

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA VENDRAMIN

**MAGISTRSKA NALOGA**

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA D-MANOZIDOV KOT  
POTENCIALNIH ANTAGONISTOV LEKTINA FimH**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA VENDRAMIN

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA D-MANOZIDOV KOT  
POTENCIALNIH ANTAGONISTOV LEKTINA FimH**

**DESIGN AND SYTHESIS OF D-MANNOSIDES AS  
POTENTIAL ANTAGONISTS OF FimH LECTIN  
RECEPTOR**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo in na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani. Biološko testiranje je bilo opravljeno na Institute of Molecular Pharmacy, Pharmacenter, Univerza v Baslu v Švici in na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm., za pomoč, nasvete in veliko mero potrpežljivosti pri delu v laboratoriju in pri pisanju magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi moji družini in vsem, ki so me spremljali in podpirali na poti do konca študija.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr.

Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

Katja Vendramin

Ljubljana, 2016

## VSEBINA

<b>POVZETEK</b> .....	IV
<b>ABSTRACT</b> .....	V
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	VI
<b>1 UVOD</b> .....	1
1.1 PATOGENEZA OKUŽBE SEČIL .....	1
1.2 ANTI-ADHEZIVNA TERAPIJA .....	2
1.3 FIMBRIJE TIPA 1 .....	3
1.4 LEKTIN FimH .....	4
1.4.1 Struktura FimH .....	7
1.5 ANTAGONISTI LEKTINA FimH .....	10
1.5.1 Selektivnost in lastnosti antagonistov FimH .....	10
1.5.2 Terapevtska uporaba antagonistov FimH .....	12
1.6 ANTAGONISTI LEKTINA DC-SIGN .....	13
<b>2 NAČRT DELA</b> .....	14
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	16
3.1 MATERIALI .....	16
3.2 METODE .....	16
3.2.1 Kromatografske metode .....	16
3.2.2 Spektroskopske metode .....	16
3.2.3 Temperatura tališča .....	17
3.2.4 Poimenovanje in risanje struktur .....	17
3.2.5 Biološko testiranje .....	17
<b>4 EKSPERIMENTALNO DELO</b> .....	19
4.1 Sinteza metil- $\alpha$ -D-manopiranozida .....	19
4.2 Sinteza metil-2,3,4,6-(tetra- <i>O</i> -benzil)- $\alpha$ -D-manopiranozida .....	20
4.3 Sinteza 3-(tetra- <i>O</i> -benzil- $\alpha$ -D-manopiranozil)propena .....	21
4.4 Sinteza 1',2'-epoksi-3'-(tetra- <i>O</i> -benzil- $\alpha$ -D-manopiranozil)propana .....	22
4.5 Sinteza metil 6-(2-hidroksi-3-(tetra- <i>O</i> -benzil- $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi-2-naftolata .....	24
4.6 Sinteza metil 6-(2-hidroksi-3-( $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftolata .....	25
4.7 Sinteza 6-(2-hidroksi-3-( $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftalenske kisline .....	26

4.8 Sinteza metil 6-(2-pentiloksi-3-(tetra- <i>O</i> -benzil- $\alpha$ -D-manopiranozil) propoksi)-2-naftolata .....	28
4.9 Sinteza pentil 6-(2-hidroksi-3-( $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftolata .....	30
4.9.1 Sinteza pentil 6-(2-hidroksi-3-(tetra- <i>O</i> -benzil- $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftolata.....	30
4.9.2 Sinteza pentil 6-(2-hidroksi-3-( $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftolata.....	31
4.10 Sinteza pentil 6-(2-pentiloksi-3-(tetra- <i>O</i> -benzil- $\alpha$ -D-manopiranozil) propoksi)-2-naftolata .....	33
4.11 Sinteza pentil 6-(2-pentiloksi-3-( $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftolata.....	34
4.12 Sinteza 6-(2-pentiloksi-3-( $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftalenske kisline .....	35
4.12.1 Hidroliza zmesi spojin 8 in 11.....	35
4.12.2 Sinteza 6-(2-pentiloksi-3-(tetra- <i>O</i> -benzil- $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftalenske kisline .....	36
4.12.3 Sinteza 6-(2-pentiloksi-3-( $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftalenske kisline .....	37
<b>5 REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	39
5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV .....	39
5.1.1 Sinteza <i>O</i> -glikozida in zaščita hidroksilnih skupin .....	39
5.1.2 Sinteza <i>C</i> -glikozida .....	41
5.1.3 Sinteza epoksida.....	42
5.1.4 Sinteza naftolata .....	43
5.1.5 Vezava alkilne verige .....	44
5.1.6 Alkalna hidroliza .....	45
5.1.7 Katalitsko hidrogeniranje .....	46
5.2 REZULTATI BIOLOŠKEGA VREDNOTENJA .....	48
5.2.1 FimH.....	48
5.2.2 DC-SIGN.....	50
<b>6 SKLEP</b> .....	51
<b>7 VIRI</b> .....	52

## POVZETEK

Med najpogostejše bakterijske okužbe spadajo okužbe sečil, ki jih v večini primerov povzročajo uropatogeni sevi bakterije *Escherichia coli* (UPEC). Predpogoj za infekcijo mehurja je adhezija UPEC na površino uroepitelijskih celic, zato imajo bakterije adhezivne organele imenovane fimbrije tipa 1. Na konici fimbrije tipa 1 se nahaja bakterijski adhezin FimH, ki se specifično veže na manozilirane glikoproteine na površini celic gostitelja. Antagonisti lektina FimH preprečujejo bakterijsko adhezijo in s tem nastanek okužbe, zato so lahko alternativa antibiotikom pri preprečevanju in zdravljenju cistitisa.

Pri našem delu smo načrtovali nove potencialne antagoniste FimH na osnovi znane kristalne strukture vezavnega mesta na lektinu, selektivnega za manozo. Sintetizirali smo  $\alpha$ -D-manopiranozide z aromatskim aglikonom, ki tvori hidrofobne interakcije s strukturo vezavnega mesta imenovano tirozinska vrata. Izbrali smo naftalenski aromatski sistem in z namenom optimizacije interakcij z vezavnim mestom uvedli različne funkcionalne skupine, vključno z daljšo alkilno verigo. Aglikon smo povezali s sladkorno enoto s C-glikozidno vezjo, ker je hidrolitsko stabilnejša v primerjavi z O-glikozidno vezjo. Ker je sinteza takšne vezi zahtevnejša, ni veliko znanih C-manoziliranih antagonistov ali podatkov o njihovi afiniteti vezave s FimH. Končnim spojinam smo določili antagonistično aktivnost na lektinu FimH. Vse spojine so se vezale na FimH, največjo afiniteto je izkazovala 6-(2-pentiloksi-3-( $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftalenska kislina (spojina **14**).

Za D-manozide je znano, da izkazujejo antagonistično aktivnost tudi na človeškem lektinu DC-SIGN (za dendrične celice specifičen, medcelično adhezijsko molekulo-3-vezoči ne-integrin), ki se nahaja na dendritičnih celicah, zato smo sintetiziranim spojinam ovrednotili vezavno afiniteto tudi na tem lektinu. Rezultati testiranja so pokazali, da ima pentil 6-(2-hidroksi-3-( $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftolat (spojina **10**) potencial uporabe tudi v preprečevanju okužbe z virusom HIV-1.

**Ključne besede:**  $\alpha$ -D-manopiranozidi, C-glikozidna vez, antagonisti DC-SIGN, antagonisti FimH, uropatogena *Escherichia coli* (UPEC)

## ABSTRACT

Urinary tract infections are one of the most common bacterial infections and are mostly caused by the uropathogenic strains of *Escherichia coli* (UPEC). A prerequisite for the bladder infection is the adhesion of UPEC on the urothelium cell surface. For this reason the bacteria have adhesive organelles on its surface called type 1 pili. On the tip of type 1 pili the bacterial adhesin molecule FimH is located, which binds specifically mannosylated glycoproteins on the host cell surface. FimH antagonists prevent bacterial adhesion and infection occurrence, thus they can be an alternative to antibiotics use in cystitis prevention and therapy.

In our work we designed new potential FimH antagonists using the known crystal structure of the carbohydrate-specific binding site on the FimH lectin. We synthesized a series of  $\alpha$ -D-mannopyranosides with an aromatic aglycone, which forms hydrophobic interactions with the binding site feature called the tyrosine gate. A naphthalene ring was selected as the core of the aglycon, and in order to optimize the interactions with the binding site, various functional groups were introduced, including a longer alkyl group. Aglycons were linked with the sugar moiety via C-glycosidic bond, which has greater hydrolytic stability than the O-glycosidic bond. Since the synthesis of C-glycosides is more complex, there are not many C-mannosylated FimH antagonists known nor there is information on their binding affinity to FimH. FimH antagonistic activity of the final compounds was evaluated and showed that all of the compounds were able to bind FimH, but the 6-(2-pentyloxy-3-( $\alpha$ -D-mannopyranosyl)propoxy)-2-naphthoic acid (compound **14**) displayed the highest binding affinity.

D-mannosides are also known to possess antagonistic activity on human lectin called dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN), which is located on dendritic cells. Therefore, the binding affinity of our compounds on this lectin was also determined. Results of the assay have shown that pentyl 6-(2-hydroxy-3-( $\alpha$ -D-mannopyranosyl)propoxy)-2-naphthoate (compound **10**) has a potential use in the HIV-1 infection prophylaxis.

**Keywords:**  $\alpha$ -D-mannopyranosides, C-glycosidic bond, DC-SIGN antagonists, FimH antagonists, uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>AIEC</b>	adherentno-invazivna <i>Escherichia coli</i>
<b>BSA</b>	<i>angl.</i> bovine serum albumine; goveji serumski albumin
<b>cAMP</b>	ciklični adenozinmonofosfat
<b>CEACAM6</b>	<i>angl.</i> carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6; karcinoembrionalna antigenu sorodna celična adhezijska molekula 6
<b>CRD</b>	<i>angl.</i> carbohydrate recognition domain; domena za prepoznavo ogljikovih hidratov
<b>DC-SIGN</b>	<i>angl.</i> dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin; za dendritske celice specifičen, medcelično adhezijsko molekulo-3-vezoči ne-integrin
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -dimetilformamid
<b>DMSO</b>	dimetilsulfoksid
<b>EtOH</b>	etanol
<b>HEPES</b>	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
<b>HIV-1</b>	<i>angl.</i> human immunodeficiency virus; virus humane imunske pomanjkljivosti
<b>HRMS</b>	<i>angl.</i> high resolution mass spectrometry; masna spektrometrija visoke ločljivosti
<b>IL</b>	interlevkin
<b>IR (ATR)</b>	<i>angl.</i> attenuated total reflection infrared spectroscopy; infrardeča spektroskopija s tehniko oslabiljenega popolnega odboja
<b>mCPBA</b>	<i>meta</i> -kloroperoskibenzojska kislina
<b>MeOH</b>	metanol
<b>MF</b>	mobilna faza
<b>NMR</b>	<i>angl.</i> nuclear magnetic resonance; jedrska magnetna resonanca
<b>THF</b>	tetrahidrofuran
<b>TLC</b>	<i>angl.</i> thin layer chromatography; tankoplastna kromatografija
<b>TLR-4</b>	<i>angl.</i> Toll-like receptor 4; toll-u podobni receptor 4
<b>TMSOTf</b>	trimetilsilil trifluorometansulfonat



**TNF $\alpha$**

**UPEC**



tumor nekrotizirajoči faktor  $\alpha$

uropatogena *Escherichia coli*

## 1 UVOD

Okužbe sečil spadajo med najbolj razširjene bakterijske okužbe, za katerimi vsako leto zboli na milijone ljudi po vsem svetu. Nezapletena vnetja sečil se pojavijo pri zdravem gostitelju brez strukturnih ali funkcijskih nenormalnosti sečil. Ločimo okužbe spodnjih sečil (cistitis), ki se lahko razširijo v resnejšo okužbo zgornjih sečil (pielonefritis). Okužbe so pogostejše pri ženskah, saj jih je znotraj ženske populacije polovica okuženih vsaj enkrat v življenju, zlasti do 10. leta starosti in med 20. ter 40. letom. Simptomi se ponovno pojavijo pri 20 do 30% primerov v okviru dveh tednov do nekaj mesecev po primarni okužbi in 1 od 20 pacientov ima kronično obliko. Zaradi ponavljajoče se narave okužbe in vedno večje rezistence bakterij proti obstoječim protibakterijskim učinkovinam je nujno iskanje alternativnih in učinkovitejših pristopov k zdravljenju. Potrebno je tudi iskanje učinkovin za samo preprečevanje okužb, kar je pomembno predvsem v bolnišničnem okolju, kjer 20-40% vseh bolnišničnih okužb predstavljajo ravno vnetja sečil, zlasti pri pacientih z urinskim katetrom. Neprimerno zdravljena okužba pri hospitaliziranih pacientih se namreč lahko razvije v zelo nevarno sistemske okužbo ali urosepso (1-4).

### 1.1 PATOGENEZA OKUŽBE SEČIL

Okužba sečil se običajno začne z naselitvijo sečnice z uropatogenimi bakterijami, ki izhajajo iz črevesne mikroflore. Bakterije se nato ascendetno širijo iz sečnice v mehur, kjer povzročajo cistitis. Nezdravljena okužba se lahko širi naprej po sečevodu do ledvic, kjer nastane pielonefritis. Ženske so zaradi anatomskih razlik med spoloma bolj dovzetne za okužbo kot moški. Pri ženskah je namreč razdalja med anusom in sečnico krajša, zato je prenos bakterij iz črevesja pogostejši. Poleg tega je območje vulve vlažno in ugodno za rast bakterij. Cistitis spremljajo značilni klinični znaki, kot so pogosto, pekoče ali boleče uriniranje, bolečine v področju mehurja, bakteriurija, levkociturija in/ali hematourija. Če te simptome spremljajo še povišana telesna temperatura, mrzlica, slabo počutje, bruhanje in ledvene bolečine, ima bolnik pielonefritis (2, 5).

Predpogoj za nastanek okužbe oz. kolonizacijo površine sluznic sečil in razmnoževanje bakterij je adhezija na površino gostiteljevih celic urotelija. Ta namreč preprečuje, da bi pretok urina odstranil bakterije s sluznice. Mikroorganizmi so za zaščito pred takšnimi obrambnimi mehanizmi gostitelja na svoji površini razvili posebno skupino struktur, ki jim omogočajo adhezijo na gostiteljeve celice in tkiva. Začetna bakterijska

adhezija se nato stopnjuje v razvoj večje in dobro organizirane strukture – biofilma. Problem predstavlja tudi nastanek bakterijskega biofilma na površini implantatov in medicinskih pripomočkov, kot v primeru urinskih katetrov, kar bistveno pripomore k patogenezi okužb povezanih s kateterizacijo (6, 7).

Med povzročitelji okužbe sečil so najpomembnejši uropatogeni sevi bakterije *Escherichia coli* (UPEC), ki povzročajo od 70 do 95% vseh primerov akutnih, nezapletenih okužb sečil in so zato tudi najpomembnejša tarča zdravljenja in razvoja novih učinkovin. *Escherichia coli* je gramnegativni fakultativno anaerobni bacil iz družine enterobakterij. Nevirulentni sevi so del normalne črevesne flore, virulentni sevi pa so povzročitelji okužb prebavil, sečil in dihal ter sistemskih okužb, kot sta sepsa ali meningitis pri novorojenčkih. Drugi možni patogeni so *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* in *Staphylococcus saprophyticus*, redko povzročajo okužbe sečil druge vrste bakterij, glive, virusi ali paraziti. UPEC so tudi najpogostejši vzrok za zapletene okužbe, ki so povezane z anatomskimi anomalijami sečil ali kateterizacijo, ampak je v tem primeru spekter možnih povzročiteljev širši (2, 5, 8).

## 1.2 ANTI-ADHEZIVNA TERAPIJA

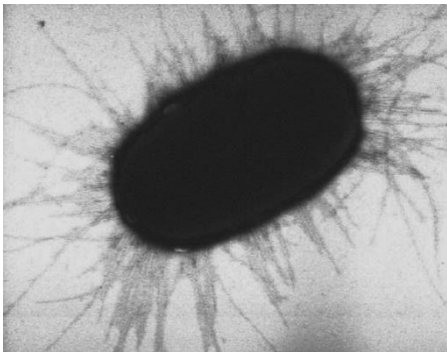
Za zdravljenje cistitisa se uporabljajo peroralne protibakterijske učinkovine: nitrofurantoin, kombinacija trimetoprima in sulfametoksazola ter fluorokinoloni – predvsem norfloksacin. Pri uporabi nitrofurantoina je najmanjša možnost pojava odpornosti, ampak ga odsvetujejo pri začetnem pielonefritisu. Bakterijska rezistenca proti trimetoprimu/sulfametoksazolu narašča predvsem pri starejši populaciji in pri okužbah, ki se pojavijo v bolnišnicah. Stopnja odpornosti proti fluorokinolonom je ocenjena na manj kot 10%, ampak tudi ta narašča, in učinkovini ciprofloksacin in levofloksacin sta omejeni na uporabo pri pielonefritisu. Hitro širjenje odpornih sevov UPEC je posledica tega, da se okužba pogosto ponavlja ali celo postane kronična, s čimer se podaljša čas izpostavljenosti protibakterijski učinkovini ter se tako lahko rezistenca enostavno prenaša z bakterije na bakterijo preko plazmidov. Pri ponavljajočem se cistitisu in pri pacientih v bolnišnicah je zato potrebno iskati alternativne pristope predvsem za preprečevanje okužbe (5).

V preteklosti so razvijali predvsem učinkovine s selektivno toksičnostjo z namenom neposrednega baktericidnega ali bakteriostatičnega učinka, ampak se danes iščejo novi učinkovitejši pristopi zaradi prej omenjene odpornosti proti protibakterijskim

učinkovinam. Zelo obetavna strategija je preprečevanje pritrjevanja bakterij na specifična tkiva gostitelja ali anti-adhezivna terapija. Učinkovine z anti-adhezivnim delovanjem nimajo vpliva na encimske tarče klasičnih protibakterijskih učinkovin, vendar imajo lahko širok spekter uporabe, ker se številne bakterije, virusi in bakterijski toksini vežejo in vdrejo v celico preko sladkornih enot na celični površini. Pri takšni strategiji je manj verjeten pojav rezistence kot pri protibakterijskih učinkovinah, ker zaviranje adhezije ne povzroča selekcijskega pritiska in bi mutacija adhezina vplivala na sposobnost vezave patogena na receptor gostitelja, kar bi posledično spremenilo samo virulenco bakterije. Bakterijski površinski lektini, ki se vežejo na glikolizirane proteine gostitelja, so najpogostejše adhezijske molekule in virulentni faktorji. Lektini imajo visoko specifičnost vezave glede na adhezin oz. glede na tarčno tkivo. Na površini UPEC se nahaja več fimbrijskih lektinov, od katerih je najpomembnejši FimH na fimbrijah tipa 1, ki je tudi primerna tarča za načrtovanje antagonistov, ki bi se lahko uporabljali v terapiji okužb sečil (9, 10).

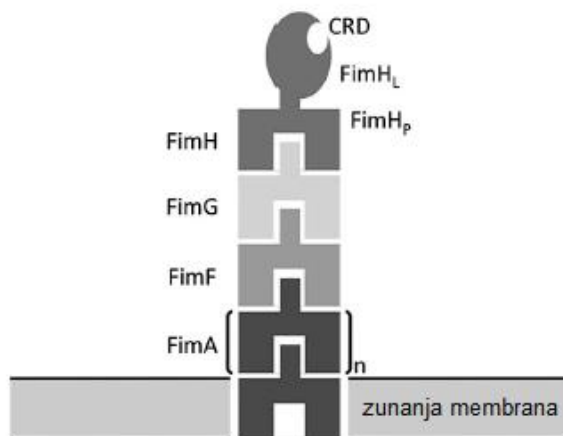
### 1.3 FIMBRIJE TIPA 1

Bakterije se zaščitijo pred mehanskimi obrambnimi mehanizmi organizma gostitelja, tako da se specifično pritrjujejo na ogljikove hidrate, ki so del glikoproteinov ali glikolipidov na površini celic gostitelja. Pritrditev omogočajo številne proteinske nitaste strukture na površini bakterijske celice, ki jih imenujemo fimbrije ali pilusi. Na površini UPEC je prisotnih več vrst fimbrij, od katerih so najštevilčnejše fimbrije tipa 1, ki so tudi specifičen virulentni dejavnik. Fimbrije so prisotne na vsaj 90% vseh znanih sevov UPEC in na bakterijski celici jih je okrog 100-400 enakomerno razporejenih po celotni površini (**Slika 1**). Dolžina fimbrije variira med 0,1 in 0,2  $\mu\text{m}$  in njena širina je približno 7 nm. Poleg tega, da so fimbrije tipa 1 adhezivni organel za pritrnitev na celice urotelija, spodbujajo tudi nevtrofilce in njihovo fagocitotno aktivnost, kar vodi v razvoj močnejšega vnetnega odgovora in posledično lahko pride do razvoja fibroze po vnetju (2, 6, 7).



**Slika 1.** Enakomerno razporejene fimbrije na površini *E. coli* (11).

Vlakno fimbrije tipa 1 sestavljajo različni proteini imenovani Fim, ki so vezani eden na drugega (**Slika 2**). Struktura v obliki filameta je pritrjena na bakterijsko membrano z več podenotami FimA, na katere so potem vezani ostali proteini. Najpomembnejši je lektin FimH na konici fimbrije, ker je adhezin, s katerim se bakterija veže na podlago (7).



**Slika 2.** Struktura fimbrije tipa 1 je sestavljena iz proteinov Fim. Lektin FimH na konici fimbrije je sestavljen iz fimbrijske in lektinske domene, na kateri se nahaja CRD. Prirejeno po (7).

#### 1.4 LEKTIN FimH

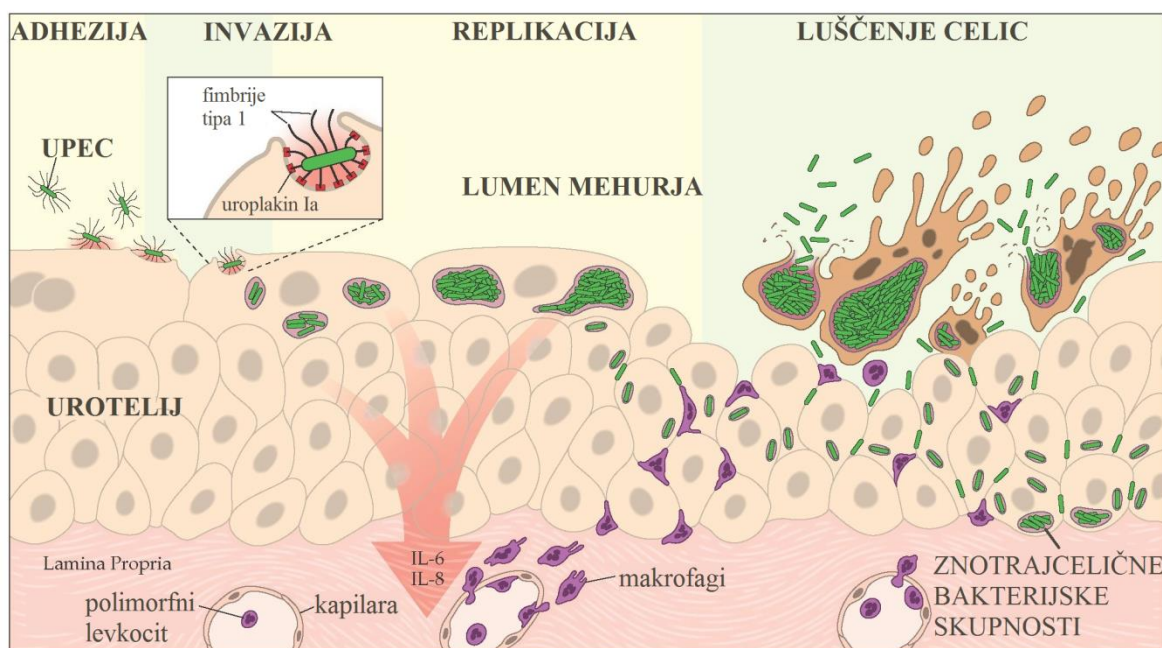
Lektini so proteini, ki se vežejo v kompleks s specifičnimi ogljikovimi hidrati. Najprej so odkrili rastlinske lektine, ki povzročajo aglutinacijo eritrocitov, kasneje so odkrili enake sposobnosti pri drugih organizmih, zlasti pri enterobakterijah. Lektine klasificiramo na podlagi strukturnih lastnosti, predvsem glede na domeno za prepoznavo ogljikovih hidratov (angl. carbohydrate recognition domain – CRD), ki se prilega specifičnemu saharidu (7).

Na konici fimbrije tipa 1 *E. coli* se nahaja lektin FimH, ki izkazuje specifičnost za  $\alpha$ -D-manozide in ima pomembno vlogo v patogenezi cistitisa, saj je vpleten v celotno

kaskado bakterijske adhezije in sledeče invazije (**Slika 3**), močnega imunskega odziva in pri pojavu kroničnih oblik okužbe, zato je tudi primerna tarča za razvoj novih učinkovin. FimH se preko lektinske domene veže na terminalne manozilirane enote uroplakina Ia. Uroplakini so proteinske podenote sestavnih delcev dvodimenzionalne kristalne strukture imenovane urotelijski plaki, ki pokrivajo več kot 90% luminalne površine dežnikastih celic urotelija. FimH se selektivno veže na sladkorne enote uroplakina Ia z zmerno afiniteto, saj je vrednost disociacijske konstante okrog 100 nM, vendar se UPEC lahko veže na eno gostiteljsko celico s 100 do 200 fimbrijami in tako poveča avidnost in stabilnost vezave. Kompleks FimH-uroplakin Ia se *in vitro* lahko tvori v širokem razponu pH vrednosti od 4 do 9, zato sprememba pH urina verjetno nima vpliva na adhezijo. So pa v urinu prisotni polisaharidi in glikoproteini, kot npr. uromodulin, ki delujejo kot naravni obrambni mehanizmi za preprečevanje adhezije UPEC (12). Na površini celic imajo bakterije idealno okolje za življenje, ker urotelijske celice vzdržujejo konstantno pH vrednost in koncentracijo soli, poleg tega je prisotnih dovolj hranil, ki jih bakterije izkoriščajo. Po uspešni adheziji in pri idealnih pogojih pride do povezovanja UPEC tesno skupaj v razvoj biofilma na površini. Biofilm olajša čvrsto ireverzibilno adhezijo UPEC na površino, poleg tega omogoča vključevanje drugih vrst bakterij, ki proizvajajo sluz iz zunajceličnih polisaharidov za ohranjanje strukture. Plast sluzi omogoča kemijsko komunikacijo in usklajevanje med bakterijami (3, 7, 13).

FimH sodeluje še pri vdoru bakterij v celice mehurja in mastocite, pri sprožitvi apoptoze in luščenja celic (**Slika 3**) ter pri povečanju koncentracije cAMP. Lektin prepozna tudi oligosaharide na integrinih  $\alpha_3\beta_1$ , ki so izraženi po celotnem uroteliju (13). Z adhezijo se sproži več odgovorov gostiteljske celice, kot so aktivacija kinaz in adaptorskih proteinov, kar vodi v lokalno reorganizacijo aktinskega citoskeleta celice in bakterija se pogrezne vanjo (12). Po vdoru UPEC se preko receptorjev TLR-4 (Toll-u podobni receptor 4) aktivirajo mehanizmi pridobljene imunosti in se jih celice mehurja znebijo z eksocitozo. Temu procesu se bakterije izognejo tako, da se umaknejo v citoplazmo celic gostitelja, kjer se hitro namnožijo in povežejo v goste znotrajcelične bakterijske skupnosti (**Slika 3**). Za tvorbo skupnosti nekaj deset tisoč UPEC je dovolj, da v celico vdre le ena bakterija. Bakterije so v takšnih kolonijah povezane skupaj v strukturo podobno biofilmu, ki nastane po mehanizmu, pri katerem sodeluje tudi FimH. Nato se UPEC iz intracelularnih skupnosti razpršijo v lumen mehurja, kjer ponovijo proces vezave in vdora v sosednje celice

urotelija. Na takšen način lahko tvorijo tudi v subepitelijskem tkivu znotrajcelične rezervoarje bakterij v mirovanju, ki so odporne proti imunski obrambi gostitelja in zdravljenju s protibakterijskimi učinkovinami. Bakterije tako ostanejo v mehurju in se lahko nekaj tednov po zdravljenju spet aktivirajo in povzročijo reinfekcijo. S tem se razjasni ponavljajoča narava cistitisa pri nekaterih bolnikih. Tarčni zaviralci adhezije preko lektina FimH, ki bi tako zaustavili vdor UPEC in nastanek biofilma, imajo velik potencial terapevtske uporabe za profilakso in zdravljenje cistitisa kot tudi za preprečevanje širjenja vnetja in ponovitve okužbe (3, 13, 14).

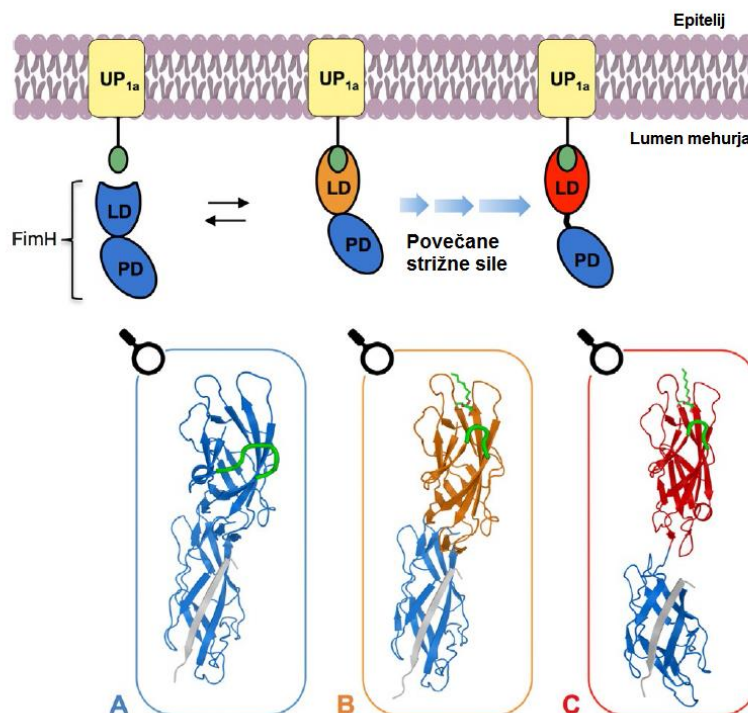


**Slika 3.** UPEC se pripne na površino dežnikastih celic urotelija preko interakcije FimH na konici fimbrij tipa 1 z uroplakinom Ia. Po adheziji se sproži več procesov od vstopa bakterij v celice do sprožitve imunskega odziva gostitelja, tako da se prične sproščati citokini, kot npr. IL-6 (interlevkin-6) in IL-8 (interlevkin-8), in se mobilizirajo makrofagi. Znotraj gostiteljskih celic se bakterije hitro namnožijo in po apoptozi celic urotelija razpršijo v lumen in okužijo sosednje celice. V subepitelijskem tkivu tvori UPEC znotrajcelične bakterijske skupnosti v mirovanju, ki lahko sprožijo reinfekcijo več tednov po primarni okužbi. Prirejeno po (15).

### 1.4.1 Struktura FimH

FimH je protein velikosti 29 kDa z 279 aminokislinskimi ostanki, ki ga običajno kristaliziramo v kompleksu z drugim proteinom, običajno s FimC, ker v nasprotnem primeru manjka en sklop za zaključek zvijanja proteina, hkrati pa lahko pride tudi do njegove proteolitične razgradnje, če se izraža kot samostojna enota. Sestavljen je iz dveh domen, podobno kot imunoglobulini, in sicer iz C-končne fimbrijske domene ali domene pilusa – FimH<sub>P</sub> in N-končne lektinske domene – FimH<sub>L</sub>. Na konici FimH<sub>L</sub>, ki zajema aminokislinske ostanke 1-156, se nahaja edina CRD, ki je razvidna iz kristalne strukture proteina. Preko CRD se lektin veže na oligomanozidne ostanke glikoproteinov na površini gostiteljevih celic, in ker je CRD samo ena, je FimH monovalentni adhezin. Ker je CRD prisotna na tej domeni, se testiranje antagonističnega delovanja *in vitro* lahko izvaja zgolj na rekombinantni FimH<sub>L</sub>. Kratka veriga povezuje FimH<sub>L</sub> s FimH<sub>P</sub>, ki je sestavljen iz preostalih aminokislinskih ostankov 160-279 in povezuje lektin s fimbrijo (4, 7, 16). Interakcije med domenama določajo konformacijsko stanje FimH in uravnavajo afiniteto vezave na manozne ostanke. Konformacijske spremembe se širijo iz manjšega območja med domenama do vezavnega mesta z dinamično alosterijo, ki se kaže kot modifikacija v dinamiki proteina. Ko v sečilih ni pretoka, je FimH v svoji nativni konformaciji z nizko afiniteto do manoze in je v ravnotežju s konformacijo s srednjo afiniteto, ki se vzpostavi med vezavo na manozilirane dele uroplakina Ia. Te interakcije so kratkoročne. Ko se poveča pretok urina, strižne sile inducirajo konformacijsko spremembo v stanje z visoko afiniteto in tako se bakterije bolj čvrsto vežejo na uroplakin Ia (**Slika 4**). V konformaciji z visoko afiniteto tvori FimH globok, ozek in negativno nabit žep, v nasprotju z lektini sesalcev, ki imajo plitva vezavna mesta. S tem mehanizmom se lahko UPEC zoperstavi mehanskemu stresu, ki nastane ob mikciji (8, 16).

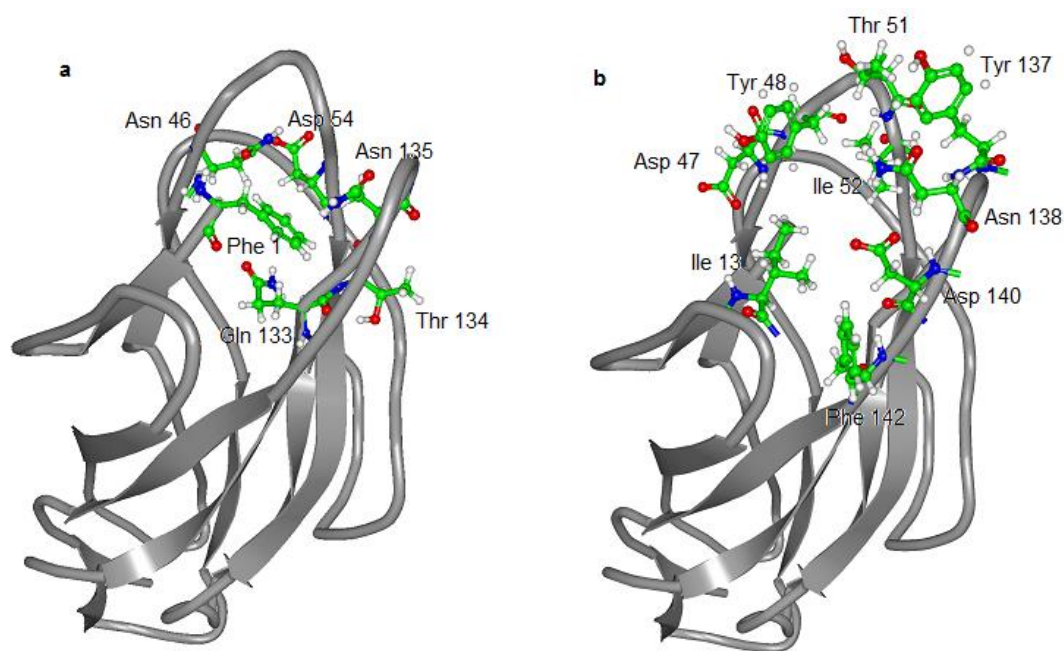




**Slika 4.** Shematski prikaz sestavljanja kompleksa FimH-uroplakin Ia (UP<sub>1a</sub>). V okvirčkih so prikazane kristalne strukture FimH pri posamezni interakciji. LD-lektinska domena; PD-domena pilusa. **A)** FimH je v konformaciji z nizko afiniteto, ko ni pretoka urina. Vezavni žep je odprt in domeni sta prepleteni med sabo. **B)** FimH v konformaciji s srednjo afiniteto ob vezavi liganda. Zanka označena z zeleno barvo se zapre čez ligand in tako oblikuje globok vezavni žep. **C)** Ob povečanem pretoku urina se domeni ločita in se inducira stanje z visoko afiniteto. Prirejeno po (16).

Natančno poznavanje kristalne strukture vezavnega mesta nam omogoča racionalno načrtovanje antagonistov z večjo afiniteto vezave v primerjavi z glikoproteini celic gostitelja. CRD izkazuje visoko specifičnost za vezavo  $\alpha$ -D-manopiranozidov. Visoka afiniteta je posledica tega, da  $\alpha$ -D-manopiranoza seže globoko v protein v dobro definiran negativno nabit žep. Tvori se gosta mreža vodikovih vezi med ligandom in proteinom, ki je motena, če ima hidroksilna skupina na mestu 2 monosaharida ekvatorialno konfiguracijo namesto aksialne. Zaradi tega imajo glukoza in drugi monosaharidi z ekvatorialno OH skupino zanemarljivo afiniteto vezave, manosa z aksialno OH skupino pa zelo močno (9). Pomembna je tudi konfiguracija na anomernem ogljikovem atomu, saj  $\beta$ -D-manopiranozidi ne morejo tvoriti kompleksa z lektinom zaradi oblike vezavnega mesta. Šestčlenski obroč manoze se globoko zaseda v žep, kjer se poveže z 10 neposrednimi in dodatnimi posrednimi vodikovimi vezmi, ki nastanejo zaradi prisotnosti vode. Vse hidroksilne

skupine sladkorja, razen skupine na anomernem ogljikovem atomu, ki je povezana z aglikonom, so vpletene v interakciji s CRD, zlasti z aminokislinskimi ostanki Phe1, Asn46, Asp47, Asp54, Gln133, Asn135, Asp140 in Phe142. Žep je obdan s hidrofobnim grebenom, ki zajema aminokislinske ostanke Ile13, Tyr48, Ile52, Tyr137 in Phe142 (**Slika 5**). Stranski verigi Tyr48 in Tyr137 sta nameščeni ob vhodu CRD tako, da tvorita strukturo podobno vratom in iz tega izhaja ime 'tirozinska vrata'. Ta struktura je zelo pomembna, saj se poveže s hidrofobnimi deli naravnih ligandov in tvori  $\pi$ - $\pi$  interakcije z aromatskimi aglikoni manozidnih antagonistov. V primeru, da je aglikon daljša alkilna veriga, kot v primeru *n*-butil  $\alpha$ -D-manopiranozida, se vzpostavijo van der Waalove interakcije s tirozinskimi vrati in z aminokislinskim ostankom Ile52, te interakcije pa se ojačajo s podaljševanjem alkilne verige. Tirozinska vrata so konformacijsko fleksibilna, lahko so v odprti ali zaprti konformaciji v odvisnosti od vezanega liganda, ki tudi spremeni konformacijo ob tvorbi kompleksa z receptorjem. Pojav do sedaj še ni podrobno raziskan, predpostavljajo pa, da ima fleksibilnost tirozinskih vrat funkcijo v selekciji ali organiziranju ogljikovih hidratov za zagotovitev čim bolj optimalne vezave (7).



**Slika 5.** Kristalna struktura CRD-domene lektina FimH; **a)** primarno vezavno mesto z AK-ostanki, ki preko H-vezi vežejo  $\alpha$ -D-manozo, **b)** okolica domene CRD, opredeljena z aminokisljinami, ki tvorijo hidrofobni greben in tirozinska vrata. Prirejeno po (17).

Različni sevi UPEC izkazujejo genetsko variabilnost za FimH in zato imamo fenotipe z različno afiniteto vezave za manozide. Mutacije so omejene predvsem na področje med domenama in s tem na uravnavanje konformacijskih sprememb vezavnega

mesta. Pojav je problematičen predvsem z vidika *in vitro* vrednotenja antagonistične aktivnosti, saj se iščejo bioaktivne spojine proti vsem variacijam FimH, čeprav se v testnih sistemih običajno uporabljata rekombinantni FimH<sub>L</sub> ali FimH v kompleksu s FimC, ki sta oba ujeta v konformacijo z visoko afiniteto. Prav tako se tudi pri celičnih testnih sistemih uporablja fenotip z visoko afiniteto (16).

## 1.5 ANTAGONISTI LEKTINA FimH

Pri razvoju antagonistov sta se uveljavila dva glavna pristopa: sinteza multivalentnih ligandov ali načrtovanje in sinteza manjših monovalentnih ligandov glede na znano kristalno strukturo FimH. Multivalentni antagonisti, kot so npr. manozilirani dendrimeri, v bioloških testnih sistemih izkazujejo visoko afiniteto vezave, čeprav je iz kristalne strukture FimH razvidno, da ima le eno CRD in je zato monovalentni lektin. Visoka učinkovitost teh velikih spojin z več terminalno vezanimi molekulami  $\alpha$ -D-manoze je lahko posledica vezave na dodatna vezavna mesta, ki še niso znana, ali visoke koncentracije manoze v bližini CRD. Čeprav mehanizem močne vezave še ni popolnoma pojasnjen, imajo te spojine velik farmakološki potencial (7). Po drugi strategiji se na osnovi strukture FimH razvijajo  $\alpha$ -D-manopiranozidi z različnimi aglikoni: od preprostih alkilnih verig do različno substituiranih aromatskih sistemov. Vse te spojine pa sledijo modelu načrtovanja glikomimetikov, kjer je osnova monosaharid, ki selektivno poveže ligand z lektinom, medtem ko aglikon, vezan na anomerni ogljikov atom, poveča vezavno afiniteto z dodatnimi interakcijami (9). Danes poznamo že širok nabor *O*- in *N*-manoziliranih antagonistov s hidrofobnim aglikonom, ki izkazujejo mikromolarno do nanomolarno afiniteto v odvisnosti od testnega sistema, vendar so glikozidne vezi s kisikom ali dušikom bolj občutljive na encimsko razgradnjo v primerjavi z vezmi z ogljikom (18).

### 1.5.1 Selektivnost in lastnosti antagonistov FimH

Pri načrtovanju novih učinkovin je zelo pomembna njihova selektivnost za izbrano tarčo v telesu. Vsi znani antagonisti FimH so po strukturi  $\alpha$ -D-manopiranozidi in so tudi potencialni ligandi receptorjev za manozo v človeškem telesu, zato bi neselektivne interakcije lahko povzročile neželene stranske učinke. Receptorji za manozo so pri sesalcih prisotni na različnih tkivih po celem telesu in so vpleteni v številne biološke procese. Večina človeških lektinov, ki vežejo manozo, pripada skupini receptorjev za

prepoznavanje patogenov, ki imajo pomembno vlogo pri imunski obrambi. Ti receptorji se izločajo kot topni plazemski proteini, ali pa se izražajo kot membranski proteini na površini celic imunskega sistema in so vključeni pri aktivaciji signalnih poti pri imunskem odzivu ter pri fagocitozi patogenov. Ker vezava na te receptorje sproži endocitozo, se posledično lahko na tak način zmanjša serumska razpolovna doba učinkovine. S preučevanjem nespecifične vezave antagonistov FimH na druge receptorje so prišli do zaključka, da posledični neželeni stranski učinki ne predstavljajo kritičnega problema pri njihovi terapevtski uporabi. Testirani monovalentni antagonisti FimH z različnimi aglikoni so izkazovali  $10^5$ -kratno manjšo afiniteto za človeške receptorje v primerjavi s FimH in so zato visoko selektivni in varni v širokem koncentracijskem območju. Takšni rezultati so primarno posledica prisotnosti hidrofobnega aglikona, ki omogoča interakcije s tirozinskimi vrati, katera so značilna samo za lektin FimH. Poleg tega predpostavljajo, da imajo monovalentni  $\alpha$ -D-manopiranozidi nizko afiniteto vezave na receptorje pri človeku, ker je pri interakciji receptorja s patogenom pomembna multivalentna predstavitev liganda (19).

Za terapevtsko aplikacijo potencialne učinkovine so pomembne njene fizikalno-kemijske lastnosti, ki vplivajo na njeno farmakokinetiko. Lastnosti spojin izboljšamo s spreminjanjem aglikona, tako da zamenjamo celotni aromatski del ali zgolj določene skupine vezane na obroč. Seveda sladkorni del mora ostati enak zaradi specifičnosti vezave na CRD. Na biološko uporabnost pri peroralni aplikaciji vplivajo topnost učinkovine, permeabilnost skozi membrane v črevesju in stabilnost molekule proti metabolizmu prvega prehoda. Terapevtski odmerek in permeabilnost opredelita minimalno topnost v vodi, ki je potrebna za učinkovito *per os* aplikacijo. Napolarni planarni aglikon vpliva na slabšo topnost antagonistov, ampak se lahko topnost izboljša z uvedbo polarnih substituentov na aromatski obroč. Lipofilnost spojine, ki je definirana z logaritmom vrednosti porazdelitvenega koeficienta v sistemu oktanol-voda oz.  $\log P$ , vpliva na več farmakokinetičnih procesov. Dobro permeabilnost skozi membrane črevesja imajo antagonisti z zmerno lipofilnostjo ( $\log P > 1,6$ ). Večja lipofilnost je običajno povezana tudi z večjo občutljivostjo na metabolizem prvega prehoda, vendar so eksperimentalno določili, da imajo antagonisti z aromatskimi substituenti manjšo dovzetnost za metabolno neledvično eliminacijo v primerjavi s spojinami z alkilnimi verigami kot aglikoni. Hitrost eliminacije učinkovine skozi ledvice je odvisna od glomerulne filtracije, tubulne sekrecije

in reabsorpcije. Na glomerulno filtracijo vpliva vezava učinkovine na plazemske proteine, ker večja kot je vezava na proteine v plazmi, počasneje se antagonist izloča v primarni urin in zato se pri razvoju določa tudi ta parameter. Pri antagonistih FimH je zaželena njihova reabsorpcija iz ledvičnega ultrafiltrata, ker se tako vzdržuje minimalna anti-adhezivna koncentracija v mehurju, ki je tarčni organ, za daljši časovni interval. Pri tem ima spet pomembno vlogo lipofilnost, ker se bolj lipofilne učinkovine ( $\log P > 1$ ) počasi in enakomerno izločajo v mehur. Nasprotno je pri bolj hidrofilnih učinkovinah, saj se slabo reabsorbirajo in hitro izločajo, kar vodi do visokih začetnih koncentracijah v urinu in minimalna anti-adhezivna koncentracija se vzdrži le za katek čas (4). Za določitev odmerka je poleg omenjenega odločilna tudi hitrost disociacije kompleksa antagonist-FimH. Počasna disociacija je ugodna za *in vivo* učinkovitost, saj je trajanje farmakološkega učinka daljše, ko je zasedenost tarče podaljšana. Posledično so potrebne nižje koncentracije antagonista za doseganje visoke učinkovitosti in se tako zmanjša tveganje za neželene stranske učinke zaradi nespecifične vezave na druge receptorje (8).

### 1.5.2 Terapevtska uporaba antagonistov FimH

Primarno področje uporabe antagonistov FimH je zdravljenje cistitisa, povzročenega z UPEC. Ker ciljanje bakterijskega lektina ne povzroča bakterijske rezistence in je pojav resnejših neželenih stranskih učinkov malo verjeten, bi se takšne učinkovine lahko uporabljale pri dolgotrajnejših zdravljenjih, kot tudi za samo preprečevanje okužbe, predvsem pri ponavljajočih se oblikah cistitisa in pri pacientih z urinskim katetrom v bolnišnicah. Kombinacija s standardno protibakterijsko terapijo bi lahko bila uspešna strategija pri zdravljenju zapletenih okužb in za preprečevanje ter zdravljenje okužb zgornjih sečil.

Poleg bolezni sečil je možna uporaba antagonistov FimH tudi v terapiji Crohnove bolezni. Crohnova bolezen je kronična vnetna črevesna bolezen, pri kateri je delni vzrok tudi genetska nagnjenost k pretiranemu imunskemu odzivu na črevesno mikrofloro. Pri eni skupini bolnikov so v ileumu prisotne kolonije adherentno-invazivnih sevov *E. coli* (AIEC), ki se preko adhezina FimH pripnejo na manozilirane proteine CEACAM6 (*angl.* 'carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6') na površini črevesnih epitelijskih celic. AIEC ima ključno vlogo pri nastanku vnetja, ker inducira izločanje citokinov in TNF- $\alpha$ . Trenutna terapija Crohnove bolezni je osredotočena na lajšanje simptomov vnetja z imunosupresivi in s protitelesi proti TNF- $\alpha$  ter integrinom, vendar bi

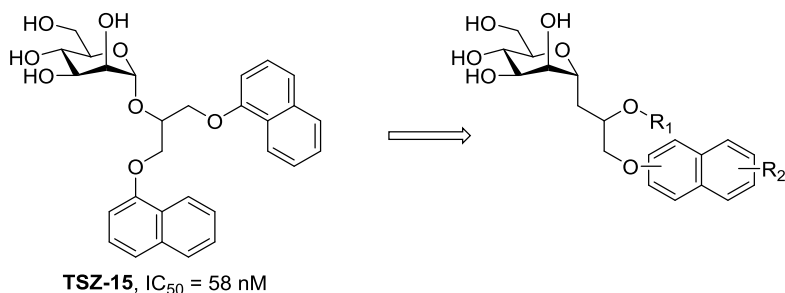
lahko z uvedbo antagonistov FimH v terapijo prepečili adhezijo samega povzročitelja vnetja. Eksperimentalno so že dokazali učinkovitost monovalentnih antagonistov iz skupine tiazomanozidov in heptilmanozidov na mišjih modelih (20, 21, 22).

## 1.6 ANTAGONISTI LEKTINA DC-SIGN

Monovalentni glikomimetiki z  $\alpha$ -D-manozo so učinkoviti tudi kot antagonisti človeškega lektina tipa C DC-SIGN (*angl.* 'dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin'), ki se izraža na dendritičnih celicah in ima različne naloge pri sprožitvi specifičnega imunskega odgovora. Poleg tega je lektin vpleten v začetni korak okužbe z virusom HIV-1, ker poteka endocitoza HIV-1 v nezrele dendritične celice preko vezave virusnega glikoproteina gp120 na DC-SIGN. Del virusov se izogne litični razgradnji in imunski obrambi gostitelja in se vezan na DC-SIGN prenese v celice T CD4<sup>+</sup>, kar vodi do nastanka okužbe. Z uporabo antagonistov DC-SIGN lahko tako preprečimo vstop virusa in sledečo okužbo celic imunskega sistema, zaradi česar imajo manozidi velik potencial uporabe za preprečevanje okužbe s HIV-1 (23).

## 2 NAČRT DELA

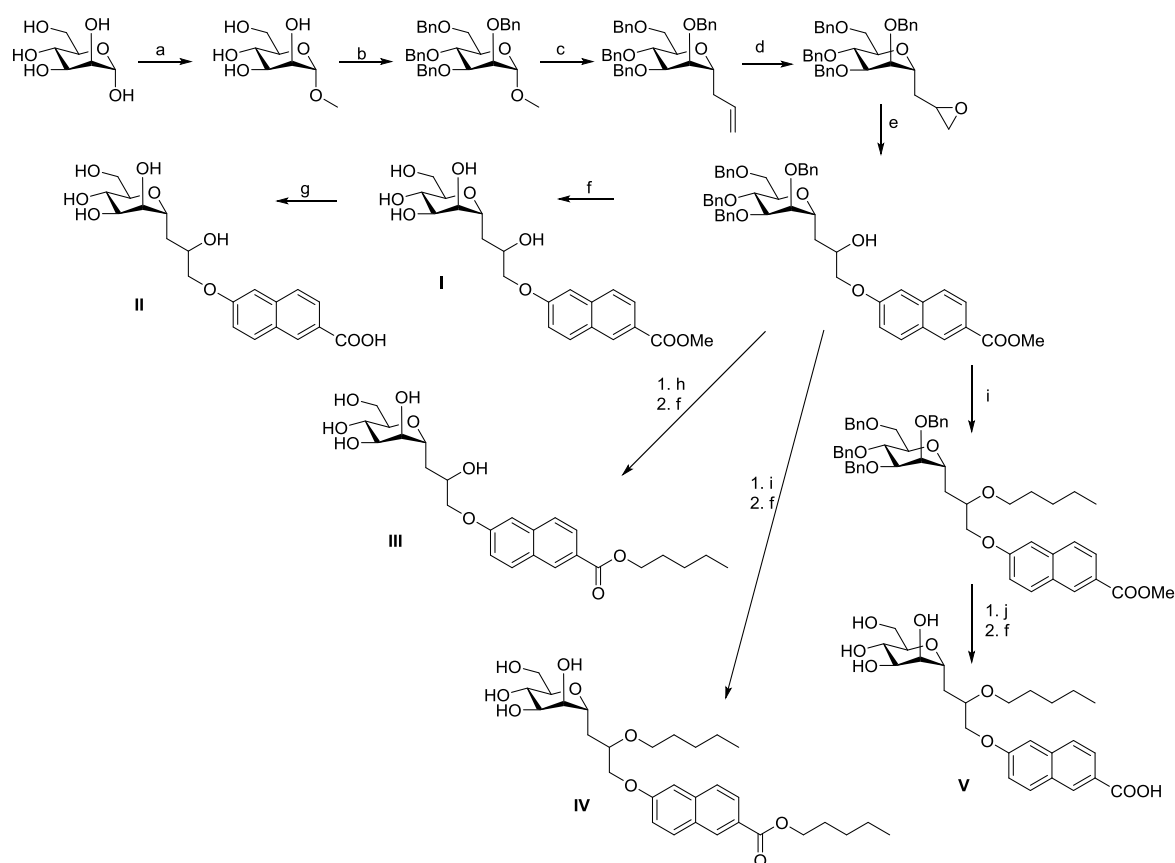
Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge bomo načrtovali in sintetizirali potencialne nove antagoniste lektina FimH. Izhajali bomo iz strukture antagonistov FimH, ki so bili nedavno odkriti in sintetizirani na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo (**TSZ-15**, **Slika 6**). Z namenom povečanja hidrolitske stabilnosti *O*-glikozidov bomo pripravili njihove *C*-glikozidne analoge (**Slika 6**). Kandidate za sintezo bomo načrtovali s pomočjo strukturno podprtega načrtovanja na osnovi znanih kristalnih struktur lektina FimH v kompleksu z antagonisti. Sintetiziranim spojinam bomo ovrednotili njihovo antagonistično aktivnost na rekombinantnem FimH in dobljene podatke uporabili v naslednjem ciklu načrtovanja in sinteze.



**Slika 6.** Struktura znanega *O*-glikozidnega antagonistu FimH (**TSZ-15**) in načrtovanih *C*-glikozidnih analogov (*desno*).

Ker je za monovalentne  $\alpha$ -D-manopiranozide značilno, da se specifično vežejo tudi na človeški lektin DC-SIGN, bomo sintetiziranim spojinam eksperimentalno določili antagonistično aktivnost tudi na tem receptorju.

Tekom eksperimentalnega dela bomo poskusili pripraviti *C*-glikozidne analoge spojine **TSZ-15**, kot je prikazano v **Shemi 1**. Pri tem bomo uporabljali uveljavljene strategije sinteze sladkorjev – zaščitne skupine, stereoselektivna sinteza na anomernem centru.



**Shema 1.** Reagenti in pogoji za sintezo novih antagonistov FimH. a) MeOH, Amberlite IR 120, refluks; b) benzil bromid, NaH, DMF; c) aliltrimetilsilan, TMSOTf, CH<sub>3</sub>CN; d) mCPBA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40 °C; e) i) metil 6-hidroksi-2-naftolat, KOH, MeOH, sobna T, 20 min; ii) tetrabutilamonijev bromid, toluen/*N,N*-dimetilformamid, refluks, 24 h; f) H<sub>2</sub>, Pd/C, EtOH, sobna T, 24-48 h; g) i) 2 M NaOH, MeOH; ii) 1 M HCl; h) pentilbromid, NaH, tetrabutilamonijev bromid, tetrahidrofuran/*N,N*-dimetilformamid; i) pentilbromid, NaH, *N,N*-dimetilformamid; j) i) 2 M NaOH, MeOH; ii) 2 M NaOH, dioksan/voda, 40 °C.



## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Alfa Aesar, Acros Organics, Fluka, Merck, Sigma-Aldrich in TCI. Brezvodni metanol, acetonitril in *N,N*-dimetilformamid smo pripravili z molekularnimi siti aktiviranimi tik pred uporabo. Brezvodni tetrahidrofuran smo destilirali direktno v bučko k izhodnim spojinam, destilacija je potekala v prisotnosti natrija v argonovi atmosferi. Ostale reagente in topila smo uporabljali brez predhodnega čiščenja.

### 3.2 METODE

#### 3.2.1 Kromatografske metode

##### 3.2.1.1 Tankoplastna kromatografija

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

##### 3.2.1.2 Kolonska kromatografija

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

#### 3.2.2 Spektroskopske metode

##### 3.2.2.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

<sup>1</sup>H-NMR spektre sintetizirani spojin smo posneli na Bruker Avance III 400 MHz spektrometru na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v devteriranih topilih CDCl<sub>3</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub> ali CD<sub>3</sub>OD. Kot interni standard smo uporabljali

tetrametilsilan (TMS). Spektre smo obdelali s programom MestRe-C 4.7.0 razvijalca Masterlab Research S. L.

### **3.2.2.2 Masna spektrometrija**

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

### **3.2.2.3 Infrardeča spektroskopija**

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

### **3.2.3 Temperatura tališča**

Tališče smo določili na Kofflerjevem mikroskopu z ogrevalno mizico Leica na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in je nekorrigirano.

### **3.2.4 Poimenovanje in risanje struktur**

Za poimenovanje in risanje strukturnih formul spojin smo uporabljali računalniški program ChemBioDraw Ultra 14.0 razvijalca CambridgeSoft Corporation.

### **3.2.5 Biološko testiranje**

#### **3.2.5.1 FimH**

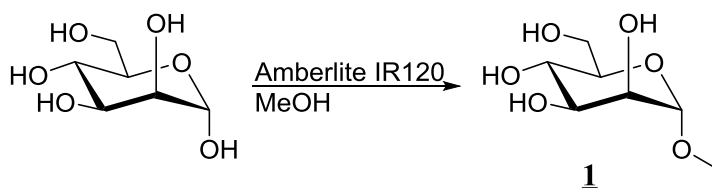
Afiniteto spojin za vezavo na receptor FimH so testirali s testom kompetitivne fluorescenčne polarizacije na Institute of Molecular Pharmacy, Pharmacenter, Univerza v Baslu v Švici. S tem testom so merili zmanjšanje fluorescenčne polarizacije, ko testiran antagonist izpodrine fluorescenčno označen ligand z vezavnega mesta na FimH (4). Pripravili so raztopine v 100% DMSO z 10 mM koncentracijo testiranih spojin, nato so za serijsko redčenje raztopin uporabljali vodni pufer s sestavo 20 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl in 50 µg/mL BSA. BSA (goveji serumski albumin) so dodali za preprečitev nespecifične vezave proteina na plastično površino (4). Določili so konstanti disociacije ( $K_D$ ) antagonistov s celotnim adhezinom FimH in z lektinsko domeno FimH. Koncentraciji označenega liganda in proteina sta bili 50 nM pri testiranju z lektinsko domeno FimH. Pri testiranju s celotnim FimH je bila koncentracija označenega liganda 10 nM in proteina 300 nM.

### 3.2.5.2 DC-SIGN

Afiniteto spojin za vezavo na DC-SIGN so določili z *in vitro* testnim sistemom, ki ga je razvil David Hajšek pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm. na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani (24). Na mikrotitrsko ploščico so najprej vezali ekstracelularno domeno receptorja DC-SIGN in s tem blokirali prosta vezavna mesta. Nanesli so raztopine potencialnega antagonista, takoj za tem pa v najkrajšem možnem času še z biotinom konjugiran gp120. Temu je sledil nanos protiteles proti biotinu, ki je bil konjugiran s hrenovo peroksidazo, nazadnje pa še nanos substrata za peroksidazo. Odstotek vezave naravnega liganda je bil določen na podlagi kemiluminescenčnega odziva. Uporabili so pozitivno kontrolo L-fukozo, ki je preprečila vezavo gp120 na CRD receptorja DC-SIGN z vrednostjo  $IC_{50} = 2,95$  mM. Obdelavo rezultatov in določitev vrednosti  $IC_{50}$ , t.j. 50% inhibicija vezave naravnega liganda gp120 na receptor DC-SIGN, so izvedli z računalniškim programom Microsoft Excel (23, 24).

## 4 EKSPERIMENTALNO DELO

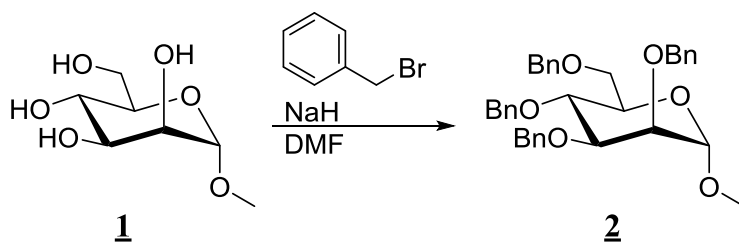
### 4.1 Sinteza metil- $\alpha$ -D-manopiranozida



10,0 g (55,0 mmol) D-manoze (99% čistost) smo raztopili v 100 mL brezvodnega MeOH. Ob mešanju na magnetnem mešalu smo raztopini počasi dodali 10,0 g kisle ionsko-izmenjevalne smole Amberlite IR120, ki smo jo predhodno sprali z brezvodnim MeOH. Reakcijsko zmes smo segrevali 18 h na oljni kopeli pri temperaturi refluxa ( $T=75^{\circ}\text{C}$ ) ob počasnem mešanju. Potek reakcije smo preverili s tankoplastno kromatografijo (mobilna faza:  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}=10:1:1$ ; orositveni reagent: fosfomolibdenska kislina). Smolo smo odstranili iz reakcijske zmesi z večkratnim nučanjem. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom in dobili rumen smolnat produkt. Ker smo pričakovali produkt v obliki kristalov, smo bučko priklopili na vakuumsko črpalko, da bi se znebili ostankov MeOH. Izvedli smo še prekristalizacijo iz EtOH, ampak tudi po hlajenju na ledu, dodatku vode in etra se je produkt izoboril kot zelo viskozna smola. Topila smo uparili pod znižanim tlakom in dobili 9,760 g spojine **1**.

<b>Metil-<math>\alpha</math>-D-manopiranozid</b>	
<b>Elementna sestava:</b> $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_6$	<b>Izgled:</b> svetlo rumena smola
<b><math>M_r</math>:</b> 194,18 g/mol	<b><math>R_f</math>:</b> 0,34 ( $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}=10:1:1$ )
<b>Izkoristek:</b> 91,2%	<b>Tališče:</b> /
<b><math>^1\text{H-NMR}</math></b> (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ )	$\delta$ 3,22-3,27 (m, 4H, manoz-a-H, CH <sub>3</sub> ), 3,38-3,48 (m, 4H, 4 x manoz-a-H), 3,59 (ddd, 1H, $J_1=1,7$ Hz, $J_2=3,4$ Hz, $J_3=4,6$ Hz, manoz-a-H), 3,66 (ddd, 1H, $J_1=2,1$ Hz, $J_2=6,0$ Hz, $J_3=11,6$ Hz, manoz-a-H), 4,47 (t, 1H, $J=6,0$ Hz, manoz-a-H), 4,49 (d, 1H, $J=1,6$ Hz, manoz-a-H), 4,57 (d, 1H, $J=6,0$ Hz, manoz-a-H), 4,72 (dd, 2H, $J_1=2,5$ Hz, $J_2=4,9$ Hz, manoz-a-H) ppm
<b>IR (ATR)</b>	$\nu$ 3326, 2913, 1647, 1411, 1198, 1131, 1027, 960, 878, 808, 679 $\text{cm}^{-1}$

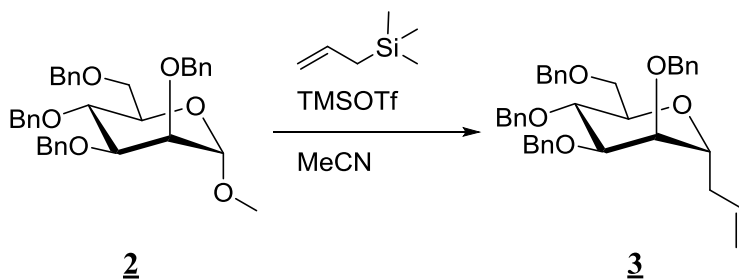
## 4.2 Sinteza metil-2,3,4,6-(tetra-*O*-benzil)- $\alpha$ -D-manopiranozida



9,564 g (49,3 mmol) spojine **1** smo raztopili v 120 mL *N,N*-dimetilformamida (DMF). Da smo dosegli hitrejše in popolno raztapljanje, smo bučko postavili v ultrazvočno kadičko za nekaj minut in nato raztopino prepihali z argonom. Raztopino smo ohladili na ledeni kopeli na 0 °C. Počasi smo dodajali 11,822 g (295,5 mmol, 6 ekv) 60% trdne disperzije NaH. Počakali smo, da je potekla reakcija v argonovi atmosferi oz. da je iz reakcijske zmesi prenehal izhajati vodik. Nato smo v bučko s pomočjo kapalnika dodajali 29,25 mL (246,29 mmol, 5 ekv) benzil bromida in ker je reakcijska zmes postala zelo gosta in se je močno penila, da je bilo mešanje oteženo, smo dodali še približno 30 mL DMF. Bučko smo ves čas hladili na kopeli z vodo in ledom. Po približno eni uri smo kopel odstranili in reakcijsko zmes pustili mešati približno 16 h pri sobni temperaturi. Potek reakcije smo preverili s TLC (mobilna faza: heksan:etilacetat=2:1; orositveni reagent: fosfomolibdenska kislina). Reakcijo smo prekinili z dodatkom 40 mL metanola, nato dodali 100 mL dietiletra in zmes zlili na 200 mL vode. Ločili smo organsko in vodno fazo, vodno fazo sprali z dietiletrom (2 x 100 mL) in združene organske faze spirali z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (1 x 100 mL), nasičeno raztopino NaCl (1 x 100 mL) in posušili nad NaSO<sub>4</sub>. Organska topila smo uparili pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Na začetku smo uporabili mobilno fazo heksan:etilacetat=10:1 in nato postopoma povečevali polarnost mobilne faze do razmerja heksan:etilacetat=2:1, da smo dosegli hitrejše spiranje s kolone. Dobili smo 17,767 g spojine **2**.

<b>Metil-2,3,4,6-(tetra-<i>O</i>-benzil)-<math>\alpha</math>-D-manopiranozid</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>35</sub> H <sub>38</sub> O <sub>6</sub>	<b>Izgled:</b> prozorna brezbarvna smola
<b>M<sub>r</sub>:</b> 554,68 g/mol	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0,50 (heksan:etilacetat=2:1)
<b>Izkoristek:</b> 65,03%	<b>Tališče:</b> /
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ 3,36 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3,74-3,84 (m, 4H, 4 x manoz-a-H), 3,91 (dd, 1H, J <sub>1</sub> =3,1 Hz, J <sub>2</sub> =9,3 Hz, manoz-a-H), 4,01 (t, 1H, J=9,2 Hz, manoz-a-H), 4,54 (d, 1H, J=10,8 Hz, manoz-a-H), 4,59 (d, 1H, J=12,1 Hz, ArOCH <sub>2</sub> H), 4,64 (s, 2H, ArOCH <sub>2</sub> ), 4,70 (d, 1H, J=12,2 Hz, ArOCH <sub>2</sub> H), 4,79 (dd, 3H, J <sub>1</sub> =2,0 Hz, J <sub>2</sub> =16,4 Hz, ArOCH <sub>2</sub> , ArOCH <sub>2</sub> H), 4,91 (d, 1H, J=10,8 Hz, ArOCH <sub>2</sub> H), 7,18-7,19 (m, 2H, 2 x Ar-H), 7,27-7,42 (m, 18H, 18 x Ar-H) ppm
<b>IR (ATR)</b>	$\nu$ 3029, 2904, 1955, 1604, 1496, 1453, 1361, 1322, 1206, 1099, 1058, 1026, 967, 909, 845, 802, 734, 696 cm <sup>-1</sup>

### 4.3 Sinteza 3-(tetra-*O*-benzil- $\alpha$ -D-manopiranozil)propena

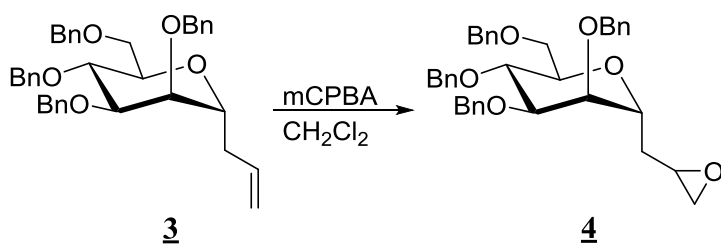


Uporabili smo dvogrlo bučko, iz katere smo s pomočjo vakuumske črpalke in segrevanja s toplotno pištolo izgnali zrak in vlago in jo nato še prepihali z argonom. Eno grlo bučke smo zamašili in nanj pritrdili iglo z balonom, napolnjenim z argonom, skozi drugo grlo pa smo v bučko natehtali 1,024 g (1,846 mmol) spojine **2** in ga zamašili. Pripravili smo brezvodni acetonitril z aktiviranimi molekularnimi siti in ga 20 mL vbrizgali v bučko, tako da smo raztopili spojino **2**. Raztopino smo ohladili na 0 °C in med mešanjem v bučko dodali 0,587 mL (3,692 mmol, 2 ekv) aliltrimetilsilana in 0,167 mL (0,923 mmol, 0,5 ekv) trimetilsilil trifluorometansulfonata (TMSOTf). Bučko smo prekrili z ledom, da smo vzdrževali nizko temperaturo med potekom reakcije. Po približno 16 h smo reakcijsko zmes prenesli v navadno bučko in uparili acetonitril pod znižanim tlakom. Preostanku v

bučki smo po kapljicah dodali nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub>, zatem smo vodno fazo ekstrahirali z diklorometanom (2 x 20 mL). Diklorometan smo uparili pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Uporabili smo mobilno fazo heksan:etilacetat=2:1 in dobili 0,737 g spojine **3**. Enak postopek smo ponovili z večjo količino spojine **2** (8,484 g, 15,295 mmol, izkoristek 67,7%) za potrebe nadaljnjih reakcij.

<b>3-(tetra-<i>O</i>-benzil-<math>\alpha</math>-D-manopiranozil)propen</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>37</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub>	<b>Izgled:</b> prozorna brezbarvna smola
<b>M<sub>r</sub>:</b> 564,72 g/mol	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0,53 (heksan:etilacetat=2:1)
<b>Izkoristek:</b> 70,7%	<b>Tališče:</b> /
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ 2,28-2,44 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3,65 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> =3,1 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> =4,7 Hz, manoz-a-H), 3,73 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> =3,5 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> =10,2 Hz, manoz-a-H), 3,77-3,91 (m, 4H, manoz-a-H), 4,07 (ddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> =4,7 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> =6,3 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> =7,7 Hz, manoz-a-H), 4,52-4,65 (m, 7H, 3 x ArOCH <sub>2</sub> , ArOCHH), 4,73 (d, 1H, <i>J</i> =11,3 Hz, ArOCHH), 5,01-5,04 (m, 1H, -CHCHH), 5,05-5,09 (m, 1H, -CHCHH), 5,73-5,84 (m, 1H, -CHCH <sub>2</sub> ), 7,21-7,25 (m, 2H, 2 x Ar-H), 7,29-7,44 (m, 18H, 18 x Ar-H) ppm
<b>IR (ATR)</b>	$\nu$ 3063, 3029, 2862, 1812, 1641, 1604, 1495, 1453, 1361, 1207, 1090, 1026, 912, 819, 734, 696 cm <sup>-1</sup>

#### 4.4 Sinteza 1',2'-epoksi-3'-(tetra-*O*-benzil- $\alpha$ -D-manopiranozil)propana



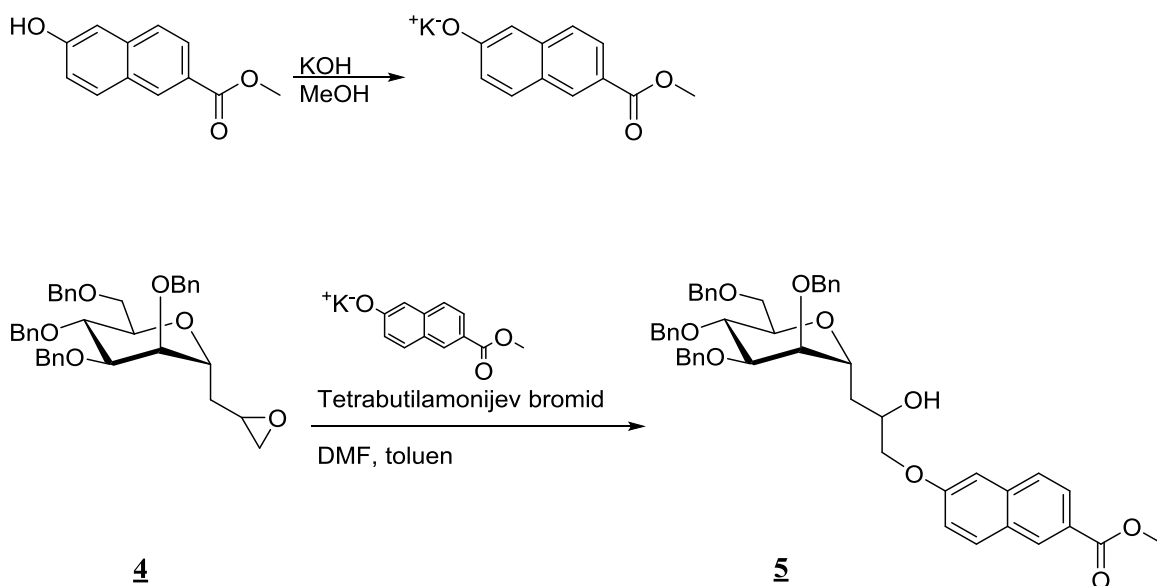
Spojino **3** (2,473 g, 4,379 mmol) smo raztopili v 40 mL diklorometana. Dodali smo 1,178 g 77% mCPBA (1,2 ekv) in bučko postavili na oljno kopel ter segrevali ob temperaturi refluxa (40 °C). Reakcijo smo spremljali s tankoplastno kromatografijo (mobilna faza: heksan:etilacetat=2:1, orositveni reagent: bromkrezol zeleno). Po približno

2 h od začetka segrevanja reakcijske zmesi smo dodali še 1 ekvivalent 77% mCPBA (0,981 g). Reakcijsko zmes smo segrevali še 2,5 h, nato smo izvedli ekstrakcijo z 1 M raztopino NaOH (2 x 20 mL). Organsko fazo smo sprali z 20 mL nasičene raztopine NaCl in posušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Diklorometan smo uparili pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Na začetku smo uporabili MF heksan:etilacetat=4:1, tekem kolonske kromatografije pa smo povečali polarnost MF na heksan:etilacetat=2:1, da smo dosegli hitrejšo elucijo produkta s kolone. Dobili smo 1,763 g spojine **4**.

<b>1',2'-epoksi-3'-(tetra-<i>O</i>-benzil-<math>\alpha</math>-D-manopiranozil)propan</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>37</sub> H <sub>40</sub> O <sub>6</sub>	<b>Izgled:</b> belo trdno olje
<b>M<sub>r</sub>:</b> 580,72 g/mol	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0,31 (heksan:etilacetat=2:1)
<b>Izkoristek:</b> 69,3%	<b>Tališče:</b> /
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ 1,66-2,06 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2,50 (ddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> =2,7 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> =5,0 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> =7,9 Hz, epoksid-H), 2,70-2,82 (m, 1H, epoksid-H), 3,00-3,10 (m, 1H, epoksid-H), 3,63-4,00 (m, 6H, 6 x manoz-H), 4,10-4,30 (m, 1H, manoz-H), 4,53-4,71 (m, 8H, 4 x ArOCH <sub>2</sub> ), 7,20-7,44 (m, 20H, 20 x Ar-H) ppm
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b>	Izračunan 581,2886; izmerjen 581,2903
<b>IR (ATR)</b>	$\nu$ 3031, 2866, 1954, 1604, 1495, 1453, 1358, 1330, 1277, 1209, 1072, 1020, 912, 872, 819, 773, 734, 695 cm <sup>-1</sup>



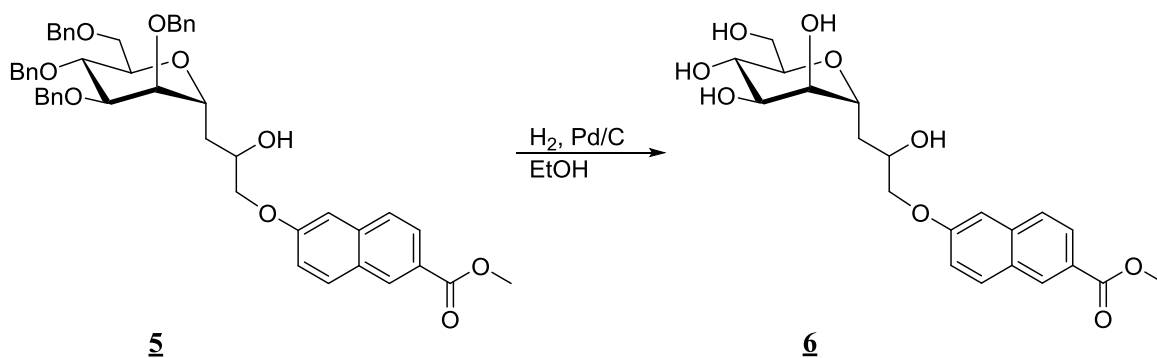
#### 4.5 Sinteza metil 6-(2-hidroksi-3-(tetra-*O*-benzil- $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi-2-naftolata



0,349 g (1,724 mmol, 1 ekv) metil 6-hidroksi-2-naftolata in 0,097 g KOH (1,724 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 50 mL metanola. Reakcijsko zmes smo mešali nekaj minut pri sobni temperaturi, da je nastala kalijeva sol metil 6-hidroksi-2-naftolata, nato pa metanol uparili pod znižanim tlakom. Suhi preostanek in 1,001 g (1,724 mmol) spojine **4** smo raztopili v zmesi 50 mL DMF in 50 mL toluena. Reakcijski zmesi smo dodali 0,5 ekvivalenta (0,278 g) tetrabutilamonijevega bromida kot katalizatorja reakcije. Bučko smo potopili v oljno kopel in segrevali pri 100 °C opremljeno z vodnim hladilnikom in z balonom, napolnjenim z argonom. Reakcijo smo spremljali s tankoplastno kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo heksan:etilacetat=2:1 z dodatkom nekaj kapljic očetne kisline. Po 16 h smo uparili topilo pod znižanim tlakom. Suhi preostanek smo raztopili v 30 mL etilacetata in spirali z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 x 20 mL), z 10% raztopino citronske kisline (1 x 20 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (1 x 20 mL). Organsko fazo smo posušili nad natrijevim sulfatom in etilacetat uparili pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Na začetku smo uporabili mobilno fazo heksan:etilacetat=4:1, nato pa povečevali polarnost MF do razmerja heksan:etilacetat=2:1. Za razvijanje TLC smo uporabili MF heksan:etilacetat=2:1. Dobili smo 0,548 g spojine **5**.

<b>Metil 6-(2-hidroksi-3-(tetra-<i>O</i>-benzil-<math>\alpha</math>-D-manopiranozil)propoksi)-2-naftolat</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>49</sub> H <sub>50</sub> O <sub>9</sub>	<b>Izgled:</b> trdna rumena prozorna smola
<b>M<sub>r</sub>:</b> 782,93 g/mol	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0,14 (heksan:etilacetat=2:1)
<b>Izkoristek:</b> 40,6%	<b>Tališče:</b> /
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ 1,86-1,98 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3,59-3,74 (m, 3H, 3 x manoz-a-H), 3,81-4,18 (m, 9H, 4 x manoz-a-H, 1 x CH <sub>3</sub> , 1 x CH, 1 x CHH), 4,25-4,41 (m, 2H, CHH, OH), 4,51-4,62 (m, 8H, 4 x ArOCH <sub>2</sub> ), 7,18 (dd, 1H, J <sub>1</sub> =2,4 Hz, J <sub>2</sub> =6,0 Hz, Ar-H), 7,21-7,27 (m, 6H, 6 x Ar-H), 7,29-7,37 (m, 15H, 15 x Ar-H), 7,75 (t, 1H, J=8,0 Hz, 1 x Ar-H), 7,86 (dd, 1H, J <sub>1</sub> =3,3 Hz, J <sub>2</sub> =9,0 Hz, 1 x Ar-H), 8,04 (td, 1H, J <sub>1</sub> =1,7 Hz, J <sub>2</sub> =8,6 Hz, 1 x Ar-H), 8,55 (s, 1H, 1 x Ar-H) ppm
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b>	Izračunan 783,3539; izmerjen 783,3533
<b>IR (ATR)</b>	$\nu$ 3402, 3029, 2862, 1712, 1624, 1479, 1453, 1391, 1362, 1279, 1199, 1091, 1025, 912, 855, 808, 733, 695 cm <sup>-1</sup>

#### 4.6 Sinteza metil 6-(2-hidroksi-3-( $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftolata

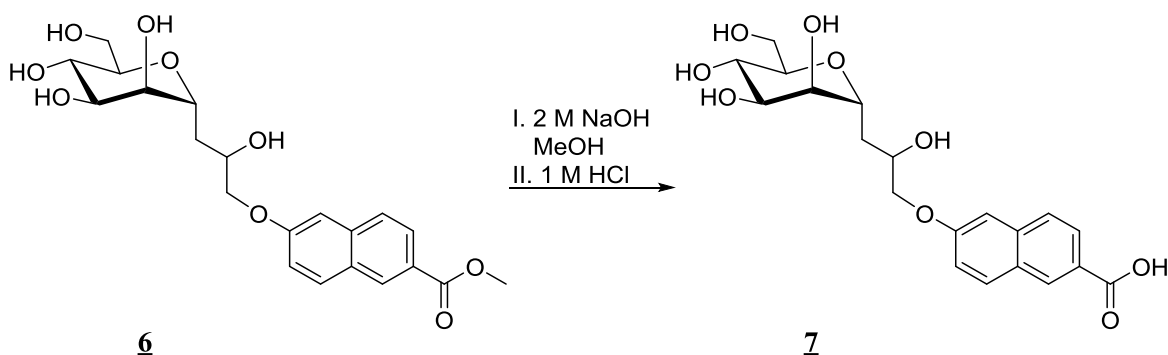


Spojino **5** (0,194 g, 0,248 mmol) smo raztopili v 15 mL etanola in raztopino prepihali z argonom. Dodali smo 0,020 g (10% m/m) katalizatorja Pd/C in prepihali z vodikom. Sistem smo zaprli in preko igle v reakcijsko zmes dovajali H<sub>2</sub> iz napolnjenega balona. Reakcija je potekala 48 ur pri sobni temperaturi, njen potek smo spremljali s tankoplastno kromatografijo (mobilna faza heksan:etilacetat=2:1). Pd/C smo odfiltrirali s presesavanjem, matičnici pa smo uparili etanol pod znižanim tlakom. Ker produkt ni bil čist, smo ga raztapljali v mobilni fazi diklorometan:metanol=7:1 za nanos na kolono, ampak so začeli izpadati kristali. Dodali smo nekaj mL diklorometana in izvedli

prekristalizacijo. Izpadle sive kristale smo odfiltrirali in dobili smo 33 mg spojine **6**. Matičnico smo nanesti na kolono (mobilna faza diklorometan:metanol=7:1 in 4:1 za končno elucijo) in dobili smo še 18 mg spojine **6**.

<b>Metil 6-(2-hidroksi-3-(<math>\alpha</math>-D-manopiranozil)-propoksi)-2-naftolat</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>9</sub>	<b>Izgled:</b> sivi kristali
<b>M<sub>r</sub>:</b> 422,43 g/mol	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0,10 (heksan:etilacetat=2:1)
<b>Izkoristek:</b> 48,6%	<b>Tališče:</b> 100-103 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	$\delta$ 1,96 (ddd, 1H, $J_1=3,0$ Hz, $J_2=8,1$ Hz, $J_3=15,9$ Hz, CHH), 2,07-2,23 (m, 1H, CHH), 3,46-3,86 (m, 7H, 6 x manoz-a-H, 1 x CH), 3,97 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4,12-4,27 (m, 3H, 1 x CH <sub>2</sub> , 1 x manoz-a-H), 7,30 (ddd, 1H, $J_1=1,0$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, $J_3=9,0$ Hz, Ar-H), 7,36 (dd, 1H, $J_1=2,2$ Hz, $J_2=8,7$ Hz, Ar-H), 7,85 (d, 1H, $J=8,6$ Hz, Ar-H), 7,92 (d, 1H, $J=9,0$ Hz, Ar-H), 8,00 (dd, 1H, $J_1=1,5$ Hz, $J_2=8,6$ Hz, Ar-H), 8,54 (s, 1H, Ar-H) ppm (v spektru niso razvidni signali za protone iz OH skupin)
<b>HRMS (ESI)</b>	Izračunan 421,1504; izmerjen 421,1499
<b>IR (ATR)</b>	$\nu$ 3337, 2922, 2360, 1704, 1625, 1505, 1480, 1435, 1392, 1339, 1287, 1203, 1094, 1059, 960, 914, 856, 820, 766, 751, 649 cm <sup>-1</sup>

#### 4.7 Sinteza 6-(2-hidroksi-3-( $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftalenske kisline

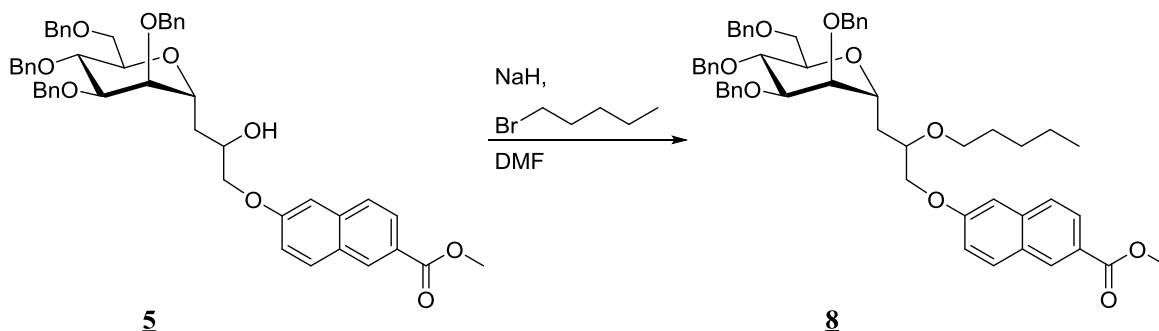


23 mg (0,054 mmol) spojine **6** smo raztopili v 5 mL metanola in dodali 140  $\mu$ L (0,272 mmol, 5 ekv) 2 M raztopine NaOH. Bučko smo zamašili in mešali na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo dodali še 27  $\mu$ L (0,054 mmol, 1 ekv) 2 M NaOH. Reakcijo smo spremljali s tankoplastno kromatografijo (mobilna faza

diklorometan:metanol=7:1). Ker po nekaj urah ni bilo sprememb v poteku reakcije, smo dodali še 3 ekvivalente 2 M NaOH (0,162 mmol, 82  $\mu$ L). Po 24 urah smo uparili metanol pod znižanim tlakom. V bučki je ostalo nekaj vodne raztopine, h kateri smo dodali nekaj mL destilirane vode in izvedli ekstrakcijo z etilacetatom. Vodno fazo smo nato nakisali z 1 M raztopino HCl do pH vrednosti okrog 1 in ponovno izvedli ekstrakcijo z etilacetatom. Ker je bil produkt slabo topen v organski fazi, smo morali lij ločnik segreti s fenom. Ekstrakcijo smo nekajkrat ponovili z minimalnim volumnom organske faze. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom in dobili 9 mg spojine **7**.

<b>6-(2-hidroksi-3-(<math>\alpha</math>-D-manopiranozil)propoksi)-2-naftalenska kislina</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	<b>Izgled:</b> umazano belo trdno olje
<b>M<sub>r</sub>:</b> 408,40 g/mol	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0,8 (diklorometan:metanol=7:1)
<b>Izkoristek:</b> 40,5%	<b>Tališče:</b> /
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	$\delta$ 1,94-2,01 (m, 1H, CHH), 2,08-2,23 (m, 1H, CHH), 3,48-3,93 (m, 7H, 6 x manoz-a-H, 1 x CH), 4,10-4,25 (m, 3H, 1 x CH <sub>2</sub> , 1 x manoz-a-H), 7,28-7,31 (m, 1H, Ar-H), 7,36 (dd, 1H, J <sub>1</sub> =2,3 Hz, J <sub>2</sub> =8,6 Hz, Ar-H), 7,84 (d, 1H, J=8,6 Hz, Ar-H), 7,92 (d, 1H, J=9,0 Hz, Ar-H), 8,00 (dd, 1H, J <sub>1</sub> =1,6 Hz, J <sub>2</sub> =8,6 Hz, Ar-H), 8,54 (s, 1H, Ar-H) ppm (v spektru niso razvidni signali protonov iz skupin OH in COOH)
<b>HRMS (ESI)</b>	Izračunan 407,1346; izmerjen 407,1342
<b>IR (ATR)</b>	$\nu$ 3311, 2960, 2919, 2361, 1699, 1626, 1480, 1416, 1391, 1339, 1258, 1202, 1021, 912, 856, 799, 767, 668 cm <sup>-1</sup>

#### 4.8 Sinteza metil 6-(2-pentiloksi-3-(tetra-*O*-benzil- $\alpha$ -D-manopiranozil) propoksi)-2-naftolata

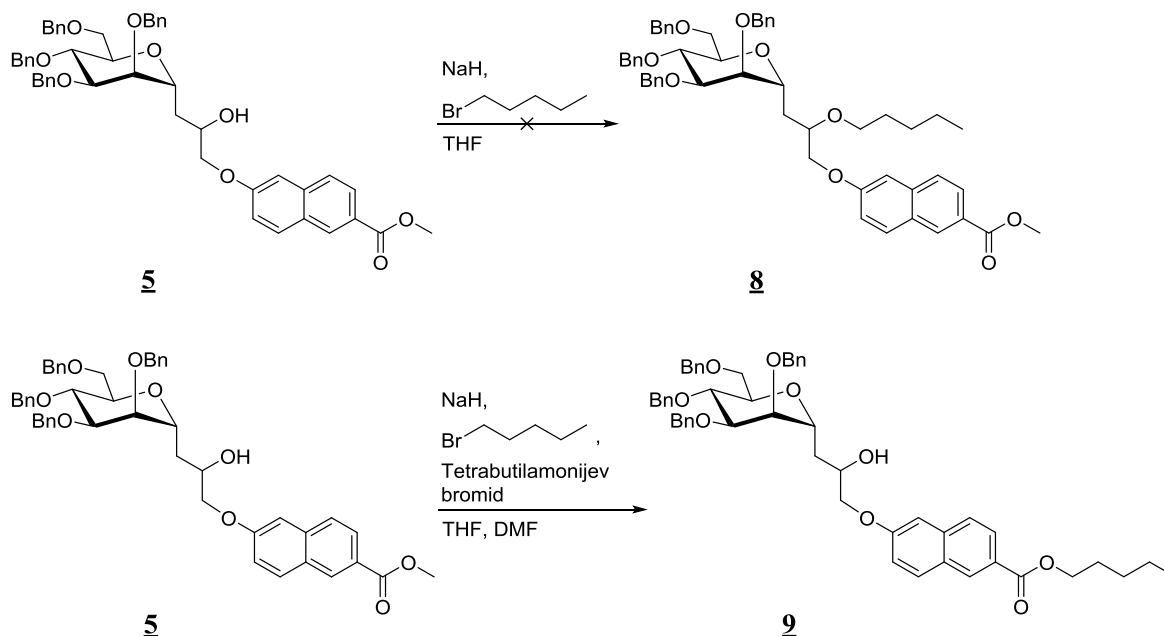


0,092 g (0,118 mmol) izhodne spojine **5** smo raztopili v 5 mL brezvodnega DMF, ki smo ga predhodno pripravili z aktiviranimi molekularnimi siti. Dodali smo 5 mg (0,129 mmol, 1,1 ekv) 60% trdne disperzije NaH in zmes dali mešati nad ledeno kopeljo. Po 15 min smo dodali 16  $\mu$ L (0,129 mmol, 1,1 ekv) 1-bromopentana in nadaljevali z mešanjem pri sobni temperaturi. Reakcijo smo spremljali s tankoplastno kromatografijo (mobilna faza heksan:etilacetat=2:1). Iz razvitih kromatogramov je bilo razvidno, da reakcija ne napreduje oz. da bi z nadaljevanjem lahko prišlo do hidrolize produkta, zato smo po 4 h prekinili z mešanjem in uparili DMF pod znižanim tlakom. Suhi preostanek smo raztopili v 10 mL etilacetata in spirali z 10% raztopino citronske kisline (1 x 10 mL), z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (1 x 10 mL), z nasičeno raztopino NaCl (1 x 10 mL) ter organsko fazo posušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Etilacetat smo uparili pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Uporabili smo mobilno fazo heksan:etilacetat=6:1 in dobili 4 mg spojine **8**.

<b>Metil 6-(2-pentiloksi-3-(tetra-<i>O</i>-benzil-<math>\alpha</math>-D-manopiranozil)propoksi)-2-naftolat</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>54</sub> H <sub>60</sub> O <sub>9</sub>	<b>Izgled:</b> brezbarvno trdno olje
<b>M<sub>r</sub>:</b> 853,07 g/mol	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0.40 (heksan:etilacetat=2:1)
<b>Izkoristek:</b> 3,6%	<b>Tališče:</b> /
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ 0,89 (t, 3H, $J=6,8$ Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1,27-1,35 (m, 5H, CHH, 2 x CH <sub>2</sub> ), 1,57-1,60 (m, 3H, CH <sub>2</sub> , CHH), 1,76 (ddd, 1H, $J_1=3,1$ Hz, $J_2=9,5$ Hz, $J_3=14,0$ Hz, CHH), 1,94-2,03 (m, 1H, CHH), 3,45-3,96 (m, 7H, 6 x manozna-H, CH), 3,99-4,00 (m, 3H, COOCH <sub>3</sub> ), 4,08-4,34 (m, 3H, 1 x manozna-H, CH <sub>2</sub> ), 4,46-4,80 (m, 8H, 4 x Ar-OCH <sub>2</sub> ), 7,15-7,42 (m, 22H, 22 x Ar-H), 7,73 (t, 1H, $J=8,4$ Hz, Ar-H), 7,84 (dd, 1H, $J_1=6,3$ Hz, $J_2=9,0$ Hz, Ar-H), 8,04 (td, 1H, $J_1=1,7$ Hz, $J_2=8,6$ Hz, Ar-H), 8,55 (d, 1H, $J=1,4$ Hz, Ar-H) ppm
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b>	Izračunan 853,4296; izmerjen 853,4316
<b>IR (ATR)</b>	$\nu$ 3030, 2927, 2862, 2360, 1715, 1626, 1604, 1479, 1453, 1391, 1362, 1277, 1200, 1093, 1027, 912, 856, 820, 736, 698 cm <sup>-1</sup>

## 4.9 Sinteza pentil 6-(2-hidroksi-3-( $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftolata

### 4.9.1 Sinteza pentil 6-(2-hidroksi-3-(tetra-*O*-benzil- $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftolata

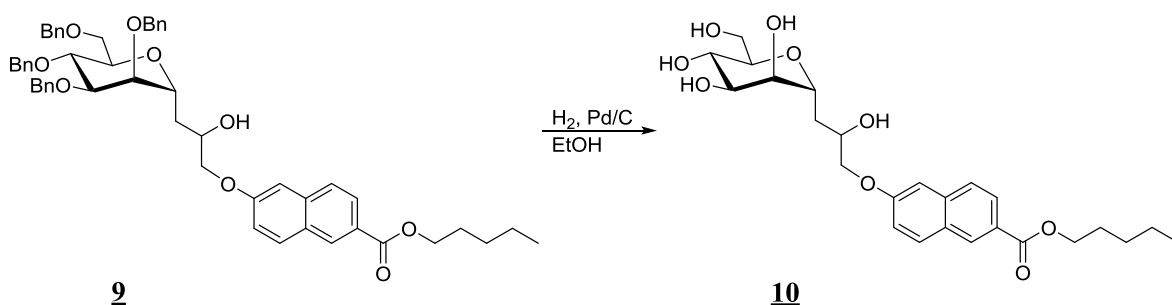


Cilj eksperimenta je bila optimizacija sinteze spojine **8**, kot prikazuje zgornja reakcijska shema, ampak je sinteza nepredvideno potekala v skladu s spodnjo shemo. Spojino **5** (0,252 g, 0,322 mmol) smo natehtali v dvogrlo bučko, iz katere smo izgnali zrak z vakuumsko črpalko in jo zatem prepihali z argonom. Bučko smo vpeli na destilacijsko napravo in izhodno spojino raztopili v približno 20 mL sveže destilirane brezvodnega THF. Raztopini smo dodali 0,014 g (0,354 mmol, 1,1 ekv) 60% trdne disperzije NaH. Po 15 min mešanja na ledeni kopeli smo dodali 44  $\mu$ L (0,354 mmol, 1,1 ekv) 1-bromopentana in reakcijsko zmes odstavili z ledene kopeli. Potek reakcije smo spremljali s tankoplastno kromatografijo z mobilno fazo heksan:etilacetat=2:1. Reakcija po 18 h mešanja pri sobni temperaturi ni potekla, zato smo bučko postavili na oljno kopel in segrevali na 50 °C v argonovi atmosferi. Ker po nekaj urah še vedno ni bilo sprememb, smo v reakcijsko zmes dodali 5 mL brezvodnega DMF (pripravljen z aktiviranimi molekularnimi siti) in za konico žličke katalizatorja tetrabutylamonijevega bromida. Po 18 h segrevanja reakcijske zmesi (50 °C, atmosfera argona) smo uparili THF in DMF pod znižanim tlakom. Suhi preostanek smo raztopili v 20 mL etilacetata in spirali z 10% raztopino citronske kisline (1 x 10 mL), z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (1 x 10 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (1 x 10 mL).

Organsko fazo smo posušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in topilo uparili pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili heksan:etilacetat=4:1 s postopnim povečevanjem polarnosti do razmerja heksan:etilacetat=1:1. Namesto spojine **8** smo dobili 47 mg spojine **9**.

<b>Pentil 6-(2-hidroksi-3-(tetra-<i>O</i>-benzil-<math>\alpha</math>-D-manopiranozil)propoksi)-2-naftolat</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>53</sub> H <sub>58</sub> O <sub>9</sub>	<b>Izgled:</b> rumeno prozorno trdno olje
<b>M<sub>r</sub>:</b> 839,04 g/mol	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0,54 (heksan:etilacetat=1:1)
<b>Izkoristek:</b> 17,4%	<b>Tališče:</b> /
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ 0,98 (t, 3H, J=7,1 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1,41-1,51 (m, 4H, 2 x CH <sub>2</sub> ), 1,81-2,11 (m, 4H, 2 x CH <sub>2</sub> ), 3,59-3,74 (m, 3H, 3 x manoz-a-H), 3,81-3,95 (m, 2H, 2 x manoz-a-H), 3,99-4,18 (m, 3H, 2 x manoz-a-H, CH), 4,30-4,34 (m, 2H, OCH <sub>2</sub> ), 4,39 (t, 2H, J=6,7 Hz, COOCH <sub>2</sub> ), 4,50-4,62 (m, 8H, 4 x ArOCH <sub>2</sub> ), 7,17-7,27 (m, 6H, 6 x Ar-H), 7,31-7,35 (m, 16H, 16 x Ar-H), 7,73-7,77 (m, 1H, Ar-H), 7,87 (dd, 1H, J <sub>1</sub> =3,2 Hz, J <sub>2</sub> =9,0 Hz, Ar-H), 8,05 (td, 1H, J <sub>1</sub> =1,7 Hz, J <sub>2</sub> =8,6 Hz, Ar-H), 8,54 (s, 1H, Ar-H) ppm (v spektru ni razviden signal za proton iz OH skupine)
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b>	Izračunan 839,4178; izmerjen 839,4159
<b>IR (ATR)</b>	$\nu$ 3482, 3030, 2926, 2863, 2361, 1709, 1626, 1604, 1479, 1453, 1388, 1339, 1273, 1197, 1090, 1025, 910, 858, 820, 733, 696 cm <sup>-1</sup>

#### 4.9.2 Sinteza pentil 6-(2-hidroksi-3-( $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftolata



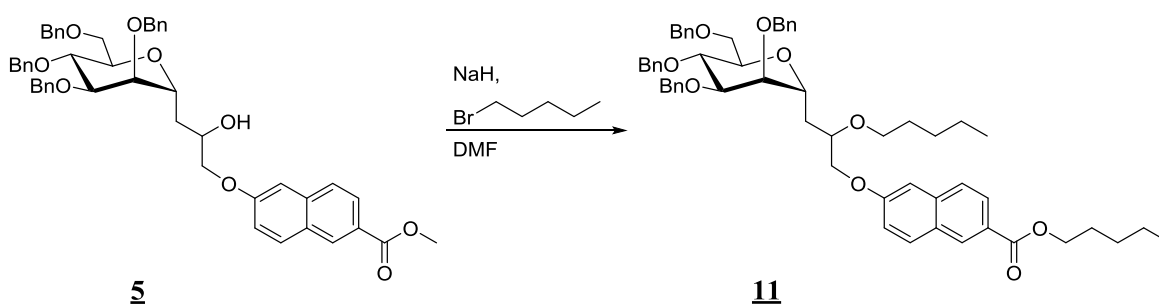
Spojino **9** (34 mg, 0,0405 mmol) smo raztopili v 5 mL etanola in raztopino prepihali z argonom. Dodali smo približno 0,005 g (10% m/m) katalizatorja Pd/C in



prepihali z vodikom. V zaprt sistem smo dovajali H<sub>2</sub> preko igle iz napolnjenega balona. Za spremljanje reakcije smo razvijali TLC v mobilni fazi diklorometan:metanol=7:1. Po 24 h mešanja pri sobni T smo Pd/C odfiltrirali s presesavanjem in matičnici uparili etanol pod nižanim tlakom. Dobili smo 14 mg spojine **10**.

<b>Pentil 6-(2-hidroksi-3-(<math>\alpha</math>-D-manopiranozil)propoksi)-2-naftolat</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	<b>Izgled:</b> umazano belo trdno olje
<b>M<sub>r</sub>:</b> 478,54 g/mol	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0,09 (diklorometan:metanol=7:1)
<b>Izkoristek:</b> 73,7%	<b>Tališče:</b> /
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	$\delta$ 0,98 (t, 3H, $J=7,1$ Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1,39-1,53 (m, 4H, 2 x CH <sub>2</sub> ), 1,65-1,73 (m, 0,5H, CH), 1,79-1,86 (m, 2H, 1 x CH <sub>2</sub> ), 1,93-2,01 (m, 0,5H, CH), 2,09-2,21 (m, 1H, CHH), 3,52-3,83 (m, 6H, 6 x manoz-a-H), 4,09-4,29 (m, 4H, 1 x manoz-a-H, CH, CH <sub>2</sub> ), 4,36 (t, 2H, $J=6,7$ Hz, COOCH <sub>2</sub> ), 7,28 (ddd, 1H, $J_1=0,9$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, $J_3=9,0$ Hz, Ar-H), 7,34 (dd, 1H, $J_1=2,4$ Hz, $J_2=8,6$ Hz, Ar-H), 7,83 (d, 1H, $J=8,5$ Hz, Ar-H), 7,91 (d, 1H, $J=9,0$ Hz, Ar-H), 7,98 (dd, 1H, $J_1=1,7$ Hz, $J_2=8,6$ Hz, Ar-H), 8,51 (d, 1H, $J=1,4$ Hz, Ar-H) ppm (v spektru niso razvidni signali za protone iz OH skupin)
<b>HRMS (ESI)</b>	Izračunan 477,2115; izmerjen 477,2125
<b>IR (ATR)</b>	$\nu$ 3902, 3853, 3838, 3801, 3734, 3710, 3690, 3674, 3649, 3629, 3567, 3311, 2956, 2861, 2361, 2334, 2152, 1920, 1709, 1626, 1557, 1541, 1507, 1480, 1419, 1391, 1338, 1273, 1198, 1122, 1093, 1064, 1024, 962, 914, 856, 812, 766, 747, 668, 620 cm <sup>-1</sup>

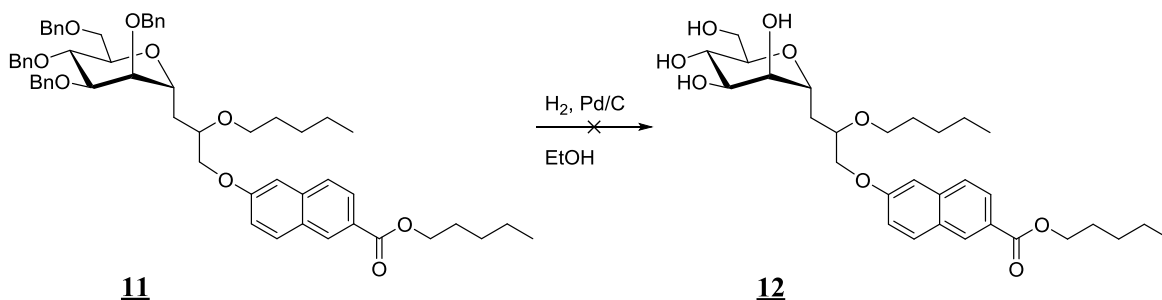
#### 4.10 Sinteza pentil 6-(2-pentiloksi-3-(tetra-*O*-benzil- $\alpha$ -D-manopiranozil) propoksi)-2-naftolata



Ponovno smo želeli izboljšati pot sinteze spojine **8**, ampak glavni produkt sinteze je bila spojina **11**. Iz bučke z izhodno spojino **5** (0,223 g, 0,285 mmol) smo izgnali zrak in ostanke topil s pomočjo vakuumske črpalke, nato smo jo prepihali z argonom in sistem zaprli. Z injekcijsko iglo smo v bučko vbrizgali 10 mL brezvodnega DMF (pripravljen z aktiviranimi molekularnimi siti). Bučko smo ohladili na ledu in dodali smo 0,0125 g 60% trdne disperzije NaH (0,313 mmol, 1,1 ekv). Reakcijsko zmes smo mešali na ledu, dokler se ni raztopil ves NaH, t.j. približno pol ure, zatem smo dodali 39  $\mu$ L 1-bromopentana (0,313 mmol, 1,1 ekv). Reakcija je potekala pri sobni T in potek smo spremljali s tankoplastno kromatografijo (mobilna faza heksan:etilacetat=2:1). Po 18 h smo dodali 1,1 ekvivalent 60% trdne disperzije NaH (0,013 g, 0,313 mmol) in 1,1 ekvivalent 1-bromopentana (39  $\mu$ L, 0,313 mmol) in nadaljevali z mešanjem pri sobni T. Po približno 18 h smo DMF uparili pod znižanim tlakom. Sui preostanek smo raztopili v 20 mL etilacetata in spirali z 10% raztopino citronske kisline (1 x 10 mL), z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (1 x 10 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (1 x 10 mL). Organsko fazo smo posušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, etilacetat uparili pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Kot mobilna faza za kolonsko kromatografijo je bila uporabljena zmes heksan:etilacetat=9:1, za končno elucijo pa smo uporabili heksan:etilacetat=2:1 in za spremljanje s TLC mobilno fazo heksan:etilacetat=1:1. Dobili smo 24 mg spojine **11** in nekaj mg spojine **8**, ampak je nismo uspeli optimalno očistiti na koloni. Sintezo smo ponovili pri enakih pogojih, le da smo že na začetku dodali 5 ekvivalentov 60% trdne disperzije NaH in 5 ekvivalentov 1-bromopentana. Po 18 h mešanja pri sobni T smo izolirali po enakem postopku in očistili s kolonsko kromatografijo 47 mg spojine **11**.

<b>Pentil 6-(2-pentiloksi-3-(tetra-<i>O</i>-benzil-<math>\alpha</math>-D-manopiranozil)propoksi)-2-naftolat</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>58</sub> H <sub>68</sub> O <sub>9</sub>	<b>Izgled:</b> brezbarvno trdno olje
<b>M<sub>r</sub>:</b> 908,17 g/mol	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0.72 (heksan:etilacetat=1:1)
<b>Izkoristek:</b> 9,3% in ponovitev 25,2%	<b>Tališče:</b> /
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ 0,86-0,91 (m, 3H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 0,97 (t, 3H, <i>J</i> =7,1 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1,28-1,33 (m, 8H, 4 x CH <sub>2</sub> ), 1,40-1,51 (m, 4H, 2 x CH <sub>2</sub> ), 1,72-1,78 (m, 1H, CHH), 1,82-1,86 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 1,94-2,03 (m, 1H, CHH), 3,44-3,96 (m, 8H, 7 x manozna-H, CH), 4,10-4,19 (m, 2H, OCH <sub>2</sub> ), 4,38 (t, 2H, <i>J</i> =6,6 Hz, COOCH <sub>2</sub> ), 4,45-4,78 (m, 8H, 4 x ArOCH <sub>2</sub> ), 7,15-7,27 (m, 3H, 3 x Ar-H), 7,29-7,36 (m, 17H, 17 x Ar-H), 7,40 (dd, 2H, <i>J</i> <sub>1</sub> =1,7 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> =7,9 Hz, 2 x Ar-H), 7,71-7,75 (m, 1H, Ar-H), 7,85 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> =6,3 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> =9,0 Hz, Ar-H), 8,04 (td, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> =1,6 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> =8,5 Hz, Ar-H), 8,54 (d, 1H, <i>J</i> =1,4 Hz, Ar-H) ppm
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b>	Izračunan 909,4933; izmerjen 909,4942
<b>IR (ATR)</b>	$\nu$ 3030, 2926, 2858, 2361, 1711, 1627, 1604, 1478, 1453, 1388, 1272, 1197, 1091, 1026, 912, 857, 820, 735, 697 cm <sup>-1</sup>

#### 4.11 Sinteza pentil 6-(2-pentiloksi-3-( $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftolata

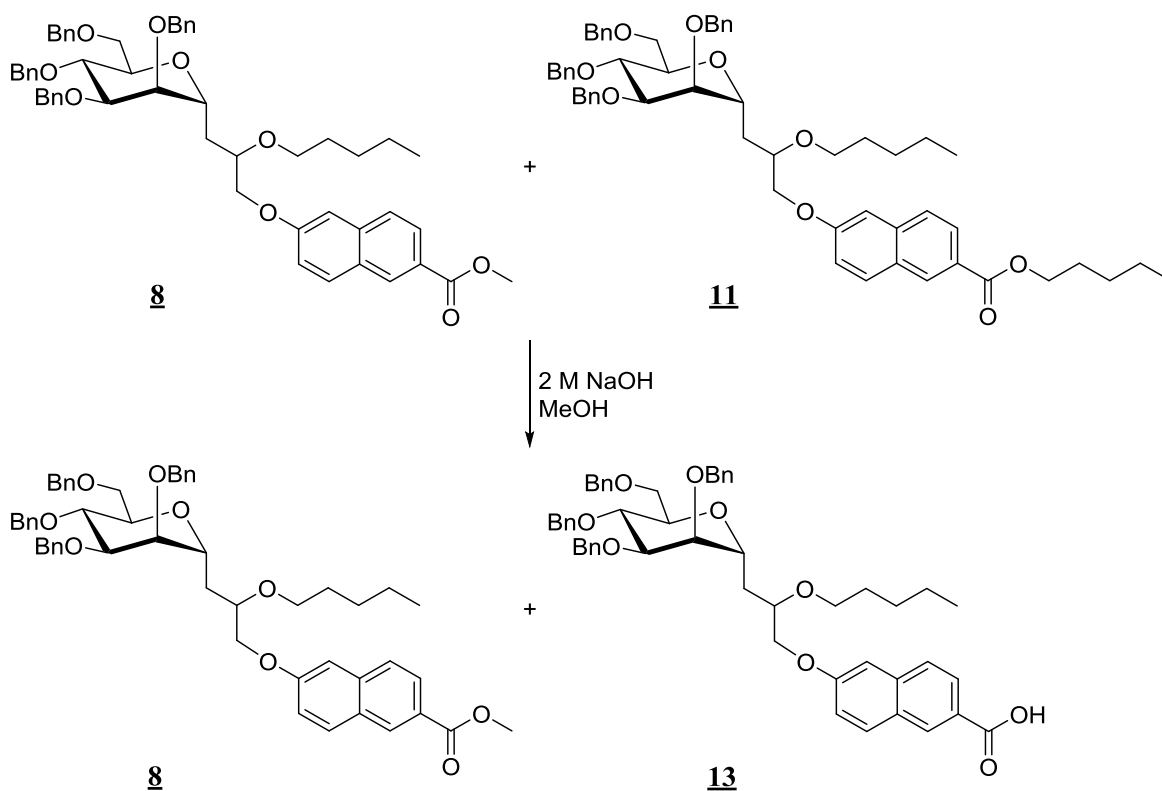


Spojino **11** (32 mg, 0,0352 mmol) smo raztopili v 5 mL etanola in raztopino prepihali z argonom. Dodali smo za konico žličke (približno 10% m/m, prenizka vrednost za tehtanje) katalizatorja Pd/C in prepihali z vodikom. V zaprt sistem smo dovajali H<sub>2</sub> preko igle iz napolnjenega balona in mešali pri sobni T. Za spremljanje reakcije smo razvijali TLC v mobilni fazi diklorometan:metanol=7:1. Po 24 h smo dodali za konico žličke Pd/C. Mešali smo 48 h pri sobni T v vodikovi atmosferi in nato Pd/C odfiltrirali s presesavanjem in matičnici uparili etanol pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s

kolonsko kromatografijo (mobilna faza diklorometan:etanol=7:1). Dobili naj bi 6 mg spojine **12**, ampak NMR spekter ni ustrežal predvideni strukturi spojine.

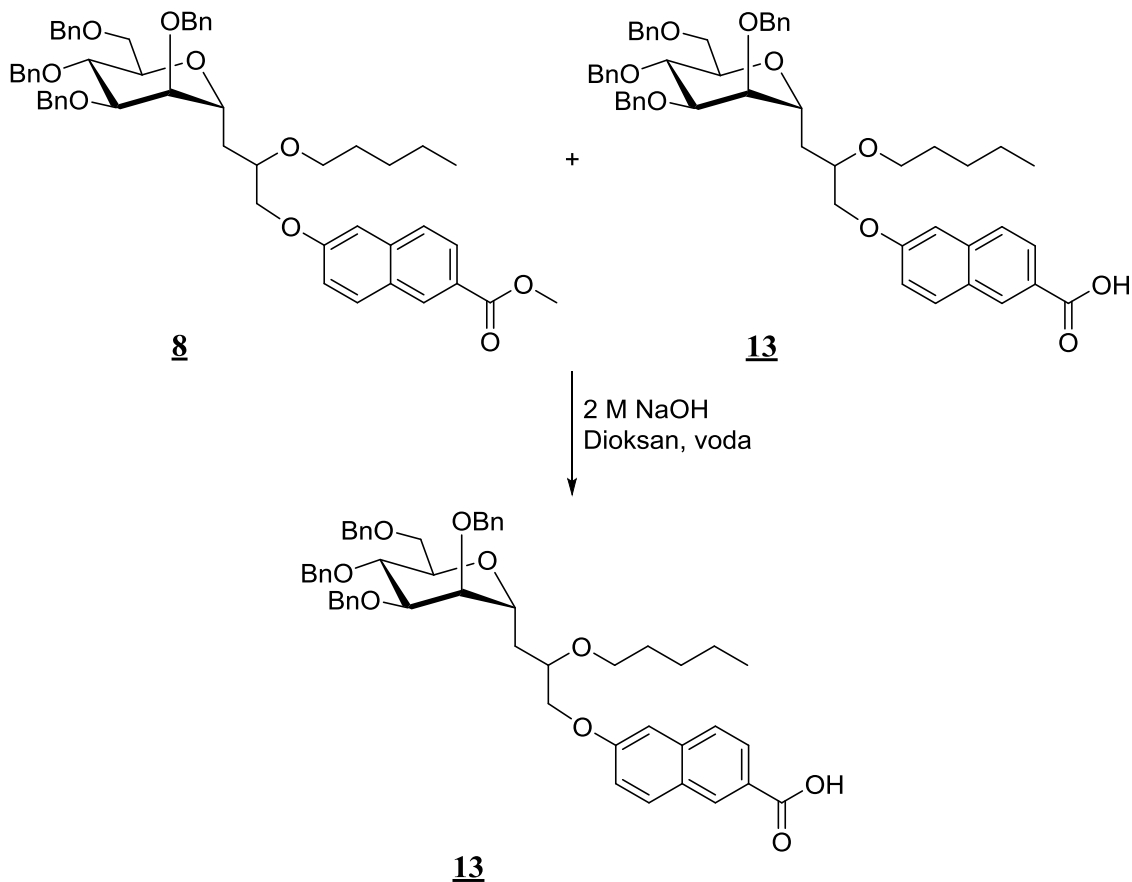
## 4.12 Sinteza 6-(2-pentiloksi-3-( $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftalenske kisline

### 4.12.1 Hidroliza zmesi spojin **8** in **11**



Med postopkom sinteze spojine **11** s kolonsko kromatografijo nismo uspeli izolirati spojine **8**, ampak smo dobili 43 mg zmesi spojin **8** in **11**. Zmes smo porabili pri nadaljnji sintezi, tako da smo jo raztopili v 5 mL metanola in dodali 118  $\mu$ L 2 M raztopine NaOH (0,237 mmol, 5 ekv glede na spojino **11**). Reakcijo smo spremljali s tankoplastno kromatografijo (mobilna faza heksan:etilacetat=2:1). Po 48 h mešanja pri sobni T smo dodali še 5 ekv 2 M raztopine NaOH (118  $\mu$ L, 0,237 mmol). Čez 16 ur smo uparili metanol pod znižanim tlakom, dodali nekaj mL vode in izvedli ekstrakcijo z etilacetatom. Organsko fazo smo sprali z nasičeno raztopino NaCl, nato jo posušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in uparili topilo pod znižanim tlakom. Iz NMR spektra je bilo razvidno, da smo dobili 42 mg zmesi spojin **8** in **13**.

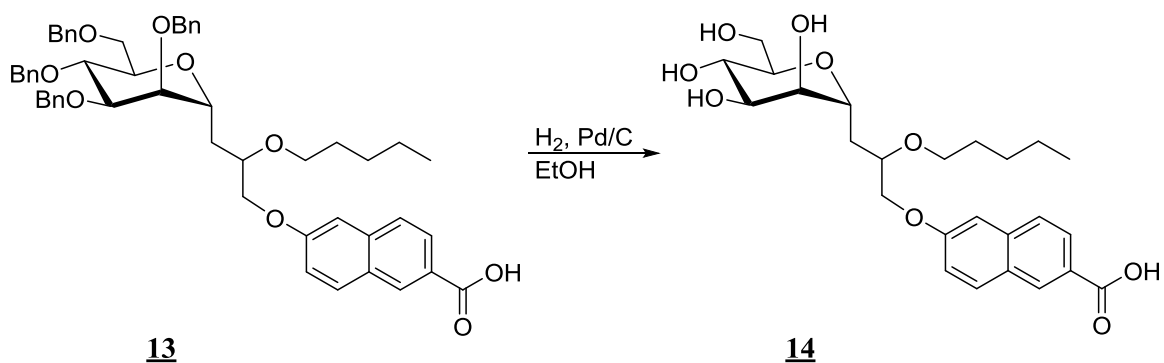
#### 4.12.2 Sinteza 6-(2-pentiloksi-3-(tetra-*O*-benzil- $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftalenske kisline



Zmes spojin **8** in **13** (42 mg) smo raztopili v 1 mL dioksana in 0,5 mL vode. Dodali smo 123  $\mu$ L 2 M raztopine NaOH (5 ekv glede na spojino **8**) in zmes segrevali na oljni kopeli pri 40 °C. Reakcijo smo spremljali s tankoplastno kromatografijo (mobilna faza heksan:etilacetat=2:1) in po približno 4 h prekinili s segrevanjem in dioksan uparili pod znižanim tlakom. Preostanku v bučki smo dodali nekaj mL vode in izvedli ekstrakcijo z etilacetatom, pri čemer je nastala bela emulzija in ločilo se je le nekaj mL etilacetata. Emulzijo smo ločili z nasičeno raztopino NaCl, združeni organski fazi posušili in topilo uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 30 mg spojine **13**.

<b>6-(2-pentiloksi-3-(tetra-<i>O</i>-benzil-<math>\alpha</math>-D-manopiranozil)propoksi)-2-naftalenska kislina</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>53</sub> H <sub>58</sub> O <sub>9</sub>	<b>Izgled:</b> rumeno trdno olje
<b>M<sub>r</sub>:</b> 839,04 g/mol	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0,0 (heksan:etilacetat=2:1)
<b>Izkoristek:</b> 72,6%	<b>Tališče:</b> /
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ 0,87-0,91 (m, 3H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1,25-1,35 (m, 6H, 3 x CH <sub>2</sub> ), 1,52-1,63 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 1,73-2,08 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3,62-3,95 (m, 8H, 7 x manoz-a-H, CH), 4,11-4,21 (m, 1H, OCHH), 4,32-4,40 (m, 1H, OCHH), 4,50-4,79 (m, 8H, 4 x ArCH <sub>2</sub> ), 7,17 (dd, 1H, J <sub>1</sub> =1,8 Hz, J <sub>2</sub> =5,3 Hz, Ar-H), 7,22 (dd, 2H, J <sub>1</sub> =2,0 Hz, J <sub>2</sub> =6,9 Hz, 2 x Ar-H), 7,28-7,34 (m, 18H, 18 x Ar-H), 7,41 (dd, 1H, J <sub>1</sub> =1,5 Hz, J <sub>2</sub> =7,8 Hz, Ar-H), 7,75 (t, 1H, J=9,1 Hz, Ar-H), 7,86 (dd, 1H, J <sub>1</sub> =6,4 Hz, J <sub>2</sub> =8,9 Hz, Ar-H), 8,08 (d, 1H, J=7,0 Hz, Ar-H), 8,63 (s, 1H, Ar-H) ppm; (v spektru ni razviden signal za proton iz COOH skupine)
<b>IR (ATR)</b>	v 3029, 2925, 2859, 1684, 1625, 1479, 1453, 1388, 1363, 1263, 1202, 1088, 1025, 911, 857, 820, 734, 696 cm <sup>-1</sup>

#### 4.12.3 Sinteza 6-(2-pentiloksi-3-( $\alpha$ -D-manopiranozil)propoksi)-2-naftalenske kisline



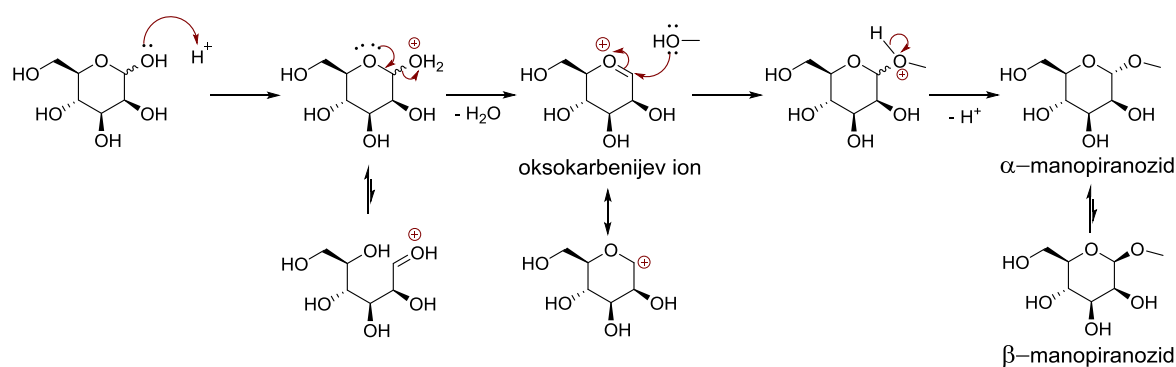
Spojino **13** (29 mg, 0,0346 mmol) smo raztopili v 6 mL etanola in raztopino prepihali z argonom. Dodali smo za konico žličke (približno 10% m/m, prenizka vrednost za tehtanje) katalizatorja Pd/C in prepihali z vodikom. V zaprt sistem smo dovajali H<sub>2</sub> preko igle iz napolnjenega balona. Za spremljanje reakcije smo razvijali TLC v mobilni fazi diklorometan:metanol=7:1. Po 24 h mešanja pri sobni T smo zamenjali balon z vodikom in po 2 h Pd/C odfiltrirali s presesavanjem in matičnici uparili etanol pod nižanim tlakom. Dobili smo 16 mg spojine **14**.

<b>6-(2-pentiloksi-3-(<math>\alpha</math>-D-manopiranozil)propoksi)-2-naftalenska kislina</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	<b>Izgled:</b> prozorno trdno olje
<b>M<sub>r</sub>:</b> 478,54 g/mol	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0,07 (diklorometan:metanol=7:1)
<b>Izkoristek:</b> 94,1%	<b>Tališče:</b> /
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	$\delta$ 0,89-0,93 (m, 3H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1,30-1,42 (m, 6H, 3 x CH <sub>2</sub> ), 1,59-1,66 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 1,74 (ddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> =2,9 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> =9,7 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> =14,4 Hz, CHH), 2,12-2,19 (m, 1H, CHH), 3,45-3,87 (m, 7H, 7 x manoz-a-H), 3,95-4,00 (m, 1H, CH), 4,15-4,31 (m, 2H, OCH <sub>2</sub> ), 7,26 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> =2,5 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> =9,0 Hz, Ar-H), 7,34-7,39 (m, 1H, Ar-H), 7,85 (d, 1H, <i>J</i> =8,6 Hz, Ar-H), 7,90-7,95 (m, 1H, Ar-H), 8,01 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> =1,5 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> =8,7 Hz, Ar-H), 8,54 (s, 1H, Ar-H) ppm (v spektru niso razvidni signali za protone iz OH skupin in COOH skupine)
<b>HRMS (ESI)</b>	Izračunan 477,2117; izmerjen 477,2125
<b>IR (ATR)</b>	$\nu$ 3254, 2926, 2858, 2487, 2361, 2341, 1685, 1626, 1479, 1389, 1340, 1261, 1202, 1061, 912, 807, 749, 693 cm <sup>-1</sup>

## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

#### 5.1.1 Sinteza *O*-glikozida in zaščita hidroksilnih skupin



**Shema 2.** Mehanizem Fischerjeve sinteze *O*-glikozida. Pri daljšem reakcijskem času nastane piranozidna oblika in izpostavi se ravnotežje v prid nastanka  $\alpha$ -anomera.

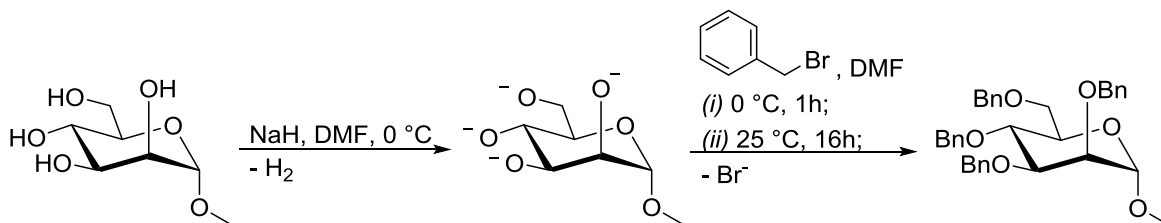
Pri sintezi potencialnih antagonistov FimH smo izhajali iz molekule monosaharida manoze in prva reakcija je bila tvorba *O*-glikozida na anomernem ogljikovem atomu ( $C_1$ ). Predhodna zaščita ostalih hidroksilnih skupin ni bila potrebna, ker je  $C_1$  najbolj reaktiven center molekule zaradi bližine obročnega atoma kisika, ki stabilizira karbokation med potekom reakcije. Ker smo imeli veliko podatkov v literaturi, smo izhajali iz večje količine izhodnih snovi. Izvedli smo neposredno metodo ali Fischerjevo sintezo, kjer reagirata ciklični hemiacetal oz. monosaharid in alkohol v prisotnosti kisline po mehanizmu dvostopenjske nukleofilne substitucije  $S_N1$  (25). Pri reakciji pride najprej do protonacije hidroksilne skupine na  $C_1$  z odvzemom vode iz manoze, kar vodi v nastanek resonančno stabiliziranega kationskega intermediata, t.i. oksokarbenijevaga iona. Sledi napad nukleofila (alkohol metanol) na kation in nastanek cikličnega acetala oz. enostavnega glikozida (**Shema 2**). Zaradi kislega okolja in nastanka vode med reakcijo, lahko pride do hidrolize glikozida, zato smo uporabili prebitek alkohola. Po končani reakciji alkohol uparimo pod znižanim tlakom, zato imajo prednost tisti z nizko temperaturo vrelišča, v našem primeru je bil to metanol. Med potekom sinteze se preko intermediata z odprto verigo (**Shema 2**) vzpostavi ravnotežje med nastankom manofuranozida (5-členski obroč) in nastankom manopiranozida (6-členski obroč). Manofuranozid nastane hitro, ampak se



po določenem času izomerizira v termodinamsko in konformacijsko stabilnejšo obliko manopiranoze. Glavni produkt med  $\alpha$ - in  $\beta$ -izomerom je tisti, ki je stabilnejši zaradi anomernega učinka (26). Nastanek spojine **1** smo torej dosegli z dolgim časom (18 h) segrevanja reakcijske zmesi. Reakcijo je katalizirala močno kislja ionsko-izmenjevalna smola Amberlite IR120 s sulfonskimi funkcionalnimi skupinami (27). Uporaba ionsko-izmenjevalne smole je najbolj ugodna, ker jo po končani reakciji enostavno odstranimo s filtriranjem (26). Dobili smo produkt v obliki smole, čeprav smo glede na podatke iz literature pričakovali nastanek kristalov. Najprej smo odstranili morebitne ostanke topila z vakuumsko črpalko in nato izvedli prekrystalizacijo iz etanola. Ker pri sobni temperaturi niso izpadli kristali, smo bučko hladili na ledu in dodali nekaj vode. Po dodatku dietiletra in hlajenju v hladilniku se je ponovno izoborila smoli podobna snov, nato smo posneli NMR spekter in ugotovili, da je produkt čista spojina **1**. Iz tega sledi, da spojina pri danih pogojih ne tvori kristalov, ampak se izobori kot amorfna snov v obliki smole. Izkoristek reakcije je bil 91,2% zaradi morebitnih izgub pri izolaciji in poskusu prekrystalizacije. Spojino **1** smo shranjevali v zamrzovalniku.

V naslednji stopnji smo zaščitili preostale hidroksilne skupine manoze, da smo zagotovili selektivnost poteka nadaljnjih reakcij. Izbrali smo uvedbo benzilnega etra, ker je obstojen proti oksidantom, hidridom in pri  $\text{pH} > 1$  ter se selektivno odstranjuje s katalitskim hidrogeniranjem (28). Eter se tvori pod klasičnimi pogoji Williamsonove sinteze z uporabo benzil bromida, polarnega aprotičnega topila DMF in baze natrijevega hidrida (26). Williamsonova reakcija je bila odkrita leta 1850 in je še vedno najboljša osnovna metoda za pripravo nesimetričnih ali simetričnih etrov. Večina takšnih sintez poteka po mehanizmu  $\text{S}_{\text{N}}2$  (29). Izhodno spojino smo raztopili v DMF in najprej počasi dodajali natrijev hidrid (NaH). Ker je NaH zelo reaktiven, burno reagira z vodo in je občutljiv tudi na vlago v zraku, smo uporabili 60% trdno disperzijo NaH v parafinu in reakcijo izvajali v brezvodnih pogojih. Močna baza reagira s prostimi hidroksilnimi skupinami manoze, te se deprotonirajo in pri tem iz reakcijske zmesi izhaja vodik (**Shema 3**). Ko je iz zmesi nehal izhajati vodik, smo začeli s kapalnikom počasi dodajati benzilbromid in burnost eksotermne reakcije preprečili s hlajenjem reakcijske zmesi. Nato smo reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi in arilhalid je reagiral z deprotoniranimi OH skupinami, nastali so štiri benzilni etri vezani na manozo (**Shema 3**). Za prekinitev reakcije smo uporabili metanol, ki je reagiral s prebitnim benzilbromidom in NaH. Produkt **2** smo po

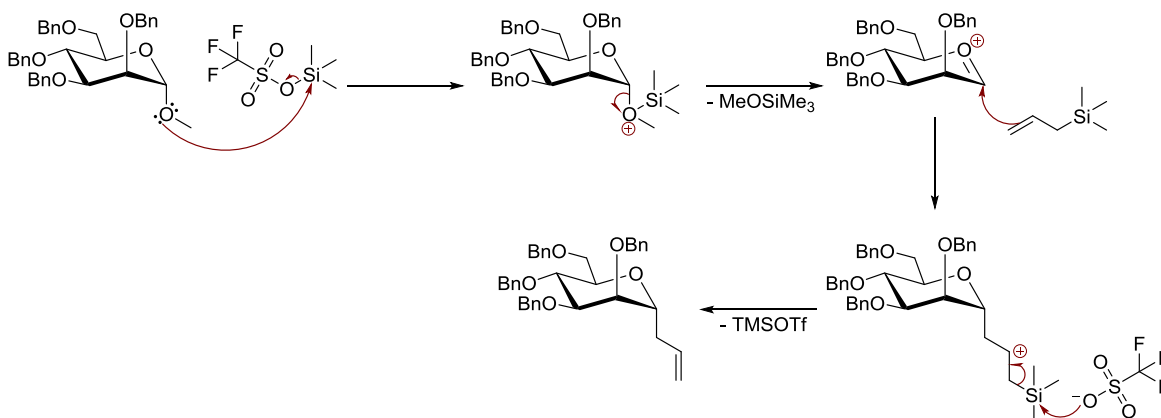
izolaciji z ekstrakcijo očistili s kolonsko kromatografijo. Da smo dosegli boljšo ločbo, smo začeli z razmerjem heksan:etilacetat=10:1, na koncu pa smo spirali kolono z MF heksan:etilacetat=2:1.



**Shema 3.** Uvajanje benzilne zaščite.

### 5.1.2 Sinteza C-glikozida

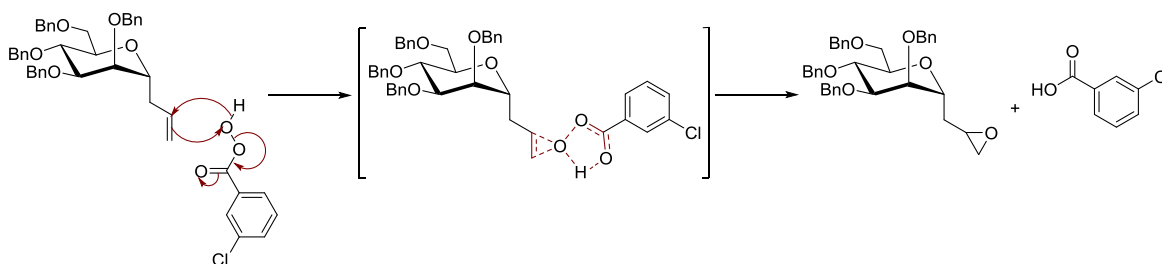
Eden glavnih ciljev eksperimentalnega dela je bila tvorba C-manozidov in tako povečati hidrolitsko stabilnost v primerjavi z O-manozidnimi analogi. Večina do sedaj znanih antagonistov FimH ima namreč C-O vez med aglikonom in  $\alpha$ -D-manopiranozidom, zato je bila tvorba novih antagonistov s C-C vezjo novost in izziv. Med najpomembnejše in najbolj razširjene metode sinteze C-glikozida sodi reakcija med glikozidnim donorjem in organskim derivatom silana v prisotnosti Lewisove kisline (30). Opirali smo se na podatke iz literature in izvedli reakcijo, pri kateri ima vlogo Lewisove kisline trimetilsilil trifluorometansulfonat (TMSOTf), ki tvori kation manozida, s katerim nato reagira aliltrimetilsilan kot nukleofil (**Shema 4**). Kot topilo smo uporabili brezvodni acetonitril (31).



**Shema 4.** Sinteza C-glikozida z uporabo TMSOTf kot katalizatorja.

Trimetilsilil trifluorometansulfonat ali TMSOTf je brezbarvna jedka tekočina, ki je lahko vnetljiva, občutljiva na toploto in zrak ter burno reagira z vodo. Vnetljivost in občutljivost na visoko temperaturo sta značilni tudi za aliltrimetilsilan, zato oba reagenta shranjujemo v hladilniku (32, 33). Zaradi narave reagentov smo reakcijo izvajali v brezvodnem okolju in v atmosferi inertnega plina argona pri 0 °C. Pri danih pogojih in stereoelektronskih učinkih, ki so posledica piranozne oblike spojine **2**, poteka napad nukleofila prednostno z aksialne smeri, kar vodi v stereoselektivni nastanek  $\alpha$ -manozida (30). Po končani reakciji smo uparili acetonitril pod znižanim tlakom, nato smo po kapljicah dodajali nasičeno raztopino natrijevega hidrogenkarbonata, da je potekla hidroliza prebitka reagentov in sledeča nevtralizacija reakcijske zmesi. Po izvedbi ekstrakcije smo morali spojino **3** očistiti s kolonsko kromatografijo.

### 5.1.3 Sinteza epoksida



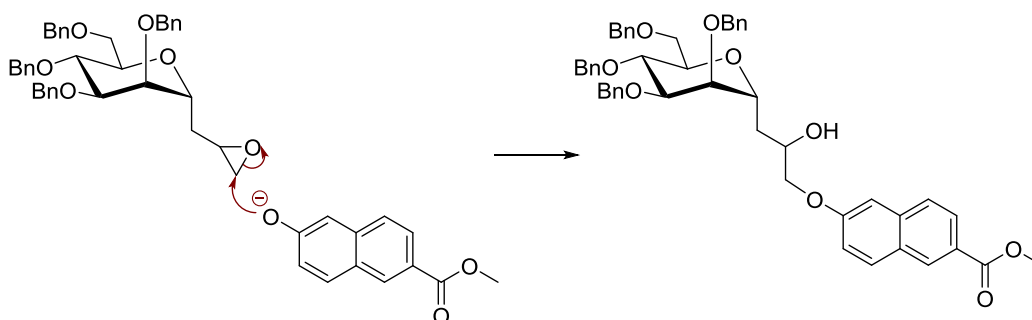
**Shema 5.** Epoksidacija spojine **3** z uporabo mCPBA - Prilezhaeva reakcija.

Epoksidacija alkena spojine **3** spada v širšo skupino oksidacij, ki so ene izmed najpomembnejših in hkrati najbolj problematičnih reakcij v sintezi organskih spojin (34). Široko uporabo ima t.i. Prilezhaeva reakcija, ki smo jo izvajali tudi sami (29). Kot oksidant smo uporabljali peroksikarboksilno kislino mCPBA (*meta*-kloroperoksibenzojska kislina), ki se pogosto uporablja za epoksidacijo v laboratoriju zaradi reaktivnosti pod milimi pogoji in relativno enostavnega rokovanja. Izredna reaktivnost izhaja iz šibke O-O vezi in nukleofilne OH skupine (34). Uporabili smo 77% mCPBA, ki je stabilizirana s klorobenzojsko kislino in vodo ter ni problematična za uporabo v manjših količinah. Čista mCPBA je namreč občutljiva na udarce in vnetljiva, v koncentracijah nad 85% pa je potencialno eksplozivna. S tem reagentom smo ves čas delali v digestoriju z zaščitnimi rokavicami in očali, ker deluje dražilno na kožo, oči, sluznice in dihala (34). Zaradi močnega oksidativnega delovanja smo za tehtanje uporabljali plastičen čolniček in žličko.

Na začetku smo uporabili 1,2 ekvivalenta mCPBA, nato smo dodali še 1 ekvivalent, da smo pospešili reakcijo. Iz šibke O-O vezi se je prenesel en kisikov atom na alken po mehanizmu  $\text{sin Ad}_E$  (25) (**Shema 5**). Reakcija je potekala pri zmernem segrevanju le nekaj ur in po končani reakciji smo izvedli ekstrakcijo z 1 M NaOH, ki je reagiral s prebitno peroksi in nastalo karboksilno kislino (35). Tudi spojino **4** je bilo potrebno očistiti s kolonsko kromatografijo.

### 5.1.4 Sinteza naftolata

Sintezo smo izvajali kot alkoholizo epoksida, ki lahko poteka tako po mehanizmu  $\text{S}_{N1}$  kot  $\text{S}_{N2}$  (29). Začeli smo s tvorbo fenolatnega aniona metil 6-hidroksi-2-naftolata s KOH v metanolu, ki smo ga potem uparili pod znižanim tlakom in nastali so fluorescentno rumeni kristali soli. Zaradi ionske narave nastale soli in nepolarnih lastnosti spojine **4**, smo uporabili zmes dveh organskih topil, nepolarnega toluena in polarnega aprotičnega *N,N*-dimetilformamida (DMF), in tako dosegli, da sta se obe spojini raztopili. Za lažji potek reakcije v takšnem sistemu smo uporabili tetrabutilamonijev bromid, ki je kvarтерна amonijeva sol in deluje kot katalizator faznega prenosa. Katalizator faznega prenosa olajša prehod reaktanta iz ene faze v drugo, kjer poteka reakcija. Z uporabo katalizatorja pospešimo potek reakcije v takšnih heterogenih sistemih, dosežemo višje izkoristke in se izognemo nastanku stranskih produktov (36). Reakcijsko zmes smo segrevali pri 100 °C in tako še dodatno pospešili reakcijo. Med reakcijo fenolatni anion kot nukleofil napade  $\text{CH}_2$  skupino oksiranskega obroča spojine **4** (**Shema 6**).



**Shema 6.** Nukleofilni napad fenolatnega aniona na epoksidni obroč spojine **4**.

Reakcijo smo spremljali s tankoplastno kromatografijo z mobilno fazo heksan:etilacetat=2:1 z dodatkom oetne kisline, da smo preprečili t.i. kislinski rep na

kromatogramu. Sintezo smo prekinili tako, da smo topilo uparili pod znižanim tlakom. Suhi preostanek smo raztopili v etilacetatu in spirali z nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$ , da smo se znebili katalizatorja in ostankov reagenta. Sledilo je spiranje z 10% raztopino citronske kisline z namenom odstranjevanja ostankov DMF. Na koncu smo organsko fazo spirali z nasičeno raztopino NaCl in posušili nad natrijevim sulfatom. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom, ampak smo morali produkt **5** očistiti še s kolonsko kromatografijo.

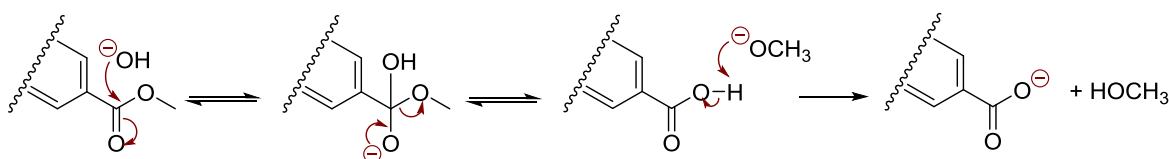
### 5.1.5 Vezava alkilne verige

Med eksperimentalnim delom nam je vezava pentilne verige povzročala največ težav. Prvotni načrt je vključeval vezavo alkila le na hidroksilno skupino distančnika med manozo in naftolatom, kot pri spojini **8**. Reakcijo smo izvajali pod pogoji Williamsonove sinteze etra, po podobnem postopku kot smo uvajali benzilno zaščito. Kot pri zaščiti hidroksilnih skupin manoze, smo uporabljali 60% trdno disperzijo NaH in topilo DMF, reakcija se je razlikovala le v uporabi 1-bromopentana kot reagenta. Reakcijo smo prekinili že po 4 h, ker je bilo iz razvitih kromatografskih ploščic razvidno, da produkt ne nastaja več oz. da prihaja do hidrolize nastale spojine **8**. Nizki izkoristki so pogosti pri izvajanju Williamsonove sinteze na sekundarnih alkoholih (29) in ker je bil izkoristek naše sinteze zgolj 3,6%, smo želeli optimizirati reakcijske pogoje. Za preprečitev hidrolize produkta smo v naslednjem poskusu izvajali reakcijo v brezvodnih pogojih. Uporabljali smo dvogro bučko, iz katere smo izgnali zrak in vlago ter jo vpeli na destilacijsko napravo. V bučko smo tako natočili sveže destilirano brezvodno polarno aprotično topilo tetrahidrofuran (THF), ki smo ga izbrali namesto DMF. V THF reakcija ni potekla, zato smo morali dodati v reakcijsko zmes DMF in katalizator faznega prenosa. Pod takšnimi pogoji je bila sinteza uspešna, ampak glavni produkt reakcije je bila spojina **9**. Iz končnega poteka reakcije je razvidno, da že minimalna prisotnost vode povzroči alkalno hidrolizo metilnega etra naftalenske kisline, zaradi bazičnih reakcijskih pogojev. Na takšen način nastane nov reaktivni center, ki je manj sterično oviran. Natrijeve soli karboksilnih kislin hitro reagirajo s primarnimi in sekundarnimi bromidi že pri sobni temperaturi v dipolarnih aprotičnih topilih in tako nastanejo estri karboksilne kisline. Reakcija sledi mehanizmu  $\text{S}_{\text{N}}2$ . Znano je tudi, da katalizator faznega prenosa pospešuje nastanek etra (29). Sintezni postopek smo ponovno želeli izboljšati tako, da smo reakcijo izvajali v zaprtem sistemu s sveže pripravljenim brezvodnim DMF. Tudi v tem primeru reakcija ni potekala po predvidenem načrtu, zato smo v reakcijsko zmes dodali prebitek 1-bromopentana in NaH, da se je

alkilna veriga vezala na oba reaktivna centra in nastala je spojina **11** s pentilnim estrom in etrom.

### 5.1.6 Alkalna hidroliza

Iz sintetiziranih spojine **6**, **8** in **11** smo z alkalno hidrolizo pripravili novi spojini **7** in **13**, ki imata namesto metilnega oz. pentilnega estra na naftalenskem obroču karboksilno funkcionalno skupino. Pri alkalni hidrolizi ima vlogo nukleofila hidroksilni ion, ki napade karbonilni ogljikov atom, pri čemer izstopi iz molekule alkoksid in nastane karboksilna kislina. Alkoksid je slabo izstopajoča skupina, ampak je tudi močna baza, ki odvzame proton karboksilni kislini in tako nastaneta alkohol in karboksilatni anion (**Shema 7**). Zadnja stopnja je edina, ki ni reverzibilna, ker je anion kisline prešibka baza, da bi lahko odvzela proton alkoholu. Prav zaradi ireverzibilnosti zadnje stopnje je alkalna hidroliza večkrat izbrana metoda kot kislinsko katalizirana hidroliza. Baza v tem primeru ne deluje kot katalizator v pravem pomenu besede, ker se med potekom reakcije ne regenerira (37).



**Shema 7.** Alkalna hidroliza metilnega estra naftolata. V zadnji stopnji se ireverzibilno tvori anion karboksilata.

Alkalno hidrolizo spojine **6** smo izvajali v metanolu s prebitkom 2 M raztopine NaOH. Reakcijo smo spremljali s tankoplastno kromatografijo in sproti dodajali NaOH za pospešitev tvorbe produkta. Metanol, ki smo ga uporabljali kot topilo, in ki je tudi nastal med reakcijo, smo uparili pod znižanim tlakom. Po ekstrakciji z etilacetatom smo vodno fazo nakisali z 1 M HCl, da smo protonirali karboksilno skupino. Produkt je bil slabo topen v organskem topilu, ker smo že izvedli odstranitev benzilne zaščite in ima zato molekula **6** več prostih polarnih hidroksilnih skupin. Zaradi slabše topnosti smo morali ekstrakcijo večkrat ponoviti z manjšim volumnom etilacetata in izkoristek sinteze je bil zato nižji.

Po enakem postopku smo izvedli alkalno hidrolizo zmesi spojin **8** in **11**. V tem primeru je bila benzilna zaščita še prisotna in je produkt pri ekstrakciji prešel v organsko

fazo brez predhodnega nakisanja vodne faze. Po izolaciji in posnetem NMR spektru smo ugotovili, da smo dobili zmes spojin **8** in **13**. Alkalno hidrolizo smo še enkrat ponovili z zamenjavo topila z zmesjo dioksana in vode, zato da smo preprečili ponovno tvorbo metilnega estera. Po končani reakciji smo uparili dioksan pod znižanim tlakom in izvedli ekstrakcijo z etilacetatom. Pred tem bi morali nakisati vodno fazo, vendar ker se je med ekstrakcijo tvorila emulzija, smo fazi potem ločili z dodatkom nasičene raztopine NaCl. Združenim organskim fazam smo uparili topilo pod znižanim tlakom in dobili produkt **13**.

### 5.1.7 Katalitsko hidrogeniranje

Po končanih vseh stopnjah sinteze spojin **5**, **9**, **11** in **13** smo odstranili benzilno zaščitno hidroksilnih skupin manoze s katalitskim hidrogeniranjem. Katalitsko hidrogeniranje poteka v vodikovi atmosferi ob prisotnosti katalizatorja. Uporabili smo katalizator 10% m/m paladij na trdnem ogljikovem nosilcu (Pd/C). Pd/C je heterogeni skeletni katalizator, ki ga zaradi visoke reaktivnosti in vnetljivosti uvajamo v argonovi atmosferi. Skeletni katalizator ima številne pore in s tem veliko specifično površino, kamor se adsorbira vodik (38). Ko je masa izhodne spojine manjša ali enaka 2 g, uporabljamo 10% m/m Pd/C, v primeru večjih mas pa 5% m/m Pd/C. Pri vseh štirih spojinah je bil postopek sinteze približno enak in pri vseh smo uporabljali enogrle bučke, ker smo imeli na voljo manjše količine spojin. Najprej smo izhodno spojino raztopili v etanolu, bučko smo zamašili s septumom in nato raztopino in bučko prepihali z argonom. Plin smo dovajali iz napolnjenega balona preko igle, ki je segala v raztopino. Ker je argon težji od zraka, ga je izpodrival ven iz raztopine in bučke skozi drugo iglo, s katero smo prebodli septum in je nismo zamašili. V Ar atmosferi smo v raztopino dodali približno za 10% mase izhodne spojine katalizatorja Pd/C, tega v primeru spojin **9**, **11** in **14** nismo tehtali, ker je bila masa Pd/C premajhna za natančno tehtanje na laboratorijski tehtnici. Po dodatku katalizatorja smo bučko in raztopino prepihali z vodikom na enak način, kot smo to naredili z Ar, tega pa je bilo treba izgnati, da ne bi motil stika med H<sub>2</sub>, katalizatorjem in izhodno spojino. Reakcijo smo izvajali pri sobni T in ves čas je igla, na kateri je bil pritrjen balon z vodikom, segala v reakcijsko zmes. Po končani reakciji smo Pd/C odfiltrirali s presesavanjem in etanol uparili pod znižanim tlakom. V primeru spojine **9** je reakcija potekla že v 24 h in produkt **10** po izolaciji ni bilo potrebno čistiti. Na enak način smo dobili čisti produkt **14**, čeprav je reakcija potekala 2 h dlje. Hidrogeniranje spojin **5** in **11** je potekalo 24 h dlje in glavna produkta je bilo potrebno očistiti. Pri produktu **6** smo izvedli

prekristalizacijo, ker so izpadli kristali čiste spojine že v mobilni fazi za kolonsko kromatografijo, vendar smo matičnico nato vseeno nanegli na kolono in tako izolirali dodatnih nekaj mg spojine **6**. Katalitsko hidrogeniranje spojine **11** je edino, ki nam ni dalo pričakovanega produkta. Že med potekom reakcije smo morali dodati katalizator, reakcija je potekla z zelo nizkim izkoristkom in NMR spekter očiščenega produkta ni ustrezal strukturi spojine **12**. Spojina **11** je večja in bolj lipofilna od ostalih spojin, kar je verjetno vplivalo na potek odstranitve benzilne zaščite in adsorpcijo na ogljikov nosilec.

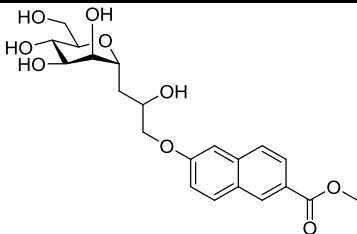
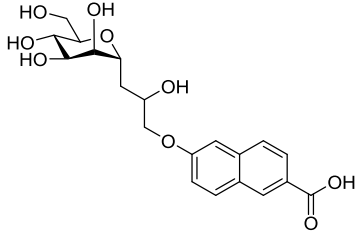
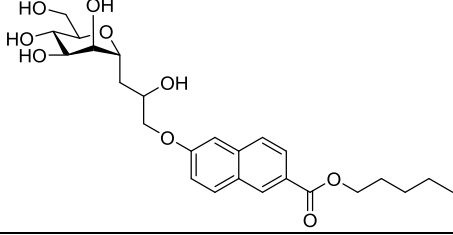
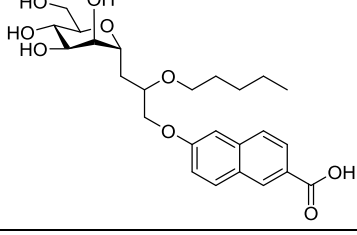


## 5.2 REZULTATI BIOLOŠKEGA VREDNOTENJA

### 5.2.1 FimH

Sintetiziranim spojinam **6**, **7**, **10** in **14** so določili antagonistično aktivnost na receptorju FimH. Konstante disociacije so zbrane v *Preglednici I*.

*Preglednica I* Rezultati biološkega vrednotenja aktivnosti spojin **6**, **7**, **10** in **14**. Antagonistom so določili konstanti disociacije ( $K_D$ ) s celotnim adhezinom FimH ('full-length' FimH) in z lektinsko domeno FimH.

Oznaka spojine	Strukturna formula	$K_D$ 'full-length' FimH [ $\mu\text{M}$ ]	$K_D$ lektinska domena FimH [nM]
<b>6</b>		$8,7 \pm 1,0$	$77,3 \pm 21,0$
<b>7</b>		$17,2 \pm 2,0$	$211,0 \pm 55,5$
<b>10</b>		$46,4 \pm 6,6$	$265,8 \pm 22,7$
<b>14</b>		$2,3 \pm 0,6$	$28,8 \pm 16,6$

Afiniteta vezave je predstavljena z vrednostmi  $K_D$  in velja, da manjša kot je vrednost konstante, močnejša je vezavna afiniteta med antagonistom in FimH ali lektinsko domeno FimH. Vse spojine so strukturno precej podobne  $\alpha$ -D-manopiranozidu z naftalenom kot delom aglikona. Spojine **6**, **7** in **10** se razlikujejo glede na substituent na

mestu 2 naftalenskega obroča. Spojina **10** je imela najslabšo afiniteto in iz tega sledi, da daljše alkilne verige na aromatskem substituentu ne pripomorejo k boljši vezavi. Verjetno predstavljajo celo oviro v fleksibilnosti povezovanja liganda z lektinom. Boljše rezultate izkazuje spojina **7** s karboksilno skupino, ki je veliko manjša in hidrofilna, tako da tvori drugačne interakcije z vezavnim mestom kot spojina **10**, kot so npr. vodikove vezi izven območja tirozinskih vrat. Antagonist **6** z metilnim estrom je med temi tremi izkazal največjo afiniteto s konstantama 8,7  $\mu\text{M}$  glede na FimH in 77,3 nM glede na lektinsko domeno FimH. V primerjavi s spojino **7** se razlikuje v tem, da ima metilni ester na aromatskem obroču, torej krajša alkilna veriga zmanjša polarnost substituenta in optimizira vezavo, vendar vezana skupina ne sme ovirati fleksibilnosti molekule. Raziskovanje vpliva substituenta na aromatskem obroču ima velik potencial pri optimiziranju strukture antagonista.

Zamenjava *O*-glikozidne vezi s *C*-glikozidno je imela pozitiven vpliv na afiniteto. Za *C*-glikozidne antagoniste FimH predpostavljajo, da se molekula vode preusmeri iz območja *C*-glikozidne povezave na področje vezave sladkorja, kjer se tvorijo vodikove vezi in lahko dodatna molekula vode poveča jakost vezave. Pri *O*- in *N*-glikozidih molekula vode ostaja pri povezavi med sladkorjem in aglikonom (18). Da bi to pokazali tudi za naše spojine, so potrebne nadaljnje študije. Pri spojinah **6**, **7** in **10** ta pojav verjetno ni tako očiten, ker imajo na distančniku med manozo in aromatom vezano hidroksilno skupino. Spojina **14** ima na istem mestu vezan pentilni eter in s tem ima dodatno hidrofobno območje in je preusmeritev vodnih molekul očitnejša. Antagonist **14** ima tudi najboljše rezultate med vsemi testiranimi spojinami s  $K_D$  2,3  $\mu\text{M}$  za FimH in 28,8 nM za lektinsko domeno FimH. Veriga sicer zmanjša fleksibilnost molekule, vendar lahko tvori tudi dodatne interakcije s hidrofobnim grebenom zunaj CRD, zlasti z Ile52.

D-manozidi s *C*-glikozidno vezjo so hidrolitsko stabilnejši v primerjavi z analogi s povezavo preko kisikovega ali dušikovega atoma in imajo lahko celo boljšo afiniteto vezave. Takšni antagonisti imajo veliko možnosti uporabe v terapiji okužbe sečil z UPEC in naše eksperimentalno delo poleg novih spojin prinaša tudi nova vprašanja glede možnosti optimizacije strukture aglikona.

### 5.2.2 DC-SIGN

Za določitev afinitete vezave spojin na lektin DC-SIGN so izvedli dvotočkovni test, pri katerem so *in vitro* merili odstotek vezave naravnega liganda gp120 na DC-SIGN pri dveh različnih koncentracijah potencialnega antagonista. Največjo inhibicijo vezave gp120 je dosegla spojina **10**.

DC-SIGN je transmembranski protein tipa II, ki v svoji strukturi vsebuje CRD, ki določa specifičnost vezave liganda. Primarno vezavno mesto za ogljikove hidrate CRD lektina DC-SIGN vsebuje ion  $\text{Ca}^{2+}$ , ki tvori šest koordinacijskih vezi s samim proteinom in dve vezi s sladkorno enoto liganda. V primeru  $\alpha$ -D-manoze tvorita koordinacijski vezi ekvatorialni hidroksilni skupini na mestih 3 in 4, poleg tega tvorita tudi vodikove vezi z aminokislinskima ostankoma Glu347 in Glu354, ki sta tudi povezana s kalcijevim ionom. Medtem ko se sladkor zasidra v CRD, ima aglikon vlogo tvorjenja dodatnih interakcij in s tem povečati afiniteto vezave. Tarčno vezavno mesto aglikona je hidrofobna regija, ki je definirana s Phe313. Fenilni obroč Phe313 tvori dva hidrofobna vezavna žepa: eden za vezavnim mestom za kalcijev ion in drugi za stransko verigo Phe313 (23). Glede na strukturo spojine **10** tvori naftalenski obroč s pentilnim estrom interakcije z enim hidrofobnim žepom.

Čeprav so bile vse spojine, ki smo jih sintetizirali, načrtovane kot antagonisti FimH, je spojina **10** dosegla obetavne rezultate kot antagonist DC-SIGN, kar spodbuja nadaljnje načrtovanje podobnih  $\alpha$ -D-manopiranozidov tudi kot potencialnih učinkovin za lokalno aplikacijo na sluznico spolovil z namenom preprečevanja okužbe z virusom HIV-1. Glede na dvotočkovni test je bil odstotek vezave gp120 na DC-SIGN 21,6 (s standardno deviacijo 1,3%) pri koncentraciji spojine **10** 0,5 mM in 77,5 (s standardno deviacijo 3,3%) pri koncentraciji 0,1 mM. Iz teh podatkov so nato izračunali vrednost  $\text{IC}_{50}$   $0,173 \pm 0,0165$  mM ( $R^2=0,997$ ), ki predstavlja koncentracijo antagonista, pri kateri se zmanjša vezava naravnega liganda na DC-SIGN za 50%.

## 6 SKLEP

Hitro naraščajoča bakterijska rezistenca proti obstoječim protibakterijskim učinkovinam je vedno večji problem javnega zdravja po celem svetu, zato se povečujejo potrebe po novih protibakterijskih učinkovinah ali po novih pristopih k zdravljenju bakterijskih okužb. Obetavne so nove učinkovine, ki preprečujejo adhezijo patogenov na gostiteljsko celico, saj imajo široko področje uporabe tako v zdravljenju kot v preprečevanju bakterijskih ali virusnih okužb.

Osredotočili smo se na sintezo antagonistov FimH, ker je znana struktura tarče in ker so potrebne nove učinkovine zlasti za preprečevanje okužbe sečil. Pričakovali smo, da bo večstopenjska tvorba C-glikozidne vezi med manozo in aglikonom najbolj problematičen korak sinteze, ker so večina do sedaj znanih antagonistov O-, N- ali S-manozidi. Edina večja težava, ki se je pojavila pri tej stopnji, je bila izbira aromatskega sistema, saj vezava naftalenskega obroča z drugačnim vzorcem vezanih substituentov, kot pri metil 6-hidroksi-2-naftolatu, ni uspela. Kot bolj problematična se je izkazala sinteza spojine **8** oz. vezava pentilne verige na hidroksilno skupino distančnika med sladkorjem in naftalenskim obročem. Poskušali smo optimizirati reakcijske pogoje, ampak kot rezultat smo dobili drugačne spojine od načrtovane. Nastale so namreč spojine **9**, **11** in **13** ter iz teh končni spojini **10** in **14**. Pri biološkem vrednotenju končnih spojin je ravno spojina **14** dosegla najboljšo afiniteto vezave na lektinsko domeno FimH in tudi na celoten lektin. Tej so sledile po padajoči afiniteti spojini **6** in **7** ter najslabšo antagonistično aktivnost je imela spojina **10**. Dokazali smo, da so  $\alpha$ -D-manopiranozidi s C-glikozidno vezjo prav tako učinkoviti pri *in vitro* testiranju in naj bi bili hkrati hidrolitsko stabilnejši v primerjavi z antagonisti z drugimi vrstami vezi med sladkorjem in aglikonom, kar pa bi morali še eksperimentalno potrditi. S tem se tudi odpirajo nove možnosti optimizacije sinteze in strukture antagonistov FimH za izboljšanje njihovega anti-adhezivnega učinka in fizikalno-kemijskih lastnosti.

Spojini **10** smo določili tudi antagonistično delovanje na človeškem lektinu DC-SIGN. Pri tem smo dokazali, da je mogoča uporaba spojine **10** tudi za preprečevanje okužbe z virusom HIV-1. Tudi tukaj je prisotna še dolga pot optimizacije in nadaljnjih testiranj za pridobitev končne učinkovine za uporabo.

## 7 VIRI

1. Dason S, Dason JT, Kapoor A: Guidelines for the diagnosis and management of recurrent urinary tract infection in women. *Can. Urol. Assoc. J.* 2011; 5: 316-322.
2. Gubina M, Ihan A in drugi. *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Medicinski razgledi*, Ljubljana, 2002: 379-382.
3. Wellens A, Lahmann M, Touaibia M, Vaucher J, Oscarson S, Roy R, Remaut H, Bouckaert J: The Tyrosine Gate as a Potential Entropic Lever in the Receptor-Binding Site of the Bacterial Adhesin FimH. *Biochemistry* 2012; 51: 4790-4799.
4. 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: 2221-2239.
5. Hooton TM, Gupta K: Acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women. [http://www.uptodate.com/contents/acute-uncomplicated-cystitis-and-pyelonephritis-in-women?source=search\\_result&search=acute+cystitis&selectedTitle=1~150](http://www.uptodate.com/contents/acute-uncomplicated-cystitis-and-pyelonephritis-in-women?source=search_result&search=acute+cystitis&selectedTitle=1~150). Dostop: 6. 7. 2016.
6. Ohlsen K, Oelschlaeger TA, Hacker J, Khan AS: Carbohydrate Receptors of Bacterial Adhesins: Implications and Reflections. *Top. Curr. Chem.* 2009; 288: 109-120.
7. Hartmann M, Lindhorst TK: The Bacterial Lectin FimH, a Target for Drug Discovery – Carbohydrate Inhibitors of Type 1 Fimbriae-Mediated Bacterial Adhesion. *Eur. J. Org. Chem.* 2011; 3583–3609.
8. Scharenberg M, Jiang X, Pang L, Navarra G, Rabbani S, Binder F, Schwardt O, Ernst B: Kinetic Properties of Carbohydrate-Lectin Interactions: FimH Antagonists. *ChemMedChem* 2014; 9: 78-83.
9. Tomašič T, Rabbani S, Gobec M, Mlinarič Raščan I, Podlipnik Č, Ernst B, Anderluh M: Branched  $\alpha$ -D-mannopyranosides: a new class of potent FimH antagonists. *MedChemComm* 2014; 5: 1247-1253.
10. Touaibia M, Wellens A, Shiao TC, Wang Q, Sirois S, Bouckaert J, Roy R: Mannosylated *G(0)* Dendrimers with Nanomolar Affinities to *Escherichia coli* FimH. *ChemMedChem* 2007; 2: 1190 – 1201.

11. Gross L, Forrero M: Bacterial Fimbriae Designed to Stay with the Flow. *PLoS Biology* 2006; 4(9): 1474-1475.
12. Zhou G, Mo WJ, Sebbel P, Min G, Neubert TA, Glockshuber R, Wu XR, Sun TT, Kong XP: Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. *J. Cell Sci.* 2001; 114: 4095-4103.
13. 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: 3945–3959.
14. 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: 4779–4792.
15. Urinary Tract Infections Part 1. <http://what-when-how.com/acp-medicine/urinary-tract-infections-part-1/>. Dostop: 12. 7. 2016.
16. 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: 1012 – 1020.
17. Vrtačnik K: Sinteza monovalentnih in tetravalentnih glicerolomanozidov kot potencialnih antagonistov receptorja DC-SIGN, Magistrska naloga. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2014: 13.
18. de Ruyck J, Lensink MF, Bouckaert J: Structures of C-mannosylated anti-adhesives bound to the type 1 fimbrial FimH adhesin. *IUCrJ* 2016; 3: 163-167.
19. Scharenberg M, Schwardt O, Rabbani S, Ernst B: Target Selectivity of FimH Antagonists. *J. Med. Chem.* 2012; 55: 9810–9816.
20. Chalopin T, Alvarez Dorta D, Sivignon A, Caudan M, Dumych TI, Bilyy RO, Deniaud D, Barnich N, Bouckaert J, Gouin SG: Second generation of thiazolylmannosides, FimH antagonists for *E. coli*-induced Crohn's disease. *Org. Biomol. Chem.* 2016; 14: 3913-3925.
21. Sivignon A, Yan X, Alvarez Dorta D, Bonnet R, Bouckaert J, Fleury E, Bernard J, Gouin SG, Darfeuille-Michaud A, Barnich N: Development of Heptylmannoside-Based Glycoconjugate Antiadhesive Compounds against Adherent-Invasive

- Escherichia coli* Bacteria Associated with Crohn's Disease. *mBio* 2015; 6(6): 1298-1315.
22. Alvarez Dorta D, Sivignon A, Chalopin T, Dumych TI, Roos G, Bilyy RO, Deniaud D, Krammer EM, de Ruyck J, Lensink MF, Bouckaert J, Barnich N, Gouin SG: The Antiadhesive Strategy in Crohn's Disease: Orally Active Mannosides to Decolonize Pathogenic *Escherichia coli* from the Gut. *ChemBioChem* 2016; 17: 936-952.
  23. Tomašič T, Hajšek D, Švajger U, Luzar J, Obermajer N, Petit-Haertlein I, Fieschi F, Anderluh M: Monovalent mannose-based DC-SIGN antagonists: Targeting the hydrophobic groove of the receptor. *Eur. J. Med. Chem.* 2014; 75: 308-326.
  24. Hajšek D: Testni sistem za določanje afinitete antagonistov receptorja DC-SIGN in vitro, Diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2012.
  25. Tišler M: Organska kemija, DZS, Ljubljana, 1991: 166-167; 356-359.
  26. Lindhorst TK: Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. Third edition, Wiley-VHC, Weinheim, 2007: 53-56; 70-71.
  27. Sigma-Aldrich Amberlite® IR120 hydrogen form.  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/216534?lang=en&region=SI>.  
Dostop: 15. 3. 2016.
  28. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmacevtska kemija III Vaje in Seminarji: Dodatne vsebine za razumevanje: Zaščitne skupine, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2010.
  29. Smith MB, March J: March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure. Sixth Edition, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2007: 529-539, 1169.
  30. Fraser-Reid B, Tatsuta K, Thiem J: Glycoscience. 2, Springer, Berlin; New York, 2008: 768-770.
  31. Bertozzi C, Bednarski M: C-Glycosyl compounds bind to receptors on the surface of *Escherichia coli* and can target proteins to the organism. *Carbohydr. Res.* 1992, 223: 243-253.
  32. Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate Safety Data Sheet.  
<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=SI&language=sl&productNumber=91741&brand=SI&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2F91741%3Flang%3Den>.  
Dostop: 30. 3. 2016.

33. Allyltrimethylsilane Safety Data Sheet.  
<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=SI&language=sl&productNumber=208264&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F208264%3Flang%3Den>. Dostop: 30. 3. 2016
34. Hussain H, Al-Harrasi A, Green IR, Ahmed I, Abbas G, Rehman NU: meta-Chloroperbenzoic acid (mCPBA): a versatile reagent in organic synthesis. RSC Adv. 2014; 4: 12882–12917.
35. Howard S, Withers SG: Bromoketone C-Glycosides, a new class of  $\beta$ -Gluconase Inactivators. J. Am. Chem. Soc. 1998; 120: 10326-10331.
36. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova, M, Pečar S: Farmacevtska kemija III, Vaje in seminarji, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2010: 71-72.
37. Dewick PM: Essentials of Organic Chemistry For Students of Pharmacy, Medicinal Chemistry and Biological Chemistry, J. Wiley & Sons, Chichester, 2006: 256-258.
38. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmacevtska kemija III Vaje in Seminarji: Dodatne vsebine za razumevanje: Redukcije in oskidacije - pregled reagentov, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2010.