

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Anja Kučević

**Sinteza i karakterizacija novih hibridnih derivata
antranilne kiseline i kinolina kao potencijalnih agensa za
suzbijanje bakterijskih biofilmova**

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc.dr.sc. Ivane Perković i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

KRATICE

2-AA	2-aminoacetofenon
2-ABA	2-aminobenzoilacetat
2-ABA-CoA	2-aminobenzoilacetat koenzim A
AHL	<i>N</i> -acil-homoserin-lakton
AI	autoinduktor (engl. <i>autoinducer</i>)
AQ	alkil-kinolon (engl. <i>alkyl-quinolone</i>)
C4-HSL	<i>N</i> -butiril-homoserin-lakton
CDI	1,1'-karbonildiimidazol
DHQ	2,4-dihidrokinolin
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamid
eDNA	ekstracelularna deoksiribonukleinska kiselina
EPS	ekstracelularne polimerne supstancije
FADH	reducirani oblik flavin adenin dinukleotida
2-HABA	2-hidroksiaminobenzoilacetat
HHQ	2-heptil-4-kinolon
HHQNO	2-heptil-4-kinolon- <i>N</i> -oksid
HIV	virus humane imunodeficijencije
IQS	2-(2-hidroksifenil)-tiazol-4-karbaldehid
MDR	sojevi rezistentni na više različitih klasa lijekova (engl. <i>multi-drug resistant</i>)
MvfR	transkripcijski regulator ekspresije faktora virulencije (engl. <i>multiple virulence factor regulator</i>)
MW	mikrovalni reaktor
NADH	reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotida
NHQ	2-nonil-4-kinolon

NMR	nuklearna magnetska rezonancija
3O-C12-HSL	<i>N</i> -(3-oksododekanoil)-L-homoserin lakton
PQS	Pseudomonas kinolonski signal (engl. <i>Pseudomonas quinolone signal</i>)
QS	međustanična bakterijska komunikacija (engl. <i>quorum sensing</i>)
QSI	inhibitor međustanične bakterijske komunikacije (engl. <i>quorum sensing inhibitor</i>)
QSSM	signalne molekule uključene u međustaničnu bakterijsku komunikaciju (engl. <i>quorum sensing signal molecules</i>)
QQ	gašenje međustanične bakterijske komunikacije (engl. <i>quorum quenching</i>)
RNA	ribonukleinska kiselina
TPSA	topološka zona polarne površine (engl. <i>topological polar surface area</i>)
UV	ultraljubičasto zračenje
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organisation</i>)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Problem antibiotske rezistencije	2
1.2. Virulentnost i rezistencija <i>P. aeruginosa</i>	3
1.3. Struktura i funkcija bakterijskog biofilma	4
1.3.1. Ciklus formiranja i disperzije bakterijskog biofilma	6
1.4. Međustanična bakterijska komunikacija (Quorum sensing, QS)	7
1.4.1. <i>Quorum sensing</i> sustavi u biofilmu <i>P. aeruginosa</i>	8
1.4.2. Biosinteza <i>Pseudomonas Quinolone Signala</i> (PQS).....	9
1.5. Inhibicija međustanične bakterijske komunikacije	10
1.6. Antranilna kiselina i njeni derivati	11
1.7. Kinolini	13
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	15
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Sinteza N^1 -(7-klorokinolin-4-il)butan-1,4-diamina (1)	19
3.2. Sinteza hidrazidnih derivata antranilne kiseline (2a-c).....	20
3.2.1. Sinteza 2-aminobenzohidrazida (2a).....	20
3.2.2. Sinteza 2-amino-6-klorobenzohidrazida (2b)	20
3.2.3. Sinteza 2-amino-4-klorobenzohidrazida (2c).....	20
3.3. Sinteza oksadiazolonskih derivata antranilne kiseline (3a-c)	21
3.3.1. Sinteza 5-(2-aminofenil)-1,3,4-oksadiazol-2(3 <i>H</i>)-ona (3a)	21
3.3.2. Sinteza 5-(2-amino-6-klorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2(3 <i>H</i>)-ona (3b).....	21
3.3.3. Sinteza 5-(2-amino-4-klorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2(3 <i>H</i>)-ona (3c)	21
3.4. Sinteza acil-semikarbazida (4a-c).....	22
3.4.1. Sinteza 2-(2-aminobenzoil)- <i>N</i> -(4-((7-klorokinolin-4-il)amino)butil)hidrazin-1-karboksamida (4a)	22
3.4.2. Sinteza 2-(2-amino-6-klorobenzoil)- <i>N</i> -(4-((7-klorokinolin-4-il)amino)butil)hidrazin-1-karboksamida (4b)	23
3.4.3. Sinteza 2-(2-amino-4-klorobenzoil)- <i>N</i> -(4-((7-klorokinolin-4-il)amino)butil)hidrazin-1-karboksamida (4c).....	23
3.5. Sinteza oksadiazolskih hibridnih derivata antranilne kiseline i kinolina (5a-c)	24
3.5.1. Sinteza N^l -(5-(2-aminofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)- N^f -(6-kloronaftalen-1-il)butan-1,4-diamina (5a)	25
3.5.2. Sinteza N^l -(5-(2-amino-6-klorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)- N^f -(6-kloronaftalen-1-il)butan-1,4-diamina (5b).....	25
3.5.3. Sinteza N^l -(5-(2-amino-4-klorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)- N^f -(6-kloronaftalen-1-il)butan-1,4-diamina (5c)	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27

5. ZAKLJUČCI.....	41
6. ZAHVALE	43
7. POPIS LITERATURE	45
8. SAŽETAK.....	52
9. SUMMARY	54
10. PRILOZI	56

1. UVOD

„Bakterije su svugdje, bakterije su svemoćne, bakterije će imati posljednju riječ.“

Louis Pasteur (1822.-1895.)

1.1. Problem antibiotske rezistencije

Antibiotici su jedno od najvećih otkrića moderne medicine, spasivši milijune života ne samo liječenjem bakterijskih infekcija, već i prevencijom nastanka infekcija u imunokompromitiranih pacijenata. Zbog njihove široke dostupnosti, neracionalna uporaba antibiotika u medicini i prehrambenoj industriji rezultirala je pojavom rezistentnih patogenih bakterija [1]. Antibiotska rezistencija rastući je globalni problem koji predstavlja veliki izazov za znanost i javno zdravstvo, a nerijetko je povezana s visokim mortalitetom i morbiditetom [2]. U veljači 2017. godine, Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*, WHO) objavila je listu „prioritetnih patogena“ koja uključuje dvanaest bakterijskih porodica s više mehanizama rezistencije na različite klase antibiotika (engl. *multi-drug resistant*, MDR) s ciljem poticanja istraživanja i razvoja novih antibiotika. Među njima, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, porodica *Enterobacteriaceae* uključujući *Escherichia coli* i *Salmonella* spp., *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* spp. i *Neisseria gonorrhoeae* uzrokuju bolničke infekcije opasne po život, pa su prepoznati kao najprioritetniji patogeni [3,4]. Većinu WHO liste čine Gram-negativne bakterije, koje su zbog svoje složene strukture vanjske membrane posljedično rezistentnije na antibiotike od Gram-pozitivnih bakterija [5]. Brojni noviji antibiotici sintetizirani su modifikacijama strukture već postojećih molekula, što je preferirano nad *de novo* sintezom. Najslikovitiji primjer je tigeciklin, derivat tetraciklina minociklina s 9-*tert*-butil-glicilamido postraničnim lancem, koji uspješno savladava mehanizme rezistencije bakterija na tetracikline, poput specifičnih efluksnih pumpi koje izbacuju antibiotik iz stanice i mehanizma ribosomske zaštite mete [6]. Prednost takvog pristupa je sinteza učinkovitijih lijekova uz znatno manja ulaganja, a veliki nedostatak predstavlja stalni porast rezistencije bakterija te pojavnost MDR bakterijskih sojeva, koji iziskuju sintezu molekula s potpuno novim mehanizmima djelovanja. Kako se antibiotici upotrebljavaju kratkotrajno za liječenje akutnih infekcija, već nekoliko godina nisu u fokusu istraživanja farmaceutske industrije kao lijekovi za prioritetne kronične bolesti, poput depresije, migrene, dijabetesa te kardiovaskularnih bolesti [7]. Zbog svega navedenog, od iznimne važnosti je poticati akademsku zajednicu i farmaceutsku industriju na istraživanje i razvoj antibiotika s novim mehanizmima djelovanja na globalnom planu, kako bi se smanjila rezistencija Gram-negativnih bakterija i ukupni troškovi koje takve infekcije zadaju zdravstvenom sustavu [8].

1.2. Virulentnost i rezistencija *P. aeruginosa*

P. aeruginosa je sveprisutna Gram-negativna bakterija koja vrlo često uzrokuje bolničke i smrtonosne infekcije u imunokompromitiranih pacijenata, poput onkoloških bolesnika i pacijenata zaraženih HIV-om, te post-operativno i uslijed teških opekline [9,10]. Genom bakterije je relativno velik te tako kodira mnogo različitih regulatornih enzima važnih za metabolizam, transport i efluks organskih tvari što omogućuje metaboličku raznolikost i lakšu prilagodbu bakterije u različitim uvjetima okoliša [11]. Kao i ostali patogeni koji pripadaju ESKAPE grupi (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.), uspješno izbjegava učinak mnogih antibiotika. *P. aeruginosa* predstavlja veliku prijetnju zbog svoje patogenosti, olakšane transmisije infekcije, antibiotske rezistencije i posljedično limitiranih opcija za liječenje infekcije [12,13].

Klinička važnost *P. aeruginosa* leži u sposobnosti patogena da proizvede niz faktora virulencije. Flagele i pili olakšavaju adheziju bakterije za tkiva domaćina te kontroliraju motilitet i time povećavaju invazivnost. Bakterija izlučuje brojne egzoenzime, egzotoksine i efektorske proteine u okoliš, nužne za degradaciju tkiva domaćina. Izlučivanjem sekundarnih metabolita poput cijanovodika, patogen izaziva oksidativni stres u organizmu domaćina, putem redoks reaktivnog pigmenta piocijanina. Bakterija proizvodi siderofore pioverdin i piokelin, kojima crpi željezo i potrebne esencijalne nutrijente [14].

Općenito, glavni mehanizmi rezistencije *P. aeruginosa* mogu se svrstati u tri skupine: intrinzična, stečena i adaptivna rezistencija [11]. Intrinzična rezistencija obuhvaća smanjenu permeabilnost vanjske membrane bakterijske stanice, pojačanu ekspresiju efluksnih pumpi koje izbacuju antibiotik iz stanice te produkciju enzima za inaktivaciju antibiotika, poput beta-laktamaza. Stečena rezistencija podrazumijeva svojstva dobivena horizontalnim prijenosom gena između bakterija te mutacijama genetskog materijala [15]. Adaptivna rezistencija, najzanimljivija za daljnju problematiku ovog rada, jest sposobnost formiranja bakterijskog biofilma. Struktura biofilma štiti bakterije od imunskog odgovora domaćina, posreduje u razvoju rezistencije na antibiotike te uzrokuje kronične upalne infekcije [11]. Karakteristika biofilma *P. aeruginosa* je *quorum sensing* (QS), specifičan oblik međustanične komunikacije signalnim molekulama pomoću kojeg bakterije reguliraju ekspresiju gena, zadovoljavaju metaboličke potrebe, povećavaju virulenciju, formiraju i održavaju biofilm te se tako prilagođavaju okolini i preživljavaju unutar zajednice [16]. Kao rezultat koordinirane

međustanične komunikacije mogu biti formirani visoko strukturirani bakterijski biofilmovi identificirani u pacijenata s kroničnim plućnim infekcijama, kroničnim infekcijama rana, kroničnim rinosinusitisom, ponavljajućim urinarnim infekcijama, endokarditisom te plućnim infekcijama u pacijenata koji boluju od cistične fibroze [17].

Zbog svega navedenog, izuzetno je važno prepoznati i liječiti infekciju *P. aeruginosa* prije formiranja bakterijskih biofilmova, no povećana incidencija akutnih i perzistentnih infekcija zahtijeva razvoj novih terapijskih strategija za učinkovitu eradikaciju ove bakterije [9].

1.3. Struktura i funkcija bakterijskog biofilma

Adaptivna rezistencija bakterije je inducibilna i ovisi o prisutnosti antibiotika ili nekog vanjskog stimulusa [15]. Najslikovitiji primjer takvog oblika rezistencije je formiranje bakterijskog biofilma koji stanicama pruža otpornost na napad antibiotika, a također ih štiti od imunskog odgovora domaćina. *P. aeruginosa* je modelni mikroorganizam za proučavanje bakterijskih biofilmova [9]. *Pseudomonas* kolonizira i različite površine medicinskih uređaja, poput urinarnih katetera, endotrahealnih tuba, implantata i kontaktnih leća [18,19].

U prirodi, mikrobi egzistiraju u dva osnovna oblika, planktonskom (nomadskom) obliku te sesilnom (sedentarnom) obliku. Sedentarne kolonije bakterijskih stanica vezanjem za neku površinu formiraju kompleksnu strukturu bakterijskog biofilma [20]. Struktura biofilma smatra se jednom od najuspješnijih strategija preživljavanja jer bakterije unutar biofilma lako podnose velike temperaturne promjene i nedostatak esencijalnih nutrijenata. Osnovu biofilma čine sedentarne bakterijske stanice koje izlučuju vlastiti ekstracelularni matriks. Matriks je formiran od ekstracelularnih polimernih supstanci (EPS) koje uključuju polisaharide, lipide, proteine i ekstracelularnu DNA (eDNA). EPS, koje zauzimaju čak 90% mase biofilma, olakšavaju adheziju na biotičke i abiotičke površine, osiguravaju opskrbu bakterijskih stanica nutrijentima te reguliraju ekspresiju potrebnih enzima i citosolnih proteina. Matriks EPS-a također sudjeluje u prijenosu signala između stanica, olakšavajući međustaničnu komunikaciju [9]. Značajnu ulogu u formiranju i održavanju stabilnosti biofilma *P. aeruginosa* imaju tri vrste egzopolisaharida: Psl, Pel i alginati. Polisaharid Psl bogat je manozom i galaktozom te je uključen u inicijalnu adheziju bakterijskih stanica za površinu,

kao i u stvaranje mikrokolonija u zreom biofilmu. Pel je glukozni polisaharid sličan celulozi koji sudjeluje u međustaničnim interakcijama prilikom nastanka biofilma. Alginati, linearni polianionski egzopolisaharidi sastavljeni iz uronskih kiselina, doprinose slabijoj osjetljivosti stanica u biofilmu na terapiju antibioticima [21].

Liza bakterijskih stanica, uzrokovana prodorom antibiotika i stresnim čimbenicima, dovodi do oslobađanja DNA u okoliš. Oslobođena eDNA, citosolni proteini i RNA se zatim pakiraju u membranske vezikule, koje su obavijene fragmentima stanične membrane liziranih stanica [22]. Ekstracelularna DNA uključena je u mnoštvo procesa: osigurava nutrijente za bakterije u biofilmu, održava pravilnu staničnu organizaciju, limitira penetraciju antibiotika u strukturu biofilma i modificira imunski odgovor domaćina [9,23,24].

Na Slici 1. prikazan je biofilm *P. aeruginosa* uzgojen u laboratoriju. Crvenom bojom obojen je kompleksan matriks EPS-a koji drži neovisne bakterijske stanice na okupu. Tamnija područja u središtu potječu od prirodnih pigmenata bakterija.

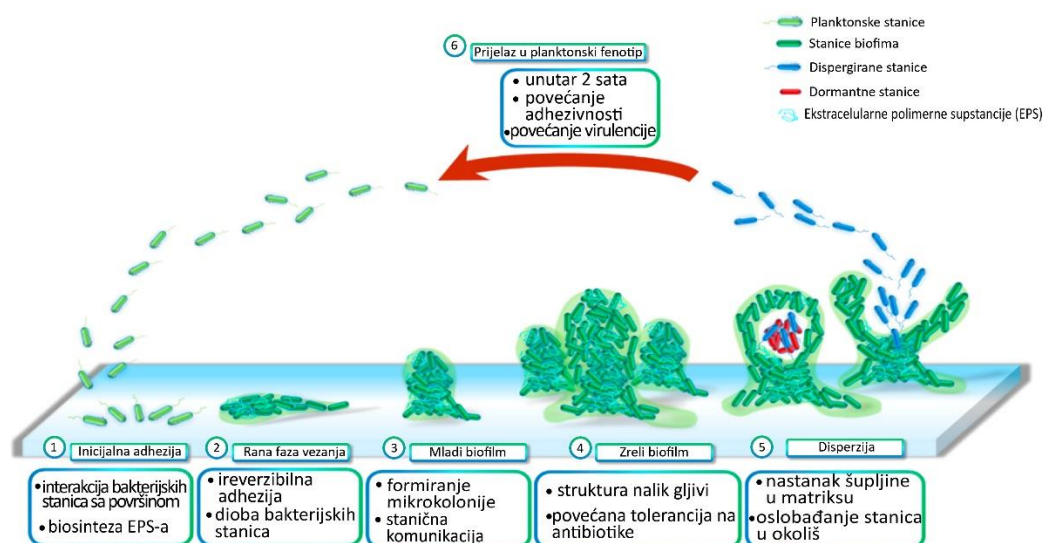


Slika 1. Biofilm *P. aeruginosa* (preuzeto iz Creative Commons galerije autora Scotta Chimileskog [25] u ožujku 2021.)

1.3.1. Ciklus formiranja i disperzije bakterijskog biofilma

Prijelaz iz planktonskog rasta bakterija u biofilm je kompleksan i visoko reguliran proces. Inicijalno dolazi do adhezije bakterija za neku površinu, što se događa zbog utjecaja vanjskih stresnih čimbenika. Bakterije se za površinu vežu u tankom sloju, a važnu ulogu u vezanju imaju adhezini, poput flagela, fimbrija i pila [26]. Adhezija je u početku reverzibilna, no diobom stanica i stvaranjem mikrokolonije postaje ireverzibilna. Diobom vezanih planktonskih stanica se zatim formira mikrokolonija. Sekrecija EPS-a unutar mikrokolonije omogućava maturaciju nastale mikrokolonije dajući biofilmu organiziranu strukturu i rigidnost. Karakteristika novonastalog biofilma je visoka poroznost, zbog mnoštva pora i kanala unutar matriksa EPS-a. Porozna struktura omogućava opskrbu sesilnih bakterijskih stanica potrebnim nutrijentima i kisikom iz okoliša [20]. Prilikom diobe stanica, bakterije, osim EPS-a, izlučuju i specifične QS molekule koje određuju ekspresiju određenih gena u biofilmu bitnih za održavanje međustanične komunikacije [11]. Nastala struktura biofilma, koja nalikuje gljivi, može samostalno egzistirati kroz dulji period, a tu sposobnost daje fenotipska diferencijacija bakterijskih stanica. Naime, prilikom formiranja biofilma *P. aeruginosa*, zamijećeno je da manje pokretljive stanice naseljavaju unutrašnjost mikrokolonije (tzv. „stručak“ gljive), dok se one pokretljivije pomoću pila penju prema površini mikrokolonije (tzv. „klobuk“ gljive). Subpopulacija stanica u unutrašnjosti je zbog manje pokretljivosti gušće naseljena, ali se smatra manje metabolički aktivnom ili čak dormantnom u odnosu na bakterijske stanice na površini [20]. Različiti antibiotici pokazuju drugačiji afinitet prema dvije subpopulacije, pa tako tobramicin djeluje na stanice površinskog sloja [27], dok kolistin ubija bakterijske stanice u unutrašnjosti mikrokolonije [28].

U kasnijim stadijima razvoja biofilma dolazi do stvaranja šupljina u unutrašnjosti mikrokolonije, koje zatim popunjavaju pokretljive stanice površinskog sloja [20]. Mehanizam tog procesa nije još u potpunosti razjašnjen, ali se smatra da lučenje EPS- hidrolaza uzrokuje razgradnju EPS-a što destabilizira strukturu biofilma i time započinje proces disperzije biofilma [26]. Bakterijske stanice dispergirane iz biofilma fiziološki nalikuju planktonskim stanicama, zbog slične ekspresije proteina, a vrlo brzo nakon disperzije biofilma takve stanice vraćaju osjetljivost na antibiotike [20,26]. Proces formiranja bakterijskog biofilma sve do njegove disperzije prikazan je na Slici 2.



Slika 2. Ciklus formiranja i disperzije biofilma *P. aeruginosa* (preuzeto i prilagođeno iz [9])

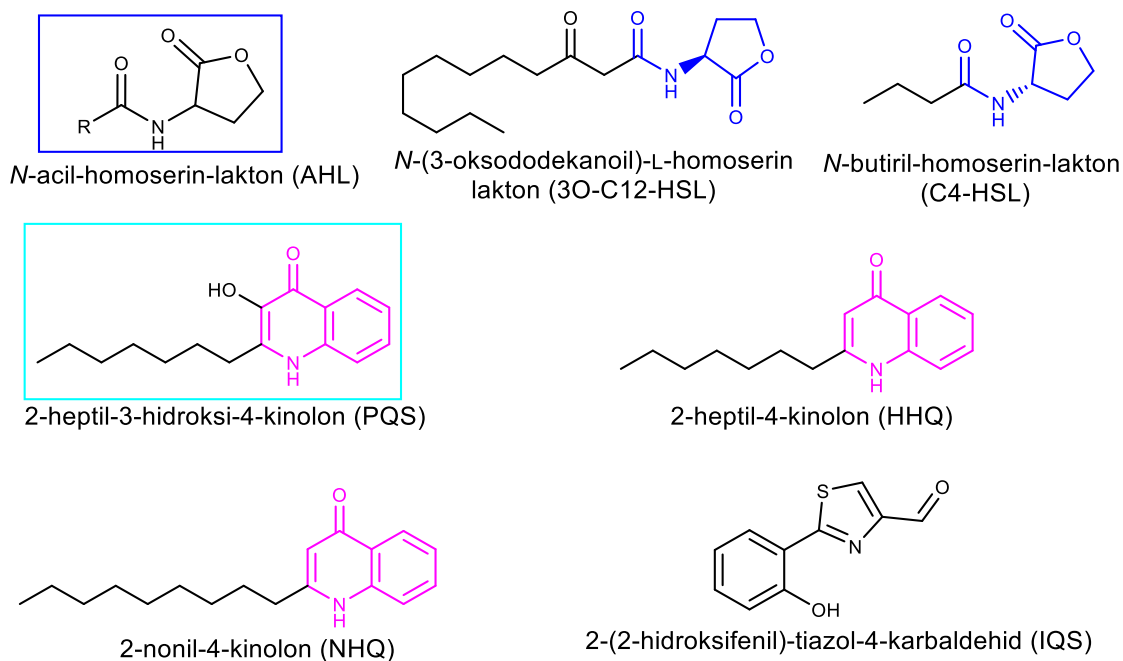
1.4. Međustanična bakterijska komunikacija (Quorum sensing, QS)

Za razvoj funkcionalnog bakterijskog biofilma potrebno je koordinirano međudjelovanje neovisnih bakterijskih stanica, kako bi se uspješno formirala mikrokolonija. Unutar biofilma *P. aeruginosa* zamijećeno je više signalnih puteva, koji su nužni za prilagodbu i preživljavanje novonastalih mikrokolonija, a nose zajednički naziv *quorum sensing* (QS) [9]. QS je mehanizam međustanične komunikacije bakterijskih stanica, koji se temelji na sekreciji i djelovanju QS signalnih molekula (QSSM), često zvanih i autoinduktorima (AI). Aktivacija QS-a nastupa kada se poveća gustoća bakterijskih stanica na određenoj površini pod djelovanjem okolišnih stresnih čimbenika. Nakon što bakterijska populacija dosegne prag podražaja, definiran koncentracijom izlučenih QSSM, dolazi do usklađene transkripcije određenih gena što omogućava kolektivno djelovanje bakterijskih stanica [14]. QS omogućava bakterijskim populacijama da zajednički obavljaju zadaće koje nisu sposobne izvršavati samostalno, a sofisticirane QS signalne putove su, zbog brojnih prednosti, razvile i Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije [12]. Osim što je izuzetno važan za formiranje biofilмова, QS je uključen i u proizvodnju faktora virulencije, toleranciju stanica na stres, metaboličku prilagodbu te interakcije mikroba i domaćina [16].

1.4.1. *Quorum sensing* sustavi u biofilmu *P. aeruginosa*

P. aeruginosa posjeduje složen sustav QS-a, sastavljen od barem četiri nezavisna puta prijenosa signala, koji su ujedno čvrsto povezani i koordinirani. Dva signalna puta, *las* i *rhl*, regulirani su signalnim molekulama sintetiziranim iz *N*-acil-homoserin-laktona (AHL) i oba sustava se aktiviraju prilikom povećanja gustoće stanica u bakterijskoj populaciji [12]. Signalni sklop *las* uključuje transkripcijski aktivacijski protein *LasR* povezan s AHL sintazom *LasI* koja regulira sintezu autoinduktora *N*-(3-oksododekanoil)-*L*-homoserin laktona (3O-C12-HSL). *LasR* veže autoinduktorsku molekulu te aktivira ekspresiju gena uključenih u sintezu faktora virulencije poput elastaza. Slično tome, aktivacijom *RhlR* proteina vezanjem autoinduktora *N*-butiril-*L*-homoserin laktona (C4-HSL) sintetiziranog *RhlI* sintazom, dolazi do ekspresije gena za produkciju piocijanina i ramnolipida [29,30].

Treći signalni put koristi 4-alkilkinolone kao signalne molekule. Hijerarhijski je povezan s dva prethodno spomenuta sustava te se aktivira prilikom nedostatka esencijalnog nutrijenta željeza u bakterijskoj populaciji [12,30]. Prva otkrivena molekula zaslužna za aktivaciju ovog sustava je 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon, nazvan *Pseudomonas* kinolonskim signalom (*Pseudomonas Quinolone Signal*, PQS). PQS spada u porodicu alkilkinolonskih molekula zajedno s 2-heptil-4-kinonom (HHQ), 2-nonil-4-kinonom (NHQ) i 2-heptil-4-kinolon *N*-oksidom (HHQNO), koje također sintetizira *P. aeruginosa* [31]. Autoinduktor četvrtog signalnog puta je 2-(2-hidroksifenil)-tiazol-4-karbaldehid (IQS), no posljednja saznanja upućuju na činjenicu da je ta molekula nusprodukt biosinteze siderofora piokelina [32]. IQS sustav je zadnji otkriven, pa njegov transkripcijski regulator i konačni učinci ekspresije još nisu u potpunosti poznati [9]. Strukture signalnih molekula QS-a u *P. aeruginosa* prikazane su na Slici 3.



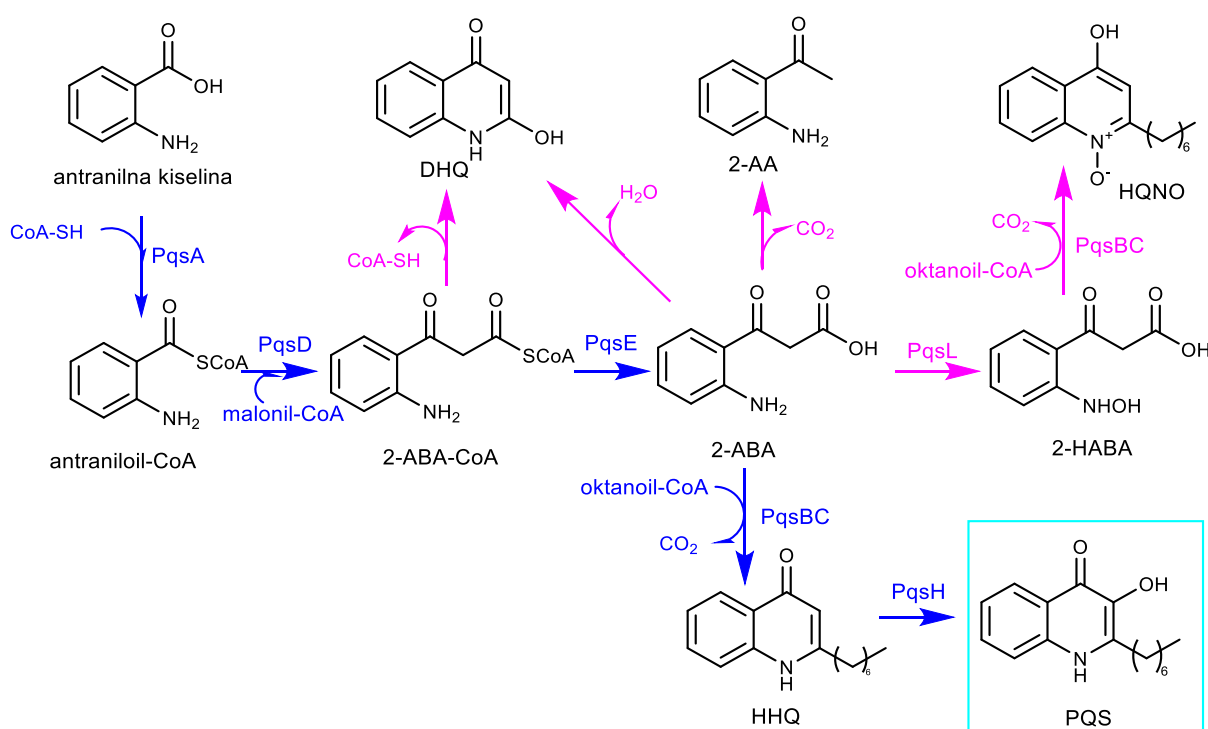
Slika 3. Signalne molekule QS-a u *P. aeruginosa*

1.4.2. Biosinteza *Pseudomonas Quinolone Signala* (PQS)

PQS i njegov biosintetski prekursor HHQ su ligandi transkripcijskog faktora *MvfR* (engl. *multiple virulence factor regulator*), koji se još naziva i *PqsR*. Vežanjem za spomenuti receptor, PQS i HHQ induciraju transkripciju različitih gena, a nazivaju se autoinduktorima zbog sposobnosti induciranja transkripcije gena vlastite biosintetske kaskade, regulirane operonom *PqsABCDE*. U proces biosinteze PQS-a i srodnih molekula uključeni su enzimi *PqsH* i *PqsL*, regulirani transkripcijskim faktorom *LasR*, što ilustrira poveznicu između AHL i AQ sustava *quorum sensinga* u *P. aeruginosa*. Polazni spoj u biosintezi je antranilna kiselina, a njeni prirodni izvori su aminokiselina triptofan i korizmička kiselina [31,33].

Prvi korak u biosintezi je kondenzacija antranilne kiseline i koenzima A (CoA), katalizirana ligazom *PqsA*, kojom nastaje aktivirani tioester antranoil-CoA. Zatim, β -ketoacil-ACP sintaza *PqsD* katalizira nastanak 2-aminobenzoilacetil-CoA (2-ABA-CoA) iz antranoil-CoA i malonil-CoA [34]. Tioesteraza *PqsE* zatim hidrolizira 2-ABA-CoA u 2-aminobenzoilacetat (2-ABA) [33]. Kondenzaciju 2-ABA s oktanoil-CoA katalizira heterodimer *PqsBC*, kojom nastaje HHQ [34]. Posljednji korak biosintetskog puta, hidroksilaciju HHQ-a u PQS, katalizira NADH-ovisna flavin-monooksigenaza *PqsH* [33,35].

Skretnicama s biosintetskog puta sintetiziraju se spojevi srodni PQS-u [33]. FADH ovisna monooksigenaza PqsL hidroksilira 2-ABA u 2-hidroksiaminobenzoilacetat (2-HABA). PqsBC kataliziranom kondenzacijom 2-HABA i oktanoil-CoA nastaje 4-hidroksi-2-heptilkinolin-*N*-oksid (HQNO) [34]. Također, 2-ABA-CoA i 2-ABA su nestabilni međuprodukti, pa se 2-ABA-CoA može intramolekulski ciklizirati u 2,4-dihidrokinolin (DHQ), a 2-ABA dekarboksilacijom daje 2-aminoacetofenon (2-AA) [36]. Na Shemi 1. prikazan je biosintetski put PQS-a tako da su glavni koraci prikazani plavim strelicama, a skretnice ružičastim.



Shema 1. Biosinteza PQS-a [33]

1.5. Inhibicija međustanične bakterijske komunikacije

Činjenica da je međustanična komunikacija (*quorum sensing*, QS) nužna kako bi bakterije proizvele faktore virulencije i formirale bakterijski biofilm upućuje na to da bi inhibicija QS-a povećala osjetljivost patogena na terapiju konvencionalnim antibioticima te na imunosti odgovor domaćina [37]. Inhibitori međustanične komunikacije (*quorum sensing inhibitors*, QSIs) pokazali su se kao obećavajući agensi za suzbijanje bakterijskih biofilmova

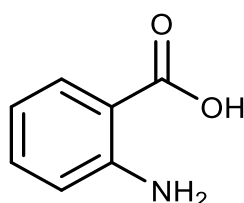
jer mogu smanjiti doziranje lijekova i skratiti trajanje terapije [38,39]. Također, smatra se da molekule koje interferiraju s QS-om stvaraju manji selektivni pritisak na bakterijsku stanicu od konvencionalnih antibiotika, pa bi se uporabom QSI lakše suzbile infekcije bez dodatnog doprinosa antibiotskoj rezistenciji [40]. Inhibicija međustanične komunikacije može se postići inhibicijom sinteze signalnih molekula, razgradnjom sintetiziranih signalnih molekula ili blokiranjem receptora na koje se vežu signalne molekule. Razgradnjom sintetiziranih signalnih molekula dolazi do gašenja međustanične komunikacije (*quorum quenching*, QQ) [39]. Do gašenja komunikacije može doći i bez prethodnog ulaska molekule u bakterijsku stanicu [40].

Primjerice, pokazalo se da komercijalno dostupni antibiotici azitromicin, ceftazidim i ciprofloksacin inhibiraju QS reguliranu ekspresiju faktora virulencije, poput elastaza, kitinaza, ramnolipida i proteaza [40]. Uporaba azitromicina u pacijenata na mehaničkoj ventilaciji s visokim rizikom razvoja pneumonije pokazala je značajan učinak azitromicina u profilaksi te infekcije, čiji je uzročnik *P. aeruginosa* [42].

Posljednjih godina u literaturi je zabilježen značajan porast novih spojeva koji učinak ispoljavaju inhibicijom stvaranja ili disperzijom formiranog biofilma, no još uvijek nije registriran niti jedan lijek, dok se nekoliko kandidata nalazi u kliničkim ispitivanjima [39]. QSI bi se u budućnosti mogli koristiti kao alternativa antibioticima, kao i u kombinaciji s antibioticima kako bi se uspješnije eradicirale infekcije vezane uz stvaranje biofilma [37,39].

1.6. Antranilna kiselina i njeni derivati

Antranilna kiselina je 2-aminobenzojeva kiselina molekulske formule $C_7H_7NO_2$ (Slika 4.). Pojavljuje se u obliku bijele do blijedo-žute kristalinične krutine, slatkastog okusa i bez mirisa. Slabo je topljiva u vodi, dok se dobro otapa u organskim otapalima [43].

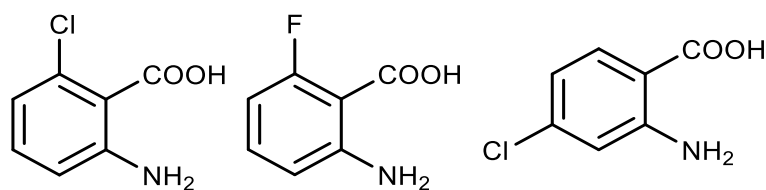


Slika 4. Antranilna kiselina

U industriji se antranilna kiselina koristi kao prekursor u sintezi azo-boja i sladila saharina. Kiselina i njeni esteri upotrebljavaju se za proizvodnju mirisa, lijekova (poput diuretika furosemida), tvari za apsorpciju UV-zračenja, inhibitora korozije i repelenata [44]. Fenamati su *N*-supstituirani derivati antranilne kiseline. U njih spadaju mefenaminska, flufenaminska i tolfenaminska kiselina, a klinički se upotrebljavaju kao nesteroidni protuupalni lijekovi [45].

Antranilna kiselina i njeni derivati pokazuju antibakterijsko djelovanje. Zamijećeno je da antranilat inhibira stvaranje biofilma kod bakterija *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio vulnificus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica* i *Staphylococcus aureus* [46]. U *P. aeruginosa*, antranilat destabilizira kompleksnu strukturu biofilma i umanjuje stimulirajući učinak indola na formiranje bakterijskog biofilma [47]. Antranilna kiselina pokazuje antibakterijski učinak na lizat stanica bakterije *Legionella pneumophila*, primarnog uzročnika legionarske bolesti [48]. Također, fenamati su pokazali antibakterijsko djelovanje na MDR bakteriju *Neisseria gonorrhoeae* [49].

Godine 2001., Calfee i suradnici identificirali su prvi PQS inhibitor, metil-antranilat, koji je pokazao parcijalnu inhibiciju ekspresije PQS-a i elastaza [50]. Halogenirani analozi antranilata, 2-amino-6-fluorobenzojeva kiselina, 2-amino-6-klorobenzojeva kiselina i 2-amino-4-klorobenzojeva kiselina (Slika 5.) inhibirali su sintezu HHQ-a i PQS-a na razini ekspresije gena te su tako povećali stopu preživljavanja miševa s infekcijom *P. aeruginosa*. Inhibicijom sinteze HHQ i PQS onemogućuje se ekspresija faktora virulencije regulirana transkripcijskim faktorom *MvfR* (odnosno *PqsR*) [51].

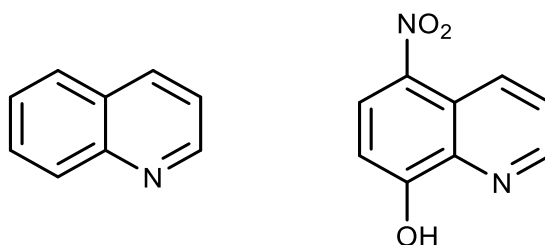


Slika 5. Halogenirani derivati antranilne kiseline koji inhibiraju QS

1.7. Kinolini

Kinolin (benzopiridin, 1-azanaftalen) heterobiciklički je spoj koji se sastoji od kondenziranog benzenskog i piridinskog prstena (Slika 6.). Bezbojna je tekućina prepoznatljivog mirisa [52]. U industriji se najčešće koristi kao međuprodukt u sintezi novih spojeva jer je kinolinski prsten pogodan za različite strukturne modifikacije. Brojni učinkoviti lijekovi su derivati kinolina, poput antimalarika (klorokin, primakin), antivirusa (sakvinavir), anthelmintika (tetrahidrokinolin oksamnivikvin), citostatika (kamptotecin, irinotekan, bosutinib), antipsihotika (tetrahidrokinolin aripiprazol) te mnogih drugih spojeva koji su u različitim fazama kliničkih ispitivanja [53].

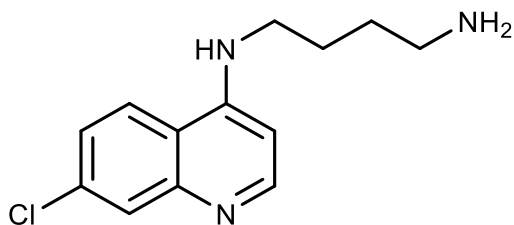
Također, derivati kinolina pokazuju i antibakterijsko djelovanje, poput 8-hidroksikinolina, nitroksolina i više generacija kinolona/fluorokinolona [54]. Nitroksolin (5-nitro-8-hidroksikinolin, Slika 7.) sintetski je antibakterijski lijek i derivat kinolina širokog spektra djelovanja. Upotrebljava se kao uroantiseptik, a djeluje keliranjem Fe^{2+} i Zn^{2+} iona važnih u regulaciji nastanka i održavanja bakterijskog biofilma. Nitroksolin inhibira QS *P. aeruginosa* i time inhibira stvaranje biofilma te pospješuje disperziju već formiranog biofilma [55].



Slika 6. Kinolinski prsten (lijevo) i nitroksolin (desno)

Derivati 4-aminokinolina se klinički upotrebljavaju kao antimalarici, no posjeduju i antibakterijsko djelovanje. Fumardiamidi i ureidoamidi antimalarika primakina pokazali su značajno djelovanje na bakterijski biofilm brojnih bakterija te gljive *Candida albicans* [40,54]. 4,7-Disupstituirani derivati kinolina pokazali su značajnu inhibiciju QS-a i time inhibiciju stvaranja bakterijskog biofilma u bakterija *P. aeruginosa* i *Serratia marcescens*. U istraživanju koje su proveli Aleksić i suradnici, ustanovljeno je da učinkovitost inhibicije QS-a leži u prisutnosti C(7)-supstituenta, bazične amino skupine te dugolančanog *N*-alkilamino supstituenta na C(4) položaju kinolinske jezgre. Na Slici 7. prikazan je *N*¹-(7-klorokinolin-4-

il)butan-1,4-diamin, derivat kinolina koji je inhibirao QS sustav *P. aeruginosa* i *S. marcescens*, a važan je za daljnju problematiku ovog rada [56].



Slika 7. N¹-(7-klorokinolin-4-il)butan-1,4-diamin

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Metoda molekulske hibridizacije podrazumijeva dizajn i sintezu hibrida sastavljenih iz dvije ili više bioaktivnih molekula u jedan novi kemijski entitet. Ova strategija može biti korisna u dizajnu novih lijekova radi većeg afiniteta i učinkovitosti hibridnih molekula te poboljšanih svojstava u odnosu na ishodišne molekule. Usto, molekulskom hibridizacijom moguće je postići međudjelovanje lijeka s više farmakoloških meta, smanjiti neželjene učinke lijekova, spriječiti interakcije lijek-lijek te usporiti razvoj rezistencije [57].

Sukladno s navedenim, cilj ovog rada je sinteza i karakterizacija novih hibridnih derivata antranilne kiseline i 4-amino-7-klorokinolina kao potencijalnih agensa za suzbijanje infekcija posredovanih bakterijskim biofilmovima. Kao što je već spomenuto u uvodu, antranilna kiselina i njeni derivati [46-51] te 4,7-disupstituirani derivati kinolina [56] pokazuju antibakterijsko djelovanje, kao i djelovanje na *quorum sensing* te posljedično na bakterijski biofilm. Moguće je da će hibridni spojevi, nastali povezivanjem ova dva molekulska motiva putem acil-semikarbazidne te oksadiazolske poveznice, imati pojačano djelovanje u odnosu na ishodišne spojeve.

Naknadnim istraživanjima, koja prelaze okvire ovoga rada, ispitat će se biološko djelovanje novosintetiziranih spojeva.

3. MATERIJALI I METODE

Tališta (t_r) sintetiziranih spojeva određena su na Stuart Melting Point instrumentu (Barloworld Scientific, UK) u otvorenim kapilarama i nisu korigirana. ^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na spektrometru Bruker Avance III HD Ascend (Bruker, SAD) pri 300 ili 400 MHz za ^1H te pri 75, 101 ili 151 MHz za ^{13}C . Uzorci su mjereni u otopinama DMSO- d_6 na temperaturi od 20 °C u NMR cjevčicama od 5 mm. Kemijski pomaci izraženi su u ppm u odnosu na unutarnji standard tetrametilsilan (TMS) u ^1H spektrima te u odnosu na rezidualni pik DMSO pri 39,52 ppm kao standard u ^{13}C spektrima. Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS (HPLC, Agilent Technologies 1200 series; MS, Agilent Technologies 6410 Triple Quadripole, SAD). Ionizacija elektroraspršenjem (ESI) u pozitivnom i negativnom modu korištena je kao tehnika ionizacije. Za reakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem korišten je mikrovalni reaktor CEM Discover (CEM, SAD).

Tijek kemijskih reakcija praćen je normalnofaznom tankoslojnom kromatografijom (TLC). Kao nepokretna faza korištene su staklene silikagel ploče 60 F₂₅₄ (Merck, Njemačka). Za pročišćavanje produkata korištena je kromatografija na koloni na nepokretnoj fazi silikagela visokog stupnja čistoće, veličine čestica 0,063-0,200 mm (Sigma-Aldrich, SAD). Pokretne faze u tankoslojnoj i kromatografiji na koloni bile su slijedeće: diklorometan/metanol (75:25, 7:3, 85:15, 8:2, 95:5, 9:1) i cikloheksan/etil-acetat/metanol (3:1:0,5 i 1:1:0,5). Analizirani spojevi detektirani su pod ultraljubičastim svjetlom ($\lambda = 254$ i 366 nm) i parama joda.

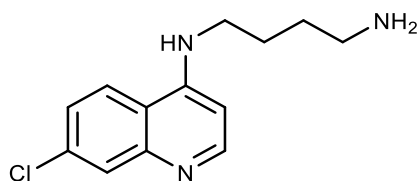
Tetraklorougljik i *N,N*-dimetilformamid (DMF) nabavljeni su od proizvođača TCI Chemicals (Japan). Hidrazin monohidrat (65%), trifenilfosfin, 1,4-diaminobutan, 4,7-diklorokinolin, 1,1'-karbonildiimidazol (CDI) i litijev klorid nabavljeni su od proizvođača Sigma-Aldrich (SAD). 2-amino-6-klorobenzojeva kiselina nabavljena je od proizvođača Apollo Scientific Limited (Ujedinjeno Kraljevstvo). Natrijev klorid, amonijev klorid i bezvodni natrijev sulfat nabavljeni su od proizvođača Gram Mol (Hrvatska). Klorovodična kiselina i tionil-klorid nabavljeni su od proizvođača Honeywell Fluka Chemicals (Njemačka). Natrijev hidrogenkarbonat nabavljen je od proizvođača Kemika (Hrvatska). Sve kemikalije bile su *p.a.* čistoće.

Bezvodni toluen dobiven je slijedećim postupkom: toluen je ekstrahiran vodom, osušen nad bezvodnim kalcijevim kloridom, destiliran i čuvan nad natrijem. Bezvodni diklorometan: diklorometan je ekstrahiran vodom, sušen nad bezvodnim kalcijevim kloridom i predestiliran. U sintetskom procesu korišten je bezvodni DMF čuvan nad aktiviranim molekulskim sitima.

U sintetskom procesu korišteni su slijedeći komercijalno dostupni esteri antranilne kiseline: metil-antranilat nabavljen od proizvođača Sigma-Aldrich (SAD) i metil-2-amino-4-klorobenzoat nabavljen od proizvođača Fluorochem (Ujedinjeno Kraljevstvo).

Metilni ester 2-amino-6-klorobenzojeve kiseline dobiven je slijedećim postupkom. Suspenziji 2-amino-6-klorobenzojeve kiseline (0,300 g, 1,7 mmol) u suhom toluenu (5 mL) dokapan je tionil-klorid (0,696 mL, 9,6 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na 120 °C uz refluxiranje. Nakon završetka reakcije, tionil-klorid je uparen pod sniženim tlakom, a ostatak nakon uparavanja naparen 2 puta suhim toluenom. Produkt reakcije suspendiran je u apsolutnom metanolu (5 mL) te je reakcijska smjesa miješana preko noći na 0 °C. Nakon završetka reakcije, metanol je uparen pod sniženim tlakom te je produkt bez daljnjeg pročišćavanja iskorišten u slijedećem koraku sinteze.

3.1. Sinteza *N*¹-(7-klorokinolin-4-il)butan-1,4-diamina (**1**)

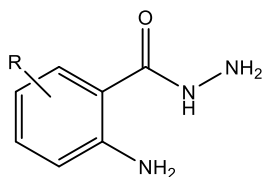


Spoj **1** pripremljen je prema prilagođenom literaturnom postupku [58]. Suspenzija 4,7-diklorokinolina (0,400 g, 2,02 mmol) u 1,4-diaminobutanu (1,780 g, 20,2 mmol) miješana je 1 sat u mikrovalnom reaktoru (MW) na 95 °C i 300 W. Reakcijska smjesa razrijeđena je diklorometanom (100 mL) i ekstrahirana 5% otopinom natrijeva hidroksida (3 × 100 mL) i vodom (1 × 100 mL). Organski sloj sušen je nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran i uparen pod sniženim tlakom. Sirovi produkt je u svrhu pročišćavanja rastavljen u dietil-eteru te je odsisan bijeli talog spoja **1**.

Iskorištenje reakcije: 0,428 g (85,6 %).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J*/Hz) δ 8,39 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H, 9); 8,27 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, 14); 7,78 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, 11); 7,43 (dd, *J* = 9,0, 2,2 Hz, 1H, 13); 7,39 (s, 1H, 6); 6,46 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H, 8); 3,26 (dd, *J* = 12,0, 6,9 Hz, 2H, 5); 2,59 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, 2); 1,69 (dt, *J* = 14,8, 7,4 Hz, 2H, 4); 1,46 (dt, *J* = 14,0, 6,9 Hz, 2H, 3).

3.2. Sinteza hidrazidnih derivata antranilne kiseline (2a-c)



Opći propis: Suspenzija odgovarajućeg metilnog estera derivata antranilne kiseline (2,7 mmol) u hidrazin monohidratu (65%, 1,689 mL, 21,0 mmol) refluksirana je 4 sata na 105 °C. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je razrijeđena zasićenom otopinom amonijeva klorida (30 mL) i ekstrahirana etil-acetatom (3 × 30 mL). Organski slojevi su sjedinjeni, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani te upareni pod sniženim tlakom. Dobiveni talog je rasturljan u dietil-eteru te je odsisan produkt **2a-c**, koji je korišten u slijedećem koraku sinteze.

3.2.1. Sinteza 2-aminobenzohidrazida (2a)

Količina metil-antranilata: 0,350 mL, 0,408 g.

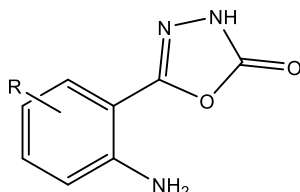
3.2.2. Sinteza 2-amino-6-klorobenzohidrazida (2b)

Količina metil-2-amino-6-klorobenzoata: 0,500 g.

3.2.3. Sinteza 2-amino-4-klorobenzohidrazida (2c)

Količina 2-amino-4-klorobenzoata: 0,500 g.

3.3. Sinteza oksadiazolonskih derivata antranilne kiseline (3a-c)



Opći propis: Otopini odgovarajućeg hidrazida derivata antranilne kiseline **2a-c** (1,4 mmol) u suhom DMF-u (1 mL) dodan je 1,1'-karbonildiimidazol (0,254 g, 1,6 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 4 sata na s.t. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je razrijeđena etil-acetatom (30 mL) i ekstrahirana zasićenom otopinom natrijeva klorida (3 × 30 mL). Organski sloj sušen je nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran i uparen pod sniženim tlakom. Sirovi produkt je rastrljan u dietil-eteru te je odsisan oksadiazolonski produkt **3a-c**.

3.3.1. Sinteza 5-(2-aminofenil)-1,3,4-oksadiazol-2(3H)-ona (3a)

Količina hidrazida **2a**: 0,212 g.

Struktura spoja **3a** je indirektno potvrđena u slijedećem reakcijskom koraku.

3.3.2. Sinteza 5-(2-amino-6-klorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2(3H)-ona (3b)

Količina hidrazida **2b**: 0,264 g.

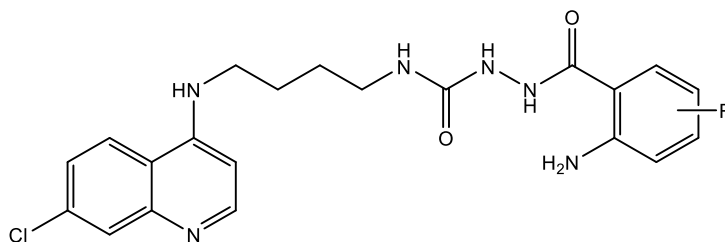
Struktura spoja **3b** je indirektno potvrđena u slijedećem reakcijskom koraku.

3.3.3. Sinteza 5-(2-amino-4-klorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2(3H)-ona (3c)

Količina hidrazida **2c**: 0,264 g.

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 12,59 (s, 1H, 11); 7,45 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, 3); 6,92 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 6); 6,66 (dd, $J = 8,5, 2,1$ Hz, 1H, 5); 6,54 (s, 2H, 7).

3.4. Sinteza acil-semikarbazida (4a-c)



Opći propis: Suspenzija odgovarajućeg oksadiazolona **3a-c** (0,915 mmol) i *N*¹-(7-klorokinolin-4-il)butan-1,4-diamina **1** (0,961 mmol) u apsolutnom etanolu (3 mL) refluxirana je 24-48 sati na 100 °C. Nakon završetka reakcije, etanol je uparen pod sniženim tlakom.

3.4.1. Sinteza 2-(2-aminobenzoil)-*N*-(4-((7-klorokinolin-4-il)amino)butil)hidrazin-1-karboksamida (**4a**)

Količina oksadiazolona **3a**: 0,162 g.

Sirovi produkt reakcije pročišćen je kromatografijom na koloni u mobilnoj fazi diklorometan/metanol (75:25).

Iskorištenje reakcije: 0,155 g (39,6%).

*t*_f: 184 °C (raspad).

ESI-MS (*m/z*): 427,1 (M+1)⁺.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J*/Hz) δ 9,78 (s, 1H, 2'); 8,38 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H, 3'); 8,28 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, 9); 7,77 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, 14); 7,69 (s, 1H, 11); 7,58 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, 6'); 7,43 (dd, *J* = 9,0, 2,3 Hz, 1H, 13); 7,34 (t, *J* = 5,4 Hz, 1H, 6); 7,20 – 7,13 (m, 1H, 8'); 6,70 (dd, *J* = 8,4, 1,2 Hz, 1H, 8); 6,52 – 6,46 (m, 3H, 1, 7', 9'); 6,41 (s, 2H, 11'); 3,28 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, 5); 3,10 (q, *J* = 6,6 Hz, 2H, 2); 1,66 (q, *J* = 7,3 Hz, 2H, 4); 1,53 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, 3).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm) δ 168,90 (4'); 158,65 (1'); 151,87 (9); 150,10 (7); 149,82 (10'); 149,03 (10); 133,34 (12); 132,11 (11); 128,43 (8'); 127,41 (6'); 124,12 (14); 123,97 (13); 117,44 (15); 116,23 (7'); 114,43 (9'); 112,67 (5'); 98,67 (8); 42,17 (5); 38,89 (2); 27,62 (4); 25,08 (3).

3.4.2. Sinteza 2-(2-amino-6-klorobenzoil)-*N*-(4-((7-klorokinolin-4-il)amino)butil)hidrazin-1-karboksamida (4b)

Količina oksadiazolona **3b**: 0,194 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni u mobilnoj fazi diklorometan/metanol (75:25).

Iskorištenje reakcije: 0,116 g (27,7 %).

t_r : 145,5 °C (raspad).

ESI-MS (m/z): 461,1 (M+1)⁺.

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 9,92 (s, 1H, 2'); 8,39 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, 3'); 8,28 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, 9); 8,17 (s, 1H, 6); 7,77 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 14); 7,42 (dd, $J = 9,0, 2,3$ Hz, 1H, 11); 7,32 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H, 13); 7,04 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H, 8'); 6,60 (dd, $J = 8,3, 1,0$ Hz, 1H, 8); 6,54 (dd, $J = 7,8, 0,9$ Hz, 1H, 9'); 6,49 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, 7'); 6,35 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H, 1); 5,93 (s, 2H, 11'); 3,29 (q, 2H, 5); 3,13 (q, $J = 6,6$ Hz, 2H, 2); 1,72 – 1,64 (m, 2H, 4); 1,59 – 1,51 (m, 2H, 3).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm) δ 165,98 (4'); 158,64 (1'); 151,97 (9); 150,05 (7); 149,10 (10'); 147,93 (10); 133,32 (6'); 130,55 (11, 12); 127,47 (8'); 124,10 (14); 123,96 (13); 119,09 (15); 117,45 (5'); 115,07 (7'); 113,21 (9'); 98,69 (8); 42,09 (5); 39,09 (2); 27,46 (4); 25,13 (3).

3.4.3. Sinteza 2-(2-amino-4-klorobenzoil)-*N*-(4-((7-klorokinolin-4-il)amino)butil)hidrazin-1-karboksamida (4c)

Količina oksadiazolona **3c**: 0,194 g.

Sirovi produkt reakcije pročišćen je kromatografijom na koloni u mobilnoj fazi diklorometan/metanol (75:25).

Iskorištenje reakcije: 0,086 g (20,5 %).

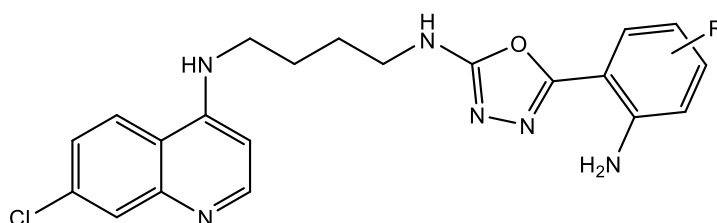
t_r : 174 °C (raspad).

ESI-MS (m/z): 461,1 ($M+1$)⁺.

¹H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J /Hz) δ 9,86 (s, 1H, 2'); 8,39 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, 3'); 8,29 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, 9); 7,78 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 14); 7,72 (s, 1H, 11); 7,58 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, 6'); 7,44 (dd, $J = 9,0, 2,3$ Hz, 1H, 6); 7,42 (t, $J = 5,3$ Hz, 1H, 13); 6,77 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 8); 6,66 (s, 2H, 7', 9'); 6,52 (dd, $J = 8,5, 2,2$ Hz, 2H, 11'); 6,49 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, 1); 3,29 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, 5); 3,09 (q, $J = 6,6$ Hz, 2H, 2); 1,69 – 1,62 (m, 2H, 4); 1,56 – 1,49 (m, 2H, 3).

¹³C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm) δ 168,14 (4'); 158,55 (1'); 151,51 (9); 151,10 (7); 150,30 (10'); 148,61 (10); 136,60 (8'); 133,52 (12); 130,28 (11); 127,09 (6'); 124,18 (14); 124,08 (13); 117,36 (15); 114,96 (7'); 114,11 (9'); 111,48 (5'); 98,66 (8); 42,19 (5); 38,88 (2); 27,59 (4); 25,07 (3).

3.5. Sinteza oksadiazolskih hibridnih derivata antranilne kiseline i kinolina (5a-c)



Opći propis: Otopini odgovarajućeg acil-semikarbazida **4a-c** (0,426 mmol) u suhom diklorometanu (4 mL) dodani su trifetilfosfin (0,168 g, 0,639 mmol), trietilamin (0,238 mL, 0,172 g, 1,704 mmol) i tetraklorougljik (0,091 mL, 0,105 g, 0,682 mmol). Reakcijska smjesa je refluksirana preko noći na 46 °C. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je razrijeđena diklorometanom (30 mL) i ekstrahirana vodom (3 × 30 mL). Zbog taloženja

produkta u diklorometanu, organski sloj nije sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom. Diklorometan je uparen pod sniženim tlakom.

3.5.1. Sinteza *N*¹-(5-(2-aminofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)-*N*⁴-(6-kloronaftalen-1-il)butan-1,4-diamina (**5a**)

Količina semikarbazida **4a**: 0,182 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni u mobilnoj fazi diklorometan/metanol (85:15) te rastrljavanjem u dietil-eteru, dajući konačan produkt **5a** (bijeli talog).

Iskorištenje reakcije: 0,128 g (73,6%).

t: 106 °C (raspad).

ESI-MS (*m/z*): 409,0 (M+1)⁺.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J*/Hz) δ 8,40 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H, 9); 8,30 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H, 14); 7,81 – 7,75 (m, 2H, 11, 13); 7,51 – 7,42 (m, 3H, 4', 6', 6); 7,19 – 7,14 (m, 1H, 7'); 6,84 (dd, *J* = 8,3, 1,1 Hz, 1H, 5'); 6,62 (t, *J* = 8,1 Hz, 1H, 8); 6,57 (s, 2H, 9'); 6,52 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H, 1); 3,36 – 3,28 (m, 4H, 2, 5); 1,78 – 1,69 (m, 4H, 3, 4).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm) δ 162,09 (1'); 158,00 (2'); 151,22 (9); 150,45 (7); 148,31 (10); 146,66 (8'); 133,68 (12); 130,79 (11); 126,84 (6'); 126,05 (4'); 124,19 (13, 14); 117,30 (15); 115,43 (5'); 115,29 (7'); 105,22 (3'); 98,66 (8); 42,32 (5); 42,09 (2); 26,46 (4); 25,06 (3).

3.5.2. Sinteza *N*¹-(5-(2-amino-6-klorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)-*N*⁴-(6-kloronaftalen-1-il)butan-1,4-diamina (**5b**)

Količina semikarbazida **4b**: 0,196 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni u mobilnoj fazi diklorometan/metanol (75:25) te rastrljavanjem u dietil-eteru, dajući konačan produkt **5b** (bijeli talog).

Iskorištenje reakcije: 0,077 g (40,8%).

t: 108 °C (raspad).

ESI-MS (m/z): 433,0 (M+1)⁺.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J /Hz) δ 8,41 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H, 9); 8,35 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, 14); 7,81 (dd, $J = 10,3, 3,9$ Hz, 2H, 11, 13); 7,74 (s, 1H, 6); 7,50 (dd, $J = 9,0, 2,2$ Hz, 1H, 5'); 7,14 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H, 7'); 6,77 (dd, $J = 8,3, 0,7$ Hz, 1H, 6'); 6,68 (dd, $J = 7,8, 0,7$ Hz, 1H, 8); 6,56 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H, 1); 6,20 (s, 2H, 9'); 3,46 – 3,23 (m, 6H, 2, 5, prekriveni signalom H₂O); 1,74 (d, $J = 3,6$ Hz, 4H, 3, 4).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm) δ 163,92 (1', 2'); 154,68 (9); 151,50 (7); 150,69 (10); 150,20 (8'); 134,64 (12); 133,09 (11); 132,16 (6'); 126,39 (4'); 124,95 (14); 124,89 (13); 117,55 (15); 117,01 (5'); 114,54 (7'); 106,28 (3'); 99,12 (8); 42,83 (5), 42,66 (2); 26,94 (4); 25,56 (3).

3.5.3. Sinteza *N*¹-(5-(2-amino-4-klorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)-*N*⁴-(6-kloronaftalen-1-il)butan-1,4-diamina (5c)

Količina semikarbazida **4c**: 0,196 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni u mobilnoj fazi diklorometan/metanol (85:15) te rastrljavanjem u dietil-eteru, dajući konačan produkt **5c** (bijeli talog).

Iskorištenje reakcije: 0,115 g (61,8%).

*t*_f: 123 °C (raspad).

ESI-MS (m/z): 433,1 (M+1)⁺.

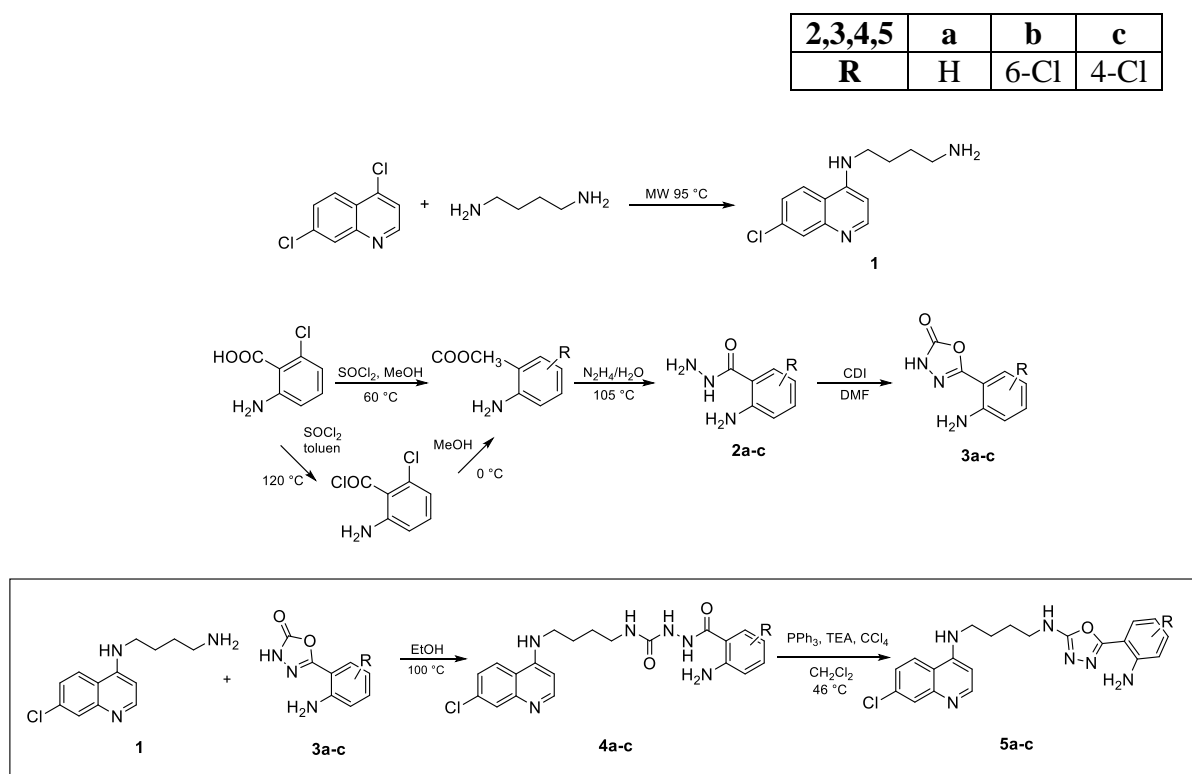
¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J /Hz) δ 8,40 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, 9); 8,30 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, 14); 7,83 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H, 11); 7,79 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 13); 7,50 (t, $J = 4,9$ Hz, 1H, 6); 7,46 (dd, $J = 9,0, 2,1$ Hz, 1H, 4'); 7,41 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, 7'); 6,90 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, 5'); 6,81 (s, 2H, 9'); 6,64 (dd, $J = 8,5, 2,0$ Hz, 1H, 8); 6,53 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H, 1); 3,80 – 3,08 (m, 2, 5, prekriveni signalom H₂O), 1,94 – 1,51 (m, 4H, 3, 4).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm) δ 162,61 (1'); 157,73 (2'); 151,58 (9); 150,99 (7); 148,62 (10); 148,16 (8'); 135,62 (12); 134,21 (11); 128,17 (6'); 127,10 (4'); 124,68 (13,14); 117,73 (15); 115,64 (5'); 114,76 (7'); 104,74 (3'); 99,14 (8); 42,78 (5); 42,56 (2); 26,90 (3); 25,50 (4).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bila je sinteza novih hibridnih derivata antranilne kiseline i kinolina kao potencijalnih agensa za suzbijanje infekcija posredovanih bakterijskim biofilmovima. Antranilna kiselina i njeni derivati pokazuju raznoliko antibakterijsko djelovanje, kao i djelovanje na QS inhibicijom sinteze signalnih molekula PQS-a i HHQ-a. Kinolin je heterobiciklički spoj koji je sastavni dio mnogih učinkovitih molekula lijekova, od kojih se kinoloni, fluorokinoloni te nitroksolin koriste kao antibakterijski lijekovi već dugi niz godina. 4,7-disupstituirani derivati kinolina pokazali su inhibitorni učinak na QS sustave bakterija *P. aeruginosa* i *S. marcescens*. Budući da obje gradivne jedinice posjeduju željeno djelovanje, njihovim se kovalentnim povezivanjem nastoji postići učinkovitije i selektivnije djelovanje nove hibridne molekule.

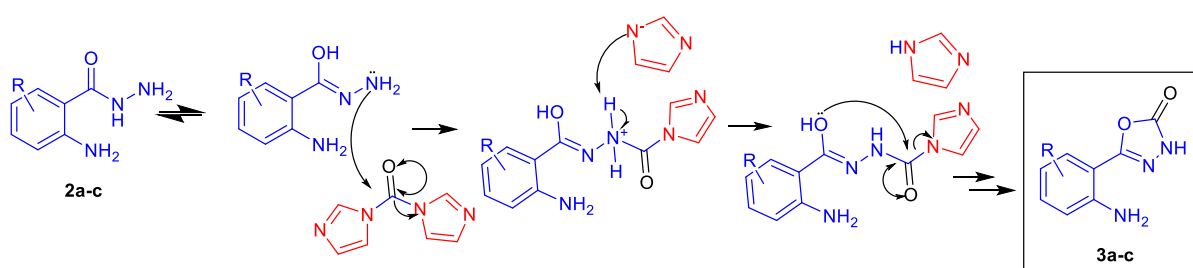
Prije početka samog sintetskog procesa potrebno je pripremiti spoj **1** reakcijom 4,7-diklorokinolina i 1,4-diaminobutana prema prilagođenom literaturnom postupku [58]. Sintetski proces dobivanja konačnih produkata prikazan je na Shemi 2.



Shema 2. Sinteza hibridnih derivata antranilne kiseline i kinolina

Sinteza započinje kemijskom pretvorbom derivata antranilne kiseline u odgovarajuće estere. 6-Kloroantranilna kiselina reagira s tionil-kloridom, refluksiranjem na 120 °C tijekom

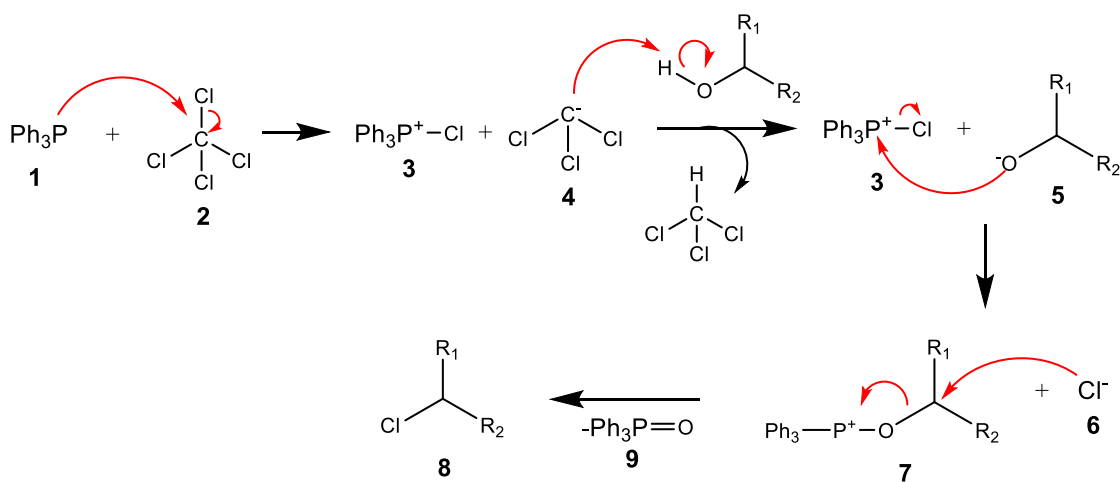
12 sati. Produkt prvog koraka reakcije, kiselinski klorid, nakon uklanjanja tionil-klorida reagira s apsolutnim metanolom na 0 °C tijekom 12 sati dajući metilni ester (neobjavljeni podaci). Ovakav postupak pripreve estera se razlikuje od uobičajenog postupka, u kojem kiselinski derivat u jednom reakcijskom koraku reagira s tionil-kloridom i metanolom, dajući odgovarajući ester. U slijedećem koraku sinteze, reakcijom odgovarajućih estera derivata antranilne kiseline sa 65%-tnim hidrazin monohidratom nastaju hidrazidi **2a-c**. Hidrazin je diamin koji se lako alkilira nukleofilnom supstitucijom, a kako oba dušikova atoma mogu djelovati kao nukleofili, izborom količina reaktanata moguće je usmjeriti nastanak željenog produkta [59], stoga je reakcija provođena uz veliki suvišak hidrazin monohidrata zagrijavanjem na 105 °C, kako ne bi došlo do nastanka dimera. Usto, ester antranilne kiseline se zagrijavanjem otapa u hidrazin monohidratu, pa ova reakcija ne zahtijeva korištenje organskog otapala. Nastali hidrazidi derivata antranilne kiseline **2a-c**, reakcijom s 1,1'-karbonildiimidazolom (CDI) u suhom *N,N'*-dimetilformamidu (DMF) daju oksadiazolonske derivate antranilne kiseline **3a-c**. CDI u ovoj reakciji služi kao dvostruki elektrofil te omogućuje povezivanje dvije nukleofilne skupine putem karbonilne skupine. Kako CDI donira svoju karbonilnu skupinu u novonastali oksadiazolonski prsten, dva imidazolska prstena iz njegove strukture su izlazne skupine [60]. Pretpostavljeni mehanizam reakcije prikazan je na Shemi 3.



Shema 3. Pretpostavljeni mehanizam nastanka oksadiazolonskih derivata antranilne kiseline

U predzadnjem koraku sinteze dolazi do kovalentnog povezivanja oksadiazolonskih derivata antranilne kiseline **3a-c** i kinolinskog derivata **1** te nastaju acil-semikarbazidni hibridni spojevi **4a-c**. Reakcija se odvija pri 100 °C u apsolutnom etanolu te nakon 12-48 sati nije u potpunosti gotova, a posljedica navedenog su niska do srednja iskorištenja ovog reakcijskog koraka (20 do 40%). Terminalna amino skupina spoja **1** nukleofilno napada karbonilnu

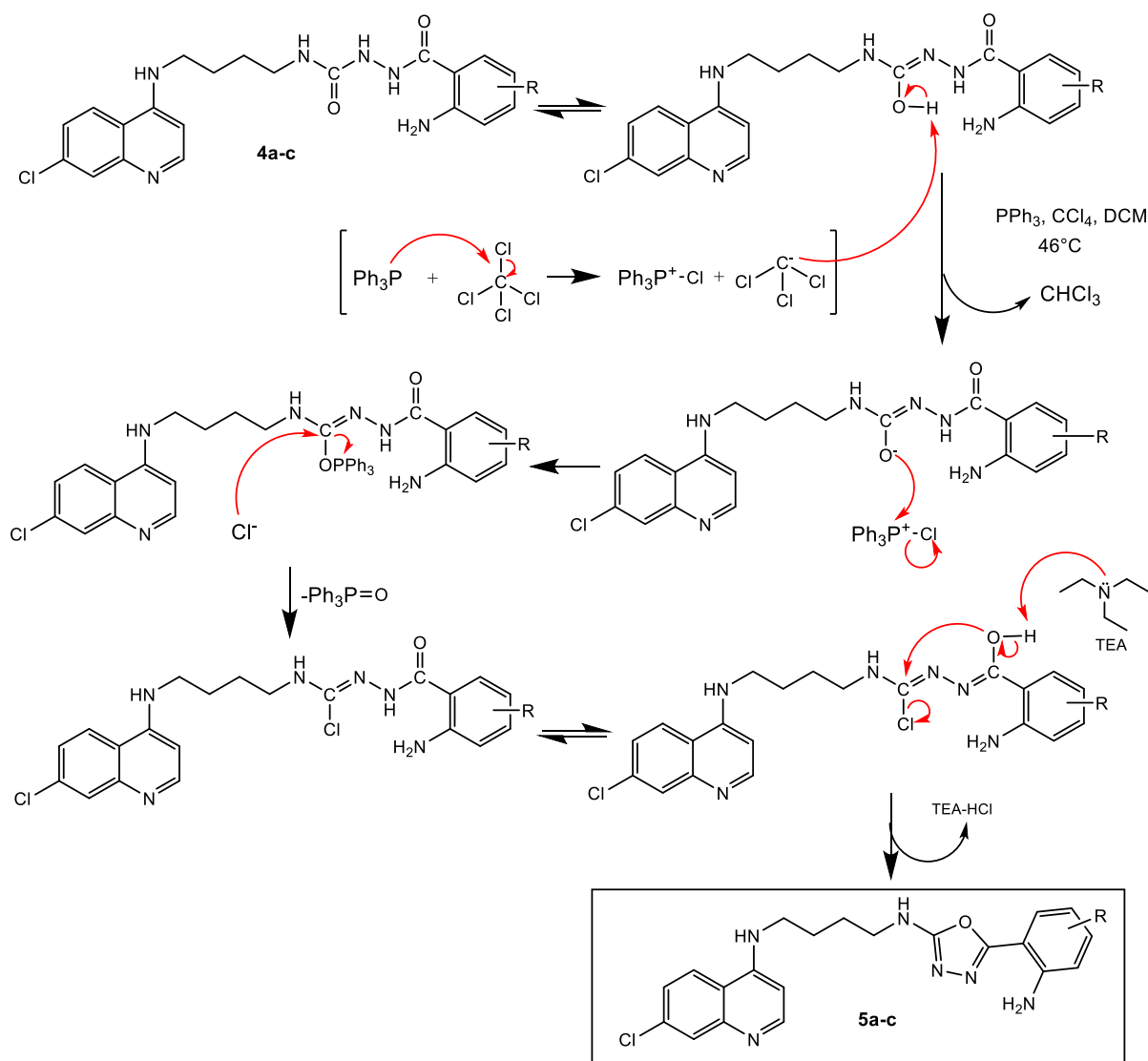
skupinu oksadiazolonskog prstena, što dovodi do otvaranja prstena i keto-enolne tautomerije te nastaje odgovarajući acil-semikarbazid **4a-c**. Nastali acil-semikarbazidi **4a-c** su u zadnjem koraku sintetskog procesa podvrgnuti intramolekulskoj ciklizaciji kojom nastaju oksadiazolski hibridni derivati **5a-c**. Pretpostavljeno je da se reakcija odvija prema mehanizmu modificirane Appelove reakcije u kojoj sudjeluju reagensi trifenilfosfin, tetraklorougljik i trietilamin. Ova reakcija napreduje do kraja te su stoga i iskorištenja nešto veća nego u prethodnom koraku, od 40 do 70%. Izvorna Appelova reakcija služi za dobivanje alkil-halogenida iz alkohola korištenjem trifenilfosfina i tetraklorougljika, a mehanizam prikazan na Shemi 4. opisao je Rolf Appel [61]. Reakcija započinje formiranjem fosfonijeve soli **3** iz trifenilfosfina **1** i tetraklorougljika **2**, koja egzistira u ionskom paru sa specijom **4**. Deprotonacijom alkohola nastaje kloroform i odgovarajući alkoksid **5**. Reaktivan alkoksid zatim nukleofilno napada fosforov atom fosfonijeve soli te nastaje intermedijer **7**. U zadnjem koraku, S_N2 reakcijom nukleofilne supstitucije dolazi do nastanka produkta alkil-halogenida **8** te nusprodukta trifenilfosfin-oksida **9**.



Shema 4. Mehanizam Appelove reakcije [62]

Na karboksilne kiseline i njihove derivate može se primijeniti modificirana Appelova reakcija u kojoj dolazi do sinteze oksazolinskih te oksazinskih prstena [63]. Kao otapalo u reakciji služi diklorometan koji se pokazao pogodnim zbog svoje dielektrične konstante koja utječe na brzinu reakcije [61]. Osim trifenilfosfina i tetraklorougljika koji sudjeluju u izvornoj Appelovoj reakciji, u modificiranoj reakciji dodaje se i baza trietilamin (TEA), koja

deprotonacijom hidroksidne skupine enolne forme acil-semikarbazida dovodi do intramolekulske ciklizacije. Pretpostavljen mehanizam nastanka oksadiazolskih hibridnih derivata modificiranom Appelovom reakcijom prikazan je na Shemi 5 [63].



Shema 5. Pretpostavljeni mehanizam nastanka oksadiazolskih derivata

Opisanim sintetskim procesom pripremljeni su slijedeći hibridni spojevi koji do sada nisu opisani u literaturi:

- 2-(2-aminobenzoi)-*N*-(4-((7-klorokinolin-4-il)amino)butil)hidrazin-1-karboksamid (4a)

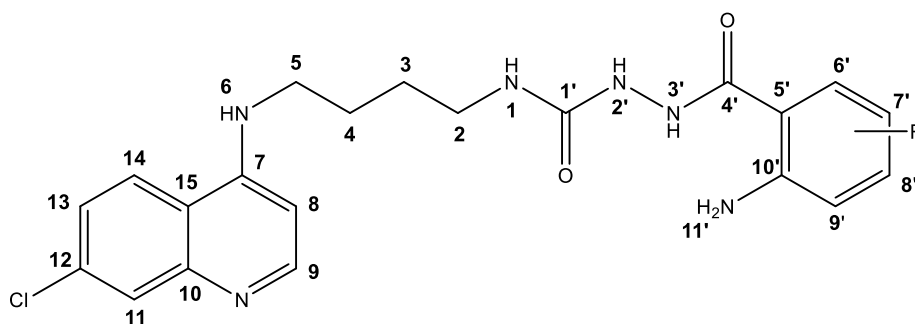
- 2-(2-amino-6-klorobenzoil)-*N*-(4-((7-klorokinolin-4-il)amino)butil)hidrazin-1-karboksamid (**4b**)
- 2-(2-amino-4-klorobenzoil)-*N*-(4-((7-klorokinolin-4-il)amino)butil)hidrazin-1-karboksamid (**4c**)
- *N*^l-(5-(2-aminofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)-*N*^d-(6-kloronaftalen-1-il)butan-1,4-diamin (**5a**)
- *N*^l-(5-(2-amino-6-klorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)-*N*^d-(6-kloronaftalen-1-il)butan-1,4-diamin (**5b**)
- *N*^l-(5-(2-amino-4-klorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)-*N*^d-(6-kloronaftalen-1-il)butan-1,4-diamin (**5c**).

Strukture dobivenih spojeva potvrđene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama- ¹H i ¹³C NMR, MS te im je određeno talište. U Tablicama 1-3 navedeni su analitički i spektroskopski podaci novosintetiziranih spojeva, a spektri se nalaze u Prilozima.

Tablica 1. Analitički i ESI-MS spektroskopski podaci za spojeve **4a-c** i **5a-c**.

Spoj	Iskorištenje (%)	<i>t</i> _i (°C, raspad)	Molekulska formula (M _r)	ESI-MS (<i>m/z</i>)
4a	39,6	184	C ₂₁ H ₂₃ ClN ₆ O ₂ (426,91)	427,1 (M+1) ⁺
4b	27,7	145,5	C ₂₁ H ₂₂ Cl ₂ N ₆ O ₂ (461,35)	461,1 (M+1) ⁺
4c	20,5	174	C ₂₁ H ₂₂ Cl ₂ N ₆ O ₂ (461,35)	461,1 (M+1) ⁺
5a	73,6	106	C ₂₁ H ₂₁ ClN ₆ O (408,89)	409,0 (M+1) ⁺
5b	40,8	108	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ N ₆ O (443,33)	433,0 (M+1) ⁺
5c	61,8	123	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ N ₆ O (443,33)	433,1 (M+1) ⁺

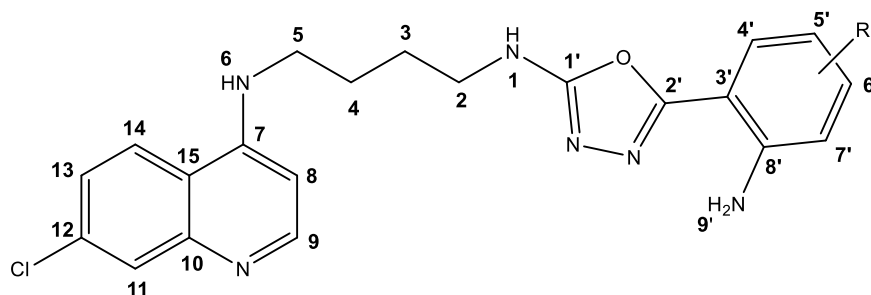
Tablica 2. Kemijski pomaci u ^1H i ^{13}C NMR spektrima acil-semikarbazida **4a-c**.



Spoj	R	^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz)	^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm)
4a	H	9,78 (s, 1H, 2'); 8,38 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, 3'); 8,28 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, 9); 7,77 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 14); 7,69 (s, 1H, 11); 7,58 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, 6'); 7,43 (dd, $J = 9,0, 2,3$ Hz, 1H, 13); 7,34 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H, 6); 7,20 – 7,13 (m, 1H, 8'); 6,70 (dd, $J = 8,4, 1,2$ Hz, 1H, 8); 6,52 – 6,46 (m, 3H, 1, 7', 9'); 6,41 (s, 2H, 11'); 3,28 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, 5); 3,10 (q, $J =$ 6,6 Hz, 2H, 2); 1,66 (q, $J = 7,3$ Hz, 2H, 4); 1,53 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, 3)	168,90 (4'); 158,65 (1'); 151,87 (9); 150,10 (7); 149,82 (10'); 149,03 (10); 133,34 (12); 132,11 (11); 128,43 (8'); 127,41 (6'); 124,12 (14); 123,97 (13); 117,44 (15); 116,23 (7'); 114,43 (9'); 112,67 (5'); 98,67 (8); 42,17 (5); 38,89 (2); 27,62 (4); 25,08 (3)
4b	6-Cl	9,92 (s, 1H, 2'); 8,39 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, 3'); 8,28 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, 9); 8,17 (s, 1H, 6); 7,77 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 14); 7,42 (dd, $J = 9,0,$ 2,3 Hz, 1H, 11); 7,32 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H, 13); 7,04 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H, 8'); 6,60 (dd, $J = 8,3,$ 1,0 Hz, 1H, 8); 6,54 (dd, $J = 7,8, 0,9$ Hz, 1H, 9'); 6,49 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, 7'); 6,35 (t, $J =$ 5,8 Hz, 1H, 1); 5,93 (s, 2H, 11'); 3,29 (q, 2H, 5); 3,13 (q, $J = 6,6$ Hz, 2H, 2); 1,72 – 1,64 (m, 2H, 4); 1,59 – 1,51 (m, 2H, 3)	165,98 (4'); 158,64 (1'); 151,97 (9); 150,05 (7); 149,10 (10'); 147,93 (10); 133,32 (6'); 130,55 (11, 12); 127,47 (8'); 124,10 (14); 123,96 (13); 119,09 (15); 117,45 (5'); 115,07 (7'); 113,21 (9'); 98,69 (8); 42,09 (5); 39,09 (2); 27,46 (4); 25,13 (3)
4c	4-Cl	9,86 (s, 1H, 2'); 8,39 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, 3'); 8,29 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, 9); 7,78 (d, $J = 2,2$	168,14 (4'); 158,55 (1'); 151,51 (9); 151,10 (7);

Hz, 1H, 14); 7,72 (s, 1H, 11); 7,58 (d, $J = 8,5$	150,30 (10'); 148,61 (10);
Hz, 1H, 6'); 7,44 (dd, $J = 9,0, 2,3$ Hz, 1H, 6);	136,60 (8'); 133,52 (12);
7,42 (t, $J = 5,3$ Hz, 1H, 13); 6,77 (d, $J = 2,2$	130,28 (11); 127,09 (6');
Hz, 1H, 8); 6,66 (s, 2H, 7', 9'); 6,52 (dd, $J =$	124,18 (14); 124,08 (13);
8,5, 2,2 Hz, 2H, 11'); 6,49 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H,	117,36 (15); 114,96 (7');
1); 3,29 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, 5); 3,09 (q, $J = 6,6$	114,11 (9'); 111,48 (5');
Hz, 2H, 2); 1,69 – 1,62 (m, 2H, 4); 1,56 –	98,66 (8); 42,19 (5); 38,88
1,49 (m, 2H, 3)	(2); 27,59 (4); 25,07 (3)

Tablica 3. Kemijski pomaci u ^1H i ^{13}C NMR spektrima oksadiazola **5a-c**.



Spoj	R	^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz)	^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm)
5a	H	8,40 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, 9); 8,30 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, 14); 7,81 – 7,75 (m, 2H, 11, 13); 7,51 – 7,42 (m, 3H, 4', 6', 6); 7,19 – 7,14 (m, 1H, 7'); 6,84 (dd, $J = 8,3, 1,1$ Hz, 1H, 5'); 6,62 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H, 8); 6,57 (s, 2H, 9'); 6,52 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H, 1); 3,36 – 3,28 (m, 4H, 2, 5); 1,78 – 1,69 (m, 4H, 3, 4)	162,09 (1'); 158,00 (2'); 151,22 (9); 150,45 (7); 148,31 (10); 146,66 (8'); 133,68 (12); 130,79 (11); 126,84 (6'); 126,05 (4'); 124,19 (13, 14); 117,30 (15); 115,43 (5'); 115,29 (7'); 105,22 (3'); 98,66 (8); 42,32 (5); 42,09 (2); 26,46 (4); 25,06 (3)
5b	6-Cl	8,41 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H, 9); 8,35 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, 14); 7,81 (dd, $J = 10,3, 3,9$ Hz, 2H, 11, 13); 7,74 (s, 1H, 6); 7,50 (dd, $J = 9,0, 2,2$ Hz, 1H, 5'); 7,14 (t, $J = 8,1$	163,92 (1', 2'); 154,68 (9); 151,50 (7); 150,69 (10); 150,20 (8'); 134,64 (12); 133,09 (11); 132,16 (6'); 126,39 (4'); 124,95

		Hz, 1H, 7'); 6,77 (dd, $J = 8,3, 0,7$ Hz, 1H, 6'); 6,68 (dd, $J = 7,8, 0,7$ Hz, 1H, 8); 6,56 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H, 1); 6,20 (s, 2H, 9'); 3,46 – 3,23 (m, 6H, 2, 5, prekriveni signalom H ₂ O); 1,74 (d, $J = 3,6$ Hz, 4H, 3, 4)	(14); 124,89 (13); 117,55 (15); 117,01 (5'); 114,54 (7'); 106,28 (3'); 99,12 (8); 42,83 (5), 42,66 (2); 26,94 (4); 25,56 (3)
5c	4-Cl	8,40 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, 9); 8,30 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, 14); 7,83 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H, 11); 7,79 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 13); 7,50 (t, $J = 4,9$ Hz, 1H, 6); 7,46 (dd, $J = 9,0, 2,1$ Hz, 1H, 4'); 7,41 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, 7'); 6,90 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, 5'); 6,81 (s, 2H, 9'); 6,64 (dd, $J = 8,5, 2,0$ Hz, 1H, 8); 6,53 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H, 1); 3,80 – 3,08 (m, 2, 5, prekriveni signalom H ₂ O), 1,94 – 1,51 (m, 4H, 3, 4)	162,61 (1'); 157,73 (2'); 151,58 (9); 150,99 (7); 148,62 (10); 148,16 (8'); 135,62 (12); 134,21 (11); 128,17 (6'); 127,10 (4'); 124,68 (13,14); 117,73 (15); 115,64 (5'); 114,76 (7'); 104,74 (3'); 99,14 (8); 42,78 (5); 42,56 (2); 26,90 (3); 25,50 (4)

Pregledom ¹H NMR spektroskopskih podataka vidljivo je da u spektrima acil-semikarbazida **4a-c** postoje pikovi NH-skupina (2' i 3') unutar acil-semikarbazidne skupine na 8-10 ppm, dok u ¹H NMR spektrima oksadiazola **5a-c** tih pikova nema. Kako oksadiazolski prsten nema slobodnih vodikovih atoma koji bi se mogli vidjeti u ¹H NMR spektru, potvrda njegovog nastanka je ¹³C NMR spektar u kojem su vidljivi signali na 150-165 ppm koji odgovaraju ugljikovim atomima u oksadiazolskom prstenu.

Kako bi pokazala očekivani farmakološki učinak, novosintetizirana molekula mora u dovoljnoj koncentraciji dospjeti do svoje mete, a sudbina molekule u organizmu značajno ovisi o njenim farmakokinetičkim svojstvima. Tijekom istraživanja i razvoja lijekova pokazalo se da rana procjena farmakokinetičkih parametara znatno povećava uspjeh određene molekule u kliničkim ispitivanjima. Procjenu apsorpcije, distribucije, metabolizma i eliminacije (ADME) određene molekule u organizmu uvelike olakšavaju bioinformatički modeli, poput besplatne web aplikacije SwissADME [64]. Budući da je preferiran peroralni način primjene lijekova, važno je procijeniti opseg apsorpcije novosintetizirane molekule iz gastrointestinalnog trakta u sistemsku cirkulaciju, što izravno utječe na njenu oralnu bioraspoloživost. Proučavanjem fizikalno-kemijskih svojstava neke molekule te

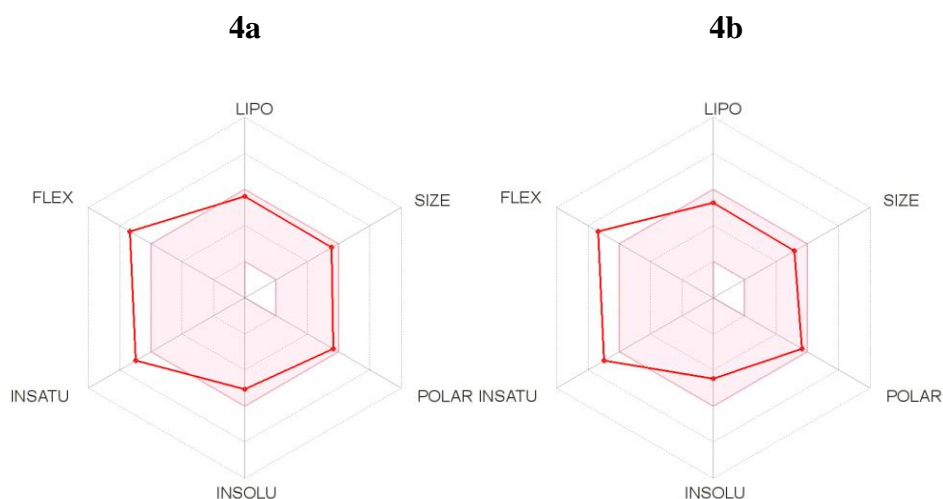
određivanjem određenih molekulskih deskriptora, moguće je predvidjeti oralnu bioraspoloživost lijeka. Većina lijekova koji se primjenjuju peroralno, uz neke izuzetke, zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila. Prema Lipinskom, ukoliko molekula ima molekulsku masu manju od 500 Da, ima manje od 5 donora vodikove veze te manje od 10 akceptora vodikove veze i ukoliko vrijednost partijskog koeficijenta *n*-oktanol/voda (*logP*) molekule iznosi manje od 5, veća je vjerojatnost da će imati dobru oralnu bioraspoloživost [65]. Prema Veberu, dobri prediktori oralne bioraspoloživosti molekule su njena fleksibilnost, promatrana kroz broj rotirajućih veza koji mora biti manji od 10 te polarnost površine, koja obuhvaća zbroj donora i akceptora vodikovih veza, manju od 12. Definiran je još kriterij da topološka zona polarne površine (TPSA) mora biti manja od 140 Å² [66]. Tablica 4. prikazuje procijenjene parametre oralne bioraspoloživosti za acil-semikarbazide **4a-c** te oksadiazole **5a-c** izračunate putem aplikacije SwissADME.

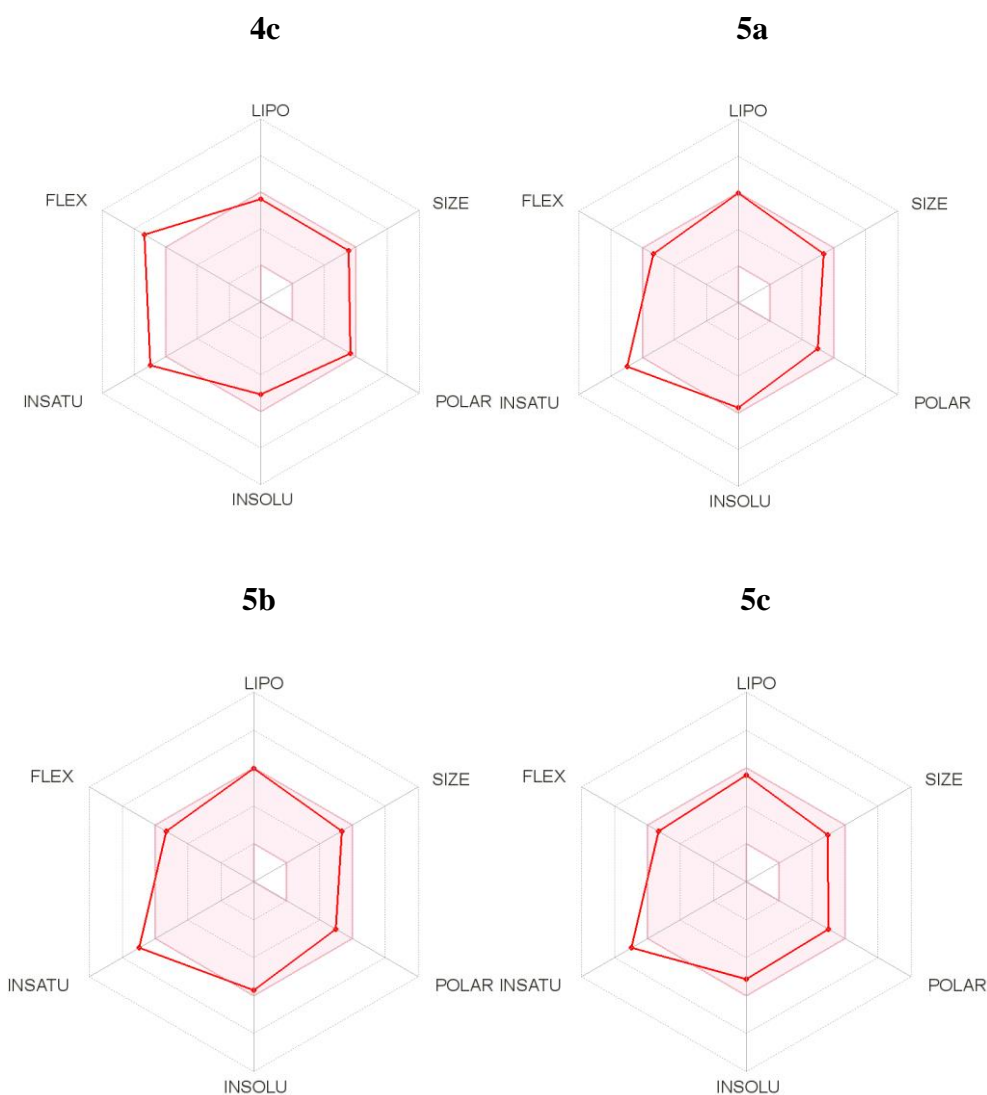
Tablica 4. Pregled parametara oralne bioraspoloživosti izračunatih putem aplikacije SwissADME

Spoj	4a	4b	4c	5a	5b	5c
logP	2,82	3,30	3,32	4,39	4,93	4,92
Broj donora vodikove veze	5	5	5	3	3	3
Broj akceptora vodikove veze	3	3	3	3	3	3
Zbroj donora i akceptora vodikove veze	8	8	8	6	6	6
Broj rotirajućih veza	11	11	11	8	8	8
TPSA (Å²)	121,17	121,17	121,17	101,89	101,89	101,89
Lipinskijeva pravila	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
Veberova pravila	2/3	2/3	2/3	3/3	3/3	3/3

Iz tablice je vidljivo da svi hibridni spojevi zadovoljavaju Lipinskijeva pravila, no acil-semikarbazidi **4a-c** ne zadovoljavaju Veberova pravila zbog prevelikog broja rotirajućih veza. Intramolekulskom ciklizacijom acil-semikarbazida u oksadiazole **5a-c** dolazi do ukrućivanja strukture, pa oksadiazolski derivati zadovoljavaju sva Veberova pravila te im se predviđa dobra oralna bioraspoloživost.

Aplikacija SwissADME omogućava jednostavan pregled 6 fizikalno-kemijskih parametara koje molekule trebaju zadovoljiti ukoliko su dobri kandidati za nove lijekove, a grafički prikaz navedenih parametara naziva se *Bioavailability radar*. Navedeni prikaz smješta svaki fizikalno-kemijski parametar u jedan vrh šesterokuta, a ružičastom bojom unutar šesterokuta označen je optimalan raspon svakog parametra. Fizikalno-kemijski parametri su lipofilnost, veličina, polarnost, netopljivost, nezasićenost i fleksibilnost molekule, a molekula mora imati optimalne vrijednosti svih parametara kako bi postala kandidatom za novi lijek. Lipofilnost (LIPO) izražena je vrijednošću $\log P$ te treba iznositi od -0,7 do 5. Veličina molekule (SIZE) promatrana je preko molekulske mase, a optimalne vrijednosti iznose od 150 do 500 g/mol. Polarnost molekule (POLAR) određena je iznosom topološke ploštine zone polarne površine (TPSA) između 20 i 130 Å². Netopljivost molekule (INSOLU) određena je vrijednošću negativnog logaritma molarne topljivosti ne većom od 6. Nezasićenost (INSATU) promatrana je udjelom ugljikovih atoma u sp³ hibridizaciji u odnosu na ukupan broj ugljikovih atoma u molekuli, a optimalna vrijednost ne smije biti manja od 0,25. Zadnji parametar, fleksibilnost (FLEX) promatra se brojem rotirajućih veza u molekuli, a njih ne smije biti više od 9 [64]. Grafički prikazi *Bioavailability radar* hibridnih spojeva antranilne kiseline i kinolina sintetiziranih u okviru ovog rada prikazani su na Slici 8.





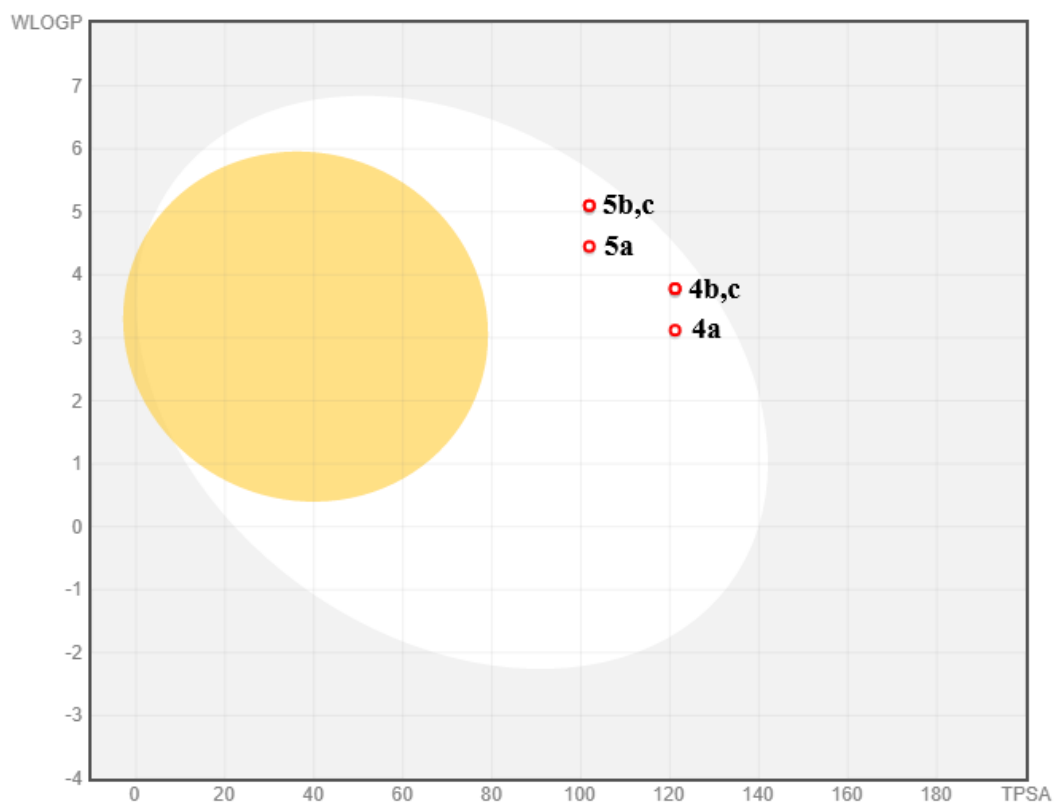
Slika 8. Grafički prikazi *Bioavailability radar* novosintetiziranih spojeva **4a-c** i **5a-c** (preuzeto s [67])

Iz prikazanih grafičkih prikaza vidljivo je da acil-semikarbazidi **4a-c** ne zadovoljavaju optimalne vrijednosti dvaju parametara- nezasićenost i fleksibilnost, dok oksadiazoli **5a-c** ne zadovoljavaju parametar nezasićenosti. Bez obzira na navedeno, novosintetizirani spojevi ne odstupaju mnogo od optimalnih vrijednosti, pa bi mogli biti dobri kandidati za nove lijekove.

Budući da je peroralni način primjene lijeka najjednostavniji za pacijenta, važno je predvidjeti i odrediti opseg apsorpcije molekule iz gastrointestinalnog trakta te raspodjelu u tjelesnim tekućinama i tkivima. Na temelju lipofilnosti ($\log P$) i polarosti molekule (TPSA), grafički prikaz BOILED-Egg omogućava uvid u farmakokinetičke parametre poput opsega

gastrointestinalne apsorpcije i penetracije krvno-moždane barijere malih molekula [68]. Usto, moguće je predvidjeti ukoliko će molekula biti supstrat P-glikoproteina. P-glikoproteini su membranski transportni proteini visoko eksprimirani u tankom crijevu, krvno-moždanoj barijeri, jetri i bubrezima. Imaju brojne uloge, poput modulacije apsorpcije lijekova, intestinalne i renalne sekrecije te modulacije prolaska lijekova u središnji živčani sustav. Supstrati P-glikoproteina su amfipatske hidrofobne supstancije te stoga oni mogu prenositi veliki broj lijekova, a protive se unutarstaničnom nakupljanju supstrata izbacivanjem molekula iz stanice u lumen crijeva ili u krvotok. To može biti problematično kod bakterijskih infekcija gdje je potrebno brzo nakupljanje lijeka na mjestu infekcije, zbog bolje i brže apsorpcije te ciljanog djelovanja lijeka. Stoga se često infekcije uzrokovane MDR sojevima bakterija povezuju sa prekomjernom ekspresijom P-glikoproteina [69], pa nije poželjno da novi antibakterijski lijekovi budu supstrati P-glikoproteina. U grafičkom prikazu, molekule označene plavom točkom će biti supstrati P-glikoproteina, dok one označene crvenom točkom neće. Peroralno primijenjeni lijek mora imati dobru apsorpciju, pa se za molekule smještene unutar bijelog područja u grafičkom prikazu predviđa pasivna apsorpcija iz gastrointestinalnog trakta. U žutom području grafičkog prikaza smještene su molekule za koje se predviđa penetracija kroz krvno-moždanu barijeru [68]. Penetracija krvno-moždane barijere je neophodna kod lijekova koji djeluju u središnjem živčanom sustavu, dok kod ostalih lijekova nije potrebna te može dovesti do neželjenih učinaka.

Grafički prikaz BOILED-Egg novosintetiziranih acil-semikarbazidnih **4a-c** i oksadiazolskih **5a-c** derivata prikazan je na Slici 9. Iz prikaza je vidljivo da se svim spojevima predviđa pasivna apsorpcija iz gastrointestinalnog trakta te nemogućnost penetracije krvno-moždane barijere. Također, spojevi nisu supstrati P-glikoproteina, što je poželjno u liječenju bakterijskih infekcija, posebice onih uzrokovanih MDR sojevima.



Slika 9. Grafički prikaz BOILED-Egg novosintetiziranih spojeva **4a-c** i **5a-c** (preuzeto s [67])

5. ZAKLJUČCI

U okviru ovog rada sintetizirani i karakterizirani su hibridni derivati antranilne kiseline i 4-amino-7-klorokinolina, acil-semikarbazidi **4a-c** te oksadiazoli **5a-c**:

- 2-(2-aminobenzoil)-*N*-(4-((7-klorokinolin-4-il)amino)butil)hidrazin-1-karboksamid (**4a**)
- 2-(2-amino-6-klorobenzoil)-*N*-(4-((7-klorokinolin-4-il)amino)butil)hidrazin-1-karboksamid (**4b**)
- 2-(2-amino-4-klorobenzoil)-*N*-(4-((7-klorokinolin-4-il)amino)butil)hidrazin-1-karboksamid (**4c**)
- *N*¹-(5-(2-aminofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)-*N*⁴-(6-kloronaftalen-1-il)butan-1,4-diamin (**5a**)
- *N*¹-(5-(2-amino-6-klorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)-*N*⁴-(6-kloronaftalen-1-il)butan-1,4-diamin (**5b**)
- *N*¹-(5-(2-amino-4-klorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)-*N*⁴-(6-kloronaftalen-1-il)butan-1,4-diamin (**5c**)

Sintetizirani su i prekursori korišteni u sintezi hibridnih spojeva, *N*¹-(7-klorokinolin-4-il)butan-1,4-diamin **1**, hidrazidi derivata antranilne kiseline **2a-c** te oksadiazoloni derivata antranilne kiseline **3a-c**.

Svi dobiveni spojevi su novi, neopisani u literaturi. Strukture hibridnih spojeva potvrđene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama- ¹H i ¹³C NMR, MS te određivanjem tališta.

U daljnjim istraživanjima, koja nadilaze okvire ovog rada, sintetiziranim spojevima ispitat će se njihov potencijal u suzbijanju bakterijskog biofilma.

6. ZAHVALE

Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku kemiju na vrlo ugodnom društvu, strpljenju i pomoći u laboratoriju, a posebice mentorici doc.dr.sc. Ivani Perković na stručnom vodstvu, savjetima i podršci prilikom izrade i pisanja ovog rada.

Hvala i dr.sc. Maji Beus na savjetima, podršci i društvu u laboratoriju.

Posebna zahvala mojoj obitelji, bratu Davoru i prijateljima na najvećoj podršci, strpljenju i motivaciji.

7. POPIS LITERATURE

- [1] E. Medina, D.H. Pieper. Tackling Threats and Future Problems of Multidrug-Resistant Bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* **2016.**, 398, 3–33.
- [2] M. Frieri, K. Kumar, A. Boutin. Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health* **2017.**, 10, 369–378.
- [3] A. Lamut, L.P. Mašič, D. Kikelj, T. Tomašič. Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. *Medicinal Research Reviews* **2019.**, 39, 2460–2504.
- [4] WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, <https://www.who.int/> (pristupljeno 3.3.2021.)
- [5] Z. Breijyeh, B. Jubeh, R. Karaman. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules* **2020.**, 25, 1340.
- [6] J. Vila, J. Moreno-Morales, C. Ballesté-Delpierre. Current landscape in the discovery of novel antibacterial agents. *Clin Microbiol Infect* **2020.**, 26, 596–603.
- [7] G. Patrick. An Introduction to Medicinal Chemistry, Sixth Edition. Oxford University Press, **2017.**, str. 197.
- [8] E. Tacconelli, E. Carrara, A. Savoldi, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* **2018.**, 18, 318–327.
- [9] M.T.T. Thi, D. Wibowo, B.H.A. Rehm. Pseudomonas aeruginosa Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences* **2020.**, 21, 8671.
- [10] M.J. Gale, M.S. Maritato, Y.-L. Chen, S.S. Abdulateef, J.E. Ruiz. Pseudomonas aeruginosa causing inflammatory mass of the nasopharynx in an immunocompromised HIV infected patient: A mimic of malignancy. *IDCases* **2015.**, 2, 40–43.
- [11] Z. Pang, R. Raudonis, B.R. Glick, T.-J. Lin, Z. Cheng. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances* **2019.**, 37, 177–192.
- [12] M.V. Turkina, E. Vikström. Bacteria-Host Crosstalk: Sensing of the Quorum in the Context of Pseudomonas aeruginosa Infections. *JIN* **2019.**, 11, 263–279.
- [13] J.N. Pendleton, S.P. Gorman, B.F. Gilmore. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **2013.**, 11, 297–308.

- [14] F. Soukarieh, P. Williams, M.J. Stocks, M. Cámara. Pseudomonas aeruginosa Quorum Sensing Systems as Drug Discovery Targets: Current Position and Future Perspectives. *J Med Chem* **2018.**, 61, 10385–10402.
- [15] E.B.M. Breidenstein, C. de la Fuente-Núñez, R.E.W. Hancock. Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* **2011.**, 19, 419–426.
- [16] M.F. Moradali, S. Ghods, B.H.A. Rehm. Pseudomonas aeruginosa Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017.**, 7, 39.
- [17] U. Römling, C. Balsalobre. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med* **2012.**, 272, 541–561.
- [18] E. Pericolini, B. Colombari, G. Ferretti, et al. Real-time monitoring of Pseudomonas aeruginosa biofilm formation on endotracheal tubes in vitro. *BMC Microbiology* **2018.**, 18, 84.
- [19] M.E. Zegans, H.I. Becker, J. Budzik, G. O’Toole. The role of bacterial biofilms in ocular infections. *DNA Cell Biol* **2002.**, 21, 415–420.
- [20] S.-K. Kim, J.-H. Lee. Biofilm dispersion in Pseudomonas aeruginosa. *J Microbiol* **2016.**, 54, 71–85.
- [21] A. Ghafoor, I.D. Hay, B.H.A. Rehm. Role of Exopolysaccharides in Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation and Architecture. *Applied and Environmental Microbiology* **2011.**, 77.
- [22] L. Turnbull, M. Toyofuku, A.L. Hynen, et al. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nat Commun* **2016.**, 7, 11220.
- [23] M. Wilton, L. Charron-Mazenod, R. Moore, S. Lewenza. Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2015.**, 60.
- [24] J.I.F. Bass, D.M. Russo, M.L. Gabelloni, et al. Extracellular DNA: A Major Proinflammatory Component of Pseudomonas aeruginosa Biofilms. *The Journal of Immunology* **2010.**, 184, 6386–6395.
- [25] Scott Chimileski: microbephotography.com (pristupljeno 21.3.2021.)
- [26] Y. Luo, Q. Yang, D. Zhang, and W. Yan. Mechanisms and Control Strategies of Antibiotic Resistance in Pathological Biofilms. **2021.**, 31, 1–7.

- [27] B.R. Boles, M. Thoendel, P.K. Singh. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol Microbiol* **2005.**, 57, 1210–1223.
- [28] J.A.J. Haagensen, M. Klausen, R.K. Ernst, et al. Differentiation and distribution of colistin- and sodium dodecyl sulfate-tolerant cells in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* **2007.**, 189, 28–37.
- [29] S. Skariyachan, V.S. Sridhar, S. Packirisamy, S.T. Kumargowda, S.B. Challapilli. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiol (Praha)* **2018.**, 63, 413–432.
- [30] S. Garcia-Reyes, G. Soberón-Chávez, M. Cocotl-Yanez. The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. *Microbiology Society*. **2020.**, 69.
- [31] J.-F. Dubern, S.P. Diggle. Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol Biosyst* **2008.**, 4, 882–888.
- [32] L. Ye, P. Cornelis, K. Guillemin, S. Ballet, O. Hammerich. Structure revision of N-mercapto-4-formylcarbostyryl produced by *Pseudomonas fluorescens* G308 to 2-(2-hydroxyphenyl)thiazole-4-carbaldehyde [aeruginaldehyde]. *Nat Prod Commun* **2014.**, 9, 789–794.
- [33] C. Schütz, M. Empting. Targeting the *Pseudomonas* quinolone signal quorum sensing system for the discovery of novel anti-infective pathoblockers. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018.**, 14, 2627–2645.
- [34] J. Lin, J. Cheng, Y. Wang, X. Shen. The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS): Not Just for Quorum Sensing Anymore. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018.**, 8.
- [35] J.W. Schertzer, S.A. Brown, M. Whiteley. Oxygen levels rapidly modulate *Pseudomonas aeruginosa* social behaviours via substrate limitation of PqsH. *Molecular Microbiology* **2010.**, 77, 1527–1538.
- [36] F. Witzgall, W. Ewert, W. Blankenfeldt. Structures of the N-Terminal Domain of PqsA in Complex with Anthraniloyl- and 6-Fluoroanthraniloyl-AMP: Substrate Activation in *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) Biosynthesis. *Chembiochem* **2017.**, 18, 2045–2055.
- [37] Q. Jiang, J. Chen, C. Yang, Y. Yin, K. Yao. Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases. *BioMed Research International* **2019.**
- [38] G. Brackman, T. Coenye. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Curr Pharm Des* **2015.**, 21, 5–11.

- [39] B. Zorc. Bakterijski biofilmovi- stanična komunikacija. *Farmaceutski glasnik* **2019.**, 75 (5).
- [40] M. Beus, K. Savijoki, J.Z. Patel, et al. Chloroquine fumardiamides as novel quorum sensing inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2020.**, 30, 127336.
- [41] E. Skindersoe, M. Alhede, R. Phipps, et al. Effects of Antibiotics on Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **2008.**, 52, 3648–3663.
- [42] C. van Delden, T. Köhler, F. Brunner-Ferber, et al. Azithromycin to prevent *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia by inhibition of quorum sensing: a randomized controlled trial. *Intensive Care Med* **2012.**, 38, 1118–1125.
- [43] PubChem, Anthranilic acid. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (pristupljeno 21.3.2021.)
- [44] Anthranilic acid. *Wikipedia*; **2021.**
- [45] J.-F. Sun, Y.-J. Xu, X.-H. Kong, Y. Su, Z.-Y. Wang. Fenamates inhibit human sodium channel Nav1.7 and Nav1.8. *Neurosci Lett* **2019.**, 696, 67–73.
- [46] X.-H. Li, S.-K. Kim, J.-H. Lee. Anti-biofilm effects of anthranilate on a broad range of bacteria. *Sci Rep* **2017.**, 7.
- [47] S.-K. Kim, H.-Y. Park, J.-H. Lee. Anthranilate Deteriorates the Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms and Antagonizes the Biofilm-Enhancing Indole Effect. *Appl Environ Microbiol* **2015.**, 81, 2328–2338.
- [48] T. Sasaki, S. Mizoguchi, K. Honda. Growth inhibitory effects of anthranilic acid and its derivatives against *Legionella pneumophila*. *J Biosci Bioeng* **2012.**, 113, 726–729.
- [49] Y.J. Seong, M. Alhashimi, A. Mayhoub, H. Mohammad, M.N. Seleem. Repurposing Fenamic Acid Drugs to Combat Multidrug-Resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2020.**, 64.
- [50] M.W. Calfee, J.P. Coleman, E.C. Pesci. Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001.**, 98.
- [51] B. Lesic, F. Lépine, E. Déziel, et al. Inhibitors of Pathogen Intercellular Signals as Selective Anti-Infective Compounds. *PLOS Pathogens* **2007.**, 3, e126.
- [52] PubChem, Quinoline. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (pristupljeno 1.4.2021).

- [53] K. Pavić. Sinteza, karakterizacija i biološko djelovanje semikarbazida, urea i ureidoamida primakina. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zavod za farmaceutsku kemiju, **2017**.
- [54] B. Zorc, I. Perković, K. Pavić, Z. Rajić, M. Beus. Primaquine derivatives: Modifications of the terminal amino group. *Eur J Med Chem* **2019.**, 182, 111640.
- [55] A. Sobke, M. Klinger, B. Hermann, et al. The Urinary Antibiotic 5-Nitro-8-Hydroxyquinoline (Nitroxoline) Reduces the Formation and Induces the Dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by Chelation of Iron and Zinc. *Antimicrob Agents Chemother* **2012.**, 56, 6021–6025.
- [56] I. Aleksić, S. Šegan, F. Andrić, et al. Long-Chain 4-Aminoquinolines as Quorum Sensing Inhibitors in *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem Biol* **2017.**, 12, 1425–1434.
- [57] Y. Li, C. Zhao, J. Zhang, et al. HybridMolDB: A Manually Curated Database Dedicated to Hybrid Molecules for Chemical Biology and Drug Discovery. *J Chem Inf Model* **2019.**, 59, 4063–4069.
- [58] K. Pavić, Z. Rajić, Z. Mlinarić, et al. Chloroquine urea derivatives: synthesis and antitumor activity in vitro. *Acta Pharmaceutica* **2018.**, 68, 471–483.
- [59] S.H. Pine. Organska kemija. Školska knjiga, Zagreb, **1994.**, str. 377.
- [60] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers. Organic Chemistry. Oxford University Press, **2000.**, str. 1166.
- [61] R. Appel. Tertiary Phosphane/Tetrachloromethane, a Versatile Reagent for Chlorination, Dehydration, and P-N Linkage. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1975.**, 14, 801–811.
- [62] Appel reaction. *Wikipedia*; **2021**.
- [63] H. Vorbrüggen, K. Krolkiewicz. A simple synthesis of Δ^2 -oxazines, Δ^2 -oxazines, Δ^2 -thiazolines and 2-substituted benzoxazoles. *Tetrahedron* **1993.**, 49, 9353–9372.
- [64] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* **2017.**, 7, 42717.
- [65] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **2001.**, 46, 3–26.

[66] D.F. Veber, S.R. Johnson, H.-Y. Cheng, et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* **2002.**, 45, 2615–2623.

[67] SwissADME. <http://www.swissadme.ch> (pristupljeno 3.6.2021.)

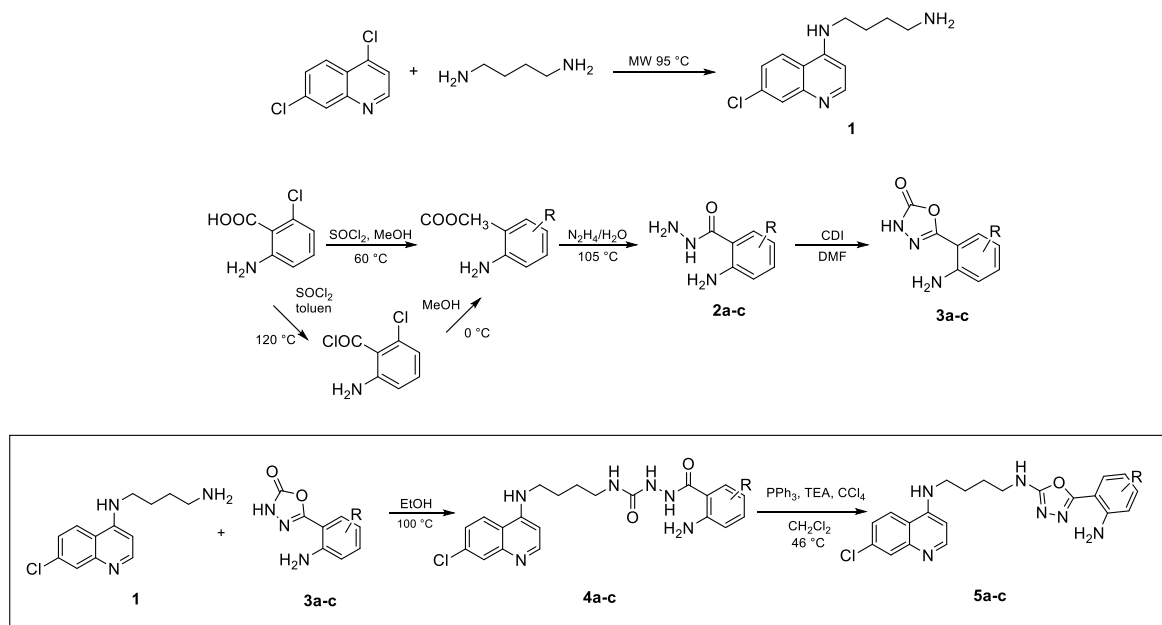
[68] A. Daina, V. Zoete. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem* **2016.**, 11, 1117–1121.

[69] Y. Li, H. Yuan, K. Yang, et al. The structure and functions of P-glycoprotein. *Curr Med Chem* **2010.**, 17, 786–800.

8. SAŽETAK

Sinteza i karakterizacija novih hibridnih derivata antranilne kiseline i kinolina kao potencijalnih agensa za suzbijanje bakterijskih biofilmova

Rastuća antibiotska rezistencija predstavlja globalni problem koji je nerijetko vezan uz porast morbiditeta i mortaliteta. Gram-negativne bakterije, poput roda *Pseudomonas*, razvile su rezistenciju na više klasa antibiotika zbog sposobnosti formiranja bakterijskog biofilma. Biofilm štiti bakterije od napada antibiotika te imunosnog odgovora domaćina, što vodi ka nastanku kroničnih infekcija opasnih po život, posebice u imunokompromitiranih pacijenata. Derivati antranilne kiseline i kinolina pokazali su inhibitorni učinak na formiranje bakterijskog biofilma, inhibicijom međustanične bakterijske komunikacije (*quorum sensinga*, QS). Povezivanjem derivata antranilne kiseline i 4-amino-7-klorokinolina u hibridne molekule, acil-semikarbazide **4a-c** i oksadiazole **5a-c** nastoji se postići učinkovitije i selektivnije djelovanje kako bi se lakše suzbile opasne infekcije posredovane bakterijskim biofilmovima. U ovom radu opisana je sinteza hibrida antranilne kiseline i 4-amino-7-klorokinolina (Shema). Strukture novosintetiziranih molekula potvrđene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (NMR, MS, talište). Naknadnim istraživanjima ispitat će se biološki učinak novosintetiziranih hibridnih derivata na formiranje bakterijskih biofilmova.



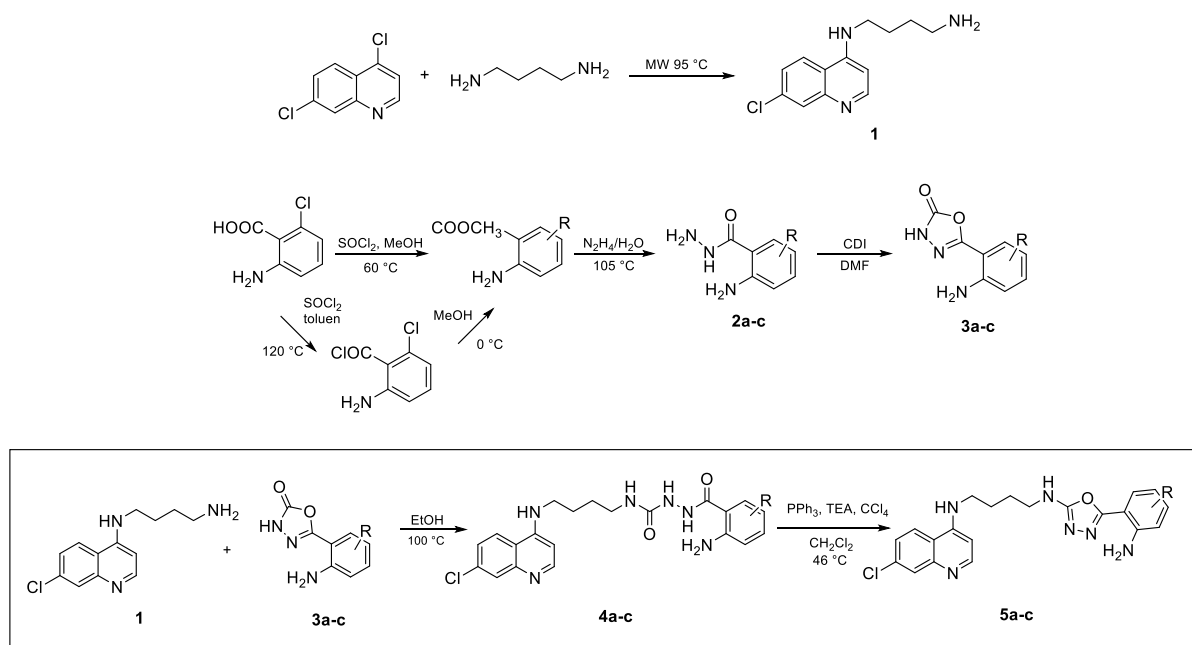
Shema. Sinteza hibridnih derivata antranilne kiseline i 4-amino-7-klorokinolina.

Ključne riječi: antranilna kiselina, kinolin, biofilm, sinteza, hibrid.

9. SUMMARY

Synthesis and characterization of hybrid molecules bearing anthranilic acid and quinoline derivatives as potential agents against bacterial biofilms

Antibiotic resistance is a growing global problem, often associated with increases in morbidity and mortality. Gram-negative bacteria, including genus *Pseudomonas*, have developed multi-drug antibiotic resistance by forming complex bacterial biofilms. Biofilm protects bacteria from antibiotic and immune system attacks which could lead to chronic life-threatening infections, especially in immunocompromised patients. Anthranilic acid derivatives and quinoline derivatives have shown inhibitory effects in formation of biofilm by suppressing bacterial communication (quorum sensing, QS). Synthesis of hybrid molecules containing anthranilic acid and 4-amino-7-chloroquinoline moieties, such as semi-carbazides **4a-c** and oxadiazoles **5a-c**, can lead to more effective and selective activity against dangerous bacterial infections caused by biofilms. In this work, synthesis of anthranilic acid and 4-amino-7-chloroquinoline hybrids (Scheme) was described. Structures of newly synthesised compounds were confirmed using standard analytical and spectroscopic methods (NMR, MS, melting point). Following studies will evaluate biological effects of synthesised hybrid derivatives on bacterial biofilms.

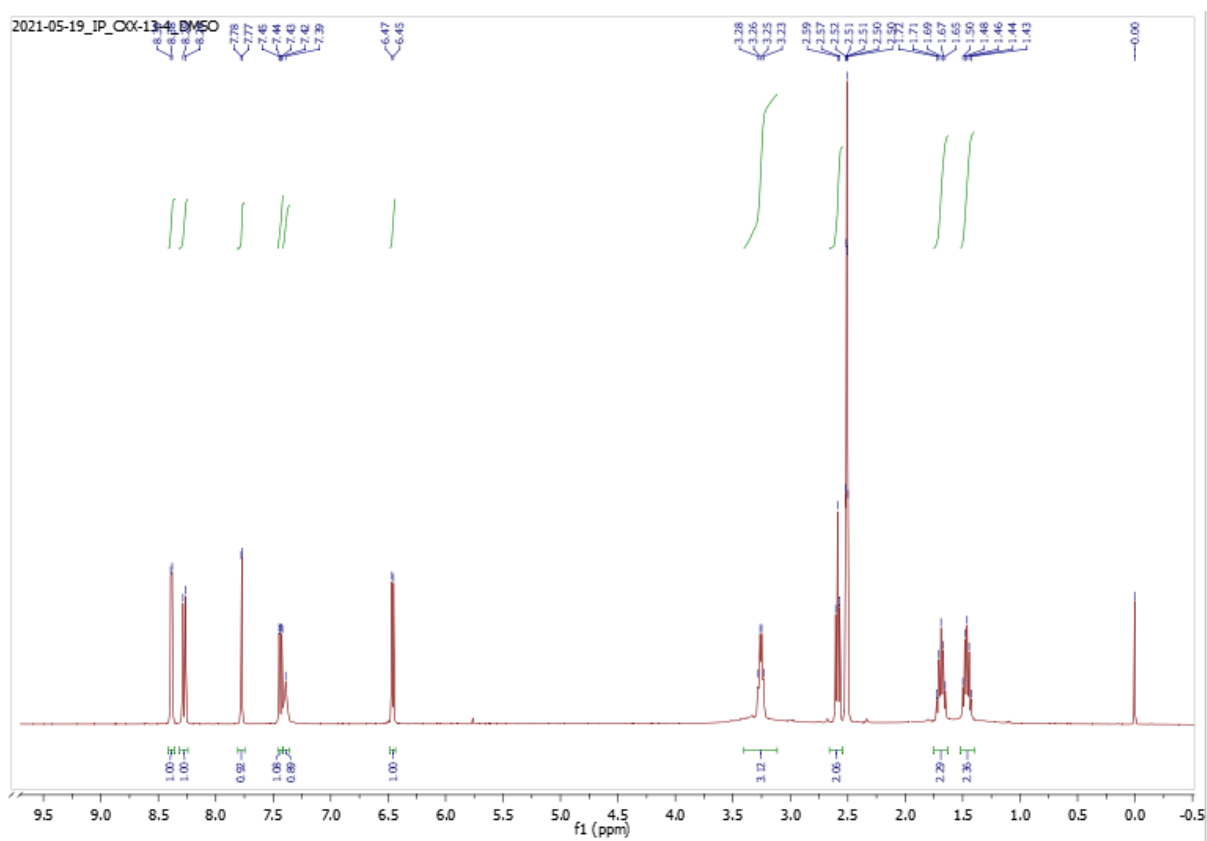
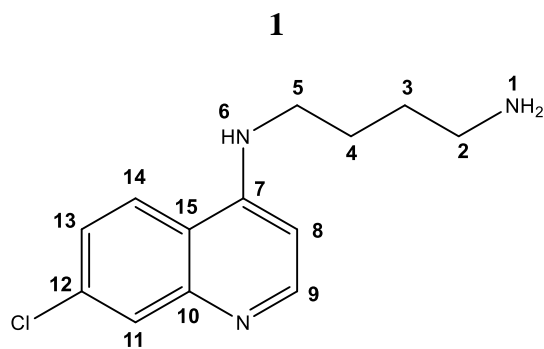


Scheme. Synthesis of anthranilic acid and 4-amino-7-chloroquinoline hybrid derivatives.

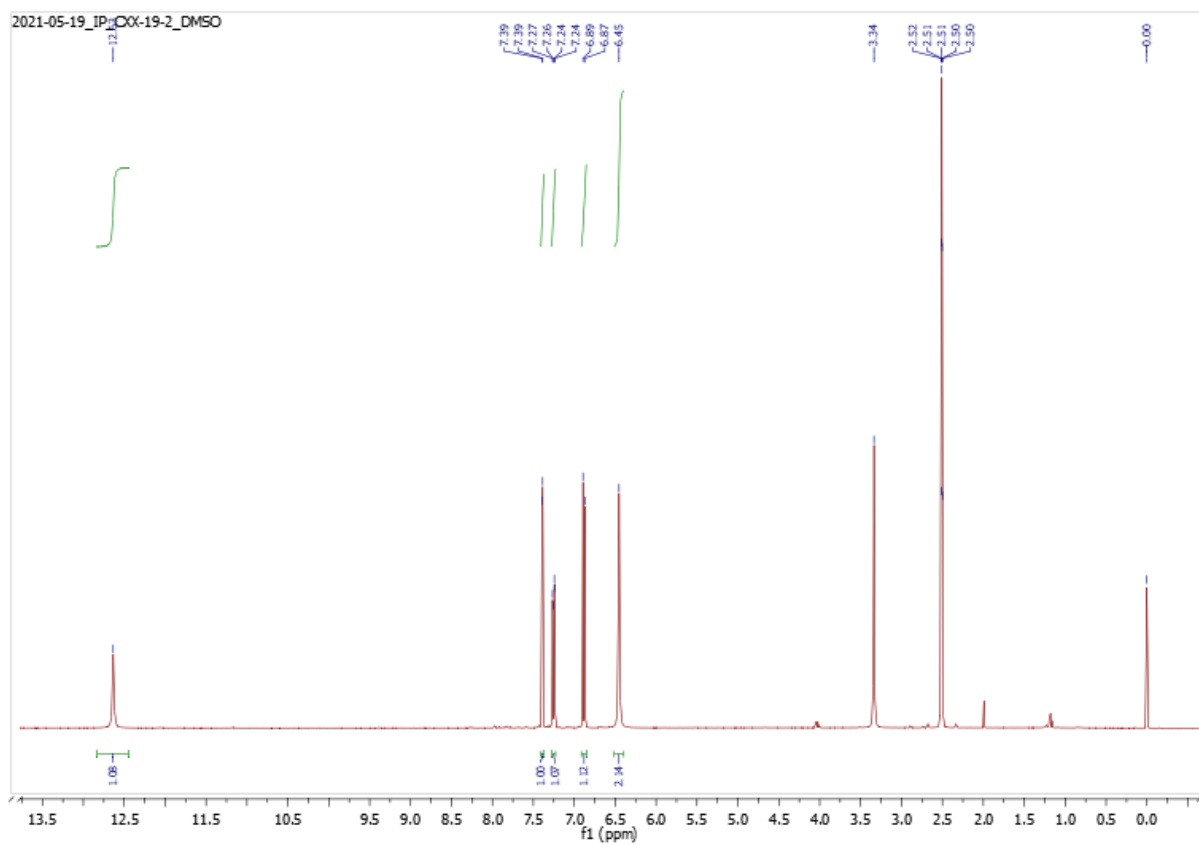
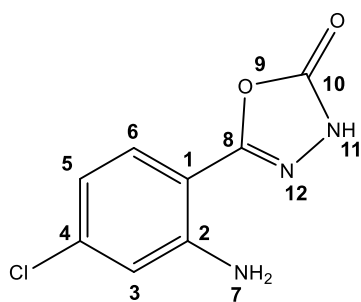
Keywords: anthranilic acid, quinoline, biofilm, synthesis, hybrid.

10. PRILOZI

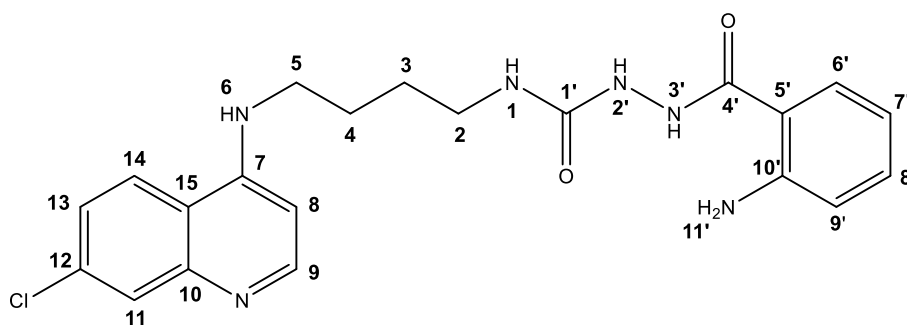
Prilozi sadrže ^1H i ^{13}C NMR i MS spektre spojeva sintetiziranih u okviru ovog rada.



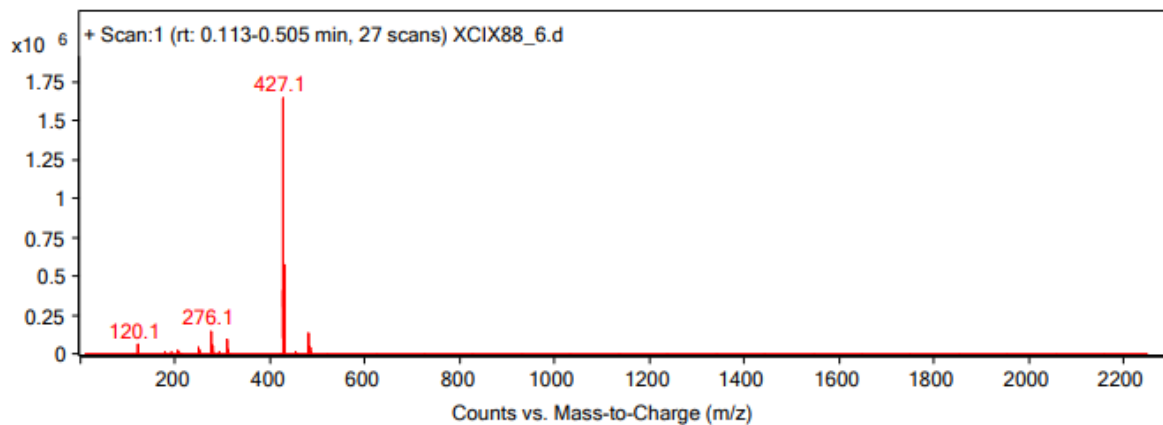
3c



4a

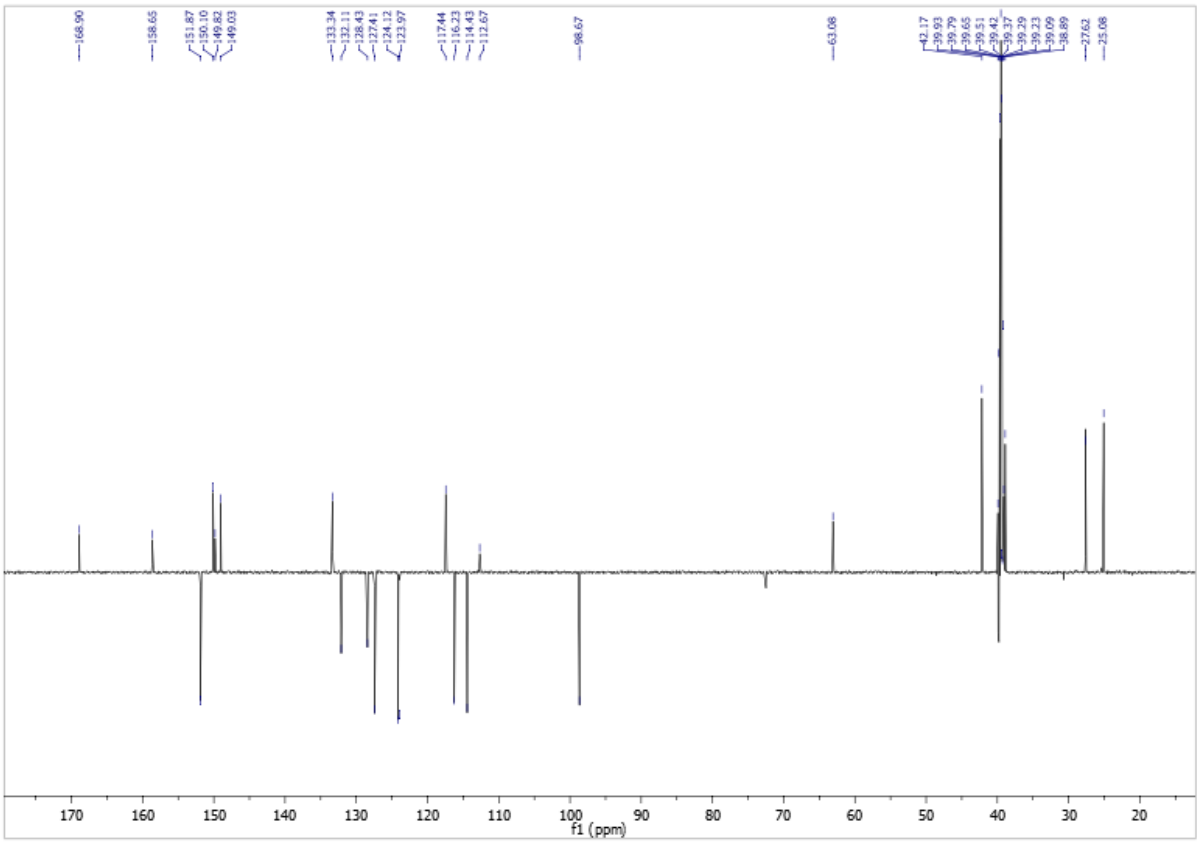
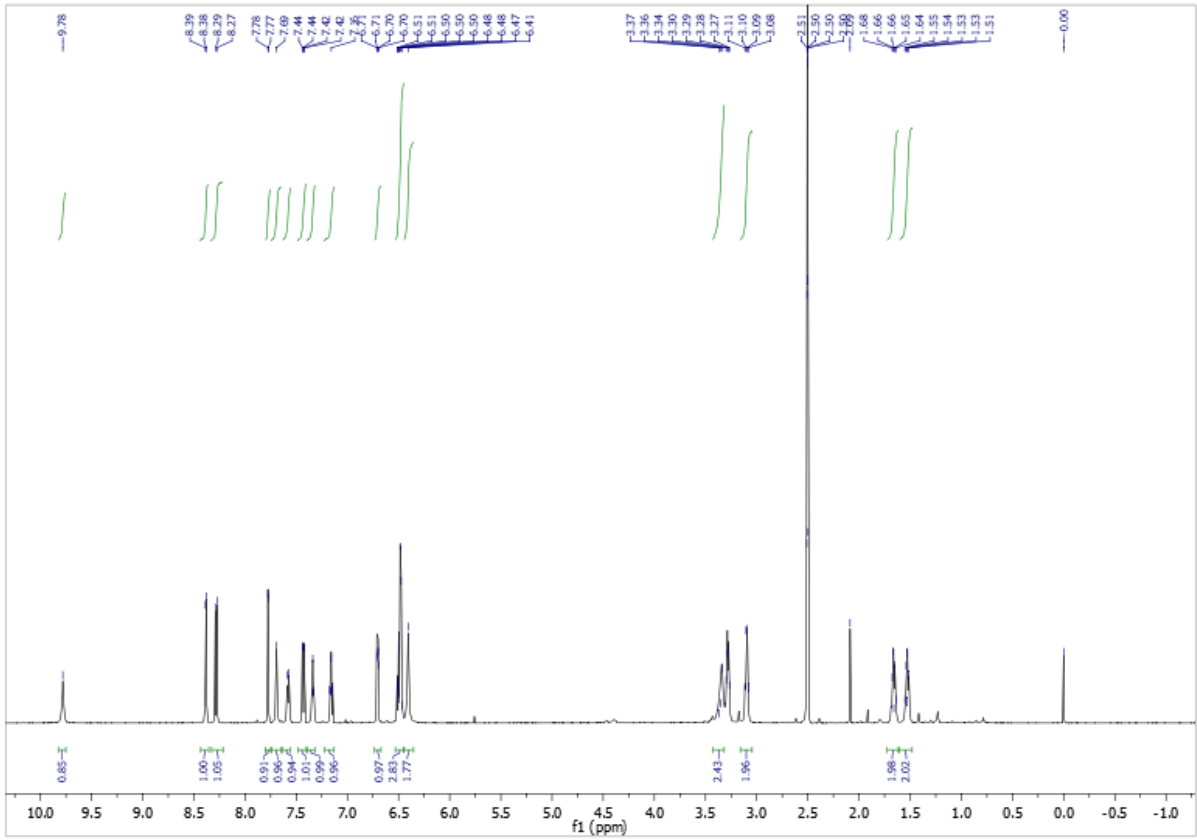


Spectrum Source	Fragmentor Voltage	Collision Energy	Ionization Mode
Peak (1) in "+/- TIC Scan"		0	ESI

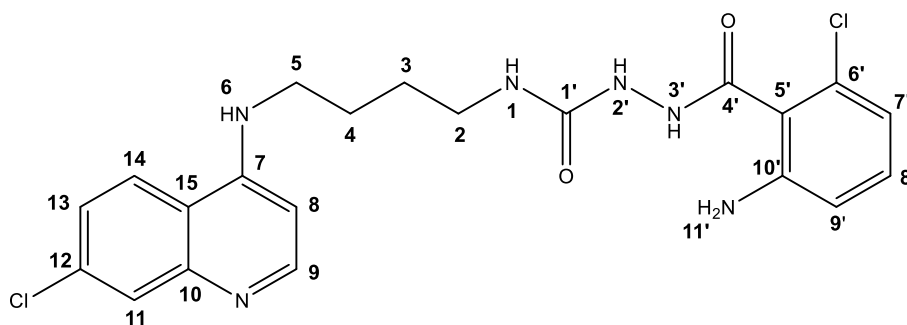


Peak List

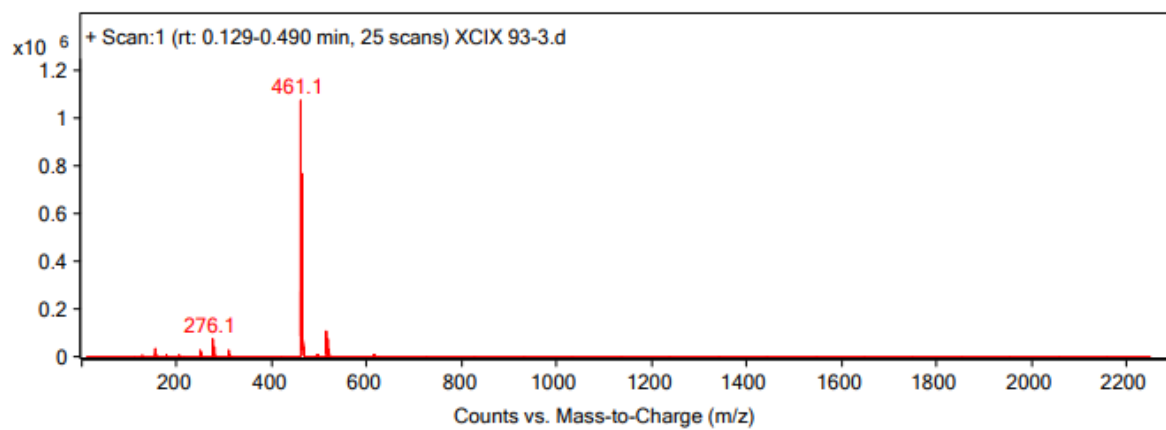
m/z	z	Abund
120.1		64236.62
276.1	1	138832.81
278.1	1	54241.45



4b

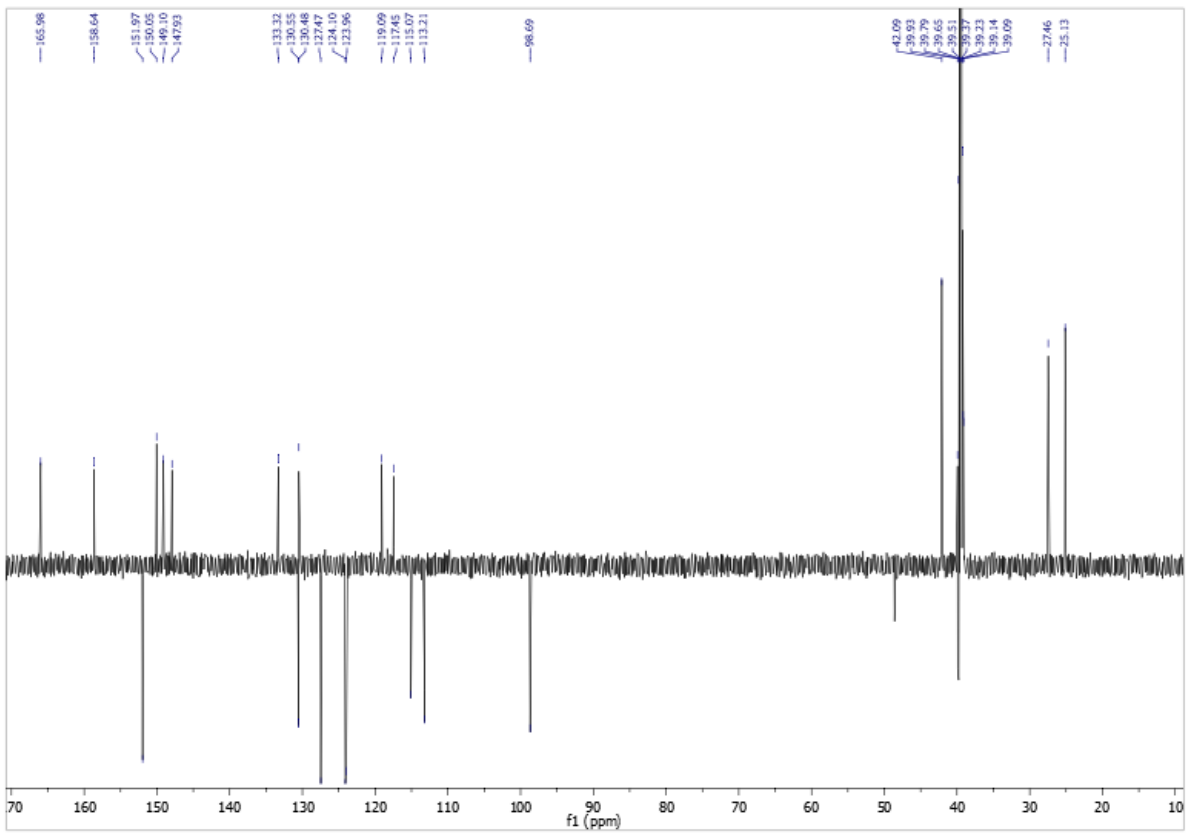
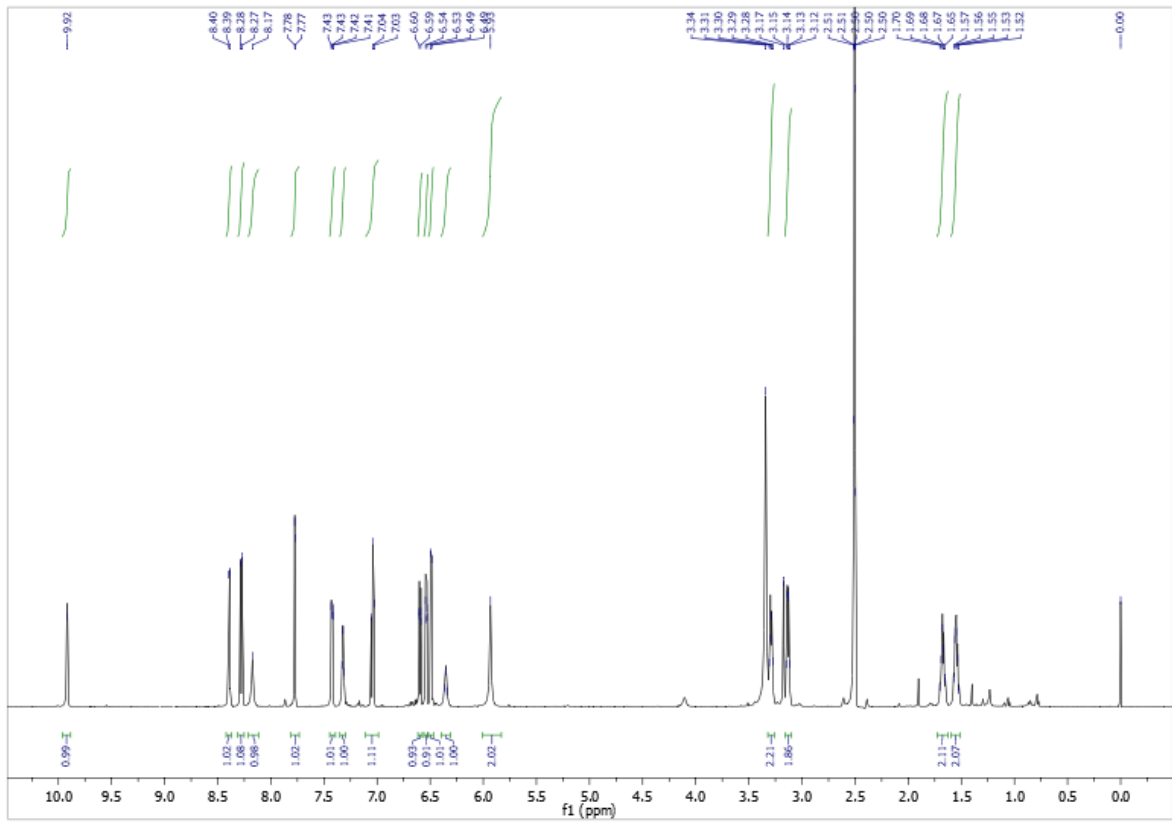


Spectrum Source	Fragmentor Voltage	Collision Energy	Ionization Mode
Peak (1) in "+/- TIC Scan"		0	ESI

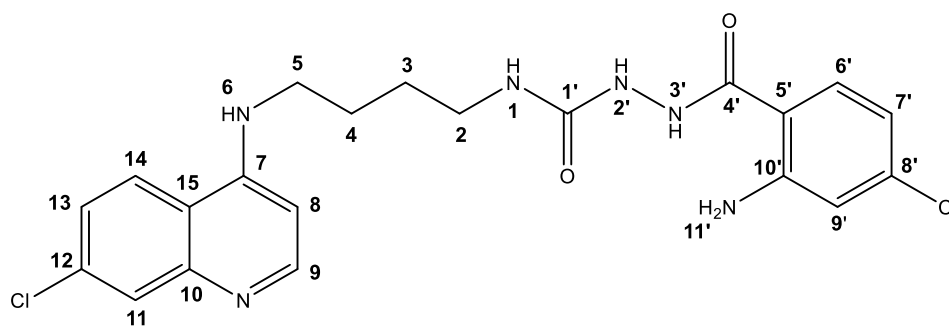


Peak List

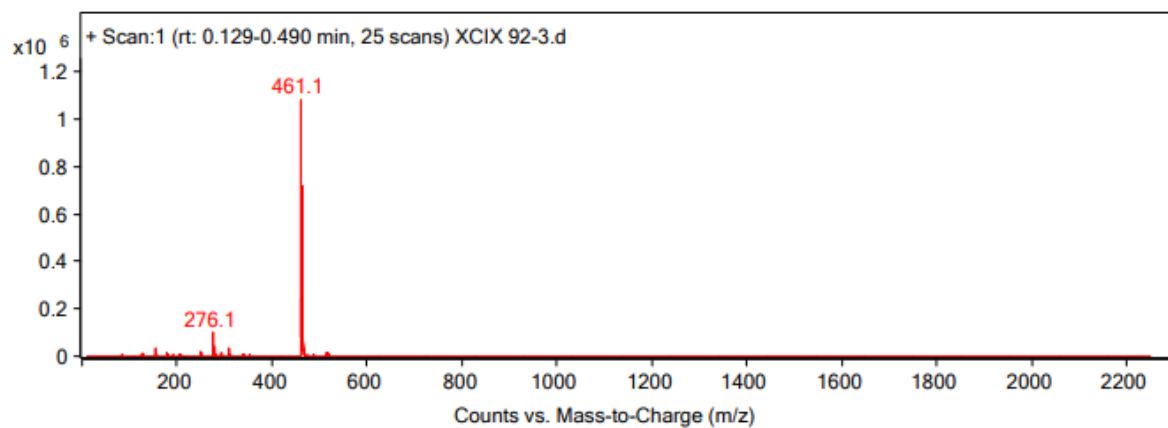
m/z	z	Abund
276.1	1	76785.66
278.1	1	43190.69
461.1	1	1076392.75



4c

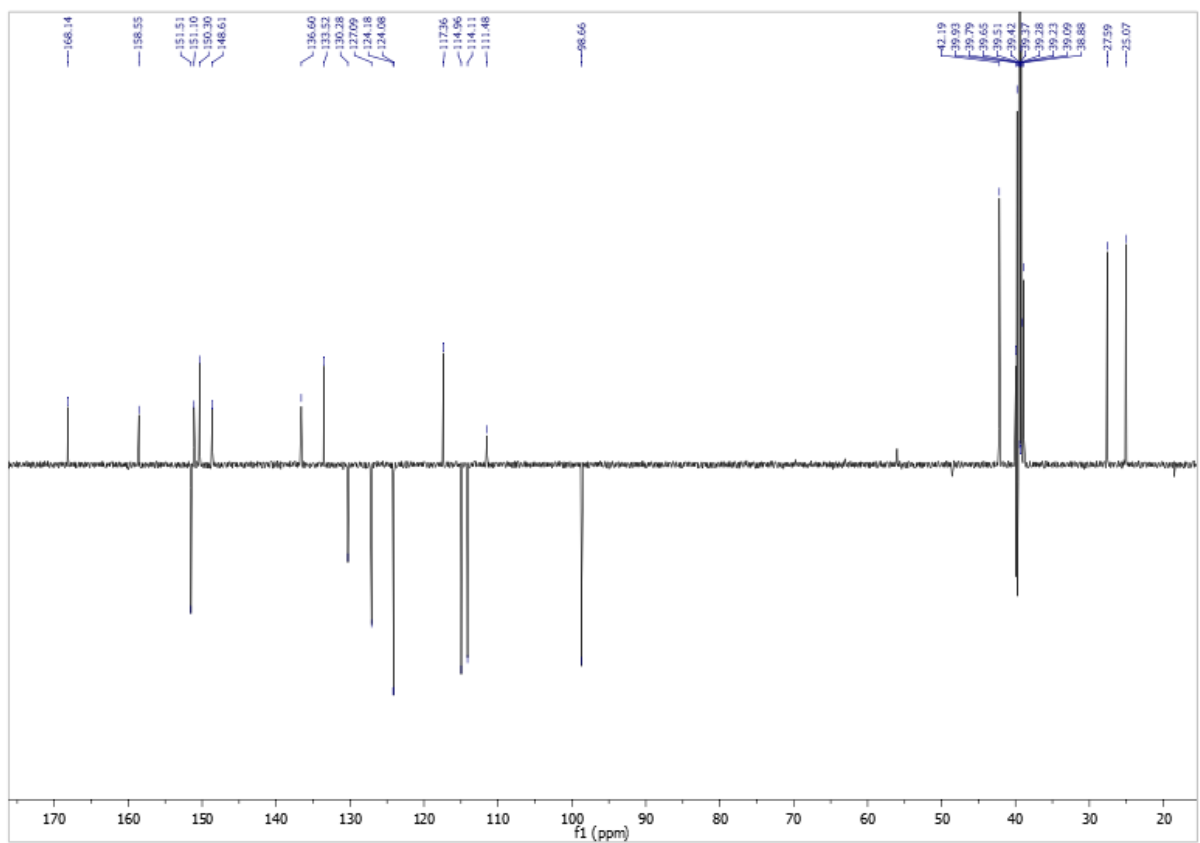
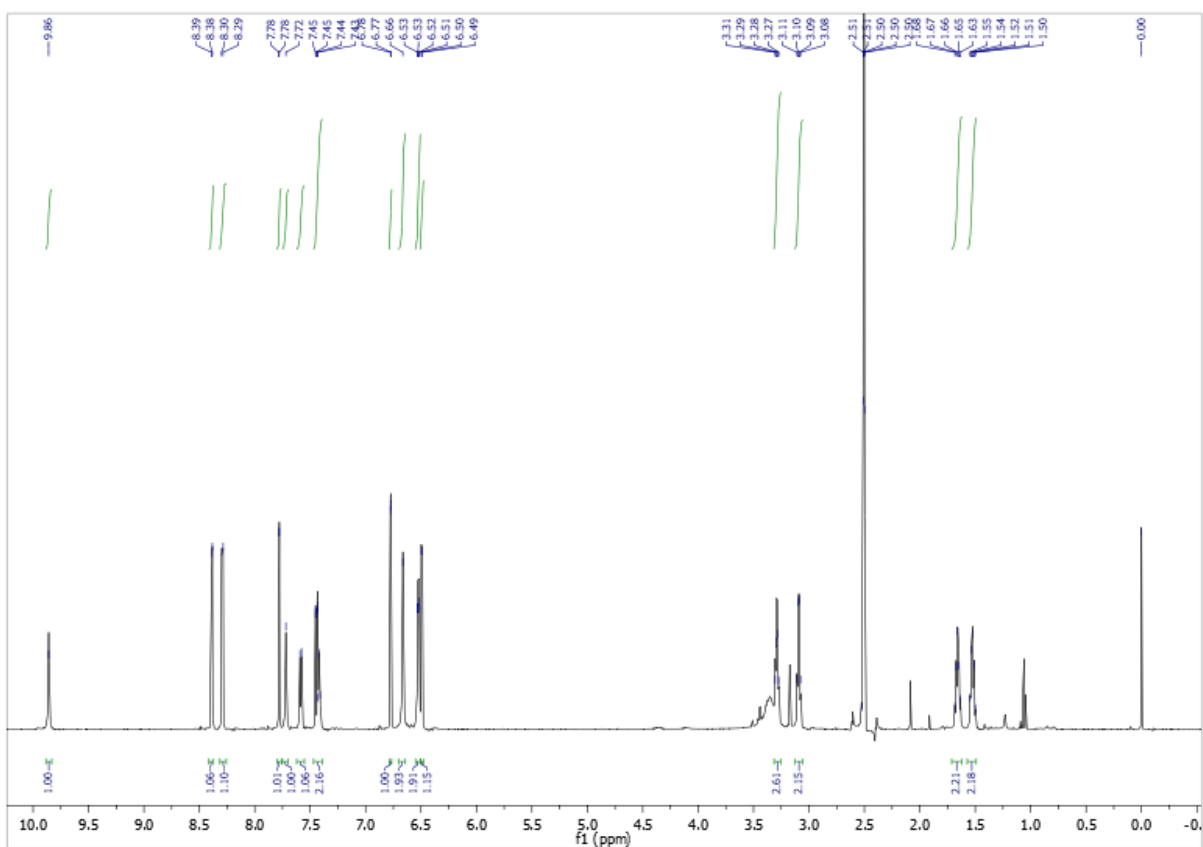


Spectrum Source	Fragmentor Voltage	Collision Energy	Ionization Mode
Peak (1) in "+/- TIC Scan"		0	ESI

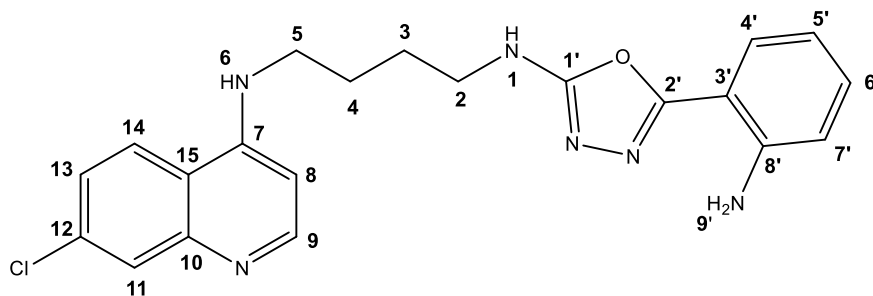


Peak List

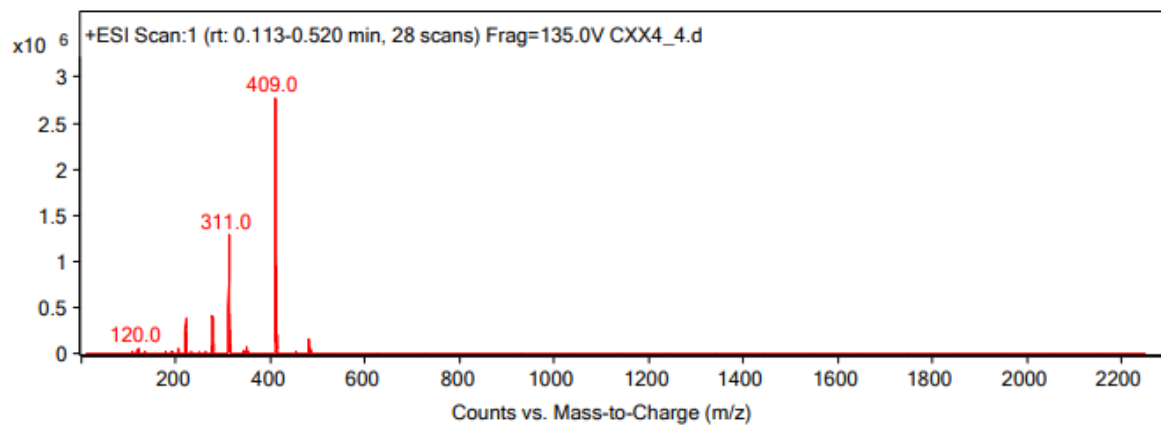
m/z	z	Abund
154		35555.68
276.1	1	103627.42
278.1	1	42853.39

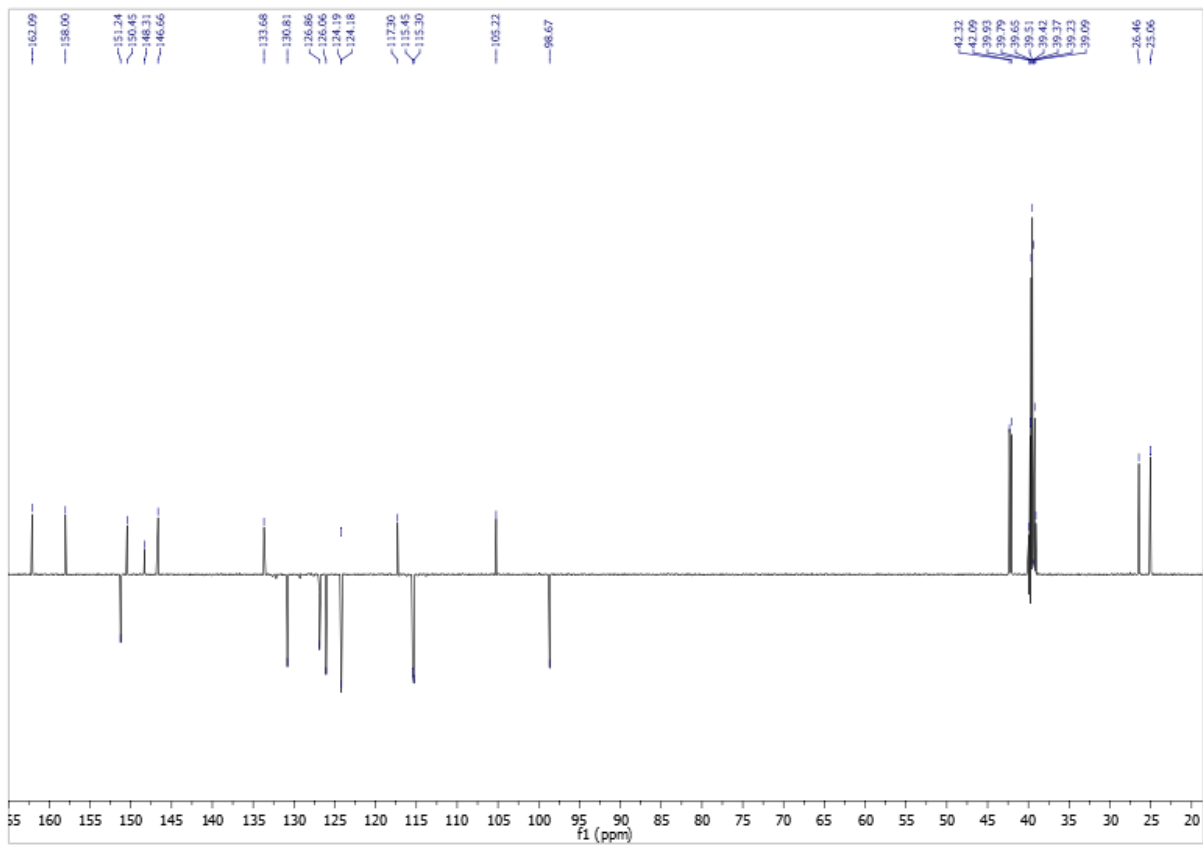
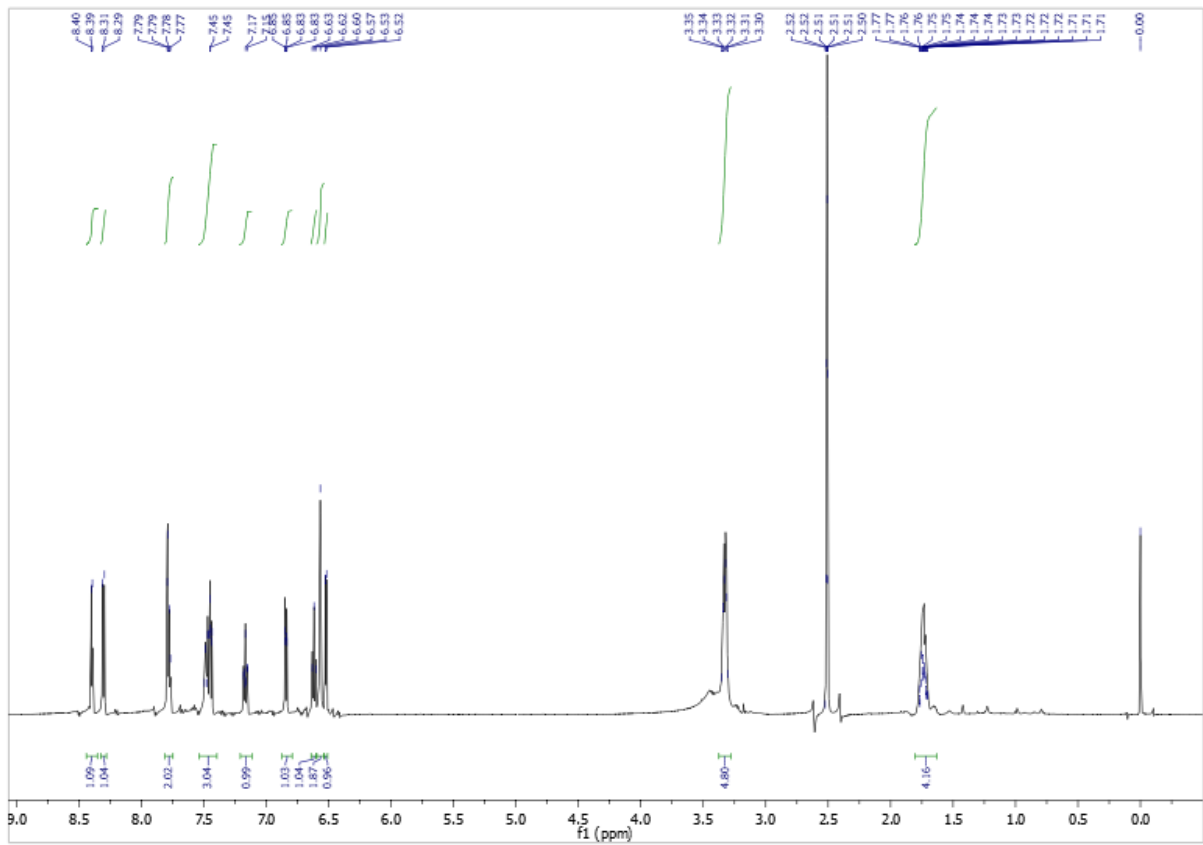


5a

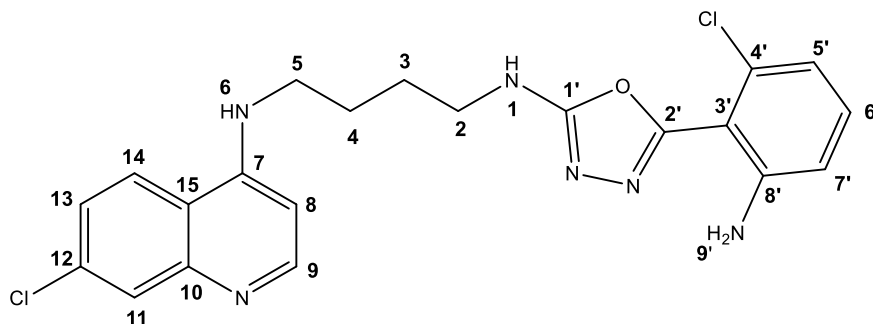


Spectrum Source	Fragmentor Voltage	Collision Energy	Ionization Mode
Peak (1) in "+/- TIC Scan"		0	ESI

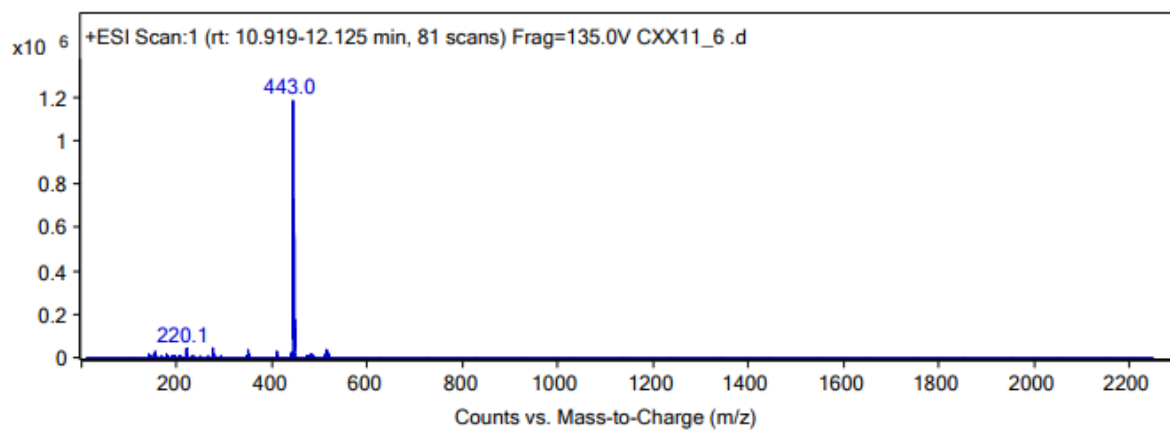




5b

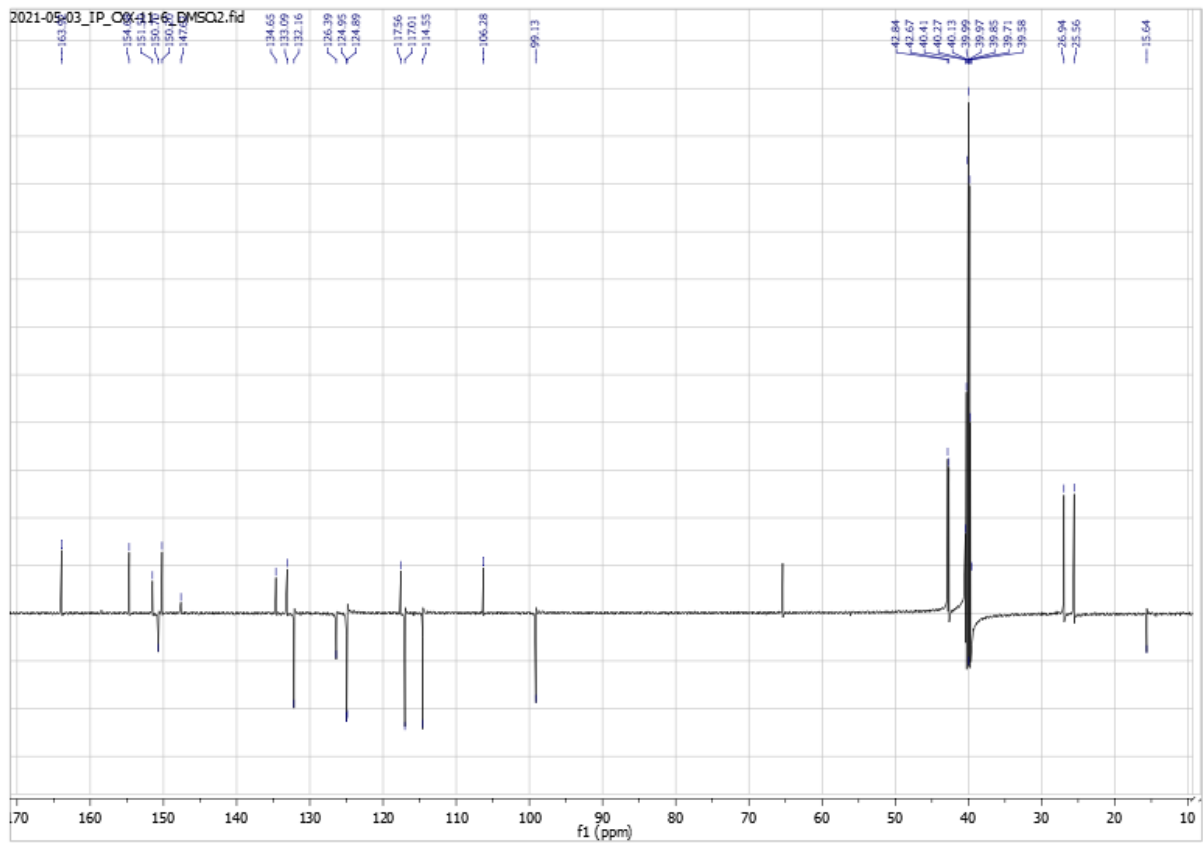
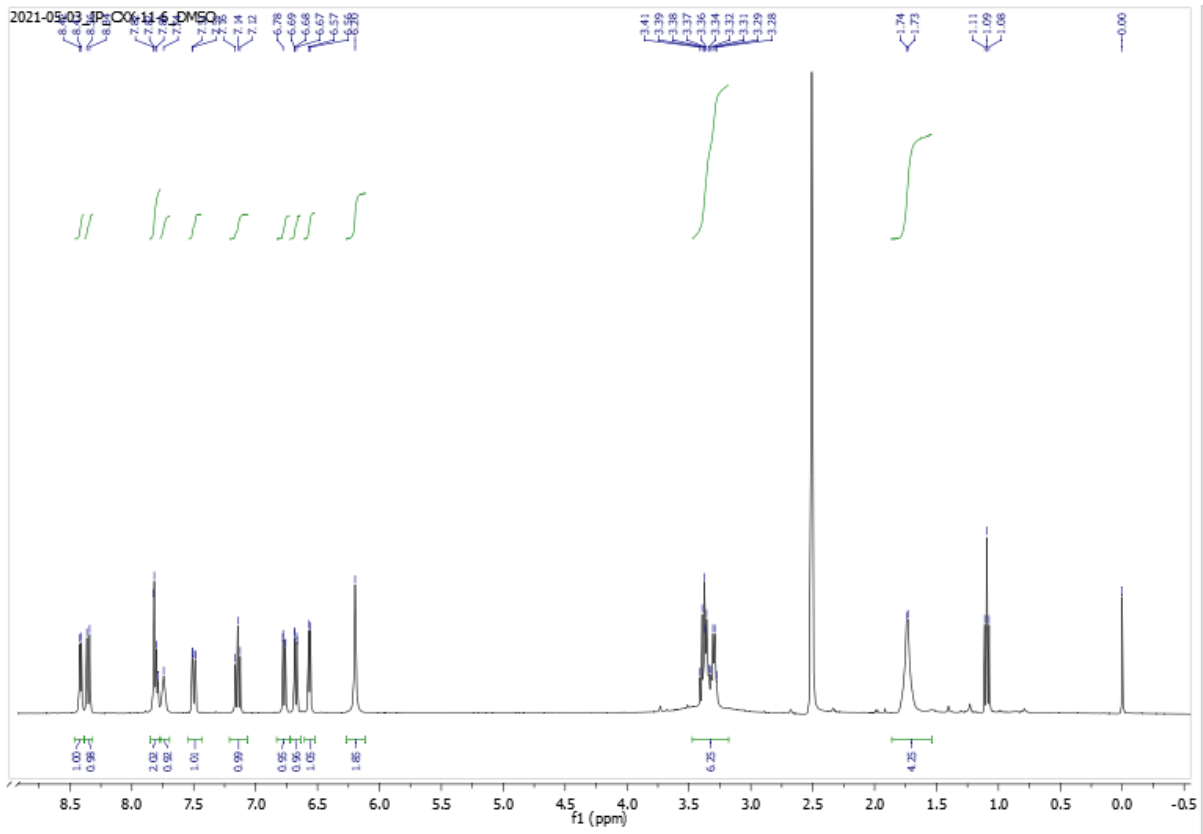


Spectrum Source: Peak (2) in "+/- TIC Scan"
 Fragmentor Voltage: 0
 Collision Energy: 0
 Ionization Mode: ESI

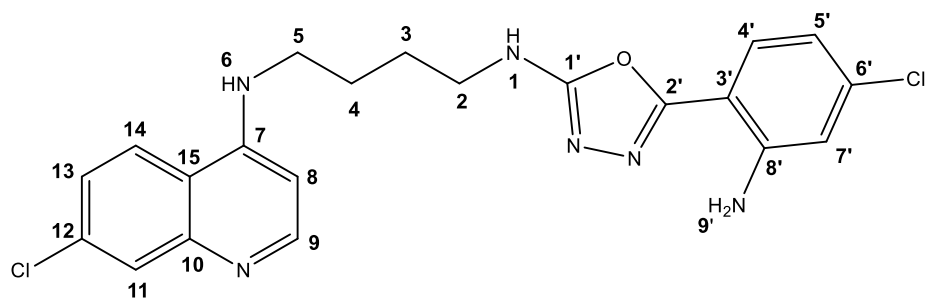


Peak List

m/z	z	Abund
220.1		47747.64
276		46653.53
349.1		36158.38



5c



Spectrum Source	Fragmentor Voltage	Collision Energy	Ionization Mode
Peak (1) in "+/- TIC Scan"		0	ESI

