

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



SUZANA KRAJNČEC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SUZANA KRAJČEC

**SINTEZA C-MANOZIDOV KOT POTENCIALNIH ANTAGONISTOV
RECEPTORJA FimH**

**SYNTHESIS OF C-MANNOSIDES AS POTENTIAL
FimH ANTAGONISTS**

**MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA**

Ljubljana, 2017

Magistrsko naložko sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm. Spektroskopske meritve in ostale analize so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in na Institutu Jozef Stefan. Biološko vrednotenje bo opravljeno na Institute of Molecular Pharmacy, University of Basel v Švici.

Zahvala

Posebno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm., ki me je spremjal, motiviral in pomagal pri delu v laboratoriju. Za vso nesebično pomoč, kjerkoli in kadarkoli, za ves čas in za vse odgovore na moja vprašanja od srca hvala. Zahvaljujem se tudi dr. Urbanu Košaku, mag. farm., za pomoč pri dolgih kolonah in suhih nanosih, Andražu Lamutu, mag. farm., za tolažbo, nasvete in motivacijo pri delu. Profesorjem in sodelavcem v pritličju na Katedri za farmacevtsko kemijo hvala; ste razlog, da sem vsak dan začela z veseljem v okolju, v katerem sem se počutila domače. Bila mi je čast, da sem bila pretekle mesece del Vaše skupnosti!

Na koncu, ne pa tudi po pomembnosti, bi se rada zahvalila staršem in bratu, ki so mi stali ob strani in mi pomagali, da sem uresničila svoje sanje in načrte. Zaradi Vas sem to, kar sem in kdor sem. Brez vaše velike podpore zagotovo ne bi pisala teh vrstic. Vam, zaradi skrajšanih skupnih trenutkov, posvečam to delo.

Bralcu teh vrstic pa se zahvaljujem za pozornost!

Izjava

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

Suzana Kranjčec

Predsednica komisije: prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Anja Pišlar, mag. farm.

Ljubljana, 2017

Thomas Alva Edison je v dva tisoč poskusih poskusil narediti žarnico. Novinar ga je vprašal, ali se zaradi tega počuti neuspešnega. Edison mu je odgovoril:

» *I didn't fail. I found 2,000 ways how not to make a light bulb; I only need to find one way to make it work.* «

Thomas Alva Edison (1847- 1931)

Kazalo

I.	POVZETEK	II
II.	ABSTRACT	III
III.	OKRAJŠAVE	IV
1.	UVOD	1
1.1	Uroinfekcije.....	1
1.1.1	Pregled zdravljenja uroinfekcij skozi zgodovino	2
1.2	<i>Esherichia coli</i>	4
1.2.1	Kolonizacija <i>E. coli</i> v urinarnem traktu	5
1.3	Sluznica urinarnega trakta, lektini in adhezija	7
1.3.1	Lektini	7
1.3.2	Adhezin - lektinski FimH receptor.....	7
1.4	Izziv farmacije - rezistenca bakterij na protibakterijske učinkovine	10
1.5	Antiadhezivna terapija.....	11
1.6	Potencialni antagonisti lektinskega receptorja FimH.....	13
2.	NAMEN DELA.....	15
3.	MATERIALI IN METODE	18
4.	EKSPERIMENTALNO DELO.....	21
4.1	Sinteza metil- α -D-manopiranozida	21
3.2	Sinteza metil-2,3,4,6-(tetra- <i>O</i> -benzil)- α -D-manopiranozida.....	22
3.3	Sinteza 3-(tetra- <i>O</i> -benzil- α -D-manopiranozil)propena	23
3.4	Sinteza Sinteza 1',2'-epoksi-3'-(tetra- <i>O</i> -benzil- α -D-manopiranozil)propana.....	24
3.5.1	Poskus sinteze 2-hidroksi-3-(tetra- <i>O</i> -benzil- α -D-manopiranozil)propoksi-1-naftola	
	25	
3.5.2	Sinteza 2-hidroksi-3- α -D-manopiranozilpropana.....	27
3.6	Sinteza 3- α -D-manopiranozilpropena	28
3.7	Sinteza 3-(tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranozil)propena	29
3.8	Sinteza 1',2'-epoksi-3'-(tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranozil)propana.....	30
3.9	Sinteza 1-(tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranozil)-3-(fenilamino)propan-2-ola.....	31
3.10	Sinteza 1-(tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranozil)-3-((4-metoksifenil)amino)propan-2-ola ..	33
3.11	Sinteza metil 4-((3-(tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranozil)-2-hidroksipropil)amino)benzoata.	34
3.12	Sinteza 1-(α -D-manopiranozil)-3-(fenilamino)propan-2-ola	35
3.13	Sinteza 1-(α -D-manopiranozil)-3-(4-metoksifenilamino)propan-2-ola	36
3.14	Sinteza metil 4-((3-(α -D-manopiranozil)-2-hidroksipropil)amino)benzoata	37

3.15 Sinteza 1-etoksi-3-(α -D-manopiranozil)propan-2-ola.....	38
5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	39
5.1 Fischerjeva glikozilacija.....	39
5.2 Sinteza C-glikozidne vezi.....	40
5.2.1 Sinteza spojine 7.....	41
5.2.2 Sinteza spojine 3.....	44
5.3 Zaščita OH skupin.....	44
5.3.1 Acetilna zaščita OH skupin.....	44
5.3.2 Benzilna zaščita OH skupin	45
5.4 Oksidacija alila in tvorba epoksida	46
5.5 Odpiranje epoksidnega obroča z nukleofili - sinteza spojin 10 , 11 in 12	46
5.6 Odpiranje epoksidnega obroča s katalitskim hidrogeniranjem in v prisotnosti natrijevega etoksida - sinteza spojin 6 in 15	49
5.7 Odstranitev benzilnih in acetilnih zaščitnih skupin.....	50
5.7.1 Zemplénova reakcija - sinteza spojin 13 , 14 in 15	50
5.7.2 Katalitsko hidrogeniranje- sinteza spojine 16	50
SKLEP.....	51
LITERATURA.....	53

I. POVZETEK

Adhezijski protein FimH, ki se nahaja na vrhu fimbrije 1 uropatogene *Escherichia coli* (*E.coli*) (UPEC), za svojo pritrditev na površino gostiteljske celice prepozna α -D-manozo, ki sestavlja glikoprotein uroplakin Ia. Slednji je gradnik uroepitelija v periuretralnem delu spodnjih sečil - mehurja. Adhezini na površini fimbrij kot virulentni dejavniki omogočajo bakterijam pritrditev na gostiteljske celice in s tem začetek kolonizacije in rasti, ki vodi v okužbo.

Na osnovi znane tridimensionalne strukture adhezina FimH sože načrtovali, sintetizirali in ovrednotili številne α -D-manokonjugate kot glikomimetike, ki bi preprečili adhezijo *E. coli* na gostiteljske celice. Ti zaviralci so strukturno predvsem N-in O-glikozidi, ki so bolj dovezetni za encimsko razgradnjo in hidrolizo. Cilj te magistrske naloge je bila sinteza C-glikozidov, ki bi bili bolj odporni proti metabolični razgradnji, bolj stabilni in bi posledično lahko imeli večjo biološko uporabnost.

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali pet novih α -D-manokonjugatov s C-glikozidno vezjo kot potencialnih antagonistov lektinskega adhezina FimH. Pri tem smo izhajali iz spojin, predhodno sintetiziranih na Katedri za farmacevtsko kemijo. Sinteza končnih spojin je potekala v šestih stopnjah iz D-manoze kot začetnega sinteznega gradnika. S postopki klasične organske sinteze in sinteze z mikrovalovi smo dobili končne C-glikozide, ki so sestavljeni iz glikonskega dela (α -D-manoze), ki v vezavnem mestu tvori številne vodikove vezi, in aglikonskega dela, ki je sestavljen iz β -amino alkohola pripetega na derivate anilina, ki so pomembni za tvorbo π - π interakcij v t.i. tirozinskih vratih FimH, s čimer ojačajo vezavo spojine v vezavno mesto. Biokemijsko vrednotenje končnih spojin še poteka, zato rezultati niso vključeni v magistrsko nalogu.

Ključne besede: adhezijski protein, antiadhezivna terapija, α -D-manozidi, *Escherichia coli*, FimH, lektini, sinteza z mikrovalovi.

II. ABSTRACT

Adhesion protein FimH, which is located on the top of fimbriae 1 of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC), binds α -D-mannose on the glycoprotein uroplakin Ia, which leads to its adhesion to the host cell surface of the bladder. Uroplakin Ia is a constituent of the urothelium, which is located in periuretral area in the lower urinary tract, specifically bladder. Adhesins as virulence factors, which are located on the surface of the fimbriae, are necessary for bacterial attachment to host cells, and thus, the beginning of the colonization and subsequent development of infection.

Based on the known three-dimensional crystal structure of the adhesin FimH, numerous α -D-mannosides have been synthesized and evaluated as FimH antagonists with a goal to prevent the adhesion of *E. coli* to host cells. These inhibitors are mostly N- and O-glycosides that are more prone to enzymatic degradation or hydrolysis. The aim of this master's thesis was to synthesize C-mannosides which are more resistant to metabolic degradation, more stable and bioavailable than their O-glycosidic analogues.

In the context of the master's thesis, we synthesized five new α -D-mannosides with C-glycosidic bond as potential antagonists of lectin FimH. Compounds previously synthesized at the Department of Pharmaceutical Chemistry were taken as starting points for further optimisation. Synthesis of the final compounds was conducted in six steps, starting from D-mannose as the initial building block. The procedures of classical organic synthesis and microwave-assisted synthesis were used to synthesize the final C-glycosides, which are composed of glyccone (α -D-mannose), which forms several hydrogen bonds in the binding site, and the aglycone part, which consists of the β -amino alcohol substituted with aniline derivatives. The latter are important for formation of π - π stacking interactions in the so-called "tyrosine gate", which results in an increase in binding affinity. Biochemical evaluation of the final compounds is still ongoing, so the results are not included in the master's thesis.

Keywords: cell adhesion proteins, antiadhesive therapy, C- α -D-mannosides, *Escherichia coli*, FimH, lectins, microwave-assisted organic synthesis.

III.OKRAJŠAVE

AK	aminokislina
BSTFA	<i>N,O</i> -bistrifluoroacetamid
cDNA	komplementarna DNA
CFU	kolonijska enota (<i>angl. colony forming unit</i>)
CNF1	citotoksični nekrotizirajoci faktor tipa 1 (<i>angl. cytotoxic necrotizing factor 1</i>)
CRD	domena za prepoznavo ogljikovih hidratov (<i>angl. carbohydrate recognition domain</i>)
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO- <i>d</i> ₆	devteriran dimetilsulfoksid
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI	elektrorazpršilna ionizacija (<i>angl. electrospray ionization</i>)
ExPEC	zunajčrevesna patogena <i>Escherichia coli</i> (<i>angl. extra-intestinal pathogenic Escherichia coli</i>)
FimH	fimbrijski adhezin H (<i>angl. fimbrial adhesin H</i>)
FimH _L	lektinska domena fimbrijskega adhezina H (<i>angl. lectin domain of fimbrial adhesin H</i>)
FimH _p	pilijska domena fimbrijskega adhezina H (<i>angl. pili domain of fimbrial adhesin H</i>)
HR-MS	masna spektrometrija visoke ločljivosti (<i>angl. high resolution mass spectrometry</i>)
IC ₅₀	koncentracija antagonista, pri kateri je vezava substrata na FimH znižana za 50% (<i>angl. half maximal inhibitory concentration</i>)
InPEC	znotrajčrevesna patogena <i>Escherichia coli</i> (<i>angl. intestinal pathogenic Escherichia coli</i>)
IR	infrardeča spektroskopija
IUT	infekcije urinarnega trakta
K _d	konstanta disociacije
mCPBA	<i>meta</i> -kloroperoksibenzojska kislina
MeOD	devteriran metanol
MF	mobilna faza

MS	masna spektrometrija
MW	sinteza z mikrovalovi (<i>angl. microwave-assisted synthesis</i>)
NMR	jedrska magnetna resonanca (<i>angl. nuclear magnetic resonance</i>)
R _f	retencijski faktor
TMSOTf	trimetilsilil trifluorometansulfonat
TPK	tankoplastna kromatografija
UPEC	uropatogena <i>Escherichia coli</i>
UT	urogenitalni trakt

1. UVOD

1.1 Uroinfekcije

Infekcije urinarnega trakta (IUT) opredelimo, ko v vzorcu urina odraslih oseb, pridobljenega s kateterizacijo, najdemo $> 5 \times 10^4$ CFU/mL. Najbolj ogrožene so ženske, saj jih IUT zaradi razlik v anatomiji in zgradbi urogenitalnega trakta (UT) prizadanejo v znatno večji meri kot moške, saj je sečnica pri ženskah približno trikrat krajsa (4-5 cm) kot pri moških (16-20 cm). Ker je *Escherichia coli* (*E. coli*) normalno prisotna v črevesju, ji je zaradi anatomske bližine prebavnega in urogenitalnega trakta olajšan vdor v urogenitalni sistem. Pri otrocih diagnosticiramo IUT, ko v urinu najdemo 10^4 CFU/mL pri vzorcih pridobljenih s kateterizacijo in 10^2 CFU/mL pri vzorcih pridobljenih z odvzemom neposredno iz mehurja. Za razliko od odraslih oseb so pri otrocih IUT pogosto posledica anatomske napake ali še ne dovolj razvitega imunskega sistema. (1)

Mehanizmi, ki v telesu vzdržujejo normalno sterilnost urinarnega trakta, so kislost urina in prost pretok, normalni mehanizem praznjenja mehurja, urejeni in fiziološko normalni uretrovezikalni in uretralni sfinktri ter imunološke bariere in sluznica. Porušenje kateregakoli od teh mehanizmov lahko povzroči uroinfekcijo. Ko potrdimo diagnozo IUT, je zdravljenje usmerjeno v zdravljenje akutne infekcije, preprečitev urosepsice in ohranjanje funkcije ledvičnega parenhima. (2)

Povzročitelji vnetij sečil so predvsem gramnegativni bacili, v manjši meri tudi grampozitivni koki iz rodov *Staphylococcus* in *Enterococcus*. Pri mikrobiološki preiskavi vzorca urina s sumom na IUT pogosto izolirajo tudi bakterije iz rodov *Proteus*, *Klebsiella* in *Enterobacter*. Med njimi je kot najpogostejši provročitelj IUT *E. coli*, ki se nahaja v debelem črevesju in je provzročitelj vsaj 80% cistitisov. (3)

Ko se patogeni mikroorganizmi pritrđijo na sluznico urinarnega trakta ter izzovejo imunski odziv, se na površini v UT tvori biofilm. Slednji lahko predstavlja resne zaplete, kadar se pojavi na katetrih in implantatih, kar v veliki meri provzroči neustrezno praznjenje mehurja, s čimer se poruši integriteta sistema. Biofilm je po definiciji skupina mikroorganizmov, ki so medsebojno ali na substrat irreverzibilno pritrjeni, vključeni pa so v zunajcelični polimerni matriks, ki so ga zgradili sami. Gre za obrambni mehanizem mikroorganizmov, ki omogoča izogibanje imunkemu odzivu gostitelja, odpornost proti

protibakterijskim učinkovinam, dolgotrajne okužbe in s tem tudi težave z odpravljanjem patoloških procesov (3, 4).

1.1.1 Pregled zdravljenja uroinfekcij skozi zgodovino

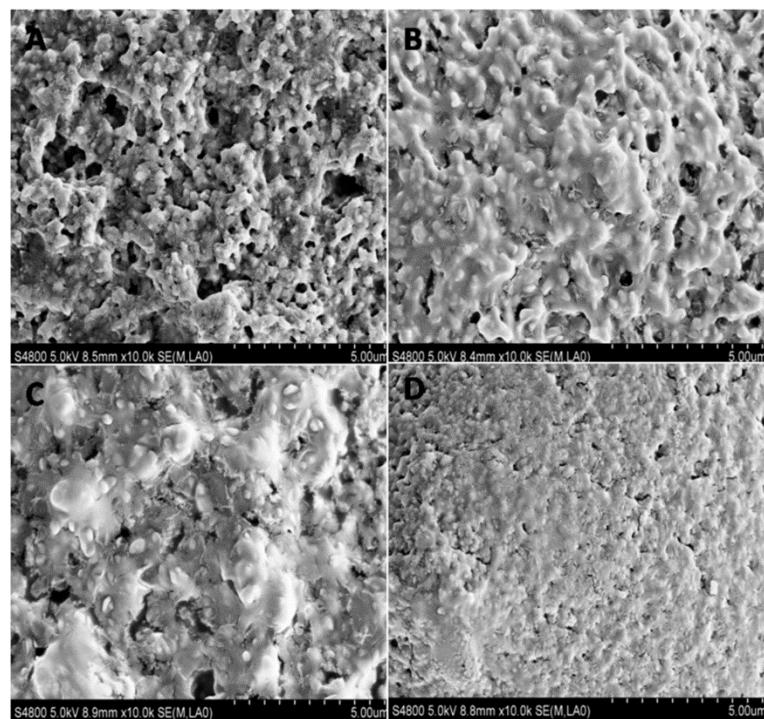
Skozi evolucijo so tipične simptome uroinfekcij zdravili z rastlinskimi pripravki, ki so se izkazali kot zelo učinkoviti. Danes za zdravljenje uroinfekcij poleg pripravkov rastlinskega izvora uporabljamo različne antibiotike in kemoterapeutike, ki delujejo baktericidno in/ali bakteriostatično. Slednja pristopa vodita k razvoju vse večje odpornosti sevov *E. coli*, ki zahtevajo potrebo po razvoju novih protibakterijskih učinkovin. To je posebej pomembno pri bolnikih, ki zaradi ponavljačih se infekcij razvijejo kronično IUT. Zato je pomembno iskati tudi dodatne alternativne pristope zdravljenja okužb, kot je anti-adhezijska terapija. Pri tem pristopu preprečujemo pritrjevanje mikroorganizmov na gostiteljske celice, s čimer hkrati preprečimo invazijo in aktivacijo virulence ter posledično razvoj okužbe. (5, 6)

Simptomi uroinfekcije so pogosto zanemarjeni in se posledično ne zdravijo, s časom izginejo, ali pa se veliko obolelih poda v samozdravljenje. S takšnim načinom se v veliki meri samo blažijo simptomi preko obilne hidracije in pitja zdravilnih čajev, ki vsebujejo npr. flavonoida arbutin in metil arbutin, prisotna v vednozelenem gorniku (*Uvae ursi*, L.), proantocianidine v brusnici (*Vaccinium macrocarpon*, L.) ter diuretične komponente (flavonoidi iz zlate rozge *Solidago virgaurea*, L.). Potrebno je poudariti, da moramo pri samozdravljenju zagotoviti alkalen pH urina, ki ga dosežemo z uravnoteženo prehrano, makrobiotiki ter izogibanjem uživanja hrane bogate z vitaminom C, rdečega mesa, pitja kave itd. To je pomembno, saj samo v alkalnem urinu pride do cepitve O-glikozidne vezi na arbutinu in s tem do nastanka hidroksikinona in fenola, ki imata antioksidativne in antiseptične lastnosti ter preprečujeta pritrditev bakterij na stene mehurja (7, 8).

Pri zdravljenju infekcij urinarnega trakta se uporablajo antibiotiki in kemoterapeutiki, kot so nitrofurantoin, cefalosporini (druge in tretje generacije), amoksicilin v kombinaciji s klavulansko kislino, trimetoprim samostojno ali v kombinaciji s sulfametoksazolom. Pri takšni terapiji je potrebna dodatna pozornost zdravnika in pacienta na pravilno jemanje protibakterijskih učinkovin zvečer, zadrževanje urina vsaj 8 ur, da zdravilo lokalno deluje dovolj časa in s tem zniža CFU na takšen nivo, da ni več prisotnih patogenih mikroorganizmov. Protimikrobna terapija pri IUT se pogosto začne tudi, ko še niso znani

povročitelj in njegova občutljivost in rezistenca proti antibiotikom, kar lahko predstavlja problem. Nepravilna raba protibakterijskih učinkovin, kot so neredno jemanje, neupoštevanje navodil in predčasna prekinitev jemanja zdravila pa vodi tudi do ponovnega pojava IUT, relapsa in reinfekcije in s tem tudi do pojava večjega števila rezistentnih sevov *E. coli* (9, 10, 11).

Danes poleg omenjene antiadhezivne terapije preučujejo tudi strategije, ki bi preprečile tvorbo biofilma ali uničile bakterije v obstoječem biofilmu, ki ga tvori uropatogena *E. coli* (UPEC). Med drugim so raziskovali tudi učinke alicina iz eteričnega olja česna na sevih UPEC CFT073 in J96, ki je v subinhibitornih koncentracijah zmanjšal tvorbo in porušil zgradbo biofilma (Slika 1) (12).



Slika 1. Prikaz zgradbe biofilma seva UPEC CF3057 brez ali v prisotnosti alicina s pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa (SEM). A) Kontrola; brez alicina. B) prisotnost 12 µg/mL, C) 25 µg/mL; D) 50 µg/mL alicina. Pritejeno po (12).

1.2 *Escherichia coli*

Bakterijo *E. coli* je odkril in prvi preučeval Nemec Theodor Escherich v 18. stoletju. Ima pomembno vlogo v mikrobiologiji, molekularni biologiji in sodobni biotehnologiji ter bioinženirstvu, kjer se uporablja za proizvodnjo velikih količin rekombinantih proteinov ali DNA. Ena izmed prvih aplikacij rekombinantne DNA tehnologije je bila ravno genetska manipulacija *E. coli* za proizvodnjo inzulina. Ločimo med sevi *E. coli* v črevesju (InPEC - *intestinal pathogenic E. coli*) in sevi izven črevesja (ExPEC - *extra-intestinal pathogenic E. coli*). Slednji zaradi anatomskeh ali funkcijskih nepravilnosti ter velikega inokuluma v potrebušnici lahko povzročajo številne zunajcelične okužbe. ExPEC lahko kolonizira v urinarnem traktu in osrednjem živčevju ter s prehodom v kri provzroči bakteriemijo (13).

E. coli je gramnegativni bacil, ki je naravno prisoten v fiziološki flori črevesja človeka, saj v prebavnem traktu sodeluje pri proizvodnji vitamina K in presnovi hrane. Kljub takšni simbiozi in komenzalizmu določeni zunajčrevesni sevi ExPEC povzročajo infekcije urinarnega trakta, ki so najbolj pogoste oportunistične okužbe. ExPEC imajo daljši genom v primerjavi z InPEC, kar jim omogoča zunajčrevesno preživetje. Njihova virulanca omogoča kolonizacijo uroepitelija in povzročitev vnetja, s tem pa tudi aktivacijo genov, ki so odgovorni za izražanje dejavnikov virulence (14, 15).

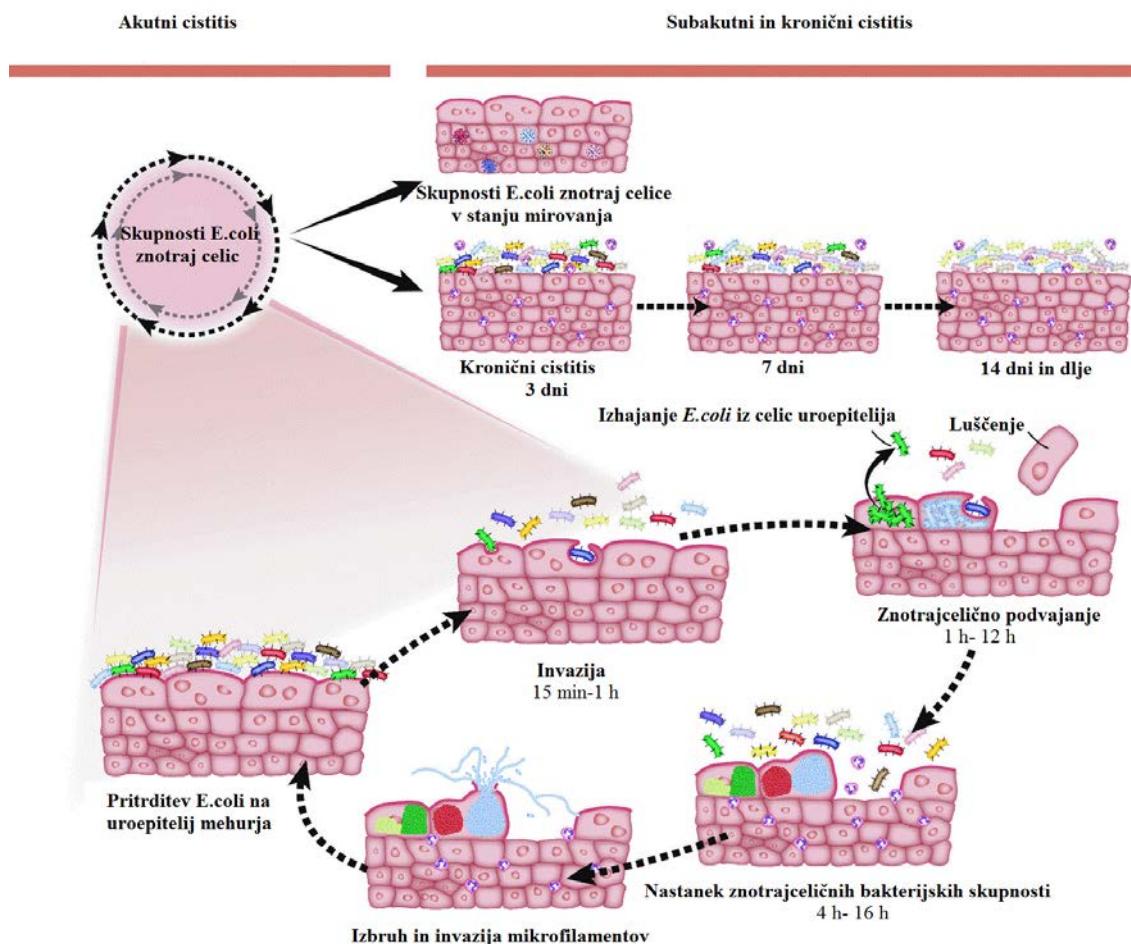
E. coli v svojem genomu vsebuje zapise za različne viruletnne dejavnike, kot so adhezini, toksini, kapsula, fimbrije, sistem za privzem ionov, sistem za izmik imunskega odziva gostitelja, ki jih imenujemo tudi faktorji preživetja. *E. coli* postane uropatogena, če navedeni virulentni dejavniki delujejo sinergistično in s tem provzročijo vnetje v urinarnem traktu (16, 17, 18, 19).

Bakterije *E. coli* lahko razvrstimo v filogenetske skupine A, B1, B2 in D, med katerimi izkazujejo urovirulenco sevi skupine B2. Za to skupino so značilni adhezini, oziroma fimbrije P, S, in Dr, ki bakteriji omogočajo adhezijo na uroepitelij, po kolonizaciji pa tudi izločanje toksinov (α -hemolizin, CNF-1 (citotoksični nekrotizirajoči faktor tipa 1), aerobaktin), ki spodbudijo vnetni odziv. Za regulacijo ekspresije genov in s tem sintezo virulentnih dejavnikov mora UPEC živeti v za to primernem okolju, za samo preživetje pa mora imeti dovolj hranil in železa. Da bi se genski zapisi prevajali v informacijo za sintezo vnetnih dejavnikov, je pomembna regulacija ekspresije genov (20, 21).

1.2.1 Kolonizacija *E. coli* v urinarnem traktu

Z različnimi raziskavami so razvili model, ki lahko pojasni mehanizem nastanka IUT. Uropatogeni sevi *E. coli*, ki se nahajajo v črevesju, zaradi velikega inokuluma preidejo v urinarni trakt in povzročajo periuretralno kontaminacijo mehurja. V celicah uroepitelija in znotraj lumna mehurja tvorijo znotrajcelične skupnosti bakterij, ki so v stanju mirovanja. Ko postanejo pogoji v mehurju, kot so npr. pH, temperatura, vsebnost hranil in železa, optimalni za razvoj bakterij, se začnejo formirati fimbrije tipa 1, ki so izjemnega pomena v začetni fazi okužbe. (22, 23)

Bakterije *E. coli* nato zapustijo notranjost gostiteljskih celic in pričnejo invazijo na uroepitelij. Da pride do okužbe, se bakterije *E. coli* s pomočjo adhezijskih proteinov pritrdijo na gostiteljske celice, znotraj katerih se nato namnožijo. Okužene epitelijske celice gostitelja, ki so sedaj zrele celice, se z normalnim tokom urina luščijo in se tako izločajo iz telesa. S tem pride do izmenjave, pri kateri se zrele »stare celice« luščijo, na površje pa pridejo nezrele celice, ki še niso razvile mehanizma za obrambo proti okužbam (Slika 2). V teh celicah se invazivni sevi UPEC nastanijo v področjih zapletenega omrežja mikrofilamentov in biofilma, kjer so manj dovetni za razmnoževanje in delovanje protibakterijskih učinkovin. Iz tega razloga se IUT ponavljajo in bakterije postanejo rezistentnej proti protibakterijskim učinkovinam (22, 23, 24).



*Slika 2. Kolonizacija bakterij *E. coli* v periuretralnem področju spodnjih sečil. Akutni cistitis - Znotrajcelične skupnosti bakterij *E. coli* so v stanju mirovanja, ko še nimajo razvitih fimbrij I. Ko se v mehurju spremenijo pogoji (pH, temperatura, vsebnost hrani), se bakterije *E. coli* začnejo razmnoževati. Ko bakterije *E. coli* zapustijo okužene celice, začnejo invazijo in adhezijo na uroplakin, hkrati pa pride do luščenja površinskih celic. Kronični cistitis - nenehna kolonizacija in invazija bakterij *E. coli* provzroča relaps in ponavljajoče se IUT. Prirejeno po (2).*

IUT se razvijajo najprej v spodnjih sečilih, ko ima UPEC razvite fimbrije tipa 1, potem pa se širijo postopoma do zgornjih sečil do ledvic, kjer imajo izražene fimbrije tipa P. Ko bakterije kolonizirajo ledvični epitelij, ga poškodujejo s hemolizinom, kar vodi do vdora v krvni sistem in lahko celo do migracije v osrednje živčeve in razvoja meningitisa (24).

1.3 Sluznica urinarnega trakta, lektini in adhezija

Sluznica notranje stene mehurja je zgrajena iz uroepitelija, ki ga sestavljajo uroplakin I, II in III. Uroplakina Ia in Ib spadata v družino proteinov, ki so sestavljeni iz 4 transmembranskih domen. Gre za post-translacijsko modificirana proteina, ki sta različno glikozilirana. Tako je človeški uroplakin Ia glikoziliran z α -D-manozo, uroplakin Ib pa je glikoziliran s kompleksnimi glikani. (25, 26).

1.3.1 Lektini

Lektini so proteini neimunskega izvora, ki imajo sposobnost prepoznavanja specifičnih monosaharidov v glikoproteinih, na katere se reverzibilno vežejo z visoko afiniteto. Monosaharid, npr. D-manoza, se lahko nahaja na koncu verige kot nereducirajoči sladkor, lahko pa je tudi lokaliziran znotraj oligosaharidne verige, ki je vezana na protein. V svoji strukturi imajo lektini posebna vezavna mesta, ki se imenujejo domene za prepoznavo ogljikovih hidratov (angl. carbohydrate recognition domain, CRD) in so specifične za določene ogljikove hidrate. Razlikujejo se od glikoproteinov, ker imajo ti v svoji strukturi sladkor, lektini pa so proteini, ki vežejo sladkorje. Najdemo jih v bakterijah, glivah in rastlinah. Pri bakterijah omogočajo adhezijo na gostiteljske celice in tkiva. Pogosto se nahajajo na organelih, ki jih imenujemo fimbrije ali pili. Adhezine izražajo tako patogene kot saprofitske bakterije. Pri patogenih bakterijah imajo adhezini pomembno vlogo v patogenezi in vnetnih procesih, pri saprofitskih bakterijah pa imajo funkcije pritrjevanja na podlago (26, 27, 28).

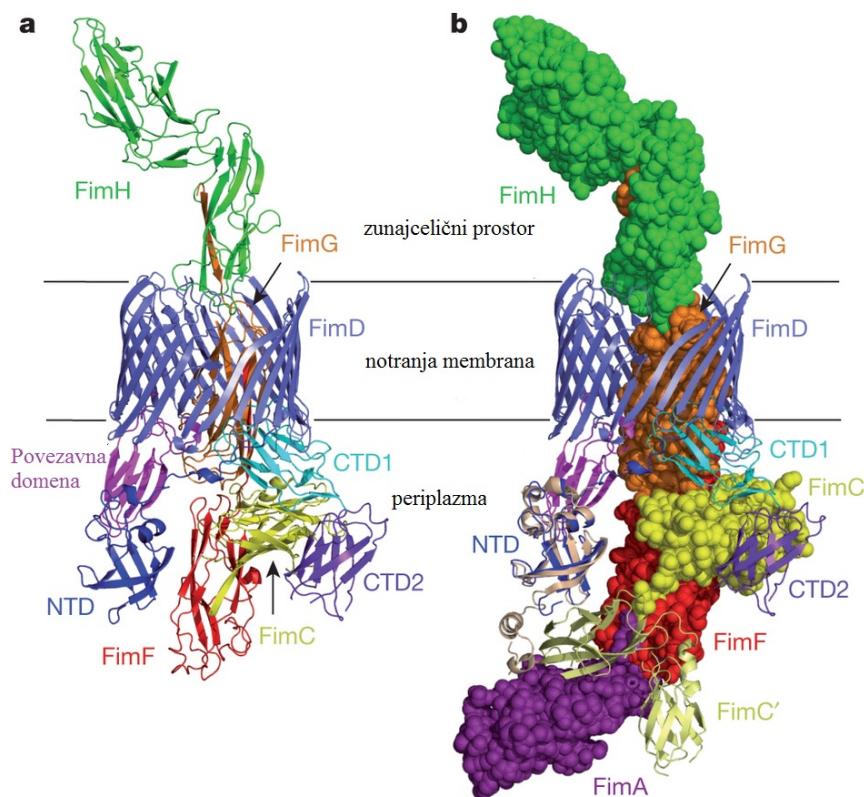
1.3.2 Adhezin - lektinski FimH receptor

Za *E. coli* je znano, da lahko vsebuje 200-500 fimbrij, občutljivih za manozo, ki so zgrajene iz različnih domen, ki jih sestavljajo proteini. Fimbrije so paličaste strukture, široke 7 nm in dolge 1-3 μm , ki jih najdemo na površini bakterijske celice in so značilne za vse koliformne bakterije. Večji del fimbrije predstavlja protein FimA, na vrhu fimbrije pa je podenota FimH, ki ima vlogo lektinskega receptorja. FimF in FimG povezujeta FimH s preostankom fimbrije. Prav zaradi svojega položaja in vloge je FimH najbolj raziskovana domena, saj je odgovoren za adhezijo na celice gostitelja, s čimer predstavlja idealno tarčo za odkrivanje antiadhezivnih glikomimetikov. Znana sta dva adhezina, ki se nahajata na dveh tipih fimbrij UPEC in se izražata odvisno od okolja in zgradbe epitelija. Adhezin

FimH se nahaja na fimbrijah tipa 1 (v spodnjih sečilih), drugi pa se nahaja na fimbrijah P (po kolonizaciji UPEC v zgornja sečila - ledvica) (26, 27).

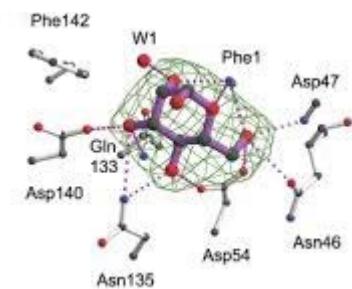
Adhezin FimH na fimbrijah 1 se specifično veže na uroplakin Ia (transmembranski protein, ki je glikoziliran z α -D-manozo na Asn169), CD11/CD18 (integrina, ki sta odgovorna za adhezijo levkocitov), CD44 (celični glikoprotein, ki je ključen za medsebojne interakcije celic ter adhezijo in migracijo slednjih) in CD48 (antigen, ki se nahaja na mastocitih v urinarnem traktu in se razlikuje od črevesnega in dihalnega epitelija, ki je v veliki meri zgrajen iz sluzi). V UT najdemo tudi manoziliran glikoprotein *Tamm-Horsfall*, na katerega se preko fimbrij tipa 1 veže *E. coli* in tako zavira vezavo adhezinov *E. coli* na epitelijske celice mehurja. Za ta protein, ki je imunomodulin, je znano, da inhibira proliferacijo, saj ima imunosupresivno aktivnost. (28, 29)

S pomočjo rentgenske kristalografije so določili tridimenzionalno strukturo FimH, ki je sestavljen iz 279 AK in se deli na dve domeni in sicer: pilusno domeno (FimH_p) in lektinsko domeno (FimH_L). N-končna lektinska domena, ki je specifična za vezavo α -D-manoze na površini uroplakina Ia, se nahaja pri samem vrhu FimH in je zgrajena iz 156 AK ostankov. C-končna pilusna domena, s katero se adhezin veže na površino, pa je zgrajena iz 123 AK ostankov (Slika 3). Masa celotnega proteina FimH znaša približno 29 kDa (30, 31).



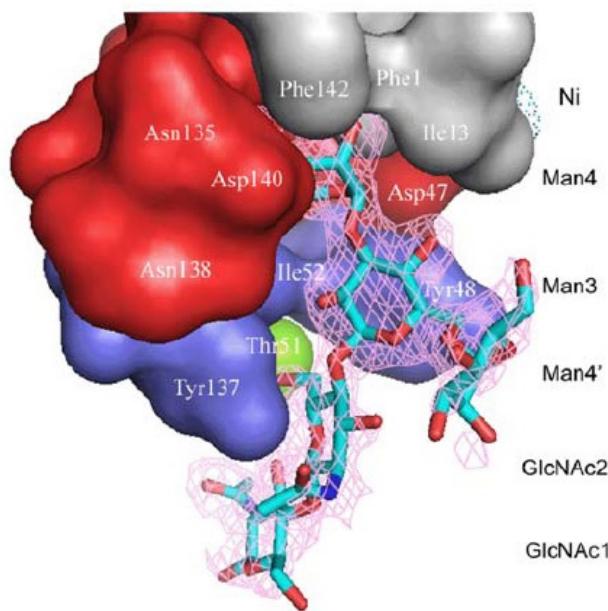
Slika 3. a) Kristalna struktura FimD-FimC-FimF-FimG-FimH. Proteinske podenote so prikazane v obliki vijačnic in beta sodčkov. FimD, označen z modro barvo, je povezan z N-končno domeno preko povezovalne domene obarvane vijolično. FimC je obarvan rumeno in je preko C-končne domene 1 (CTD1) povezan s FimD. FimG, ki je obarvan oranžno, povezuje FimD s pilusno domeno FimH, ki je obarvana zeleno. b) Kristalna struktura kompleksa FimC-FimA, ki je povezan s pilusnimi podenotami fimbrije. FimG, obarvan oranžno, povezuje FimHP s FimD. Prirejeno po (30).

Pomembno vlogo za vezavo na CRD lektina FimH imajo OH skupine α -D-manoze, ki vse razen reducirajočega anomernega kisika na mestu 1 tvorijo številne vodikove vezi in hidrofobne interakcije z aminokislinskimi ostanki Phe1, Asn46, Asp47, Asp54, Gln133, Asn135, Asp140 in Ph142 (Slika 4) (28).



Slika 4. Aminokislinski ostanki so prikazani v obliki paličic, vodikove vezi pa kot prekinjene črte. Prirejeno po (28).

Za vezavo inhibitorja v vezavno mesto na CRD je pomembno, da je aglikonski distančnik zgrajen iz aromatskih obročev, ki so ključnega pomena za izboljšanje afinitete vezave. Tirozinska ostanka na CRD lektina FimH, Tyr48 in Tyr137, s stranskima verigama oblikujeta strukturo, ki jo imenujemo »tirozinska vrata«, ki s tvorbo π - π interakcij z aromatskimi ligandi aglikonskega distančnika manokonjugatov povečajo afiniteto vezave ligandov (Slika 5) (29, 30, 31).



Slika 5. Kristalna struktura adhezina FimH_L. Lektinsko domeno FimH razdelimo na polarni žep, v katerega se veže α -D-manoza z H-vezmi (rdeče obarvano). V tirozinskih vratih (modro) interagirajo aromatski ligandi s Tyr48 in Tyr137 preko π - π interakcij, tvorijo pa se tudi van der Waalsove in hidrofobne interakcije. Prirejeno po (30).

1.4 Izliv farmacije - rezistenca bakterij na protibakterijske učinkovine

Odkritju in hitremu razvoju protibakterijskih učinkovin v 70. letih prejšnjega stoletja je posledično sledil tudi hiter razvoj bakterijske rezistence, ki predstavlja resno grožnjo s pojavom multirezistentnih sevov.

Glavni vzroki odpornosti bakterij so različni:

- pretirana in nepotrebna uporaba protibakterijskih učinkovin
- prekinitev zdravljenja preden je predvidena terapija končana
- velika poraba protibakterijskih učinkovin v prehrambni industriji, v čistilnih sredstvih

- velika poraba protibakterijskih učinkovin v veterini
- uporaba protibakterijskih učinkovin v čiščenju odpadnih voda in neposredni vnos protibakterijskih učinkovin v človeški organizem preko hrani in vode iz okolja (32).

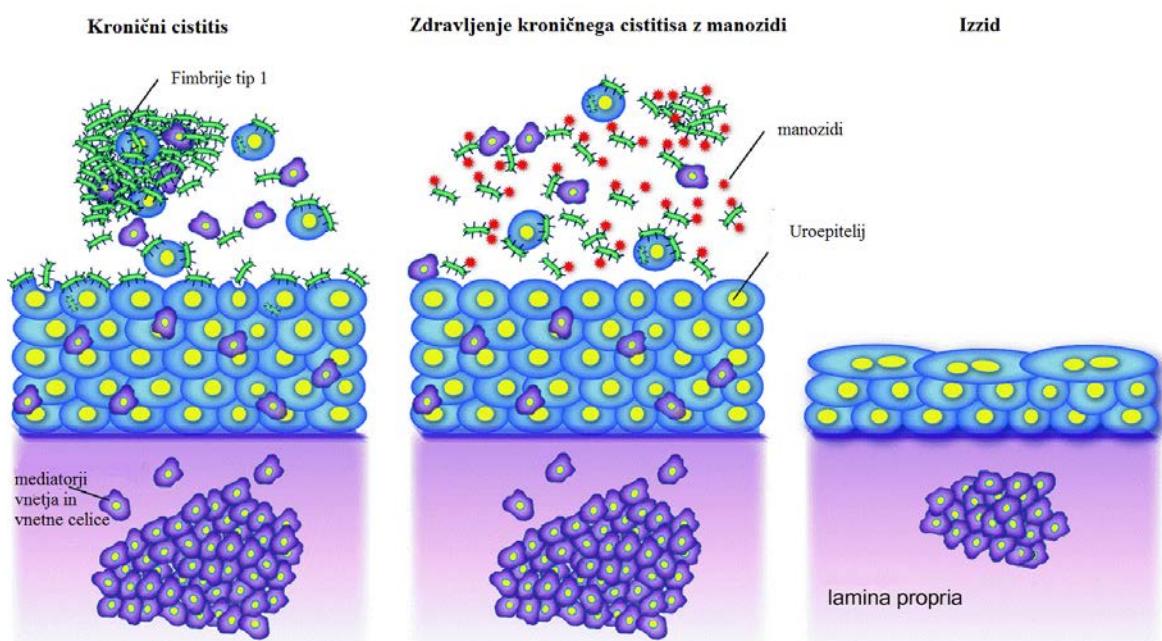
Uporaba protibakterijskih učinkovin ima pogosto tudi svoje neželene učinke, kot so diareja, zaprtje, glavoboli in vaginalne mikoze. Statistika kaže, da je v ZDA 19% pacientov potrebovalo nujno medicinsko pomoč zaradi neželenih učinkov protibakterijskih učinkovin, od česa so bile v največji meri (80%) prisotne alergijske reakcije. V črevesju imamo okoli 2-2,5 kg koristnih bakterij, ki se lahko deloma uničijo pri zdravljenju s protibakterijskimi učinkovinami in s tem odprejo pot razmnoževanju patogenih bakterij ter pojavu prebavnih motenj, diareje, glavobolov in hujšanja. Prav tako se pri ženskah poveča razmnoževanje glivic, predvsem *Candida albicans*, ki inaktivirajo limfocite T pri imunskega odzivu. Pri baktericidnem učinku protibakterijskih učinkovin bakterije izločajo številne eksotoksine in endotoksine, ki lahko izzovejo alergijske reakcije in lahko poškodujejo tkivo. Pri nekaterih protibakterijskih učinkovinah pa je možna tvorba kompleksov s kationi in je tudi zaradi tega njihova uporaba lahko omejena. Zaradi številnih slabosti protibakterijskih učinkovin se pojavlja potreba po iskanju učinkovite antiadhezivne terapije, ki bi pomagala pri preprečevanju in zdravljenju okužb UT (33).

1.5 Antiadhezivna terapija

Kolonizacija bakterij in posledično razvoj okužbe z bakterijami prebavnega trakta, dihal in ustne votline poteka preko adhezije bakterij na tkivo gostitelja, kar jim omogoča daljše zadrževanje v organizmu in izogibanje faktorjem imunskega sistema, bakteriolitičnim encimom in protibakterijskim učinkovinam. Takšne bakterije so v večji meri sposobne sintetizirati hranila, kar jim izboljša in poveča sposobnost preživetja in okužbe gostitelja.

Glede na to, da je adhezija bakterij na gostiteljske celice pogoj za razvoj okužbe, bi lahko bilo potencialno zaviranje tega procesa učinkovit in uspešen način v preprečevanju okužb (Slika 6). Na površini celic gostitelja se nahajajo ogljikohidratni epitopi, ki jih virusi in bakterije prepoznajo in izkoriščajo za kolonizacijo in razvoj infekcije. Derivati ogljikovih hidratov kot antiadhezivi bi lahko bili alternativa klasičnemu zdravljenju z antibiotiki in kemoterapeutiki, ki delujejo bakteriostatično ali baktericidno. Takšne spojine

bi imele številne prednosti, pojav rezistence bakterij bi bil manjši, mutacije adhezinov pri patogenih pa bi neposredno povzročile manjšo sposobnost patogena za adhezijo in invazijo gostitelja. Bistveno je, da antiadhezivi niso baktericidni in je zaradi tega manjša verjetnost nastanka rezistentnih sevov patogenih mikroorganizmov za razliko od baktericidnih spojin, kot so nekateri antibiotiki.



*Slika 6. Princip antiadhezivne terapije - preprečevanje pritrjevanja *E. coli* na uroepitelij gostitelja z zdravljenjem uroinfekcij z manozidi. Prijejeno po (49).*

Vendar se antiadhezivna terapija srečuje s številnimi izviri. Veliko patogenov ima gene, ki kodirajo različne tipe adhezinov, možno pa je tudi, da geni za adhezine mutirajo in se zaradi tega patogenu zmanjša verjetnost, da se veže na glikoprotein gostitelja. Dosedanje študije so pokazale, da se α -D-manopiranoza in metil- α -D-manopiranozid vežeta na CRD/FimH_L ($K_d=2,3 \mu\text{M}$) in povzročata inhibicijo aglutinacije kvasovk, povzročene z *E. coli* ($IC_{50}=56 \text{ nM}$). Sintetizirani in *in vivo* okarakterizirani so bili tudi derivati *n*-heptil- α -D-manopiranozida ($IC_{50}=65 \text{ nM}$), bifenilni α -D-manopiranozidi ($IC_{50}=6,7-17 \text{ nM}$), indolin- α -D-manopiranozidi ($IC_{50}=20 \text{ nM}$) in drugi. Vrednosti IC_{50} za FimH so določali z metodo kompetitivne vezave liganda v vezavno mesto lektinske domene FimH (34).

1.6 Potencialni antagonisti lektinskega receptorja FimH

Do sedaj so bili sintetizirani in biološko vrednoteni številni C-, N- in O- manozidi kot potencialni antagonisti FimH. Večina med njimi je O-glikozidov, saj so sintezno najlažje dostopni, ker je stereoselektivna tvorba O-glikozidne vezi v α -konfiguraciji dobro opisana metoda, ki poteka z dobrim izkoristkom. Nasprotno je znanih C-glikozidov (Slika 7) in N-glikozidov malo, čeprav verjetno nudijo večjo stabilnost, vendar so sintezne možnosti omejene. (31, 34, 35, 36).

Slika 7. Serija C-manozidov z etilnim in propilnim distančnikom, ki so jih pripravili Ruyck in sodelavci. Pritejeno po (34).

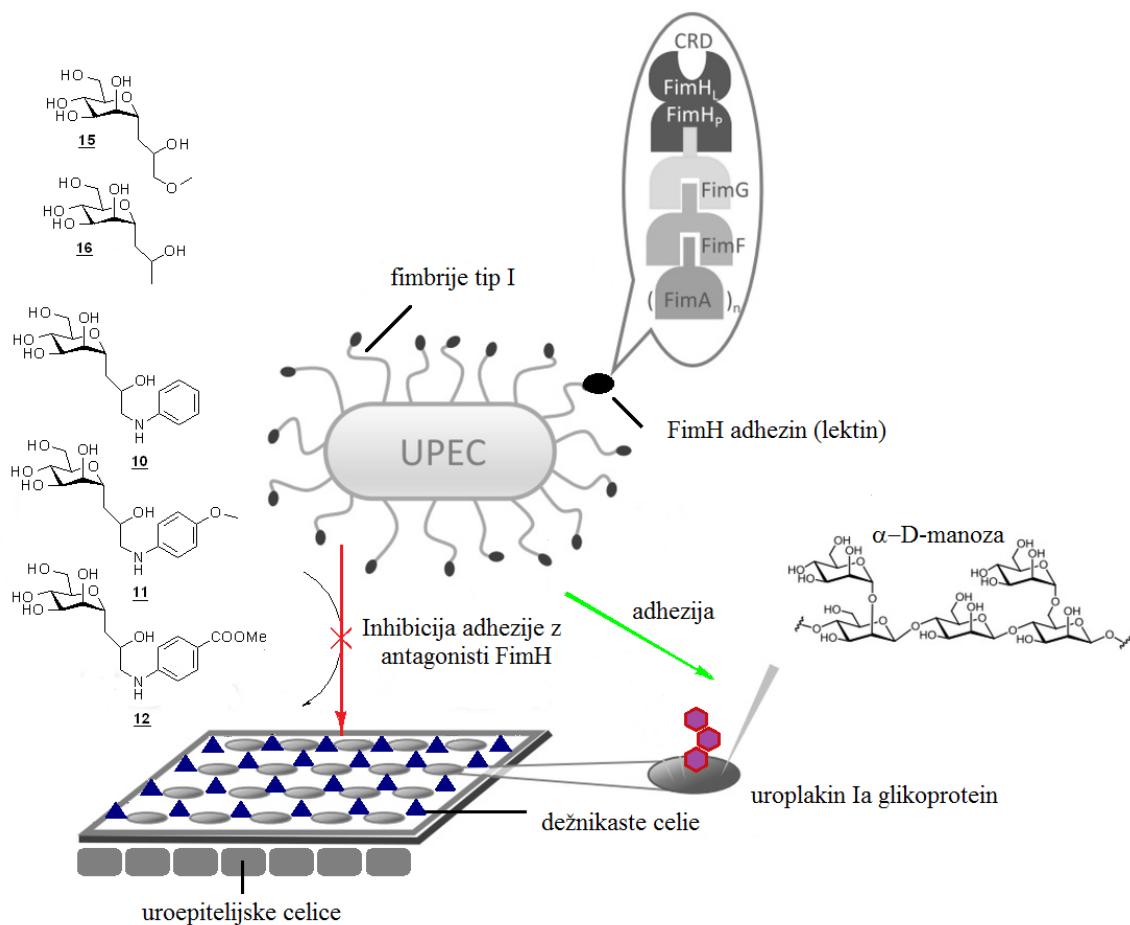
Mydock-McGrane je s sodelavci objavil študijo, v kateri so načrtovali, sintetizirali in ovrednotili N-, S- in C-manozide kot potencialne antagoniste FimH_L. Sinteza slednjih je temeljila na novi, stereoselektivni sintezni poti z namenom tvorbe biarilnih C-manozidnih antagonistov FimH_L, s katero so želeli sintetizirati predvsem spojine s hidroksilno skupino v *R* konfiguraciji na distančniku, ki povezuje glikon in aglikon, saj so *R*-hidroksi analogi izkazali bistveno močnejše aktivnosti kot *S*-hidroksi izomeri. N- in S-manozidi so pokazali šibkejše aktivnosti (4 μ M) kot obstoječi O-manozidi, medtem ko so C-manozidi v *in vivo* študijah na miših zaradi stabilnosti C-glikozidne vezi v prebavnem sistemu pokazali bistveno boljše farmakokinetične lastnosti od analogih O-manozidov. Zaključili so, da je vezava C-manozidov v FimH_L stereospecifično pogojena, saj je *R*-hidroksi izomer pokazal 60-kratno povečanje afinitete do vezavnega mesta v primerjavi s *S*-izomerom (Slika 8). Ker so paralelno sintetizirali tudi manozide z metilaminskim in triazolskim distančnikom, so ugotovili, da le-ti ne tvorijo ugodnih interakcij z vezavnim mestom FimH, saj so imeli šibko antagonistično aktivnost. (37).

Slika 8. C-manozidi, ki so jih sintetizirali Mydock-McGrane s sodelavci. R-hidroksi izomer je pokazal 60-krat večjo učinkovitost v razgradnji biofilma kot S-hidroksi izomer. Prijeno po (37).

Za načrtovanje antagonistov FimH je potrebno poznavanje tridimensinalne strukture lektinske domene receptorja FimH, ki specifično veže α -D-manopiranozide, ki so sestavni del kompleksnih naravno prisotnih N-glikanov na površini proteinov. Hidrofobni aglikon mora biti povezan z D-manozo v α -anomerni konfiguraciji, kar predstavlja enega od sinteznih izzivov pri pripravi antagonistov. Študije so pokazale, da se β -D-manokonjugati zaradi steričnih ovir ne morejo vezati v vezavno mesto lektina FimH (35, 38, 39).

2. NAMEN DELA

Cilj eksperimentalnega dela magistrske naloge bo načrtovanje in sinteza novih potencialnih antagonistov FimH s C-glikozidno vezjo, ki bodo vsebovali α -D-manozo in hidrofobni aglikon, ki je sestavljen iz distančnika in aromatskega obroča (Slika 9). S pomočjo uvedbe aromatskega obroča derovatov anilina bomo poskušali s tvorbo π - π interakcij s Tyr48 in Tyr137 v tirozinskih vratih FimH izboljšati afiniteto spojin do lektina in s tem posledično preprečiti adhezijo UPEC na uroepitelij (Slika 9). Pripravili bomo C-glikozidne analoge obstoječih spojin, s čimer želimo izboljšati hidrolitsko stabilnost obstoječih O-glikozidov. Testirali bomo tudi antagonistično aktivnost končnih sintetiziranih spojin na rekombinantnem FimH in rezultate uporabili v naslednjem ciklu načrtovanja in sinteze.



Slika 9. Princip antiadhezivnega delovanja z načrtovanimi antagonistimi FimH. Uroplakin Ia je glikoprotein, ki je manoziliran z α -D-manozo (obarvana vijolično rdeče). Na konicah fimbrij I se nahaja adhezin FimH, ki s svojo lektinsko domeno FimH_L specifično prepozna manozo na uroplakinu Ia. Po vezavi α -D-manoze v vezavno mesto FimH pride do

pritrjevanja E. coli na površino uroepitelija. Potencialni antagonisti FimH tekmujejo z manozo na uroplakinu Ia za vezavna mesta na FimH_L in tako preprečijo pritrjevanje E. coli na stene mehurja.

Načrtovane spojine bomo sintetizirali, tako kot je prikazano v *Shemi 1*. Začeli bomo s Fisherjevo glikozilacijo, s katero bomo uvedli metilno skupino na anomerno OH skupino. Ker je manzoa polifunkcionalna spojina, bomo vse OH skupine, razen anomerne, zaščitili bodisi v obliki benzilnega etra bodisi v obliki acetata. Sledila bo stereoselektivna C-glikozilacija ob prisotnosti Lewisove kisline in nato oksidacija alkena do epoksidov s Prilezhaevou reakcijo. Dobljeni epoksid bomo potem odpirali z različnimi nukleofili, predvsem z anilini. Na koncu bo sledila še odstranitev zaščitnih skupin (40).

Shema 1. Reagenti in pogoji. a) metanol, Amberlite 120 IR, 75 °C, 12 h; b) (i) *N,O*-bistrifluoroacetamid, acetonitril, 80 °C, 2,5 h; (ii) aliltrimetilsilan, trimetilsilil trifluorometansulfonat, sobna T, 24 h; c) piridin, acetanhidrid, sobna T, 24 h; d) *m*-kloroperoksibenzojska kislina, diklorometan, 40 °C, 3 h; e) anilin, propan-2-ol, 80 °C, 24 h; ali (MW) dioksan, anilin, kalcijev triflat, 120 °C, 15 bar, 30 W, 3 h; f) propan-2-ol, *p*-metoksianilin, 80 °C, 24 h; ali (MW) dioksan, *p*-metoksianilin, kalcijev triflat, 120 °C, 15 bar, 30 W, 3 h; ali (MW) dioksan, metil 4-aminobenzoat, kalcijev triflat, 6 h, 120 °C, 15 bar, 30 W; h) brezvodni metanol, natrijev metoksid, sobna T, čez noč; i) (i) *N,N*-dimetilformamid, natrijev hidrid, benzilbromid, 0 °C, 2,5 h; (ii) sobna T, čez noč; j) (i) acetonitril, aliltrimetilsilan, trimetilsilil trifluorometansulfonat; (ii) sobna T, 24 h; k) H₂, Pd/C, ocetna kislina, etanol, sobna T, čez noč.

3. MATERIALI IN METODE

Laboratorijska oprema:

Laboratorij na Katedri za farmacevtsko kemijo je bil opremljen z naslednjo laboratorijsko opremo, ki smo jo uporabljali pri eksperimentalnem delu:

- magnetno mešalo IKA® RCT basic IKAMAG Magnetic stirrer
- tehtnica METTLER®TOLEDO PB403-S/FACT Precision Balance, Sartorius Max 620 g
- UV svetilka CAMAG UV-cabinet II ($\lambda=254$ nm/366 nm)
- rotavapor BÜCHI ®type R-200
- ultrazvočna kadička
- hibridna vakuumnska črpalka TRIVAC D88
- mikrovalovni reaktor CEM Discover S System, (CEM Corporation, USA).

Reagenti in topila:

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili reagente in topila proizvajalcev Apollo Scientific, Acros Organics, TCI, Fluka, Panreac, Sigma Aldrich in Merck. Brezvodna topila so bila pripravljena tik pred uporabo v skladu z literurnimi postopki. Argon in vodik smo uporabljali iz jeklenk, ki jih polni Messer.

Kromatografske metode:

1. Tankoplastna kromatografija:

To metodo smo uporabljali za spremljanje poteka reakcij in pri kolonski kromatografiji za določanje primerne mobilne faze ter za spremljanje čistote zbranih frakcij. Kot stacionarno fazo smo uporabljali plošče Merck Silica Gel 60 F₂₅₄ z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodatkom fluorescenčnega označevalca, uporabljeni mobilni faze so navedene v posameznih sinteznih postopkih. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščicah smo uporabljali UV lučko valovne dolžine 254 nm in orositvena reagenta fosfomolibdensko kislino ter bromkrezolno zeleno.

2. Kolonska kromatografija:

Surove produkte smo čistili s »flash« kolonsko kromatografijo, t.j. kolonska kromatografija, pri kateri pospešimo pretok mobilne faze z zračnim nadtlakom. Uporabljali smo steklene kolone različnih velikosti v odvisnosti od količine zmesi za ločevanje in kot stacionarno fazo silikagel Merck Silica Gel 60 z velikostjo delcev 0,040 – 0,063 mm. Mobilne faze so navedene v posameznih sinteznih postopkih.

Raztopine kot mobilne faze (MF) uporabljeni za TPK in kolonsko kromatografijo so navedene v Preglednici 1.

Preglednica 1. Mobilne faze uporabljeni za tankoplastno in kolonsko kromatografijo

mobilna faza	topilo 1	topilo 2	topilo 1: topilo2
A	EtOAc	heksan	1:1
B	EtOAC	heksan	1:2
C	EtOAc	heksan	1:4
D	EtOAc	heksan	2:1
E	EtOAc	metanol	4:1
F	EtOAc	metanol	15:1

Orositveni reagenti: fosfomolibdat in ninhidrin

Spektroskopske metode:

1. Jedrska magnetna resonanca (NMR):

¹H-NMR spektre sintetiziranih spojin smo posneli na Bruker Avance III 400 MHz spektrometu na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v devteriranih topilih CDCl₃, DMSO-d₆ ali CD₃OD. Kot interni standard smo uporabljali tetrametilsilan (TMS). Spektre smo obdelali s programom MestRe-C 4.7.0 razvijalca Masterlab Research S. L.

2. Masna spektrometrija (MS):

Masni spektri so bili posneti na masnem spektrometu VG-Analytical AutoSpec Q s tehniko ESI v Centru za masno spektrometrijo na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

3. Infrardeča spektrometrija (IR):

Spektre IR smo posneli na spektrometru Nicolet Nexus 470 FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Računalniška programska oprema:

Strukture spojin in reakcijske sheme smo narisali v programu ChemBioDraw Ultra 12, Cambridge Soft. Znanstvene članke smo iskali s pomočjo podatkovnih baz SciFinder in PubMed.

Mikrovalovni reaktor

Reakcije z mikrovalovi smo izvajali v mikrovalovnem reaktorju proizvajalca CEM Discover S System, (CEM Corporation, USA). Temperaturni razpon (50-300 °C); moč 0-300 W pri 2,45 MHz; opremljen z magnetnim mešalom.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Sinteza metil- α -D-manopiranozida

REAKCIJA:

POSTOPEK:

V bučko, prepihano z argonom, smo natehtali 10,055 g (0,558 mol) α -D-(+)-manoze in jo raztopili v 200 mL brezvodnega metanola. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo reakcijski zmesi dodali 10 g kislega ionskega izmenjevalca Amberlite IR 120, pri čemer je nastala suspenzija rahlo oranžne barve. Amberlite IR 120 smo pred dodatkom v reakcijsko zmes sprali z metanolom. Reakcijo smo pustili potekati čez noč pod refluksom pri 75 °C v argonovi atmosferi. Potek reakcije smo preverjali s TPK kromatogramom (MF: CH₃CN/MeOH:H₂O=10:1:1). Po 12 urah mešanja na oljni kopeli smo reakcijsko zmes ohladili, smolo odfiltrirali s presesavanjem in še dodatno spirali z MeOH (3 × 10 mL). Filtratu smo uparili topilo pod znižanim tlakom in ga dodatno sušili čez noč v sušilniku pri 60 °C. Dobili smo 10,880 g spojine **1**, ki smo jo brez dodatnega čiščenja uporabili v naslednji stopnji.

PRODUKT:

Elementna sestava: C₇H₁₄O₆

R_f: 0,6 (EA/HEX=1/2)

Izgled: beli do svetlorumeni prah

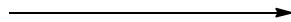
OR: fosfomolibdat

Izkoristek: 99%

M_r: 194,182 g/mol

MERITVE:

¹H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 3,22-3,27 (m, 4H, <u>H</u> -manoza, CH ₃), 3,38-3,48 (m, 4H, 4 x <u>H</u> -manoza), 3,59 (ddd, 1H, J ₁ =4,6 Hz, J ₂ =3,4 Hz, J ₃ =1,7 Hz, <u>H</u> -manoza), 3,66 (ddd, 1H, J ₁ =11,6 Hz, J ₂ =6,0 Hz, J ₃ =2,1 Hz, <u>H</u> -manoza), 4,47 (t, 1H, J=6,0 Hz, <u>H</u> -manoza), 4,49 (d, 1H, J=1,6 Hz, <u>H</u> -manoza), 4,57 (d, 1H, J=6,0 Hz, <u>H</u> -manoza), 4,72 (dd, 2H, J ₁ =4,9 Hz, J ₂ =2,5 Hz, <u>H</u> -manoza) ppm
---	--

3.2 Sinteza metil-2,3,4,6-(tetra-*O*-benzil)-α-D-manopiranozida**REAKCIJA:****POSTOPEK:**

V 500 mL dvogrlo bučko, prepahano z argonom, smo natehtali 8,442 g (0,044 mol) spojine **1** in jo raztopili v približno 150 mL brezvodnega *N,N*-dimetilformamida, ki smo ga predhodno pripravili s sušenjem nad molekularnimi siti. Mešali smo na magnetnem mešalu, dokler se spojina **1** ni popolnoma raztopila, in potem počasi po delih dodajali na konici plastične spatule 10,8 g (0,27 mol) 60% suspenzije natrijevega hidrida v mineralnem olju. Zmes se je penila in segrela, zato smo reakcijo izvajali s hlajenjem na vodni kopeli. Po dodanem natrijevem hidridu smo reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi približno 2,5 ure. S kapalnikom smo dodali 25 mL (0,21 mol) benzil bromida in pustili reagirati čez noč pri sobni temperaturi na vodni kopeli. Potek reakcije smo spremljali s TPK (MF: EA/HEX=1/2). Reakcijski zmesi smo nato dodali 100 mL dietiletra in zmes prenesli v 500 mL lij ločnik. Dodali smo 200 mL prečiščene vode, ločili fazi in potem vodno fazo ekstrahirali še z 2×100 mL dietiletra. Združene organske faze smo prenesli v 500 mL lij ločnik in sprali z 3×100 mL nasičene raztopine NaHCO₃ in 3×100 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in topilo

uparili pod znižanim tlakom. Tako smo dobili 25,473 g surovega produkta sivo bele barve, ki smo ga čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EA/HEX=1/2). Dobili smo 16,693 g spojine **2**. Sintezo smo nadaljevali z tvorbo alila in sintezo spojine **3**.

PRODUKT:

Elementna sestava: C₃₅H₃₈O₆ **R_f:** 0,45 (EA/HEX=1/2)

Izgled: svetlorumeno olje **OR:** fosfomolibdat

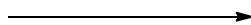
Izkoristek: 66,1% **M_r:** 554,68

MERITVE:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 3,36 (s, 3H, CH ₃), 3,75-3,85 (m, 4H, 4 x H-manoza), 3,92 (dd, 1H, J ₁ =3,2 Hz, J ₂ =9,1 Hz, H-manoza), 4,02 (t, 1H, J=9,3 Hz, H-manoza), 4,55 (d, 1H, J=10,6 Hz, H-manoza), 4,57 (d, 1H, J=12,2 Hz, CHH-O-Ar), 4,65 (s, 2H, Ar-O-CH ₂), 4,71 (d, 1H, J=12,3 Hz, Ar-O-CH-H), 4,78 (dd, 3H, J ₁ =2,1 Hz, J ₂ =16,5 Hz, Ar-O-CH ₂ , Ar-O-CH-H), 4,93 (d, 1H, J=10,9 Hz, Ar-O-CH-H), 7,19-7,20 (m, 2H, 2 x Ar-H), 7,26-7,41 (m, 18H, 18 x Ar-H) ppm
---	---

3.3 Sinteza 3-(tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranozil)propena

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V bučko, ki smo jo prepihalo z argonom, smo natehtali 8,798 g (1,586 mmol) spojine **2** ter jo raztopili v 100 mL brezvodnega acetonitrila. Sistem smo zaprli septumom in z brizgo dodali 14,4 mL (17,625 g, 0,079 mol) TMSOTf. Po približno pol ure mešanja smo dodali še 5 mL (3,625 g, 0,032 mol) aliltrimetilsilana in pustili mešati čez noč pri sobni

temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s TPK (MF: EA/HEX=1/2). V reakcijsko zmes smo nato dodali 20 mL nasičene raztopine NaHCO₃ in acetonitril uparili pod znižanim tlakom. Zaostalo vodno fazo smo ekstrahirali z 3 × 20 mL diklorometana. Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili do suhega. Tako smo dobili 27,343 g surovega produkta, ki smo ga čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EA/HEX=1/2), s katero smo pridobili 4,22 g spojine **3**, ki smo jo uporabili za sintezo tvorbe epoksida.

Elementna sestava: C₃₇H₄₀O₅

R_f: 0,58 (EA/HEX=1/2)

Izgled: svetlorumeno olje

OR: fosfomolibdat

Izkoristek: 49%

M_r: 564,72

MERITVE:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 2,29-2,45 (m, 2H, CH ₂), 3,66 (dd, 1H, J ₁ =3,2 Hz, J ₂ =4,8 Hz, H-manoza), 3,74 (dd, 1H, J ₁ =3,6 Hz, J ₂ =10,3 Hz, H-manoza), 3,78-3,92 (m, 4H, H-manoza), 4,08 (ddd, 1H, J ₁ =4,8 Hz, J ₂ =6,2 Hz, J ₃ =7,6 Hz, H-manoza), 4,53-4,66 (m, 7H, 3 x Ar-O- CH ₂ , Ar-O-CHH), 4,74 (d, 1H, J=11,4 Hz, Ar-O-CHH), 5,02- 5,05 (m, 1H, -CH-CHH), 5,06-5,10 (m, 1H, -CH-CHH), 5,74- 5,85 (m, 1H, -CH-CH ₂), 7,22-7,26 (m, 2H, 2 x Ar-H), 7,30- 7,45 (m, 18H, 18 x Ar-H) ppm
---	--

3.4 Sinteza Sinteza 1',2'-epoksi-3'-(tetra-O-benzil- α -D-manopiranozil)propana

REAKCIJA:



POSTOPEK:

Bučko smo prepihali z argonom, vanjo natehtali 4,22 g spojine **3** (7,47 mmol) in jo raztoplili v 40 mL CH₂Cl₂. Dodali smo 2,00 g (8,97 mmol) 77% disperzije mCPBA in segrevali pod refluksom približno 2 uri. Potek reakcije smo preverjali s TPK (MF:

EA/HEX=1/2). Po približno 2,5 ure segrevanja smo dodali še 1,70 g (7,76 mmol) disperzije mCPBA in segrevali še dodatno uro. Izolacijo smo izvajali tako, da smo najprej organsko fazo sprali z 2×40 mL 1 M NaOH in nato z 2×40 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom, surov produkt (4,9 g) pa čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EA/HEX= 1/4). Dobili smo 3,293 g čiste spojine **4**.

PRODUKT:

Elementna sestava: $\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{O}_6$	R_f: 0,25 (EA/HEX=1/2)
Izgled: svetlorumeno olje	OR: bromkrezolno zeleno
Izkoristek: 76%	M_r: 580, 71 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3)	δ 1,67-2,07 (m, 2H, CH_2), 2,51 (ddd, 1H, $J_1=2,8$ Hz, $J_2=5,1$ Hz, $J_3=7,8$ Hz, <u>H</u> -epoksid), 2,71-2,81 (m, 1H, <u>H</u> -epoksid), 3,01-3,11 (m, 1H, <u>H</u> -epoksid), 3,64-4,01 (m, 6H, 6 x <u>H</u> -manoza), 4,11-4,31 (m, 1H, <u>H</u> -manoza), 4,54-4,72 (m, 8H, 4 x Ar-O- CH_2), 7,21-7,45 (m, 20H, 20 x Ar- <u>H</u>) ppm
HR-MS (ESI)	Izračunan 581,2878; izmerjen 581,2910

3.5.1 Poskus sinteze 2-hidroksi-3-(tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranozil)propoksi-1-naftola

PREDVIDENA REAKCIJA:

REAKCIJA:**POSTOPEK:**Raztopina 1:

Najprej smo pripravili natrijev etilat. V suho bučko, prepohano z argonom, smo natehtali 64 mg (2,79 mmol) natrija, ga raztopili v 5 mL brezvodnega etanola in pustili mešati pri sobni T, dokler ni reagiral ves natrij. V dobljeni raztopini natrijevega etilata smo suspendirali 403,2 mg (2,79 mmol) 1-naftola in mešali približno 15 minut. Raztopina se je obarvala rahlo zeleno.

Raztopina 2:

V bučko, prepohano z argonom, smo natehtali 1,083 g (1,87 mmol) spojine **4** in jo raztopili v 2 mL brezvodnega etanola.

Raztopini 1 in 2 smo nato združili ter pustili mešati pod refluksom čez noč. Potek reakcije smo spremljali s TPK (MF: EA/HEX=1/2). Zmesi smo nato uparili topilo, preostanek pa raztopili v 40 mL etilacetata. Organsko fazo smo spirali z 2×40 mL 10% citronske kisline in 2×40 mL nasičene raztopine NaHCO_3 . Organsko fazo smo sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Po čiščenju 1,316 g surovega produkta s kolonsko kromatografijo (MF: EA/HEX=1/4) smo dobili 104 mg spojine **5**.

PRODUKT:**Elementna sestava:** $\text{C}_{39}\text{H}_{46}\text{O}_7$ **R_f:** 0,36 (EA/HEX=1/2)**Izgled:** belo sivi kristali**OR:** fosfomolibdat**Izkoristek:** 19%**M_r:** 626,78 g/mol

MERITVE:

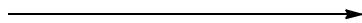
¹H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1,07-1,10 (t, 3H, <i>J</i> = 7,0 Hz, -CH ₃), 1,32-1,88 (m, 2H), 3,24-3,45 (m, 4H), 3,58-3,85 (m, 7H), 4,13-4,23 (m, 1H), 4,45-4,72 (m, 9H), 7,21-7,37 (m, 20H, 20 x Ar-H) ppm
MS (ESI⁺ Na)	Izračunan 649, 42 izmerjen 649,41

3.5.2 Sinteza 2-hidroksi-3-α-D-manopiranozilpropana**REAKCIJA:****POSTOPEK:**

Spojino **5** (1,50 g, 2,35 mmol) smo raztopili v 5 mL brezvodnega MeOH. V raztopino smo dodali 3 kapljice ocetne kisline in bučko prepihali z argonom. Potem smo dodali 10% Pd/C (16 mg). Po dodatku katalizatorja smo reakcijsko zmes 30 minut prepihavali z vodikom, nato pa smo na bučko namestili balon z vodikom in mešali čez noč pri sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s TPK. Odfiltrirali smo katalizator skozi Celite 545 in topilo uparili pod znižanim tlakom. NMR in MS spektra surovega produkta sta pokazala, da izolirana spojina ni naš željen produkt, ampak se je pri katalitskem hidrogenranju odprl obroč epoksida, pri čemer smo dobili 523 mg spojine **6**.

PRODUKT:**Elementna sestava:** C₁₁H₂₂O₇**Rf:** 0 (EA/HEX=1/2)**Izgled:** rumeno olje**OR:** fosfomolibdat**Izkoristek:** 73%**M_r:** 222,11 g/mol**MERITVE:**

¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ 1,22 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 3H), 1,35-1,51 (m, 1H), 1,59 (ddd, <i>J</i> ₁ = 14,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 6,1 Hz, <i>J</i> ₃ = 4,9 Hz, 1H), 1,82-2,05 (m, 3H), 3,30-4,24 (m, 12H), 7,29-7,09 (m, 1H) ppm
MS (ESI⁺ Na)	Izračunan 245,11 ; izmerjen 245,12.

[3.6 Sinteza 3-α-D-manopiranozilpropena](#)**REAKCIJA:****POSTOPEK:**

Dvogrlo bučko smo opremili s septumom in povratnim hladilnikom s klorkalcijevo cevko, prepihali z argonom, vanjo natehtali 10,88 g (0,0608 mol) spojine **1** in jo suspendirali v 40 mL brezvodnega acetonitrila, ki smo ga predhodno pripravili s sušenjem nad molekularnimi siti. Suspenziji smo skozi stransko grlo z brizgo dodali 11,072 mL (0,0456 mol) BSTFA in segrevali pri 80 °C na oljni kopeli približno 2,5 ur. Dvogrlo bučko smo odstranili z oljne kopeli in jo postavili na ledeno kopel ter jo postopoma ohladili. Pri 0 °C smo skozi septum z brizgo dodali 55 mL (0,304 mol) TMSOTf in zatem še 48,31 mL (0,304 mol) aliltrimetilsilana. Spojina **1** se je po dodatku reagentov takoj raztopila, pri čemer je nastala rumena raztopina. Reakcijo smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi, sistem pa smo zaprli z septumom. Potek reakcije smo preverjali s TPK (MF: EA/MeOH=4/1). Po približno 12 urah mešanja smo reakcijo ustavili in nadaljevali z

izolacijo. Reakcijsko zmes smo na ledeni kopeli naalkalili do pH 7 s trdnim NaOH. Vodno in organsko fazo smo uparili pri znižanem tlaku, pri čemer smo dobili rahlo rumen surov produkt, ki smo ga čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EA/MeOH=15/1 in EA/MeOH=8/1). Po čiščenju smo dobili 5,313 g belega prahu spojine **7**.

PRODUKT:

Elementna sestava: C₉H₁₆O₅

R_f: 0,30 (EA/MeOH=4/1)

Izgled: bela trdna snov

OR: fosfomolibdat

Izkoristek: 46%

M_r: 204,22 g/mol

MERITVE:

¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ 2,32-2,42 (m, 1H), 2,46-2,66 (m, 1H), 3,44-3,52 (m, 1H), 3,54-3,88 (m, 1H), 3,93 (ddd, <i>J</i> ₁ = 8,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 6,6 Hz, <i>J</i> ₃ = 2,5 Hz, 1H), 5,09 (m, 1H), 5,15 (m, 1H), 5,88 (m, 1H) ppm
---	--

3.7 Sinteza 3-(tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranozil)propena

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V bučko smo natehtali 5,313 g (0,0342 mol) spojine **7** in jo raztopili v 200 mL brezvodnega piridina, ki smo ga predhodno pripravili s sušenjem nad molekularnimi siti. Reakcijsko zmes smo med mešanjem na ledeni kopeli ohladili na 0 °C in s kapalnikom previdno po kapljicah dodali 13,3 mL (0,14 mol) acetanhidrida. Po približno pol ure smo po kapljicah dodali še dodatnih 3,5 mL (0,036 mol) acetanhidrida. Kapalnik smo odstranili in reakcijo pustili potekati čez noč pri sobni temperaturi v argonovi atmosferi. Potek reakcije smo preverjali s TPK (MF: EA/HEX=1/1). V reakcijsko zmes smo najprej dodali

100 mL EA in vse skupaj prenesli v 500 mL lij ločnik. Organsko fazo smo spirali s 3×100 mL nasičene raztopine NaHCO_3 , nato s 3×100 mL 1 M HCl. Organsko fazo smo sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Tako smo dobili 2,28 g spojine **8**, svetlorumenega olja, ki smo ga uporabili za nadaljnjo oksidacijo alila in tvorbo epoksida.

PRODUKT:

Elementna sestava: $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_9$

R_f: 0,28 (EA/HEX=1/1)

Izgled: svetlorumeno olje

OR: fosfomolibdat

Izkoristek: 28%

M_r: 372,37 g/mol

MERITVE:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3)	δ 2,01 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 3,99 (ddd, $J_1 = 9,4$ Hz, $J_2 = 5,4$ Hz, $J_3 = 2,4$ Hz, 1H), 4,10-4,18 (m, 2H), 4,31 (dd, 1H, $J_1 = 12,2$ Hz, $J_2 = 5,4$ Hz,), 4,74 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H), 5,22-5,37 (m, 1H) ppm
HR-MS (ESI⁺)	Izračunan 373,1498; izmerjen 373,1499.

3.8 Sinteza 1',2'-epoksi-3'-(tetra-O-acetyl- α -D-manopiranozil)propana

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V bučko, ki smo jo prepihalo z argonom, smo natehtali 2,28 g (6,127 mmol) spojine **8**, jo raztopili v 15 mL diklorometana in refluktirali približno pol ure, dokler se oljasta spojina **8** ni popolnoma raztopila. Bučko smo opremili s povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko. V raztopino smo dodali 2,74 g (12,2 mmol) 77% disperzije mCPBA in refluktirali. Potek oksidacije smo spremljali s TPK (MF: EA/HEX=1/1) in po približno 2,5 urah smo

dodali še 0,526 g (3,05 mmol) mCPBA. Po približno 3 urah segrevanja smo ustavili reakcijo. Reakcijsko zmes smo ohladili do sobne temperature in uparili topilo pri znižanem tlaku. Dobili smo 2,58 g surovega produkta, ki smo ga čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EA/HEX=1/1). Dobili smo 1,60 g spojine **9**.

PRODUKT:

Elementna sestava: C₁₇H₂₄O₁₀

R_f: 0,28 (EA/HEX=1/1)

Izgled: svetlorumeno olje

OR: bromkrezol zeleno

Izkoristek: 67 %

M_r: 388,37 g/mol

MERITVE:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 1,68 (ddd, J ₁ = 14,7 Hz, J ₂ = 7,1 Hz, J ₃ = 4,2 Hz, 1H), 1,96 (m, 1H), 2,06-2,16 (m, 12H), 2,56-2,60 (m, 1H), 2,79-2,87 (m, 1H), 3,04-3,11 (m, 1H), 3,94-4,03 (m, 1H), 4,12-4,27 (m, 2H), 4,41-4,49 (m, 1H), 5,14-5,29 (m, 3H) ppm.
HR-MS (ESI)	Izračunan 389,1443; izmerjen 389,1448.

3.9 Sinteza 1-(tetra-O-acetyl-α-D-manopiranozil)-3-(fenilamino)propan-2-ola

REAKCIJA:



METODA A: klasična sinteza

V bučko smo natehtali 110 mg (2,83 mmol) spojine **9** in jo raztopili v 3 mL izopropanola. Potem smo dodali še 0,039 mL (0,34 mmol) anilina, reakcijsko zmes prepihali argonom in jo opremili s povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko ter refluktirali čez noč. Potek reakcije smo spremljali s TPK (MF: EA/HEX=2/1). Nato smo uparili izopropanol in surov

produkt čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EA/HEX=1/2). Dobili smo 123 mg spojine **10**.

PRODUKT:

Elementna sestava C₂₃H₃₁NO₁₀

R_f: 0,35 (EA/HEX=2/1)

Izgled: svetlorumeno olje

OR: fosfomolibdat

Izkoristek: 90%

M_r: 481,49 g/mol

METODA B: postopek z mikrovalovi

V mikrovalovni reaktor smo natehtali 117 mg (0,301 mmol) spojine **9** in jo raztopili v 2 mL dioksana. Z avtomatsko pipeto smo dodali 0,04 mL anilina (4,9 mmol) in na konici spatule katalizator kalcijev triflat. Reakcijsko zmes smo mešali in segrevali v mikrovalovnem reaktorju 2 uri pri temperaturi 120 °C, tlaku 15 bar in moči 300 W. Potek reakcije smo spremljali s TPK (MF: EA/HEX=1/1). Dioksan smo uparili pod znižanim tlakom, surov produkt pa smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EA/HEX=1/2, nato EA). Dobili smo 117 mg čiste spojine **10**.

Izkoristek: 80,6%

MERITVE:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 1,71-1,85 (m, 2H), 2,05-2,13 (m, 12 H), 3,11-3,21 (m, 1H), 3,28-3,33 (m, 1H), 3,95-4,01 (m, 1H), 4,04-4,12 (m, 1H), 4,26-4,33 (m, 1H), 4,44 (dd, J ₁ = 12,0 Hz, J ₂ = 8,1 Hz, 0,5H), 4,75 (dd, J ₁ = 12,7 Hz, J ₂ = 8,6 Hz, 0,5H), 5,06-5,16 (m, 2H), 5,25-5,31 (m, 1H), 6,81-6,90 (m, 3H, Ar-H), 7,22-7,27 (m, 2H, Ar-H) ppm.
---	---

3.10 Sinteza 1-(tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranozil)-3-((4-metoksifenil)amino)propan-2-ola

REAKCIJA:



METODA A - klasična sinteza

V bučko smo natehtali 100 mg (0,257 mmol) spojine **6** in jo raztopili v 3 mL izopropanola. Potem smo dodali še 38 mg 4-metoksianilina (0,309 mmol), reakcijsko zmes prepihali argonom in jo opremili s povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko ter refluktirali čez noč. Nato smo uparili izopropanol in surov produkt čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EA/HEX=1/2). Dobili smo 64 mg spojine **11**.

PRODUKT:

Elementna sestava: C₂₄H₃₃NO₁₁ **R_f:** 0,45 (EA/HEX=1/2).

Izgled: olje jantarne barve **OR:** fosfomolibdat

Izkoristek: 37,6% **M_r:** 511,52 g/mol

METODA B:

V mikrovalovni reaktor smo natehtali 100 mg (0,257 mmol) spojine **9** in jo raztopili v 2 mL dioksan. Potem smo dodali 38 mg 4-metoksianilina (0,309 mmol) in na konici spatule katalizator kalcijev triflat. Reakcijsko zmes smo mešali in segrevali v mikrovalovnem reaktorju 2 uri pri temperaturi 120 °C, tlaku 15 bar in moči 300 W. Potek reakcije smo spremljali s TPK (MF: EA/HEX=1/1). Dioksan smo uparili pod znižanim tlakom, surov produkt pa smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EA/HEX=1/2, nato EA). Dobili smo 53 mg čiste spojine **11**.

Izkoristek: 48,8%

MERITVE:

¹H-NMR (400 MHz, CH ₃ OD)	δ 1,74-1,84 (m, 2H), 2,06-2,13 (m, 12 H), 3,08-3,18 (m, 1H), 3,25-3,30 (m, 1H), 3,79 (s, 3H, OCH ₃), 3,95-4,02 (m, 1H), 4,06-4,17 (m, 1H), 4,25-4,33 (m, 1H), 4,44 (dd, <i>J</i> ₁ = 12,0 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,0 Hz, 0,5H), 4,75 (dd, <i>J</i> ₁ = 11,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,4 Hz, 0,5H), 5,06-5,16 (m, 2H), 5,25-5,31 (m, 1H), 6,83-6,94 (m, 4H, Ar-H) ppm.
HR-MS (ESI⁺)	Izračunan 512,2122; izmerjen 512,2132.

3.11 Sinteza metil 4-((3-(tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranozil)-2-hidroksipropil)amino)benzoata

REAKCIJA:



METODA B:

V mikrovalovni reaktor smo natehtali 200 mg (0,515 mmol) spojine **9** in jo raztopili v 2 mL dioksana. Potem smo dodali 93,4 mg metil 4-aminobenzoata (0,618 mmol) in na konici spatule katalizator kalcijev triflat. Reakcijsko zmes smo mešali in segrevali v mikrovalovnem reaktorju 2 uri pri temperaturi 120 °C, tlaku 15 bar in moči 300 W. Potek reakcije smo spremljali s TPK (MF: EA/HEX=1/1). Dioksan smo uparili pod znižanim tlakom, surov produkt pa smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EA/HEX=1/2, nato EA). Dobili smo 84 mg čiste spojine **12**.

PRODUKT

Elementna sestava: C₂₅H₃₃NO₁₂

Rf: 0,16 (EA/HEX=1/1)

Izgled: rumeno olje

OR: fosfomolibdat

Izkoristek: 29,3%**M_r:** 539,53 g/mol**MERITVE:**

¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 1,75-1,78 (m, 2H), 2,05-2,15 (m, 12 H), 3,10-3,22 (m, 1H), 3,29-3,34 (m, 1H), 3,87 (s, 3H, COOCH ₃), 3,92 (dd, 1H, J ₁ = 12,2 Hz, J ₂ = 2,7 Hz), 3,98-4,02 (m, 1H), 4,09-4,16 (m, 1H), 4,26-4,35 (m, 1H), 4,50 (dd, J ₁ = 12,3 Hz, J ₂ = 8,9 Hz, 0,5H), 4,91 (dd, J ₁ = 12,2 Hz, J ₂ = 8,6 Hz, 0,5H), 5,03 (dd, J ₁ = 6,1 Hz, J ₂ = 4,4 Hz, 0,6H), 5,10-5,15 (m, 1H), 5,19-5,29 (m, 1H), 5,32 (dd, J ₁ = 6,1 Hz, J ₂ = 3,2 Hz, 0,5H), 6,60-6,62 (m, 2H, Ar-H), 7,88-7,90 (m, 2H, Ar-H) ppm
HR-MS (ESI⁺)	Izračunan 540,2084 ; izmerjen 540,2135.

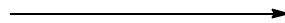
3.12 Sinteza 1-(α-D-manopiranozil)-3-(fenilamino)propan-2-ola**REAKCIJA:****POSTOPEK:**

Spojino **10** (260 mg, 0,498 mol) smo raztopili v 3 mL brezvodnega MeOH, dodali katalitično količino NaOMe (2 kapljici) in mešali pri sobni temperaturi čez noč. Dobili smo 30 mg končne spojine **13**.

PRODUKT:**Elementna sestava:** C₁₆H₂₅NO₇**R_f:** 0,0 (EA/HEX=1/2)**Izgled:** rumeni prah**OR:** fosfomolibdat**Izkoristek:** 39,5%**M_r:** 313,35 g/mol

MERITVE:

¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ 1,48-1,55 (m, 0,5H), 1,79-1,85 (m, 0,5H), 1,96-2,12 (m, 1H), 3,08-3,26 (m, 2H), 3,42-3,89 (m, 7H), 3,97-4,03 (m, 1H), 4,12- 4,19 (m, 1H), 6,61-6,70 (m, 3H, Ar-H), 7,09-7,14 (m, 2H, Ar-H) ppm
HR-MS (ESI)	Izračunan 313,1443 ; izmerjen 312,1447.

3.13 Sinteza 1-(α-D-manopiranozil)-3-(4-metoksifenilamino)propan-2-ola**REAKCIJA:****POSTOPEK:**

Spojino **11** (117 mg, 0, 228 mol) smo raztopili v 3 mL brezvodnega MeOH, dodali katalitično količino NaOMe (2 kapljici) in mešali pri sobni temperaturi čez noč. Dobili smo 12 mg končne spojine **14**.

PRODUKT:

Elementna sestava: C ₁₇ H ₂₅ NO ₇	R_f: 0,0 (EA/HEX=1/2)
Izgled: beli kristali	OR: fosfomolibdat
Izkoristek: 35,4%	M_r: 343,37 g/mol

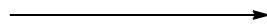
MERITVE:

¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ 1,47-1,54 (m, 0,5H), 1,77-1,85 (m, 0,5H), 1,94-2,11 (m, 1H), 3,01-3,24 (m, 2H), 3,41-3,59 (m, 1H), 3,58-3,83 (m, 8H), 3,94- 4,01 (m, 1H), 4,12-4,19 (m, 1H), 6,67-6,70 (m, 2H, Ar-H),
TKS 40	

	6,76-6,78 (m, 2H, Ar-H) ppm
HR-MS (ESI⁻)	Izračunan 342,1556; izmerjen 342,1553.

3.14 Sinteza metil 4-((3-(α -D-manopiranozil)-2-hidroksipropil)amino)benzoata

REAKCIJA:



POSTOPEK:

Spojino **12** (84 mg, 0,155 mol) smo raztopili v 3 mL brezvodnega MeOH, dodali katalitično količino NaOMe (2 kapljici) in mešali pri sobni temperaturi čez noč. Dobili smo 17 mg končne spojine **13**.

PRODUKT:

Elementna sestava: C₂₅H₂₅NO₈

R_f: 0,0 (EA/HEX=1/2)

Izgled: belo rumeni prah

OR: fosfomolibdat

Izkoristek: 45%

M_r: 371,38 g/mol

MERITVE:

¹H-NMR (400 MHz, MeOD) TKS 42	δ 1,47-1,56 (m, 0,5H), 1,77-1,83 (m, 0,5H), 1,98-2,10 (m, 1H), 3,17-3,29 (m, 2H), 3,42-3,82 (m, 8H), 3,83 (s, 3H, COOCH ₃), 3,97-4,03 (m, 1H), 4,14-4,18 (m, 1H), 6,65-6,68 (m, 3H, Ar-H), 7,77-7,79 (m, 2H, Ar-H) ppm
HRMS (ESI⁻)	Izračunan 370,1494 ; izmerjen 370,1502.

3.15 Sinteza 1-etoksi-3-(α -D-manopiranozil)propan-2-ola

REAKCIJA:

POSTOPEK.

V bučko, prepihano z argonom, smo natehtali spojino **5** (104 mg, 0,166 mmol) in jo raztopili v 5 mL brezvodnega EtOH ter dodali 2 kapljici ocetne kisline. Bučko z raztopino smo prepihali z argonom in ji dodali 10% Pd/C (16 mg). Po dodatku katalizatorja smo reakcijsko zmes 30 minut prepihavali z vodikom, nato pa smo na bučko namestili balon z vodikom in mešali čez noč pri sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s TPK. Po končani reakciji smo odfiltrirali katalizator skozi Celite 545 in uparili topilo. Dobili smo 14 mg spojine **16**.

PRODUKT:

Elementna sestava: C₁₁H₂₂O₇

R_f: 0,0 (EA/HEX=1/2)

Izgled: beli kristali

OR: fosfomolibdat

Izkoristek: 35,4%

M_r: 266,28 g/mol

MERITVE:

¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ 1,20-1,23 (m, 3H), 1,43-1,50 (m, 0,5H), 1,76-2,03 (m, 1,5H) 3,42-3,79 (m, 10H), 3,90-3,95 (m, 1H), 4,07-4,18 (m, 1H) ppm
HR-MS (ESI⁻)	Izračunan 265,28 ; izmerjen 265,10.

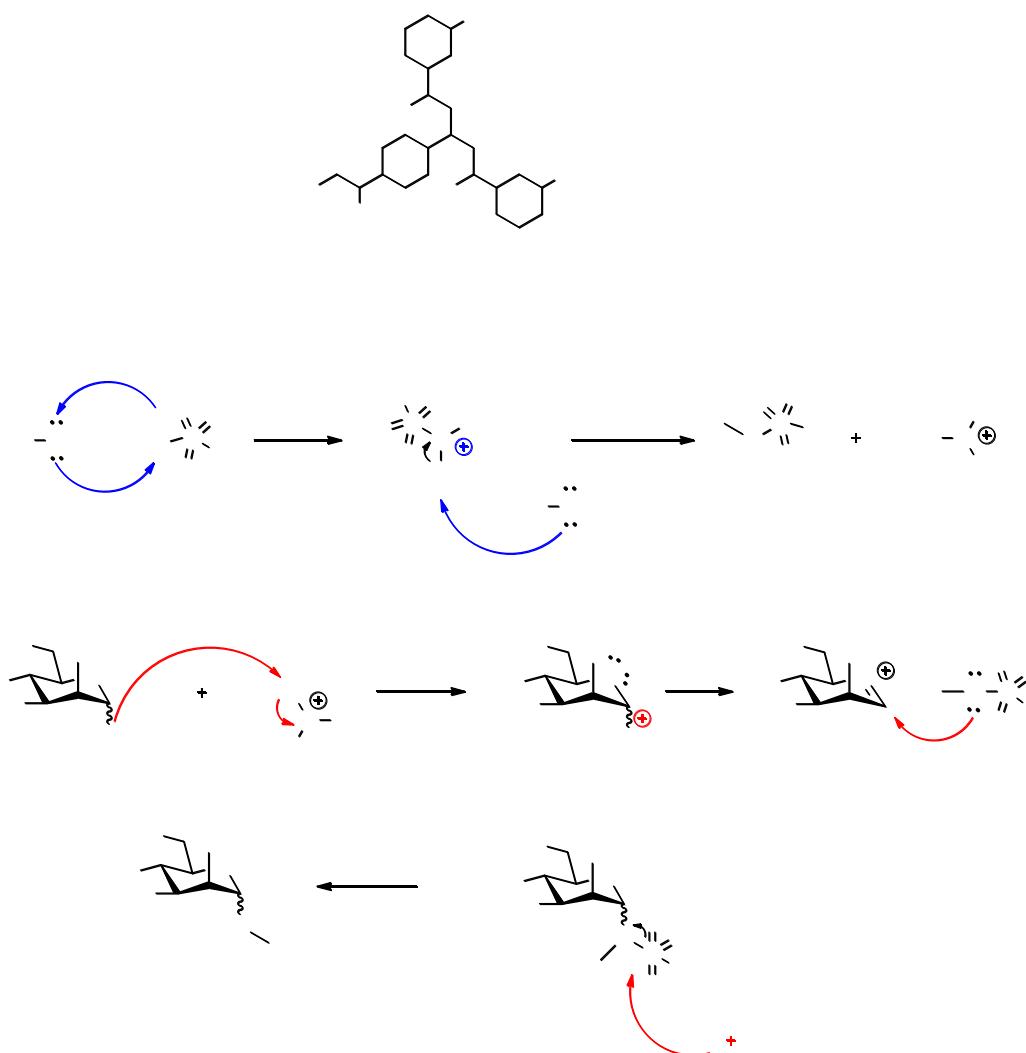
5. REZULTATI IN RAZPRAVA

Prvotni sintezni načrt je vključeval benzilno zaščito OH skupin na D-manozi, vendar je zadnja stopnja odstranitve zaščitne skupine s katalitskim hidrogeniranjem potekla z zelo nizkim izkoristkom ali pa sploh ni potekla tudi po zelo dolgem reakcijskem času (26 dni). Poskus odpiranja tetrabenziliranega epoksida z 1-naftolom v večih poskusih ni bil uspešen, vendar smo pri tej stopnji ugotovili, da s katalitskim hidrogeniranjem pride do odpiranja epoksida. To smo ugotovili tako, da smo posneli NMR in masni spekter izoliranemu produktu, spojini **6**, ki smo ji dodatno odstranili zaščitno skupino s katalitskim hidrogeniranjem in tako uspešno izolirali prvo končno spojino **16**.

Da bi se izognili problemom odstranitve benzilnih zaščitnih skupin, smo uvedli acetilno zaščito OH skupin na D-manozi, ki jo lahko odstranimo s katalitično količino natrijevega metilata (Zemplénova reakcija). Alternativna pot je bila bolj uspešna, saj smo uspeli deacetylirati spojine **10**, **11** in **12** in tako dobili končne spojine **13**, **14** in **15**.

5.1 Fischerjeva glikozilacija

Fischerjeva glikozilacija ali O-glikozilacija je reakcija, ki jo je odkril in raziskal nemški kemik Emil Herman Fischer v obdobju 1893-1895. Gre za reakcijo med aldozo ali ketozo v alkoholu ob prisotnosti kislega katalizatorja. V našem primeru je bila α -D-manoza (aldoza) raztopljena v brezvodnem MeOH (alkohol) s kislim katalizatorjem Amberlite IR 120 (močni kationski izmenjevalec). Zaradi samega mehanizma reakcije, ki vodi v nastanek α -anomera, smo Amberlite IR 120 dodali v prebitku in segrevali 24 ur. V ^1H NMR spektru, posnetem v $\text{DMSO}-d_6$, je razvidno, da je za kemijski premik za anomerni H-atom pri $\delta = 6$ ppm, izračunana sklopitvena konstanta dubleta $J = 1,6$ Hz, kar ustreza α -anomeru. V literaturi je navedeno, da za α -anomer velja razpon vrednosti $J = 1\text{-}2$ Hz.



Shema 2. Mehanizem Fischerjeve glikozilacije. Pritejeno po 40.

5.2 Sinteza C-glikozidne vezi

Reakcija tvorbe C-glikozidne vezi (spojini **3** in **7**) je potekla po Husomi-Sakurai mehanizmu. Pomembno je, da zagotovimo ustrezne pogoje reakcije med glikozilnim donorjem (sladkorni sinton) in glikozilnim akceptorjem (alkilna veriga) z aktivacijo anomernega C-atoma s pomočjo Lewisove kisline – trimetilsilil trifluorometansulfonata (TMSOTf). V okviru našega eksperimentalnega dela smo preizkusili metodo tvorbe C-glikozidne vezi na nezaščiteni in zaščiteni α -metoksi-D-manozi. V prvem primeru smo s pomočjo *N,O*-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) izvedli *in situ* sililno zaščito OH skupin, ki ji je sledila tvorba C-C glikozidne vezi preko aktivacije anomernega C-

atoma in nukleofilnega napada aliltrimetil silana na aktiviran anomerni C-atom (Shema 3) (41).

*Shema 3. Mehanizem tvorbe C-glikozidne vezi. Začetni uvedbi sililne zaščite OH skupin α-metoksi-D-manozida **I** sledi aktivacija anomernega C-atoma z Lewisovo kislino (TMSOTf) in uvedba alilne skupine z aliltrimetilsilanom.*

Izkoristki pri obeh sinetznih postopkih so bili podobni, pri nezaščiteni metil α-D-manozi 46%, pri tetrabenzilirani metil α-D-manozi pa 49%.

5.2.1 Sinteza spojine **7**

Po modifikaciji prvotnega sintezega načrta smo se odločili, da bomo uvedbo alilne skupine izvedli tudi na nezaščiteni metil α-D-manozi. Bennek in Gray sta ugotovila, da lahko nezaščiteni metil glikozidi v reakciji z aliltrimetilsilanom dajejo C-glikozide. Kot reagent za *in situ* sililno zaščito OH skupin sta uporabila *N,O*-bis (trimetilsilil)-trifluoroacetamid (BSTFA). Reakcijo ustavimo z dodatkom vode, pri čemer pride do hidrolize sililnih zaščitnih skupin (Shema 4) (41, 42).

*Shema 4. Mehanizem *in situ* zaščite OH skupin metil-α-D-manozida.*

V našem primeru je Lewisova kislina, ki aktivira anomerni C-atom, močan nukleofil TMSOTf z dobro izstopajočo sililno skupino, ki reagira z elektrofilni (Shema5).

Shema 5. Mehанизem aktivacije anomernega C-atoma s TMSOTf kot katalizatorjem.

Nukleofilnemu napadu (TMSOTf) na terminalni C-atom aliltrimetilsilana sledi tvorba kationskega intermediata ter izstopa dobro izstopajoče sililne skupine in nastanka dvojne vezi (Shema 6). Sladkorni acetali reagirajo stereoselektivno v prid nastanka α -anomerov zaradi aksialnega napada na anomerni C-atom. Ker pri tvorbi C-glikozidne vezi nastane močna trifluorometansulfonska kislina, ki zniža pH raztopine tudi do 1, moramo pri izolaciji reakcijsko zmes naalkaliti z močno bazo. Zato smo reakcijo tvorbe C-glikozidne vezi izvajali na nezaščiteni D-manozi, saj bi v alkalnih pogojih prišlo do hidrolize acetatne zaščitne skupine. Ker je reakcijska zmes močno kisla, smo pred izolacijo raztopino v prvem poskusu naalkalili z 2 M NaOH. Ker smo morali dodati veliki volumen 2 M NaOH, smo imeli težavo z uparevanjem topila. Zato smo v naslednjem poskusu v terilnici razdrobili granule NaOH in trdnega previdno dodajali v reakcijsko zmes. Ko pH ni bil več kisel, smo uparili vodni in organski fazi, surov produkt pa čistili s kolonsko kromatografijo.

Shema 6. Nukleofilni napad aliltrimetilsilana na aktiviran C-atom manozida in sinteza C-glikozidne vezi.

Reagente smo morali dodajati počasi z brizgo skozi septum, v manjših volumnih in intervalih, ker je reakcija močno eksotermna. Opazili smo tudi intenzivno penjenje raztopine in nastajanje mehurčkov, zato smo sistem opremili z dodatnim praznim balonom.

Pomembno je, da pri reakciji zagotovimo brezvodne pogoje, saj je reagent TMSOTf občutljiv na vlago in v stiku z vlago iz zraka in z vodo burno reagira. Aliltrimetilsilan draži sluznico in zato je ključno previdno rokovanje z reagenti v tej stopnji sinteze. Z dodatkom ledeno mrzle vode na koncu reakcije zagotovimo nukleofilni napad vode na sililno zaščitene OH skupine in s tem odstranitev zaščitne skupine in nastanek spojine **7** (Shema 7).

Shema 7. Hidroliza zaščitene manoze z dodatkom ledeno mrzle vode.

Sama reakcija uvedbe alilne skupine je hkrati tudi sinteza C-glikozida, ki poteka med glikozilnim donorjem (nezaščiten metoksi-D-manozid) in glikozilnim akceptorjem (aliltrimetilsilan). Analogno hemiacetalom so anomerni sililno zaščiteni glikozidni etri zelo dobri glikozilni donorji. TMSOTf je v vlogi Lewisove kisline milejši reagent od ostalih reagentov, kot so $\text{BF}_3 \times \text{Et}_2\text{O}$, Ph_2SnS , $\text{Ph}_2\text{SnS} + \text{LiClO}_4$, ki se prav tako uporabljajo kot aktivatorji anomernega C-atoma (41, 42, 43).

5.2.2 Sinteza spojine 3

Podobno kot pri prejšnji stopnji smo tvorili C-glikozidno vez, vendar nekoliko drugače. Reakcijo smo izvajali v acetonitrilu z dodatkom TMSOTf (kot Lewisova kislina, aktivator anomernega C-atoma) in aliltrimetilsilana po Husomi-Sakurai mehanizmu (Shema 8). Ker je bila metil α -D-manoza kot glikozilni donor tetrabenzilirana, gre za drugačen mehanizem reakcije kot zgoraj. Po končani reakciji je bila reakcijska zmes kisla zaradi nastanaka trifluorometansulfonske kisline, ki smo se je znebili s spiranjem z nasičeno raztopino NaHCO₃ pri ekstrakciji. Zaradi lipofilnosti se je spojina 3 porazdelila v CH₂Cl₂ in ima višji R_f od bolj polarne spojine 2.

Shema 8. Mehanizem nastanka C-glikozidne vezi s TMSOTf kot katalizatorjem in aliltrimetilsilanom kot elektron akceptorskim donorjem na tetrabenzilirani manozi.

5.3 Zaščita OH skupin

5.3.1 Acetilna zaščita OH skupin

Shema 9. Mehanizem tetraacetiliranja manoze z acetanhidridom v piridinu.

Izbrana acetilna zaščita se je izkazala boljša kot benzilna, saj je bila enostavna za uvedbo in odstranitev. Acetiliranje je možno izvajati s pomočjo joda, ki je v vlogi Lewisove kisline. Prednosti takšnega acetiliranja so lahko dostopen in poceni reagent (jod), za reakcijo ni potrebno dodati topila, saj se sladkor in jod raztopita v acetanhidridu, čas reakcije je kratek (1-60 minut) in je odvisen tudi od količine joda in sladkorja. Mehanizem

te reakcije temelji na polarizaciji acetanhidrida, ki postane bolj elektrofilen in dostopen za nukleofilni napad OH skupin sladkorja. Izvajali smo acetyliranje v piridinu, ki se obnaša kot topilo in katalizator, tvori pa *in situ* z acetanhidridom *N*-acetylpiridinijev kation (kvarterna amonijeva sol), ki kot močan elektrofil acetylira OH skupine sladkorja. Dodatno lahko acetyliranje v piridinu pospešimo z dodatkom 4-dimetilaminopiridina (DMAP) v reakcijsko zmes. Pri izolaciji se moramo znebiti piridina, saj bi motil naslednjo stopnjo sinteze. Reakcijsko zmes smo zato po končani reakciji prenesli v lij ločnik, dodali EA in spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃, da se znebimo ocetne kisline, ki nastane pri reakciji in hidrolizi acetanhidrida. Organsko fazo smo nato spirali še z 1 M HCl, da bi se znebili piridina. Ker smo z 1 M HCl spirali večkrat, smo v vodno fazo izgubili del spojine **3**. Posledica tega je bil nizek 28% izkoristek. Izkoristek bi verjetno lahko izboljšali, če bi pred ekstrakcijo uparili piridin in nato spirali organsko fazo z manjšimi volumni vodnih raztopin (42, 43).

5.3.2 Benzilna zaščita OH skupin

Pri uvedbi benzilne zaščite smo se odločili za strategijo Williamsonove sinteze etrov. Gre za reakcijo, ki temelji na S_N2 mehanizmu, za uvedbo benzilnega etra pa smo uporabljali močno bazo natrijev hidrid, benzilbromid in polarno aprotično topilo DMF. Natrijev hidrid je močna baza, ki odcepi proton na OH skupinah manoze, ker pa je občutljiv na vlogo in v stiku z vodo reagira burno, smo reakcijo izvajali v brezvodnih pogojih. Reakcija je bila burna, reakcijska zmes se je močno penila, izhajalo je veliko vodika, zato smo sistem dodatno opremili s praznim balonom. Sledil je postopek dodajanja benzilbromida s kapalnikom, in ker je reakcija eksotermna, smo jo izvajali na ledeni kopeli (44).

5.4 Oksidacija alila in tvorba epoksida

Shema 10. Oksidacija alilne skupine do epoksida v acetonitrilu.

Pri reakciji pride do oksidacije alkena z *meta*-kloroperoksibenzojsko kislino (mCPBA), ki je močan oksidant, je stabilna in zelo dobro topna v večini organskih topil. Uporabljali smo 77% oljno disperzijo, v kateri je mCPBA stabilizirana z vodo in klorobenzojsko kislino, saj je čista mCPBA vnetljiva, občutljiva na trenje in udarce ter nad 85% v disperziji eksplozivna. Reakcija epoksidacije ali Prilezhaeva reakcija poteka po mehanizmu imenovanem »butterfly mechanism«, pri katerem ima mCPBA vlogo elektrofila, alken pa nukleofila. Sam mehanizem je rezultat idealne pozicije O-O sigma orbital za napad C-C π elektronov. Pri izolaciji smo uporabili 1 M NaOH, s katero smo spirali organsko fazo, da smo se znebili 3-klorobenzojske kisline, ki nastane kot stranski produkt pri reakciji (44, 45, 46).

5.5 Odpiranje epoksidnega obroča z nukleofili - sinteza spojin **10**, **11** in **12**

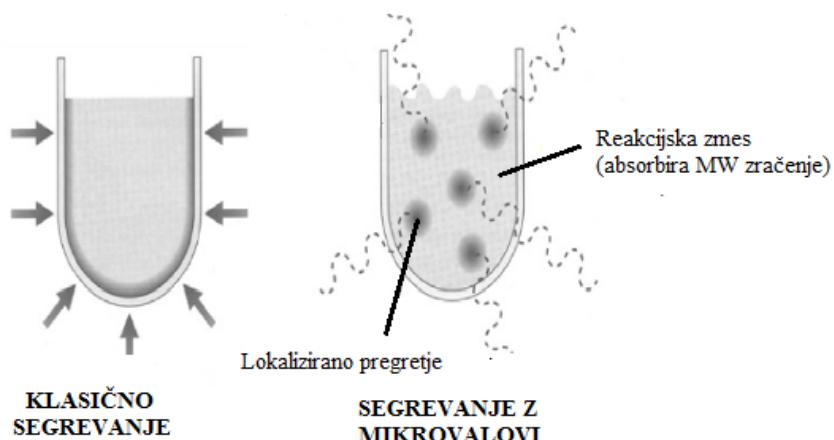
Aminolizo epoksidnih obročev z amini smo izvajali z dodatkom kalcijevega triflata kot katalizatorja pri klasični sintezi (reakcija A) ali sintezi z mikrovalovi (reakcija B). Reakcija je omejena za aniline, ki imajo elektronakceptorske substituente in sterično ovirane aniline. Metodo aminolize epoksidnega obroča s kalcijevim triflatom so kot učinkovito regio- in stereoselektivno sintezo β -amino alkoholov odkrili Cepanec in sodelavci leta 2003 (47, 48, 49).

Zaradi nizkih izkoristkov reakcij in dolgega reakcijskega časa s klasičnim segrevanjem, smo se odločili za sintezo s pomočjo mikrovalov (*angl. microwave-assisted synthesis*). Organska sinteza z mikrovalovi temelji na segrevanju oz. prenosu toplotne energije s fotokemično ultrazvočno tehniko pri visokem tlaku s ciljem dosežka kemijskih procesov in reakcij. Gre za mikrovalovno ali dielektrično segrevanje, ki temelji na

magnetni energiji, ki se po absorpciji skozi snov pretvori v toploto. V elektromagnethem spektru je področje mikrovalovnega valovanja med infrardečim in mikrovalovnim (0,3-300 MHz). Leta 1986 je Gedye s sodelavci objavil prvi članek o uporabi mikrovalov za pospeševanje štirih tipov reakcij. Danes se mikrovalovno ali dielektrično segrevanje uporablja kot alternativa klasičnemu segrevanju. Zaradi mikrovalovnega valovanja ni potrebno mešanje reakcijske zmesi, zato je ta metoda uporabna tudi za reakcije brez topil in sintezo na trdnih nosilcih. Energetski potencial, ki ga imajo mikrovalovi, je omejen in zaradi tega ne provzročijo spremembe v zgradbi, ampak vplivajo samo na temperaturo sistema (50) .

Pomembno je, kako topilo absorbira mikrovalovno energijo, zato temperatura vrelišča ni ključnega pomena, ker se vsa topila segrejejo do T vrelišča v nekaj sekundah. Topilo in reaktanti absorbirajo mikrovalovno valovanje, stene reaktorja pa so transparentne in ne pride do pregretja. Pri konvencionalnem segrevanju s kondukcijo pa pride do prenosa toplote s telesa na telo preko njihovega neposrednega stika, kar je bolj počasen in energetsko manj učinkovit proces (Slika 10) (50, 51). Če povzamemo, prednosti sinteze z mikrovalovi (MW) pred klasično sintezo so:

- skrajšanje reakcijskega časa;
- višji izkoristek;
- nižji delež nečistoč;
- možnost izvajanja reakcij, ki ne potekajo s klasično sintezo.



Slika 10. Primerjava med klasičnim segrevanjem in segrevanjem z mikrovalovi. Pritejeno po 50.

REAKCIJA A - klasična sinteza

Gre za aminolizo epoksidnega obroča, ki je katalizirana s kalcijevim triflatom pri segrevanju ob refluksu. V reakcijsko zmes dodamo katalitično količino kalcijevega triflata, ki je milejši katalizator od drugih katalizatorjev ($\text{Al}(\text{OTf})_3$, $\text{Sc}(\text{OTf})_3$, $\text{Er}(\text{OTf})_3$), ki so bili uporabljeni v različnih sintezah z nukleofilnim odpiranjem epoksidnega obroča. Izkoristek naše sinteze je bil zelo visok (90%). Izkoristek klasične sinteze je bil 90%. Pri sintezi spojine **11** nismo dodali katalizatorja in je izkoristek reakcije znašal le 38%, kar je bistveno nižje od izkoristka predhodne sinteze spojine **10**.

REAKCIJA B - sinteza z mikrovalovi

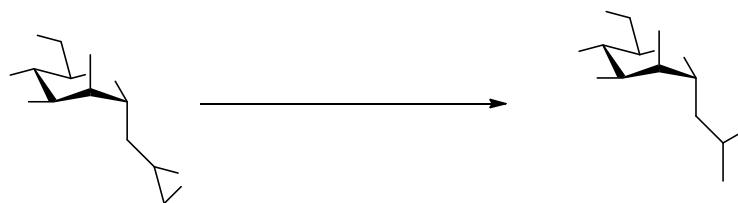
Nukleofilno odpiranje epoksidnega obroča z amini, katalizirano s kalcijevim triflatom, pri metodi z mikrovalovi je potekalo v 1,4-dioksanu. Po 40 minutah segrevanja v mikrovalovnem reaktorju in čiščenju s kolonsko kromatografijo smo dobili 117 mg spojine **10** z izkoristkom 81%. Sintezo spojine **11**, odpiranje epoksidnega obroča z 4-metoksianilinom, smo izvedli v mikrovalovnem reaktorju ob prisotnosti kalcijevega triflata. Tokrat smo reakcijo pustili mešati dlje, tj. 2 uri in 15 minut. Izkoristek je bil le nekoliko višji kot pri klasičnem postopku in je po kolonski kromatografiji znašal 49%. Izkoristek sinteze spojine **12** je znašal le 29%, kar najverjetneje lahko pripisemo elektronskim vplivom COOMe skupine.

Kot je razvidno iz *Preglednice 2*, je v našem primeru čas reakcije bistveno skrajšan, iz 24 ur na 3 ure. Pri sintezi spojine **10** je s klasično sintezo po 24 urah izkoristek znašal 90%, pri sintezi z mikrovalovi pa je po 40 minutah izkoristek znašal prav tako visokih 81%. Pri sintezi spojine **11** je s klasično sintezo po 24 urah izkoristek znašal 38%, pri sintezi z mikrovalovi pa je po 3 urah izkoristek znašal 49%, pri čemer je pomembno poudariti, da je izkoristek reakcije odvisen tudi od tega, kako dobro smo izvedli kolono.

*Preglednica 2. Primerjava izkoristkov reakcij (η) spojin **10**, **11** in **12** s klasično sintezo in sintezo z mikrovalovi.*

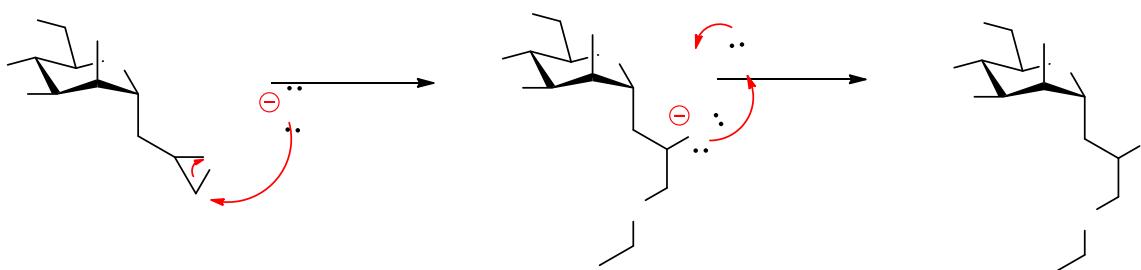
Spojina			
Klasična sinteza - metoda <u>A</u> (η)	90 %	38%	/
Reakcijski čas	24 h	24 h	/
Sinteza z MW- metoda <u>B</u> (η)	81 %	49%	29%
Reakcijski čas	40 min	3x45 min	3x45 min

5.6 Odpiranje epoksidnega obroča s katalitskim hidrogeniranjem in v prisotnosti natrijevega etoksida - sinteza spojin **6** in **15**



Shema 11. Odpiranje epoksidnega obroča s katalitskim hidrogeniranjem.

Ta reakcija ni bila del sinteznega načrta, vendar je pri poskusu odstranitve benzilnih zaščitnih skupin na spojni **4** s katalitskim hidrogeniranjem poleg tega poteklo tudi odpiranje epoksidnega obroča, pri čemer smo izolirali spojino **15**. Pri tem je kot nukleofil deloval H^- .



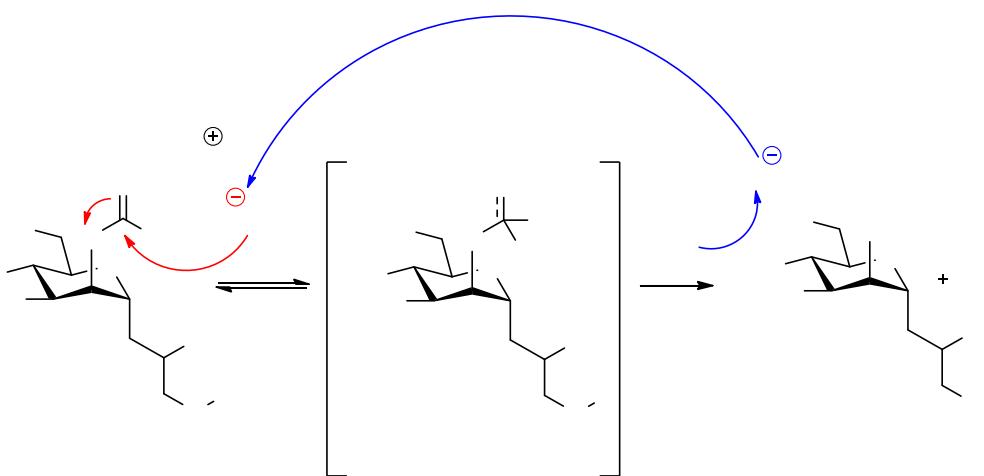
Shema 12. Mehanizem odpiranja epoksidnega obroča po bazično kataliziranem mehanizmu

Kot neželeni stranski produkt smo uspeli izolirati tudi spojino **15**. Reakcija je bila izvedena po postopku za odpiranje epoksida z 1-naftolom ob dodatku natrijevega etilata kot baze. Glede na NMR spekter izoliranega produkta smo ugotovili, da je nastala spojina **15** in ne želena spojina. Natrijev etilat je kot nukleofil napadel reaktivno elektrofilno mesto na epoksidnem obroču, pri čemer je prišlo do odpiranja obroča.

5.7 Odstranitev benzilnih in acetilnih zaščitnih skupin

5.7.1 Zemplénova reakcija - sinteza spojin **13**, **14** in **15**

Zadnja stopnja sinteznega načrta ni predstavljala težav in se je pokazala kot uspešna. Reakcija poteka preko nukleofilnega napada metoksidnega aniona na karbonilni C-atom, pri čemer pride do preestrenja in nastanka metilacetata. Tako smo pripravili končne spojine **13**, **14**, **15**.



Shema 13. Mehanizem Zemplénove reakcije.

5.7.2 Katalitsko hidrogeniranje- sinteza spojine **16**

Pri katalitskem hidrogeniranju spojine **5** smo uspešno odstranili vse benzilne skupine na manozi, kar je bilo razvidno iz kromatograma - končna spojina **16** je ostala na startni liniji, ker je zaradi OH skupin zelo polarna in v MF ne potuje. Menimo, da je razlog dokaj slabemu izkoristku postopek izolacije, pri katerem je možno, da se naša spojina ujame v Celite 545.

SKLEP

Na osnovi literature, znane kristalne strukture vezavnega mesta lektinskega receptorja FimH in do sedaj sintetiziranih N- in O-manozidov kot glikokonjugatov smo načrtovali in sintetizirali pet novih glikokonjugatov iz α -D-manoze in lipofilnega aglikona povezanih s C-glikozidno vezjo kot potencialnih antagonistov FimH. Spojine **6, 13, 14, 15, 16** so strukturno podobne spojinam, za katere je že znano, da so antagonisti FimH. Prvotni sintezni načrt smo morali nekoliko modificirati in optimizirati, saj smo z večjim številom poskusov prišli do poti, po kateri smo lahko sintetizirali končne spojine.

Prvotni sintezni načrt je bil sestavljen iz šestih sinteznih stopenj in je vključeval benzilno zaščito hidroksilnih skupin na D-manozi. Začetna benzilna zaščita hidroksilnih skupin na D-manozi se v zadnji stopnji ni izkazala kot optimalna, ker je odstranitev zaščitne skupine s katalitskim hidrogeniranjem pri dveh načrtovanih spojinah v zadnji stopnji potekla le deloma. Zato smo spremenili strategijo zaščite hidroksilnih skupin in uvedli acetilno zaščito. Kot je razvidno iz reakcijskih schem, smo spojine **10, 11** in **12** pri reakciji po Zemplénu uspešno deacetilirali in tako sintetizirali končne spojine **13, 14, 15**. Nizki izkoristki reakcij posameznih stopenj, predvsem zaradi težavnega čiščenja spojin, so priveli do zelo majhnih količin končnih spojin.

Pri eksperimentalnem delu smo tako razvili novo sintezno pot do končnih spojin, ki bodo v prihodnosti ovrednotene v biokemijskih testih, s katerimi bomo preverili potencial spojin kot antagonistov lektina FimH. Glede na to, da so spojine strukturno C-glikozidi, bi lahko primerjali tudi njihovo hidrolitsko stabilnost v primerjavi z obstoječimi O-glikozidi. Končne spojine so diastereomeri, zato bi bilo smiselno razviti metodo za resolucijo enantiomerov in preveriti, kateri od enantiomerov ima boljšo aktivnost. Dobljeni rezultati bodo pomembno vplivali na nadaljnje načrtovanje tako sinteze novih spojin kot tudi nadaljnje optimizacije strukture za izboljšanje antagonističnega delovanja spojin.

LITERATURA

1. Morović M. Biofilmske infekcije urinarnog trakta. Medicus 2012; No. 1, 43 – 46, Vol. 21
2. Flores-Mireles AL, Walker, JN, Caparaon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat. Rev. Microbiol. 2015; 13: 269-284.
3. Moreno E, Johnson JR, Perez T, Prats G, Kuskowski MA, Andreu A. Structure and urovirulence characteristics of the fecal *Escherichia coli* population among healthy women. Microbes Infect. 2009; 11: 274–280.
4. Anderson GG, Goller CC, Justice S, Hultgren SJ, Seed PC. Polysaccharide capsule and sialic acid-mediated regulation promote biofilm-like intracellular bacterial communities during cystitis. Infect. Immun. 2010; 78: 963–975.
5. Nicolle LE. Urinary tract infection- traditional pharmacologic therapies. Dis. Mon. 2003; 49: 111-128.
6. Zhang L, Foxman B. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* mediated urinary tract infections. Frontiers in Bioscience 2003; 8: 235-244.
7. Dombrowicz E, Zadernowski R, Swiatek L. Phenolic acids in leaves of *Arctostaphylos uva ursi* L., *Vaccinium vitis idaea* L. and *Vaccinium myrtillus* L. Pharmazie 1991; 46: 680–681.
8. Jahodar L, Grygarova V, Budesinsky M. Triterpenoids of *Arctostaphylos uva-ursi* roots. Pharmazie 1988; 43: 442–443.
9. Zhanel GG, Karlowsky JA, Harding GK, Carrie A, Mazzulli T, Low DE et al. A Canadian national surveillance study of urinary tract isolates from outpatients: comparison of the activities of trimethoprim-sulfamethoxazole, ampicilin, mecinilam, nitrofurantoin, and ciprofloxacin. Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44: 1089-1092.
10. Barišić Z, Borzić E, Šiško Kraljević K, Carev M, Zoranić V, Kaliterna V. Rise in ciprofloxacin resistance in *E. coli* from UTI from 1999 to 2004. Int. J. Antimicrob. Agents 2005; 25: 550-551.
11. Andriole VT. Quinolones. In: Finch RG, Greenwood D, Norrby SR, Whitley RJ. Antibiotic and chemotherapy. Anti-ingfective agents and their use in therapy. Edinburgh Churchill Livingstone 2003; 349-373.

12. Sha X, Xu K, Tian G, Wang H, Chen X, Wang S, Li Y, Chen J, Huang J. Subinhibitory concentrations of allicin decrease uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) biofilm formation, adhesion ability, and swimming motility. Int. J. Mol. Sci. 2016; 17: 979.
13. Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol. Microbiol. 1998; 30: 258-293.
14. Oelschlaeger TA, Dobrindt U, Hacker J. Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. Int. J. Antimicrob. Agents 2002; 19: 517-521.
15. Čitar M: Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata pri zdravih ljudi, Diplomsko delo. Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2010: 4- 25.
16. Wold AE, Caugant DA, Lidin-Janson G, de Man P, Svanborg C. Resident colonic *Escherichia coli* strains frequently display uropathogenic characteristics. J. Infect. Dis. 1992; 165:46–52.
17. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. J. Infect. Dis. 2000; 181:1753–1754.
18. Frömmel U, Lehmann W, Rödiger S, Böhm A, Nitschke J, Weinreich J, Groß J, Roggenbuck D, Zinke O, Ansorge H, Vogel S, Klemm P, Wex T, Schröder C, Wieler LH, Schierack P. Adhesion of human and animal *Escherichia coli* strains in association with their virulence-associated genes and phylogenetic origins. Appl. Environ. Microbiol. 2013 ; 19: 5814–5829
19. Garcia MI, Le Bouguénec C. Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic *Escherichia coli*. Bull. Inst. Pasteur 1996; 94:201–236.
20. Hung CS, Bouckaert J, Hung D, Pinkner J, Widberg C, DeFusco A, Auguste CG, Strouse R, Langermann S, Waksman G, Hultgren SJ. Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. Mol. Microbiol. 2002; 44: 903-15.
21. Connel I, Agace W, Klemm P. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1996; 93: 9827–9832.

22. Mulvey MA. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 2002; 4: 257–271.
23. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2: 123-140.
24. Yu J, Lin JH, Wu XR, Sun TT. Uroplakins Ia and Ib, two major differentiation products of bladder epithelium, belong to a family of four transmembrane domain (4TM) proteins. *J. Cell Biol.* 1994; 1: 171–182.
25. Zhou G. Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. *J Cell Sci.* 2001; 114: 4095-103.
26. Hirose T, Kumamoto Y, Matsukawa M, Yokoo A, Satoh T, Matsuura A. Study on local immune response in *Escherichia coli*-induced experimental urinary tract infection in mice—Infiltration of Ia-positive cells, macrophages, neutrophils, T cells and B cells. *Jpn. Assoc. Infect. Dis.* 1992; 66: 964–973.
27. Guiton PS, Cusumano CK, Kline KA, Dodson KW, Han Z, Janetka JW, Henderson JP, Caparon MG, Hultgren SJ. Combinatorial small-molecule therapy prevents uropathogenic *Escherichia coli* catheter-associated urinary tract infections in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56: 4738–4745.
28. Gunther NW, Lockatell V, Johnson DE, Mobley HL. In vivo dynamics of type 1 fimbria regulation in uropathogenic *Escherichia coli* during experimental urinary tract infection. *Infect. Immun.* 2001; 69: 2838–2846.
29. Thankavel K, Madison B, Ikeda T, Malaviya R, Shaw A H, Arumugam P M, Abraham S N. Localization of a domain in the FimH adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. *J. Clin. Invest.* 1997; 100: 1123–1136.
30. Fiege B, Rabbani S, Preston RC, Jakob RP, Zihlmann P, Schwardt O, Jiang X, Maier T, Ernst B. The tyrosine gate of the bacterial lectin FimH: a conformational analysis by NMR spectroscopy and X-ray crystallography. *ChemBioChem* 2015; 16: 1235-46.
31. Geibel S, Procko E, Hultgren SJ, Baker D, Waksman G. Structural and energetic basis of folded-protein transport by the FimD usher. *Nature* 2013; 496: 243-6.
32. Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opinion Biotechnol.* 2008; 19: 260-265.

33. Howard AJ, Magee JT, Fitzgerald KA, Dunstan FD. Factors associated with antibiotic resistance in coliform organisms from community urinary tract infection in Wales. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001; 47: 305-13.
34. de Ruyck J, Lensink MF, Bouckaert J. Structures of C-mannosylated anti-adhesives bound to the type 1 fimbrial FimH adhesin. *IUCrJ*, 2016; 3: 163-167.
35. Vanwetswinkel S, Volkov AN, Sterckx YG, Garcia-Pino A, Buts L, Vranken WF, Bouckaert J, Roy R, Wyns L, van Nuland NA. Study of the structural and dynamic effects in the FimH adhesin upon α -D-heptyl mannose binding. *J. Med. Chem.* 2014; 57: 1416-1427.
36. Wellens A, Garofalo C, Nguyen H, Van Gerven N, Slättegård R, Hernalsteens JP, Wyns L, Oscarson S, De Greve H, Hultgren S, Bouckaert J. Intervening with urinary tract infections using anti-adhesives based on the crystal structure of the FimH-oligomannose-3 complex. *PLoS One.* 2008; 3(4): 2040 - 2043.
37. Mydock-McGrane L, Cusumano Z, Han Z, Binkely J, Kostakioti M, Hannan T, Pinkner JS, Klein RD, Kalas V, Crowley J, Rath NP, Hultgren SJ, and Janetka JW. Anti-virulence C-mannosides as antibiotic-sparing, oral therapeutics for urinary tract infections. *J. Med. Chem.* 2016, 59 (20), 9390- 9408.
38. Tomašić T, Rabbani S, Gobec M, Mlinarič Raščan I, Podlipnik Č, Ernst B, Anderluh M. *Med. Chem. Commun.* 2014; 5: 1247-1253.
39. Scharenberg M, Schwardt O, Rabbani S, Ernst B. Target selectivity of FimH antagonists. *J. Med. Chem.* 2012; 55 (22): 9810–9816.
40. Emil Fischer. Ueber die Glucoside der Alkohole. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft.* 1893, 26 (3) : 2400–2412.
41. Postema M. C- glycoside synthesis. CRC Press, 1995, 7- 8.
42. Levy DE, Fügedi P. The Organic Chemistry of Sugars. CRC Press, 1 edition, 2005, 274- 278.
43. John A, Bennek, Gary R. Gray. An Efficient Synthesis of Anhydroalditols and Allyl C-Glycosides. *J. Org. Chem.* 1987; 52: 892–897.
44. Vendramin K: Načrtovanje in sinteza D-manzidov kot potencialnih antagonistov lektina FimH, Magistrska naloga. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2016: 40-42.
45. <http://encyclopedia2.thefreedictionary.com/Prilezhaev%27s+Reaction>. Dostop: 30.9.2016

46. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/273031?lang=en®ion=SI>.
Dostop 30.9.2016
47. Cepanec I, Litvic M, Mikuldas H, Bartolincic A, Vinkovic V. Calcium trifluoromethanesulfonate-catalysed aminolysis of epoxides. *Tetrahedron*, 2003; 59: 2435-2439.
48. Mari S, Canada JF, Jimenez-Barbero J, Bernardi A, Marcou G, Motto I. Synthesis and conformational analysis of galactose-derived bicyclic scaffolds. *Eur. J. Org. Chem.* 2006; 13: 2925-2933.
49. Calcium Triflate Catalyzed Regioselective Nucleophilic Ring Opening of Epoxides to afford Beta-aminoalcohols. *Chemspider Synthetic Pages*, 560.
50. <http://www.organic-chemistry.org/topics/microwave-synthesis.shtml>. Dostop
15.8.2016
51. <http://www.unc.edu/depts/mtcgroup/litmeetings/microwaves.pdf>. Dostop
15.8.2016

