

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JEANNINE KOBE

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



JEANNINE KOBE

SINTEZA ALFA-D-MANOZILIRANIH  
GLIKOKONJUGATOV KOT ANTAGONISTOV  
RECEPTORJA FIMH

SYNTHESIS OF ALPHA-D-MANOSILATED  
GLICOCONYUGATES AS FIMH ANTAGONISTS

Ljubljana, 2016

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

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Marku Anderluhu, za nesebično pomoč, kadarkoli, kjerkoli. Ste razlog, da sem vzljubila farmacevtsko kemijo in se v laboratoriju počutila sproščeno in domače. Hvala tudi Marku Jukiču, Damjanu in Damjani, za vse še prehitro posnete NMR spektre, pripravljene raztopine in laboratorijski čvek. Hvala Tanji, s katero sva se skupaj prebijali skozi prve laboratorijske dni in je bila vse do zdaj moja boljša laboratorijska polovica. Hvala Evi, za pomoč pri slogovnem urejanju naloge in lektoriranju. Pa Roku, za vizualizacijo, brez njega bi naloga izgledala bolj kot dokument iz beležnice. Nazadnje, hvala mami, tatu ter vsem prijateljem, ki ste mojo glavo držali nad gladino farmacevtskih voda, ko sem se skoraj že utopila. A kljub vsemu, sem danes kjer sem, in ni dvoma v to, da mi brez vas ne bi uspelo.

### **Izjava**

Izjavljam, da se diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm.

Jeannine Kobe

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanko Srčič

Član diplomske komisije: asist. dr. Matjaž Ravnkar, mag. farm.

# Vsebina

Kazalo slik .....	I
I. Povzetek .....	III
II. Abstract.....	IV
III. Okrajšave .....	V
1 Uvod .....	1
1.1 Uropatogena E. coli in zdravljenje infekcij urinarnega trakta .....	1
1.2 Antiadhezivna terapija in potencialna uporaba antagonistov adhezije .....	3
1.2.1 Bakterijska adhezija.....	4
1.3 Lektini .....	5
1.3.1 FimH kot receptor lektinskega tipa .....	7
1.4 Glikomimetiki in FimH .....	8
1.5 Antagonisti za manozo specifičnega receptorja FimH .....	10
2 Namen dela .....	12
3 Materiali in metode.....	16
4 Eksperimentalno delo .....	20
4.1 Sinteza monosaharidnega jedra.....	20
4.1.1 Zaščita manoznih OH skupin - sinteza 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-D-manopiranoze (1).....	20
4.1.2 Tvorba azida na anomernem ogljiku zaščitene manoze - sinteza (2R,3R,4S,5S,6S)-2-(acetoksimetil)-6-azidotetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil triacetata (2)	21
4.2 Sinteza aglikona.....	22
4.2.1 Sinteza spojine s 4 C distančnikom .....	22
4.2.1.1 Williamsonova sinteza etra - sinteza etil 5-(4-jodofenoksi) pentanoata (3)	

4.2.1.2	Sonogashira sklopitev - sinteza etil 5-(4-((trimetilsilil)etnil)fenoksi) pentanoata(4) .....	24
4.2.1.3	Odščita sililne zaščitne skupine - sinteza etil 5-(4-etinilfenoksi) pentanoata (5) .....	25
4.2.1.4	Huisgenova cikloadicija - sinteza (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> )-2-acetoksimetil-6-(4-(4-((5-etoksi-5-oksopentil)oksi)fenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il) tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-3,4,5-triil triacetata (6).....	27
4.2.1.5	Zemplénova odščita - sinteza etil 5-(4-(1-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi) pentanoata (7).....	29
4.2.1.6	Hidroliza etilnega estra - sinteza 5-(4-(1-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi) pentanojske kisline (8) .....	31
4.2.2	Sinteza spojine s 5 C distančnikom .....	33
4.2.2.1	Willamsonova sinteza etra - sinteza etil 5-(4-jodofenoksi) heksanoata (9).....	33
4.2.2.2	Sonogashira sklopitev - sinteza etil 6-(4-((trimetilsilil)etnil)fenoksi) heksanoata (10).....	35
4.2.2.3	Odščita sililne zaščitne skupine - sinteza etinil 6-(4-etinilfenoksi) heksanoata (11).....	36
4.2.2.4	Huisgenova cikloadicija - sinteza (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> )-2-(acetoksimetil)-6-(4-(4-((6-etoksi-6-oksoheksil)oksi)fenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-3,4,5-triil triacetata (12).....	38
4.2.2.5	Zemplénova odščita - sinteza etil 6-(4-(1-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi) heksanoata (13).....	40
4.2.2.6	Hidroliza etilnega estra - sinteza natrijevega 6-(4-(1-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi) heksanoata (14) .....	42
4.2.3	Sinteza spojine s 6 C distančnikom .....	44

4.2.3.1	Williamsonova sinteza etra - sinteza etil 6-(4-jodofenoksi) heptanoata (15)	44
4.2.3.2	Sonogashira sklopitev - sinteza etil 7-(4-((trimetilsilil)etinil)fenoksi heptanoata (16) .....	45
4.2.3.3	Odščita sililne zaščitne skupine - sinteza etil 7-(4-etinilfenoksi)heptanoata (17)	46
4.2.3.4	Huisgenova cikloadicija - sinteza (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> )-2-(acetoksimetil)-6-(4-(4-((7-etoksi-7-oksoheptil)oksi)fenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-3,4,5-triil triacetata (18).....	48
4.2.3.5	Zemplénova odščita - sinteza (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> )-2-(acetoksimetil)-6-(4-(4-((7-etoksi-7-oksoheptil)oksi)fenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-3,4,5-triil triacetata (19) .....	50
4.2.3.6	Hidroliza etilnega estra - sinteza etil 7-(4-(1-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)heptanoata (20).....	52
4.2.4	Sinteza spojine s 7 C distančnikom .....	54
4.2.4.1	Williamsonova sinteza etra - sinteza etil 8-(4-jodofenil)oktanoata (21) ...	54
4.2.4.2	Sonogashira sklopitev - sinteza etil 8-(4-((trimetilsilil)etinil)fenoksi oktanoata (22) .....	56
4.2.4.3	Odščita sililne zaščitne skupine – sinteza etil 8-(4-etinilfenoksi)oktanoata (23)	57
4.2.4.4	Huisgenova cikloadicija - sinteza (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> )-2-(acetoksimetil)-6-(4-(4-((8-etoksi-8-oksooktil)oksi)fenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-3,4,5-triil triacetata (24).....	59
4.2.4.5	Zemplénova odščita - sinteza etil 8-(4-(1-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)oktanoata (25) .....	61
4.2.4.6	Hidroliza etilnega estra - sinteza natrijevega 8-(4-(1-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)oktanoata (26) .....	63

4.3	Molekulsko sidranje.....	65
5	Rezultati in razprava.....	66
5.1	Eksperimentalno delo .....	66
5.1.1	Sinteza monosaharidnega jedra .....	66
5.1.1.1	Zaščita manoznih OH skupin (sinteza spojine 1) .....	66
5.1.1.2	Tvorba azida na anomernem ogljiku zaščitene manoze (sinteza spojine 2) 67	
5.1.2	Sinteza aglikona.....	68
5.1.2.1	Williamsonova sinteza etrov (sinteza spojin 3, 9, 15 in 21).....	68
5.1.2.2	Sonogashira sklopitev in odščita Si(Me) <sub>3</sub> skupine (sinteza spojin 5, 11, 17 in 23) 69	
5.1.2.3	Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija oz. CuAAC reakcija (sinteza spojin 6, 12, 18 in 24).....	72
5.1.2.4	Zemplénova odščita zaščitnih acetilnih skupin (sinteza spojin 7, 13, 19 in 25) 74	
5.1.2.5	Hidroliza etilnega estra (sinteza spojin 8, 14, 20 in 26).....	75
5.2	Sidranje spojin v vezavno mesto FimH .....	76
6	Zaključek .....	77
7	Literatura .....	79
8	Priloge.....	82
8.1	Priloga 1: Rezultati sidranja v CRD vezavnega mesta FimH.....	82

## Kazalo slik

Slika 1: Okužba z UPEC, povzeto po (4). .....	2
Slika 2: Adhezija bakterije na gostiteljsko celico, prirejeno po (6).....	5
Slika 3: Fimbrija s FimH receptorjem, prirejeno po (12).....	8
Slika 4: Pogled v manozni vezavni žep. Vodikove vezi med OH skupinami manoze in lektinsko domeno FimH so prikazane s prekinjenimi črtami (povzeto po 11).....	9
Slika 5: Monosaharidno jedro z na anomernem C-atomu pripetim aglikonom. ....	10
Slika 6: Nekatero že narejene spojine (povzeto po 14-19).....	11
Slika 7: Spojini, prirejeni po (13). ....	11
Slika 8: Struktura sintetiziranih potencialnih FimH antagonistov.....	12
Slika 9: Na sliki vidimo aromatski obroč, ki tvori interakcije s Tyr 48 in Tyr 137 ( tvorita t.i. »Tyrosine gate«). Sem naj bi segal tudi triazolofenilni fragment naših sintetiziranih učinkovin. Povzeto po (20).....	13
Slika 10: Spojina iz triazolofenilne serije, ki je izkazovala najvišjo afiniteto do FimH vezavnega mesta. Povzeto po (13). ....	13
Slika 11: Sintezni načrt za delo. Reagenti in reakcijski pogoji so navedeni na naslednji strani. ....	14
Slika 12: Shematski prikaz molekulskega sidranja. ....	18
Slika 13: Acetilacija alkoholov z acetanhidridom in piridinom.....	66
Slika 14: Mehanizem tvorbe azida na anomernem ogljiku manoze.....	67
Slika 15: Mehanizem Williamsonove sinteze etrov. ....	68
Slika 16: Tvorili smo distančnike dolge štiri, pet, šest in sedem C atomov.....	68
Slika 17: Sonogashira reakcija. ....	69
Slika 18: Mehanizem Sonogashira reakcije. Povzeto po (28).....	70
Slika 19: Spojine, ki smo jih delali s Sonogashira reakcijo in sledeča odščita zaščitne sililne skupine.....	71
Slika 20: Potek Huisgenove 1,3- dipolarne cikloadicije. ....	72
Slika 21: Mehanizem CuAAC.....	73
Slika 22: Mehanizem Zemplénove odščite.....	74
Slika 23: Mehanizem z bazo katalizirane hidrolize estra. ....	75
Slika 24: Sidranje spojine <b>14</b> v vezavno mesto FimH. Z zeleno barvo je označena spojina <b>14</b> , z modro pa referenčna spojina 3MCY.....	76



Slika 25: Sidranje spojine <b>7</b> v vezavno mesto FimH. Z zeleno barvo je označena spojina <b>7</b> , z modro pa referenčna spojina 3MCY.....	82
Slika 26: Sidranje spojine <b>8</b> v vezavno mesto FimH. Z zeleno barvo je označena spojina <b>8</b> , z modro pa referenčna spojina 3MCY.....	82
Slika 27: Sidranje spojine <b>13</b> v vezavno mesto FimH. Z zeleno barvo je označena spojina <b>13</b> , z modro pa referenčna spojina 3MCY.....	83
Slika 28: Sidranje spojine <b>19</b> v vezavno mesto FimH. Z zeleno barvo je označena spojina <b>19</b> , z modro pa referenčna spojina 3MCY.....	83
Slika 29: Sidranje spojine <b>20</b> v vezavno mesto FimH. Z zeleno barvo je označena spojina <b>20</b> , z modro pa referenčna spojina 3MCY.....	84
Slika 30: Sidranje spojine <b>25</b> v vezavno mesto FimH. Z zeleno barvo je označena spojina <b>25</b> , z modro pa referenčna spojina 3MCY.....	84
Slika 31: Sidranje spojine <b>26</b> v vezavno mesto FimH. Z zeleno barvo je označena spojina <b>26</b> , z modro pa referenčna spojina 3MCY.....	85

## I. Povzetek

FimH (fimbrijski adhezin H) je ekstracelularni lektinski receptor, ki se nahaja na površini uropatogenih bakterij (UPEC).

Bakterijske infekcije urinarnega trakta lahko preprečimo tako, da onemogočimo stik med bakterijo in gostiteljskimi tkivi. Bakterije se na gostiteljsko celico pripnejo s pomočjo FimH receptorja, ki se nahaja na konici njihovih pilov. V laboratoriju smo sintetizirali potencialne monovalentne glikomimetične antagoniste FimH, ki hkrati zasedejo le eno CRD (*«carbohydrate recognition domain»* ali domeno za vezavo ogljikovih hidratov) FimH.

V sklopu magistrske naloge smo potencialne FimH antagoniste oblikovali na osnovi monosaharidnega jedra, v našem primeru manoze, kateremu smo pripeli različne aglikone. Preko Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije ali t.i. »click« reakcije smo med manozo in aglikonom tvorili N-glikozidno vez, ki je v fizioloških pogojih stabilnejša od O-glikozidne vezi. Na manozo pripetemu triazolu je sledil fenilni obroč, na katerega smo nizali različno dolge distančnike (od štirih do sedmih metilenskih skupin), ki so se končali z bodisi etilnim estrom ali pa so bili v obliki karboksilata. Različno dolge distančnike smo tvorili z namenom, da ugotovimo kolikšna dolžina je potrebna, da spojine tvorijo optimalno interakcijo z aminokislinskim ostankom Arg 98.

Cilj našega dela je bil vzpostavitev kombinacije optimalnih ionskih in vodikovih interakcij z gvanidinsko skupino Arg 98. Po pregledu rezultatov virtualnega sidranja predvidevamo, da nam je to najbolje uspelo s spojino **14**, ki ima distančnik dolg pet metilenskih skupin in je v obliki prostega karboksilata.

**Ključne besede:** FimH, uropatogena *E.coli*, antiadhezivna terapija, glikomimetik, antagonisti FimH, D-manoza, infekcija, urinarni trakt.

## II. Abstract

FimH (fibril adhesin H) is one of many bacterial extracellular lectin receptors which is primarily expressed on the surface of uropathogenic *E. coli* (UPEC).

Urinary tract infections can be prevented by inhibiting bacterial adhesion to host surfaces, i.e. by inhibiting FimH receptors on the tip of *E. coli* pili. We have synthesised potential monovalent glycomimetic FimH antagonists, which bind to one carbohydrate recognition domain of FimH receptor.

Within this thesis we synthesized potential FimH antagonists by the classic scheme of glycomimetic design. We used mannose as monosaccharide core onto which we pinned different aglycons. Using Huisgen reaction, also known as »click« reaction we formed N-glycosidic bond, which is more stable in physiological conditions than O-glycosidic bond. Mannose core was linked to the triazolophenyl moiety. Different spacers (from four to seven methylene groups long) were used to detach carboxylic moiety (or an ester group) from the phenyl group. With this group we were targeting hydrogen and/or ionic interactions with Arg 98 amino acid residues in the FimH binding site. A careful analysis of docking results demonstrated that compound **14**, with five methylenes and a carboxylate moiety should be the most potent compound, which will be evaluated by affinity measurement on isolated FimH receptors.

**Key words:** FimH, uropathogenic *E. coli*, anti adhesion therapy, glycomimetic, FimH antagonists, D-mannose, urinary tract, infection.

### III. Okrajšave

<b>Å</b>	angstrom
<b>AK</b>	aminokislina
<b>Arg</b>	arginin
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	devteriran kloroform
<b>CRD</b>	<i>carbohydrate recognition domain</i> – domena za vezavo ogljikovih hidratov
<b>CuCAA</b>	<i>copper(I)catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i> – z bakrom katalizirana azid-alkin cikloadicija
<b>d</b>	dublet
<b>dd</b>	dublet dubleta
<b>ddd</b>	dublet dubleta dubleta
<b>DIPEA</b>	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
<b>DKM</b>	diklorometan
<b>DMF</b>	dimetilformamid
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	devteriran dimetilsulfoksid
<b>D<sub>2</sub>O</b>	devterirana voda
<b>ekv</b>	ekvimolarna količina (ekvivalent)
<b>ESI</b>	<i>electrospray ionization</i> – elektrorazpršilna ionizacija
<b>FimH</b>	<i>fimbrial adhesin H</i> – fimbrijski adhezini H
<b>GC</b>	gostiteljska celica
<b>GIT</b>	gastrointestinalni trakt
<b>Hex</b>	n-heksan
<b>HRMS</b>	<i>high resolution mass spectrometry</i> – masna spektrometrija visoke ločljivosti
<b>IBC</b>	<i>intracellular bacterial communities</i> – znotrajcelične bakterijske kolonije
<b>IR</b>	infrardeča spektroskopija
<b><i>J</i></b>	sklopitvena konstanta
<b>KKR</b>	kolonska kromatografija
<b>m</b>	multiplet
<b>Man</b>	D-manoza
<b>MeOD</b>	devteriran metanol

<b>MF</b>	mobilna faza
<b>Mr</b>	relativna molekulska masa
<b>MS</b>	masna spektrometrija
<b>NaOD</b>	devteriran natrijev hidroksid
<b>n.r.</b>	nasičena raztopina
<b>NMR</b>	<i>nuclear magnetic resonance</i> – jedrska magnetna resonanca
<b>Nu</b>	nukleofil
<b>OF</b>	organska faza
<b>Phe</b>	fenilalanin
<b>q</b>	kvartet
<b>Rf</b>	retencijski faktor
<b>RZ</b>	reakcijska zmes
<b>s</b>	singlet
<b>T</b>	temperatura
<b>Tv</b>	temperatura vrelišča
<b>t</b>	triplet
<b>TBABr</b>	tetrabutylamonijev bromid
<b>TLC</b>	<i>thin layer chromatography</i> – tankoplastna kromatografija
<b>Trp</b>	triptofan
<b>Tyr</b>	tirozin
<b>UPEC</b>	uropatogena <i>Escherichia coli</i>
<b>UTI</b>	<i>urinary tract infection</i> – infekcija urinarnega trakta
<b>VF</b>	vodna faza
<b>η</b>	izkoristek reakcije
<b>δ</b>	kemijski premik
<b>v</b>	valovno število

# 1 Uvod

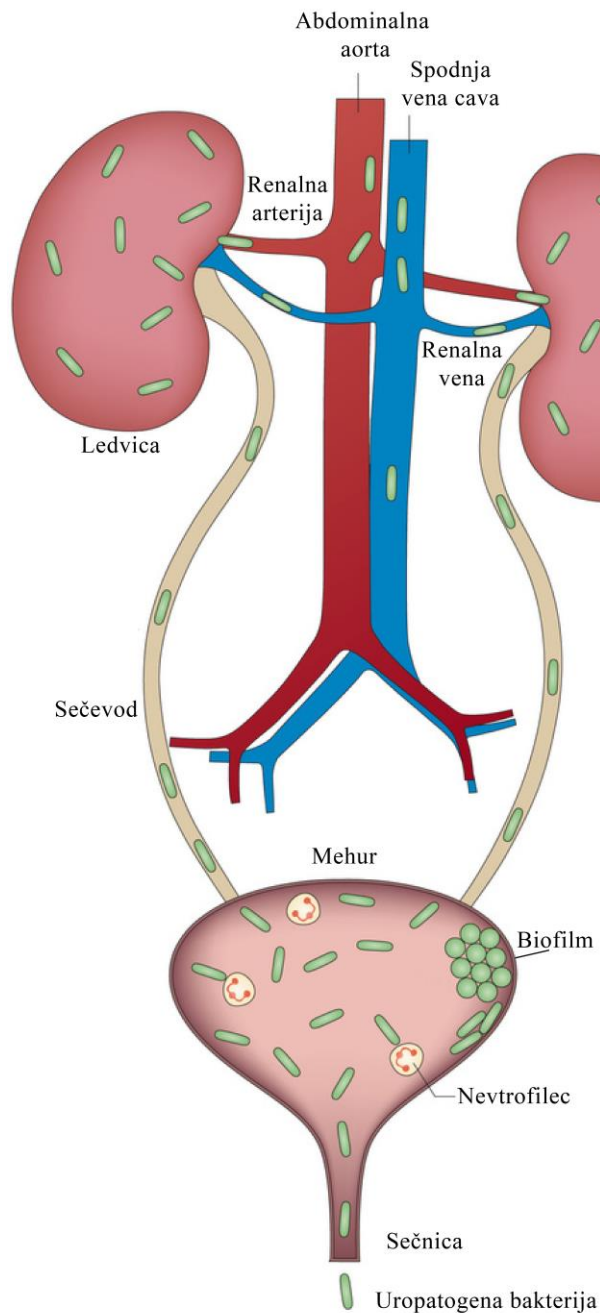
Uropatogena *Escherichia coli* (UPEC) je glavni povzročitelj okužb (80%) urinarnega trakta (UTI), kar je ocenjeno na 150 milijonov primerov po svetu letno. V glavnini so prizadete ženske. Kar 50% naj bi jih v življenju doletela okužba urinarnega trakta. Pri 20-30% predstavnic pride do remisije v roku pol leta od prve okužbe. Ponavljanje infekcij urinarnega trakta (UTI) občutno prispeva k razširjenosti le-teh in njihovo zdravljenje predstavlja vse večji javnozdravstveni problem (1).

Zaradi zaskrbljujoče razsežnosti rezistence bakterij na antibiotično terapijo je smiselno iskanje alternativnih terapij. Ena tovrstnih alternativ je antiadhezivna terapija, pri kateri patogena ne ubijemo in tako ne spodbujamo nastanka rezistentnih bakterijskih sevov (2).

## 1.1 Uropatogena *E. coli* in zdravljenje infekcij urinarnega trakta

Široko sprejeto mnenje je, da je cistitis bolezen, ki se pozdravi spontano in brez specifičnega zdravljenja, vendar pa so s placebo študijami dokazali, da slednji lahko traja tudi do par tednov pri več kot polovici pacientov. Pri mnogih bolnikih pride do kroničnega pojavljanja UTI. Ti pacienti potrebujejo terapijo, s katero bomo uspešno prekinili ponavljajoči se cikel okužb.

Za glavnino UTI je še vedno učinkovito kratkotrajno zdravljenje s konvencionalnimi antibiotiki, a prihaja do vse večjega razvoja rezistence med UPEC sevi. Študije kažejo, da je že 20-50% sevov UPEC rezistentnih na najpogosteje predpisane antibiotike in kemoterapevtike, kot so kombinacija trimetoprima s sulfametoksazolom, fluorokinoloni in betalaktami. Rezistenca na že obstoječe antibiotike in kemoterapevtike se povečuje, razvoj novih pa je prepočasen in nezadosten, zato lahko pričakujemo vse bolj težavno zdravljenje UTI v prihodnosti. Tako so alternativni načini zdravljenja trenutno potrebna osvežitev na področju zdravljenja bakterijskih okužb (1, 3).



11. Bakteriemija

10. Poškodba gostiteljevih ledvičnih tkiv z bakterijskimi toksini

9. Kolonizacija ledvic

8. Vzpon bakterij do ledvic

7. Poškodbe epitelija, povzročene z bakterijskimi toksini in proteazami

6. Formacija biofilma

5. Razmnoževanje bakterij in uničenje imunskega sistema

4. Infiltracija nevtrofilcev

3. Kolonizacija in vdor patogenov v mehur, ki sta medirana z adhezini

2. Kolonizacija sečnice in migracija patogenov v mehur

1. Kontaminacija periuretalnega območja z uropatogeni iz prebavil

Slika 1: Okužba z UPEC, povzeto po (4).

UPEC so zmožne kolonizacije na celotnem območju sečil, od sečnice in sečevodov, do ledvic in mehurja. Povzročajo lahko akutne, kronične, trdovratne in ponavljajoče se okužbe (1).

Nekomplicirane UTI sproži prehod bakterij iz črevesja v območje ob sečevodih. Največkrat gre za prenos bakterij iz rektuma. Temu sledi ekspresija pilijev in adhezinov na površini bakterijske celice, ki privede do kolonizacije in vdora bakterij v površinske dežnikaste celice uroepitelija. Gostiteljev imunski sistem z infiltracijo nevtrofilcev prične odstranjevati ekstracelularne bakterije, a se nekaterim kljub temu uspe izmuzniti. Slednje bodisi vdrejo v gostiteljeve površinske celice in se tam skrijejo ali pa so podvržene morfološkim spremembam, s filamentiranimi bakterijami pa se nevtrofilci težje spopadajo. Bakterije, ki uidejo imunskemu sistemu se hitro razmnožujejo in tvorijo biofilm. S proizvodnjo različnih toksinov in proteaz, ki inducirajo poškodbe gostiteljskih celic si zagotovijo esencialna hranila in zadostno količino železa za uspešen vzpon do ledvic. Kolonizaciji ledvic sledi proizvodnja toksinov, ki poškodujejo ledvična tkiva. Če okužbe ne zdravimo in patogen prestopi tubularno epitelno bariero, lahko v ledvicah privede do bakteriemije (slika 1). Komplicirane UTI imajo podoben potek kot nekomplicirane UTI, s tem da so pogosto povezane s kateterizacijo (3, 4, 5).

## **1.2 Antiadhezivna terapija in potencialna uporaba antagonistov**

### **adhezije**

Za uspešno kolonizacijo gostitelja in povzročitev okužbe so mnogi patogeni organizmi razvili sposobnost adhezije na gostiteljske celice in tkiva. Adhezija je potrebna, da naravni mehanizmi gostitelja ne odstranijo patogena. Tovrstni mehanizmi so tok urina v sečilih in tok zraka v pljučih, patogenu pa hkrati zagotavlja boljši dostop do hranil, izločanje toksinov v gostiteljeva tkiva in nenazadnje tudi penetracijo bakterije v tkivo.

Najpogostejši način adhezije je interakcija med površinskimi lektini, proteini, prisotnimi na bakteriji, in komplementarnimi ogljikovimi hidrati, ki so prisotni na površini gostiteljske celice. Lektini služijo kot virulentni faktor, lahko jih blokiramo ali inhibiramo. Inhibicija z ogljikovimi hidrati ali njihovimi analogi pa je primeren način za zdravljenje ali preventivo infekcij, povzročenih z mikroorganizmi. Iz slednjega lahko sklepamo, da je poseganje v adhezijo učinkovit način preprečevanja bakterijskih okužb. Tak način zdravljenja imenujemo antiadhezivna terapija (2, 8, 9, 10).



Razlogov za obsežno raziskovanje na področju antiadhezije je več:

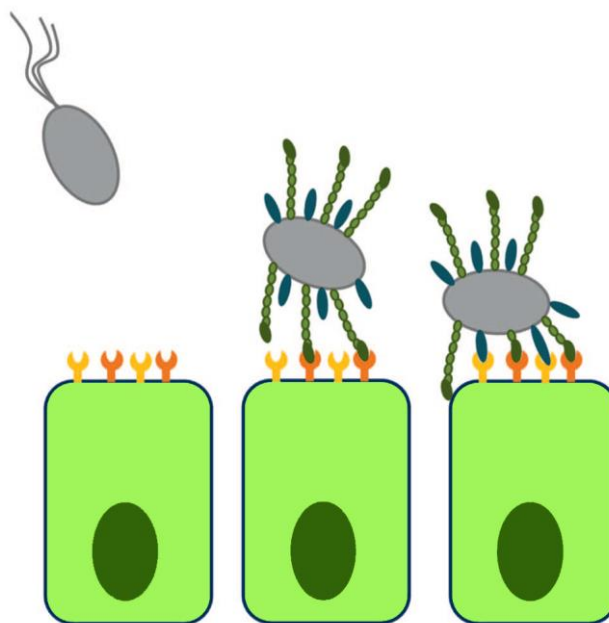
- Antiadhezivne učinkovine ne povečujejo (znatno) verjetnosti nastanka bakterijske rezistence. Privedejo le do inhibicije vezave bakterije na gostiteljsko celico, tako bakterije preživijo, a jim odvzamemo sposobnost vdiranja in okužbe gostitelja.
- Učinkovine, ki delujejo antiadhezivno niso baktericidne. V primeru baktericidnih učinkovin bakterije ob propadu sprostijo toksine in lipopolisahade, ki sprožijo prekomeren odziv imunskega sistema. Tako pa bolnik ostane izpostavljen nefunkcionalnim bakterijam, kar gostitelju omogoči hitrejši razvoj protiteles proti ponovni infekciji. Pospeši se imunski očistek bakterij, ki niso bile odstranjene mehansko.
- Z aplikacijo antiadhezivne učinkovine v organizmu ne pride do porušanja mikroflore v GIT, kot se to zgodi pri uporabi antibiotikov.
- Znanstveniki domnevajo, da se bakterije na antiadhezivno terapijo lahko prilagodijo tako, da pride do mutacije adhezina. Antiadhezivne učinkovine tako nimajo več vpliva nanj, saj se je spremenil, a s tem bakterije vplivajo tudi na svojo virulentnost, saj se ne morejo pripeti na celično steno gostiteljske celice zaradi nefunkcionalnosti adhezina (6, 8).

Veliko spojin, ki delujejo na antiadheziven način in vsebujejo sladkorne monosaharidne enote, najdemo v prehrani. Kot primer lahko vzamemo sok brusnice (*Vaccinium macrocarpon*), ki vsebuje polifenole in protoantocianine (6, 7). Tudi mleko doječih mater vsebuje ogromno kompleksnih oligosaharidov z L-fukoznimi ostanki, ki imajo imunostimulatorni učinek (8, 9).

### **1.2.1 Bakterijska adhezija**

Ko se bakterijska in gostiteljska celica približata, pride do primarne adhezije. Najprej se vzpostavijo šibke, nespecifične interakcije na površini celic. Te interakcije so odvisne od fizikalno-kemijskih lastnosti (naboja in hidrofobnosti) površine bakterijske in gostiteljske celice. Šibkim in nespecifičnim interakcijam sledi začetna adhezija, pri kateri pride do vzpostavitve specifičnih interakcij, ki se nato še okrepijo s specifičnimi visoko afinitetnimi

interakcijami (6). Te tvorijo lektini prisotni na površini patogena, ki komplementarno vežejo ogljikove hidrate s površine gostiteljskih celic (10).



Slika 2: Adhezija bakterije na gostiteljsko celico, prirjeno po (6).

### 1.3 Lektini

Vse celice so prekrte s kompleksnimi ogljikovimi hidrati, ki jih imenujemo glikani. Glikani tvorijo plast, glikokaliks (sladkorni plašč), široko 10 do 100 nm, sestavljeno iz omrežja polisaharidov in kompleksnih ogljikovih hidratov (glikoproteini, proteoglikani, glikolipidi,...).

Beseda lektin je izpeljana iz latinščine (*«legere»*) in pomeni »izbrati«. To se navezuje na vlogo lektinov v naravi - prepoznavanje spojin. Lektini specifično in reverzibilno vežejo monosaharide, oligosaharide in delne strukture saharidov. Lahko jih definiramo kot proteine, ki niso imunskega izvora. So brez katalitične aktivnosti in imajo sposobnost reverzibilne vezave ogljikovih hidratov. V naravi so močno zastopani. V začetku 19. stoletja so jih raziskovalci odkrili v rastlinah, a kljub temu njihova funkcija še ni najbolj poznana. Domnevno sodelujejo v obrambnih mehanizmih proti parazitom in glivam. Pozneje so bili odkriti še v virusih in bakterijah, kjer v večini primerov sodelujejo v adheziji molekul in

posledični tvorbi biofilma in tako kolonizirajo gostitelja. Mnogi lektini v bakterijah so virulentni faktorji, ki v velikem obsegu pripomorejo k patogenosti v procesu okužbe.

Vsaka lektinska molekula je sestavljena iz vsaj dveh vezavnih mest za ogljikove hidrate – CRD (*carbohydrate recognition domain*). Zaradi več CRD vezavnih mest so lektini di- ali oligovalentni ter lahko privedejo do premreženja celic. Na tak način tvorijo celične precipitate, ki jih imenujemo aglutinati. Ena izmed glavnih lastnosti lektinov je aglutinacija eritrocitov (hemaglutinacija), ki se pogosto uporablja za detekcijo in karakterizacijo. Lektini so heterogena skupina oligomernih proteinov, ki se razlikujejo v velikosti, strukturi, organizaciji molekul in predvsem v CRD.

Lektine delimo na podlagi afinitete za različne monosaharide v 5 skupin:

- Za manozo specifični,
- za galaktozo in GalNAc specifični,
- za GlcNAc specifični,
- za L-fukozo specifični,
- ter za N-acetilneuramisko kislino specifični lektini.

Kljub temu, da so pogosto klasificirani glede na specifičnost vezave saharidov, pa ni nujno, da vežejo le omenjene. Le redki so tako zelo specifični, da vežejo samo eno vrsto monosaharidov. Razlikujejo npr. med galaktozo in glukozo, ali med GalNAc in GlcNAc, poznamo pa primere, ko je specifičnost za monosaharide izjemno nizka, npr. pri za manozo specifičnih lektinih, ki hkrati vežejo tudi L-fukozo. Največkrat lektini specifično vežejo bolj kompleksne oligosaharide, prisotne v glikokonjugatih. Delitev na zgoraj omenjenih 5 skupin je tako zgolj poenostavitev (3, 9, 11).

Lektine, prisotne v živalskem kraljestvu lahko delimo tudi na dve družini, glede na nahajališče v celici:

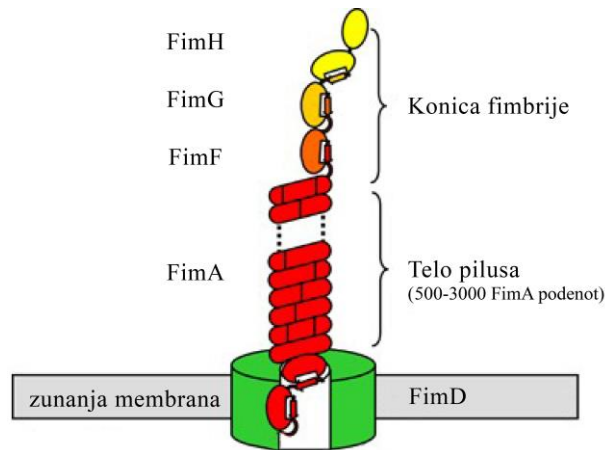
- **Intracelularni lektini** (kalheksin, lektini L- in P-tipa).  
So vpleteni v procesiranje glikoproteinov in kvaliteto kontrole.
- **Ekstracelularni lektini** (galektini, lektini C-, I- in R-tipa).  
Sodelujejo v prepoznavanju epitopov terminalnih ogljikovih hidratov patogenov in drugih celic. So glavna tarča različnih zdravilnih učinkovin (3).

### 1.3.1 FimH kot receptor lektinskega tipa

Velika večina bakterijskih lektinov je vezanih na površino celice. Običajno so v obliki podaljšanih submikronskih proteinskih podaljškov, sestavljenih iz večih podenot, ki jih imenujemo fimbrije oz. pili. Ekspresija slednjih je odvisna od pogojev v katerih bakterija živi. Najbolje so raziskane za manozo specifične fimbrije tipa 1 *E. coli*, za galabiozo specifične fimbrije P *E. Coli* (UPEC) in za N-acetilglukozamin specifične F17 fimbrije *E. coli*. Mutanti brez lektinskih receptorjev običajno v gostiteljski celici niso sposobni povzročiti okužbe (6, 7, 10).

Fimbrije tipa 1 izraža velika večina sevov bakterije *E. coli*. Najdemo jih v več kot 95% izolatov *E. coli* iz črevesja ali izven le tega, npr. v sečilih. V urinarnem traktu medirajo vezavo bakterij na uroplakin Ia in Ib, dva glavna glikoproteina urotelnih apikalnih celic. Sidranje *E. Coli* na urotelno površino s pomočjo fimbrij tipa 1 – uroplakin I interakcij (vezava manoziliranega uroplakina Ia in IIIa) igra pomembno vlogo v kolonizaciji celic v mehurju. Vezava pili tipa 1 na celice spodbudi kaskado signalov, ki aktivira Rho GTPaze. Tako pride do prerazporeditve aktinskih vlaken preko aktivacije Rac proteinov in ovitja bakterije. To privede do tvorbe IBC (*internal bacterial complex* – znotrajcelični kompleksi bakterij). Kasneje lahko skozi sečevoda proti toku urina bakterije prilezejo tudi do ledvic in tam vdirajo ter kolonizirajo gostiteljske celice (10).

V Gram-negativnih bakterijah je veliko adhezinov izraženih na bakterijski površini s pomočjo »*chaperone-usher-assisted*« *transporta. Tipična bakterija s fimbrijami tipa 1, izraža na svoji površini približno 200-500 enakomerno razporejenih le teh. Fimbrije so 1-2 μm dolga in 7 nm široka vlakna, podobna paličicam. Sestavljene so iz štirih gradbenih elementov, v glavnem iz ponavljajočih se FimA podenot. Več kot 1000 le teh je polimeriziranih v desno sučno heliksno strukturo. Dodatno ta struktura vsebuje še ostale komponente, FimF, FimG in FimH. Zadnja, FimH podenota je edina, ki premore CRD in je tako odgovorna za specifično vezavo sladkorjev na fimbrijo (slika 3) (2,10).*



Slika 3: Fimbrija s FimH receptorjem, prirejeno po (12).

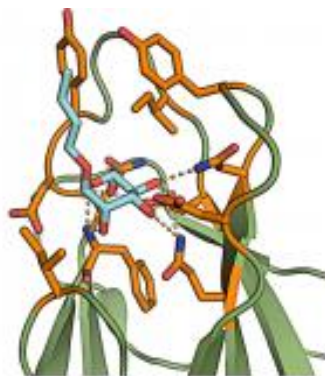
Prekurzor FimH je sestavljen iz 300 AK. Da dozori do svoje odrasle strukture (279 AK), mora pridi do odcepa signalnega peptida. Delimo ga na dve domeni:

- N-terminalno adhezivno lektinsko domeno (1-156 AK, ki ima na koncu vezavno mesto za manozo (CRD)), in
- C-terminalno pilijsko lektinsko domeno (160-279 AK, ki skrbi za sidranje adhezina in regulira preklap med dvema konformacijskima stanjema CRD).

Domeni sta medsebojno povezani s tetra peptidno zanko (2,10).

## 1.4 Glikomimetiki in FimH

Del zunanje domene fimbrijskega adhezina FimH je za manozo specifično vezavno mesto, ki veže glikozilirane uroplakine uroepitelija. Tako sodeluje pri vzpostavitvi bakterijske okužbe v urinarnem traktu gostitelja. S študijami strukture manoznega žepa so znanstveniki ugotovili, da je za specifično prepoznavanje manoze ključna tvorba mreže vodikovih vezi s hidroksilnimi skupinami na položajih 2-, 3-, 4- in 6-D-manoze (slika 4).

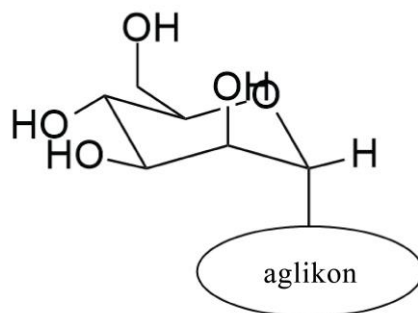


Slika 4: Pogled v manozni vezavni žep. Vodikove vezi med OH skupinami manoze in lektinsko domeno FimH so prikazane s prekinjenimi črtami (povzeto po 11).

Afiniteta manoze do FimH receptorja je izražena s  $K_d = 2.3 \mu\text{M}$ . Vendar pa lahko dosežemo do 100x višjo, če uporabimo glikane, ki terminalno izražajo  $\text{Man}\alpha\text{-(1,3)Man}\beta\text{(1,4)GlcNAc}$  trisaharide ali pa oligomanozide.

Kristalna struktura kompleksa FimH z ligandom heptil  $\alpha\text{-D}$ -manopiranozidom je razkrila, da alkilna veriga liganda sega proti t.i. “tirozinskim vratom”, ki jih tvorita dva tirozinska ostanka (Tyr 48 in Tyr 137). Med alkilno verigo in AK ostanki v tirozinskih vratih pride do hidrofobnih interakcij s FimH vezavnim mestom, kar privede do zaželjenih sprememb v entropiji vezave. “Tirozinska vrata” z dodatnimi hidrofobnimi interakcijami kompenzirajo izgubo entropije, do katere privede zmanjšanje konformacijske svobode alkilnih in arilnih ligandov. Te interakcije tvorijo aromatski  $\alpha\text{-D}$ -manopiranozidi s svojimi lipofilnimi skupinami in aromatskimi aminokislinami (Phe, Trp, Tyr) ter poskrbijo za še večjo selektivnost in višjo afiniteto vezave glikomimetikov v lektinski receptor (10, 11, 13).

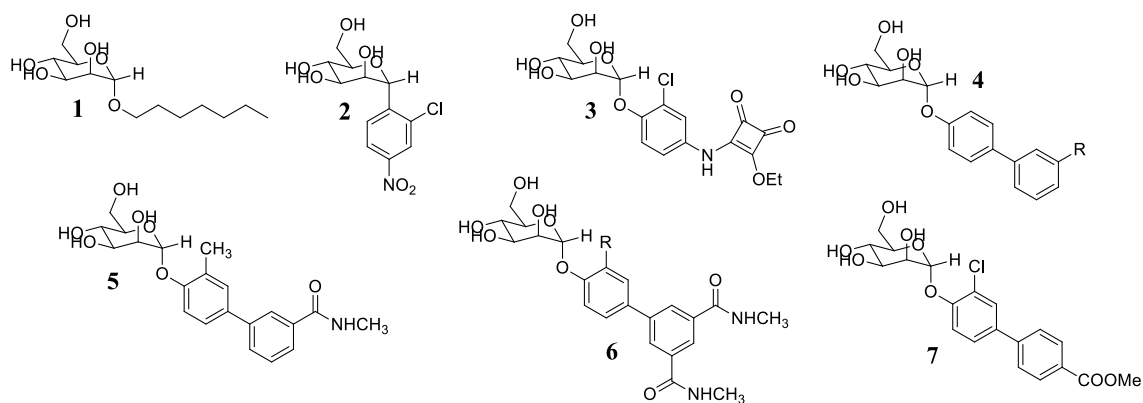
Vse spojine, tudi sintetizirane v sklopu našega magistrskega dela, so sledile istemu principu glikomimetičnega načrtovanja. Monosaharidno jedro se specifično in selektivno veže v lektinsko vezavno mesto (FimH), medtem ko aglikon, pripet na anomerni manozni C-atom povečuje afiniteto te vezave (slika 5).



Slika 5: Monosaharidno jedro z na anomernem C-atomu pripetim aglikonom.

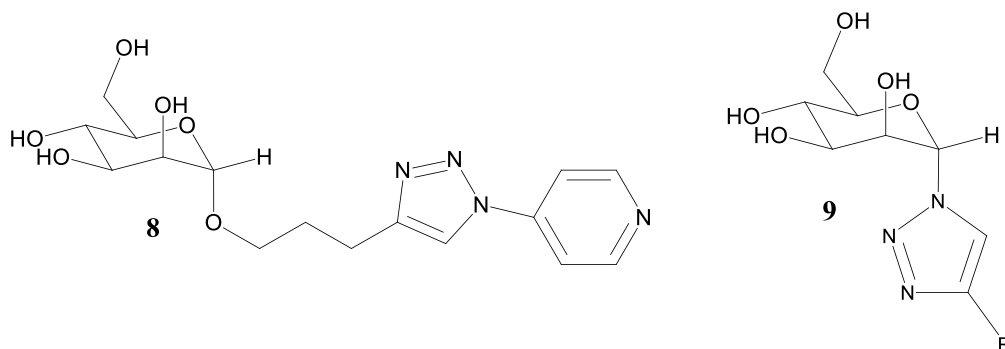
## 1.5 Antagonisti za manozo specifičnega receptorja FimH

Pred več kot tridesetimi leti so Sharon in njegova ekipa raziskovalcev opisali različne oligomanozide in aril  $\alpha$ -D-manozide, ki so preprečevali bakterijsko adhezijo preko lektina FimH. Vse opisane spojine so izkazale šibke interakcije s FimH v mili- oz. mikromolarnem koncentracijskem območju. Od takrat je minilo precej časa, znanstveniki pa so odkrili mnoge visoko afinitetne monovalentne FimH antagoniste, ki so kot monosaharidno jedro vsebovali manozo, pripete pa so imeli različne aglikone. Spojina **1** heptil  $\alpha$ -D-manozid (slika 6) ima alkilni aglikon, ki sega v tirozinska vrata in zaradi močnih hidrofobnih interakcij izraža nanomolarno afiniteto do vezavnega mesta (14). Nadaljnje je razvoj vodil do aromatskih aglikonov, od preprostih, z enim aromatskim obročem **2**, do bolj kompleksih, kot sta spojini **3** in **4** (R=H ali COOMe), ki z biarilnim aglikonom zagotavljata okrepljene  $\pi$ - $\pi$  interakcije s tirozinskimi vrati. To še posebej velja za spojino **4**, ki z elektronakceptorsko skupino na meta poziciji terminalnega aromatskega obroča tvori močne  $\pi$ - $\pi$  interakcije s »tirozinskimi vrati« (15, 16). *In vivo* farmakokinetične študije spojin **5**, **6** (R= H in CF<sub>3</sub>) in **7** so v študijah na miškah pokazale visok potencial bifenilnih  $\alpha$ -D-manozidov po peroralni aplikaciji. Uporabljeni odmerki, za doseg minimalne inhibitorne koncentracije so bili  $\geq 50$ mg/kg. Med drugim je bil tudi terapevtski učinek zelo kratek, približno 4h, saj so bile spojine podvržene hitri eliminaciji z glomerulno filtracijo. Tudi reabsorpcija iz primarnega urina je bila nizka (11, 20).



Slika 6: Nekatere že narejene spojine (povzeto po 14-19).

Preučevanje spojin, ki so jih sintetizirali Bouckaert in sodelavci je privedlo do zaključka, da  $\alpha$ -D-manopiranozidi s podaljšano alkilno verigo izkazujejo do 1000x višjo afiniteto do vezavnega mesta kot manosa sama. Heptil  $\alpha$ -D-manopiranozid **1** se je izkazal za najbolj potentnega (do 5 nM), vendar pa zaradi neustreznih farmakokinetičnih parametrov ni primeren za peroralno uporabo (20, 21, 22).



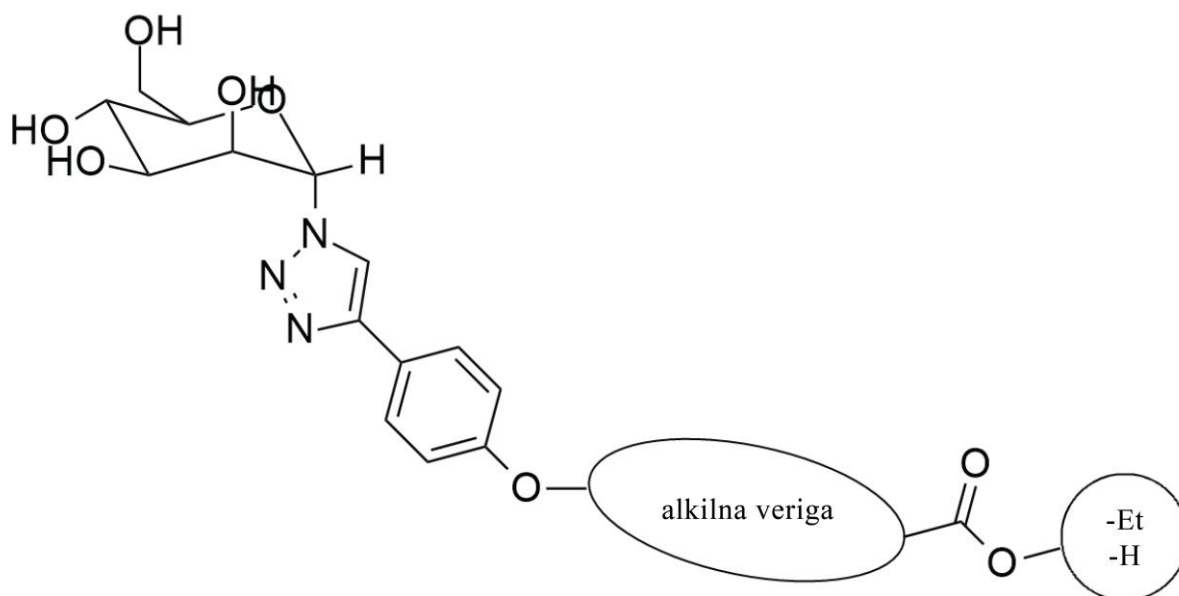
Slika 7: Spojini, prirejani po (13).

Spojina **8** je pokazala visoko afiniteto do receptorja v nanomolarnem območju ( $IC_{50}=0,070 \mu M$ ), kar je v območju n-heptil  $\alpha$ -D-manopiranozida. V primeru spojine **9**, ko je triazol vezan direktno na anomerni ogljik manose, so afinitete 2-8 krat nižje. Predpostavljamo, da je to posledica zmanjšane fleksibilnosti, ki preprečuje vzpostavitev močnejših interakcij aglikona s tirozinskimi vrati. Kljub nižji afiniteti je razvoj naših potencialnih učinkovin temeljil na podlagi spojine **9**, katero smo še dodatno modificirali. Za tvorbo N-glikozidne vezi smo se odločili ker so med prvimi sintetiziranimi tipi spojin O-glikozidi in za njih predvidevamo, da so metabolno manj stabilni (13).



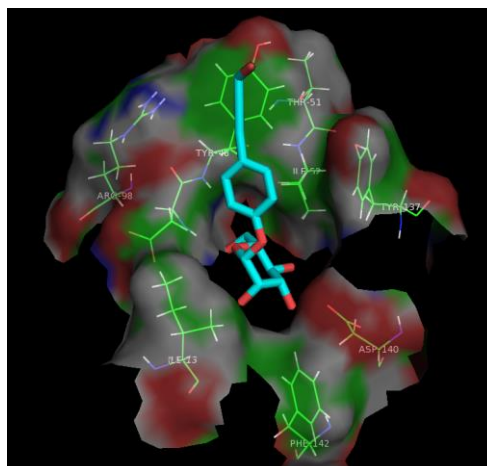
## 2 Namen dela

V okviru magistrske naloge bomo v laboratoriju sintetizirali nove  $\alpha$ -D-manozilirane glikokonjugate kot potencialne antagoniste receptorja FimH. Antagoniste bomo načrtovali kot glikokonjugate, sestavljene iz D-manoze, ki je preko  $\alpha$ -N-glikozidne vezi pripeta na triazolofenilni aglikon. Triazolofenilni fragment bomo dodali zaradi povečane vezavne afinitete v del vezavnega mesta FimH z imenom »tirozinska vrata« (regija med Tyr 48 in Tyr 137). Hkrati bomo na biarilni fragment dodali ustrezno alkiloksi verigo, na koncu katere bomo vpeljali estrsko skupino oziroma prosto karboksilno kislino. Naš cilj bo doseči ionske interakcije z gvanidinom Arg 98, česar do sedaj objavljeni antagonisti FimH niso uspeli. Z variacijami dolžine alkilnega distančnika bomo poskusili ugotoviti optimalno razdaljo le tega za čim močnejšo ionsko interakcijo z Arg 98.



Slika 8: Struktura sintetiziranih potencialnih FimH antagonistov.

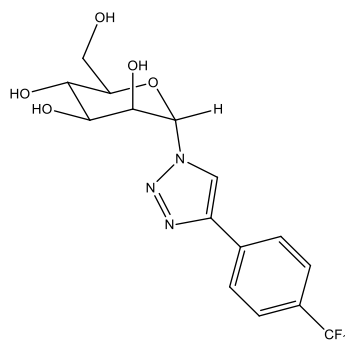
Z molekulskim modeliranjem bomo poizkusili predvideti načine vezave načrtovane molekule v vezavno mesto FimH.



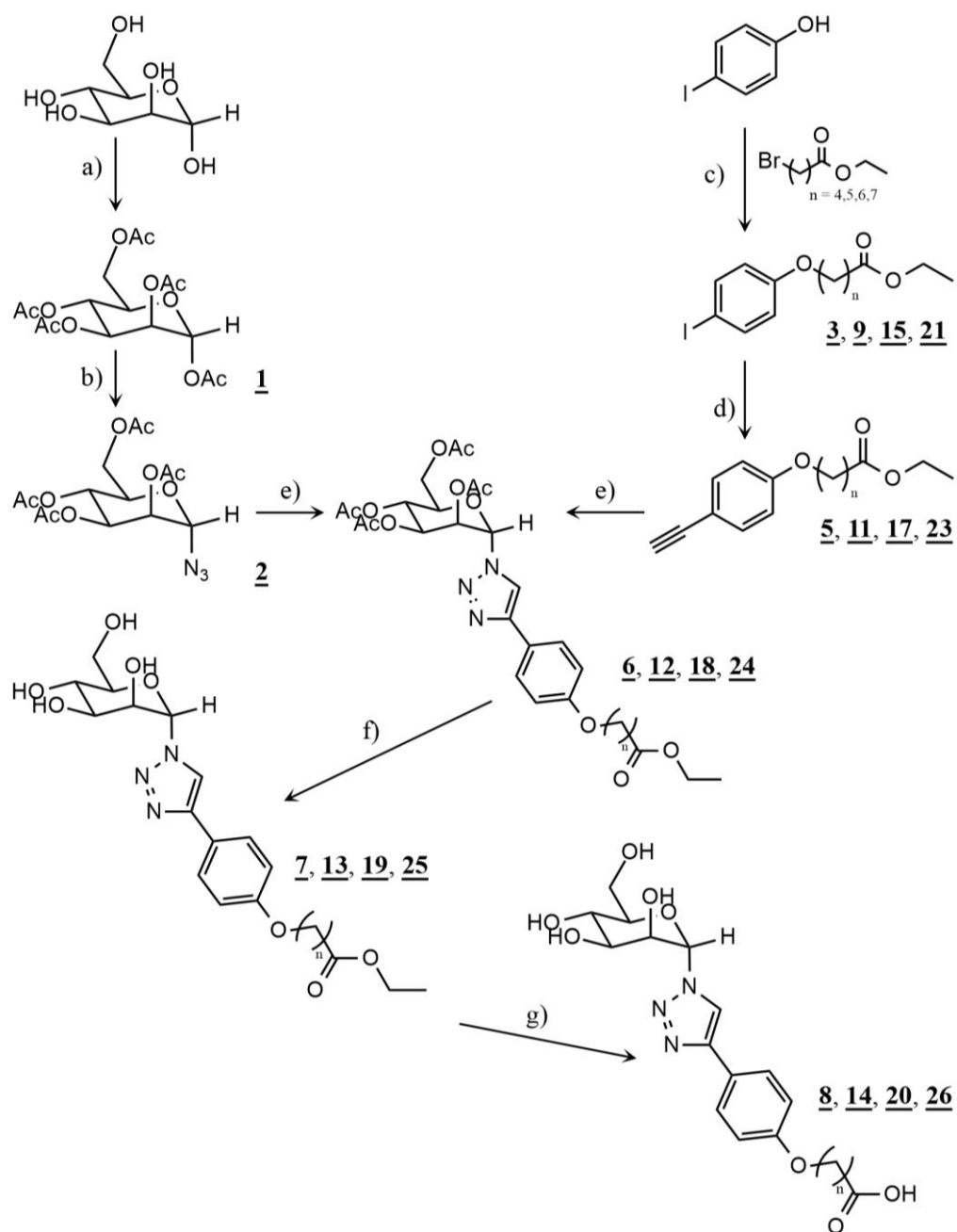
Slika 9: Na sliki vidimo aromatski obroč, ki tvori interakcije s Tyr 48 in Tyr 137 ( tvorita t.i. »Tyrosine gate«). Sem naj bi segal tudi triazolofenilni fragment naših sintetiziranih učinkovin. Povzeto po (20).

Za doseg dobrega antiadhezivnega delovanja potrebujemo spojine, ki bodo imele dobro per os biološko razpoložljivost, bodo metabolno stabilne in bodo hkrati imele hitro renalno eliminacijo iz urinarnega trakta v lumen ledvičnih tubulov, kjer je njihovo mesto delovanja. Da se izognemo metabolni nestabilnosti O-manozidov (razkroj z manozidazami), bomo sintetizirali N-glikozide. Za ustrezno absorpcijo iz GIT morajo biti spojine dovolj lipofilne (logP vrednosti naj bi bile predvidoma od -1,5 do 1,5). Za zagotovitev ustrezne topnosti bomo spojine oblikovali v kisline. Estri se lahko uporabijo kot predzdravila in predvidevamo, da bo njihova afiniteta do receptorja šibkejša (13).

Kot temelj sinteze bomo uporabili serijo spojino, ki so jo sintetizirali Ernst in sodelavci (13). Najvišjo afiniteto vezave je izkazala spodaj prikazana spojina, v kompetitivnem testu vezave je izkazala najvišjo afiniteto ( $IC_{50} = 0,144 \mu M$ ).



Slika 10: Spojina iz triazolofenilne serije, ki je izkazovala najvišjo afiniteto do FimH vezavnega mesta. Povzeto po (13).



Slika 11: Sintezni načrt za delo. Reagenti in reakcijski pogoji so navedeni na naslednji strani.

Distančnik	3. stopnja c)	4. stopnja d)	5. stopnja e)	6. stopnja f)	7. stopnja g)
n = 4	<u><b>3</b></u>	<u><b>5</b></u>	<u><b>6</b></u>	<u><b>7</b></u>	<u><b>8</b></u>
n = 5	<u><b>9</b></u>	<u><b>11</b></u>	<u><b>12</b></u>	<u><b>13</b></u>	<u><b>14</b></u>
n = 6	<u><b>15</b></u>	<u><b>17</b></u>	<u><b>18</b></u>	<u><b>19</b></u>	<u><b>20</b></u>
n = 7	<u><b>21</b></u>	<u><b>23</b></u>	<u><b>24</b></u>	<u><b>25</b></u>	<u><b>26</b></u>

Tabela 1: Oznake sintetiziranih spojin.

### Reagenti in reakcijski pogoji za reakcijsko shemo na sliki 11:

- a)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , piridin, argonova atmosfera, 24h,  $0^\circ\text{C}$ .
- b)  $\text{TMeSiN}_3$ , 1M  $\text{SnCl}_4$  v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , brezvodni  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , argonova atmosfera, 24h,  $25^\circ\text{C}$ .
- c)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , BTEAc / TBABr, AcCN, 24h,  $50^\circ\text{C}$ .
- d) 1.)  $\text{TMSiC}\equiv\text{CH}$ , brezvodni trietilamin, CuI,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ , brezvodni DMF, argonova atmosfera, 24h,  $25^\circ\text{C}$ .  
2.) TBAF x 3  $\text{H}_2\text{O}$  oz. tekoči TBAF, brezvodni DMF, 10min,  $25^\circ\text{C}$ .
- e) DIPEA, CuI, brezvodni DMF, argonova atmosfera, 24h,  $25^\circ\text{C}$ .
- f) 1M NaOMe v MeOH oz. 30 wt% NaOMe v MeOH, brezvodni EtOH, argonova atmosfera, 2h,  $25^\circ\text{C}$ .
- g) 1M NaOH, 96% EtOH, 24h,  $25^\circ\text{C}$ , Amberlite IR120.

Večina reakcij (reakcije pod alinejami **a**), **b**), **e**) in **g**)), ki jih bomo izvedli je že modificiranih, naš cilj pa bo:

- Izbor ustreznega katalizatorja faznega prenosa za Williamsonovo sintezo **c**) in ustrezno čiščenje surovega produkta.
- Optimizacija reakcijskih pogojev pri pripajanju etinilne skupine, Sonogashira sklopitvi na aromatsko jedro **d**), in uspešna odščita silila z etinilne skupine.
- Zemplénovo reakcijo **f**) bomo izvajali v brezvodnem etanolu, saj so sintetizirane spojine etilni estri in nočemo, da zaradi brezvodnega metanola kot medija poteče preestrenje. V primeru slednjega bi verjetno po koncu reakcije dobili zmes dveh produktov, metilnega in etilnega estra. Težave pri odščiti se kljub temu lahko pojavijo zaradi natrijevega metoksida, ki je raztopljen v brezvodnem metanolu.

### 3 Materiali in metode

#### Reagenti in topila:

Pri laboratorijskem delu smo uporabljali kemikalije proizvajalcev Apollo Organics, Sigma Aldrich, Acros Organics, Panreac, Fluka in Merck. Slednji so bili takšne čistosti, kot je navedel proizvajalec.

Argon smo uporabljali iz jeklenke, ki jo polni Messer.

Brezvodna topila in reagente (dimetilformamid, trietilamin, diklorometan) smo pripravili tik pred uporabo in jih hranili nad molekularnimi siti z velikostjo por 4 Å. Za ekstrakcije smo uporabljali prečiščeno vodo.

1M NaOMe v MeOH smo pripravili sami in ga hranili v argonovi atmosferi na temnem.

Nasičeni raztopini NaCl in NaHCO<sub>3</sub> je pripravila laborantka po standardnem postopku.

#### Laboratorijska oprema:

- termometer za oljno kopel IKA®ETS-D4 fuzzy
- magnetno mešalo IKA® RCT basic
- tehtnica Sartorius Max 620 g
- rotavapor BÜCHI Rotavapor R-114
- UV svetilka CAMAG UV-CABINET II ( $\lambda = 254 \text{ nm} / 366 \text{ nm}$ )
- rotavapor BÜCHI Rotavapor RE 111
- hibridna vakuumška črpalka TRIVAC D88
- ultrazvočna kadička

#### Kromatografske metode:

Kolonska kromatografija (KKR):

Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel Silica Gel 60 z velikostjo delcev 0,040 – 0,063 mm proizvajalca Merck. Pri delu smo uporabljali različne mobilne faze, mešanice le teh smo pripravili sami. Kromatografijo smo izvajali v steklenih kolonah različnih dimenzij. Pretok mobilne faze smo pospeševali z nadtlakom v koloni.

Tankoplastna kromatografija (TLC):

Kot stacionarno fazo smo uporabili aluminijaste plošče proizvajalca Merck, TLC Silica Gel 60 F<sub>254</sub>. Plošče so prevlečene z 0,2 mm debelo plastjo silikagela in imajo dodan fluorescenčni označevalec. Za razvijanje TLC kromatogramov smo uporabljali različne mobilne faze. Spojine smo detektirali s pomočjo UV svetilke CAMAG UV-CABINET II ( $\lambda = 254 \text{ nm} / 366 \text{ nm}$ ) in orositvenimi reagenti ( $\text{FeCl}_3$  in fosfomolibdat).

### **Spektroskopske metode:**

Jedrska magnetna resonanca (NMR):

Spektri vzorcev so bili posneti na spektrometru Bruker Avance DPX400 na Fakulteti za Farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztapljali v devteriranih topilih DMSO-d<sub>6</sub>, D<sub>2</sub>O, CDCl<sub>3</sub>, MeOD in NaOD.

Masna spektrometrija (MS):

Spektri vzorcev so bili posneti na spektrometru Q-TOF Premier (Micromass, Waters, Manchester, Velika Britanija) v Centru za masno spektrometrijo na Institutu »Jožef Stefan« v Ljubljani. Vzorci so bili ionizirani z ESI tehniko.

Infrardeča spektrometrija (IR):

Spektre vzorcev smo posneli na spektrometru PerkinElmer Spectrum BX System FT-IR na Fakulteti za Farmacijo Univerze v Ljubljani.

### **Določanje tališč:**

Tališča smo določali na talilnem mikroskopu Cambridge Instruments. Meritve so nekorrigirane.

### **Računalniška programska oprema:**

Sintezne postopke smo iskali na spletni strani SciFinder, znanstvene članke in ostale podatke pa s pomočjo PubMed brskalnika.

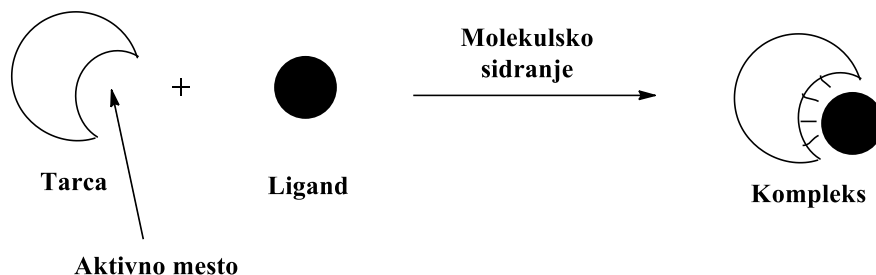
Kemijske strukture in reakcijske sheme smo risali s pomočjo programa ChemBioDraw Ultra 12, podjetja CambridgeSoft.

NMR spektre smo procesirali in signirali s pomočjo programa MestReC 4. 8. 6. 0 podjetja Mestrelab Research SL.

Molekulsko sidranje smo izvajali z računalniškim programom LeadIT Flexx. Slike, kot rezultat sidranja smo obdelali v programu Pymol.

### **Molekulsko sidranje:**

Molekulsko sidranje ali virtualno reševanje na podlagi strukture tarče je metoda za izračun preferenčne konformacije izbrane molekule (običajno gre za manjše molekule ligandov) v izbranem aktivnem mestu tarče (biološke makromolekule) in jakosti interakcij te konformacije z vezavnim mestom, ob predpostavki, da pri interakciji teh dveh pride do tvorbe stabilnega kompleksa.



Slika 12: Shematski prikaz molekulskega sidranja.

Programi molekulskega sidranja so sestavljeni iz dveh skupin algoritmov. Prvi, **iskalni algoritmi** (*ang. search algorithms*) poskrbijo za nastanek vedno novih veznih konformacij. Drugi, **cenilne funkcije** (*ang. scoring functions*) pa vezavni geometriji liganda, ki je nastala, izračunajo pripadajočo energijo vezave, ki predstavlja oceno jakosti interakcij z makromolekulo. Pri izračunu geometrije kompleksa sodelujeta algoritma vzajemno. Tako je cenilna funkcija tudi kvantitativno merilo za prenos konformacij v nov korak procesa sidranja. Kot rezultat molekulskega sidranja dobimo skupek po afiniteti rangiranih kompleksov makromolekula-ligand.

Zaradi fleksibilne obravnave liganda in spreminjanja konformacije le tega, a hkrati statične obravnave makromolekule, prihaja do napak pri določanju vezavne geometrije. Nekateri programi se napakam izognejo tako, da upoštevajo fleksibilnost stranskih verig ali pa del vezavnega mesta. Zato je pred uporabo programa za molekulsko sidranje potrebno validirati

in določiti, pri katerih pogojih pride do uspešne reprodukcije vezavne konformacije liganda, za katere pa imamo tudi eksperimentalne podatke kot je npr. kristalna struktura kompleksa. Validacije programov so pokazale, da programi večinoma uspešno posnemajo eksperimentalno določene vezavne geometrije ligandov, a hkrati so napovedi afinitet s cenilnimi funkcijami še vedno premalo natančne, da bi lahko sistem popolnoma avtomatizirali.

Pri gradnji molekulskega kompleksa programi uporabljajo dva pristopa. Temelj prvega pristopa je koncept inkrementne konstrukcije. Tu najprej sidramo večji fragment molekule v aktivno mesto in nato z različnimi omejitvenimi kriteriji do konca zgradimo konformacijo v aktivnem mestu. Drug pristop pa uporablja različne genetske algoritme. Ti pri ustvarjanju novih konformacij posnemajo principe evolucije in selekcije.

Moč interakcij med ligandom in biološko makromolekulo ocenijo cenilne funkcije. Te poskušajo določiti približek proste energije vezave. Prvotno razvite metode so težile k čim večjemu mimikiranju fizikalno – kemijskega procesa vezave liganda na protein. Pri reševanju zelo velikega števila spojin je ta postopek zelo zamuden in zahteven ter tako neuporaben. Kasneje so bile razvite metode z veliko približki, ki pa zanemarijo nekatere vidike vezave. Vsaka do sedaj razvita cenilna funkcija ima svoje prednosti in slabosti, nobena pa ne ustreza vsem pogojem idealne funkcije. Slednja naj bi bila robustna, natančna, zanesljiva, fizikalno osnovana in splošno uporabna. Tako cenilne funkcije delimo na tri kategorije:

- Cenilne funkcije, ki temeljijo na polju sil (*angl. force-field-based*).
- Empirične cenilne funkcije (*angl. empirical*).
- Cenilne funkcije, dobljene s statistično mehaniko (*angl. knowledge-based*).

Najpogosteje uporabljamo kombinacijo več cenilnih funkcij skupaj, kar imenujemo **ocenjevanje na podlagi konsenza** (*angl. consensus scoring*). Tak princip običajno daje boljše rezultate molekulskega sidranja.

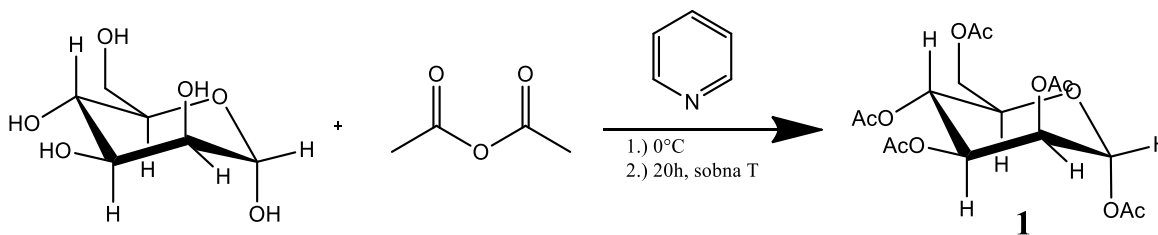


## 4 Eksperimentalno delo

### 4.1 Sinteza monosaharidnega jedra

#### 4.1.1 Zaščita manoznih OH skupin - sinteza 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-D-manopiranoze (**1**)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK:

V bučko, prepihano z argonom smo zatehtali 10,000 g (0,555 mol, 1 ekv) manoze ter dodali 50 ml piridina. Reakcijsko zmes smo med mešanjem s pomočjo ledene kopeli ohladili na 0°C in nato po kapljicah dodali 40 ml acetanhidrida. Reakcijo smo pustili potekati čez noč na sobni temperaturi v argonovi atmosferi. Naslednje jutro smo pod znižanim tlakom odparili topilo. V preostalo reakcijsko zmes smo dolili 200 ml etilacetata in vse skupaj premestili v 500 ml lij ločnik. OF smo spirali s 4 x 100 ml n.r. NaHCO<sub>3</sub>. Med zbiranjem VF smo merili pH – ko je slednji med pH 8 in 9, smo dodali v OF 50 ml prečiščene vode, da smo preprečili penjenje pri spiranju z 1 x 100 ml 1M HCl ter nato še 1 x z 50 ml HCl. Na koncu smo OF še dodatno sušili z 100 ml n.r. NaCl in z dodatkom trdnega Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Mešanico smo filtrirali skozi vato in topilo OF uparili pod znižanim tlakom. Tako smo dobili 23,352 g spojine **1** zadovoljive čistote, s katero smo nadaljevali pripenjanje azidne skupine.

##### PRODUKT:

**Molekulska formula:** C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>

**Izgled:** blago rumeno olje

**Izkoristek:** 23,352 g ( $\eta$  = 107,83 %)

**Rf:** 0,47 (MF: etilacetat/heksan = 1/1;

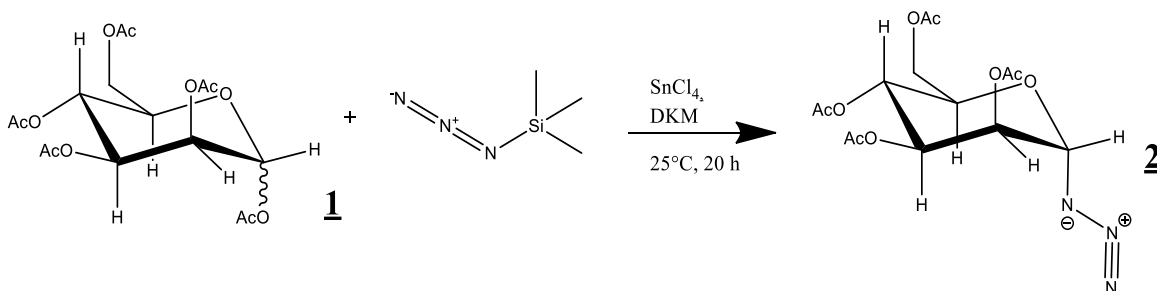
OR: fosfomolibdat)

**Mr (izračunano):** 390,34

#### 4.1.2 Tvorba azida na anomernem ogljiku zaščitene manoze - sinteza

##### (2R,3R,4S,5S,6S)-2-(acetoksimetil)-6-azidotetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil triacetata (**2**)

#### REAKCIJA:



#### POSTOPEK:

V bučko smo zatehtali 10,000 g (0,256 mol, 1 ekv) spojine **1**, ki smo jo raztopili v 100 ml suhega DKM. Celoten sistem smo zaprli s septuumom in ga prepihali z argonom. Sledil je dodatek 10 ml (71,351 mmol, 2,78 ekv) trimetilsilil azida in 0,8 ml (6,664 mmol, 0,26 ekv) kositrovega(IV) klorida. Reakcijo smo pustili potekati 20h, pri sobni temperaturi. Nadaljevali smo z izolacijo, reakcijsko zmes smo prenesli v 500 ml lij ločnik in OF spirali z 2 x 100 ml n.r. NaHCO<sub>3</sub>, 2 x 100 ml prečiščene vode ter z 1 x 100 ml n.r. NaCl. OF smo po ekstrakciji še dodatno sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali skozi vato in pod znižanim tlakom odparili topilo. Dobljeno zmes smo očistili s KKR (MF: etilacetat/heksan = 1/1) in s tem dobili čisto spojino **2**.

#### PRODUKT:

**Molekulska formula:** C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>

**Rf:** 0,42 (MF: etilacetat/heksan = 1/1;

**Izgled:** snežno beli kristali

OR: fosfomolibdat)

**Izkoristek:** 4,053 g (η = 42,38 %)

**Mr (izračunano):** 373,32

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 2.01 (s, 3H, Man-OCOCH<sub>3</sub>), 2.07-2.05 (m, 3H, Man-OCOCH<sub>3</sub>), 2.12 (s, 3H, Man-OCOCH<sub>3</sub>), 2.18 (s, 3H, Man-OCOCH<sub>3</sub>), 4.09-4.20 (m, 3H, H-5, H-6, H-6'), 4.28-4.35 (m, 1H, H-4), 5.16 (dd, J = 3.00, 1.96 Hz, 1H, H-3), 5.27 (dd, J = 3.00, 2.07 Hz, 1H, H-2), 5.40 (d, J = 1.92 Hz, 1H, H-1) ppm.

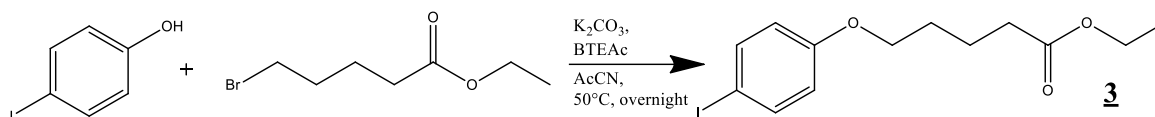
**Ostale analize:** (23)

## 4.2 Sinteza aglikona

### 4.2.1 Sinteza spojine s 4 C distančnikom

#### 4.2.1.1 Williamsonova sinteza etra - sinteza etil 5-(4-jodofenoksi) pentanoata (**3**)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK 1:

V bučko smo zatehtali smo 0,880 g (4,000 mmol, 1 ekv) 4-jodofenola in 2,2114 g (16,000 mmol, 4 ekv)  $K_2CO_3$  ter jima dodali 20 ml AcCN. Med mešanjem smo dodali 633  $\mu L$  (4,000 mmol, 1 ekv) etil 5-bromovalerata in na koncu še 0,2734 g (1,6 mmol, 0,4 ekv) BTEAc. Reakcijo smo pustili mešati pri  $50^\circ C$  na oljni kopeli s povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko čez noč. Drugo jutro smo prefiltrirali RZ, da smo se znebili nastale oborine in slednjo sprali s 3 x 10 ml AcCN. Pod znižanim tlakom smo se znebili AcCN in preostanek raztopili v 50 ml etilacetata. Nadaljevali smo z ekstrakcijo, OF smo spirali z 3 x 25 ml 0,1M HCl, 2 x 25 ml  $H_2O$ , 1 x 25 ml  $NaHCO_3$  in 1 x 25 ml n.r. NaCl. OF smo sušili nad  $Na_2SO_4$  in se pod znižanim tlakom znebili etilacetata. Po čiščenju RZ s kolonsko kromatografijo (MF: etilacetat/heksan=1/3) smo dobili 0,962 g čiste spojine **3**.

##### POSTOPEK 2:

V bučko smo zatehtali 0,880 g (4,000 mmol, 1 ekv) 4-jodofenola ter 2,211 g (16,000 mmol, 4 ekv)  $K_2CO_3$  in ju raztopili v 20 ml AcCN. Nato smo v RZ dodali 0,633 ml (4,200 mmol, 1,05 ekv) etil 5-bromovalerata ter 0,091 g (1,200 mmol, 0,1 ekv) BTEAc. RZ smo mešali na oljni kopeli s povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko pri  $50^\circ C$ . Po dveh urah smo preverili potek reakcije s TLC kromatogramom (MF: etilacetat/heksan = 1/3) in ugotovili, da reakcija še ni potekla, zato smo dodali še 0,182 g (2,400 mmol, 0,2 ekv) katalizatorja BTEAc in pustili mešati RZ čez noč. Po 12h smo zoper preverili potek reakcije s TLC kromatogramom in nadaljevali z izolacijo. Iz reakcijske zmesi smo odfiltrirali  $K_2CO_3$  in z vodno črpalko pod znižanim tlakom odparili AcCN. Preostanek RZ smo s pomočjo 50 ml etilacetata prenesli v lij ločnik. OF smo spirali z 3 x 25 ml 0,1 M HCl, 2 x 25 ml prečiščene  $H_2O$  in 1 x 25 ml n.r. NaCl. Na koncu smo OF še dodatno posušili pod  $Na_2SO_4$  in pod

znižanim tlakom uparili etilacetat. Produkt smo očistili s KKR (MF: etilacetat/heksan = 1/3) in dobili 1,090 g čiste frakcije spojine **3**.

**PRODUKT:**

**Molekulska formula:** C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>IO<sub>3</sub>

**Izgled:** brezbarvno olje

**Izkoristek:**

1. 0,962 g ( $\eta = 69,11\%$ )
2. 1,090 g ( $\eta = 78,26\%$ )

**Rf:** 0,43 (MF: etilacetat/heksan = 1/3)

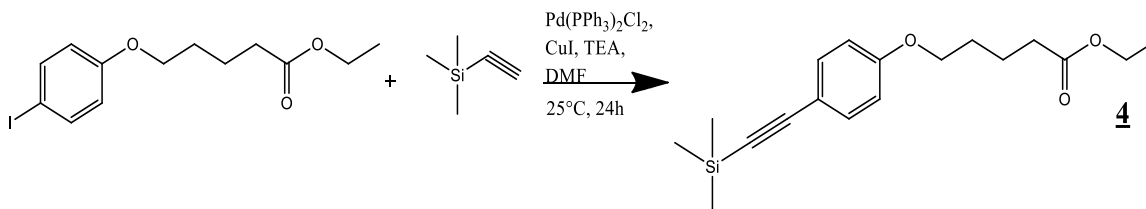
**Mr (izračunano):** 348,02

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 1.28$  (t,  $J = 7.14$ , 3H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.83 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 2.40 (t,  $J = 7.08$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COO), 3.95 (t,  $J = 5.93$  Hz, 2H, ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.15 (q,  $J = 7.14$  Hz, 2H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.69 (d,  $J = 9.03$  Hz, 2H, Ar-H<sub>A</sub>), 7.56 (d,  $J = 9.03$  Hz, 2H, Ar-H<sub>B</sub>) ppm.

**Ostale analize:** (24)

#### 4.2.1.2 Sonogashira sklopitev - sinteza etil 5-(4-((trimetilsilil)etnil)fenoksi)pentanoata(4)

##### REAKCIJA:

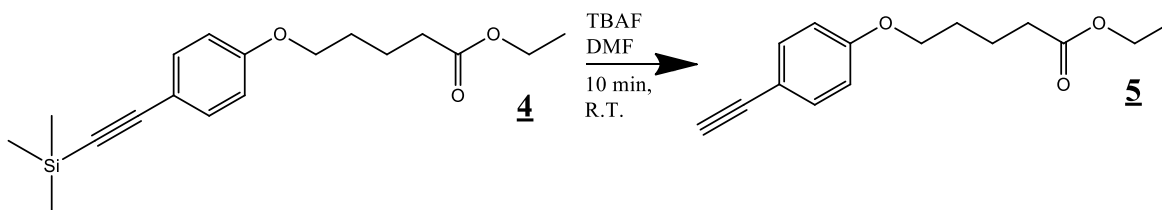


##### POSTOPEK:

V bučko smo natehtali 1,979 g (5,684 mmol, 1 ekv) spojine **3**, ki smo jo raztopili v 7 ml predhodno destiliranega trietilamina. Ko se je vsebina bučke homogeno premešala, smo dodali oba katalizatorja - 0,079 g (0,114 mmol, 0,02 ekv) bis(trifenilfosfin)paladijevega(II)diklorida ter 0,037 g (0,341 mmol, 0,06 ekv) CuI, nato s siringo dodamo še 0,964 ml (6,821 mmol, 1,2 ekv) etiniltrimetilsilana. Ker se je kljub upom, da bo trietilamin zadostoval kot topilo v bučki naredila gmota, smo dodali še 7 ml brezvodnega DMF, dokler nismo dosegli homogene RZ. Reakcijo smo pustili potekati čez noč pri sobni temperaturi. Po 24ih urah smo vsebino bučke prelili v lij ločnik in dodali 80 ml etilacetata. OF smo spirali s 4 x 20 ml H<sub>2</sub>O, da smo se znebili DMF. OF smo nato nadaljno spirali s 3 x 20 ml 1M HCl, 1 x 30 ml H<sub>2</sub>O ter 1 x 25 ml n.r. NaCl. OF smo še posušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ter pod znižanim tlakom uparili preostalo topilo. Dobimo RZ v kateri je tudi spojina **4**, ki jo takoj uporabimo v naslednji stopinji.

### 4.2.1.3 Odščita sililne zaščitne skupine - sinteza etil 5-(4-etinilfenoksi) pentanoata (5)

#### REAKCIJA:



#### POSTOPEK:

V bučko v kateri smo imeli RZ s spojino **4** (2,020 g, 6,343 mmol, 1 ekv) smo dodali 25 ml brezvodnega DMF in 0,942 ml (3,171 mmol, 0,5 ekv) TBAF. Reakcijo smo nato pustili mešati 10 minut pri sobni temperaturi. Po poteku smo najprej pod znižanim tlakom uparili DMF in nato nadaljevali z izolacijo. V RZ smo dodali 75 ml prečiščene vode in 150 ml kloroforma, OF smo spirali z 2 x 20 ml prečiščene vode in 1 x 20 ml n.r. NaCl. Sledilo je sušenje pod Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtracija slednjega in uparevanje kloroforma pod znižanim tlakom. Ostanek po uparevanju topila smo prečistili s kolonsko kromatografijo (MF: etilacetat/heksan = 1/4) pri nanosu vzorca smo si pomagali s kapljico kloroforma, saj smo prepozno ugotovili, da slednji ni dobro topen v naši mobilni fazi. Uspešno smo sintetizirali in očistili spojino **5**.

#### PRODUKT:

**Molekulska formula:** C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>

**Rf:** 0,38 (MF: etilacetat/heksan = 1/4)

**Izgled:** rumeno – rjav kristal

**Mr (izračunano):** 246,31

**Izkoristek:** 0,437 g ( $\eta$  = 27,98 %)

**Tališče:** 38,6 – 39,3 °C

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 1.28 (t,  $J$  = 7.14 Hz, 3H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.84 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 2.40 (t,  $J$  = 7.08 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COO), 3.02 (s, 1H, CH≡C-Ar), 3.99 (t,  $J$  = 5.94 Hz, 2H, ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.14 (q,  $J$  = 7.14 Hz, 2H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.84 (d,  $J$  = 8.94 Hz, 2H, Ar-H<sub>A</sub>), 7.43 (d,  $J$  = 8.89 Hz, 2H, Ar-H<sub>B</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 14.3 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 21.6 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO), 28.6 (ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 33.9 (CH<sub>2</sub>COO), 60.4 (COOCH<sub>2</sub>), 67.4 (Ar-OCH<sub>2</sub>), 75.8 (CH≡CH-Ar), 83.7

(CH≡CH-Ar), 114.0 (Ar-C), 2 x 114.4 (2 x Ar-C), 2 x 133.6 (2 x Ar-C), 159.3 (Ar-C), 173.4 (C=O) ppm.

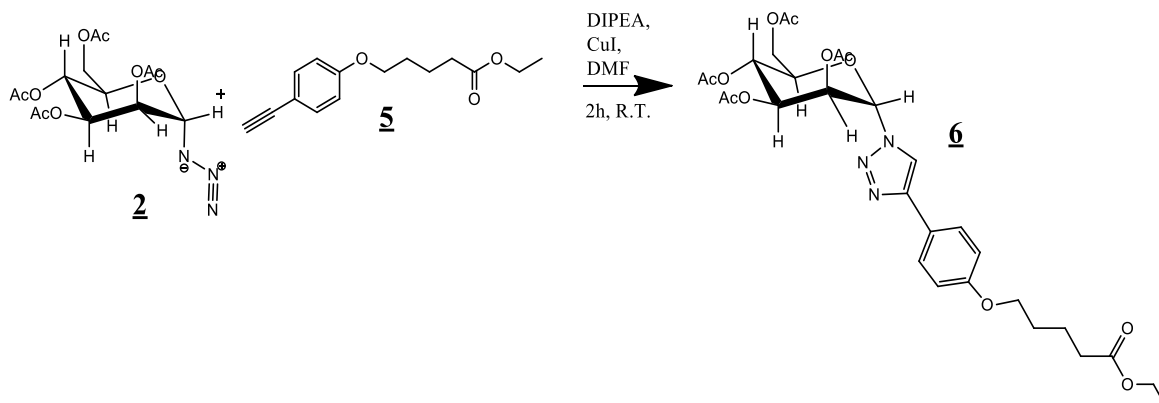
**IR (KBr):**  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3247, 1719, 1605, 1507, 1475, 1460, 1416, 1332, 1247, 1183, 1173, 1115, 1062, 1041, 1006, 836, 815, 740, 701, 654, 647, 541, 508.

**MS (ESI+)** m/z = 269.1 ([MNa<sup>+</sup>], 60 %), 129.1 (100 %).

**HRMS (ESI+)** m/z za C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>Na ([MNa<sup>+</sup>]) izračunano 269.116, izmerjeno 269.115.

**4.2.1.4 Huisgenova cikloadicija - sinteza (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-acetoksimetil-6-(4-(4-((5-etoksi-5-oksopentil)oksi)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il) tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetata (**6**)**

**REAKCIJA:**



**POSTOPEK:**

V dvogrlo bučko smo zatehtali 0,455 g (1,218 mmol, 1 ekv) spojine **2** in 0,300 g (1,218 mmol, 1 ekv) spojine **5** ter ju prepihali z argonom. Skozi stransko grlo smo s stekleno brizgo dodali 7 ml brezvodnega DMF. Ko je bila RZ homogena smo dodali še oba katalizatorja, 0,023 g (0,122 mmol, 0,1 ekv) CuI ter 0,220 ml (1,218 mmol, 1 ekv) DIPEA. Reakcijo smo pustili v argonovi atmosferi, pri sobni temperaturi potekati 2 dni. Po poteku smo spojino **6** izolirali tako, da smo RZ dodali 100 ml etilacetata in 100 ml prečiščene H<sub>2</sub>O, nato smo spirali OF z 3 x 100 ml prečiščene H<sub>2</sub>O in 1 x 100 ml n.r. NaCl. Po ekstrakciji smo OF še sušili pod Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali in upareli preostala topila pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s KKR (MF: etilacetat/heksan= 1/1).

**PRODUKT:**

**Molekulska formula:** C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub>

**Rf:** 0,16 (MF: etilacetat/heksan = 1/1)

**Izgled:** rahlo rumeno obarvano olje

**Mr (izračunano):** 619,62

**Izkoristek:** 0,590 g ( $\eta$  = 78,14 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, COSY, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ =1.28 (t, *J* = 7.14 Hz, 3H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.87 (m, 4H, 2 x ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.13 (m, 12H, 4x OCOCH<sub>3</sub>), 2.42 (t, *J* = 7.06 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.93-3.99 (ddd, *J* = 9.01, 5.40, 2.51 Hz, 1H, H-5), 4.04 (t, *J* = 5.88 Hz, 2H, ArOCH<sub>2</sub>), 4.09 (dd, *J* = 12.51, 2.58 Hz, 1H, H-6'), 4.16 (q, *J* = 7.14 Hz, 2H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.40 (dd, *J* = 12.52, 5.36 Hz, 1H, H-6), 5.41 (t, *J* = 8.80, 1H, H-4), 6.00 (dd,



$J = 8.54, 3.73$  Hz, 1H, H-3), 6.03 (dd,  $J = 3.68, 2.53$  Hz, 1H, H-2), 6.06 (d,  $J = 2.46$  Hz, 1H, H-1), 6.97-6.99 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, Ar-H<sub>A</sub>), 7.77-7.79 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, Ar-H<sub>B</sub>), 7.88 (s, 1H, C<sub>2</sub>N<sub>3</sub>H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 14.3$  (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20.6, 20.8, 20.8, 21.7 (4 x OCOCH<sub>3</sub>) 28.7 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.7 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 33.9 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 33.9 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 60.4 (COOCH<sub>2</sub>), 61.6, 67.5, 67.5, 68.3, 72.2, 83.6 (6 x Man-C), 68.4 (Ar-OCH<sub>2</sub>), 2 x 114.9 (2 x Ar-C), 118.9 (Ar-C), 122.2 (N-CH=C), 2 x 127.2 (2 x Ar-C), 148.3 (N-CH=C), 159.4 (Ar-C-O), 169.3, 169.7, 169.8, 170.6 (4 x OCOCH<sub>3</sub>), 173.5 (COO) ppm.

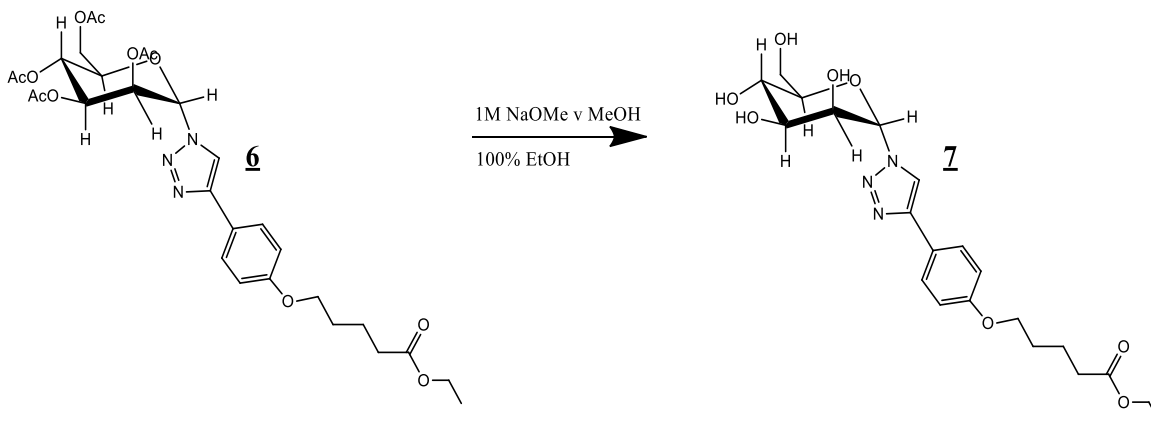
**IR (KBr):**  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 2941, 1744, 1617, 1562, 1499, 1438, 1368, 1218, 1176, 1129, 1034, 986, 958, 904, 839, 772, 650, 599, 531.

**MS (ESI+):**  $m/z = 620.3$  ([MH<sup>+</sup>], 100 %).

**HRMS (ESI+):**  $m/z$  za C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub> izračunano 620.246, izmerjeno 620.245.

#### 4.2.1.5 Zemlénova odščita - sinteza etil 5-(4-(1-((2S,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)pentanoata (**7**)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK 1:

V bučko, preprihano z argonom smo zatehtali 0,250 g (0,403 mmol, 1 ekv) spojine **6**. S stekleno brizgo smo dodali približno 15 ml brezvodnega EtOH, dokler se spojina **6** ni raztopila. Na koncu smo z brizgo dodali še 40  $\mu$ L (0,040 mmol, 0,1 ekv) 1M NaOMe v MeOH. Reakcijo smo pustili potekati čez noč pri sobni temperaturi. Potek slednje smo preverili s TLC kromatogramom (MF: DKM/MeOH = 5/1). Spojino **7** smo izolirali tako, da smo RZ filtrirali skozi teflonski filter in v bučki zbirali matičnico, ki smo jo pozneje macerirali z Amberlite IR120 (Amberlite IR120 smo pred uporabo sprali s 3 x 10 ml brezvodnega EtOH, skozi presejalno erlenmajerico in nato sušili z vodno črpalko – guč s poroznostjo št. 4). Po zaključku filtracije smo odstranili teflonski filter in poskušali z njega postrgati čim več oborine, kar nam ni uspelo pa smo z brezvodnim EtOH sprali v matičnico. Ker se je naš produkt v etanolu slabo topil, smo dodali DKM, medtem pa smo matičnico dodobra raztopili in dali notri 1 žličko Amberlite IR120, s prečiščeno vodo omočili pH papirček in s spatulo, pomočeno v bučko razmazali matičnico po lističu, ko je slednji pokazal pH 5-6 (indikacija rahlo kislega medija), je ionski izmenjevalec opravil svoje delo. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom in iz matičnice dobili oborino.

##### POSTOPEK 2:

V bučko, preprihano z argonom smo zatehtali 0,310 g (0,500 mmol, 1 ekv) spojine **6** in jo raztopili v 15 ml brezvodnega etanola. Z brizgo smo dodali 50  $\mu$ L (0,050 mmol, 0,1 ekv) 1M NaOMe v MeOH in pustili reakcijo potekati čez noč. Po 12 urah smo potek reakcije

preverili s TLC kromatogramom (MF: DKM/MeOH = 5/1 ) in nato nadaljevali z izolacijo. RZ smo prefiltrirali skozi teflonski filter in matičnico zbirali posebej v bučki, pomagali smo si s spiranjem z brezvodnim etanolom in DKM. Oborino s filtra smo dodatno posušili s pomočjo vodne črpalke, v bučko z matičnico pa smo dodali Amberlite IR120 in po dosegu pH<7 smo oboje prefiltrirali skozi guč s poroznostjo št. 4 in uparili topilo pod znižanim tlakom. Iz matičnice smo dobili 0,095 g produkta.

### PRODUKT:

**Molekulska formula:** C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>

Oborina matičnice:

**Izgled:** trdna bela oborina (kreda)

1. 0,095 g ( $\eta$  = 42,09 %)

**Izkoristek:**

2. 0,030 g ( $\eta$  = 16,48 %)

Oborina:

1. 0,084 g ( $\eta$  = 46,15 %)

**Rf:** 0,36 (MF: DKM/MeOH = 5/1)

2. 0,123 g ( $\eta$  = 54,50 %)

**Mr (izračunano):** 451,48

**Tališče:** 149,2 – 150,4 °C

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, COSY, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  = 1.19 (t,  $J$  = 7.11 Hz, 3H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.69-1.75 (m, 2 x 2H, ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.38 (t,  $J$  = 7.16 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub>), 3.39-3.44 (ddd, 1H, H-5), 3.55-3.67 (m, 3H, H-4, H-6, H-6'), 3.87 (dd,  $J$  = 6.58, 3.25 Hz, 1H, H-3), 4.02 (dd,  $J$  = 9.97, 3.97 Hz, 2H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.07 (t,  $J$  = 7.12 Hz, 2H, ArOCH<sub>2</sub>), 4.43 (t,  $J$  = 3.60 Hz, 1H, H-2), 5.95 (d,  $J$  = 4.66 Hz, 1H, H-1), 7.01 (d,  $J$  = 8.90 Hz, 2H, Ar-H<sub>A</sub>), 7.80 (d,  $J$  = 8.90 Hz, 2H, Ar-H<sub>B</sub>), 8.61 (s, 1H, C<sub>2</sub>N<sub>3</sub>H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  = 14.1 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 21.2 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.0 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 33.1 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 59.7 (COOCH<sub>2</sub>), 60.6, 67.6, 68.0, 71.2, 78.3, 85.8 (6 x Man-C), 67.0 (Ar-OCH<sub>2</sub>), 2 x 114.8 (2 x Ar-C), 120.0 (Ar-C), 123.0 (N-CH=C), 2 x 126.6 (2 x Ar-C), 146.2 (N-CH=C), 158.4 (Ar-C-O), 172.8 (COO) ppm.

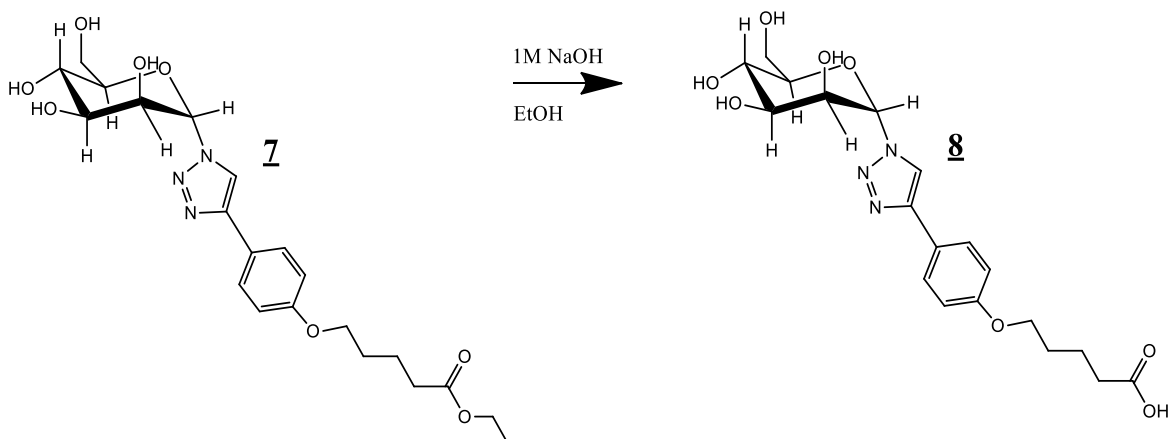
**IR (KBr):**  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3321, 3089, 2948, 1731, 1618, 1501, 1476, 1441, 1418, 1381, 1335, 1305, 1255, 1181, 1109, 1073, 1035, 1014, 975, 925, 881, 828, 799, 739, 674, 581, 539.

**MS (ESI+)**  $m/z$  = ([MH<sup>+</sup>], 100 %).

**HRMS (ESI+):**  $m/z$  za C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> izračunano 452.203, izmerjeno 452.204.

#### 4.2.1.6 Hidroliza etilnega estra - sinteza 5-(4-(1-((2S,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)pentanojske kisline (**8**)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK:

V bučko smo zatehtali 0,192 g (0,425 mmol, 1 ekv) spojine **7** in jo raztopili s pomočjo ultrazvočne kadičke v EtOH, nato smo dodali 1,276 ml (1,276 mmol, 3 ekv) 1M NaOH in RZ pustili mešati na sobni temperaturi čez noč. Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatogramom (MF: DKM/MeOH = 5/1) in po poteku reakcije nadaljevali z izolacijo. RZ smo na ledu nakisali z 1M HCl do pH 2-3. Zaradi nastanka čudne gelaste zmesi smo se odločili, da bomo pod znižanim tlakom uparili vodo v RZ, saj filtracija ni bila mogoča oz. bi pri njej prišlo do prevelikih izgub. Po uparevanju vode smo RZ raztopili v brezvodnem etanolu in predvidevali smo, da je tisto, kar se ni raztopilo bil NaCl. Oborino smo odnučali in pod znižanim tlakom uparili topilo v matičnici, kjer smo predvidevali, da se je nahajal naš produkt. Po pregledu NMR spektra smo ugotovili, da je oborina, prisotna na filter papirju zmes NaCl in spojine **8**.

##### PRODUKT:

**Molekulska formula:** C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>

**Rf:** 0,12 (MF: DKM/MeOH = 5/1)

**Izgled:** bela oborina

**Mr (izračunano):** 423,42

**Izkoristek:**

**Tališče:** 218,0 – 224,4 °C

Oborina: 0,209 g ( $\eta$  = 116,11 %)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, COSY, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ = 1.67 (dd, *J* = 7.6 Hz, *J* = 14.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH), 1.74 (td, *J* = 6.3 Hz, *J* = 10.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH), 2.30 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOH), 3.40 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, H-6), 3.60 (m, 3H, H-4, H-5, H-6), 3.88 (dd, *J* = 5.0 Hz, *J* = 10.1 Hz, 1H, H-3), 4.01 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, ArOCH<sub>2</sub>), 4.46 (dd, *J* = 4.4 Hz, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-2), 4.67 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, OH-4), 5.13 (dd, *J* = 5.2 Hz, *J* = 20.8 Hz, 2H, OH-2 in OH-3), 5.37 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, OH-1), 5.93 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, H-1), 7.02 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, Ar-H<sub>A</sub>), 7.80 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, Ar-H<sub>B</sub>), 8.64 (s, 1H, C<sub>2</sub>N<sub>3</sub>H), 12.10 (s, 1H, CH<sub>2</sub>COOH) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ = 21.2 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH), 28.1 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 33.3 (CH<sub>2</sub>COOH), 60.6, 67.1, 67.6, 71.2, 78.3, 85.8 (6 x Man-C), 68.1 (Ar-OCH<sub>2</sub>), 2 x 114.8 (2 x Ar-C), 120.1 (Ar-C), 122.9 (N-C=C), 2 x 126.6 (2 x Ar-C), 146.2 (N-C=C), 158.4 (Ar-C), 174.4 (COOH) ppm.

**IR (KBr):** ν [cm<sup>-1</sup>] = 3379, 3088, 2941, 2869, 1712, 1691, 1621, 1566, 1504, 1473, 1448, 1382, 1355, 1303, 1284, 1260, 1235, 1206, 1177, 1112, 1078, 1035, 1007, 974, 898, 839, 819, 791, 747, 731, 710, 684, 650, 549, 527.

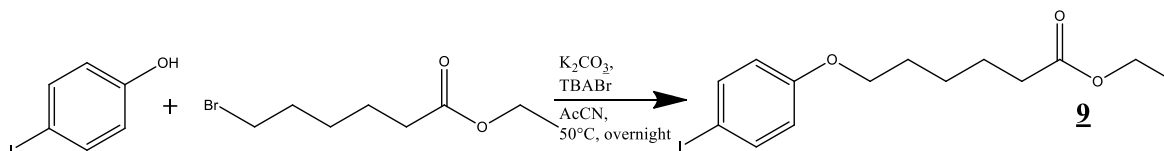
**MS (ESI+):** m/z = ([MNa<sup>+</sup>], 100 %).

**HRMS (ESI+):** m/z za C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Na izračunano 446.154, izmerjeno 446.154.

## 4.2.2 Sinteza spojine s 5 C distančnikom

### 4.2.2.1 Willamsonova sinteza etra - sinteza etil 5-(4-jodofenoksi) heksanoata (**9**)

#### REAKCIJA:



#### POSTOPEK:

V 100 ml bučko smo zatehtali 1,760 g (8,000 mmol, 1 ekv) 4-jodofenola in 4,423 g (32,000 mmol, 4 ekv)  $K_2CO_3$  ter ju raztopili v 40 ml acetonitrila. RZ smo pustili mešati na oljni kopeli pri  $50^\circ C$  in medtem dodali 1,419 ml (8,000 mmol, 1 ekv) etil-6-bromoheksanoata ter 0,7737 g (4,000 mmol, 0,3 ekv) TBABr, ki služi kot katalizator faznega prenosa. RZ smo pustili mešati 20 h v oljni kopeli pri  $50^\circ C$  in na povratnem hladilniku. Po poteku smo naredili TLC kromatogram (MF: etilacetat/heksan = 1/3) in ugotovili, da je v RZ prisoten še 4-JF, zato smo dodali še 0,2 ekv katalizatorja in 0,2 ekv etil-6-bromoheksanoata. Po štirih urah na TLC kromatogramu več nismo opazili prisotnosti 4-JF zato smo nadaljevali z izolacijo spojine **9**. Skozi vato smo prefiltrirali RZ in se tako znebili trdnega  $K_2CO_3$ , preostalo oborino na vati pa smo splaknili s 3 x 20 ml acetonitrila. Ostanek RZ smo upareli na rotavaporju pod znižanim tlakom. Nadaljevali smo z ekstrakcijo, s pomočjo 50 ml etilacetata smo RZ prenesli v lij ločnik in OF spirali najprej z 3 x 25 ml 0,1M HCl, nato z 2 x 25 ml prečiščene vode in na koncu še z 25 ml n.r. NaCl. OF smo nato dodatno posušili z  $Na_2SO_4$  in ga po 20 minutah odfiltrirali. Topilo smo upareli pod znižanim tlakom in dobili 3,100 g produkta. Slednjega smo očistili z uparovanjem na vakuumski črpalki (2h,  $75^\circ C$ , 0 mbar) s katerim smo iz RZ izgnali prebitek etil-6-bromoheksanoata. Na koncu smo dobili 2,776 g čiste spojine **9**.

#### PRODUKT:

**Molekulska formula:**  $C_{14}H_{19}IO_3$

**Rf:** 0,48 (MF: etilacetat/heksan = 1/3)

**Izgled:** brezbarvno olje

**Mr (izračunano):** 362,04

**Izkoristek:** 2,776 g ( $\eta = 95,86\%$ )

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta = 1.27$  (t,  $J = 7.14$  Hz, 3H,  $COOCH_2CH_3$ ), 1.53 (td,  $J = 9.81$  Hz,  $J = 1.69$  Hz, 2H,  $ArOCH_2CH_2CH_2$ ), 1.76-1.66 (m, 2H,  $ArOCH_2CH_2CH_2CH_2$ ), 1.85-

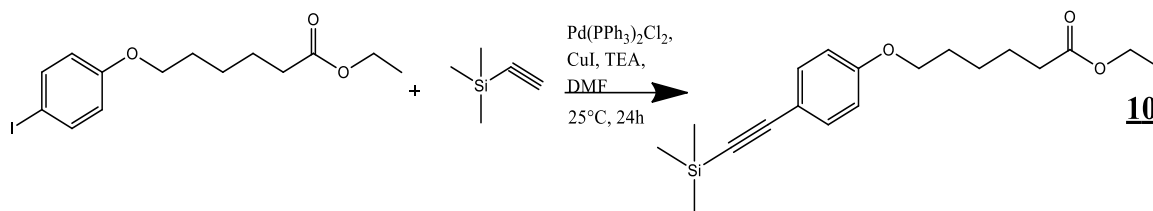
1.76 (m, 2H, ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.35 (t,  $J = 7.47$  Hz, 2H, ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.93 (t,  $J = 6.43$  Hz, ArOCH<sub>2</sub>), 4.15 (q,  $J = 7.14$  Hz, 2H, COOCH<sub>2</sub>), 6.68 (d,  $J = 9.03$  Hz, 2H, Ar-H<sub>A</sub>), 7.55 (d,  $J = 9.03$  Hz, 2H, Ar-H<sub>B</sub>) ppm.

**Ostale analize:** (24)

#### 4.2.2.2 Sonogashira sklopitev - sinteza etil 6-(4-((trimetilsilil)etnil)fenoksi

##### heksanoata (10)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK:

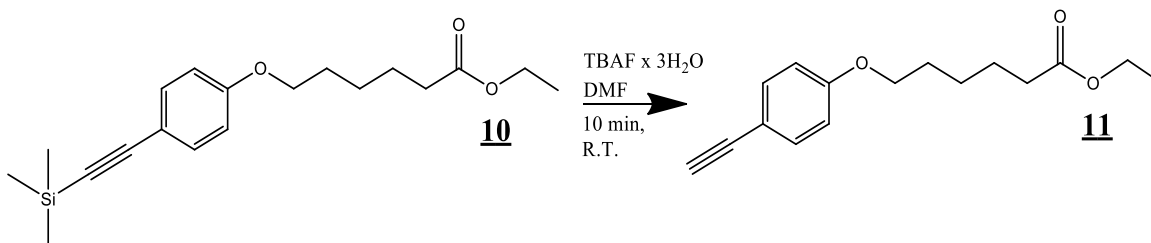
V 50 ml bučki, prepihani z argonom smo v 15 ml brezvodnega DMF raztopili spojino **9** (2,674 g, 7,384 mmol, 1 ekv). Nato smo v inerten sistem dodali 0,048 g (0,443 mmol, 0,06 ekv) CuI, 0,104 g (0,148 mmol, 0,02 ekv) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in 10 ml trietilamina. Ko je RZ postala homogena smo s teflonsko brizgo dodali še 1,252 ml (8,861 mmol, 1,2 ekv) trimetilsilil acetilena. Reakcijo smo pustili potekati dva dni na sobni temperaturi. Nato smo s TLC kromatogramom (MF: etilacetat/heksan = 1/3) potrdili, da je reakcija potekla in nadaljevali smo z izolacijo. Najprej smo s pomočjo vakuumske črpalke (0 mbar, 30 min, 40° C) uparili DMF in trietilamin. Preostalo RZ smo s pomočjo 150 ml etilacetata prenesli v lij ločnik in pogasili sistem z dodatkom 100 ml prečiščene vode. Sledila je ekstrakcija, OF smo spirali najprej s 4 x 40 ml prečiščene vode, nato s 3 x 30 ml 1M HCl, 2 x 30 ml prečiščene vode in nazadnje še sušili s 40 ml n.r. NaCl. Zaključili smo s sušenjem pod Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in s filtracijo slednjega. Etilacetat smo pod znižanim tlakom uparili in dobili 2,649 g surovega produkta, kateremu smo odščitili sililno skupino.



#### 4.2.2.3 Odščita sililne zaščitne skupine - sinteza etinil 6-(4-etinilfenoksi) heksanoata

(11)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK:

V 50 ml bučko smo s pomočjo brezvodnega DMF kvantitativno prenesli RZ v kateri je spojina **10** (2,649 g, 7,966 mmol, 1 ekv), dodali 1,257 g (3,983 mmol, 0,5 ekv) TBAF x 3 H<sub>2</sub>O. Reakcijo smo pustili potekati 10 min pri sobni temperaturi. Nato smo s TLC kromatogramom (MF: etilacetat/heksan = 1/3) preverili potek reakcije in nadaljevali z izolacijo. Najprej smo z vakuumsko črpalko (0 mbar, 30 min, 40 °C) upareli DMF, preostanek pa smo s pomočjo 150 ml kloroforma prenesli v lij – ločnik. Dodali smo 75 ml prečiščene vode in OF spirali s 3 x 50 ml prečiščene vode, sušili z n.r. NaCl in nato še dodatno pod Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po 20 min smo odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom uparili kloroform. Spojino smo nato še dodatno očistili s KK (MF: kloroform/etilacetat/heksan = 1/2/16) in dobili 0,707 g čiste frakcije spojine **11**.

##### PRODUKT:

**Molekulska formula:** C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>

**Rf:** 0,21 (MF: etilacetat/heksan = 1/3)

**Izgled:** kristali jantarjeve barve

**Mr (izračunano):** 258,355

**Izkoristek:** 0,707 g ( $\eta$  = 37,06 %)

**Tališče:** 40,5 – 41,2 °C

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 1.28 (t,  $J$  = 7.14 Hz, 3H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.57-1.47 (m, 2H, ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.77-1.67 (m, 2H, ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.82 (ddd,  $J$  = 12.99, 9.67, 6.49 Hz, 2H, ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.35 (t,  $J$  = 7.47 Hz, 2H, ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.01 (s, 1H, CH<sub>3</sub>-C≡C-Ar), 3.97 (t,  $J$  = 6.43 Hz, 2H, ArOCH<sub>2</sub>), 4.15 (q,  $J$  = 7.14, Hz, 2H, COOCH<sub>2</sub>), 6.84 (d,  $J$  = 8.90 Hz, 2H, Ar-H<sub>A</sub>), 7.43 (d,  $J$  = 8.90 Hz, 2H, Ar-H<sub>B</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 14.3 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24.7 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.6 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.9 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 34.2 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 60.3

(COOCH<sub>2</sub>), 67.7 (Ar-OCH<sub>2</sub>), 75.7 (CH≡C-Ar), 83.7 (CH≡C-Ar), 113.9 (Ar-C), 2 x 114.4 (2 x Ar-C), 2 x 133.6 (2 x Ar-C), 159.4 (Ar-C-O), 173.6 (COO) ppm.

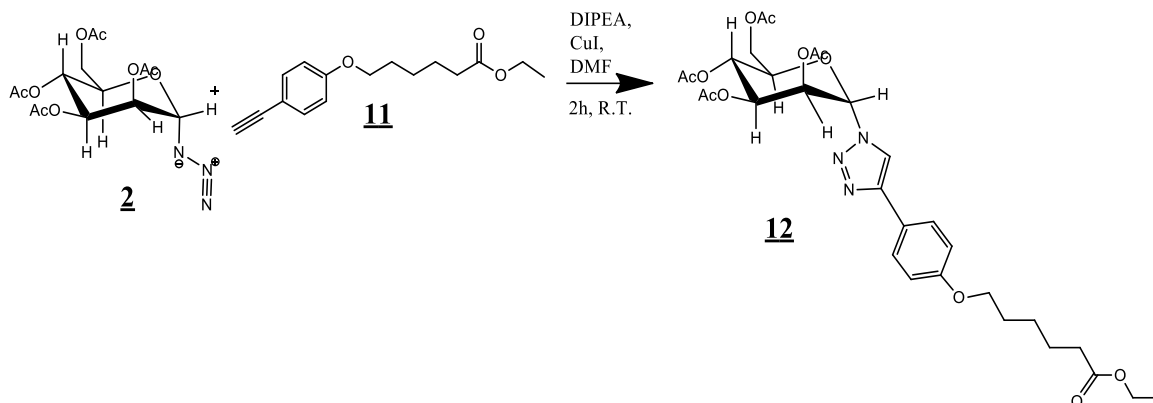
**IR (KBr)**  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3234, 2954, 2874, 1717, 1605, 1571, 1509, 1474, 1455, 1417, 1397, 1383, 1351, 1311, 1291, 1254, 1186, 1174, 1115, 1070, 1029, 1015, 1004, 941, 864, 837, 807, 719, 671, 643, 536, 514.

**MS (ESI+)** m/z = 143.1 (100 %), 261.2 ([MH<sup>+</sup>]).

**HRMS (ESI+):** m/z za C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>O<sub>3</sub> izračunano 261.149, izmerjeno 261.149.

**4.2.2.4 Huisgenova cikloadicija - sinteza (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-(acetoksimetil)-6-(4-(4-((6-etoksi-6-oksoheksil)oksi)fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetata (12)**

**REAKCIJA:**



**POSTOPEK:**

V 50 ml bučko smo zatehtali 0,400 g (1,548 mmol, 1 ekv) spojine **11** in 0,577 g (1,548 mmol, 1 ekv) spojine **2**. Obe smo raztopili v 15 ml brezvodnega DMF, nato smo dodali še 0,029 g (0,155 mmol, 0,1 ekv) CuI ter 0,269 ml (1,548 mmol, 1 ekv) DIPEA. Reakcijo smo pustili potekati 2 dni in po tem preverili potek slednje s TLC kromatogramom (MF: etilacetat/heksan = 1/1) iz katerega smo ugotovili, da je reakcija potekla, zato smo nadaljevali z izolacijo spojine **12**. Na vakuumski črpalki (30 min, 40 °C, 0 mbar) smo uparili DMF, preostanek RZ pa smo s pomočjo 100 ml etilacetata prenesli v lij ločnik ter sprali s 100 ml prečiščene vode. Sledilo je spiranje OF z 2 x 50 ml prečiščene vode, nato sušenje s 50 ml n.r. NaCl. OF smo še dodatno posušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ki smo ga nato odfiltrirali in preostali etilacetat uparili pod znižanih tlakom. Po uparevanju smo dobili 0,996 g produkta, ki smo ga očistili še s KK (MF: etilacetat/heksan = 1/1) in dobili 0,934 g čistega produkta **12**.

**PRODUKT:**

**Molekulska formula:** C<sub>30</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub>

**Rf:** 0,24 (MF: etilacetat/heksan = 1/1)

**Izgled:** rumeno olje

**Mr (izračunano):** 633,65

**Izkoristek:** 0,934 g ( $\eta$  = 95,22 %)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, COSY, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 1.18 (t, *J* = 7.10 Hz, 3H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.44 (m, 2H, Ar-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.60 (td, *J* = 15.0, 7.40 Hz, 2H, Ar-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.74 (m, 2H, Ar-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.01 (d, *J* = 4.3 Hz, 6H, C<sub>3</sub>-OCOCH<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>-OCOCH<sub>3</sub>), 2.05 (s, 3H, C<sub>6</sub>-OOCH<sub>3</sub>), 2.18 (s, 3H, C<sub>2</sub>-OCOCH<sub>3</sub>), 2.32 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COO), 3.85 (ddd, *J* = 9.5, 4.7, 2.5 Hz, 1H, H-5), 4.04 (m, 5H, COOCH<sub>2</sub>, Ar-O-CH<sub>2</sub>, H-6), 4.25 (dd, *J* = 12.6, 4.8 Hz, 1H, H-6), 5.28 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-4), 5.83 (dd, *J* = 9.3, 3.9 Hz, 1H, H-3), 5.87 (dd, *J* = 3.9, 2.1 Hz, 1H, H-2), 6.43 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-1), 7.03 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, Ar-H<sub>A</sub>), 7.83 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, Ar-H<sub>B</sub>), 8.70 (s, 1H, C<sub>2</sub>N<sub>3</sub>H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ = 14.1 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20.3, 20.4, 20.5, 20.5 (4 x OCOCH<sub>3</sub>) 24.2 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.0 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.3 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 33.4 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 59.6 (COOCH<sub>2</sub>), 61.4, 65.2, 68.5, 71.1, 79.1, 83.1 (6 x Man-C), 67.4 (Ar-OCH<sub>2</sub>), 2 x 114.8 (2 x Ar-C), 121.1 (Ar-C), 122.3 (N-CH=C), 2 x 126.8 (2 x Ar-C), 146.9 (N-CH=C), 158.7 (Ar-C-O), 169.4, 169.4, 169.4, 169.9 (4 x OCOCH<sub>3</sub>), 172.8 (COO) ppm.

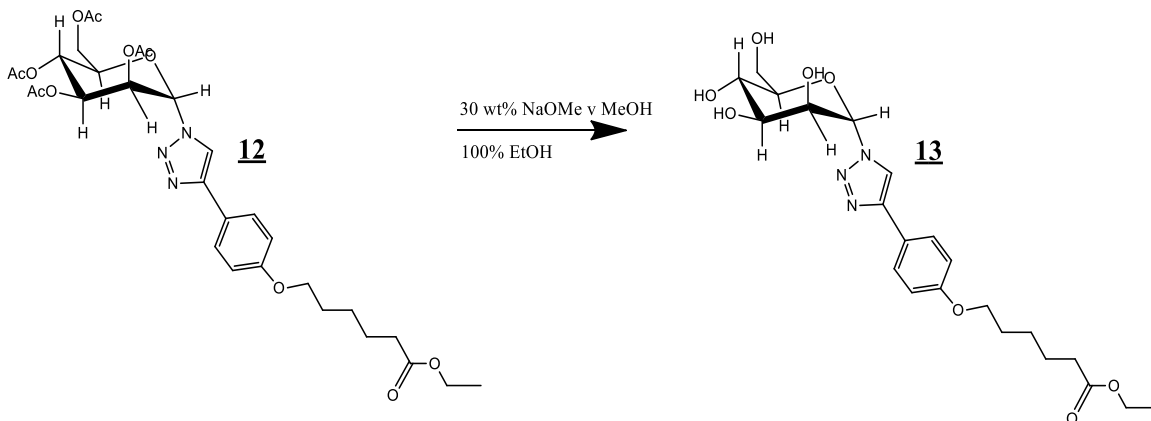
**IR (KBr)** ν [cm<sup>-1</sup>] = 1744, 1499, 1369, 1216, 1176, 1129, 1032, 985, 903, 838, 754, 600, 534.

**MS (ESI+):** *m/z* = 634.3 ([MH<sup>+</sup>], 100 %).

**HRMS (ESI+):** *m/z* za C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub> izračunano 634.261, izmerjeno 634.262.

**4.2.2.5 Zemplénova odščita - sinteza etil 6-(4-(1-((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)heksanoata (**13**)**

**REAKCIJA:**



**POSTOPEK:**

V 25 ml bučko, prepihano z argonom smo s pomočjo brezvodnega etanola in ultrazvočne kadičke prenesli spojino **12** (0,500 g, 0,789 mmol, 1 ekv). Ko se je slednja raztopila v brezvodnem etanolu smo dodali 14,8  $\mu$ L (0,0789 mmol, 0,1 ekv) 30 wt % NaOMe v MeOH. Reakcijo smo pustili potekati čez noč. Po dvanajstih urah smo preverili potek reakcije s TLC kromatogramom (MF: DKM/MeOH = 5/1) in nadaljevali z izolacijo. Ker je bila RZ motna, smo jo prefiltrirali skozi teflonski filter in oborino sprali z brezvodnim etanolom. Matičnici, ki smo jo zbirali v bučki smo pod znižanim tlakom odpareli topilo in v bučki dobili preostalo oborino. Po omenjenem postopku smo sintetizirali tudi spojini **19** in **25**.

**PRODUKT:**

**Molekulska formula:** C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>

Oborina matičnice: 0,047 g ( $\eta$  = 12,81 %)

**Izgled:** snežno bela oborina

**Rf:** 0,38 (MF: DKM/MeOH = 5/1)

**Izkoristek:**

**Mr (izračunano):** 465,50

Oborina: 0,193 g ( $\eta$  = 52,56 %)

**Tališče:** 169,8 – 172,0 °C

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, COSY, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$ = 1.18 (t, *J* = 7.11 Hz, 3H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.38-1.48 (m, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.60 (td, *J* = 15.02, 7.36 Hz, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.68-1.77 (m, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.32 (t, *J* = 7.35 Hz, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.38-3.49 (m, 1H, H-5), 3.61 (ddd, *J* = 18.90, 11.88, 7.76 Hz, 3H, H-4, H-6, H-6'), 3.87 (dd,

$J = 6.88, 3.24$  Hz, 1H, H-3), 3.92-4.13 (m, 4H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, Ar-OCH<sub>2</sub>), 4.44-4.48 (m, 1H, H-2), 4.59-5.49 (m, 4H, 4 x Man-OH), 5.92 (d,  $J = 4.25$  Hz, 1H, H-1), 7.01 (d,  $J = 8.85$  Hz, 2H, Ar-H<sub>A</sub>), 7.79 (d,  $J = 8.85$  Hz, 2H, Ar-H<sub>B</sub>), 8.61 (s, 1H, C<sub>2</sub>N<sub>3</sub>H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta = 14.1$  (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24.2 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.0 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.3 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 33.4 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 59.6 (COOCH<sub>2</sub>), 60.7, 67.6, 68.1, 71.2, 78.3, 85.8 (6 x Man-C), 67.3 (Ar-OCH<sub>2</sub>), 2 x 114.8 (2 x Ar-C), 120.0 (Ar-C), 122.9 (N-CH=C), 2 x 126.6 (2 x Ar-C), 146.2 (N-CH=C), 158.5 (Ar-C-O), 172.8 (COO) ppm.

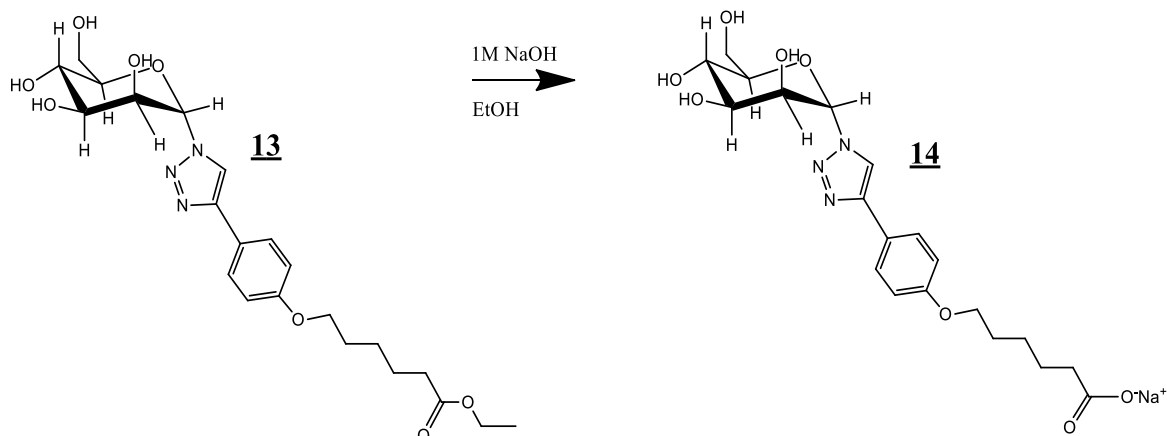
IR (KBr)  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3326, 3090, 2937, 2866, 1732, 1619, 1568, 1504, 1464, 1445, 1417, 1374, 1353, 1307, 1279, 1251, 1183, 1116, 1081, 1039, 992, 978, 963, 926, 878, 842, 820, 793, 728, 673, 559, 538.

MS (ESI +):  $m/z = 304.2$  (100 %), 466.2 ([MH<sup>+</sup>])

HRMS (ESI +):  $m/z$  za C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> izračunano 466.219, izmerjeno 466.218.

**4.2.2.6 Hidroliza etilnega estra - sinteza natrijevega 6-(4-(1-((2S,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahydro-2H-piran-2-il-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi) heksanoata (14)**

**REAKCIJA:**



**POSTOPEK:**

V 25 ml bučko smo zatehtali 0,096 g oborine in 0,047 g oborine matičnice spojine **13** (0,307 mmol, 1 ekv). Pri prenosu oborine iz matičnice smo si pomagali z etanolom. Slednjega smo dodajali, dokler ni RZ izgledala homogeno (vse skupaj smo dodali približno 10 ml etanola) in po tem dodali še 1,843 ml (1,843 mmol, 6 ekv) 1M NaOH. Reakcijo smo pustili potekati čez noč. Po 12ih urah smo preverili potek reakcije s TLC kromatogramom (MF: DKM/MeOH = 5/1). Reakcija je potekla, a se ni izoborilo dovolj spojine, zato smo bučko dali v hladilnik za 48h in nato RZ filtrirali skozi teflonski filter. Dobili smo 0,079 g trdne bele oborine spojine **14**.

**PRODUKT:**

**Molekulska formula:** C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>8</sub>

**Rf:** 0,14 (MF: DKM/MeOH = 5/1)

**Izgled:** bela oborina

**Mr (izračunano):** 459,43

**Izkoristek:**

**Tališče:** 254,1 – 256,2 °C

Oborina: 0,079 g ( $\eta = 55,97\%$ )

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, COSY, D<sub>2</sub>O)  $\delta = 1.20 - 1.35$  (m, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.42-1.52 (m, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.56-1.66 (m, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.07 (t,  $J = 7.48$  Hz, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.19-3.25 (m, 1H, H-5), 3.64-3.77 (m, 3H, H-4, H-6, H-6'), 3.87 (t,  $J = 6.66$  Hz, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>), 4.05 (dd,  $J = 9.20, 3.54$  Hz, 1H, H-3), 4.46 (m, 1H, H-

$\underline{2}$ ), 5.95 (d,  $J = 2.01$  Hz, 1H,  $\underline{H-1}$ ), 6.85 (d,  $J = 8.80$  Hz, 2H, Ar- $\underline{H_A}$ ), 7.52 (d,  $J = 8.80$  Hz, 2H, Ar- $\underline{H_B}$ ), 8.17 (s, 1H,  $\underline{C_2N_3H}$ ) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $D_2O$ )  $\delta = 25.1$  (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> $\underline{C}H_2$ ), 25.6 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> $\underline{C}H_2$ ), 28.1 (Ar-OCH<sub>2</sub> $\underline{C}H_2$ ), 37.5 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> $\underline{C}H_2$ ), 60.4, 68.3, 68.5, 70.5, 75.9, 86.7 (6 x Man- $\underline{C}$ ), 66.4 (Ar-O $\underline{C}H_2$ ), 2 x 115.1 (2 x Ar- $\underline{C}$ ), 120.7 (Ar- $\underline{C}$ ), 122.0 (N- $\underline{C}H=C$ ), 2 x 126.9 (2 x Ar- $\underline{C}$ ), 147.5 (N- $\underline{C}H=C$ ), 158.5 (Ar- $\underline{C}-O$ ), 183.8 ( $\underline{C}OO^-$ ) ppm.

IR (KBr)  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3257, 2943, 2865, 1617, 1552, 1499, 1466, 1391, 1339, 1303, 1281, 1251, 1177, 1111, 1085, 1069, 1042, 974, 931, 892, 833, 801, 731, 679, 644, 530.

HRMS (ESI +):  $m/z = 276.1$  (100 %), 438.2 ( $[MH^+]$ ).

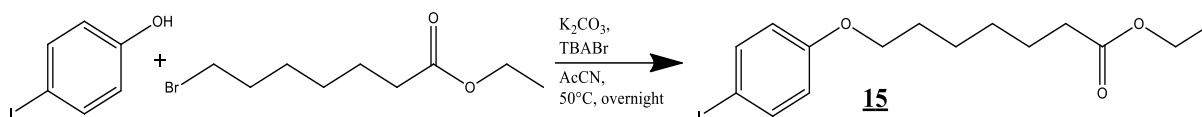
HRMS (ESI +):  $m/z$  za  $C_{20}H_{28}N_3O_8$  ( $[MH^+]$ ) izračunano 438.188, izmerjeno 438.187.



## 4.2.3 Sinteza spojine s 6 C distančnikom

### 4.2.3.1 Williamsonova sinteza etra - sinteza etil 6-(4-jodofenoksi) heptanoata (**15**)

#### REAKCIJA:



#### POSTOPEK:

V 100 ml bučko smo zatehtali 1,760 g (8,000 mmol, 1 ekv) 4-jodofenola in 4,423 g (32,000 mmol, 4 ekv)  $K_2CO_3$ . Raztopili smo ju v 60 ml acetonitrila in dodali 0,7737 g (2,400 mmol, 0,3 ekv) TBABr. Na koncu smo v RZ z avtomatsko pipeto odmerili 1,714 ml (8,800 mmol, 1,1 ekv) etil 7-bromoheptanoata. Reakcijo smo pustili potekati čez noč na povratnem hladilniku in oljni kopeli pri  $50^\circ C$ . Po dvajsetih urah smo preverili potek reakcije s TLC kromatogramom (MF: etilacetat/heksan = 1/3) in nadaljevali z izolacijo. RZ smo najprej prefiltrirali skozi vato, da smo se znebili trdnega  $K_2CO_3$  in nato pod znižanim tlakom uparili acetonitril. Preostanek RZ smo s pomočjo 50 ml etilacetata prenesli v lij ločnik, kjer smo spirali OF z 3 x 25 ml 0,1 M HCl, 2 x 25 ml prečiščene vode in 1 x 25 ml n.r. NaCl. Preostanek OF smo sušili pod  $Na_2SO_4$  in nato odpareli etilacetat pod znižanim tlakom. Ker je NMR spekter pokazal, da je spojina nečista, zaradi še vedno prisotnega etil 7-bromoheptanoata, smo slednjega uparili s pomočjo črpalke (2h,  $85^\circ C$ , 0 mbar) in tako dobili 2,830 g čiste spojine **15**.

#### PRODUKT:

**Molekulska formula:**  $C_{15}H_{21}IO_3$

**Rf:** 0,56 (MF: etilacetat/heksan = 1/3)

**Izgled:** rumeno olje

**Mr (izračunano):** 376,23

**Izkoristek:** 2,830 g ( $\eta = 94,02\%$ )

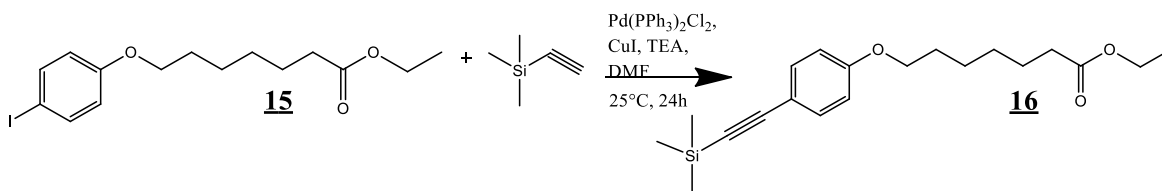
$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta = 1.27$  (t,  $J = 7.14$  Hz, 3H,  $COOCH_2CH_3$ ), 1.35-1.44 (m, 2H,  $ArOCH_2CH_2CH_2CH_2$ ), 1.44-1.53 (m, 2H,  $ArOCH_2CH_2CH_2$ ), 1.67 (td,  $J = 15.01, 7.41$ , Hz, 2H,  $ArOCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$ ), 1.78 (tt,  $J = 11.69, 5.94$  Hz, 2H,  $ArOCH_2CH_2$ ), 2.32 (t,  $J = 7.50$  Hz, 2H,  $CH_2COO$ ), 3.92 (t,  $J = 6.47$  Hz, 2H,  $ArOCH_2$ ), 4.14 (q,  $J = 7.14$ , Hz, 2H,  $COOCH_2$ ), 6.68 (d,  $J = 9.03$  Hz, 2H, Ar- $H_A$ ), 7.55 (d,  $J = 9.03$  Hz, 2H, Ar- $H_B$ ) ppm.

**Ostale analize:** (24)

#### 4.2.3.2 Sonogashira sklopitev - sinteza etil 7-(4-((trimetilsilil)etnil)fenoksi

##### heptanoata (**16**)

##### REAKCIJA:



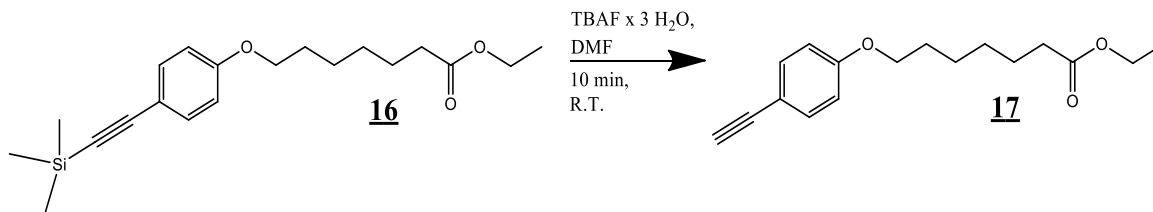
##### POSTOPEK:

V z argonom prepihano 50 ml bučko smo s pomočjo 15 ml brezvodnega DMF prenesli spojino **15** (2,830 g, 7,522 mmol, 1 ekv) in v RZ dodali 10 ml trietilamina ter oba trdna katalizatorja – 0,105 g (0,150 mmol, 0,02 ekv) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in 0,049 g (0,451 mmol, 0,06 ekv) CuI. Ko je bila RZ homogena smo s teflonsko brizgo v inerten sistem dodali še 1,276 ml (9,026 mmol, 1,2 ekv) trimetilsilil acetilena. Po 24ih urah smo preverili potek reakcije s TLC kromatogramom (MF: etilacetat/heksan = 1/3) in nato nadaljevali z izolacijo. Najprej smo s črpalko pod znižanim tlakom (0 mbar, 2h, 40 °C) uparili brezvodni DMF in trietilamin in preostanek v bučki s pomočjo 150 ml etilacetata in 100 ml prečiščene vode prenesli v lij ločnik. Organsko fazo smo spirali s 4 x 50 ml prečiščene vode, 2 x 50 ml 1M HCl, ponovno z 2 x 50 ml prečiščene vode in na koncu še 1 x z 50 ml n.r. NaCl. OF smo dodatno posušili pod Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in preostanek topila uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 3,082 g surovega produkta **16**, s katerim nadaljujemo odščito sililne skupine.

### 4.2.3.3 Odščita sililne zaščitne skupine - sinteza etil 7-(4-etinilfenoksi)heptanoata

(17)

#### REAKCIJA:



#### POSTOPEK:

V bučko, v kateri smo imeli spojino **16** (3,082 g, 8,894 mmol, 1 ekv) smo dodali 30 ml brezvodnega DMF in dodali 1,403 g (4,447 mmol, 0,5 ekv) TBAF x 3H<sub>2</sub>O. Počakali smo 10 minut in preverili potek reakcije s TLC kromatogramom (MF: etilacetat/heksan = 1/3). Reakcija je potekla, zato smo najprej uparili brezvodni DMF (30 min, 40 °C, 0 mbar) in nato nadaljevali z izolacijo. Preostalo RZ smo s pomočjo 150 ml kloroforma in 100 ml prečiščene vode prenesli v lij ločnik. OF smo spirali z 4 x 50 ml prečiščene vode in nato še 1 x z 75 ml n.r. NaCl. Preostanek OF smo nato sušili pod Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in preostanek topila uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 3,7 g nečiste spojine **17**, ki smo jo očistili s KK (MF: kloroform/etilacetat/heksan = 1/2/16). Dobili smo 0,634 g čiste frakcije spojine **17**.

#### PRODUKT:

**Molekulska formula:** C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>

**Izgled:** rumeno-rjava oborina

**Izkoristek:** 0,634 g ( $\eta$  = 30,72 %)

**Rf:** 0,31 (MF: kloroform/etilacetat/heksan = 1/2/16)

**Mr (izračunano):** 274,36

**Tališče:** 43,8 – 45,1 °C

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 1.27 (t,  $J$  = 7.14 Hz, 3H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.36-1.45 (m, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.45-1.55 (m, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.62-1.73 (m, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.80 (qd,  $J$  = 12.91, 6.53 Hz, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.33 (t,  $J$  = 7.49 Hz, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.01 (s, 1H, CH<sub>2</sub>=C-Ar), 3.97 (t,  $J$  = 6.47 Hz, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>), 4.15 (q,  $J$  = 7.14, Hz, 2H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.84 (d,  $J$  = 8.90 Hz, 2H, Ar-H<sub>A</sub>), 7.43 (d,  $J$  = 8.90 Hz, 2H, Ar-H<sub>B</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 14.3 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24.9 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.7 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.8 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.9 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 34.3 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 60.2 (COOCH<sub>2</sub>), 67.9 (Ar-OCH<sub>2</sub>), 75.7 (CH≡C-Ar), 83.8 (CH≡C-Ar), 113.9 (Ar-C), 2 x 114.4 (2 x Ar-C), 2 x 133.6 (2 x Ar-C), 159.5 (Ar-C-O), 173.8 (COO) ppm.

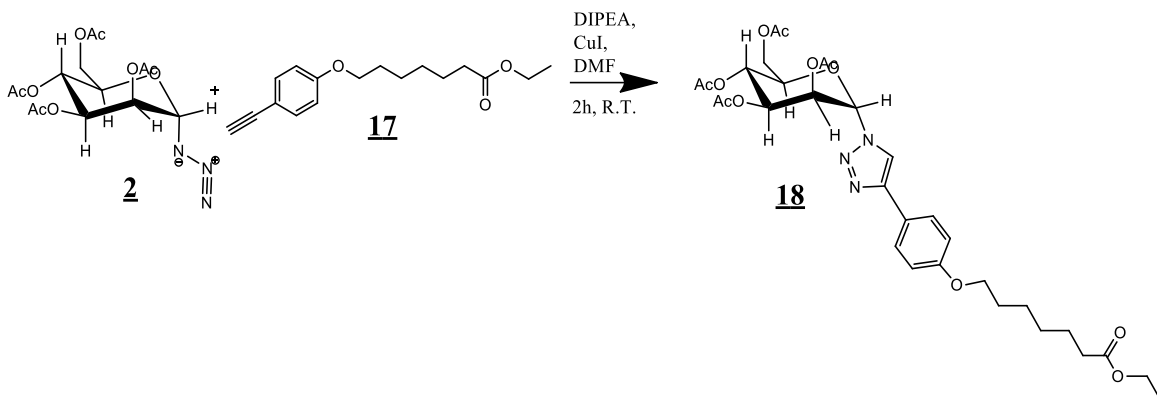
**IR (KBr)** ν [cm<sup>-1</sup>] = 3241, 2940, 2871, 1715, 1608, 1509, 1471, 1452, 1422, 1396, 1384, 1336, 1285, 1256, 1229, 1190, 1170, 1111, 1061, 1043, 1031, 1014, 998, 939, 889, 867, 839, 817, 802, 733, 718, 676, 642, 588, 533.

**HRMS (ESI +):** m/z = 275.2 ([MH<sup>+</sup>]).

**HRMS (ESI +):** m/z za C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>O<sub>3</sub> ([MH<sup>+</sup>]) izračunano 275.165, izmerjeno 275.164.

**4.2.3.4 Huisgenova cikloadicija - sinteza (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-(acetoksimetil)-6-(4-(4-((7-etoksi-7-oksoheptil)oksi)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetata (**18**)**

**REAKCIJA:**



**POSTOPEK:**

V 50 ml bučko prepihano z argonom, smo zatehtali 0,680 g (1,822 mmol, 1 ekv) spojine **2** in 0,500 g (1,822 mmol, 1 ekv) spojine **17** ter ju raztopili v brezvodnem DMF, nato smo s stekleno brizgo dodali 0,317 ml (1,822 mmol, 1 ekv) DIPEA in 0,035 g (0,182 mmol, 0,1 ekv) trdnega CuI. Reakcija je potekala 3 dni, zatem smo potek slednje preverili s TLC kromatogramom in nato nadaljevali z izolacijo. Uparili smo brezvodni DMF (30min, 40 °C, 0 mbar) in preostalo RZ s pomočjo 100 ml etilacetata in 100 ml prečiščene vode prenesli v lij ločnik. OF smo spirali z 2 x 50 ml prečiščene vode in z 1 x 50 ml n.r. NaCl. Na koncu smo OF še sušili pod Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Spojino **18** smo naknadno očistili s KK (MF: etilacetat/heksan = 1/1) in tako smo dobili 0,989 g čistih frakcije.

**PRODUKT:**

**Molekulska formula:** C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub>

**Rf:** 0,19 (MF: etilacetat/heksan = 1/1)

**Izgled:** rumeno olje

**Mr (izračunano):** 647,68

**Izkoristek:** 0,989 g ( $\eta$  = 83,81 %)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, COSY, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 1.19 (t, *J* = 7.14, 3H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.27-1.38 (m, 2H, Ar-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.43 (ddd, *J* = 11.62, 8.92, 7.02 Hz, 2H, Ar-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.60 (td, *J* = 15.08, 7.45 Hz, 2H, Ar-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.69-1.78 (m, 2H, Ar-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.97-2.05 (m, 9H, 3 x Man-OCOCH<sub>3</sub>), 2.13 (s, 3H, Man-OCOCH<sub>3</sub>), 2.25 (t, *J* = 7.49 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COO), 3.84-3.89 (m, 1H, H-5), 3.92 (dd, *J* = 8.28, 4.66 Hz, 2H, Ar-O-CH<sub>2</sub>), 4.01 (dd, *J* = 12.52, 2.57 Hz, 1H, H-6), 4.06 (q, *J* = 7.14, Hz, 2H, COOCH<sub>2</sub>), 4.31 (dd, *J* = 12.52, 5.34 Hz, 1H, H-6), 5.32 (t, *J* = 8.89 Hz, 1H, H-4), 5.91 (dd, *J* = 8.66, 3.74 Hz, 1H, H-3), 5.93-5.95 (m, 1H, H-2), 5.98 (d, *J* = 2.50 Hz, 1H, H-1), 6.89 (d, *J* = 8.84 Hz, 2H, Ar-H<sub>A</sub>), 7.70 (d, *J* = 8.84 Hz, 2H, Ar-H<sub>B</sub>), 7.80 (s, 1H, C<sub>2</sub>N<sub>3</sub>H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ = 14.3 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20.6, 20.7, 20.8, 24.9 (4 x OCOCH<sub>3</sub>) 25.8 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.9 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29.1 (ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 34.3 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 59.6 (COOCH<sub>2</sub>), 61.4, 65.2, 68.5, 71.1, 79.1, 83.1 (6 x Man-C), 67.4 (Ar-OCH<sub>2</sub>), 2 x 114.8 (2 x Ar-C), 121.1 (Ar-C), 122.3 (N-CH=C), 2 x 126.8 (2 x Ar-C), 146.9 (N-CH=C), 158.7 (Ar-C-O), 169.4, 169.4, 169.4, 169.9 (4 x OCOCH<sub>3</sub>), 172.8 (COO) ppm.

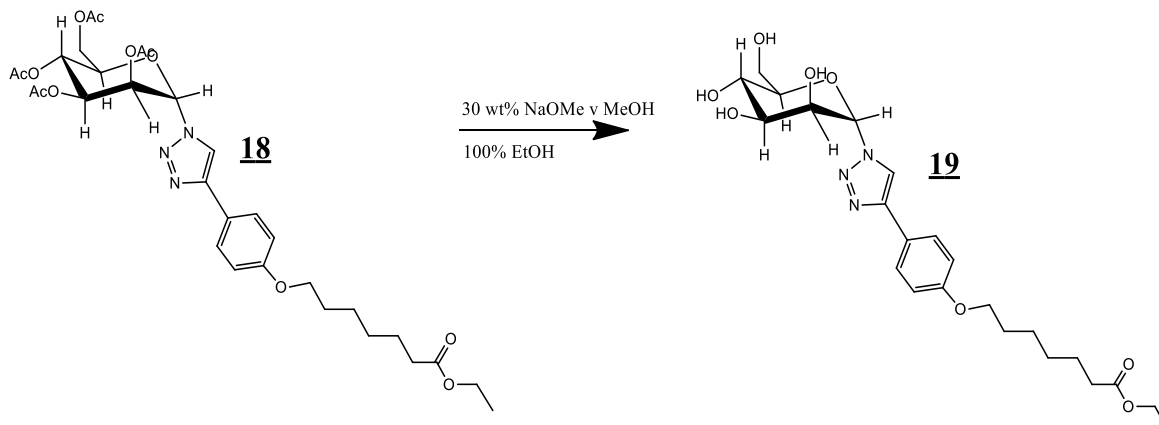
**IR (KBr)** ν [cm<sup>-1</sup>] = 2941, 1744, 1617, 1563, 1499, 1438, 1368, 1215, 1177, 1129, 1032, 986, 938, 904, 838, 772, 653, 600, 536.

**HRMS (ESI +):** *m/z* = 648.3 ([MH<sup>+</sup>]).

**HRMS (ESI +):** *m/z* za C<sub>31</sub>H<sub>42</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub> ([MH<sup>+</sup>]) izračunano 648.277, izmerjeno 648.277.

**4.2.3.5 Zemplénova odščita - sinteza (2R,3R,4S,5S,6S)-2-(acetoksimetil)-6-(4-(4-((7-etoksi-7-oksoheptil)oksi)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil triacetata (**18**)**

**REAKCIJA:**



**POSTOPEK:**

V 50 ml bučko, prepihano z argonom smo zatehtali 0,840 g (1,396 mmol, 1 ekv) spojine **18**, jo raztopili v 25 ml absolutnega etanola in z brizgo dodali 26,34  $\mu$ L (0,139 mmol, 0,1 ekv) 30 wt % NaOMe v MeOH. Izolacijo smo opravili po že omenjenemu postopku 4.2.2.5. Oborino smo dodatno posušili s črpalko (2h, 0 mbar) in dobili 0,456 g spojine **19**.

**PRODUKT:**

**Molekulska formula:** C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>

**Rf:** 0,32 (MF: DKM/MeOH = 5/1)

**Izgled:** bela oborina

**Mr (izračunano):** 479,53

**Izkoristek:** 0,456 g ( $\eta$  = 68,16 %)

**Tališče:** 180,1 – 184,9 °C

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, COSY, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  = 1.17 (t, *J* = 7.11 Hz, 3H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.29-1.38 (m, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.42 (td, *J* = 8.78, 6.86 Hz, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.50-1.60 (m, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.67-1.76 (m, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.29 (t, *J* = 7.35 Hz, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.36-3.41 (m, 1H, H-5), 3.61 (td, *J* = 17.35, 11.31, 11.31 Hz, 3H, H-4, H-6, H-6'), 3.84-3.89 (m, 1H, H-3), 3.94-4.09 (m, 4H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, Ar-OCH<sub>2</sub>), 4.46 (t, *J* = 3.48 Hz, 1H, H-2), 4.62 (s, 1H, ManC<sub>6</sub>-OH), 5.03 (s, 1H, ManC<sub>4</sub>-OH), 5.09 (s, 1H, ManC<sub>3</sub>-OH), 5.31 (s, 1H, ManC<sub>2</sub>-OH), 5.92 (d, *J* = 4.26 Hz, 1H, H-1), 7.01 (d, *J* = 8.85 Hz, 2H, Ar-H<sub>A</sub>), 7.79 (d, *J* = 8.85 Hz, 2H, Ar-H<sub>B</sub>), 8.60 (s, 1H, C<sub>2</sub>N<sub>3</sub>H) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, *DMSO-d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 14.1 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24.4 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.2 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.2 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.5 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 33.4 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 59.6 (COOCH<sub>2</sub>), 60.7, 67.6, 68.1, 71.2, 78.3, 85.8 (6 x Man-C), 67.3 (Ar-OCH<sub>2</sub>), 2 x 114.8 (2 x Ar-C), 120.0 (Ar-C), 122.9 (N-CH=C), 2 x 126.6 (2 x Ar-C), 146.3 (N-CH=C), 158.5 (Ar-C-O), 172.9 (COO) ppm.

IR (KBr)  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3409, 2938, 1717, 1499, 1468, 1423, 1382, 1357, 1300, 1283, 1249, 1225, 1190, 1177, 1118, 1093, 1072, 1034, 1018, 990, 974, 924, 874, 848, 833, 813, 792, 675, 632, 584, 531.

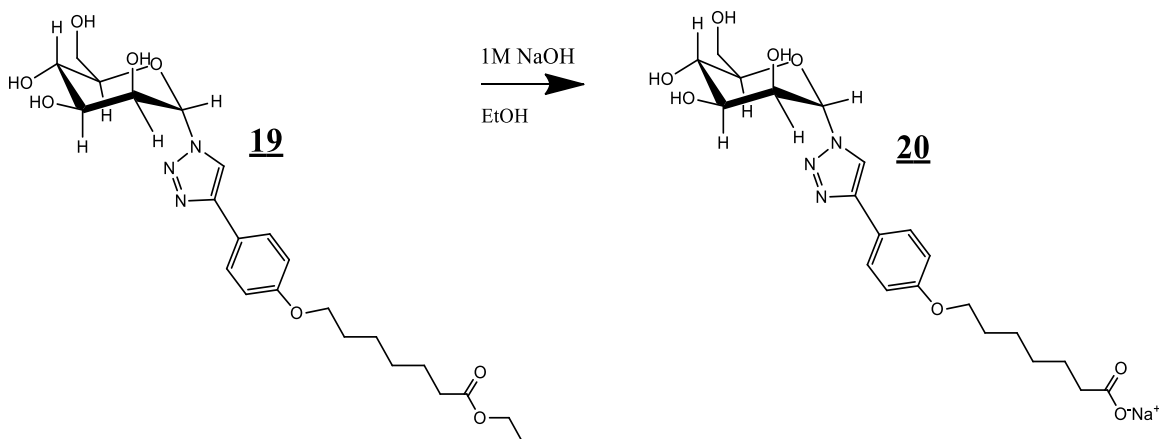
HRMS (ESI +):  $m/z$  = 480.2 ([MH<sup>+</sup>]).

HRMS (ESI +):  $m/z$  za C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> ([MH<sup>+</sup>]) izračunano 480.235, izmerjeno 480.234.



**4.2.3.6 Hidroliza etilnega estra - sinteza etil 7-(4-(1-((2S,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)heptanoata (20)**

**REAKCIJA:**



**POSTOPEK:**

V 50 ml bučko smo zatehtali 0,311 g (0,649 mmol, 1 ekv) spojine **19** in jo raztopili v 30 ml etanola. Z avtomatsko pipeto smo dodali 3,891 ml (3,891 mmol, 6 ekv) 1M NaOH. Reakcijo smo pustili potekati čez noč. Po 12 urah smo preverili potek reakcije s TLC kromatogramom (MF: DKM/MeOH = 5/1), ki je pokazal, da je naša RZ v obliki soli, saj ne potuje na kromatogramu. Nadaljevali smo s filtracijo in dobili 0,264 g oborine spojine **20**.

**PRODUKT:**

**Molekulska formula:** C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>8</sub>

**Rf:** 0,0 (MF: DKM/MeOH = 5/1)

**Izgled:** bela oborina

**Mr (izračunano):** 473,46

**Izkoristek:**

**Tališče:** 259,6 – 262,5 °C

Oborina: 0,264 g ( $\eta$  = 85,91 %)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, COSY, D<sub>2</sub>O)**  $\delta$  = 1.08-1.22 (m, 4H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.33-1.42 (m, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.43-1.52 (m, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.02 (t,  $J$  = 7.50 Hz, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.17-3.23 (m, 1H, H-5), 3.64-3.77 (m, 5H, Ar-OCH<sub>2</sub>, H-4, H-6, H-6'), 4.06 (dd,  $J$  = 9.25, 3.52 Hz, 1H, H-3), 4.64-4.67 (m, 1H, H-2), 5.92 (d,  $J$  = 1.71 Hz, 1H, H-1), 6.74 (d,  $J$  = 8.67 Hz, 2H, Ar-H<sub>A</sub>), 7.47 (d,  $J$  = 8.67 Hz, 2H, Ar-H<sub>B</sub>), 8.13 (s, 1H, C<sub>2</sub>N<sub>3</sub>H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ = 24.9 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.8 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.3 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.5 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 37.5 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 60.4, 68.3, 68.4, 70.4, 75.9, 86.8 (6 x Man-C), 66.3 (Ar-OCH<sub>2</sub>), 2 x 114.9 (2 x Ar-C), 120.6 (Ar-C), 121.9 (N-CH=C), 2 x 126.9 (2 x Ar-C), 147.4 (N-CH=C), 158.5 (Ar-C-O), 183.9 (COO<sup>-</sup>) ppm.

**IR (KBr)** ν [cm<sup>-1</sup>] = 3223, 2939, 2856, 1618, 1555, 1499, 1405, 1339, 1315, 1279, 1254, 1174, 1110, 1087, 1072, 1046, 1029, 975, 929, 893, 835, 818, 803, 730, 681, 647, 536, 507.

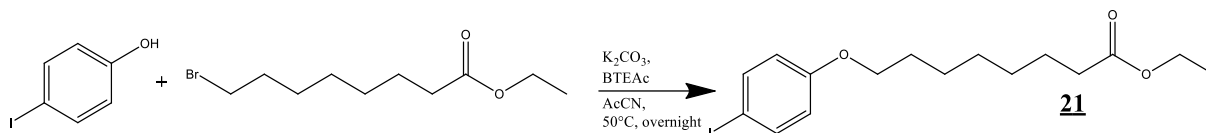
**HRMS (ESI -):** m/z = 450.2 ([MH<sup>-</sup>]).

**HRMS (ESI -):** m/z za C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> ([MH<sup>-</sup>]) izračunano 450.188, izmerjeno 450.188.

## 4.2.4 Sinteza spojine s 7 C distančnikom

### 4.2.4.1 Williamsonova sinteza etra - sinteza etil 8-(4-jodofenil)oktanoata (21)

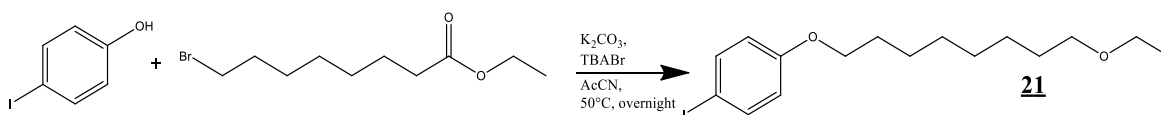
#### REAKCIJA 1 (BTEAc):



#### POSTOPEK:

V 100 ml bučko smo zatehtali 1,760 g (8,000 mmol, 1 ekv) 4-jodofenola in 4,423 g (32,000 mmol, 4 ekv)  $K_2CO_3$  in ju raztopili v 50 ml AcCN. RZ smo dali mešati na oljno kopel pri 50°C in nato z avtomatsko pipeto dodali še 1,604 ml (7,600 mmol, 0,95 ekv) etil 8-bromooktanoata in 0,547 g (2,400 mmol, 0,3 ekv) BTEAc. Reakcijo smo pustili potekati čez noč na oljni kopeli s povratnim hladilnikom. Po 12ih urah smo preverili potek z TLC kromatogramom (MF: etilacetat/heksan = 1/3) in nadaljevali z izolacijo. Najprej smo odfiltrirali oborino v RZ ( $K_2CO_3$ ) in nato pod znižanim tlakom uparili AcCN. S pomočjo 50 ml etilacetata smo RZ prenesli v lij ločnik kjer smo nadaljevali z ekstrakcijo. OF smo spirali s 3 x 25 ml 0,1M HCl, 2 x 25 ml prečiščene  $H_2O$  in 1 x z 25 ml n.r. NaCl. OF smo dodatno sušili pod  $Na_2SO_4$  in po filtraciji slednjega smo pod znižanim tlakom uparili preostanek etilacetata. Dobili smo 3,044 g produkta, katerega smo očistili s KK (MF: etilacetat/heksan = 1/3), s KK smo ločili dve frakciji, ki smo ju še dodatno očistili z uparivanjem etil 8-bromooktanoata na tlačni črpalki (2h, 85 °C, 0 mbar). Skupaj smo dobili 1,784 g čiste spojine 21.

#### REAKCIJA 2 (TBABr):



#### POSTOPEK:

V 100 ml bučko smo zatehtali 1,228 g (5,580 mmol, 1 ekv) 4-jodofenola in 3,086 g (22,330 mmol, 4 ekv)  $K_2CO_3$  ter ju raztopili v 40 ml AcCN. RZ smo dali mešati na oljno kopel pri 50° C in nato z avtomatsko pipeto dodali še 1,178 ml (5,580 mmol, 1 ekv) etil 8-bromooktanoata in 0,538 g (1,670 mmol, 0,3 ekv) TBABr. Reakcijo smo na oljni kopeli s

povratnim hladilnikom pustili mešati čez noč. Po 12ih urah smo s TLC kromatogramom (MF: etilacetat/heksan = 1/3) preverili potek reakcije in ugotovili, da je v RZ še vedno prisoten 4-jodofenol, zato smo v RZ dodali še 0,359 g (0,334 mmol, 0,2 ekv) TBABr in 0,236 g (1,116 mmol, 0,2 ekv) etil 8-bromooktanoata, po treh urah pa smo nadaljevali z izolacijo. Odfiltrirali smo oborino ( $K_2CO_3$ ), pod znižanim tlakom uparili AcCN, s pomočjo 50 ml etilacetata prenesli RZ v lij ločnik in nadaljevali z ekstrakcijo. OF smo spirali s 3 x 25 ml 0,1M HCl, 2 x 25 ml prečiščene  $H_2O$  ter 1 x 25 ml n.r. NaCl. OF smo še dodatno posušili pod  $Na_2SO_4$  in uparili preostanek topila pod znižanim tlakom. Dobili smo 2,600 g produkta, a je bilo iz TLC kromatograma razvidno, da je spojina nečista, zato smo jo najprej dali na tlačno črpalko (2h, 85 °C, 0 mbar), da smo se znebili etil 8-bromooktanoata in nato smo jo še dodatno očistili s KK (MF: aceton/toluen/heksan = 1/1/6). Dobili smo 1,843 g čiste spojine **21**.

#### PRODUKT:

**Molekulska formula:**  $C_{16}H_{23}IO_3$

**Rf:**

**Izgled:** snežno beli kristali

1. 0,29 (MF: etilacetat/heksan = 1/3)

**Izkoristek:**

2. 0,36 (MF: aceton/toluen/heksan =

1. 1,784 g ( $\eta = 57,14 \%$ )

1/1/6)

2. 1,843 g ( $\eta = 84,77 \%$ )

**Mr (izračunano):** 390,26

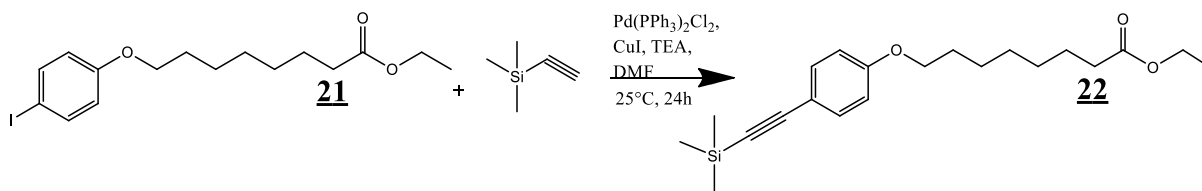
**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta = 1.27$  (t,  $J = 7.7$  Hz, 3H,  $COOCH_2CH_3$ ), 1.38 (tq,  $J = 6.60, 3.21$  Hz, 4H, Ar- $OCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$ ), 1.41-1.53 (m, 2H, Ar- $OCH_2CH_2CH_2$ ), 1.58-1.72 (m, 2H, Ar- $OCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH$ ), 1.78 (qd,  $J = 12.88, 6.55$  Hz, 2H, Ar- $OCH_2CH_2$ ), 2.31 (t,  $J = 7.52$  Hz, 2H, Ar- $OCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$ ), 3.92 (t,  $J = 6.52$  Hz, 2H, Ar- $OCH_2$ ), 4.14 (q,  $J = 7.14$  Hz, 2H,  $COOCH_2CH_3$ ), 6.68 (d,  $J = 9.03$  Hz, 2H, Ar- $H_A$ ), 7.55 (d,  $J = 9.03$  Hz, 2H, Ar- $H_B$  ppm).

**Ostale analize:** (24)

#### 4.2.4.2 Sonogashira sklopitev - sinteza etil 8-(4-((trimetilsilil)etnil)fenoksi

##### oktanoata (22)

##### REAKCIJA:

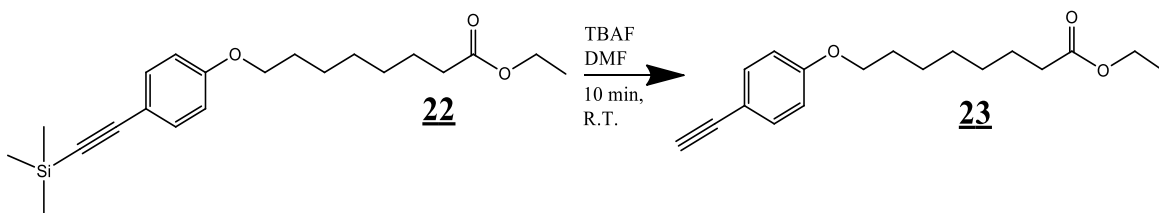


##### POSTOPEK:

V 100 ml bučko, preprihano z argonom, smo zatehtali 2,800 g (7,178 mmol, 1 ekv) spojine **21** ter jo raztopili v 25 ml brezvodnega DMF. V RZ smo dodali še 0,047 g (0,431 mmol, 0,06 ekv) CuI, 0,101 g (0,144 mmol, 0,02 ekv) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ter 10 ml brezvodnega trietilamina. Reakcijsko zmes smo mešali približno pol ure in nato smo v homogen sistem s teflonsko brizgo dodali 1,217 ml (8,614 mmol, 1,2 ekv) trimetilsilil acetilena. Reakcijo smo pustili potekati čez noč in po 12ih urah preverili potem s TLC kromatogramom (MF: etilacetat/heksan = 1/3), nadaljevali smo z izolacijo. Najprej smo trietilamin in brezvodni DMF odpareli s pomočjo tlačne črpalke z dušikovo pastjo (30 min, 40 °C, 0 mbar), preostanek smo s pomočjo 150 ml etilacetata in 100 ml prečiščene H<sub>2</sub>O prenesli v lij ločnik. OF smo spirali z 4 x 50 ml prečiščene H<sub>2</sub>O, 3 x 50 ml 1M HCl, 2 x 50 ml prečiščene H<sub>2</sub>O ter 1 x 50 ml n.r. NaCl. OF smo dodatno sušili pod Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in uparili etilacetat pod znižanim tlakom. Dobili smo 2,68 g produkta, s katerim smo nadaljevali odščitno zaščitne sililne skupine.

#### 4.2.4.3 Odščita sililne zaščitne skupine – sinteza etil 8-(4-etinilfenoksi)oktanoata (23)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK:

V bučko, kjer smo imeli spojine **22** (2,680 g, 7,433 mmol, 1 ekv) smo dodali 30 ml brezvodnega DMF in 1,173 g (3,712 mmol, 0,5 ekv) TBAF x 3 H<sub>2</sub>O. Po 10 minutah smo preverili potek reakcije s TLC kromatogramom (MF: etilacetat/heksan = 1/3) in nadaljevali z izolacijo. Najprej smo brezvodni DMF odpareli s pomočjo tlačne črpalke z dušikovo pastjo (30 min, 40 °C, 0 mbar) in preostanek v bučki prenesli v lij ločnik s pomočjo 150 ml kloroforma in 100 ml prečiščene H<sub>2</sub>O. OF smo spirali z 2 x 50 ml prečiščene H<sub>2</sub>O in 1 x 50 ml n.r. NaCl. OF smo dodatno sušili pod Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in uparili preostanek kloroforma pod znižanim tlakom. Ker produkt ni bil čist, smo ga očistili s KK (MF: kloroform/etilacetat/heksan = 1/2/16) in dobili 1,228 g čiste spojine **23**.

##### PRODUKT:

**Molekulska formula:** C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>

2. 0,53 (MF: etilacetat/heksan = 1/3)

**Izgled:** belo-rumeni kristali

**Mr (izračunano):** 288,38

**Izkoristek:** 1, 228 g ( $\eta = 59,43 \%$ )

**Tališče:** 38,4 – 39,7 °C

**Rf:**

1. 0,58 (MF: etilacetat/heksan = 1/3)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 1.30 (t,  $J = 7.14$  Hz, 3H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.44 (td,  $J = 15.72, 8.50, 5.32$ , Hz, 6H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.63-1.74 (m, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.76-1.86 (m, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.34 (t,  $J = 7.52$  Hz, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.05 (s, 1H, CH<sub>2</sub>=C-Ar), 3.98 (t,  $J = 6.52$  Hz, 2H, Ar-OCH<sub>2</sub>), 4.17 (q,  $J = 7.14$ , Hz, 2H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.86 (d,  $J = 8.90$  Hz, 2H, Ar-H<sub>A</sub>), 7.45 (d,  $J = 8.90$  Hz, 2H, Ar-H<sub>B</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 14.3 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24.9 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.8 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29.0 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>),

29.1 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 34.3 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 60.2 (COOCH<sub>2</sub>), 67.9 (Ar-OCH<sub>2</sub>), 75.8 (CH≡C-Ar), 83.7 (CH≡C-Ar), 113.9 (Ar-C), 2 x 114.4 (2 x Ar-C), 2 x 133.5 (2 x Ar-C), 159.5 (Ar-C-O), 173.8 (COO) ppm.

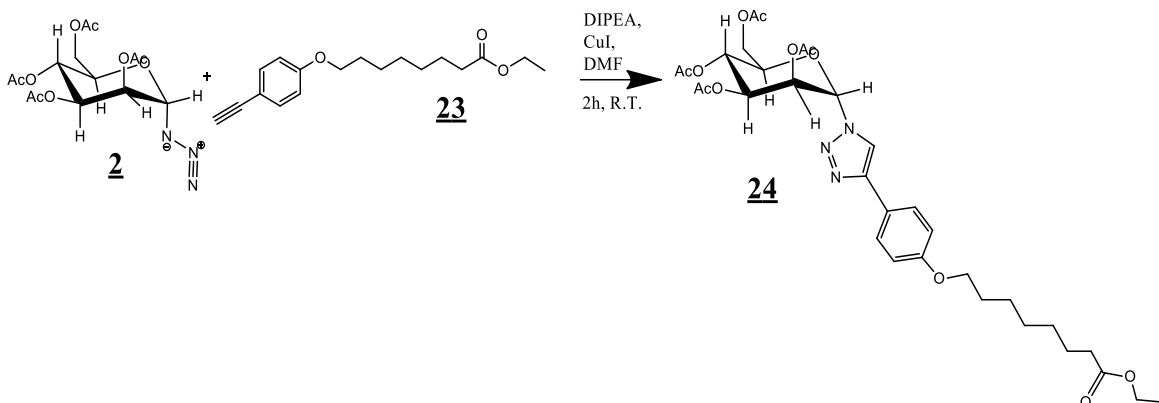
**IR (KBr)** ν [cm<sup>-1</sup>] = 3283, 2938, 2856, 1725, 1605, 1572, 1508, 1471, 1439, 1413, 1394, 1375, 1350, 1310, 1286, 1244, 1217, 1173, 1160, 1111, 1094, 1061, 1009, 991, 937, 917, 856, 837, 814, 773, 728, 708, 667, 653, 582, 538, 508.

**HRMS (ESI +):** m/z = 289.2 ([MH<sup>+</sup>]).

**HRMS (ESI +):** m/z za C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>O<sub>3</sub> ([MH<sup>+</sup>]) izračunano 289.180, izmerjeno 289.181.

#### 4.2.4.4 Huisgenova cikloadicija - sinteza (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-(acetoksimetil)-6-(4-(4-((8-etoksi-8-oksooktil)oksi)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetata (**24**)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK:

V 50 ml bučko, prepihano z argonom smo zatehtali 0,468 g (1,623 mmol, 1 ekv) spojine **23** in 0,606 g spojine (1,623 mmol, 1 ekv) **2** ter ju raztopili v brezvodnem DMF. V sistem smo dodali 0,031 g (0,162 mmol, 0,1 ekv) trdnega CuI ter 283  $\mu$ L (1,623 mmol, 1 ekv) DIPEA. Reakcijo smo pustili potekati čez noč, nato smo potek preverili s TLC kromatogramom (MF: etilacetat/heksan = 1/1) in nadaljevali z izolacijo. Najprej smo s tlačno črpalko uparili brezvodni DMF (30 min, 40 °C, 0 mbar) ter s pomočjo 150 ml etilacetata in 100 ml prečiščene H<sub>2</sub>O prenesli preostanek RZ v lij ločnik. OF smo spirali s 3 x 50 ml prečiščene H<sub>2</sub>O ter 1 x 50 ml n.r. NaCl. Naknadno smo OF sušili še pod Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in uparili preostanek topila pod znižanim tlakom. RZ smo očistili s KK (MF: etilacetat/heksan = 1/1) in dobili 0,896 g čiste spojine **24**.

##### PRODUKT:

**Molekulska formula:** C<sub>32</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub>

**Rf:** 0,3 (MF: etilacetat/heksan = 1/1)

**Izgled:** brezbarvno olje

**Mr (izračunano):** 661,71

**Izkoristek:** 0,896 g ( $\eta$  = 83,43 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, COSY, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.19 (t,  $J$  = 7.14 Hz, 3H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.26-1.37 (m, 4H, Ar-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.37-1.46 (m, 2H, Ar-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.53-1.63 (m, 2H, Ar-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.68-1.78 (m, 2H, Ar-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.97-2.05 (m, 9H,



3 x Man-OCOCH<sub>3</sub>, 2.09-2.15 (m, 3H, Man-OCOCH<sub>3</sub>), 2.23 (t,  $J = 7.52$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COO), 3.84-3.89 (m, 1H, H-5), 3.92 (t,  $J = 6.52$  Hz, 2H, Ar-O-CH<sub>2</sub>), 4.01 (dd,  $J = 12.51, 2.56$  Hz, 1H, H-6), 4.06 (q,  $J = 7.14$ , Hz, 2H, COOCH<sub>2</sub>), 4.31 (dd,  $J = 12.52, 5.36$  Hz, 1H, H-6), 5.32 (t,  $J = 8.82$  Hz, 1H, H-4), 5.93 (td,  $J = 8.49, 3.73$ , Hz, 2H, H-2 in H-3), 5.98 (d,  $J = 2.41$  Hz, 1H, H-1), 6.90 (d,  $J = 8.83$  Hz, 2H, Ar-H<sub>A</sub>), 7.70 (d,  $J = 8.83$  Hz, 2H, Ar-H<sub>B</sub>), 7.79 (s, 1H, C<sub>2</sub>N<sub>3</sub>H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 14.3$  (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20.6, 20.7, 20.7, 20.8 (4 x OCOCH<sub>3</sub>) 24.9 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.9 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2 x 29.0 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29.2 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 34.3 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 60.2 (COOCH<sub>2</sub>), 60.2, 61.6, 61.6, 66.1, 68.0, 83.6 (6 x Man-C), 68.8 (Ar-OCH<sub>2</sub>), 2 x 114.9 (2 x Ar-C), 118.8 (Ar-C), 122.1 (N-CH=C), 2 x 127.2 (2 x Ar-C), 148.3 (N-CH=C), 159.6 (Ar-C-O), 169.3, 169.7, 169.8, 170.5 (4 x OCOCH<sub>3</sub>), 173.9 (COO) ppm.

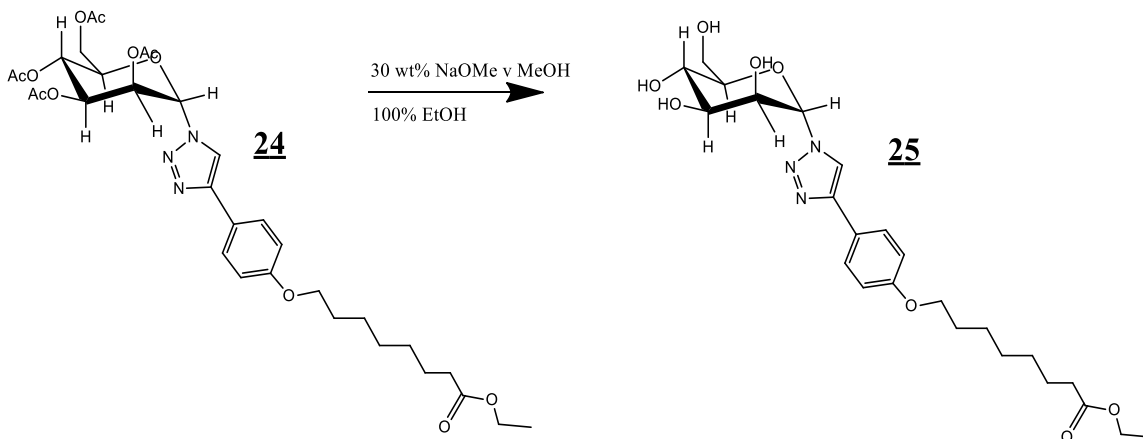
IR (KBr)  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 2938, 1744, 1617, 1563, 1499, 1438, 1368, 1216, 1177, 1129, 1032, 939, 904, 837, 772, 730, 690, 651, 598, 536.

MS (ESI +):  $m/z = 662.3$  ([MH<sup>+</sup>]).

HRMS (ESI +):  $m/z$  za C<sub>32</sub>H<sub>44</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub> izračunano 662.293, izmerjeno 662.293.

#### 4.2.4.5 Zemlénova odščita - sinteza etil 8-(4-(1-((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)oktanoata (25)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK:

Spojino **24** (0,750 g, 1,133 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 20 ml absolutnega etanola, pri tem smo si pomagali z ultrazvočno kadičko, bučko smo prepihali z argonom in dodali 21,3  $\mu$ L (0,113 mmol, 0,1 ekv) 30 wt % NaOMe v MeOH. Izolacijo smo opravili po že opisanem predpisu 4.2.2.5. RZ smo filtrirali skozi teflonski filter, a je bila zmes pregosta, zato smo poskusili z modrim papirnatim filtrom in nučo. Ker je bila slednja umazana smo morali produkt očistiti s KK (MF: DKM/MeOH = 5/1). Dobili smo 0,224 g čiste frakcije spojine **25**.

##### PRODUKT:

**Molekulska formula:** C<sub>24</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>

**Rf:** 0,38 (MF: DKM/MeOH = 5/1)

**Izgled:** bela oborina

**Mr (izračunano):** 493,55

**Izkoristek:** 0,224 g ( $\eta$  = 40,07 %)

**Tališče:** 146,2 – 148,9 °C

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, COSY, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  = 1.23 (t, *J* = 7.11 Hz, 3H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.29-1.53 (m, 6H, Ar-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.54-1.64 (m, 2H, Ar-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.73-1.83 (m, 2H, Ar-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.34 (t, *J* = 7.37 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COO), 3.46 (d, *J* = 2.86 Hz, 1H, H-5), 3.60-3.65 (m, 1H, H-4), 3.66 (d, *J* = 7.62 Hz, 1H, H-6), 3.71 (dd, *J* = 11.86, 2.81 Hz, 1H, H-6), 3.93 (dd, *J* = 6.87, 3.25 Hz, 1H, H-3), 4.05 (t, *J* = 6.50 Hz, 2H, Ar-O-CH<sub>2</sub>), 4.10 (q, *J* = 7.11, Hz, 2H, COOCH<sub>2</sub>), 4.50-4.54 (m,

1H, H-2), 4.94 (m, 4H, 4 x ManC-OH), 5.98 (d,  $J = 4.26$  Hz, 1H, H-1), 7.07 (d,  $J = 8.86$  Hz, 2H, Ar-H<sub>A</sub>), 7.85 (d,  $J = 8.86$  Hz, 2H, Ar-H<sub>B</sub>), 8.66 (s, 1H, C<sub>2</sub>N<sub>3</sub>H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 14.1 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24.4 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.3 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 27.1 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.4 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.6 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 33.4 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 59.6 (COOCH<sub>2</sub>), 60.7, 67.6, 68.0, 71.2, 78.3, 85.8 (6 x Man-C), 67.4 (Ar-OCH<sub>2</sub>), 2 x 114.8 (2 x Ar-C), 120.0 (Ar-C), 122.9 (N-CH=C), 2 x 126.6 (2 x Ar-C), 146.2 (N-CH=C), 158.5 (Ar-C-O), 172.9 (COO) ppm.

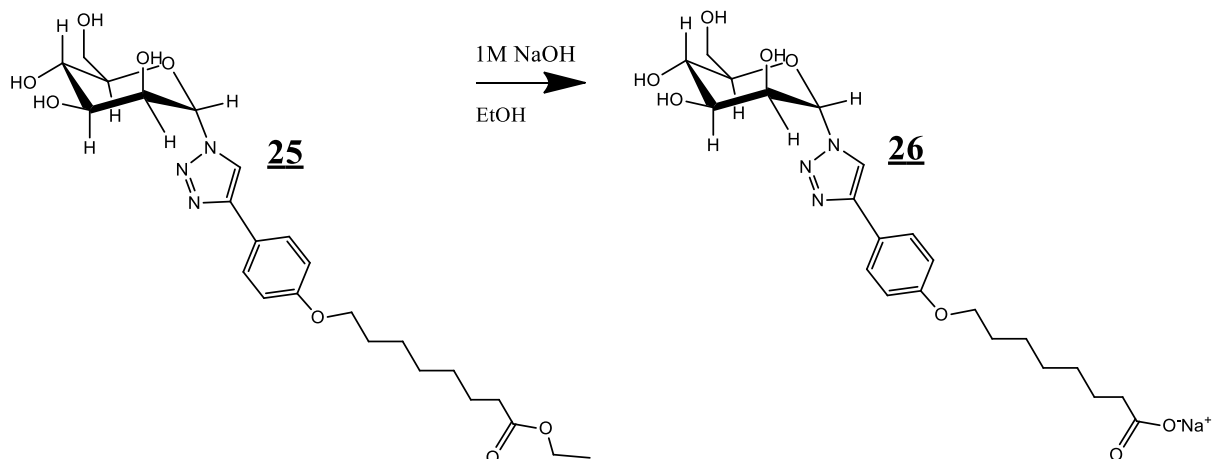
IR (KBr)  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3134, 2935, 2868, 1731, 1619, 1498, 1475, 1439, 1379, 1354, 1304, 1245, 1218, 1178, 1111, 1070, 1027, 976, 922, 891, 831, 801, 726, 678, 646, 534.

HRMS (ESI +):  $m/z = 493.3$  ([MH<sup>+</sup>]).

HRMS (ESI +):  $m/z$  za C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> ([MH<sup>+</sup>]) izračunano 494.250, izmerjeno 494.251.

**4.2.4.6 Hidroliza etilnega estra - sinteza natrijevega 8-(4-(1-((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)fenoksi)oktanoata (**26**)**

**REAKCIJA:**



**POSTOPEK:**

V bučko smo zatehtali 0,223 g (0,452 mmol, 1 ekv) spojine **25** in jo raztopili v 20 ml etanola. Z avtomatsko pipeto smo dodali 2,711 ml (2,711 mmol, 6 ekv) 1M NaOH in pustili reakcijo potekati tri dni, potek smo preverili s TLC kromatogramom (MF: DKM/MeOH = 5/1) in nadaljevali z izolacijo. RZ smo prefiltrirali skozi teflonski filter in po uparivanju na znižanem tlaku smo dobili 0,203 g uparjene oborine iz matičnice in 0,153 g oborine. Posneli smo IR spekter in ugotovili, da v matičnici ni le naša spojina, zato smo kot čisto spojino uporabili le oborino.

**PRODUKT:**

**Molekulska formula:** C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>8</sub>

**Rf:** 0,0 (MF: DKM/MeOH = 5/1)

**Izgled:** bela oborina

**Mr (izračunano):** 473,46

**Izkoristek:** 0,153 g ( $\eta$  = 69,44 %)

**Tališče:** nad 340 °C

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, COSY, D<sub>2</sub>O)**  $\delta$  = 1.17 (d,  $J$  = 14.17 Hz, 6H, Ar-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.34-1.45 (m, 2H, Ar-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.52 (dd,  $J$  = 13.17, 6.41 Hz, 2H, Ar-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.02 (t,  $J$  = 7.45 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COO), 3.19-3.25 (m, 1H, H-5), 3.65-3.83 (m, 5H, Ar-OCH<sub>2</sub>, H-4, H-6, H-6'), 4.06 (dd,  $J$  = 9.20, 3.78 Hz, 1H, H-3),

4.68 (m, 1H, H-2), 5.96 (d,  $J = 1.61$  Hz, 1H, H-1), 6.83 (d,  $J = 8.24$  Hz, 2H, Ar-H<sub>A</sub>), 7.55 (d,  $J = 8.14$  Hz, 2H, Ar-H<sub>B</sub>), 8.20 (s, 1H, C<sub>2</sub>N<sub>3</sub>H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta = 25.0$  (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.8 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2 x 28.3 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.6 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 37.6 (Ar-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 60.4, 68.3, 68.6, 70.5, 76.0, 86.8 (6 x Man-C), 66.4 (Ar-OCH<sub>2</sub>), 2 x 115.1 (2 x Ar-C), 120.7 (Ar-C), 122.0 (N-CH=C), 2 x 127.1 (2 x Ar-C), 147.5 (N-CH=C), 158.6 (Ar-C-O), 184.1 (COO<sup>-</sup>) ppm.

IR (KBr)  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3240, 2937, 2857, 1618, 1556, 1499, 1439, 1404, 1341, 1307, 1253, 1177, 1110, 1071, 1044, 1027, 975, 928, 892, 836, 802, 725, 680, 646, 534.

HRMS (ESI +):  $m/z = 466.2$  ([MH<sup>+</sup>]).

HRMS (ESI +):  $m/z$  za C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> ([MH<sup>+</sup>]) izračunano 466.219, izmerjeno 466.218.

### 4.3 Molekulsko sidranje

Kot vhodno informacijo za virtualno molekulsko sidranje smo uporabili 3D strukturo tarče - vezavnega mesta FimH iz RCSB Protein Data Bank (25). Da je iskanje obrodilo več uporabnih zadetkov, smo iskali strukturo s čim boljšo ločljivostjo, pridobljeno z rentgensko kristalografijo. Za sidranje smo uporabili kristalno strukturo 3MYC, kompleks lektinske domene receptorja FimH z bifenilnim manozidom, ki ima na meta poziciji metilni ester. Pred sidranjem smo 3D strukturo CRD-ja obdelali in določili vezavno mesto, kamor se vežejo potencialni antagonisti.

Potencialne antagoniste FimH smo načrtovali tako, da lahko tvorijo dodatne ionske in/ali vodikove interakcije z gvanidinom Arg 98. Te naj bi še dodatno okrepile vezavo načrtovanih spojin v CRD, poleg že znanih interakcij z aminokislinskimi ostanki Tyr 48 in Tyr 137 tirozinskih vrat ter interakcij manoze z manoznim vezavnim žepom. Strukture potencialnih antagonistov FimH smo pred sidranjem energijsko minimizirali s programom Chem3D programskega paketa ChemBioOffice.

Molekulsko sidranje smo izvajali z računalniškim programom LeadIT Flexx. Program je napovedal konformacijo, orientacijo in položaj potencialnih testiranih antagonistov v vezavnem mestu. Slike, kot rezultate sidranja smo obdelali v programu Pymol. Orientacijo in konformacijo liganda, ki je imel najboljšo vrednost cenilne funkcije, smo pregledali in ocenili ustreznost načrtovanih ligandov.

## 5 Rezultati in razprava

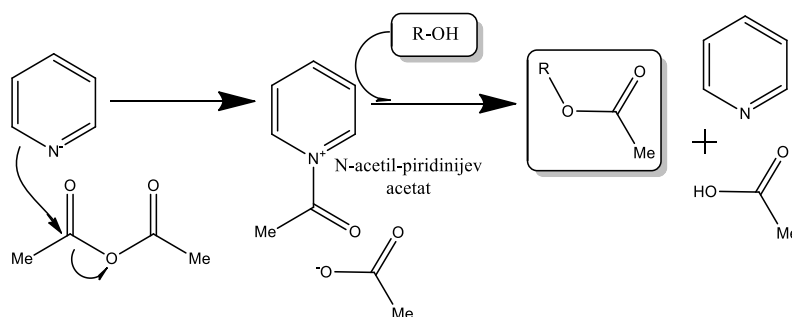
### 5.1 Eksperimentalno delo

Pri eksperimentalnem delu v laboratoriju smo se soočili z mnogimi izzivi. Večino reakcij je bilo potrebno modificirati in odkriti najboljšo kombinacijo pogojev, da je bil izkoristek čim boljši. Predvsem zaradi velikega števila sinteznih stopenj, je bilo pomembno, da reakcije potečejo z dobrimi izkoristki, saj smo tako privarčevali z reagenti in časom pri začetnih sinteznih stopnjah. Zaradi prevelike obsežnosti in preglednosti magistrskega dela vseh poskusnih reakcij nismo zapisali, jih bomo pa omenili pri razpravi eksperimentalnega dela.

#### 5.1.1 Sinteza monosaharidnega jedra

##### 5.1.1.1 Zaščita manoznih OH skupin (sinteza spojine **1**)

V kemiji ogljikovih hidratov pogosto uporabljamo acetilne zaščitne skupine. Te so večinoma prvi korak v seriji sledečih reakcij, da zaščitijo reaktivne OH skupine. Če delamo z bolj občutljivimi monosaharidi dodamo RZ piridin, ki z acetanhidridom tvori N-acetilpiridinijev acetat. In situ tvorjena kvarтерна piridinijeva sol deluje kot močno acetilirno sredstvo pri čemer se piridin regenerira kot dobra izstopajoča skupina (slika 13), zato je piridin pri reakciji acetiliranja topilo in katalizator hkrati (9).

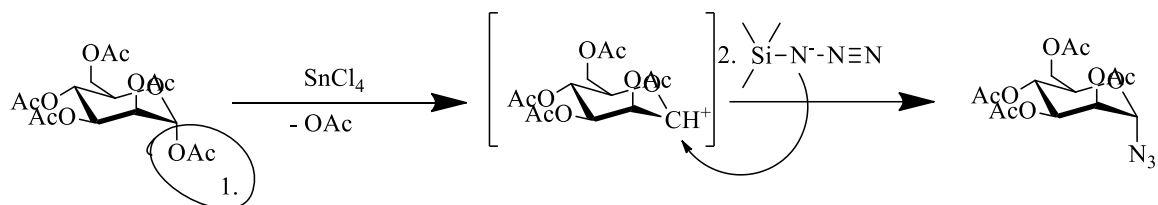


Slika 13: Acetilacija alkoholov z acetanhidridom in piridinom.

Za izvajanje reakcije **4.1.1** smo bučko dodatno posušili, da smo izgnali morebitno prisotno vlago. Brezvodne pogoje med potekom reakcije smo zagotavljali z argonovo atmosfero. Spojine **1** nismo dodatno očistili s KKR saj stranski produkti in morebitni vhodni reaktanti ne motijo pri nadaljni tvorbi azida na anomernem ogljiku. Tako je navidezni izkoristek

reakcije kar 107,83%, pri čemer smo se zavedali, da je to najverjetneje posledica zaostalega piridina.

### 5.1.1.2 Tvorba azida na anomernem ogljiku zaščitene manoze (sinteza spojine 2)



Slika 14: Mehanizem tvorbe azida na anomernem ogljiku manoze.

Pri tvorbi azida na anomernem ogljiku acetilirane manoze poteče reakcija nukleofilne substitucije po  $S_N1$  mehanizmu. Ta se od  $S_N2$  mehanizma razlikuje v tem, da je v tem primeru hitrost reakcije pogojena z odcepom izstopajoče skupine (-OAc) in šele nato pride do napada nukleofila ( $N_3$ ).  $SnCl_4$  je Lewisova kislina, ki aktivira sicer slabo reaktivne peracetilirane monosaharide in tako tvori oksokarbenijev kation po odcepu ene acetilne skupine z anomernega C-atoma. TMS- $N_3$  je donor azidne skupine in predstavlja v reakciji nukleofil (26, 27). Trimetilsililna skupina se odcepi od molekule produkta ob stiku z vodo in tako dobimo peracetilirano manozo z azidno skupino na anomernem C-atomu.

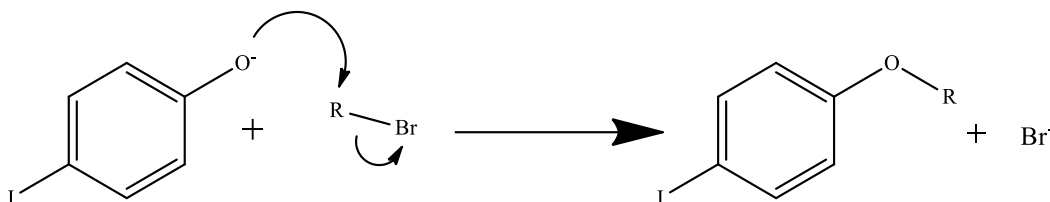
Reakcijo smo izvajali pri sobni temperaturi 24h, v brezvodnem  $CH_2Cl_2$  in v argonovi atmosferi. Pomembno je, da reakcija poteka v brezvodnem mediju in da iz bučke izženemo vodo, saj ob njeni prisotnosti pride do hidrolize TMS- $N_3$ , ta pa privede do hidrazojske kisline, ki je veliko bolj eksplozivna in nevarna za delo. Nizek izkoristek reakcije (42,37%) je najverjetneje posledica izgub pri ekstrakciji ter v neustreznih pogojih hranjenih reagentov. Poleg tega pri reakciji lahko nastaja neželen produkt z  $\beta$ -konfiguracijo na anomernem centru.



## 5.1.2 Sinteza aglikona

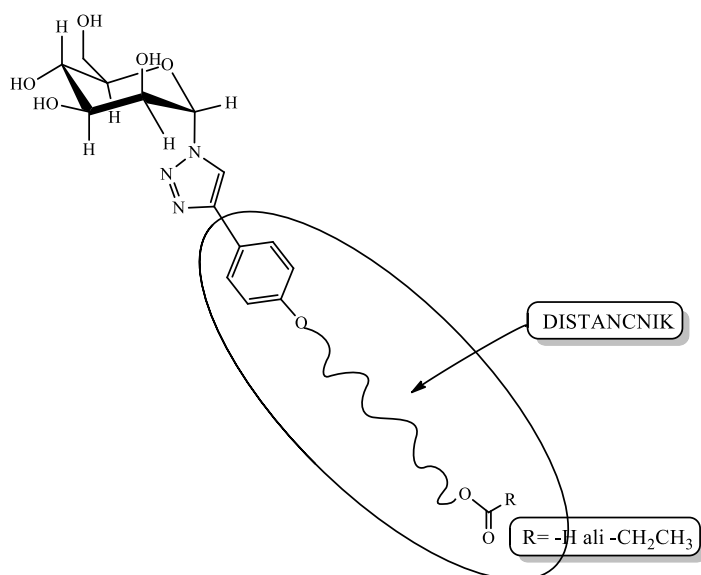
### 5.1.2.1 Williamsonova sinteza etrov (sinteza spojin **3**, **9**, **15** in **21**)

Bistvo Williamsove sinteze je nastanek etra iz organskega halida in alkohola. Običajno gre za reakcijo med alkoksidnim ionom in primarnim halidom - poteče po S<sub>N</sub>2 mehanizmu.



Slika 15: Mehanizem Williamsonove sinteze etrov.

Z Williamsovo sintezo etrov smo tvorili distančnik/alkilni rep med fenoksi skupino in etilnim estrom oz. kislino, na koncu alkilne verige.



Slika 16: Tvorili smo distančnike dolge štiri, pet, šest in sedem C atomov.

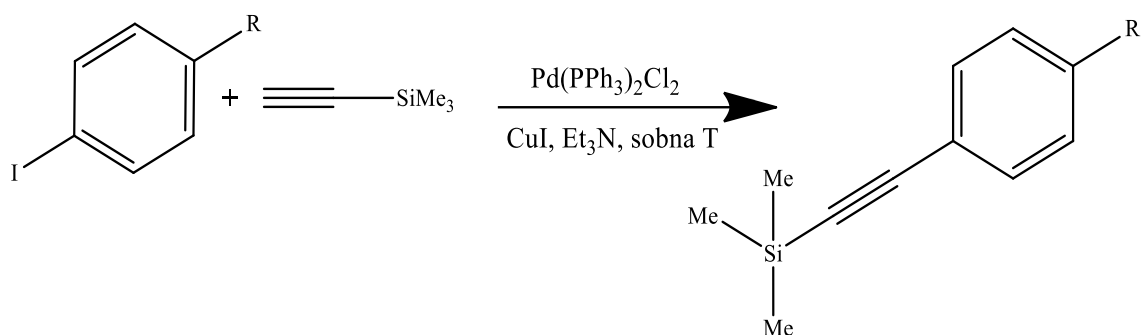
Reakcijo smo izvajali s povratnim hladilnikom pri 50 °C na oljni kopeli. Kot medij smo uporabili AcCN, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pa smo v RZ dodali, da odcepi vodikov proton iz OH skupine. Ker je slednji praktično netopen v organskem topilu, za ustrezen potek reakcije potrebujemo katalizator faznega prehoda (TBABr in BTEAc), ki omogoči lažjo solubilizacijo anorganskih anionov v organskem mediju, ti pa so baze in omogočijo odcepitev protona. Reakcija je v glavnini potekala z dobrim ~ cca. 70 % izkoristkom.

Po poteku reakcije smo se soočili s problemom, kako se znebiti prebitnih vhodnih reagentov. Najprej smo reakcije izvajali s prebitkom alkilbromidov (~ 1,05 – 1,10 ekv) in ugotovili, da s KKR, kljub uporabi različnih MF, nikakor ne moremo ločiti alkilbromida in končnega produkta reakcije. Ugotovitve so vodile do sklepa, da damo v RZ prebitek 4-jodofenola (~ 1,50 ekv), kar se ni izkazalo kot uspešno. 4-jodofenola se s KKR zopet nismo mogli znebiti in je v RZ poleg produkta motil potek naslednjih sinteznih stopenj. Po pregledu vrelišč uporabljenih alkilbromidov in spojin **3**, **9**, **15** in **21** v literaturi, smo se odločili, da v RZ dodamo prebitek alkilbromidov (1,20 ekv) saj je njihovo vrelišče pri 5mbar ~ 100–150 °C, kar je še vedno vsaj 200 °C nižje od pripadajočih produktov. Po poteku reakcije smo se prebitka alkilbromidov znebili s pomočjo hibridne vakuumske črpalke TRIVAC D88 z dušikovo pastjo in rotavaporjem z vodno kopeljo pri 85 °C. RZ smo pustili uparevati približno 2 uri na ~ 0 mbar in po tem posneli NMR vzorca produkta, ki je pokazal, da je naš produkt čist.

#### 5.1.2.2 Sonogashira sklopitev in odščita Si(Me)<sub>3</sub> skupine

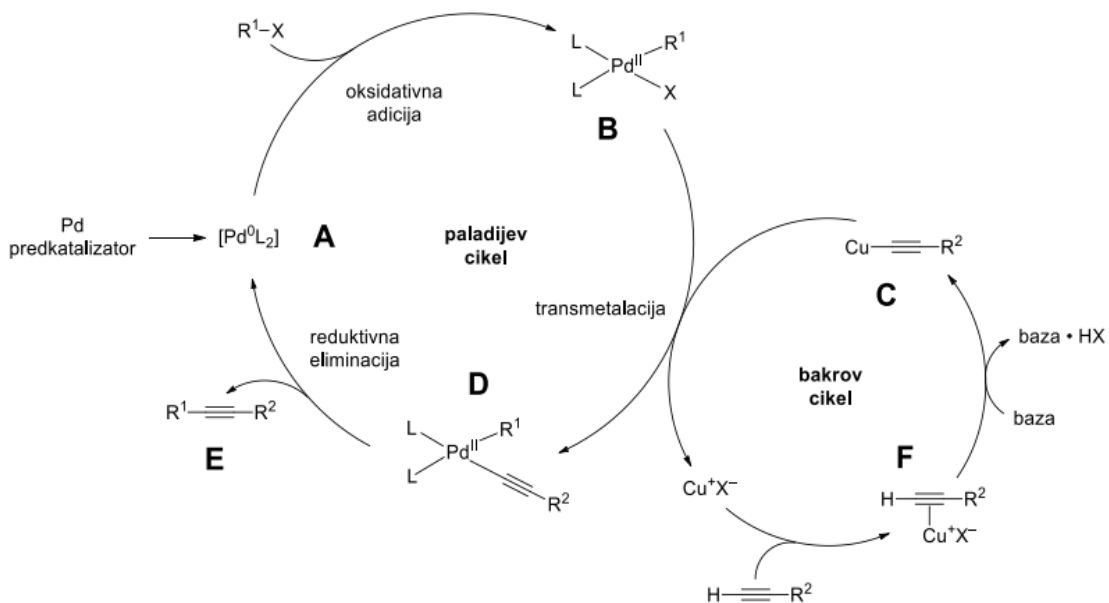
(sinteza spojin **5**, **11**, **17** in **23**)

Sonogashira sklopitev (*ang. Sonogashira coupling*) je heterogena reakcija med terminalnim alkinom in arilnimi oz. vinilnimi halidi. Zahteva blažje pogoje od njenih predhodnic. Kot katalizatorja smo uporabljali paladijev kompleks in bakrov (I) jodid. Prav slednja povečata reaktivnost reagentov pri sobni T, pri kateri reakcijo izvajamo. Kot medij uporabimo aminsko bazo, npr. trietilamin.



Slika 17: Sonogashira reakcija.

S Sonogashira reakcijo smo namesto joda na aromatskem obroču tvorili alkin.

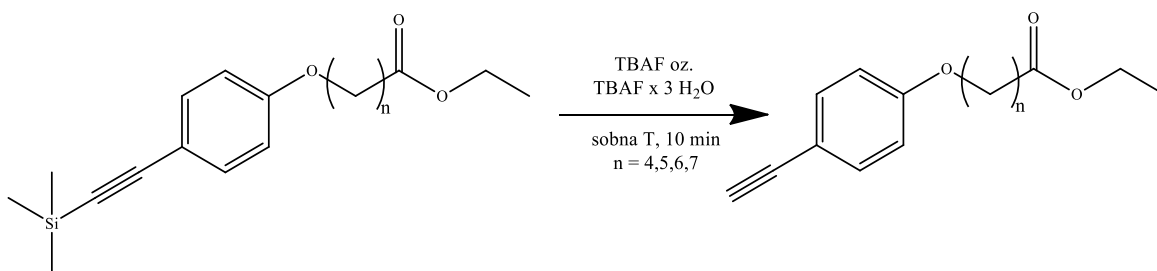


Slika 18: Mehanizem Sonogashira reakcije. Povzeto po (28)

Mehanizem reakcije razložimo s potekom po dveh neodvisnih ciklih - dobro raziskanem paladijevem ciklu in bakrovem, ki je manj raziskan. Katalitsko zvrst predstavlja kompleks [Pd<sup>0</sup>L<sub>2</sub>] **A**, ki je v RZ stabiliziran posamezno ali v kombinaciji ligandov, baze in topila. Časovno najbolj potraten in zahteven proces je oksidativna adicija, v katerem nastane paladijev (II) kompleks. V naslednji stopnji poteče transmetalacija z bakrovim (I) acetilidom **C** (tu se paladijev in bakrov cikel skleneta) do kompleksa **D**. Iz slednjega se po reduktivni eliminaciji sprostita regeneriran katalizator in produkt **E**.

Bakrov cikel je slabše preučen. V začetku pride do nastanka  $\pi$ -alkinskega bakrovega kompleksa **F**, kar poveča kislost terminalnega protona. Sledi deprotoniranje in nastanek bakrovega acetilida **C**, v kar je udeležena baza (28).

Sonogashira reakcija je bila z vidika modifikacij pogojev ter količine reagentov ena najbolj problematičnih pri našem eksperimentalnem delu. Prvotno smo po predpisu (29) naredili serijo poskusnih reakcij.



Slika 19: Spojine, ki smo jih delali s Sonogashira reakcijo in sledeča odščita zaščitne sililne skupine.

	1.	2.	3.	4.	5.
Distančnik	3 CH <sub>3</sub>	5 CH <sub>3</sub>	1 CH <sub>3</sub>	4 CH <sub>3</sub>	6 CH <sub>3</sub>
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0,01 ekv	0,02 ekv	0,02 ekv	0,02 ekv	0,02 ekv
CuI	0,03 ekv	0,06 ekv	0,06 ekv	0,06 ekv	0,06 ekv
Trietilamin	0,15 ekv	0,3 ekv	2 + 4 ekv	9 ekv	9 ekv
TMS acetilen	1,1 ekv	1,1 ekv	1,2 ekv	1,2 ekv	1,2 ekv
Topilo	brezvodni DMSO	brezvodni DMSO	brezvodni DMSO	brezvodni DMF	brezvodni DMF
Odščita	0,5 ekv TBAF	0,5 ekv TBAF	0,5 + 0,5 ekv TBAF	0,5 ekv TBAF	0,5 ekv TBAF
Izkoristek reakcije	19,56 %	2,32 %	39,90 %	31,22 %	/

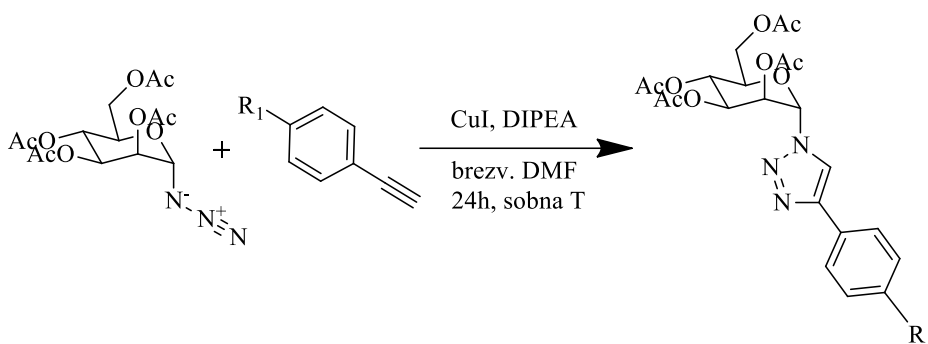
Tabela 2: Serija poskusnih reakcij z različnimi distančniki.

Predpis (29) po katerem smo delali je narekoval pogoje, uporabljene v **1.** reakciji. V te smo postopno uvajali modifikacije. Uporabljena trietilamin in DMF smo sušili nad molekularnimi siti z velikosti por 4 Å, brezvoden DMSO pa smo uporabili že pripravljen s strani proizvajalca. Zaradi slabega izkoristka prve reakcije, smo v drugem poskusu podvojili količino katalizatorjev in trietilamina. Slab izkoristek **2.** reakcije (pičla 2,32 %) smo pripisali izolaciji s pomočjo aktivnega oglja, ki smo ga po uporabi odfiltrirali in je najverjetneje na svojo površino vezalo tudi naš produkt. Pri pregledu ostale literature in sinteznih postopkov smo predvidevali, da bo večji dodatek trietilamina ugodno vplival na potek in izkoristek reakcije, saj so po mehanizmu bakrovega cikla v reakciji nujno potrebni bazični pogoji za uspešen potek reakcije. V **3.** reakciji smo tako uporabili kar 6 ekv trietilamina ( $T_v = 88,8\text{ }^\circ\text{C}$ ) in 1,2 ekv trimetilsilil acetilena ( $T_v = 53\text{ }^\circ\text{C}$ ). Prebitek obeh nikakor ni problematičen, saj smo se ju po poteku reakcije iz RZ znebili med uparivanjem topila. Veliko višji izkoristek smo pripisali večjemu dodatku trietilamina ter dvakrat večji količini dodanega TBAF, ki je bil verjetno že kontaminiran (po pregledu TLCja smo dodali še dodatnih 0,5 ekv). Kot smo pozneje (po **5.** reakciji) ugotovili, smo reagent za odščito (TBAF) kontaminirali s plastičnim

nastavkom elektronske pipete. Najverjetneje je prišlo do reakcije s plastizatorji, npr. s ftalati. Pri **4**. reakciji smo količino trietilamina še povečali in ga poskusili uporabiti kot topilo. Po petih minutah se je v bučki reakcijska zmes zgostila v gelu podobno strukturo, zato smo kot topilo dodali brezvodni DMF, ki je bolj hlapen od DMSO in smo se ga z uparjanjem pod znižanim tlakom lažje znebili pred ekstrakcijo. Za odščito smo uspešno uporabili 0,5 ekv TBAF. Izkoristek reakcije je bil 31,22 % in tako smo dobili spojino **5**. Za pridobitev spojin **11**, **16** in **21** uporabili enak sintezni postopek kot za spojino **5**, le da smo pri odščiti uporabili TBAF x 3 H<sub>2</sub>O, saj pri reakciji **5**. vidimo, da je TBAF že popolnoma neučinkovit in odščita ni potekla.

### 5.1.2.3 Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija oz. CuAAC reakcija (sinteza spojin **6**, **12**, **18** in **24**)

Huisgenova cikloadicija je ena izmed reakcij t.i. »click« kemije. Gre za reakcijo med dvema navidezno nereaktivnima skupinama – azido in alkinsko skupino.

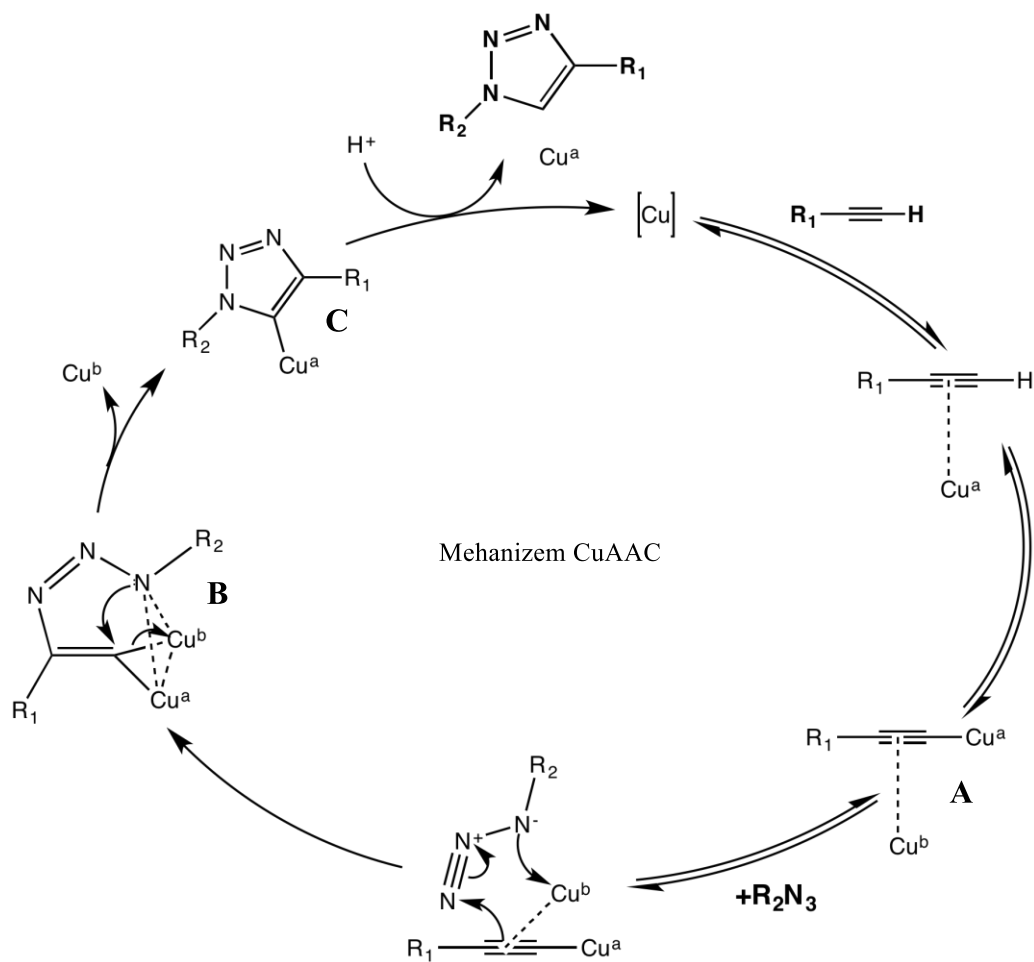


Slika 20: Potek Huisgenove 1,3- dipolarne cikloadicije.

Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija je v bistvu reakcija brez uporabe bakrovega katalizatorja. O uporabi slednjega so prvi pisali Medal, Folkin in Sharpless. Zato lahko rečemo, da ne gre več za »pravo« cikloadicijo temveč za t.i. CuCAA (*copper (I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition*) (30).

V predvidenem mehanizmu CuAAC reakcije sodelujeta minimalno dva bakrova atoma (slika 21). Strukturo Cu-acetilida **A** je težko predvidet zaradi veliko različnih interakcij. Metalacil **B** se zelo hitro tvori iz kompleksa **A** z vstopom azidne skupine v cikel. Temu sledi kontrakcija obroča in tvori se stabilnejši intermediat **C**, bakrov triazolid. Na koncu pride do regeneracije katalizatorja in izstopi produkt 1,2,3-triazol (30). Reakcija lahko vodi

v tvorbo dveh različnih regioizomerov (izmenjava substituentov  $R_1$  in  $R_2$ ), a smo jo načrtovali tako, da zaradi steričnih razlogov nastane predvsem želeni regioizomer.



Slika 21: Mehanizem CuAAC.

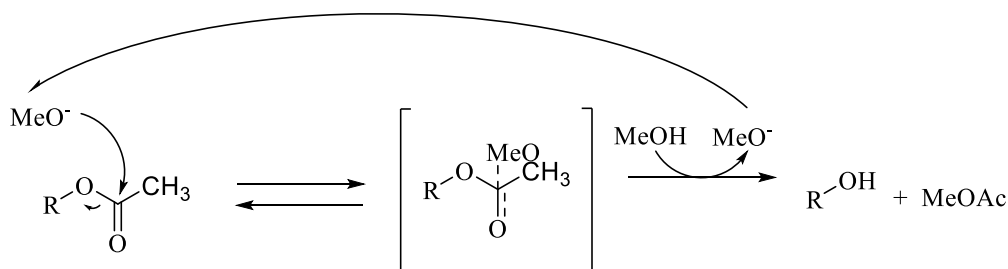
Reakcijo smo izvajali v argonovi atmosferi, v dobro posušeni bučki, saj lahko morebitno prisoten kisik oksidira Cu (I) in tako se zmanjša katalizatorska sposobnost le tega, reakcija poteka počasneje, izkoristki so slabši. Argonova inertna atmosfera hkrati prepreči tudi potek neželenih, stranskih reakcij. Uporabljeno topilo je bil brezvodni DMF, katalizator bakrov (I) jodid, baza pa DIPEA. Reakcija je potekala na sobni temperaturi, približno 24 ur in obrodila dobre izkoristke (vse od 78,14 pa do 95,20 %).

#### 5.1.2.4 Zemplénova odščita zaščitnih acetilnih skupin (sinteza spojin **7**, **13**, **19** in **25**)

Z Zemplénovo metodo smo s peracetilirane manoze odstranili acetilne zaščitne skupine. Gre za S<sub>N</sub>2 reakcijo. Pogoji za potek reakcije so relativno blagi. Izvajali smo jo pri sobni temperaturi, v brezvodnem topilu – etanolu in v argonovi atmosferi. Brezvodno okolje je pomembno predvsem zaradi možne hidrolize estra na koncu alkilne verige.

Reagent, ki poskrbi za odščito je NaOMe v MeOH. Tega smo dodali le katalitično količino (0,1 ekv), saj se OMe<sup>-</sup> v reakciji obnavlja. Brezvodni etanol smo uporabili zato, da ne bi na koncu alkilne verige prišlo do preestrenja, pri katerem bi dobili mešanico metilnih in etilnih estrov.

Slabost Zemplénove metode so Na<sup>+</sup> ioni, ki ostanejo v RZ. V primeru sinteze spojine **7** smo s pomočjo anionskega izmenjevalca Amberlite IR120 le te odstranili. Pri sintezi spojin **13**, **19** in **25** pa smo Na<sup>+</sup> ione pustili v RZ in tako so po hidrolizi estrov tvorili Na-soli.



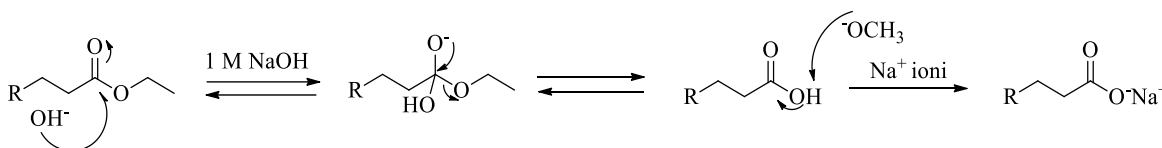
Slika 22: Mehanizem Zemplénove odščite.

MeO<sup>-</sup>, metoksidni anion je v reakciji nukleofil, ki napade karboksilni C-atom. Tako pride do preestrenja. Od produkta se odcepi MeOAc in tako se nukleofil regenerira.

Po poteku reakcije je RZ v bučki izgledala zelo zgoščeno, saj se je izoboril produkt. RZ smo filtrirali skozi teflonski filter, spirali z brezvodnim etanolom. Popolnoma raztopljeno matičnico smo macerirali z eno žličko aktiviranega Amberlite IR120. Reakcije so potekale z izkoristki od 40,07 do 68,18 %. Spojine na katerih smo delali odščito so bile čiste in pri reakciji smo zagotovili ustrezne pogoje. Možno je, da je pri sintezi spojine **7**, zaradi uporabe anionskega izmenjevalca prišlo do vezave spojine nanj in je tako izkoristek slabši. Do precejšnjih izgub je prišlo tudi pri filtraciji skozi teflonski filter, ki smo jo opravili pri sintezi vseh spojin (31, 32).

### 5.1.2.5 Hidroliza etilnega estra (sinteza spojin **8**, **14**, **20** in **26**)

Hidroliza etilnega estra je še ena od reakcij, ki potekajo po mehanizmu  $S_N2$ . Izvajali smo jo s 3-6 ekv 1M NaOH. Trdne oborine spojin **7**, **13**, **19** in **25** smo raztopili v 96% etanolu s pomočjo ultrazvočne kadičke in segrevanja. Dodali smo vodno raztopino 1M NaOH in pustili reakcijo potekati čez noč.



Slika 23: Mehanizem z bazo katalizirane hidrolize estra.

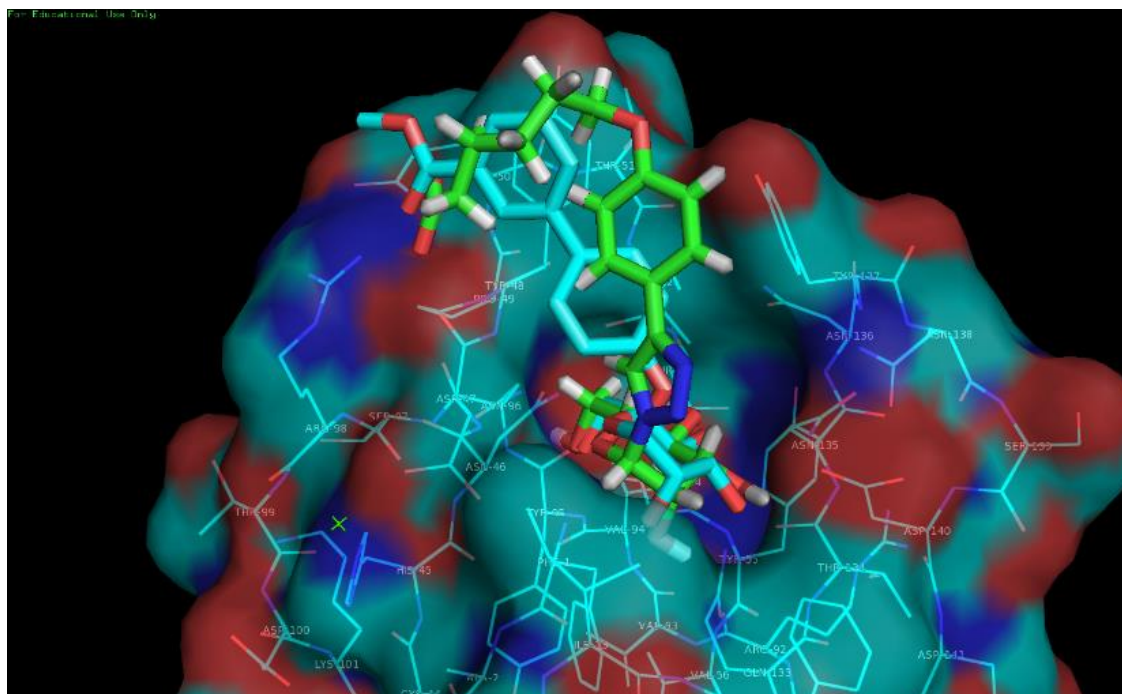
$\text{OH}^-$  predstavlja Nu in napade elektrofilni center, karbonilni C-atom. Pride do tvorbe intermediata. V drugem koraku intermediat razpade, alkoxid izstopi. Tako nastane karboksilna kislina. Slednjo ionizira  $\text{OCH}_3^-$ , ki je prej izstopil iz intermediata in z  $\text{Na}^+$  ioni iz RZ tvori sol (33).

V primeru spojine **8** smo tvorili kislino, v sintezi spojin **14**, **20** in **26** pa se  $\text{Na}^+$  ionov nismo znebili s pomočjo Amberlite IR120, saj smo predvideli, da bo topnost spojin v vodi v obliki soli veliko boljša. Izkoristki so zadovoljivi ~ 50-80 %. Nižje izkoristke smo dobili pri sintezi spojin **14**, **20** in **26**, saj smo v teh primerih uporabili le oborino prefiltrirane RZ, kjer so se nahajale  $\text{Na}^+$  soli produktov, kot smo potrdili z IR spektri. Matičnico smo zavrgli, saj je ta vsebovala zmes našega produkta in neznanih stranskih produktov. Višji izkoristek reakcije smo dobili pri sintezi spojine **8**, saj je tam poleg našega produkta v oborini prisoten še NaCl, ki občutno poveča maso.



## 5.2 Sidranje spojin v vezavno mesto FimH

Pri pregledu rezultatov virtualnega sidranja, smo ugotovili, da bo po predispozicijah najbolj optimalno vezana v vezavno mesto spojin **14**. Po dolžini distančnika ta najbolje sega do gvanidina Arg 98, ki je bil poleg sidranja v manozni žep skozi tirozinska vrata dodatna tarča naših spojin. Kljub temu pa rezultati sidranja vseh končnih spojin kažejo, da ne pride do interakcij z aminokislinskimi ostanki tirozinskih vrat, saj so spojine predolge in se zasukajo okoli. V vseh primerih kisline vzpostavijo dodatne vodikove vezi z gvanidinom Arg 98 in zato predvidevamo, da bodo imele večjo afiniteto do vezavnega mesta od pripadajočih estrov. Kot referenčno spojino v vezavnem mestu smo uporabili 3MCY.



Slika 24: Sidranje spojine **14** v vezavno mesto FimH. Z zeleno barvo je označena spojina **14**, z modro pa referenčna spojina 3MCY.

## 6 Zaključek

V sklopu magistrske naloge smo uspešno sintetizirali potencialne N-glikozidne glikomimetične antagoniste FimH receptorja. Sintetizirane končne spojine smo poslali na testiranje na Institute of Molecular Pharmacy, University of Basel, a rezultatov žal še nismo prejeli. Kljub temu se nadejamo, da bodo izkazali afiniteto do vezavnega mesta v nanomolarnem območju.

V sklopu eksperimentalnega dela smo sintetizirali 8 končnih spojin, potencialnih FimH antagonistov. Po pregledu rezultatov virtualnega rešetanja smo zaključili, da bo po naših predpostavkah najvišjo afiniteto do vezavnega mesta FimH izkazovala spojina **14**, ki ima distančnik dolg 5 metilenskih skupin in je v obliki karboksilata. Po dolžini distančnika najbolj optimalno cilja gvanidin aminokislinskega ostanka Arg 98, s katerim vzpostavi vodikove interakcije in tako še dodatno okrepi vezavo v receptor FimH.

Pri sintezi glikozidnega jedra nismo imeli večjih težav, saj smo obe reakciji izvajali pod že modificiranimi pogoji. Pri sintezi različnih aglikonov smo morali pogoje poteka reakcij še naknadno prilagoditi.

- Pri Williamsonovi sintezi smo uporabili dva različna katalizatorja faznega prenosa, BTEAc in TBABr, ki sta omogočila lažjo solubilizacijo anorganskih anionov v organskem mediju. Reakcija je v glavnini potekla z dobrim, ~ cca. 70 % izkoristkom, je pogosto uporabljena in ni povzročala težav. Večji izziv nam je predstavljalo čiščenje zmesi produkta, ki smo ga nato uspešno očistili s pomočjo vakuumske črpalke z dušikovo pastjo (~ 2h, 0 mbar, 85 °C).
- S Sonogashira sklopitvijo smo uspešno pripajali etinilno skupino na aromatsko jedro, pri čemer smo kot donor etinilne skupine uporabili acetilen-TMS. Zaradi narave uporabljenega reagenta, smo nato izvajali še odščito TMS zaščitne skupine (s TBAF x 3 H<sub>2</sub>O in TBAF). Reakcijo smo predvsem s povečanjem deleža trietilamina in katalizatorskega sistema optimizirali do zadovoljivih izkoristkov (~30 %), a menimo, da je prostora za optimizacijo še veliko.

- Zemplénova reakcija je potekala v brezvodnem etanolu, izkoristki so bili zadovoljivi in po pregledu NMR spektrov sintetiziranih spojin lahko potrdimo, da do preestrenja ni prišlo, saj so bili produkti čisti, zgolj etilni estri.

Kljub mnogim privlačnim lastnostim antiadhezivne terapije bomo morali preiti marsikatero oviro, pri uveljavitvi slednje kot konvencionalne terapije za zdravljenje infekcij. Kot prvo bo potrebno doseči dovolj visoko afiniteto za uspešno tekmovanje z bakterijami, ki običajno na svoji površini nosijo na tisoče različnih specifičnih adhezivnih molekul. Ta problem bi lahko rešili z uporabo multitarčnih ali širokospektralnih antiadhezivnih agensov. Zaradi nizke afinitete interakcij proteinov in ogljikovih hidratov bo potrebna tudi izboljšava le-teh. Problematična je stabilnost trenutno že raziskanih spojin. V prihodnje bodo raziskovalci morali najti kombinatorni pristop med antiadhezivnimi substancami in že uveljavljenimi antimikrobnimi spojinami v terapiji infekcij (6, 7, 8).

## 7 Literatura

1. Totsika M, Kostakioti M, Hannan TJ, Upton M, Beatson SA, Janetka JW, Hultgren SJ, Schembri MA. A FimH Inhibitor Prevents Acute Bladder Infection and Treats Chronic Cystitis Caused by Multidrug-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* ST131. *The Journal of Infectious Diseases* 2013; 208: 921-928.
2. Klemm P, Schembri M. Bacterial Adhesins: function and structure. *Int. J. Med. Microbiol.* 2000; 290, 27–35.
3. Ernst B, Magnani JL. From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, Avgust 2009; Volume 8, 661–677
4. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, May 2015; Volume 13, 1-16
5. Foxman B. Urinary Tract Infections Syndromes, Occurrence, Recurrence, Bacteriology, Risk Factors and Disease Burden. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 28, 2014; 1-13
6. Krachler A, Orth K. Targeting the bacteria-host interface; Strategies in anti-adhesion therapy. *Landes Bioscience* 2013; *Virulence* 4:4: 284-294
7. Ofek I, Hasty DL, Sharon N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 38 2003; 181-191.
8. Pieters R. Intervention with Bacterial Adhesion by Multivalent Carbohydrates. *Medicinal Research Reviews*, 2007; Vol. 27, No. 6, 796–816.
9. Lindhorst TK. *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Second revised and updated edition, Wiley-VCH, Weinheim, 2003, 28.
10. Sharon N. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760 2006; 527-537.
11. Cecioni S, Imberty A, Vidal S. Glycomimetics versus Multivalent Glycoconjugates for the Design of High Affinity Lectin Ligands. *ACS* 2014; A-AD
12. Do gradiva dostopano dne 4.1.2016 na naslovu: <http://2008.igem.org/Team:NYMU-Taipei/Project/Attachment>
13. Schwardt O, Rabbani S, Hartmann M, Abgottspon D, Wittwer M, Kleeb S, Zalewski A, Smieško M, Cutting B, Ernst B. Design, synthesis and biological

- evaluation of mannosyl triazoles as FimH antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19, 2011; 6454-6473.
14. Bouckaert J, Berglund J, Schembri M, De Genst E, Cools L, Wuhler M, Hung C S, Pinkner J, Slättegård R, Zavialov A, Choudhury D, Langermann S, Hultgren S J, Wyns L, Klemm P, Oscarson S, Knight S D, De Greve H. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli*, FimH adhesin. *Molecular Microbiology* 2005; 55, 441-455.
  15. Sperling O, Fuchs A, Lindhorst T K. Evaluation of the carbohydrate recognition domain of the bacterial adhesin FimH. Design, synthesis and binding properties of mannose ligands. *Organic Biomolecular Chemistry* 2006; 4, 3913–3922.
  16. Han Z, Pinkner JS, Ford B, Obermann R, Nolan W, Wildman SA, Hobbs D, Ellenberger T, Consumano CK, Hultgren SJ, Janetka JW. Structure-based drug design and optimization of mannoside bacterial FimH antagonist. *JMC* 2010; 53, 4779–4792.
  17. Klein T, Abgottspon D, Wittwer M, Rabbani S, Herold J, Jiang X, Kleeb S, Lüthi C, Scharenberg M, Bezençon J, Gubler E, Pang L, Smiesko M, Cutting B, Schwardt O, Ernst B. FimH antagonists for the oral treatment of urinary tract infections: from design and synthesis to in vitro and in vivo evaluation. *JMC* 2010; 53, 8627-8641.
  18. Consumano CK, Pinkner JS, Han Z, Greene SE, Ford BA, Crowley JR, Henderson JP, Janetka JW, Hultgren SJ. Treatment and Prevention of Urinary Tract Infection with Orally Active FimH Inhibitors. *Sci Transl Med*. November 2011; 3(109).
  19. Firon N, Ashkenazi S, Mirelman D, Ofek L, Sharon N. Aromatic alpha-glycosides of mannose are powerful inhibitors of the adherence of type 1 fimbriated *Escherichia coli* to yeast and intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 1987; 55, 472-476.
  20. 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.
  21. Tomašić 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. *Med. Chem. Commun.*, 2014; 5,1247-1253.
  22. 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

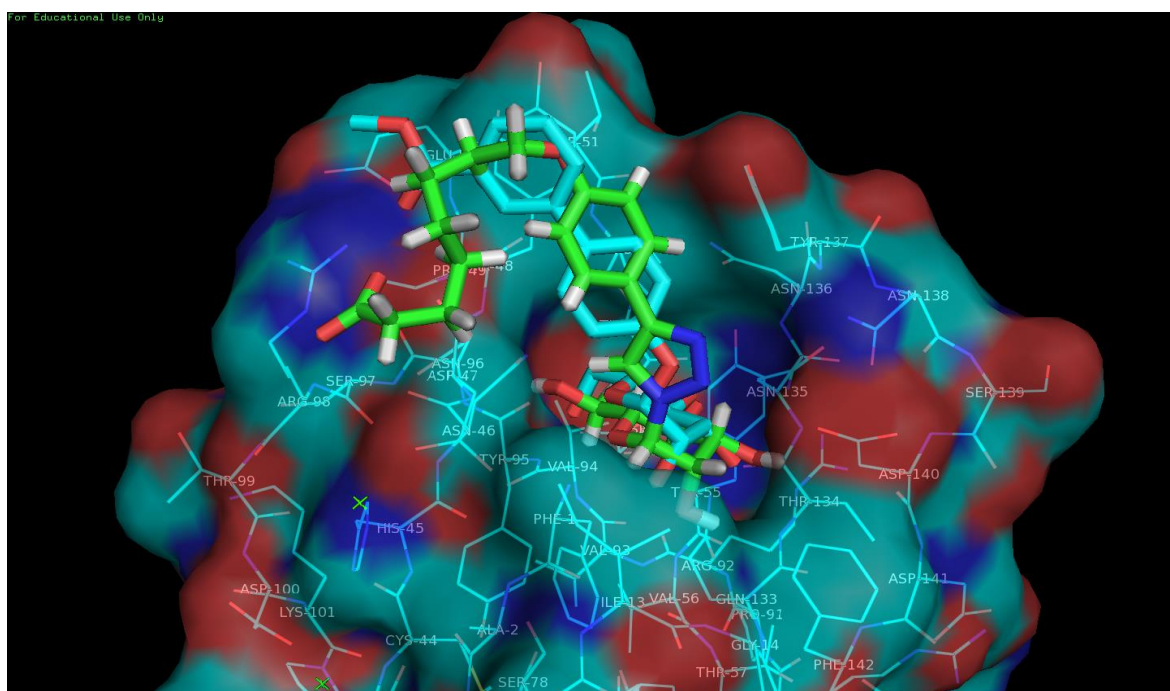
- Antagonists: Bioisosteres To Improve the in Vitro and in Vivo PK/PD Profile. *JMC*, 2015; 58, 2221-2239.
23. Percec V, Leowanawat P, Sun H, Kulikov O, Nusbaum C., Tran TM, et al. Modular Synthesis of Amphiphilic Janus Glycodendrimers and their Self-Assembly into Glycodendrimersomes and Other Complex Architectures with Bioactivity to Biomedically Relevant Lectins. *J. Am. Chem. Soc.*, Jun 2013; 135 (24):9055-77.
  24. Lehmann M, Seltmann J. Low temperature enantiotropic nematic phases from V-shaped, shape persistent molecules. *Beilstein J. Org. Chem.* 2009, 5, No. 73.
  25. Do gradiva dostopano dne 4.1.2016 na naslovu: <http://www.rcsb.org>.
  26. Kuribayashi T, Ohkawa N, Satoh S: AgOTfa SnCl<sub>4</sub> : A powerful new promoter combination in the aryl C-glycosidation of a diverse range of sugar acetates and aromatic substrates; *Tetrahedron Letters* (Impact Factor: 2.38). 06/1998; 39(25): 4537-4540.
  27. O'Brien C, Polakova M, Pitt N, Tosin M, Murphy V. P: Glycosidation–Anomerisation Reactions of 6,1-Anhydroglucopyranuronic Acid and Anomerisation of b-d-Glucopyranosiduronic Acids Promoted by SnCl<sub>4</sub>; *Chem. Eur. J.* 2007; 13, 902–909.
  28. Magistrsko delo, Virant M. Sinteza paladijevih kompleksov s triazolilidenskimi ligandi in njihova uporaba v katalizi. Avgust 2015.
  29. Xu H, Xie BY, Yuan WZ, Sun JZ, Yang F, Dong YQ, Qin A, Zhang S....
  30. Aragao-Leoneti V, Campo VL, Gomes AS, Field RA, Carvahlo I: application of copper (I) catalysed azide/alkyne CA(CuAAC) »click chemistry« in carbohydrate drug and neoglycopolymer synthesis
  31. Ren B, Wang M, Liu J, Ge J, Zhang X, Dong H. Zemplén transesterification: a name reaction that has misled us for 90 years; *Green Chemistry* 2015, 17, 1390-1394.
  32. Agoston K, Dobo A, Rako J, Kerekgyarto J, Szurmai Z: Anomalous Zemplén deacylation reactions of  $\alpha$ - and  $\beta$ -D-mannopyranoside derivatives; *Carbohydrate Research* 330 (2001) 183–190
  33. Do gradiva dostopano dne 2.2.2016 na naslovu: <http://www.chemguide.co.uk/organicprops/esters/hydrolysis.html>











Slika 31: Sidranje spojine 26 v vezavno mesto FimH. Z zeleno barvo je označena spojina 26, z modro pa referenčna spojina 3MCY.