UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA KONDA MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO



TANJA KONDA

ANTAGONISTI RECEPTORJA FIMH Z ALFA-D-MANOZO VEZANO PREKO N-GLIKOZIDNE VEZI

FIMH ANTAGONISTS BASED ON THE ALPHA-D-MANNOSE WITH N-GLYCOSIDIC BOND

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm. Spektroskopske meritve in ostale analize so bile opravljene na Fakulteti za Farmacijo in na Institutu »Jožef Stefan« v Ljubljani. Biološko vrednotenje je bilo opravljeno na Institute of Molecular Pharmacy, University of Basel v Švici in na oddelku Biomedizinische Analytik, Univerze FH Joanneum, Graz, Avstrija.

Zahvala

Iskreno zahvalo bi rada izrekla mentorju, prof. dr. Marku Anderluhu najprej za dodelitev izredno zanimive teme magistrske naloge, za vodenje skozi celoten eksperimentalni del in kasneje za usmerjanje pri pisanju. Hvala za vso tvojo strokovno pomoč, debate, nasvete, spodbudne besede in hitro odzivnost.

Zahvalila bi se tudi doc. dr. Tihomirju Tomašiču za uvod v moje eksperimentalno delo. Hvala dr. Marku Jukiču in Damjani Zalar za začetno pomoč v laboratoriju ter vsem super ljudem, ki sem jih spoznala tekom dela v laboratoriju, kjer smo si skupaj krajšali ure ob našem delu. Na koncu, hvala družini za podporo skozi vsa leta študija in hvala mojim puncam, ki so moja študijska leta naredila še bolj čudovita.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm.

Tanja Konda

Predsednik komisije: prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm. Članica komisije: izr. prof. dr. Barbara Ostanek, mag. farm.

Vsebina

I.		Pov	zetek	ζ	IX
II.		Abs	stract		. X
III	•	С)krajš	śave	XI
1		Uvo	od		1
	1.	1	Anti	iadhezivna terapija in njene prednosti	1
	1.	2	Infe	kcije urinarnega trakta	2
		1.2.	1	Mehanizem nastanka UTI	3
	1.	.3	Lek	tini	4
		1.3.	1	FimH kot adhezivna komponenta UPEC	4
		1.3.	2	Mehanizem vezave UPEC	6
		1.3.	3	Sestava vezavnega mesta	7
	1.	4	Glik	comimetiki kot zdravilne učinkovine	9
	1.	.5	Raz	voj antagonistov FimH	10
		1.5.	1	Nearomatski antagonisti	11
		1.5.	2	Preprosti aromatski antagonisti	12
		1.5.	3	Biarilni antagonisti	12
		1.5.	4	Izboljšava metabolne stabilnosti	14
		1.5.	5	Potencialni stranski učinki	14
		1.5.	6	Peroralno učinkoviti antagonisti FimH	14
2		Nar	nen d	lela	16
3		Mat	terial	i in metode	21
4		Eks	perin	nentalno delo	26
4	4.	1	Sint	eza osrednjega manoznega monosaharida	26
		4.1.	1 Zaš	ščita OH skupin manoze - sinteza 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-D-manopiranoze	
		(1).			26

	4.1.2 1,2-transglikozidacija; tvorba azida na anomernem ogljiku peracetilirane mano	oze
	– sinteza 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-α-D-manopiranozil azida (2)	. 27
4	.2 Sinteze z aglikonskim delom prve serije spojin	. 27
	4.2.1 Splošni postopek za izvedbo Huisgenove, 1,3-dipolarne cikloadicije – sinteza (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-2-(acetoksimetil)-6-(4-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)tetrahidro-2 <i>H</i> -	
	piran-3,4,5-triil triacetata (3)	. 27
	4.2.2 Splošni postopek za Zemplénovo deacilacijo manoznih OH skupin – sinteza (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-2-(hidroksimetil)-6-(4-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)tetrahidro-2 <i>H</i> -	
	piran-3,4,5-triola (4)	. 28
	4.2.3 Huisgenova, 1,3-dipolarna cikloadicija – sinteza (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-2- (acetoksimetil)-6-(4-(4-(metoksikarbonil)fenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)tetrahidro-2 <i>H</i> -	
	piran-3,4,5-triil triacetata (5)	. 29
	4.2.4 Zemplénova deacilacija manoznih OH skupin – sinteza metil 4-(1- ((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)-1 <i>H</i> -	
	1,2,3-triazol-4-il)benzoata (6)	. 30
	4.2.5 Splošni postopek za hidrolizo metilnega estra – sinteza 4-(1-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>) 3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-)-
	il)benzojske kisline (7)	. 31
4	.3. Sinteza aglikonskega dela druge serije spojin	. 32
	4.3.1 Spojina s 4 C distančnikom	. 32
	4.3.1.1 Splošni postopek za Williamsonovo sintezo etrov – sinteza etil 5-(3- iodofenoksi)pentanoata (8)	. 32
	4.3.1.2 Splošni postopek za Sonogashira sklopitev – sinteza etil 5-(3- ((trimetilsilil)etinil)fenoksi)pentanoata (9)	. 33
	4.3.1.3 Splošni postopek za odščito TMS skupine – sinteza etil 5-(3- etinilfenoksi)pentanoata (10)	. 33
	4.3.1.4 Huisgenova, 1,3-dipolarna cikloadicija – sinteza ($2R$, $3R$, $4S$, $5S$, $6S$)-2-	
	(acetoksimetii)-6-(4-(3-((5-etoksi-5-oksopentii)oksi)fenii)-1H-1,2,3-triazol-1- il)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil triacetata (11)	. 34

4.3.1.5 Zemplénova deacilacija manoznih OH skupin – sinteza etil 5-(3-(1-	
((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)-1 <i>H</i> -	
1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)pentanoata (12)	. 35
4.3.1.6 Hidroliza etilnega estra – sinteza natrijevega 5-(3-(1-((2S,3S,4S,5S,6R)-3,4,5	5-
trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-	
il)fenoksi)pentanoata (13)	. 35
4.3.2 Spojina s 5 C distančnikom	. 36
4.3.2.1 Williamsonova sinteza etrov – sinteza etil 6-(3-iodofenoksi)heksanoata (14)	36
4.3.2.2 Sonogashira sklopitev – sinteza etil 6-(3-((trimetilsilil)etinil) fenoksi) heksanoata (15)	. 37
4.3.2.3 Odščita TMS skupine – sinteza etil 6-(3-etinilfenoksi)heksanoata (16)	. 37
4.3.2.4 Huisgenova, 1,3-dipolarna cikloadicija – sinteza (2R,3R,4S,5S,6S)-2-	
(acetoksimetil)-6-(4-(3-((6-etoksi-6-oksoheksil)oksi)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-	
il)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-3,4,5-triil triacetata (17)	. 38
4.3.2.5 Zemplénova deacilacija manoznih OH skupin – sinteza etil 6-(3-(1-	
((2S,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-	
1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)heksanoata (18)	. 39
4.3.2.6 Hidroliza etilnega estra – sinteza natrijevega 6-(3-(1-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5	5-
trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-	
il)fenoksi)heksanoata (19)	. 39
4.3.3 Spojina s 6 C distančnikom	. 40
4.3.3.1 Williamsonova sinteza etrov – sinteza etil 7-(3-iodofenoksi)heptanoata (20).	. 40
4.3.3.2 Sonogashira sklopitev – sinteza etil 7-(3-((trimetilsilil) etinil) fenoksi)	
heptanoata (21)	.41
4.3.3.3 Odščita TMS skupine – sinteza etil 7-(3-etinilfenoksi)heptanoata (22)	. 41
4.3.3.4 Huisgenova, 1,3-dipolarna cikloadicija – sinteza (2R,3R,4S,5S,6S)-2-	
(acetoksimetil)-6-(4-(3-((7-etoksi-7-oksoheptil)oksi)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-	
il)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-3,4,5-triil triacetata (23)	. 42

4.3.3.5 Zemplénova deacilacija manoznih OH skupin – sinteza etil 7-(3-(1-
((2S,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-
1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)heptanoata (24)
4.3.3.6 Hidroliza etilnega estra – sinteza natrijevega 7- $(3-(1-((2S,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-$ trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)-1 <i>H</i> -1.2.3-triazol-4-
il)fenoksi)heptanoata (25)
4.3.4 Spojina s 7 C distančnikom
4.3.4.1 Williamsonova sinteza etrov – sinteza etil 8-(3-iodofenoksi)oktanoata (26) 44
4.3.4.2 Sonogashira sklopitev – sinteza etil 8-(3-((trimetilsilil)etinil)fenoksi)oktanoata (27)
4.3.4.3 Odščita TMS skupine – sinteza etil 8-(3-etinilfenoksi)oktanoata (28)
4.3.4.4 Huisgenova, 1,3-dipolarna cikloadicija – sinteza (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-2- (acetoksimetil)-6-(4-(3-((8-etoksi-8-oksooktil)oksi)fenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-
il)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-3,4,5-triil triacetata (29)
4.3.4.5 Zemplénova deacilacija manoznih OH skupin – sinteza etil 8-(3-(1-
((2S,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-
1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)oktanoata (30)
4.3.4.6 Hidroliza etilnega estra – sinteza natrijevega 8-(3-(1-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-
trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-
il)fenoksi)oktanoata (31)
4.3.5 Spojina z 2 C distančnikom na para mestu
4.3.5.1 Williamsonova sinteza etrov – sinteza 3-(4-iodofenoksi)propan-1-ola (32) 48
4.3.5.2 Jonesova oksidacija – sinteza 3-(4-iodofenoksi)propanojske kisline (33) 48
4.3.5.3 Fischerjeva esterifikacija – sinteza etil 3-(4-iodofenoksi)propanoata (34) 49
4.3.5.4 Sonogashira sklopitev – sinteza etil 3-(4-((trimetilsilil)etinil)fenoksi)
propanoata (35)
4.3.5.5 Odščita TMS skupine – sinteza etil 3-(4-etinilfenoksi)propanoata (36)

	4.3.	5.6 I	Huisgenova, 1,3-dipolarna cikloadicija – sinteza (2R,3R,4S,5S,6S)-2-	
(acetoksimetil)-6-(4-(4-(3-etoksi-3-oksopropoksi)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-				
il)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-3,4,5-triil triacetata (37)				51
	4.3.	5.7 Z	Zemplénova deacilacija manoznih OH skupin – sinteza etil 3-(4-(1-	
	((25	5,35,4	4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)-1 <i>H</i> -	-
	1,2,	3-tri	azol-4-il)fenoksi)propanoata (38)	51
5	Rez	cultat	i in razprava	53
	5.1	Eks	perimentalni del	53
	5.1.	1	Bazična zaščita OH skupin manoze	54
	5.1.	2	Tvorba azida na anomernem ogljiku acetilirane manoze; 1,2 – trans	
	glik	ozid	acija	55
	5.1.	3	Williamsonova sinteza etrov	56
	5.1.	4	Sonogashira sklopitev in sledeča odščita TMS skupine	57
	5.1.	5	Huisgenova cikloadicija – »klik« reakcija	59
	5.1.	6	Zemplénova deacilacija manoznih OH skupin	61
	5.1.	7	Hidroliza etilnega estra	62
	5.1.	8	Sinteza derivata z 2 C distančnikom na para mestu	63
	5.1.	8.1	Jonesova oksidacija	64
	5.1.	8.2	Fischerjeva esterifikacija	66
	5.2	Bio	loško vrednotenje	66
	5.3	Mo	lekulsko sidranje	68
6	Zak	ljuče	ek	70
7	Lite	eratui	ra	72
8	Pril	oge .		77
8.1 Analizni izvidi		Ana	ılizni izvidi	77
	8.2	Rez	ultati molekulskega sidranja v vezavno mesto FimH	93

Kazalo slik

Slika 1 : Princip antiadhezivne terapije	2
Slika 2: Infekcijski cikel okužbe z UPEC	3
Slika 3: Sestava pilija	5
Slika 4: »Catch-bond« mehanizem FimH	7
Slika 5: Aminokislinska sestava vezavnega mesta	8
Slika 6: Kristalna struktura FimH z oligomanozo-3	9
Slika 7: Primer bioizosterne zamenjave in uvedbe predzdravil	. 10
Slika 8: Znani alkilni in preprosti arilni α-D-manozidi z mikro in nanomolarnimi	
afinitetami	.11
Slika 9: Znani biarilni α-D-manozidi z mikro in nanomolarnimi afinitetami	. 13
Slika 10: SAR naših načrtovanih glikokonjugatov	. 16
Slika 11: Sintezni načrt za prvo serijo spojin	.17
Slika 12: Načrtovanje α-D-triazolmanopiranozidov na podlagi zadetka	. 18
Slika 13: Sintezni načrt za drugo serijo spojin	. 19
Slika 14: Sintezni načrt za derivat z 2 C na p- mestu	. 20
Slika 15: Številčenje spojin pri procesiranju ¹ H in ¹³ C spektrov	. 23
Slika 16: Princip kompetitivne fluorescentne polarizacije	. 25
Slika 17: Mehanizem reakcije acetiliranja manoznih OH skupin	. 54
Slika 18: Mehanizem 1,2 - transglikozidacije	. 55
Slika 19: Mehanizem Williamsonove sinteze etrov	. 56
Slika 20: Mehanizem "Sonogashira coupling" reakcije	. 57
Slika 21: Mehanizem odščite s TBAF	. 59
Slika 22: Predviden mehanizem Cu katalizirane 1,3-dipolarne Huisgenove cikloadicije	
(CuAAC), katalizirane z dvema Cu atomoma	. 60
Slika 23: Mehanizem Zemplénove deacilacije	. 62
Slika 24: Mehanizem hidrolize estra	. 63
Slika 25: Mehanizem beta eliminacije pri prvem poskusu sinteze	. 63
Slika 26: Drugi neuspešen poskus sinteze	. 63
Slika 27: Tvorba kromove kisline, Jonesov reagent	. 64
Slika 28: Mehanizem Jonesove oksidacije do aldehida	. 65
Slika 29: Mehanizem Jonesove oksidacije do kisline	. 65
Slika 30: Mehanizem Fischerjeve esterifikacije	. 66

Slika 31: Sidranje spojin 18 in 19 v vezavno mesto FimH	. 69
Slika 32: Sidranje spojine 12 v vezavno mesto FimH	. 93
Slika 33: Sidranje spojine 24 v vezavno mesto FimH	. 93
Slika 34: Sidranje spojine 30 v vezavno mesto FimH	. 94

Kazalo tabel

Tabela 1: Serija poskusnih reakcij pri reakciji Sonogashira sklopitve	. 58
Tabela 2: Rezultati testiranja vezavne afinitete prve serije spojin	. 67
Tabela 3: Rezultati in vitro testiranja tvorbe biofilma prve serije spojin	. 67
Tabela 4: Rezultati testiranja vezavne afinitete druge serije spojin	68

I. Povzetek

Površina celic lahko služi za prepoznavanje med celicami in vezavo patogenov. Adhezijski procesi vključujejo proteine, specifične za ogljikove hidrate, lektine, ki interagirajo s sladkorji preko domen za vezavo ogljikovih hidratov. FimH je fimbrijski lektin tipa 1, lociran na konicah pilijev tipa 1 uropatogene *Escherichie coli*, ki ima sposobnost adhezije in infekcije uroepitelijskih celic.

Inhibicija mikrobne kolonizacije celic z uporabo primernih antiadhezivnih ligandov za bakterijske površinske receptorje, predstavlja novo terapevtsko alternativo za zdravljenje infekcij, ki jih pozroča uropatogena *E.coli*. Ker bi se zmanjšal selektivni pritisk na invazivne bakterije, bi takšna inhibicija, ki prepreči celoten cikel okužbe, utrla pot novim metodam zdravljenja urinarnih infekcij, ne da bi prišlo do bakterijske rezistence.

Naš cilj je bil izboljšati afiniteto antagonistov bakterijskega površinskega lektina FimH z uvedbo različnih aglikonov na D-manopiranozo preko α -glikozidne vezi. Izhajali smo iz začetnega »zadetka«, spojine 4-feniltriazol- α -D-manopiranoze z obetavno afiniteto in z aglikonom, ki je vezan preko nenaravne N-glikozidne vezi, ki zagotavlja večjo stabilnost v fiziološkem okolju. Najprej smo načrtovali in sintetizirali prvo serijo spojin s fenilnim delom, ki sega skozi t. i. »tirozinska vrata«, kot je bilo predvideno z molekulskim sidranjem. Druga serija spojin je bila načrtovana in sintetizirana z različnimi oksialkilkarboksilnimi deli, vezanimi na *m*- in en na *p*- mestu fenilnega obroča z namenom interakcije z aminokislinskim ostankom Arg98, saj bi s tvorbo ionskih ali vodikovih vezi s tem ostankom lahko dosegli višjo afiniteto do FimH.

Spojine so bile testirane v obeh oblikah, v obliki kisline in estra na izolirani FimH (*wild type*) in na R98A mutantu, da bi ocenili morebiten vpliv tvorbe ionske vezi z Arg98, če do tvorbe te sploh pride. Po testiranju na izoliranem FimH, je bila prva serija spojin ocenjena še v testiranju statične tvorbe biofilma. Rezultati so podani kot minimalna inhibitorna biofilmska koncentracija, ki predstavlja koncentracijo, pri kateri pride do zmanjšanja tvorbe biofilma kliničnega izolata *E. coli*. Rezultati testiranj kažejo, da testirane spojine vežejo FimH v nanomolarnih koncentracijah, za zmanjšanje tvorbe biofilma pri prvi seriji spojin pa so potrebne mikromolarne koncentracije.

Ključne besede: uropatogena *E. coli*, infekcije urinarnega trakta, antiadhezivna terapija, FimH antagonisti, glikomimetiki, N – glikozidna vez, D-manoza.

II. Abstract

The cell surface serves as a docking site of other cells or pathogens. Such adhesion processes involves carbohydrate-specific proteins lectins, which interact with sugars with their carbohydrate recognition domains. FimH is a type 1 fimbrial lectin located at the tip of type-1 pili of uropathogenic *Escherichia coli* guiding its ability to adhere and infect urothelial cells.

Inhibition of microbial colonization of cells by utilizing antiadhesive ligands for bacterial surface adhesive proteins is considered as a promising new therapeutic alternative to treat infections caused by uropathogenic *E.coli*. Given the lack of selective pressure imposed on the invading bacteria, such inhibition (preventing the entire infection cycle) would pave the way to a novel urinary tract infections treatment method, unlikely to encounter resistance phenomena.

Our goal was to improve affinity of FimH antagonists by incorporating various aglycones to the D-mannopyranose via α -glycosidic bond. We started from initial hit, 4-phenyltriazolo- α -D-mannopyranoside with promising affinity and with an aglycone moiety attached via unnatural N-glycosidic bond that warrants stability in physiological environment. First, a series of compounds was designed and synthesized with phenyl moiety that protrudes through so-called »tyrosine gate«, as predicted by molecular docking calculations. Next series designed and synthesized was with various oxyalkylcarboxylate residues which were introduced at *m*- and one at *p*- position of the phenyl moiety to target ionic or hydrogen bond with Arg98 residue.

Compounds were assayed in both ester and free acid form on isolated FimH (*wild type*) and R98A mutant to evaluate potential ionic bond formation with Arg98 and to evaluate the influence of both free acids and esters on compounds' potency. After screening on isolated FimH, first series of compounds were also evaluated in a static biofilm formation assay and the data given as the minimal biofilm inhibitory concentration that leads to the attenuation of biofilm formation of *E. coli* clinical isolate. The results of the binding assays indicate that tested compounds bind FimH at nanomolar concentrations and reduce the formation of biofilm in micromolar concentrations.

Keywords: uropathogenic *E. coli*, urinary tract infections, antiadhesion therapy, FimH antagonists, glicomimetics, N – glycosidic bond, D-mannose.

III. Okrajšave

Å	angström
AAT	antiadhezivna terapija
AK	aminokislina
Arg	arginin
BTEAc	benziltrietilamonijev klorid
cAMP	ciklični adenozinmonofosfat
CDCl ₃	devteriran kloroform
CRD	carbohydrate recognition domain – domena za vezavo ogljikovih
	hidratov
CuCAA	copper(I)catalyzed azide-alkyne cycloaddition – z bakrom katalizirana
	azid-alkin cikloadicija
d	dublet
dd	dublet dubleta
ddd	dublet dubleta dubleta
DIPEA	N,N-diizopropiletilamin
DKM	diklorometan
DMF	dimetilformamid
DMSO-d ₆	devteriran dimetilsulfoksid
D ₂ O	devterirana voda
ekv	ekvimolarna količina (ekvivalent)
ESI	electrospray ionization – elektrorazpršilna ionizacija
FimH	<i>fimbrial adhesin H</i> – fimbrijski adhezin H
FimH _{LD}	lektinska domena FimH
FimHPD	pilijska domena FimH
FimH _{FL}	FimH full length – celotna dvodomenska FimH
FP	fluorescentna polarizacija
Hex	<i>n</i> -heksan
HM	<i>N</i> -heptil α-D-manozid
HRMS	high resolution mass spectrometry – masna spektrometrija visoke
	ločljivosti
IBC	intracellular bacterial communities – znotrajcelične bakterijske kolonije

Ile	izolevcin
IR	infrardeča spektroskopija
J	sklopitvena konstanta
KKR	kolonska kromatografija
m	multiplet
Man	D-manoza
MF	mobilna faza
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MO	mikroorganizmi
MS	masna spektrometrija
nas. razt.	nasičena raztopina
NMR	nuclear magnetic resonance – jedrska magnetna resonanca
Phe	fenilalanin
PRR	pattern recognition receptor - vzorčno prepoznavni receptor
q	kvartet
Rf	retencijski faktor
RIP	relative inhibitory potency – relativna inhibitorna moč glede na *metil α -
	D-manopiranozid ali **heptil α-D-manopiranozid
S	singlet
SAR	structure-activity relationship – odnos med strukturo in delovanjem
Tv	temperatura vrelišča
t	triplet
TBABr	tetrabutilamonijev bromid
TBAF	tetrabutilamonijev fluorid
TLC	thin layer chromatography – tankoplastna kromatografija
TLR-4	toll-like receptor 4
Tyr	tirozin
UPEC	uropatogena Escherichia coli
UTI	urinary tract infection – infekcija urinarnega trakta
ŋ	izkoristek reakcije
δ	kemijski premik

1 Uvod

Mikroorganizmi (MO), kot so bakterije, virusi in paraziti predstavljajo velik del narave, a le majhen delež njih je sposoben povzročati infekcijske bolezni, ki veljajo za drugi najpogostejši vzrok smrti na svetu (1). Poleg zelo patogenih in kolonizirajočih MO, so zelo pogoste fakultativno patogene klice, med katere spada *Escherichia coli*, ki lahko v določenih pogojih povzroči infekcijo. Prisotnost MO pa ni edini pogoj za nastanek bolezni. Čeprav je njihova sposobnost, da povzročijo bolezen pomemben virulentni faktor, sta ključna dejavnika še dispozicija človeka, da sprejme bolezen in velika masa bakterij.

Infekcije, ki jih povzročajo bakterije, zdravimo predvsem ali izključno z antibiotiki. Prekomerna in nepravilna uporaba antibiotikov, ki imajo za tarčo večinoma proces za bakterijsko replikacijo, je pripeljala do pritiska za razvoj rezistence in tako postala eden največjih izzivov sodobne medicine. Nabor antibiotikov je postal omejen, rezistenca na bakterije pa čedalje večja, kar je med drugim pripeljalo do razvoja antiadhezivne terapije, ki predstavlja alternativo ali pa je komplementarna terapiji z antibiotiki. Kljub vsemu pa antibiotiki še vedno ostajajo zdravila prve izbire za zdravljenje bakterijskih infekcij (2).

1.1 Antiadhezivna terapija in njene prednosti

Adhezija bakterij na tkiva je eden izmed ključnih korakov za razvoj infekcije, zato skušamo z antiadhezivno terapijo (AAT) preprečiti interakcije med patogeni in tkivi gostitelja. Pri tem ne delujemo bakteriostatično ali bakteriolitično, zato je pričakovati zmanjšan selekcijski pritisk in s tem zmanjšan potencial za razvoj rezistence patogena. Med ostale prednosti AAT lahko štejemo še ohranjeno spodbujanje lastne imunosti, saj ostanejo bakterije mehansko intaktne. Naravna flora ni prizadeta, obenem pa ne pride do sproščanja toksinov, saj ne ubijemo bakteriji. Če bi prišlo do mutacije adhezina, bi se spremenili površinski receptorji na bakterijah, kar vpliva direktno na vezavo patogena na celične receptorje. S tem zmanjšamo virulenca patogena, do adhezije ne pride, posledično ne pride do tvorbe biofilma in ne do infekcije. Zmanjšana je tudi kontaminacija okolja v primerjavi s terapijo z antibiotiki (3, 4, 5).



Slika 1 : Princip antiadhezivne terapije. Bakterije se z vezavo na urotelijske celice izognejo odstranitvi z urinom (A), AAT skuša preprečiti vezavo patogena in posledično infekcijo (B). Povzeto po (6).

1.2 Infekcije urinarnega trakta

Bakterijska kolonizacija organov in tkiv lahko povzroči številne težave za organizem. Mednje spadajo infekcije, katerih razvoj je pogojen s prepoznavo in adhezijo patogenov na površino epitelija gostitelja (7).

Infekcije urinarnega trakta (UTI) so ene izmed najbolj prevalentnih bakterijskih infekcij, ki prizadanejo na milijone ljudi in zahtevajo visoke stroške zdravljenja. Za več kot 80 % uroinfekcij je vzrok uropatogena *Escherichia coli* (UPEC), sicer komenzalna prebivalka prebavnega trakta sesalcev. Spada v družino *Enterobacteriaceae*, med fakultativno anaerobne G(-) bakterije. Najbolj ogrožene so ženske, ki imajo kar 50 % možnost okužbe z vsaj eno simptomatsko UTI v svojem življenju. Uroinfekcije imajo tako negativen vpliv na življenja žensk, predvsem tistih, ki trpijo za ponavljajočimi okužbami. Razlog za večjo obolevnost žensk leži v njihovi anatomski strukturi. Ženske imajo krajšo (3 – 4 cm) sečnico od moških (do 20 cm), kar pomeni manjšo oviro za migracijo bakterij do mehurja. Večje tveganje za okužbo obstaja tudi pri diabetikih, pacientih z anomalijami urinarnega trakta, paraplegikih in bolnikih s permanentnim urinarnim katetrom, pri katerih so pogoste ponavljajoče okužbe z rezistentnimi sevi. Predvideva se, da pride do sprememb v glikozilaciji receptorjev FimH, atrofijskih sprememb epitelija, kar vodi do povečane vezave UPEC na FimH in posledično do infekcije (4, 8, 9, 10).

Pri zdravih posameznikih večina uropatogenov izhaja iz rektalne mikrobiote, v mehur vstopijo skozi sečnico, kjer telo odreagira z infekcijo – cistitisom, za katero je značilna disurija, pogosto uriniranje, bakteriurija, piurija, lahko celo življenjsko ogrožujoča stanja

kot sta pielonefritis in urosepsa. UTI, povzročene zaradi prisotnosti in razmnoževanja MO, se lahko razvijejo v nižjem ali višjem predelu urinarnega trakta. Akutne, nekomplicirane infekcije spodnjega urinarnega trakta zdravimo z β – laktami (amoksicilin) in fluorokinoloni (ciprofloksacin), ki so učinkoviti za zdravljenje kratkotrajnih simptomov UTI, pri podaljšani ali večkratni aplikaciji pa zaradi pojava bakterijske rezistence niso več učinkoviti (11, 12).

1.2.1 Mehanizem nastanka UTI

Bakterija se v urinarnem traktu adherira in prične s procesom, podobnim fagocitozi. Z adhezijo bakterije lažje pridobijo hranila, dostavljajo toksine, razvijajo sposobnost preživetja, kolonizirajo epitelij in se lažje izognejo obrambnim mehanizmom gostitelja. Izziv AAT je dejstvo, da patogeni nosijo gene, ki kodirajo različne tipe adhezinov, ki se izrazijo glede na okolje v katerem so (11, 13). Vezava UPEC na visoko manozne N-glikane transmembranskega glikoproteina uroplakin 1a vodi v apoptozo in luščenje celic mehurja ter povišane vrednosti cAMP. Le majhen odstotek adheriranih bakterij napade urotelijske celice, kjer kolonizirajo in invadirajo epitelij mehurja. Te bakterije lahko imunski sistem odstrani v procesu eksocitoze, v procesu odvisnem od TLR4 (Toll Like Receptors), v katerem urotelijske celice izločajo citokine in aktivirajo nevtrofilce za eliminacijo bakterij.



Slika 2: Infekcijski cikel okužbe z UPEC. Povzeto po (28).

Lahko pa se bakterije imunskemu sistemu izognejo in se premaknejo v citoplazmo, kjer se hitro agregirajo v znotrajcelične bakterijske skupnosti (IBC), kjer so zaščitene pred imunskim sistemom in antibiotiki. Nastanek IBC je prehoden in omogoča njihovo hitro širitev do več tisoč bakterij, združenih v biofilm. Glavni razlog za ponavljajoče okužbe UTI pa je sposobnost UPEC, da se lahko odcepijo iz IBC in se premaknejo v epitelij mehurja, kjer ustvarijo znotrajcelične rezervoarje, ki so v mirujočem stanju tudi do več tednov, tolerantni na antibiotike in kjer lahko kasneje ponovijo proces invazije in tvorbe biofilma (9, 14, 15, 16, 17).

1.3 Lektini

Za prepoznavo in adhezijo bakterije uporabljajo lektine (lat. *legere*, izbrati), sladkorno – vezavne proteine, ki so visoki specifični za posamezne glikokonjugate in so lahko izraženi na bakteriji ali na površini gostitelja. Po drugi strani pa lahko lektini, ki so del imunskega sistema, identificirajo in vežejo druge patogene in njihove glikane. To lastnost bakterije izkoriščajo za kolonizacijo, saj so lektini domene bakterijskih toksinov, ki izkoriščajo adhezijo na glikokonjugate z namenom vstopa v tarčno celico. Adhezine pa uporabljajo tudi za povezavo z drugimi mikrobnimi celicami in s tem za tvorbo biofilma. Delimo jih na intracelularne, ki so vključeni v procese znotraj celice in ekstracelularne, ki prepoznavajo terminalne epitope ogljikovih hidratov drugih celic in patogenov (18):

- Lektini tipa C: vsebujejo CRD domeno za vezavo glikanov, so pomembni v intracelularni adheziji in prepoznavi patogenov (19)
- Lektini tipa I: spadajo v družino imunoglobulinov (11)
- Bakterijski in virusni lektini (20).

Večina manozo vezavnih lektinov spada v skupino vzorčno prepoznavnih receptorjev, PPRs (**P**attern **R**ecognition **R**eceptors) receptorjev, ki spadajo med lektine tipa C. Lahko so izraženi kot topni proteini plazme ali kot vezavni membranski proteini na površini celic imunskega sistema (makrofagi, dendritične celice) (21).

1.3.1 FimH kot adhezivna komponenta UPEC

Za uropatogeno *E. Coli* je en izmed glavnih viruletnih faktorjev lektin **FimH**, s katerim se bakterija pripne na oligomanozide, ki so del glikoproteina uroplakin 1a, naravnega liganda FimH in se na ta način izogne obrambnim mehanizmom gostitelja (4, 22). FimH se nahaja

na konicah pilijev tipa 1 UPEC, je del šaperonsko – vratarske poti, katere funkcija je kolonizacija, tvorba biofilma in invazija celic. Urinarna infekcija je tako posledica interakcije med FimH in visoko manoziliranimi glikoproteini, prisotnimi na urotelijskih celicah (3, 16).

Bakterijska adhezija je odvisna od adhezivnih organelov, fimbrij oz. pilijev, ki izhajajo iz površine bakterije in vsebujejo lektinsko domeno, s katero se bakterija pripne na glikokaliks evkariontskih celic. Najbolj znane fimbrije so fimbrije **tipa 1** uropatogene *E. coli* z manozo specifičnim lektinom FimH, ki imajo glavno vlogo pri povzročitvi urinarnih infekcij (23, 24, 25). Gre za proteinske strukture, v obliki laskov, dolgih 1 – 2 μ m in širokih 7 nm na površini bakterijskih celic. Imajo izgled toge vijačne palice, ki ima na konici dvodomenski FimH (3, 26). Glede na specifičnost ogljikovih hidratov razdelimo pilije v 2 razreda:

- **Tip 1**: krajši, manozno specifični, ki se lahko vežejo na manozide dveh glikoproteinov, uroplakin 1a in $\alpha_3\beta_1$ integrin, ki sta v velikih količinah prisotna na urotelijskih celicah. Poleg povzročitve cistitisa, vnetja sluznice sečnega mehurja, imajo pomembno vlogo tudi pri neonatalnem meningitisu in Chronovi bolezni.
- Tip P: daljši, galabiozno specifični lektini, ki lahko povzročijo pielonefritis, okužbo ledvic zaradi vezave na galabiozne receptorje (7, 13, 27).



Slika 3: Sestava pilija. Levo: shematski prikaz sestave pilija. Desno: mikroskopska slika pilijev. Povzeto po (30).

Fimbrija *E. coli* je sestavljena iz štirih podenot: FimA, FimF, FimG in FimH. Prevladujoča strukturna komponenta je več tisoč nekovalentno povezanih FimA podenot, ki sestavljajo telo pilusa ter po ena enota FimF, FimG in FimH na konici fimbrije. FimC je periplazmatski šaperon, protein, ki usmerja sestavljanje fimbrij tipa 1, pri tem mu pomaga porin FimD. FimH nosi domeno CRD (Carbohydrate Recognition Domain), ki je ključna za prepoznavo sladkorjev (29, 30).

1.3.2 Mehanizem vezave UPEC

FimH_{FL} sestavljata dve domeni iz skupno 279 aminokislinskih ostankov:

- **N** terminalna lektinska domena (Fim H_{LD} , tudi CRD domena) z manoznim vezavnim žepom (AK ostanki 1 156) in
- C terminalna pilijeva domena (FimH_{PD}), ki povezuje adhezin z ostalim delom pilija in je zasidran v konico fibrile (AK ostanki 160 279).

Obe domeni sta povezani preko kratkega povezovalca (AK ostanki 157 – 159). Lektinska domena je sestavljena iz več antiparalelnih β vijačnic, povezanih z zankami na obeh straneh domene (3, 26, 30).

FimH lahko izkazuje 2, med seboj različna mehanizma, »slip-bond« in »catch-bond« mehanizem, kar je odvisno predvsem od pogojev, v katerih se bakterija nahaja. Za obrambo pred različnimi jakostmi urinskega pretoka, so UPEC razvile obrambni mehanizem, vezan na konformacijsko dinamiko FimH adhezina, »catch-bond« mehanizem. V odsotnosti pretoka pa prevladuje »slip-bond« mehanizem, ki je značilen za konformacijo s srednje veliko afiniteto, v kateri bakterija predvsem raziskuje okolico za pridobitev hranil.

Mehanizem, kjer se adhezivne vezi z manozilirano površino krepijo z večanjem mehanskega stresa, imenujemo »catch-bond« mehanizem in je direktna posledica konformacijske heterogenosti FimH. Gre za trofazni mehanizem, ki je podrobneje opisan pod sliko 4. Vse konformacijske spremembe so posledica interakcij med obema domenama (FimH_{LD} in FimH_{PD}) in so vodene preko dinamične alosterije, ki se kaže kot razlika v proteinski dinamiki. Pilijska domena ima vlogo negativnega alosteričnega modulatorja. Interdomenske interakcije tako povzročajo hitro vezavo liganda in hitro disociacijo liganda od pilijev, ko ni prisotne strižne sile. Hitra sprostitev liganda, uroplakina 1a, iz vezavnega mesta v nižjem predelu urinarnega trakta je pomembna za premikanje bakterij s piliji in s tem njihovo sposobnostjo za kolonizacijo novih površin (3, 31, 32, 33).



Slika 4: »Catch-bond« mehanizem FimH. V osnovnem stanju FimH, v odsotnosti strižnih sil oz. pretoka urina, sta obe domeni med seboj povezani, FimH_{LD} je v stisnjeni konformaciji z odprtim vezavnim mestom (A_{prost}), kjer ima konformacija nizko afiniteto. Po vezavi liganda se zanka, ki tvori odprto vezavno mesto, zapre in tako tvori globok in jasno strukturiran vezavni žep (A_{vezan}). Tu ima konformacija FimH srednje veliko afiniteto. V tej konformaciji so interakcije med FimH in manozo še vedno relativno šibke in prehodne, tako je bakteriji omogočena boljša kolonizacija, kar prispeva k patogenezi UTI. Z večanjem strižne napetosti se domeni ločita, med seboj ne interagirata, povezani sta le preko linkerja FimH ostankov 154 – 160. FimH_{LD} gre v iztegnjeno konformacijo z najvišjo afiniteto (S_{vezan}). V konformaciji z visoko afiniteto, je vezavno mesto FimH globoko, ozko in negativno nabito. Z visoko afiniteto se bakterija močneje veže na uroplakin 1a, interakcije postanejo dolgotrajne in nastanejo mikrokolonije, ki so trajno povezane s površino in se tako izognejo odstranitvi med uriniranjem. Po prenehanju strižne sile, se FimH vrne v ravnotežje konformacij med nizko in srednje veliko afiniteto. Povzeto po (31).

1.3.3 Sestava vezavnega mesta

Že pred dobrimi 35-imi leti so dokazali, da je vezavno mesto manoze v iztegnjeni konformaciji in ustreza velikosti trisaharidov, blizu vezavnega mesta pa je hidrofobna regija, kamor se vežejo aromatski deli antagonistov. V vezavno mesto CRD domene se najbolj prilegajo strukture N-glikozidnih glikoproteinov, vanj se lahko veže le en ostanek α -D-manoze (24, 34). Zamenjave OH skupin na mestih 2,3,4 in 6 manoze rezultirajo v izgubi afinitete, kar kaže na nujnost teh skupin za vezavo. Povezane so v sistem vodikovih vezi s stranskimi verigami hidrofilnih AK vezavnega mesta. Anomerna OH skupina manoze ni vpletena v direktne interakcije z vezavnim mestom FimH, zato jo izkoriščamo za vezavo aglikonskega dela antagonistov. Izguba afinitete se pojavi tudi pri antagonistih z β – glikozidi ali pri zamenjavah manoze z drugimi sladkorji (npr. L – izomer manoze, glukoza, fruktoza). Vse to kaže na specifičnost vezavnega mesta FimH za manozo, ki je z

 α -glikozidno vezjo pripeta na preostanek glikozida, kar omogoča UPEC, da prepozna le celice z manozilirano površino (14, 16, 17, 27, 35).

Notranjost vezavnega mesta je sestavljena iz aminokislin s hidrofilnimi stranskimi verigami, med njimi Phe1 (N-terminalna AK). Zunanjost vezavnega mesta pa sestavljajo AK s hidrofobnimi stranskimi verigami med katerimi sta najpomembnejši Tyr48 in Tyr137, ki sestavljata tirozinska vrata, kamor se vežejo aromatski aglikoni antagonistov za dosego π - π interakcij ali van der Waalsovih interakcij v primeru alkilnih verig (7, 17).



Slika 5: Aminokislinska sestava vezavnega mesta. Levo: je prikazana notranjost CRD domene, ki jo sestavljajo hidrofilni AK ostanki: Phe1 in Asn46, Asp47, Asp54, Gln133, Asn135 in Asp140. Centralna Asp54 tvori močne interakcije z manozo oz. manozidi. Desno: zunanjost vezavnega mesta sestavljena iz hidrofobnih AK ostankov: Ile13, Tyr48, Ile52, Tyr137 in Phe142. Povzeto po (7).

Manoza se veže v visoko specifičen, negativno nabit, polaren α -D-manozni vezavni žep. Boljšo afiniteto vezave dosežemo s hidrofobnimi deli antagonista, ki so usmerjeni proti vhodu v manozni vezavni žep, tirozinskim vratom, ki so zelo fleksibilna regija. Sestavljena so iz tirozinskih ostankov Tyr48 in Tyr137 z aromatskimi stranskimi verigami in Ile52, ki leži med njima. Tyr137 stabilizira zanko z Tyr48 preko hidrofobne interakcije z Ile52 (14, 26). Glede na strukturo antagonista, so tirozinska vrata v odprti ali zaprti konformaciji, kar je posledica induciranega prileganja, saj se protein prilagodi v določeno konformacijo glede na tip vezanega liganda. Pri tem ima glavno vlogo Tyr48, ki z različnimi položaji stranske verige upravlja afiniteto in specifičnost vezave. Ob vezavi naravnega substrata oligomanoze-3, ki vsebuje Man α 1-3Man β 1-4GlcNac, ključen za naravno adhezijo FimH, se premakne v odprto konformacijo. Z alkilnimi ali aromatskimi deli antagonistov tako posnemamo vezavne interakcije med oligomanozo-3 v tirozinskih vratih.



Slika 6: Kristalna struktura FimH z oligomanozo-3. Povzeto po (17).

Ključno je tudi prilagajanje antagonistov površini tirozinskih vrat in velikost aglikonskega dela, saj v primeru prevelikega aglikona, le ta vzpostavi interakcije že v periferiji vezavnega mesta in tako ne pride do vezave glikona v vezavno mesto (7, 36, 37).

1.4 Glikomimetiki kot zdravilne učinkovine

Ogljikovi hidrati imajo pomembno vlogo v presnovi, strukturi celic in celičnih prepoznavnih procesih. So del glikokaliksa, sladkornega plašča, ki je zunanja komponenta površine celic in so pomembni pri vzdrževanju homeostaze celic. Vendar imajo zdravilne učinkovine, ki temeljijo na ogljikovih hidratih precej slabosti, najbrž največja pa so neustrezne farmakokinetične lastnosti. Zaradi številnih OH skupin in nabojev (karboksilati, sulfati) so izredno polarni in ne morejo pasivno prečkati plasti enterocitov v tankem črevesju, kar je pogoj za peroralno aplikacijo. Ovire predstavljajo tudi molekulska masa oligo- in polisaharidov, število akceptorjev in donorjev vodikovih vezi. Tudi če jih apliciramo parenteralno, jih doleti hitra renalna ekskrecija, pogoste so tudi interakcije s komponentami plazme in razgradnja z jetrnimi mikrosomi ali različnimi glikozidazami. Slabostim ogljikovih hidratov se lahko izognemo z načrtovanjem glikomimetikov, a je to vseprej kot lahka naloga. Čeprav je problem visoke polarnosti teoretično rešljiv z odstranitvijo za vezavo nepomembnih hidroksilnih skupin, večina sladkornih receptorjev izkazuje visoko stopnjo specifičnosti za naravne ligande ter tako preprečujejo tudi najmanjše odstopanje od originalne strukture liganda. To velja še posebno za OH skupine, ki sodelujejo v tvorbi strogo geometričnih vodikovih vezi (11, 30).

Z glikomimetiki skušamo posnemati bioaktivno funkcijo sladkorjev in obenem izboljšati njihove slabosti kot sta slaba aktivnost ter nezadostne »drug-like« lastnosti. Doseči želimo

večjo metabolno stabilnost in večjo selektivnost. Izboljšati želimo biološko uporabnost in serumski razpolovni čas, obenem pa znižati toksičnost in stroške sinteze.

Kompleksi med sladkorji in lektini imajo zaradi visokih disociacijskih konstant (k_{off}) kratek razpolovni čas ($t_{1/2}$), ponavadi v območju nekaj sekund, cilj rezidualnega časa glikomimetikov pa se giba v rangu nekaj minut do nekaj ur, zato je nujno izboljšanje k_{off} za dosego terapevtskega učinka. V ta namen se uporabljata pristopa bioizosterne zamenjave ključnih funkcionalnih skupin (vogliboza pri zdravljenju diabetesa) in uvedba predzdravil (npr. oseltamivir za zdravljenje virusnih infekcij) (11, 13, 25).



Slika 7: Primer bioizosterne zamenjave in uvedbe predzdravil. Levo: vogliboza, N-substituiran derivat valiolamina. Desno: fosfatno predzdravilo oseltamivir. Povzeto po (11).

1.5 Razvoj antagonistov FimH

Zaradi specifičnosti fimbrij tipa 1 za manopiranozide je razvoj antagonistov FimH potekal v smeri glikomimetikov, ki temeljijo na manozi z različnimi aglikoni. Najbolj pogosto uporabljen pristop je zamenjava ali podaljšanje OH skupine na anomernem C1 atomu manoze. V zadnjem času pa se za dosego peroralno uporabnih antagonistov uporablja pristop z uvedbo predzdravil.

Dokazano je, da α -D-manozni inhibitorji ne samo blokirajo bakterijsko adhezijo na uroepitelijske celice ampak tudi antagonizirajo invazijo in tvorbo biofilma. Že pred dobrimi 30 leti so dokazali afiniteto α -D-manoze v milimolarnem območju (K_D = 2.3 µm), kristalna struktura FimH vezavnega mesta pa je bila razrešena leta 1999. Različni oligosaharidi so izkazali 20 – 30 – krat večji inhibitorni potencial kot metil α -Dmanopiranozid (K_D = 2.2 µm). Di- (RIP* = 0.5), tetra- (RIP* = 0.7) in pentasaharidi (RIP* = 0.7) so v primerjavi z metil α -D-manozidom izkazali nizke afinitete. Za idealni disaharidni ligand se je izkazal 1,3 – vezan manobiozid α -D-Man-(1-3)-D-Man (9, 11, 14, 23, 26, 34). Oblikovala sta se dva pristopa razvoja učinkovin, multivalentni FimH antagonisti, ki afiniteto povečajo preko avidnosti in majhne molekule, monovalentni antagonisti načrtovani na osnovi α -D-manoze, ki z hidrofobnimi aglikoni, vezani na anomerni ogljik, povečajo afiniteto vezave do vezavnega mesta. Dosedanje raziskave so pripeljale do številnih razredov α -D-manopiranozidnih derivatov, z akilnimi, arilnimi, bifenilnimi, indolfenilnimi in indolinilfenilnimi aglikoni (3, 29).

1.5.1 Nearomatski antagonisti

n-Heptil- α -D-manozid (HM, **1**) je nearomatski antagonist v nanomolarnem območju (K_D = 5 nM) in je največkrat uporabljen kot referenčna spojina v študijah, čeprav so njegove farmakokinetične lastnosti neustrezne za peroralno aplikacijo. Ostaja eden izmed najmočnejših monovalentnih FimH antagonistov. Z vezavo HM na FimH, je bakterija ireverzibilno inhibirana, posledično ni adhezije in invazije celic. V mikromolarnih koncentracijah tudi prepreči formacijo biofilma. Tako močne vezi z FimH ustvarja tudi v pogojih brez strižnih sil. Alkilna veriga tvori hidrofobne interakcije, van der Waalsove vezi s tirozinskimi vrati, kar izboljša vezavno energijo. Ker prve generacije antagonistov z alkilnimi aglikoni vsebujejo večje število rotirajočih vezi, to pomeni večjo entropijsko izgubo ob vezavi, kar skušamo popraviti z vezavo na hidrofobno regijo poleg vezavnega mesta (5, 9, 37)



Slika 8: Znani alkilni in preprosti arilni α-D-manozidi z mikro in nanomolarnimi afinitetami. Povzeto po (2, 8).

Heptavalenten HM (2) privezan na β -ciklodekstrin, se je izkazal za zelo učinkovitega (K_D = 2.9 nM), apliciran skozi kateter. Multivalentni HM inhibitorji izkazujejo visoke afinitete *in vitro*, zaradi fenomena vezave na skupke lektinskih receptorjev, t. i. »cluster effect«. Interakcije med proteini in sladkorji so ponavadi zelo šibke in to slabost narava premaga z

multivalentnostjo na glikanu in lektinu, tako da je dosežena visoka avidnost vezave. Slabost ciklodekstrinov je, da so izredno polarni, imajo veliko molekulsko maso, zato niso primerni za peroralno aplikacijo (2, 13).

1.5.2 Preprosti aromatski antagonisti

Prvi arilni antagonisti so bili preprosti aril manozidi, z aromatskim obročem vezanim na anomerni OH skupini α -D-manoze substituirani z majhnimi substituenti (NO₂, Cl, CN, COOR,...) na različnih mestih aromatskega obroča. Z aromatskimi aglikoni so dosegli hidrofobne interakcije s tirozinskimi vrati, *p*-nitrofenil- α -D-manozid (**3**) je izboljšal afiniteto za dva velikostna razreda (K_d = 44 nM) v primerjavi z metil α -D-manozidom (K_D = 2.2 µm) (**1**). Benzilni analogi z metilenskim distančnikom (**4**), narejeni z namenom povečanja fleksibilnosti molekule, so pripeljali do zmanjšanja afinitete (RIP* = 85). Višjo afiniteto imajo antagonisti, ki imajo aromatski del vezan direktno na anomerni ogljik α -Dmanoze.

Derivati, ki imajo za terminalni obroč štiričlenski aromatski obroč (RIP* = 6900) (5), so ustvarjali dodatne interakcije s tirozinskimi vrati zaradi njegove planarne strukture. Metilenski distančnik namesto fenilnega obroča je močno zmanjšal afiniteto (RIP* = 2.7), ker je premajhen, da bi omogočil interakcijo kvadratne kisline s tirozinskimi vrati (7).

1.5.3 Biarilni antagonisti

Ker anomerna fenilna skupina ne doseže tirozinskih vrat, je sledilo podaljšanje s še enim fenilnim obročem. Bifenilni antagonisti so bili načrtovani z namenom ustvarjanja dodatnih hidrofobnih, $\pi - \pi$ interakcij s tirozinskimi vrati in vodikovih vezi, elektrostatskih interakcij, s solnim mostom med Arg98 in Glu50 (4, 16, 22). Poleg izboljšanja afinitete so bili ustvarjeni tudi z namenom izboljšanja farmakokinetičnih lastnosti in metabolne stabilnosti.

Za izboljšanje π - π interakcij so predvsem na terminalem fenilnem obroču dodajali elektronakceptorske skupine, substituirani do izkazali do 7x višjo afiniteto kot nesubstituirani bifenilni derivati. Do danes najbolj aktiven FimH antagonist tesiran in vivo, je indolinfenil manozid (RIP** = 30) (6), ki pri miši zdravi infekcijo z odmerkon 1mg/kg brez dodatne terapije z antibiotiki in vzdržuje MIC več kot 8 ur. Še vedno pa je njegova največja slabost slaba topnost v vodnem mediju (29). Derivata s karboksilatom ($K_D = 17.9 \text{ nM}$) in njegovim metilnim estrom ($K_D = 3.6 \text{ nM}$) (7) na terminalnem fenilnem obroču sicer znižata lipofilnost, a sta potrebna za interakcijo s tarčo in prispevata k $\pi - \pi$ interakcijam s tirozinskimi vrati in polarnimi interakcijami z Arg98. Slabost pa je njegova desolvatacija ob vezavi, kar zmanjša entalpijo vezave. V splošnem velja, da je vezava večinoma vodena entalpijsko ter da je povečana entropija ponavadi kompenzacija za nižjo entalpijo, ki je posledica desolvatacije ter manjše konformacijske in rotacijske energije ob vezavi liganda. Za izboljšanje entalpije so uporabili CN skupino ($K_D = 2.0 \text{ nM}$) (7) namesto karboksilata (5, 12, 17, 26).



Slika 9: Znani biarilni α -D-manozidi z mikro in nanomolarnimi afinitetami. Povzeto po (8, 12).

Bifenilni derivati imajo to slabost, da je omejena njihova konformacijska fleksibilnost, zato so prvi fenilni obroč zamenjali s triazolnim obročem, s katerim bi dosegli ugodnejši položaj v tirozinskih vratih. Vsi triazoli izkazujejo nanomolarne afinitete in dobro topnost, vendar se ne pričakuje, da bi bili peroralno absorbirani (8).

Čeprav lahko lektin FimH nastopa v 3 različnih konformacijah, so bila testiranja do sedaj raziskanih spojin večinoma narejena le v eni konformaciji, visoko afinitetni konformaciji (FimH_{LD}). Razlog za to tiči v dejstvu, da je monomerna FimH_{FL} po naravi zelo nestabilna, izolirana FimH_{LD} pa je »zaklenjena« v konformaciji z visoko afiniteto, zato z oceno afinitet v tej konformaciji ne vidimo celotne slike, saj je naravna in fiziološko bolj pomembna konformacija z srednjo afiniteto, to je konformacija, v kateri ni prisotne strižne sile.

Za uspešno terapijo mora biti antagonist učinkovit v vseh fiziološko relavantnih konformacijah FimH. Tako so afinitete, izmerjene v prejšnih študijah le na $FimH_{LD}$ za

nekatere potencialne antagoniste precenjene tudi do 2 razreda. HM je za $\text{Fim}H_{\text{FL}}$ izkazoval kar 100 x manjšo afiniteto (K_D = 3600 nM) kot pri $\text{Fim}H_{\text{LD}}$ (K_D = 28 nM) (33).

1.5.4 Izboljšava metabolne stabilnosti

Da bi se izognili nizki metabolni stabilnosti O – manozidov, ki bi jih razgradile manozidaze, so bili načrtovani N – manozidi, tudi tema te magistrske naloge in različni C – manozidi. Primer učinkovin na trgu, kjer so uspešno nadomestili metabolno nestabilno O – glikozidno vez s C – glikozidno vezjo, so gliflozini, učinkovine, ki zavirajo prenašalce SGLT-2 in se uporabljajo pri zdravljenju diabetesa tipa II. Naravno prisotni florizin z O - glikozidno vezjo, so nadomestili s C – glikozidno vezjo (dapagliflozin).

1.5.5 Potencialni stranski učinki

Pri načrtovanju antagonistov je potebno upoštevati, da aglikonski deli antagonistov poleg višanja afinitete do FimH, lahko vodijo tudi do nepričakovane toksičnosti (27). Ker so receptorji za manozilirane glikane prisotni tudi drugod v telesu, ne samo na površini *E. coli*, bi lahko prišlo do škodljivih stranskih učinkov zaradi neselektivne vezave antagonistov, vendar le ti niso pričakovani, saj so bili antagonisti optimizirani z hidrofobnimi substituenti, ki interagirajo samo s tirozinskimi vrati, kar je posebnost FimH. Manozni receptorji so vpleteni v številne biološke procese, kot je adhezija med celicama (DC-SIGN) in regulacija homeostaze serumskih glikoproteinov. Sodelujejo tudi pri prirojenem in pridobljenem imunskem odzivu na patogene, ker prepoznajo določene molekularne vzorce. Večina manozno-vezavnih lektinov spada v skupino PRR receptorjev, ki so prisotni predvsem na makrofagih in dendritičnih celicah, vezava povzroči endocitozo in fagocitozo patogenov. Neselektivna vezava na PRR receptorje bi tako imela vpliv na serumski razpolovni čas antagonista, saj bi lahko pripeljala do endocitoze in s tem do eliminacije antagonista iz cirkulacije (21).

1.5.6 Peroralno učinkoviti antagonisti FimH

Za dosego terapevtske tarče, mora biti peroralno apliciran antagonist FimH absorbiran v GIT in renalno izločen, kar pomeni, da mora izkazovati optimalno ravnotežje med topnostjo, permeabilnostjo in lipofilnostjo. Imeti mora nizek jetrni očistek, da je učinek prvega prehoda čim manjši. Za lipofilne antagoniste velja, da se bodo delno reabsorbirali v renalnih tubulih, kar pomeni počasno izločanje z urinom v mehur. Hidrofilni pa bodo slabo reabsorbirani iz primarnega urina in posledično hitro renalno izločeni, kar vodi v visoke začetne koncentracije v urinu in kratko terapevstsko koncentracijo, le nekaj ur (4, 12, 26).

Z glikomimetiki s spremenjeno glikozidno vezjo skušamo preprečiti kislo hidrolizo glikozidne vezi z encimsko hidrolizo α -manozidaz v prebavnem traktu, krvi in tkivih (15). Načrtovani estri kot predzdravila naj bi se absorbirali v intestinalnem traktu in kasneje podlegli hidrolizi z esterazami (karboksilesteraza 2) do karboksilatov, ki so prisotne v enterocitih (4, 38).

Za terapevtsko aplikacijo je izrednega pomena tudi dolg razpolovni čas ($t_{1/2}$), saj je patogenost bakterije odvisna od časa interakcije z endogenim ligandom (uroplakinom Ia) na urotelijski površini. Daljši (več 10 minut ali celo ur) $t_{1/2}$ pomenijo večji *in vivo* izkoristek in posledično večjo možnost za uspešno terapijo (32).

Do sedaj raziskani peroralni antagonisti FimH na miših zahtevajo visoke odmerke za dosego minimalne efektivne koncentracije, da je dosežen antiadhezivni učinek v mehurju. Poleg tega se hitro izločijo, tako da terapevtski učinek traja le nekaj ur. Vzrok temu sta nizka intestinalna absorbcija zaradi slabe topnosti ali slabe permeabilnosti in visoka glomerulna filtracija (majhna vezava na proteine plazme ali slaba reabsorpcija v renalnih tubulih).

Za dosego peroralne absorbcije načrtujemo predzdravila s tvorbo estrov in uporabo bioizosternih zamenjav, s katerimi povečamo lipofilnost in vezavo na proteine plazme ter s tem zmanjšamo izločanje zdravila. Možna je tudi acilacija C-6 hidroksilne skupine manoze, ker je sterično najlažje dostopna za encimsko hidrolizo (38). Načrtovano je bilo tudi fosfatno predzdravilo z namenom povečanja topnosti v primeru zelo lipofilnih glikomimetičnih antagonistov FimH. Aktivna oblika zdravila se hitro sprosti s pomočjo endogene fosfataze, npr. alkalne fosfataze, encima, ki je obilno prisoten v enterocitih (39).

2 Namen dela

V okviru te magistrske naloge bomo v sinteznem laboratoriju pripravili dve seriji spojin potencialnih antagonistov receptorja FimH. Na podlagi že objavljenih publikacij, kjer so ugotovili, da FimH veže alfa-O-manozide, ki imajo v strukturi O-glikozidno vez, ki bi lahko bila vzrok za metabolno (hidrolitično) nestabilnost, bodo naši glikokonjugati vsebovali N-glikozidno vez, metabolno bolj stabilno vez.

Spojine bomo sintetizirali iz D-manoze, kot osrednjega monosaharida in aglikonskega dela, ki bo sestavljen iz različno substituiranih feniltriazolov, vezanih na anomerni ogljik α -D-manoze. Pri prvi seriji spojin bo fenilni obroč v biarilnem sistemu na para poziciji nosil karboksilat oz. njegov metilni ester, druga spojina pa bo vsebovala nesubstituiran fenilni obroč. Z aglikonskim delom bomo pri tej seriji spojin poskušali izboljšati afiniteto vezave s povečanimi interakcijami s tirozinskimi vrati (področje med Tyr48 in Tyr137).

Z drugo serijo spojin bomo poleg interakcij s tirozinskimi vrati, skušali doseči še ionske interakcije med karboksilatom oz. njegovim etilnim estrom in gvanidinom aminokislinskega ostanka Arg98. V ta namen bomo na meta mesto fenilnega obroča pripenjali alkilne verige različnih dolžin, med 4 do 7 C atomov, ki imajo na koncu karboksilat oz. njegov etilni ester. Pri tej seriji spojin bomo sintetizirali tudi derivat z 2 C dolgim distančnikom na para mestu, kar predstavlja poseben izziv, saj je poskus sinteze te spojine spodletel že večkrat.



Slika 10: SAR naših načrtovanih glikokonjugatov.

Sintezo bomo začeli z linearnim pristopom sinteze na monosaharidnem jedru, kateremu bo sledil kovergentni pristop, kjer bomo združili glikonski del z aglikonskim. Sledila bo še odščita in hidroliza estra v primeru spojine ($\underline{\mathbf{8}}$).



Slika 11: Sintezni načrt za prvo serijo spojin. Reagenti in reakcijski pogoji: a) Ac₂O, Pyr, 0-20°C, 24h; b)
 TMSN₃, SnCl₄O, CH₂Cl₂, sobna T, 2h; c) Huisgenova cikloadicija: DIPEA, Cu(I)I, DMF, sobna T, 24h; d)
 NaOMe/MeOH, EtOH, sobna T, 24h; e) 1M NaOH, EtOH, sobna T, 24h.

Po uspešno sintetizirani prvi seriji spojin in po pregledu rezultatov bioloških testiranj, smo pripravili sintezni načrt za drugo serijo spojin pri kateri bomo poskušali izboljšati afiniteto vezave tako, da bomo z modificiranjem aglikonskega dela, s pripenjanjem različno dolgih alkilnih verig na fenilnem obroču, ciljali na ionsko interakcijo med karboksilatom in Arg98:



Slika 12: Načrtovanje α-D-triazolmanopiranozidov na podlagi zadetka.Vpeljani so bili različno dolgi distančniki s karboksilati (-COOH) in njihovi estri (morebitna predzdravila) za izboljšavo pasivne permetacije in za ciljanje Arg98. Povzeto po (40).

Tudi pri sinteznem načrtu druge serije spojin bomo uporabili kombinacijo linearnega in konvergentnega pristopa sinteze. Po linearni sintezi glikonskega in aglikonskega dela, bomo združili oba pristopa v konvergentno sintezo s t.i. Huisgenovo cikloadicijo. Enak pristop bo uporabljen tudi pri sintezi derivata z 2 C distančnikom na *p*- mestu (naslednja stran).



Slika 13: Sintezni načrt za drugo serijo spojin. Reagenti in reakcijski pogoji: a) K₂CO₃, BTEAc, AcCN,
50°C, 24h; b) Sonogashira sklopitev: etiniltrimetilsilan, Pd(Ph₃)₂Cl₂, Cu(I)I, TEA, (DMF), sobna T, 24h; s
sledečo TMS odščito: TBAF, DMF, sobna T, 10 min; c) Huisgenova cikloadicija: DIPEA, Cu(I)I, DMF,
sobna T, 24h; d) NaOMe/MeOH, EtOH, sobna T, 24h; e) 2M NaOH, EtOH, sobna T, 24h.



Slika 14: Sintezni načrt za derivat z 2 C na p- mestu. Reagenti in reakcijski pogoji:a) K₂CO₃, BTEAc, AcCN, 50°C, 24h; b) H₂O:H₂SO₄ = 2:1, aceton, CrO₃, propanol, 0°C, 10min – 24h; c) H₂SO₄/EtOH, etanol, 0 – 75°C, 24h; d) Sonogashira sklopitev: etiniltrimetilsilan, Pd(Ph₃)₂Cl₂, Cu(I)I, TEA, DMF, 60°C, 24h; s sledečo TMS odščito: TBAF, DMF, sobna T, 10 min; e) Huisgenova cikloadicija: DIPEA, Cu(I)I, DMF, sobna T, 24h; f) NaOMe/MeOH, EtOH, sobna T, 24h.

3 Materiali in metode

Reagenti in topila:

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali kemikalije proizvajalcev Sigma Aldrich, Merck, Acros Organics, Panreack, Fluka in Appolo Organics. Kemikalije so bile takšne čistosti, kot jih je navedel proizvajalec in so bile uporabljene brez dodatnega čiščenja.

Kemijske reakcije, občutljive na vlago, so bile izvedene v argonovi atmosferi ter v čisti in suhi steklovini. Argon smo uporabljali iz jeklenke, ki jo polni Messer.

Brezvodna topila (DMF, trietilamin in etanol) smo pripravili tik pred uporabo in jih hranili v dobro zaprtih plastenkah na molekularnih sitih z velikostjo por 4 Å.

Za izvedbo ekstrakcij smo uporabljali prečiščeno vodo. Nasičeni raztopini NaHCO₃ in NaCl je pripravila laborantka po standardnem postopku. Enako velja za 1M HCl.

1M NaOMe v MeOH smo pripravili sami, pred izvedbo reakcije in ga hranili v dobro zaprti bučki, v hladilniku in zaščiteno pred svetlobo.

Laboratorijska oprema:

- tehtnica METTLER TOLEDO[®] PB 403-S/FACT Precision Balance
- termometer za oljno kopel IKA[®] ETS-D4 fuzzy
- magnetno mešalo IKA[®] RCT basic ICAMAG Magnetic stirrer
- rotavapor BÜCHI[®] Rotavapor RE 111
- rotavapor BÜCHI[®] Rotavapor type 200
- UV svetilka CAMAG UV-cabinet II ($\lambda = 254$ nm / 366 nm)
- hibridna vakuumska črpalka TRIVAC D88
- ultrazvočna kadička

Kromatografske metode:

<u>Tankoplastna kromatografija (TLC)</u>: za stacionarno fazo smo uporabili plošče TLC Silica Gel 60 F_{254} (Merck), ki so prevlečene z 0,2 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu in z dodanim fluorescenčnim označevalcem. Plošče smo razvijali v različnih mobilnih fazah, detekcija je potekala pod UV svetilko in različnimi orositvenimi reagenti (ninhidrin, FeCl₃ in fosfomolibdat).

<u>Kolonska kromatografija (KKR)</u>: za stacionarno fazo je bil uporabljen silikagel Silica Gel 60 (Merck), velikost delcev 0,040 – 0,063 mm. Mobilne faze smo pripravljali sproti, iz sveže odprtih topil. Uporabljali smo steklene kolone, različnih velikosti. Če je bilo potrebo, smo pretok pospeševali z zračnim nadtlakom.

Spektroskopske metode:

<u>Jedrska magnetna resonanca (NMR)</u>: ¹H in ¹³C NMR spektri so bili posneti na spektrometru Bruker Avance DPX400 na Fakulteti za farmacijo. Kemijski premiki so relativni na interni tetrametilsilan ($\delta = 0.000$ ppm). Vzorce smo raztapljali v CDCl₃, D₂O, DMSO-d₆, MeOD ali NaOD.

<u>Masna spektrometrija (MS)</u>: ESI masni spektrometri so bili posneti na spektrometru Q-TOF Premier (Micromass, Waters, Manchester, Velika Britanija) v Centru za masno spektrometrijo na Institutu »Jožef Stefan« v Ljubljani.

<u>Infrardeča spektrometrija (IR)</u>: IR spektri so bili posneti na spektrometru PerkinElmer Spectrum BX System FT-IR na Fakulteti za Farmacijo.

Tališča:

Tališča smo določali na Koflerjem talilnem mikroskopu, ki ima ogrevalno mizico, proizvajalca Leica. Meritve so nekorigirane.

Računalniška programska oprema:

Sintezne postopke smo iskali na podatkovni bazi Scifinder, znanstvene članke pa na portalih PubMed in ScienceDirect. Pri poimenovanju in risanju struktur smo si pomagali s programom ChemDraw Professional 16.0, podjetja CambridgeSoft. ¹H in ¹³C NMR spektri so bili sprocesirani s programom MestReNova 11.0.4, podjetja MestreLab Research SL. Pri procesiranju spektrov je bilo uporabljeno naslednje označevanje spojin:


Slika 15: Številčenje spojin pri procesiranju ${}^{1}H$ (levo) in ${}^{13}C$ (desno) spektrov.

Molekulsko sidranje:

Za oceno potencialnosti antagonistov se opravi tudi strukturno podprto rešetanje in analiza vezave učinkovin v vezavno mesto. Za to potrebujemo 3D strukturo tarče, ki jo dobimo s pomočjo rentgenske kristalografije, NMR spektroskopije ali jo zgradimo sami s pomočjo homolognega modeliranja. Strukturno podprto rešetanje uporablja metode sidranja, ki razvrstijo spojine iz knjižnice spojin glede na izračunane vezavne energije.

Sidranje (ang. *docking*) je proces pri katerem lahko z računskimi metodami napovemo položaj, konformacijo in orientacijo liganda oz. spojin vezanih v vezavno mesto tarčnega proteina, lahko pa tudi napovemo aktivnost. Ta metoda nam pomaga pri optimizaciji naših spojin vodnic. Sam proces sidranja lahko razdelimo na dva dela:

- <u>Umeščanje oz. sidranje liganda:</u> najbolj natančne rezultate bi dobili, če bi program upošteval fleksibilnost tarče in tudi samega liganda, vendar gre za računsko in časovno zelo zahteven proces, zato se ponavadi upošteva samo fleksibilnost liganda (semi-fleksibilno sidranje). Obstaja tudi rigidno sidranje, ki tarčo in ligand obravnava rigidno.
 - a) Simulacijske metode: so najbolj natančne, saj upoštevajo fleksibilnost liganda in tarče. Ker so računsko in časovno prezahtevne, se uporabljajo redko.
 - b) Naključne oz. stohastične metode: pri tej metodi algoritem naključno umesti ligand v aktivno mesto in naključno spreminja njegove torzijske kote, pride tudi do naključnih translacij in rotacij. Po vsaki spremembi cenilna funkcija oceni vezavno energijo liganda.
 - c) Sistematične metode: te metode vzorčijo vse možne stopnje prostosti liganda z neko ločljivostjo, kar lahko privede do kombinatorne eksplozije, zato z raznimi algoritmi že na začetku izločimo konformacije, ki so nesmiselne.

- Ocena vezavne energije liganda s pomočjo cenilne funkcije (ang. scoring): za oceno vezavne energije se uporabljajo cenilne funkcije, ki lahko temeljijo na polju sil (force field-based), empirične cenilne funkcije (empirical) in cenilne funkcije dobljene s pomočjo statistične mehanike (knowledge-based).
 - a) Cenilne funkcije, ki upoštevajo polje sil: izračunajo energije pri interakciji med ligandom-receptorjem in notranjo energijo liganda.
 - b) Empirične cenilne funkcije: temeljijo na eksperimentalno določenih kompleksih med proteinom in ligandom.
 - c) »Knowledge-based« cenilne funkcije: s statistično analizo frekvenc razdalj med vsemi atomi kompleksa med ligandom in proteinom iz znanih kristalnih struktur dobimo parne potenciale, s pomočjo katerih cenilna funkcija oceni vezavno energijo (41).

Biološka testiranja:

Za oceno potenciala naših potencialnih antagonistov FimH, sta bili izvedeni dve različni testiranji na Institute of Molecular Pharmacy, University of Basel v Švici in na oddelku Biomedizinische Analytik, Univerze FH Joanneum, Graz, Avstrija.

- Kompetitivna fluorescentna polarizacija (FP), opravljena v Baslu, na izolirani FimH (*wild type*) in na R98A mutantu (podatki K_d) za oceno vezavne afinitete oz. potencialne ionske vezi z Arg98 (12).
- Testiranje nastanka statičnega biofilma, opravljeno v Grazu. Rezultati so podani kot minimalna inhibitorna biofilmska koncentracija, ki povzroči zmanjšanje nastanka biofilma s strani *E. coli*. Le spojine prve serije so bile testirane za MIC.

Naši potencialni antagonisti so pri testu FP tekmovali za vezavno mesto s fluorescentno označenim ligandom. Antagonisti so bili pripravljeni kot 100 mM raztopine v 100 % DMSO in dodani na mikrotitrsko ploščico, na kateri je bil že nanešen protein (FimH) in fluorescentno označen ligand. Sledila je inkubacija plošč, 24ur pri sobni temperaturi na stresalniku, da je reakcija dosegla ravnotežje. Po pretečenem času je bila odčitana FP in s pomočjo računalniškega programa Prism je bila izračunana IC_{50} vrednost, ki so jo pretvorili v vrednost K_d(12).

FP izkorišča razmerje med vrtilno frekvenco in velikostjo fluorescentno označene molekule oz. kompleksa. Spremembe v molekulski masi fluorescenčnega označevalca so vidne kot spremembe v polarizaciji emitirane svetlobe vzorca. Preiskovan antagonist (analit) tekmuje s fluorescentno označenim analogom (*tracer*) in zmanjša polarizacijo označevalca, ko je vezan v kompleks s proteinom (antagonist – FimH). Če pride do vezave označevalca na protein, se močno poveča molekulsa masa produkta in posledično se upočasni vrtenje, kar poveča FP. Označevalec (fluorofor) absorbira fotone, ki po ekscitaciji s svetlobo preidejo v vzbujeno stanje, v katerem se vrtijo. Večji produkti se ne vrtijo hitro, zato je svetloba polarizirana (večja FP) (42, 43).



Slika 16: Princip kompetitivne fluorescentne polarizacije. Povzeto po (44).

S spektrometrom merimo razliko polarizacije med vezanim, delno vezanim in prostim fluorescentnim ligandom. Rezultati so podani kot IC_{50} , ki definira molarno koncentracijo preisovane spojine, ki inhibira maksimalno specifično vezavo fluorescentno označenega liganda na FimH-CRD za 50 % (22).

Za določitev MIC so celicam mehurja na mikrotitrski ploščici dodali suspenzijo UPEC, označenih z fluorescentnim označevalcem in različne koncentracije naših antagonistov. Sledila je inkubacija in nato analiza s pretočno citometrijo. Na podlagi rezultatov je bila določena vrednost MBIC₅₀ in preračunana vrednost MBIC₉₀ (12).

4 Eksperimentalno delo

V tem poglavju so opisani vsi sintezni postopki priprave vseh vmesnih in končnih spojin. Spektroskopski analizni izvidi (analize NMR, IR in MS) sintetiziranih vmesnih in končnih spojin se nahajajo v prilogi (poglavje 8.1).

4.1 Sinteza osrednjega manoznega monosaharida

4.1.1 Zaščita OH skupin manoze - sinteza 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil-D-manopiranoze (<u>1</u>)



V 250 mL bučko smo zatehtali 10,01 g (55,57 mmol, 1 ekv) D-manoze in jo raztopili v 50 mL brezvodnega piridina. Bučko z reakcijsko zmesjo smo prepihali z argonom, postavili na ledeno kopel in po kapljicah pričeli dodajati acetanhidrid (40 mL) ter reakcijo pustili potekati čez noč, v argonovi atmosferi, pri sobni temperaturi.

Naslednji dan smo reakcijsko zmes prelili v lij ločnik, dodali 100 mL EtOAc in 100 mL vode. Vodno fazo smo ekstrahirali s 3 x 100 mL EtOAc. Ko je bil ves naš produkt v organski fazi, smo nadaljevali z ekstrakcijo. Organsko fazo smo ekstrahirali z 4 x 100 mL nas. razt. NaHCO₃ in 4 x 100 mL 1 M HCl oz. dokler ni bilo več prisotnosti piridina v organski fazi. Organsko fazo sprali še z 1 x 100 mL nas. razt. NaCl, posušili nad Na₂SO₄ filtrirali in topilo uparili na rotavaporju. Dobili smo 20,896 g brezbarvnega olja, spojine

<u>1</u>.

Elementna sestava:	$C_{16}H_{22}O_{11}$	Izgled:	brezbarvno olje
Molska masa:	390,34 g/mol	Izkoristek:	96,39 %
Rf:	0,37 (EtOAc:Hex = 1:1)		

4.1.2 1,2-transglikozidacija; tvorba azida na anomernem ogljiku peracetilirane manoze – sinteza 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-manopiranozil azida (<u>2</u>)



V 250 mL suho bučko smo zatehtali 10 g (25,63 mmol, 1 ekv) spojine <u>1</u>. Dodali smo 75 mL diklorometana in bučko prepihali z argonom. Skozi septum smo dodali 13,6 mL (102,50 mmol, 4 ekv) TMSiN₃. V 25 mL bučki smo zmešali 0,78 mL (6,67 mmol, 0,26 ekv) SnCl₄ in 6,67 mL diklorometana ter vse skupaj dodali v reakcijsko zmes. Reakcijo smo pustili potekati v brezvodnih pogojih 2 uri pri sobni temperaturi.

Po preteku reakcije smo v reakcijsko zmes dolili 75 mL diklorometana in organsko fazo spirali najprej z 2 x 100 mL nas. razt. NaHCO₃, 2 x 100 mL H₂O in nato še z 1 x 100 mL nas. razt. NaCl. Posušili smo nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo na rotavaporju. Dobili smo 8,048 g belega, strjenega olja, spojine <u>2</u>.

Elementna sestava:	$C_{14}H_{19}N_3O_9$	Izgled:	belo strjeno olje
Molska masa:	373,32 g/mol	Izkoristek:	63,26 %
Rf:	0,39 (EtOAc:Hex = 1:1)		

4.2 Sinteze z aglikonskim delom prve serije spojin

4.2.1 Splošni postopek za izvedbo Huisgenove, 1,3-dipolarne cikloadicije – sinteza (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-(acetoksimetil)-6-(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetata (<u>3</u>)



V čisto in suho 50 mL bučko smo zatehtali 500 mg (1,340 mmol, 1 ekv) spojine <u>2</u> ter jo prepihali z argonom. Dodali smo 25,5 mg (0,134 mmol, 0,1 ekv) katalizatorja CuI, zaprli s septumom skozenj dodali 10 mL brezvodnega DMF in 0,147 mL (1,340 mmol, 1 ekv) fenilacetilena, ter na koncu še 0,233 mL (1,340 mmol, 1 ekv) drugega katalizatorja, DIPEA. Reakcijo smo pustili potekati v argonovi atmosferi, čez noč, pri sobni temperaturi.

Po preteku reakcije smo reakcijsko zmes razredčili z vodo do 50 mL. Vodno fazo smo ekstrahirali z EtOAc, organsko fazo pa spirali z 2 x 50 mL H₂O in 1 x 50 mL nas. razt. NaCl. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, odfiltrirali in uparili topilo. Čiščenje spojine <u>3</u> s kristalizacijo (etilacetat, heksan) ni uspelo, zato smo spojino očistili s KKR (etilacetat : heksan = 1 : 1) in dobili 0,341 g rumenega olja, spojine <u>3</u>.

Elementna sestava:	$C_{22}H_{25}N_3O_9$	Izgled:	rumeno olje
Molska masa:	475,45 g/mol	Izkoristek:	53,99 %
Rf:	0,33 (EtOAc:Hex = 1:1)		

4.2.2 Splošni postopek za Zemplénovo deacilacijo manoznih OH skupin – sinteza (2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-(hidroksimetil)-6-(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triola (<u>4</u>)



V 25 mL bučko smo zatehtali 0,314 g (0,678 mmol, 1 ekv) spojine <u>3</u>, bučko dobro prepihali s argonom, jo zaprli s septumom in dodali najprej 10 mL brezvodnega EtOH ter nato še 0,678 mL (0,0678 mmol, 0,1 ekv) 1M NaOMe/MeOH, katerega smo svežega pripravili pred reakcijo.

Reakcijo smo pustili potekati 2 uri. Ker je po preteku reakcje izpadla oborina, smo vse skupaj odfiltrirali skozi teflonski filter in kristale posušili v sušilniku (60 °C, 2 uri). Dobili smo 0,102 g belih kristalov, spojine <u>4</u>.

Elementna sestava:	$C_{14}H_{17}N_3O_5$	Izgled:	beli kristali
Molska masa:	307,31 g/mol	Izkoristek:	48,80 %
Rf:	0,58 (DKM:MeOH =4:1)	Tališče:	143,3 – 151,8 °C

4.2.3 Huisgenova, 1,3-dipolarna cikloadicija – sinteza (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-(acetoksimetil)-6-(4-(4-(metoksikarbonil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)tetrahidro-2*H*piran-3,4,5-triil triacetata (<u>5</u>)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Huisgenovo cikloadicijo, ki je opisan pod točko **4.2.1.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>2</u>	1,165 g (3,122 mmol, 1 ekv)
metil 4-etinilbenzoat	0,500 g (3,122 mmol, 1 ekv)
CuI	0,060 g (0,312 mmol, 0,1 ekv)
DIPEA	0,544 mL (3,122 mmol, 1 ekv)

Dobili smo 0,516 g rumenkastih kristalov, spojine 5.

Elementna sestava:	$C_{24}H_{27}N_3O_{11}$	Izgled:	rumenkasti kristali
Molska masa:	533,49 g/mol	Izkoristek:	54,47 %
Rf:	0,34 (EtOAc:Hex =1:1)	Tališče:	154,8–157,7 °С

4.2.4 Zemplénova deacilacija manoznih OH skupin – sinteza metil 4-(1-((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)benzoata (<u>6</u>)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Zemplénovo deacilacijo, ki je opisan pod točko **4.2.2.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>5</u>	0,1 g (0,187 mmol, 1 ekv)
1 M NaOMe/MeOH	90 μL (0,0187 mmol, 0,1 ekv)

Po preteku 2 ur smo opazili v bučki oborino, zato smo naredili TLC tako oborine kot tudi matičnice. Iz TLC-ja je bilo razvidno, da se je naš produkt nahajal v oborini in v matičnici. Zato smo oborino odnučali in jo posušili v sušilniku (60 °C, 2 uri). Dobili smo 0,197 g belih kristalov, spojine <u>6</u>. Matičnico smo dali nazaj v bučko, uparili topilo na rotavaporju in preostanek ponovno raztopili v brezvodnem MeOH. Izolacijo smo izvedli s pomočjo ionskega izmenjevalca, Amberlita IR120.

Za izolacijo z Amberlitom smo uporabili čisto in suho steklovino. Žličko Amberlita smo najprej macerirali v 5 mL brezvodnega EtOH. Nato smo EtOH odnučali in sprali še z 3x10 mL brezvodnega EtOH, do brezbarvnosti EtOH. Kroglice Amberlita smo nato dali v bučko z našo matičnico in pustili mešati na magnetnem mešalu 10 min. Po 10 minutah mešanja smo preverili pH, ki je moral biti rahlo kisel (pH = 5 - 6). Nato smo Amberlit odnučali, sprali še z nekaj brezvodnega EtOH in uparili topilo. Dobili smo še 0,047 g spojine <u>6</u>.

Elementna sestava:	$C_{16}H_{19}N_3O_7$	Izgled:	beli kristali (kreda)
Molska masa:	365,34 g/mol	Izkoristek:	76,49 %
Rf:	0,17 (DKM:MeOH =9:1)	Tališče:	252,8 – 255,5°C

4.2.5 Splošni postopek za hidrolizo metilnega estra – sinteza 4-(1-((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4il)benzojske kisline (<u>7</u>)



V 25 mL bučko smo zatehtali 100 mg (0,274 mmol, 1 ekv) spojine <u>6</u>. Dodali smo 10 mL EtOH in 0,821 mL (0,822 mmol, 3 ekv) 1 M NaOH. Po 2 urah reakcija še ni potekla, zato smo dodali še 3 ekv (0,821 mL) 1 M NaOH ter pustili mešati do naslednjega dne, pri sobni temperaturi.

Sledila je izolacija s kristalizacijo. Uparili smo EtOH, dodali 10 mL vode in na ledu nakisali našo reakcijsko zmes z 1 M HCl, dokler nismo dosegli pH 2 - 3. Po izpadu oborine, smo jo odnučali in posušili v sušilniku (60 °C, 2 uri). Dobili smo 0,072 g belih kristalov, spojine <u>7</u>.

Elementna sestava:	$C_{15}H_{17}N_3O_{22}$	7	Izgled:	beli kristali (kreda)
Molska masa:	351,32 g/m	ol	Izkoristek:	75,00 %
Rf:	0,49	(DKM:MeOH:	Tališče:	233,4 – 238,7 °C
	$CH_{3}COOH = 9:1:0,1)$			

4.3. Sinteza aglikonskega dela druge serije spojin

4.3.1 Spojina s 4 C distančnikom

4.3.1.1 Splošni postopek za Williamsonovo sintezo etrov – sinteza etil 5-(3iodofenoksi)pentanoata (<u>8</u>)



V dvogrlo 50 mL bučko smo zatehtali 0,880 g (4,0 mmol, 1 ekv) 3 – jodofenola. Dodali smo 2,211 g (16,0 mmol, 4 ekv) K_2CO_3 , 0,364 g (1,6 mmol, 0,4 ekv) BTEAc in dolili 20 mL AcCN. Med mešanjem smo skozi stransko grlo dodali 0,633 mL (4,0 mmol, 1 ekv) etil-5-bromovalerata. Reakcijo smo pustili potekati pri 50 °C na oljni kopeli, pod refluksom, do naslednjega dne.

Ker je bila bučka slabo zaprta s hladilnikom, je nekaj etil-5-bromovalerata izhlapelo, kar je bilo vidno tudi po TLC, saj reakcija ni potekla do konca. Zato smo dodali še 2 x 0,2 ekv etil-5-bromovalerata, vendar reakcijo še vedno ni potekla do konca. Vseeno smo šli v izolacijo. Odfiltrirali smo K_2CO_3 in sprali z 3 x 10 mL AcCN. Nato smo uparili AcCN in preostanek raztopili v 50 mL etilacetata. Sledila je ekstrakcija z 3 x 25 mL 0,1 M HCl, 2 x 25 mL H₂O, 1 x 25 mL nas. razt. NaHCO₃ in 1 x 25 mL nas. razt. NaCl. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in skoncentrirali pod znižanim tlakom. Sledilo je čiščenje s KKR (EtOAc : Hex = 1 : 3), da smo dobili 0,901 g brezbarvega olja, spojine <u>8</u>.

Elementna sestava:	$C_{13}H_{17}IO_3$	Izgled:	brezbarvno olje
Molska masa:	348,18 g/mol	Izkoristek:	64,73 %
Rf:	0,51 (EtOAc:Hex = 1:3)		

4.3.1.2 Splošni postopek za Sonogashira sklopitev – sinteza etil 5-(3-((trimetilsilil)etinil)fenoksi)pentanoata (<u>9</u>)



V čisto in suho 50 mL bučko smo zatehtali 0,752 g (2,3 mmol, 1 ekv) spojine $\underline{8}$ in jo dobro prepihali z argonom. Dodali smo 0,030 g (0,046 mmol, 0,02 ekv) Pd(PPh₃)₂Cl₂ in 0,025 g (0,138 mmol, 0,06 ekv) CuI. Ponovno smo prepihali z argonom, bučko dobro zaprli in dodali 15 mL TEA ter 0,366 mL (2,76 mmol, 1,2 ekv) trimetilsilil acetilena. Reakcijo smo pustili mešati pri čez noč, sobni temperaturi, v argonovi atmosferi.

Naslednji dan je sledila izolacija. Najprej smo uparili Et₃N in preostanek raztopili v približno 50 mL EtOAc. Ekstrahirali smo z 4 x 25 mL H₂O, 3 x 25 mL 0,1 M HCl, 2 x 25 mL H₂O, in 1 x 25 mL nas. razt. NaCl. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili EtOAc. Dobili smo 0,680 g rdeče-rjavega strjenega olja, spojine <u>9</u> in ga takoj uporabili v naslednji stopnji.

Elementna sestava:	$C_{18}H_{26}O_3Si$	Izgled:	rdeče-rjavo olje
Molska masa:	318,49 g/mol	Izkoristek:	98,84 % (nečisto)
Rf:	0,59 (EtOAc:Hex = 1:3)		

4.3.1.3 Splošni postopek za odščito TMS skupine – sinteza etil 5-(3etinilfenoksi)pentanoata (<u>10</u>)



V bučko s spojino <u>9</u> (0,680 g, 2,135 mmol, 1 ekv) smo dodali približno 25 mL DMF, da se je spojina raztopila in nato še 0,307 mL (1,068 mmol, 0,5 ekv) TBAF. Reakcijo smo pustili potekati 10 min, pri sobni temperaturi.

Pri izolaciji smo najprej uparili DMF. Preostanek smo raztopili v 75 mL H₂O in 150 mL DKM. Organsko fazo smo spirali z 2 x 20 mL H₂O in 1 x 20 mL nas. razt. NaCl. Posušili smo jo nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili CHCl₃. Spojino <u>10</u> smo očistili s KKR (mobilna faza: EtOAc : Hex = 1 : 4) in dobili 0,192 g strjenega rdeče-rjavega olja spojine <u>10</u>.

Elementna sestava:	$C_{15}H_{18}O_3$	Izgled:	rdeče - rjavo olje
Molska masa:	246,31 g/mol	Izkoristek:	36,50 %
Rf:	0,28 (EtOAc:Hex =1:4)		

4.3.1.4 Huisgenova, 1,3-dipolarna cikloadicija – sinteza (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-(acetoksimetil)-6-(4-(3-((5-etoksi-5-oksopentil)oksi)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1il)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetata (11)

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Huisgenovo cikloadicijo, ki je opisan pod točko **4.2.1.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>2</u>	0,261 g (0,698 mmol, 1 ekv)
Spojina <u>10</u>	0,172 g (0,698 mmol, 1 ekv)
CuI	0,013 g (0,069 mmol, 0,1 ekv)
DIPEA	0,122 mL (0,698 mmol, 1 ekv)

Dobili smo 0,364 g rumeno-rjavega olja, spojine <u>11</u>.

Elementna sestava:	$C_{29}H_{37}N_3O_{12}$	Izgled:	rumeno-rjavo olje
Molska masa:	619,62 g/mol	Izkoristek:	84,06 %
Rf:	0,25 (EtOAc:Hex = 1:1)		

4.3.1.5 Zemplénova deacilacija manoznih OH skupin – sinteza etil 5-(3-(1-((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)pentanoata (<u>12</u>)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Zemplénovo deacilacijo, ki je opisan pod točko **4.2.2.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>11</u>	0,310 g (0,500 mmol, 1 ekv)
1 M NaOMe/MeOH	50 μL (0,050 mmol, 0,1 ekv)

Izolacijo smo izvedli s pomočjo ionskega izmenjevalca, Amberlit IR120, postopek je opisan pod točko **4.2.4**.. Dobili smo 0,200 g rumenega strjenega olja, spojine <u>12</u>.

Elementna sestava:	$C_{21}H_{29}N_3O_8$	Izgled:	rumeno strjeno olje
Molska masa:	451,48 g/mol	Izkoristek:	88,50 %
Rf:	0,47 (DKM:MeOH=4:1)		

4.3.1.6 Hidroliza etilnega estra – sinteza natrijevega 5-(3-(1-((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4il)fenoksi)pentanoata (<u>13</u>)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za hidrolizo estra, ki je opisan pod točko **4.2.5.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>12</u>	0,140 g (0,310 mmol, 1 ekv)
2 M NaOH	930 μL (1,861 mmol, 6 ekv)

Produkt se nam je izoboril, zato smo reakcijsko zmes filtrirali skozi teflonski filter in oborino posušili v sušilniku (50 °C, 2 uri). Po sušenju smo dobili 0,087 g belih kristalov (kreda) spojine <u>13</u>.

Elementna sestava:	$C_{19}H_{24}N_3NaO_8\\$	Izgled:	beli kristali (kreda)
Molska masa:	445,40 g/mol	Izkoristek:	85,50 %
Rf:	0,74 (H ₂ O:MeOH:AcCN =	Tališče:	229,8 – 234,1 °C
	1:1:3)		

4.3.2 Spojina s 5 C distančnikom

4.3.2.1 Williamsonova sinteza etrov – sinteza etil 6-(3-iodofenoksi)heksanoata (14)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Williamsonovo sintezo etrov, ki je opisan pod točko **4.3.1.1.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
3-jodofenol	0,880 g (4,0 mmol, 1 ekv)
K ₂ CO ₃	2,211 g (16,0 mmol, 4 ekv)
TBABr	0,387 g (1,2 mmol, 0,3 ekv)
etil 6-bromoheksanoat	0,709 mL (4,0 mmol, 1 ekv)

Dobili smo 0,901 g brezbarvnega olja, spojine 14.

Elementna sestava:	$C_{14}H_{19}IO_3$	Izgled:	brezbarvno olje
Molska masa:	362,21 g/mol	Izkoristek:	90,75 %
Rf:	0,53 (EtOAc:Hex = 1:3)		

4.3.2.2 Sonogashira sklopitev – sinteza etil 6-(3-((trimetilsilil)etinil)fenoksi)heksanoata (<u>15</u>)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Sonogashira sklopitev, ki je opisan pod točko **4.3.1.2.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>14</u>	1,000 g (2,761 mmol, 1 ekv)
$Pd(PPh_3)_2Cl_2$	0,039 g (0,055 mmol, 0,02 ekv)
CuI	0,032 g (0,166 mmol, 0,06 ekv)
trimetilsilil acetilen	0,468 mL (3,313 mmol, 1,2 ekv)

Uparili smo TEA ter preostanek direktno prenesli na kolono in spojino očistili s KKR, v mobilni fazi EtOAc : Hex = 1: 4. Dobili smo 0,903 g rdeče-rjavega strjenega olja, spojine <u>15</u>, s katero smo šli takoj v naslednjo stopnjo sinteze.

Elementna sestava:	$C_{19}H_{28}O_3Si$	Izgled:	rdeče-rjavo olje
Molska masa:	332,52 g/mol	Izkoristek:	98,37 % (nečisto)
Rf:	0,57 (EtOAc:Hex = 1:3)		

4.3.2.3 Odščita TMS skupine – sinteza etil 6-(3-etinilfenoksi)heksanoata (16)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za odščito TMS skupine, ki je opisan pod točko **4.3.1.3.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>15</u>	0,903 g (2,716 mmol, 1 ekv)
TBAF	0,391 mL (1,358 mmol, 0,5 ekv)

Nato smo uparili DMF in preostanek prenesli direktno na kolono, kjer smo spojino <u>16</u> očistili s KKR (MF = EtOAc : PE = 1 : 6) in dobili 0,579 g rumenega olja, spojine <u>16</u>.

Elementna sestava:	$C_{16}H_{20}O_3$	Izgled:	rumeno olje
Molska masa:	260,33 g/mol	Izkoristek:	68,32 %
Rf:	0,45 (EtOAc:PE = 1:6)		

4.3.2.4 Huisgenova, 1,3-dipolarna cikloadicija – sinteza (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-(acetoksimetil)-6-(4-(3-((6-etoksi-6-oksoheksil)oksi)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1il)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetata (<u>17</u>)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Huisgenovo cikloadicijo, ki je opisan pod točko **4.2.1.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>2</u>	0,717 g (1,921 mmol, 1 ekv)
Spojina <u>16</u>	0,500 g (1,921 mmol, 1 ekv)
CuI	0,037 g (0,192 mmol, 0,1 ekv)
DIPEA	0,335 mL (1,921 mmol, 1 ekv)

Dobili smo 1,075 g rumeno-rjavega olja, spojine <u>17</u>.

Elementna sestava:	$C_{30}H_{39}N_3O_{12}$	Izgled:	rumeno-rjavo olje
Molska masa:	633,65 g/mol	Izkoristek:	88,26 %
Rf:	0,28 (EtOAc:Hex = 1:1)		

4.3.2.5 Zemplénova deacilacija manoznih OH skupin – sinteza etil 6-(3-(1-((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)heksanoata (<u>18</u>)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Zemplénovo deacilacijo, ki je opisan pod točko **4.2.2.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>17</u>	0,750 g (1,184 mmol, 1 ekv)
1 M NaOMe/MeOH	110 μL (0,118 mmol, 0,1 ekv)

Izolacijo smo izvedli s pomočjo ionskega izmenjevalca, Amberlit IR120, postopek je opisan pod točko **4.2.4**. Dobili smo 0,556 g rjavega olja, spojine <u>18</u>.

Elementna sestava:	$C_{22}H_{31}N_3O_8$	Izgled:	rjavo strjeno olje
Molska masa:	465,50 g/mol	Izkoristek:	99,64 %
Rf:	0,50 (DKM:MeOH=4:1)		

4.3.2.6 Hidroliza etilnega estra – sinteza natrijevega 6-(3-(1-((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-

il)fenoksi)heksanoata (<u>19</u>)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za hidrolizo estra, ki je opisan pod točko **4.2.5.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>18</u>	0,250 g (0,537 mmol, 1 ekv)
2 M NaOH	1,6 mL (3,222 mmol, 6 ekv)

Izolacijo smo izvedli po postopku pod točko **4.3.1.6**. Dobili smo 0,184 g belih kristalov (kreda), spojine <u>19</u>.

Elementna sestava:	$C_{20}H_{26}N_3NaO_8$	Izgled:	beli kristali (kreda)
Molska masa:	459,43 g/mol	Izkoristek:	78,30 %
Rf:	0,73 (H ₂ O:MeOH:AcCN =	Tališče:	240,4 – 246,1 °C
	1:1:3)		

4.3.3 Spojina s 6 C distančnikom

4.3.3.1 Williamsonova sinteza etrov – sinteza etil 7-(3-iodofenoksi)heptanoata ($\underline{20}$)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Williamsonovo sintezo etrov, ki je opisan pod točko **4.3.1.1.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
3-jodofenol	0,880 g (4,0 mmol, 1 ekv)
K ₂ CO ₃	2,211 g (16,0 mmol, 4 ekv)
TBABr	0,387 g (1,2 mmol, 0,3 ekv)
etil 7-bromoheptanoat	0,779 mL (4,0 mmol, 1 ekv)

Dobili smo 0,975 g brezbarvnega olja, spojine 20.

Elementna sestava:	$C_{15}H_{21}IO_3$	Izgled:	brezbarvno olje
Molska masa:	376,23 g/mol	Izkoristek:	64,78 %
Rf:	0,59 (EtOAc:Hex = 1:3)		

4.3.3.2 Sonogashira sklopitev – sinteza etil 7-(3-((trimetilsilil)etinil)fenoksi)heptanoata (<u>21</u>)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Sonogashira sklopitev, ki je opisan pod točko **4.3.1.2.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>20</u>	0,700 g (1,861 mmol, 1 ekv)
$Pd(PPh_3)_2Cl_2$	0,026 g (0,0372 mmol, 0,02 ekv)
CuI	0,021 g (0,112 mmol, 0,06 ekv)
trimetilsilil acetilen	0,316 mL (2,233 mmol, 1,2 ekv)

Izolacija je potekala enako kot pri točki **4.3.2.2**. Dobili smo 0,692 g rdeče-rjavega strjenega olja spojine <u>21</u> in šli v naslednjo stopnjo sinteze.

Elementna sestava:	$C_{20}H_{30}O_{3}Si$	Izgled:	rdeče-rjavo olje
Molska masa:	346,54 g/mol	Izkoristek:	107,45 % (nečisto)
Rf:	0,51 (EtOAc:Hex = 1:3)		

4.3.3.3 Odščita TMS skupine – sinteza etil 7-(3-etinilfenoksi)heptanoata (22)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za odščito TMS skupine, ki je opisan pod točko **4.3.1.3.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>21</u>	0,692 g, (1,997 mmol, 1 ekv)
TBAF	0,288 mL (0,999 mmol, 0,5 ekv)

Izolacija je potekala enako kot pod točko **4.3.2.3**. Dobili smo 0,345 g brezbarvenga olja, spojine <u>22</u>.

Elementna sestava:	$C_{17}H_{22}O_3$	Izgled:	brezbarvno olje
Molska masa:	274,36 g/mol	Izkoristek:	72,60 %
Rf:	0,49 (EtOAc:Hex = 1:4)		

4.3.3.4 Huisgenova, 1,3-dipolarna cikloadicija – sinteza (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-(acetoksimetil)-6-(4-(3-((7-etoksi-7-oksoheptil)oksi)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1il)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetata (<u>23</u>)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Huisgenovo cikloadicijo, ki je opisan pod točko **4.2.1.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>2</u>	0,408 g (1,093 mmol, 1 ekv)
Spojina <u>22</u>	0,300 g (1,093 mmol, 1 ekv)
CuI	0,021 g (0,109 mmol, 0,1 ekv)
DIPEA	0,191 mL (1,093 mmol, 1 ekv)

Dobili smo 0,548 g rumeno-rjavega olja, spojine 23.

Elementna sestava:	$C_{31}H_{41}N_3O_{12}$	Izgled:	rumeno-rjavo olje
Molska masa:	647,68 g/mol	Izkoristek:	77,40 %
Rf:	0.30 (EtOAc:Hex = 1:1)		

4.3.3.5 Zemplénova deacilacija manoznih OH skupin – sinteza etil 7-(3-(1-((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)heptanoata (<u>24</u>)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Zemplénovo deacilacijo, ki je opisan pod točko **4.2.2.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>23</u>	0,450 g (0,695 mmol, 1 ekv)
1 M NaOMe/MeOH	70 μL (0,070 mmol, 0,1 ekv)

Izolacijo smo izvedli s pomočjo ionskega izmenjevalca, Amberlit IR120, postopek je opisan pod točko **4.2.4** Dobili smo 0,333 g strjenega olja, spojine <u>24</u>.

Elementna sestava:	$C_{23}H_{33}N_3O_8$	Izgled:	rjavo strjeno olje
Molska masa:	479,53 g/mol	Izkoristek:	95,50 %
Rf:	0,45 (DKM:MeOH=4:1)		

4.3.3.6 Hidroliza etilnega estra – sinteza natrijevega 7-(3-(1-((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4il)fenoksi)heptanoata (<u>25</u>)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za hidrolizo estra, ki je opisan pod točko **4.2.5.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>24</u>	0,121 g (0,252 mmol, 1 ekv)
2 M NaOH	757 μL (1,514 mmol, 6 ekv)

Izolacijo smo izvedli po postopku pod točko **4.3.1.6**. Dobili smo 0,116 g belih kristalov (kreda), spojine <u>25</u>.

Elementna sestava:	$C_{21}H_{28}N_3NaO_8$	Izgled:	beli kristali (kreda)
Molska masa:	473,46 g/mol	Izkoristek:	98,28 %
Rf:	0,76 (H ₂ O:MeOH:AcCN =	Tališče:	nad 300 °C
	1:1:3)		

4.3.4 Spojina s 7 C distančnikom

4.3.4.1 Williamsonova sinteza etrov – sinteza etil 8-(3-iodofenoksi)oktanoata (26)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Williamsonovo sintezo etrov, ki je opisan pod točko **4.3.1.1.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
3-jodofenol	0,880 g (4,0 mmol, 1 ekv)
K ₂ CO ₃	2,211 g (16,0 mmol, 4 ekv)
TBABr	0,387 g (1,2 mmol, 0,3 ekv)
etil 8-bromooktanoat	0,841 mL (4,0 mmol, 1 ekv)

Dobili smo 0,717 g brezbarvnega olja, spojine 26.

Elementna sestava:	$C_{16}H_{23}IO_3$	Izgled:	brezbarvno olje
Molska masa:	390,07 g/mol	Izkoristek:	45,96 %
Rf:	0,55 (EtOAc:Hex = 1:3)		

4.3.4.2 Sonogashira sklopitev – sinteza etil 8-(3-((trimetilsilil)etinil)fenoksi)oktanoata (27)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Sonogashira sklopitev, ki je opisan pod točko **4.3.1.2.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>26</u>	0,700 g (1,794 mmol, 1 ekv)
$Pd(PPh_3)_2Cl_2$	0,025 g (0,0359 mmol, 0,02 ekv)
CuI	0,021 g (0,108 mmol, 0,06 ekv)
trimetilsilil acetilen	0,304 mL (2,152 mmol, 1,2 ekv)

Izolacija je potekala enako kot pri točki **4.3.2.2**. Dobili smo 0,686 g rjavega olja, spojine <u>27</u>, katero smo takoj uporabili v naslednji sintezni stopnji.

Elementna sestava:	$C_{21}H_{32}O_3Si$	Izgled:	rdeče-rjavo olje
Molska masa:	360,57 g/mol	Izkoristek:	106,19 % (nečisto)
Rf:	0,55 (EtOAc:Hex = 1:3)		

4.3.4.3 Odščita TMS skupine – sinteza etil 8-(3-etinilfenoksi)oktanoata (28)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za odščito TMS skupine, ki je opisan pod točko **4.3.1.3.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>27</u>	0,686 g (1,902 mmol, 1 ekv)
TBAF	0,274 mL (0,951 mmol, 0,5 ekv)

Izolacija je potekala enako kot pod točko **4.3.2.3**. Dobili smo 0,318 g brezbarvnega olja, spojine <u>28</u>.

Elementna sestava:	$C_{18}H_{24}O_3$	Izgled:	brezbarvno olje
Molska masa:	288,39 g/mol	Izkoristek:	57,92 %
Rf:	0,46 (EtOAc:PE = 1:6)		

4.3.4.4 Huisgenova, 1,3-dipolarna cikloadicija – sinteza (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-(acetoksimetil)-6-(4-(3-((8-etoksi-8-oksooktil)oksi)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1il)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetata (<u>29</u>)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Huisgenovo cikloadicijo, ki je opisan pod točko **4.2.1.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>2</u>	0,411 g (1,103 mmol, 1 ekv)
Spojina <u>28</u>	0,318 g (1,103 mmol, 1 ekv)
CuI	0,021 g (0,110 mmol, 0,1 ekv)
DIPEA	0,192 mL (1,103 mmol, 1 ekv)

Dobili smo 0,645 g rumeno-rjavega olja, spojine 29.

Elementna sestava:	$C_{32}H_{43}N_3O_{12}$	Izgled:	rumeno-rjavo olje
Molska masa:	661,71 g/mol	Izkoristek:	88,36 %
Rf:	0,29 (EtOAc:Hex = 1:1)		

4.3.4.5 Zemplénova deacilacija manoznih OH skupin – sinteza etil 8-(3-(1-((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)oktanoata (<u>30</u>)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Zemplénovo deacilacijo, ki je opisan pod točko **4.2.2.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>29</u>	0,500 g (0,756 mmol, 1 ekv)
1 M NaOMe/MeOH	76 μL (0,076 mmol, 0,1 ekv)

Izolacijo smo izvedli s pomočjo ionskega izmenjevalca, Amberlit IR120, postopek je opisan pod točko **4.2.4.** Dobili smo 0,373 g strjenega olja, spojine <u>30.</u>

Elementna sestava:	$C_{24}H_{35}N_3O_8$	Izgled:	rjavo strjeno olje
Molska masa:	493,56 g/mol	Izkoristek:	94,10 %
Rf:	0,52 (DKM:MeOH=4:1)		

4.3.4.6 Hidroliza etilnega estra – sinteza natrijevega 8-(3-(1-((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-

il)fenoksi)oktanoata (<u>31</u>) $H_{HO} \xrightarrow{OH}_{N_{N}^{\prime}N}$ $H_{O} \xrightarrow{OH}_{N_{N}^{\prime}N}$ $H_{O} \xrightarrow{OH}_{HO}$ 2M NaOH, etanolsobna T, 24h

<u>30</u>

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za hidrolizo estra, ki je opisan pod točko **4.2.5.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

-ONa

<u>31</u>

Reagent	Količina
Spojina <u>30</u>	0,130 g (0,263 mmol, 1 ekv)
2 M NaOH	800 μL (1,580 mmol, 6 ekv)

Izolacijo smo izvedli po postopku pod točko **4.3.1.6**. Dobili smo 0,116 g belih kristalov (kreda), spojine <u>31</u>.

Elementna sestava:	$C_{22}H_{30}N_3NaO_8$	Izgled:	beli kristali (kreda)
Molska masa:	487,48 g/mol	Izkoristek:	95,08 %
Rf:	0,78 (H ₂ O:MeOH:AcCN =	Tališče:	239,2 – 248,3 °C
	1:1:3)		

4.3.5 Spojina z 2 C distančnikom na para mestu

4.3.5.1 Williamsonova sinteza etrov – sinteza 3-(4-iodofenoksi)propan-1-ola (32)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Williamsonovo sintezo etrov, ki je opisan pod točko **4.3.1.1.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
3-jodofenol	5 g (22,726 mmol, 1 ekv)
K ₂ CO ₃	12,564 g (90,905 mmol, 4 ekv)
3-bromo-1-propanol	2,055 mL (22,726 mmol, 1 ekv)

Dobili smo 4,937 g rjavih kristalov, spojine <u>32</u>.

Elementna sestava:	$C_9H_{11}IO_2$	Izgled:	rjavkasti kristali
Molska masa:	278,09 g/mol	Izkoristek:	78,64 %
Rf:	0,21 (EtOAc:Hex = 1:2)		

4.3.5.2 Jonesova oksidacija – sinteza 3-(4-iodofenoksi)propanojske kisline (33)



2 g (7,192 mmol, 1 ekv) spojine <u>32</u> smo zatehtali v 250 mL bučko in jo raztopili v približno 70 mL acetona. V bučko smo nato dodali zmes H_2O : 97% $H_2SO_4 = 2$: 1 (2,830 mL : 1,415 mL) ter postavili na led in pri 0 °C pustili potekati reakcijo 10 minut. Nato smo postopoma začeli dodajati 2,876 g (28,768 mmol, 4 ekv) CrO₃. Vse skupaj smo pustili mešati na ledu do naslednjega dne.

Pri izolaciji smo najprej dodali 10 mL 2-propanola in pustili mešati reakcijo zmes še 10 minut. Izolacijo smo izvedli s suhim nanosom na kolono, s KKR. Mobilna faza na

začetku je bila EtOAc : Hex = 3 : 1, nato pa EtOAc : Hex : $CH_3COOH = 3 : 1 : 0,1$. Dobili smo 0,786 g rumeno-rjavih kristalov, spojine <u>33</u>.

Elementna sestava:	$C_9H_9IO_3$	Izgled:	rumeno-rjavi kristali
Molska masa:	292,07 g/mol	Izkoristek:	37,40 %
Rf:	0,46 (EtOAc:Hex:ledocet =		
	3:1:0,1)		

4.3.5.3 Fischerjeva esterifikacija – sinteza etil 3-(4-iodofenoksi)propanoata (34)



V 50 mL merilno bučko smo zatehtali 0,500 g (1,712 mmol, 1 ekv) spojine <u>33</u> in jo raztopili v 20 mL EtOH. Reakcijsko zmes smo ohladili na 0 °C na ledeni kopeli. V manjši bučki smo zmešali 91 μ L H₂SO₄ v 5 mL EtOH ter to zmes po kapljicah dodajali v našo rekacijsko zmes. Reakcijo smo refluktirali čez noč, pri 75 °C.

Sledila je izolacija. Najprej smo uparili EtOH pod znižanim tlakom. Dodali smo 5 mL H_2O in 50 mL EtOAc. Organsko fazo smo nato ekstrahirali z 2 x 25 mL nas. razt. NaHCO₃, jo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili EtOAc. Dobili smo 0,451 g rjavega olja, spojine <u>34</u>.

Elementna sestava:	$C_{11}H_{13}IO_3$	Izgled:	rjavo olje
Molska masa:	320,13 g/mol	Izkoristek:	85,88 %
Rf:	0,87(DKM:MeOH=15:1)		

4.3.5.4 Sonogashira sklopitev – sinteza etil 3-(4-((trimetilsilil)etinil)fenoksi) propanoata (<u>35</u>)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Sonogashira sklopitev, ki je opisan pod točko **4.3.1.2.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>34</u>	0,370 g (1,209 mmol, 1 ekv)
$Pd(PPh_3)_2Cl_2$	0,017 g (0,024 mmol, 0,02 ekv)
CuI	0,014 g (0,073mmol, 0,06 ekv)
trimetilsilil acetilen	0,256 mL (1,813 mmol, 1,5 ekv)

Izolacija je potekala enako kot pri točki **4.3.2.2**. Dobili smo 0,314 g rdeče-rjavega olja, spojino <u>35</u>, katero smo takoj uporabili v naslednji stopnji.

Elementna sestava:	$C_{16}H_{22}O_3Si$	Izgled:	rdeče-rjavo olje
Molska masa:	290,43 g/mol	Izkoristek:	89,46 %
Rf:	0,43 (EtOAc:Hex = 1:4)		

4.3.5.5 Odščita TMS skupine – sinteza etil 3-(4-etinilfenoksi)propanoata (36)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za odščito TMS skupine, ki je opisan pod točko **4.3.1.3.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>35</u>	0,314 g (1,136 mmol, 1 ekv)
TBAF	0,164 mL (0,568 mmol, 0,5 ekv)

Izolacija je potekala enako kot pod točko **4.3.2.3**. Dobili smo 0,082 g rumenega olja, spojine <u>36</u>.

Elementna sestava:	$C_{13}H_{14}O_3$	Izgled:	rumeno olje
Molska masa:	218,25 g/mol	Izkoristek:	35,34 %
Rf:	0,33 (EtOAc:Hex = 1:4)		

4.3.5.6 Huisgenova, 1,3-dipolarna cikloadicija – sinteza (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-(acetoksimetil)-6-(4-(4-(3-etoksi-3-oksopropoksi)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1il)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetata (<u>37</u>)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Huisgenovo cikloadicijo, ki je opisan pod točko **4.2.1.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>2</u>	0,106 g (0,284 mmol, 1 ekv)
Spojina <u>36</u>	0,058 g (0,284 mmol, 1 ekv)
CuI	0,005 g (0,028 mmol, 0,1 ekv)
DIPEA	0,050 mL (0,284 mmol, 1 ekv)

Dobili smo 0,111 g rumenega olja, spojine 37.

Elementna sestava:	$C_{27}H_{33}N_3O_{12}$	Izgled:	rumeno strjeno olje
Molska masa:	591,57 g/mol	Izkoristek:	65,29 %
Rf:	0,15 (EtOAc:Hex = 1:1)		

4.3.5.7 Zemplénova deacilacija manoznih OH skupin – sinteza etil 3-(4-(1-((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-

1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)propanoata (38)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Zemplénovo deacilacijo, ki je opisan pod točko **4.2.2.** Uporabljene so bile naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina <u>37</u>	0,088 g (0,153 mmol, 1 ekv)
1 M NaOMe/MeOH	15 μL (0,015 mmol, 0,1 ekv)

Zaradi nastanka oborine, smo reakcijsko zmes filtrirali skozi teflonski filter in oborino posušili v sušilniku (60 °C, 2h). Dobili smo 0,021 g belih kristalov (kreda), spojine <u>38</u>.

Elementna sestava:	$C_{19}H_{25}N_3O_8$	Izgled:	beli kristali (kreda)
Molska masa:	423,42 g/mol	Izkoristek:	33,3 %
Rf:	0,54 (DKM:MeOH=4:1)	Tališče:	181,6 – 185,4 °C

5 Rezultati in razprava

5.1 Eksperimentalni del

Eksperimentalni del smo glede na sintezni načrt pričeli z reakcijami na glikonskem delu, manozi. Sintezni postopki so bili adaptirani iz literature, zato prvi dve stopnji, acetilacija manoznih OH skupin in tvorba azida na anomernem ogljiku peracetilirane manoze (1,2 – transglikozidacija) nista predstavljali večjih težav. Pri prvi seriji spojin je sledila Huisgenova cikloadicija z dvema različnima aglikonoma in nato še odščita manoznih OH skupin ter hidroliza estra. Največji izziv so bile izolacije po posameznih stopnjah, ker nismo vedeli, kako se bodo spojine obnašale, saj so bili to prvi poskusi sinteze takih spojin.

Pri drugi seriji spojin je bil prvi večji izziv iskanje ustreznih sinteznih postopkov za sintezo aglikonskega dela. Z željo po interakciji z Arg98 smo načrtovali aglikone, ki imajo na fenilni obroč na m- in p- mestu pripete različno dolge (1 – 7 C) alkilne distančnike in imajo na koncu alkilnih verig karboksilat oz. njegov ester. Z iskalnikom SciFinder smo z željenimi kriteriji iskali sintezne postopke, s katerimi bi kar najlažje prišli do željenih spojin. V tej magistrski nalogi smo se osredotočili na alkilne distančnike z dolžino 4 C do 7 C, pripete na m- mesto in na 2 C distančnik, pripet na p- mesto. Distančnike smo pripeli z Williamsonovo sintezo etrov. Aglikone smo nato po tvorbi etilne skupini v naslednji stopnji pripeli na glikonski del. Literaturne postopke smo morali prilagoditi, zato je bilo narejenih veliko poskusnih reakcij z različnimi razmerji reagentov za dosego čim večjih izkoristkov. Izzivi pri posameznih stopnjah reakcij so opisani v opisih posameznih stopnjah sinteze. Poleg uspešnih sintez, smo si zaradi veliko sinteznih stopenj želeli tudi čim boljše izkoristke, da smo prišli do zadostne količine končnih spojin. Majhne izkoristke smo poskušali popraviti s prilagajanjem razmerij in zamenjavo reagentov ter reakcijskih pogojev, nečistot smo se poskušali znebiti z različnimi tehnikami čiščenja spojin.

Končne spojine so predstavljali derivati v obliki kislin in estrov, ki so bili načrtovani predvsem z namenom ugotavljanja, ali kisline ponujajo optimalno interakcijo z Arg98 v vezavnem mestu FimH. V primeru, da bi se estri pokazali kot ekvipotentni, bi ovrgli hipotezo, da je za doseganje visoke afinitete možno izkoristiti ionsko interakcijo z Arg98. Poleg tega z estri povečamo lipofilnost in oblikujemo predzdravilne oblike. S temi bi lahko dosegli višjo biološko uporabnost po peroralni aplikaciji spojin v morebitnih *in vivo* študijah.

5.1.1 Bazična zaščita OH skupin manoze

Zaradi številnih OH skupin z različno reaktivnostjo, je regioselektivnost prvi začetni izziv, s katerim se srečamo pri sintezi. Acetilne skupine so ene izmed najbolj pogosto uporabljenih zaščitnih skupin v kemiji sladkorjev zaradi njihove stabilnosti, enostavne uvedbe in kasnejše odščite. Gre za trajno zaščitno skupino, ki je obstojna skozi vse sintezne stopnje, vse do njihove odščite. Nimajo samo vloge zaščitne skupine, so razlog za zmanjšano ali povečano reaktivnost, vplivajo tudi na stereokemijski rezultat.

Popolna acilacija sladkorjev vodi v zmes anomerov (α in β), prevladuje pa tisti anomer, ki je termodinamsko bolj stabilen. V reakciji med acetanhidridom in piridinom se prehodno tvori N-acetilpiridinijev acetat, ki igra vlogo acetilatorja. Piridin ima tako hkrati vlogo katalizatorja in topila.



Slika 17: Mehanizem reakcije acetiliranja manoznih OH skupin. Povzeto po (45).

Reakcijski postopek zaščite manoznih OH skupin je bil povzet iz literature (45). Manozo smo raztopili v piridinu, postavili na led, sistem zaprli in prepihali z argonom za dosego brezvodnih pogojev. Reakcijski zmesi smo po kapljicah dodali acetanhidrid ter pustili potekati reakcijo čez noč, pri sobni temperaturi. Brezvodni pogoji, nizka temperatura in počasno dokapavanje Ac₂O so pomembni, da ne pride do stika med vodo in Ac₂O, saj bi lahko prišlo do njegove hidrolize in nastanka ocetne kisline. Pri ekstrakciji smo lahko preko TLC spremljali prisotnost piridina in z njo končali, ko piridin ni bil več viden pod UV lučjo. Izkoristek je znašal 95 %, kar pomeni, da smo odlično izvedli sintezo in izolacijo.

5.1.2 Tvorba azida na anomernem ogljiku acetilirane manoze; 1,2 – trans glikozidacija

Glikozidi so spojine, ki vsebujejo glikonski del in nanj preko anomernega centra vezan aglikonski del z glikozidno vezjo. Retrosintezna analiza pokaže, da je glikozid sestavljen iz elektrofilnega donorja (manoza) in nukleofilnega akceptorja (azid), katera oba vstopata v

reakcijo glikozilacije, katero aktivira Lewisova kislina (SnCl₄). Zaradi vpliva substituenta na C2, je stereospecifični rezultat glikozilacije 1,2 – trans oblika.

Izstopajoča skupina (OAc) na anomernem C atomu je aktivirana z Lewisovo kislino (katalizator oz. promotor) in tvori oksokarbenijev ion, kjer ima anomerni C atom elektrofilni značaj. Sledi nukleofilni napad azida na anomerni C atom, ki se lahko zgodi na obeh diastereomernih straneh oksokarbenija. Zaradi anomernega efekta je favorizirana α -glikozidna oblika, čeprav nastane tudi manjši delež β oblike. Na stereomerni izid ima vpliv tudi zaščitna skupina na C2, saj karbonil acetilne zaščitne skupine stabilizira pozitivni naboj (»anchimeric assistance«) in tako ščiti kation. Napad nukleofila tako poteče *trans* glede na substituent na C2 atomu in tako dobimo prevladujoče α -glikozide (45).



Slika 18: Mehanizem 1,2 - transglikozidacije. Povzeto po (45).

Gre za nukleofilno substitucijo ($S_N 2$ mehanizem) izstopajoče skupine (OAc) na anomernem C atomu, z azidnim ionom.

Reakcijski postopek je bil povzet iz literature (46). V čisto in suho bučko smo zatehtali izhodno spojino <u>1</u>, jo prepihali z argonom ter zaprli. Dodali smo brezvodni DKM, nato pa previdno dodali najprej TMSiN₃ in SnCl₄ v DKM. Brezvodni pogoji so pomembni, ker TMSiN₃ lahko ob prisotnosti vode hidrolizira do hidrazojske kisline, SnCl₄ pa do kositrovega oksida in HCl. Po pregledu NMR sprektra smo ugotovili, da je produkt <u>2</u>

večinoma v željeni α obliki. Izkoristek je znašal 63 %, kar je posledica težav pri ekstrakciji, ko nam je ob spiranju z NaHCO₃, zaradi premočnega stresanja, odneslo pokrovček in je prišlo do izgub. Nižjemu izkoristku prispeva tudi nastanek neželene, β oblike spojine <u>2</u>.

5.1.3 Williamsonova sinteza etrov

Sintezo alkilnih distančnikov aglikonov smo pričeli z Williamsonovo sintezo etrov, ki poteka po enostopenjskem $S_N 2$ mehanizmu, pri katerem poteka hkratni nastanek nove C-Nuk vezi in cepitev C-X vezi. V prvem delu, kislinsko – bazni reakciji med 3–jodofenolom in K_2CO_3 pride do deprotonacije kislega protona na 3-jodofenolu in nastanka alkoksidnega iona (RO⁻). V drugem delu reakcije pa alkoksidni ion nukleofil reagira s primarnim alkil halidom in dobimo asimetričen eter (47).



Slika 19: Mehanizem Williamsonove sinteze etrov. Povzeto po (47).

Postopek je bil adaptiran iz literaturnega postopka (48). Izhodnemu 3-jodofenolu smo dodali šibko bazo, K_2CO_3 , ki je zelo slabo topna v organskih topilih (AcCN), zato smo dodali enega od katalizatorjev faznega prenosa, TBABr ali BTEAc. Med mešanjem smo dodali še alkil halid in reakcijo pustili potekati čez noč, pod refluksom, pri 60 °C.

Največjo težavo pri tej stopnji nam je predstavljaja izolacija spojin, kar kažejo tudi izkoristki reakcij, ki se gibljejo okoli 70 %. Po čiščenju s KKR so nam NMR spektri še vedno kazali prisotnost izhodnih alkilbromidov, zato smo se odločili za uparevanje na hibridni vakuumski črpalki (0 mbar, 80 °C, 2h), saj smo iz literaturnih virov ugotovili, da imajo le ti nižja vrelišča (med 100 – 130 °C) kot sintetizirani produkti te stopnje. Po uparevanju produkti še vedno niso bili čisti, zato smo zaradi lažje izolacije reakcije izvajali s presežkom 3-JF, ki smo se ga znebili z KKR in različnimi mobilnimi fazami. S kombinacijo obeh tehnik čiščenja spojin smo po pregledu NMR sprektrov prišli do čistih spojin <u>8</u>, <u>14</u>, <u>20</u>, <u>26</u> in <u>32</u>.

5.1.4 Sonogashira sklopitev in sledeča odščita TMS skupine

Reakcija med aril halidom ali vinil halidom s terminalnimi alkini, katalizirana z Pd(II)/Cu(I) sistemom, je znana pod imenom »Sonogashira coupling« oz. Sonogašira sklopitev in je ena izmed najpogosteje uporabljenih metod za direktno tvorbo sp^2-sp C-C vezi. Od odkritja reakcije, leta 1975, pa vse do danes so bili reakcijski pogoji modificirani saj reakcije med arilnimi halidi in terminalnimi alkini lahko privedejo do različnih produktov. Celoten mehanizem reakcije še ni popolnoma razjasnen zaradi težavne izolacije in analize organometaličnih spojin, ki so prisotni kot intermediati v reakciji, predvsem je nejasna struktura katalitično aktivnih spojin in vloga CuI. Predvideva se, da reakcija poteka po mehanizmu, ki je sestavljen iz paladijevega in bakrovega cikla:



Slika 20: Mehanizem "Sonogashira coupling" reakcije. Povzeto po (51).

Mehanizem reakcije sledi oksidativni adiciji in reduktivni eliminaciji, kar je tudi značilno za Pd-katalizirane C-C tvorbe vezi. V splošnem ga lahko razdelimo na 4 stopnje. V prvi stopnji, oksidativni adicji, pride do adicije paladija na izhodni aril halid (sp^2 -C halid). Sledi nastanek Cu-alkin kompleksa, bakrovega acetanilida iz izhodnega reagenta z acetilno skupino in CuI. Potreben je presežek baze (Et₃N), ki poveča kislost protona na alkinu. V tretjem koraku sledi transmetalacija, kjer pride do prenosa liganda med halidom in

bakrovim acetanilidom. V zadnji stopnji, reduktivni eliminaciji, se ligand eliminira, katalizator se regenerira in sprosti se željen produkt.

CuI ima vlogo ko-katalizatorja in omogoča, v kombinaciji s paladijevim katalizatorjem, sintezo aril alkinov pri sobni temperaturi. Pomembno je, da reakcija poteka v brezvodnih pogojih, saj bi CuI, izpostavljen zraku, tvoril bakrov acetilid in bi prišlo do samozdruževanja s samim seboj in ne z arilnim halidom. Tako bi prišlo do nastanka neželenih stranskih produktov, zato smo reakcijo izvajali v argonovi atmosferi (49, 50, 51).

Ta stopnja reakcije je zahtevala največ prilagajanj in obenem tudi poskusov reakcij. Izhajali smo iz predpisa, ki je narekoval pogoje, zapisane v spodnji tabeli v 1. poskusu.

Standardni pogoji za reakcijo so (povzeto po(49)):

RX + HC CH
$$(PPh_3)_2Cl_2, CuI$$

NEt₃ ali piperidin
sobna T
R = aril, alkil
X = Cl, Br, I, OTf

	1. poskus	2. poskus	3. poskus	Končni pogoji
$Pd(PPh_3)_2Cl_2$	0,01 ekv	0,02 ekv	0,02 ekv	0,02 ekv
CuI	0,03 ekv	0,06 ekv	0,06 ekv	0,06 ekv
Et ₃ N	0,15 ekv	0,30 ekv	9,00 ekv	presežek – topilo
TMS	1,10 ekv	1,10 ekv	1,20 ekv	1,20 ekv
topilo	DMSO	DMSO	DMF	Et ₃ N
izkoristek	20%	3%	32%	70%

Tabela 1: Serija poskusnih reakcij pri reakciji Sonogashira sklopitve.

Kot je razvidno iz tabele, nam je prvi poskus reakcije prinesel nizek izkoristek, zato smo se odločili, da v 2. poskusu podvojimo količine obeh katalizatorjev in tudi baze (Et₃N). Izkoristek je bil še slabši, to pa je predvsem posledica izolacije z aktivnim ogljem, saj se je naš produkt več kot očitno vezal nanj. Odločili smo se raziskati naše težave in po pregledu literature ugotovili, da so boljši izkoristki posledica presežka baze (46), zato smo v 3. poskusu dodali 9 ekv TEA, namesto DMSO pa smo uporabili DMF, saj se ga lažje znebimo kot DMSO. Reakcije so potekale bolje, ko smo na podlagi publikacij, kjer so namesto topila uporabili kar Et₃N (36), mi ubrali enako pot, saj so bile naše spojine v njem
dobro topne, po zaključeni reakciji pa smo se ga preprosto znebili z uparevanjem ($T_{vrel.} = 90$ °C). Izkoristke smo izboljšali tudi z zamenjavo načina izolacije. Sprva je postopek predpisoval izolacijo z ekstrakcijo, vendar smo po pregledu TLC opazili, da se nam pojavijo 4 dodatne lise, kar je kazalo na to, da prihaja do delnega razpada naše spojine, enak problem se je pojavil tudi pri ekstrakciji po odščiti SiMe₃ skupine. Težave so se pojavile tudi pri ločitvi vodne in organske faze, na kar je vplival tudi TBAF, ki deluje kot površinsko aktivna snov, zato smo se odločili, da bomo izolacijo in čiščenje izvajali direktno s KKR, kar nam je dvignilo izkoristke vse do 70 %, po odščiti TMS. Izkoristki spojin <u>16</u>, <u>22</u> in <u>28</u> so se gibali okoli 70 %, izjema sta spojini <u>10</u>, ki smo jo izvedli še z ekstrakcijo in spojina <u>36</u>, kjer predvidevamo, da prihaja do β – eliminacije.

Da bi lahko naši aglikonski deli vstopili v naslednjo stopnjo sinteze, 1,3-dipolarno cikloadicijo z azidom, kjer so produkti 1,4-disubstituirani triazoli, je bila potrebna še odščita trimetilsililne zaščite in tako smo prišli do terminalnih alkinov. Odščita poteka z virom fluora, mi smo v ta namen uporabili TBAF.



Slika 21: Mehanizem odščite s TBAF.

Reakcija je hitra, poteka 10 min pri sobni temperaturi. Izolacija je bila zaradi težav z ekstrakcijo izvedena s KKR, tako smo hkrati še očistili spojine.

5.1.5 Huisgenova cikloadicija – »klik« reakcija

Izraz »click chemistry« je bil prvič uporabljen leta 2001 in opisuje reakcije, ki imajo poleg enostavnih reakcijskih pogojev, izolacije produktov in nekromatografske odstranitve stranskih produktov ter topil, še visok izkoristek in stereospecifičnost produktov. Tem kriterijem najbolj ustreza 1,3-dipolarna cikloadicija, imenovana tudi Huisgenova cikloadicija med azidom in terminalnim acetilenom (**c**opper-catalyzed **a**zide **a**lkyne **c**ycloaddition – CuAAC), ki ima za rezultat 1,4 – substituiran 1,2,3 triazol. Triazoli so izredno pogosti v farmacevtski kemiji, so namreč izredno stabilni, predvsem proti kisli in bazični hidrolizi, na reduktivne in oksidativne pogoje, sposobni so tudi tvorbe vodikovih

vezi, dipol-dipol in π - π interakcij. Relativno stabilni so tudi proti encimski razgradnji. Čeprav je bila reakcija odkrita že v začetku 20. stoletja, je imela to pomankljivost, da so bili produkti zmes 1,4- in 1,5-regioizomerov (v razmerju 1:1), zahtevala je segrevanje in dolg reakcijski čas. Šele leta 2002 so bili znani reakcijski pogoji, ki vodijo v sintezo le enega regioizomera, 1,4-izomera. Tu imajo ključno vlogo bakrove soli in sobna temperatura. Katalitični sistem vsebuje bakrove soli v prisotnosti reducirajočega agenta, ki vseskozi reducira Cu(II) v Cu(I) in tako vzdržuje visoke nivoje katalizatorja. Poleg uporabe organskega topila (v našem primeru DMF), je potrebna še stehiometrična količina bakrove soli (npr. CuI) in presežek baze, ki je ponavadi terciarni amin (DIPEA – diizopropiletilamin) (52).

Natančen mehanizem reakcije še ni znan, vzrok temu pa so številna ravnotežja med reaktivnimi intermediati, ki jih je skoraj nemogoče izolirati. Domneva se, da naj bi v mehanizmu sodelovala dva bakrova atoma za nastanek cikloadicijskega kompleksa. Gonilna sila tvorbe triazolov pa naj bi bila izguba nabojev azida.



Slika 22: Predviden mehanizem Cu katalizirane 1,3-dipolarne Huisgenove cikloadicije (CuAAC), katalizirane z dvema Cu atomoma. Povzeto po (53).

Prvi korak je in situ tvorba Cu- π – kompleksa in sicer preko π -koordinacije alkina na Cu kar močno poveča kislost terminalnega protona na alkinu, ki se tako lažje deprotonira. Vključi se drug Cu atom preko σ – vezi, tvori se katalitično aktiven kompleks - Cu(I) acetilid- π – kompleks, ki aktivira azid preko koordinacije azida na drug Cu atom in s tem poveča reaktivnost acetilida za ciklizacijo (intermediat **a**). Sledi nukleofilen napad β ogljika acetilida na N3 azida, nastane prve kovalentna C – N vez, intermediat **b**. Triazolni obroč se sklene in nastane bakrov triazolid. V zadnjem koraku sledi še protonacija in izstop produkta ter regeneracija katalizatorja (Cu).

Reakcija je bila adaptirana iz literature (52). Izvajali smo jo v brezvodnih pogojih, uporabljali smo čisto in suho steklovino, predvsem zaradi uporabljenega katalizatorja (CuI) in baze, DIPEA (**di**izo**p**ropil**e**til**a**min, tudi Hünigova baza). Kot topilo smo uporabili DMF, ki smo se ga pred izolacijo znebili s hibridno vakuumsko črpalko, saj bi nam drugače otežil ločevanje faz med ekstrakcijo. Mili reakcijski pogoji, sobna temperatura in čas reakcije 24 ur, so nam dali zelo dobre izkoristke, od 60 % (spojine <u>3</u>, <u>5</u> in <u>37</u>) pa vse do 90 % (spojine <u>11</u>, <u>17</u>, <u>23</u> in <u>29</u>). Pri izolaciji spojin smo najprej poskusili s prekristalizacijo iz EtOAc in Hex, vendar imajo te spojine zelo slabo topnost, saj se niso raztopile kljub mešanju in segrevanju, zato smo za izolacijo uporabili ekstrakcijo in dodatno očitstili spojine s KKR, s katero smo se znebili tudi DIPEA. Po razvitju TLC bi glede na molekulsko maso oz. lipofilnost spojin <u>2</u> (R_f = 0,39) in <u>3</u> (R_f = 0,34) pričakovali, da bo spojina <u>3</u> imela višji retencijski faktor. Pa vendar temu ni tako, saj imata očitno elektronska para na obeh nesubstituiranih dušikih triazola večji vpliv kot sama lipofilnost molekule. Kot stranski produkt bi lahko prišlo tudi do nastanka regioizomera, kar smo opazili pri spojini <u>23</u>, po pregledu NMR spektra.

5.1.6 Zemplénova deacilacija manoznih OH skupin

Odščito *O*-acetil zaščitnih skupin manoze poteka z uporabo metanola in katalitične količine natrijevega metoksida (NaOMe), pri sobni temperaturi. Klasična hidroliza estra z uporabo baz (npr. KOH, NaOH) v stehiometričnih količinah za vsako estersko funkcionalno skupino lahko privede do večjih količin kalijevega oz. natrijevega acetata. Zemplenova deacilacija pa potrebuje le katalitično količino natrijevega metoksida. Slabost te metode so natrijevi ioni, ki zaostanejo v raztopini, vendar se jih lahko znebimo z ionskimi izmenjevalci (54). Pri uporabi ionskega izmenjevalca obstaja nevarnost da se naše spojine nanj vežejo, še posebno to velja za zelo polarne spojine. Ker gre za bazno katalizirano reakcijo, smo morali biti pazljivi tudi pri izbiri pogojev, da ni prišlo do hidrolize estra ali preestrenja na aglikonskem delu.



Slika 23: Mehanizem Zemplénove deacilacije, povzeto po (54).

Zemplénova transesterifikacija poteka po S_N^2 mehanizmu. Metoksidni anion kot nukleofil napade karbonil na acetatu, pride do intermediata kjer se tvorijo intrermolekularne vodikove vezi med acetatnimi anioni in OH skupinami. Sledi odcepitev MeOAc in regeneracija nukleofila (MeO⁻), ki je obenem tudi katalizator v reakciji. Nukleofilna adicija metoksida na estrske skupine je naključna, dokler niso odščitene vse acetilne skupine.

Reakcijo smo izvajali pri brezvodnih pogojih in v brezvodnem etanolu, saj nismo hoteli, da bi prišlo do preestrenja ali hidrolize estra na koncu aglikonskega dela, saj so nam estri predstavljali prvo skupino končnih spojin. 1 M NaOMe/MeOH smo pripravili sami, v čisto bučko smo dodali brezvodni MeOH, zaprli z refluksom in postopoma dodajali koščke Na. Pri tem smo lahko opazovali eksotermno reakcijo: $2Na + 2MeOH \longrightarrow 2Na^+ + 2MeONa$ $+ H_2$. Če ne bi uporabili brezvodnega metanola, bi zaradi prisotnosti vode prišlo do nastajanja NaOH.

Pri spojinah <u>4</u>, <u>6</u> in <u>38</u> se po poteku reakcije pojavila oborina, a po pregledu TLC je bilo vidno, da se naš produkt nahaja tako v oborini kot tudi v matičnici. Zato smo oborino filtrirali skozi teflonski filter in oborino posušili v sušilniku (60 °C, 2 uri). Produkt iz matičnice pa smo izolirali s pomočjo ionskega izmenjevalca, Amberlit IR120. Vse ostale spojine (<u>12</u>, <u>18</u>, <u>24</u> in <u>30</u>) smo izolirali samo z ionskim izmenjevalcem, saj ni prišlo do nastanka oborine. Izkoristki so bili zelo dobri, gibali so se od 60 % (<u>4</u> in <u>6</u>) pa vse do 95 % (<u>12</u>, <u>18</u>, <u>24</u> in <u>30</u>).

5.1.7 Hidroliza etilnega estra

V zadnji stopnji je sledila še hidroliza estra pod bazičnimi pogoji. Mehanizem reakcije poteka po $S_N 2$ mehanizmu, gre za ireverzibilno hidrolizo estra, kjer estrsko vez napade nukleofil, hidroksidni anion (OH⁻) in se pripne na karbonilni C atom. Tvori se intermediat, nastaneta karboksilna kislina in alkoksidni ion, ki je močno bazičen. Pod vplivom alkoksidnega iona pride do deprotonacije in dobimo sol karboksilne kisline ter alkohol (v našem primeru etanol) (55).



Slika 24: Mehanizem hidrolize estra. Povzeto po (55).

Izkoristki reakcij so se gibali od 75 % do 98 %. Reakcija zahteva mile reakcijske pogoje, izhodne spojine smo raztopili v EtOH in dodali 6 ekv 2 M NaOH. Po preteku reakcije nam je izpadla oborina, ki smo jo prefiltrirali skozi teflonski filter in posušili v sušilniku (60 °C, 2 uri). Čeprav je TLC kazal prisotnost spojine tudi v matičnici, smo jo zavrgli, saj so bili poleg naše spojine prisotni še neznani stranski produkti. Končne spojine (<u>13</u>, <u>19</u>, <u>25</u> in <u>31</u>) so bile izolirane v obliki Na⁺ soli, spojina <u>7</u> pa je bila izolirana v obliki kisline.

5.1.8 Sinteza derivata z 2 C distančnikom na para mestu

Sinteza spojine <u>38</u> nam je predstavljala nemalo težav. Sinteza aglikonskega dela po sinteznem načrtu, uporabljenem za ostale spojine, ni bila uspešna. Zataknilo se je že pri prvi stopnji, Williamsonovi sintezi etrov med 4-jodofenolom in etil 3-bromopropanoatom, kjer reakcija ni potekla. Izmerjen pH reakcijske zmesi je bil močno kisel (pH = 2 - 3), kar je nakazovalo, da prihaja do β -eliminacije (1,2 – eliminacije):



Slika 25: Mehanizem beta eliminacije pri prvem poskusu sinteze.

Gre za E_2 mehanizem eliminacij, kjer pride do napada protona na β C atomu in prekinitvijo vezi med α C atomom in Br in posledično do nastanka dvojne vezi.

Izbrali smo drug pristop, z dvostopenjsko reakcijo smo na izhodni spojini, 4-jodofenolu z uporabo NaH/DMF (60 % wt/wt NaH v mineralnem olju) tvorili sol in šele po poteku reakcije smo postopoma dokapavali v raztopino etil 3-bromopropionat.



Slika 26: Drugi neuspešen poskus sinteze.

Tudi ta pristop ni prinesel uspeha, saj je bil izmerjen pH ponovno kisel, β -eliminacijo nam je potrdil tudi pregled NMR spektra izolirane spojine, ki je sicer nakazoval nastajanje željenega produkta, vendar v zelo majhnih količinah.

Sledil je še tretji pristop, ki se je izkazal za uspešnega. Še vedno je bil prvi sintezni korak tvorba etra z Williamsonovo sintezo etrov, le da smo izhajali iz 4-jodofenola in 3-bromo propanola in prišli do spojine <u>32</u>, ki smo jo izolirali z ekstrakcijo in očistili s KKR. Sledili sta dodatni sintezni stopnji, oksidacija do karboksilne kisline (Jonesova oksidacija) in tvorba etilnega estra na karboksilatu (Fischerjeva sinteza estrov). V naslednjo stopnjo, Sonogashira sklopitev, smo nameravali tako s kislino kot tudi z estrom. Pot preko estra, se je tako kot pri prejšnih spojinah, izkazala za uspešno (spojina <u>36</u>), čeprav je bil izkoristek manjši, kot pri ostalih (35 %), sklepali smo da še vedno prihaja do β -eliminacije. Kislinski derivat, ki je bil v Et₃N slabo topen, dodati smo morali DMF, pa nam je v Sonogashira sklopitvi dal produkt neznane strukture, zato smo zaključili, da sintezna pot preko kisline ni prava. Nadaljna sintezna koraka, Huisgenova cikloadicija (spojina <u>37</u>) in Zemplénova deacilacija (spojina <u>38</u>) sta potekala kot pri ostalih spojinah, le z manjšimi izkoristki (65 %), kar nakazuje na še vedno prisotno β -eliminacijo. Za zadnjo stopnjo, hidrolizo estra pa nam je žal zmanjkalo spojine.

5.1.8.1 Jonesova oksidacija

Jonesova oksidacija je organska reakcija, pri kateri lahko oksidiramo primarne alkohole do karboksilne kisline ali sekundarne alkohole do ketonov z uporabo kromove kisline. Reakcija poteka v raztopini acetona, je hitra in ima nizko selektivnost. Gonilna sila mehanizma reakcije je pretvorba Cr(VI) do Cr(IV), vlogo oksidanta ima t.i. Jonesov reagent (CrO₃ – H₂SO₄ – H₂O) (50).

Mehanizem reakcije se prične s tvorbo kromove(VI) kisline, ki nastane in situ v reakciji med kromovim trioksidom (CrO₃) in vodni raztopini H₂SO₄.



Slika 27: Tvorba kromove kisline, Jonesov reagent. Povzeto po (56).

Reakcija med primarnim alkoholom in kromovo(VI) kislino da kromov(VI) monoester, ki lahko interagira intra- ali intermolekularno, preko mehanizma β -eliminacije skozi ciklično prehodno stanje, v prisotnosti baze (v našem primeru H₂O) in tako oksidiramo alkohol do aldehida in kromove(IV) kisline.



Slika 28: Mehanizem Jonesove oksidacije do aldehida. Povzeto po (56).

Aldehidi so nato zaradi prisotnosti vode podvrženi oksidaciji in se oksidirajo do karboksilne kisline.



Slika 29: Mehanizem Jonesove oksidacije do kisline. Povzeto po (50).

Spojino <u>32</u> smo zatehtali v bučko in jo raztopili v acetonu, ki smo ga zaradi velike higroskopnosti CrO₃ glede na predpis (80 ml) dodali več (100 ml). Dodali smo zmes H₂SO₄/H₂O v razmerju 1 : 2, postavili na led in mešali 10 min. Počasi smo začeli dodajati CrO₃, da se je reakcijska zmes obarvala črno in nato reakcijo pustili mešati na ledu do naslednjega dne, saj gre za eksotermno reakcijo. Zaradi toksičnosti Cr(VI) smo morali biti pri rokovanju z njim zelo previdni. Potek reakcije smo lahko poleg spremljanja s TLC, opazovali tudi v spremembi barve reakcije bučke, saj se reduciran Cr(IV) obarva temno zeleno. Po poteku reakcije smo v zmes dodali 2 – propanol, ki razbije komplekse s kromom in pobere morebitne ostanke Cr(VI). Poskus izolacije z ekstrakcijo nam zaradi neločevanja faz ni uspel, tudi zato, ker smo v prvem poskusu reakcijo pustili potekati le 3 ure, namesto 97 % H₂SO₄ pa smo uporabili le 1 M H₂SO₄. V naslednjem poskusu smo izolacijo izvedli s KKR s suhim nanosom na kolono in uspešno izolirali spojino <u>33</u> z izkoristkom 35 %.

5.1.8.2 Fischerjeva esterifikacija

Pred Sonogashiro sklopitvijo je sledila še tvorba estra na karboksilatu. Gre za nukleofilno acilno substitucijo, kjer smo etilni ester karboksilne kisline spojine <u>33</u> sintetizirali v reakciji esterifikacije s segrevanjem, in v prisotnosti etanola in močne kisline (H_2SO_4) kot katalizatorja.

Mehanizem reakcije se prične s protonacijo karbonilnega kisika, ki ga povzroči kislinski katalizator (H_2SO_4), saj so alkoholi šibki nukleofili in s tem povečamo elektrifilnost karbonilnega ogljika za nukleofilni napad etanola, tvori se intermediat. Sledi deprotonacija intermediata, ki privede do hidratnega estra, temu sledi transfer protona iz alkohola na hidroksilno skupino, tako da se tvori boljša izstopajoča skupina (HOH). Voda se eliminira in po deprotonaciji intermediata dobimo (etilni) ester (57).



Slika 30: Mehanizem Fischerjeve esterifikacije. Povzeto po (57).

Spojino <u>33</u> smo raztopili v etanolu, vse skupaj ohladili na ledu in po kapljicah dodali kislino, H_2SO_4 , ki smo jo pred tem razredčili v etanolu. Vse skupaj smo refluktirali pri 75 °C do naslednjega dne. Povišana temperatura in uporaba katalizatorja pospešita tvorbo estra, saj je reakcija esterifikacije počasen proces. Izkoristek spojine <u>34</u> po izolaciji z ekstrakcijo je znašal 85 %.

5.2 Biološko vrednotenje

Sintetizirane spojine, razen spojine <u>38</u> so bile poslane na biološko vrednotenje. Vse spojine vežejo izoliran FimH (*wild type*) v nanomolarnih koncentracijah. Na podlagi zadetka, spojine <u>4</u>, smo pri prvi seriji spojin sintetizirali še derivat s karboksilatom in njegovim estrom. Za najbolj potencialnega se je, presenetljivo, izkazal derivat z metilnim estrom, spojina <u>6</u>, ki na izoliranem FimH izkazuje afiniteto $K_d = 36.0$ nM in se tako skoraj izenači z referenčno spojino HM.

Spojina	K_D celotnega FimH (μ M)	
4	30.8 ± 5.3	336.1 ± 81.5
6	4.2 ± 0.9	36.0 ± 12.5
7	15.5 ± 1.4	127.5 ± 58.1
HM	2.6 ± 0.5	36.8 ± 8.1

⁽¹⁾IC₅₀ za HM je 58.8/36.8 nM

Tabela 2: Rezultati testiranja vezavne afinitete prve serije spojin.

Prva serija spojin je bila testirana tudi na *in vitro* testiranju tvorbe biofilma na in vitro vzpostavljenim sistemom s kateteriziranim mehurjem, kjer kultivirajo urin z antagonisti FimH. Rezultati so podani kot MBIC₅₀ in MBIC₉₀. Iz rezultatov vidimo, da testirane spojine zavirajo nastajanje biofilma E. coli v mikromolarnih koncentracijah.

Spojina	$\mathrm{MBIC}_{50}\left(\mu\mathrm{M}\right)^{(2)}$	$\mathrm{MBIC}_{90}(\mu\mathrm{M})^{(3)}$	$C_{min}(\mu M)$	$C_{max}(\mu M)$
4	220	>220	60	220
6 ⁽⁴⁾	80	>100	40	100
7	260	>280	100	280
HM (MM)	>200	>200	60	200

⁽²⁾ minimalna biofilmska inhibitorna koncentracija, ki vodi v zmanjšanje nastanka biofilma za vsaj 50% ⁽³⁾ minimalna biofilmska inhibitorna koncentracija, ki vodi v zmanjšanje nastanka biofilma za vsaj 90%

⁽⁴⁾ možni problemi s topnostjo v višjih koncentracijah a ne nujno

Tabela 3: Rezultati in vitro testiranja tvorbe biofilma prve serije spojin.

Rezultati biološkega vrednotenja druge serije spojin so prikazani v spodnji tabeli, z rezultati smo hoteli preveriti, ali nam je uspelo doseči interakcijo z argininskim ostankom Arg98, s katero bi preko ionske vezi še povečali afiniteto vezave do FimH. Testiranja so bila opravljena na lektinski domeni FimH in na mutantu R98A, kjer je Arg zamenjan z Ala.

Spojina	K _D lektinske domene FimH (nM)	K _D R98A (nM)
12	65.0 (52.2 - 81.0)	16.2 (13.9 – 18.7)
13	78.5 (64.3 - 96.0)	16.3 (13.7 – 19.3)
18	48.8 (40.7 - 58.5)	11.5 (9.80 – 13.4)
19	56.0 (46.5 - 67.4)	17.3 (14.2 – 21.0)
24	69.1 (58.2 - 81.9)	13.4 (10.8 – 16.7)
25	533 (417 - 681)	63.2 (46.9 - 85.3)
30	107 (79.8 – 143)	25.0 (21.4 - 29.1)
31	>1000	/

Tabela 4: Rezultati testiranja vezavne afinitete druge serije spojin.

Glede na izmerjene afinitete, na lektinski domeni kot tudi R98A, nam interakcije z Arg98 ni uspelo doseči, smo pa, tako kot pri prvi seriji spojin, opazili zanimiv vzorec. Estri, sicer načrtovani kot potencialna predzdravila za dosego peroralne absorpcije, imajo malenkost višjo afiniteto do FimH kot prosti karboksilati. Najvišjo afiniteto izkazuje spojina <u>18</u> (K_d = 11.5 nM) na R98A, z distančnikom dolgim 5 C in etilnim estrom.

Pri obeh serijah so tudi opazne višje K_D vrednosti pri testiranju lektinske domene FimH v primerjavi s K_D celotne (*wild type*) FimH ali R98A FimH. To je posledica »catch-bond« mehanizma vezave, saj se ob prisotnosti strižne sile domeni ločita, interakcije med njima se prekinejo, pilijeva domena ima le vlogo steričnega modulatorja. Ob prenehanju strižne sile pa se interakcije med obema domenama ponovno povečajo, kar ima za posledico tudi povečano afiniteto do antagonistov FimH.

Iz rezultatov lahko tudi vidimo, da R98A mutant sprejme karboksilate – biarilne analoge bolje kot *wild type*. To bomo v prihodnosti skušali razločiti s homolognim modelom R98A in sidranjem tako v *wild type* kot tudi v R98A.

5.3 Molekulsko sidranje

Pri razlagi rezultatov biološkega vrednotenja naših potencialnih antagonistov FimH so nam v pomoč tudi rezultati virtualnega sidranja, ki so potrdli rezultate bioloških testiranj. Najbolj ugodne interakcije z vezavnim mestom doseže spojina <u>18</u>, derivat z dolgim distančnikom 5 C in etilnim estrom na koncu verige. Zelo podoben vezavni položaj doseže spojina <u>19</u>, ki ima namesto estra na koncu verige karboksilat. Če primerjavo vezavo z

ostalimi derivati, ugotovimo, da je derivat z distančnikom 4 C malce prekratek, vendar ne bistveno, kar smo potrdili tudi z biološkimi testiranji, kjer sta vezavni afiniteti spojin <u>12</u> in <u>13</u> le malce slabši od derivata s 5 C. Pri derivatih z dolžino distančnika 6 C in 7 C pa so vezavne afinitete slabše, saj je distančnik glede na molekulsko sidranje predolg in zvit, zato ne ustvarijo interakcij z Arg98.

Rezultati virtualnega sidranja spojine $\underline{18}$ v vezavno mesto FimH v primerjavi s spojinami $\underline{12}$, $\underline{24}$ in $\underline{30}$ so del priloge (poglavje 8.2).



Slika 31: Sidranje spojine <u>18</u> v vezavno mesto FimH, označeno z zeleno barvo in spojine <u>19</u>, označene s sivo barvo.

6 Zaključek

V okviru te magistrske naloge smo uspešno sintetizirali 12 končnih spojin, potencialnih antagonistov receptorja FimH, od katerih je bilo 11 poslanih na biološka testiranja na Institute of Molecular Pharmacy, University of Basel v Švici. Čeprav nam glede na rezultate tesiranj ni uspelo vzpostaviti ionskih interakcij z Arg98, nas je presenetilo dejstvo, da estri izkazujejo višje afinitete kot kisline, kar vsekakor velja raziskati.

Glavni namen magistrske naloge, sestava sinteznega načrta in prilagoditev sinteznih postopkov za dosego optimalnih pogojev in izkoristkov, s katerim smo prišli do zadostne količine končnih spojin, je bil dosežen. Čeprav je bila večina reakcij povzeta iz literature, so bila potrebna prilagajanja in številni poskusi reakcij, da smo prišlo do končne oblike predpisov, ki zagotavljajo uspešen potek kemijskih reakcij z zadovoljivimi izkoristki. Prostor za izboljšave še vedno ostaja, med ključne spremembe reakcijskih postopkov pa sodijo:

- Uspešno smo sestavili sintezni načrt za sintezo aglikonskega dela druge serije spojin, katerega smo z glikonom združili v Huisgenovi cikloadiciji. Pri prvem sinteznem koraku, Williamsonovi sintezi etrov smo prilagodili razmerje reagentov v prid 3-JF, saj smo se ga pri čiščenju spojin lažje znebili s KKR, alkilbromidov pa smo se dokončno znebili z uparevanjem na hibridni vakuumski črpalki.
- Ena izmed najtežjih stopenj reakcij, Sonogashira sklopitev, s katero smo pripeli etilno skupino na fenilni obroč, je zahtevala največ prilagajanj, izkoristki so se najbolj povečali ob povečani količini katalizatorjev in menjavi topila (DMSO, DMF) z TEA, ki ima sicer vlogo baze, po končani reakciji pa se ga preprosto znebimo z uparevanjem. Po začetnih težavah z izolacijo spojin z ekstrakcijo, kjer so nam spojine delno razpadale, smo spremenili način izolacije in sicer smo spojine izolirali in obenem očistili s KKR, enako velja tudi za sledečo odščito TMS.
- Uspelo nam je prilagoditi sintezni načrt za derivat, ki ima na aglikonskem delu na p- mestu distančnik z dolžino 2 C in ima zaradi svojih kemijskih lastnosti veliko verjetnost za β-eliminacijo, ki pa smo jo z dodatnima sinteznima stopnjama močno zmanjšali, tako da smo uspešno sintetizirali derivat do končne oblike spojine z estrom.

Po pregledu rezultatov molekulskega sindranja in bioloških testiranj lahko zaključimo, da:

- Se naši potencialni antagonisti vežejo na izolirano FimH v nanomolarnih koncentracijah. Kot najbolj potencialni sta se izkazali spojini <u>6</u> ($K_d = 36.0 \text{ nM}$) pri prvi seriji spojin in <u>18</u> ($K_d = 48.8 \text{ nM}$) pri drugi seriji spojin. Rezultate bioloških testiranj potrjujejo tudi rezultati molekulskega sidranja, kjer derivat s 5 C dolgim distančnikom (<u>18</u> in <u>19</u>) tvori najbolj optimalne vodikove vezi z Arg98.
- Estri izkazujejo malenkost višjo afiniteto za vezavo FimH kot kisline, s čimer smo ovrgli hipotezo, da je za doseganje visoke afinitete možno izkoristiti ionsko interakcijo z Arg98, saj le ta v vezavnem mestu že tvori ionsko vez z Glu50 (solni most), ob vezavi pa se mora Arg98 najprej desolvatirati, kar zmanjša entalpijo vezave.
- Spojine imajo večjo afiniteto do celotne FimH (*wild type* in R98A mutant) v
 primerjavi z lektinsko domeno FimH, kar je posledica vezavnega mehanizma
 FimH, *»catch-bond«* mehanizma, kjer sta obe domeni v odsotnosti strižnih sil
 blizu skupaj in med seboj interagirata kar poveča vezavno afiniteto do ligandov.
- Spojine prve serije, testirane tudi za nastanek statičnega biofilma s strani E.coli, inhibirajo tvorbo biofilma v mikromolarnih koncentracijah.

Boj proti bakterijski rezistenci, ki poteka že zadnjih 40 let, je utrl pot novim metodam zdravljenja bakterijskih infekcij, med drugim antiadhezivni terapiji, ki je pri zdravljenju virusa HIV-1 (Maravirok, 2007), že nekaj časa uveljavljena učinkovina. Antiadhezivna metoda, kjer so kot inhibitorji načrtovani receptorski analogi, ki posnemajo ostanke sladkorjev, za katere ni pričakovati toksičnosti ali imunogenosti, saj so zelo podobni naravno prisotnim molekulam. Za uspešno terapijo je vzdrževanje MIC antagonista v urinu ključnega pomena, kar smo v mikromolarnih koncentracijah dosegli z našimi monovalentnimi antagonisti, ki so tako sposobni prekiniti več molekularnih interakcij med procesom adhezije.

Tako bi klinično uspešen manozid predstavljal ne le prvo majhno molekulo antagonista FimH, ampak bi bil tudi prva zdravilna učinkovina, ki bi zmanjšala uporabo antibiotikov pri zdravljenju urinarnih infekcij in bi bil odličen primer zdravila, ki cilja na lektine oziroma dejavnike virulence in so nujno potrebni za razvoj nalezljivih bolezni. (6)

7 Literatura

- 1. Anderluh M. Predavanje pri predmetu Farmacevtska kemija III. Selektivna toksičnost, SAR sulfonamidov, SAR inhibitorjev giraze. 10.12.2013.
- Bouckaert J, Li Z, Xavier C, Almant M, Caveliers V, Lahoutte T, et al. Heptyl α-D-Mannosides Grafted on a β-Cyclodextrin Core to Interfere with *Escherichia coli* Adhesion: An In Vivo Multivalent Effect. Chem. Eur. J. 2013; 19, 7847-7855.
- Eris D, Preston RC, Scharenberg M, Hulliger F, Abgottspon D, Pang L, et al. The Conformational Variability of FimH: Which Conformation Represents the Therapeutic Target? Chembiochem. 2016; 17, 1012-1020.
- Klein T, Abgottspon D, Wittwer M, Rabbani S, Herold J, Jiang X, et al. FimH Antagonists for the Oral Treatment of Urinary Tract Infections: From Design and Synthesis to in Vitro and in Vivo Evaluation. J. Med. Chem. 2010; 53, 8627-8641.
- Tomašić T, Rabbani S, Gobec M, Mlinarič Raščan I, Podlipnik Č, Ernst B, Anderluh M. Branched α-D-mannopyranosides: a new class of potent FimH antagonists. Med. Chem. Commun. 2014; 5, 1247-1253.
- 6. Cozens D, Read RC. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 2012; 10 (12), 1457-1468.
- Sperling O, Fuchs A, Lindhorst TK. Evaluation of the carbohydrate recognition domain of the bacterial adhesin FimH: design, synthesis and binding properties of mannoside ligands. Org. Biomol. Chem. 2006; 4, 3913–3922.
- Schwardt O, Rabbani S, Hartmann M, Abgottspon D, Wittwer M, Kleeb S, et al. Design, synthesis and biological evaluation od mannosyl triazoles as FimH antagonists. Bioorg Med Chem. 2011; 19, 6454-6473.
- Wellens A, Garofalo C, Nguyen H, Van Gerven N, Slättegard R, Hernalsteens JP, et al. Intervening with Urinary Tract Infections Using Anti-Adhesives Based on the Crystal Structure of the FimH-Oligomannose-3 Complex. PloS One. 2008; Volume 3, Issue 4, e2040.
- Davis C, Rantell A. Lower urinary tract infections in women. Br J Nurs. 2017, Vol 26, No 9, S12-S19.
- Ernst B, Magnani JL. From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. Nat Rev Drug Discov. 2009; Volume 8, 661–677.

- Kleeb S, Pang L, Mayer K, Eris D, Sigl A, Preston RC, et al. FimH Antagonists: Bioisosteres To Improve the in Vitro and in Vivo PK/PD Profile. J. Med. Chem. 2015; 58, 2221-2239.
- 13. Sattion S, Bernardi A. Glycoconjugates and Glycomimetics as Microbial Anti-Adhesives. Trends Biotechnol. 2016; Vol. 34, No. 6, 483-495.
- 14. Bouckaert J, Berglund J, Schembri M, De Genst E, Cools L, Wuhrer M, et al. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the Escherichia coli, FimH adhesin. Mol Microbiol. 2005; 55, 441-455.
- 15. Han. Z, Pinkner JS, Ford B, Chorell E, Crowley JM, Cusumano CK, et al. Lead Optimization Studies on FimH Antagonists: Discovery of Potent and Orally Bioavaliable Ortho-Substituted Biphenyl Mannosides. J. Med. Chem. 2012; 55, 3945-3959.
- Han Z, Pinkner JS, Ford B, Obermann R, Nolan W, Wildman SA, et al. Structure-Based Drug Design and Optimization of Mannoside Bacterial FimH Antagonists. J. Med. Chem. 2010; 53, 4779–4792.
- 17. Wellens A, Lahmann M, Touaibia M, Vaucher J, Oscarson S, Roy R, et al. The Tyrosine Gate as a Potential Entropic Lever in the Receptor-Binding Site of the Bacterial Adhesin FimH. Biochemistry. 2012; 51, 4790-4799.
- Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al. Essentials of Glycobiology, 2nd edition. Chapter 26: Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins. Cold Spring Harbor, 2009.
- Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al. Essentials of Glycobiology, 2nd edition. Chapter 31: C-Type Lectins. Cold Spring Harbor, 2009.
- Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al. Essentials of Glycobiology, 2nd edition. Chapter 34: Microbial Lectins: Hemmagglutinins, Adhesins and Toxins. Cold Spring Harbor, 2009.
- 21. Scharenberg M, Schwardt O, Rabbani S, Ernst B. Target Selectivity of FimH Antagonists. J. Med. Chem. 2012; 55, 9810-9816.
- 22. Pang L, Kleeb S, Lemme K, Rabbani S, Scharenberg M, Zalewski A, et al. FimH Antagonists: Structure-Activity and Structure-Property Realtionship for Biphenyl α-D-Mannopyranosides. Chemmedchem. 2012; 7, 1404-1422.
- 23. Chandrasekaran V, Kolbe K, Beiroth F., Lindhorst TK. Synthesis and testing of the first azobenzene mannobioside as photoswitchable ligand for the bacterial lectin FimH. Beilstein J. Org.Chem. 2013; 9, 223-233.

- 24. Firon N, Ashkenazi S, Mirelman D, Ofek L, Sharon N. Aromatic Alpha-Glycosides of Mannose Are Powerful Ihibitors of the Adherence of Type 1 Fimbriated *Escherichia coli* to Yeast and Intestinal Epithelial Cells. Infect Immun. 1987; 55, 472-476.
- 25. Imberty A, Chabre YM, Roy R. Glycomimetics and Glycodendrimers as High Affinity Microbial Anti-adhesins. Chem. Eur. J. 2008; 14, 7490-7499.
- 26. Fiege B, Rabbani S, Preston RC, Jakob RP, Zihlmann P, Schwardt O, et al. The Tyrosine Gate of the Bacterial Lectin FimH: A Conformational Analysis by NMR Spectroscopy and X-ray Crystallography. Chembiochem. 2015; 16, 1235-1246.
- 27. Fessele C, Lindhorst TK. Effect of Aminophenyl and Aminothiahexyl α-D-Glycosides of the Manno-, Gluco-, and Galacto-Series on Type 1 Fimbriae-Mediated Adhesion of Escherischia coli. Biology. 2013; 2, 1135-1149.
- 28. Do gradiva dostopano dne 10.06.2017 na naslovu: http://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.0040329
- 29. Jiang X, Abgottspon D, Kleeb S, Rabbani S, Scharenberg M, Wittwer M, et al. Antiadhesion Therapy for Urinary Tract Infections – A Balanced PK/PD Profile Proved To Be Key for Success. J. Med. Chem. 2012; 55, 4700-4713.
- Inaugural dissertation, Zalewski A. In pursuit of a novel UTI treatment strategy an *in silico* study of the FimH adhesion. 2013.
- 31. Sauer MM, Jakob RP, Eras J, Baday S, Eris D, Navarra G, et al. Catch-bond mechanism of the bacterial adhesin FimH. Nat commun. 2016; 7, 1-13.
- 32. Scharenberg M, Jiang X, Pang L, Navarra G, Rabbani S, Binder F, et al. Kinetic Properties of Carbohydrate-Lectin Interactions: FimH Antagonists. Chemmedchem. 2014; 9, 78-83.
- 33. Mayer K, Eris D, Schwardt O, Sager CP, Rabbani S, Kleeb S, Ernst B. Urinary Tract Infection: Which Conformation of the Bacterial Lectin FimH is Therapeutically Relevant? J. Med. Chem. 2017; 60, 5646-5662.
- 34. Firon N, Ofek I, Sharon N. Interaction of Mannose-Containing oligosaccharides with the fibrial lectin of *Escherichia coli*. Biochem bioph res co. 1982; Vol. 105, No.4, 1426-1432.
- 35. Firon N, Ofek I, Sharon N. Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae*, AND Salmonella typhimurium. Carbohydr Res. 1983; 120, 235-249.

- 36. Roos G, Wellens A, Touaibia M, Yamakawa N, Geerlings P, Roy R, et al. Validation of Reactivity Descriptors to Assess the Aromatic Stacking within the Tyrosine Gate of FimH. ACS Med. Chem. Lett. 2013; 4, 1085-1090.
- 37. Vanwetswinkel S, Volkov AN, Sterckx YGJ, Garcia-Pino A, Buts L, Vranken WF, et al. Study of the Structural and Dynamic Effects in the FimH Adhesin upon α-D-Heptyl Mannose Binding. J. Med. Chem. 2014; 57, 1416-1427.
- Schönemann W, Kleeb S, Dätwyler P, Schwardt O, Ernst B. Prodruggability of Carbohydrates – Oral FimH Antagonists. Can J Chem. 2016; 94(11), 909-919.
- 39. Kleeb S, Jiang X, Frei P, Sigl A, Bezencon J, Bamberger K, et al. FimH Antagonists: Phosphate Prodrugs Improve Oral Bioavailability. J. Med. Chem. 2016; 59, 3163-3182.
- 40. Anderluh M, Tomašič T, Reisner A, Rabbani S, Ernst B. Triazolomannopyranoside FimH antagonists block E.coli biofilm formation. EuroCarb 2017, poster.
- 41. Tomašič T. Vaje pri predmetu Načrtovanje in sinteza učinkovin, 3.vaja, 2015.
- Graves TL, Zhang Y, Scott JE. A universal competitive fluorescence polarization activity assay for S-adenosylmethionine utilizing methyltransferases. Anal. Biochem. 2008; 373(2), 296-306.
- 43. Hall MD, Yasgar A, Peryea T, Braisted JC, Jadhav A, Simeonov A, et al. Fluorescence polarisation assays in high-throughput screening and drug discovery: a review. IOS Publ. 2016 (4).
- 44. Do gradiva dostopano dne 15.7.2017 na naslovu http://www.echeloninc.com/index.php?module=Products&func=detail&id=887
- 45. Lindhorst TK. Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Third, completely revised and enlarged edition, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.
- 46. Percec V, Leowanawat P, Sun HJ, Kulikov O, Nusbaum C., Tran TM, et al. Modular Synthesis of Amphiphilic Janus Gycodendrimers and Their Self-Assembly into Glycodendrimersomes and Other Complex Architectures with Bioactivity to Biomedically Relevant Lectins. J. Am. Chem. Soc. 2013; 135, 9055-9077.
- 47. Do gradiva dostopano dne 05.06.2017 na naslovu: http://www.wikipremed.com/03_organicmechanisms.php?mch_code=030207_08
 0

- 48. Nakamura H, Yasui Y, Ban HS. Synthesis and biological evaluation of *ortho*carborane containing benzoxazole as an inhibitor of hypoxia inducible factor (HIF)-1 transcriptional activity. J Organomet Chem. 2013; 747, 189-194.
- 49. Sonogashira K. Development of Pd-Cu catalyzed cross-coupling of terminal acetylenes with sp²-carbon halides. J Organomet Chem. 2002; 653, 46-49.
- 50. Lin BN, Huang SH, Wu WY, Mou CY, Tsai FY. Sonogashira reaction of Aryl and Heteroaryl Halides with Terminal Alkynes Catalyzed by a Highly Efficient and Recycable Nanosized MCM-41 Anchored Palladium Bipyridyl Complex. Molecules. 2010; 15, 9157-9173.
- 51. Do gradiva dostopano dne 03.06.2017 na naslovu: http://organic.chm.muohio.edu/CHM254_html/pdfs/name_reactions2.pdf
- 52. Tron GC, Pirali T, Billington RA, Canonico PL, Sorba G, Genazzani AA. Click Chemistry Reactions in Medicinal Chemistry: Applications of the 1,3-dipolar Cycloaddition Between Azides and Alkynes. Med Res Rev. 2008; Vol. 28, No.2, 278-308
- 53. Pretze M, Pietzsch D, Mamat C. Recent Trends in Bioorthogonal Click-Radiolabeling Reactions Using Fluorine-18. Molecules. 2013; 18, 8618-8665.
- 54. Ren B, Wang M, Liu J, Ge J, Zhang X, Dong H. Zemplén transesterification: a name reaction that has misled us for 90 years. Green Chem. 2015; 17, 1390-1394.
- 55. Do gradiva dostopano dne 06.06.2017 na naslovu: <u>http://caravel.sc.edu/wp-</u> content/uploads/2014/10/Bell-Scheme-4.jpg
- 56. Do gradiva dostopano dne 15.06.2017 na naslovu: http://www.adichemistry.com/organic/organicreagents/jones/jones-reagentreaction-1.html
- 57. Do gradiva dostopano dne 20.06.2017 na naslovu: https://www.slideshare.net/Oatsmith/20-carboxylic-acids-wade-7th-33311420

8 Priloge

8.1 Analizni izvidi

<u>Spojina 1</u>

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.02, 2.06, 2.11, 2.18, 2.22 (5 x s, 15H, 5 x *COCH₃*), δ 4.05 – 4.08 (m, 1H, *H*₅) δ 4.11 (dd, *J*_{6a,6b} = 12.4 Hz, *J*_{6a,5} = 2.4 Hz, 1H, *H*_{6a}), δ 4.29 (dd, *J*_{6a,6b} = 12.4 Hz, *J*_{6b,5} = 4.9 Hz, 1H, *H*_{6b}), δ 5.26 – 5.28 (m, 1H, *H*₄), δ 5.36 (dd, *J*_{2,3} = 3.7 Hz, *J*_{1,2} = 2.6 Hz, 2H, *H*₃, *H*₂), δ 6.09 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, *H*₁) ppm. MS (ESI): [M + Na]⁺ = 412, 94.

Spojina 2:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.01, 2.07, 2.13, 2.19 (4 x s, 12H, 4 x *COCH₃*), δ 4.14 (m, 1H, *H*₅), δ 4.18 (dd, *J*_{6a,6b} = 12.0 Hz, *J*_{5,6b} = 2.37 Hz, 1H, *H*_{6a}), δ 4.32 (dd, *J*_{6a,6b} = 12.4 Hz, *J*_{5,6a} = 5.5 Hz, 1H, *H*_{6b}), δ 5.17 (dd, *J*_{1,2} = 2.0 Hz, *J*_{2,3} = 3.0 Hz, 1H, *H*₂), δ 5.28 (dd, *J*_{2,3} = 2.3 Hz, 1H, *H*₃), δ 5.31 (dd, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9.9 Hz, 1H, *H*₄), δ 5.41 (d, *J*_{1,2} = 1.9 Hz, 1H, *H*₁) ppm. MS (ESI): [M + Na]⁺ = 395,91.

Spojina 3:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 2.09, 2.09, 2.11, 2.22 (4 x s, 12 H, 4 x *COCH₃*), δ 3.97 (ddd, $J_{\text{H5-H6b}} = 2.6$ Hz, $J_{\text{H5-H6a}} = 5.5$ Hz, $J_{\text{H4-H5}} = 8.7$ Hz, 1H, H_5), δ 4.10 (dd, $J_{\text{H5-H6b}} = 2.5$ Hz, $J_{\text{H6a-H6b}} = 12.5$ Hz, 1H, H_{6a}), δ 4.41 (dd, $J_{\text{H5-H6a}} = 5.4$ Hz, $J_{\text{H6a-H6b}} = 12.5$ Hz, 1H, H_{6b}), δ 5.42 (t, $J_{\text{H3-H4}} = J_{\text{H4-H5}} = 8.9$ Hz, 1H, H_4), δ 6.01 (dd, $J_{\text{H2-H3}} = 3.7$ Hz, $J_{\text{H3-H4}} = 8.8$ Hz, 1H, H_3), δ 6.04 (dd, $J_{\text{H1-H2}} = 2.7$ Hz, $J_{\text{H2-H3}} = 3.7$ Hz, 1H, H_2), δ 6.09 (d, $J_{\text{H1-H2}} = 2.6$ Hz, 1H, H_1), δ 7.40 (t, J = 7.4 Hz, 1H, $C_6H_5-\underline{H_c}$), δ 7.48 (t, J = 7.1 Hz, 2H, $C_6H_5-\underline{H_b},H_d$), δ 7.88 (d, J = 7.1 Hz, 2H, $C_6H_5-\underline{H_a},H_e$), δ 7.98 (s, 1H, C_2N_3H) ppm.

Spojina 4:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 3.40 (ddd, J_{H5-H6b} = 2.6 Hz, J_{H5-H6a} = 6.6 Hz, J_{H4-H5} = 9.0 Hz, 1H, H_5), δ 3.62 – 3.67 (m, 1H, *Man-OH*), δ 3.81 (dd, J_{H5-H6b} = 2.4 Hz, $J_{H6a-H6b}$ = 12.1 Hz, 1H, H_{6a}), δ 3.79 (t, J_{H3-H4} = J_{H4-H5} = 8.9 Hz, 1H, H_4), δ 3.87 (dd, J_{H5-H6a} = 5.4 Hz, $J_{H6a-H6b}$ = 12.1 Hz, 1H, H_{6b}), δ 4.13 (dd, J_{H2-H3} = 3.5 Hz, J_{H3-H4} = 8.7 Hz, 1H, H_3), δ 4.77 (t,

 $J_{\text{H1-H2}} = 2.9 \text{ Hz}, J_{\text{H2-H3}} = 3.4 \text{ Hz}, 1\text{H}, H_2$, $\delta 4.91$ (s, 3H, $3 \times Man$ -OH), $\delta 6.09$ (d, $J_{\text{H1-H2}} = 2.7 \text{ Hz}, 1\text{H}, H_1$), $\delta 7.38$ (t, $J = 7.4 \text{ Hz}, 1\text{H}, C_6H_5$ - \underline{H}_{3c}), $\delta 7.47$ (t, $J = 7.3 \text{ Hz}, 2\text{H}, C_6H_5$ - $\underline{H}_{b},\underline{H}_{d}$), $\delta 7.87$ (d, $J = 7.1 \text{ Hz}, 2\text{H}, C_6H_5$ - $\underline{H}_{a},\underline{H}_e$), $\delta 8.53$ (s, 1H, $C_2N_3\underline{H}$) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO):_ δ 60.6 (Man- \underline{CH}_2 -OH), δ 67.6 (Man- $\underline{C2}$), δ 68.0 (Man- $\underline{C4}$), δ 71.3 (Man- $\underline{C3}$), δ 78.4 (Man- $\underline{C5}$), δ 85.8 (Man- $\underline{C1}$), δ 121.1 (triazol C1= $\underline{C2}$ -N-N=N), δ 125.2 (2 x C, Ar- $\underline{C2},\underline{C6}$), δ 128.0 (Ar- $\underline{C4}$), δ 128.9 (2 x C, Ar- $\underline{C3},\underline{C5}$), δ 130.5 (Ar- $\underline{C1}$), δ 146.3 (triazol $\underline{C1}$ =C2-N-N=N) ppm. IR (KBr) v [cm⁻¹] = 3325, 2925, 2107, 1455, 1425, 1239, 1122, 1091, 1064, 1023, 973, 920, 880, 836, 807, 792, 762, 690, 662, 559, 518. MS (ESI +): m/z = 306.1 ([MH])^-. HRMS (ESI +): m/z za $C_{14}H_{17}N_3O_5$ ([MH])^- izračunano 306.1090, izmerjeno 306.1093.

Spojina 5:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 2.10, 2.10, 2.12, 2.22 (4 x s, 12 H, *COCH₃*), δ 3.97 (s, 3H, *COCH₃*), δ 3.99 (ddd, *J*_{H5-H6b} = 2.6 Hz, *J*_{H5-H6a} = 5.5 Hz, *J*_{H4-H5} = 8.6 Hz, 1H, *H₃*), δ 4.11 (dd, *J*_{H5-H6b} = 2.7 Hz, *J*_{H6a-H6b} = 12.5 Hz, 1H, *H_{6a}*), δ 4.44 (dd, *J*_{H5-H6a} = 5.5 Hz, *J*_{H6a-H6b} = 12.5 Hz, 1H, *H_{6b}*), δ 5.41 (t, *J*_{H3-H4} = *J*_{H4-H5} = 8.8 Hz, 1H, *H₄*), δ 5.98 (dd, *J_{H2-H3}* = 3.7 Hz, *J_{H3-H4}* = 8.7 Hz, 1H, *H₃*), δ 6.03 (dd, *J_{H1-H2}* = 2.8 Hz, *J_{H2-H3}* = 3.7 Hz, 1H, *H₂*), δ 6.11 (d, *J_{H1-H2}* = 2.7 Hz, 1H, *H₁*), δ 7.97 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, *C₆H₅-<u>H_a,H_d</u>), δ 8.07 (s, 1H, <i>C₂N₃<u>H</u>*), δ 8.15 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, *C₆H₅-<u>H_b,H_c</u>) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ 20.3, 20.4, 20.5 (4 x O-CO-<u>C</u>H₃), δ 52.2 (CO-O-<u>C</u>H₃), δ 61.3 (Man-<u>C</u>H₂-OCOCH₃), δ 65.2 (Man-<u>C2</u>), δ 67.4 (Man-<u>C4</u>), δ 68.4 (Man-<u>C3</u>), δ 71.2 (Man-<u>C5</u>), δ 83.3 (Man-<u>C1</u>), δ 123.4 (triazol C1=<u>C2</u>-N-N=N), δ 125.5 (2 x C, Ar-<u>C2,C6</u>), δ 129.1 (Ar-<u>C4</u>), δ 129.9 (2 x C, Ar-<u>C3,C5</u>), δ 134.4 (Ar-<u>C1</u>), δ 145.8 (triazol <u>C1</u>=C2-N-N=N), δ 165.8 (<u>C</u>=O-O-CH₃), δ 169.3, 169.4, 170.0 (4 x O-<u>C</u>=O-CH₃) ppm. IR (KBr) v [cm⁻¹] = 1736, 1711, 1619, 1437, 1373, 1220, 1132, 1067, 1056, 1042, 1033, 1017, 957, 908, 855, 770, 688, 586.MS (ESI +): m/z = 534.2 ([MH])⁺._HRMS (ESI +): m/z za C₂₄H₂₇N₃O₁₁ ([MH])⁺ izračunano 534.1724, izmerjeno 534.1722.*

<u>Spojina 6:</u>

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 3.40 – 3.44 (m, 1H, H_5), δ 3.56 – 3.68 (m, 3H, H_{6a} , H_{6b} , *1x Man-OH*), δ 3.88 (s, 4H, H_4 , *COO-C<u>H_3</u>*), δ 4.48 (dd, $J_{2,3} = 4.9$ Hz, $J_{3,4} = 8.4$ Hz, 1H, H_3), δ 4.63 (t, $J_{2,1} = J_{2,3} = 5.8$ Hz, 1H, H_2), δ 5.06, 5.14, 5.36 (3 x d, J = 5,4 Hz, 3H, 3 x *Man-O<u>H</u>*), δ 5.97 (d, $J_{1,2} = 4,5$ Hz, 1H, H_1), δ 8.06 (s, 4H, $C_6\underline{H_4}$), δ 8.92 (s, 1H, $C_2N_3\underline{H}$) ppm. 13 C NMR (100 MHz, DMSO): δ 52.2 (CO-O-<u>C</u>H₃), δ 60.6 (Man-<u>C</u>H₂-OH), δ 67.7

(Man-<u>C2</u>), δ 68.0 (Man-<u>C4</u>), δ 71.3 (Man-<u>C3</u>), δ 78.5 (Man-<u>C5</u>), δ 85.9 (Man-<u>C1</u>), δ 122.4 (triazol C1=<u>C2</u>-N-N=N), δ 125.3 (2 x C, Ar-<u>C2,C6</u>), δ 128.7 (Ar-<u>C4</u>), δ 129.9 (2 x C, Ar-<u>C3,C5</u>), δ 135.0 (Ar-<u>C1</u>), δ 145.3 (triazol <u>C1</u>=C2-N-N=N), δ 165.9 (<u>C</u>=O-O-CH₃) ppm. IR (KBr) v [cm⁻¹] = 3246, 3091, 2936, 1714, 1611, 1435, 1272, 1237, 1112, 1101, 1071, 1036, 1019, 1010, 969, 857, 824, 795, 773, 711, 696, 676, 552, 529. MS (ESI +): m/z = 364.1 ([MH])⁻. HRMS (ESI +): m/z za C₁₆H₁₉N₃O₇ ([MH])⁻ izračunano 364.1145, izmerjeno 364.1146.

Spojina 7:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.40 – 3.44 (m, 1H, H_5), δ 3.56 – 3.69 (m, 3H, H_{6a} , H_{6b} , *Ix Man-OH*), δ 3.85 – 3.89 (m, 1H, H_4), δ 4.48 (dd, $J_{2,3}$ = 4.8 Hz, $J_{3,4}$ = 8.5 Hz, 1H, H_3), δ 4.63 (t, $J_{2,1} = J_{2,3} = 5.9$ Hz, 1H, H_2), δ 5.05, 5.13, 5.35 (3 x d, J = 5,4 Hz, 3H, *3 x Man-OH*), δ 5.97 (d, $J_{1,2} = 4,5$ Hz, 1H, H_1), δ 8.03 (s, 4H, C_6H_4), δ 8.89 (s, 1H, C_2N_3H), δ 13.01 (s, 1H, *COOH*) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ 60.6 (Man-<u>CH</u>₂-OH), δ 67.7 (Man-<u>C2</u>), δ 68.0 (Man-<u>C4</u>), δ 71.3 (Man-<u>C3</u>), δ 78.5 (Man-<u>C5</u>), δ 85.9 (Man-<u>C1</u>), δ 122.2 (triazol C1=<u>C2</u>-N-N=N), δ 125.2 (2 x C, Ar-<u>C2,C6</u>), δ 129.9 (Ar-<u>C4</u>), δ 130.0 (2 x C, Ar-<u>C3,C5</u>), δ 134.6 (Ar-<u>C1</u>), δ 145.4 (triazol <u>C1</u>=C2-N-N=N), δ 167.0 (<u>C</u>OOH) ppm. IR (KBr) v [cm⁻¹] = 3337, 1674, 1608, 1426, 1321, 1294, 1279, 1239, 1112, 1067, 1033, 1017, 973, 952, 925, 870, 851, 812, 795, 773, 715, 697, 677, 667, 551, 526, 512. MS (ESI +): m/z = 350.1 ([MH])⁻. HRMS (ESI +): m/z za C₁₅H₁₇N₃O₇ ([MH])⁻ izračunano 350.0988, izmerjeno 350.0987.

<u>Spojina 8:</u>

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.27 (t, J = 7.2 Hz, 3H, $COO-CH_2-C\underline{H}_3$), δ 1.79 – 1.84 (m, 4H, $Ar-O-CH_2-C\underline{H}_2-C\underline{H}_2$), δ 2.39 (t, J = 7.0, 2H, $C\underline{H}_2COO$), δ 3.95 (t, J = 5.9, $Ar-O-C\underline{H}_2-CH_2$), δ 4.15 (q, J = 7.2 Hz, 2H, $COOC\underline{H}_2CH_3$), δ 6.86 (dd, $J_{orto} = 8.4$ Hz, $J_{meta} = 2.4$ Hz, $J_{para} = 0.9$ Hz, 1H, H_c), δ 7.00 (t, $J_{orto} = 8.4$ Hz, 1H, H_b), δ 7.25 (dd, $J_{meta} = 2.5$ Hz, $J_{para} = 0.9$ Hz, 1H, H_d), δ 7.28 (dd, $J_{orto} = 7.2$ Hz, $J_{meta} = 1.6$ Hz, $J_{para} = 0.9$ Hz, 1H, H_d), δ 7.28 (dd, $J_{orto} = 7.2$ Hz, $J_{meta} = 1.6$ Hz, $J_{para} = 0.9$ Hz, 1H, H_d), δ 7.28 (dd, $J_{orto} = 7.2$ Hz, $J_{meta} = 1.6$ Hz, $J_{para} = 0.9$ Hz, 1H, H_a) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.3 (CO-CH₂- \underline{C} H₃), δ 21.6 (\underline{C} H₂-CH₂-COO), δ 28.6 (Ar-O-CH₂- \underline{C} H₂), δ 33.9 (\underline{C} H₂-COO), δ 60.4 (COO- \underline{C} H₂), δ 67.6 (Ar-O- \underline{C} H₂), δ 94.4 ($Ar-\underline{C1}$ -I), δ 114.2 ($Ar-\underline{C4}$), δ 123.6 ($Ar-\underline{C6}$), δ 129.7 ($Ar-\underline{C2}$), δ 130.8 ($Ar-\underline{C3}$), δ 159.5 ($Ar-\underline{C5}$), δ 173.4 (\underline{C} OO-CH₂-CH₃) ppm. IR (KBr) v [cm⁻¹] = 2936, 1728, 1583, 1566, 1465, 1417, 1389, 1373, 1284, 1240, 1224, 1159, 1112, 1093, 1082, 1030, 989, 963, 844,

765, 680. MS (ESI +): $m/z = 349.0 ([MH])^+$. HRMS (ESI +): m/z za $C_{13}H_{17}IO_3 ([MH])^+$ izračunano 349.0301, izmerjeno 349.0298.

Spojina 10:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.28 (t, J = 7.2 Hz, 3H, $COO-CH_2-CH_3$), δ 1.82 – 1.86 (m, 4H, $Ar-O-CH_2-CH_2CH_2$), δ 2.40 (t, J = 7.2, 2H, CH_2COO), δ 3.07 (s, 1H, $Ar-C\equiv CH$), δ 3.98 (t, J = 5.0, $Ar-O-CH_2-CH_2$), δ 4.15 (q, J = 7.2 Hz, 2H, $COOCH_2CH_3$), δ 6.91 (dd, $J_{orto} = 8.4$ Hz, $J_{meta} = 2.6$ Hz, $J_{para} = 1.0$ Hz, 1H, H_c), δ 7.02 (dd, $J_{meta} = 1.3$ Hz, 1H, H_d), δ 7.10 (dd, $J_{orto} = 7.6$ Hz, $J_{meta} = 1.5$ Hz, 1H, H_a), δ 7.23 (t, $J_{orto} = 7.1$ Hz, 1H, H_b) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.3 (CO-CH₂-CH₃), δ 21.6 (CH₂-CH₂-COO), δ 28.6 (Ar-O-CH₂-CH₂), δ 33.9 (CH₂-COO), δ 60.4 (COO-CH₂), δ 67.4 (Ar-O-CH₂), δ 76.9 (C=CH), δ 83.6 (C=CH), δ 115.9 (Ar-C4), δ 117.6 (Ar-C6), δ 123.0 (Ar-C1), δ 124.6 (Ar-C2), δ 129.4 (Ar-C3), δ 158.6 (Ar-C5), δ 173.4 (COO-CH₂-CH₃) ppm. IR (KBr) v [cm⁻¹] = 3282, 2945, 1722, 1593, 1574, 1460, 1422, 1373, 1311, 1280, 1249, 1150, 1123, 1090, 1033, 853, 780, 680. MS (ESI +): m/z = 269.2 ([MNa])⁺. HRMS (ESI +): m/z za C₁₅H₁₈O₃ ([MNa])⁺ izračunano 269.2093, izmerjeno 269.2100.

<u>Spojina 11:</u>

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.28 (t, J = 7.1 Hz, 3H, $COO-CH_2-CH_3$), δ 1.85 – 1.89 (m, 4H, Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂), δ 2.06, 2.09, 2.11, 2.22 (4 x s, 12 H, COCH₃), δ 2.42 (t, J = 7.1 Hz, 2H, CH_2 - CH_2 -COO), δ 3.95 (ddd, J_{H5-H6b} = 2.6 Hz, J_{H5-H6a} = 5.5 Hz, J_{H4-H5} = 8.7 Hz, 1H, H_5), $\delta 4.07$ (t, J = 6.1 Hz, 2H, $Ar-O-CH_2$), $\delta 4.10$ (dd, $J_{H5-H6b} = 2.6$ Hz, $J_{H6a-H6b} =$ 12.5 Hz, 1H, H_{6a}), δ 4.16 (q, J_q = 7.1 Hz, 2H, $COO-CH_2-CH_3$), δ 4.41 (dd, J_{H5-H6a} = 5.4 Hz, $J_{\text{H6a-H6b}} = 12.5$ Hz, 1H, H_{6b}), δ 5.41 (t, $J_{\text{H3-H4}} = J_{\text{H4-H5}} = 8.9$ Hz, 1H, H_4), δ 6.00 (dd, $J_{\text{H2-H3}} = 3.7 \text{ Hz}, J_{\text{H3-H4}} = 8.8 \text{ Hz}, 1\text{H}, H_3$, $\delta 6.03 \text{ (dd, } J_{\text{H1-H2}} = 2.7 \text{ Hz}, J_{\text{H2-H3}} = 3.7 \text{ Hz}, 1\text{H}$, H_2), δ 6.08 (d, $J_{\text{H1-H2}} = 2.6$ Hz, 1H, H_1), δ 6.92 (dd, $J_{\text{orto}} = 7.8$ Hz, $J_{\text{meta}} = 2.6$ Hz, $J_{\text{para}} =$ 1.0 Hz 1H, $C_6H_5-\underline{H}_c$), δ 7.36 (t, $J_{orto} = 7.5$ Hz, 1H, $C_6H_5-\underline{H}_b$), δ 7.40 (dd, $J_{orto} = 7.6$ Hz, $J_{\text{meta}} = 1.5 \text{ Hz}, 1\text{H}, C_6H_5-\underline{H}_a), \delta 7.47 \text{ (dd, } J_{\text{meta}} = 2.3 \text{ Hz}, 1\text{H}, C_6H_5-\underline{H}_a), \delta 7.97 \text{ (s, 1H, } I\text{H}, C_6H_5-\underline{H$ C_2N_3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.3 (COO-CH₂-<u>C</u>H₃), δ 20.6, 20.7, 20.8 (4) x O-CO-CH₃), δ 21.7 (Ar-O-CH₂-CH₂), δ 28.7 (Ar-O-CH₂-CH₂), δ 34.0 (CH₂-COO), δ 60.4 (COO-<u>C</u>H₂), δ 61.6 (Man-<u>C</u>H₂-O-CO-CH₃), δ 66.1 (Ar-O-<u>C</u>H₂), δ 67.5 (Man <u>C2</u>), δ 68.3 (Man <u>C4</u>), δ 68.8 (Man <u>C3</u>), δ 72.2 (Man <u>C5</u>), δ 83.6 (Man <u>C1</u>), δ 111.6 (Ar-C6), δ 115.2 (Ar-C4), δ 118.2 (Ar-C2), δ 119.9 (triazol C1=C2-N-N=N), δ 130.0 (Ar-C3), δ 131.0 (Ar-C1), δ 148.3 (triazol C1=C2-N-N=N), δ 159.5 (Ar-C5), δ 169.3, 169.7,

170.5 (4 x Man-O-<u>C</u>=O-CH₃), δ 173.5 (<u>C</u>=O-O-CH₂-CH₃) ppm. IR (KBr) v [cm⁻¹] = 2936, 1740, 1580, 1366, 1210, 1163, 1133, 1032, 985, 899, 768, 690, 599. MS (ESI +): m/z = 634.3 ([MH])⁺. HRMS (ESI +): m/z za C₂₉H₃₇N₃O₁₂ ([MH])⁺ izračunano 634.2612, izmerjeno 634.2626.

Spojina 12:

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 1.18 (t, J = 7.1 Hz, 3H, COO-CH₂-CH₃), δ 1.66 – 1.81 (m, 4H, $Ar-O-CH_2-CH_2-CH_2$), δ 2.39 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2-CH_2-COO), δ 3.40 – 3.44 (m, 1H, H_5), $\delta 3.55 - 3.63$ (m, 2H, H_4 , H_{6b}), $\delta 3.66$ (dd, $J_{H5-H6b} = 3.0$ Hz, $J_{H6a-H6b} = 12.0$ Hz, 1H, H_{6a}), δ 3.87 (dd, J = 3.4 Hz, 1H, H_3), δ 4.03, 4.06 (t + q, $J_t = 6.2$ Hz, $J_q = 7.2$ Hz, 4H, $Ar-O-CH_2$, $COO-CH_2-CH_3$), δ 4.46 (dd, $J_{H1-H2} = 1.2$ Hz, $J_{H2-H3} = 3.2$ Hz, 1H, H_2), δ 4.91 - 5.45 (s, 3H, 3 x Man-O<u>H</u>), δ 5.93 (d, $J_{\text{H1-H2}} = 4.6$ Hz, 1H, H_1), δ 6.91 (dd, $J_{\text{orto}} =$ 8.2 Hz, $J_{\text{meta}} = 2.5$ Hz, $J_{\text{para}} = 1.0$ Hz, 1H, C_6H_5 - H_c), δ 7.36 (t, $J_{\text{orto}} = 8.0$ Hz, 1H, C_6H_5 -<u> H_b </u>), δ 7.44 – 7.48 (m, 2H, C_6H_5 -<u> H_a </u>, C_6H_5 -<u> H_d </u>), δ 8.77 (s, 1H, C_2N_3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.1 (COO-CH₂-CH₃), δ 21.2 (Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂), δ 28.0 (Ar-O-CH₂-<u>CH</u>₂), δ 33.1 (<u>CH</u>₂-COO), δ 59.7 (COO-<u>C</u>H₂), δ 60.6 (Man-<u>C</u>H₂-OH), δ 67.0 (Ar-O-<u>C</u>H₂), δ 67.7 (Man <u>C2</u>), δ 68.0 (Man <u>C4</u>), δ 71.3 (Man <u>C3</u>), δ 78.4 (Man <u>C5</u>), δ 85.8 (Man <u>C1</u>), δ 111.0 (Ar-<u>C6</u>), δ 114.1 (Ar-<u>C4</u>), δ 117.4 (Ar-<u>C2</u>), δ 121.3 (triazol C1=<u>C2</u>-N-N=N), δ 130.0 (Ar-C3), δ 131.8 (Ar-C1), δ 146.2 (triazol C1=C2-N-N=N), δ 159.0 (Ar-C5), δ 172.8 (C=O-O-CH₂-CH₃) ppm. IR (KBr) v $[cm^{-1}] = 3375, 2925, 1726, 1593, 1456, 1422,$ 1347, 1237, 1181, 1116, 1070, 1041, 1027, 984, 966, 884, 849, 826, 796, 721, 691, 664, 601, 568, 544, 524, 501. MS (ESI +): m/z = 452.2 ([MH])⁺. HRMS (ESI +): m/z za $C_{21}H_{29}N_3O_8([MH])^+$ izračunano 452.2033, izmerjeno 452.2020.

Spojina 13:

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 1.54 – 1.59 (m, 2H, *Ar-O-CH₂-C<u>H₂</u>), δ 1.69 – 1.83 (m, 2H, <i>Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂*, δ 1.96 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, *CH₂-C<u>H₂</u>-COO), δ 3.43 – 3.46 (m, 1H, <i>H₅*), δ 3.55 – 3.67 (m, 3H, *H₄*, *H_{6a}*, *H_{6b}*), δ 3.96 (dd, *J* = 3.2 Hz, 1H, *H₃*), δ 4.07 (t, *J_t* = 6.7 Hz, 2H, *Ar-O-C<u>H₂</u>*), δ 4.37 – 4.32 (m, 1H, *H₂*), δ 4.82, 5.43, 6.03 (3 x s, 3H, *3 x Man-O<u>H</u>*), δ 5.93 (d, *J*_{H1-H2} = 4.7 Hz, 1H, *H₁*), δ 6.84 (dd, *J_{orto}* = 8.3 Hz, *J_{meta}* = 2.6 Hz, *J_{para}* = 1.0 Hz, 1H, *C₆H₅-<u>H_c</u>), δ 7.32 (t, <i>J_t* = 7.9 Hz, 1H, *C₆H₅-<u>H_b</u>), δ 7.49 – 7.54 (m, 2H, <i>C₆H₅-<u>H_a</u>, <i>C₆H₅-<u>H_a</u>), δ 9.28 (s, 1H, <i>C₂N₃<u>H</u>*) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ 22.7 (<u>CH₂-CH₂-COONa</u>), δ 28.6 (Ar-O-CH₂-<u>CH₂</u>), δ 37.6 (<u>CH₂-COONa</u>), δ 60.7 (Man-<u>CH₂-OH</u>), δ 67.6 (Ar-O-<u>CH₂</u>), δ 67.8 (Man <u>C2</u>), δ 68.0 (Man <u>C4</u>), δ 71.2 (Man <u>C3</u>), δ 78.5

(Man <u>C5</u>), δ 85.9 (Man <u>C1</u>), δ 110.9 (Ar-<u>C6</u>), δ 114.4 (Ar-<u>C4</u>), δ 117.1 (Ar-<u>C2</u>), δ 121.3 (triazol C1=<u>C2</u>-N-N=N), δ 130.0 (Ar-<u>C3</u>), δ 131.9 (Ar-<u>C1</u>), δ 146.2 (triazol <u>C1</u>=C2-N-N=N), δ 159.1 (Ar-<u>C5</u>), δ 177.1 (<u>C</u>=O-ONa) ppm. IR (KBr) v [cm⁻¹] = 2943, 2864, 1555, 1487, 1386, 1344, 1292, 1246, 1164, 1112, 1067, 1036, 977, 892, 881, 860, 803, 773, 750, 686, 661, 648. MS (ESI +): m/z = 446.2 ([MH])⁺. HRMS (ESI +): m/z za C₁₉H₂₄N₃NaO₈ ([MH])⁺ izračunano 446.1539, izmerjeno 446.1534.

Spojina 14:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.27 (t, J = 7.2 Hz, 3H, $COO-CH_2-C\underline{H}_3$), δ 1.47 – 1.55 (m, 2H, $Ar-O-CH_2-CH_2-CH_2$), δ 1.67 – 1.75 (m, 2H, $Ar-O-CH_2-C\underline{H}_2$), δ 1.77 – 1.84 (m, 2H, $C\underline{H}_2CH_2COO$), δ 2.35 (t, J = 7.4, 2H, $C\underline{H}_2COO$), δ 3.93 (t, J = 6.4, $Ar-O-C\underline{H}_2-CH_2$), δ 4.15 (q, J = 7.1 Hz, 2H, $COOC\underline{H}_2CH_3$), δ 6.86 (dd, $J_{orto} = 8.4$ Hz, $J_{meta} = 2.4$ Hz, $J_{para} = 0.9$ Hz, 1H, H_c), δ 6.99 (t, $J_{orto} = 8.2$ Hz, 1H, H_b), δ 7.25 (dd, $J_{meta} = 1.6$ Hz, 1H, H_d), δ 7.28 (dd, $J_{orto} = 7.6$ Hz, $J_{meta} = 1.6$ Hz, $J_{para} = 0.9$ Hz, 1H, H_a) ppm. MS (ESI) : [M + MeOH]⁺ = 417.01

Spojina 16:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.28 (t, J = 7.2 Hz, 3H, $COO-CH_2-C\underline{H}_3$), δ 1.48 – 1.56 (m, 2H, $Ar-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2$), δ 1.69 – 1.76 (m, 2H, $Ar-O-CH_2-C\underline{H}_2$), δ 1.79 – 1.86 (m, 2H, $C\underline{H}_2CH_2COO$), δ 2.36 (t, J = 7.5, 2H, $C\underline{H}_2COO$), δ 3.07 (s, 1H, $Ar-C\equiv C\underline{H}$), δ 3.97 (t, J = 6.4, $Ar-O-C\underline{H}_2-CH_2$), δ 4.15 (q, J = 7.1 Hz, 2H, $COOC\underline{H}_2CH_3$), δ 6.91 (dd, $J_{orto} = 8.4$ Hz, $J_{meta} = 2.6$ Hz, $J_{para} = 1.0$ Hz, 1H, H_c), δ 7.02 (dd, $J_{meta} = 1.4$ Hz, 1H, H_d), δ 7.11 – 7.08 (dd, $J_{orto} = 7.6$ Hz, $J_{meta} = 1.3$ Hz, 1H, H_a), δ 7.23 (t, $J_{orto} = 7.8$ Hz, 1H, H_b) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.3 (CO-CH₂- CH_3), δ 24.7 (\underline{CH}_2 -CH₂-COO), δ 25.6 (\underline{CH}_2 -CH₂-CH₂), δ 76.9 ($C\equiv CH$), δ 83.6 ($\underline{C}\equiv CH$), δ 115.9 ($Ar-\underline{C4}$), δ 117.6 ($Ar-\underline{C6}$), δ 123.0 ($Ar-\underline{C1}$), δ 124.5 ($Ar-\underline{C2}$), δ 129.4 ($Ar-\underline{C3}$), δ 158.7 ($Ar-\underline{C5}$), δ 173.6 ($\underline{COO-CH}_2-CH_3$) ppm. IR (KBr) v [cm⁻¹] = 3288, 2940, 1728, 1593, 1574, 1473, 1424, 1373, 1318, 1280, 1255, 1154, 1144, 1093, 1069, 1031, 853, 784, 686, 651. MS (ESI +): m/z = 261.2 ([MH])⁺. HRMS (ESI +): m/z za C₁₆H₂₀O₃ ([MH])⁺ izračunano 261.1491, izmerjeno 261.1497.

Spojina 17:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.28 (t, J = 7.1 Hz, 3H, $COO-CH_2-CH_3$), δ 1.53 – 1.59 (m, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂), δ 1.70 – 1.78 (m, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂), δ 1.82 – 1.89 (m, 2H, CH_2CH_2COO), δ 2.07, 2.09, 2.11, 2.22 (4 x s, 12 H, $COCH_3$), δ 2.37 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH_2 - CH_2 -COO), δ 3.96 (ddd, J_{H5-H6b} = 2.6 Hz, J_{H5-H6a} = 5.5 Hz, J_{H4-H5} = 8.5 Hz, 1H, H_5), $\delta 4.06$ (t, J = 6.5 Hz, 2H, $Ar-O-CH_2$), $\delta 4.10$ (dd, $J_{H5-H6b} = 2.6$ Hz, $J_{H6a-H6b} = 12.5$ Hz, 1H, H_{6a}), δ 4.15 (q, J_q = 7.1 Hz, 2H, $COO-CH_2-CH_3$), δ 4.41 (dd, J_{H5-H6a} = 5.5 Hz, $J_{H6a-H6b}$ = 12.5 Hz, 1H, H_{6b}), δ 5.41 (t, $J_{H3-H4} = J_{H4-H5} = 8.8$ Hz, 1H, H_4), δ 6.00 (dd, $J_{H2-H3} = 3.7$ Hz, $J_{\text{H3-H4}} = 8.8$ Hz, 1H, H_3), $\delta 6.03$ (dd, $J_{\text{H1-H2}} = 2.7$ Hz, $J_{\text{H2-H3}} = 3.7$ Hz, 1H, H_2), $\delta 6.08$ (d, $J_{\text{H1-H2}} = 2.6 \text{ Hz}$, 1H, H_1), $\delta 6.92$ (dd, $J_{\text{orto}} = 7.8 \text{ Hz}$, $J_{\text{meta}} = 2.5 \text{ Hz}$, $J_{\text{para}} = 1.0 \text{ Hz}$, 1H, $C_6H_5-\underline{H}_c$), δ 7.36 (t, $J_{\text{orto}} = 7.5$ Hz, 1H, $C_6H_5-\underline{H}_b$), δ 7.40 (dd, $J_{\text{orto}} = 7.6$ Hz, $J_{\text{meta}} = 1.5$ Hz, 1H, C_6H_5 - H_a), δ 7.47 (dd, $J_{\text{meta}} = 1.6$ Hz, 1H, C_6H_5 - H_d), δ 7.96 (s, 1H, C_2N_3H) ppm. 13 C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.3 (COO-CH₂-CH₃), δ 20.6, 20.7, 20.8 (4 x O-CO-CH₃), δ 24.7 (<u>CH₂-CH₂-COO</u>), δ 25.7 (Ar-O-CH₂-CH₂), δ 29.0 (Ar-O-CH₂-<u>C</u>H₂), δ 34.3 (CH₂-COO), δ 60.3 (COO-CH₂), δ 61.6 (Man-CH₂-O-CO-CH₃), δ 66.1 (Ar-O-CH₂), δ 67.8 (Man C2), δ 68.3 (Man C4), δ 68.8 (Man C3), δ 72.2 (Man C5), δ 83.6 (Man C1), δ 111.6 (Ar-<u>C6</u>), δ 115.2 (Ar-<u>C4</u>), δ 118.1 (Ar-<u>C2</u>), δ 119.9 (triazol C1=<u>C2</u>-N-N=N), δ 130.0 (Ar-<u>C3</u>), δ 131.0 (Ar-<u>C1</u>), δ 148.3 (triazol <u>C1</u>=C2-N-N=N), δ 159.5 (Ar-<u>C5</u>), δ 169.3, 169.7, 170.5 (4 x Man-O-<u>C</u>=O-CH₃), δ 173.7 (<u>C</u>=O-O-CH₂-CH₃) ppm. IR (KBr) v $[cm^{-1}] = 2936, 1743, 1581, 1368, 1213, 115, 9, 1129, 1032, 985, 904, 784, 691, 597.$ MS $(\text{ESI} +): \text{m/z} = 634.3 ([\text{MH}])^+$. HRMS $(\text{ESI} +): \text{m/z} \text{ za } C_{30}H_{39}N_3O_{12} ([\text{MH}])^+ \text{ izračunano}$ 634.2612, izmerjeno 634.2623.

Spojina 18:

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 1.18 (t, J = 7.1 Hz, 3H, $COO-CH_2-C\underline{H}_3$), δ 1.41 – 1.49 (m, 2H, $Ar-O-CH_2-CH_2-C\underline{H}_2$), δ 1.61 (p, J = 7.6 Hz, 2H, $Ar-O-CH_2-C\underline{H}_2$), δ 1.75 (p, J = 7.1 Hz, 2H, $C\underline{H}_2CH_2COO$), δ 2.33 (t, J = 7.3 Hz, 2H, $CH_2-C\underline{H}_2-COO$), δ 3.39 – 3.45 (m, 1H, H_5), δ 3.57 – 3.63 (m, 2H, H_4 , H_{6b}), δ 3.66 (dd, $J_{H5-H6b} = 3.0$ Hz, $J_{H6a-H6b} = 11.9$ Hz, 1H, H_{6a}), δ 3.87 (dd, J = 3.3 Hz, 1H, H_3), δ 4.02, 4.06 (t + q, $J_t = 6.3$ Hz, $J_q = 7.1$ Hz, 4H, $Ar-O-C\underline{H}_2,COO-C\underline{H}_2-CH_3$), δ 4.46 (dd, $J_{H1-H2} = 1.4$ Hz, $J_{H2-H3} = 3.4$ Hz, 1H, H_2), δ 4.95 – 5.40 (s, 3H, $3 \times Man-O\underline{H}$), δ 5.93 (d, $J_{H1-H2} = 4.4$ Hz, 1H, H_1), δ 6.91 (dd, $J_{orto} = 8.3$ Hz, $J_{meta} = 2.6$ Hz, $J_{para} = 1.0$ Hz, 1H, $C_6H_5-\underline{H}_c$), δ 7.36 (t, $J_{orto} = 8.0$ Hz, 1H, $C_6H_5-\underline{H}_b$), δ 7.44 – 7.48 (m, 2H, $C_6H_5-\underline{H}_a$, $C_6H_5-\underline{H}_d$), δ 8.77 (s, 1H, $C_2N_3\underline{H}$) ppm. ¹³C NMR (100 MHz,

DMSO): δ 14.1 (COO-CH₂-<u>C</u>H₃), δ 24.2 (<u>C</u>H₂-CH₂-COO), δ 25.1 (<u>C</u>H₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO), δ 28.4 (Ar-O-CH₂-<u>C</u>H₂), δ 33.4 (<u>C</u>H₂-COO), δ 59.7 (COO-<u>C</u>H₂), δ 60.6 (Man-<u>C</u>H₂-OH), δ 67.3 (Ar-O-<u>C</u>H₂), δ 67.7 (Man <u>C2</u>), δ 68.0 (Man <u>C4</u>), δ 71.3 (Man <u>C3</u>), δ 78.4 (Man <u>C5</u>), δ 85.8 (Man <u>C1</u>), δ 111.0 (Ar-<u>C6</u>), δ 114.1 (Ar-<u>C4</u>), δ 117.4 (Ar-<u>C2</u>), δ 121.3 (triazol C1=<u>C2</u>-N-N=N), δ 130.0 (Ar-<u>C3</u>), δ 131.8 (Ar-<u>C1</u>), δ 146.2 (triazol <u>C1</u>=C2-N-N=N), δ 159.1 (Ar-<u>C5</u>), δ 172.8 (<u>C</u>=O-O-CH₂-CH₃) ppm. IR (KBr) v [cm⁻¹] = 3371, 2932, 1731, 1600, 1577, 1471, 1445, 1370, 1235, 1161, 1120, 1066, 1030, 975, 913, 875, 818, 781, 733, 719, 689, 632, 578, 562, 544, 524, 506. MS (ESI +): m/z = 466.2 ([MH])⁺. HRMS (ESI +): m/z za C₂₂H₃₁N₃O₈ ([MH])⁺ izračunano 466.2189, izmerjeno 466.2177.

Spojina 19:

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 1.37 – 1.44 (m, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂), δ 1.51 (p, J = 7.4 Hz, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂), δ 1.67 - 1.75 (m, 2H, CH₂CH₂COO), δ 1.90 (t, J = 7.1 Hz, 2H, CH_2 - CH_2 -COO) δ 3.41 – 3.46 (m, 1H, H_5), δ 3.56 – 3.62 (m, 2H, H_4 , H_{6b}), δ 3.65 (dd, $J_{\text{H5-H6b}} = 3.0 \text{ Hz}, J_{\text{H6a-H6b}} = 12.0 \text{ Hz}, 1\text{H}, H_{6a}, \delta 3.89 \text{ (dd}, J = 3.2 \text{ Hz}, 1\text{H}, H_3), \delta 4.03 \text{ (t, } J_{\text{t}}$ = 6.7 Hz, 2H, Ar-O-CH₂), δ 4.48 (dd, $J_{\text{H1-H2}}$ = 1.4 Hz, $J_{\text{H2-H3}}$ = 3.2 Hz, 1H, H_2), δ 4.82, 5.48 (2 x s, 2H, 2 x Man-O<u>H</u>), δ 5.94 (d, $J_{\text{H1-H2}}$ = 4.7 Hz, 3H, H_1 , 2 x Man-O<u>H</u>), δ 6.89 (dd, $J_{\text{orto}} = 8.3 \text{ Hz}$, $J_{\text{meta}} = 2.6 \text{ Hz}$, $J_{\text{para}} = 1.0 \text{ Hz}$, 1H, C_6H_5 - \underline{H}_c), δ 7.36 (t, $J_{\text{orto}} = 8.0 \text{ Hz}$, 1H, $C_6H_5-\underline{H}_b$), δ 7.43 – 7.50 (m, 2H, $C_6H_5-\underline{H}_a$, $C_6H_5-\underline{H}_d$), δ 8.88 (s, 1H, $C_2N_3\underline{H}$) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ 25.1 (<u>CH</u>₂-CH₂-COO), δ 25.6 (<u>C</u>H₂-CH₂-CH₂-COO), δ 28.2 (Ar-O-CH₂-<u>CH₂</u>), δ 37.5 (<u>C</u>H₂-COO), δ 60.4 (Man-<u>C</u>H₂-OH), δ 66.4 (Ar-O-<u>C</u>H₂), δ 68.3 (Man C2), δ 68.4 (Man C4), δ 70.4 (Man C3), δ 76.0 (Man C5), δ 86.8 (Man C1), δ 111.4 (Ar-C6), δ 115.0 (Ar-C4), δ 118.3 (Ar-C2), δ 121.6 (triazol C1=C2-N-N=N), δ 130.3 (Ar-C3), δ 130.4 (Ar-C1), δ 147.3 (triazol C1=C2-N-N=N), δ 158.5 (Ar-C5), δ 183.8 (C=O-O-Na) ppm. IR (KBr) v $[cm^{-1}] = 3227, 2936, 1556, 1490, 1445, 1406, 1376, 1346, 1245, 14066, 1406, 1406, 1406, 1406, 1406, 1406, 1406,$ 1159, 1103, 1085, 1070, 1046, 1027, 973, 891, 799, 776, 686, 616. MS (ESI +): m/z = 460.2 ([MH])⁺. HRMS (ESI +): m/z za $C_{20}H_{26}N_3NaO_8$ ([MH])⁺ izračunano 460.1696, izmerjeno 460.1695.

Spojina 20:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.27 (t, J = 7.3 Hz, 3H, $COO-CH_2-C\underline{H}_3$), δ 1.36 – 1.52 (m, 4H, $Ar-O-CH_2-C\underline{H}_2-C\underline{H}_2-C\underline{H}_2$), δ 1.64 – 1.72 (m, 2H, $Ar-O-CH_2-C\underline{H}_2$), δ 1.75 – 1.82 (m, 2H, $C\underline{H}_2CH_2COO$), δ 2.33 (t, J = 7.3, 2H, $C\underline{H}_2COO$), δ 3.92 (t, J = 6.6, $Ar-O-C\underline{H}_2-C\underline{H}_2$), δ 4.14 (q, J = 7.2 Hz, 2H, $COOC\underline{H}_2CH_3$), δ 6.86 (dd, $J_{orto} = 8.4$ Hz, $J_{meta} = 2.5$ Hz,

 $J_{\text{para}} = 0.9 \text{ Hz}, 1\text{H}, H_c$), $\delta 6.99$ (t, $J_{\text{orto}} = 8.1 \text{ Hz}, 1\text{H}, H_b$), $\delta 7.25$ (dd, $J_{\text{meta}} = 1.5 \text{ Hz}, 1\text{H}, H_d$), $\delta 7.27$ (dd, $J_{\text{orto}} = 8.3 \text{ Hz}, J_{\text{meta}} = 1.5 \text{ Hz}, J_{\text{para}} = 0.9 \text{ Hz}, 1\text{H}, H_a$) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta 14.3$ (CO-CH₂-<u>C</u>H₃), $\delta 24.9$ (<u>C</u>H₂-CH₂-COO), $\delta 25.7$ (Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂), $\delta 28.8$ (<u>C</u>H₂-CH₂-CH₂-COO), $\delta 29.0$ (Ar-O-CH₂-<u>C</u>H₂), $\delta 34.3$ (<u>C</u>H₂-COO), $\delta 60.3$ (COO-<u>C</u>H₂), $\delta 68.0$ (Ar-O-<u>C</u>H₂), $\delta 94.4$ (*Ar*-<u>C1</u>-I), $\delta 114.2$ (*Ar*-<u>C4</u>), $\delta 123.6$ (*Ar*-<u>C6</u>), $\delta 129.6$ (*Ar*-<u>C2</u>), $\delta 130.7$ (*Ar*-<u>C3</u>), $\delta 159.7$ (*Ar*-<u>C5</u>), $\delta 173.8$ (<u>COOCH₂CH₃) ppm. IR (KBr)</u> ν [cm⁻¹] = 2932, 2855, 1583, 1566, 1465, 1375, 1284, 1240, 1225, 1158, 1095, 1059, 1028, 989, 847, 766, 860. MS (ESI +): m/z = 377.1 ([MH])⁺. HRMS (ESI +): m/z za C₁₅H₂₁IO₃ ([MH])⁺ izračunano 377.0614, izmerjeno 377.0609.

Spojina 22:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.28 (t, J = 7.1 Hz, 3H, $COO-CH_2-C\underline{H}_3$), δ 1.37 – 1.54 (m, 4H, $Ar-O-CH_2-CH_2-C\underline{H}_2-C\underline{H}_2$), δ 1.64 – 1.72 (m, 2H, $Ar-O-CH_2-C\underline{H}_2$), δ 1.77 – 1.84 (m, 2H, $C\underline{H}_2CH_2COO$), δ 2.33 (t, J = 7.4, 2H, $C\underline{H}_2COO$), δ 3.07 (s, 1H, $Ar-C\equiv C\underline{H}$), δ 3.96 (t, J = 6.5, $Ar-O-C\underline{H}_2-CH_2$), δ 4.15 (q, J = 7.2 Hz, 2H, $COOC\underline{H}_2CH_3$), δ 6.91 (dd, $J_{orto} = 8.4$ Hz, $J_{meta} = 2.6$ Hz, $J_{para} = 1.0$ Hz, 1H, H_c), δ 7.03 (dd, $J_{meta} = 1.4$ Hz, 1H, H_d), δ 7.09 (dd, $J_{orto} = 7.6$ Hz, $J_{meta} = 1.5$ Hz, 1H, H_a), δ 7.23 (t, $J_{orto} = 8.0$ Hz, 1H, H_b) ppm.

<u>Spojina 23:</u>

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.28 (t, J = 7.1 Hz, 3H, *COO-CH*₂-*CH*₃), δ 1.39 – 1.47 (m, 2H, *Ar-O-CH*₂- *CH*₂-*CH*₂), δ 1.49 – 1.57 (m, 2H, *CH*₂-*CH*₂-*COO*), δ 1.66 – 1.73 (m, 2H, *Ar-O-CH*₂-*CH*₂), δ 1.81 – 1.88 (m, 2H, *CH*₂*CH*₂*COO*), δ 2.07, 2.09, 2.12, 2.22 (4 x s, 12 H, *COCH*₃), δ 2.34 (t, J = 7.6 Hz, 2H, *CH*₂-*CH*₂-*COO*), δ 3.96 (ddd, *J*_{H5-H6b} = 2.5 Hz, *J*_{H5-H6a} = 5.5 Hz, *J*_{H4-H5} = 8.5 Hz, 1H, *H*₅), δ 4.08 (dd, *J*_{H5-H6b} = 2.7 Hz, *J*_{H6a-H6b} = 12.2 Hz, 1H, *H*_{6a}), δ 4.13, 4.15 (q + t, *J*_q = 7.1 Hz, *J*_t = 6.0 Hz, 4H, *COO-CH*₂-*CH*₃, *Ar-O-CH*₂), δ 4.41 (dd, *J*_{H5-H6a} = 5.5 Hz, *J*_{H6a-H6b} = 12.6 Hz, 1H, *H*_{6b}), δ 5.41 (t, *J*_{H3-H4} = *J*_{H4-H5} = 8.8 Hz, 1H, *H*₄), δ 6.00 (dd, *J*_{H2-H3} = 3.8 Hz, *J*_{H3-H4} = 8.7 Hz, 1H, *H*₃), δ 6.04 (dd, *J*_{H1-H2} = 2.7 Hz, *J*_{He2-H3} = 3.8 Hz, 1H, *H*₂), δ 6.09 (d, *J*_{H1-H2} = 2.7 Hz, 1H, *H*₁), δ 6.93 (dd, *J*_{orto} = 7.8 Hz, *J*_{meta} = 2.6 Hz, *J*_{para} = 1.0 Hz, 1H, *C*₆*H*₅-*H*₂), δ 7.36, 7.41 (t + dd, *J*_t = 7.6 Hz, *J*_{dd - orto} = 7.6 Hz, *J*_{dd - meta} = 1.5 Hz, 2H, *C*₆*H*₅-*H*₂, δ 7.48 (dd, *J*_{meta} = 1.5 Hz, 1H, *C*₆*H*₅-*H*_d), δ 7.96 (s, 1H, *C*₂*N*₃*H*) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.3 (CO-O-CH₂-*C*H₂), δ 28.9 (*C*H₂-CH₂-CH₂-COO), δ 29.1 (Ar-O-CH₂-*C*H₂), δ 34.3 (*C*H₂-COO), δ 60.2 (COO-*C*H₂), δ 61.6 (Man-*C*H₂-O-CO-CH₃), δ 66.1 (Ar-O-*C*H₂), δ 67.9 (Man <u>C2</u>), δ 68.3 (Man

<u>C4</u>), δ 68.8 (Man <u>C3</u>), δ 72.2 (Man <u>C5</u>), δ 83.6 (Man <u>C1</u>), δ 111.6 (Ar-<u>C6</u>), δ 115.3 (Ar-<u>C4</u>), δ 118.1 (Ar-<u>C2</u>), δ 119.9 (triazol C1=<u>C2</u>-N-N=N), δ 130.0 (Ar-<u>C3</u>), δ 131.0 (Ar-<u>C1</u>), δ 148.3 (triazol <u>C1</u>=C2-N-N=N), δ 159.6 (Ar-<u>C5</u>), δ 169.3, 169.7, 170.5 (4 x Man-O-<u>C</u>=O-CH₃), δ 173.8 (<u>C</u>=O-O-CH₂-CH₃) ppm. IR (KBr) v [cm⁻¹] = 2940, 2868, 1743, 1732, 1615, 1581, 1426, 1370, 1231, 1210, 1164, 1120, 1064, 1050, 1031, 982, 913, 867, 780, 770, 689, 605. MS (ESI +): m/z = 648.3 ([MH])⁺. HRMS (ESI +): m/z za C₃₁H₄₁N₃O₁₂ ([MH])⁺ izračunano 648.2768, izmerjeno 648.2786.

Spojina 24:

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3H, $COO-CH_2-CH_3$), δ 1.33 – 1.38 (m, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂), δ 1.40 – 1.48 (m, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), δ 1.56 (p, J = 7.3 Hz, 2H, $Ar-O-CH_2-CH_2$), $\delta 1.74$ (p, J = 6.7 Hz, 2H, CH_2CH_2COO), $\delta 2.30$ (t, J =7.3 Hz, 2H, CH_2 - CH_2 -COO), δ 3.39 – 3.44 (m, 1H, H_5), δ 3.57 – 3.63 (m, 2H, H_4 , H_{6b}), δ 3.66 (dd, $J_{\text{H5-H6b}} = 3.0$ Hz, $J_{\text{H6a-H6b}} = 11.8$ Hz, 1H, H_{6a}), $\delta 3.87$ (dd, J = 3.3 Hz, 1H, H_3), δ 4.02, 4.05 (t + q, $J_t = 6.0$ Hz, $J_q = 7.0$ Hz, 4H, $Ar-O-CH_2$, $COO-CH_2-CH_3$), δ 4.47 (dd, J_{H1-} $_{H2} = 1.3 \text{ Hz}, J_{H2-H3} = 3.3 \text{ Hz}, 1\text{H}, H_2), \delta 4.71 - 5.53 \text{ (s, 3H, } 3 \times Man-OH), \delta 5.93 \text{ (d, } J_{H1-H2})$ = 4.6 Hz, 1H, H_1), δ 6.91 (dd, J_{orto} = 8.3 Hz, J_{meta} = 2.5 Hz, J_{para} = 1.0 Hz, 1H, C_6H_5 - \underline{H}_c), δ 7.36 (t, $J_{\text{orto}} = 8.0 \text{ Hz}$, 1H, $C_6H_5-\underline{H}_b$), δ 7.44 – 7.48 (m, 2H, $C_6H_5-\underline{H}_a$, $C_6H_5-\underline{H}_d$), δ 8.77 (s, 1H, *C*₂*N*₃*H*) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ 14.1 (COO-CH₂-<u>C</u>H₃), δ 24.4 (<u>C</u>H₂-CH₂-COO), δ 25.2 (Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂), δ 28.2 (Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂), δ 28.5 (Ar-O-CH₂-<u>CH₂</u>), δ 33.4 (<u>CH₂-COO</u>), δ 59.6 (COO-<u>CH₂</u>), δ 60.6 (Man-<u>CH₂-OH</u>), δ 67.3 (Ar-O-<u>C</u>H₂), δ 67.7 (Man <u>C2</u>), δ 68.0 (Man <u>C4</u>), δ 71.3 (Man <u>C3</u>), δ 78.4 (Man <u>C5</u>), δ 85.8 (Man <u>C1</u>), δ 111.0 (Ar-<u>C6</u>), δ 114.1 (Ar-<u>C4</u>), δ 117.4 (Ar-<u>C2</u>), δ 121.3 (triazol C1=<u>C2</u>-N-N=N), δ 130.0 (Ar-C3), δ 131.8 (Ar-C1), δ 146.2 (triazol C1=C2-N-N=N), δ 159.1 (Ar-C5), δ 172.9 (C=O-O-CH₂-CH₃) ppm. IR (KBr) v [cm⁻¹] = 3371, 2940, 2872, 1726, 1611, 1582, 1471, 1375, 1356, 1293, 1278, 1248, 1226, 1161, 1106, 1066, 1024, 979, 881, 858, 800, 782, 734, 718, 691, 675, 555. MS (ESI +): m/z = 480.2 ([MH])⁺. HRMS (ESI +): m/z za $C_{23}H_{33}N_3O_8([MH])^+$ izračunano 480.2346, izmerjeno 480.2343.

Spojina 25:

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 1.18 – 1.26 (m, 4H, *Ar-O-CH*₂-*CH*₂-*CH*₂), δ 1.28 – 1.36 (m, 2H, *Ar-O-CH*₂-*CH*₂-*CH*₂-*CH*₂), δ 1.45 (p, *J* = 7.4 Hz, 2H, *Ar-O-CH*₂-*CH*₂), δ 1.63 (p, *J* = 6.9 Hz, 2H, *CH*₂*CH*₂*COO*), δ 2.06 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, *CH*₂-*COO*), δ 3.25 (ddd, *J*_{H5-H6b} = 2.6 Hz, *J*_{H5-H6a} = 5.6 Hz, *J*_{H4-H5} = 8.9 Hz, 1H, *H*₅), δ 3.67 – 3.73 (m, 2H, *H*₄,

*H*_{6b}), δ 3.75 (dd, *J*_{H5-H6b} = 2.6 Hz, *J*_{H6a-H6b} = 9.4 Hz, 1H, *H*_{6a}), δ 3.92 (t, *J*_t = 6.6 Hz, 2H, *Ar-O-C<u>H</u>₂)*, δ 4.07 (dd, *J*_{2,3} = 3.6 Hz, *J*_{3,4} = 8.9 Hz, 1H, *H*₃), δ 4.71 – 4.73 (m, 1H, *H*₂), δ 6.00 (d, *J*_{H1-H2} = 2.3 Hz, 1H, *H*₁), δ 6.84 – 6.87 (m, 1H, *C*₆*H*₅-<u>*H*_c), δ 7.17 – 7.18 (m, 1H, *C*₆*H*₅-<u>*H*_b), δ 7.25 – 7.31 (m, 2H,*C*₆*H*₅-<u>*H*_a), *C*₆*H*₅-<u>*H*_d), δ 8.29 (s, 1H, *C*₂*N*₃<u>*H*) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ 24.9 (CH₂-CH₂-COONa), δ 25.8 (Ar-O-CH₂-CH₂-<u>C</u>H₂), δ 28.2 (Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂-<u>C</u>H₂), δ 28.4 (Ar-O-CH₂-<u>C</u>H₂), δ 37.5 (CH₂-COONa), δ 60.4 (Man-<u>C</u>H₂-OH), δ 66.4 (Ar-O-<u>C</u>H₂), δ 68.3 (Man <u>C2</u>), δ 68.6 (Man <u>C4</u>), δ 70.4 (Man <u>C3</u>), δ 76.0 (Man <u>C5</u>), δ 86.8 (Man <u>C1</u>), δ 111.7 (Ar-<u>C6</u>), δ 115.2 (Ar-<u>C4</u>), δ 118.4 (Ar-<u>C2</u>), δ 121.7 (triazol C1=<u>C2</u>-N-N=N), δ 130.4 (Ar-<u>C3</u>, Ar-<u>C1</u>), δ 147.4 (triazol <u>C1</u>=C2-N-N=N), δ 158.6 (Ar-<u>C5</u>), δ 184.1 (<u>C</u>=O-ONa) ppm. IR (KBr) ν [cm⁻¹] = 1649, 1440, 1392, 1058, 1008, 901, 862, 836, 700, 589. MS (ESI +): m/z = 474.2 ([MH])⁺. HRMS (ESI +): m/z za C₂₁H₂₈N₃NaO₈ ([MH])⁺ izračunano 474.1852, izmerjeno 474.1845.</u></u></u></u></u>

<u>Spojina 26:</u>

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.28 (t, J = 7.1 Hz, 3H, $COO-CH_2-CH_3$), δ 1.34 – 1.50 (m, 6H, $Ar-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2$), δ 1.62 – 1.69 (m, 2H, $Ar-O-CH_2-CH_2$) δ 1.74 – 1.81 (m, 2H, CH_2CH_2COO), δ 2.32 (t, J = 7.5, 2H, CH_2COO), δ 3.93 (t, J = 6.5, $Ar-O-CH_2-CH_2$), δ 4.15 (q, J = 7.1 Hz, 2H, $COOCH_2CH_3$), δ 6.87 (dd, $J_{orto} = 8.4$ Hz, $J_{meta} = 2.5$ Hz, $J_{para} = 0.9$ Hz, 1H, H_c), δ 7.00 (t, $J_{orto} = 7.7$ Hz, 1H, H_b), δ 7.26 (dd, $J_{meta} = 1.5$ Hz, 1H, H_d), δ 7.28 (dd, $J_{orto} = 7.7$ Hz, $J_{para} = 0.9$ Hz, 1H, H_a) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.3 (CO-CH₂-CH₃), δ 24.9 (CH₂-CH₂-CH₂-COO), δ 25.8 (Ar-O-CH₂-CH₂), δ 28.6 (CH₂-CH₂-CH₂-COO), δ 28.9 (CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), δ 94.4 (Ar-C1-C), δ 114.2 (Ar-C4), δ 123.6 (Ar-C6), δ 129.6 (Ar-C2), δ 130.7 (Ar-C3), δ 159.7 (Ar-C5), δ 173.8 (COO-CH₂-CH₃) ppm. IR (KBr) v [cm⁻¹] = 2932, 2856, 1731, 1583, 1566, 1465, 1373, 1284, 1241, 1225, 1158, 1097, 1059, 1023, 989, 851, 771, 681. MS (ESI +): m/z = 391.1 ([MH])⁺. HRMS (ESI +): m/z za C₁₆H₂₃IO₃ ([MH])⁺ izračunano 391.0770, izmerjeno 391.0774.

Spojina 28:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.28 (t, J = 7.4 Hz, 3H, $COO-CH_2-C\underline{H}_3$), δ 1.33 – 1.42 (m, 4H, $Ar-O-CH_2-C\underline{H}_2-C\underline{H}_2$), δ 1.43 – 1.51 (m, 2H, $C\underline{H}_2CH_2CH_2COO$), δ 1.62 – 1.70 (m, 2H, $Ar-O-CH_2-C\underline{H}_2$), δ 1.76 – 1.83 (m, 2H, $C\underline{H}_2CH_2COO$), δ 2.32 (t, J = 7.5, 2H, $C\underline{H}_2COO$), δ 3.07 (s, 1H, $Ar-C=C\underline{H}$), δ 3.96 (t, J = 6.4, $Ar-O-C\underline{H}_2-CH_2$), δ 4.15 (q, J = 7.5).

7.2 Hz, 2H, $COOC\underline{H}_2CH_3$), δ 6.91 (dd, $J_{orto} = 8.4$ Hz, $J_{meta} = 2.6$ Hz, $J_{para} = 1.0$ Hz, 1H, H_c), δ 7.03 (dd, $J_{meta} = 1.4$ Hz, 1H, H_d), δ 7.09 (dd, $J_{orto} = 7.6$ Hz, $J_{meta} = 1.2$ Hz, 1H, H_a), δ 7.24 (t, $J_{orto} = 7.7$ Hz, 1H, H_b) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.3 (CO-CH₂-<u>C</u>H₃), δ 24.9 (<u>C</u>H₂-CH₂-CH₂-COO), δ 25.8 (Ar-O-CH₂-CH₂-<u>C</u>H₂), δ 29.0 (<u>C</u>H₂-CH₂-CH₂-COO), δ 29.1 (<u>C</u>H₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO), δ 29.1 (Ar-O-CH₂-<u>C</u>H₂), δ 34.3 (<u>C</u>H₂-COO), δ 60.2 (COO-<u>C</u>H₂), δ 68.0 (Ar-O-<u>C</u>H₂), δ 76.9 (C=<u>C</u>H), δ 83.6 (<u>C</u>=CH), δ 115.9 (Ar-<u>C4</u>), δ 116.5 (Ar-<u>C6</u>), δ 123.0 (Ar-<u>C1</u>), δ 124.5 (Ar-<u>C2</u>), δ 129.4 (Ar-<u>C3</u>), δ 158.8 (Ar-<u>C5</u>), δ 173.8 (<u>C</u>OO-CH₂-CH₃) ppm. IR (KBr) v [cm⁻¹] = 3284, 2928, 2849, 1730, 1593, 1574, 1471, 1422, 1366, 1317, 1283, 1255, 1178, 1144, 1096, 1032, 851, 785, 686, 643, 603. MS (ESI +): m/z = 289.2 ([MH])⁺. HRMS (ESI +): m/z za C₁₈H₂₄O₃ ([MH])⁺ izračunano 289.1804, izmerjeno 289.1798.

Spojina 29:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.28 (t, J = 7.1 Hz, 3H, COO-CH₂-CH₃), δ 1.36 – 1.44 (m, 4H, Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), δ 1.47 – 1.54 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-COO), δ 1.63 – 1.70 (m, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂), δ 1.80 – 1.87 (m, 2H, CH₂CH₂COO), δ 2.07, 2.09, 2.11, 2.22 (4 x s, 12 H, COCH₃), δ 2.32 (t, J = 7.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-COO), δ 3.96 (ddd, J_{H5-H6b} = 2.5 Hz, $J_{\text{H5-H6a}}$ = 5.4 Hz, $J_{\text{H4-H5}}$ = 8.7 Hz, 1H, H_5), δ 4.05 (t, J = 6.7 Hz, 2H, Ar-O- CH_2), δ 4.10 (dd, $J_{\text{H5-H6b}}$ = 2.6 Hz, $J_{\text{H6a-H6b}}$ = 12.5 Hz, 1H, H_{6a}), δ 4.15 (q, J_{q} = 7.1 Hz, 2H, $COO-CH_2$ -CH₃), δ 4.41 (dd, J_{H5-H6a} = 5.4 Hz, $J_{H6a-H6b}$ = 12.6 Hz, 1H, H_{6b}), δ 5.42 (t, J_{H3-H6a} = 12.6 Hz, 1H, H_{6b}), δ 5.42 (t, J_{H3-H6a} = 12.6 Hz, 1H, H_{6b}), δ 5.42 (t, J_{H3-H6a} = 12.6 Hz, 1H, H_{6b}), δ 5.42 (t, J_{H3-H6a} = 12.6 Hz, 1H, H_{6b}), δ 5.42 (t, J_{H3-H6a} = 12.6 Hz, 1H, H_{6b}), δ 5.42 (t, J_{H3-H6a} = 12.6 Hz, 1H, H_{6b}), δ 5.42 (t, J_{H3-H6a} = 12.6 Hz, 1H, H_{6b}), δ 5.42 (t, J_{H3-H6a} = 12.6 Hz, 1H, H_{6b} $_{H4} = J_{H4-H5} = 8.9$ Hz, 1H, H_4), δ 6.01 (dd, $J_{H2-H3} = 3.7$ Hz, $J_{H3-H4} = 8.8$ Hz, 1H, H_3), δ 6.03 (dd, $J_{\text{H1-H2}} = 2.6 \text{ Hz}$, $J_{\text{H2-H3}} = 3.7 \text{ Hz}$, 1H, H_2), $\delta 6.08$ (d, $J_{\text{H1-H2}} = 2.6 \text{ Hz}$, 1H, H_1), $\delta 6.93$ (dd, $J_{\text{orto}} = 7.7 \text{ Hz}$, $J_{\text{meta}} = 2.5 \text{ Hz}$, $J_{\text{para}} = 1.0 \text{ Hz}$, 1H, $C_6H_5-\underline{H}_c$), δ 7.36, 7.39 (t + dd, $J_{\text{t-orto}}$ = 7.6 Hz, $J_{dd - orto} = 7.6$ Hz, $J_{dd - meta} = 1.4$ Hz, 2H, $C_6H_5-\underline{H}_b,\underline{H}_a$), δ 7.48 (dd, $J_{meta} = 1.3$ Hz, 1H, $C_6H_5-H_d$), δ 7.96 (s, 1H, C_2N_3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.3 (COO-CH₂-<u>C</u>H₃), δ 20.6, 20.7, 20.8 (4 x O-CO-<u>C</u>H₃), δ 24.9 (<u>C</u>H₂-CH₂-COO), δ 25.9 (Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂), δ 29.0 (CH₂-CH₂-CH₂-COO), δ 29.1 (Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), δ 29.2 (Ar-O-CH₂-<u>C</u>H₂), δ 34.4 (<u>C</u>H₂-COO), δ 60.2 (COO-<u>C</u>H₂), δ 61.6 (Man-<u>C</u>H₂-O-CO-CH₃), δ 66.1 (Ar-O-<u>CH</u>₂), δ 68.0 (Man <u>C2</u>), δ 68.3 (Man <u>C4</u>), δ 68.8 (Man <u>C3</u>), δ 72.2 (Man <u>C5</u>), δ 83.6 (Man <u>C1</u>), δ 111.6 (Ar-<u>C6</u>), δ 115.3 (Ar-<u>C4</u>), δ 118.1 (Ar-<u>C2</u>), 119.9 (triazol C1=<u>C2</u>-N-N=N), δ 130.0 (Ar-<u>C3</u>), δ 130.9 (Ar-<u>C1</u>), δ 148.4 (triazol <u>C1</u>=C2-N-N=N), δ 159.6 (Ar-C5), δ 169.3, 169.7, 170.5 (4 x Man-O-C=O-CH₃), δ 173.9 (C=O-O-CH₂-CH₃) ppm. IR (KBr) v $[cm^{-1}] = 2936, 2357, 1746, 1585, 1368, 1214, 1159, 1129, 1032, 984,$

903, 867, 784, 691, 594. MS (ESI +): $m/z = 662.3 ([MH])^+$. HRMS (ESI +): m/z za $C_{32}H_{43}N_3O_{12}([MH])^+$ izračunano 662.2925, izmerjeno 664.2935.

Spojina 30:

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3H, $COO-CH_2-CH_3$), δ 1.26 – 1.38 (m, 4H, Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), δ 1.39 - 1.47 (m, 2H, Ar-O-CH₂ CH_2), δ 1.54 (p, J = 7.3 Hz, 2H, $Ar-O-CH_2-CH_2$), δ 1.74 (p, J = 6.7 Hz, 2H, CH_2CH_2COO), δ 2.29 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH_2 - CH_2 -COO), δ 3.38 – 3.46 (m, 1H, H_5), δ 3.57 - 3.63 (m, 2H, H_4 , H_{6b}), δ 3.66 (dd, $J_{H5-H6b} = 3.0$ Hz, $J_{H6a-H6b} = 11.8$ Hz, 1H, H_{6a}), δ 3.87 (dd, J = 3.2 Hz, 1H, H_3), δ 4.02, 4.05 (t + q, $J_t = 6.0$ Hz, $J_q = 7.1$ Hz, 4H, Ar-O- CH_2 , $COO-CH_2$ - CH_3), δ 4.46 (dd, J_{H1-H2} = 1.3 Hz, J_{H2-H3} = 3.3 Hz, 1H, H_2), δ 4.92 – 5.45 (s, 3H, 3 x Man-O<u>H</u>), δ 5.93 (d, $J_{\text{H1-H2}}$ = 4.6 Hz, 1H, H_1), δ 6.91 (dd, J_{orto} = 8.2 Hz, J_{meta} = 2.6 Hz, $J_{\text{para}} = 0.9$ Hz, 1H, $C_6H_5-\underline{H}_c$), δ 7.36 (t, $J_{\text{orto}} = 8.0$ Hz, 1H, $C_6H_5-\underline{H}_b$), δ 7.44 – 7.48 (m, 2H, C_6H_5 -<u>H</u>_a, C_6H_5 -<u>H</u>_d), δ 8.77 (s, 1H, C_2N_3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ 14.1 (COO-CH₂-CH₃), δ 24.4 (CH₂-CH₂-COO), δ 25.3 (Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂), δ 28.4 (Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), δ 28.6 (Ar-O-CH₂-CH₂), δ 33.4 (CH₂-COO), δ 59.6 (COO-<u>CH</u>₂), δ 60.6 (Man-<u>C</u>H₂-OH), δ 67.4 (Ar-O-<u>C</u>H₂), δ 67.7 (Man <u>C2</u>), δ 68.0 (Man <u>C4</u>), δ 71.3 (Man C3), δ 78.4 (Man C5), δ 85.8 (Man C1), δ 111.0 (Ar-C6), δ 114.1 (Ar-C4), δ 117.4 (Ar-<u>C2</u>), δ 121.2 (triazol C1=<u>C2</u>-N-N=N), δ 130.0 (Ar-<u>C3</u>), δ 131.8 (Ar-<u>C1</u>), δ 146.2 (triazol <u>C1</u>=C2-N-N=N), δ 159.1 (Ar-<u>C5</u>), δ 172.9 (<u>C</u>=O-O-CH₂-CH₃) ppm. IR $(KBr) v [cm^{-1}] = 3390, 2943, 1721, 1604, 1474, 1439, 1358, 1310, 1251, 1219, 1159,$ 1111, 1083, 1065, 1026, 973, 873, 858, 819, 787, 726, 688, 596, 582. MS (ESI +): m/z = 494.5 ([MH])⁺. HRMS (ESI +): m/z za $C_{24}H_{35}N_3O_8$ ([MH])⁺ izračunano 494.2502, izmerjeno 494.2497.

Spojina 31:

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 1.16 – 1.27 (m, 4H, *Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂-C<u>H₂</u>), δ 1.28 – 1.37 (m, 2H, <i>Ar-O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂)*, δ 1.43 (p, *J* = 7.4 Hz, 2H, *Ar-O-CH₂-C<u>H₂</u>), δ 1.65 (p, <i>J* = 6.7 Hz, 2H, *C<u>H₂</u>CH₂COO)*, δ 2.05 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, *CH₂-C<u>H₂-COO</u>), δ 3.27 (ddd, <i>J*_{H5-H6b} = 2.7 Hz, *J*_{H5-H6a} = 5.7 Hz, *J*_{H4-H5} = 9.0 Hz, 1H, *H₅*), δ 3.67 – 3.73 (m, 2H, *H₄*, *H_{6b}*), δ 3.75 (dd, *J*_{H5-H6b} = 1.9 Hz, *J*_{H6a-H6b} = 9.4 Hz, 1H, *H_{6a}*), δ 3.98 (t, *J*_t = 6.5 Hz, 2H, *Ar-O-C<u>H₂</u>), δ 4.08 (dd, <i>J* = 3.6 Hz, 1H, *H₃*), δ 4.72 – 4.74 (m, 3H, *H₂*, 2 *x Man-O<u>H</u>*), δ 6.03 (d, *J*_{H1-H2} = 2.2 Hz, 1H, *H₁*), δ 6.88 – 6.92 (m, 1H, *C₆H₅-<u>H_c</u>), δ 7.25 (s, 1H, <i>C₆H₅-<u>H_b</u>), δ 7.30 – 7.35 (m, 2H, <i>C₆H₅-<u>H_a</u>, <i>C₆H₅-<u>H_d</u>), δ 8.34 (s, 1H, <i>C₂N₃H*) ppm. ¹³C

NMR (100 MHz, DMSO): δ 24.9 (<u>CH</u>₂-CH₂-COO), δ 25.5 (Ar-O-CH₂-CH₂-<u>C</u>H₂), δ 28.0 (Ar-O-CH₂-CH₂-<u>C</u>H₂-<u>C</u>H₂), δ 28.5 (Ar-O-CH₂-<u>C</u>H₂), δ 61.7 (Man-<u>C</u>H₂-OH), δ 67.8 (Ar-O-<u>C</u>H₂), δ 68.9 (Man <u>C2</u>), δ 68.0 (Man <u>C4</u>), δ 69.2 (Man <u>C3</u>), δ 78.8 (Man <u>C5</u>), δ 88.3 (Man <u>C1</u>), δ 111.0 (Ar-<u>C6</u>), δ 118.0 (Ar-<u>C2</u>), δ 130.4 (Ar-<u>C3</u>), δ 130.7 (Ar-<u>C1</u>), δ 146.2 (triazol <u>C1</u>=C2-N-N=N), δ 158.5 (Ar-<u>C5</u>), δ 182.0 (<u>C</u>=O-ONa) ppm. IR (KBr) v [cm⁻¹] = 3205, 2932, 2838, 1555, 1406, 1335, 1243, 1162, 1110, 1086, 1070, 1048, 1028, 975, 889, 802, 777, 689. MS (ESI +): m/z = 488.2 ([MH])⁺. HRMS (ESI +): m/z za C₂₂H₃₀N₃NaO₈ ([MH])⁺ izračunano 488.2009, izmerjeno 488.2002.

Spojina 32:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.69 (t, J = 5.3 Hz, 1H, *OH*), δ 2.06 (p, J = 6.0 Hz, 2H, *Ar-O-CH*₂-*C*<u>H</u>₂), δ 3.88 (q, J = 5.8 Hz, 2H, *CH*₂-*C*<u>H</u>₂-*OH*), δ 4.11 (t, J = 6.0 Hz, 2H, *Ar-O-CH*₂), δ 6.71 (d, J = 9.0 Hz, 2H, *C*₆*H*₅-<u>*H*_b,*H*_c}), δ 7.57 (d, J = 9.0 Hz, 2H, *C*₆*H*₅-<u>*H*_a,*H*_d}) ppm.</u></u>

Spojina 33:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.87 (t, J = 6.3 Hz, 2H, $C\underline{H_2}$ -COO), δ 4.24 (t, J = 6.3 Hz, 2H, Ar-O-C $\underline{H_2}$), δ 6.71 (d, J = 9.0 Hz, 2H, C_6H_5 - $\underline{H_b},\underline{H_c}$), δ 7.58 (d, J = 9.0 Hz, 2H, C_6H_5 - $\underline{H_a},\underline{H_d}$) ppm. MS (ESI) : $[M - H]^- = 290.88$

<u>Spojina 34:</u>

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.30 (t, J = 7.1 Hz, 3H, $COO-CH_2-C\underline{H}_3$), δ 2.80 (t, J = 6.4 Hz, 2H, $C\underline{H}_2$ -COO), δ 4.18 – 4.25 (t + q, $J_t = 6.3$ Hz, $J_q = 7.1$ Hz, 4H, $Ar-O-C\underline{H}_2$, $COO-C\underline{H}_2$), δ 6.71 (d, J = 9.0 Hz, 2H, $C_6H_5-\underline{H}_b,\underline{H}_c$), δ 7.57 (d, J = 9.0 Hz, 2H, $C_6H_5-\underline{H}_a,\underline{H}_d$) ppm. MS (ESI) : [M + Na]⁺ = 342.13

Spojina 36:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.30 (t, J = 7.1 Hz, 3H, $COO-CH_2-C\underline{H}_3$), δ 2.81 (t, J = 6.4 Hz, 2H, $C\underline{H}_2$ -COO), δ 3.02 (s, 1H, $Ar-C \equiv C\underline{H}$), δ 4.21 (q, $J_q = 7.1$ Hz, 2H, $COO-C\underline{H}_2$), δ 4.27 (t, $J_t = 6.3$ Hz, 2H, $Ar-O-C\underline{H}_2$), δ 6.87 (d, J = 9.0 Hz, 2H, $C_6H_5-\underline{H}_b,\underline{H}_c$), δ 7.44 (d, J = 9.0 Hz, 2H, $C_6H_5-\underline{H}_a,\underline{H}_d$) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.2 (COO-CH₂- \underline{C} H₃), δ 34.5 (Ar-O-CH₂- \underline{C} H₂), δ 60.8 (COO- \underline{C} H₂-CH₃), δ 63.5 (Ar-O- \underline{C} H₂), δ 75.9 (C= \underline{C} H), δ 83.6 (\underline{C} =CH), δ 114.5 (Ar- $\underline{C3}$, $\underline{C5}$), δ 114.6 (Ar- $\underline{C1}$), δ 133.6 (Ar- $\underline{C2}$, $\underline{C6}$), δ 158.9 (Ar-

<u>C4</u>), δ 170.9 (<u>C</u>=O-O-CH₂-CH₃) ppm. MS (ESI +): m/z = 219.1 ([MH])⁺. HRMS (ESI +): m/z za C₁₃H₁₄O₃ ([MH])⁺ izračunano 219.1021, izmerjeno 219.1027.

Spojina 37:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.31 (t, J = 7.1 Hz, 3H, COO-CH₂-CH₃), δ 2.07, 2.09, 2.11, 2.22 (4 x s, 12 H, COCH₃), δ 2.84 (t, J = 6.4 Hz, 2H, CH₂-CH₂-COO), δ 3.96 (ddd, $J_{\text{H5-H6b}} = 2.4 \text{ Hz}, J_{\text{H5-H6a}} = 5.6 \text{ Hz}, J_{\text{H4-H5}} = 8.5 \text{ Hz}, 1\text{H}, H_5$, $\delta 4.10 \text{ (dd, } J_{\text{H5-H6b}} = 2.4 \text{ Hz}$, $J_{\text{H6a-H6b}} = 12.4 \text{ Hz}, 1\text{H}, H_{6a}$, $\delta 4.22 \text{ (q, } J_{\text{q}} = 7.2 \text{ Hz}, 2\text{H}, COO-CH_2-CH_3$), $\delta 4.32 \text{ (t, } J = 6.5 \text{ Hz})$ Hz, 2H, $Ar-O-C\underline{H_2}$), δ 4.40 (dd, $J_{H5-H6a} = 5.3$ Hz, $J_{H6a-H6b} = 12.5$ Hz, 1H, H_{6b}), δ 5.41 (t, $J_{\text{H3-H4}} = J_{\text{H4-H5}} = 8.9 \text{ Hz}, 1\text{H}, H_4$, $\delta 5.99 - 6.04 \text{ (m, 2H, } H_2\text{, } H_3$), $\delta 6.07 \text{ (d, } J_{\text{H1-H2}} = 2.6 \text{ Hz}$, 1H, H_1), δ 7.01 (d, J = 8.8 Hz, 2H, C_6H_5 -<u> H_b . H_c </u>), δ 7.79 (d, J = 8.8 Hz, 2H, C_6H_5 -<u> H_a . H_d </u>), δ 7.89 (s, 1H, C₂N₃<u>H</u>) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):_δ 14.2 (COO-CH₂-<u>C</u>H₃), δ 20.6, 20.7, 20.8, 21.1 (4 x O-CO-<u>C</u>H₃), δ 34.6 (Ar-O-CH₂-<u>C</u>H₂), δ 60.8 (COO-<u>C</u>H₂), δ 61.6 (Man-CH₂-O-CO-CH₃), δ 63.6 (Ar-O-CH₂), δ 66.1 (Man C2), δ 68.4 (Man C4), δ 68.8 (Man C3), δ 72.1 (Man C5), δ 83.6 (Man C1), δ 115.1 (Ar-C3,C5), δ 118.9 (Ar-C1), δ 122.7 (triazol C1=C2-N-N=N), δ 127.2 (Ar-C2, C6), δ 148.2 (triazol C1=C2-N-N=N), δ 159.0 (Ar-C4), δ 169.3, 169.7, 169.8, 170.5 (4 x Man-O-C=O-CH₃), δ 171.0 (C=O-O- CH_2 - CH_3) ppm. IR (KBr) v [cm⁻¹] = 2981, 1736, 1611, 1498, 1368, 1215, 1177, 1128, 1029, 985, 915, 837, 771, 599. MS (ESI +): m/z = 592.2 ([MH])^{+.} HRMS (ESI +): m/z za $C_{27}H_{33}N_{3}O_{12}([MH])^{+}$ izračunano 592.2142, izmerjeno 592.2159.

Spojina 38:

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, *COO-CH*₂-*CH*₃), δ 2.80 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, *CH*₂-*CH*₂-*COO*), δ 3.38 – 3.42 (m, 1H, 1 x *Man-OH*), δ 3.54 – 3.62 (m, 2H, *H*_{6a}, *H*_{6b}), δ 3.63 – 3.68 (m, 1H, *H*₅), δ 3.85 – 3.89 (m, 1H, *H*₄), δ 4.12 (q, *J*q = 7.1 Hz, 2H, *COO-CH*₂-*CH*₃), δ 4.24 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, *Ar-O-CH*₂), δ 4.45 – 4.48 (m, 1H, *H*₃), δ 4.62 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, *H*₂), δ 5.03, 5.09, 5.32 (3 x d, *J* = 5.25 Hz, 3H, *3 x Man-OH*), δ 5.92 (d, *J*_{H1-H2} = 4.3 Hz, 1H, *H*₁), δ 7.03 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, *C*₆*H*₅-*H*_b*H*_c),δ 7.81 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, *C*₆*H*₅-*H*_a*H*_d), δ 8.62 (s, 1H, *C*₂*N*₃*H*) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ 14.1 (COO-CH₂-CH₃), δ 34.0 (Ar-O-CH₂-CH₂), δ 60.1 (COO-CH₂), δ 60.7 (Man-CH₂-OH), δ 63.4 (Ar-O-CH₂), δ 67.6 (Man C2), δ 68.0 (Man C4), δ 71.2 (Man C3), δ 78.3 (Man C5), δ 85.8 (Man C1), δ 114.8 (Ar-C3,C5), δ 120.1 (Ar-C1), δ 123.3 (triazol C1=C2-N-N=N), δ 126.6 (Ar-C2, C6), δ 146.1 (triazol C1=C2-N-N=N), δ 158.1 (Ar-C4), δ 170.7 (C=O-O-CH₂-CH₃) ppm. IR (KBr) v [cm⁻¹] = 3345, 3068, 1730, 1611, 1498, 1407, 1362, 1301,

1261, 1191, 1109, 1072, 1031, 977, 854, 837, 811, 796, 669, 641, 626, 536. MS (ESI +): $m/z = 424.2 ([MH])^+$. HRMS (ESI +): m/z za $C_{19}H_{25}N_3O_8 ([MH])^+$ izračunano 424.1720, izmerjeno 424.1727.

8.2 Rezultati molekulskega sidranja v vezavno mesto FimH



Slika 32: Sidranje spojine <u>18</u> v vezavno mesto FimH, označeno z zeleno barvo in spojine <u>12</u>, označene s sivo barvo.



Slika 33: Sidranje spojine <u>18</u> v vezavno mesto FimH, označeno z zeleno barvo in spojine <u>24</u>, označene s sivo barvo.



Slika 34: Sidranje spojine <u>18</u> v vezavno mesto FimH, označeno z zeleno barvo in spojine <u>30</u>, označene s sivo barvo.