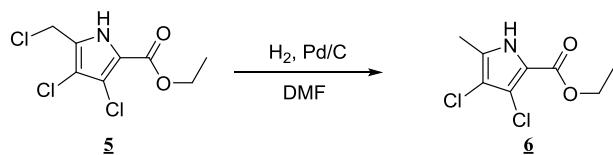
4.1.4 Sinteza etil 3,4-dikloro-5-(klorometil)-1H-pirol-2-karboksilata



Spojino **4**(10,0 g, 65,28 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 100 mL tetraklorometana in reakcijsko zmes prepihovali z argonom, da smo ustvarili inertno atmosfero. Nato smo po kapljicah dodajali sulfurilklorid (15,83 mL, 195,75 mmol, 3 ekv.) in pustili reakcijo, da poteka 3 ure. Po tem času, smo nastalo oborino odfiltrirali s presesavanjem in jo posušili v sušilniku (40°C). Dobili smo 11,504 g spojine **5**.

etil 3,4-dikloro-5-(klorometil)-1H-pirol-2-karboksilat		
Elementna sestava	<chem>C8H8Cl3NO2</chem>	$M_r = 256,51$
Izgled spojine	Bela oborina	
Izkoristek	68,7 %	
Retencijski faktor (R_f)	0,71 (DKM : MeOH = 30 : 1)	
Tališče	127 – 130 °C	
^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)	δ 1.31 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH_2CH_3), 4.31 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, CH_2CH_3), 4.72 (s, 2H, CH_2Cl), 12.89 (s, 1H, NH) ppm	
IR (ATR)	ν 3244, 1667, 1489, 1447, 1422, 1290, 1282, 1159, 1048, 1013, 739, 725, 648, 637, 624 cm^{-1}	

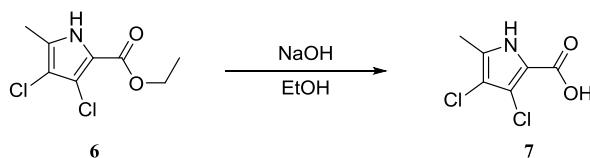
4.1.5 Sinteza etil 3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksilata



Spojino **5** (11,450 g, 44,64 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 50 mL *N,N*-dimetilformamida (DMF) in prepiali z argonom. Nato smo dodali paladij na ogljiku (Pd/C) (1,72 g, ≈15%), ki potrebuje inertno atmosfero in začeli dovajati vodik. Po enem tednu smo s tankoplastno kromatografijo določili konec reakcije. Oborino smo odnučali skozi plast Celita, matičnici pa uparili topilo. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo, najprej z mobilno fazo DKM, nato pa še DKM : MeOH = 5 : 1. Dobili smo 2,761 g spojine **6**.

etil 3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilat		
Elementna sestava	C ₈ H ₉ Cl ₂ NO ₂	M _r = 222,07
Izgled spojine	Oranžna oborina	
Izkoristek	27,9 %	
Retencijski faktor (R_f)	0,35 (DKM)	
Tališče	94 - 97 °C	
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ 1.29 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH ₂ CH ₃), 2.20 (s, 3H, CH ₃), 4.27 (q, 2H, J = 7.1 Hz, CH ₂ CH ₃), 12.31 (s, 1H, NH) ppm	
IR (ATR)	v3254, 1668, 1491, 1473, 1460, 1431, 1373, 1327, 1284, 1217, 1189, 1106, 1084, 1047, 1014, 941, 766, 735, 639, 630 cm ⁻¹	

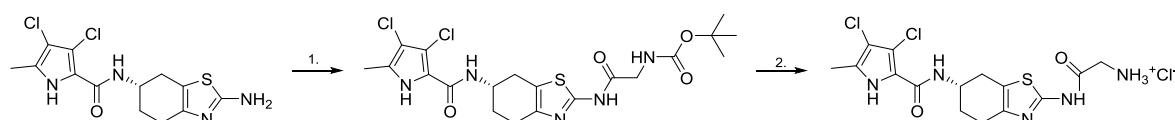
4.1.6 Sinteza 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline



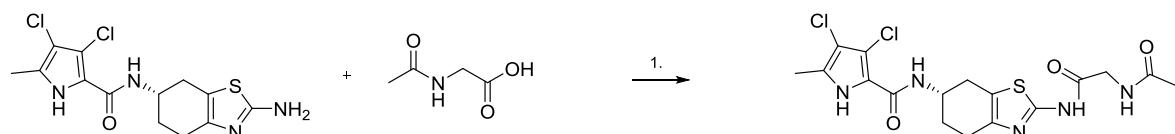
Spojino **6** (1.532 g, 6,90 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 60 mL etanola, dali na oljno kopel (90 °C) in takoj dodali 10M NaOH(12,4 mL, 124,0 mmol, 18 ekv.). Reakcijsko zmes smo segrevali 2 uri, nato pa določili konec reakcije s tankoplastno kromatografijo. Reakcijsko zmes smo ohladili na sobno temperaturo in uparili topilo. Vodni ostanek smo ekstrahirali z dietiletrom (2 x 40 mL), oborino, ki je pri tem nastala pa smo odfiltrirali s presesavanjem in posušili v sušilniku (40°C), pri čemer smo dobili 0,915 g spojine **7**. Vodno fazo smo po ekstrakciji nakisali z nasičeno HCl in ponovno je izpadla oborina. Ko smo jo posušili v sušilniku (40°C), smo dobili še 0,150 g spojine **7**. Vodno fazo smo ponovno ekstrahirali z etil acetatom (2 x 40 mL), združene organske faze pa smo nato spirali z nasičeno raztopino natrijevega klorida (20 mL), sušili z natrijevim sulfatom in filtrirali. Ko smo uparili topilo, smo dobili dodatnih 0,039 g spojine **7**.

etil 3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksilna kislina		
Elementna sestava	C ₆ H ₅ Cl ₂ NO ₂	M _r = 194,01
Izgled spojine	Rumena/rdeča oborina	
Izkoristek	82,5 %	
Retencijski faktor (R_f)	0,1 (DKM : MeOH = 9 : 1)	
Tališče	Več kot 300 °C	
¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆)	δ 2,17 (s, 3H, CH ₃), 12,31 (s, 1H, NH) ppm	
IR (ATR)	v1726, 1623, 1595, 1541, 1500, 1459, 1427, 1247, 1209, 1097, 1031, 1002, 986, 936, 896, 879, 835, 781, 757, 733, 693, 654, 583, 552, 519 cm ⁻¹	

4.2 POSTOPEK SINTEZE ZAVIRALCEV DNA GIRAZE B



Shema 7: Shema sinteze zaviralca DNA giraze B 1.



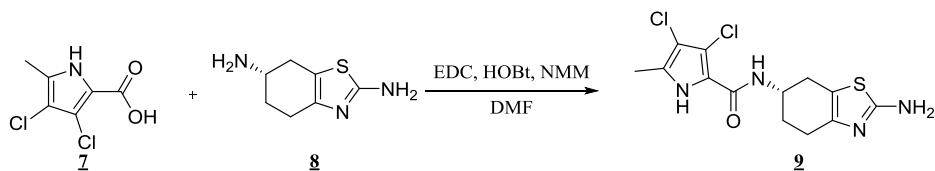
Shema 8: Shema sinteze zaviralca DNA giraze B 2.

4.2.1 Splošni sintezni postopek 1

Izhodno kislino (1 ekv.) smo raztopili v DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli (0°C). Dodali smo EDC (1,2 ekv.), HOBT (1,3 ekv.) in NMM (2 ekv., pH ≈ 8) ter mešali na ledeni kopeli (0°C) 20 min, da je potekla aktivacija kisline. Nato smo dodali izhodni amin (1 ekv.), raztopljen v ustrezni količini DMF. Odstranili smo ledeno kopel in mešali čez noč pri

sobni temperaturi. Izolacijo smo izvedli tako, da smo uparili topilo, oljnat preostanek raztopili v etil acetatu (50 mL) in ga ekstrahirali z 1% citronsko kislino (2 x 25 mL), nato pa spirali z nasičenima raztopinama natrijevega hidrogenkarbonata (2 x 25 mL) in natrijevega klorida (1 x 25 mL). Po sušenju z natrijevim sulfatom in sledeči filtraciji smo odparili topilo.

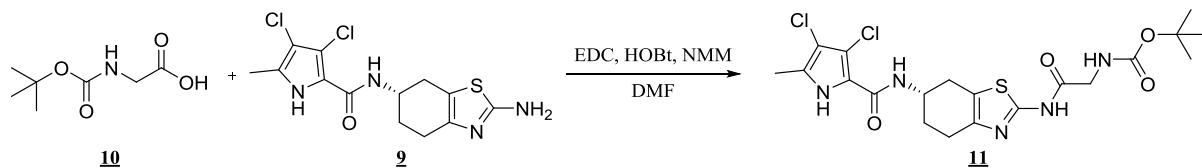
4.2.2 Sinteza (S)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamida



Reakcijo smo izvedli po splošnem sinteznem postopku 1 iz spojine **7** (0,973 g, 5,02 mmol, 1 ekv.), spojine **8** (0,848 g, 5,02 mmol, 1 ekv.), DMF (15 mL), EDC (1,155 g, 6,02 mmol, 1,2 ekv.), HOBT (0,882 g, 6,53 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (1,09 mL, 10,04 mmol, 2 ekv.). Dobili smo 0,962 g spojine **9**.

(S)- <i>N</i> -(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid		
Elementna sestava	C ₁₃ H ₁₄ Cl ₂ N ₄ OS	M _r = 345,24
Izgled spojine	Rumena oborina	
Izkoristek	55,5 %	
Retencijski faktor (R _f)	0,38 (DKM : MeOH = 9 : 1)	
Tališče	189 - 192 °C	
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1.81-1.89 (m, 1H, H _A -7), 1.90-1.99 (m, 1H, H _B -7), 2.18 (s, 3H, CH ₃), 2.53-2.60 (m, 3H, H _A -4, H-5), 2.83 (dd, 1H, J ₁ = 15.5 Hz, J ₂ = 5.1 Hz, H _B -4), 4.17-4.25(m, 1H, CHNH), 6.70 (s, 2H, NH ₂), 7.27 (d, 1H, J = 7.8 Hz, CONH), 12.02 (s, 1H, NH) ppm	
IR (ATR)	v3192, 1627, 1574, 1519, 1446, 1402, 1371, 1300, 1270, 1233, 1091, 1050, 988, 928, 786, 776, 759, 711, 649, 636, 598, 574, 559, 529, 516, 501 cm ⁻¹	

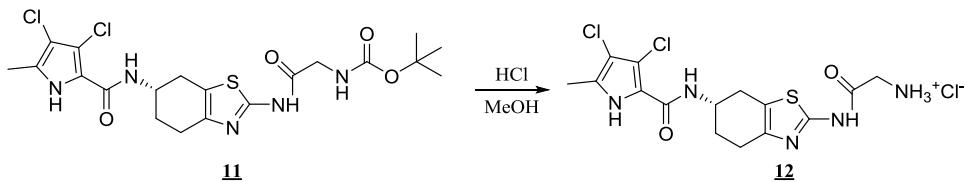
4.2.3 Sintezaterc-butil (S)-(2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)karbamata



Reakcijo smo izvedli po splošnem sinteznem postopku 1 iz spojine **10** (0,294 g, 1,68 mmol, 1 ekv.), spojine **9** (0,580g, 1,68 mmol, 1 ekv.), DMF (20 mL), EDC (0,386 g, 2,02 mmol, 1,2 ekv.), HOBr (0,295 g, 2,18 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (0,37 mL, 3,36 mmol, 2 ekv.). Produkt ni bil čist, zato smo po izolaciji izvedli še kolonsko kromatografijo z mobilno fazo DKM : MeOH = 30 : 1 in dobili 0,549 g spojine **11**.

<i>terc-butil (S)-(2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)karbamat</i>		
Elementna sestava	C ₂₀ H ₂₅ Cl ₂ N ₅ O ₄ S	M _r = 502,41
Izgled spojine	Rumena oborina	
Izkoristek	65,1 %	
Retencijski faktor (R_f)	0,83 (DKM : MeOH = 9 : 1)	
Tališče	221 - 224 °C	
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 1.40 (s, 9H, 3 x CH ₃), 1.92-1.99 (m, 2H, H-7), 2.19 (s, 3H, CH ₃), 2.69-2.71(m, 3H, H _A -4, H-5),3.02 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15.5 Hz, <i>J</i> ₂ = 5.1 Hz, H _B -4), 3.81 (d, 2H, <i>J</i> = 6.0Hz, COCH ₂ NH), 4.21-4.30(m, 1H, CHNH), 7.14 (t, 1H, <i>J</i> = 6.0 Hz, CH ₂ NHCOO), 7.33 (d, 1H, <i>J</i> = 7.8Hz, CONH), 11.95 (s, 1H, NH), 12.02 (s, 1H, NH) ppm	
IR (ATR)	ν1690, 1628, 1525, 1455, 1417, 1392, 1367, 1253, 1160, 1051, 1027, 943, 862, 779, 725, 645, 530, 513 cm ⁻¹	
HRMS (ESI) za C ₂₀ H ₂₄ Cl ₂ N ₅ O ₄ S ([M-H] ⁻)	izračunana masa:500,0926; izmerjenamasa: 500,0933	

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

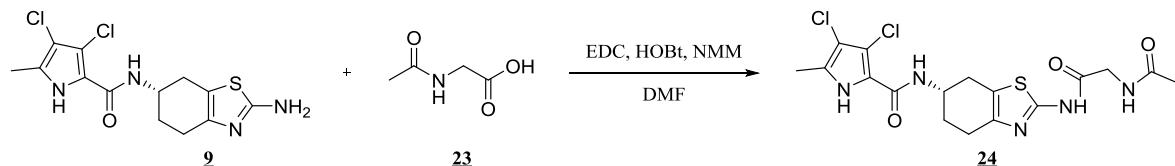


20 mL metanola smo dali v bučko, ki smo jo postavili na ledeno kopel in nato preko septuma z iglo dodali acetil klorid (0,21 mL, 2,95 mmol, 10 ekv.). Pustili smo mešati 30 min, da nastane plinasti HCl in medtem spojino **11** (0,148 g, 0,295 mmol, 1 ekv.) raztopili v 12 mL metanola. Nato smo preko septuma z iglo kvantitativno prenesli raztopino spojine **11** v bučko z raztopino HCl v metanolu. Reakcijsko zmes smo pustili na vodni kopeli še 1 uro, nato pa smo jo odstranili in mešali pri sobni temperaturi 2 dni. Konec reakcije smo določili s tankoplastno kromatografijo. Po uparevanju topila pod znižanim tlakom, smo dobili 0,125 g spojine **12**.

(S)-2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetan-1-aminijev klorid		
Elementna sestava	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₃ N ₅ O ₂ S	M _r = 437,75
Izgled spojine	Rjava oborina	
Izkoristek	96,8 %	
Retencijski faktor (R_f)	0,48 (DKM : MeOH = 9 : 1)	
Tališče	155 - 157 °C	
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ 1.90–2.06 (m, 2H, H-7), 2.20(s, 3H, CH ₃), 2.61-2.63 (m, 1H, H _A -5), 2.72-2.74 (m, 2H, H _A -4, H _B -5), 2.99-3.10 (dd, 1H, J ₁ = 15.8 Hz, J ₂ = 5.2 Hz, H _B -4), 3.87 (d, 2H, J = 5.8 Hz, COCH ₂ NH), 4.22-4.28(m, 1H, CHNH), 7.48 (d, 1H, J = 7.7 Hz, CONH), 8.28 (s, 3H, NH ₃ ⁺), 12.17 (s, 1H, NH), 12.46 (br s, 1H, NH) ppm	
IR (ATR)	v1726, 1623, 1595, 1541, 1459, 1427, 1414, 1247, 1209, 1097, 986, 936, 896, 879, 835, 781, 757, 733, 693, 654, 583, 552, 518 cm ⁻¹	

HRMS (ESI⁻) za C ₁₅ H ₁₆ Cl ₂ N ₅ O ₂ S ([M-H] ⁻)	izračunana masa: 400,0402; izmerjena masa: 400,0409
---	--

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

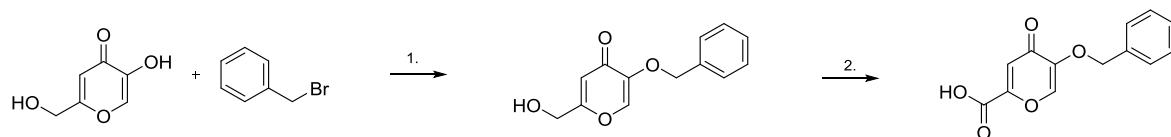


Reakcijo smo izvedli po splošnem sinteznem postopku 1 iz spojine **9** (0,150 g, 0,435 mmol, 1 ekv.), spojine **23** (0,051 g, 0,435 mmol, 1 ekv.), EDC (0,100 g, 0,522 mmol, 1,2 ekv.), HOBr (0,076 g, 0,566 mmol, 1.3 ekv.), NMM (0,09 mL, 0,870 mmol, 2 ekv.) in DMF (5 mL). Po izolaciji produkt ni bil čist, zato smo združili oborino, ki je nastala po dodatku etil acetata in ostanelek po koncu izolacije ter poskušali kristalizirati najprej iz DKM : MeOH = 20 : 1, nato pa še iz metanola. Dobili smo 0,101 g spojine **24**.

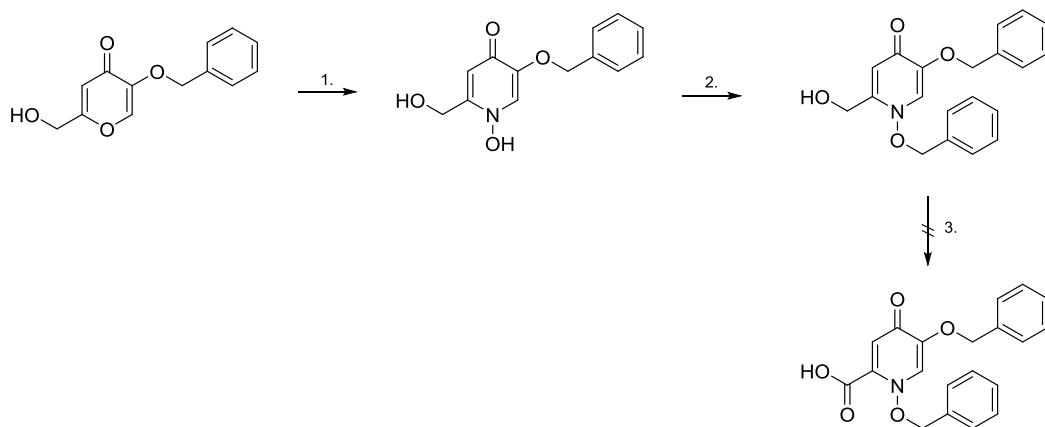
<i>(S)-N-(2-(2-acetamidoacetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-6-il)-3,4-dikloro-5-metil-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamid</i>		
Elementna sestava	C ₁₇ H ₁₉ Cl ₂ N ₅ O ₃ S	M _r = 444,33
Izgled spojine	Rumena oborina	
Izkoristek	52,3 %	
Retencijski faktor (R_f)	0,29 (DKM : MeOH = 9 : 1)	
Tališče	168 – 171 °C	
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 1.88 (s, 3H, COCH ₃), 1.95-2.01 (m, 2H, H-7), 2.19 (s, 3H, CH ₃), 2.67-2.75(m, 3H, H _A -4, H-5), 3.01 (dd, 1H, J ₁ = 16.2 Hz, J ₂ = 4.7 Hz, H _B -4), 3.94 (d, 2H, J = 5.8Hz, COCH ₂ NH), 4.22-4.31(m, 1H, CHNH), 7.32 (d, 1H, J = 7.8 Hz, CHNH), 8.27 (t, 1H, J = 5.8 Hz, COCH ₂ NH), 11.99 (s, 1H, NH), 12.02 (s, 1H, NH) ppm	

IR (ATR)	ν 1627, 1525, 1479, 1437, 1411, 1374, 1356, 1310, 1265, 1236, 1197, 1081, 1032, 973, 779, 761, 690, 643, 631 cm^{-1}
HRMS (ESI) za $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_3\text{SCl}_2$ ($[\text{M}-\text{H}]^+$)	izračunana masa: 442,0507; izmerjena masa: 442,0496

4.3 SINTEZA SIDEROFOROV IZ KOJIČNE KISLINE

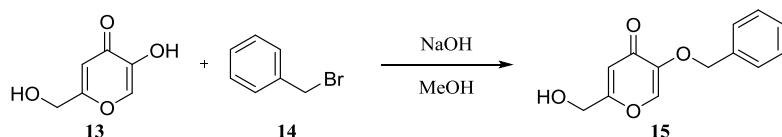


Shema 9: Shema sinteze prekurzorjasiderofora 1.



Shema 10: Shema sinteze prekurzorja siderofora 2.

4.3.1 Sinteza 5-(benziloksi)-2-(hidroksimetil)-4H-piran-4-ona



Spojino **13** (10,0 g, 70,36 mmol, 1 ekv.) smo suspendirali v 80 mL metanola. Najprej smo dodali 10M natrijev hidroksid (7,74 mL, 77,39 mmol, 1,1 ekv.), nato pa še benzilbromid(**14**) (9,61 mL, 80,91 mmol, 1,15 ekv.) po kapljicah. Reakcijsko zmes smo segrevali na oljni kopeli pri 80°C čez noč. Naslednji dan smo reakcijsko zmes ohladili na

sobno temperaturo, uparili topilo in dodali aceton (12 mL) ter destilirano vodo (120 mL). Izpadla je oborina, ki smo jo odnučali in po sušenju v sušilniku (40°C) smo dobili 16,845 g spojine **15**. Matičnici smo dodali še nekaj destilirane vode (20 mL) in jo nato ekstrahirali z diklorometanom (3 x 50 mL). Združene organske faze smo sušili z natrijevim sulfatom, filtrirali in nato odparili topilo. Ponovno smo dodali aceton (1,2 mL) in destilirano vodo (12 mL) in oborino odfiltrirali s presesavanjem. Po sušenju v sušilniku (40°C) smo dobili še 0,265 g spojine **15**.

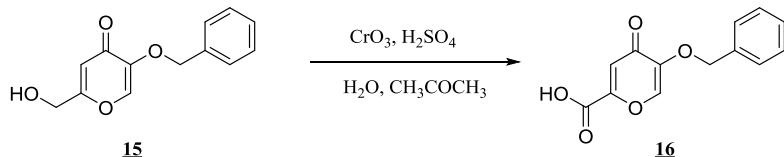
5-(benziloksi)-2-(hidroksimetil)-4H-piran-4-on		
Elementna sestava	C ₁₃ H ₁₂ O ₄	M _r = 232,24
Izgled spojine	Rumena oborina	
Izkoristek	99,0 %	
Retencijski faktor (R_f)	0,51 (DKM : MeOH = 9 : 1)	
Tališče	123 - 125 °C	
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ 4.48(s, 2H, CH ₂), 5.08 (s, 1H, CH ₂), 6.57 (s, 1H, piran-H), 7.31-7.42 (m, 5H, Ph), 7.56 (s, 1H, piran-H) ppm, signala za OH skupino v spektru ne vidimo	
IR (ATR)	v3319, 1643, 1601, 1587, 1501, 1455, 1443, 1327, 1257, 1234, 1197, 1148, 1077, 1018, 994, 946, 907, 865, 838, 778, 741, 695, 630, 584, 563, 530, 511 cm ⁻¹	

4.3.2 Splošni sintezni postopek 2

Izhodni alkohol (1 ekv.) smo raztopili v acetonu in bučko postavili na ledeno kopel (-5 °C). Kromov (IV) oksid (1,5 ekv.) smo raztopili v destilirani vodi, bučko postavili na ledeno kopel (-5 °C), nato pa dodali koncentrirano žveplovo(VI) kislino po kapljicah. Dodali smo še preostanek destilirane vode in mešanico kvantitativno prenesli v raztopino alkohola po kapljicah. Konec reakcije smo določili s tankoplastno kromatografijo. Oborino, ki je nastala med reakcijo, smo odnučali skozi plast Celita, matičnici pa uparili topilo. Preostanku smo dodali destilirano vodo in izpadla je oborina, ki smo jo sušili v sušilniku (40°C). Vodno fazo smo ekstrahirali z etil acetatom. Združene organske faze smo sprali z 2M NaOH in vodno fazo nato nakisali s koncentrirano HCl do pH ≈2 in ponovno

ekstrahirali z etil acetatom. Združene organske faze smo spirali z nasičeno raztopino natrijevega klorida, sušili z natrijevim sulfatom in filtrirali. Na koncu smo uparili topilo.

4.3.3 Sinteza 5-(benziloksi)-4-okso-4H-piran-2-karboksilne kisline (Siderofor 1)

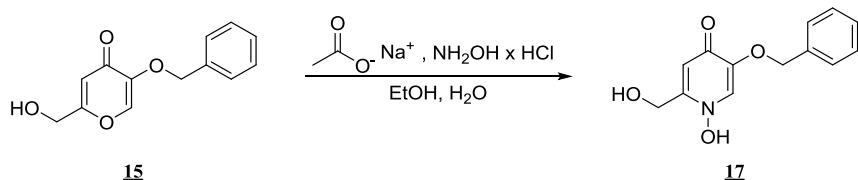


Reakcijo smo izvedli po splošnem sinteznem postopku 2 iz spojine **15** (5,0 g, 21,46 mmol, 1 ekv.), acetona (225 mL), kromovega (IV) oksida (3,219 g, 32,19 mmol, 1,5 ekv.), destilirane vode (4,5 mL + 2,0 mL) in koncentrirane žveplove kisline (2,8 mL). Reakcijsko zmes smo mešali 3 ure. Produkt smo izolirali z dodatkom 40 mL destilirane vode, pri čemer je izpadla oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem in po sušenju v sušilniku (40°C) dobili 3,437 g spojine **16**. Matičnico smo ekstrahirali z etil acetatom (2 x 40 mL) in združene organske faze spirali z 2M NaOH (20 mL). Vodno fazo smo nakisali skoncentrirano HCl in jo ponovno ekstrahirali z etil acetatom (2 x 40 mL). Združene organske faze smo spirali še z nasičeno raztopino natrijevega klorida (1 x 20 mL) in z natrijevim sulfatom. Po filtraciji in uparevanju topila, smo dobili še 0,078 g spojine **16**.

5-(benziloksi)-4-okso-4H-piran-2-karboksilna kislina		
Elementna sestava	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	M _r = 246,22
Izgled spojine	Rumena oborina	
Izkoristek	66,5 %	
Retencijski faktor (R_f)	0,1 (DKM : MeOH = 9 : 1)	
Tališče	162 - 164 °C	
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ 4.99 (s, 2H, OCH ₂ Ph), 6.93 (s, 1H, piran-H), 7.37-7.45 (m, 5H, Ar-H), 8.37 (s, 1H, piran-H) ppm, signala za COOH v spektru ne vidimo	
IR (ATR)	ν 1726, 1623, 1595, 1541, 1459, 1427, 1247, 1209, 1096, 1031, 986, 936, 896, 879, 835, 781, 756, 733, 693, 654, 583, 552, 518 cm ⁻¹	

HRMS (ESI)⁻ za C ₁₃ H ₉ O ₅ ([M-H] ⁻)	izračunana masa: 245,0450; izmerjena masa: 245,0451
---	--

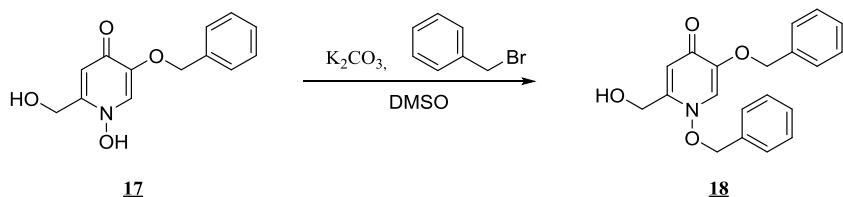
4.3.4 Sinteza 5-(benziloksi)-1-hidroksi-2-(hidroksimetil)piridin-4(1H)-ona



Spojino **15** (2,0 g, 8,58 mmol, 1ekv.) smo suspendirali v 3 mL etanola in 20 mL destilirane vode. Nato smo dodali hidroksilamin hidroklorid (4,17 g, 60,06 mmol, 7 ekv.) in natrijev acetat (5,279 g, 64,35 mmol, 7,5 ekv.) ter reakcijsko zmes segrevali na oljni kopeli pri 60°C čez vikend. Po tem času smo reakcijsko zmes ohladili na sobno temperaturo in uparili topilo. Oborino, ki je izpadla, smo odnučali in sprali z malo vode. Po sušenju v sušilniku (40°C) smo dobili 0,592 g spojine **17**.

<i>5-(benziloksi)-1-hidroksi-2-(hidroksimetil)piridin-4(1H)-on</i>		
Elementna sestava	C ₁₃ H ₁₃ NO ₄	M _r = 247,25
Izgled spojine	Zlato rumena oborina	
Izkoristek	27,9 %	
Retencijski faktor (R_f)	0,25 (DKM : MeOH = 9 : 1)	
Tališče	162 - 165 °C	
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 4.46 (s, 2H, CH ₂), 5.13 (s, 2H, CH ₂), 6.86 (s, 1H, piran-H), 7.33-7.47 (m, 5H, Ph), 7.98 (s, 1H, piran-H) ppm, signalov za OH skupini v spektru ne vidimo	
IR (ATR)	ν1726, 1623, 1595, 1541, 1459, 1427, 1248, 1210, 1097, 1002, 986, 936, 896, 879, 835, 781, 758, 733, 693, 654, 583, 552, 519 cm ⁻¹	
HRMS (ESI)⁻ za C ₁₃ H ₁₂ NO ₄ [M-H] ⁻	izračunana masa: 246,0766; izmerjena masa: 246,0762	

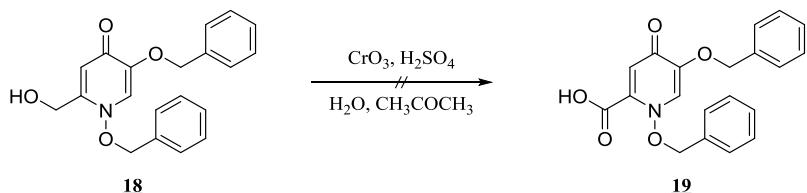
4.3.5 Sinteza 1,5-bis(beziloksi)-2-(hidroksimetil)piridin-4(1*H*)-ona



Spojino **17** (0,550 g, 2,22 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 2,75 mL dimetilsulfoksida (DMSO), dodali kalijev karbonat (0,368 g, 2,664 mmol, 1,2 ekv.) in benzil bromid (0,29 mL, 2,442 mmol, 1,1 ekv.) po kapljicah ter mešalipri sobni temperaturi 2 uri. V reakcijski zmesi je nastala oborina, ki je izginila po dodatku 15 mL destilirane vode. Vodno fazo smo ekstrahirali z etil acetatom (3 x 20 mL), združene organske faze pa nato spirali z destilirano vodo (2 x 10 mL), sušili z natrijevim sulfatom in filtrirali. Ko smo uparili topilo, smo dobili oljnati preostanek, ki ni bil čist, zato smo izvedli kolonsko kromatografijo v mobilni fazi DKM : MeOH = 20 : 1. Dobili smo 0,372 g spojine **18**.

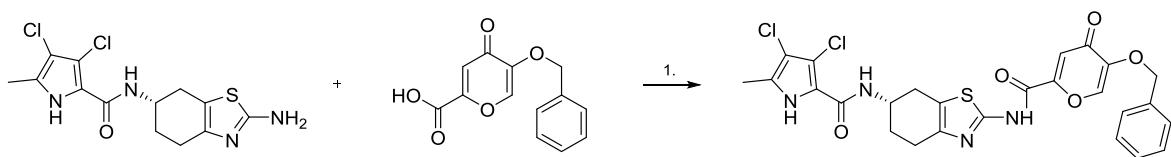
<i>1,5-bis(beziloksi)-2-(hidroksimetil)piridin-4(1H)-on</i>		
Elementna sestava	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄	M _r = 337,38
Izgled spojine	Rumen oljnati produkt	
Izkoristek	49,7 %	
Retencijski faktor (R_f)	0,27 (DKM : MeOH = 9 : 1)	
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ 4.40 (d, 2H, J = 5.9 Hz, CH ₂ OH), 5.01 (s, 2H, CH ₂ Ph), 5.25(s, 2H, CH ₂ Ph), 5.60 (t, 1H, J = 5.9 Hz, CH ₂ OH), 6.13 (s, 1H, piran-H), 7.34-7.52 (m, 10H, 2 x Ph), 8.02 (s, 1H, piran-H) ppm	
IR (ATR)	ν1611, 1557, 1524, 1455, 1381, 1357, 1277, 1213, 1177, 1105, 1078, 1030, 980, 912, 854, 750, 644, 631, 596, 543 cm ⁻¹	
HRMS (ESI⁺) za C₂₀H₂₀NO₄[M+H]⁺	izračunana masa: 338,1392; izmerjena masa: 338,1394	

4.3.6 Poskus sinteze 1,5-bis(beziloksi)-4-okso-1,4-dihidropiridin-2-karboksilne kisline (Siderofor 2)

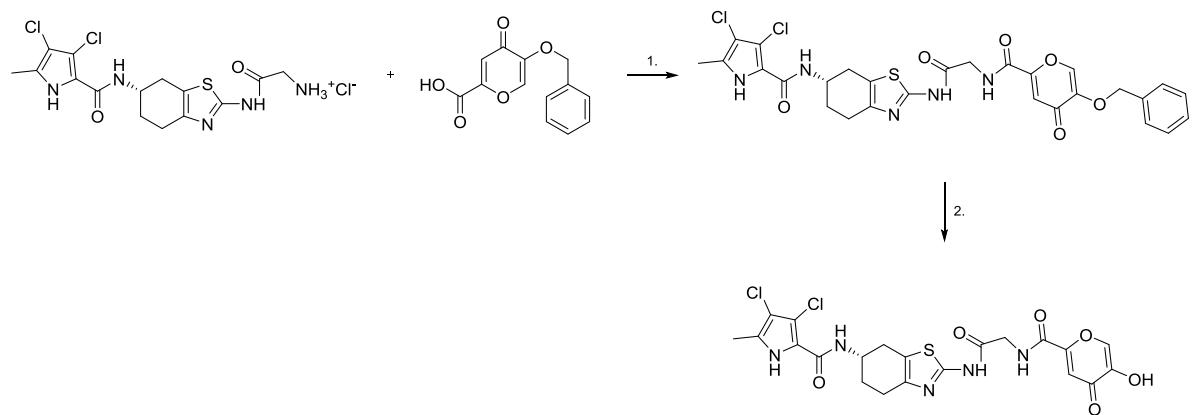
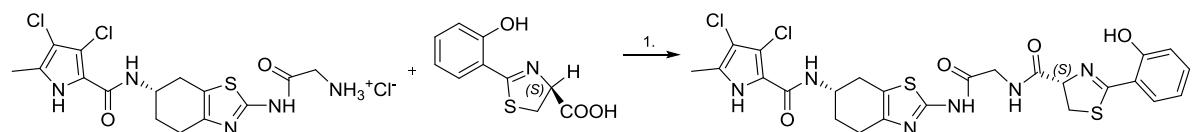
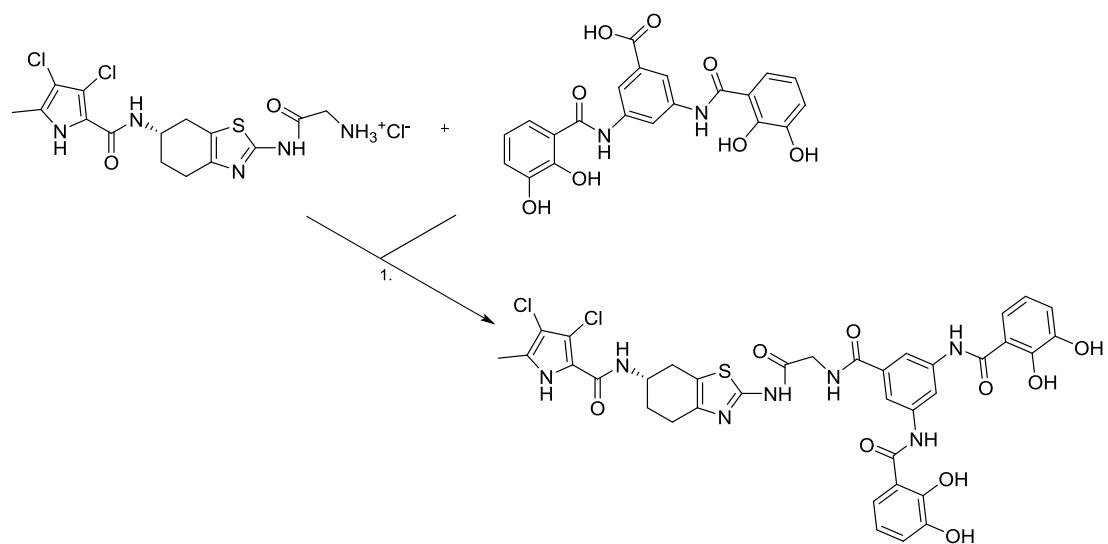


Reakcijo smo izvedli po splošnem sinteznem postopku 2 iz spojine **18** (0,180 g, 0,514 mmol, 1 ekv.), acetona (8,1 mL), kromovega (IV) oksida (0,077 g, 0,771 mmol, 1,5 ekv.), destilirane vode (0,16 mL + 0,07 mL) in koncentrirane žveplove kisline (0,10 mL). Reakcija ni potekla, zato smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. Oborino smo odfiltrirali skozi plast Celita, matičnici pa uparili topilo. Produkt smo izolirali tako, da smo dodali 1,5 mL destilirane vode in jo ekstrahirali zetil acetatom (30 mL). Organsko fazo smo spirali 2M NaOH (20 mL), nato pa vodno fazo nakisalili koncentrirano HCl. Ponovno smo vodno fazo ekstrahirali etil acetatom (2 x 20 mL), združene organske faze pa smo nato spirali z nasičeno raztopino natrijevega klorida (1 x 20 mL) in z natrijevim sulfatom. Oborina, ki je nastala pri dodatku destilirane vode, je bila lepljiva gmota, zato smo jo raztopili v etil acetatu in nadaljevali izolacijo. Ko smo uparili topilo, smo dobili 0,023 g produkta, ampak je bila na kromatogramu še vidna lisa v vodni fazi. Šele ko smo uparili vodo in trdi preostanek ekstrahirali z vročim etil acetatom, smo dobili še 0,052 g produkta. NMR je pokaal, da dobljeni rjav oljnati produkt ni spojina **19**.

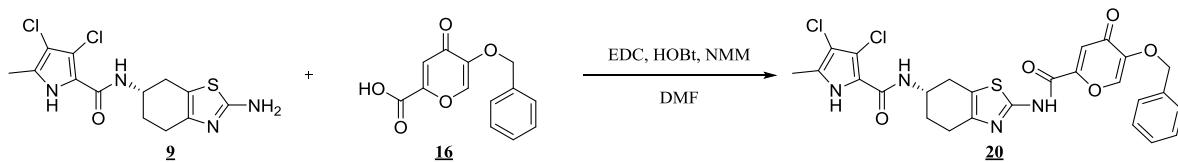
4.4 SINTEZA KONJUGATOV



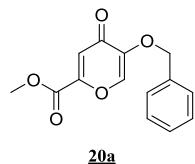
Shema 11: Shema sinteze konjugata 1.

**Shema 12:** Shema sinteze konjugata 2.**Shema 13:** Shema sinteze konjugata 3.**Shema 14:** Shema sinteze konjugata 4.

4.4.1 Poskus sinteze (*S*)-*N*-(2-(5-(beziloksi)-4-okso-4*H*-piran-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-3,4-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamida (Konjugat 1)

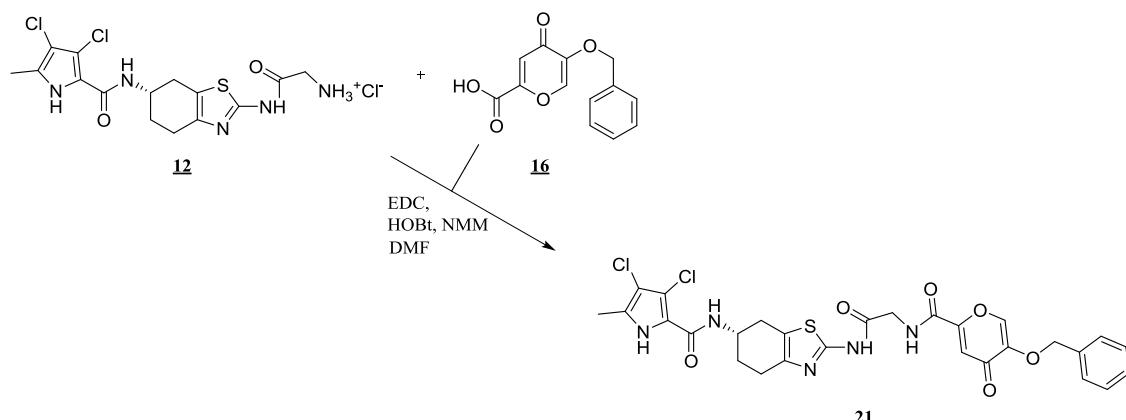


Reakcijo smo izvedli po splošnem sinteznem postopku 1 iz spojine **9** (0,150 g, 0,435 mmol, 1 ekv.), spojine **16** (0,107 g, 0,435 mmol, 1 ekv.), EDC (0,100 g, 0,522 mol, 1,2 ekv.), HOBr (0,076 g, 0,566 mmol, 1,3 ekv.), NMM (0,09 mL, 0,870 mmol, 2 ekv.) in DMF (8 mL). Po izolaciji produkt ni bil čist, zato smo izvedli še kolonsko kromatografijo z mobilno fazo DKM : MeOH = 20 : 1. Dobili smo 0,065 g produkta, ampak je NMR pokazal, da to ni spojina **20**, ampak stranski produkt **20a**.



metil 5-(benziloksi)-4-okso-4 <i>H</i> -piran-2-karboksilat		
Elementna sestava	C ₁₄ H ₁₂ O ₅	M _r = 260,25
Izgled spojine	Oranžni kristali	
Retencijski faktor (R_f)	0,63 (DKM : MeOH = 20 : 1)	
Tališče	103 – 106 °C	
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 3.89 (s, 3H, CH ₃), 4.99 (s, 2H, CH ₂), 6.99 (s, 1H, piran-H), 7.37-7.45 (m, 5H, Ar-H), 8.41 (s, 1H, piran-H) ppm	
IR (ATR)	v1741, 1644, 1619, 1586, 1450, 1383, 1310, 1250, 1199, 1100, 1013, 957, 936, 901, 880, 857, 812, 783, 770, 733, 693, 662, 579, 554cm ⁻¹	
HRMS (ESI⁺) za C₁₄H₁₃O₅([M+H]⁺)	izračunana masa: 261,0763; izmerjena masa: 261,0770	

4.4.2 Sinteza (*S*)-*N*-(2-(2-(5-(beziloksi)-4-okso-4*H*-piran-2-karboksamido)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamida

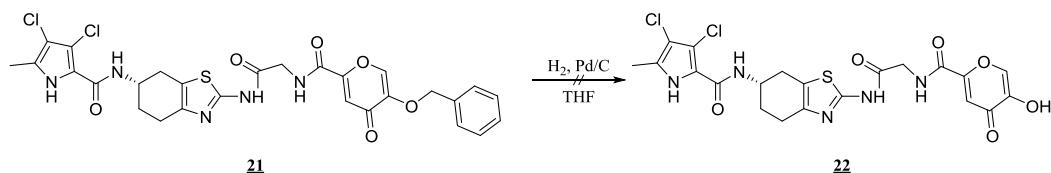


Reakcijo smo izvedli po splošnem sinteznem postopku 1 iz spojine **12** (0,125 g, 0,287 mmol, 1 ekv.), spojine **16** (0,071 g, 0,287 mmol, 1 ekv.), EDC (0,066 g, 0,344 mmol, 1,2 ekv.), HOBr (0,050 g, 0,373 mmol, 1.3 ekv.), NMM (0,06 mL, 0,574 mL, 2 ekv.) in DMF (8 mL). Pri izolaciji se nam je po dodatu etil acetata produkt oboril in po sušenju v sušilniku (40°C) smo dobili 0,032 g spojine **21**. Po končani izolaciji, ki smo jo nadaljevali po splošnem sinteznem postopku 1, smo dobili nečist produkt, ki smo ga očistili s kristalizacijo iz metanola. Dobili smo še 0,024 g spojine **21**.

<i>(S</i>)- <i>N</i> -(2-(2-(5-(beziloksi)-4-okso-4 <i>H</i> -piran-2-karboksamido)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid		
Elementna sestava	C ₂₈ H ₂₅ Cl ₂ N ₅ O ₆ S	M _r = 630,50
Izgled spojine	Rumena oborina	
Izkoristek	30,9 %	
Retencijski faktor (R_f)	0,43 (DKM : MeOH = 9 : 1)	
Tališče	182 – 185 °C	
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 1.91-2.05(m, 2H, H-7), 2.19 (s, 3H, CH ₃), 2.70-2.78(m, 3H, H _A -4, H-5), 2.99-3.05 (m, 1H, H _B -4), 4.13 (d, 2H, <i>J</i> = 6.0 Hz, COCH ₂ NH), 4.22-4.31(m, 1H, CHNH), 5.03 (s, 2H, OCH ₂ Ph), 6.91 (s, 1H, piran-H), 7.33 (d, 1H, <i>J</i> = 7.6 Hz, CHNH), 7.36-7.47 (m, 5H, Ph), 8.32 (s, 1H, piran-H), 9.31 (t, 1H, <i>J</i> = 6.0 Hz, COCH ₂ NH), 12.02 (s, 1H, NH), 12.13 (s, 1H, NH) ppm	

IR (ATR)	v1632, 1572, 1525, 1408, 1376, 1236, 1190, 971, 920, 779, 763, 697, 545 cm ⁻¹
HRMS (ESI⁻) za C ₂₈ H ₂₄ N ₅ O ₆ SCl ₂ ([M-H] ⁻)	izračunana masa: 628,0824; izmerjena masa: 628,0812

4.4.3 Poskus sinteze (*S*)-3,4-dikloro-*N*-(2-(2-(5-hidroksi-4-okso-4*H*-piran-2-karboksamido)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamida (Konjugat 2)

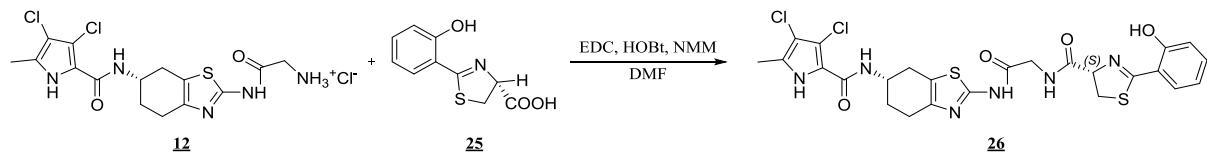


Spojino **21** (0,044 g, 0,070 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 20 mL THFin prepihalo z argonom. Nato smo dodali Pd/C (0,013 g, ≈ 30%), ki potrebuje inertno atmosfero in začeli dovajati vodik. V reakcijski zmesi ni bilo spremembe niti po dodatku še enkratne količine paladija, dodatku etanola in zamenjavi topila za ocetno kislino, ki ima običajno najhitrejšo kinetiko pri katalitskem hidrogenirjanju. Reakcije ni potekla.

4.4.4 Splošni sintezni postopek 1a

Izhodno kislino (1 ekv.) smo raztopili v DMF in bučko postavili na ledeno kopel (0°C). Dodali smo izhodni amin (1 ekv.), raztopljen v ustrezeni količini DMF in NMM (2 ekv.). Nato smo dodali EDC (1,2 ekv.) in HOBr (1,3 ekv.) ter mešali na ledeni kopeli čez noč. Izolacijo smo izvedli tako, da smo uparili topilo, oljnat preostanek raztopili v etil acetatu (50 mL) in spirali z 1% citronsko kislino (2 x 25 mL) ter z nasičenima raztopinama natrijevega hidrogenkarbonata (2 x 25 mL) in natrijevega klorida (1 x 25 mL). Po sušenju z natrijevim sulfatom in sledeči filtraciji smo odparili topilo.

4.4.5 Sinteza (S)-N-(2-(((S)-6-(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)-2-(2-hidroksifenil)-4,5-dihidrotiazol-5-karboksamida(Konjugat 4)

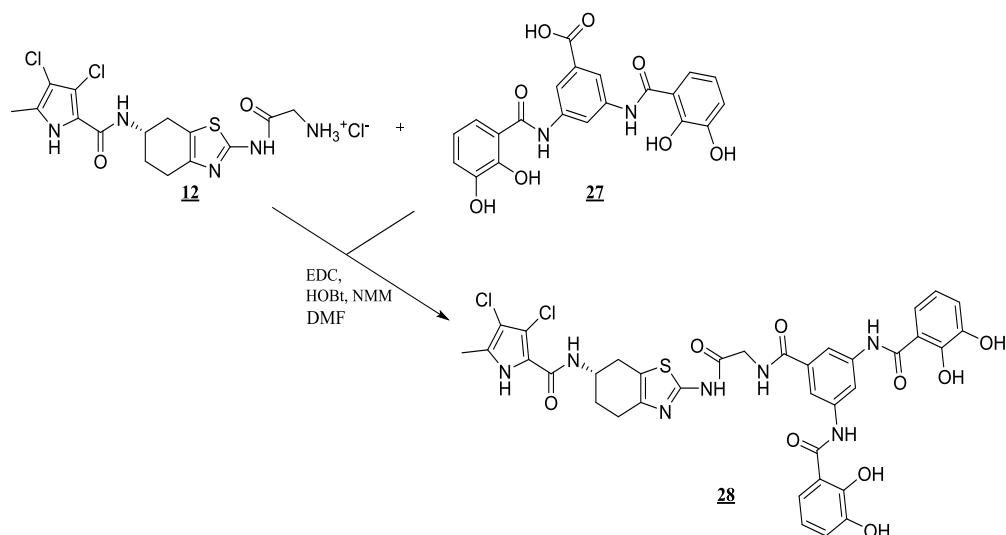


Reakcijo smo izvedli po splošnem sinteznem postopku 1a iz spojine **12** (0,100 g, 0,230 mmol, 1 ekv.), spojine **25** (0,051 g, 0,230 mmol, 1 ekv.), EDC (0,053 g, 0,276 mmol, 1,2 ekv.), HOBT (0,040 g, 0,299 mmol, 1,3 ekv.), NMM (0,05 mL, 0,460 mmol, 2 ekv.) in DMF (6 mL). Po koncu izolacije smo dobili nečist produkt, zato smo ga očistili s kolonsko kromatografijo. Najprej smo uporabili mobilno fazo DKM : MeOH = 30 : 1, nato pa še DKM : MeOH = 9 : 1. Dobili smo 0,104 g spojine **26**.

<i>(S)-N-(2-(((S)-6-(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)-2-(2-hidroksifenil)-4,5-dihidrotiazol-5-karboksamid</i>		
Elementna sestava	C ₂₅ H ₂₄ Cl ₂ N ₆ O ₄ S ₂	M _r = 607,53
Izgled spojine	Rumena oborina	
Izkoristek	74,4 %	
Retencijski faktor (R_f)	0,52 (DKM : MeOH = 9 : 1)	
Tališče	119 - 122 °C	
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 1.92-2.01 (m, 2H, H-7), 2.18 (s, 3H, CH ₃), 2.63-2.77 (m, 3H, H _A -4, H-5), 3.02 (dd, 1H, J_1 = 15.6 Hz, J_2 = 5.0 Hz, H _B -4), 3.59(dd, 1H, J_1 = 11.1 Hz, J_2 = 8.4 Hz, tiazolin-CH _{2A}), 3.71 (dd, 1H, J_1 = 11.1 Hz, J_2 = 9.6 Hz, tiazolin-CH _{2B}), 4.06 (s, 2H, COCH ₂ NH), 4.21-4.30 (m, 1H, CHNH), 5.43 (dd, 1H, J_1 = 9.6 Hz, J_2 = 8.4 Hz, tiazolin-CH), 6.95-7.02 (m, 2H, 2 x Ar-H), 7.33 (d, 1H, J = 7.8Hz, CHNH), 7.44-7.51 (m, 2H, 2 x Ar-H), 8.63 (t, 1H, J = 5.7 Hz, COCH ₂ NH), 12.02 (s, 1H, NH/OH), 12.07 (s, 1H, NH/OH), 12.08 (s, 1H, NH/OH) ppm	

IR (ATR)	v1621, 1571, 1525, 1481, 1376, 1236, 1191, 1121, 1067, 1033, 957, 824, 783, 751, 685, 571, 534 cm ⁻¹
HRMS (ESI) za C ₂₅ H ₂₃ N ₆ O ₄ S ₂ Cl ₂ ([M-H] ⁻)	izračunana masa: 605,0599; izmerjena masa: 605,0593

4.4.6 Sinteza (*S*)-N,N'-(5-((2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)karbamoil)-1,3-fenilen)bis(2,3-dihidroksibenzamida) (Konjugat 5)



Reakcijo smo izvedli po splošnem sinteznem postopku 1a iz spojine **12** (0,091 g, 0,209 mmol, 1 ekv.), spojine **27** (0,089 g, 0,209 mmol, 1 ekv.), EDC (0,048 g, 0,251 mmol, 1,2 ekv.), HOBT (0,037 g, 0,272 mmol, 1,3 ekv.), NMM (0,05 mL, 0,418 mmol, 2 ekv.) in DMF (5 mL). Po dodatku etil acetata in 1% citronske kisline smo dobili oborino, ki smo jo odnučali in kristalizirali iz metanola (10 mL). Po sušenju v sušilniku (40°C) smo dobili 0,040 g spojine **28**.

(S)-N,N'-(5-((2-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)karbamoil)-1,3-fenilen)bis(2,3-dihidroksibenzamid)

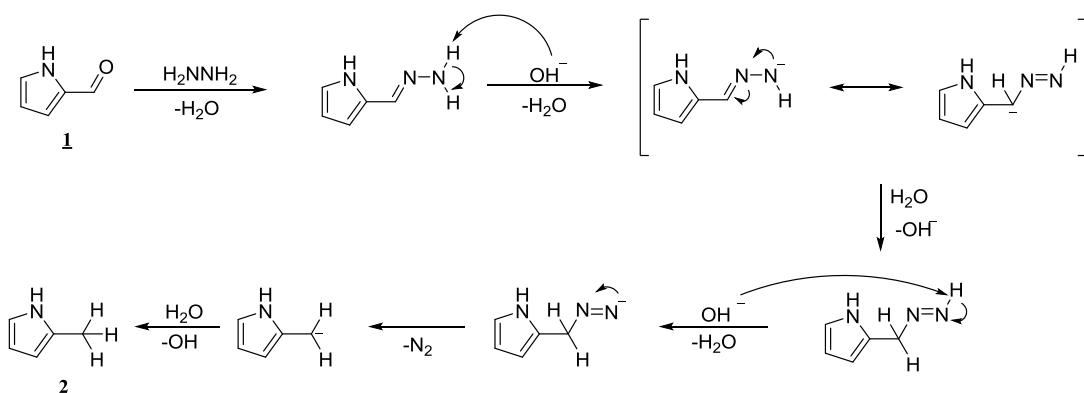
Elementna sestava	C ₃₆ H ₃₁ Cl ₂ N ₇ O ₉ S	M _r = 808,64
Izgled spojine	Rjava oborina	
Izkoristek	23,7 %	
Retencijski faktor (R_f)	0,79 (DKM : MeOH = 9 : 1)	
Tališče	Več kot 300 °C	
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ 1.91-2.01 (m, 2H, H-7), 2.18 (s, 3H, CH ₃), 2.68-2.76(m, 3H, H _A -4, H-5), 2.99-3.04 (m, 1H, H _B -4), 4.16-4.27 (m, 3H, COCH ₂ NH, CHNH), 6.80-7.02 (m, 3H), 7.33-7.51 (m, 3H), 7.98-8.04 (m, 2H), 8.33-8.39 (m, 1H), 8.90-8.92 (m, 1H), 9.50 (br s, 1H), 10.60 (br s, 1H), 11.63 (br s, 1H), 12.02 (s, 1H), 12.12 (s, 1H) ppm, signali za nekatere NH in OH skupine niso vidni v spektru	
IR (ATR)	v1634, 1529, 1452, 1265, 1079, 852, 748, 678, 614, 545, 534 cm ⁻¹	
HRMS (ESI) za C₃₆H₃₀Cl₂N₇O₉S ([M-H]⁻)	izračunana masa: 806,1203; izmerjena masa: 806,1201	

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

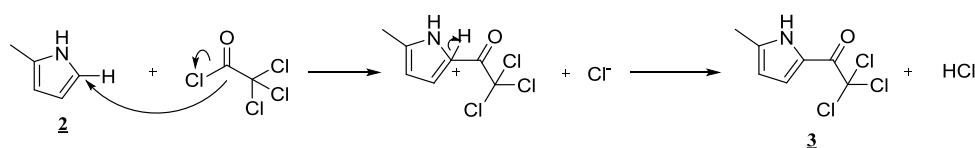
5.1.1 Sinteza izhodne kisline

Začeli smo s sintezo spojine **7**. Prva stopnja pri sintezi je bila Wolff-Kishnerjeva redukcija aldehyda do alkana (shema 14). Kondenzacija karbonilne skupine s hidrazinom tvori hidrazon, dodatek baze (KOH) pa povzroči redukcijo ogljika, ki je sklopljena z oksidacijo hidrazina do plinastega dušika (N_2). Pri tem nastane metilna skupinain dobimo spojino **2**.



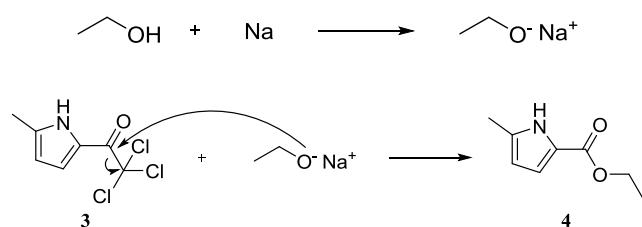
Shema 14: Mehanizem Wolff-Kishnerjeve redukcije (prirejeno po 27).

V drugi stopnji poteka elektrofilna aromatska substitucija na sp^2 -hibridiziranem ogljikovem atomu trikloroacetilklorida. Reakcija bi lahko potekla tudi na sp^3 -hibridiziranem atomu CH_2 , ampak z izbiro ustreznih topil, reagentov in reakcijskih pogojev vodimo reakcijo v smeri aciliranja in ne alkiliranja. S tem postopkom na pirolni obroč pripnemo trikloroacetilno skupino in dobimo spojino **3** (28).



Shema 15: Mehanizem elektrofilne aromatske substitucije (prirejeno po 29).

V tretji stopnji tvorimo etilni ester z natrijevim etoksidom, ki ga pripravimo tako, da previdno dodamo natrij v etanol in pustimo 30 min, da poteče redoks reakcija, pri kateri nastane še plinasti vodik. Natrijev etoksid je močna baza in dober nukleofil, ki lahko sodeluje v nukleofilnih substitucijah s halogenoalkani (4).

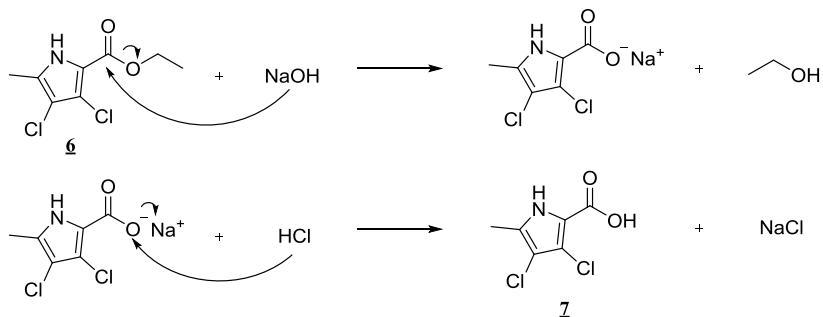


Shema 16: Tvorba natrijevega etokсида in tvorba estra.

Nato je sledilo kloriranje pirolnega obroča na mestih 3,4 in 5 s sulfurilkloridom v tetraklorometanu. Dodali smo tri ekvivalente sulfurilklorida glede na izhodno spojino, da je kloriranje poteklo na vseh treh mestih, saj ob dodatku enega ekvivalenta sulfurilklorida poteče monokloriranje, od dodatku dveh ekvivalentov pa dobimo zmes monokloriranega, dikloriranega in trikloriranega produkta, ki jo je težko ločiti na posamezne spojine (5).

V četrti stopnji sinteze izhodne kisline smo odstranili klor iz klorometilenske skupine na mestu 5 s katalitskim hidrogeniranjem (6). Reakcija v tej stopnji ni potekla najboljše, čeprav smo uporabljali optimiziran postopek, saj produkt ni bil čist in smo morali izvajati kolonsko kromatografijo in kristalizacijo, izkoristek pa je bil po čiščenju zelo nizek.

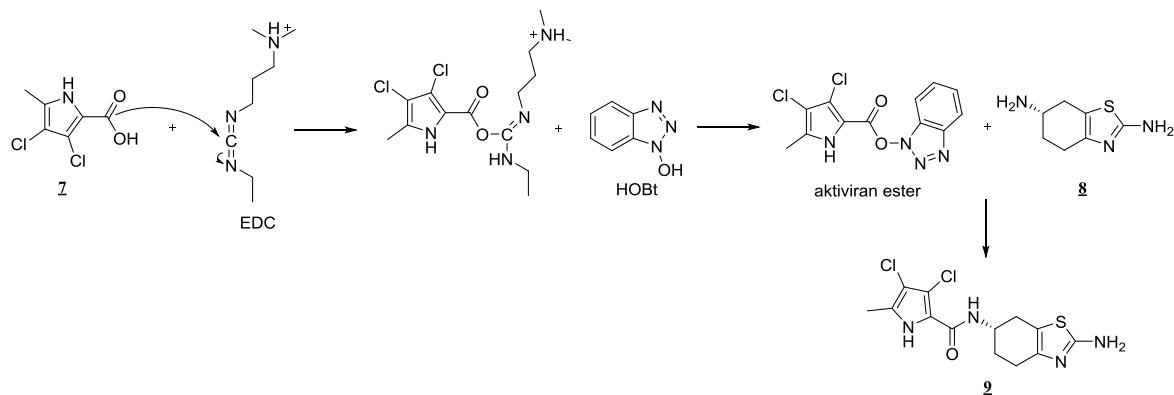
V zadnji stopnji sinteze smo iz estra tvorili kislino s postopkom alkalne hidrolize, da smo dobili spojino 7. Uporabili smo natrijev hidroksid, ki hidrolizira ester do etanola in ustrezne natrijeve soli karboksilne kisline. V postopku izolacije smo dobljeno sol pretvorili v kislino z dodatkom klorovodikove kisline, pri čemer se je produkt oboril.



Shema 17: Tvorba natrijevega karboksilata in njegova pretvorba v karboksilno kislino.

5.1.2 Sinteza zaviralcev DNA-giraze B

Nato smo se lotili sinteze zaviralca DNA-giraze B 1. V prvi stopnji smo izvedli sklopitev izhodne kisline in ustreznega amina. Le-ta ima sicer dve aminski skupini, ampak je alifatska aminska skupina na mestu 6 veliko bolj nukleofilna kot aromatska aminska skupina na mestu 2 tiazolnega obroča, zato reakcija poteče samo na želeni funkcionalni skupini in uvedba zaščitne skupine ni potrebna. Za reakcijo smo uporabili EDC, ki je aktivacijski reagent in pretvori kislino v aktiviran ester, da reakcija nukleofilne substitucije lažje poteče. Kot reagent smo uporabili tudi HOBT, ki je nukleofilni katalizator, pospeši reakcijo in prepreči morebitno racemizacijo (Shema 18), ter NMM, s katerim smo dosegli želeni $\text{pH} \approx 8$, ki je potreben za aktivacijo kisline.



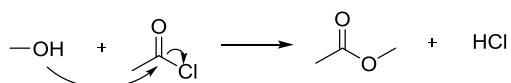
Shema 18: Mehanizem aktivacije kisline z EDC in HOBT in nastanek amida.

Kot topilo smo uporabili DMF, ki je zaradi dobre topnosti izhodnih spojin in reagentov najprimernejše topilo. Ker je spojina **9** šibka baza (ima prosto aminsko skupino na tiazolnem obroču), smo pri izolaciji namesto 10 % citronske kisline uporabili razredčeno 1 % raztopino. Če bi uporabili premočno kislino, bi se naša spojina lahko protonirala in pri izolaciji lahko deloma ostala v vodni fazi, pri čemer bi imeli velike izgube.

V naslednji stopnji sinteze smo izvedli sklopitev spojine **9** z Boc-glicinom, da smo dobili spojino **11**. Uporabili smo iste reagente in pogoje kot v prejšnji stopnji. Glicin ima po eni strani vlogo distančnika, na katerega bomo kasneje pripeli še siderofor, po drugi strani pa predvideno tudi sam interagira z ATP-vezavnim mestom bakterijske DNA-giraze B in s tem poveča zaviralno aktivnost. Zaščiten je z Boc-zaščitno skupino, ki je labilna v kislem in se lahko selektivno odščiti z acidolizo. Produkt, ki smo ga dobili, ni bil čist, zato

smo morali izvesti še kolonsko kromatografijo, pri kateri se je spojina **11** lepo ločila od ostalih nečistot.

V zadnji stopnji sinteze smo izvedli odščito naše končne spojine z acidolizo *tert*-butilkarbamata. Najprej smo *in situ* pripravili vodikov klorid, tako da smo v metanol dodali acetilklorid in pustili 30 minut, da reakcija poteče.



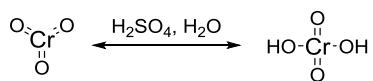
Shema 19: Mehanizem nastanka klorovodikove kislne *in situ*.

Ko je nastala raztopina $\text{HCl}_{(g)}$ v metanolu, smo dodali še spojino **11**. Prišlo je do cepitve karbamata in odstranitve zaščitne skupine. Spojina **12**, ki smo jo dobili, je bila v obliki soli.

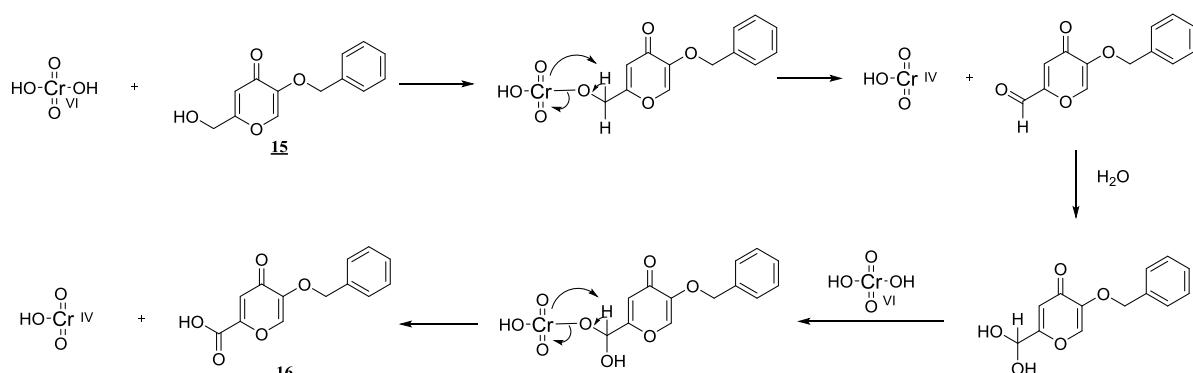
Spojina **24** je zelo podobna spojini **11**, le da je tu glicin zaščiten z acetamidno skupino, namesto z Boc-skupino. Acetamidna zaščitna skupina je bolj stabilna kot Boc, težje se odstrani in se zato tudi ne uporablja tako pogosto. Pri spojini **24** nismo izvedli odščite, ampak nas je zanimala encimska in protibakterijska aktivnost take spojine.

5.1.3 Sinteza sideroforov iz kojične kisline

V prvi stopnji sinteze smo na hidroksilno skupino na mestu 5 uvedli benzilno zaščitno skupino, nato pa primarni alkoholna mestu 2 z Jonesovo oksidacijo pretvorili v kislino, da smo dobili spojino **16** (prekurzor siderofora 1). Jonesov regent je mešanica kromovega trioksida in razredčene žveplove kisline, kar *in situ* tvori kromovo kislino. Ta v prisotnosti vode reagira z alkoholom do aldehida, ki z vodo tvori acetal in se nato s kromovo kislino oksidira do karboksilne kisline (30).



Shema 20: *In situ* nastanek Jonesovega reagenta (prirejeno po 30).



Shema 21: Mehanizem Jonesove oksidacije primarnega alkohola do karboksilne kisline s kromovo kislino (prirejeno po 30).

Sintezo drugega siderofora smo začeli iz spojine **15**, ki je že imela uvedeno zaščitno skupino na hidroksilni skupini na mestu 5. Namesto kisika smo v obroč uvedli dušik, na katerega je bila pripeta hidroksilna skupina, s pomočjo hidroksilamina.

Na hidroksilno skupino na dušiku smo v naslednji stopnji ponovno uvedli benzilno zaščitno skupino z benzil bromidom. Reakcija ni popolnoma potekla in izvesti smo morali kolonsko kromatografijo, da smo spojino **18** očistili.

V zadnji stopnji sinteze smo hoteli ponoviti Jonesovo oksidacijo nezaščitenega primarnega alkohola, ampak so se že pri izolaciji pojavili problemi. Sodeč po tankoplastni kromatografiji, je naš produkt ostajal v vodni fazi, zato smo poskusili ekstrakcijo izvesti z vročim etilacetatom, ampak smo na koncu dobili le malo produkta. Ko smo posneli NMR spekter, smo ugotovili, da izolirana snov ni želen produkt in da oksidacija ni potekla. Drugega siderofora tako nismo uporabili za sklopitev reakcije in sintezo načrtovanih konjugatov.

5.1.4 Sinteza konjugatov

Sintetizirali smo različne konjugate, in sicer smo spojini **20** in **21** pripravili po splošnem sinteznem postopku 1, spojini **26** in **28** pa smo pripravili po splošnem sinteznem postopku 1a. Pri splošnem sinteznem postopku 1 smo sklopitev izvedli tako, da smo izhodni karboksilni kislini dodali vse reagente, pustili 20 minut, da poteče aktivacija in šele nato dodali izhodni amin. Pri splošnem sinteznem postopku 1a, pa smo raztopini izhodnega amina najprej dodali izhodno kislino in NMM, šele nato pa EDC in HOBr. Modifikacijo

prvega postopka smo naredili zato, ker imamo pri spojinah **26** in **28** v strukturi hidroksilno skupino, ki lahko reagira kot kompetitivni nukleofil in bi lahko reakcija potekla v smeri nastanka estra, če bi najprej izvedli aktivacijo kisline. Z različnim vrstnim redom dodajanja reagentov smo se temu izognili, saj je po aktivaciji kisline nastali aktiviran ester reagiral z aminsko skupino, ki je boljši nukleofil od hidroksilne skupine in nastala je amidna vez. Na ta način smo se izognili zaščiti hidroksilne skupine pri izhodni kislini.

Spojini **21** in **28** smo po izolaciji še prekristalizirali iz metanola in dobili čista produkta, spojino **26** pa smo čistili s kolonsko kromatografijo, ker ni kristalizirala.

Reakcija do spojine **20** ni potekla tako, kot smo pričakovali, in smo namesto želenega produkta dobili stranski produkt, ki je metilni ester izhodne kisline (siderofora 1), saj na NMR-spektru vidimo dodatno CH_3 -skupino. Masni spekter dodatno potrjuje našo domnevo. Izhodna kislina se je s sklopitvenimi reagenti aktivirala, vendar reakcija z aminom ni potekla. Ko smo izvedli kolonsko kromatografijo, je namesto sklopitve s spojino **9** najbrž prišlo do preestrenja z metanolom, ki je bil del mobilne faze. Aminska skupina na spojini **9** je najbrž preslab nukleofil za reakcijo z nastalim aktiviranim estrom, ali pa bi bilo potrebno optimizirati reakcijske pogoje in zato sklopitev ni potekla tako, kot smo načrtovali.

Spojini **21** smo hoteli še odščititi hidroksilno skupino, na katero smo v prvi stopnji vezali benzilno zaščitno skupino. Reakcijo redukcije z vodikom in paladijem na ogljiku kot katalizatorjem smo izvajali po uveljavljenem postopku, ampak reakcija ni potekla, niti po zamenjavi topila ali dodatku večje količine katalizatorja. Razlog za neuspeh bi lahko bila prisotnost žveplovega atoma v strukturi izhodne spojine, ki lahko »zastrupi« katalizator, tako da se veže na njegovo površino. Prosta hidroksilna skupina je pomembna, da lahko naš konjugat kompleksira železo, saj bakterije v celico privzamejo samo siderofore, ki tvorijo komplekse. Zaščitna skupina, ki smo jo izbrali, ni bila najboljša, tako da bi morali izbrati drugo, ki jo lahko lažje odščitimo. Alternativen postopek bi lahko bil, da bi izvedli odščito siderofora pred sintezo konjugata in nato sklopitev izvedli po splošnem sinteznem postopku 1a.

6. SKLEP

Princip »Trojanskega konja« potencialno predstavlja rešitev za prehod celične membrane z zmanjšano prepustnostjo, ki se je razvila kot mehanizem odpornosti pri bakterijah. Siderofori, ki bakterijske celice oskrbujejo z železom, so esencialni za njihovo preživetje, zato njihov mehanizem privzema predstavlja odlično tarčo za dostavo protibakterijskih učinkovin, kot so zaviralci DNA-giraze. DNA-giraza je encim, pomemben pri podvojevanju DNA, ki pa ga ne najdemo pri sesalcih. Tako predstavlja odlično tarčo za razvoj novih protibakterijskih učinkovin s selektivno toksičnostjo. Konjugati siderofor-zaviralec DNA-giraze bi tako uspešno premostili zmanjšano prepustnost bakterijske membrane, poleg tega pa je vezavno mesto na encimu dovolj veliko, da odcep siderofora v celici ni potreben.

V okviru te naloge, smo sintetizirali pirolamidna zaviralca DNA-giraze B (spojini **12** in **24**) in poskusili sintetizirati dva siderofora iz kojične kisline. Pri prvem nismo naleteli na težave (spojina **16**), zadnja stopnja v sintezi drugega siderofora pa nam je povzročala težave (spojina **19**). Hidroksilno skupino na sideroforu smo hoteli oksidirati do kisline, ampak reakcija ni potekla. V zadnji stopnji smo tvorili še konjugate siderofor-zaviralec DNA-giraze, pri čemer smo spet naleteli na težave. Sklopitev zaviralca DNA-giraze in siderofora iz kojične kisline je potekla (spojina **21**), ko pa smo hoteli odščititi hidroksilno skupino, ki je potrebna za kompleksacijo železa, pa reakcija ni uspela (spojina **22**). Izbira benzilne zaščitne skupine tako ni bila najboljša, alternativno pa bi lahko poskusili odščito izvesti pred sklopitvijo z zavircem DNA-giraze. Prav tako ni potekla sklopitev spojine **9** z našim sideroforom, ampak je v reakciji nastal stranski produkt – metilni ester siderofora (spojina **20a**).

Sintetizirane potencialne nove inhibitorje DNA-giraze **B11**, **12** in **24** ter konjugate spojine **12** s siderofori (spojine **21**, **26** in **28**) bomo tudi biokemijsko ovrednotili. Določili bomo njihovo zaviralo aktivnost na izoliranem encimu DNA-girazi iz *E. coli* in njihovo protibakterijsko aktivnost na izbranih bakterijskih sevih. Odgovor, ali prpenanje siderofora izboljša protibakterijsko delovanje spojin, bo ključnega pomena za nadaljnje načrtovanje in optimizacijo tega strukturnega razreda spojin.

7. LITERATURA

1. Wencewicz T.A., Möllmann U., Long T.E., Miller M.J.: 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* 2009; 22: 633–648.
2. Mitton-Fry M.J., Arcari J.T., Brown M.F., Casavant J.M., Finegan S.M., Flanagan M.E., Gao H., George D.M., Gerstenberger B.S., Han S., Hardink J.R., Harris T.M., Hoang T., Huband M.D., Irvine R, Lall M.S., Lemmon M., Li C., Lin J., McCurdy S.P., Mueller J.P., Mullins L., Niosi M., Noe M.C., Pattavina D., Penzien J., Plumer M.S., Risley H., Schuff B.P., Shanmugasundaram V., Starr J.T., Sun J., Winton J., Young J.A.: Novel monobactams utilizing a siderophore uptake mechanism for the treatment of gram-negative infections. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2012; 22: 5989–5994.
3. Basarab G.S., Manchester J.I., Bist S., Boriack-Sjodin P.A., Dangel B., Illingworth R., Sherer B.A., Sriram S., Uria-Nickelsen M., Eakin A.E.: Fragment-to-hit-to-lead discovery of a novel pyridylurea scaffold of ATP competitive dual targeting type II topoisomerase inhibiting antibacterial agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 56: 8712-8735.
4. Miller M.J., Zhu H., Xu Y., Wu C., Walz A.J., Vergne A., Eoosenberg J.M., Moraski G., Minnick A.A., McKee-Dolence J., Hu J., Fennel K., Dolence E.K., Dong L., Franzblau S., Malouin F., Möllmann U.: Utilization of microbial iron assimilation processes for the development of new antibiotics and inspiration for the design of new anticancer agents. *Biometals* 2009; 22: 61–75.
5. Möllman U., Heinisch L., Bauernfeind A., Köhler T., Ankel-Fuchs D.: Siderophores as drug delivery agents: application of the “Trojan Horse” strategy. *Biometals* 2009; 22: 615–624.
6. <http://www.gustrength.com/health:antibiotic-resistance-questions-and-answers>, dostopano 1.8.2015.
7. Tomašić T., Peterlin Mašić L.: Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2014, 14: 130-151.

8. Mies K.A., Gebhardt P., Möllmann U., Crumbliss A.L.: Synthesis, siderophore activity and iron(III) chelation chemistry of a novel mono-hydroxamate, bis catecholate siderophore mimic. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2008; 102: 850-861.
9. Bergeron R.J., Wiegand J., McManis J.S., Bharti N.: The design, synthesis and evaluation of organ-specific iron chelators. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006; 49: 7032-7043.
10. Heinisch L., Wittmann S., Stoiber T., Berg A., Ankel-Fuchs D., Möllmann U.: Highly antibacterial active aminoacyl penicillin conjugates with acylated bis catecholate siderophores based on secondary diamino acids and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* 2002; 45: 3032-3040.
11. Brandel J., Humbert N., Elhabiri M., Schalk I.J., Mislin G.L.A., Albrecht-Gary A.M.: Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: physicochemical characterization of the iron(III), copper(II) and zinc(II) complexes. *Dalton Transactions* 2012; 41: 2820-2834.
12. Štrukelj B., Kos J., Bozovičar K., Bratkovič T., Lunder M., Glavač I., Kristl J., Doljak B., Slanc P., Kočevar N.: Biološka zdravila: Od gena do učinkovine. 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana. 2007: 26-30.
13. Tomašić T., Katsamakas S., Hodnik Ž., Ilaš J., Brvar M., Solmajer T., Montalvão S., Tammela P., Banjanac M., Ergović G., Anderluh M., Peterlin Mašič L., Kikelj D.: Discovery of 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-*d*]thiazoles as novel DNA gyrase inhibitors targeting the ATP-binding site. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 58(14): 5501-5521.
14. Brvar M., Perdih A., Renko M., Anderluh G., Turk D., Solmajer T.: Structure-based discovery of substituted 4,5'-bithiazoles as novel DNA gyrase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2012; 55: 6413-6426.
15. Eakin A.E., Green O., Hales N., Walkup G.K., Bist S., Singh A., Mullen G., Bryant J., Embrey K., Gao N., Breeze A., Timms D., Andrews B., Uria-Nickelsen M., Demeritt J., Loch III J.T., Hull K., Blodget A., Illingworth R.N., Prince B., Boriack-Sjodin P.A., Hauck S., MacPherson L.J., Ni H., Sherer B.: Pyrrolamide DNA gyrase inhibitors: Fragment-based nuclear magnetic resonance screening to identify antibacterial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012; 56(3): 1240-1246.

16. Hameed P.S., Raichurkar A., Madhavapeddi P., Menasinakai S., Sharma S., Kaur P., Nandishaiah R., Panduga V., Reddy J., Sambandamurthy V.K., Sriram D.: Benzimidazoles: Novel mycobacterial gyrase inhibitors from scaffold morphing. ACS Medicinal Chemistry Letters 2014; 5: 820-825.
17. Uria-Nickelsen M., Blodgett A., Kamp H., Eakin A., Sherer B., Green O.: Novel DNA gyrase inhibitors: Microbiological characterization of pyrrolamides. International Journal of Antimicrobial Agents 2013; 41: 28-35.
18. Clark M.A., Finkel R., Rey J.A., Whalen K., Harvey R.A.: Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology. 5. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, China. 2012: 369-379.
19. Peterson R.L.: Quinolone molecular structure-activity relationships: What we have learned about improving antimicrobial activity. Clinical Infectious Diseases 2001; 33(Suppl 3): 180-186.
20. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/novobiocin#section=Top>, dostopano 30.7.2015.
21. http://www.nature.com/nrd/journal/v6/n1/fig_tab/nrd2202_F3.html, dostopano 1.8.2015.
22. Bisacchi G.S., Manchester J.I.: A new-classs antibacterial – almost. Lesson in drug discovery and development: a critical analysis of more than 50 years of effort toward ATPase inhibitors of DNA gyrase and topoisomerase IV. ACS Infectious Diseases 2015; 1: 4-41.
23. Tomašič T., Hartzoulakis B., Zidar N., Chan F., Kirby R.W., Madge D.J., Peigneur S., Tytgat J., Kikelj D.: Ligand and structure based virtual screening for clathrodin-derived human voltage-gated sodium channels modulators. Journal of Chemical Information and Modeling 2013; 53: 3223-3232.
24. Tomašič T., Nabergoj D., Verbek S., Zidar N., Jakopin Ž., Žula A., Hodnik Ž., Jukič M., Anderluh M., Ilaš J., Sollner Dolenc M., Peluso J., Ubeaud-Sequier G., Muller C.D., Peterlin Mašič L., Kikelj D.: Analogues of marine alkaloids orodin, clathrodin and hymenidin induce apoptosis in human HepG2 and THP-1 cancer cells. Medicinal Chemistry Communications 2015; 6: 105-110.
25. https://sl.wikipedia.org/wiki/Trojanski_konj, dostopano 1.8.2015.

26. Page M.G.P., Dantier C., Desarbre E.: In vitro properties of BAL30072, a novel siderophore sulfactam with activity against multiresistant Gram-negative bacilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; 6: 2291-2302.
27. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/wolff-kishner-reduction.shtml>, dostopano 8.8.2015.
28. Anderluh M., Mravljak J., Perdih A., Sova M., Pečar S.: Farmacevtska kemija III Vaje in Seminarji, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2010.
29. Smith M.B.: March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 7th Edition, John Wiley & Sons, 2013: 569-575.
30. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/jones-oxidation.shtml>, dostopano 8.8.2015.