

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**TINE KEPIC**

**DIPLOMSKA NALOGA**

**UNIVERZITENI ŠTUDIJ FARMACIJE**

**LJUBLJANA, 2009**

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**TINE KEPIC**

**SINTEZA MORFOLINSKIH GLIKOMIMETIKOV  
SYNTHESIS OF MORPHOLINE GLYCOMIMETICS**

**UNIVERZITENI ŠTUDIJ FARMACIJE**

**LJUBLJANA, 2009**

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom doc. dr. Marka Anderluha, mag. farm. NMR spektri so bili posneti v Centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani. Masni spektri so bili posneti na inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani. IR spektri so bili posneti na Fakulteti za farmacijo.

Iskreno se zahvaljujem mentorju za vso posredovano strokovno pomoč in nasvete ter obilico potrpljenja in dobre volje pri delu.

Zahvaljujem se tudi celotnemu osebju Katedre za farmacevtsko kemijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri diplomskem delu ter kolegom diplomantom za prijetno vzdušje.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Marka Anderluha, mag. farm.

Ljubljana, november 2009

Tine Kepic

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Iztok Grabnar, mag. farm.

# 1 VSEBINA

<b>1 VSEBINA .....</b>	<b>1</b>
<b>2 POVZETEK .....</b>	<b>3</b>
<b>3 SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>4</b>
<b>4 UVOD .....</b>	<b>6</b>
4.1 Bakterijska celična stena .....	6
4.1.1 Zgradba .....	6
4.1.2 Biosinteza peptidoglikana .....	8
4.1.3 Celična stena po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij .....	10
4.2 Protimikrobne učinkovine in njihov mehanizem delovanja .....	12
4.3 Rezistenza na protimikrobne učinkovine .....	13
4.4 Mur ligaze .....	15
4.4.1 MurD ligaza .....	15
4.4.2 Inhibitorji encima MurD .....	18
<b>5 NAČRT DELA .....</b>	<b>20</b>
<b>6 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>23</b>
<b>7 EKSPERIMENTALNO DELO .....</b>	<b>24</b>
7.1 REAKCIJSKE SHEME .....	24
7.1.1 Shema 1: Sinteza (2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil) tetrahidro-2H-piran-2-ola .....	24
7.1.2 Shema 2: Sinteza (2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil) tetrahidro-2H-piran-2-il 2-fenilacetata .....	24
7.1.3 Shema 3: Poskus sinteze (2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil) tetrahidro-2H-piran-2-il 2-fenilacetata .....	25
7.1.4 Shema 4: Sinteza terc-butil 2-((2R,3S,4R,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)acetata .....	25
7.1.5 Shema 5: Poskus sinteze 1-fenil-2-((2R,3S,4R,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)etanona .....	25
7.1.6 Shema 6: Poskus sinteze 3-((2S,6S)-2-(hidroksimetil)-6-(2,4,6-trioksoheksahidropirimidin-5-il)morfolino)propanojske kisline .....	26
7.1.7 Shema 7: Sinteza 3-((2S,6S)-2-(benziloksi)-6-(hidroksimetil)morfolino) propanojske kisline .....	27
7.1.8 Shema 8: Sinteza 3-((2S,6S)-2-(hidroksimetil)-6-(2-okso-2-feniletil)morfolino) propanojske kisline .....	28
7.2 SINTEZNI POSTOPKI IN REZULTATI ANALIZ .....	29
7.2.1 Sinteza benzilnega estra $\beta$ -alanina (benzil 3-aminopropanoata) .....	29
7.2.2 Sinteza $\alpha$ -D-alilglukozida .....	30
7.2.3 Sinteza (2S,3R,4S,5R,6R)-2-(aliloksi)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil) tetrahidro-2H-pirana .....	31
7.2.4 Sinteza (2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-ola .....	32
7.2.5 Sinteza (2R,3R,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(benziloksi)-2-(benziloksimetil)-6-metoksi tetrahidro-2H-pirana .....	33
7.2.6 Sinteza (2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-ola .....	34
7.2.7 Sinteza (2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il 2-fenilacetata .....	35

7.2.8 Poskus sinteze (2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il 2-fenilacetata .....	36
7.2.9 Sinteza terc-butil 2-((2R,3S,4R,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)acetata .....	37
7.2.10 Poskus sinteze 1-fenil-2-((2R,3S,4R,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il) etanona .....	38
7.2.11 Sinteza natrijevega 5- $\beta$ -D-glukopiranozilbarbiturata .....	39
7.2.12 Poskus sinteze benzil 3-((2S,6S)-2-(hidroksimetil)-6-(2,4,6-trioksoheksahidropirimidin-5-il)morpholino)propanoata .....	40
7.2.13 Sinteza (2S,3R,4S,5S,6R)-2-(benziloksi)-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-3,4,5-triola .....	41
7.2.14 Sinteza benzil 3-((2S,6S)-2-(benziloksi)-6-(hidroksimetil)morpholino)propanoata .....	42
7.2.15 Sinteza 3-((2S,6S)-2-(benziloksi)-6-(hidroksimetil)morpholino)propanojske kisline .....	43
7.2.16 Sinteza 1-fenil-2-((2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il) etanona .....	44
7.2.17 Sinteza benzil 3-((2S,6S)-2-(hidroksimetil)-6-(2-okso-2-feniletil)morpholino)propanoata .....	45
7.2.18 Sinteza 3-((2S,6S)-2-(hidroksimetil)-6-(2-okso-2-feniletil)morpholino)propanojske kisline .....	47
<b>8 RAZPRAVA .....</b>	48
<b>9 ZAKLJUČEK .....</b>	53
<b>10 LITERATURA .....</b>	54

## **2 POVZETEK**

Peptidoglikan, iz katerega je sestavljena bakterijska celična stena, s svojo trdnostjo zagotavlja preživetje bakterije tudi ob neugodnih razmerah v okolju. Inhibicija biosinteze peptidoglikana je zanimiv in priznan koncept delovanja protibakterijskih učinkovin predvsem zaradi selektivne toksičnosti, ki jo z njimi dosežemo. Pri sintezi peptidoglikana sodelujejo tudi encimi Mur, ki sintetizirajo znotrajcelični prekurzor UDP-*N*-acetilmuramil pentapeptid. Z zaviranjem delovanja encimov Mur lahko preprečimo sintezo peptidoglikana, zato so encimi Mur obetavne nove tarče delovanja protimikrobnih učinkovin.

V diplomski nalogi smo z različnimi sinteznimi pristopi poskušali sintetizirati spojine z morfolinskim obročem kot ustrezne mimetike *N*-acetilmuraminske kisline, ki bi lahko imele inhibitorno delovanje na MurD ligazo. Uspešno smo izvedli reakcijo dvojnega reduktivnega aminiranja in sintetizirali končni spojini 3-((2S,6S)-2-(hidroksimetil)-6-(2-okso-2-feniletil)morfolino)propanojsko kislino in 3-((2S,6S)-2-(benziloksi)-6-(hidroksimetil)morfolino)propanojsko kislino.

### 3 SEZNAM OKRAJŠAV

AcOH	ocetna kislina
ADP	adenozindifosfat
Ala	alanin
Ar	aromatski substituent
Arg	arginin
Asp	asparaginska kislina
ATP	adenozintrifosfat
Bn	benzilna skupina
CDCl <sub>3</sub>	devteriran kloroform
DKM	diklorometan
DMSO	dimetilsulfoksid
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
d	dublet
dd	dublet dubleta
ddd	dublet dubleta dubleta
dt	dublet tripleta
DMAP	4- <i>N,N</i> -dimetilaminopiridin
EI	elektronska ionizacija (electron ionization)
ESI	elektrosprej ionizacija (electrospray ionization)
Et	etilna skupina
EtOH	etanol
FAB	obstreljevanje s hitrimi atomi (fast atom bombardment)
G+	po Gramu pozitivni mikroorganizmi
G-	po Gramu negativni mikroorganizmi
Glu	glutaminska kislina
Gly	glicin
GluNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
HRMS	visoko ločljiva masna spektrometrija (high resolution mass spectrometry)
IC <sub>50</sub>	srednja inhibitorna koncentracija
IR	infrardeča spektroskopija
J	sklopitevna konstanta

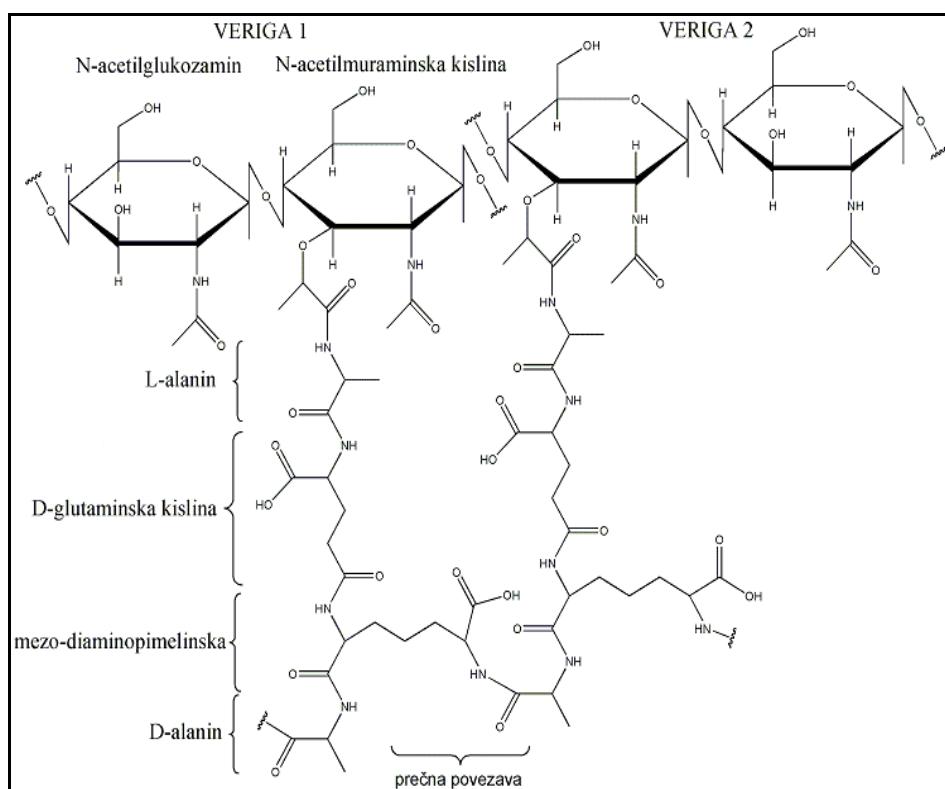
Lys	lizin
M	molarna koncentracija
m	multiplet
Me	metilna skupina
MeOH	metanol
m.f.	mobilna faza
Mr	molekulska masa
MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruviltransferaza
MurB	UDP- <i>N</i> -acetilenolpiruvilglukozamin reduktaza
MurC	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat L-alanin ligaza
MurD	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin D-glutamat ligaza
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamat <i>mezo</i> -diaminopimelat ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamil- <i>mezo</i> -diaminopimelat D-alanil-D-alanin ligaza
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
NMR	jedrska magnetna resonanca
Ph	fenilna skupina
s	singlet
Ser	serin
t	triplet
T <sub>tal</sub>	temperatura tališča
TBAB	tetrabutilamonijev bromid
TFAA	anhidrid trifluorocetne kisline
THF	tetrahidrofuran
Thr	treonin
TLC	tankoplastna kromatografija
TsOH	<i>p</i> -toluensulfonska kislina
UDP	uridin-difosfat
UMP	uridin-monofosfat
UMA	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin

## 4 UVOD

### 4.1 Bakterijska celična stena

#### 4.1.1 Zgradba

Bakterijska celična stena je kompleksna struktura, sestavljena iz makromolekul, ki jih ne najdemo pri drugih živih bitjih. Obdaja citoplazemskega membrano in je odgovorna za ohranitev oblike in enovitosti celice. Njen osnovni gradnik je prečno povezana polimerna molekula peptidoglikana (Slika 1), ki s svojo trdnostjo zagotavlja preživetje bakterije tudi v zelo hipotoničnem okolju. Ker ima edinstveno zgradbo, je peptidoglikan najprimernejša tarča protibakterijskih učinkovin. Edina rodova bakterij, pri katerih niso našli peptidoglikana, sta rodova *Mycoplasum* in *Clamidium*, našli pa so encime, ki so potrebni za sintezo celične stene (1).



Slika 1: Zgradba monomerne enote peptidoglikana in prečna povezava dveh polimernih verig peptidoglikana.

Linearne polisaharidne verige so sestavljene iz izmenjujočih se enot *N*-acetilglukozamina in *N*-acetilmuraminske kislina, ki so med seboj povezane z 1,4- $\beta$ -glikozidno vezjo. *N*-acetilmuraminska kislina je *N*-acetilglukozamin, ki ima na C-3 mestu z etersko vezjo pripeto D-laktoilno skupino. Na karboksilne skupine *N*-acetilmuraminskih kislín so pripeti pentapeptidi z naslednjim aminokislinskim zaporedjem: L-alanil-D-glutamil-mezodiaminopimelinil-D-alanil-D-alanin. *Mezo*-diaminopimelinska kislina je simetrična kislina z dvema kiralnima centroma s konfiguracijo D in L. Prečne povezave linearnih molekul se tvorijo s peptidno vezjo med tretjo aminokislino (*mezo*-diaminopimelinska kislina) ene polisaharidne verige in četrto aminokislino (D-alanin) druge polisaharidne verige (Slika 1). Takšna je struktura peptidoglikana pri *E. Coli*. Osnovna struktura peptidoglikana je relativno konstantna pri vseh bakterijah, obstajajo različne variacije med posameznimi rodovi in vrstami (1,2).

Pri G+ bakterijah je prečno povezanih okoli devetdeset odstotkov vseh peptidoglikanskih verig (*S. aureus*), medtem ko je stopnja premreženosti pri G- bakterijah le okoli dvajset odstotkov (*E. coli*). *Mezo*-diaminopimelinska kislina je lahko zamenjana z L-lizinom, L-ornitinom, L-diaminobutanojsko kislino ali L-homoserinom. Razlike so tudi v prostih karboksilnih skupinah D-glutaminske kisline in *mezo*-diaminopimelinske kisline, ki sta lahko nesubstituirani ali v obliki amida. Nekateri mikroorganizmi imajo muraminsko kislino modificirano tako, da tudi do polovica fragmentov nosi acetilno skupino na C-6 atomu. Fragmenti *N*-acetilglukozamina tudi izgubijo *N*-acetilni ostanek. Prečna povezava pri nekaterih G+ bakterijah poteka preko dodatnega pentaglicinskega mosta, ki se nahaja med *mezo*-diaminopimelinsko kislino ene verige in D-alaninom naslednje verige (2).

## **4.1.2 Biosinteza peptidoglikana**

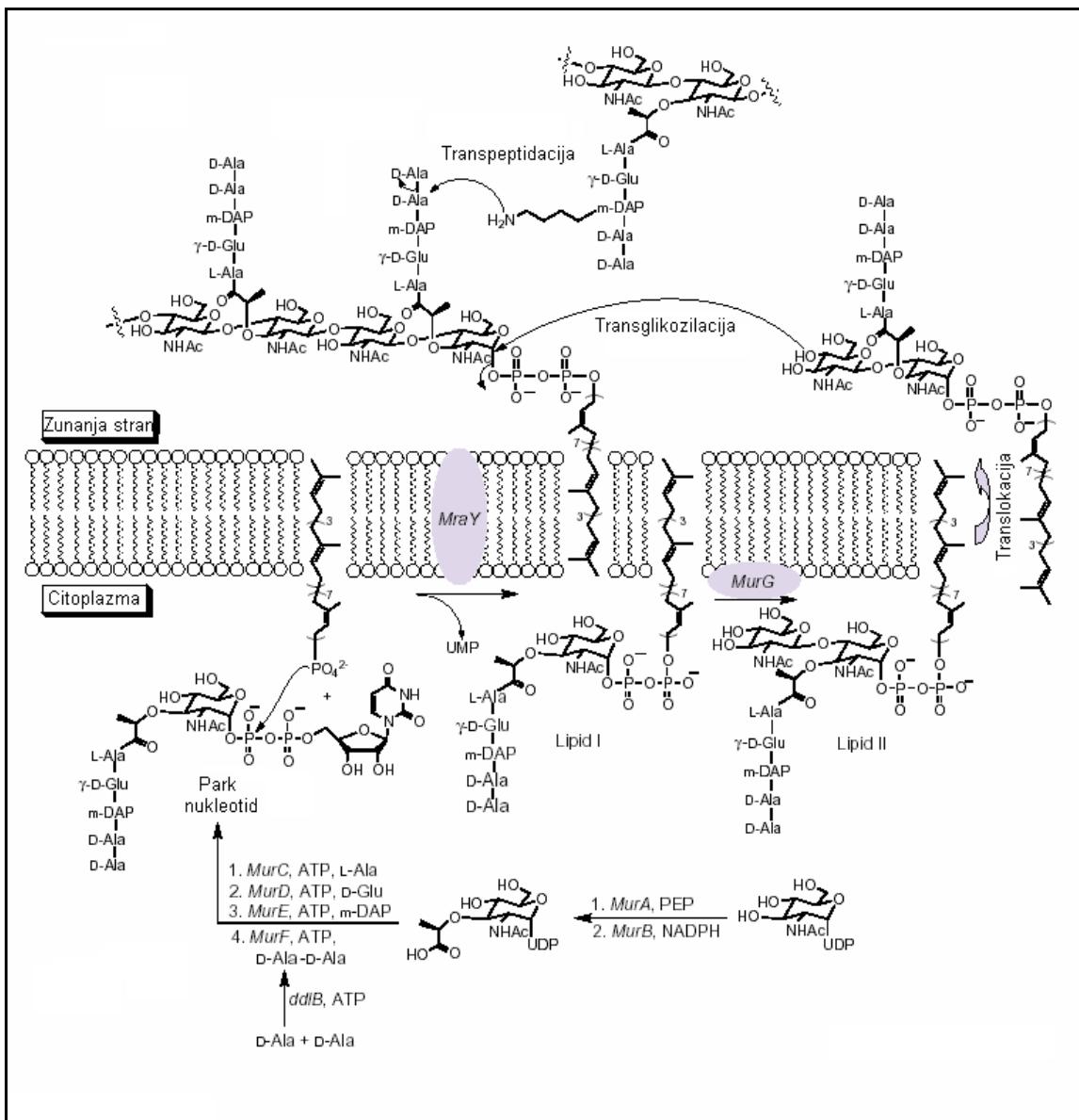
Biosintezo peptidoglikana lahko razdelimo na tri dele:

1. sinteza prekurzorjev v citoplazmi,
2. prenos prekurzorjev do lipidnega nosilca, ki jih prenese čez plazemsko membrano – krog lipidnega nosilca,
3. prehod prekurzorjev v celično steno in pripajanje na že obstoječi peptidoglikan.

Za ohranitev oblike in integritete bakterije mora sinteza peptidoglikana potekati kontrolirano.

### **4.1.2.1 Sinteza prekurzorjev**

Končna produkta intracelularne sinteze nukleotidnih prekurzorjev peptidoglikana sta UDP-*N*-acetilglukozamin in UDP-*N*-acetilmuramilpentapeptid (Slika 2). Bakterije sintetizirajo UDP-*N*-acetilglukozamin (UDP-GluNAc) iz primarnega metabolita fruktoze-6-fosfata v štirih stopnjah. *N*-acetilmuraminska kislina (UDP-MurNAc) se sintetizira v naslednjih dveh stopnjah. V prvi stopnji pride do prenosa fosfoenol piruvata, ki ga katalizira encim UDP-GluNAc enolpiruvil transferaza ali MurA, kateri sledi redukcija enola do D-laktoilne skupine, kar katalizira encim MurB reduktaza. Nato se na prosto karboksilno skupino UDP-MurNAc z amidno vezjo postopoma veže pet aminokislin. Prve tri aminokisline se pripnejo zaporedoma na UDP-*N*-acetilmuraminsko kislino s pomočjo specifičnih encimov MurC, MurD in MurE, ki za vir energije uporabljajo ATP. Encim MurF katalizira pripenjanje preostalih dveh D-alaninska ostanka se dodata kot že prej tvorjen dipeptid D-alanil-D-alanin, ki nastane iz L-alanina s pomočjo encima alaninske racemaze, ki katalizira pretvorbo L-alanina v D-alanin in encima D-alanil-D-alanin ligaze, ki katalizira nastanek dipeptida D-alanin-D-alanin (3,4).



Slika 2: Sinteza peptidoglikana v citoplazmi bakterije,  
krog lipidnega nosilca in vgradnja v celično steno.

#### 4.1.2.2 Krog lipidnega nosilca

Naslednje stopnje v sintezi peptidoglikana katalizirajo membranski encimi. Slika 2 prikazuje tudi krog lipidnega nosilca. V prvi stopnji se UDP-MurNAc-pentapeptid poveže s fosforiliranim lipidnim nosilcem, s katerim ostane povezan do konca lipidnega cikla, sprosti se UMP. Nato se k molekuli undekaprenil difosfo-MurNAc-pentapepida pripne še N-acetilglukozaminska enota. Disaharid pentapeptid se nato prenese na zunanjost bakterijske membrane. Vključevanje prenesenega gradnika v že obstoječi peptidoglikan se začne s povezovanjem sladkornih enot z encimom transglykozilazo, pri čemer se ena

molekula lipidnega nosilca najprej reciklira v obliki pirofosfata in zatem še defosforilizira (1).

#### 4.1.2.3 Vgraditev prekurzorjev v celično steno

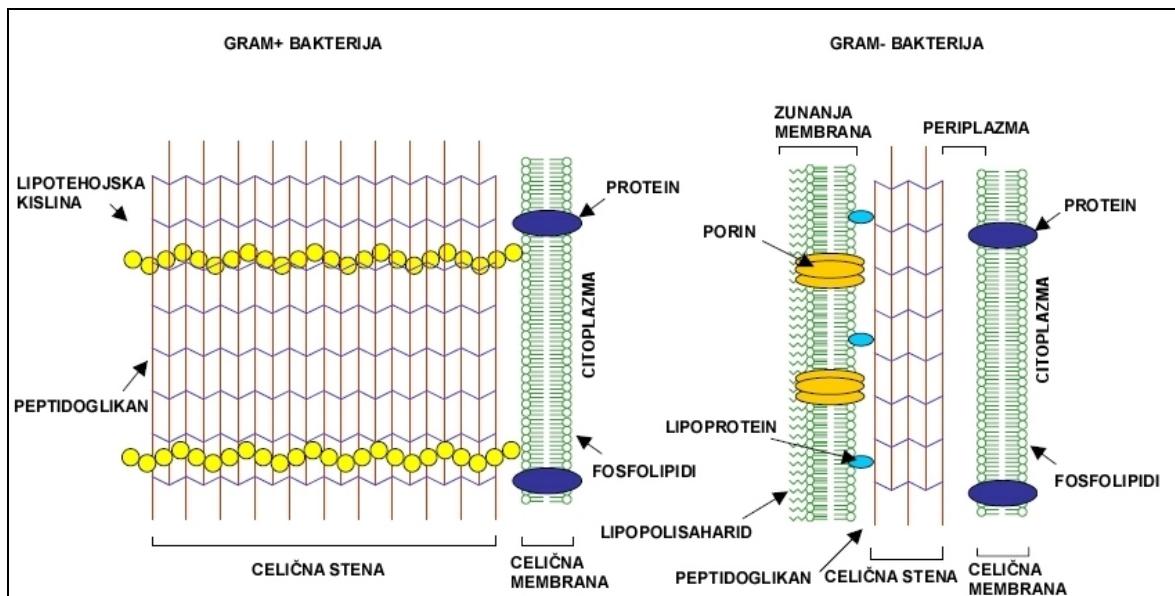
V tej fazi se linearne molekule glikana, ki so zbrane na lipidnem nosilcu na zunanji strani citoplazemske membrane, vgradijo v celično steno. Vezi nastajajo med novonastalimi glikanskimi molekulami in že obstoječim peptidoglikanom v celični steni. To reakcijo imenujemo transpeptidacija, ki jo katalizira encim transpeptidaza (Slika 2). Transpeptidaza se najprej veže na D-alanil-D-alaninsko enoto pentapeptidne verige, ki je vezana na muraminsko kislino na nastajajočem glikanskem vlaknu. Peptidna vez med D-alaninskima ostankoma se razcepi in odcepi se terminalni D-alanin. Nastane nova peptidna vez med karboksilno skupino preostalega alanina in končno  $\epsilon$ -amino skupino na ostanku diaminopimelinske kisline sosednje regije peptidoglikana. Tako se nastajajoči glikan poveže s peptidoglikanom celične stene. Stopnja prečne povezanosti peptidoglikana je lahko različna, kar uravnavajo encimi karboksipeptidaze, ki povzročijo odcep terminalnega D-alanina, sledi lahko tudi cepitev predzadnjega alaninskega ostanka. S tem preprečijo delovanje transpeptidaz, saj te za svoje delovanje zahtevajo D-Ala-D-Ala konec pentapeptida. Obstaja tudi encim endopeptidaza, ki ima nasprotno delovanje kot transpeptidaza, saj cepi prečne peptidne povezave. Naloga tega encima je najverjetneje priprava mest, na katera se vežejo nova glikanska vlakna (1).

### 4.1.3 Celična stena po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij

Večino celične stene G+ bakterij sestavlja večplastni peptidoglikan. Plasti je lahko več kot štirideset. Ostalo so drugi polimeri, od katerih so najpomembnejše tehojske in teihuronske kisline, lipidi pa navadno niso prisotni. Tehojske in teihuronske kisline so anionski polimeri, ki vsebujejo fosfatne, hidroksilne in amino skupine. Delujejo kot ionsko-izmenjevalni sistem, ki uravnava koncentracijo magnezijevih ionov, kateri so zelo pomembni za pravilno delovanje mnogih encimov v sintezi peptidoglikana.

V G- bakterijah je peptidoglikan le enoplasten. Postavljen je med citoplazemsko in čvrstejšo zunanjo membrano. Zaradi zunanje membrane, ki je sestavljena iz lipopolisaharidov, fosfolipidov in proteinov, je prepustnost stene G- bakterij zelo

zmanjšana. Membrana ne prepušča hidrofilnih molekul, lipofilnih molekul, maščobnih kislin, detergentov in tudi nekaterih antibiotikov, kar je vzrok za neučinkovitost mnogih antibiotikov proti G- bakterijam, kajti antibiotiki ne morejo priti do mesta delovanja v zadostno veliki koncentraciji. Slika 3 shematsko predstavlja razlike v zgradbi celične stene med G+ in G- bakterijami (1,2).



Slika 3: Celična stena G+ in G- bakterij (2).

## **4.2 Protimikrobne učinkovine in njihov mehanizem delovanja**

Protimikrobne učinkovine so spojine naravnega ali sinteznega izvora, ki izkazujejo bakteriostatično ali baktericidno delovanje. Antibiotiki so sekundarni metaboliti več vrst mikroorganizmov, ki v majhnih količinah inhibirajo rast mikroorganizmov brez resne toksičnosti za gostitelja. Med antibiotike prištevamo še njihove polsinteze derivate, ki jih pridobimo s kemično modifikacijo naravnih antibiotikov, s tem pa lahko razširimo spekter delovanja, povečamo učinkovitost, zmanjšamo toksičnost ali izboljšamo farmakokinetične lastnosti.

Glede na način delovanja in kemizem lahko protimikrobne učinkovine razdelimo na naslednje skupine (5-7):

### **Učinkovine, ki inhibirajo tvorbo folata:**

Mednje spadajo sulfonamidi in trimetoprim. Sulfonamidi so antimetaboliti *p*-aminobenzojske kisline (PABA) in inhibirajo dihidrofolat sintazo. V terapevtskih odmerkih delujejo bakteriostatično. Trimetoprim inhibira dihidrofolat reduktazo, ki je naslednji encim v kaskadi za dihidrofolat sintazo. Oboji preprečujejo tvorbo folne kisline in posledično preprečujejo sintezo DNA.

### **Učinkovine, ki inhibirajo sintezo beljakovin:**

V to skupino sodijo aminoglikozidi, makrolidni antibiotiki, linkozamidi, tetraciklini, kloramfenikol. Aminoglikozidi delujejo na proteinski del 30S ribosomske podenote in povzročijo napake v translaciji, kar ima za posledico tvorbo nefunkcionalnega proteina. Makrolidni antibiotiki delujejo na 50S ribosomsko podenoto in inhibirajo translokacijo aminoacil t-RNA po njeni vezavi na ribosomsko podenoto. Linkozamidi delujejo podobno kot makrolidi, tetraciklini delujejo na 30S podenoto, kloramfenikol pa deluje na 50S podenoto.

### **Učinkovine, ki inhibirajo bakterijsko DNA girazo in topoizomerazo:**

Ta encim skrbi za zvijanje DNA. Inhibitorji, mednje sodijo kinoloni, se vgradijo med nukleotidne pare, kar prepreči normalno zvijanje DNA. Kinoloni delujejo baktericidno.

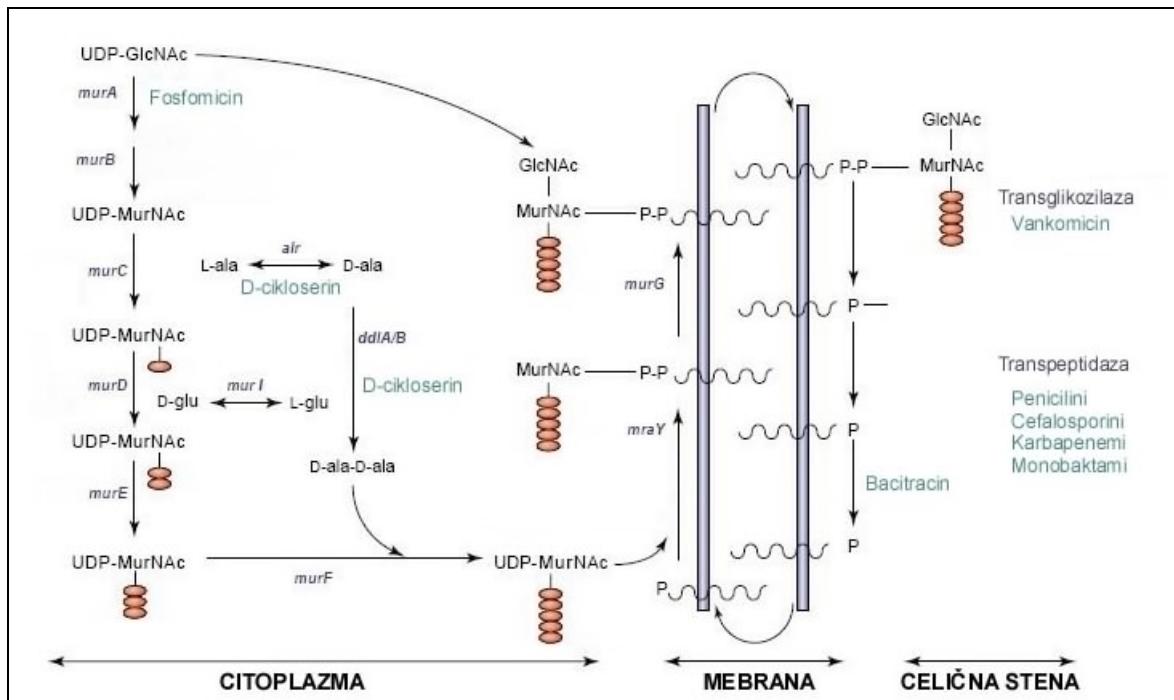
### **Inhibitorji biosinteze bakterijske celične stene:**

V tej kategoriji največjo skupino tvorijo  $\beta$ -laktamski antibiotiki: penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami, ki vsi inhibirajo transpeptidazo in s tem preprečijo premreženje peptidoglikana, kar ima za posledico povečano permeabilnost celične stene in smrt celice. Sem spadajo tudi glikopeptidi (vankomicin), ki specifično inhibirajo sintezo celične stene s tem, da inhibirajo rast esencialnih peptidoglikanskih komponent, ter še

nekateri drugi (bacitracin). Med novejše inhibitorje biosinteze bakterijske celične stene spadajo inhibitorji encimov Mur (fosfomicin in D-cikloserin), ki zavirajo sintezo peptidoglikana že na nivoju sinteze prekurzorjev (Slika 4).

### Antibiotiki, ki delujejo na membrano:

V to skupino sodijo polimiksini, ki imajo lastnosti kationskih detergentov.



Slika 4: Mesto delovanja inhibitorjev encimov, vpletenih v

biosintezo celične stene (G+ bakterije) (7).

### 4.3 Rezistenca na protimikrobne učinkovine

V zadnjih 60 letih je odkritje in razvoj protimikrobnih učinkovin revolucionarno spremenilo zdravljenje okužb in obolenj. Obobelost in predvsem smrtnost zaradi mikrobnih okužb sta se drastično zmanjšali. Kmalu po razširjeni uporabi antibiotikov se je pojavila rezistenca na njih. Mikrobi, ki so bili na določeno zdravilno učinkovino odporni, so se hitro razširili. To jim omogoča izjemno hiter življenjski cikel, saj ena delitev traja okoli 20 minut in v samo nekaj urah lahko nastane veliko novih generacij (8). Poseben primer je pojav meticilin rezistentnih sevov *Staphylococcus aureus* (MRSA), ki so danes odporni praktično na vse znane antibiotike (9).

Mehanizmi rezistence so lahko različni (5,9):

- bakterije proizvajajo encime, ki razgradijo protibakterijske učinkovine,
- spremeni se vezavno mesto za protibakterijsko učinkovino na tarčnem proteinu,

- spremeni se permeabilnost protibakterijskih učinkovin zaradi sprememb transportnega sistema za privzem protibakterijskih učinkovin v celico, aktivnega izločanja protibakterijskih učinkovin iz celice ali spremenjene strukture polisaharidov na zunanji površini celične membrane,
- vzpostavi se nova biosinteza pot, ki zaobide tisto, ki je bila zaradi delovanja protimikrobnih učinkovin prekinjena.

Mnoge bakterije nosijo s seboj še izvenkromosomski dedni material – plazmide. To so krožne verige DNA, ki prosto plavajo v citoplazmi in se lahko pomnožujejo neodvisno od kromosomov. Med seboj so si plazmidi različni tako po številu prisotnih kopij, kakor tudi po velikosti in številu genov, ki jih nosijo (od nekaj pa do 500). Nekateri plazmidi nosijo gene, ki so odgovorni za rezistenco. Tak plazmid imenujemo R-plazmid, gen pa R-gen. Med plazmidi oz. med plazmidi in kromosomom se geni lahko prenašajo s transposoni, ki lahko vsebujejo enega ali več R-genov.

Prenos rezistentnih genov med bakterijami lahko poteka po več načinih: konjugacija, transdukcija in transformacija. Konjugacija zajema nastanek fizičnega kontakta med dvema celicama in prenos dednega materiala preko tega mostiča. Sposobnost konjugacije je zapisana na posebnih genih na konjugativnih plazmidih, mnogi med njimi vsebujejo tudi R-gene. Konjugacija je poglavitni način širjenja rezistence. Transdukcija je prenos dednega materiala med bakterijami z bakteriofagi (virusi, ki napadajo bakterije) in razen pri stafilokokih in streptokokih nima večjega kliničnega pomena. Transformacija je prenos proste DNA iz okolice v celico in njena umestitev v kromosomske DNA. Ta način nima večjega pomena pri kliničnem problemu rezistence (5).

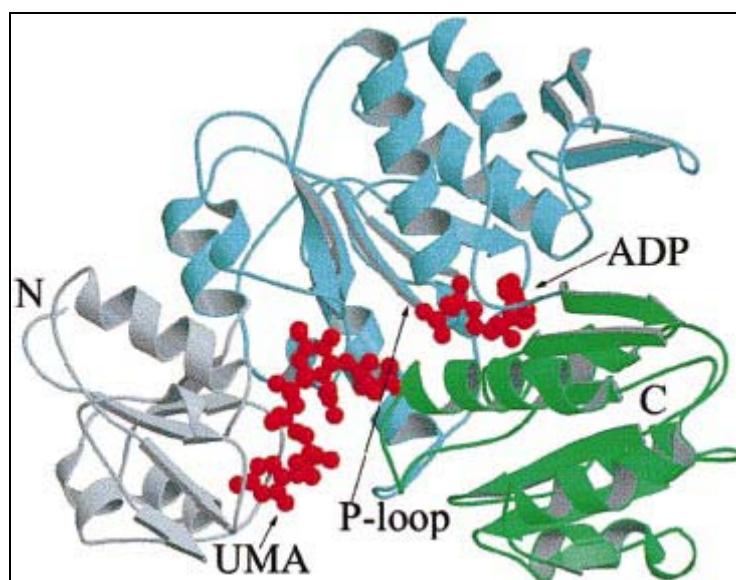
Podatek, da so nekateri sevi rodov *Staphylococcus* in *Enterococcus* odporni praktično na vse antibiotike, dokazuje resnost situacije (9). Razvoj protimikrobnih učinkovin v velikih farmacevtskih podjetjih je omejen na modifikacijo že znanih učinkovin z namenom povečanja spektra delovanja ali učinkovitosti (8). Če se želimo uspešno spoprijeti z bakterijskimi okužbami in pojavom rezistence v prihodnosti, je nujno potrebno iskati in razvijati nove učinkovine, ki ciljajo na povsem nova prijemališča znotraj bakterije (7,10).

## 4.4 Encimi Mur

Encimi od MurC do MurF so od ATP odvisni encimi, esencialni za preživetje bakterije, saj bi kakršnakoli okvara na encimu preprečila sintezo peptidoglikana. Glede na splošno razširjenost peptidoglikana v bakterijskem svetu in veliko strukturno podobnost teh encimov med vrstami lahko pričakujemo, da bi bil potencialni inhibitor širokospektralen in baktericiden (3,11).

### 4.4.1 MurD ligaza

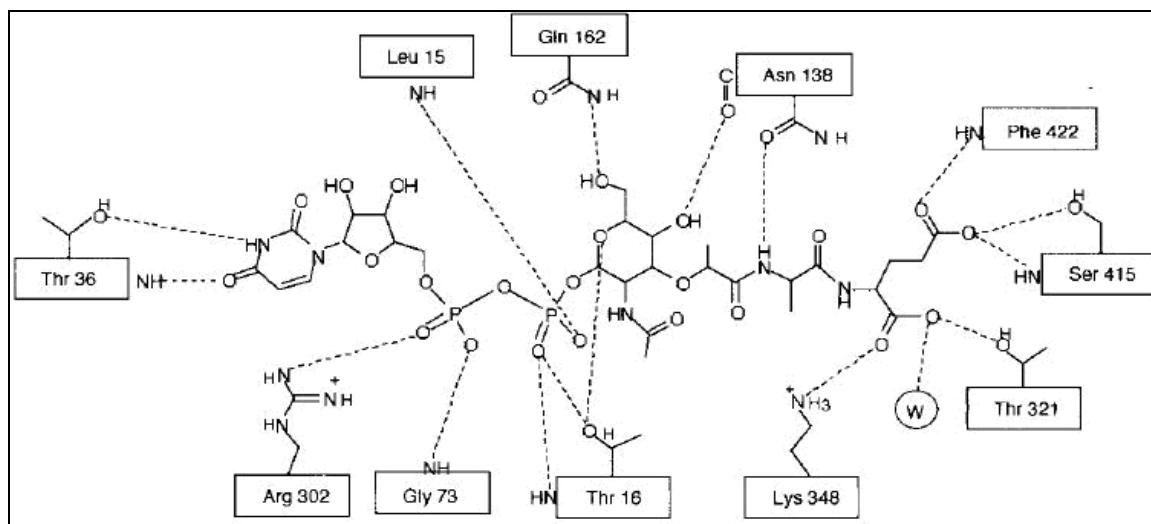
MurD (*N*-acetilmuramoil-L-alanin D-glutamat ligaza) katalizira pripenjanje D-glutamata na UMA (UDP- *N*-acetilmuramoil-L-alanin). Najbolje je preučen MurD iz *E. coli*, ki je sestavljen iz treh globularnih domen. Aktivno mesto se nahaja v kotanji, obdani z vsemi domenami (Slika 5). *N*-terminalna domena je sestavljena iz petih paralelnih  $\beta$ -struktur, ki jo obdajajo 4  $\alpha$ -vijačnice. Odgovorna je za vezavo UDP dela substrata UDP-MurNAc-L-Ala. Centralna domena je sestavljena iz šest paralelnih  $\beta$ -struktur, ki jih obdaja 7  $\alpha$ -vijačnic in tri majhne antiparalelne  $\beta$ -strukture. Na to domeno se veže ATP in preostali del substrata. C-terminalna domena je zgrajena iz šestih  $\beta$ -struktur, obdanih z 5  $\alpha$ -vijčnicami. Odgovorna je za vezavo D-glutaminskega ostanka produkta UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu (3,12).



Slika 5: Vezava substrata in ADP na vezavna mesta v encimu MurD (12).

Za vezavo substrata v aktivno mesto so nujne interakcije z naslednjimi aminokislinski preostanki (Slika 6):

- Leu 15, Thr 16, Thr 36 in Gly 73, ki tvorijo vodikove vezi z UDP delom substrata;
- Thr 16, Gln 162 in Asn 138 so pomembni pri interakcijah z N-acetilmuraminsko kislino;
- Asn 138 in His 183, ki z H-vezmi vežeta L-alaninski del substrata; s tem delom substrata tvori interakcije tudi magnezijev ion.

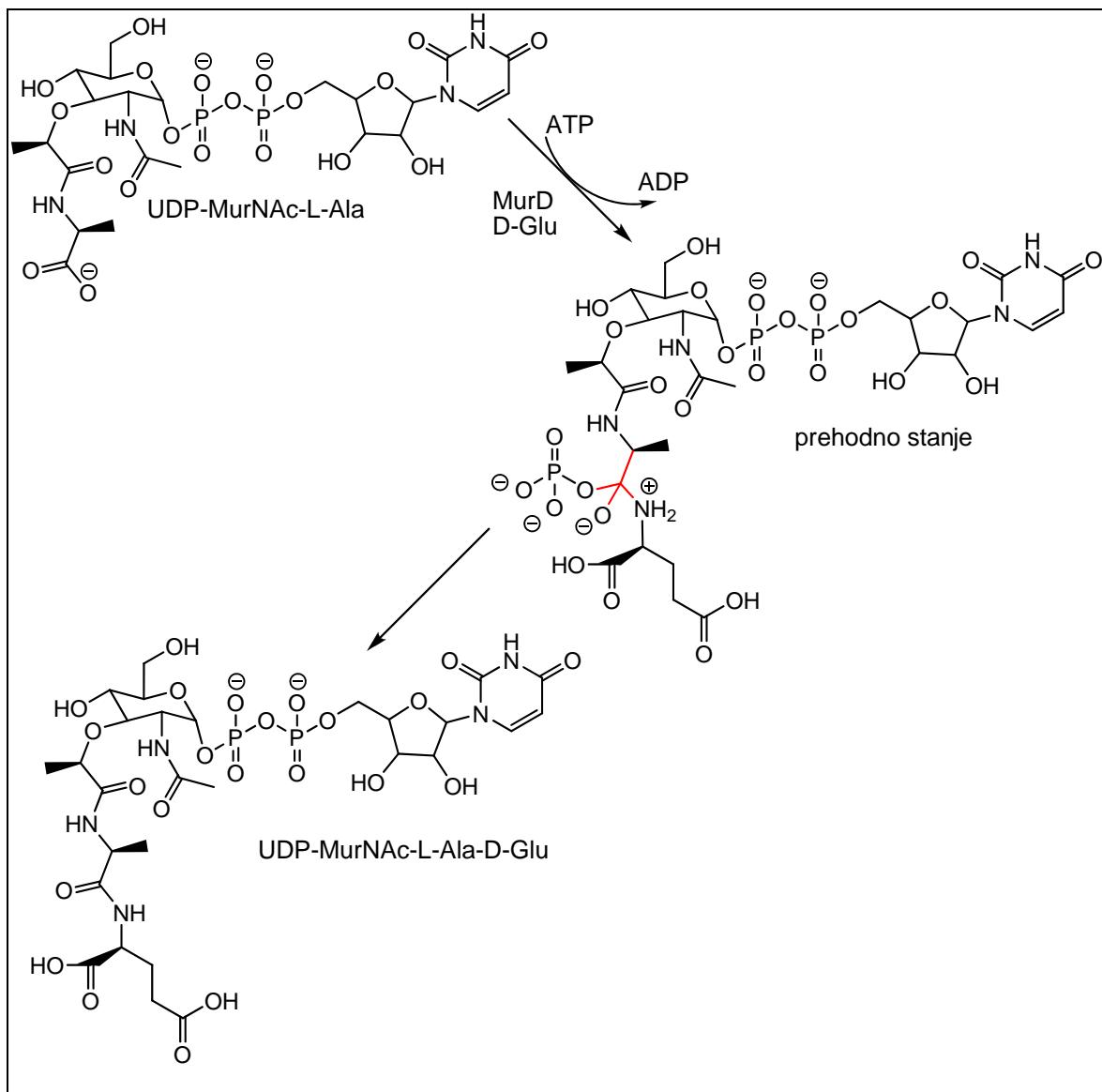


Slika 6: Prikaz interakcij med encimom in substratom UDP-Mur-NAc-L-Ala-D-Glu (12).

Celotna ATP molekula se veže v žep med centralno in C-terminalno domeno. Žep, kamor se veže adeninski obroč, tvorita na eni strani Asn 113 in Gly 114, na drugi strani His 267 in na vrhu Asn 271. Za specifičnost encima MurD za adeninski obroč sta odgovorni 2 vodikovi vezi z aminokislinskim preostankom Asn 271. Ribozni obroč sega tudi v centralno domeno in tvori hidrofobne interakcije s Ser 325 ter vodikove vezi s stransko verigo Asp 317 in molekulo vode.  $\alpha$ -fosfat tvori interakcije z Gly 114, Lys 115 in Arg 302,  $\beta$ -fosfat pa z Gly 114, Lys 115, Ser 116 in enim izmed magnezijevih ionov.

Za vezavo D-glutaminske kisline so pomembni naslednji aminokislinski preostanki: Phe 422, Ser 415, Thr 321 in Lys 348 (12).

Za encimsko reakcijo, ki jo katalizira MurD ligaza predvidevajo, da poteka v treh stopnjah in je odvisna od ATP (Slika 7). V prvi stopnji naj bi prišlo do aktivacije nukleotidnega substrata, karboksilna skupina le-tega se fosforilira s pomočjo ATP, ki se ob tem pretvorci v ADP. Aminska skupina D-glutaminske kisline nato reagir z acilfosfonatom, pri čemer pride do nastanka tetraedričnega prehodnega stanja, ki v tretji, zadnji stopnji, razpade na produkt in anorganski fosfat (3).

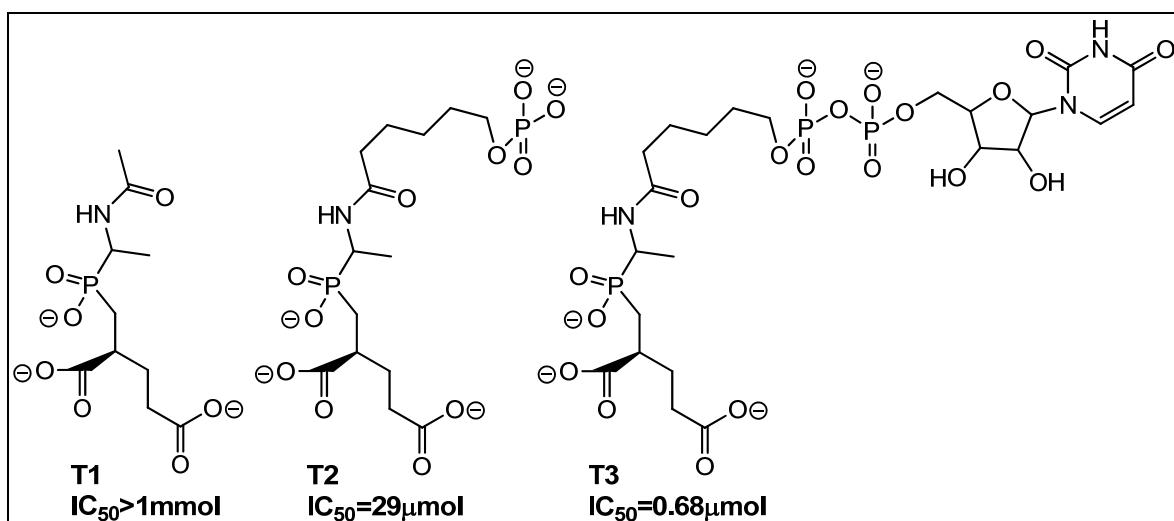


Slika 7: Mehanizem tvorbe amidne vezi med L-Ala in D-Glu

preko tetraedričnega prehodnega stanja.

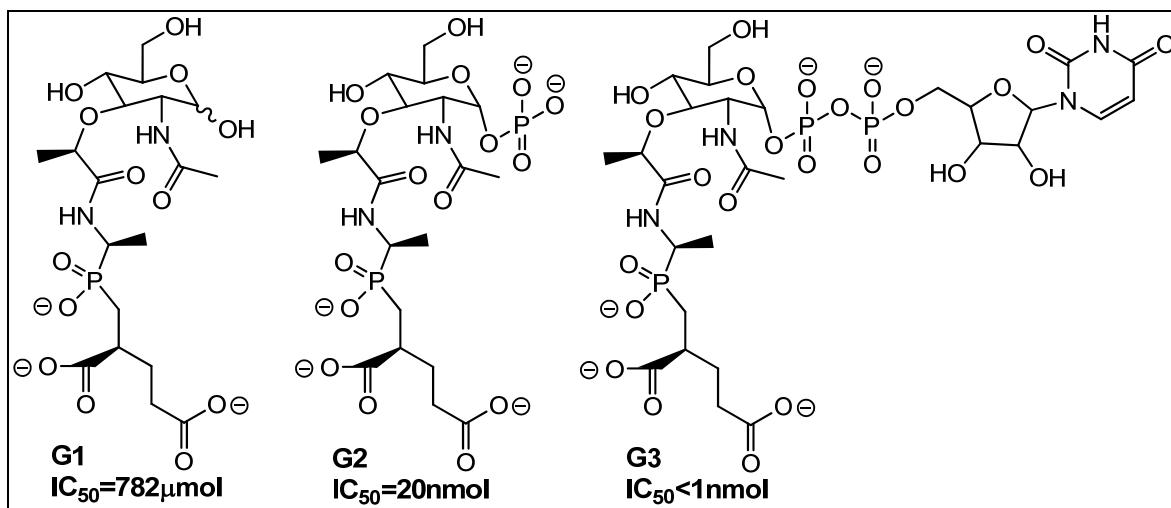
#### 4.4.2 Inhibitorji encima MurD

Tanner in sodelavci so v vrsti fosfinatnih analogov pokazali, da je možno pripraviti inhibitorje MurD na osnovi fosfinatne strukture. Spojina **T1**, ki posnema del ostankov mlečne kisline, L-Ala in D-Glu, pri čemer je vez med L-Ala in D-Glu zamenjana s fosfinatom, je kazala slabo inhibicijo MurD. Spojina **T2**, ki je poleg omenjenega vsebovala še enostaven nadomestek N-acetilglukozamina in fosfatno skupino, je kazala razmeroma močno inhibicijo MurD. Spojina **T3**, ki je vsebovala še uridin-fosfatni del molekule, je kazala močan inhibitoren učinek na MurD (Slika 8) (14).



Slika 8: Inhibitorji encima MurD, ki ga je razvila Tannerjeva skupina (14).

Gegnas in sodelavci so v vrsti močnih inhibitorjev MurD postavili in potrdili hipotezo, da je za močno delovanje poleg fosfinatnega dela pomemben tudi N-acetilmuraminski del ter vsaj ena fosfatna skupina. Tako so spojine **G1-3** pokazale močno inhibitorno delovanje na izoliranem MurD, pri čemer je jakost sovpadala s strukturno podobnostjo inhibitorjev s celotno strukturo prehodnega stanja (Slika 9) (15).



Slika 9: Inhibitorji encima MurD, ki so ga razvili Gegnas in sodelavci (15).

Iz predstavljenih rezultatov so sklepalni, da so za inhibitorno delovanje na MurD potrebni naslednji farmakoforni elementi (15):

- L-Ala-D-Glu fragment z mimetikom prehodnega stanja na mestu peptidne vezi med L-Ala in D-Glu,
- sladkorna enota (*N*-acetilmuraminska kislina) in  $\alpha$ -fosfatna skupina na mestu 1 sladkorne enote,
- v manjši meri sodeluje pri vezavi z aktivnim mestom encima tudi uridinski del ter druga fosfatna skupina.

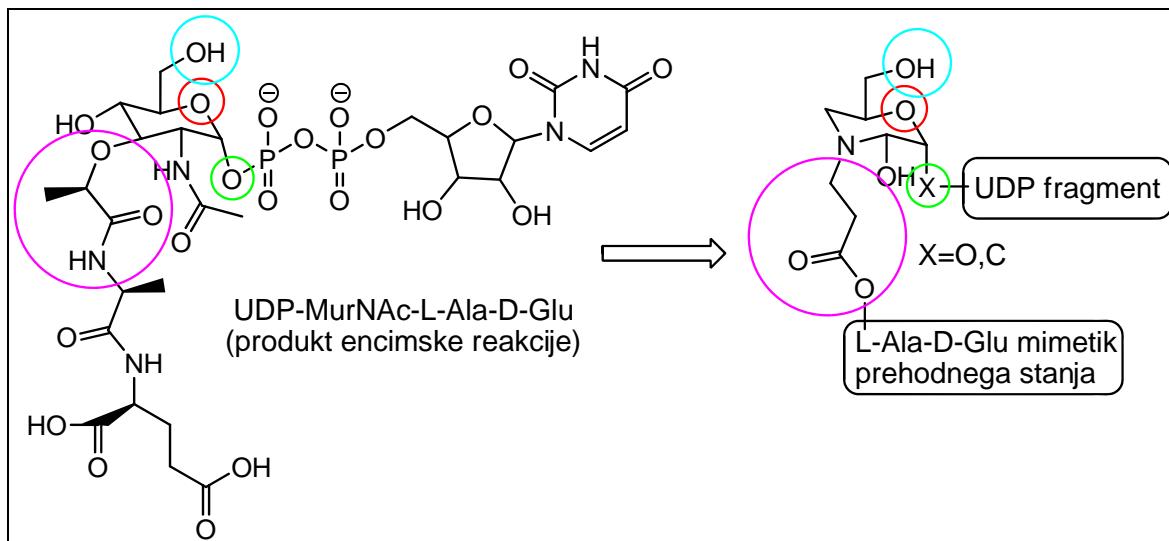
Podrobnosti interakcij med substratom oziroma produktom encimske reakcije in encimom MurD so na osnovi več različnih kristalnih struktur razvozlali Bertrand in sodelavci ter prišli do podobnih ugotovitev (12).

Omenjeni fosfinatni inhibitorji MurD so pokazali močan učinek na izoliranih encimih, a odsotnost protibakterijskega učinka. To dejstvo je lahko posledica nezadostnega transporta omenjenih spojin v citoplazmo bakterijske celice in kaže na to, da se spojine verjetno ne prenašajo v bakterijske celice z aktivnim transportom ter da so preveč polarne za ustrezno pasivno prehajanje skozi biološke membrane.

## 5 NAČRT DELA

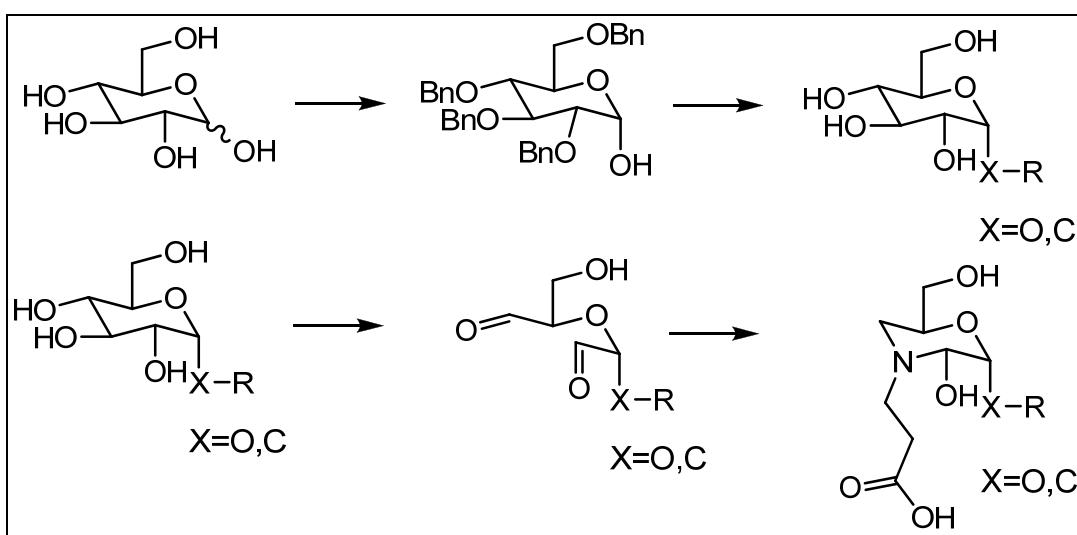
Namen diplomskega dela je sintetizirati potencialne MurD inhibitorje, ki bodo imeli močan inhibitorni učinek, hkrati bodo ustrezali pravilom Lipinskega (“Lipinski rule of five”) (13) in zato bolje prehajali biološke membrane ter bakterijsko celično steno. Še posebej smo se osredotočili na UDP-*N*-acetilmuramilni del molekule in skušali načrtovati mimetike le-tega s čim manj polarnimi strukturami, ki bodo ohranili vse strukturne lastnosti potrebne za visoko afiniteto do vezavnega mesta za substrat/produkt encima MurD. Pri tem smo želeli sladkorni del zamenjati z nasičenim heterocikličnim obročem, ki naj vsebuje funkcionalne skupine, odgovorne za vezavo na encim MurD in za pripajanje mimetikov UDP-fragmenta in mimetikov prehodnega stanja na osnovi L-Ala-D-Glu dipeptida (Slika 10):

- hidroksilno skupino (ali njen nadomestek) na mestu 6 *N*-acetilglukozamina, ki pri vezavi substrata/produkta tvori vodikovo vez z Gln162 MurD,
- obročni kisik, ki pri vezavi substrata/produkta tvori vodikovo vez s Thr16 MurD,
- anomerno hidroksilno skupino (ali njen nadomestek) kot osnovo za pripajanje UDP-fragmenta,
- laktoilni ostanek na mestu 4 (ozioroma njegov nadomestek) za pripajanje L-Ala-D-Glu fragmenta.



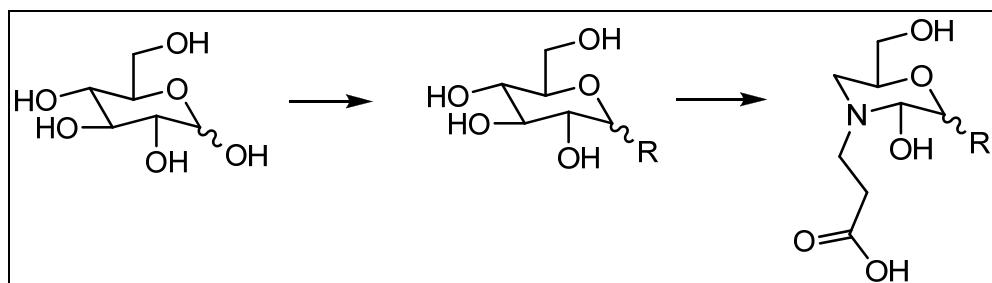
Slika 10: Strukturni elementi substrata za encim MurD, pomembni za interakcije z encimom.

Odločili smo se uporabiti dva različna sintezna pristopa, po katerih bomo prišli do produktov. Najprej bomo pripravili glukozo, ki bo imela benzilne zaščite na vseh hidroksilnih skupinah razen na mestu 1. Na to hidroksilno skupino bomo pripenjali različne fragmente R, ki bodo posnemali le del ali celotno strukturo UDP. Benzilne skupine bomo odstranili s katalitskim hidrogeniranjem. V naslednji stopnji bomo izvedli odprtje obroča in oksidacijo hidroksilnih skupin do dialdehyda z uporabo  $\text{NaIO}_4$ . Nato bomo izvedli dvojno reduktivno aminiranje dialdehyda z ustreznim zaščitenim  $\beta$ -alaninom in  $\text{NaCNBH}_3$ . Na koncu bomo odstranili zaščito na karboksilni skupini  $\beta$ -alanina (Slika 11).



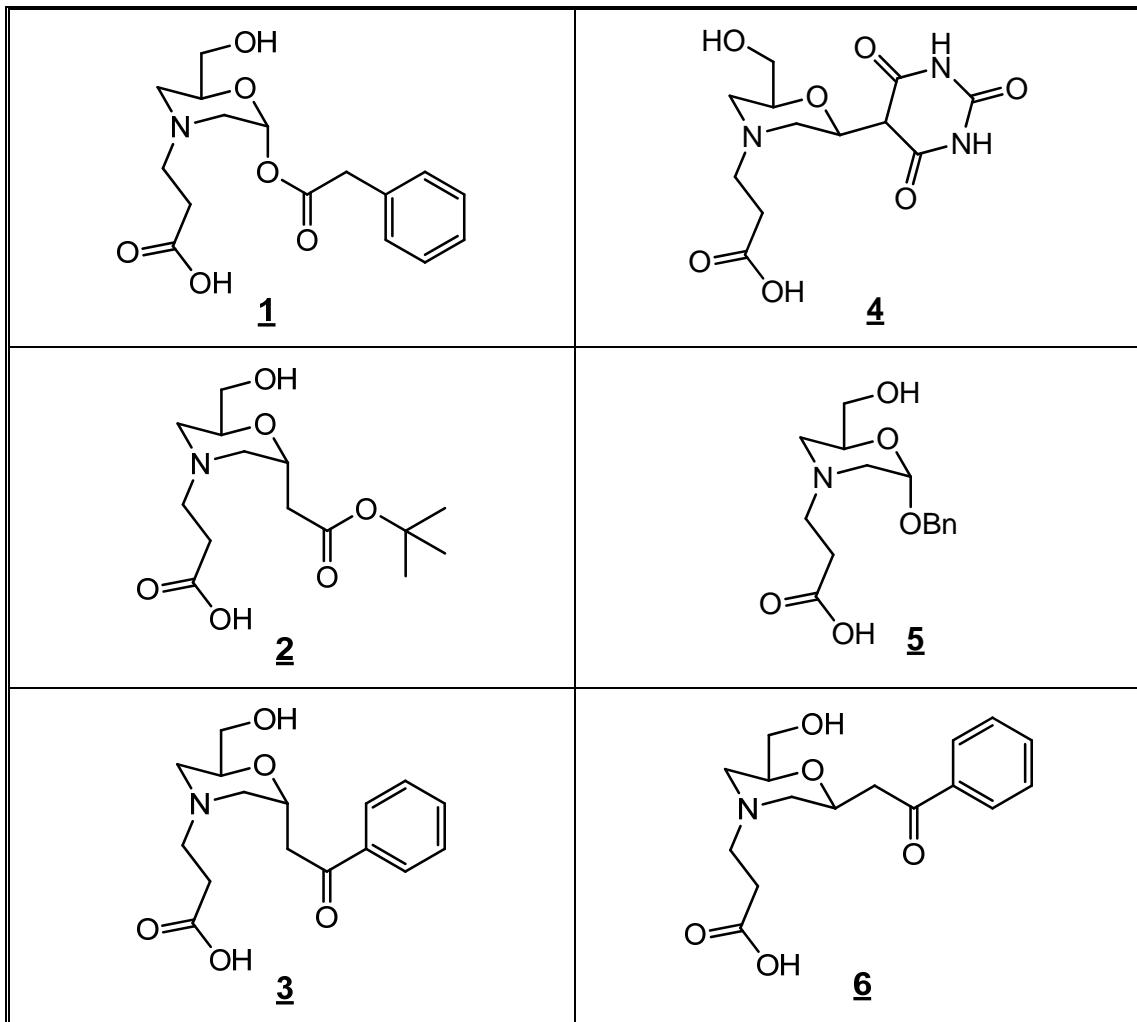
Slika 11: Shematsko prikazan prvi sintezni pristop za sintezo inhibitorjev MurD.

Pri drugem pristopu bomo pripenjali fragmente na glukozo selektivno na mesto 1 brez predhodne zaščite hidroksilnih skupin. Nato bomo izvedli oksidacijo do dialdehyda in dvojno reduktivno aminiranje kot pri prvem sinteznem pristopu (Slika 12).



Slika 12: Shematsko prikazan drugi sintezni pristop za sintezo inhibitorjev MurD.

Končne spojine, ki jih bomo sintetizirali, so predstavljene v razpredelnici 1. Spojine **1-3** bomo sintetizirali po prvem sinteznem pristopu, spojine **4-6** po drugem.



Razpredelnica 1: Končne spojine.

## **6 MATERIALI IN METODE**

### **Reagenti in topila**

Proizvajalci reagentov in topil, ki smo jih uporabili pri delu, so ACROS, FLUKA, MERCK in MAYBRIDGE.

### **Kromatografske metode**

Za tankoplastno kromatografijo smo uporabljali plošče Kieselgel 60 F<sub>254</sub> z 0,20 milimetrskim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu podjetja Merck.

Za kolonsko kromatografijo smo uporabljali steklene kolone, napolnjene s silikagelom podjetja Merck z velikostjo delcev 0,063–0,200 mm, kot stacionarno fazo v izbrani mobilni fazi.

Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabili UV svetilko ( $\lambda = 254$  nm) .

### **Tališča**

Tališča smo merili s Polytherm A Heintsch mikroskopom podjetja Wagner & Munz z grelno ploščo. Tališča niso korigirana.

### **Spektroskopske metode**

Masne spektre so posneli na masnem spektrometu Varian-MAT 311 A s FAB, EI in ESI tehniko na inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

<sup>1</sup>H-NMR spektre so posneli na NMR-spektrometu Bruker Avance DPX 300 v Nacionalnem centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti v Ljubljani. Vzorce so raztopili v devteriranih topilih DMSO-d<sub>6</sub> in CDCl<sub>3</sub> na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Kot interni standard so uporabili tetrametilsilan. Spektre so posneli pri temperaturi 302 K.

IR spektre so posneli na spektrofotometru Perkin Elmer 1600 FTIR in FTIR spektrometu Nexus, proizvajalec NICOLET-nastavek Smart DuraSampl IR za snemanje spektrov z ATR tehniko, na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

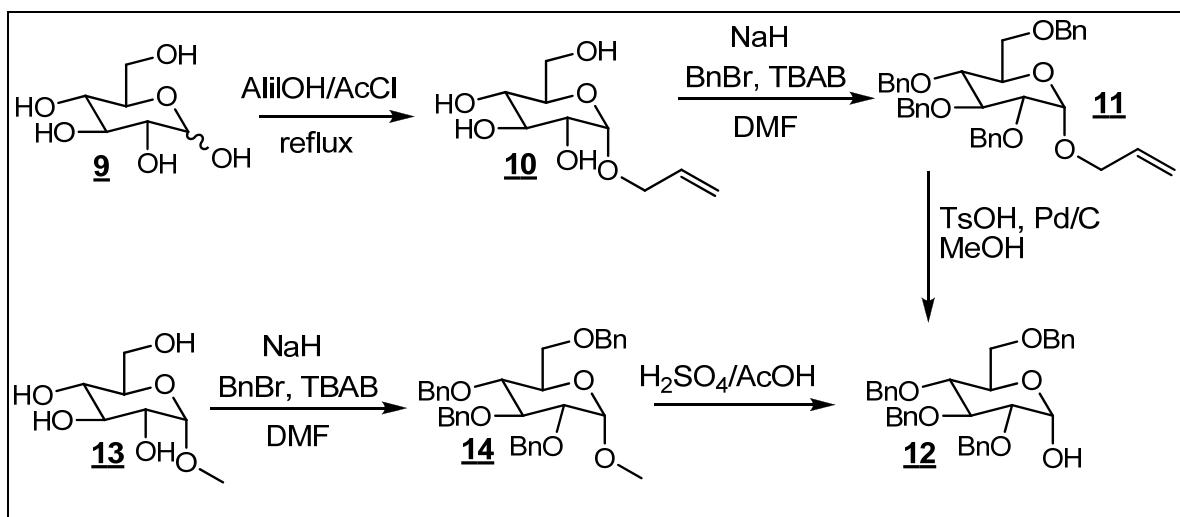
### **Poimenovanje in risanje spojin**

Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabljali računalniški program ChemBio Office 2008 podjetja Cambridgesoft.

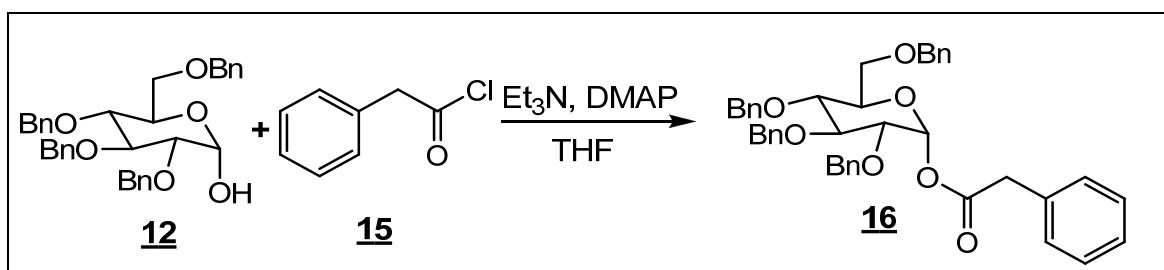
## 7 EKSPERIMENTALNO DELO

### 7.1 REAKCIJSKE SHEME

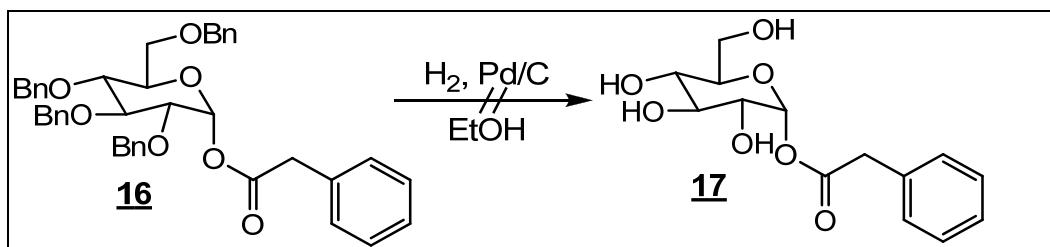
#### 7.1.1 Shema 1: Sinteza (2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-ola



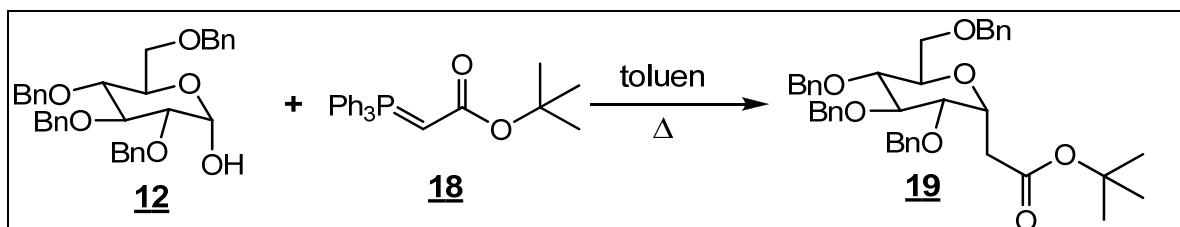
#### 7.1.2 Shema 2: Sinteza (2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il 2-fenilacetata



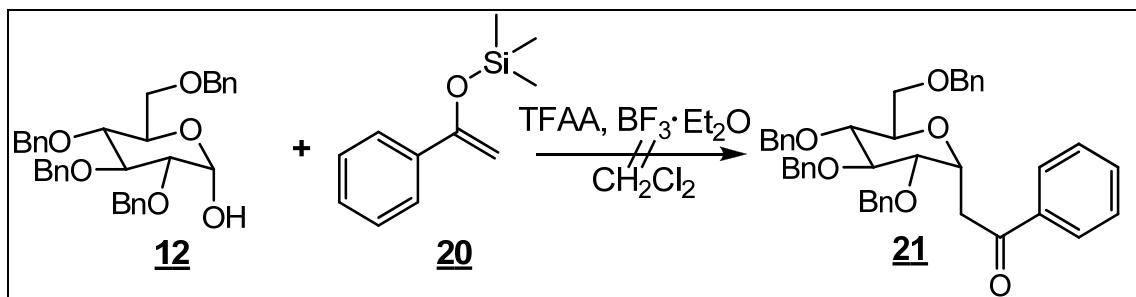
**7.1.3 Shema 3: Poskus sinteze (2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il 2-fenilacetata**



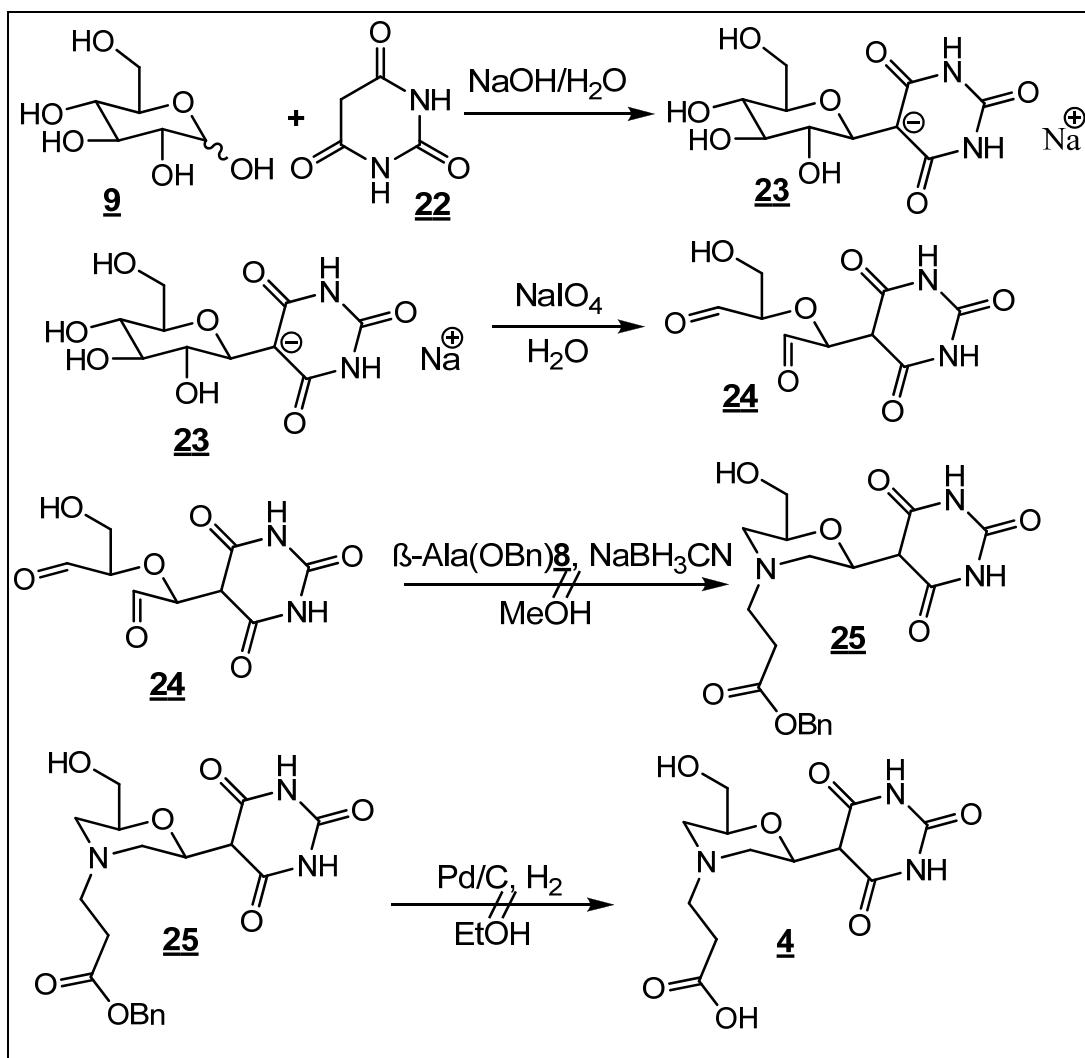
**7.1.4 Shema 4: Sinteza terc-butil 2-((2R,3S,4R,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)acetata**



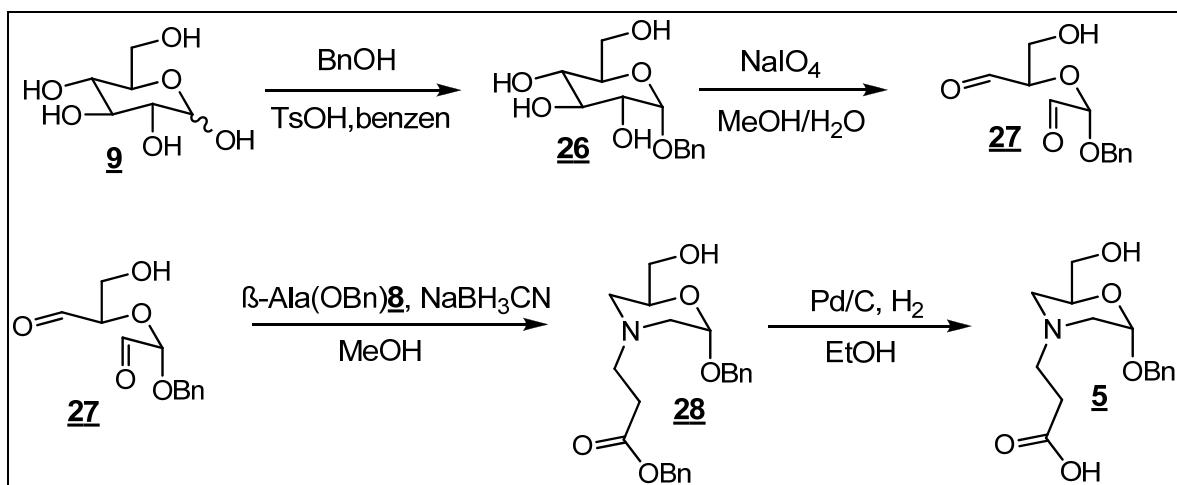
**7.1.5 Shema 5: Poskus sinteze 1-fenil-2-((2R,3S,4R,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)etanona**



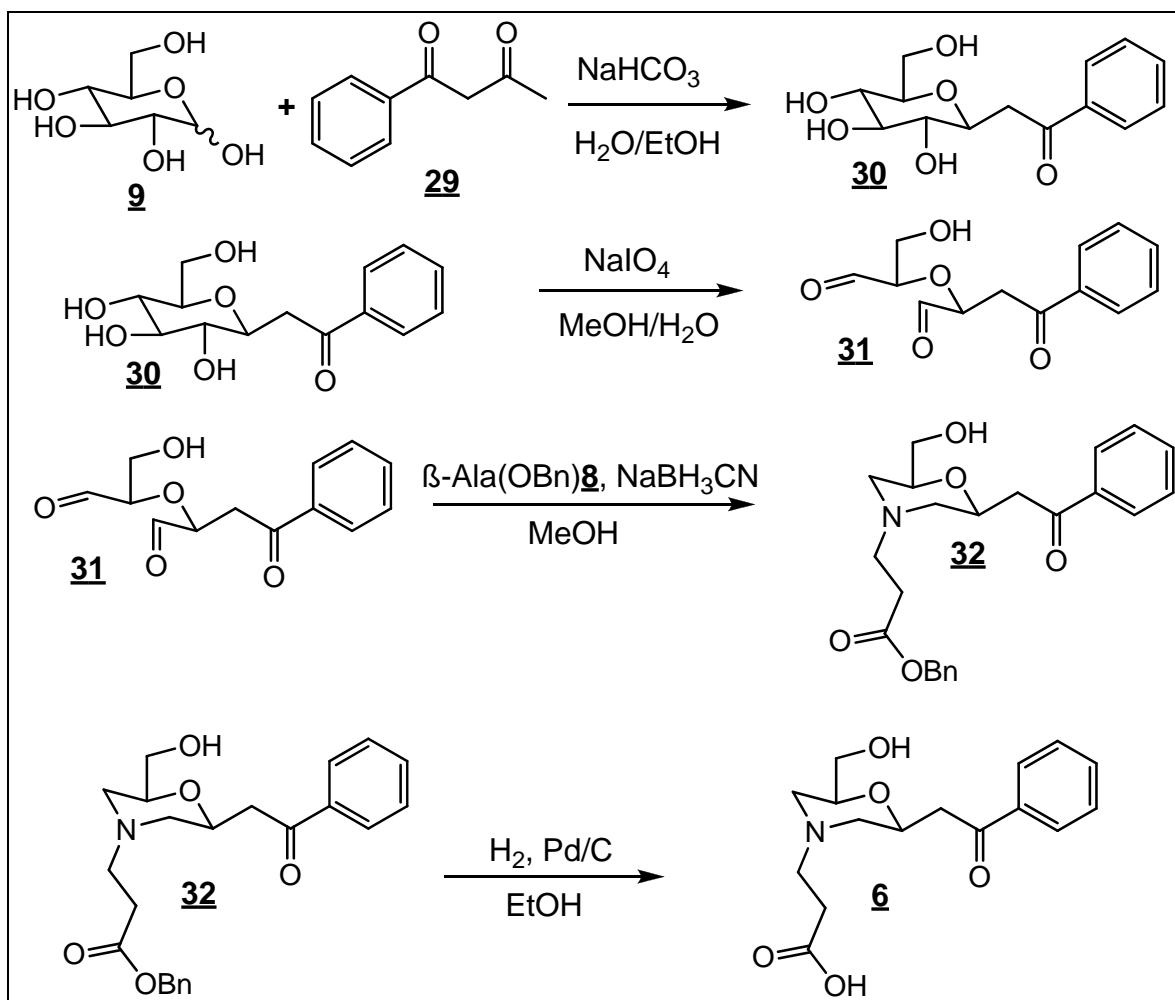
**7.1.6 Shema 6: Poskus sinteze 3-((2S,6S)-2-(hidroksimetil)-6-(2,4,6-trioksoheksahidropirimidin-5-il)morfolino)propanojske kisline**



**7.1.7 Shema 7: Sinteza 3-((2S,6S)-2-(benziloksi)-6-(hidroksimetil)morfolino)propanojske kisline**

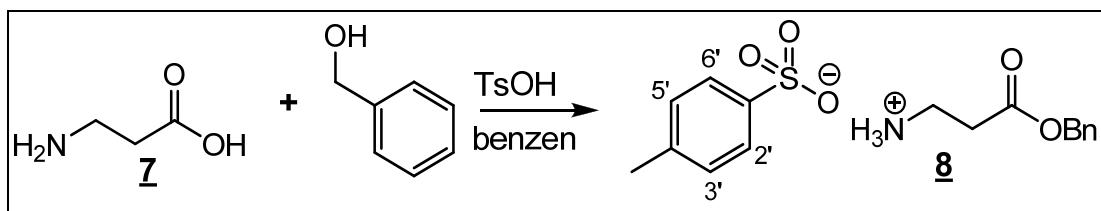


**7.1.8 Shema 8: Sinteza 3-((2S,6S)-2-(hidroksimetil)-6-(2-okso-2-feniletil)morfolino)propanojske kisline**



## 7.2 SINTEZNI POSTOPKI IN REZULTATI ANALIZ

### 7.2.1 Sinteza benzilnega estra $\beta$ -alanina (benzil 3-aminopropanoata)



5,4 g (60,6 mmol)  $\beta$ -alanina **7** in 12,7 g (66,7 mmol) p-toluensulfonske kisline raztopimo v zmesi 40 mL benzil alkohola in 20 mL benzena. Opremimo z Dean-Starkovo pastjo in segrevamo 3-4 ure pod refluksom. Po končani reakciji reakcijsko zmes ohladimo. Izpadle bele kristale čistimo z dietiletrom in filtriramo z odsesavanjem. Po sušenju dobimo 21,1 g spojine **8** (16).

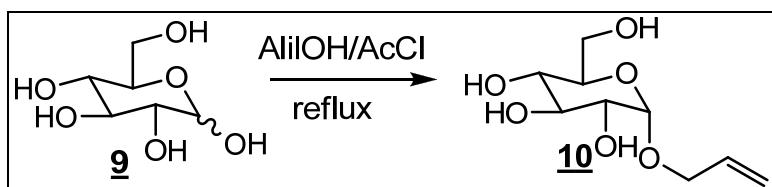
Izkoristek reakcije: 21,1 g (99%)

$R_f$  (acetonitril:MeOH:H<sub>2</sub>O=3:1:1): 0,79

Orositveni reagent: ninhidrin

Benzilni ester $\beta$ -alanina		$M_r=351,417$
<b>Izgled</b>	beli kristali	
<b>Analiza</b>	<b>Rezultati</b>	
<b><math>^1\text{H-NMR}</math> (DMSO-<math>d_6</math>, 300 MHz)</b>	$\delta$ [ppm]= 2,29 (s, 3H, $\text{CH}_3$ ), 2,70-2,75 (t, 2H, $J=7,0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 3,04-3,09 (t, 2H, $J=7,0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 5,13 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 7,11-7,13 (d, 2H, $J=8,2$ Hz, Ar-H <sub>3',5'</sub> ), 7,34-7,40 (m, 5H, Ar-H Bn), 7,49-7,51 (d, 2H, $J=8,2$ Hz, Ar-H <sub>2',6'</sub> ), 7,78 (s, 3H, $\text{NH}_3^+$ )	
<b>MS (ESI)</b>	180,1 ( $\text{MH}^+$ )	
<b>IR (KBr)</b>	$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3061, 2296, 1944, 1734, 1654, 1623, 1519, 1466, 1401, 1362, 1238, 1155, 1123, 1032, 1009, 870, 816, 743, 687, 560	
<b>T<sub>t</sub></b>	138-141°C	

### 7.2.2 Sinteza $\alpha$ -D-alilglukozida



V bučko odmerimo 240 ml alilnega alkohola, ohladimo na 0°C in po kapljicah dodamo 20 ml (0,28 mol) acetil klorida. Dodamo 20 g (0,111 mol) glukoze **9** in segrevamo 4 ure pri 70°C. Po končani reakciji odparimo alilni alkohol pod znižanim tlakom. Oljnat preostanek čistimo z gradientno kolonsko kromatografijo (m.f. DKM:MeOH = 9:1, nato 4:1). Po odstranitvi topila z znižanim tlakom dobimo 12,12 g brezbarvnega olja **10** (17).

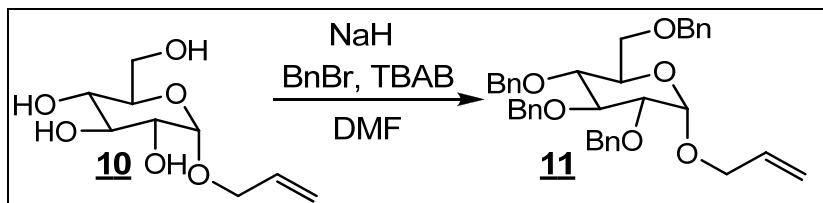
Izkoristek reakcije: 12,12 g (49,6%)

Rf (m.f. DKM:MeOH = 4:1): 0,35

Orositveni reagent: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

<b><math>\alpha</math>-D-alilglukozid (17)</b>		M <sub>r</sub> =220,220
<b>Izgled</b>	brezbarvno olje	
<b>Analiza</b>	<b>Rezultati</b>	
<b><sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz)</b>	$\delta$ [ppm]=3,07-3,22 (več m, 3H, 3×CH), 3,35-3,46 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -OH), 3,60-3,63 (d, 1H, J=11,6 Hz, CH-CH <sub>2</sub> OH), 3,91-4,14 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -CHCH <sub>2</sub> ), 4,55-4,67 (več m, 5H, 4×OH, CH-OCH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> ), 5,13-5,16 (d, 1H, J=10,1 Hz, CH=CH <sub>2</sub> ), 5,30-5,35 (d, 1H, J=17,1 Hz, CH=CH <sub>2</sub> ), 5,88-5,96 (m, 1H, CH=CH <sub>2</sub> )	
<b>MS (FAB)</b>	240 (MNH <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>	
<b>IR (KBr)</b>	$\nu$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3319, 2922, 1645, 1342, 1034, 910	

### 7.2.3 Sinteza (2S,3R,4S,5R,6R)-2-(aliloksi)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2H-piran



3,98 g (165,6 mmol) natrijevega hidrida (60% suspenzija v parafinu) suspendiramo v 20 ml DMF, ohladimo na 0°C, nato po kapljicah dodajamo 9,12 g (41,4 mmol) alilglukoze **10**, raztopljene v 30 ml DMF. Po 20 minutah dodamo 28,3 g (165,6 mmol) benzilbromida, raztopljenega v 10 ml DMF in 200 mg tetrabutilamonijevega bromida.

Po končani reakciji reakcijsko zmes ohladimo na 0°C in dodamo vodo, da zreagira preostali natrijev hidrid, nato izvajamo ekstrakcijo s 3x50 ml dietiletra. Organsko fazo spiramo z nasičeno raztopino NaCl in posušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Spojino **11** čistimo s kolonsko kromatografijo (m.f. eter:petroleter = 1:2) (18).

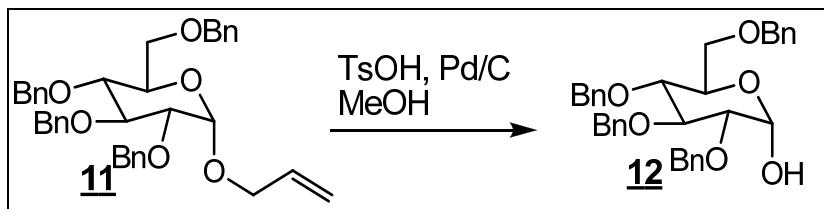
Izkoristek reakcije: 8,38 g (34,8%)

Rf (m.f. eter:petroleter = 1:2): 0,33

Orositveni reagent: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

<b>(2S,3R,4S,5R,6R)-2-(aliloksi)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2H-piran (19)</b>		M <sub>r</sub> =580,710
<b>Izgled</b>	brezbarvno olje	
<b>Analiza</b>	<b>Rezultati</b>	
<b><sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)</b>	δ[ppm]= 3,54-3,83 (več m, 5H, 3×CH, CH <sub>2</sub> -OBn), 3,97-4,04 (dva m, 3H, CH <sub>2</sub> -CHCH <sub>2</sub> , CH-CH <sub>2</sub> OBn), 4,44-4,85 (več m, 8H, 4×CH <sub>2</sub> -Ph), 4,97-5,01 (d, 1H, J=10,9 Hz, CH-OCH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> ), 5,18-5,22 (dd, 1H, J <sub>1</sub> =1,6 Hz, J <sub>2</sub> =10,3 Hz, CH=CH <sub>2</sub> ), 5,27-5,34 (ddd, 1H, J <sub>1</sub> =1,5 Hz, J <sub>2</sub> =3,1 Hz, J <sub>3</sub> =17,2 Hz, CH=CH <sub>2</sub> ), 5,86-6,00 (m, 1H, CH=CH <sub>2</sub> ), 7,25-7,33 (več m, 20H, Ar-H)	
<b>MS (EI)</b>	579 (M) <sup>+</sup>	
<b>IR (NaCl)</b>	v [cm <sup>-1</sup> ] = 3027, 1490, 1447, 1354, 1206, 1069, 910, 731, 692	

### 7.2.4 Sinteza (2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-ola



2,4 g (4,13 mmol) spojine **11** raztopimo v 20 ml 85% metanola, dodamo 0,53 g Pd/C in 0,378 g (1,98 mmol) p-toluensulfonske kisline. Reakcijsko zmes segrevamo 3 h pod refluksom. Po končani reakciji odstranimo Pd/C s filtriranjem z odsesavanjem in topilo odparimo pod znižanim tlakom. Preostanek **12** čistimo s kolonsko kromatografijo (m.f. petroleter:etilacetat = 3:1) (20).

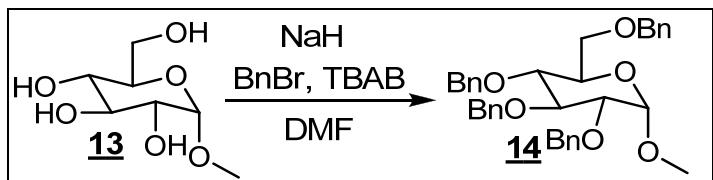
Izkoristek reakcije: 2,4 g (25,6%)

Rf (m.f. petroleter:etilacetat = 1:1): 0,62

Orositveni reagent:  $\text{H}_2\text{SO}_4$

<b>(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-ol (21)</b>		$M_r=540,646$
<b>Izgled</b>	beli kristali	
<b>Analiza</b>	<b>Rezultati</b>	
<b><math>^1\text{H-NMR}</math> (<math>\text{CDCl}_3</math>, 300 MHz)</b>	$\delta$ [ppm] = 3,36-3,73 (več m, 5H, 3× $\text{CH}$ , $\text{CH}_2\text{-OBn}$ ), 3,93-4,05 (m, 2H, $\text{OH}$ , $\text{CH}\text{-CH}_2\text{OBn}$ ), 4,46-4,96 (več m, 8H, 4× $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 5,22-5,23 (d, 1H, $J=3,6$ Hz, $\text{CH}\text{-OH}$ ), 7,25-7,35 (več m, 20H, Ar-H)	
<b>MS (FAB)</b>	539 ( $\text{M}-\text{H}$ ) <sup>+</sup>	
<b>IR (NaCl)</b>	$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3356, 3030, 2858, 1487, 1452, 1354, 1209, 1146, 1083, 1024, 902, 730, 694	
<b>T<sub>t</sub></b>	148-152°C	

### 7.2.5 Sinteza (2R,3R,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(benziloksi)-2-(benziloksimetil)-6-metoksi tetrahidro-2H-piran



4,46 g (185,4 mmol) natrijevega hidrida (60% suspenzija v parafinu) suspendiramo v 20 ml DMF, ohladimo na 0°C, nato po kapljicah dodajamo 8 g (41,2 mmol) metilglukoze **13**, raztopljene v 30 ml DMF. Po 20 minutah dodamo 28,2 g (164,8 mmol) benzilbromida, raztopljenega v 10 ml DMF, in 200 mg tetrabutilamonijevega bromida.

Po končani reakciji reakcijsko zmes ohladimo na 0°C in dodamo vodo, da zreagira preostali natrijev hidrid, nato izvajamo ekstrakcijo s 3x50 ml dietiletra. Organsko fazo spiramo z nasičeno raztopino NaCl in posušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Spojino **14** čistimo s kolonsko kromatografijo (m.f. petroleter:etilacetat = 3:1).

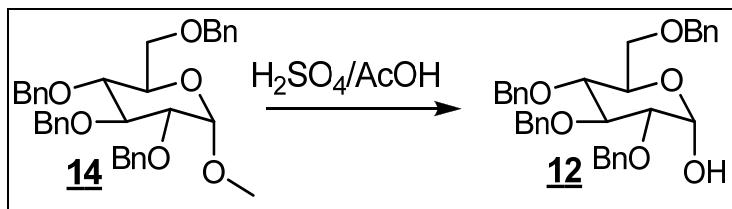
Izkoristek reakcije: 10,19 g (44,6%)

Rf (m.f. petroleter:etilacetat = 3:1): 0,39

Orositveni reagent: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

<b>(2R,3R,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(benziloksi)-2-(benziloksimetil)-6-metoksitetrahidro-2H-piran (22)</b>		M <sub>r</sub> =554,673
<b>Izgled</b>	brezbarvno olje	
<b>Analiza</b>	<b>Rezultati</b>	
<b><sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)</b>	$\delta$ [ppm] = 3,37 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3,53-3,77 (več m, 5H, 3×CH, CH <sub>2</sub> -OBn), 3,95-4,01 (t, 1H, J=9,2 Hz, CH-CH <sub>2</sub> OBn), 4,45-4,84 (več m, 8H, 4×CH <sub>2</sub> -Ph), 4,96-4,99 (d, 1H, J=10,9 Hz, CH-OMe), 7,22-7,34 (več m, 20H, Ar-H)	
<b>MS (EI)</b>	463 (M-Bn) <sup>+</sup>	
<b>IR (NaCl)</b>	$\nu$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3358, 3027, 2852, 1494, 1455, 1357, 1206, 1143, 1042, 910, 735, 688	

### 7.2.6 Sinteza (2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-ola



10,19 g spojine **14** raztopimo v 100 ml ledoceta, dodamo 18 ml 3M  $H_2SO_4$  in segrevamo 4 ure pri  $80^\circ C$ . Po ohladitvi na sobno temperaturo izpadne bela oborina **12**, ki jo odfiltriramo z odsesavanjem in spiramo z vodo in hladnim etanolom (23).

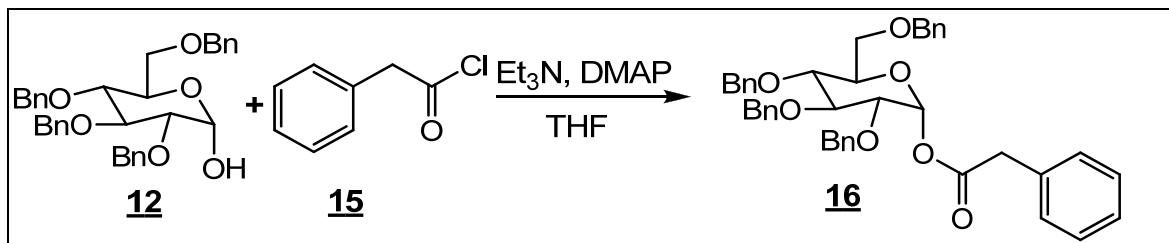
Izkoristek reakcije: 5,2 g (52,3%)

Rf (m.f. petroleter:etilacetat = 1:1): 0,49

Orositveni reagent:  $H_2SO_4$

<b>(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-ol</b>		$M_r=540,646$
<b>Izgled</b>	beli kristali	
<b>Analiza</b>	<b>Rezultati</b>	
<b><math>^1H</math>-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)</b>	$\delta$ [ppm] = 3,27-3,73 (več m, 5H, 3×CH, CH <sub>2</sub> -OBn), 3,93-4,06 (m, 2H, OH, CH-CH <sub>2</sub> OBn), 4,46-4,96 (več m, 8H, 4×CH <sub>2</sub> -Ph), 5,23 (s, 1H, CH-OH), 7,25-7,31 (več m, 20H, Ar-H)	
<b>MS (FAB)</b>	539 (M-H) <sup>+</sup>	
<b>IR (NaCl)</b>	$\nu$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3412, 2922, 2856, 1579, 1509, 1466, 1365, 1116, 960, 871, 836	
<b>T<sub>t</sub></b>	148-152°C	

### 7.2.7 Sinteza (2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il 2-fenilacetata



1 g (1,85 mmol) spojine **12** raztopimo v 15 ml brezvodnega THF, dodamo 0,28 g (2,78 mmol) trietylamina in 23 mg (0,185 mmol) DMAP. Med mešanjem po kapljicah dodajamo 0,31 g (2,03 mmol) fenilacetilklorida **15**. Po končani reakciji reakcijsko zmes spiramo z 0,1M HCl in nasičeno raztopino NaCl. THF odstranimo pod znižanim tlakom, preostanek **16** čistimo s kolonsko kromatografijo (m.f. petroleter:etilacetat = 3:1).

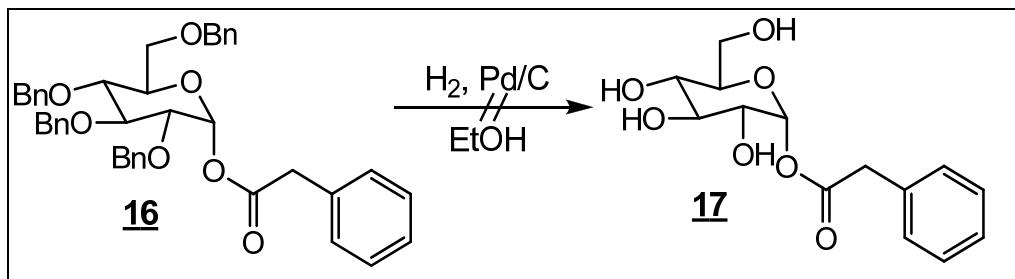
Izkoristek reakcije: 0,8 (65,7%)

Rf (m.f. petroleter:etilacetat = 1:1) = 0,74

Orositveni reagent:  $\text{H}_2\text{SO}_4$

<b>(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il 2-fenilacetat</b>		M <sub>r</sub> =658,779
<b>Izgled</b>	brezbarvno olje	
<b>Analiza</b>	<b>Rezultati</b>	
<b><math>^1\text{H-NMR}</math> (<math>\text{CDCl}_3</math>, 300 MHz)</b>	$\delta[\text{ppm}] = 3,53\text{-}3,77$ (več m, 8H, $4\times\text{CH}$ , $\text{CH}_2\text{-OBn}$ , $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 4,42-4,88 (več m, 8H, $4\times\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 5,61-5,63 (d, 1H, $J=8,1$ Hz, $\text{CH}\text{-OCO}$ ), 7,10-7,31 (več m, 25H, Ar-H)	
<b>MS (FAB)</b>	657 ( $\text{M}-\text{H}$ ) <sup>+</sup>	
<b>IR (NaCl)</b>	$\nu [\text{cm}^{-1}] = 3388, 3062, 3030, 2919, 1748, 1602, 1585, 1496, 1453, 1361, 1311, 1245, 1210, 1071, 1028, 943, 913, 843, 737, 697$	
<b>HRMS</b>	<b>Izračunana M<math>\text{Na}^+</math> za <math>\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{Na}</math></b>	<b>Izmerjena M<math>\text{Na}^+</math> za <math>\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{Na}</math></b>
	681,2828	681,2823

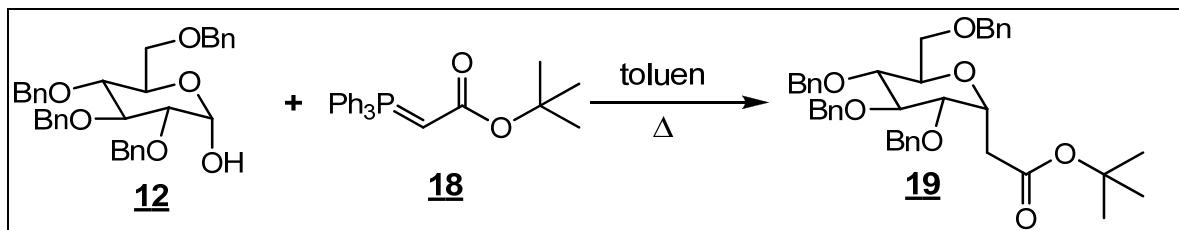
### 7.2.8 Poskus sinteze (*2R,3R,4S,5S,6R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-*2H*-piran-2-il 2-fenilacetata



1,148 g (1,743 mmol) spojine **16** raztopimo v 60 ml brezvodnega etanola, prepipamo z argonom in dodamo 110 mg Pd/C. Reakcijsko zmes nato čez noč prepihujemo z vodikom. Po končani reakciji Pd/C odstranimo s filtriranjem z odsesavanjem, preostanek spiramo z etanolom, nato topilo odparimo pod znižanim tlakom (23).

Kromatogram tankoplastne kromatografije je pokazal, da je izhodna spojina izginila in nastala je nova lisa, vendar v masnem spektru ni bilo želenega masnega signala. Tudi NMR spekter ni potrdil prisotnosti spojine **17**.

**7.2.9 Sinteza terc-butil 2-((2R,3S,4R,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)acetata**



0,5 g (1,328 mmol) spojine **18** in 0,36 g (0,664 mmol) spojine **12** raztopimo v 15 mL brezvodnega toluena, prepihamo z argonom in segrevamo pod refluksom čez noč. Po končani reakciji pod znižanim tlakom odstranimo topilo. Oljnat preostanek **19** čistimo s kolonsko kromatografijo (m.f. petroleter:etilacetat = 3:1).

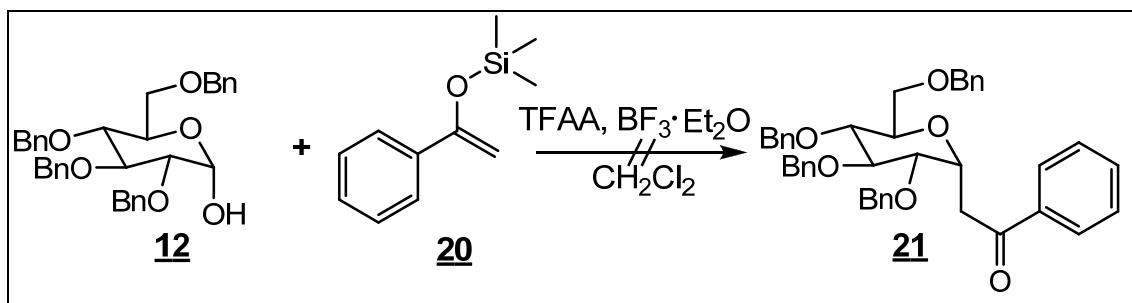
Izkoristek reakcije: 0,14 g (33%)

Rf (m.f. petroleter:etilacetat = 3:1) = 0,34

Orositveni reagent: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

<b>Terc-butil 2-((2R,3S,4R,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)acetat</b>		M <sub>r</sub> =638,789
<b>Izgled</b>	brezbarvno olje	
<b>Analiza</b>	<b>Rezultati</b>	
<b><sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)</b>	$\delta$ [ppm] = 1,41-1,57 (m, 9H, 3×CH <sub>3</sub> ), 2,30-2,44 (m, 1H, CH <sub>2</sub> -COO), 3,01-3,24 (m, 1H, CH <sub>2</sub> -COO), 3,48-3,98 (več m, 5H, 3×CH, CH <sub>2</sub> -OBn), 4,16-4,25 (m, 1H, CH-CH <sub>2</sub> OBn), 4,38-4,85 (več m, 8H, 4×CH <sub>2</sub> -Ph), 5,38-5,49 (m, 1H, CH-CH <sub>2</sub> CO), 7,24-7,37 (več m, 20H, Ar-H)	
<b>MS (ESI)</b>	661,3 (MNa) <sup>+</sup>	
<b>IR (NaCl)</b>	$\nu$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3434, 3062, 3030, 2976, 2929, 2348, 1710, 1639, 1496, 1454, 1367, 1309, 1207, 1152, 1093, 1027, 847, 736, 698	
<b>HRMS</b>	<b>Izračunana MNa<sup>+</sup> za C<sub>40</sub>H<sub>46</sub>O<sub>7</sub>Na</b>	<b>Izmerjena MNa<sup>+</sup> za C<sub>40</sub>H<sub>46</sub>O<sub>7</sub>Na</b>
	661,3141	661,3148

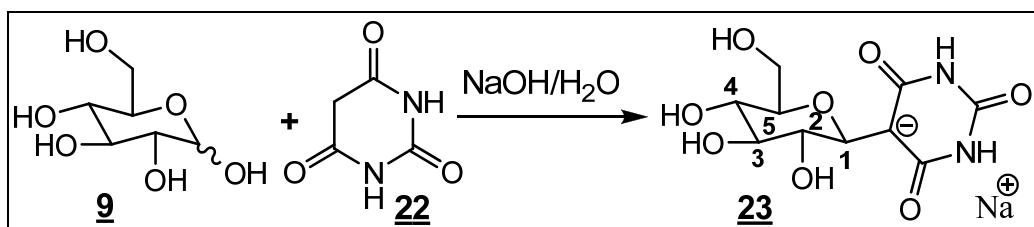
**7.2.10 Poskus sinteze 1-fenil-2-((2R,3S,4R,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloksi)-6-(benziloksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il) etanona**



0,527 g (0,97 mmol) spojine **12** raztopimo v 10 ml brezvodnega diklormetana, prepihamo z argonom in dodamo anhidrid trifluorocetne kisline. Po 30 minutah dodamo 0,5 ml (2,44 mmol) spojine **20** in 0,18 ml (1,46 mmol)  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ . Po končani reakciji diklormetan odparimo pod znižanim tlakom (24).

Na razviti kromatografski ploščici je vidna novonastala lisa, vendar po opravljenih masni in NMR analizi nismo mogli potrditi prisotnosti želene spojine **21**.

### 7.2.11 Sinteza natrijevega 5- $\beta$ -D-glukopiranozilbarbiturata



4,22 g (23,4 mmol) glukoze **9** in 3,0 g (23,4 mmol) barbiturne kisline **22** raztopimo v 16 ml vode, dodamo 24 ml 1M NaOH in segrevamo 5 ur pri 80°C. Po končani reakciji pod znižanim tlakom uparimo večino vode in dodamo metanol. Nastalo oborino filtriramo z odsesavanjem in sušimo v sušilniku pri 50°C. Dobimo 5,98 g vijoličnih kristalov spojine **23** (25).

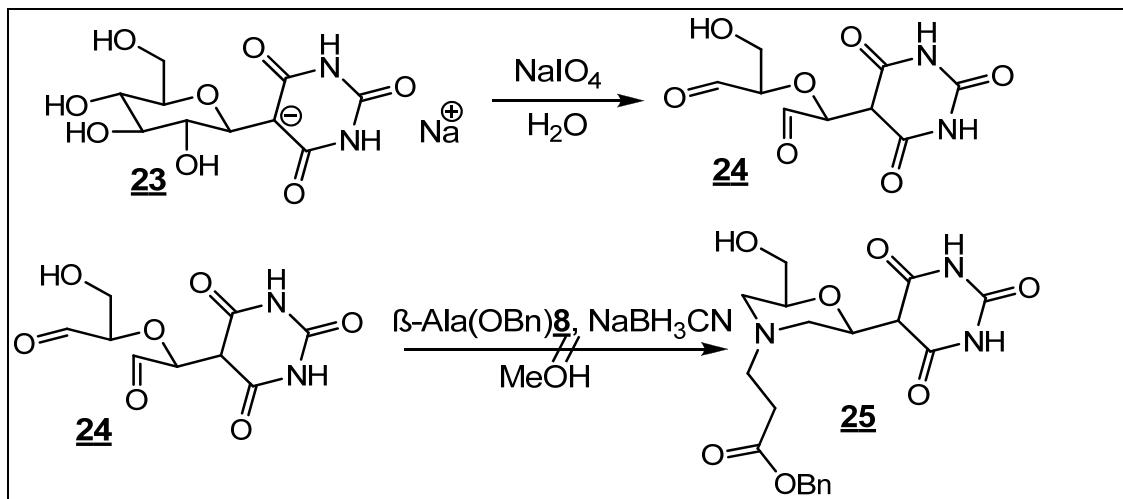
Izkoristek reakcije: 5,98 g (81,9%)

Rf (m.f. DKM:MeOH = 1:1) = 0,40

Orositveni reagent: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

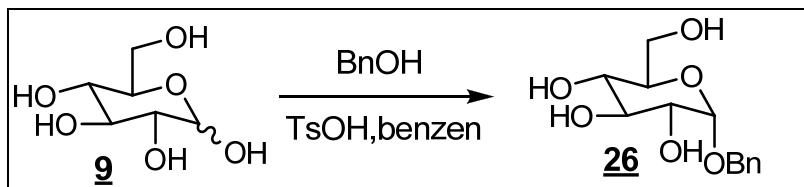
<b>natrijev 5-<math>\beta</math>-D-glukopiranozilbarbiturat (25)</b>		M <sub>r</sub> =312,209
<b>Izgled</b>	vijolični kristali	
<b>Analiza</b>	<b>Rezultati</b>	
<b><sup>1</sup>H-NMR (DMSO<sub>d</sub><sub>6</sub>, 300 MHz)</b>	$\delta$ [ppm]= 3,00-3,03 (m, 1H, C <sup>2</sup> H), 3,09-3,16 (dt, 1H, J <sub>1</sub> =3,6 Hz, J <sub>2</sub> =8,7 Hz, C <sup>2</sup> H), 3,18-3,22 (m, 1H, C <sup>4</sup> H), 3,54 (s, 2H, CH <sub>2</sub> -OH), 3,90-3,97 (dt, 1H, J <sub>1</sub> =4,3 Hz, J <sub>2</sub> =9,3 Hz, C <sup>5</sup> H), 4,07-4,09 (d, 1H, J= 4,3 Hz, CH <sub>2</sub> -OH), 4,13-4,16 (d, 1H, J=9,8 Hz, 1×OH), 4,60-4,61 (d, 1H, J=3,6 Hz, C <sup>3</sup> H-OH), 4,68-4,70 (d, 1H, J=4,9 Hz, 1×OH), 4,83 (bs, 1H, O-C <sup>1</sup> H <sub>α</sub> ), 9,04 (s, 2H, 2×NH)	
<b>MS (ESI)</b>	289,1 (M-Na) <sup>+</sup>	
<b>IR (KBr)</b>	$\nu$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3854, 3751, 3352, 1700, 1589, 1475, 1361, 1191, 1077, 1014, 907, 784, 539	
<b>T<sub>t</sub></b>	Ni bilo mogoče izmeriti	

**7.2.12 Poskus sinteze benzil 3-((2S,6S)-2-(hidroksimetil)-6-(2,4,6-trioksoheksa hidropirimidin-5-il)morfolino)propanoata**



5 g (16 mmol) spojine **23** raztopimo v 30 ml vode in ohladimo na ledeni kopeli. 6,85 g (32 mmol)  $\text{NaIO}_4$  raztopimo v 100 ml vode in dokapavamo v reakcijsko zmes. Po končani reakciji reakcijsko zmes nakisamo z 1M HCl do pH 2,5. Pod znižanim tlakom odparimo vodo in spiramo z metanolom. Frakcije z organsko fazo združimo in odparimo topilo. Dobavljeni spojini **24** dodamo 3,76 g (10,7 mmol) spojine **8** in raztopimo v brezvodnem metanolu. Po 30 minutah dodamo 2,69 g (42,8 mmol) natrijevega cianborhidrida (17, 26). Na kromatogramih, razvitih v mobilni fazi DKM:MeOH = 2:1, pod UV svetlobo ni bilo vidne nobene lise. Tudi oroševanje z ninhidrinom ni pokazalo prisotnosti lise s produktom **25**.

### 7.2.13 Sinteza (2S,3R,4S,5S,6R)-2-(benziloksi)-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triola



10 g (55,5 mmol) glukoze **9** dispergiramo v zmesi 50 ml benzena in 50 ml benzilnega alkohola. Dodamo 1 g (5,26 mmol) p-toluensulfonske kisline, opremimo z Dean-Starkovim nastavkom in segrevamo 24 ur. Po končani reakciji odstranimo benzilni alkohol pod znižanim tlakom. Zaradi visokega vreliča le-tega uporabimo oljno črpalko. Ostanek čistimo z gradientno kolonsko kromatografijo (m.f. DKM:MeOH = 9:1, nato 4:1). Po odstranitvi topila z znižanim tlakom dobimo 3,24 g brezbarvnega olja **26** (17).

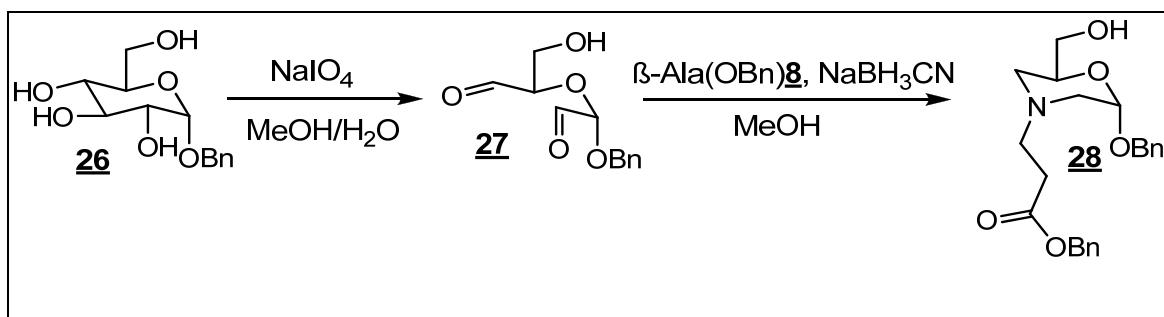
Izkoristek reakcije: 3,24 g (21,6%)

Rf (m.f. DKM:MeOH = 4:1): 0,35

Orositveni reagent:  $\text{H}_2\text{SO}_4$

<b>(2S,3R,4S,5S,6R)-2-(benziloksi)-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triol (17)</b>		$M_r=270,278$
<b>Izgled</b>	brezbarvno olje	
<b>Analiza</b>	<b>Rezultati</b>	
<b><math>^1\text{H-NMR}</math> (DMSOd<sub>6</sub>, 300 MHz)</b>	$\delta[\text{ppm}] = 3,03\text{-}3,27$ (več m, 3H, 3×CH), 3,43-3,51 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -OH), 3,60-3,74 (m, 1H, CH-CH <sub>2</sub> OH), 4,06-4,72 (več m, 4H, 4×OH), 4,74-4,76 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -Ph), 4,85-4,89 (m, 1H, CH-OBn), 7,26-7,41 (m, 5H, Ar-H)	
<b>MS (ESI)</b>	293,1 (MNa) <sup>+</sup>	
<b>IR (NaCl)</b>	$\nu [\text{cm}^{-1}] = 3380, 2931, 1656, 1496, 1435, 1358, 1240, 1154, 1108, 1026, 919, 852, 775, 734, 695$	

### 7.2.14 Sinteza benzil 3-((2S,6S)-2-(benziloksi)-6-(hidroksimetil)morfolino)propanoata



3,49 g (12,9 mmol) spojine **26** raztopimo v 50 ml metanola in ohladimo na ledeni kopeli. 11,05 g (51,6 mmol)  $\text{NaIO}_4$  raztopimo v 150 ml vode in počasi dodajamo v reakcijsko zmes. Reakcijo pustimo teči čez noč. Po končani reakciji odstranimo topilo, preostanek spiramo s THF. Frakcije z organsko fazo združimo in odparimo THF pod znižanim tlakom. Dobljeni spojini **27** dodamo 3,025 g (8,6 mmol) spojine **8**, raztopimo v 60 ml brezvodnega metanola in mešamo 30 min. Nato dodamo 2,16 g (34,4 mmol) natrijevega cianborhidrida in pustimo mešati čez noč. Po končani reakciji odparimo topilo, dodamo 100 ml etilacetata in spiramo s 3x50 ml nasičene raztopine  $\text{NaHCO}_3$ , 50 ml vode in 50 ml nasičene raztopine  $\text{NaCl}$ . Organsko fazo sušimo z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , sušilno sredstvo odfiltriramo in etilacetat odparimo pod znižanim tlakom. Produkt **28** čistimo s kolonsko kromatografijo (m.f. DKM:MeOH = 20:1).

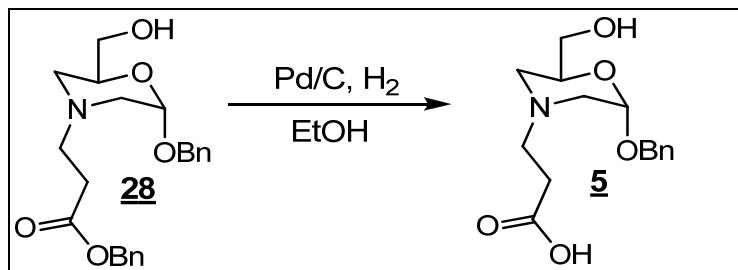
Izkoristek reakcije: 3,075 g (61,7%)

Rf (m.f. DKM:MeOH = 9:1) = 0,56

Orositveni reagent:  $\text{H}_2\text{SO}_4$

<b>benzil3-((2S,6S)-2-(benziloksi)-6-(hidroksimetil)morfolino)propanoat (17)</b>	$M_f=385,453$
<b>Izgled</b>	brezbarvno olje
<b>Analiza</b>	<b>Rezultati</b>
<b><math>^1\text{H-NMR}</math> (<math>\text{CDCl}_3</math>, 300 MHz)</b>	$\delta[\text{ppm}] = 2,08-2,15$ (t, 1H, $J=10,8$ Hz, $H_{\text{ax}}$ $\text{CH}_2\text{-CHOBn}$ ), 2,23-2,28 (dd, 1H, $J_1=2,9$ Hz, $J_2=11,5$ Hz, $H_{\text{ax}}$ $\text{CH}_2\text{-CHCH}_2\text{OH}$ ), 2,49-2,60 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$ ), 2,67-2,76 (m, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{COO}$ ), 2,80-2,89 (m, 1H, $H_{\text{eq}}$ $\text{CH}_2\text{-CHOBn}$ ), 3,51-3,57 (m, 1H, $H_{\text{eq}}$ $\text{CH}_2\text{-CHCH}_2\text{OH}$ ), 3,60-3,68 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 4,05-4,12 (m, 1H, $\text{CH}\text{-CH}_2\text{OH}$ ), 4,55-4,76 (več m, 4H, 2 $\times$ $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 4,84-4,89 (m, 1H, -OH), 5,11-5,12 (d, 1H, $J=3,4$ Hz, $\text{CH-OBn}$ ), 7,27-7,37 (m, 10H, Ar-H)
<b>MS (ESI)</b>	$386,2 (\text{MH})^+$
<b>IR (NaCl)</b>	$\nu [\text{cm}^{-1}] = 3407, 2922, 1736, 1496, 1452, 1048, 736, 697$

### 7.2.15 Sinteza 3-((2S,6S)-2-(benziloksi)-6-(hidroksimetil)morfolino)propanojske kislinske



1,848 g (4,79 mmol) spojine **28** raztopimo v 50 ml etanola, prepihamo z argonom, dodamo 185 mg Pd/C in prepihujemo z vodikom pri sobni temperaturi 24 ur. Po končani reakciji odstranimo Pd/C s filtriranjem z odsesavanjem, topilo odparimo pod znižanim tlakom. Oljnat preostanek čistimo s kolonsko kromatografijo (m.f. DKM:metanol = 4:1). Po odstranitvi topila dobimo 0,358 g oljnate spojine **5**, ki sčasoma kristalizira.

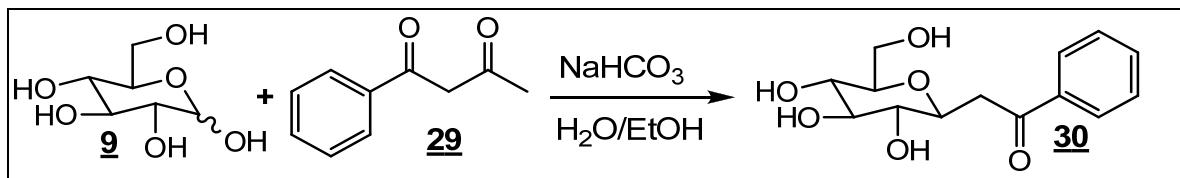
Izkoristek reakcije: 0,358 g (25,3%)

Rf (m.f. DKM:MeOH = 4:1) = 0,15

Orositveni reagent:  $\text{H}_2\text{SO}_4$

<b>3-((2S,6S)-2-(benziloksi)-6-(hidroksimetil)morfolino)propanojska kislina (17)</b>		$M_r=295,391$
<b>Izgled</b>	beli kristali	
<b>Analiza</b>	<b>Rezultati</b>	
<b><math>^1\text{H-NMR}</math> (DMSO<sub>d</sub><sub>6</sub>, 300 MHz)</b>	$\delta$ [ppm]= 1,87-1,94 (t, 1H, $J=10,9$ Hz, H <sub>ax</sub> $\text{CH}_2\text{-CHOBn}$ ), 2,16-2,21 (dd, 1H, $J_1=2,7$ Hz, $J_2=11,8$ Hz, H <sub>ax</sub> $\text{CH}_2\text{-CHCH}_2\text{OH}$ ), 2,34-2,38 (t, 2H, $J=7,0$ Hz, NCH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH), 2,51-2,56 (m prekrivanje s signalom za DMSO <sub>d</sub> <sub>6</sub> , 2H, N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> COOH), 2,81-2,87 (m, 2H, H <sub>eq</sub> $\text{CH}_2\text{-CH-OBn}$ + H <sub>eq</sub> $\text{CH}_2\text{-CHCH}_2\text{OH}$ ), 3,31-3,45 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH},$ ), 3,17 (s, 1H, -OH), 3,84-3,90 (m, 1H, $\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$ ), 4,42-4,67 (dd, 2H, $J_1=12,0$ Hz, $J_2=61,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 4,84 (s, 1H, $\text{CH-OBn}$ ), 7,28-7,36 (m, 5H, Ar-H)	
<b>MS (ESI)</b>	296,2 ( $\text{MH}^+$ ) <sup>+</sup>	
<b>IR (NaCl)</b>	$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3358, 1590, 1390, 1049, 673	
<b>T<sub>t</sub></b>	110-114°C	
<b>HRMS</b>	<b>Izračunana <math>\text{MH}^+</math> za <math>\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_5</math></b>	<b>Izmerjena <math>\text{MH}^+</math> za <math>\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_5</math></b>
	296,1498	296,1491

**7.2.16 Sinteza 1-fenil-2-((2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il) etanona**



1g glukoze **9** raztopimo v 40 ml vode, dodamo 0,70g natrijevega hidrogenkarbonata in 1,35g benzoilacetona **29**. Po potrebi dodamo etanol, da se raztopi ves benzoilaceton. Reakcijsko zmes segrevamo na 90°C in pustimo čez noč. Po končani reakciji reakcijsko zmes nakisamo z Dowex-om do pH 2. Filtriramo in odparimo topilo pod znižanim tlakom. Vodno fazo spiramo z etrom, združimo vodne frakcije in odparimo vodo. Preostanek **30** čistimo s kolonsko kromatografijo (m.f.:DKM:MeOH = 4:1) (27).

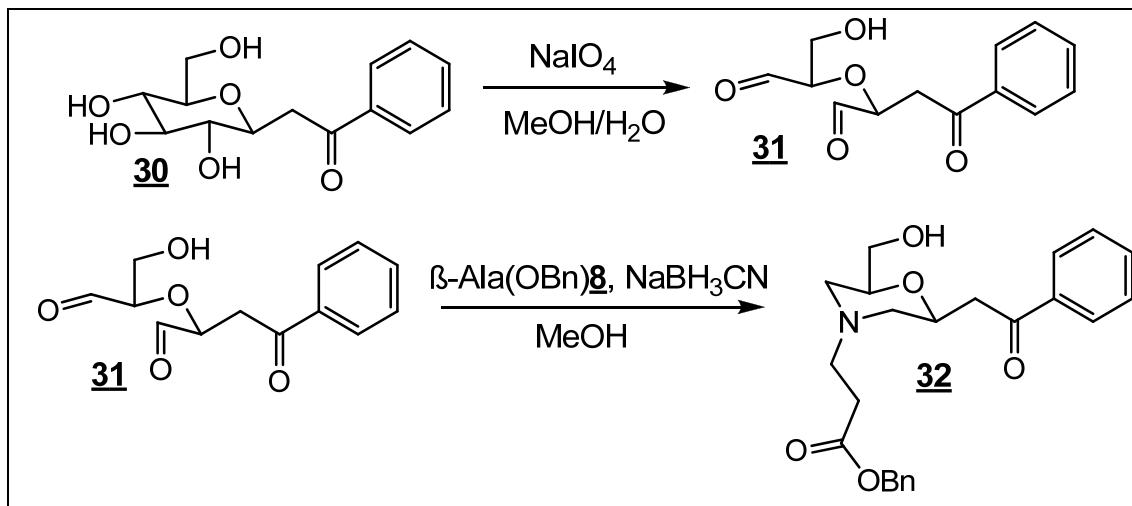
Izkoristek reakcije: 0,96g (61,3%)

Rf (m.f.:DKM:MeOH = 4:1) = 0,38

Orositveni reagent: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

<b>1-fenil-2-((2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)etanon (28)</b>		M <sub>r</sub> =282,289
<b>Izgled</b>	beli kristali	
<b>Analiza</b>	<b>Rezultati</b>	
<b><sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz)</b>	δ[ppm]= 3,0-3,19 (več m, 5H, CH <sub>2</sub> -CO + 4× -CH), 3,25-3,29 (m, 1H, CH <sub>2</sub> -CO), 3,35-3,41 (dd, 1H, J <sub>1</sub> =5,5 Hz, J <sub>2</sub> =11,5 Hz, CH <sub>2</sub> -OH), 3,53-3,60 (ddd, 1H, J <sub>1</sub> =1,7 Hz, J <sub>2</sub> =5,5 Hz, J <sub>3</sub> =11,5 Hz, CH <sub>2</sub> -OH), 3,66-3,73 (dt, 1H, J <sub>1</sub> =2,5 Hz, J <sub>2</sub> =9,0 Hz, CH-CH <sub>2</sub> CO), 4,23-4,27 (dd, 1H, J <sub>1</sub> =6,9 Hz, J <sub>2</sub> =12,6 Hz, CH <sub>2</sub> -OH), 4,81-4,82 (d, 1H, J=4,9 Hz, CH-OH), 4,88-4,90 (d, 1H, J=4,5 Hz, CH-OH), 5,03-5,05 (d, 1H, J=5,6 Hz, CH-OH), 7,50-7,55 (t, 2H, J=7,4 Hz, Ar-H <sub>3,5</sub> ), 7,61-7,66 (t, 1H, J=7,4 Hz, Ar-H <sub>4</sub> ), 7,84-7,97 (m, 2H, Ar-H <sub>2,6</sub> )	
<b>MS (ESI)</b>	283,1 (MH) <sup>+</sup>	
<b>IR (NaCl)</b>	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3368, 2915, 1708, 1676, 1596, 1578, 1448, 1384, 1218, 1079, 753, 684	
<b>T<sub>t</sub></b>	195-203°C	

**7.2.17 Sinteza benzil 3-((2S,6S)-2-(hidroksimetil)-6-(2-okso-2-feniletil)morfolino)propanoata**



2,16 g (7,65 mmol) spojine 30 raztopimo v 20 ml metanola in ohladimo na ledeni kopeli. 6,55 g (30,6 mmol)  $\text{NaIO}_4$  raztopimo v 80 ml vode in počasi dodajamo v reakcijsko zmes. Reakcijo pustimo teči čez noč. Po končani reakciji odstranimo topilo, preostanek spiramo s THF. Frakcije z organsko fazo združimo in odparimo THF pod znižanim tlakom. Dobljeni spojini 31 dodamo 1,793 g (5,1 mmol) spojine 8, raztopimo v 40 ml brezvodnega metanola in mešamo 30 min. Nato dodamo 1,282 g (20,4 mmol) natrijevega cianborhidrida in pustimo čez noč. Po končani reakciji odparimo topilo, dodamo 100 ml etilacetata in spiramo s 3x50 ml nasičene raztopine  $\text{NaHCO}_3$ , 50 ml vode in 50 ml nasičene raztopine  $\text{NaCl}$ . Organsko fazo sušimo z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , sušilno sredstvo odfiltriramo in etilacetat odparimo pod znižanim tlakom. Produkt 32 čistimo z gradientno kolonsko kromatografijo (m.f. DKM:MeOH = 20:1, nato 9:1).

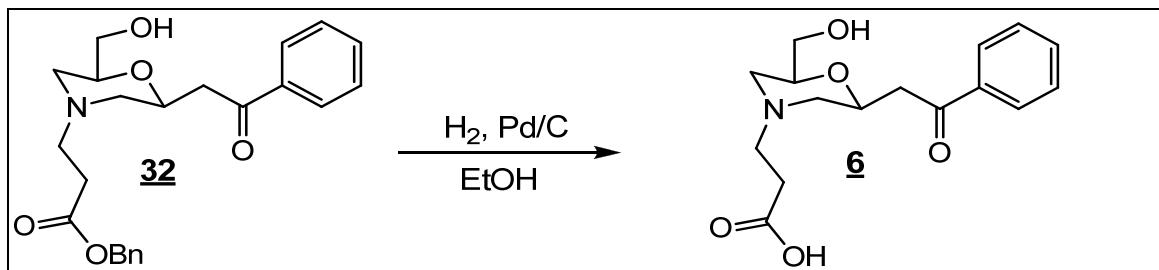
Izkoristek reakcije: 3,04 g (31,3%)

Rf (m.f. DKM:MeOH = 9:1) = 0,57

Orositveni reagent:  $\text{H}_2\text{SO}_4$

<b>3-((2S,6S)-2-(hidroksimetil)-6-(2-okso-2-feniletil) morfolino)propanoat</b>		M <sub>r</sub> =397,464
<b>Izgled</b>	brezbarvno olje	
<b>Analiza</b>	<b>Rezultati</b>	
<b><sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)</b>	$\delta[\text{ppm}] = 1,86\text{-}1,97$ (m, 3H, H <sub>ax</sub> N-CH <sub>2</sub> -CHCH <sub>2</sub> CO + H <sub>ax</sub> CH <sub>2</sub> -CHCH <sub>2</sub> OH + -OH), 2,53-2,57 (t, 2H, J=6,9 Hz, NCH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COO), 2,69-2,74 (m, 2H, H <sub>eq</sub> CH <sub>2</sub> -CHCH <sub>2</sub> OH + N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> COO), 2,89-2,92 (m, 1H, H <sub>eq</sub> N-CH <sub>2</sub> -CHCH <sub>2</sub> CO), 2,87-2,96 (dd, 1H, J <sub>1</sub> =6,2 Hz, J <sub>2</sub> =16,2 Hz, CH-CH <sub>2</sub> -CO), 3,24-3,32 (dd, 1H, J <sub>1</sub> =6,2 Hz, J <sub>2</sub> =16,2 Hz, CH-CH <sub>2</sub> -CO), 3,45-3,60 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -OH), 3,62-3,67 (m, 1H, CH-CH <sub>2</sub> OH), 4,14-4,23 (m, 1H, CH-CH <sub>2</sub> CO), 5,13 (s, 2H, CH <sub>2</sub> -Ph), 7,28-7,35 (m, 5H, Ar-H), 7,43-7,48 (m, 2H, Ar-H), 7,54-7,59 (m, 1H, Ar-H), 7,92-7,96 (m, 2H, Ar-H)	
<b>MS (ESI)</b>	398,2 (MH <sup>+</sup> )	
<b>IR (NaCl)</b>	$\nu [\text{cm}^{-1}] = 3435, 3062, 3032, 2942, 1734, 1685, 1596, 1580, 1496, 1449, 1353, 1268, 1214, 1184, 1151, 1113, 1049, 1001, 753, 698$	
<b>HRMS</b>	<b>Izračunana MH<sup>+</sup> za C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>5</sub></b>	<b>Izmerjena MH<sup>+</sup> za C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>5</sub></b>
	398,1967	398,1959

**7.2.18 Sinteza 3-((2S,6S)-2-(hidroksimetil)-6-(2-okso-2-feniletil)morfolino)propanojske kislina**



0,681 g (1,71 mmol) spojine **32** raztopimo v 50 ml etanola, prepihamo z argonom, dodamo 70 mg Pd/C in prepipujemo z vodikom pri sobni temperaturi 24 ur. Po končani reakciji odstranimo Pd/C s filtriranjem z odsesavanjem, topilo odparimo pod znižanim tlakom. Oljnat preostanek **6** čistimo s kolonsko kromatografijo (m.f. DKM:MeOH:AcOH = 4:1:0,1).

Izkoristek reakcije: 0,18 g (25,8%)

Rf (m.f. DKM:MeOH:AcOH = 4:1:0,1) = 0,22

Orositveni reagent: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

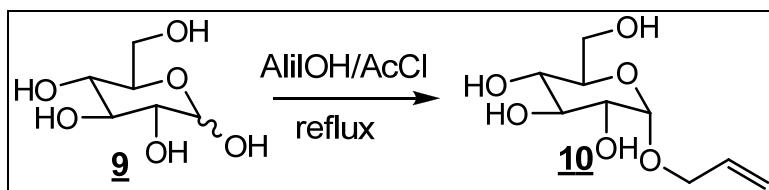
<b>3-((2S,6S)-2-(hidroksimetil)-6-(2-okso-2-feniletil)morfolino)propanojska kislina</b>		M <sub>r</sub> =307,342
<b>Izgled</b>	brezbarvno olje	
<b>Analiza</b>	<b>Rezultati</b>	
<b><sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)</b>	δ[ppm]= 2,20-2,27 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = J <sub>2</sub> =11,1 Hz, H <sub>ax</sub> CH <sub>2</sub> -CHCH <sub>2</sub> CO), 2,26-2,33 (t, 1H, J=11,1 Hz, H <sub>ax</sub> CH <sub>2</sub> -CHCH <sub>2</sub> OH), 2,54-2,58 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -COOH), 2,91-2,93 (m, 2H, N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH), 2,99-3,06 (dd, 1H, J <sub>1</sub> =6,0 Hz, J <sub>2</sub> =16,9 Hz, CH <sub>2</sub> -CO), 3,13-3,17 (d, 1H, J=11,1 Hz, H <sub>eq</sub> CH <sub>2</sub> -CHCH <sub>2</sub> OH), 3,25-3,29 (d, 1H, J=11,1 Hz, H <sub>eq</sub> CH <sub>2</sub> -CHCH <sub>2</sub> CO), 3,30-3,37 (dd, 1H, J <sub>1</sub> =6,0 Hz, J <sub>2</sub> =16,9 Hz, CH <sub>2</sub> -CO), 3,57-3,68 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -OH), 3,84-3,86 (m, 1H, CH-CH <sub>2</sub> CO), 4,34-4,37 (m, 1H, CH-CH <sub>2</sub> OH), 7,42-7,47 (t, 2H, J=7,5 Hz, Ar-H <sub>3,5</sub> ), 7,54-7,59 (t, 1H, J=7,5 Hz, Ar-H <sub>4</sub> ), 7,91-7,93 (d, 2H, J=7,5 Hz, Ar-H <sub>2,6</sub> )	
<b>MS (ESI)</b>	308,1 (MH) <sup>+</sup>	
<b>IR (NaCl)</b>	v [cm <sup>-1</sup> ] = 3368, 2925, 1685, 1595, 1449, 1389, 1286, 1221, 1128, 1054, 1000, 879, 756, 690	
<b>HRMS</b>	<b>Izračunana MH<sup>+</sup> za C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>5</sub></b> 308,1498	<b>Izmerjena MH<sup>+</sup> za C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>5</sub></b> 308,1495

## 8 RAZPRAVA

V okviru diplomske naloge smo po dveh različnih sinteznih poteh poskušali sintetizirati šest končnih spojin. Uspešno smo sintetizirali le dve končni spojini. Sinteze preostalih končnih spojin nismo mogli izvesti, ker nismo uspeli odstraniti benzilnih zaščitnih skupin.

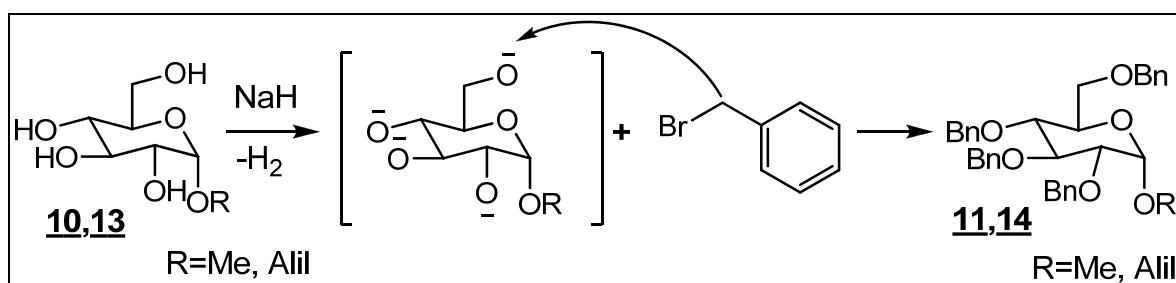
### Prva sintezna pot

Najprej smo zaščitili anomerno hidroksilno skupino na glukozi z alilno skupino (Fischerjeva glikozilacija, Slika 13) (17). Reakcija poteka selektivno na anomerni hidroksilni skupini, ki je najbolj reaktivna.



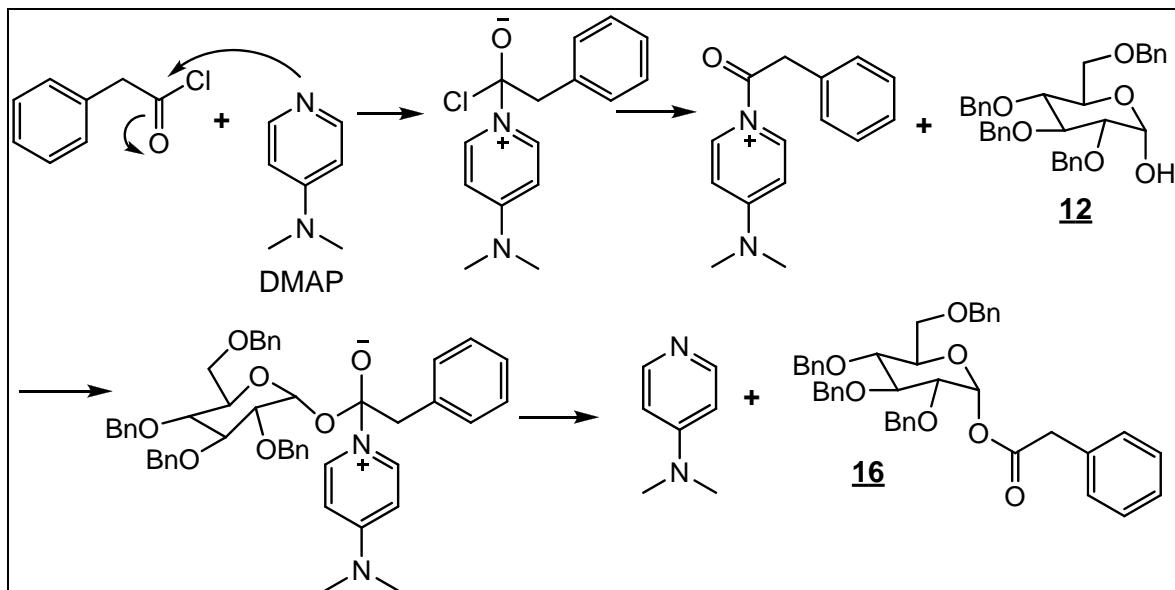
Slika 13: Fischerjeva glikozilacija.

Nato smo ostale hidroksilne skupine zaščitili z benzilnimi skupinami (Slika 14) (18). Alilno skupino smo nato odstranili z uporabo *p*-toluensulfonske kisline in paladija (20), da smo dobili spojino **12**, na katero smo pripenjali različne fragmente (UDP mimetike). Celokupni izkoristek treh stopenj je bil samo 4,4%, zato smo se odločili, da bomo kot izhodno spojino uporabili  $\alpha$ -D-metilglukozo **13**. Spojino **12** smo sintetizirali v dveh stopnjah (18,23) s 23,3% izkoristkom (Reakcijska shema 1). Po odstranitvi metilne skupine spojina v vodni raztopini kristalizira. Spojino smo čistili s filtriranjem z odsesavanjem, kar je občutno skrajšalo čas čiščenja produkta v primerjavi s čiščenjem s kolonsko kromatografijo. Benzilno zaščito smo uvedli z Williamsonovo sintezo etrov (Slika 14). Uporabili smo natrijev hidrid, ki je dovolj močna baza, da odcepi protone s hidroksilnih skupin sladkorja. Benzilbromid deluje kot elektrofil, katalizator pri reakciji je TBAB.



Slika 14: Uvajanje benzilne zaščite z Williamsonovo sintezo etrov.

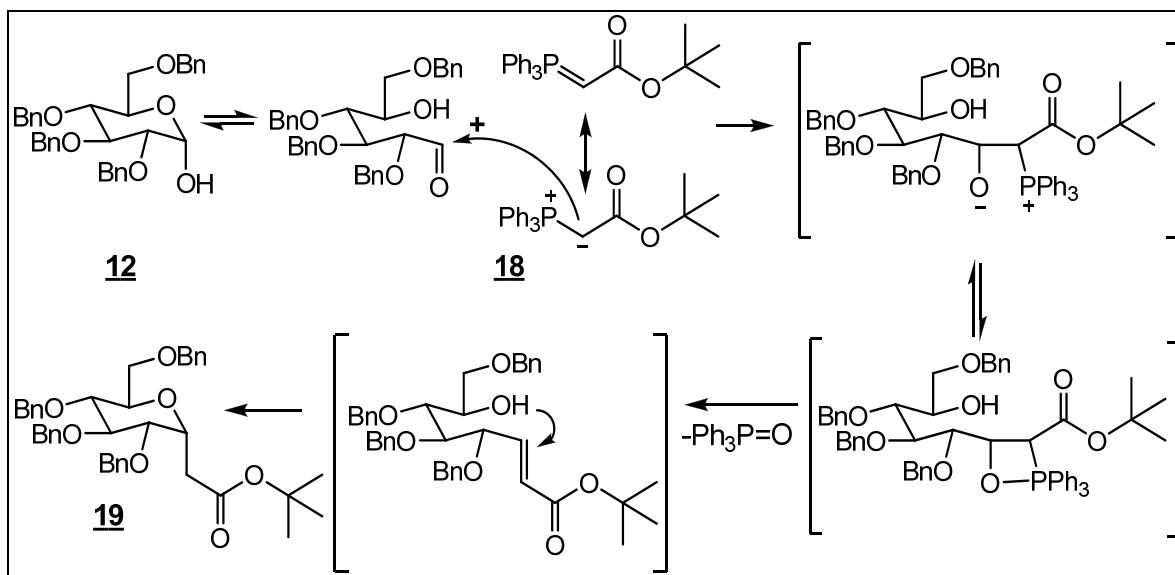
Na tako pripravljeno spojino **12** smo najprej pripenjali fenilacetilklorid. Pri reakciji smo uporabljali različna topila (DKM, DMF in THF). Najboljši izkoristek (65,7%) smo dobili z uporabo trietilamina, THF kot topila in DMAP kot katalizatorja. Slika 15 prikazuje mehanizem reakcije.



Slika 14: Mehanizem sinteze estra z aktivacijo karbonilne skupine z DMAP.

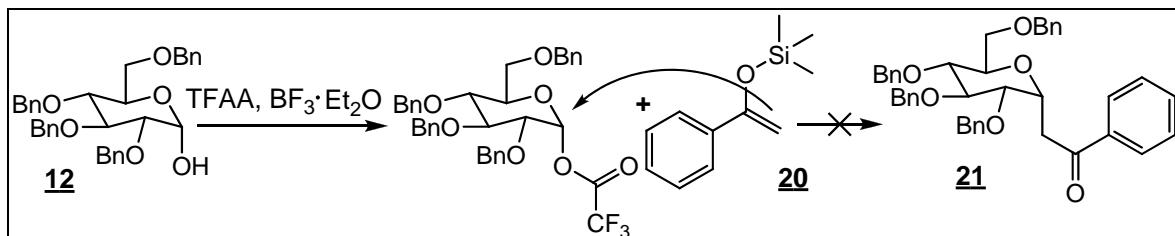
Nato smo hoteli odstraniti benzilne skupine s katalitskim hidrogeniranjem, vendar reakcija ni potekla. Med reakcijo je verjetno prišlo do odprtja obroča ali preestrenja. Možna razloga za neuspelo odstranitev benzilnih skupin je, da spojina, ki je zelo nepolarna, v etanolu zavzame takšno konformacijo, da ne pride do stika med katalizatorjem in benzilnimi skupinami.

Odstranitev benzilnih skupin s spojine **16** s kakšno drugo metodo zaradi občutljivosti estrske vezi na kisle in bazične pogoje ni bila možna, zato smo hoteli sintetizirati C-glikozid z uporabo trifenilfosfonijevega ilida. Sklepalni smo, da bi z večjo stabilnostjo C-C vezi lahko v naslednji stopnji izvedli katalitsko hidrogeniranje in se izognili odprtju obroča. Izvajali smo Wittigovo reakcijo z uporabo trifenilfosfonijevega ilida **18** (Slika 16). Reakcijo nam je uspelo izvesti, vendar smo se zaradi uporabe velike količine reagenta in slabega izkoristka (33%) odločili, da katalitskega hidrogeniranja s spojino **19** ne bomo izvajali.



Slika 16: Mehanizem Wittigove reakcije.

Poizkusili smo sintetizirati C-glikozid tudi z uporabo trimetil(1-fenilviniloksi)silana **20** (24). Pri reakciji najprej aktiviramo hidroksilno skupino na mestu 1, kamor se nato veže omenjeni reagent (Slika 17). Reakcija ni bila uspešna. Izvedba reakcije je problematična, ker so reagenti in intermediati zelo občutljivi na vlago in kisik, zato bi morali reakcijo izvajati v popolnoma inertnih pogojih, ki jih v laboratoriju nismo mogli zagotoviti.

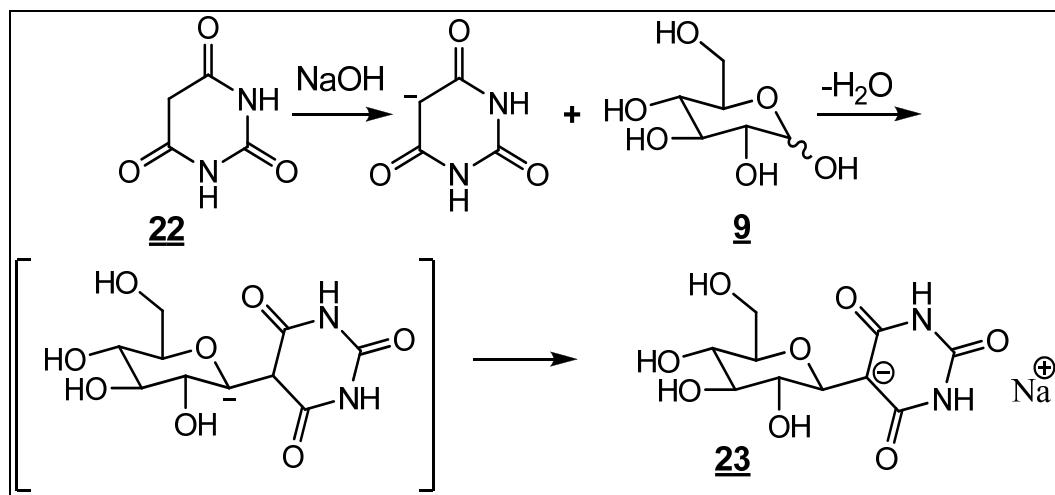


Slika 17: Tvorba C-glikozida.

### Druga sintezna pot

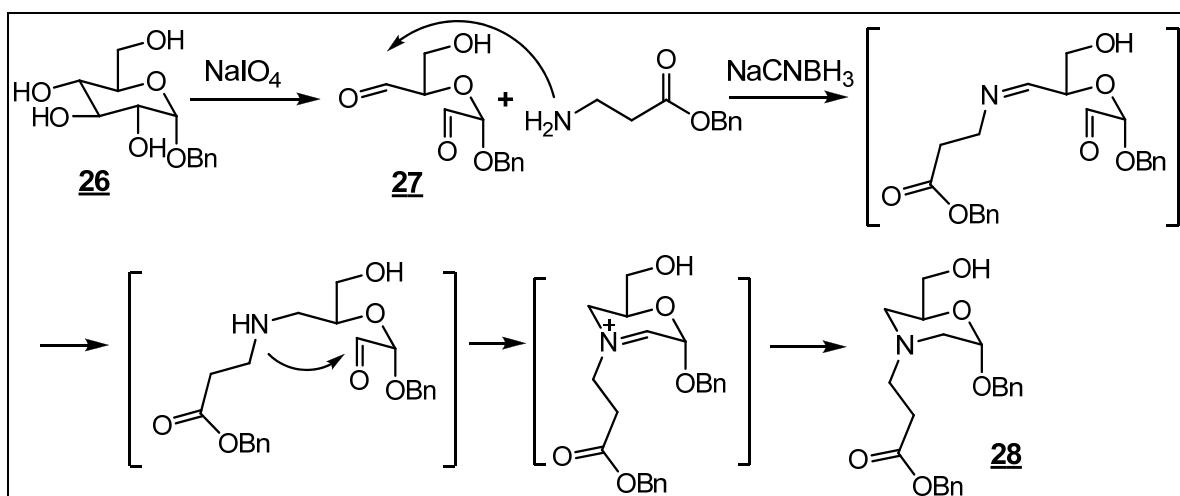
Izvajali smo reakcije, kjer smo mimetike UDP pripnjali selektivno na mesto anomerne hidroksilne skupine direktno na glukozo, da smo se izognili zaščiti preostalih hidroksilnih skupin. V literaturi smo našli podatke o sintezah C-glikozidov, ki potekajo v vodnih raztopinah brez predhodne zaščite hidroksilnih skupin sladkorja (25,27). Prva takšna reakcija je pripenjanje barbiturne kisline na glukozo. Ob prisotnosti baze se odcepi proton na metilenski skupini barbiturne kisline. Nastali nukleofil reagira z glukozo (Slika 18). Dobljeno spojino **23** smo oksidirali z natrijevim perjodatom do dialdehyda (Malapradejeva reakcija), nato smo izvajali reakcijo reduktivnega aminiranja (13,26). Mehanizem reakcije na primeru sinteze spojine **28** prikazuje Slika 19. Reakcija ni bila uspešna. Možni vzrok za

neuspeh je prenizek pH v reakcijski zmesi (pKa barbiturne kisline je 4), saj reduktivno aminiranje optimalno poteka v rahlo kislih pogojih (pH 5-6) (26). Tudi dialdehid, ki nastane po oksidaciji, ni stabilen dalj časa, zato obe reakciji izvajamo zaporedoma. Reakcijo smo izvedli tudi brez predhodnega nakisanja reakcijske zmesi, vendar nismo dobili želenega produkta.



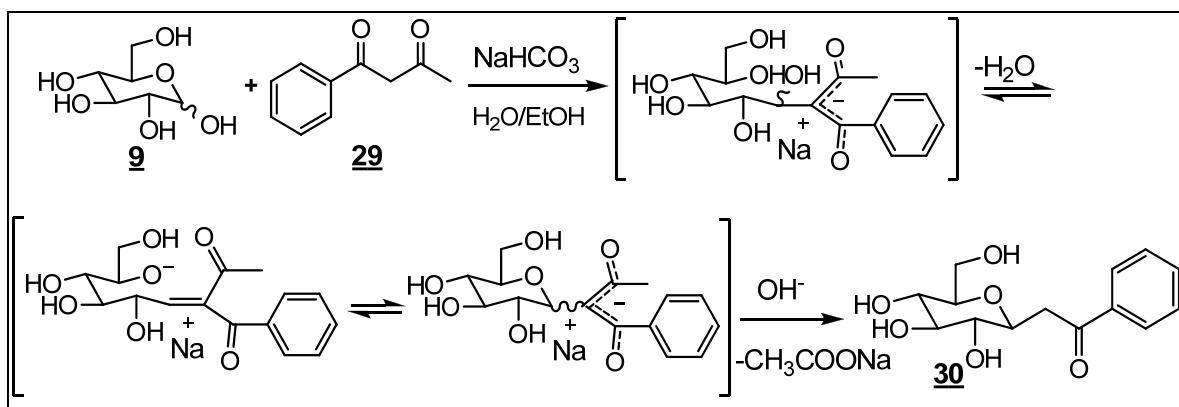
Slika 18: Mehanizem pripenjanja barbiturne kisline.

Sintezo končne spojine **5** smo pričeli z uvajanjem benzilne zaščite na anomerno hidroksilno skupino (Reakcijska shema 7) (17). Reakcijo smo poskusno izvedli tudi v mikrovalovnem reaktorju, vendar je bila količina spojine **26** zanemarljiva. Zaščiteno spojino smo oksidirali z natrijevim perjodatom, nato smo izvajali dvojno reduktivno aminiranje. Mehanizem reakcije prikazuje Slika 19. Na koncu smo s katalitskim hidrogeniranjem odstranili benzilno zaščito z estra in dobili spojino **5** (23).



Slika 19: Malapradejeva reakcija in dvojno reduktivno aminiranje.

Kot zadnjo reakcijo smo izvajali sintezo D-glikozida **30** z uporabo benzoilacetona **29** (27). Reakcija je potekala podobno kot z barbiturno kislino. Z bazo smo odstranili proton iz metilenske skupine, ki reagira kot nukleofil. Mehanizem reakcije prikazuje Slika 20. Nato smo izvajali Malapradejevo reakcijo in dvojno reduktivno aminiranje. Na koncu smo s katalitskim hidrogeniranjem odstranili benzilno zaščito, da smo dobili spojino **6**.



Slika 20: Mehanizem sinteze spojine **30**.

## **9 ZAKLJUČEK**

V okviru diplomske naloge smo na podlagi različnih sinteznih pristopov poskušali sintetizirati spojine z morfolinskim obročem, ki bi se lahko izkazale kot inhibitorji encima MurD. Uspešno smo sintetizirali končni spojini **5** in **6**. Sinteza ostalih končnih spojin ni bila uspešna, saj nismo mogli odstraniti benzilnih zaščit. Pripravili smo C-glikozide z uporabo trifenilfosfonijevega ilida **19** in s pripajanjem barbiturne kisline **23** ter benzoilacetona **29** selektivno na mesto anomerne hidroksilne skupine na glukozo.

## 10 LITERATURA

1. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA: Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 32 (2008): 149-167
2. Green DW: The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert. Opin. Ther: Targets* (2002) 6(1): 1-19
3. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 32 (2008): 168-207
4. El Zoeiby A, Sanschagrin F, Levesque GC: Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Molecular Microbiology* 2003, 47(1): 1–12.
5. Williams DA, Lemke TL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 819-864
6. von Nussbaum F, Brands M, Hinzen B, Weigand S, Häbich D: Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry - Exodus or Revival? *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45: 5072-5129
7. Silver LL: Novel inhibitors of bacterial cell wall synthesis. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6: 431-438
8. Fernandes P: Antibacterial discovery and development – the failure of success? *Nature Biotechnology*, December 2006, Volume 24, Number 12: 1497-1503
9. Walsh FM, Amyes SGB: Microbiology and drug resistance mechanism of fully resistant pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 2004, 7: 439-444
10. Livermore DM: Minimising antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 450-459
11. Katz AH, Caufield CE: Structure – Based Approaches to Cell Wall Biosynthesis Inhibitors. *Current Pharmaceutical Design*, 2003, Vol. 9, No. 11: 857-866
12. Bertrand JA, Auger G, Martin L, Fanchon E, Blanot D, Le Beller D, Van Heijenoort J, Dideberg O: Determination of the MurD Mechanism Through Crystallographic Analysis of Enzyme Complexes. *J Mol Biol*, 1999, 289: 579-590
13. Lipinski CA: Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 2000, 44: 235-49
14. Tanner ME, Vagany S, van Heijenoort J, Blanot D: Phosphinate Inhibitors of the D-Glutamic Acid-Adding Enzyme of Peptidoglycan Biosynthesis. *J. Org. Chem.* 1996, 61: 1756-1760

15. Gegnas DL, Waddell ST, Chabin RM, Reddy S, Wong KK: Inhibitors of bacterial cell wall Biosynthesis enzyme MurD. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, 8: 1643-1648
16. Bodanszky M: Principles of Peptide Synthesis, 2nd Edition. Springer-Verlag, 1993
17. Anderluh M: An imporoved synthesis of morpholino-glycoamino acids. *Tetrahedron letters*, 2006, 47: 9203-9206
18. Demange R, Awad L, Vogel P: Synthesis of C-linked analogues of  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1→3)-D-galactopyranosides and of  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1→3)-D-galactal. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, 15: 3573-3585
19. Listkowski A, Ing P, Cheaib R, Chambert S, Douthean A, Quenean Y: Carboxymethylglycoside Lactones (CMGLs): structural variations on the carbohydrate moiety. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2007, 18: 2201-2210
20. Lindhorst TK: Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry, 3rd Ed., WILEY-WCH Verlag 2007: 57,58
21. Pfeffer PE, Rothman ES, Moore GG: Stereochemical Control in the Acylation of 2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-D-glucopyranose. A route to 1-O-Acyl- $\alpha$ - and- $\beta$ -D-glucopyranoses. *J. Org. Chem.* 1976, 41: 16, 17
22. Shingu Y, Nishida Y, Dohi H, Matsuda K, Kobayashi K: Convenient access to halide Ion-catalysed  $\alpha$ -glycosylation free from noxious fumes at the donor synthesis. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2002, Vol.21, No. 6: 605-611
23. Greene TW, Wuts PGM: Greene's protective groups in organic synthesis, 4th ed. A John Wiley & Sons, Inc, 2007.
24. Allevi P, Anastasia M, Ciuffreda P, Fiechi A, Scala A: The First Direct Method for C-Glucopyranosyl Derivatization of 2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-D-glucopyranose. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1987:1245-1246
25. Wulff G, Clarkson G: On the synthesis of C-glycosyl compounds containing double bonds without the use of protection groups. *Carbohydrate Research*, 1994, 257: 81-95
26. Borch RF, Bernstein MD, Dupont Durst H: The Cyanohydridoborate Anion as a Selective Reducing Agent. *Journal of the American Chemical Society*, 1971, June: 2897-2904
27. Hersant Y, Abou-Jneid R, Canac Y, Lubineau A, Philippe M, Semeria D, Radisson X, Scherrmann MC: One-step synthesis of  $\beta$ -C-glycolipid derivatives from unprotected sugars. *Carbohydrate Research*, 2004, 339: 741-745

28. Lavezza A, Boulle C, Gueguinat A, Pichaud P, Trouille S, Rinard L, Dalko-Csiba M: Synthesis of Pro-Xylane<sup>TM</sup>: A new biologically active C-glycoside in aqueous media. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 19, Issue 3, 2009: 845-849