SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

MATEJ POLETAR

SINTEZA NOVIH IMIDAZOLNIH α-D-MANOPIRANOZIDA KAO POTENCIJALNIH FimH INHIBITORA

Zagreb

2016.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u okviru projekta HRZZ pod nazivom „Sinteza, strukturna analiza i biološka evaluacija peptidomimetika i glikokonjugata“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Srđanke Tomić – Pisarović i pod neposrednim vodstvom dr. sc. Krešimira Baumanna i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2015./16.

POPIS KRATICA I OZNAKA

Me	metil
Et	etil
Ac	acetil
Ph	fenil
Bn	benzil
Bz	benzoil
All	alil
Piv	pivaloil
Tr	tritil
Ts	tosil
Tf	triflil
DMAP	4-(*N*,*N*-dimetilaminopiridin)
TBDMS	*t*-butildimetilsilil
THP	tetrahidropiranil
DMF	*N*,*N*-dimetilformamid
DHP	dihidropiran
DDQ	2,3-diklor-5,6-dicijanobenzokinon
CAN	cerij amonijev nitrat
TBAF	tetra-*n*-butilamonijev fluorid
TFA	trifluoroctena kiselina
THF	tetrahidrofuran
UPEC	uropatogena bakterija *E. coli*

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

2. LITERATURNI PREGLED.....3

2.1. Kemija monosaharida - svojstva, reakcije i zaštitne skupine.....3

2.2. Kemija imidazola i njegovih derivata.....15

2.3. Lektini. FimH adhezin i njegovi inhibitori.....23

3. EKSPERIMENTALNI DIO.....28

3.1. Opće napomene.....28

3.2. Sinteza 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil-α-D-manopiranozida (**2**).....29

3.3. Sinteza 1-(2-brometil)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-manopiranozida (**3**).....30

3.4. Opći postupak sinteze spojeva **7**-**10** (kvaternizacije).....31

3.5. Opći postupak dobivanja spojeva **11**-**14** (deacetiliranje).....33

3.6. Optimizacije geometrija ciljnih molekula računalnim metodama.....36

4. REZULTATI I RASPRAVA.....37

5. ZAKLJUČCI.....48

6. LITERATURNA VRELA.....49

7. SAŽETAK.....51

8. SUMMARY.....52

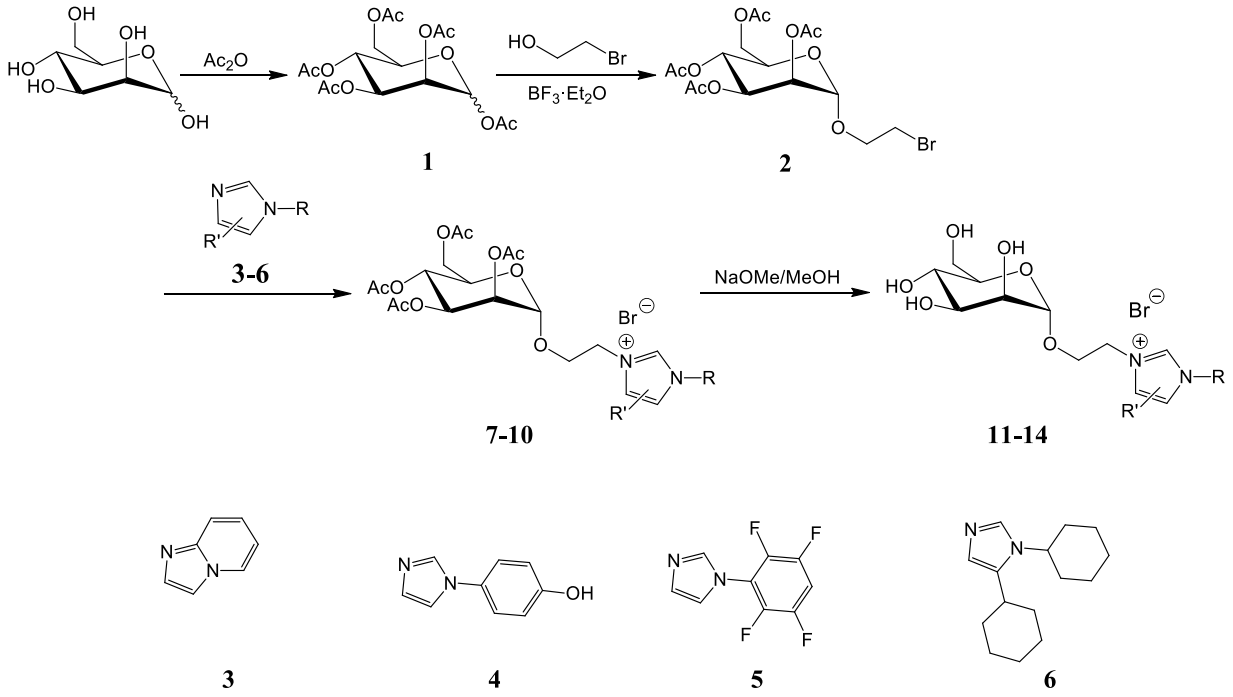
9. PRILOG.....53

10. ŽIVOTOPIS.....65

§1. UVOD

Adhezijski protein FimH iz uropatogene bakterije *Escherichia coli* specifično prepoznaje spojeve koji u svojoj strukturi sadrže α-D-manopiranozide. Adhezini bakterijskoj stanici omogućuju adheziju na druge površine pa tako i na druge stanice i tkiva čime patogene bakterije započinju napad na stanice domaćina. U ljudi bakterija *E. coli* najčešće uzrokuje upale mokraćnih puteva, ali može izazvati i druge bolesti. Nakon otkrića strukture bakterijskih adhezina i nakon što je došlo do saznanja da FimH ima specifična vezna mjesta za α-D-manozide sintetiziran je i ispitan veliki broj α-D-manokonjugata u svrhu nalaženja pogodnog FimH inhibitora. Naime, ukoliko dolazi do inhibicije adhezina, patogena bakterija neće prepoznavati stanicu jer su aktivna mjesta FimH blokirana inhibitorom.

U okviru ovoga rada sintetizirani su novi heterociklički α-D-manokonjugati koji su potencijalni FimH inhibitori. Koristeći znanja i metode kemije ugljikohidrata povezana je α-D-manopiranoza sa bicikličkim derivatima imidazola **3-6** preko dimetilenske poveznice („mosta“). Sinteza ciljnih molekula **11-14** prikazana je na Shemi 1.



Shema 1. Sinteza ciljnih molekula **11 -14**

Imidazol je važan dio strukture mnogih prirodnih spojeva, ali i sintetskih biološki aktivnih spojeva (lijekova) kao što su antifungicidi, antiobiotici, antihistaminici, antitumorski agensi za kemoterapeutsko liječenje nekih oblika raka, lijekovi koji se koriste u liječenju kardiovaskularnih bolesti i bolesti kostiju, protuupalni lijekovi itd. Stoga su za kondenzaciju sa šećernom komponentom glikozidnom vezom izabrani upravo derivati imidazola. Heterociklički spojevi **3**-**6** koji su povezani s α-D-manozidom su komercijalno dostupne kemikalije. Spojevi **3**-**6** osim imidazolnog prstena sadrže još barem jedan prsten (aromatski ili zasićeni) i izabrani su kao prekursori za sintezu jer upravo takve strukture s dva prstena u aglikonskom dijelu α-D-manozida prema dosadašnjim istraživanjima pokazuju najbolja svojstva kao FimH inhibitori.

Ciljnim molekulama optimizirane su geometrije molekulsko-mehaničkim (MM2) računom te pretraživanjem konformacijskog prostora.

§2. LITERATURNI PREGLED

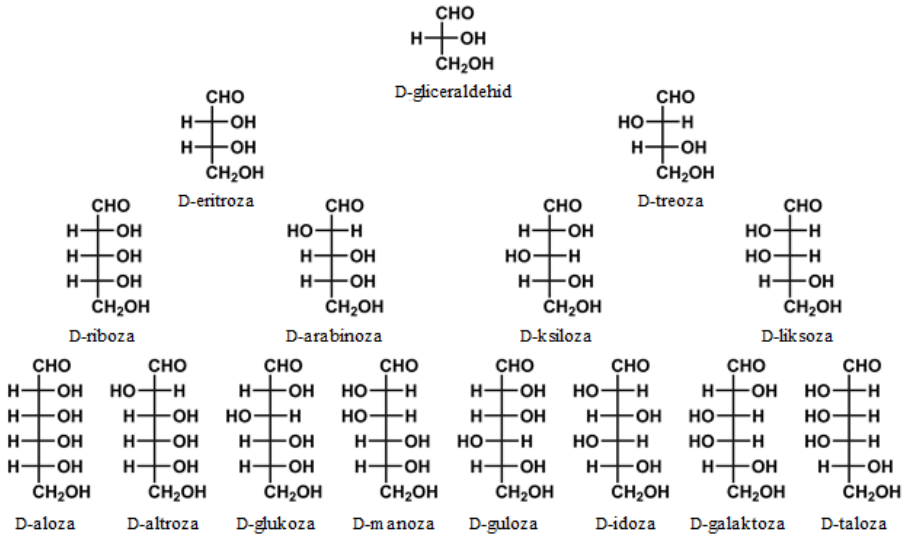
2.1. Kemija monosaharida- svojstva, reakcije i zaštitne skupine

Monosaharidi (grč. μονος: jednostavni, ζάχαρη: šećer), njihovi derivati i polimeri čine veliku skupinu prirodnih spojeva (ugljikohidrati) koji su uključeni u životni ciklus velikog broja živih bića. Monosaharidi polimerizacijom grade oligo- (do 10 monosaharidnih jedinica) i polisaharide (više od 10 monosaharidnih jedinica) koji su također važni prirodni spojevi, poput saharoze i laktoze (disaharidi) te škroba i celuloze (polisaharidi). Oksidacija nekih monosaharida glavni je izvor energije u stanici, kako u bakterijskoj tako i u eukariotskoj. Velike količine saharida (ugljikohidrata) proizvode biljke i mikroorganizmi u procesu fotosinteze.

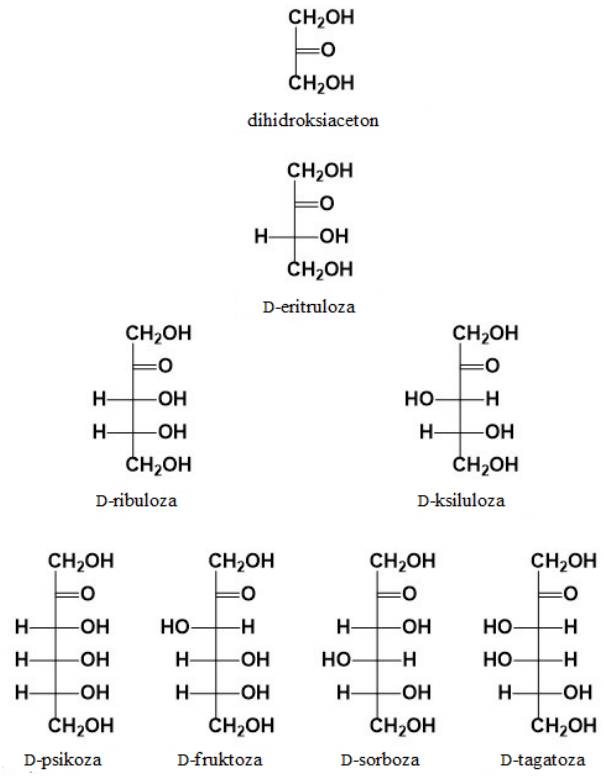
No monosaharidi imaju i druge uloge osim što su stanični izvor energije. Određeni monosaharidi su gradivni dijelovi nukleinskih kiselina (DNA i RNA). Posttranslacijskom doradom proteina u stanici, proteini se često glikoziliraju na bočnim ograncima nekih aminokiselina (glikoproteini). Šećeri koji se pritom vežu, a nalaze se isključivo na vanjskoj membrani stanice zbog prirodnih mehanizama koji to reguliraju, imaju ulogu u staničnom prepoznavanju. Također, vezani šećeri mogu pridonijeti stabilizaciji proteina i olakšati njihovo smatanje. Mnogi monosaharidi i njihovi derivati su dio strukture mnogih biološki aktivnih molekula.

Monosaharidi (Slike 1 i 2) se prema kemijskoj funkcionalnosti mogu podijeliti na aldoze (polihidroksialdehidi) i ketoze (polihidroksiketoni) te prema broju ugljikovih atoma koje sadrže na trioze (3 C-atoma), tetroze (4 C-atoma), pentoze (5 C-atoma), heksoze (6 C-atoma) itd. Molekule monosaharida su kiralne, stoga svaki monosaharid egzistira u dva enantiomerna oblika koje označavamo relativnim konfiguracijskim oznakama D i L u odnosu na konfiguraciju gliceraldehida. Ako je konfiguracija na posljednjem asimetrično supstituiranom ugljikovom atomu jednaka konifugraciji asimetrično supstituiranog ugljikovog atoma u D-gliceraldehidu onda je i šećer D- konfiguracije (analogno za L- konfiguraciju). Ravnolančasta struktura koju prikazujemo Fischerovom projekcijskom formulom nije realna struktura u kojoj monosaharidi

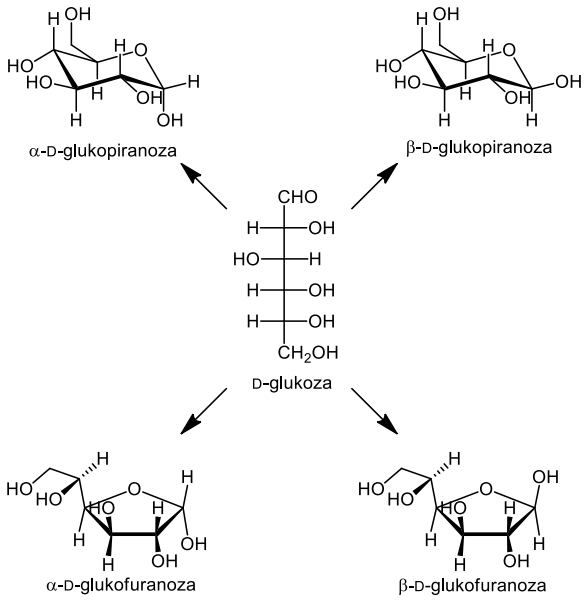
egzistiraju, već su često peteročlane (piranozne) ili šesteročlane (furanozne) cikličke strukture koje nastaju intramolekulskom adicijom hidroksilne skupine na karbonilnu skupinu. Tom ciklizacijom inducira se dodatni asimetrični centar kojeg nazivamo anomerni centar, pa stoga postoje još dva enantiomerna (anomerna) oblika cikličkog monosaharida koje označavamo označavamo oznakama α i β. Moguće cikličke strukture D-glukoze prikazane su na Slici 3.



Slika 1. Serija D- aldoheksoza



Slika 2. Serija D- 2-ketoheksoza



Slika 3. Moguće cikličke strukture D-glukoze

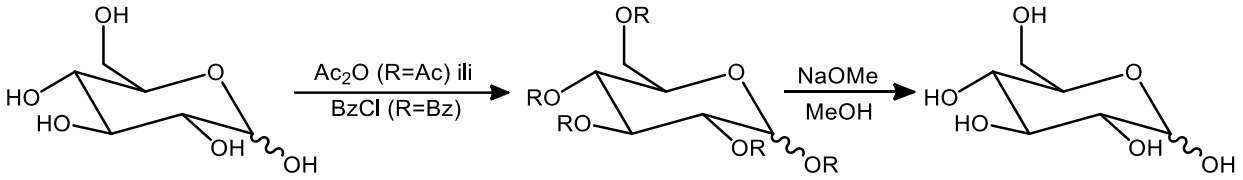
Svaki šećer kao krutina može egzistirati kao zaseban stereoizomer, no otapanjem u vodi dolazi do otvaranja poluacetalnog prstena i ponovnog zatvaranja istog. Kako određeni ciklički oblici nisu jednako stabilni nakon nekog vremena uspostavit će se ravnotežno stanje, u kojem će uvijek prevladati jedan ciklički oblik i to onaj koji je termodinamički najstabilniji (tablica 1). Ravnotežna reakcija prijelaza jednog anomera u drugi naziva se mutarotacija.

Tablica 1. Ravnotežni udjeli pojedinih oblika šećera u vodenoj otopini određeni polarimetrijom i NMR spektroskopijom[1]

Ugljikohidrat	α-piranoza (%)	β-piranoza (%)	α-furanoza (%)	β-furanoza (%)	Karbonilna forma (%)	Specifična rotacija (u ravnoteži)
Glukoza	38,0	62,0	0,5	0,5	0,002	+53°
Manoza	65,5	34,5	0,6	0,3	0,005	+15°
Galaktoza	30,0	64,0	2,5	3,5	0,02	+80°
Fruktoza	2,5	65,0	6,5	25,0	0,8	-92°
Ksiloza	36,5	63,0	0,3	0,3	0,002	+19°
Riboza	21,5	58,5	6,4	13,5	0,05	-24°

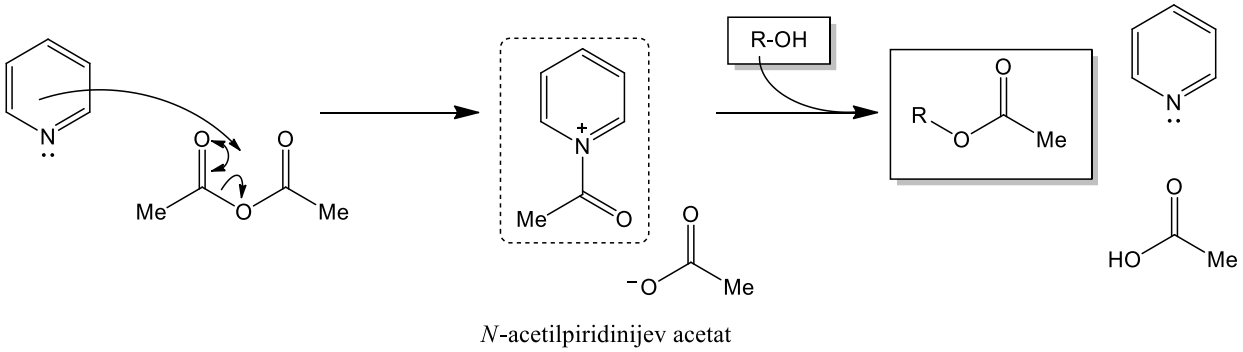
Monosaharidi su zanimljivi spojevi sa stajališta sintetske organske kemije. No izazov za ugljikohidratnu kemiju je regioselektivnost. Naime monosaharidi sadrže nekoliko hidroksilnih skupina različite reaktivnosti često uz prisutne i druge funkcionalnosti kao što je karbonilna ili amino skupina. Stoga je od velike važnosti znati kako manipulirati zaštitnim skupinama i sintetskim metodama koje će dovesti do željenog produkta. Kada govorimo o zaštitnim skupinama važno je napomenuti da su dobre zaštitne skupine one koje se mogu ukloniti bez da se „poremeti“ ostatak molekule. Danas je na raspolaganju veliki broj zaštitnih skupina pa ih treba odabrati tako da daju što veću fleksibilnost pri sintezi. Unatoč tome, izbor dobrih zaštitnih skupina kao i metoda uvođenja istih i dalje su izazov za sintetsku organsku kemiju. Najčešće zaštitne skupine koje susrećemo u kemiji ugljikohidrata su acilne (esterske), eterske i acetalne/ketalne skupine. Funkcionalnost koja se pritom najčešće zaštićuje su hidroksilne (-OH) skupine. Monosaharadine hidroksilne skupine nisu jednake reaktivnosti, već se razlikuju po tome jesu li vezane na primarni, sekundarni ili anomerni ugljikov atom. Temeljeno na tom razmišljanju razvijeni su brojni postupci regioselektivnog uvođenja zaštitnih skupina i njihovog uklanjanja.[2-6]

Acilne zaštitne skupine često su korište u kemiji ugljikohidrata zbog jednostavnog uvođenja i kasnijeg uklanjanja (Shema 2). Monosaharid je moguće potpuno acetilirati (peracetilirani monosaharid) uz acetanhidrid ili perbenzoilirati uz benzoil-klorid. Esteri koji pritom nastaju mogu se hidrolizirati u bazičnim uvjetima (saponifikacija) ili se monosaharid može osloboditi u transesterifikacijskoj reakciji (Zemplénov postupak).[1] Pritom se dodaje katalitička količina natrijevog metoksida u suhom metanolu. Reakcija se lagano odvija kod uklanjanja acetilne zaštite dok je benzoate puno teže razgraditi ovim postupkom. Za peracetiliranje nezaštićenih monosaharida dodaje se uz acetenhidrid i natrijev acetat kao pufer.[1]



Shema 2. Uvođenje i uklanjanje acilnih zaštitnih skupina

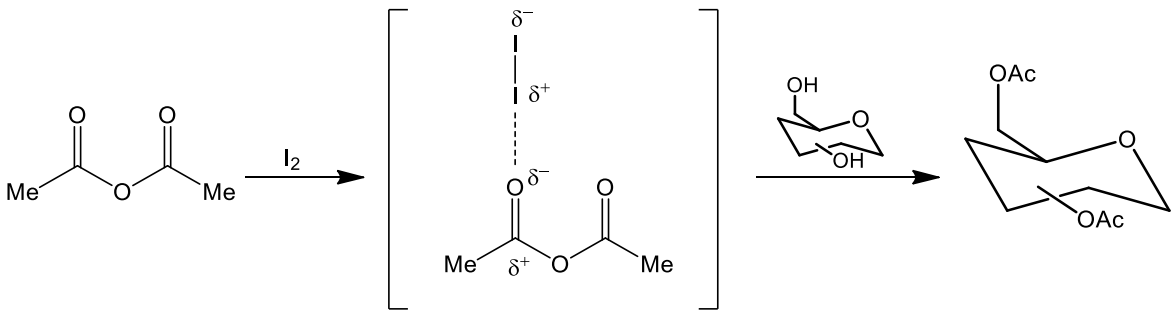
Aciliranje se može provesti i u piridinu. Piridin se tada ponaša kao nukleofilni katalizator te nastaje *N*-acetilpiridinijev kation koji acetilira monosahardini supstrat (Shema 3). Aciliranje u piridinu može se ubrzati dodatkom *N, N*-dimetilaminopiridin (DMAP) u reakcijsku smjesu.[1]



N-acetilpiridinijev acetat

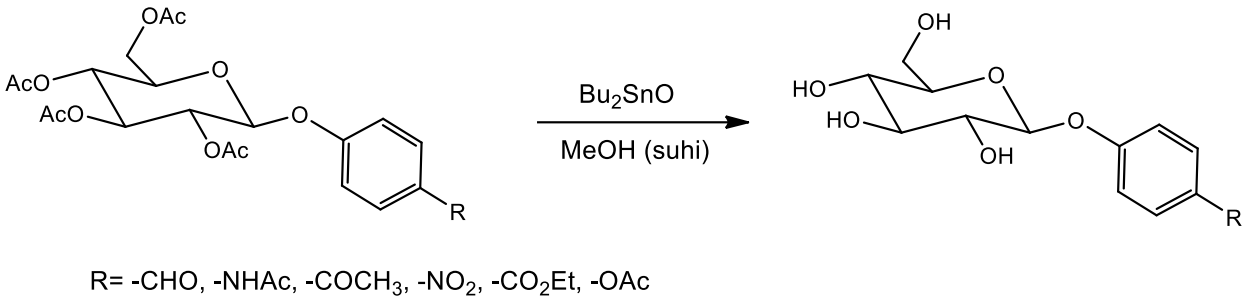
Shema 3. Mehanizam acetiliranja u piridinu

Jod se također pokazao kao vrlo dobra Lewisova kiselina u reakciji peracetiliranja nezaštićenog šećera.[7, 8] Prednosti su mu što je jeftin i dostupan u gotovo svakom laboratoriju, a rukovanje njime je jednostavno. Dodatno, za ovu reakciju nije potrebno otapalo, a reakcija se provodi pri sobnoj temperaturi uz miješanje u kratkom vremenskom razdoblju (1 - 60 min) ovisno o šećeru i količini dodanog joda. Oba prethodno opisana postupka peracetiliranja imaju neke nedostatke. Postupak u kojem se koristi piridin, koji je dobra Lewisova baza, je toksičan i ima vrlo neugodan miris, dok postupak u kojem se šećer refluksira s acetanhidridom i natrijevim acetatom također može biti upitan. Stoga je korištenje katalitičke količine joda u reakcijama peracetiliranja dobra alternativa navedenim postupcima. U kontroliranim uvjetima čak je moguće provesti regioselektivno aciliranje monosahardinih derivata ovim postupkom. Predloženi mehanizam djelovanja joda je da polarizira acetanhidrid čime on postaje elektrofilniji i podložniji nukleofilnom napadu hidroksilne skupine šećera (Slika 6).



Shema 4. Jod kao Lewisova kiselina u reakciji šećera s acetanhidridom[7]

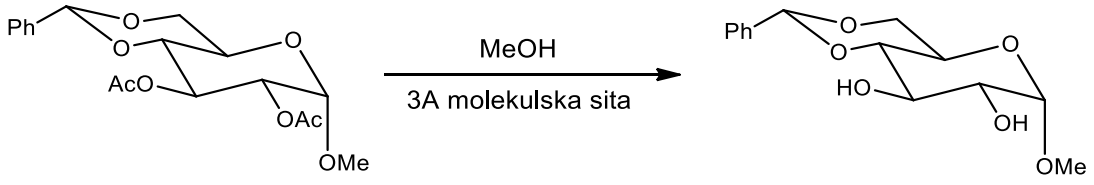
Acetilne zaštitne skupine se mogu odgraditi i s dibutilkositrovim oksidom (Bu_2SnO) u katalitičkim količinama (0.1 ekv.) uz vrlo dobro iskorištenje (>90 %) i u blagim uvjetima (Shema 5).[9] Druge acilne skupine uključujući acetanilidne i benzoilne skupine su stabilne pod reakcijskim uvjetima što je velika prednost ove selektivne metode.



R= -CHO, -NHAc, -$COCH_3$, -NO_2, -CO_2Et, -OAc

Shema 5. Deacetiliranje šećera dibutilkositrovim oksidom u suhom metanolu [9]

Mizuno i suradnici otkrili su da je moguće provesti uklanjanje acetilnih zaštitnih skupina apsolutnim metanolom sušenim na molekulskim sitima ili metanolom uz dodatak molekulskih sita (Shema 6).[10] Reakcije provedene u metanolu bez dodataka molekulskih sita nisu rezultirale uklanjanjem acetilnih skupina. Molekulska sita su prirodni zeoliti koji se sastoje od alumosilikata alkalijskog ili zemnoalkalijskog metala. Veličina njihovih pora ovisi o vrsti metalnog iona. U organskoj sintezi, molekulska sita se koriste kao promotori i katalizatori reakcija te za sušenje organskih otapala.[10]



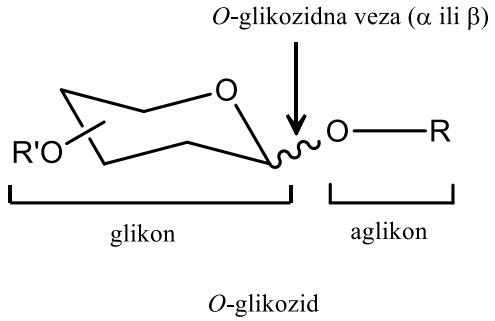
Shema 6. Deacetiliranje apsolutnim metanolom sušenim na molekulskim sitima[10]

Pregled često korištenih zaštitnih skupina u ugljikohidratnoj kemiji s reagensima i uvjetima uvođenja (protekcije) i uklanjanja (deprotekcije) dan je u tablici 2.

Tablica 2. Zaštitne skupine i reagensi u kemiji ugljikohidrata. Posljednjih pet stupaca prikazuje stabilnost zaštićenog šećernog derivata u pojedinim reakcijskim uvjetima B=stabilnost u bazičnom mediju, K=stabilnost u kiselom mediju, H_2/kat.=stabilnost pri katalitičkom hidrogeniranju, H^-=stabilnost uz hidrid, [O]=stabilnost u oksidacijskim uvjetima (+ stabilno, - nije stabilno) [1]

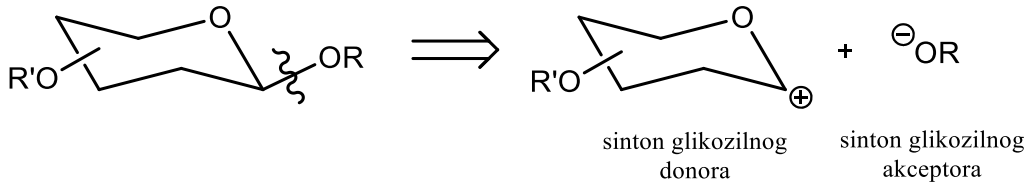
Zaštitna skupina	Reagens za uvođenje	Reagens za uklanjanje	B	K	H_2/kat	H^-	[O]
Acetil	Ac_2O / piridin	NaOMe/MeOH	-	+	+	-	+
Benzoil	BzCl / piridin	NaOMe/MeOH	-	+	+	-	+
Pivaloil	PivCl / piridin	KOH/MeOH	-	-	+	-	+
Kloroacetil	ClAc-Cl / piridin	Tiourea u EtOH ili piridinu	-	+	+	-	+
Benzil	BnBr/NaH/ DMF	Pd-C/H_2	+	+	-	+	-
p-metoksi-benzil (pMBn)	*p*-MeOBnCl/ NaH/DMF	DDQ u CH_2Cl_2 ili CAN	+	-	-	+	-
Alil	AllBr/NaH/ DMF	$(Ph_3P)_3RhCl$	+	+	-	+	+/-
Tritil	Ph_3CCl/ piridin	AcOH/H_2O	+	-	-	+	+
TBDMS	TBDMS-Cl/ imidazol/ DMF ili piridin	AcOH/H_2O ili TBAF	+	-	+	+	+
Izopropiliden	Aceton/ H_2SO_4/$CuSO_4$ ili $Me_2C(OMe)_2$/ *p*-TsOH	AcOH/H_2O ili TFA/THF/H_2O	+	-	+	+	+
Benziliden	PhCHO/$ZnCl_2$ ili $PhCH(OMe)_2$/*p*-TsOH	AcOH/H_2O ili Pd-C/H_2 ili TFA/THF/H_2O	+	-	-	+	-
THP	DHP/*p*-TsOH /CH_2Cl_2	TFA/THF/H_2O	+	-	+	+	+

Glikozidi su ciklički acetalni derivati monosaharida (Slika 4). U kemiji ugljikohidrata susrećemo uz *O*-glikozide koji su najčešći i prirodno se javljaju i *N*-, *C*- i *S*- glikozide. Glikozid se sastoji od glikonske (šećer) i aglikonske komponente.



Slika 4. Struktura *O*-glikozida

Danas je razvijeno mnogo različitih postupaka glikozilacije, tj. sinteze glikozida koji se još uvijek istražuju i poboljšavaju. Retrosintetski gledano glikozid možemo diskonektirati na šećerni sinton koji je glikozilni donor i sinton koji želimo vezati na šećer, tj. glikozilni akceptor (Shema 7).



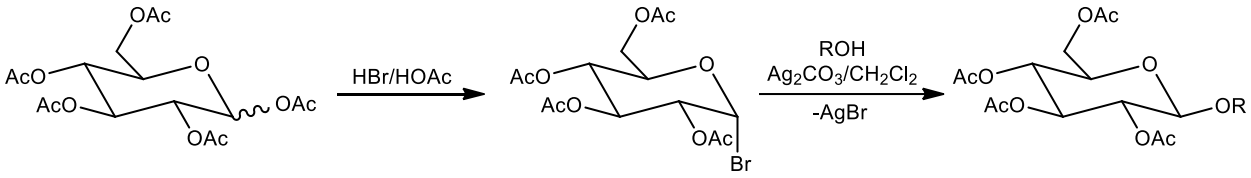
Shema 7. Retrosintetska analiza – sinteza *O*-glikozida

Prekursori za sintezu glikozida su zaštićeni šećer (glikozilni donor) i alkohol ili drugi monosaharid (glikozilni akceptor). Glikozilni donor s izlaznom skupinom na anomernom C-atomu potrebno je aktivirati. U tu se svrhu koriste različiti spojevi kao npr. borov trifluorid eterat ($BF_3 \cdot Et_2O$), trimetilsilil-triflat (TMSOTf), srebrov karbonat (Ag_2CO_3), *p*-toluensulfonska kiselina (*p*-TsOH) i mnogi drugi aktivatori.

U sintezi glikozida korisne su tri sljedeće reakcije

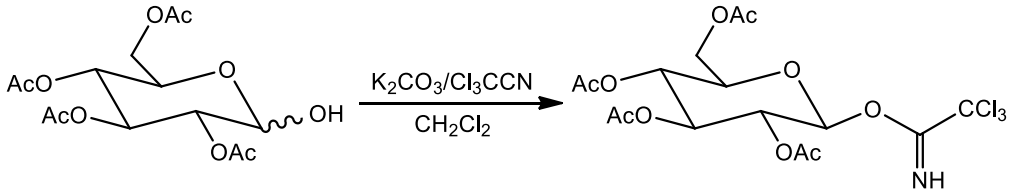
(i) Koenigs-Knorr-ova reakcija
(ii) trikloracetimidatna metoda
(iii) reakcije uz pomoć stabilnih glikozida / glikozilnih donora (*n*-pentenil-glikozidi i tioglikozidi)

Koenigs-Knorr-ova metoda (Shema 8) je najstarija i još često korištena metoda priprave *O*-glikozida. Reakcija se odvija uz dodatak soli srebra (promotori reakcije) kao što su Ag_2O i Ag_2CO_3 koje su netopljive ili AgOTf i $AgClO_3$ koje su topljive u diklormetanu. Važna je činjenica da je ova reakcija stereospecifična. Nastaje onaj glikozid u kojemu je aglikonski dio u *trans* položaju u odnosu na C-2 skupinu (1,2-*trans* glikozid).



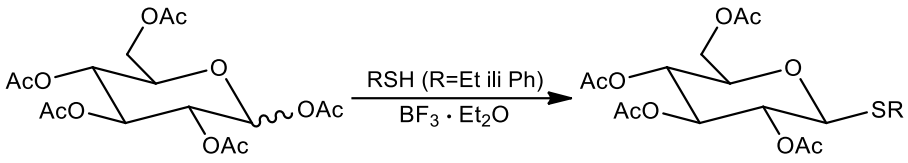
Shema 8. Koenigs-Knorr-ova reakcija

U trikloracetimidatnoj metodi (Shema 9) anomerni kisikov atom se derivatizira tako da nastane stabilni glikozilni donor. β-Glikozil trikloroacetimidati su stabilniji od odgovarajućih glikozil bromidnih analoga. Glikozil trikloroacetimidati se katalitički aktiviraju Lewisovim kiselinama kao što su borov trifluorid eterat ($BF_3 \cdot Et_2O$) ili trimetilsilil-triflat (TMSOTf).



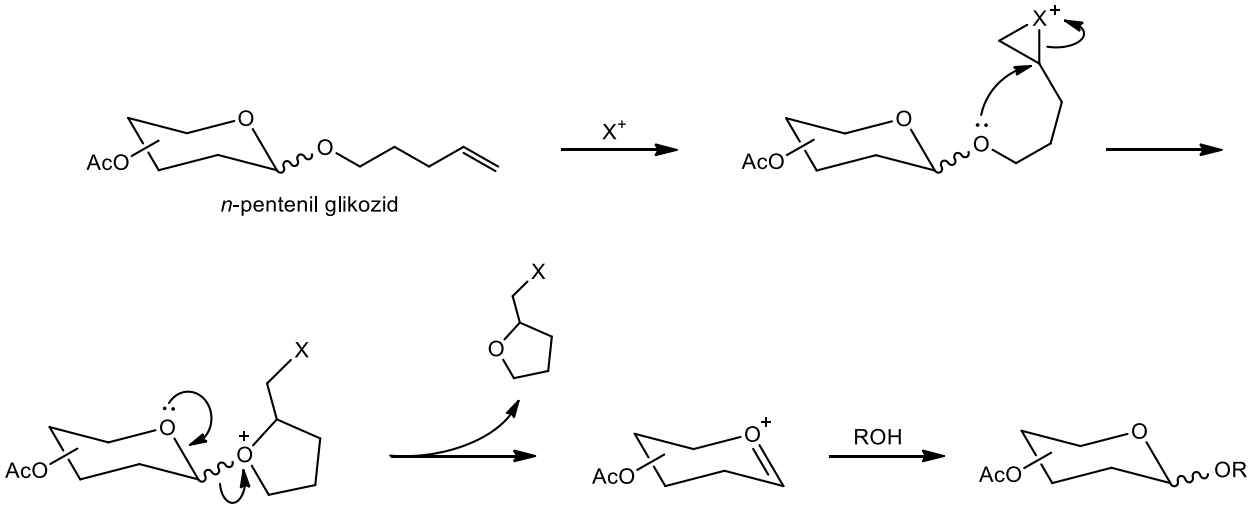
Shema 9. Trikloracetimidatna metoda

Peracetilirane heksopiranoze u prisutnosti $BF_3 \cdot Et_2O$ ili nekih drugih promotora reagiraju s tiolima te nastaju stabilni tioglikozidi. Reakcija je također stereospecifična te nastaje dominantno 1,2-*trans S*-glikozid (Shema 10). Glikozil bromidi i glikozil trikloroacetimidati nisu stabilni u uvjetima deacetiliranja dok tioglikozidi jesu pa je moguća izmjena zaštitnih skupina.



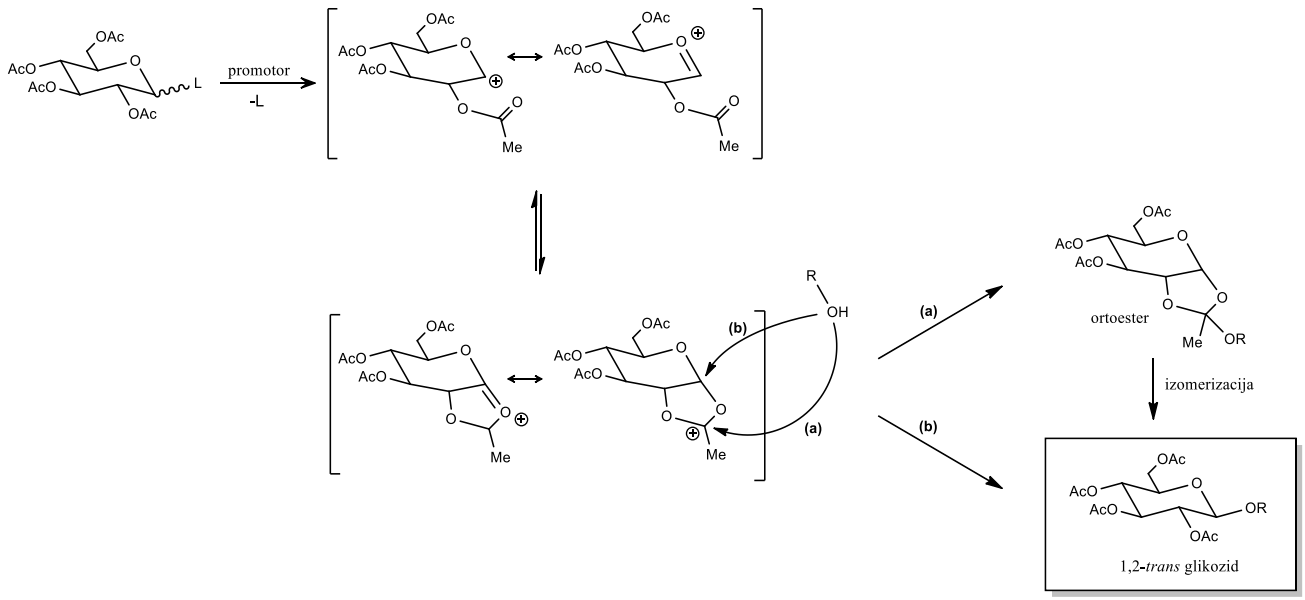
Shema 10. Priprava tioglikozida

U uporabi su i *n*-pentenil-glikozidi koji su stabilni u većini reakcijskih uvjeta osim u uvjetima katalitičkog hidrogeniranja. Mogu se pripraviti Koenigs-Knorr-ovom reakcijom ili se mogu dobiti iz *n*-pentenil 1,2-ortoestera. Promotori u reakciji glikoziliranja pomoću *n*-pentenilglikozidnih donora su X^+ čestice (kationi halogenih elemenata) koje vode k nastajanju cikličkog halonijevog iona elektrofilnom adicijom X^+ na alkensku π-vezu. Ovaj međuprodukt se pregrađuje u drugi međuprodukt iz kojeg izlazi 2-halometiltetrahidrofuran, koji je nusprodukt u ovom postupku. Eliminacijom izlazne skupine nastaje glikozilni kation koji reagira s glikozilnim akceptorom čime konačno nastaje glikozid (Shema 11).



Shema 11. Mehanizam glikoziliranja uz *n*-pentenil glikozidne donore

Stereokemijski ishod reakcije glikoziliranja ovisi o tome da li se reakcija odvija uz participaciju skupine na C-2 (efekt susjedne skupine). Ukoliko dolazi do utjecaja skupine na C-2 nastat će pretežno 1,2-*trans* glikozid, a ako nema značajnog utjecaja reakcija će rezultirati nastajanjem oba, 1,2-*cis* i 1,2-*trans* produkta. Nukleofilnom participacijom 2-*O*-acetilne skupine nastaju aciloksonijevi kationski međuprodukti koji su pak nastali pregradnjom oksokarbenijevih iona nakon otcijepljenja izlazne skupine L. Nukleofilni napad alkohola može se odvijati na dva mjesta. Ukoliko nukleofil (alkohol) napadne na anomerni C-atom nastaje 1,2-*trans* glikozid jer mora prići sa suprotne strane dioksalnog prstena. Napad na C-atom u dioksalnom prstenu rezultira nastajanjem ortoestera koji zatim izomerizira u isti 1,2-*trans* glikozid (Shema 12). Dakle, kako se glikozilacija uz sudjelovanje skupine na C-2 odvija tako da nastane 1,2-*trans* glikozid, to znači da ako je skupina na C-2 položaju ekvatorijalna (kao kod D-glukoze) nastajat će β-glikozidna veza, a ako je skupina na C-2 u aksijalnom položaju (kao ukod D-manoze) nastajat će α-glikozidna veza. Nasuprot tome, sinteze 1,2-*cis* glikozida kao što su α-glukozidi ili β-manozidi su puno zahtijevnije i ne mogu se provesti na ovako jednostavan način.



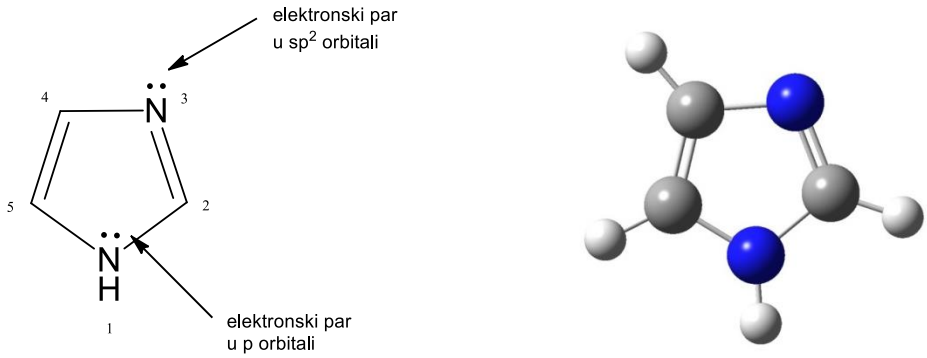
Shema 12. Mehanizam reakcije glikozilacije uz sudjelovanje skupine na C-2

2.2. Kemija imidazola i njegovih derivata

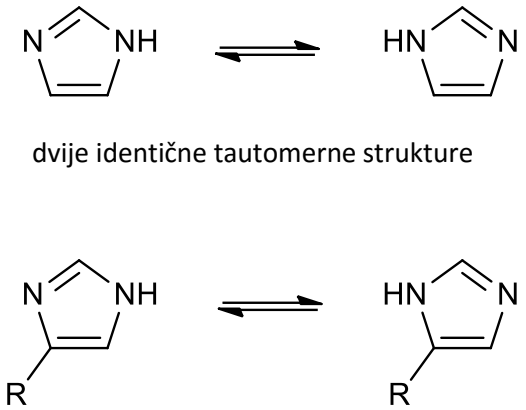
Kako su u ovom radu sintetizirani spojevi koji su konjugati α-D-manozida (o kojima je bilo riječi u prethodnom poglavlju) i različitih derivata imidazola slijedi kratki pregled kemije imidazola i njegovih derivata s naglaskom na strukturu, reaktivnost i sinteze istih.

Imidazol je aromatski heterociklički spoj koji sadrži dva dušikova atoma u strukturi, jedan pirolnog (N-1), a drugi piridinijskog tipa (N-3). Imidazol i njegovi derivati su sastavni dijelovi mnogih prirodnih i sintetskih aktivnih bioloških molekula kao što su alkaloidi, antifungicidi, antiobiotici, antihistaminici, sedativi, antitumorski agensi za kemoterapeutsko liječenje nekih oblika raka, lijekovi koji se koriste u liječenju kardiovaskularnih bolesti i bolesti kostiju, protuupalni lijekovi itd. Stoga upravo kemija imidazola i imidazolijevih derivata privlači veliku pozornost znanstvenika u dizajnu novih biološki aktivnih molekula.

Struktura imidazola je planarna što je posljedica aromatičnosti sustava. Naime četiri elektrona u dvije π-veze su u konjugaciji s elektronskim parom na pirolnom dušikovom atomu (N-1) imidazola koji je u p-orbitali. Šest elektrona u konjugiranom planarnom heterocikličkom sustavu zadovoljava i Hückelov kriterij aromatičnosti (Slika 5). Elektronski par na piridinijskom dušikovom atomu (N-3) imidazola nalazi se u sp^2 orbitali koja je okomita na π-sustav i ne igru ulogu u aromatičnosti već je mjesto reakcije s elektrofilima. Imidazol egzistira u dvije ekvivalentne tautomerne forme koje se mogu razlikovati tek kod supsituiranih imidazola (Slika 6). Imidazol je vrlo polarna molekula s dipolnim momentom 3.67 D. Pri normalnim uvjetima je bijela kristalna supstancija dobro topljiva u vodi.



Slika 5. Imidazol-struktura i aromatičnost (lijevo); kalotni model molekule imidazola (desno)



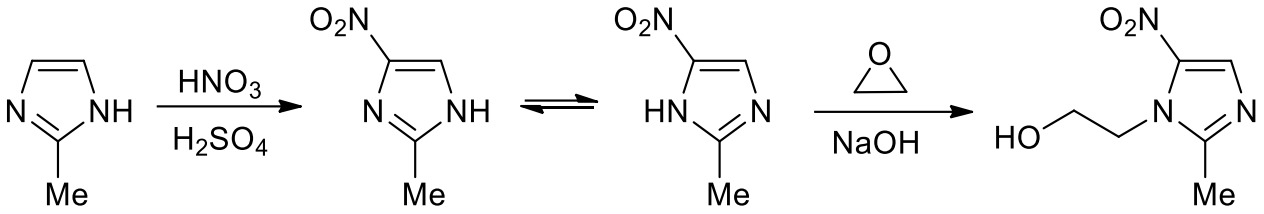
Slika 6. Tautomeri imidazola i supstituiranog imidazola

Imidazol se može supstituirati na bilo kojem položaju u prstenu. Pri tome razlikujemo *N*-supstituirane i *C*-supstituirane imidazole. U slučaju da su supstituirana oba dušikova atoma, imidazol postoji kao kvaterna sol s delokaliziranim pozitivnim nabojem.

Elektrofilna supstitucija *N*-supstituiranih imidazola preferirano se odvija na položajima 4 i 5 u odnosu na manje reaktivan položaj 2, a reakcije su ograničene na halogeniranje, nitriranje i sulfoniranje.

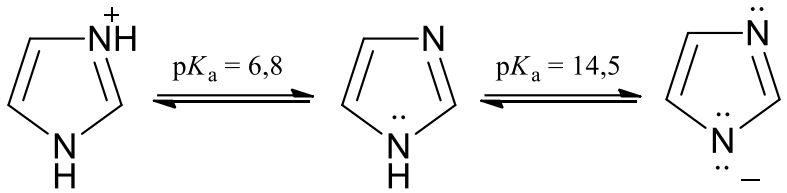
Jedna od često korištenih nukleofilnih reakcija s jakim bazama poput *n*-BuLi i Grignardovih reagenasa, kada je pirolni dušik zaštićen, uključuje formiranje organometalnih imidazolijevih derivata. Karbanion takvog imidazola reagira s elektrofilima što omogućuje uvođenje širokog spektra funkcionalnih skupina na imidazolni prsten.

Ukoliko se 2-supstituirani imidazol nitrira zbog keto-enolne tautomerije nastaje smjesa produkata. Međutim, tautomerizacija se može zaustaviti uvođenjem supstituenta na jedan od N- položaja npr. alkiliranjem u bazičnoj otopini. Naime, intermedijarni se anion supstituira elektrofilom samo na jednom dušikovom atomu, u ovom slučaju onom bliže nitro- skupini, zbog formiranja duljeg konjugiranog sustava. Na ovaj način sintetiziran je metronidazol, spoj koji se koristi u medicini (Shema 13). Nitriranjem 2-metilimidazola dobivena je smjesa izomernih nitrometilimidazola koja u reakciji s epoksidom u bazičnom mediju daje samo jedan produkt.[12]



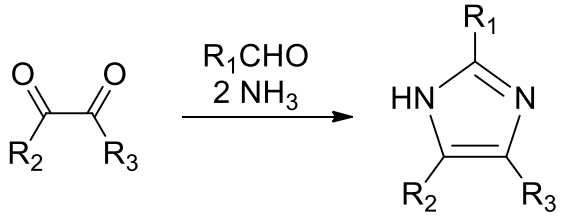
Shema 13. Sinteza metronidazola

Imidazol je amfoteran, tj. može se ponašati i kao kiselina i kao baza (Slika 7). Kao kiselina ima pK_a vrijednost 14,5 i nešto je kiseliji od alkohola, ali znatno manje kiseo od fenola i imida. Kao baza ima pK_a 6,8 i oko 60 puta je bazičniji od piridina. Činjenica da mu je pK_a blizu 7 znači da u gotovo neutralnim, odnosno fiziološkim uvjetima lako prelazi iz protoniranog u deprotonirani oblik i obrnuto. Zbog ovog svojstva imidazolni prsten se često može naći u aktivnim mjestima mnogih enzima (kao dio bočnog ogranka histidina).



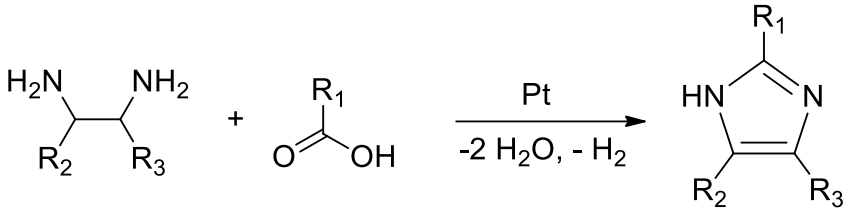
Slika 7. Kiselo-bazna svojstva imidazola

Imidazol je prvi put sintetiziran još sredinom 19. stoljeća iz 1,2-diketona (glioksal), formaldehida i amonijaka, poznato i kao Debusova metoda (Shema 14). Prinos te reakcije nije velik, ali se reakcija i dalje koristi za sintezu C-supstituiranih imidazola. Lofin ili 2,4,5-trifenilimidazol sintetiziran je mikrovalnom modifikacijom Debusovog postupka.[11]



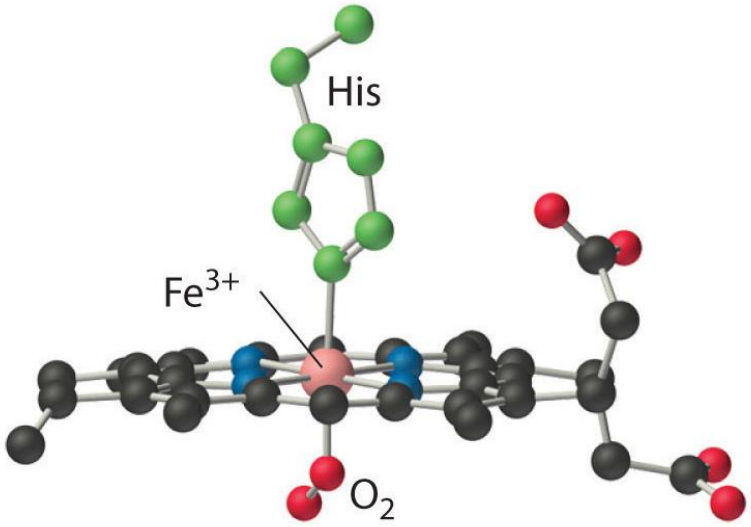
Shema 14. Debusova sinteza supstituiranih imidazola

Supstituirani imidazoli mogu se sintetizirati i iz 1,2-diaminoalkana i alkohola, aldehida ili karboksilne kiseline pri povišenoj temperaturi uz katalizator (Shema 15).

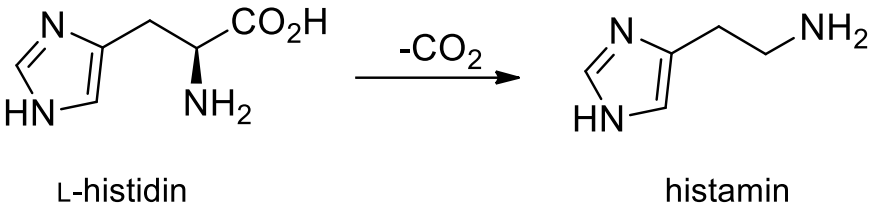


Shema 15. Sinteza supstituiranih imidazola iz 1,2-diamina i karboksilne kiseline

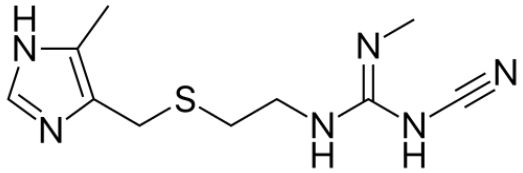
Imidazol je sastavni mnogih prirodnih spojeva, a među njima je vjerojatno najpoznatija aminokiselina histidin. Histidin se nalazi u aktivnom mjestu mnogih enzima. Jedan od razloga su svakako kiselo-bazna svojstava imidazola koji je u bočnom ogranku histidina, ali i njegova kompleksirajuća svojstva. Tako se histidin nalazi koordinacijski vezan na željezo (II) u aktivnom mjestu hemoglobina i sudjeluje u transportu kisika (Slika 8). Dekarboksilacijom histidina nastaje histamin koji je također biološki važna molekula (Shema 16). Organizam ga proizvodi kod alergijske reakcije i može izazvati urtikariju. Histamin je uključen i u kontrolu količine želučane kiseline. Imidazol koji je i sastavni dio lijeka cimetidina (komericijalno Tagamet®) djeluje tako da blokira receptore za histamin i time smanjuje izlučivanje želučane kiseline (Slika 8).



Slika 8. Prikaz aktivnog mjesta hemoglobina s vezanom molekulom O_2

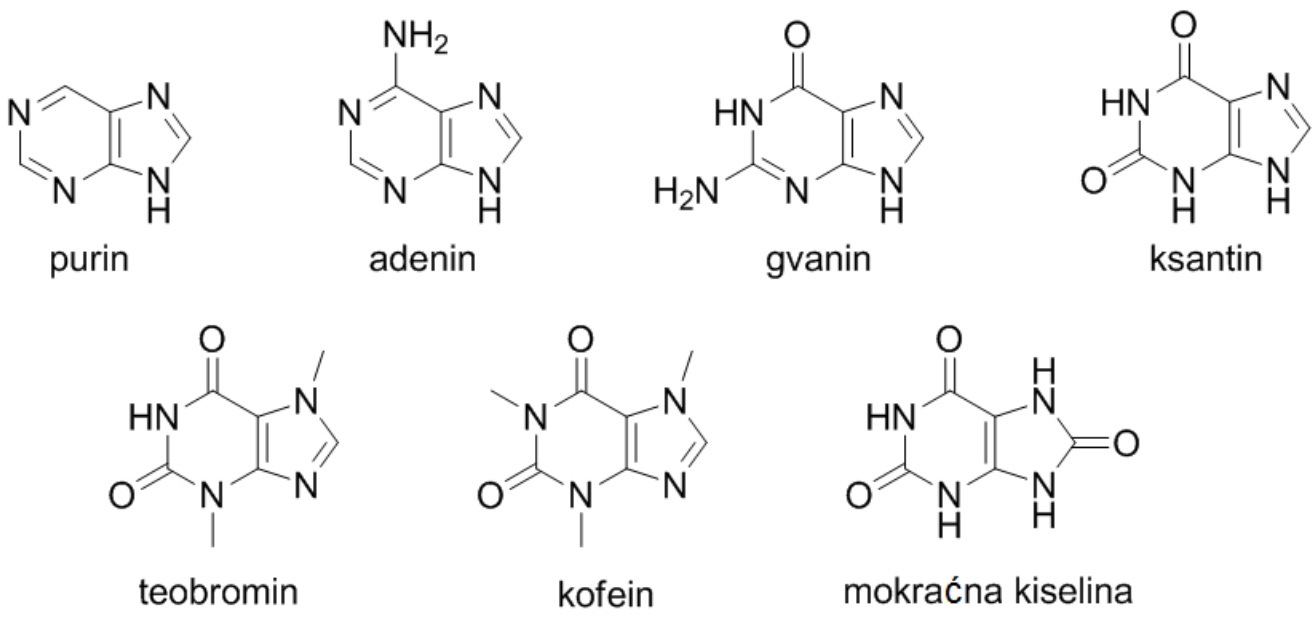


Shema 16. Dekarboksilacija L-histidina



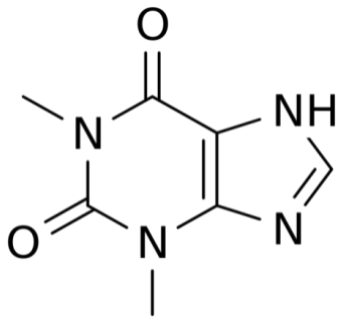
Slika 9. Cimetidin (Tagamet®)

Imidazol kondenziran s pirimidinom čini purin koji izgrađuje nukleinske kiseline. U DNA i RNA molekulama prisutne su dvije purinske dušične baze: adenin (6-aminopurin) i gvanin (2-amino-6-oksopurin). Adenin je i osnova strukture važnih metabolita, poput cikličkog AMP (adenozin monofosfat) koji je sekundarni glasnik u provođenju staničnog impulsa i NADH (nikotinamid adenin dinukleotid) važnog reducensa u oksido-redukcijskim metaboličkim reakcijama te mnogih drugih. Ostali značajniji spojevi koji sadrže purin su ksantin, teobromin, kofein i mokraćna kiselina (Slika 10).



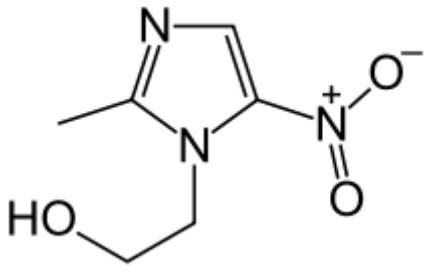
Slika 10. Purin i prirodni organski spojevi koji su derivati purina

Imidazol je i dio strukture teofilina (Slika 11), koji je nađen u čaju i kavi, a stimulans je središnjeg živčanog sustava. Koristi se kao lijek u liječenju respiratornih bolesti (kronična opstruktivna plućna bolest, astma).



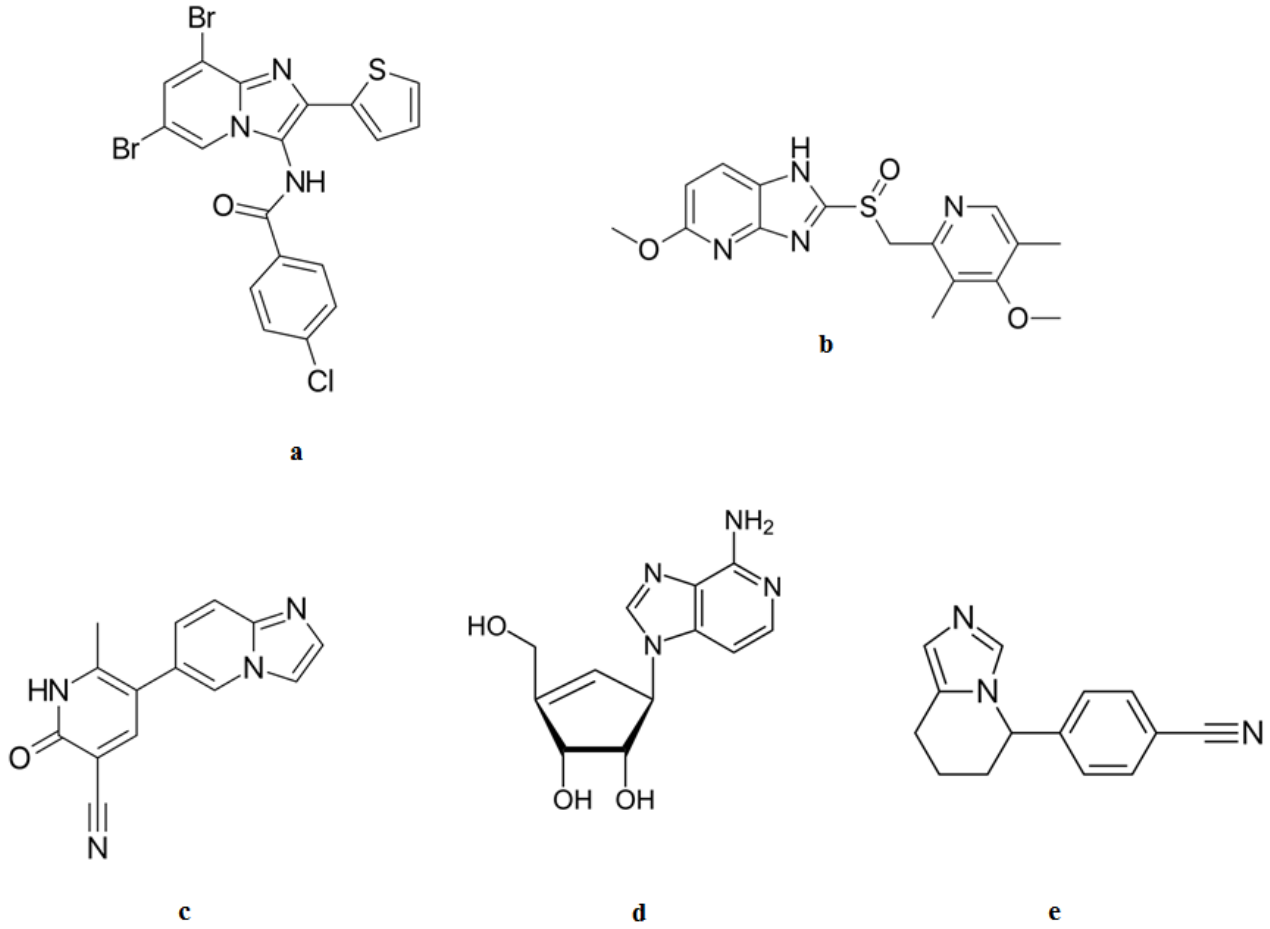
Slika 11. Teofilin

Metronidazol (Slika 12) je još jedna važna biološki aktivna molekula koja u strukturi sadrži imidazol. Koristi se kao antibiotik u liječenju nekih bakterijskih bolesti. Djeluje na razini inhibicije sinteze DNA no aktivan je samo u reduciranom obliku što je slučaj kod anaerobnih stanica. Dakle gotovo ne utječe na ljudske stanice i aerobne bakterije.



Slika 12. Metronidazol

Imidazopiridini (fuzionirani imidazolni i piridinijski prsten) su spojevi čiji je spektar bioloških aktivnosti vrlo širok. Generalno gledano, oni su pozitivni alosterički reuglatori GABA receptora (GABA = γ-aminobutanska kiselina), ali i inhibitori protonskih crpki, inhibitori aromataza i nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID – engl. *non stereoidal anti-inflammatory drug*). Prvi otkriveni pozitivni alosterički reuglator GABA receptora je lijek DS-1 (Slika 13a) koji je selektivan za određeni tip GABA receptora, a spada u klasu imidazopiridina.[13] Tenatoprazol (Slika 13b) je inhibitor protonskih crpki koji je potencijalni agens za smanjenje pretjeranog izlučivanja želučane kiseline. Olprinon (Slika 13c), farmaceutik koji je na tržištu od 1996. godine u Japanu, je kardiovaskularni stimulator. 3-Deazaneplanocin A (Slika 13d) je lijek koji djeluje kao inhibitor *S*-adenozilhomocistein sintetaze i inhibitor histon metiltransferaze EZH2 s kojim su provedena *in vitro* testiranja na antitumorsko djelovanja različitih stanica raka. Fadrazol (Slika 13e) koji također spada u skupinu derivata imidazolpiridina je selektivni inhibitor aromataze te je korišten kao kemoterapeutik u liječenju raka dojke.



Slika 13. Neki predstavnici klase imidazopiridinijskih lijekova (**a**-DS-1, **b**-Tenatoprazol, **c**-Olprinon, **d**-3-deazaneplanocin A, **e**-Fadrazol)

2.3. Lektini. FimH adhezin i njegovi inhibitori

Lektini su proteini neimunološkog podrijetla koji posjeduju mogućnost aglutiniranja eritrocita i drugih tipova stanica. Klasificiraju se na temelju strukturne građe i odgovarajućih veznih mjesta za ugljikohidrate koji se nazivaju CR domene (engl. *carbohydrate recognition domain,* CRD). Lektini su dio staničnih struktura koje bakterijskoj stanici omogućuju adheziju na druge stanice i tkiva. Organele koje pritom vrše tu funkciju nazivaju se fimbrije (lat. *fimbirae*) ili pili. Fimbrije u svojoj strukturi sadrže lektine koji posreduju u ugljikohidrat-specifičnoj adheziji na površinu stanice kao i staničnoj aglutinaciji tzv. adhezine. Većina fimbrija gram-negativnih bakterija se ponašaju kao adhezini, no samo je podjedinica proteina na vrhu fimbrija adhezin. Kod gram-pozitivnih bakterija proteinski i polisaharidni omotači služe kao specifični adhezini. Adhezine eksprimiraju i patogene i saprofitske bakterije. Kod saprofitskih bakterija adhezin ima samo ulogu u adheziji na podlogu, dok kod patogenih bakterija ima značajnu ulogu u patogenezi i upalnim procesima.

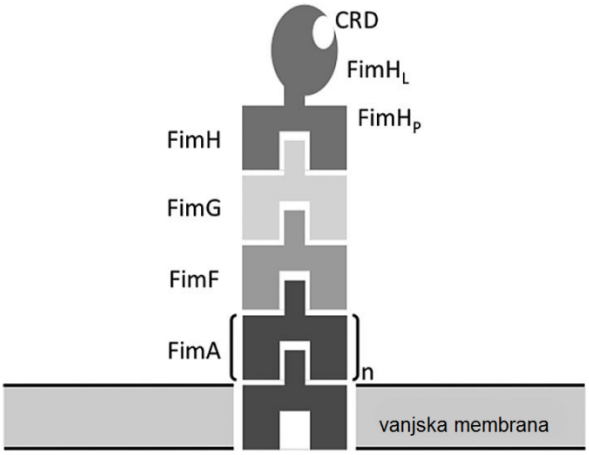
Iako je otkriće antibakterijskih lijekova predstavljalo veliko medicinsko dostignuće, sve veća rezistentnost bakterija na postojeće antibiotike zahtijeva razvoj novih antibaktericida. S obzirom da je sposobnost bakterija da zaraze organizam domaćina vođena upravo njihovom adhezijom na specifično tkivo, potencijalna inhibicija tog procesa mogla bi biti učinkovita u zaustavljanju infekcije. Ugljikohidratni derivati kao antiadhezivni lijekovi mogli bi se upotrijebiti kao alternativa antibioticima. Takvi spojevi imali bi nekoliko važnih prednosti. Manje je za očekivati da će doći do razvoja rezistentnosti bakterija na takav tip lijekova, a i mutacije samih adhezina bi direktno utjecale na sposobnost patogena da se vežu na receptor domaćina umanjujući tako i samu zarazu te otrovnost. Na žalost, trenutno na tržištu nema registriranih kemijskih spojeva ovog tipa koji bi služili kao antibakterijski adhezivni lijekovi.

Rana istraživanja na području mehanizama adhezije pokazala su da ja za obranu organizma od patogenih bakterija ključna sposobnost stanice domaćina da spriječi vezanje bakterijskog adhezina.[14] Adhezini su, također, pogodna meta za cjepiva jer su često nužni za patogenezu, a njihova subcelularna lokacija je površina stanice pa su lagano dostupni antitijelima.

Istraživanja koja su pokazala učinkovitost antitijela na adhezin rađena su na FimH proteinu, adhezinu iz fimbrija uropatogene bakterije *Escherichia coli* (*E. coli,* UPEC) koja uzrokuje brojne infekcije mokraćnog sustava, ali i meningitis.[14] Bakteriju *E. coli* otkrio je pedijatar i bakteriolog Theodor Escherich i jedna je od glavnih vrsta bakterija koje žive u donjem dijelu probavnog trakta sisavaca. Nužna je za pravilnu probavu hrane te sudjeluje u radu crijevne flore. Njezina je prisutnost u podzemnim vodama obično indikator fekalne zaraze.

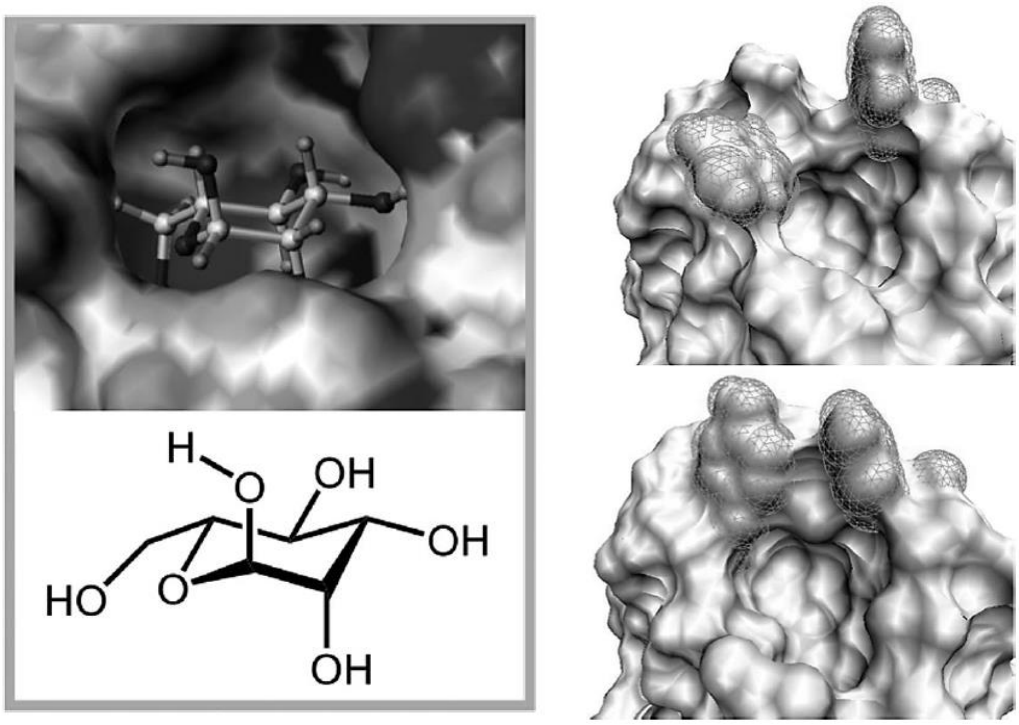
Najbolje proučeni adhezin je FimH protein (Slika 14) koji je eksprimiran u fimbrijima tipa 1 bakterije *E. coli*. Nađeno je da FimH specifično veže α-D-manopiranozu te da je odogovaran za specifičnost cijelog receptora.[15,16] α -D-manopiranoza i metil-α-D-manopiranozid vežu se na FimH lektin (K_d 2,3 i 2,2 μM) i inhibiraju aglutinaciju stanica kvasca bakterijom *E. coli* (IC_{50} 0,56 i 0,45 mM).[17,18] Nakon otkrića specifičnih interakcija između FimH receptora i α-D-manozida literaturi se mogu naći brojni pokušaji razumijevanja procesa adhezije bakterijskih stanica.[19,20] Nedavno je objavljen i mehanizam djelovanja adhezina FimH.[21] Također, mnogo je objavljenih članaka na temu sinteze spojeva koji su dobri FimH inhibitori.[22-24] Pokazano je da oralno aktivni FimH inhibitori preveniraju infekcije urinarnog trakta.[25,26] Kako FimH specifično prepoznaje α-D-manopiranozu i njene glikokonjugate, spojevi koji su dobri FimH inhibitori redovito su strukturno temeljeni na tom monosaharidu. Ova neobična, ali visoko specifična interakcija jednog monosaharida s lektinom rezultat je strogo definiranog FimH-manoznog veznog mjesta. Glukoza i drugi monosaharidi s ekvatorijalnom C-2 hidroksilnom skupinom vežu se na FimH lektin sa zanemarivim afinitetom.

FimH lektin nalazi se na samom vrhu strukture fimbrije tipa 1 te sadrži CR domenu specifičnu za α-D-manozide (Slika 14). Sekvenca FimH proteina duga je 279 aminokiselinskih ostataka te mu masa približno iznosi 29 kDa.



Slika 14. Shema strukture bakterijskih fimbrija tip 1[18]

Poznato je da FimH ima dvije domene: pilus domenu (FimH$_P$) i lektinsku domenu (FimH$_L$). N-terminalna lektinska domena (FimH$_L$) specifična za vezanje α-D-manozida, građena je od 156 aminokiselinskih ostataka, a C-terminala pilus domena koja usidruje adhezin od 119 ostataka. CR domena u koju se smještaju α-D-manopiranozidi, kako pokazuje kristalna struktura, nalazi se na samom vrhu lektinske domene (Slika 14). α-D-manozidi se pritom vežu u negativno nabijenu šupljinu stvarajući 10 direktnih vodikovih veza s FimH veznim mjestom i indirektne vodikove veze s vodom. Sve OH skupine piranoznog prstena (izuzev anomerne) u snažnoj su interakciji s CR domenom FimH lektina. Vezno mjesto za manozu okruženo je hidrofobnom brazdom (rubom, grebenom). Bočni ogranci nekoliko tirozinskih ostataka smješteni su tako da formiraju strukturu nalik vratima / ulazu tzv. „tirozinska vrata“ koja stvarajući π-π interakcije s aromatskim ligandima aglikonskog dijela α-D-manopiranozida pojačavaju afinitet vezanja (Slika 15, 16).



Slika 15. Položaj smještanja α-D-manozidnog liganda u vezno mjesto FimH CR domene, dok se β-D-manozidi iz steričkih razloga ne mogu vezati na FimH lektin (slika lijevo). Struktura CR domene bakterijskog lektina FimH s jasno vidljivim veznim mjestom za α-D-manozide i tirozinskim vratima u otvorenoj i zatvorenoj konformaciji (slika desno). [18]

Slika 16. Kristalna struktura FimH proteina s *n*-heptil-*O*-D-manopiranozidom (izvor: baza podataka *Protein Data Bank*)[27]

§3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće napomene

Sve su korištene kemikalije i otapala bila analitičke čistoće (p.a.). Otapala su po potrebi sušena uobičajenim postupcima opisanima u literaturi.[28] Heterociklički spojevi korišteni kao aglikonski dijelovi (imidazolni derivati) su komercijalno dostupni.

Tijek reakcija, identifikacija spojeva i kontrola čistoće ispitivane su uzlaznom tankoslojnom kromatografijom, infracrvenom spektroskopijom (IR), masenom spektrometrijom (MS) te ^{1}H i ^{13}C nuklearnom magnetskom rezonancijom (NMR).

Uzlazna tankoslojna kromatografija (TSK) rađena je na staklenim pločicama silikagela (DC-Alufolien Kiesegel 60 F_{254}, Merck) ili na pločicama aluminijeva oksida (DC-Alufolien Aluminiumoxide 60 F_{254}, Merck), a spojevi su detektirani UV svjetlom, reverzibilnom adicijom joda i spaljivanjem nakon prskanja sumpornom kiselinom (*w*=10%), tim redom. Sustavi otapala koja su korištena za kromatgrafiju navedena su u tablici 3.

Tablica 3. Sustavi otapala korišteni za TSK i kromatografsko razdvajanje

sustav otapala	otapalo 1	otapalo 2	otapalo 1 : otapalo 2
A	EtOAc	heksan	1:1
B	EtOAc	petroleter	1:1
C	$CHCl_3$	MeOH	9:1
D	$CHCl_3$	MeOH	1:1

Optička skretanja odrađena su na polarimetru *SCHMIDT-HAENSCH Polartronic NH8* (589 nm) na sobnoj temperaturi (25 ^{o}C) u ćeliji dugoj 1 dm. Koncentracija otopine izražena je kao masa otopljenog uzorka u 100 mL otopine (g/100mL).

Vibracijski spektri (IR spektri) snimljeni su na uređaju *FTIR Perkin-Elmer Spectrum Two* koristeći KBr pastile u području 4000-400 cm^{-1}.

NMR spektri (^{1}H i ^{13}C) spojeva snimljeni su na uređajima Bruker AV300/AV600 i Bruker Avance III HD 400 MHz/54 mm Ascend u deuteriranim otapalima na sobnoj temperaturi koristeći tetrametilsilan (Me_4Si, TMS) kao unutarnji standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u dijelovima na milijun (ppm) prema signalu TMS-a, a konstante sprege (*J*) izražene su u hercima (Hz). Multiplicitet signala označen je slovima s (sinlget), d (dublet), t (triplet), q (kvartet), m (multiplet). Atomi glikonskog dijela glikozida označeni su brojevima 1-6, atomi u aglikonskom dijelu koji povezuju glikon s heterociklom označeni su s apostrofom (') i numerirani s 1 ili 2 (npr. H'-1 ili C'-1) dok su atomi heterocikla označeni s indeksom Im i numerirani (npr. H_{Im}-1 ili C_{Im}-4). Ukoliko je primjećeno postojanje dijastereotopnih protona, dodana im je oznaka a, b, c itd.

Određivanje molekulskog iona provedeno je na HPLC Agilent 1200 Series s DAD detektorom i spektrometrom mase s trostrukim kvadrupolom Agilent 6410. Kao način ionizacije korištena je ionizacija raspršenim elektronima (engl. *Electrospray Ionisation* - ESI)

3.2. Sinteza 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil-α-D-manopiranozida (**1**).

Smjesi D-(+)-manoze (0,94 g, 5,22 mmol) i acetanhidrida (6 mL, $6{,}31 \cdot 10^{-2}$ mol) uz snažno miješanje (do 1200 rpm) pri sobnoj temperaturi dodan je jod (50 mg). Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom na pločici silikagela u sustavu otapala **A**. Nakon 1-10 min uočen je egzotermni skok (do 90°C) te je reakcija prekinuta. Hladna reakcijska smjesa izlivena je u lijevak za odjeljivanje u kojem se nalazio diklormetan (50 mL), zasićena otopina $Na_2S_2O_3$ (10 mL) i usitnjeni led. Organski je sloj odvojen, a vodeni ekstrahiran dva puta sa po 20 mL diklormetana. Organski ekstrakti spojeni su, neutralizirani zasićenom vodenom otopinom Na_2CO_3 i sušeni na bezvodnom Na_2SO_4. Nakon sušenja otopina je profilitrirana, a otapalo upareno na rotacijskom uparivaču.

Sirovi produkt je dodatno pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala **A** u kojem je R_f (**1**)=0,33. Dobiven je blijedo žućkasti sirupasti produkt **1** (2,23 g, 91,3 %) koji kristalizira stajanjem u ledenici.

IR (KBr) ν / cm^{-1}: 2987-2893 (C-H), 1742 (C=O)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ_H / ppm: 6,09 (d, 1H, J=1,6 Hz, H-1), 5,36-5,24 (m, 3H, H-2,3,4), 4,28 (dd, 1H, J_1=12,5 Hz, J_2=2,2 Hz, H-6a), 4,11 (dd, 1H, J_1=12,4, J_2=4,9 Hz, H-6b), 4,08-4,02 (m, 1H, H-5) 2,22 - 2,05 (5 s, 15H, 5 C<u>H</u>$_3$-C=O)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$), δ_C / ppm: 170,0, 169,4, 169,1, 168,9, 167,5 (5 <u>C</u>=O), 90,1 (C-1), 70,1, 68,2, 67,9, 65,1 (C-2, 3, 4, 5), 61,6 (C-6), 20,3, 20,2, 20,1 20,07, 20,04 (5 <u>C</u>H$_3$-C=O)

3.3. Sinteza 1-(2-brometil)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-manopiranozida (**2**).

Otopina penta-*O*-acetil-α-D-manopiranozida (**1**) (1,8612 g, 4,785 mmol) i 2-brometanola (0,41 mL, 5,8 mmol) u suhom diklormetanu (20 mL) miješana je na 0 °C u inertnoj atmosferi argona zaštićena od svjetla. Potom je u nju postupno kroz 10 minuta dokapavan $BF_3 \cdot Et_2O$ (3,38 mL, 23,8 mmol). Miješanje je nastavljeno 1 sat na 0 °C, a potom na sobnoj temperaturi još 12 sati. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala **B**. Reakcijska smjesa razrijeđena je diklormetanom (20 mL) i ledenom vodom (100 mL) uz miješanje. Organski sloj je odijeljen te ispran vodom, zasićenom otopinom natrijevog karbonata i zasićenom otopinom natrijevog klorida. Organski ekstrakt je sušen na bezvodnom Na_2SO_4, profiltriran i koncentriran uklanjanjem otapala na rotacijskom uparivaču.

Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala **B** , R_f (**2**)=0,43 te je dobiven bezbojni sirupasti viskozni produkt **2** (1,9631 g, 90,2 %) koji stajanjem u ledenici kristalizira (bijeli kristali).

IR (KBr) ν / cm^{-1}: 2998-2894 (C-H), 1739 (C=O)

^{1}H-NMR (DMSO-d_6), δ_H / ppm: 5,376-5,255 (m, 3H, H-2,3,4), 4,878 (d, 1H, *J*=1,6 Hz, H-1), 4,301-4,247 (m, 1H, H-6a), 4,163-4,110 (m, 2H, H-6b+H'-1a), 4,015-3,947 (m, 1H, H'-1b), 3,923-3,854 (m, 1H, H-5), 3,541-3,495 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz, H'-2), 2,163, 2,110, 2,056, 2,002 (četiri s, 4×3H, C<u>H</u>$_3$-C=O)

^{13}C-NMR (DMSO-d_6), δ_C / ppm: 170,0, 169,4, 169,3, 169,2 (C=O), 97,3 (C-1), 68,9, 68,6, 68,4 (C-2, 3, 4), 68,0 (C-6), 65,6 (C-5), 61,9 (C'-1), 29,0 (C'-2), 20,9, 20,8, 20,7, 20,6 (4×<u>C</u>H$_3$-C=O)

3.4. Opći postupak sinteze spojeva **7**-**10** (kvaternizacije).

Spoj **2** (oko 200 mg) i odgovarajući derivat imidazola **3**-**6** u blagom suvišku (1,5 ekv.) otope se u suhom *N*,*N*-dimetilformamidu (5 mL). Reakcijska smjesa se miješa uz zagrijavanje na temperaturi 100 °C. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala **C**. Reakcije priprave spojeva **7**-**10** (kvaternizacije) su se odvijale 24-96 sata. Po završetku reakcije, preostalo je otapalo upareno te je produkt pročišćen na stupcu silikagela u sustavu otapala **C**.

3.4.1. 1-(2-(2,3,4,6-tetra-O-*acetil-α-D-manopiranoziloksi)etil)imidazo[1,2-a]piridinijev bromid* (**7**)

Prema opisanom općem postupku iz **2** i **3** dobiven je spoj **7**, smeđi sirupasti produkt (110,0 mg, 45,1%)

R_f (**7**)=0 (sustav otapala **C**)

IR (KBr) ν / cm^{-1}: 1748 (C=O), 1630 (C=N)

^{1}H-NMR (DMSO-d_6), δ_H / ppm: 8,982 (d, 1H, *J*=6,7 Hz, H$_{Im}$-5), 8,482 (d, 1H, *J*=2,1 Hz, H$_{Im}$-3), 8,340 (d, 1H, *J*=9,5 Hz, H$_{Im}$-8), 8,322 (d, 1H, *J*=2,1 Hz, H$_{Im}$-2), 8,018 (t, 1H, *J*= 8,2 Hz, H$_{Im}$-7), 7,589 (t, 1H, *J*= 7,0 Hz, H$_{Im}$-6), 5,028-4,755 (m, 5H, H-1,2,3,4,5), 4,061-3,712 (m, 4H, H-6 + H'-2), 3,403 (m, 1H, H'-1a), 2,064, 2,020, 2,001, 1,921 (četiri s, 4×3H, C<u>H</u>$_3$-C=O), 1,236 (m, 1H, H'-1b)

^{13}C-NMR (DMSO-d_6), δ_C / ppm: 170,5, 170,0, 169,8 (C=O), 140,0 (C_{Im}-9), 134,2 (C_{Im}-5), 130,1 (C_{Im}-3), 126,2 (C_{Im}-8), 117,9 (C_{Im}-2), 115,9 (C_{Im}-7), 112,2 (C_{Im}-6), 96,5 (C-1), 68,8, 68,7, 68,3 (C-2, 3, 4), 66,2 (C-6), 65,5 (C-5), 62,2 (C'-2), 46,9 (C'-1), 21,0, 20,9, 20,8 ($\underline{C}H_3$-C=O)

MS (ESI) *m/z* izračunato: 493,182, izmjereno: 493,1

*3.4.2. 1-(4-hidroksifenil)-3-(2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-manopiranoziloksi)oksi)etil) imidazolijev bromid* (**8**)

Prema opisanom općem postupku iz **2** i **4** dobiven je spoj **8**, svijetlo smeđa krutina (232,4 mg, 82,8%).

R_f (**8**)=0 (sustav otapala **C**)

IR (KBr) ν / cm^{-1}: 3437 (O-H), 3146(C=H), 1747 (C=O)

^{1}H-NMR (DMSO-d_6), δ_H / ppm: 9,78 (m, 1H, H_{Im}-2), 8,26-8,20 (m, 1H, H_{Im}-5), 8,01-7,94 (m, 1H, H_{Im}-4), 7,57 (d, 2H, *J*=8,7 Hz, *o*-$\underline{H}$-PhOH), 6,99 (d, 2H, *J*=8,9 Hz, *m*-$\underline{H}$-PhOH), 5,15-5,06 (m, 2H, PhO$\underline{H}$ + $\underline{H}$-šećer), 4,97 (d, 1H, *J*=1,1 Hz, H-1), 4,57-4,35 (m, 3H), 4,13-3,89 (m, 5H), 3,69-3,64 (m, 1H) , 2,10, 2,01, 1,97, 1,94 (4 s, 4×3H, C$\underline{H}_3$-C=O)

MS (ESI) *m/z* izračunato: 535,192, izmjereno: 535,1

*3.4.3. 1-(2,3,5,6-tetrafluorfenil)-3-(2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-manopiranoziloksi)oksi)etil) imidazolijev bromid* (**9**)

Prema opisanom općem postupku iz **2** i **5** dobiven je spoj **9**, tamno smeđi sirupasti talog (155,8 mg, 45,4%). (Napomena: Spoj je bez pročišćavanja podvrgnut reakciji deacetiliranja)

R_f (**9**)=0 (sustav otapala **C**)

IR (KBr) ν / cm^{-1}: 2933 (C-H), 1748 (C=O)

*3.4.4. 1,5-dicikloheksil-3-(2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-manopiranoziloksi)oksi)etil)imidazolijev bromid* (**10**)

Prema opisanom općem postupku iz **2** i **6** dobiven je spoj **10**, smeđi sirupasti produkt (93,6 mg, 30,8%).

R_f (**10**)=0 (sustav otapala **C**)

IR (KBr) ν / cm^{-1}: 3420 (O-H), 2931, 2856 (C-H), 1750 (C=O), 1672 (C=N)

^{1}H-NMR (DMSO-d_6), δ_H / ppm: 9,40 (s, 1H, H_{Im}-2), 7,62 (s, 1H, H_{Im}-4), 5,10-4,96 (m, 3H, H-2,3,4), 4,94 (d, 1H, *J*=1,5 Hz, H-1), 4,4 (m, 2H, H'-2), 4,12-3,80 (m, 3H, H-6+H'-1a), 2,77-2,89 (m, 1H, H'-1b), 2,10, 2,05, 1,98, 1,94 (4 s, 4×3H, C$\underline{H}_3$-C=O), 1,9-1,2 (m, 22H, cikloheksil)

^{13}C-NMR (DMSO-d_6), δ_C / ppm: 170,5, 170,1, 169,9, 169, 7 (C=O), 140,2 (C_{Im}-4), 135,3 (C_{Im}-2), 118,2 (C_{Im}-5), 96,4 (C-1), 68,9, 68,8, 68,4 (C-2,3,4), 65,6 (C-5), 64,9 (C-6), 62,1 (C'-2), 56,1 (N_{Im}-3−$\underline{C}$), 49,0 (C'-1), 34,3, 34,1, 32,9, 32,7 (cikloheksil), 32,5 (C_{Im}-4−$\underline{C}$), 25,8, 25,6, 25,2, 24,9 (cikloheksil), 21,0, 20,9, 20,8, 20,7 ($\underline{C}H_3$-C=O)

MS (ESI) *m/z* izračunato: 607,323, izmjereno: 607,2

3.5. Opći postupak dobivanja spojeva **11**-**14** (deacetiliranje).

Produkti **7**-**10** otopljeni su u 10 mL metanola te je u otopinu dodano 10 μL otopine natrijevog metoksida u metanolu (*w*(NaOMe)=25%) . Tijek reakcije praćen je IR spektroskopijom. Po završetku reakcije deacetilirani spojevi pročišćeni su na stupcu silikagela u sustavu otapala **D** te im je snimljen maseni i NMR spektar te optičko skretanje.

3.5.1. 1-(2-(α-D-manopiranoziloksi)etil)imidazo[1,2-a]piridinijev bromid (**11**)

Prema opisanom općem postupku deacetiliranjem spoja **7** dobiven je spoj **11**, tamno smeđa krutina. (16,3 mg, 9,5%).

R_f (**11**)=0 (sustav otapala **D**)

IR (KBr) ν / cm^{-1}: 3435 (O-H), 2929 (C-H) 1629 (C=N)

^{1}H-NMR (DMSO-d_6), δ_H / ppm: 8,967 (d, 1H, *J*=6,8 Hz, H_{Im}-5), 8,459 (d, 1H, *J*=1,9 Hz, H_{Im}-3), 8,289 (d, 1H, *J*=2,2 Hz, H_{Im}-2), 8,256 (d, 1H, *J*=9,3 Hz, H_{Im}-8), 8,036 (t, 1H, *J*= 8,1 Hz, H_{Im}-7), 7,562 (t, 1H, *J*= 6,9 Hz, H_{Im}-6), 4,789-4,638 (m, 4H), 4,592 (d, 1H, *J*=1,4 Hz, H-1), 4,531 (s, 1H), 4,385 (t, 1H, *J*=5,8 Hz) 4,010-3,887 (m, 1H), 3,835-3,731 (m, 1H), 3,530-3,132 (m, 5H), 2,830 (t, 1H, *J*=7,9 Hz)

^{13}C-NMR (DMSO-d_6), δ_C / ppm: 139,7 (C_{Im}-9), 134,0 (C_{Im}-5), 130,1 (C_{Im}-3), 126,3 (C_{Im}-2), 117,8 (C_{Im}-8), 115,7 (C_{Im}-7), 112,0 (C_{Im}-6), 100,2 (C-1), 74,6, 71,2, 70,4 (C-2,3,4), 67,1 (C-5), 65,1 (C-6), 61,4 (C'-2), 47,2 (C'-1)

MS (ESI) *m/z* izračunato: 325,139, izmjereno: 325,2

3.5.2. 1-(4-hidroksifenil)-3-(2-(α-D-manopiranoziloksi)etil)imidazolijev bromid (**12**)

Prema opisanom općem postupku deacetiliranjem spoja **8** dobiven je spoj **12**, žuti do svijetlo smeđi prah (23,2 mg, 9,0%).

R_f (**12**)=0 (sustav otapala **D**)

IR (KBr) ν / cm^{-1}: 3418 (O-H), 2923 (C-H), 1619 (C=N)

^{1}H-NMR (DMSO-d_6), δ_H / ppm: 9,80 (s, 1H, H_{Im}-2), 8,43 (s, 2H, Ph-OH), 8,20 (m, 1H, H_{Im}-4), 8,00 (m, 1H, H_{Im}-4), 7,57 (d, 1H, *J*=8,9 Hz, *o*-H-PhOH), 6,98 (d, 1H, *J*=8,5 Hz, *m*-H-PhOH), 4,85-4,72 (m, 3H), 4,73-4,66 (m, 2H), 4,62 (d, 1H, *J*=1,5 Hz, H-1), 4,63-4,61 (m, 1H), 4,01-3,92 (m, 1H), 3,90-3,81 (m, 2H), 3,78-3,72 (m, 2H), 3,68-3,54 (m, 5H)

MS (ESI) *m/z* izračunato: 367,150, izmjereno: 367,2

3.5.3. 1-(2,3,5,6-tetrafluorfenil)-3-(2-(α-D-manopiranoziloksi)etil)imidazolijev bromid (**13**)

Prema opisanom općem postupku deacetiliranjem spoja **9** dobiven je spoj **13**, tamnosmeđa krutina (116,9 mg, 45,4%).

R_f (**13**)=0 (sustav otapala **D**)

IR (KBr) ν / cm^{-1}: 3391 (O-H), 2934 (C-H), 1649 (C=N)

^{1}H-NMR (DMSO-d_6), δ_H / ppm: 8,28 (s, 1H, Ph-H), 7,69-7,62 (m+d, 2H, *J*=1,6 Hz H_{Im} + H-1), 7,29-7,17 (m, 2H, H_{Im}), 5,08 (m, 3H, H-2,3,4), 4,57 (s, 1H, OH), 4,49-4,41 (m, 2H, H-6), 4,25 (d, 1H, *J*=7,6 Hz), 4,09-4,01 (m, 1H, H-5), 3,92-3,85 (m, 1H), 3,72-3,64 (m,1H), 3,21-3,09 (m,2H), 3,08-2,93 (m, 2H, H'-1)

^{13}C-NMR (DMSO-d_6), δ_C / ppm: 164,4 (H_{Im}-5), 148,5, 147,7, 145,3 (Ph-F,N), 100,3 (C-1), 100,1 (Ph-H), 95,5, 95, 2 (H_{Im}-2, 4), 74,5, 71,4, 70,7, 67,3 (C-2, 3, 4, 5), 64,4, 61,6 (C-6 + C'-2), 47,8 (C'-1)

MS (ESI) *m/z* izračunato: 423,117, izmjereno: 423,1

$[\alpha]_D^{25}$ = +14,7° (*c* 0,82, MeOH)

3.5.4. 1,5-dicikloheksil-3-(2-(α-D-manopiranoziloksi)etil)imidazolijev bromid (**14**)

Prema opisanom općem postupku deacetiliranjem spoja **10** dobiven je spoj **14**, bijeli do svijetlo žuti kristalni produkt (93,6 mg, 30,8%).

R_f (**14**)=0 (sustav otapala **D**)

IR (KBr) ν / cm^{-1}: 3371 (O-H), 2930, 2855 (C-H) 1667 (C=N)

^{1}H-NMR (DMSO-d_6), δ_H / ppm: 9,38 (d, 1H, *J*=1,4 Hz, H_{Im}-2), 7,56 (d, 1H, *J*=1,2 Hz, H_{Im}-4), 4,61 (d, 1H, *J*=1,4 Hz, H-1), 4,33 (t, 2H, *J*=5,0 Hz, H-6), 4,21 (t, 2H, *J*=11,8 Hz, H'-2), 3,94-3,86 (m, 1H), 3,78-3,70 (m, 1H), 3,58-3,51 (m, 3H), 3,42-3,28 (m, 4H, 4OH, prekrivanje sa signalom H_2O), 2,84-2,75 (m, 2H, H'-1), 2,09-1,15 (m, 22H, cikloheksilni protoni)

^{13}C-NMR (DMSO-d_6), δ_C / ppm: 140,0 (C_{Im}-5), 135,1 (C_{Im}-4), 118,2 (C_{Im}-3), 100,0 (C-1), 74,5, 71,4, 70,4 (C-2, 3, 4), 67,1 (C-5), 64,4 (C-6), 61,5 (C'-2), 56,1 (N_{Im}-1 – C), 49,4 (C'-1), 34,1, 32,8 (cikloheksil), 32,6 (C_{Im}-5 – C), 25,9, 25,7, 25,2, 24,9 (cikloheksil)

MS (ESI) *m/z* izračunato: 439,280, izmjereno: 439,3

$[\alpha]_D^{25}$ = +15,4° (*c* 0,85, MeOH)

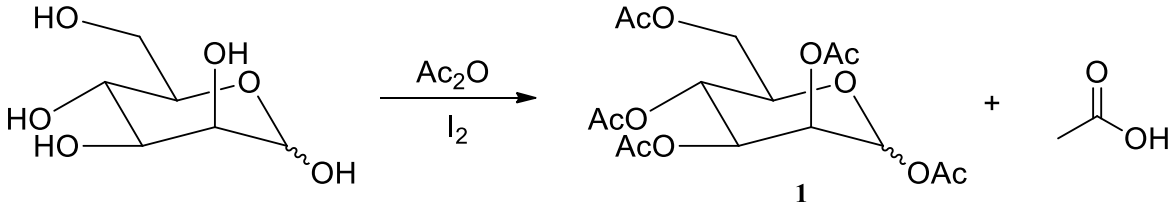
3.6. Optimizacije geometrija ciljnih molekula računalnim metodama

Ciljne molekule **11** – **14** optimizirane su računalnim metodama u programu *ChemBio3D Ultra 13.0* koristeći MM2 optimizaciju te je pretražen konformacijski prostor. Slike izračunatih geometrija spremljene su te su priložene u radu.

§4. REZULTATI I RASPRAVA

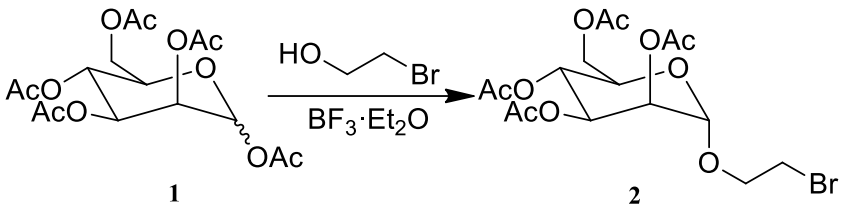
Na temelju proučene literature i poznavanja kristalne strukture aktivnog mjesta FimH lektina studirana su, dizajnirana, sintetizirana i okarakterizirana 4 nova heterociklička glikokonjugata α-D-manopiranoze (**11-14**) kao potencijalni FimH inhibitori. Dobiveni spojevi su strukturno slični spojevima za koje je literaturno poznato da su FimH inhibitori. Heterociklički spojevi **3-6** koji su korišteni u sintezi derivati su imidazola, peteročlanog heterocikla s dva dušikova atoma u prstenu. Imidazolnim derivatima pripisuju se različiti terapeutski učinci, od antibiotskih i antiparazitskih pa sve do antitumorskih i protuupalnih. Spojevi α-D-manopiranoze su pak poznati kao bakterijski anti-adhezini jer inhibiraju adhezijski protein FimH. Biciklički derivati imidazola povezani s α-D-manopiranozidom pokazali su najbolji postotak inhibicije stoga su izabrana četiri različita biciklička imidazolna derivata **3-6** za kondenzaciju s glikonskim donorom **2**.

Sinteza konačnih spojeva odvijala se u 4 koraka. Prva dva koraka koja uključuju protekciju šećera acetilnim skupinama i pripravu glikozida opisana su u literaturi. Acetiliranje šećera provedeno je metodom bez otapala kako su opisali Kartha i suradnici[7], reakcijom D-manoze u acetanhidridu uz dodatak katalitičke količine joda (Shema 17). Nakon završetka reakcije jod je uklonjen dodatkom natrijevog tiosulfata koji ga reducira u jodid. Octena kiselina koja je nusprodukt u ovoj reakciji neutralizirana je zasićenom otopinom Na_2CO_3. Jodid i natrijev acetat su potom odvojeni ekstrakcijom u vodenom sloju. Organski sloj sadržavao je neizreagirani šećer, acetanhidrid i acetilirani šećer (produkt). Sva tri spoja u smjesi imaju različitu R_f vrijednost u sustavu otapala **A** te je produkt **1** uspješno odvojen od ostatka smjese kromatografijom.



Shema 17. Acetiliranje D-manoze

Reakcijom peracetilirane D-manoze sa C-2 razmaknicom (glikozilacija) pripravljen je glikozid α-konfiguracije. Korištena je direktna metoda glikozilacije uz borov trifluorid eterat kao aktivator (Shema 18). Konstanta sprege protona na anomernom C-atomu određena ^{1}H NMR-om je iznosila 1,6 Hz što je u skladu s literaturnim podacima (konstante sprege α-anomera iznose 1-3 Hz, dok su za β-anomere nešto veće). Cilj uvođenja razmaknice od dva C-atoma koja odvaja glikonski dio od heterocikličkog potrebna je za smanjivanje steričkih smetnji. Time je molekuli dostupan veći broj konformacija i veća je vjerojatnost da će bolje „sjesti“ u aktivno mjesto na proteinu.



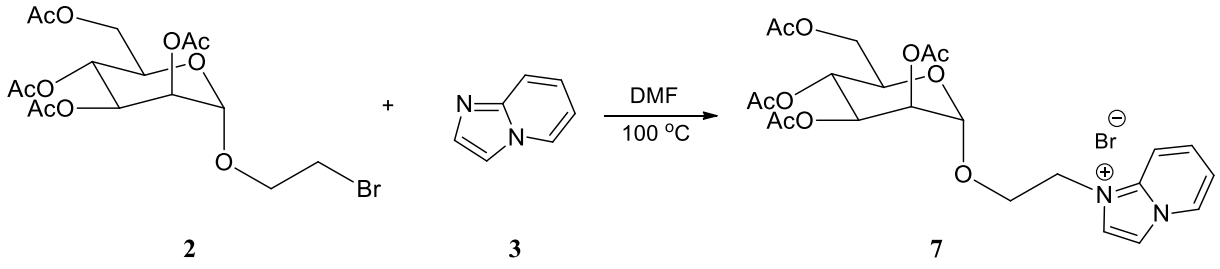
1 **2**

Shema 18. *O*-glikozilacija peracetilirane D-manoze s 2-brometanolom uz borov trifluorid eterat kao aktivator

Reakcijom spoja **2** sa spojevima **3-6** dobivene su kvaterne amonijeve soli. Derivati imidazola **3-6** imaju supsitituiran pirolni dušikov atom, stoga je uvijek piridinijski dušik bio nukleofil u reakciji s glikozidom čime je kontroliran ishod reakcije. Imidazolni derivat napada s nukleofilnim piridinijskim dušikom na C-2 atom prijemosnice („mosta“) uz izlaženje broma kao dobre izlazne skupine i formiranja pozitivnog naboja na piridinijskom dušikovom atomu čime nastaje kvaterna amonijeva sol. Reakcija kvaternizacije se vjerojatno odvija S_N2 mehanizmom. Sve četiri kvaternizacije provedene su u dimetilformamidu kao polarnom aprotonskom otapalu. Reakcije su provedene i u drugim otapalima poput acetona i dioksana, međutim manje polarna otapala nisu dala dobar ishod reakcije (manja iskorištenja i duže trajanje reakcije). S_N2 reakcije jako ovise o otapalu, osobito kada se u prijelaznom stanju razvija naboj. Ovdje iz neutralnih supstrata dobivamo kvaterni amonijev kation i bromid kao anion. Dakle, već u prijelaznom stanju dolazi do nezanemarive separacije naboja. Time dipolni moment molekulskog kompleksa postaje veći što nije povoljno, a te nepovoljne doprinose dobro će stabilizirati aprotično otapalo velike dielektrične konstante poput dimetilformamida ili dimetilsulfoksida. Ovdje je DMF bio

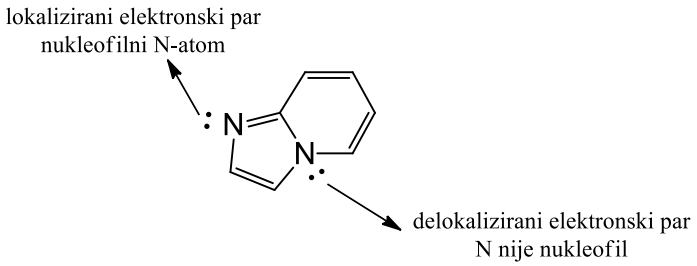
najbolji izbor jer se DMSO znatno teže uklanja iz reakcijske smjese (t_v = 189 °C). Većina DMF-a nakon završetka kvaternizacijske reakcije uspješno je uklonjena na rotacijskom uparivaču uz neko kootapalo (azeotrop), dok su zaostali tragovi uklonjeni kromatografijom na stupcu silikagela.

Imidazo[1,2-a]piridin (**3**) također je ostvario vezu preko piridinijskog tipa dušika (N-3) što je potvrđeno NMR spektrima spoja **7** i njegovog deacetiliranog analoga, spoja **11** (Shema 19). Ukoliko bi se reakcija odvijala preko pirolnog tipa dušika (N-1) koji je ovdje u glavi mosta bicikličkog heterocikla također bi nastala kvaterna amonijeva sol. No, elektronski par na tom dušiku je u p- orbitali i delokaliziran je kroz aromatski π- sustav pa je pretpostavljeno da taj dušik neće nukleofilno napasti na glikozid (Slika 17). Pretpostavka se na temelju NMR spektara pokazala točnom tako da je i ova reakcija, kao i ostale tri kvaternizacijske reakcije, bila regiospecifična.



2 **3** **7**

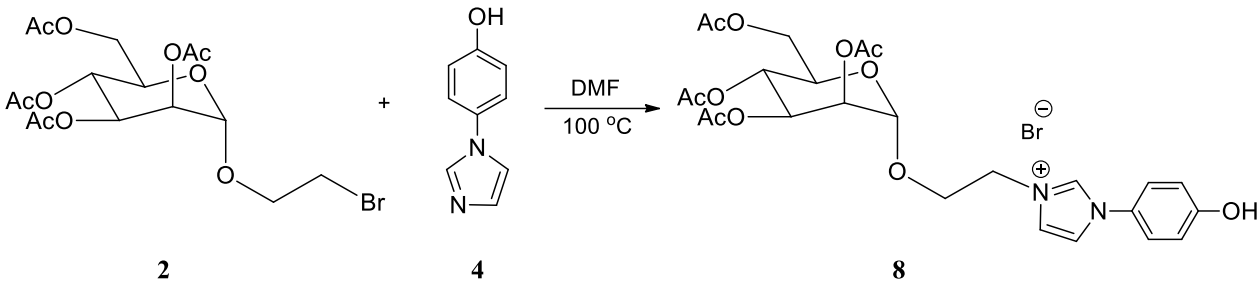
Shema 19. Sinteza spoja **7**



3

Slika 17. Imidazo[1,2-a]piridin (**3**)

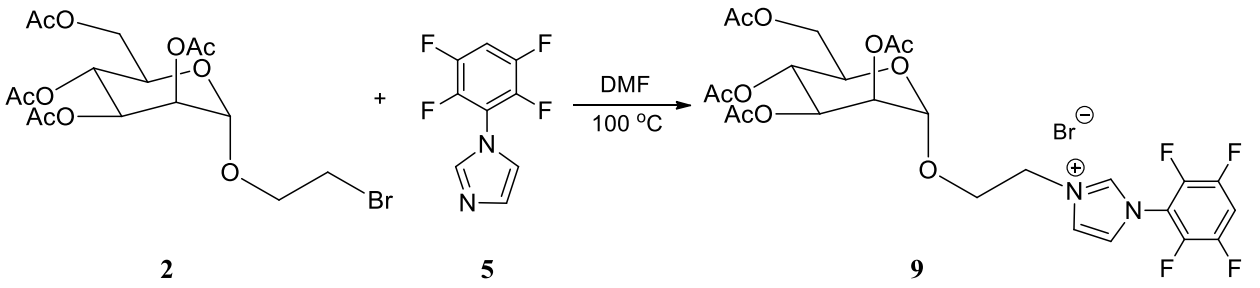
Spoj **8** dobiven je reakcijom glikozida **2** i heterocikla **4** (Shema 20). Molekulski ion spoja **8** potvrđen je masenom spektrometrijom, a strukutura je potvrđena ^{1}H NMR spektrom.



2 **4** **8**

Shema 20. Sinteza spoja **8**

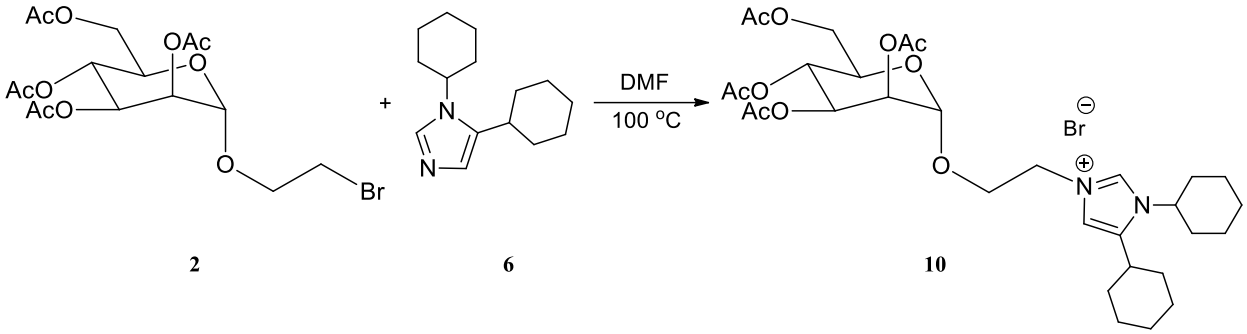
Kvaternizacijom heterocikla **5** s glikozidom **2** pripravljena je acetilirana imidazolijeva kvaterna sol **9** (Shema 21). Pri sintezi **9** reakcijska smjesa je bez pročišćavanja na stupcu silikagela odmah po završetku reakcije podvrgnuta deacetiliranju. Stoga spoj **9** nije analitički karakteriziran već je potpuno okarakterizan njegov deacetilirani analog **12** koji je ciljna molekula. Kod priprave spoja **9** odstupljeno je od općeg postupka kako bi se ispitala mogućnost skraćivanja cijelog postupka priprave kvaternih soli, tj. može li se deacetilirati *in situ* bez izolacije acetiliranog derivata, s obzirom da su samo deacetilirani spojevi (krajnji produkti sinteze) potencijalni FimH inhibitori.



2 **5** **9**

Shema 21. Sinteza spoja **9**

Za razliku od spojeva **7**-**9** u spoju **10** koji je dobiven kvaternizacijom heterocikla **6** u reakciji s glikozidom **2** (Shema 22), imidazolni prsten je supsitituiran s dva zasićena cikloalkilna supstituenta (cikloheksili) te se za njega očekuje veći hidrofobni karakter zbog voluminoznih cikloalkanskih skupina. FimH adhezin ima hidrofobne „džepove“ blizu veznog mjesta za α-D-manozide u koje bi se hidrofobni cikloheksilni dio molekule mogao smjestiti i time stabilizirati vezanje α-D-manoznog dijela u CR domenu.



2 **6** **10**

Shema 22. Sinteza spoja **10**

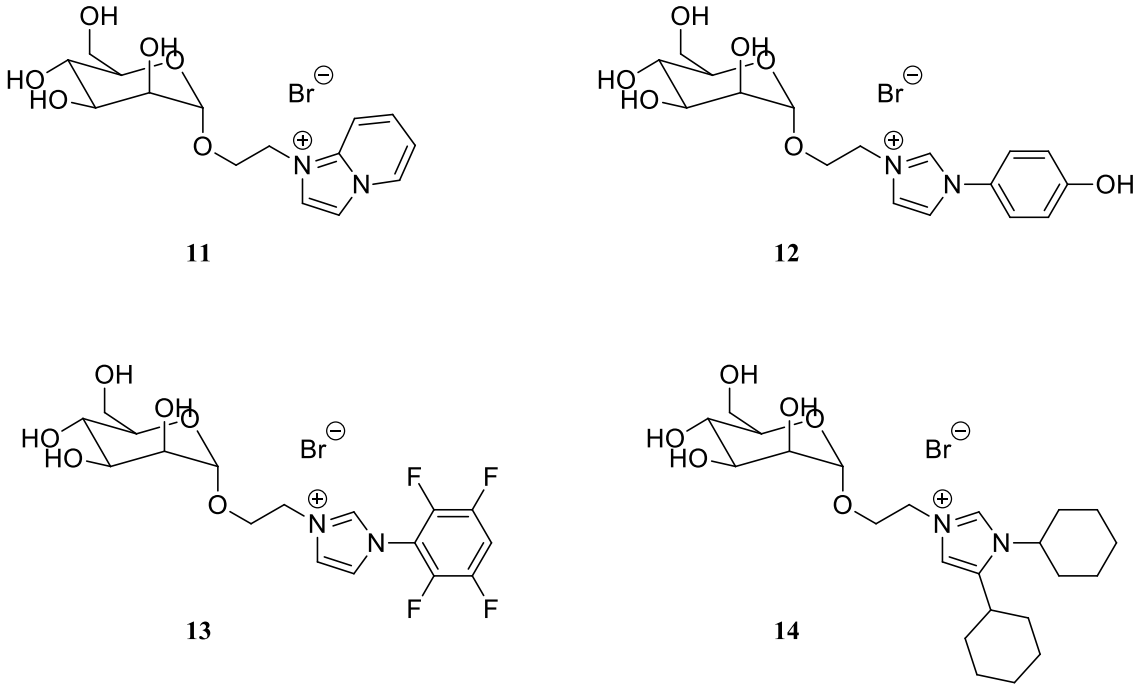
Iskorištenja kvaternizacijskih reakcija dana su u tablici 4.

Tablica 4. Iskorištenja reakcija kvaternizacije

Spoj	η / %
7	45,1
8	82,8
9	Ø *
10	30,8

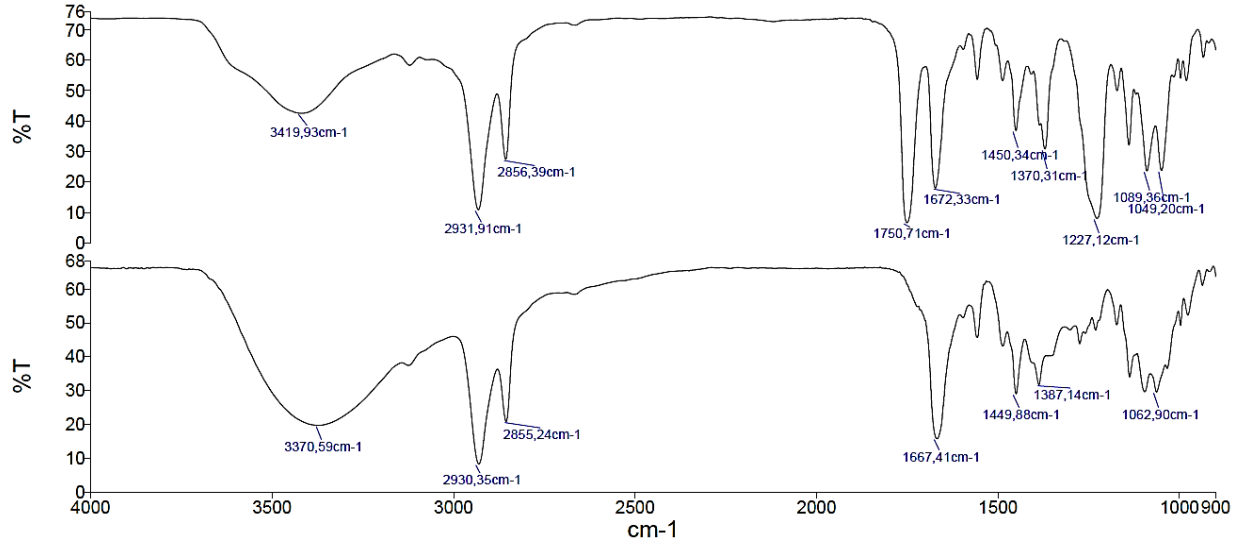
*Spoj je bez izolacije podvrgnut idućem sintetskom koraku

Spojevi **7-10** podvrgnuti su reakciji deacetiliranja po Zemplénu i svi su uspješno deacetilirani te su dobiveni njihovi deacetilirani analozi ciljne molekule **11-14** (Slika 18). Za potpuno deacetiliranje glikonskog dijela bilo je potrebno dodati vrlo malu (katalitičku) količinu natrijevog metoksida u metanolu. Uz veće količine metoksida koji je vrlo jak nukleofil može doći do nastanka neželjenenih nusprodukata i pucanja glikozidne veze.



Slika 18. Strukture ciljnih molekula (**11-14**)

Reakcije deacetiliranja praćene su IR spektroskopijom. Spojevi **7-10** imaju apsorpcijske vrpce kod 1750 cm^{-1} što je posljedica istezne vibracije C=O skupine koja je prisutna u acetilnim skupinama. Nakon uklanjanja acetilnih skupina s α-D-manopiranoznog prstena u IR spektru potpuno nestaje vrpca pri 1750 cm^{-1} te se znatno poveća intenzitet i širina vrpce u području 3200-3600 cm^{-1} što je pokazatelj prisutnosti OH skupina u spoju (Slika 19).



Slika 19. IR spektri acetiliranog spoja **10** (gore) i njegovog deacetiliranog analoga **14** (dolje).

Od u literaturnom pregledu opisana tri postupka deacetiliranja šećera, isprobana je i metoda deacetiliranja uz Bu_2SnO (str. 8,9) [9]. No pritom je u reakcijskoj smjesi po završetku reakcije TSK-om detektirana veća količina nusprodukata te je pročišćavanje reakcijske smjese bilo otežano zbog bliskih R_f - vrijednosti.

Spoj **13** dobiven je deacetiliranjem međuprodukta **9** koji nije zasebno pročišćavan već je reakcijska smjesa pročišćena nakon uklanjanja zaštitnih acetilnih skupina. Iskorištenje je u tom slučaju bilo veće nego kod ostalih spojeva.

Iskorištenja sinteze konačnih spojeva **11-14** dana su u tablici 5.

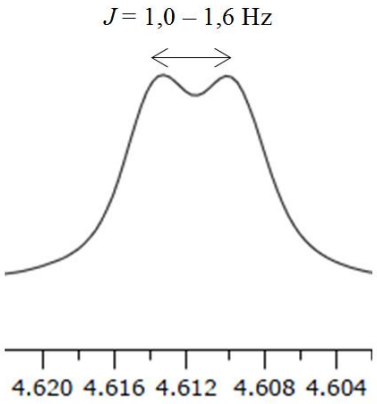
Tablica 5. Iskorištenja sinteze spojeva **11-14**

Spoj	η / %
11	9,5
12	9,0
13	45,4
14	30,8

Kako su svi dobiveni spojevi i izolirani međuprodukti u sintezi α-konfiguracije na anomernom C-atomu, uspoređene su konstante sprege anomernog protona i protona na susjednom C-atomu u sintetiziranim spojevima koje su očitane iz NMR spektara odgovarajućih spojeva (tablica 6). Signal H-1 protona u NMR spektru je dublet (Slika 20) jer se anomerni vodikov atom spreže sa protonom na susjednom ugljikovom atomu (C-2). Konstante sprege u svim ciljnim spojevima i nekim izoliranim međuproduktima redovito su bile manje od 2 Hz što je u skladu s literaturnim podatkom za konstante sprezanja anomernog protona sa susjednim protonom u α-manopiranozidima.

Tablica 6. Usporedba vrijednosti konstante sprege *J* anomernog protona (H-1) s protonom na susjednom C-atomu u sintetiziranim spojevima

Spoj	δ (H-1) / *ppm*	*J* / Hz
1	6,09	1,6
2	4,88	1,6
8	4,97	1,1
10	4,94	1,5
11	4,59	1,4
12	4,62	1,5
13	7,62	1,6
14	4,61	1,4

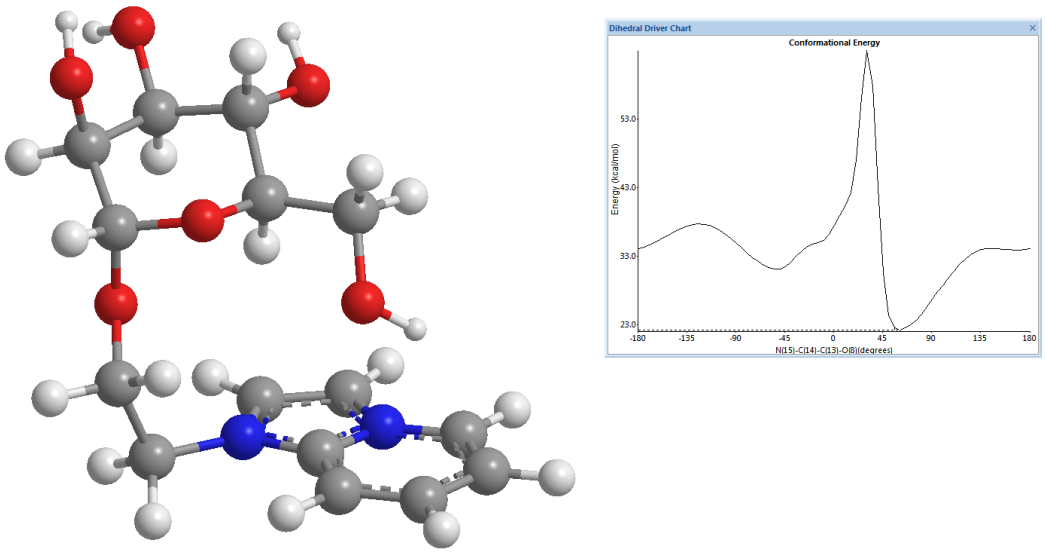


Slika 20. Dubletni signal anomernog protona u ^{1}H-NMR spektru

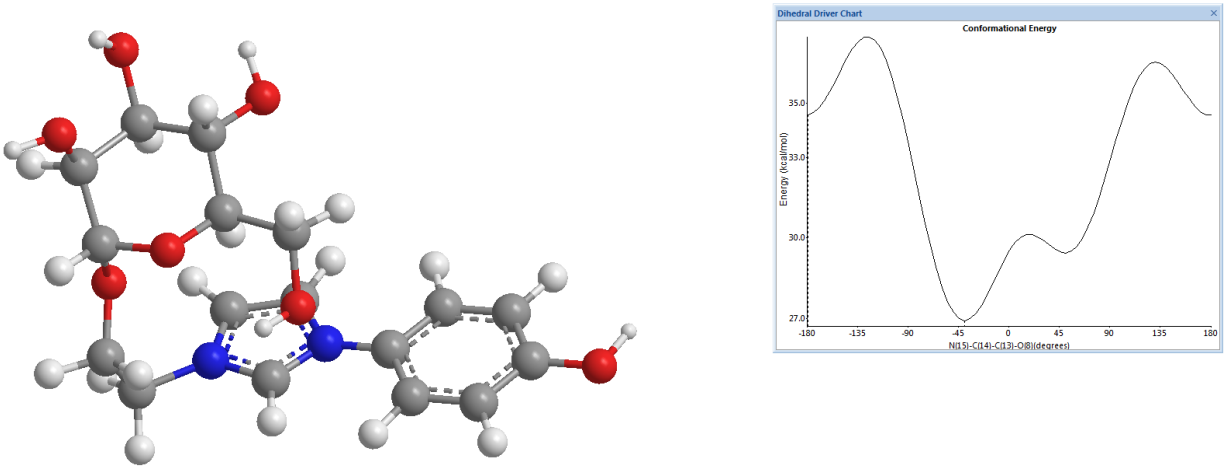
Geometrije ciljnih molekula **11** -**14** optimizirane su u programu *ChemBio3D Ultra 13.0* koristeći MM2 optimizacijsku metodu. Pretražen je konformacijski prostor *Dihedral Driver* –om za rotaciju oko veze C'1-C'2 („most“). Potom je svaki pronađeni minimum optimiziran u konformer. Za svaki spoj nađena su tri konformera, jedan antiperiplanarni i dva sinklinalna (*gauche*) u kojima je diedarski kut između heterocikličkog i glikonskog dijela približno 60^{o}. Antiperiplanarna konformacija je u sva četiri slučaja konformer najviše energije, a dva *gauche* konformera su niže i različite energije. Od dva *gauche* konformera niže je energije onaj u kojem je šećerni dio okrenut tako da se nalazi iznad (ili ispod) heterocikličkog dijela molekula. Pritom se hidroksilna skupina na C-6 nalazi vrlo blizu aromatskog sustava imidazola što dovodi do stabilizirajućih interakcija zbog kojih je jedan *gauche* konformer niže energije u odnosu na drugi. Najstabilniji konformeri ciljnih molekula **11** -**14** dani su na slikama 21-24 zajedno s *output*-om diedarskog *Driver*-a

Tablica 7. Optimizacijske energije u kcal mol^{-1} za 3 najstabilnije konformacije spojeva **11** - **14**

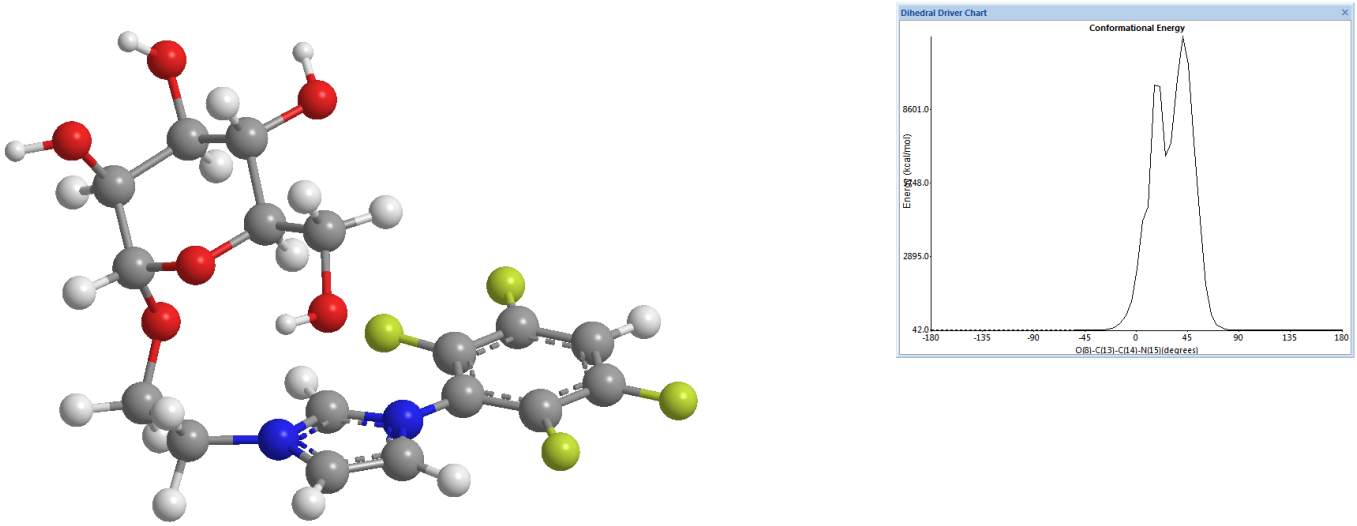
E / kcal mol^{-1} / Spoj	*Sinklinalni (1)*	*Sinklinalni (2)*	*Antiperiplanarni*
11	22,2569	26,3028	31,3843
12	24,8549	26,9252	32,8086
13	41,2385	51,0186	52,4489
14	39,8323	41,7163	48,2260



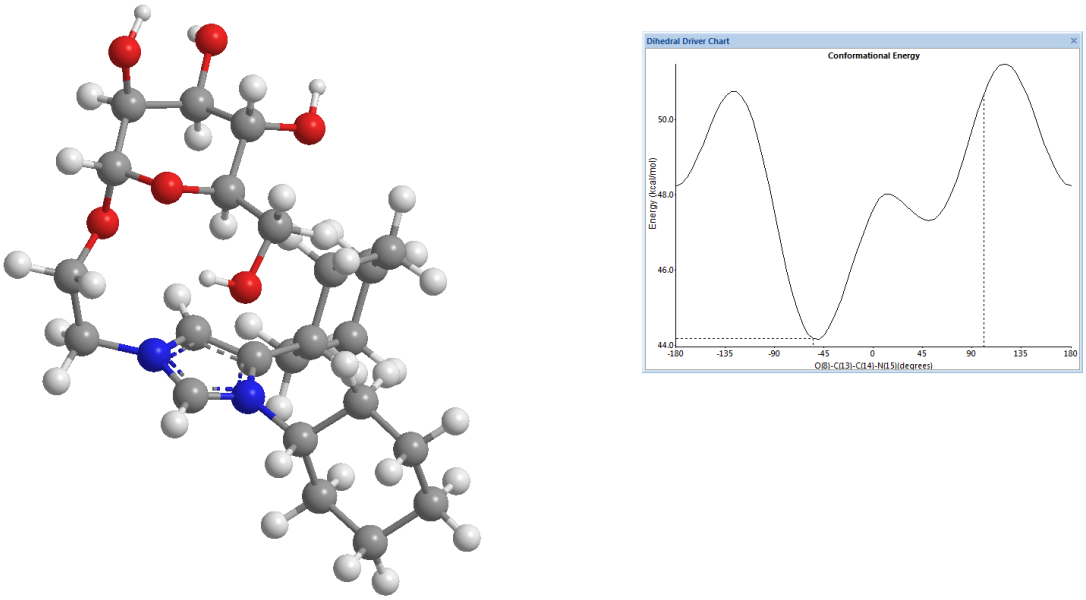
Slika 21. Optimizirana geometrija spoja **11**



Slika 22. Optimizirana geometrija spoja **12**



Slika 23. Optimizirana geometrija spoja **13**



Slika 24. Optimizirana geometrija spoja **14**

§5. ZAKLJUČCI

1. Acetiliranjem D-manoze uz I_2 kao katalizator pripravljen je peracetilirani spoj **1**. Prema ^{1}H NMR spektru iz kemijskog pomaka za anomerni H-1 atom na δ = 6,08 ppm određena je konstanta sprege, J = 1,6 Hz, što odgovara α-anomeru.
2. Direktnom metodom *O*-glikozilacije iz spoja **1** i 2-brometanola uz BF_3 eterat kompleks kao promotor dobiven je glikozid **2**. Prema ^{1}H NMR spektru iz kemijskog pomaka za anomerni H-1 atom na δ = 4,87 ppm određena je konstanta sprege, J = 1,4 Hz, što odgovara α-anomeru.
3. Kvaternizacijom manozida **2** i heterocikličkih spojeva **3-6** (redom derivata imidazola) u suhom DMF-u dobivene su kvaterne amonijeve soli **7-10**. Struktura pripravljenih spojeva potvrđena je analizom IR, MS i 1D (^{1}H, ^{13}C (APT)) NMR spektara. Iz pomaka za anomerni H-1 atom određene su konstante sprege (J = 1 - 2 Hz) koje su odgovarale onima literaturnima za α-anomere.
4. Iskorištenja reakcija kvaternizacije spoja **2** sa spojevima **3-6** su manja kada se kao reakcijsko otapalo upotrijebi manje polarno aprotično otapalo od DMF-a poput acetona ili 1,4-dioksana.
5. Ispitane su dvije metode uklanjanja zaštitnih skupina koristeći: a) NaOMe u metanolu i b) dibutilkositrov oksid, Bu_2SnO u metanolu. Uporaba katalitičke količine NaOMe u metanolu dala je bolje rezultate u kraćem vremenu, uz lakšu obradu i uz manje nusprodukata. Pripravljeni su spojevi **11-14**, a struktura pripravljenih spojeva potvrđena je analizom IR, MS i 1D (^{1}H, ^{13}C (APT)) NMR spektara. Iz kemijskog pomaka za anomerni H-1 atom određene su konstante sprege (J = 1,1 – 1,6 Hz) koje su odgovarale onima literaturnima za α-anomere. Spojevima je također izmjerena optička rotacija tj. kut specifičnog zakretanja pri 25 °C, $[\alpha]_{25}^{D}$
6. Geometrije ciljnih molekula spojeva **11** – **14** optimizirane su računalnim metodama (molekulska mehanika, MM2) te je im pretražen konformacijski prostor. Sinklinalni konformer u kojem je šećer točno iznad/ispod u odnosu na heterociklički dio molekule je najstabilniji.

§6. LITERATURNA VRELA

[1] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Wiley, Weinheim, 2003

[2] T. K. Lindhorst, J. Thiem, *Carbohydr. Res.* **209** (1991) 119-129

[3] J. Zhang, P. Kováč, *J. Carbohydr. Res.* **18** (1999) 461-469

[4] M. Therisod, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **109** (1987) 3977–3981

[5] Z. Zhang, C. Wong, *Tetrahedron Lett.* **58** (2002) 6513-6519

[6] T. K. Lindhorst, J. Thiem, *Liebigs Ann. Chem*. **1990** (1990) 1237-1241

[7] K. P. R. Kartha, R. A. Field, *Tetrahedron Lett.* **53** (1997) 11753-11766

[8] B. Mukhopadhyay, K. P. R. Kartha, D. A. Russell, R. A. Field, *J. Org. Chem.* **69** (2004) 7758-7760

[9] H. Liu, X. Yan, W. Li, C. Huang, *Carbohydr. Res.* **337** (2002) 1763-1767

[10] M. Mizuno, K. Kobayashi, H. Nakajima, M. Koya, T. Inazu, *Synth. Commun*. **32** (2002) 1665-1670

[11] R. D. Crouch, J. L. Howard, J. L. Zile, K. H. Barker, *J. Chem Educ*. **83** (2006) 1658-1660

[12] J. Clayden, N. Geeves, S. Warren, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, 2012, 1165-1167

[13] K. A. Wafford, M. B. Van Niel, Q. P. Ma, E. Horridge, M. B. Herd, D. R. Peden, D. Belelli, J. J. Lambert, *Neuropharmacology* **56** (2009) 182–189

[14] Levine, M. M.; Giron, J. A.; Noriega, E. R. "Fimbrial vaccines". In Klemm, Per. Fimbriae : adhesion, genetics, biogenesis, and vaccines,1Boca Raton, CRC Press, 1994, 255–270

[15] P. Klemm, M. A. Schembri, *Int. J. Med. Microbiol.* **290** (2000) 27-35

[16] K. A. Krogfelt, H. Bergmans, P. Klemm, *Infect Immun* **58** (1990) 1995-1998

[17] T. Tomašić, S. Rabbani, M. Gobec, I. M. Raščan, Č. Podlipnik, B. Ernst, A. Anderluh, *Med. Chem. Comm.* **5** (2014) 1247-1253

[18] M. Hartmann, T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem* **2011**. (2011) 3583-3609

[19] C. Hung, J. Bouckaert, D. Hung, J. Pinkner, C. Widberg, A. DeFusco, C. G. Auguste, R. Strouse, S. Langermann, G. Waksman, S. J. Hultgren, *Mol. Microbiol*. **44** (2002) 903-915

[20] M. A. Schembri, E. V. Sokurenko, P. Klemm, *Infect Immun* **68** (2000) 2638-2646

[21] M. M. Sauer, R. P. Jakob, J. Eras, S. Baday , D. Eris, G. Navarra, S. Berne`che, B. Ernst, T. Maier, R. Glockshuber, *Nat. Commun.* **7** (2016)

[22] T. K. Lindhorst, S. Kötter, U. Krallman-Wenzel, S. Ehlers, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1** (2001) 823-831

[23] T. K. Lindhorst, S. Kötter, J. Kubisch, U. Krallman-Wenzel, S. Ehlers, V. Kren, *Eur. J. Org. Chem.* **1998** (1998) 1669-1674

[24] T. K. Lindhorst, K. Bruegge, A. Fuchs, O. Sperling, *Beilstein J. Org. Chem.* **6** (2010) 801-809

[25] C. K. Cusumano, J. S. Pinkner, Z. Han, S. E. Green, B. A. Ford, J. R. Crowley, J. P. Henderson, J. W. Janetka, S. J. Hultgren, *Sci Transl Med.* **3** (2011), 109-130

[26] M. Totsika, M. Kostakioti, T. J. Hannan, M. Upton, S. A. Beatson, J. W. Janetka, S. J. Hultgren, M. A. Schembri, *J. Infect. Dis*. **208** (2013) 921-928

[27] Protein Data Bank http://www.rcsb.org/pdb (14.04.2016.) Sadrži 47 kristalnih struktura FimH receptora s različitim ligandima

[28] B. S. Furniss, A. J. Hannaford, P. W. G. Smith, A. R. Tatchell, *Vogels Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th edition, Longman Scientific & Technical, Harlow, 1989.

§7. SAŽETAK

SINTEZA NOVIH IMIDAZOLNIH α-D-MANOPIRANOZIDA KAO POTENCIJALNIH FimH INHIBITORA

MATEJ POLETAR

Poznato je da FimH adhezin koji gradi fimbrije tipa 1 bakterije *Escherichia coli* ima vezna mjesta za α-D-manopiranozu i druge spojeve koji u strukturi uključuju taj monosaharid. Ova specifična interakcija omogućuje bakterijama vezanje za razna tkiva i kolonizaciju stanica domaćina uzrokujući time razna oboljenja. U svrhu pronalaženja pogodnih inhibitora FimH proteina, potencijalnih anti-adhezina, sintetiziran je niz bicikličkih imidazolnih derivata α-D-manopiranozida. Sinteza ciljnih molekula odvijala se u 4 koraka. U prvom koraku zaštićene su slobodne hidroksilne skupine D-manoze acetiliranjem. Potom je na anomerni C-atom peracetilirane α-D-manopiranoze vezan 2-brometanol (*O*-glikozilacija). Fragment od dva ugljikova atoma je poveznica između manopiranozida i imidazolnog derivata koji je kondenziran s glikozidom u idućem koraku. Naposljetku su uklonjene preostale zaštitne acetilne skupine s manopiranoznog prstena te dobiveni željeni spojevi.

Struktura spojeva određena je standardnim analitičkim spektroskopskim metodama: IR spektroskopijom, masenom spektrometrijom, nuklearnom magnetskom rezonancijom kao i polarimetrijskim mjerenjima. Također, u daljnjem tijeku istraživanja optimizirane su geometrije ciljnih molekula računalnim metodama molekulske mehanike (MM2) i konformacijskim pretraživanjem u svrhu izučavanja molekulskih interakcija s FimH adhezinom.

Ključne riječi: imidazol, α-D-manopiranozidi, FimH inhibitori

§8. SUMMARY

SYNTHESIS OF NOVEL IMIDAZOLE α-D-MANOPYRANOSIDES AS POTENTIAL FimH INHIBITORS

MATEJ POLETAR

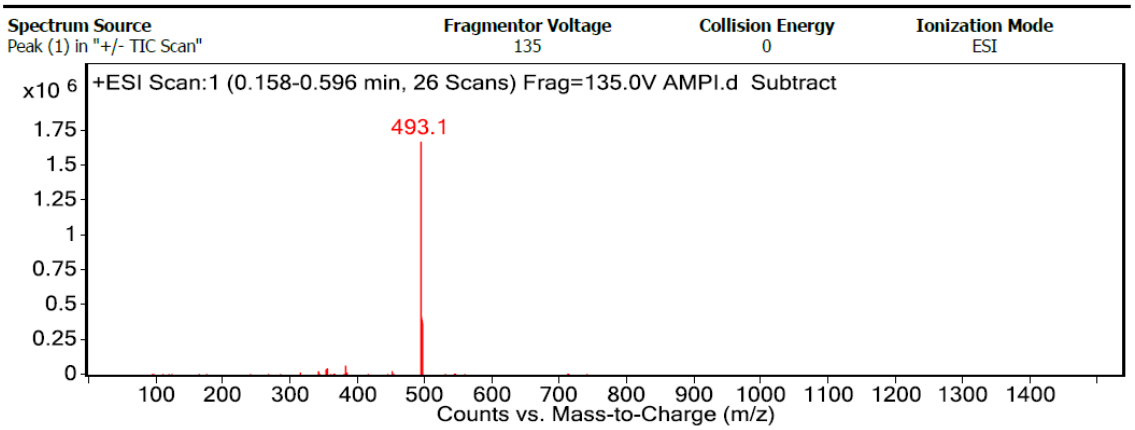
It is well known from previously reported data that in uropathogenic bacteria *Escherichia coli* adhesion is mediated by the FimH adhesin located at the tip of the mannose-specific type 1 *fimbriae*. This specific interaction with mannose containing compounds enable bacteria to colonize various cell types and tissues causing illnesses. The aim of this work was to find potential FimH ihnibitors and therefore bacterial anti-adhesion substances. Series of novel bicyclic imidazole α-D-manopyranoside derivatives were synthesised as potential FimH inhibitors. Synthesis of target molecules was conducted in four steps: protection of sugar hydroxyl groups by peracetylation, *O*-glycosylation of the anomeric C-atom with 2-bromoethanol leading to the introduction of the two C-atoms spacer, followed by condensation with bicyclic imidazole derivatives. The removal of acetyls as protecting groups was the final step.

All compounds were prepared in good yields and were characterized by standard analytical spectroscopy methods (NMR, IR, MS) and optical rotation measurements. Additionally, simple computational methods (MM2 and conformational space searching) were used to optimize target molecules geometries in order to study molecular interactions with FimH adhesin.

Keywords: imidazole, α-D-manopyranozides, FimH inhibitors

§9. PRILOZI

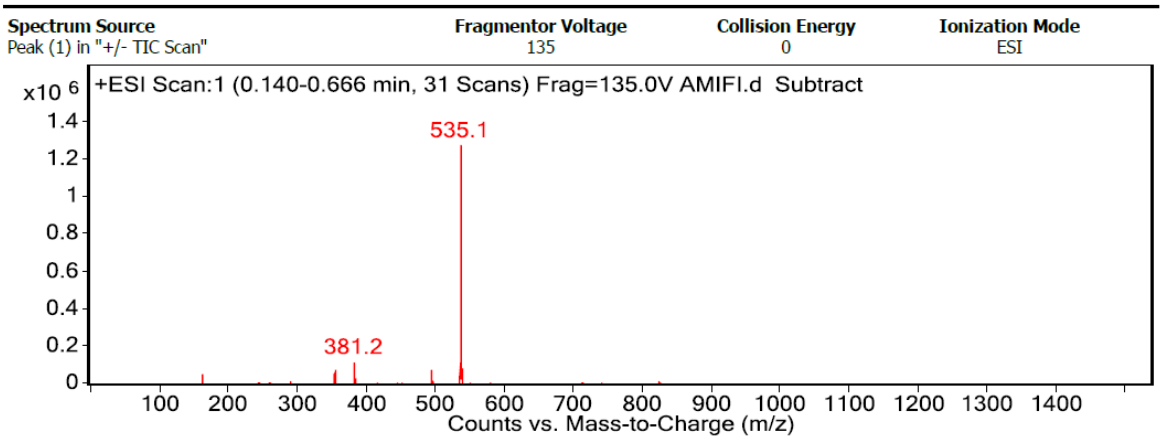
Priloženi su MS i NMR spektri sintetiziranih spojeva.



Peak List

m/z	z	Abund
493.1	1	1671169.6
494.1	1	431105.3
495.1	1	87693.3

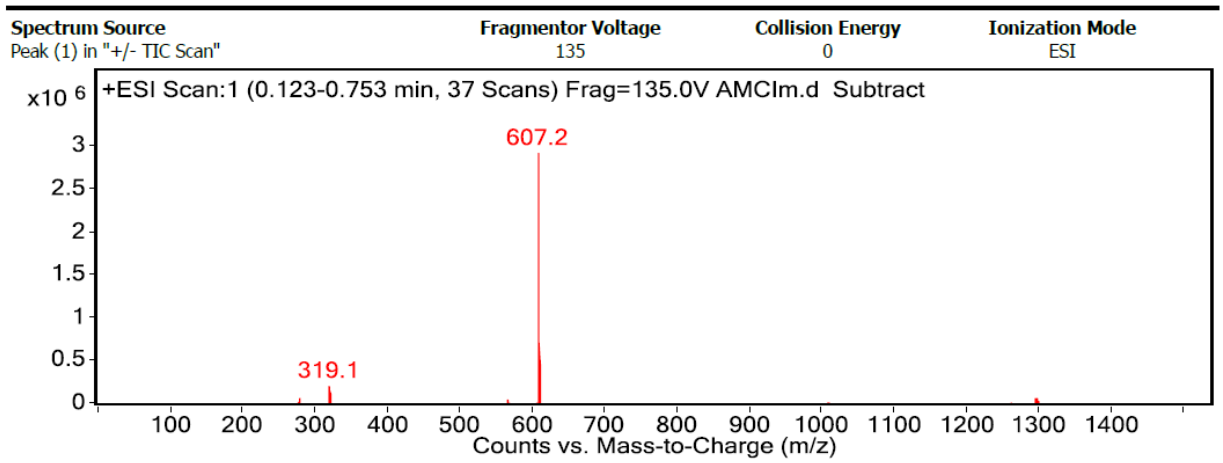
Slika 25. MS spoja **7**



Peak List

m/z	z	Abund
353.2		79421.8
381.2		116984
493.1		79457.5
535.1	1	1279213.3
536.1	1	362411.8
537.1	1	81972.3

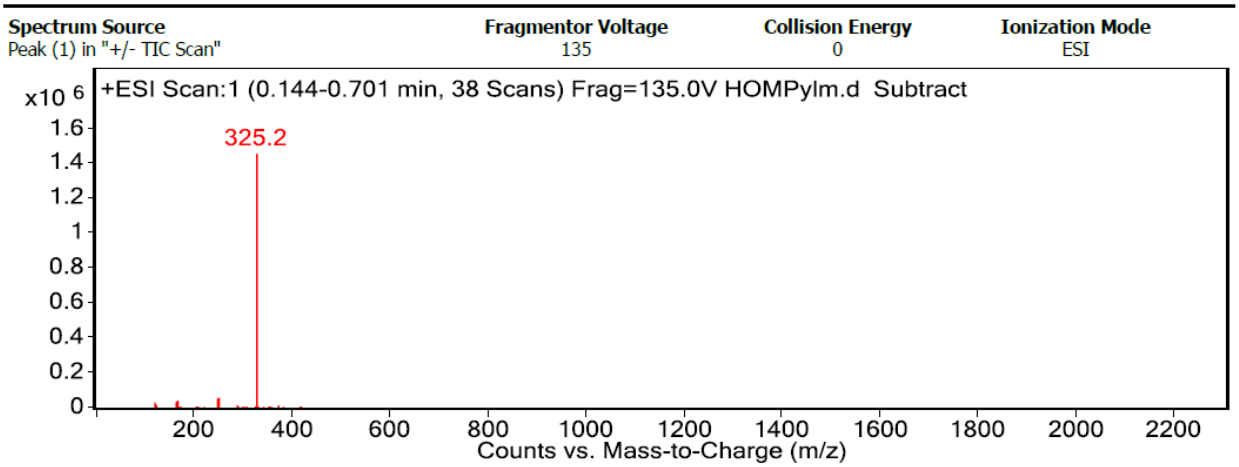
Slika 26. MS spoja **8**



Peak List

m/z	z	Abund
319.1		205125.1
607.2	1	2921352.3
608.2	1	1066283.6
609.2	1	251555.6

Slika 27. MS spoja **10**

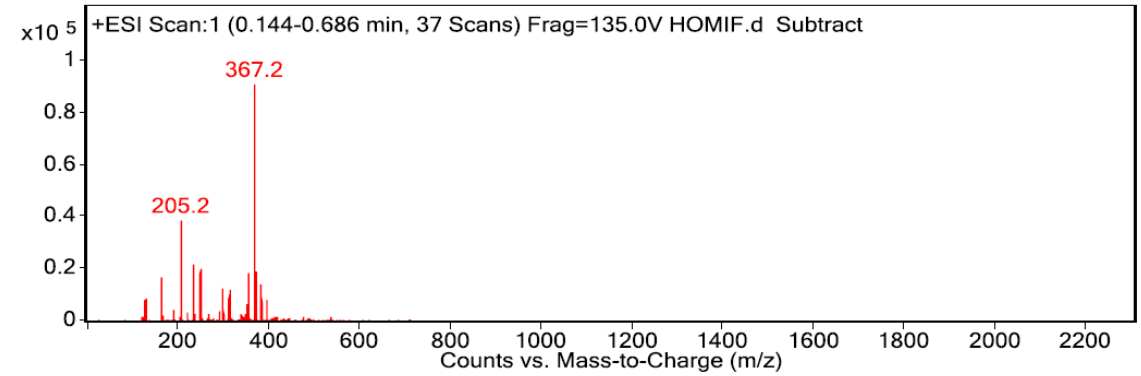


Peak List

m/z	z	Abund
325.2	1	1457785.3
326.2	1	257461.9

Slika 28. MS spoja **11**

Spectrum Source	Fragmentor Voltage	Collision Energy	Ionization Mode
Peak (1) in "+/- TIC Scan"	135	0	ESI

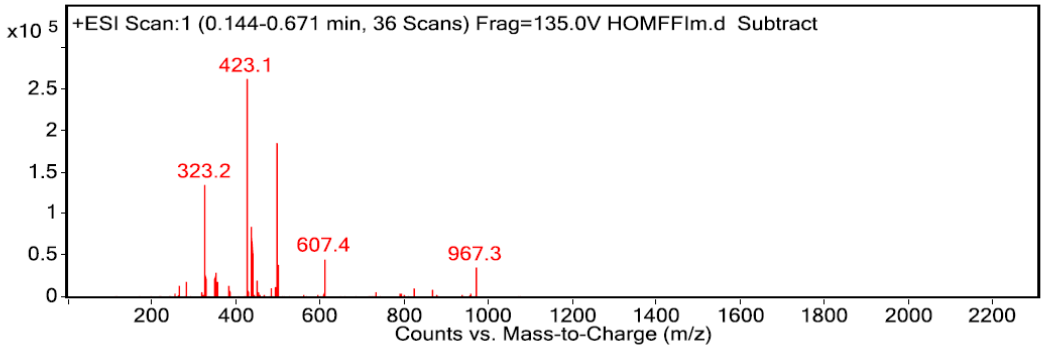


Peak List

m/z	z	Abund
161.1		16690.7
205.2		38492
233.1		22008
247.2		20251.9
297.1		12554.5
311.1		11735.3
353.2		18623.6
367.2	1	90914.8

Slika 29. MS spoja **12**

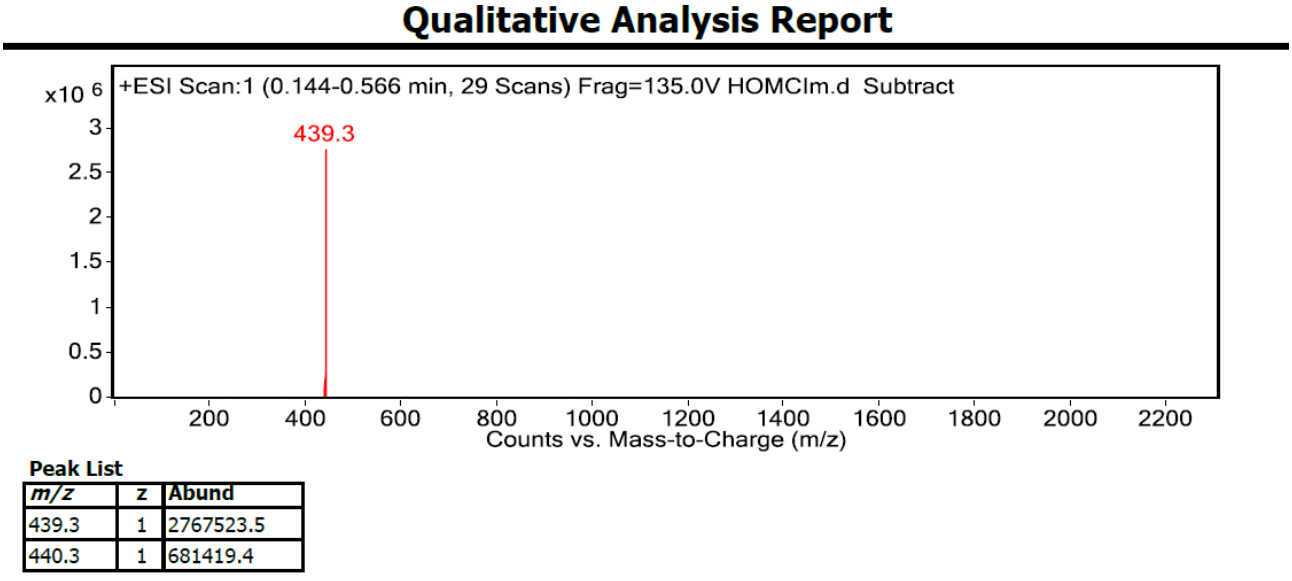
Qualitative Analysis Report



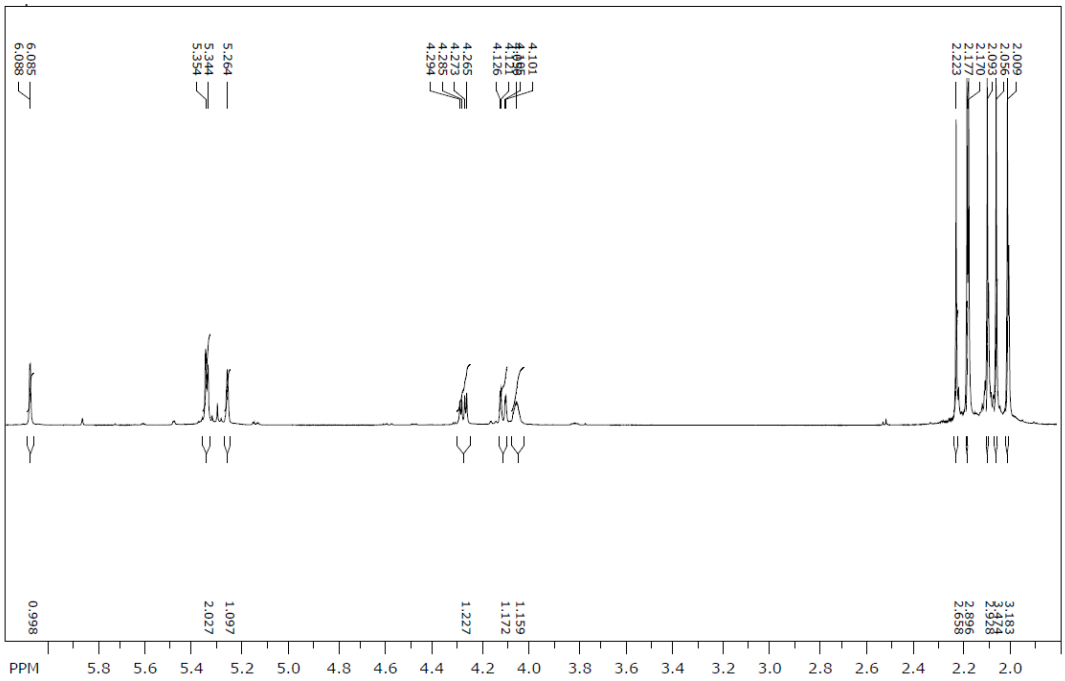
Peak List

m/z	z	Abund
323.2	1	135401.1
324.2	1	30762.1
348.1		29985.7
423.1	1	263076.8
424.2	1	48356.9
435.1	1	85543.1
495.1	1	185184.3

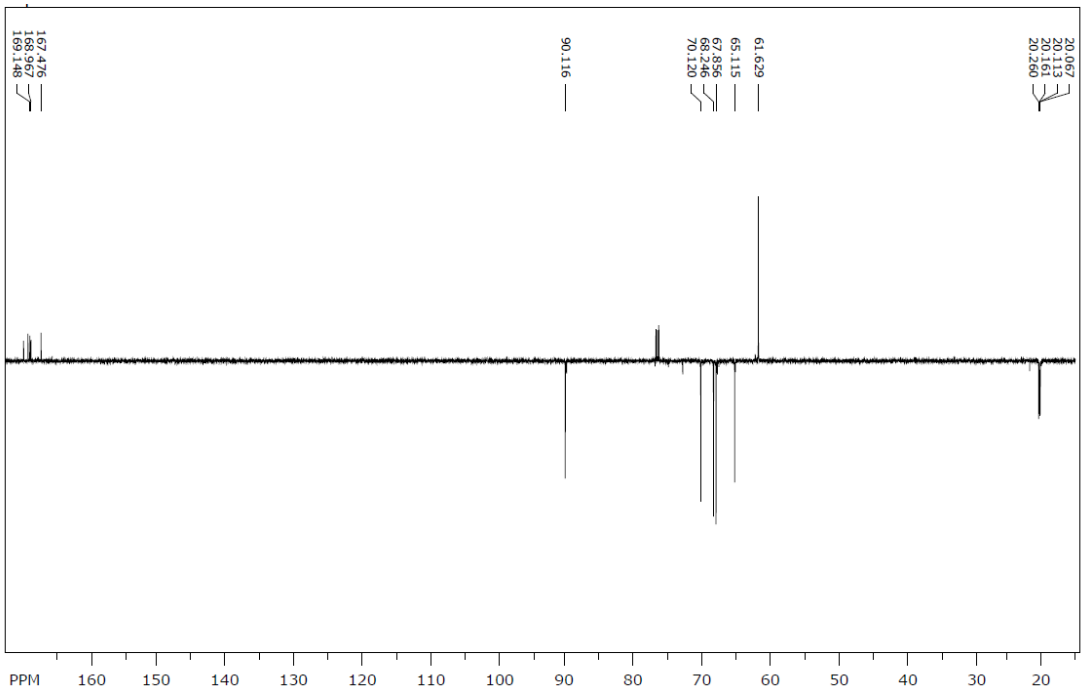
Slika 30. MS spoja **13**



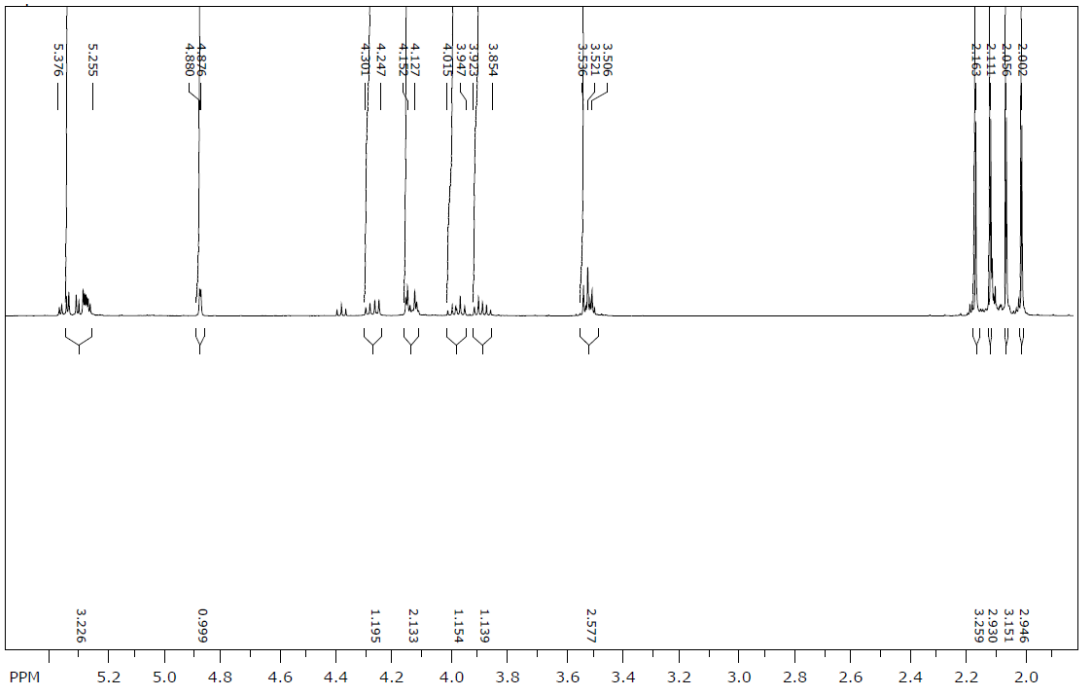
Slika 31. MS spoja **14**



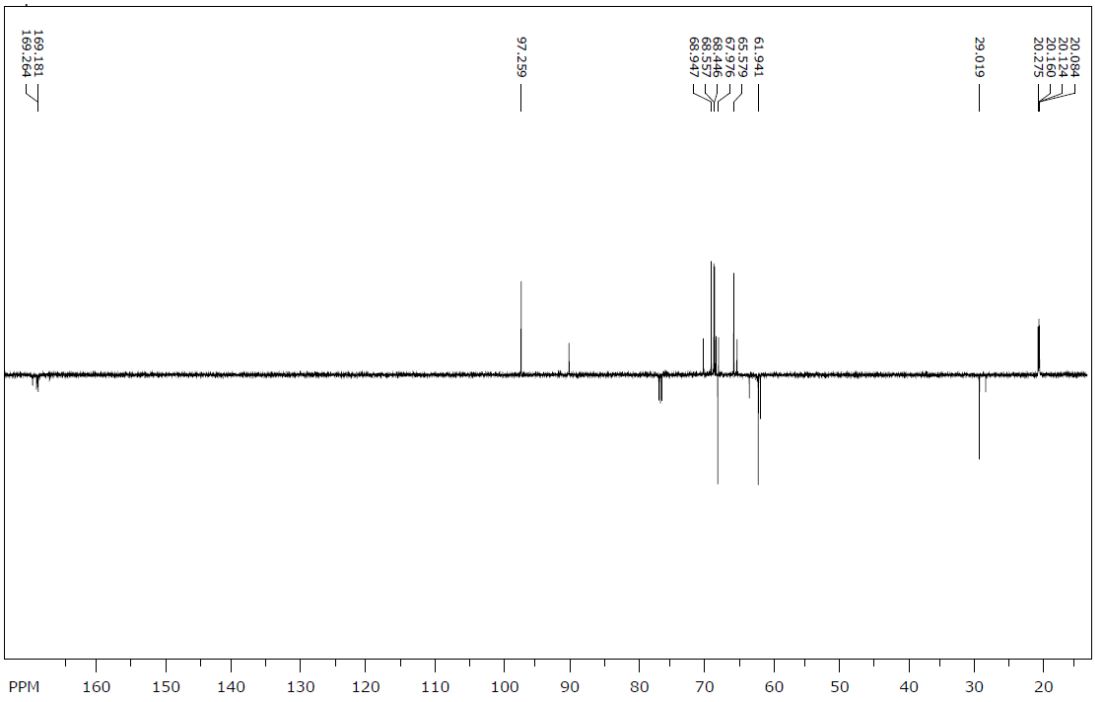
Slika 32. ^{1}H-NMR spektar spoja **1**



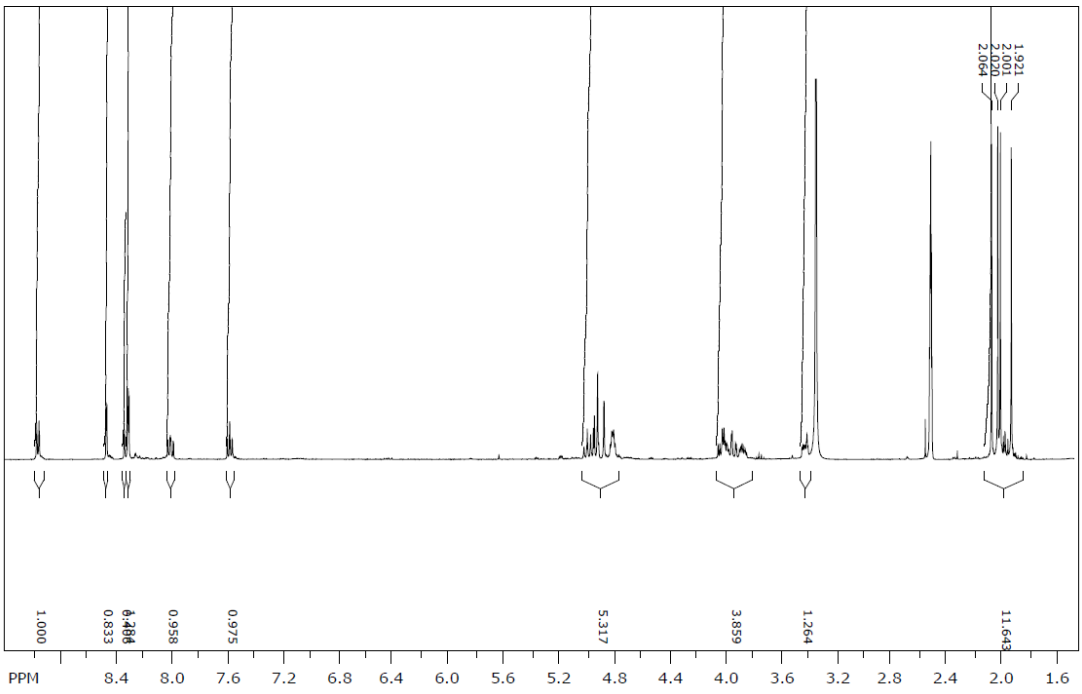
Slika 33. ^{13}C-NMR spektar spoja **1**



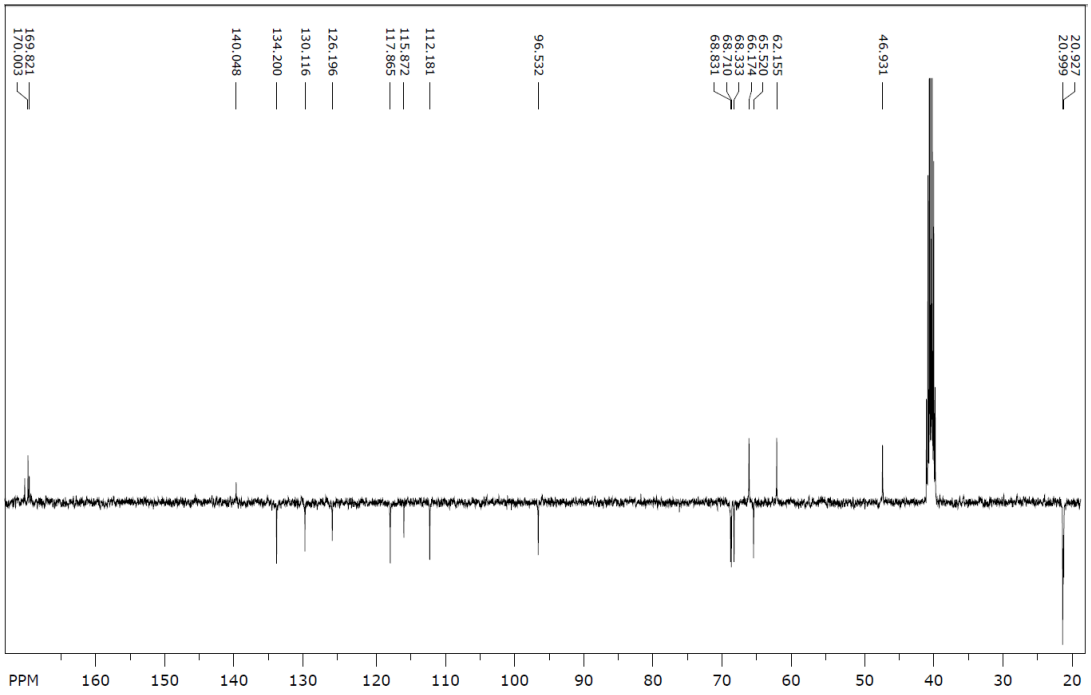
Slika 34. ^{1}H-NMR spektar spoja **2**



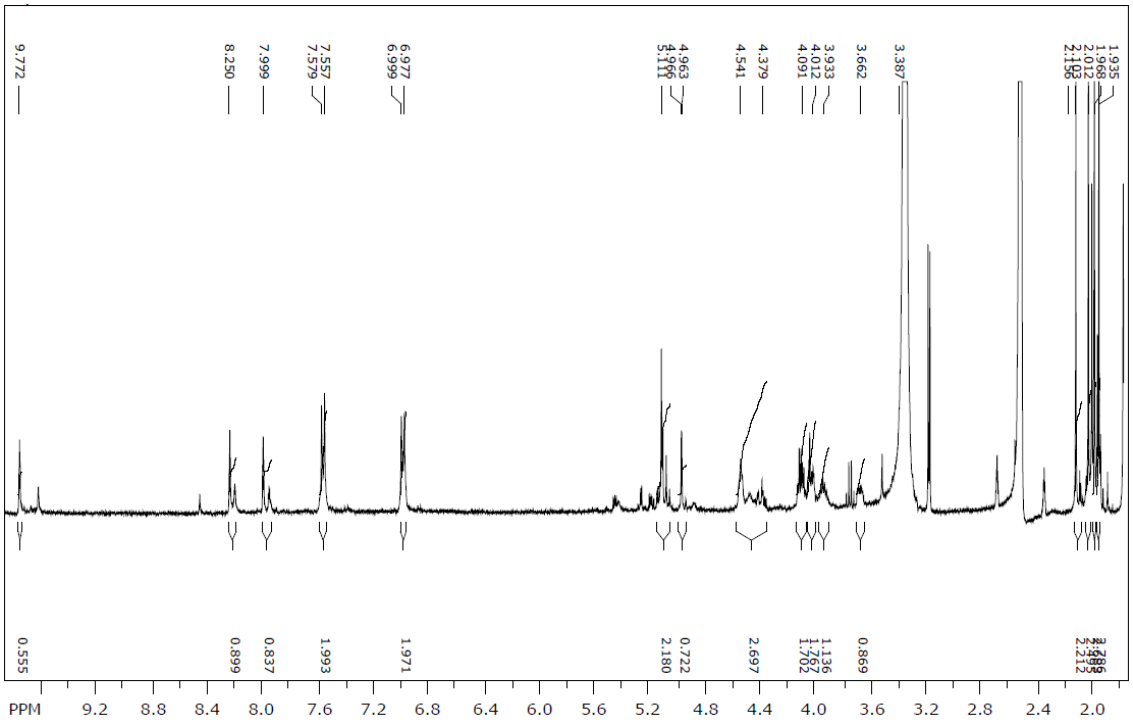
Slika 35. ^{13}C-NMR spektar spoja **2**



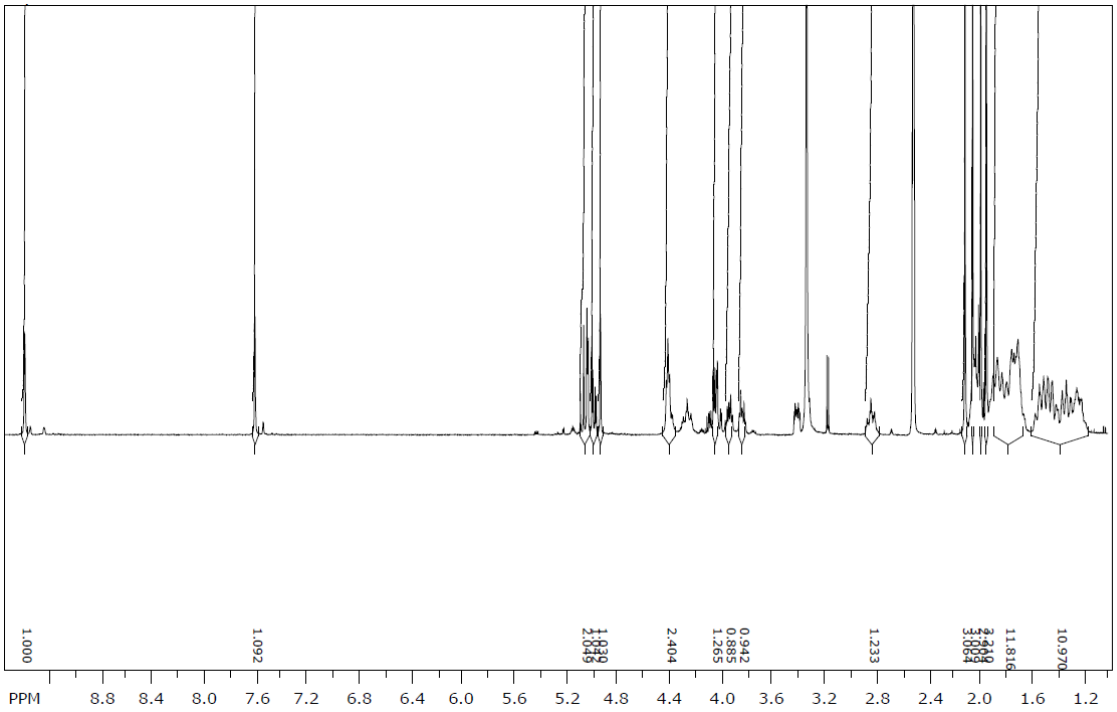
Slika 36. ^{1}H-NMR spektar spoja **7**



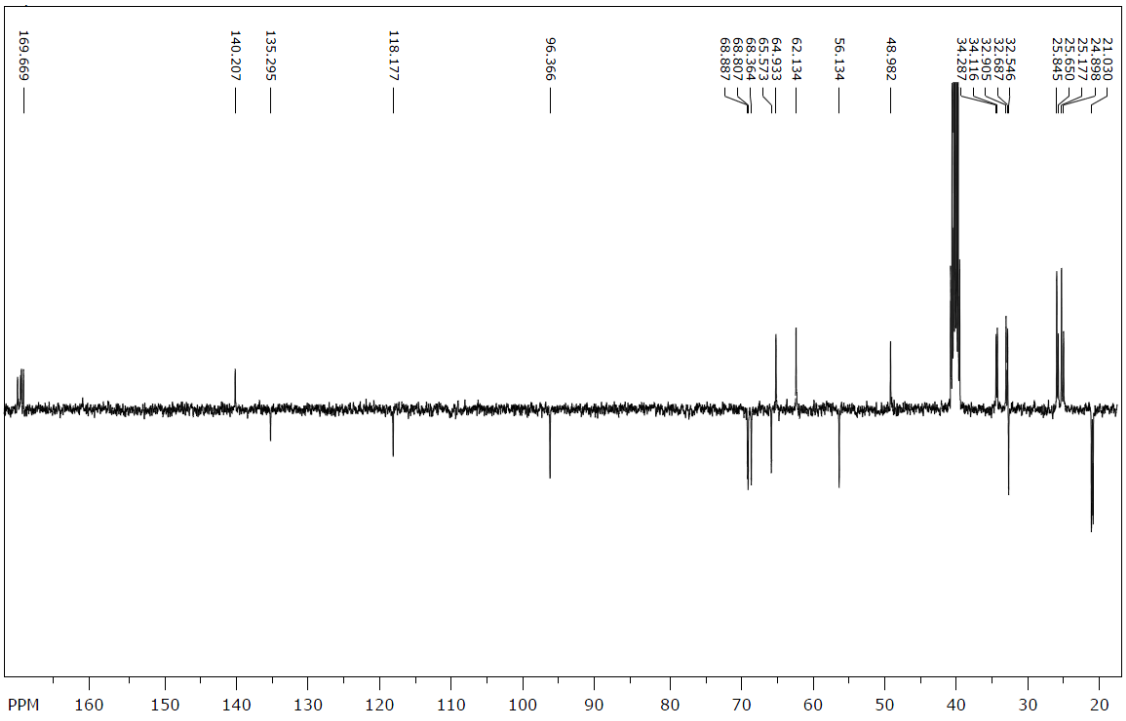
Slika 37. ^{13}C-NMR spektar spoja **7**



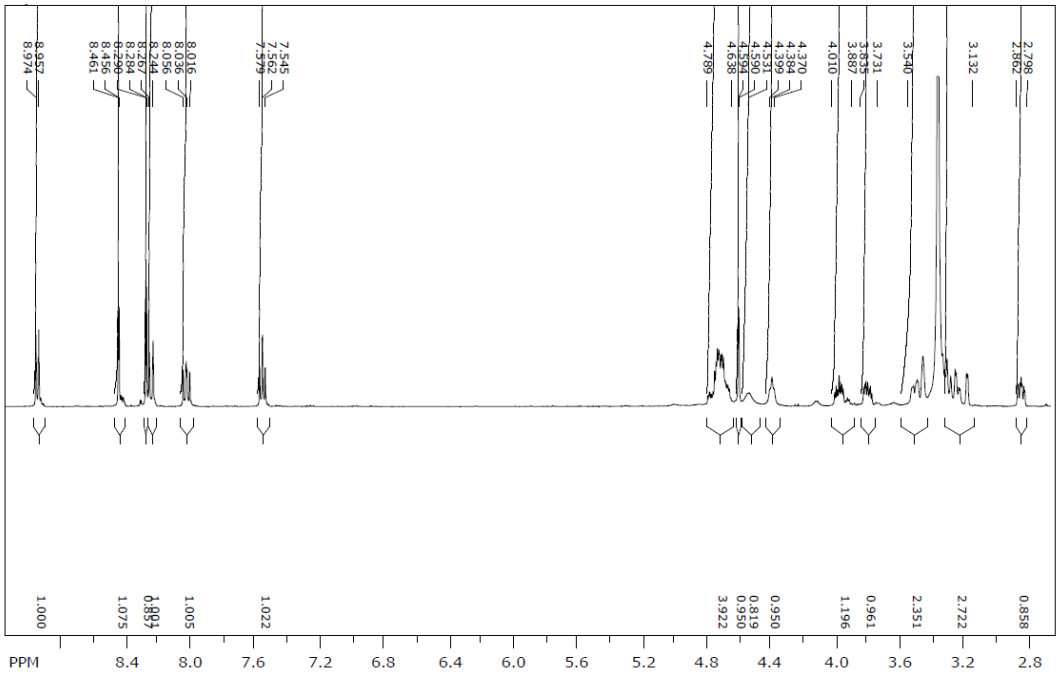
Slika 38. [1]H-NMR spektar spoja **8**



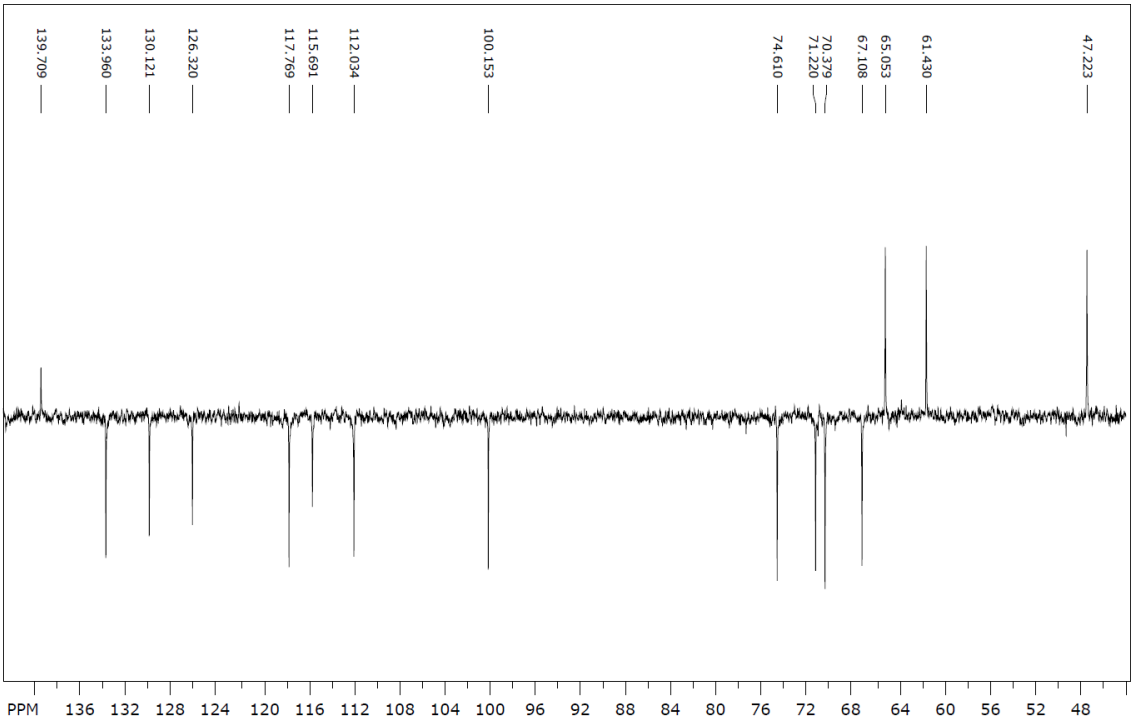
Slika 39.[1]H-NMR spektar spoja **10**



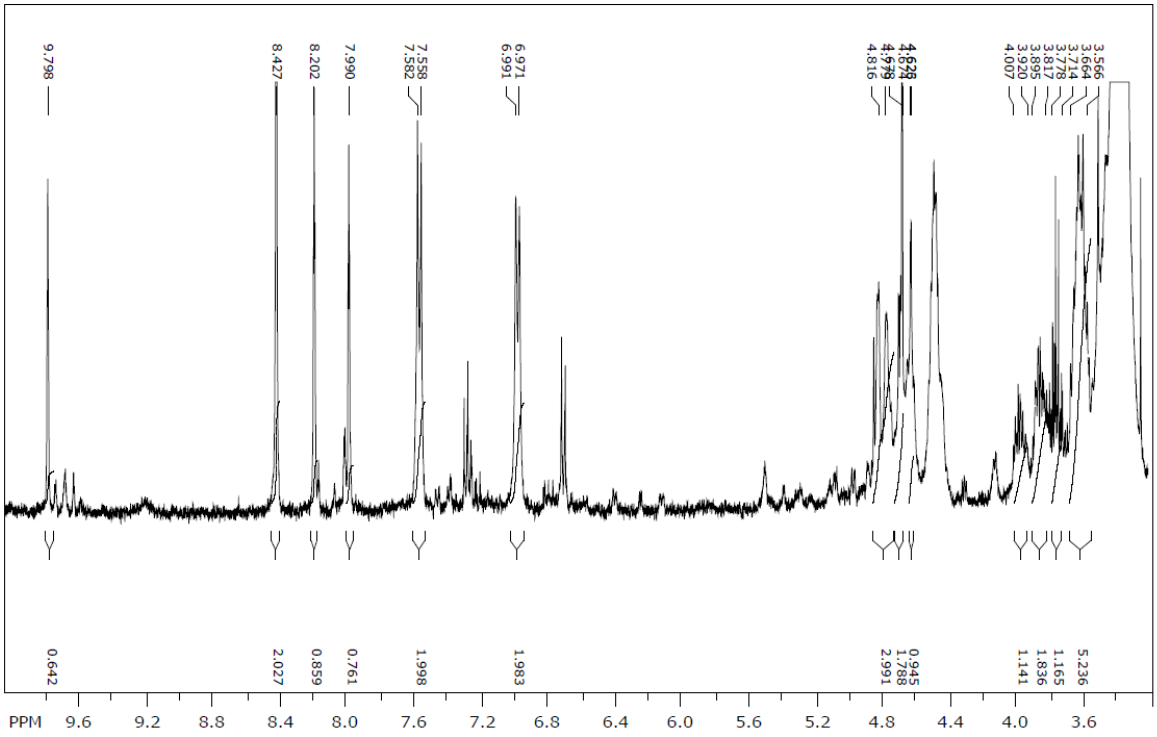
Slika 40. ^{13}C-NMR spektar spoja **10**



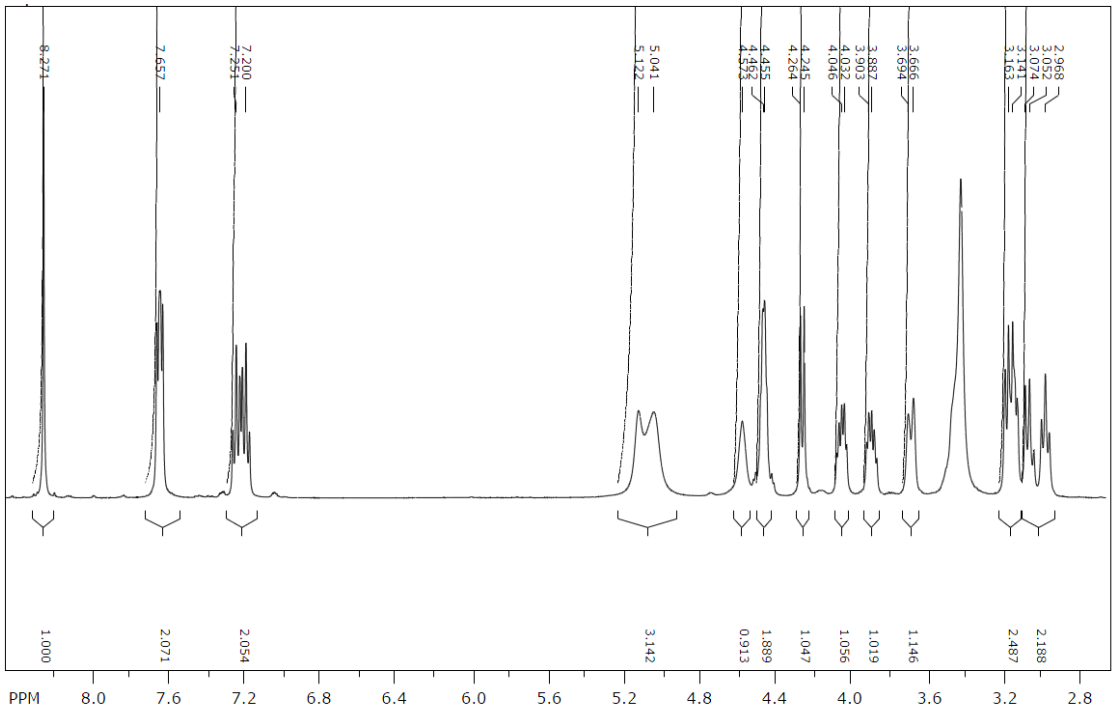
Slika 41. ^{1}H-NMR spektar spoja **11**



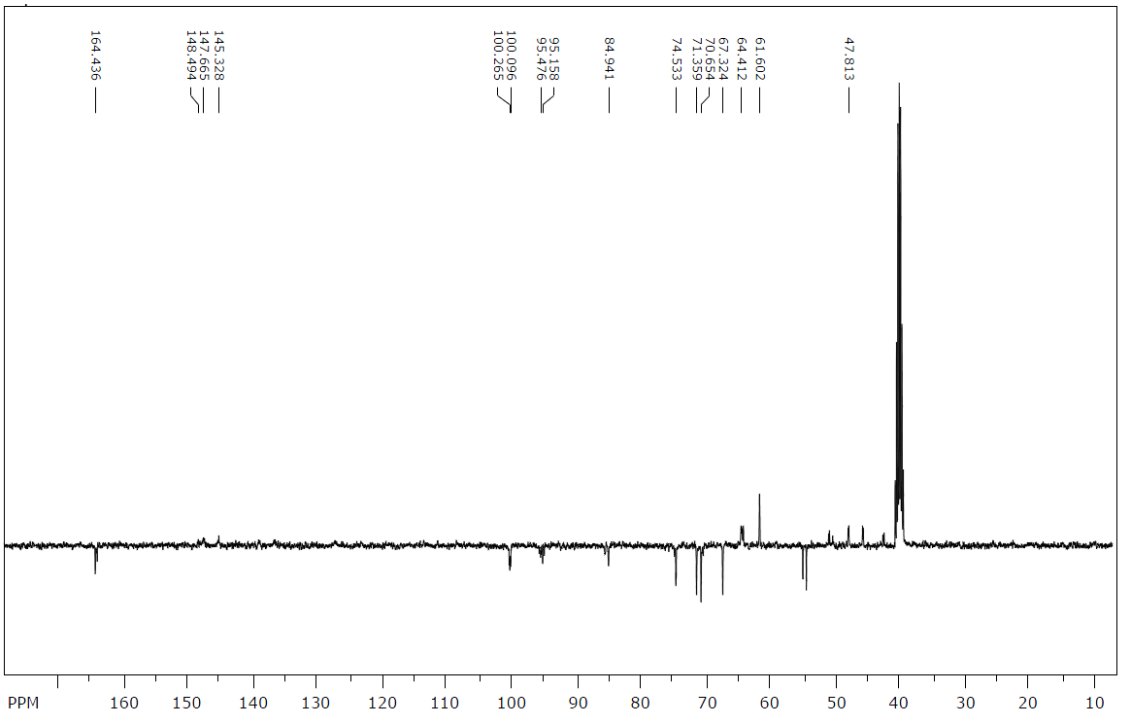
Slika 42. ^{13}C-NMR spektar spoja **11**



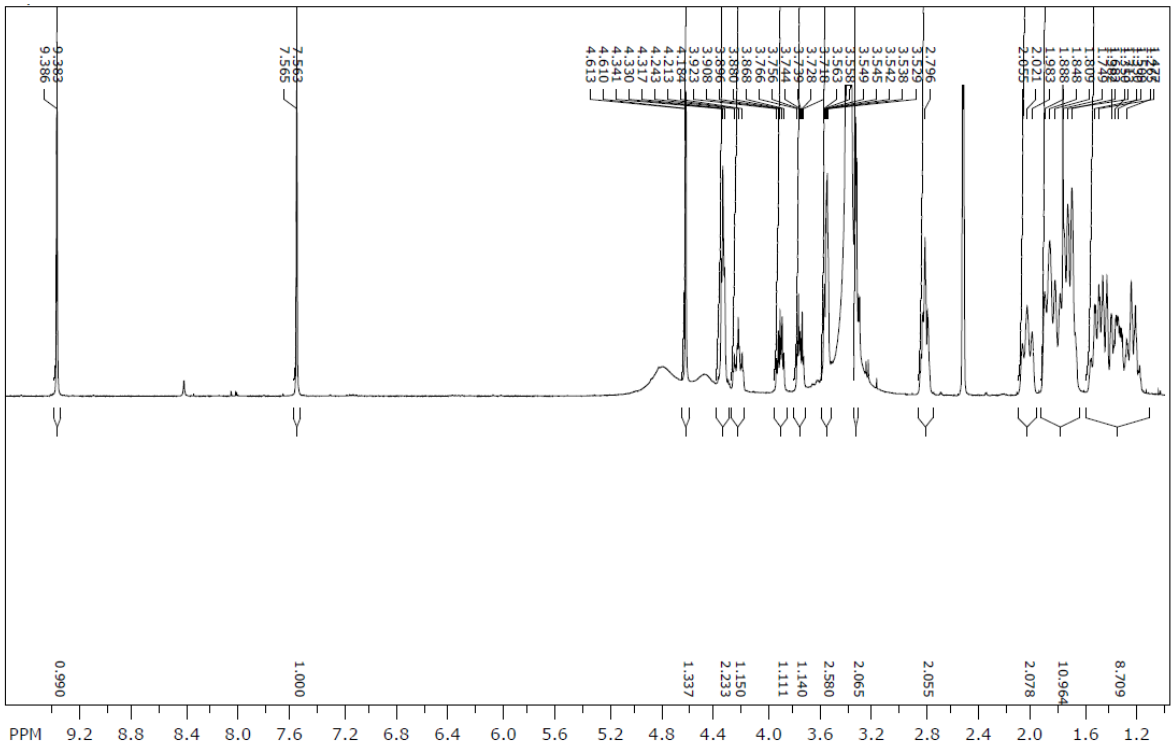
Slika 43. ^{1}H-NMR spektar spoja **12**



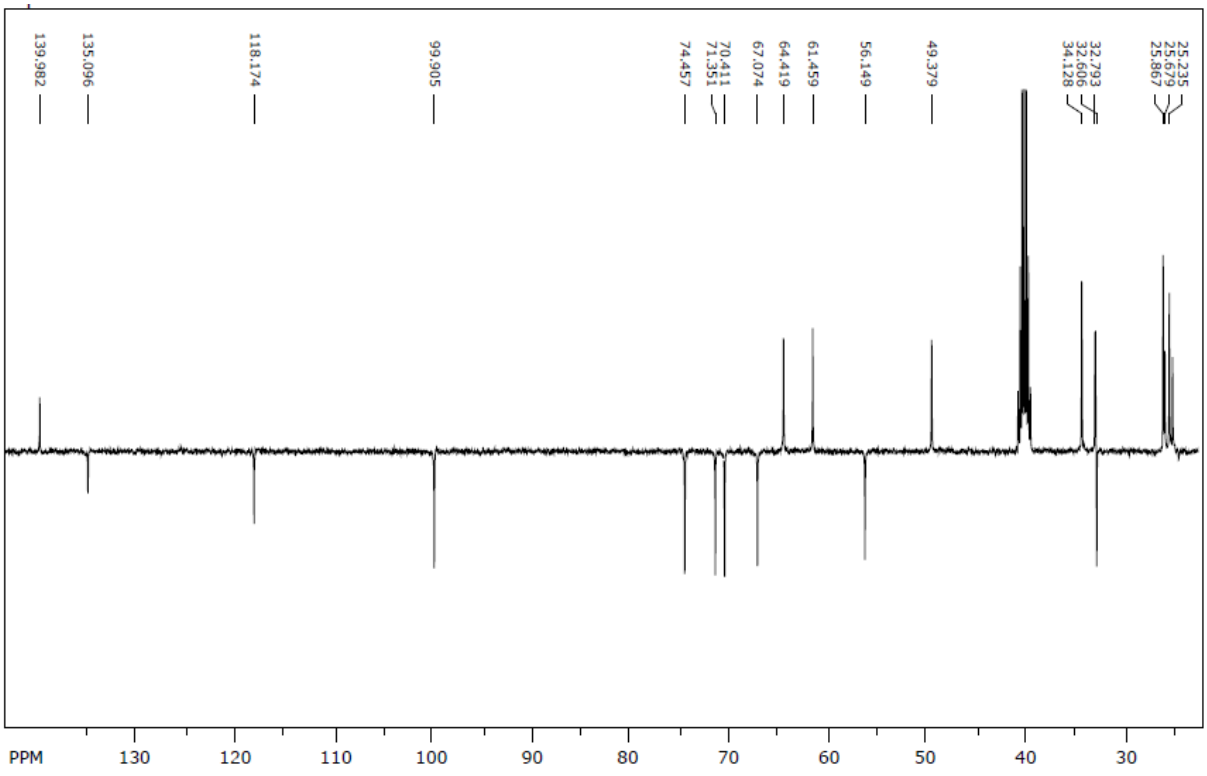
Slika 44. ^{1}H-NMR spektar spoja **13**



Slika 45. ^{13}C-NMR spektar spoja **13**



Slika 46. ^{1}H-NMR spektar spoja **13**



Slika 47. ^{13}C-NMR spektar spoja **13**

§10. ŽIVOTOPIS

OBRAZOVANJE

Srednja škola:

2008. – 2012. III. Gimnazija Osijek (smjer: prirodoslovno-matematički)

2008. – 2012. Glazbena i plesna škola Franje Kuhača Osijek (smjer: Klavir)

Visoko obrazovanje:

2012. Upisan prediplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

2015. Završen preddiplomski studij sa temom Završnog rada *Taxol – sinteza i svojstva* (mentor: prof. dr. sc. S. Tomić – Pisarović) i stečena titula prvostupnika kemije (*univ. bacc. chem*)

2015. Upisan diplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (smjer: istraživački, grana: organska kemija i biokemija)

REZULTATI, NAGRADE, POSTIGNUĆA

Državno natjecanje iz kemije: 2010. (6. mjesto), 2011. (4. mjesto), 2012. (3. mjesto)

Državno natjecanje iz matematike - A kategorija: 2011. , 2012. (sudjelovanje)

Izravan upis na PMF (kemija, matematika, fizika)

Stipendist Sveučilišta u Zagrebu (2014, 2015, 2016)

AKADEMSKI I ZNANSTVENO-ISTRAŽIVAČKI RAD

Demonstrator kolegija Matematika 1 i Matematika 2 na preddiplomskom studiju kemije (2014-2016)

Volontiranje na projektu - Sinteza, strukturna analiza i biološka evaluacija peptidomimetika i glikokonjugata (2016.)

PODRUČJA POSEBNOG ZNANSTVENOG INTERESA

Primjena naprednih matematičkih alata u kemiji

Sinteza i dizajn novih biološki aktivnih molekula