

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



VERONIKA PELICON

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



VERONIKA PELICON

**SINTEZA ALFA-D-MANOZILTRIAZOLOV KOT
ANTIADHEZIVNIH LIGANDOV ZA BAKTERIJSKI POVRŠINSKI
LEKTIN FIMH**

**SYNTHESIS OF ALPHA-D-MANNOSYLTRIAZOLES AS ANTI-
ADHESIVE LIGANDS FOR BACTERIAL SURFACE LECTIN FIMH**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

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

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Marku Anderluhu za vse praktične nasvete pri izvajanju eksperimentalnega dela magistrske naloge. Pod tvojim vodstvom sem se v laboratoriju hitro počutila kot doma. Hvala tudi za odzivnost, dostopnost in posredovano strokovno znanje. Velika zahvala gre tudi Damjani Zalar, ki je vedno poskrbela, da v laboratoriju nič ni manjkalo in hitro priskočila na pomoč ob kakršnikoli zagati. Tako je laboratorijsko delo lahko potekalo brez zapletov, če le kemija ni zatajila in so reakcije ubrale drugačno pot od načrtovane.

Hvala tudi mami, tatu in sestri za podporo skozi vsa leta študija. Da ste verjeli vame, me prenašali med izpitnimi obdobji in poskrbeli, da sem lahko študij opravljala nemoteno brez drugih skrbi. Brez vas mi ne bi uspelo. Zahvaljujem se tudi prijateljem, ki ste mi vedno stali ob strani in mi pomagali premagovati izzive, ki jih tekom študija farmacije ni bilo malo. Predvsem pa ste poskrbeli, da so bila študijska leta res tista prava, nepozabna.

Izjava

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

Veronika Pelicon

Predsednik komisije: prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Nina Kočevar Glavač, mag. farm.

VSEBINA

KAZALO SLIK	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
I. POVZETEK.....	VII
II. ABSTRACT	VIII
III. OKRAJŠAVE	IX
1 UVOD	1
1.1 BAKTERIJSKE OKUŽBE SEČIL	1
1.1.1 Zdravljenje bakterijskih okužb sečil.....	1
1.1.2 Odpornost bakterij	2
1.2 ANTIADHEZIVNA TERAPIJA	2
1.2.1 Prednosti in pomanjkljivosti antiadhezivne terapije pri zdravljenju bakterijskih okužb.....	4
1.3 LEKTINI KOT TARČE ANTIADHEZIVNIH SPOJIN	6
1.3.1 FimH.....	7
1.3.1.1 Vloga FimH pri okužbi z uropatogeno <i>E. coli</i>	7
1.3.1.2 Zgradba proteina FimH in vezavnega mesta	8
1.3.1.3 »Catch-bond« mehanizem proteina FimH.....	9
1.4 ANTAGONISTI ADHEZINA FIMH	11
1.4.1 Selektivnost antagonistov adhezina FimH	11
1.4.2 Farmakokinetične lastnosti peroralno učinkovitih antagonistov FimH.....	12
2 NAČRT DELA.....	14
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 MATERIALI.....	19
3.2 METODE	19
4 EKSPERIMENTALNO DELO.....	25
4.1 SINTEZA SLADKORNEGA DELA.....	25
4.1.1 Zaščita OH skupin manoze – sinteza peracetilirane α -D-manopiranoze (1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -acetil-D-manopiranoze) (1)	25

4.1.2 1,2-transglikozidacija – sinteza 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-manopiranozil azida (2)	26
4.2 SINTEZA AGLIKONA	26
4.2.1 Sinteza spojine z 1 C distančnikom	26
4.2.1.1 Splošni postopek za Williamsonovo sintezo etrov – sinteza metil 2-(4-jodofenoksi)acetata	26
4.2.1.2 Splošni postopek za Sonogashirovo sklopitev – sinteza metil 2-(4-((trimetilsilil)etinil)fenoksi)acetata - uvedba alkina s sililno zaščito (4)	28
4.2.1.3 Splošni postopek za odstranitev sililne zaščitne skupine – sinteza metil 2-(4-etinilfenoksi)acetata (5)	28
4.2.1.4 Splošni postopek za Huishgenovo cikloadicijo (klik reakcija) – sinteza 2,3,4,6-(tetra- <i>O</i> -acetyl)-1-(4-(4-(2-metoksi-2-oksoetoksi)fenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)- α -D-manopiranoze (6)	29
4.2.1.5 Splošni postopek za Zemplenovo odščito – sinteza metil 2-(4-(1-(α -D-manopiranoza-1-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)acetata (7)	30
4.2.1.6 Hidroliza metilnega estra – sinteza natrijevega 2-(4-(1-(α -D-manopiranoza-1-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)acetata (8)	31
4.2.2 Sinteza spojine s 3 C distančnikom	32
4.2.2.1 Williamsonova sinteza etra – sinteza etil 4-(4-jodofenoksi)butanoata (9)	32
4.2.2.2 Sonogashirova sklopitev – sinteza etil 4-(4-((trimetilsilil)etinil)fenoksi)butanoata (10)	33
4.2.2.3 Odstranitev sililne zaščitne skupine – sinteza etil 4-(4-etinilfenoksi)butanoata (11)	34
4.2.2.4 Huishgenova cikloadicija (klik reakcija) – sinteza 2,3,4,6-(tetra- <i>O</i> -acetyl)-1-(4-(4-(4-etoksi-4-oksobutoksi)fenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)- α -D-manopiranoze (12)	35
4.2.2.5 Zemplenova odščita – sinteza etil 4-(4-(1-(α -D-manopiranoza-1-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi) butanoata (13)	36
4.2.2.6 Hidroliza etilnega estra – sinteza natrijevega 4-(4-(1-(α -D-manopiranoza-1-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)butanoata (14)	37
4.2.3 Sinteza spojine z 2 C distančnikom	38
4.2.3.1 Williamsonova sinteza etra – sinteza 3-(4-jodofenoksi)propan-1-ola (15)	38
4.2.3.2 Oksidacija alkohola do karboksilne kisline (Jonesova oksidacija) – sinteza 3-(4-jodofenoksi) propanojske kisline (16)	38

4.2.2.3 Fischerjeva esterifikacija – sinteza etil 3-(4-jodofenoksi)propanoata (17)	39
4.2.2.4 Sonogashirova sklopitev – sinteza etil 3-(4-((trimetilsilil)etinil)fenoksi)propanoata (18).....	40
4.2.2.5 Odstranitev sililne zaščitne skupine – sinteza etil 3-(4-etinilfenoksi)propanoata (19)	41
5 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	42
5.1 EKSPERIMENTALNI DEL	42
5.1.1 Acetiliranje manoznih OH skupin	42
5.1.2 Tvorba peracetilirane manoze z azidno skupino na anomernem C-atomu – 1,2 – transglikozidacija.....	43
5.1.3 Williamsonova sinteza etrov	44
5.1.4 Sonogashirova sklopitev in odščita sililne zaščitne skupine	44
5.1.5 Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija – »klik« reakcija	47
5.1.6 Zemlenova odščita peracetilirane manoze.....	49
5.1.7 Hidroliza estra.....	50
5.1.8 Poskus sinteze spojine z 2 C distančnikom na <i>para</i> poziciji.....	51
5.1.8.1 Jonesova oksidacija	54
5.1.8.2 Fischerjeva estrifikacija	55
5.2 BIOLOŠKA TESTIRANJA	55
5.3 RAČUNALNIŠKO SIDRANJE.....	58
6 SKLEP	61
7 LITERATURA	63
8 PRILOGE.....	68
8.1 ANALIZNI IZVIDI.....	68

Kazalo slik

Slika 1: Mehanizem pripetja bakterij na tarčne celice gostitelja.....	3
Slika 2: Vstop virusa HIV v CD4+ dendritično celico.	4
Slika 3: Razlika v spodbujanju razvoja rezistence med antibiotičnim zdravljenjem in antiadhezivno terapijo.....	5
Slika 4: Shematski prikaz sestave fimbrije tipa I uropatogene <i>E. coli</i>	7
Slika 5: Shematski prikaz »catch-bond« mehanizma adhezina FimH.....	10
Slika 6: Strukture antagonistov FimH.....	11
Slika 7: Na miših testirani antagonisti FimH.	12
Slika 8: Predvidene interakcije naših načrtovanih glikokonjugatov v vezavnem mestu FimH.....	14
Slika 9: Sintezni načrt za derivata z 1 in 3 C distančnikom na <i>para</i> mestu (n =1,3).....	15
Slika 10: Sintezni načrt za derivat z 2 C distančnikom na <i>para</i> mestu.....	17
Slika 11: »In-docking-mode« vezave in »out-docking-mode« vezave na lektinsko domeno FimH.....	18
Slika 12: Številčenje spojin pri procesiranju ¹ H (levo) in ¹³ C(desno) spektrov.	20
Slika 13: Shematski prikaz metode molekulskega sidranja.....	22
Slika 14: Kompetitivna fluorescenčna polarizacija.	24
Slika 15: Mehanizem zaščite manoznih OH skupin.	43
Slika 16: Mehanizem tvorbe azida z α -konfiguracijo.....	43
Slika 17: Predviden mehanizem Sonogashirove reakcije, predstavljen na derivatu z 1 C distančnikom.....	45
Slika 18: Predlagan mehanizem samozdruževanja terminalnih alkinov.....	46
Slika 19: Sonogashirova sklopitev s sledečo odščito trimetilsililne zaščite.	46
Slika 20: Predviden mehanizem z Cu(I) katalizirane azid-alkin cikloadicije.....	48
Slika 21: Mehanizem Zemplenove transestrifikacije.....	50
Slika 22: Mehanizem alkalne hidrolize estra.	50
Slika 23: Mehanize E2 eliminacije pri poskusu sinteze spojine z 2 C distančnikom.	51
Slika 24: Mehanize delokalizacije elektronskega para.	52
Slika 25: Neuspešen poskus sinteze spojine z 2 C distančnikom.	52
Slika 26: Poskus sinteze spojine z 2 C distančnikom.	53
Slika 27: Mehanizem anionske adicijske polimerizacije.	53
Slika 28: Mehanizem tvorbe kromove kisline.	54

Slika 29: Mehanizem Jonesove oksidacije.	54
Slika 30: Mehanizem Fischerjeve estrifikacije.	55
Slika 31: Računalniško sidranje spojine 13 v aktivno mesto FimH.	58
Slika 32: Računalniško sidranje spojine 14 v aktivno mesto FimH.	59
Slika 33: Računalniško sidranje spojine 8 v aktivno mesto FimH.	59
Slika 34: Računalniško sidranje spojine 7 v aktivno mesto FimH. Biarilni fragment tvori π - π interakcije s tirozinskimi vrati.	60

Kazalo preglednic

Preglednica I: Rezultati bioloških testiranj končnih spojin.	56
--	----

I. Povzetek

Infekcije urinarnega trakta, katerih povzročiteljica je običajno uropatogena *Escherichia coli*, sodijo med najpogostejše bakterijske okužbe. Uropatogena *Escherichia coli* se zoperstavi odstranitvi s tokom urina tako, da se preko lektina FimH pripne na glikoproteine, prisotne na uroepitelijskih celicah. FimH, ki specifično veže manozilirane ligande, je lociran na konicah pilijev tipa I na površini uropatogene *Escherichia coli*.

Trenutni način zdravljenja bakterijskih okužb sečil temelji na antibiotikih. Veliko težavo predstavlja hiter razvoj rezistentnih bakterij na uporabljene protimikrobne učinkovine, zato intenzivno raziskujejo alternativne načine zdravljenja. Med njimi veliko obeta antiadhezivna terapija na podlagi glikomimetikov.

V sklopu magistrske naloge smo oblikovali antagoniste FimH na osnovi D-manoze, ki sicer izkazuje relativno nizko afiniteto do adhezina FimH ($K_D = 2,3 \mu\text{M}$). Afiniteto lahko bistveno izboljšamo s pripenjanjem različnih aglikonov preko α -glikozidne vezi na D-manopiranozo. Spojine smo sintetizirali na podlagi zadetka 4-feniltriazol- α -D-manopiranoze, ki je v kompetitivnem testu vezave izkazal visoko afiniteto ($K_D = 336 \text{ nM}$) do FimH vezavnega mesta. Slabost zadetka je visoka polarnost, ki onemogoča zadovoljivo pasivno difuzijo in s tem možnost *per os* absorpcije. Aglikon smo na monosaharidno jedro vezali preko N-glikozidne vezi, s čimer izboljšamo stabilnost v fiziološkem okolju zaradi upočasnjene razgradnje z glikozidazami. Triazolofenilni biarilni fragment poveča afiniteto vezave preko interakcij s »tirozinskimi vrati«, ki tvorijo vhod v manozni vezavni žep. Z oksialkylkarboksilnimi fragmenti na *para* poziciji fenilnega obroča smo poskušali še dodatno povečati moč vezave z željo po vzpostavitvi ionskih in vodikovih vezi z Arg98.

Spojine smo testirali v kompetitivnem testu vezave na lektinski domeni FimH (wild type) in na R98A mutantu, da bi ocenili morebiten vpliv tvorbe ionske vezi z Arg98. Rezultati testiranja kažejo, da se pripravljene antagoniste vežejo na FimH v nanomolarnih koncentracijah.

Ključne besede: uropatogena *Escherichia coli*, FimH, antiadhezivna terapija, antagonisti FimH, glikomimetiki, α -D-manopiranozidi, N-glikozidna vez.

II. Abstract

Urinary tract infections, predominantly caused by uropathogenic *Escherichia coli*, belong to the most prevalent infectious diseases worldwide. Uropathogenic *Escherichia coli* binds to glycoproteins on uroepithelial cells with lectin FimH. This is how bacteria resist clearance from the urinary tract by the shear stress that arises during micturition. FimH is a mannose-binding adhesin located at the tip of bacterial type 1 pili.

To date, urinary tract infections are mainly treated with antibiotics, leading to development of strains resistant against most of the currently available antimicrobials. Therefore, new treatment strategies are urgently needed. Antiadhesive glycomimetics offer an attractive alternative to the conventional antibiotic treatment.

Within this thesis we synthesized mannose-based FimH antagonists. D-mannose has a relatively weak affinity for FimH ($K_D=2.3 \mu\text{M}$), but affinity can be improved markedly by incorporating various aglycones to the D-mannopyranose via α -glycosidic bond. We designed potential antagonists upon initial hit 4-phenyltriazolo- α -D-mannopyranoside with promising affinity ($K_D = 366 \text{ nM}$). The downside of the hit is its high polarity which is detrimental for its passive diffusion and consequently no oral absorption could be guaranteed. Compounds that we synthesized within the thesis have an aglycon attached via N-glycosidic bond, which is more stable in physiological environment, because of slower hydrolysis via mannosidases. The triazolophenyl biaryl moiety improves affinity by interacting with “tyrosine gate” that forms the entrance to mannoside binding pocket. We attached various oxyalkylcarboxylate residues at *p*-position of the phenyl moiety to establish ionic and hydrogen bonds with previously unexplored Arg98 residue.

We evaluated potential FimH antagonists with competitive fluorescence polarization assay on FimH lectin domain (wild type) and R98A mutant to see if they form interactions with Arg98. We report that tested α -D-triazolomannopyranosides showed affinities in the low nanomolar range.

Keywords: uropathogenic *E. coli*, FimH, antiadhesion therapy, FimH antagonists, glycomimetics, α -D-triazolomannopyranosides, N – glycosidic bond.

III. Okrajšave

Å	angström
AcCN	acetonitril
Ala	alanin
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	aspartat
BTEAc	benziltriethylamonijev klorid
CDCl₃	devteriran kloroform
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i> – domena za vezavo ogljikovih hidratov
CuCAA	<i>copper(I)catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i> – z bakrom katalizirana azid-alkin cikloadicija
d	dublet
dd	dublet dubleta
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DKM	diklorometan
DMF	dimetilformamid
DMSO-d₆	devteriran dimetilsulfoksid
D₂O	devterirana voda
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ekv	ekvimolarna količina (ekvivalent)
ESI	<i>electrospray ionization</i> – elektrorazpršilna ionizacija
EtOAc	etil acetat
FimC	periplazmatski šaperon, ki usmerja sestavljanje fimbrij tipa I
FimH	<i>fimbrial adhesin H</i> – fimbrijski adhezini H
FimH_L	lektinska domena FimH
FimH_P	pilijska domena FimH
FP	fluorescenčna polarizacija
Gln	glutamin
Hex	<i>n</i> -heksan
HEPES	ion dvojček: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIV	humani imunodeficientni virus – virus humane imunske pomankljivosti

HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> – masna spektrometrija visoke ločljivosti
Ile	izolevcin
IR	infrardeča spektroskopija
J	sklopitvena konstanta
K_D	konstanta disociacije
logP	logaritem porazdelitvenega koeficienta
m	multiplet
MeOD	devteriran metanol
MF	mobilna faza
MS	masna spektrometrija
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> – jedrska magnetna resonanca
Phe	fenilalanin
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> – vzorčno prepoznavni receptor
q	kvartet
Rf	retencijski faktor
R98A	lektinska domena FimH, kjer je Arg98 zamenjan z Ala
s	singlet
t	triplet
TBABr	tetrabutilamonijev bromid
TBAF	tetrabutilamonijev fluorid
TEA	triethylamin
Thr	treonin
TLC	<i>thin layer chromatography</i> – tankoplastna kromatografija
TLR-4	<i>toll-like receptor 4</i> – tolični receptor 4
Tyr	tirozin
δ	kemijski premik

1 Uvod

1.1 Bakterijske okužbe sečil

Infekcije urinarnega trakta so med najpogostejšimi bakterijskimi okužbami in zato predstavljajo velik javnozdravstveni problem. Približno 40 % žensk in 12 % moških doživi v svojem življenju vsaj eno simptomatsko okužbo sečil. Če okužba prizadene spodnji del (sečnico in mehur), govorimo o uretritisu in cistitisu, kadar pa se bakterije preselijo višje preko sečevodov do ledvic, govorimo o pielonefritisu (1, 2). Simptomi, ki spremljajo vnetje mehurja, so pekoče, pogosto uriniranje in neprestan občutek tiščanja na vodo, kljub temu da je mehur prazen. Pri vnetju ledvic pa se poleg težav, ki so značilne za cistitis, pojavijo še povišana telesna temperatura, mrzlica, slabost ter bolečine ledveno. V 70-90 % primerov je povzročitelj infekcije urinarnega trakta uropatogena *Escherichia coli* (1, 3).

Ženske so zaradi anatomskih značilnosti sečil bolj dovzetne za infekcije urinarnega trakta kot moški. Ženska sečnica (4 cm) je krajša od moške (20 cm), zato patogeni lažje in hitreje vstopijo v mehur. Poleg tega je razdalja pri ženskah med sečnico in rektumom oziroma nožnico, od koder izhaja večina uropatogenov, izredno majhna (4).

Infekcije urinarnega trakta razdelimo v dve skupini, in sicer med nezapletene in zapletene. Nezapletene okužbe sečil so lažje ozdravljive in se pojavijo pri sicer zdravih posameznikih. Zapletene okužbe sečil so verjetnejše pri moških, nosečnicah, imunsko oslabelelih, pri ledvični odpovedi, nevroloških boleznih, ki povzročajo retenco urina, pri tujkih v sečilih (urinski kateter, ledvični kamni) in po nedavnem zdravljenju z antibiotiki (1, 2, 5, 6).

1.1.1 Zdravljenje bakterijskih okužb sečil

Za zdravljenje blagih okužb spodnjega urinarnega trakta lahko uporabimo pripravke iz listov vednozelenega gornika. Večinoma pa zdravljenje temelji na protimikrobnih učinkovinah (antibiotiki in kemoterapevtiki). Ključni dejavniki, ki vplivajo na trajanje zdravljenja okužbe sečil in izbiro protimikrobne učinkovine, so mesto, zapletenost okužbe, starost in spol bolnika. Na uspešnost zdravljenja ima velik vpliv ustrezna farmakokinetika protimikrobnih učinkovin. Pri zdravljenju okužb spodnjih sečil je pomembna dovolj velika koncentracija učinkovine v urinu. Zdravljenje zapletenih infekcij urinarnega trakta in okužb zgornjih sečil pa zahteva ustrezne koncentracije učinkovine v plazmi (6).

Prva izbira za zdravljenje nezapletenega cistitisa sta nitrofurantoin in kombinacija trimetoprim-sulfometoksazol. Pri zdravljenju okužb zgornjih sečil so v ospredju kinoloni. Zapletene okužbe sečil z blažjimi simptomi običajno pričnemo zdraviti peroralno s kinoloni. Po določitvi občutljivosti izoliranih bakterij pa terapijo prilagodimo. Zapletene okužbe sečil, ki jih spremlja hujša klinična slika, zdravimo bolnišnično z intravensko aplikacijo protimikrobnih učinkovin (6, 7).

1.1.2 Odpornost bakterij

Zdravljenje simptomatskih urinarnih infekcij s protimikrobnimi učinkovinami pripelje do porušanja normalne črevesne in nožnične flore. Največjo nevarnost pa predstavlja razvoj odpornih bakterij. Antibiotik bakterije, ki so nanj občutljive, uniči oziroma zavre njihovo razmnoževanje. Odpornim bakterijam na ta način omogoča zaščito, saj jim prostora in hranilnih snovi ni treba deliti z bakterijami, ki so na antibiotik občutljive. Rezistentne bakterije lahko tako povzročijo ponoven izbruh bolezni, ki pa je veliko težje obvladljiva (5).

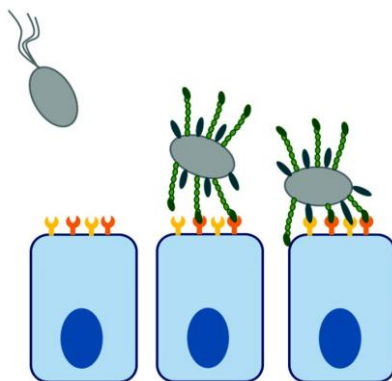
Odpornost povzročiteljev okužb sečil predstavlja problem tako pri bolnišničnem kot tudi pri ambulantnem zdravljenju. Odpornost uropatogene *Escherichia coli*, ki je najpogostejša povzročiteljica okužb sečil, na trimetoprim-sulfometoksazol zaradi pogoste uporabe hitro narašča. Sočasno se zaradi vse večje uporabe povečuje tudi odpornost uropatogene *Escherichia coli* na kinolone (6). Standardne protimikrobne učinkovine tako pri zdravljenju infekcij urinarnega trakta ne zadoščajo več. Povečuje se uporaba antibiotikov druge in tretje linije (aminoglikozidi, cefalosporini, karbapenemi) in s tem razvoj večkratno odporne uropatogene *Escherichia coli*. »Zlata doba« antibiotikov tako počasi ugaša. Razvoj alternativnega načina zdravljenja, ki ga predstavlja antiadhezivna terapija, tako predstavlja nujno osvežitev na področju bakterijskih okužb (5, 6, 8).

1.2 Antiadhezivna terapija

Če se patogen želi izogniti obrambnemu odzivu gostitelja, se mora hitro in učinkovito vezati na tarčne celice. Adhezija bakterije na celice gostitelja je eden izmed prvih korakov pri bakterijski okužbi, ki je bistven za njeno preživetje in ji omogoča kolonizacijo. Antiadhezivna terapija tako predstavlja učinkovit način preprečevanja oziroma zdravljenja bakterijskih okužb (9).

Bakterija s celico gostitelja najprej vzpostavi nespecifične interakcije (**slika 1**). Gre za reverzibilen fizikalno kemijski stik na podlagi hidrofobnosti, dipola in naboja. Sledi

začetna adhezija s specifičnimi interakcijami, ki pa bakteriji še vedno omogočajo svobodno gibanje po celični površini in iskanje ugodnega okolja z dovolj hranili. V primeru, da bakteriji grozi odstranitev zaradi imunskega odziva ali mehanskega stresa (pretok urina), pa pride med površinskimi molekulami bakterije in gostiteljske celice do tvorbe specifičnih interakcij z visoko afiniteto (9).

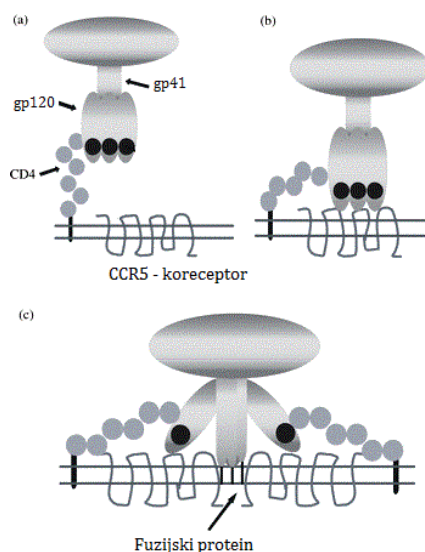


Slika 1: Mehanizem pripetja bakterij na tarčne celice gostitelja. Povzeto po (9).

Začetki antiadhezivne terapije pri zdravljenju bakterijskih okužb sečil segajo v ljudsko medicino. Uspešnost soka ameriške brusnice (*Vaccinium macrocarpon*) pri preventivi infekcij urinarnega trakta je spodbudila prve raziskave na tem področju. Polifenoli (proantocianidini), prisotni v ameriški brusnici, so dokazano sposobni preprečiti stik med uropatogeno *Escherichia coli* in gostiteljskimi uroepitelijskimi celicami *in vitro* (10, 11). Nekateri manjše klinične študije so pokazale pomembno zmanjšanje pogostosti bakteriurije tako pri mlajših kot pri starejših ženskah ob rednem pitju soka ameriške brusnice, kar nakazuje na učinkovitost brusničnih polifenolov tudi *in vivo* (10, 12). Večje klinične študije tega zaenkrat še niso uspele potrditi, zato avtorji sistemskega preglednega članka, objavljenega v medicinski podatkovni bazi Cochrane, navajajo, da trenutno ni dovolj dokazov, ki bi potrdili učinkovitost soka ameriške brusnice v preventivi bakterijskih okužb sečil (9, 13).

Na trgu so že prisotna zdravila, ki delujejo po principu antiadhezivne terapije, in sicer za zdravljenje okužb z virusom humane imunske pomankljivosti (HIV). Virus HIV se veže na celični receptor CD4 dendritičnih celic preko virusne beljakovine gp120. Sledi konformacijska sprememba gp120 in vezava na koreceptor CCR5, kar povzroči dodatne konformacijske spremembe in razgaljenje transmembranskega fuzijskega peptida gp41, ki penetrira v membrano levkocita (**slika 2**). Enfuviritid preprečuje fuzijo virusa HIV z

dendritičnimi celicami preko vezave na virusno podenoto gp41. Maravirok pa je antagonist koreceptorja CCR5 (9, 14, 15).

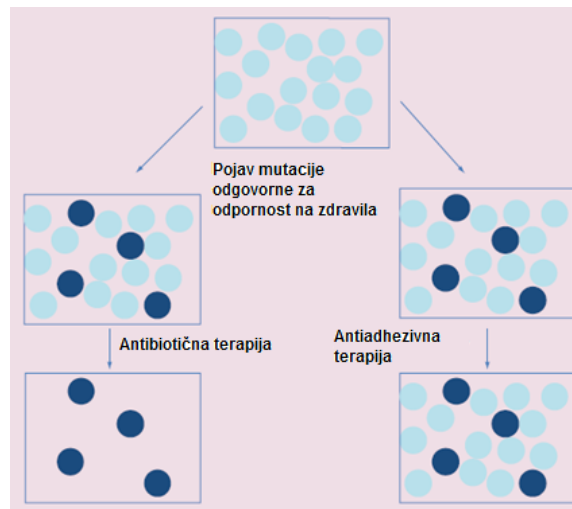


Slika 2: Vstop virusa HIV v CD4+ dendritično celico. Povzeto po (15).

Zaradi hitrega razvoja na obstoječe protimikrobno zdravljenje odpornih sevov v zadnjih desetletjih princip antiadhezivne terapije intenzivno raziskujejo na področju zdravljenja bakterijskih okužb.

1.2.1 Prednosti in pomanjkljivosti antiadhezivne terapije pri zdravljenju bakterijskih okužb

Glavna prednost antiadhezivne terapije je, da ni pričakovati spodbujanja razvoja odpornih sevov, vsaj v znatni meri ne (**slika 3**). Zaviralci adhezije namreč bakterij ne uničijo ali zavrejo razmnoževanja, temveč le preprečijo njihovo vezavo na gostiteljsko celico (10, 16).



Slika 3: Razlika v spodbujanju razvoja rezistence med antibiotičnim zdravljenjem in antiadhezivno terapijo.

Antibiotik uniči le občutljive bakterije, bakterije z mutacijo pa preživijo. Tako imajo več prostora, da se hitro razširijo. Z antiadhezivno terapijo patogena ne uničimo, temveč le preprečimo njegovo vezavo, tako ni selekcijskega pritiska, ki bi spodbujal hitrejši razvoj odpornega seva. Povzeto po (10).

Mutacije adhezivnih receptorjev, ki zmanjšajo učinkovitost antiadhezivnih spojin, se lahko pojavijo, vendar to vpliva tudi na sposobnost vezave patogena na gostiteljsko celico. Bakterija tako ni več zmožna adhezije in s tem kolonizacije, zato takšne mutacije niso zaželene. Prednost antiadhezivne terapije je tudi možnost razvoja ozkospektralnih učinkovin, s čimer zmanjšamo vpliv na normalno bakterijsko floro. Spremembe v genih za bakterijske adhezine namreč vplivajo na tkivni tropizem. Variacija v genetskem zapisu za adhezijski lektin FimH spremeni komenzalni sev *E. coli* v uropatogeno *E. coli*, ki ima veliko afiniteto do manoziliranih glikoproteinov uroepitelijskih celic. To nam omogoča oblikovanje antiadhezivnih spojin, ki specifično ciljajo le patogene bakterije (9, 17).

Težava baktericidnih antibiotikov je tudi pospešeno sproščanje bakterijskih toksinov, kar lahko poslabša zdravstveno stanje bolnika. Sproščanje Shiga toksina iz enterohemoragičnih sevov *E. coli* po odmrtnju bakterij privede do diareje, hemoragičnega kolitisa in v najhujših primerih do hemolitično-uremičnega sindroma. Običajno zdravljenje z antibiotiki je pri teh sevih kontraindicirano, saj spodbudi sproščanje Shiga toksina in tako poslabša okužbo in poveča smrtnost. Nasprotno z antiadhezivno terapijo bakterij ne ubijemo, zato ne pride do povečanega sproščanja toksinov, ki bi imeli dodaten škodljiv vpliv na potek bolezni (9, 18). Bakterije, ki jim preprečimo vezavo na gostiteljske celice, so nepoškodovane, vendar niso funkcionalne. Intaktne bakterije omogočajo okrepitev specifičnega imunskega sistema, ki nas varuje pred ponovno okužbo in poskrbi za očistek bakterij, ki niso bile odstranjene mehansko (9).

Bakterije imajo na svoji površini običajno različne tipe adhezinov, zato inhibicija enega izmed njih najverjetneje ni dovolj. To nakazuje tudi visok delež neuspešnih kliničnih preizkušanj na področju antiadhezivne terapije. Težava, ki dodatno prispeva k neučinkovitosti *in vivo*, je zahtevno vzdrževanje terapevtskih koncentracij antiadhezivnih spojin na mestu okužbe. Za klinično uspešnost antiadhezivne terapije pri zdravljenju bakterijskih okužb bo tako najverjetneje potrebno uporabiti koktejl učinkovin, specifičnih za različne adhezine, oziroma razviti širokospektralno spojino, ki se bo vezala na raznovrstne bakterijske adhezine (10, 16).

1.3 Lektini kot tarče antiadhezivnih spojin

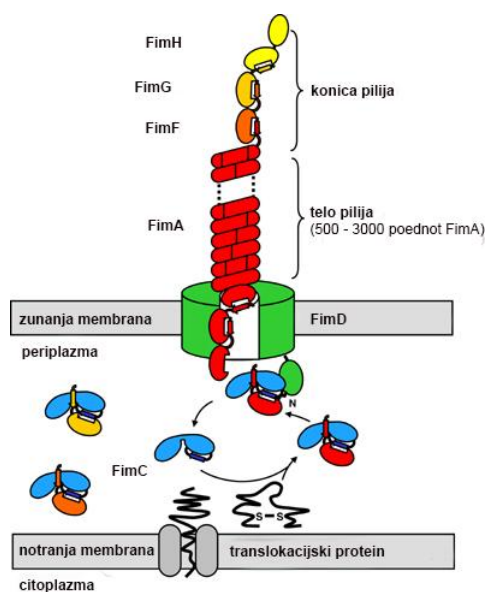
Lektini so celični proteini, ki specifično in reverzibilno vežejo ogljikove hidrate. Prisotni so pri vseh živih organizmih, tako pri rastlinah, živalih kot tudi mikroorganizmih. Lektini imajo pomembno vlogo pri medceličnem povezovanju. Običajno vsebujejo eno ali več vezavnih mest za ogljikove hidrate (CRD – carbohydrate recognition domain). Zunajcelični lektini tvorijo nekovalentne interakcije z ogljikovimi hidrati, prisotnimi na površini drugih celic. Zaradi številnih nekovalentnih vezi je povezava specifična, a še vedno reverzibilna (19).

Biološka funkcija lektinov je zelo raznolika. Rastlinski lektini ščitijo rastline pred patogeni, živalski lektini sodelujejo pri transportu in odstranjevanju glikoproteinov, pomembno vlogo imajo pri oploditvi ter v prirojenem imunskem sistemu sesalcev. Sposobni so namreč razlikovati med različnimi ogljikovimi hidrati, čeprav so ti sestavljeni iz enakih sladkornih enot. To omogoča ločevanje med tujimi in lastnimi ogljikovimi hidrati, kar ima ključno vlogo pri odstranjevanju patogenih mikroorganizmov iz telesa (19, 20).

Tudi patogeni mikroorganizmi uporabljajo lektine za vezavo na glikane, prisotne na površini gostiteljskih celic. Z uporabo spojin, ki oponašajo naravno prisotne ogljikove hidrate – glikomimetiki, lahko preprečimo adhezijo bakterij in posledično zagon okužbe. Glikomimetiki namreč tekmujejo za vezavo v aktivno mesto lektina s sladkornimi komponentami, prisotnimi na celični površini gostitelja. Bakterijski lektin FimH, izražen na površini uropatogene *E. coli*, ki se veže na manozilirane glikoproteine uroepitelijskih celic, predstavlja odlično tarčo za razvoj glikomimetičnih antiadhezivnih spojin za zdravljenje infekcij urinarnega trakta (20, 21).

1.3.1 FimH

FimH je bakterijski lektin, ki se nahaja na konici fimbrije tipa I uropatogene *E. coli* in omogoča specifično pritrditev na ogljikove hidrate gostiteljskih celic. Fimbrije ali pilusi so proteinske nitaste strukture, prisotne na površini bakterijskih celic, dolge med 0,1 in 2 μm ter široke približno 7 nm. Na površini *E. coli* najdemo od 100 do 400 enakomerno razporejenih za α -D-manozide specifičnih fimbrij tipa I. Te so sestavljene iz številnih nekovalentno vezanih podenot FimA. Konica pilija pa je zgrajena iz podenot FimF, FimG in FimH, kot prikazuje shematski prikaz na spodnji sliki (22–24).



Slika 4: Shematski prikaz sestave fimbrije tipa I uropatogene *E. coli*. Povzeto po (22).

1.3.1.1 Vloga FimH pri okužbi z uropatogeno *E. coli*

FimH se z zmerno afiniteto (konstanta disociacije je približno 100 nM) veže na visokomanozilirane terminalne enote uroplakina Ia. Uroplakin je transmembranski glikoprotein, ki prekriva več kot 90 % luminalne površine dežnikastih celic. Slednje tvorijo zgornjo plast epitelija sečnega mehurja. FimH poleg sladkornih enot uroplakina Ia prepozna tudi oligosaharide na integrinih $\alpha_3\beta_1$, ki jih najdemo po celotnem uroteliju. Uropatogena *E. coli* se lahko na gostiteljsko celico veže s 100 do 200 fimbrijami, s čimer bistveno poveča stabilnost vezave (25, 26). Po adheziji sledi invazija v uroteljske celice. Celice mehurja se uropatogene *E. coli* po vdoru lahko znebijo z eksocitozo, sproženo preko aktivacije receptorjev TLR-4 (*toll-like receptor 4* – tolični receptor 4). Lahko pa se zgodi, da uropatogena *E. coli* pobegne v citoplazmo, kjer se namnoži in tvori znotrajcelične bakterijske skupnosti. FimH ima pomembno vlogo pri povezovanju med

bakterijami znotraj takšnih kolonij. Bakterije so v znotrajceličnih skupnostih skrite pred imunsko obrambo gostitelja in protimikrobnimi učinkovinami. Tako lahko mirujejo v mehurju in po zaključenem zdravljenju povzročijo ponovno okužbo. Z zaviranjem lektina FimH bi tako preprečili adhezijo in vdor uropatogene *E. coli* ter tvorbo biofilma. Antiadhezivne spojine, specifične za FimH, zato predstavljajo velik potencial za uspešnejše zdravljenje cistitisa in njegovo profilakso (25, 27).

1.3.1.2 Zgradba proteina FimH in vezavnega mesta

Protein FimH je zgrajen iz 279 aminokislin. Sestavljata ga dve domeni, ki ju povezuje kratka veriga (aminokislinski ostanki 157–159): N-končna lektinska domena (FimH_L), kjer se nahaja manozni vezavni žep, in C-končna pilijska domena (FimH_P), ki povezuje adhezin s fimbrijo. Za pravilno zvitje FimH poskrbi kot N-končni donor predhodna enota fimbrije FimG. Jasna struktura proteina FimH zato dolgo ni bila poznana, saj mora biti C-končni del vezan naprej na drug protein, da pride do pravilnega zvitja, poleg tega pa je kot samostojna enota tudi hitro izpostavljen proteolitični razgradnji. Leta 2002 so objavili kristalno strukturo šaperon-adhezijskega kompleksa FimC-FimH z α -D-manozo v vezavnem mestu (3, 23, 24).

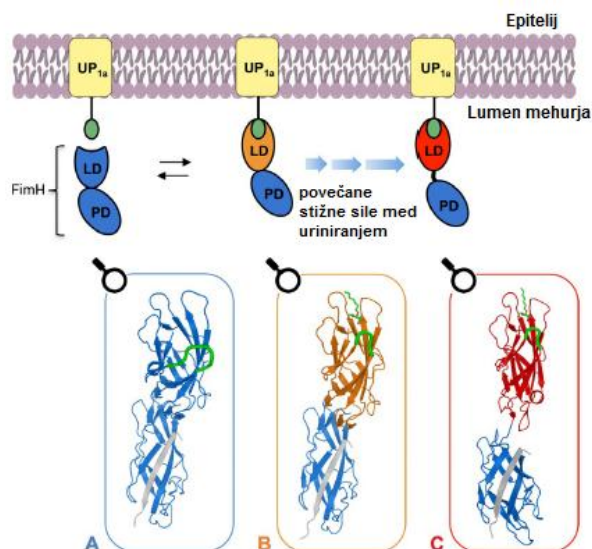
Poznavanje kristalne strukture FimH_L in načina vezave naravnih glikoproteinskih ligandov nam omogoča načrtovanje antagonistov z visoko afiniteto do vezavnega mesta. Manozna se z vodikovimi vezmi veže v globok in negativno nabit žep na FimH_L. Vse hidroksilne skupine α -D-manoze razen anomerne sodelujejo pri tvorbi goste mreže vodikovih vezi s stranskimi verigami hidrofilnih aminokislinskih ostankov v vezavnem mestu, zlasti s Phe1, Asn46, Asp47, Asp54, Gln133, Asn135, Asp140 in Phe142. Konfiguracija na anomernem C-atomu bistveno vpliva na afiniteto vezave, β -D-manozidi zaradi steričnih ovir ne uspejo vstopiti v manozni vezavni žep. Ekvatorialna konfiguracija hidroksilne skupine sladkorja na mestu 2, ki jo najdemo pri glukozi, namesto aksialne, ki je značilna za manozo, onemogoča vzpostavitev mreže vodikovih vezi. Afiniteta glukoze do vezavnega mesta je zato praktično zanemarljiva (24, 28, 29).

Vhod v manozni vezavni žep sestavlja hidrofobno področje, ki ga med drugim tvorita aminokislinska ostanka Tyr48 in Tyr137 v obliki t. i. »tirozinskih vrat«. Ker anomerna OH skupina ni vpletena v neposredne interakcije z manoznim žepom, jo lahko izkoriščamo za pripenjanje različnih aglikonov, ki s tvorbo vezi s hidrofobnim grebenom povečajo afiniteto do lektina FimH (24). Alkilni aglikoni α -D-manopiranozidov s

tirozinskimi vrati in Ile52 vzpostavijo Van der Waalsove interakcije, aromatski pa dodatno še π - π interakcije. Ob vezavi alkilnih in aromatskih ligandov na receptor se zmanjša njihova konformacijska svoboda, kar ni entropijsko ugodno (izguba rotacijskih in translacijskih prostostnih stopenj). Tirozinska vrata preko hidrofobnih interakcij z lipofilnimi aglikoni kompenzirajo te entropijske izgube (28, 30).

1.3.1.3 »Catch-bond« mehanizem proteina FimH

Adhezin FimH obstaja v različnih konformacijah z različno afiniteto do manoziliranih ligandov (**slika 5**). Konformacijo proteina FimH določajo interakcije med FimH_L in FimH_P. Ob odsotnosti toka urina sta domeni med seboj povezani, vezavno mesto pa je slabo strukturirano, plitvo in zavzema konformacijo z nizko afiniteto do manoze. Konformacijsko stanje z nizko afiniteto je ob odsotnosti uriniranja v dinamičnem ravnovesju s konformacijo s srednjo afiniteto. Slednjo adhezin FimH zavzame ob vezavi liganda, pri čemer se tvori globok vezavni žep. V konformaciji s srednjo afiniteto so interakcije še vedno kratkoročne in bakteriji omogočajo raziskovanje okolice in kolonizacijo. Pri povečanju mehanskega stresa, ki ga povzroči uriniranje, se domeni lektina FimH ločita. Konformacijske spremembe se z dinamično alosterijo razširijo iz območja med domenama do vezavnega mesta, ki zavzame konformacijo z visoko afiniteto. Manozni žep postane jasno strukturiran, ozek in globok, zato so interakcije z ligandom močnejše. Ta »catch-bond« mehanizem uropatogeni *E. coli* omogoča, da se ob povečanju mehanskega stresa močneje veže na manozilirane enote uroplakina Ia, in se na ta način zoperstavi odstranitvi s tokom urina (3, 23).

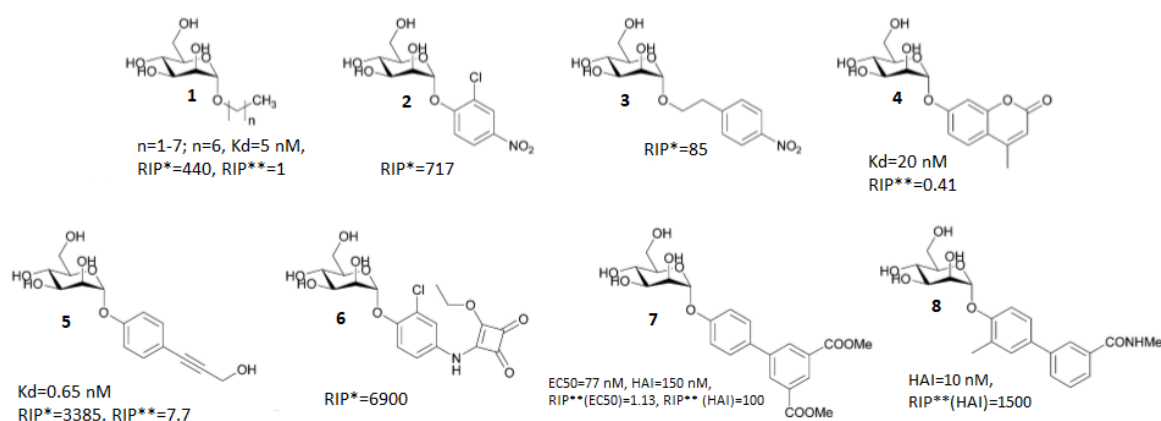


Slika 5: Shematski prikaz »catch-bond« mehanizma adhezina FimH. V okvirčkih so predstavljene kristalne strukture FimH. **A)** V odsotnosti uriniranja se FimH nahaja v konformaciji z nizko afiniteto. Domeni (FimH_L in FimH_P) sta med seboj prepleteni, pilijska domena deluje kot negativni alosterični modulator, vezavni žep je zato plitev in slabo strukturiran. **B)** Ob vezavi na manoziliran uroplakin Ia FimH zavzame konformacijo s srednjo afiniteto. Zanka označena z zeleno, objame ligand in tako tvori globok vezavni žep. **C)** Med uriniranjem se zaradi povečanja strižnih sil domeni adhezina FimH ločita in inducira se konformacija z visoko afiniteto. Prirejeno po (3).

Sevi uropatogene *E. coli* izražajo adhezine FimH, ki imajo širok spekter vezavne afinitete. Večina naravno prisotnih razlik v aminokislinskem zaporedju FimH se običajno ne nahaja v vezavnem žepu, temveč v območju med domenama. Genetske variante v interdomenski regiji preko dinamične alosterije vplivajo na konformacijo vezavnega mesta, na katero še dodatno vpliva mehanski stres, povzročen s tokom urina. Naravno prisotni FimH adhezini imajo tako različno afiniteto za vezavo na uroplakin Ia. Za učinkovitost antiadhezivne terapije bi bilo optimalno, da bi se antagonisti FimH vezali na vse fiziološko prisotne variante FimH. Običajno izvajamo biološka testiranja učinkovitosti potencialnih antagonistov FimH *in vitro* na rekombinantno izraženi FimH_L ali na kompleksu FimH s FimC. V obeh primerih ni interakcij med domenama, zato je lektinska domena zaklenjena v konformacijo z visoko afiniteto, kar ne zagotavlja popolnega sistema za vrednotenje antagonistov. Testiranja na celičnih linijah *in vitro* pa običajno izvajajo na sevu UTI89, ki izraža adhezin FimH z visoko afiniteto do manoze. Ta sev ne izkazuje »catch-bond« mehanizma in zato ni idealen za vrednotenje antagonistov FimH, za katere želimo, da se učinkovito vežejo na vse fiziološko prisotne variante (3).

1.4 Antagonisti adhezina FimH

D-manoza ter raznovrstni naravni in sintezni sladkorji, ki vsebujejo terminalne manozne ostanke, preprečijo interakcije med lektinom FimH in uropalakinom Ia in s tem adhezijo uropatogena *E. coli* na urotelijske celice. D-manoza se na FimH lektin veže s $K_d = 2.3 \mu\text{M}$. Bouckaert in sodelavci so ugotovili, da izkazujejo preprosti alkil α -D-manopiranozidi interakcije s FimH v nanomolarnem koncentracijskem območju. Med njimi je najmočnejši heptil α -D-manopiranozid s konstanto disociacije (K_D) = 5 nM (slika 6, 1). S pripetjem alkilnega aglikona na manozno jedro torej dobimo antagoniste FimH s 1000-krat večjo afiniteto do vezavnega mesta v primerjavi s samo D-manozo. Razlog za močnejše interakcije s FimH je tvorba Van der Waalsovih vezi med alkilno verigo liganda s tirozinskimi vrati in Ile52. Poleg alkilnih so se za učinkovite izkazali tudi aromatski α -D-manopiranozidi, kar so že pred tremi desetletji pokazali Firon in sodelavci (2). Od takrat so raziskovalci razvili in sintetizirali številne antagoniste FimH z aromatskimi aglikoni, ki izkazujejo vezavno afiniteto, primerljivo heptil α -D-manopiranozidu (3-8). Aromatski aglikoni namreč tvorijo s tirozinskimi vrati π - π interakcije. FimH povzroči aglutinacijo rdečih krvnih celic, zato lahko učinkovitost potencialnih antagonistov merimo s pomočjo testa inhibicije hemaglutinacije. Pri slednjem so se nekateri aromatski derivati izkazali za učinkovitejše od alifatskih, čeprav izkazujejo podobno afiniteto vezave (7 in 8) (31, 32).



Slika 6: Strukture antagonistov FimH. RIP^* = relativni inhibitorni potencial glede na metil α -D-manopiranozid, RIP^{**} = relativni inhibitorni potencial glede na heptil α -D-manopiranozid, HAI = inhibicija hemaglutinacije. Povzeto po (28).

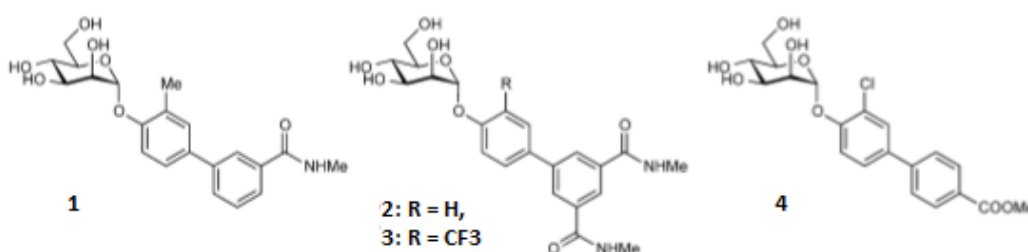
1.4.1 Selektivnost antagonistov adhezina FimH

Antagonisti FimH so po strukturi α -D-manopiranozidi in so tako tudi potencialni ligandi človeških receptorjev, ki vežejo manozo. Pri sesalcih najdemo receptorje, ki vežejo

manozo, na različnih tkivih, kjer uravnavajo različne biološke procese, med drugim celično adhezijo in serumsko homeostazo glikoproteinov. Pomembno vlogo pa imajo pri prirojenem in pridobljenem imunskem odzivu na patogene. Večina človeških manozno specifičnih lektinov sodi v skupino receptorjev, ki je odgovorna za prepoznavo patogenov (PRR). PRR so lahko prisotni kot topni plazemski proteini ali pa gre za transmembranske proteine, prisotne na površini celic imunskega sistema (makrofagih, dendritičnih celicah, Langerhansovih celicah). Vezava PRR na patogen pospeši proces fagocitoze in aktivira imunski odziv gostitelja. Neselektivne interakcije antagonistov FimH bi porušile biološke procese, povezane z manozno specifičnimi človeškimi receptorji, kar bi najverjetneje pripeljalo do neželenih učinkov. Pot v manozni vezavni žep receptorja FimH tvorijo »tirozinska vrata«, ki jih pri človeških receptorjih, ki vežejo manozo, ne najdemo. Antagonisti FimH, ki imajo na manozno jedro vezane hidrofobne aglikone, tvorijo interakcije s tirozinskimi vrati in tako izkazujejo 10^5 -krat večjo afiniteto do adhezina FimH v primerjavi s človeškimi receptorji. Neželenih učinkov, ki so posledica neselektivne vezave antagonistov FimH na človeške receptorje, pri zdravljenju okužb sečil tako ne pričakujemo (33).

1.4.2 Farmakokinetične lastnosti peroralno učinkovitih antagonistov FimH

Farmakokinetične študije na miših *in vivo* so pokazale možnost *per os* zdravljenja infekcij urinarnega trakt z bifenilnimi α -D-manopiranozidi. Primer peroralno uporabnih učinkovin so spojine **1-4** na **sliki 7**. Slabost teh spojin je, da so za doseg minimalnih inhibitornih koncentracij v mehurju in s tem ustrezen antiadheziven učinek potrebni veliki odmerki (≥ 50 mg/kg). Poleg tega traja terapevtski učinek, zaradi hitre eliminacije z glomerulno filtracijo in slabe tubulne reabsorpcije iz primarnega urina, kratek čas. Spojina **3** je po enkratnem *per os* odmerku (50 mg/kg) učinkovita 4 ure (31).



Slika 7: Na miših testirani antagonisti FimH. Povzeto po (31).

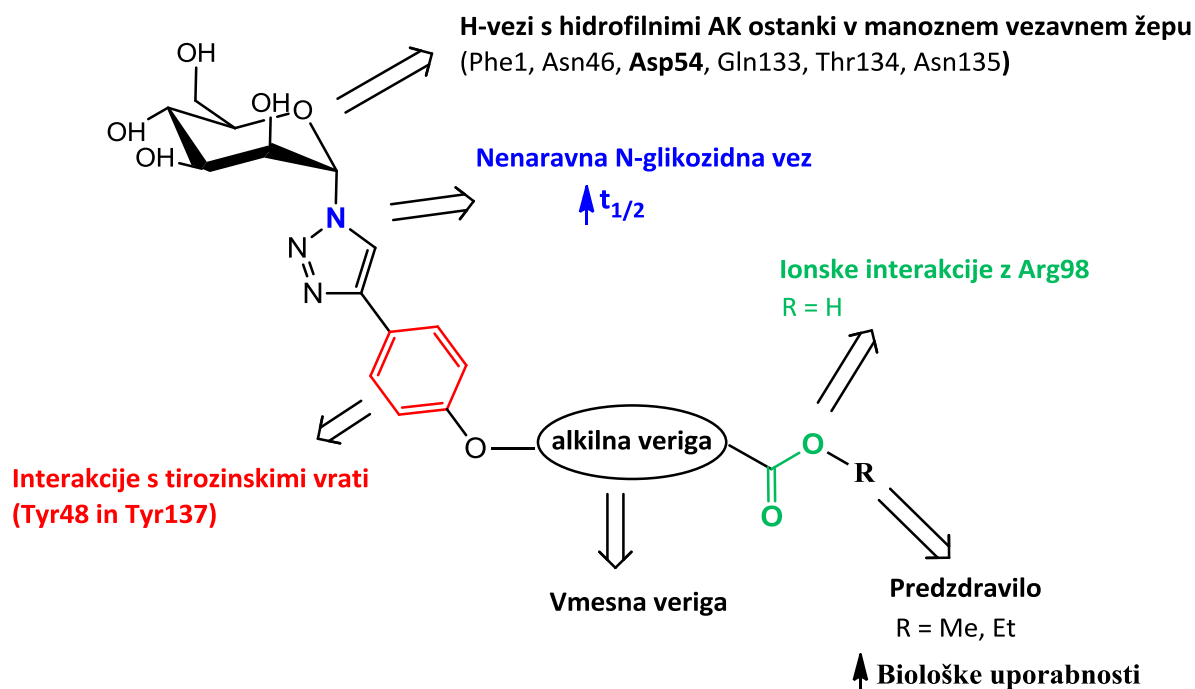
Za uspešno *per os* zdravljenje okužb mehurja sta nujna predpogoja črevesna absorpcija in izločanje antagonista FimH preko ledvic. Za dovolj visoko biološko uporabnost po

peroralni aplikaciji so bistveni topnost antagonistov, permeabilnost celičnih membran in odpornost proti metabolizmu prvega prehoda. Dobro permeabilnost enterocitov izkazujejo antagonisti z zmerno lipofilnostjo ($\log P > 1,6$). Težava je, da se z večanjem lipofilnosti večja podvrženost antagonistov jetrnemu metabolizmu, ki tako ne uspejo prispeti nespremenjeni do mehurja. Hitrost ledvičnega izločanja učinkovin je odvisna od podvrženosti antagonista glomerulni filtraciji, tubulni sekreciji in reabsorpciji. Spojina, vezana na plazemske proteine, se ne izloča z glomerulno filtracijo. Bolj lipofilne spojine se na plazemske proteine vežejo močnejše, zato poteka ledvično izločanje počasneje in dalj časa. Zaželeno je tudi, da je antagonist podvržen tubulni reabsorpciji, saj to omogoča vzdrževanje ustrezne antiadhezivne koncentracije v mehurju skozi daljši čas. Reabsorbirajo se spojine z večjo lipofilnostjo ($\log P > 1$). Hidrofilne spojine se sicer hitro izločijo preko ledvic v primarni urin in dosežejo veliko začetno koncentracijo, a se ne reabsorbirajo, tako je minimalna inhibitorna koncentracija dosežena le kratek čas (31).

2 Načrt dela

V okviru eksperimentalnega dela magistrske naloge bomo v laboratoriju sintetizirali potencialne antagonistice receptorja FimH uropatogene *E. coli*. Spojine bomo pripravili na podlagi spojine zadetka – 4-feniltriazol- α -D-manopiranoze, ki je v kompetitivnem testu vezave izkazal visoko afiniteto ($K_D = 366$ nM) do FimH vezavnega mesta. Slabost zadetka je visoka polarnost, ki onemogoča zadovoljivo pasivno difuzijo in s tem možnost absorpcije *per os*. Sintetizirali bomo alfa-D-manoziltriazole, pri katerih bomo s prilagoditvijo aglikonskega dela skušali izboljšati farmakokinetične lastnosti in sočasno ohraniti afiniteto vezave.

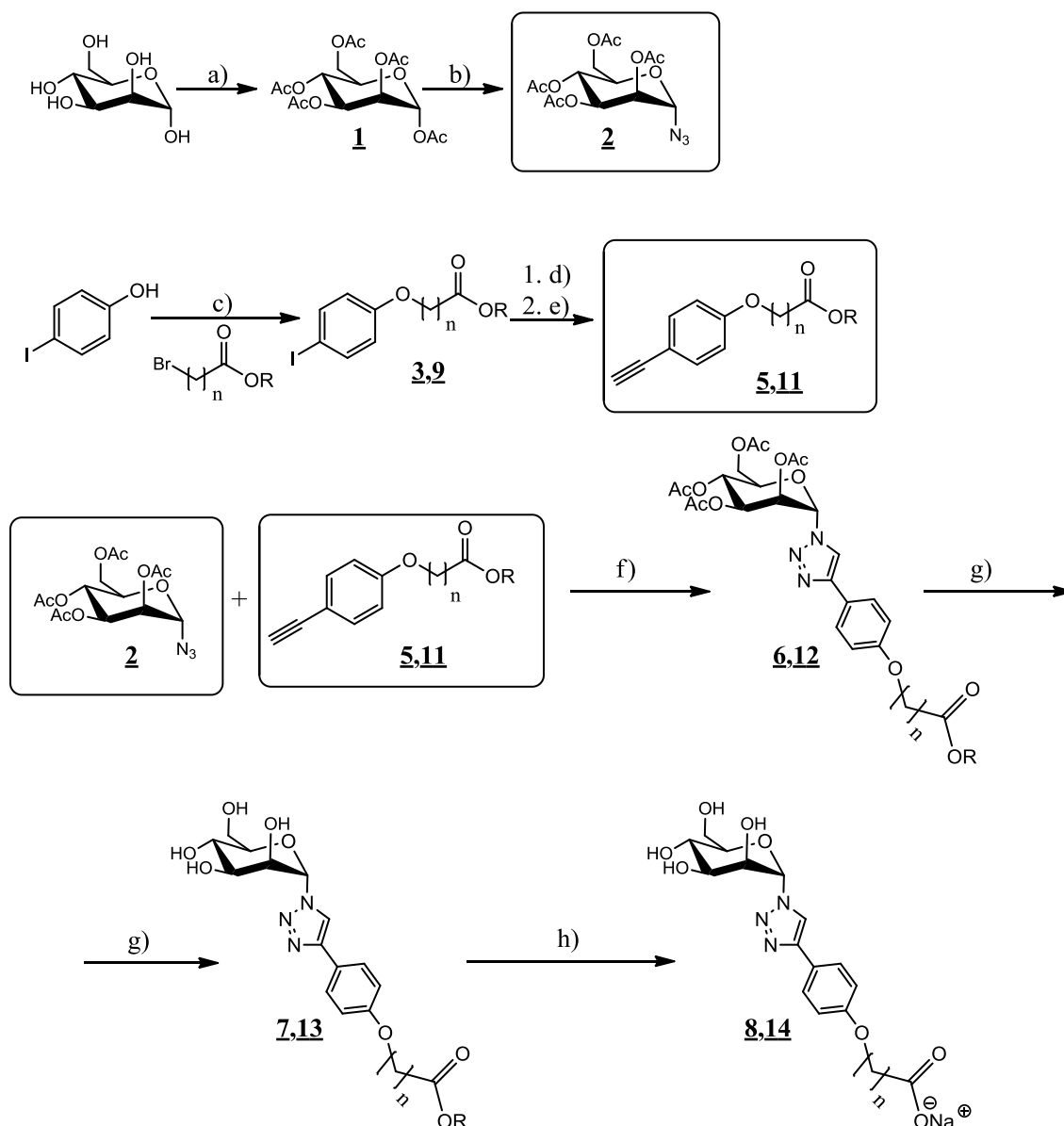
Osnovni gradnik naših spojin bo D-manoza, na katero bomo preko anomernega ogljika vezali feniltriazole, ki bodo na *para* mestu različno substituirani (slika 8). Aglikonski del bo na sladkorno komponento pripet preko nenaravne α -N-glikozidne vezi, ki naj bi izboljšala stabilnost v fiziološkem okolju. Večina do sedaj znanih antagonistov FimH vsebuje O-glikozidno vez. Slednji imajo zaradi možne razgradnje z manozidazami nizko metabolno stabilnost.



Slika 8: Predvidene interakcije načrtovanih glikokonjugatov v vezavnem mestu FimH.

Za vezavo antagonistov na adhezin FimH je nujen fragment D-manoza, ki z negativno nabitim manozna-vezavnim žepom vzpostavi mrežo H-vezi, zato bo D-manoza osnova naših glikomimetikov. Dodatno bomo poskušali afiniteto vezave povečati preko π - π

interakcij s tirozinskimi vrati (območje med Tyr48 in Tyr137) in triazolofenilnim biarilnim fragmentom. Z oksialkylkarboksilnim fragmentom na *para* poziciji fenilnega obroča bomo poskušali povečati moč vezave preko ionskih in vodikovih vezi z Arg98, kar do sedaj objavljeni antagonisti še niso uspeli. Karboksilat bo na spojine pripet preko akilnih verig različnih dolžin, in sicer od 1 do 3 C atomov, s čimer bomo poskušali ugotoviti optimalno razdaljo za interakcije antagonista z gvanidinom v aminokislinskem ostanku Arg98.

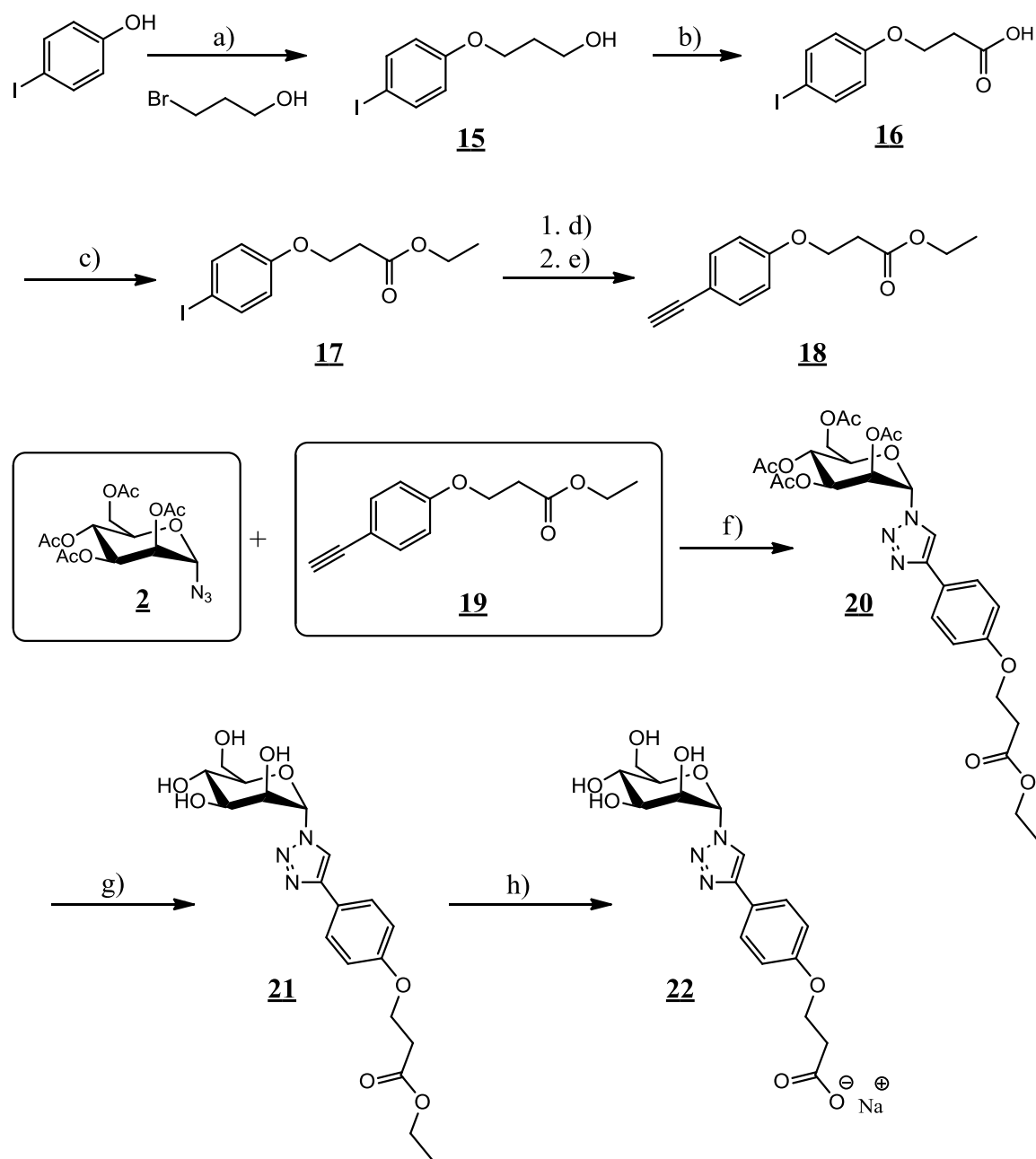


Slika 9: Sintezni načrt za derivata z 1 in 3 C distančnikom na *para* mestu ($n = 1, 3$). Reagenti in reakcijski pogoji: a) acetanhidrid, piridin, 0-20 °C, 24 h; b) trimetilsilil azid, SnCl_4 , CH_2Cl_2 , sobna T, 24 h; c) K_2CO_3 , TBABr (tetrabutylamonijev bromid), acetonitril, 50 °C, 24 h; d) Sonogashirova sklopitev: trimetilsilil acetilen, $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_2\text{Cl}_2$, Cu(I)I, TEA (trietilamin), (DMF), sobna T, 24 h; e) odstranitev sililne zaščitne skupine: TBAF (tetrabutylamonijev fluorid), DMF, sobna T, 10 min; f) Huisgenova cikloadicija: DIPEA

(*N,N*-diizopropiletilamin), Cu(I)I, DMF, sobna T, 24 h; g) Zemlenova odščita: NaOMe/MeOH, sobna T, 24 h; h) 1 M NaOH, EtOH, sobna T, 24 h.

Karboksilata in njuna estra z 1 in 3 C atomi dolgim distančnikom bomo sintetizirali po sinteznem načrtu, predstavljenem na **sliki 9**. Kombinirali bomo linearni in konvergentni pristop sinteze. Najprej bomo ločeno pripravili sladkorni in aglikonski del, ki ju bomo s pomočjo Huisgenove cikloadicije združili. Sledila bo odščita manoznih OH skupin in hidroliza estra.

Derivat z 2 C dolgim distančnikom na *para* mestu bomo pripravili po drugačnem sinteznem postopku. Poskus sinteze po enakem principu kot za derivata z 1 in 3 C atomi dolgim distančnikom namreč ni bil uspešen. Razlika bo pri sintezi aglikonskega dela spojine. Na 4-jodofenol bomo z Williamsonovo sintezo etrov pripeli 3-bromopropan-1-ol. Prosto OH skupino bomo v naslednji stopnji oksidirali in nastalo kislino zaestrili z etanolom. Nadaljnje sintezne reakcije bodo enake kot pri sintezi derivatov z 1 in 3 C atomi dolgim distančnikom. Sintezni načrt je predstavljen na **sliki 10**.

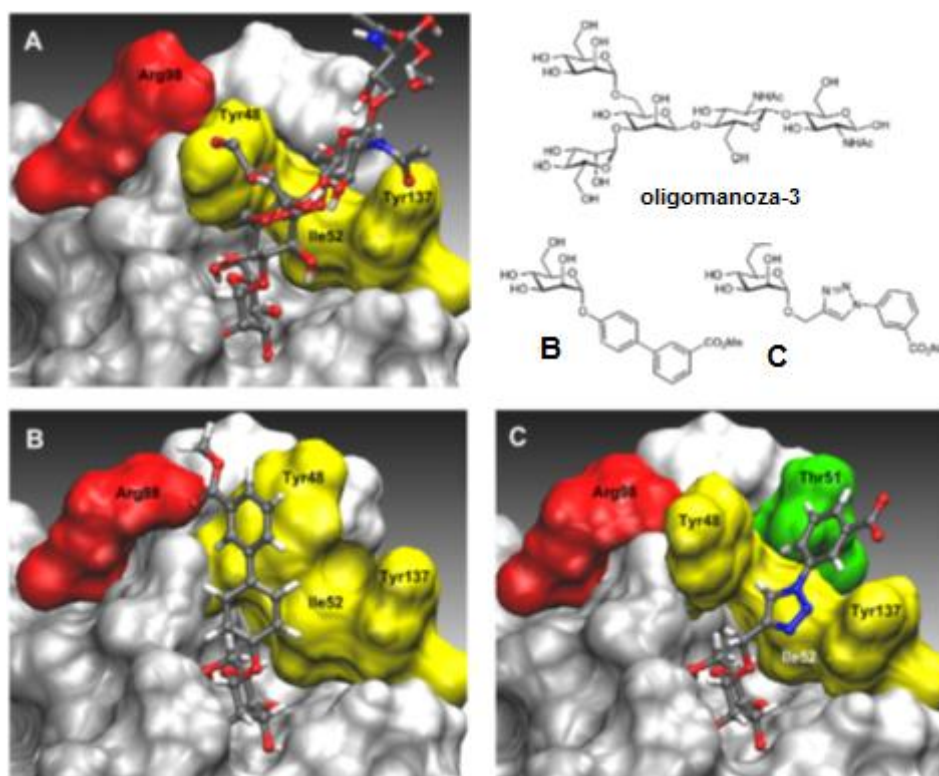


Slika 10: Sintezni načrt za derivat z 2 C distančnikom na para mestu. Reagenti in reakcijski pogoji: a) K_2CO_3 , TBABr, acetonitril, 80°C , 24 h; b) $\text{H}_2\text{O} : \text{H}_2\text{SO}_4 = 2 : 1$, aceton, CrO_3 , 0°C , 3 h; c) $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{EtOH}$, etanol, $0-78^\circ\text{C}$, 3 h; d) Sonogashirova sklopitev: trimetilsilil acetilen, $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_2\text{Cl}_2$, $\text{Cu}(\text{I})\text{I}$, trietilamin, sobna T, 24 h; e) odstranitev sililne zaščitne skupine: TBAF, DMF, sobna T, 10 min; f) Huisgenova cikloadicija: DIPEA, $\text{Cu}(\text{I})\text{I}$, DMF, sobna T, 24 h; g) Zemlenova odščita: NaOMe/MeOH , EtOH , sobna T, 24 h; h) 1 M NaOH, etanol, sobna T, 24 h.

Za oceno vezavne afinitete do vezavnega mesta FimH bomo naše spojine poslali na biološka testiranja. Vpliv potencialne ionske vezi z Arg98 na K_D bomo ocenjevali s

testom kompetitivne fluorescenčne polarizacije (FP) na izolirani lektinski domeni FimH (wild type) in na R98A mutantu, kjer je Arg na mestu 98 zamenjan z Ala. Rezultate biološkega vrednotenja naših glikomimetičnih antagonistov bomo primerjali tudi z rezultati virtualnega molekulskega sidranja. Pričakujemo, da bodo spojine v obliki prostih kislin oziroma v ionizirani obliki pri fiziološkem pH zaradi ionske vezi tvorile močnejše interakcije z vezavnim mestom. Estre bi lahko uporabljali kot predzdravila za povečanje biološke uporabnosti *per os*.

Na **sliki 11** vidimo različne načine interakcij antagonistov z lektinsko domeno FimH receptorja. Nekateri manozidi se vežejo tako, da vstopajo v manozni vezavni žep preko tirozinskih vrat (»in-docking-mode«), drugi pa se zaradi rigidnosti umestijo mimo in tvorijo interakcije le s Tyr48 (»out-docking-mode«). Slednji afiniteto vezave povečajo s pomočjo H-vezi z Arg98. Z načrtovanimi antagonisti FimH želimo doseči tako interakcije s tirozinskimi (»in-docking-mode« vezave) vrati kot tudi z Arg98.



Slika 11: A) Kristalna struktura oligomanoze-3 s FimH-CRD. B) Kristalna struktura spojine B s FimH-CRD. C) Molekularno sidranje spojine C s FimH-CRD. Oligomanoza-3 in spojina C vstopata v manozni vezavni žep preko tirozinskih vrat (»in-docking-mode vezave«). Spojina B ne sega v tirozinska vrata (»out-docking-mode vezave«), tvori pa H-vezi z Arg98. Povzeto po (30).

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

Reagenti in topila

Laboratorijsko delo je obsegalo delo z reagenti in topili proizvajalcev Acros Organics, Merck, Sigma Aldrich, Panreack, Fluka in Appolo Organics. Kemikalije smo uporabili brez nadaljnega čiščenja.

Brezvodni trietilamin smo pripravili tik pred uporabo z destilacijo v argonovi atmosferi. Brezvodni DMF, etanol in metanol smo pripravili na molekularnih sitih z velikostjo por 4 Å. Brezvodna topila smo shranjevali v zrakotesno zaprtih erlenmajericah, predhodno preprihanih z argonom. Argon smo uporabljali iz jeklenke, ki jo polni Messer. Kemijske reakcije, občutljive na vlago, so bile izvedene v argonovi atmosferi ter v čisti in suhi steklovini.

Za izvedbo ekstrakcij smo uporabljali prečiščeno vodo. Nasičeni raztopini NaHCO₃ in NaCl je pripravila laborantka po standardnem postopku. 1 M HCl smo pripravili sami. 1 M NaOMe v MeOH, ki smo ga uporabili pri Zemlenovi deacilaciji manoznih OH skupin, smo pripravili sami. Shranjevali smo ga v dobro zaprti bučki, v hladilniku in zaščiteno pred svetlobo.

3.2 Metode

Pri izvajanju eksperimentalnega dela smo reagente tehtali na tehtnici METTLER TOLEDO[®] PB 403-S/FACT Precision Balance. Konstatno mešanje reakcijskih zmesi smo zagotavljali z magnetnim mešalom IKA[®] RCT basic ICAMAG Magnetic stirrer. Pri reakcijah, ki smo jih izvajali pri povišani temperaturi v oljni kopeli, smo temperaturo določali s termometerom za oljno kopel IKA[®] ETS-D4 fuzzy.

Lažje hlapna topila smo odstranili pod znižanim tlakom (rotavapor BÜCHI[®] Rotavapor RE 111 ali rotavapor BÜCHI[®] Rotavapor type 200). Težje hlapna topila in izhodne spojine (DMF, bromoalkilestre pri Williamsonovi sintezi etrov) smo odparili s hibridno vakuumsko črpalo TRIVAC D88.

Kromatografske metode

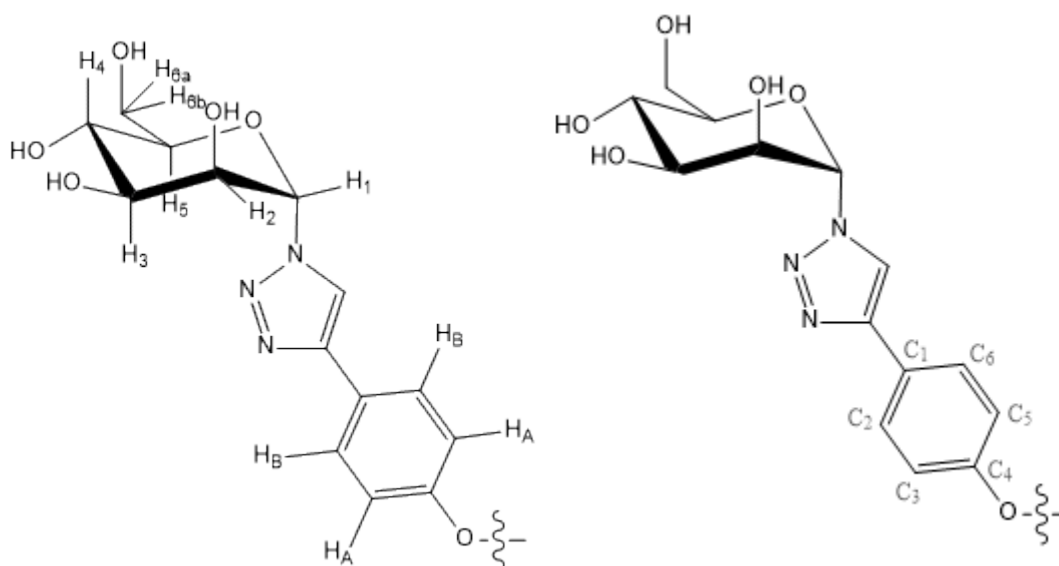
Potek reakcij smo spremljali z analitičnim TLC (*Thin layer chromatography* – tankoplastna kromatografija). Za stacionarno fazo smo uporabili aluminijaste plošče s silikagelom 60 F₂₅₄ (0,25 mm), ki jih proizvaja Merck. Za razvijanje TLC kromatogramov smo uporabljali različne mobilne faze, ki smo jih pripravili sami. Za detekcijo smo

uporabili UV svetlobo z valovno dolžino 254 in 366 nm (UV svetilka CAMAG UV-cabinet II) ter orositvene reagente (FeCl_3 in fosfomolibdat).

Čiščenje surovih produktov smo izvajali s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel 60 (premer delcev: 0,040–0,063 mm) proizvajalca Merck. Mobilne faze smo pripravljali sproti pred izvedbo kromatografije. Uporabljali smo steklene kolone.

Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca (NMR): ^1H in ^{13}C NMR spektre smo posneli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani na spektrometru Bruker AVANCE DPX400 pri 400 MHz v devteriranih topilih (CDCl_3 , D_2O , DMSO-d_6 , MeOD) s trimetilsilanom kot internim standardom. Dobljene spektre smo obdelali s programom MestReNova 11.0.4 podjetja MesreLab Research SL. Pri procesiranju spojin smo uporabili označevanje spojin, prikazano na **sliki 12**.



Slika 12: Številčenje spojin pri procesiranju ^1H (levo) in ^{13}C (desno) spektrov.

Infrardeča spektroskopija (IR): Za izvedbo IR analiz smo uporabili spektrometer PerkinElmer Spectrum BX System FT-IR na Fakulteti za Farmacijo Univerze v Ljubljani.

Masna spektrometrija (MS): Masne spektre so posneli na Inštitutu Jožef Stefan na masnem spektrometru Watters Micromass Q-TOF Premier. Rezultate smo potrdili tudi z meritvami na masnem spektrometru Expression CMS podjetja Advion na Fakulteti za farmacijo.

Tališča

Tališča smo sintetiziranim spojinam določali na talilnem mikroskopu Cambridge

instruments z grelni ploščo proizvajalca Leica. Meritve so nekorrigirane.

Računalniška programska oprema

Sintezne postopke smo iskali z aplikacijo SciFinder Scholar na podlagi kemijske strukture zelenih produktov, znanstvene članke pa na portalih PubMed, ScienceDirect in Cochrane Database. Pri poimenovanju in risanju struktur smo si pomagali s programom ChemDraw Professional 16.0 proizvajalca CambridgeSoft.

Računalniško sidranje

Za ocenjevanje vezavne afinitete potencialnih FimH ligandov smo uporabili konformacijo FimH receptorja (3MCY), dostopno v javni bazi proteinskih struktur Protein Data Bank (PDB). Za sidranje spojin v FimH vezavno mesto smo uporabili program FRED programskega paketa OpenEye Scientific. Vizualizacijo vezave spojine pa smo izvedli s programom VIDA (OpenEye Scientific).

Če je tridimenzionalna struktura tarče znana, lahko potencialne ligande sidramo v aktivno mesto receptorja in ocenimo vezavno afiniteto sidranih konformacij. Molekulsko sidranje je metoda, ki izračuna preferenčno konformacijo izbrane majhne molekule v aktivnem mestu biološke makromolekule (tarče). Poleg strukture molekul in aktivnega mesta sta potrebna iskalni algoritem, ki pravilno umesti ligand v aktivno mesto, in cenilna funkcija (scoring function) za napoved afinitete do tarče (**slika 13**). 3D strukturo tarče lahko eksperimentalno pridobimo s pomočjo rentgenske (X-ray) kristalografije ali NMR spektroskopije ali jo zgradimo sami s pomočjo homolognega modeliranja.

Idealno bi bilo, da bi programi pri umeščanju liganda upoštevali tako fleksibilnost liganda kot tarče, vendar so taki programi redki, ker je tak postopek računsko in časovno preveč zahteven. Večina programov upošteva samo fleksibilnost liganda. Program FRED, s katerim smo izvedli molekularno sidranje, pa obravnava tako tarčo kot tudi ligand rigidno. Pred sidranjem zato sestavimo bazo z različnimi konformacijami liganda (34).



Slika 13: Shematski prikaz metode molekulskega sidranja. Za izbrano tridimenzionalno strukturo tarče iskalni algoritem izračuna možne orientacije (vezavne geometrije) liganda v aktivnem mestu. Cenilna funkcija nastali vezavni geometriji liganda izračuna pripadajočo energijo afinitete, ki predstavlja oceno intenzitete interakcij z makromolekulo . Povzeto po (35).

Iskalni algoritem: FRED sidra molekule različnih konformacij, pridobljenih iz podatkovne knjižnice, ki jo je treba predhodno pripraviti, na receptorsko vezavno mesto z uporabo sistematičnih metod. S tem nenaključno preveri vse mogoče konformacije liganda, vezanega na receptor. FRED označi vsako možno rotacijo in translacijo vsake konformacije liganda, ki je sidran v aktivno mesto. Zavrže konformacije, ki so od aktivnega mesta preveč oddaljene in se vanj ne vežejo, in tiste, ki ne ustrezajo omejitvam, ki jih uporabnik določi vnaprej. Preostale konformacije oceni z uporabo cenilne funkcije in razvrsti. Najboljše preda v optimizacijo (36).

Če želimo identificirati spojine, ki bodo v eksperimentalnih testih izkazovale interakcijo s tarčo (npr. inhibicijo encima), je pomembno pravilno rangiranje izračunane proste vezavne entalpije napovedanih konformacij ligandov v vezavnem mestu. V ta namen uporabljamo **cenilno funkcijo** za napoved afinitete. Metode, ki jih uporabljajo programi, upoštevajo številne približke, saj je natančna simulacija fizikalno-kemijskega procesa vezave liganda na protein časovno zelo zahteven proces.

FRED za rangiranje spojin uporablja cenilno funkcijo Chemgauss4. Ta z uporabo Gaussovega zglajenega potenciala oceni komplementarnost liganda z aktivnim mestom. Pri ovrednotenju konformacij upošteva komplementarnost oblike liganda obliki aktivnega

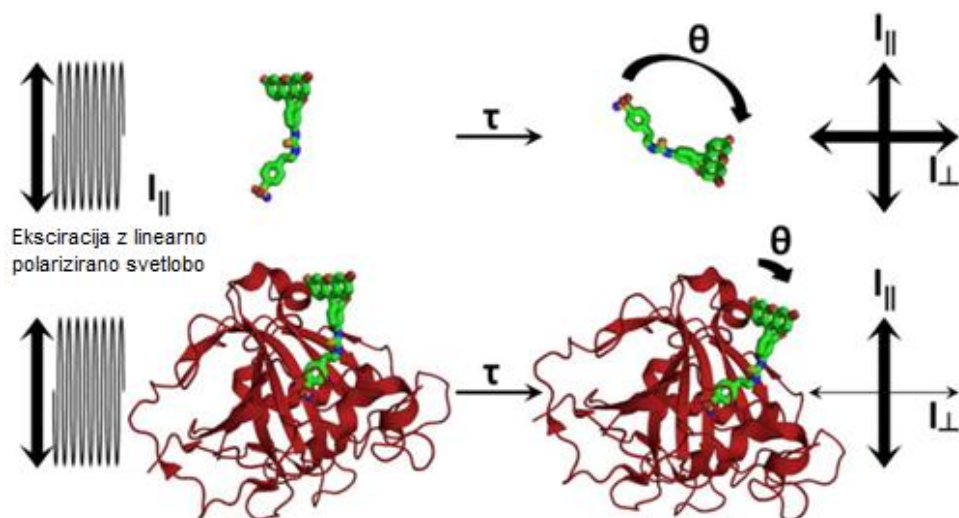
mesta, vodikove vezi med ligandom in proteinom, vodikove vezi med ligandom in topilom ter interakcije med kovinskimi ioni in kelatorji (36).

Biološka testiranja

Zaviralno aktivnost sintetiziranih spojin na FimH so na Institute of Molecular Pharmacy, University of Basel, ovrednotili s kompetitivno fluorescenčno polarizacijo (FP). Testiranja so izvedli na rekombinanto pridobljeni izolirani lektinski domeni FimH (wild type) in na R98A mutantu za potrditev nastanka ionske vezi z Arg98.

Naše potencialne antagoniste so pripravili kot 100 mM raztopine v 100-odstotnem DMSO. Preden so jih nanegli na mikrotitrsko ploščico, so raztopine ustrezno redčili z vodnim pufrom (20 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl in 50 µg/ml govejega serumskega albumina), tako da so dobili raztopine z linearno padajočo koncentracijo antagonista. Goveji serumski albumin so v raztopino dodali, da bi preprečili nespecifično vezavo rekombinantnega proteina na plastično površino. Antagoniste so na ploščico nanegli v koncentracijah od 0 do 10 mM. Na mikrotitrsko ploščico so predhodno nanegli protein (FimH) in fluorescenčno označen ligand. Sledila je inkubacija plošč 24ur pri sobni temperaturi na stresalniku, dokler reakcija ni dosegla ravnotežja. Po pretečenem času so odčitali FP. S pomočjo računalniškega programa GraphPad Prism so odčitano vrednost izrazili kot IC_{50} , ki predstavlja molarno koncentracijo preiskovane spojine, ki zmanjša maksimalno specifično vezavo fluorescenčno označenega liganda na FimH-CRD za 50 %. Dobljene IC_{50} vrednosti so pretvorili v K_d (31).

FP izkorišča razmerje med vrtilno frekvenco in velikostjo fluorescenčno označene molekule oz. kompleksa (**slika 14**). Ko je fluorescenčno označen ligand vezan na protein FimH, se zaradi večje molekulske mase kompleksa vrti počasneje. Polarizacija emitirane svetlobe je zaradi nižje vrtilne frekvence kompleksa visoka. Če preiskovani antagonist izpodrine fluorescenčno označen ligand iz vezavnega mesta, se ta vrti hitreje, posledično pa je polarizacija emitirane svetlobe nizka (37).



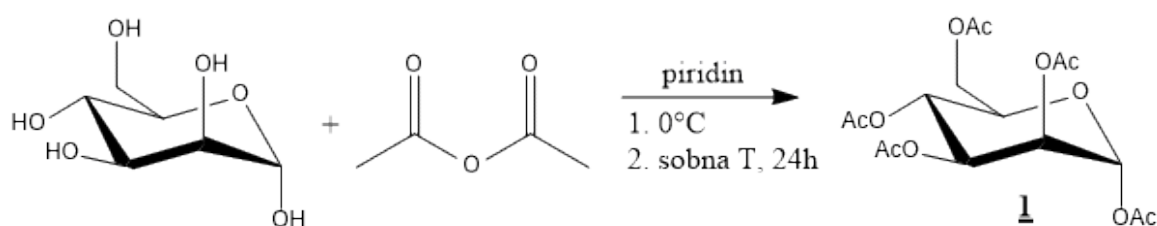
Slika 14: Pri FP fluorescenčni označevalec vzbujamo z vertikalno polarizirano svetlobo in nato merimo intenziteto emitirane svetlobe v vertikalni in horizontalni smeri. Ko je označevalec vezan na protein, se vrti počasneje, polarizacija emitirane svetlobe je visoka (visoka intenziteta emitirane svetlobe v vertikalni smeri). Ko je označevalec prost, je rotacija večja in polarizacija svetlobe se zmanjša (intenziteta emitirane svetlobe v horizontalni in vertikalni smeri je približno enaka). Povzeto po (37).

4 Eksperimentalno delo

V tem poglavju so predstavljeni sintezni postopki vmesnih in končnih spojin. Rezultati analiz NMR, IR in MS sintetiziranih intermediatov in končnih spojin so v prilogi (poglavje 8.1).

4.1 Sinteza sladkornega dela

4.1.1 Zaščita OH skupin manoze – sinteza peracetilirane α -D-manopiranoze (1,2,3,4,6-penta-O-acetil-D-manopiranoze) (**1**)

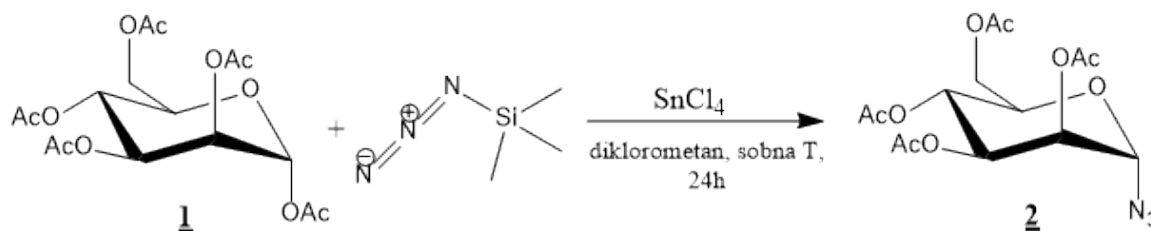


10,000 g (55,550 mmol, 1 ekv) D-manoze smo raztopili v 50 mL brezvodnega piridina. Za ohranitev brezvodnih pogojev smo bučko prepihali z argonom. Reakcijsko zmes smo s pomočjo ledene kopeli ohladili na 0 °C in med mešanjem po kapljicah dodali 40 mL acetanhidrida. Reakcijo smo izvajali pri sobni temperaturi v argonovi atmosferi čez noč. Reakcijsko zmes smo po 24 urah prenesli v lij ločnik in dodali 200 mL EtOAc (etil acetata) in 100 mL vode. Vodno fazo smo dodatno ekstrahirali z dvakrat po 100 mL EtOAc, da smo ves produkt sprali v organsko fazo. Etilacetatno fazo smo nato ekstrahirali s trikrat po 100 mL nasičene raztopine NaHCO₃ in trikrat po 100 mL 1 M HCl. Uspešnost čiščenja smo preverili s tankoplastno kromatografijo. V organski fazi je bil še vedno prisoten piridin, zato smo jo dodatno sprali s 100 ml 1 M HCl. Organsko fazo smo nazadnje sušili s 100 mL nasičene raztopine NaCl in z dodatkom trdnega Na₂SO₄. Mešanico smo filtrirali skozi vato in etil acetat uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 20,317 g spojine **1**.

1,2,3,4,6-penta-O-acetil-D-manopiranoza (1)			
Elementna sestava:	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	Izgled:	brezbarvno olje
Molska masa:	390,34 g/mol	Izkoristek:	93,68 %
Rf:	0,41 (EtOAc :Hex = 1 : 1)	Tališče:	/

4.1.2 1,2-transglikozidacija – sinteza 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-manopiranozil azida

(2)



V 500-mililitrsko bučko smo zatehtali 12,000 g (30,740 mmol, 1 ekv) spojine **1** in jo raztopili v 150 mL diklorometana. Sistem smo zaprli s septumom in ga prepihali z argonom. Skozi septum smo dodali 12,2 mL (92,220 mmol, 3 ekv) trimetilsilil azida. V 25-mililitrski bučki smo ločeno pripravili 1 M SnCl₄. Zmešali smo 0,80 mL (7,990 mmol, 0,26 ekv) SnCl₄ in 8,00 mL diklorometana ter nato dodali v reakcijsko zmes s spojino **1** in trimetilazidom. Reakcijo smo pustili potekati čez noč pri sobni temperaturi.

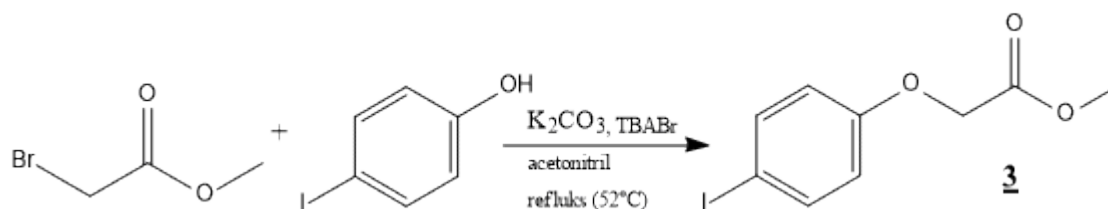
Izolacijo spojine **2** smo izvedli z ekstrakcijo. Reakcijsko zmes smo prenesli v lij ločnik in organsko fazo spirali najprej z dvakrat po 100 mL nasičene raztopine NaHCO₃ in dvakrat po 100 mL H₂O. Ostanek vode v organski fazi smo odstranili s spiranjem s 100 mL nasičene raztopine NaCl in s sušenjem nad Na₂SO₄. Slednjega smo odstranili s filtriranjem skozi vato. Nazadnje smo na rotavaporju uparili diklorometan. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo in tako dobili 6,264 g čiste spojine **2**.

2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-manopiranozil azida (2)			
Elementna sestava:	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O ₉	Izgled:	belo strjeno olje
Molska masa:	373,32 g/mol	Izkoristek:	54,58 %
Rf:	0,41 (EtOAc : Hex = 1 : 1)	Tališče:	/

4.2 Sinteza aglikona

4.2.1 Sinteza spojine z 1 C distančnikom

4.2.1.1 Splošni postopek za Williamsonovo sintezo etrov – sinteza metil 2-(4-jodofenoksi)acetata



V 50-mililitrsko bučko smo zatehtali 1,540 g (7,000 mmol, 1 ekv) 4-jodofenola, 3,870 g (28,000 mmol, 4 ekv) K₂CO₃ in prilili 20 mL AcCN. Nato smo v reakcijsko zmes dodali

0,677 g (2,100 mmol, 0,3 ekv) TBABr. Nazadnje smo med mešanjem z elektronsko pipeto dodali 1,152 mL (7,700 mmol, 1,1 ekv) metil bromoacetata in pustili reakcijsko zmes mešati pri 52 °C na oljni kopeli s povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko čez noč. Preden smo izvedli izolacijo, smo s TLC preverili potek reakcije (mobilna faza: EtOAc/heksan = 1/3).

Reakcijsko zmes smo filtrirali v 100-mililitrsko bučko, da smo odstranili K₂CO₃ ter oborino spirali s trikrat po 10 ml AcCN, ki smo ga nato odparili pod znižanim tlakom. Sledila je ekstrakcija, surovi produkt smo raztopili v 50 mL EtOAc. Organsko fazo smo spirali s trikrat po 25 mL 0,1 M HCl, enkrat s 25 mL H₂O ter enkrat s 25 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo še dodatno sušili z Na₂SO₄ in EtOAc uparili na rotavaporju. Nazadnje smo s črpalko (80 °C, 2 h) odstranili prebitni metil bromoacetat. Dobili smo 1,667 g produkta **3**.

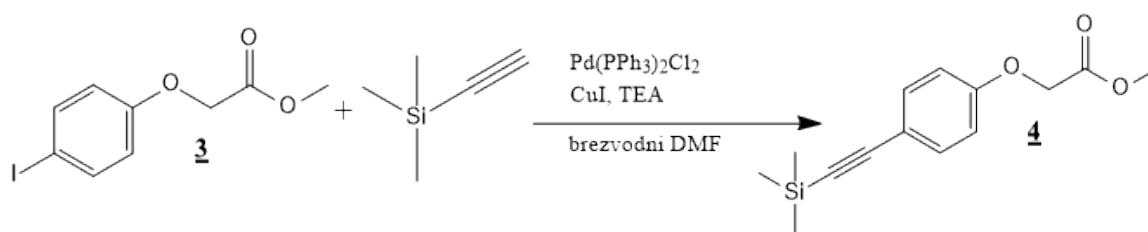
Metil 2-(4-jodofenoksi)acetata (3)			
Elementna sestava:	C ₉ H ₉ IO ₃	Izgled:	beli kristali
Molska masa:	292,07 g/mol	Izkoristek:	81,56 %
Rf:	0,35 (EtOAc : Hex = 1 : 3)	Tališče:	54,3–55,5 °C

Zgornji postopek smo ponovili še enkrat z večjimi količinami izhodnih reagentov, da smo dobili večjo količino produkta **3** za naslednje sintezne stopnje. Uporabili smo naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
4-jodofenol	2,640 g (12,000 mmol, 1 ekv)
K ₂ CO ₃	6,629 g (48,000 mmol, 4 ekv)
TBABr	1,160 g (3,600 mmol, 0,3 ekv)
metil bromoacetat	1,152 mL (12,100 mmol, 1,1 ekv)

Dobili smo 1,988 g produkta **3**. Izkoristek je bil tokrat manjši kot pri prvem poskusu, in sicer 56,7 %. Razlog za manjšo količino dobljenega produkta je bila izguba produkta v vodno fazo pri ekstrakciji, ki smo jo zlili med odpadna topila, preden smo potrdili, da je ves produkt v organski fazi.

4.2.1.2 Splošni postopek za Sonogashirovo sklopitev – sinteza metil 2-(4-((trimetilsilil)etinil)fenoksi)acetata – uvedba alkina s sililno zaščito (4)



Reagente smo temperirali in CuI posušili v sušilniku. 3,250 g (11,140 mmol, 1 ekv) izhodne spojine 3 smo natehtali v suho 50-mililitrsko bučko. Dodali smo približno 20 mL brezvodnega DMF. Nato smo v argonovi atmosferi dodali oba katalizatorja - 0,154 g (0,220 mmol, 0,02 ekv) bis(trifenilfosfin)paladijevega(II)diklorida in 0,073 g (0,670 mmol, 0,06 ekv) CuI. Z iglo smo dodali 10 mL (71,831 mmol, 6,4 ekv) predhodno destiliranega trietilamina in nazadnje s teflonsko iglo 1,889 mL (13,370 mmol, 1,2 ekv) trimetilsililacetilena. Reakcijo smo izvajali v inertni argonovi atmosferi čez noč.

Naslednji dan smo izvedli izolacijo. S črpalko (1 h 30 min, 50 °C) smo odstranili DMF in nato izvedli ekstrakcijo. Surovi produkt smo prenesli v lij ločnik s 150 mL EtOAc in organsko fazo spirali z dvakrat po 100 mL in enkrat s 50 mL H₂O, dvakrat po 30 mL 0,1 M HCl, nato ponovno s 50 mL H₂O ter nazadnje dvakrta s po 30 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo dodatno sušili z Na₂SO₄ in pod znižanim tlakom odparili EtOAc. Dobili smo 3,376 g nečiste spojine 4. Sintezo (odstranitev sililne zaščite) smo nadaljevali brez vmesnega čiščenja.

Metil 2-(4-((trimetilsilil)etinil)fenoksi)acetat (<u>4</u>)			
Elementna sestava:	C ₁₄ H ₁₈ O ₃ Si	Izgled:	rjava oborina
Molska masa:	262,38 g/mol	Izkoristek:	116 % (nečisto)
Rf:	0,40 (EtOAc : Hex = 1 : 3)	Tališče:	/

4.2.1.3 Splošni postopek za odstranitev sililne zaščitne skupine – sinteza metil 2-(4-etinilfenoksi)acetata (5)



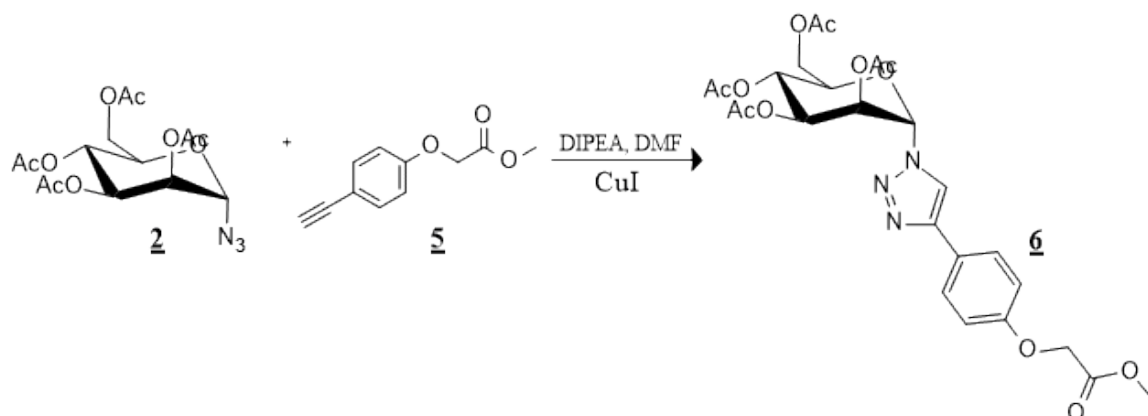
V 50-mililitrsko bučko, v kateri smo imeli reakcijsko zmes s spojino **4** (3,376 g, 12,867 mmol, 1 ekv), smo dodali približno 30 mL brezvodnega DMF. Nato smo dodali 2,030 g (6,434 mmol, 0,5 ekv) TBAF \cdot 3H₂O in pustili, da je reakcija potekala petnajst minut pri sobni temperaturi. S TLC smo preverili potek reakcije.

Nato smo izvedli izolacijo. S črpalko smo odstranili DMF. Produkt smo raztopili v 150 mL kloroforma ter organsko fazo spirali enkrat s 100 mL in dvakrat s po 50 mL H₂O in nazadnje še s 50 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄, ki smo ga po nekaj minutah odfiltrirali, in kloroform odparili pod znižanim tlakom. Vzorec smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, kot mobilno fazo (MF) pa EtOAc/heksan = 1/3. Pri nanosu smo v MF dodali nekaj kapljic kloroforma, saj se vzorec v MF ni popolnoma raztopil. Pri frakcijah, ki so vsebovale le liso produkta, smo odparili MF in čistost spojine **5** potrdili z NMR-om. Dobili smo 0,450 g spojine **5**.

Metil 2-(4-etinilfenoksi)acetat (5)			
Elementna sestava:	C ₁₁ H ₁₀ O ₃	Izgled:	rumenobeli kristali
Molska masa:	190,20 g/mol	Izkoristek:	18,38 %
Rf:	0,26 (EtOAc : Hex = 1 : 3)	Tališče:	82,6–82,9 °C

Celokupen izkoristek od spojine **3** do spojine **5** po Sonogashirovi sklopitvi in odstranitvi sililne zaščite je bil 21,3 %.

4.2.1.4 Splošni postopek za Huishgenovo cikloadicijo (klik reakcija) – sinteza 2,3,4,6-(tetra-*O*-acetil)-1-(4-(4-(2-metoksi-2-oksoetoksi)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)- α -D-manopiranoze (**6**)



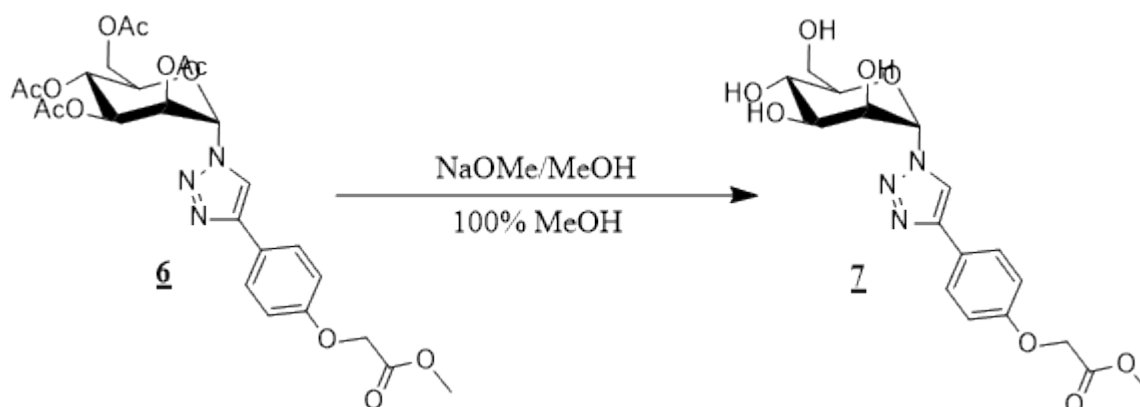
V 50-mililitrsko bučko smo zatehtali 0,838 g (2,245 mmol, 1 ekv) spojine **2** in 0,427 g (2,245 mmol, 1 ekv) spojine **5** in ju prepihali z argonom. Z brizgo smo dodali 10 mL brezvodnega DMF. Ko sta se izhodna reagentna raztopila, smo dodali še katalizatorja, in

sicer 0,043 g (0,225 mmol, 0,1 ekv) CuI in 0,391 mL (2,245 mmol, 1 ekv) DIPEA. Reakcijo smo pustili v argonovi atmosferi potekati čez noč.

S pomočjo vakumske črpalke smo odparili DMF ter nato izvedli ekstrakcijo. Produkt smo s 50 mL EtOAc prenesli v lij ločnik in spirali: trikrat s po 50 mL H₂O, enkrat s 50 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato sušili z Na₂SO₄ in pri znižanem tlaku odparili EtOAc. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, kot mobilno fazo pa EtOAc/heksan = 1/1. Dobili smo 0,825 g spojine **6**.

2,3,4,6-(tetra-<i>O</i>-acetil)-1-(4-(4-(2-metoksi-2-oksoetoksi)fenil)-1<i>H</i>-1,2,3-triazol-1-il)-α-D-manopiranoza (6)			
Elementna sestava:	C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₁₂	Izgled:	rjava olje
Molska masa:	563,51 g/mol	Izkoristek:	65,7 %
Rf:	0,10 (EtOAc : Hex = 1 : 1)	Tališče:	/

4.2.1.5 Splošni postopek za Zemlenovo odščito – sinteza metil 2-(4-(1-(α -D-manopiranoza-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)acetata (**7**)



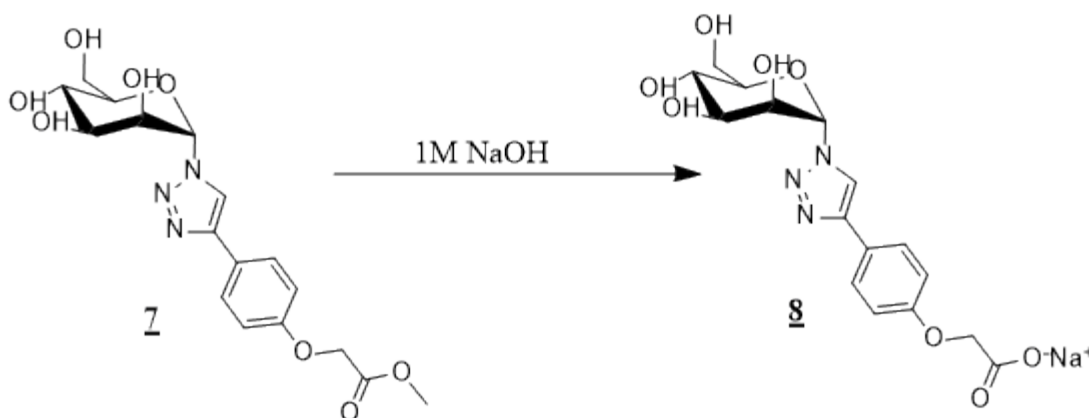
V bučko smo zatehtali 0,684 g (1,214 mmol, 1 ekv) spojine **6** in zagotovili argonovo atmosfero. S stekleno brizgo smo dodali 20 mL brezvodnega MeOH, v katerem se je spojina **6** raztopila. Nato smo s siringo dodali še 28,3 μ L (0,151 mmol, 0,1 ekv) 30-odstotne raztopine NaOMe. Reakcijo smo pustili potekati pri sobni temperaturi čez noč.

Spojina se je v MeOH začela obarjati, zato smo reakcijsko zmes ohladili na ledu, da smo pospešili obarjanje. Reakcijsko zmes smo filtrirali skozi teflonski filter in sprali oborino z brezvodnim MeOH, ohlajenim na ledu. Matičnico smo zbirali v bučko, saj se spojina **7** v MeOH deloma raztaplja in prehaja skozi teflonski filter. Oborino na filtru smo posušili s pomočjo vodne črpalke ter dodatno v sušilniku. Dobili smo 0,170 g spojine **7** in njeno

čistoto potrdili z NMR spektroskopijo. Glede na teoretično maso produkta smo predpostavili, da je v matičnici še 0,310 g spojine **7**. Dodatno smo v matičnico postrgali in z absolutnim MeOH sprali ostanke s teflonskega filtra in jo uporabili v naslednji stopnji sinteze – hidrolizi estra.

metil 2-(4-(1-(α -D-manopiranoza-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)acetata (7)			
Elementna sestava:	C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₈	Izgled:	rjavobela oborina
Molska masa:	395,36 g/mol	Izkoristek:	35,4 %
Rf:	0,42 (DKM : MeOH = 3 : 1)	Tališče:	183,3–184,5 °C

4.2.1.6 Hidroliza metilnega estra – sinteza natrijevega 2-(4-(1-(α -D-manopiranoza-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)acetata (**8**)



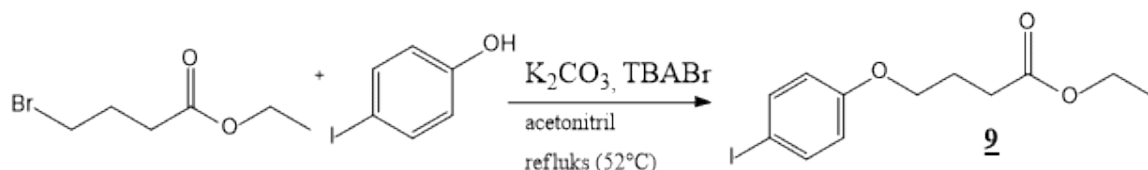
V 100-mililitrsko bučko, v kateri je bila matičnica z 0,310 g (0,784 mmol, 1 ekv) spojine **7**, smo z avtomatsko pipeto dodali 6,0 mL (6,000 mmol, 7,65 ekv) 1 M NaOH in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 2 h smo s TLC preverili potek reakcije in nato izvedli izolacijo.

Spojina se je oborila, tako smo jo enostavno izolirali s filtracijo s teflonskim filtrom. Dobili smo rjavkasto oborino. Surovemu produktu smo dodali 10 mL acetona. Barvne nečistote so se raztopile, ostala je sivobela oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem. Produkt smo dobro posušili v sušilniku. NMR spekter še vedno ni bil čist, zato smo produkt dodatno čistili s kolonsko kromatografijo. Izvedli smo suh nanos, saj je bila spojina v preizkušanih organskih topilih slabo topna. Spojino **8** smo raztopili v MeOH in dodali približno 1 g silikagela. Nato smo MeOH odparili pod znižanim tlakom ter zmes dodatno sušili v sušilniku, da smo dobili sipek prašek, ki smo ga nanесли na kolono. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, kot mobilno fazo pa smo uporabili CH₂Cl₂ : MeOH : CH₃COOH = 5 : 1 : 0,1. Dobili smo 81 mg spojine **8**.

Natrijev 2-(4-(1-(α -D-manopiranoza-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)acetat (8)			
Elementna sestava:	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ NaO ₈	Izgled:	bela oborina
Molska masa:	403,32 g/mol	Izkoristek:	25,6 %
Tališče:	234,5–236,0 °C		
Rf:	0,33 (DKM : MeOH : CH ₃ COOH = 5 : 1 : 0,1)		

4.2.2 Sinteza spojine s 3 C distančnikom

4.2.2.1 Williamsonova sinteza etra - sinteza etil 4-(4-jodofenoksi)butanoata (**9**)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Wiliamsonovo sintezo etrov, ki je predstavljen v poglavju **4.2.1.1**. Uporabili smo naslednje količine reagentov:

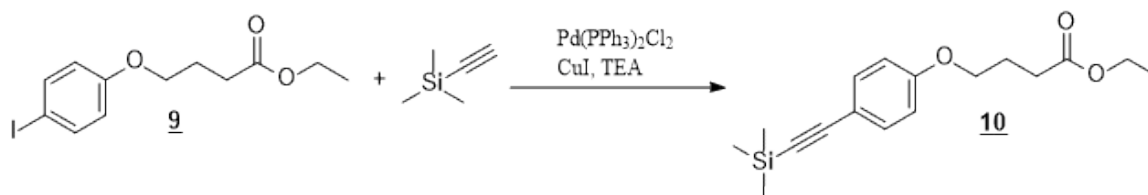
Reagent	Količina
4-jodofenol	2,200 g (10,000 mmol, 1 ekv)
K ₂ CO ₃	5,528 g (40,000 mmol, 4 ekv)
TBABr	0,967 g (3,000 mmol, 0,3 ekv)
etil 4-bromobutirat	1,449 mL (10,100 mmol, 1,1 ekv)

Naslednji dan smo s TLC preverili potek reakcije, v reakcijski zmesi je bil še vedno prisoten 4-jodofenol, zato smo dodali še 0,300 mL (2,091 mmol, 0,2 ekv) etil 4-bromobutirata in pustili reakcijo potekati 2 h.

Reakcijsko zmes smo filtrirali v bučko, da smo odstranili K₂CO₃ ter zaostanek na filtru sprali s trikrat po 10 ml AcCN, ki smo ga nato odparili pod znižanim tlakom. Surovi produkt smo raztopili v 50 mL EtOAc in izvedli ekstrakcijo. Organsko fazo smo nato spirali z dvakrat po 25 mL 0,1 M HCl, enkrat s 25 mL H₂O ter enkrat s 25 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo še dodatno sušili z Na₂SO₄ in EtOAc uparili pod znižanim tlakom. NMR spekter je pokazal, da je še vedno prisoten etil 4-bromobutirat, ki smo ga nato odparili s pomočjo črpalke (80 °C, 2 h). Dobili smo 2,500 g čiste spojine **9**.

Etil 4-(4-jodofenoksi)butanoat (9)			
Elementna sestava:	C ₁₂ H ₁₅ IO ₃	Izgled:	rumeno olje
Molska masa:	334,15 g/mol	Izkoristek:	74,8 %
Rf:	0,41 (EtOAc : Hex = 1 : 3)	Tališče:	/

4.2.2.2 Sonogashirova sklopitev – sinteza etil 4-(4-((trimetilsilil)etnil)fenoksi)butanoata (**10**)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Sonogashirovo sklopitev, ki je opisan v poglavju 4.2.1.2. Kot topilo smo uporabili DMF (15 mL) Uporabili smo naslednje količine reagentov:

Reagent	Količina
Spojina 9	1,827 g (5,468 mmol, 1 ekv)
Trimetilsilil acetilen	0,927 mL (6,561 mmol, 1,2 ekv)
CuI	0,036 g (0,328 mmol, 0,06 ekv)
Pd(PPh) ₃ Cl ₂	0,077 g (0,109 mmol, 0,02 ekv)
TEA	8 mL

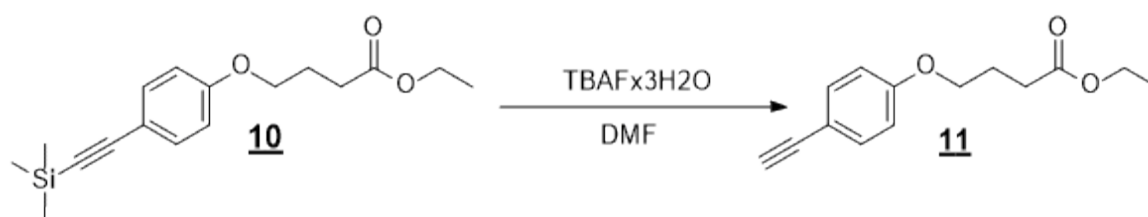
Dobljeno spojino **10** smo brez čiščenja uporabili v naslednji stopnji. Po zgornjem postopku smo v nadaljevanju po odščitni dobili premalo produkta za nadaljevanje. Reakcijo smo ponovili in izvedli Sonogashirovo sklopitev brez DMF ter kot topilo uporabili sam TEA. V 50-mililitrsko bučko, v kateri smo imeli 1,832 g (5,480 mmol, 1 ekv) spojine **9**, smo s stekleno brizgo v argonovi atmosferi dodali 20 mL TEA ter počakali, da se je spojina raztopila. Dodali smo oba katalizatorja – 0,036 g (0,330 mmol, 0,06 ekv) CuI in 0,077 g (0,110 mmol, 0,02 ekv) bis(trifenilfosfin)paladijevega(II)diklorida. Nazadnje smo s teflonsko iglo dodali še 0,929 mL (6,580 mmol, 1,2 ekv) trimetilsilil acetilena. Reakcijo smo izvajali 24 h.

Naslednji dan smo pod znižanim tlakom odparili TEA. Dobili smo rjavo smolo. Surovi produkt smo raztopili v 100 mL EtOAc in prenesli v lij ločnik. Organsko fazo smo sprali s trikrat po 50 mL H₂O, dvakrat po 25 mL 0,1 M HCl in z dvakrat po 25 mL nasičene raztopine NaCl ter nato dodatno sušili z Na₂SO₄ in odparili EtOAc. Po ekstrakciji so se na TLC kromatogramu pojavile dodatne lise, zato smo pred odščitno sililne zaščitne skupine spojino **10** čistili s kolonsko kromatografijo

Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel, za MF pa smo izbrali EtOAc : heksan = 1 : 5. Dobili smo 1,474 g produkta, ki še vedno ni bil popolnoma čist, a smo nadaljevali z naslednjo stopnjo sinteze brez dodatnega čiščenja.

Etil 4-(4-((trimetilsilil)etinil)fenoksi)butanoat (10)			
Elementna sestava:	C ₁₇ H ₂₄ O ₃ Si	Izgled:	bela oborina
Molska masa:	304,46 g/mol	Izkoristek:	88,4 % (nečisto)
Rf:	0,47 (EtOAc : Hex = 1 : 3); 0,29 (EtOAc : Hex = 1 : 5)	Tališče	/

4.2.2.3 Odstranitev sililne zaščitne skupine – sinteza etil 4-(4-etinilfenoksi)butanoata (**11**)



Reakcijo smo izvedli po postopku za odstranitev sililne zaščitne skupine, ki je opisan v poglavju 4.2.1.3. Spojino **10** smo raztopili v 20 mL DMF. Uporabili smo naslednje količine reagentov.

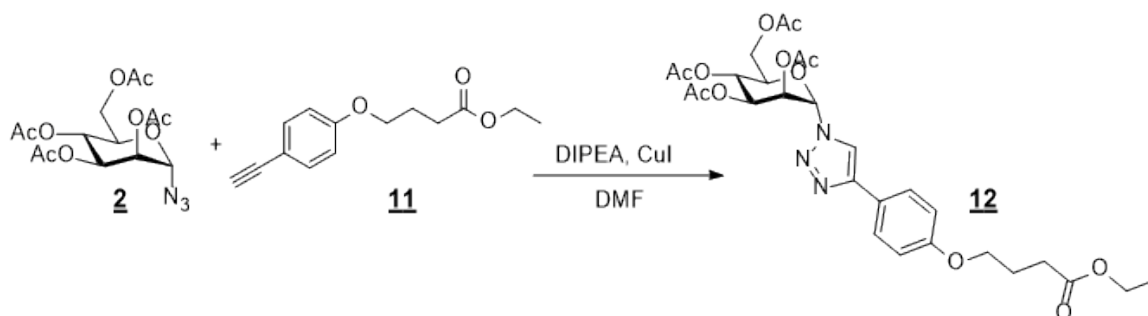
Reagent	Količina
Spojina 10	1,445 g (4,750 mmol, 1 ekv)
TBAF·3H ₂ O	0,749 g (2,370 mmol, 0,5 ekv)

Reakcijo odšcite smo izvajali 15 minut, reakcijska zmes je v tem času spremenila barvo iz svetlejše do temno rjave barve. DMF smo odparili s črpalko (2 h, 50 °C). Dobili smo 1,418 g surovega produkta (temnorjava tekočina), ki smo ga brez predhodne ekstrakcije očistili s kolonsko kromatografijo. Uporabili smo MF EtOAc : heksan = 1 : 5. Dobili smo 0,999 g spojine **11**.

Etil 4-(4-etinilfenoksi)butanoat (11)			
Elementna sestava:	C ₁₄ H ₁₆ O ₃	Izgled:	veliki beli kristali
Molska masa:	232,28 g/mol	Izkoristek:	90,6 %
Rf:	0,28 (EtOAc : Hex = 1 : 5)	Tališče:	42,2–43,4 °C

Celokupen izkoristek od spojine **9** do spojine **11** po Sonogashirovi sklopitvi in odstranitvi sililne zaščite je bil 78,4 %.

4.2.2.4 Huishgenova cikloadicija (klik reakcija) – sinteza 2,3,4,6-(tetra-*O*-acetil)-1-(4-(4-(4-etoksi-4-oksobutoksi)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)- α -D-manopiranoze (12**)**



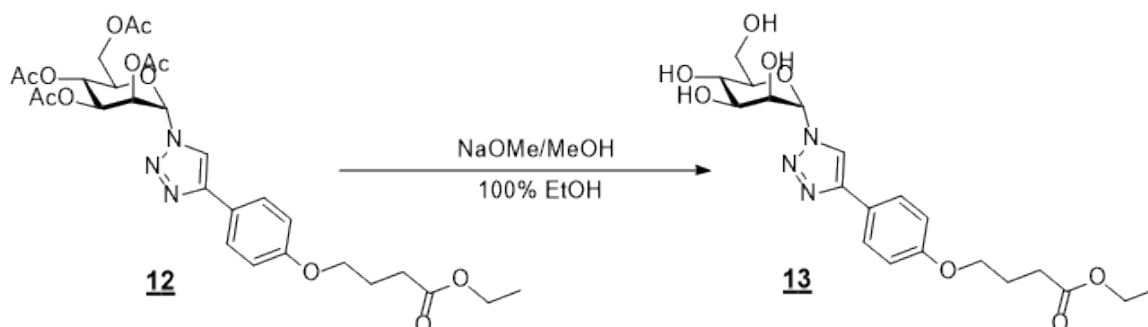
Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za klik reakcijo, ki je predstavljen v poglavju 4.2.1.4. Reakcijo smo izvajali v 10 mL DMF. Uporabili smo količine reagentov, ki so navedene v spodnji preglednici:

Reagent	Količina
Spojina 2	1,061 g (2,841 mmol, 1 ekv)
Spojina 10	0,660 g (2,841 mmol, 1 ekv)
CuI	0,054 g (0,284 mmol, 0,1 ekv)
DIPEA	0,495 mL (2,841 mmol, 1 ekv)

Postopek izolacije smo pri sintezi spojine s 3 C distančnikom spremenili. Odparili smo DMF (1 h, 40 °C). Surovi produkt smo nato čistili s kolonsko kromatografijo brez predhodne ekstrakcije, ki smo jo izvajali pri sintezi spojine z 1 C distančnikom, saj smo tu opazili nastanek dodatnih lis na kromatogramu po ekstrakciji in posledično slabši izkoristek. Kot stacionarno fazo smo izbrali silikagel, za mobilno fazo pa EtOAc : Hex = 1 : 1. Skupaj s produktom smo dobili v frakcijah še stranski produkt (dve lisi na TLC ploščici), zato smo postopek čiščenja s kolonsko kromatografijo ponovili, le da smo za MF izbrali EtOAc : toluen = 1 : 1. Dobili smo 0,800 g čiste spojine **12**.

2,3,4,6-(tetra-<i>O</i>-acetil)-1-(4-(4-(4-etoksi-4-oksobutoksi)fenil)-1<i>H</i>-1,2,3-triazol-1-il)-α-D-manopiranoza (12)			
Elementna sestava:	C ₂₈ H ₃₅ N ₃ O ₁₂	Izgled:	rumeno olje
Molska masa:	605,59 g/mol	Izkoristek:	46,5 %
Rf:	0,27 (EtOAc : Hex = 1 : 1)	Tališče:	/

4.2.2.5 Zemplenova odščita – sinteza etil 4-(4-(1-(α -D-manopiranoza-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi) butanoata (**13**)



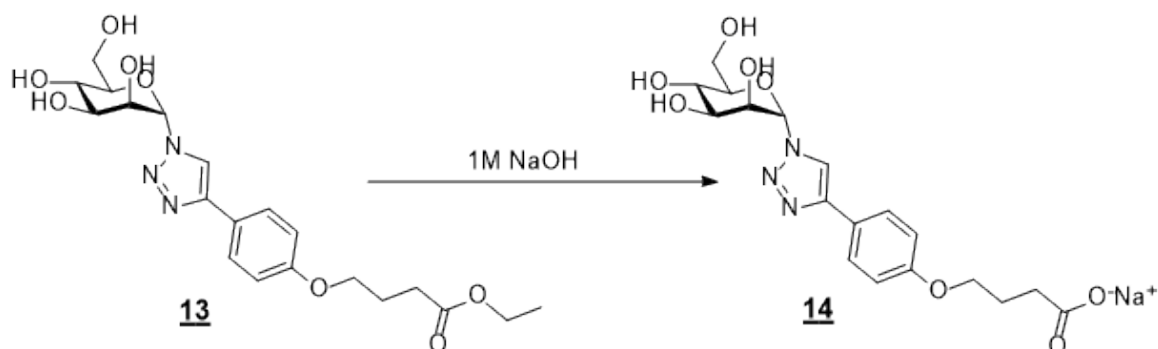
Deacilacijo manoznih OH skupin smo izvedli po splošnem postopku Zemplenove odščite, ki je opisan v poglavju 4.2.1.5. Ker je spojina **12** etilni ester, smo kot topilo uporabili brezvodni etanol namesto metanola. Uporabili smo naslednje količine reagentov.

Reagent	Količina
Spojina 12	0,960 g (1,585 mmol, 1 ekv)
1 M NaOMe/MeOH	159 μ L (0,159 mmol, 0,1 ekv)

Spojina **13** je v etanolu slabo topna in se je deloma oborila v topilu. Reakcijsko zmes smo zato prefiltrirali skozi teflonski filter. Matičnico smo zbirali v bučko, saj nekaj produkta preide skozi filter. Oborino smo dodatno sprali s trikrat po 5 mL brezvodnega etanola, ki smo ga predhodno ohladili na ledu, ter jo posušili s pomočjo vodne črpalke. Dobili smo 0,560 g čiste spojine **13**. Matičnico, ki naj bi glede na teoretično maso produkta vsebovala 0,133 g spojine **13**, pa smo uporabili v naslednji stopnji pri hidrolizi estrske vezi.

Etil 4-(4-(1-(α -D-manopiranoza-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi) butanoat (13)			
Elementna sestava:	C ₂₀ H ₂₇ N ₃ O ₈	Izgled:	bela oborina
Molska masa:	437,44 g/mol	Izkoristek:	80,8 %
Rf:	0,46 (DKM : MeOH = 3 : 1)	Tališče:	154,6–155,2 °C

4.2.2.6 Hidroliza etilnega estra – sinteza natrijevega 4-(4-(1-(α -D-manopiranoza-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)butanoata (**14**)



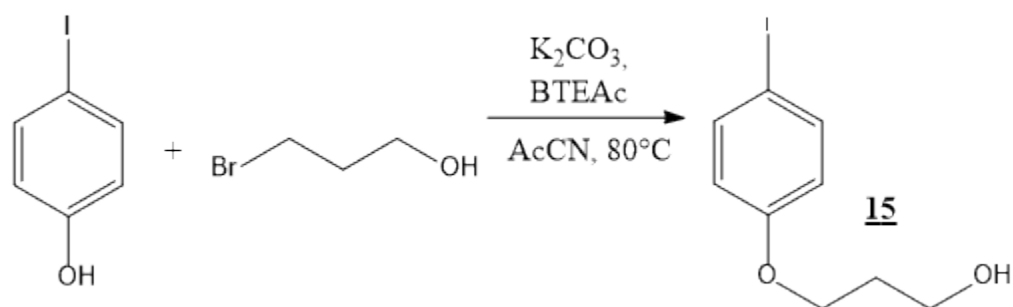
V matičnico, ki smo jo pridobili pri izolaciji izhodne spojine **13**, smo dodali še 0,240 g te spojine. Predvidevali smo, da imamo v bučki skupaj 0,373 g (0,852 mmol, 1 ekv) spojine **13**. Dodali smo še 10 mL 96-odstotnega etanola, tako da smo imeli skupaj približno 30 mL topila. Z avtomatsko pipeto smo dodali 5 ml (5,000 mmol, 5,869 ekv) 1 M NaOH in pustili potekati hidrolizo pri sobni temperaturi do naslednjega dne. Čez noč je izpadel produkt.

Reakcijsko zmes smo filtrirali skozi teflonski filter. Ker je produkt izpadel kot zelo fina oborina, so se pore filtra zamašile in topilo ni več prehajalo skozi filter, zato smo oborino prenesli na nučo in filtrirali skozi filter papir za fine delce ter sušili z vodno črpalko in dodatno v sušilniku. NMR spekter je pokazal, da je oborina čista, zato dodatno čiščenje ni bilo potrebno. Dobili smo 0,211 g spojine **14**.

Natrijev 4-(4-(1-(α -D-manopiranoza-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)butanoat (14)			
Elementna sestava:	$C_{18}H_{22}N_3NaO_8$	Izgled:	bela oborina
Molska masa:	431,37 g/mol	Izkoristek:	57,3 %
Tališče	236,3–237,5 °C		
Rf:	0,36 (DKM : MeOH : CH ₃ COOH = 5 : 1 : 0,1)		

4.2.3 Sinteza spojine z 2 C distančnikom

4.2.3.1 Williamsonova sinteza etra – sinteza 3-(4-jodofenoksi)propan-1-ola (**15**)



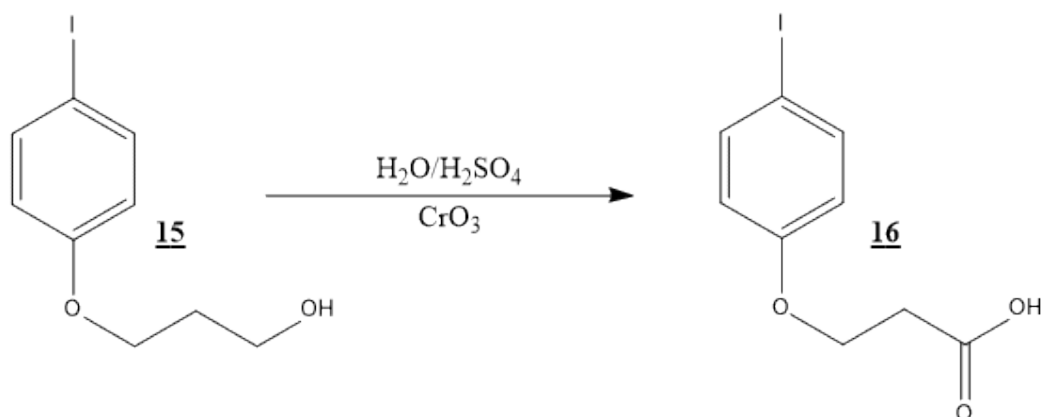
Reakcijo smo izvedli po postopku za Wiliamsonovo sintezo etrov, ki je predstavljen v poglavju **4.2.1.1**. Kot katalizator faznega prehoda smo namesto TBABr uporabili BTEAc (benziltriethylamonijev klorid). Reakcijo smo izvajali z naslednjimi količinami reagentov:

Reagent	Količina
4-jodofenol	2,000 g (9,090 mmol, 1 ekv)
K_2CO_3	5,025 g (36,360 mmol, 4 ekv)
BTEAc	0,621 g (2,727 mmol, 0,3 ekv)
3-bromo-1-propanol	0,986 mL (10,908 mmol, 1,2 ekv)

Dobili smo 2,298 g čiste spojine **15**.

3-(4-jodofenoksi)propan-1-ol (15)			
Elementna sestava:	$C_9H_{11}IO_2$	Izgled:	rumeno olje
Molska masa:	278,09 g/mol	Izkoristek:	92,0 %
Rf:	0,20 (EtOAc : Hex = 1 : 2)		

4.2.3.2 Oksidacija alkohola do karboksilne kisline (Jonesova oksidacija) – sinteza 3-(4-jodofenoksi) propanojske kisline (**16**)



2,844 g (10,230 mmol, 1 ekv) spojine **15** smo raztopili v acetonu in ohladili na $0^\circ C$ na ledeni kopeli. Dodali smo mešanico H_2O/H_2SO_4 (2/1 = 4,540 mL/2,270 mL), ki smo jo

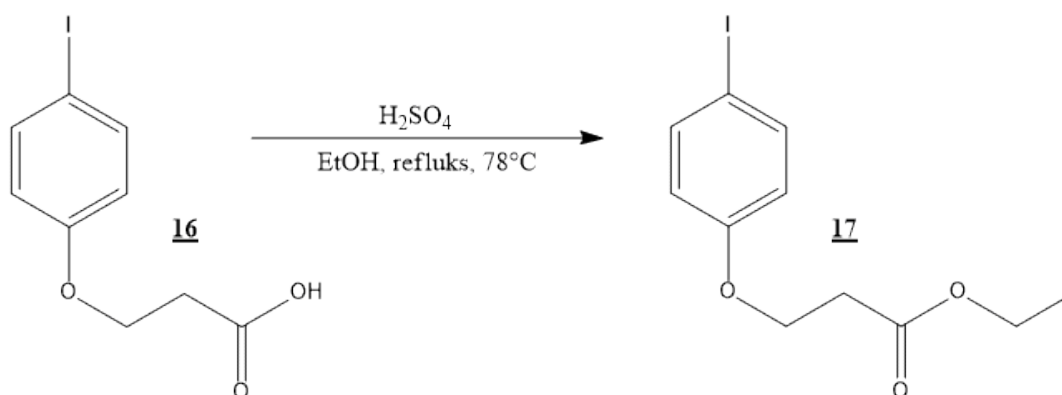
predhodno pripravili, in po dodatku pustili mešati 10 minut. Nato smo postopoma dodali 4,090 g (40,910 mmol, 4 ekv) CrO₃. Reakcijo smo izvajali 3 ure in potek preverili s tankoplastno kromatografijo. Reakcija je potekla, zato smo dodali 2-propanol, da smo reakcijo ustavili.

Izolacijo spojine **16** smo začeli tako, da smo reakcijsko zmes filtrirali skozi grob filter papir. Tako smo odstranili netopne stranske produkte in nečistote. Ostanek na nuči smo sprali s trikrat po 10 mL acetona in matičnici odparili topilo pod nižanim tlakom.

Čiščenje smo nadaljevali z izvedbo kolonske kromatografije. Za MF smo izbrali mešanico diklorometan/metanol/ocetna kislina = 20/1/0,1. Izvedli smo suh nanos z etil acetatom. Naš produkt se je izločil v velikem volumnu mobilne faze. Izolirali smo 1,696 g čiste spojine **16**.

3-(4-jodofenoksi) propanojska kislina(16)			
Elementna sestava:	C ₉ H ₉ IO ₃	Izgled:	rjavo olje
Molska masa:	292,07 g/mol	Izkoristek:	56,8 %
Rf:	0,25 (MF: diklorometan : metanol :ocetna kislina = 20 : 1 : 0,1)		

4.2.2.3 Fischerjeva esterifikacija – sinteza etil 3-(4-jodofenoksi)propanoata (**17**)

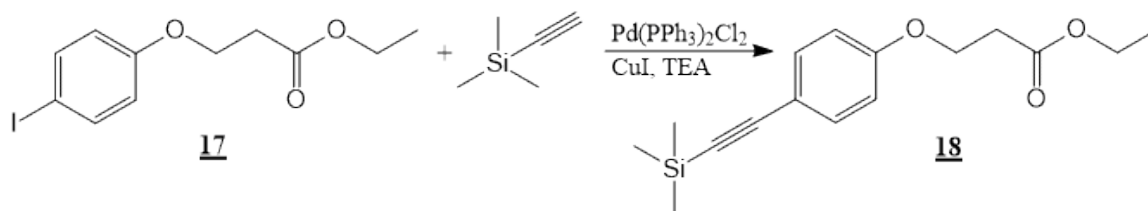


V 25 mL etanola smo raztopili 1,704 g (5,834 mmol, 1 ekv) spojine **16** ter raztopino ohladili na 0 °C na ledeni kopeli. Dodali smo 0,323 ml (5,834 mmol, 1 ekv) 96-odstotne raztopine H₂SO₄, ki smo jo predhodno razredčili v 5 mL etanola. Na bučko smo nato namestili vodni hladilnik in segreli do 78 °C, pri tem se je reakcijska zmes zbistrila, spojina **16** je namreč pri nižji temperaturi slabše topna. Po dveh urah izvajanja reakcije pri temperaturi refluxa smo preverili potek s tankoplastno kromatografijo. Ugotovili smo, da je še vedno prisotna izhodna spojina **16**, zato smo dodali še par kapljic v etanolu razredčene H₂SO₄ in pustili mešati še 30 minut.

Pod znižanim tlakom smo odparili etanol, surovi produkt smo raztopili v 50 mL etil acetata in organsko fazo spirali z dvakrat po 25 mL nasičene raztopine NaHCO₃ in enkrat s 25 mL nasičene raztopine NaCl. Dodatno smo organsko fazo sušili z Na₂SO₄ in pod znižanim tlakom odparili topilo. Dobili smo 1,731 g čiste spojine **17**.

Etil 3-(4-jodofenoksi)propanoat (17)			
Elementna sestava:	C ₁₁ H ₁₃ IO ₃	Izgled:	rjavo olje
Molska masa:	320,12 g/mol	Izkoristek:	92,7 %
Rf:	0,68 (MF: EtOAc : heksan = 1 : 1)		

4.2.2.4 Sonogashirova sklopitev – sinteza etil 3-(4-((trimetilsilil)etnil)fenoksi)propanoata (**18**)



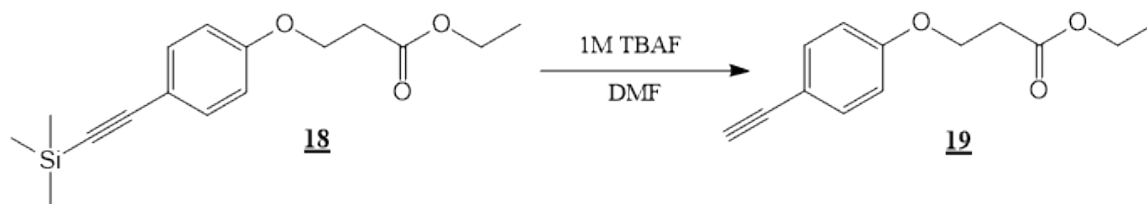
Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Sonogashirova sklopitev, ki je predstavljen pod točko **4.2.1.2**, le da smo kot topilo uporabili TEA brez dodatka DMF.

Reagent	Količina
Spojina 17	1,731 g (5,407 mmol, 1 ekv)
Trimetilsilil acetilen	0,637 g (6,488 mmol, 1,2 ekv)
CuI	0,036 g (0,324 mmol, 0,06 ekv)
Pd(PPh) ₃ Cl ₂	0,076 g (0,108 mmol, 0,02 ekv)
TEA	30 mL

Dobili smo 1,570 g spojine **18**. Nadaljevali smo z naslednjo stopnjo sinteze – odstranitev sililne zaščitne skupine, brez dokončnega čiščenja.

Etil 3-(4-((trimetilsilil)etnil)fenoksi)propanoat (18)			
Elementna sestava:	C ₁₆ H ₂₂ O ₃ Si	Izgled:	rjavo olje
Molska masa:	290,43 g/mol	Izkoristek:	101,5 % (nečisto)
Rf:	0,45 (EtOAc : Hex = 1 : 3)		

4.2.2.5 Odstranitev sililne zaščitne skupine – sinteza etil 3-(4-etinilfenoksi)propanoata (**19**)



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za odstranitev sililne zaščitne skupine, ki je opisan v poglavju **4.2.1.3**. Spojino **18** smo raztopili v 20 mL DMF. Namesto TBAF \cdot 3H $_2$ O smo uporabili 1 M raztopino TBAF v tetrahidrofuranu. Uporabili smo naslednje količine reagentov.

Reagent	Količina
Spojina 18	1,594 g (5,488 mmol, 1 ekv)
1M TBAF	2,744 mL (2,744 mmol, 0,5 ekv)

Izolacijo in čiščenje spojine **19** smo izvedli s kolonsko kromatografijo brez predhodne ekstrakcije. Izvedli smo suh nanos na kolono, kot mobilno fazo smo uporabili EtOAc : Hex = 1 : 5. Po zbranih 12 frakcijah smo povečali delež etil acetata v MF in sicer na EtOAc : Hex = 1 : 3, da bi povečali hitrost izločanja produkta s kolone. Dobili smo le 37 mg čiste spojine **19**, kar je bilo premalo za nadaljnje sintezne stopnje.

Etil 3-(4-etinilfenoksi)propanoat (19)			
Elementna sestava:	C $_{13}$ H $_{14}$ O $_3$	Izgled:	rumeno olje
Molska masa:	218,25 g/mol	Izkoristek:	3,1 %
Rf:	0,21 (EtOAc : Hex = 1 : 5)		

5 Rezultati in razprava

5.1 Eksperimentalni del

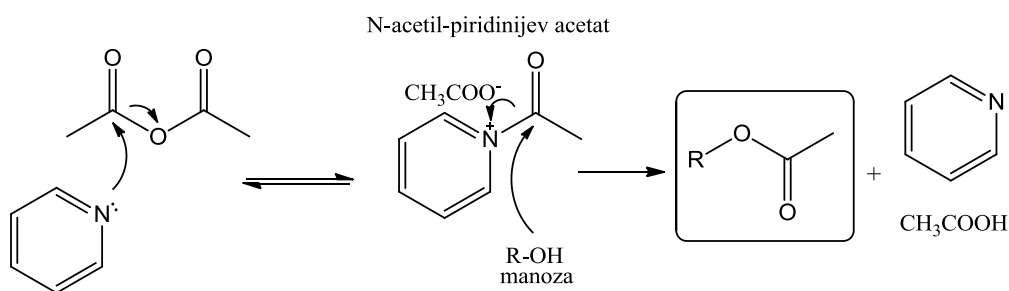
Sintezne postopke smo iskali z iskalnikom SciFinder Scholar na podlagi kemijske strukture načrtovanih alfa-D-manoziltriazolov. Postopke, navedene v literaturi, smo ovrednotili glede na praktičnost izvedbe (število uporabljenih reagentov in katalizatorjev, zahtevnost postopka) in stroškovno učinkovitost. Ker je za pripravo končnih spojin potrebno veliko število sinteznih stopenj, so bile nujen pogoj reakcije s čim večjim izkoristkom.

Pri sintezi osrednjega sladkornega dela nismo imeli veliko težav, medtem ko smo morali postopke, navedene v literaturi, pri pripravi aglikonskega dela za doseg večjega izkoristka v določenih primerih prilagoditi. Največ težav nam je povzročala sinteza spojine z 2 C distančnikom, ki je kljub številnim poskusom z različnimi sintezni postopki nismo uspeli pripeljati do konca. Pri razpravi eksperimentalnega dela bomo prikazali mehanizme izvedenih reakcij in predstavili tudi neuspele poskuse sinteze.

5.1.1 Acetiliranje manoznih OH skupin (sinteza spojine 1)

Prvi korak pri sintezi sladkornega jedra je bil zaščita manoznih OH skupin (**slika 15**). Alfa-D-manoza vsebuje pet OH skupin z različno reaktivnostjo, ki bi v nadaljnjih stopnjah motile reakcijo. Zaščitne skupine v sintezi ogljikovih hidratov nimajo le vloge maskiranja reaktivnih skupin, temveč sodelujejo tudi pri nadaljnjih reakcijah in vplivajo na stereokemijo nastalih produktov. FimH vezavni žep je visoko specifičen za α -D-manozo, zato smo morali uporabiti zaščitno skupino, ki favorizira nastanek α -glikozidne vezi. Zaradi enostavne uvedbe in stabilnosti pod številnimi reakcijskimi pogoji smo se odločili za uporabo acetilne zaščitne skupine. Acetat na C2 v naslednji stopnji spodbuja nastanek α -glikozidne vezi in zmanjša tvorbo neželenega produkta z β -konfiguracijo na anomernem centru (38).

Reakcijo smo izvedli po postopku, predstavljenem v literaturi (39). Za vir acetatne zaščitne skupine smo uporabili acetanhidrid. Kot topilo smo uporabili piridin, ki ima hkrati tudi vlogo katalizatorja, saj z acetanhidridom tvori kvarterno piridinijevo sol. Tako se poveča elektrofilnost karbonilnega ogljika in olajšan je napad OH skupine manoze. Piridin dodatno pospeši reakcijo z nevtralizacijo očetne kisline, ki predstavlja stranski produkt.

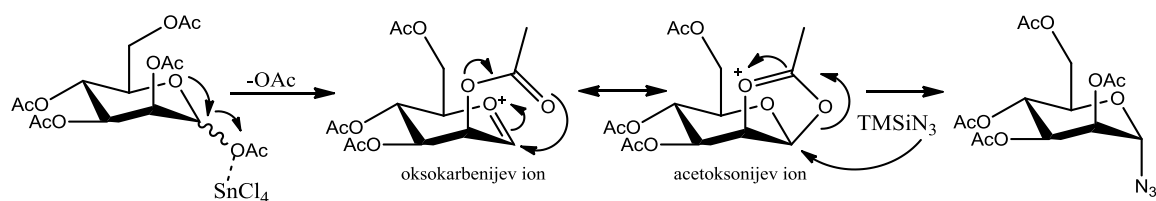


Slika 15: Mehanizem zaščite manoznih OH skupin. Povzeto po (39).

Reakcijsko zmes smo pred dodatkom acetanhidrida prepihali z argonom in ohladili na ledeni kopeli, da smo zagotovili pogoje, ki preprečujejo hidrolizo acetanhidrida. Piridin smo odstranili z ekstrakcijo v vodno fazo z 1 M HCl, saj ga zaradi visokega vrelišča težje odstranimo z odparevanjem. Sintezo in izolacijo smo izvedli uspešno z visokim izkoristkom (94 %).

5.1.2 Tvorba peracetilirane manoze z azidno skupino na anomernem C-atomu – 1,2 – transglikozidacija (sinteza spojine 2)

Tvorba azida na anomernem ogljiku peracetilirane manoze poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije S_N1 . Reakcijo katalizira Lewisova kislina $SnCl_4$, ki olajša tvorbo oksokarbenijevega kationa z odcepom izstopajoče skupine (OAc) na anomernem ogljiku. Vlogo nukleofila ima trimetilsilil azid, ki je donor azidne skupine. Azid lahko dostopa do anomernega C atoma z obeh diastereomernih smeri. Zaščitna skupina na C2 atomu manoze favorizira sintezo 1,2-transglikozidne vezi. To pomeni večji delež produkta z α -konfiguracijo in manj β -oblike, ki predstavlja stranski produkt reakcije (39).



Slika 16: Mehanizem tvorbe azida z α -konfiguracijo. Povzeto po (39).

Reakcijo smo izvajali v brezvodnem diklorometanu (DKM) ter v argonovi atmosferi. Voda namreč povzroči hidrolizo trimetilsilil azida do hidrazojske kisline (HN_3), ki je izredno hlapna tekočina, eksplozivna pri sobni temperaturi in tlaku. Nizek izkoristek (55 %) je posledica tvorbe β -anomera in izgub pri kolonski kromatografiji. Razlili smo namreč eno izmed frakcij, ki je vsebovala produkt reakcije.

5.1.3 Williamsonova sinteza etrov (sinteza spojin **3** in **9**)

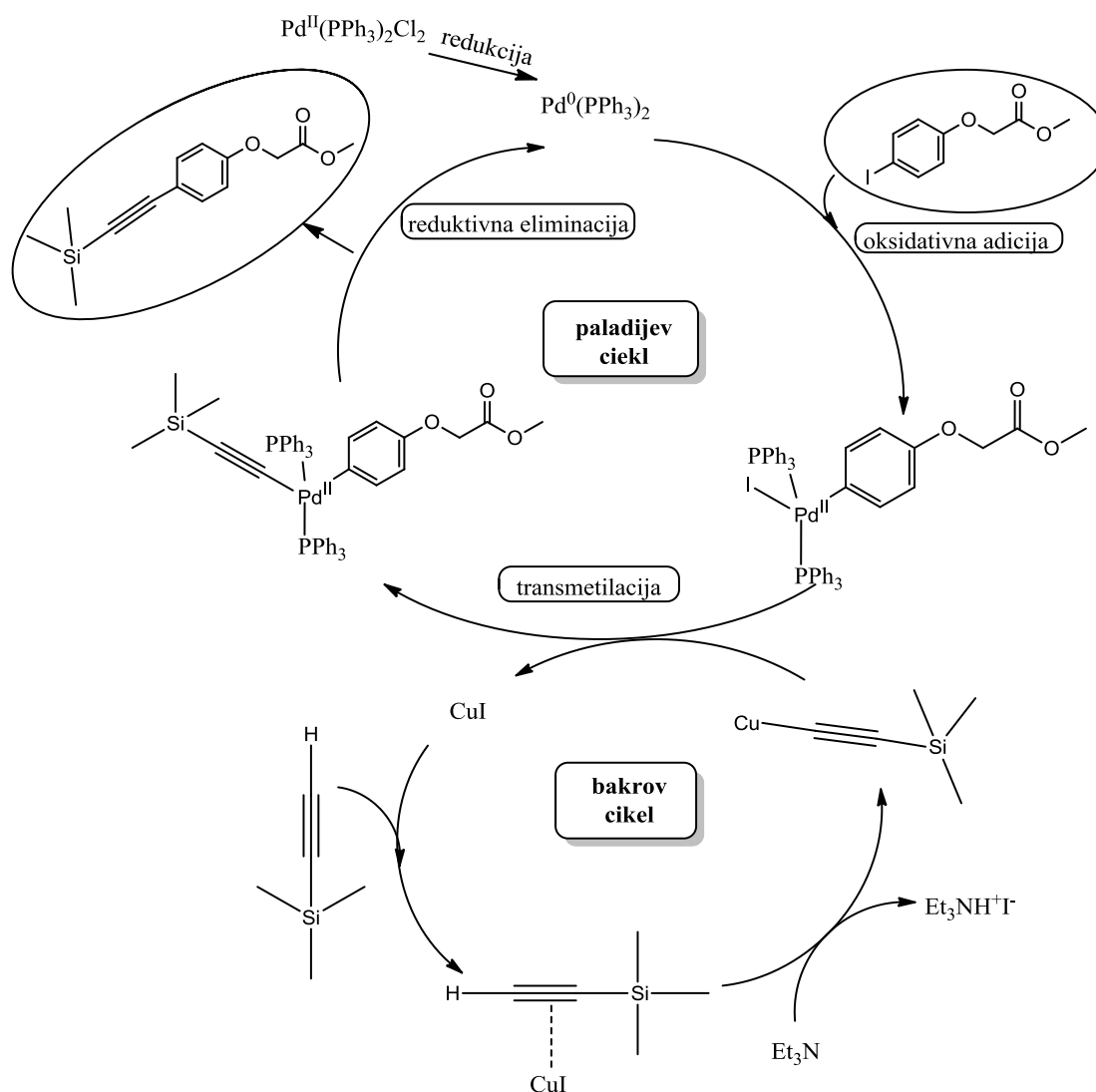
Tvorbo aglikonskega dela smo pričeli s tvorbo etra med 4-jodofenolom in primarnim alkil halidom. Uporabili smo sintezni postopek, ki ga je Alexander Williamson opisal leta 1850. Gre za reakcijo med deprotoniranim alkoholom (alkoksidom) in organskim halidom, ki poteče po mehanizmu S_N2 (40).

Alkoksidni ion smo pripravili in situ, saj gre za izredno reaktivne spojine. 4-jodofenolu smo s K_2CO_3 odcepili kisel proton, tako smo dobili nukleofil, ki je reagiral s primarnim alkil halidom. K_2CO_3 je v organskih topilih zelo slabo topen, zato smo morali v reakcijsko zmes dodati katalizator faznega prehoda (TBABr ali BTEAc). Reakcijo smo izvajali pod refluxom pri temperaturi $52\text{ }^\circ\text{C}$ čez noč. Sintezo smo sprva skušali izvesti s prebitkom 4-jodofenola. Slednjega se s kolonsko kromatografijo nismo uspeli odstraniti, saj je razlika v polarnosti med 4-jodofenolom in produkti reakcije (**3**, **9**) izredno majhna. Preostali 4-jodofenol je motil nadaljnje stopnje reakcije. Ugotovili smo, da imajo izhodni alkilbromidi nižja vrelišča od produktov (**3**, **9**), zato smo se odločili reakcijo izvesti s prebitkom alkilhalidov (1,1 ekv). Prebitek smo nato odstranili z uparevanjem na hibridni vakumski črpalki ($80\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h). Z NMR smo potrdili, da smo alkilbromide uspešno odstranili, in dodatno čiščenje s kolonsko kromatografijo ni bilo potrebno. Reakcija je pri spojinah z 1 in 3 C distančnikom potekla z izkoristkom okrog 80 %.

5.1.4 Sonogashirova sklopitev in odščita sililne zaščitne skupine (sinteza spojin **5** in **11**)

Sonogashirova sklopitev je s Pd in Cu katalizirana sklopitvena reakcija med terminalnim acetilenom in sp^2 -C hibridiziranim halidom, ki so jo Sonogashira in sodelavci objavili leta 1975. Gre za nadgraditev sklopitvenih reakcij, ki kot katalizator uporabljajo le Pd in potrebujejo za uspešnost ostrejšje pogoje (višja temperatura, močnejša baza, večje količine katalizatorja). Sočasna uporaba Cu in Pd katalizatorja poveča reaktivnost reagentov in omogoča izvedbo sinteze pri sobni temperaturi (41, 42).

Točen mehanizem delovanja dveh kovinskih katalizatorjev, ki ju uporabljamo pri Sonogashirovi reakciji, še ni razjasnjen. Reakcija naj bi bila sestavljena iz dveh ločenih ciklov, in sicer bakrovega in paladijevega cikla, ki sta predstavljena na **sliki 17** (42).



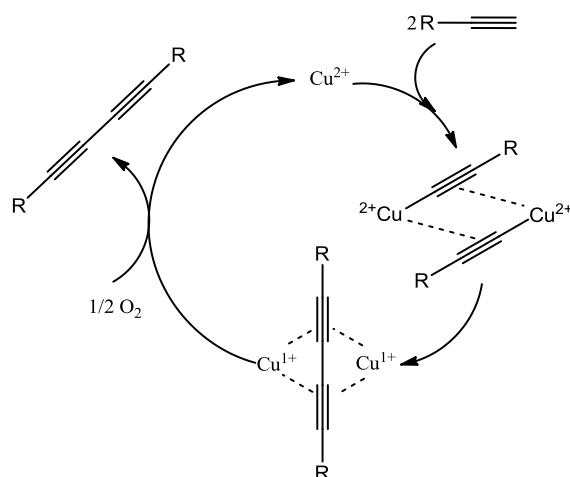
Slika 17: Predvideni mehanizem Sonogashirove reakcije, predstavljen na derivatu z 1 C distančnikom.

Prvi korak v paladijevem ciklu je oksidativna adicija aril jodida na paladijev katalizator, pri katerem nastane $\text{Pd}(\text{II})$ kompleks. Ta stopnja določa hitrost Sonogashirove reakcije. Sledi transmetilacija s $\text{Cu}(\text{I})$ acetilidom, ki nastane v bakrovem ciklu. Zadnja stopnja Sonogashirove sklopitve je reduktivna eliminacija, pri kateri dobimo produkt in regeneriran Pd katalizator.

Bakrov cikel se prične s tvorbo kompleksa med trojno vezjo alkina in CuI . Na ta način se poveča kislost terminalnega protona na alkinu, ki ga sedaj lahko odcepi šibka baza. Pri deprotonaciji dobimo $\text{Cu}(\text{I})$ acetilid, ki vstopi v paladijev cikel (42).

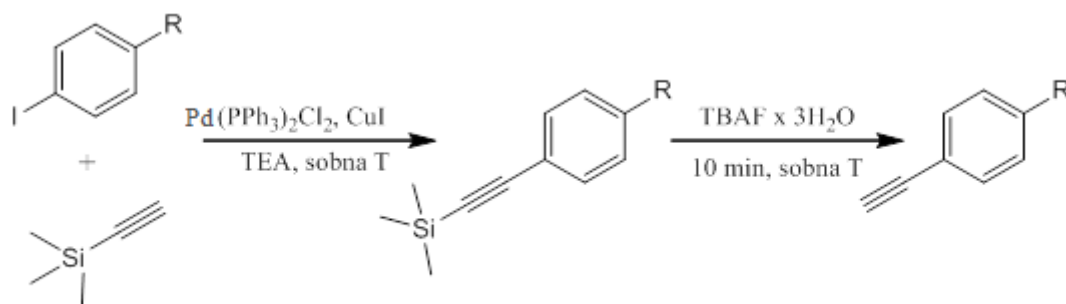
Reakcijo smo izvajali v inertni argonovi atmosferi, da smo preprečili oksidacijo Pd in Cu katalizatorja s kisikom iz zraka. Če je bakrov katalizator izpostavljen zraku, poteče namesto sklopitvene reakcije z aril halidom samozdruževanje bakrovega acetilida (**slika**

18). Za potek reakcije smo poleg inertne atmosfere zagotovili tudi brezvodne pogoje. V vodi namreč poteka disproporcionacija Cu(I) do bakra in Cu(II), ki nista katalitično aktivna (43,44).



Slika 18: Predlagan mehanizem samozdruževanja terminalnih alkinov. Povzeto po (45).

Reagente, uporabljene v Sonogashirovi reakciji, smo povzeli po predpisu iz literature, ki je predstavljen na **sliki 19** (46).



Slika 19: Sonogashirova sklopitev s sledečo odščito trimetilsililne zaščite.

Sonogashirova sklopitev pri sintezi spojine z 1 C distančnikom smo izvajali v dimetilformamidu (DMF). Kot šibko bazo smo uporabili TEA (6,4 ekv). DMF smo odstranili s hibridno vakumsko črpalko. Surovi produkt smo raztopili v EtOAc in spirali z vodo, da smo odstranili soli. Nato smo EtOAc spirali z 0,1 M HCl ter ponovno z vodo, da smo odstranili presežek baze (TEA). Organsko fazo smo sušili z nasičeno raztopino NaCl in Na₂SO₄. Po ekstrakciji so se na TLC kromatogramu pojavile dodatne lise, ki so nakazovale delen razpad produkta.

Brez dodatnega čiščenja smo izvedli odščito trimetilsililne zaščite s TBAF. Kot topilo smo uporabili DMF, ki smo ga ponovno odstranili s črpalko. Izolacijo smo nadaljevali z ekstrakcijo. TBAF deluje kot površinsko aktivna snov in otežuje ločitev vodne in organske faze, zato smo imeli veliko težav pri izvedbi ekstrakcije. Poleg tega so se po ekstrakciji na TLC kromatogramu pojavile dodatne lise, zato smo produkt pred snemanjem NMR spektra očistili s kolonsko kromatografijo. Celokupen izkoristek Sonogashirove reakcije ter sledeče odščite (spojina **5**) je bil 21 %.

Prvi poskus Sonogashirove sklopitve in sledeče odščite pri sintezi spojine s 3 C distančnikom (**11**) smo izvedli po enakem postopku kot pri spojini z 1 C distančnikom in praktično nismo dobili produkta. V drugem poskusu smo kot topilo pri Sonogashirovi sklopitvi uporabili kar sam TEA. Izhodna spojina je bila v TEA dobro topna. Bolj bazični pogoji, ki so nujni za potek bakrovega cikla, so ugodno vplivali na potek reakcije. Izolacijo produkta smo začeli z ekstrakcijo in tudi tokrat so se na TLC pojavile dodatne lise. Pred odščito trimetilsililne zaščitne skupine smo se zato odločili izvesti čiščenje s kolonsko kromatografijo.

Izkoristek odščite smo izboljšali s spremembo načina izolacije, ki smo jo izvedli neposredno s kolonsko kromatografijo brez predhodne ekstrakcije. Z uporabo TEA kot topila pri Sonogashirovi sklopitvi in opustitvijo ekstrakcije po odščiti smo dvignili izkoristek na 78 %. Ta bi bil verjetno še višji, če bi izvedli direktno izolacijo s kolonsko kromatografijo brez ekstrakcije že po Sonogashirovi sklopitvi.

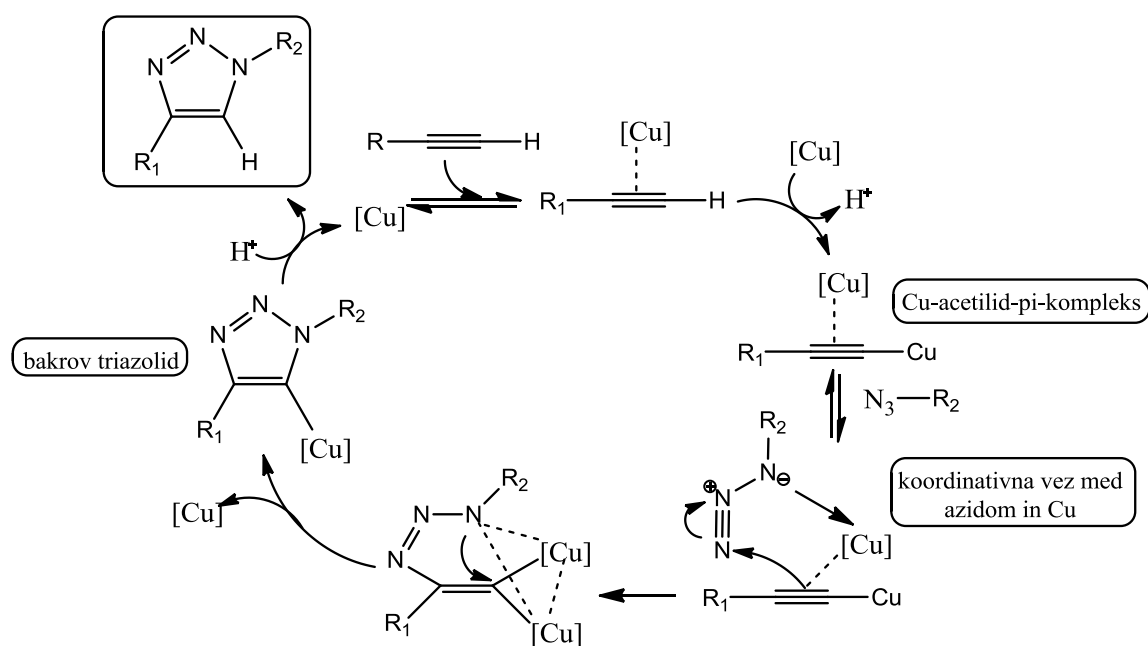
5.1.5 Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija – »klik« reakcija (sinteza spojin **6 in **12**)**

Reakcije, ki jih uvrščamo v »klik« kemijo, imajo visok izkoristek, so regio- in stereospecifične, potekajo v blagih reakcijskih pogojih, izolacija produkta pa je enostavna (47).

Huisgenova reakcija je klasičen primer »klik« kemije. Gre za 1,3-dipolarno cikloadicijo azida na terminalni alkin. Produkt Huisgenove cikloadicije je zmes 1,4 in 1,5 substituiranih 1,2,3-triazolov v razmerju 1 : 1. Za uspešnost reakcije sta potrebna segrevanje in dolg reakcijski čas. Pri sintezi zaviralcev FimH smo zato uporabili s Cu(I) katalizirano različico Huisgenove reakcije (*CuCAAC* – z bakrom katalizirana azid-alkin cikloadicija), katere mehanizem je predstavljen na **sliki 20**. Cu(I) in sobna temperatura

usmerjata reakcijo le v sintezo 1,4-regioizomera, kar bistveno poveča izkoristek reakcije (48).

Običajno pri CuCAAC Cu(I) katalizator tvorimo in situ iz Cu(II) soli (npr. CuSO_4) v prisotnosti reducenta, kot je natrijev askorbat. Če za topilo uporabimo zmes vode in terc-butilnega alkohola, za tvorbo bakrovega acetilida ne potrebujemo baze. Pri sintezah, pri katerih ne moremo uporabiti vodnih pogojev, reakcijo izvajamo v organskem topilu (toluen, DKM, DMF, acetonitril) v prisotnosti stehiometrične količine Cu(I) soli in prebitka baze, običajno je to terciarni amin (TEA, DIPEA) (47).



Slika 20: Predviden mehanizem s Cu(I) katalizirane azid-alkin cikloadicije. Povzeto po (49).

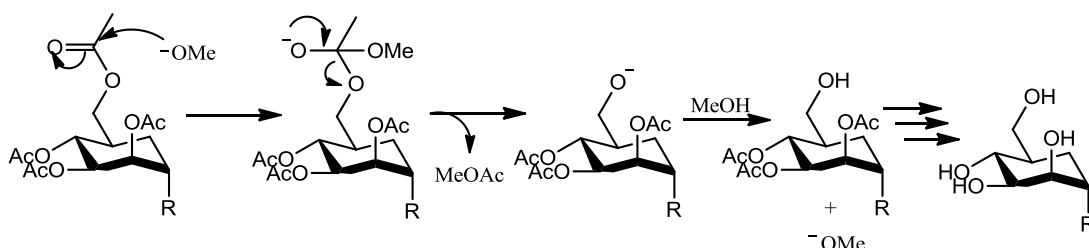
Cu(I) s trojno vezjo alkina tvori π -kompleks. Tako poveča kislost terminalnega protona na alkinu, ki ga sedaj lahko odcepi šibka baza. V reakcijo nato vstopi drug Cu atom, ki se veže na alkin preko σ -vezi. Nastane Cu(I)-acetilid- π -kompleks, ki torej vključuje dva Cu atoma. Cu atom, ki je vezan na alkin preko π -vezi, aktivira azid. Azid namreč tvori koordinativno vez s Cu atomom in tako postane bolj elektrofilen. Sledi tvorba kovalentne C-N vezi z nukleofilnim napadom β -C atoma acetilida na azid. Naslednji korak je tvorba druge kovalentne C-N vezi, s katero se sklene triazolni obroč. Nastane bakrov triazolid. Zadnja stopnja pri tvorbi produkta je protonacija bakrovega triazolida in s tem regeneracija Cu katalizatorja (49).

S CuCAAC smo združili sladkorni in aglikonski del naših spojin. Reakcijo smo povzeli iz literature (47). Izvajali smo jo v brezvodnih pogojih, da smo zmanjšali možnost disproporcionacije Cu(I), in v argonovi atmosferi. Kisik iz zraka lahko namreč zaradi oksidacije zmanjša katalitično sposobnost Cu(I) in tako upočasni reakcijo ter zniža njen izkoristek. Za vir Cu(I) katalizatorja smo uporabili CuI, vlogo baze pa je imel diizopropiletilamin (DIPEA). Kot topilo za izvedbo reakcije smo uporabili brezvodni DMF, ki smo ga pred izolacijo odstranili s hibridno vakumsko črpalko. DMF bi namreč motil ločevanje vodne in organske faze (EtOAc) pri ekstrakciji. Reakcijo smo izvajali pri sobni temperaturi čez noč.

Izolacijo spojin smo izvedli z ekstrakcijo in kolonsko kromatografijo. Nastali produkti imajo, kljub večji molski masi in višjemu teoretičnemu logP, nižji retencijski faktor od izhodnih alkinov. Elektronska para, ki sta na nesubstituiranih dušikih triazola manj sterično ovirana, očitno povečata interakcije med spojino in silikagelom, ter s tem upočasni njeno potovanje po TLC ploščici. Izkoristek reakcije pri sintezi spojine z 1 C distančnikom (**6**) je bil 66 %, pri tvorbi derivata s 3 C distančnikom pa 47 % (**12**). Razlog za manjši izkoristek pri 3 C distančniku je tvorba 1,5-regioizomera, ki smo ga zaznali na NMR spektru.

5.1.6 Zemlenova odščita peracetilirane manoze (sinteza spojin **7** in **13**)

Pri Zemlenovi transesterifikaciji acetilne zaščitne skupine odstranimo s katalitično količino NaOMe (0,1 ekv) v brezvodnem MeOH oziroma EtOH pri sobni temperaturi (**slika 21**). Reakcijo smo izvajali v brezvodnih pogojih, s čimer smo preprečili hidrolizo estra na aglikonskem delu potencialnih antagonistov FimH. Estri namreč predstavljajo prvo skupino končnih spojin. Pri sintezi spojine z 1 C distančnikom (**7**) smo kot topilo uporabili MeOH, pri derivatu s 3 C distančnikom (**13**) pa EtOH. Spojina s krajšim distančnikom je namreč v obliki metilnega estra, pri daljšem pa gre za etilni ester. Z izbiro ustreznega topila smo tako preprečili, da bi prišlo do preestrenja in s tem nastanka zmesi metilnega in etilnega estra.



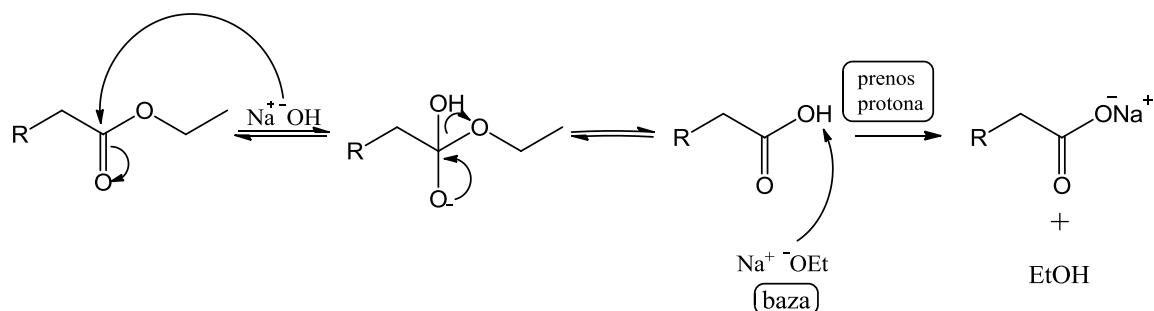
Slika 21: Mehanizem Zemplenove transestrifikacije. Povzeto po (50).

Reakcija poteka po mehanizmu Sn2. Metoksidni anion ima vlogo nukleofila in napade elektrofilni karbonilni ogljik acetata. V naslednjem koraku se odcepi MeOAc. MeOH nato protonira alkoksid do hidroksilne skupine, pri čemer pride do regeneracije katalizatorja reakcije (MeO⁻). Nukleofilni napad metoksida poteka naključno, dokler niso odščitene vse hidroksilne skupine. Slabost Zemplenove deacilacije so Na⁺ ioni, ki po reakciji ostanejo v raztopini. Pri sintezi FimH ligandov jih iz reakcijske zmesi nismo odstranili, zato predvidevamo, da so naši končni produkti po hidrolizi estra v obliki Na⁺ soli (50).

Spojini **7** in **13** sta se v topilu zaradi slabše topnosti oborili, tako smo izolacijo izvedli enostavno s filtracijo skozi teflonski filter. Izkoristek pri sintezi spojine **7** je bil 35 %, pri spojini **13** pa 81 %. Na TLC kromatogramu je razvidno, da se spojini deloma raztapljata v topilu, saj se nahajata tudi v matičnici, kar je razlog za nižji izkoristek reakcij. To zlasti velja za bolj polarno spojino z 1 C distančnikom (**7**), pri kateri se je izoborilo le 35 % čistega derivata. Matičnico z našima spojinama (**7** in **13**) smo uporabili v zadnji stopnji sinteze antagonistov FimH – hidrolizi estra.

5.1.7 Hidroliza estra (sinteza spojin **8** in **14**)

Zadnja stopnja pri sintezi inhibitorjev FimH v obliki prostih kislin je bila bazična hidroliza estra. Izvedli smo jo s prebitkom 1 M NaOH, pri sintezi spojine **8** smo uporabili 7,7 ekv, pri spojini **14** pa 5,9 ekv. Reakcija hidrolize poteka po mehanizmu Sn2 (*slika 22*).



Slika 22: Mehanizem alkalne hidrolize estra. Povzeto po (51).

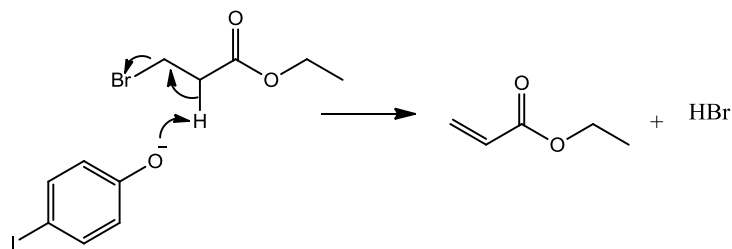
Hidroksilni ion napade karbonilni ogljik v estrski vezi, nastane tetraedrični intermediet, ki razpade na karboksilno kislino in alkoksid. Natrijev alkoksid je močno bazičen in

povzroči deprotonacijo kisline. Končna produkta reakcije sta natrijeva sol karboksilne kisline in etanol.

Končni spojini **8** in **14** smo pustili v obliki natrijevih soli. Spojini sta izpadli v obliki oborine, tako smo ju lahko enostavno izolirali s filtracijo. Pri derivatu z 1 C distančnikom (**8**) so bile prisotne nečistote, zato smo izvedli dodatno čiščenje. Surovemu produktu smo dodali aceton, v katerem naša spojina ni topna, del nečistot pa se je v acetonu raztopil. Produkt smo filtrirali, a je NMR spekter pokazal, da še vedno ni čist, zato smo spojino dodatno očistili še s kolonsko kromatografijo. Izkoristek reakcije je bil zaradi dodatnih korakov čiščenja nižji (26 %). Pri spojini s 3 C distančnikom (**14**) je izpadel produkt brez nečistot, zato dodatno čiščenje ni bilo potrebno. Izkoristek je bil več kot dvakrat višji, in sicer 57 %. Na TLC kromatogramu smo videli, da je naša spojina prisotna tudi v matičnici, a dodatne izolacije zaradi stranskih produktov, ki jih je matičnica vsebovala, nismo izvedli.

5.1.8 Poskus sinteze spojine z 2 C distančnikom na *para* poziciji

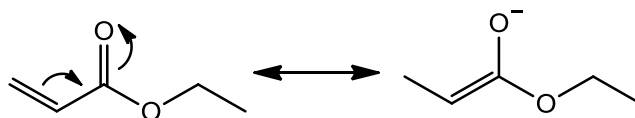
Pri sintezi aglikona z 2 C distančnikom na *para* mestu smo imeli težave že pri prvi stopnji. Williamsonova sinteza etrov med 4-jodofenolom in 3-bromopropanoatom po enakem sinteznem postopku ni potekla. Stranska reakcija, ki pogosto poteka pri Williamsonovi sintezi, je z bazo katalizirana β -eliminacija (**slika 23**). Delež stranskega produkta, ki pri sintezi nastane, je močno odvisen od lastnosti alkilhalida. Primarni alkilhalidi favorizirajo nukleofilno substitucijo, terciarni pa 1,2-eliminacijo. Na potek reakcije vplivajo tudi topilo in reakcijski pogoji. E2 eliminacija je enostopenjska reakcija, alkoxid odcepi šibko kisel proton na β -C atomu, sočasno pa pride do odcepa broma na α -C atomu (40).



Slika 23: Mehanize E2 eliminacije pri poskusu sinteze spojine z 2 C distančnikom.

Naše domneve, da je pri sintezi namesto nukleofilne substitucije potekla eliminacija, smo potrdili s preverjanjem kislosti reakcijske zmesi. Uporabili smo z vodo omočen pH papir, ki je zaradi med reakcijo nastalega HBr pokazal razmeroma kisel pH (pH ~ 3). Vzrok za

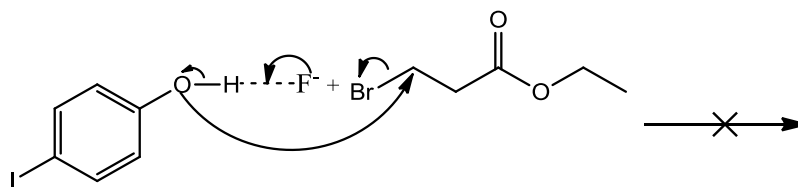
prevlado E2 nad mehanizmom Sn2 je najverjetneje velika stabilnost nastalega alkena zaradi možnosti delokalizacije elektronskega para multiple vezi (**slika 24**).



Slika 24: Mehanizme delokalizacije elektronskega para.

V drugem poskusu sinteze spojine z 2 C distančnikom smo šibko bazo (K_2CO_3) zamenjali z močno (NaH). 4-jodofenol smo raztopili v brezvodnem DMF, zagotovili smo argonovo atmosfero in segreli na $50\text{ }^\circ\text{C}$ pod reflusom. Dodali smo NaH in pustili 30 minut, da se je ves 4-jodofenol pretvoril v alkoksid, šele nato smo po kapljicah dodali etil 3-bromopropanoat. S predhodno tvorbo alkoksida in postopnim dokapavanjem etil 3-bromopropanoata smo želeli doseči prevlado substitucije Sn2 nad β -eliminacijo, vendar nam ni uspelo. NMR spekter in kisel pH sta pokazala, da je kot pri prvem pristopu potekla eliminacija namesto nukleofilne substitucije.

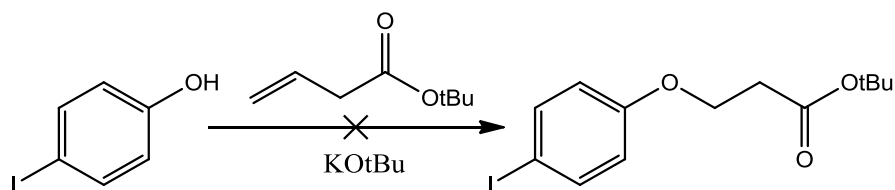
Naslednji poskus sinteze etra z 2 C distančnikom smo skušali izpeljati v nebazičnih pogojih, da bi na ta način preprečili potek β -eliminacije (**slika 25**). Za izvedbo nukleofilne substitucije smo uporabili KF in kvarterno amonijevo sol. KF bistveno poveča nukleofilnost fenola zaradi tvorbe močne vodikove vezi med fluoridnim anionom in vodikom hidroksilne skupine fenola. Za povečanje topnosti KF v DMF smo v reakcijsko zmes dodali kvarterno amonijevo sol (52).



Slika 25: Neuspešen poskus sinteze spojine z 2 C distančnikom.

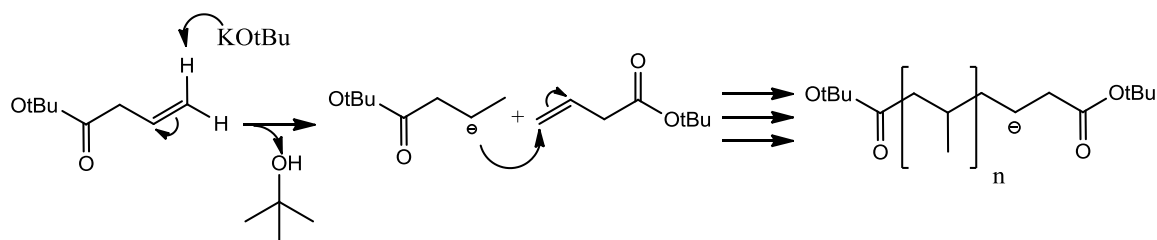
V bučko smo natehtali 4-jodofenol in ga raztopili v DMF. Nato smo dodali 2 ekvivalenta KF in 0,5 ekvivalenta butil trietilamonijevega klorida. Nazadnje smo po kapljicah dodali etil 3-bromopropanoat. Reakcijo smo pustili potekati čez vikend. Tudi ta pristop ni bil uspešen. Na TLC kromatogramu je bil v reakcijski zmesi še vedno prisoten 4-jodofenol, ki je bil viden po oroševanju s fosfomolibdenovo kislino. Tudi pregled NMR spektra nam je potrdil, da reakcija ni potekla.

Naslednji poskus sinteze predstavlja spodnja slika.



Slika 26: Poskus sinteze spojine z 2 C distančnikom.

Natehtali smo 4-jodofenol in KOTBu ter ju prenesli v vialo. Nato smo dodali 5 mL tercbutilakrilata in magnetno mešalo. Reakcijo smo izvajali v mikrovalovnem reaktorju. Sinteza ni potekla uspešno, nastala je viskozna plastična snov. Očitno je namesto nukleofilne adicije alkoksida na alken potekla polimerizacija alkena, in sicer po mehanizmu anionske adicijske polimerizacije (**slika 27**).



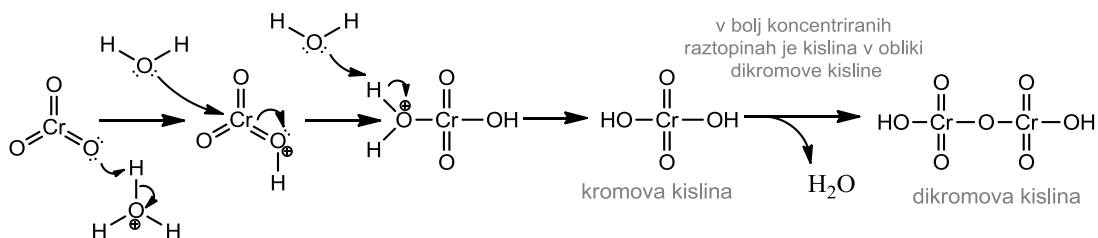
Slika 27: Mehanizem anionske adicijske polimerizacije. Povzeto po (53).

KOTBu začne polimerizacijo z deprotonacijo alkena, pri kateri nastane anionski intermediat. Sledi adicija intermediata na drugo molekulo alkena, pri čemer dobimo nov anionski intermediat, daljši za en monomer. Rast polimerne verige se nadaljuje z dodajanjem alkenov (monomerov) na aktivno mesto (anion) na koncu verige (53).

Sintezo 2 C derivata smo nato poskusili po sinteznem načrtu, predstavljenem na **sliki 10**. Ta pristop se je izkazal za najbolj obetavnega. Sintezo smo ponovno začeli z Williamsonovo sintezo etrov, le da smo kot alkil halid namesto 3-bromopropanoata uporabili 3-bromopropanol. Na ta način smo dosegli prevlado substitucije Sn2 nad β -eliminacijo. Prosto OH skupino spojine **15** smo v naslednji stopnji po mehanizmu Jonesove oksidacije oksidirali in nastalo kislino zaestrili z etanolom po mehanizmu Fisherjeve estrifikacije.

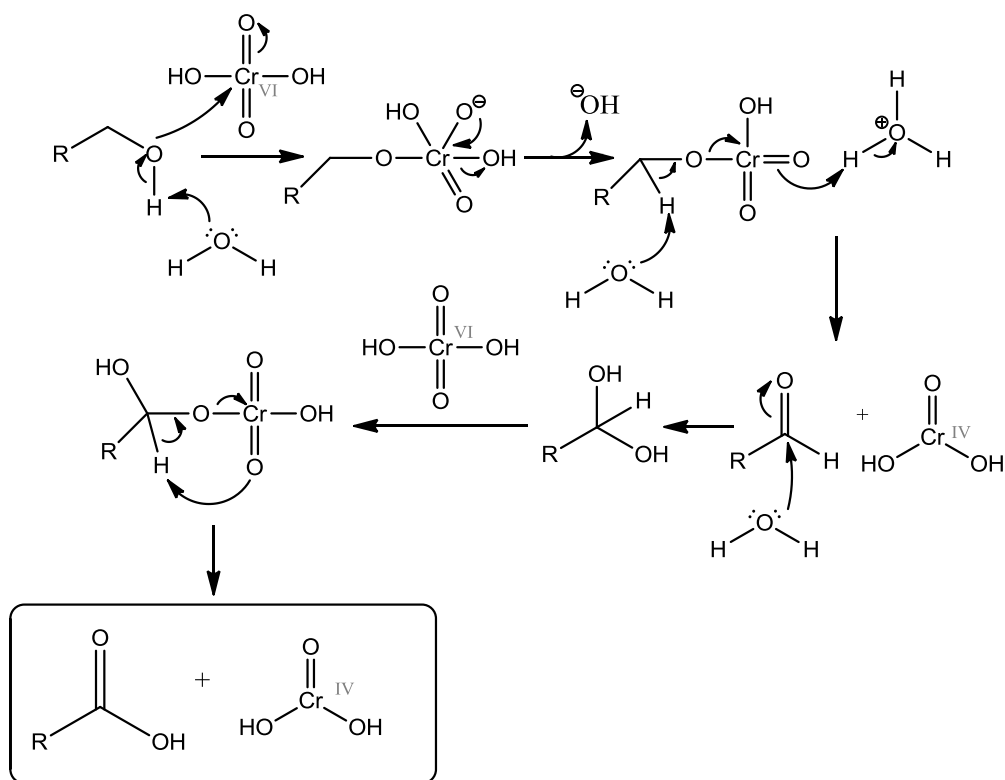
5.1.8.1 Jonesova oksidacija

Pri Jonesovi oksidaciji s CrO_3 in kislino (H_2SO_4) v vodi oksidiramo primarni alkohol do karboksilne kisline. Najprej poteče tvorba kromove oziroma dikromove kisline med CrO_3 in H_2SO_4 , kar vidimo na spodnji sliki (54).



Slika 28: Mehanizem tvorbe kromove kisline. Povzeto po (55).

Sledi oksidacija alkohola s kromovo kislino, najprej do aldehida in nato naprej do karboksilne kisline (slika 29).



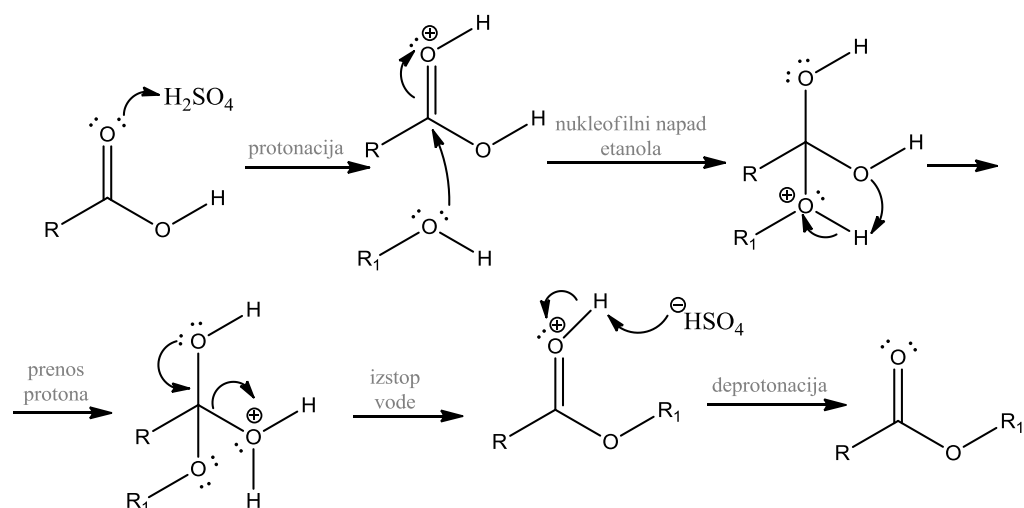
Slika 29: Mehanizem Jonesove oksidacije. Povzeto po (55).

Sintezo smo izvajali na ledu, saj gre za eksotermno reakcijo. Barva reakcijske zmesi se je tekom reakcije spremenila iz rjavooranžne (barva Cr^{VI} ionov) v temnozeleno (barva Cr^{IV} ionov). Potek reakcije smo preverili s TLC in nato v reakcijsko zmes dodali 2-

propanol, ki reagira s prebitno kromovo kislino do acetona. S kolonsko kromatografijo smo izolirali spojino **16** s 57-odstotnim izkoristkom.

5.1.8.2 Fischerjeva estrifikacija

Tvorbo etilnega estra smo izvedli po mehanizmu Fischerjeve estrifikacije pri povišani temperaturi z močno kislino (H_2SO_4) kot katalizatorjem (**slika 30**).



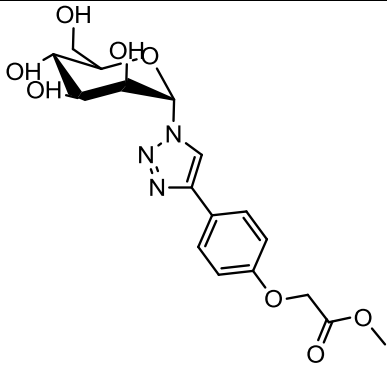
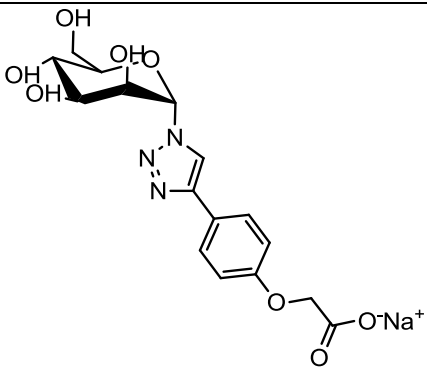
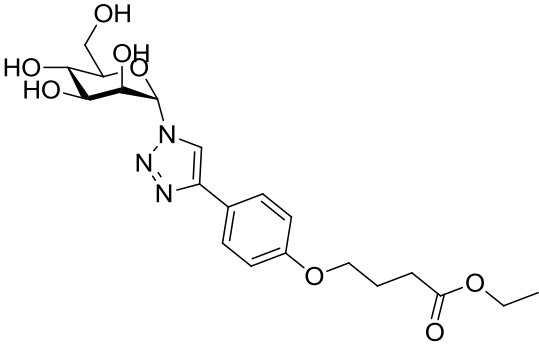
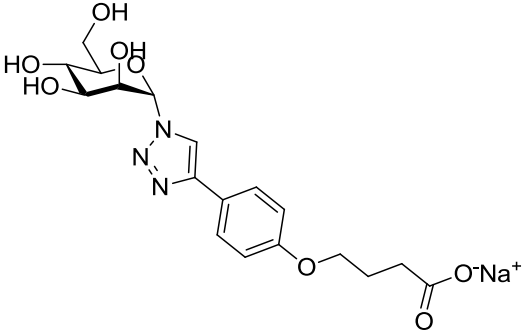
Slika 30: Mehanizem Fischerjeve estrifikacije. Povzeto po (56).

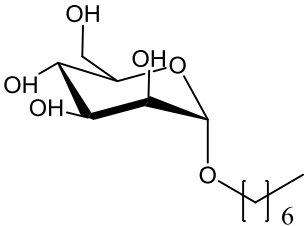
Reakcija je reverzibilna, zato smo uporabili etanol kot topilo. Z alkoholom v prebitku namreč dosežemo večji izkoristek reakcije. Najprej poteče protonacija karbonilnega kisika, s čimer povečamo elektrofilitnost kisline, ki jo sedaj lahko napade šibek nukleofil – etanol. Po nukleofilnem napadu etanola dobimo tetraedrični intermediat. Sledi premik protona na hidroksilno skupino in eliminacija vode. Nazadnje poteče deprotonacija do etilnega estra (56).

5.2 Biološka testiranja

V preglednici so zbrani rezultati bioloških testiranj na izolirani lektinski domeni FimH-CRD (wild type) in na R98A mutantu. Testiranje so izvedli na Institute of Molecular Pharmacy, University of Basel, s testom kompetitivne fluorescenčne polarizacije. Meritve so izvedli v dvojnikih, razen pri določanju K_D spojini **8** na R98A.

Preglednica I: Rezultati bioloških testiranj končnih spojin.

Oznaka	Struktura	K_D lektinke domene FiMH (nM)	K_D R98A (nM)
<u>7</u>		66,2 (58,7–74,7)	7,22 (5,74–9,07)
<u>8</u>		171 (134–219)	14,6
<u>13</u>		60,7 (52,7–70,0)	8,07 (7,20–9,04)
<u>14</u>		63,3 (54,9–73,1)	9,45 (7,73–11,6)

N-heptil α-D- manozid		36,8 (28,7–44,9)	/
--------------------------------------	---	---------------------	---

Pričakovali smo, da bodo spojine v obliki prostih kislin oziroma natrijevih soli zaradi ionske vezi z Arg98 v vezavnem mestu izkazovale večjo afiniteto do receptorja FimH. Na podlagi rezultatov bioloških testiranj spojin z 1 in 3 C distančnikom smo našo hipotezo ovrgli. Estri (spojini **7** in **13**), ki naj bi imeli zaradi večje lipofilnosti boljšo biološko uporabnost in smo jih načrtovali predvsem kot potencialna predzdravila, imajo namreč nekoliko nižjo K_D kot prosti karboksilati (spojini **8** in **14**). Interakcije z Arg98 nam glede na izmerjene afinitete torej ni uspelo doseči.

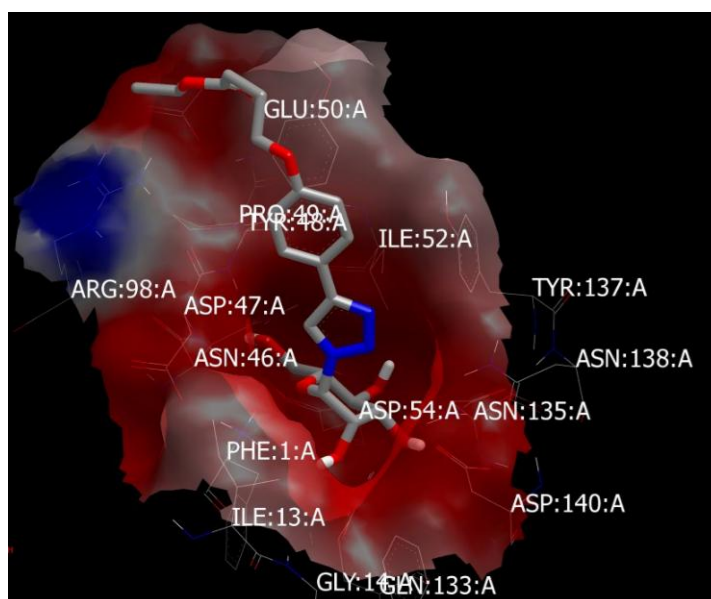
Oba estra vežeta FimH s primerljivo afiniteto (K_D okrog 60 nM), število metilenskih skupin med biarlinim fragmentom in estrsko funkcionalno skupino torej nima bistvenega vpliva na moč vezave. Natrijeva sol s 3 C distančnikov (**14**) ima prav tako primerljivo učinkovitost (K_D okrog 60 nM), najslabšo afiniteto pa izkazuje spojina **8**. Predvidevamo, da prosta karboksilna skupina zmanjšuje interakcije aglikonskega fragmenta s tirozinskimi vrati, interakcija z Arg98 pa ni dosežena. V primerjavi z *N*-heptil α-D-manozidom je afiniteta naših sintetiziranih spojin nekoliko nižja, a pričakujemo, da imajo naše spojine, predvsem estri, boljše farmakokinetične lastnosti in bi z njimi lahko dosegli zadovoljive koncentracije v urinarnem traktu. Učinkovitost *N*-heptil α-D-manozida *in vivo* je namreč majhna.

Spojine smo testirali na izolirani lektinski domeni, ki je zaklenjena v konformacijo z visoko afiniteto. FimH se *in vivo* večinoma nahaja v konformaciji z nižjo in srednjo afiniteto, saj so strižne sile, ki povzročijo disociacijo FimH_L in FimH_P, prisotne le med uriniranjem. Smiselno bi bilo zato določiti tudi K_D na celotni FimH, saj je za učinkovitost antiadhezivne terapije bistveno, da se FimH antagonist veže na vse fiziološko prisotne konformacije lektina FimH, ne le na konformacijo z visoko afiniteto, na katero se antagonist najlažje vežejo.

Na R98A se spojine vežejo močnejše kot na izolirano lektinsko domeno FimH, in sicer z afiniteto K_D okrog 10 nM. Vzrok je najverjetneje večja dostopnost vezavnega mesta. Arg98 tvori s Tyr48 kation- π vez, s čimer drži tirozinska vrata v odprti konformaciji. Če se naši antagonisti vežejo na lektin FimH mimo tirozinskih vrat (tirozinska vrata v zaprti konformaciji), se morajo interakcije med Arg98 in Tyr48 prekiniti, kar ni energijsko ugodno. Če Arg98 zamenjamo z Ala, pa so tirozinska vrata že zaprta in dodatna energija za prekinitev kation- π interakcij ni potrebna.

5.3 Računalniško sidranje

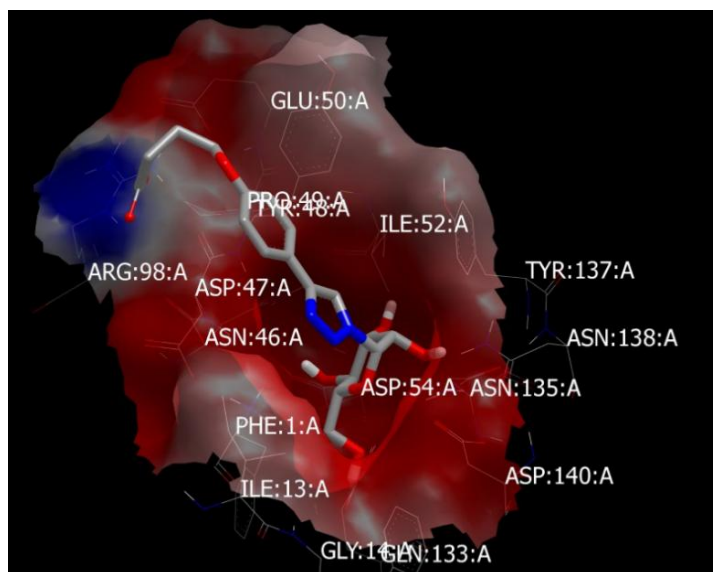
Slika 31 prikazuje rezultate virtualnega sidranja spojine **13**, ki je v bioloških testiranjih *in vitro* izkazala najvišjo afiniteto do izolirane lektinske domene FimH. Alfa-D-manoza je vsidrana v manozni vezavni žep, kjer tvori mrežo H-vezi s hidrofилnimi AK ostanki, med katerimi igra pomembno vlogo Asp54. Biarlini fragment sega v tirozinska vrata, kar bistveno poveča afiniteto do receptorja FimH in omogoča K_D v nanomolarnem območju. Estrska funkcionalna skupina pa lahko igra vlogo akceptorja vodikove vezi. Možen donor je Thr51, ki pa na sliki ni izpostavljen.



Slika 31: Računalniško sidranje spojine **13** v aktivno mesto FimH.

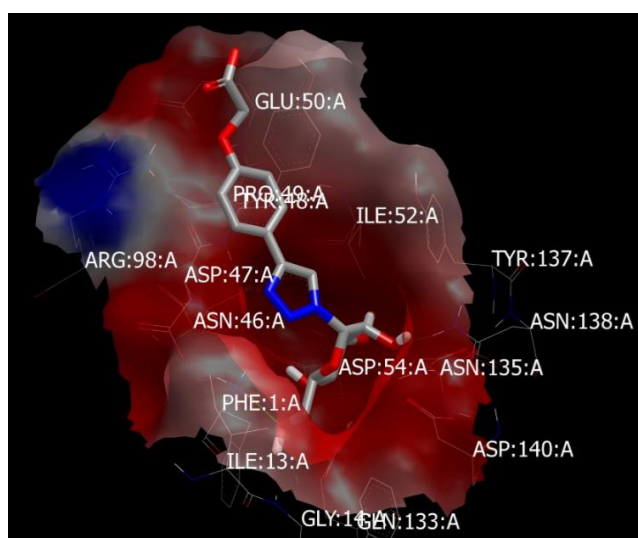
Karboksilat **14** naj bi na podlagi rezultatov virtualnega molekulskega sidranja dosegel ionsko interakcijo z Arg98 (**slika 32**). Triazolofenilni fragment gre ob takem načinu vezave mimo tirozinskih vrat (»out-docking« način vezave), kar je možen razlog, da spojina na bioloških testiranjih *in vitro* ne izkazuje večje afinitete od pripadajočega estra (spojina **13**). Sočasne interakcije s tirozinskimi vrati (»in-docking« način vezave) in

ionske vezi z Arg98 s karboksilatom s 3 C atomi dolgim distančnikom torej očitno ne dosežemo.

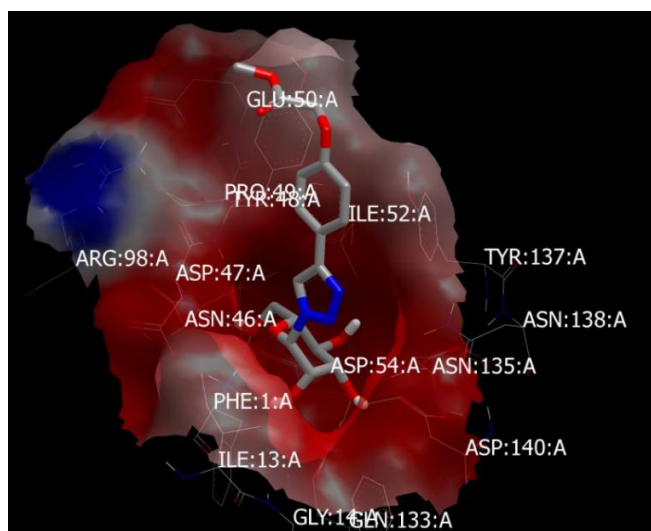


*Slika 32: Računalniško sidranje spojine **14** v aktivno mesto FimH.*

Spojina **8**, ki se je na biološkem testiranju na izolirani lektinski domeni izkazala za najmanj učinkovito, se tudi na podlagi računalniškega vrednotenja najmanj prilega vezavnemu mestu (**slika 33**). Kot spojina **14** z receptorjem vzpostavi »out-docking mode« vezave, poleg tega pa je distančnik prekratek za dosego ionske interakcije z gvanidinom Arg98. Na **sliki 34** vidimo računalniško sidranje spojine **7** v aktivno mesto FimH.



*Slika 33: Računalniško sidranje spojine **8** v aktivno mesto FimH.*



*Slika 34: Računalniško sidranje spojine **7** v aktivno mesto FimH. Biarilni fragment tvori π - π interakcije s tirozinskimi vrati.*

6 Sklep

Razvoj bakterij, odpornih na trenutne protimikrobne učinkovine, hitro narašča. Potreba po novih pristopih, ki ga predstavlja antiadhezivna terapija, je zato nujna osvežitev na področju zdravljenja bakterijskih okužb. Pri zdravljenju bakterijskih okužb sečil veliko obetajo antagonisti adhezina FimH, ki se nahaja na površini uropatogene *E. coli* in ji omogoča pripetje na uroepitelijske celice.

V sklopu magistrske naloge smo uspešno sintetizirali štiri potencialne antagoniste lektina FimH. Na podlagi rezultatov bioloških testiranj vidimo, da se spojine na izolirano lektinsko domeno vežejo v nanomolarnih koncentracijah. To so obetavni rezultati, saj lahko nanomolarne koncentracije na mestu delovanja, ob ustrezni farmakokinetiki antagonistov, dosežemo z relativno majhnimi *per os* odmerki. Poleg tega imajo učinkovine z visoko afiniteto običajno večjo selektivnost vezave napram podobnim/sorodnim makromolekulskim tarčam. Visoka jakost in nizki peroralni odmerki pomenijo manjšo verjetnost zasičenja jetrnih encimov in s tem tvorbo toksičnih metabolitov. Poleg tega pa lahko učinkovino vgradimo v farmacevtsko obliko ustrezne velikosti, ki ne bo predstavljala težav pri požiranju.

Oba estra (**7**, **13**) in kislina s 3 C distančnikom (**14**) vežejo FimH s primerljivo afiniteto ($K_D \sim 60$ nM). Najnižjo afiniteto izkazuje prosta kislina z 1 C distančnikom (**8**). Predvidevamo, da prosta karboksilna skupina zmanjšuje interakcije aglikonskega fragmenta z lipofilnim grebenom vezavnega mesta. Kisline ne izkazujejo višje afinitete do FimH od estrov. Pri derivatu z 1 C distančnikom je afiniteta pri kislini celo nižja kot pri estru. Pri vezavi sintetiziranih antagonistov torej ne pride do vzpostavitve predvidene ionske vezi med prosto kislino in Arg98.

Postopka, navedenega v literaturi, pri pripravi sladkornega jedra spojin nismo spreminjali, saj je sinteza potekala brez težav z visokimi izkoristki. Pri sintezi aglikona smo predvsem pri Sonogashirovi sklopitvi in sledeči odščiti z menjavo topila in optimizacijo izolacije povečali izkoristek. Kot topilo smo pri Sonogashirovi sklopitvi pri spojini s 3 C distančnikom namesto DMF uporabili TEA. Bolj bazični pogoji, ki so nujni za potek bakrovega cikla, so ugodno vplivali na potek reakcije. Izolacijo spojin po odstranitvi sililne zaščitne skupine smo sprva izvajali z ekstrakcijo, pri tem so se na TLC kromatogramu pojavile dodatne lise, ki kažejo na delen razpad spojin. Poleg tega je bila ekstrakcija zaradi TBAF, ki deluje kot površinsko aktivna snov, izredno težavna. Izolacijo

derivata s 3 C distančnikom po odščiti sililne zaščitne skupine smo izvedli s kolonsko kromatografijo brez predhodne ekstrakcije, s čimer smo se izognili razpadu spojine pri ekstrakciji in izgubi v vodno fazo. Z uporabo TEA kot topila pri Sonogashirovi sklopitvi in opustitvijo ekstrakcije po odščiti smo dvignili izkoristek z 21 % na 78 %.

Spojina z 2 C distančnikom nam je povzročala največ težav. Po sinteznem načrtu, ki smo ga uporabili pri spojinah z distančnikoma dolgima 1 C in 3 C, je pri Williamsonovi sintezi etrov namesto nukleofilne substitucije potekla β -eliminacija. Za uspešno se je izkazala menjava alkil halida, 3-bromopropanol namesto 3-bromopropanoata, in uvedba dveh dodatnih stopenj, Jonesove oksidacije in Fisherjeve esterifikacije. Kljub temu sinteze nismo uspeli pripeljati do končnih spojin, saj smo imeli po Sonogashirovi sklopitvi in odstranitvi sililne zaščitne skupine premalo produkta za nadaljevanje.

Kljub številnim prednostim, ki jih antiadhezivna terapija prinaša napram uveljavljeni protimikrobni terapiji, bo potrebno še veliko izboljšav, da bodo antiadhezivne spojine lahko prodrle na trg za zdravljenje bakterijskih okužb. Bakterije imajo na svoji površini običajno različne tipe adhezinov, zato inhibicija enega izmed njih najverjetneje ni dovolj. To nakazuje tudi visok delež neuspešnih kliničnih preizkušanj na področju antiadhezivne terapije. Za klinično uspešnost antiadhezivne terapije pri zdravljenju bakterijskih okužb bo tako najverjetneje potrebno uporabiti koktejl učinkovin, specifičnih za različne adhezine, oziroma razviti širokospektralno spojino, ki se bo vezala na raznovrstne bakterijske adhezine. Veliko prostora za optimizacijo antagonistov FimH predstavlja tudi izboljšava farmakokinetičnih lastnosti, ki jih pri naših spojinah nismo testirali (10, 16).

7 Literatura

1. Nielubowicz GR, Mobley HLT: Host–pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat Rev Urol* 2010; 7(8): 430–441.
2. Lane DR, Takhar SS: Diagnosis and Management of Urinary Tract Infection and Pyelonephritis. *Emerg Med Clin North Am* 2011; 29(3): 539–552.
3. Eris D, Preston RC, Scharenberg M, Hulliger F, Abgottspon D, Pang L, Jiang X, Schwardt O, Ernst B: The Conformational Variability of FimH: Which Conformation Represents the Therapeutic Target? *ChemBioChem* 2016; 17(11): 1012–1020.
4. Dielubanza EJ, Schaeffer AJ: Urinary Tract Infections in Women. *Med Clin North Am* 2011; 95(1): 27–41.
5. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ: Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* 2015; 13(5): 269–284.
6. Kos MK: Zdravljenje bakterijskih okužb urogenitalnega trakta. *Farmacevtski vestnik* 2011; 62: 81–6.
7. Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, Moran GJ, Nicolle LE, Raz R, Schaeffer AJ, Soper DE: International Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Acute Uncomplicated Cystitis and Pyelonephritis in Women: A 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Infect Dis* 2011; 52(5): 103–120.
8. Totsika M, Kostakioti M, Hannan TJ, Upton M, Beatson SA, Janetka JW, Hultgren SJ, Schembri MA: A FimH Inhibitor Prevents Acute Bladder Infection and Treats Chronic Cystitis Caused by Multidrug-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* ST131. *J Infect Dis* 2013; 208(6): 921–8.
9. Krachler AM, Orth K: Targeting the bacteria–host interface: Strategies in anti-adhesion therapy. *Virulence* 2013; 4(4): 284–294.
10. Cozens D, Read RC: Anti-adhesion methods as novel therapeutics for bacterial infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; 10(12): 1457–1468.
11. Liu Y, Pinzón-Arango PA, Gallardo-Moreno AM, Camesano TA: Direct adhesion force measurements between *E. coli* and human uroepithelial cells in cranberry juice cocktail. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54(12): 1744–1752.

12. Kontiokari T, Sundqvist K, Nuutinen M, Pokka T, Koskela M, Uhari M: Randomised trial of cranberry-lingonberry juice and Lactobacillus GG drink for the prevention of urinary tract infections in women. *BMJ* 2001; 322(7302): 1–5.
13. Jepson R, Mihaljevic L, Craig J: Cranberries for preventing urinary tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2008.
14. Qian K, Morris-Natschke SL, Lee K-H: HIV entry inhibitors and their potential in HIV therapy. *Med Res Rev* 2009; 29(2): 369–393.
15. Briz V, Poveda E, Soriano V: HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57(4): 619–627.
16. Ofek I, Hasty DL, Sharon N: Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 38(3): 181–191.
17. Sokurenko EV, Chesnokova V, Dykhuizen DE, Ofek I, Wu X-R, Krogfelt KA, Struve C, Schembri MA, Hasty DL: Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(15): 8922–6.
18. Rogers TJ, Paton JC: Therapeutic strategies for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7(6): 683–6.
19. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: *Biochemistry*. 7th ed. New York: W.H. Freeman, 2012.
20. Audfray A, Varrot A, Imberty A: Bacteria love our sugars: Interaction between soluble lectins and human fucosylated glycans, structures, thermodynamics and design of competing glycoconjugates. *C R Chim* 2013; 16(5): 482–490.
21. Ernst B, Magnani JL: From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(8): 661–677.
22. Zalewski A: In pursuit of a novel UTI treatment strategy – an in silico study of the FimH adhesin, Inauguraldissertation. 2013.
23. 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.
24. Hartmann M, Lindhorst TK: The Bacterial Lectin FimH, a Target for Drug Discovery - Carbohydrate Inhibitors of Type 1 Fimbriae-Mediated Bacterial Adhesion. *J Org Chem* 2011; 2011(20–21): 3583–3609.
25. Han Z, Pinkner JS, Ford B, Chorell E, Crowley JM, Cusumano CK, Campbell S, Henderson JP, Hultgren SJ, Janetka JW: Lead Optimization Studies on FimH Antagonists: Discovery of Potent and Orally Bioavailable Ortho-Substituted Biphenyl Mannosides. *J Med Chem* 2012; 55(8): 3945–3959.

26. Zhou G, Mo W-J, Sebbel P, Min G, Neubert TA, Glockshuber R, Wu X-R, Sun T-T, Kong X-P: Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. *J Cell Sci* 2001; 114(22): 4095–4103.
27. Han Z, Pinkner JS, Ford B, Obermann R, Nolan W, Wildman SA, Hobbs D, Ellenberger T, Cusumano CK, Hultgren SJ, Janetka JW: Structure-Based Drug Design and Optimization of Mannoside Bacterial FimH Antagonists. *J Med Chem* 2010; 53(12): 4779–4792.
28. Tomašić T, Rabbani S, Gobec M, Raščan IM, Podlipnik Č, Ernst B, Anderluh M: Branched α -D-mannopyranosides: a new class of potent FimH antagonists. *Med Chem Commun* 2014; 5(8): 1247–1253.
29. Sperling O, Fuchs A, Lindhorst TK: Evaluation of the carbohydrate recognition domain of the bacterial adhesin FimH: design, synthesis and binding properties of mannoside ligands. *Org Biomol Chem* 2006; 4(21): 3913–39122.
30. 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(21): 6454–6473.
31. Kleeb S, Pang L, Mayer K, Eris D, Sigl A, Preston RC, Zihlmann P, Sharpe T, Jakob RP, Abgottspon D, Hutter AS, Scharenberg M, Jiang X, Navarra G, Rabbani S, Smiesko M, Lüdin N, Bezençon J, Schwardt O, Maier T, Ernst B: FimH Antagonists: Bioisosteres To Improve the in Vitro and in Vivo PK/PD Profile. *J Med Chem* 2015; 58(5): 2221–2239.
32. Bouckaert J, Berglund J, Schembri M, Genst ED, Cools L, Wuhrer M, Hung C-S, Pinkner J, Slättegård R, Zavialov A, Choudhury D, Langermann S, Hultgren SJ, Wyns L, Klemm P, Oscarson S, Knight SD, Greve HD: Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli* FimH adhesin. *Mol Microbiol* 2005; 55(2): 441–455.
33. Scharenberg M, Schwardt O, Rabbani S, Ernst B: Target Selectivity of FimH Antagonists. *J Med Chem* 2012; 55(22): 9810–6.
35. Perdih A, Kotnik M, Oblak M: Uporaba računalniške kemije pri načrtovanju in iskanju novih spojin vodnic. *Farmaceutski vestnik* 2010; 61: 195–202.
36. Do gradiva dostopano 17.12.2017 na naslovu: <https://docs.eyesopen.com/oedocking/algorithm.html#theory-algorithm-chemgauss3>.
37. Hall MD, Yasgar A, Peryea T, Braisted JC, Jadhav A, Simeonov A, Coussens NP: Fluorescence polarization assays in high-throughput screening and drug discovery: a review. *Methods Appl Fluoresc* 2016; 4(2): 1-21.

38. Guo J, Ye X-S: Protecting Groups in Carbohydrate Chemistry: Influence on Stereoselectivity of Glycosylations. *Molecules* 2010; 15(10): 7235–7265.
39. Lindhorst TK: *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Third, Completely Revised and Enlarged Edition. Wiley-VCH: Weinheim, 2007.
40. Williamson AW: XXII.—On etherification. *J Chem Soc* 1852; 4(3): 229–239.
41. Sonogashira K: Development of Pd–Cu catalyzed cross-coupling of terminal acetylenes with sp²-carbon halides. *J Organomet Chem* 2002; 653(1): 46–9.
42. Chinchilla R, Nájera C: Recent advances in Sonogashira reactions. *Chem Soc Rev* 2011; 40(10): 5084–5121.
43. Elangovan A, Wang Y-H, Ho T-I: Sonogashira Coupling Reaction with Diminished Homocoupling. *Org Lett* 2003; 5(11): 1841–4.
44. Naskar JP, Chowdhury S, Drew MGB, Datta D: Chemistry of the copper(I)–water bond. Some new observations. *New J Chem* 2002; 26(1): 170–5.
45. Narani A, Marella RK, Ramudu P, Rao KSR, Burri DR: Cu (II) complex heterogenized on SBA-15: a highly efficient and additive-free solid catalyst for the homocoupling of alkynes. *RSC Advances* 2014; 4(8): 3774–3781.
46. Xu H-P, Xie B-Y, Yuan W-Z, Sun J-Z, Yang F, Dong Y-Q, Qin A, Zhang S, Wang M, Tang BZ: Hybridization of thiol-functionalized poly(phenylacetylene) with cadmium sulfide nanorods: improved miscibility and enhanced photoconductivity. *ChemComm* 2007; 0(13): 1322–4.
47. Tron GC, Pirali T, Billington RA, Canonico PL, Sorba G, Genazzani AA: Click chemistry reactions in medicinal chemistry: Applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. *Med Res Rev* 2008; 28(2): 278–308.
48. Rostovtsev V, Green L, Fokin V, Sharpless KB: A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew Chem Int Ed* 2002; 41(14): 2596–9.
49. Worrell BT, Malik JA, Fokin VV: Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* 2013; 340(6131): 457–460.
50. Wang Z: Zemplén Deacetylation (Zemplén De-O-acetylation, Zemplén Transesterification, Zemplén Deprotection). *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagent* 2010: 3123–8.
51. Do gradiva dostopano dne 08.02.2018 na naslovu: <https://www.chemguide.co.uk/organicprops/esters/hydrolysis.html>.

52. Ando T, Yamawaki J, Kawate T, Sumi S, Hanafusa T: Fluoride Salts on Alumina as Reagents for Alkylation of Phenols and Alcohols. *Bull Chem Soc Jpn* 1982; 55(8): 2504-7.
53. Smid J: Historical perspectives on living anionic polymerization. *J Polym Sci A* 2002; 40(13): 2101-7.
54. Bowden K, Heilbron IM, Jones ERH, Weedon BCL: Researches on acetylenic compounds. Part I. The preparation of acetylenic ketones by oxidation of acetylenic carbinols and glycols. *J Chem Soc* 1946: 39-45.
55. Do gradiva dostopano dne 04.03.2018 na naslovu: <https://www.name-reaction.com/jones-oxidation>.
56. Do gradiva dostopano dne 04.03.2018 na naslovu: https://chem.libretexts.org/Core/Organic_Chemistry/Carboxylic_Acids/Reactivity_of_Carboxylic_Acids/Fischer_Esterification. Chemistry LibreTexts 2013.

8 Priloge

8.1 Analizni izvidi

Spojina 1:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.02, 2.06, 2.11, 2.18, 2.22$ (5 x s, 15H, 5 x COCH_3), $\delta = 4.05 - 4.08$ (m, 1H, H-5) $\delta = 4.11$ (dd, $J = 12.4$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-6_A), $\delta = 4.29$ (dd, $J = 12.4$ Hz, $J = 4.9$ Hz, 1H, H-6_B), $\delta = 5.26 - 5.28$ (m, 1H, H-4), $\delta = 5.36$ (dd, $J = 3.7$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 2H, H-3, H-2), $\delta = 6.09$ (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-1) ppm. MS (ESI+): $m/z = 412,94$ ($[\text{MNa}^+]$).

Spojina 2:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.01, 2.07, 2.13, 2.19$ (4 x s, 12H, 4 x COCH_3), $\delta = 4.14$ (m, 1H, H-5), $\delta = 4.18$ (dd, $J = 12.0$ Hz, $J = 2.37$ Hz, 1H, H-6_A), $\delta = 4.32$ (dd, $J = 12.4$ Hz, $J = 5.5$ Hz, 1H, H-6_B), $\delta = 5.17$ (dd, $J = 2.0$ Hz, $J = 3.0$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-2), $\delta = 5.28$ (dd, $J = 3.0$ Hz, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-3), $\delta = 5.31$ (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.9$ Hz, 1H, H-4), $\delta = 5.41$ (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-1) ppm. MS (ESI): $m/z = 395,91$ ($[\text{MNa}^+]$).

Spojina 3:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.83$ (s, 3H, COOCH_3), 4.63 (s, 2H, CH_2COO), 6.71 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, Ar-H_A), 7.60 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, Ar-H_B) ppm. MS (ESI+): $m/z = 293.0$ ($[\text{MH}^+]$), 166.1 (100%). HRMS (ESI+): m/z za $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{IO}_3$ ($[\text{MH}^+]$) izračunano 292.967, izmerjeno 292.967. IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 2944, 1758, 1585, 1485, 1436, 1396, 1283, 1242, 1210, 1174, 1106, 1083, 1061, 1002, 973, 916, 835, 811, 715, 604, 512.

Spojina 5:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.03$ (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}-\text{Ar}$), 3.83 (s, 3H, COOCH_3), 4.67 (s, 2H, CH_2COO), 6.87 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, Ar-H_A), 7.46 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, Ar-H_B) ppm. MS (ESI+): $m/z = 213,1$ ($[\text{MNa}^+]$, 100%)

Spojina 6:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 2.07-2.11 (m, 9H, 3xMan- OCOCH_3), 2.22 (s, 3H, Man- OCOCH_3), 3.85 (s, 3H, COOCH_3) 3.94-3.98 (m, 1H, H-5), 4.10 (dd, J = 12.5 Hz, J = 2.6 Hz 1H, H-6_A), 4.41 (dd, J = 12.5, J = 2.4 Hz, Hz, 1H, H-6_B), 4.71 (s, 2H, ArOCH_2COO), 4.12 (t, J = 8.9 Hz, 1H, H-4), 6.01 (dd, J = 8.6 Hz, J = 3.7 Hz, 1H, H-3), 6.02-6.04 (m, 1H, H-2), 6.07 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H-1), 7.01 (d, J = 6.9 Hz, 2H, Ar- H_A), 7.81 (d, J = 6.9 Hz, 2H, Ar- H_B), 7.90 (s, 1H, $\text{C}_2\text{N}_3\text{H}$) ppm. MS (ESI+): m/z = 586.5 ($[\text{MNa}^+]$, 100%). HRMS (ESI+): m/z za $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_{12}$ ($[\text{MH}^+]$) izračunano 564.183, izmerjeno 564.184. IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 2952, 1740, 1616, 1498, 1434, 1369, 1205, 1177, 1129, 1034, 985, 901, 837, 772, 692, 598.

Spojina 7:

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ = 3.37-3.41 (m, 1H, H-5), 3.76-3.80 (m, 2H, H-4 , H-6_A), 3.81 (s, 3H, COOCH_3), 3.87 (dd, J = 12.1 Hz, J = 2.6 Hz, 1H, H-6_B), 4.12 (dd, J = 8.5 Hz, J = 3.5 Hz, 1H, H-3), 4.75-4.77 (m, 1H, H-2), 4.79 (s, 2H, ArOCH_2COO), 6.08 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H-1), 7.04 (d, J = 6.8 Hz, 2H, Ar- H_A), 7.80 (d, J = 6.8 Hz, 2H, Ar- H_B), 8.44 (s, 1H, $\text{C}_2\text{N}_3\text{H}$) ppm. MS (ESI+): m/z = 418.0 ($[\text{MNa}^+]$, 100%). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ = 51.9 (COOCH_3), 65.3 (Ar- OCH_2COO), 61.9, 65.3, 67.6, 71.2, 78.3, 85.8 (6 x Man- C), 2 x 114.8 (2 x Ar- C_3 , C_5), 122.1 (Ar- C_1), 129.5 (N- $\text{CH}=\text{C}$), 2 x 128.5 (2 x Ar- C_2 , C_6), 148.2 (N- $\text{CH}=\text{C}$), 158.1 (Ar- C_4), 169.4 (COO) ppm. MS (ESI-): m/z = 394.1 ($[\text{MH}^-]$). HRMS (ESI-): m/z za $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_8$ ($[\text{MH}^-]$) izračunano 394.125, izmerjeno 394.125. IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3311, 2952, 1736, 1620, 1502, 1419, 1370, 1307, 1278, 1250, 1176, 1115, 1093, 1074, 1041, 1016, 970, 861, 839, 816, 800, 707, 677, 643, 607, 537, 510.

Spojina 8:

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ = 3.43-3.47 (m, 1H, H-5), 3.79-3.88 (m, 3H, H-4 , H-6_A , H-6_B), 4.12 (dd, J = 8.3 Hz, J = 3.5 Hz, 1H, H-3), 4.74-4.76 (m, 1H, H-2), 4.81 (s, 2H, ArOCH_2COO), 6.14 (d, J = 3.0 Hz, 1H, H-1), 7.07 (d, J = 6.8 Hz, 2H, Ar- H_A), 7.82 (d, J = 6.8 Hz, 2H, Ar- H_B), 8.60 (s, 1H, $\text{C}_2\text{N}_3\text{H}$) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ = 78.0

(Ar-OCH₂COO), 61.9, 65.3, 67.6, 71.2, 78.3, 85.8 (6 x Man-C), 2 x 114.8 (2 x Ar-C₃, C₅), 122.1 (Ar-C₁), 129.5 (N-CH=C), 2 x 128.5 (2 x Ar-C₂, C₆), 148.2 (N-CH=C), 158.1 (Ar-C₄), 180.5 (COO) ppm. MS (ESI+): m/z = 404.0 ([MH⁺], 100%). HRMS (ESI+): m/z za C₁₆H₁₉N₃NaO₈ ([MH⁺]) izračunano 404.107, izmerjeno 404.107. IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3232, 2944, 1736, 1565, 1501, 1417, 1370, 1277, 1248, 1175, 1114, 1074, 1041, 1016, 970, 861, 839, 816, 800, 707, 660, 618, 537.

Spojina 9:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.28 (t, J = 7.15, 3H, COOCH₂CH₃), 2.08-2.15 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.51 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂COO), 3.97 (t, J = 5.9 Hz, 2H, COOCH₂CH₃), 4.16 (q, J = 7.0 Hz, ArOCH₂CH₂), 6.69 (d, J = 6.8 Hz, 2H, Ar-H_A), 7.55 (d, J = 6.8 Hz, 2H, Ar-H_B) ppm. MS (ESI+): m/z = 357,1 ([MNa⁺], 100%). HRMS (ESI+): m/z za C₁₂H₁₆IO₃ ([MH⁺]) izračunano 335.013, izmerjeno 335.013.

Spojina 10:

MS (ESI+): m/z = 327.13 ([MNa⁺], 50%), 359.17 (100%).

Spojina 11:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.28 (t, J = 7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃), 2.10-2.17 (m, 2H, ArOCH₂CH₂CH₂), 2.53 (t, J = 7.3 Hz, 2H, ArOCH₂CH₂CH₂), 3.02 (s, 1H, CH≡C-Ar), 4.03 (t, J = 6.1 Hz, 2H, ArOCH₂), 4.17 (q, J = 7.1 Hz, 2H, COOCH₂CH₃), 6.84 (d, J = 6.8 Hz, 2H, Ar-H_A), 7.44 (d, J = 6.8, 2H, Ar-H_B) ppm. MS (ESI+): m/z = 255,1 ([MNa⁺], 100%). HRMS (ESI+): m/z za C₁₄H₁₇O₃ ([MH⁺]) izračunano 233,118, izmerjeno 233,118. IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3277, 2970, 1721, 1607, 1508, 1469, 1268, 1250, 1176, 1116, 1094, 1013, 846, 813, 762, 654, 641, 540.

Spojina 12:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.27 (t, J = 7.2 Hz, 3H, COOCH₂CH₃), 2.06-2.09 (m, 9H, 3xMan-OCOCH₃), 2.10-2.17 (m, 2H, ArOCH₂CH₂CH₂), 2.20 (s, 3H, Man-OCOCH₃), 2.53 (t, J = 7.3 Hz, 2H, ArOCH₂CH₂CH₂), 3.91-3.96 (m, 1H, H-5), 4.05 (t, J =

6.1 Hz, 2H, ArOCH₂), 4.08 (dd, J = 12.5 Hz, J = 2.6 Hz, 1H, H-6_A), 4.15 (q, J = 7.2 Hz, 2H, COOCH₂CH₃), 4.38 (dd, J = 12.5 Hz, J = 5.3 Hz, 1H, H-6_B), 5.40 (t, J = 8.9 Hz, 1H, H-4), 5.99 (dd, J = 8.7 Hz, J = 3.7 Hz, 1H, H-3), 6.00-6.02 (m, 1H, H-2), 6.05 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-1), 6.96 (d, J = 6.8 Hz, 2H, Ar-H_A), 7.77 (d, J = 6.8 Hz, 2H, Ar-H_B), 7.87 (s, 1H, C₂N₃H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ = 14.1 (COOCH₂CH₃), 24.3 (Ar-OCH₂CH₂CH₂), 30.2 (Ar-OCH₂CH₂CH₂), 59.7 (COOCH₂), 60.6, 67.6, 68.0, 71.2, 78.3, 85.8 (6 x Man-C), 67.0 (Ar-OCH₂), 2 x 114.8 (2 x Ar-C₃, C₅), 120.0 (Ar-C₁), 123.0 (N-CH=C), 2 x 128.1 (2 x Ar-C₂, C₆), 146.2 (N-CH=C), 159.4 (Ar-C₄), 172.8 (COO) ppm. MS (ESI⁺): m/z = 628,6 ([MNa⁺], 100 %). HRMS (ESI⁺): m/z za C₂₈H₃₆N₃O₁₂ ([MH⁺]) izračunano 606,230, izmerjeno 606,231.

Spojina 13:

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃), 2.08-2.15 (m, 2H, ArOCH₂CH₂CH₂), 2.55 (t, J = 7.3 Hz, 2H, ArOCH₂CH₂CH₂), 3.36-3.41 (m, 1H, H-5), 3.76-3.81 (m, 3H, H-4, H-6_A), 3.87 (dd, J = 12.1 Hz, J = 2.6 Hz, 1H, H-6_B), 4.08 (t, J = 6.2 Hz, 2H, ArOCH₂), 4.12 (dd, J = 8.5 Hz, J = 3.5 Hz, 1H, H-3), 4.16 (q, J = 7.1 Hz, 2H, COOCH₂CH₃), 4.75-4.77 (m, 1H, H-2), 6.07 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H-1), 7.02 (d, J = 6.8 Hz, 2H, Ar-H_A), 7.77 (d, J = 6.8 Hz, 2H, Ar-H_B), 8.42 (s, 1H, C₂N₃H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ = 25.0 (Ar-OCH₂CH₂), 33.3 (CH₂COO), 60.6, 67.1, 67.6, 71.2, 78.3, 85.8 (6 x Man-C), 68.1 (Ar-OCH₂), 2 x 114.9 (2 x Ar-C₃, C₅), 120.1 (Ar-C₁), 124.9 (N-CH=C), 2 x 128.1 (2 x Ar-C₂, C₆), 146.2 (N-CH=C), 158.4 (Ar-C₄), 174.4 (COO) ppm. MS (ESI⁺): m/z = 460,42 ([MNa⁺], 100%). HRMS (ESI⁻): m/z za C₂₀H₂₆N₃O₈ ([MH⁻]) izračunano 436,172, izmerjeno 436,173. IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3372, 2895, 1731, 1612, 1504, 1415, 1374, 1277, 1256, 1188, 1115, 1074, 1041, 1020, 972, 848, 815, 799, 678, 534, 520.

Spojina 14:

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 1.89-1.96 (m, 2H, ArOCH₂CH₂CH₂), 2.23 (t, J = 7.4 Hz, 2H, ArOCH₂CH₂CH₂), 3.22-3.27 (m, 1H, H-5), 3.67-3.76 (m, 3H, H-4, H-6_A, H-6_B), 3.98 (t, J = 6.2 Hz, 2H, ArOCH₂), 4.07 (dd, J = 8.7 Hz, 3.5 Hz, 1H, H-3), 4.71-4.72 (m,

1H, H-2), 5.99 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-1), 6.96 (d, J = 6.8 Hz, 2H, Ar-H_A), 7.61 (d, J = 6.8 Hz, 2H, Ar-H_B), 8.23 (s, 1H, C₂N₃H) ppm. MS (ESI-): m/z = 430,4 ([MH⁻], 100%). HRMS (ESI-): m/z za C₂₈H₂₂N₃O₈ ([MNa⁻]) izračunano 408,141, izmerjeno 408,140. IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3103, 2933, 1551, 1405, 1379, 1306, 1245, 1116, 1107, 1083 1068, 1045, 1024, 976, 891, 817, 805, 682, 647, 608, 531.

Spojina 15:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.69 (t, J = 5.3 Hz, 1H, OH), δ = 2.06 (p, J = 6.0 Hz, 2H, ArOCH₂CH₂), δ = 3.88 (q, J = 5.8 Hz, 2H, CH₂CH₂OH), δ = 4.11 (t, J = 6.0 Hz, 2H, ArOCH₂), δ = 6.71 (d, J = 9.0 Hz, 2H, Ar-H_A), δ 7.57 (d, J = 9.0 Hz, 2H, Ar-H_B) ppm.

Spojina 16:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.87 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH₂COOH), δ = 4.24 (t, J = 6.3 Hz, 2H, ArOCH₂), δ = 6.71 (d, J = 9.0 Hz, 2H, Ar-H_A), δ = 7.58 (d, J = 9.0 Hz, 2H, Ar-H_B) ppm. MS (ESI-): m/z = 290,88 ([MH⁻], 100%).

Spojina 17:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.30 (t, J = 7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃), δ = 2.80 (t, J = 6.4 Hz, 2H, CH₂COO), δ = 4.18 – 4.25 (t,q, J = 6.3 Hz, J = 7.1 Hz, 4H, ArOCH₂, COOCH₂), δ = 6.71 (d, J = 9.0 Hz, 2H, Ar-H_A), δ = 7.57 (d, J = 9.0 Hz, 2H, Ar-H_B) ppm. MS (ESI+) : m/z = 342,13 ([MNa⁺], 100%).

Spojina 19:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.30 (t, J = 7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃), δ = 2.81 (t, J = 6.4 Hz, 2H, CH₂COO), δ = 3.02 (s, 1H, Ar-C \equiv CH), δ = 4.21 (q, J = 7.1 Hz, 2H, COOCH₂), δ = 4.27 (t, J = 6.3 Hz, 2H, ArOCH₂), δ = 6.87 (d, J = 9.0 Hz, 2H, Ar-H_A), δ = 7.44 (d, J = 9.0 Hz, 2H, Ar-H_B) ppm. MS (ESI+): m/z = 592.2 ([MH⁺], 100%)