

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SABRINA KOLENKO

**SINTEZA NOVIH 4,5-DIBROMOPIROLAMIDNIH ZAVIRALCEV
DNA GIRAZE B IN NJIHOVIH KONJUGATOV S SIDEROFORI**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SABRINA KOLENKO

**SINTEZA NOVIH 4,5-DIBROMOPIROLAMIDNIH ZAVIRALCEV
DNA GIRAZE B IN NJIHOVIH KONJUGATOV S SIDEROFORI**

**SYNTHESIS OF NOVEL 4,5-DIBROMOPYRROLAMIDE DNA
GYRASE B INHIBITORS AND THEIR SIDEROPHORE
CONJUGATES**

Ljubljana, 2016

Magistrsko naložko sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani. Encimski testi bodo opravljeni na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, protibakterijski testi pa so bili opravljeni na Fakulteti za Farmacijo, Univerze v Helsinki na Finskem.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm. za prijaznost, strokovno pomoč in vso predano strokovno znanje.

Zahvaljujem se tudi družini in prijateljem, ki so mi tekom študija stali ob strani in me podpirali.

IZJAVA

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

Sabrina Kolenko

Ljubljana, 2016

VSEBINA

POVZETEK	vi
ABSTRACT	viii
KLJUČNE BESEDE	x
SEZNAM OKRAJŠAV	x
1. UVOD	1
1.1. Protibakterijske učinkovine	1
1.2. Odpornost proti protibakterijskim učinkovinam	2
1.2.1. Ne-genetski mehanizmi odpornosti	2
1.2.2. Genetski mehanizmi odpornosti	3
1.3. Bakterijska DNA	3
1.4. Topoizomeraze	4
1.5. Topoizomeraze IIA	4
1.5.1. Struktura topoizomeraz IIA	5
1.5.2. Mehanizem delovanja topoizomeraz IIA	6
1.5.3. ATP-vezavno mesto	7
1.6. Topoizomeraze IIA, kot tarča za protibakterijske učinkovine	8
1.6.1. Zaviralci GyrA in/ali ParC	8
1.6.2. Zaviralci GyrB in/ali ParE	9
1.7. Celična stena bakterij	10
1.8. Železo	11
1.9. Siderofori	12
1.9.1. Receptorji/transportni proteini za siderofore	13
1.9.2. Struktura sideroforov	14
1.9.3. Strategija Trojanskega konja	14
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	19
3.1. Reagenti in topila	19
3.2. Kromatografske metode	19
3.3. Spektroskopske metode	19

3.4.	Nomenklatura in risanje spojin	19
3.5.	Določevanje tališča	20
3.6.	Biokemijska testiranja	20
4.	EKSPERIMENTALNO DELO	21
4.1.	Sinteza 4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilne kisline	21
4.2.	Sintezni postopek A	22
4.3.	Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida	22
4.4.	Sinteza (<i>terc</i> -butoksikarbonil)glicina	23
4.5.	Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-(2-((6-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirola-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)karbamata	24
4.6.	Sinteza (<i>S</i>)-2-((6-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-2-okoetan-1-amonijevega klorida	26
4.7.	Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-(2-(5-(benzoksi)-4-okso-4 <i>H</i> -piran-2-karboksamido)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida	27
4.8.	Poskus sinteze (<i>S</i>)-4,5-dibromo- <i>N</i> -(2-(2-(4-hidroksi-3-oksocikloheksa-1,4-dien-1-karboksamido)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida	29
4.9.	Sinteza 5-hidroksi-4-okso-4 <i>H</i> -piran-2-karboksilne kisline	30
4.10.	Sintezni postopek B	31
4.11.	Sinteza (<i>S</i>)-4,5-dibromo- <i>N</i> -(2-(2-(4-hidroksi-3-oksocikloheksa-1,4-dien-1-karboksamido)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida	31
4.12.	Sinteza (<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)-4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida	33
4.13.	Poskus sinteze (<i>S</i>)-4,5-dibromo- <i>N</i> -(2-(5-hidroksi-4-okso-4 <i>H</i> -piran-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida	34
4.14.	Poskus sinteze (<i>S</i>)-(((5-((2-((6-(4,5-dibromo-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(azanediil))bis(karbonil)bis(benzen-3,1,2-triil) tetraacetata.....	35
4.15.	Sinteza 3,5-bis(2,3-dihidroksibenzamido)benzojske kisline	36
4.16.	Sinteza (<i>S</i>)- <i>N,N'</i> -(5-((2-((6-(4,5-dibromo-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)	37
4.17.	Sinteza (<i>S</i>)-2-(2-hidroksifenil)-4,5-dihidrotiazol-4-karboksilne kisline.....	39
4.18.	Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-(((<i>S</i>)-6-(4,5-dibromo-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-4-karboksamida	40
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	42

5.1.	Komentar sinteznih postopkov.....	42
5.1.1.	Sinteza zaviralca GyrB.....	42
5.1.2.	Pripenjanje distančnika na zaviralec GyrB.....	42
5.1.3.	Sinteza amidne vezi z uporabo sklopitvenih reagentov	44
5.1.4.	Sinteza spojine 20.....	46
5.1.5.	Odčita benzilnega etra s katalitskim hidrogeniranjem.....	47
5.1.6.	Sinteza siderofora (spoijne 23).....	49
5.2.	Rezultati bioloških testiranj.....	50
6.	SKLEP.....	53
7.	LITERATURA.....	55

KAZALO SLIK

Slika 1:	Mesta delovanja različnih tipov protibakterijskih učinkovin (prirejeno po 1).	2
Slika 2:	Mehanizem delovanja DNA-giraze (levo) in topoizomeraze IV (desno) (prirejeno po 9).....	5
Slika 3:	Struktura DNA-giraze v kompleksu z DNA in ADPNP (prirejeno po 8).	5
Slika 4:	Shema katalitičnega delovanja topoizomeraz IIA (prirejeno po 16).	6
Slika 5:	GyrB43 v obliki dimera po vezavi ADPNP (prirejeno po 17).	7
Slika 6:	Interakcije med ATP in GyrB43 iz <i>E. coli</i> (prirejeno po 13).	8
Slika 7:	Primerjava strukture celične stene G+ in G- bakterij (prirejeno po 19).	10
Slika 8:	Shema transportnih sistemov za železo v G- bakterijah (prirejeno po 28).....	13
Slika 9:	Glavni strukturni tipi sideroforov v kompleksu z železom (prirejeno po 20).	14
Slika 10:	Splošni model dostave učinkovin v bakterije z uporabo sideroforov (prirejeno po 27).....	15
Slika 11:	Shema sinteze novega potencialnega zaviralca DNA-giraze B in pripenjanja distančnika.	16

Slika 12: A. Struktura 5-hidroksi-4-okso-4 <i>H</i> -piran-2-karboksilne kisline. B. Struktura 3,5-bis(2,3-dihidroksibenzamido)benzojske kisline C. Shema sinteze (<i>S</i>)-2-(2-acetoksifenil)-4,5-dihidrotiazol-4-karboksilne kisline.	17
Slika 13: Shema sinteze konjugatov.	18
Slika 14: Mehanizem reakcije sinteze 4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilne kisline (spojine 2).	42
Slika 15: Mehanizem uvedbe BOC skupine na amino skupino.	43
Slika 16: Mehanizem odščite BOC skupine ob prisotnosti HCl.	44
Slika 17: Mehanizem sklopitvene reakcije z EDC, HOBT in NMM.	45
Slika 18: Mehanizem alkalne hidrolize acetilne zaščitne skupine.	47
Slika 19: Mehanizem katalitskega hidrogeniranja s Pd.	48
Slika 20: Mehanizem ciklokondenzacije 2-hidroksibenzonitrila in L-cisteina.	50

POVZETEK

Široka uporaba protibakterijskih učinkovin v preteklih desetletjih je privedla do pojava bakterijske odpornosti proti večini protibakterijskih učinkovin. Naraščajoča odpornost bakterij je resna grožnja za zdravje na svetovni ravni, zato je odkrivanje novih in učinkovitejših učinkovin nujno potrebno. Da bi se izognili navzkrižni odpornosti, potrebujemo učinkovine, ki bodo delovale na nova tarčna mesta ali pa na že znane tarče, vendar z novim mehanizmom delovanja. Takšna tarča je ATP-vezavno mesto na podenoti B bakterijske DNA-giraze. Bakterijska DNA-giraza je topoizomeraza tipa IIA, ki katalizira negativno dodatno zvitje dvoverižne krožne DNA. Najdemo jo le v bakterijah ne pa tudi v evkariontskih celicah, zato je z vidika selektivne toksičnosti primerna kot tarča za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. Sestavljata jo dve podenoti A (GyrA) in dve podenoti B (GyrB). GyrA je odgovorna za cepljenje in ponovno povezavo verig DNA, GyrB pa z vezavo in hidrolizo ATP zagotovi energijo potrebno za delovanje GyrA.

Pomemben faktor rezistence gramnegativnih bakterij je permeabilnostna bariera zunanje membrane. Problem s permeabilnostjo lahko zaobidemo z zlorabo bakterijskega transportnega sistema za železo. Železo je pomembno za rast bakterij med okužbo, vendar ga je v okuženem gostitelju malo. Ob pomanjkanju železa zato bakterije v svoje okolje izločajo siderofore, ki z visoko afiniteto vežejo železo. Komplekse siderofor-železo prepoznajo specifični membranski receptorji in jih nato privzamejo v celico. Siderofore lahko izkoriščamo za dostavo protibakterijskih učinkovin. Če protibakterijsko učinkovino vežemo na siderofor ali na njegov mimetik, bo bakterija skupaj s kompleksom siderofor-železo v celico privzela tudi nanj vezano učinkovino.

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali conjugate med novimi zaviralci GyrB in siderofori. Začeli smo s sintezo potencialnega zavirala DNA giraze B - (S)-N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamida. Na pripravljen zaviralec smo nadalje pripeli distančnik – glicin. Nazadnje smo na sintetizirane zaviralce pripeli še tri različne siderofore. Siderofori, ki smo jih najprej pripeli na zaviralec, so imeli zaščitene –OH skupine, ki so pomembne za vezavo železa. Te skupine smo po vezavi skušali odščititi, ker pa odščita ni potekla, smo končne spojine sintetizirali po alternativnem postopku, kjer smo na zaviralec vezali siderofore z že odščitenimi OH skupinami.

Uspelo nam je pripraviti pet končnih spojin (**12**, **13**, **15**, **20** in **24**), ki smo jih poslali na testiranje na izolirani DNA-girazi iz bakterije *E. coli* in na živih bakterijah. Testiranje na izolirani DNA-girazi še poteka, tako da rezultatov še nimamo. Testiranje na živih bakterijah pa je pokazalo, da imajo testirane spojine šibko protibakterijsko delovanje. Največje zaviranje rasti bakterij je izkazala spojina **20**, in sicer 39% zaviranje rasti grampozitivne bakterije *S. aureus* in 22% zaviranje rasti gramnegativne bakterije *E. coli* pri 50 µM koncentraciji.

ABSTRACT

Widespread use of antibacterials in the past decades has led to the emergence of bacterial resistance to the majority of antibacterial drugs. Increasing resistance of bacteria is a serious threat to global health, therefore discovery of novel and more efficient agents is necessary. To avoid cross-resistance new agents that will bind to new target sites or on already known targets but with a new mechanism of action are needed. An underexplored target site is the ATP-binding site on subunit B of bacterial DNA gyrase. Bacterial DNA gyrase is a type IIA topoisomerase that catalyzes negative supercoiling of double-stranded circular DNA. It can only be found in bacteria but not in eukaryotic cells and is therefore a suitable target for new antibacterials from the perspective of selective toxicity. It consists of two subunits A (GyrA) and two subunits B (GyrB). GyrA is responsible for cleaving and religation of DNA strands, while GyrB binds and hydrolyses ATP to provide the energy needed for GyrA function.

Important factor of resistance in Gram negative bacteria is the permeability of outer membrane. Problem with permeability can be avoided by misuse of bacterial transport system for iron. Iron is essential for bacterial growth during infection, but its quantities in an infected host are low. Because of that bacteria will in the absence of iron, secrete into their environment siderophores, which bind iron with high affinity. Complexes siderophore-iron are recognized by specific outer membrane receptors and then transported into the cell. In this way siderophores can be exploited for antibacterial drug delivery. If an antibacterial drug is bound to a siderophore, bacteria will uptake the drug together with the complex siderophore-iron.

As part of the master's thesis we synthetized conjugates between novel GyrB inhibitors and siderophores. We started with the synthesis of a potential DNA gyrase B inhibitor - (*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-*d*]thiazol-6-yl)-4,5-dibromo-1*H*-pyrrole-2-carboxamide. In the next step a glycine linker was attached, which was finally conjugated with three different siderophores. Siderophores that were attached to the inhibitor had protected hydroxyl groups that are important for iron binding. We tried to deprotect these groups, but the deprotection reaction failed. Because of that we synthetized final compounds following an alternative procedure, where we attached siderophores with already deprotected hydroxyl groups to the inhibitor.

We managed to synthesize five final compounds (**12**, **13**, **15**, **20** in **24**), which were sent to be tested on the isolated DNA gyrase from bacteria *E. coli* and on live bacteria. Results of testing on the isolated DNA gyrase are not yet known. Testing on live bacteria showed that tested compounds possess weak antibacterial activity. Compound **20** showed the highest inhibition of bacterial growth, with 39% growth inhibition of Gram positive *S. aureus* and 22% growth inhibition of Gram negative *E. coli* at 50 µM concentration.

KLJUČNE BESEDE

DNA-giraza, zaviralec, železo, siderofor, konjugat

SEZNAM OKRAJŠAV

ADPNP – 5'-adenilil-beta, gama-imidodifosfat

AK – aminokislina

ATP – adenozin-5'-trifosfat

BOC – *terc*-butoksikarbonil

BOC₂O – di-*terc*-butil dikarbonat

CTD – C-končna domena

DKM – diklorometan

DMF – *N,N*-dimetilformamid

DMSO – *d*₆ – devteriran dimetil sulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kislina

EA – etilacetat

EDC – *N*-(3-(dietilamino)prop-1-il)-*N'*-etilkarbodiimid hidroklorid

G+ bakterija – po Gramu pozitivna bakterija

G– bakterija – po Gramu negativna bakterija

GHKL – naddružina proteinov: DNA-giraza B-Hsp90-histidin/serin protein kinaze-MutL

GyrA – podenota A DNA-giraze

GyrB – podenota B DNA-giraze

HOBt – 1-hidroksibenzotriazol hidrat

IR – infrardeča spektroskopija

MeOH – metanol

MF – mobilna faza

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

M_r – molekulska masa

MS – masna spektrometrija

NMM – *N*-metilmorfolin

NMR – jedrska magnetna resonanca

NTD – N-končna domena

OMR – receptorji na zunanji membrani (ang. outer membrane receptors)

ParC – podenota C topoizomeraze IV

ParE – podenota E topoizomeraze IV

Pd/C- paladij na aktiviranem ogljiku

R_f – retencijski faktor

THF - tetrahidrofuran

TLC – tankoplastna kromatografija

1. UVOD

1.1. *Protibakterijske učinkovine*

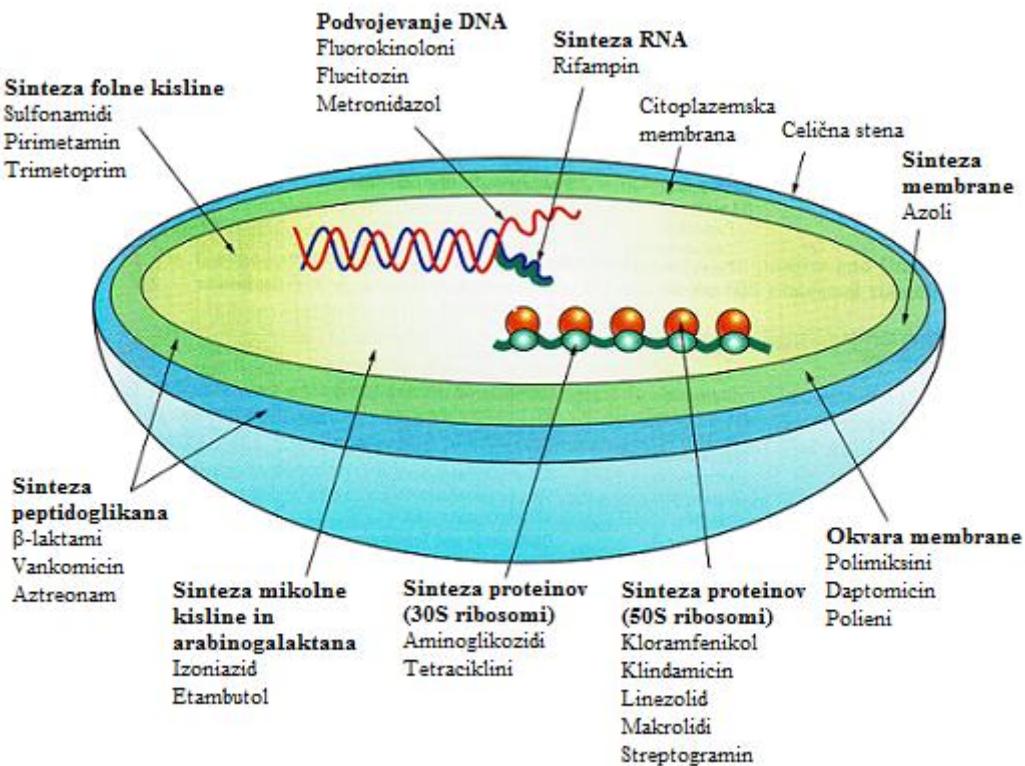
Protibakterijske učinkovine so organske spojine, ki zavirajo rast (bakteriostatično delovanje) ali pa povzročijo smrt (baktericidno delovanje) bakterij. Naravno pridobljene protibakterijske učinkovine imenujemo antibiotiki, za sintetično pridobljene učinkovine pa se je najprej uporabljalo ime kemoterapeutiki. Danes izraz kemoterapeutiki zajema tako naravne kot sintežno pridobljene učinkovine, katerih značilnost je, da so selektivno toksični, kar pomeni da selektivno poškodujejo ali ubijejo bakterije, ne da bi pri tem škodovali celicam gostitelja. Selektivna toksičnost temelji na biokemijskih razlikah med mikroorganizmi in gostiteljem. Lahko je posledica delovanja učinkovine na sestavni del mikroba (npr. celična stena) ali biokemijski proces (npr. sinteza folata), ki ga v gostitelju ne najdemo, ali pa visoke afinitete za določene mikrobne biomolekule (1, 2, 3).

Občutljivost na protibakterijske učinkovine se med mikroorganizmi razlikuje. Glede na spekter delovanja protibakterijske učinkovine delimo na tri skupine. Ozko-spektralne učinkovine delujejo le na eno ali pa na zelo omejeno skupino mikroorganizmov. Učinkovine z zmernim spektrom delovanja so učinkovite proti grampozitivnim bakterijam in nekaterim gramnegativnim bakterijam. Široko-spektralne učinkovine pa vplivajo na širok nabor mikroorganizmov. Uporaba široko-spektralnih učinkovin je lahko problematična, saj lahko spremeni naravo normalne bakterijske flore in povzroči naknadno infekcijo (t.i. superinfekcijo) zaradi razrasti oportunističnih bakterij, ki so del bakterijske flore (2, 4).

Glede na mehanizem delovanja delimo protibakterijske učinkovine na štiri večje skupine:

- učinkovine, ki inhibirajo sintezo celične stene,
- učinkovine, ki inhibirajo funkcijo celične membrane,
- učinkovine, ki inhibirajo sintezo proteinov in
- učinkovine, ki inhibirajo sintezo nukleinskih kislin (5, 6).

Različna mesta delovanja posameznih skupin protibakterijskih učinkovin so predstavljena na sliki 1.



Slika 1: Mesta delovanja različnih tipov protibakterijskih učinkovin (prirejeno po 1).

1.2. Odpornost proti protibakterijskim učinkovinam

Neprimerna, pretirana uporaba protibakterijskih učinkovin v preteklih desetletjih je privedla do hitrega razvoja odpornosti bakterij proti tem učinkovinam. O bakterijski odpornosti govorimo, kadar maksimalna količina kemoterapevtika, ki jo gostitelj še prenaša, ne zaustavi njihove rasti (2). Mikroorganizmi, ki so odporni proti določeni učinkovini, so lahko odporni tudi proti drugim učinkovinam, ki delujejo s podobnim mehanizmom delovanja. Taki odpornosti pravimo navzkrižna odpornost in se pojavlja med učinkovinami, ki so si sorodne po kemijski strukturi, ali pa imajo podoben način vezave ali delovanja.

Poznamo številne mehanizme, preko katerih bakterije izražajo odpornost proti protimikrobnim učinkovinam. Delimo jih na ne-genetske in genetske mehanizme (5).

1.2.1. Ne-genetski mehanizmi odpornosti

Nekateri mikroorganizmi so že sami po sebi odporni proti določenim protibakterijskim učinkovinam. Ta odpornost je posledica odsotnosti tarčnih struktur ali pa biokemijskih

procesov, na katere te učinkovine delujejo. Tak primer so bakterije v L obliku, ki so odporne proti penicilinom, ker nimajo celične stene. Odpornost je lahko tudi posledica metabolne neaktivnosti mikroorganizmov, saj je aktivna replikacija bakterij potrebna za delovanje številnih protibakterijskih učinkovin (1, 2, 5).

1.2.2. Genetski mehanizmi odpornosti

Genetski mehanizmi odpornosti so lahko posledica kromosomske ali izvenkromosomske odpornosti.

Kromosomska odpornost je posledica spontane mutacije na delu kromosoma, ki kontrolira občutljivost za določeno protibakterijsko učinkovino. Kromosomski mutanti so najpogosteje odporni zaradi spremembe v strukturi receptorja za učinkovino, lahko pa so tudi posledica zmanjšane prodornosti učinkovine zaradi spremembe permeabilnosti membrane (2, 5).

Poleg kromosoma imajo številne bakterije tudi izvenkromosomske genetske elemente, imenovane plazmidi, ki jih najdemo proste v citoplazmi. Plazmidi lahko vsebujejo genski zapis za odpornost proti protibakterijskim učinkovinam, take plazmide imenujemo R plazmidi. R plazmid lahko kodira encime, ki razgradijo (β -laktamaze) ali spremenijo (modifikatorji aminoglikozidov) učinkovino, ali pa proteine, ki aktivno odstranjujejo učinkovino iz celice (1, 7). Plazmidi vsebujejo odseke imenovane transpozoni. Ti odseki se zlahka prenašajo iz enega plazmida na drugega in tudi na in iz kromosomov. Transpozoni lahko nosijo zapis za enega ali več mehanizmov rezistence in se lahko prenašajo med različnimi vrstami bakterij. Ta lastnost je razlog za hitro širjenje določenih genov za rezistenco med bakterijami (1, 5, 7).

1.3. Bakterijska DNA

DNA ni statična dvoverižna struktura, ampak se zavija in upogiba, kar vodi v spremembe topologije vključno z dodatnim zvitjem in lokalnim odvijanjem. Obstajata dve različni oblici DNA, linearna in krožna. Kromosomska DNA mnogih mikroorganizmov je zaprta krožna molekula, kjer sta kovalentno povezana oba konca linearne dvojne vijačnice. Zaprta krožna dvojna vijačnica DNA ima strukturno posebnost, da je zvita v novo konformacijo z imenom dodatno zvita DNA. Dodatna zvitost je lahko pozitivna ali negativna. Pozitivno dodatno zvita oblika dvojne vijačnice DNA je stabilna in nasprotuje ločitvi verig,

negativno dodatno zvita DNA pa spodbuja ločitev verig DNA, ki je pomembna pri procesih kot so podvojevanje, transkripcija, rekombinacija in popravljanje DNA (8, 9, 10).

1.4. Topoizomeraze

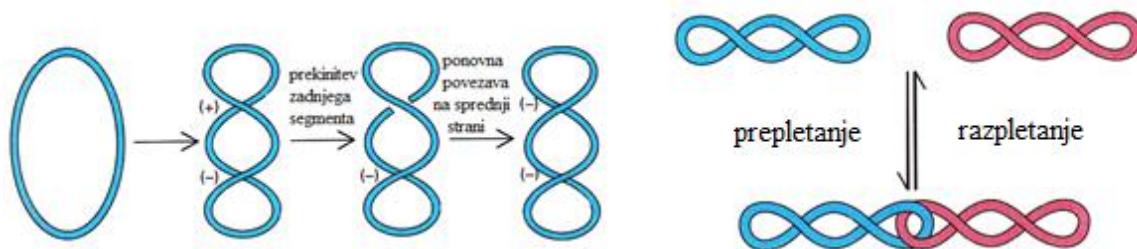
Topoizomeraze so encimi, ki spreminjajo topološka stanja molekule DNA. Katalizirajo usklajeno cepljenje in združevanje verige DNA, ob čemer nastaja DNA, ki je bolj ali manj zvita kot začetna. Poznamo dva glavna tipa topoizomeraz, topoizomeraze I in topoizomeraze II.

Topoizomeraze I cepijo eno verigo dvojne vijačnice. Delimo jih na dve podskupini – topoizomeraze IA in topoizomeraze IB. Topoizomeraze IA se vežejo na 5' konec razcepljene verige in katalizirajo prehod nerazcepljene verige skozi cepljeno verigo DNA, s čimer odstranijo en negativen dodaten zavoj. Topoizomeraze IB pa se vežejo na 3' konec razcepljene verige DNA in dovoljujejo kontrolirano rotacijo 5' konca DNA, kar vodi do sprostitive pozitivno in negativno dodatno zvite DNA. Na koncu reakcije dodatnega zvijanja se razcepljena veriga DNA znova poveže.

Topoizomeraze II so dimerni proteini, ki cepijo obe verigi dvostranske DNA. Vežejo se na oba 5' konca razcepljenih verig DNA in katalizirajo prehod enega segmenta dvostranske DNA skozi razcepljen segment dvostranske DNA, kar vodi do sprostitive ali pa do uvedbe dodatnega zavoja. Prehod iste dvostranske DNA skozi prekinjeno verigo doda ali odstrani dva dodatna zavoj. Medtem ko prehod druge verige DNA skozi režo vodi v razpletanje ali zapletanje dveh verig DNA. Tudi topoizomeraze II delimo na dve podskupini – topoizomeraze IIA in topoizomeraze IIB (8, 9, 11).

1.5. Topoizomeraze IIA

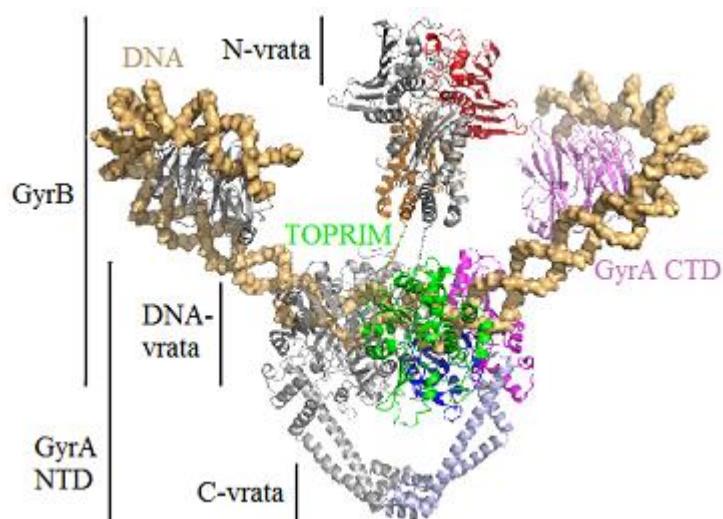
Poznamo dve bakterijski topoizomerazi IIA in sicer DNA-girazo in topoizomerazo IV. DNA-giraza je edina topoizomeraza II, ki lahko tvori negativno dodatno zvitje, za kar potrebuje energijo, ki jo pridobi s hidrolizo ATP. Deluje tako, da se veže na molekulo DNA v konformaciji, ki vpelje eno negativno in eno pozitivno dodatno zvitje, vendar ne spremeni topologije DNA. Cepitev dvojne verige in prehod DNA skozi režo pa vpelje dva negativna dodatna zvitja. Topoizomeraza IV je DNA-girazi homologen encim, ki je pomemben za razpletanje hčerinskih kromosomskih DNA po podvojevanju (slika 2) (8, 11, 12).



Slika 2: Mehanizem delovanja DNA-giraze (levo) in topoizomeraze IV (desno) (prirejeno po 9).

1.5.1. Struktura topoizomeraz IIA

DNA-giraza ima heterotetramerno strukturo sestavljenou iz dveh podenot GyrA in dveh podenot GyrB (A_2B_2). Zelo podobno strukturo ima tudi topoizomeraza IV, ki je sestavljena iz dveh podenot ParC in dveh podenot ParE (C_2E_2). GyrA in ParC podenoti sta odgovorni za cepljenje in ponovno združevanje DNA, GyrB in ParE podenoti pa vsebujejo vezavna mesta za ATP (13, 14). Vsaka od teh podenot je sestavljena iz dveh strukturnih domen. GyrA in ParC podenoti imata N-končno domeno (NTD) in C-končno domeno (CTD). GyrB in ParE pa imata N-končno ATP domeno iz družine GHKL (GyrB-Hsp90-histidin/serin protein kinaze-MutL) in domeno TOPRIM. Kompleks NTD in TOPRIM domene je katalitično mesto za cepitev in povezavo dvoverižne DNA. Domena z ATPazo s hidrolizo ATP proizvaja energijo, ki je potrebna za obsežne konformacijske spremembe. CTD pa je pomembna pri zvijanju DNA (8, 15).

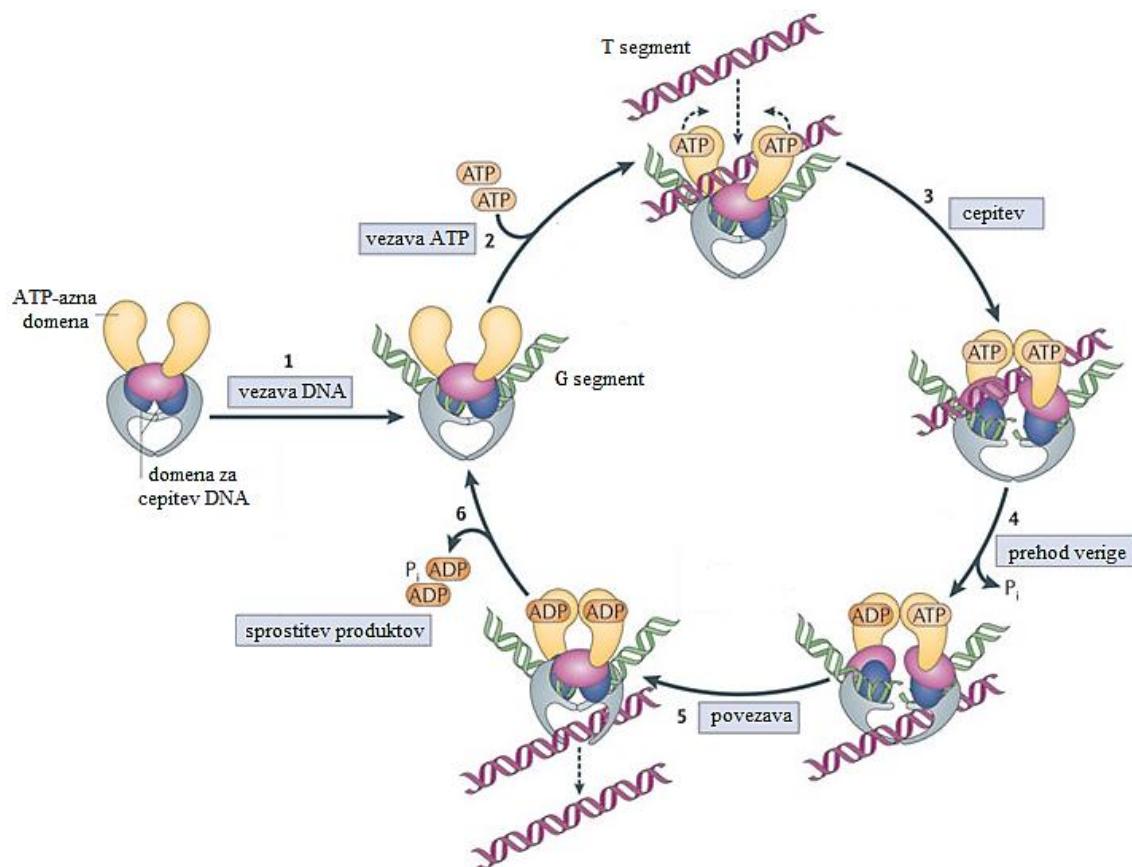


Slika 3: Struktura DNA-giraze v kompleksu z DNA in ADPNP (prirejeno po 8).

Celotni kristalni strukturi DNA-giraze in topoizomeraze IV nista poznani, poznani pa so posamezni fragmenti obeh encimov. Iz teh fragmentov in iz strukture humane topoizomeraze II lahko identificiramo, da imajo troje vrat, in sicer N-vrata, DNA-vrata in C-vrata, ki se odpirajo in zapirajo v zaporedju in tako omogočajo prehajanje dvoverižne DNA v določenih stopnjah katalitičnega cikla. N-vrata tvorita dve podenoti GyrB, N-končne domene GyrA pa tvorijo DNA-vrata in C-vrata (slika 3) (14).

1.5.2. Mehanizem delovanja topoizomeraz IIA

Katalitično delovanje topoizomeraz II, ki ga vidimo prikazanega na sliki 4, se začne, ko NTD veže odsek DNA imenovan G-segment pri DNA-vratih. Nato pride do vezave ATP, kar povzroči dimerizacijo N-končne ATPazne domene (zaprtje N-vrat) in ujetje drugega odseka DNA (T-segmentsa) v zgornjo odprtino encima. Po ujetju T-segmentsa se G-segment razcepi in odprejo se DNA-vrata, kar omogoči T-segmentu, da preide iz zgornje v spodnjo odprtino encima (skozi razcepljen G-segment). Po prehodu T-segmentsa se DNA-vrata zaprejo in razcepljen G-segment se ponovno poveže. T-segment nato zapusti spodnjo

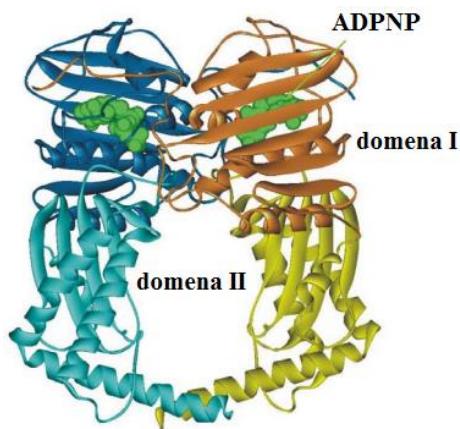


Slika 4: Shema katalitičnega delovanja topoizomeraz IIA (prirejeno po 16).

odprtino skozi proteinska vrata imenovana C-vrata. Hidroliza ATP pa vodi do ponovnega odprtja N-vrat in povratek encima v prvotno stanje, kar omogoči ponovitev katalitičnega cikla (8, 15).

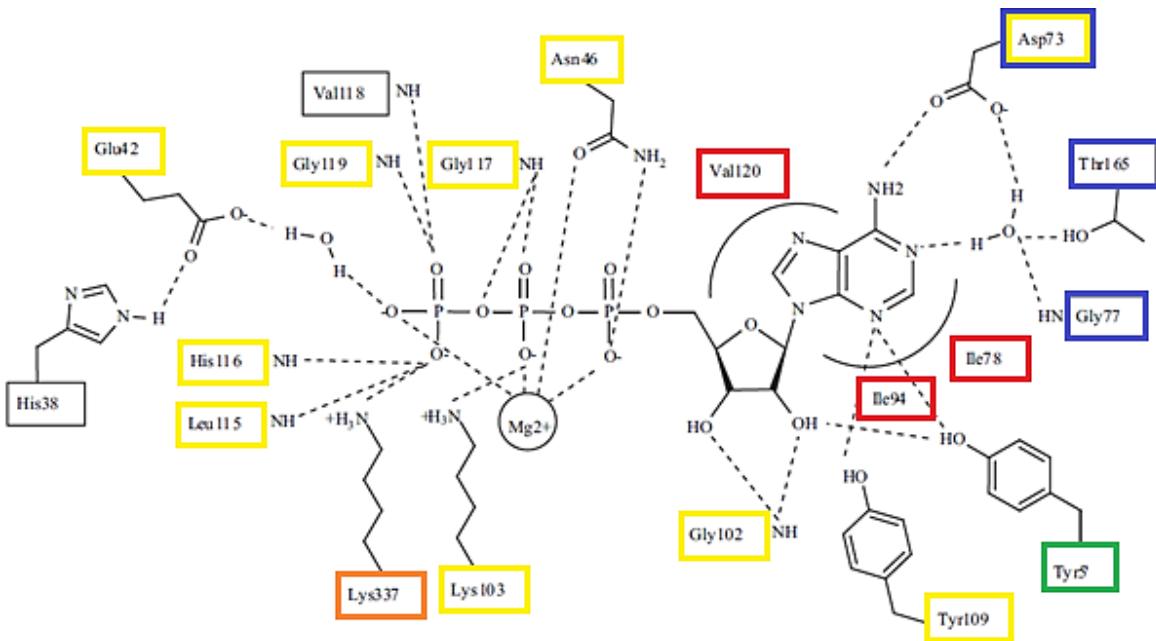
1.5.3. ATP-vezavno mesto

Prva poznana kristalna struktura bakterijske topoizomeraze II je bil 43 kDa velik N-končni fragment GyrB iz bakterije *Escherichia coli* (imenovan GyrB43) v kompleksu z ADPNP (ne-hidrolizirajoči analog ATP). GyrB43 je sestavljena iz dveh domen – domene I (GyrB24) in domene II (slika 5). Vezavno mesto za ATP se nahaja v domeni I, ki obsega osem β -struktur in pet α -vijačnic. Domeno II pa sestavljajo štiri β -strukture in štiri α -vijačnice. Ob vezavi ATP ali ADPNP GyrB43 dimerizira, pri čemer nastane v strukturi velika odprtina s premerom 20 Å. Ta odprtina vsebuje pozitivno nabite argininske ostanke in omogoča prehajanje DNA (13).



Slika 5: GyrB43 v obliki dimera po vezavi ADPNP (prirejeno po 17).

Kompleks GyrB43-ATP je stabiliziran s številnimi vodikovimi vezmi, ki jih tvori z aminokislinskimi (AK) ostanki direktno ali preko molekul vode (slika 6). Taki AK ostanki so Glu42, Asn46, Asp73, Gly102, Lys103, Tyr109, Leu115, His116, Gly117 in Gly119 (označeni rumeno) na domeni I in Lys337 (označen oranžno) iz domene II. Poleg vodikovih vezi tvorijo ostanki Ile78, Ile94 in Val120 (označeni rdeče) hidrofobne interakcije z adeninom in ribozo. Pomemben strukturni element je molekula vode, ki tvori mrežo vodikovih vezi med adeninskim obročem in ostanki Asp73, Gly77 in Thr165 (označeni modro). Stranska veriga Tyr5' (označena zeleno) tvori dve vodikovi vezi z ribozo in dušikom na adeninu in je AK ostanek, ki ga najdemo le pri bakterijah, ne pa pri evkariontskih in virusnih topoizomerazah II (13).



Slika 6: Interakcije med ATP in GyrB43 iz *E. coli* (prirejeno po 13).

1.6. Topoizomeraze IIA, kot tarča za protibakterijske učinkovine

Zaviralci bakterijskih topoizomeraz tipa IIA običajno ciljajo tako na DNA-girazo, kot na topoizomerazo IV. Visoka stopnja homologije aminokislinskega zaporedja obeh encimov, še posebej ATP-vezavne regije, podpira načrtovanje zaviralcev, ki zavirajo oba encima (dualnih zaviralcev). Taki dualni zaviralci otežujejo razvoj rezistence zaradi mutacije gena, ki kodira za tarčo, saj sta oba encima neodvisno esencialna in neodvisno kodirana. Za razvoj rezistence bi moralo priti do spremembe genetskega zapisa za obe tarči, kar pa je v eni generaciji bakterij malo verjetno. Oba encima sta ohranjena med različnimi vrstami bakterij, kar omogoča široko spektralno protibakterijsko delovanje potencialnih učinkovin (12, 14).

1.6.1. Zaviralci GyrA in/ali ParC

Zaviralci podenote GyrA/ParC stabilizirajo kompleks med verigo DNA in DNA-girazo in tako preprečijo, da bi DNA zapustila encim. Edini zaviralci DNA-giraze in topoizomeraze IV, ki so trenutno v klinični uporabi, so fluorokinoloni. **Fluorokinoloni** so širokospektralne učinkovine, z bakteriostatičnim in baktericidnim delovanjem. V gramnegativnih bakterijah delujejo predvsem na DNA-girazo, v grampozitivnih bakterijah pa na topoizomerazo IV. Zaradi opozoril o neželenih stranskih učinkih in o toksičnosti ter

zaradi pojava bakterij odpornih proti fluorokinolonom se je povečal razvoj zaviralcev, ki delujejo na GyrB/ParE (13, 14).

1.6.2. Zaviralci GyrB in/ali ParE

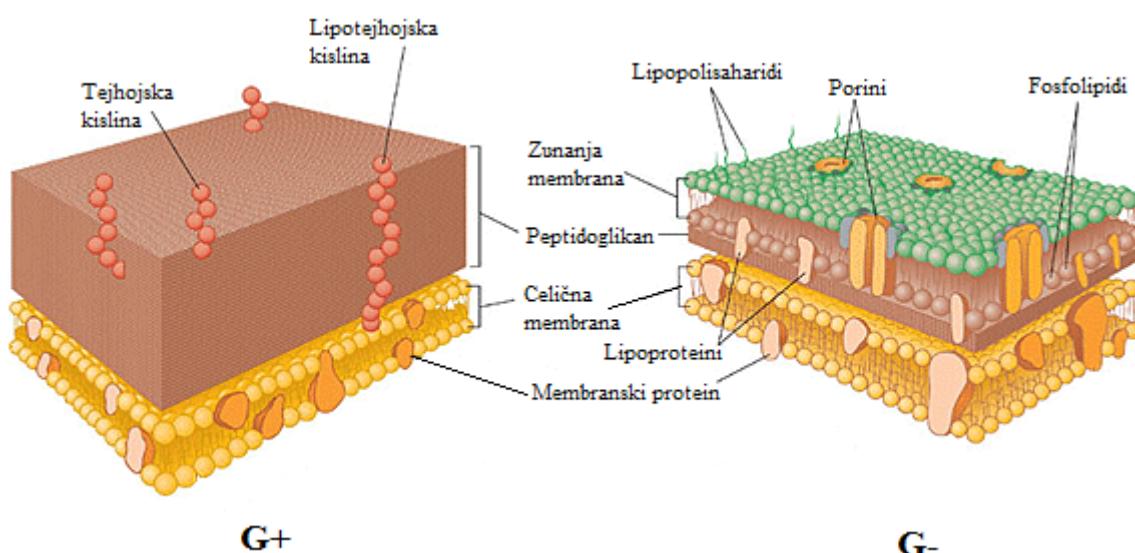
Zaviralci podenote GyrB/ParE se vežejo na vezavno mesto za ATP v N-končnem delu GyrB/ParE in s tem preprečujejo vezavo ATP. Zaradi odstranitve vira energije encim izgubi svojo aktivnost. Podobno kot adeninski del molekule ATP tvorijo vsi zaviralci GyrB/ParE vodikove vezi z Asp73 in s strukturno ohranjeno molekulo vode (številčenje AK v *E. coli*). Poleg tega tvorijo vodikovo vez tudi z Arg136, ki je AK ostanek, s katerim ATP ne tvori interakcij. ATP-kompetitivni zaviralci se vežejo tudi izven ATP-vezavnega žepka v visoko ohranjeno regijo, ki sodeluje pri dimerizaciji GyrB podenot po vezavi ATP. Zaradi funkcionalnih razlik je ta regija drugačna v primerjavi s sesalskimi homologi in drugimi ATPazami iz družine GHKL proteinov, kar omogoča selektivno toksičnost zaviralcev (12, 13, 14).

Najbolj poznani zaviralci GyrB so (amino)kumarini in ciklotialidini. Novobiocin, klorobiocin in kumermicin A₁ so naravni kumarinski antibiotiki, ki jih proizvajajo mikroorganizmi *Streptomyces*. **Kumarini** so kompetitivni zaviralci, ki z ATP tekmujejo za vezavo na N-končni del GyrB43 (GyrB24). V manjši meri se vežejo tudi na ATP-vezavno mesto na ParE podenoti topoizomeraze IV. Delujejo predvsem na grampozitivne bakterije. Novobiocin je edini aminokumarin, ki je bil v klinični uporabi, vendar je bil zaradi vprašljive varnosti in odkritja cefalosporinov, doksiciklina in pozne generacije penicilinov le malo uporabljan in sčasoma odpoklican s tržišča. **Ciklotialidini** se prav tako kot kumarini vežejo na N-končni fragment GyrB. V primerjavi z novobiocinom ima ciklotialidin dvakrat večjo aktivnosti in je visoko selektiven, vendar ima slabo protimikrobnlo delovanje zaradi slabe penetracije v citoplazmo bakterijske celice (12, 13).

Nov razred zaviralcev GyrB so **pirolamidi**. Odkrili so jih v podjetju AstraZeneca, kjer so s pomočjo rešetanja knjižnice fragmentov z uporabo NMR spektroskopije iskali nizkomolekularne spojine, ki se vežejo v ATP-vezavno mesto GyrB. Z uporabo računalniškega načrtovanja in rentgenske kristalografije so načrtovali in sintetizirali močne zaviralce encima z obetavnim protibakterijskim delovanjem, predvsem proti grampozitivnim bakterijam (18).

1.7. Celična stena bakterij

Bakterije lahko razdelimo v dve večji skupini - grampozitivne (G+) in gramnegativne (G-) bakterije. Razlika izhaja iz postopka imenovanega barvanje po Gramu in je posledica razlik v strukturi celične stene. Struktura celične stene G+ bakterij je dokaj enostavna, sestavlja jo peptidoglikan (murein), kisli polimeri (tejhojske kislina, lipotejhojske kislina) in peptidi ter polisaharidi. Sestava celične stene G- bakterij pa je veliko bolj kompleksna in ima več slojev. Sestavlja jo peptidoglikan, lipoproteini in dodatna zunana fosfolipidna membrana, ki vsebuje lipopolisaharide. Razliko med celičnima stenama lahko vidimo na sliki 7 (1, 4).



Slika 7: Primerjava strukture celične stene G+ in G- bakterij (prirejeno po 19).

Peptidoglikan je kompleksen polimer sestavljen iz dveh sladkornih derivatov (*N*-acetilglukozamin in *N*-acetilmuraminska kislina), povezanih z $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidnimi vezmi v iztegnjene verige. Na *N*-acetilmuraminsko kislino je pripeta peptidna veriga, sestavljena iz treh do petih AK. Peptidne verige so še dodatno prečno premrežene s kratkimi peptidi. Aminokislinska sestava in zaporedje peptidov se lahko od bakterije do bakterije razlikujeta. Pri G+ bakterijah peptidoglikan sestavlja do 50% celične stene, pri G- bakterijah pa le 2% - 10%. Najdemo ga le v bakterijah, zato je tarča številnih protibakterijskih učinkovin (npr. penicilini, cefalosporini, vankomicin, ...) (1, 4, 5, 10).

Tejhojske in lipotejhojske kisline so vodotopni polimeri, ki jih najdemo v G+ bakterijah. Vsebujejo ribitolne ali glicerolne ostanke povezane s fosfodiestrskimi vezmi. Tejhojske

kisline so kovalentno vezane na peptidoglikan, lipotejhojske kisline pa so kovalentno vezane na membranski glikolipid.

Zunanja membrana G- bakterij je fosfolipidni dvosloj, v katerem je zunanji del fosfolipidov zamenjan z lipopolisaharidom. Velike molekule protibakterijskih učinkovin počasi prehajajo zunano membrano, zato so G- bakterije visoko odporne proti protibakterijskim učinkovinam. Zunanja membrana ima zaščitno vlogo in preprečuje prehajanje hidrofobnih molekul v celico. Ker je lipidni dvosloj hidrofoben, ima posebne kanalčke, proteine imenovane porini, ki omogočajo pasivno difuzijo hidrofilnih spojin z nizko molekulsko maso (sladkorji, aminokisline, nekateri ioni) v celico. Vsebuje tudi proteine, ki so odgovorni za transport specifičnih molekul, kot so na primer vitamin B₁₂ in kompleksi siderofor-železo.

Lipoproteini stabilizirajo zunano membrano G- bakterij in jo povezujejo s peptidoglikanskim slojem.

Periplazma je prostor med zunano in notranjo membrano. Sestavlja jo peptidoglikanski sloj in gelu podobna raztopina proteinov. Pri G- bakterijah periplazmo sestavlja več proteinov, med drugimi tudi hidrolitični encimi, vezavni proteini za številne substrate in kemoreceptorji (npr. β-laktamaze in aminoglikozidfosforilaze), ki razstrupljajo celico in so odgovorni za inaktivacijo nekaterih protibakterijskih učinkovin (1, 4, 5).

1.8. Železo

Železo je pomemben element za vse žive organizme in ima ključno vlogo v raznih encimih in bioloških funkcijah. Razširjena vključenost železa v biološke funkcije je posledica dejstva, da njegovi dve stabilni ionizirani oblici omogočata številne reakcije oksidacije/redukcije in kemijsko reaktivnost. Kljub njegovi pomembnosti pa je v okolju in v okuženem gostitelju redko na voljo v prosti obliki (20, 21).

Privzem železa v celice je mogoč le kadar je železo v obliki Fe²⁺ (železovi(II) ioni) ali v obliki Fe³⁺ (železovi(III) ioni). Fe²⁺ je topen v vodnih raztopinah pri nevtralnem pH in je kot tak na voljo celicam. V večini okolij pa se Fe²⁺ oksidira v Fe³⁺ spontano z molekularnim kisikom ali encimsko med vnosom in kroženjem po gostitelju (22).

Visoke koncentracije železa so lahko toksične za celice, ker spodbujajo nastajanje škodljivih oksidativnih radikalov. Tako prenizke kot previsoke koncentracije železa lahko

ogrozijo celično funkcijo, zato mora biti raven železa, kateremu so celice izpostavljene, natančno regulirana (23). V človeškem telesu se večina železa nahaja v celicah, kompleksiranega z metaloproteini, kot so hemoglobin, mioglobin, katalaza in citokrom C, ali pa je shranjeno v proteinih, ki skladiščijo ione, kot sta feritin in njegov netopen produkt hemosiderin. Železo, ki kroži po telesu, pa je vezano na transportne proteine, kot sta transferin (v krvi) in lakoferin (v raznih telesnih tekočinah) (21, 22).

Odtegnitev železa je pomemben obrambni mehanizem gostitelja, zato vdor mikroorganizmov sproži številne procese, ki vodijo do zmanjšanja koncentracije železa. Zmanjša se absorpcija železa iz prebavil, poveča se sinteza feritina in njegova razgradnja v hemosiderin, prav tako se poveča sinteza prenašalnega proteina lakoferina na mestu okužbe (20, 21, 24). Koncentracija prostega železa v serumu in tkivih je tako le nekje med 10^{-18} M in 10^{-24} M, medtem ko bakterije potrebujejo koncentracije nad 10^{-6} M, da lahko rastejo. Da si zagotovijo zadostno količino železa, so mikroorganizmi razvili visoko učinkovite sisteme za privzem železa (24). Mikrobi uporabljajo tri splošne mehanizme za pridobitev železa: (a) kelacija in aktivni transport, (b) nizko afinitetni transport železa iz gostiteljevih zalog železa in (c) redukcija Fe^{3+} v Fe^{2+} pred transportom. Najpogostejsi mehanizem je kelacija z aktivnim transportom, ki poteka z nizkomolekularnimi organskimi kelatorji imenovanimi siderofori (25).

1.9. Siderofori

Siderofori so molekule z nizko molekulsko maso, ki jih bakterije sintetizirajo in izločajo v okolje, kjer vežejo (kelirajo) železo. Njihova vloga je, da bakterijske celice oskrbujejo z železom. Bakterije proizvajajo več kot 500 različnih sideroforov (21, 26). Vsaka bakterija izraža več različnih sideroforov, da si zagotovi dostop do železa, ki se v njeni okolini nahaja v zelo nizkih koncentracijah. V človeškem gostitelju morajo siderofori za vezavo železa tekmovati s transferini in lakoferini, zato morajo siderofori imeti višjo afiniteto do železa kot proteini gostitelja. Siderofori so najmočnejši poznani kelatorji železa, nekateri lahko celo pridobijo železo iz človeških transportnih proteinov (20, 22).

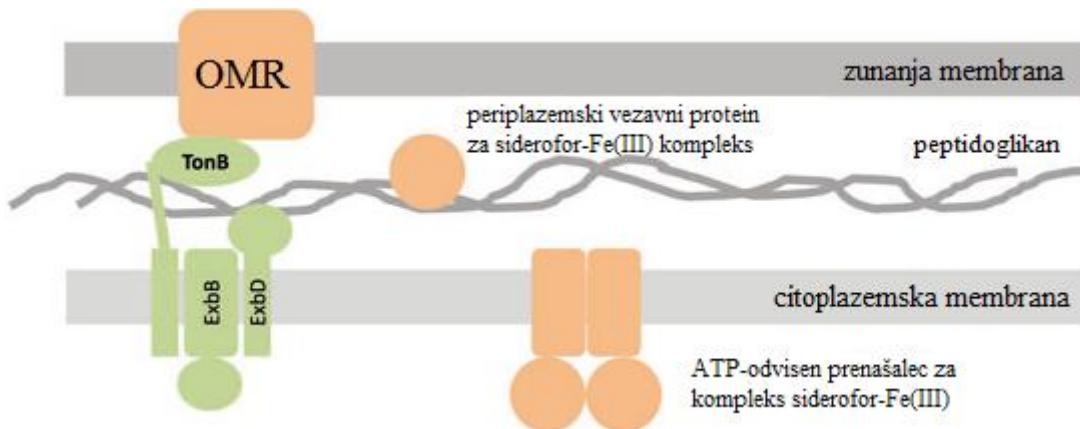
Sistem s siderofori začne v celoti delovati ob pomanjkanju železa. Vsi geni bakterij vpleteni v biosintezo in transport sideroforov so koordinirano negativno regulirani, kot odgovor na stanje železa v celici. To je doseženo z aktivnostjo represorskega proteina Fur, ki skupaj z Fe^{3+} , kot ko-represorjem, kontrolira transkripcijo genov. De-represija Fur

repressorja poveča biosintezo sideroforov in ekspresijo receptorjev/transportnih proteinov za siderofore (20, 21, 27). Sintetizirani siderofori se nato izločijo v okolico celice, kjer vežejo železove(III) ione. Siderofor z vezanim železom bakterije znova privzamejo v celico, in sicer preko specifičnih prenašalcev, ki se nahajajo v celični membrani. Nekatere bakterije uporabljajo tudi ksenosiderofore, kar pomeni, da imajo sisteme za privzem sideroforov, ki jih ne sintetizirajo same. Po privzetju kompleksa v celico se železovi(III) ioni sprostijo iz sideroforov. Sprostitev večinoma poteka s pomočjo reduktaz, ki pretvorijo vezano Fe^{3+} v Fe^{2+} , lahko pa tudi s hidrolizo (razgradnjo) siderofora, ki zmanjša stabilnost kompleksa (20, 22, 25).

1.9.1. Receptorji/transportni proteini za siderofore

Privzem kompleksa siderofor- Fe^{3+} v bakterije je odvisen od ABC-tipa prenašalcev, v primeru G- bakterij pa tudi od OM receptorjev (OMR).

OMR so v splošnem sestavljeni iz sodčka, ki ga sestavlja 22 β-verig, in N-končne globularne domene (imenovane čep), sestavljene iz mešanih štiriverižnih β-struktur, obdanih z zankami in vijačnicami. Domena čepa zamaši lumen β-sodčka in tako preprečuje, da bi kompleks siderofor- Fe^{3+} prehajal direktno skozi sodček. Vezavno mesto za kompleks siderofor- Fe^{3+} se nahaja na zunajcelični strani OMR in ga sestavljajo AK ostanki domene čepka in β-sodčka. Da lahko kompleks prehaja skozi zunanjou membrano, mora priti do konformacijskih sprememb v domeni čepka, za kar je potreba energija. To energijo dobavlja TonB kompleks, ki ga sestavljajo trije proteini: v notranjo membrano zasidrani protein TonB in v notranjo membrano vgrajena proteina ExbB in ExbD (slika 8). OMR prenašajo komplekse siderofor- Fe^{3+} čez zunanjou membrano v periplazmo (22, 24).

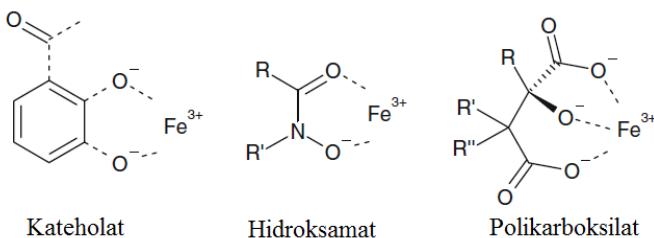


Slika 8: Shema transportnih sistemov za železo v G- bakterijah (prirejeno po 28).

Dostava kompleksa siderofor- Fe^{3+} v citoplazmo je odvisna od ABC-tipa prenašalnega sistema, ki ima izvencitoplazemske vezavne proteine. Ti se običajno nahajajo v periplazmi G- bakterij in so prisotni kot lipoproteini vezani na zunanjo površino celične membrane v G+ bakterijah. Izvencitoplazemski vezavni proteini odstranijo kompleks siderofor- Fe^{3+} , ki se po interakciji s transmembranskimi proteini prenese skozi membrano, za kar je potrebna energija. Dimerizacija in konformacijske spremembe po vezavi in/ali hidrolizi nukleozid tri fosfata (npr. ATP) v citoplazemskih ABC podenotah, daje energijo, ki potisne substrate skozi transmembranski kanal (22).

1.9.2. Struktura sideroforov

Siderofore lahko razdelimo v tri glavne skupine glede na kemijsko strukturo skupin, ki kompleksirajo železove(III) ione. Te skupine so kateholati (fenolati), hidroksamati in polikarboksilati (derivati citronske kisline), ki so prikazani na sliki 9. Poleg teh treh skupin poznamo tudi še druge siderofore (20, 22).



Slika 9: Glavni strukturni tipi sideroforov v kompleksu z železom (prirejeno po 20).

Naravni siderofori, ki jih sintetizirajo bakterije, imajo predvsem hidroksamatne (npr. ferikrom, desferioksammin B in E) in kateholatne (npr. enterobactin) skupine za vezavo železa. Obstajajo tudi siderofori s kombinacijo različnih vezavnih skupin, npr. pioverdini, ki vsebujejo kateholatne in hidroksamatne skupine ter psevdobaktin, ki vsebuje karboksilatne, kateholatne in hidroksamatne funkcionalne skupine (28).

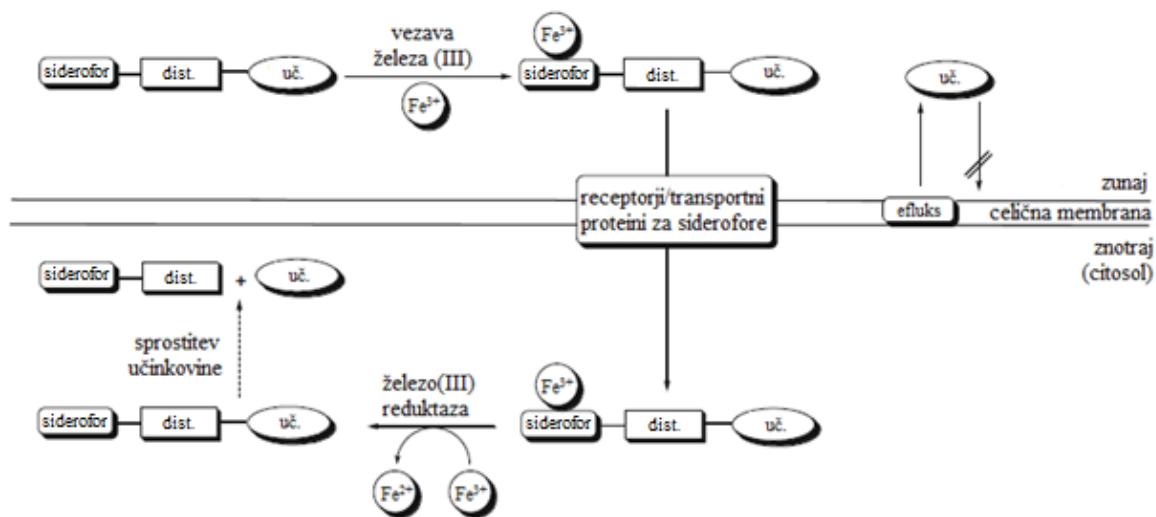
1.9.3. Strategija Trojanskega konja

Bakterije izražajo receptorske proteine, ki specifično prepoznavajo železove komplekse njim lastnih sideroforov. Da si zagotovijo dovolj železa za rast, imajo bakterije tudi sisteme za prepoznavanje in transport kompleksov siderofor- Fe^{3+} , ki jih proizvajajo druge vrste. Nekatere vrste bakterij so se naučile izkorističati te sisteme za dostavo antibiotikov s pripetjem toksičnih substanc na siderofore. Take naravno prisotne konjugate imenujemo

sideromicini. Učinkovitost in selektivnost delovanja sideromicinov proti gramnegativnim bakterijam kaže, da so konjugati med siderofori in učinkovinami primerni kot dostavnici za protibakterijske učinkovine z uporabo strategije Trojanskega konja (24, 27).

Konjugati siderofor-učinkovina so tri komponentni sistemi sestavljeni iz siderofora, distančnika in učinkovine. Vse tri komponente imajo pomembno funkcijo. Vloga siderofora je prenos konjugata čez celično steno v bakterijo. Učinkovina (odnos med strukturo in delovanjem ter tarčno mesto) določa ali je za aktivnost učinkovine potrebna njena sprostitev iz konjugata. Distančnik pa omogoča, da je konjugat stabilen v zunajceličnem okolju, intracelularno (v citoplazmi ali periplazmi) pa pride do sprostiteve učinkovine iz konjugata s pomočjo encimov (27, 29).

Za učinkovine, katerih tarče so v citoplazmi, se zdi, da vezava na siderofore povzroči izgubo aktivnosti protibakterijske učinkovine. Predvidevajo, da vezan siderofor ovira učinkovino, da bi prišla do tarčnega mesta ali pa povzroči znatno znižanje vezavne afinitete učinkovine za tarčo. To kaže, da mora po privzemu konjugata v celico, priti do odcepitve siderofora od učinkovine, da lahko ta nato difundira do mesta delovanja (25, 27).



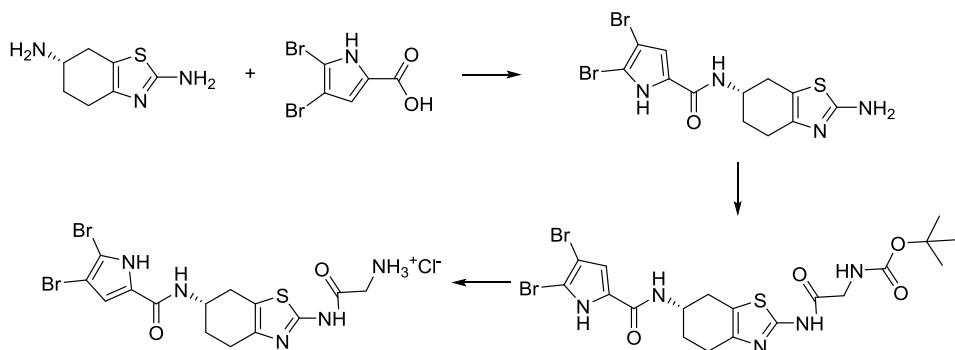
Slika 10: Splošni model dostave učinkovin v bakteriji z uporabo sideroforov (prirejeno po 27).

2. NAMEN DELA

Pri eksperimentalnem delu bomo sintetizirali konjugate med zaviralci DNA-giraze B in siderofori. Uporabili bomo znani pirolamidni ATP kompetitivni zaviralec GyrB, ki je bil nedavno odkrit in sintetiziran na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo. Za ta zaviralec je bilo ugotovljeno, da ima kljub dobri nanomolarni zaviralni aktivnosti na izolirani DNA-girazi iz *E. coli* šibko protibakterijsko aktivnost proti G+ in G- bakterijam (30). Šibko protibakterijsko delovanje je najbrž posledica slabega prehajanja celične stene bakterij, zato bomo na zaviralec pripeli različne siderofore, s čimer bomo skušali povečati vstop zavirala v celico in izboljšati njegovo protibakterijsko delovanje.

Konjugati med siderofori in zaviralci bodo sestavljeni iz treh komponent: siderofora, distančnika in zavirala. Sklepamo, da cepitev konjugata siderofor-zaviralec v našem primeru ni potrebna, saj bomo siderofor vezali na terminalni del zavirala, ki je usmerjen proti topilu. Zato bomo uporabili distančnik, ki se po vnosu spojine v bakterijo ne bo cepil, bo pa tvoril dodatne vodikove vezi s tarčnim mestom.

Najprej bomo sintetizirali zaviralec GyrB in nanj pripeli distančnik, kot je prikazano na sliki 11. Zaviralec bomo sintetizirali iz izhodne spojine (*S*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamina, na katerega bomo z amidno vezjo pripeli 4,5-dibromopirolni fragment.

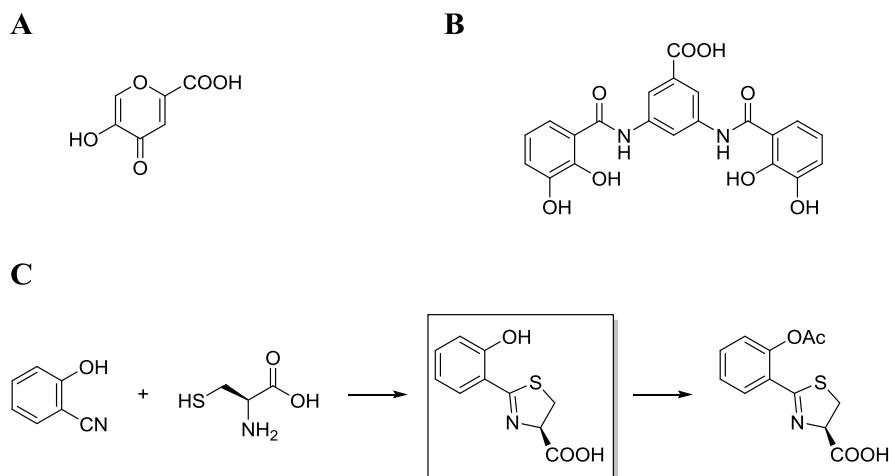


Slika 11: Shema sinteze novega potencialnega zavirala DNA-giraze B in pripenjanja distančnika.

Na dobljeni (*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid bomo nato pripeli distančnik – glicin. Glicin bomo pred vezavo na zaviralec GyrB še zaščitili z BOC-anhidridom. Po vezavi BOC-glicina pa bomo nazadnje BOC zaščitno skupino odstranili in tako sintetizirali (*S*)-2-((6-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-

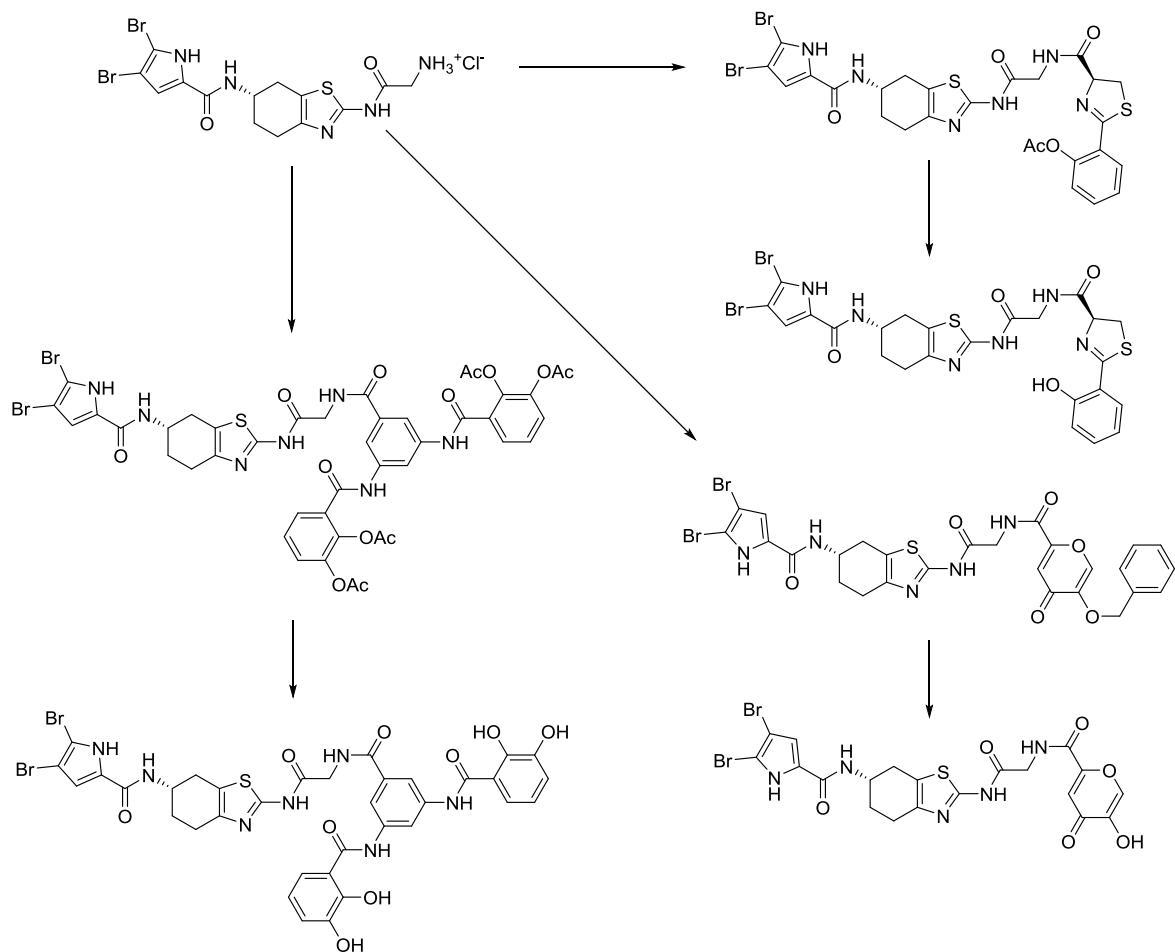
karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetan-1-amonijev klorid.

Na sintetizirani zaviralec z distančnikom bomo potem pripeli tri različne siderofore. Prvi siderofor, 5-hidroksi-4-okso-4*H*-piran-2-karboksilna kislina (slika 12A), je derivat kojične kisline in je mimetik piridonskega tipa sideroforov. Drugi siderofor, 3,5-bis(2,3-dihidroksibenzamido)benzojska kislina (slika 12B), pa je cateholatni tip siderofora. Oba siderofora sta bila predhodno pripravljena na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani, in sicer v obliki z zaščitenimi -OH skupinami. Tretji siderofor, (*S*)-2-(2-hidroksifenil)-4,5-dihidrotiazol-4-karboksilna kislina, bomo pripravili sami iz 2-hidroksibenzonitrila in L-cisteina, kot je prikazano na sliki 12C. (*S*)-2-(2-hidroksifenil)-4,5-dihidrotiazol-4-karboksilna kislina je analog naravnega siderofora desferitiocina in piokelina. Preden bomo sintetizirani siderofor vezali na zaviralec bomo tudi temu zaščitili -OH skupino.



Slika 12: **A.** Struktura 5-hidroksi-4-okso-4*H*-piran-2-karboksilne kisline. **B.** Struktura 3,5-bis(2,3-dihidroksibenzamido)benzojske kisline **C.** Shema sinteze (*S*)-2-(2-acetoksifenil)-4,5-dihidrotiazol-4-karboksilne kisline.

Ker bomo siderofore na zaviralec pripeli z zaščitenimi -OH skupinami, ki so pomembne za vezavo železa, bomo po sintezi konjugatov te zaščitne skupine še odcepili (slika 13). Sintetiziranim konjugatom, z zaščitenimi in z odščitenimi -OH skupinami, bomo nazadnje tudi ovrednotili njihovo zaviralno aktivnost na izolirani DNA-girazi iz *E. coli* in protibakterijsko aktivnost na izbranih G+ in G- sevih.



Slika 13: Shema sinteze konjugatov.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Reagenti in topila

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

3.2. Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC): Kot stacionarno fazo smo uporabljali plošče Merck Silica Gel 60 F₂₅₄ z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu, kot mobilno fazo (MF) pa smo uporabljali topila diklorometan (DKM), metanol (MeOH) in ocetno kislino v različnih razmerjih. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščicah smo uporabljali UV lučko z valovno dolžino 254 nm in orositvene reagente.

Flash kolonska kromatografija: Kot stacionarno fazo smo uporabljali silikagel Silica Gel 60 proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,040 - 0,063 mm, kot mobilno fazo pa smo uporabljali topili DCM in MeOH v različnih razmerjih.

3.3. Spektroskopske metode

Infrardeča spektroskopija (IR): IR spektre smo posneti na spektrofotometru Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Jedrska magnetna resonanca (NMR): NMR spektri so bili posneti na Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Kot topila smo uporabljali devteriran dimetil sulfoksid (DMSO-*d*₆), kot interni standard pa TMS. Spektre smo procesirali s pomočjo programa MestRe-C 4.8.6.0 proizvajalca Mesterlab Research S.L.

Masna spektrometrija (MS): Masni spektri so bili posneti na spektrometu Autospec (VG – Analytical) z ESI tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

3.4. Nomenklatura in risanje spojin

Za risanje strukturnih formul spojin in reakcij ter za poimenovanje po IUPAC nomenklaturi smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 13.0 proizvajalca CambridgeSoft.

3.5. Določevanje tališča

Tališča smo določili s Koflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica.

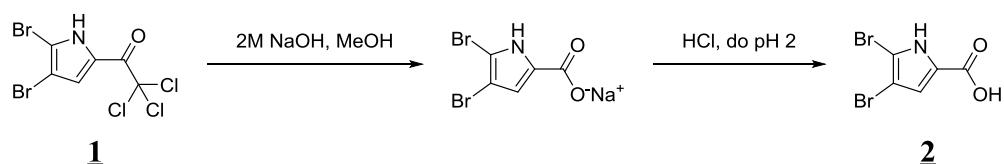
3.6. Biokemijska testiranja

Protibakterijsko delovanje bodo testirali na Univerzi v Helsinki na Finskem. Uporabili bodo klinično nadzorovane seve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in *Pseudomonas aeruginosa*. Bakterijske seve so gojili na Mueller Hinton II agarju (MHA, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) in na Mueller Hinton II tekočem gojišču (MHB, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Protimikrobi testi so bili izvedeni z metodo mikrodilucije bujona v skladu s smernicami CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) in EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Protibakterijska aktivnost je bila določena s primerjavo absorbanc vzorcev (pri 0, 4, 24 h) in kontrol pri 620 nm in je izražena v odstotkih zaviranja rasti. Za pozitivno kontrolo so na vsaki testni plošči uporabili referenčno protibakterijsko učinkovino ciprofloksacin, katere MIK₅₀ za *E. coli* je <0,015 µg/mL, MIK₉₀ za *E. coli* je 0,016 µg/mL, za *S. aureus* 0,51 µg/mL, za *E. faecalis* 1 µg/mL in za *P. aeruginosa* 1 µg/mL. Spojine so bile testirane pri koncentraciji 50 µM (31).

Encimske teste na DNA-girazi iz bakterije *E. coli* bo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani opravil izr. prof. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. Sinteza 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline



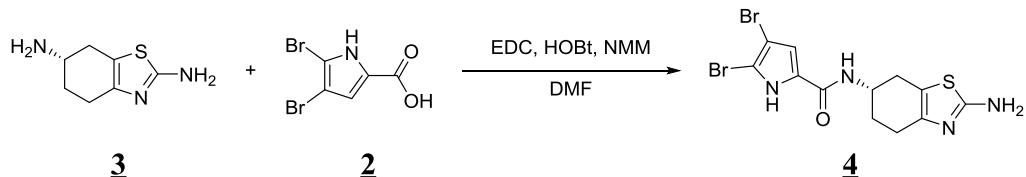
Spojino **1** (2,003 g, 5,410 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 30 mL MeOH. Dodali smo 2 M natrijev hidroksid (NaOH; 14 mL, 27,05 mmol, 5 ekv.) in segrevali na oljni kopeli (60°C). Po 2 urah in pol smo s pomočjo TLC kromatograma ugotovili, da je reakcija potekla do konca, zato smo reakcijski zmesi uparili metanol. Preostanek smo nato stresali z dietiletrom (2x30 mL) in s pomočjo TLC kromatograma ugotovili, da imamo v vodni fazи še prisotne nečistote. Stresanje z EA smo zato ponovili še dvakrat, vsakič z 2x30 mL, nakar smo s pomočjo TLC kromatograma ugotovili, da smo nečistote odstranili iz vodne faze. Po ločitvi faz, smo vodno fazo z dodatkom 1 M HCl nakisali do pH 2. Nakisanje smo izvajali na ledeni kopeli, ob tem pa se nam je produkt oboril. Dobili smo 1,113 g spojine **2**.

Kemijska formula	$C_5H_3Br_2NO_2$
M_r	268,89 g/mol
Opis	rdeče rjavi kristali
Izkoristek	76,5%
R_f (MF)	0 (DKM:MeOH = 20:1)
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 6,84 (singlet (s), 1H, Ar-H), 12,79 (s, 1H, CO-OH), 12,99 (s, 1H, Ar-NH) ppm

4.2. Sintezni postopek A

Kislino (1 ekv.) smo raztopili v *N,N*-dimetilformamidu (DMF) in na ledeni kopeli ohladili do približno 0 °C. Nato smo dodali *N*-(3-(diethylamino)prop-1-il)-*N'*-etilkarbodiimid hidroklorid (EDC; 1,2 ekv.), 1-hidroksibenzotriazol hidrat (HOEt; 1,3 ekv.) in nazadnje še *N*-metilmorfolin (NMM; 2 ekv.) ter pustili mešati na ledu 20 minut. Nato smo dodali amin (1 ekv.) in reakcijsko zmes mešali čez noč pri sobni temperaturi. Po koncu reakcije, ki smo ga določili s pomočjo TLC kromatograma, smo začeli z izolacijo produkta. Reakcijski zmesi smo najprej uparili topilo – DMF, preostanek pa smo raztopili v EA. Dobljeno raztopino smo nato najprej spirali z 1% citronsko kislino, nato z nasičeno raztopino natrijevega hidrogenkarbonata (NaHCO_3) in nazadnje še z nasičeno raztopino natrijevega klorida (NaCl). Organsko fazo smo nato še sušili nad natrijevim sulfatom (Na_2SO_4), natrijev sulfat smo odfiltrirali, filtratu pa smo uparili topilo - EA.

4.3. Sinteza (S)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamida

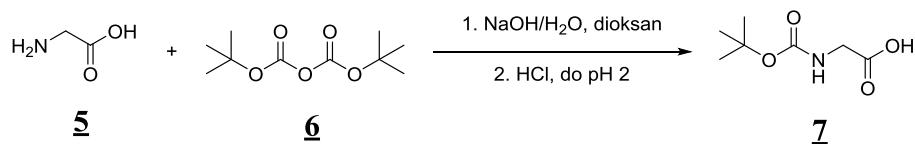


Sintezo spojine **4** smo izvedli po sinteznem postopku **A** v 15 mL DMF iz spojine **2** (1,113 g, 4,139 mmol, 1 ekv.), EDC (0,952 g, 4,967 mmol, 1,2 ekv.), HOEt (0,727 g, 5,381 mmol, 1,3 ekv.), NMM (0,90 mL, 8,278 mmol, 2 ekv.) in spojine **3** (0,701 g, 4,139 mmol, 1 ekv.). Pri izolaciji produkta smo zmes raztopili v 100 mL EA. Za spiranje smo uporabili 2x20 mL 1% citronske kisline, 2x50 mL nasičenega NaHCO_3 in 1x50 mL nasičenega NaCl. Ob stresanju organske faze z 1% citronsko kislino, se nam je pojavila temna oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem in je bilo zanemarljivo malo. Dobili smo 1,380 g spojine **4**.

Kemijska formula	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{Br}_2\text{N}_4\text{OS}$
------------------	--

M_r	420,12 g/mol
Opis	temno oranžni kristali
Izkoristek	79,4%
R_f (MF)	0,38 (DKM:MeOH = 9:1)
Tališče (°C)	108 - 111
IR (ATR)	ν 3116, 2935, 2843, 1723, 1615, 1558, 1507, 1414, 1392, 1371, 1317, 1230, 1170, 1096, 1043, 970, 825, 752, 683, 639, 613, 542, 512 cm ⁻¹
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1,69-1,87 (multiplet (m), 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,86-1,97 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,43-2,54 (m, 3H, signal se delno prekriva s signalom za DMSO- <i>d</i> ₅ , -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 2,79 (dvojni dublet (dd), 1H, <i>J</i> = 5,5 Hz, 14,7 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,08-4,18 (m, 1H, -CH-H-6), 6,69 (s, 2H, -NH ₂), 7,00 (s, 1H, Ar-CH), 8,06 (dublet (d), 1H, <i>J</i> = 7,8 Hz, -CO-NH-), 12,69 (dd, 1H, <i>J</i> = 1,2 Hz, 0,5 Hz, Ar-NH), ppm

4.4. Sinteza (terc-butoksikarbonil)glicina

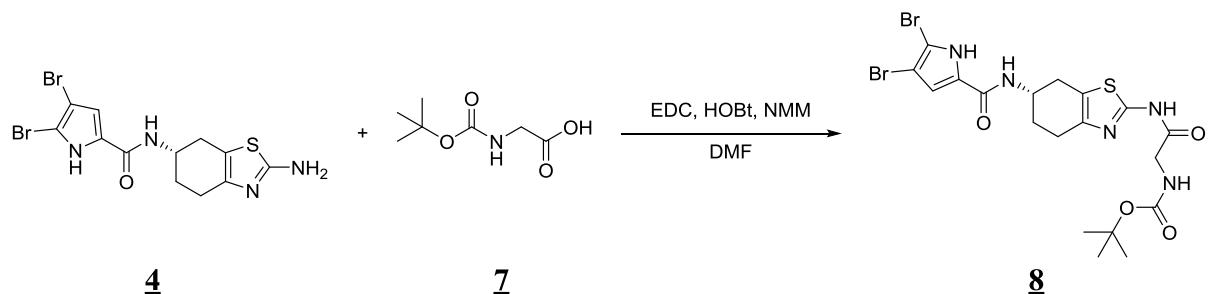


Glicin (**5**; 5,058g, 67,4 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v zmesi 1 M NaOH (70 mL) in 1,4-dioksana (35 mL) ter jo na ledu ohladili na približno 0 °C. Nato smo po kapljicah dodajali di-terc-butil dikarbonat (BOC₂O, **6**; 17,65 g, 80,88 mmol, 1,2 ekv.) raztopljen v 35 mL dioksana. Reakcijsko zmes smo pustili, da se je čez noč mešala pri sobni temperaturi. Reakcijski zmesi smo nato uparili topilo (1,4-dioksan), ostanek pa smo v liju ločniku stresali z dietiletrom (2x70 mL). Vodno fazo smo nato ob mešanju na ledeni kopeli nakisali do pH 2 z 2 M HCl. Nakisano vodno fazo smo stresali še z EA (3x70 mL).

Združene organske faze smo sušili nad Na_2SO_4 , Na_2SO_4 smo odfiltrirali, filtratu pa smo nazadnje uparili še topilo. Dobili smo 10,195 g spojine **7**.

Kemijska formula	$\text{C}_{17}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_7$
M_r	175,18 g/mol
Opis	beli kristali
Izkoristek	86,3%
R_f (MF)	0,39 (DKM:MeOH = 9:1)
Tališče (°C)	74 – 75
IR (ATR)	ν 3408, 3343, 2979, 1738, 1667, 1529, 1454, 1408, 1368, 1336, 1298, 1281, 1256, 1195, 1155, 1055, 1033, 957, 882, 857, 780, 734, 673, 579 cm^{-1}

4.5. Sinteza *terc-butil (S)-(2-((6-(4,5-dibromo-1*H*-pirola-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)karbamata*

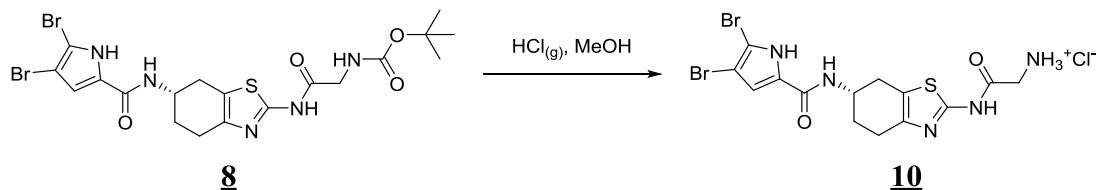


Sintezo spojine **8** smo izvedli po sinteznem postopku A v 30 mL DMF iz spojine **7** (0,383 g, 2,185 mmol, 1 ekv.), EDC (0,503 g, 2,622 mmol, 1,2 ekv.), HOBT (0,348 g, 2,841 mmol, 1,3 ekv.), NMM (0,5 mL, 4,370 mmol, 2 ekv.) in spojine **4** (0,918 g, 2,185 mmol, 1 ekv.). Pri izolaciji smo zmes raztopili v 100 mL EA in raztopino najprej spirali z destilirano vodo (1x40 mL). Nato pa smo nadaljevali s postopkom izolacije, kot je naveden v sinteznem

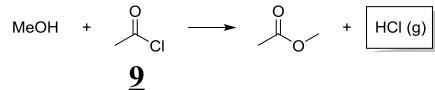
postopku A. Porabili smo 1x40 mL 1% citronske kisline, 2x40 mL nasičenega NaHCO_3 in 1x40 mL nasičenega NaCl. Spojino smo po izolaciji še očistili s flash kolonsko kromatografijo z MF DKM:MeOH = 20:1. Dobili smo 0,735 g spojine **8**.

Kemijska formula	$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{Br}_2\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$
M_r	577,29 g/mol
Opis	rumeni kristali
Izkoristek	58,3%
R_f	0,42 (DKM:MeOH = 9:1)
Tališče (°C)	155 – 158
IR (ATR)	ν 3169, 2977, 2356, 1683, 1644, 1613, 1557, 1509, 1413, 1392, 1367, 1280, 1248, 1229, 1160, 1090, 1051, 1026, 976, 942, 856, 817, 754, 694, 638, 614, 563, 538, 511 cm^{-1}
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	δ 1,39 (2xs, 9H, -C-(CH ₃) ₃), 1,79-1,94 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,96-2,02 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,57-2,78 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 2,97 (dd, 1H, J = 5,1 Hz, 15,6 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 3,80 (d, 2H, J = 6,2 Hz, -CH ₂ -CO-), 4,11-4,26 (m, 1H, -CH-NH-), 7,00 (d, 1H, J = 2,8 Hz, Ar-H), 7,14 (triplet (t), 1H, J = 6,1 Hz, -NH-CH ₂ -), 8,10 (d, 1H, J = 7,8 Hz, -CH-NH-CO-), 11,94 (s, 1H, CH ₂ -CO-NH-), 12,70 (d, 1H, J = 2,6 Hz, Ar-NH) ppm
^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	δ 24,6, 28,1 (3C), 28,4, 28,6, 42,9, 45,2, 78,2, 97,8, 104,5, 112,9, 119,2, 128,0, 143,5, 155,3, 155,8, 158,4, 168,2 ppm

4.6. Sinteză (S)-2-((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetan-1-amonijevega klorida



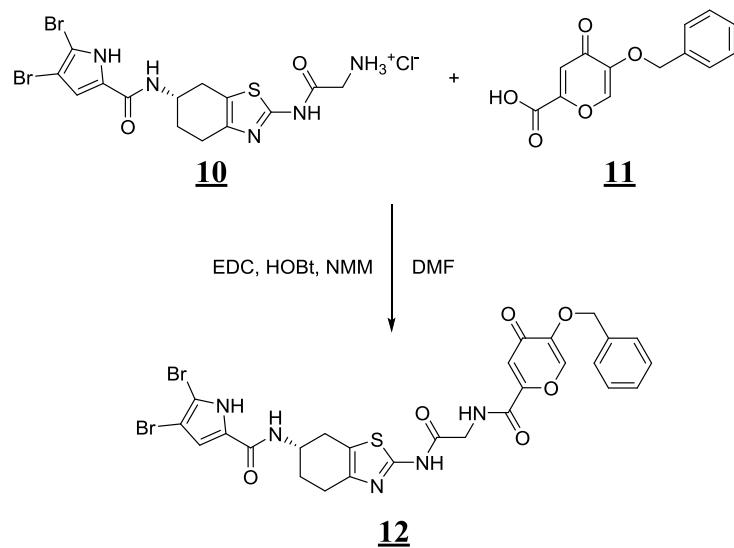
V bučko smo odmerili 70 mL metanola in ga ohladili na 0 °C. Nato smo bučko nepredušno zaprli in prek septuma z iglo dodali acetil klorid (**9**; 1,2 mL, 11,970 mmol, 10 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali na ledeni kopeli 30 minut, potem smo k reakcijski zmesi dodali še spojino **8** (0,691 g, 1,197 mmol, 1 ekv.) raztopljeno v 40 mL metanola in pustili, da se reakcijska zmes meša na ledu še 1 uro. Potem smo ledeno kopel odstranili in pustili, da reakcija poteka pri sobni temperaturi 3 dni. Po treh dneh smo s pomočjo TLC kromatograma ugotovili, da je reakcija v celoti potekla, zato smo reakcijski zmesi uparili topilo in jo posušili. Dobili smo 0,615 g spojine **10**. Ker je spojina zelo hidroskopna in jo je zelo težko posušiti do suhega, je masa produkta večja, kot smo pričakovali.



Kemijska formula	$C_{14}H_{16}Br_2ClN_5O_2S$
M_r	513,63 g/mol
Opis	bež kristali
Izkoristek	112,7%
R_f	0 (DKM:MeOH = 20:1)
Tališče (°C)	196 - 199
IR	v 2845, 1722, 1622, 1558, 1519, 1413, 1305, 1207, 1109, 1081, 970,

(ATR)	903, 830, 756, 733, 708, 614, 541 cm ⁻¹
¹ H NMR	δ 1,81-1,93 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,96-2,04 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,63-2,74 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 2,93-3,03 (dd, 1H, J =5,4 Hz, 15,5 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 3,86 (dd, 2H, J = 3,3 Hz, 8,6 Hz, -CH ₂ -CO-), 4,14-4,24 (m, 1H, CH-NH), 7,02 (d, 1H, J = 2,8 Hz, Ar-H), 8,23 (d, 1H, J = 7,8 Hz, -CH-NH-CO-), 8,31 (s, 3H, NH ₃ ⁺), 12,77 (d, 1H, J = 2,7 Hz, Ar-NH) ppm
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 24,6, 28,4, 28,5, 40,6, 45,2, 97,8, 104,5, 113,1, 120,0, 128,0, 142,0, 157,3, 157,7, 158,3 ppm

4.7. Sinteza (S)-N-(2-(2-(5-(benzoksi)-4-okso-4H-piran-2-karboksamido)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamida



Sintezo spojine **12** smo izvedli po sinteznem postopku A v 8 mL DMF iz spojine **11** (0,072 g, 0,292 mmol, 1 ekv.), EDC (0,067 g, 0,350 mmol, 1,2 ekv.), HOBr (0,051 g, 0,380 mmol, 1,3 ekv.), NMM (0,1 mL, 0,584 mmol, 2 ekv.) in spojine **10** (0,150 g, 0,292 mmol, 1 ekv.). Pri izolaciji smo zmes raztopili v 30 mL EA. Pri spiranju pa smo porabili 2x10 mL 1%

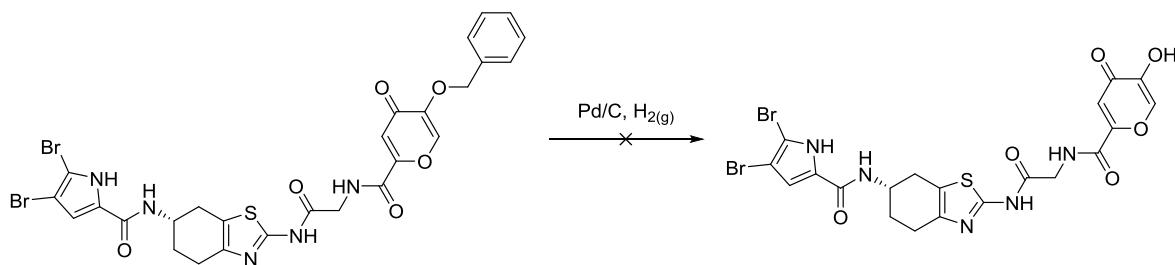
citronske kisline, 2x10 mL nasičenega NaHCO₃ in 1x10 mL nasičenega NaCl. Ob spiranju z 1% citronsko kislino se nam je pojavila oborina, ki smo jo odfiltrirali. Organske faze tokrat nismo sušili z Na₂SO₄, ker smo spojino že leli očistiti še s kolonsko kromatografijo. Organski fazi smo tako uparili topilo in dobljeno zmes skušali raztopiti v MF DKM:MeOH = 20:1, vendar se je ob raztopljanju oboril čist produkt (brez izhodnih spojin), ki smo ga odfiltrirali in posušili. Dobili smo 0,228 g spojine **12**. Pozneje smo ugotovili, da imamo v produktu prisoten še NaCl, ker raztopine po ekstrakciji nismo sušili nad Na₂SO₄. Produkt, ki smo ga še imeli (0,057 g) smo raztopili v THF in odfiltrirali NaCl, filtrat pa smo posušili. Ob tem smo dobili 0,028 g čiste spojine **12**.

Kemijska formula	C ₂₇ H ₂₃ Br ₂ N ₅ O ₆ S
M _r	705,38 g/mol
Opis	svetlo rumeni kristali
Izkoristek	110% (nečiste spojine s prisotnim NaCl)
R _f	0,36 (DKM:MeOH = 9:1)
Tališče (°C)	165 – 168
IR (ATR)	v 3186, 2954, 2358, 1759, 1639, 1558, 1520, 1455, 1431, 1394, 1371, 1288, 1264, 1192, 1119, 1063, 1035, 971, 921, 883, 827, 746, 697, 613, 574, 547 cm ⁻¹
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1,81-1,92 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,95-2,05 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,65-2,76 (m, 3H, -CH ₂ -5, -CH ₂ -H _A -4), 2,98 (dd, 1H, <i>J</i> = 4,5 Hz, 15,7 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,13 (d, 2H, <i>J</i> = 6,0 Hz, -CO-CH ₂ -NH-), 4,16-4,23 (m, 1H, -CH-NH-), 5,03 (s, 2H, -O-CH ₂ -Ph), 6,91 (s, 1H, -CH-CO-), 7,01 (s, 1H, Ar-H), 7,35-7,47 (m, 5H, Ph), 8,18 (d, 1H, <i>J</i> = 8,4 Hz, -CO-NH-CH-), 8,32 (s, 1H, -CH-O-), 9,32 (t, 1H, <i>J</i> = 6,0 Hz, -CH ₂ -NH-CO-), 12,13 (s, 1H, -NH-), 12,74 (s, 1H, -NH-) ppm

HR-MS (ESI⁻) za
 $C_{27}H_{22}Br_2N_5O_6S$
 $([M-H]^-)$

izračunana masa: 701,9658; izmerjena masa: 701,9658

4.8. Poskus sinteze (S)-4,5-dibromo-N-(2-(2-(4-hidroksi-3-oksocikloheksa-1,4-dien-1-karboksamido)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-1H-pirol-2-karboksamida

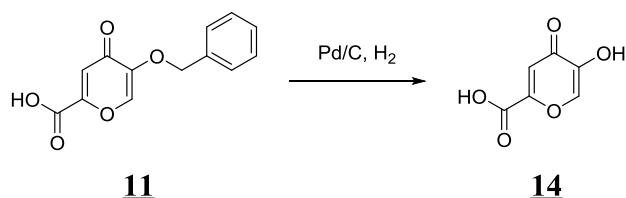


12

13

Spojino **12** (0,171 g) smo raztopili v 5 mL etanola in 15 mL THF. Raztopino smo nato prepihali z argonom, dodali 0,025 g Pd/C ter bučko prepihali še z H₂. Reakcijo smo pustili, da je potekala čez noč. S pomočjo TLC kromatograma smo ugotovili, da je nastalo le malo produkta, zato smo reakcijsko zmes zopet prepihali z argonom, dodali še 0,020 g Pd/C in reakcijsko zmes zopet prepihali z H₂. Reakcijo smo spet pustili, da je potekala čez noč, vendar ni nastalo nič več produkta, zato smo se odločili, da začnemo z izolacijo. Reakcijski zmesi smo najprej odfiltrirali paladij na ogljiku, nato pa ji uparili topilo. Dobljeno zmes smo se odločili očistiti s flash kolonsko kromatografijo ob uporabi MF DCM:MeOH = 9:1. Ob spiranju kolone z izbrano MF smo iz kolone dobili zanemarljivo količino produkta, zato smo kolono spirali še z čistim MeOH, z zmesjo DCM:MeOH:ocetna kislina=5:1:0,1 in pa z DMF. Ob tem iz kolone nismo pridobili nič več produkta.

4.9. Sinteza 5-hidroksi-4-okso-4H-piran-2-karboksilne kisline



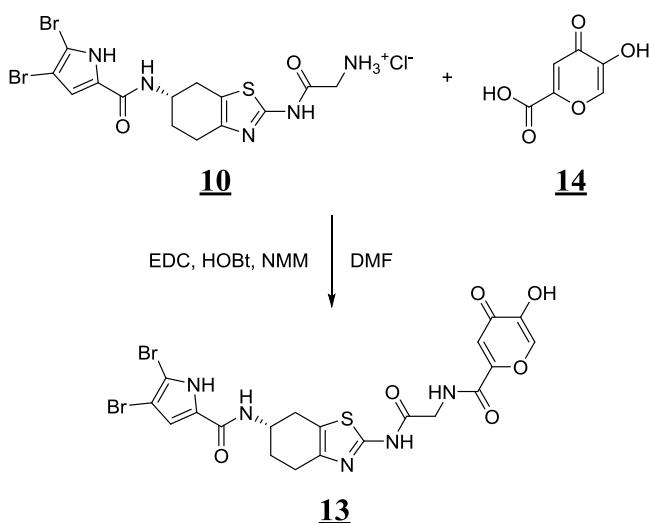
Spojino **11** (0,505 g) smo raztopili v 20 mL etanola in bučko prepihali z argonom. Nato smo dodali 0,054 g Pd/C in bučko prepihali z H₂. Po dveh dneh smo s pomočjo TLC kromatograma ugotovili, da reakcija ne poteka več zato smo začeli z izolacijo produkta. Reakcijski zmesi smo najprej s filtriranjem odstranili paladij na ogljiku, nato pa uparili topilo. Nadalje smo nečist produkt žeeli očistiti s flash kolonsko kromatografijo. Ob raztapljanju zmesi v MF DKM:MeOH:acetna k. = 4:1:0,1 se nam je oboril čist produkt, ki smo ga odfiltrirali in posušili. Dobili smo 0,138 g spojine **14**.

Kemijska formula	C ₆ H ₄ O ₅
M _r	156,09 g/mol
Opis	beli kristali
Izkoristek	43,1%
R _f	0,24 (DKM:MeOH:acetna k. = 4:1:0,1)
Tališče (°C)	> 310
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 6,95 (s, 1H, -CH-CO-), 8,20 (s, 1H, -CH-O-), 9,66 (s, 1H, -OH), 13,71-14,98 (razširjen singlet (br s), 1H, -CO-OH) ppm

4.10. Sintezni postopek B

V bučko smo natehtali izhodni amin (1 ekv.) in ga ob mešanju na ledeni kopeli raztopili v DMF. Nato smo dodali izhodno kislino (1 ekv.) in NMM (2 ekv.), nazadnje pa še EDC (1,2 ekv.) in HOBr (1,3 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili, da se čez noč meša na ledu. Po koncu reakcije smo začeli z izolacijo produkta. Reakcijski zmesi smo najprej uparili topilo, preostanek pa raztopili v EA. Dobljeno raztopino smo nato stresali z 1% citronsko kislino in z nasičeno raztopino NaCl. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, ga odfiltrirali in filtratu uparili topilo.

4.11. Sinteza (*S*)-4,5-dibromo-N-(2-(2-(4-hidroksi-3-oksocikloheksa-1,4-dien-1-karboksamido)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-1H-pirol-2-karboksamida

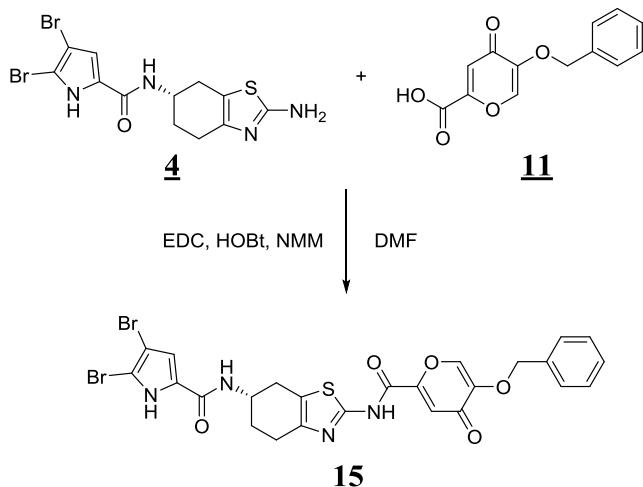


Spojino **13** smo sintetizirali po sinteznem postopku **B** v 8 mL DMF. Uporabili smo spojino **10** (0,100 g, 0,195 mmol, 1 ekv.), spojino **14** (0,030 g, 0,195 mmol, 1 ekv.), NMM (0,05 mL, 0,390 mmol, 2 ekv.), EDC (0,045 g, 0,234 mmol, 1,2 ekv.) in HOBr (0,034 g, 0,254 mmol, 1,3 ekv.). Ob izolaciji smo reakcijsko zmes raztopili v 30 mL EA in jo stresali z 10 mL 1% citronske kisline. Ob tem se nam je tvorila emulzija, zato smo zmesi dodali še 10 mL EA, 10 mL 1% citronske kisline in NaCl. Ob tem sta se nam fazi ločili, ostala pa je oborina, ki smo jo odfiltrirali. Po ločitvi faz smo organsko fazo še enkrat sprali z 10 mL 1% citronske kisline, nato pa smo jo sušili nad Na₂SO₄. Ko smo Na₂SO₄ odfiltrirali, smo

zmesi uparili topilo. Dobrijenemu zaostanku smo dodali oborino, ki je izpadla ob stresanju s citronsko kislino, nato pa smo vse skupaj očistili s flash kolonsko kromatografijo. Kot MF smo najprej uporabili DKM:MeOH = 9:1, nato pa smo jo zamenjali za MF DKM:MeOH = 4:1. Dobili smo 0,008 g spojine **13**.

Kemijska formula	$C_{20}H_{17}Br_2N_5O_6S$
M_r	615,25 g/mol
Opis	svetlo rumeni kristali
Izkoristek	11,7%
R_f	0,29 (DKM:MeOH) = 4:1
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1,83-1,91 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,95-2,03 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,65-2,73 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 2,98 (dd, 1H, J = 5,2 Hz, 15,6 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,13 (d, 2H, J = 5,8 Hz, -CO-CH ₂ -NH-), 4,15-4,21 (m, 1H, -CH-NH), 6,92 (s, 1H, -CH-CO-), 7,00 (s, 1H, Ar-H), 8,18-8,23 (m, 2H, -CO-NH-CH-, -CH-O-), 9,28 (t, 1H, J = 5,9 Hz, -CH ₂ -NH-CO-), 9,52-9,92 (br s, 1H, -OH), 12,14 (s, 1H, -NH-CO-CH ₂ -), 12,62-12,96 (br s, 1H, Ar-NH) ppm
HR-MS (ESI) za $C_{20}H_{16}Br_2N_5O_6S$ ([M-H] ⁻)	izračunana masa: 611,9188; izmerjena masa: 611,9180

4.12. Sinteza (S)-N-(2-(5-(benziloksi)-4-okso-4H-piran-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamida

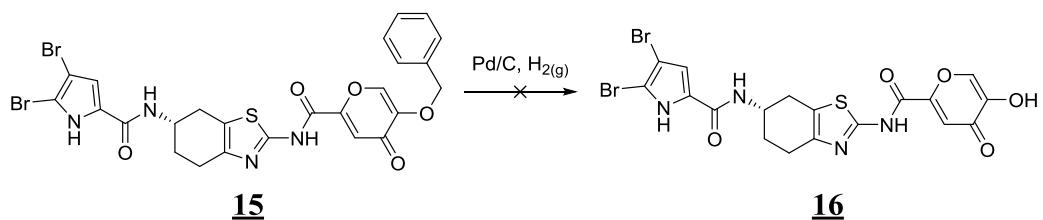


Sintezo spojine **15** smo izvedli po sinteznem postopku A v 8 mL DMF iz spojine **11** (0,088 g, 0,357 mmol, 1 ekv.), EDC (0,082 g, 0,428 mmol, 1,2 ekv.), HOBT (0,063 g, 0,464 mmol, 1,3 ekv.), NMM (0,1 mL, 0,714 mmol, 2 ekv.) in spojine **4** (0,150 g, 0,357 mmol, 1 ekv.). Ob izolaciji smo reakcijsko zmes raztopili v 30 mL EA. Ob stresanju pa smo porabili 2x10 mL 1% citronske kisline, 2x10 mL nasičenega NaHCO₃ in 1x10 mL nasičenega NaCl. Ob spiranju z 1% citronsko kislino se nam je pojavila oborina, ki smo jo odfiltrirali in jo pozneje dodali k produktu iz organske faze. Nazadnje smo produkt še očistili s kolonsko kromatografijo z MF DKM:MeOH = 30:1. Dobili smo 0,075 g spojine **15**.

Kemijska formula	C ₂₅ H ₂₀ Br ₂ N ₄ O ₅ S
M _r	648,33 g/mol
Opis	rumeni kristali
Izkoristek	32,5%
R _f	0,41 (DKM:MeOH = 9:1)
Tališče (°C)	168 – 170

IR (ATR)	v 3113, 2941, 2356, 1633, 1587, 1558, 1515, 1423, 1390, 1328, 1264, 1237, 1201, 1082, 1032, 975, 946, 862, 744, 697, 675, 613, 585, 538 cm ⁻¹
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1,83-1,94 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,95-2,08 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,57-2,66 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -5), 2,70-2,78 (m, 2H, -CH ₂ -H _B -5, -CH ₂ - H _A -4), 2,94-3,06 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -4), 4,16-4,31 (m, 1H, -CH-NH), 5,02 (s, 2H, -O-CH ₂ -Ph), 7,01 (d, 1H, <i>J</i> = 2,6 Hz, Ar-H), 7,05-7,16 (m, 1H, -CH-CO-), 7,43 (M, 5H, Ph), 8,12 (d, 1H, <i>J</i> = 7,8 Hz, -CO- NH-CH-), 8,33 (s, 1H, -CH-O-), 12,72 (d, 1H, <i>J</i> = 2,5 Hz, -NH-), 12,87-13,60 (br s, 1H, -C-NH-CO-C-) ppm
HR-MS (ESI) za C ₂₅ H ₂₀ Br ₂ N ₄ O ₅ S ([M-H] ⁻)	izračunana masa: 644,9443; izmerjena masa: 644,9439

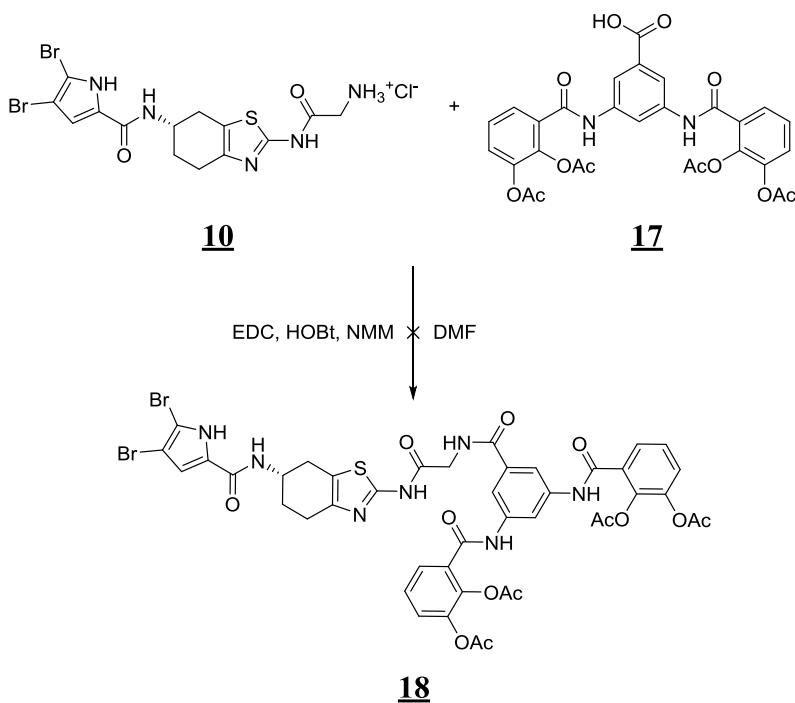
4.13. Poskus sinteze (S)-4,5-dibromo-N-(2-(5-hidroksi-4-okso-4H-piran-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-1H-pirol-2-karboksamida



Spojino **15** (0,036 g) smo raztopili v tetrahidrofuranu (THF, 10 mL). Raztopino smo prepihali z argonom in dodali paladij na aktiviranem ogljiku (Pd/C, 0,008 g). Nato smo raztopino prepihali z vodikom (H_2) in pustili, da se reakcijska zmes v H_2 atmosferi meša čez noč. Po 24 urah smo s pomočjo TLC kromatograma ugotovili, da je reakcija zelo slabo potekla, zato smo raztopino zopet prepihali z argonom, dodali še 0,010 mg Pd/C in raztopino znova prepihali z H_2 . Tokrat smo reakcijsko zmes pustili, da se meša 3 dni. Po treh dneh smo s pomočjo TLC kromatograma ugotovili, da reakcija ni potekla, zato smo k

reakcijski zmesi dodali etanol in pustili, da se je mešala čez noč. Naslednji dan smo zopet razvili kromatogram, da bi preverili ali je reakcija potekla in ugotovili, da tudi dodatek etanola ni pomagal. Reakcijski zmesi smo nato zamenjali topilo. Odfiltrirali smo paladij na ogljiku in uparili THF in etanol. Preostanek smo raztopili v ocetni kislini (10 mL). Zmes smo nato znova prepihalo z argonom, dodali Pd/C (0,018 g) in jo nazadnje prepihalo še z H₂. Reakcijo smo pustili, da poteka čez noč, vendar zopet ni potekla. Reakcijsko zmes smo nato dali še segrevati na oljno kopel (50 °C). Reakcijsko zmes smo na oljni kopeli mešali 5 dni, ob tem smo vsak dan s pomočjo TLC kromatograma preverjali potek reakcije. Ker v teh petih dneh ni bilo nobene spremembe smo reakcijo prekinili, reakcijsko zmes pa zavrgli.

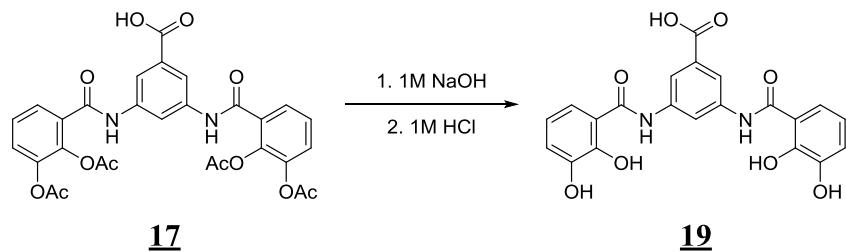
4.14. Poskus sinteze (S)-(((5-((2-((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)karbamoil)-1,3-fenilen)bis(azanediil))bis(karbonil)bis(benzen-3,1,2-triil) tetraacetata



Sintezo spojine **18** smo izvedli po sinteznem postopku A v 8 mL DMF iz spojine **17** (0,116 g, 0,195 mmol, 1 ekv.), EDC (0,045 g, 0,234 mmol, 1,2 ekv.), HOBT (0,034 g, 0,254 mmol,

1,3 ekv.), NMM (0,05 mL, 0,390 mmol, 2 ekv.) in spojine **10** (0,100 g, 0,195 mmol, 1 ekv.). Po dodatku EDC in HOBr smo reakcijsko zmes prepihali z argonom in nato dodali še NMM. Pri izolaciji smo reakcijsko zmes raztopili v 30 mL EA. Pri ekstrakciji smo uporabili 2x10 mL 1% citronske kisline, 2x10 mL nasičenega NaHCO₃ in 1x10 mL nasičenega NaCl. Po izolaciji smo produkt žeeli še očistili s flash kolonsko kromatografijo z MF DKM:MeOH = 20:1. Iz kolone smo dobili dve skupini frakcij s čistima spojinama, vendar nobena ni bila naš produkt. Reakcija ni uspela.

4.15. Sinteza 3,5-bis(2,3-dihidroksibenzamido)benzojske kisline

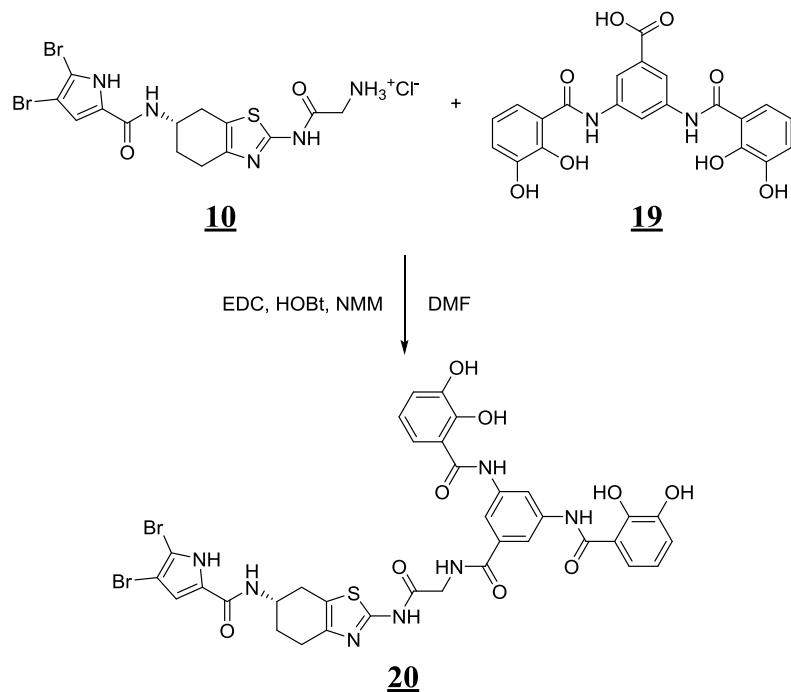


Spojino **17** (0,500 g, 0,884 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 10 mL MeOH. Dodali smo 1 M NaOH (5,1 mL, 5,064 mmol, 6 ekv.) in pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Po koncu reakcije, ugotovljenem z TLC, smo raztopini uparili topilo (MeOH). Preostanek smo z 1 M HCl nakisali do pH 2, pri čemer se je spojina **19** oborila. Oborjen produkt smo odfiltrirali in posušili. Dobili smo 0,411 g spojine **19**, ki še ni bila popolnoma suha.

Kemijska formula	<chem>C21H16N2O8</chem>
M _r	424,37
Opis	temno rjavi kristali
Izkoristek	114,8%
R _f	0 (DKM:MeOH = 9:1)
Tališče (°C)	> 340

IR (ATR)	v 3117, 2359, 1587, 1556, 1454, 1426, 1329, 1261, 1203, 1080, 975, 848, 734, 696, 675, 612, 580, 536 cm ⁻¹
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 6,79 (t, 2H, J = 7,9 Hz, Ar-H), 7,04 (dd, 2H, J = 7,8 Hz, 1,3 Hz, Ar-H), 7,45-7,55 (m, 2H, Ar-H), 8,13 (d, 2H, J = 1,9 Hz, Ar-H), 8,42 (triplet (t), 1H, J = 1,8 Hz, Ar-H), 9,20-10,00 (br s, 2H, -OH), 10,62 (s, 2H, -NH-), 11,15-11,68 (br s, 2H, -OH), 12,36-13,49 (br s, 1H, - COOH) ppm

4.16. Sinteza (S)-N,N'-(5-((2-((6-(4,5-dibromo-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-dihidroksibenzamida)

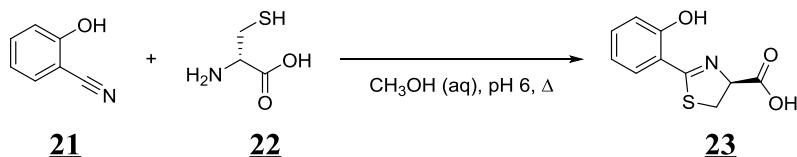


Spojino **20** smo sintetizirali po sinteznem postopku **B** v 6 mL DMF. Uporabili smo spojino **10** (0,100 g, 0,195 mmol, 1 ekv.), spojino **19** (0,087 g, 0,205 mmol, 1,05 ekv.), NMM (0,05 mL, 0,390 mmol, 2 ekv.), EDC (0,045 g, 0,234 mmol, 1,2 ekv.) in HOEt (0,034 g, 0,254 mmol, 1,3 ekv.). Pri izolaciji smo reakcijsko zmes raztopili v 30 mL EA in jo spiralni z 2x10 mL 1% citronske kisline. Ob tem se nam je pojavila oborina, ki smo jo odfiltrirali

in je bila nečista spojina **20**. Oborino smo nazadnje še prekristalizirali iz MeOH in dobili smo 0,172 g spojine **20**.

Kemijska formula	$C_{35}H_{29}Br_2N_7O_9S$
M_r	883,53 g/mol
Opis	svetlo rjavi kristali
Izkoristek	31,4%
R_f	0 (DKM:MeOH = 4:1 + ocetna k.)
Tališče (°C)	> 340
IR (ATR)	ν 3118, 2360, 1558, 1520, 1454, 1423, 1329, 1263, 1207, 1080, 974, 861, 745, 696, 614, 571, 543 cm^{-1}
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1,80-1,93 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,93-2,06 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,64- 2,83 (m, 4H, -CH ₂ -H-4, -CH ₂ -H-5), 4,10-4,27 (m, 3H, -CO-CH ₂ - NH-, -CH-NH-), 6,74-6,86 (m, 1H), 6,96 (s, 1H) 7,00-7,03 (m, 1H), 7,50-7,52 (m, 1H), 7,75-7,86 (m, 2H), 7,95-8,07 (m, 2H), 8,30-8,36 (m, 1H), 8,55-8,60 (m, 1H), 8,96 (br s, 1H), 10,03-10,65 (m, 2H,), 11,79 (m, 1H, NH), 12,44 (s, 1H, NH), ppm; signali za nekatere NH in OH skupine niso vidni v spektru
HR-MS (ESI) za $C_{35}H_{29}Br_2N_7O_9S$ ([M-H] ⁻)	izračunana masa: 880,0036; izmerjena masa: 880,0031

4.17. Sinteza (S)-2-(2-hidroksifenil)-4,5-dihidrotiazol-4-karboksilne kislina

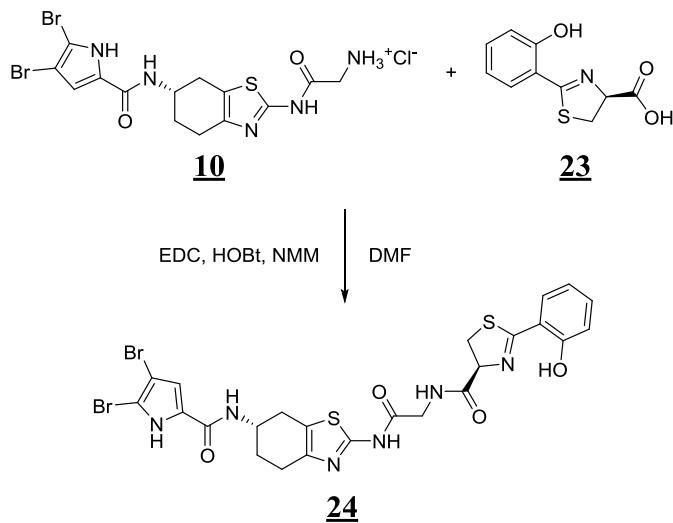


2-hidroksibenzonitril (**21**; 1,000 g, 8,395 mmol, 1ekv.) smo raztopili v 60 mL metanola in dodali 60 mL fosfatnega pufra (pH 6). Raztopino smo nato prepihali z argonom in dodali L-cistein (**22**; 1,526 g, 12,592 mmol, 1,5 ekv.). Raztopini smo nato dodali smo še NaHCO_3 (1,2 g), da smo dosegli pH raztopine 6. Reakcijsko zmes smo nato segrevali na oljni kopeli pri temperaturi 65 °C pod refluksom. Po 2 urah smo s TLC preverili potek reakcije in ugotovili, da je že skoraj v celoti potekla, zato smo reakcijo ustavili in začeli z izolacijo produkta. Raztopini smo uparili metanol in zmes z 2 M HCl nakisali do pH 2. Pri tem se nam je izločila oborina, ki smo jo raztopili z dodatkom EA (60 mL). Vsebino bučke smo prenesli v ljubločnik in ločili vodno fazo od organske faze. Vodno fazo smo nato še enkrat stresali z 60 mL EA. Združene organske faze smo nato še sušili nad Na_2SO_4 , Na_2SO_4 smo odfiltrirali in filtratu uparili topilo. Spojino smo nazadnje še prekristalizirali iz etanola in vode. Dobili smo 0,973 g spojine **23**.

Kemijska formula	$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}$
M_r	223,25 g/mol
Opis	rumeni kristali
Izkoristek	51,9%
R_f	0,40 (DKM:MeOH = 9:1 + ocetna kislina)
Tališče (°C)	96 – 99
IR (ATR)	ν 3225, 2560, 1712, 1614, 1573, 1489, 1455, 1433, 1394, 1314, 1292, 1252, 1217, 1154, 1120, 1055, 1032, 967, 956, 945, 860, 827,

	788, 747, 686, 667, 603, 542, 525 cm ⁻¹
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 3,65 (dd, 1H, J = 11,3 Hz, 7,4 Hz, -CH ₂ -), 3,73 (dd, 1H, J = 11,3 Hz, 9,7 Hz, -CH ₂ -), 5,50 (dd, 1H, J = 9,6 Hz, 7,4 Hz, -CH-CO-), 6,88-7,08 (m, 2H, Ar-H), 7,38-7,55 (m, 2H, Ar-H), 12,51 (s, 1H, -OH), 12,89-13,60 (br s, 1H, -COOH) ppm
HR-MS (ESI ⁺) za C ₁₀ H ₁₀ NO ₃ S ([M+H] ⁺)	izračunana masa: 224,0381; izmerjena masa: 224,0385

4.18. Sinteza (S)-N-(2-((S)-6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)-2-(hidroksifenil)-4,5-dihidrotiazol-4-karboksamida



Spojino **24** smo sintetizirali po sinteznem postopku **B** v 7 mL DMF. Uporabili smo spojino **10** (0,100 g, 0,195 mmol, 1 ekv.), spojino **23** (0,043 g, 0,195 mmol, 1 ekv.), NMM (0,05 mL, 0,390 mmol, 2 ekv.), EDC (0,045 g, 0,234 mmol, 1,2 ekv.) in HOEt (0,034 g, 0,254 mmol, 1,3 ekv.). Pri izolaciji smo zmes raztopili v 20 mL EA, stresali pa smo jo z 2x10 mL 1% citronske kisline in z 1x10 mL nasičene raztopine NaCl. Po izolaciji smo produkt očistili s flash kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili MF DKM:MeOH = 30:1.

Ob raztpljanju v MF se nam je pojavila oborina, ki je bila nečista spojina **24**. Oborino smo odfiltrirali in nadaljevali s čiščenjem. Dobili smo 0,026 g spojine **24**.

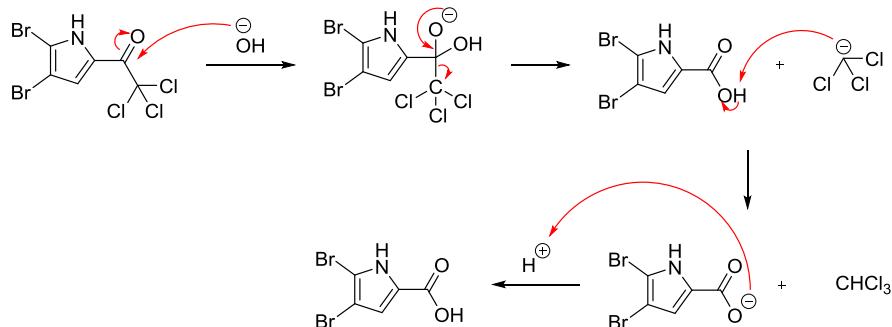
Kemijska formula	$C_{24}H_{22}Br_2N_6O_4S_2$
M_r	682,41 g/mol
Opis	svetlo rumeni kristali
Izkoristek	19,5%
R_f	0,45 (DKM:MeOH = 9:1)
Tališče (°C)	170 – 173
IR (ATR)	ν 3113, 2936, 2360, 1622, 1587, 1558, 1513, 1423, 1391, 1263, 1204, 1080, 1032, 975, 946, 862, 823, 749, 696, 613, 574, 533, 513 cm^{-1}
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1,81-1,93 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,95-2,06 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,58-2,74 (m, 3H, -CH ₂ -H _A -4, -CH ₂ -H-5), 2,99 (dd, 1H, J = 5,4 Hz, 15,8 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 3,59 (dd, 1H, J = 11,1 Hz, 8,3 Hz, -CH ₂ -), 3,71 (dd, 1H, J = 11,1 Hz, 9,7 Hz, -CH ₂ -), 4,06 (dd, 2H, J = 8,7 Hz, 6,1 Hz, -CO-CH ₂ -NH-), 4,13-4,27 (m, 1H, -CH-NH-), 5,43 (dd, 1H, J = 9,6 Hz, 8,4 Hz, -CH-), 6,90-7,07 (m, 3H, Ar-H), 7,41-7,54 (m, 2H, Ar-H), 8,11 (d, 1H, J = 7,8 Hz, -CO-NH-CH-), 8,63 (t, 1H, J = 5,7 Hz, -CH ₂ -NH-CO-), 12,06 (s, 1H, Ar-OH ali NH-CO-CH ₂ -), 12,08 (s, 1H, Ar-OH ali NH-CO-CH ₂ -), 12,71 (s, 1H, Ar-NH) ppm
HR-MS (ESI ⁻) za $C_{24}H_{21}Br_2N_6O_4S_2$ ([M-H] ⁻)	izračunana masa: 678,9432; izmerjena masa: 678,9431

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. Komentar sinteznih postopkov

5.1.1. Sinteza zaviralca GyrB

Sintezo potencialnega zaviralca GyrB smo začeli s pripravo spojine **2**. Sintetizirali smo jo iz izhodne spojine 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)etan-2-ona (**1**) po mehanizmu prikazanem na sliki 14. Izhodno spojino smo najprej raztopili v MeOH. Nato smo raztopini dodali 2 M NaOH in zmes pustili, da se meša pri 60 °C. Med reakcijo hidroksidni anion napade karbonilni ogljik in pride do nastanka karboksilata ter odcepa kloroformja. Reakcijsko zmes smo po zaključku reakcije stresali z dietiletrom, da smo odstranili vso nezreagirano izhodno spojino, ki je prešla v organsko fazo. Vodno fazo smo nato ob hlajenju na ledu nakisali do pH 2 z 1 M HCl, ker je reakcija eksotermna. Ob tem se je karboksilat protoniral in nastala karboksilna kislina se je oborila.



Slika 14: Mehanizem reakcije sinteze 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilne kislino (spojine **2**).

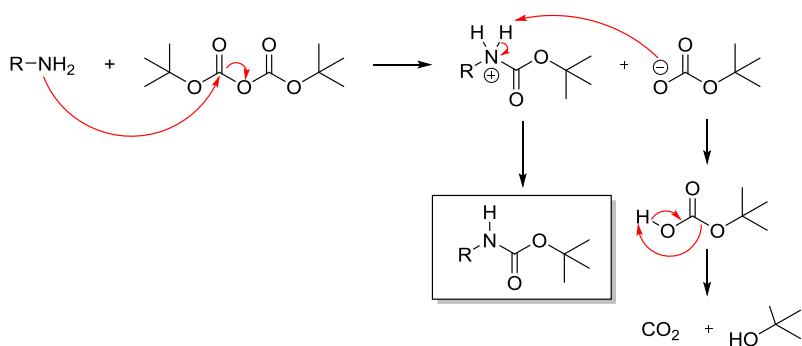
Nastalo 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilno kislino (**2**) smo nato pripeli na (*S*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamin (**3**) s pomočjo sklopitvenih reagentov in tako sintetizirali znani zaviralec GyrB.

5.1.2. Pripenjanje distančnika na zaviralec GyrB

Po sintezi zaviralca smo nanj pripeli distančnik, ki je bil v našem primeru glicin. Da smo reakcijo lahko selektivno izvedli, smo morali na glicin najprej uvesti zaščitno skupino. Zaščitne skupine uvajamo, kadar imamo na spojini več funkcionalnih skupin, ki lahko reagirajo. Z uvedbo zaščitnih skupin začasno pretvorimo funkcionalne skupine v manj

reaktivne, s tem pa zmanjšamo nastajanje stranskih produktov (32). Glicin ima amino skupino in karboksilno skupino, ki bi lahko reagirali, zato smo se odločili, da bomo amino skupino zaščitili z uvedbo BOC skupine.

BOC zaščitna skupina se veliko uporablja v sintezi peptidov in heterociklični sintezi kot zaščitna skupina za amine (33). BOC zaščito uvedemo z uporabo BOC anhidrida, reakcija pa poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije, kot je prikazano na sliki 15. Amino skupina na glicinu je nukleofil, ki napade elektrofilni C-atom C=O skupine na BOC_2O . Ob tem pride do odcepa *terc*-butil karbonata in nastanka tetraedričnega intermediata. *Ter*c-butil-karbonat nato odvzame en proton iz protoniranega amina in razpade na *terc*-butanol ter CO_2 .



Slika 15: Mehanizem uvedbe BOC skupine na amino skupino.

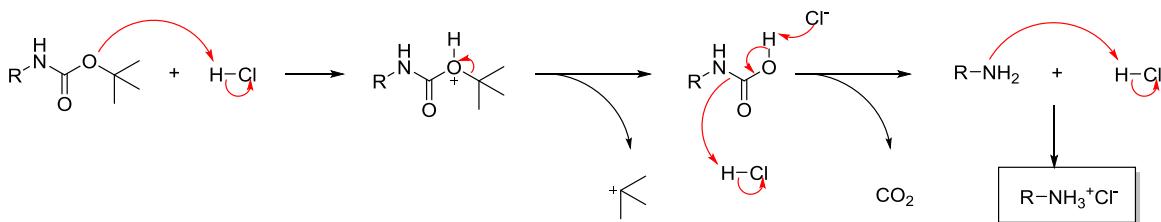
Kot topilo smo uporabili zmes 1,4-dioksana in 1 M NaOH, ker je glicin je topen v vodni fazi (1 M NaOH), BOC_2O (6) pa je topen v organski fazi (1,4-dioksan). Obe topili se dobro mešata, zato lahko reagenta prideta v stik. NaOH poveča topnost glicina s tem, da odvzame proton karboksilni kislini, pri čemer nastane karboksilat, ki ima boljšo topnost kot neionizirana spojina. Z izvajanjem reakcije na ledeni kopeli smo zmanjšali nastajanje stranskih produktov.

Ko je reakcija potekla, smo zmesi uparili 1,4-dioksan in jo nato prenesli v lij ločnik. Ob stresanju z dietiletrom smo se znebili nezreagiranega BOC_2O , ki je prešel v organsko fazo. Vodno fazo smo nato nakisali do pH 2, da smo pretvorili naš produkt iz ionizirane v neionizirano obliko. Raztopino smo nazadnje stresali še z etilacetatom, da smo se znebili nezreagiranega glicina, ki je ostal v vodni fazi, naš produkt pa je prešel v organsko fazo.

Po uvedbi BOC skupine na glicin smo zaščiteno spojino (spojino **7**) pripeli na pripravljen zaviralec GyrB (spojino **4**), pri čemer pa smo uporabili sklopitvene reagente. Po pripetju distančnika na zaviralec smo morali zaščitno skupino na aminu odstraniti.

Odščita BOC skupine poteka pod kislimi pogoji. Za odščito se ponavadi uporablja klorovodikova kislina v ocetni kislini ali pa trifluoroacetna kislina (32). Mi smo za odščito uporabili acetil klorid v MeOH. V bučko smo dali najprej metanol, nato pa smo jo nepredušno zaprli in z iglo preko septuma dodali acetil klorid. Acetil klorid in metanol zreagirata in pride do tvorbe plinastega HCl. Reakcija je eksotermna, zato smo jo izvajali na ledeni kopeli, saj je topnost HCl v MeOH večja pri nižji temperaturi. Da je v bučki nastalo dovolj HCl, smo reakcijo pustili potekati 30 minut, nato pa smo dodali spojino **9** in zmes še 1 uro mešali na ledu.

Po dodatku spojine **9** je reakcija potekla po mehanizmu prikazanem na sliki 16. *terc*-Butil karbamat se ob prisotnosti prebitnega HCl protonira, kar vodi do odcepa *terc*-butilnega karbokationa in nastanka karbaminske kisline. Karbaminska kislina je nestabilna zato razpade na amin in CO₂. Ker reakcija poteka v kislem se nazadnje amin protonira in nastane sol produkta s HCl.



Slika 16: Mehanizem odščite BOC skupine ob prisotnosti HCl.

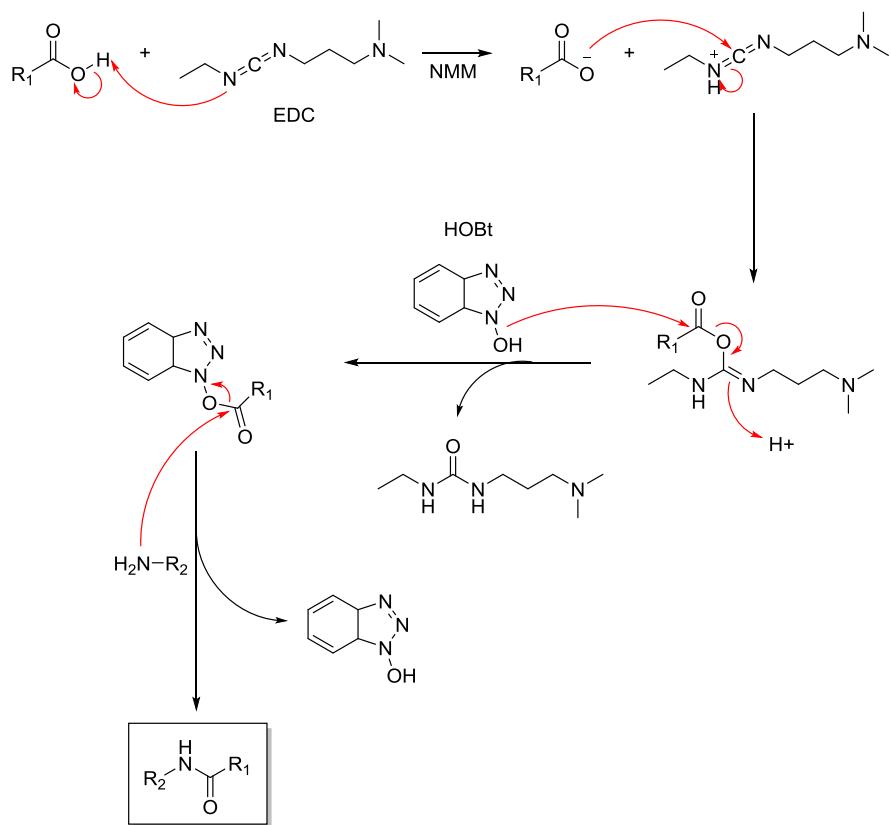
5.1.3. Sinteza amidne vezi z uporabo sklopitvenih reagentov

Pri sintezi potencialnega zaviralca GyrB (spojine **4**), ob pripenjanju distančnika na zaviralec (sinteza spojine **8**) in ob pripenjanju sideroforov (sinteza spojin **12**, **13**, **15**, **20** in **24**) na zaviralec smo tvorili amidno vez iz karboksilne kisline in primarnega amina s pomočjo sklopitvenih reagentov.

Reakcija nastanka amidne vezi med karboksilnimi kislinami in primarnimi amini pri sobni temperaturi ne poteče spontano, zato je potrebno najprej aktivirati karboksilno kislino. Aktivacijo kisline dosežemo z uporabo sklopitvenih reagentov. Pri sintezi naših spojin smo uporabili karbodiimidni sklopitveni reagent EDC, pomožni nukleofil HOEt, ki zavira

stranske reakcije in zmanjšuje racemizacijo, in NMM, ki deluje kot baza (pH 8). Da preprečimo nastanek stranskega produkta *N*-acilsečnine, smo vse reakcije izvajali na ledeni kopeli.

Mehanizem nastanka amidne vezi s sklopitvenimi reagenti EDC, HOBr, NMM je prikazan na sliki 17. NMM najprej ionizira karboksilno kislino, da lahko ta nato z EDC tvori aktivirani ester (*O*-acilsečnino). Z *O*-acilsečnino nato reagira HOBr in nastane aktivirani ester, ki je še bolj reaktiv. Ta aktivirani ester nazadnje napade amin in tvori se amidna vez.



Slika 17: Mehanizem skloplitvene reakcije z EDC, HOBr in NMM.

Reakcije s sklopitevenimi reagenti smo izvajali po dveh različnih postopkih (postopek sinteze A in B). Postopek sinteze A smo uporabili za sintezo zaviralca GyrB, za pripenjanje distančnika in za pripenjanje sideroforov z zaščitenimi –OH skupinami. Pri sintezi amidne vezi smo najprej v DMF raztopili karboksilno kislino in ji nato dodali EDC, HOBt ter NMM. Tako reakcijsko zmes smo nato pustili mešati na ledeni kopeli 20 minut. Ob tem je v reakcijski zmesi potekala aktivacija karboksilne kisline. Po 20 minutah smo v zmes dodali še amin in odstavili ledeno kopel.

Sintezni postopek B pa smo uporabili za pripenjanje sideroforov s prostimi fenolnimi -OH skupinami. Fenolne -OH skupine so nukleofilne, zato bi lahko reagirale z aktivirano karboksilno kislino. Zaradi tega smo pri reakcijah s temi spojinami v topilu najprej raztopili amin in karboksilno kislino in šele nato dodali NMM, EDC in HOBr. Ker je amin močnejši nukleofil kot fenolna -OH skupina, je kislina po aktivaciji tako prednostno reagirala z aminom. S tako spremembo reakcijskega postopka smo zmanjšali možnost nastanka stranskih produktov.

Izolacijo sintetiziranih amidov smo izvedli z ekstrakcijo. Po uparevanju topila (DMF) smo preostanek raztopili v EA. Ob stresanju z 1% citronsko kislino smo se znebili sklopitvenih reagentov in produktov, ki nastanejo iz njih po aktivaciji kisline, ki so prešli v vodno fazo. Ob stresanju z nasičeno raztopino NaHCO_3 smo se znebili nezreagirane karboksilne kisline. Ob stresanju z nasičeno raztopino NaCl pa smo se znebili večine vode v organskem topilu. Morebitno preostalo vodo smo nato odstranili še z dodatkom brezvodnega Na_2SO_4 . Pri izolaciji spojin **13**, **20** in **24**, ki smo jih sintetizirali po sinteznem postopku B, organske faze nismo stresali z nasičeno raztopino NaHCO_3 , ker bi lahko prišlo do tvorbe soli na fenolni -OH in bi tako nekaj produkta prešlo v vodno fazo.

S sklopitveno reakcijo po sinteznem postopku A smo skušali sintetizirati tudi spojino **18**. Izhodna karboksilna kislina (spojina **17**) je vsebovala štiri -OH skupine zaščitene z acetilno skupino. Acetylna zaščitna skupina je stabilna pri pH 4 – 8. Ker naša reakcija poteka v bazičnem pH (NMM deluje kot baza, pH je okoli 8), smo predvideli, da bi lahko prišlo do odcepa acetilnih zaščitnih skupin. Da bi preprečili oksidacijo nastalih fenolov smo reakcijo izvajali v brezzračnih pogojih, pod argonom. Po koncu reakcije smo s pomočjo TLC kromatograma ugotovili, da je prišlo do delne odščite -OH skupin. Zmes smo izolirali s stresanjem z 1% citronsko kislino, NaHCO_3 in NaCl. Ob stresanju z NaHCO_3 , ki je bazičen, bi lahko najbrž prišlo še do dodatne odščite preostalih acetilnih skupin. Na koncu smo zmes še očistili s kolonsko kromatografijo. Ob tem smo ugotovili, da spojine, ki smo jih dobili iz kolone, niso naš željen produkt.

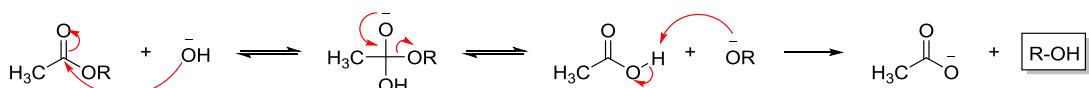
5.1.4. Sinteza spojine **20**

Ker vezava 3,5-bis(2,3-diacetoksibezamido)benzojske kisline (**17**) na potencialni zaviralec GyrB ni uspela, smo konjugat zaviralca z 3,5-bis(2,3-dihidroksibenzamido)benzojsko

kislino (**19**) sintetizirali po alternativni poti. Ob tem smo najprej morali odcepiti acetilne zaščitne skupine na spojini **17**.

Odcepitev acetilne skupine dosežemo z mehanizmom nukleofilne substitucije ob uporabi vode, razredčene kisline ali razredčene baze. Ob tem nastaneta karboksilna kislina (ali njena sol) in alkohol. Reakcija z vodo je tako počasna, da se nikoli ne uporablja. Reakcija s kislino pa je reverzibilna, zato se v praksi najpogosteje uporablja ireverzibilna hidroliza estrov z bazami (alkalna hidroliza) (34).

Odščita acetata z alkalno hidrolizo poteka po mehanizmu prikazanem na sliki 18. Začne se z napadom nukleofilnega hidroksidnega aniona na elektrofilni karbonilni ogljik estra. Ob tem nastane tetraedrični intermedijat, ki pa ni stabilen, zato pride do odcepa alkoxsidnega iona in nastanka karboksilne kisline. V alkalnem mediju alkoxsidni ion deluje kot baza in deprotonira karboksilno kislino, s tem pa dobimo naš končni produkt – alkohol in pa acetat.



Slika 18: Mehanizem alkalne hidrolize acetilne zaščitne skupine.

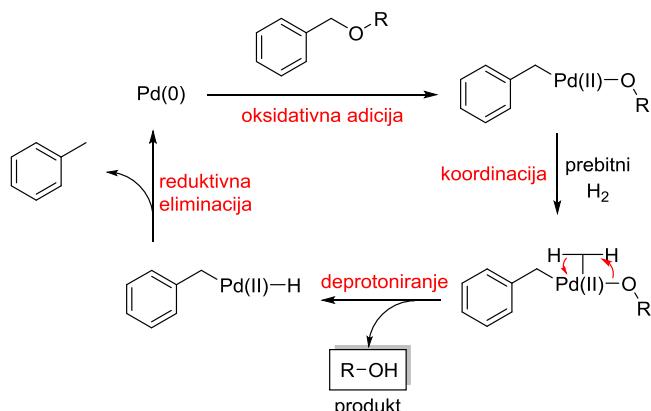
Ob sintezi spojine **19** smo za cepitev estra uporabili 1 M NaOH v topilu MeOH. NaOH smo dodali v prebitku (6 ekv.) in s tem dosegli, da je zreagirala vsa izhodna spojina. Reakcijo smo pustili, da je potekala 24 ur, nato pa smo produkt izolirali. Reakcijski zmesi smo najprej uparili MeOH, preostanek pa smo nakisali do pH 2 z 1 M HCl. Ob tem se je naš produkt, ki je bil v alkalnem v obliki karboksilata, protoniral in oboril. Izoliran produkt smo nazadnje z uporabo sklopitvenih reagentov vezali na potencialni zaviralec GyrB in tako dobili končno spojino **20**.

5.1.5. Odščita benzilnega etra s katalitskim hidrogeniranjem

Benzilni eter je ena najbolj robustnih zaščitnih skupin. Stabilna je v kislih in bazičnih pogojih in se pogosto uporablja za zaščito hidroksilnih in karboksilnih funkcionalnih skupin. Odstranitev benzilne zaščitne skupine najpogosteje poteka s katalitskim hidrogeniranjem z uporabo Pd/C ob prisotnosti H₂ ali pa s kovinskim natrijem v tekočem amonijaku (32).

Katalitsko hidrogeniranje poteka v vodikovi atmosferi ob prisotnosti katalizatorja – paladija na aktiviranem ogljiku (Pd/C). Pd/C je skeletni katalizator. Posebnost skeletnih katalizatorjev je, da je kovina (Pd) porazdeljena na inertnem trdnem nosilcu z veliko površino (ogljik) (35). Reakcija katalitskega hidrogeniranja poteka na površini kovinskega katalizatorja, kamor se vežeta vodik in izhodna spojina. Mešanje uprašene kovine z nosilcem to površino poveča, kar pospeši reakcijo, poleg tega pa tudi omogoči uporabo manjše količine kovine (ponavadi se uporablja 5-10 % kovine na nosilcu).

Reakcija katalitskega hidrogeniranja s Pd poteka po mehanizmu prikazanem na sliki 19. Za hidrolizo C-O vezi je pomembna adsorpcija kisika benzilnega etra na površino paladija. Benzilni eter se veže na paladij z oksidativno adicijo. Ob tem pride do cepitve kovalentne vezi C-O in tvorbe dveh novih vezi ter spremembe oksidativnega stanja paladija. Ob prisotnosti prebitnega H₂ pride do tvorbe kompleksa in nato do deprotoniranja in odcepa alkoholnega produkta. Nazadnje se z reduktivno eliminacijo Pd povrne v izhodno stanje, ob tem pa se odcepi še toluen. Regeneriran Pd lahko nato znova vstopi v katalitični cikel (36).



Slika 19: Mehanizem katalitskega hidrogeniranja s Pd.

Pd po vezavi vodika postane zelo reaktivен. Ob stiku z vnetljivimi organskimi topili ali z zrakom se lahko spontano vžge. Da preprečimo piroforne dogodke, moramo s Pd/C delati v inertni atmosferi (dušik ali argon). Pri našem sinteznem postopku smo zato raztopino izhodne spojine najprej prepihali z argonom, nato dodali Pd/C in šele nazadnje raztopino prepihali z H₂.

Pri izvedbi naših reakcij smo uporabljali različna topila. Pri sintezi spojine **14** smo, kot topilo uporabili EtOH. Prav tako smo skušali EtOH uporabiti kot topilo pri sintezi spojine

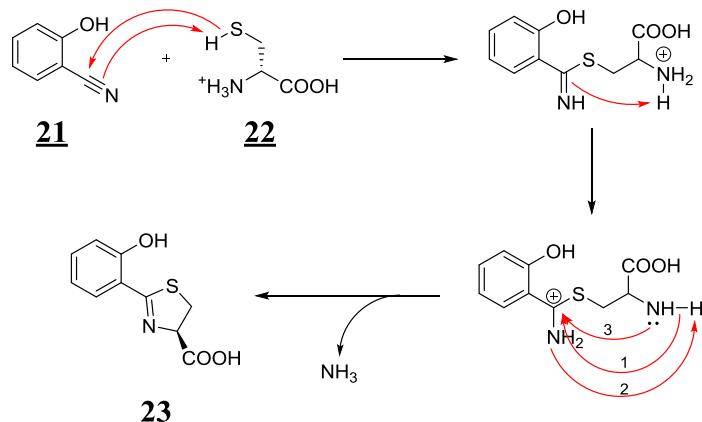
13, vendar se izhodna spojina (**12**) v EtOH ni popolnoma raztopila, zato smo dodali še THF. Pri poskusu sinteze spojine **16** smo na začetku kot topilo uporabili THF, ko reakcija ni potekla, pa smo dodali še EtOH. Ker tudi po dodatku EtOH reakcija ni potekla smo se odločili za menjavo topila EtOH/THF za ocetno kislino, saj uporaba ocetne kisline kot topila velikokrat poveča hitrost reakcije.

Ker se Pd/C med reakcijo ne porablja, v reakcijsko zmes običajno dodamo okoli 10 masnih % Pd/C glede na maso izhodne spojine (velja za mase manjše od 2 g, pri masah večjih od 2 g pa dodamo 5%). Pri poskusu sinteze spojine **13** smo na začetku v reakcijsko zmes dodali okoli 15 masnih % Pd/C, v reakcijsko zmes sinteze spojine **16** pa 22%. V obeh primerih reakcija ni potekla, zato smo dodali še več Pd/C. V primeru sinteze spojine **13** smo tako na koncu v reakcijski zmesi imeli okoli 26%, v primeru spojine **13** pa kar 50% Pd/C, vendar nobena reakcija ni potekla. Predvidevamo, da je prišlo v obeh primerih do tako imenovane zastrupitve katalizatorja. Ob prisotnosti določenih spojin, ki jim pravimo strupi, lahko pride do upočasnitve ali zaustavitve reakcije katalitskega hidrogeniranja. Primeri takih stupov so amini, žveplove spojine in svinec. Značilnost teh spojin je, da kompeksirajo kovinski katalizator in tekmujejo z H₂ in izhodno spojino za vezavo na Pd. V primeru poskusa sinteze spojin **13** in **16** sta izhodni spojini vsebovali žveplo v tiazolnem obroču, ki je najbrž zastrupilo naš katalizator, zato reakciji odščite nista potekli.

Ker spojin **13** in **16** nismo uspeli sintetizirati z odščito benzilne skupine na konjugatih, smo se odločili, da bomo odščitili siderofore in nato odščitene siderofore vezali na sintetizirane potencialne zaviralce GyrB. Tako smo za sintezo spojine **13** s katalitskim hidrogeniranjem odščitili benzilno skupino na spojini **11**. Nastalo spojino **14** pa smo nato s sklopitveno reakcijo pripeli na spojino **10**, da smo dobili končno spojino **13**. Spojine **16** nismo sintetizirali po alternativni poti, ker nismo imeli več izhodne spojine **4**.

5.1.6. Sinteza siderofora (spojoine **23**)

Spojino **23** smo sintetizirali z mehanizmom ciklokondenzacije (slika 20) iz 2-hidroksibenzonitrila (**21**) in L-cisteina (**22**) v etanolu pri pH 6 ob segrevanju na 65 °C.



Slika 20: Mehanizem ciklokondenzacije 2-hidroksibenzonitriла in L-cisteina.

Sintezo spojine 13 smo priredili po sinteznem postopku, ki so ga Bergeron in sodelavci uporabili za sintezo kelatorja podobnega naši spojini (37). Reakcijo smo izvajali v pufru, da smo preprečili racemizacijo produkta, uporabili smo fosfatni pufer in dodali NaHCO_3 , da smo dosegli pH 6. Pred dodatkom L-cisteina smo reakcijsko zmes prepihali z argonom ter tako izgnali ves zrak. Ker cistein vsebuje tiolno skupino, bi lahko ob prisotnosti kisika prišlo do tvorbe disulfidnih vezi. Glede na sintezni postopek, ki so ga uporabili Bergeron in sodelavci, smo predvideli, da bo reakcija potekala 1-2 dni, vendar smo po približno dveh urah s pomočjo TLC kromatograma ugotovili, da je reakcija že skoraj popolnoma potekla.

Ob izolaciji smo reakcijsko zmes po uparevanju metanola nakisali in s tem protonirali karboksilat. Karboksilna kislina, ki je nastala, je netopna v vodi, zato se je produkt oboril. Dobljeno zmes smo nato stresali z EA, v katerem se je produkt raztoplil. Obe fazi smo nato ločili. Ob tem smo se znebili nezreagiranega L-cisteina, ki zaradi protonirane amino skupine ostane raztopljen v vodni fazi. Ob produktu v organski fazi pa imamo še vedno prisoten nezreagiran 2-hidroksibenzonitril. Organsko fazo smo nato posušili nad Na_2SO_4 in ji odstranili topilo pod znižanim tlakom. Dobljeno oborino smo nazadnje rekristalizirali iz zmesi etanola in vode in tako dobili čist produkt.

5.2. Rezultati bioloških testiranj

Spojinam 12, 13, 15, 20 in 24 je bila določena aktivnost na grampozitivni bakteriji *Staphylococcus aureus* in na gramnegativni bakteriji *Escherichia coli* na Univerzi v Helsinkih na Finskem. Rezultati so podani kot odstotek zaviranja rasti bakterij v primerjavi s kontrolo (cipprofloksacin) pri 50 μM koncentraciji po 24 urni izpostavitvi.

Preglednica I: Rezultati protibakterijskih testov na *S. aureus* in *E. coli*.

SPOJINA	STRUKTURA	Zaviranje rasti bakterij pri koncentraciji 50 µM po 24h (%)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<u>12</u>		-15%	3%
<u>13</u>		-11%	4%
<u>15</u>		-10%	2%
<u>20</u>		39%	22%
<u>24</u>		-5%	5%

Kot je razvidno iz preglednice I, testirane spojine, z izjemo spojine **20**, niso imele pomembne protibakterijske aktivnosti. Spojina **20** je izkazovala najvišji odstotek zaviranja rasti obeh bakterij, in sicer 39% zaviranje rasti grampozitivne bakterije *S. aureus* in 22% zaviranje rasti gramnegativne bakterije *E. coli* po 24 urni izpostavljenosti 50 µM koncentraciji spojine. Testiranja na *P. aeruginosa* in *E. faecalis* pa še potekajo.

Spojine bodo naknadno testirane še na izolirani DNA-girazi iz bakterije *E. coli*. Na izolirani DNA-girazi in izbranih bakterijah bo naknadno testirana tudi spojina **10**, ki je naš zaviralec brez vezanega siderofora. Rezultati vseh testiranj nam bodo pomagali razkriti ali je za slabo protibakterijsko aktivnost kriv vezan siderofor, ki ovira vezavo na tarčno mesto.

Videli bomo ali je za protibakterijsko aktivnost, kljub temu da smo predpostavili, da vezan siderofor ne bo oviral vezave zaviralca na DNA-girazo, potrebna cepitev konjugata po vstopu spojine v citoplazmo. Poleg tega nam bodo razlike med rezultati na izoliranem encimu in živih bakterijah pokazale, ali vezava siderofora poveča vnos zaviralca v celice in tako izboljša njegovo protibakterijsko delovanje.

6. SKLEP

Sinteza potencialnega zaviralca GyrB in pripenjanje distančnika sta potekli brez težav. Problemi pa so se pojavili ob pripenjanju sideroforov. Zaradi slabe topnosti spojin smo imeli težave ob izolaciji in čiščenju spojin.

Veliko težavo nam je predstavljala odščita benzilne skupine na spojinah **12** (ob sintezi spojine **13**) in **15** (ob sintezi spojine **16**). Zaradi prisotnosti žvepla v molekuli spojine je najbrž prišlo do zastrupitve katalizatorja Pd/C in odščite nismo mogli izvesti. Zaradi tega smo se odločili za alternativno pot sinteze, pri kateri smo najprej odščitili hidroksilno skupino na sideroforu in ga šele nato pripeli na zaviralec. Tako smo uspeli sintetizirati spojino **13**.

Problematično je bilo tudi pripenjanje spojine **17** pri sintezi spojine **18**. Acetilne zaščitne skupine na sideroforu (**17**) so se v alkalnih reakcijskih pogojih sklopitvene reakcije in ob stresanju z NaHCO₃ delno odcepile, zato smo na koncu dobili le zmes stranskih produktov. Ker ta reakcija ni uspela, smo se odločili, da bomo spojini **17** najprej odščitili hidroksilne skupine in jo nato pripeli na zaviralec. Tako nam je uspelo sintetizirati spojino **20**.

Pri sintezi siderofora – spojine **23** nismo imeli težav. Reakcija je celo potekla hitreje, kot smo pričakovali glede na objavljen članek. Smo se pa zaradi problemov pri sintezi spojine **18** odločili, da hidroksilne skupine na spojini ne bomo zaščitili z acetilno skupino, kot smo na začetku načrtovali, ampak smo siderofor na zaviralec pripeli kar z nezaščiteno hidroksilno skupino.

Poleg sinteze načrtovanih konjugatov smo siderofore pripeli tudi direktno na zaviralec GyrB, brez distančnika. Zaradi majhne količine izhodne spojine **4** smo sintetizirali le eno takoj spojino – spojino **15**.

V okviru magistrske naloge smo uspeli sintetizirali pet končnih spojin, te spojine so **12**, **13**, **15**, **20** in **24**. S testiranjem protibakterijske aktivnosti na bakterijah *S. aureus* in *E. coli* smo ugotovili, da spojine nimajo znatne protibakterijske aktivnosti. Izjema je spojina **20**, ki izkazuje 39% zaviranje rasti bakterije *S. aureus* in 22% zaviranje rasti bakterije *E. coli* po 24 urni izpostavljenosti. Spojine bodo naknadno testirane še na izolirani DNA-girazi iz bakterije *E. coli* in na bakterijah *Enterococcus faecalis* ter *Pseudomonas aeruginosa*. Naknadno bo testirana tudi spojina **10**, ki je naš zaviralec brez vezanega siderofora. Rezultati vseh testiranj nam bodo pomagali razkriti razloge za slabo protibakterijsko

aktivnost sintetiziranih konjugatov in bodo nadalje pomembno prispevali k načrtovanju nove generacije konjugatov.

7. LITERATURA

1. Hawley L, Ziegler RJ, Clarke BL: Microbiology and Immunology, 6th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2014: 7 – 13; 32 – 36.
2. Whalen K, Finkel R, Panavelil TA: Lippincott's illustrated reviews. Pharmacology. 6th Ed., Wolters Kluwer, Philadelphia, MD, 2015: 471 – 482.
3. Tripathi KD: Essentials of Medical Pharmacology, 7th Ed., Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, India, 2013: 688 – 703.
4. Madigan MT, Martinko JM, Parker J: Brock Biology of Microorganisms, 9th Ed., Prentice-Hall, New Jersey, 2000: 69 – 75, 740 – 772.
5. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA: Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology, 26th Ed., The McGraw-Hill Companies, 2013: 23 – 32, 371 – 405.
6. Gualerzi CO, Brandi L, Fabbretti A, Pon CL: Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2014: 53 – 71.
7. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ: Rang and Dale's Pharmacology, 6th Ed., Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 2007: 655 – 663.
8. Gubaev A, Klostermeier D: The mechanism of negative DNA supercoiling: A cascade of DNA-induced conformational changes prepares gyrase for strand passage, DNA Repair 2014, 16: 23 – 24.
9. Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J: Molecular Cell Biology, 3rd Ed., Scientific American Books, New York, 1995: 381 – 385.
10. Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 251 – 257.
11. Devlin TM: Textbook of biochemistry with clinical correlations, 6th Ed., Wiley-Liss, Hoboken, NJ, 2006: 50 – 54.
12. Basarab GS, Hill PJ, Garner CE, Hull K, Green O, Sherer BA, Dangel PB, Manchester JI, Bist S, Hauck S, Zhou F, Urias-Nickelsen M, Illingworth R, Alm R, Rooney M, Eakin AE: Optimization of Pyrrolamide Topoisomerase II Inhibitors Toward Identification of an Antibacterial Clinical Candidate (AZD5099), Journal of Medical Chemistry 2014, 57: 6060 – 6082.
13. Oblak M, Kotnik M, Solmajer T: Discovery and Development of ATPase Inhibitors of DNA Gyrase as Antibacterial Agents, Current Medical Chemistry 2007, 14: 2033 – 2047.

14. Tomašić T, Peterlin Mašić L: Prospects for Developing New Antibacterials Targeting Bacterial Type IIA Topoisomerases, Current Topics in Medicinal Chemistry 2014, 14: 130 – 151.
15. Mayer C, Janin YL: Non-quinolone Inhibitors of Bacterial Type IIA Topoisomerases: A Feat of Bioisosterism, Chemical Reviews 2014, 114: 2313 – 2342.
16. http://www.nature.com/nrm/journal/v12/n12/fig_tab/nrm3228_F6.html, 17.8.2015
17. http://wwwffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva_FK/2010/Predavanja/FK3/FK3Q28GB.pdf, 13.9.2015
18. Eakin AE, Green O, Hales N, Walkup GK, Bist S, Singh, Mullen G, Bryant J, Embrey K, Gao N, Breeze A, Timms D, Andrews B, Uria-Nickelsen M, Demeritt J, Loch JT, Hull K, Blodgett A, Illingworth RN, Prince B, Boriack-Sjodin A, Hauck S, MacPherson LJ, 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.
19. <http://water.me.vccs.edu/courses/ENV108/clipart/cellwall.gif>, 3.8.2015
20. Möllmann U, Heinsich L, Bauernfeind A, Köhler T, Ankel-Fuchs D: Siderophores as drug delivery agents: application of the »Trojan Horse« strategy, Biometals 2009, 22: 615 – 624.
21. Wooldridge KG, Williams PH: Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria, FEMS Microbiology Reviews 1993, 12: 325 – 348.
22. Miethke M, Marahiel MA: Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control, Microbiology and Molecular Biology Reviews 2007, 71(3): 413 – 451.
23. Cherayil BJ: The role of iron in the immune response to bacterial infection, Immunologic Research 2011, 50(1): 1 – 9.
24. Mislin GLA, Schalk IJ: Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic Trojan horse strategies against *Pseudomonas aeruginosa*, Metallomics 2014, 6: 408 – 420.
25. Miller MJ, Zhu H, Xu Y, Wu C, Walz AJ, Vergne A, Roosenberg JM, Moraski G, Minnick AA, McKee-Dolence J, Hu J, Fennell K, Dolence EK, 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.
26. Ratledge C, Dover LG: Iron metabolism in pathogenic bacteria, *Annual Review of Microbiology* 2000, 54: 881 – 941.
 27. Wencewicz TA, Möllmann U, Long TE, Miller MJ: 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.
 28. Page MGP: Siderophore conjugates, *Annals of the New York Academy of Sciences* 2013, 1277: 115 – 126.
 29. Carvalho CCCR, Fernandes P: Siderophores as “Trojan Horses”: tackling multidrug resistance?, *Frontiers in Microbiology* 2014, 5: 290.
 30. Tomašič 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.
 31. Zidar N, Jakopin Ž, Madge DJ, Chan F, Tytgat J, Peigneur S, Sollner Dolenc M, Tomašič T, Ilaš J, Peterlin Mašič L, Kikelj D: Substituted 4-phenyl-2-aminoimidazoles and 4-phenyl-4,5-dihydro-2-aminoimidazoles as voltage-gated sodium channel modulators, *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014, 74: 23 – 30.
 32. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmacevtska kemija III, Vaje in seminarji: Dodatne vsebine za razumevanje, Zaščitne skupine, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
 33. Wuts PGM: Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, 5th Ed., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2014: 930 – 946.
 34. Tišler M: Organska kemija, 3. izdaja, DZS, Ljubljana, 1991: 239 – 243.
 35. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmacevtska kemija III, Vaje in seminarji: Dodatne vsebine za razumevanje, Redukcije in oksidacije – pregled reagentov, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
 36. Tsuji J: Palladium Reagents and Catalysts: New Perspectives for the 21st Century, John Wiley & Sons Ltd., England, 2004: 6 – 24.

37. Bergeron RJ, Wiegand J, McManis JS, Bharti N: The Design, Synthesis, and Evaluation of Organ-Specific Iron Chelators, *Journal of Medical Chemistry* 2006, 49: 7032 – 7043.