

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії

проф. Сергій Вікторович Рябухін

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20__ р.

**Розробка, синтез та оцінка антибактеріальної активності комплексів
сидерофор-рифампіцин**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студента спеціальності

102 Хімія

ОП «Хімія та наноматеріали»

Лисенка Владислава Вікторовича

Науковий керівник від кафедри

професор кафедри

супрамолекулярної хімії

д.х.н. **Сергій Вікторович Рябухін**

Робота виконана у групі біологічної хімії,

Інституту біології Лейденського університету

під керівництвом д.х.н. **Н. І. Мартіна**

Оцінка захисту роботи

АНОТАЦІЯ

Ключові слова: стратегія “троянського коня”, сидерофори, рифампіцин, альбоміцин, антибіотик, відновлення росту бактерій, ентеробактин, протимікробні дослідження.

Розробка ефективних протимікробних засобів продовжує залишатися великою проблемою, особливо через зростання стійкості бактерій до антибіотиків, перспективним вирішенням цієї проблеми є використання кон'югатів сидерофор-антибіотик. Розроблено ефективний твердофазний метод синтезу аналогу сидерофору, що є частиною антибіотику альбоміцину, оптимізовано метод синтезу інших сидерофорів, включно з ентеробактином. Перевірено можливість різних сидерофорів до відновлення життєдіяльності бактерій. Синтезовано кон'югати сидерофорів з антибіотиком рифампіцином та перевірено їх протимікробна активність.

ANNOTATION

Key words: “Trojan horse” strategy, siderophores, rifampicin, albomycin, antibiotic, bacterial growth recovery, enterobactin, antimicrobial studies.

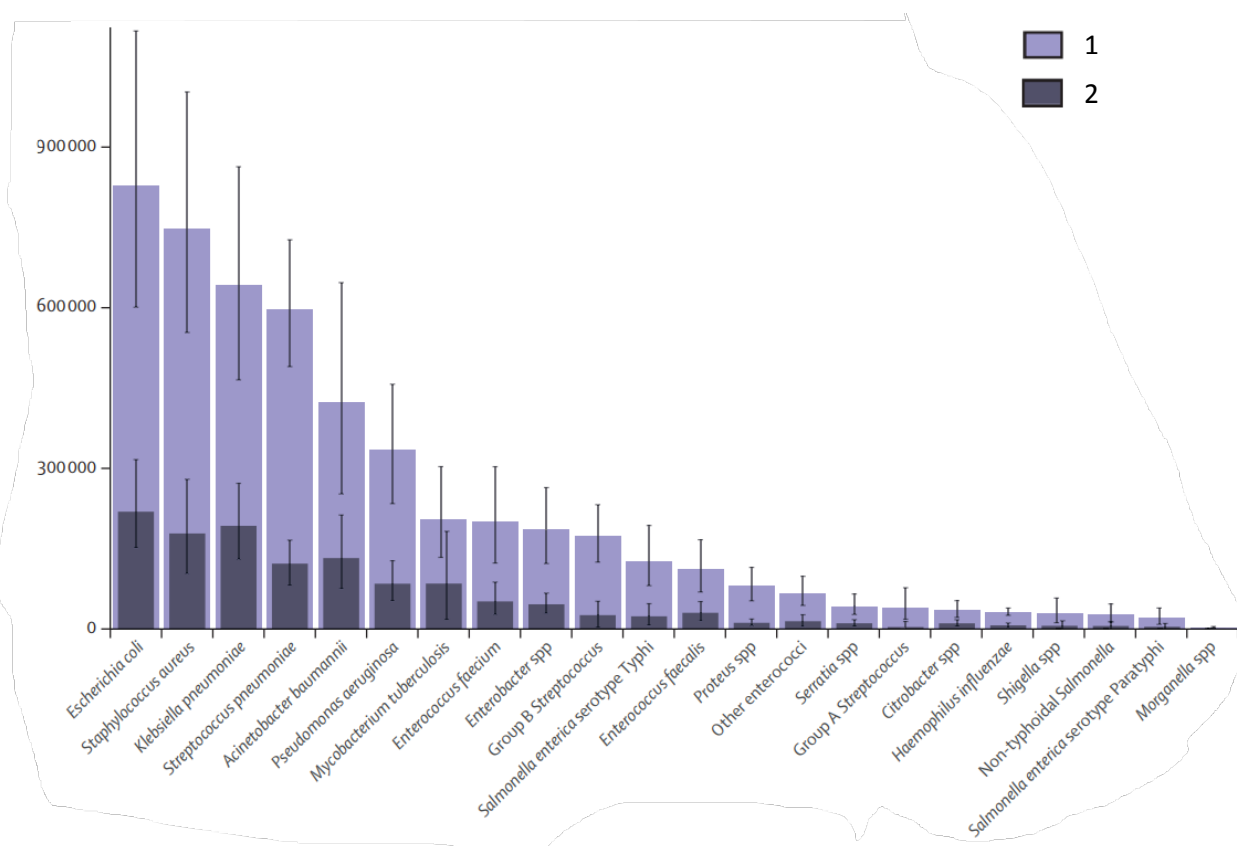
The development of effective antimicrobial agents continues to be a great challenge, particularly due to the growing resistance of bacteria to antibiotics, and a promising solution to this problem is the use of siderophore-antibiotic conjugates. An effective solid-phase method for the synthesis of siderophore analogue which is a part of the antibiotic albomycin has been developed, the methods for the synthesis of other siderophores, including enterobactin, have been optimized. Various siderophores has been tested in a growth recovery assays. Siderophores conjugates with the antibiotic rifampicin have been synthesized and tested in MIC experiments.

Зміст

Вступ	4
Розділ 1. Огляд літератури	6
1.1 Рифампіцин	6
1.2 Сидерофори. Загальна характеристика	9
1.3 Кон'югати сидерофор-антибіотик. Стратегія “троянського коня”	14
1.4 Альбоміцин як природний аналог кон'югатів сидерофор-антибіотик.....	17
1.5 Підходи до синтезу сидерофорів	20
Розділ 2. Обговорення експериментальних даних	23
2.1 Синтез ентеробактину.....	23
2.2 Синтез сидерофорів	27
2.3 Синтез кон'югатів	33
2.4 Експерименти з відновлення росту бактерій	35
2.5 Антибактеріальні дослідження.....	37
Розділ 3. Експериментальна частина	42
Висновки	57
Список використаних джерел	58
Додатки	64

Вступ

Поки світ бореться з загрозою COVID-19, пандемія бактеріальних інфекцій розвивається у тіні. Кожного року кількість смертей від таких інфекцій суттєво зростає. Це пов'язано з тим, що бактерії виробляють своєрідний імунітет проти антибіотиків, стають резистивними до них, що підвищує складність лікування спричинених ними захворювань. За розрахунками у 2019 році такі бактерії стали причиною майже 5 мільйонів смертей (графік 1), а вже в 2050 році ця цифра може сягнути 50 мільйонів [1].

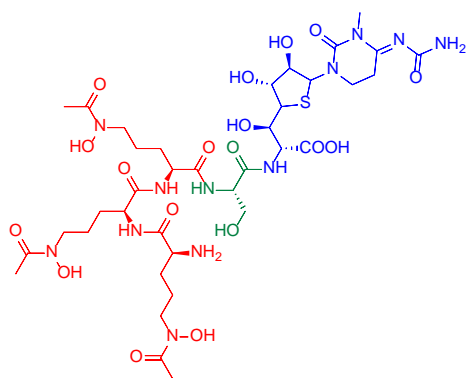


Графік 1 – Глобальна кількість смертей, пов'язаних із стійкістю бактеріальних інфекцій проти антимикробних препаратів, 2019 рік [1]. 1 – кількість смертей, яких вдалося би уникнути, якщо б не було інфекцій; 2 - кількість смертей, яких вдалося би уникнути, якщо б бактерії не були резистивними.

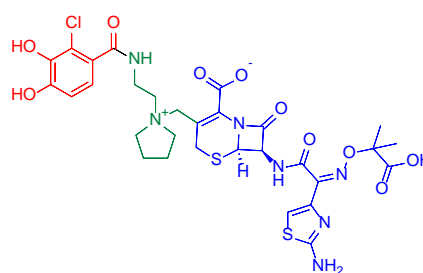
Наразі налічується багато підходів до розробки нових антибіотиків, один з достатньо сучасних – це використання сидерофорів – маломолекулярних хелаторів заліза, які виділяють бактерії. Після

хелатування з іонами заліза вони розпізнаються специфічними рецепторами зовнішньої мембрани і транспортуються в цитоплазму, щоб забезпечити бактерії необхідним запасом заліза [2]. Цей підхід отримав назву стратегія «троянського коня», вона заснована на кон'югації сидерофорів з антимікробними препаратами, таким чином захоплюючи бактеріальну систему поглинання заліза і дозволяючи антибіотикам проникати всередину та вбивати бактерії [3]. Натхненні попередніми дослідженнями та природними сидерофорними антибіотиками (рис. 1, А) ми зосередились на розробці методів синтезу нових кон'югатів сидерофор-антибіотик (рис. 1, Б) для перевірки їх протимікробного потенціалу та модифікації методів синтезу відомих сидерофорів.

А)

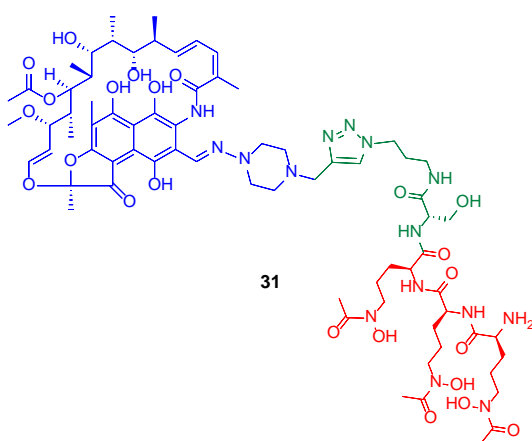


Альбоміцин

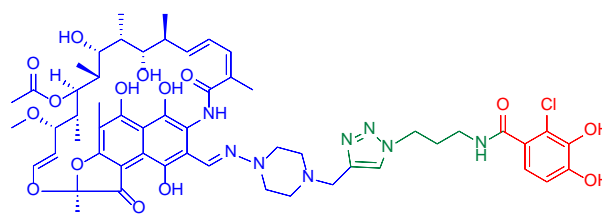


Цефідерокол

Б)



31



32

Рисунок 1 – А) приклади описаних кон'югатів сидерофор-антибіотик, що проявляють хороші антибактеріальні властивості [2-4]. Б) кон'югати запропоновані в цій роботі.

Розділ 1. Огляд літератури

1.1 Рифампіцин

Рифампіцин (рис. 1.1) є напівсинтетичним похідним сполук класу Рифампіцини, антибіотиків, які є продуктами ферментації *Nocardia mediterranei* [5, 6, 8]. Рифампіцин має широкий антибактеріальний спектр і особливо активний у низьких концентраціях проти мікобактерій та грампозитивних мікроорганізмів. Зараз препарат широко використовується в клінічній практиці і виявився особливо ефективним при лікуванні туберкульозу [7, 8]. Високий рівень антибактеріальної активності рифампіцину заснований на специфічному та унікальному механізмі дії.

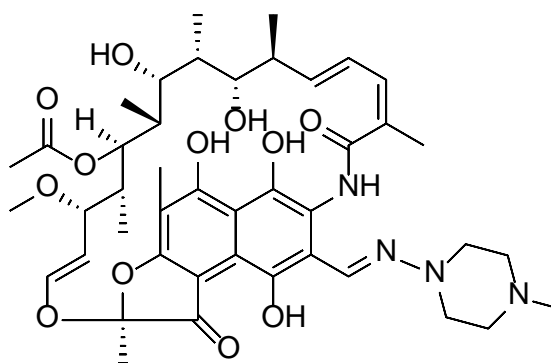


Рисунок 1.1 – Рифампіцин

Рифампіцин специфічно інгібує бактеріальну РНК-полімеразу, фермент, що відповідає за транскрипцію ДНК, утворюючи стабільний комплекс антибіотик-фермент з константою зв'язування 10^{-9} М при 37°C [8].

Група Хартмана вперше показала специфічний інгібуючий ефект рифампіцину на РНК-полімеразу з *Escherichia coli* [9]. Цей фермент полімеризує рибонуклеозидтрифосфати на матриці ДНК і каталізує транскрипцію ДНК на РНК. Було також виявлено, що РНК-полімерази різноманітних бактерій, окрім *E. coli*, чутливі до рифампіцину. А пригнічення синтезу РНК рифампіцином зупиняє ріст бактерій. Однак на відміну від інших антибіотиків, які мають токсичну дію на організм людини, через те, що взаємодіють з матрицею ДНК, рифампіцин специфічно взаємодіє з ферментом, який він дезактивує при дуже низьких концентраціях. Відповідні

ферменти ссавців не інгібуються рифампіцином в широкому спектрі концентрацій [8].

Хоча чутливість до рифампіцину РНК-полімераза грамнегативних і грампозитивних бактерій однаково висока, значення МІК для грамнегативних бактерій набагато вищі (8-32 мкг/мл), ніж для грампозитивних бактерій, таких як стафілококи (0.01 мкг/мл) (таблиця 1.1). Значно вищі значення МІК у грамнегативних бактерій пояснюються не менш чутливим ферментом, а зниженою проникністю рифампіцину через зовнішню мембрану цих організмів. Таким чином, у грамнегативних організмів проникнення через зовнішню мембрану є етапом, що обмежує швидкість дії рифампіцину, а отже робить ці бактерії набагато резистивнішими до цього антибіотику [8, 10].

Таблиця 1.1 – Порівняння значень мінімальних інгібуючих концентрацій рифампіцину (МІК₅₀ – інгібування 50% колоній, МІК₉₀ – інгібування 90% колоній) для різних штамів бактерій [10].

Штам бактерій	МІК (мкг/мл)	
	МІК ₅₀	МІК ₉₀
Грампозитивні		
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.015	0.015
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.015	0.015
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0.12	4
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.12	0.25
<i>Staphylococcus faecalis</i>	2	8
Грамнегативні		
<i>Escherichia coli</i>	8	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32	64
<i>Enterobacter cloacae</i>	64	64
<i>Serratia marcescens</i>	64	64

з енергією, що забезпечується перенесенням протону, яке опосередковується білковим комплексом TonB-ExbB/D. Потім комплекс зв'язується з периплазматичним зв'язуючим білком (РВР) FerВ і транспортується в цитоплазму через транспортер АВС. Далі під дією редуктази координований Fe^{3+} відновлюється до Fe^{2+} . Комплекс сидерофор- Fe^{2+} набагато менш стабільний, ніж відповідний комплекс сидерофор- Fe^{3+} , тому Fe^{2+} легко вивільняється з комплексу. Секреція ентеробактину (рис. 1.3) у грамнегативних бактерій включає транспортування з цитоплазми в периплазматичний простір за допомогою підтипу білків головного фасилітатора (MFS). Транспортування через зовнішню мембрану включає комплекс TolC і пов'язаний з ним насос виводу (RND). У грампозитивних бактерій, наприклад *S. Aureus* (рис. 1.2), комплекс сидерофор- Fe^{3+} розпізнається сидерофор-зв'язуючим білком (SBP), розташованим на клітинній мембрані. Подальші етапи поглинання та вивільнення відбуваються аналогічно грамнегативним бактеріям [4, 11, 12, 17].

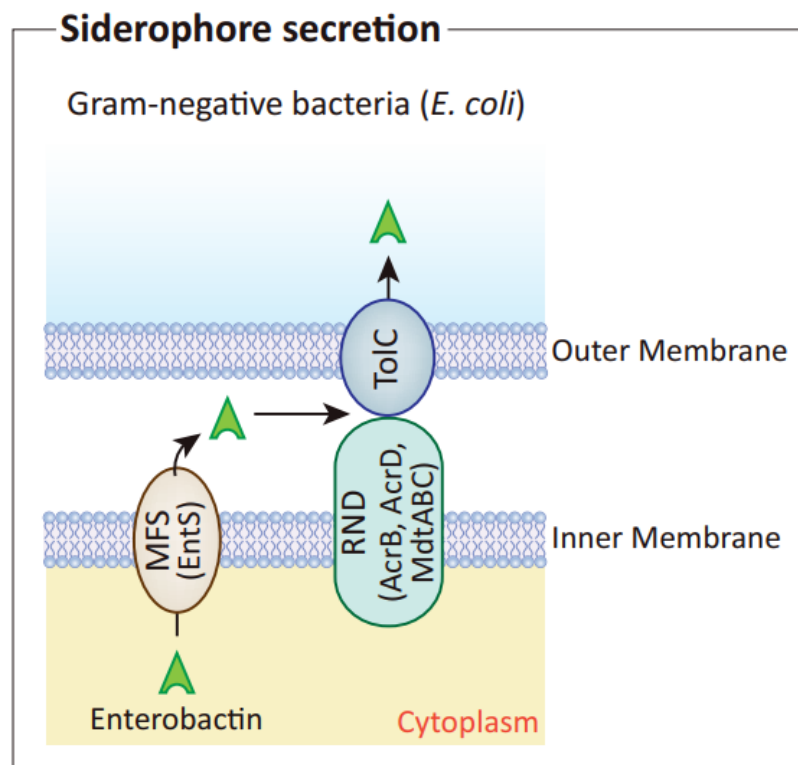


Рисунок 1.3 – Секреція ентеробактину на прикладі грам-негативної бактерії *E. coli* [11].

Біосинтез сидерофорів регулюється за допомогою внутрішньоклітинної концентрації заліза відповідно до принципу індукованої експресії генів при низьких внутрішньоклітинних концентраціях заліза. Інші бактерії використовують регулятор транскрипції Fur (регулятор поглинання заліза) замість IdeR (залізо залежний регулятор) [11, 18].

Відомі два різних принципи синтезу, або через білкові комплекси нерибосомних пептидних синтаз (NRPS) (рис. 1.4), або через NRPS-незалежний сидерофорний синтез (NIS). NRPS використовують арил і амінокислотні будівельні блоки, тоді як синтез NIS заснований на утворенні амідних або складноєфірних зв'язків між дикарбоновими кислотами, діамінами, аміноспиртами або спиртами [11, 19].

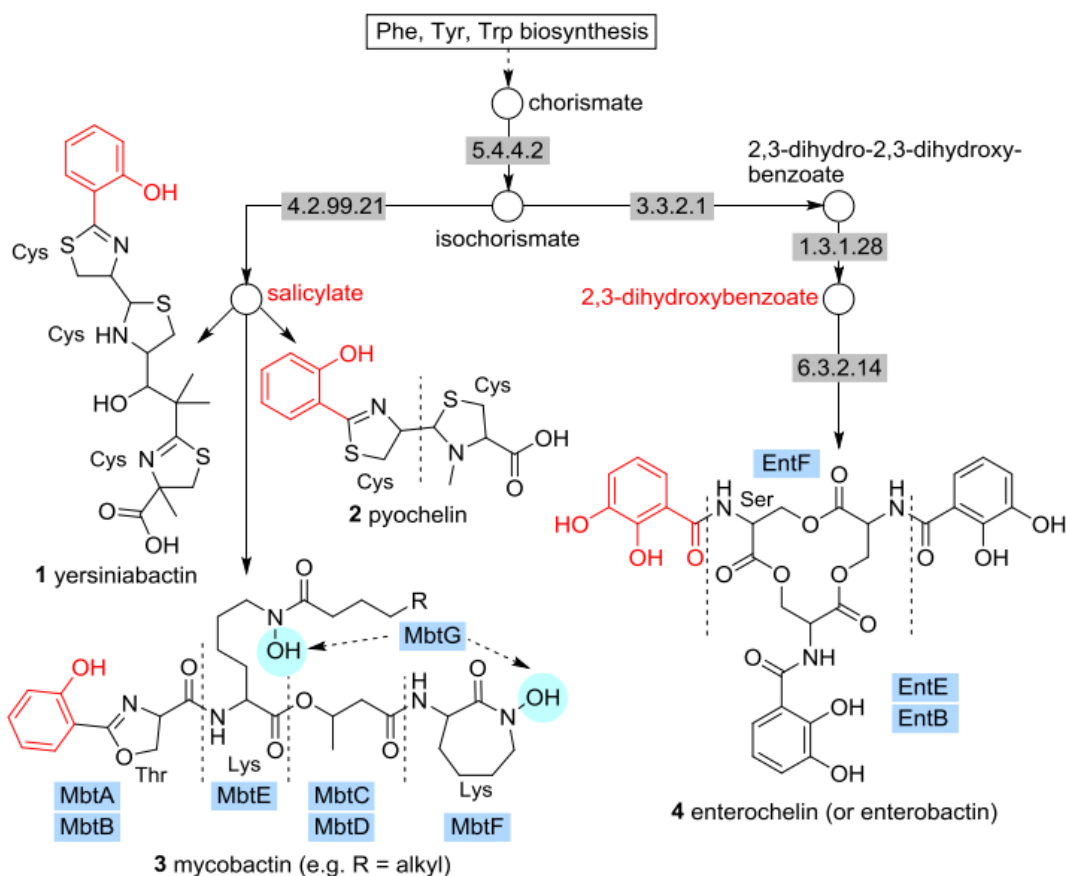


Рисунок 1.4 – NRPS-залежний біосинтез деяких сидерофорів. 1 – ієрсиніабактин; 2 – піохелін; 3 – мікобактин; 4 – ентеробактин; 5.4.4.2 – ізохоримат синтаза; 3.3.2.1 – біфункціональний ізохоримат ліаза/білок носій ацилу; 4.2.99.21 – ізохоримат піруватліаза; 1.3.1.28 – 2,3-дигідро-2,3-дигідроксибензоатдегідрогеназа; 6.3.2.14 – ентеробактинсинтаза [17]

Наразі виявлено понад 500 різних сидерофорів [16]. Ці сидерофори можна класифікувати на п'ять основних сімейств відповідно до різних залізо-хелатуючих груп: катехолят, гідроксамат, фенолят, карбоксилат і «змішаний тип» (рис. 1.5) [4, 11, 12, 16, 17].

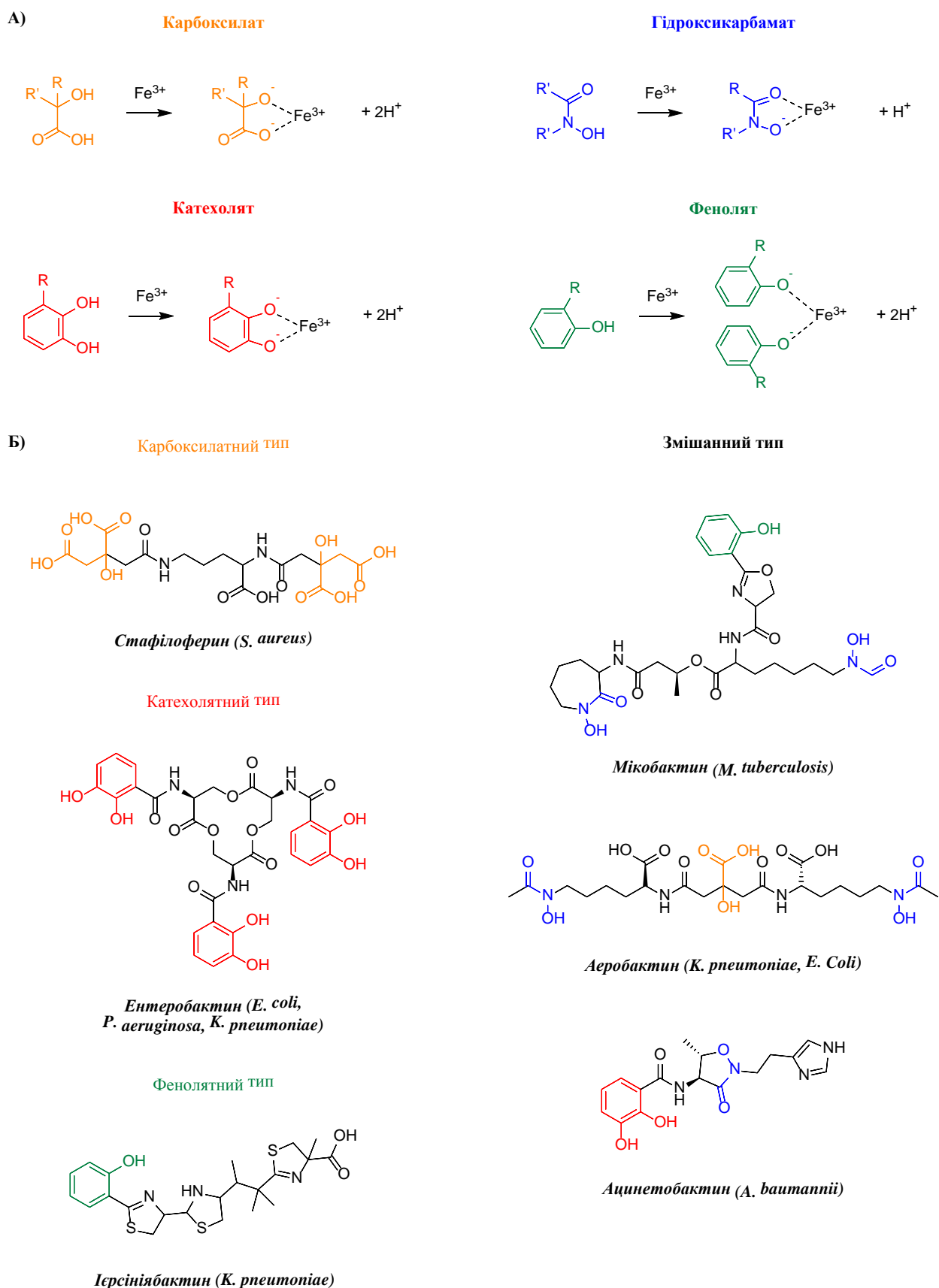


Рисунок 1.5 – А) Різні типи хелатуючих груп, Б) Структура сидерофорів, що синтезуються різними бактеріями

1.3 Кон'югати сидерофор-антибіотик. Стратегія «троянського коня»

Протимікробні засоби, що містять сидерофори, як згадувалося в попередньому розділі, можна назвати молекулярними кон'югатами «троянських коней» і вони зазвичай складаються з трьох частин: сидерофора, антибіотика та групи, що їх зв'язує (рис. 1.6) [20]. З точки зору молекулярного дизайну, природа кожного з трьох компонентів може впливати на антибактеріальний ефект, тому дуже важко правильно підібрати їх структуру, адже результат не завжди легко спрогнозувати. Кінцевою метою є досягнення хорошого проникнення через мембрану та ефективного вивільнення антибіотиків.

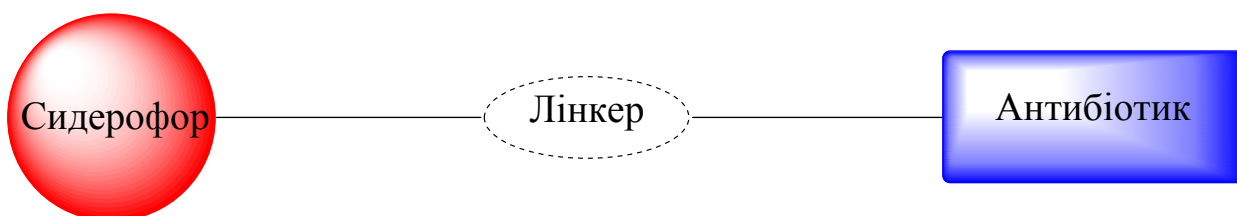


Рисунок 1.6 – Схематичне зображення будови кон'югатів сидерофор-антибіотик

При розробці нових кон'югатів сидерофор-антибіотик необхідно усунути ряд перешкод: перша пов'язана з вибором сидерофорів, що будуть переносити антибіотик в бактерію, адже існує значна різниця в транспортній селективності між сидерофорами, кон'югованими з антибіотиком, і сидерофорами, які виробляють бактерії [21, 23-25]. Другою проблемою є пошук антибіотиків, придатних для стратегії «троянського коня», більшість з яких діють на мішені, присутні в цитоплазмі бактерій (8.2 і 8.8, рис. 1.8) [21, 22], також важливо відмітити, що кон'югований антибіотик може втратити частину своєї дії через природу або розташування лінкерної/сидерофорної частини. Третьою проблемою є розробка з'єднувальної групи (лінкеру), яка повинна бути не тільки стабільною у фізіологічних умовах, але й бути здатною протистояти активній транспортній системі бактерій, яка відповідає за поглинання заліза.

У деяких випадках, кон'югат сидерофор-антибіотик також повинен бути здатним до розщеплення в цитоплазмі і, з подальшим вивільненням антибіотик поблизу своєї мішені. Ці контрастні вимоги викликають проблеми: більшість легко розщеплюваних зв'язуючих груп через їхню нестабільність можуть легко призвести до передчасного вивільнення антибіотиків. З іншого боку, занадто стабільний лінкер може ускладнити вивільнення антибіотика (8.10-8.12, рис. 1.8) [28-36]. Досить цікаво до вирішення цієї проблеми підійшла група Міллера у своїй роботі над кон'югатами сидерофор-оксазолідинон (рис. 1.7) [27]. Ними було показано, що β -лактами можуть служити функціональною групою для вивільнення інших націлених на цитоплазму антибіотиків.

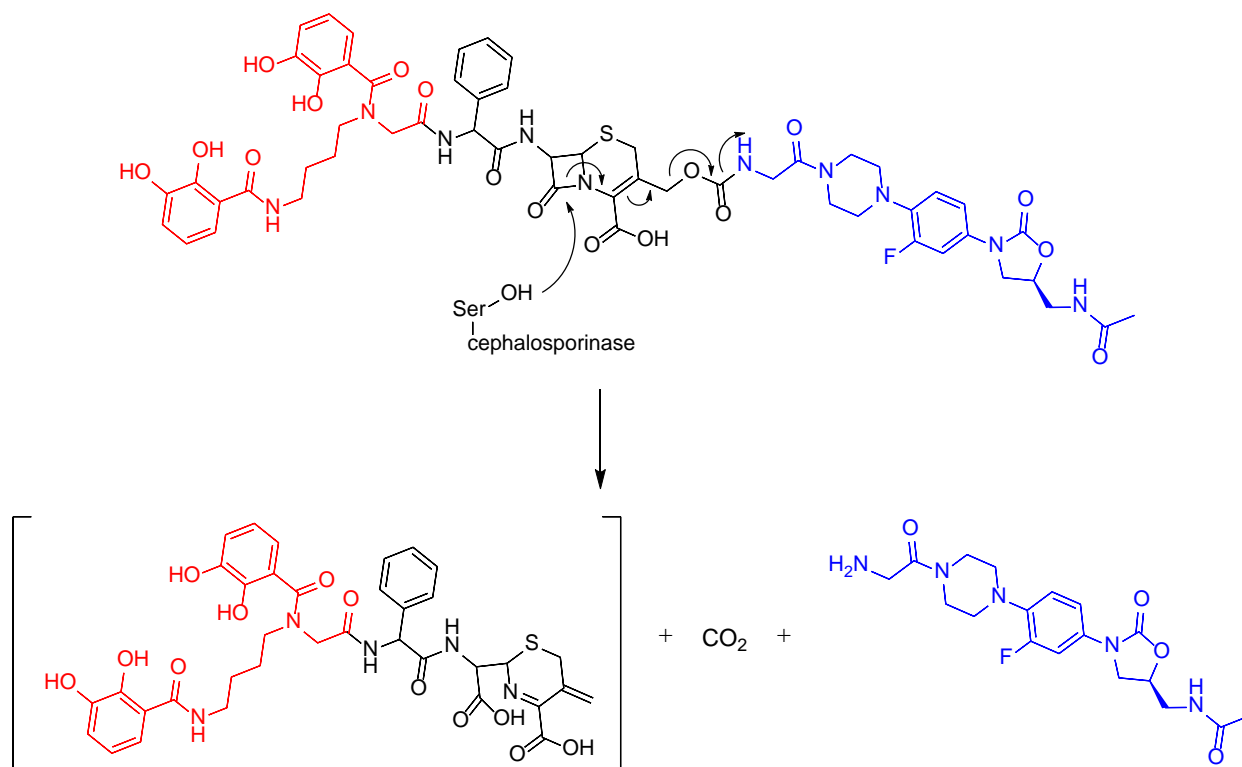


Рисунок 1.7 – Розщеплення кон'югату сидерофор- β -лактама-антибіотик з вивільненням антибіотика.

Нарешті, природа сидерофору, що зв'язує залізо, також може впливати на антимікробні властивості кон'югатів сидерофор-антибіотик. На даний момент, сидерофори типу катехолів або гідроксаматів давали найкращі результати при використанні в рамках стратегії «троянського коня» (8.13-8.17, рис. 1.8) [23, 34, 37-40]. Вдалим прикладом цього підходу є кон'югат

сидерофор-цефалоспорин – Цефідерокол (8.9, рис. 1.8) [26], який було затверджено FDA та який знаходиться в переліку основних лікарських засобів ВООЗ. Однак незважаючи на багатообіцяючі результати, оптимізація цього типу трикомпонентних сидерофор-антибіотиків все ще є проблемою в області антимікробних досліджень.

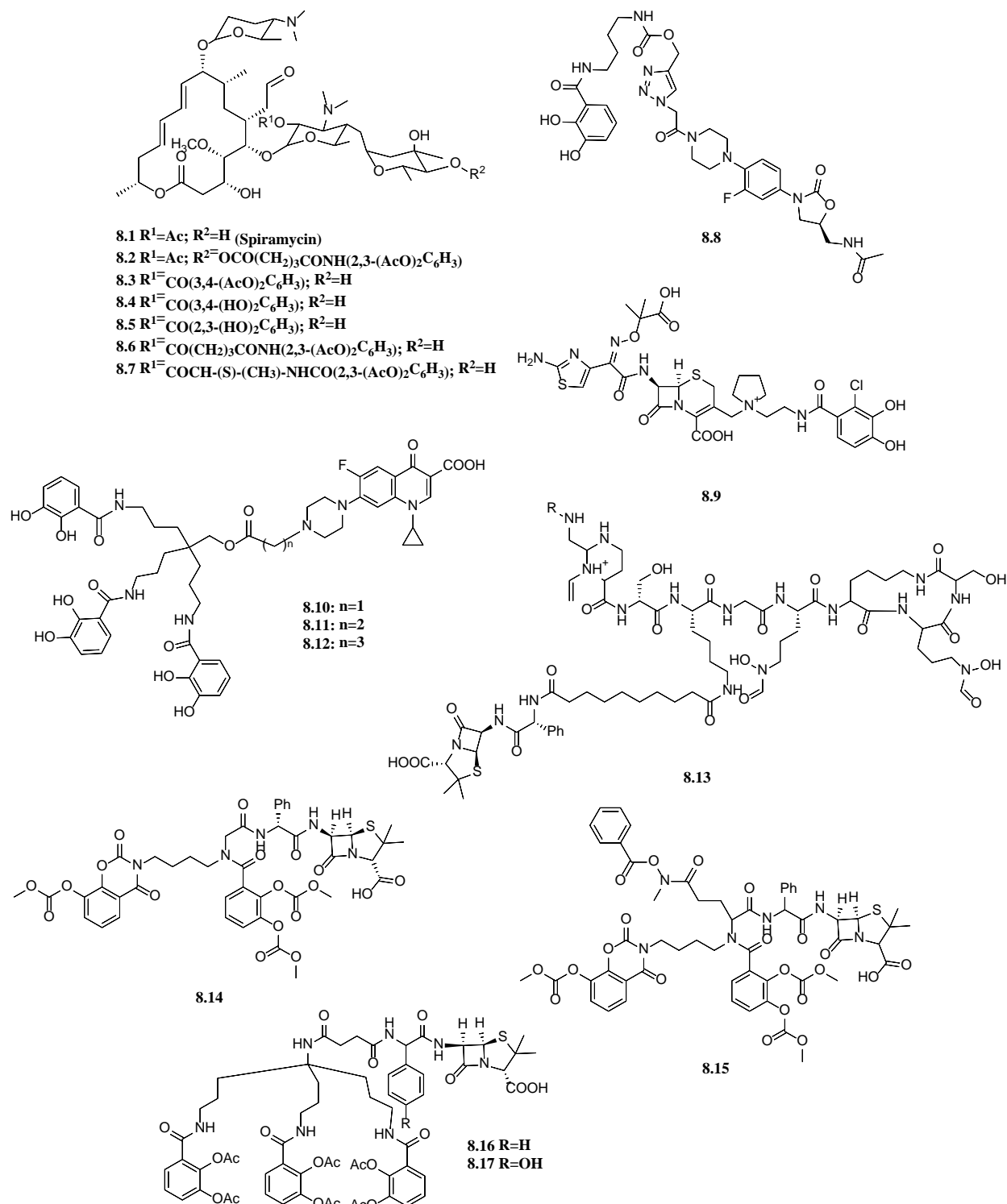


Рисунок 1.8 – Кон'югати сидерофор-антибіотик описані в літературі

1.4 Альбоміцин як природний аналог кон'югатів сидерофор-антибіотик

Альбоміцин (рис. 1.9) є природним сидерофорним антибіотиком, що містить в своїй структурі групу для хелатування заліза, що складається з трьох залишків гідроксамової кислоти, з'єднаних з фрагментом інгібітора тРНК-синтетази SB-217452, який і надає цій молекулі антибактеріальний ефект [41, 42].

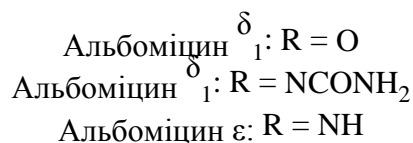
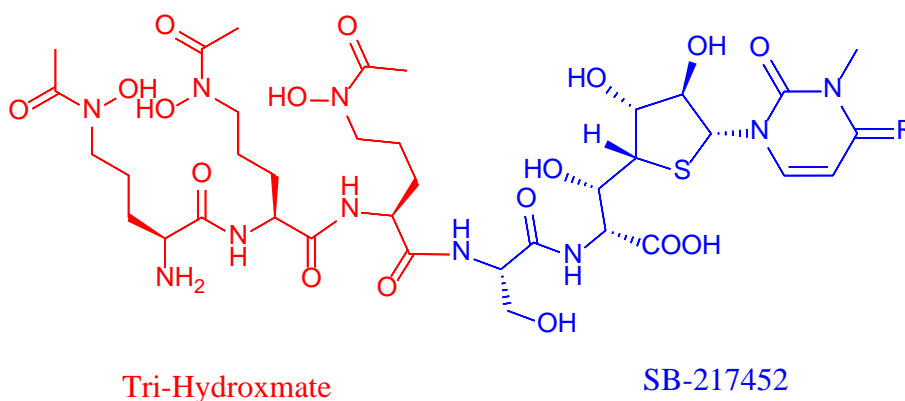


Рисунок 1.9 – Структура альбоміцинів

Альбоміцин може проходити через зовнішню мембрану, периплазму та внутрішню мембрану за допомогою транспортних білків, таким чином проникаючи у грамотрицателі бактерії. Після потрапляння альбоміцину в клітину сидерофорна частина розщеплюється пептидазою, а антибактеріальна частина, яка пригнічує синтез білка, вивільняється в цитоплазмі, що спричиняє загибель бактеріальної клітини (рис. 1.10). Завдяки своїй ефективності в проникненні в бактерію через системи транспорту заліза та специфічності антибіотичної частини, альбоміцин має високу антибактеріальну активність. Натомість людські бактерії мають менш ефективну систему транспорту заліза, тому альбоміцин гірше в них абсорбується і проявляє низьку токсичність [41].

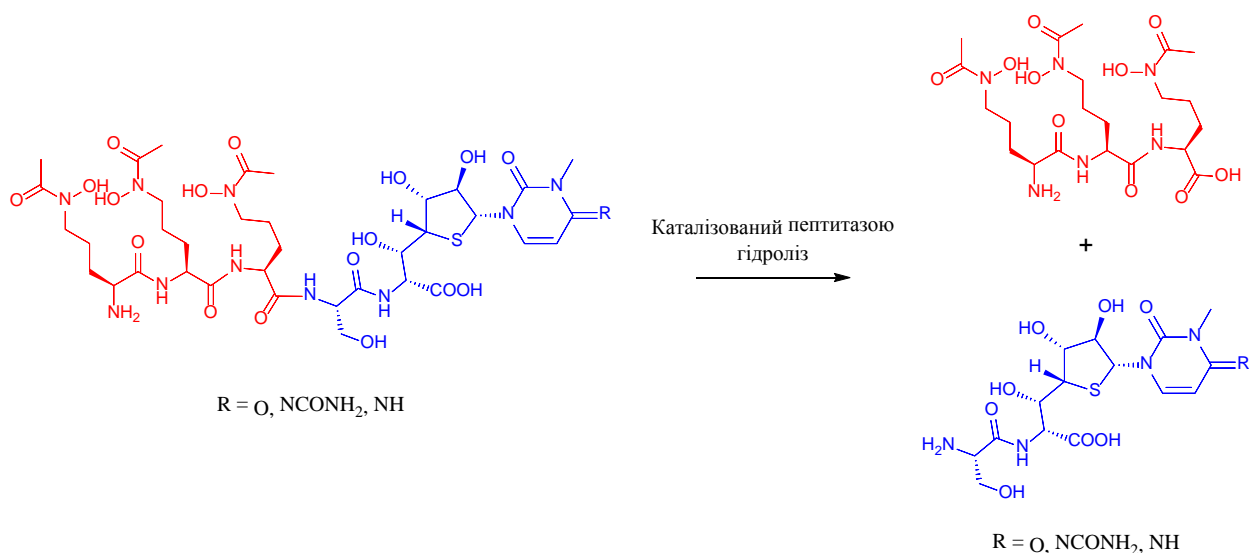


Рисунок 1.10 – Гідроліз альбоміцинів всередині бактерії

Виходячи з антибактеріального механізму дії альбоміцину, було зроблено припущення, що його сидерофорна частина може бути використана для розширення антибактеріальної активності інших антибіотиків, які, як правило, активні лише проти грампозитивних бактерій. Одним із таких класів грампозитивних специфічних антимікробних засобів є Рифаміцини.

В нещодавніх роботах в якості антибактеріальної частини був використаний антибіотик Ципрофлоксацин. Вчені показали що кон'югати сидерофор-ципрофлоксацин (рис. 1.11) є менш токсичним, та більш ефективним ніж антибіотик сам по собі. Також в цих роботах було показано важливість наявності серину, як частини сидерофору, для подальшого розщеплення пептидазою в бактерії, адже Галбофлоксацин був значно активнішим за M-D2 [46, 47].

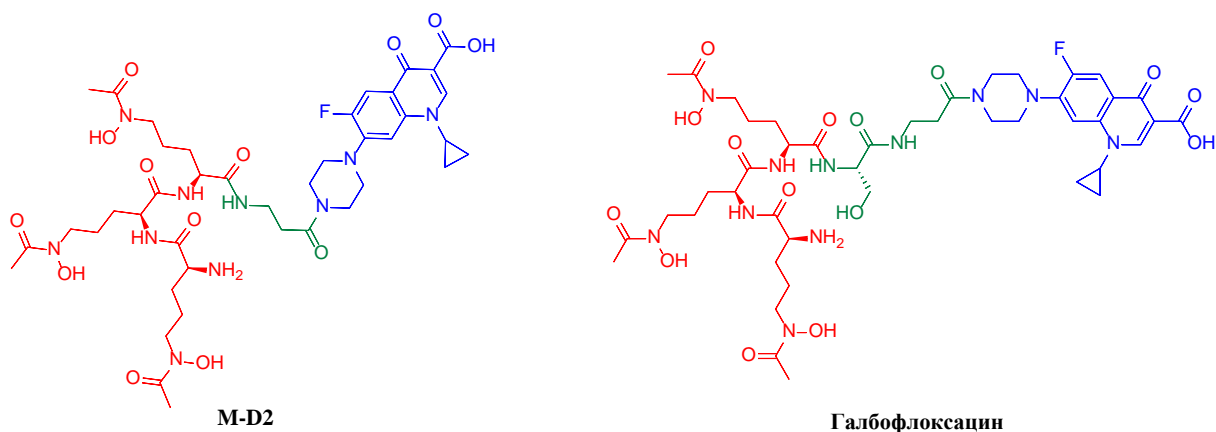


Рисунок 1.11 – Кон'югати сидерофор-ципрофлоксацин [46, 47]

1.5 Підходи до синтезу сидерофорів

В нещодавній роботі під керівництвом Йан Хе було розроблено синтез альбоміцинів, а відповідно розглянуто і підходи до синтезу сидерофорної частини, яку також було використано в цій роботі [43]. Ця група розпочала синтез виходячи з захищеного орнітину (речовина 1.1) і далі слідувала схемі, яка наведена нижче (схема 1.1):

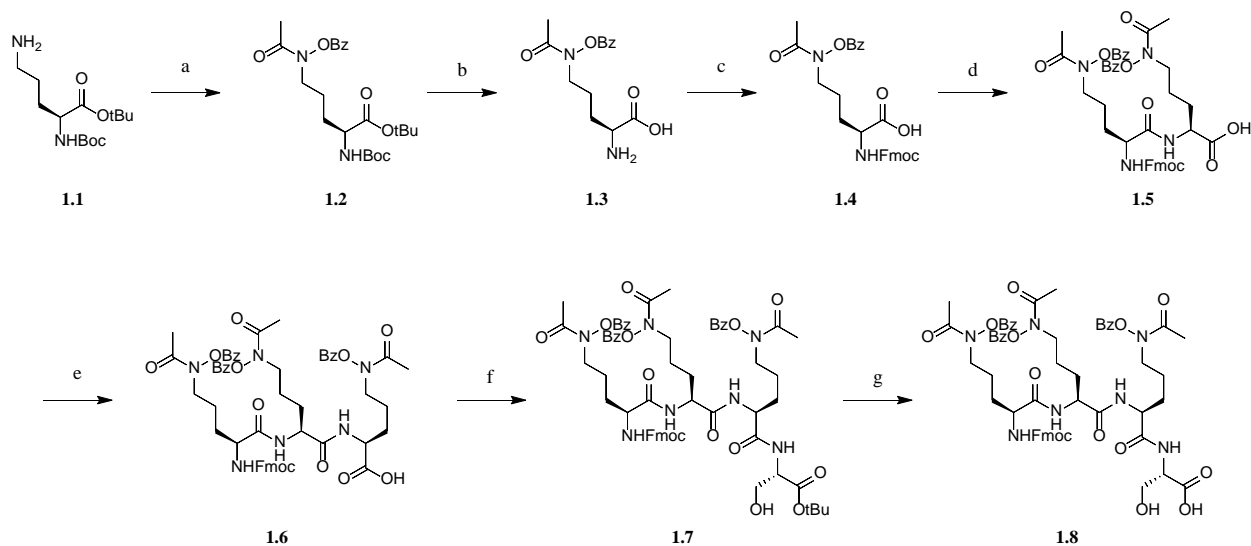


Схема 1.1 – Реагенти та умови: (a) BPO, pH 10.5 буфер, CH_2Cl_2 , 3 год., потім AcCl , CH_2Cl_2 ; (b) TFA, H_2O , КТ, 12 год.; (c) Fmoc-OSu, Et_3N , ДМФ, -15°C , ніч; (d) VtH, SOCl_2 , ТГФ, 50 хвилин, потім **1.3**, Et_3N , $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (5:2), -15°C , 2 год.; (e) VtH, SOCl_2 , ТГФ, 50 хвилин, потім **1.3**, Et_3N , $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (5:2), -15°C , 2 год.; (f) H-Ser-OtBu гідрохлорид, NATU, DIPEA, ДМФ, -15°C , 2 год.; (g) TFA, H_2O , CH_2Cl_2 , 0°C , 18 год.

Загалом вихід кожної з стадій цього синтезу перевищували 80%, однак умови для каплінгів (d), (e) та (f) було досить складними для постановки експерименту, а також потребували очистки методом колонкової хроматографії після кожної стадії, що робить такий підхід до синтезу не дуже зручним.

Одним з дуже зручних методів зв'язування двох речовин в один кон'югат є азидно-алкіновий метод [44]. В основу методу покладено реакцію циклоприєднання каталізовану солями міді (рис. 1.12). Такий підхід дозволяє отримувати кон'югати досить великих молекул, навіть, якщо в цих

молекулах присутня велика кількість незахищених функціональних груп, адже така реакція циклоприєднання проводиться в м'яких умовах і є дуже селективною.

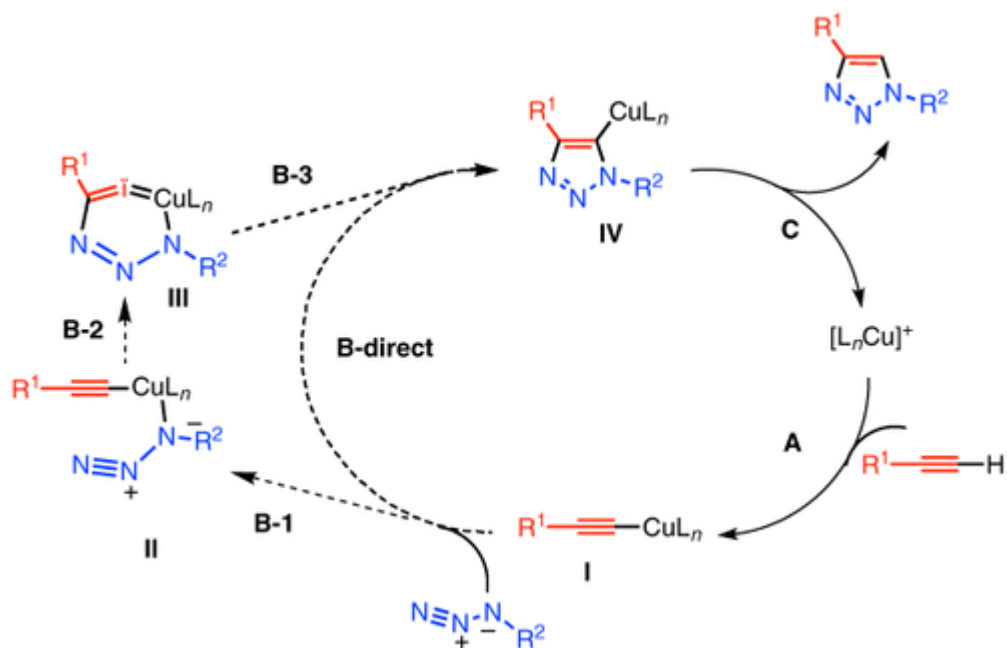


Рисунок 1.12 – Можливий каталітичний цикл для реакції циклоприєднання між азидом та алкіном у присутності солей одновалентної міді [44].

Для такого підходу чудово підходив синтез раніше описаної модифікації рифампіцину [45], що містить алкіновий фрагмент, наведеної на схемі 1.2:

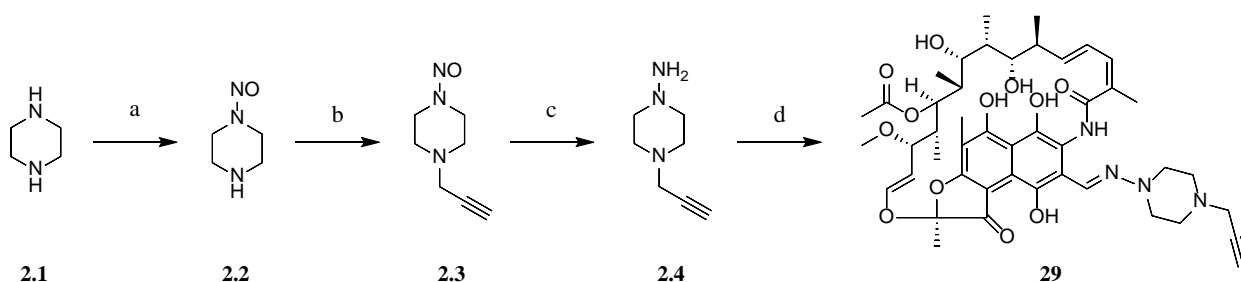


Схема 1.2 – Реагенти та умови: (a) NaNO_2 , HCl , -10°C , 1 год.; (b) пропаргіл бромід, Et_3N , MeCN , кип'ятіння, 3 год.; (c) LiAlH_4 , ТГФ, кип'ятіння, 2 год.; (d) Ріфальдегід, ТГФ, КТ, ніч.

Виходи на кожній стадії даного синтезу були досить низькими. Особливо варто відмітити вихід речовини **2.4**, який складав лише 10%, однак за рахунок низької вартості вихідних реагентів їм вдалося синтезувати сполуку **29** в достатній кількості.

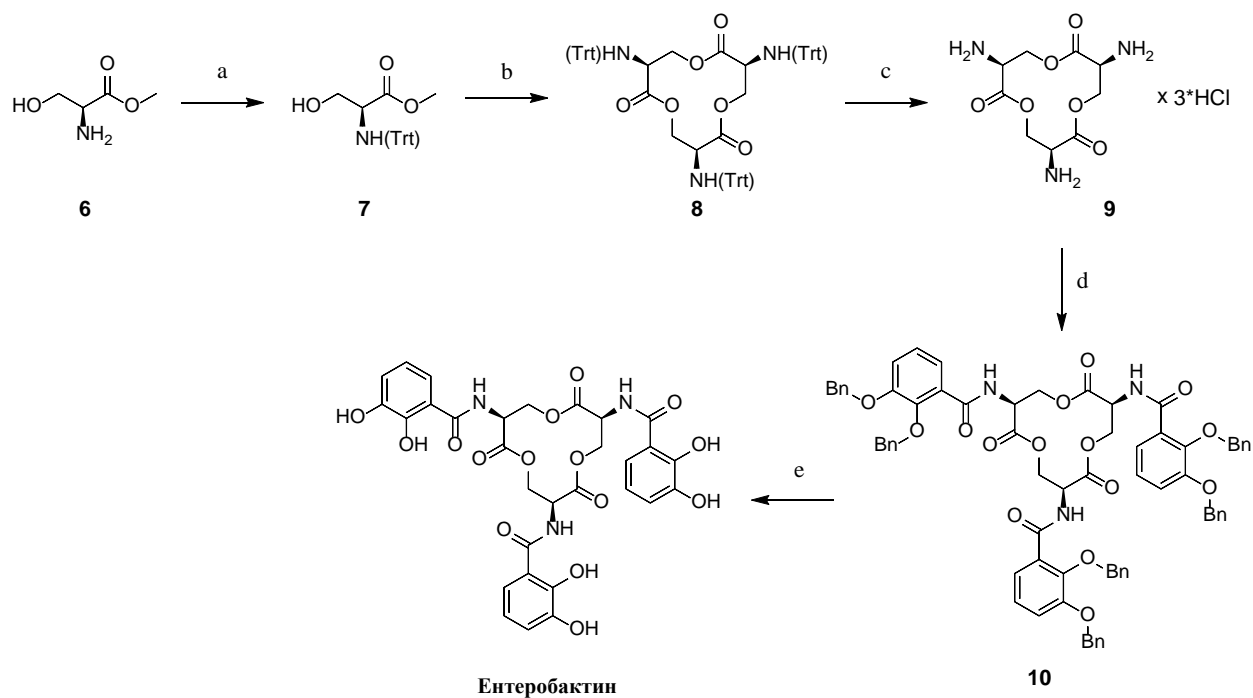


Схема 2.1 – Реагенти та умови: (a) TrtCl, ДХМ, Et₃N, 0°C, 15 год.; (b) 1) **5**, TolH, кип'ятіння, 48 год., 2) **5**, Ксилен, кип'ятіння, 18 h год.; (c) AcCl, EtOH, кип'ятіння, 3 год.; (d) **3**, НОВТ, DIC, Et₃N, КТ, ДХМ, 24 год.; (e) Pd/C, H₂ (1 атмосфера), EtOH/EtAc (1:1), КТ, 24 год.

Розпочинали синтез з досить дешевого метилового естеру L-серину (**6**), після захисту цієї речовини Тритильною групою за стандартною методикою слідувала стадія циклізації в макроцикл (**b**). Як каталізатор в цій реакції було використано свіжоприготовлений станат **5**, який був синтезований за наступною схемою (схема 2.2):

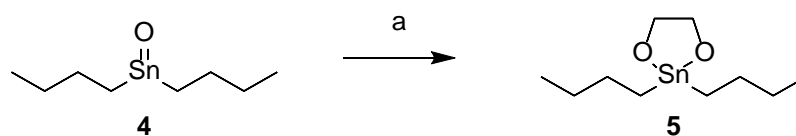


Схема 2.2 – Реагенти та умови: (a) Етилен гліколь, TolH, кип'ятіння, 5 год.

Реакція циклізації в такий макроцикл є досить складною. Так після 2 днів кип'ятіння в толуолі ми перевірили конверсію реакції за допомогою приладу LCMS, однак речовина **9** була присутня в розчині лише в слідових кількостях. Тоді ми замінили розчинник на ксилол, щоб підняти температуру кипіння розчину, і після 18 годин конверсія речовини **8** складала близько 70%. Далі ми спростили методику виділення цієї сполуки до простого

фільтрування через цеоліт та кристалізації в МТБЕ, за допомогою цього нам вдалось уникнути проблемної хроматографії. Ми також спробували повторити цю стадію одразу замішавши реакцію в ксилолі, однак це негативно вплинуло на конверсію і вона становила лише 20%.

Після гідролізу отриманої сполуки в сполуку **9**, яка була отримана в чистому вигляді після кристалізації, слідувала стадія каплінгу, для якої була використана сполука **3**, яка була синтезована в дві стадії, як наведено на схемі 2.3. Нам вдалося уникнути очистки речовини **2**, та оптимізувати методику так, щоб почистити речовину **3** методом кислотно-основної екстракції та кристалізації, що значно спростило отримання катехолу **3** для подальшого каплінгу.

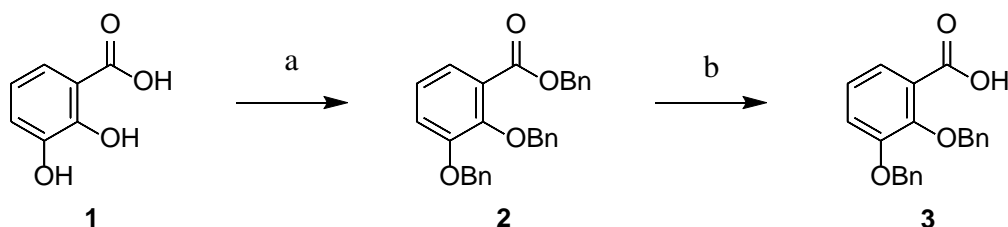
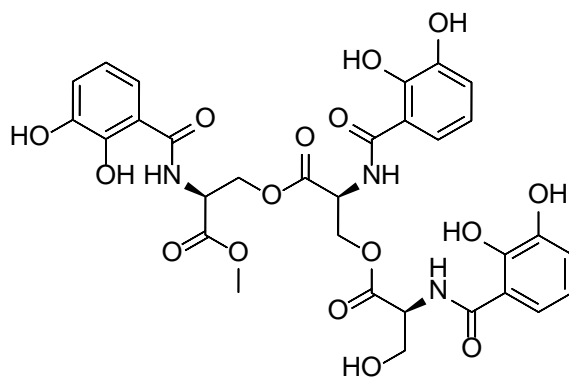


Схема 2.3 – Реагенти та умови: (a) VnBr, K₂CO₃, ДМФ, КТ, 15 год.; (b) NaOH, MeOH, КТ, 15 год.

Після стадії каплінгу речовин **9** та **3** (стадія **d**, схема 2.1), була отримана речовина **10**, єдиним методом очистки якої була колонкова хроматографія. Після очистки було проведено гідрогенування сполуки **10** з отриманням ентеробактину. Однак при перевипаровуванні ентеробактину з метанолом, в якому він найкраще розчинний, в кристалах сполуки залишилось приблизно 20-30% метанолу.

Залишивши цю речовину на декілька тижнів за температури 0°C нами було виявлено, що навіть в таких м'яких умовах, без кислотного чи основного каталізу, за досить низької температури ентеробактин розкрився метанолом, який був у кристалах, з отриманням сполуки **11** (рис. 2.2), яку нам вдалося відділити від ентеробактину за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії. Речовина **11** також була протестована на можливість виконання функцій сидерофору.



11

Рисунок 2.2 – Сполука **11** – продукт розкриття ентеробактинового циклу метанолом.

2.2 Синтез сидерофорів

Взявши до увагу попередні дослідження в області антибактеріальних кон'югатів сидерофор-антибіотик, ми вирішили перевірити активність комплексів сидерофор-рифампіцин (рис. 2.3):

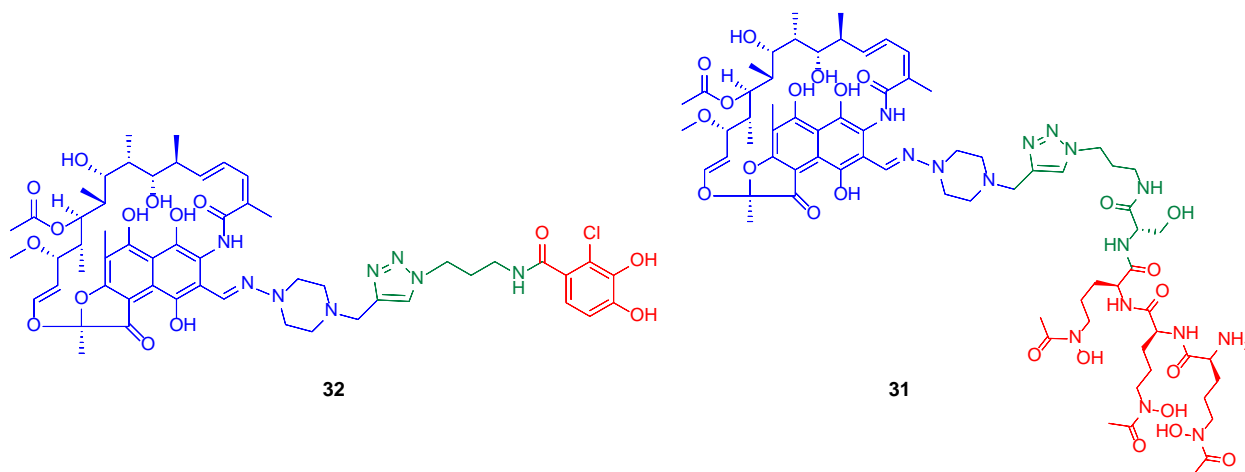


Рисунок 2.3 – Структури кон'югатів сидерофор-рифампіцин. Синім позначена частина антибіотику, зеленим – лінкер, червоним – частина сидерофору.

Враховуючи те, що рифампіцин сам по собі має багато функціональних груп і не є достатньо стабільним, адже може окиснюватись, нами було запропоновано в якості лінкера використати триазол. Реакції отримання таких триазолів є дуже селективними і проводяться в м'яких умовах. На схемі 2.4 наведено аналіз вихідних молекул, які після реакції циклоприєднання утворили би необхідні для дослідження кон'югати.

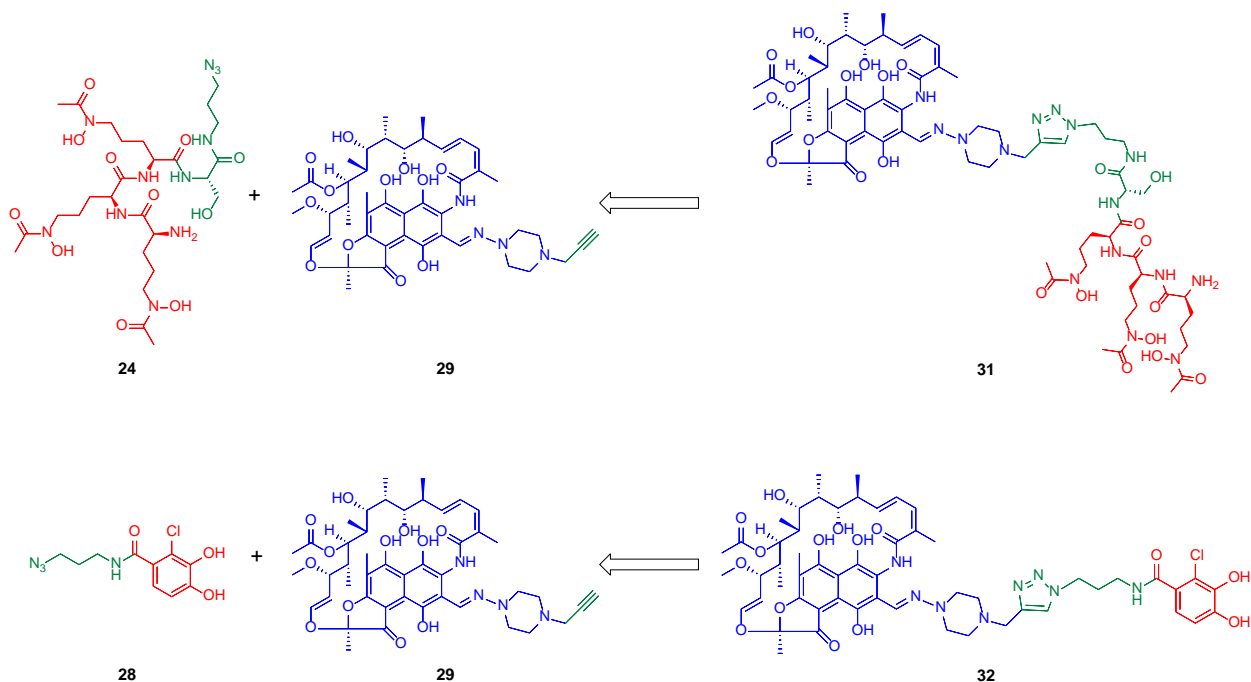


Схема 2.4 – Аналіз вихідних молекул для синтезу кінцевих кон'югатів сидерофор-антибіотик.

Перед синтезом сполуки **24** нами було проведено ретросинтетичний аналіз, який наведений на схемі 2.5. За результатами якого було вирішено спочатку синтезувати складові сидерофору – речовини **18** та **21**.

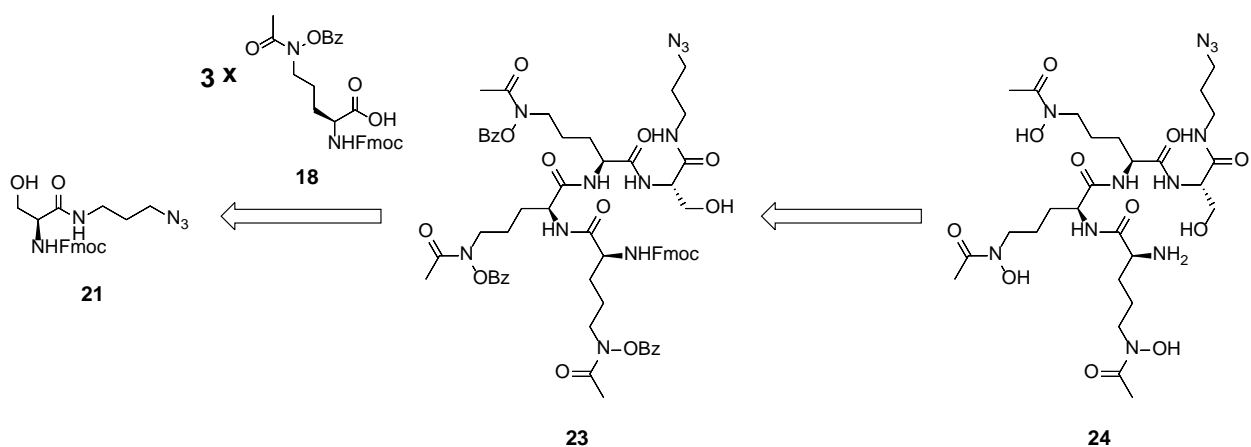


Схема 2.5 – Ретросинтетичний аналіз сполуки **24**.

Синтез сполуки **18** був частково описаний в роботі 2018 року [43], яка була присвячена синтезу альбоміцину. Однак як вихідну речовину ми обрали дещо дешевшу амінокислоту – Boc-Orn(Z)-OH, та вирішили самостійно захистити кислотну групу третбутильною групою використавши для цього свіжоприготовлену сполуку **13** слідуючи як наведено на схемі 2.6:

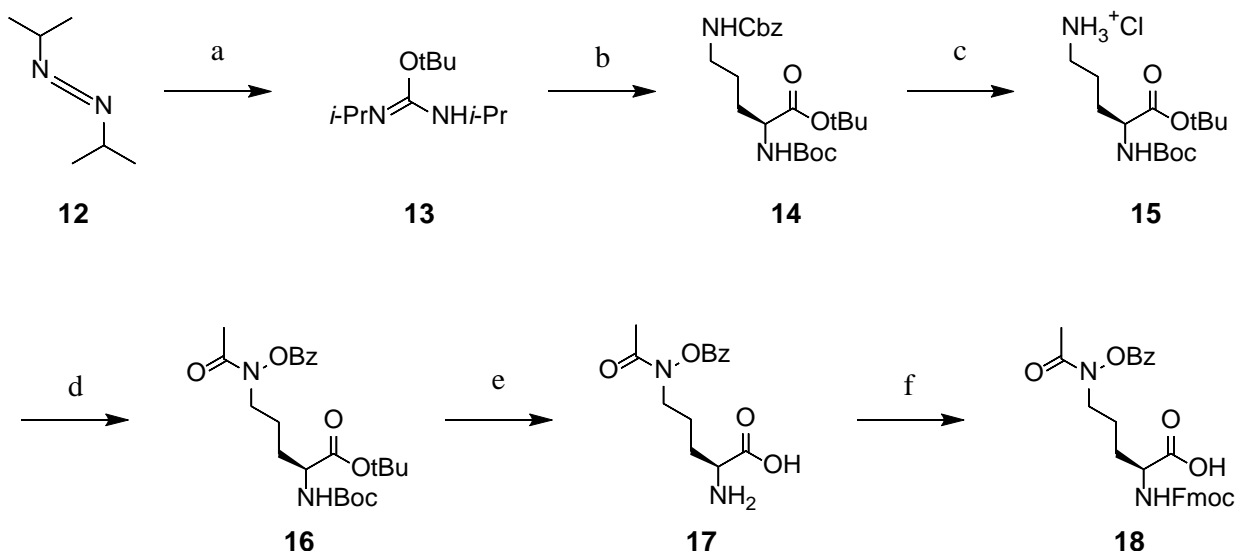


Схема 2.6 – Реагенти та умови: (a) $t\text{BuOH}$, CuCl , КТ, 20 год.; (b) Boc-Orn(Z)-OH , ДХМ, $t\text{-BuOH}$, 40°C , ніч; (c) H_2 , Pd/C , EtOH , 1M HCl , КТ, ніч; (d) 1) BPO , ДХМ, $\text{pH } 10.5 \text{ buffer}$, КТ, 2) AcCl , ДХМ, КТ, 18 год.; (e) TFA , H_2O , КТ, 18 год.; (f) Fmoc-OSu , Et_3N , DMF , -15°C , 30 хвилин.

Далі після зняття карбоксибензильного захисту методом гідрування з отриманням сполуки **15**, ми окислили цю речовину бензоїл пероксидом та не виділяючи провели наступну стадію з ацил хлоридом. Після виділення і очистки методом хроматографії отримали сполуку **16**. На наступних стадіях ми зняли кислотну вразливу групу з молекули, отримавши сполуку **17**, та захистили азот за допомогою популярної в синтезі пептидів захисної групи – Fmoc , з отриманням речовини **18**.

Інша частину сидерофору **24**, а саме сполука **21**, була отримана виходячи з речовини **20**, яка була отримана зі сполуки **19** нуклеофільним заміщенням атому Хлору на азидну групу, та Fmoc -серину з досить високим виходом за схемою 2.7:

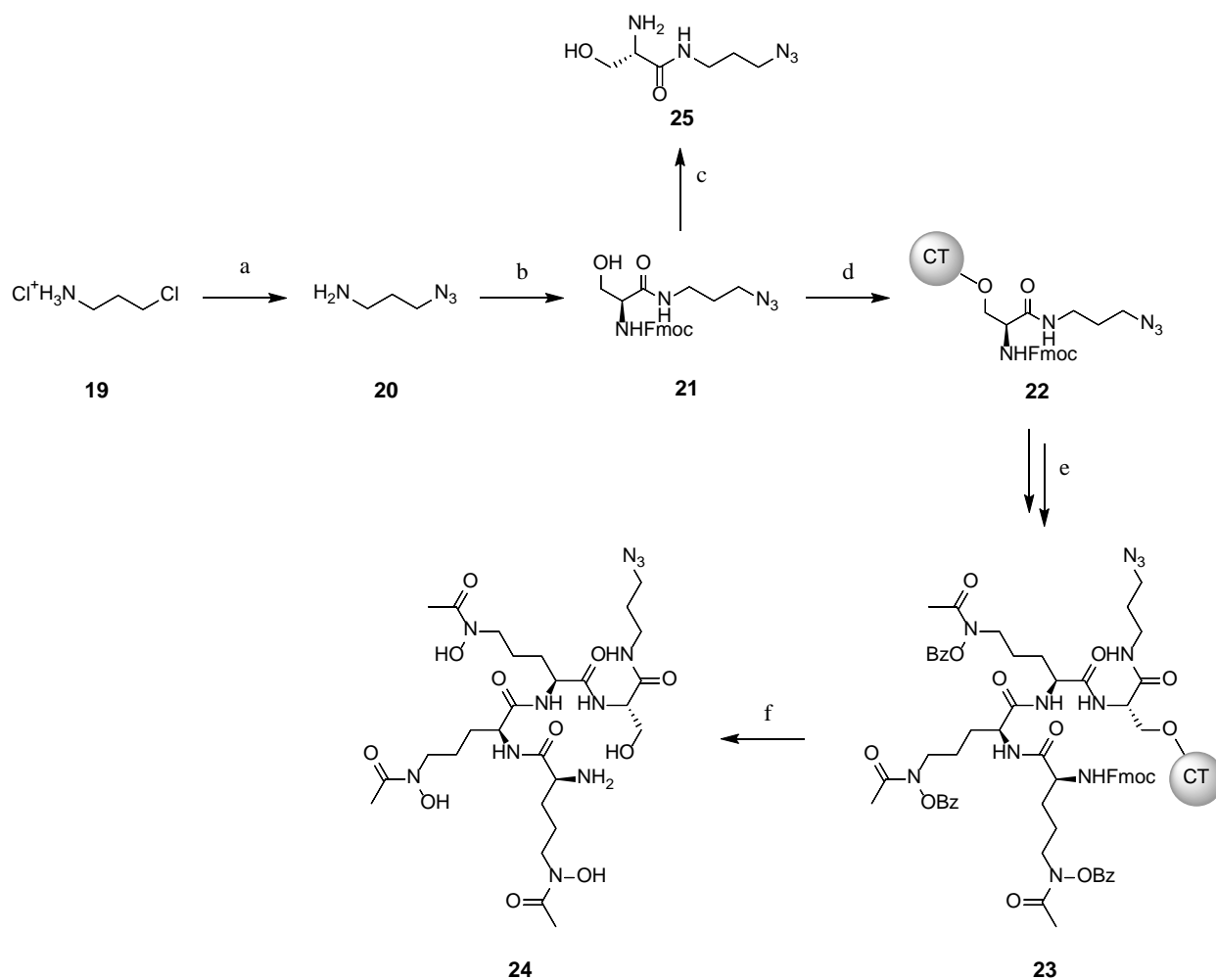


Схема 2.7 – Реагенти та умови: (a) NaN_3 , H_2O , 80°C , 15 год.; (b) Fmoc-Ser-OH, NATU, DIPEA, ДМФ, 0°C потім КТ, 4 год.; (c) Диетиламін, ТГФ, КТ, 3 год.; (d) **CTBr** полімер, ДХМ, DIPEA, КТ, 30 хвилин; (e) SPPS: Зняття захисту: 2-метилпіперидин (20% в ДМФі), КТ, 25 хвилин; умови для каплінгу: **18**, НВТУ, DIPEA, КТ, 1.5 год.; 3 цикли; (f) 1) 1М LiOH в ТГФ:MeOH (1:1), 2*30 хвилин, 2) TFA/ H_2O /TIPS (95/2.5/2.5), 1 год.

Також на цій схемі наведено синтез сидерофору **24**, який було отримано методом твердофазного синтезу. Для цього спочатку речовина **21** була нанесена на підкладку. Спочатку ми спробували провести реакцію нанесення використовуючи хлортритил хлоридний полімер (**CTCl**) в якості підкладки, однак через недостатню активність атому Хлору виходи були досить низькими, близько 25%, тоді ми вирішили модифікувати хлортритил гідроксидний полімер (**CTOH**) модифікувавши його в відповідний бромід (**CTBr**) за схемою 2.8:

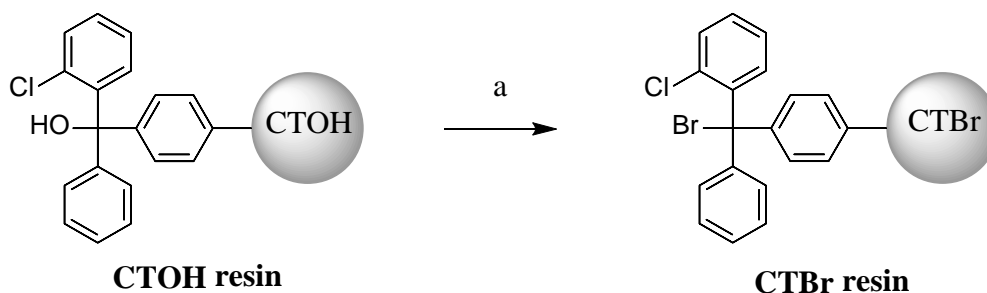


Схема 2.8 – Реагенти та умови: (а) AcBr, ДХМ, КТ, 30 хвилин.

Використовуючи даний полімер нам вдалося вдвічі покращити конверсію речовини **22**, яка і стала основою для твердофазного синтезу. Сам твердофазний синтез був включав по три цикли зняття флуоренілметилоксикарбонільного захисту (Fmoc) та три цикли каплінгу. Для зняття Fmoc захисту з азоту було використано розчин 2-метилпіперидин, адже при використанні розчину метилпіперидину, який є стандартним реагентом для такого типу реакцій, ми спостерігали зняття бензильного захисту паралельно з захисною групою Fmoc, що не дозволяло провести каплінг, через високу нуклеофільність незахищеного кисню гідроксиламінової групи. Однак при використанні більш стерично утрудненого 2-метилпіперидину нам вдалось повністю уникнути такої побічної реакції.

Після 3 циклів каплінгу і отриманні речовини **23**, було проведено реакцію з комплексного зняття усіх захисних груп, а саме 3 бензильних захистів з атомів кисню та однієї Fmoc-групи, для цього було використано 1М розчин LiOH в системі метанол/ТГФ. Далі молекула сидерофору **24** була від'єднана від підкладки за допомогою трифтороцтової кислоти. Після ліофілізації молекула **24** була отримана з чистотою 90% і виходом більше 90%, що дозволяло використовувати її в наступній реакції утворення кон'югату без попередньої очистки. Також хочеться відмітити, що такий метод синтезу є дуже швидким, адже один цикл: зняття захисту та каплінг, триває лише 2 години. При виконанні такого синтезу у розчині такий цикл зайняв би значно більше часу та вимагав би очистки, як це було показано в попередніх дослідженнях [43].

Для отримання речовини **25** було використано стандартну методику зняття захисту з Fmoc-серину. Ця речовина, після циклоприєднання до антибіотику **29** слугувала гарним стандартом для дослідження та порівняння активності кон'югатів **31** та **32**.

Для синтезу сидерофору **28** було використано прекурсор **26**, який вдалося перетворити в **27** за допомогою VBr_3 . Після каплінгу сполуки **27** з речовиною **20**, як наведено на схемі 2.9, вдалося утворити необхідний сидерофор **28** за високим виходом та чистотою близько 90%, що також дозволяло використати його в наступній реакції без попередньої очистки.

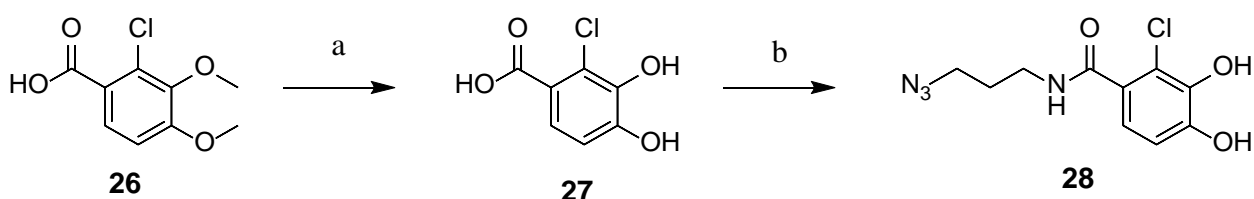


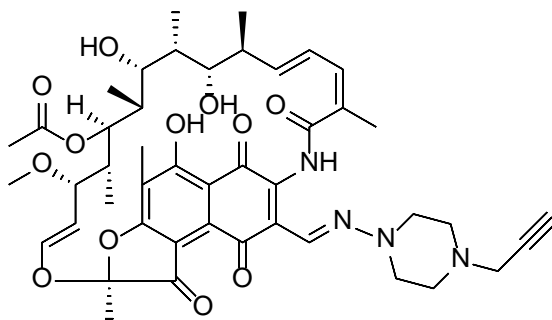
Схема 2.9 – Реагенти та умови: (a) VBr_3 , ДХМ, 0°C до КТ, 3 год.; (b) НОВт, DIPEA, **20**, EDC*HCl, ДХМ, КТ, 4 год.

Цікаво відзначити, що при заміні стадій **(b)** та **(a)** на схемі 2.9 місцями, стадія каплінгу проходила з високим виходом, однак при подальшому знятті метильного захисту ми спостерігали дуже низький вихід сполуки **28**, через це такий підхід виявився неефективним.

2.3 Синтез кон'югатів

Для синтезу кон'югатів сидерофор-рифампіцин **31**, **32** та сполуки **30**, дослідження якої повинно показати активність розщепленого в середині бактерії кон'югату **31**, було використано реакцію [3+2] циклоприєднання між азидною групою сидерофорів та алкіновим фрагментом рифампіцину. Модифікований рифампіцин **29** з алкіновим фрагментом був синтезований аспіранткою інституту біології Лейденського університету Мейлін Гао за попередньо описаною в розділі 1 схемою 1.2 [45].

Для каплінгу було обрано речовини **24**, **25** та **28**, які були приєднанні до сполуки **29** за схемою 2.10. Для реакції циклоприєднання було обрано дещо не стандартні умови, а саме використано аскорбінову кислоту. При проведенні даного експерименту з натрієвою сіллю аскорбінової кислоти було помічено значне утворення окисненого аналогу рифампіцину **33** (рис. 2.4), який також вступав в реакцію циклоприєднання, що суттєво впливало на вихід реакції та ускладнювало очистку фінальних кон'югатів. Такий процес перетворення гідрохінонового фрагменту рифампіцину в хіноновий вже був відомий та описаний у декількох роботах [49, 50], та як було зауважено в цих роботах в кислих умовах процес окиснення відбувається значно повільніше.



33

Рисунок 2.4 – Окиснений аналог рифампіцину.

Тому при використанні аскорбінової кислоти разом з сульфатом міді та зменшенні часу реакції до двох годин за рахунок невеликого нагрівання нам вдалося досягти гарних виходів сполук **30**, **31** та **32**, які становили близько 50% для цих речовин після очистки методом вискоефективної рідинної

хроматографії. Варто зауважити, що реакційний розчин був очищений без виділення, адже як розчинник була використана система вода/третбутиловий спирт, яку можна використовувати при очистці на оберненій фазі.

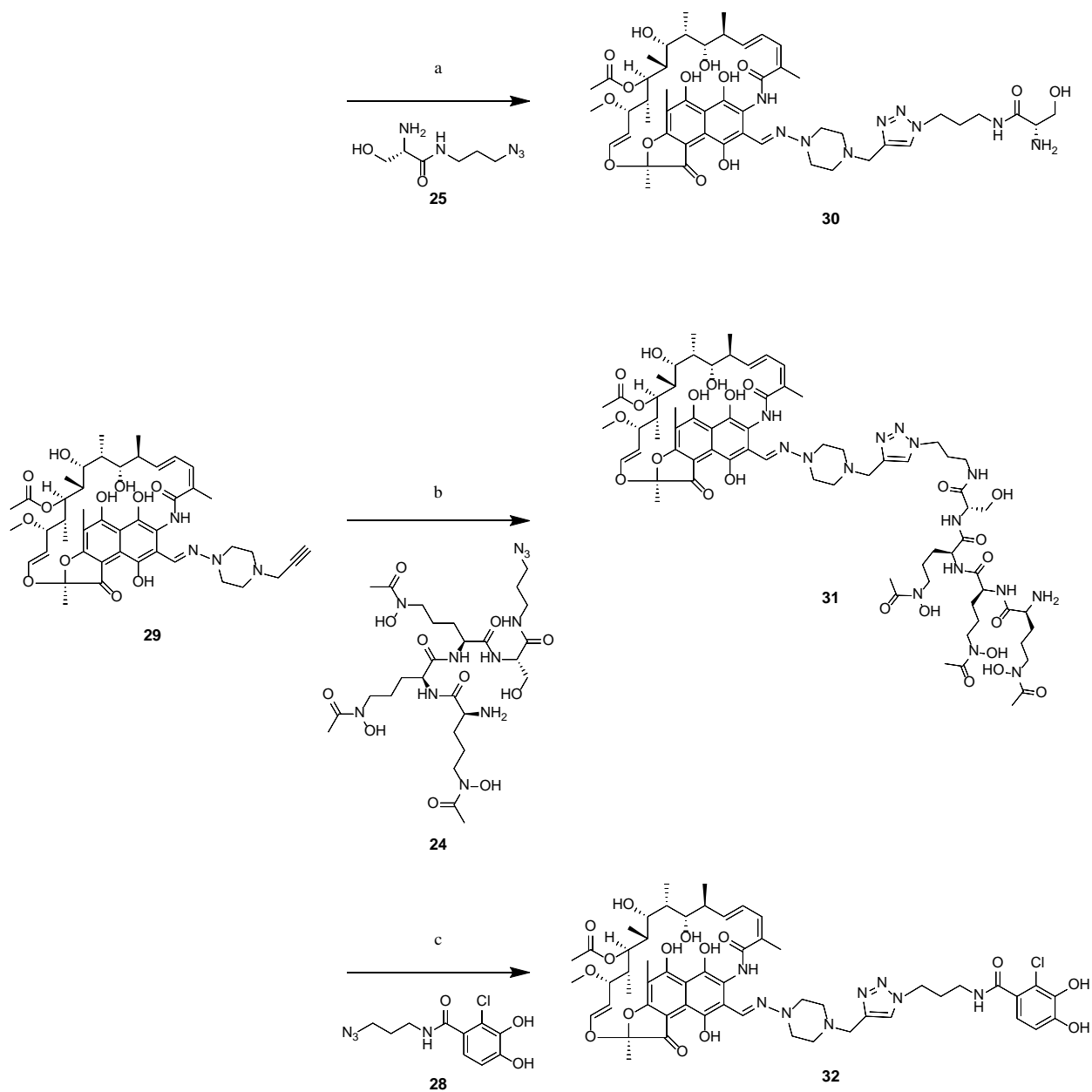
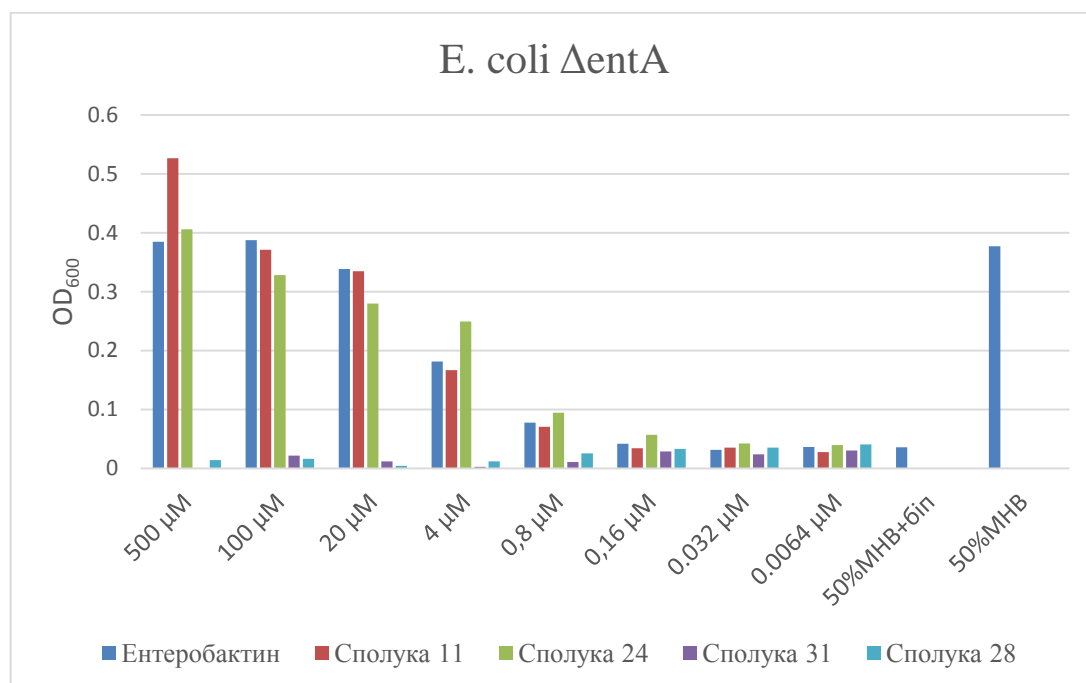


Схема 2.10 – Реагенти та умови: (a) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Аскорбінова кислота, **25**, $\text{H}_2\text{O}/t\text{-BuOH}(1:1)$, 50°C , 2 год.; (b) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Аскорбінова кислота, **24**, $\text{H}_2\text{O}/t\text{-BuOH}(1:1)$, 50°C , 2 год.; (c) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Аскорбінова кислота, **28**, $\text{H}_2\text{O}/t\text{-BuOH}(1:1)$, 50°C , 2 год.

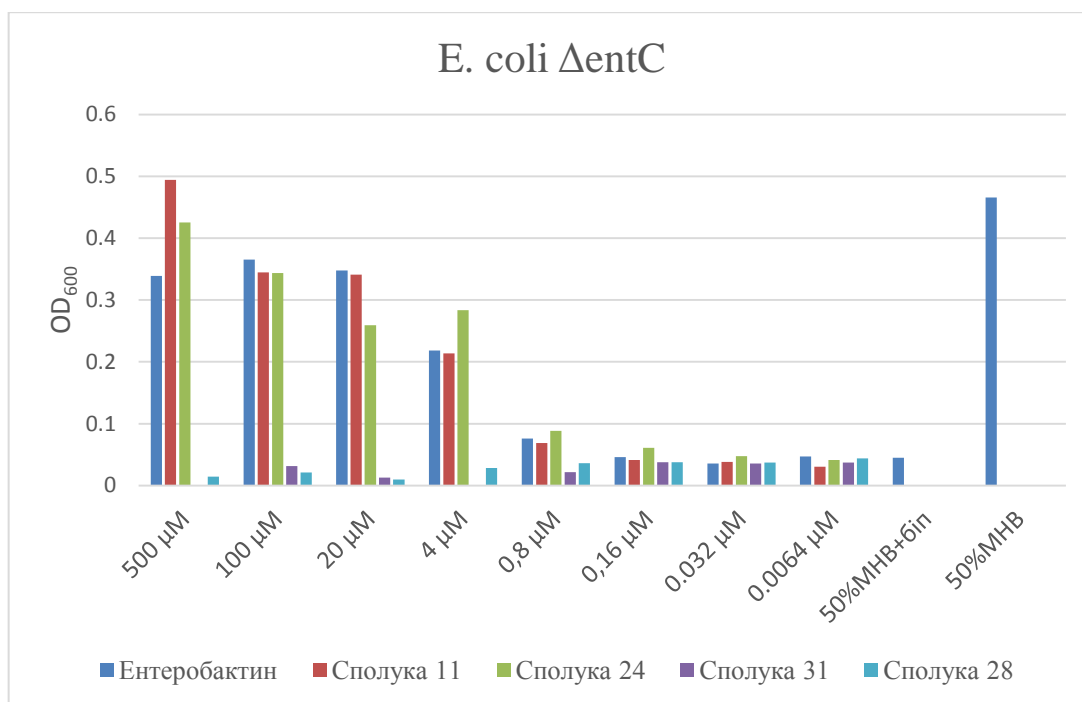
2.4 Експерименти з відновлення росту бактерій

Щоб перевірити можливість синтезованих нами сидерофорів, а саме ентеробактину та сполук **11**, **24**, **28**, **31** транспортувати залізо в середину клітини було проведено серію експериментів, які базувались на попередньо розроблених методиках [51]. Для цього було обрано два штами бактерій, які не здатні синтезувати сидерофор – *E. coli* Δ entA та *E. coli* Δ entC. В даному випадку ці бактерії не здатні синтезувати ентеробактин, а тому не можуть жити в середовищі з малою концентрацією заліза. Для створення такого середовища ми обрали наполовину розбавлену водою мікстуру Мюллера-Хінтона (МНВ) та додали до неї 2,2-біпіридин, що зв'язати усе залізо та зробити його недоступним для бактерій.

Щоб приготувати широкий спектр розчинів сидерофорів різної концентрації було використано метод розбавлень. Ріст бактерій було перевірено визначаючи OD_{600} – оптичну густину розчину при довжині хвилі 600 нм. Отримані результати експерименту наведено на графіках 2.1 та 2.2:



Графік 2.1 – Експеримент з відновлення росту бактерії *E. coli* Δ entA.



Графік 2.2 – Експеримент з відновлення росту бактерії *E. coli* ΔentC.

Як можна помітити результати експерименту на обох штаммах є майже однаковими. За відсутності 2,2-біпіридину в 50%МНВ бактерії зростають без проблем, однак при додаванні цієї хелатуючої добавки (50% МНВ+біпіридин), яка зв'язує залізо, розмноження бактерій припиняється. Слід відмітити, що загалом ентеробактин та сполуки **11**, **24** проявляють майже однакову здатність до відновлення росту бактерій, однак за високих концентрацій сполука **11** все ж показує кращі результати. З іншого боку сполука **24** на обох штаммах показала кращі результати за порівняно низької концентрації 4 мікромолі на літр, ніж ентеробактин та сполука **11**.

Пояснити неможливість сполуки **28** до відновлення росту бактерій можна тим, що вона досить мала, щоб цілком захопити йон заліза, тому може лише прикоординуватись до нього, тобто існує в комплексі з 2,2-біпіридином і не здатна переносити залізо в бактерію.

Для сполуки **31** дослідження за концентрації 500 мікромоль/л не проводили, адже за такої концентрації вона здатна зупиняти розмноження бактерій. Сполука **31** не відновила розмноження бактерій, одним з пояснень може бути те, що бактерія не здатна розпізнавати та переносити за сидерофорним механізмом таку велику молекулу.

2.5 Антибактеріальні дослідження

Значення МІК сполук **29, 30, 31, 32** були вибірково перевірені на семи грамнегативних бактеріях, включаючи *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* BW25113, *E. coli* BW25113 Δ entA, *E. coli* BW25113 Δ entC, *E. coli* BW25113 Δ ferA, і двох грампозитивних, *S.aureus* ATCC 29213, *S.aureus* USA 300. Концентрації масштабувались методом розведення, а в якості позитивного контролю використовували наступні антибіотики: рифампіцин, цефтазидим та колістин.

На першому етапі ми вирішили перевірити ефективність ключового кон'югату **31** проти деяких штамів грамнегативних бактерій, а саме *E. coli* BW25113, *E. coli* BW25113 Δ entA (заблокований один з генів необхідних для синтезу ентеробактину), *E. coli* BW25113 Δ entC (заблокований один з генів необхідних для синтезу ентеробактину), *E. coli* BW25113 Δ ferA (заблокований ген необхідний для транспорту сидерофорів в середину бактерії). Також в ході цих досліджень було проведено декілька цікавих порівнянь. По-перше, було досліджено дію ентеробактину на ефективність антибіотиків та сполуки **31**. По-друге, було перевірено можливість використання 2,2-біпіридину в якості речовини, яка б зв'язала залізо, адже мікстура ID-САМНВ (Мікстура Мюллера-Хінтона з додаванням кальцію та зі зменшеною кількістю заліза) є досить дорогою. Отримані дані наведено в таблиці 2.1.

В першу чергу слід відмітити, що значної різниці між використанням мікстури ID-САМНВ та звичайної САМНВ з додавання 2,2-біпіридину виявлено не було, тобто додавання 2,2-біпіридину впливає лише на концентрацію заліза в розчині і не шкодить бактерії. Також варто додати, що додавання ентеробактину не вплинуло на активність досліджуваних сполук, однак можна помітити, що ентеробактин допомагав бактеріям зростати, що пояснюється його участю в транспорті заліза. Щодо активності цільового

кон'югату, то він проявив значно гіршу ефективність в інгібуванні росту та розмноження бактерій, ніж немодифікований рифампіцин.

Таблиця 2.1 – Значення МІК для сполуки **31**, рифампіцину, колістину та цефтазидину в мкг/мл проти різних штамів бактерії *E. coli*.

Штам бактерій	ID-САМНВ				САМНВ + 2,2-біпіридин (100 μМ)			
	31	Риф.	Кол.	Цеф.	31	Риф.	Кол.	Цеф.
	Без додавання ентеробактину							
<i>E. coli</i> BW25113	>128	8	0.5	0.5	>128	8	0.5	0.5
<i>E. coli</i> BW25113 ΔentA	>128	8	0.5	0.25	>128	4	0.5	0.5
<i>E. coli</i> BW25113 ΔentC	>128	8	0.5	0.5	>128	8	0.5	0.5
<i>E. coli</i> BW25113 ΔferA	>128	16	0.5	0.5	>128	8	0.5	0.5
З додаванням ентеробактину (8 мкг/мл)								
<i>E. coli</i> BW25113	>128	8	0.5	0.5	>128	16	0.5	0.5
<i>E. coli</i> BW25113 ΔentA	>128	16	0.5	0.5	>128	16	0.5	0.5
<i>E. coli</i> BW25113 ΔentC	>128	8	0.5	0.5	>128	16	0.5	0.5
<i>E. coli</i> BW25113 ΔferA	128	4	0.5	0.125	>128	4	0.5	0.5

В наступному досліді було порівняно ефективність кон'югатів **30**, **31**, **32** з рифампіцином проти грамнегативних та грампозитивних бактерій (таблиця 2.2). Як можна побачити з результатів, кон'югат **31** знову проявив значну нижчу активність ніж рифампіцин, як у випадку граменативних, так і проти грампозитивних бактерій. Сполука **30** була використана, щоб показати активність вивільненого гідролізом сполуки **31** модифікованого рифампіцину (схема 2.11). Ця речовина також показали надзвичайно нижчу активність проти бактерій, ніж рифампіцин, що може свідчити про те, що застосування обраного нами серинового лінкеру значно знижує активність досліджуваного антибіотику.

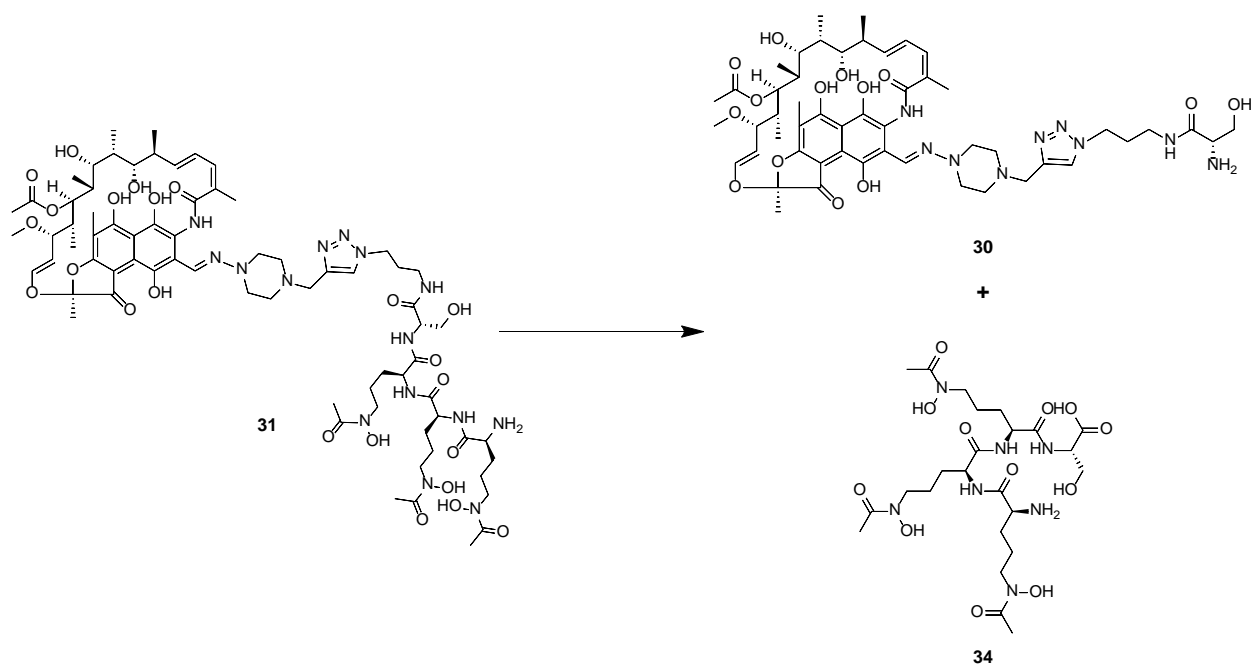


Схема 2.11 – Запропонований гідроліз сполуки **31** в цитоплазмі бактерії

Кон'югат **32** також виявився неактивним проти грампозитивних бактерій. Однак можна зауважити, що він проявив себе значно краще проти грамнегативних бактерій, для деяких штамів показав навіть кращий результат за рифампіцин. Особливо це помітно на штамх *E. coli* BW25113 Δ entA, *E. coli* BW25113 Δ entC, що може свідчити про те, що сполука **32** використовує сидерофорний транспорт для проникнення в середину бактерії.

Таблиця 2.2 – Значення МІК для сполук **30**, **31**, **32** та рифампіцину в мкг/мл проти різних штамів бактерій.

ID-CAMNB(0.5 mM Mg ²⁺ and Ca ²⁺)				
	30	31	32	Рифампіцин
Грамнегативні бактерії				
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>64	>64	16	8
<i>E. coli</i> BW 25113	32	>64	4	8
<i>E. coli</i> BW25113 Δ entA	-	>64	4	16
<i>E. coli</i> BW25113 Δ entC	-	>64	4	16
<i>E. coli</i> BW25113 Δ fepA	-	>128	-	16
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>64	>64	>64	32
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	>64	>64	>64	64
Грампозитивні бактерії				
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.125	0.5	0.5	≤ 0.0625
<i>S. aureus</i> USA 300	0.5	0.5	1	≤ 0.0625

Для підтвердження того, що модифікований рифампіцин **30** і справді є неактивним варіантом антибіотику, було вирішено провести протимікробні дослідження сполук **29**, **30**, **31**, **32** та рифампіцину у присутності PMBN (поліміксин Б нонапептид), ця сполука здатна руйнувати структуру бактеріальної клітинної мембрани діючи на її фосфоліпіди, тобто вона руйнує зовнішню стінку грамнегативних бактерій роблячи їх більш вразливими до антибіотиків. Результати цих досліджень наведені в таблиці 2.3:

Таблиця 2.3 – Значення МІК для сполук **29**, **30**, **31**, **32** та рифампіцину в мкг/мл проти різних штамів бактерій при концентрації РМВН (8 мкг/мл).

САМНВ(0.5 мМ Mg ²⁺ and Ca ²⁺) + РМВН					
	29	30	31	32	Рифампіцин
<i>E. coli</i> ATCC 25922	≤0.5	32	-	8	≤0.5
<i>E. coli</i> BW 25113	0.25	64	32	8	0.25
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	1	-	64	-	1
<i>A. baumannii</i> 17978	0.0625	-	64	-	0.0625

Результати показують, що сполука **29** проявляє однакову активність з рифампіцином, що означає, що включення алкінового фрагменту не впливає на активність антибіотику. Однак сполука **30** вже не є ефективною в порівнянні з рифампіцином, тобто включення серинового лінкеру в структуру антибіотику знижує його активність. Кон'югат **32** теж показав значно нижчу активність в порівнянні з рифампіцином,

Розділ 3. Експериментальна частина

Усі реагенти, які були використані в даній роботі були комерційно доступними і використовувалися без додаткового очищення, якщо не вказано інше. Для характеристики фінальних кон'югатів проводили мас-спектрометрію високої роздільної здатності (HRMS) на системі UHPLC Shimadzu Nexera X2 з колонкою Waters Acquity HSS C18 (2.1 × 100 мм, 1.8 мкм) при 30 °C з детектором із діодною матрицею. При швидкості потоку 0.5 мл/хв використовували систему розчинників з розчинником А: 0.1% мурашиної кислоти у воді та розчинником В: 0.1% мурашиної кислоти в ацетонітрилі. Градієнтне елюювання було таким: 95:5 (А/В) протягом 1 хвилини, 95:5 до 15:85 (А/В) протягом 6 хвилин, 15:85 до 0:100 (А/В) протягом 1 хвилини, 0:100 (А/В) протягом 3 хвилин, потім повернення до 95:5 (А/В) протягом 3 хвилин. Ця система була під'єднана до мас-спектрометра Shimadzu 9030 QTOF (іонізація ESI), відкаліброваного внутрішньо за допомогою набору еталонних масових розчинів. Чистоту та підтвердження синтезу будівельних блоків малих молекул оцінювали за допомогою ядерного магнітного резонансу (ЯМР) та LC-MS. Спектри ЯМР були отримані для розчинів сполук у дейтерохлороформі, дейтероводі чи дейтеродиметилсульфоксиді з використанням ТМС в якості внутрішнього стандарту. Хроматомас-спектрометричні дослідження проводились на LC-MS інструменті (хімічна іонізація (CI)).

Сполуки очищали за допомогою препаративної вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з використанням системи BESTA-Technik з колонкою Dr. Maisch Reprosil Gold 120 C18 (25 × 250 мм, 10 мкм) та з УФ-детектором ECOM Flash для моніторингу при 214 нм. Усі очистки проводили зі швидкістю потоку 12 мл/хв і використовували: розчинник А: 0.1 % TFA у воді/ацетонітрилі 95/5; розчинник В: 0.1 % TFA у воді/ацетонітрилі 5/95. Для очистки використовували методи зазначені в методиках.

Чистоту кон'югатів після каплінугу азид-алкін оцінювали шляхом інтегрування фракцій та підтверджували, що вона становить >95%, за

допомогою аналітичної ВЕРХ з оберненою фазою (RP-HPLC) з використанням системи Shimadzu Prominence-і LC-2030 з колонкою Dr. Maisch ReproSil Gold 120 C18 (4.6 × 250 мм, 5 мкм) при 30 °С та з УФ-детектором для моніторингу при 214 нм. При швидкості потоку 1 мл/хв використовували систему розчинників з розчинником А: 0.1% ТФА у воді/ацетонітрилі 95:5 і розчинником В: 0.1% ТФА у воді/ацетонітрилі 5:95. Градієнтне елюювання було таким: 95:5 (А/В) протягом 2 хвилин, від 95:5 до 0:100 (А/В) протягом 55 хвилин, 0:100 (А/В) протягом 2 хвилин, потім повернення до 95:5 (А/В) протягом 1 хвилини, 95:5 (А/В) протягом 2 хвилин.

Бензил 2,3-біс(бензилокси)бензоат (2). До розчину 2,3-дигідроксибензойної кислоти (**1**) (5 г, 32.4ммоль, 1 екв.) та бензилброміду (19.4 г, 113.4 ммоль, 3.5 екв.) у ДМФА (40 мл) додали подрібнений K_2CO_3 (22.4 г, 162 ммоль, 5 екв.). Після перемішування протягом 16 год реакцію загасили 200 мл H_2O та отриманий розчин проекстрагували $EtOAc$ (2×150 мл). Об'єднані органічні шари промили насиченим розчином NH_4Cl (150 мл), водою (2×150 мл) і брайном (100 мл), посушили над безводним Na_2SO_4 та розчинники були видалені у вакуумі для одержанням сполуки **2**, яку використали у наступній стадії без додаткового очищення. LCMS: $[M+H^+] = 425.2$.

2,3-біс(бензилокси)бензойна кислота (3). Бензил 2,3-біс(бензилокси)бензоат (**2**) розчинили в суміші $MeOH$ (150 мл) і 6 М водного розчину $NaOH$ (30 мл) і перемішували протягом 15 год при кімнатній температурі. Потім метанол випарили і отриманий розчин розбавили H_2O (100 мл), промили Et_2O (2×60 мл) і підкислили водним розчином HCl з утворенням білого осаду. Осад відфільтровували і промили H_2O (2×20 мл) для одержання сполуки **3** (10.2 г, вихід 94% після 2 стадій) у вигляді білого порошку. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.39 (br s, 1H), 7.74 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 1H), 7.52 – 7.35 (m, 6H), 7.38 – 7.31 (m, 4H), 7.30 – 7.15 (m, 2H), 5.27 (s, 2H), 5.20 (s, 2H). LCMS: $[M+H^+] = 335.1$.

2,2-дибутил-1,3,2-діоксастаннолан (5). Етиленгліколь (11.23 мл, 200 ммоль, 5 екв.) додали до розчину дибутилстаннанону (4) (10 г, 40.2 ммоль, 1 екв.) у толуені (50 мл) при 25 °С. Реакційну суміш перемішували при кип'ятінні зі зворотним холодильником протягом 5 годин. Після поступового охолодження від 110 °С до 20 °С осад утворився осад, який відфільтрували, промили толуеном і посушили при 40 °С у вакуумі з одержанням сполуки **5** (9.9 г, вихід 84%) у вигляді білого порошку. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.64 (s, 4H), 1.82 – 1.61 (m, 4H), 1.47 – 1.29 (m, 8H), 0.94 (t, $J = 7.3$ Hz, 6H).

Метилтритил-L-серинат (7). До суспензії гідрохлориду метилового ефіру L-серину (6) (5 г, 32.2 ммоль, 1 екв.) у 50 мл метилену при 0 °С додали по краплях триетиламін (9 мл, 64.4 ммоль, 2.0 екв.), а потім розчин трифенілметил хлориду (8.96 г, 32.2 ммоль, 1 екв.) в 20 мл метилену. Після перемішування при кімнатній температурі протягом 15 годин утворений білий осад відфільтровували і фільтрат випарювали у вакуумі з одержанням білої твердої речовини, яку розчили в EtOAc (200 мл) і промили 10% лимонною кислотою (2×100 мл), насиченим розчином NaHCO_3 (100 мл) і водою (2*100 мл). Відокремлений органічний шар посушили над Na_2SO_4 , фільтрували та сконцентрували у вакуумі. Неочищений продукт перекристалізували з гексану з одержанням сполуки **7** (10 г, вихід 86%) у вигляді білого порошку. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.56 – 7.44 (m, 6H), 7.39 – 7.26 (m, 6H), 7.30 – 7.17 (m, 3H), 3.75 (dd, $J = 10.4, 4.2$ Hz, 1H), 3.61 – 3.57 (m, 2H), 3.33 (s, 3H), 3.01 (brs, 1H), 2.34 (brs, 1H). LCMS: $[\text{M}+\text{H}^+] = 362.2$.

(3S,7S,11S)-3,7,11-трис(третиламіно)-1,5,9-триоксациклододекан-2,6,10-тріон (8). До розчину метилтритил-L-серинату (7) в 150 мл сухого толуену додали молекулярні сита (20 г) і 2,2-дибутил-1,3,2-діоксастаннолан (5) (0.41 г, 1.4 ммоль, 0.1 екв.). Отриману суміш перемішували при кип'ятінні зі зворотним холодильником протягом 60 год. Потім толуен випарили, а залишок розчинили в ксилолі і перемішували ще 15 зі зворотним холодильником при 140 °С. Отриману суміш охолодили до кімнатної температури, відфільтрували через шар цеоліту і промили 100 мл толуену.

Потім фільтрат вилили, а шар цеоліту промили теплим метиленом (5×150 мл). Фільтрат випарили, а отриману в'язку рідину затерли в МТБЕ (25 мл) для отримання осаду, який відфільтрували та промили МТБЕ (10 мл) з отриманням сполуки **8** (2.2 г, вихід 48%) у вигляді жовтуватого порошку. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.51 (d, $J = 7.5$ Hz, 18H), 7.40 – 7.20 (m, 27H), 4.12 (t, $J = 10.6$ Hz, 3H), 3.52 (ddd, $J = 19.2, 10.5, 4.1$ Hz, 6H), 2.70 (br s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 172.47, 145.38, 128.75, 128.12, 126.72, 71.43, 66.77, 54.46. LCMS: $[\text{M}+\text{H}^+] = 988.4$.

(3S,7S,11S)-3,7,11-триаміно-1,5,9-триоксациклододекан-2,6,10-тріон тригідрохлорид (9). Безводний розчин HCl готували реакцією ацетилхлориду (0.35 мл, 4.86 ммоль, 4 екв.) та сухого етанолу (30 мл). Потім розчин (3S,7S,11S)-3,7,11-трис(третиламіно)-1,5,9-триоксациклододекан-2,6,10-тріон (**8**) (1.2 г, 1.21 ммоль, 1 екв.) у сухому етанолі (10 мл) додали до розчину HCl і кип'ятили протягом 30 хвилин. Отриману суміш сконцентрували до 15 мл під вакуумом і охолодили на крижаній бані. Отриману тверду речовину фільтрували, промили холодним сухим етанолом (5 мл), CHCl_3 (15 мл), а потім Et_2O (2×15 мл) і посушили з отриманням сполуки **9** (0,39 г, вихід 87%) у вигляді бежевого порошку. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.28 (s, 9H), 5.12 (dd, $J = 12.5, 2.0$ Hz, 3H), 4.63 (d, $J = 2.5$ Hz, 3H), 4.31 (dd, $J = 12.4, 2.7$ Hz, 3H).

N,N',N'' -((3S,7S,11S)-2,6,10-триоксо-1,5,9-триоксоциклододекан-3,7,11-трііл)трис(2,3-біс(бензилокси)бензамід) (10). (3S,7S,11S)-3,7,11-триаміно-1,5,9-триоксациклододекан-2,6,10-тріон тригідрохлорид (**9**) (0.38 г, 1.03 ммоль, 1 екв.) суспендували в безводному метилені (12 мл) і додали триетиламін (0.5 мл, 4.61 ммоль, 4.5 екв.) в атмосфері азоту. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 10 хв. Потім в окремій круглодонній колбі розчинили суміш 2,3-біс(бензилокси)бензойної кислоти (**3**) (1.2 г, 3.59 ммоль, 3.5 екв.) і $\text{NOBt}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0.785 г, 5.13 ммоль, 5 екв.) в безводному метилені (20 мл), з подальшим додаванням 1,3-диізопропілкарбодіміду (0.65 г, 5.13 ммоль, 5 екв.), даний рочин

перемішували при кімнатній температурі протягом 20 хв ф атмсфері азоту. Потім ці два заготовлені розчини змішали та залишили перемішуватись протягом ночі при кімнатній температурі. Після цього суміш розбавили 20 мл метилену та 50 мл води. Після екстракції органічний шар відокремили, промили 1М розчином HCl (25 мл), насиченим розчином NaHCO₃ (25 мл), водою (25 мл) і брайном (15 мл), посушили над Na₂SO₄ і сконцентрували у вакуумі. Отриману смолисту рідину очистили методом колонкової хроматографією на силікагелі (EtOAc/PE) з одержанням сполуки **10** (0.8 г, вихід 65%) у вигляді безбарвної рідини. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.47 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 7.66 (dd, J = 6.8, 2.8 Hz, 3H), 7.45 – 7.30 (m, 16H), 7.32 – 7.24 (m, 5H), 7.24 – 7.06 (m, 15H), 5.18 – 5.04 (m, 12H), 4.91 (td, J = 7.7, 4.6 Hz, 3H), 4.16 (dd, J = 10.8, 4.6 Hz, 3H), 4.01 (dd, J = 10.9, 8.1 Hz, 3H). LCMS: [M+H⁺] = 1210.4.

Ентеробактин. N,N',N''-((3S,7S,11S)-2,6,10-триоксо-1,5,9-триокса циклодекан-3,7,11-триїл)трис(2,3-біс(бензилокси)бензамід) (**10**) (0.75 г, 0.62 ммоль, 1 екв.) розчиняли в суміші EtOH (5 мл) і EtOAc (5 мл) і гідрували в круглодонній колбі при постійному перемішуванні в атмосфері водню (1 атм) протягом 24 год з використанням 10 % Pd/C (75 мг) як каталізатора. Каталізатор відфільтровували і промили дво порціями метанолу по 15 мл, потім розчинники видали у вакуумі, і продукт повторно переупарили з метанолом для отримання **ентеробактину** (360 мг, вихід 87%, 20-30 мольних відсотків MeOH у кристалах) у вигляді білого порошку.

Після перебування в холодильнику з деякою кількістю MeOH в кристалах **ентеробактин** прореагував з MeOH, для очистки цієї суміші було використано препаративну ВЕРХ з наступним градієнтним елююванням: 80:20 (A/B) протягом 5 хв, 80:20 до 30:70 (A/B) протягом 50 хв, 30:70 до 0:100 (A/B) протягом 1 хв. , 0:100 (A/B) протягом 2 хвилин, потім повернення до 95:5 (A/B) протягом 1 хвилини, 95:5 (A/B) протягом 2 хвилин. Фракції негайно висушували заморожуванням і потім аналізували за допомогою LCMS. Фракції, що містять чистий продукт, повторно розчинили, об'єднали

та ліофілізували з одержанням **ентеробактину** (278 мг, вихід 67%) та **(S)-2-(2,3-дигідроксибензамідо)-3-((S)-2-(2,3)-дигідроксибензамідо)-3-метокси-3-оксопропокси)-3-оксопропіл (2,3-дигідроксибензоїл)-L-серинат (11)** (52 мг) у вигляді білого порошку.

Ентеробактин: ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.63 (br s, 3H), 9.43 (br s, 3H), 9.11 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 7.34 (dd, $J = 8.2, 1.5$ Hz, 3H), 6.96 (dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz, 3H), 6.74 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H), 4.90 (ddd, $J = 9.3, 6.9, 4.6$ Hz, 3H), 4.64 (dd, $J = 10.9, 9.3$ Hz, 3H), 4.39 (dd, $J = 10.9, 4.5$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 169.95, 169.42, 149.05, 146.62, 119.74, 118.91, 118.74, 115.71, 63.87, 51.75. LCMS: $[\text{M}+\text{H}^+] = 670.1$.

Речовина 11: ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.74 (d, $J = 9.7$ Hz, 2H), 11.59 (s, 1H), 9.42 (br s, 3H), 9.14 (dd, $J = 14.4, 7.5$ Hz, 2H), 8.93 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.37 (dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 1H), 7.32 (td, $J = 8.3, 1.5$ Hz, 2H), 7.01 – 6.92 (m, 3H), 6.72 (td, $J = 8.0, 3.6$ Hz, 3H), 4.89 (qd, $J = 7.4, 4.6$ Hz, 2H), 4.60 (dt, $J = 10.8, 4.3$ Hz, 3H), 4.45 (ddd, $J = 11.5, 6.8, 4.9$ Hz, 2H), 3.87 – 3.73 (m, 2H), 3.63 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 170.36, 169.82, 169.56, 169.53, 169.07, 168.90, 149.14, 148.63, 146.57, 146.48, 119.63, 119.31, 119.07, 118.84, 118.76, 118.63, 118.60, 116.41, 115.73, 64.05, 63.48, 61.20, 55.62, 52.84, 51.96, 51.86. LCMS: $[\text{M}+\text{H}^+] = 702.2$.

N,N'-диізопропіл-третбутилізосечовину (13). 1,3-діізопропілкарбодимід **(12)** (34.38 г, 273 ммоль, 1 екв.) розчинили в безводному tBuOH (33.34 мл, 352 ммоль, 1.29 екв.) і потім додали CuCl (0.327 г, 33 ммоль, 0.12 екв.). Суспензію перемішували при кімнатній температурі протягом 20 год в атмосфері азоту. Невелику аліквоту реакційної суміші відбирали, щоб перевірити, чи завершилася реакція за допомогою ^1H ЯМР-спектроскопії. Отриману сполуку **13** використовували для наступної стадії етерифікації без додаткового очищення. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 3.80-3.58 (m, 1H), 3.31-2.97 (m, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.19-1.01 (m, 12H).

Трет-бутил(S)-5-(((бензилокси)карбоніл)аміно)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)пентаноат (14). У 500 мл колбу, оснащену

мішалкою, додали 120 мл метилену, а потім (S)-5-(((бензилокси)карбоніл)аміно)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)пентанову кислоту (10 г, 27.3 ммоль, 1 екв.). До цього розчину додали свіжоприготовлену N,N'-диізопропіл-третбутилізосечовину (**13**) (54.69 г, 273 ммоль, 10 екв.) і реакційну суміш помістили в баню при 40°C. Реакційну суміш перемішували протягом ночі при 40°C і потім охолодили до кімнатної температури. Суміш сконцентрували у вакуумі і неочищений продукт додали до охолодженого 1M розчину HCl (300 мл) і проекстрагували EtOAc (400 мл). Органічний шар промили брайном (150 мл) і сконцентрували. Отриманий продукт очистили колонковою хроматографією (30% EtOAc/PE, Rf = 0.3) з одержанням сполуки **14** (11.2 г, вихід 95%) у вигляді безбарвної рідини. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38-7.29 (m, 5H), 5.09 (s, 2H), 5.06 (bs, 1H), 4.88 (bs, 1H), 4.18-4.15 (m, 1H), 3.22 (q, J = 6.4 Hz, 2H), 1.85-1.5 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.44 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 27.78, 28.31, 28.49, 30.32, 53.36, 66.44, 79.77, 82.17, 128.42, 128.57, 128.89, 135.83, 155.39, 171.32, 172.67. LCMS: [M+H⁺] = 423.2.

Гідрохлорид трет-бутил (S)-5-аміно-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)пентаноату (15). Трет-бутил (S)-5-(((бензилокси)карбоніл)аміно)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)пентаноат (**14**) (11.2 г, 26.5 ммоль, 1 екв.) розчили в 110 мл EtOH і додали в колбу на 500 мл, оснащену мішалкою. До цього розчину додали 1M HCl (водн.) (30 мл, 1.1 екв.), а потім 10 % Pd/C в якості каталізатору (1.1 г, 10 % мас.). H₂ пропускали через реакцію протягом 5 хв, а підключили кулю з воднем. Реакційну суміш перемішували протягом 20 годин, після чого аналіз ТШХ показав відсутність вихідної речовини. Реакційну суміш відфільтрували через шар целіту та цей шар промили EtOH. Фільтрат сконцентрували у вакуумі та отримали маслувату речовину, яку розтерли з метил-трет-бутиловим ефіром і сконцентрували у вакуумі з одержанням сполуки **15** (7.72 г, 90%) у вигляді білої пухкої твердої речовини. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.28 (s, 3H), 5.42 (s, 1H), 4.15 (s, 1H), 3.09 (m, 2H), 1.8-1.94 (m, 4H), 1.49 (s, 9H), 1.46 (s, 9H).

Трет-бутил(S)-5-(N-(бензоїлокси)ацетамідо)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)пентаноат (16). Розчин пероксиду бензоїлу (6.93 г, 28.6 ммоль, 1.2 екв.) у метилені (300 мл) швидко додали до розчину трет-бутил (S)-5-аміно-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)пентаноату гідрохлорид (15) (7.72 г, 23.8 ммоль, 1 екв.) і NaOH (0.95 г, 23.8 ммоль, 1 екв.) у буфері з pH 10.5 (300 мл), отриманому з 120 мл 0.5M NaHCO₃ і 180 мл Na₂CO₃ за кімнатної температури. Отриману двофазну суміш перемішували протягом 3 год при кімнатній температурі. Потім до реакційної суміші додали розчин ацетилхлориду (2.25 г, 23.8 ммоль, 1 екв.) у метилені (30 мл). Після завершення реакції ацилювання шари розділили, а водний шар проекстрагували метиленом (200 мл × 2). Об'єднані органічні шари промили брайном, посушили над Na₂SO₄ і сконцентрували у вакуумі. Отриманий залишок очищали колонковою хроматографією на силікагелі (PE/EtOAc = 3:1) з одержанням сполуки **16** (7.41 г, вихід 69%) у вигляді безбарвного масла. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.15 – 8.08 (m, 2H), 7.75 – 7.66 (m, 1H), 7.54 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 5.11 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.18 (dt, J = 19.7, 7.4 Hz, 1H), 3.86 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.08 (s, 3H), 1.95 – 1.59 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.43 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.7, 164.5, 155.5, 134.6, 130.1, 129.0, 126.7, 82.0, 79.6, 53.7, 47.8, 30.2, 28.4, 28.0, 23.2, 20.4. LCMS: [M+H⁺] = 451.2.

Трифторацетат (S)-4-(N-(бензоїлокси)ацетамідо)-1-карбоксібуган-1-аміну (17). Трет-бутил (S)-5-(N-(бензоїлокси)ацетамідо)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)пентаноат (16) (7.4 г, 16.4 ммоль, 1 екв.) розчинили в TFA (35 мл) і H₂O (2 мл) і перемішували при кімнатній температурі протягом 5 год. Після цього реакційну суміш сконцентрували, а залишок розчинили в сухому CH₃OH (30 мл) і випарювали у вакуумі. Цю процедуру повторили тричі для отримання сполуки **17** (6.7 г, кількісний вихід), яку використали у наступній стадії без додаткового очищення. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.07 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.67 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.51 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.37 (broad s, 3H), 4.11 (s, 1H), 3.86 (s, 2H), 2.15 – 2.04 (m, 5H), 1.88 (s, 2H). LCMS: [M+H⁺] = 295.1.

(S)-2-((((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)-5-(N-(бензоїлокси)ацетамідо)пентанова кислота (18). Et₃N (6.86 мл, 49.2 ммоль, 3 екв.) і Fmoc-OSu (6.63 г, 19.7 ммоль, 1.2 екв.) додали до добре перемішаного розчину трифторацетату (S)-4-(N-(бензоїлокси)ацетамідо)-1-карбоксібутан-1-аміну (**17**) (6.7 г, 16.4 ммоль, 1.0 екв.) у ДМФА (60 мл) при -15 °С. Реакційну суміш перемішували при цій температурі протягом 1 години, потім підкислили до рН 5 використовуючи 1 М водний розчином HCl і проекстрагували МТБЕ (2×150 мл). Об'єднані органічні шари промили 1 М водною HCl (100 мл), водою (2×80 мл) і брайном (50 мл), посушили над Na₂SO₄ і сконцентрували у вакуумі. Неочищений продукт розтерли з гексаном (50 мл), осад відфільтровували і промили гексаном (20 мл). Після очистки колонковою хроматографією з використанням метилену/CH₃OH як елюентів було отримано сполуку **18** (6.7 г, вихід 79%) у вигляді білого порошку. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.8 (br s, 1H), 8.09 – 8.05 (m, 2H), 7.75 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.63 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.59 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 7.47 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.38 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.28 (td, J = 7.4, 1.2 Hz, 2H), 5.66 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.52 – 4.09 (m, 3H), 4.19 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 4.02 – 3.7 (m, 2H), 2.2 – 2.0 (m, 4H), 1.95 – 1.59 (m, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 175.03, 164.57, 156.30, 143.89, 143.70, 141.30, 134.73, 130.09, 129.01, 127.74, 127.11, 126.36, 125.21, 125.16, 119.99, 67.19, 53.32, 47.12, 29.47, 23.33, 20.33. LCMS: [M+H⁺] = 517.2.

3-азидопропан-1-амін (20). До розчину гідрохлориду 3-хлорпропан-1-аміну (**19**) (3 г, 23.1 ммоль, 1 екв.) у воді (12 мл) додали NaN₃ (4.5 г, 69.3 ммоль, 3 екв.) і реакційну суміш перемішували за температури 80 °С протягом 15 год. До розчину додали КОН (3.24 г, 57.8 ммоль, 2.5 екв.) і проекстрагували диетиловим ефіром (3×50 мл). Об'єднані органічні шари посушили над безводним Na₂SO₄, відфільтрували, а розчинник видалили у вакуумі при 25°C з одержанням сполуки **20** (1.8 г, вихід 78%) у вигляді жовтуватого масла. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3.38 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.81 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.73 (p, J = 6.8 Hz, 2H), 1.26 (br. s, 2H).

(9H-флуорен-9-іл)метил (S)-(1-((3-азидопропіл)аміно)-3-гідрокси-1-оксопропан-2-іл)карбамат (21). До розчину ((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)-L-серину (4.58 г, 14 ммоль, 1 екв.), 3-азидопропан-1-аміну (**20**) (1.4 г, 14 ммоль), 1 екв.) і НАТУ (7.99 г, 21 ммоль, 1.5 екв.) у ДМФА (25 мл), додали DIPEA (4.88 мл, 28 ммоль, 2 екв.) по краплях при -15 °С. Реакційній суміші дали вигрітися до кімнатної температури, при якій перемішували ще 2 години. Після цього до суміші додали 2М водну HCl і суміш проекстрагували EtOAc (2×80 мл), об'єднані органічні шари промили водою (2×50 мл), насиченим водним NaHCO₃ (50 мл), брайном (30 мл), посушили над Na₂SO₄ і сконцентрували у вакуумі. Залишок очистили методом колонкової хроматографії на силікагелі з використанням системи 5% розчину MeOH в метилені (за об'ємом) як елюенту для отримання сполуки **21** (3.1 г, вихід 54%) у вигляді білого порошку. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.83 – 7.76 (m, 2H), 7.61 (dd, J = 7.5, 2.6 Hz, 2H), 7.43 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 2H), 7.34 (td, J = 7.4, 1.2 Hz, 2H), 6.87 (s, 1H), 5.99 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 4.45 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 4.23 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 4.09 (dd, J = 11.7, 3.5 Hz, 1H), 3.69 (dd, J = 11.6, 5.2 Hz, 1H), 3.36 (q, J = 6.9 Hz, 4H), 2.99 (s, 1H), 1.80 (q, J = 6.7 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.05, 156.83, 143.61, 143.58, 141.34, 127.87, 127.14, 125.00, 120.11, 67.35, 62.77, 55.40, 49.15, 47.08, 37.14, 28.55. LCMS: [M+H⁺] = 410.2.

Гідрохлорид (S)-2-аміно-N-(3-азидопропіл)-3-гідроксипропанамід (25). До розчину (S)-2-аміно-N-(3-азидопропіл)-3-гідроксипропанаміду (**21**) (400 мг, 0.977 ммоль, 1 екв.) у ТГФ (2 мл) додали Et₂NH (2 мл) при к.т. Суміш перемішували при цій температурі протягом 1 год, потім додали ще 1 мл Et₂NH і перемішували ще 2 год. ТГФ та Et₂NH видалили у вакуумі, а маслянистий залишок розчиняли у H₂O (10 мл) і проекстрагували 2 рази EtOAc (10 мл), потім водний шар підкислили конц. HCl (150 мкл) і сконцентрували у вакуумі з одержанням сполуки **25** (150 мг, 82%) у вигляді білого порошку. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 3.97 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 3.84 (qd, J = 12.3, 4.9 Hz, 2H), 3.25 (dt, J = 16.5, 6.7 Hz, 4H), 1.69 (p, J = 6.7 Hz, 2H). ¹³C

NMR (101 MHz, D₂O) δ 167.68, 60.28, 54.60, 48.54, 36.91, 27.51. LCMS: [M+H⁺] = 188.1.

Нанесення 9H-флуорен-9-іл)метил (S)-(1-((3-азидопропіл)аміно)-3-гідрокси-1-оксопропан-2-іл)карбамату (21) на тверду фазу CTBr за допомогою спиртової групи (тверда фаза 22). Тверду фазу CT-OH (0.75 г, 1 ммоль/г, 1 екв.) розчинили у сухому метилені (10 мл) і помістили в атмосферу N₂. Потім до суміші додали ацетилбромід (555 мкл, 7.5 ммоль, 10 екв.) і обережно перемішували протягом 30 хв. Потім осад відфільтрували, промили сухим метиленом (3 x 10 мл) і перенесли в круглодонну колбу об'ємом 50 мл, що містила (9H-флуорен-9-іл)метил (S)-(1-((3-азидопропіл)аміно)-3-гідрокси-1-оксопропан-2-іл)карбамат (21) (0.62 г, 1.5 ммоль, 2 екв.) і DIPEA (653 мкл, 3.75 ммоль, 5 екв.). Реакційну суміш струшували протягом 30 хвилин в атмосфері N₂ і потім загасили 0.4 мл DIPEA і 2 мл MeOH. Після струшування ще 15 хвилин тверду фазу фільтрували, промили ДМФА, діоксаном, MeOH та Et₂O для отримання **твердої фази 22** з концентрацією сполуки 21 – 0.495 ммоль/г (вихід 49.5%).

(2S)-2-аміно-N-((7S,10S)-18-азидо-3-гідрокси-10-(3-(N-гідроксиацетамідо)пропіл)-13-(гідроксиметил)-2,8,11,14-тетраоксо-3,9,12,15-тетраазаоктадекан-7-іл)-5-(N-гідроксиацетамідо)пентанамід (24). Тверду фазу 22 (610 мг, 0.3 ммоль) додали в посудину для твердофазного синтезу і барботували азотом в метилені (8 мл) впродовж 5 хвилин. Розчинник видалили, а до твердої фази додали 8 мл 20% розчин 2-метилпіперидину в ДМФА та барботували азотом протягом 5 хвилин, розчинник видалили, а процедуру повторили з новим об'ємом 20% розчину 2-метилпіперидину в ДМФА протягом 25 хвилин. Після цього розчинник видалили, а тверду фазу промивли метиленом (3 x 8 мл), ДМФА (3 x 8 мл). Після видалення розчинників до твердої фази додали розчин Fmoc-Orn(As,OBz)-OH (18) (390 мг, 0.75 ммоль, 2.5 екв.), HBTU (284 мг, 0.75 ммоль, 2.5 екв.) і DIPEA (262 мкл, 1.5 ммоль, 5 екв.) у ДМФА (8 мл). Потім розчин барботували аргоном протягом 1 години, потім розчинник було

видалено, а тверду фазу промили ДМФА (3 x 8 мл). Цей процес (зняття захисту за 2-меилпіперидином та амідний каплінг) повторювали тричі для отримання сполуки **23**. Потім ДМФА видалили і додали 1М розчин LiOH у ТГФ/MeOH (1:1, 8 мл). Потім розчин барботували азотом протягом 30 хв, після чого розчинник видалили і додали нову порцію 1М LiOH у ТГФ/MeOH (1:1, 8 мл) і суміш барботували ще 30 хв, перш ніж розчинник видалили, а тверду фазу промили MeOH (3 x 8 мл), ДМФА (3 x 8 мл) і метиленом (3 x 8 мл). До висушеної твердої фази потім додали суміш TFA, TIPS і дистильованої води (10 мл, 95 : 2.5: 2,5) і перемішували протягом 1 години для відокремлення цільової речовини від твердої фази. Суспензію відфільтрували фільтрат сконцентрували під вакуумом. Холодний МТБЕ використали для осадження неочищеного пептиду, який потім центрифугували та промили додатковою кількістю МТБЕ. Осад розчинили в мінімальній кількості 1:1 tBuOH і води і посушили методом ліофілізації з отриманням сполуки **24** (192 мг, вихід 91%, чистота 90% за LCMS) у вигляді жовтуватого порошку.

Для аналітичних цілей пептид очищали методом ВЕРХ з наступним градієнтним елююванням: 100:0 (А/В) протягом 3 хв, 100:0 до 35:65 (А/В) протягом 50 хв, 35:65 до 0:100 (А/В) протягом 1 хв., 0:100 (А/В) протягом 2 хвилин, потім повернення до 100:0 (А/В) протягом 1 хвилини, 100:0 (А/В) протягом 2 хвилин. Фракції негайно висушували заморожуванням і потім аналізували за допомогою LCMS. Фракції, що містять чистий продукт, повторно розчинили, об'єднали та ліофілізували з одержанням сполуки **24**. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.80 (br s, 3H), 8.52 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.14 (m, 4H), 7.90 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.40 – 4.32 (m, 1H), 4.28 (m, 1H), 4.18 (dt, $J = 7.8, 5.7$ Hz, 1H), 3.80 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 3.61 – 3.44 (m, 8H), 3.34 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.13 (ddt, $J = 16.3, 13.3, 6.6$ Hz, 2H), 2.02 – 1.97 (m, 9H), 1.66 1.45 (m, 1f4H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 171.78, 171.66, 170.98, 170.83, 170.80, 170.34, 168.89, 62.00, 55.60, 52.84, 52.3, 48.70, 47.13, 46.91,

40.56, 40.35, 40.14, 39.93, 39.72, 39.52, 39.31, 36.34, 29.81, 29.60, 29.07, 28.76, 23.46, 22.44, 20.78. LCMS: $[M+H^+] = 704.4$.

2-хлор-3,4-дигідроксибензойна кислота (27). До розчину 2-хлор-3,4-диметоксибензойної кислоти (**26**) (1 г, 4.62 ммоль, 1 екв.) у метилені (15 мл) додавали 1 М розчин VBr_3 в метилені (18.46 мл, 18.46 ммоль, 4 екв.) протягом 10 хв при 0 °С в атмосфері N_2 . Після перемішування протягом 3 год при кімнатній температурі реакційну суміш вилили в 2М HCl (60 мл) з льодом і потім проекстрагували $EtOAc$ (150 мл). Органічний шар відділили та промили H_2O (3x50 мл), брайном (20 мл) і посушили над Na_2SO_4 , сконцентрували у вакуумі з одержанням сполуки **27** (0.75 г, вихід 86%), яку використали в наступній стадії без попередньої очистки. 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.65 (br s, 1H), 10.41 (br s, 1H), 9.31 (br s, 1H), 7.23 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.76 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H). LCMS: $[M+H^+] = 189:191$ (3:1).

N-(3-азидопропіл)-2-хлор-3,4-дигідроксибензамід (28). До розчину 3-азидопропан-1-аміну (**20**) (265 мг, 2.65 ммоль, 2 екв.) у метилені (10 мл) і ДМФА (5 мл) додали $HOBT$ (447.1 мг, 2.92 ммоль, 2.2 екв.), $DIPEA$ (810 мкл, 4.64 ммоль, 3.5 екв.), 2-хлор-3,4-дигідроксибензойну кислоту (**27**) (250 мг, 1.33 ммоль, 1 екв.) і $EDC \cdot HCl$ (559.8 мг, 2.92 ммоль, 2.2 екв.) відповідно при кімнатній температурі. Після перемішування протягом 4 годин реакційну суміш розбавили $EtOAc$ (50 мл) і промили наполовину насиченим розчином NH_4Cl (10 мл) і брайном. Органічну фазу посушили над Na_2SO_4 і сконцентрували у вакуумі з отриманням сполуки **27** (248 мг, вихід 69%) у вигляді жовтуватої рідини. 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.87 (br s, 1H), 9.38 (br s, 1H), 8.21 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 6.73 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H), 3.41 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.23 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.73 (p, $J = 6.8$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 167.27, 167.19, 147.66, 142.43, 129.14, 119.20, 118.13, 113.49, 48.92, 40.52, 40.31, 40.11, 39.90, 39.69, 39.48, 39.27, 36.74, 36.62, 28.79. LCMS: $[M+H^+] = 271.1:273.1$ (3:1).

Загальна методика синтезу кон'югатів:

Відповідний азид (речовини **24**, **25** або **28**) (1 екв.) і модифікований рифампіцин (**29**) (1.2 екв) розчинили у 1:1 H₂O/tBuOH (1.2 мл). Додали свіжоприготований 500 мМ розчин аскорбінової кислоти (2.4 екв.) і 100 мМ розчин CuSO₄· 5H₂O (0.6 екв.) і суміш перемішували при 50 °С протягом 3 годин. Реакційну суміш без попередньої обробки очистили за допомогою препаративної ВЕРХ з наступним методом градієнтного елюювання: 100:0 (А/В) протягом 3 хвилин, від 100:0 до 0:100 (А/В) протягом 55 хвилин, 0:100 (А/В) протягом 2 хвилин, потім повернення до 100:0 (А/В) протягом 1 хвилини, 100:0 (А/В) протягом 2 хвилин. Фракції аналізували за допомогою LCMS та ВЕРХ. Фракції, що містять чистий продукт, об'єднали та ліофілізували з одержанням відповідних кон'югатів.

Речовина (30) – кон'югат модифікованого рифампіцину (**29**) з речовиною **24**. Вихід: 20 мг, 54%; червоний порошок. HRMS: [M+H⁺] = 1034.5193, розраховане значення = 1034.5193.

Речовина (31) – кон'югат модифікованого рифампіцину (**29**) з речовиною **25**. Вихід: 18 мг, 47%; червоний порошок. HRMS: [M+H⁺] = 1550.7737, розраховане значення = 1550.7737.

Речовина (32) – кон'югат модифікованого рифампіцину (**29**) з речовиною **28**. Вихід: 18 мг, 48%; червоний порошок. HRMS: [M+H⁺] = 1117.4645, розраховане значення = 1117.4644.

Антибактеріальні аналізи

МІК аналіз. Антибактеріальну активність сполук визначали шляхом вимірювання їх мінімальних інгібуючих концентрацій (МІК) за допомогою методу мікророзведення мікстур згідно з рекомендаціями Інституту клінічних та лабораторних стандартів (CLSI). Для визначення МІК в цьому дослідженні використовувалась мікстура Мюллера-Хінтона (САННВ) з додаванням рекомендованих катіонів та мікстура Мюллера-Хінтона (ID-САННВ) зі зменшеною концентрацією заліза та з додаванням катіонів, як рекомендовано CLSI, оскільки МІК сидероміцину, визначені в середовищі з мінімальною кількістю заліза, показали хороші співвідношення з реальною

ефективність *in vivo*. ID-CAMNB готували наступним чином: один літр мікстури Мюллера-Хінтона (Brand, Company) інкубували зі 100 г катіонозв'язуючої смоли Chelex 100 (Brand, Company) для видалення катіонів, включаючи залізо, із середовища та відфільтрували, далі рН довели до позначки 7.3 за допомогою соляної кислоти. Розчин знову відфільтрували та доповнювали 20-25 мг/літр Ca^{2+} , 10-12,5 мг/літр Mg^{2+} і 0,5-1 мг/літр Zn^{2+} , згідно з рекомендаціями CLSI. Додавання Ca^{2+} і Mg^{2+} було необхідним для відновлення росту бактерій. Для експериментів з відновлення росту бактерій використовували наполовину розбавлений розчин мікстура Мюллера-Хінтона (МНВ) у воді з додаванням 2,2-біпіридину для отримання концентрації останнього – 200 мікромоль в літрі.

Із запасів гліцерину бактерії висаджували на чашки з кров'яним агаром і давали їм рости протягом ночі при 37 °С. Далі одну колонію переносили в середовище для росту та вирощували при 37 °С та при 200 об/хв до фази експоненційного росту, яку визначали за допомогою OD_{600} . При $\text{OD}_{600} = 0.5$ бактерії розбавляли в 100 разів і 50 мкл додавали до серії розведень досліджуваної сполуки (50 мкл) для досягнення загального об'єму 100 мкл на лунку. 96-лункові поліпропіленові планшети інкубували при 37 °С при 600 об/хв протягом ночі (18–20 год для грамнегативних штамів, 20–24 години для грампозитивних штамів), далі планшети перевіряли на візуальний ріст бактерій або визначали OD_{600} . У цьому випадку в якості контролю використовували рифампіцин.

Висновки

В результаті роботи було оптимізовано синтез ентеробактину, також було виявлено, що при наявності метанолу ентеробактиновий цикл легко розкривається, сполуку **11**, отриману в результаті такого процесу, було очищено та охарактеризовано.

Було розроблено методи синтезу не описаних раніше сполук **24** та **28**, та модельної сполуки **25**. Також створено методику твердофазного синтезу завдяки якій можна пришвидшити синтез інших аналогів сидерофору **24**.

Перевірено можливість ентеробактину та сполук **11**, **24**, **28**, **31** до відновлення росту бактерій в середовищі зі збідненим вмістом заліза. Показано, що сполуки **11**, **24** та ентеробактин здатні ефективно виконувати роль сидерофорів.

Розроблено метод синтезу та проведено антимікробні дослідження сполук **29**, **30**, **31**, **32** та порівняно їх активність з модельним рифампіцином.

Список використаних джерел

- [1] Christopher J. L. Murray, “Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis,” *The Lancet*, volume 399, issue 10325, pp. 629-655, February 12, 2022.
- [2] Bilitewski U, Blodgett J.A., Duhme Klair A.K., Dallavalle S., Laschat S., Routledge A., Schobert R., “Chemical and Biological Aspects of Nutritional Immunity – Perspectives for New Anti-Infectives that Target Iron Uptake Systems,” *Angewandte Chemie International Edition*, pp. 2-25. ISSN 1433-7851, November 13, 2017.
- [3] Roosenberg II J.M., Lin Y.M., Lu Y., Miller M.J., “Studies and syntheses of siderophores, microbial iron chelators, and analogs as potential drug delivery agents,” *Current medicinal chemistry*, 7(2):159-97, February 1, 2000.
- [4] Kong H, Cheng W, Wei H, Yuan Y, Yang Z, Zhang X., “An overview of recent progress in siderophore-antibiotic conjugates,” *European journal of medicinal chemistry*, 182: 111615, November 15, 2019.
- [5] Sensi P, Margalith P, Timbal MT., “Rifomycin, a new antibiotic-preliminary report.” *Farmaco [Sci]* 1959;14:146.
- [6] Maggi N, Pasqualucci CR, Ballotta R, Sensi P., “Rifampicin: a new orally active rifamycin.” *Chemotherapia* 1966; 11:285-92.
- [7] Binda G, Domenichini E, Gottardi A, Orlandi E, Ortelli E, Pacini B, Forwst G., “Rifampicin, a general review.” *Arzneimittelforsch* 1971;21:1907- 77
- [8] Walter Wehrli, “Rifampin: Mechanisms of Action and Resistance,” *Reviews of Infectious Diseases*, vol. 5, supplement 3, July-August 1983.
- [9] Hartmann G, Honikel KO, Kniisel F, Niiesch J., “The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin.” *Biochim Biophys Acta* 1967;145:843-4.
- [10] Clyde Thornsberry, B. C. Hill, J. M. Swenson and L. K. McDougal, “The Use of Rifampin in the Treatment of Nontuberculous Infections,” *Reviews of Infectious Diseases*, Vol. 5, Supplement 3, pp. S412-S417, July. - August 1983.

- [11] Wilson, B. R., Bogdan, A. R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., & Tsuji, Y., “Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential.” *Trends in Molecular Medicine*, 22(12), 1077–1090, December 2016.
- [12] Ji, C., Juárez-Hernández, R. E., & Miller, M. J., “Exploiting bacterial iron acquisition: siderophore conjugates.” *Future Medicinal Chemistry*, 4(3), 297–313, November 2009.
- [13] Soares, M. P., & Weiss, G., “The Iron age of host-microbe interactions.” *EMBO Reports*, 16(11), 1482–1500, October 2015.
- [14] Messenger, A. J., & Barclay, R., “Bacteria, iron and pathogenicity.” *Biochemical Education*, 11(2), 54–63, April 1983.
- [15] Hancock, R., “The bacterial outer membrane as a drug barrier.” *Trends in Microbiology*, 5(1), 37–42, January 1997.
- [16] Robert C. Hider and Xiaole Konga, “Chemistry and biology of siderophores”, *Natural Product Reports*, Issue 5, 2010
- [17] Bilitewski, U., Blodgett, J. A. V., Duhme-Klair, A.-K., Dallavalle, S., Laschat, S., Routledge, A., & Schobert, R., “Chemical and Biological Aspects of Nutritional Immunity-Perspectives for New Anti-Infectives that Target Iron Uptake Systems.” *Angewandte Chemie International Edition*, 56(46), 14360–14382, April 2017
- [18] Troxell, B., & Hassan, H. M., “Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, article 59, October 2013.
- [19] Barry, S. M., & Challis, G. L., “Recent advances in siderophore biosynthesis.” *Current Opinion in Chemical Biology*, 13(2), 205–215, April 2009.
- [20] Miller M.J., Malouin F., “Microbial iron chelators as drug delivery agents: the rational design and synthesis of siderophore-drug conjugates.” *Accounts of chemical research*, 26(5):241-9, May 1993.

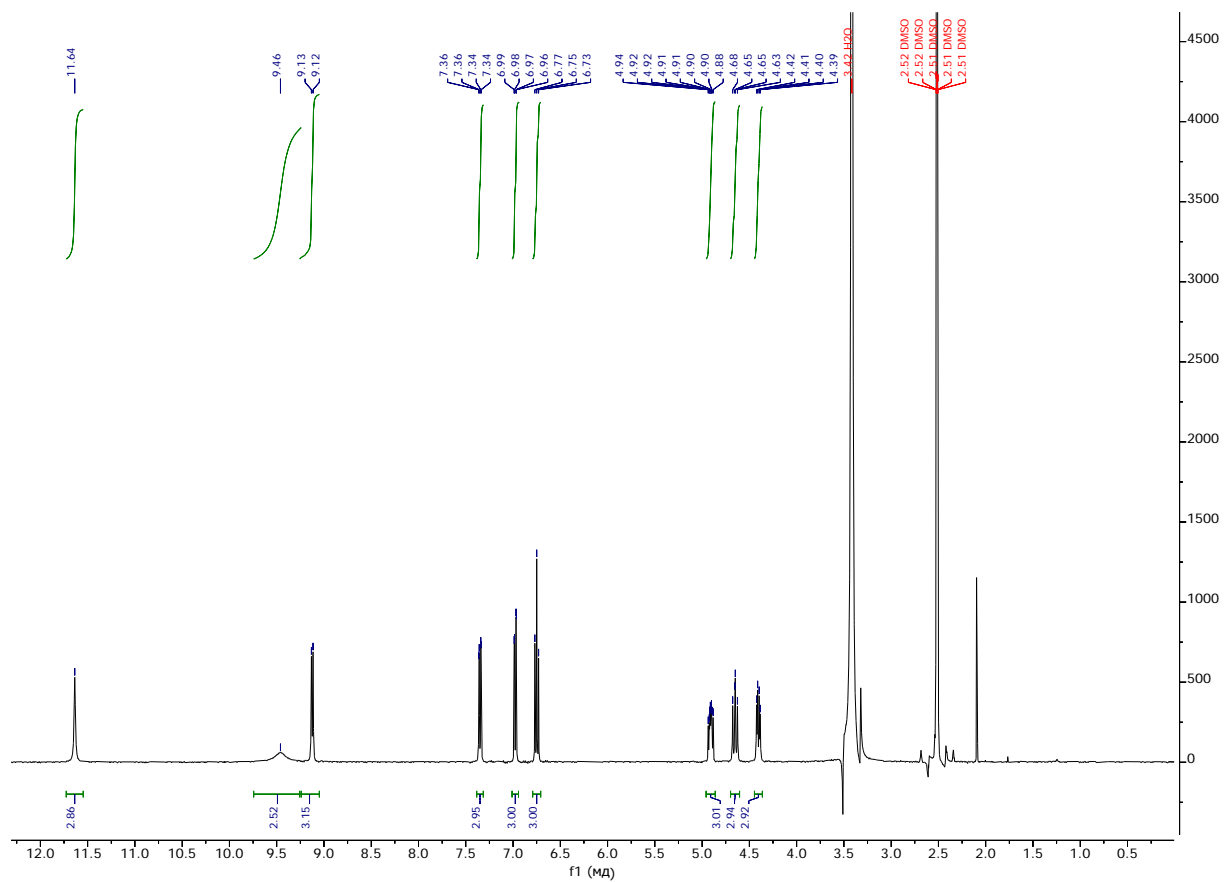
- [21] Poras H., Kunesch G., Barriere J. C., Berthaud N., Andremont A., “Synthesis and in vitro antibacterial activity of catechol-spiramycin conjugates.” *The Journal of antibiotics*, 51(8):786-94, August 1998.
- [22] Paulen A., Gasser V., Hoegy F., Perraud Q., Pesset B., Schalk I. J., Mislin G. L., “Synthesis and antibiotic activity of oxazolidinone–catechol conjugates against *Pseudomonas aeruginosa*.” *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13(47):11567-79, 2015.
- [23] Ji C., Miller P. A., Miller M. J., “Iron transport-mediated drug delivery: practical syntheses and in vitro antibacterial studies of tris-catecholate siderophore–aminopenicillin conjugates reveals selectively potent antipseudomonal activity.” *Journal of the American Chemical Society*. 2012 Jun 20; 134(24):9898-901.
- [24] Bassetti M., Baguneid M., Bouza E., Dryden M., Nathwani D., Wilcox M., “European perspective and update on the management of complicated skin and soft tissue infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after more than 10 years of experience with linezolid.” *Clinical Microbiology and Infection*. 2014 Apr; 20:3-18.
- [25] Mendes R. E., Hogan P. A., Streit J. M., Jones R. N., Flamm R. K., “Update on linezolid in vitro activity through the Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum Program, 2013.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015 Apr 1; 59(4):2454-7.
- [26] Sato T, Yamawaki K., “Cefiderocol: discovery, chemistry, and in vivo profiles of a novel siderophore cephalosporin.” *Clinical Infectious Diseases*. 2019 Nov 13; 69(7): S538-43.
- [27] Liu R, Miller P. A., Vakulenko S. B., Stewart N. K., Boggess W. C., Miller M. J., “A synthetic dual drug sideromycin induces Gram-negative bacteria to commit suicide with a Gram-positive antibiotic.” *Journal of medicinal chemistry*. 2018 Mar 19; 61(9):3845-54.
- [28] Souto A., Montaos M. A., Balado M., Osorio C. R., Rodríguez J., Lemos M. L., Jiménez C., “Synthesis and antibacterial activity of conjugates between

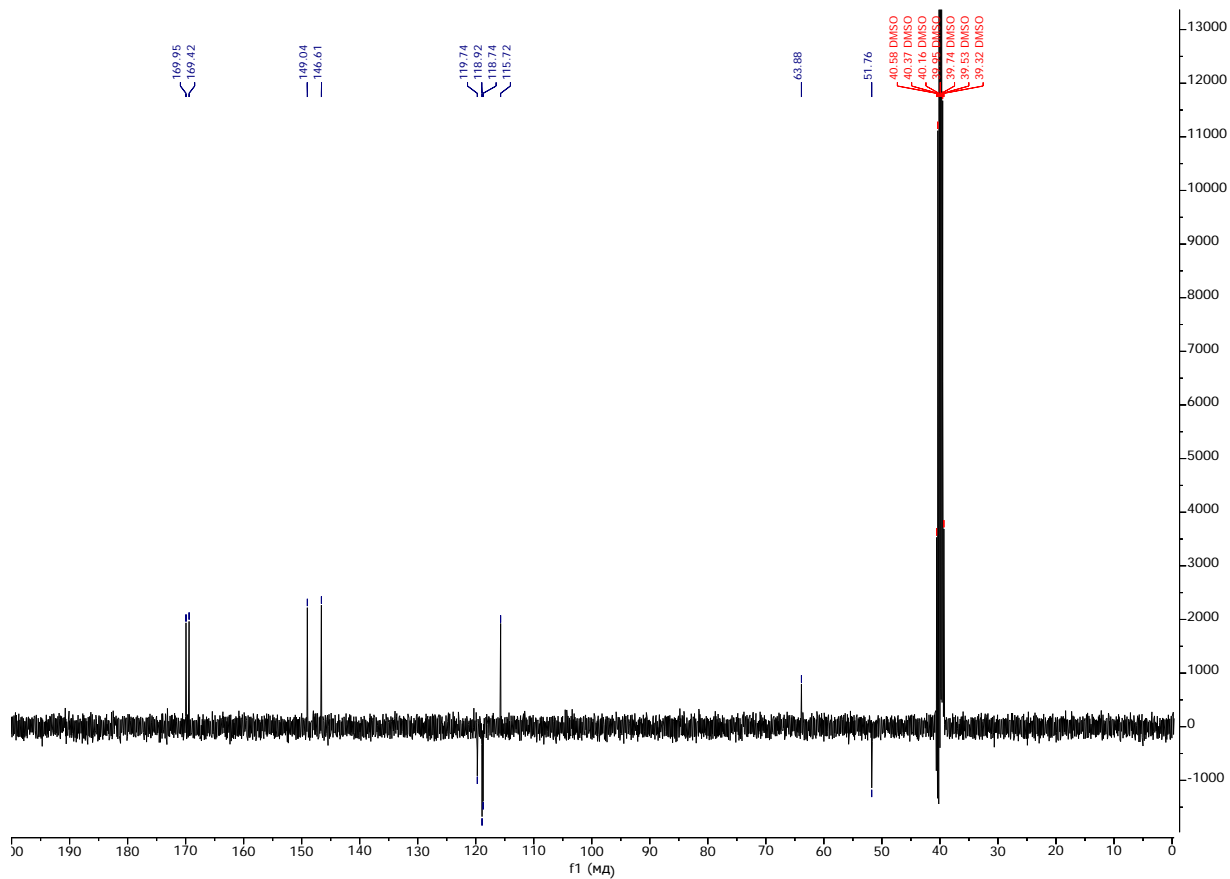
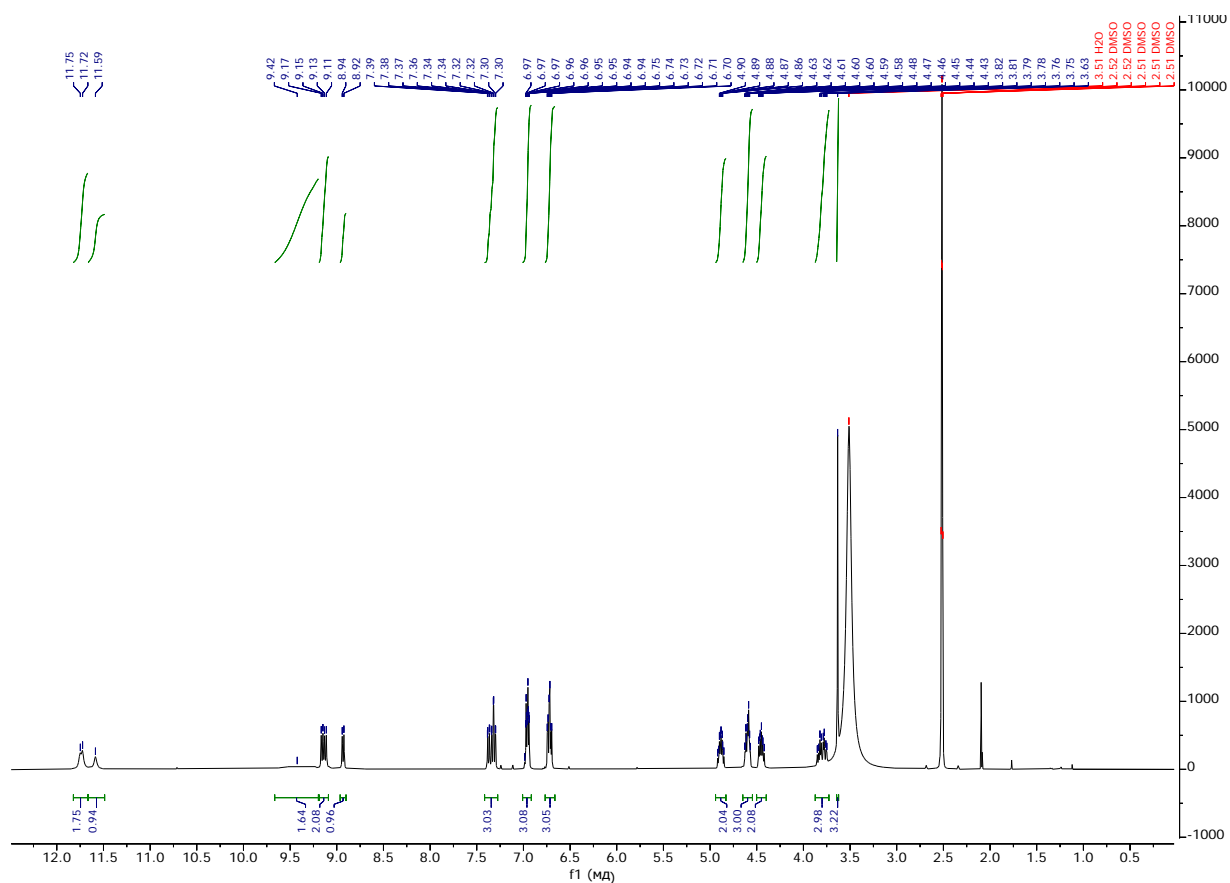
- norfloxacin and analogues of the siderophore vanchrobactin.” *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2013 Jan 1; 21(1):295-302.
- [29] Paulen A., Hoegy F., Roche B., Schalk I.J., Mislin G.L., “Synthesis of conjugates between oxazolidinone antibiotics and a pyochelin analogue.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2017 Nov 1; 27(21):4867-70.
- [30] Noël S., Gasser V., Pesset B., Hoegy F., Rognan D., Schalk I.J., Mislin G.L., “Synthesis and biological properties of conjugates between fluoroquinolones and a N3"-functionalized pyochelin.” *Organic & biomolecular chemistry*. 2011; 9(24):8288-300.
- [31] Wencewicz T.A., Long T.E., Möllmann U., Miller M.J., “Trihydroxamate siderophore–fluoroquinolone conjugates are selective sideromycin antibiotics that target *Staphylococcus aureus*.” *Bioconjugate chemistry*. 2013 Mar 20; 24(3):473-86.
- [32] Fardeau S., Dassonville-Klimpt A., Audic N., Sasaki A., Pillon M., Baudrin E., Mullié C., Sonnet P., “Synthesis and antibacterial activity of catecholate–ciprofloxacin conjugates.” *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2014 Aug 1; 22(15):4049-60.
- [33] Milstien S., Cohen L.A., “Stereopopulation control. I. Rate enhancement in the lactonizations of o-hydroxyhydrocinnamic acids.” *Journal of the American Chemical Society*. 1972 Dec; 94(26):9158-65.
- [34] Ji C., Miller M.J., “Chemical syntheses and in vitro antibacterial activity of two desferrioxamine B-ciprofloxacin conjugates with potential esterase and phosphatase triggered drug release linkers.” *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2012 Jun 15; 20(12):3828-36.
- [35] Wilhelm S., Tommassen J., Jaeger K.E., “A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*.” *Journal of bacteriology*. 1999 Nov 15; 181(22):6977-86.
- [36] Zheng T., Nolan E.M., “Evaluation of (acyloxy) alkyl ester linkers for antibiotic release from siderophore–antibiotic conjugates.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015 Nov 1; 25(21):4987-91.

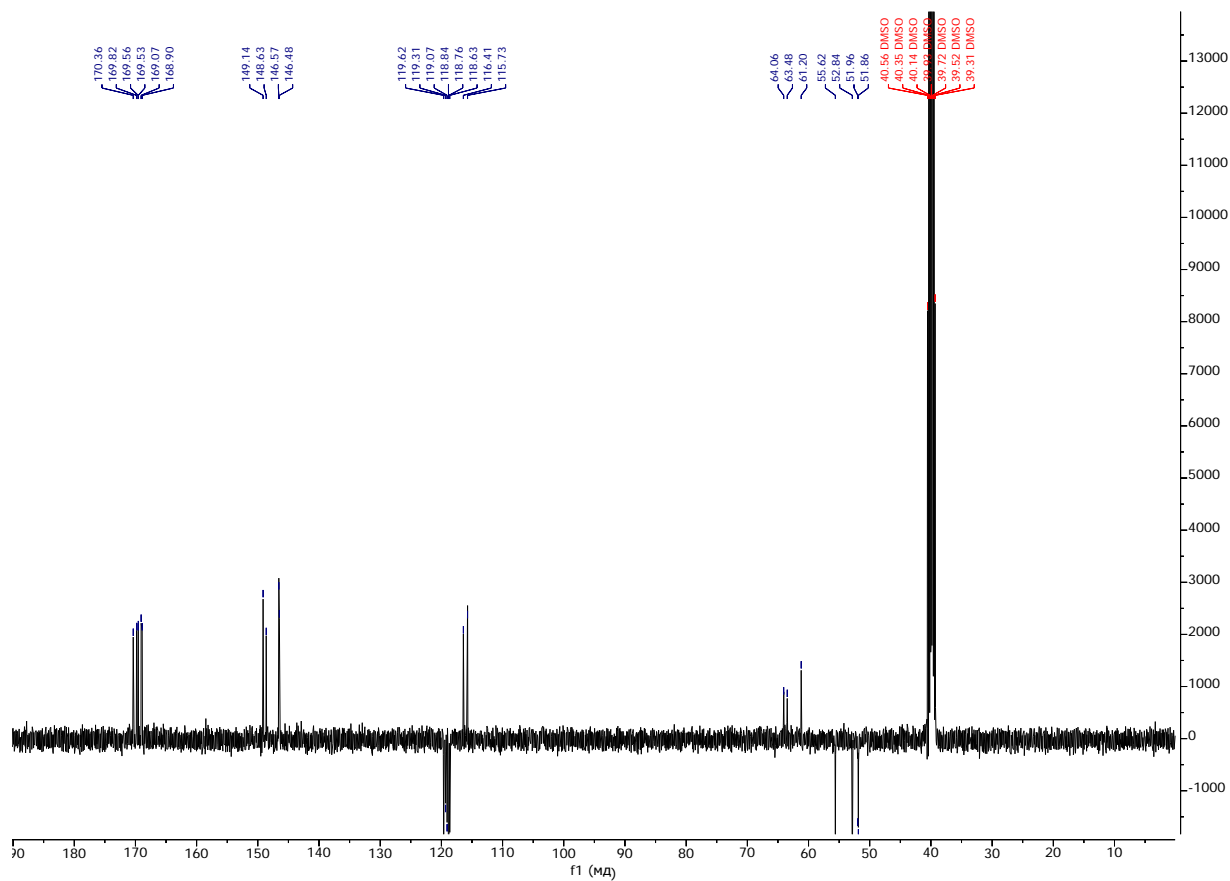
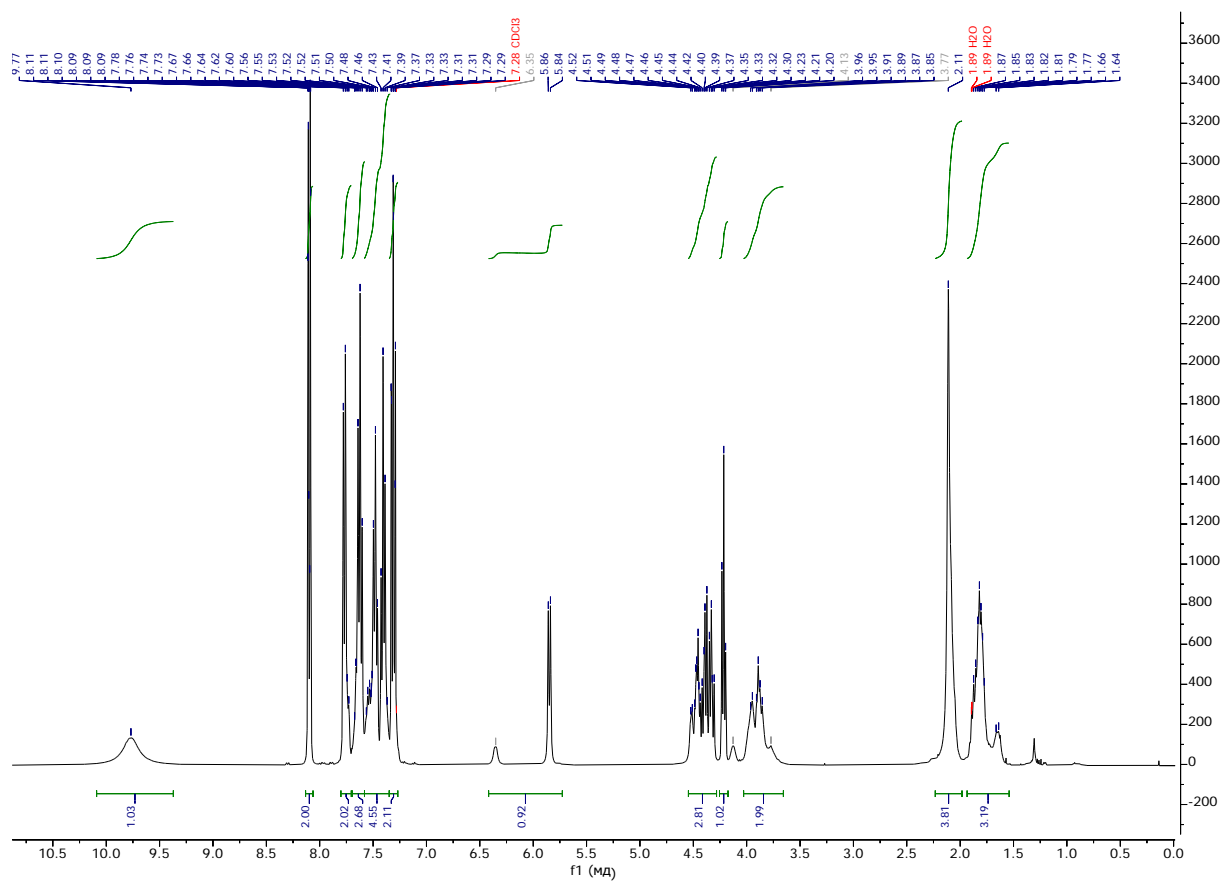
- [37] Kinzel O., Tappe R., Gerus I., Budzikiewicz H., “The synthesis and antibacterial activity of two pyoverdinin-ampicillin conjugates, entering *Pseudomonas aeruginosa* via the pyoverdinin-mediated iron uptake pathway.” *The Journal of antibiotics*. 1998 May 25; 51(5):499-507.
- [38] Heinisch L., Wittmann S., Stoiber T., Scherlitz-Hofmann I., Ankel-Fuchs D., Möllmann U., “Synthesis and Biological Activity of Trisand Tetrakis catecholate Siderophores Based on Poly-aza Alkanoic Acids or Alkylbenzoic Acids and their Conjugates with β -Lactam Antibiotics.” *Arzneimittelforschung*. 2003 Mar; 53(03):188-95.
- [39] Wencewicz T.A., Möllmann U., Long T.E., Miller M.J., “Is drug release necessary for antimicrobial activity of siderophore-drug conjugates? Syntheses and biological studies of the naturally occurring salmicycin “Trojan Horse” antibiotics and synthetic desferridanoxamine-antibiotic conjugates.” *Biometals*. 2009 Aug; 22(4):633-48.
- [40] Möllmann U., Ghosh A., Dolence E.K., Dolence J.A., Ghosh M., Miller M.J., Reissbrodt R., “Selective growth promotion and growth inhibition of Gram-negative and Gram-positive bacteria by synthetic siderophore- β -lactam conjugates.” *Biometals*. 1998 Mar; 11(1):1-2.
- [41] Gause G.F., “Recent studies on albomycin, a new antibiotic.” *British medical journal*. 1955 Nov 12; 2(4949):1177.
- [42] Stefanska A.L., Fulston M., Houge-Frydrych C.S., Jones J.J., Warr S.R., “A potent seryl tRNA synthetase inhibitor SB-217452 isolated from a *Streptomyces* species.” *The Journal of antibiotics*. 2000 Dec 25; 53(12):1346-53.
- [43] Lin Z., Xu X., Zhao S., Yang X., Guo J., Zhang Q., Jing C., Chen S., He Y., “Total synthesis and antimicrobial evaluation of natural albomycins against clinical pathogens.” *Nature communications*. 2018 Sep 4; 9(1):1-8
- [44] Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B., “A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper (I) catalyzed regioselective “ligation”

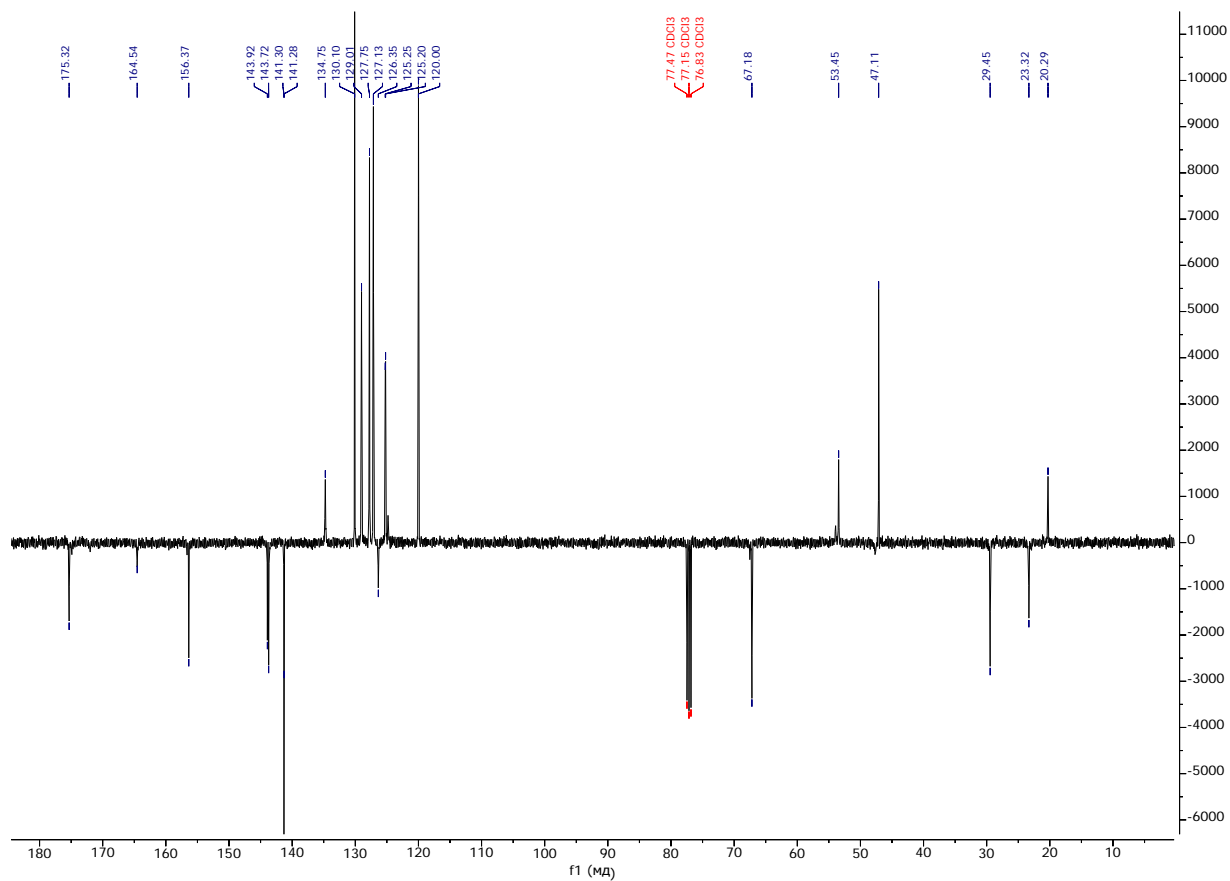
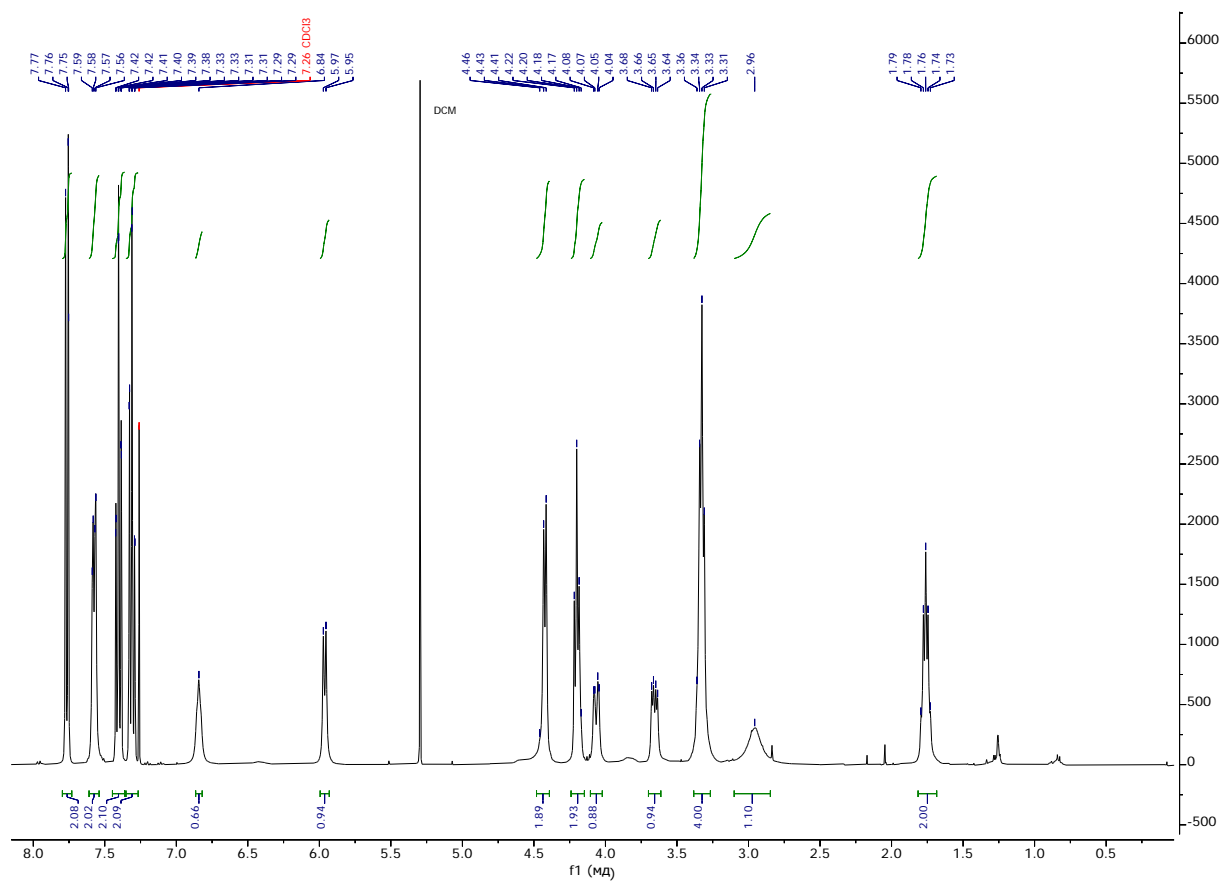
- of azides and terminal alkynes.” *Angewandte Chemie*. 2002 Jul 15; 114(14):2708-11.
- [45] Cochrane S.A., Li X., He S., Yu M., Wu M., Vederas J.C., “Synthesis of tridecaptin–antibiotic conjugates with in vivo activity against gram-negative bacteria.” *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015 Dec 24; 58(24):9779-85.
- [46] A. Pandey, D. Śmiłowicza and E. Boros, “Galbofloxacin: a xenometal-antibiotic with potent in vitro and in vivo efficacy against *S. aureus*.” *Chemical Science*, 2021, 12, 14546–14556.
- [47] Pandey, A., Savino, C., Ahn, S. H., Yang, Z., Van Lanen, S. G., & Boros, E., “A Theranostic Gallium Siderophore Ciprofloxacin Conjugate with Broad Spectrum Antibiotic Potency.” *Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 62, 9947–9960.
- [48] Lee A. A., Chen Y.-C. S., Ekalestari E., Ho S.-Y., Hsu N.-S., Kuo T.-F., & Wang T.-S. A. “Facile and Versatile Chemoenzymatic Synthesis of Enterobactin Analogues and Applications in Bacterial Detection.” *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(40), 12338–12342.
- [49] Buss W.C., Reyes E., Barela T.D., “Metal ion catalyzed oxidation of the antibiotic rifampicin.” *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 01 Jul 1977, 17(3):547-550.
- [50] Acuña L., Hamadat S., Corbalán N.S., González-Lizárraga F., dos-Santos-Pereira M., Rocca J., ... Raisman-Vozari R., “Rifampicin and Its Derivative Rifampicin Quinone Reduce Microglial Inflammatory Responses and Neurodegeneration Induced In Vitro by α -Synuclein Fibrillary Aggregates.” *Cells*, 2019, 8(8), 776.
- [51] Zheng, T., Bullock, J. L., & Nolan, E. M., “Siderophore-Mediated Cargo Delivery to the Cytoplasm of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: Syntheses of Monofunctionalized Enterobactin Scaffolds and Evaluation of Enterobactin–Cargo Conjugate Uptake.” *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(44), 18388–18400

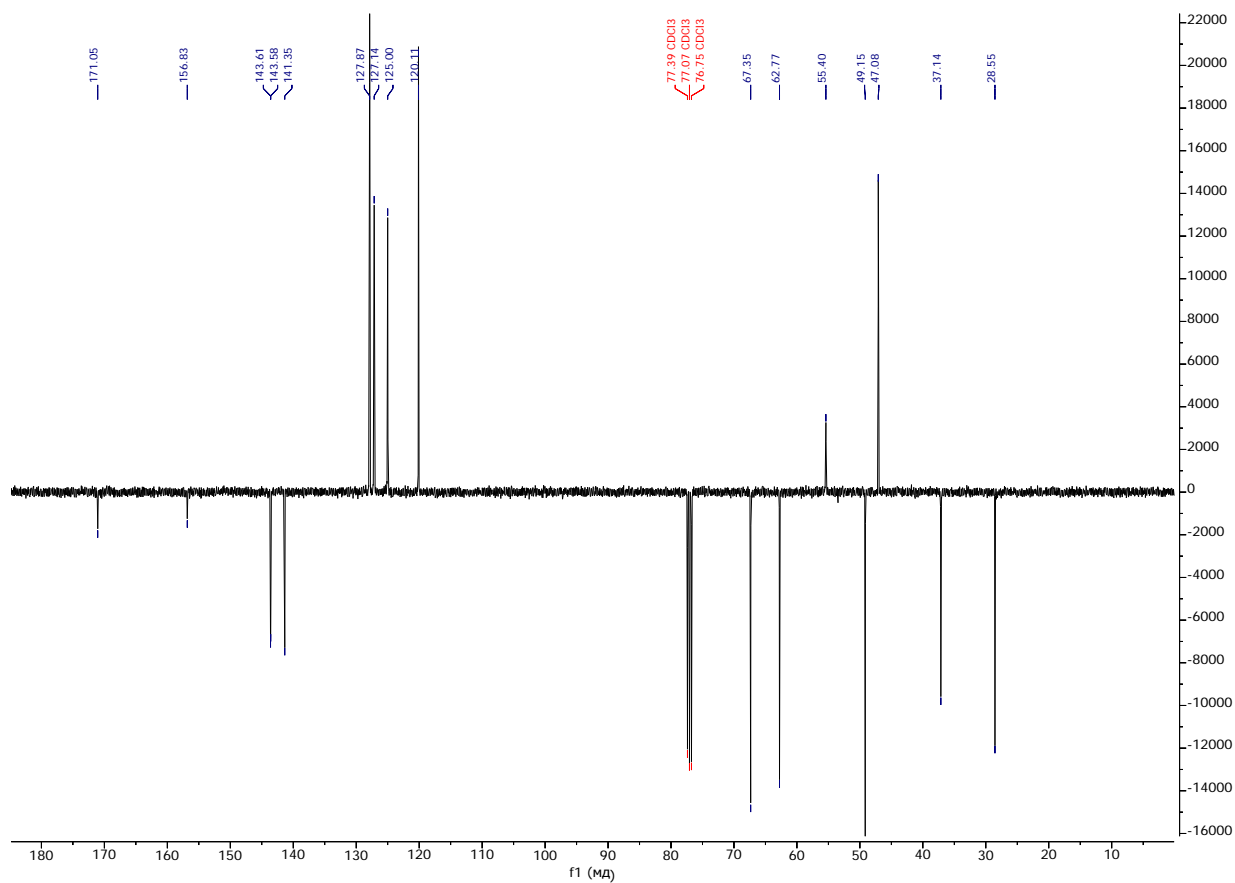
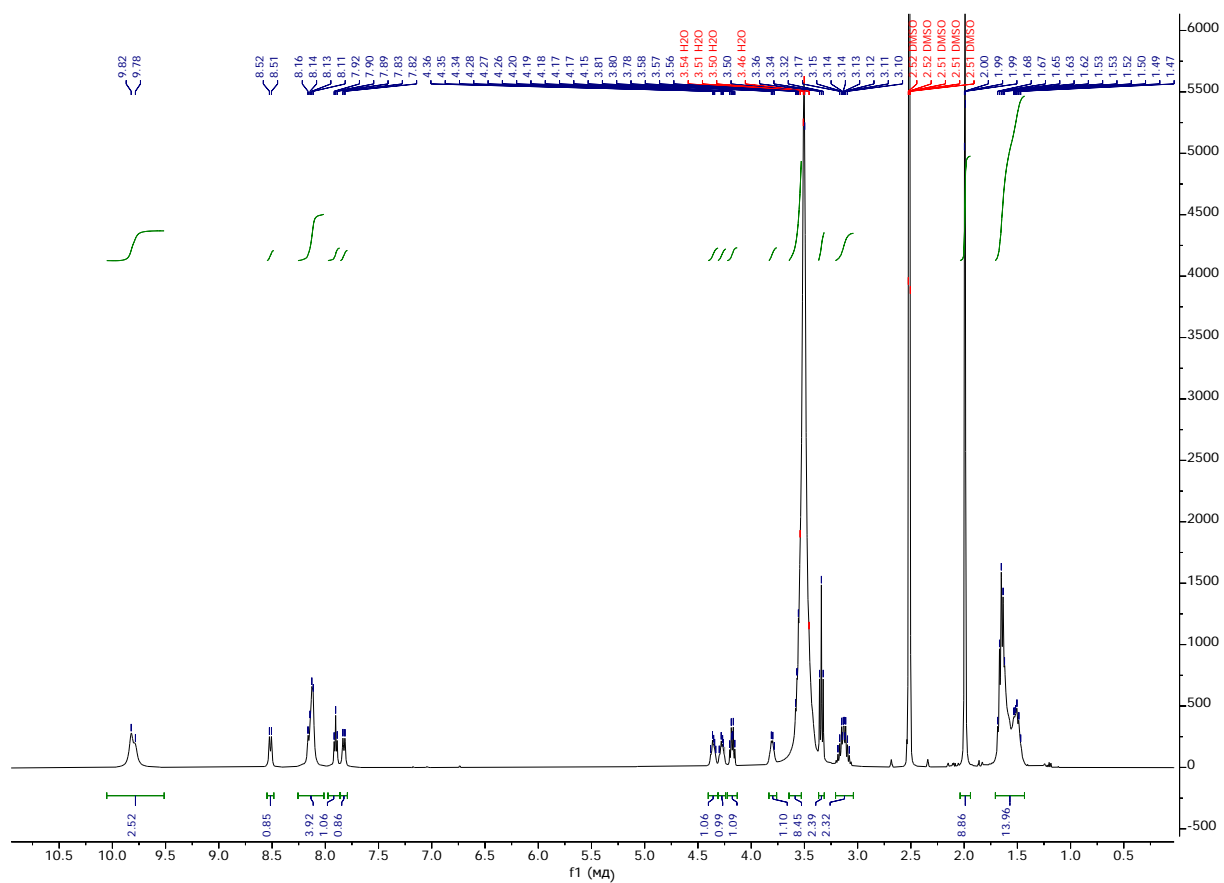
Додатки

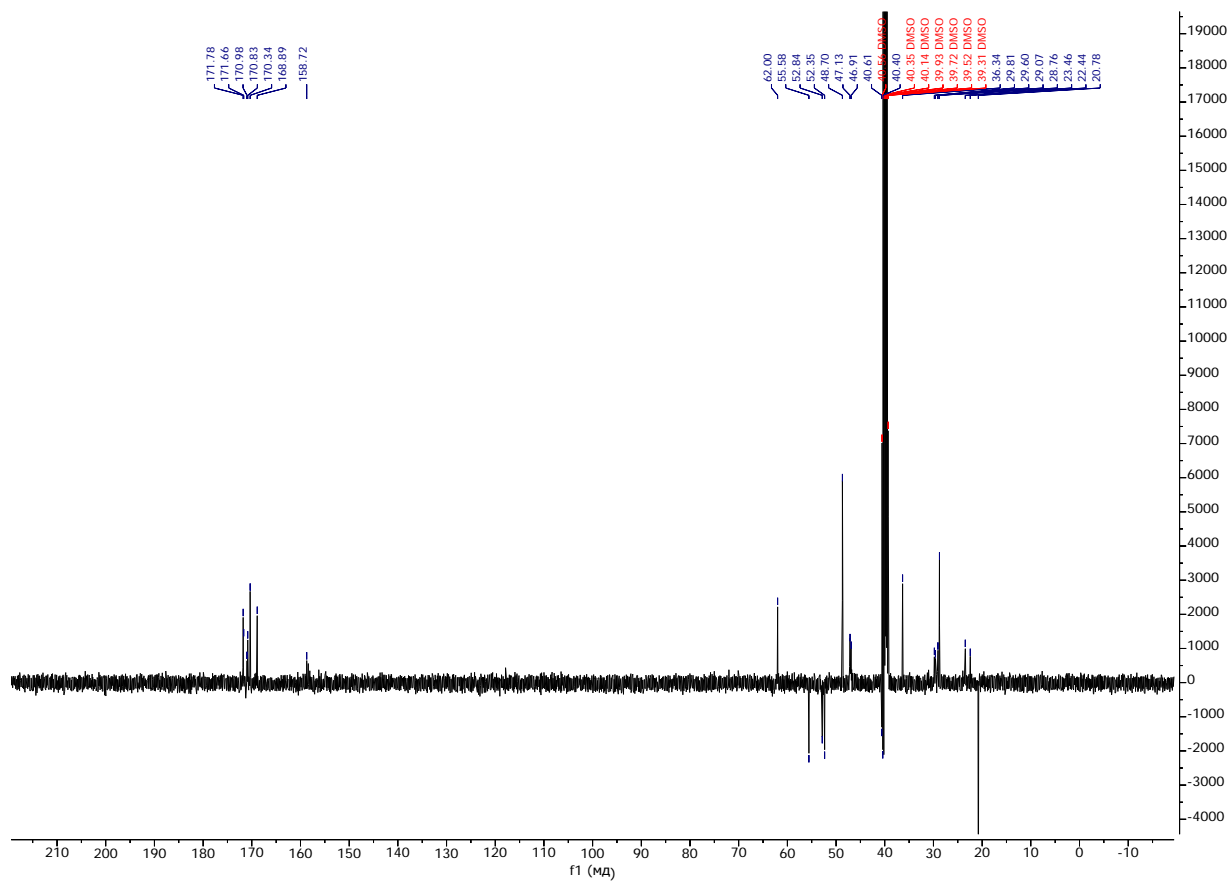
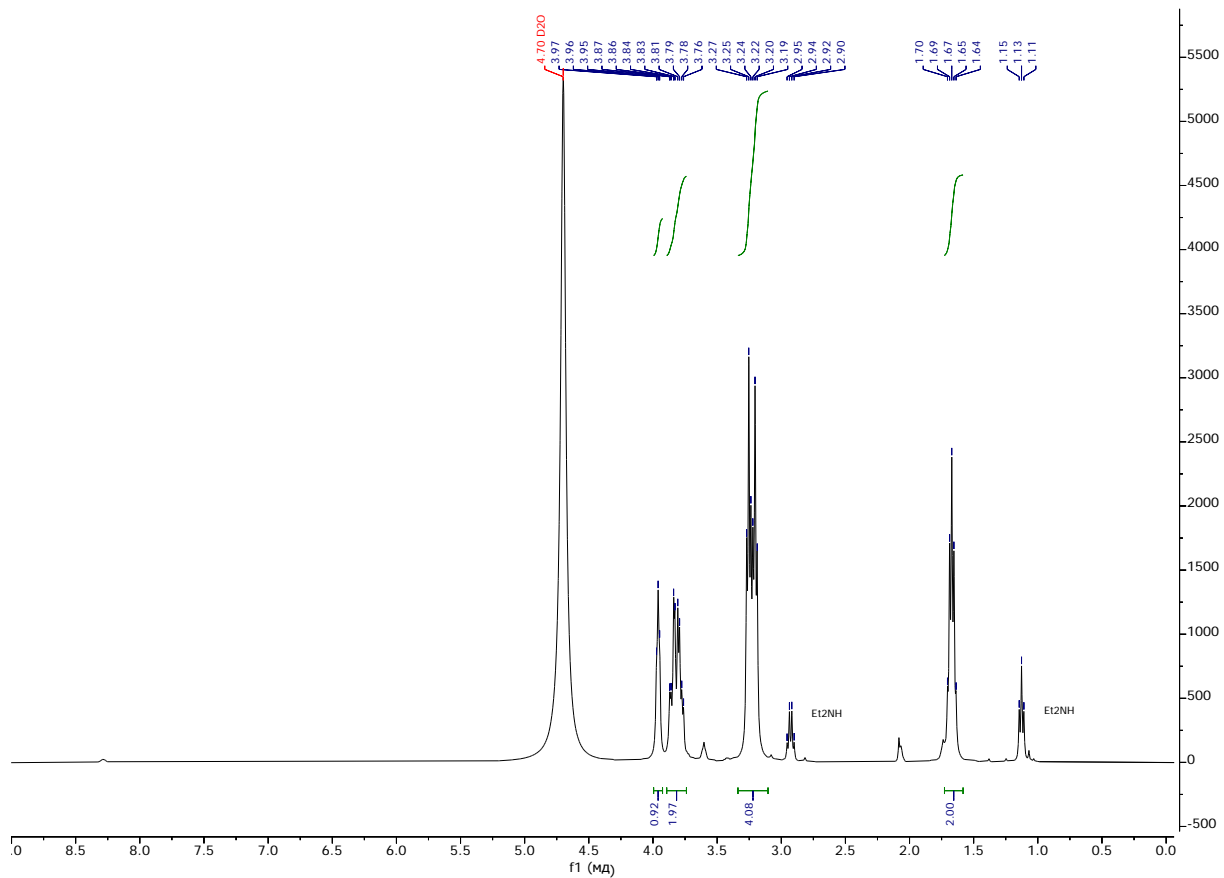
 ^1H спектр ентеробактину (DMSO)

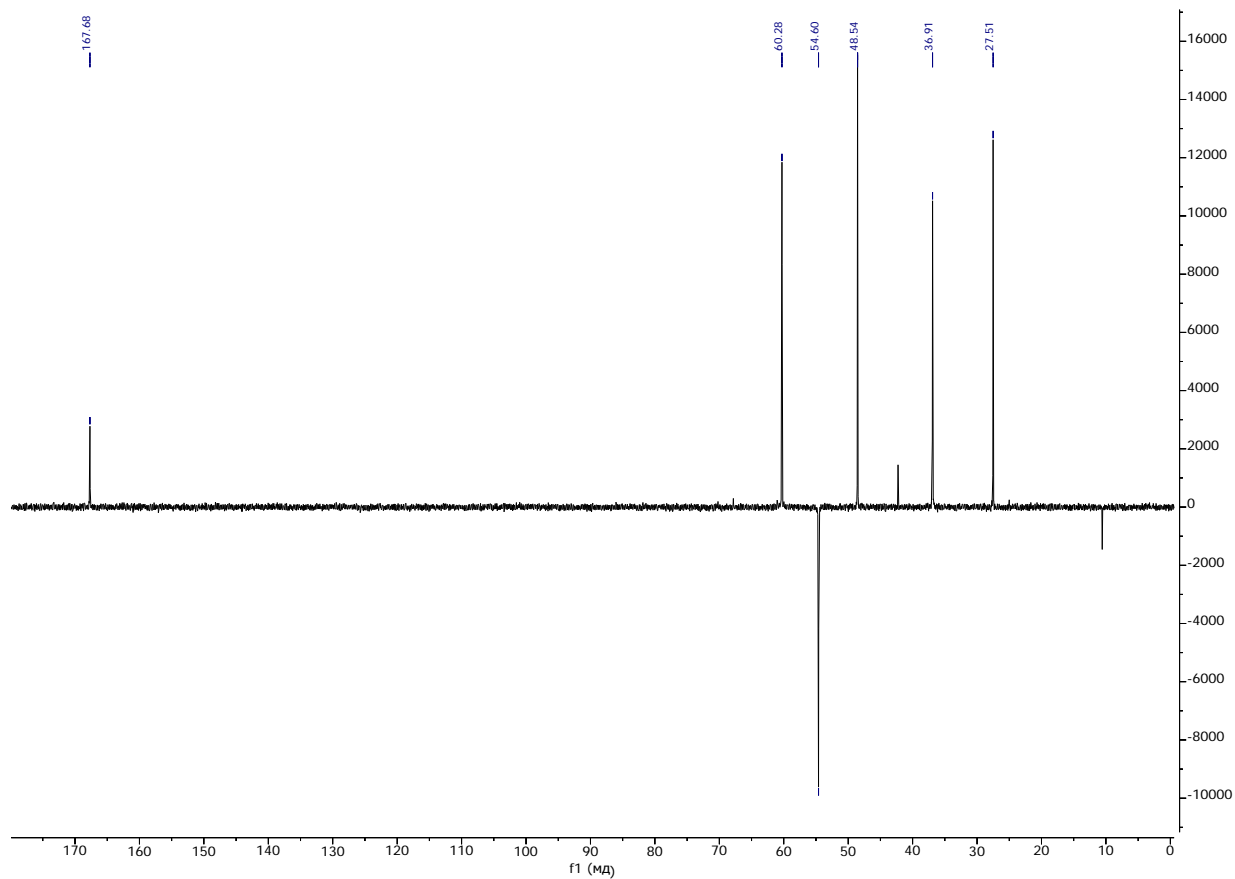
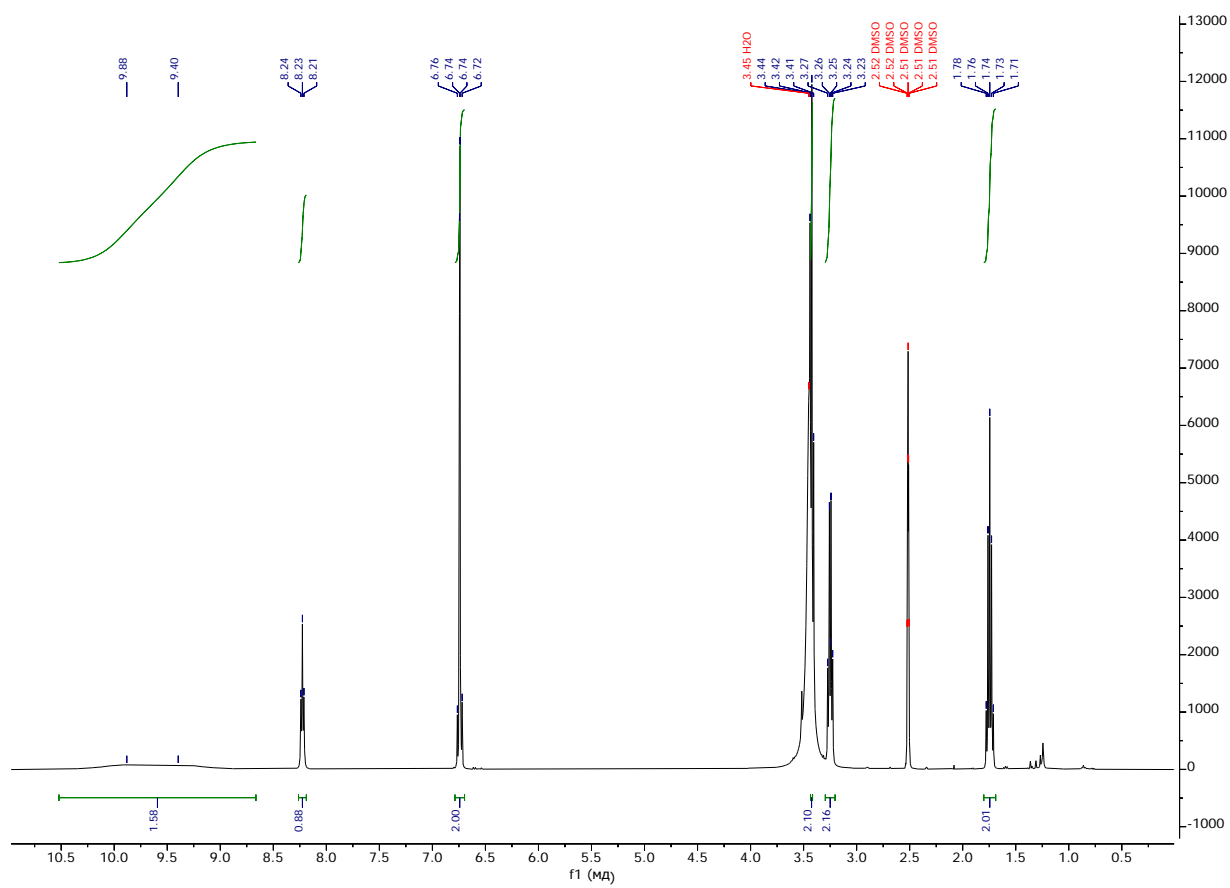
^{13}C -APT спектр ентеробактину (DMSO) ^1H спектр сполуки 11 (DMSO)

^{13}C -APT спектр сполуки 11 (DMSO) ^1H спектр сполуки 18 (CDCl_3)

^{13}C -АРТ спектр сполуки 18 (CDCl_3) ^1H спектр сполуки 21 (CDCl_3)

^{13}C -APT спектр сполуки 21 (CDCl_3) ^1H спектр сполуки 24 (DMSO)

^{13}C -APT спектр сполуки 24 (DMSO) ^1H спектр сполуки 25 (D_2O)

^{13}C -APT спектр сполуки 25 (D_2O) ^1H спектр сполуки 38 (DMSO)

^{13}C -APT спектр сполуки 38 (DMSO)