

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA MALEŠIČ

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA C-MANOZIDOV IN N-MANOZIDOV KOT
POTENCIALNIH ANTAGONISTOV LEKTINA FimH**

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA MALEŠIČ

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA C-MANOZIDOV IN N-MANOZIDOV KOT
POTENCIALNIH ANTAGONISTOV LEKTINA FimH**
**DESIGN AND SYNTHESIS OF C-MANNOSIDES AND N-MANNOSIDES AS
POTENTIAL ANTAGONISTS OF LECTIN FimH**

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem izdelala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

Spektroskopske meritve in ostale analize so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani. Biološka testiranja so bila opravljena na Institute of Molecular Pharmacy, University of Basel v Švici.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm., za potrpežljivost, spodbudne besede in vso strokovno pomoč pri eksperimentalnem delu in pri pisanju magistrske naloge. Posebna zahvala gre moji družini, ki mi je skozi celotno študijsko obdobje stala ob strani, verjela vame in me spodbujala na poti do zaključka študija.

Izjava

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

Ljubljana, 2017

Nina Malešič

Kazalo

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV	III
1. UVOD	1
1.1. Mehanizmi vdora bakterij v človeško telo	1
1.1.1. Mehanizmi razvoja bakterijske odpornosti	2
1.2. Lektini	3
1.2.1. Lektin FimH	4
1.3. Načrtovanje antagonistov lektina FimH	6
1.3.1. Znani antagonisti lektina FimH	7
1.4. Antiadhezivna terapija	10
1.4.1. Alternativne poti antiadhezivne terapije	10
1.5. Okužbe urinarnega trakta	11
1.5.1. Zdravljenje okužb urinarnega trakta s protimikrobnimi učinkovinami	13
2. NAMEN DELA	15
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1. Materiali	18
3.2. Spektroskopske metode	18
3.2.1. Jedrska magnetna resonanca (NMR)	18
3.2.2. Infrardeča spektroskopija (IR)	18
3.2.3. Masna spektrometrija (MS)	18
3.3. Kromatografske metode	18
3.3.1. Tankoplastna kromatografija (TLC)	18
3.3.2. »Flash« kolonska kromatografija	19
3.3.3. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti	19

3.4.	Temperatura tališča.....	19
3.5.	Mikrovalovni reaktor	19
3.6.	Poimenovanje in risanje spojin.....	19
3.7.	Biokemijska testiranja	19
4.	EKSPERIMENTALNO DELO	20
4.1.	SINTEZA C-MANOZIDOV	20
4.1.1.	Sinteza metil- α -D-manopiranozida	20
4.1.2.	Sinteza 3- α -D-manopiranozilpropena	21
4.1.3.	Sinteza 3-(tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranozil)propena.....	22
4.1.4.	Sinteza 1',2'-epoksi-3'-(tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranozil)propana.....	23
4.1.5.	Sinteza metil 4-((3-(tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranozil)-2-hidroksipropil)amino)benzoata	25
4.1.6.	Sinteza metil 3-((3-(tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranozil)-2-hidroksipropil)amino)benzoata	26
4.1.7.	Sinteza metil 4-((3-(α -D-manopiranozil)-2-hidroksipropil)amino)benzoata.....	27
4.1.8.	Sinteza metil 3-((3-(α -D-manopiranozil)-2-hidroksipropil)amino)benzoata.....	28
4.1.9.	Sinteza 4-((3-(α -D-manopiranozil)-2-hidroksipropil)amino)benzojske kisline.	30
4.2.	SINTEZA N-MANOZIDOV	31
4.2.1.	Sinteza etil 4-(3-jodofenoksi)butanoata	31
4.2.2.	Sinteza etil 4-(3-((trimetilsilil)etinil)fenoksi)butanoata	32
4.2.3.	Sinteza etil 4-(3-etinilfenoksi)butanoata	34
4.2.4.	Sinteza etil 4-(3-(1-(tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranozil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)butanoata	35
4.2.5.	Sinteza metil 4-(3-(1-(α -D-manopiranozil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)butanoata	36
4.2.6.	Sinteza 4-(3-(1-(α -D-manopiranozil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)butanojske kisline	38
4.2.7.	Sinteza metil 2-(3-jodofenoksi)acetata.....	39

4.2.8.	Sinteza metil 2-(3-((trimetilsilil)etinil)fenoksi)acetata	40
4.2.9.	Sinteza metil 2-(3-etinilfenoksi)acetata	42
4.2.10.	Sinteza metil 2-(3-(1-(tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranozil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)acetata.....	43
4.2.11.	Sinteza metil 2-(3-(1-(α -D-manopiranozil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)acetata	44
4.2.12.	Sinteza 2-(3-(1-(α -D-manopiranozil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)ocetne kisline	46
4.2.13.	Sinteza 3-(3-jodofenoksi)propan-1-ola	47
4.2.14.	Sinteza 3-(3-jodofenoksi)propanojske kisline.....	48
4.2.15.	Sinteza metil 3-(3-jodofenoksi)propanoata	49
4.2.16.	Sinteza metil 3-(3-((trimetilsilil)etinil)fenoksi)propanoata.....	50
4.2.17.	Sinteza metil 3-(3-etinilfenoksi)propanoata.....	51
4.2.18.	Sinteza metil 2-(3-(1-(tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranozil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)propanoata	52
4.2.19.	Sinteza metil 2-(3-(1-(α -D-manopiranozil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)propanoata	54
4.2.20.	Sinteza 2-(3-(1-(α -D-manopiranozil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)propanojske kisline	55
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	56
5.1.	SINTEZA C-MANOZIDOV	56
5.1.1.	Fischerjeva glikozilacija.....	56
5.1.2.	Uvedba alilne skupine	56
5.1.3.	Acetilna zaščita OH skupin	57
5.1.4.	Tvorba epoksida – oksidacija alila	57
5.1.5.	Odpiranje epoksida.....	58
5.1.6.	Zemplénova metoda	58
5.1.7.	Alkalna hidroliza	58

5.2.	SINTEZA N-MANOZIDOV	59
5.2.1.	Williamsonova sinteza etrov	59
5.2.2.	Sklopitev Sonogashira.....	59
5.2.3.	Odstranitev sililne zaščitne skupine	60
5.2.4.	Huisgenova cikloadicija - reakcija klik	60
5.2.5.	Zemplénova metoda	61
5.2.6.	Alkalna hidroliza	61
5.3.	Komentar neuspešne sinteze.....	61
5.4.	REZULTATI BIOKEMIJSKIH TESTIRANJ	63
6.	SKLEP	67
7.	LITERATURA	68

POVZETEK

Okužbe urinarnega trakta predstavljajo velik zdravstveni problem, ki zahteva premišljeno rabo protimikrobnih učinkovin in ustrezen pristop k vedno pogostejšemu pojavu odpornosti bakterij. Na trgu obstaja širok spekter protimikrobnih učinkovin, ki pa jih zaradi pojava rezistence zamenjujejo alternativni načini zdravljenja okužb. Eden izmed pristopov je uporaba antiadhezivne terapije z razvojem antagonistov lektina FimH. Bakterije se z lektinom FimH na površini fimbrij pritrdijo na receptorje urotelija in s tem omogočijo njihovo kolonizacijo. Najpogostejša povzročiteljica okužb v urinarnem traktu je bakterija *Escherichia coli*. Lektin FimH predstavlja podenoto fimbrij tipa 1, ki so značilne za enterobakterije. Visoko manozno specifični fenotipi bakterij prepoznajo terminalne α -D-manoze receptorjev urotelija, kar jim omogoča vezavo na glikoprotein uroplakin 1a ter zaščito pred obrambnimi mehanizmi človeškega telesa. Lektin FimH predstavlja potencialno tarčo novih protimikrobnih učinkovin, ki bi nadomestile obstoječo terapijo in na ta način zmanjšale verjetnost pojava rezistence.

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge smo na podlagi dejstva, da bakterijski lektin FimH prepozna α -D-manozne fragmente, načrtovali in sintetizirali potencialne nove antagoniste lektina FimH. Sintetizirane spojine vsebujejo manozni del in aglikonski del molekule, ki se s hidrofobnimi interakcijami vsidra v vezavno mesto omenjenega lektina. Sintetizirali smo C-manozide in N-manozide ter jih ovrednotili na podlagi bioloških testiranj s testiranjem vezave na receptor. Med 7 končnimi spojinami so se kot potencialne protimikrobne spojine izkazali predvsem N-manozidi, ki se bolje prilegajo vezavnemu mestu in tvorijo močnejše interakcije in imajo posledično močnejšo afiniteto vezave v biokemijskem testu. Kot najaktivnejša spojina med N-manozidi se je izkazala spojina **14**, ki ima v svoji strukturi triazolni obroč in relativno kratko verigo. Tudi ostali končni N-manozidi so izkazali precej podobno afiniteto vezave, na podlagi česar sklepamo, da spojine predstavljajo uspešen korak k novim antiadhezivnim učinkovinam. C-manozidi se na bioloških testiranjih niso izkazali kot dobre spojine, saj je bila njihova afiniteta vezave slaba. Izjemo predstavlja spojina **7**, ki ima primerljivo afiniteto vezave z N-manozidi. Poleg težavne sinteze nam torej C-manozidi ne služijo kot osnova za nadaljnji razvoj novih antagonistov lektina FimH kot protimikrobnih učinkovin, saj ne izkazujejo dovolj dobre afinitete vezave za učinkovito delovanje.

Ključne besede: protimikrobne učinkovine, bakterijska odpornost, antiadhezivna terapija, *Escherichia coli*, α -D-manoza, C-manozidi, N-manozidi

ABSTRACT

Urinary tract infections represent a major health problem, which requires careful use of antimicrobials and an appropriate approach to fight the increasing occurrence of bacterial resistance. There is a wide range of antimicrobials on the market, but they are replaced by alternative ways of treating infections due to the onset of resistance. One approach is the use of anti-adherence therapy by the development of FimH antagonists. The bacteria are fixed to the urothelium receptors via FimH lectin on the surface of fimbria, thus enabling their colonization. The most common cause of infections in the urinary tract is *Escherichia coli*. FimH is a subunit of type 1 fimbriae, which is characteristic for enterobacteria. Highly mannose-specific phenotypes of bacteria recognize terminal urothelial α -D-mannose receptors, which allow them to bind to uroplakin 1a glycoprotein and protect them against human body defense. FimH is therefore a potential target for new antimicrobial agents that could replace existing therapy and in this way reduce resistance development.

In the experimental part of the master's thesis, we have designed and synthesized potential new FimH antagonists on the basis of the fact that the FimH bacterial lectin recognizes α -D-mannose fragments. The synthesized compounds are therefore composed of D-mannose sugar and an aglycone moiety, which binds to the lectin by hydrophobic interactions. Final C- and N-mannosides were synthesized and evaluated in biological assay by testing the binding to the receptor. Among 7 final compounds, N-mannosides have been shown to be potential antimicrobial compounds and they form stronger interactions in the binding site and, consequently, have more potent affinity in the biochemical test. Compound **14**, which has a triazole ring and a relatively short chain in its structure, has been shown as the most active compound between N-mannosides. The other final N-mannosides displayed similar affinities, which suggests that the compounds are a successful step towards new anti-adhesive agents. In contrast, C-mannosides showed only poor affinity for FimH lectin. The exception is compound **7** having comparable affinity with N-mannosides. In addition to the difficult synthesis, C-mannosides do not serve as a basis for further development of new FimH antagonists as antimicrobials since they do not show sufficient binding affinity to achieve potent antiadhesive effect.

Key words: antimicrobials, bacterial resistance, antiadhesive therapy, *Escherichia coli*, α -D-mannose, C-mannosides, N-mannosides

SEZNAM OKRAJŠAV

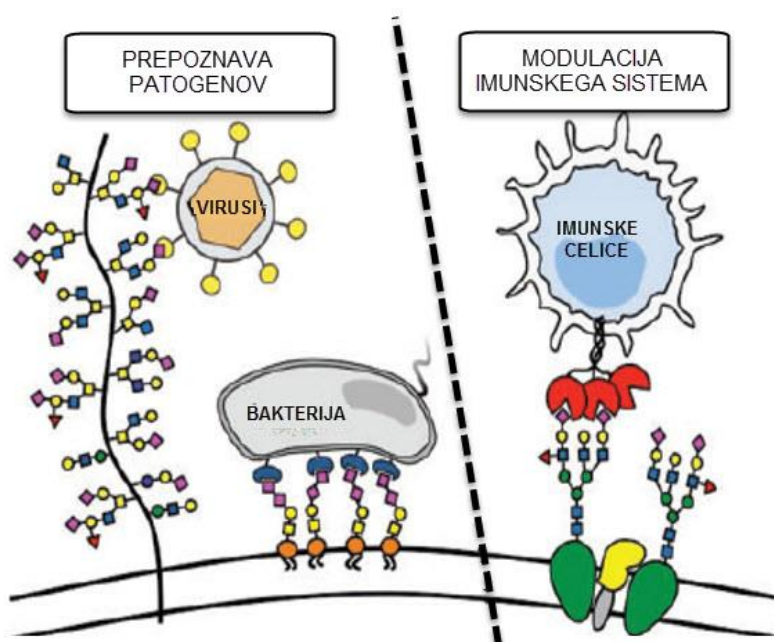
AcCN	acetonitril
AK	aminokislina
ATR	oslabljen popolni odboj (<i>attenuated total reflection</i>)
BSA	goveji serumski albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid
BTEAC	benziltriethylamonijev klorid
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetil sulfoksid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eq	ekvivalent (<i>equivalent</i>)
ESI	elektrozapršilna ionizacija (<i>electrospray ionization</i>)
FimH	fimbrijski adhezin H (<i>fimbrial adhesin H</i>)
FimH _L	lektinska domena fimbrijskega adhezina H
FimH _P	pilijska domena fimbrijskega adhezina H
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti (<i>high resolution mass spectrometry</i>)
IC ₅₀	srednja zaviralna koncentracija, ki pomeni 50 % inhibicijo vezave fluorescenčno označenega liganda na protein
Ig	imunoglobulin ali protitelo
IL	interlevkin
IR	infrardeča spektroskopija
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
mCPBA	<i>m</i> -kloroperoksibenzojska kislina
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MS	masna spektrometrija
MW	sinteza z mikrovalovi (<i>microwave synthesis</i>)

NMR	jedrska magnetna resonanca (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
R _f	retencijski faktor
RIP	relativna inhibitorna jakost (<i>relative inhibitory potency</i>)
RT	sobna temperatura (<i>room temperature</i>)
<i>Salmonella spp</i>	<i>Salmonella species</i>
TBAF	tetra- <i>n</i> -butilamonijev fluorid
TEA	triethylamin
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija (<i>thin-layer chromatography</i>)
TMS	tetrametilsilan
TMSOTf	trimetilsilil trifluorometansulfonat
t _R	retencijski čas (<i>retention time</i>)

1. UVOD

1.1. Mehanizmi vdora bakterij v človeško telo

Komenzalne bakterije so del normalne flore človeškega telesa, medtem ko patogene bakterije povzročajo okužbe in posledično vodijo do razvoja bolezni. Bakterija *Escherichia coli* je normalno prisotna v prebavnem traktu, kadar zaide v urinarni trakt, pa tam povzroči okužbe in zaplete, povezane s kolonizacijo bakterij. Bakterije se na različne načine prilagodijo na okolje in na obrambne mehanizme, ki telo ščitijo pred patogeni. S pomočjo adhezinov se bakterija pritrdi na celice gostitelja in se na ta način zaščiti pred pretokom urina, kar ji omogoči kolonizacijo v urinarnem traktu (1,2).



Slika 1: Adhezija bakterij na receptorje in posredovanje imunskega odziva. Prirejeno po 3.

Patogeni prepoznajo glikokonjugate na površini celic in s tem omogočijo adhezijo ter vdor v celice gostitelja. Z vezavo na receptorje pride do sprožitve vrste procesov, ki povzročijo lokalno in sistemsko vnetje (Slika 1). V začetni fazi pride do izločanja provnetnih citokinov, ki preko različnih signalnih poti vodijo do razvoja simptomov vnetja in v končni fazi do simptomov bolezni (2,3). S pojavom tropizma imajo bakterije različno afiniteto do tkiv, zato se določeni tipi bakterij z večjo afiniteto vežejo na določena tkiva. Bakterije so sposobne izražati več različnih adhezinov in posledično tvorijo interakcije z različnimi receptorji. Na ta način *Escherichia coli* z različnimi adhezini tvori interakcije na različnih tkivih, kot so prebavni trakt, endotelijske celice in urinarni trakt (1). V urinarnem traktu bakterije povzročijo akutni pielonefritis, akutni cistitis ali pa asimptomatsko vnetje. Preko

izločanja provnetnih citokinov in ostalih faktorjev vnetja pride do razvoja simptomov bolezni. IL-6 povzroča povišanje telesne temperature in akutne simptome vnetja, medtem ko IL-8 aktivira polimorfonuklearne granulocite. V nekaterih primerih pride do vdora bakterij v kri preko mukoze. V naslednji fazi pride do tvorbe protiteles preko specifičnega imunskega odgovora organizma, le-ta pa nevtralizirajo bakterije in odstranijo razloge za vnetje (2).

1.1.1. Mehanizmi razvoja bakterijske odpornosti

Pri uporabi protimikrobnih učinkovin je skozi leta prihajalo do razvoja bakterijske odpornosti, ki je omejila nabor protibakterijskih učinkovin, ki bi delovale na določene tipe bakterij. Intrinzična odpornost je značilna za vse pripadnike neke vrste, medtem ko imajo pridobljeno odpornost samo določeni sevi. Bakterije imajo več različnih načinov, s pomočjo katerih razvijejo odpornost proti določenim protimikrobnim učinkovinom (Preglednica I).

Preglednica I: Mehanizmi rezistence in primeri protibakterijskih učinkovin (4).

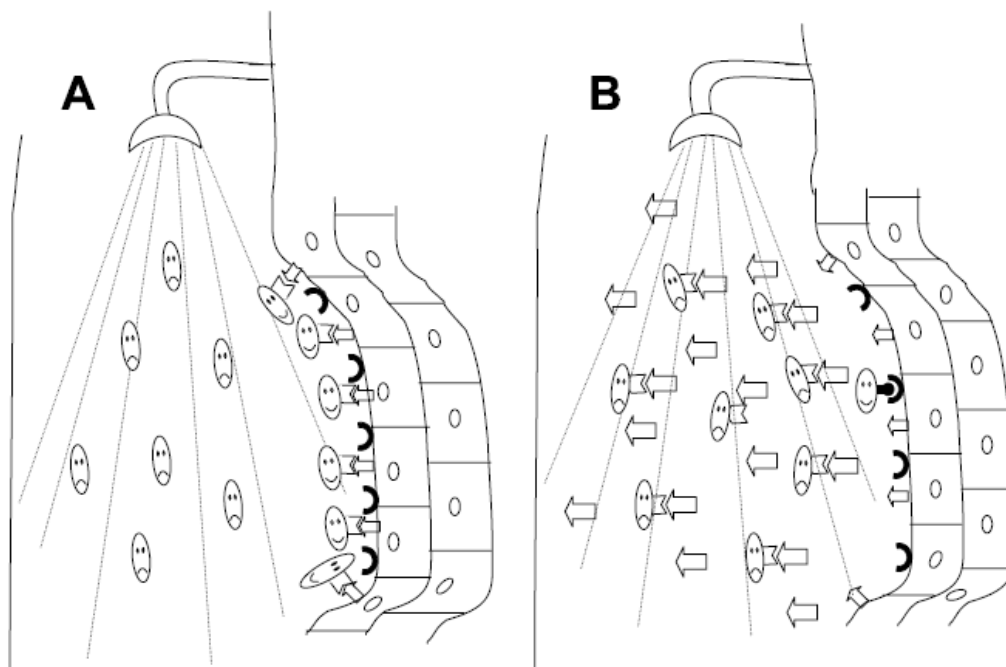
1. Modifikacija protimikrobne učinkovine	Aminoglikozidi, kloramfenikol, laktami
2. Mutacija tarčnega mesta	Aminoglikozidi, laktami, makrolidi, kinoloni, rifampicin, trimetoprim, tetraciklini, mupirocin
3. Zmanjšan privzem učinkovine v bakterijsko celico	Številne protimikrobne učinkovine
4. Povečano izločanje učinkovine iz bakterijske celice	Tetraciklini, makrolidi, kloramfenikol, kinoloni
5. Sprememba encimske poti	Sulfonamidi, trimetoprim

Bakterije lahko začnejo izločati protimikrobne učinkovine iz bakterijske celice, ali pa je zmanjšan njihov privzem v bakterijsko celico in na ta način onemogočijo protimikrobno delovanje. Znotraj bakterijske celice lahko bakterije začnejo razgrajevati protimikrobne učinkovine, ali pa pride do encimske modifikacije le-teh, ki posledično ne dosežejo tarčnega mesta delovanja. V določenih primerih lahko pride do spremembe permeabilnosti membrane ali celične stene bakterij, kar zopet vodi do neučinkovite terapije. Bakterije pa

lahko razvijejo tudi alternativne metabolne poti, zaradi česar se bakterija kljub prisotnosti protimikrobne učinkovine nemoteno razmnožuje naprej, kljub temu da so nekatere metabolne poti zaradi delovanja protimikrobnih učinkovin zavrite. Nekatere bakterije lahko s pomočjo mutacije tarčnega mesta spremenijo afiniteto za določene protimikrobne učinkovine in se na ta način zavarujejo (4).

1.2. Lektini

Lektini predstavljajo skupino proteinov, ki jih najdemo pri rastlinah, živalih in mikroorganizmih. Tvorijo reverzibilne interakcije z glikoproteini na površini celic preko dveh ali več vezavnih mest. To jim omogoča tvorbo kompleksov z ogljikovimi hidrati, ali pa povroči aglutinacijo celic. Imajo več različnih bioloških funkcij, zaradi česar predstavljajo tarčo za nove učinkovine, predvsem zaradi interakcij med lektini in gostiteljskimi celicami (5).



Slika 2: Adhezija bakterij na urotelij. A: Bakterijska adhezija v običajnih pogojih. B: Odporne bakterije ostanejo vezane na receptorje, kljub prisotnosti inhibitorjev adhezije, občutljive bakterije pa se izločijo iz telesa s pretokom urina. Prirejeno po (6).

Lektine delimo na znotrajcelične lektine, ki so odgovorni za vezavo oligosaharidov in na zunajcelične lektine. Bakterijam lektini omogočajo adhezijo na receptorje gostitelja, s čimer se poveča njihova možnost preživetja pred obrambnim odzivom organizma (Slika 2). Z adhezijo bakterije onemogočijo organizmu njihovo izločanje s pretokom urina,

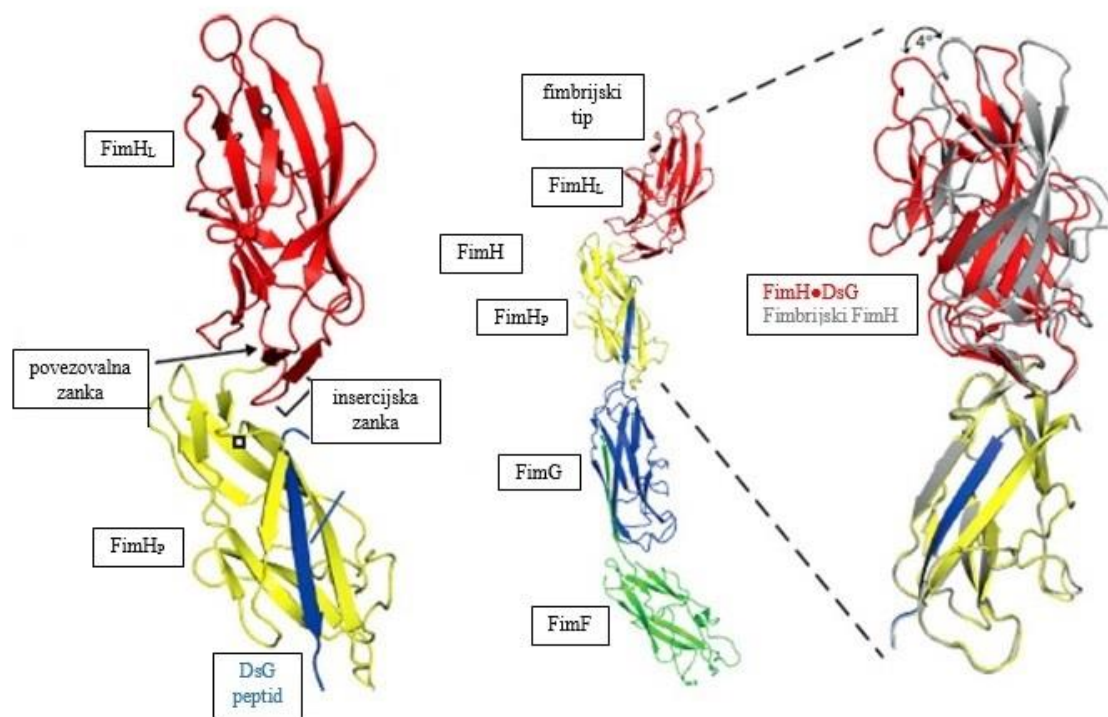
nevtralizacijo s protitelesi in encimsko razgradnjo. Z učinkovinami, ki bi preprečile bakterijam adhezijo na površino gostiteljskih celic, želimo nadomestiti antibiotično terapijo, ki postaja vedno bolj problematična zaradi razvoja bakterijske odpornosti (6,7).

1.2.1. Lektin FimH

Lektin FimH predstavlja podenoto fimbrij tipa 1, ki je značilen za družino *Enterobacteriaceae* in ga izraža veliko število sevov *E. coli*. Poleg *E. coli* ga tvorita tudi *Klebsiella pneumoniae* in *Salmonella spp.* Glede na afiniteto vezave na receptorje ločimo visoko in šibko manozno specifične fenotipe *E. coli*. V normalni črevesni flori so prisotni šibko manozno specifični fenotipi, ki se vežejo predvsem na trimanozne receptorje, saj gre za oligomanozne fenotipe. Z manjšimi mutacijami pri prehodu iz črevesne flore v urinarni trakt pa nekateri sevi pridobijo sposobnost vezave na monomanozne receptorje, zato govorimo o visoko manozno specifičnih fenotipih (1).

Tip 1 fimbrij sestoji iz dolgega paličastega dela in iz tankega vrha, ki ga v veliki meri predstavlja adhezin FimH. Poleg njega sta prisotna še FimF in FimG, ki sta odgovorna za integracijo lektina FimH v fimbrij, FimA pa predstavlja paličast del in tvori desno sučno strukturo heliksa. Lektin FimH se na začetku nahaja v obliki prekursorja s 300 AK, nato pa se med potovanjem preko notranje membrane pretvori v zrelo obliko s 279 AK. Fimbriji so poleg adhezije odgovorni tudi za prepoznavo zunanjih okoljskih dejavnikov, kot so pH, temperatura in vsebnost kisika, s čimer bakteriji omogočajo prilagajanje na zunanje dejavnike in posledično omogočajo njeno preživetje (8,9).

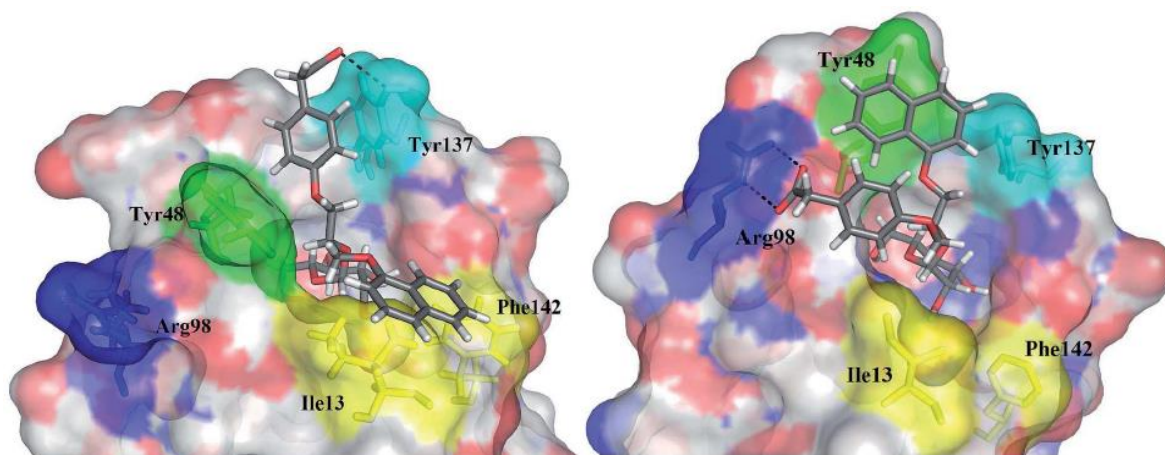
Lektin FimH na koncu fimbrija se veže na končne α -D-manoze receptorja na epiteljskih celicah urinarnega trakta. Sestoji iz N-končnega dela ali lektinske domene FimHL, ki veže D-manozo, in iz C-končnega dela fimbrije ali FimHP (Slika 3). Interakcije med obema domenama so odgovorne za vezavo liganda na FimHL (10).



Slika 3: Struktura lektina FimH. Prirejeno po (10).

Velik del lektina FimH je odgovoren za vezavo z receptorjem preko vodikovih vezi, preostali del pa tvori hidrofobne interakcije z okolico in na ta način izboljša vezavo na receptor (1).

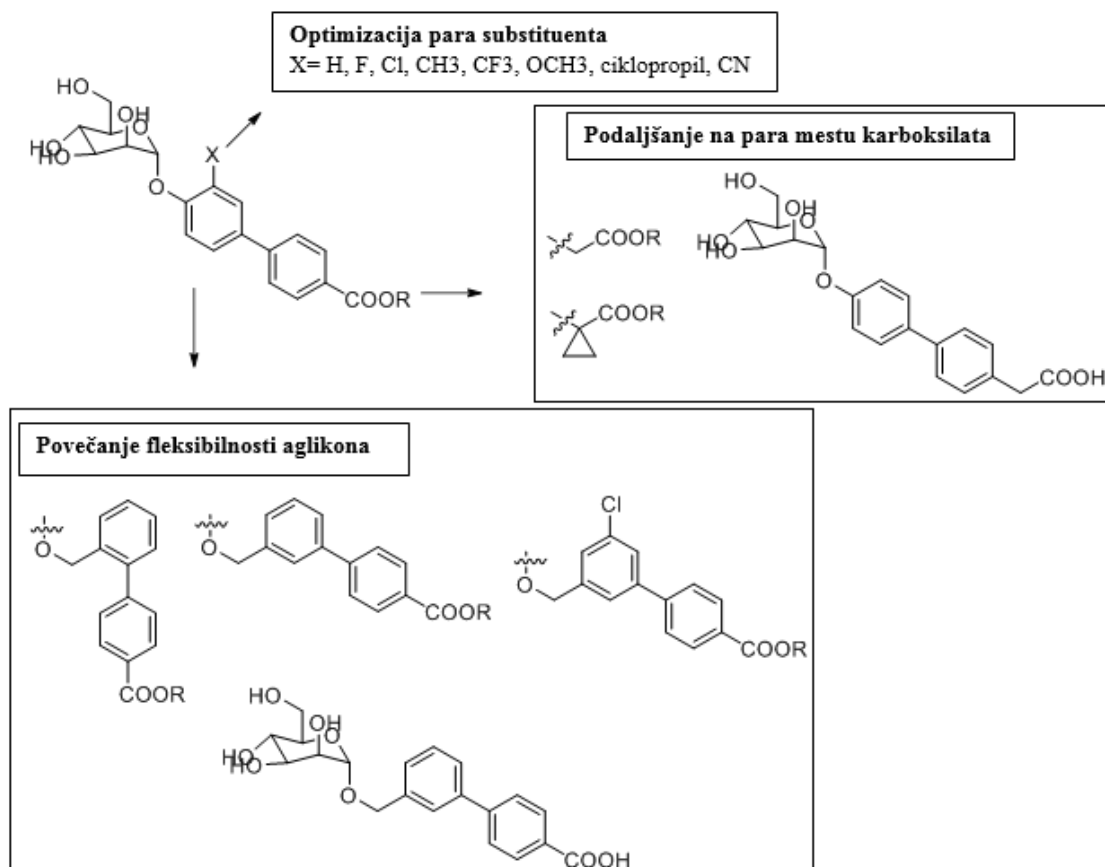
Fimbrije tvorijo interakcije z uroplakinom 1a na urotelijskih celicah. Tirozinska vrata tvorita amonikislina Tyr48 in Tyr137, ki sta pomembni za tvorbo hidrofobnih interakcij s preostalim delom molekule, ki ne sodeluje pri tvorbi vodikovih vezi (Slika 4). Odprta tirozinska vrata omogočajo tvorbo hidrofobne interakcije molekule s tirozinskimi vrati in hkrati interakcije s hidrofobno okolico (angl. *in-docking mode*). Zaprta ali pol odprta tirozinska vrata pa omogočajo hidrofobnemu delu molekule tvorbo interakcij le s hidrofobno okolico (angl. *out-docking mode*), kjer se lahko tvorijo dodatne interakcije preko ionskih in vodikovih vezi z Arg98 (11,12).



Slika 4: Odprta (levo) in zaprta (desno) konformacija lektina FimH. Prirejeno po (12).

1.3. Načrtovanje antagonistov lektina FimH

Pri načrtovanju novih antiadhezivnih učinkovin je osnova struktura lektina FimH. Glede na tridimenzionalno strukturo so z upoštevanjem vezavnega žepa načrtovali molekule, ki se z visoko afiniteto vežejo na omenjeni lektin. Bifenilni α -D-manozidi (Slika 5) so izkazali visoko vezavno afiniteto, z modifikacijami molekule pa so želeli izboljšati farmakokinetične lastnosti spojin. Bifenilni aglikon tvori π - π interakcije s hidrofobno okolico vezavnega žepa (t.i. *out-docking mode*), medtem ko α -D-manoza tvori vodikove vezi z vezavnim žepom. Bifenilna struktura zaradi slabe fleksibilnosti molekule ne omogoče tvorbe dovolj močnih interakcij, zato so z modifikacijami poskušali izboljšati le-te. Z vezavo klorovega atoma na *orto* mestu na obroču tik za manoznim fragmentom se vezava molekule v vezavno mesto izboljša. Z uvedbo dodatnega alkilnega fragmenta med anomernim kisikom in bifenilnim fragmentom molekule izboljšamo fleksibilnost molekule in hkrati povečamo topnost ter na ta način izboljšamo afiniteto vezave. Afiniteto vezave lahko izboljšamo tudi z uvedbo karboksilne skupine na *para* mestu na koncu bifenilnega obroča, pri čemer se tvorijo dodatne polarne interakcije z Arg98. Slabost estrov v obliki predzdravil za peroralno uporabo je njihova slaba topnost, ki jo lahko izboljšamo s porušenjem simetričnosti molekule. Prednost uporabe predzdravil v obliki estrov je njihova izboljšana absorpcija, medtem ko se molekula v obliki kisline hitro izloči iz telesa skozi ledvice (11,12).



Slika 5: Načrtovanje in optimizacija antagonistov lektina FimH. Prirejeno po (11).

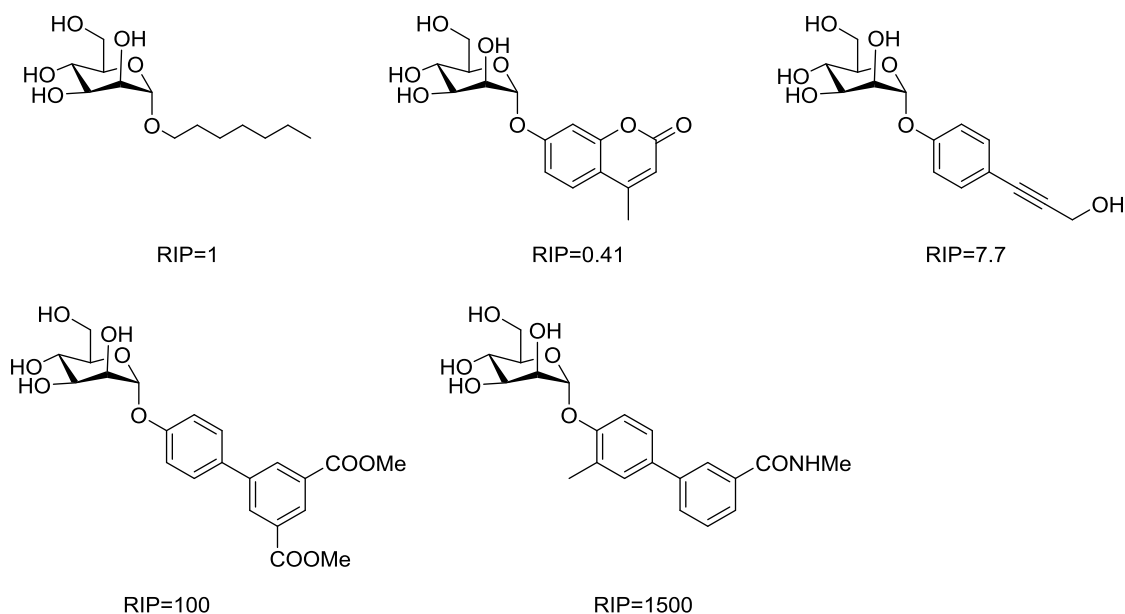
Novejši antagonisti lektina FimH vsebujejo namesto bifenilnega fragmenta arilne triazole ali indofenilne aglikone, ki imajo izboljšane farmakokinetične lastnosti. Prednost le-teh je v daljšem času zadrževanja spojine v telesu zaradi počasnejšega klirensa in večje afinitete vezave na plazemske proteine kot posledice večje lipofilnosti molekul. V primeru uporabe 1,3-diamino-2-propanolnega linkerja med O-glikozidom in aromatskim delom molekule dosežemo manjšo afiniteto vezave zaradi simetričnosti molekule, ki ne omogoča optimalne rotacije molekule v vezavnem mestu. Afiniteto vezave lahko izboljšamo z uporabo glicerolnega linkerja, ki omogoča interakcijo tako s tirozinskimi vrati kot tudi s hidrofobno okolico vezavnega mesta (12).

1.3.1. Znani antagonisti lektina FimH

1.3.1.1. O-manozidi

Raziskovalci so do sedaj razvili kar nekaj antagonistov lektina FimH, a do danes na trgu še ni registriranega nobenega zdravila z antiadhezivnim mehanizmom delovanja. Vse spojine, ki delujejo antagonistično na omenjeni lektin, vsebujejo α -D-manozo, ki se veže v vezavni žep preko vodikovih vezi. Na D-manozo vezan heptilni fragment (Slika 6) se je izkazal kot

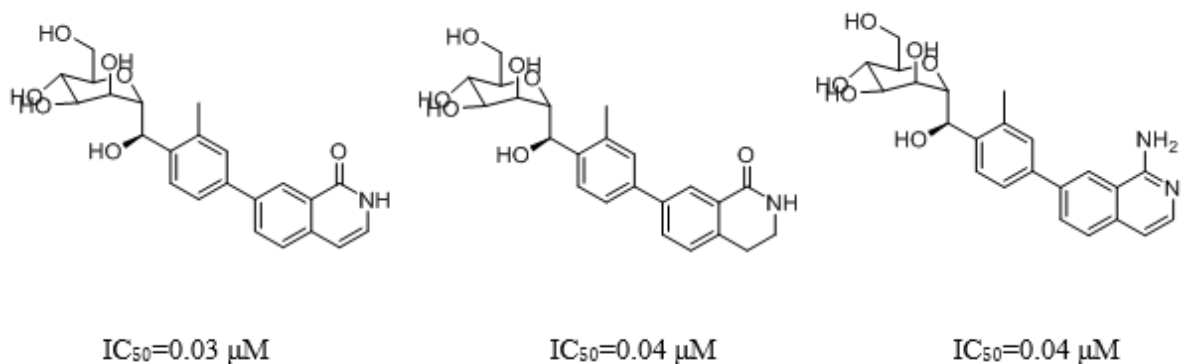
dober primer močnega antagonista, a so raziskovalci nadaljevali razvoj novih antagonistov lektina FimH z boljšo vezavno afiniteto. Ugotovili so, da zamenjava alkilnega fragmenta z aromatskim obročem bistveno izboljša vezavo zaradi močnejših hidrofobnih interakcij s Tyr48 in Tyr137, ki tvorita tirozinska vrata. Na ta način so razvili številne spojine z bifenilnim fragmentom (Slika 6), pri katerih so preko π - π interakcij bistveno izboljšali njihove vezavne lastnosti v primerjavi z alkilnimi fragmenti. Te spojine v obliki kislin imajo precej izboljšano topnost, medtem ko so spojine v obliki estrov učinkovite kot predzdravila. Spojine v obliki kislin se zaradi hidrofilnosti precej hitreje izločijo iz telesa kot njihovi estri. Raziskovalci so zato razvili nove spojine z izboljšanimi lastnostmi, ki omogočajo boljše delovanje in posledično boljši terapevtski učinek (12,13).



Slika 6: Strukture izbranih O-manozidov kot antagonistov lektina FimH (RIP=relativna inhibična jakost). Prirejeno po (12).

1.3.1.2. C-manozidi

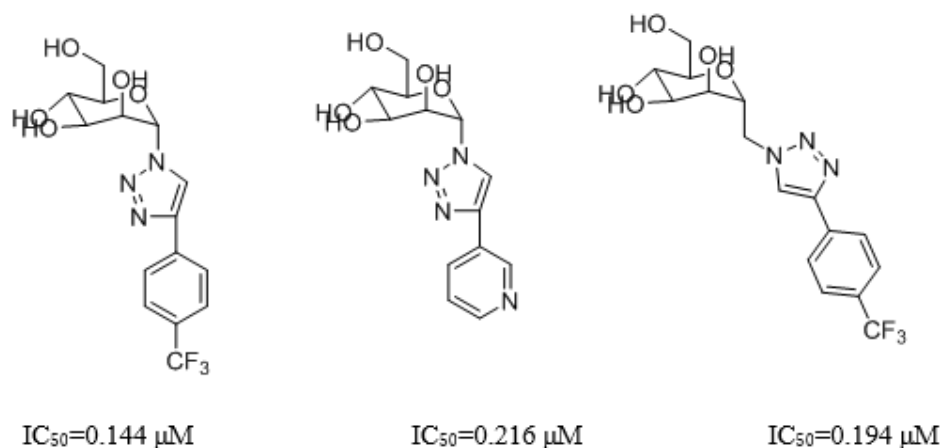
Namesto O-manozidov, ki so občutljivi na hidrolizo, so razvili spojine, pri katerih je kisikov atom na anomernem centru zamenjan z dušikom, žveplom ali ogljikom. Kot učinkovita zamenjava se je izkazal predvsem dušikov atom v obliki triazolnega fragmenta. V obliki C-manozidov pa so z optimizacijo molekule izboljšali fizikalno-kemijske lastnosti spojin in razvili heterociklične spojine, ki so kandidati za predklinična testiranja, saj so se v *in vivo* testiranjih izkazali za učinkovite (Slika 7). C-manozidi so v primerjavi z O-manozidi bistveno bolj stabilni, zato se poveča tudi njihova biološka uporabnost pri peroralni uporabi (14).

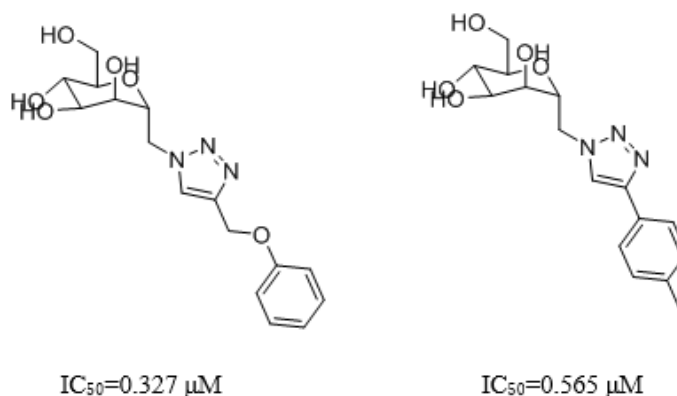


Slika 7: Strukture izbranih C-manozidov kot antagonistov lektina FimH. Prirejeno po (14).

1.3.1.3. N-manozidi

Raziskovalci so poleg optimizacije O-manozidov razvili tudi nove spojine v obliki N-manozidov (Slika 8). Bifenilni fragmenti se ne prilagodijo optimalno vezavnemu mestu zaradi slabe fleksibilnosti molekule, ki ne omogoča optimalne rotacije. Prvega od obročev so zato zamenjali s triazolnih obročem in z različnimi modifikacijami dosegli visoko afiniteto vezave. Z dodatnim C atomom med manozo in triazolnim obročem lahko še dodatno povečamo fleksibilnost molekule, medtem ko z dodanim halogenom povečamo afiniteto vezave (Slika 8). Z dodatnimi optimizacijami so na ta način sintetizirali vrsto novih potencialnih protimikrobnih učinkovin, ki imajo večjo biološko uporabnost kot do sedaj sintetizirane spojine (15).





Slika 8: Strukture izbranih N-manozidov kot antagonistov lektina FimH. Prirejeno po (15).

1.4. Antiadhezivna terapija

V boju proti patogenom uporabljamo različne pristope, s katerimi onemogočamo njihovo kolonizacijo v človeškem telesu. S pomočjo antiadhezivne terapije dosežemo željen učinek, ki ne temelji na baktericidnosti in posledično v manjši meri pride do razvoja bakterijske odpornosti. Pri tem pristopu je potrebno upoštevati vse komponente, ki sodelujejo pri adheziji. Poleg adhezinov na adhezijo pomembno vplivajo tudi hidrofobne in nespecifične interakcije (1,6,8).

Uporabimo lahko pristop receptorskih analogov, ki so strukturno podobni receptorjem in omogočijo kompetitivno inhibicijo adhezije. Na drugi strani pa lahko s pomočjo analogov adhezina kompetitivno inhibiramo vezavo adhezina, vendar nastopi problem zaradi same velikosti molekul in posledično slabe biološke uporabnosti. Hkrati je potrebno upoštevati tudi, da patogeni tvorijo več različnih adhezinov, ki se na različne načine vežejo na receptorje (1,6).

Uspešen pristop lahko dosežemo tudi z uporabo cepiv, s katerimi lahko preko aktivne in pasivne imunizacije preprečimo adhezijo patogenov. Pri aktivni imunizaciji aktiviramo sekretorna IgA protitelesa, hkrati pa pride tudi do aktivacije IgG protiteles, ki nato preprečijo razvoj okužbe. Pasivna imunizacija temelji na vnosu antiadhezivnih protiteles, ki jih tvori nek drug organizem in uspešno prepreči adhezijo v gostiteljskem organizmu. Eden od pristopov je tudi uporaba subletalne koncentracije antibiotikov, ki pa je slabo sprejet pri bolnikih in se ga zaradi slabe compliance bolnikov ne poslužujemo (6,16).

1.4.1. Alternativne poti antiadhezivne terapije

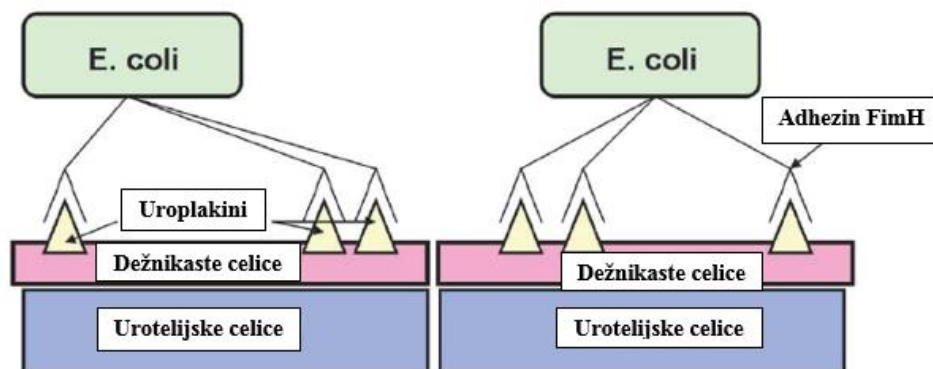
Z uživanjem določenih živil lahko dosežemo antiadhezivni učinek in na ta način preprečimo okužbe. Tak primer je uživanje ekstrakta brusnice (*Vaccinium macrocarpon*),

ki klinično dokazano deluje antiadhezivno in preprečuje okužbe urinarnega trakta. Ekstrakt vsebuje flavonoide, katehine, triterpenoide, askorbinsko kislino in organske kisline ter antocianine. Kombinacija teh spojin inhibira adhezijo *E. coli* v urinarnem traktu, ne deluje pa antiadhezivno na enterotoksikogeno *E. coli*, ki povzroča diarejo (6,16).

Na podoben način kot brusnica deluje tudi ekstrakt borovnice (*Vaccinium myrtillus*) in služi kot alternativa antibiotični terapiji ter preventiva okužbam urinarnega trakta. Z uživanjem ekstrakta vednozelenega gornika (*Arctostaphylos uva ursi*) dosežemo poleg antiadhezivnega učinka tudi protivnetni učinek, hkrati pa deluje tudi kot diuretik. Z uporabo rastlinskih pripravkov lahko preprečimo razvoj okužb na naraven način, s čimer se izognemo uporabi antibiotikov in težav, povezanih z odpornostjo bakterij (16).

1.5. Okužbe urinarnega trakta

Okužbe urinarnega trakta predstavljajo eno od najpogostejših okužb pri ženskah, s starostjo pa pogostost okužb narašča. Kar 25-50 % žensk po 80. letu starosti se srečuje s pojavom bakteriurije. Kritičen parameter predstavlja v začetni fazi adhezija bakterij na urotelijske celice, zaradi česar pride do kolonizacije v urinarnem traktu (Slika 9). Kadar bakterije zaidejo v mehur, pride do pojava cistitisa, kar predstavlja najpogostejšo okužbo, ki jo povzroča bakterija *E. coli*. V urinu se lahko pojavijo bakterije, ki jih odplavlja tok urina, saj različni tipi bakterij nimajo enake afinitete vezave na receptorje urotelija. Po Gramu negativne bakterije s kolonizacijo povzročijo $\geq 10^5$ bakterij/mL urina. V nekaterih primerih lahko bakterije povzročijo okužbo zgornjega dela urinarnega trakta, zaradi česar pride do pielonefritisa ali obolenja ledvic. V več kot 50 % primerov bolnikov s cistitisom pride tudi do okužbe ledvic. V določenih primerih lahko patogeni povzročijo okužbe urinarnega trakta tudi preko prehoda iz krvi ali preko limfatične poti.



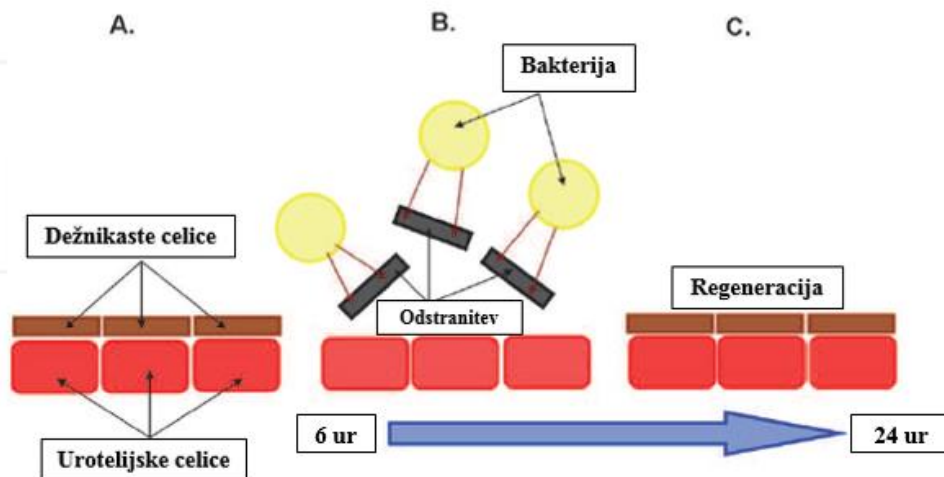
Slika 9: Adhezija bakterije *E. coli* na površinske ali dežnikaste celice urotelija preko uroplakina 1a. Prirejeno po (17).

Najpogostejši povzročitelj okužb urinarnega trakta je bakterija *E. coli*, ki povzroči tako nezapletene kot tudi zapletene okužbe urinarnega trakta (Preglednica II). V nekaterih primerih lahko okužbe obravnavamo kot zapletene, saj zahtevajo precej bolj kompleksno obravnavo tako zaradi narave bolnikov kot tudi zaradi pridruženih bolezenskih stanj. Tovrstne primere predstavljajo starostniki, bolniki z vstavljenimi katetri, sladkorno boleznijo, komorbidnost pri pediatrični populaciji in bolniki s poškodbami hrbtenjače (2,17).

Preglednica II: Primeri nekaterih bakterij, ki povzročajo okužbe urinarnega trakta. Prirejeno po (17).

Patogeni pri nezapletenih okužbah	Patogeni pri zapletenih okužbah
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Enterococcus faecalis</i>
	Skupina B streptokokov

Normalna flora ima dobre obrambne mehanizme, ki organizem ščitijo pred vdorom patogenov (Slika 10). V primeru porušanja normalne flore z uporabo protimikrobnih učinkovin, povečamo verjetnost za okužbe, saj so obrambni mehanizmi manj učinkoviti. Ženski spol je bolj dovzeten za okužbe urinarnega trakta, saj je sečnica pri ženskah krajša in tudi razdalja med sečnico in anusom je manjša kot pri moških. Pri postmenopavzalnih ženskah pride zaradi zmanjšane izločanja estrogenov do porušanja vaginalne flore in posledično do zvišanja pH, kar vodi do zmanjšane števila koristnih bakterij, ki jih predstavlja *Lactobacillus acidophilus*. Kot rezultat imajo postmenopavzalne ženske večjo verjetnost za okužbe urinarnega trakta preko okužb z *Enterobacteriaceae* (17).



Slika 10: Obnavljanje urotelijskih celic. V normalnih pogojih se pri zdravem človeku dežnikaste celice obnavljajo vsakih nekaj mesecev, medtem ko je pri vnetjih obnova pogostejša. Po 6 urah od začetne adhezije bakterij se plast dežnikastih celic urotelija odstrani in v 24 urah pride do regeneracije okuženih celic. Prirejeno po (17).

Sevi *E. coli* iz urina hospitaliziranih bolnikov so precej bolj odporni proti protibakterijskim učinkovinam kot sevi *E. coli*, izolirani iz urina nehospitaliziranih bolnikov z okužbami urinarnega trakta. Razlog za razlike je predvsem v pogostejši uporabi protibakterijskih učinkovin pri bolnikih v bolnišnicah zaradi zdravljenja različnih vrst okužb. V bolnišnični oskrbi je zdravljenje okužb urinarnega trakta velik problem zaradi odpornosti bakterij proti protibakterijskim učinkovinam, problem pa predstavljajo tudi bolniki z diabetesom, pri katerih lahko okužbe urinarnega trakta povzročijo resnejše zaplete in poslabšajo sladkorno bolezen (18).

1.5.1. Zdravljenje okužb urinarnega trakta s protimikrobnimi učinkovinami

Pri uporabi protibakterijskih učinkovin se želimo izogniti uporabi širokospektralnih učinkovin in se s tem izogniti neželenim učinkom na gastrointestinalni trakt. Problem predstavlja predvsem selekcijski pritisk širokospektralnih protibakterijskih učinkovin in posledično razvoj odpornosti bakterij. Najpogosteje uporabljene protibakterijske učinkovine pri zdravljenju okužb urinarnega trakta so amoksisilin, kloksacilin, eritromicin, cefaleksin, gentamicin in ciprofloksacin (18,19).

Najvišja odpornost bakterij je še vedno proti amoksicilinu in trimetoprimu (51,5 %), precej nizka pa je odpornost proti gentamicinu (4,8 %). Pri zdravljenju z ozkospektralnimi protibakterijskimi učinkovinami se v zadnjem času poslužujemo uporabe nitrofurantoina,

saj imajo bakterije proti tej učinkovini nizko odpornost. Kontraindicirana pa je uporaba nitrofurantoina pri ženskah v rodni dobi, pri dojenčkih in v primeru pacientov s slabo ledvično funkcijo (16,19).

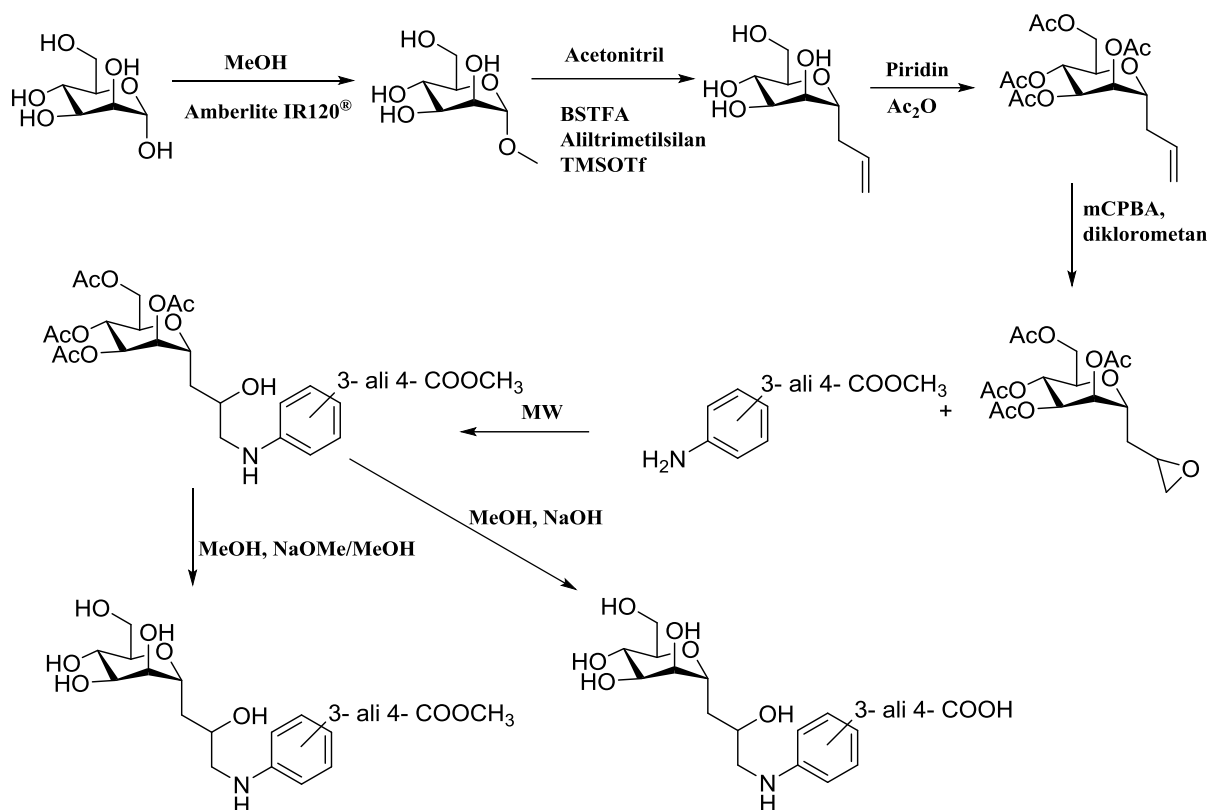
V primeru nezapletenih okužb se poslužujemo zdravljenja s kombinacijo trimetoprim-sulfametoksazol, saj so v večini primerov bakterije občutljive na ta režim zdravljenja. Problem predstavlja vedno večja odpornost bakterij proti tej kombinaciji protimikrobnih učinkovin, hkrati pa bakterije pridobivajo odpornost tudi proti drugim protibakterijskim učinkovinam. Na drugi strani pa je odpornost bakterij proti nitrofurantoinu in ciprofloksacinu precej nizka, zato se v primeru neučinkovite terapije poslužujemo uporabe le-teh. Na podlagi kliničnih študij priporočajo zdravljenje nezapletenih okužb s fluorokinoloni in nitrofurantoinom (17,19).

V eni izmed študij so dokazali, da se pri kombinaciji protimikrobnih učinkovin odpornost razvije počasneje in v manjšem obsegu kot pri uporabi ene same protimikrobne učinkovine. Kombinacije kloramfenikola in oksitetraciklina ter kombinacija kloramfenikola in polimiksina delujejo sinergistično, zato se v teh primerih uporabljajo polovični odmerki običajnih odmerkov (20).

2. NAMEN DELA

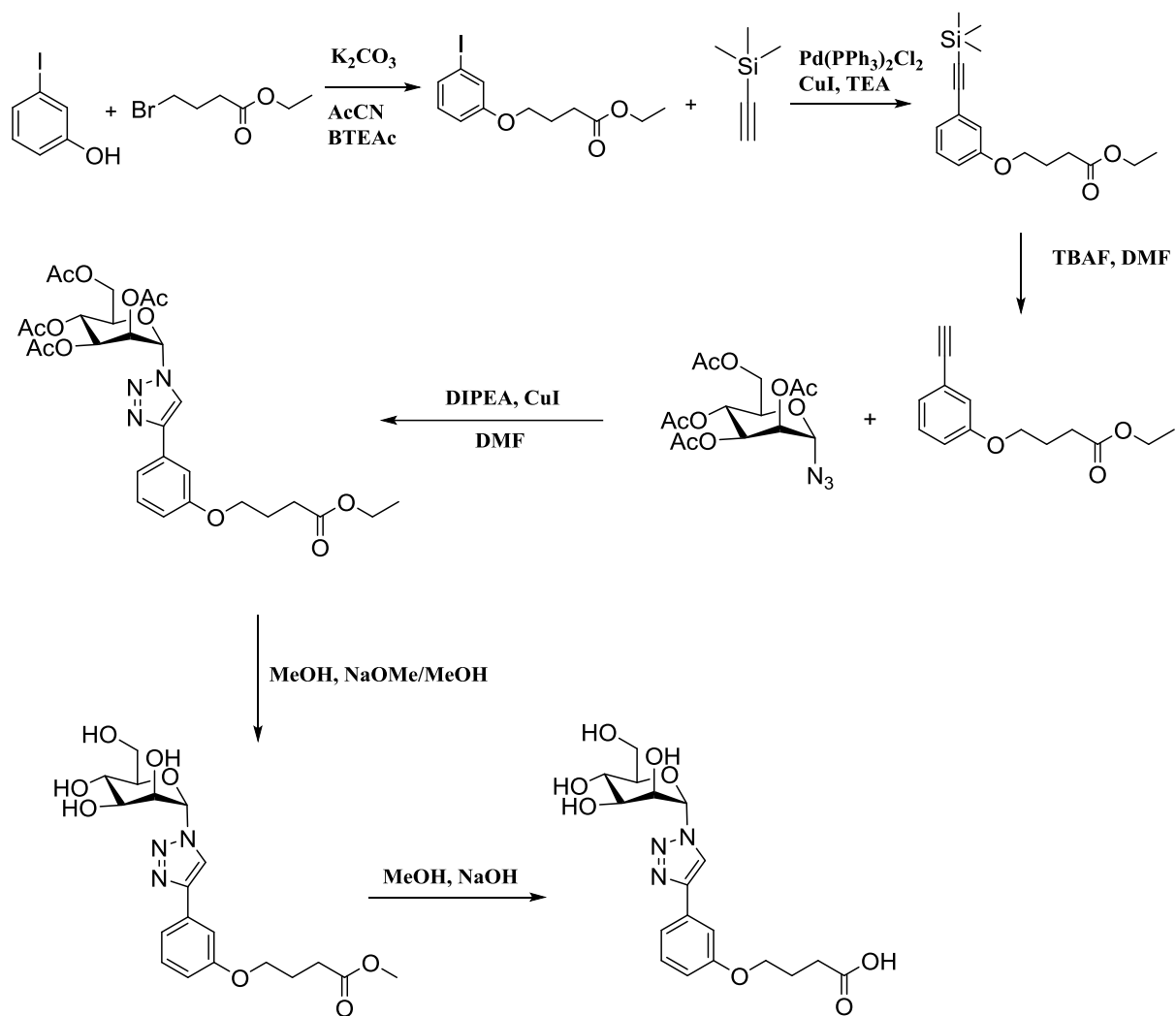
Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge bomo načrtovali in sintetizirali nove potencialne antagoniste lektina FimH v obliki C-manozidov in N-manozidov. Izhajali bomo iz že sintetiziranih antagonistov, ki jim bomo z modifikacijami izboljšali fizikalno-kemijske lastnosti in na ta način predvidoma povečali njihovo biološko uporabnost. Namen dela je izboljšati interakcije med spojinami in vezavnim mestom lektina FimH, pri čemer poleg D-manoze v veliki meri sodeluje tudi aglikonski del, ki tvori π - π interakcije s tirozinskimi vrati. Pomembno vlogo pri tem imata aminokislini Tyr48 in Tyr137, ki predstavljata vstop do vezavnega mesta, kjer se tvorijo vodikove vezi s hidroksilnimi skupinami D-manoze. Aglikonski del molekule mora biti ustrezne velikosti, da se tvorijo dovolj močne interakcije s hidrofobno okolico vezavnega mesta. Prevelik aglikonski del pa zniža afiniteto vezave zaradi ločitve manoze od vezavnega mesta, saj se vzpostavijo precej močne hidrofobne interakcije z okolico.

Za sintezo C-manozidov bomo izhajali iz D-(+)-manoze, na kateri bomo s Fischerjevo glikozilacijo metilirali anomerno OH skupino. V naslednjem koraku bomo na anomerno mesto uvedli alilno skupino in nato zaščitili vse OH skupine manoze s pomočjo acetanhidrida. Alilno skupino bomo nato pretvorili v epoksid, na katerega bomo kasneje vezali anilinski derivat. Za odpiranje epoksida bomo uporabili metil 3-aminobenzoat in metil 4-aminobenzoat ter tako dobili več različnih spojin. V zaključni fazi bomo z Zemplénovo metodo odstranili acetilno zaščito in tako prišli do prve končne spojine v obliki estra, v primeru alkalne hidrolize pa bomo dobili spojino v obliki kisline (Slika 11).



Slika 11: Sintezna shema tvorbe C-manozidov.

Pri sintezi N-manozidov bomo izhajali iz 3-jodofenola in alkil halida v obliki estra z različno dolžino verige. V prvi stopnji bomo za tvorbo željene spojine uporabili Williamsonovo sintezo etrov, v naslednji stopnji pa bomo s pomočjo sklopitve Sonogashira na benzenov obroč pripeli etilno skupino z dodatkom trimetilsilil acetilena. Iz tvorjene spojine bomo nato odstranili sililno zaščito, s Huisgenovo cikloadicijo pa bomo združili D-manozni ter aglikonski del in dobili spojino s triazolnim obročem. Na koncu bomo s pomočjo Zemplénove metode in alkalne hidrolize tvorili končne spojine v obliki estrov in kislin (Slika 12).



Slika 12: Sintezna shema tvorbe N-manozidov.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

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

3.2. Spektroskopske metode

3.2.1. Jedrska magnetna resonanca (NMR)

Za identifikacijo spojin smo uporabljali jedrsko magnetno resonanco. ^1H -NMR spektre smo posneli na Bruker Avance III 400 MHz spektrometru na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Kot topilo smo uporabili CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$ in $\text{MeOH-}d_4$, za interni standard pa smo uporabili TMS. NMR spektre smo reševali s pomočjo programa MestRe-C, proizvajalca Mestrelab Research S.L.

3.2.2. Infrardeča spektroskopija (IR)

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

3.2.3. Masna spektrometrija (MS)

Masni spektri so bili posneti na masnem spektrometru VG-Analytical AutoSpec Q z ESI tehniko v Centru z masno spektrometrijo Instituta Jožef Stefan v Ljubljani.

3.3. Kromatografske metode

3.3.1. Tankoplastna kromatografija (TLC)

S tankoplastno kromatografijo smo spremljali potek reakcij in izolacij produktov, izbirali ustrezno mobilno fazo za čiščenje produktov s kolonsko kromatografijo in spremljanje poteka čiščenja. Kot stacionarno fazo smo uporabili plošče proizvajalca Merck, TLC Silica Gel 60 F₂₅₄ z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Kot mobilne faze smo uporabili različne kombinacije in razmerja topil, navedene pa so pri posameznem sinteznem postopku. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabili UV svetilko z valovno dolžino 254 nm ali 366 nm, kot orositveni reagent pa smo uporabili fosfomolibdat.

3.3.2. »Flash« kolonska kromatografija

Po končani reakciji smo produkte očistili s kolonsko kromatografijo. Glede na količino produkta smo uporabili steklene kolone različnih dolžin. Za stacionarno fazo smo uporabili Silica Gel 60 proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,04 – 0,063 mm, kot mobilno fazo pa smo uporabili različne kombinacije in razmerja topil.

3.3.3. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC – high-performance liquid chromatography) uporabljamo za kvalitativno in kvantitativno vrednotenje vzorcev. HPLC analize so bile izvedene na aparaturi Agilent Technologies 1100 z uporabo G1365B UV-VIS detektorja, G1316A termostata in G1313A avtomatskega vzorčevalnika. Pri meritvah je bila uporabljena kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μ m, 4,6 \times 150 mm) kot MF pa 0,1 % trifluoroocetna kislina (A) v vodi in acetonitril (B). Gradientna elucija MF: 2 minuti 95 % A, 90 % A do 10 % A v 12-ih minutah, 10 % A do 5 % A v 1 minuti in nato 5 minut 5 % A; uporabljen pretok MF: 1,0 mL/min; volumen injiciranja: 10 μ L. Valovna dolžina detekcije je bila 254 nm.

3.4. Temperatura tališča

Temperaturo tališča smo določali na Kofflerjevem mikroskopu z ogrevalno mizico Leica na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

3.5. Mikrovalovni reaktor

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

3.6. Poimenovanje in risanje spojin

Za risanje in poimenovanje strukturnih formul spojin smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 12.0 proizvajalca Cambridge Soft.

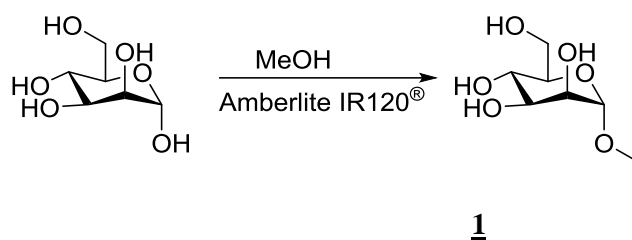
3.7. Biokemijska testiranja

Biološka testiranja so bila opravljena na Institute of Molecular Pharmacy, University of Basel v Švici. Afiniteto spojin za vezavo na receptor so testirali s testom fluorescenčne polarizacije, na podlagi česar so določili afiniteto vezave sintetiziranih spojin.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. SINTEZA C-MANOZIDOV

4.1.1. Sinteza metil- α -D-manopiranozida



D-(+)-manozo (10,0 g, 55,5 mmol) smo raztopili v 200 mL MeOH v 500 mL bučki in med mešanjem na magnetnem mešalu dodali 10 g smole Amberlite IR120[®]. Reakcijsko zmes smo pustili refluktirati 24 ur pri 75 °C v brezvodnih pogojih, hladilnik pa smo opremili s septumom ter na vrhu septum prebodli z iglo in nanj namestili prazen balon zaradi možnosti povečanja tlaka v reakcijski zmesi. Vzorcju smo nato uparili topilo na rotavaporju ter dobili belo-rumeno trdno snov.

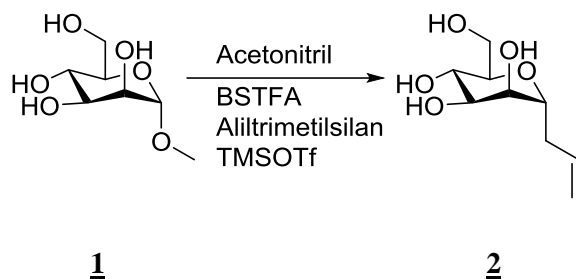
m (teoretično)= 10,78 g

m (praktično)= 8,49 g

izkoristek reakcije= 78,8 %

metil-α-D-manopiranozid	
Elementna sestava: C ₇ H ₁₄ O ₆	
Molska masa: 194,18 g/mol	
Izgled: svetlo rumeno strjeno olje	
Rr: 0,26 (diklorometan:metanol= 5/1)	
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 4,71 (dd, 2H, $J_1 = 4,8$ Hz, $J_2 = 2,6$ Hz, <u>Man-H</u>), 4,57 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz, <u>Man-H</u>), 4,49 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, <u>Man-H</u>), 4,47 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz, <u>Man-H</u>), 3,66 (ddd, 1H, $J_1 = 11,6$ Hz, $J_2 = 6,0$ Hz, $J_3 = 2,0$ Hz, <u>Man-H</u>), 3,59 (ddd, 1H, $J_1 = 4,6$ Hz, $J_2 = 3,4$ Hz, $J_3 = 1,6$ Hz, <u>Man-H</u>), 3,38-3,48 (m, 4H, 4 x <u>Man-H</u>), 3,22-3,27 (m, 4H, <u>Man-H</u> , <u>CH₃</u>) ppm

4.1.2. Sinteza 3- α -D-manopiranozilpropena



Izhodno spojino 1 (5,010 g, 25,8 mmol) smo raztopili v 30 mL acetonitrila in dodali BSTFA (5,12 mL, 4,983 g, 19,4 mmol). Spojina se tudi po daljšem segrevanju ni popolnoma raztopila v topilu. Reakcijsko zmes smo pustili refluktirati čez noč pri 80 °C. Bučko smo nato odstranili iz oljne kopeli in jo ohladili na ledu. Pri 0 °C smo po kapljicah skozi septum z iglo dodali aliltrimetilsilan (8,20 mL, 51,6 mmol) ter TMSOTf (9,34 mL, 51,6 mmol). Pri dodatku TMSOTf je prišlo do burne eksotermne reakcije, zato je pomembno ohlajati bučko na ledu in postopno dodajati reagent. Reakcijsko zmes smo nato pustili mešati čez noč na sobni temperaturi.

IZOLACIJA:

V bučko smo dodali 20 mL ledene vode in pustili mešati na sobni temperaturi 2,5 ure. Reakcijsko zmes smo nato naalkalili z NaOH do pH 7. Pri tem smo uporabili uprašene granule NaOH, da bi čim manj povečali volumen reakcijske zmesi. V naslednjem koraku smo uparili topilo na rotavaporju, pri čemer smo dobili oljnato snov rjave barve.

Vzorec smo raztopili v 10 mL vode in dodali nekaj mL etilacetata, nato pa raztopljeno zmes prenesli v lij ločnik in jo ekstrahirali v etilacetat. V preostali del neraztopljene snovi v bučki smo dodali še nekaj mL etilacetata in pri raztapljanju je nastala bela oborina, ki smo jo nato odnučali. Na kromatogram smo nato nanegli standard, obe fazi v liju ločniku (vodna in organska faza), oborino in matičnico. Oborino smo zavrgli, matičnico in vodno fazo pa smo združili ter še nekajkrat ekstrahirali v etilacetat, dokler je iz vodne faze v etilacetat še prehajal naš končni produkt. Organske faze smo nato združili, pred uparevanjem topila na rotavaporju pa smo v reakcijsko zmes dodali brezvodni trdni Na₂SO₄, ki je vezal preostalo vodo. Na₂SO₄ smo nato odstranili s filtracijo, nato pa uparili topilo. V bučki smo na koncu zopet dobili oljnato snov rjave barve.

ČIŠČENJE: KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

S pomočjo kolonske kromatografije smo očistili dobljeni surovi produkt. Uporabili smo mobilno fazo etilacetat:MeOH = 8:1, proti koncu čiščenja pa etilacetat:MeOH = 5:1. Stacionarna faza za kolono je bil silikagel. Mobilna faza za spremljanje poteka čiščenja je bil etilacetat:MeOH = 4:1, orositveni reagent pa fosfomolibdat. Izbrane frakcije smo združili in uparili topilo na rotavaporju.

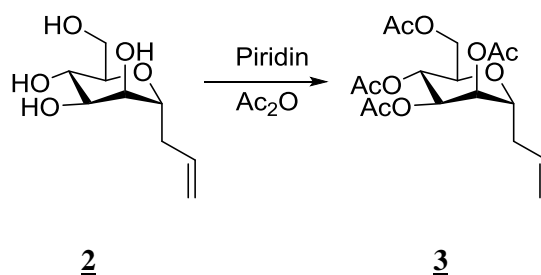
m(teoretično)= 5,27 g

m(praktično)= 2,44 g

izkoristek reakcije= 46,3 %

3-α-D-manopiranozilpropen	
Elementna sestava: C ₉ H ₁₆ O ₅	
Molska masa: 204,22 g/mol	
Izgled: rumeno strjeno olje	
R_f: 0,24 (MF: etilacetat/metanol= 8/1)	
¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ 5,88 (m, 1H), 5,15 (m, 1H), 5,09 (m, 1H), 3,93 (ddd, $J_1 = 8,8$ Hz, $J_2 = 6,6$ Hz, $J_3 = 2,4$ Hz, 1H), 3,54-3,88 (m, 1H), 3,44-3,52 (m, 1H), 2,48-2,68 (m, 1H), 2,33-2,43 (m, 1H) ppm
IR (ATR)	ν 3589, 1560, 1258, 1190, 1171, 1035, 766, 623, 531, 515 cm ⁻¹

4.1.3. Sinteza 3-(tetra-*O*-acetyl- α -D-manopiranozil)propena



Izhodno spojino 2 (0,587 g, 2,87 mmol) smo raztopili v 9 mL piridina. Na ledeni kopeli smo po kapljicah dodali acetanhidrid (1,470 g, 14,4 mmol), reakcijsko zmes pa smo pustili mešati pri sobni temperaturi čez noč.

IZOLACIJA:

Na rotavaporju smo uparili piridin, nato pa smo v bučko dodali 20 mL etilacetata. Izvedli smo ekstrakcijo najprej z 2×10 mL HCl, nato pa z 2×10 mL nasičene raztopine NaHCO_3 . Preostanka vode smo se znebili s sušenjem nad Na_2SO_4 , ki smo ga nato odfiltrirali. Na rotavaporju smo uparili etilacetat in dobili oljnat produkt.

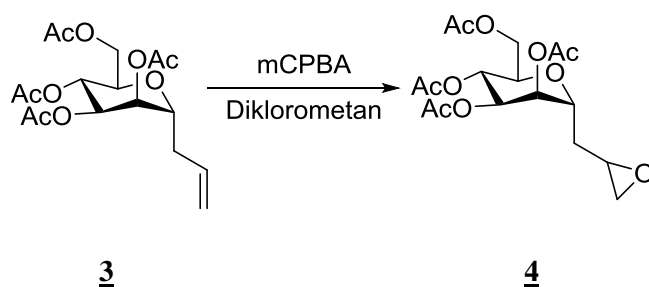
m (teoretično)= 1,07 g

m (praktično)= 0,44 g

izkoristek reakcije= 41,1 %

3-(tetra-<i>O</i>-acetil-α-D-manopiranozil)propen	
Elementna sestava: $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_9$	
Molska masa: 372,37 g/mol	
Izgled: rumeno olje	
Rf: 0,60 (MF: etilacetat/metanol= 4/1)	
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ 5,22-5,37 (m, 1H), 4,74 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz), 4,31 (dd, 1H, $J_1 = 12,2$ Hz, $J_2 = 5,4$ Hz, <u>Man-H</u>), 4,10-4,18 (m, 2H), 3,99 (ddd, 1H, $J_1 = 9,4$ Hz, $J_2 = 5,4$ Hz, $J_3 = 2,4$ Hz, <u>Man-H</u>), 2,18 (s, 3H, <u>OCOCH₃</u>), 2,12 (s, 3H, <u>OCOCH₃</u>), 2,06 (s, 3H, <u>OCOCH₃</u>), 2,01 (s, 3H, <u>OCOCH₃</u>) ppm
IR (ATR)	ν 1739, 1434, 1368, 1219, 1117, 1047, 986, 917, 765, 642, 601, 511 cm^{-1}

4.1.4. Sinteza 1',2'-epoksi-3'-(tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranozil)propana



Izhodno spojino **3** (0,437 g, 1,17 mmol) smo raztopili v 10 mL diklorometana in dodali oksidant mCPBA (0,395 g, 1,71 mmol). Reakcijsko zmes smo refluktirali 2 uri pri 50°C ,

vmes pa s pomočjo TLC-ja spremljali potek reakcije. Po refluktiranju smo uparili topilo na rotavaporju in nato izvedli čiščenje.

ČIŠČENJE: KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

S pomočjo kolonske kromatografije smo očistili dobljeni surovi produkt. Kot mobilno fazo smo uporabili etilacetat:heksan = 1:2, proti koncu čiščenja pa etilacetat:heksan = 2:1. Uporabljena stacionarna faza je silikagel, mobilna faza za spremljanje poteka čiščenja pa etilacetat:heksan = 1:2. Naš produkt se je precej časa zadrževal na koloni, zato smo ga eluirali šele s spremembo mobilne faze z večjim deležem etilacetata (bolj polarna mobilna faza).

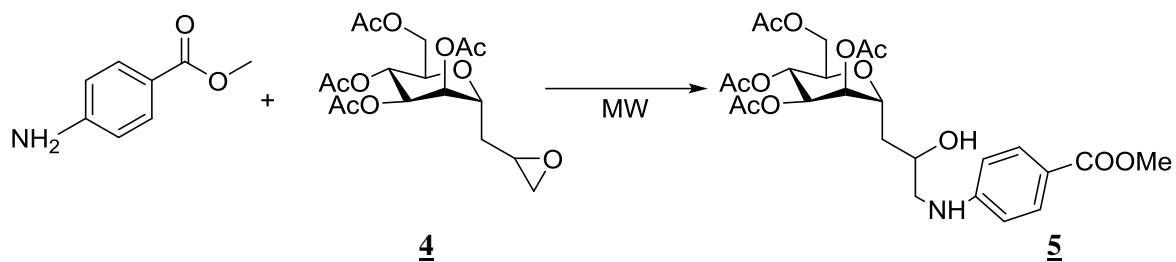
m (teoretično)= 456,0 mg

m (praktično)= 385,0 mg

izkoristek reakcije= 84,0 %

1',2'-epoksi-3'-(tetra-<i>O</i>-acetil-α-D-manopiranozil)propan	
Elementna sestava: C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	
Molska masa: 388,37 g/mol	
Izgled: rumeno strjeno olje	
R_f: 0,10 (MF: etilacetat/heksan= 1/2)	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ 5,14-5,24 (m, 3H), 4,41-4,49 (m, 1H), 4,11-4,27 (m, 2H), 3,94-4,04 (m, 1H), 3,04-3,10 (m, 1H), 2,80-2,88 (m, 1H), 2,57-2,60 (m, 1H), 2,06-2,16 (m, 12H, 4 \times OCOCH ₃), 1,96 (m, 1H, oksiran- <u>H</u>), 1,68 (ddd, 1H, $J_1 = 14,8$ Hz, $J_2 = 7,0$ Hz, $J_3 = 4,2$ Hz, oksiran- <u>H</u>) ppm
IR (ATR)	ν 1736, 1431, 1368, 1213, 1128, 1045, 982, 905, 851, 753, 601 cm ⁻¹

4.1.5. Sinteza metil 4-((3-(tetra-*O*-acetyl- α -D-manopiranozil)-2-hidroksipropil)amino)benzoata



Pogoji: MW, 120°C, 60 min + 60 min, 15 bar

Izhodno spojino **4** (0,131 g, 0,337 mmol) smo raztopili v 3 mL 1,4-dioksana, dodali za konico spatule kalcijevega triflata (katalizator) in metil 4-aminobenzoat (0,076 g, 0,51 mmol) v prebitku. Nastalo reakcijsko zmes smo reagirali v mikrovalovnem reaktorju pri 120 °C 60 minut, da je reakcija hitreje potekla. Ker je v končnem produktu ostalo še precej izhodne spojine, smo reakcijsko zmes pustili v mikrovalovnem reaktorju še 60 minut, a tudi s tem nismo dosegli popolnega poteka reakcije. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom.

ČIŠČENJE: KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

Z dobljenim surovim produktom smo nato izvedli čiščenje s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, kot mobilno fazo pa etilacetat:heksan= 1:1. Združili smo frakcije, v katerih se je pojavil naš produkt. Orositveni reagent za detekcijo je bil fosfomolibdat. Združenim frakcijam smo nato uparili topilo na rotavaporju, pri čemer smo dobili rumeno oljnato snov.

m (teoretično)= 182,0 mg

m (praktično)= 37,0 mg

izkoristek reakcije= 20,3 %

metil 4-((3-(tetra-<i>O</i>-acetyl-α-D-manopiranozil)-2-hidroksipropil)amino)benzoat

Elementna sestava: C ₂₅ H ₃₃ NO ₁₂
--

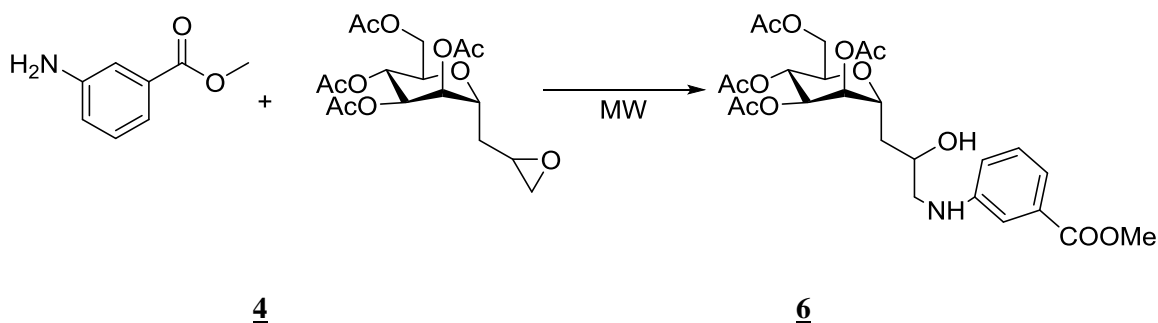
Molska masa: 539,53 g/mol

Izgled: brezbarvno olje

R_f: 0,11 (MF: etilacetat/heksan= 1/1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ 7,87-7,90 (m, 2H, 2 × ArH), 6,60-6,62 (m, 2H, 2 × ArH), 5,32 (dd, 0,5H, $J_1 = 6,0$ Hz, $J_2 = 3,2$ Hz), 5,19-5,29 (m, 1H), 5,10-5,14 (m, 1H), 5,02 (dd, $J_1 = 6,0$ Hz, $J_2 = 4,4$ Hz, 0,5H), 4,91 (dd, 0,5H, $J_1 = 12,2$ Hz, $J_2 = 8,6$ Hz), 4,50 (dd, 0,5H, $J_1 =$ 12,2 Hz, $J_2 = 8,8$ Hz), 4,26-4,36 (m, 1H), 4,10-4,16 (m, 1H), 3,98-4,02 (m, 1H), 3,92 (dd, 1H, $J_1 = 12,2$ Hz, $J_2 = 2,8$ Hz), 3,87 (s, 3H, COOCH ₃), 3,30-3,34 (m, 1H), 3,10-3,22 (m, 1H), 2,05-2,15 (m, 12 H, 4 × OCOCH ₃), 1,75-1,78 (m, 2H) ppm
--	---

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



Pogoji: MW, 120°C, 60 min + 60 min, 15 bar

Izhodno spojino **4** (0,165 g, 0,425 mmol) smo raztopili v 3 mL 1,4-dioksana, dodali za konico spatule kalcijevega triflata (katalizator) in metil 3-aminobenzoat (0,096 g, 0,64 mmol) v prebitku. Nastalo reakcijsko zmes smo reagirali v mikrovalovnem reaktorju pri 120 °C 2 uri, da je reakcija hitreje potekla. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom.

ČIŠČENJE: KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

Z dobljenim surovim produktom smo nato izvedli kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, kot mobilno fazo pa etilacetat:heksan= 1:1. Združili smo frakcije, v katerih se je pojavil naš produkt. Orositveni reagent za detekcijo je bil fosfomolibdat. Združenim frakcijam smo nato uparili topilo na rotavaporju, pri čemer smo dobili rumeno oljnato snov.

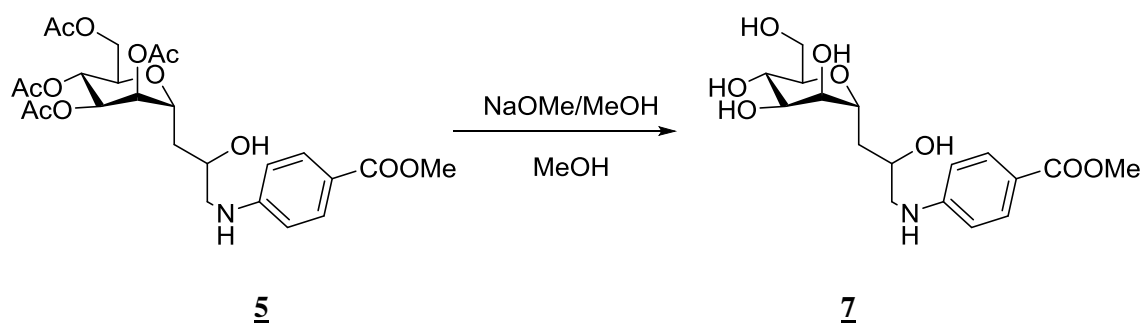
m (teoretično)= 229,2 mg

m (praktično)= 129,0 mg

izkoristek reakcija= 56,0 %

metil 3-((3-(tetra-<i>O</i>-acetil-α-D-manopiranozil)-2-hidroksipropil)amino)benzoat	
Elementna sestava: C ₂₅ H ₃₃ NO ₁₂	
Molska masa: 539,53 g/mol	
Izgled: svetlo rumeno strjeno olje	
R_f: 0,12 (MF= etilacetat/heksan= 1/1)	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 7,40-7,42 (m, 1H, ArH), 7,32-7,337 (m, 1H, ArH), 7,23-7,27 (m, 1H, ArH), 6,85 (ddd, 1H, $J_1 = 8,1$ Hz, $J_2 = 2,5$ Hz, $J_3 = 1,0$ Hz, ArH), 5,12-5,33 (m, 3H), 5,05 (dd, 0,5H, $J_1 = 6,3$ Hz, $J_2 = 4,7$ Hz), 4,86 (dd, 0,5H, $J_1 = 12,1$ Hz, $J_2 = 8,3$ Hz), 4,20-4,35 (m, 2H), 4,10-4,17 (m, 1H), 3,93-4,02 (m, 2H), 3,92 (s, 3H, COOCH ₃), 3,29-3,33 (m, 2H), 3,09-3,22 (m, 1H), 2,01-2,15 (m, 12 H, 4 \times OCOCH ₃), 1,77-1,82 (m, 2H) ppm
HRMS (ESI⁺)	izračunan 540,2081; izmerjen 540,2079
IR (ATR)	v 1736, 1606, 1491, 1437, 1368, 1217, 1108, 1045, 992, 901, 755, 685, 601 cm ⁻¹

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



Izhodno spojino 5 (0,037 g, 0,069 mmol) smo raztopili v 5 mL MeOH in dodali 2 kapljici NaOMe v MeOH ter pustili mešati na magnetnem mešalu čez noč pri sobni temperaturi. Za izolacijo naše spojine smo v bučko dodali konico spatule ionsko-izmenjevalne smole Amberlite IR120[®], nato pa smo reakcijsko zmes pustili mešati pol ure pri sobni temperaturi. Smolo smo predhodno sprali z MeOH, da smo se znebili morebitnih nečistot.

Smolo smo nato odfiltrirali z odsesavanjem, matičnici pa uparili topilo pod znižanim tlakom.

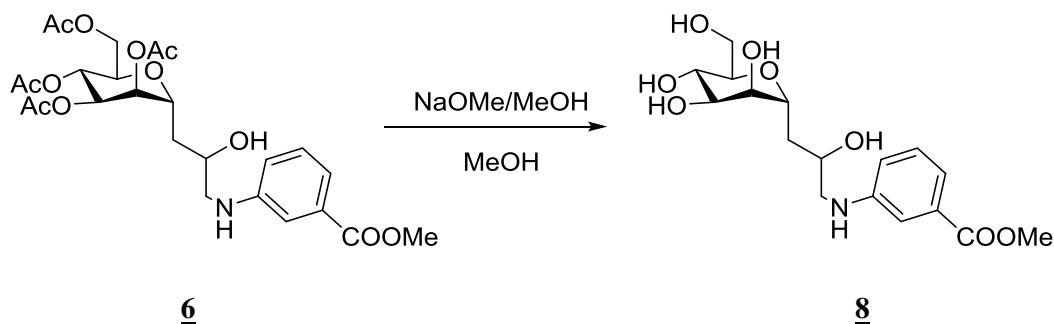
m (teoretično)= 25,5 mg

m (praktično)= 13 mg

izkoristek reakcije= 51,0 %

metil 4-((3-(α-D-manopiranozil)-2-hidroksipropil)amino)benzoat	
Elementna sestava: C ₁₇ H ₂₅ NO ₈	
Molska masa: 371,39 g/mol	
Izgled: rumeno strjeno olje	
R_f: 0,15 (MF: diklorometan/metanol= 5:1)	
¹H-NMR (400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄)	δ 7,78 (d, 2H, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2 \times ArH), 6,64-6,68 (m, 2H, 2 \times ArH), 4,14-4,19 (m, 1H), 3,97-4,04 (m, 1H), 3,83 (s, 3H, COOCH ₃), 3,42-3,82 (m, 8H), 3,18-3,29 (m, 2H), 1,98-2,10 (m, 1H), 1,78-1,84 (m, 0,5H), 1,48-1,58 (m, 0,5H) ppm
HRMS (ESI⁻)	izračunan 370,1502; izmerjen 370,1507
IR (ATR)	ν 3339, 2948, 1682, 1603, 1530, 1434, 1344, 1315, 1279, 1176, 1097, 1060, 961, 838, 769, 700 cm ⁻¹
HPLC	t _R = 8,802 min; čistost: 100,00 %

4.1.8. Sinteza metil 3-((3-(α -D-manopiranozil)-2-hidroksipropil)amino)benzoata



Izhodno spojino **6** (0,063 g, 0,117 mmol) smo raztopili v 5 mL MeOH in dodali 2 kapljici NaOMe v MeOH ter pustili mešati na magnetnem mešalu čez noč pri sobni temperaturi.

Reakcija čez noč ni potekla do konca, zato smo dodali še 2 kapljici NaOMe v MeOH in zopet pustili mešati čez noč.

IZOLACIJA:

Za izolacijo naše spojine smo v bučko dodali konico spatule ionsko-izmenjevalne smole Amberlite IR120[®], nato pa smo reakcijsko zmes pustili mešati pol ure pri sobni temperaturi. Smolo smo predhodno sprali z MeOH, da se znebimo morebitnih nečistot. Smolo smo nato odfiltrirali z odsesavanjem, matičnici pa uparili topilo na rotavaporju. Dobili smo rumen oljast produkt, ki je čez noč kristaliziral. S pomočjo MS smo ugotovili, da je končni produkt zmes 2 diastereomerov, ki ju ne moremo ločiti, na TLC kromatogramu pa imata različen retencijski faktor.

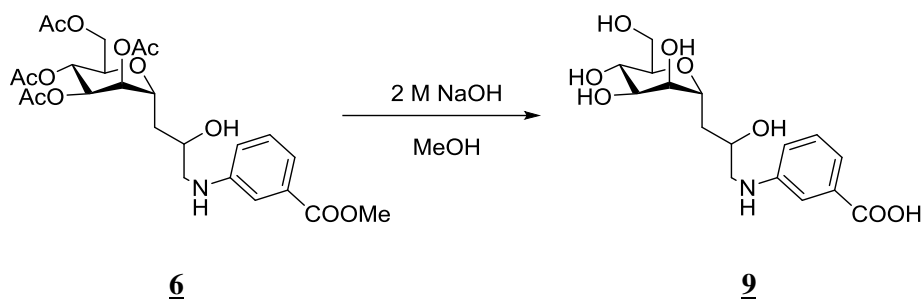
m (teoretično)= 0,043 mg

m (praktično)= 0,043 mg

izkoristek reakcije= 100 %

metil 3-((3-(α-D-manopiranozil)-2-hidroksipropil)amino)benzoat	
Elementna sestava: C ₁₇ H ₂₅ NO ₈	
Molska masa: 371,39 g/mol	
Izgled: rumeno strjeno olje	
R_f: 0,32 ; 0,46 (MF: diklorometan/metanol= 2/1)	
¹H-NMR (400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄)	δ 7,10-7,31 (m, 3H, 3 \times ArH), 6,72-6,93 (m, 1H, ArH), 3,99-4,20 (m, 2H), 3,62-3,81 (m, 6H), 3,43-3,48 (m, 1H), 3,37 (s, 3H, COOCH ₃), 3,12-3,28 (m, 2H), 2,06-2,14 (m, 1H), 1,48-1,55 (m, 1H) ppm
HRMS (ESI⁻)	izračunan 370,1502; izmerjen 370,1501
IR (ATR)	ν 3293, 2947, 1707, 1552, 1437, 1376, 1248, 1062, 993, 880, 838, 755, 511 cm ⁻¹
HPLC	t _R = 8,052 min; čistost: 100,00 %

4.1.9. Sinteza 4-((3-(α -D-manopiranozil)-2-hidroksipropil)amino)benzojske kisline



Izhodno spojino **6** (0,129 g, 0,239 mmol) smo raztopili v 3 mL MeOH in dodali 2M NaOH (0,720 mL, 1,44 mmol) ter pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi.

IZOLACIJA:

Reakcijsko zmes smo nevtralizirali do pH 7 s kislino smolo Amberlite IR120[®] in pustili mešati pol ure, nato pa smo smolo odnučali in jo večkrat sprali z MeOH ter uparili topilo na rotavaporju.

m (teoretično)= 85,4 mg

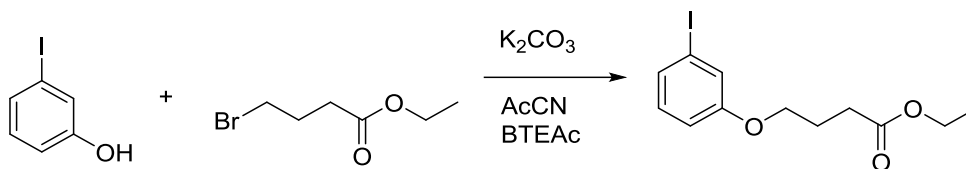
m (praktično)= 85,4 mg

izkoristek reakcije= 100 %

4-((3-(α-D-manopiranozil)-2-hidroksipropil)amino)benzojska kislina	
Elementna sestava: C ₁₆ H ₂₃ NO ₈	
Molska masa: 357,36 g/mol	
Izgled: rumeno strjeno olje	
Rf: 0,32 (MF: diklorometan/metanol= 2/1)	
¹H-NMR (400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄)	δ 7,25-7,30 (m, 3H, 2 \times ArH), 7,13 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, ArH), 6,75-6,79 (m, 1H, ArH), 4,14-4,21 (m, 1H), 3,99-4,05 (m, 1H), 3,43-3,84 (m, 7H), 3,13-3,28 (m, 2H), 2,07-2,14 (m, 1H), 1,48-1,55 (m, 1H) ppm
HRMS (ESI⁻)	izračunan 356,1345; izračunan 356,1348
IR (ATR)	ν 3294, 1700, 1556, 1394, 1066, 1015, 925, 873, 767, 741, 647, 618, 540 cm ⁻¹
HPLC	$t_R = 3,901$ min; čistost: 96,67 %

4.2. SINTEZA N-MANOZIDOV

4.2.1. Sinteza etil 4-(3-jodofenoksi)butanoata



10

V 50 mL bučko smo natehtali 3-jodofenol (0,891 g, 4,05 mmol) ter dodali K_2CO_3 (2,24 g, 16,2 mmol) in 20 mL AcCN. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo dodali etil 4-bromobutanoat (0,585 mL, 4,05 mmol) in na koncu še BTEAC (0,369 g, 1,62 mmol). Reakcijsko zmes smo refluktirali pri $50^\circ C$ čez noč, uporabili smo povratni hladilnik in klorkalcijevo cevko (brezvodni pogoji).

Naslednji dan reakcija še ni potekla do konca, zato smo dodali še 0,810 mmol etil 4-bromobutanoata in pustili refluktirati še 2 uri, nato pa smo odnučali K_2CO_3 in ga sprali s 3×10 mL AcCN. Uparili smo topilo na rotavaporju.

IZOLACIJA:

Preostanek v bučki smo raztopili v 50 mL etilacetata in izvedli ekstrakcijo s 3×25 mL 0,1 M HCl, 2×25 mL H_2O , 1×25 mL nasičene raztopine $NaHCO_3$ in z 1×25 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili nad Na_2SO_4 , ki smo ga nato odfiltrirali. Organsko fazo smo uparili na rotavaporju in dobili rumeno oljnato snov.

ČIŠČENJE: KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

Izvedli smo čiščenje surovega produkta s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, uporabili pa smo mobilno fazo etilacetat:heksan = 1:3. Dobili smo brezbarvno oljnato snov.

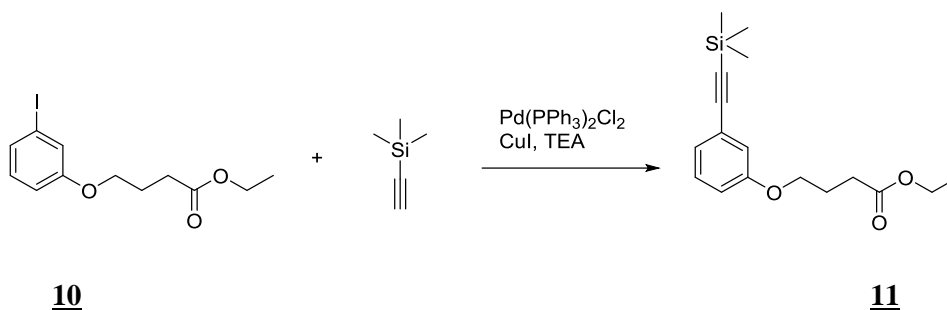
m (teoretično) = 1,35 g

m (praktično) = 0,775 g

izkoristek reakcije = 57,4 %

etil 4-(3-jodofenoksi)butanoat	
Elementna sestava: C ₁₂ H ₁₅ IO ₃	
Molska masa: 334,15 g/mol	
Izgled: brezbarvno olje	
R_f: 0,44 (MF: etilacetat/heksan= 1/3)	
¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d₆)	δ 7,28 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 7,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,4 Hz, <i>J</i> ₃ = 0,9 Hz, Ar- <u>H</u>), 7,25 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 2,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,6 Hz, Ar- <u>H</u>), 7,00 (t, 1H, <i>J</i> = 8,0 Hz, Ar- <u>H</u>), 6,86 (dddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 5,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 3,2 Hz, <i>J</i> ₃ = 2,4 Hz, <i>J</i> ₄ = 0,8 Hz, Ar- <u>H</u>), 4,16 (q, 2H, <i>J</i> = 7,2 Hz, <u>CH</u> ₂ CH ₃), 3,99 (t, 2H, <i>J</i> = 6,1 Hz, <u>CH</u> ₂), 2,51 (t, 2H, <i>J</i> = 7,2 Hz, <u>CH</u> ₂), 2,11 (m, 2H, <u>CH</u> ₂), 1,28 (t, 3H, <i>J</i> = 7,2 Hz, CH ₂ <u>CH</u> ₃) ppm
HRMS (ESI⁺)	izračunan 335,0144; izmerjen 335,0150
IR (ATR)	ν 2977, 2361, 2015, 1733, 1583, 1567, 1467, 1418, 1389, 1285, 1244, 1227, 1181, 1094, 1046, 990, 956, 856, 773, 683 cm ⁻¹

4.2.2. **Sinteza etil 4-(3-((trimetilsilil)etininil)fenoksi)butanoata**



V trogrlo bučko smo zatehtali izhodno spojino **10** (0,701 g, 2,10 mmol), odesali zrak in bučko prepivali z argonom. V epico smo natehtali CuI (0,024 g, 0,13 mmol) in Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,030 g, 0,042 mmol) in ju dodali skozi stransko grlo ter zopet prepivali z argonom. Skozi septum smo dodali 15 mL TEA in nato še trimetilsilil acetilen (0,356 mL, 2,52 mmol). S črpalko smo odesali zrak in zopet prepivali z argonom ter pustili mešati na magnetnem mešalu čez noč pri sobni temperaturi.

IZOLACIJA:

Uparili smo topilo na rotavaporju s pomočjo vodne črpalke ter vzorec pripravili za nanos na kolono.

ČIŠČENJE: KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, za mobilno fazo pa smo uporabili etilacetat:heksan = 1:6. Dobili smo rjavo obarvano olje.

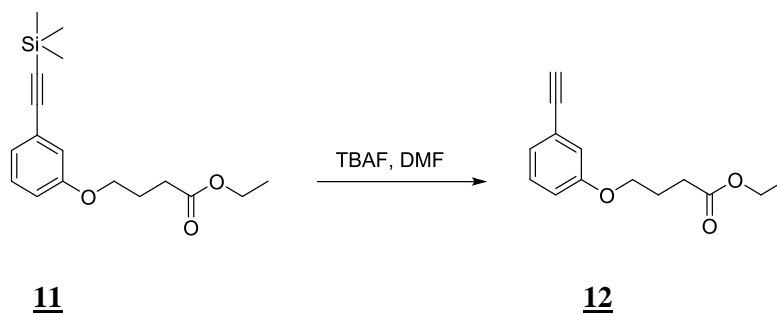
m (teoretično) = 0,639 g

m (praktično) = 0,447 g

izkoristek reakcije = 70,0 %

etil 4-(3-((trimetilsilil)etnil)fenoksi)butanoat	
Elementna sestava: C ₁₇ H ₂₄ O ₃ Si	
Molska masa: 304,46 g/mol	
Izgled: rjavo olje	
R_f: 0,19 (MF: etilacetat/heksan = 1/6)	
¹H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 7,25-7,30 (m, 1H, Ar- <u>H</u>), 7,01-7,03 (m, 1H, Ar- <u>H</u>), 6,95-6,98 (m, 2H, 2 × Ar-H), 4,07 (q, 2H, <i>J</i> = 7,1 Hz, <u>CH</u> ₂ CH ₃), 4,00 (t, 2H, <i>J</i> = 6,4 Hz, CH ₂), 2,45 (t, 2H, <i>J</i> = 7,3 Hz, CH ₂), 1,92-1,99 (m, 2H, CH ₂), 1,18 (t, 3H, <i>J</i> = 7,1 Hz, CH ₂ <u>CH</u> ₃), 0,23 (s, 9H, Si(<u>CH</u> ₃) ₃) ppm
HRMS (ESI⁺)	izračunan 305,1573; izmerjen 305,1569
IR (ATR)	ν 2958, 2916, 2848, 2154, 1734, 1595, 1574, 1473, 1424, 1375, 1310, 1283, 1249, 1173, 1155, 1096, 1047, 997, 977, 919, 841, 786, 759, 687, 646, 596, 544, 521, 509 cm ⁻¹

4.2.3. Sinteza etil 4-(3-etinilfenoksi)butanoata



V bučko z izhodno spojino **11** (0,447 g, 1,47 mmol) smo dodali 25 mL DMF in TBAF (0,211 mL, 0,734 mmol, 1 M v THF) ter pustili mešati na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi 10 minut.

IZOLACIJA:

Uparili smo topilo na rotavaporju.

ČIŠČENJE: KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

Surov produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, kot mobilno fazo pa smo uporabili etilacetat:heksan = 1:6.

m (teoretično) = 0,341 g

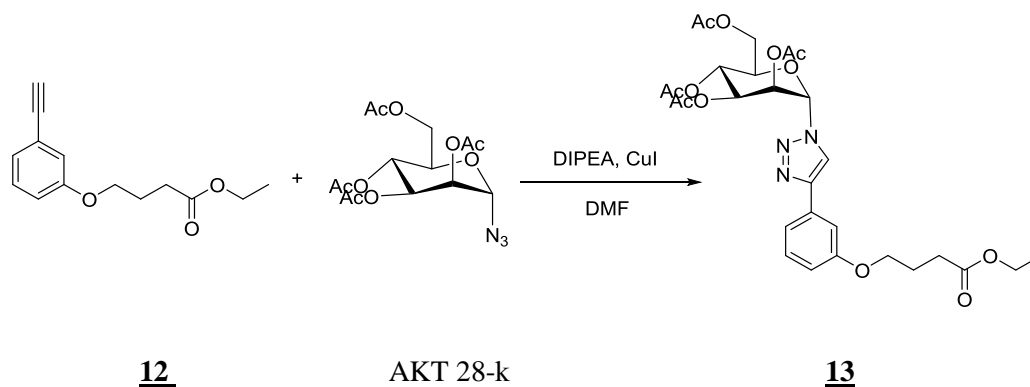
m (praktično) = 0,222 g

izkoristek reakcije = 65,1 %

etil 4-(3-etinilfenoksi)butanoat	
Elementna sestava: C ₁₄ H ₁₆ O ₃	
Molska masa: 232,28 g/mol	
Izgled: belo strjeno olje	
R_f: 0,30 (MF: etilacetat/heksan = 1/6)	
¹H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 7,27-7,31 (m, 1H, Ar- <u>H</u>), 7,05 (td, 1H, <i>J</i> ₁ = 7,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,1 Hz, Ar- <u>H</u>), 6,97-7,00 (m, 2H, 2 × Ar-H), 4,18 (s, 1H, CH), 4,07 (q, 2H, <i>J</i> = 7,1 Hz, <u>CH</u> ₂ CH ₃), 4,00 (t, 2H, <i>J</i> = 6,4 Hz, CH ₂), 2,45 (t, 2H, <i>J</i> = 7,3 Hz, CH ₂), 1,93-1,99 (m, 2H, CH ₂), 1,18 (t, 3H, <i>J</i> = 7,1 Hz, CH ₂ <u>CH</u> ₃) ppm
HRMS (ESI⁺)	izračunan 233,1178; izmerjen 233,1183

IR (ATR)	v 3227, 1718, 1582, 1490, 1413, 1377, 1322, 1275, 1259, 1192, 1172, 1153, 1092, 1021, 927, 881, 854, 801, 764, 729, 704, 683 cm ⁻¹
-----------------	---

4.2.4. Sinteza etil 4-(3-(1-(tetra-*O*-acetyl- α -D-manopiranozil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)butanoata



V bučko smo natehtali izhodno spojino 12 (0,195 g, 0,840 mmol) in spojino AKT 28-k (0,313 g, 0,840 mmol), dobro prepihali z argonom in nato dodali magnet ter CuI (0,016 g, 0,084 mmol). Bučko smo zaprli s septumom in zopet prepihali z argonom. Skozi septum smo nato dodali 20 mL DMF in DIPEA (0,146 mL, 0,840 mmol) ter pustili mešati čez noč.

IZOLACIJA:

Pod znižanim tlakom smo uparili DMF in preostanek raztopili v 100 mL etilacetata in 100 mL H₂O. Organsko fazo smo spirali z 2 × 50 mL H₂O in 50 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili nad trdnim Na₂SO₄, filtrirali ter uparili topilo pod znižanim tlakom.

ČIŠČENJE: KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

Surov prosukt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, kot mobilno fazo pa smo uporabili etilacetat:heksan = 1:1. Dobili smo brezbarvno olje.

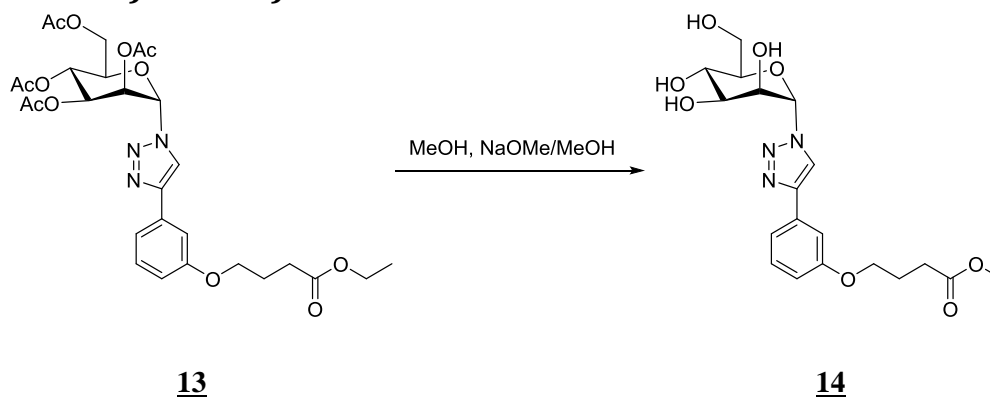
m (teoretično) = 0,508 g

m (praktično) = 0,310 g

izkoristek reakcije= 61,0 %

etil 4-(3-(1-(tetra-<i>O</i>-acetil-α-D-manopiranozil)-1<i>H</i>-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)butanoat	
Elementna sestava: C ₂₈ H ₃₅ N ₃ O ₁₂	
Molska masa: 605,60 g/mol	
Izgled: brezbarvno olje	
Rf: 0,26 (MF: etilacetat/heksan= 1/1)	
¹H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 7,97 (s, 1H, Ar- <u>H</u>), 7,47 (dd, 1H, $J_1 = 2,4$ Hz, $J_2 = 1,5$ Hz, Ar- <u>H</u>), 7,41 (td, 1H, $J_1 = 7,6$ Hz, $J_2 = 1,3$ Hz, Ar- <u>H</u>), 7,36 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar- <u>H</u>), 6,92 (ddd, 1H, $J_1 = 7,9$ Hz, $J_2 = 2,6$ Hz, $J_3 = 1,3$ Hz, Ar- <u>H</u>), 6,08 (d, 1H, $J = 2,7$ Hz, Man- <u>H</u>), 6,04 (dd, 1H, $J_1 = 3,7$ Hz, $J_2 = 2,7$ Hz, Man- <u>H</u>), 6,00 (dd, 1H, $J_1 = 8,7$ Hz, $J_2 = 3,6$ Hz, Man- <u>H</u>), 5,41 (t, 1H, $J = 8,9$ Hz, Man- <u>H</u>), 4,41 (dd, 1H, $J_1 = 12,5$ Hz, $J_2 = 5,4$ Hz, Man- <u>H</u>), 4,17 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, CH ₂ CH ₃), 4,08-4,13 (m, 3H, Man- <u>H</u> , CH ₂), 3,93-3,98 (m, 1H, Man- <u>H</u>), 2,56 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, CH ₂), 2,22 (s, 3H, OCOCH ₃), 2,14-2,18 (m, 2H, CH ₂), 2,12 (s, 3H, OCOCH ₃), 2,09 (s, 3H, OCOCH ₃), 2,08 (s, 3H, OCOCH ₃), 1,28 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, CH ₂ CH ₃) ppm
HRMS (ESI⁺)	izračunan 606,2299; izmerjen 606,2308
IR (ATR)	ν 2982, 1743, 1584, 1474, 1428, 1369, 1215, 1129, 1032, 985, 942, 903, 870, 785, 691, 600 cm ⁻¹

4.2.5. Sinteza metil 4-(3-(1-(α -D-manopiranozil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)butanoata



Izhodno spojino **13** (0,281 g, 0,464 mmol) smo raztopili v 10 mL MeOH in dodali 5 kapljic NaOMe v MeOH ter pustili mešati na magnetnem mešalu čez noč pri sobni temperaturi.

IZOLACIJA:

V bučko smo dodali konico spatule smole Amberlite IR120[®], ki veže bazične spojine in mešali do nevtralnega pH. Smolo smo odfiltrirali z odsesavanjem, nato pa smo uparili topilo. Pri reakciji je prišlo do preestrenja z NaOMe, zato smo na koncu dobili metilni ester namesto etilnega.

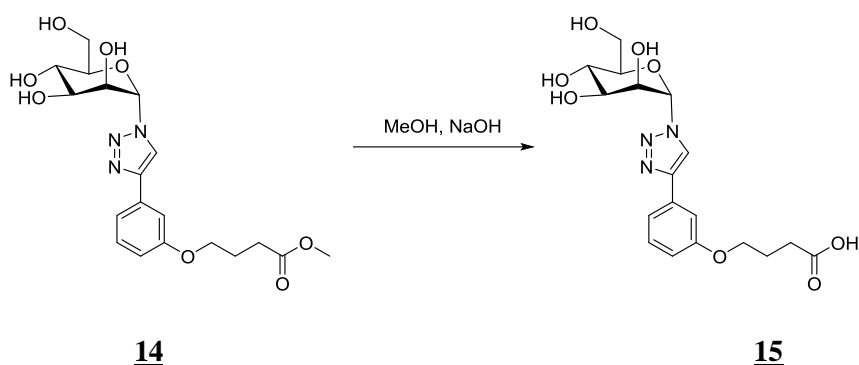
m (teoretično)= 0,196 g

m (praktično)= 0,125 g

izkoristek reakcije= 63,8 %

metil 4-(3-(1-(α-D-manopiranozil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)butanoat	
Elementna sestava: C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₈	
Molska masa: 423,42 g/mol	
Izgled: belo strjeno olje	
R_f: 0,18 (MF: diklorometan/metanol= 7/1)	
¹H-NMR (400 MHz, MeOH-<i>d</i>₄)	δ 8,53 (s, 1H, Ar- <u>H</u>), 7,42-7,44 (m, 1H, Ar- <u>H</u>), 7,41 (td, 1H, $J_1 = 7,6$ Hz, $J_2 = 1,3$ Hz, Ar- <u>H</u>), 7,36 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar- <u>H</u>), 6,94 (ddd, 1H, $J_1 = 8,1$ Hz, $J_2 = 2,4$ Hz, $J_3 = 1,3$ Hz, Ar- <u>H</u>), 6,09 (d, 1H, $J = 2,8$ Hz, Man- <u>H</u>), 4,77 (t, 1H, $J = 3,2$ Hz, Man- <u>H</u>), 4,09-4,14 (m, 3H, CH ₂ , Man- <u>H</u>), 3,87 (dd, 1H, $J_1 = 12,1$ Hz, $J_2 = 2,6$ Hz, Man- <u>H</u>), 3,77-3,82 (m, 2H, 2 \times Man- <u>H</u>), 3,70 (s, 3H, COOCH ₃), 3,40 (ddd, 1H, $J_1 = 9,1$ Hz, $J_2 = 6,7$ Hz, $J_3 = 2,6$ Hz, Man- <u>H</u>), 2,57 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, CH ₂), 2,09-2,16 (m, 2H, CH ₂) ppm
HRMS (ESI⁺)	izračunan 424,1720; izmerjen 424,1717
IR (ATR)	ν 3362, 2950, 1740, 1618, 1583, 1491, 1453, 1436, 1418, 1362, 1271, 1235, 1194, 1167, 1417, 1065, 1034, 979, 916, 859, 795, 766, 720, 689, 670, 609, 524, 508 cm ⁻¹
HPLC	t _R = 10,358 min; čistost: 100,00 %

4.2.6. Sinteza 4-(3-(1-(α -D-manopiranozil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)butanojske kisline



Izhodno spojino **14** (0,100 g, 0,236 mmol) smo raztopili v 5 mL MeOH in dodali 2 M NaOH (0,236 mL, 0,472 mmol) ter pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Reakcija čez noč ni potekla, zato smo dodali še 2 M NaOH (0,118 mL, 0,236 mmol), čez nekaj časa pa še dodatno 2 M NaOH (0,354 mL, 0,708 mmol) in pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi.

IZOLACIJA:

V reakcijsko zmes smo dodali nekaj smole Amberlite IR120[®] in pustili mešati 0,5 ure (do nevtralnega pH), nato pa smo smolo odfiltrirali z odsesavanjem in uparili topilo.

m (teoretično) = 0,097 g

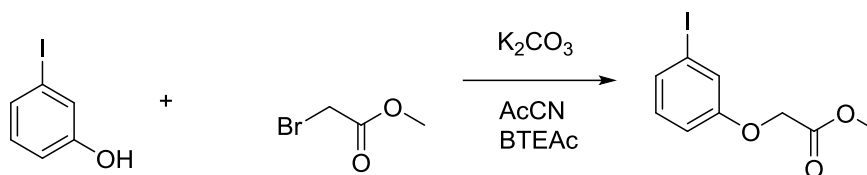
m (praktično) = 0,097 g

izkoristek reakcije = 100 %

4-(3-(1-(α-D-manopiranozil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)butanojske kisline	
Elementna sestava: C ₁₈ H ₂₃ N ₃ O ₈	
Molska masa: 409,39 g/mol	
Izgled: rumeni kristali	
Rf: 0,65 (MF: acetonitril/metanol/voda = 3/1/1)	
T tališča: 76 ± 2°C	
¹H-NMR (400 MHz, MeOH-d₄)	δ 8,53 (s, 1H, Ar- <u>H</u>), 7,42-7,46 (m, 2H, 2 × Ar- <u>H</u>), 7,36 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar- <u>H</u>), 6,95 (ddd, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 2,5$ Hz, $J_3 = 1,1$ Hz, Ar- <u>H</u>), 6,09 (d, 1H, $J = 2,7$ Hz, Man- <u>H</u>), 4,77 (t, 1H, $J = 3,2$ Hz, Man- <u>H</u>), 4,09-4,14 (m, 3H, CH ₂ , Man- <u>H</u>),

	3,87 (dd, 1H, $J_1 = 12,1$ Hz, $J_2 = 2,6$ Hz, Man- <u>H</u>), 3,77-3,82 (m, 2H, 2 × Man- <u>H</u>), 3,40 (ddd, 1H, $J_1 = 8,9$ Hz, $J_2 = 6,5$ Hz, $J_3 = 2,5$ Hz, Man- <u>H</u>), 2,54 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, CH ₂), 2,08-2,15 (m, 2H, CH ₂) ppm
HRMS (ESI⁻)	izračunan 408,1407; izmerjen 408,1401
IR (ATR)	ν 3338, 2946, 1707, 1614, 1585, 1472, 1417, 1354, 1241, 1164, 1122, 1070, 1038, 978, 951, 920, 857, 784, 720, 687, 583, 512 cm ⁻¹
HPLC	$t_R = 9,375$ min; čistost: 100,00 %

4.2.7. Sinteza metil 2-(3-jodofenoksi)acetata



16

V 50 mL bučko smo zatehtali 3-jodofenol (0,888 g, 4,04 mmol) ter dodali K₂CO₃ (2,23 g, 16,1 mmol) in 20 mL AcCN. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo dodali metil bromoacetat (0,384 mL, 4,04 mmol) in na koncu še BTEAC (0,368 g, 1,62 mmol). Reakcijsko zmes smo segrevali pri 50 °C čez noč, pri čemer smo uporabili povratni hladilnik in klorkalcijevo cevko (brezvodni pogoji).

IZOLACIJA:

Iz reakcijske zmesi smo se s filtracijo z odsesavanjem znebili K₂CO₃ in ga sprali s 3 × 10 mL AcCN ter topilo uparili pod znižanim tlakom, preostanek pa smo raztopili v 50 mL etilacetata. Izvedli smo ekstrakcijo s 3 × 25 mL 0,1 M HCl, 2 × 25 mL H₂O, 25 mL nasičene raztopine NaHCO₃ in s 25 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, ki smo ga nato odfiltrirali in uparili topilo.

ČIŠČENJE: KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

Surov produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, kot mobilno fazo pa smo uporabili etilacetat:petroleter = 1:6. Dobili smo brezbarvno olje.

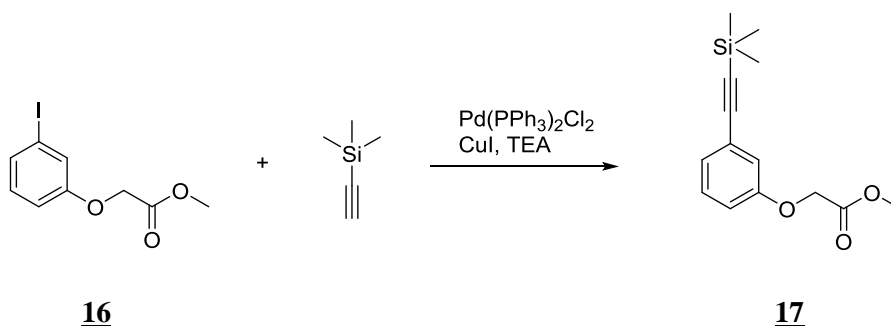
m (teoretično)= 1,18 g

m (praktično)= 0,840 g

izkoristek reakcije= 71,2 %

metil 2-(3-jodofenoksi)acetat	
Elementna sestava: C ₉ H ₉ IO ₃	
Molska masa: 292,07g/mol	
Izgled: belo strjeno olje	
Rf: 0,27 (MF: etilacetat/petroleter= 1/6)	
¹H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 7,31-7,35 (m, 2H, 2xAr-H), 7,09 (t, 1H, <i>J</i> = 8,4 Hz, Ar-H), 6,97 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,5 Hz, <i>J</i> ₃ = 0,9 Hz, Ar-H), 4,84 (s, 2H, CH ₂), 3,70 (s, 3H, CH ₃) ppm
IR (ATR)	ν 3078, 3018, 2962, 2920, 2162, 1770, 1755, 1587, 1567, 1474, 1446, 1427, 1418, 1400, 1336, 1307, 1270, 1241, 1200, 1160, 1126, 1100, 1080, 1058, 1017, 988, 978, 918, 890, 873, 848, 833, 773, 714, 681, 654, 590 cm ⁻¹

4.2.8. Sinteza metil 2-(3-((trimetilsilil)etnil)fenoksi)acetata



V trogrlo bučko smo natehtali izhodno spojino **16** (0,686 g, 2,349 mmol), odsesali zrak ter bučko prepihali z argonom. V epico smo natehtali CuI (0,027 g, 0,14 mmol) in Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,033 g, 0,047 mmol) in ju dodali skozi stransko grlo ter zopet prepihali z

argonom. Skozi septum smo dodali 15 mL TEA in nato še trimetilsilil acetilen (0,398 mL, 2,82 mmol). S črpalko smo odfiltrirali zrak in zopet prepihali z argonom ter pustili mešati na magnetnem mešalu čez noč pri sobni temperaturi.

IZOLACIJA:

Uparili smo topilo na rotavaporju s pomočjo vodne črpalke ter pripravili vzorec za nanos na kolono.

ČIŠČENJE: KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

Surov produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, za mobilno fazo pa smo uporabili etilacetat:heksan = 1:6. Dobili smo rjavo obarvano olje.

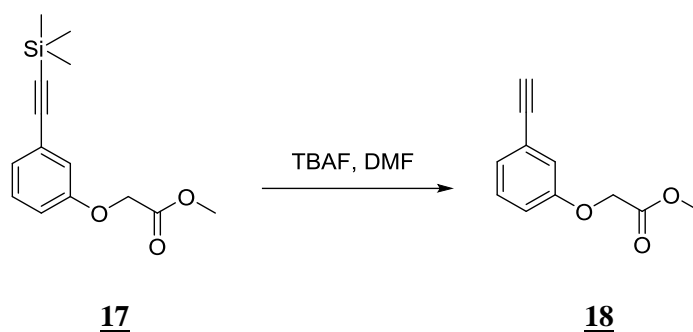
m (teoretično)= 0,616 g

m (praktično)= 0,544 g

izkoristek reakcije= 88,3 %

metil 2-(3-((trimetilsilil)etinil)fenoksi)acetat	
Elementna sestava: C ₁₄ H ₁₈ O ₃ Si	
Molska masa: 262,38/mol	
Izgled: rjavo olje	
R_f: 0,21 (MF: etilacetat/heksan= 1/6)	
¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d₆)	δ 7,27-7,31 (m, 1H, Ar- <u>H</u>), 7,06-7,08 (m, 1H, Ar- <u>H</u>), 6,98-7,01 (m, 2H, 2xAr- <u>H</u>), 4,85 (s, 2H, CH ₂), 3,70 (s, 3H, CH ₃), 0,24 (s, 9H, Si(CH ₃) ₃) ppm
IR (ATR)	ν 2957, 2154, 1764, 1576, 1488, 1437, 1295, 1251, 1214, 1176, 1161, 1089, 935, 860, 790, 761, 686, 647 cm ⁻¹

4.2.9. Sinteza metil 2-(3-etinilfenoksi)acetata



V bučko z izhodno spojino **17** (0,496 g, 1,89 mmol) smo dodali 25 mL DMF in TBAF (0,272 mL, 0,945 mmol, 1 M v THF) ter pustili mešati na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi 10 minut.

IZOLACIJA:

Uparili smo topilo pod znižanim tlakom.

ČIŠČENJE: KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

Surov produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, kot mobilno fazo pa smo uporabili etilacetat:heksan = 1:6.

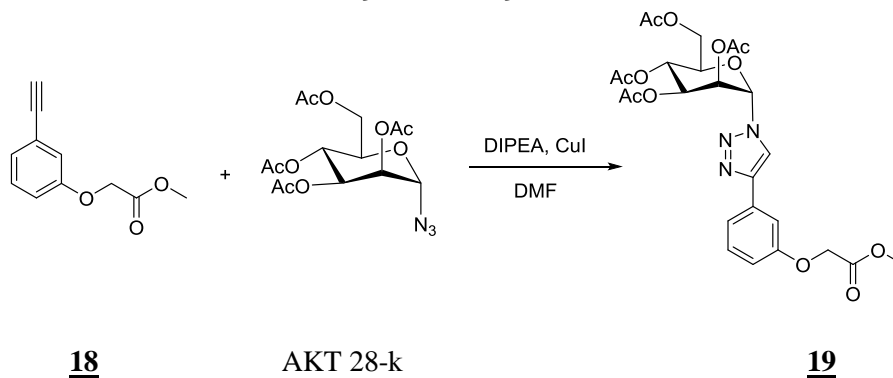
m (teoretično) = 0,360 g

m (praktično) = 0,284 g

izkoristek reakcije = 78,9 %

metil 2-(3-etinilfenoksi)acetat	
Elementna sestava: C ₁₁ H ₁₀ O ₃	
Molska masa: 190,20 g/mol	
Izgled: svetlo rumeno strjeno olje	
R_f: 0,16 (MF: etilacetat/heksan = 1/6)	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 7,25-7,29 (m, 1H, Ar- <u>H</u>), 7,16 (td, 1H, <i>J</i> ₁ = 7,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,2 Hz, Ar- <u>H</u>), 7,03 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 2,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,4 Hz, Ar- <u>H</u>), 6,94 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,7 Hz, <i>J</i> ₃ = 1,0 Hz, Ar- <u>H</u>), 4,66 (s, 2H, CH ₂), 3,84 (s, 3H, CH ₃), 3,09 (s, 1H, CH) ppm
IR (ATR)	ν 3221, 2960, 2921, 1754, 1605, 1574, 1479, 1426, 1390, 1314, 1293, 1262, 1212, 1150, 1097, 1083, 986, 931, 896,

4.2.10. Sinteza metil 2-(3-(1-(tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranozil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)acetata



V bučko smo natehtali izhodno spojino **18** (0,198 g, 1,041 mmol) in spojino AKT 28-k (0,389 g, 1,04 mmol), dobro prepihali z argonom in nato dodali magnet ter CuI (0,020 g, 0,10 mmol). Bučko smo zaprli s septumom in zopet prepihali z argonom. Skozi septum smo nato dodali 20 mL DMF in DIPEA (0,181 mL, 1,04 mmol) ter pustili mešati čez noč.

IZOLACIJA:

Na rotavaporju smo uparili DMF pod znižanim tlakom in preostanek raztopili v 100 mL etilacetata in 100 mL H₂O. Organsko fazo smo ekstrahirali z 2 × 50 mL H₂O in 50 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali ter uparili topilo pod znižanim tlakom.

ČIŠČENJE: KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

Surov produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, kot mobilno fazo pa smo uporabili etilacetat:heksan = 1:1. Dobili smo brezbarvno olje.

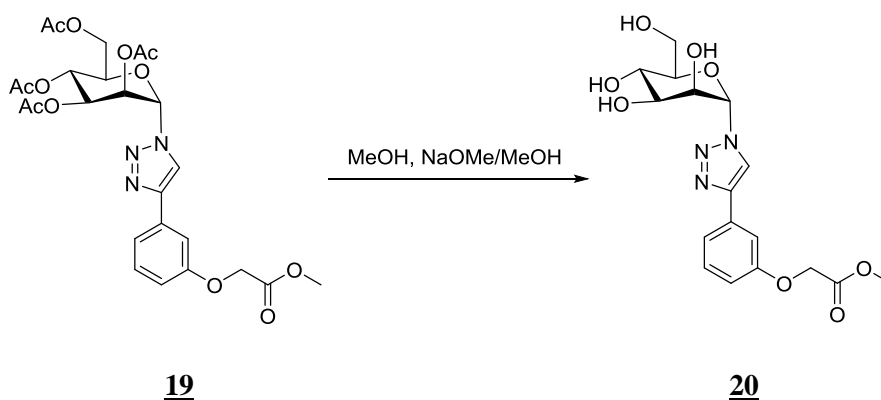
m (teoretično)= 0,587 g

m (praktično)= 0,388 g

izkoristek reakcije= 66,1 %

metil 2-(3-(1-(tetra-<i>O</i>-acetil-α-D-manopiranozil)-1<i>H</i>-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)acetat	
Elementna sestava: C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₁₂	
Molska masa: 563,52g/mol	
Izgled: belo strjeno olje	
R_f: 0,16 (MF: etilacetat/heksan= 1/1)	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ 7,97 (s, 1H, Ar- <u>H</u>), 7,46-7,50 (m, 2H, 2 \times Ar- <u>H</u>), 7,40 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar- <u>H</u>), 6,96 (ddd, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 2,6$ Hz, $J_3 = 1,0$ Hz, Ar- <u>H</u>), 6,09 (d, 1H, $J = 2,7$ Hz, Man- <u>H</u>), 6,04 (dd, 1H, $J_1 = 3,7$ Hz, $J_2 = 2,8$ Hz, Man- <u>H</u>), 5,99 (dd, 1H, $J_1 = 8,8$ Hz, $J_2 = 3,8$ Hz, Man- <u>H</u>), 5,41 (t, 1H, $J = 8,9$ Hz, Man- <u>H</u>), 4,75 (s, 2H, OCH ₂ COO), 4,42 (dd, 1H, $J_1 = 12,5$ Hz, $J_2 = 5,5$ Hz, Man- <u>H</u>), 4,10 (dd, 1H, $J_1 = 12,5$ Hz, $J_2 = 2,6$ Hz, Man- <u>H</u>), 3,94-3,98 (m, 1H, Man- <u>H</u>), 3,85 (s, 3H, COOCH ₃), 2,22 (s, 3H, OCOCH ₃), 2,12 (s, 3H, OCOCH ₃), 2,10 (s, 3H, OCOCH ₃), 2,09 (s, 3H, OCOCH ₃) ppm
IR (ATR)	ν 2992, 1740, 1616, 1587, 1487, 1435, 1369, 1212, 1163, 1130, 1034, 984, 939, 903, 865, 785, 691, 600 cm ⁻¹

4.2.11. Sinteza metil 2-(3-(1-(α -D-manopiranozil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)acetata



Izhodno spojino **19** (0,353 g, 0,626 mmol) smo raztopili v 10 mL MeOH in dodali 5 kapljic NaOMe v MeOH ter pustili mešati na magnetnem mešalu čez noč pri sobni temperaturi.

IZOLACIJA:

V bučko smo dodali konico spatule smole Amberlite IR120[®], ki veže bazične spojine in mešali do nevtralnega pH. Smolo smo nato odfiltrirali, sprali z metanolom in nato uparili pod nižanim tlakom.

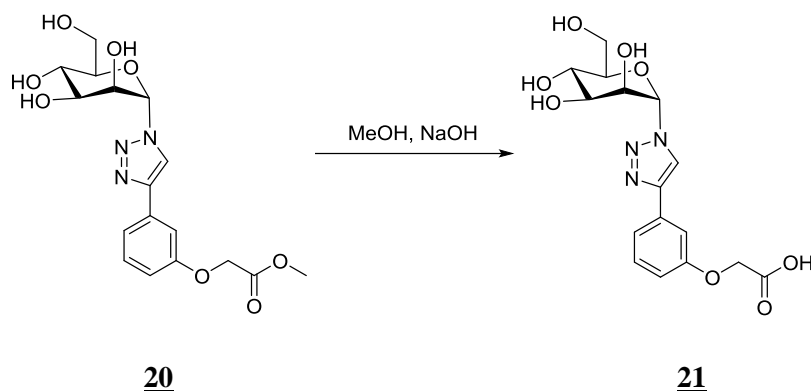
m (teoretično)= 0,248 g

m (praktično)= 0,243 g

izkoristek reakcije= 98,0 %

metil 2-(3-(1-(α-D-manopiranozil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)acetata	
Elementna sestava: C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₈	
Molska masa: 395,37 g/mol	
Izgled: belo strjeno olje	
Rf: 0,43 (diklorometan/metanol = 7/1)	
¹H-NMR (400 MHz, MeOH-<i>d</i>₄)	δ 8,54 (s, 1H, Ar- <u>H</u>), 7,46-7,50 (m, 2H, 2 \times Ar- <u>H</u>), 7,39 (t, 1H, <i>J</i> = 8,0 Hz, Ar- <u>H</u>), 6,96 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,6 Hz, <i>J</i> ₃ = 0,9 Hz, Ar- <u>H</u>), 6,09 (d, 1H, <i>J</i> = 2,7 Hz, Man- <u>H</u>), 4,81 (s, 2H, OCH ₂ COO), 4,76 (t, 1H, <i>J</i> = 8,9 Hz, Man- <u>H</u>), 4,13 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 3,5 Hz, Man- <u>H</u>), 3,87 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 12,1 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,6 Hz, Man- <u>H</u>), 3,77-3,82 (m, 5H, 2 \times Man- <u>H</u> , COOCH ₃), 3,40 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 9,1 Hz, <i>J</i> ₂ = 6,6 Hz, <i>J</i> ₃ = 2,6 Hz, Man- <u>H</u>) ppm
IR (ATR)	ν 3346, 2953, 1747, 1615, 1587, 1485, 1434, 1208, 1163, 1123, 1070, 1038, 976, 911, 857, 785, 719, 685, 575, 508 cm ⁻¹
HPLC	t _R = 9,441 min; čistost: 89,67 %

4.2.12. Sinteza 2-(3-(1-(α -D-manopiranozil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)ocetne kisline



Izhodno spojino **20** (0,207 g, 0,524 mmol) smo raztopili v 5 mL MeOH in dodali 2 M NaOH (1,571 mL, 3,141 mmol) ter pustili mešati 1 uro.

IZOLACIJA:

V reakcijsko zmes smo dodali nekaj smole Amberlite IR120® in pustili mešati 0,5 ure (do nevtralnega pH), nato pa smo smolo odfiltrirali z odsesavanjem, sprali z metanolom in topilo uparili pod znižanim tlakom.

m (teoretično) = 0,200 g

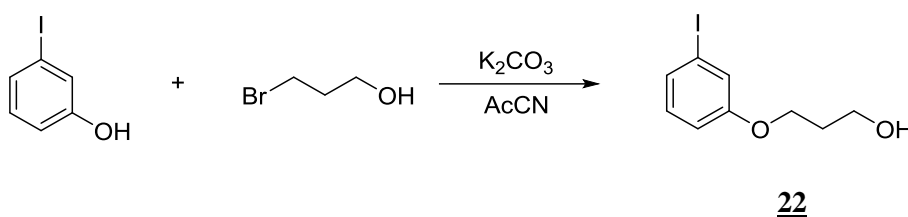
m (praktično) = 0,200 g

izkoristek reakcije = 100 %

2-(3-(1-(α-D-manopiranozil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)ocetna kislina	
Elementna sestava: C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₈	
Molska masa: 381,34 g/mol	
Izgled: beli kristali	
R_f: 0,72 (MF: acetonitril/metanol/voda = 3/1/1)	
T tališča: 90 ± 2°C	
¹H-NMR (400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄)	δ 8,54 (s, 1H, Ar- <u>H</u>), 7,48-7,50 (m, 2H, 2 × Ar- <u>H</u>), 7,39 (t, 1H, <i>J</i> = 8,2 Hz, Ar- <u>H</u>), 6,98 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, <i>J</i> ₃ = 1,2 Hz, Ar- <u>H</u>), 6,09 (d, 1H, <i>J</i> = 2,8 Hz, Man- <u>H</u>), 4,75-4,77 (m, 3H, OCH ₂ COO, Man- <u>H</u>), 4,13 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 3,5 Hz, Man- <u>H</u>), 3,87 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 12,1 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,6

	Hz, Man- <u>H</u>), 3,77-3,82 (m, 2H, 2 × Man- <u>H</u>), 3,40 (ddd, 1H, $J_1 = 8,8$ Hz, $J_2 = 6,5$ Hz, $J_3 = 2,5$ Hz, Man- <u>H</u>) ppm
IR (ATR)	ν 3392, 3139, 2543, 2365, 2032, 1986, 1961, 1732, 1488, 1430, 1340, 1208, 1165, 1125, 1069, 1041, 962, 917, 876, 851, 785, 685, 597, 578, 559, 524, 511 cm^{-1}
HPLC	$t_R = 8,579$ min; čistost: 100,00 %

4.2.13. Sinteza 3-(3-jodofenoksi)propan-1-ola



V 250 mL bučko smo natehtali 3-jodofenol (2,64 g, 12,0 mmol), dodali K_2CO_3 (6,63 g, 48,0 mmol) in 60 mL AcCN. Med mešanjem smo dodali 3-bromo-1-propanol (1,089 mL, 12,0 mmol) in reakcijsko zmes refluktirali čez noč pri 85 °C (povratni hladilnik, klorkalcijeva cevka).

IZOLACIJA:

Iz reakcijske zmesi smo odfiltrirali K_2CO_3 in ga sprali s 3×10 mL AcCN ter uparili topilo na rotavaporju, preostanek pa raztopili v 50 mL etilacetata. Izvedli smo ekstrakcijo s 3×25 mL 0,1 M HCl, 2×25 mL H_2O , 25 ml nasičene raztopine NaHCO_3 in s 25 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili nad Na_2SO_4 , ki smo ga nato odfiltrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom.

m (teoretično) = 3,337 g

m (praktično) = 2,343 g

izkoristek reakcije = 70,2 %

3-(3-jodofenoksi)propan-1-ol

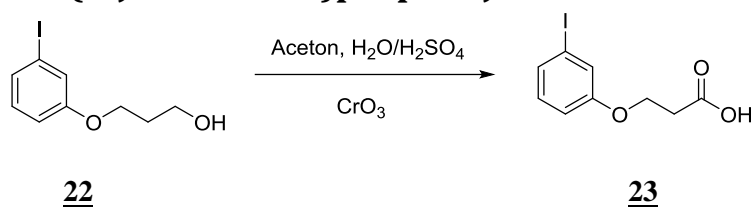
Elementna sestava: $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{IO}_2$

Molska masa: 278,09 g/mol

Izgled: brezbarvno olje

Rf: 0,25 (MF: etilacetat/heksan = 1/2)	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 7,28-7,32 (m, 2H, 2 × Ar-H), 6,99-7,04 (m, 1H, Ar-H), 6,89 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,5 Hz, <i>J</i> ₃ = 1,0 Hz, Ar-H), 4,11 (t, 2H, <i>J</i> = 6,0 Hz, CH ₂), 3,87 (t, 2H, <i>J</i> = 5,8 Hz, CH ₂), 2,03-2,05 (m, 2H, CH ₂), 1,76 (s, 1H, OH) ppm
HRMS (ESI⁺)	izračunan 278,9882; izmerjen 278,9890
IR (ATR)	ν 2877, 2148, 1585, 1568, 1467, 1418, 1285, 1228, 1063, 991, 954, 852, 776, 682 cm ⁻¹

4.2.14. Sinteza 3-(3-jodofenoksi)propanojske kisline



Izhodno spojino **22** (2,28 g, 8,18 mmol) smo raztopili v 50 mL acetona in dodali mešanico H₂O/H₂SO₄ (2:1) na ledeni kopeli pri 0 °C ter mešali še 10 minut. Postopoma smo nato dodajali CrO₃ (3,27 g, 32,7 mmol) in reakcijsko zmes mešali na ledeni kopeli 2 uri, da je reakcija potekla do konca. Dodali smo 2-propanol, da smo ustavili reakcijo, nato pa smo reakcijsko zmes mešali še 15 minut.

IZOLACIJA:

Oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem, matičnici pa uparili topilo pod znižanim tlakom. Dodali smo 5 mL H₂O in ekstrahirali z 20 mL etilacetata in nato organski fazi uparili topilo.

ČIŠČENJE: KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

Surov produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, kot mobilno fazo pa smo uporabili diklorometan: metanol: očetna kislina=15: 1: 0,1 .

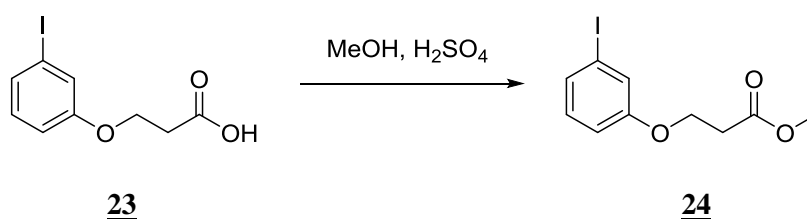
m (teoretično)= 2,39 g

m (praktično)= 0,544 g

izkoristek reakcije= 22,8 %

3-(3-jodofenoksi)propanojska kislina	
Elementna sestava: C ₉ H ₉ IO ₃	
Molska masa: 292,07 g/mol	
Izgled: zeleno strjeno olje	
R_f: 0,21 (MF: diklorometan/metanol/ocetna kislina= 15:1:0,1)	
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 12,25 (s, 1H, COOH), 7,29-7,32 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,08 (t, 1H, <i>J</i> = 8,0 Hz, Ar-H), 6,97 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,7 Hz, Ar-H), 4,16 (t, 2H, <i>J</i> = 6,0 Hz, CH ₂), 2,68 (t, 2H, <i>J</i> = 5,6 Hz, CH ₂) ppm
HRMS (ESI⁻)	izračunan 291,0457; izmerjen 291,0458
IR (ATR)	ν 2893, 2630, 1697, 1623, 1588, 1567, 1483, 1465, 1438, 1419, 1319, 1308, 1274, 1226, 1204, 1162, 1091, 1065, 1035, 990, 926, 871, 847, 813, 679, 650, 594, 524 cm ⁻¹

4.2.15. Sinteza metil 3-(3-jodofenoksi)propanoata



Izhodno spojino **23** (0,503 g, 1,72 mmol) smo raztopili v 20 mL MeOH in na ledeni kopeli pri 0°C dodali H₂SO₄ (0,092 mL, 1,72 mmol), razredčeno v 5 mL MeOH. Reakcijsko zmes smo refluktirali pri 75 °C 1,5 ure.

IZOLACIJA:

Reakcijsko zmes smo ohladili, nato pa uparili topilo pod znižanim tlakom. V bučko smo dodali 5 mL H₂O ter 50 mL etilacetata in spirali organsko fazo z 2 × 25 mL nasičene raztopine NaHCO₃. Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom.

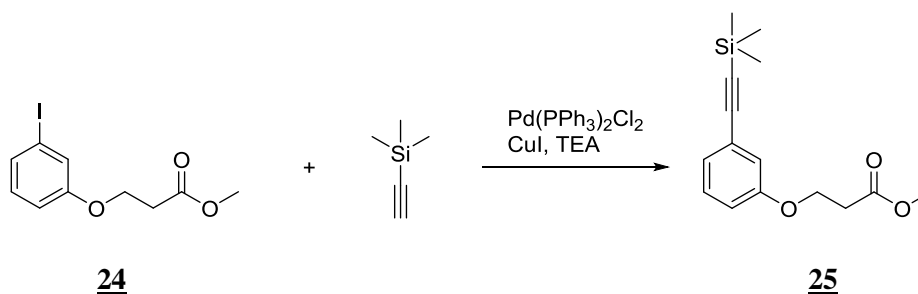
m (teoretično)= 0,527 g

m (praktično)= 0,372 g

izkoristek reakcije= 70,6 %

metil 3-(3-jodofenoksi)propanoat	
Elementna sestava: C ₁₀ H ₁₁ IO ₃	
Molska masa: 306,10 g/mol	
Izgled: rjavo strjeno olje	
R_f: 0,8 (MF: diklorometan/metanol/ocetna kislina= 15:1:0,1)	
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 7,29-7,32 (m, 2H, 2 × Ar- <u>H</u>), 7,01 (t, 1H, <i>J</i> = 7,8 Hz, Ar- <u>H</u>), 6,89 (d, 1H, <i>J</i> = 7,7 Hz, Ar- <u>H</u>), 4,24 (s, 2H, CH ₂), 3,76 (s, 2H, COOCH ₃), 2,82 (s, 2H, CH ₂) ppm
HRMS (ESI⁺)	izračunan 306,9831; izmerjen 306,9833
IR (ATR)	ν 2940, 2618, 1697, 1624, 1584, 1567, 1466, 1438, 1419, 1319, 1308, 1274, 1226, 1204, 1162, 1092, 1065, 1035, 990, 926, 871, 847, 813, 774, 679, 650, 594, 524 cm ⁻¹

4.2.16. Sinteza metil 3-(3-((trimetilsilil)etinil)fenoksi)propanoata



V troglo bučko smo natehtali izhodno spojino **24** (0,273 g, 0,892 mmol), dodali magnet in odsesali zrak ter bučko prepihali z argonom. V epico smo natehtali CuI (0,010 g, 0,054 mmol) in Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,013 g, 0,018 mmol) in ju dodali skozi stransko grlo ter zopet prepihali z argonom. Skozi septum smo dodali 15 mL TEA in nato še trimetilsilil acetilen (0,151 mL, 1,07 mmol). S črpalko smo odsesali zrak in zopet prepihali z argonom ter pustili mešati na magnetnem mešalu čez noč pri sobni temperaturi.

IZOLACIJA:

Uparili smo topilo na rotavaporju s pomočjo vodne črpalke ter vzorec pripravili za nanos na kolono.

ČIŠČENJE: KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

Surov produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, za mobilno fazo pa smo uporabili etilacetat:heksan = 1:6. Dobili smo rjavo obarvano olje.

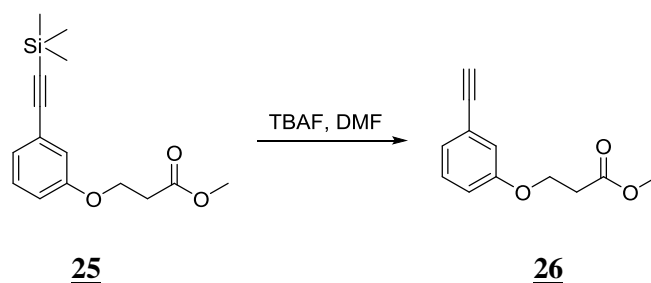
m (teoretično)= 0,247 g

m (praktično)= 0,253 g

izkoristek reakcije= 102,4 %

metil 3-(3-((trimetilsilil)etnil)fenoksi)propanoat	
Elementna sestava: C ₁₅ H ₂₀ O ₃ Si	
Molska masa: 276,41g/mol	
Izgled: rjavo olje	
Rf: 0,3 (MF: etilacetat/heksan= 1:6)	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 7,20-7,24 (m, 1H, Ar-H), 7,08-7,10 (m, 1H, Ar-H), 7,02 (dd, 1H, J ₁ = 2,4 Hz, J ₂ = 1,4 Hz, Ar-H), 6,89 (ddd, 1H, J ₁ = 8,3 Hz, J ₂ = 2,6 Hz, J ₃ = 1,0 Hz, Ar-H), 4,26 (d, 2H, J = 6,4 Hz, CH ₂), 3,75 (s, 2H, COOCH ₃), 2,82 (d, 2H, J = 6,4 Hz, CH ₂), 0,27 (s, 9H, Si(CH ₃) ₃) ppm
HRMS (ESI⁺)	izračunan 277,1260; izmerjen 277,1264
IR (ATR)	ν 2955, 2155, 1739, 1701, 1571, 1542, 1437, 1319, 1284, 1225, 1202, 1158, 1064, 1035, 989, 925, 843, 814, 774, 680, 645, 593, 523 cm ⁻¹

4.2.17. Sinteza metil 3-(3-etinilfenoksi)propanoata



V bučko z izhodno spojino **25** (0,217 g, 0,785 mmol) smo dodali 10 mL DMF in TBAF (0,113 mL, 0,393 mmol, 1 M v THF) ter pustili mešati pri sobni temperaturi 10 minut.

IZOLACIJA:

Uparili smo topilo pod znižanim tlakom.

ČIŠČENJE: KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

Surov produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, kot mobilno fazo pa smo uporabili etilacetat:heksan = 1:6.

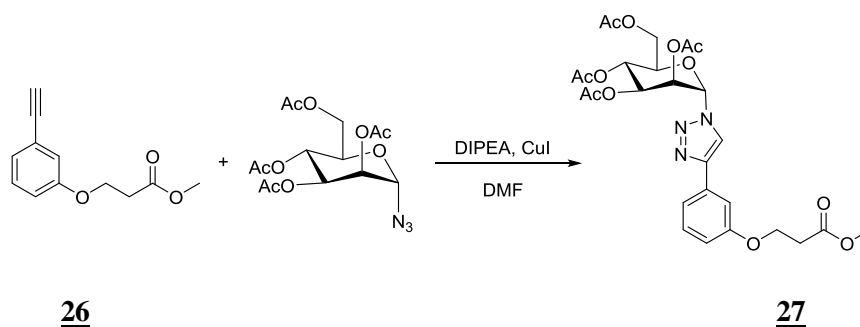
m (teoretično)= 0,160 g

m (praktično)= 0,060 g

izkoristek reakcije= 37,5 %

metil 3-(3-etinilfenoksi)propanoat	
Elementna sestava: C ₁₂ H ₁₂ O ₃	
Molska masa: 204,23 g/mol	
Izgled: svetlo rumeno olje	
R_f: 0,21 (MF: etilacetat/heksan= 1:6)	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 7,22-7,27 (m, 1H, Ar-H), 7,11-7,13 (m, 1H, Ar-H), 7,05 (dd, 1H, J ₁ = 2,6 Hz, J ₂ = 1,4 Hz, Ar-H), 6,93 (ddd, 1H, J ₁ = 8,3 Hz, J ₂ = 2,6 Hz, J ₃ = 1,0 Hz, Ar-H), 4,27 (d, 2H, J = 6,4 Hz, CH ₂), 3,75 (s, 2H, COOCH ₃), 3,08 (s, 1H, CH), 2,83 (d, 2H, J = 6,4 Hz, CH ₂) ppm
IR (ATR)	ν 3287, 2953, 2210, 1735, 1593, 1574, 1477, 1436, 1397, 1365, 1318, 1280, 1254, 1195, 1177, 1145, 1081, 1044, 996, 955, 937, 872, 849, 784, 686, 656, 535, 509 cm ⁻¹

4.2.18. Sinteza metil 2-(3-(1-(tetra-*O*-acetyl- α -D-manopiranozil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)propanoata



V bučko smo natehtali izhodno spojino **26** (0,060 g, 0,294 mmol) in spojino AKT 28-k (0,110 g, 0,294 mmol), prepihali z argonom in nato dodali magnet ter CuI (0,006 g, 0,029 mmol). Bučko smo zaprli s septumom in zopet prepihali z argonom. Skozi septum smo nato dodali 10 mL DMF in DIPEA (0,051 ml, 0,294 mmol) ter pustili mešati čez noč.

IZOLACIJA:

Na rotavaporju smo uparili DMF pod znižanim tlakom in preostanek raztopili v 50 mL etilacetata in 50 mL H₂O. Organsko fazo smo ekstrahirali z 2 × 25 mL H₂O in 25 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali ter uparili topilo na rotavaporju.

ČIŠČENJE: KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

Surov produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, kot mobilno fazo pa smo uporabili etilacetat:heksan = 1:1. Dobili smo rumeno strjeno olje.

m (teoretično)= 0,170 g

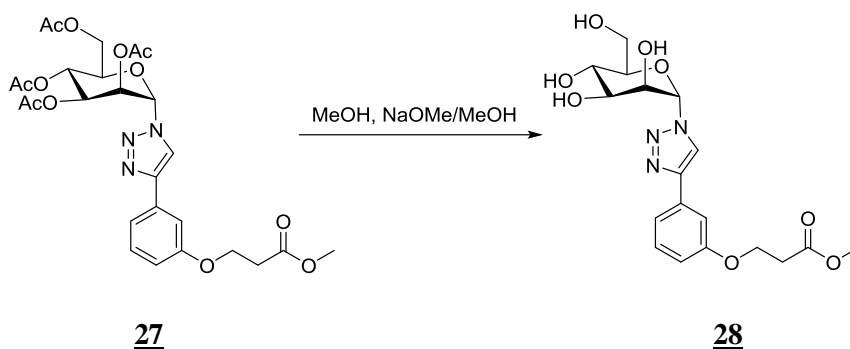
m (praktično)=0,087

izkoristek reakcije=51,2 %

S pomočjo NMR spektra smo ugotovili, da je pri tej stopnji nastala zmes diastereomerov, ki je ni bilo mogoče ločiti. Signali se v spektru podvajajo, saj se triazolni fragment lahko veže na mesto 2 ali 3 na benzenovem obroču, zaradi česar nastaneta 2 diastereomera. Tudi nadaljni dve stopnji sta nečisti in posledično ne dobimo željene končne spojine.

metil 2-(3-(1-(tetra-<i>O</i>-acetyl-α-D-manopiranozil)-1<i>H</i>-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)propanoat	
Elementna sestava: C ₂₆ H ₃₁ N ₃ O ₁₂	
Molska masa: 577,54 g/mol	
Izgled: rumeno strjeno olje	
R_f: 0,16 (MF: etilacetat/heksan= 1/1)	
HRMS (ESI⁺)	izračunan 578,1986; izmerjen 578,1973
IR (ATR)	v 2956, 1739, 1585, 1436, 1368, 1213, 1130, 1034, 985, 903, 785, 691, 600 cm ⁻¹

4.2.19. Sinteza metil 2-(3-(1-(α -D-manopiranozil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)propanoata



Izhodno spojino **27** (0,069 g, 0,12 mmol) smo raztopili v 5 mL MeOH in dodali 2 kapljici NaOMe v MeOH ter pustili mešati na magnetnem mešalu čez noč pri sobni temperaturi.

IZOLACIJA:

V bučko smo dodali konico spatule smole Amberlite IR120[®], ki veže bazične spojine in mešali do nevtralnega pH. Smolo smo odfiltrirali z odsesavanjem, jo sprali z metanolom in nato uparili topilo pod znižanim tlakom.

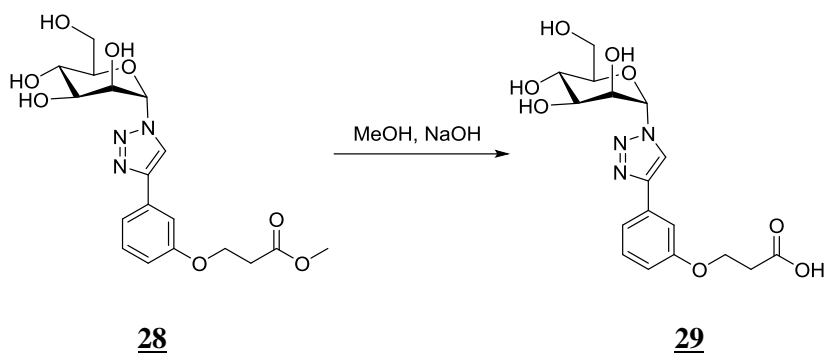
m (teoretično)= 0,049 g

m (praktično)= 0,039 g

izkoristek reakcije= 80,0 %

metil 2-(3-(1-(α-D-manopiranozil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)propanoat
Elementna sestava: C ₁₈ H ₂₃ N ₃ O ₈
Molska masa: 409,39 g/mol
Izgled: rumeno strjeno olje
R_f: 0,26 (MF: diklorometan/metanol= 9/1)

4.2.20. Sinteza 2-(3-(1-(α -D-manopiranozil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)propanojske kisline



Izhodno spojino **28** (0,027 g, 0,067 mmol) smo raztopili v 3,5 mL MeOH in dodali 2 M NaOH (0,2 mL, 0,400 mmol) ter pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi.

IZOLACIJA:

V reakcijsko zmes smo dodali nekaj smole Amberlite IR120[®] in pustili mešati 0,5 ure (do nevtralnega pH). Smolo smo odfiltrirali z odsesavanjem, jo sprali z metanolom in nato topilo uparili pod znižanim tlakom.

m (teoretično)= 0,029 g

m (praktično)= 0,015 g

izkoristek reakcije= 57,7 %

2-(3-(1-(α -D-manopiranozil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)propanojska kislina
--

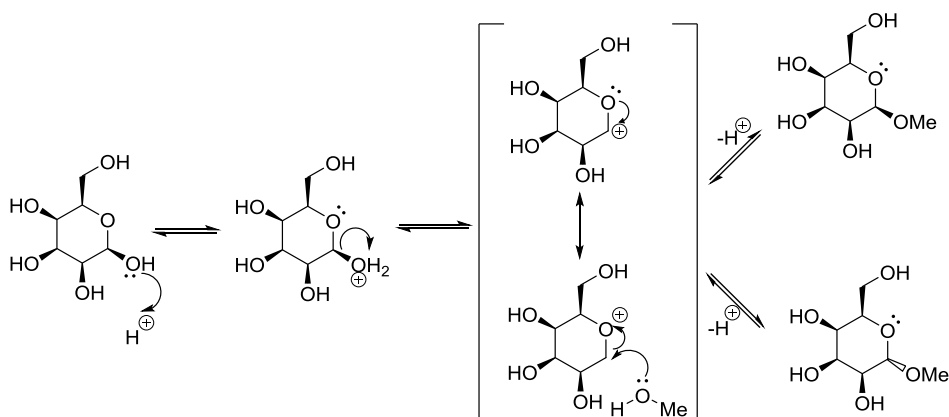
Elementna sestava: C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₈
Molska masa: 395,37g/mol
Izgled: rumeno strjeno olje
Rf: 0,74 (acetonitril/metanol/voda= 3/1/1)

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. SINTEZA C-MANOZIDOV

5.1.1. Fischerjeva glikozilacija

Pri sintezi C-manozidov smo izhajali iz D-(+)-manoze, ki smo jo raztopili v metanolu ter v raztopino dodali kislno smolo Amberlite IR120[®]. Na ta način smo s Fischerjevo glikozilacijo metilirali anomerno OH skupino ob prisotnosti kisline. Smola Amberlite IR120[®] povzroči protonacijo OH skupine in odcepitev vode ter nastanek stabilnega karbokationa. V naslednji stopnji pride do napada alkohola, pri tem pa nastane metil α -D-manozid (Slika 13). V tej stopnji nastaneta tako α - kot tudi β -manozid, a zaradi anomernega učinka v večji meri nastane α -manozid. Reakcijsko zmes smo pustili refluktirati čez noč in tako omogočili potek reakcije pri povišani temperaturi.



Slika 13: Mehanizem Fischerjeve glikozilacije. Prirejeno po (21).

5.1.2. Uvedba alilne skupine

V naslednji stopnji smo spojino **1** raztopili v acetonitrilu in dodali BSTFA, nato pa smo reakcijsko zmes segrevali čez noč. Bučko smo nato ohladili na ledu in po kapljicah dodali aliltrimetilsilan in TMSOTf, šele po dodatku TMSOTf pa se je naša izhodna spojina v celoti raztopila. V tej stopnji smo imeli precej težav, saj je pri dodatku omenjenega reagenta potekala precej burna eksotermna reakcija. Zaradi nastanka podtlaka v bučki je pri dodajanju reagenta skozi iglo v bučko v hipu prešlo preveč reagenta naenkrat in povzročilo precej burno reakcijo, kljub ledeni kopeli. Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Za izolacijo smo v bučko dodali vodo in pustili mešati na sobni temperaturi, nato pa smo reakcijsko zmes naalkalili z NaOH do nevtralnega pH. V naslednjem koraku smo našo spojino ekstrahirali z dodatkom etilacetata, a tudi po čiščenju

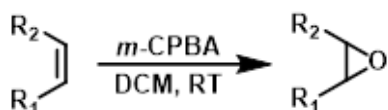
s kolonsko kromatografijo nismo dobili željene spojine. Na koncu smo posneli NMR spekter, ki je pokazal, da končna spojina ni željena spojina, zato smo postopek ponovili še enkrat brez ekstrakcije. Tudi pri ponovitvi sinteze nismo dobili željene spojine, saj smo zopet dobili zmes večih spojin z neznano strukturo. Verjetno bi bilo potrebno prilagoditi postopek sinteze, ali pa je bil kateri od reagentov neustrezen.

5.1.3. Acetilna zaščita OH skupin

Za naslednjo stopnjo smo uporabili že pripravljeno izhodno spojino **2**, ki smo jo raztopili v piridinu in po kapljicah dodali acetanhidrid na ledeni kopeli. Reakcijsko zmes smo nato pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Z acetanhidridom zaščitimo proste OH skupine, ki bi sicer v naslednjih stopnjah lahko neselektivno reagirale. Izolacijo produkta smo izvedli z ekstrakcijo z etilacetatom, pri čemer smo organsko fazo spirali z 1 M HCl (znebimo se preostanka piridina) in nato še z nasičeno raztopino NaHCO₃ (znebimo se prebitnega acetanhidrida in nastale očetne kisline).

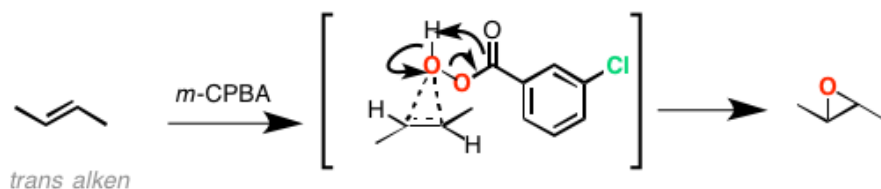
5.1.4. Tvorba epoksida – oksidacija alila

V naslednjem koraku smo iz alilne skupine tvorili epoksid, pri čemer smo izhodno spojino **3** raztopili v diklorometanu in dodali oksidant *meta*-kloroperoksibenzojsko kislino (mCPBA). Reakcijsko zmes smo refluktirali 2 uri pri 50 °C (Slika 14).



Slika 14: Mehanizem oksidacije alilne skupine. Prirejeno po (22).

Pri dodatku mCPBA se tvori vez med alkenom in OH skupino oksidanta, hkrati pa pride do prekinitve te vezi in tvorbe epoksida in *m*-klorobenzojske kisline (Slika 15). Epoksid deluje kot dober elektrofil, katerega v naslednji stopnji napade nukleofil.



Slika 15: Mehanizem tvorbe epoksida in *m*-klorobenzojske kisline. Prirejeno po (23).

5.1.5. Odpiranje epoksida

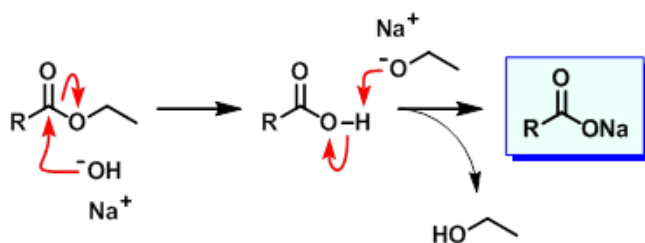
Izhodno spojino smo raztopili v 1,4-dioksanu, dodali za konico spatule katalizatorja kalcijevega triflata in že pripravljeni spojini metil 3-aminobenzoat in metil 4-aminobenzoat v prebitku. Reakcijo smo izvajali v mikrovalovnem reaktorju pri 120 °C 60 minut, reakcija pa tudi kljub podaljšanju časa v reaktorju iz 60 na 120 minut ni potekla do konca. Možni razlogi za slab izkoristek reakcije so slaba reaktivnost izhodnih spojin ali pa neoptimalni reakcijski pogoji. Veliko produkta ostane vezanega tudi na koloni pri končnem čiščenju spojine, saj gre za anilinski derivat (delno bazičen), silikagel pa je rahlo kisel in z njim lahko tvori sol. Potek reakcije moti tudi prisotnost mCPBA iz prejšnje stopnje, ki se je kljub čiščenju s kolonsko kromatografijo nismo uspeli popolnoma znebiti. Le-ta je oksidant in lahko oksidira izhodni anilinski derivat, kar ima za posledico nižji izkoristek reakcije.

5.1.6. Zemplénova metoda

V naslednji stopnji smo izhodni spojini **5** in **6** raztopili v MeOH in dodali 2 kapljici NaOMe/MeOH ter pustili mešati čez noč na sobni temperaturi. Gre za Zemplénovo metodo, s katero odstranimo acetilno zaščito na OH skupinah. V reakcijsko zmes smo nato dodali smolo Amberlite IR120[®], ki je kationski izmenjevalec, s pomočjo katerega pride do izmenjave protonov iz smole z natrijevimi ioni iz reakcijske zmesi. Na ta način smo dobili končno spojino v obliki estra.

5.1.7. Alkalna hidroliza

V primeru željene končne spojine v obliki kisline pa smo spojino **6** raztopili v MeOH in ji dodali bazo NaOH v prebitku ter pustili mešati čez noč pri sobni temperature (Slika 16). V zadnjem koraku smo reakcijsko zmes nevtralizirali do pH 7 s pomočjo kisle smole Amberlite IR120[®] ter se tako znebili prebitne baze.

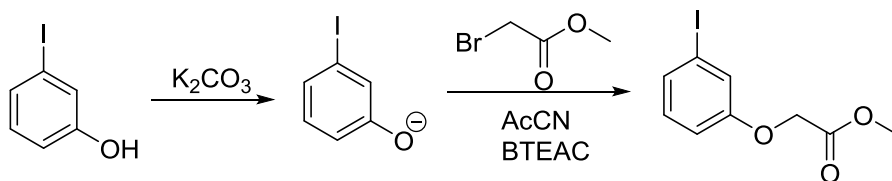


Slika 16: Mehanizem alkalne hidrolize. Prirejeno po (24).

5.2. SINTEZA N-MANOZIDOV

5.2.1. Williamsonova sinteza etrov

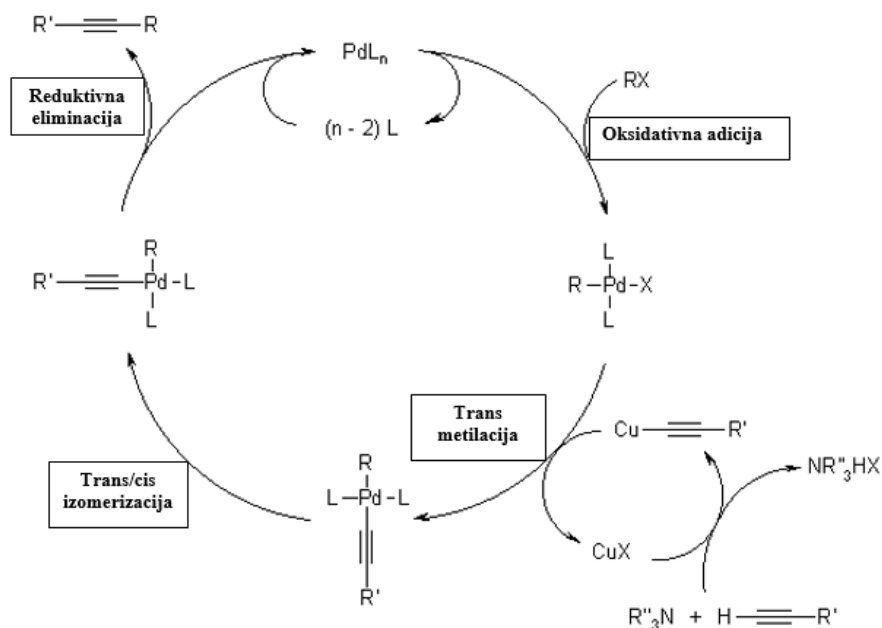
Pri sintezi N-manozidov smo v začetni fazi izvedli Williamsonovo sintezo etrov, pri čemer smo izhajali iz 3-jodofenola in alkil halida v obliki estra z različno dolžino verige. Najprej smo 3-jodofenolu dodali prebitek K_2CO_3 , ki kot alkalna sol zagotavlja bazične pogoje za ustrezen potek reakcije. Baza odcepi proton fenolu, nastali fenolat pa tvori alkoksid z alkil halidom (Slika 17). Kot topilo pri tej reakciji smo uporabili acetonitril, med mešanjem pa smo nato dodali alkil halid ter na koncu še BTEAC, ki deluje kot katalizator faznega prenosa. Reakcijsko zmes smo refluktirali čez noč, povratni hladilnik pa smo opremili s klorkalcijevo cevko za zagotavljanje brezvodnih pogojev. V primeru, da je v reakcijski zmesi ostal nezreagirani izhodni 3-jodofenol, smo dodali še 0,2 ekvivalenta alkil halida. S filtracijo smo se nato znebili K_2CO_3 in ga sprali s topilom ter nato uparili topilo pod znižanim tlakom. Preostanek v bučki smo raztopili v etilacetatu ter organsko fazo sprali z 1 M HCl, vodo, nasičeno raztopino $NaHCO_3$ ter nasičeno raztopino NaCl. Na ta način smo se znebili nezreagiranih izhodnih spojin ter dobili končno spojino v obliki etra. Na koncu smo organsko fazo sušili nad brezvodnim Na_2SO_4 in izvedli čiščenje surovega produkta s kolonsko kromatografijo.



Slika 17: Mehanizem Williamsonove sinteze etrov. Prirejeno po (25).

5.2.2. Sklopitev Sonogashira

V naslednjem koraku smo spojino v obliki etra v trogrli bučki prepihali z argonom ter dodali katalizatorja reakcije $Pd(PPh_3)Cl_2$ ter CuI ter reakcijsko zmes zopet prepihali z argonom (Slika 18). Skozi septum smo nato dodali bazičen trietilamin in na koncu še trimetilsilil acetilen. Na koncu smo zopet reakcijsko zmes prepihali z argonom ter pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. V tej stopnji smo izvedli reakcijo Sonogashira, pri čemer je pomembna inertna atmosfera, ki jo zagotavljamo s prepihavanjem z argonom. Trimetilsilil acetilen se v tej stopnji zamenja z jodom, s čimer na benzenov obroč pripnemo etilno skupino.



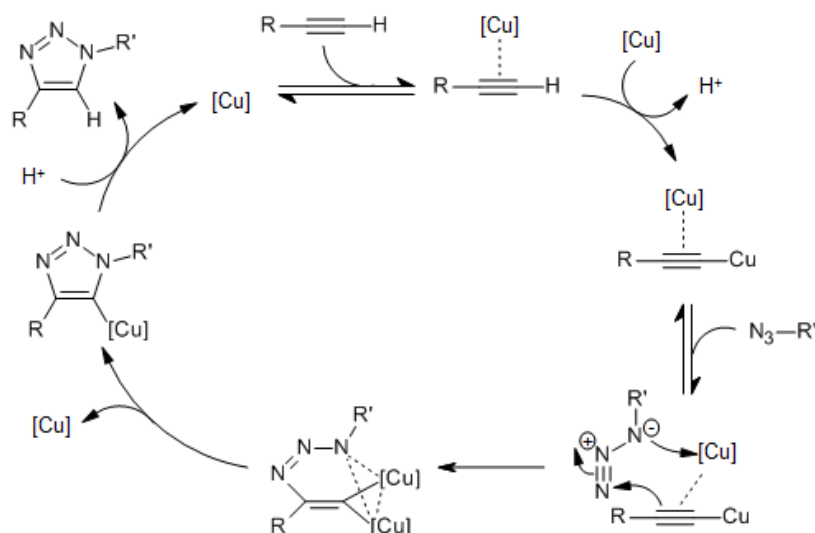
Slika 18: Mehanizem reakcije Sonogashira. Prirejeno po (26).

5.2.3. Odstranitev sililne zaščitne skupine

Sililno skupino smo odstranili v naslednji stopnji, ko smo izhodno spojino raztopili v DMF in dodali tetra-*n*-butilamonijev fluorid, ki deluje kot kvarterna amonijeva sol. Atom fluora deluje kot močan akceptor vodikove vezi in v tej stopnji tvori stranski produkt s sililno skupino. Reakcijsko zmes smo pustili mešati pri sobni temperaturi 10 minut in nato uparili topilo ter očistili produkt z nanosom na kolono.

5.2.4. Huisgenova cikloadicija - reakcija klik

S končno spojino po odščiti smo nato izvedli Huisgenovo cikloadicijo (t.i. reakcija klik). Izhodni spojini smo dodali D-manozo v obliki azida in reakcijsko zmes prepihali z argonom ter dodali katalizator CuI. Skozi septum smo nato dodali topilo DMF ter DIPEA, ki deluje kot baza. V tem primeru je zopet pomembna inertna atmosfera z argonom. Topilo smo po končani reakciji uparili in preostanek raztopili v enakem volumskem razmerju etilacetata in vode. Organsko fazo smo spirali z vodo in z nasičeno raztopino NaCl. Po ekstrakciji smo organsko fazo sušili nad Na_2SO_4 ter izvedli čiščenje surovega produkta s kolonsko kromatografijo. Ta reakcija stereospecifično vodi do 1,4-disubstituiranih izomerov (Slika 19).



Slika 19: Mehanizem Huisgenove cikloadicije. Prirejeno po (27).

5.2.5. Zemplénova metoda

Po izvedbi reakcije s Huisgenovo cikloadicijo smo odstranili acetilno zaščito OH skupin z Zemplénovo metodo, enako kot pri sintezi C-manozidov, z raztapljanjem v MeOH ter dodatkom NaOMe v MeOH. Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi, po končani reakciji pa smo se bazičnih izhodnih spojin znebili s dodatkom kisle smole Amberlite IR120[®]. V primeru etilnega estra pri sintezi spojine **14** je prišlo do preestrenja z NaOMe, zato smo na koncu dobili metilni ester.

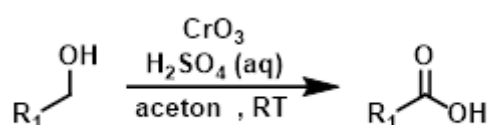
5.2.6. Alkalna hidroliza

Na koncu smo do željene spojine v obliki kisline prišli z alkalno hidrolizo z NaOH. Izhodno spojino smo raztopili v MeOH ter dodali prebitok NaOH in pustili mešati čez noč. V tem primeru smo imeli precej težav, saj je bilo potrebno dodati precej večji prebitok baze, da je reakcija potekla do konca. Na koncu smo se prebitka baze znebili z dodatkom kisle smole Amberlite IR120[®] in dobili končni spojini **15** in **21**.

5.3. Komentar neuspešne sinteze

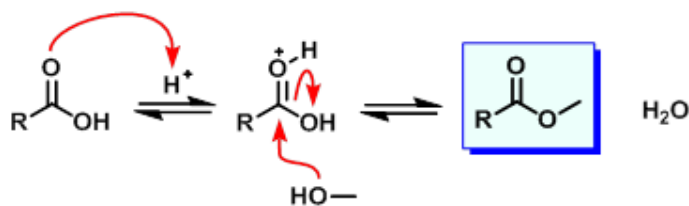
V zadnjem poskusu smo se začetne stopnje lotili nekoliko drugače, saj smo Williamsonovo sintezo etrov začeli z uporabo alkil halida v obliki alkohola. Po enakem postopku kot pri zgoraj omenjeni reakciji smo 3-jodofenolu dodali prebitok K₂CO₃ in kot topilo uporabili acetonitril. Med mešanjem smo nato dodali 3-bromo-1-propanol in reakcijsko zmes refluktirali čez noč, povratni hladilnik pa opremili s klorkalcijevo cevko. S filtracijo smo se znebili K₂CO₃ ter ga večkrat sprali s topilom ter izvedli ekstrakcijo enako kot pri zgoraj omenjeni reakciji. Na koncu te stopnje ni bilo potrebno izvajati čiščenja s kolonsko kromatografijo, saj smo dobili precej čisto spojino **22**.

V naslednji stopnji smo izvedli oksidacijo primarnega alkohola v stranski verigi nastalega etra. Izhodno spojino **22** smo raztopili v acetonu in dodali mešanico H₂O in H₂SO₄ (2:1) pri 0 °C ter reakcijsko zmes mešali 10 minut. Postopoma smo nato dodajali oksidant CrO₃ v prebitku ter reakcijsko zmes mešali na ledeni kopeli do popolnega poteka reakcije (Slika 20). Na koncu smo reakcijo ustavili z dodatkom 2-propanola, ki ga oksidira prebitek CrO₃. S filtracijo smo se znebili izhodnih spojin in matičnici uparili topilo. Preostanek smo raztopili v etil acetatu in spirali z vodo ter izvedli čiščenje surovega produkta s kolonsko kromatografijo. Na koncu te stopnje smo iz alkohola tvorili spojino **23** v obliki kisline, s katero smo v naslednjem koraku tvorili ester s kislinsko katalizirano esterifikacijo.



Slika 20: Mehanizem oksidacije alkohola do kisline. Prirejeno po (28).

Izhodno spojino **23** smo raztopili v MeOH ter ji na ledeni kopeli dodali H₂SO₄, raztopljeno v MeOH (Slika 21). Reakcijsko zmes smo nato refluktirali 1,5 ure, nato pa smo jo ohladili ter uparili topilo. Dodali smo nekaj vode in etilacetata ter organsko fazo spirali še z nasičeno raztopino NaHCO₃, da smo se znebili izhodne kisline. Na ta način smo dobili spojino **24** v obliki estra s pomočjo Fischerjeve esterifikacije, preostale stopnje pa smo nadaljevali po enakem postopku kot zgoraj s pripenjanjem etilne skupine.



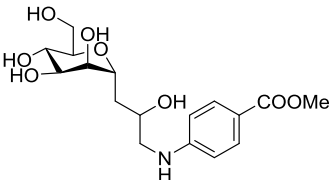
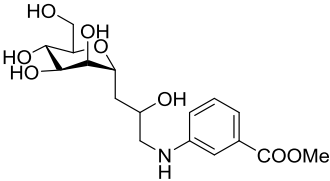
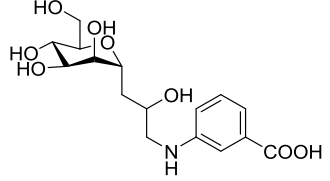
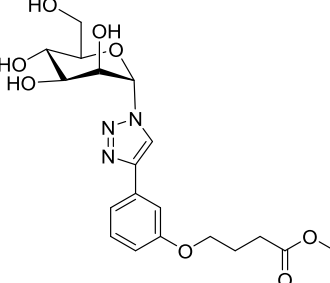
Slika 21: Mehanizem esterifikacije. Prirejeno po (29).

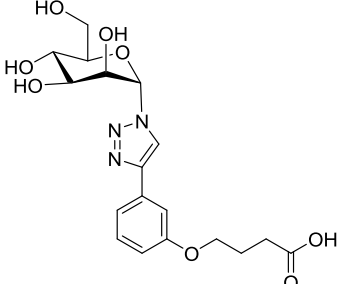
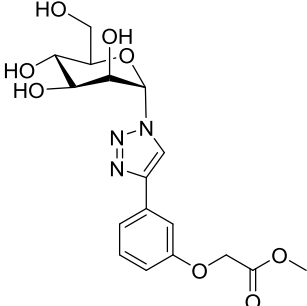
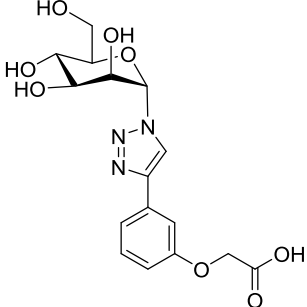
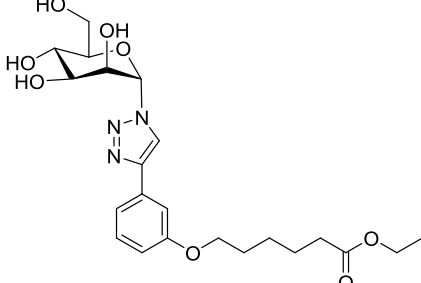
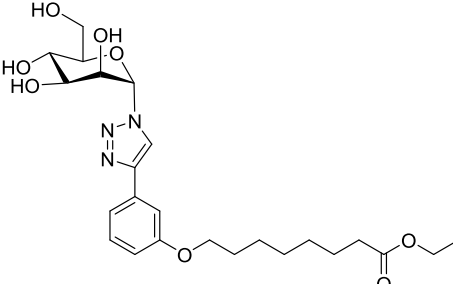
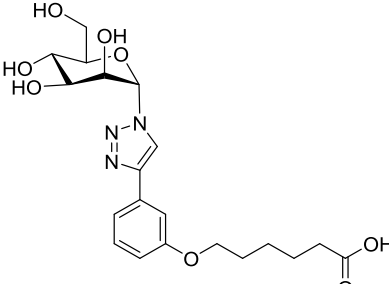
Po odščiti sililne skupine smo dobili precej nečisto spojino **26**, ki je v naslednjih korakih sinteze nismo uspeli očistiti. Na kromatogramih so se lise prekrivale, saj smo najverjetneje dobili zmes diastereomerov in je zato sinteza te spojine ponesrečena, kljub spremenjenem poteku reakcije.

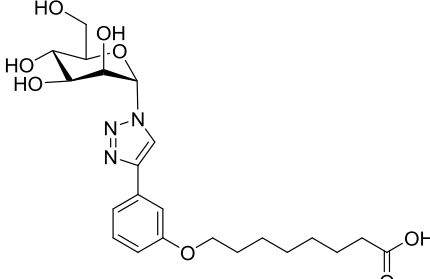
5.4. REZULTATI BIOKEMIJSKIH TESTIRANJ

Uspešno smo sintetizirali 7 končnih spojin, ki smo jih testirali na lektinski domeni FimH in na mutirani različici lektina, ki ima Arg98 zamenjan z Ala98. Spojine so bile pripravljene v obliki 100 mM raztopine v 100 % DMSO. Raztopine za testiranja so bila redčene v vodnem pufru z 20 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl in 50 µg/mL BSA. V tabeli so podane afinitete spojin v obliki vrednosti IC₅₀, ki pomeni 50 % inhibicijo vezave fluorescenčno označenega liganda na lektin FimH. Nižja kot je vrednost IC₅₀, učinkovitejša je sintetizirana spojina kot antagonist lektina FimH. V preglednici so poleg naših spojin predstavljene že sintetizirane spojine (AKT-34, AKT-35, AKT-38 in AKT-40), ki nam služijo kot pomoč pri interpretaciji rezultatov biokemijskih testiranj (Preglednica III).

Preglednica III: Afiniteta vezave na receptor FimH sintetiziranih spojin.

SPOJINA	STRUKTURNA FORMULA	LEKTINSKA DOMENA IC ₅₀ [nM]	R98A IC ₅₀ [nM]
<u>7</u>		213 178 - 254	16.6 14.3 - 19.4
<u>8</u>		634 521 - 771	93.7 78.0 - 113
<u>9</u>		3350 2780 - 4020	307 230 - 407
<u>14</u>		143 125 - 165	16.0 12.5 - 20.6

<u>15</u>		178 146 - 216	20.7 14.9 - 28.8
<u>20</u>		175 150 - 205	22.3 19.8 - 25.2
<u>21</u>		356 304 - 417	29.0 23.1 - 36.5
<u>AKT-34</u>		48.8 40.7 - 58.5	11.5 9.80 - 13.4
<u>AKT-35</u>		107 79.8 - 143	25.0 21.4 - 29.1
<u>AKT-38</u>		56.0 46.5 - 67.4	17.3 14.2 - 21.0

<u>AKT-40</u>		<p style="text-align: center;">533 417 - 681</p>	<p style="text-align: center;">63.2 46.9 - 85.3</p>
----------------------	---	---	--

Na podlagi rezultatov opazimo, da imajo C-manozidi precej šibkejšo afiniteto vezave kot N-manozidi, z izjemo spojine **7**, ki ima afiniteto vezave primerljivo N-manozidom. Pri C-manozidih ima spojina **7** z 1,4-substitucijo na anilinu močnejšo afiniteto vezave kot spojina **8** z 1,3-substitucijo, saj se najverjetneje zaradi steričnih ovir na ta način tvorijo močnejše interakcije z aktivnim mestom, ali pa 1,4-substitucija omogoča tvorbo dodatne vodikove vezi. Na podlagi strukturnih formul lahko opazimo, da imajo pri obeh tipih spojin estri močnejšo afiniteto vezave kot kisline. Kisline so v vodnem mediju obdane z molekulami vode, zato je najprej potrebna desolvatacija, preden lahko spojina tvori interakcije z aminokislinskimi ostanki lektina FimH. Tudi pri spojinah v obliki estra je potrebna desolvatacija, a za le-to ni potrebna tako velika energija desolvatacije kot pri kislinah, zato je lahko to eden od razlogov, da je inhibitorna aktivnost estrov močnejša. Lahko pa negativno nabiti karboksilat spojine tvori odbojne interakcije z aminokislinskimi ostanki proteina, kot sta negativno nabita glutamat in aspartat, kar poslabša afiniteto vezave.

Pri interakcijah aglikona končnih spojin z vezavnih mestom so pomembne predvsem 3 aminokisliline: Tyr48, Tyr137 in predvidoma Arg98. Z namenom dodatnih interakcij s pozitivno nabito stransko verigo Arg98 smo uvajali karboksilno kislino v sintetizirane spojine. Glede na dobljene rezultate in primerjavo afinitete vezave na nativnem proteinu in mutantu R98A pa nam doseganje le-teh verjetno ni uspelo, saj so na mutiranem proteinu afinitete vezave boljše kot na nativnem lektinu FimH. Protein pri vezavi spojin spreminja svojo konformacijo iz odprte oblike preko pol odprte v zaprto obliko. Odprta konformacija lektina FimH omogoča, da spojine tvorijo močnejše π - π interakcije z vezavnim mestom. V primeru odprte oblike sta Tyr48 in Tyr 137 bolj oddaljena drug od drugega in omogočata spojinam, da tvorijo interakcije z obema aromatskima aminokislinama preko π - π interakcij. Kadar je protein v zaprti obliki, pa se aminokislini Tyr 48 in Tyr 137 pomakneta bližje skupaj in omogočita, da Arg98 tvori interakcije s spojinami preko ionskih ali vodikovih vezi (Slika 4). Arg98 kot aminokislina s pozitivnim nabojem tvori tudi

interakcije z negativno nabitim π -elektronskim obročem Tyr48. V primeru mutirane različice proteina je Arg98 zamenjan z Ala98, ki pa ne tvori tako močnih interakcij s Tyr48, zato je pri spremembi konformacije FimH iz odprte v zaprto konformacijo potrebne manj energije, kar vpliva tudi na samo afiniteto vezave spojin. Na podlagi rezultatov lahko tudi sklepamo, da nobena od spojin ne tvori interakcij z Arg98, saj se pri zamenjavi le-tega z Ala98 pri vseh sintetiziranih spojinah afiniteta vezave bistveno izboljša v primerjavi z nativnim proteinom FimH.

N-manozidi imajo v primerjavi s C-manozidi precej večjo afiniteto vezave, iz česar sklepamo, da del molekule med manozo in aromatom pri C-manozidih ne tvori ugodnih interakcij v vezavnem mestu lektina FimH. Pri N-manozidih pa je nasprotno in triazolni obroč verjetno tvori interakcije z vezavnim mestom, kar pripomore k močnejši vezavi spojin. Alkilna veriga med manozo in aromatskim delom molekule pri C-manozidih omogoča tudi večjo fleksibilnost strukture kot triazolni obroč, kar tudi lahko prispeva k šibkejši vezavi. Kot smo opazili že pri C-manozidih, se tudi pri N-manozidih estri vežejo močnejše kot pripadajoče kisline. Na podlagi rezultatov naših spojin težko sklepamo, kako dolžina verige vpliva na afiniteto vezave, saj so rezultati med seboj precej primerljivi, kar dodatno potrjuje našo domnevo, da spojine ne interagirajo z Arg98. V pomoč so v Preglednici III prikazane že sintetizirane spojine, ki nam pomagajo pri interpretaciji rezultatov. Opazimo lahko, da se z daljšanjem verige afiniteta vezave zmanjšuje tako pri estrih kot tudi pri kislinah. Alkilna veriga v našem primeru z večanjem dolžine verige lahko stopi v stik z vodnim medijem in ne tvori interakcij z vezavnim mestom. Posledično se zmanjša tudi afiniteta vezave, zato je potrebno optimizirati dolžino verige, ki bi tvorila interakcije s proteinom.

6. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo načrtovali in sintetizirali nove potencialne antagoniste lektina FimH, ki bakterijam omogoča adhezijo na receptorje urotelija. Značilen je za družino enterobakterij, izraža pa ga veliko število sevov bakterije *E. coli*, ki najpogosteje povzroča okužbe urinarnega trakta. V začetnem delu smo sintetizirali C-manozide, pri čemer smo imeli precej težav tako pri sintezi, kot tudi pri čiščenju spojin s kolonsko kromatografijo. Zaradi težav pri sintezi smo imeli na koncu posameznih stopenj precej nizke izkoristke reakcij, hkrati pa smo v nekaj primerih dobili zmes diastereomerov, ki jih nismo uspeli ločiti. Tudi po večkratni ponovitvi sinteze uvedbe alilne skupine na anomerni C atom na koncu nismo dobili željene spojine, razlog pa je lahko neustrezen reagent, ali pa bi bilo potrebno spremeniti postopek sinteze. Težave nam je povzročalo tudi odpiranje epoksida, saj v tej stopnji reakcija v mikrovalovnem reaktorju ni potekala optimalno in tudi kljub podaljšanju časa v reaktorju nismo dosegli visokih izkoristkov. Nekaj spojine se je najverjetneje vezalo tudi na stacionarno fazo pri čiščenju s kolonsko kromatografijo, zaradi česar smo na koncu dobili precej nizek izkoristek reakcije. V nadaljevanju smo sintetizirali N-manozide, katerih sinteza je potekala z višjimi izkoristki in smo tako na koncu dobili čiste končne spojine.

Na podlagi biokemijskih testiranj so se kot močni antagonisti lektina FimH izkazali predvsem N-manozidi, ki imajo med seboj precej podobno afiniteto vezave. C-manozidi so imeli z izjemo spojine **7** precej manjšo afiniteto vezave in zato njihova sinteza ne predstavlja temelja za nadaljne raziskave. Pri obeh tipih spojin imajo estri večjo afiniteto vezave kot kisline, kar si lahko razlagamo s pomočjo energije desolvatacije. Alkilna veriga med manozo in aromatom pri C-manozidih ne sodeluje pri tvorbi interakcij z vezavnim mestom, medtem ko pri N-manozidih triazolni obroč tvori dodatne, verjetno hidrofobne, interakcije. Hkrati se z daljšanjem alkilne verige na koncu aromata zmanjša afiniteta vezave.

Na podlagi končnih testiranj smo dobili antagoniste lektina FimH, ki pa bi v prihodnosti potrebovali dodatne spremembe za izboljšanje njihove afinitete vezave. Spojine morajo biti za peroralno biološko uporabnost metabolno stabilne in se morajo hitro izločati iz telesa skozi ledvice za doseg tarčnega mesta delovanja. Na sintetiziranih spojinah bi bilo zato potrebno opraviti dodatna testiranja, ki bi omogočila vpogled v učinkovitost naših spojin kot antagonistov lektina FimH v testnih antibiogramih v kulturah bakterij ter v *in vivo* pogojih.

7. LITERATURA

1. Ohlsen K, Oelschlaeger TA, Hacker J, Khan AS.: Carbohydrate Receptors of Bacterial Adhesins: Implications and Reflections. *Top. Curr. Chem.* 2009; 288: 109-120.
2. Connell H, Hedlund M, Agace W, Svanborg C.: Bacterial Attachment to Uro-epithelial Cells: Mechanisms and Consequences. *Adv. Dent. Res.* 1997; 11: 50-58.
3. Huang ML, Fisher CJ, Godula K.: Glycomaterials for probing host–pathogen interactions and the immune response. *Exp. Biol. M.* 2016; 241: 1042-1053.
4. McDermott PF, Walker RD, White DG.: Antimicrobials: Modes of Action and Mechanisms of Resistance. *Int. J. Toxicol.* 2003; 22: 135-143.
5. Kiran Kumar K, Lalith Prakash Chandra K, Sumanthi J, Sridhar Reddy G, Chandra Shekar P, Reddy BVR.: Biological role of lectins: A review. *J. Orofac. Sci.* 2012; 4: 20-25.
6. Ofek I, Hasty DL, Sharon N.: Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunol. Med. Mic.* 2003; 38: 181-191.
7. Ernst B, Magnani JL.: From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009; 10: 661-677.
8. Wu H, Fives-Taylor PM.: Molecular Strategies for Fimbrial Expression and Assembly. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 2001; 12: 101-115.
9. Schembri MA, Sokurenko EV, Klemm P.: Functional Flexibility of the FimH Adhesin: Insights from a Random Mutant Library. *Infect. Immun.* 2000; 68: 2638-2646.
10. Sauer MM, Jakob RP, Eras J, Baday S, Eriş D, Navarra G, Bernèche S, Ernst B, Maier T, Glockshuber R.: Catch-bond mechanism of the bacterial adhesin FimH. *Nat. Commun.* 2016; 7: 1-13.
11. Pang L, Kleeb S, Lemme K, Rabbani S, Scharenberg M, Zalewski A, Schädler F, Schwardt O, Ernst B.: FimH Antagonists: Structure–Activity and Structure–Property Relationships for Biphenyl α -D-Mannopyranosides. *ChemMedChem* 2012; 7: 1404-1422.
12. Tomašič T, Rabbani S, Gobec M, Mlinarič Raščan I, Podlipnik Č, Ernst B, Anderluh M.: Branched α -D-mannopyranosides: a new class of potent FimH antagonists. *Med. Chem. Commun.* 2014; 5: 1247-1253.
13. Wellens A, Lahmann M, Touaibia M, Vaucher J, Oscarson S, Roy R, Remaut H, Bouckaert J.: The Tyrosine Gate as a Potential Entropic Lever in the Receptor-Binding Site of the Bacterial Adhesin FimH. *Biochemistry* 2012; 51: 4790–4799.
14. Mydock-McGrane L, Cusumano Z, Han Z, Binkley J, Kostakioti M, Hannan T, Pinkner JS, Klein R, Kalas V, Crowley J, Rath NP, Hultgren SJ, Janetka JW.:

- Antivirulence C-Mannosides as Antibiotic-Sparing, Oral Therapeutics for Urinary Tract Infections. *J. Med. Chem.* 2016; 59: 9390-9408.
15. Schwardt O, Rabbani S, Hartmann M, Abgottspon D, Wittwer M, Kleeb S, Zalewski A, Smieško M, Cutting B, Ernst B.: Design, synthesis and biological evaluation of mannosyl triazoles as FimH antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* 2011; 19: 6454-6473.
 16. Roshni Amalaradjou MA, Venkitanarayanan K.: *Urinary Tract Infections*, InTech, Dooradoyle, 2011: 227-244.
 17. Davis NF, Flood HD: *Clinical Management of Complicated Urinary Tract Infection*, InTech, Dooradoyle, 2011: 101-120.
 18. Jinnah F, Islam MS, Rumi MAK, Morshed MG, Huq F.: Drug Sensitivity Pattern of *E. coli* Causing Urinary Tract Infection in Diabetic and Non-diabetic Patients. *J. Int. Med. Res.* 1996; 24: 296-301.
 19. Teoh P, Basarab A, Pickering R, Ali A, Hayes M, Somani BK.: Changing trends in antibiotic resistance for urinary *E. coli* infections over five years in a university hospital. *J. Clin. Urol.* 2014; 7: 116-120.
 20. Wright SS, Purcell EM, Wilcox C, Broderick MK, Finland M.: Antibiotic Combinations and Resistance : Response of *E. coli* to Antibiotics, Singly and in Pairs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1953; 85: 128-133.
 21. http://s3.amazonaws.com/oxbridgenotes/samples/7800/original/Ether_Protecting_Groups_sample.pdf, dostopano 08.04.2017.
 22. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Alkene_to_Epoxyde/Alkene_to_Epoxyde_Index.htm, dostopano 08.04.2017.
 23. <http://www.masterorganicchemistry.com/2011/06/17/reagent-friday-m-cpba-meta-chloroperoxybenzoic-acid/>, dostopano 08.04.2017.
 24. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Ester_to_Acid/Ester_to_Acid_NaOH_Mech.htm, dostopano 08.04.2017.
 25. <http://www.masterorganicchemistry.com/2014/10/24/the-williamson-ether-synthesis/>, dostopano 08.04.2017.
 26. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/sonogashira-coupling.shtm>, dostopano 08.04.2017.
 27. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/click-chemistry.shtm>, dostopano 08.04.2017.

28.http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Alcohol_to_Acid/Alcohol_to_Acid_Index.htm, dostopano 04.05.2017.

29.http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Acid_to_Ester/Acid_to_Ester_H2SO4_Mech.htm, dostopano 04.05.2017.