

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



MATJAŽ WEISS

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



MATJAŽ WEISS

SINTEZA MONOMERNIH IN MULTIMERNIH
ANTAGONISTOV RECEPTORJA DC-SIGN
SYNTHESIS OF MONOMERIC AND MULTIMERIC
DC-SIGN ANTAGONISTS

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

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

Zahvala

Najprej se zahvaljujem vsem predavateljem, asistentom in ostalim zaposlenim na Fakulteti za farmacijo za vse posredovano znanje in izkušnje tekom mojega študija. Velika zahvala gre mentorju za pomoč pri delu v laboratoriju, za vsestranske praktične nasvete in podarjeno strokovno znanje. Hvala tudi Damijani in Marku za nesebično pomoč pri delu v laboratoriju. Na koncu se zahvaljujem tudi družini in dekletu Uni ter svojim prijateljem Sebastijanu, Adrijanu, Neži in vsem članom RC 40th EPSA AC za vso podporo v času študija.

Magistrsko delo posvečam svojemu dedku, ki me je z ljubeznijo do narave vpeljal v svet naravoslovnih ved.

Izjava

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

Matjaž Weiss

Predsednik komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Članica komisije: izr. prof. dr. Barbara Ostanek, mag. farm.

VSEBINA

I. POVZETEK	VII
II. ABSTRACT	VIII
III. SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1 UVOD	1
1.1 Lektini.....	1
1.1.1 Lektini tipa C.....	2
1.2 Receptor DC-SIGN in njegova vloga pri celični imunosti	2
1.2.1 Zgradba receptorja DC-SIGN	3
1.2.2 Vezavno mesto receptorja DC-SIGN	4
1.2.3 Vloga receptorja DC-SIGN pri celični imunosti	5
1.2.4 Vezava patogenov na receptor DC-SIGN	7
1.2.5 Primer vezave virusa HIV-1 na receptor DC-SIGN	8
1.3 Receptor FimH	9
1.3.1 Vezava na gostiteljsko celico in potek okužbe	9
1.3.2 Primer bakterijske okužbe povzročene z <i>E. coli</i> preko receptorja FimH	10
1.4 Antiadhezivna terapija.....	11
1.5 Razvoj antagonistov receptorja DC-SIGN	13
1.5.1 Glikomimetiki	13
1.5.2 Dendronski multimerni antagonisti.....	14
1.5.3 Nesaharidni antagonisti.....	15
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 Materiali.....	19
3.1.1 Reagenti in topila	19
3.1.2 Laboratorijska oprema	19
3.2 Metode.....	19
3.2.1 Kromatografske metode	19
3.2.2 Spektroskopske in spektrometrične metode	20
3.2.3 Določevanje tališč.....	20
3.2.4 Računalniška programska oprema	21
3.2.5 Biološka testiranja	21
3.2.6 Ostale metode	22
4 EKSPERIMENTALNI DEL	23
4.1 Sinteza monomernega antagonista preko benzilnega estra	23
4.1.1 Sinteza Benzil 3-hidroksibenzoata (1).....	23
4.1.2 Sinteza Benzil 3-(2-hidroksi-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzoata (3)	24
4.1.3 Sinteza Benzil 3-(2-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzoata (4)	25

4.1.4	Sinteza Benzil 3-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzoata (5)	26
4.2	Sinteza monomernega antagonista preko metilnega estra	27
4.2.1	Sinteza Metil 3-hidroksibenzoata (7)	27
4.2.2	Sinteza 2-((naftalen-1-iloksi)metil)oksirana (2)	27
4.2.3	Sinteza Metil 3-(2-hidroksi-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzoata (9)	28
4.2.4	Sinteza Metil 3-(2-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzoata (10)	30
4.2.5	Sinteza Metil 3-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzoata (11)	31
4.2.6	Sinteza 3-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzojske kisline (12)	32
4.3	Pripenjanje različnih distančnikov	33
4.3.1	Sinteza <i>N</i> -(2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etil)-3-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzamida (13)	33
4.3.2	Sinteza <i>N</i> -(2-(2-(4-(2-azidoetil)piperazin-1-il)etoksi)etil)-3-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzamida (14)	34
4.3.3	Sinteza <i>N</i> -(2-(2-(2-(4-(2-azidoetil)piperazin-1-il)etoksi)etoksi)etil)-3-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzamida (22)	35
4.3.4	Sinteza <i>N</i> -(2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etil)-3-(2-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzamida (18)	36
4.3.5	Sinteza <i>N</i> -(2-(2-(4-(2-azidoetil)piperazin-1-il)etoksi)etil)-3-(2-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzamida (23)	37
4.4	Sinteza multimernih antagonistov	38
4.4.1	Sinteza Ac-Dendrona 1 (25)	38
4.4.2	Sinteza Ac-Dendrona 2 (26)	39
4.4.3	Sinteza Dendrona 1 (27)	40
4.4.4	Sinteza Dendrona 2 (28)	40
4.4.5	Poizkus sinteze Dendrona 3 (30)	41
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	42
5.1	Sinteza monomernega antagonista	42
5.2	Od monomernega do multimernega antagonista	47
5.3	Biološko vrednotenje	52
5.3.1	Vrednotenje spojin v vezavnem mestu receptorja DC-SIGN	52
5.3.2	Vrednotenje spojin v vezavnem mestu receptorja FimH	56
6	SKLEP IN ZAKLJUČEK	57
7	LITERATURA	59
8	PRILOGE	69
	<i>Priloga 1: Podatki o reverznofazni ločbi spojine 30</i>	69
	<i>Priloga 2: Strukturne formule dendronskih antagonistov</i>	70
	<i>Priloga 3: NMR spektri</i>	75
	<i>Priloga 4: Podatki analiznih izvidov spektroskopskih tehnik (NMR, MS, IR)</i>	78

I. POVZETEK

Receptor DC-SIGN, ki se nahaja na nezrelih dendritičnih celicah in je lektinski receptor tipa C, ima eno izmed ključnih vlog pri okužbah z nekaterimi patogeni. Njegove poglavitne naloge so prepoznavanje patogenih organizmov preko specifične zgradbe patogenih glikoproteinov, internalizacija in sodelovanje pri uničenju patogenov. Nekateri patogeni izrabijo prenos z receptorjem DC-SIGN v celico za povečanje svoje infektivnosti, saj se s svojimi mehanizmi izognejo razgradnji in tako povzročijo okužbo. Eden izmed takšnih patogenov je tudi virus HIV. Z namenom preprečitve vezave patogenov na receptor smo na podlagi ugotovitev do tedaj ovrednotenih monomerov in strukturno podprtega načrtovanja sintetizirali potencialne glikomimetične antagoniste DC-SIGN. Sintetizirali smo monomerni derivat 1,3-diarilglicerilmanozida, ki je bil preko različnih distančnikov povezan na glukopiranozidno dendronsko jedro z namenom povečanja avidnosti vezave. Z benzoatno obliko enega izmed arilnih fragmentov smo ciljali na izboljšanje topnostnih lastnosti, medtem ko z obema ariloma (naftilom in fenilom) na izboljšanje vezave s Phe313 in z aminokislinskimi ostanki v hidrofobnem žepu receptorja DC-SIGN. Sintetiziranim spojinam smo ovrednotili sposobnost vezave v vezavno mesto enote CRD receptorja DC-SIGN z *in vitro* testnimi sistemi in s tehniko STD NMR. Pri tetravalentni predstavitvi smo dosegli koncentracijo IC_{50} v spodnjem mikromolarnem območju, za monomer pa v zgornjem mikromolarnem območju. S STD NMR spektroskopijo so bile ovrednotene interakcije posameznih protonov v vezavnem mestu, iz česar je bilo določeno dodatno vezavno mesto v hidrofobnem žepu z aminokislinskim ostankom Asn344, kar ponuja možnosti za razvoj novih močnejših antagonistov z boljšimi topnostnimi lastnostmi in boljšo selektivnostjo. Prav tako smo vezavo sintetiziranih spojin ovrednotili z vezavnim mestom receptorja FimH, ki je bakterijski lektinski receptor in igra vlogo pri uroepitelni okužbah z bakterijo *Escherichia coli*. Izkazale so se kot odlični inhibitorji receptorja z vrednostmi IC_{50} v spodnjem nanomolarnem območju. Sintetizirane spojine spadajo med antiadhezivne spojine, katerih skupna lastnost je preprečevanje adhezije patogenov na receptorje. Predstavljajo potencialno podporno terapijo antibiotikom ali protivirusnim učinkovinam brez povzročitve odpornosti na zdravila. Glede na to, da je antiadhezivnih zdravil na tržišču malo, je to popolnoma nov pristop zdravljenja okužb. Za doseg ustrezne in selektivne inhibicije vezave posameznih patogenov na receptorje ter izboljšanje topnostnih lastnosti pa bodo potrebne še številne nadaljnje raziskave.

Ključne besede: DC-SIGN, HIV-1, dendroni, FimH, antiadhezivi, antagonisti DC-SIGN

II. ABSTRACT

The DC-SIGN receptor is a C-type lectin expressed by immature and mature dendritic cells. It has one of the main roles in cases of some pathogen infections: it is an adhesion molecule, which enables pathogen/antigen recognition by pathogen specific glycoprotein structures, pathogen internalisation with intent of processing it and pathogen processing. Some pathogens use internalisation to overcome the lytical process in cells and increase their infectiveness. We have synthesized potential glycomimetic DC-SIGN antagonists in order to prevent pathogen receptor binding. Their structure is based on previous monomer outcomes and structure-based design. Among the monomeric molecules, we have chosen asymmetrically disubstituted 1,3-diarylglycerylmannopyranosides monomer and attached it to a tetravalent glucopyranoside dendron core with three different linkers in order to increase binding avidity. The benzoate form of one of the aryl groups was attached to the glyceryl linker with the intent of improving antagonists solubility, while both aryl groups were attached to improve antagonists binding to Phe313 and other aminoacids in the hydrophobic pocket of the DC-SIGN. Furthermore, the ability of the potential synthesised DC-SIGN antagonists for carbohydrate recognition domain (CRD) of the DC-SIGN receptor binding was evaluated by *in vitro* testing systems and STD NMR binding analysis. We found out the tetravalent antagonist to be active in the low micromolar range and the monomeric compound in the high micromolar range. Interactions of certain protons with the receptor's binding site have been evaluated by STD NMR spectroscopy. Those that were studied point out a new binding opportunity in hydrophobic pockets by binding to an aminoacid residue Asn344. This offers the development of new and more potent antagonists with better solubility and higher selectivity. Moreover, the ability of the synthesised compounds for binding the FimH bacterial lectin receptor domain was also evaluated. This receptor has a role in the uroepithelial infection by *Escherichia coli*. These compounds show great affinity for the FimH with IC₅₀ in the low nanomolar range. Drugs blocking pathogen binding to the receptor are called antiadhesion drugs. Blocking binding sites in adhesion receptors with antagonists is considered to be a promising new alternative therapy or co-therapy to treat infections caused by pathogen organisms while not causing resistance to drug therapy. At the moment, only a few antiadhesion drugs on the market exist, showing the novelty of this approach. Therefore, more research is needed to achieve the appropriate individual and selective blocking of pathogen binding to receptors.

Keywords: DC-SIGN, HIV-1, dendrons, FimH, anti-adhesion, DC-SIGN antagonists

III. SEZNAM OKRAJŠAV

Okrajšava	Pomen
Å	angstrem
APC	antigen predstavitvena celica
BSA	<i>bovine serum albumine</i> – goveji serumski albumin
CMV	citomegalovirus
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i> – domena za prepoznavo ogljikovih hidratov
d	dublet
DC	dendritične celice
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i> – za dendritske celice specifični, medcelično adhezijsko molekulo-3 vezujoči neintegrin
dd	dublet dubleta
ddd	dublet dubleta dubleta
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DKM	diklorometan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO-d ₆	devteriran dimetilsulfoksid
EDC	3-(etiliminometilenamino)- <i>N,N</i> -dimetilpropan-1-amin
Ekv	ekvimolarna količina (ekvivalent)
ESI	<i>electrospray ionization</i> – elektrorazpršilna ionizacija
EtOAc	etil acetat
FimH	<i>fimbrial adhesin H</i> – fimbrijski adhezini H
Glu	glukoza
HCV	hepatitis C virus
Hex	<i>n</i> -heksan
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> – virus humane imunske pomanjkljivosti
HOBt	1-hidroksibenzotriazol
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> – masna spektrometrija visoke ločljivosti
HSV	herpes simpleks virus
HTS	<i>high-throughput screening</i> – reševanje visoke zmogljivosti
IC ₅₀	koncentracija antagonista, ki povzroči inhibitorni učinek enak 50 % maksimalnega
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i> – medcelična adhezijska molekula
IR	infrardeča spektroskopija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
K _D	konstanta disociacije
KKR	kolonska kromatografija

m	multiplet
Man	manosa
MF	mobilna faza
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> – poglavitni kompleks tkivne skladnosti
Mr	relativna molekulska masa
MS	masna spektrometrija
n.r.	nasičena raztopina
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> – jedrska magnetna resonanca
OF	organska faza
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i> – molekulski vzorci povezani s patogeni
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> – receptor, ki prepozna različne patogene molekulske vzorce
Py	piridin
q	kvartet
Rf	retencijski faktor
s	singlet
SARS-CoV	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus</i> – koronavirus, ki povzroča resen akutni respiratorni sindrom
S _N	nukleofilna substitucija
STD NMR	<i>saturation transfer difference NMR</i> – tehnika z razliko v prenosu nasičenja
T	temperatura
t	triplet
TBABr	tetrabutilamonijev bromid
TFA	trifluoroocetna kislina
T _H	<i>T helper cell</i> – celica T pomagalka
TLC	<i>thin layer chromatography</i> – tankoplastna kromatografija
TLR	<i>toll-like receptor</i> – toll-u podoben receptor
TMSOTf	trimetilsilil trifluorometansulfonat
T _{VK}	temperatura vodne kopeli
UPEC	uropatogena <i>Escherichia coli</i>
VF	vodna faza
WNV	<i>west Nile virus</i> – zahodnonilski virus
δ	kemijski premik
η	izkoristek reakcije
v	valovno število

1 UVOD

V svetu živi ogromno enoceličnih organizmov. Njihovo razločevanje je enostavno – to sem jaz, tisto si pa ti. V večceličnih organizmih se celice podredijo nečemu skupnemu in živijo v skupkih s podobnimi nalogami in lastnostmi, ki se s kompleksnostjo organizmov večajo. Sedaj ni več jaz in ti, ampak mi in vi. Pojavi pa se še težava – razlikovanje, ali je mimoidoča celica, ki je različna od mene, res del mojega organizma ali je vsiljivec in ali je ta vsiljivec škodljiv ali neškodljiv.

Z vsemi temi problemi se soočajo celice v večceličnih organizmih. Z evolucijo so se celice in organizmi temu prilagodili in razvili specifične molekule, ki jim pri tem razločevanju pomagajo. To so imunske celice, katerih glavni nalogi sta razločevanje med celicami in obramba organizma. Evolucija pa organizmov ni pustila brezskrbnih, saj obstajajo invazivni organizmi, ki zlorabijo molekule imunskih celic za vstop v gostiteljski organizem in se tako ali drugače izognejo pogubnemu imunskemu odzivu. To vse vodi v okužbo organizma, ki je lahko smrtno nevarna in se ji poskušamo izogniti z ustrezno preventivo ali kurativo.

1.1 LEKTINI

Med zgoraj omenjene molekule spadajo tudi lektini. To so beljakovine, ki so sposobne specifičnega prepoznavanja in reverzibilne vezave glikoproteinskih saharidov. Zato ne preseneča, da beseda lektin izhaja iz latinske besede *legere*, kar pomeni *izbirati* (1). Najdemo jih v živalih, rastlinah, glivah in prav tako pri mikroorganizmih, torej v vsem živem.

Kontakt med celicami in prepoznavanje na molekularnem nivoju je življenjskega pomena za biokemijsko delovanje organizma. Poglavitna naloga lektinov je lajšanje kontakta med celicami. Te navadno vsebujejo dve ali več vezavnih mest za oligosaharide, preko katerih pride do vezave in/ali prenosa informacij. Do vezave pride, ko lektini na površini ene celice prepoznajo specifični glikan na površini druge celice, ki je bodisi patogena bodisi organizmu lastna (1). Vse to pa omogoča unikatna zgradba lektinov, ki ima v domenah za prepoznavo ogljikovih hidratov (CRD) specifično komplementarnost za posamezne oligosaharide in omogoča vezavo le nekaterim (2). Ta visoko specifična vezava omogoča celicam ločitev med nativnimi, organizmu lastnimi glikoproteini in organizmu tujimi, na

katere se odzove z imunskim odzivom (3). Za vezavo je značilno, da se vzpostavi šibka nekovalentna vez, vendar pa je teh vezi veliko in je celokupno gledano vezava močna. Lektini se na podlagi aminokislinskega zaporedja in biokemijskih lastnosti razvrščajo v skupine. Med temi je najštevilčnejša skupina lektinov tipa C, ki jih najdemo v živalskih celicah in imajo Ca^{2+} v vezavnem mestu (1).

1.1.1 Lektini tipa C

Za C-tip lektinov je značilno, da imajo homologno domeno iz 120 aminokislin, ki je odgovorna za vezavo ogljikovih hidratov (CRD). Pri tem Ca^{2+} ioni in aminokislinski ostanki domene CRD predstavljajo vez med lektinom in OH skupinami ogljikovih hidratov (1). Domena CRD ima lahko vezane do 4 Ca^{2+} ione, od katerih je Ca^{2+} v 2. vezavnem mestu tisti, ki je odgovoren za vezavo ligandov. Izguba Ca^{2+} vodi v destabilizacijo in izgubo sposobnosti vezave liganda (4). Vezava liganda z aminokislinskimi ostanki je specifična, kar pomeni, da posamezen receptor ne prepozna vseh oligosaharidnih enot, kot tudi ne gostiteljskih celic. Lektini tipa C sodelujejo v številnih celičnih aktivnostih, vključujoč z receptorsko pogojeno endocitozo, celičnim prepoznavanjem in endocitozo topnih molekul (1).

Velikokrat jih najdemo v skupkih, v obliki homodimerov, trimerov ali v več povezanih enotah, kar povečuje afiniteto večvalentnih ligandov. Ne glede na zgradbo pa se močno razlikujejo po sposobnostih prepoznave različnih ligandov in afinitete do le-teh. Poleg tega sposobnost adhezije in signalizacije dajeta celicam vlogo v imunskem odzivu pri vnetjih, tumorjih in virusnih infekcijah (4).

Glede na to, da so lektini tako zelo pomembni za prepoznavo in komunikacijo med samimi celicami, predstavljajo tudi veliko in v preteklosti zapostavljeno skupino tarč, ki jih lahko izrabimo pri zdravljenju določenih okužb, povezanih s specifičnimi lektinskimi receptorji. V nadaljevanju se bomo tako srečali s humanim receptorjem DC-SIGN in bakterijskim receptorjem FimH, ki oba v vezavno mesto vežeta podobne manozide.

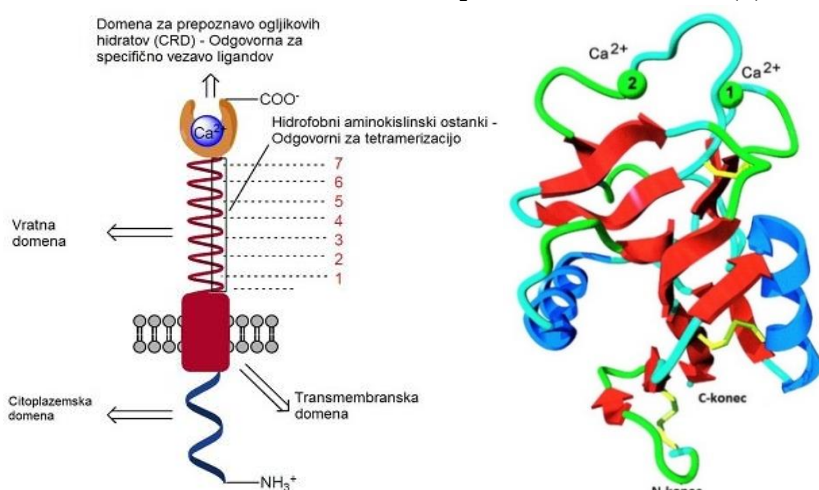
1.2 RECEPTOR DC-SIGN IN NJEGOVA VLOGA PRI CELIČNI IMUNOSTI

DC-SIGN (ang. *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Nonintegrin*) spada v skupino II lektinov tipa C in je transmembranski protein. Receptor,

ki je bil v prejšnjih desetletjih precej zapostavljen, je v zadnjem desetletju doživel preporod. Raziskave in študije tega receptorja so se znatno povečale zaradi odkritja njegove z imunskim sistemom povezane vloge in celično-specifičnega izražanja, ki je omejena izključno na dendritične celice in makrofage. Prve so najbolj potentne antigen predstavitvene celice (APC), ki imajo visoko sposobnost vezave, obdelave in predstavitve antigenov. Tako lahko izzovejo zelo močan antigensko specifičen imunski odziv, kot tudi povzročijo toleranco in vzdrževanje imunske homeostaze. Izražanje receptorja DC-SIGN je značilna za nezrele dendritične celice v perifernih tkivih (sluznici in koži) in v nekaterih primerih tudi za zrele ali aktivirane dendritične celice v limfatičnem tkivu (5).

1.2.1 Zgradba receptorja DC-SIGN

Receptor DC-SIGN je sestavljen iz več enot, in sicer: domene CRD, ki je odgovorna za specifično vezavo ligandov, sledi vratna domena, ki povezuje domeno CRD s transmembransko domeno, in citoplazemska domena (5). Domena CRD je globularna

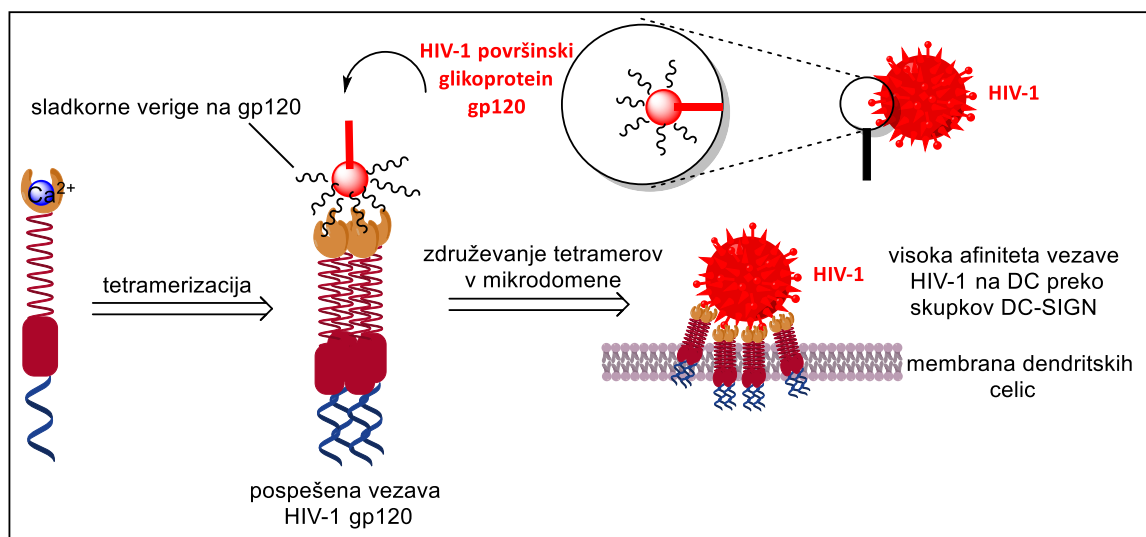


Slika 1: Levo je predstavljena zgradba receptorja DC-SIGN (prirejeno po (13)), desno pa njegova 3D struktura CRD (prirejeno po (7)).

struktura, sestavljena iz 12 β -ravnin (rdeče barve), 2 α -vijačnic (modre barve) in 3 disulfidnih mostičkov (rumena barva), kot je prikazano na sliki 1B. Hidrofilna zanka štrli iz ravnine proteina in oblikuje dve vezavni

mesti za Ca²⁺. Vezavno mesto 2 je odgovorno za vzdrževanje terciarne strukture domene CRD in vezavno mesto 1 je nujno za formacijo koordinativnih vezi z ligandi – sladkornimi enotami (6, 7). Domeno CRD s transmembransko in citoplazemsko domeno povezuje vratna domena, kot je prikazano na sliki 1A. Vsaka je sestavljena iz 7 popolnih in ene nepopolne tandemske ponovitve aminokislinskega zaporedja, sestavljenega iz 23 aminokislin, kjer se na vsakih 3 in 5 enot izmenja hidrofobna aminokislina, ki omogoča tetramerizacijo posameznih verig (5). Tetramerizacija poteče le v primeru, ko imamo v vratni domeni vsaj 6 vijačnih ponovitev in ima poglavitno vlogo pri povečanju afinitete receptorja do ligandov (8, 9). V primeru tetramerizacije se poveča specifičnost enot CRD

za gostiteljske molekule, in s tem prepoznavo molekulske specifičnih patogenov (8). Razmerje med monomerno in tetramerno obliko receptorja je pogojeno s pH-jem in podaja vratni domeni vlogo pH senzorja. Kot smo že prej omenili, je od tetramerizacije odvisna specifičnost domen CRD, kar pomeni, da pH znatno vpliva na afiniteto vezave ligandov (10). Vratna domena ima tudi funkcijo stabilizacije domene CRD in izpostavitvijo le-te ligandom. To je omogočeno z odmaknitvijo od površine celic, kar omogoča enoti večvalentno interakcijo z glikiranimi ligandi (9). DC-SIGN kot drugi lektini tvori mikrodomene na celični površini (Slika 2). To pomeni, da ob stiku z molekulami patogena pride do združevanja posameznih receptorjev v skupke, s čimer se vzpostavi mesto za sidranje in internalizacijo posameznih patogenov (11). Za DC-SIGN je prav tako značilno, da je fleksibilen in se prilagaja oligo- in monosaharidom z namenom, da se lahko vse enote CRD povežejo z ligandi. To skupaj s tetramerizacijo omogoča učinkovito in selektivno vezavo različnih glikiranih ligandov na receptor (12).

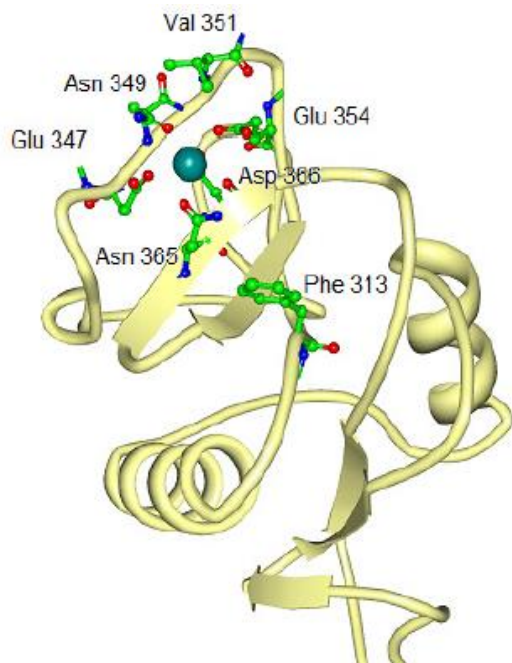


Slika 2: Tetramerizacija in tvorjenje skupkov receptorja DC-SIGN (prirejeno po (13)).

1.2.2 Vezavno mesto receptorja DC-SIGN

Za razvoj tako antagonistov kot tudi agonistov receptorja je nujno poznavanje zgradbe aktivnega oziroma vezavnega mesta receptorja. Ta je v primeru receptorja DC-SIGN obdan z zaporedjem štirih aminokislin (Glu347-Pro348-Asn349-Asn350), ki omogočajo selektivno vezavo monosaharidov z ekvatorialno ležnima 3-OH in 4-OH skupinama (14). Kot je bilo že omenjeno, v aktivnem mestu najdemo Ca^{2+} ion, ki ponuja 8 koordinativnih vezi, in sicer 2 ligandu (2 omenjeni ekvatorialno ležeči –OH sodelujeta pri tem) in 6 aminokislinskim ostankom sledečih aminokislin Glu347, Glu354, Asp366, Asn349, Asn365 (8, 15). Poleg koordinativne vezi s Ca^{2+} ionom na samo afiniteto vplivajo tudi ostali

aminokislinski ostanki (16), ki z različnimi nekovalentnimi vezmi vežejo ligande (Slika 3). Najpomembnejše so predvsem interakcije s preostalimi OH skupinami manoze, ki jih vzpostavijo Glu347, Glu354, Asn349, Asn365 in Lys368 (17). Poleg tega aminokislina Phe313 s fenilno skupino deli hidrofobno območje na dva dela. V primerjavi z drugimi lektinskimi



Slika 3: Domena CRD, z označenimi vsemi najpomembnejšimi aminokislinami (zelene palčke) in Ca^{2+} (modro-zelena kroglica) ionoma v vezavnem mestu receptorja (prirejeno po (104)).

receptorji tipa C se vezavno mesto receptorja DC-SIGN razlikuje v legi aminokislina Phe313, ki sterično ovira vezavo terminalno ležnih glikozidov (6). S tem prispeva k selektivnosti receptorja, hkrati pa je fenilna skupina pomembna tudi za tvorbo π - π ali hidrofobne vezi z določenimi ligandi. Aminokislina Val351 prav tako pomembno vpliva na vezavo, predvsem vezavo fukoznih enot oligosaharidov, in tvori s fukozno 4-OH skupino van der Waalsove vezi (15). Kotar in sod. so s STD NMR prišli do spoznanja, da pride prav tako do vezave med ligandi in receptorjem preko vodikove vezi med karboksilatoma liganda in receptorsko Asn344, kar predstavlja novo, še ne izkoriščeno interakcijo

(17). Ugotovljeno je bilo tudi, da obstaja 5 različnih vezavnih mest na samem receptorju, kar daje možnost za razvoj novih glikozidov z novimi fragmenti, ki bi ojačali vezavo glikozida na receptor (18).

1.2.3 Vloga receptorja DC-SIGN pri celični imunosti

Glavna naloga lektinskih receptorjev tipa C in s tem tudi receptorja DC-SIGN, je endocitoza antigenov z namenom njihove razgradnje in olajšane predstavitve ter obdelave v kompleksu z molekulami poglavitne tkivne skladnosti (MHC) (19).

DC-SIGN v vlogi PRR (ang. *Pattern Recognition Receptor*) na površini dendritičnih celic prepozna določene molekulske vzorce PAMP (ang. *Pathogen-Associated Molecular Pattern*). DC-SIGN ne samo prepozna in povzroča endocitozo patogenov, ampak tudi inducira znotrajcelične signalne poti, kot tudi modulira signale drugih PRR (13, 20).

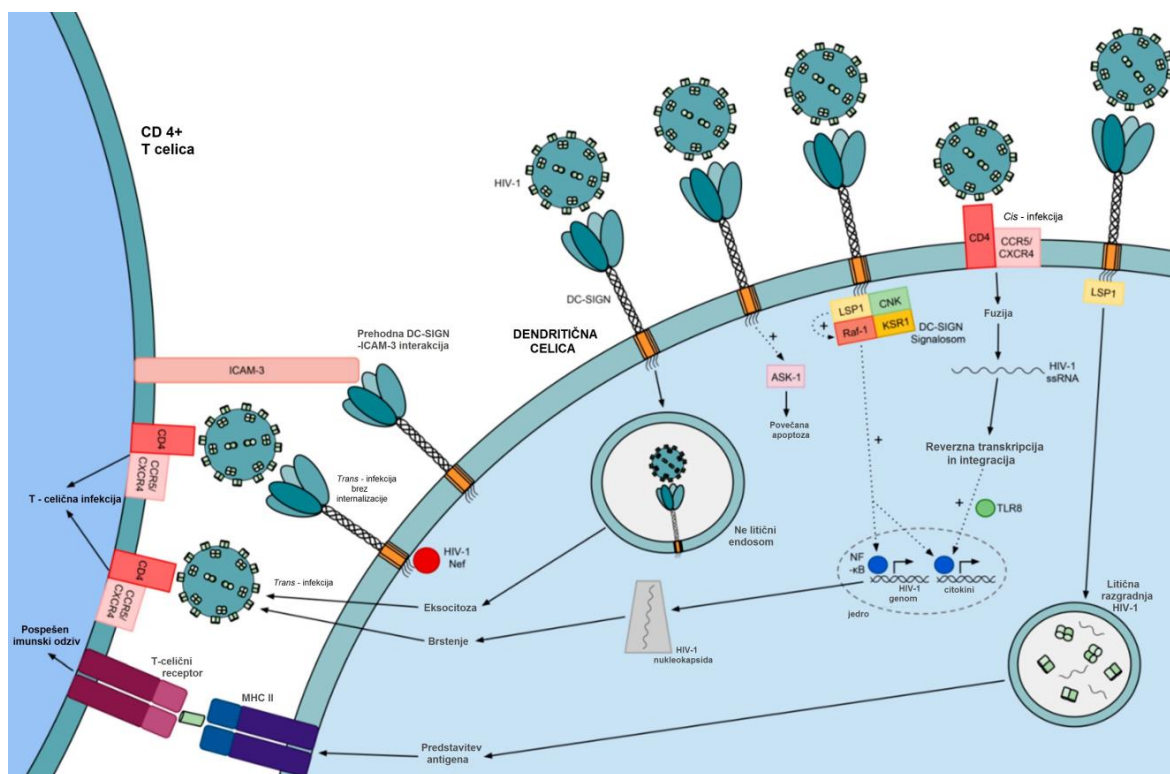
DC-SIGN je torej receptor, ki usmerja privzem antigenov v celico. Po vezavi ligandov povzroči hitro endocitozo iz površine celice v notranjost celice. Poleg tega je struktura

citoplazemskega repa takšna, da omogoča vezavo proteolitičnih fragmentov, hkrati pa signalizira pri izločalni in endocitozni poti. Cilj kompleksa DC-SIGN-ligand so endosomalni in lizosomalni razdelki, kjer pride do sproščanja liganda zaradi razlike v pH-ju. Sledi razgradnja in obdelava liganda z namenom njegove predstavitve T-celicam preko konjugacije peptidnih fragmentov z receptorji MHC II (13).

Z namenom vzpostavitve celične povezave med migracijsko dendritično celico in T-limfociti se DC-SIGN veže na adhezijske proteine, to sta znotrajcelični molekuli ICAM-2 in ICAM-3. Kotaleča dendritična celica se s pomočjo receptorja DC-SIGN veže na ICAM-2 na žilnem in limfatičnem endoteliju. S tem povzroči inducirano migracijo dendritičnih celic iz perifernih tkiv do limfnih vozlov, kjer se DC-SIGN veže na ICAM-3 na T-limfocitih in povzroči zgodnji nespecifični kontakt med dendritično celico in T-celico (5). S prehodno vezavo DC-SIGN na ICAM-3 je omogočeno pregledovanje MHC-peptidnega kompleksa, preko katerega nato pride do stabilizacije vezave preko T-celičnega receptorja, kar rezultira v nastanek virusnih sinaps. DC-SIGN tako podpira zgodnji nespecifični kontakt med T-celicami in dendritičnimi celicami, omogoča vključitev T-celičnega receptorja v stabilizacijo DC-T-celičnega stika in omogoča prepoznavo antigena s strani T-celice. Takšen način vezave preprečuje tvorjenje skupkov med DC in T-celicami in hkrati povzroči proliferacijo mirujočih T-celic, dokler ni doseženo zadostno delovanje imunskega odziva (5).

DC-SIGN ima tudi funkcijo signalnega receptorja. Sam po sebi ne spremeni stanja dendritičnih celic ali izločanja citokinov, ampak oblikuje imunski odgovor z modulacijo signalizacije preko drugih receptorjev PRR. Znotrajcelični rep receptorja DC-SIGN je povezan z različnimi zaviralci in ojačevalci, ki ob vezavi liganda izzovejo podaljšano transkripcijo genov za interlevkina IL-12 in IL-6, ki sta vnetna citokina, ali s transkripcijo zmanjša koncentracijo protivnetnih (IL-12 in IL-6) in poveča koncentracijo protivnetnih citokinov (IL-10). Slednje služi organizmu pri prepoznavi organizmu lastnih ligandov (21). Sposobnost receptorja DC-SIGN, ki je sposoben razlikovanja med ligandi, je tudi ta, da lahko uravna signaliziranje ostalih receptorjev TLR (ang. *Toll-like receptor*), kar vodi bodisi v pro- bodisi v protivnetno delovanje in je unikatno (20). Ena izmed pomembnih vlog receptorja DC-SIGN je tudi vpliv na preko IL-4 povzročeno diferenciacijo dendritičnih celic iz monocitov. Izsledki kažejo na njuno medsebojno odvisno vlogo pri diferenciaciji dendritičnih celic (13). Torej ima DC-SIGN ključno vlogo pri migraciji

dendritičnih celic, prepoznavanju antigenov oziroma patogenov, vezavi dendritične celice na T-limfocite, in s tem antigen predstavitveno delovanje, ter tudi pri diferenciaciji dendritičnih celic (Slika 4).



Slika 4: Primeri vlog receptorja DC-SIGN na primeru okužbe z virusom HIV-1. Prirejeno po (22).

1.2.4 Vezava patogenov na receptor DC-SIGN

V tekmi za obstoj veliko patogenov izrablja različne mehanizme, da izobidejo imunski sistem in preživijo. Skupna značilnost številnih patogenov je ta, da za vstop v celice izrabljajo DC-SIGN, ki prepozna številne mikroorganizme, vključujoč viruse (HIV-1, HCV, CMV, Dengue, Ebola, HSV, H5N1, WNV, koronaviruse, SARS-CoV), bakterije (*H. Pylori*, *M. tuberculosis*, *Leptospira interrogans*), glive (*Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*) in parazite (*Leishmania*, *Schistosoma mansoni*) (23–25). V veliki večini primerov so ti patogeni podvrženi razgradnji po vezavi na DC-SIGN in posledični internalizaciji. Pa vendar v določenih primerih po prepoznavi preko receptorja DC-SIGN pride do internalizacije patogenov v dendritične celice, kjer ti ostanejo vezani na receptor in se tako izognejo litičnemu procesu v endosomu, kar je lahko za organizem pogubno. S tem, ko preživijo razgradnjo, se poviša njihova infektivnost, saj so z vezavo na DC-SIGN v endosomu zaščiteni pred mehanizmi in okoljem gostiteljske celice. Ta pot lahko vodi v kronično okužbo, ki je zaradi znotrajcelične lokacije izjemno težavna za terapijo in trajno eradikacijo tovrstnega patogena (23–25).

Ti patogeni se izognejo razgradnji oziroma imunskemu odzivu s tem, da ostanejo vezani na receptor, in prav tako z manipulacijo T_h1/T_h2 ravnotežja na stran T_h2 , ki vodi v protivnetno delovanje in posledično obstojnost patogenov v organizmu (25, 26). Kot je bilo omenjeno že v prejšnjih poglavjih, ima DC-SIGN vlogo pri indukciji imunskega odziva z modulacijo aktivacije dendritičnih celic preko receptorja TLR. Specifična modulacija imunskega odziva je ne glede na DC-SIGN odvisna tudi od vezanega patogena, saj različni povzročajo izločanje različnih citokinov in posledično privedejo do različnih efektov – inhibicije ali aktivacije polarizacije T_h1 , odziva T_h2 ali inducirane regulacije T-celične diferenciacije (13, 26). Vezava enih povzroči sproščanje IL-12, ki izzove diferencirajo T-celice v T_h1 . Te sproščajo IFN- γ in imajo protivnetno delovanje, medtem ko vezava drugih povzroči sproščanje IL-10 in IL-4, slednji izzove diferenciacijo T-celic v T_h2 . Te pa sproščajo večje število protivnetnih interlevkinov (20, 24).

Patogeni, ki vstopajo v dendritično celico in se izognejo litičnemu procesu, so za organizem grožnja, saj niso predstavljeni imunskim celicam in posledično niso ustrezno odstranjeni. Vsak patogen ima svoj mehanizem, kako se izogne imunskemu sistemu in preživi celične obrambne mehanizme. V nadaljevanju bo na primeru okužbe z virusom HIV-1 prikazano njegovo preživetje v celici. Okužba z virusom HIV (virus humane imunske pomanjkljivosti) je z 1,1 milijona smrti letno in prevalenco 2,1 milijona ena izmed najbolj smrtonosnih okužb, takoj za okužbami spodnjega dihalnega trakta in tuberkulozo in je posledično tudi ena najbolj raziskanih (27, 28).

1.2.5 Primer vezave virusa HIV-1 na receptor DC-SIGN

HIV-1 izkorišča nativno funkcijo receptorja DC-SIGN, da lahko razvije popolnoma razpršeno okužbo preko *trans*-infekcije, kjer dendritične celice prenesejo HIV-1 do T-limfocitov oziroma $CD4^+$ celic brez lastne okužbe (29). Do vezave in prepoznavne patogena na nezrelih dendritičnih celicah pride preko virusnih glikoproteinov gp120 na površini ovojnice. Kompleks HIV-1-DC-SIGN se ali takoj internalizira v endosome, kjer je prisoten nižji pH, zaradi česar pride do zmanjšane afinitete in ločitve od DC-SIGN, ali pa se HIV-1 direktno prenese na receptor $CD4/CCR5$ na T-celici (30). V primeru internalizacije se po disociaciji od receptorja navadno večina ligandov razgradi. Pri HIV-1 pa ni tako; ta se sicer še vedno v večini razgradi in ta delež ne predstavlja grožnje organizmu. Problematičen je drugi, bistveno manjši del, ki ostane vezan na DC-SIGN in tako zaščiten pred imunskim odzivom ohrani svojo invazivnost (5, 23). Virus HIV-1 lahko

tako skrit v multivezikularnih telescih, v dendritičnih celicah čaka dneve, mesece na ustrezne razmere (31). Poleg tega ga ohranjajo tudi imunosupresivni učinki, ki jih povzroči ob sočasni aktivaciji TLR in so posledica sinteze IL-10 na dendritičnih celicah (13). Po primarnem stiku med DC-SIGN-HIV-1 pride tudi do prenosa patogena do receptorja CD4/CCR5 izraženega na istih nezrelih dendritičnih celicah. Fuzija njegove virusne ovojnice s celično membrano omogoči vstop virusa v celico in infekcijo dendritične celice po *cis* poti (32). Zrele dendritične celice prenesajo HIV-1 do CD4⁺ celic preko aktivacije imunskega odziva in tvorbe infekcijskih sinaps. HIV-1 s signalizacijo prav tako sproži dva kontradiktorna procesa – inhibicijo dozorevanja dendritičnih celic, hkrati pa povzroči nastanek virusnih sinaps, ki so značilne le za zrele celice (13). Torej HIV-1 ne glede na način vstopa v celico izrabi receptor DC-SIGN kot trojanskega konja za vstop v dendritično celico in pobeg imunskemu sistemu organizma (33). Po prenosu na T-celice pride do transfekcije (okužbe) in posledične oslabitve imunskega sistema.

1.3 RECEPTOR FimH

V skupino lektinov spada tudi receptor FimH (ang. *Fimbrial adhesin H*), vendar se za razliko od receptorja DC-SIGN nahaja na bakterijskih celicah. Najdemo ga na terminalnem delu fimbrij tipa I (34). Te so značilne za Enterobakterije – *Klebsiella*, *Salmonella*, *Enterobacter* in *E. coli*. FimH je sestavljen iz dveh domen, ena se pripenja na fimbrij, druga pa se specifično veže α -D-manozid gostiteljske celice, preko katerega se na njo tudi pripne. Interakcija med bakterijo in celico omogoča gibanje bakterij proti toku urina in povzroči namnožitev bakterij ter njihov vstop v uroepitelno celico, kar se kaže kot kronična ali akutna oblika infekcije urinarnega trakta. Vezava receptorja FimH na α -D-manozid gostiteljske celice ponuja prijemališče antiadhezivnim spojinam, ki bi z vezavo v vezavno mesto receptorja to vezavo preprečile in posledično tudi preprečile okužbo z Enterobakterijami (35). To bi lahko bila podporna terapija konvencionalni terapiji z antibiotiki, saj se zaradi ponavljajočih okužb pojavlja večje število odpornih bakterijskih sevov na antibiotike (36).

1.3.1 Vezava na gostiteljsko celico in potek okužbe

Vezavno mesto receptorja FimH lahko razdelimo na 4 regije – hidrofobno (Phe142, Phe1 in Ile13), ki usmerja manozne ligande s hidrofobnimi interakcijami preko specifičnih tirozinskih vrat (Tyr137, Ile52, Tyr48) v polarni žep (Asn46, Asp47, Asp54, Gln133,

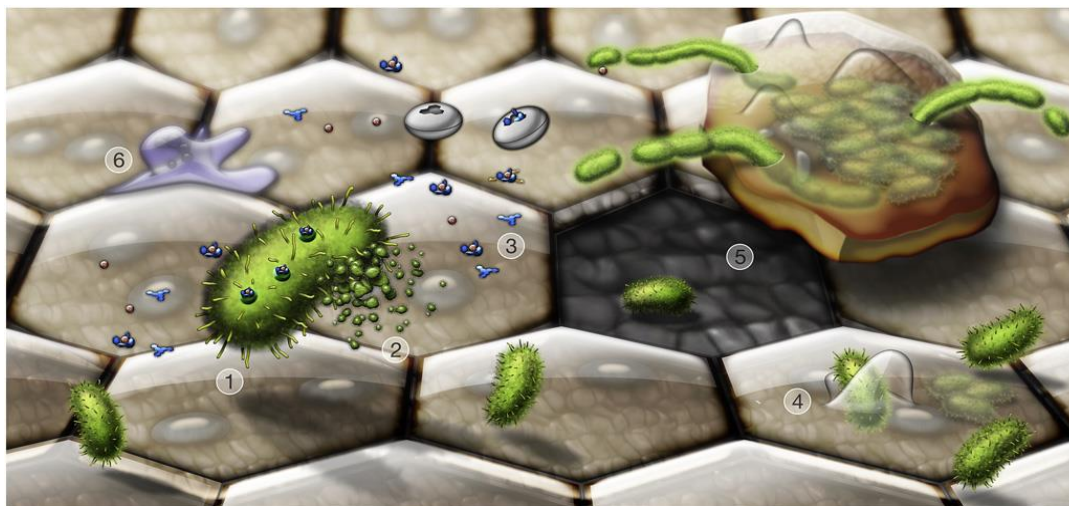
Asn135, Asn138 in Asp140), kjer pride do tvorbe vodikovih vezi z manoznimi OH skupinami liganda, in na aminokislinski ostanek Thr51 (35,37). Vezava bakterij na gostiteljsko celico poteka v več stopnjah. Najprej pride do šibkih reverzibilnih interakcij preko naboja ali hidrofobnih interakcij na podlagi fizikalno-kemijskih lastnosti celic; temu sledi močna specifična adhezija bakterije preko bakterijskih lektinov na epitelne celice gostiteljske celice (38) in translokacija efektornih proteinov v gostiteljsko celico. Fagociti (nevtrofilci, makrofagi, mastociti in dendritične celice) so ključni za odstranitev patogenih bakterij s fagocitozo in aktivacijo imunskega odziva (39). To se zgodi preko indukcije specifičnih signalnih kaskad, ki vodijo v internalizacijo patogena (40). Z vezavo na makrofage se del bakterij lahko izogne fagocitozi in predstavlja rezervoar za ponavljajoče se infekcije. To se zgodi zaradi zmanjšane izločanja reaktivnih kisikovih radikalov in kislega pH-ja (41). Za bakterije pa je precej neugodna vezava na mastocite, ki jih z vezavo aktivirajo, s tem izovejo izločanje citokinov in posledično prihod nevtrofilcev, ki te bakterije odstranijo (42). FimH torej z vezavo omogoča adhezijo na gostiteljsko celico, invazijo bakterije in sodeluje pri formaciji znotrajceličnega biofilma (43, 44). To vse predstavlja bakterijskim celicam možnost preživetja, medtem ko človeškemu organizmu velik problem, ki ga rešujemo z antibiotično terapijo in bi jo bilo smiselno dopolniti z antiadhezivnimi zdravili, ki bi preprečila vezavo patogena na gostiteljske celice.

1.3.2 Primer bakterijske okužbe povzročene z *E. coli* preko receptorja FimH

Bakterija *Escherchia coli* je del naravne flore človeka, kjer z epitelnimi celicami shaja v simbiozi (45). Nekateri sevi *E. coli* lahko postanejo nevarni, ko pridobijo bolj patogene lastnosti in povzročijo resne težave (46). V večini primerov (70–95 %) so urinarne infekcije povzročene s patogenom *E. coli* (47) in vodijo v vnetji cistitis ali pielonefritis (48, 49).

Bakterija se prvotno nahaja v intestinalnem traktu in nato preide v urinarni trakt (48). Do vezave v urinarnem traktu pride preko oligomanozida na glikoproteinu uroplakin Ia (50) ali preko integrina $\alpha 3\beta 1$ (51), ki se nahajata na uroepitelnih celicah. Vezava je predpogoj za okužbo, saj v nasprotnem primeru pride do odstranitve bakterije s tokom urina (50). Do prenosa bakterije iz površine uroepitelne celice mehurja v notranjost celice pride v endosomu ali lizosomu podobnemu razdelku z nizkim pH-jem. UPEC je sposoben priti skozi celice v citosol in tvoriti biofilm, v katerem se namnoži več kot tisoč bakterij. Pri tem povzroča vnetni proces s svojimi toksini (HlyA – vnetje, apoptoza celic, liza celic; Sat/Vat

– poškodba tkiva; CNF - degradacija in poškodbe membrane) (50) in izzove imunski odziv gostitelja z mobilizacijo levkocitov. Poškodbe celic vodijo v apoptozo in odstranitev patogena, vendar pa hkrati razkrijejo nezrele epitelne celice, ki so bolj dovzetne za okužbo in tako lahko v njih nastanejo tihi znotrajcelični rezervoarji, skriti pred imunskimi celicami gostitelja (Slika 5) (52, 53).



Slika 5: Slika prikazuje glavne dogodke pri infekciji mehurja z UPEC. 1 – izražanje fimbrij 1 na površini bakterije; 2 – izločanje toksinov in virulentnih dejavnikov; 3 – izločanje sideroforov; 4 – adhezija in invazija na epitelne celice mehurja; 5 – luščenje okuženih epitelnih celic in hkrati razkrivanje nezrelh za okužbo bolj dovzetnih celic; 6 – prihod nevtrofilcev, ROS, RNS in protimikrobnih peptidov (prirejeno po (50)).

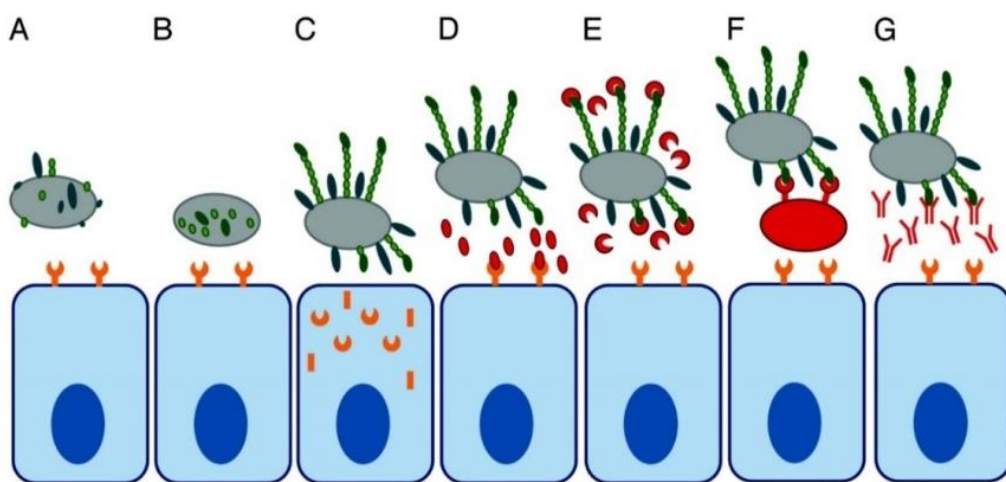
1.4 ANTIADHEZIVNA TERAPIJA

Adhezija na gostiteljsko celico je nujna za patogen in se zgodi z molekularnim prepoznavanjem ob stiku med gostiteljsko celico in patogenom. Učinkovita in hkrati hitra adhezija dovoljuje, da se patogen izogne odstranitvenim mehanizmom gostiteljske celice, poleg tega mora biti tudi dovolj tesna in dolga, da omogoči dostop do hranil, prenos toksinov, kolonizacijo in invazijo ter tvorbo biofilma (54). V večini primerov pride do specifičnega prepoznavanja med ogljikovimi hidrati in proteini (lektini).

Lektini gostitelja, ki se nahajajo na celicah imunskega sistema, prepoznavajo patogene preko stika z njihovimi površinskimi glikani. Ta stik je navadno namenjen uničenju in odstranitvi patogena, vendar pa ga patogeni uporabljajo za vstop v organizem. Zato bi s primernimi glikokonjugati lahko inhibirali vezavo patogena v zgodnjih fazah infekcije. S tem pristopom se prepreči vstop, kolonizacijo in nastajanje biofilma patogena in, najpomembnejše, patogena se ne uniči. S tem ne delamo evlucijske selekcije med posameznimi patogeni, kar zmanjša pojav odpornosti na terapijo (40). Sicer lahko pride do mutacije in spremembe površine, kar pa je samomor za patogena, saj se zaradi drugačnih

površinskih lastnosti ne bi več mogel vezati na receptor. S tem, ko ne razgradimo patogena, tudi preprečimo potencialno sproščanje toksinov (npr. pri *E. coli*) ob njegovi razgradnji in, kot zadnje, zaradi neuspešne vezave ima gostitelj več časa, da izzove imunski odziv in odstrani patogena. Pomembno dejstvo in prednost je tudi, da so antiadhezivne spojine, ki posnemajo površino patogenov ali gostiteljskih celic (fiziološko stabilne in aktivne fragmente), manj dovzetne za razgradnjo kot sintetizirane, organizmu tuje protimikrobne ali protivirusne učinkovine (38).

Ker se bakterijska odpornost pri zdravljenju z antibiotiki povečuje in postaja največja skrb javnega zdravja (55), se antiadhezivna terapija pojavlja kot neprecenljiv alternativni ali dopolnilni pristop. Poleg tega je to tudi nadvse uporaben pristop v borbi z virusnimi okužbami, kjer z inhibicijo vezave preprečimo vstop organizma v celico.



Slika 6: Strategije za antiadhezivno terapijo: 1. Spreminjanje površinskih lastnosti patogena ali gostiteljske celice in s tem preprečitev prvega nespecifičnega stika; 2. Zaviranje biogeneze adhezinov ali receptorjev z zaviranjem sinteze podenot ali z blokiranjem translokacije na membrano (A, B in C); 3. Blokiranje specifičnih vezav med patogenom in gostiteljsko celico z antagonisti površinskih receptorjev (D, E in F); 4. Blokiranje epitopov adhezijskih molekul patogenov s protitelesi (G) (prirejeno po (38)).

V naslednjih poglavjih bodo predstavljene spojine, katerih cilj je bil doseči antiadhezijo patogenov po mehanizmu opisanem pod točko 3, slika 6. Največja težava pri doseganju antiadhezivnega učinka je doseganje avidnosti vezave, ki bi bila zadosti visoka, da premaga patogena, ki ima na stotine adhezijskih molekul. Zato se poslužujemo polimerov, dendrimerov in nanodelcev, ki pa so, kot bomo videli v nadeljevanju, lahko preveč rigidni in manj učinkoviti (38). Glede na stanje na tržišču je antiadhezivna terapija dokaj nov pristop, ki je dobila na veljavi z registracijo Enfuvirtida, prvega registriranega antiadheziva, v letu 2003. Poleg Enfuvirtida lahko na tržišču najdemo samo še en antiadheziv, to je Maravirok (56). Upajmo, da jima bodo v prihodnje sledili še številni antiadhezivi.

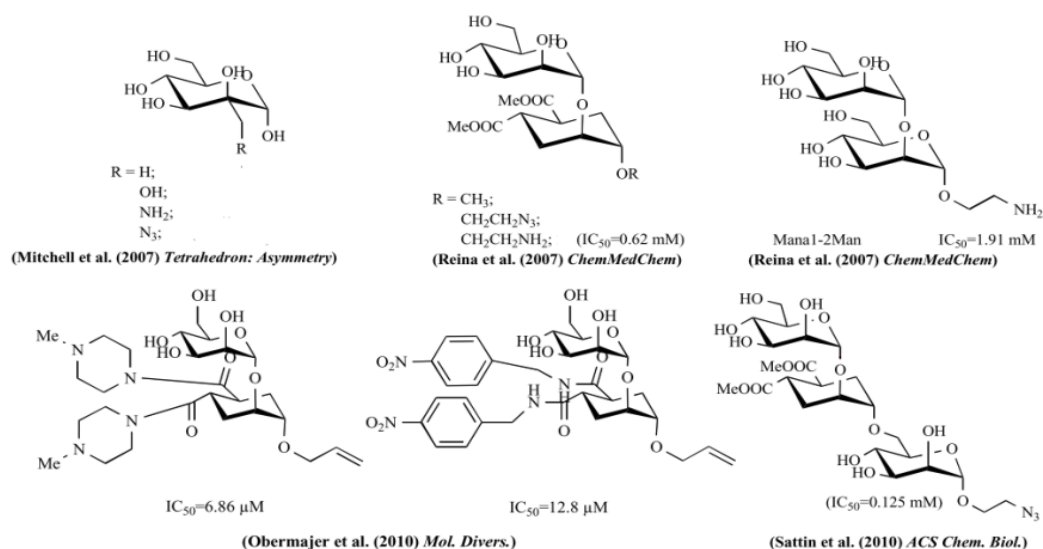
1.5 RAZVOJ ANTAGONISTOV RECEPTORJA DC-SIGN

Inhibicija vezave patogena z antagonisti DC-SIGN je ena obetavnih poti protimikrobnega zdravljenja. Terapija z monosaharidi ni najboljša in nudi slabo afiniteto v milimolarnem območju, kar je v primerjavi z ostalimi terapevtiki v nano- in mikromolarnem območju prešibko. Medtem ko so oligosaharidi precej polarni in imajo zato slabe farmakokinetične lastnosti, jih z modifikacijo s pripenjanjem dodatnih neglikozidnih fragmentov lahko spremenimo v glikomimetike z ustreznimi lastnostmi, ki bi bili uporabni v antiadhezivni terapiji. Topikalna uporaba pa je ne glede na farmakokinetične lastnosti vedno možna (26). Poglavitni problem spojin je doseganje zadovoljive selektivnosti, saj so si lektinski receptorji med seboj zelo podobni in vežejo podobne ligande. Položaj manoze v oligosaharidu je eden izmed načinov, kako lahko vplivamo na selektivnost vezave (57). Z namenom antiadhezije na DC-SIGN je bilo sintetiziranih že veliko antagonistov, ki jih lahko razdelimo v 3 skupine in so predstavljene v nadaljevanju.

1.5.1 Glikomimetiki

Glavna skupna značilnost naravnih ligandov receptorja DC-SIGN je njihov fragment, ki je bodisi manosa bodisi fukoza, oba pa imata slabe farmakokinetične lastnosti. Afiniteta manoze in fukoze je 3,42 mM oziroma 2,52 mM (58), virusnega glikoproteina gp120 pa 2 nM (59). Pridobivanje glikomimetikov sloni na sintezi spojin z manozo ali fukozo kot osrednjim delom in dodatnimi fragmenti, s katerimi se poskuša izboljšati njihove farmakokinetične lastnosti in afiniteto do receptorja (26).

Med fukoznimi glikomimetiki so bile prve spojine tiste, ki temeljijo na strukturi Lewis-X trisaharida z α -amidno vezjo, kot nadomestkom za nestabilno α -glikozidno vez (60, 61). Spojine izkazujejo dobro selektivnost napram drugim lektinskim receptorjem, vendar pa je njihova vrednost IC_{50} v območju med 0,3-0,8 mM (60). V C-disaharidih najdemo alternativo amidni vezi s primerljivo afiniteto in boljšimi farmakokinetičnimi lastnostmi (58). Poleg zgoraj omenjenih skupin se pojavijo tudi spojine s šikimsko kislino, ki pa ni izkazala obetajoče afinitete (62). Več pozornosti so pritegnili manozni antagonisti. Eni prvih so bile 2-C-substituirane spojine, ki so dosegale višjo afiniteto od same manoze (63). Sledil je razvoj pseudo-1,2-manobiozidov s substitucijo na anomernem kisiku ($IC_{50} = 0,62$ mM) (64) in njihovih S- in C-analogov. Oboji imajo malenkost višje vrednosti IC_{50} , vendar pa boljše farmakokinetične lastnosti (58, 65). Sledijo pseudo-trisaharidni antagonisti, ki so dosegli inhibicijo v zgornjem mikromolarnem območju ($IC_{50} = 0,125$ mM) (66,67).



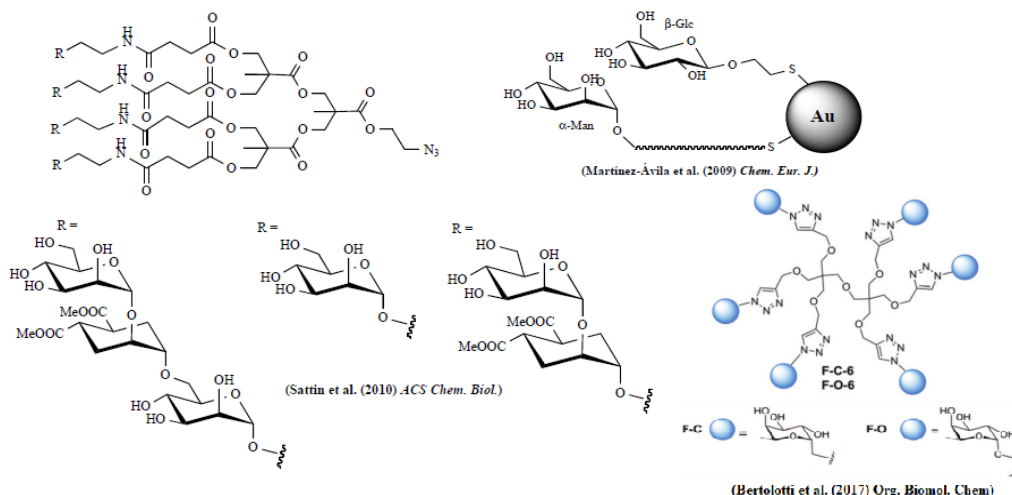
Slika 7: Nekateri izmed manoznih antagonistov receptorja DC-SIGN (prirejeno po (26)).

Do sedaj najbolj potentni monovalentni antagonisti so psevd-1,2-manobiozidi s pripetimi različnimi hidrofobnimi fragmenti, ki so povečali afiniteto z dodatnimi hidrofobnimi interakcijami ($\text{IC}_{50} = 6,86 \text{ }\mu\text{M}$) (68). Kot nadgradnja so bili sintetizirani tudi manozidi z 1,3 diarilglicerolnim fragmentom pripetim na anomerno skupino, s čimer sta bili ciljani dve hidrofobni območji receptorja, vendar se afiniteta ni izboljšala ($\text{IC}_{50} = 40 \text{ }\mu\text{M}$) (16). Jakost inhibicije sintetiziranih monomernih antagonistov ne dosega virusnega gp120, ki je visoko glikoziliran z večjim številom monosaharidov, ki izboljšajo afiniteto. Zaradi tega monovalentni ligandi v vezavnem mestu težko tekmujejo z večvalentnimi ali nativnimi ligandi, kjer ena molekula večvalentnega liganda ali veliko število glikoproteinov patogena interegira s štirimi domenami CRD tetramerne oblike DC-SIGN. To dognanje vodi v sintezo spojin z več monomernimi enotami na polimernem jedru (26).

1.5.2 Dendronski multimerni antagonisti

Z namenom večvalentne predstavitve monomerov so nastali dendrimerni antagonisti. To so makromolekule z definirano globularno obliko in polivalentnimi »izrastki«, na katere so vezani monomeri (69). S polivalentno predstavitvijo lahko dosežemo t. i. avidnost vezave in inhibicijo v nanomolarnem koncentracijskem območju, medtem ko slaba topnost v večini primerov še vedno ni izboljšana. Eni prvih antagonistov te vrste so bili glikodendrimeri, ki vključujejo 16 ali 32 manozidov, psevd-dimanozidov ($\text{IC}_{50} = 31,5 \text{ nM}$) ali psevd-trimanozidov ($\text{IC}_{50} = 62 \text{ nM}$), pripetih na jedro preko jantarno kislinskega distančnika (70–73). Razlike med manozidom, psevd-dimanozidom in psevd-trimanozidom niso bile prenesene na tetravalentno predstavitev monomerov, saj se je psevd-trimanozidni monomer izkazal za najboljšega (66, 73). Sinteza različno razvejanih

glikodendronov je pokazala, da so bolj razvejani boljši antagonisti, kar je potrdilo zgornje rezultate (74). Primerjava različnih dendronskih jeder in enako dolgih distančnikov je pokazala, da so najmočnejši antagonisti spojine z etilenglikolnim in etilglikolno-glicinskim distančnikom ($IC_{50} \approx 1 \mu M$) (75). Na samo afiniteto pa vpliva dolžina distančnika, saj so se daljši izkazali za močnejše (76), in sestava oligosaharidnih fragmentov, afiniteta z deležem manoze raste (77). Med spojinami najdemo tudi nekaj manoznih glikonanodelcev, ki imajo glikozide preko distančnikov pripete na zlatove nanodelce. Spojine z zlatom dajejo izjemne rezultate inhibicije, tako za manozo 0,30 nM (78, 79), kot tudi za fukozo 0,11 nM (80). Največji problem teh spojin bi bila akumulacija zlata v telesu, kar pa pri topikalni uporabi ni tako velik problem (78). Sintetizirani so bili tudi glikolipidni antagonisti, ki imajo tri dimanozide pripete na dolge lipofilne verige ($IC_{50} = 38 \text{ nM}$) (81).



Slika 8: Primeri dendronskih antagonistov in primer antagonista vezanega na nanodelce zlata (prirejeno po (26, 82)).

Z namenom izboljšave selektivnosti in farmakokinetičnih lastnosti so bili sintetizirani C-glikozidni dendroni, pri katerih se izboljša tako obstojnost, kot tudi afiniteta v primerjavi z O-glikozidi (82). Z enakim namenom so nastali tudi glikofulereni, ki imajo manoze vezane preko etilenglicerolnega distančnika na fullerensko jedro ($IC_{50} = 300 \text{ nM}$) (76) in dobro selektivne spojine bisbenzilnih derivatov psevdomanozidov pripetih na rodeninski polivalentni dendrimer (83, 84).

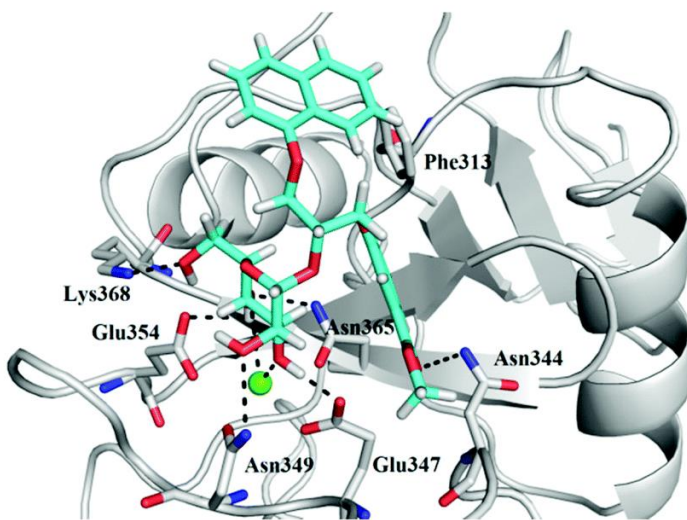
1.5.3 Nesaharidni antagonisti

Potencialnih neglikozidnih antagonistov, na podlagi katerih bi lahko razvijali nove antagoniste, je malo. V preteklosti so Borrok in sod. s tehniko HTS pregledali 36.000 spojin, med katerimi so dobili 7 zadetkov, vendar pa nobeden ni dosegel submikromolarne inhibicije. To je še vedno v območju monomernih antagonistov, kar je še en dokaz, da za nM inhibicijo potrebujemo na polivalentni nosilec pripete monoglikozidne enote (85).

2 NAMEN DELA

Na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani že dalj časa razvijamo potencialne antagoniste receptorja DC-SIGN. Načrtujemo jih s strukturno podprtim načrtovanjem, kjer primerne kandidate izberemo za kemijsko sintezo potencialnih novih učinkovin (Slika 9).

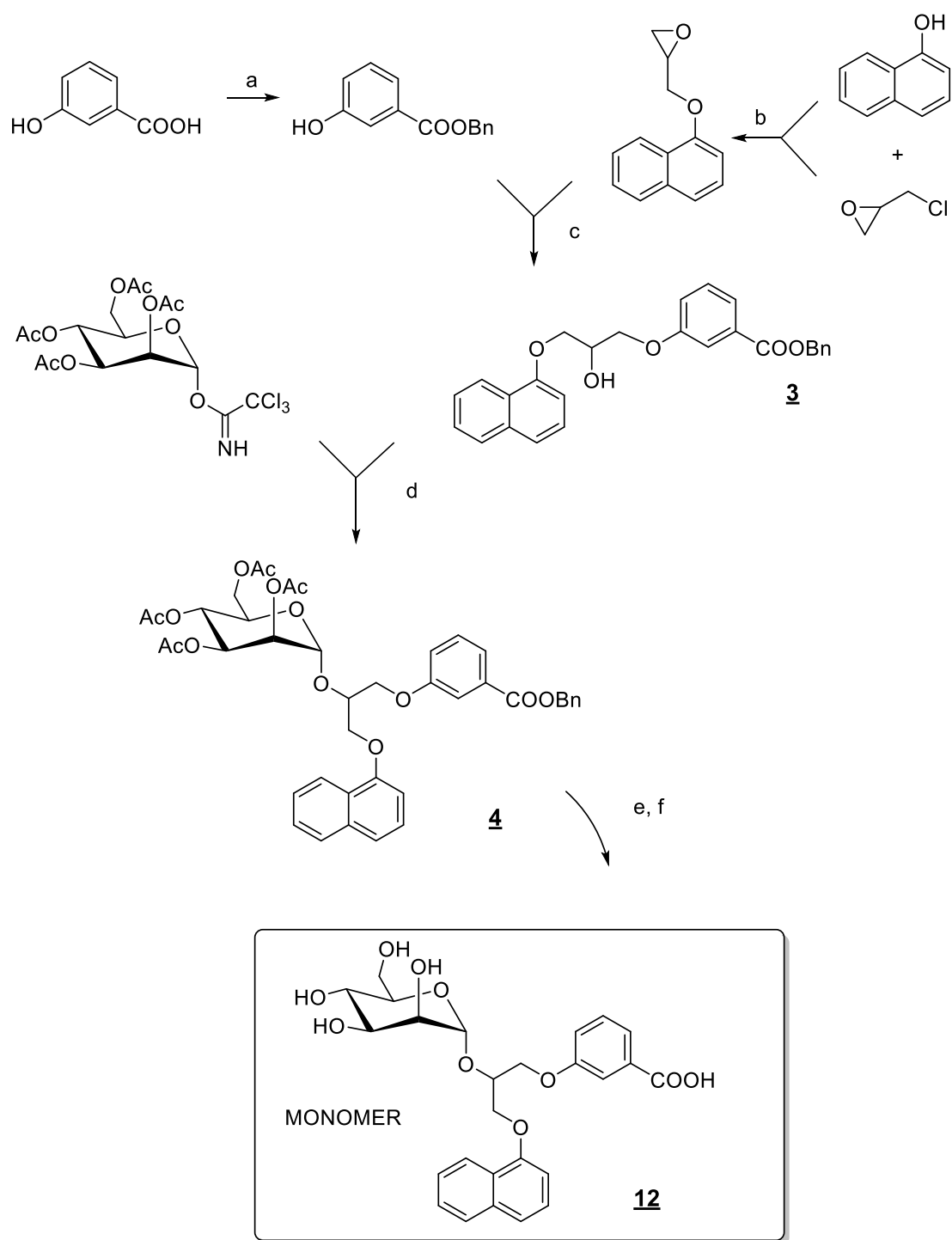
Na fakulteti je bilo v preteklih letih sintetiziranih veliko antagonistov s spodbudnimi rezultati. Zato bomo glikomimetične antagoniste sestavili iz fragmentov z najboljšimi rezultati in nekaterimi



Slika 9: Spojina **11** v vezavnem mestu receptorja (prirejeno po (17)).

novimi modifikacijami. Poleg manoze, ki je izjemno pomembna za vezavo, bomo ohranili še 1,3-diarilglicerolni del in naftilni fragment brez substitucije, ki sta pokazala najboljšo inhibicijo pri prejšnjih spojinah (16). Na 1,3-diarilglicerol bomo poleg manoze in naftila vezali še en hidrofobni fragment – substituiran fenil, s katerimi bomo poskušali doseči močnejšo inhibicijo z njegovo vezavo v hidrofobni žep in s tvorbo dodatnih π - π vezi z aminokislinskim ostankom Phe313 receptorja DC-SIGN. Na fenil bo vezana še polarna funkcionalna skupina - karboksilna kislina, in sicer na mestu 3, s katero bomo poskušali izboljšati topnost spojine, ki je bila problematična pri dosedanjih spojinah, in morebiti doseči dodatne interakcije v vezavnem mestu (16, 86). Monomerne enote bomo nato poizkusili vezati na dendronsko jedro z uporabo postopka klik kemije preko distančnikov z etilenglikolnimi fragmenti, ki so se izkazali za najbolj potentne (75). Prav tako bomo poizkusili z vezavo preko alternativnih distančnikov z različnimi dodatnimi fragmenti, ki bodo v danem trenutku na voljo, in tako tudi preko njih doseči boljše topnostne lastnosti. Z monomeri, pripetimi na dendronsko jedro, bomo tako z multimerno predstavitevjo poizkusili povečati avidnost vezave in doseči boljše inhibicijske rezultate.

Sintezna pot nas bo torej vodila iz 3-hidroksibenzojske kisline in 1-naftola do spojine, sestavljene iz obeh fragmentov in glicerolnega distančnika med njima. Nato bo sledilo pripenjanje manoze in temu odščita zaščitnih skupin po Zemplénu in s hidrolitskim hidrogeniranjem, ki nas bosta pripeljali do monomera (Shema 1).



(a) benzilbromid, NaHCO_3 , DMF, 40°C

(b) trd. NaOH, H_2O , dioksan

(c) 1. trd.KOH, MeOH; 2. TBA-Br, toluen / DMF, 120°C

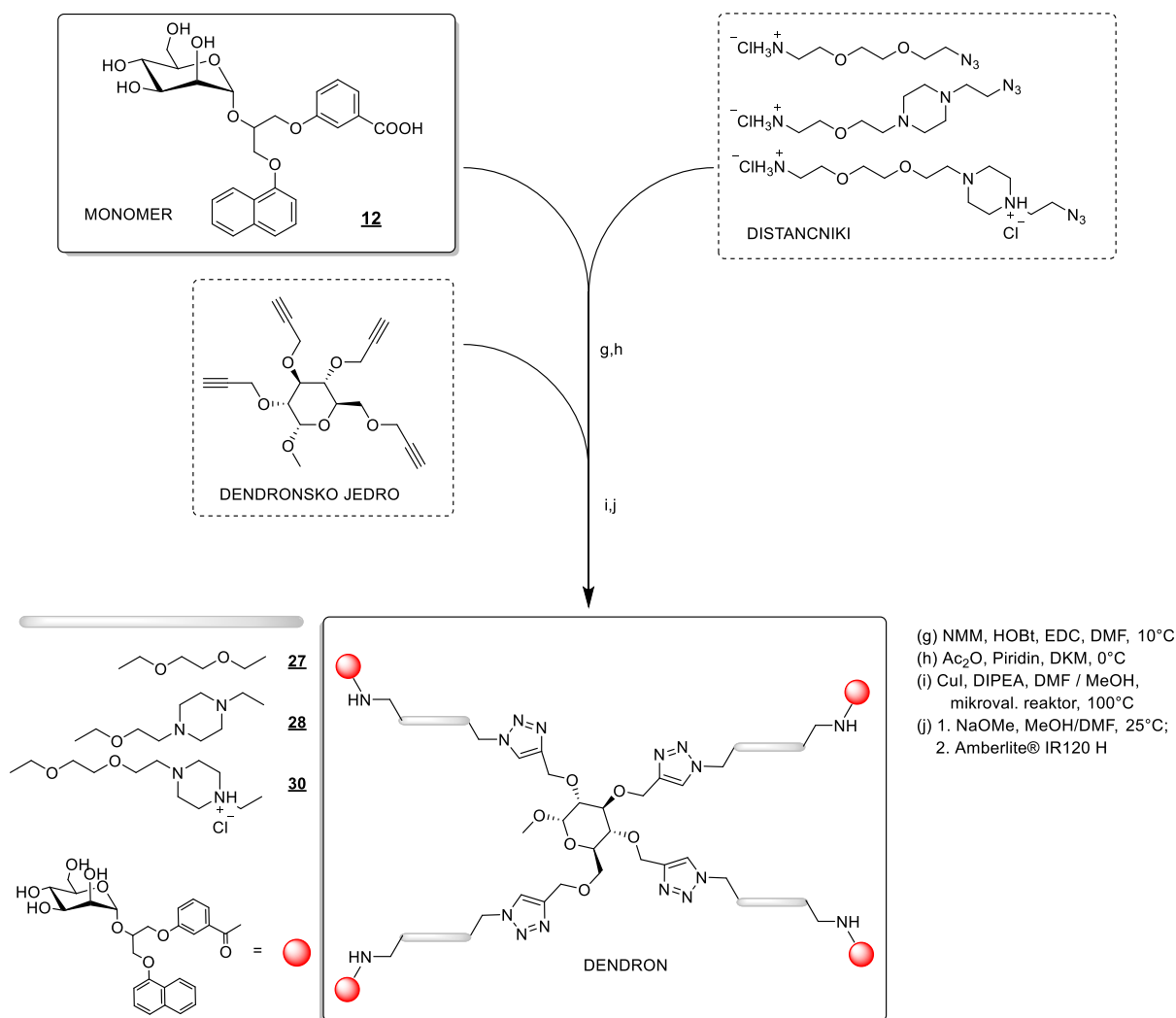
(d) 1.TMSOTf, DKM, 30 min $0^\circ\text{C} \rightarrow 22^\circ\text{C}$
2. Et_3N

(e) 1. NaOMe / MeOH, 25°C ;

(f) H_2 , Pd/C, CH_3COOH , 25°C

Shema 1: Sintezna shema monomera.

Odščiti zaščitnih skupin bo sledilo pripenjanje različnih distančnikov preko karboksilne kisline monomera. Dobljenim spojinam bomo nato pripeli dendronsko jedro za tvorbo tetravalentnega dendrona po postopku klik kemije. Ostala nam bo samo še odščita predhodno acetiliranih OH skupin manozida, ki jo bomo ponovno opravili po Zemplénovem postopku (Shema 2).



Shema 2: Shema sintezne poti od monomernega do multimernega antagonista.

Sintetiziranim spojinam bomo na koncu določili jakosti zaviranja vezave dendritičnih celic na imobilizirane native ligande (manan, GP-120). Najmočnejšim antagonistom bomo določili tudi inhibitorne koncentracije vezave (IC₅₀). Prav tako bomo sintetiziranim spojinam določili jakost vezave na bakterijski receptor FimH, saj so predhodne spojine z diarilglicerilmanozidno zgradbo dale odlične rezultate inhibicije v nanomolarnem območju (86).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti in topila

V okviru izdelave magistrske naloge smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Carlo Erba Reagents, ki so bili ustrezne čistosti, kot je deklariral proizvajalec. Brezvodni DKM, MeOH in DMF smo pripravili tik pred uporabo po standardnem postopku z destilacijo v argonovi atmosferi in ju hranili nad molekularnimi siti (velikost por 3 Å za MeOH in 4 Å za DKM in DMF). Bidestilirana voda je bila pripravljena s sistemom za čiščenje vode Milli-Q Advantage A10 proizvajalca Merck Millipore. Voda, ki smo jo uporabljali za ekstrakcije, je bila prečiščena.

3.1.2 Laboratorijska oprema

- magnetno mešalo IKA[®] RCT basic IKAMAG Magnetic stirrer
- tehtnica SARTORIUS[®] AG GOTTINGEN BA BF 500
- UV svetilka CAMAG UV-cabinet II ($\lambda = 254\text{nm} / 366\text{ nm}$)
- rotavapor BÜCHI[®] type R-114
- mikrovalovni reaktor CEM Discover[®]
- vakuumaska črpalka Trivac D8B
- ultrazvočna kadička ISKRA PIO SONIS 4

3.2 METODE

3.2.1 Kromatografske metode

3.2.1.1 Tankoplastna kromatografija (TLC)

Pri tankoplastni kromatografiji smo za stacionarno fazo uporabljali plošče proizvajalca Merck, TLC Silica gel 60 F254 z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem ter za mobilne faze različne mešanice topil. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko z valovno dolžino 254 nm ali 366 nm in orositvene reagente ninhidrin, fosfomolibdensko kislino, bromkrezol zeleno, FeCl₃.

3.2.1.2 Kolonska kromatografija (KKR)

Kolonsko kromatografijo smo uporabljali za izolacijo produkta, pri čemer smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel proizvajalca Merck, Silica Gel 60 z velikostjo delcev 0,040–0,063 mm in različne mobilne faze. Uporabljali smo steklene kolone različnih velikosti in oblik. Za mobilno fazo smo uporabili kombinacije etilacetata in heksana, diklorometana in metanola ter kloroforma in metanola. Pretok mobilne faze smo po potrebi pospeševali z uvajanjem zračnega nadtlaka.

3.2.1.3 Reverznofazna kolonska kromatografija

Izvajali smo jo na polavtomatiziranem sistemu IsoleraOne™ proizvajalca Biotage®. Za stacionarno fazo smo uporabili Biotage® kolono SNAP 25 g 18C. Mobilna faza je bila sestavljena iz MeOH in 0,1 % TFA v bidestilirani vodi. Izvajali smo gradientno elucijo po protokolu, ki je opisan v Prilogi 1. Zbrane frakcije smo uparevali pod znižanim tlakom in koevaporirali s toluenom (3×10 ml) do suhega. Na tak način smo iz zmesi odstranili TFA.

3.2.2 Spektroskopske in spektrometrične metode

3.2.2.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

^1H in ^{13}C spektri so bili posneti na spektrometru Bruker Avance DPX400 na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorci so bili raztopljeni v devteriranih topilih CDCl_3 , DMSO-d_6 , CD_3OD ali aceton- d_6 s tetrametilsilanom (TMS) kot internim standardom. Dobljene spektre smo obdelali z računalniškim programom MestReNova 11.0.1 proizvajalca Mestrelab Research S.L.

3.2.2.2 Masna spektrometrija (MS)

Masni spektri so bili posneti na spektrometru VG-Analytical Autospec Q proizvajalca Micromass v Centru za masno spektrometrijo na Institutu »Jožef Stefan« v Ljubljani. Uporabljena je bila tehnika ionizacije ESI.

3.2.2.3 Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektri so bili posneti na spektrometru Perkin Elmer 1600 Series FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

3.2.3 Določevanje tališč

Tališča smo določevali na Koflerjevem talilnem mikroskopu z ogrevalno mizico proizvajalca Leica na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Tališča so nekorrigirana.

3.2.4 Računalniška programska oprema

Za poimenovanje in risanje spojin smo uporabljali računalniški program ChemBioDraw Ultra 13.0 podjetja CambridgeSoft. NMR spektre smo procesirali s pomočjo programov MestReC 4.8.6.0 in MestReNova 11.0.1. podjetja Mestrelab Research S.L. Za iskanje sinteznih postopkov po podatkovnih bazah smo uporabljali program SciFinder Scholar. Znanstvene članke smo iskali s pomočjo ScienceDirect in PubMed brskalnikov.

3.2.5 Biološka testiranja

3.2.5.1 DC-SIGN

Spojine so bile testirane z vzpostavljenim testnim sistemom na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Protokol testiranja je tak, da se na mikrotitrsko ploščico najprej veže zunajcelično domeno CRD receptorja DC-SIGN in nato blokira preostala prosta vezavna mesta. Sledi nanos raztopine potencialnega antagonista, za njim pa v najkrajšem možnem času še z biotinom konjugiran glikoprotein gp120. Nato se nanesejo protitelesa proti biotinu, ki so konjugirana s hrenovo peroksidazo. Nazadnje se doda še substrat za peroksidazo, ki ob oksidaciji povzroči kemiluminiscenco. Odstotek vezave gp120 se določi na podlagi kemiluminiscenčnega odziva. Pri testu se kot referenčna spojina uporablja L-fukoza ($IC_{50} = 2,95 \text{ mM}$). Rezultate se obdelata z računalniškima programoma Origin proizvajalca OriginLab Corporation in GraphPad Prism proizvajalca GraphPad Software. Tako se potencialnim antagonistom določi vrednosti IC_{50} , ki v tem primeru pomenijo 50 % inhibicijo vezave naravnega liganda gp120 na receptor DC-SIGN (16, 87).

3.2.5.2 FimH

Spojine so bile testirane z že vzpostavljeno kompetitivno fluorescenčno polarizacijsko metodo na Institute of Molecular Pharmacy, University of Basel. S testom je bila merjena razlika signala pri izpodrivanju fluorescenčno označenega liganda z vezavnega mesta FimH s testiranim antagonistom. Spojine so bile raztopljene v 100 % DMSO na koncentracijo 10 mM. Za nadaljnjo serijsko redčenje raztopin so uporabili vodni pufer s sestavo 20 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl in 50 $\mu\text{g/mL}$ BSA. BSA je bil dodan za preprečitev nespecifičnih vezav proteina na plastično površino. Koncentraciji označenega liganda in proteina sta bili 50 nM pri testiranju z lektinsko domeno FimH ter 10 nM (ligand) in 300 nM (protein) pri testiranju s celotnim FimH. Odstotek vezave naravnega liganda so določili na podlagi merjenja fluorescence pri 528 nm. Rezultate so obdelali z

računalniškimi programi GraphPad Prism proizvajalca GraphPad Software. Tako so potencialnim antagonistom določili vrednosti IC_{50} , ki v tem primeru pomenijo 50 % inhibicijo vezave naravnega liganda. Iz IC_{50} so nato določili konstante disociacije (K_D) antagonistov s celotnim adhezinom FimH in prav tako z lektinsko domeno FimH (88).

3.2.5.3 Določanje afinitete antagonistov DC-SIGN s STD NMR

Testiranje spojin s tehniko STD NMR je bilo izvedeno v NMR centru na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Vzorci so bili raztopljeni v mediju (25 mM tris- d_{11} , 150 mM NaCl, 4mM $CaCl_2$ in 2H_2O). Za doseg ustreznega raztapljanja je bil dodan še DMSO- d_6 (25 %). Določitev vezave med DC-SIGN in ligandi je bila narejena pri 5-ih koncentracijah liganda - 80, 240, 400, 560 in 800 μM in pri času saturacije 2,0 sekunde. Koncentracija receptorja je bila 8 μM . Uporabljen je bil 600 MHz NMR spektrometer Agilent Technologies DD2, opremljen s hladno resonančno probo HCN. Nastavitve NMR snemanja so natančno opisane v citiranem članku. Iz pridobljenih podatkov je bila določena konstanta disociacije (K_D) (17).

3.2.6 Ostale metode

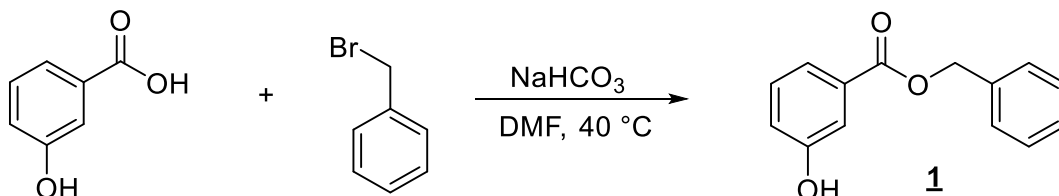
Brezvodno atmosfero smo ustvarili s pomočjo prepihanja z argonom. Kadar smo imeli pri spojini zaostanke vode, smo le-to koevaporirali s toluenom, ki z vodo tvori azeotropno zmes in ima vrelišče pri atmosferskem tlaku pri 84 °C. Vsebnost vode v omenjeni azeotropni zmesi je 13,5 masnih % (89). Za kvantitativno odstranitev vode je bilo potrebno zmes s toluenom koevapurirati vsaj trikrat.

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 SINTEZA MONOMERNEGA ANTAGONISTA PREKO BENZILNEGA ESTRA

4.1.1 Sinteza Benzil 3-hidroksibenzoata (1)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V bučko smo natehtali 5,000 g (36,20 mmol) 3-hidroksibenzojske kisline in jo raztopili v 36 ml DMF. Raztopini smo nato dodali 3,652 g (43,47 mmol) NaHCO₃. Ko je bilo vse raztopljeno v topilu, smo dodali še 4,7 mL (39,57 mmol) benzilbromida. Reakcijsko zmes smo čez noč pustili na vodni kopeli pri 40 °C (24 h). Po 24 urah smo uparili topilo pod znižanim tlakom, zmes raztopili v 100 mL EtOAc in to spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 x 50 mL), destilirano vodo (3 x 50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 x 50 mL). OF smo sušili z Na₂SO₄, prefiltrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo belo kristalinično snov, spojino **1**. Spojina je že poznana in opisana v literaturi (90).

PRODUKT:

Molekulska formula: C₁₄H₁₂O₃

Mr (izračunano): 228,24

Izgled: beli kristali

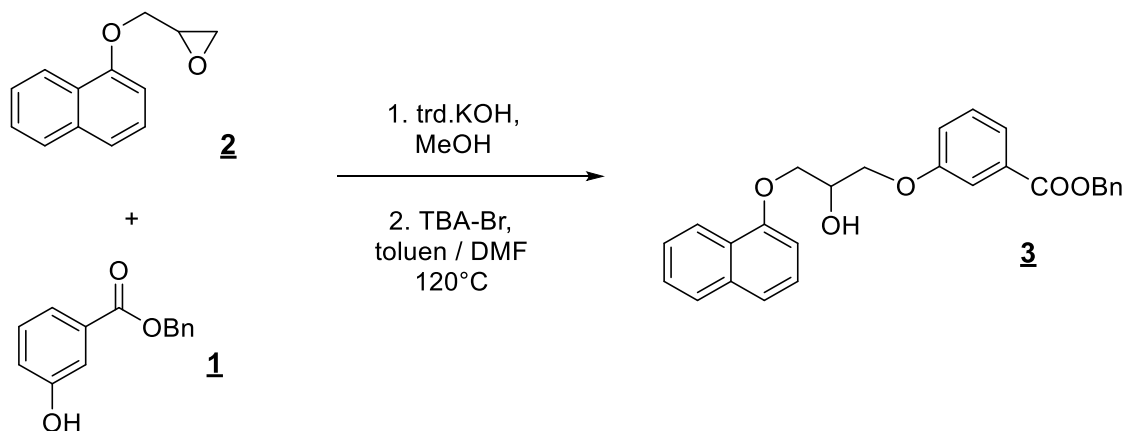
Temp. tališča: 69,4-71,0 °C

Izkoristek: 4,778 g (η = 57,83 %)

Rf: 0,27 (MF: EtOAc/Hex = 1/3)

4.1.2 Sinteza Benzil 3-(2-hidroksi-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzoata (3)

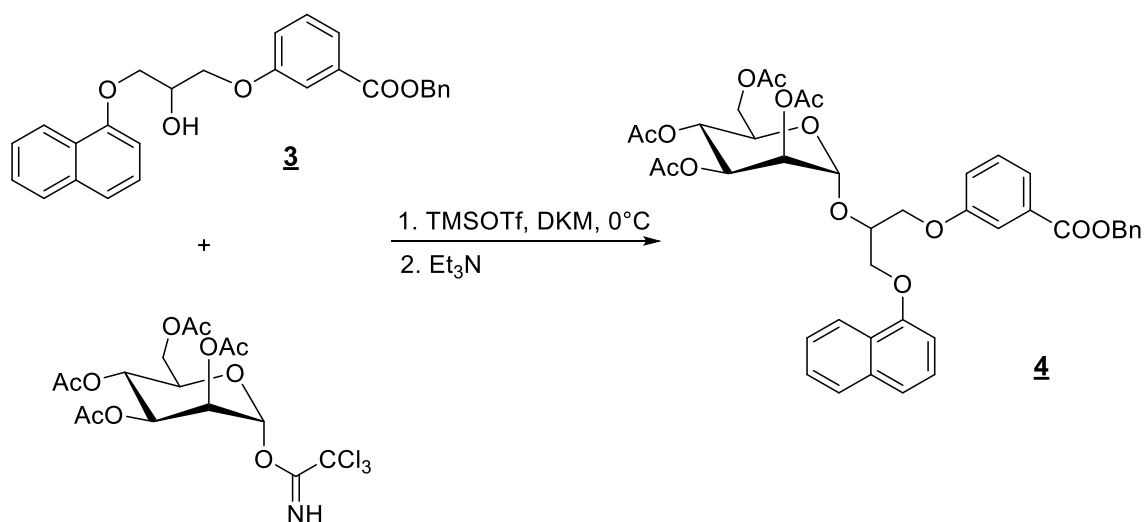
REAKCIJA:



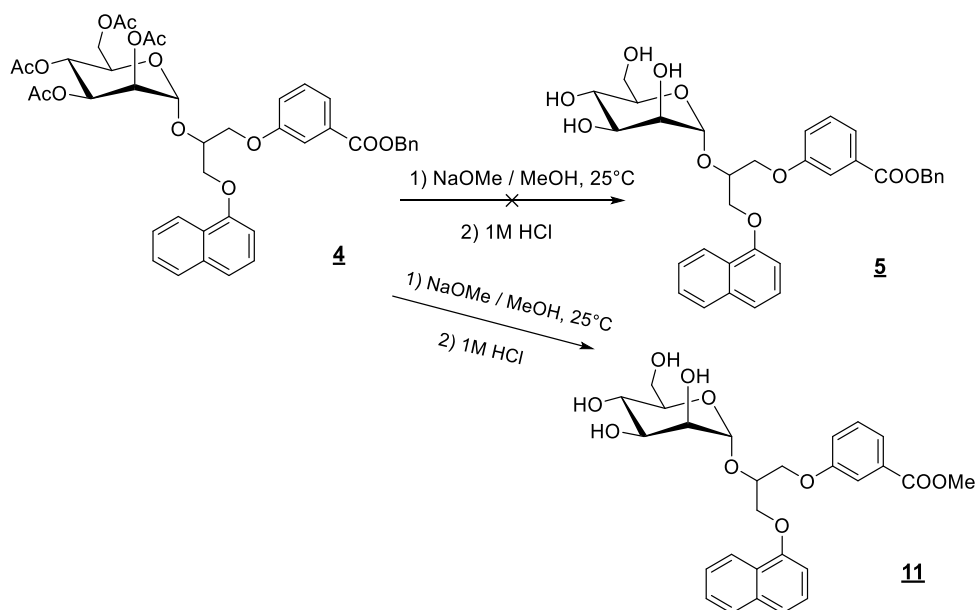
POSTOPEK:

2,500 g (10,95 mmol) spojine **1** smo raztopili v 15 ml brezvodnega MeOH in dodali 0,584 g (10,41 mmol) trdnega KOH. Vsebino bučke smo mešali, dokler se ni ves KOH raztopil (10 min), nato pa topilo uparili pod znižanim tlakom in koevaporirali s toluenom (3×5 ml) do suhega ($T_{VK} = 50$ °C). Dobili smo rjavo oljnato snov.

Nato smo v dvoglavo bučko zatehtali 2,190 g (10,94 mmol) spojino **2** in v njo kvantitativno prenesli vsebino prve bučke. Vsebino smo raztopili v 20 mL toluena in 3 mL DMF. Ko je bilo vse raztopljeno, smo bučko postavili nad oljno kopel (120 °C), povezali s povratnim hladilnikom in vsebino dobro prepihali z argonom. Dodali smo še 0,706 g (2,190 mmol) TBABr in reakcijsko zmes pustili pod inertnimi pogoji čez noč (24 h). Reakcijski zmesi smo nato dodali 20 mL toluena in jo v lij ločniku spirali z 10 % citrsko kislino (1 x 20 mL), destilirano vodo (3 x 20 mL), nasičeno raztopino NaHCO_3 (2 x 20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 x 50 mL). Dobili smo trofazni sistem z želeno spojino v najvišji fazi. VF (NaHCO_3) smo ekstrahirali še s toluenom (1 x 20 mL). Združene OF smo sušili z Na_2SO_4 , prefiltrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. S pomočjo TLCja smo ugotovili, da spojina ni čista in zato izvedli še KKR (MF: EtOAc/Hex = 1/3), ki pa ni dal zadovoljive čistote; zato smo postopek še enkrat ponovili z enako mobilno fazo in večjim deležem silikagela. Produkt je bela kristalinična spojina **3**.

PRODUKT:**Molekulska formula:** C₂₇H₂₄O₅**Mr (izračunano):** 428,48**Izgled:** beli kristali**Temp. tališča:** 71,6-73,7 °C**Izkoristek:** 1,627 g (η = 34,65 %)**Rf:** 0,70 (MF: Hex/EtOAc = 1/1)**4.1.3 Sinteza Benzil 3-(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzoata (4)****REAKCIJA:****POSTOPEK:**

Spojino **3** (0,926 g, 2,161 mmol) in 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranozil trikloroacetimidat (0,911 g, 1,849 mmol) smo pod inertnimi pogoji (argon) raztopili v 40 mL sušenega DKM. Raztopino smo ohladili na 0 °C in ob mešanju počasi injicirali TMSOTf (0,42 mL, 2,321 mmol). Reakcijo smo pustili čez noč pod inertnimi pogoji na sobni temperaturi (14 h). Za ustavitev reakcije smo dodali Et₃N (0,484 g). Glede na TLC je reakcija potekla, tako da smo se odločili za čiščenje s kolonsko kromatografijo s suhim nanosom (MF: gradient EtOAc/Hex = 1/2 do 1/1). Dobili smo zmes dveh epimerov spojine **4**.

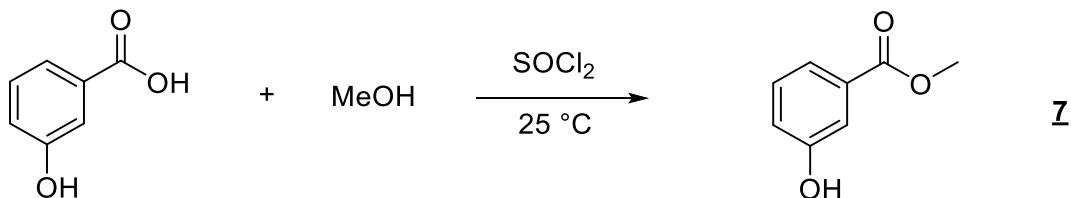
PRODUKT:**Molekulska formula:** C₄₁H₄₂O₁₄**Mr (izračunano):** 758,77**Izgled:** blede rumena strjena smola**Izkoristek:** 0,712 g ($\eta = 50,75 \%$)**Rf:** 0,48 (MF: Hex/EtOAc = 1/1)**4.1.4 Sinteza Benzil 3-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzoata (5)****REAKCIJA:****POSTOPEK:**

Spojino **4** (0,821 g, 1,082 mmol) smo pod inertnimi pogoji (argon) raztopili v brezvodnem MeOH (15 mL) in dodali 30 % NaOMe (0,20 mL, 1,080 mmol). Ker reakcija po 2 urah ni potekla, smo dodali še 30 % NaOMe (0,10 mL, 0,540 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili 16 h pri sobnih pogojih. Končni raztopini smo dodali dietil eter (15 mL), ki je povzročil izobaranje produkta. Tega smo odnučali in ga s suhim nanosom nanegli na kolono za KKR (MF: DKM/MeOH = 9/1 + 1 % AcOH). Iz NMR-a je bilo razvidno, da smo namesto željenega produkta dobili produkt v obliki metilnega estra - spojina **11**, in še to majhne količine. Zaradi tega sinteze nismo nadaljevali (spojina je okarakterizirana v poglavju 4.2.5).

4.2 SINTEZA MONOMERNEGA ANTAGONISTA PREKO METILNEGA ESTRA

4.2.1 Sinteza Metil 3-hidroksibenzoata (7)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V bučko smo natehtali 7,000 g (50,68 mmol) 3-hidroksibenzojske kisline in jo raztopili v 55 ml brezvodnega MeOH. Bučko smo takoj zamašili s septumom in jo povezali s hladilnikom. Vsebino smo prepihali z argonom in postavili na ledeno kopel. Preko septuma smo počasi po kapljicah dodali 4,4 ml (60,65 mmol) SOCl_2 . Naslednje jutro (po 18 h) smo uparili topilo pod znižanim tlakom. Glede na TLC analizo je reakcija potekla v celoti brez vidnih nečistot in čiščenje ni bilo potrebno. Tako smo dobili čisto spojino **7**, ki je že dobro poznana in opisana v literaturi (91).

PRODUKT:

Molekulska formula: $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$

Mr (izračunano): 152,15

Izgled: beli kristali

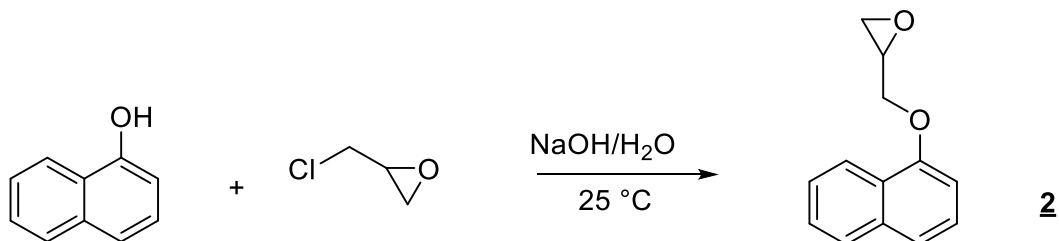
Temp. tališča: $62,1\text{--}64,0^\circ\text{C}$

Izkoristek: 7,713 g ($\eta = 99,99\%$)

Rf: 0,54 (MF: DKM/MeOH = 9/1 + 1 % AcOH)

4.2.2 Sinteza 2-((naftalen-1-iloksi)metil)oksirana (2)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V bučko smo odmerili 75 mL destilirane vode in ob mešanju počasi dodajali 5,00 g NaOH. Dodali smo še 1-naftol (18,00 g, 124,9 mmol), ki smo mu zaradi slabe topnosti s pomočjo kapalnika dodali raztopino epiklorhidrina (9,9 mL, 126,3 mmol) v 50 ml 1,4 dioksana. Reakcijsko zmes smo pustili čez noč (24 h) na magnetnem mešalu. Glede na TLC analizo je reakcija potekla v celoti. Izvedli smo izolacijo produkta s pomočjo ekstrakcije. Reakcijsko zmes smo 3-krat spirali s po 60 mL dietil etra. Organsko fazo pa nato 3-krat s po 50 mL 0,1M NaOH in 2-krat s po 50 mL nasičene raztopine NaCl. Vsebino organske faze smo sušili z Na₂SO₄ in jo prefiltrirali. Dietil eter iz organske faze smo odstranili s pomočjo rotavaporja. Izvedli smo še vakuumsko destilacijo zmesi, kjer smo pri 146 °C destilirali naš želeni produkt. Dobili smo čisto spojino **2**, ki je že dobro poznana in opisana v literaturi (92).

PRODUKT:

Molekulska formula: C₁₃H₁₂O₂

Mr (izračunano): 200,24

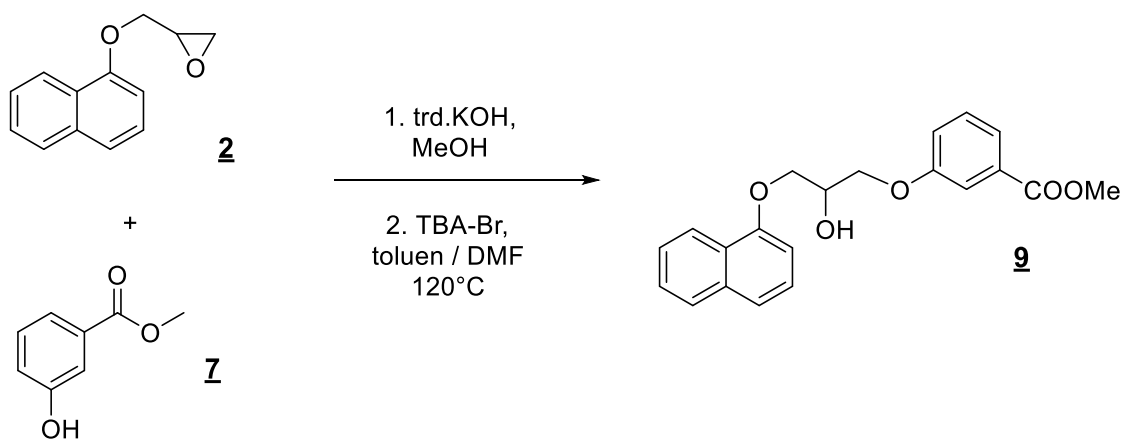
Izgled: brezbarvno olje

Izkoristek: 11,98 g ($\eta = 47,90 \%$)

Rf: 0,52 (MF: Toluen)

4.2.3 Sinteza Metil 3-(2-hidroksi-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzoata (9)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

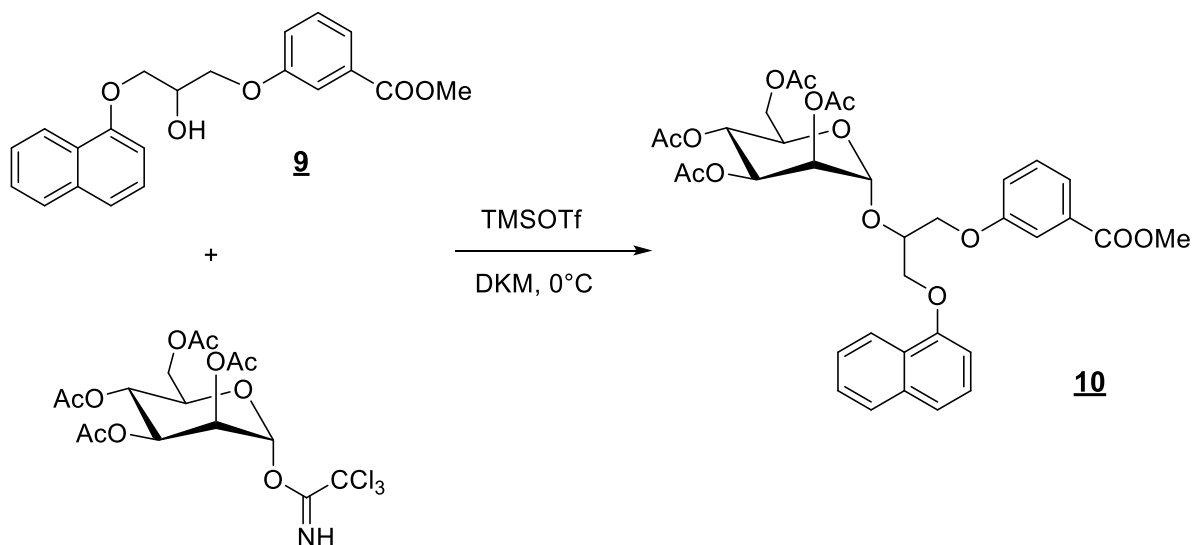
7,039 g (46,26 mmol) spojine **7** smo raztopili v 35 ml brezvodnega MeOH in dodali 1,133 g (20,19 mmol) trdnega KOH. Vsebino bučke smo mešali, dokler se ni ves KOH raztopil (10 min), nato pa topilo uparili pod znižanim tlakom in koevaporirali s toluenom (3×5 ml) do suhega ($T_{VK} = 50$ °C). Dobili smo rjavo oljnato snov.

Nato smo v triglavo bučko zatehtali 7,412 g (37,02 mmol) spojine **2** in v njo kvantitativno prenesli vsebino prve bučke. Vsebino prve bučke smo predhodno raztopili v 40 mL toluena in 12 mL DMF. Ko je bilo vse raztopljeno, smo bučko postavili nad oljno kopel (80 °C), povezali s povratnim hladilnikom in vsebino dobro prepihali z argonom. Dodali smo še 2,938 g (9,114 mmol) TBABr in reakcijsko zmes pustili pod inertnimi pogoji čez noč (18 h). Dobili smo temno zeleno obarvano reakcijsko zmes, izhodne snovi pa niso bile več prisotne. Organsko fazo smo v lij ločniku spirali z destilirano vodo (3 x 50 mL), nasičeno raztopino NaHCO_3 (2 x 50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 x 50 mL). OF smo sušili z Na_2SO_4 , prefiltrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. S pomočjo TLCja smo ugotovili, da spojina ni čista in je prisotnega še nekaj TBA-Br. Izvedli smo še eno ekstrakcijo produkta. Preostanek OF smo ponovno raztopili v EtOAc (40 mL) in jo spirali z 0,1M HCl (2 x 30 mL), destilirano vodo (30 mL) in nasičeno raztopino NaCl (20 mL). OF smo ponovno sušili z Na_2SO_4 , prefiltrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo viskozno temno rjavo oljnato snov, spojino **9**. Spojina je že poznana in opisana v literaturi (17).

PRODUKT:**Molekulska formula:** $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_5$ **Mr (izračunano):** 352,39**Izgled:** temno rjavo viskozno olje**Izkoristek:** 12,104 g ($\eta = 92,78$ %)**Rf:** 0,50 (MF: Hex/EtOAc = 1/1)

4.2.4 Sinteza Metil 3-(2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzoata (**10**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

Spojino **9** (5,220 g, 14,81 mmol) in 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranozil trikloroacetamidat (6,048 g, 12,28 mmol) smo pod inertnimi pogoji (argon) raztopili v 80 mL brezvodnega DKM. Raztopino smo ohladili na 0 °C ter ob mešanju počasi injicirali TMSOTf (2,96 mL, 16,35 mmol). Reakcijo smo pustili čez noč pod inertnimi pogoji na sobni temperaturi (16 h). Za ustavitev reakcije smo dodali Et₃N (3,308 g, 32,71 mmol).

Organsko fazo smo spirali z destilirano vodo (3 x 60 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 x 50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (50 mL). Preostanek organske faze smo sušili z Na₂SO₄, filtrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom. Za izolacijo produkta smo uporabili še kolonsko kromatografijo s suhim nanosom (MF: EtOAc/Hex = 1/1). Dobili smo zmes dveh epimerov spojine **10**. Spojino smo že objavili in opisali v literaturi (17).

PRODUKT:

Molekulska formula: C₃₅H₃₈O₁₄

Mr (izračunano): 682,67

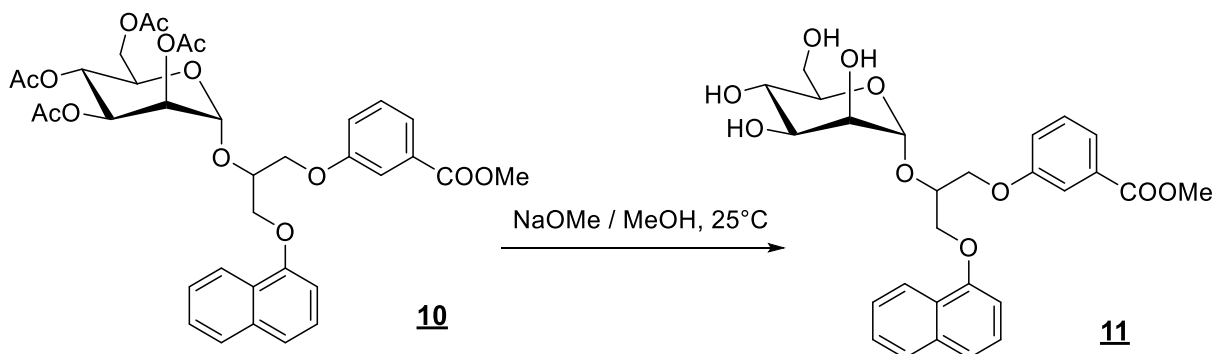
Izgled: zelo viskozno rumeno-rdeče olje

Izkoristek: 6,657 g (η = 79,44 %)

Rf: 0,32 (MF: Hex/EtOAc = 1/1)

4.2.5 Sinteza Metil 3-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzoata (**11**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

Spojino **10** (6,637 g, 9,722 mmol) smo pod inertnimi pogoji (argon) raztopili v brezvodnem metanolu (60 mL) in dodali 30 % NaOMe (0,57 mL, 2,917 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 2 uri pri sobnih pogojih. V naslednjo stopnjo smo šli brez čiščenja spojine **11**. Spojino smo že objavili in opisali v literaturi (17).

PRODUKT:

Molekulska formula: C₂₇H₃₀O₁₀

Mr (izračunano): 514,53

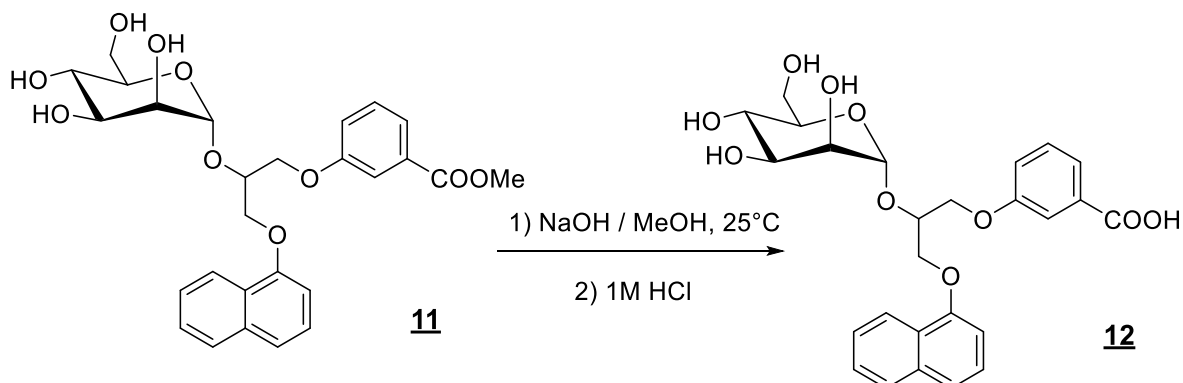
Izgled: snežno bela amorfna snov

Izkoristek: /

Rf: 0,34 (MF: Kloroform/ MeOH = 5/1)

4.2.6 Sinteza 3-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzojske kisline (**12**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

Reakcijski zmesi iz prejšnje stopnje smo dodali 1M NaOH (59 mL, 58,33 mmol) in bučko pustili nad mešalom pri sobnih pogojih (24 h). Vsebino smo koncentrirali tako, da smo pod znižanim tlakom odparili MeOH. Preostanek smo raztopili v destilirani vodi (40 mL) in ledu. Ob stalnem mešanju smo izvedli nakisanje z 1M HCl (do pH = 2). Izoborjen produkt smo odnučali pod znižanim tlakom in počakali, da se je le-ta posušil. Dobili smo bele kristale (spojina **12**). Spojino smo že objavili in opisali v literaturi (17).

PRODUKT:

Molekulska formula: C₂₆H₂₈O₁₀

Mr (izračunano): 500,50

Izgled: beli kristali

Temp. tališča: 146,3-150,1 °C

Izkoristek: 4,075 g (η = 83,74 %)**

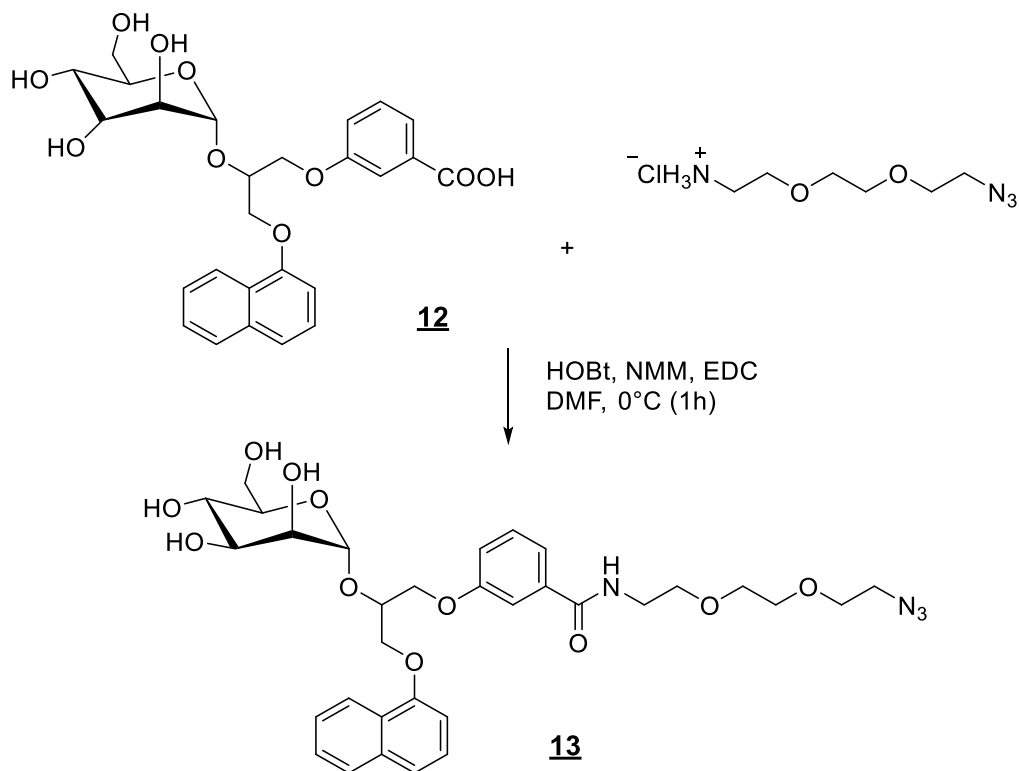
Rf: 0,28 (MF: DKM/MeOH = 4/1 + 1 % CH₃COOH)

Izkoristek obeh sinteznih stopenj (11** in **12**).

4.3 PRIPENJANJE RAZLIČNIH DISTANČNIKOV

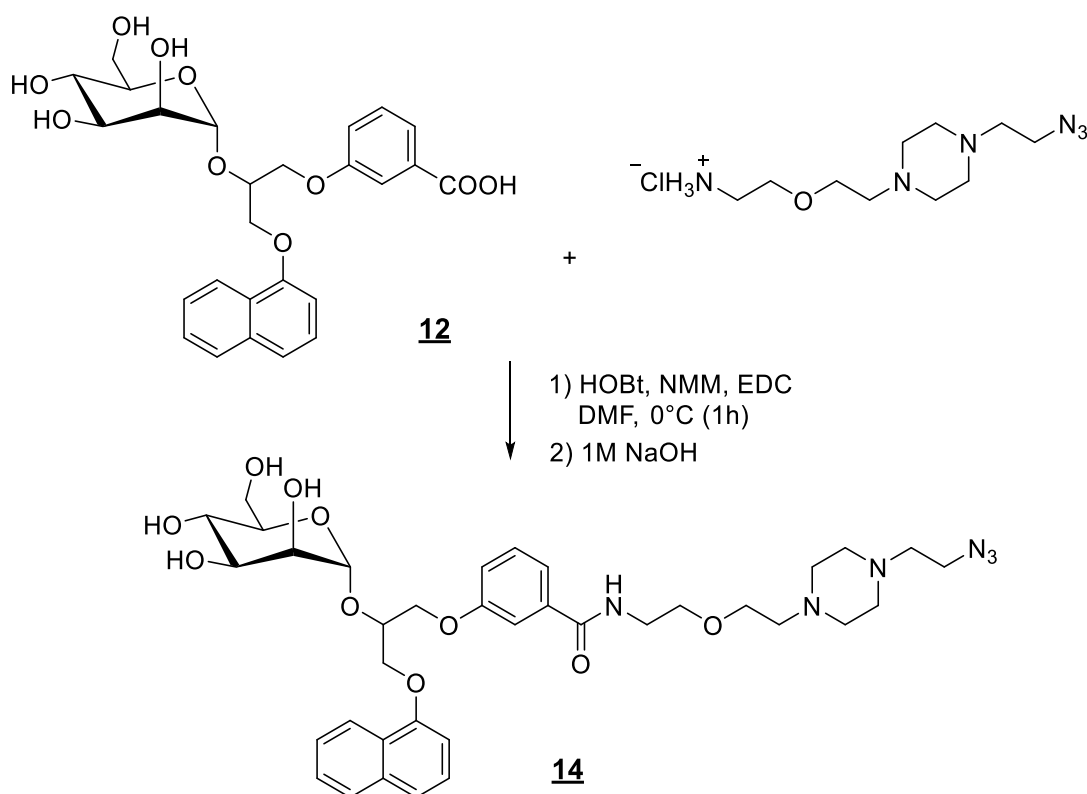
4.3.1 Sinteza *N*-(2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etil)-3-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzamida (**13**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V 30 mL dimetilformamida smo raztopili spojino 2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etan-1-amonijev klorida (0,459 g, 2,179 mmol) in raztopini v ledeni kopeli dodali še spojino **12** (1,200 g, 2,398 mmol). Med mešanjem smo zaporedno dodali HOBT (1-hidroksibenzotriazol) (0,354 g, 2,620 mmol), NMM (*N*-metilmorfolin) (0,72 mL, 6,540 mmol) in EDC (*N*-etil,*N'*-dimetilaminopropil karbodiimid) (0,543 g, 2,830 mmol). Reakcijo smo čez noč pustili pri sobnih pogojih (18 h). Raztopini smo najprej pod znižanim tlakom odparili topilo DMF. Preostanek smo s pomočjo EtOAc (80 mL) in vode (40 mL) prenesli v lij ločnik, kjer smo vodno fazo odstranili. Preostalo organsko fazo pa smo spirali z 0,1M HCl (2 x 30 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 x 30 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 x 20 mL). Organsko fazo smo sušili s pomočjo Na₂SO₄, filtrirali in odvečno topilo odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo spojino **13**.

PRODUKT:**Molekulska formula:** C₃₂H₄₀N₄O₁₁**Mr (izračunano):** 656,69**Izgled:** blede rumena smola**Izkoristek:** 0,990 g (η = 69,78 %)**Rf:** 0,60 (MF: DKM/MeOH = 4/1 + 1 % AcOH)**4.3.2 Sinteza *N*-(2-(2-(4-(2-azidoetil)piperazin-1-il)etoksi)etil)-3-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzamida (14)****REAKCIJA:****POSTOPEK:**

V 30 mL dimetilformamida smo raztopili spojino 2-(2-(4-(2-azidoetil)piperazin-1-il)etoksi)etan-1-amonijev klorid (0,628 g, 2,253 mmol). Raztopino smo postavili v ledeno kopel in dodali spojino **12** (1,000 g, 1,998 mmol). Med mešanjem smo zaporedno dodali HOBt (1-hidroksibenzotriazol) (0,295 g, 2,180 mmol), NMM (*N*-metilmorfolin) (1,00 mL, 9,091 mmol) in EDC (*N*-etil,*N'*-dimetilaminopropil karbodiimid) (0,453 g, 2,364 mmol). Reakcijski zmesi smo dodali večjo količino NMM-ja, kot je bilo predvideno, ker je za optimalno izvedbo reakcije potreben pH = 7-8. Reakcijo smo čez noč pustili pri sobnih pogojih (18 h). Zaradi dobre topnosti produkta v vodi smo izolacijo izvedli z izobarjanjem.

Vodno fazo smo zato naalkalili z 1M NaOH do pH = 11, kar je povzročilo izobarjanje produkta. Vsebinsko smo prenesli v lij ločnik in vodno fazo spirali z EtOAc (2 x 100 mL) in DKM (2 x 100 mL). Organsko fazo smo nato posušili z Na₂SO₄, filtrirali in odvečno topilo odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo spojino **14**, v kateri je v NMR spektru viden zaostanek topila DMF.

PRODUKT:

Molekulska formula: C₃₆H₄₈N₆O₁₀

Mr (izračunano): 724,81

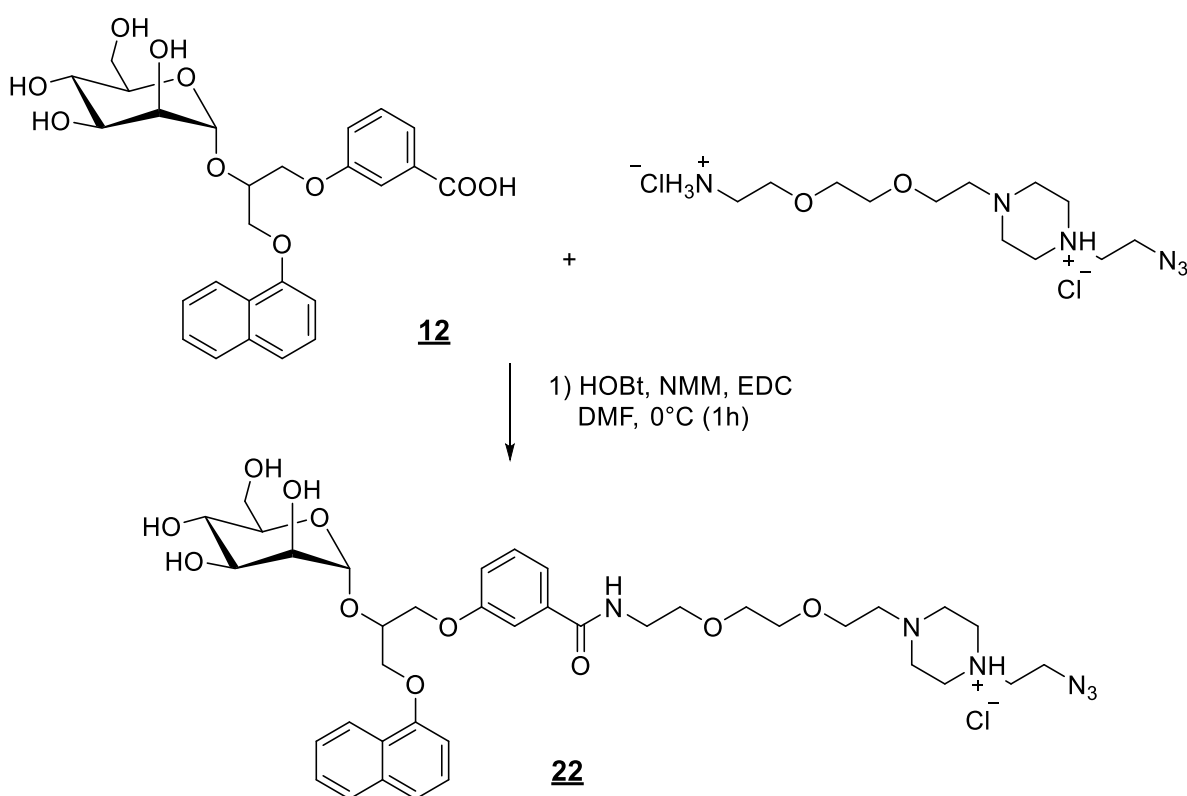
Izgled: rumeno oranžna smola

Izkoristek: 2,010 g (η = 138,81 %; visok izkoristek je posledica zaostalega DMF)

Rf: 0,67 (MF: DKM/MeOH = 2/1 + 1 % Et₃N)

4.3.3 Sinteza N-(2-(2-(2-(4-(2-azidoetil)piperazin-1-il)etoksi)etoksi)etil)-3-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzamida (**22**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V 30 mL dimetilformamida smo raztopili spojino 2-(2-(2-(4-(2-azidoetil)piperazin-1-il)etoksi)etoksi)etan-1-amonijev diklorid (0,319 g, 0,888 mmol). Raztopino smo postavili v ledeno kopel in dodali spojino **12** (0,489 g, 0,977 mmol). Med mešanjem smo zaporedno

dodali še HOBt (1-hidroksibenzotriazol) (0,144 g, 1,066 mmol), NMM (*N*-metilmorfolin) (0,49 mL, 4,440 mmol) in EDC (*N*-etil,*N'*-dimetilaminopropil karbodiimid) (0,221 g, 1,154 mmol). Reakcijo smo pustili pri sobnih pogojih čez noč (18 h). Raztopini smo pod znižanim tlakom odparili topilo DMF. Za nadaljnjo izolacijo se nismo odločili zaradi majhne količine produkta. Dobili smo spojino 22.

PRODUKT:

Molekulska formula: C₃₈H₅₃ClN₆O₁₁

Mr (izračunano): 805,32

Izgled: *

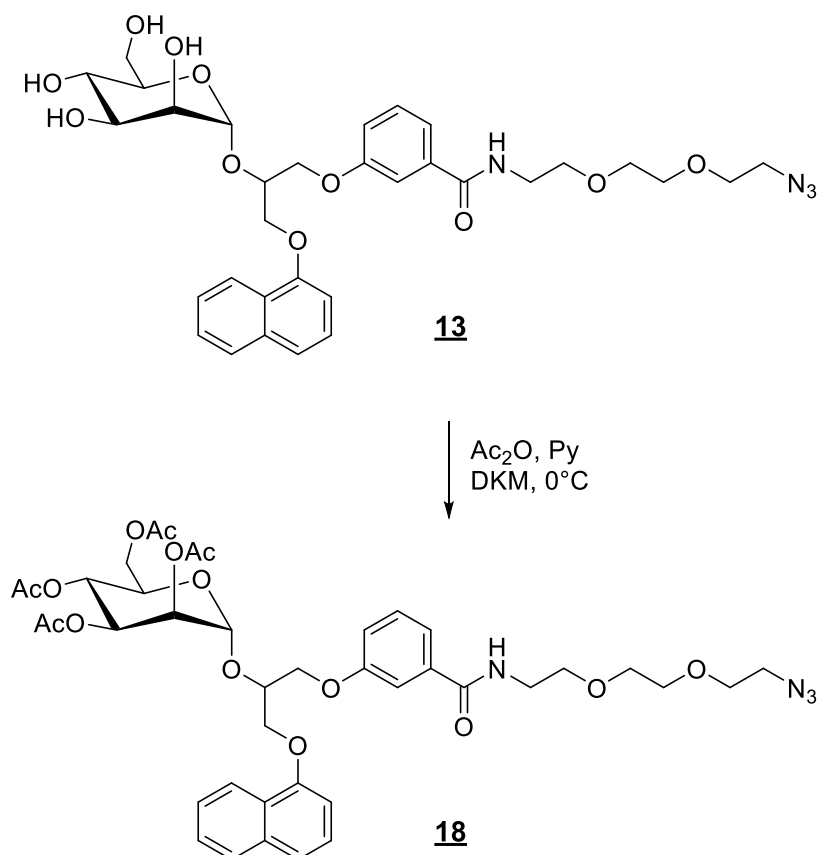
Izkoristek: *

*Produkt ni bil čiščen, zaradi tega izkoristek in izgled nista bila določena

Rf: 0,17 (MF: Toluen/MeOH = 10/3)

4.3.4 Sinteza *N*-(2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etil)-3-(2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzamida (18)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V bučko smo natehtali spojino **13** (0,990 g, 1,508 mmol) in vsebino prepihali z argonom. Pod inertnimi pogoji smo dodali suh DKM (50 mL) in raztopino prestavili na ledeno kopel. Ob mešanju smo dodali piridin (3 mL) in Ac₂O (0,71 mL, 7,538 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili čez noč (16 h) in naslednji dan ugotovili, da reakcija ni popolnoma potekla, zato smo dodali še dodaten Ac₂O (0,30 mL). Reakcijsko zmes smo pustili pod inertnimi pogoji, dokler ni reakcija v celoti potekla (24 h). Nato smo vsebini dodali 1 mL MeOH in odparili topilo. Za izolacijo produkta smo izvedli KKR (MF: EtOAc/Hex = 6/1). Dobili smo čisto spojino **18**.

PRODUKT:

Molekulska formula: C₄₀H₄₈N₄O₁₅

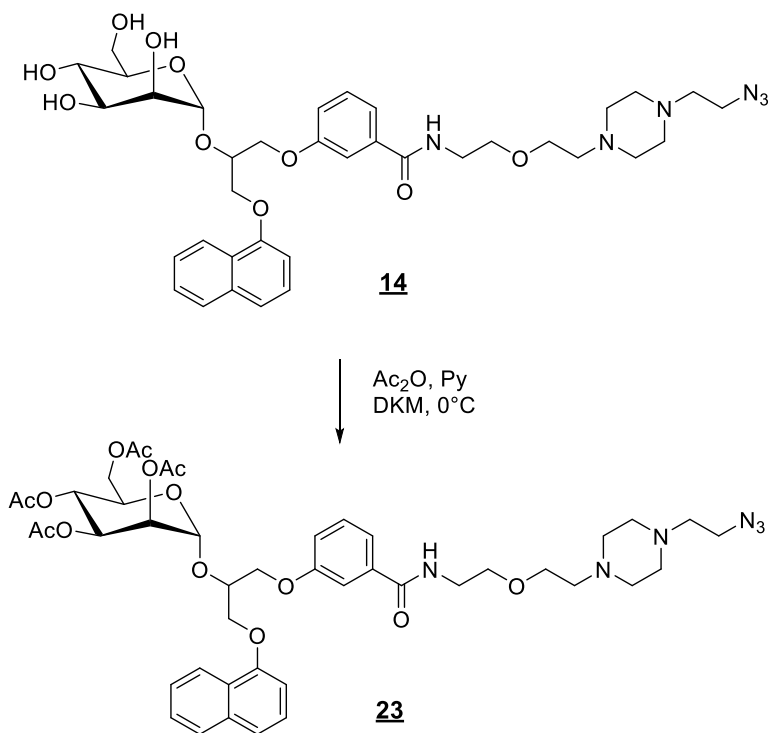
Mr (izračunano): 824,84

Izgled: blede rumena smola

Izkoristek: 0,989 g (79,51 %)

Rf: 0,30 (MF: EtOAc/Hex = 7/1)

4.3.5 Sinteza *N*-(2-(2-(4-(2-azidoetil)piperazin-1-il)etoksi)etil)-3-(2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)benzamida (23)

REAKCIJA:

POSTOPEK:

V bučko smo natehtali spojino **14** (1,390 g, 1,918 mmol) in vsebino prepihali z argonom. Pod inertnimi pogoji smo dodali suh DKM (60 mL) in raztopino prestavili na ledeno kopel. Ob mešanju smo dodali piridin (5 mL) in Ac₂O (1,10 mL, 10,920 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili čez noč (16 h) in naslednji dan ugotovili, da reakcija ni popolnoma potekla, zato smo dodali še pribitek Ac₂O (0,40 mL). Reakcijsko zmes smo pustili pod inertnimi pogoji, dokler reakcija ni potekla (24 h). Nato smo vsebini dodali 1 mL MeOH in odparili topilo. Za izolacijo produkta smo izvedli KKR (MF: DKM/MeOH = 10/1). Dobili smo čisto spojino **23**.

PRODUKT:

Molekulska formula: C₄₄H₅₆N₆O₁₄

Mr (izračunano): 892,96

Izgled: rumena smola

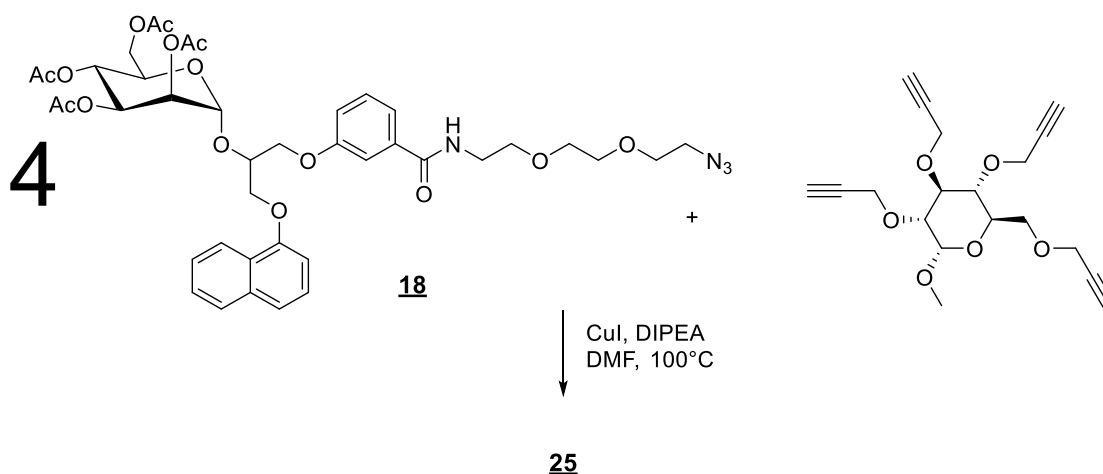
Izkoristek: 1,175 g (68,52 %)

Rf: 0,36 (MF: DKM/MeOH = 9/1)

4.4 SINTEZA MULTIMERNIH ANTAGONISTOV

4.4.1 Sinteza Ac-Dendrona 1 (25)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V 6 mL dimetilformamida smo raztopili spojino **18** (0,501 g, 0,607 mmol) in metil 2,3,4,6-tetra-O-(prop-2-in-1-il)- α -D-glukopiranozid (0,044 g, 0,127 mmol). Raztopini smo dodali še CuI (0,010 g, 0,051 mmol) in DIPEA (0,25 mL, 1,528 mmol). Vsebino smo zaprli in vstavili v mikrovalni reaktor (20 minut, 100 °C), kjer je glede na TLC reakcija uspešno

potekla. Produkt smo poskušali izolirati s pomočjo KKR (MF: DKM/MeOH = 9/1), kar pa ni uspelo, zato smo ponovili KKR z drugo mobilno fazo (MF: Kloroform/MeOH = 15/1). Izolirali smo spojino **25** (strukturna formula se nahaja v prilogi 2).

PRODUKT:

Molekulska formula: C₁₇₉H₂₁₄N₁₆O₆₆

Mr (izračunano): 3645,73

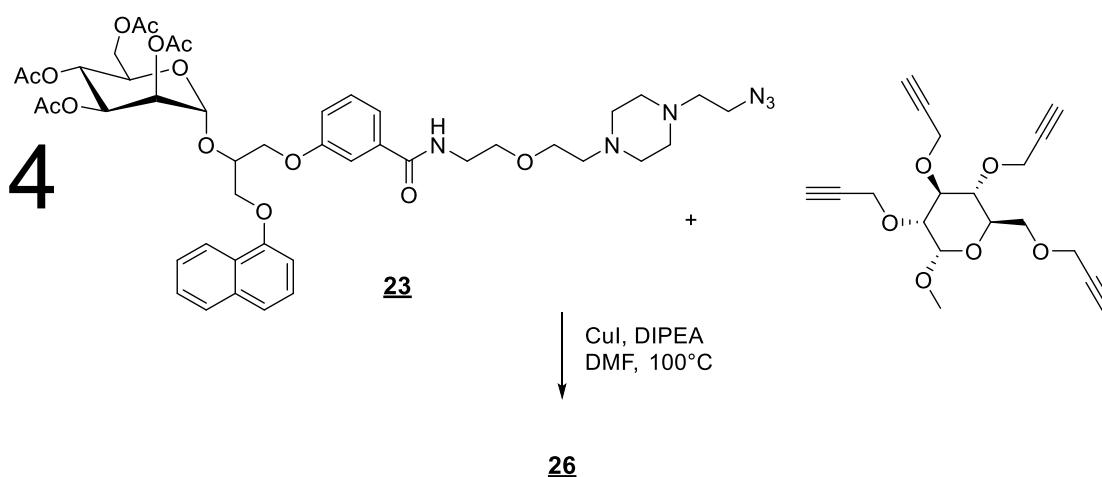
Izgled: rumeno-oranžna strjena smola

Izkoristek: 0,356 g (76,89 %)

Rf: 0,30 (MF: Kloroform/MeOH = 15/1)

4.4.2 Sinteza Ac-Dendrona 2 (26)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V 6 mL dimetilformamida smo raztopili spojino **23** (0,547 g, 0,613 mmol) in metil 2,3,4,6-tetra-O-(prop-2-in-1-il)-α-D-glukopiranozid (0,044 g, 0,127 mmol). Nato smo raztopini dodali še CuI (0,010 g, 0,051 mmol) in DIPEA (0,25 mL, 1,528 mmol). Vsebinsko smo zaprli in vstavili v mikrovalovni reaktor (20 minut, 100 °C), kjer je reakcija uspešno potekla. Produkt smo izolirali s pomočjo gradientne KKR (MF: DKM/MeOH = 10/1 do 4/1). Po izolaciji smo dobili čisto spojino **26** (strukturna formula se nahaja v prilogi 2).

PRODUKT:

Molekulska formula: C₁₉₅H₂₄₆N₂₄O₆₂

Mr (izračunano): 3915,68

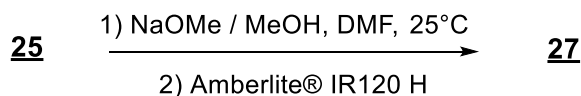
Izgled: rumena strjena smola

Izkoristek: 0,200 g (39,90 %)

Rf: 0,19 (MF: DKM/MeOH = 7/1)

4.4.3 Sinteza Dendrona 1 (27)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

Spojino **25** (0,156 g, 0,043 mmol) smo prepihali z argonom (10 min) in jo raztopili v 25 mL brezvodnega MeOH. Zaradi slabe topnosti smo dodali še 10 mL brezvodnega DMF in produkt raztopili s pomočjo ultrazvočne kadičke. Raztopini smo ob mešanju dodali 30 % NaOMe (8 µL, 0,013 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili naslednjih 48 ur pod inertnimi pogoji. Po končani reakciji smo v reakcijski zmesi opazili oborino, ki smo jo odfiltrirali. Za izolacijo spojine iz matičnice smo uporabili kationsko izmenjevalno smolo Amberlit IR120 H (600 mg). Preostanek matičnice smo koncentrirali s pomočjo vakuumske črpalke. Zaradi zaostanka DMF v produktu smo izvedli še trituracijo le-tega s pomočjo dietil etra (3 x 20 mL). Dobili smo spojino **27** (strukturna formula se nahaja v prilogi 2).

PRODUKT:

Molekulska formula: C₁₄₇H₁₈₂N₁₆O₅₀

Mr (izračunano): 2973,14

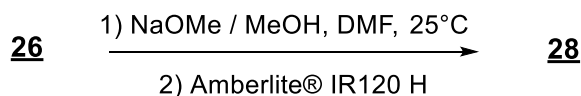
Izgled: rumena strjena smola

Izkoristek: 0,086 g (η = 67,27 %)

Rf: 0,72 (MF: CH₃CN/MeOH/H₂O = 3/1/1)

4.4.4 Sinteza Dendrona 2 (28)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

Spojino **26** (0,235 g, 0,060 mmol) smo prepihali z argonom (10 min) in jo raztopili v 30 mL brezvodnega MeOH. Zaradi slabe topnosti smo dodali še 20 mL brezvodnega DMF in produkt raztopili s pomočjo ultrazvočne kadičke (10 min). Raztopini smo ob mešanju dodali 30 % NaOMe (0,011 mL, 0,018 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili naslednjih 72 ur pod inertnimi pogoji. Po končani reakciji smo v reakcijski zmesi opazili oborino, ki smo jo odfiltrirali. Za izolacijo spojine iz matičnice smo uporabili kationsko izmenjevalno smolo Amberlit IR120 H (600 mg). Preostanek matičnice smo koncentrirali s pomočjo

vakuumske črpalke. Zaradi zaostanka DMF v produktu smo izvedli še trituracijo le-tega s pomočjo dietil etra (3 x 15 mL). Dobili smo končno spojino **28** (strukturna formula se nahaja v prilogi 2), ki je zelo slabo topna v večini topil.

PRODUKT:

Molekulska formula: C₁₆₃H₂₁₄N₂₄O₄₆

Mr (izračunano): 3243,51

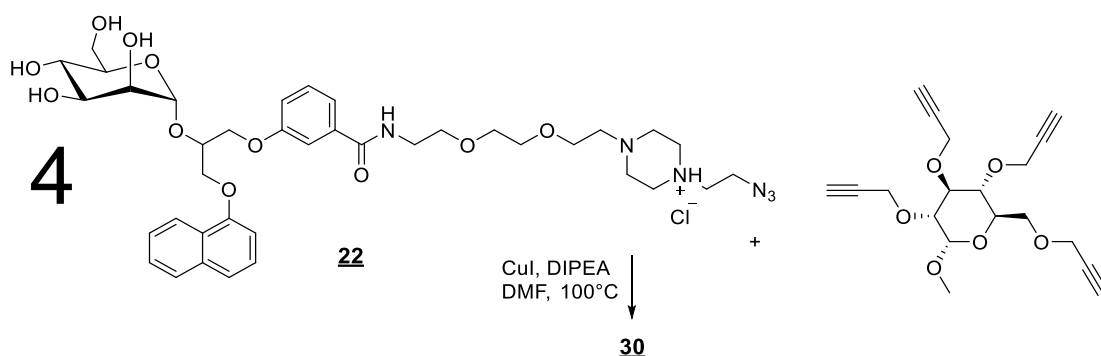
Izgled: Rumeno-oranžna strjena smola

Izkoristek: 0,177 g (η = 90,95 %)

Rf: Zaradi slabe topnosti spojine v večini topil nam TLC-ja ni uspelo razviti.

4.4.5 Poizkus sinteze Dendrona 3 (30)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V 7 mL MeOH smo raztopili spojino **22** (0,375 g, 0,466 mmol) in metil 2,3,4,6-tetra-O-(prop-2-in-1-il)- α -D-glukopiranozid (0,035 g, 0,101 mmol). Nato smo raztopini dodali še CuI (0,008 g, 0,041 mmol) in DIPEA (0,20 mL, 1,219 mmol). Vsebinsko smo zaprli in vstavili v mikrovalovko (20 minut, 100 °C, 100 W). Topilo iz vsebnika smo s pomočjo led oceta in znižanega tlaka odparili. Trden preostanek smo ločili s pomočjo reverznofazne kromatografije (Topilo 1: 0,1 % TFA v H₂O; Topilo 2: MeOH) (Priloga 1). Po izolaciji smo dobili končno spojino **30** (Priloga 2), ki je zelo slabo topna v večini topil. Glede na NMR spekter reakcija ni potekla v želeni smeri oziroma je potekla v zelo majhnem deležu.

PRODUKT:

Molekulska formula: C₁₇₁H₂₃₀N₂₄O₅₀

Mr (izračunano): 3419,62

Izgled: rumena strjena smola

Izkoristek: 0,162 g (η = 46,44 %)

Rf: 0,22 (MF: DKM/MeOH = 3/1)

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

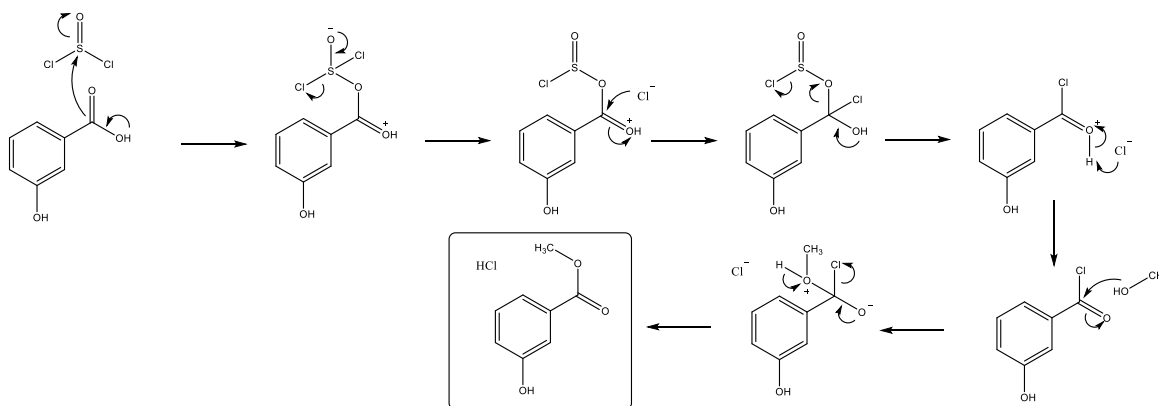
Načrtovana sintezna pot nas je večkrat postavila pred preizkušnjo. Morali smo biti precej iznajdljivi, da smo kritične točke razumeli in našli rešitve zanje. Glede na načrtovano sintezno pot smo naredili nekaj modifikacij, saj je bila pot z benzilno zaščito z zelo nizkimi izkoristki prepotratna. Zato smo bili primorani sintezno pot ponoviti, tokrat z metilno zaščito, ki se je izkazala za odlično alternativo prvotni z mnogo višjimi izkoristki. Naj dodam, da so v sintezni shemi tudi 3 distančniki, vendar pa je bil v prvotnem načrtu samo polietilenglikolni, ostala dva s piperazinskim fragmentom smo uporabili, ker sta bila na voljo in je bila njuna uporaba smiselna zaradi povišanja hidrofilnih lastnosti spojin. Cilj sinteznega načrta smo dosegli in tako dobili potencialne antagoniste, ki so dali raznolike rezultate na *in vitro* testnih sistemih.

5.1 SINTEZA MONOMERNEGA ANTAGONISTA

Sintezno pot smo začeli z uvedbo zaščitne skupine na našo izhodno spojino 3-hidroksibenzojsko kislino. Uvedba zaščitnih skupin je nujna, saj s tem omogočimo selektiven potek sledečih reakcij. Skladno z načrtom smo 3-hidroksibenzojsko kislino zaščitili z benzilno zaščitno skupino. Reakcija je potekla s predhodnim povečanjem nukleofilnih lastnosti benzojske kisline z dodatkom NaHCO_3 . Nukleofilna substitucija je potekla na elektron pozitivnem δ^+ ogljiku benzilbromida po mehanizmu $\text{S}_{\text{N}}2$. Produkt smo izolirali z ekstrakcijo. Zaradi neuporabe argonove atmosfere je bil izkoristek reakcije precej nizek (57 %), saj ob prisotnosti vode, ki je prav tako nukleofil in tekmuje za benzilklorid v reakcijski zmesi, pride do nastanka stranskih produktov.

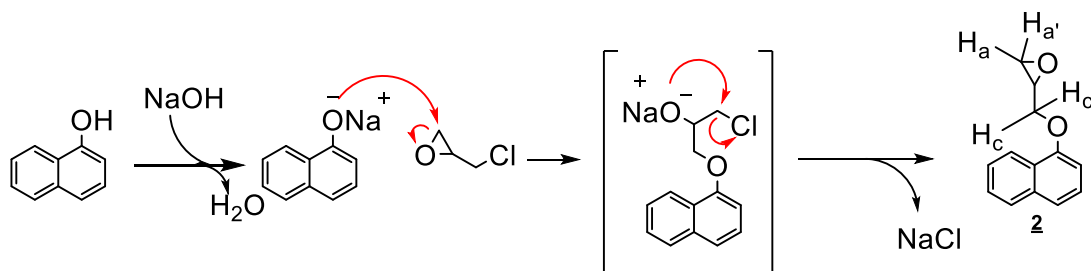
Veliko višji izkoristek nam je uspelo dobiti pri zaščiti karboksilne kisline preko metilnega estra, ki ga uvedemo s pomočjo brezvodnega metanola ob dodatku SOCl_2 . Za reakcijo so prav tako nujni brezvodni pogoji zaradi labilnosti nastalega halida, ki nastane ob dodatku tionilklorida. Potek reakcije lahko predvidimo po dveh mehanizmih: preko kislinskega klorida ali preko klorometana. Pri prvem ob dodatku tionilklorida poteče adicija elektron negativne δ^- karboksilne kisline na elektron pozitivno δ^+ žveplo tionilklorida s sledečo eliminacijo. Pri tem dobimo visoko reaktivni kislinski klorid, čemur ob dodatku MeOH ponovno sledi adicija nukleofila (MeOH) na elektron pozitivni ogljik δ^+ karboksilne kisline s sledečo eliminacijo klora (Shema 3). SOCl_2 torej služi kot aktivator, ki z benzojsko kislino tvori kislinski klorid, saj klor, ki je dobro izstopajoča skupina, povleče elektrone iz

ogljika in ga naredi bolj dovzetnega za napad nukleofilne OH skupine MeOH (93). Po drugem mehanizmu pa se tionil klorid veže na metanol, kjer pride do eliminacije OH skupine in nastanek alil klorida. Klor enako kot prej potegne elektrone na sebe in metilno skupino naredi bolj elektron pozitivno δ^+ in dovzetno za napad karboksilne kisline, ki je sicer šibek nukleofil. Ne glede na mehanizem reakcije smo glede na izkoristek, ki je 100 %, sintezo uspešno izvedli. Produkt smo izolirali samo z odparevanjem topila in reagentov pod znižanim tlakom.



Shema 3: Potek sinteze estra preko nastanka kislinskega klorida (prirejeno po (93)).

Z Williamsovo sintezo etrov, pri kateri gre za reakcijo med alkil halidom in alkoksidom, v našem primeru med epiklorhidrinom in 1-naftolom, smo sočasno pripravili oksiranski derivat 1-naftila. Gre za nukleofilno substitucijo po mehanizmu S_N2 (94), kjer 1-naftol, ki smo ga predhodno deprotonirali z NaOH, v obliki 1-naftolata napade sterično manj ovirano in bolj elektrofilno CH_2 skupino oksiranskega obroča epiklorhidrina. Tej sledi še ena, tokrat intramolekularna Williamsova sinteza z zapiranjem oksiranskega obroča (Shema 4). Zaradi nastalih stranskih produktov smo bili primorani poleg ekstrakcije narediti tudi ločbo z vakuumsko destilacijo, kjer se pri 146 °C destilira zeleni produkt. Pri tem je potrebno izpostaviti, da je produkt neobstoje in je nujno shranjevanje v hladilniku, zaščiteno pred vlago in svetlobo. NMR analiza produkta je pokazala neekvivalentne sklopitve protonov, saj so premiki posameznih protonov obeh CH_2 kar daleč narazen (Priloga 3).



Shema 4: Mehanizem Williamsove sinteze etrov (prirejeno po (93)).

Konvergentni sintezni poti se nato tukaj združita z odpiranjem epoksidnega obroča, ki sicer poteka v dveh stopnjah. Najprej pretvorimo spojino **1** ali **7** v ionsko obliko - fenolat, ki v nadaljevanju v vlogi nukleofila napade sterično manj ovirano sp^3 hibridizirano metilensko CH_2 skupino oksiranskega obroča. Ponovno gre za nukleofilno substitucijo, ki poteka po mehanizmu S_N2 (93). Za uspešno izvedbo druge stopnje reakcije je bistveno, da nastalo vodo iz prvega dela sinteze uspešno odstranimo. To smo storili s koevaporacijo s toluenom. Brezvodni pogoji nam torej zagotavljajo, da ob prisotnosti močne baze (KOH) ne pride do hidrolize estra ali nukleofilnega napada vode na oksiranski obroč in s tem do tvorbe stranskih produktov.

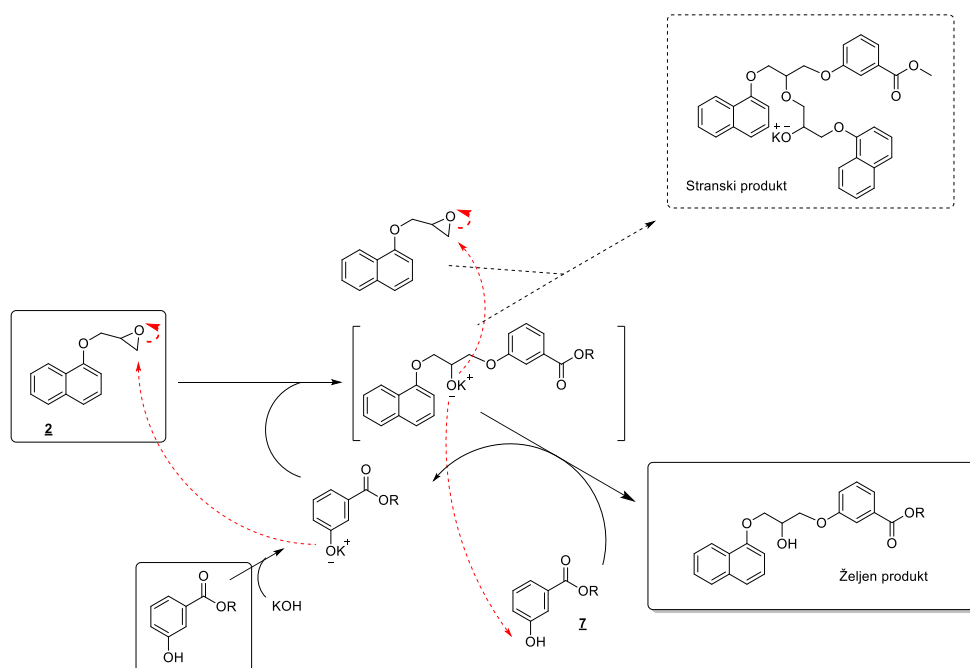
Pri sami sintezi se srečamo s težavo izredno nizkih izkoristkov, tudi pod 20 % (Tabela 1). Vse reakcije smo opravili v predhodno osušeni steklovini, pri brezvodnih pogojih (argonova atmosfera) s povratnim hladilnikom. Razlike so se pojavile le pri T reakcijske zmesi in molarne razmerju reagentov.

Tabela 1: Poizkusi sinteze spojine **3** in **9** s spreminjanjem ekvimolarnega razmerja reagentov.

Produkt	Ekv. spojin			T [°C]	η [%]
	KOH	1 ali 7	2		
3	0,95	1	1	120	16,30; 28,16
9	0,95	1	1	90	43,40
3	0,95	1,25	1	70	16,62
9	0,55	1,25	1	80	92,79

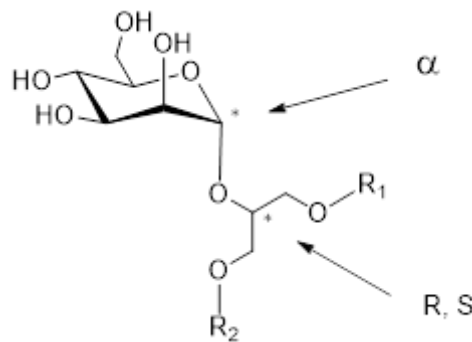
Kot je lahko opaziti tudi pri ostalih sinteznih stopnjah, ima tudi tukaj benzilni ester zelo slabe izkoristke – pod 30 %, medtem ko ima metilni za odtenek boljše. Razlogi za razlike so v sami izolaciji - nastanek trofaznega sistema pri ekstrakciji in slaba topnost v mobilni fazi za kolonsko kromatografijo ter posledični suh nanos na silikagel. Prednost metilnega estra pri tej sintezni stopnji je tudi ta, da zaradi preestranja z MeOH v alkalnih pogojih ne pride do spremembe zaščitne skupine in potencialnega nižjega izkoristka. Se pa izkoristek spojini z metilnim estrom znatno poveča s spremembo molarne razmerja reagentov, in sicer z zmanjšanjem količine uporabljenega KOH in s povečanjem izhodne spojine **7**. To si lahko razlagamo z vlogo K^+ ionov kot nekakšne vrste katalizatorjev, ki deprotonirajo fenolno OH skupino s pomočjo K^+ ionov in jo naredijo bolj reaktivno. Da dobimo manj

reaktiven produkt v protonirani obliki, se mora K^+ prenesti s produkta na izhodno spojino. Ko zmanjka fenolne OH skupine, se K^+ nima več kam prenesti in ostane vezan na produkt, kar z napadom na oksiranski obroč vodi v sintezo stranskih produktov, kot je prikazano na shemi spodaj (Shema 5). Torej smo z zmanjšanjem dodanega KOH zmanjšali količino nastalega ioniziranega produkta in hkrati s povečanjem izhodne spojine dosegli, da se je ta lahko prenesel in ostal vezan na izhodni spojini. S tem principom smo zminimalizirali nastajanje stranskih produktov in po ekstrakciji produkta dosegli zelo dober izkoristek, in sicer 92,79 %.



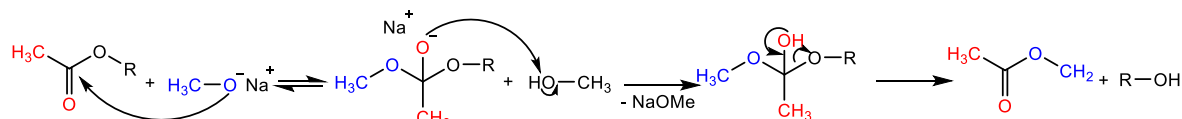
Shema 5: Mehanizem odpiranja oksiranskega obroča in sinteza spojin **3** ali **9**.

V naslednji stopnji sinteze je sledila glikozilacija spojine **3** oziroma **9** z uporabo trikloroacetamidatnega manozida kot donorja glikozidne vezi, ki je v obeh primerih potekla brez težav z visokim izkoristkom. Reakcija poteka v brezvodnih pogojih, saj voda kot nukleofil moti pripenjanje manoze preko α -glikozidne vezi. Pri reakciji smo za tvorbo α -vezi v anomernem centru uporabili stereoselektivni katalizator – Lewisovo bazo (TMSOTf) (95). Katalizator z vezavo na kisik trikloroacetamidata povzroči premik elektronov iz C_1 manoze na OTf. S tem postane ogljik C_1 , ki je elektron pozitiven δ^+ , tarča nukleofila, ki je v našem primeru OH skupina glicerolnega distančnika spojine **3** oziroma **9**. Torej TMSOTf aktivira manozid s



povečanjem elektrofilnih lastnosti ogljika. Rezultat sinteze je spojina **4** oziroma **10**, racemna zmes dveh epimerov (Slika 10), kar je lepo vidno tudi na NMR spektru (priloga 3), kjer so signali podvojeni. Epimera sta stereoizomera, ki se razlikujeta v le enem kiralnem centru in imata različne fizikalno-kemijske (topnost, T tališča in vrelišča, signale v NMR spektrih) ter farmakološke lastnosti (afiniteta do receptorja, aktivnost), kar se prav tako odraža pri sintezi, izolaciji in čiščenju spojin.

Do monomera nas je ločila samo še odščita zaščitnih skupin. Deacetilacijo smo izvedli po klasični Zemplénovi reakciji, kjer s pomočjo katalitične količine alkoksida pride do transesterifikacije oziroma izmenjave acetilov med dvema spojinama (Shema 6) (96). Za uspešno izvedbo sinteze je nujna prisotnost alkoksida. Uporabili smo NaOMe, ki je najmočnejša organska baza med alkoksidi. Z napadom MeO^- aniona na acetatno skupino pride do preestrenja in prenosa acetatne skupine na metoksidni anion MeO^- . Pri tem so nujni brezvodni pogoji, saj v nasprotnem primeru pride do razpada alkoksida.

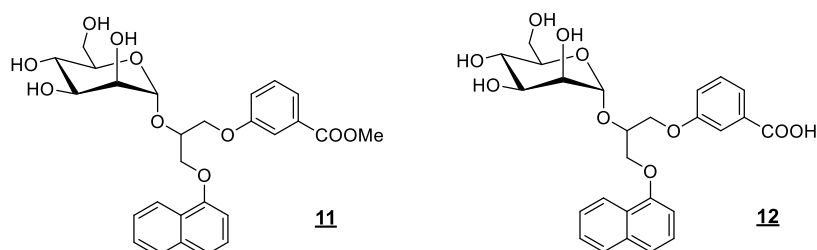


Shema 6: Potek deacetilacije manoznih hidroksilnih skupin (prirejeno po (97)).

V primeru sintezne poti preko benzilne zaščite smo prišli do presenetljivega odkritja – ni prišlo samo do odščite manoznih OH skupin, ampak tudi do spremembe zaščitne spojine na karboksilni kislini. Ker je prišlo do preestrenja, sta se benzilna in metilna skupina zamenjali, kar pa sploh ni tako presenetljivo, če preučimo mehanizem reakcije. Prav tako kot na acetatih tudi tukaj pride do napada MeO^- aniona na benzilni ester, kjer naposled izstopi benzilni alkohol. Po prvotnem načrtu bi morali benzilno zaščitno skupino odstraniti s hidrolitskim hidrogeniranjem, čemur smo se na ta način izognili. Prav tako nas je tudi sama spremenjena sinteza pripeljala do bolj enostavnega načina – odščite metilnega estra z NaOH. To je poenostavilo sintezno pot in združilo dve sintezni stopnji v eno. Torej, po Zemplénovi reakciji, ki poteka ob prisotnosti NaOMe, lahko reagent elegantno pretvorimo v reagent za odščito metilnega estra, saj v vodi nestabilni NaOMe ob prisotnosti vlage reagira do NaOH in MeOH, kar pa sta reagenta odščite karboksilne kisline. Tako smo reakcijski zmesi dodali samo še 1M vodno raztopino NaOH in brez večjih težav z alkalno hidrolizo pripeljali sintezo do spojine **12**. V tem primeru je bila izolacija enostavna, z nakisanjem z 1M HCl, pri čemer se je produkt v vodi izoboril in smo ga samo odnučali in posušili. Za primerjavo izkoristkov stopenjske sinteze in združene sinteze podajam obe

vrednosti; stopenjska sinteza je potekala z izkoristkoma 43,42 % in 54,55 % (slednji je nizek tudi zaradi neuspelega raztapljanja oborjene spojine **12** v DKM), medtem ko je združena dosegla 83,74 % izkoristek. Ker je sintezna pot brez vmesnega čiščenja veliko bolj ekonomična in donosna, je zato njena uporaba upravičena in priporočljiva. Kot je bilo že ugotovljeno pri sintezi podobnih spojin (98), smo tudi tukaj opazili različno topnost obeh epimerov med samo ekstrakcijo, kar je prineslo skoraj popolno resolucijo racemne zmesi (glej spektra spojine **12** v prilogi 3).

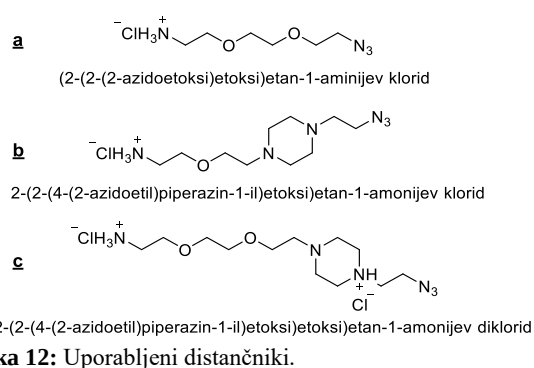
Če primerjamo in povzamemo razlike obeh sinteznih poti, lahko hitro ugotovimo, da pot preko metilnega estra daje boljše izkoristke, omogoča boljšo ločbo s kolonsko kromatografijo ter enostavnejšo izolacijo in, najpomembneje, ni težav s topnostjo produktov. Poleg tega večina za obstojnost estra kritičnih stopenj poteka v MeOH, kar nam ob uporabi metilne zaščite vedno zagotavlja, da bo ta na koncu tudi ostala. Ob uporabi benzilne zaščitne skupine pa njena obstojnost ni samoumevna in morajo biti mehanizmi reakcij bolj preučeni, da ne pride do nepredvidenih sprememb, kot smo to videli pri neuspeli sintezi (poglavje 4.1.4).



Slika 11: Sintetizirana monomera.

5.2 OD MONOMERNEGA DO MULTIMERNEGA ANTAGONISTA

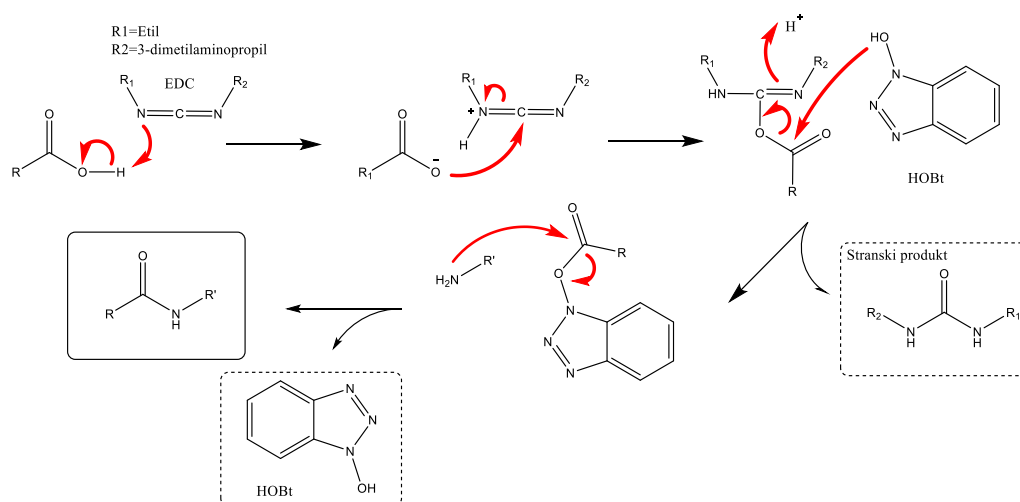
Sintezi monomera je sledila sinteza tetramerov preko različnih distančnikov. Distančniki imajo pri spojinah vlogo vezi med dendronskim jedrom in monomerom. Prav tako lahko z modifikacijo dolžin distančnika in njegovih fragmentov vplivamo na topnost in vrtljivost oziroma fleksibilnost pripetih monomerov, kar posledično lahko vodi v boljšo vezavo in farmakokinetične



Slika 12: Uporabljeni distančniki.

lastnosti. Pri sintezi smo uporabili po pričakovanjih najustreznejše distančnike, ki so bili v danem trenutku na voljo (Slika 12).

Sama sinteza, pri kateri smo uporabili sklopitveni reagent, je ponovno potekala po mehanizmu nukleofilne substitucije. V našem primeru je bil sklopitveni reagent EDC, ki se uporablja za aktivacijo karboksilne spojine monomera. Predhodno karboksilni kislini odcepimo proton s pomočjo dodatka srednje močne organske baze *N*-metilmorfolina (NMM). Ta kislini odtegne proton, ki se prenese na karbadiimid, in s tem poveča nukleofilnost karboksilatnega aniona in elektrofilnost karbadiimidnega ogljika. Sledi napad karboksilatnega aniona na karbadiimidni ogljik. Za izboljšanje reaktivnosti estra reakcijski zmesi dodamo pomožni nukleofil (HOBt). Ta s prostim elektronskim parom napade karbonilno spojino O-acilsečnine in povzroči zmanjšanje elektronske gostote na karbonilnem ogljiku, kar poveča reaktivnost spojine, ki hitreje in bolj selektivno zreagira z aminom. Amin pa se predhodno ob stiku z NMM pretvori iz soli v deprotonirano obliko, ki je močnejši nukleofil in lažje napade karbonilni ogljik (glej mehanizem na shemi 7).



Shema 7: Mehanizem tvorbe amidne vezi s pomočjo sklopitvenih reagentov (prirejeno po (99)).

Izolacijo spojine **13** smo dosegli z ekstrakcijo, pri spojini **14** smo izkoristili bazično piperazinsko spojino in smo spojino izoborili s pomočjo naalkaljenja z 1M NaOH, spojine **22** pa nismo izolirali zaradi majhnih količin produkta. Pri spojini **14** smo dobili izkoristek reakcije, ki je višji od 100 %, kar je posledica nezadostne evaporacije DMF-ja, kar nam potrjuje tako vonj, kot tudi NMR analiza produkta, medtem ko je bil pri spojini **13** izkoristek 70 %.

Zaradi zagotavljanja selektivnega pripenjanja monomerov na dendronsko jedro smo spojinama **13** in **14** manozne OH skupine predhodno zaščitili z acetiliranjem, medtem ko

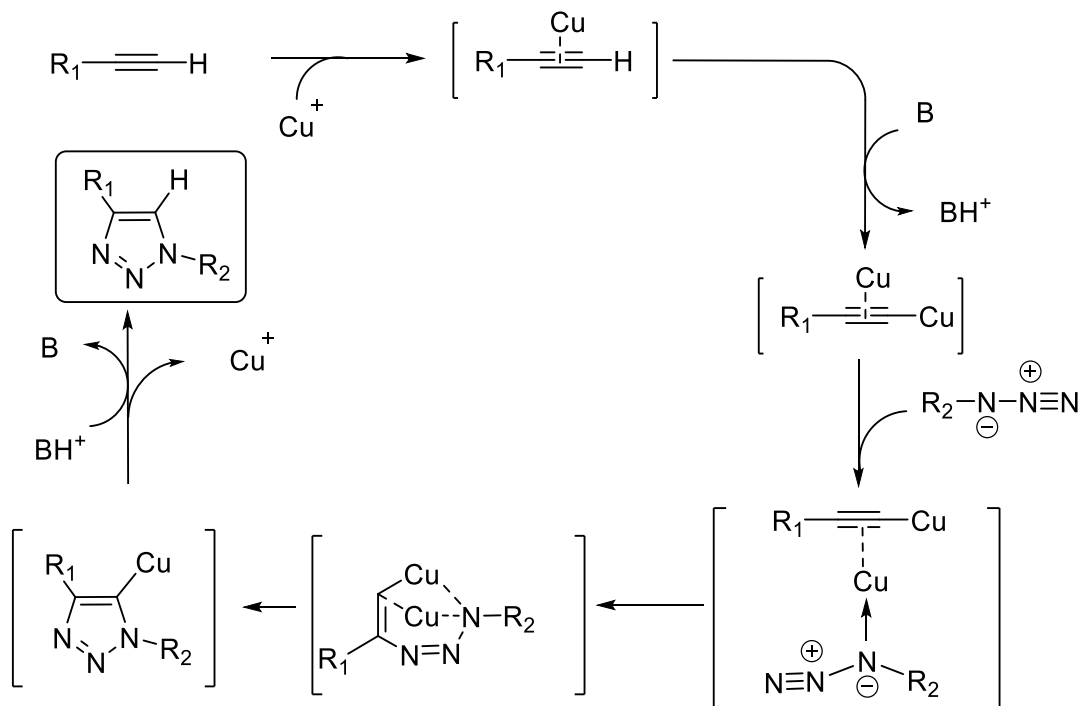
tega pri spojini **22** nismo naredili, kar se je pozneje pokazalo kot slaba odločitev. Acetiliranje OH skupin je nukleofilna substitucija, pri kateri gre za napad na polariziran δ^+ ogljik karbonilne skupine acetanhidrida. Reakcija je potekala precej počasi in smo ji po 24 urah dodali nova 2,5 ekv. acetanhidrida, ki je po nadaljnjih 16 urah reakcijo pripeljal do zadovoljive kvalitete in kvantitete produkta. Obe spojini smo izolirali s kolonsko kromatografijo, s čimer smo se znebili nezadostno zaščenega produkta, slabo hlapnega reagenta in topila.

Za sintezo dendronskih spojin smo uporabili glukopiranozidno dendronsko jedro, ki se je v preteklosti zaradi svoje polarnosti izkazalo za eno boljših. Za izvedbo reakcije smo kot katalizator uporabili CuI, topilo DMF in šibko organsko bazo DIPEA. Reakcijo smo izvedli v mikrovalovnem reaktorju pri 100 °C v času 20 minut. Na podlagi TLC-ja smo se odločili za izvedbo čiščenja s kolonsko kromatografijo, ki je bila v primeru sinteze spojine **25** v dveh poizkusih neuspešna (MF: DKM/MeOH = 9/1), v tretje pa je z zamenjavo mobilne faze le uspela (MF: Kloroform/MeOH = 15/1). V primeru spojine **26** se je pojavil problem topnosti zaradi piperazinskega fragmenta. Dobili smo razvlečene lise z visoko polarnostjo, ki so bile zelo nizko na TLC-ju. Zato je bila izvedba kolonske kromatografije težavna, a vseeno glede na spektroskopsko analizo uspešna (gradient MF: DKM/MeOH = 10/1 – 4/1). Pri obeh spojinah se na NMR spektru vidijo signali tako triazolov, kot tudi metilne skupine dendronskega jedra. Prav tako je lepo vidno razmerje med aromatskimi protoni monomera in protoni glukopiranozidnega jedra, ki znaša 4 : 1, kar pomeni, da so nastali tetrameri in je reakcija potekla v celoti. Pri triazolih smo opazili, da je integral signala sicer nekoliko manjši, kar pa je najbrž posledica prekratkega zajema relaksacije protonov pri snemanju NMR spektra, saj naj bi relaksacija pri triazolih potekala počasneje.

Prav tako smo podobno reakcijo izvedli s spojino **22**, ki je bila za razliko od spojin **25** in **26** brez zaščitnih manoznih OH skupin. Reakcija je potekla pod enakimi pogoji kot predhodnji, le končni produkt **30** smo zaradi velike polarnosti poskušali izolirati z reverznofazno ločbo. Po reverznofazni ločbi je bilo iz TLC-ja nemogoče določiti uspešnost ločbe, saj so bile lise zaradi slabe topnosti razvlečene. Zbrane frakcije iz večjega območja retencije smo združili in odparili topilo pod znižanim tlakom. Spektroskopska analiza produkta je bila precej kompleksna in je pokazale različne rezultate. Z masno spektroskopijo smo dobili dokaj ustrezno molekulsko maso, ki pa je lahko posledica prisotne majhne količine produkta med ostalimi nečistotami, kar je v obliki zelo šibkih

signalov za triazolno CH skupino vidno tudi v NMR spektru. Pri NMR analizi smo ugotovili, da manjka kar nekaj signalov, oziroma je njihova intenziteta prešibka, iz česar lahko sklepamo, da je sinteza potekla predvsem na neželenem mestu ali pa je produkt razpadel. Možno bi bilo tudi, da smo tekom izolacije izgubili želen produkt. Glede na zgoraj navedeno je smiselna predhodna zaščita manoznih OH skupin z acetatnimi skupinami. S tem dosežemo boljšo topnost spojin, ki v klik reakcijo vstopajo in prav tako izstopajo, kar pripomore k lažji izolaciji. Poleg tega deacetilacija poteka brez težav, kot smo videli pri sintezi spojin **27** in **28**, saj so bile tudi izgube minimalne. Predhodna acetilacija OH skupin je bila predvidena tudi za spojino **30**, vendar smo se zaradi majhne količine spojine **22** odločili za direktno sintezno pot do končne spojine.

Zgoraj omenjena reakcija sinteze dendronskih spojin spada med tako imenovane klik reakcije, za katere je značilen hiter in nereverzibilen potek reakcij v blagih pogojih z velikim izkoristkom. Poleg tega med sintezo nastajajo neškodljivi stranski produkti, ki jih lahko odstranimo z nekromatografskimi metodami (100). Poznamo več skupin klik reakcij, ena in hkrati najbolj pogosta med njimi je Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija azidov na terminalne alkine, katalizirana s Cu^+ ioni (Shema 8). Glede na uporabljen mehanizem in reagente spada uporabljena klik reakcija v to skupino. Pri reakciji med azidom in alkinom nastanejo 1,2,3-triazoli, ki so 1,4-substituirani (101, 102).



Shema 8: Mehanizem klik reakcije (prirejeno po (103)). Opomba: Cu^+ tvorbi kompleks dveh Cu^+ z dvema ligandoma, kar na shemi zaradi poenastavitve ni prikazano.

Mehanizem reakcije je tak, da se Cu^+ veže na terminalni alkin, pri tem pride do deprotonacije z organsko bazo in tvorbe Cu-acetilida. V naslednjem koraku pride do tvorbe kompleksa med vezanim Cu^+ in azidom, s čimer pride do aktivacije azida za nukleofilni napad na alkilni ogljik in izvedbo 1,3-bipolarne cikloadicije. Po tvorbi C-N vezi pride še do napada elektronskega para dušika na ogljik alkena, s čimer se obroč zapre in nastane triazol. Sledi samo še prenos odcepljenega Cu^+ na nov terminalni alkin in protonacija triazola z organsko bazo (101, 103).

Po klik reakciji je v primeru produktov **25** in **26** sledila še zadnja stopnja, pri kateri smo ponovni izvedli Zemplénovo odščito estrov s 30 % NaOMe v MeOH in DMF ob brezvodnih pogojih in argonovi atmosferi. Reakcija je v obeh primerih potekla v zadovoljivem obsegu. Pokazala pa se je težava končnih dendronskih spojin, in sicer njihova topnost. Že med samo sintezo smo imeli obilo težav s topnostjo spojin, ki pa smo jih uspešno reševali. Kljub dodatku DMF se topnosti v tem primeru ni bistveno izboljšala. Zato smo uporabili ultrazvočno kadičko, ki s pomočjo valovanja oziroma akustične kavitacije povzroča lokalna pregretja in s tem pospeši raztapljanje. Tako smo dosegli malo boljšo raztopljenost izhodne spojine, ki pa ni trajala dolgo, saj se je počasi izobarjala, kar se je samo pospešilo po dodatku NaOMe. Sinteza je potekala 72 ur, kar je posledica velikosti spojine in tudi slabe topnosti, saj sta topna in netopna količina spojine v ravnotežju, deacetilira se pa lahko samo topni del. Slaba topnost je otežila tudi izolacijo. Produkt smo sprva neuspešno poskušali prefiltrirati preko teflonskega filtra in nato uspešno preko filter papirja. Iz matičnice smo produkt izolirali s kationsko izmenjevalno smolo, potrebna je bila tudi 3-kratna koevaporacija z dietil etrom zaradi zaostanka DMF topila. NMR analiza je potrdila, da acetatnih vrhov v spektru ni več, kar kaže na uspešno izvedbo reakcije. Filtrat, ki je ostal po filtraciji, pa je bil toliko netopen, da nam ni uspelo preveriti njegovih lastnosti s TLC analizo.

Končne spojine so se pokazale s svojimi fizikalno kemijski lastnostmi kot zelo težavne, saj je bila njihova topnost precej omejena. Zaradi tega smo imeli težave pri tankoplastni kromatografiji, reakcijah, izolacijah in čiščenju produktov. Poleg tega je topnost vseh petih dendronskih spojin v NMR topilih tako nizka, da je bilo ^{13}C spektre, za katero potrebujemo malo večje koncentracije, nemogoče posneti. Ugotovili smo, da se spojine raztapljajo le v polarnih topilih, pa še to izjemno slabo, kar je povzročalo tudi velike izzive pri biološkem vrednotenju spojin.

5.3 BIOLOŠKO VREDNOTENJE

5.3.1 Vrednotenje spojin v vezavnem mestu receptorja DC-SIGN

Potencialne antagoniste receptorja DC-SIGN smo testirali na *in vitro* testnih sistemih na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Za testiranje smo izbrali oba monomera (**11** in **12**), z distančnikoma **a** (**13**) in **b** (**14**) konjugirano obliko spojine **12**, ter njuno tetravalentno prezentacijo (**27** in **28**). Monomera **11** in **12** sta bila testirana tudi s tehniko STD NMR na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Rezultati obeh testiranj so zbrani v tabeli 2. Pri samem testiranju na *in vitro* testih smo imeli težave s topnostjo spojin, saj se je pri najvišjih koncentracijah pojavila oborina (1,0, 0,8, in 0,5 mM).

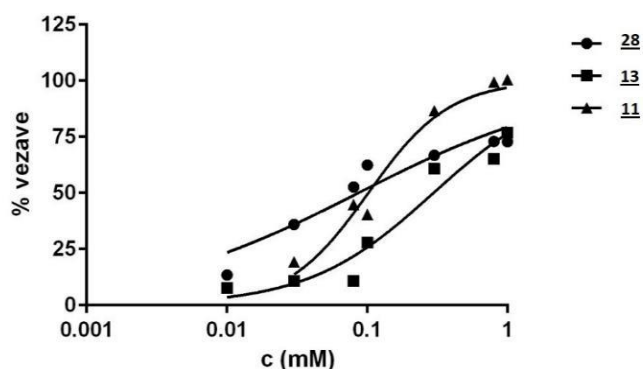
Tabela 2: Rezultati testiranja antagonistov receptorja DC-SIGN

Spojina	koncentracija	% vezave*	IC ₅₀ [mM]*	K _D [mM]**
11	0,5 mM	79,31	0,1017 ± 0,0109	0,45
	0,1 mM	64,23		
12	0,5 mM	1,63	/	0,96
	0,1 mM	-24,38		
13	0,5 mM	48,53	0,2962 ± 0,0513	/
	0,1 mM	-20,58		
14	0,5 mM	-13,35	/	/
	0,1 mM	-28,22		
27	0,5 mM	-23,45	/	/
	0,1 mM	-36,27		
28	0,5 mM	30,67	0,0861 ± 0,0201	/
	0,1 mM	15,68		

*Določeno na testnih sistemih *in vitro*.

**Določeno s tehniko STD NMR.

Izbranim spojinam smo na testnih sistemih v dveh koncentracijskih območjih določili



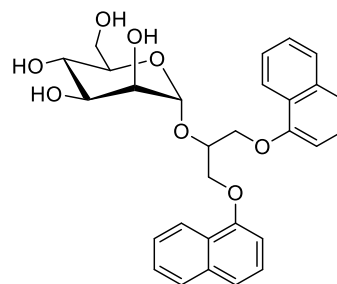
Slika 13: Graf % vezave spojine v odvisnosti od koncentracije.

odstotek vezave glede na pozitivno kontrolo (gp120-biotin). Afiniteto do receptorja v preiskovanem koncentracijskem območju so pokazale samo tri spojine, **11**, **13** in **28**, med katerimi je prva imela najmočnejšo vezavo. Spojine **12**, **14** in **27** se niso vezale niti v 0,5 mM

koncentraciji. Primerjava obeh monomernih oblik brez vezanih distančnikov nam glede na rezultate poda sklep, da imajo spojine z zaščiteno karboksilno kislino višjo afiniteto do receptorja, kar je verjetno posledica dejstva, da negativno nabita karboksilna kislina (spojina **12**) ovira vezavo. To si lahko razlagamo s tem, da ob vezavi molekule v vezavno mesto v hidrofobnem žepu, v katerega se naj bi vezal fenilkarboksilatni fragment, pride do odboja med π elektronskim oblakom aminokislinskega ostanka Phe313 in anionskim nabojem karboksilata. Poleg tega lahko pride tudi do odboja z drugimi aminokislinskimi ostanki, ki določajo hidrofobni žep. Iz rezultatov je torej razvidno, da v hidrofobnem žepu ne pride do vzpostavitve ustreznih vezi s karboksilatom, zato je smiselna njegova zamenjava ali pretvorba v estersko obliko. Pri sintetiziranih konjugatih je zanimivo, da se spojina **28**, ki je tetravalent spojine **14**, veže na receptor, medtem ko se njen monovalent ne. Razloga za to sta lahko dva. Eden je ta, da se pozitivno nabit piperazinski obroč distančnika **b** v tetravalentni obliki lažje skrije pred hidrofobnimi ali pozitivno nabitimi aminokislinskimi ostanki receptorja in posledično ne pride do odboja, drugi in bolj verjeten pa ta, da je afiniteta do receptorja veliko višja ob povečani avidnosti vezave in tetravalentni prezentaciji. V primeru distančnika **a** je ravno obratno, saj se monovalent veže v vezavno mesto, medtem ko se v tetravalentni obliki ne. Razlog za to bi lahko bil v manjši hidrofilnosti distančnika, ki se v tetravalentni obliki samo še zmanjša. Tetravalentna oblika je tudi veliko slabše topna v večini topil, kar bi lahko bil tudi vzrok za lažno nižjo inhibicijo receptorja.

Spojinam z najvišjimi deleži vezave pri obeh koncentracijah smo nato določali odstotek vezave pri različnih koncentracijah (od 0,001-1,0 mM). Rezultati so grafično prikazani na sliki 13. V primerjavi z rezultati testiranja spojin v dveh koncentracijskih točkah so rezultati v več koncentracijskih točkah podali popolnoma drugačne % vezave (glej tabelo 2) – veliko boljše, zato bi bilo smiselno prvotno testiranje ponoviti ali pa testirati vse spojine tudi pri dodatnih koncentracijah. Iz dobljenih rezultatov smo vseeno določili vrednosti IC_{50} , ki predstavlja koncentracijo antagonista, ob kateri pride do 50 % zaviranja vezave gp120 na receptor (Tabela 2) glede na pozitivno kontrolo. Najnižji IC_{50} in s tem najboljšo inhibicijo vezave gp120 na receptor ima tetravalentna dendronska spojina **28** z $IC_{50} = 86,1 \mu M$, medtem ko sta monomera v milimolarnem območju z IC_{50} vrednostima $101,7 \mu M$ (**11**) in $296,2 \mu M$ (**13**). Sintetizirana monomera sta primerljiva z do sedaj znanimi monomernimi antagonisti. Razlika med njima in najboljšim monomernim

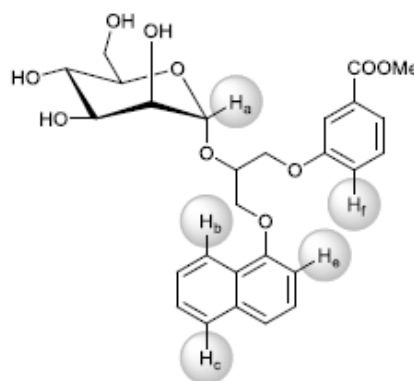
antagonistom je en velikostni razred (Slika 7, spojina z $IC_{50} = 6,86 \mu M$). Spojini **11** in **12** sta izhajali iz dobljenih rezultatov predhodnih izsledkov, zato sta vsebovali tudi za vezavo najustreznejši naftilni fragment. Če primerjamo vrednosti IC_{50} , smo s spojinama **11** in **12** nazadovali iz $40 \mu M$ (spojina na sliki 14) (16) na $101 \mu M$. To pomeni, da derivat benzoata s stališča afinitete ni ustrezna alternativa naftilnega fragmenta, kljub temu da smo izboljšali topnost. Pa vendar je treba te rezultate gledati skozi drugačno prizmo – afiniteto je najlažje povečati z lipofilnimi substituenti, ki tvorijo nespecifične vdW ali hidrofobne interakcije in katere temeljijo na povečanju entropijskih prispevkov. Bistveno težje je oblikovati spojine, katerih vezava temelji na entalpijskih prispevkih, a imajo te ponavadi ustreznejše fizikalno-kemijske lastnosti. Kot je bilo že prej omenjeno, je spojina **28** pokazala največji potencial, kar je po eni strani pričakovano, saj so tetravalentne predstavitve monomerov v predhodnih



Slika 14: Spojina z dvema naftilnima skupinama in $IC_{50} = 40 \mu M$ (16).

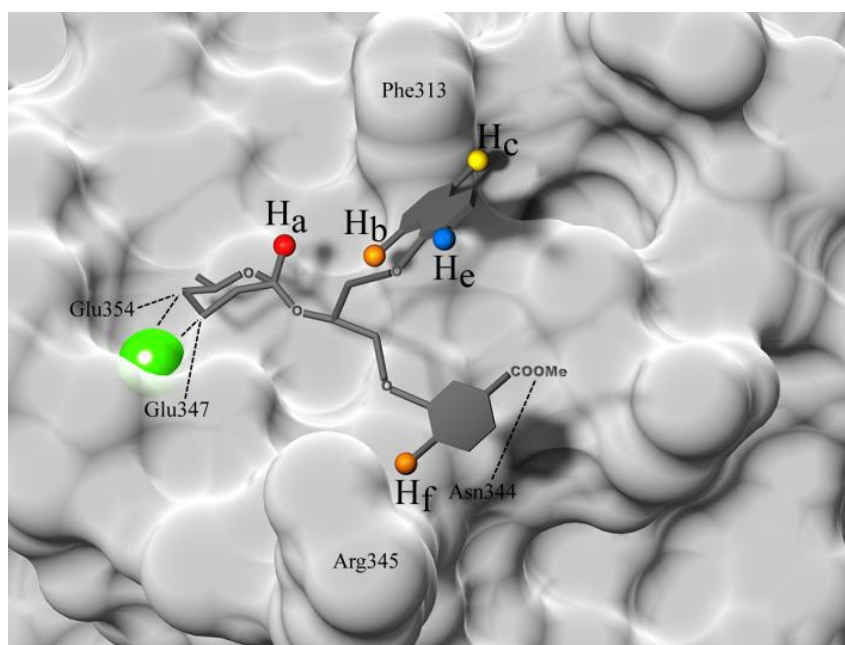
študijah pokazale veliko višjo inhibicijo v primerjavi z monomeri, po drugi strani pa je ta vezava dokaj slaba v primerjavi z ostalimi dendronskimi spojinami, kjer so raziskovalci s podobnimi dosegli tudi do 3 razrede boljšo afiniteto (75, 78, 84). S tetravalentno predstavitvijo monomerov torej ponovno dokažemo, da je ta nujna, saj imajo monomeri nizko afiniteto napram multimerom. Poleg tega se dendronske spojine lažje povezujejo z več enotami CRD, kar bolj posnema dejansko stanje ob vezavi patogena na receptor in v našem primeru rezultira v večji avidnosti vezave.

Vezava spojin **11** in **12** na domeno CRD receptorja DC-SIGN je bila prav tako ovrednotena s tehniko STD NMR, kjer smo podrobno preučili vezavo obeh spojin na receptor in določili njuno afiniteto do receptorja (Slika 16) (17). Za obe spojinii je bilo potrjeno, da imata manopiranozni obroč v najtesnejšem stiku z receptorjem in dodatni efekti prav tako nakazujejo, da je manozni obroč najmočneje vezan v vezavno mesto. V nadaljevanju je bila narejena primerjava med posameznimi protoni, ki imajo prav tako vpliv na vezavo. Za lažjo interpretacijo so na sliki 15 označeni posamezni protoni (17).



Slika 15: Spojina **11** z označenimi protoni, ki so bili analizirani s tehniko STD NMR. Prirejeno po (17).

S STD NMR smo ugotovili, da so parametri pri protonu H_c primerljivi, kar kaže tvorbo predvidenih hidrofobnih in π - π vezi s Phe313. Se pa vrednosti razlikujejo za H_b in H_e , kar nakazuje na različno pozicioniranje naftilnega fragmenta v vezavno mesto v odvisnosti od drugih fragmentov. S povečanjem lipofilnosti v primeru estra je bila dosežena močnejša interakcija z vezavnim mestom protona H_f in prav tako naftilnih protonov v primerjavi s spojino **12** iz česar lahko sklepamo, da že sama lipofilnost oziroma sprememba funkcionalne skupine vpliva tako na lego tako fenilne skupine, kot tudi naftilne skupine. V primeru spojine **11** so vsi z izjemo H_b protona kazali močnejšo vezavo v primerjavi s spojino **12**, kar potrjuje našo domnevo, da zaradi negativnega odboja karboksilne kisline pride do odboja tako fenilnega fragmenta, kot tudi do spremembe lege naftilnega. Pri analizi vezave je bilo prav tako ugotovljeno, da se karboksilat ne veže na predviden aminokislinski ostanek (Arg345) v hidrofobnem žepu, ampak verjetno na Asn344. Je pa ta vezava precej šibka in nima velikega vpliva na vezavo v vezavno mesto (17).



Slika 16: Predikcija pozicioniranja spojine **11** v vezavnem mestu (prirejeno po (17)).

Prav tako so bile določene vrednosti K_D spojinama **11** in **12**, ki sta potrdili predhodne razlike v afiniteti med obema spojinama (Tabela 2). Kot je razvidno iz tabele, je prišlo tudi do odstopanj med vrednostjo K_D določeno s tehniko STD NMR in vrednostjo IC_{50}

dobljeno na *in vitro* testnih sistemih, za kar je lahko več razlogov. Razlika je pričakovana, saj so navadno dobljeni rezultati s STD NMR višji ali enaki *in vitro* vrednostim. Razlogi za razliko sta lahko priprava vzorca in uporabljeno topilo, ki nista bila enaka. Dodamo lahko še slabo topnost spojin oziroma tvorbo agregatov v primeru STD NMR in prav tako na *in vitro* testih, ki bi lahko z nespecifičnimi interakcijami dajali lažne rezultate. Slednje je tudi največja pomanjkljivost sistema napram *in vitro* testnim sistemom, kjer naj ne bi prihajalo do nespecifičnih vezav. Kot zadnji razlog bi lahko bila razlika v kinetiki vezave (17). Iz

podatkov iz kinetične študije lahko sklepamo, da prihaja do hitrih izmenjav ligandov v vezavnem mestu in prav tako do izmenjav obeh hidrofobnih skupin med dvema vezavnima mestoma Phe313 in Asn344/Arg345 zaradi glibljivosti vmesnega glicerolnega distančnika. Oboje vodi v šibkejšo interakcijo.

Če povzamemo in opišemo interakcije med spojinama in vezavnim mestom, ki so bile tudi potrjene z molekulskim sidranjem, je spojina pozicionirana v vezavno mesto receptorja tako, da tvori dve koordinativni vezi, in sicer med 3-OH in 4-OH skupinama manozida in Ca^{2+} ionom receptorja, in prav tako dve vodikovi vezi z Glu347 in Glu354. Ostale OH skupine pa najbrž tvorijo vodikove vezi z Asn349, Asn365, Lys368. Ostali deli spojine so pokazali šibke interakcije, predvsem monomerni glicerolni distančnik, ki se nahaja med obema hidrofobnima fragmentoma. Izmed aromatskih protonov je najbližje receptorju H_b , sledi H_c (rumena) in z najšibkejšimi interakcijami H_e (moder) (Slika 16). Poleg tega glicerolni distančnik omogoča pozicijo fenilne skupine v nekoliko bolj polarno območje, kjer pride do tvorbe vodikove vezi med metilnim estrom in Asn344 in do kontakta z Arg345 (možna kation- π interakcija).

5.3.2 Vrednotenje spojin v vezavnem mestu receptorja FimH

Za receptor FimH je znano, da tudi veže različne manozide. Zaradi tega dejstva smo sintetizirane spojine poslali na *in vitro* testiranje na omenjenem receptorju. Od 6 testiranih spojin je bilo moč določiti vrednost K_D samo trem zaradi že prej omenjene slabe topnosti (Tabela 3). Vrednosti posameznih spojin so v spodnjem nanomolarnem območju na domeni CRD

Tabela 3: Rezultati testiranja potencialnih antagonistov receptorja FimH

Spojina	K_D na celotnem FimH [μM]	K_D na FimH CRD domeni [nM]
<u>11</u>	*	
<u>12</u>	$7,9 \pm 0,6$	$95,1 \pm 31,8$
<u>13</u>	$23,7 \pm 4,2$	$273,3 \pm 97,1$
<u>14</u>	$7,1 \pm 4,2$	$88,3 \pm 65,6$
<u>27</u>	*	
<u>28</u>	*	

*Zaradi slabe topnosti, določitev K_D ni bila mogoča.

receptorja FimH in spodnjem mikromolarnem območju na celotnem FimH. Spojini **12** in **14** spadata med močne antagoniste receptorja FimH. Iz rezultatov je razvidno, da je konstanta disociacije za spojini **12** in **14** primerljiva, kar pomeni, da se z vezavo

piperazinskega distančnika inhibicija signifikatno ne spremeni, medtem ko se z vezavo etilenglicerolnega distančnika izgubi afiniteta do receptorja. Iz tega sledi, da je za višjo afiniteto nujen naboj, bodisi negativni naboj karboksilne kisline bodisi pozitivni naboj piperazinskega obroča. Glede na netopnost določenih spojin so za ustrezno vrednotenje nujne hidrofilne lastnosti. Če lahko potegnemo vzporednico s pozicioniranjem že znanih spojin v vezavno mesto, se manoza z vodikovimi vezmi veže na aminokislinske ostanke, naftilni fragment v t. i. »tirozinska vrata« in karboksilna skupina z ionskimi vezmi na Arg98 (86).

Spojine so bile razvite na podlagi strukture vezavnega mesta receptorja DC-SIGN, vendar pa so se izkazale kot mnogo boljši antagonisti receptorja FimH. Razlog je v boljše definiranem vezavnem mestu in boljšem prileganju sintetiziranih spojin v samo vezavno mesto receptorja FimH.

6 SKLEP IN ZAKLJUČEK

Sintezni načrt dela je v popolnosti uspel in nas z manjšimi modifikacijami pripeljal do dveh monomernih in dveh multimernih spojin. Zaradi nizkih izkoristkov in težav pri določenih stopnjah sintezne poti smo le-to začeli trikrat in jo naposled le pripeljali do konca. Največja težava so bili slabi izkoristki, ki niso bili posledica dela, ampak obnašanja spojin med izolacijo, in topnost slednjih. Pot preko benzilnega estra se je izkazala za zelo težavno s slabimi izkoristki in težavami pri izolaciji, kar smo z uporabo metilnega estra signifikantno izboljšali. K izboljšanju sta pripomogla tudi uporaba KOH v katalitski količini pri odpiranju oksiranskega obroča in zaporedna odščita zašitnih OH in COOH skupin, brez vmesne izolacije, ki povzroča izgube. Zaščita manoznih OH skupin pred klik reakcijo je nujna, saj so izkoristki veliko višji. Zaradi hitrosti in uporabe nižje temperature je smotrna uporaba klik reakcij pri sintezi dendronskih spojin.

Kot najmočnejši antagonist DC-SIGN se je izkazala dendronska spojina **28**, kar je skladno s pričakovanji in odkritji ostalih raziskovalnih skupin. Poleg tega smo ugotovili, da negativni naboj karboksilata oteži vezavo. Uporaba distančnikov je nujna za večvalentno prezentacijo monomerov in njihovo vezavo z več enotami CRD receptorja DC-SIGN hkrati, pri čemer pa lahko dosežemo inhibicijo tudi v nanomolarnem območju. Poleg tega z distančniki vplivamo na hidrofilnost in prav tako na gibljivost, zaradi česar pride do lažje vezave posameznih monomerov z receptorjem. Etilenglicerolni distančnik se je izkazal za

neprimerne zaradi svoje slabše hidrofilnosti, medtem ko je distančnik s piperazinskim fragmentom boljši. V primerjavi z dinaftilnim monomerom smo s povečanjem hidrofilnih lastnosti s spojino **12** izgubili afiniteto do receptorja. Topnost spojin kljub dodatku hidrofilnih fragmentov še vedno ni zadostna in je povzročala težave pri sintezi in prav tako pri testiranjih na testih *in vitro*. Zaradi težav s topnostjo in zaradi same kompleksnosti spojine bi bila težavna tudi aplikacija. Možna in smiselna bi bila le topikalna pred samim spolnim odnosom.

Čeprav nismo sintetizirali terapevtsko uporabnih spojin, pa smo dobili določene nove izsledke, ki bojo koristili v nadaljevanju razvoja antagonistov DC-SIGN. Kaj so torej izsledki, ki so lahko koristni pri sestavi bodočih antagonistov? Za vezavo je še vedno nujna manoza, ki bi bila lahko tudi v obliki α -(1,2)-bimanozida, ker se je pri določenih študijah izkazala za močnejšega inhibitorja. Preko gibljivega in zadosti dolgega monomernega distančnika je smotrno pripenjanje lipofilnega fragmenta za vezavo s Phe313, ter na drugi strani fragmenta, ki bi vstopal v hidrofojni žep in bi hkrati interagiral preko vodikove ali kation- π vezi z Asn344 ali Arg345. Prav tako je še nekaj prostora pri uporabi distančnikov, preko katerih bi lahko izboljšali topnost in razpoložljivost monomerov. Kot je bilo že velikokrat omenjeno, topnost tako velikih in kompleksnih spojin je izziv in bo to tudi ostala.

Pri sintezi antagonistov lektinskih tarč naletimo na problem selektivnosti, saj so si spojine med seboj zelo podobne, vendar pa, kot smo videli pri DC-SIGN in FimH, lahko že minimalne modifikacije znatno vplivajo na samo afiniteto do posameznega receptorja. V našem primeru so bile sintetizirane spojine močnejši antagonisti receptorja FimH, celo v nižjem nanomolarnem območju (spojini **12** in **14**), kljub temu, da so bile sintetizirane na podlagi molekulskega modeliranja in sidranja v vezavno mesto receptorja DC-SIGN. Je pa pomembno, da smo na selektivnost med tarčami pozorni, saj je ta nujna za zagotavljanje varnosti in učinkovitosti potencialnih terapevtikov.

Antagonisti receptorja DC-SIGN imajo velik terapevtski potencial. Kot smo videli, je to receptor, ki sodeluje pri okužbah z mnogimi patogeni, zato bi blo smiselno vlagati čas in denar v njegove raziskave in pripravo njegovih antagonistov. V času, ko se borimo z rezistenco na protimikrobna zdravila, bi bilo odkritje učinkovitih antiadhezivnih terapevtikov več kot dobrodošlo.

7 LITERATURA

1. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. Biochemistry. 8th ed. in pp 333-335 (W. H. Freeman, 2010).
2. Nelson, D. L. & Cox, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry 6th ed. in pp 262 (W. H. Freeman, 2013).
3. Drickamer, K. & Taylor, M. E. Recent insights into structures and functions of C-type lectins in the immune system. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **34**, 26–34 (2015).
4. Cummings, R. D. & McEver, R. P. Essentials of Glycobiology. 2nd ed. in Chapter 31 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
5. Geijtenbeek, T. B. . *et al.* Identification of DC-SIGN, a Novel Dendritic Cell–Specific ICAM-3 Receptor that Supports Primary Immune Responses. *Cell* **100**, 575–585 (2000).
6. Feinberg, H. Structural Basis for Selective Recognition of Oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science (80-.)*. **294**, 2163–2166 (2001).
7. Geijtenbeek, T. B. H. *et al.* Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J. Biol. Chem.* **277**, 11314–11320 (2002).
8. Mitchell, D. A., Fadden, A. J. & Drickamer, K. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J. Biol. Chem.* **276**, 28939–28945 (2001).
9. Feinberg, H., Guo, Y., Mitchell, D. A., Drickamer, K. & Weis, W. I. Extended neck regions stabilize tetramers of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *J. Biol. Chem.* **280**, 1327–1335 (2005).
10. Tabarani, G. *et al.* DC-SIGN neck domain is a pH-sensor controlling oligomerization. Saxs and hydrodynamic studies of extracellular domain. *J. Biol. Chem.* **284**, 21229–21240 (2009).
11. Cambi, A. *et al.* Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *J. Cell Biol.* **164**, 145–155 (2004).

12. Anderluh, M. DC-SIGN Antagonists – A Paradigm of C-Type Lectin Binding Inhibition. *Carbohydrates- Compr. Stud. Glycobiol. Glycotechnol.* 137–160 (2012).
13. Švajger, U., Anderluh, M., Jeras, M. & Obermajer, N. C-type lectin DC-SIGN: An adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell. Signal.* **22**, 1397–1405 (2010).
14. Weis, W. I., Drickamer, K. & Hendrickson, W. A. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* **360**, 127–134 (1992).
15. Guo, Y. *et al.* Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 591–598 (2004).
16. Tomašić, T. *et al.* Monovalent mannose-based DC-SIGN antagonists: Targeting the hydrophobic groove of the receptor. *Eur. J. Med. Chem.* **75**, 308–326 (2014).
17. Kotar, A. *et al.* STD NMR and molecular modelling insights into interaction of novel mannose-based ligands with DC-SIGN. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 862–875 (2016).
18. Aretz, J. *et al.* Identification of Multiple Druggable Secondary Sites by Fragment Screening against DC-SIGN. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 1–6 (2017).
19. Figdor, C. G., Kooyk, Y. Van & Adema, G. J. C-Type Lectin Receptors on Dendritic Cells and. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 2740 (2002).
20. Garcia-Vallejo, J. J. & van Kooyk, Y. The physiological role of DC-SIGN: A tale of mice and men. *Trends Immunol.* **34**, 482–486 (2013).
21. Gringhuis, S. I., den Dunnen, J., Litjens, M., van der Vlist, M. & Geijtenbeek, T. B. H. Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to Mycobacterium tuberculosis, HIV-1 and Helicobacter pylori. *Nat. Immunol.* **10**, 1081–1088 (2009).
22. Mason, C. P. & Tarr, A. W. Human lectins and their roles in viral infections. *Molecules* **20**, 2229–2271 (2015).
23. Kwon, D. S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W. A. & Littman, D. R. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell

- infection. *Immunity* **16**, 135–144 (2002).
24. van Kooyk, Y. & Geijtenbeek, T. B. H. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 697–709 (2003).
 25. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767–811 (2000).
 26. Anderluh, M., Jug, G., Svajger, U. & Obermajer, N. DC-SIGN Antagonists, a Potential New Class of Anti-Infectives. *Curr. Med. Chem.* **19**, 992–1007 (2012).
 27. Who | Hiv/Aids. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>. (Accessed: 17th July 2017).
 28. Global HIV and AIDS statistics | AVERT. Available at: <http://www.avert.org/global-hiv-and-aids-statistics>. (Accessed: 17th July 2017).
 29. Tsegaye, T. S. & Pöhlmann, S. The multiple facets of HIV attachment to dendritic cell lectins. *Cellular Microbiology* **12**, 1553–1561 (2010).
 30. Cambi, A., Beeren, I., Joosten, B., Fransen, J. A. & Figdor, C. G. The C-type lectin DC-SIGN internalizes soluble antigens and HIV-1 virions via a clathrin-dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.* **39**, 1923–1928 (2009).
 31. Trumpfheller, C., Park, C. G., Finke, J., Steinman, R. M. & Granelli-Piperno, A. Cell type-dependent retention and transmission of HIV-1 by DC-SIGN. *Int. Immunol.* **15**, 289–298 (2003).
 32. Sodhi, A., Montaner, S. & Gutkind, J. S. Viral hijacking of G-protein-coupled-receptor signalling networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 998–1012 (2004).
 33. Van Kooyk, Y., Appelmelk, B. & Geijtenbeek, T. B. H. A fatal attraction: Mycobacterium tuberculosis and HIV-1 target DC-SIGN to escape immune surveillance. *Trends in Molecular Medicine* **9**, 153–159 (2003).
 34. Schembri, M. A., Kjaergaard, K., Sokurenko, E. V & Klemm, P. Molecular characterization of the Escherichia coli FimH adhesin. *J. Infect. Dis.* S28-31 (2001).
 35. Mydock-McGrane, L. K., Cusumano, Z. T. & Janetka, J. W. Mannose-derived

- FimH antagonists: a promising anti-virulence therapeutic strategy for urinary tract infections and Crohn's disease. *Expert Opin. Ther. Pat.* **26**, 175–197 (2016).
36. Bader, M. S., Loeb, M. & Brooks, A. A. An update on the management of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance. *Postgrad. Med.* **129**, 242–258 (2017).
 37. Bouckaert, J. *et al.* Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the Escherichia coli FimH adhesin. *Mol. Microbiol.* **55**, 441–455 (2005).
 38. Krachler, A. M. & Orth, K. Targeting the bacteria–host interface. *Virulence* **4**, 284–294 (2013).
 39. Kline, K. A., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S. & Henriques-Normark, B. Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. *Cell Host Microbe* **5**, 580–592 (2009).
 40. Sharon, N. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1760**, 527–537 (2006).
 41. Baorto, D. M. *et al.* Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature* **389**, 636–639 (1997).
 42. Malaviya, R. & Abraham, S. N. Mast cell modulation of immune responses to bacteria. *Immunol. Rev.* **179**, 16–24 (2001).
 43. Martinez, J. J., Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Pinkner, J. S. & Hultgren, S. J. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J.* **19**, 2803–12 (2000).
 44. Wright, K. J., Seed, P. C. & Hultgren, S. J. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic Escherichia coli depends on type 1 pili. *Cell. Microbiol.* **9**, 2230–2241 (2007).
 45. Yan, F. & Polk, D. B. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **20**, 565–571 (2004).
 46. Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. Pathogenic Escherichia coli. *Nat. Rev.*

- Microbiol.* **2**, 123–140 (2004).
47. Ronald, A. The etiology of urinary tract infection: Traditional and emerging pathogens. *Disease-a-Month* **49**, 71–82 (2003).
 48. Bower, J. M., Eto, D. S. & Mulvey, M. A. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the Urinary Tract. *Traffic* **6**, 18–31 (2005).
 49. Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Martinez, J. J. & Hultgren, S. J. Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8829–35 (2000).
 50. Wiles, T. J., Kulesus, R. R. & Mulvey, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp. Mol. Pathol.* **85**, 11–19 (2008).
 51. Eto, D. S., Jones, T. A., Sundsbak, J. L. & Mulvey, M. A. Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* **3**, 0949–0961 (2007).
 52. Mulvey, M. A., Schilling, J. D. & Hultgren, S. J. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect. Immun.* **69**, 4572–4579 (2001).
 53. Anderson, G. G. Intracellular Bacterial Biofilm-Like Pods in Urinary Tract Infections. *Science (80-.).* **301**, 105–107 (2003).
 54. Sharon, N. & Lis, H. Lectins as cell recognition molecules. *Science (80-.).* **246**, 227–234 (1989).
 55. WHO | Antimicrobial resistance. WHO Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. (Accessed: 17th July 2017).
 56. HIV/AIDS Treatment - Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection. Available at: <https://www.fda.gov/forpatients/illness/hiv aids/treatment/ucm118915.htm>. (Accessed: 18th July 2017).
 57. Holla, A. & Skerra, A. Comparative analysis reveals selective recognition of glycans by the dendritic cell receptors DC-SIGN and Langerin. *Protein Eng. Des.*

- Sel.* **24**, 659–669 (2011).
58. Bertolotti, B. *et al.* Nonhydrolyzable C-disaccharides, a new class of DC-SIGN ligands. *Carbohydr. Res.* **435**, 7–18 (2016).
 59. Snyder, G. A. *et al.* Characterization of DC-SIGN/R Interaction with Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 and ICAM Molecules Favors the Receptor's Role as an Antigen-Capturing Rather than an Adhesion Receptor. *J. Virol.* **79**, 4589–4598 (2005).
 60. Andreini, M. *et al.* Second generation of fucose-based DC-SIGN ligands : affinity improvement and specificity versus Langerin. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 5778 (2011).
 61. Timpano, G. *et al.* Synthesis of novel DC-SIGN ligands with an alpha-fucosylamide anchor. *Chembiochem* **9**, 1921–30 (2008).
 62. Garber, K. C. A., Wangkanont, K., Carlson, E. E. & Kiessling, L. L. A general glycomimetic strategy yields non-carbohydrate inhibitors of DC-SIGN. *Chem. Commun.* **46**, 6747 (2010).
 63. Mitchell, D. A. *et al.* Synthesis of 2-C-branched derivatives of D-mannose: 2-C-aminomethyl-D-mannose binds to the human C-type lectin DC-SIGN with affinity greater than an order of magnitude compared to that of D-mannose. *Tetrahedron Asymmetry* **18**, 1502–1510 (2007).
 64. Reina, J. J. *et al.* 1,2-mannobioside mimic: Synthesis, DC-SIGN interaction by NMR and docking, and antiviral activity. *ChemMedChem* **2**, 1030–1036 (2007).
 65. Tamburrini, A. *et al.* Facile access to pseudo-thio - 1,2 - dimannoside, a new glycomimetic DC-SIGN antagonist. *Bioorg. Med. Chem.* (2017).
 66. Sattin, S. *et al.* Inhibition of DC-SIGN-mediated HIV infection by a linear trimannoside mimic in a tetravalent presentation. *ACS Chem. Biol.* **5**, 301–312 (2010).
 67. Mari, S. *et al.* Synthesis and conformational analysis of an α -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-mannopyranose mimic. *Carbohydr. Res.* **342**, 1859–1868 (2007).

68. Obermajer, N. *et al.* Design, synthesis and activity evaluation of mannose-based DC-SIGN antagonists. *Mol. Divers.* **15**, 347–360 (2011).
69. Rojo, J. & Delgado, R. Glycodendritic structures: Promising new antiviral drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**, 579–581 (2004).
70. Lasala, F., Arce, E., Otero, J. R., Rojo, J. & Delgado, R. Mannosyl Glycodendritic Structure Inhibits DC-SIGN-Mediated Ebola Virus Infection in cis and in trans. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3970–3972 (2003).
71. Tabarani, G. *et al.* Mannose hyperbranched dendritic polymers interact with clustered organization of DC-SIGN and inhibit gp120 binding. *FEBS Lett.* **580**, 2402–2408 (2006).
72. Bernardi, A. & Cheshev, P. Interfering with the sugar code: Design and synthesis of oligosaccharide mimics. in *Chemistry - A European Journal* **14**, 7434–7441 (2008).
73. Luczkowiak, J. *et al.* Pseudosaccharide functionalized dendrimers as potent inhibitors of DC-SIGN dependent ebola pseudotyped viral infection. *Bioconjug. Chem.* **22**, 1354–1365 (2011).
74. Wang, S.-K. *et al.* Targeting the carbohydrates on HIV-1: Interaction of oligomannose dendrons with human monoclonal antibody 2G12 and DC-SIGN. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 3690–3695 (2008).
75. Cecioni, S. *et al.* Rational design and synthesis of optimized glycoclusters for multivalent lectin-carbohydrate interactions: Influence of the linker arm. *Chem. - A Eur. J.* **18**, 6250–6263 (2012).
76. Luczkowiak, J. *et al.* Glycofullerenes inhibit viral infection. *Biomacromolecules* **14**, 431–437 (2013).
77. Becer, C. R. *et al.* High-affinity glycopolymer binding to human DC-SIGN and disruption of DC-SIGN interactions with HIV envelope glycoprotein. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 15130–15132 (2010).
78. Martínez-Ávila, O. *et al.* Gold manno-glyconanoparticles: Multivalent systems to block HIV-1 gp120 binding to the lectin DC-SIGN. *Chem. - A Eur. J.* **15**, 9874–

- 9888 (2009).
79. Di Gianvincenzo, P., Chiodo, F., Marradi, M. & Penadés, S. Gold manno-Glyconanoparticles for Intervening in HIV gp120 Carbohydrate-Mediated Processes. *Methods Enzymol.* **509**, 21–40 (2012).
 80. Arosio, D. *et al.* Effective targeting of DC-sign by α -fucosylamide functionalized gold nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* **25**, 2244–2251 (2014).
 81. Dehuyser, L. *et al.* Synthesis of novel mannoside glycolipid conjugates for inhibition of HIV-1 trans -infe1. Dehuyser, L. *et al.* Synthesis of novel mannoside glycolipid conjugates for inhibition of HIV-1 trans -infection. *Bioconjug. Chem.* **23**, 1731–1739 (2012).
 82. Bertolotti, B. *et al.* Polyvalent C-glycomimetics based on L-fucose or D-mannose as potent DC-SIGN antagonists. *Org. Biomol. Chem.* **15**, 3995–4004 (2017).
 83. Berzi, A. *et al.* Pseudo-mannosylated DC-SIGN Ligands as potential adjuvants for HIV vaccines. *Viruses* **6**, 391–403 (2014).
 84. Berzi, A. *et al.* Pseudo-Mannosylated DC-SIGN Ligands as Immunomodulants. *Sci. Rep.* **6**, 35373 (2016).
 85. Borrok, M. J. & Kiessling, L. L. Non-carbohydrate inhibitors of the lectin DC-SIGN. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 12780–12785 (2007).
 86. Tomašić, T. *et al.* Branched α - D -mannopyranosides: a new class of potent FimH antagonists. *Medchemcomm* **5**, 1247 (2014).
 87. Hajšek, D. Testni sistem za določanje afinitete antagonistov receptorja DC-SIGN in vitro. (Fakulteta za farmacijo, 2012).
 88. Kleeb, S. *et al.* Supporting Information of FimH Antagonists - Bioisosteres to Improve the in vitro and in vivo PK / PD Profile. *J. Med. Chem* **58**, 1–32 (2015).
 89. Chauvel, A. & Lefebvre, G. Petrochemical processes. in *Petrochemical processes* pp 31-33 (Technip Editions, 2004).
 90. Pratap Singh, P. & S Chauhan, S. M. Synthetic Communications Chemoselective

Esterification of Phenolic Acids in the Presence of Sodium Bicarbonate in Ionic Liquids Chemoselective Esterification of Phenolic Acids in the Presence of Sodium Bicarbonate in Ionic Liquids. *Synth. Commun.* **386**, 928–936 (2008).

91. Bastos, E. L., Leite Ciscato, L. F. M., Weiss, D., Beckert, R. & Baader, W. J. Comparison of convenient alternative synthetic approaches to 4-[(3-tert-butyltrimethylsilyloxy)phenyl]-4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3, 2'-adamantane]. *Synthesis (Stuttg)*. **11**, 1781–1786 (2006).
92. Anderluh, M., Mravljak, J., Perdih, A., Sova, M. & Pecar, S. *Farmacevtska kemija III: vaje in seminarji*. (Fakulteta za farmacijo, 2010).
93. Clayden, Jonathan; Greeves, Nick; Warren, S. Organic Chemistry. in pp 199, 214-215, 747-748, 1064 (Oxford University Press, 2012).
94. Smith, M. B. & March, J. March's advanced organic chemistry. in pp 1064-1065 (Wiley, 2007).
95. Garg, H. G., Cowman, M. K. & Hales, C. A. Carbohydrate Chemistry, Biology and Medical Applications. in pp 62 (Elsevier Science, 2008).
96. Wang, Z. Comprehensive organic name reactions and reagents. in pp 3123-3126 (Wiley, 2009).
97. Zweckmair, T. *et al.* A novel method to analyze the degree of acetylation in biopolymers. *J. Chromatogr. A* **1372**, 212–220 (2014).
98. Lamut, A. Sinteza in biološko vrednotenje dendronskih antagonistov receptorja DC-SIGN. *Magistrsko delo* (Fakulteta za farmacijo, 2014).
99. Montalbetti, C. A. G. N. & Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **61**, 10827–10852 (2005).
100. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie - International Edition* **40**, 2004–2021 (2001).
101. Himo, F. *et al.* Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 210–216 (2005).

102. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective 'ligation' of azides and terminal alkynes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **41**, 2596–2599 (2002).
103. Bock, V. D., Hiemstra, H. & Van Maarseveen, J. H. Cu I-catalyzed alkyne-azide 'click' cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. *European J. Org. Chem.* **2006**, 51–68 (2006).
104. Vrtačnik, K. Sinteza monovalentnih in tetravalentnih glicerolmanozidov kot potencialnih antagonistov receptorja DC-SIGN. *Magistrsko delo* (Fakulteta za farmacijo, 2014).

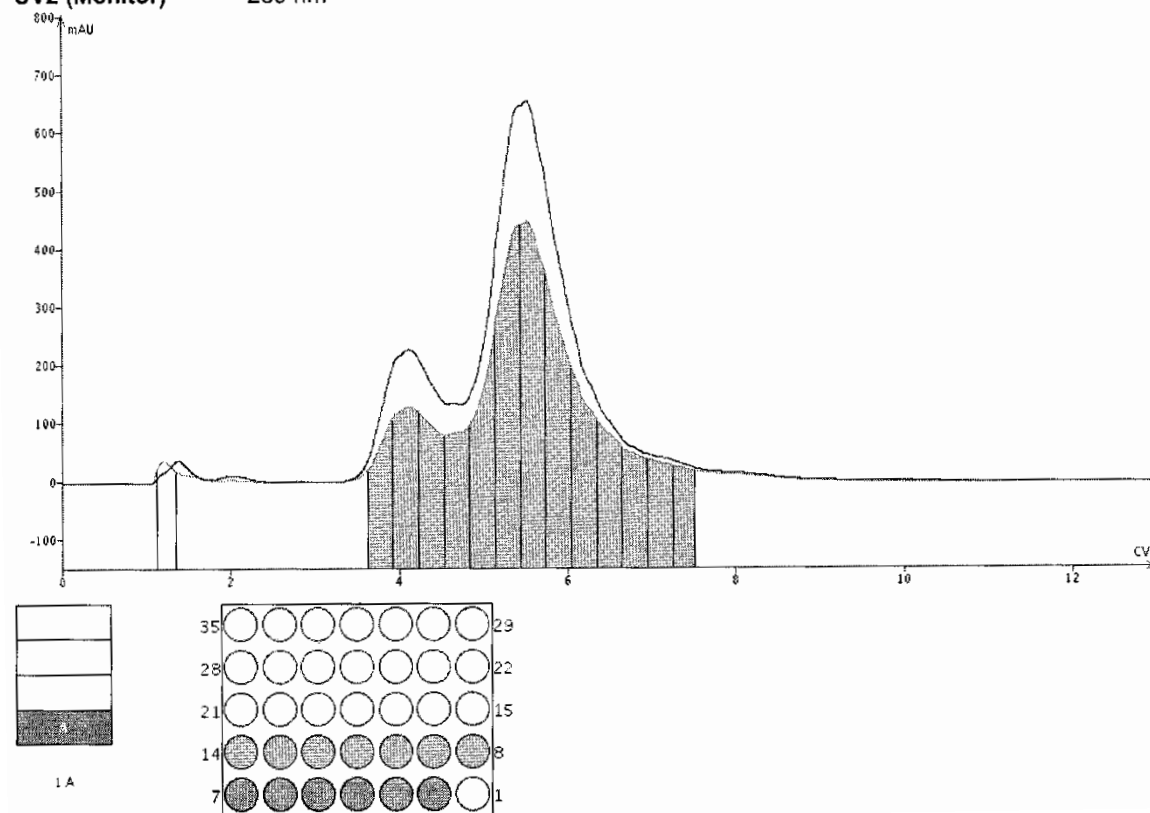
8 PRILOGE

Priloga 1: Podatki o reverznofazni ločbi spojine 30

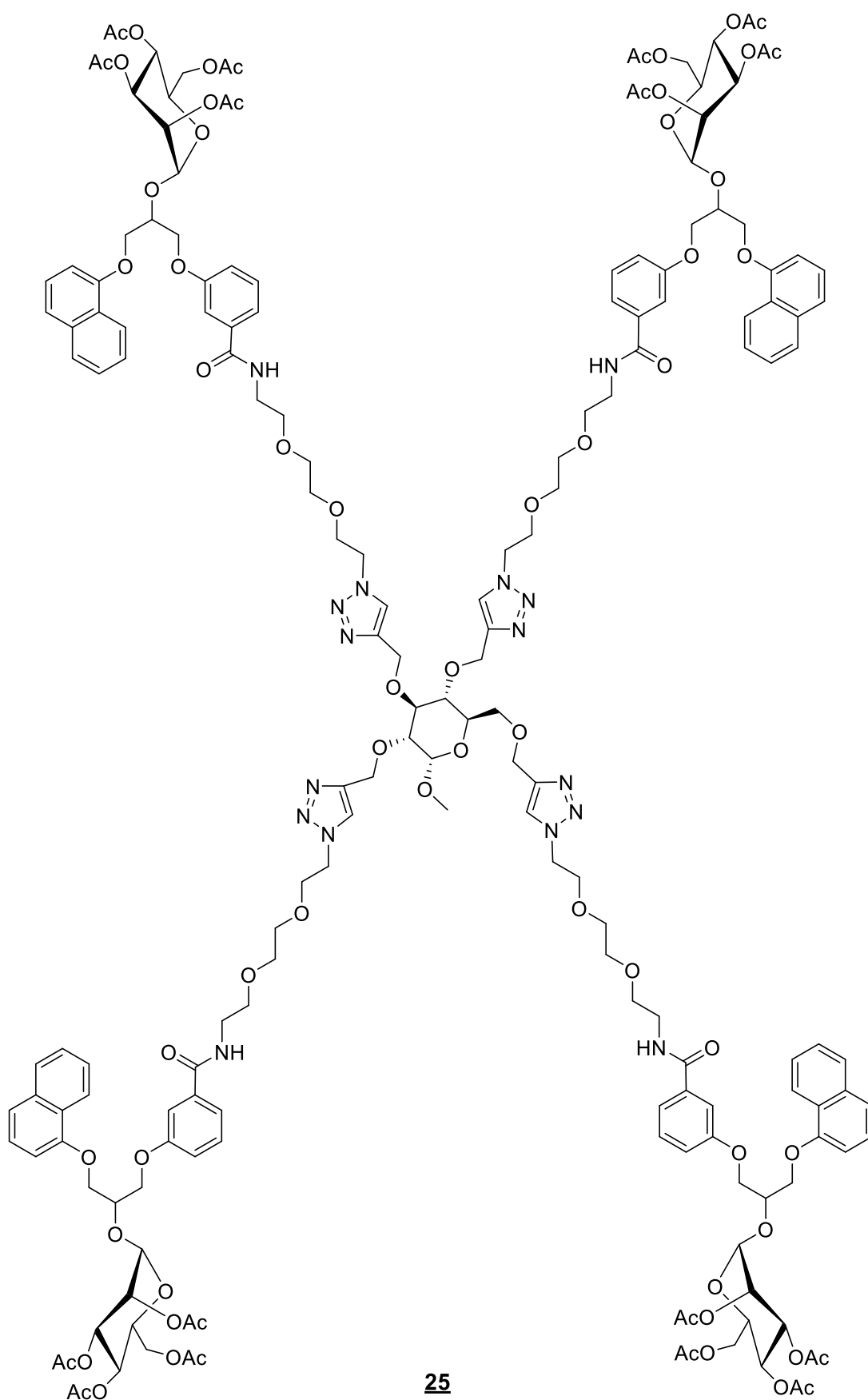
Biotage

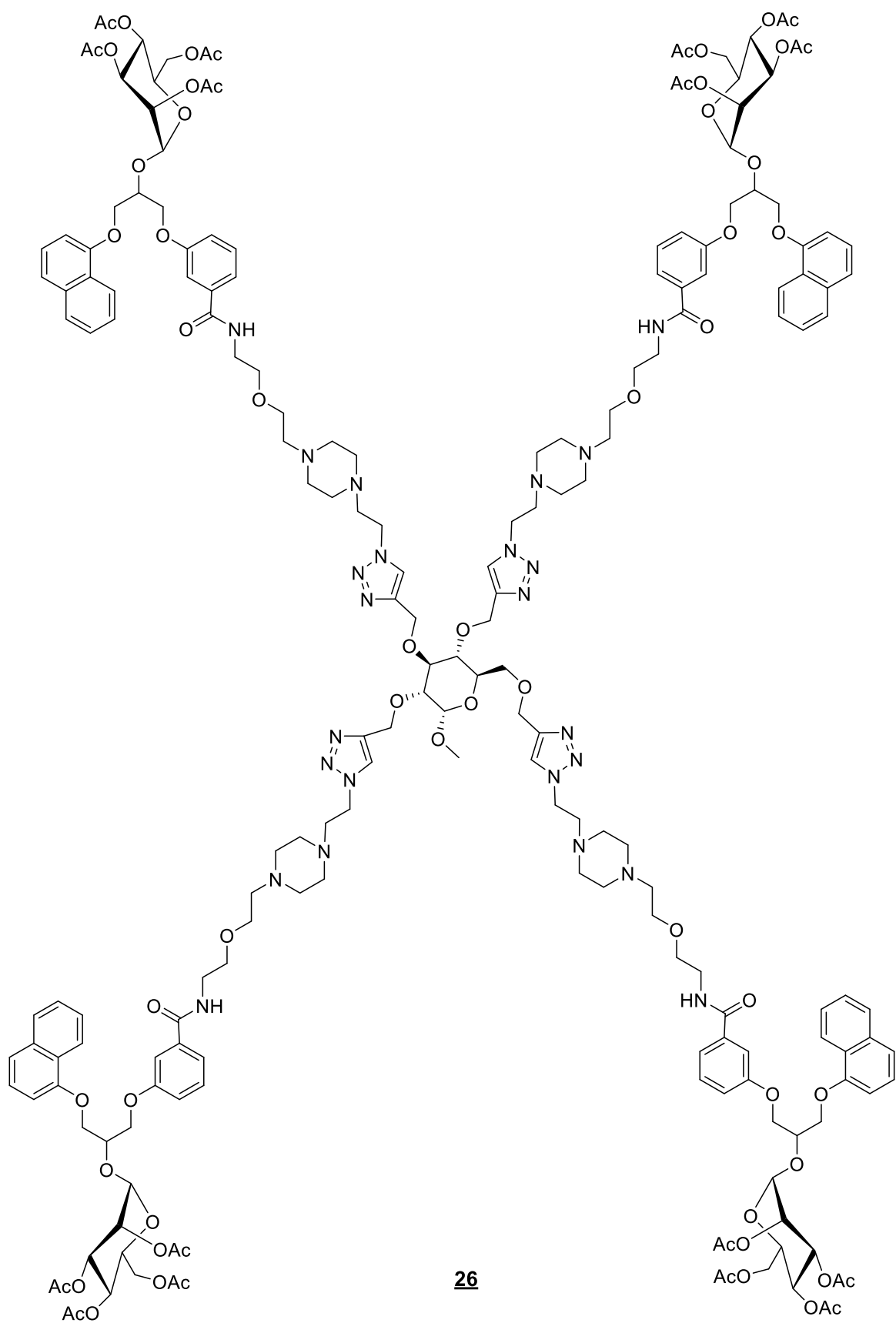
Isolera Fractions Report

User	Marko Anderluh	Cartridge Position	1
Sample Name	amw-30	Cartridge	SNAP 25g
Date	2014 Nov 07 at 11:27	Rack Type	16x150 mm
Method		Max Fraction	10 ml
		Volume	
Detection Mode	UV1	Solvent A	0.1%TFA v H2O
UV1 (Collection)	254 nm	Solvent B	MeOH
UV2 (Monitor)	280 nm		

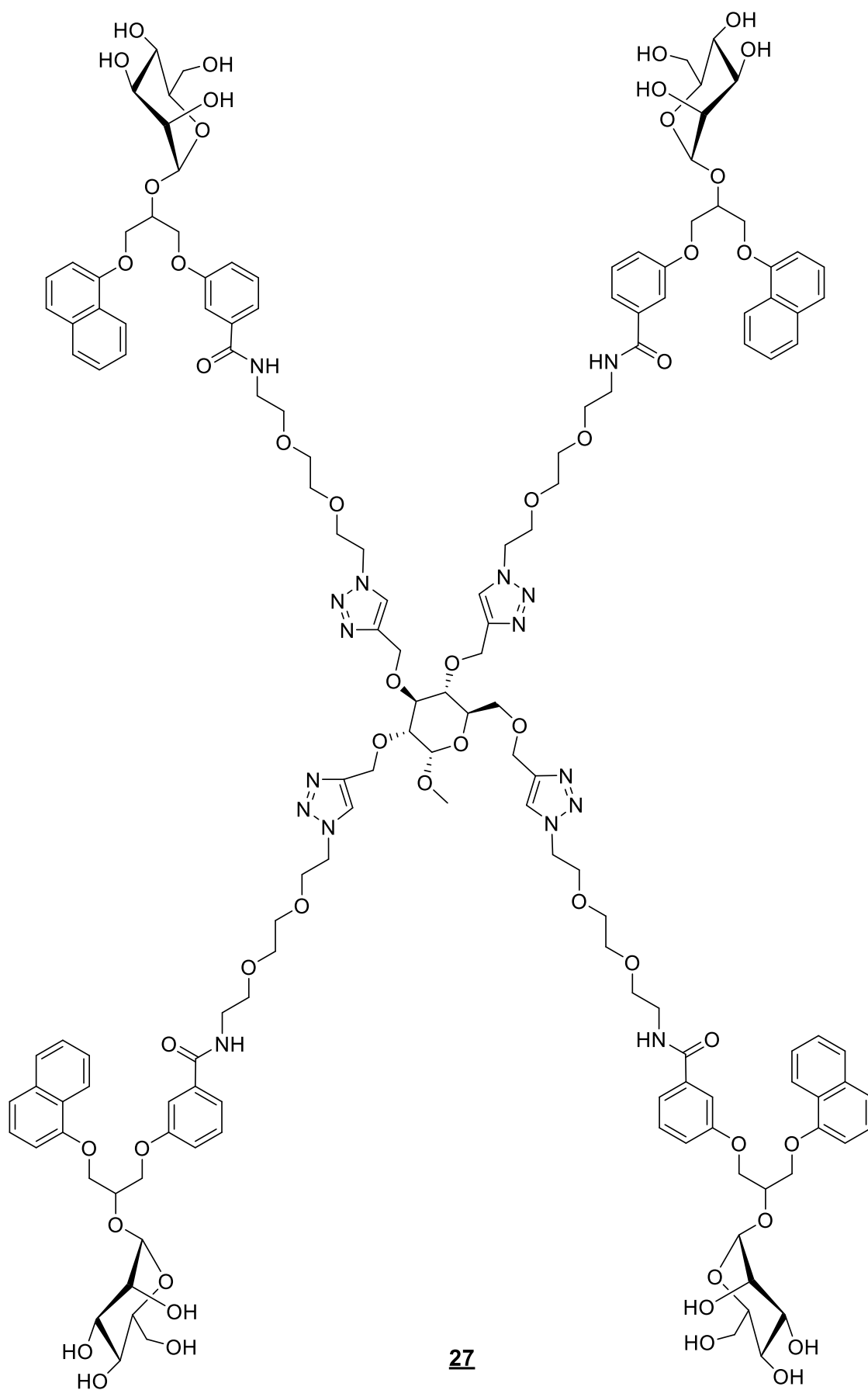


Priloga 2: Strukturne formule dendronskih antagonistov

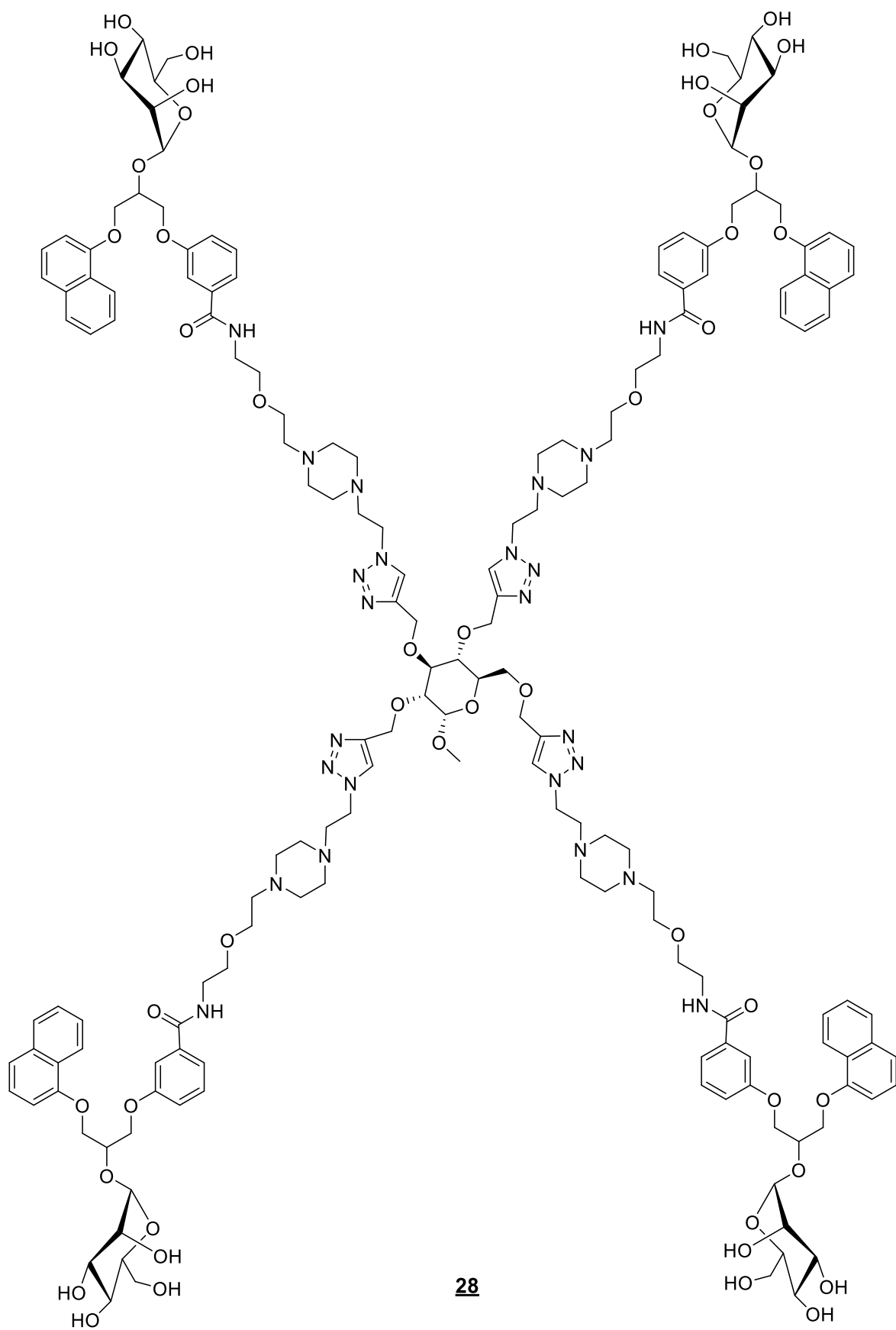




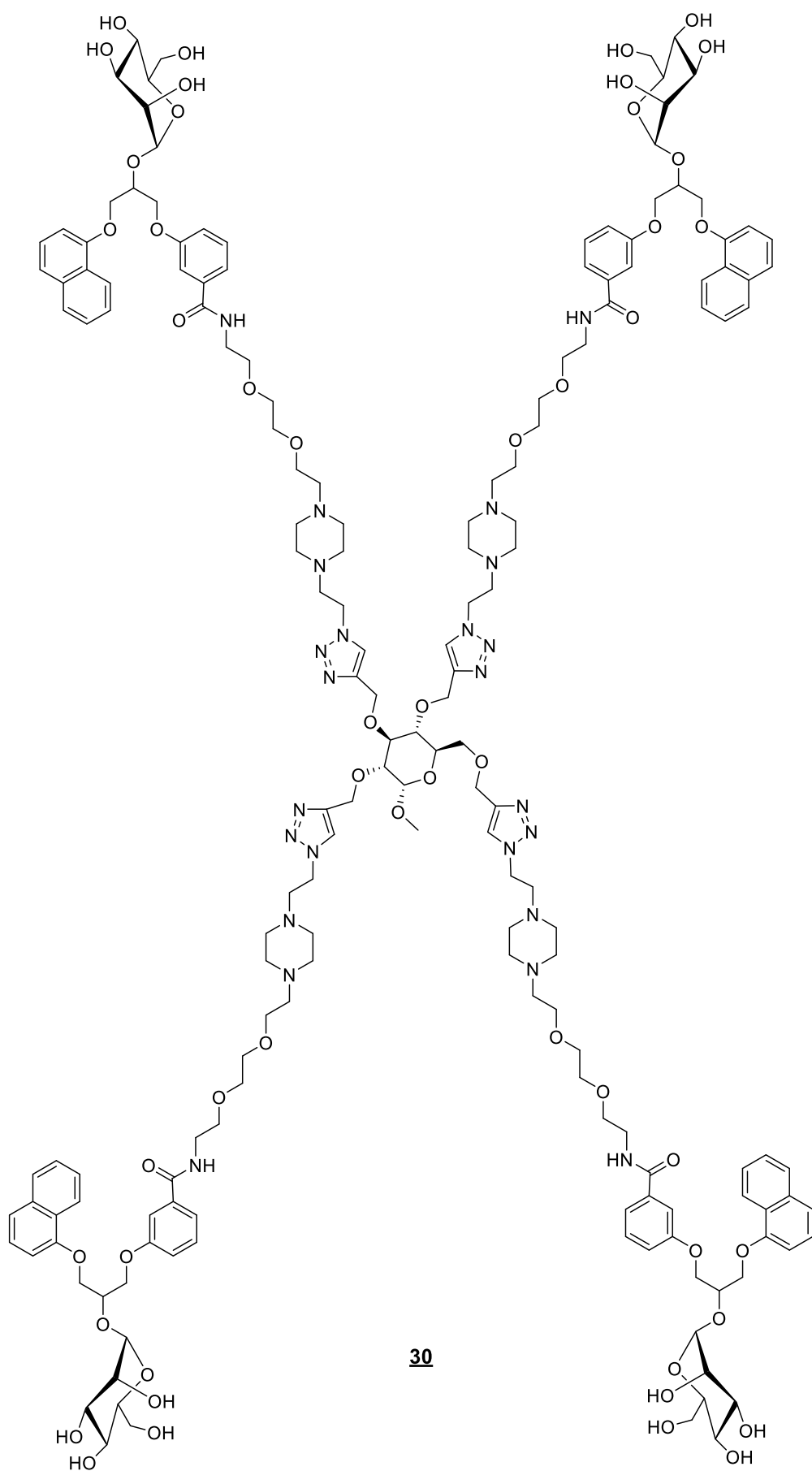
26



27

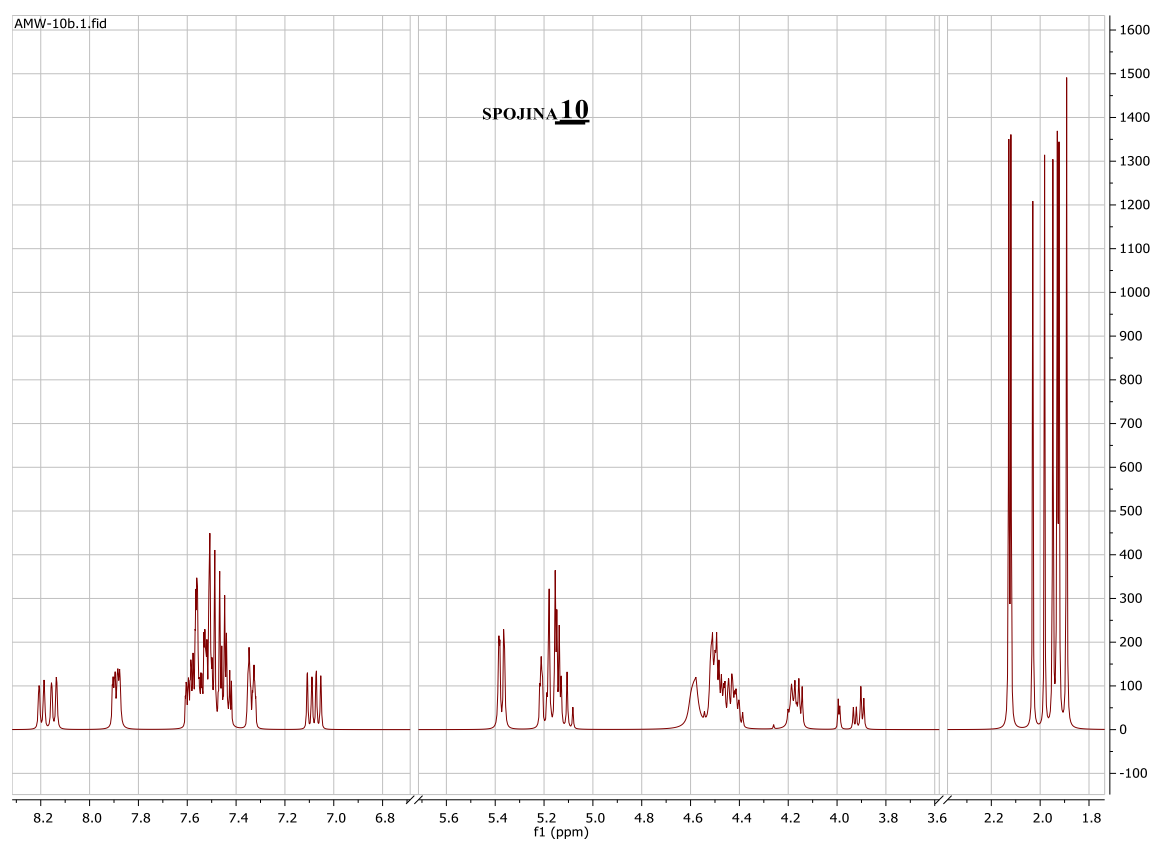
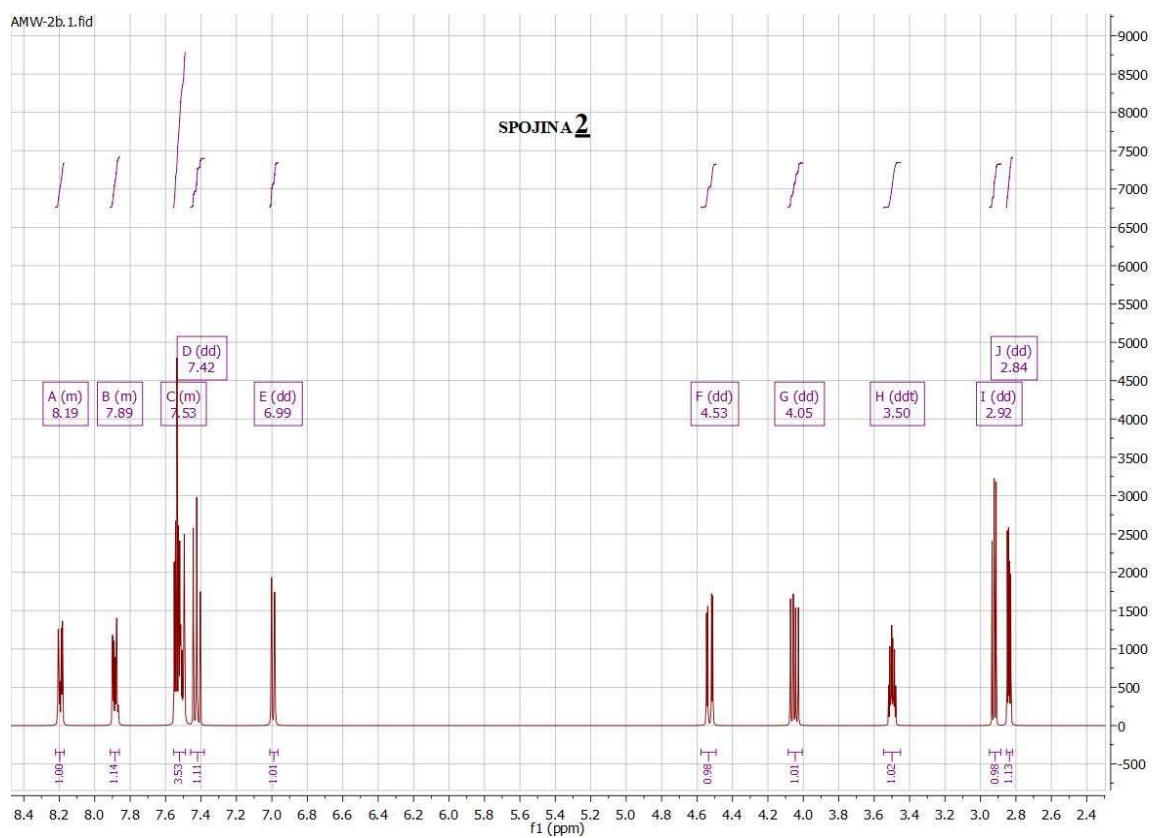


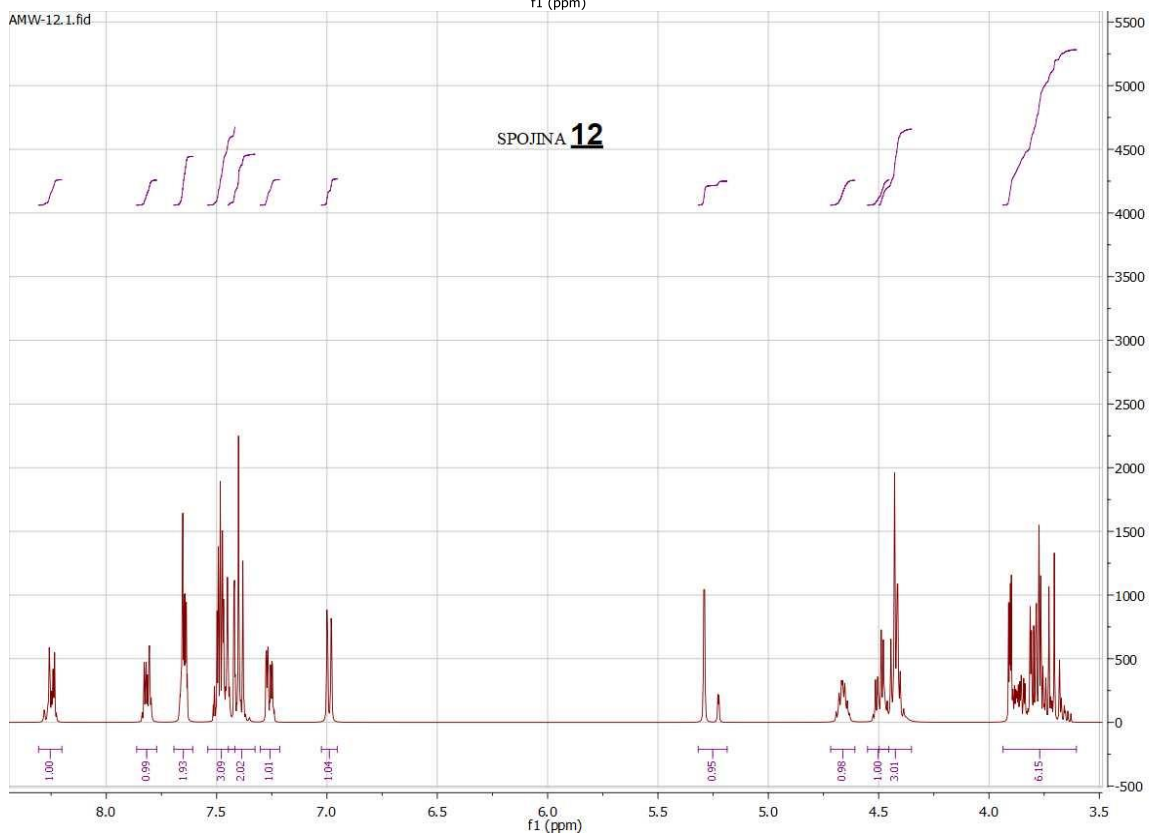
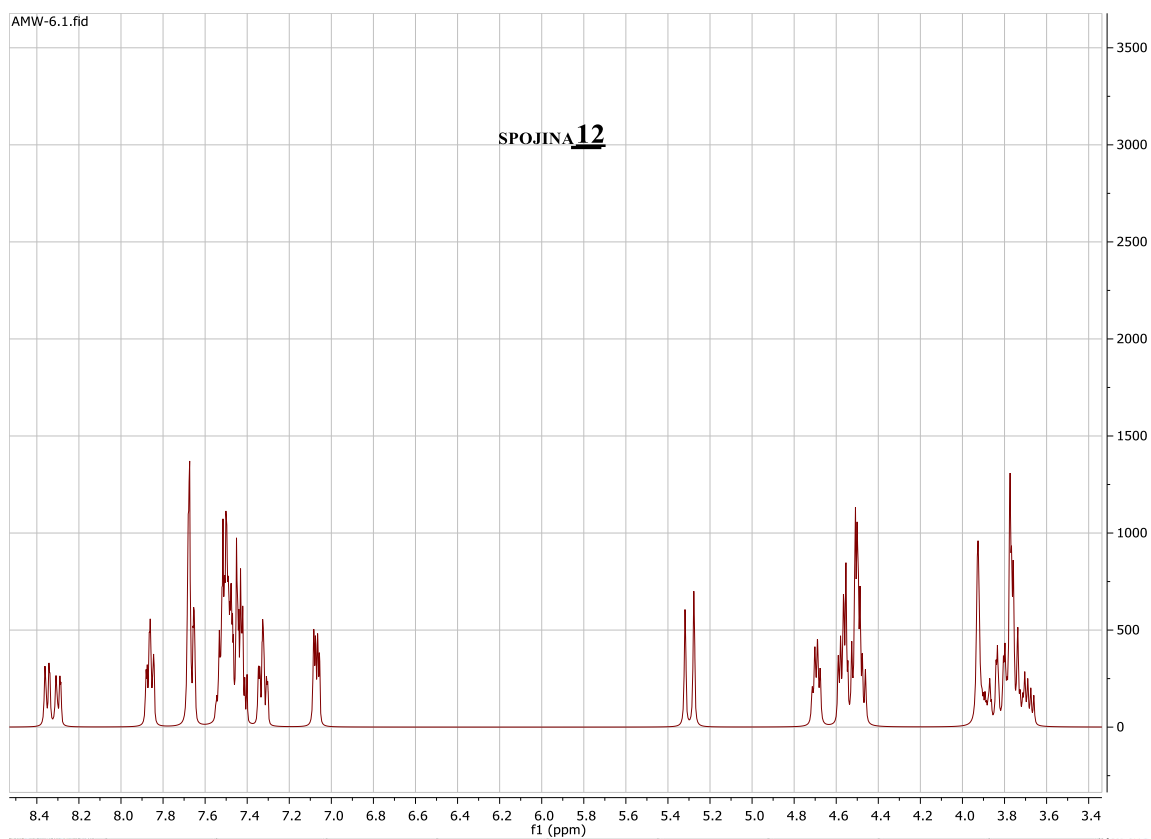
28

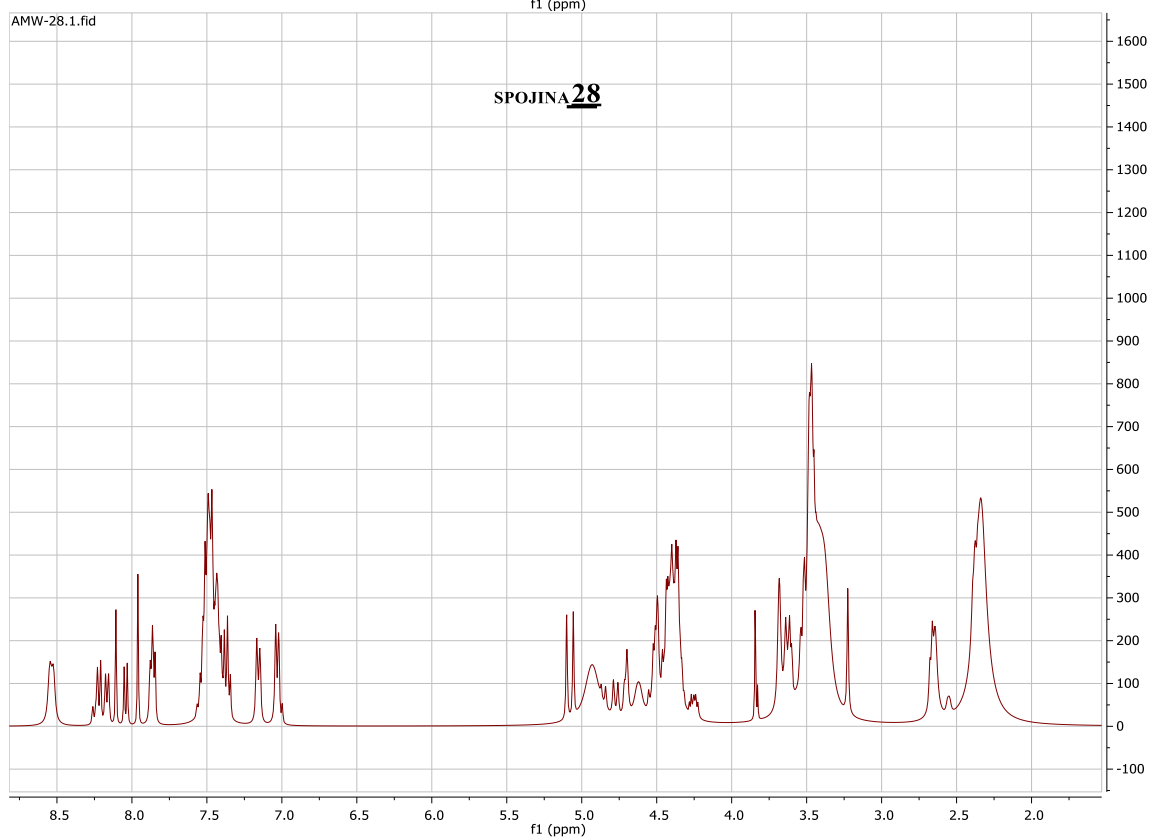
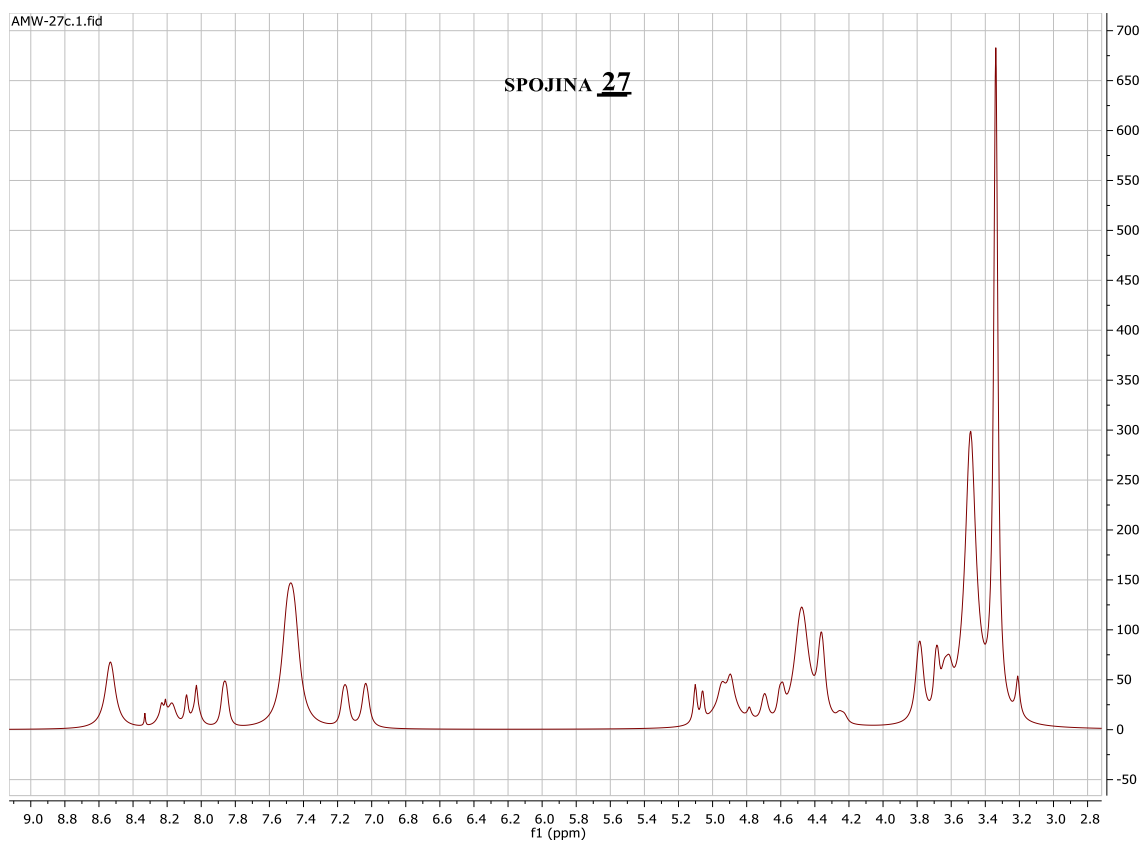


30

Priloga 3: NMR spektri







Priloga 4: Podatki analiznih izvidov spektroskopskih tehnik (NMR, MS, IR)

Spojina 1

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 5.33 (s, 2H, CH_2), 7.04 (ddd, 1H, $J_1 = 8.1$ Hz, $J_2 = 2.6$ Hz, $J_3 = 1.1$ Hz, Ar-H), 7.31-7.49 (m, 8H, Ar-H), 9.84 (s, 1H, Ar-OH).

MS (ESI-): $m/z = 252.2$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 100 %)

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3422, 2363, 1690, 1602, 1500, 1456, 1388, 1313, 1289, 1240, 1221, 1111, 998, 964, 947, 889, 784, 756, 701, 678, 594, 547, 520.

Spojina 3

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 4.18-4.40 (m, 5H, CH_2CHCH_2), 5.35 (s, 2H, CH_2 -Ar), 5.55 (d, 1H, $J = 4.9$ Hz, CHOH), 7.00 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, Ar-H), 6.99 (dd, 1H, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 1.2$ Hz, Ar-H), 7.27-7.62 (m, 13H, Ar-H), 7.86 (dd, 1H, $J_1 = 7.3$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz, Ar-H), 8.26 (dd, 1H, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, Ar-H).

MS (ESI+): $m/z = 429.2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$), 186.2 (100 %)

HRMS (ESI+): m/z za $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{O}_5$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): izmerjeno 429.1695; izračunano 429.1702

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3504, 3051, 2936, 1710, 1582, 1508, 1499, 1490, 1442, 1401, 1350, 1316, 1286, 1241, 1228, 1180, 1158, 1128, 1095, 1069, 1034, 1020, 1007, 938, 890, 852, 788, 769, 752, 730, 714, 692, 680, 626, 570, 547, 521, 476, 458, 420.

Spojina 4

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.98 (s, 3H, OCOCH_3), 2.01, 2.02 ($2 \times$ s, 3H, OCOCH_3), 2.05, 2.06 ($2 \times$ s, 3H, OCOCH_3), 2.17, 2.19 ($2 \times$ s, 3H, OCOCH_3), 4.03-4.10 (m, 1H, Man-H), 4.27-4.43 (m, 5H, Man-H, CH_2CHCH_2), 4.46 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz, Man-H), 4.65 (quin, 1H, $J = 5.3$ Hz, CH_2CHCH_2), 5.26-5.30 (m, 1H, Man-H), 5.33-5.41 (m, 5H, Man-H, 2H, CH_2 -Ar), 7.31-7.56 (m, 10H, Ar-H), 6.89 (dd, 1H, $J_1 = 7.7$ Hz, $J_2 = 1.0$ Hz, Ar-H), 7.18 (ddd, 1H, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 7.5$ Hz, $J_3 = 1.0$ Hz, Ar-H), 7.63-7.68 (m, 1H, Ar-H), 7.72-7.77 (m, 1H, Ar-H), 7.79-7.87 (m, 1H, Ar-H), 8.17-8.28 (m, 1H, Ar-H). Signali so podvojeni zaradi prisotnosti obeh epimernih oblik.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 20.7, 20.7, 20.9, 21.0 ($4 \times$ OCOCH_3), 62.2, 62.4, 65.9, 66.0, 66.9, 66.9, 67.2, 67.6, 67.7, 67.9, 68.9, 68.9, 68.9, 69.0, 69.6, 69.7, 74.9, 75.1 ($\text{COO}-\text{CH}_2$, CH_2CHCH_2 , $5 \times$ Man-C), 97.4, 97.5 (Man-C), 105.0, 105.0, 114.8, 115.0, 119.8, 120.0, 121.1, 121.2, 121.7, 121.7, 122.8, 122.9, 125.4, 125.5,

125.7, 125.8, 126.5, 126.5, 126.6, 126.6, 127.5, 127.6, 127.7, 128.2, 128.3, 128.6, 129.7, 129.7, 131.6, 131.7, 134.5, 134.6, 135.9, 136.0 (18 x Ar-C-C), 153.8, 153.9, 158.3, 158.3 (2 x Ar-C-O), 166.1, 166.2, 169.7, 169.8, 169.9, 170.0 (4 x OCOCH₃), 170.6, 170.7 (COOBn). Signali so podvojeni zaradi prisotnosti obeh epimernih oblik.

MS (ESI⁺): m/z = 759.3 ([M + H]⁺, 100 %)

HRMS (ESI⁺): m/z za C₄₁H₄₃O₁₄ ([M + H]⁺): izračunano 759.2653, izmerjeno 759.2640.

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3375, 3246, 3187, 2954, 2800, 1752, 1696, 1618, 1490, 1444, 1376, 1274, 1225, 1136, 1109, 1076, 1047, 980, 929, 833, 794, 755, 698, 670, 649, 620, 440.

Spojina 7

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 3.83 (s, 3H, CH₃), 7.04 (ddd, 1H, *J*₁ = 7.8 Hz, *J*₂ = 2.5 Hz, *J*₃ = 1.5 Hz, Ar-H), 7.32 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, Ar-H), 7.35 (dd, 1H, *J*₁ = 2.5 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz, Ar-H), 7.40 (dt, 1H, *J*₁ = 7.8 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz, Ar-H), 9.84 (s, 1H, Ar-OH).

MS (ESI⁻): m/z = 151.3 ([M - H]⁻), 92.3 (100 %)

Spojina 2

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 2.84, 2.92 (2 x dd, 2H, *J*₁ = 5.1 Hz, *J*₂ = 4.3 Hz, *J*₂' = 2.7 Hz, CH_b-CH_aH_a-O)*, 3.50 (ddt, 1H, *J*₁ = 6.3 Hz, *J*₂ = 4.3 Hz, *J*₃ = 2.7 Hz, CH_b), 4.05, 4.52 (2 x dd, 2H, O-CH_cH_c-oksiaran, *J*₁ = 11.4 Hz, *J*₂ = 6.3 Hz, *J*₃ = 2.7)*, 6.99 (d, 1H, *J*₁ = 7.7 Hz, *J*₂ = 1.0 Hz, Ar-H), 7.42 (dd, 1H, *J*₁ = 8.3 Hz, *J*₂ = 7.7 Hz, Ar-H), 7.49-7.56 (m, 3H, Ar-H), 7.89 (m, 1H, Ar-H), 8.20 (m, 1H, Ar-H). *Signal je posledica magnetno neekvivalentnih protonov.

Spojina 9

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 3.84 (s, 3H, CH₃), 4.20-4.38 (m, 5H, CH, 2 × CH₂), 5.58 (d, 1H, *J* = 5.3 Hz, CHOH), 7.00 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, Ar-H), 7.31 (dd, 1H, *J*₁ = 2.7 Hz, *J*₂ = 1.0 Hz, Ar-H), 7.39-7.57 (m, 7H, Ar-H), 7.85-7.89 (m, 1H, Ar-H), 8.19-8.30 (m, 1H, Ar-H).

MS (ESI⁺): m/z = 353.1 ([M + H]⁺), 186.2 (100 %)

HRMS (ESI+): m/z za $C_{21}H_{21}O_5$ ($[M + H]^+$): izmerjeno 353.1389; izračunano 353.1379

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3432, 3053, 2949, 2874, 1720, 1629, 1596, 1581, 1509, 1489, 1446, 1399, 1271, 1240, 1157, 1102, 1072, 1020, 999, 874, 793, 772, 756, 681, 636, 572, 420.

Spojina **10**

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.89, 1.92 (2 $\times$ s, 3H, OCOCH₃), 1.93, 1.95 (2 $\times$ s, 3H, OCOCH₃), 1.98, 2.03 (2 $\times$ s, 3H, OCOCH₃), 2.12, 2.13 (2 $\times$ s, 3H, OCOCH₃), 3.85, 3.86 (2 $\times$ s, 3H, COOCH₃), 3.89-3.93 (2 x d, 1H, J = 4.9 Hz, Man-H), 3.97-4.02 (m, 1H, Man-H), 4.14-4.21 (m, 1H, Man-H), 4.39-4.52 (m, 4H, CH₂CHCH₂), 4.55-4.62 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 5.08-5.22 (m, 3H, Man-H), 5.37 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, Man-H), 7.05-7.11 (dd, 1H, J_1 = 7.7 Hz, J_2 = 1.1 Hz, Ar-H), 7.31-7.35 (m, 1H, Ar-H), 7.42-7.61 (m, 7H, Ar-H), 7.87-7.91 (m, 1H, Ar-H), 8.12-8.22 (m, 1H, Ar-H). Signali so podvojeni zaradi prisotnosti obeh epimernih oblik.

MS (ESI+): m/z = 683.2 ($[M + H]^+$), 186.2 (100 %)

HRMS (ESI+): m/z za $C_{35}H_{39}O_{14}$ ($[M + H]^+$): izračunano 683.2313, izmerjeno 683.2328

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3465, 3056, 2954, 1752, 1596, 1582, 1560, 1509, 1490, 1447, 1397, 1371, 1271, 1226, 1137, 1103, 1076, 1046, 980, 935, 892, 794, 773, 757, 737, 683, 636, 600, 572, 497, 469, 420.

Spojina **11**

1H NMR (400 MHz, Aceton- d_6): δ [ppm] = 3.16-3.20 (m, 3H, Man-H), 3.39-3.55 (m, 3H, Man-H), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 4.34-4.48 (m, 4H, CH₂CHCH₂), 4.48-4.57 (m, 2H, Man-OH, CH₂CHCH₂), 4.61, 4.62 (2 x d, 1H, J = 4.2 Hz, Man-OH), 4.75, 4.77 (2 x d, 1H, J = 5.2 Hz, Man-OH), 4.81 (t, 1H, J = 4.3 Hz, Man-OH), 5.07 (2 x d, 1H, J = 1.7 Hz, Man-H), 7.05 (dd, 1H, J_1 = 4.2 Hz, J_2 = 1.0 Hz, Ar-H), 7.29-7.35 (m, 1H, Ar-H), 7.38-7.57 (m, 7H, Ar-aH), 7.85-7.92 (m, 1H, Ar-H), 8.14-8.26 (d, 1H, Ar-H). Signali so podvojeni zaradi prisotnosti obeh epimernih oblik.

^{13}C NMR (100 MHz, Aceton- d_6): δ [ppm] = 52.5 (OCH₃), 62.8, 62.9, 68.6, 68.6, 68.7, 68.8, 68.9, 71.8, 71.9, 72.4, 72.4, 74.5, 74.6, 74.7, 74.7 (CH₂CHCH₂, 5 x Man-C), 101.2, 106.0, 106.1, 115.7, 115.9, 120.6, 121.2, 121.3, 122.7, 122.7, 122.8, 122.9, 126.0, 126.1, 126.4, 126.9, 127.3, 127.3, 128.3, 128.4, 130.6, 132.5, 135.5 (14 x Ar-C-

C, Man-C), 155.2, 155.3, 159.8, 159.9 (2 x Ar-C-O), 172.3 (COOH). Nekateri signali so podvojeni zaradi obeh epimernih oblik.

MS (ESI⁺): $m/z = 515.2$ ($[M + H]^+$, 100 %)

HRMS (ESI⁺): m/z za $C_{27}H_{31}O_{10}$ ($[M + H]^+$): izračunano 515.1917, izmerjeno 515.1911

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3422, 2934, 1725, 1581, 1509, 1490, 1446, 1399, 1293, 1271, 1241, 1222, 1138, 1104, 1060, 1021, 974, 876, 794, 773, 756, 683, 572, 420

Spojina **12**

¹H NMR (400 MHz, Metanol-d₄): δ [ppm] = 3.68-3.91 (m, 6H, Man-H), 4.39-4.51 (m, 4H, CH_2CHCH_2), 4.64-4.69 (m, 1H, CH_2CHCH_2), 5.29 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, Man-H), 6.99 (dd, 1H, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 1.0$ Hz, Ar-H), 7.26 (ddd, 1H, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 2.6$ Hz, $J_3 = 1.0$ Hz, Ar-H), 7.38-7.50 (m, 5H, Ar-H), 7.64-7.66 (m, 2H, Ar-H), 7.80-7.83 (m, 1H, Ar-H), 8.23-8.26 (m, 1H, Ar-H). Singali so podvojeni; Signali od COOH, NH in OH v spektru niso vidni zaradi devterijske izmenjave.

¹³C NMR (100 MHz, Aceton-d₆): δ [ppm] = 63.0, 63.0, 68.7, 68.8, 68.8, 68.9, 71.9, 71.9, 72.4, 72.5, 74.5, 74.6 (CH_2CHCH_2 , 5 x Man-C), 101.2, 101.2, 106.0, 106.0, 116.0, 116.1, 120.4, 121.2, 121.3, 122.7, 122.9, 123.0, 123.1, 126.1, 126.2, 126.5, 126.9, 127.3, 127.3, 128.3, 128.3, 130.5, 132.9, 135.5 (14 x Ar-C, Man-C), 155.2, 155.3, 159.8, 159.9 (2 x Ar-C-O), 167.4, 167.5 (COOH). Nekateri signali so podvojeni, ker imamo zmes obeh epimerov.

MS (ESI⁻): $m/z = 499.2$ ($[M - H]^-$, 100 %)

HRMS (ESI⁻): m/z za $C_{26}H_{27}O_{10}$ ($[M - H]^-$): izračunano 499.1604, izmerjeno 499.1598

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3421, 2930, 1700, 1582, 1448, 1397, 1268, 1240, 1103, 1054, 1022, 978, 793, 771, 680, 571.

Spojina **13**

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 3.35-3.69 (m, 18H, 6 x CH_2 , 6 x Man-H), 4.32-4.48 (m, 4H, CH_2CHCH_2), 4.48-4.57 (m, 2H, Man-OH, CH_2CHCH_2), 4.61, 4.63 (2 x s, 1H, Man-OH), 4.77, 4.78 (2 x s, 1H, Man-OH), 4.80, 4.81 (2 x s, 1H, Man-OH), 5.10 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz, Man-H), 7.02-7.07 (m, 1H, Ar-H), 7.17 (ddd, 1H, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 2.5$ Hz, $J_3 = 1.1$ Hz, Ar-H), 7.33-7.57 (m, 7H, Ar-H), 7.85-7.94 (m, 1H, Ar-H),

8.13-8.21 (m, 1H, Ar-H), 8.51 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz, NHCO). Nekateri signali so podvojeni, ker imamo zmes dveh epimerov.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 38.8-40.5 (NHCH $_2$)*, 49.9 (CH $_2$ N $_3$), 61.2, 66.7, 67.5, 67.5, 68.9, 69.2, 69.6, 69.6, 70.5, 70.8, 72.8, 74.4 (4 x CH $_2$, CH $_2$ CHCH $_2$, 5 x Man-C), 100.0, 105.4, 112.9, 117.5, 119.7, 120.3, 121.4, 124.8, 125.5, 126.2, 126.5, 127.5, 129.4, 134.0, 135.8 (14 x Ar-C-C, Man-C), 153.8, 158.2 (2 x Ar-C-O), 165.9 (NHCO). *Signal je prekrit s topilom.

MS (ESI+): $m/z = 657$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100 %)

HRMS (ESI+): m/z za C $_{32}$ H $_{41}$ N $_4$ O $_{11}$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): izračunano 657.2772, izmerjeno 657.2772

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3403, 3065, 2927, 2107, 1718, 1647, 1580, 1542, 1509, 1485, 1459, 1439, 1397, 1269, 1240, 1180, 1133, 1103, 1069, 1021, 977, 878, 794, 773, 754, 684, 636, 572, 510, 420.

Spojina 14

^1H NMR (400 MHz, Metanol- d_4): δ [ppm] = 2.69-2.77 (m, 2H, CH $_2$), 2.83-2.94 (m, 4H, CH $_2$), 3.33-3.43 (m, 8H, 4 x CH $_2$)*, 3.60-3.65 (m, 2H, CH $_2$), 3.68-3.79 (m, 5H, Man-H, 2 x CH $_2$), 3.79-3.90 (m, 5H, Man-H), 4.39-4.55 (m, 4H, CH $_2$ CHCH $_2$), 4.66 (q, 1H, $J = 5.1$ Hz, CH $_2$ CHCH $_2$), 5.25 (2 x d, 1H, $J = 1.7$ Hz, Man-H)*, 6.99 (dd, 1H, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 1.1$ Hz, Ar-H), 7.24 (ddd, 1H, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 2.6$ Hz, $J_3 = 1.6$ Hz, Ar-H), 7.37-7.55 (m, 7H, Ar-H), 7.80-7.86 (m, 1H, Ar-H), 8.21-8.28 (m, 1H, Ar-H). *Signal je prekrit s signalom topila; signali protonov NHCO in OH skupin so zaradi devterijske izmenjave nevidni v spektru. Nekateri signali so podvojeni, ker imamo zmes dveh epimerov.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 38.7-40.2 (NHCH $_2$)*, 46.4, 48.8, 48.8, 48.8, 50.6, 50.6, 55.0 (4 x piperazin-C, NCH $_2$ CH $_2$ N $_3$, OCH $_2$ CH $_2$ N), 61.2, 64.1, 66.7, 67.5, 67.5, 69.0, 70.5, 70.8, 72.9, 74.3 (2 x OCH $_2$, CH $_2$ CHCH $_2$, 5 x Man-C), 100.1, 105.4, 113.1, 117.4, 120.3, 124.8, 125.5, 126.2, 126.5, 127.5, 129.5, 140.0, 135.7, 153.8, 158.0, 158.2, 158.4 (16 x Ar-C, Man-C), 166.0 (NHCO). *Signal je prekrit s topilom.

MS (ESI+): $m/z = 725.3$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100 %)

HRMS (ESI+): m/z za C $_{36}$ H $_{49}$ N $_6$ O $_{10}$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): izračunano 725.3510, izmerjeno 725.3494

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3412, 3020, 2938, 2589, 2116, 1677, 1581, 1546, 1509, 1434, 1399, 1271, 1202, 1134, 1058, 1023, 977, 918, 835, 798, 775, 722, 706, 598, 573, 518.

Spojina **18**

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.92 (s, 3H, OCOCH₃), 1.97 (s, 3H, OCOCH₃); 2.02 (s, 3H, OCOCH₃); 2.11 (s, 3H, OCOCH₃); 3.35-3.46 (m, 4H, CH₂, CH₂N₃), 3.50-3.63 (m, 8H, 4 x CH₂), 3.97-4.03 (m, 1H, Man-H), 4.09-4.20 (m, 1H, Man-H), 4.25-4.31 (m, 1H, Man-H), 4.36-4.52 (m, 4H, CH₂CHCH₂), 4.54-4.60 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 5.12-5.22 (m, 3H, Man-H), 5.37 (2 x d, 1H, J = 1.7 Hz, Man-H), 7.02-7.10 (m, 1H, Ar-H), 7.15-7.20 (m, 1H, Ar-H), 7.36-7.57 (m, 7H, Ar-H), 7.86-7.91 (m, 1H, Ar-H), 8.11-8.21 (m, 1H, Ar-H), 8.52 (t, 1H, J = 5.5 Hz, NHCO). Signali so podvojeni zaradi prisotnosti obeh epimerov.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 20.4, 20.4, 20.4, 20.5 (4 x OCOCH₃), 38.8-40.2 (NHCH₂)*, 49.9 (CH₂N₃), 62.0, 66.7, 68.6, 68.8, 68.9, 69.2, 69.2, 69.6, 69.6, 69.6, 74.1 (4 x CH₂, CH₂CHCH₂, 5 x Man-C), 96.4, 105.5, 112.9, 119.8, 120.4, 121.4, 124.8, 125.4, 126.1, 126.5, 127.4, 129.5, 134.0, 134.0, 135.9 (14 x Ar-C-C, Man-C), 153.5, 158.1 (2 x Ar-C-O), 165.8 (NHCO), 169.5, 169.6, 169.6, 170.0 (4 x OCOCH₃). *Signal je prekrit s topilom.

MS (ESI+): m/z = 825.3 ([M + H]⁺, 100 %)

HRMS (ESI+): m/z za C₄₀H₄₉N₄O₁₅ ([M + H]⁺): izračunano 825.3194, izmerjeno 825.3203

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 2936, 2100, 1743, 1654, 1580, 1368, 1271, 1218, 1134, 1042, 980, 935, 794, 774, 754, 688, 600, 573.

Spojina **22**

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 2.31-2.42 (m, 8H, 4x CH₂), 2.37-2.42 (m, 2H, CH₂), 2.44-2.48 (m, 2H, CH₂), 3.27-3.31 (m, 2H, CH₂), 3.39-3.55 (m, 12H, 5 x CH₂, 2 x Man-H)*, 3.59-3.63 (m, 2H, Man-H), 3.63-3.69 (m, 2H, Man-H), 4.10-4.30 (br s, 1H, Man-OH), 4.32-4.47 (m, 4H, CH₂CHCH₂), 4.48-4.55 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 4.55-4.95 (br s, 3H, Man-OH), 5.07 (2 x d, 1H, J = 1.6 Hz, Man-H), 7.04 (ddd, 1H, J_1 = 7.7 Hz, J_2 = 3.3 Hz, J_3 = 1.0 Hz, Ar-H), 7.14-7.20 (m, 1H, Ar-H), 7.34-7.56 (m, 7H, Ar-H), 7.84-7.91 (m, 1H, Ar-H), 8.14-8.24 (m, 1H, Ar-H), 8.49-8.56 (m, 1H, NHCO). *Signal delno prekrit s topilom. Signali so podvojeni zaradi prisotnih obeh epimernih oblik.

Spojina 23

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.96 (2 x s, 3H, OCOCH₃), 1.99, 2.00 (2 x s, 3H, OCOCH₃); 2.06, 2.07 (2 x s, 3H, OCOCH₃); 2.15, 2.19 (2 x s, 3H, OCOCH₃); 2.49-2.53 (m, 2H, CH₂), 2.53-2.62 (m, 4H, 2 x CH₂), 2.84-2.94 (m, 6H, 3 x CH₂), 3.20-3.25 (m, 2H, CH₂), 3.64-3.67 (m, 4H, 2 x CH₂), 3.71-3.75 (t, 2H, J = 5.1 Hz, CH₂), 3.83-3.87, 4.01-4.12 (m, 2H, Man-H), 4.29-4.51 (m, 5H, CH₂CHCH₂, Man-H), 4.60-4.68 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 5.27-5.40 (m, 4H, Man-H), 6.84-6.94 (m, 1H, Ar-H), 7.04-7.13 (m, 1H, Ar-H), 7.32-7.43 (m, 2H, Ar-H), 7.43-7.52 (m, 3H, Ar-H), 7.52-7.64 (m, 2H, Ar-H), 7.81 (m, 2H, Ar-H, NHCO), 8.16-8.27 (m, 1H, Ar-H). Nekateri signali so podvojeni, ker imamo zmes dveh epimerov.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 20.4, 20.6, 21.0, 21.0 (4 x OCOCH₃), 38.7-40.2 (NHCH₂)*, 46.9, 46.9, 51.8, 51.8, 52.8, 52.8, 52.8, 56.4, 56.4, 56.7, 61.6, 61.9, 65.2, 65.3, 67.5, 67.5, 68.6, 68.7, 68.7 (4 x piperazin-C, NCH₂CH₂N₃, OCH₂CH₂N, 5 x Man-C, CH₂CH₂, CH₂CHCH₂), 105.5, 113.0, 117.4, 119.9, 120.4, 121.3, 121.4, 124.8, 125.3, 125.4, 126.1, 126.1, 126.5, 127.5, 129.5, 134.0, 135.8, 135.9, 153.4, 153.5, 158.1 (16 x Ar-C, 1 x Man-C), 165.8 (NHCO), 169.5, 169.6, 169.8, 170.0, 172.0, 172.0 (4 x OCOCH₃). Nekateri signali so podvojeni, ker imamo zmes dveh epimerov. *Signal je prekrit s topilom.

MS (ESI+): m/z = 893.4 ([M + H]⁺, 100 %)

HRMS (ESI+): m/z za C₄₄H₅₇N₆O₁₄ ([M + H]⁺): izračunano 893.3933, izmerjeno 893.3940

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3353, 2944, 2100, 1742, 1646, 1579, 1368, 1223, 1134, 1103, 1042, 979, 936, 795, 774, 688, 601, 572.

Spojina 25

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.88, 1.91 (2 x s, 12H, OCOCH₃), 1.91, 1.93 (2 x s, 12H, OCOCH₃); 1.96, 2.01 (s, 12H, OCOCH₃); 2.11 (s, 12H, OCOCH₃); 3.20 (s, 3H, Glu-OMe), 3.35-3.40 (m, 8H, 4 x CH₂), 3.42-3.56 (m, 26H, 12 x CH₂, 2 x Glu-H) 3.62-3.70 (m, 1H, Glu-H), 3.75-3.82 (m, 9H, 4 x CH₂, 1 x Glu-H), 3.86-4.00 (m, 4H, Man-H), 4.13-4.25 (m, 4H, Man-H), 4.25-4.32 (m, 2H, 2 x Glu-H), 4.32-4.54 (m, 28H, 4 x CH₂CHCH₂, 4 x Man-H, 4 x CH₂) 4.54-4.62 (m, 4H, CH₂CHCH₂), 4.65-4.89 (m, 9H, 4 x O-CH₂-Triazol, Glu-H), 5.01-5.26 (m, 12H, 12 x Man-H), 5.36 (2 x d, 4H, J = 1.7 Hz, Man-H), 7.01-7.11 (m, 4H, Ar-H), 7.17 (dd, 4H, J_1 = 7.0 Hz, J_2 = 3.8

Hz, Ar-H), 7.32-7.56 (m, 28H, Ar-H), 7.83-7.90 (m, 4H, Ar-H), 8.01-8.22 (s, 4H, Triazol-CH), 8.32 (s, 4H, Ar-H), 8.50 (d, 4H, $J = 5.2$ Hz, NHCO). Nekateri signali so podvojeni, ker imamo zmes dveh epimerov.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): zaradi slabe topnosti produkta posnet spekter ni dal nobenega jasnega signala navkljub dolgotrajnemu eksperimentu snemanja ^{13}C spektra.

MS (ESI+): $m/z = 3646.5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 1823.7 (100 %)

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3383, 2929, 1744, 1646, 1580, 1438, 1397, 1368, 1226, 1133, 1044, 795, 774, 754, 687, 572, 508.

Spojina 26

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.88, 1.91 (2 x s, 12H, OCOCH₃), 1.92, 1.94 (2 x s, 12H, OCOCH₃); 1.96, 2.02 (2 x s, 12H, OCOCH₃); 2.11 (2 x s, 12H, OCOCH₃); 2.25-2.42 (m, 32H, 16 x CH₂), 2.61-2.68 (m, 8H, 4 x CH₂), 3.22 (s, 3H, Glu-OMe), 3.29-3.38 (m, 8H, 4x CH₂)*, 3.38-3.42 (m, 8H, 4 x CH₂), 3.43-3.55 (m, 17H, 8 x CH₂, Glu-H), 3.64-3.70 (t, 1H, $J = 9.0$ Hz Glu-H), 3.74-3.76, 3.77-3.79 (2 x d, 2H, $J = 2.4$ Hz, Glu-H), 3.88-3.93, 3.98-4.02 (m, 8H, Man-H), 4.14-4.21 (m, 4H, Man-H), 4.25-4.32 (m, 2H, 2 x Glu-H), 4.33-4.51 (m, 24H, 4 x CH₂CHCH₂, 4 x CH₂), 4.54-4.61 (m, 4H, 4 x CH₂CHCH₂), 4.66-4.89 (m, 9H, 4 x O-CH₂-Triazol, Glu-H), 5.07-5.22 (m, 12H, Man-H), 5.37 (2 x d, 4H, $J = 1.7$ Hz, Man-H), 7.03-7.10 (m, 4H, Ar-H), 7.15-7.20 (m, 4H, Ar-H), 7.35-7.56 (m, 28H, Ar-H), 7.87 (dd, 4H, $J_1 = 7.9$ Hz, $J_2 = 4.2$ Hz, Ar-H), 8.11 (s, 4H, Triazol-CH), 8.12-8.21 (m, 4H, Ar-H), 8.50 (d, 4H, $J = 4.4$ Hz, NHCO). Nekateri signali so podvojeni, ker imamo zmes dveh epimerov. *Signal je prekrit s topilom.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): zaradi slabe topnosti produkta posnet spekter ni dal nobenega jasnega signala navkljub dolgotrajnemu eksperimentu snemanja ^{13}C spektra.

MS (ESI+): $m/z = 3918.9$ ($[\text{M} + 3\text{H}]^+$), 1306.6 ($([\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$, 100 %)

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3345, 2914, 1397, 1269, 1238, 1101, 1052, 859, 794, 773, 517.

Spojina 27

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.20-3.42* (s, 19H, 8 x CH₂, Glu-OMe), 3.44-3.57 (m, 34H, 16 x Man-H, 8 x CH₂, 2 x Glu-H), 3.57-3.71 (m, 9H, 8 x Man-H, Glu-H), 3.73-3.87 (m, 9H, 4 x CH₂, Glu-H), 4.19-4.29 (m, 2H, Glu-H), 4.30-4.57 (m, 28H, 4 x CH₂CHCH₂, 4 x Man-OH, 4 x CH₂), 4.58-4.67 (m, 4H, CH₂CHCH₂), 4.67-4.88 (m, 9H, 4 x O-CH₂-Triazol, Glu-H), 4.90-5.17 (m, 16H, 4 x Man-H, 12 x Man-

OH), 7.00-7.09 (m, 4H, Ar-H), 7.12-7.21 (m, 4H, Ar-H), 7.32-7.56 (m, 28H, Ar-H), 7.82-7.91 (m, 4H, Ar-H), 7.99-8.11 (s, 4H, Triazol-CH), 8.12-8.27 (m, 4H, Ar-H), 8.46-8.62 (s, 4H, NHCO). Nekateri signali so podvojeni, ker imamo zmes dveh epimerov. *Signali prekriti z zaostankom topila.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): zaradi slabe topnosti produkta posnet spekter ni dal nobenega jasnega signala navkljub dolgotrajnemu eksperimentu snemanja ¹³C spektra.

MS (ESI-): m/z = 2971.1 ([M-2H]⁻), 544.1 (100 %)

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3345, 2917, 1579, 1536, 1508, 1439, 1399, 1351, 1268, 1239, 1130, 1100, 1052, 1025, 977, 868, 806, 795, 773, 755, 683, 515.

Spojina 28

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 2.20-2.45 (m, 32H, 16 x CH₂), 2.59-2.69 (m, 8H, 4 x CH₂), 3.23 (s, 3H, Glu-OMe), 3.29-3.38 (m, 8H, 4x CH₂)*, 3.40-3.56 (m, 37H, 12 x CH₂, 12 x Man-H, 1 x Glu-H), 3.57-3.73 (m, 13H, 12 x Man-H, Glu-H), 3.82-3.83, 3.84-3.86 (m, 2H, Glu-H), 4.21-4.29 (m, 2H, Glu-H), 4.30-4.57 (m, 28H, 4x CH₂CHCH₂, 4 x Man-OH, 4 x CH₂), 4.57-4.67 (m, 4H, 4 x CH₂CHCH₂), 4.67-4.82 (m, 8H, 4 x O-CH₂-Triazol), 4.83-5.02 (m, 13H, 12 x Man-OH, Glu-H), 5.08 (2 x d, 4H, J = 1.7 Hz, 4 x Man-H), 7.00-7.06 (m, 4H, Ar-H), 7.13-7.18 (m, 4H, Ar-H), 7.33-7.59 (m, 28H, Ar-H), 7.86 (dd, 4H, J₁ = 7.8 Hz, J₂ = 3.5 Hz, Ar-H), 8.11 (2 x s, 4H, Triazol-CH), 8.14-8.25 (m, 4H, Ar-H), 8.54 (d, 4H, J = 8.9 Hz, NHCO). Nekateri signali imajo razcepljene vrhove ali pa so podvojeni, ker imamo zmes dveh epimerov. *Signal je prekrit s topilom.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): zaradi slabe topnosti produkta posnet spekter ni dal nobenega jasnega signala navkljub dolgotrajnemu eksperimentu snemanja ¹³C spektra.

MS (ESI+): m/z = 3245 ([M+2H]⁺), 812.1 (100 %)

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3341, 2929, 1642, 1579, 1491, 1480, 1439, 1397, 1269, 1239, 1131, 1101, 1052, 1024, 794, 773, 755, 516.

Spojina 30

¹H NMR (400 MHz, Metanol-d₄): δ [ppm] = 2.25-2.60 (m, 8H, 4 x CH₂)*, 2.66-2.91 (m, 16H, 8 x CH₂), 3.13-3.23 (m, 11H, Glu-OMe, 4x CH₂), 3.50-3.92 (m, 68H, 20 x CH₂, 12 x Man-H, 1 x Glu-H, 12 x Man-H, 3x Glu-H), 4.25-4.35 (m, 2H, Glu-H), 4.30-4.54 (m, 24H, 4x CH₂CHCH₂, 4 x CH₂), 4.57-4.82 (m, 13H, 4 x CH₂CHCH₂, 4 x O-CH₂-Triazol, Glu-H)**, 5.22; 5.26 (2 x s, 4H, 4 x Man-H), 6.90-7.01 (m, 4H, Ar-H),

7.13-7.23 (m, 4H, Ar-H), 7.32-7.52 (m, 28H, Ar-H), 7.76-7.85 (m, 4H, Ar-H), 8.11 (s, 4H, Triazol-CH)**, 8.18-8.30 (m, 4H, Ar-H).

*Manjka 16 protonov, ki pripadajo CH₂ skupinam distančnika.

** Signala triazola in CH₂ skupine vezane na triazol sta za 4-krat premajhna.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): zaradi slabe topnosti produkta posnet spekter ni dal nobenega jasnega signala navkljub dolgotrajnemu eksperimentu snemanja ¹³C spektra.

MS (ESI+): m/z = 3425.4 ([M+6H]⁺), 769.7 (100 %)

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3360, 2929, 1673, 1579, 1457, 1389, 1271, 1239, 1199, 1128, 1101, 1051, 1022, 833, 797, 774, 755, 721, 684, 573, 518.