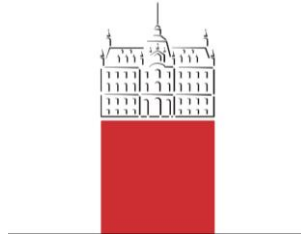


UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



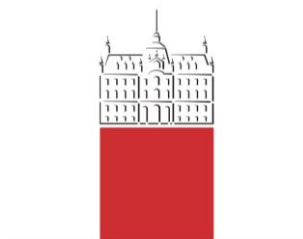
ANDRAŽ LAMUT

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ANDRAŽ LAMUT

SINTEZA IN BIOLOŠKO VREDNOTENJE
DENDRONSKIH ANTAGONISTOV RECEPTORJA
DC-SIGN

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF
DENDRON ANTAGONISTS OF RECEPTOR
DC-SIGN

Ljubljana, 2014

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

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju za vsestransko pomoč pri izdelavi diplomske naloge, praktične nasvete in podarjeno strokovno znanje. Hvala Alešu in Marku za nesebično pomoč pri delu v laboratoriju. Končno bi izrazil zahvalo svoji družini za podporo tekom študija in Mojci, ki me je spremljala na poti do diplome.

Diplomsko nalogo posvečam svojim staršem.

Izjava

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

Andraž Lamut

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Janko Kos, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

VSEBINA

I. POVZETEK.....	I
II. ABSTRACT	II
III. SEZNAM OKRAJŠAV	III
1. UVOD	1
1.1 LEKTINI KOT TARČE ZA PROTIMIKROBNO TERAPIJO	1
1.1.1 DC-SIGN	2
1.1.2 <i>FimH</i>	4
1.2 ANTIADHEZIVNA TERAPIJA.....	6
1.2.1 HIV-1 IN PROTIVIRUSNA TERAPIJA	7
1.2.2 UPEC IN PROTIBAKTERIJSKA TERAPIJA	8
1.3 STRUKTURA DC-SIGN IN ANTAGONISTI	10
1.3.1 VEZAVNO MESTO CRD DOMENE (DC-SIGN).....	11
1.3.2 GLIKOMIMETIKI	12
1.3.3 DENDRONSKI ANTAGONISTI	13
1.3.4 STRUKTURNI RAZREDI ZNANIH ANTAGONISTOV.....	14
1.4 TOPIKALNO UPORABNA ZDRAVILA	15
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	19
4. EKSPERIMENTALNI DEL	22
4.1 SINTEZNA POT PREKO BENZILNEGA ESTRA.....	22
4.1.1 <i>Sinteza benzil 2-(4-hidroksifenil)acetata (1)</i>	22
4.1.2 <i>Sinteza benzil 2-(4-(2-hidroksi-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)acetata (2)</i>	23
4.1.3 <i>Sinteza 2-(4-(2-hidroksi-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)ocetne kisline(3)</i>	24
4.1.4 <i>Sinteza benzil 2-(4-(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)acetata (4)</i>	25
4.1.5 <i>Sinteza 2-(4-(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-manopiranoziloksi)-3-</i>	

	(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)ocetne kisline (5).....	26
4.1.6	Sinteza 2-(4-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)ocetne kisline (6).....	27
4.1.7	Poskus sinteze benzil 2-(4-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)acetata (7).....	28
4.2	SINTEZNA POT PREKO METILNEGA ESTRA.....	29
4.2.1	Sinteza metil 2-(4-hidroksifenil)acetata (8).....	29
4.2.2	Sinteza metil 2-(4-(2-hidroksi-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)acetata (9).....	30
4.2.3	Sinteza metil 2-(4-(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)acetata (10).....	31
4.2.4	Sinteza metil 2-(4-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)acetata (11).....	32
4.2.5	Sinteza 2-(4-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)ocetne kisline (6).....	33
4.3	SINTEZA DISTANČNIKA	34
4.3.1	Sinteza 2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etan-1-ola (12).....	34
4.3.2	Sinteza 2-(2-(2-aminoetoksi)etoksi)etan-1-ola (13)	34
4.3.3	Sinteza terc-butil (2-(2-(2-hidroksietoksi)etoksi)etil)karbamata (14).....	35
4.3.4	Sinteza terc-butil (2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etil)karbamata (15)	36
4.3.5	Sinteza (2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etan-1-aminijevega klorida (16)	37
4.4	SINTEZA DENDRONOV	38
4.4.1	Sinteza 1-(4-(2-((3-((3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)amino)-3-oksopropil)amino)-2-oksoetil)fenoksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranozida (17).....	38
4.4.2	Poskus sinteze dendrona 1 (18).....	39
4.4.3	Sinteza N-(2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etil)-2-(4-(3-(naftalen-1-iloksi)-2-(α -D-manopiranoziloksi)propoksi)fenil)acetamida (19).....	41
4.4.4	Sinteza dendrona 2 (20).....	42
4.4.5	Sinteza N-(2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etil)-2-(4-(3-(naftalen-1-iloksi)-2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranoziloksi)propoksi)fenil)acetamida (21).....	43
4.4.6	Sinteza dendrona 3 (22).....	44

4.4.7	<i>Sinteza dendrona 4 (23)</i>	45
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	46
5.1	SINTEZA MONOMERA.....	46
5.1.1	<i>Tvorba benzilnega in metilnega estra (sinteza spojin 1 in 8)</i>	46
5.1.2	<i>Odpiranje epoksidnega obroča (sinteza spojin 2 in 9)</i>	47
5.1.3	<i>Glikozilacija alkohola (sinteza spojin 4 in 10)</i>	50
5.1.4	<i>Odstranjevanje zaščitnih skupin – Bn, Me in Ac estrov (sinteza spojin 3, 5, 6, 11 in poskus sinteze spojine 7)</i>	51
5.2	SINTEZA DISTANČNIKA	54
5.3	SINTEZA DENDRONA	55
5.3.1	<i>Tvorba amidne vezi (sinteza spojin 17 in 19) in zaščita OH skupin sladkorja (sinteza spojine 21)</i>	55
5.3.2	<i>Klik reakcija na dendronsko jedro (poskus sinteze spojine 18, sinteza spojin 20 in 22)</i>	55
5.3.3	<i>Odstranjevanje Ac estrov in tvorba končnega produkta (sinteza spojine 23)</i>	58
5.4	BIOLOŠKO VREDNOTENJE.....	59
5.4.1	<i>DC-SIGN</i>	59
5.4.2	<i>FimH</i>	60
6.	SKLEP IN ZAKLJUČEK	61
7.	LITERATURA	63
8.	PRILOGE	73
	<i>Priloga 1: Strukturne formule dendronskih antagonistov</i>	73
	<i>Priloga 2: Čiščenje spojin s sistemom IsoleraOne™</i>	76
	<i>Priloga 3: NMR spektri spojin</i>	80
	<i>Priloga 4: Analizni izvidi spektroskopskih tehnik (NMR, MS, IR)</i>	82

I. POVZETEK

Človeški organizem je vsakodnevno izpostavljen različnim patogenim mikroorganizmom (virusom, bakterijam, glivam, parazitom), ki povzročajo infektivne bolezni. Njihov vstop v telo posreduje lektin DC-SIGN (za dendrične celice specifični, medcelično adhezijsko molekulo-3 vezujoči neintegrin). Bakterije na površini svojih fimbrij izražajo lektin FimH, ki je virulentni dejavnik in omogoča bakterijam vstop v gostiteljsko celico. Inhibicija vezave patogenov na DC-SIGN / FimH bi predstavljala temelj novega koncepta protimikrobnega zdravljenja – antiadhezivne terapije. Virus humane imunski pomanjkljivosti (HIV-1) izkorišča DC-SIGN kot trojanskega konja za pobeg nadzoru imunskega sistema in raztros virusa po telesu, uropatogena *Escherichia Coli* pa receptor FimH za pritrditev na steno mehurja, kjer povzroči okužbo. V diplomski nalogi smo sintetizirali potencialne antagoniste DC-SIGN in FimH ter ovrednotili njihov biološki učinek. Sintezni načrt je bil usmerjen v pripravo derivatov glicerolomanozida kot monomernih spojin, katerim smo nato s tetramerno predstavitvijo hoteli povečati avidnost vezave na receptor v okviru sinteze dendrona. Pri tem smo za izolacijo in čiščenje spojin uporabljali ekstrakcijo in kromatografske metode, za identifikacijo in analizo spektroskopske tehnike. Optimizirali smo postopek odpiranja epoksidnega obroča, ki bi lahko bil uporaben tudi v industriji. S pomočjo klik kemije smo vzpostavili primeren postopek za sintezo dendronov in njihovo čiščenje. Biološko vrednotenje nastalih spojin je bilo izvedeno na vzpostavljenih *in vitro* testnih sistemih za DC-SIGN in FimH. Ugotovili smo, da so monomeri aktivni na DC-SIGN v spodnjem mikromolarnem območju. Spojina, ki na DC-SIGN ni bila aktivna pa se je vezala z visoko afiniteto na FimH, kar odpira nove možnosti uporabe kot protibakterijske učinkovine. V obeh primerih se spojine uvrščajo med močne antagoniste obeh receptorjev. Razvite spojine bi bile uporabne v obliki topikalnih pripravkov za aplikacijo na vaginalno sluznico v preventivi okužbe z virusom HIV kot alternativa in/ali dopolnilo mehanski zaščiti, kar je povsem nov koncept preprečevanja širjenja virusa. Antiadhezivna terapija po drugi strani ponuja mehanizem delovanja novih protibakterijskih učinkovin, ki ne vzpodbujajo razvoja rezistence, je bolniku prijazna in predstavlja prihodnost zdravljenja bakterijskih infekcij.

Ključne besede: DC-SIGN, FimH, HIV-1, antiadhezivna terapija, dendronski antagonisti.

II. ABSTRACT

Human organism is daily exposed to different pathogenic microorganisms (viruses, bacteria, fungi, parasites), which cause infectious diseases. Their entry into the body is mediated across the DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) lectin. Bacteria on the surface of their fimbriae express FimH lectin, which is virulence factor and allows bacterial entry into the host cell. Inhibition of pathogen binding to DC-SIGN / FimH would represent the new antimicrobial treatment concept – antiadhesion therapy. Human immunodeficiency virus (HIV-1) exploits DC-SIGN as a Trojan horse to escape immune surveillance and for viral dissemination throughout the body, but uropathogenic *Escherichia Coli* FimH for adhesion on bladder surface, where it causes infection. In the present study we have synthesized a potential DC-SIGN / FimH antagonists and evaluated their biological effect. Synthesis project was directed towards preparation of monomeric glycerolomannoside derivatives and afterward increasing their avidity with tetrameric presentation on dendron. We have used extraction and chromatographic methods for compound isolation and purification and spectroscopic techniques for identification and analysis. Along the experimental section we have optimized the epoxide ring opening procedure, which could be suitable also for industrial purposes. Using a click chemistry we have established a suitable procedure for dendron synthesis and purification. Biological evaluation was performed on established *in vitro* testing systems for DC-SIGN and FimH. We found out monomers to be active on DC-SIGN in lower micromolar range. A compound, that was not active on DC-SIGN showed high binding affinity to FimH, which opens new therapeutic possibilities. In both cases compounds are among the most potent antagonists known so far. Developed compounds could be used as a topical agents for application on vaginal mucosa in prevention of HIV infection as alternative approach and/or supplement to mechanical protection, which is completely new concept of prevention of virus spreading. Antiadhesion therapy, on the other hand, offers a new mechanism of action of antibacterial agents, that do not stimulate development of bacterial resistance, is patient-friendly and therefore represents prospective of treatment bacterial infections.

Keywords: DC-SIGN, FimH, HIV-1, antiadhesion therapy, dendron antagonists.

III. SEZNAM OKRAJŠAV

Å	angstrom
AK	aminokislina
APC	antigen predstavljena celica
Boc	<i>tert</i> -butiloksikarbonil
CMV	citomegalovirus
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i> – domena za prepoznavo ogljikovih hidratov
d	dublet
DC	dendritske celice
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i> – za dendritske celice specifični, medcelično adhezivsko 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 (ekivalent)
ESI	<i>electrospray ionization</i> – elektrorazpršilna ionizacija
FimH	<i>fimbrial adhesin H</i> – fimbrijski adhezin 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> – rešetanje visoke zmogljivosti
IBC	<i>intracellular bacterial communities</i> – znotrajcelični bakterijski skupki
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
KKR	kolonska kromatografija
m	multiplet
Man	manoza
MeV	<i>measles virus</i> – virus ošpic
MF	mobilna faza
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> – poglavitni kompleks tkivne skladnosti
Mr	relativna molekulska masa
MS	masna spektrometrija
MsCl	mezil klorid (metansulfonil klorid)
n.r.	nasičena raztopina
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> – jedrska magnetna resonanca
Nu	nukleofil
OF	organska faza
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i> – molekularni vzorci, povezani s patogeni
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> – receptor, ki prepoznava različne patogene molekularne vzorce
q	kvartet
QIR	<i>quiescent intracellular reservoirs</i> – tihi znotrajcelični rezervoarji
Rf	retencijski faktor
s	singlet

SARS-CoV	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus</i> – koronavirus, ki povzroča resen akutni respiratorni sindrom
Siglec 4A	<i>sialic acid binding immunoglobulin-like lectin 4A</i> – sialično kislino vezujoči imunoglobulinu podobni lektin 4A
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
WHO	<i>world health organization</i> – svetovna zdravstvena organizacija
WNV	<i>west Nile virus</i> – zahodnonilski virus
δ	kemijski premik
η	izkoristek reakcije
v	valovno število
Σ	vsota

1. UVOD

Infekcijske bolezni pestijo človeštvo že vse od njegovega obstoja dalje. Povzročajo jih patogeni mikroorganizmi (virusi, bakterije, glive, paraziti), ki se nahajajo v našem okolju in se tako kot mi neprestano borijo za preživetje (1). Po podatkih WHO infekcijske bolezni povzročijo 26 % vseh smrti svetovnega prebivalstva na letni ravni in so najpogostejši vzrok smrti v državah v razvoju. Ena izmed takih je tudi okužba z virusom HIV, za katero letno umre 1.5 milijona ljudi. Trenutno je v vseh državah sveta okuženih že preko 35 milijonov ljudi, kar daje okužbi s HIV razsežnosti pandemije (2).

Za zdravljenje infekcijskih bolezni se uporabljajo protimikrobna zdravila, ki pa zaradi razvoja rezistence mikroorganizmov postajajo vse manj učinkovita (3). To predstavlja velik problem javnemu zdravju, saj na ta način izgubljammo dragoceno orožje v boju z mikroorganizmi (4). Eden izmed načinov, kako ta problem rešiti, je razvoj novih protimikrobnih učinkovin. Pri tem je najpogostejši pristop identifikacija ustreznih bioloških tarč – specifičnih celičnih komponent, ki so odgovorne za bolezensko stanje in bi lahko predstavljale mesta za delovanje novih učinkovin (1).

1.1 LEKTINI KOT TARČE ZA PROTIMIKROBNO TERAPIJO

Lektini (lat. *legere*, izbirati) so celični proteini, ki jih lahko najdemo pri vseh živih bitjih – živalih, rastlinah, glivah in mikroorganizmih. Specifično vežejo ogljikove hidrate in na ta način skrbijo za medcelično prepoznavanje na molekularnem nivoju, kar omogoča komunikacijo med celicami (5). Pri vretenčarjih nahajamo dve večji skupini lektinov:

- znotrajcelične, ki imajo nalogo vezave oligosaharidnih struktur v jedru celice in procesiranju glikoproteinov,
- zunajcelične, ki prepoznavajo terminalne epitope ogljikovih hidratov na površini drugih celic in patogenih mikroorganizmov (6).

Biološke funkcije lektinov so zelo raznolike. Igrajo pomembno vlogo v prirojenem imunskem odzivu, saj so sposobni razlikovati številne kompleksne strukture ogljikovih

hidratov, četudi so le-ti sestavljeni iz istih monosaharidnih enot. Na tak način lahko sesalci razlikujejo med sebi lastnimi in telesu tujimi ogljikovimi hidrati, kar je osnova za uspešno odstranjevanje patogenih mikroorganizmov iz telesa (7, 8).

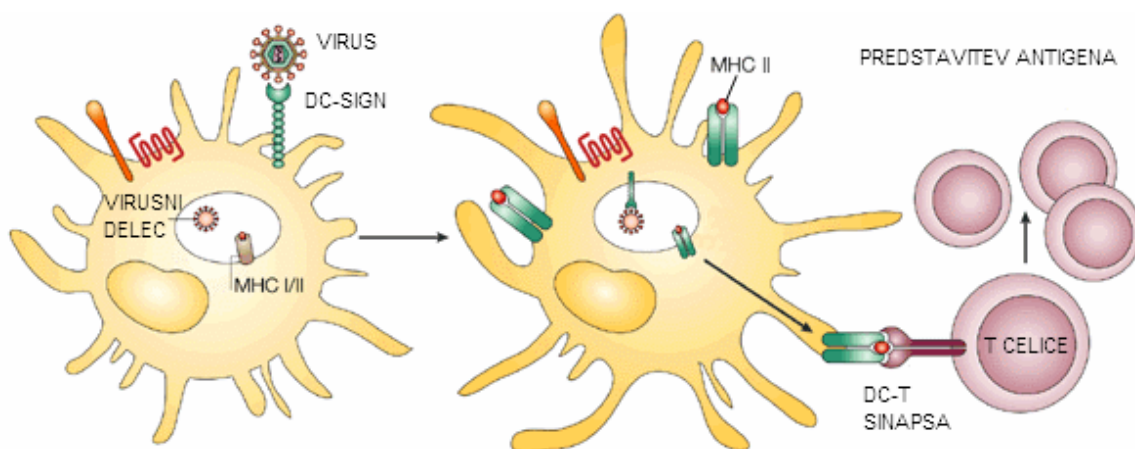
Patofiziološko pomembne interakcije med lektini in ogljikovimi hidrati predstavljajo zanimive biološke tarče in s tem odpirajo nove terapevtske možnosti. Ogljikovi hidrati so namreč še dokaj nedotaknjeno področje odkrivanja učinkovin (6), ki je bilo v preteklosti velikokrat podcenjeno, v zadnjem času pa doživlja renesanso. Velik raziskovalni interes pri tem vzbujata lektina DC-SIGN in FimH, ki sta bila prepoznana kot dobra kandidata za razvoj novih učinkovin. Ostali potencialno uporabni lektini so še selektini (do sedaj najbolj intenzivno proučevana skupina), Siglec 4A (sialično kislino vezujoči imunoglobulinu podobni lektin) ter virulentna faktorja *P. aeruginosa* PA-IL (galaktofilni lektin) in PA-IIL (fukoza-vezoči lektin) (6, 9).

1.1.1 DC-SIGN

DC-SIGN (**D**endritic **C**ell-**S**pecific **I**ntercellular adhesion molecule-3-**G**rabbing **N**on-integrin) je transmembranski protein, ki ga uvrščamo med lektine tipa C in glede na klasifikacijo po strukturi spada v podskupino II (10). Izraža se izključno na dendritskih celicah (DC), zato je njegova funkcija neposredno vezana na vloge, ki jih te celice opravljajo (11). Kot tarča je zanimiv, ker prepoznava jasno izražene molekularne vzorce PAMP (**P**athogen-**A**ssociated **M**olecular **P**atterns) na površini patogenov in na tak način deluje kot receptor za vezavo patogenov (PRR – **P**attern **R**ecognition **R**eceptor) (12). To je pri človeku pogosto tudi prvi korak okužbe z mnogimi mikroorganizmi. Molekule, ki bi preprečile vezavo PAMP na DC-SIGN, bi delovale protimikrobno in s tem zavirale okužbo v njeni začetni fazi (13).

DC so specializirane antigen predstavitvene celice (APC) in imajo visoko sposobnost vezave, obdelave in prezentacije antigenov (Slika 1). Ta lastnost jim daje osrednji pomen v okviru prirojenega imunskega odziva (14). Sposobne so generirati močan antigensko specifičen imunski odziv, odgovorne pa so tudi za vzdrževanje homeostaze našega imunskega sistema. DC-SIGN se izraža v izobilju na nezrelih DC, ki jih najdemo v

perifernih tkivih (koži, sluznicah) in v manjši meri na zrelih (aktiviranih) DC, ki so prisotne v limfatičnem tkivu (mandeljnih, bezgavkah in vranici) (15).



Slika 1: Dendritske celice in njihova vloga. Prirejeno po (22).

Funkcija DC-SIGN je zelo raznolika. Poleg tujih antigenov veže številne endogene ligande, od katerih sta najpomembnejši intercelularni adhezijski molekuli ICAM-2 (nahaja se na celicah žilnega endotelija) in ICAM-3 (prisoten na T limfocitih; po njem je receptor dobil tudi svoje ime). Ta lastnost DC omogoča dvoje:

- migracijo preko žilnega endotelija,
- tvorbo sinapse s T limfociti (DC-T celična sinapsa) (15, 16).

DC-SIGN posreduje pri adheziji in kotaljenju DC vzdolž venskih endoteljskih celic preko vezave na ICAM-2 (ugotovljeno s poskusom na popkovnični veni) (17). Z vezavo ICAM-3 pa v okviru nespecifične imunosti vzpodbuja zgodnji kontakt med T celicami in DC ter stabilizacijo DC-T kontaktnega območja. Na tak način deluje kot adhezijska molekula.

Pomembna naloga DC-SIGN je prepoznavanje telesu lastnih glikoziliranih antigenov in s tem zagotavljanje tolerance nezrelih DC, kar je bistvenega pomena za selektivno odstranjevanje tujkov iz organizma (18). Vezava tujega antigena sproži takojšnjo endocitozo in internalizacijo receptorja s celične površine v notranjost, kjer se kompleks ligand-receptor pospravi v pozne endosomalne ali lizosomalne predelke celice (19). Sledi dozorevanje DC, v okviru katerega pride do razgradnje in obdelave vezanih ligandov z namenom njihove predstavitve T celicam pomagalkam preko konjugacije fragmentov z MHC II receptorji (20), kar je povod za razvoj pridobljenega imunskega odziva.

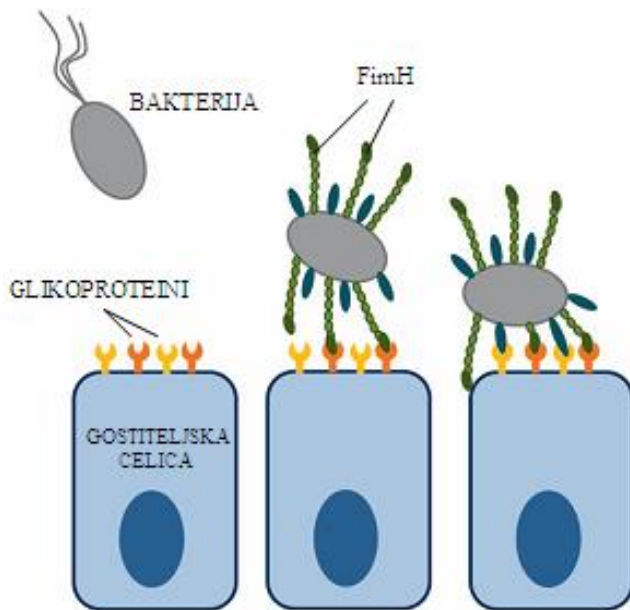
Vezava patogenov na DC-SIGN lahko povzroči zaviranje ali spodbujanje diferenciacije celic T_H1 , odziv celic T_H2 in/ali indukcijo diferenciacije regulatornih T celic (21). To je odvisno od narave patogena. Vsem pa je skupno, da povzročajo kronične infekcije in da je za vzdrževanje infekcije odločilnega pomena manipulacija ravnotežja med T_H1 in T_H2 celicami (22). Ne glede na zelo učinkovit mehanizem odstranjevanja tujkov, posredovan s pomočjo DC, pa nekateri patogeni izkoriščajo vezavo na DC-SIGN kot orodje za pobeg imunskemu nadzoru. Lep primer tovrstnega pobega je virus HIV-1.

1.1.2 FimH

FimH (**F**imbrial adhesin **H**) je strukturni protein bakterijskih fimbrij in ga zato uvrščamo med bakterijske lektine. Nahaja se na fimbrijah tipa 1, ki jih imenujemo tudi manozno specifične fimbrije in so značilnost družine *Enterobacteriaceae* (enterobakterije). FimH tako zasledimo pri *E. coli*, *K. pneumoniae* in *Salmonella spp.* Lociran je povsem na vrhu fimbrij, kar mu daje pomembno nalogo – vezavo ogljikovih hidratov, prisotnih na površini gostiteljskih celic (23, 24). To je ključnega pomena za potek okužbe pri človeku, saj predstavlja prvi stik med bakterijami in gostiteljem, ki omogoči bakterijam vzpostavitev ugodnega okolja za razvoj okužbe. Z zaviranjem interakcij na tem nivoju infekcija ne bi bila produktivna, kar bi predstavljalo temelj nove protimikrobne terapije (25).

Tipična bakterija ima na svoji površini okoli 200–500 enakomerno razporejenih fimbrij. Fimbrije tipa 1 so ene najpogostejših in tudi najboljše raziskanih. Izražene so pri več kot 95 % izoliranih kultur *E. coli*, ki povzročajo črevesne in urinarne infekcije. V urinarnem traktu fimbrije preko FimH receptorja posredujejo pri vezavi bakterij na uroplakin Ia in Ib, ki sta dva glavna glikoproteina na površini uroepitelijskih celic (26, 27). FimH selektivno prepozna njune D-manozne ostanke in je ključen za kolonizacijo bakterij v mehurju.

Zmožnost kolonizacije je neposredno odvisna od mehanizmov, ki jih ima bakterija na voljo, da se upira gostiteljevim mehanskim (tok urina, mukus) in imunološkim pregradam (prirojeni imunski odziv). Fimbriji omogočajo hitro in učinkovito adhezijo iz varne razdalije, s čimer se bakterija izogne aktivaciji imunskih celic in fagocitozi (Slika 2). Tako lahko nemoteno razvije svoje virulentne dejavnike (28, 29).



Slika 2: Adhezija bakterij na gostiteljske celice. Prvotne interakcije so šibke, nespecifične in posledica fizikalno-kemijskih površinskih lastnosti obeh vrst celic. Bakterija s tem vzorči površino gostiteljske celice. Temu sledijo dodatne receptorske povezave in ojačanje interakcij. Prirejeno po (28).

Adheziji sledi translokacija efektornih proteinov iz bakterijske citoplazme v gostiteljsko celico, za kar je nujen direkten, tesen in časovno dovolj dolg kontakt obeh celic (30). Na tak način pride do aktivacije tarčnih celic, ki z izločanjem citokinov povzročijo nastanek vnetja in s tem simptome bolezni.

Človeški imunski sistem prepoznava patogene bakterije s pomočjo fagocitov (nevtrofilcev, makrofagov, mastocitov in DC), ki s fagocitozo poskrbijo za ustrezen imunski odgovor. Ne glede na to, pa nekatere bakterije tovrstne celice izrabijo kot orodje, s katerim se skrijejo pred delovanjem imunskega sistema (29). FimH ima sposobnost, da v gostiteljski celici direktno sproži specifične signalne kaskade, ki vodijo do internalizacije bakterije v tarčno celico (23). Po vezavi na makrofage se tako npr. bakterije ubranijo fagocitoze, saj v notranjosti veziklov zmanjšajo izločanje reaktivnih kisikovih radikalov in kisel pH, kar jim omogoča preživetje znotraj fagocitne celice. To predstavlja rezervoar za (ponavljajočo se) infekcijo in raztros bakterij po telesu (31).

FimH se kot površinski lektin lahko pripne tudi na mastocite in jih aktivira, kar je za bakterije neugodno. Mastociti (pitanke) namreč začnejo izločati citokine, ki privabijo nevtrofilce na mesto infekcije. To pa povzroči eliminacijo bakterije iz telesa (32). Narava fagocitoze je torej dvojna; po eni strani je del skrbno reguliranega prirojenega imunskega odziva gostitelja, po drugi strani pa virulentni dejavnik bakterij. Bakterije so zmožne

regulirati število fimbrij na svoji površini – temu fenomenu pravimo **fazna variacija** (33). Ugotovljeno je bilo, da imajo bakterije z manjšim številom fimbrij tipa 1 več bičkov in so zato bolj gibljive. Tovrstna recipročna povezava omogoča bakterijam vzpenjanje iz sečnega mehurja proti toku urina vse do ledvic (34). Tipični primer bakterije, ki izkorišča ta mehanizem je uropatogena *Escherichia coli* (UPEC).

1.2 ANTIADHEZIVNA TERAPIJA

Številna zdravila, ki jih danes uporabljamo, so bila razvita na podlagi opazovanja narave oz. spojin, ki so prisotne v naravi. Koncept antiadhezivne terapije pri tem ni izjema. Začetki segajo vse do ustnega izročila o učinkovitosti soka brusnic (*Vaccinium macrocarpon*) pri preventivi urinarnih infekcij, ki je vzpodbudilo prve raziskave na tem področju (35–37). Alarmanten porast na obstoječo protimikrobno zdravljenje odpornih sevov je zahteval nov pristop k zdravljenju infekcijskih bolezni. Odgovor znanosti na ta problem je antiadhezivna terapija, ki predstavlja alternativo in/ali dopolnilo obstoječemu zdravljenju (38).

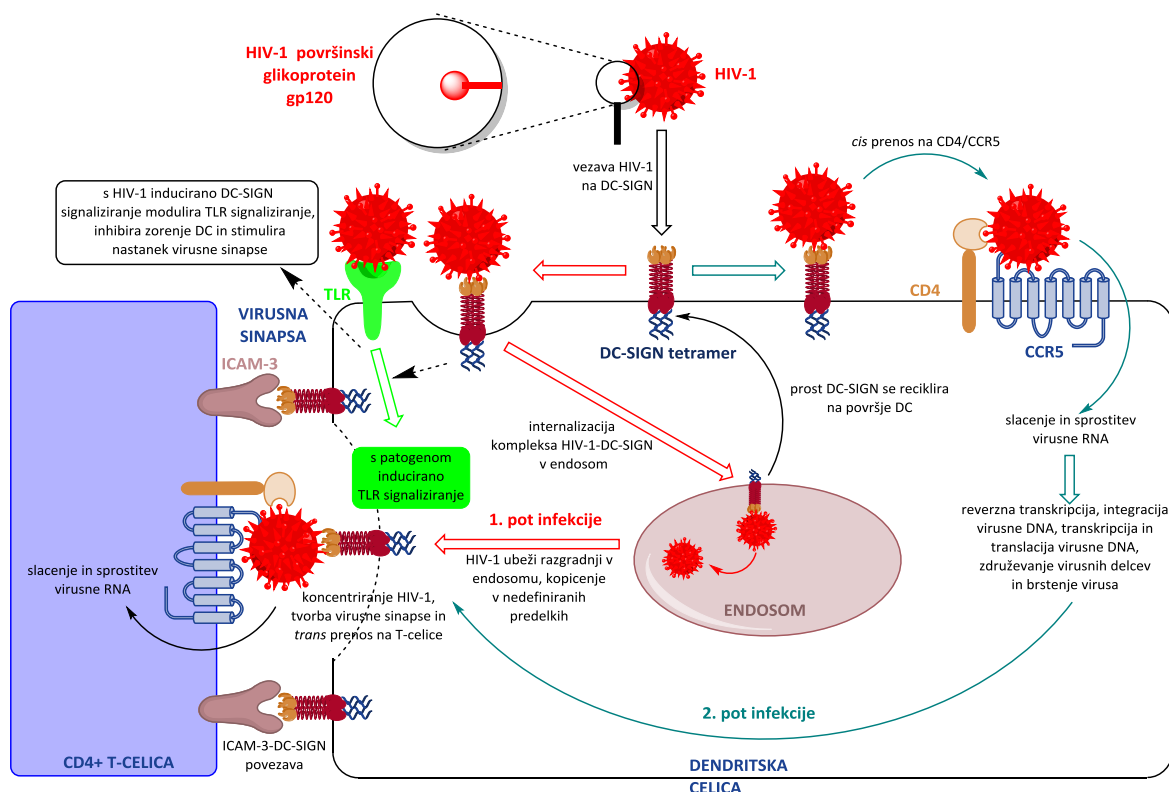
Bistvo antiadhezivne terapije je zmanjšanje kontakta med patogeni in gostiteljskim tkivom. Glavne prednosti takega pristopa so:

- mehanizem delovanja ne vzpodbuja razvoj rezistentnih sevov, ker nanje ne izvajamo selekcijskega pritiska (patogena ne uničimo, ampak le preprečujemo njegovo vezavo),
- potencialno razviti rezistentni sevi na tovrstne učinkovine bi hkrati negativno vplivali tudi na lastno sposobnost za vezavo na gostiteljsko celico in s stališča evolucije ne bi bili favorizirani,
- ne prizadane normalne bakterijske flore v telesu (pogost neželeni učinek obstoječih protimikrobnih zdravil),
- ne delujemo mikrobicidno, zato ne pride do sproščanja toksinov, ki bi imeli dodatne škodljive učinke na bolnika,
- vzpodbujanje lastne imunosti (telo je izpostavljeno nepoškodovanim, a hkrati nefunkcionalnim patogenom, kar omogoča razvoj ustreznega imunskega odziva, ki nadalje ščiti pred ponovno infekcijo z istim mikroorganizmom) (28, 39–41).

Vloga DC-SIGN pri poteku okužbe z mikroorganizmi je široka. Poleg vezave številnih virusov (HIV-1, HCV, CMV, Dengue, Ebola, SARS-CoV, HSV, H5N1, WNV, MeV) (21, 42–45), prepoznava tudi PAMP nekaterih bakterij (*Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leptospira interrogans*) (46, 47), gliv (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*) (48) in parazitov (*Leishmania spp.*, *Schistosoma mansoni*) (49, 50). Inhibicija interakcij med DC-SIGN in patogeni je zatorej široko uporaben pristop antiadhezivne terapije, ki bi preprečevala ne le lokalizirano okužbo DC, pač pa tudi raztros patogena po telesu. DC-SIGN odpira možnosti za razvoj novih, učinkovitih protimikrobnih zdravil (13).

1.2.1 HIV-1 IN PROTIVIRUSNA TERAPIJA

Prvi koncept antiadhezivne terapije najbolj ponazarja okužba z virusom HIV-1 (bolj virulentna, lažje prenosljiva in infektivnejša oblika virusa HIV (3, 51)). HIV-1 se prenaša med spolnim odnosom preko površine sluznice in/ali krvi, od koder se transportira v limfo in limfne organe, kjer lahko okuži tarčne celice – CD4⁺ T limfocite (Slika 3).



Slika 3: Potek okužbe z virusom HIV-1. Prirejeno po (21).

V sluznici ga pričakajo DC, na katere se veže s svojim plaščnim glikoproteinom gp120 preko receptorja DC-SIGN. Kompleks ligand-receptor se takoj internalizira in pospravi v endosom (52), kjer zaradi kislega pH kompleks razpade. Prost DC-SIGN se vrne nazaj na površino celice, virus pa se s pomočjo endosomalnih encimov razgradi (53). Na tak način se odstrani večina virionov. Majhen delež virusa se temu izogne, ker ostane vezan na DC-SIGN in kot tak ohrani infekcijsko sposobnost (15, 54). V DC ostane še dolgo skrit v obliki **multivezikularnih telesc** (55), a samih DC pri tem ne okuži. Alternativna pot vstopa virusa v celico je preko *cis* prenosa na CD4 / CCR5 receptorje, izražene na nezrelih DC. Po vezavi pride do zlitja virusne ovojnice z membrano celice, kar povzroči okužbo DC (56).

V obeh primerih HIV-1 izrablja DC kot trojanskega konja, s katerim se skriva pred imunskim sistemom gostitelja (57). DC tekom zorenja migrirajo v limfatično tkivo, kjer srečajo T limfocite. Ob pomoči DC-SIGN pride do tvorbe **infekcijske sinapse** (DC-T celični kontakt), preko katere se virus prenese na CD4⁺ celice. Proces imenujemo *trans* prenos ali transfekcija (58). S tem se virus raznese po celotnem telesu in povzroči trdovratno razsejano okužbo, ki oslabi imunski sistem.

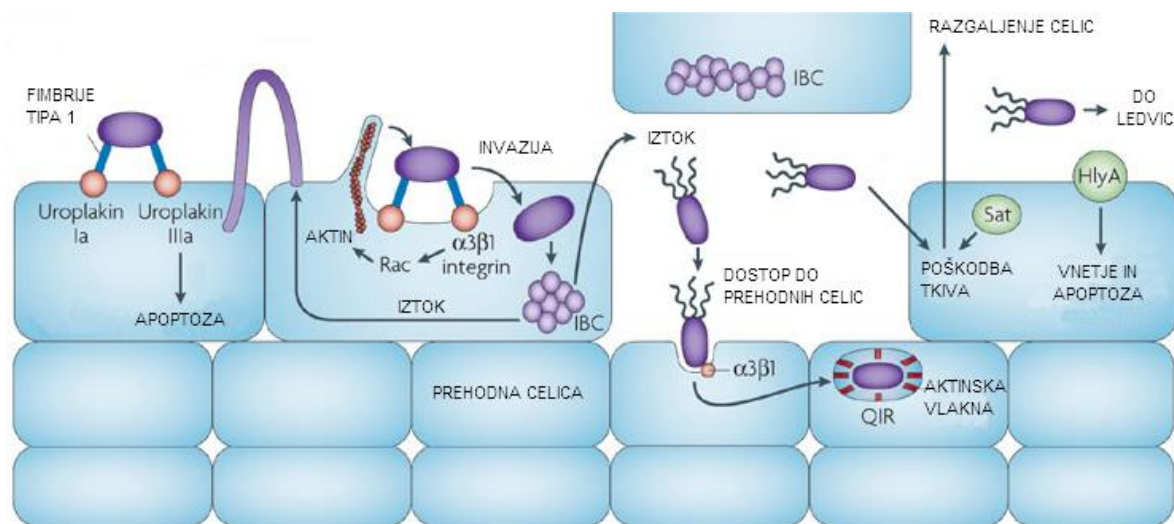
HIV-1 tako po eni strani inhibira zorenje DC, po drugi strani pa vzpodbuja nastanek DC-T celične sinapse – proces, ki ga sicer opravljajo le zrele DC. Ob tem HIV-1 izkorišča DC-SIGN tudi za modulacijo TLR (**Toll-Like Receptor**) in z njim povezanih signalnih poti, ki omogočajo pobeg nadzoru imunskega sistema (21).

1.2.2 UPEC IN PROTIBAKTERIJSKA TERAPIJA

Infekcije urinarnega trakta so med najpogostejšimi vnetnimi boleznimi, ki jih povzročajo patogeni. Od tega jih več kot 80 % povzroča uropatogena *E. coli*. Pri zdravih ljudeh večina tovrstnih infekcij izvira iz rektuma, od koder bakterije zaidejo v sečnico in splezajo do mehurja, kjer sprožijo infekcijo (6, 59).

Drugi koncept antiadhezivne terapije lahko prikažemo na primeru UPEC. Po vstopu v urinarni trakt se UPEC najprej pritrdi na ploščate površinske uroepitelijske celice mehurja s pomočjo FimH, ki se veže na uroplakin Ia (60) (Slika 4). Vezava na uroplakin IIIa stimulira signalne poti, ki pripomorejo k vdoru bakterije v celico in apoptozi (61). Vdor

omogoča tudi vezava FimH na $\alpha 3$ in $\beta 1$ integrinska receptorja (direktno povezana z aktinom) in s strani bakterije povzročena destabilizacija mikrotubulov (62, 63). Ob tem pride do lokalne prerazporeditve aktinskih filamentov, kar ima za posledico ovitje bakterije in njeno internalizacijo.



Slika 4: UPEC in okužba urinarnega trakta. Prirejeno po (70).

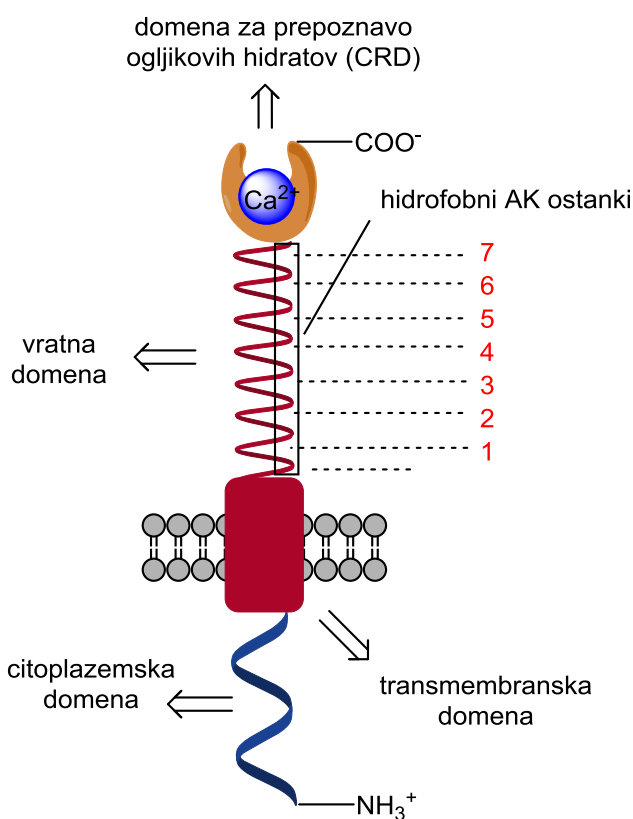
Znotraj celice se UPEC hitro namnoži in tvori znotrajcelične bakterijske skupke (IBC). To so biofilmu podobni kompleksi, ki služijo kot prehodna zaščita pred okoljem (64). Iz tovrstnih kokonov se lahko posamezne UPEC odcepijo, preobrazijo v gibljivejšo obliko in izvržejo iz celice v lumen mehurja (65). Na tak način dosežejo sosednje celice in okužba se širi. UPEC izloča tudi specifične toksine (Sat, HlyA), ki predrejo membrano uroepitelijskih celic in pripomorejo k poškodbi tkiva.

Imunski odziv gostitelja se na infekcijo odzove z mobilizacijo levkocitov, ki vdirajo v okužene celice in s tem povzročijo dodatne poškodbe tkiva, kar vodi do apoptoze in odlučanja vrhnjih celic (66). S tem se razgalijo vmesne (prehodne) celice mehurja, ki ležijo pod njimi in so sedaj dostopne za vdor bakterij. UPEC se v teh celicah transportira v endocitozne vezikle, kjer pride do premreženja z aktinskimi vlakni. Nastanejo t.i. tihi znotrajcelični rezervoarji (QIR) v katerih se bakterija ne razmnožuje – je v spečem stanju (67, 68). V takšni obliki lahko UPEC preživi dolgo časa, saj so QIR skriti pred imunskim sistemom gostitelja. Služijo kot zaloga bakterij, ki se lahko kasneje reaktivirajo in namnožijo, nato pa izvržejo iz celice ali v citosolu tvorijo IBC, iz katerih se UPEC

sproščajo v okolico. Tako pride do ponovne akutne infekcije mehurja (69). Če infekcije ne zdravimo, se bakterije povzpnejo preko sečevodov vse do ledvic, kjer povzročijo vnetje (pielonefritis). Od tod lahko zaidejo v kri, kar vodi v življenje ogrožujočo sepsa (70). Reaktivacija QIR in remisija bolezni zahtevata vnovično zdravljenje z obstoječimi protibakterijskimi učinkovinami. To vzpodbuja nastanek rezistentnih sevov in zmanjšuje terapevtske možnosti. Razvoj učinkovitih zdravil, ki bi preprečevale in zdravile tovrstne infekcije brez vzpodbujanja rezistence, je zato nujen (6).

1.3 STRUKTURA DC-SIGN IN ANTAGONISTI

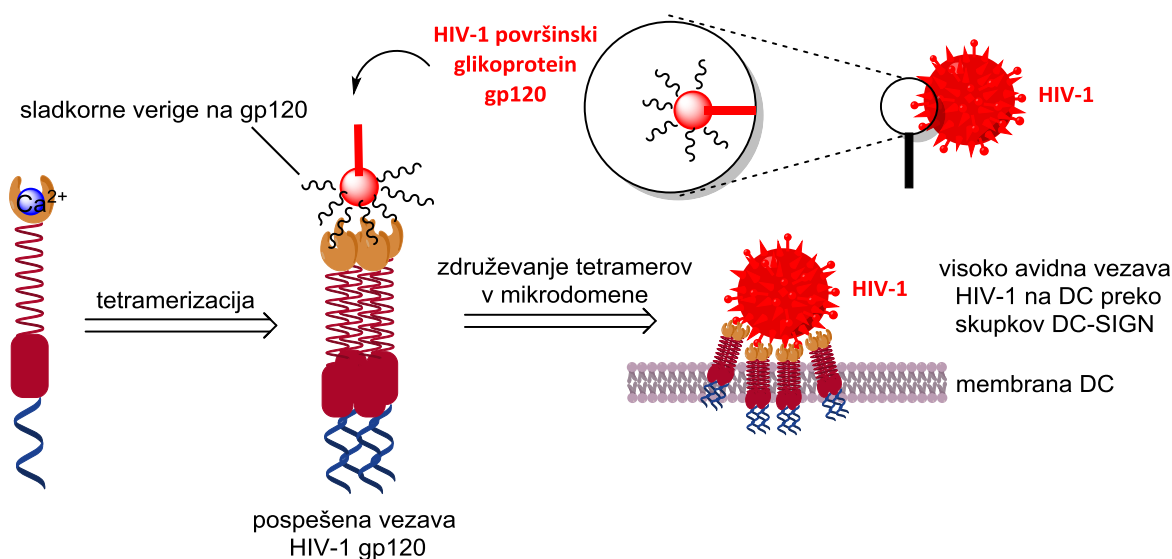
Receptorji so pogoste biološke tarče učinkovin. Za razumevanje mehanizmov delovanja je potrebno natančno poznavanje njihove strukture. Najpomembnejši strukturni element DC-SIGN je vrhnja domena za prepoznavo ogljikovih hidratov (CRD) (Slika 5). Ta ima globularno strukturo, ki veže tri Ca^{2+} ione – odgovorne za vzdrževanje terciarne strukture



in tvorbo koordinacijskih vezi z ligandi (71, 72). Pod njo je vratna domena, sestavljena iz 7 in pol ponovitev po 23 AK v tandemu. Skupaj tvorijo vijačnico, ki se dviga nad površino celice. Na tak način izpostavijo CRD za interakcije z ligandi in jo hkrati stabilizirajo. V vratni regiji se na vsake 3–5 AK pojavijo hidrofobni ostanki, ki so obrnjeni navzven in navpično poravnani. To jim omogoča tvorbo interakcij z vratnimi domenami drugih DC-SIGN receptorjev. Sledita še transmembranska in znotrajcelična domena (citoplazemski rep) receptorja (21, 73).

Slika 5: Struktura DC-SIGN. Prirejeno po (74).

Pri vezavi patogenov na DC-SIGN igra ključno vlogo tetramerizacija receptorja, ki združi štiri CRD domene in s tem poveča afiniteto vezave oligosaharidnih enot na površini mikroorganizma (Slika 6). Zveča se tudi specifičnost vezave in tako določi nabor patogenov, ki jih prepozna DC-SIGN (74). Poleg tega DC-SIGN na plazemski membrani še dodatno tvori skupke, ki se organizirajo v membranske mikrodomene. To je pomembno za vezavo in internalizacijo – so funkcionalna mesta za zasidranje patogenov (75). Tetramerizacijo omogočajo vratne domene receptorja, ki se povežejo preko izpostavljenih hidrofobnih AK ostankov (76). Te domene v odvisnosti od pH regulirajo ravnotežje med monomerno in tetramerno obliko. S tem se neposredno spreminja tudi afiniteta do ligandov, kar v kislem okolju endosomov omogoča odpuščanje vezanih patogenov (77). Po vrhu vsega se je DC-SIGN zmožen prilagoditi prostorski razporeditvi terminalnih mono- in oligosaharidov, tako da lahko vse CRD domene pridejo v stik s svojimi ligandi. Tovrstna konformacijska prožnost mu omogoča, da veže patogene zares selektivno in učinkovito (74, 78).

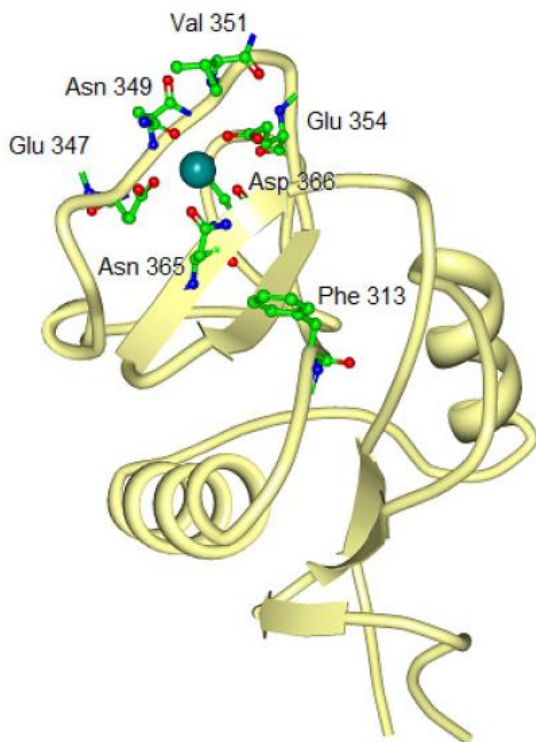


Slika 6: Po vezavi HIV-1 receptor tetramerizira in se združi v skupke (mikrodomene). Prirejeno po (74).

1.3.1 VEZAVNO MESTO CRD DOMENE (DC-SIGN)

Najpomembnejši del CRD domene je vezavno mesto, ki z vezavo nativnih oligosaharidov skrbi za medmolekulsko prepoznavanje (Slika 7). Sestavljajo ga Ca^{2+} ion, ki je oktakoordiniran – tvori 6 koordinacijskih vezi z AK ostanki (Glu347, Glu354, Asp366,

Asn349, Asn365), 2 pa sta na voljo za vezavo liganda (13); ter preostali pomembnejši AK ostanki, ki tudi prispevajo k vezavi liganda (Phe313, Val351, Arg345 in Asn362) (79). V



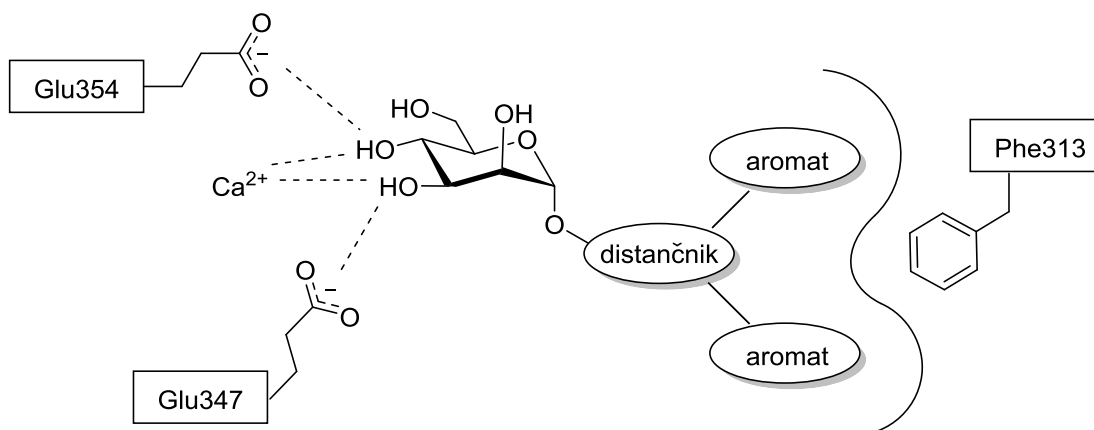
vezavno mesto se kot nativni ligand veže D-manoza, ki preko hidroksilnih skupin na mestih 3 in 4 tvori koordinacijski vezi s Ca²⁺ in vodikove vezi z AK ostanki (Glu354, Glu347). Phe313 predstavlja hidrofobno področje – fenilni obroč stranske verige ga razdeli na dva dela. To sta dva hidrofobna žepka, ki omogočata dodatne hidrofobne in/ali π - π interkacije vezanih ligandov. Eden je obrnjen proti Ca²⁺, drugi pa se nahaja za fenilnim obročem. Območje Arg345 in Asn362 je zaenkrat še slabo raziskano (79, 80).

Slika 7: CRD domena – vezavno mesto za ogljikove hidrate. Prirejeno po (81, 82).

1.3.2 GLIKOMIMETIKI

Potencialne zdravilne učinkovine morajo zadostiti določenim kriterijem. Nativni monosaharidi se v vezavno mesto vežejo le s šibko afiniteto, zato niso primerni kot učinkovine. Dodaten problem predstavljajo njihove slabe farmakokinetične lastnosti, saj so zelo polarni. Rešitev omogoča razvoj glikomimetikov – spojini, ki posnemajo bioaktivno funkcijo ogljikovih hidratov (6, 13).

Osnovo za načrtovanje glikomimetikov – antagonistov predstavlja D-manoza, ki jo vsebuje večina nativnih ligandov (HIV-1 gp120 plaščni glikoprotein je visoko manoziliran). Ta služi kot sidro, ki se pripne v osrednji del vezavnega mesta – na Ca²⁺ ion (Slika 8). Nadalje lahko afiniteto vezave povečamo, če na ustrezni oddaljenosti od sladkornega dela pripravimo hidrofobne molekulske fragmente z namenom, da pokrijemo oba hidrofobna žepka. Na tak način so bili sintetizirani najmočnejši monomerni antagonisti do sedaj (79, 83). Ob tem se je kot najboljši distančnik izkazal glicerolni strukturni fragment.



Slika 8: Interakcije monomera v vezavnem mestu. Prirejeno po (79).

1.3.3 DENDRONSKI ANTAGONISTI

Do sedaj razviti antagonisti DC-SIGN so kompetitivni antagonisti. To pomeni, da je ugodno, če se na receptor vežejo z večjo afiniteto kot nativni ligandi. Slednji avidnost vezave povečajo predvsem na račun multivalentne predstavitve monosaharidnih enot, kar omogoča interakcije z več CRD domenami hkrati (glej sliko 6). Podoben pristop se je uveljavil tudi pri načrtovanju glikomimetikov (84). Na tak način so s tvorbo razvejanih polimernih struktur (dendrimerov ali dendronov) sintetizirali številne različne molekule, ki so vse imele boljšo afiniteto od ustreznih monomernih enot (13) in inhibirale vezavo gp120 na DC-SIGN v nanomolarnem območju. To nakazuje na dejstvo, kako pomembna je polivalentna predstavitev za doseganje visoke avidnosti vezave.

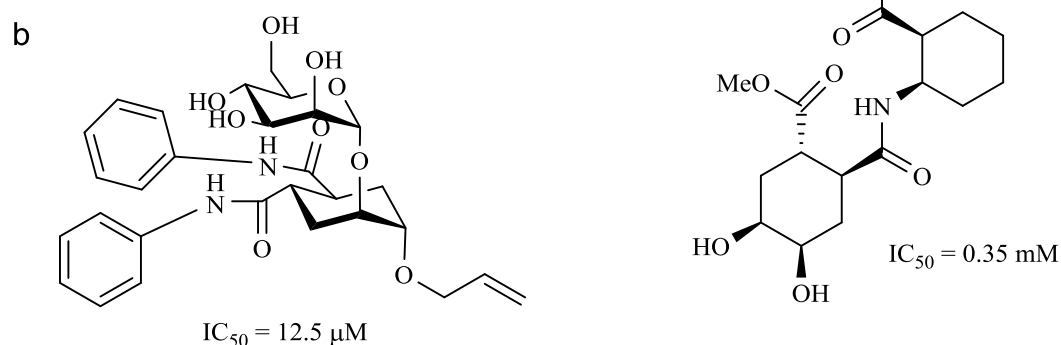
Čeprav imajo monovalentni glikomimetiki prenizko jakost vezave (najmočnejši imajo IC₅₀ v spodnjem mikromolarnem območju), so v primerjavi z D-manozo kot nativnim monosaharidom še vedno močnejši. To pomeni, da se multivalentna predstavitev ligandov lahko zmanjša do nivoja tetramera ob ohranitvi ustrezne afinitete do receptorja v nanomolarnem območju (13, 85).

Termin DENDRIMER ali DENDRON izhaja iz besede *dendros*, kar v grščini pomeni drevo. Nanaša se na razvejano drevesasto strukturo sintetiziranih makromolekul s ponavljajočimi se strukturnimi motivi. Sestavlja ga dendronsko jedro (locirano v samem središču molekule), iz katerega radialno v krogu izhajajo razvejane ročice (posamično nanizane monomerne enote) (86, 87).

1.3.4 STRUKTURNI RAZREDI ZNANIH ANTAGONISTOV

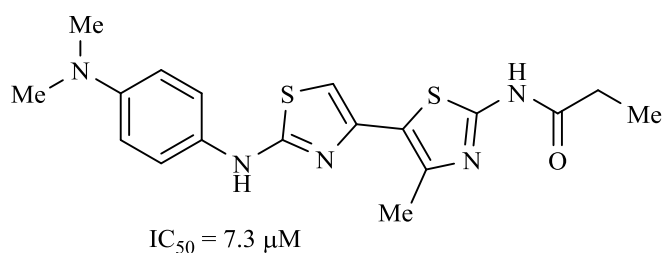
V osnovi ločimo tri strukturne razrede monovalentnih antagonistov DC-SIGN:

- glikozidi na osnovi fukoze (Slika 9a),
- glikozidi na osnovi manoze (Slika 9b),
- neglikozidne spojine (Slika 10) (13).



Slika 9: Tipična predstavnika glikozidnih antagonistov DC-SIGN. Prirejeno po (13).

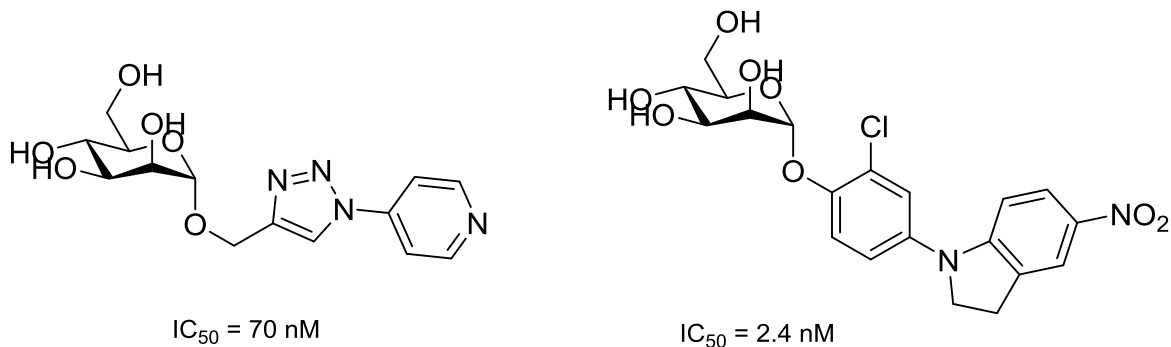
Prvi kot sidro vsebujejo L-fukozo in do receptorja izkazujejo nizko afiniteto. Gre za α -fukozilamide kot trisaharidne mimetike. Bistveno nižjo IC_{50} dosegajo glikozidi na osnovi D-manoze, ki so pseudo-1,2-manobiozidni analogi in v svoji strukturi vsebujejo dodatna lipofilna področja. Ti veljajo za do sedaj najmočnejše na ogljikovih hidratih temelječe monovalentne antagoniste DC-SIGN (83). Posebno skupino predstavljajo neglikozidni antagonisti, ki so bili identificirani s pomočjo visokozmogljivega reševanja knjižnice spojin (HTS) (88). Njihova afiniteta je v spodnjem mikromolarnem območju, čeprav strukturno niso podobni naravnim mono- in oligosaharidnim ligandom. Odsotnost ogljikohidratnih strukturnih motivov nakazuje na dejstvo, da le-ti niso pogoj za uspešen antagonistični učinek. Glede na to, da tovrstne molekule ne vsebujejo funkcionalnih skupin, ki bi



učinkovito vezale Ca^{2+} , je njihov mehanizem delovanja najverjetneje drugačen in ne gre za enostavni kompetitivni antagonizem kot pri prejšnjih dveh skupinah.

Slika 10: Neglikozidni antagonisti DC-SIGN. Prirejeno po (13).

Antagonisti na FimH so strukturno zelo sorodni antagonistom DC-SIGN (Slika 11). Vselej kot sidro vsebujejo D-manozo, na katero je pripeto lipofilno (aromatsko) področje. Najmočnejši FimH antagonisti imajo za aglikonski del ariltriazolni ali indolinilfenilni strukturni fragment (89).



Slika 11: Antagonisti FimH. Prirejeno po (89).

1.4 TOPIKALNO UPORABNA ZDRAVILA

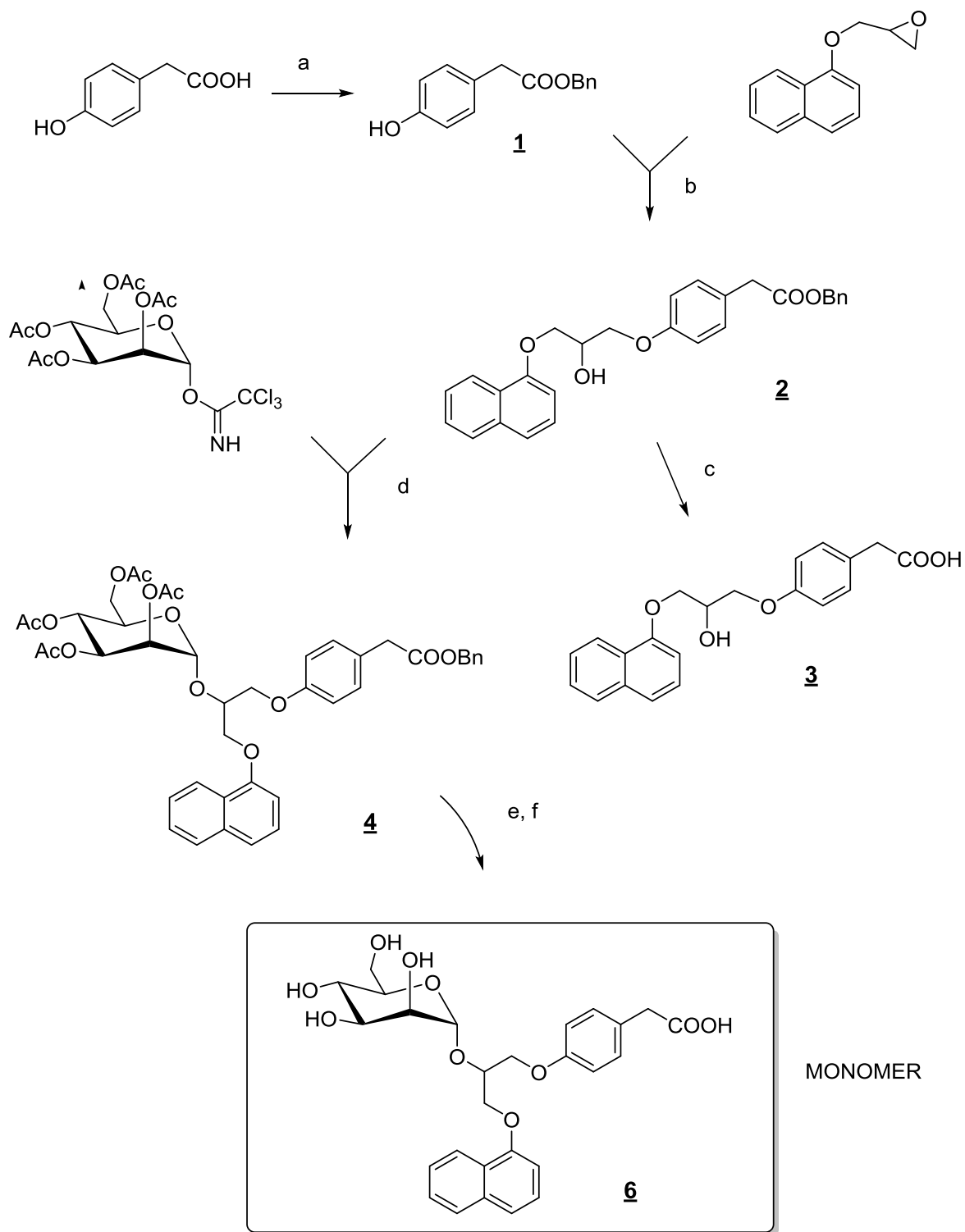
Virus HIV z do sedaj znanimi zdravili ne moremo odstraniti iz telesa, zato le preprečujemo poslabšanje simptomov bolezni in njeno napredovanje (3). Pravtako zaenkrat še ni učinkovitega cepiva, ki bi pred virusom nudilo popolno zaščito. Razvoj novih zdravil na tem področju se zato usmerja v preprečevanje širjenja okužbe. Topikalna zdravila za preventivo tako predstavljajo dopolnilo in/ali alternativo mehanski zaščiti (kondomu), ki se v najbolj prekuženih predelih sveta še vedno premalo uporablja (90). Razlogi za to so kulturne narave (kondom v teh deželah pomeni nezvestobo, nezaupanje v partnerja) in slabo sodelovanje partnerja (predvsem moških) (91). Topikalno uporabna zdravila v obliki vaginalnega gela, kreme, pene ali obročka s podaljšanim sproščanjem bi pomenila za ženske novo možnost, s katero bi lahko kontrolirale okužbo brez sodelovanja oz. privolitve partnerja (92). Antagonisti DC-SIGN bi bili uporabni kot učinkovine za preventivo okužbe s HIV v obliki pripravkov za topikalno aplikacijo na vaginalno sluznico. Tako bi se izognili sistemski aplikaciji zdravila, ki vzpodbuja razvoj rezistentnih sevov in virusnih mutantov, zaradi katerih terapija sčasoma ne bi bila več učinkovita (90, 93).

2. NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge bomo s kemijsko sintezo pripravili nove glikomimetične spojine, potencialne antagoniste DC-SIGN in FimH. Ti bodo vsebovali vse strukturne elemente, ki so pomembni za vezavo in prispevajo k večji afiniteti do receptorja: D-manozo, glicerolni distančnik in dve hidrofobni področji. V našem primeru bosta hidrofobni področji dva aromatska dela, s katerima želimo doseči dodatne hidrofobne in/ali π - π interakcije v vezavnem mestu (pokriti oba hidrofobna žepka). Glavni problem tovrstnih spojin je bila slaba vodotopnost (79, 89), ki jo bomo poskušali izboljšati tako, da bomo v molekulo vgradili polarno funkcionalno skupino (karboksilno kislino). Ta v odvisnosti od pH ionizira, s čimer bi se topnost še povečala. Na tak način želimo izboljšati fizikalno-kemijske lastnosti molekule in s tem zagotoviti njeno terapevtsko uporabnost. Kislina nam bo služila tudi kot funkcionalna enota za nadaljno pripajanje distančnika.

Naš sintezni načrt bo najprej usmerjen v pripravo monomerne spojine, kateri bomo nato s tetramerno predstavitvijo v okviru sinteze dendrona poskušali povečati avidnost vezave do receptorja. V ta namen bomo nanjo sprva pripeli distančnik, ki bo vzdrževal razdaljo monomernih enot od dendronskega jedra. Z izbiro ustrezne dolžine distančnika bomo poskušali med posameznimi monomernimi enotami doseči razdaljo ~ 40 Å, kar ustreza širini CRD domene DC-SIGN (74). Tako bi pokrili vsa 4 vezavna mesta, ki nastanejo po tetramerizaciji receptorja, do katere pride ob vezavi patogenov. Končna reakcija bo vezava spojin na tetravalentno dendronsko jedro, pri čemer bomo uporabili postopek klik kemije. Tako želimo doseči karseda visoko afiniteto do receptorja in s tem ustrezno jakost, ki bi pomenila, da je spojina primerna kandidatka za zdravilno učinkovino.

Sintetizirane spojine **2**, **3**, monomer in dendron bomo ovrednotili na biološki učinek s pomočjo razvitega *in vitro* testnega sistema za določanje sposobnosti inhibicije vezave HIV-1 gp120 na izolirano ekstracelularno CRD receptorja DC-SIGN (94). Ker so podobne monomerne spojine v preteklosti izkazovale zelo visoko afiniteto tudi do lektina FimH, bomo spojino **6** nadalje testirali še z vzpostavljenim *in vitro* testnim sistemom za določanje sposobnosti inhibicije vezave poliakrilamidnega glikopolimera TM-PAA na CRD receptorja FimH (95).



(a) benzilbromid, NaHCO₃, DMF, 60°C

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

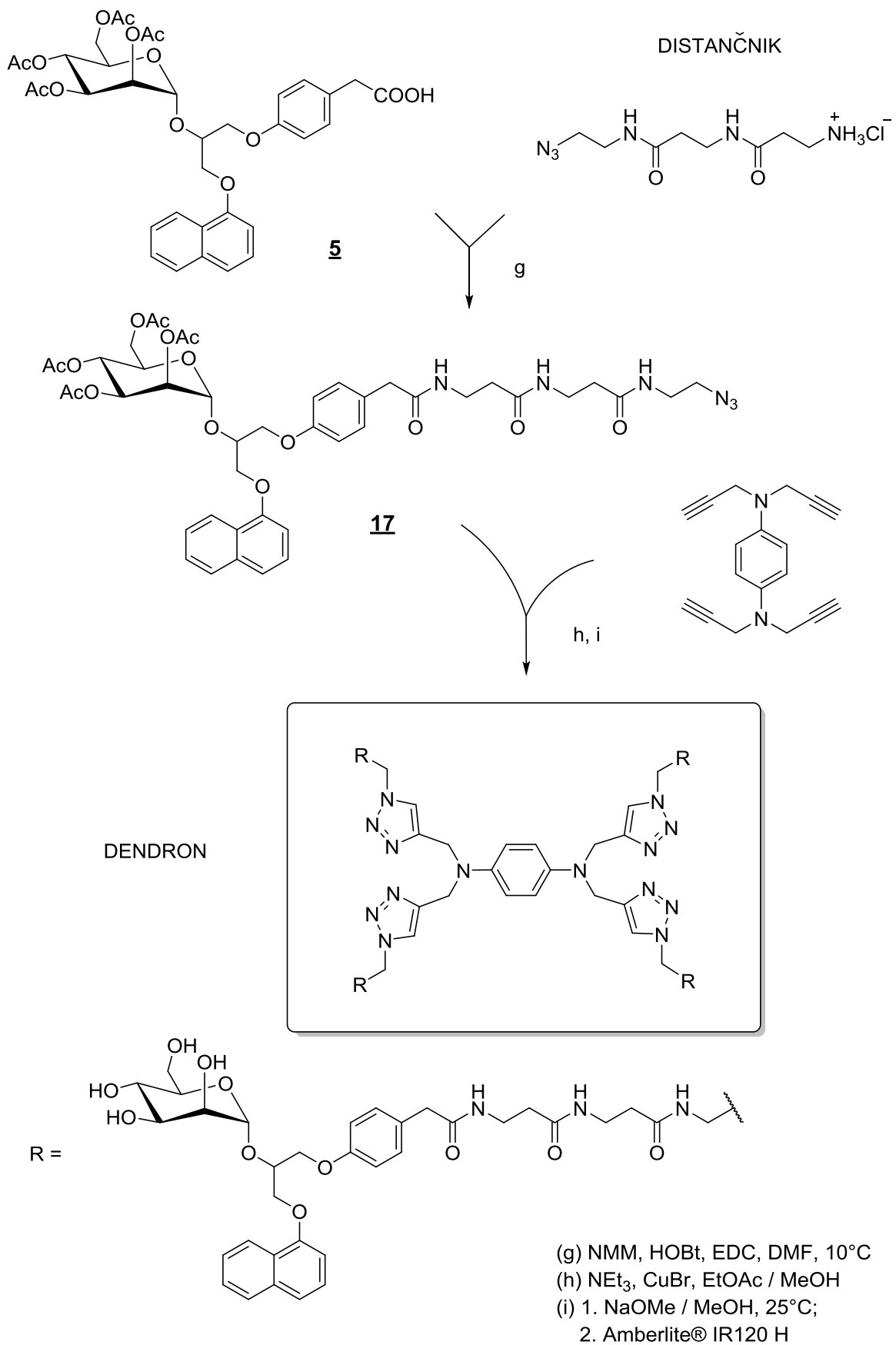
(c) 1. 1M NaOH, EtOH, 25°C; 2. 1M HCl

(d) TMSOTf, DKM, -20°C

(e) H₂ / Pd / C, CH₃COOH, 25°C

(f) 1. NaOMe / MeOH, 25°C;
2. Amberlite® IR120 H

Slika 12: Sintezni načrt priprave monomera.



Slika 13: Sintezni načrt priprave dendrona.

3. MATERIALI IN METODE

Reagenti in topila

Pri delu smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Sigma-Aldrich, Fluka, Merck in so bili ustrezne čistosti, kot je navedel proizvajalec. Brezvodni DKM in MeOH smo pripravili tik pred uporabo po standardnem postopku z destilacijo in ju hranili nad molekularnimi siti (velikost por 3 Å za MeOH in 4 Å za DKM). 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.

Laboratorijska oprema

- magnetno mešalo IKA[®] RCT basic IKAMAG Magnetic stirrer
- tehtnica METTLER TOLEDO[®] PB403-S/FACT Precision Balance
- UV svetilka CAMAG UV-cabinet II ($\lambda = 254\text{nm} / 366 \text{ nm}$)
- rotavapor BÜCHI[®] type R-200
- mikrovalovni reaktor CEM Discover[®]

Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC) – kot stacionarno fazo smo uporabljali plošče proizvajalca Merck, TLC Silica gel 60 F254 z 0,2 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem in različne mobilne faze. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko in orositvene reagente ninhidrin, fosfomolibdensko kislino, bromkrezol zeleno, FeCl_3 .

Kolonska kromatografija (KKR) – kot stacionarno fazo smo 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. Pretok mobilne faze smo po potrebi pospeševali z uvajanjem zračnega nadtlaka.

Reverznofazna kolonska kromatografija – izvajali smo jo na polavtomatiziranem sistemu IsoleraOne[™] proizvajalca Biotage[®]. Kot stacionarno fazo smo uporabili Biotage[®] kolone SNAP 25g in SNAP KP-C18-HS. Mobilna faza je bila sestavljena iz MeOH in 0,1 % TFA v bidestilirani vodi. Izvajali smo gradientno elucijo po protokolu, ki je za vsako spojino

posebej opisan (Priloga 2). Tam so navedeni tudi vsi ostali podatki v zvezi s čiščenjem spojin. Zbrane frakcije smo uparevali pod znižanim tlakom in koevaporirali s toluenom (2×10 ml) do suhega. Na tak način smo iz zmesi odstranili TFA.

Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca (NMR) – spektri so bili posneti na spektrometru Bruker Avance DPX400 na Fakulteti za Farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorci so bili raztopljeni v CDCl_3 , DMSO-d_6 ali CD_3OD . Kot interni standard smo uporabili tetrametilsilan (TMS).

Masna spektrometrija (MS) – 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 ESI tehnika ionizacije.

Infrardeča spektroskopija (IR) – spektri so bili posneti na spektrometru PerkinElmer Spectrum BX System FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Določevanje tališč

Tališča smo določevali na Koflerjevem talilnem mikroskopu z ogrevalno mizico proizvajalca Leica in so nekorrigirana.

Računalniška programska oprema

Za poimenovanje in risanje spojin smo uporabljali računalniški program ChemBioDraw Ultra 13.0 podjetja PerkinElmer Informatics, za izračun razdalje med posameznimi deli molekule in gibljivostjo molekulskih vezi pa ChemBio 3D Ultra 13.0 istega podjetja. NMR spektre smo procesirali s pomočjo programov MestReC 4.8.6.0 in MestReNova Lite 5.2.5-5780 podjetja Mestrelab Research SL. Za iskanje sinteznih postopkov po podatkovnih bazah smo uporabljali program SciFinder Scholar. Znanstvene članke smo iskali s pomočjo ScienceDirect in PubMed brskalnikov.

Biološka testiranja

a) DC-SIGN

Spojine so testirali z vzpostavljenim testnim sistemom na Fakulteti za Farmacijo Univerze v Ljubljani. Protokol testiranja je tak, da se na mikrotitrsko ploščico najprej veže ekstracelularno CRD receptorja DC-SIGN in blokira prosta vezavna mesta. Sledi nanos raztopine potencialnega antagonista, za njim pa v najkrajšem možnem času še z biotinom konjugiranega glikoproteina gp120. Nato se nanesejo protitelesa proti biotinu, ki so konjugirana s hrenovo peroksidazo. Nazadnje se doda še substrat za peroksidazo, ki po oksidaciji povzroči kemiluminiscenco. Odstotek vezave naravnega liganda se določi na podlagi kemiluminiscenčnega odziva. Pri testu se kot referenčna spojina uporablja L-fukoza. Rezultate se obdela z računalniškim programom Origin proizvajalca OriginLab Corporation. Tako se potencialnim antagonistom določi vrednosti IC_{50} , ki v tem primeru pomenijo 50 % inhibicijo vezave naravnega liganda gp120 na receptor DC-SIGN.

b) FimH

Spojine so testirali z vzpostavljenim testnim sistemom na Institute of Molecular Pharmacy, University of Basel. Protokol testiranja je tak, da se na mikrotitrsko ploščico najprej veže CRD receptorja FimH in blokira prosta vezavna mesta. Sledi nanos raztopine potencialnega antagonista, za njim pa v najkrajšem možnem času še s streptavidin-peroksidazo konjugiranega poliakrilamidnega glikopolimera TM-PAA. Nato se doda še substrat za peroksidazo, ki po oksidaciji spremeni svoj absorpcijski maksimum. Odstotek vezave naravnega liganda se določi na podlagi merjenja absorbance pri 415 nm. Pri testu se kot referenčni spojini uporabljata metil α -D-manopiranozid oz. n-heptil α -D-manopiranozid. Rezultate se obdela z računalniškim programom GraphPad Prism proizvajalca GraphPad Software. Tako se potencialnim antagonistom določi vrednosti IC_{50} , ki v tem primeru pomenijo 50 % inhibicijo vezave naravnega liganda TM-PAA na receptor FimH.

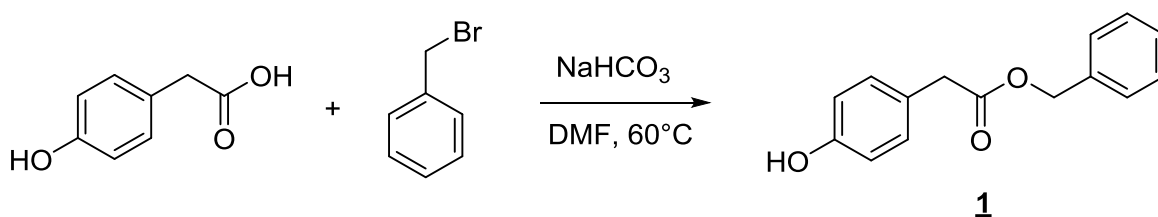
4. EKSPERIMENTALNI DEL

V nadaljevanju so opisani postopki priprave vseh sintetiziranih končnih in vmesnih spojin. Spektroskopski analizni izvidi produktov (NMR, MS, IR) so predmet dodatka (Priloga 4).

4.1 SINTEZNA POT PREKO BENZILNEGA ESTRA

4.1.1 Sinteza benzil 2-(4-hidroksifenil)acetata (**1**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

4,000 g (26,3 mmol) 2-(4-hidroksifenil)ocetne kisline in 2,651 g NaHCO₃ smo raztopili v 20 ml DMF. Ob stalnem mešanju smo po kapljicah dodali 3,4 ml (28,9 mmol) benzil bromida. Nato smo sistem prepihali z argonom in pod refluxom segrevali na oljni kopeli pri 60 °C. Reakcija je potekala čez noč (18 h). Naslednji dan smo blede rumeno reakcijsko zmes vrednotili s TLC in ugotovili, da je reakcija potekla – izhodnih snovi ni bilo več v zmesi. Sledilo je uparjevanje DMF pod znižanim tlakom. Suh zaostanek smo raztopili v 50 ml EtOAc in 20 ml vode ter vse skupaj prelili v lij ločnik. Odločili smo VF in spirali OF z vodo (2 × 20 ml), n.r. NaHCO₃ (3 × 20 ml) in n.r. NaCl (1 × 20 ml). OF smo sušili nad Na₂SO₄, prefiltrirali in uparili EtOAc pod znižanim tlakom. Izpadli so oranžno-beli kristali, ki smo jih očistili s KKR (MF: DKM : MeOH = 20/1) in dobili čisto spojino **1**, ki je že dobro poznana in opisana v literaturi (96).

PRODUKT:

Molekulska formula: C₁₅H₁₄O₃

Mr (izračunano): 242,27

Izgled: snežno beli kristali

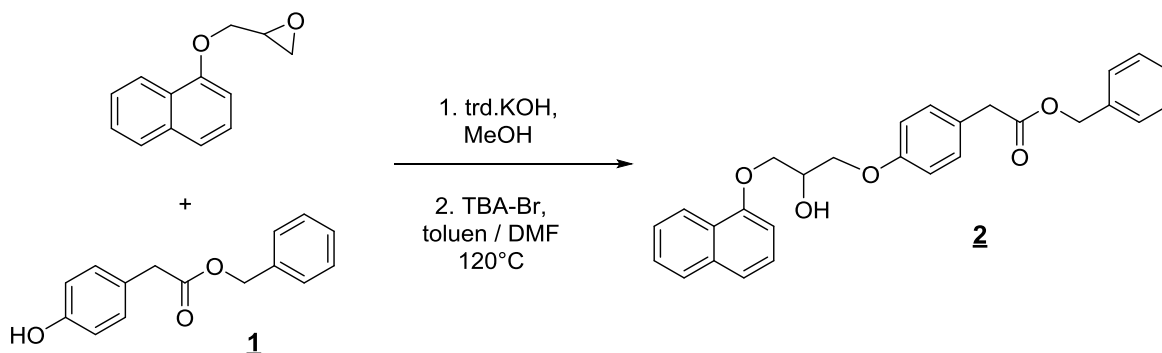
Izkoristek: 2,904 g (η = 45,6 %)

Tališče: 90–92 °C

Rf: 0,37 (MF: DKM : MeOH = 20/1)

4.1.2 Sinteza benzil 2-(4-(2-hidroksi-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)acetata (2)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

2,000 g (8,26 mmol) spojine 1 smo raztopili v 10 ml brezvodnega MeOH in dodali 0,463 g (8,26 mmol) trdnega KOH. Mešali smo 10 min, da se je ves KOH raztopil, nato pa topilo uparili pod znižanim tlakom in koevaporirali s toluenom (2×10 ml) do suhega. Dobili smo rjavo-rumeno oljnato snov.

Nato smo dodali 1,378 g (6,88 mmol) 2-((naftalen-1-iloksi)metil)oksidirana in 0,444 g (1,38 mmol) TBABr. Vse skupaj smo raztopili v 20 ml toluena in 1 ml DMF. Sistem smo prepihali z argonom in segrevali ob povratnem hladilniku na oljni kopeli pri 120 °C čez noč (24 h). Naslednji dan je reakcijska zmes bila obarvana črno s prisotno oborino. TLC nam je pokazal, da je reakcija potekla. Reakcijsko zmes smo odstavili, ohladili na sobno T in pod znižanim tlakom uparili toluen. Nato smo preostanku dodali 20 ml EtOAc in 20 ml 10 % citronske kisline. S pomočjo lij ločnika smo odločili VF, OF pa še enkrat sprali z 20 ml 10 % citronske kisline in 20 ml n.r. NaCl. OF smo sušili nad Na₂SO₄, prefiltrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Ostala je temno rjava oljnata snov, ki smo jo očistili s KKR (gradientna ločba, MF: Hex : EtOAc = 3/1, nato 2/1) in tako dobili spojino 2.

PRODUKT:

Molekulska formula: C₂₈H₂₆O₅

Mr (izračunano): 442,50

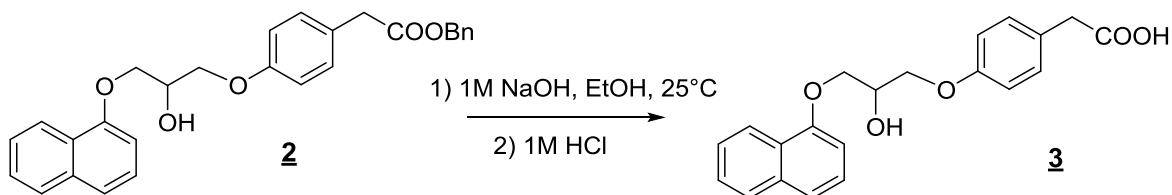
Izgled: belo-rumeno olje

Izkoristek: 0,938 g ($\eta = 30,8$ %)

Rf: 0,48 (MF: Hex : EtOAc = 1/1)

4.1.3 Sinteza 2-(4-(2-hidroksi-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)ocetne kisline(**3**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

Zatehtali smo 1,062 g (2,40 mmol) spojine **2** in dodali 17,4 ml (17,39 mmol) 1M NaOH. Vse skupaj smo raztopili v 30 ml EtOH in pustili mešati pri sobni T čez noč (20 h). Naslednji dan izhodne snovi ni bilo več v zmesi, zato smo uparili EtOH in zaostanku dodali 30 ml vode. Sledila je ekstrakcija VF z diizopropil etrom (3 × 15 ml). OF smo zavrgli, VF pa nakisali z 1M HCl na ledu ob neprestanem mešanju do pH = 1. Izpadel nam je gumijast produkt **3**, ki smo ga odnučali, nato pa raztopili v nekaj ml EtOH in uparili pod znižanim tlakom do suhega.

PRODUKT:

Molekulska formula: C₂₁H₂₀O₅

Mr (izračunano): 352,38

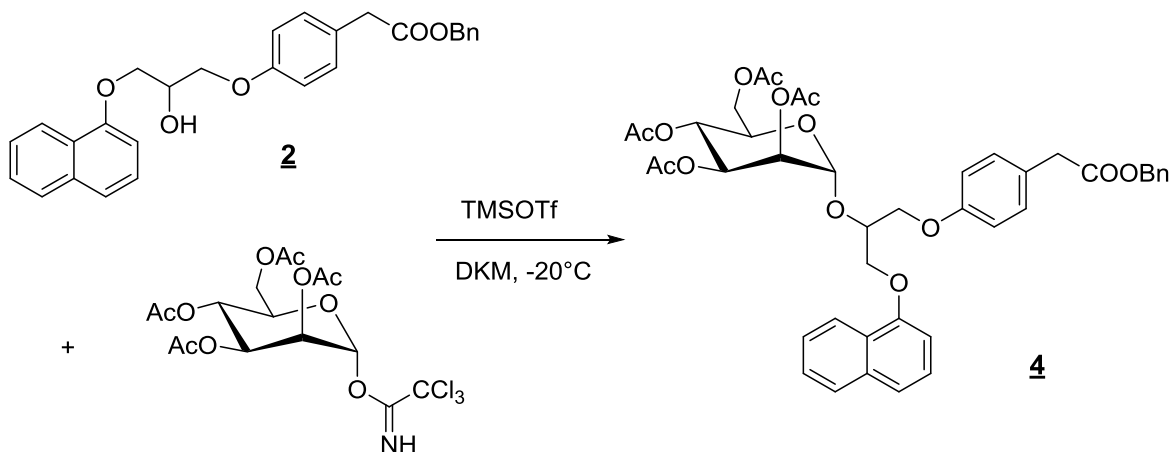
Izgled: temno rumeno olje

Izkoristek: 0,846 g (η = 100 %)

Rf: 0,30 (MF: Hex : EtOAc = 1/1 + 1% CH₃COOH)

4.1.4 Sinteza benzil 2-(4-(2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)acetata (**4**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

Natehtali smo 0,900 g (2,03 mmol) spojine **2** in 1,002 g (2,03 mmol) tetraacetilmanoziltrikloroacetimidata. Vse skupaj smo raztopili v 10 ml DKM. Nato smo uparili topilo pod znižanim tlakom in koevaporirali s toluenom (2×10 ml) do suhega. Še vročo bučko smo zaprli s septumom in prepihali z argonom. Preko septuma smo dodali 20 ml sveže destiliranega DKM. Zatem smo bučko ohladili na -20 °C s pomočjo mešanice led / MeOH / NaCl. Sledil je dodatek 0,37 ml (2,03 mmol) TMSOTf. Raztopina se je takoj obarvala črno. Reakcija je potekala ob stalnem mešanju čez noč (20 h). Vseskozi smo vzdrževali argonovo atmosfero in hkrati dopustili, da se je mešanica počasi segrela do sobne T.

Naslednji dan nam je TLC pokazal, da je reakcija potekla, zato smo zmesi dodali 0,54 ml (3,87 mmol) NEt_3 in s tem prekinili reakcijo. Raztopina se je takoj razbarvala do zlato rumeno-oranžne barve. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom ($T_{\text{VK}} = 35$ °C) in dobili rjavo-oranžno oljnato snov, ki smo jo očistili s KKR (MF: Hex : EtOAc = 1/3). Dobili smo zmes dveh diastereomerov spojine **4**.

PRODUKT:

Molekulska formula: $\text{C}_{42}\text{H}_{44}\text{O}_{14}$

Mr (izračunano): 772,79

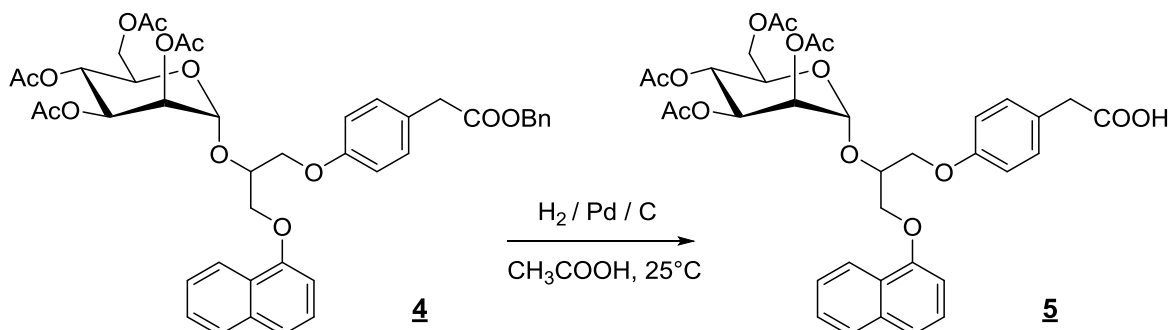
Izgled: rjavo-oranžna amorfná snov

Izkoristek: 1,572 g ($\eta = 100$ %)

Rf: 0,71 (MF: Hex : EtOAc = 1/3)

4.1.5 Sinteza 2-(4-(2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)ocetne kisline (**5**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,373 g (0,48 mmol) spojine **4** smo raztopili v 10 ml brezvodne očetne kisline. Sistem smo dobro prepihali z argonom in šele nato dodali 15 % (m/m) (0,056 g) katalizatorja Pd / C. Sledilo je prepihanje bučke z vodikom. Reakcijo smo pustili mešati 5 h pri sobni T. Po pretečenem času je bilo izhodne snovi v reakcijski zmesi zanemarljivo malo, zato smo reakcijo ustavili. Katalizator smo odnučali in kot filtrat dobili bistro blede rumeno raztopino. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom in koevaporirali s toluenom (2×10 ml) do suhega. Produkt smo očistili s KKR (gradientna ločba, MF: DKM : MeOH = 9/1, nato 2/1 + 1% CH₃COOH) in tako dobili spojino **5** v obliki dveh diastereomerov.

PRODUKT:

Molekulska formula: C₃₅H₃₈O₁₄

Mr (izračunano): 682,67

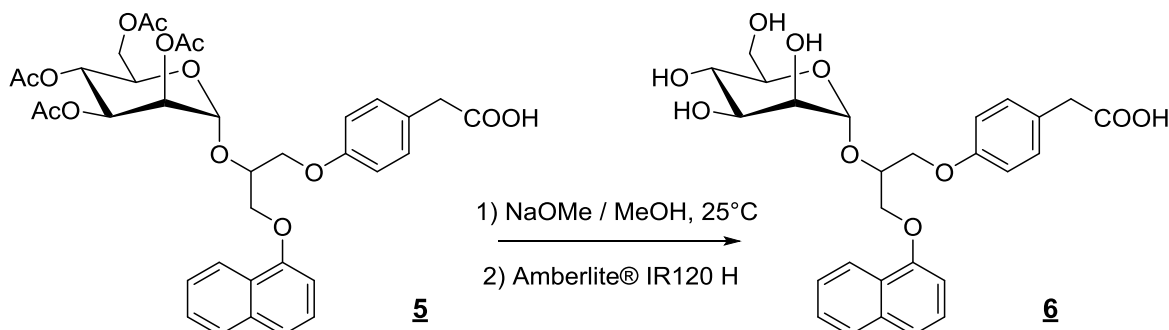
Izgled: oranžno-rjava viskozna tekočina

Izkoristek: 0,240 g ($\eta = 72,7$ %)

Rf: 0,34 (MF: DKM : MeOH = 9/1 + 1% CH₃COOH)

4.1.6 Sinteza 2-(4-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)ocetne kisline (**6**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,100 g (0,15 mmol) spojine **5** smo raztopili v 5 ml brezvodnega MeOH. Bučko smo takoj zamašili s septumom in prepihali z argonom. Nato smo preko septuma injicirali 40 μ l (0,21 mmol) 30 % raztopine NaOMe v metanolu. Ob stalnem mešanju na sobni T je reakcija potekala čez noč (20 h). Naslednji dan je prej temno rumena bistra raztopina postala motna – izoboril se nam je produkt. Izhodnih snovi glede na TLC ni bilo več v zmesi, zato je sledila izolacija. V bučko smo dolili 20 ml EtOEt in postavili na led. Izpadli so sivo-beli kosmiči Na⁺ soli spojine **6**, ki smo jih odfiltrirali z mikrofiltracijo (velikost por filtra 0,2 μ m) s presesavanjem. TLC nam je pokazal, da je nekaj produkta še v matičnici, zato smo vanjo dodali ionsko izmenjevalno smolo Amberlite® IR120 H in sicer toliko, da pH matičnice ni bil več alkalen. Ob tem se je poprej rumena raztopina razbarvala. Smolo smo nato odfiltrirali s presesavanjem in uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo rjavo oljnato snov, spojino **6** (ni v obliki soli). Oba produkta (spojino **6** in njeno sol) smo združili in očistili s sistemom IsoleraOne™ (gradientna ločba, MF: MeOH / 0,1 % TFA v bidestilirani vodi) (Priloga 2a). S tem smo dobili monomerno spojino.

PRODUKT:

Molekulska formula: C₂₇H₃₀O₁₀

Mr (izračunano): 514,53

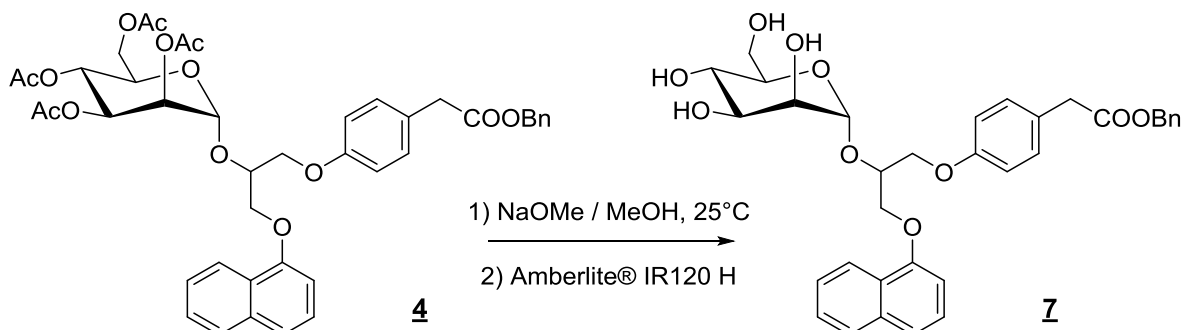
Izgled: belo-rumeno olje

Izkoristek: 0,011 g (η = 14,2 %)

Rf: 0,44 (MF: DKM : MeOH = 4/1 + 1% CH₃COOH)

4.1.7 Poskus sinteze benzil 2-(4-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)acetata (**7**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,100 g (0,13 mmol) spojine **4** smo raztopili v 5 ml brezvodnega MeOH. Bučko smo takoj zamašili s septumom in prepihali z argonom. Nato smo preko septuma injicirali 15 μ l (0,08 mmol) 30 % raztopine NaOMe v metanolu. Ob stalnem mešanju na sobni T je reakcija potekala 2 h. Nato nam je TLC pokazal, da izhodne snovi ni bilo več v zmesi, zato je sledila izolacija. V bučko smo dodali toliko Amberlite® IR120 H, da pH ni bil več alkalen. Hkrati se je prej rumena raztopina reakcijske zmesi razbarvala. Smolo smo nato odfiltrirali s presesavanjem in uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo rumeno oljnato snov, ki smo jo očistili s sistemom IsoleraOne™ (gradientna ločba, MF: MeOH / 0,1 % TFA v bidestilirani vodi) (Priloga 2b). Ko smo produkt analizirali, pa smo prišli do presenetljivega spoznanja. Namreč nismo dobili željene spojine **7**, temveč zelo čisto spojino **6**!

PRODUKT:

Molekulska formula: C₂₇H₃₀O₁₀

Mr (izračunano): 514,53

Izgled: belo olje

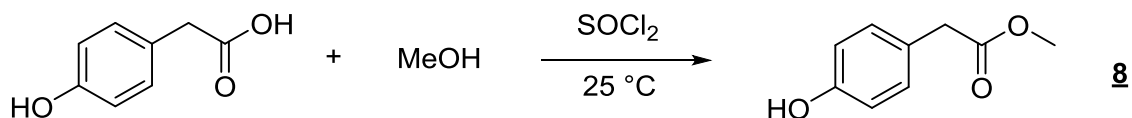
Izkoristek: 0,032 g (η = 47,8 %)

Rf: 0,82 (MF: DKM : MeOH = 4/1 + 1% CH₃COOH)

4.2 SINTEZNA POT PREKO METILNEGA ESTRA

4.2.1 Sinteza metil 2-(4-hidroksifenil)acetata (**8**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V bučko smo natehtali 4,000 g (26,3 mmol) 2-(4-hidroksifenil)ocetne kisline in jo raztopili v 10 ml brezvodnega MeOH. Bučko smo takoj zamašili s septumom in prepihali z argonom. Vse skupaj smo postavili na led in preko septuma počasi in previdno dokapavali 2,1 ml (28,9 mmol) SOCl₂. Reakcija je potekala 2 h v argonovi atmosferi. Nato smo reakcijski zmesi uparili topilo pod znižanim tlakom in koevaporirali z EtOEt (3 × 10 ml). Preostanku smo dodali 20 ml EtOAc in spirali z 2 × 20 ml n.r. NaHCO₃. Vodni fazi smo ekstrahirali še z 2 × 20 ml EtOAc. Združene OF smo nato sprali z 20 ml n.r. NaCl, sušili nad Na₂SO₄, prefiltrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Sledila je še koevaporacija z EtOEt (1 × 10 ml). Tako smo dobili čisto spojino **8**, ki je že dobro poznana in opisana v literaturi (97).

PRODUKT:

Molekulska formula: C₉H₁₀O₃

Mr (izračunano): 166,17

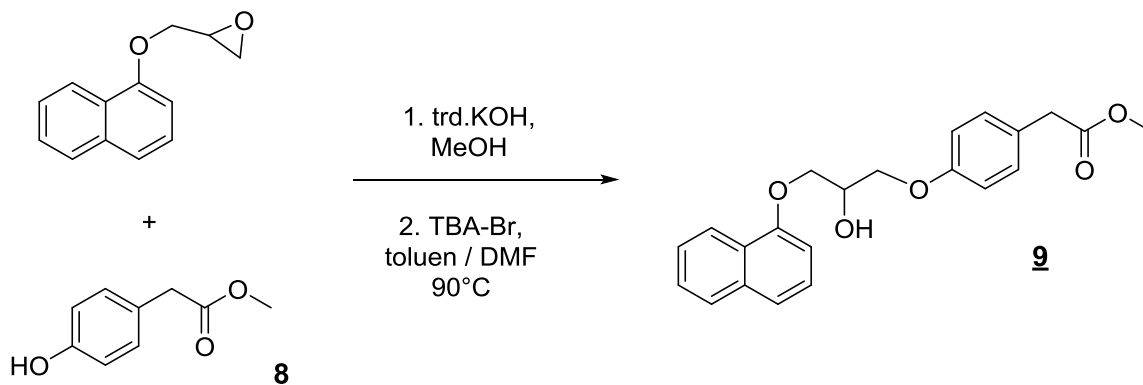
Izgled: temno rumena tekočina

Izkoristek: 4,336 g (η = 99,2 %)

Rf: 0,60 (MF: Hex : EtOAc = 1/1)

4.2.2 Sinteza metil 2-(4-(2-hidroksi-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)acetata (**9**) acetata (**9**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

3,500 g (21,06 mmol) spojine **8** smo raztopili v 10 ml brezvodnega MeOH in dodali 0,591 g (10,53 mmol) trdnega KOH. Mešali smo 10 min, da se je ves KOH raztopil, nato pa topilo uparili pod znižanim tlakom in koevaporirali s toluenom (2×5 ml) do suhega ($T_{VK} = 50$ °C). Dobili smo rjavo oljnato zdrizasto snov.

Nato smo dodali 2,109 g (10,53 mmol) 2-((naftalen-1-iloksi)metil)oksidirana in 1,358 g (4,21 mmol) TBABr. Vse skupaj smo raztopili v 10 ml toluena in 2 ml DMF. Sistem smo dobro prepihali z argonom in segrevali ob povratnem hladilniku na oljni kopeli pri 90 °C 2 h. Po pretečenem času je reakcijska zmes bila obarvana temno zeleno, izhodne snovi pa ni bilo več prisotne. Nato smo pod znižanim tlakom uparili topilo in zaostanku dodali 100 ml EtOAc, 50 ml vode in 50 ml n.r. NaCl. S pomočjo lij ločnika smo odločili VF, OF pa še enkrat sprali s 50 ml vode in 50 ml n.r. NaCl. OF smo sušili nad Na_2SO_4 , prefiltrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Ostala je temno rjava oljnata snov, ki smo jo očistili s KKR (MF: Hex : EtOAc = 2/1) in tako dobili spojino **9**.

PRODUKT:

Molekulska formula: $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_5$

Mr (izračunano): 366,41

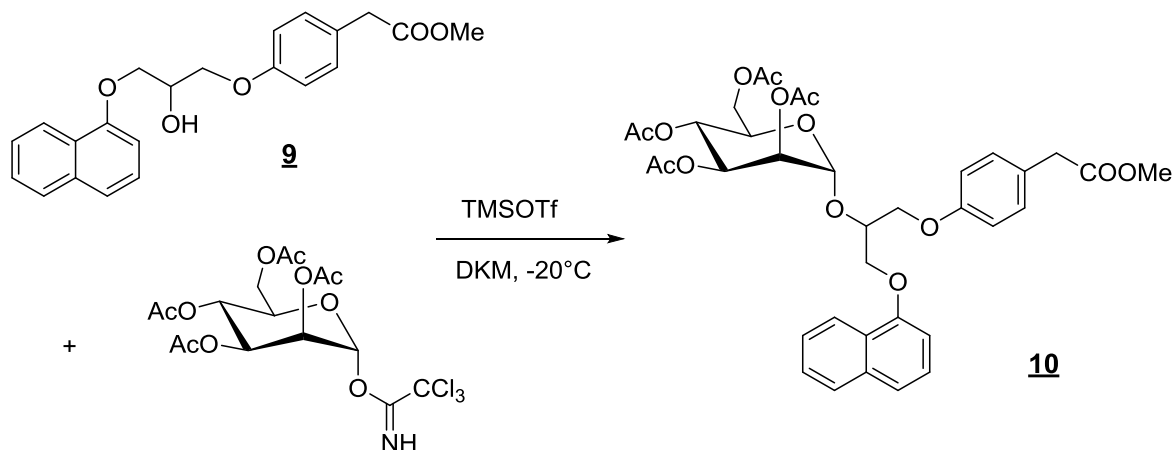
Izgled: blede rumeno olje

Izkoristek: 2,937 g ($\eta = 76,1$ %)

Rf: 0,18 (MF: Hex : EtOAc = 2/1)

4.2.3 Sinteza metil 2-(4-(2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)acetata (**10**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

Natehtali smo 2,937 g (8,02 mmol) spojine **9** in 3,949 g (8,02 mmol) tetraacetilmanoziltrikloroacetimidata. Vse skupaj smo raztopili v 10 ml sveže destiliranega DKM. Nato smo uparili topilo pod znižanim tlakom do suhega. Še vročo bučko smo zaprli s septumom in prepihali z argonom. Preko septuma smo dodali 20 ml destiliranega DKM. Zatem smo bučko ohladili na -20 °C s pomočjo mešanice led / MeOH / NaCl. Sledil je dodatek 1,45 ml (8,02 mmol) TMSOTf. Raztopina se je takoj obarvala temno zeleno. Reakcija je potekala 3 h v argonovi atmosferi ob stalnem mešanju. Dopustili smo, da se je mešanica počasi segrela do sobne T. Nato smo reakcijo prekinili z dodatkom 1,80 ml (12,91 mmol) NEt₃. Prej temno zeleno-črna raztopina se je takoj razbarvala do oranžne barve. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom (T_{VK} = 35 °C) in dobili rjavo oljnato snov, ki smo jo očistili s KKR (gradientna ločba, MF: Hex : EtOAc = 2/1, nato 1/1). Dobili smo zmes dveh diastereomerov spojine **10**.

PRODUKT:

Molekulska formula: C₃₆H₄₀O₁₄

Mr (izračunano): 696,70

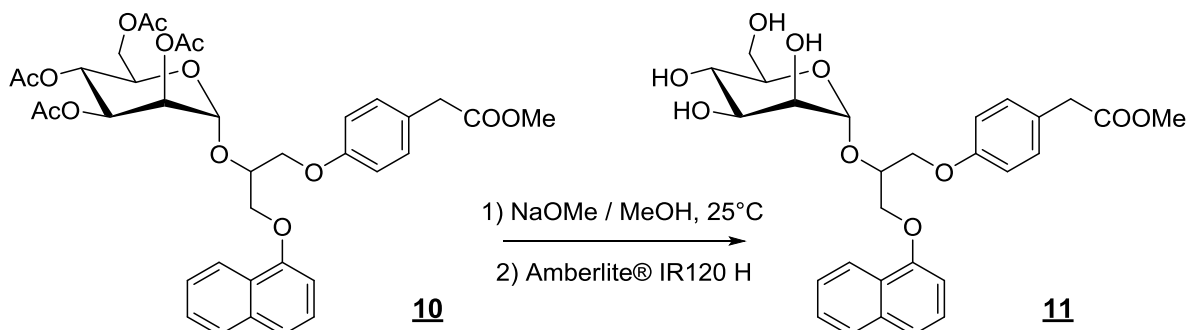
Izgled: svetlo rumeno olje

Izkoristek: 4,719 g (η = 84,5 %)

Rf: 0,49 (MF: Hex : EtOAc = 1/1)

4.2.4 Sinteza metil 2-(4-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)acetata (**11**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

4,719 g (6,77 mmol) spojine **10** smo raztopili v 30 ml brezvodnega MeOH. Bučko smo takoj zamašili s septumom in prepihali z argonom. Nato smo preko septuma injicirali 125 μ l (0,67 mmol) 30 % raztopine NaOMe v metanolu. Reakcija je potekla po 2 h ob stalnem mešanju na sobni T. Nato smo v bučko dodali Amberlite® IR120 H in sicer toliko, da pH ni bil več alkalen. Hkrati se je prej svetlo rumena raztopina reakcijske zmesi razbarvala. Smolo smo nato odfiltrirali s presesavanjem in uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo snežno belo-rumeno oljnato penasto snov, ki smo jo očistili s KKR (MF: DKM : MeOH = 9/1). S tem smo pridobili čisto spojino **11**.

PRODUKT:

Molekulska formula: C₂₈H₃₂O₁₀

Mr (izračunano): 528,55

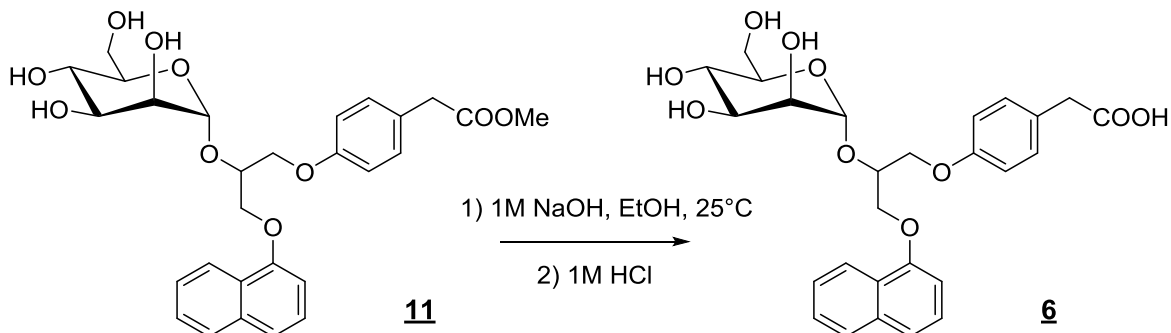
Izgled: snežno belo strjeno olje

Izkoristek: 2,693 g (η = 75,3 %)

Rf: 0,20 (MF: DKM : MeOH = 9/1)

4.2.5 Sinteza 2-(4-(2-(α -D-manopiranoziloksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propoksi)fenil)ocetne kisline (**6**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V bučko smo zatehtali 0,270 g (0,51 mmol) spojine **11** in jo raztopili v 10 ml EtOH. Nato smo dodali 1,53 ml (1,53 mmol) 1M NaOH. Takoj se je pojavila bela oborina. Reakcijo smo pustili mešati na sobni T čez noč (24 h). Naslednji dan smo reakcijo ustavili in pod znižanim tlakom iz reakcijske zmesi uparili topilo. Zaostanek smo raztopili v 20 ml vode in 20 ml DKM. Sledilo je previdno nakisanje z 1M HCl po kapljicah ob neprestanem mešanju na ledu, do pH = 2. Oborina je bila v kisli VF še vedno prisotna, pojavila pa se je tudi motnost v OF. Zato smo najprej s pomočjo lij ločnika odločili VF in odfiltrirali oborino s pomočjo mikrofiltra (velikost por 0,22 μ m). Nato smo s TLC ugotovili, da se je v OF ekstrahiralo zanemarljivo malo produkta, zato smo VF ekstrahirali še z EtOAc (2 \times 40 ml) in združeni organski fazi (EtOAc) uparili pod znižanim tlakom do suhega. Dobili smo spojino **6** v obliki dveh diastereomerov. Po pregledu NMR spektrov smo ugotovili, da se spojina **6** nahaja tudi v oborini, ki smo jo odfiltrirali.

PRODUKT:

Molekulska formula: C₂₇H₃₀O₁₀

Mr (izračunano): 514,53

Izgled: bel amorfni prašek

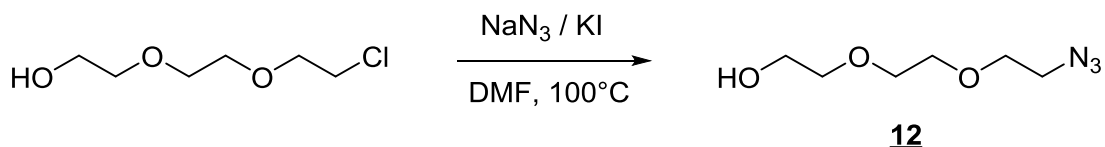
Izkoristek: 0,209 g (η = 79,5 %)

Rf: 0,50 (MF: DKM : MeOH = 4/1 + 1% CH₃COOH)

4.3 SINTEZA DISTANČNIKA

4.3.1 Sinteza 2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etan-1-ola (**12**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

14,000 g (83,03 mmol) 2-(2-(2-kloroetoksi)etoksi)etan-1-ola smo raztopili v 30 ml DMF in dodali še 10,795 g (166,05 mmol) NaN_3 ter kristalček KI. Sistem smo prepihali z argonom in segrevali pod refluxom na oljni kopeli pri 100°C čez noč (16 h) (98). Naslednji dan je bila raztopina rumeno-oranžne barve z usedlino. Izhodne snovi ni bilo več v zmesi, zato smo reakcijsko zmes ohladili in uparili DMF pod znižanim tlakom ($T_{\text{VK}} = 60^\circ\text{C}$, $p = 8$ mbar). Preostanek smo raztopili v 100 ml EtOAc, prefiltrirali in filtratu uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo spojino **12**, ki smo jo brez čiščenja uporabili kar direktno v naslednji sintezni stopnji. Spojina je že opisana v literaturi (98, 99).

PRODUKT:

Molekulska formula: $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$

Mr (izračunano): 175,19

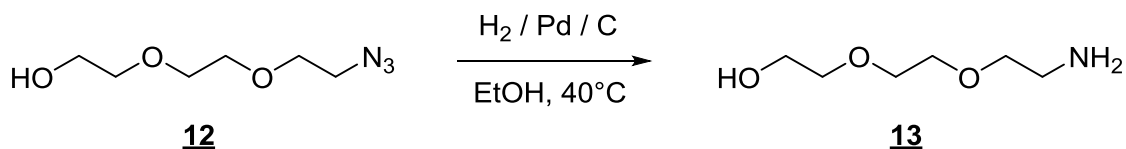
Izgled: temno oranžna tekočina

Izkoristek: 14,546 g ($\eta = 100\%$)

Rf: 0,24 (MF: EtOAc : Hex = 2/1)

4.3.2 Sinteza 2-(2-(2-aminoetoksi)etoksi)etan-1-ola (**13**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

14,520 g (82,88 mmol) **12** smo raztopili v 350 ml brezvodnega EtOH. Sistem smo prepihali z argonom in šele nato dodali 15 % (m/m) (2,178 g) katalizatorja Pd / C. Sledilo je prepihanje bučke z vodikom. Reakcijo smo pustili mešati 40 h pri 40 °C (modificirano po (100)). Po pretečenem času smo reakcijo ustavili, odnučali katalizator in kot filtrat dobili bistro rumeno raztopino. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom in dobili spojino **13**, ki smo jo brez predhodnega čiščenja uporabili v naslednji reakciji. Spojina je že opisana v literaturi (101).

PRODUKT:

Molekulska formula: C₆H₁₅NO₃

Mr (izračunano): 149,19

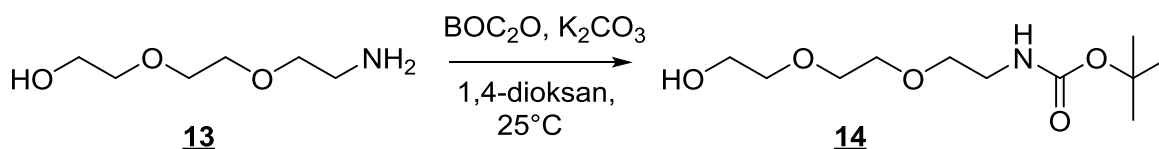
Izgled: rumena tekočina

Izkoristek: 12,365 g (η = 100 %)

Rf: 0,10 (MF: DKM : MeOH = 9/1 + 1% NEt₃)

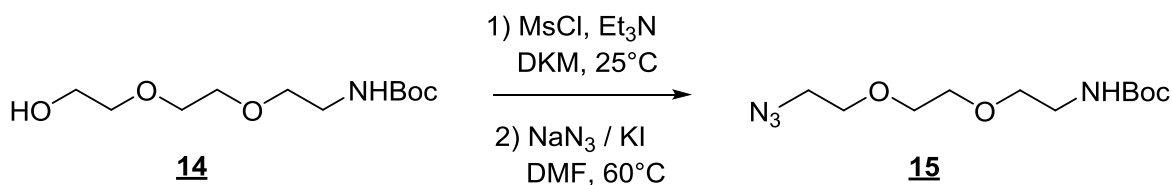
4.3.3 Sinteza terc-butil (2-(2-(2-hidroksietoksi)etoksi)etil)karbamata (**14**)

REAKCIJA:



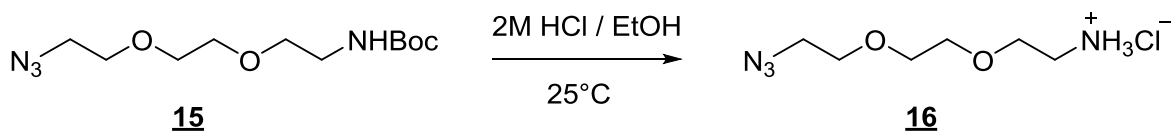
POSTOPEK:

12,340 g (82,71 mmol) **13** smo raztopili v 20 ml 1,4-dioksana in ob stalnem mešanju dokapavali 22,286 g (102,11 mmol) di-*terc*-butil dikarbonata (BOC₂O), ki smo ga predhodno raztopili v 80 ml 1,4-dioksana. Nato smo dodali 11,431 g (82,71 mmol) K₂CO₃. Sistem smo prepihali z argonom in mešali 7 h pri sobni T. Po pretečenem času smo reakcijsko mešanico prefiltrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom (T_{VK} = 35 °C). Dobili smo oranžno-rjavo raztopino, ki smo jo nadalje očistili s KKR (gradientna ločba, MF: DKM : MeOH = 20/1, nato 9/1). Dobili smo čisto spojino **14**, ki je že opisana v literaturi (101).

PRODUKT:**Molekulska formula:** C₁₁H₂₃NO₅**Mr (izračunano):** 249,30**Izgled:** temno oranžna tekočina**Izkoristek:** 6,569 g ($\eta = 31,9\%$)**Rf:** 0,38 (MF: DKM : MeOH = 9/1)**4.3.4 Sinteza terc-butil (2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etil)karbamata (15)****REAKCIJA:****POSTOPEK:**

9,108 g (36,53 mmol) **14** smo raztopili v 100 ml sveže destiliranega DKM in preko septuma dodali 6,58 ml (47,49 mmol) Et₃N. Sistem smo prepihali z argonom, nato pa ponovno preko septuma po kapljicah ob neprestanem mešanju na ledu dodali 3,12 ml (40,19 mmol) MsCl (modificirano po (100)). Raztopina je rahlo pomotnela in takoj so se razvili beli hlapi. Balonček z argonom smo zaradi izenačevanja tlaka vseskozi pustili vpetega v sistem. Reakcija je potekala 5 h na sobni T. Hlapi so se postopoma polegli. Po pretečenem času smo bučko ohladili na ledu in nato reakcijsko zmes prefiltrirali. Dobili smo bister rumen filtrat, ki smo ga nadalje ekstrahirali z n.r. NaCl (7 × 50 ml). OF smo nato sušili nad Na₂SO₄, uparili topilo in dobili rdeče-rjavo tekočino z vonjem po žveplu.

Le-to smo raztopili v 80 ml DMF in dodali 3,341 g (51,39 mmol) NaN₃ ter kristalček KI. Sistem smo prepihali z argonom in pod refluksom segrevali na oljni kopeli pri 60 °C čez noč (24 h). Rumena raztopina je naslednji dan postala svetlo oranžne barve. TLC nam je pokazal, da je reakcija potekla, zato smo pod znižanim tlakom uparili DMF. Suh zaostanek smo raztopili v 100 ml EtOAc in ekstrahirali z vodo (3 × 50 ml) in n.r. NaCl (3 × 50 ml). OF smo nato sušili nad Na₂SO₄, prefiltrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Preostala nam je rdeče-rjavo tekočina, ki smo jo očistili s KKR (MF: Hex : EtOAc = 2/1) in dobili čisto spojino **15**, ki je že poznana v literaturi (102).

PRODUKT:**Molekulska formula:** C₁₁H₂₂N₄O₄**Mr (izračunano):** 274,32**Izgled:** brezbarvna tekočina**Izkoristek:** 2,957 g ($\eta = 29,5 \%$)**Rf:** 0,35 (MF: Hex : EtOAc = 1/1)**4.3.5 Sinteza (2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etan-1-aminijevega klorida (16))****REAKCIJA:****POSTOPEK:**

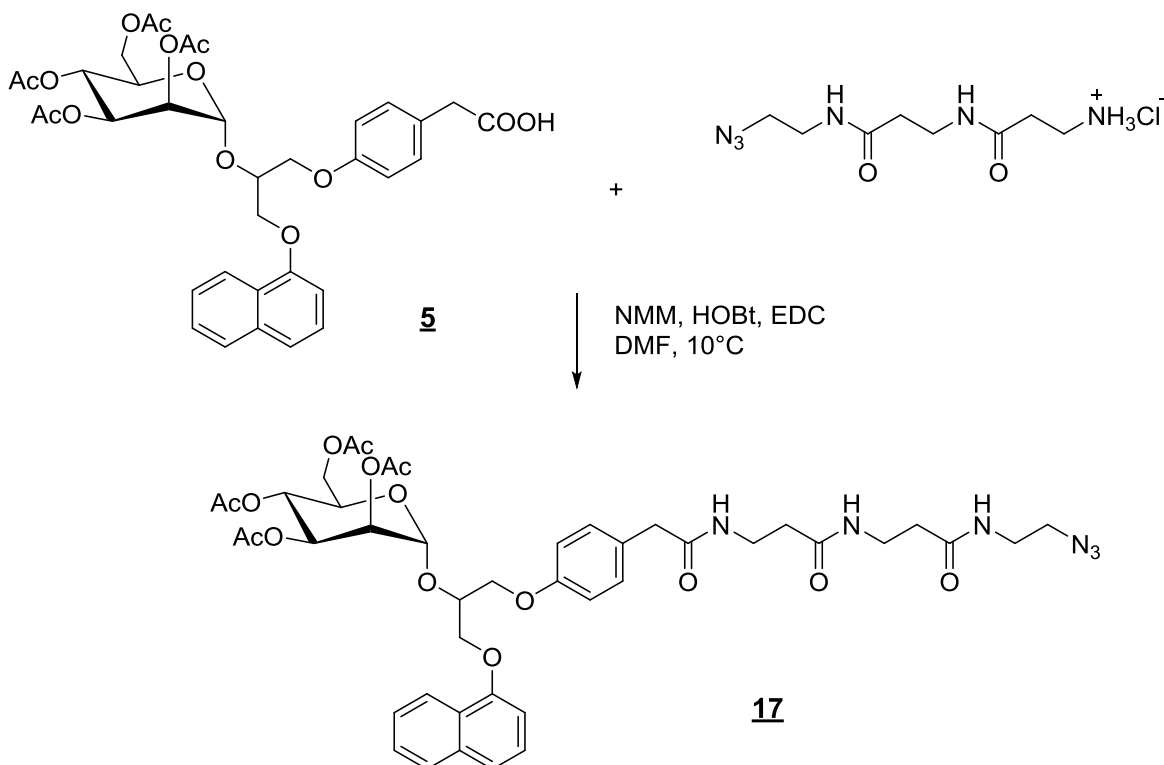
V bučko smo natehtali 2,642 g (9,631 mmol) 15 in dobro prepihali z argonom. Nato smo dolili 150 ml 2M HCl v absolutnem EtOH. Ponovno smo prepihali z argonom in mešali pri sobni T čez noč (16 h). Raztopina je bila v začetku brezbarvna in bistra, nato je postopoma do naslednjega dne prešla v blede rumeno. Reakcija je potekla popolnoma, kar nam je pokazal TLC, zato smo uparili EtOH pod znižanim tlakom do suhega in koevaporirali še z EtOEt (5 × 10 ml). Zmes smo dobro osušili v eksikatorju čez noč in dobili čisto spojino 16 – distančnik v obliki soli s HCl.

PRODUKT:**Molekulska formula:** C₆H₁₅N₄O₂Cl**Mr (izračunano):** 210,66**Izgled:** rumeno olje**Izkoristek:** 2,005 g ($\eta = 98,8 \%$)**Rf:** 0 (MF: DKM : MeOH = 20/1)

4.4 SINTEZA DENDRONOV

4.4.1 Sinteza 1-(4-(2-((3-((3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)amino)-3-oksopropil)amino)-2-oksoetil)fenoksi)-3-(naftalen-1-iloksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranozida (17)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

Natehtali smo 0,226 g (0,33 mmol) **5** in 0,088 g (0,33 mmol) 3-((3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)amino)-3-oksopropan-1-aminijevega klorida ter vse skupaj raztopili v 20 ml DMF. Nato smo zmes ohladili na 10 °C in v sledečem vrstnem redu dodali:

- 0,109 ml (0,99 mmol) NMM,
- 0,054 g (0,40 mmol) HOBT,
- 0,076 g (0,40 mmol) EDC.

Sistem smo prepihali z argonom in reakcijo pustili mešati čez noč (20 h). Dovolili smo, da se je zmes počasi segrela do sobne T. Naslednji dan smo s TLC ugotovili, da je reakcija potekla, zato smo iz reakcijske zmesi najprej pod znižanim tlakom odstranili DMF ($T_{VK} = 40$ °C, $p = 3$ mbar). Suhemu zaostanku smo dodali 50 ml EtOAc in ekstrahirali z n.r.

NaHCO₃ (3 × 50 ml) ob dodatku n.r. NaCl (3 × 10 ml), da sta se fazi bolje ločili. OF smo sprali še z vodo (10 ml), združene vodne faze pa ekstrahirali s 50 ml EtOAc, ki smo ga nadalje sprali z vodo (10 ml). Obe organski fazi smo združili in uparili topilo pod znižanim tlakom. Izpadel je oranžen gumijast produkt, ki smo ga očistili s KKR (gradientna ločba, MF: DKM : MeOH = 20/1, nato 9/1) in dobili spojino **17** kot zmes dveh diastereomerov.

PRODUKT:

Molekulska formula: C₄₃H₅₂N₆O₁₅

Mr (izračunano): 892,92

Izgled: blede rumeno strjeno olje

Izkoristek: 0,200 g (η = 67,8 %)

Rf: 0,19 (MF: DKM : MeOH = 9/1)

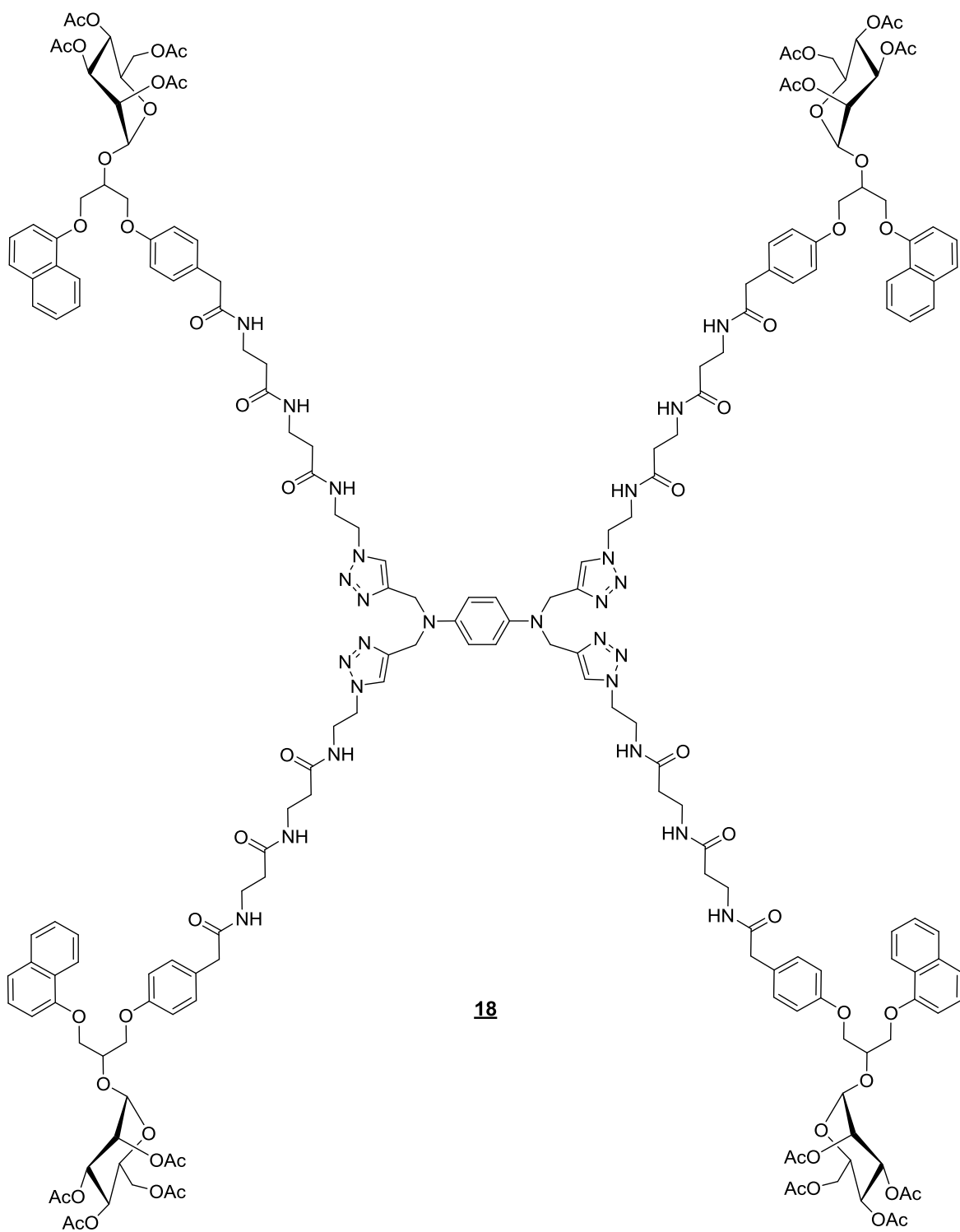
4.4.2 Poskus sinteze dendrona 1 (**18**)

POSTOPEK:

100,0 mg (112 μ mol) **17** in 7,1 mg (27 μ mol) *N*¹, *N*¹, *N*⁴, *N*⁴-tetra(prop-2-in-1-il)benzen-1,4-diamina smo raztopili v 2 ml EtOAc in 0,5 ml MeOH. Nato smo dodali 3,8 μ l NEt₃ (27 μ mol) ter za majhno konico spatule CuBr (katalitična količina, ki ustreza ~ 0,4 mg (3 μ mol)) (modificirano po (82)). Bučko smo zamašili s septumom, prepihali z Ar in mešali pri sobni T čez noč (17 h). Naslednji dan smo s TLC vzorčili reakcijsko zmes in videli, da reakcija še ni potekla. Domnevali smo, da je vzrok za to slabo raztopljen CuBr – usedlina na dnu bučke. Zato smo reakcijski zmesi dodali 0,2 ml prečiščene vode. Raztopina se je zbistrila, usedlina je izginila. TLC po 30 minutah mešanja je razkril, da so izhodne snovi še vedno v zmesi. Reakcijo smo tako pustili mešati na sobni T čez noč (20 h).

Naslednji dan reakcija še vedno ni potekla, zato smo jo odstavili in uparili reakcijsko zmes do suhega. Na kromatogramu TLC je bilo vidnih več lis, od katerih se je razvlečena lisa iz štarta po oroševanju s fosfomolibdatom obarvala zanimivo vijolično, za razliko od ostalih lis. Domnevali smo, da bi to lahko bila spojina **18**, zato smo reakcijsko zmes poskušali očistiti s KKR (gradientna ločba, MF: DKM : MeOH = 7/1 + 1% CH₃COOH, nato 4/1 + 1% CH₃COOH). Vzorec se je dobro raztopil v MF, lise pa so zelo slabo absorbirale pod UV. Vse ločene frakcije smo pregledali z NMR in MS, ki pa sta pokazali, da želenega produkta nismo dobili. MS je nakazala, da bi lahko nastal zgolj dimer.

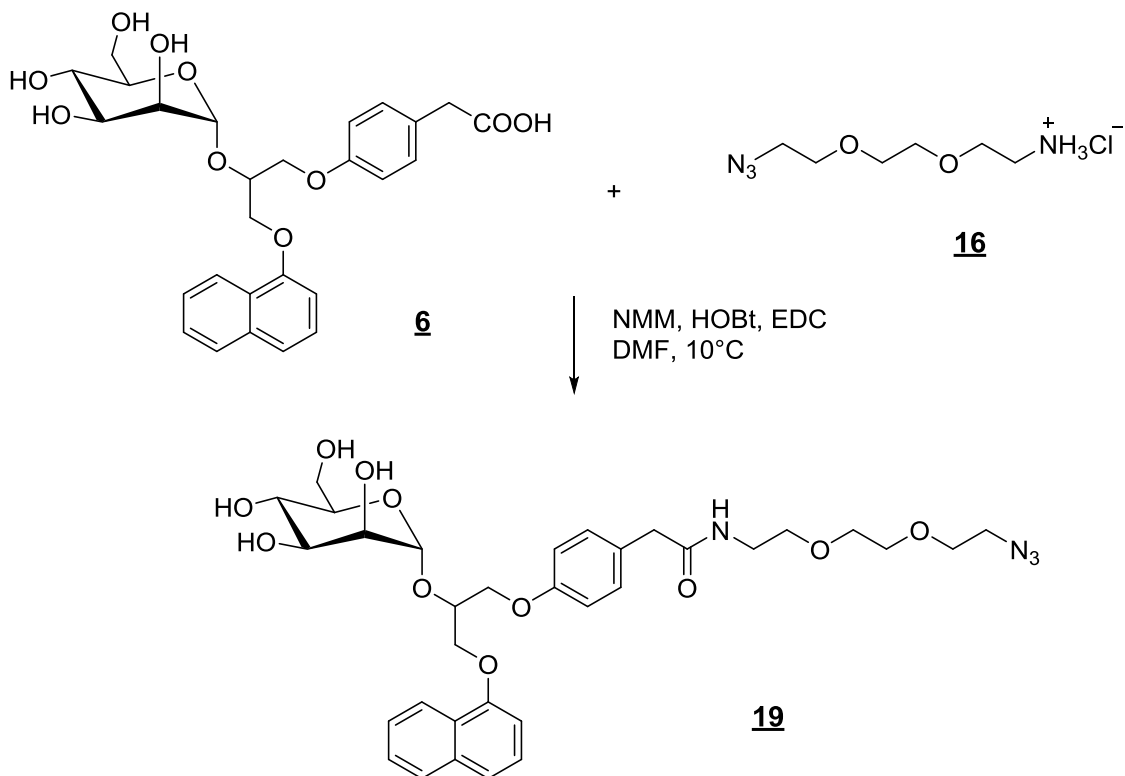
STRUKTURNA FORMULA:



18

4.4.3 Sinteza N-(2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etil)-2-(4-(3-(naftalen-1-iloksi)-2-(α -D-manopiranoziloksi)propoksi)fenil)acetamida (**19**)

REAKCIJA:

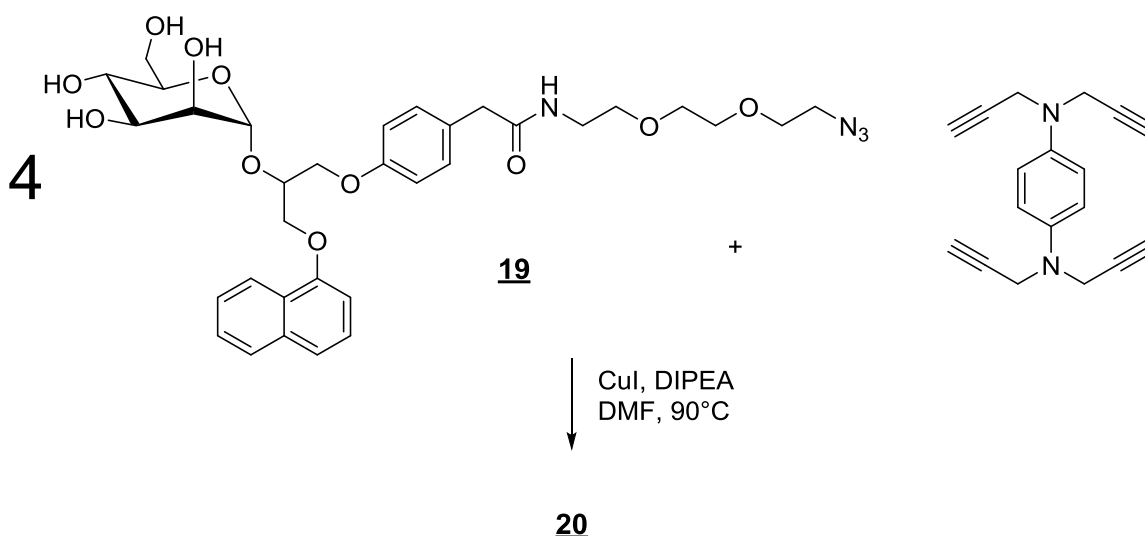


POSTOPEK:

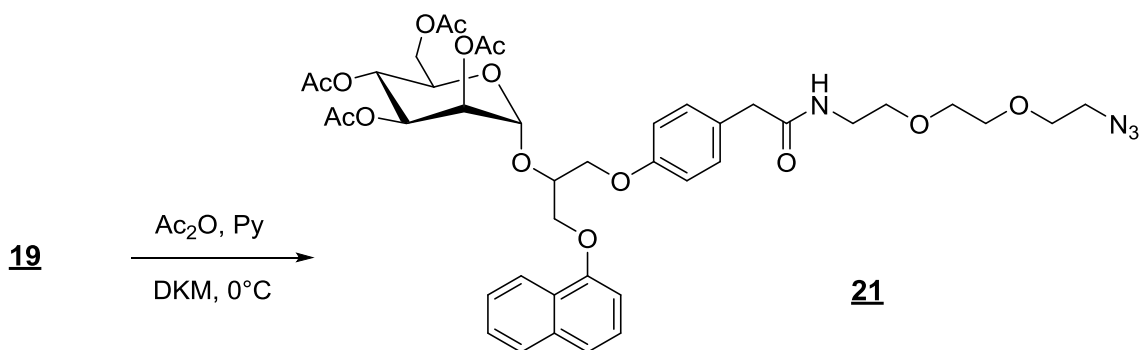
V bučko smo natehtali 1,500 g (2,92 mmol) **6** in 0,614 g (2,92 mmol) **16** ter ju raztopili v 50 ml DMF. Nato smo zmes ohladili na 10 °C in v sledečem vrstnem redu dodali:

- 0,962 ml (8,75 mmol) NMM,
- 0,473 g (3,50 mmol) HOBT,
- 0,671 g (3,50 mmol) EDC.

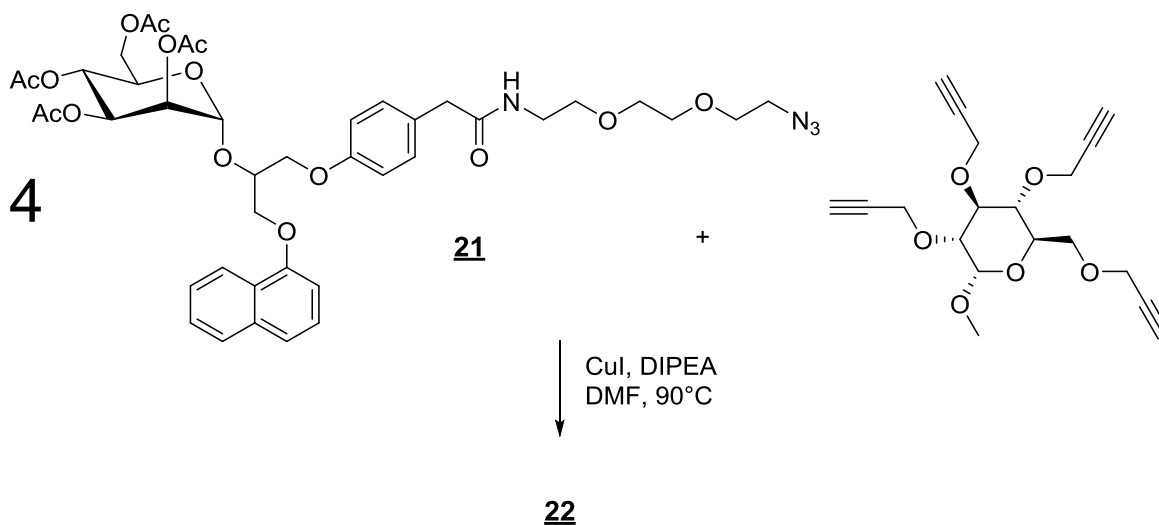
Sistem smo prepihali z argonom in reakcijo pustili mešati čez noč (20 h). Dovolili smo, da se je zmes počasi segrela do sobne T. Naslednji dan smo iz temno rdeče-rjave reakcijske mešanice najprej pod znižanim tlakom uparili DMF ($T_{VK} = 40$ °C, $p = 3$ mbar) in suhemu zaostanku dodali 100 ml EtOAc. Sledila je ekstrakcija zaporedno z NaHCO₃ (3 × 50 ml), 0,1M HCl (2 × 50 ml) in n.r. NaCl (1 × 50 ml). OF smo nato sušili nad Na₂SO₄, prefiltrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom do suhega. Izpadel je blede rumen gumijast produkt, ki smo ga očistili s KKR (MF: DKM : MeOH = 9/1) in dobili čisto zmes dveh diastereomerov spojine **19**.

PRODUKT:**Molekulska formula:** C₃₃H₄₂N₄O₁₁**Mr (izračunano):** 670,72**Izgled:** svetlo rumeno viskozno olje**Izkoristek:** 1,628 g ($\eta = 83,1 \%$)**Rf:** 0,60 (MF: DKM : MeOH = 5/1)**4.4.4 Sinteza dendrona 2 (20)****REAKCIJA:****POSTOPEK:**

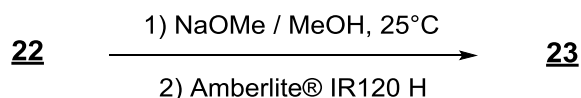
V poseben vsebnik za mikrovalovno pečico smo natehtali 200,0 mg (298 μmol) **19** in 16,2 mg (62 μmol) *N*¹, *N*¹, *N*⁴, *N*⁴-tetra(prop-2-in-1-il)benzen-1,4-diamina ter ju raztopili v 5 ml DMF. Nato smo dodali 4,7 mg (25 μmol) CuI in 130 μl (745 μmol) DIPEA. Vsebnik smo zatesnili z zamaškom in mešali 20 min v mikrovalovni pečici pri 90 °C in 30 W (modificirano po (103)). Po pretečenem času je prej temno rumena raztopina z usedlino postala rjave barve in bistra. TLC nam je pokazal, da dendronskega jedra zagotovo ni več v zmesi. Hkrati je bila na kromatogramu vidna lisa produkta, ki je ob uporabi mobilne faze CH₃CN : MeOH : H₂O = 3/1/1 imela retencijski faktor 0,69. To je bil znak, da je reakcija potekla. Reakcijsko zmes smo prelili v bučko in uparili DMF pod znižanim tlakom ($T_{\text{VK}} = 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $p = 3 \text{ mbar}$). Dobili smo rjavo olje, ki smo ga poskušali očistiti s sistemom IsoleraOneTM (gradientna ločba, MF: MeOH / 0,1 % TFA v bidestilirani vodi) (Priloga 2c), vendar neuspešno. NMR je namreč pokazal, da so v spektru še vedno prisotne nečistote. Sinteza spojine **20** (Priloga 1) je tako sicer uspela, vendar je nismo uspeli izolirati v dovolj čisti obliki iz reakcijske mešanice.

PRODUKT:**Molekulska formula:** C₁₅₀H₁₈₄N₁₈O₄₄**Mr (izračunano):** 2943,20**Izgled:** temno rjavo-sivo strjeno olje**Izkoristek:** 63 mg ($\eta = 34,5 \%$)**Rf:** 0,69 (MF: CH₃CN : MeOH : H₂O = 3/1/1)**4.4.5 Sinteza N-(2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etil)-2-(4-(3-(naftalen-1-iloksi)-2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranoziloksi)propoksi)fenil)acetamida (21)****REAKCIJA:****POSTOPEK:**

Natehtali smo 0,650 g (0,97 mmol) **19** in jo raztopili v 20 ml brezvodnega DKM. Sistem smo zamašili s septumom in prepihali z argonom, nato pa s pomočjo ledu ohladili na 0 °C. Sledil je dodatek 0,5 ml piridina (Py) in zatem še 411 μ l (4,36 mmol) acetanhidrida (Ac₂O). Ob vzdrževanju argonove atmosfere je reakcija potekala 6 h. Zmes se je med tem počasi segrela na sobno T. Reakcija je potekla popolnoma, kar smo ugotovili s TLC. Zato smo pod znižanim tlakom uparili DKM, zaostanku dodali 50 ml EtOAc in ekstrahirali z n.r. NaHCO₃ (6 \times 20 ml). OF smo sušili nad Na₂SO₄, prefiltrirali, uparili topilo pod znižanim tlakom in koevaporirali s toluenom (2 \times 10 ml). Produkt smo čez noč sušili še v eksikatorju (pri tlaku p = 10 mbar) in dobili čisto spojino **21** v obliki dveh diastereomerov.

PRODUKT:**Molekulska formula:** C₄₁H₅₀N₄O₁₅**Mr (izračunano):** 838,86**Izgled:** bledo rumeno olje**Izkoristek:** 0,780 g ($\eta = 95,8 \%$)**Rf:** 0,69 (MF: DKM : MeOH = 9/1)**4.4.6 Sinteza dendrona 3 (22)****REAKCIJA:****POSTOPEK:**

V vsebnik za mikrovalovno pečico smo natehtali 400,0 mg (477 μmol) 21 in 34,4 mg (99 μmol) metil 2,3,4,6-tetra-*O*-(prop-2-in-1-il)- α -D-glukopiranozida ter ju raztopili v 5 ml DMF. Nato smo dodali 7,6 mg (40 μmol) CuI in 208 μl (1,19 mmol) DIPEA. Vsebnik smo zatesnili z zamaškom in mešali 20 min v mikrovalovni pečici pri 90 °C in 30 W (modificirano po (103)). Po pretečenem času je poprej rumena raztopina z usedlino postala temno rjave barve in bistra. Dendronskega jedra glede na TLC ni bilo več v zmesi in pokazala se je lisa produkta, ki je v mobilni fazi DKM : MeOH = 9/1 imela retencijski faktor 0,40. Reakcija je potekla, zato smo pod znižanim tlakom uparili DMF ($T_{\text{VK}} = 40^\circ\text{C}$, $p = 3$ mbar) in dobili rjavo olje, ki smo ga očistili s KKR (MF: CHCl₃ : MeOH = 12/1). Očiščen produkt smo sušili še na vakuumski črpalki ($p = 6 \times 10^{-2}$ mbar) in v eksikatorju čez noč ($p = 10$ mbar). Spojino 22 (Priloga 1) smo dobili kot diastereomerno zmes.

PRODUKT:**Molekulska formula:** C₁₈₃H₂₂₂N₁₆O₆₆**Mr (izračunano):** 3701,84**Izgled:** rumeno strjeno olje**Izkoristek:** 126 mg ($\eta = 34,4 \%$)**Rf:** 0,40 (MF: DKM : MeOH = 9/1)**4.4.7 Sinteza dendrona 4 (23)****REAKCIJA:****POSTOPEK:**

V bučko smo natehtali 105 mg (28 μmol) spojine 22 in jo raztopili v 5 ml brezvodnega MeOH. Sistem smo takoj zamašili s septumom in prepihali z argonom. Nato smo preko septuma dodali 1 kapljico 30 % raztopine NaOMe v metanolu (katalitična količina, ki ustreza $\sim 0,5 \mu\text{l}$ (3 μmol)). Reakcija je potekala 4 h ob stalnem mešanju pri sobni T. Po tem času se je raztopina obarvala rumeno-zeleno, reakcija pa je popolnoma potekla, saj izhodne snovi glede na TLC ni bilo več v zmesi. Produkt smo opazili kot liso, ki je po razvijanju v mobilni fazi DKM : MeOH = 9/1 ostala na startu.

Zato smo v bučko dodali Amberlite® IR120 H in sicer toliko, da pH ni bil več alkalen. Raztopina se je razbarvala do svetlo rumene barve. Smolo smo nato odfiltrirali s presesavanjem in jo še dodatno macerirali v brezvodnem MeOH ($3 \times 10 \text{ ml}$). Filtrat in macerate smo združili in uparili topilo pod znižanim tlakom. Izpadlo je rumeno strjeno olje, ki smo ga očistili s sistemom IsoleraOne™ (gradientna ločba, MF: MeOH / 0,1 % TFA v bidestilirani vodi) (Priloga 2d). Ločba na koloni je bila dobra, zato smo dobili naš končni produkt, čisto spojino 23 (Priloga 1).

PRODUKT:**Molekulska formula:** C₁₅₁H₁₉₀N₁₆O₅₀**Mr (izračunano):** 3029,24**Izgled:** rumeno strjeno olje**Izkoristek:** 25 mg ($\eta = 29,5 \%$)**Rf:** 0,79 (MF: CH₃CN : MeOH : H₂O = 3/1/1)

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

Narava eksperimentalnega dela je od nas zahtevala temeljito prilagoditev sintezne strategije za doseg končnega cilja. Prvoten sintezni načrt smo morali spremeniti na več mestih – pravzaprav na vseh glavnih segmentih, od sinteze monomera do sinteze dendrona. Zaradi slabih izkoristkov smo v prvem delu dobili premalo končne spojine (monomera), kar nas je vodilo do alternativnega postopka sinteze preko Me estra kot zaščitne skupine. Nadalje je zaradi slabe topnosti spojin bilo potrebno sintetizirati nov, bolj hidrofilen distančnik. Hkrati smo iz istega razloga zamenjali tudi dendronsko jedro, kar se je izkazalo kot uspešna poteza. Večji η sintezne poti smo dobili v primeru, ko smo najprej izvedli pripajanje distančnika in šele nato acetiliranje OH skupin na sladkorju, kar je pravtako sprememba glede na prvotni načrt dela. Tako smo uspešno sintetizirali končno spojino – dendron, sicer po drugačnem postopku in z drugačno strukturo od prvotno načrtovane.

5.1 SINTEZA MONOMERA

5.1.1 Tvorba benzilnega in metilnega estra (sinteza spojin 1 in 8)

Benzilni ester tvorimo v brezvodnih pogojih, ker voda moti reakcijo. V alkalnih vodnih raztopinah namreč estri niso obstojni. Glede na slab η te reakcije lahko sklepamo, da je v zmesi bilo prisotno še nekaj vlage, ki je povzročila hidrolizo produkta. Dodatno je hidrolizo pospešila povišana T, pri kateri smo izvajali reakcijo. Potekla je nukleofilna substitucija na sp^3 hibridiziranem elektron pozitivnem (δ^+) ogljiku benzilbromida in sicer po S_N2 mehanizmu (104). Izkoristek reakcije bi povečali, če bi predhodno bučko dobro osušili (izgnali vso vlago).

Metilni ester pravtako tvorimo v brezvodnih pogojih. Poteče nukleofilna substitucija na polarizirano karbonilno skupino, v kateri ima ogljik primanjkljaj elektronov in je zato dovzeten za napad Nu. Pomembno je, da reakcijsko zmes koevaporiramo z EtOEt, saj se na tak način znebimo HCl, ki nastaja pri reakciji. V nasprotnem primeru bi se pri rotavapiranju le-ta lahko skoncentrirala in ob najmanjši količini prisotne vode povzročila kislinsko katalizirano hidrolizo estrske vezi. Reakcija je potekla brez posebnosti in z zelo visokim η .

5.1.2 Odpiranje epoksidnega obroča (sinteza spojin 2 in 9)

Sinteza 2 poteka v dveh stopnjah. Najprej s pomočjo KOH iz fenola tvorimo fenolat, ki je dober Nu, ta pa nato po S_N2 mehanizmu izvrši nukleofilno substitucijo na sp^3 hibridiziranem ogljikovem atomu, pri čemer pride do odpiranja epoksidnega obroča (105). Za reakcijo so nujno potrebni brezvodni pogoji, saj zaradi močne baze lahko že v prvi stopnji pride do hidrolize estra. Voda moti reakcijo tudi v drugi stopnji, saj je Nu in povzročča neželjeno odpiranje epoksidnega obroča, s čimer pride do nastanka stranskih produktov. Hkrati smo z NMR potrdili, da tekom prve stopnje prihaja do preestrenja z MeOH, kar dodatno zmanjša η . Vse zgoraj opisano se je zgodilo v našem primeru in je glavni vzrok za slab η .

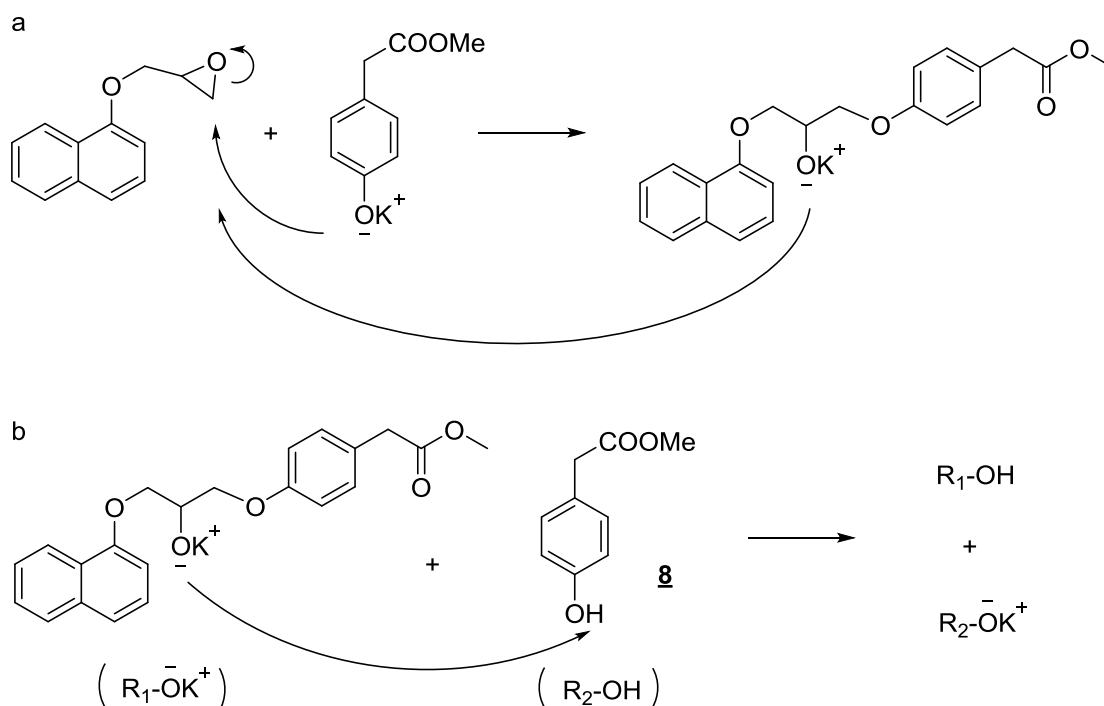
Pri tovrstni reakciji smo imeli največ težav. Številni predhodno izvedeni neuspešni poskusi sinteze spojine 2 so zbrani v Tabeli 1. Vse reakcije od 1 – 4 smo izvajali pod zaprtim sistemom v inertni argonovi atmosferi, pri 60 °C in opremljeno s povratnim hladilnikom.

Tabela 1: Pogoji in reagenti, s katerimi reakcija sinteze spojine 2 ni potekla.

Poskus	Reagent in ekvimolarna količina			Topilo	Čas
1	Spojina <u>1</u> 1,0	Epoksid 1,0	NaH (60%) 1,1	DMF	20h
2	Spojina <u>1</u> 1,0	Epoksid 1,0	CS_2CO_3 2,0	DMF	20h
3	Spojina <u>1</u> 1,0	Epoksid 1,0	CS_2CO_3 2,0	CH_3CN	20h
4	Spojina <u>1</u> 1,2	Epoksid 1,0	NaH (60%) 0,2	DMF	48h

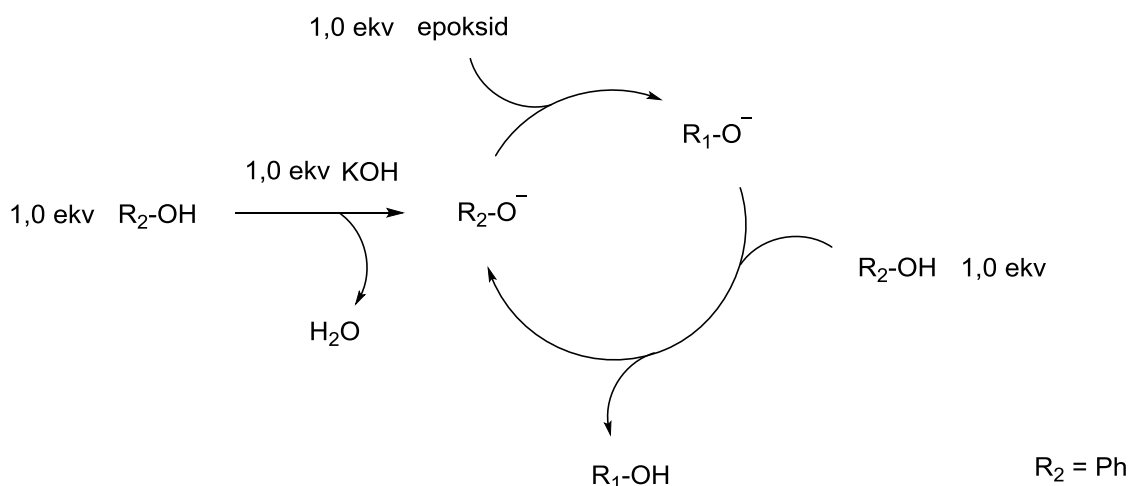
Reakcijo smo poskušali nadalje optimizirati tako, da smo znižali ekvimolarno količino epoksida iz prvotnih 1,0 na 0,5; spojine 8 iz 1,2 na 1,0; KOH iz 1,2 na 0,5. Odločitev se je izkazala za uspešno, saj je sinteza 9 potekla z mnogo višjim η . Razmislek, ki nas je vodil do tega sklepa je sledeč:

Pri reakciji nastaja produkt v obliki soli (alkoholata), ki je Nu in napade epoksidni obroč (Slika 14a). To je neželena stranska reakcija, v kateri se porabita tako izhodna snov kot tudi produkt, kar pa močno zmanjša η . Rešitev predstavlja donor H^+ , ki bi protoniral alkoholat, pri čemer bi nastal sekundarni alkohol, ki je veliko slabši Nu in ne bi vstopal v stransko reakcijo. Ker so potrebni brezvodni pogoji, donor H^+ ne more biti voda. Edina možnost je, da kot donor H^+ nastopi spojina **8** (Slika 14b).



Slika 14: Razmislek v zvezi z optimizacijo reakcije odpiranja epoksida.

Zato je potrebno dati reagente v razmerju 2 : 1 : 1 (**8** : KOH : epoksid). Tako ionizira le 50 % **8**, ki zreagira do produkta v obliki soli. Preostalih 50 % pa se porabi za izmenjavo H^+ , ki se premaknejo iz fenola (močna kislina, fenolat je zato šibkejši Nu) na alkoholat (močan Nu, alkohol je namreč šibka kislina). V zmesi po tem mehanizmu preostane 50 % nezreagirane spojine **8**, ki je v obliki soli in že aktivirana za ponovno reakcijo z epoksidom. Ob dodatku najprej 1,0 ekv **8** in nato še 1,0 ekv epoksida (vrstni red je pomemben, da ne pride do stranske reakcije) v reakcijsko mešanico bi reakcija ponovno stekla in krog je sklenjen (Slika 15). Še več, iz sheme je razvidno, da bi za uspešen potek reakcije zadostovala že katalitična količina KOH (npr. 0,1 ekv), saj se Nu pri reakciji sproti regenerira. Tako bi dosegli še dodatno optimizacijo procesa in izboljšali η .

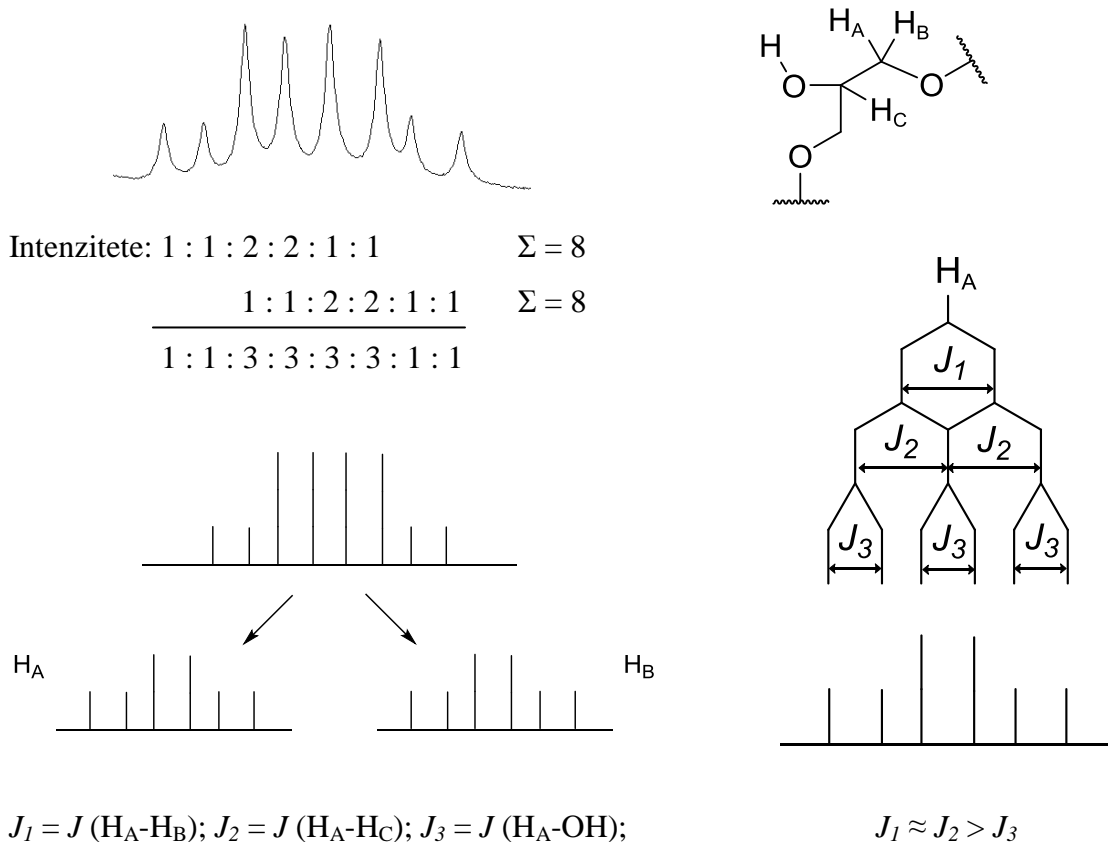


Slika 15: Cikel vrtenja procesa.

Opisani postopek bi bil primeren za industrijsko uporabo, saj omogoča recikliranje izhodne snovi ob hkratnem nastajanju produkta z visokim η . Nezreagirane izhodne snovi in ostale nečistoče lahko uspešno odstranimo z ekstrakcijo in KKR, kar daje postopku dodatno uporabno vrednost. Dobimo čist produkt **9**, kar je potrdil tudi NMR. Prednost tega postopka je uporaba metilnega estra kot izhodne snovi, saj morebitno preestrenje, do katerega pride v prvi stopnji, nima vpliva na izkoristek reakcije. Ključnega pomena za učinkovit proces je hitro in popolno odparevanje vode, ki nastane kot produkt nevtralizacijske reakcije v prvi stopnji. S tem se izognemo hidrolizi estra in stranskim reakcijam v drugi stopnji. Koevaporacija s toluenom (voda in toluen tvorita azeotropno zmes z minimumom vrelišča) predstavlja elegantno rešitev, saj je na ta način pri istem tlaku potrebna veliko nižja T in s tem manjši vložek energije, kar v praksi pomeni nižje stroške procesa.

V NMR spektrih spojin **2** in **9** smo opazili zanimiv simetričen signal, ki pripada protonoma alifatske -CH₂- skupine glicerolnega distančnika (Slika 16). Signal je sestavljen iz 8 linij, katerih intenziteta je v razmerju 1 : 1 : 3 : 3 : 3 : 3 : 1 : 1. Za razlago oblike signala in intenzitete posameznih linij se opremo na drevesni diagram, ki nam prikaže sklopitve med protoni (106). Hitro lahko opazimo, da je signal dejansko sestavljen iz dveh identičnih signalov – protona nista magnetno ekvivalentna, zato dajeta vsak svoj signal, ki je po obliki enak. Gre za 2 × ddd. Intenziteta linij je v obeh primerih 1 : 1 : 2 : 2 : 1 : 1, vsota letih pa ustreza pravilu 2ⁿ (2³ = 8), pri čemer je n število sklopitev. Vsak proton (H_A in H_B)

ima v soseščini 3 H-atome in zato v magnetnem polju oba čutita isto okolico. Posledično so tudi sklopitve 3 – J_1 in J_2 sta po velikosti enaki, J_3 je manjša. To da signalu značilno obliko.

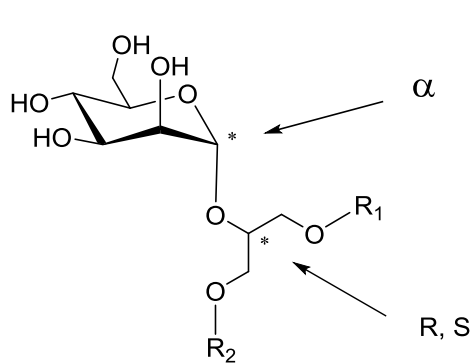


Slika 16: Karakterističen signal in prikaz sklopitev za H_A . Podobno velja za H_B .

5.1.3 Glikozilacija alkohola (sinteza spojin 4 in 10)

Glikozilacija je v obeh primerih potekla brez posebnosti in z visokim η . Gre za Nu substitucijo na sp^3 hibridiziranem anomernem ogljikovem atomu. Za dober izkoristek je nujno zagotavljanje brezvodnih pogojev. Produkt 4 je imel prijeten sladek vonj po medu. NMR spekter 10 je veliko bolj čist kot 4 (manj dodatnih signalov oz. nečistot).

Z glikozilacijo v molekulo vnesemo nov stereogeni center, s čimer povzročimo nastanek diastereomerov (Slika 17). Glikozidna vez je namreč vselej α zaradi stereoselektivne izvedbe glikozilacije z Lewisovo kislino (TMSOTf) kot katalizatorjem. Drugi stereogeni center je lahko R ali S. Na tak način dobimo dve molekuli entiteti, ki se po fizikalno-

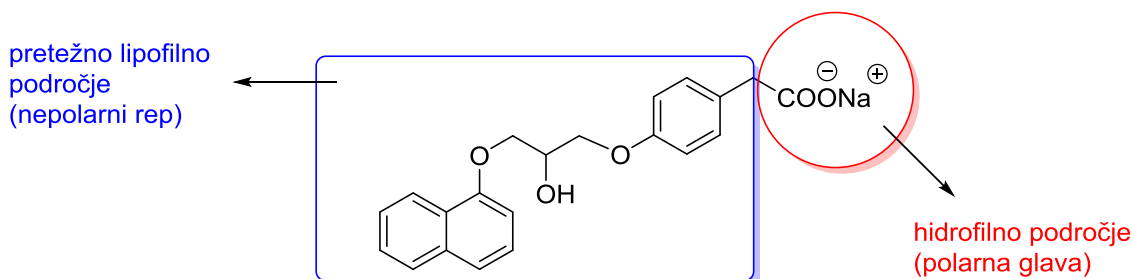


kemijskih lastnostih (topnost, tališče, ^1H in ^{13}C NMR signali) zelo razlikujeta. To se neposredno odraža pri reakcijah, izolaciji in čiščenju spojin. Prvi diastereomer ima konfiguracijo αR , drugi pa αS . V NMR spektrih se nastanek diastereomerov kaže kot podvajanje signalov in se pojavi od te stopnje dalje.

Slika 17: Stereogeni centri molekule.

5.1.4 Odstranjevanje zaščitnih skupin – Bn, Me in Ac estrov (sinteza spojin 3, 5, 6, 11 in poskus sinteze spojine 7)

Sinteza 3 (alkalna hidroliza Bn estra) je potekla brez težav in z visokim η . Omeniti velja, da je spojina 3 v obliki soli površinsko aktivna snov (anionski emulgator) z amfifilno strukturo (Slika 18) in povzroča intenzivno penjenje pri ekstrakciji. Posledično se fazi dolgo ločujeta – počakati smo morali čez noč. Temu bi se izognili, če lija ločnika ne bi tako močno stresali. S tem bi prihranili veliko časa pri izolaciji.



Slika 18: Amfifilna struktura Na^+ soli spojine 3.

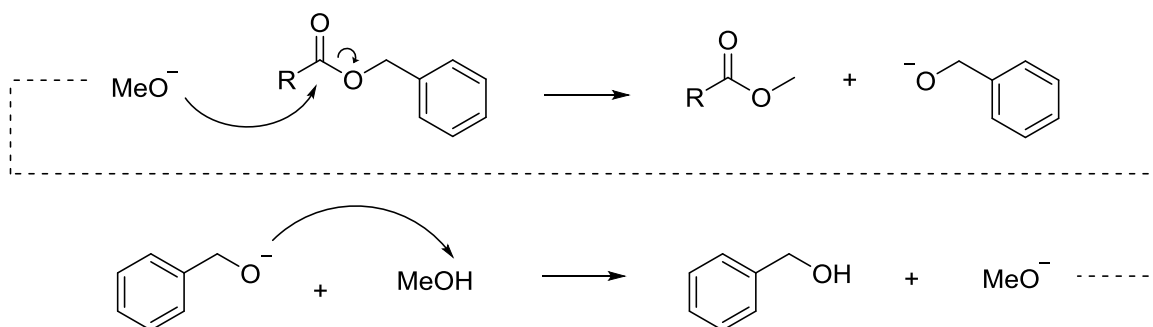
Sinteza 5 (katalitsko hidrogeniranje Bn estra) je potekla z nižjim η , hkrati pa je iz NMR bilo razvidno, da spojine nismo uspeli zadovoljivo očistiti. Vzrok za to je uporaba očetne kisline v MF za KKR, ki sicer omogoči potovanje naše spojine, a obenem iz starta spere tudi nekatere nečistote, ki drugače ne bi potovale po koloni. Zaradi tega ločba lis ni bila optimalna in posledično je bil nižji η . Opazili smo, da je dobljeni produkt 5 sprva bil zeleno modra viskozna tekočina, po nekaj dneh pa je postal oranžno-rjave barve. Verjetno

je sprememba barve neposredno povezana z odhlapevanjem očetne kisline, ki je po čiščenju s KKR navzlic koevaporaciji s toluenom zaostala v vzorcu.

Sinteza **6** (alkalna hidroliza Me estra) je potekla z dobrim η . Takoj po dodatku NaOH se je iz EtOH oboril produkt v obliki soli. Nastala je diastereomerna zmes, pri čemer sta diastereomera izkazovala zelo različne lastnosti glede topnosti. Skupna obema je bila slaba topnost v DKM, kamor se nista hotela porazdeliti niti po nakisanju. Eden je bil slabo topen v vodi in EtOAc, drugi bolje topen v vodi, a še boljše v EtOAc. Oba sta se dobro raztapljala v MeOH. Tako smo enega lahko direktno odfiltrirali iz VF (oborina), drugega pa ekstrahirali v EtOAc. Na tak način smo iz reakcijske zmesi dobili ločena diastereomera. NMR je pokazal, da je v spektru prvega prisotno še $\sim 10\%$ (m/m) drugega in obratno. To pomeni, da je prvi pravtako boljše topen v EtOAc kot v vodi in da se iz vode deloma obarja tudi drugi (topnost v vodi je boljše od prvega, a še vedno slaba). Optimiziran postopek izolacije bi vseboval samo ekstrakcijo z EtOAc, saj je ekstrakcija z DKM neučinkovita in zmanjša η (dodatne izgube). V okviru izolacije je zelo pomembno, da reakcijske zmesi ne uparimo do suhega, saj se pri rotavapiranju koncentrira NaOH, ki bi lahko povzročil hidrolizo glikozidne vezi.

Spojino **6** smo pripravili tudi z Zemplénovo metodo. Gre za odstranjevanje Ac estrov (odščito OH skupin sladkorja) z reakcijo preestrenja, ki jo izvede metoksidni anion (MeO^-). Dovolj je že katalitična količina, saj se med samo reakcijo MeO^- regenerira (107). Izkoristek je bil zelo slab predvsem na račun nečiste izhodne snovi **5**. Dodatno je k temu pripomogla še slaba topnost vzorca v MF za čiščenje s sistemom IsoleraOneTM. Možno je tudi, da se je vzorec adsorbiral na ionsko izmenjevalno smolo Amberlite[®] in smo ga skupaj s smolo odfiltrirali. NMR je pokazal, da so v vzorcu prisotne še nečistote. Presenetljiv rezultat je Zemplénova metoda dala v primeru poskusa sinteze **7**, saj smo dejansko dobili spojino **6**. To si lahko razlagamo na sledeč način:

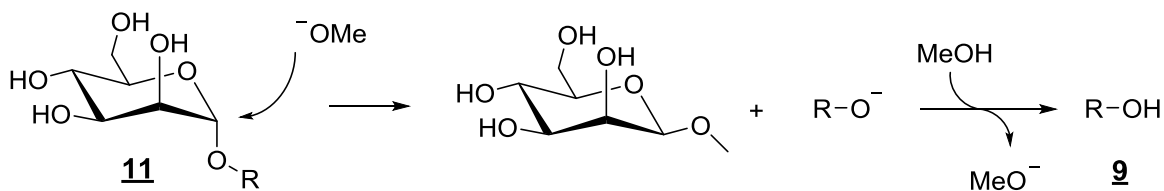
Tekom reakcije MeO^- kot Nu napade polarizirano karbonilno skupino Bn estra in povzroči preestrenje tudi v tem delu molekule (NMR potrди signal Me estra pri 3.66 ppm v reakcijski zmesi pred čiščenjem) (Slika 19). Pri tem nastane Bn alkoholat, ki pobere H^+ in tako dobimo Bn alkohol (signal $-\underline{\text{CH}}_2\text{OH}$ viden pri 4.74 ppm v spektru pred čiščenjem), hkrati pa se Nu regenerira. Gre torej za enak mehanizem kot pri preestrenju Ac skupin.



Slika 19: Regeneracija nukleofila in preestrenje.

Nadalje je tekom čiščenja prišlo do kislinske hidrolize Me estra, saj smo uporabili kislo MF ($\text{pH} \approx 2$) in zaradi slabe topnosti vzorca v MF bučko tudi segrevali, kar je reakcijo še pospešilo. Nastala je spojina **6**, ki se je na sistemu IsoleraOneTM dobro ločila od vseh prisotnih nečistot, zato smo dobili mnogo bolj čist produkt kot v prejšnjem primeru (Priloga 3a). Izkoristek zopet ni presegel 50 %. Za sintezo **6** je tako najprimernejši postopek hidrolize Me estra, ki ima najvišji η , nastali produkt pa je tudi zelo čist.

Po Zemplénovi metodi je pravtako potekala sinteza **11**, ki je imela dober η predvsem na račun čistejše izhodne snovi. Pri tej sintezi zaradi uporabe Me estra kot zaščitne skupine preestrenje z MeO^- nima vpliva na končni η . S pomočjo NMR smo ugotovili, da je kot stranska reakcija poteklo preetrenje na δ^+ anomernem ogljikovem atomu, pri čemer je nastala spojina **9** (Slika 20). MeO^- je ponovno izvršil nalogo Nu in se nato po že znanem mehanizmu regeneriral. Stranski produkt **9** smo s KKR izolirali v čisti obliki, eluiral se je kot samostojna lisa veliko pred spojino **11**. To je bil glavni dejavnik, ki je znižal η .



Slika 20: Preetrenje.

5.2 SINTEZA DISTANČNIKA

Sinteza **12** (Nu substitucija na sp^3 hibridiziranem δ^+ ogljiku) je potekla popolnoma in brez posebnosti. Kristalček KI smo dodali kot katalizator, saj je I^- dober Nu, ki predhodno izvrši Nu substitucijo. S tem pride do tvorbe boljše izstopajoče skupine (atom I je večji od Cl) in reakcija hitreje steče. I^- se pri tem regenerira. Pri sintezi **13** (katalitsko hidrogeniranje) smo imeli nekaj več težav, saj je kljub večji količini dodanega Pd/C, povečanju volumna topila in povišani T v zmesi po 2 dneh še vedno bila prisotna izhodna snov. To je glavni vzrok, da je sinteza **14** (Nu substitucija na polarizirano karbonilno skupino anhidrida) potekla z zelo nizkim η . Spojin **12** in **13** namreč predhodno nismo čistili, saj smo direktno izvedli naslednjo sintezno stopnjo. Tako so v reakcijski zmesi bile prisotne še vse nečistote iz predhodnih dveh reakcij. Sama sinteza **14** pravtako ni potekla popolnoma (v zmesi je bil prisoten še izhodni amin). Voda moti reakcijo, saj je Nu in reagira z izhodnim Boc anhidridom. Prisotna vlaga bi lahko bila dodaten razlog za slab η . Ločba lis na koloni ni bila optimalna. Dobili smo manj čistega produkta, kot smo pričakovali, zato smo naslednjo stopnjo izvajali tudi iz delno čistih frakcij.

Posledično je nizek η imela reakcija tvorbe **15**, ki je potekala v dveh delih. Sprva smo pretvorili alkohol v dobro izstopajočo skupino (metansulfonat) po smislu Nu substitucije na δ^+ žveplovem atomu. Baza je na tej stopnji nujno potrebna, saj nevtralizira pri reakciji nastalo HCl (Boc zaščitna skupina v močno kislem mediju ni stabilna, saj poteče acidoliza). Druga stopnja je praktično enaka sintezi **12**, vendar z eno pomembno razliko. Temperatura pri reakciji je nižja, ker je Boc termolabilen. Na obeh stopnjah reakciji nista potekli popolnoma, saj so v zmesi vselej bile prisotne še izhodne snovi, ki jih nismo dali v prebitku. To je pravtako vzrok za slab η . Izkoristek bi povečali, če tekom izolacije OF ne bi spirali z vodo (produkt se v tem primeru delno ekstrahira v VF in je izgubljen), ampak le z n.r. NaCl. Nujno je tudi zagotavljanje brezvodnih pogojev, saj voda v obeh primerih moti reakcijo (reagira z izhodnimi snovmi in/ali produktom). Čiščenje s KKR je bilo uspešno, saj smo eluirali čisto liso **15**. Brez težav in z visokim η je potekla sinteza **16** (acidoliza Boc zaščitne skupine). Produkt **16** na zraku ni stabilen in kaj hitro oksidira, pri čemer spremeni barvo iz rumene v temno rjavo. To je posledica v molekuli prisotnega amina, ki se oksidira do ustrezne nitro spojine (108). Distančnik **16** je zato potrebno hraniti v hladilniku in inertni argonovi atmosferi.

5.3 SINTEZA DENDRONA

5.3.1 Tvorba amidne vezi (sinteza spojin 17 in 19) in zaščita OH skupin sladkorja (sinteza spojine 21)

Pripajanje distančnika poteka kot Nu substitucija na polarizirano karbonilno skupino. Ker je kislina slabo reaktivna za tovrstne reakcije, jo je predhodno potrebno aktivirati (tvorimo boljšo izstopajočo skupino). NMM kot organska baza odtegne kislini H⁺, pri čemer nastane karboksilatni anion. Ta ima nukleofilen značaj in lahko zreagira z EDC oz. HOBT do nastanka aktiviranega estra (109). NMM hkrati omogoči, da aminska skupina, ki je v obliki soli, postane nukleofil in lahko opravi svojo nalogo – nukleofilni napad na δ⁺ estrski ogljikov atom. Sinteza 17 je potekla z nižjim η kot sinteza 19 in tudi NMR spekter je razkril, da so v vzorcu prisotne še nečistote. To je posledica slabše ločbe lis na koloni pri čiščenju 17. Proste OH skupine sladkorja pri spojini 19 namreč prispevajo k polarnosti, zato se spojina dlje časa zadrži na koloni (večja retencija), kar omogoča boljšo ločbo. K večjemu η prispeva dodatna ekstrakcija s kislom VF (0,1M HCl), saj se na tak način znebimo nekaterih nečistot. Ne glede na to, da imamo pri spojini 17 prisotne še Ac skupine na sladkorju, kislina ekstrakcija ne bi predstavljala problema, saj so Ac estri pri pH = 1 in sobni T obstojni. Pri sintezi 19 nismo imeli težav, potekla je z dobrim η.

Sinteza 21 je potekla brez posebnosti in z zelo visokim η. Gre za klasično acetiliranje OH skupin sladkorja – Nu substitucijo na polariziranem δ⁺ ogljiku karbonilne skupine acetanhidrida. S tem zvečamo lipofilnost molekule, kar je ključnega pomena za potek reakcije pri glavni stopnji sinteze dendrona – pripajanju distančnika na dendronsko jedro. Edino težavo pri sintezi 21 predstavlja Py, ki se ga po koncu ekstrakcije le stežka znebimo iz zmesi. V ta namen izvedemo intenzivno ekstrakcijo, koevaporacijo s toluenom in nazadnje zmes sušimo še v eksikatorju čez noč.

5.3.2 Klik reakcija na dendronsko jedro (poskus sinteze spojine 18, sinteza spojin 20 in 22)

Poskus sinteze 18 je temeljil na predhodnih dognanjih v zvezi z reakcijami dendronskih spojin, ki niso bile uspešne (82). Še enkrat smo dokazali, da reakcija pod takimi pogoji ne

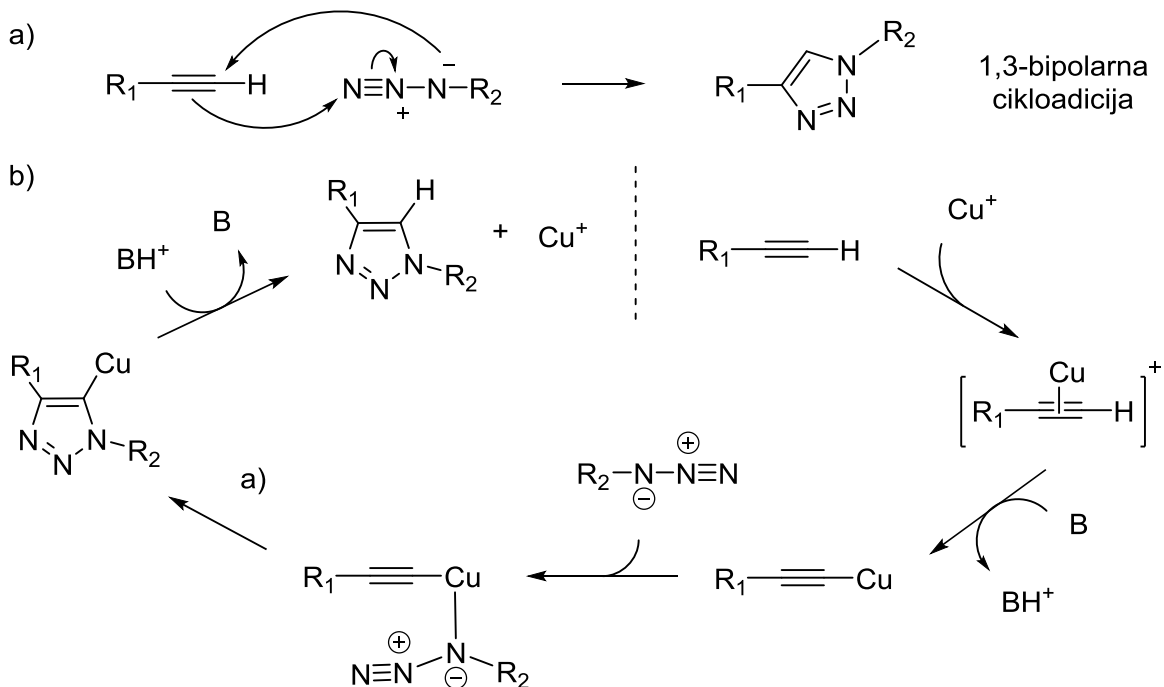
poteka. V našem primeru tudi topnost vzorca ni bila problematična, saj se je le-ta dobro raztopil. TLC je nakazal liso, ki bi lahko bila naš produkt, zato smo ga poskušali izolirati iz reakcijske mešanice s pomočjo KKR. To nam ni uspelo, za kar bi lahko bil glavni razlog uporaba očetne kisline v MF, ki iz starta spere tudi druge lise (nečistote).

Sledila je sprememba sintezne strategije. Sintezo **20** smo izvedli pod drugačnimi pogoji. Bistvena razlika je bila, da smo tokrat reakcijo izvajali pri povišani T in uporabili mikrovalove. Odločitev se je izkazala za uspešno, saj smo dobili končni produkt. Težave so ponovno nastopile pri izolaciji oz. čiščenju spojine. Vzorec se je zelo slabo raztapljal v MF, kar je močno zmanjšalo izkoristek reakcije. Obenem je bila slaba tudi ločba na koloni (Priloga 2c). Analize so sicer potrdile strukturo končnega produkta, vendar je bil vzorec še mnogo onečiščen. V NMR spektru je kot nečistoča bila vidna izhodna snov (azid **19**), kar je potrdil tudi IR. Od vsega najbolj pomembno pa je dejstvo, da so v NMR bili signali aromatskih protonov monomerov in dendronskega jedra v ustreznem razmerju (1 : 4). To je očitni znak, da je nastal tetramer. Jasno so bili vidni signali $4 \times$ Ar-H dendronskega jedra in $4 \times$ Ar-H triazolov. Slednji so karakteristični znak poteka klik reakcije. Nekateri signali v spektru so bili celo dvakrat podvojeni (kvadruplirani) zaradi diastereomerov.

Posumili smo, da bi za slabo topnost vzorca lahko bilo odgovorno dendronsko jedro, ki je pri **20** precej lipofilno. Naš raziskovalni interes se je zato usmeril v sintezo dendrona z bolj hidrofilnim jedrom. Po drugi strani pa je problematično čiščenje spojine predstavljalo nov izziv. Sklepali smo, da težavo predstavljajo nezaščitene OH skupine sladkorja, ki jih **20** vsebuje v izobilju ($16 \times$). Te so zelo polarne, tvorijo veliko vodikovih vezi z stacionarno fazo in onemogočajo čiščenje z normalnofazno KKR, ker spojina ostane na startu. Zato smo sintezo **22** izvedli s predhodno zaščitnimi OH skupinami na izhodni snovi. Reakcija je potekla popolnoma, produkt pa je bil dovolj nepolaren, da smo ga lahko čistili z normalnofazno KKR. Vzorec se je dobro raztopil v MF. Ločba sicer ponovno ni bila najboljša, vendar nam je uspelo izolirati nekaj frakcij, v katerih je bil produkt čist. Na račun tega je bil η nižji. NMR je razkril lep aromatski del z ustreznim razmerjem signalov ($1 \times$ tetrazolni H : $4 \times$ Ar-H monomera) in oster signal Me skupine jedra, ki je sicer skrit v gozdičku protonov CH_2 skupin distančnika.

Opisane reakcije spadajo v področje organskih sintez, ki ga imenujemo klik kemija. Koncept je bil vpeljan na osnovi opazovanja narave, saj večina osnovnih organskih molekul (gradnikov večjih strukturnih enot) v svoji strukturi vsebuje vez ogljik-heteroatom-ogljik (110). Klik reakcije so definirane kot hitre, ireverzibilne povezave substratov, kar lahko najbolje ponazorimo kot zaklepanje ključavnice. So zanesljive in potekajo z visokim η . Zanje so značilni neškodljivi stranski produkti, ki jih lahko zlahka odstranimo z nekromatografskimi metodami (111).

Ena izmed glavnih klik reakcij je tudi s Cu^+ katalizirana azid-alkin ligacija. Gre za različico Huisgenove azid-alkin sinteze 1,2,3-triazolov (112, 113). Dodatek Cu^+ aktivira terminalne acetilenske skupine za reakcijo 1,3-bipolarne cikloadicije z organskimi azidi, pri čemer nastane izključno 1,4-disubstituiran regioizomer 1,2,3-triazolnega heterocikličnega obroča (Slika 21a). Mehanizem reakcije vključuje prisotno bazo, ki odtegne kisel H^+ acetilenske skupine. Po koordinacijski vezavi katalizatorja na trojno vez (tvorba prehodnega π kompleksa) se namreč acetilenskemu protonu močno zniža pKa (iz prvotnih ~ 25 za cca. 10 enot), kar omogoči odcep H^+ s pomočjo baze (Slika 21b).



Slika 21: a) Smer premika elektronov pri 1,3-bipolarni cikloadiciji.

b) Poenostavljen mehanizem reakcije in vloga katalizatorja.

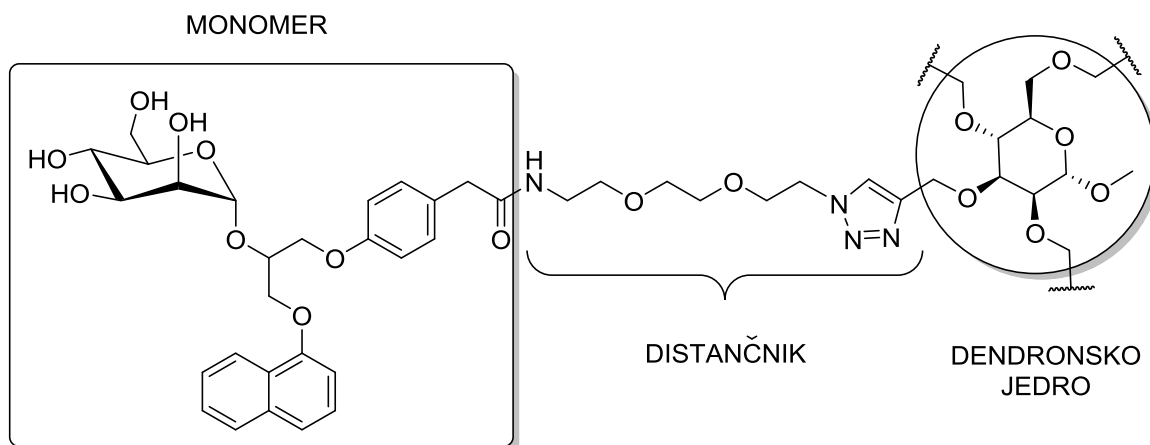
Katalizator nadalje preko koordinativne vezi poveže azid s substratom. Vezava poteka preko N-atoma, ki je vezan direktno na ogljik. Sledi 1,3-bipolarna cikoadicija, pri čemer pride do tvorbe 1,4-disubstituiranega 1,2,3-triazolnega obroča. Končno elektrofilni donor ujame triazolil-bakrov intermediat in nastane končni produkt reakcije. Katalizator ob tem izstopi iz molekule (se regenerira) (114). Za normalen potek reakcije je zato dovolj že za konico spatule majhna količina CuI. Vlogo baze v našem primeru opravlja DIPEA. Oba vzorca (**20** in **22**) sta se v DMF dobro raztopila.

5.3.3 Odstranjevanje Ac estrov in tvorba končnega produkta (sinteza spojine **23**)

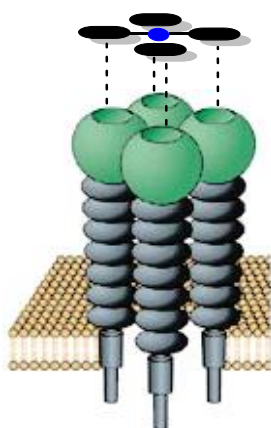
Sintezo **23** smo izvedli po Zemplénovem postopku. Izhodna snov **22** se je dobro raztopila v MeOH. Iz tega lahko sklepamo, da dendronsko jedro bistveno pripomore k izboljšanju hidrofilnosti molekule. Ne glede na to, da imamo pri **22** OH skupine zaščitene z Ac estri, je namreč spojina za razliko od **20** topna v MeOH. Reakcija je potekla popolnoma, vendar so bile izgube pri čiščenju. Produkt se je slabo raztapljal v MF in MeOH. To je glavni vzrok za slab η . Ločba na sistemu IsoleraOneTM je bila dobra (Priloga 2d), saj smo uspeli izolirati končno spojino v čisti obliki (potrjeno z NMR spektrom) (Priloga 3b). Ob tem je potrebna pazljivost, saj vzorec pri 254 nm slabo absorbira, zato je valovno dolžino detektorja za zbiranje frakcij potrebno nastaviti na 280 nm, kjer spojina absorbira bolje (vendar še vedno slabo). V okviru izolacije je pomembno, da uporabimo čim manj ionsko izmenjevalne smole in tako zmanjšamo možnost adsorpcije vzorca ob sočasnem intenzivnem spiranju produkta, ki se je na smolo že vezal. Ugotovili smo, da je vzorec v raztopini nestabilen (po določenem času vidimo na TLC dodatne lise z višjim R_f – razpadni produkti), zato je potrebna pazljivost tudi pri shranjevanju. Dendron **22** je topen le v MeOH (pa še to slabo) ter netopen v acetonu in DKM.

Z namenom izboljšanja vodotopnosti smo v strukturo dendrona vgradili tudi nov, bolj polaren distančnik (Slika 22). Ta hkrati omogoča večjo gibljivost ročic (monomernih enot), kar je pomembno zaradi prostorske razporeditve posameznih segmentov dendrona pri vezavi na tetramerni DC-SIGN (Slika 23). V primerjavi s prejšnjim distančnikom imajo etrske vezi prosto vrtljivost, amidne vezi pa so toge in tega ne dovolijo – imajo delni značaj dvojne vezi (to lahko vidimo iz zapisa resonančnih struktur), kar povzroči planarno

lego atomov (104). Celotna molekula je zaradi tega dosti bolj okorna in nezmožna prilagoditi se razdaljam med posameznimi CRD domenami, ko pride do vezave na receptor v realnem okolju. Podoben razmislek velja tudi za dendronsko jedro – glukoza je strukturno bolj fleksibilna kot planarni aromatski obroč.



Slika 22: Monomer, ročica in jedro.



Zagotavljanje ustrezne vodotopnosti je predpogoj za izvedbo *in vitro* biološkega vrednotenja sintetiziranih spojin in dobre rezultate testiranja. Če namreč spojina pri fizioloških pogojih ni topna, potem tudi ne more delovati kot antagonist na receptorju (1).

Slika 23: Vezava dendrona na tetramerni DC-SIGN receptorski kompleks – povečanje avidnosti vezave z multimerno prezentacijo monomernih enot. Prirejeno po (115).

5.4 BIOLOŠKO VREDNOTENJE

5.4.1 DC-SIGN

Sintetizirane spojine smo ovrednotili na *in vitro* biološki učinek s pomočjo vzpostavljenega testnega sistema na Fakulteti za Farmacijo Univerze v Ljubljani. Rezultati testiranja so zbrani v Tabeli 2.

Tabela 2: Rezultati testiranja.

Spojina	DC-SIGN IC ₅₀ [mM]
<u>6</u>	> 1
<u>11</u>	0.111 ± 0.006

Spojina **6** se je izkazala kot slab antagonist DC-SIGN. Razlog za to bi lahko bil odboj po vezavi karboksilata v hidrofobni žep. V molekuli **6** je namreč prisoten negativen naboj, ki povzroči odboj z oblakom π elektronov aromatskega sistema Phe313. Omeniti velja, da je pri tem zelo pomembna prostorska lega karboksilata v vezavnem mestu, ki je v našem primeru očitno neugodna. Prebitek elektronov (δ^-) na karboksilatu lahko povzroči odboj tudi z drugimi, sosednjimi AK ostanki. Kot kaže v tem delu vezavnega mesta ni možnosti tvorbe H-vezi, ki bi povečale afiniteto vezave. To potrjuje tudi dejstvo, da je spojina **11** imela veliko boljši rezultat. Me ester je glede na **6** bolj nepolaren in v žepku, če že ne tvori dodatnih interakcij, vsaj ne povzroči odboja. Ne glede na to je **11** trenutno med močnejšimi monovalentnimi zaviralci DC-SIGN, saj najboljši rezultati dosegajo vrednosti IC₅₀ v spodnjem mikromolarnem območju (13, 79). Z ozirom na to bi bilo smiselno testirati tudi spojino **7**. Ta v stranski verigi vsebuje večje hidrofobno območje, ki bi lahko prispevalo k afiniteti vezave. Predlagam še testiranje **19**, kjer bi glede na prejšnja dognanja (82) pričakovali podobno dober rezultat. Spojine **2**, **3** in **23** še niso bile testirane.

5.4.2 FimH

Spojino **6** smo ovrednotili tudi na *in vitro* testnem sistemu za FimH na Institute of Molecular Pharmacy, University of Basel. Rezultat IC₅₀ = 232 nM jo uvršča med močnejše zaviralce FimH. Rezultat je del objavljenega članka (89). Čeprav je spojina bila razvita kot antagonist DC-SIGN se je izkazalo, da se veže z veliko večjo afiniteto na FimH. To je posledica bolj ozko definiranega vezavnega mesta za D-manozo in boljše definiranih lipofilnih žepkov na FimH receptorju, kamor se **6** lepo prilega. Tri velikostne razrede močnejša interakcija navaja na dejstvo, da je FimH bolj prikladen kot tarča za razvoj novih zdravilnih učinkovin – majhnih molekul (glikomimetikov). **6** se namreč v vezavno mesto zasidra s takšno afiniteto, da smo blizu že skoraj terapevtski uporabi. To je dokaz, kako so si antagonisti FimH in DC-SIGN strukturno sorodni, a vendar hkrati z majhnimi potezami toliko različni, da prihaja do velikih razlik, ko govorimo o potencialnih kandidatih za razvoj novega zdravila.

6. SKLEP IN ZAKLJUČEK

Namen dela diplomske naloge je bil v celoti dosežen. Uspešno smo sintetizirali monomer in dendron, za kar je bila potrebna temeljita prilagoditev sinteznega postopka. Izboljšali smo topnost monomera, saj je spojina **6** bila dobro topna v MeOH. Rezultati biološkega vrednotenja so razkrili, da je spojina **11** trenutno med močnejšimi zaviralci DC-SIGN, kar se sklada s pričakovanji. Poleg tega je **6** izvrsten antagonist na receptorju FimH, kar odpira nove raziskovalne možnosti in uporabno vrednost sintetiziranih spojin. Glede na prejšnja spoznanja v zvezi z aktivnostjo antagonistov DC-SIGN (82) se lahko nadejamo dobrih rezultatov testiranja tudi za spojini **19** in **23**.

Primerjava sinteznih postopkov preko Bn in Me estra je razkrila, da je za sintezo monomera bolj ugoden slednji. Reakcije po tej poti namreč potekajo z višjim η , dobljeni produkti pa so bolj čisti (razvidno iz NMR spektrov). Pri rokovanju z glikozidnimi spojinami se je potrebno zavedati, da je glikozidna vez ob prisotnosti vode termolabilna, kar moramo upoštevati tekom postopka izolacije in čiščenja. Kljub temu smo ugotovili, da je za sintezo dendrona bistvena kratkotrajna močno povišana T (90 °C) ob uporabi mikrovalov. Ne glede na to v okviru izolacije ni smiselno segrevati vzorca (z namenom izboljšanja topnosti v MF), saj lahko dendron razpade. Namesto tega se je kot praktična izkazala uporaba ultrazvočne kadičke. Ta sicer ne izboljša topnosti, pospeši pa hitrost raztapljanja, ki je tudi pomemben omejujoč faktor pri čiščenju, saj bistveno podaljša celoten postopek.

Uspešno razvit postopek sinteze dendrona bo omogočil pripravo novih dendronskih antagonistov. Zagotavljanje njihove topnosti in ustrezno čiščenje pa predstavlja nov izziv za bodoče raziskovanje na tem področju. Ugotovili smo, da dendronsko jedro bistveno pripomore k izboljšanju vodotopnosti spojin. Na nivoju distančnika bi bilo zavoľjo tega smiselno vgraditi še dodatno ionizirajočo funkcionalno skupino (npr. bazični center, ki bi pri fizioloških pogojih bil ioniziran). Topnost dendronske spojine pri fiziološkem pH in ustrezno hidrolipofilno ravnotežje je ključen farmakokinetični parameter, ki bi zagotovil tudi *in vivo* biološki učinek in končno terapevtsko uporabnost. Zdi se, da je ustrezno visoko afiniteto vezave v nanomolarnem območju možno doseči le na račun multimerne

predstavitve monomernih ligandov, saj monomerni antagonisti zaenkrat nimajo dovolj visoke afinitete do vezavnega mesta DC-SIGN. Zavedati se je potrebno tudi, da so tovrstne spojine namenjene topikalni aplikaciji na vaginalno sluznico pred spolnim odnosom, kar zmanjša potrebo po visokih odmerkih peroralno aplicirane učinkovine. Pri lokalni uporabi namreč lažje dosežemo visoko koncentracijo učinkovine na mestu delovanja. Z ozirom na to je IC_{50} lahko višja, kot bi jo sicer zahtevala sistemska aplikacija (13). Učinkovine, ki bi inhibirale vezavo virusa na DC-SIGN, bi tako sočasno preprečevale lokalizirano okužbo in raztros virusa HIV po telesu gostitelja.

DC-SIGN poleg številnih virusov veže tudi bakterije, glive in parazite. Njegova vloga pri procesu okužbe z mikroorganizmi je široka in razviti antagonisti bi bili uporabni širše kot le v preventivi okužbe s HIV. Povečanje avidnosti vezave do receptorja in s tem doseganje želenega inhibitornega učinka vezave patogenov je ključnega pomena za zagotavljanje ustrezne učinkovitosti novih protimikrobnih zdravil. Razvoj antiinfektivnih zdravil je nujen, saj omogoča obstoj človeške vrste, ki se za preživetje vsakodnevno spopada z mikroorganizmi. Visok porast rezistence na protimikrobno terapijo, kateri smo priča v zadnjem času (116) je povečal potrebo po razvoju novih, učinkovitih protimikrobnih zdravil. Antiadhezivna terapija in antagonisti na FimH receptorju so nov prispevek na tem področju, koncept povečanja afinitete vezave do DC-SIGN pa nas uči, da je narava še vedno naša največja učiteljica.

7. LITERATURA

1. Lemke TL, Williams DA, Roche VF, Zito SW. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 7th Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 2013: 15–18, 48, 49, 61–104, 1074.
2. WHO. Fact sheet N°310: The top 10 causes of death. 2014. Dostopano 28.7.2014 na spletnem naslovu: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
3. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Floer RJ. Rang and Dale's Pharmacology. 6th Ed. Churchill Livingstone Elsevier. Philadelphia. 2007: 8,9, 655–660, 682–689.
4. WHO. Fact sheet N°194: Antimicrobial resistance. 2014. Dostopano 29.7.2014 na spletnem naslovu: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>.
5. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 6th Ed. W H Freeman and Company. New York. 2007: 320–323.
6. Ernst B, Magnani JL. From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8(8): 661–77.
7. Audfray A, Varrot A, Imberty A. Bacteria love our sugars: Interaction between soluble lectins and human fucosylated glycans, structures, thermodynamics and design of competing glycocompounds. *Comptes Rendus Chim.* 2013; 16(5): 482–90.
8. Vasta GR, Ahmed H. Animal lectins, A functional view. Taylor & Francis Group. Boca Raton. 2009: 14.
9. Finkelstein J. Insight – Glycochemistry & Glycobiology. *Nature.* 2007; 446 (7139), 999–1051.
10. Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 2005; 272(24): 6179–217.
11. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YT, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Ann Rev Immunol.* 2000; 18: 767–811.
12. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Ann Rev Immunol.* 2002; 20: 197–216 .
13. Anderluh M, Jug G, Svajger U, Obermajer N. DC-SIGN antagonists, a potential new class of anti-infectives. *Curr Med Chem.* 2012; 19(7): 992–1007.
14. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392 (6673): 245–52.

15. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*. 2000; 100(5): 575–85.
16. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 2000; 100(5): 587–97.
17. Garcia-Vallejo JJ, van Liempt E, da Costa Martins P, Beckers C, van het Hof B, Gringhuis SI, et al. DC-SIGN mediates adhesion and rolling of dendritic cells on primary human umbilical vein endothelial cells through LewisY antigen expressed on ICAM-2. *Mol Immunol*. 2008; 45(8): 2359–69.
18. Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Engering A, 't Hart BA, van Kooyk Y. Self- and Nonself-Recognition by C-Type Lectins on Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22: 33–54.
19. Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, Nussenzweig M, Steinman RM. The Dendritic Cell Receptor for Endocytosis, Dec-205, Can Recycle and Enhance Antigen Presentation via Major Histocompatibility Complex Class II-Positive Lysosomal Compartments. *J Cell Biol*. 2000; 151(3): 673–84.
20. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 2007; 449: 419–426.
21. Svajger 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*. 2010; 22(10): 1397–405.
22. van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3(9): 697–709.
23. Sharon N. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1760(4): 527–37.
24. Schembri MA, Kjaergaard K, Sokurenko EV, Klemm P. Molecular characterization of the *Escherichia coli* FimH adhesin. *J Infect Dis*. 2001; 183 Suppl 1: S28–31.
25. Krachler AM, Ham H, Orth K. Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by gram-negative pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 11614-9.

26. Wu XR, Sun TT, Medina JJ. In vitro binding of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to uroplakins Ia and Ib: relation to urinary tract infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(18): 9630–35.
27. Klemm P, Schembri MA. Bacterial adhesins: function and structure. *Int J Med Microbiol*. Urban & Fischer Verlag. 2000; 290(1): 27–35.
28. Krachler AM, Orth K. Targeting the bacteria-host interface: strategies in anti-adhesion therapy. *Virulence*. 2013; 4(4): 284–94.
29. Kline KA, Fälker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe*. 2009; 5(6): 580–92.
30. Hayes CS, Aoki SK, Low DA. Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annu Rev Genet*. 2010; 44: 71–90.
31. Baorto DM, Gao Z, Malaviya R, Dustin ML, van der Merwe A, Lublin DM, Abraham SN. Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature*. 1997; 389(6651): 636–9.
32. Malaviya R, Abraham SN. Mast cell modulation of immune responses to bacteria. *Immunol Rev*. 2001; 179: 16–24.
33. Klemm P. Two regulatory fim genes, fimB and fimE, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *EMBO J*. 1986; 5(6): 1389–93.
34. Lane MC, Simms AN, Mobley HLT. Complex interplay between type 1 fimbrial expression and flagellum-mediated motility of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2007; 189(15): 5523–33.
35. Sternlieb P. Cranberry juice in renal disease. *N Engl J Med*. 1963; 268: 57.
36. Moen DV. Observations on the effectiveness of cranberry juice in urinary infections. *Wis Med J*. 1962; 61: 282–3.
37. Papas PN, Bruschi CA, Cresia GC. Cranberry juice in the treatment of urinary tract infections. *Southwest Med*. 1966; 47: 17–20.
38. Ofek I, Hasty DL, Sharon N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003; 38(3): 181–91.
39. Blondeau JM. What have we learned about antimicrobial use and the risks for *Clostridium difficile* - associated diarrhoea? *J Antimicrob Chemother*. 2009; 63(2): 238–42.
40. Holzheimer RG. Antibiotic induced endotoxin release and clinical sepsis: a review. *J Chemother*. 2001; 13 Spec No 1(1): 159–72.

41. Ghosh S, Chakraborty K, Nagaraja T, Basak S, Koley H, Dutta S, et al. An adhesion protein of *Salmonella enterica* serovar Typhi is required for pathogenesis and potential target for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(8): 3348–53.
42. Klimstra WB, Nangle EM, Smith MS, Yurochko AD, Ryman KD. DC-SIGN and L-SIGN can act as attachment receptors for alphaviruses and distinguish between mosquito cell- and mammalian cell-derived viruses. *J Virol*. 2003; 77(22): 12022–32.
43. Lozach PY, Lortat-Jacob H, de Lacroix de Lavalette A, Staropoli I, Fong S, Amara A, et al. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem*. 2003; 278(22): 20358–66.
44. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*. 2003; 197(7): 823–9.
45. Lin G, Simmons G, Pohlmann S, Baribaud F, Ni H, Leslie GJ, et al. Differential N-linked glycosylation of human immunodeficiency virus and Ebola virus envelope glycoproteins modulates interactions with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol*. 2003; 77(2): 1337–46.
46. Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk B, van Kooyk Y. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med*. 2003; 197(1): 7–17.
47. Gaudart N, Ekpo P, Pattanapanyasat K, van Kooyk Y, Engering A. *FEMS Immunol Med Microbiol*. *Leptospira interrogans* is recognized through DC-SIGN and induces maturation and cytokine production by human dendritic cells. 2008; 53(3): 359–67.
48. Cambi A, Gijzen K, de Vries JM, Torensma R, Joosten B, Adema GJ, et al. The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2003; 33(2): 532–8.
49. Appelmelk BJ, van Die I, van Vliet SJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol*. 2003; 170(4): 1635–9.
50. Colmenares M, Constant SL, Kima PE, McMahon-Pratt D. *Leishmania pifanoi* pathogenesis: selective lack of a local cutaneous response in the absence of circulating antibody. *Infect Immun*. 2002; 70(12): 6597–605.

51. Gilbert PB, McKeague IW, Eisen G, Mullins C, Guéye-NDiaye A, Mboup S, Kanki PJ. Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. *Stat Med.* 2003; 22(4): 573–93.
52. Cambi A, Beeren I, Joosten B, Fransen JA, Figdor CG. The C-type lectin DC-SIGN internalizes soluble antigens and HIV-1 virions via a clathrin-dependent mechanism. *Eur J Immunol.* 2009; 39(7): 1923–8.
53. Bernhard OK, Lai J, Wilkinson J, Sheil MM, Cunningham AL. Proteomic analysis of DC-SIGN on dendritic cells detects tetramers required for ligand binding but no association with CD4. *J Biol Chem.* 2004; 279(50): 51828–35.
54. Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, Hendrickson WA, Littman DR. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity.* 2002; 16(1): 135–44.
55. Trumpheller C, Park CG, Finke J, Steinman RM, Granelli-Piperno A. Cell type-dependent retention and transmission of HIV-1 by DC-SIGN. *Int Immunol.* 2003; 15(2): 289–98.
56. Sodhi A, Montaner S, Gutkind JS. Viral hijacking of G-protein-coupled-receptor signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5(12): 998–1012.
57. van Kooyk, Appelmelk YB, Geijtenbeek TB. A fatal attraction: *Mycobacterium tuberculosis* and HIV-1 target DC-SIGN to escape immune surveillance. *Trends Mol Med.* 2003; 9(4): 153–9.
58. Hodges A, Sharrocks K, Edelmann M, Baban D, Moris A, Schwartz O, et al. Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication. *Nat Immunol.* 2007; 8(6): 569–77.
59. Mak RH, Kuo HJ. Pathogenesis of urinary tract infection: an update. *Curr Opin Pediatr.* 2006; 18(2): 148–52.
60. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol.* 2008; 85(1): 11–9.
61. Thumbikat P, Berry RE, Zhou G, Billips BK, Yaggie RE, Zaichuk T, Sun TT, Schaeffer AJ, Klumpp DJ. Bacteria-induced uroplakin signaling mediates bladder response to infection. *PLoS Pathog.* 2009; 5(5): e1000415.
62. Eto DS, Jones TA, Sundsbak JL, Mulvey MA. Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* 2007; 3(7): e100.

63. Dhakal BK, Mulvey MA. Uropathogenic *Escherichia coli* invades host cells via an HDAC6 - modulated microtubule-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2009; 284(1): 446–54.
64. Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science.* 2003; 301(5629): 105–7.
65. Justice SS, Hung C, Theriot JA, Fletcher DA, Anderson GG, Footer MJ, Hultgren SJ. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(5): 1333–8.
66. Wiles TJ, Dhakal BK, Eto DS, Mulvey MA. Inactivation of host Akt/protein kinase B signaling by bacterial pore-forming toxins. *Mol Biol Cell.* 2008; 19(4): 1427–38.
67. Eto DS, Sundsbak JL, Mulvey MA. Actin-gated intracellular growth and resurgence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 2006; 8(4): 704–17.
68. Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun.* 2001; 69(7): 4572–9.
69. Mysorekar IU, Hultgren SJ. Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(38): 14170–5.
70. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(1): 26–38.
71. Feinberg H, Mitchell DA, Drickamer K, Weis WI. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science.* 2001; 294(5549): 2163–6.
72. Guo Y, Feinberg H, Conroy E, Mitchell DA, Alvarez R, Blixt O, et al. Structural basis for distinct ligand- binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat Struct Mol Biol.* 2004; 11(7): 591–8.
73. Feinberg H, Guo Y, Mitchell DA, Drickamer K, Weis WI. Extended neck regions stabilize tetramers of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Biol Chem.* 2005; 280(2): 1327–35.
74. Anderluh M. DC-SIGN Antagonists – A Paradigm of C-Type Lectin Binding Inhibition. Poglavlje 7, str. 140 – 143 v knjigi: *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology.* Uredil Chang CF. InTech. Maastricht. 2012.

75. Cambi A, de Lange F, van Maarseveen NM, Nijhuis M, Joosten B, van Dijk EM, et al. Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *J Cell Biol.* 2004; 164(1): 145–55.
76. Mitchell DA, Fadden AJ, Drickamer K. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organisation and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem.* 2001; 276(31): 28939–45.
77. Tabarani G, Thepaut M, Stroebel D, Ebel C, Vives C, Vachette P, Durand D, Fieschi F. DC-SIGN Neck Domain Is a pH-sensor Controlling Oligomerisation SAXS and Hydrodynamic Studies of Extracellular Domain. *J Biol Chem.* 2009; 284(32): 21229–40.
78. Menon S, Rosenberg K, Graham SA, Ward EM, Taylor ME, Drickamer K, Leckband DE. Binding-site geometry and flexibility in DC-SIGN demonstrated with surface force measurements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(28): 11524–29.
79. Tomašić T, Hajšek D, Švajger U, Luzar J, Obermajer N, Petit-Haertlein I, et al. Monovalent mannose-based DC-SIGN antagonists: targeting the hydrophobic groove of the receptor. *Eur J Med Chem.* 2014; 75: 308–26.
80. Feinberg H, Mitchell DA, Drickamer K, Weis WI. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science.* 2001; 294(5549): 2163–6.
81. Guo Y, Feinberg H, Conroy E, Mitchell DA, Alvarez R, Blixt O. Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat Struct Mol Biol.* 2004; 11(7): 591–8.
82. Vrtačnik K. Sinteza monovalentnih in tetravalentnih glicerolomanozidov kot potencialnih antagonistov receptorja DC-SIGN. Diplomsko delo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo. 2014.
83. Obermajer N, Sattin S, Colombo C, Bruno M, Svajger U, Anderluh M, et al. Design, synthesis and activity evaluation of mannose-based DC-SIGN antagonists. *Mol Divers.* 2011; 15(2): 347–60.
84. Rojo J, Delgado R. Glycodendritic structures: promising new antiviral drugs. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54(3): 579–81.
85. Sattin S, Daggetti A, Thepaut M, Berzi A, Sanchez-Navarro M, Tabarani G. Inhibition of DC-SIGN-mediated HIV infection by a linear trimannoside mimic in a tetravalent presentation. *ACS Chem Biol.* 2010; 5(3): 301–12.

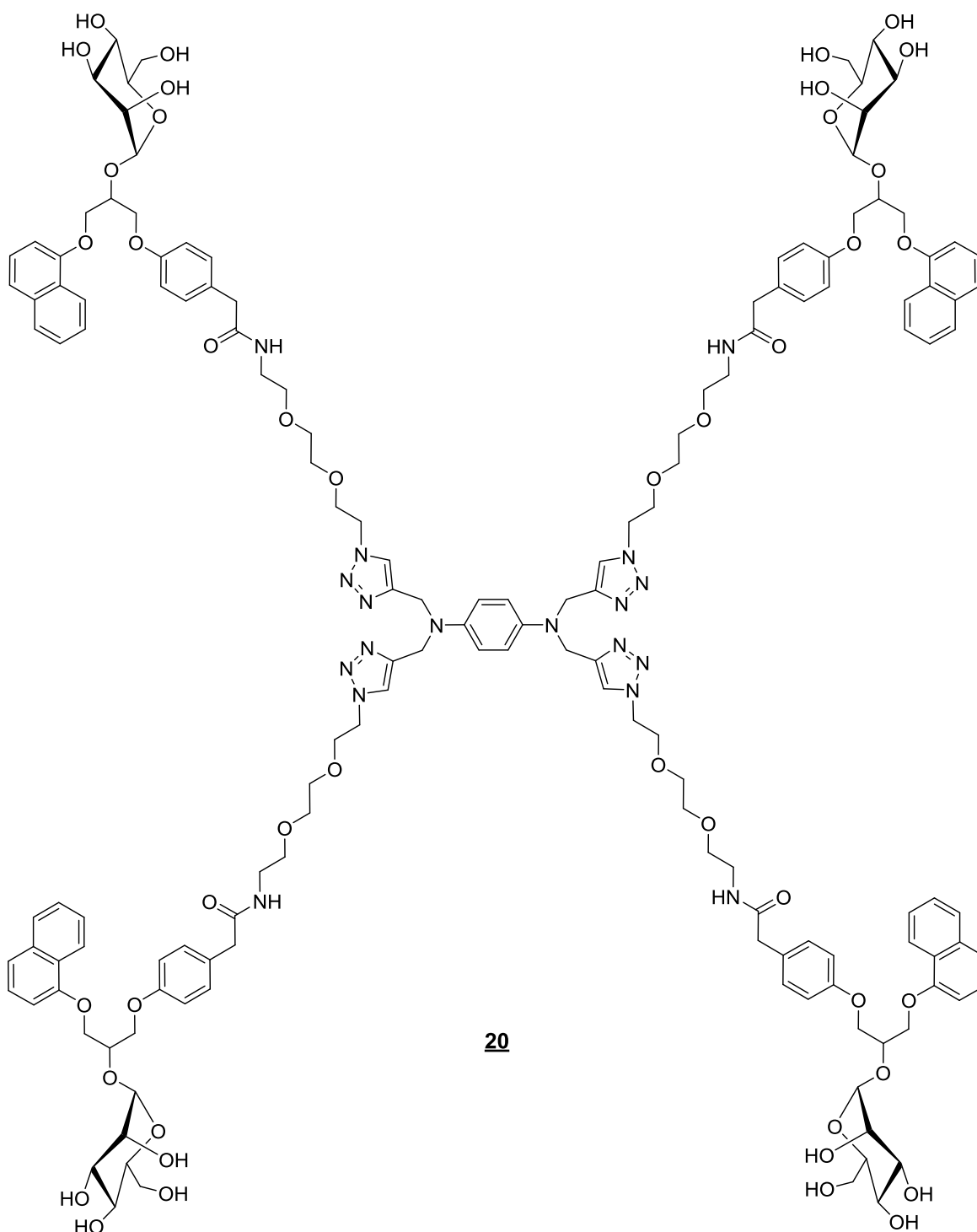
86. Boas U, Christensen JB, Heegaard PMH. Dendrimers in Medicine and Biotechnology: New Molecular Tools. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 2006: 1–4.
87. Sigma-Aldrich Co. Dendrons in nanomaterials. 2014. Dostopano 7.8.2014 na spletnem naslovu: <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/dendrimers/dendrons.html>.
88. Borrok MJ, Kiessling LL. Non-carbohydrate inhibitors of the lectin DC-SIGN. *J Am Chem Soc.* 2007; 129(42): 12780–5.
89. Tomašić T, Rabbani S, Gobec M, Raščan IM, Podlipnik Č, Ernst B, Anderluh M. Branched α -D-mannopyranosides: a new class of potent FimH antagonists. *Med Chem Comm.* 2014; 5(8): 1247–53.
90. Lederman MM, Offord RE, Hartley O. Microbicides and other topical strategies to prevent vaginal transmission of HIV. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(5): 371–82.
91. Pool R, Hart G, Green G, Harrison S, Nyanzi S, Whitworth J. Men's attitudes to condoms and female controlled means of protection against HIV and STDs in southwestern Uganda. *Cult Health Sex.* 2000; 2(2): 197–211.
92. WHO. Microbicides. 2014. Dostopano 7.8.2014 na spletnem naslovu: <http://www.who.int/hiv/topics/microbicides/microbicides/en/>.
93. Veazey RS, Springer MS, Marx PA, Dufour J, Klasse PJ, Moore JP. Protection of macaques from vaginal SHIV challenge by an orally delivered CCR5 inhibitor. *Nature Med.* 2005; 11(12): 1293–4.
94. Hajšek D. Testni sistem za določanje afinitete antagonistov receptorja DC-SIGN *in vitro*. Diplomsko delo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo. 2014.
95. Rabbani S, Jiang X, Schwardt O, Ernst B. Expression of the carbohydrate recognition domain of FimH and development of a competitive binding assay. *Anal Biochem.* 2010; 407(2): 188–95.
96. Iso Y, Shindo H, Hamana H. Efficient Synthesis of Resin-Bound α -TMSdiazoketones and Their Use in Solid-Phase Organic Synthesis. *Tetrahedron.* 2000; 56(30): 5353–61.
97. Bozzini T, Botta G, Delfino M, Onofri S, Saladino R, Amatore D, et al. Tyrosinase and Layer-by-Layer supported tyrosinases in the synthesis of lipophilic catechols with antiinfluenza activity. *Bioorg Med Chem.* 2013; 21(24): 7699–708.
98. Song HO, Lee B, Bhusal RP, Park B, Yu K, Chong CK, et al. Development of a novel fluorophore for real-time biomonitoring system. *PLoS One.* 2012; 7(11): e48459.

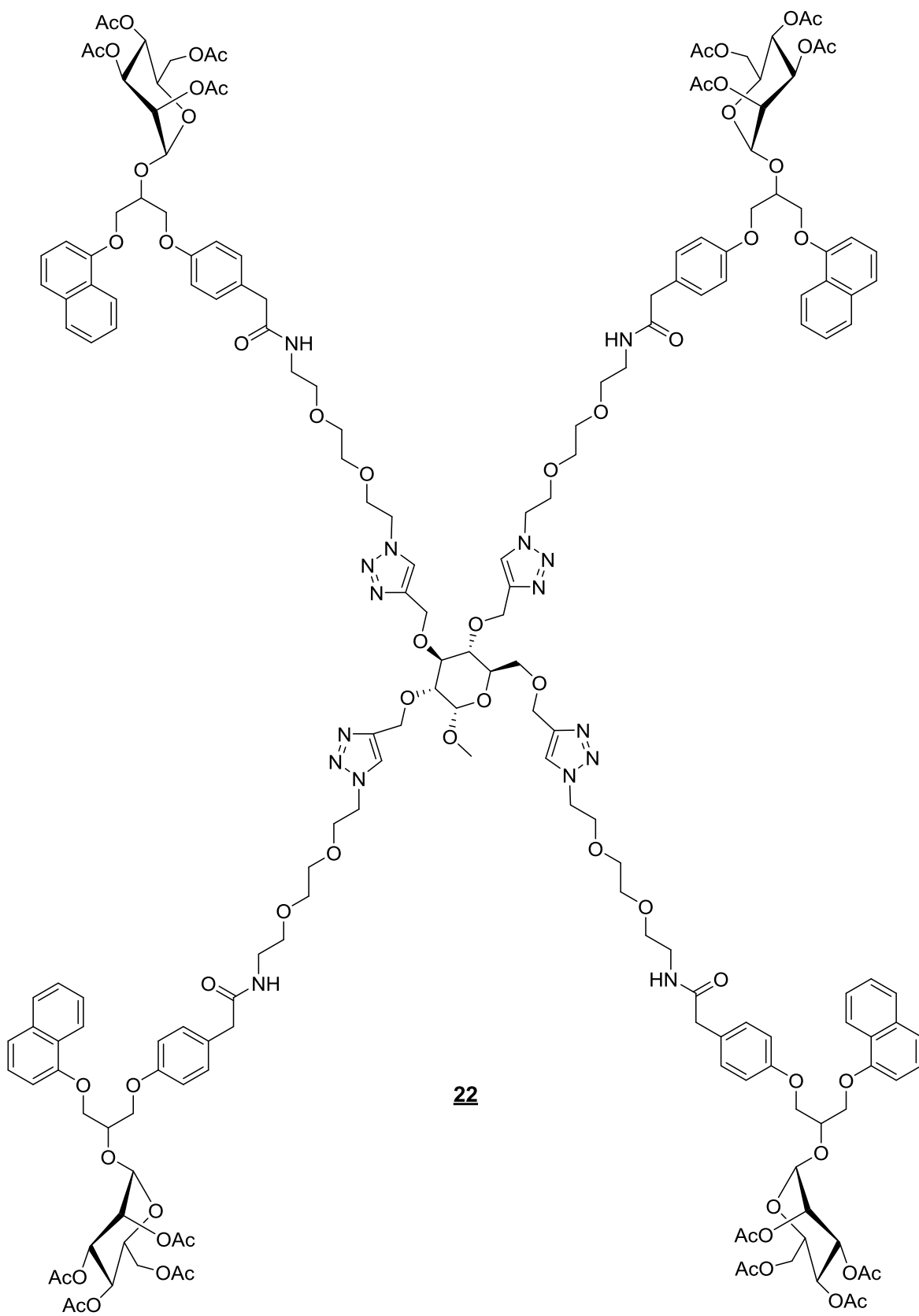
99. Uppal T, Bhupathiraju NVSDK, Vicente MGH. Synthesis and cellular properties of Near-IR BODIPY–PEG and carbohydrate conjugates. *Tetrahedron*. 2013; 69(23): 4687–93.
100. Moreau J, Marchand-Brynaert J. Modular Synthesis of Bifunctional Linkers for Materials Science. *European J Org Chem*. 2011; 2011(9): 1641–4.
101. Dakanali M, Do TH, Horn A, Chongchivivat A, Jarusreni T, Lichlyter D, et al. Self-calibrating viscosity probes: design and subcellular localization. *Bioorg Med Chem*. Elsevier Ltd. 2012; 20(14): 4443–50.
102. Howarth NM, Ricci (née Goujon) J. Synthesis of N-propynyl analogues of peptide nucleic acid (PNA) monomers and their use in the click reaction to prepare N-functionalized PNAs. *Tetrahedron*. 2011; 67(49): 9588–94.
103. Cecioni S, Praly JP, Matthews SE, Wimmerová M, Imberty A, Vidal S. Rational design and synthesis of optimized glycoclusters for multivalent lectin-carbohydrate interactions: influence of the linker arm. *Chemistry*. 2012; 18(20): 6250–63.
104. Tišler M. *Organska kemija*. Tretja izdaja. DZS. Ljubljana. 1991: 121–140, 383.
105. Roy CD, Brown HC. A highly regio- and chemoselective synthesis of vicinal bromohydrins by ring opening of terminal epoxides with dibromoborane–dimethyl sulfide. *J Organomet Chem*. 2007; 692(7): 1608–13.
106. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. *Introduction to spectroscopy*. 4th Ed. Brooks / Coole, Cengage Learning. Belmont. 2009: 257–268.
107. Agoston K, Dobó A, Rákó J, Kerékgyártó J, Szurmai Z. Anomalous Zemplén deacylation reactions of alpha- and beta-D-mannopyranoside derivatives. *Carbohydr Res*. 2001; 330(2): 183–90.
108. Robinson CH, Milewich L, Hofer P. The oxidation of steroidal amines to nitro steroides. *J Org Chem*. 1966; 31 (2): 524–528.
109. Al-Warhi TI, Al-Hazimi HMA, El-Faham A. Recent development in peptide coupling reagents. *J Saudi Chem Soc*. 2012; 16(2): 97–116.
110. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2001; 40(11): 2004–21.
111. Sharpless WD, Wu P, Hansen TV, Lindberg JG. Just Click It: Undergraduate Procedures for the Copper (I)-Catalyzed Formation of 1, 2, 3-Triazoles from Azides and Terminal Acetylenes W. *J Chem Ed*. 2005; 82(12): 1833–6.

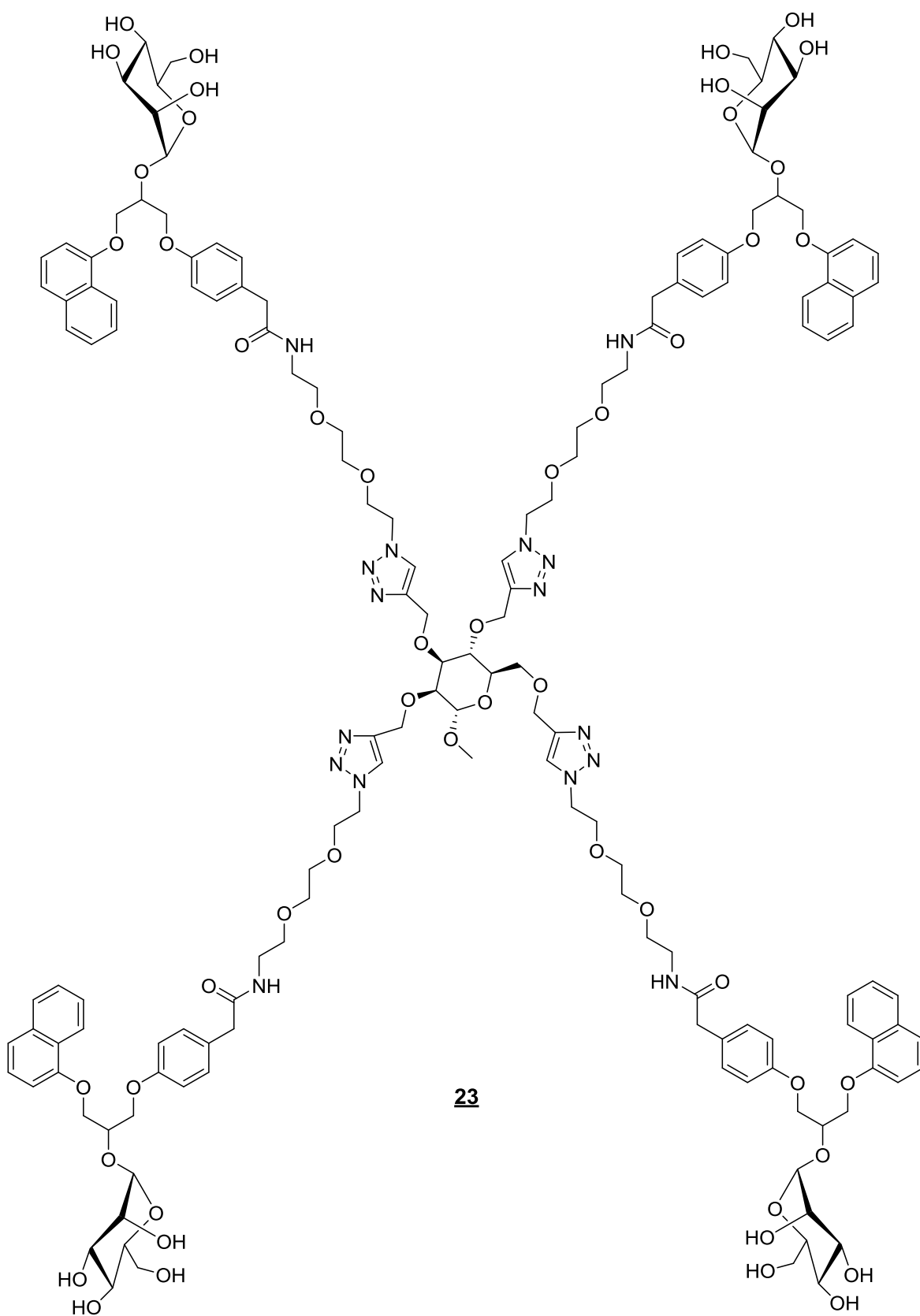
112. Rostovtsev VV, Green LC, Fokin VV, Sharpless KB. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2002; 41(14): 2596–9.
113. Huisgen R. Introduction, survey and mechanism. Poglavlje 1, str. 1–176 v knjigi: *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry (Vol 1)*. Uredil Padwa A. Wiley-Interscience. New York. 1984; 1–176.
114. Himo F, Lovell T, Hilgraf R, Rostovtsev VV, Noodleman L, Sharpless KB, Fokin VV. Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *J Am Chem Soc.* 2005; 127(1): 210–6.
115. Wu L, KewalRamani VN. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(11): 859–68.
116. Casadevall A. The case for pathogen specific-therapy. *Expert Opin Pharmacother.* 2009; 10(11): 1699–703.

8. PRILOGE

Priloga 1: Strukturne formule dendronskih antagonistov







Priloga 2: Čiščenje spojin s sistemom IsoleraOne™

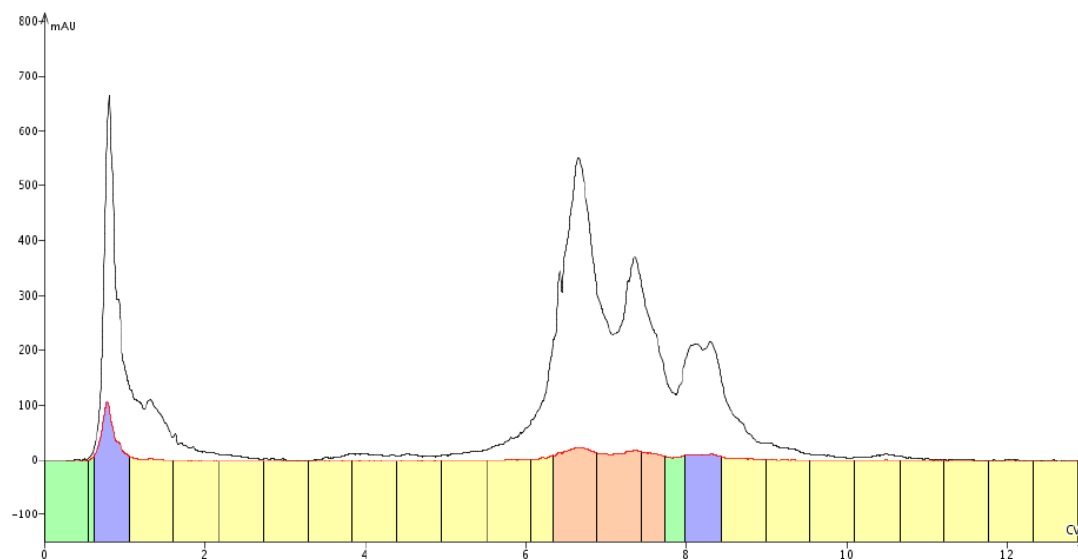
a) Spojina **6** prva reakcija



Isolera Archive Report

User Marko Anderluh
Sample Name aal-12
Date 2013 Aug 26 at 08:22
Method
Project
Comment
Cartridge SNAP KP-C18-HS **Detection Mode** UV1
Flowrate 10 ml/min **UV1 (Collection)** 254 nm
Solvent A 0.1% TFA v H₂O **UV2 (Monitor)** 230 nm
Solvent B MeOH **Collect All** On
Start Threshold 10 mAU

Rack Type 16x150 mm
Max Fraction 10 ml
Volume
Dispense Order Z
Initial Waste 0 ml



Gradient

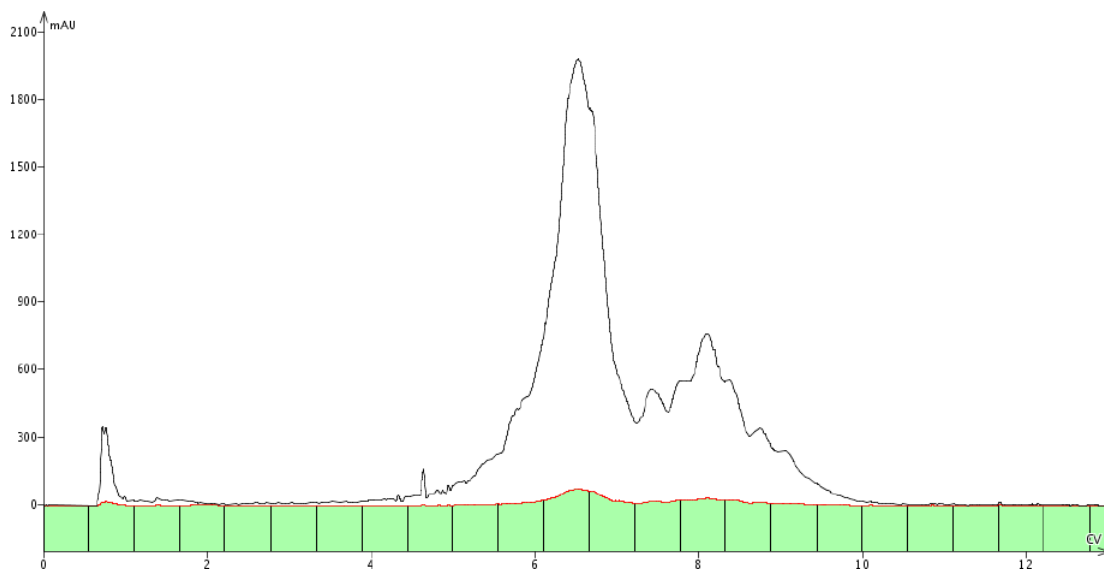
	Solvents Mix		Length (CV)	
Equil.	A/B	40%	1.0	flowrate 10 ml/min
1	A/B	40%	1.0	
2	A/B	40% - 100%	8.0	
3	A/B	100%	4.0	

b) Spojina 6 druga reakcija



Isolera Archive Report

User Marko Anderluh
Sample Name aal-11
Date 2013 Aug 27 at 10:24
Method
Project
Comment
Cartridge SNAP KP-C18-HS **Detection Mode** UV1
Flowrate 10 ml/min **UV1 (Collection)** 254 nm
Solvent A 0.1%TFA v H2O **UV2 (Monitor)** 230 nm
Solvent B MeOH **Collect All** On
Rack Type 16x150 mm
Max Fraction 10 ml
Volume
Dispense Order Z
Initial Waste 0 ml



Gradient

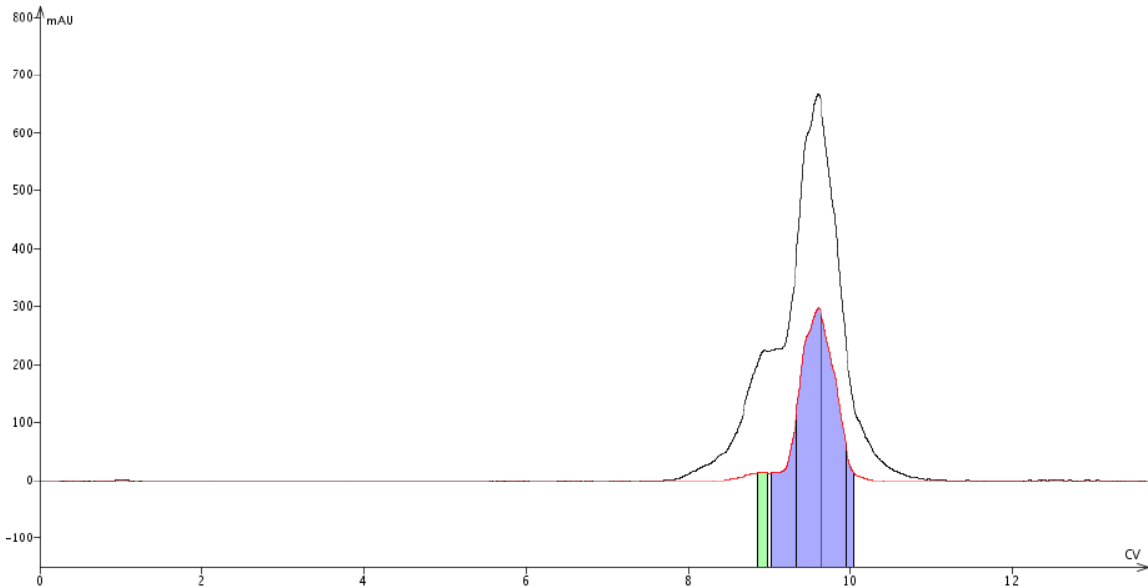
	Solvents Mix		Length (CV)	
Equil.	A/B	50%	2.0	flowrate 10 ml/min
1	A/B	50%	1.0	
2	A/B	50% - 100%	8.0	
3	A/B	100%	4.0	

c) Spojina 20



Isolera Archive Report

User Marko Anderluh
Sample Name AAL-26
Date 2014 Mar 27 at 14:12
Method
Project
Comment
Cartridge SNAP 25g **Detection Mode** UV1
Flowrate 25 ml/min **UV1 (Collection)** 254 nm
Solvent A 0.1%TFA v H2O **UV2 (Monitor)** 280 nm
Solvent B MeOH **Start Threshold** 15 mAU
Rack Type 16x150 mm
Max Fraction 10 ml
Volume
Dispense Order Z
Initial Waste 0 ml



Gradient

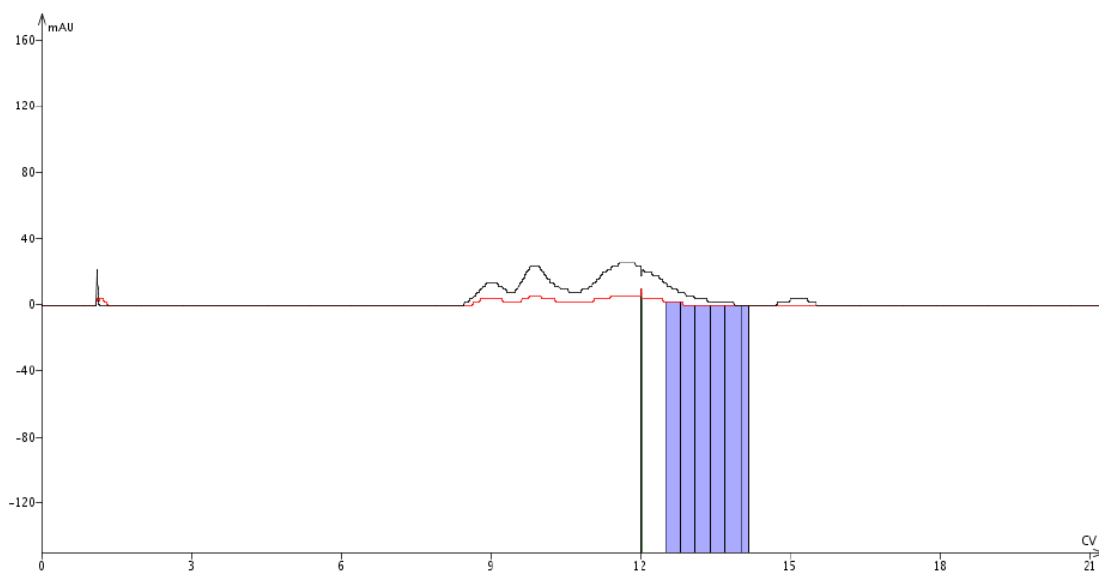
	Solvents Mix		Length (CV)	
Equil.	A/B	15%	2.0	flowrate 25 ml/min
1	A/B	15%	1.0	
2	A/B	15% - 45%	3.6	
3	A/B	45% - 100%	5.0	Edit on the fly
4	A/B	100%	2.5	
5	A/B	100%	1.0	Edit on the fly
6	A/B	100%	0.4	Edit on the fly

d) Spojina 23



Isolera Archive Report

User Marko Anderluh
Sample Name aal-31
Date 2014 Apr 16 at 08:31
Method
Project
Comment
Cartridge SNAP 25g **Detection Mode** UV1
Flowrate 25 ml/min **UV1 (Collection)** 254 nm
Solvent A 0.1%TFA v H2O **UV2 (Monitor)** 280 nm
Solvent B MeOH **Start Threshold** 10 mAU
Rack Type 16x150 mm
Max Fraction 10 ml
Volume
Dispense Order Z
Initial Waste 0 ml

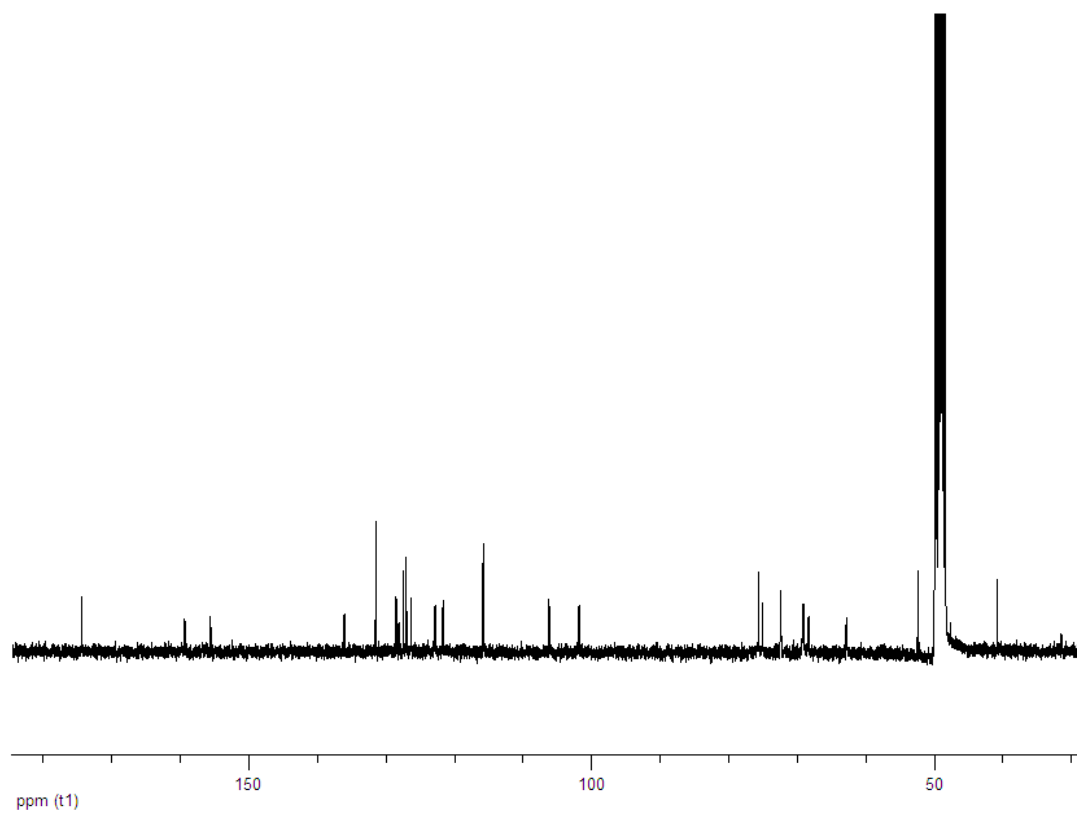
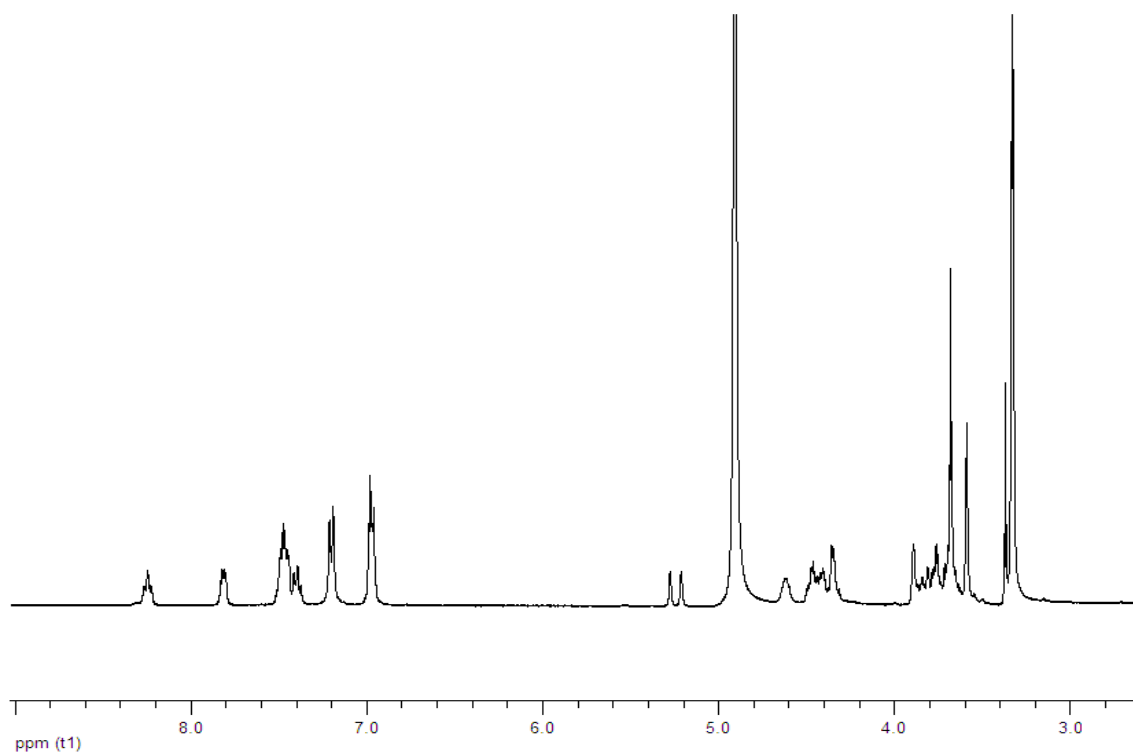


Gradient

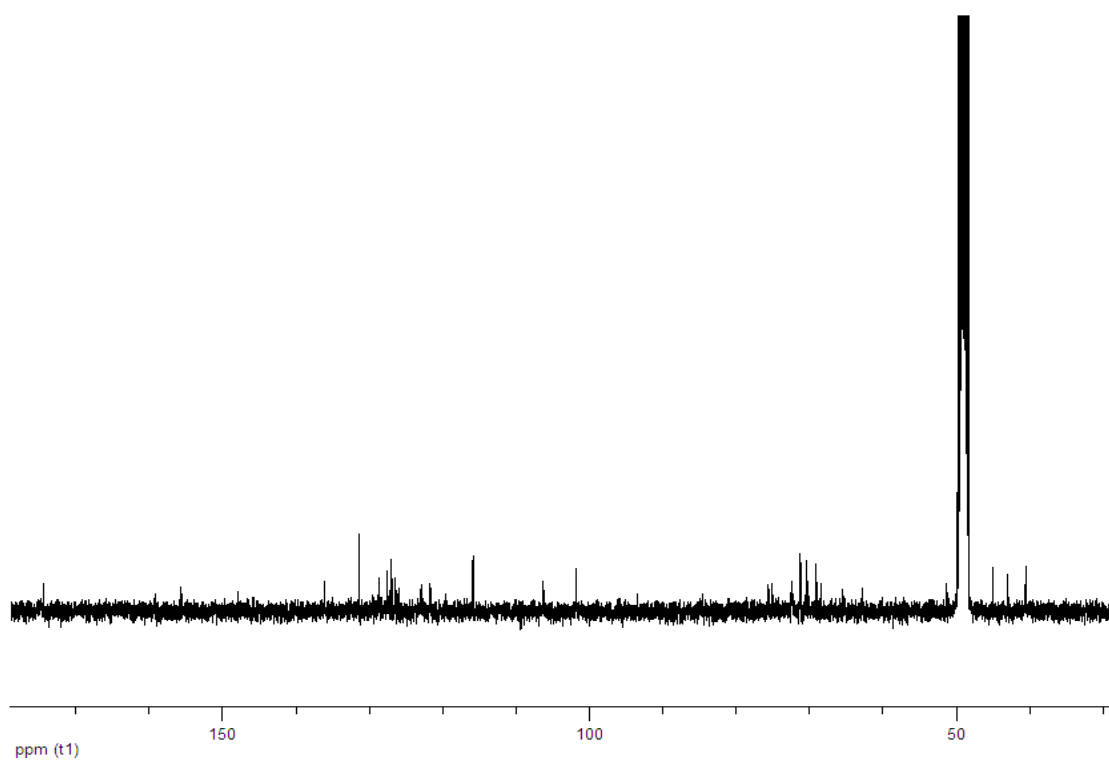
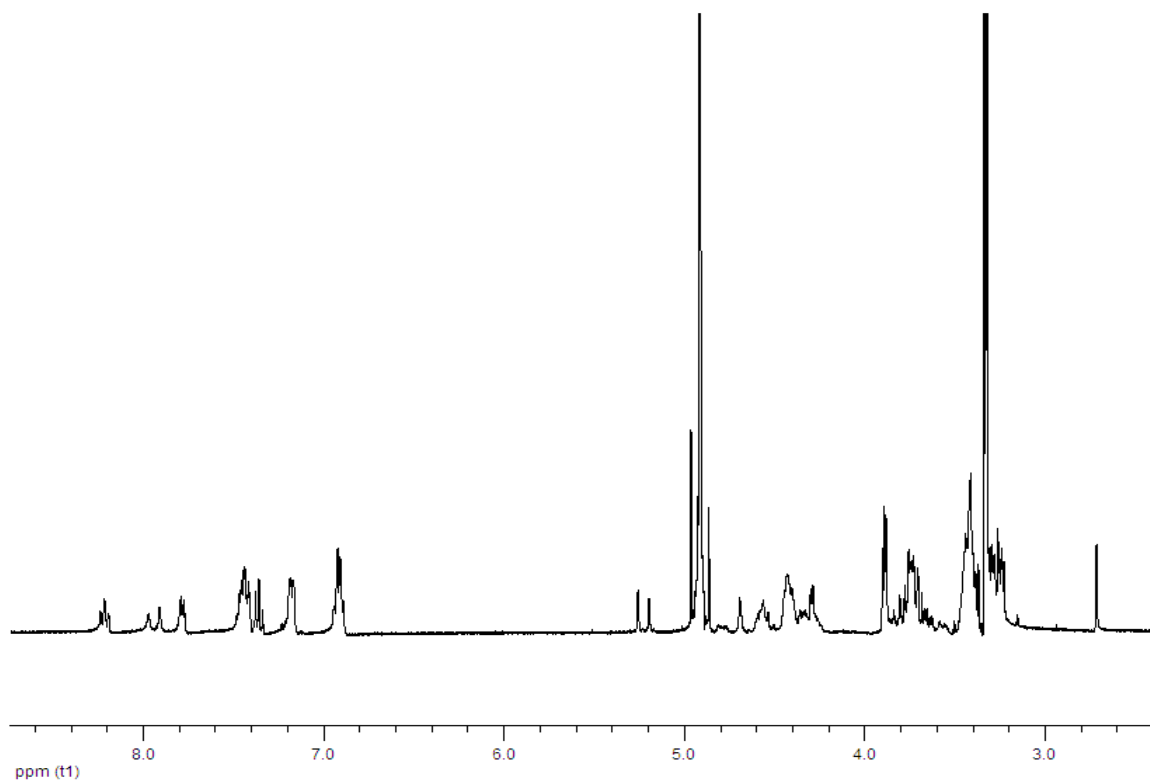
	Solvents Mix		Length (CV)	
Equil.	A/B	20%	1.0	flowrate 25 ml/min
1	A/B	20%	1.0	
2	A/B	20% - 80%	8.0	
3	A/B	80%	3.0	
4	A/B	80%	1.0	Edit on the fly
5	A/B	80% - 100%	1.0	Edit on the fly
6	A/B	100%	0.5	Edit on the fly
7	A/B	100%	2.4	Edit on the fly
8	A/B	100%	1.6	Edit on the fly
9	A/B	100%	2.5	Edit on the fly

Priloga 3: NMR spektri spojin

a) ^1H NMR in ^{13}C NMR monomera (spojina **6**)



b) ^1H NMR in ^{13}C NMR dendrona (spojina **23**)



Priloga 4: Analizni izvidi spektroskopskih tehnik (NMR, MS, IR)

Spojina 1

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3.63 (s, 2H, $\underline{\text{CH}_2}$ -COO), 4.89 (br s, 1H, OH), 5.15 (s, 2H, COO- $\underline{\text{CH}_2}$), 6.80 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, Ar- H_A^*), 7.17 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, Ar- H_B), 7.31–7.42 (m, 5H, Ar-H).

* kemijsko ekvivalentna aromatska protona, ki sta bližje OH skupini

MS (ESI+): $m/z = 265.1$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), 165.1 (100 %)

Spojina 2

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2.67 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, OH), 3.62 (s, 2H, $\underline{\text{CH}_2}$ -COO), 4.21–4.31 (m, 2H, CH_2 - $\underline{\text{H}}_A$, CH_2 - $\underline{\text{H}}_B$)*, 4.35 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H, CH_2), 4.51–4.60 (m, 1H, CH), 5.13 (s, 2H, COO- $\underline{\text{CH}_2}$), 6.87 (d, $J_{2,3} = 7.5$ Hz, 1H, Ar-H), 6.92 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, Ar- H_A), 7.22 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, Ar- H_B), 7.29–7.42 (m, 6H, Ar-H), 7.44–7.53 (m, 3H, Ar-H), 7.82 (dd, $J_{5,6} = 6.8$, $J_{5,7} = 2.5$ Hz, 1H, Ar-H), 8.24 (dd, $J_{8,7} = 7.4$, $J_{8,6} = 2.2$ Hz, 1H, Ar-H). * Signal je posledica magnetno neekvivalentnih protonov ene od alifatskih CH_2 skupin (glej poglavje 5.1.2).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 40.5 ($\underline{\text{CH}_2}$ -COO), 66.7, 68.9*, 69.1 (COO- $\underline{\text{CH}_2}$, CH_2CHCH_2), 105.0, 114.7*, 120.9, 121.7, 125.4, 125.5, 125.8, 126.6, 126.7, 127.6, 128.2*, 128.3, 128.6*, 130.5*, 134.5, 135.9, 154.1, 157.6 ($22 \times \text{Ar-C}$), 171.7 (CH_2 - $\underline{\text{C}}\text{OO}$).

* signali so dvojni, v njih se skrivata dva C-atoma

MS (ESI+): $m/z = 443.2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$), 370.3 (100 %)

HRMS (ESI+): m/z za $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{O}_5$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): izračunano 443.1858, izmerjeno 443.1868

IR (NaCl): ν [cm^{-1}] = 3614, 3020, 2977, 1734, 1581, 1512, 1458, 1420, 1404, 1218, 1157, 1104, 1045, 929, 877, 850, 772, 669, 626.

Spojina **3**

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.58 (s, 2H, CH₂-COOH), 4.13 (dd, $J = 9.9, 5.8$ Hz, 1H, CH₂-H_A), 4.17–4.28 (m, 3H; CH₂-H_B, CH₂), 4.29–4.35 (m, 1H, CH), 5.53 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, OH), 6.94 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, Ar-H_A), 7.00 (dd, $J_{2,3} = 7.6, J_{2,4} = 0.9$ Hz, 1H, Ar-H), 7.18 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, Ar-H_B), 7.39–7.45 (m, 1H, Ar-H), 7.46–7.56 (m, 3H, Ar-H), 7.87 (dd, $J_{5,6} = 7.4, J_{5,7} = 1.9$ Hz, 1H, Ar-H), 8.24 (dd, $J_{8,7} = 8.1, J_{8,6} = 1.6$ Hz, 1H, Ar-H). Signal za -COOH se na spektru ne vidi.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 40.0 (CH₂-COOH), 2 × 68.9, 69.0 (CH₂CHCH₂), 105.0, 114.8*, 120.9, 121.7, 125.4, 125.5, 125.8, 126.1, 126.5, 127.6, 130.6*, 134.5, 154.0, 157.7 (16 × Ar-C), 177.0 (COOH).

* signali so dvojni, v njih se skrivata dva C-atoma

MS (ESI⁻): $m/z = 351.1$ ([M - H]⁻), 143.0 (100 %)

HRMS (ESI⁻): m/z za C₂₁H₁₉O₅ ([M - H]⁻): izračunano 351.1232, izmerjeno 351.1222

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3214, 3050, 2925, 2662, 1690, 1579, 1511, 1459, 1399, 1270, 1239, 1180, 1147, 1104, 1072, 1021, 943, 905, 857, 833, 789, 771, 731, 695, 612, 571, 518, 420.

Spojina **4**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.98 (2 × s, 3H, OCOCH₃), 2.01 (2 × s, 3H, OCOCH₃); 2.06, 2.08 (2 × s, 3H, OCOCH₃); 2.17, 2.19 (2 × s, 3H, OCOCH₃); 3.63, 3.65 (2 × s, 2H, CH₂-COO), 4.06 (dd, $J = 12.4, 5.0$ Hz, 1H, CH₂-H_A), 4.20–4.26 (m, 1H, CH₂-H_B), 4.26–4.32 (m, 2H, CH₂), 4.32–4.42 (m, 2H, Man-H), 4.45 (dd, $J = 8.0, 5.3$ Hz, 1H, Man-H), 4.57–4.67 (m, 1H, CH), 5.15 (2 × s, 2H, COO-CH₂), 5.26–5.30 (m, 1H, Man-H), 5.30–5.38 (m, 2H, Man-H); 5.39, 5.42 (2 × d, $J = 3.0$ Hz, 1H, Man-H₁), 6.85–6.90 (m, 1H, Ar-H), 6.90–6.95 (2 × d, $J = 8.7$ Hz, 2H, Ar-H_A), 7.21–7.27 (2 × d, $J = 8.7$ Hz, 2H, Ar-H_B), 7.32–7.44 (m, 6H, Ar-H), 7.45–7.55 (m, 3H, Ar-H), 7.81–7.86 (m, 1H, Ar-H); 8.16–8.21, 8.23–8.27 (2 × m, 1H, Ar-H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 20.7, 20.8, 20.9, 21.0 (4 × OCOCH₃); 40.4 (CH₂-COO), 62.2, 62.4, 65.9, 66.0, 66.7, 67.3, 67.5, 67.7, 67.8, 68.8, 69.0, 69.1, 69.6, 69.7, 75.0, 75.1, 91.8, 97.4 (COO-CH₂, CH₂CHCH₂, 6 × Man-C); 105.0, 114.5, 114.8, 121.1, 121.7, 125.4, 125.5, 125.7, 125.8, 126.6, 126.8, 127.6, 127.7, 128.2, 128.3, 128.6, 130.5,

130.6, 134.5, 134.6, 135.8, 153.9, 157.4, 157.5 ($22 \times \text{Ar-C}$); 163.5, 169.7, 169.8, 170.0, 170.1, 170.6, 170.8 ($4 \times \text{OCOCH}_3$); 171.7 ($\text{CH}_2\text{-COO}$).

Signali so podvojeni zaradi prisotnih diastereomerov.

MS (ESI+): $m/z = 773.3$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$), 331.1 (100 %)

HRMS (ESI+): m/z za $\text{C}_{42}\text{H}_{45}\text{O}_{14}$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): izračunano 773.2809, izmerjeno 773.2813

IR (NaCl): ν [cm^{-1}] = 3020, 2977, 1743, 1582, 1513, 1458, 1424, 1371, 1220, 1139, 1105, 1049, 982, 929, 877, 760, 669, 624.

Spojina 5

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.98 ($2 \times \text{s}$, 3H, OCOCH_3), 2.01 ($2 \times \text{s}$, 3H, OCOCH_3); 2.06, 2.08 ($2 \times \text{s}$, 3H, OCOCH_3); 2.17, 2.19 ($2 \times \text{s}$, 3H, OCOCH_3); 3.61, 3.63 ($2 \times \text{s}$, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 4.03–4.10 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-H}_A$), 4.20–4.26 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-H}_B$), 4.26–4.33 (m, 2H, CH_2), 4.32–4.41 (m, 2H, Man-H), 4.44 (dd, $J = 8.9, 5.1$ Hz, 1H, Man-H), 4.57–4.67 (m, 1H, CH), 5.25–5.30 (m, 1H, Man-H), 5.30–5.38 (m, 2H, Man-H); 5.39, 5.42 ($2 \times \text{d}$, $J = 3.5$ Hz, 1H, Man- H_1), 6.84–6.90 (m, 1H, Ar-H), 6.90–6.97 ($2 \times \text{d}$, $J = 8.7$ Hz, 2H, Ar- H_A), 7.18–7.25 (m, 2H, Ar- H_B), 7.37–7.44 (m, 1H, Ar-H), 7.45–7.56 (m, 3H, Ar-H), 7.80–7.86 (m, 1H, Ar-H); 8.15–8.21, 8.22–8.28 ($2 \times \text{m}$, 1H, Ar-H).

Signal za $-\text{COOH}$ se na spektru ne vidi.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 20.7, 20.9 ($4 \times \text{OCOCH}_3$); 40.0 ($\text{CH}_2\text{-COOH}$), 62.3, 65.9, 66.1, 67.2, 67.4, 67.5, 68.7, 68.8, 68.9, 69.6, 74.2, 74.7, 74.8, 97.0, 97.4 (CH_2CHCH_2 , $6 \times \text{Man-C}$); 105.0, 114.6, 114.8, 122.2, 125.3, 128.2, 129.1, 130.6, 130.7, 137.9, 157.5, 157.6 ($16 \times \text{Ar-C}$); 169.8, 170.0, 170.1 ($4 \times \text{OCOCH}_3$); 170.8 (COOH).

MS (ESI+): $m/z = 683.2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$), 281.2 (100 %)

HRMS (ESI+): m/z za $\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{O}_{14}$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): izračunano 683.2340, izmerjeno 683.2328

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3448, 2938, 1751, 1611, 1514, 1458, 1371, 1240, 1137, 1047, 981, 899, 795, 773, 736, 601, 502, 468.

Spojina **6** prva reakcija (poglavje 4.1.6)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 3.55 (s, 2H, CH₂-COOH), 3.58–3.66 (m, 1H, Man-H), 3.66–3.74 (m, 2H, Man-H), 3.75–3.80 (m, 1H, Man-H), 3.80–3.86 (m, 1H, Man-H), 3.87–3.91 (m, 1H, Man-H), 4.34 (dd, $J = 10.5, 6.2$ Hz, 1H, CH₂-H_A), 4.38–4.52 (m, 3H, CH₂-H_B, CH₂), 4.56–4.67 (m, 1H, CH); 5.21, 5.28 (2 \times d, $J = 1.8$ Hz, 1H, Man-H₁), 6.94–7.02 (m, 3H, Ar-H_A, Ar-H), 7.22 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, Ar-H_B), 7.36–7.43 (m, 1H, Ar-H), 7.43–7.58 (m, 3H, Ar-H), 7.78–7.85 (m, 1H, Ar-H), 8.21–8.29 (m, 1H, Ar-H).

Signali -OH skupin in -COOH se na spektru ne vidijo (devterijska izmenjava s topilom).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 42.4, 42.5 (CH₂-COOH); 62.7, 68.3, 69.2, 72.3, 72.4, 72.5, 75.1, 75.8, 101.8 (CH₂CHCH₂, 6 \times Man-C); 106.1, 115.6, 115.8, 121.6, 121.7, 123.0, 126.3, 126.9, 127.0, 127.4, 128.5, 128.6, 131.5, 136.1, 155.6, 159.1, 159.2 (16 \times Ar-C); 169.8, 169.9 (COOH).

MS (ESI⁻): $m/z = 513.2$ ([M - H]⁻), 113.0 (100 %)

HRMS (ESI⁻): m/z za C₂₇H₂₉O₁₀ ([M - H]⁻): izračunano 513.1761, izmerjeno 513.1761

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3432, 2928, 1685, 1509, 1400, 1234, 1137, 1103, 1070, 1025, 975, 795, 770, 723, 572.

Spojina **6** druga reakcija (poglavje 4.1.7)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 3.48–3.65 (m, 3H, CH₂-COOH, Man-H), 3.65–3.71 (m, 4H, OH, Man-H), 3.71–3.79 (m, 2H, Man-H), 3.79–3.88 (m, 2H, Man-H), 3.88–3.92 (m, 1H, OH), 4.30–4.39 (m, 2H, CH₂), 4.39–4.52 (m, 2H, CH₂), 4.56–4.67 (m, 1H, CH); 5.21, 5.28 (2 \times d, $J = 1.7$ Hz, 1H, Man-H₁), 6.92–7.02 (m, 3H, Ar-H_A, Ar-H), 7.20 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, Ar-H_B), 7.35–7.43 (m, 1H, Ar-H), 7.43–7.58 (m, 3H, Ar-H), 7.77–7.85 (m, 1H, Ar-H), 8.20–8.29 (m, 1H, Ar-H). Signal za -COOH se na spektru ne vidi.

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 40.8 (CH₂-COOH), 62.7, 62.9, 68.3, 68.4, 69.1, 69.2, 69.3, 72.4, 72.5, 75.1, 75.7, 101.8 (CH₂CHCH₂, 6 \times Man-C); 106.1, 106.2, 115.7, 115.8, 121.6, 121.7, 126.3, 126.9, 127.0, 127.4, 128.1, 128.2, 128.5, 128.6, 131.5, 136.1, 155.6, 155.7, 159.3, 159.4 (16 \times Ar-C); 174.4 (COOH).

Nekateri signali so podvojeni zaradi prisotnih diastereomerov.

MS (ESI⁻): $m/z = 513.2$ ([M - H]⁻), 573.2 (100 %)

HRMS (ESI⁻): m/z za C₂₇H₂₉O₁₀ ([M - H]⁻): izračunano 513.1761, izmerjeno 513.1765

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3412, 2929, 1735, 1612, 1596, 1580, 1512, 1458, 1397, 1269, 1240, 1135, 1103, 1055, 1020, 977, 881, 793, 772, 735, 680, 571, 516, 420.

Spojina **8**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.58 (s, 2H, CH₂-COO), 3.73 (s, 3H, CH₃), 6.12 (br s, 1H, OH), 6.76 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar-H_A), 7.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar-H_B).

MS (ESI⁺): m/z = 167 ([M + H]⁺), 269 (100 %)

Spojina **9**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.67 (br s, 1H, OH), 3.60 (s, 2H, CH₂-COO), 3.71 (s, 3H, CH₃), 4.23–4.33 (m, 2H, CH₂-H_A, CH₂-H_B)*, 4.37 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, CH₂), 4.54–4.62 (m, 1H, CH), 6.89 (d, *J*_{2,3} = 7.6 Hz, 1H, Ar-H), 6.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar-H_A), 7.24 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar-H_B), 7.38–7.44 (m, 1H, Ar-H), 7.46–7.56 (m, 3H, Ar-H), 7.84 (dd, *J*_{5,6} = 6.9, *J*_{5,7} = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 8.26 (dd, *J*_{8,7} = 8.3, *J*_{8,6} = 1.3 Hz, 1H, Ar-H).
* Signal je posledica magnetno neekvivalentnih protonov ene od alifatskih CH₂ skupin (glej poglavje 5.1.2).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 40.3 (CCH₂-COO), 52.1 (CH₃), 68.9*, 69.1 (CH₂CHCH₂), 105.0, 114.7*, 120.9, 121.7, 125.4, 125.5, 125.8, 126.5, 126.8, 127.6, 130.5*, 134.5, 154.1, 157.6 (16 × Ar-C), 172.3 (CH₂-COO).

* signali so dvojni, v njih se skrivata dva C-atoma

MS (ESI⁺): m/z = 367 ([M + H]⁺, 100 %)

HRMS (ESI⁺): m/z za C₂₂H₂₃O₅ ([M + H]⁺): izračunano 367.1545, izmerjeno 367.1542

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3448, 3052, 2949, 1735, 1581, 1512, 1458, 1438, 1399, 1270, 1240, 1158, 1103, 1043, 949, 895, 824, 793, 773, 734, 572, 526, 420.

Spojina **10**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.98 (2 × s, 3H, OCOCH₃); 2.01, 2.02 (2 × s, 3H, OCOCH₃); 2.07, 2.08 (2 × s, 3H, OCOCH₃); 2.17, 2.19 (2 × s, 3H, OCOCH₃); 3.59, 3.60 (2 × s, 2H, CH₂-COO), 3.71 (2 × s, 3H, COO-CH₃), 4.03–4.12 (m, 1H, CH₂-H_A), 4.20–4.27 (m, 1H, CH₂-H_B), 4.27–4.35 (m, 2H, CH₂), 4.35–4.42 (m, 2H, Man-H), 4.42–4.50 (m, 1H, Man-H), 4.57–4.67 (m, 1H, CH), 5.26–5.30 (m, 1H, Man-H), 5.30–5.38 (m, 2H, Man-H); 5.39, 5.42 (2 × d, *J* = 3.1 Hz, 1H, Man-H₁), 6.85–6.90 (m, 1H, Ar-H), 6.90–6.95 (2 × d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar-H_A), 7.21–7.27 (2 × d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar-H_B), 7.37–7.44 (m, 1H, Ar-H), 7.45–7.56 (m, 3H, Ar-H), 7.80–7.86 (m, 1H, Ar-H); 8.16–8.20, 8.23–8.27 (2 × m, 1H, Ar-H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 20.6, 20.7, 20.8, 20.9, 21.0, 21.1 (4 × OCOCH₃); 40.3 (CH₂-COO), 52.1 (COO-CH₃) 62.2, 62.4, 65.9, 66.0, 67.3, 67.5, 67.7, 67.8, 68.8, 69.0, 69.1, 69.6, 69.7, 75.0, 75.1, 97.4 (CH₂CHCH₂, 6 × Man-C); 105.0, 114.5, 114.8, 121.1, 121.7, 125.4, 125.5, 125.7, 125.8, 126.6, 126.9, 127.6, 130.5, 130.6, 134.5, 134.6, 153.9, 157.5 (16 × Ar-C); 169.7, 169.8, 169.9, 170.0, 170.6, 170.8, 171.2 (4 × OCOCH₃); 172.3 (CH₂-COO). Signali so podvojeni zaradi prisotnih diastereomerov.

MS (ESI+): *m/z* = 697 ([M + H]⁺), 331 (100 %)

HRMS (ESI+): *m/z* za C₃₆H₄₁O₁₄ ([M + H]⁺): izračunano 697.2496, izmerjeno 697.2501

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3056, 2954, 1751, 1582, 1513, 1459, 1438, 1371, 1240, 1138, 1104, 1048, 981, 935, 825, 794, 774, 736, 689, 600, 572, 502, 468, 420.

Spojina **11**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.21 (br s, 4H, OH), 3.51 (s, 2H, CH₂-COO); 3.64, 3.65 (2 × s, 3H, CH₃), 3.66–3.83 (m, 2H, Man-H), 3.83–4.02 (m, 4H, Man-H), 4.08–4.29 (m, 4H, CH₂CHCH₂), 4.39–4.48 (m, 1H, CH); 5.17, 5.20 (2 × s, 1H, Man-H₁), 6.75 (dd, *J*_{2,3} = 7.6 Hz, *J*_{2,4} = 1.6 Hz, 1H, Ar-H); 6.81, 6.84 (2 × d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar-H_A), 7.13 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar-H_B), 7.29–7.34 (m, 1H, Ar-H), 7.37–7.48 (m, 3H, Ar-H), 7.71–7.77 (m, 1H, Ar-H), 8.13–8.21 (m, 1H, Ar-H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 40.2 (CH₂-COO), 52.0 (COO-CH₃); 60.8, 60.9, 66.0, 66.1, 67.2, 67.4, 67.6, 67.8, 71.1, 71.4, 71.5, 72.6, 72.7, 74.0, 74.3, 99.7, 99.9 (CH₂CHCH₂, 6 × Man-C); 104.8, 104.9, 114.6, 114.8, 120.8, 120.9, 121.8, 125.4, 125.5,

125.8, 126.6, 126.7, 127.5, 130.4, 134.5, 153.9, 154.1, 157.5, 157.6 (16 × Ar-C); 172.4 (CH₂-COO).

MS (ESI⁻): m/z = 527 ([M - H]⁻), 97 (100 %)

HRMS (ESI⁻): m/z za C₂₈H₃₁O₁₀ ([M - H]⁻): izračunano 527.1917, izmerjeno 527.1918

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3422, 3054, 2931, 1735, 1581, 1512, 1459, 1438, 1397, 1269, 1239, 1136, 1103, 1055, 1021, 977, 880, 793, 771, 736, 681, 572, 512, 420.

Spojina **6** tretja reakcija (poglavje 4.2.5)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 3.4–3.57 (m, 5H, CH₂-COOH, Man-H), 3.58–3.72 (m, 3H, Man-H), 4.24–4.40 (m, 3H, OH, CH₂CHCH₂), 4.40–4.57 (m, 3H, CH₂CHCH₂), 4.57–4.68 (br s, 1H, OH), 4.71–4.85 (m, 2H, OH); 5.04, 5.09 (2 × d, J = 1.5 Hz, 1H, Man-H₁), 6.92–6.99 (2 × d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar-H_A), 7.01–7.06 (2 × dd, J_{2,3} = 7.6 Hz, J_{2,4} = 0.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.14–7.22 (2 × d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar-H_B), 7.39–7.46 (m, 1H, Ar-H), 7.46–7.58 (m, 3H, Ar-H), 7.85–7.92 (m, 1H, Ar-H); 8.13–8.19, 8.20–8.24 (2 × m, 1H, Ar-H), 12.25 (s, 1H, COOH).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 61.2, 66.7, 67.3, 67.6, 70.5, 70.8, 73.0, 74.3, 100.1 (CH₂CHCH₂, 6 × Man-C); 105.4, 114.3, 120.2, 121.4, 124.9, 125.5, 126.2, 126.5, 127.2, 127.5, 130.4, 134, 153.8, 157.1 (16 × Ar-C); 173.0 (COOH).

Signal za CH₂-COOH prekriva topilo pri ~ 40 ppm.

MS (ESI⁻): m/z = 513 ([M - H]⁻, 100 %)

HRMS (ESI⁻): m/z za C₂₇H₂₉O₁₀ ([M - H]⁻): izračunano 513.1761, izmerjeno 513.1746

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3422, 3061, 2932, 1708, 1612, 1596, 1581, 1512, 1458, 1397, 1269, 1240, 1134, 1103, 1054, 1021, 977, 793, 772, 737, 679, 572, 517, 420.

Spojina **12**

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 3.37–3.46 (m, 4H), 3.47–3.52 (m, 2H), 3.52–3.59 (m, 4H), 3.59–3.64 (m, 2H), 4.59 (t, J = 5.5 Hz, 1H, OH).

Spojina **13**

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 2.65 (t, J = 5.8 Hz, 2H, NH₂), 3.38–3.46 (m, 4H), 3.46–3.53 (m, 5H), 3.53–3.59 (m, 2H), 3.59–3.63 (m, 1H), 4.59 (br s, 1H, OH).

Spojina **14**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.46 (s, 9H, Boc), 3.55–3.59 (m, 2H), 3.60–3.70 (m, 7H), 3.70–3.80 (m, 3H), 5.19 (br s, 1H, NH). Signal OH skupine v spektru ni viden.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 28.4 (3 × CH₃)*, 40.3 (CH₂NHBoc), 61.7 (CH₂OH), 70.3, 70.4, 72.5, 72.6 (4 × CH₂); 79.4 (Boc-C), 156.1 (NHCO).

* Signal je zelo visok.

MS (ESI+): m/z = 272.2 ([M + Na]⁺), 150.1 (100 %)

HRMS (ESI+): m/z za C₁₁H₂₃NO₅ ([M + Na]⁺): izračunano 272.1474, izmerjeno 272.1480

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3367, 2931, 2873, 1697, 1527, 1458, 1393, 1367, 1280, 1252, 1173, 1125, 1071, 934, 864, 782, 560.

Spojina **15**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.46 (s, 9H, Boc), 3.33 (dd, J = 10.2, 5.1 Hz, 2H), 3.39–3.44 (m, 2H), 3.56 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.62–3.68 (m, 4H), 3.68–3.72 (m, 2H), 5.03 (br s, 1H, NH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 28.4 (3 × CH₃)*, 40.4 (CH₂NHBoc), 50.6 (CH₂N₃), 70.1, 70.2, 70.3, 70.6 (4 × CH₂); 79.3 (Boc-C), 156.0 (NHCO).

* Signal je zelo visok.

MS (ESI+): m/z = 297.2 ([M + Na]⁺), 175.1 (100 %)

HRMS (ESI+): m/z za C₁₁H₂₂N₄O₄ ([M + Na]⁺): izračunano 297.1539, izmerjeno 297.1536

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3367, 2977, 2931, 2871, 2111, 1713, 1509, 1458, 1392, 1366, 1280, 1251, 1174, 1123, 1041, 934, 864, 781, 646, 557.

Spojina **16**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.80–4.16 (m, 12H), 8.33 (br s, 3H, NH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 40.3 (CH₂NH₃⁺), 50.9 (CH₂N₃), 61.7, 70.1, 70.4, 70.7 (4 × CH₂).

MS (ESI+): m/z = 175 ([M]⁺, 100 %)

HRMS (ESI+): m/z za C₆H₁₅N₄O₂ ([M]⁺): izračunano 175.1195, izmerjeno 175.1194

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3392, 2946, 2835, 2113, 1618, 1508, 1458, 1406, 1347, 1288, 1116, 1028, 929, 850, 818, 639, 557.

Spojina **17**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.98 (2 × s, 3H, OCOCH₃), 2.01 (2 × s, 3H, OCOCH₃); 2.07, 2.09 (2 × s, 3H, OCOCH₃); 2.17, 2.20 (2 × s, 3H, OCOCH₃); 2.32–2.41 (m, 4H, CH₂CH₂CONH), 3.39–3.54 (m, 10H, CONHCH₂, CH₂N₃, Ar-CH₂-CONH), 4.03–4.12 (m, 1H, CH₂-H_A), 4.19–4.26 (m, 1H, CH₂-H_B), 4.26–4.35 (m, 2H, CH₂), 4.35–4.41 (m, 2H, Man-H), 4.44 (dd, *J* = 10.5, 5.1 Hz, 1H, Man-H), 4.58–4.68 (m, 1H, CH), 5.26–5.30 (m, 1H, Man-H), 5.30–5.37 (m, 2H, Man-H), 5.37–5.43 (m, 1H, Man-H₁), 6.28–6.40* (m, 1H, NH), 6.42–6.54* (m, 1H, NH), 6.56–6.64* (m, 1H, NH), 6.85–6.90 (m, 1H, Ar-H), 6.90–6.97 (2 × d, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ar-H_A), 7.21 (t, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H_B), 7.37–7.44 (m, 1H, Ar-H), 7.46–7.56 (m, 3H, Ar-H), 7.80–7.86 (m, 1H, Ar-H); 8.16–8.21, 8.23–8.28 (2 × m, 1H, Ar-H). Signali so podvojeni zaradi prisotnih diastereomerov. * Signali so široki.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 20.6, 20.7, 20.8, 20.9, 21.0 (4 × OCOCH₃); 35.5, 35.8, 35.9, 38.9 (5 × CH₂), 42.8 (Ar-CH₂-CONH), 50.7 (CH₂N₃); 62.2, 62.4, 65.9, 66.0, 67.2, 67.7, 67.8, 68.8, 69.1, 69.6, 69.7, 74.9, 75.4, 97.4, 97.6 (CH₂CHCH₂, 6 × Man-C); 105.0, 114.8, 115.1, 121.1, 121.7, 125.4, 125.5, 125.8, 126.6, 127.6, 127.7, 130.6, 130.7, 134.5, 134.6, 153.9, 157.6, 166.0 (16 × Ar-C); 169.7, 169.8, 170.0, 170.1, 170.2, 170.6, 170.9, 171.6, 171.7, 171.9 (4 × OCOCH₃, 3 × CONH). Signali so podvojeni, ker imamo zmes dveh diastereomerov.

MS (ESI+): m/z = 893.4 ([M + H]⁺), 809.3 (100 %)

HRMS (ESI+): m/z za C₄₃H₅₃N₆O₁₅ ([M + H]⁺): izračunano 893.3569, izmerjeno 893.3576

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3293, 3081, 2937, 2106, 1750, 1646, 1543, 1513, 1458, 1370, 1242, 1137, 1047, 981, 828, 796, 771, 691, 600, 503, 472, 420.

Spojina **19**

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 3.35–3.39 (m, 4H, NHCH_2 , CH_2N_3), 3.46 (s, 2H, CH_2CONH), 3.54 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, CH_2), 3.57–3.64 (m, 6H, CH_2), 3.64–3.73 (m, 2H, Man-H), 3.73–3.77 (m, 1H, Man-H), 3.77–3.87 (m, 2H, Man-H), 3.87–3.90 (m, 1H, Man-H), 4.31–4.51 (m, 4H, CH_2CHCH_2), 4.58–4.66 (m, 1H, CH); 5.21, 5.27 ($2 \times$ d, $J = 1.7$ Hz, 1H, Man- H_1), 6.95–7.01 (m, 3H, Ar- H_A , Ar-H), 7.23 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, Ar- H_B), 7.37–7.42 (m, 1H, Ar-H), 7.43–7.53 (m, 3H, Ar-H), 7.79–7.84 (m, 1H, Ar-H), 8.21–8.28 (m, 1H, Ar-H). Signali OH skupin in NH se v spektru ne vidijo (devterijska izmenjava s topilom). Oboje lahko opazimo, ko posnamemo spekter v CDCl_3 . NH signal se nahaja pri 6.24 ppm (q, $J = 5.5$ Hz).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 39.4 (NHCH_2), 42.5 (CH_2CONH), 50.5 (CH_2N_3); 61.0, 61.1, 66.2, 66.4, 67.0, 67.6, 67.8, 69.7*, 70.0*, 70.1*, 70.4*, 71.0, 71.1, 71.4, 72.6, 72.8, 74.0, 74.8, 99.5, 100.0 (CH_2CHCH_2 , $4 \times \text{CH}_2$, $6 \times \text{Man-C}$); 104.8, 104.9, 114.9, 115.2, 120.8, 120.9, 121.8, 125.4, 125.5, 125.8, 126.5, 127.5, 127.6, 127.7, 130.5, 134.5, 154.0, 154.1, 157.6, 157.8 ($16 \times \text{Ar-C}$), 171.8 (CONH). Nekateri signali imajo razcepljene vrhove ali pa so podvojeni, ker imamo zmes dveh diastereomerov. * Signali so visoki in pripadajo preostalim CH_2 skupinam distančnika.

MS (ESI+): $m/z = 671$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100 %)

HRMS (ESI+): m/z za $\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_{11}$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): izračunano 671.2909, izmerjeno 671.2928

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3405, 2932, 2110, 1654, 1579, 1511, 1459, 1397, 1270, 1240, 1179, 1104, 1071, 1025, 977, 920, 881, 795, 774, 736, 680, 572.

Spojina 20

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 3.16–3.92 (več multipletov, 80H, $28 \times \text{CH}_2$, $24 \times \text{Man-H}$; v tem območju je spekter zelo kompleksen, hkrati zaradi nečistosti spektra ni bilo razvidno, koliko protonov produkta se nahaja v posameznem signalu), 4.18–4.44 (m, 24H, CH_2CHCH_2 , CH_2 dendronsko jedro), 4.49–4.58 (m, 4H, CH); 5.18, 5.24 ($2 \times \text{d}$, $J = 1.3$ Hz, 4H, Man-H_1), 6.70–6.79 (m, 4H, Ar-H), 6.81–6.91 (m, 8H, Ar-H_A), 7.10–7.16 (m, 8H, Ar-H_B), 7.20–7.26 (m, 4H, Ar-H dendronsko jedro), 7.28–7.36 (m, 4H, Ar-H), 7.36–7.52 (m, 12H, Ar-H), 7.61–7.68 (m, 4H, Triazol-CH), 7.72–7.83 (m, 4H, Ar-H), 8.15–8.25 (m, 4H, Ar-H). Nekateri signali so pri ~ 3.33 ppm prekriti s topilom. Signali NH in OH skupin se v spektru ne vidijo (devterijska izmenjava).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 40.6 ($4 \times \text{NHCH}_2$), 43.0 ($4 \times \text{CH}_2$ dendronsko jedro), 44.7 ($4 \times \text{CH}_2\text{CONH}$), 51.7 ($4 \times \text{Triazol-N-CH}_2$); 62.7, 62.9, 68.4, 68.5, 69.1, 70.5, 71.1, 71.2, 71.3, 71.5, 72.3, 72.5, 75.1, 75.6, 75.7, 101.7, 101.8, ($4 \times \text{CH}_2\text{CHCH}_2$, $16 \times \text{CH}_2$, $24 \times \text{Man-C}$); 106.2, 106.3, 115.8, 115.9, 121.6, 121.7, 121.8, 122.8, 122.9, 123.0, 126.4, 126.5, 126.8, 126.9, 127.0, 127.2, 127.5, 127.6, 128.5, 128.6, 128.7, 129.5, 129.6, 131.3, 131.4, 136.0, 155.5, 155.6, 155.7, 159.1, 159.2 ($78 \times \text{Ar-C}$), 174.6 ($4 \times \text{CONH}$).

MS (ESI+): $m/z = 2946$ ($[\text{M} + 4\text{H}]^+$), 1472 ($[\text{M} + \text{H}]^{2+}$), 702 (100 %)

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3422, 2929, 2109*, 1662, 1509, 1458, 1397, 1364, 1270, 1241, 1178, 1133, 1103, 1070, 795, 772, 572.

* signal je posledica v zmesi zaostale izhodne snovi (azida)

Spojina 21

^1H NMR (400 MHz, COSY, CDCl_3): δ [ppm] = 1.98 (s, 3H, OCOCH_3); 2.01, 2.02 ($2 \times \text{s}$, 3H, OCOCH_3); 2.07, 2.09 ($2 \times \text{s}$, 3H, OCOCH_3); 2.17, 2.20 ($2 \times \text{s}$, 3H, OCOCH_3); 3.34–3.39 (m, 2H, CH_2N_3), 3.41–3.48 (m, 2H, NHCH_2), 3.50–3.56 (m, 4H, CH_2CONH , NHCH_2CH_2), 3.60 (d, $J = 5.2$ Hz, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.64 (dd, $J = 10.0$ Hz, 4.6, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.83–3.90, 4.03–4.14, 4.20–4.25, ($3 \times \text{m}$, 2H, Man-H), 4.25–4.34 (m, 2H, CH_2CHCH_2), 4.34–4.43 (m, 2H, Man-H , $\text{CH}_2\text{-H}_A$), 4.43–4.51 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-H}_B$), 4.58–4.68 (m, 1H, CH), 5.26–5.34 (m, 2H, Man-H), 5.34–5.38 (m, 1H, Man-H), 5.38–5.44 (m, 1H, Man-H_1), 5.89–6.02 (m, 1H, CONH), 6.85–6.91 (m, 1H, Ar-H), 6.91–6.97 ($2 \times \text{d}$, $J = 8.7$

Hz, 2H, Ar-H_A), 7.18–7.26 (m, 2H, Ar-H_B), 7.37–7.45 (m, 1H, Ar-H), 7.46–7.56 (m, 3H, Ar-H), 7.80–7.86 (m, 1H, Ar-H); 8.16–8.21, 8.23–8.28 (2 × m, 1H, Ar-H).

Signali so podvojeni zaradi prisotnih diastereomerov.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 20.6, 20.7, 20.8, 20.9, 21.0 (4 × OCOCH₃); 39.3 (NHCH₂), 42.8 (CH₂CONH), 50.6 (CH₂N₃); 62.2, 62.3, 65.9, 66.0, 67.2, 67.5, 67.7, 67.8, 68.8, 69.0, 69.6, 69.7, 69.8*, 70.1*, 70.2*, 70.5*, 74.9, 75.2, 97.4, 97.5 (CH₂CHCH₂, 4 × CH₂, 6 × Man-C); 104.8, 105.0, 115.0, 121.1, 121.7, 125.4, 125.5, 125.7, 125.8, 126.6, 127.6, 127.7, 127.9, 130.6, 130.7, 134.5, 153.9, 157.5 (16 × Ar-C), 169.7, 169.8, 169.9, 170.1, 170.6, 170.8, 171.3, 171.4 (4 × OCOCH₃, CONH). Nekateri signali so podvojeni zaradi diastereomerov. * Signali so visoki in pripadajo preostalim CH₂ skupinam distančnika.

MS (ESI⁺): m/z = 839.3 ([M + H]⁺, 100 %)

HRMS (ESI⁺): m/z za C₄₁H₅₁N₄O₁₅ ([M + H]⁺): izračunano 839.3351, izmerjeno 839.3346

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3422, 2936, 2111, 1751, 1654, 1581, 1511, 1458, 1370, 1241, 1179, 1137, 1076, 1048, 982, 935, 795, 775, 736, 600, 573.

Spojina **22**

¹H NMR (400 MHz, COSY, CDCl₃): δ [ppm] = 1.97 (s, 12H, OCOCH₃), 2.00 (2 × s, 12H, OCOCH₃); 2.06, 2.08 (2 × s, 12H, OCOCH₃); 2.16, 2.18 (2 × s, 12H, OCOCH₃); 3.30–3.42 (m, 12H, 6 × CH₂), 3.42–3.55 (m, 29H, Glu-CH₃, Glu-H, 12 × CH₂), 3.55–3.75 (m, 6H, Glu-H, 2 × CH₂), 3.75–3.85 (m, 10H, 4 × CH₂, Glu-H); 3.85–3.89, 4.00–4.14, 4.19–4.23 (3 × m, 8H, Man-H), 4.16–4.56 (m, 28H, 4 × CH₂, CH₂CHCH₂, Man-H), 4.56–4.70 (m, 6H, CH, 1 × O-CH₂-Triazol), 4.70–5.08 (m, 7H, 3 × O-CH₂-Triazol, Glu-H₁), 5.24–5.44 (m, 16H, Man-H), 6.04–6.44 (br m, 4H, NH), 6.83–6.95 (m, 12H, Ar-H_A, Ar-H), 7.15–7.26 (m, 8H, Ar-H_B), 7.35–7.44 (m, 4H, Ar-H), 7.44–7.55 (m, 12H, Ar-H), 7.76–7.85 (m, 5H, Ar-H, Triazol-CH); 7.86, 7.90, 8.00 (3 × s, 3H, Triazol-CH); 8.14–8.20, 8.21–8.27 (2 × m, 4H, Ar-H). Nekateri signali so podvojeni zaradi diastereomerov.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 20.6, 20.7, 20.8, 20.9, 21.0 (16 × OCOCH₃); 39.3 (4 × NHCH₂), 42.6, 42.7 (4 × CH₂CONH), 50.2 (4 × Triazol-N-CH₂); 62.2, 62.3,

65.9, 66.0, 67.3, 67.5, 67.6, 67.7, 67.8, 68.8, 69.0, 69.1, 69.6, 69.7, 70.1, 70.4, 74.9, 75.2, 97.4, 97.5 (Glu-CH₃, 6 × Glu-C, 4 × O-CH₂-Triazol, 4 × CH₂CHCH₂, 16 × CH₂, 24 × Man-C); 105.1, 114.7, 115.0, 121.1, 121.7, 125.4, 125.5, 125.8, 126.6, 127.6, 127.7, 127.9, 128.0, 128.1, 130.6, 130.7, 134.2, 134.5, 134.6, 153.9, 157.5 (72 × Ar-C), 169.7, 169.8, 169.9, 170.1, 170.6, 170.8, 171.0, 171.5 (16 × OCOCH₃, 4 × CONH). Signali imajo zvečine razcepljene vrhove ali pa so podvojeni, kar je posledica prisotnih diastomerov.

MS (ESI+): m/z = 3707.9 ([M + 8H]⁺), 1852.0 ([M + 4H]²⁺), 693.2 (100 %)

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3422, 2930, 1751, 1654, 1509, 1458, 1370, 1240, 1179, 1137, 1048, 982, 796, 775, 735, 600.

Spojina **23**

¹H NMR (400 MHz, COSY, CD₃OD): δ [ppm] = 2.72 (s, 3H, Glu-CH₃), 3.20–3.31 (m, 20H, 10 × CH₂), 3.35–3.49 (m, 26H, Glu-H, 12 × CH₂), 3.52–3.66 (m, 4H, Glu-H), 3.66–3.79 (m, 16H, Man-H, 2 × CH₂), 3.79–3.86 (m, 4H, 2 × CH₂), 3.86–3.92 (m, 8H, Man-H), 4.22–4.48 (m, 20H, Man-H, CH₂CHCH₂), 4.51–4.63 (m, 6H, CH, O-CH₂-Triazol), 4.66–4.72 (s, 2H, O-CH₂-Triazol), 4.74–5.84 (m, 2H, O-CH₂-Triazol); 5.20, 5.26 (2 × d, J = 1.2 Hz, 4H, Man-H₁), 6.87–6.99 (m, 12H, Ar-H_A, Ar-H), 7.15–7.26 (m, 8H, Ar-H_B), 7.36 (t, J = 7.9 Hz, 4H, Ar-H), 7.40–7.51 (m, 12H, Ar-H), 7.76–7.83 (m, 4H, Ar-H), 7.91 (s, 2H, Triazol-CH), 7.97 (s, 2H, Triazol-CH), 8.17–8.28 (m, 4H, Ar-H). Signali NH in OH skupin se v spektru ne vidijo (devterijska izmenjava). O-CH₂-Triazol (2H) in Glu-H₁ (1H) sta prekrita z vodo pri 4.91 ppm, 2 × CH₂ (4H) sta prekrite s topilom pri 3.33 ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 40.5 (4 × NHCH₂), 43.0 (4 × CH₂CONH), 45.0 (Glu-CH₃), 51.3 (4 × Triazol-N-CH₂); 62.7, 62.9, 65.5, 68.4, 69.1, 70.3, 70.5, 71.2, 71.4, 72.3, 72.4, 72.5, 75.0, 75.1, 75.6, 75.7, 84.5, 93.4, 101.7 (6 × Glu-C, 4 × O-CH₂-Triazol, 4 × CH₂CHCH₂, 16 × CH₂, 24 × Man-C); 106.2, 106.3, 115.8, 115.9, 121.6, 121.7, 122.8, 123.0, 126.0, 126.1, 126.3, 126.4, 126.9, 127.1, 127.5, 128.6, 131.4, 136.0, 147.9, 155.5, 155.7, 159.1, 159.2 (72 × Ar-C), 174.4 (4 × CONH). Nekateri signali imajo razcepljene vrhove ali pa so podvojeni.

MS (ESI+): m/z = 3032.9 ([M + 5H]⁺), 1514.7 ([M + 2H]²⁺, 100 %)

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3422, 2928, 1647, 1509, 1399, 1270, 1240, 1178, 1103, 1054, 981, 795, 774, 572.