

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA VUČKO

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA VUČKO

**SINTEZA IN BIOLOŠKO VREDNOTENJE
GLICEROLOMANOZIDOV KOT POTENCIALNIH
ANTAGONISTOV LEKTINOV DC-SIGN IN FIMH**

**SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF
GLYCEROLOMANNOSIDES AS POTENTIAL ANTAGONISTS OF
LECTINS DC-SIGN AND FIMH**

Ljubljana, 2013

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani in Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. *In vitro* testiranja so opravili na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in na Institute of Molecular Pharmacy na University of Basel v Švici.

Zahvala:

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm. za vso potrpežljivost, trud, strokovno pomoč in podarjeno znanje ter izkušnje med izdelavo magistrske naloge.

Velika zahvala gre tudi staršem, bratu in Taji za vzpodbudo in pomoč ter Kristjanu, ki mi je stal ob strani in vedno verjel vame.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

Sara Vučko

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

Član komisije: doc. dr. Robert Roškar, mag. farm.

Vsebina

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV	III
1. UVOD	1
1.1. LEKTINI TIPA C	1
1.1.1. VLOGA LEKTINOV TIPA C PRI IMUNSKEM ODZIVU	2
1.2. DC-SIGN	5
1.2.1. STRUKTURA.....	5
1.2.2. VLOGA DC-SIGN PRI IMUNSKEM ODZIVU.....	7
1.2.3. DC-SIGN KOT TERAPEVTSKA TARČA.....	8
1.2.4. DC-SIGN ANTAGONISTI.....	9
1.3. BAKTERIJSKI LEKTINI	11
1.3.1. ADHEZIJA BAKTERIJ.....	12
1.3.2. STRUKTURA LEKTINA FimH	13
1.3.3. VLOGA IN ANTAGONISTI FimH	14
2. NAČRT DELA	17
3. MATERIALI IN METODE	20
3.1. MATERIALI	20
3.1.1. REAGENTI IN TOPILA	20
3.2. METODE	20
3.2.1. TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA	20
3.2.2. »FLASH« KOLONSKA KROMATOGRAFIJA.....	20
3.2.3. DOLOČEVANJE TALIŠČA	20
3.2.4. MASNA SPEKTROSKOPIJA (MS)	21
3.2.5. JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA (NMR).....	21
3.2.6. INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA (IR).....	21
3.2.7. POLARIMetriJA	21
3.2.8. POIMENOVANJE IN RIsANJE SPOJIN	21
3.2.9. BIOLošKO TESTIRANJE	22

4.	EKSPERIMENTALNI DEL.....	23
4.1.	Sinteza 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-D-manopiranoze	23
4.2.	Sinteza 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranoze	24
4.3.	Sinteza 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranozil trikloroacetimidata	25
4.4.	Sinteza diarilglicerolov	26
4.4.1.	Sinteza 1,3-bis(4-metoksifenoksi)propan-2-ola	27
4.4.2.	Sinteza 1,3-bis(4-nitrofenoksi)propan-2-ola	28
4.4.3.	Poskus sinteze 1,3-bis(naftalen-2-iloksi)propan-2-ola	29
4.4.4.	Poskus sinteze 1,3-bis(2-naftoksi)propan-2-ona	29
4.4.5.	Sinteza 2-((naftalen-2-iloksi)metil)oksirana (31)	30
4.4.6.	Poskus sinteze 1,3-bis(naftalen-2-iloksi)propan-2-ola (31)	31
4.4.7.	Sinteza 1,3-bis(naftalen-2-iloksi)propan-2-ola	32
4.4.8.	Sinteza 2,3-difenoksipropan-1-ola	34
4.4.9.	Sinteza 2,3-bis(4-nitrofenoksi)propan-1-ola	35
4.4.10.	Sinteza 2,3-bis((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-1-ola	36
4.4.11.	Sinteza 1,3-bis(4-metoksifenoksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranozida ..	38
4.4.12.	Sinteza 1,3-bis(4-nitrofenoksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranozida	39
4.4.13.	Sinteza 1,3-bis(naftalen-2-iloksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranozida ...	40
4.4.14.	Sinteza 2,3-difenoksipropan-1-il 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranozida	42
4.4.15.	Sinteza 2,3-bis(4-nitrofenoksi)propan-1-il 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranozida	43
4.4.16.	Sinteza 2,3-bis((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-1-il 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranozida	44
4.5.	Zemlénova metoda.....	45
4.5.1.	Sinteza 1,3-bis(4-metoksifenoksi)propan-2-il α -D-manopiranozida	46
4.5.2.	Sinteza 1,3-bis(4-nitrofenoksi)propan-2-il α -D-manopiranozida	47
4.5.3.	Sinteza 1,3-bis(naftalen-2-iloksi)propan-2-il α -D-manopiranozida	48
4.5.4.	Sinteza 2,3-difenoksipropan-1-il α -D-manopiranozida	50
4.5.5.	Sinteza 2,3-bis(4-nitrofenoksi)propan-1-il α -D-manopiranozida	51
4.5.6.	Sinteza 2,3-bis((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-1-il α -D-manopiranozida	52
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	53
5.1.	KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV	55
5.1.1.	Zaščita hidroksilnih skupin D-manoze	55
5.1.2.	Selektivna odščita anomerne hidroksilne skupine	55
5.1.3.	Priprava trikloroacetimidata z DBU	56
5.1.4.	Priprava diarilglicerolov	56
5.1.5.	Glikozilacija	60
5.1.6.	Zemlénova metoda	60
5.2.	REZULTATI BIOLOŠKEGA VREDNOTENJA	61
6.	ZAKLJUČEK.....	68
7.	LITERATURA.....	70

POVZETEK

Kljub razvoju številnih učinkovin še vedno nimamo zdravila, ki bi v telesu uničilo virus HIV-1. V uporabi so učinkovine, ki preprečujejo njegovo razmnoževanje in na ta način prispevajo k zmanjšanju obolevnosti in smrtnosti okuženih oseb. DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) je lektin tipa C iz skupine II. Specifično se izraža na dendritičnih celicah, ki so najvplivnejše antigen predstavitvene celice, katerih ključna vloga je regulacija imunskega odziva. Na svoji površini izražajo številne receptorje, ki so sposobni prepoznati različne bakterije in viruse. Med temi receptorji je smiselno izpostaviti receptorje tipa C, preko katerih lahko v gostiteljsko celico vstopi tudi virus HIV-1. DC-SIGN prepozna virus HIV-1 in omogoči njegov vstop v gostiteljsko celico brez aktivacije imunskega sistema gostitelja. Na ta način se HIV-1 izogne normalni litični razgradnji in preslepi imunski odziv. Podoben mehanizem so zasledili tudi pri številnih drugih patogenih organizmih, zato je smiselno preprečiti interakcijo med patogenom in DC-SIGN. Antagonisti receptorja DC-SIGN so tako potencialne protivirusne in protibakterijske učinkovine, s katerimi bi lahko preprečili okužbo z različnimi patogeni (npr.: HIV-1, *Mycobacterium tuberculosis*) v njenih začetnih stopnjah. Receptor FimH prav tako uvrščamo med lektinske receptorje. Nekatere bakterije (npr. *Escherichia coli*) imajo na svoji površini izražene fimbrije tipa I, ki jim omogočajo pritrditev na specifične receptorje na membrani epiteljskih celic gostitelja. Terapija z učinkovinami, ki preprečujejo adhezijo, bi lahko bila učinkovita še posebno proti bakterijam, ki so že razvile rezistenco na protibakterijske učinkovine.

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali diarilglicerolomanozide kot nove potencialne antagoniste receptorjev DC-SIGN in FimH. Najpomembnejši strukturni element načrtovanih spojin za interakcijo z receptorjem je D-manoza, ki v vezavnem mestu tvori koordinativne vezi s Ca^{2+} in dodatne vodikove vezi z aminokislinskimi ostanki proteina. Z različnimi arilnimi substituenti na glicerolnem distančniku pa smo želeli zagotoviti ustrezne hidrofobne interakcije z aminokislinskim ostankom Phe313 v vezavnem mestu DC-SIGN. Sintetiziranim spojinam smo določili tudi njihovo aktivnost tako na lektinskem receptorju DC-SIGN kot tudi na FimH. Kljub temu da je bila osnovna ideja načrtovanje in sinteza DC-SIGN antagonistov, kažejo sintetizirane spojine boljšo aktivnost na lektinskem receptorju FimH.

ABSTRACT

Despite the development of many agents, we still do not have an agent that would destroy HIV-1 virus in a body. Active ingredients that prevent the propagation of HIV-1 and contribute to the reduction of disease rate and mortality of infected people are being used. DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-grabbing Non-integrin) is a C-type lectin from group II. It is specifically expressed on dendritic cells, which are the most powerful antigen presenting cells; their key role is to regulate immune response. Dendritic cells express a number of receptors on their surface, which are able to recognize different bacterial and viral pathogens. Among these receptors, the C-type receptors need to be mentioned, through which HIV-1 can enter the host cell. DC-SIGN recognizes HIV-1 and enables its entry into a host cell without activating the host immune system. This is how HIV-1 avoids normal lytic degradation and deludes the immune response. A similar mechanism was observed in many other pathogenic organisms, so it seems reasonable to prevent the interaction between the pathogen and DC-SIGN. Antagonists of receptor DC-SIGN are therefore potential antiviral and antibacterial agents, which could prevent infection with different pathogens (e.g. HIV, *Mycobacterium tuberculosis*) in its early stages.

FimH receptor is also placed among lectin receptors. It can be found on type I fimbriae that cover the surface of bacteria and allow them (e.g. *Escherichia coli*) to attach to specific receptors located on the membrane of epithelial host cells. Anti-adhesive therapy with FimH antagonist may be particularly effective against the bacteria that have already developed resistance to antibacterial agents.

In this dissertation we synthesized a focused library of diarylglycerolomanosides as new potential antagonists of DC-SIGN and FimH. The most important structural element of the designed compounds is a D-mannose moiety, which forms coordinative bonds with Ca^{2+} and additional hydrogen bonds with amino acid residues in the binding site. With a variety of aryl substituents on the glycerol spacer, we wanted to ensure additional hydrophobic and/or π - π interactions with the side chain of Phe313 in DC-SIGN CRD. The synthesized compounds were tested for their activity on DC-SIGN receptor as well as FimH due to their similarity to the known FimH antagonists. Despite the fact that the original idea was the design and synthesis of DC-SIGN antagonists, synthesized compounds show better activity on the FimH receptor.

SEZNAM OKRAJŠAV

APC	antigen predstavitvene celice
CLR	C-type lectin receptor – lektinski receptor tipa C
CRD	carbohydrate-recognition domain – domena za prepoznavo ogljikovih hidratov
CTLD	C-type lectin domain – domena lektinov tipa C
DBU	1,8-diazobiciklo[5.4.0]undec-7-en
DC	dendritične celice
DC-SIGN	dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin
gp120	plaščni glikoprotein, ki se nahaja na površini virusa HIV
HIV	human immunodeficiency virus – virus humane imunske pomanjkljivosti
ICAM	intercellular adhesion molecule – medcelična adhezijska molekula
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns – molekularni vzorci povezani z mikrobi
PHK	poglavitni kompleks tkivne skladnosti
PRR	pattern recognition receptor – receptor, ki prepoznava različne molekularne vzorce mikrobov
TLR	Toll-like receptor – Toll-u podobni receptor
T_H	T helper cell – celice T pomagalke
TBAB	tetrabutilamonijev bromid
TCR	T cell receptor – receptor celic T
TMSOTf	trimetilsilil trifluorometansulfonat
UPEC	uropathogenic <i>Escherichia coli</i> – uropatološka <i>Escherichia coli</i>

1. UVOD

Izraz lektini je namenjen proteinom, ki kompleksirajo ogljikove hidrate. Zgodovina lektinov sega v 19. stoletje, ko so se ukvarjali z izvlečki semen iz ricinusovega drevesa (*Ricinus communis*) in odkrili, da določene rastline vsebujejo proteine, ki omogočajo aglutinacijo eritrocitov (1).

Lektini tvorijo raznovrstno skupino monovalentnih in multivalentnih proteinov ter glikoproteinov s selektivno afiniteto za vezavo ogljikovih hidratov (2). Prisotni so v večini rastlin in nekaterih živalih. Ne povzročajo stimulacije imunskega sistema, imajo pa sposobnost vezave na protitelesa (3).

Lektini se lahko nahajajo na celični površini ali pa v topni obliki v plazmi. V notranjosti celic lahko lektine najdemo tudi v citosolu in jedru. Živalski lektini imajo pomembno vlogo tako v fizioloških kot tudi patofizioloških procesih (2). Opravljajo številne biološke funkcije, kot so znotrajcelična adhezija, odstranjevanje glikoproteinov iz seruma in prepoznavanje patogenih organizmov (4).

1.1. LEKTINI TIPA C

Lektini tipa C so transmembranski proteini, ki imajo vlogo adhezijskih celičnih receptorjev. Delujejo kot signalne molekule in prepoznavajo različne strukture ogljikovih hidratov, ki so prisotni na človeku lastnih proteinih in na proteinih patogenih organizmov. Funkcionalno so zelo raznolika skupina. Povezani so s številnimi procesi, vključno s celično adhezijo, aktivacijo krvnih ploščic, aktivacijo komplementa, prepoznavo patogenov, endocitozo in fagocitozo (2, 5).

Uvrščamo jih v družino proteinov, ki vsebujejo domeno za prepoznavo ogljikovih hidratov (carbohydrate recognition domain - CRD), oziroma natančnejše domeno lektinov tipa C (C-type lectin domain - CTLD). Gre za veliko skupino zunajceličnih proteinov z različnimi funkcijami. Glavna lastnost lektinov tipa C so Ca^{2+} ioni, ki sodelujejo pri vezavi ogljikovih hidratov na CRD. Nekateri CTLD omogočajo tudi vezavo proteinov ali glikolipidov namesto ogljikovih hidratov, vendar so tovrstni CTLD ponavadi neodvisni od Ca^{2+} ionov (6, 7). Ca^{2+} ioni so vključeni v vezavo ligandov, hkrati pa sodelujejo tudi pri ohranjanju integritete CRD, ki je nujna za aktivnost lektinov (7). Lektini imajo pomembno vlogo pri

normalnem delovanju imunskega sistema, saj posredujejo prirojeno odpornost, vnetje in odpornost na tumorje ter okužene celice (4, 8, 9).

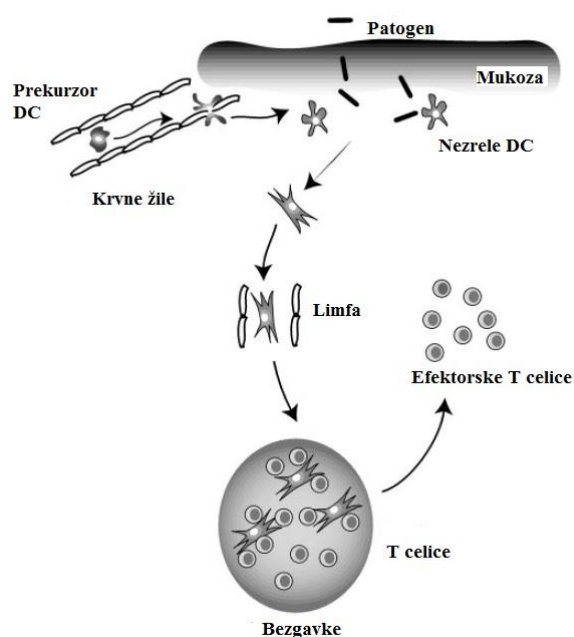
CTLD ima kompaktno globularno strukturo in je odgovorna za selektivno vezavo terminalnih delov ogljikovih hidratov. Posebna lastnost te domene so vezavna mesta za Ca^{2+} ione, ki delujejo kot most med proteinom in jedrom monosaharida, preko katerega se tvorijo interakcije s sladkornimi hidroksilnimi skupinami (10).

1.1.1. VLOGA LEKTINOV TIPA C PRI IMUNSKEM ODZIVU

Patogene organizme prepoznajo antigen predstavitvene celice (APC), kot so makrofagi ali dendritične celice (DC). Prepoznavna je ključna za določitev ustreznih efektorskih T celic, ki posredujejo imunski odziv. APC imajo na površini visoko specializirane receptorje (pattern recognition receptor - PRR), kot so receptorji lektinov tipa C (CLR) in Toll-u podobni receptorji (TLR), ki skrbijo za prepoznavo določenih vzorcev patogenov (pathogen-associated molecular patterns - PAMPs) (2).

Dendritične celice so vrsta APC, nastajajo v kostnem mozgu, kjer pride do diferenciacije izvornih celic, nato sledi migracija diferenciranih celic v kri (glej sliko 1). Nezrele DC nato iz krvi potujejo v različna tkiva, kjer so prva obramba imunskega sistema proti patogenim organizmom. Po interakciji s patogeni sledi zorenje DC in predstavitev antigenov T celicam. DC imajo tako pomembno vlogo pri razvoju specifičnega imunskega odziva (5, 11, 12).

Za učinkovit odziv efektorskih celic T proti patogenom ni zadosti samo predstavitev antigenov preko DC, ampak je potrebna tudi diferenciacija CD4^+ T celic v celice T pomagalke (T_H). Tip diferenciacije je odvisen od vrste citokinov in kostimulatornih molekul (10). T_H1 celice izločajo interferon- γ (IFN- γ), ki aktivira makrofage, ki se borijo proti znotrajceličnim mikroorganizmom. T_H2 celice izločajo interleukin 4 (IL-4), IL-5 in IL-13, ki sprožijo humoralni imunski odziv proti parazitom. T_H17 celice izločajo IL-17, kar aktivira fagocitozo v boju proti zunajceličnim glivam in bakterijam. Regulatorne T celice nadzorujejo aktivnost efektorskih T celic. DC morajo prevesti informacijo o patogenih, da pride do izločanja ustreznih citokinov, ki omogočijo diferenciacijo ustreznih T_H celic (9).

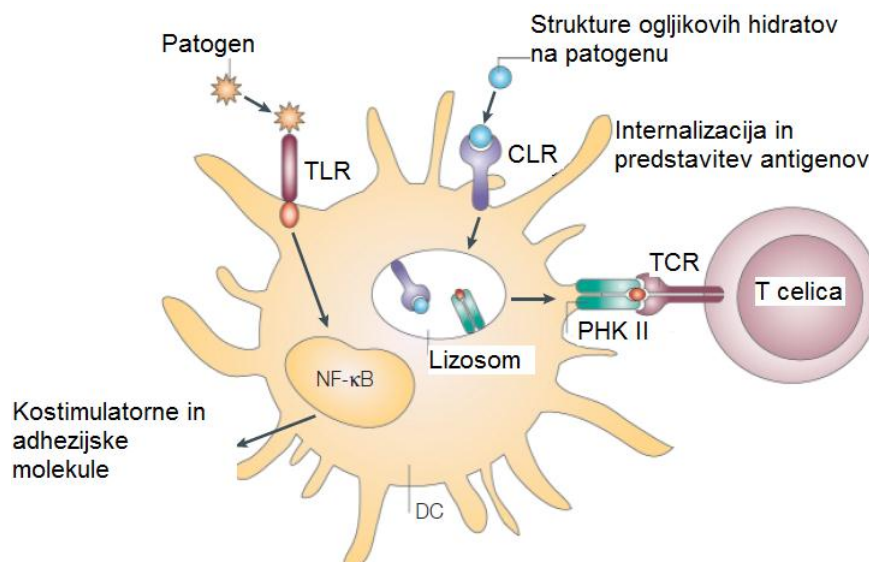


Slika 1. Vloga DC v imunskem sistemu. Prekurzorji DC potujejo iz krvi v tkiva. Pred vstopom patogene prepoznajo nezrele DC, kar vodi v zorenje in migracijo DC v limfatične organe. Naivnim T celicam antigene predstavijo zrele DC. T celice nato proliferirajo in migrirajo v tkiva, kjer opravljajo svoje efektorske naloge (povzeto po 11).

Signal za aktivacijo omogoči zorenje DC in prehod v sekundarne limfatične organe (glej sliko 1), kjer antigene predstavijo naivnim T celicam in sprožijo specifičen imunski odgovor na antigene (11, 13). DC preko molekul PHK I in PHK II (poglavitni kompleks tkivne skladnosti) antigene predstavijo celicam pomagalkam $CD4^+$ in citotoksičnim celicam $CD8^+$ (6, 9). Za aktivacijo celic pomagalk je potrebno, da je antigen prikazan na membrani APC v povezavi z molekulami PHK II.

Te specializirane celice, ki vključujejo makrofage, celice B in DC, prenesejo kostimulativni signal v celice T pomagalk, ki je potreben za njihovo aktivacijo (9).

Adhezijske molekule so ključne za interakcije DC med njihovo potjo iz kostnega mozga v kri in iz krvi v periferna tkiva ter posledično v limfatične organe. Adhezijski receptorji in kostimulativne molekule omogočajo interakcijo med naivnimi T celicami in DC. Lektini tipa C vplivajo na številne funkcije DC. Nekateri od teh lektinov se ne izražajo samo na DC, ampak tudi na makrofagih, ki sodelujejo pri aktivaciji imunskega sistema. Drugi pa so specifično izraženi na DC in vplivajo samo na funkcije slednjih (11).



Slika 2. Lektini tipa C (CLR) in Toll-u podobni receptorji (TLR): Receptorji za patogene na dendritičnih celicah (DC). Nezrele DC izražajo TLR in CLR, kar omogoča prepoznavo mikroorganizmov preko vezave specifičnih ogljikovih hidratov. TCR - receptor T celic (povzeto po 5).

Vsak TLR prepozna specifične antigene patogenov, kot so lipoproteini, lipopolisaharidi ali bakterijska DNA. TLR informacijo o patogenih prenesejo do DC preko znotrajceličnega signaliziranja. Po prepoznavi vzorcev patogenov s TLR pride do transdukcije kaskade signalov, kar vodi v aktivacijo nuklearnega faktorja- κ B (NF- κ B). Sledita izražanje kostimulatornih in adhezivskih molekul ter začetek celičnega procesa, ki vodita v indukcijo izražanja vnetnih citokinov in v zorenje DC. V nasprotju s TLR, CLR prepoznajo specifične strukture ogljikovih hidratov, ki so prisotni na celicah patogenov. Začne se proces internalizacije in procesiranja patogenov za predstavitev T celicam preko molekul PHK I in II ter razgradnjo v lizosomih (glej sliko 2) (5).

Interakcije med proteini in ogljikovimi hidrati imajo pomembno vlogo v dveh različnih pogledih imunskega odziva. Vključene so tako v prepoznavo patogenov kot tudi v celične interakcije, ki vodijo v nevtralizacijo patogenov. Lektinski receptorji sprožijo prirojen imunski odziv s prepoznavo specifičnih regij ogljikovih hidratov na površini potencialnih patogenov preko CRD (2).

Njihovo pomembnost je potrebno izpostaviti tudi zaradi dejstva, da lahko nekateri patogeni in tumorski antigeni izkoristijo te receptorje, da se izognejo znotrajcelični razgradnji in preprečijo razvoj učinkovitega imunskega odziva gostitelja (2).

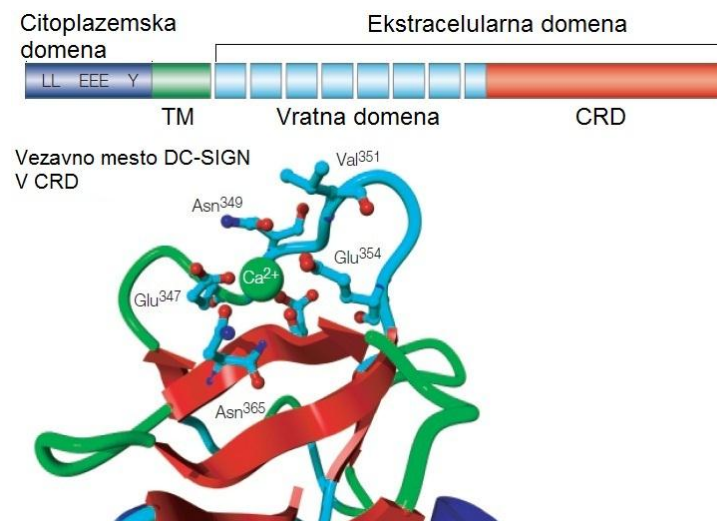
1.2. DC-SIGN

DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Non-integrin) je transmembranski protein tipa II, ki ga izražajo DC in ga glede na strukturo uvrščamo v družino lektinov tipa C (10, 11, 12, 14).

Dejstvo, da različni patogeni izkoriščajo DC-SIGN za vstop v gostitelja, izpostavlja DC-SIGN kot zanimivo terapevtsko tarčo. S pomočjo glikomimetikov, spojin, ki oponašajo biološko funkcijo ogljikovih hidratov, bi lahko preprečili vezavo patogenov na DC-SIGN in posledično tudi okužbo z njimi (4, 12).

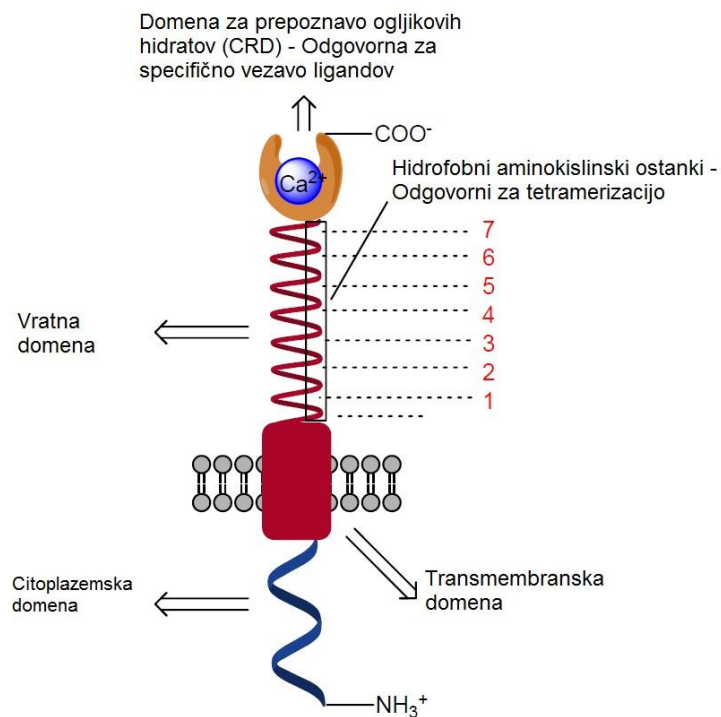
1.2.1. STRUKTURA

DC-SIGN spada v skupino lektinskih receptorjev tipa C (CLR), ki lahko vsebujejo eno ali več domen za prepoznavo ogljikovih hidratov (CRD). Družina CLR SIGN (specific ICAM-3 grabbing non-integrin) sodi v tip II CLR, ker vsebuje eno CRD, kar definira specifičnost ligandov za ta receptor. Struktura CRD DC-SIGN je globularna, vsebuje dvanajst β površin, dva α heliksa in tri disulfidne mostove. Vezavno mesto za Ca^{2+} je odgovorno za ustrezno konformacijo CRD in je najpomembnejše za tvorbo koordinativnih vezi z ogljikovimi hidrati. Štiri aminokisljine v CRD (Glu347, Asn349, Glu354 in Asn365) tvorijo interakcije s Ca^{2+} in omogočajo prepoznavo specifičnih ogljikovih hidratov (glej sliko 3). Med CRD DC-SIGN in transmembransko domeno (TM) se nahaja vratna domena oziroma vrat, ki je sestavljen iz štirih povezanih verig, od katerih je vsaka sestavljena iz sedmih zaključenih in ene nezaključene tandemske ponovitve. Na vratni domeni pride do oligomerizacije, ki je ključna za ustrezno specifičnost za ogljikove hidrate. V strukturo DC-SIGN spada tudi citoplazemska domena ali rep, ki vsebuje motive za internalizacijo in intracelularno signaliziranje - di-levcinski (LL) motiv, tri kislinske (EEE) skupke in nepopolni ITAM («immunoreceptor tyrosine - based activation motif») motiv (glej sliko 3) (5, 10).



Slika 3. Struktura DC-SIGN (povzeto po 5).

Tetramerizacija DC-SIGN, do katere pride preko povezave vratnih domen DC-SIGN, je ključna za ustrezno afiniteto vezave (glej sliko 4). Na oligomerizacijo SIGN družine CLR vpliva število heliksov v vsakem delu vratne regije. Vsaj šest ponovitev je potrebnih za tetramerizacijo, s tem pa se poveča specifičnost za večkrat ponavljajoče se enote na molekulah patogena. Na ta način se definirajo patogeni, ki jih prepozna DC-SIGN (10, 15).



Slika 4. Tetramerizacija DC-SIGN. Začne se preko povezav na vratni domeni. Ponovitve na vratni domeni so sestavljene iz ponovitev heliksov (povzeto po 10).

1.2.2. VLOGA DC-SIGN PRI IMUNSKEM ODZIVU

DC-SIGN deluje kot receptor (PRR) za prepoznavo različnih molekularnih vzorcev patogenov (PAMPs). Ko prepozna patogene, se sproži proces internalizacije in neodvisno od ostalih PRR se inducirajo znotrajcelične signalne poti (10). V lizosomih sledi razgradnja patogena in konjugacija nastalih fragmentov s PHK II, kar sproži pridobljen imunski odziv preko celic T. DC-SIGN je tudi signalna molekula, ki posreduje signaliziranje, sproženo preko TLR, kar vpliva na zorenje DC in prirojen imunski odziv (12).

DC-SIGN se veže na adhezijski molekuli ICAM-2 in ICAM-3, ki sta visoko glikozilirana glikoproteina in vsebujeta manozni tip oligosaharidov. ICAM-2 je izražen na vaskularnem in limfatičnem endoteliju. Vezava nanj usmerja potovanje DC iz perifernih tkiv do bezgavk. Vezava DC-SIGN na ICAM-3 pa sproži nespecifičen imunski odziv preko interakcije med DC in T celicami v bezgavkah. Zato je DC-SIGN glavni receptor, ki omogoča delovanje normalnih funkcij DC. Preko interakcij z manoziliranimi PAMPs pa sodeluje pri imunskem odzivu na določene patogene (10, 15).

Določeni patogeni prevzamejo nadzor nad mehanizmom zorenja DC. Preko signaliziranja DC-SIGN preprečijo zorenje DC in predstavitev antigenov T celicam. Ugotovili so, da HIV-1 vstopi v DC preko DC-SIGN. Na ta način se izogne normalni litični poti razgradnje, pobegne imunskemu odzivu gostitelja in je poleg tega direktno predstavljen T celicam. To ima za posledico popolno okužbo z virusom HIV-1 (12). Ker ta princip izkoriščajo tudi številni drugi patogeni, je preprečitev interakcije med patogenom in DC-SIGN zanimiv koncept odkrivanja in načrtovanja novih protiinfekcijskih učinkovin (12).

1.2.3. DC-SIGN KOT TERAPEVTSKA TARČA

Receptor DC-SIGN omogoča vezavo oligo- in polisaharidov, ki v svoji strukturi vsebujejo manozo ali fukozo. Iz tega izhaja načrtovanje strukturnih glikomimetikov, ki bi lahko preprečevali interakcijo DC-SIGN-patogen (15).

Po vezavi DC-SIGN s patogenom, se nastali kompleks internalizira v DC, hkrati pa tudi vpliva na imunski odziv gostitelja preko uravnavanja aktivacije drugih PRR. Številnim virusom (HIV-1) in bakterijam (*Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Leishmania*) je skupno, da izkoriščajo DC-SIGN za vstop v DC, s čimer se izognejo imunskemu sistemu gostitelja, povečata pa se tudi njihova infektivnost in preživetje znotraj gostitelja, kar povzroči kronična stanja infekcij. Imunskemu odzivu se izognejo z učinkovito manipulacijo ravnotežja T_H1/T_H2 celic. Na ta način virus HIV-1 povzroči razpršeno okužbo. Iz mukozne površine potuje v DC, kri in limfna tkiva, kjer primarno okuži $CD4^+$ T celice. Do stika z nezrelimi DC pride preko DC-SIGN in glikoproteinske ovojnice virusa HIV-1 (gp120). Sledi internalizacija v endosome, kjer v kislem okolju pride do disociacije iz DC-SIGN. Po disociaciji pride do razgradnje številnih vezanih ligandov DC-SIGN, del HIV-1 ostane vezan na DC-SIGN in tako majhna količina HIV-1, ki vstopi v DC, ostane zaščitena pred imunskim odzivom gostitelja. Ker DC-SIGN deluje tudi kot signalna molekula, HIV-1 inhibira zorenje DC, inducira pa nastajanje virusne sinapse. Opisan mehanizem izkoriščajo tudi številni drugi virusni in bakterijski patogeni. Kot pomembna terapevtska tarča se DC-SIGN kaže predvsem zato, ker deluje kot vstopna točka za številne patogene (15).

1.2.4. DC-SIGN ANTAGONISTI

Za razvoj DC-SIGN antagonistov je ključno razumevanje vezave oligosaharidov na CRD DC-SIGN. Do vezave oligosaharidov pride v vezavnem mestu za Ca^{2+} ione. Ca^{2+} ion v vezavnem mestu tvori šest koordinativnih vezi z aminokislinskimi ostanki DC-SIGN, dve dodatni koordinativni vezi pa lahko tvori z oligosaharidi. CRD domena DC-SIGN vsebuje zaporedje Glu347-Pro348-Asn349-Asn350, ki prioriteto omogoča vezavo z manozo substituiranih oligosaharidov s hidroksilnimi skupinami v ekvatorialni legi na mestu tri in štiri. Hidroksilni skupini v takem položaju omogočata tvorbo koordinativne vezi s Ca^{2+} in nastanek vodikovih vezi z omenjenimi aminokisljinami. DC-SIGN omogoča vezavo številnih monosaharidov, daleč največjo afiniteto pa ima za L-fukozo in D-manozo (15).

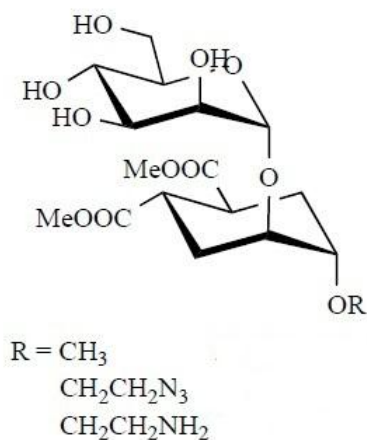
DC-SIGN antagonisti so lahko zasnovani kot monovalentni glikomimetiki, kot polivalentni ligandi, ali antagonisti, ki v strukturi ne vsebujejo ogljikovih hidratov (15). Pri preprečevanju funkcij DC-SIGN glavno težavo predstavljajo zelo šibke interakcije med monomernimi mono- in oligosaharidi ter lektini tipa C. Protein gp120 na virusu HIV-1 in številni drugi naravni ligandi DC-SIGN so visoko glikozilirani ter izkoriščajo multimerne strukture monosaharidov. Na ta način se poveča afiniteta vezave in avidnost. Tudi najmočnejši monovalentni ligandi tako zelo težko presežejo avidnost polivalentnih ligandov, kjer ena večja molekula tvori interakcije s štirimi CRD v DC-SIGN tetrameru ali celo v skupkih tetramerov (15).

Do okužb z virusom HIV-1 pride v večini primerov preko kontakta med HIV-1 in DC-SIGN na vaginalni mukozni, zato bi bilo smiselno DC-SIGN antagoniste aplicirati lokalno in na ta način preprečiti prenos HIV-1 v sistemski obtok. Trenutno še nobena terapija z DC-SIGN antagonisti ni v klinični uporabi (10, 15).

MONOVALENTNI GLIKOMIMETIKI KOT DC-SIGN ANTAGONISTI

Vezava naravnih ligandov na DC-SIGN je odvisna od prisotnosti L-fukozne ali D-manozne heksopiranozne enote. Njuni slabosti sta predvsem šibka aktivnost in slabe lastnosti kot terapevtske učinkovine, ki se lahko izboljšajo z načrtovanjem ustreznih glikomimetikov. Ta koncept se je uspešno uporabil pri načrtovanju in sintezi monovalentnih DC-SIGN antagonistov (slika 5). Beseda monovalenten pomeni spojine z nizko molekulsko maso, ki lahko na CRD DC-SIGN zasedejo samo eno mesto naenkrat.

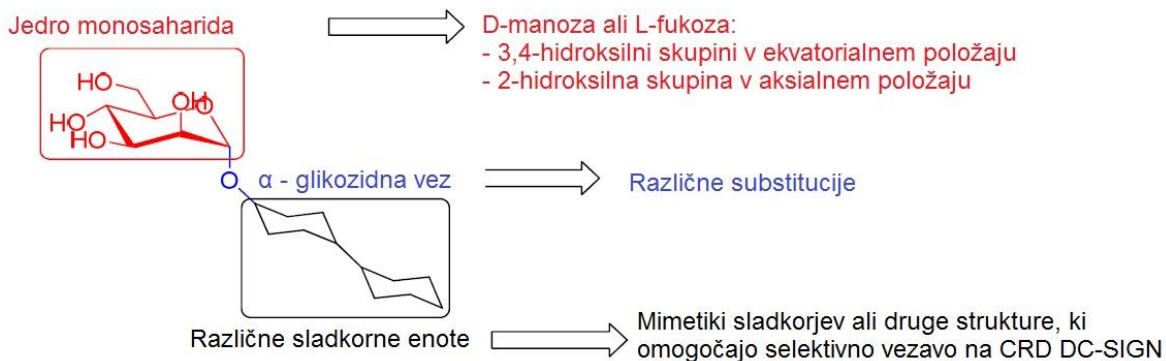
Več zanimanja se pojavlja za spojine, ki vsebujejo manozo, saj je večina naravnih ligandov DC-SIGN manoziliranih (10, 15).



Slika 5. Primer monovalentnih DC-SIGN antagonistov (povzeto po 15).

Pri sintezi monovalentnih DC-SIGN antagonistov obstaja več pristopov (glej sliko 6):

- izbira monosaharida
- izbira glikozidne vezi
- izbira substituentov, ki vplivajo na afiniteto vezave (10).



Slika 6. Shematski prikaz načrtovanja potencialnih antagonistov DC-SIGN (povzeto po 10).

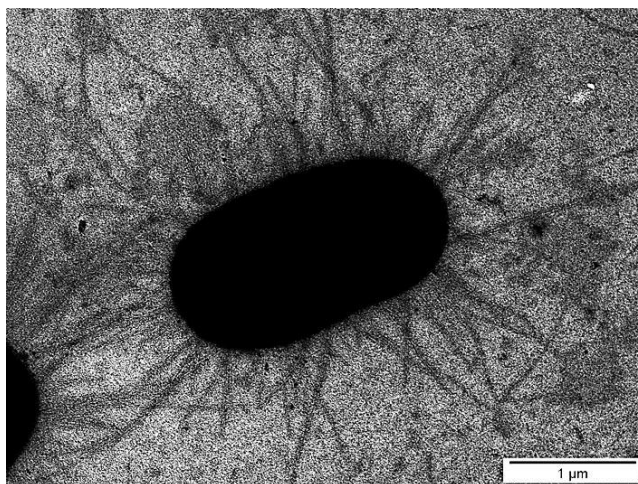
1.3. BAKTERIJSKI LEKTINI

Adhezija patogenih organizmov na gostiteljska tkiva je predpogoj za razvoj večine infekcijskih bolezni. Razvoj bolezni je v številnih sistemih povezan z lektini, ki se nahajajo na površini patogenov in omogočajo reverzibilno vezavo na komplementarne ogljikove hidrate na površini gostiteljske celice. Bakterijski lektini se nahajajo na izrastkih, ki jih imenujemo fimbrije oziroma pilusi. Poznamo več vrst fimbrij, in sicer fimbrije tipa I, ki so specifične za manozo, fimbrije P, ki so specifične za galabiozo, in fimbrije *Escherichie coli*, ki so specifične za *N*-acetilglukozamin (16).

Z adhezijo na površino celic imajo bakterije omogočeno kolonizacijo, preko katere se lahko razmnožujejo. Ker se bakterije pritrdijo na površino, jih mehanizem imunskega sistema ne more odstraniti. Za organizem so lektini virulentni dejavniki, zato predstavlja terapija z učinkovinami, ki preprečujejo adhezijo, zanimiv terapevtski pristop pri preprečevanju in zdravljenju različnih infekcijskih bolezni (16).

Okužbe urinarnega trakta so najbolj razširjene med vnetnimi boleznimi, ki jih povzročajo patogeni organizmi. Prevladujoča bakterija je *E. coli*, ki povzroča več kot 80% vseh infekcij pri zdravi populaciji ljudi. V urinarnem traktu se bakterija veže na epitelij preko fimbrij in se na ta način zaščiti pred obrambo imunskega sistema (4, 17).

FimH spada v skupino površinskih lektinov, ki so značilni za družino *Enterobacteriaceae*. Nahaja se na fimbrijah tipa I, ki so izražene na velikem številu sevov *E. coli* in jih lahko najdemo na več kot 95% sevov *E.coli*, izoliranih iz tkiv pri različnih črevesnih in zunaj črevesnih boleznih, kot so tudi infekcije urinarnega trakta (glej sliko 7). Fimbrije tipa I najdemo tudi na drugih enterobakterijskih vrstah, kot so *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* in *Salmonella enteritidis* (16, 18).



Slika 7. Slika pod elektronskim mikroskopom. Celica *E.coli* s fimbrijami tipa I. Celično površino prekriva nekaj sto adhezivnih organelov (povzeto po 1).

1.3.1. ADHEZIJA BAKTERIJ

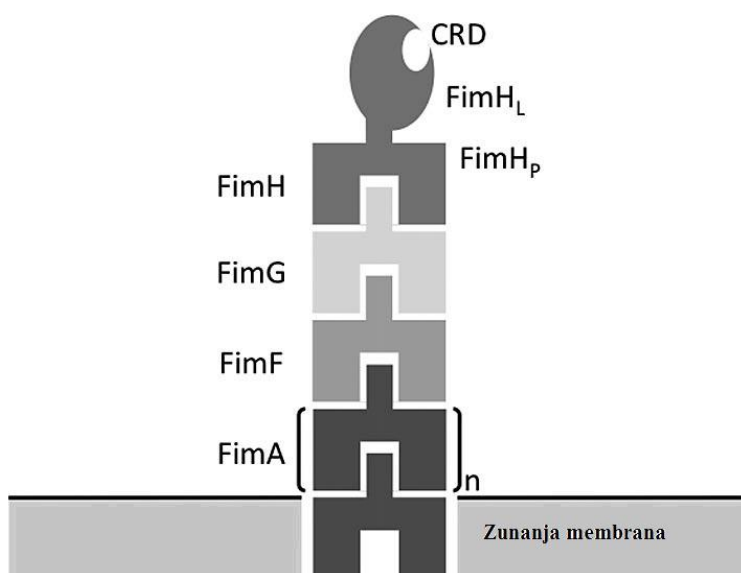
Za terapijo z učinkovinami, ki preprečujejo adhezijo, je značilno, da naj bi zmanjšala interakcije med gostiteljsko celico in patogenom s preprečevanjem reverzibilne adhezije patogenov. Z adhezijo se bakterije zaščitijo pred normalnim odstranjevalnim mehanizmom in normalnim imunskim odzivom, bakteriolitičnim encimom in protibakterijskim učinkovinam. Na ta način si tudi zagotovijo potrebna hranila in povečajo možnost za preživetje znotraj gostiteljske celice. Pritrjeno stanje je prednostno stanje za preživetje bakterij in je ključni korak pri patogenezi (19).

Bakterije se lahko prilagodijo na številne škodljive dejavnike bodisi z mutacijo, prevzemom novega genetskega materiala z vključevanjem proste DNA v njihov kromosom ali v ekstrakromosomsko plazmidno obliko (transformacija). Geni se lahko prenesejo tudi preko infekcije z bakteriofagom (transdukcija) ali preko plazmidov in konjugativnih transpozonov (konjugacija). Lahko se razvije tudi rezistenca na učinkovine, ki preprečujejo adhezijo. Učinkovine, ki preprečujejo adhezijo, ne delujejo po takšnem mehanizmu kot protibakterijske učinkovine, ki ubijejo patogene ali preprečujejo njihovo rast, zato lahko sklepamo, da bo del rezistentnih bakterij odstranjen iz gostitelja skupaj z občutljivimi bakterijami, ki jim je bila preprečena adhezija. Širjenje bakterijske rezistence na učinkovine, ki preprečujejo adhezijo, naj bi bilo veliko počasnejše kot pa razvoj bakterijske rezistence na protibakterijske učinkovine (19, 20).

Številni patogeni vsebujejo gene za več tipov adhezinov, kar je glavna slabost terapije z učinkovinami, ki preprečujejo adhezijo. Med procesom infekcije je zato prisotnih več različnih vrst adhezinov, v samem procesu adhezije pa ne sodelujejo samo interakcije med adhezinom in patogenom, ampak tudi različne hidrofobne in druge nespecifične interakcije. Za učinkovito terapijo z učinkovinami, ki preprečujejo adhezijo, bi bilo zato potrebnih več različnih spojin, ki bi specifično preprečevale interakcije različnih adhezinov, ali monomerna spojina z multiplim delovanjem, ki bi preprečevala interakcije širšemu spektru adhezinov (19).

1.3.2. STRUKTURA LEKTINA FimH

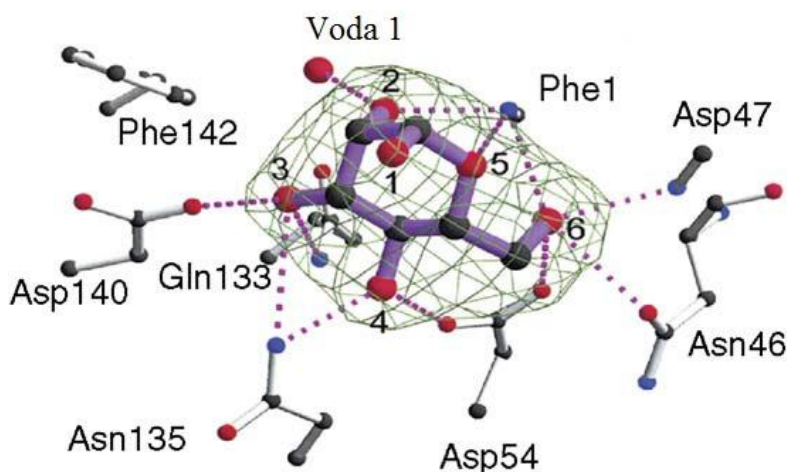
Fimbrije so dolge 1-2 μm in imajo 7 nm debela vlakna, ki so sestavljena iz ponavljajočih



Slika 8. *Struktura fimbrije tipa I.* Sestavljena je iz različnih Fim proteinov. FimH sestavljata lektinska (FimH_L) in pilin (FimH_P) domena (povzeto po 1).

se podenot imunoglobulina FimA (glej sliko 8), ki so v obliki heliksa organizirani v paličasto strukturo. Ta je povezana s kratkim 3 nm debelim vlaknom, ki ga tvorita dva adaptorska proteina, FimF in FimG, ter protein FimH, ki je edina podenota na fimbrijah tipa I z vezavnim mestom za ogljikove hidrate (CRD) in je tako odgovorna za vezavo sladkorjev na fimbrije (16, 18).

Molekulska masa receptorja FimH znaša 29 kDa in je sestavljen iz 279 aminokislinskih ostankov. FimH sestavljata dve β domeni, ki sta povezani s kratkim iztegnjenim linkerjem. Ena od teh, ki se nahaja na *N*-terminalnem delu (aminokislinski ostanki od 1 do 156), se imenuje lektinska domena. Na vrhu te domene se nahaja vezavno mesto za manozo (CRD). *C*-terminalni del (aminokislinski ostanki od 160 do 279) se imenuje pilin domena in omogoča pritrnitev na FimG podenoto fimbrijev. V kristalni strukturi FimH je samo ena CRD, nahaja se na vrhu lektinske domene. CRD FimH prepozna različne manozne oligosaharide v α konfiguraciji (1, 16, 18).



Slika 9. α -Manoza v vezavnem mestu FimH. Osem označenih aminokislinskih ostankov tvori interakcije z manozo preko vodikovih vezi in hidrofobnih interakcij. Interakcije so prikazane s črtkanimi vezmi (povzeto po 16).

Čeprav se manozna lahko nahaja v obliki α ali β anomera, je v kristalni strukturi FimH samo α anomer. Vse manozne hidroksilne skupine, razen anomerne, tvorijo interakcije z aminokislinskimi ostanki v vezavnem mestu za manozo (glej sliko 9). Asp54 tvori vodikove vezi s hidroksilnima skupinama na mestih 4 in 6, medtem ko Asn140 interagira s hidroksilnima skupinama na mestih 3 in 4. *N*-terminalna amino skupina FimH tvori vodikovo vez s hidroksilno skupino na mestih 2 in 6 ter z obročnim kisikom manoze. To je tudi eden izmed redkih primerov, ko *N*-terminalna amino skupina sodeluje pri vezavi liganda. Phe142 tvori hidrofobne interakcije z vezjo med ogljikovima atomoma C2 in C3 manoze. Za vezavo ogljikovih hidratov preko FimH so tako ključni predvsem aminokislinski ostanki Asp54, Gln133, Asn135 in Asp140 (16).

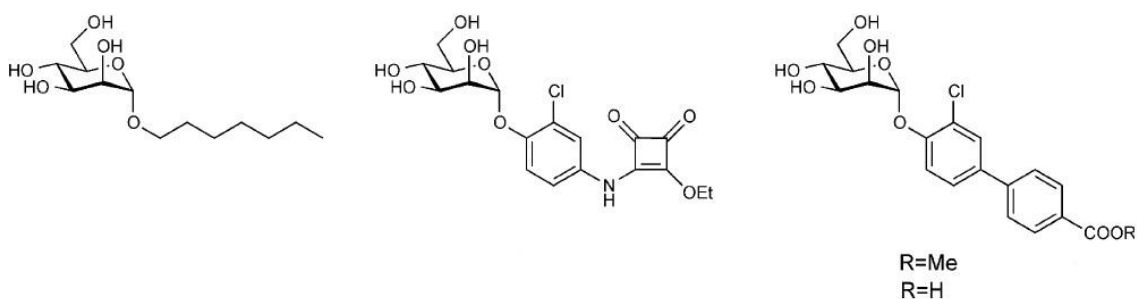
1.3.3. VLOGA IN ANTAGONISTI FimH

Glavna funkcija enterobakterijskih površinskih lektinov je adhezija organizmov na gostiteljske celice in s tem začetek okužbe. Sama pritrditev patogenov na tkiva še ne povzroči bolezni. Za razvoj bolezni so potrebni specifični odzivi, ki vodijo v infekcijo. Po adheziji sledi aktivacija tarčnih celic in nastajanje citokinov, ki spodbujajo nastanek akutnega vnetja ter drugih simptomov bolezni. Po interakciji pride znotraj bakterije do povečane regulacije signalov transdukcije (16).

Začetna bakterijska adhezija na celično površino vodi v nastanek dobro organizirane strukture, ki jo imenujemo biofilm in ima zelo ugodno strukturo za kolonizacijo mikrobov ter omogoča čvrsto in ireverzibilno pritrditev na celično površino. Preko biofilma začne nastajati koristna simbioza med mikroorganizmom in gostiteljem. Takoj, ko začne mikroorganizem vdirati v druge predele, lahko pride do vnetja, apoptoze ali nenadzorovane celične rasti. Najbolj so razširjene infekcije urinarnega trakta, kjer imajo najpomembnejšo vlogo različni sevi uropatološke *E. coli* (uropathogenic *E. coli* - UPEC) (1, 21, 23).

Infekcije urinarnega trakta se simptomatsko zdravijo s protimikrobnimi učinkovinami, vendar obstaja možnost hitrega razvoja rezistence na tovrstne učinkovine. Pogosto zdravljenje takšnih infekcij s protibakterijskimi učinkovinami postaja zahtevno zaradi omejene izbire le-teh in naraščanja rezistence *E. coli* na te učinkovine, še posebno pri sladkornih bolnikih, pri bolnikih z napakami v urinarnem traktu, paraplegikih in tistih, ki imajo trajen kateter v urinarnem traktu (22, 23).

Ker je lektinski receptor FimH odgovoren za adhezijo bakterije na gostiteljsko celico, predstavlja blokada tega lektina z ogljikovimi hidrati ali glikomimetiki nov zanimiv terapevtski pristop pri preprečevanju in zdravljenju bolezni sečil (21, 22). Pomembno vlogo pri vezavi na receptor FimH ima α -D-manoza, ki tvori številne interakcije z aminokislinskimi ostanki v CRD, zato številni znani antagonisti FimH v svoji strukturi vsebujejo D-manozo. Ker ima sama D-manoza nizko afiniteto do receptorja poskušajo jakost vezave povečati z izkoriščanjem dodatnih interakcij v vezavnem mestu CRD. Pri tem imajo pomembno vlogo tirozinska vrata, ki so sestavljena iz dveh tirozinov (Tyr48 in Tyr137) in enega izolevcina (Ile52), saj omogočajo hidrofobne interakcije s potencialnimi glikomimetiki (20).

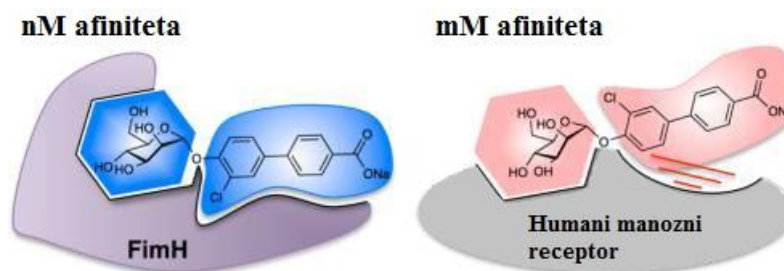


Slika 10. Alkilni in arilni α -D-manopiranozidi (povzeto po 24).

Pri načrtovanju učinkovin, ki preprečujejo adhezijo, se pojavljajo različne ideje (19): (i) analogi receptorjev; (ii) analogi adhezinov in (iii) prehranski inhibitorji adhezije.

Analogi receptorjev so primerni proti patogenom, ki se na živalske celice vežejo preko lektinov – adhezinov, ki so specifični za ogljikove hidrate. Analogi receptorjev so v tem primeru saharidi, ki so strukturno podobni ogljikovim hidratom na glikoproteinih ali glikolipidih na gostiteljski celici in delujejo kot kompetitivni antagonisti. Običajno so potrebne visoke koncentracije (mM) ogljikovih hidratov za učinkovito inhibicijo adhezije, saj je afiniteta sladkorjev za bakterijske lektine nizka. Afiniteto je mogoče povečati s pripenjanjem različnih lipofilnih substituentov na sladkor ali z vezavo večjih kopij sladkorjev na primerni nosilec (dendrimer, dendron) (19).

Vsi znani FimH antagonisti so α -D-manozidi, zato so hkrati tudi ligandi za manozne receptorje na gostiteljskih celicah (glej sliko 11). Na podlagi tega, je ključno poiskati ustrezno selektivne FimH antagoniste, ki se bodo vezali izključno na receptor FimH in ne na ostale sorodne lektine (30).



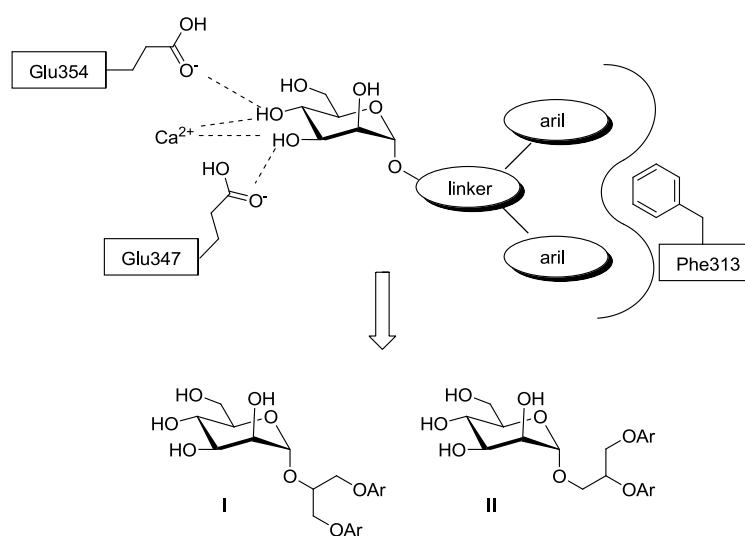
Slika 11. Prileganje potencialnih FimH antagonistov v vezavnem mestu (povzeto po 30).

Strategija za načrtovanje ustreznih analogov adhezinov izhaja iz domneve, da se izolirana molekula adhezina, aktivna spojina, ali rekombinantni fragment, lahko veže na receptor (glikoprotein ali glikolipid na gostiteljski celici) in kompetitivno prepreči adhezijo bakterij. Kljub dobri zamisli, je njihova priprava nepraktična, saj gre za makromolekule, ki so potrebne v visokih koncentracijah. Prav tako je potrebna velika previdnost v smislu toksičnosti in imunogenosti (19). Nekatere izmed najbolj učinkovitih, do sedaj identificiranih učinkovin, ki preprečujejo adhezijo, so prisotne v živilih. Živila vsebujejo tako zmesi zaviralcev kot tudi zaviralce s širokim spektrom delovanja. Kljub temu, da lahko najdemo živila, ki vsebujejo specifične zaviralce adhezije za določeni patogen, je težko sestaviti takšno dieto, ki bi vsebovala zaviralce proti točno določenemu patogenu ali celo večji skupini različnih patogenov (19).

2. NAČRT DELA

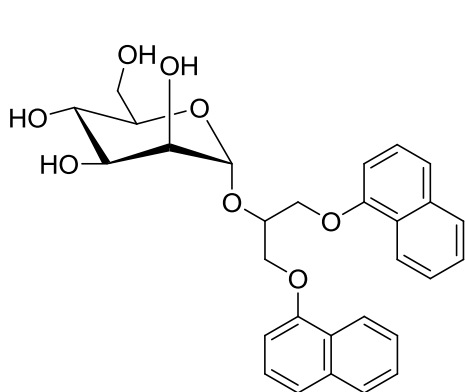
Cilj magistrske naloge bo sinteza novih glicerolomanozidov kot potencialnih antagonistov lektinskih receptorjev DC-SIGN in FimH.

Kot ključni strukturni element načrtovanih spojin bomo uporabili D-manozo, ki je osnova za vezavo Ca^{2+} v vezavnem mestu CRD DC-SIGN in prav tako omogoča vezavo v vezavnem mestu receptorja FimH. Na D-manozo bomo stereoselektivno pripeli različno substituirane diarilglicerole, s čimer želimo doseči dodatne hidrofobne in/ali π - π interakcije v vezavnem mestu (slika 12).

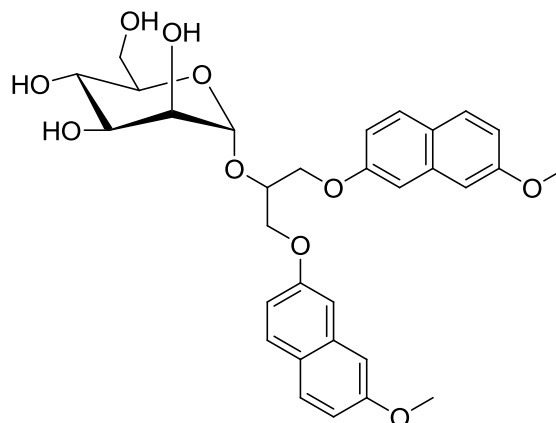


Slika 12. Shema načrtovanih potencialnih antagonistov DC-SIGN.

Tekom eksperimentalnega dela bomo tako sintetizirali manjšo knjižnico glicerolomanozidov, saj so na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani predhodno ugotovili, da imajo take spojine antagonistično aktivnost na receptoju DC-SIGN. Primer sta spojini **TSZ-15** in **TSZ-20** (slika 13), ki preprečujeta vezavo gp120 iz virusa HIV-1 na CRD DC-SIGN z IC_{50} vrednostmi v nizkem mikromolarnem območju (33). Ker so načrtovani potencialni antagonisti receptorja DC-SIGN podobni znanim antagonistom FimH, bomo ovrednotili njihovo aktivnost tudi na tem receptorju.



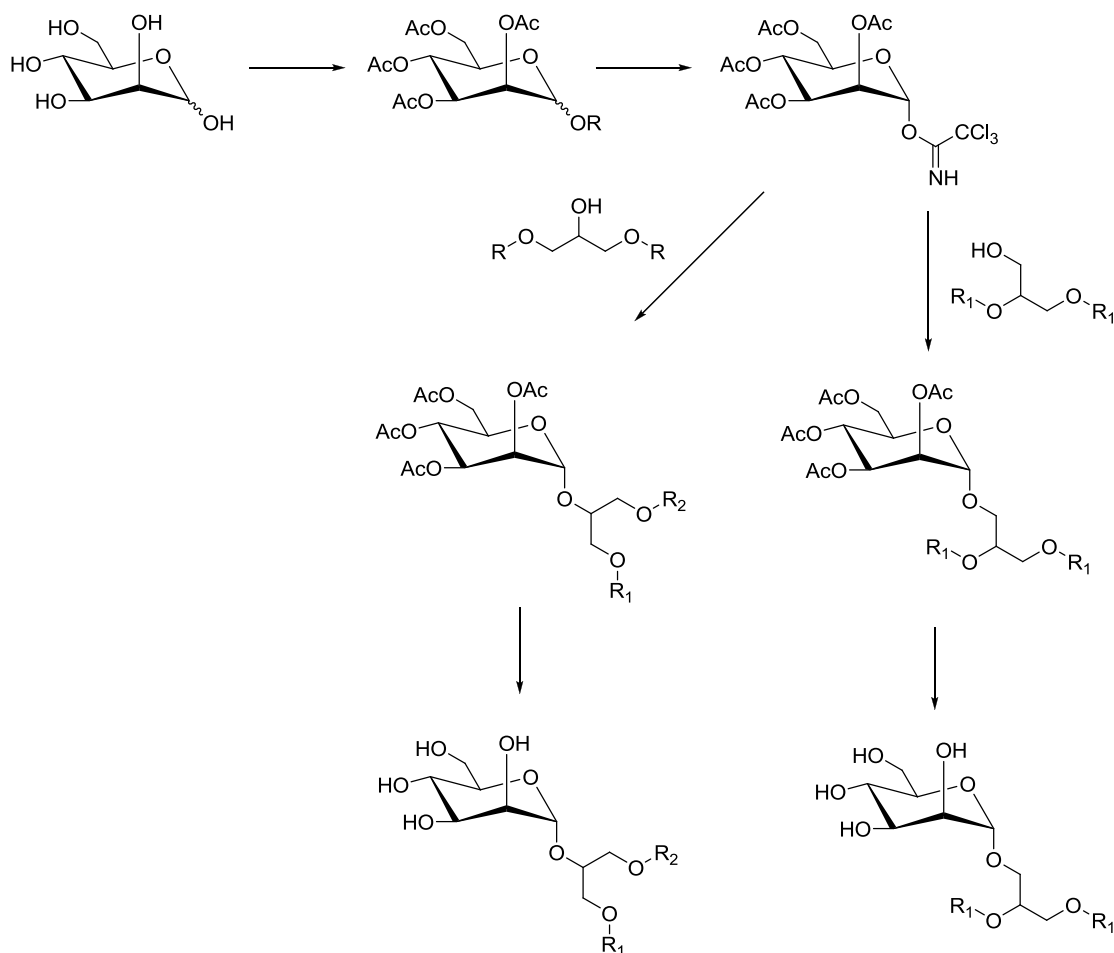
TSZ-15



TSZ-20

Slika 13. Izbrani spojini TSZ-15 in TSZ-20 (povzeto po 33).

Na D-manozo bomo uvedli različno substituirane diarilglicerole (shema 1). Zaradi petih hidroksilnih skupin v D-manozi bomo morali na začetku izvesti ustrezno zaščito, da bo glikozilacija lahko selektivno potekla na anomernem centru. Glikozilacijo bomo izvajali na anomerni hidroksilni skupini, ki bo aktivirana v obliki trikloroacetimidata. Z ustreznimi reakcijskimi pogoji bomo sintezo izvajali stereoselektivno, tako da bo nastal samo α -anomer. V drugem delu bomo pripravili različne diarilglicerole, pri čemer bomo izhajali iz različnih fenolov in naftolov kot nukleofilov ter epiklorhidrina ali 2,3-dibromopropanola kot elektrofila. Tako bomo sintetizirali različne simetrične in nesimetrične diarilglicerole, ki jih bomo pripeli na zaščiten D-manozo. V zadnji stopnji bomo odščitili preostale hidroksilne skupine po Zemplénovi metodi, tako da bomo dobili načrtovane končne spojine.



Shema 1. Splošen prikaz sinteze načrtovanih glicerolomanozidov.

Sintetizirane glicerolomanozide bomo tudi biološko ovrednotili z *in vitro* testnim sistemom za določanje antagonistov receptorjev DC-SIGN in FimH. V testnem sistemu bomo določili vrednost IC₅₀ - koncentracijo potencialnega antagonista, ki povzroči 50% inhibicijo vezave naravnega liganda gp120 iz virusa HIV-1 na DC-SIGN oziroma metil α -D-manozopiranozida na FimH. Za določitev IC₅₀ na receptorju DC-SIGN bomo uporabili testni sistem, ki ga je David Hajšek razvil tekom svojega diplomskega dela (33). Spojine bodo testirane na receptor FimH pri prof. dr. Beatu Ernstu na Institute of Molecular Pharmacy, Pharmacenter, University of Basel v Švici (22).

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. REAGENTI IN TOPILA

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Fluka, Merck, Sigma-Aldrich.

3.2. METODE

3.2.1. TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA

S tankoplastno kromatografijo (TLC) smo spremljali potek reakcije in določili ustrezno mobilno fazo za postopek čiščenja spojin s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabljali plošče Merck Silica Gel 60 F₂₅₄ z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijskem nosilcu, kot mobilno fazo pa različne zmesi organskih topil. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV lučko z valovno dolžino 254 nm ali 366 nm in orositvene reagente:

- fosfomolibdenovo kislino – oksidant za detekcijo alkoholov, ogljikovih hidratov, dolgoverižnih ogljikovodikov, alkaloidov in steroidov. Po orositvi smo kromatografsko ploščo segreli, da so se pojavile temno modre ali črne lise na rumeni podlagi.
- železove (III) soli - s fenolno hidroksilno skupino tvorijo obarvane komplekse.

3.2.2. »FLASH« KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

Flash kolonsko kromatografijo smo uporabljali za čiščenje spojin. Uporabljali smo različno velike steklene kolone, katerih velikost je bila odvisna od količine vzorca, ki smo ga čistili. Za stacionarno fazo smo uporabljali silikagel Silica Gel 60 proizvajalca Merck z velikostjo delcev med 0,040 - 0,063 mm. Uporabljali smo različne mobilne faze.

3.2.3. DOLOČEVANJE TALIŠČA

Tališča smo določali s Koflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica in so nekorrigirana.

3.2.4. MASNA SPEKTROSKOPIJA (MS)

Masni spektri so bili posneti na spektrometru Autospec (VG – Analytical) z ESI tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

3.2.5. JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA (NMR)

^1H in ^{13}C NMR spektre smo posneli na spektrometru Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v devteriranih topilih DMSO- d_6 , CDCl_3 in CD_3OD . Za reševanje spektrov smo uporabljali računalniški program MestRe-C 4.8.6. proizvajalca Mestrelab Research S. L.

3.2.6. INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA (IR)

IR spektre smo posneli na spektrofotometru Perkin Elmer 1600 FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

3.2.7. POLARIMETRIJA

Sučnost sintetiziranih spojin smo določili na polarimetru Perkin-Elmer 241 MC. Specifično sučnost smo izračunali s pomočjo spodnje enačbe, pri čemer je izmerjeni kot zasuka (α) povprečje petih meritev z integracijskim časom 5 s, l dolžina kivete in c koncentracija spojine.

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha}{l \times c}$$

3.2.8. POIMENOVANJE IN RISANJE SPOJIN

Za poimenovanje in risanje spojin smo uporabljali računalniški program ChemBioDraw Ultra 12.0 podjetja CambridgeSoft. Za iskanje sinteznih postopkov po podatkovnih bazah smo uporabljali program SciFinder Scholar.

3.2.9. BIOLOŠKO TESTIRANJE

- DC-SIGN

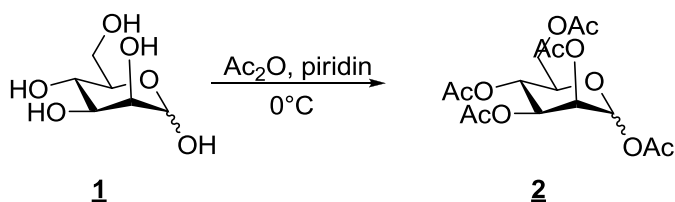
Za določitev biološke aktivnosti sintetiziranih spojin na receptorju DC-SIGN smo uporabili testni sistem, ki ga je David Hajšek razvil tekom svojega diplomskega dela. Na podlagi izmerjenih vrednosti IC_{50} smo določili afiniteto za vezavo na receptor DC-SIGN. Izmerjena vrednost IC_{50} pomeni 50% inhibicijo vezave gp120 na CRD DC-SIGN (33).

- FimH

Spojine so bile testirane na receptor FimH pri prof. dr. Beatu Ernstu na Institute of Molecular Pharmacy, Pharmacenter, University of Basel v Švici po objavljenem protokolu. Izmerjena vrednost IC_{50} pomeni 50% inhibicijo vezave metil α -D-manopiranozida na FimH (22).

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. Sinteza 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil-*D*-manopiranoze

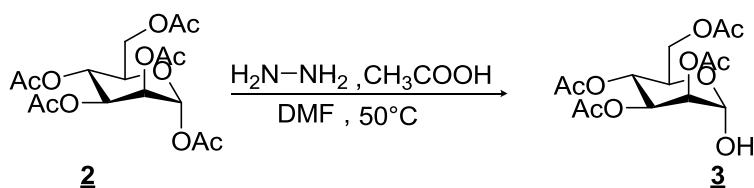


V suho bučko smo natehtali spojino **1** (4.981 g, 41.5 mmol) in jo raztopili v brezvodnem piridinu (25 mL). Na ledeni kopeli smo ohladili na 0 °C. Raztopino smo prepihali z argonom in po kapljicah dodali acetanhidrid (20 mL). Na sobni temperaturi smo pustili mešati 24 ur. Po končani reakciji smo odparili topilo pod znižanim tlakom in dodali etil acetat (100 mL). Organsko fazo smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2 x 80 mL), 1M HCl (2 x 80 mL) in z nasičeno vodno raztopino NaCl (1 x 80 mL). Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄. Raztopino smo filtrirali in pod znižanim tlakom odparili topilo. Dobili smo 12.699 g produkta **2** (Zmes α in β anomera: $\alpha/\beta = 33:67$).

1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl-*D*-manopiranoza

Elementna sestava	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	M _r = 388.37
Opis	brezbarven, oljnat produkt	
Izkoristek	79%	
R _f	0.46 (MF: heksan/etil acetat = 1:1)	
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	Signali za α-anomer δ 1.98 (s, 3H, COCH ₃), 2.03 (s, 3H, COCH ₃), 2.07 (s, 3H, COCH ₃), 2.15 (s, 3H, COCH ₃), 2.16 (s, 3H, COCH ₃), 3.79 (ddd, 1H, $J_{5,6} = 2.4$ Hz, $J_{5,6'} = 5.3$ Hz, $J_{4,5} = 9.9$ Hz, H-5), 4.11 (dd, $J_{5,6} = 2.4$ Hz, $J_{6,6'} = 12.4$ Hz, 1H, H-6), 4.28 (dd, $J_{5,6'} = 5.3$ Hz, $J_{6,6'} = 12.4$ Hz, 1H, H-6'), 5.11 (dd, $J_{2,3} = 3.3$ Hz, $J_{3,4} = 10.0$ Hz, 1H, H-3), 5.27 (t, $J_{3,4; 4,5} = 10.0$ Hz, 1H, H-4), 5.46 (dd, $J_{1,2} = 1.2$ Hz, $J_{2,3} = 3.3$ Hz, 1H, H-2), 5.84 (d, $J_{1,2} = 1.2$ Hz, 1H, H-1); Signali za β-anomer , δ 1.98 (s, 3H, COCH ₃), 2.07 (s, 3H, COCH ₃), 2.08 (s, 3H, COCH ₃), 2.15 (s, 3H, COCH ₃), 2.19 (s, 3H, COCH ₃), 3.99–4.05 (m, 1H, H-5), 4.07 (dd, $J_{5,6} = 2.4$ Hz, $J_{6,6'} = 12.4$ Hz, 1H, H-6), 4.26 (dd, $J_{5,6'} = 4.9$ Hz, $J_{6,6'} = 12.4$ Hz, 1H, H-6'), 5.23 (dd, $J_{1,2} = 2.0$ Hz, $J_{2,3} = 3.1$ Hz, 1H, H-2), 5.31–5.34 (m, 2H, H-3, H-4), 6.06 (d, $J_{1,2} = 2.0$ Hz, 1H, H-1) ppm	
IR (NaCl)	ν [cm ⁻¹] = 2991, 1740, 1434, 1368, 1207, 1147, 1086, 1048, 971, 786, 685, 600	

4.2. Sinteza 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoze

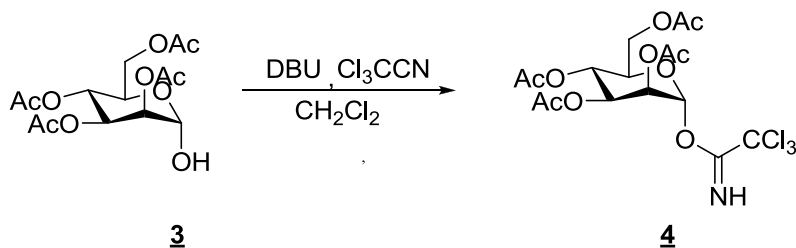


V suho bučko smo natehtali spojino **2** (11.57 g, 30.0 mmol) in jo raztopili v *N,N*-dimetilformamidu (DMF) (10 mL). Dodali smo hidrazin (3.2 mL, 35.6 mmol) in očetno kislino (2.4 mL, 41.5 mmol). Pri temperaturi 50 °C smo pustili mešati preko noči. Po končani reakciji smo odparili topilo pod znižanim tlakom in dodali destilirano vodo (50 mL). Ekstrahirali smo z etil acetatom (2 x 100 mL). Združene organske faze smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2 x 50 mL) ter z nasičeno vodno raztopino NaCl (50 mL). Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali ter pod znižanim tlakom odparili topilo. Dobili smo 2.739 g produkta **3**.

2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-manopiranoza

Elementna sestava	C ₁₄ H ₂₀ O ₁₀	M _r = 348.30
Opis	brezbarven oljnat produkt	
Izkoristek	27%	
R _f	0.30 (MF: etil acetat/heksan = 1:1)	
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 2.02 (s, 3H, COCH ₃), 2.07 (s, 3H, COCH ₃), 2.13 (s, 3H, COCH ₃), 2.19 (s, 3H, COCH ₃), 3.35 (d, 1H, <i>J</i> = 4.2 Hz, OH), 4.16 (dt, 1H, <i>J</i> _{5,6} = 2.6 Hz, <i>J</i> _{6,6'} = 4.4 Hz, H-6), 4.24-4.30 (m, 2H, H-5, H-6'), 5.27-5.35 (m, 3H, H-1, H-2, H-4), 5.45 (dd, 1H, <i>J</i> _{2,3} = 3.4 Hz, <i>J</i> _{3,4} = 10.0 Hz, H- 3) ppm	
IR(NaCl)	ν [cm ⁻¹] = 3446, 2961, 1739, 1434, 1369, 1214, 1163, 1125, 1043, 977, 907, 792, 600	

4.3. *Sinteza 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranozil trikloroacetimidata*



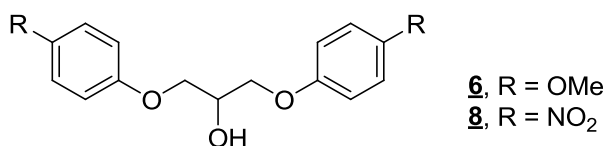
Sintezo spojine **4** smo izvedli v brezvodnih pogojih v inertni atmosferi. Pred začetkom reakcije smo pripravili brezvodni diklorometan. V bučko smo odmerili diklorometan (100 mL) in dodali kalcijev hidrid kot sušilno sredstvo. Pod refluxom smo segrevali 20 min. Suho bučko, ki smo jo predhodno prežarili in evakuirali s pomočjo membranske črpalke, smo napolnili z argonom in vanjo natehtali spojino **3** (2.739 g, 7.84 mmol). V bučko smo pod argonom destilirali brezvodni diklorometan (50 mL). V reakcijsko zmes smo dodali še trikloroacetonitril (9.43 mL, 9.4 mmol) in bazo 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en (DBU) (0.351 mL, 2.35 mmol). Na ledeni kopeli smo pustili mešati 3 h. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo in produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili heksan/etil acetat (3:1) in etil acetat/heksan (1:1). Dobili smo 2.57 g produkta **4**.

2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranozil trikloroacetimidat

Elementna sestava	$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{Cl}_3\text{NO}_{10}$	$M_r = 492.69$
Opis	rumen, oljnat produkt	
Izkoristek	62.5%	
R_f	0.42 (MF: etil acetat/heksan = 1:1)	
$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3)	δ 2.01 (s, 3H, COCH_3), 2.07 (s, 3H, COCH_3), 2.09 (s, 3H, COCH_3), 2.20 (s, 3H, COCH_3), 4.15-4.22 (m, 2H, H-5, H-6), 4.28 (dd, 1H, $J_{5,6'} = 4.7$ Hz, $J_{6,6'} = 12.0$ Hz, H-6'), 5.40-5.42 (m, 2H, H-3, H-4), 5.47-5.48 (m, 1H, H-2), 6.29 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.8$ Hz, H-1), 8.79 (s, 1H, NH) ppm	
IR (NaCl)	ν [cm^{-1}] = 3321, 2941, 1744, 1678, 1637, 1534, 1434, 1368, 1211, 1155, 1087, 1043, 973, 938, 835, 795, 643, 599, 578	

4.4. *Sinteza diarilglicerolov*

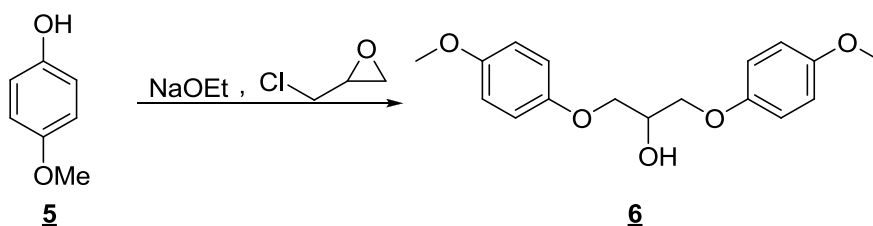
SINTEZA SIMETRIČNIH DIARILGLICEROLOV: postopek A



Sintezni postopek A

Najprej smo pripravili natrijev etanolat (NaOEt). V suho bučko smo dodali absolutni etanol (50 mL) in vanj počasi dodajali ustrezno količino elementnega natrija (20 mmol). Zaradi eksotermnosti reakcije smo bučko opremili s povratnim hladilnikom in na vrh dali balon z argonom, s čimer smo preprečili vdor zraka in s tem zračne vlage. Po končani reakciji med natrijem in etanolom smo dodali 4-metoksifenol ali 4-nitrofenol (20 mmol). Na sobni temperaturi smo mešali 15 min in dodali epiklorhidrin (10 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali pod refluxom preko noči. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in dodali 2 M NaOH (50 mL). Ekstrahirali smo z etil acetatom (2 x 50 mL). Združene organske faze smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl (1 x 50 mL) in jih posušili nad Na₂SO₄, filtrirali ter odparili topilo pod znižanim tlakom.

4.4.1. Sinteza 1,3-bis(4-metoksifenoksi)propan-2-ola

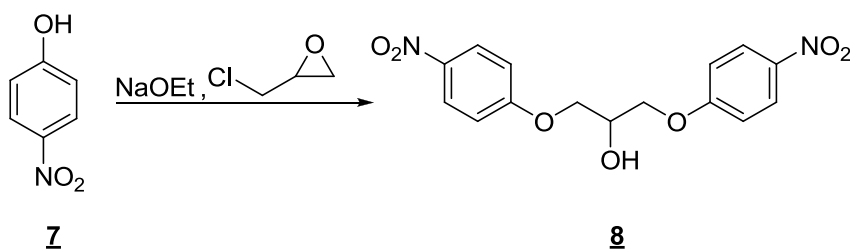


Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku A iz spojine **5** (2.48 g, 20 mmol) in epiklorhidrina (0.784 mL, 10 mmol). Rdečkasto oljnat produkt smo čistili s prekristalizacijo. Surov produkt smo raztopili v majhnem volumnu vrelega etil acetata, nato smo dodali heksan, v katerem se produkt slabše topi. Dodajali smo ga toliko časa, da je začela izpadati oborina. Nato smo ponovno segreti do vrenja in pustili, da se raztopina ohladi, pri čemer je prišlo do kristalizacije čistega produkta **6**. Oborino smo odfiltrirali s presesavanjem. Spirali smo z majhnim volumnom hladne zmesi etil acetat/hexsan (1:1). Dobili smo 0.9 g produkta **6**.

1,3-bis(4-metoksifenoksi)propan-2-ol

Elementna sestava	$C_{17}H_{20}O_5$	$M_r = 304.34$
Opis	beli kristali	
Izkoristek	14.8%	
R_f	0.34 (MF: diklorometan/metanol = 40:1)	
T_{tal}	80-82 °C	
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)	δ 3.69 (s, 6H, 2 \times CH_3), 3.94 (dd, 2H, $J_1 = 5.3$ Hz, $J_2 = 9.8$ Hz, 2 \times CH_2-H_A), 4.00 (dd, 2H, $J_1 = 5.3$ Hz, $J_2 = 9.2$ Hz, 2 \times CH_2-H_B), 4.07-4.13 (m, 1H, CH), 6.84-6.91 (m, 8H, Ar-H) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$)	δ 55.8 (2 \times OCH_3), 69.0 (2 \times CH_2), 69.5 (CH), 114.7, 115.6, 152.6, 154.2 (12 \times Ar-C) ppm	
HR-MS (ESI ⁺)	$C_{17}H_{21}O_5$ ($[M+H]^+$): izračunan 305.1389; izmerjen 305.1391	
IR(KBr)	ν [cm^{-1}] = 3576, 3004, 2947, 1628, 1609, 1516, 1466, 1445, 1389, 1253, 1211, 1166, 1119, 1030, 998, 860, 839, 630	

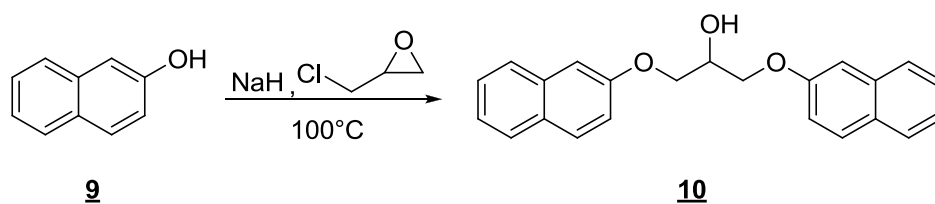
4.4.2. Sinteza 1,3-bis(4-nitrofenoksi)propan-2-ola



Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku A iz spojine **7** (2.78 g, 20 mmol) in epiklorhidrina (0.784 mL, 10 mmol). Suh produkt smo čistili s prekrystalizacijo iz zmesi heksan/etil acetata. Dobimo 0.233 g produkta **8**.

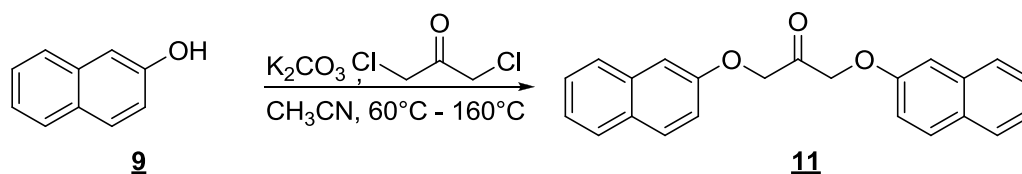
1,3-bis(4-nitrofenoksi)propan-2-ol		
Elementna sestava	$C_{15}H_{14}N_2O_7$	$M_r = 334.28$
Opis	rumeni kristali	
Izkoristek	7.0%	
R_f	0.44 (MF: diklorometan/metanol = 40:1)	
T_{tal}	122-123 °C	
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 4.18-4.72 (m, 5H, CH, 2 \times CH $_2$), 5.63 (d, 1H, $J = 4.6$ Hz, OH), 7.18-7.22 (m, 4H, Ar-H), 8.20-8.24 (m, 4H, Ar-H) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl $_3$)	δ 68.3 (2 \times CH $_2$), 69.2 (CH), 114.6, 126.0, 142.1, 163.1 (12 \times Ar-C) ppm	
HR-MS (ESI $^+$)	$C_{15}H_{15}N_2O_7$ ($[M+H]^+$): izračunan 335.0879; izmerjen 335.0880	
IR(KBr)	ν [cm^{-1}]= 3572, 3115, 1610, 1592, 1509, 1466, 1337, 1301, 1258, 1174, 1027, 942, 848, 751, 690, 668, 652, 629	

4.4.3. Poskus sinteze 1,3-bis(naftalen-2-iloksi)propan-2-ola



Natehtali smo spojino **9** (2.024 g, 14 mmol) in jo raztopili v DMF (15 mL). Reakcijsko zmes smo ohladili na 0 °C in prepihali z argonom. Nato smo dodali NaH (0.59 g, 14.74 mmol). Na ledeni kopeli smo mešali 15 min, nato smo dodali epiklorhidrin (0.550 mL, 7 mmol). Pri temperaturi 100 °C smo mešali preko noči. Reakcijski zmesi smo odparili topilo pod znižanim tlakom in preostanku dodali etil acetat (50 mL). Organsko fazo smo spirali z 10% citrsko kislino (2 x 50 mL). Ker je nastala emulzija smo dodali nasičeno vodno raztopino NaCl (10 mL). Organsko fazo smo nato sprali še z 2M NaOH (2 x 50 mL). Želenelega produkta nismo uspeli izolirati.

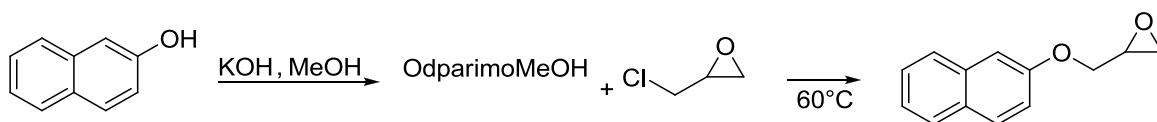
4.4.4. Poskus sinteze 1,3-bis(2-naftoksi)propan-2-ona



Natehtali smo 1,3-dikloroaceton (0.577 g, 4.5 mmol) in ga raztopili v acetonitrilu (CH₃CN) (50 mL). Nato smo dodali K₂CO₃ (6.21 g, 0.045 mol) in spojino **9** (1.44 g, 10 mmol). Pri temperaturi 60 °C smo mešali preko noči. Reakcija ni potekla.

Enak postopek, z manjšimi količinami, smo ponovili v mikrovalovnem reaktorju pri temperaturah 100 °C, 120 °C, 140 °C in 160 °C, kjer smo vsako reakcijsko zmes mešali 20 min. Reakcija prav tako ni potekla.

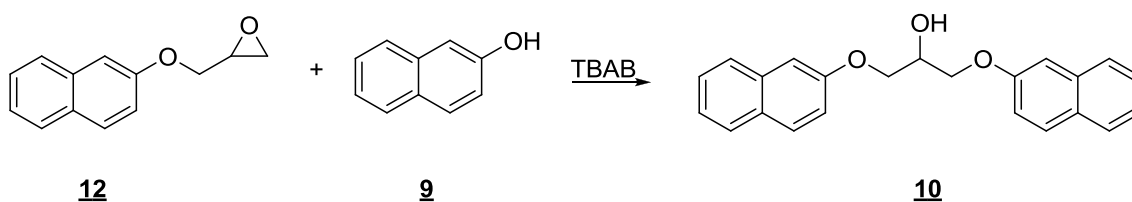
4.4.5. Sinteza 2-((naftalen-2-iloksi)metil)oksirana (31)

**9****12**

Natehtali smo spojino **9** (1.8 g, 12.5 mmol) in KOH (0.701 g, 12.5 mmol) ter ju raztopili v metanolu (15 mL). Ko se je KOH popolnoma raztopil, smo takoj do suhega odparili topilo pod znižanim tlakom. Oljno kopel smo segreli na 60 °C in nastali kalijevi soli 2-naftola dodali epiklorhidrin (9.8 mL, 125 mmol). Pri tej temperaturi smo mešali 30 min. Nato smo v reakcijsko zmes dodali nasičeno vodno raztopino NaCl (50 mL) in ekstrahirali z diklorometanom (2 x 50 mL). Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s flash kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili etil acetat/heksan (1:2). Dobili smo 1.176 g produkta **12**.

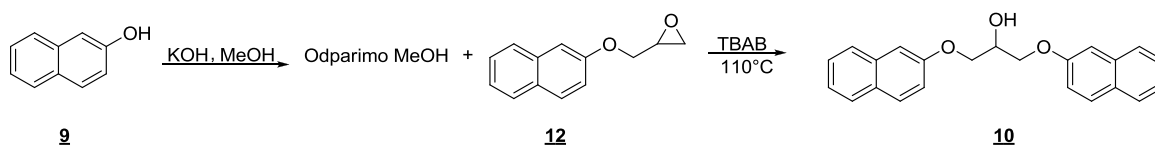
2-((naftalen-2-iloksi)metil)oksiran

Elementna sestava	C ₁₃ H ₁₂ O ₂	M _r = 200.23
Opis	beli kristali	
Izkoristek	47%	
R _f	0.18 (MF: etil acetat/heksan = 1:2)	
T _{tal}	nad 300 °C	
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 2.84 (dd, 1H, J ₁ = 2.7 Hz, J ₂ = 4.9 Hz, oksiranska CH ₂ -H _A), 2.98 (dd, 1H, J ₁ = 4.2 Hz, J ₂ = 4.9 Hz, oksiranska CH ₂ -H _B), 3.44-3.48 (tdd, 1H, J ₁ = 2.7 Hz, J ₂ = 3.1 Hz, J ₃ = 4.1 Hz, J ₄ = 5.8 Hz, CH), 4.10 (dd, 1H, J ₁ = 5.7 Hz, J ₂ = 11.0 Hz, OCH ₂ -H _A), 4.37 (dd, 1H, J ₁ = 3.1 Hz, J ₂ = 11.0 Hz, OCH ₂ -H _B), 7.17 (d, 1H, J = 2.5 Hz, Ar-H), 7.22 (dd, 1H, J ₁ = 2.6 Hz, J ₂ = 8.9 Hz, Ar-H), 7.38 (ddd, 1H, J ₁ = 1.2 Hz, J ₂ = 6.8 Hz, J ₃ = 8.1 Hz, Ar-H), 7.47 (ddd, 1H, J ₁ = 1.2 Hz, J ₂ = 6.8 Hz, J ₃ = 8.2 Hz, Ar-H), 7.74-7.81 (m, 3H, Ar-H) ppm	
¹³ C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ 44.8, 50.1 (CH, CH ₂), 68.7 (CH ₂), 106.8, 118.8, 123.8, 126.4, 126.8, 127.7, 129.1, 129.5, 134.4, 156.4 (12 × Ar-C) ppm	
IR(KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3388, 3057, 1684, 1628, 1599, 1558, 1509, 1389, 1354, 1256, 1216, 1181, 1118, 1031, 971, 838, 743, 681	

4.4.6. Poskus sinteze 1,3-bis(naftalen-2-iloksi)propan-2-ola (31)

Natehtali smo spojino **12** (0.501 g, 2.5 mmol) in spojino **9** (0.216 g, 1.5 mmol) ter ju raztopili v toluenu (10 mL). Pod refluxom pri temperaturi 110 °C smo pustili mešati 2.5 ure. Reakcija v tem času ni potekla, zato smo pustili še 48 ur pri istih pogojih. Po 48 urah smo reakcijski zmesi pod nižanim tlakom odparili topilo. Preostanku smo dodali etil acetat (50 mL). Organsko fazo smo spirali z 2M NaOH (2 x 50 mL) in z nasičeno vodno raztopino NaCl (50 mL). Reakcija ni potekla.

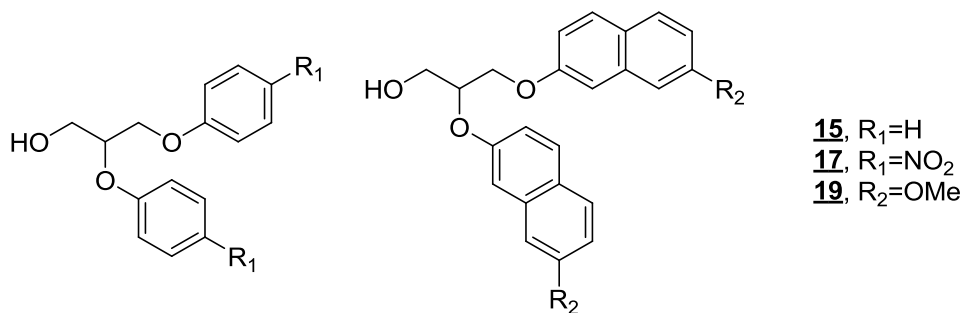
4.4.7. Sinteza 1,3-bis(naftalen-2-iloksi)propan-2-ola



Natehtali smo spojino **9** (0.498 g, 3.45 mmol) in KOH (0.194 g, 3.45 mmol) ter ju raztopili v metanolu (20 mL). Ko se je KOH popolnoma raztopil smo takoj do suhega odparili topilo. K nastali kalijevi soli 2-naftola smo dodali spojino **12** (0.536 g, 2.68 mmol) in ju raztopili v toluenu (20 mL). Nato smo dodali še tetrabutilamonijev bromid (TBAB) (0.093 g, 0.288 mmol). Pri temperaturi 110 °C smo mešali 48 ur. Reakcijski zmesi smo nato odparili topilo pod znižanim tlakom in preostanku dodali etil acetat (50 mL). Organsko fazo smo spirali z 1 M NaOH (2 x 50 mL) in z nasičeno vodno raztopino NaCl (50 mL). Organski fazi smo nato pod znižanim tlakom odparili topilo in produkt očistili s flash kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili etil acetat/heksan (1:4). Dobili smo 0.662 g produkta **10**.

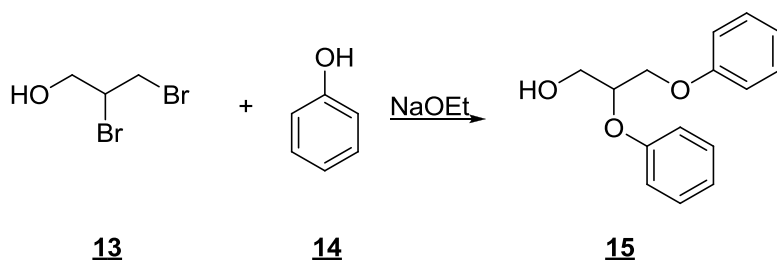
1,3-bis(naftalen-2-iloksi)propan-2-ol

Elementna sestava	$\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{O}_3$	$M_r = 344.40$
Opis	rjavi/beli kristali	
Izkoristek	56%	
R_f	0.54 (MF: etil acetat/heksan = 1:1)	
T_{tal}	97-98 °C	
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ 4.33-4.40 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 4.55-4.59 (m, 1H, CH), 7.21-7.243 (m, 4H, Ar-H), 7.36-7.40 (m, 2H, Ar-H), 7.46-7.50 (m, 2H, Ar-H), 7.72-7.82 (m, 6H, Ar-H) ppm;	
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3)	δ 68.8 ($2 \times \text{CH}_2$), 77.2 (CH), 106.9, 118.7, 123.9, 126.5, 126.8, 127.7, 129.2, 129.6, 134.4, 156.4 ($20 \times \text{Ar-C}$) ppm	
IR (KBr)	ν [cm^{-1}] = 3448, 3056, 2913, 2877, 1627, 1598, 1508, 1462, 1389, 1352, 1254, 1214, 1178, 1118, 1032, 959, 837, 809, 740, 623	

SINTEZA NESIMETRIČNIH DIARILGLICEROLOV: postopek B**Sintezni postopek B**

Najprej smo pripravili natrijev etanolat (NaOEt). V suho bučko smo dodali absolutni etanol (50 mL) in vanj počasi dodajali ustrezno količino elementnega natrija (20 mmol). Zaradi eksotermnosti reakcije smo bučko opremili s povratnim hladilnikom in na vrh dali balon z argonom, s čimer smo preprečili vdor zraka in s tem zračne vlage. Po končani reakciji med natrijem in etanolom smo dodali fenol, 4-nitrofenol ali 7-metoksi-2-naftol (20 mmol). Na sobni temperaturi smo mešali 15 min in dodali 2,3-dibromopropan-1-ol (10 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali pod refluxom preko noči. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in preostanku dodali 2 M NaOH (50 mL) ter ekstrahirali z etil acetatom (2 x 50 mL). Združene organske faze smo spirali z nasičeno vodno raztopino NaCl (1 x 50 mL), posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom.

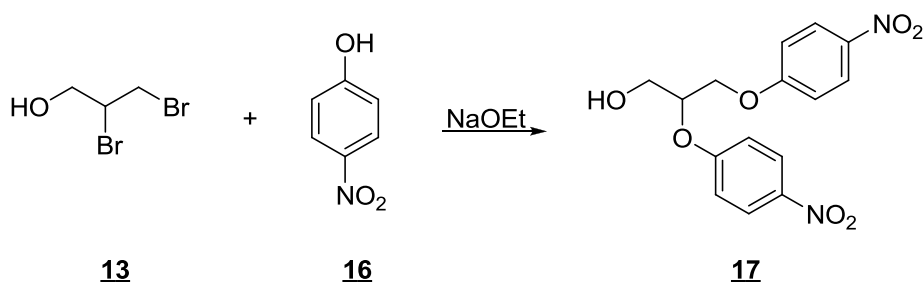
4.4.8. Sinteza 2,3-difenoksipropan-1-ola



Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku B iz spojin **14** (1.88 g, 20 mmol) in **13** (1.03 mL, 10 mmol). Produkt smo čistili s flash kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili diklorometan/metanol (70:1). Dobili smo 1.187 g spojine **15**.

2,3-difenoksipropan-1-ol		
Elementna sestava	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$	$M_r = 244.29$
Opis	beli kristali	
Izkoristek	48.6%	
R_f	0.41 (MF: diklorometan/metanol = 50:1)	
T_{tal}	80-82°C	
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ 2.66 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, OH), 4.15-4.23 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 4.40-4.47 (m, 1H, CH), 6.96-7.03 (m, 6H, Ar-H), 7.29-7.35 (m, 4H, Ar-H) ppm	
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3)	δ 68.7 ($2 \times \text{CH}_2$), 68.8 (CH), 114.6, 121.3, 129.6, 158.4 ($12 \times \text{Ar-C}$) ppm	
HR-MS (ESI ⁺)	$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): izračunan 245.1178; izmerjen 245.1173	
IR (KBr)	ν [cm^{-1}] = 3515, 3058, 2944, 1598, 15087, 1497, 1456, 1443, 1322, 1294, 1244, 1175, 1117, 1084, 1058, 1035, 1013, 992, 904, 828, 815, 755, 691, 637, 575, 541, 509	

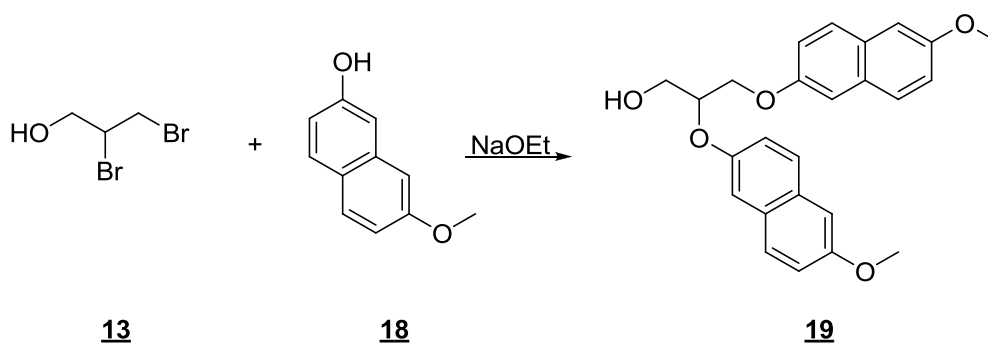
4.4.9. Sinteza 2,3-bis(4-nitrofenoksi)propan-1-ola



Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku B iz spojine **16** (2.780 g, 20 mmol) in spojine **13** (1.03 mL, 10 mmol). Produkt smo prekristalizirali iz zmesi etil acetat/heksan. Dobili smo 1.543 g spojine **17**.

2,3-bis(4-nitrofenoksi)propan-1-ol		
Elementna sestava	$C_{15}H_{14}N_2O_7$	$M_r = 334.28$
Opis	beli kristali	
Izkoristek	44.8%	
R_f	0.21 (MF: diklorometan/metanol = 50:1)	
T_{tal}	135-136°C	
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)	δ 2.69 (s, 1H, OH), 4.29 (dd, 2H, $J_1 = 5.0$ Hz, $J_2 = 8.9$ Hz, $2 \times CH_2-H_A$), 4.32 (dd, 2H, $J_1 = 4.0$ Hz, $J_2 = 8.9$ Hz, $2 \times CH_2-H_B$), 4.50-4.54 (m, 1H, CH), 7.02-7.06 (m, 4H, Ar-H), 8.23-8.27 (m, 4H, Ar-H) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$)	δ 66.2 ($2 \times CH_2$), 68.5 (CH), 113.6, 124.7, 140.3, 162.6 ($12 \times Ar-C$) ppm	
HR-MS (ESI ⁺)	$C_{15}H_{15}N_2O_7$ ($[M+H]^+$): izračunan 335.0879; izmerjen 335.0874	
IR(KBr)	ν [cm^{-1}] = 3513, 3111, 2936, 1607, 1590, 1506, 1449, 1340, 1299, 1259, 1173, 1112, 1048, 1032, 948, 900, 865, 838, 753, 698, 690, 656, 632, 592	

4.4.10. Sinteza 2,3-bis((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-1-ola

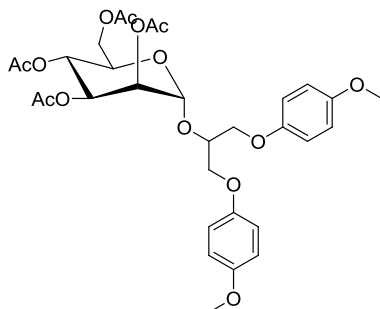


Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku B iz spojine **18** (3.48 g, 20 mmol) in spojine **13** (1.03 mL, 10 mmol). Nastalo oborino v organski fazi smo odfiltrirali s presesavanjem, nato smo matičnici odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo prekrystalizirali. Dodali smo majhno količino etil acetata in segrevali do vrenja. Pustili smo, da se je raztopina ohladila na sobno temperaturo in pustili v hladilniku, da je izpadla oborina. Nastalo oborino smo odfiltrirali s presesavanjem. Spirali smo z zmesjo etil acetat/heksan (1:4). Dobili smo 1.844 g spojine **19**.

2,3-bis((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-1-ol

Elementna sestava	$C_{25}H_{24}O_5$	$M_r = 404.46$
Opis	beli kristali	
Izkoristek	45.6%	
R_f	0.36 (MF: diklorometan/metanol = 40:1)	
T_{tal}	147-149°C	
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 3.84 (s, 6H, 2 \times OCH ₃), 4.19 (dd, 2H, $J_1 = 5.8$ Hz, $J_2 = 9.9$ Hz, 2 \times CH ₂ -H _A), 4.24 (dd, 2H, $J_1 = 4.7$ Hz, $J_2 = 9.9$ Hz, 2 \times CH ₂ -H _B), 4.29-4.34 (m, 1H, CH), 5.54 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, OH), 6.99 (dd, 2H, $J_1 = 2.6$ Hz, $J_2 = 8.9$ Hz, Ar-H), 7.04 (dd, 2H, $J_1 = 2.6$ Hz, $J_2 = 8.9$ Hz, Ar-H), 7.23 (d, 2H, $J = 2.5$ Hz, Ar-H), 7.29 (d, 2H, $J = 2.5$ Hz, Ar-H), 7.72 (d, 2H, $J = 5.0$ Hz, Ar-H), 7.75 (d, 2H, $J = 5.0$ Hz, Ar-H) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ 55.3 (2 \times OCH ₃), 68.8 (CH, 2 \times CH ₂), 105.3, 106.5, 116.0, 116.4, 124.5, 129.2, 129.3, 135.8, 157.0, 158.3 (20 \times Ar-C) ppm	
HR-MS (ESI ⁺)	$C_{25}H_{25}O_5$ ([M+H] ⁺): izračunan 405.1702; izmerjen 405.1699	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] 3576, 3004, 2947, 1628, 1609, 1516, 1466, 1445, 1389, 1254, 1226, 1187, 1166, 1120, 1039, 998, 860, 839, 816, 629	

4.4.11. Sinteza 1,3-bis(4-metoksifenoksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranozida

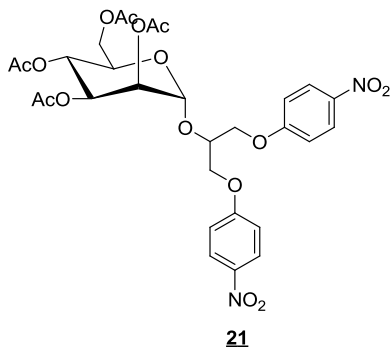
**20**

Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku C iz spojine **6** (0.350 g, 1.15 mmol) in spojine **4** (0.5 g, 0.96 mmol). Produkt smo očistili s flash kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili etil acetat/heksan (1:2). Dobili smo 0.244 g spojine **20**.

1,3-bis(4-metoksifenoksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranozid

Elementna sestava	$C_{31}H_{38}O_{14}$	$M_r = 634.63$
Opis	rumen, oljnat produkt	
Izkoristek	33.4%	
R_f	0.13 (MF: etil acetat/heksan = 1:2)	
Sučnost	$[\alpha]_D +35.9$ (<i>c</i> 0.20, MeOH)	
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1.94 (s, 3H, COCH ₃), 1.97 (s, 3H, COCH ₃), 2.02 (s, 3H, COCH ₃), 2.13 (s, 3H, COCH ₃), 3.70 (s, 6H, 2 × OCH ₃), 3.98 (dd, 1H, $J_{5,6} = 2.6$ Hz, $J_{6,6'} = 12.2$ Hz, H-6), 4.09-4.24 (m, 6H, CH ₂ CHCH ₂ , H-5, H-6'), 4.29-4.34 (m, 1H, CH ₂ CHCH ₂), 5.09-5.17 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 5.24 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.1$ Hz, H-1), 6.85-6.94 (m, 8H, Ar-H) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ 20.7, 21.0 (4 × COCH ₃), 55.7 (2 × OCH ₃), 62.3 (C-6), 66.0 (C-4), 68.1, 68.3 (2 × CH ₂), 68.7 (C-2), 69.0 (C-3), 69.7 (C-5), 75.2 (CH), 97.3 (C-1), 114.7, 114.8, 115.4, 115.7, 152.4, 152.5, 154.2, 154.3 (12 × Ar-C), 169.8, 169.9, 170.0, 170.7 (4 × CO) ppm	
HR-MS (ESI ⁺)	$C_{31}H_{39}O_{14}$ ($[M+H]^+$): izračunan 635.2340; izmerjen 635.2352	
IR (NaCl)	ν [cm ⁻¹] = 3349, 2974, 1756, 1508, 1379, 1231, 1089, 1049, 881	

4.4.12. Sinteza 1,3-bis(4-nitrofenoksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranozida

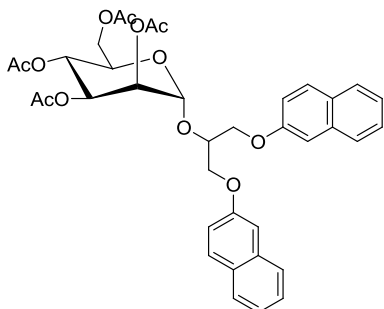


Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku C iz spojine **8** (0.200 g, 0.60 mmol) in spojine **4** (0.284 g, 0.54 mmol). Produkt smo očistili s flash kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili etil acetat/heksan (1:2). Dobimo 0.260 g spojine **21**.

1,3-bis(4-nitrofenoksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranozid

Elementna sestava	$C_{29}H_{32}N_2O_{16}$	$M_r = 664.57$
Opis	beli kristali	
Izkoristek	72.0%	
R_f	0.46(MF: etil acetat:heksan = 1:1)	
Sučnost	$[\alpha]_D +28.0$ (<i>c</i> 0.23, MeOH)	
T_{tal}	110-111°C	
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1.92 (s, 3H, COCH ₃), 1.98 (s, 3H, COCH ₃), 2.01 (s, 3H, COCH ₃), 2.12 (s, 3H, COCH ₃), 3.99 (dd, 1H, $J_{5,6} = 2.6$ Hz, $J_{6,6'} = 12.2$ Hz, H-6), 4.13-4.17 (m, 2H, H-5, H-6'), 4.41-4.49 (m, 5H, CH ₂ CHCH ₂ , CH ₂ CHCH ₂), 5.05 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3.4$ Hz, $J_{3,4} = 10.2$ Hz, H-3), 5.09-5.12 (m, 2H, H-2, H-4), 5.29 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.7$ Hz, H-1), 7.22-7.24 (m, 4H, Ar-H), 8.21-8.26 (m, 4H, Ar-H) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ 20.7, 20.8, 20.9 (4 × COCH ₃), 62.4 (C-6), 66.0 (C-4), 67.5, 67.9 (2 × CH ₂), 68.6 (C-3), 69.1 (C-2), 69.6 (C-5), 74.5 (CH), 97.4 (C-1), 114.5, 114.7, 126.0, 126.1, 142.2, 162.9 (12 × Ar-C), 169.7, 170.0, 170.1, 170.6 (4 × CO) ppm	
HR-MS (ESI ⁺)	$C_{29}H_{32}N_2O_{16}Na$ ($[M+Na]^+$): izračunan 687.1650; izmerjen 687.1652	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3375, 2938, 1756, 1594, 1508, 1457, 1369, 1340, 1256, 1175, 1113, 1041, 1011, 979, 862, 848, 754, 692, 676, 650	

4.4.13. Sinteza 1,3-bis(naftalen-2-iloksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranozida

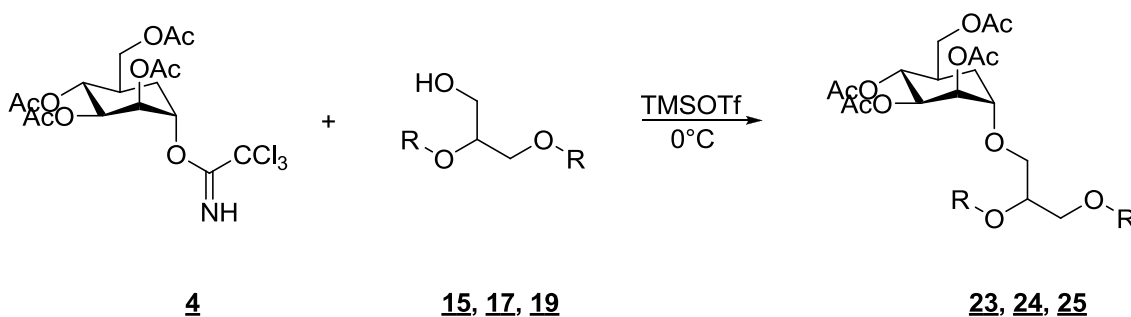
**22**

Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku C iz spojine **10** (0.316 g, 0.92 mmol) in spojine **4** (0.400 g, 0.77 mmol). Produkt smo očistili s flash kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili etil acetat/heksan (1:2). Dobili smo 0.300 g spojine **22**.

1,3-bis(naftalen-2-iloksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranozid

Elementna sestava	$C_{37}H_{38}O_{12}$	$M_r = 674.69$
Opis	beli kristali	
Izkoristek	58.0%	
R_f	0.20 (MF: etil acetat:heksan = 1:2)	
Sučnost	$[\alpha]_D +26.6$ (c 0.23, MeOH)	
T_{tal}	68-70°C	
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)	δ 2.02 (s, 3H, $COCH_3$), 2.04 (s, 6H, $2 \times COCH_3$), 2.21 (s, 3H, $COCH_3$), 4.10 (dd, 1H, $J_{5,6} = 2.1$ Hz, $J_{6,6'} = 12.1$ Hz, H-6), 4.32-4.42 (m, 6H, H-5, H-6', CH_2CHCH_2), 4.60-4.65 (m, 1H, CH_2CHCH_2), 5.30 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.7$ Hz, H-1), 5.33-5.38 (m, 2H, H-2, H-4), 5.43 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3.3$ Hz, $J_{3,4} = 10.0$ Hz, H-3), 7.16-7.24 (m, 4H, Ar-H), 7.36-7.41 (m, 2H, Ar-H), 7.46-7.50 (m, 2H, Ar-H), 7.76-7.82 (m, 6H, Ar-H) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$)	δ 20.7, 20.8, 21.0 ($4 \times COCH_3$), 62.4 (C-6), 66.0 (C-4), 67.3, 67.7 ($2 \times CH_2$), 68.9 (C-3), 69.0 (C-2), 69.7 (C-5), 74.9 (CH), 97.4 (C-1), 106.8, 106.9, 118.5, 118.7, 123.9, 124.0, 126.5, 126.6, 126.9, 127.7, 129.2, 129.3, 129.7, 129.8, 134.4, 134.5, 156.2, 156.3 ($20 \times Ar-C$), 169.8, 170.0, 170.1, 170.7 ($4 \times CO$) ppm	
HR-MS (ESI ⁺)	$C_{37}H_{39}O_{12}$ ($[M+H]^+$): izračunan 675.2442; izmerjen 675.2432	
IR (KBr)	ν [cm^{-1}] = 2936, 1742, 1629, 1600, 1510, 1465, 1389, 1213, 1181, 1136, 1039, 979, 836, 811, 747, 623, 598	

GLIKOZILACIJA – postopek D

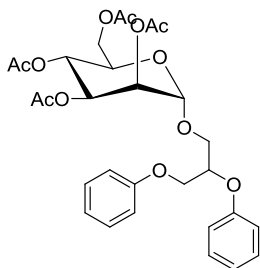


- 23**, R= fenil
24, R= 4-nitrofenil
25, R= 7-metoksi-2-naftil

Sintezni postopek D

Ustrezni diarilglicerol **15**, **17** ali **19** (1.2 mmol) in spojino **4** (1 mmol) smo zatehtali v prežarjeno bučko napolnjeno z argonom in ju raztopili v sveže predestiliranem brezvodnem diklorometanu (20 mL). Reakcijsko zmes smo v inertni atmosferi ohladili na ledeni kopeli in dodali trimetilsilil trifluorometansulfonat (TMSOTf) (1.3 mmol). Reakcijsko zmes smo najprej mešali 30 min pri 0 °C, nato pa segreli na sobno temperaturo in mešali preko noči. Nato smo dodali trietilamin (Et₃N) (2.6 mmol). Topilo smo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s flash kolonsko kromatografijo. Uporabili smo različne mobilne faze.

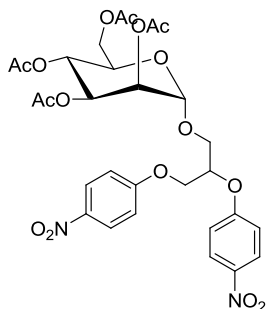
4.4.14. Sinteza 2,3-difenoksipropan-1-il 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-manopiranozida

**23**

Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku D iz spojine **15** (0.332 g, 1.36 mmol) in spojine **4** (0.592 g, 1.13 mmol). Produkt smo očistili s flash kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili etil acetat/heksan (1:2). Dobili smo 0.154 g spojine **23**.

2,3-difenoksipropan-1-il 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-manopiranozid		
Elementna sestava	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₂	M _r = 574.57
Opis	rumen, oljnat produkt	
Izkoristek	20%	
R _f	0.24 (MF: etil acetat/heksan = 1:2)	
Sučnost	[α] _D +7.3 (c 0.30, MeOH)	
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1.93 (s, 3H, COCH ₃), 1.96 (s, 3H, COCH ₃), 2.02 (s, 3H, COCH ₃), 2.13 (s, 3H, COCH ₃), 3.98 (dd, 1H, $J_{5,6} = 2.6$ Hz, $J_{6,6'} = 12.2$ Hz, H-6), 4.12-4.31 (m, 6H, H-5, H-6', CH ₂ CHCH ₂), 4.36-4.41 (m, 1H, CH ₂ CHCH ₂), 5.13-5.15 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 5.27 (d, 1H, $J_{1,2} = 0.9$ Hz, H-1), 6.93-7.00 (m, 6H, Ar-H), 7.28-7.34 (m, 4H, Ar-H) ppm	
¹³ C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ 20.7, 21.0 (4 \times COCH ₃), 62.3 (C-6), 66.0 (C-4), 67.2, 67.5 (2 \times CH ₂), 68.7 (C-3), 69.0 (C-2), 69.7 (C-5), 75.0 (CH), 97.3 (C-1), 114.4, 114.6, 121.3, 121.4, 129.6, 129.7, 158.2, 158.3 (12 \times Ar-C), 169.8, 169.9, 170.0, 170.8 (4 \times CO) ppm	
HR-MS (ESI ⁺)	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₂ Na ([M+Na ⁺] ⁺): izračunan 597.1948; izmerjen 597.1946	
IR (NaCl)	ν [cm ⁻¹] = 3446, 2936, 1742, 1599, 1587, 1496, 1456, 1369, 1218, 1174, 1218, 1174, 1134, 1042, 980, 910, 825, 754, 691, 598	

4.4.15. Sinteza 2,3-bis(4-nitrofenoksi)propan-1-il 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranozida

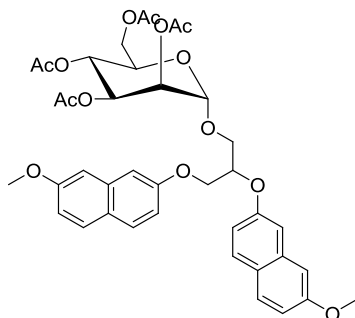
**24**

Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku D iz spojine **17** (0.425 g, 1.27 mmol) in spojine **4** (0.554 g, 1.06 mmol). Produkt smo očistili s flash kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabimo etil acetat/heksan (1:2). Dobili smo 0.389 g spojine **24**.

2,3-bis(4-nitrofenoksi)propan-1-il 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranozid

Elementna sestava	$C_{29}H_{32}N_2O_{16}$	$M_r = 664.57$
Opis	beli kristali	
Izkoristek	46%	
R_f	0,11 (MF etil acetat/heksan = 1:3)	
T_{tal}	128-129°C	
Sučnost	$[\alpha]_D +30.7$ (c 0.19, MeOH)	
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1.92 (s, 3H, COCH ₃), 1.98 (s, 3H, COCH ₃), 2.01 (s, 3H, COCH ₃), 2.13 (s, 3H, COCH ₃), 3.98 (dd, 1H, $J_{5,6} = 2.6$ Hz, $J_{6,6'} = 12.0$ Hz, H-6), 4.13-4.17 (m, 2H, H-5, H-6'), 4.38-4.52 (m, 5H, CH ₂ CHCH ₂ , CH ₂ CHCH ₂), 5.05 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3.4$ Hz, $J_{3,4} = 10.2$ Hz, H-3), 5.09-5.15 (m, 2H, H-2, H-4), 5.29 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.7$ Hz, H-1), 7.21-7.26 (m, 4H, Ar-H), 8.22-8.26 (m, 4H, Ar-H) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ 20.6, 20.7, 20.9 (4 \times COCH ₃), 62.4 (C-6), 66.0 (C-4), 67.5, 67.9 (2 \times CH ₂), 68.6 (C-3), 69.1 (C-2), 69.6 (C-5), 74.5 (CH), 97.4 (C-1), 114.5, 114.6, 126.0, 126.1, 142.1, 163.0 (12 \times Ar-C), 169.7, 170.0, 170.1, 170.6 (4 \times CO) ppm	
HR-MS (ESI ⁺)	$C_{29}H_{32}N_2O_{16}Na$ ($[M+Na]^+$): izračunan 687.1650; izmerjen 687.1652	
IR(KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3511, 3086, 2940, 1756, 1594, 1509, 1498, 1458, 1370, 1341, 1256, 1175, 1113, 1041, 1010, 979, 862, 848, 753, 691, 675, 597	

4.4.16. Sinteza 2,3-bis((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-1-il 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranozida

**25**

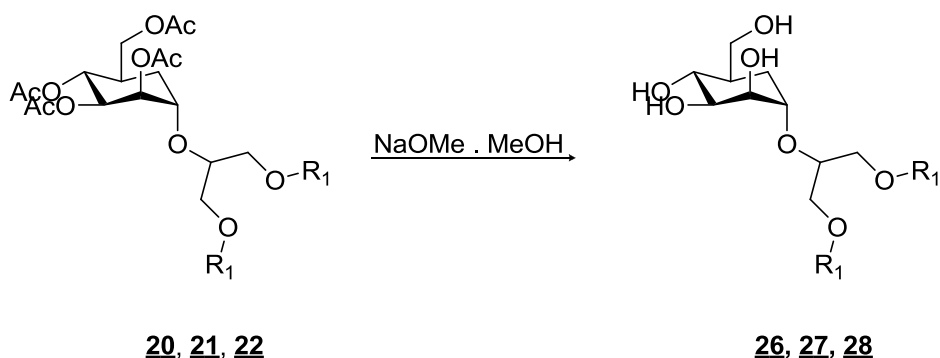
Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku D iz spojine **19** (0.382 g, 0.94 mmol) in spojine **4** (0.449 g, 0.86 mmol). Produkt smo očistili s flash kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili etil acetat/heksan (1:2). Dobili smo 0.410 g spojine **25**.

2,3-bis((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-1-il 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranozid

Elementna sestava	$C_{39}H_{42}O_{14}$	$M_r = 734.74$
Opis	rjav, oljnat produkt	
Izkoristek	65%	
R_f	0.51 (MF etil acetat/heksan = 1:1)	
Sučnost	$[\alpha]_D +28.4$ (c 0.17, MeOH)	
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1.93 (s, 3H, COCH ₃), 1.94 (s, 3H, COCH ₃), 2.01 (s, 3H, COCH ₃), 2.14 (s, 3H, COCH ₃), 3.85 (s, 3H, OCH ₃), 3.86 (s, 3H, CH ₃), 4.00 (dd, 1H, $J_{5,6} = 2.6$ Hz, $J_{6,6'} = 12.2$ Hz, H-6), 4.17 (dd, 1H, $J_{5,6} = 4.8$ Hz, $J_{6,6'} = 12.2$ Hz, H-6'), 4.31 (ddd, 1H, $J_{5,6} = 2.6$ Hz, $J_{5,6'} = 4.8$ Hz, $J_{4,5} = 9.9$ Hz, H-5), 4.34-4.47 (m, 4H, CH ₂ CHCH ₂), 4.51-4.56 (m, 1H, CH ₂ CHCH ₂), 5.15-5.17 (m, 2H, H-3, H-4), 5.21 (dd, 1H, $J_{1,2} = 1.7$ Hz, $J_{2,3} = 3.2$ Hz, H-2), 5.35 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.7$ Hz, H-1), 7.00 (dd, 2H, $J_1 = 2.6$ Hz, $J_2 = 8.9$ Hz, Ar-H), 7.06 (ddd, 2H, $J_1 = 2.6$ Hz, $J_2 = 8.9$ Hz, $J_3 = 14.1$ Hz, Ar-H), 7.22 (t, 2H, $J = 2.8$ Hz, Ar-H), 7.34 (t, 2H, $J = 2.8$ Hz, Ar-H), 7.74-7.79 (m, 4H, Ar-H) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ 20.7, 21.0 (4 \times COCH ₃), 55.3 (2 \times OCH ₃), 62.3 (C-6), 66.0 (C-4), 67.2, 67.7 (2 \times CH ₂), 68.8 (C-3), 69.0 (C-2), 69.7 (C-5), 74.9 (CH), 97.3 (C-1), 105.3, 106.3, 106.4, 115.8, 116.0, 116.4, 116.5, 124.5, 124.6, 129.2, 129.4, 129.5, 135.8, 135.9, 156.8, 156.9, 158.3, 158.4 (20 \times Ar-C), 169.8, 170.0, 170.1, 170.8 (4 \times CO) ppm	
HR-MS (ESI ⁺)	$C_{39}H_{43}O_{14}$ ($[M+H]^+$): izračunan 735.2653; izmerjen 735.2632	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3421, 2946, 1627, 1516, 1465, 1388, 1253, 1226, 1210, 1187, 1166, 1119, 1030, 860, 840, 801	

4.5. Zemplénova metoda

Zemplénova metoda – postopek E



26, R= 4-metoksifenil

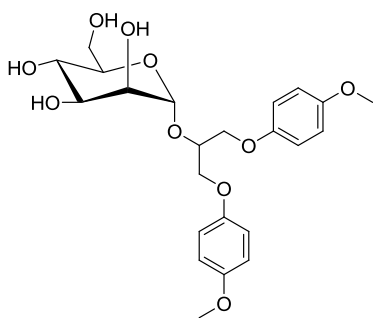
27, R= 4-nitrofenil

28, R= 2-naftil

Sintezni postopek E

Zaščiten manopiranozid (1 mmol) smo raztopili v brezvodnem metanolu in dodali raztopino natrijevega metanolata (30 wt % etanolu, 0,01 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 30 min in nato dodali kislinski ionski izmenjevalec Amberlite® IR120 H za nevtralizacijo. Mešali smo 10 min ter filtrirali. Sprali smo z metanolom in topilo odparili pod znižanim tlakom. Reakcija je potekla kvantitativno, nadaljnje čiščenje ni bilo potrebno.

4.5.1. Sinteza 1,3-bis(4-metoksifenoksi)propan-2-il α -D-manopiranozida

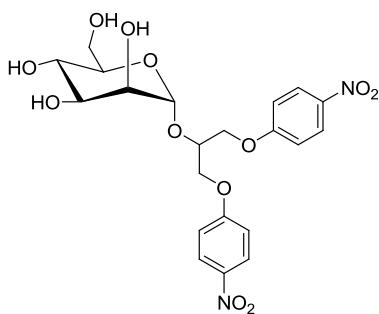


26

Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku E iz spojine **20** (0.190 g, 0.30 mmol). Dobili smo 0.140 g produkta **26**.

1,3-bis(4-metoksifenoksi)propan-2-il α -D-manopiranozid	
Elementna sestava	$C_{23}H_{30}O_{10}$ $M_r = 466.48$
Opis	oranžni kristali
Izkoristek	100%
R_f	0 (MF = etil acetat/heksan = 1:1)
Sučnost	$[\alpha]_D +35.0$ (c 0.20, MeOH)
T_{tal}	69-71°C
1H NMR (400 MHz, CD_3OD)	δ 3.65-3.74 (m, 3H, H-3, H-4, H-6), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 3.77-3.84 (m, 2H, H-5, H-6'), 3.86 (dd, 1H, $J_{1,2} = 1.7$ Hz, $J_{2,3} = 3.2$ Hz, H-2), 4.11-4.25 (m, 4H, $\underline{CH_2}CH\underline{CH_2}$), 4.37-4.42 (m, 1H, $\underline{CH_2}CH\underline{CH_2}$), 5.14 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.7$ Hz, H-1), 6.84-6.87 (m, 4H, Ar-H), 6.89-6.93 (m, 4H, Ar-H) ppm
^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD)	δ 56.1 ($2 \times OCH_3$), 62.8 (C-6), 68.4 (C-4), 69.5, 69.7 ($2 \times CH_2$), 72.3 (C-3), 72.5 (C-2), 74.8 (C-5), 75.7 (CH), 101.7 (C-1), 115.6, 115.8, 116.6, 116.7, 154.2, 154.4, 155.6, 155.7 ($12 \times Ar-C$) ppm
HR-MS (ESI)	$C_{23}H_{29}O_{10}$ ($[M-H]^-$): izračunan 465.1761; izmerjen 465.1757
IR(KBr)	ν [cm^{-1}] = 3378, 2925, 2832, 1507, 1458, 1289, 1232, 1133, 1107, 1064, 1044, 978, 824, 754, 670, 520

4.5.2. Sinteza 1,3-bis(4-nitrofenoksi)propan-2-il α -D-manopiranozida

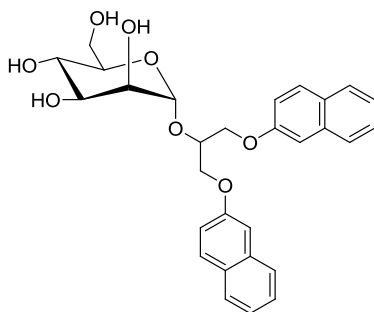
**27**

Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku E iz spojine **21** (0.107 g, 0.16 mmol). Dobili smo 0.080 g spojine **27**.

1,3-bis(4-nitrofenoksi)propan-2-il α -D-manopiranozid

Elementna sestava	$C_{21}H_{24}N_2O_{12}$	$M_r = 496.42$
Opis	Rumeni kristali	
Izkoristek	100%	
R_f	0 (MF = etil acetat/heksan = 1:1)	
Sučnost	$[\alpha]_D +18.7$ (c 0.25, MeOH)	
T_{tal}	98-99°C	
1H NMR (400 MHz, CD_3OD)	δ 3.64-3.74 (m, 3H, H-3, H-4, H-6), 3.78 (dd, 1H, $J_{5,6} = 2.7$ Hz, $J_{4,5} = 8.8$ Hz, H-5), 3.81-3.85 (m, 2H, H-2, H-6'), 4.38-4.48 (m, 4H, $\underline{CH_2}CHCH_2$), 4.52-4.56 (m, 1H, $CH_2CH\underline{CH}CH_2$), 5.15 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.7$ Hz, H-1), 7.17-7.19 (m, 4H, Ar-H), 8.23-8.26 (m, 4H, Ar-H) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD)	δ 63.0 (C-6), 68.5 (C-4), 69.3, 69.4 ($2 \times CH_2$), 72.2 (C-2), 72.4 (C-3), 75.3 (C-5, CH), 101.9 (C-1), 115.9, 116.0, 126.8, 126.9, 143.1, 143.2, 165.1, 165.2 ($12 \times Ar-C$) ppm	
HR-MS (ESI)	$C_{21}H_{23}N_2O_{12}$ ($[M-H]^-$): izračunan 495.1251; izmerjen 495.1264	
IR (KBr)	ν [cm^{-1}] = 3420, 2928, 1592, 1507, 1340, 1299, 1256, 1175, 1111, 1028, 863, 844, 751, 689	

4.5.3. Sinteza 1,3-bis(naftalen-2-iloksi)propan-2-il α -D-manopiranozida

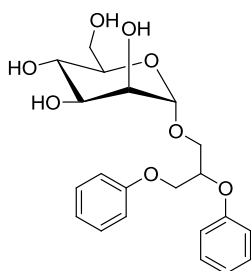
**28**

Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku E iz spojine **22** (0.253 g, 0.375 mmol). Dobili smo 0.164 g spojine **28**.

1,3-bis(naftalen-2-iloksi)propan-2-il α -D-manopiranozid

Elementna sestava	$C_{29}H_{30}N_2O_8$	$M_r = 506.54$
Opis	beli kristali	
Izkoristek	86.3%	
R_f	0 (MF = etil acetat/heksan = 1:1)	
Sučnost	$[\alpha]_D +8.5$ (c 0.23, MeOH)	
T_{tal}	179-180 °C	
1H NMR (400 MHz, CD_3OD)	δ 3.69-3.82 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'), 3.93 (dd, 1H, $J_{1,2} = 1.7$ Hz, $J_{2,3} = 3.3$ Hz, H-2), 4.37-4.50 (m, 4H, $\underline{CH_2CHCH_2}$), 4.60-4.65 (m, 1H, $\underline{CH_2CHCH_2}$), 5.25 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.6$ Hz, H-1), 7.20-7.23 (m, 2H, Ar-H), 7.31-7.36 (m, 4H, Ar-H), 7.41-7.45 (m, 2H, Ar-H), 7.76-7.79 (m, 6H, Ar-H) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD)	δ 62.7 (C-6), 68.4 (C-4), 68.9, 69.0 ($2 \times CH_2$), 72.4 (C-2), 72.5 (C-3), 75.0 (C-5), 75.5 (CH), 101.8 (C-1), 107.9, 108.0, 119.7, 119.8, 124.7, 124.8, 127.3, 127.4, 128.0, 128.6, 130.4, 130.5, 130.6, 130.7, 136.1, 158.0, 158.1 ($20 \times Ar-C$) ppm	
HR-MS (ESI)	$C_{29}H_{29}O_8$ ($[M-H]^-$): izračunan 505.1862; izmerjen 505.1856	
IR (KBr)	ν [cm^{-1}] = 3233, 2872, 1628, 1599, 1510, 1456, 1354, 1255, 1215, 1180, 1118, 1033, 974, 833, 808, 742, 682, 623	

4.5.4. Sinteza 2,3-difenoksipropan-1-il α -D-manopiranozida

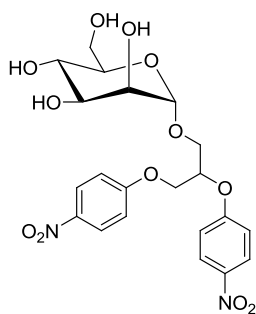
**29**

Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku E iz spojine **23** (0.154 g, 1.36 mmol). Dobili smo 0.109 g spojine **29**.

2,3-difenoksipropan-1-il α -D-manopiranozid

Elementna sestava	$C_{21}H_{26}O_8$	$M_r = 406.43$
Opis	oranžen, oljnat produkt	
Izkoristek	100%	
R_f	0 (MF = etil acetat/heksan = 1:1)	
Sučnost	$[\alpha]_D +45.2$ (c 0.20, MeOH)	
1H NMR (400 MHz, CD_3OD)	δ 3.67-3.78 (m, 4H, H-3, H-4, H-6), 3.83 (ddd, 1H, $J_{5,6} = 2.5$ Hz, $J_{5,6'} = 5.1$ Hz, $J_{4,5} = 8.2$ Hz, H-5), 3.87 (dd, 1H, $J_{1,2} = 1.7$ Hz, $J_{2,3} = 3.2$ Hz, H-2), 4.18-4.30 (m, 4H, $\underline{CH_2CHCH_2}$), 4.43-4.48 (m, 1H, $\underline{CH_2CHCH_2}$), 5.16 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.7$ Hz, H-1), 6.93-6.99 (m, 6H, Ar-H), 7.26-7.31 (m, 4H, Ar-H) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD)	δ 62.8 (C-6), 68.4 (C-4), 68.7, 68.9 ($2 \times CH_2$), 72.3 (C-2), 72.5 (C-3), 74.9 (C-5), 75.6 (CH), 101.7 (C-1), 115.6, 115.7, 122.0, 122.1, 130.5, 130.6, 160.1, 160.2 ($12 \times Ar-C$) ppm	
HR-MS (ESI ⁺)	$C_{21}H_{26}O_8Na$ ($[M+Na]^+$): izračunan 429.1525; izmerjen 429.1528	
IR (KBr)	ν [cm^{-1}] = 3421, 2929, 1599, 1496, 1457, 1301, 1243, 1174, 1134, 1058, 976, 882, 816, 753, 690, 508	

4.5.5. Sinteza 2,3-bis(4-nitrofenoksi)propan-1-il α -D-manopiranozida

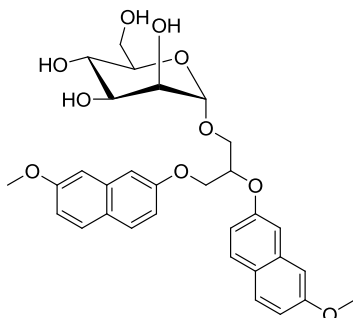
**30**

Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku E iz spojine **24** (0.324 g, 0.49 mmol). Dobili smo 0.242 g spojine **30**.

2,3-bis(4-nitrofenoksi)propan-1-il α -D-manopiranozid

Elementna sestava	$C_{21}H_{24}N_2O_{12}$	$M_r = 496.42$
Opis	rjavi kristali	
Izkoristek	100%	
R_f	0 (MF = etil acetat/heksan = 1:1)	
Sučnost	$[\alpha]_D +22.3$ (c 0.22, MeOH)	
T_{tal}	176-179°C	
1H NMR (400 MHz, CD_3OD)	δ 3.64 (t, 1H, $J_{3,4; 4,5} = 9.3$ Hz, H-4), 3.66-3.74 (m, 2H, H-3, H-6), 3.77-3.85 (m, 3H, H-2, H-5, H-6'), 4.38-4.48 (m, 4H, $\underline{CH_2}CH\underline{CH_2}$), 4.53-4.58 (m, 1H, $\underline{CH_2}CH\underline{CH_2}$), 5.15 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.7$ Hz, H-1), 7.16-7.20 (m, 4H, Ar-H), 8.23-8.26 (m, 4H, Ar-H) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD)	δ 62.9 (C-6), 68.5 (C-4), 69.3, 69.4 ($2 \times CH_2$), 72.2 (C-2), 72.4 (C-3), 75.3 (C-5, CH), 101.9 (C-1), 116.0, 126.9, 143.1, 143.2, 165.1, 165.2 ($12 \times Ar-C$) ppm	
HR-MS (ESI ⁺)	$C_{21}H_{24}N_2O_{12}Na$ ($[M+Na^+]^+$): izračunan 519.1227; izmerjen 519.1218	
IR(KBr)	ν [cm^{-1}] = 3421, 1593, 1507, 1340, 1254, 1174, 1111, 1024, 863, 844, 751, 690	

4.5.6. Sinteza 2,3-bis((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-1-il α -D-manopiranozida

**31**

Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku E iz spojine **25** (0.200 g, 0.27 mmol). Dobili smo 0.154 g spojine **31**.

2,3-bis((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-1-il α -D-manopiranozid

Elementna sestava	$C_{31}H_{34}O_{10}$	$M_r = 566.60$
Opis	beli kristali	
Izkoristek	100%	
R_f	0 (MF = etil acetat/heksan = 1:1)	
Sučnost	$[\alpha]_D +31.1$ (c 0.22, MeOH)	
T_{tal}	135°C	
1H NMR (400 MHz, CD_3OD)	δ 3.70 (t, 1H, $J_{3,4; 4,5} = 9.7$ Hz, H-4), 3.73-3.84 (m, 3H, H-3, H-6), 3.89-3.90 (m, 7H, H-5, $2 \times OCH_3$), 3.92 (dd, 1H, $J_{1,2} = 1.7$ Hz, $J_{2,3} = 3.3$ Hz, H-2), 4.36-4.49 (m, 4H, CH_2CHCH_2), 4.59-4.64 (m, 1H, CH_2CHCH_2), 5.24 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.7$ Hz, H-1), 6.97 (ddd, 2H, $J_1 = 0.97$ Hz, $J_2 = 2.5$ Hz, $J_3 = 8.8$ Hz, Ar-H), 7.05 (m, 2H, Ar-H), 7.15 (dd, 2H, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 8.9$ Hz, Ar-H), 7.25 (d, 2H, $J = 2.6$ Hz, Ar-H), 7.65-7.70 (m, 4H, Ar-H) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$)	δ 55.9 ($2 \times OCH_3$), 62.9 (C-6), 68.5 (C-4), 68.9, 69.0 ($2 \times CH_2$), 72.4 (C-3), 72.5 (C-2), 75.3 (C-5), 75.8 (CH), 101.8 (C-1), 106.5, 106.6, 107.7, 107.8, 117.2, 117.3, 117.4, 117.5, 125.9, 126.0, 130.0, 130.4, 130.5, 137.6, 158.6, 158.7, 159.8 ($20 \times Ar-C$) ppm	
HR-MS (ESI)	$C_{31}H_{33}O_{10}$ ($[M-H]^-$): izračunan 565.2074; izmerjen 565.2073	
IR(KBr)	ν [cm^{-1}] = 3445, 2932, 1630, 1609, 1516, 1448, 1387, 1257, 1209, 1185, 1165, 1137, 1023, 974, 842, 831, 808, 631	

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

Pri načrtovanju monovalentnih glikomimetikov kot potencialnih antagonistov receptorja DC-SIGN se uporabljajo različni pristopi (15). Običajno antagonisti vključujejo sladkorni del, ki je ključen za prepoznavo molekule in vezavo v vezavno mesto za Ca^{2+} na CRD DC-SIGN, kjer tvori številne interakcije (koordinativne vezi s Ca^{2+} in vodikove vezi z aminokislinskimi ostanki proteina). Na voljo so številne tridimenzionalne strukture receptorja DC-SIGN v kompleksu z različnimi ligandi (dimanozidom, tetramanozidom), ki nam omogočajo strukturno podprto načrtovanje antagonistov tega receptorja. Iz kristalnih struktur je tako razvidno, da hidrofobna regija, ki jo definira fenilni obroč stranske verige Phe313, tvori šibke interakcije z manoznimi ostanki manoziliranih oligosaharidov, ki jih prepozna in veže DC-SIGN. Ugotovili so, da so interakcije glikomimetikov s Phe313 ključne za ustrezno afiniteto do receptorja DC-SIGN (12). Preko hidrofobnih in/ali π - π interakcij lipofilnih substituentov na glikomimetikih s stransko verigo Phe313 se poveča afiniteta vezave le-teh na receptor DC-SIGN. Vezava na CRD DC-SIGN je možna samo pri glikomimetikih, ki imajo dodatne strukturne elemente pripete na sladkor preko α -glikozidne vezi, medtem ko β -glikozidi nimajo afinitete do receptorja. Sladkorni del pri večini znanih glikomimetikov je bodisi D-manoza ali L-fukoza, ker imata med monosaharidi največjo afiniteto do CRD DC-SIGN zaradi ustrezne razporeditve hidroksilnih skupin, ki omogočajo optimalne interakcije s Ca^{2+} in aminokislinskimi ostanki receptorja. Pri sintezi takšnih glikomimetikov je torej ključno, da sintezo izvajamo stereoselektivno, da dobimo ustrezno α konfiguracijo na anomernem centru (12).

Naše spojine smo načrtovali tako, da smo kot sladkor izbrali D-manozo, na katero smo po ustrezni zaščiti preostalih hidroksilnih skupin s stereoselektivno glikozilacijo pripeli predhodno sintetizirane diarilglicerole z dvema hidrofobnima substituentoma, s katerima smo želeli izboljšati afiniteto vezave zaradi dodatnih interakcij s Phe313. Pri eksperimentalnem delu smo tako sintetizirali spojine s splošno strukturo **I** in **II** (slika 12), ki so analogi spojin **TSZ-15** in **TSZ-20** (slika 13), ki sta znana antagonista DC-SIGN, sintetizirana na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani.

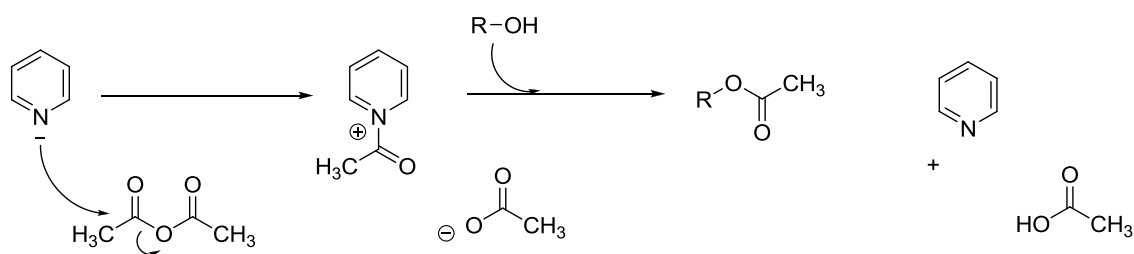
FimH je bakterijski lektin, ki prav tako specifično prepozna in veže D-manozo, katera je tudi pomemben strukturni element pri večini znanih glikomimetičnih antagonistov tega receptorja. V vezavnem mestu CRD FimH so tako imenovana tirozinska vrata, ki omogočajo dodatne hidrofobne in/ali π - π interakcije z lipofilnimi/aromatskimi substituenti glikomimetikov, s čimer se močno ojača antagonistično delovanje takih spojin. Omenjene skupne lastnosti obeh lektinskih receptorjev, torej vezavno mesto za D-manozo in aminokislinski ostanki z aromatskimi stranskimi verigami (Phe313 pri DC-SIGN, Tyr48 in Tyr137 pri FimH) ter podobnost znanih antagonistov obeh receptorjev, so nas spodbudile, da smo spojine, prvotno načrtovane za DC-SIGN, testirali tudi za aktivnost na FimH.

5.1. KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

5.1.1. Zaščita hidroksilnih skupin D-manoze

Pri kemiji ogljikovih hidratov je pomembno izpostaviti problem regioselektivnosti, saj sladkorji vsebujejo hidroksilne skupine z različno reaktivnostjo in tudi druge reaktivne funkcionalne skupine kot sta karbonilna in amino skupina. Pri sintezi želenih spojin je zato ključna izbira tistih zaščitnih skupin, ki jih bomo lahko tudi enostavno odstranili, brez vpliva na preostali del molekule (34).

D-manoza v svoji strukturi vsebuje pet nukleofilnih hidroksilnih skupin, zato mora biti sinteza spojin skrbno načrtovana, da lahko selektivno izvedemo glikozilacijo na anomernem centru. Za zaščito hidroksilnih skupin D-manoze smo uporabili acetatno skupino. Ugodna je zaradi selektivnih in milih pogojev odstranjevanja. Pri reakciji smo bili pozorni, da smo zagotovili brezvodne pogoje, zato smo reakcijsko zmes prepihali z argonom. Prav tako smo kot topilo uporabili brezvodni piridin (shema 2) (34). Produkt smo izolirali s pomočjo ekstrakcije. S spiranjem organske faze z različnimi vodnimi raztopinami, smo se znebili še vedno prisotne izhodne spojine, piridina in nastale očetne kisline. Izvedli smo acetiliranje vseh hidroksilnih skupin, zato smo dobili zmes α in β anomera.



Shema 2. Mehanizem uvedbe acetatne zaščitne skupine ob prisotnosti piridina kot katalizatorja.

5.1.2. Selektivna odščita anomerne hidroksilne skupine

Selektivno deacetiliranje na anomernem centru lahko izvedemo z različnimi reagenti. Nastali reducirajoči sladkor je pomemben intermediat za nadaljnjo stopnjo sinteze glikozil trikloroacetimidata (spojina **4**), ki deluje kot glikozilni donator v stopnji glikozilacije (34). Regioselektivno deacetiliranje na anomernem centru smo izvedli z uporabo hidrazin hidrata in DMF. Namesto hidrazin hidrata bi lahko uporabili tudi piperidin in 2-aminoetanol (34). Uporabili smo majhen pribitek hidrazina in očetne kisline v DMF.

Reakcija deacetiliranja je potekla regioselektivno na anomernem mestu D-manoze. Dodatek očetne kisline je pripomogel še k večji regioselektivnosti deacetiliranja. Produkt smo izolirali s pomočjo ekstrakcije. Izkoristek te reakcije je bil 27%, kar je slabše kot smo pričakovali. Najverjetneje je nizek izkoristek posledica neustrezne izolacije, saj pred ekstrakcijo nismo odpareli DMF, kar je vodilo do izgube produkta v vodno fazo.

5.1.3. Priprava trikloroacetimidata z DBU

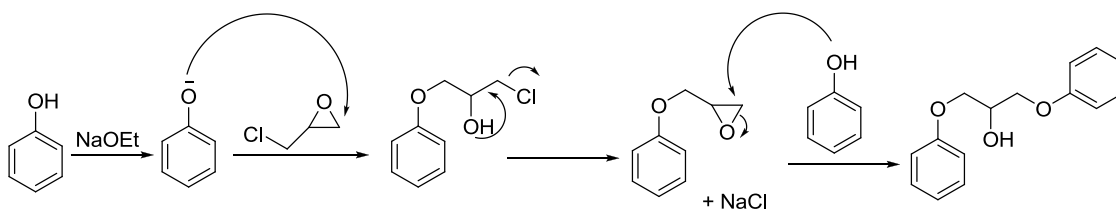
Derivati D-manoze lahko zasedejo α ali β konfiguracijo. Za sintezo antagonistov DC-SIGN in FimH je ključna α konfiguracija, zato smo pri sintezi trikloroacetimidata uporabili kot bazo DBU. Kot bazo bi lahko uporabili tudi K_2CO_3 ali NaH. Bazo DBU smo uporabili, ker gre sinteza v prisotnosti DBU praktično samo v smeri nastanka α anomera (34). Podatke iz literature je potrdil tudi NMR spekter spojine **4**, v katerem ni bilo videti β anomera. V nastalem glikozil trikloroacetimidatu se nahaja kisikov atom v anomernem položaju in velja za dobro izstopajočo skupino. Zaradi tega je glikozil trikloroacetimidat glikozilni donor, ki ga lahko aktiviramo z uporabo Lewisove kisline kot katalizatorja (npr.: $BF_3 \cdot Et_2O$ ali TMSOTf) (34).

5.1.4. Priprava diarilglicerolov

Sintezo diarilglicerolov smo razdelili v dva sklopa. Sintetizirali smo simetrične in nesimetrične diarilglicerole.

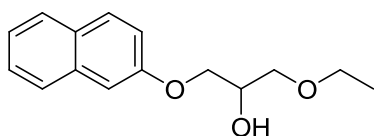
a) SIMETRIČNI

Pri spojinah **6** in **8** je reakcija potekla v dveh stopnjah po principu nukleofilnega napada hidroksilne skupine fenola ali naftola na oba elektrofilna centra epiklorhidrina (shema 3). Ker smo hoteli, da reakcija poteče na obeh mestih in ne samo na sterično manj ovirani metilenski skupini, smo ustrezni fenol dodali v pribitku (dva ekvivalenta) glede na epiklorhidrin.



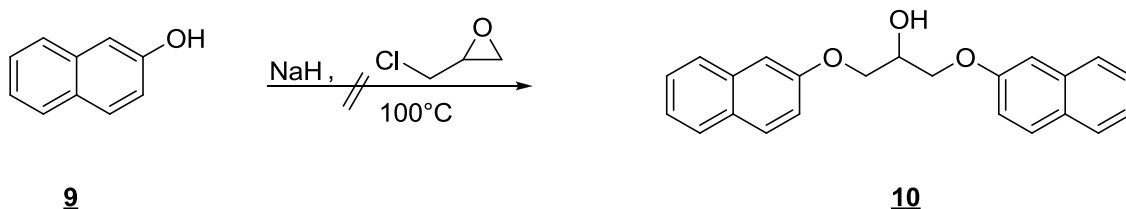
Shema 3. Mehanizem nastanka simetričnih diarilglicerolov.

Kljub previdnosti pri delu, so bili izkoristki reakcij pri spojinah **6** in **8** dokaj slabi (7 in 15%). Pri sintezi spojine **6** so nastali poleg pričakovanega produkta še številni stranski produkti. Po čiščenju surovega produkta s prekrystalizacijo je izpadlo zelo malo oborine (0.223 mg). Po pregledu NMR spektra smo ugotovili, da je to čist želeni produkt. Matičnici, ki je ostala po prekrystalizaciji smo zato odparili topilo pod znižanim tlakom in še enkrat prekrystalizirali. Nato smo pustili v hladilniku, da bi izpadla oborina, vendar nastala oborina ni bila naš čist produkt, ampak zmes stranskih produktov. Pri izolaciji spojine **8** smo imeli prav tako največje težave s tem, ker ni izpadla oborina pri krystalizaciji. Pomagali smo si z ultrazvočno kadičko, kjer je nato izpadla oborina. Surov produkt bi lahko čistili tudi s kolonsko kromatografijo, vendar bi bila ločba težavna zaradi prisotnosti različnih stranskih produktov in nezreagiranih izhodnih spojin. Izkoristek te reakcije je bil malo višji - 15%. Višje izkoristke bi verjetno lahko dosegli, če bi uporabili dvostopenjski sintezni postopek, ki smo ga kasneje uporabili za sintezo spojine **10**. Po enakem postopku smo najprej želeli sintetizirati tudi spojino **10**. Za izhodno spojino smo vzeli 2-naftol. Pri reakciji 2-naftola z epiklorhidrinom in natrijevim etanolatom kot bazo ni nastalo nič pričakovanega produkta, ampak je bila glavni produkt reakcije spojina **32** (slika 14). Očitno je natrijev 2-naftolat, ki nastane pri reakciji med 2-naftolom in natrijevim etanolatom, prešibek nukleofil, da bi odprl v prvi stopnji nastali epoksid.



Slika 14. Struktura stranskega produkta **32**.

V naslednjem poskusu smo kot bazo, ki bo 2-naftolu odcepila proton in mu s tem izboljšala nukleofilnost, uporabili natrijev hidrid (NaH). Reakcija po dodatku epiklorhidrina žal ni potekla (slika 15).

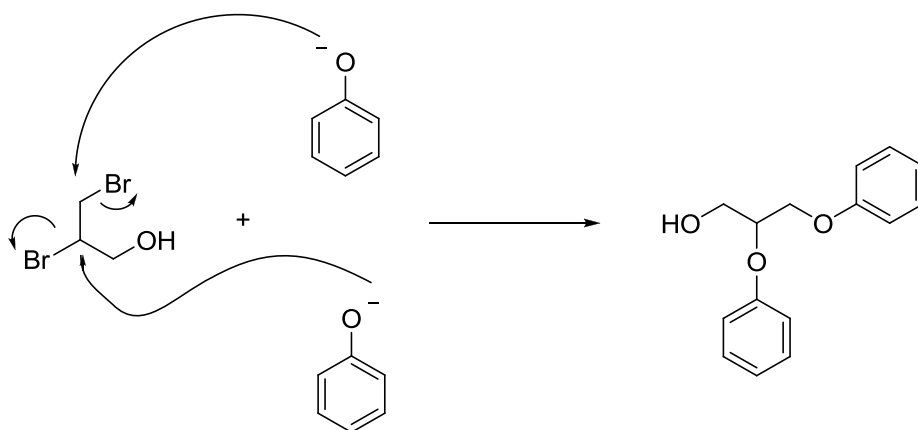


Slika 15. Poskus sinteze spojine **10**.

Druga stopnja je nukleofilni napad aromatskega alkohola na aktivirano in manj sterično ovirano oksiransko metilensko skupino. V patentu so drugo stopnjo izvedli tako, da so spojini **12** in **9** raztopili v toluenu ter dodali katalizator faznega prenosa tetrabutilamonijev bromid (TBAB). V tem primeru reakcija ni potekla. Z majhnimi količinami smo poskusili drugo stopnjo reakcije na način, da ponovno iz spojine **9** pripravimo kalijevo sol 2-naftola, s čimer povečamo njegovo nukleofilnost. Na ta način je reakcija potekla, čeprav produkta nismo popolnoma očistili. V večjih količinah smo ponovili reakcijo, pri čemer smo uspeli izolirati želeni produkt z dokaj dobrim izkoristkom. Ugotovili smo, da je za ustrezno reaktivnost spojine **9** nujno potrebno, da ga predhodno pretvorimo v ustrezno sol. Prav tako mora biti spojina **9** vedno v pribitku (1.2 ekvivalenta) glede na epiklorhidrin in v naslednji stopnji glede na spojino **12**.

b) NESIMETRIČNI

Sinteza spojin **15**, **17** in **19** je potekala po opisanem postopku. Mehanizem reakcije je nukleofilna substitucija broma (shema 5). Reakcijo smo izvajali pod enakimi pogoji kot smo jih uporabili za sintezo spojin **6** in **8**. Zaradi večje elektrofilnosti alkilbromidov pri tej sintezi nismo imeli težav. Pri sintezi spojine **19** je po ekstrakciji v organski fazi nastala oborina. Po pregledu NMR spektra smo ugotovili, da je to želeni produkt, ki smo ga prav tako dobili tudi po čiščenju organske faze s prekrystalizacijo.



Shema 5. Mehanizem nukleofilne substitucije broma.

5.1.5. Glikozilacija

Obstaja več različnih metod glikozilacije, največ se uporabljajo glikozil halidi, glikozil trikloroacetimidati in tioglikozidi (34). Pred začetkom sinteze smo si kot glikozilni donor izbrali glikozil trikloroacetimidat, kot aktivator pa bo v reakciji nastopal TMSOTf. Želeli smo si, da v glikozilaciji sodeluje samo anomerna hidroksilna skupina, zato smo vse ostale tudi pustili zaščitene. Glavna lastnost sintetizirane spojine **4** je delovanje kot močan glikozilni donor pod relativno milimi pogoji kislinske katalize. V tej stopnji pride do izmenjave med donorjem in akceptorjem. Kot topilo smo uporabili diklorometan, saj je pomembno, da nobena spojina s topilom ne reagira. V topilo smo nazadnje dodali tudi aktivator TMSOTf. V tej stopnji so zelo pomembni brezvodni pogoji. Bučko smo prežarili in prepihali z argonom, prav tako smo z destilacijo pripravili svež brezvodni diklorometan. Kot sušilno sredstvo smo uporabili kalcijev hidrid. Nastale produkte smo čistili s flash kolonsko kromatografijo. Glavni problem je bila slaba topnost spojin, saj se niso topile v izbrani mobilni fazi. Zaradi tega smo morali dodati nekaj etil acetata, s tem pa smo poslabšali ločbo. Izkoristek reakcije spojine **29** je bil zgolj 20%, razlog je bila slaba topnost, saj drugih težav pri sintezi ni bilo. Slaba topnost je bila problem tudi pri čiščenju spojine **27** (33%). Izkoristek spojine **30** je bil boljši (46%), vendar je veliko diarilglicerola – spojine **17** ostalo nezreagirane. Zaradi počasnega potovanja spojine **30** po koloni smo morali povečati polarnost mobilne faze in sicer, iz razmerja zmesi etil acetat/heksan (1:1) na razmerje etil acetat/heksan (2:1). Izkoristek reakcije je bil največji pri spojini **28**, vendar spojine nismo dobro očistili. Prisotnih je bilo še nekaj nečistot, na NMR spektru pa je bilo videti tudi nekaj β anomera.

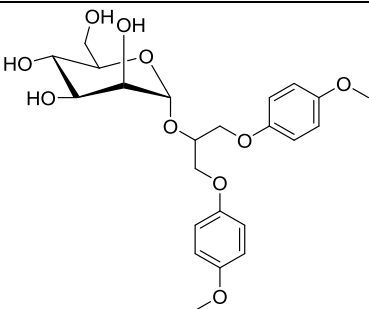
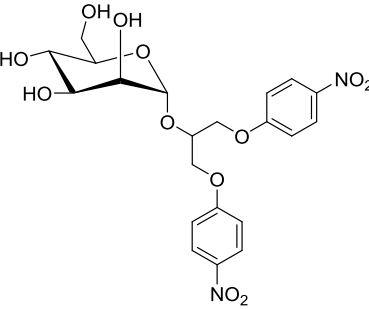
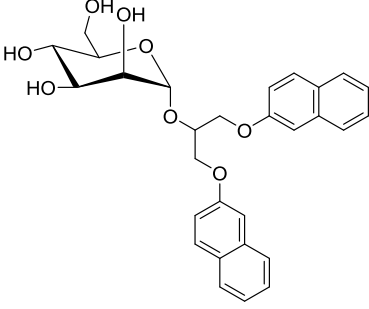
5.1.6. Zemplénova metoda

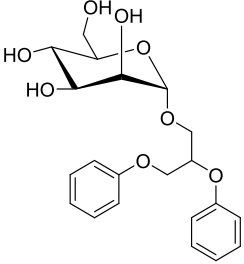
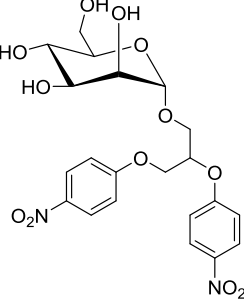
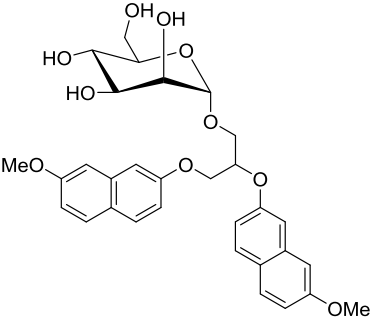
Hidroksilne skupine D-manoze smo v prvi stopnji zaščitili v obliki estra z acetatno skupino. Estre lahko hitro odstranimo v bazičnem mediju. Namesto uporabe pogojev saponifikacije, lahko uporabimo reakcijo transesterifikacije, ki jo imenujemo Zemplénova metoda (34). Ta stopnja reakcije je potekla kvantitativno in brez stranskih produktov, zato ni bilo potrebe po dodatnem čiščenju. Pri spojini **30** smo imeli težave s topnostjo spojine v metanolu, zato smo dodali diklorometan in v tako pripravljeno zmes smo dodali NaOMe. Pustili smo mešati nekaj časa, nato smo odparili diklorometan in dodali kislinski izmenjevalec za nevtralizacijo. Pri ostalih spojinah **26**, **27**, **28**, **29** in **31** je reakcija potekla po opisanem postopku.

5.2. REZULTATI BIOLOŠKEGA VREDNOTENJA

Končne spojine smo biološko ovrednotili na receptorjih DC-SIGN in FimH. Rezultati testiranja so zbrani v preglednici I. Podane so ustrezne IC₅₀ vrednosti.

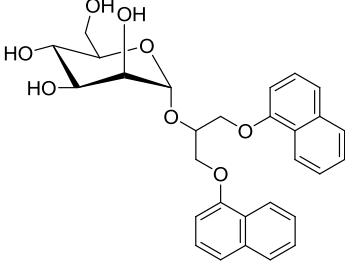
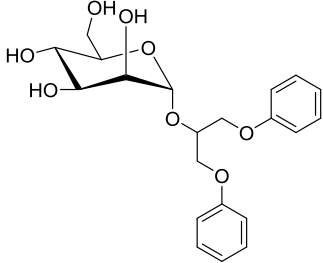
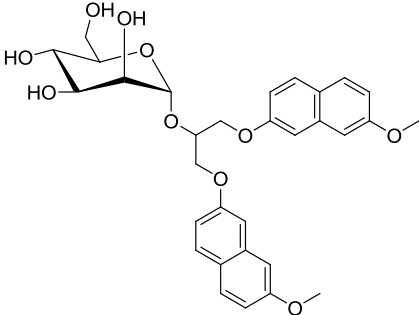
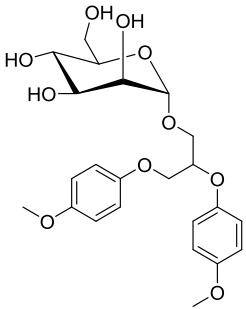
Preglednica I. Rezultati biološkega testiranja sintetiziranih spojih na receptorjih DC-SIGN in FimH.

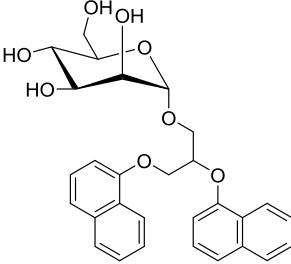
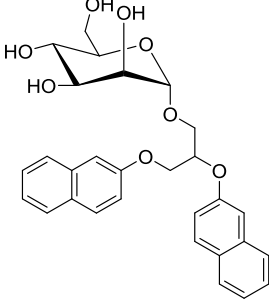
Oznaka	Struktura	DC-SIGN IC ₅₀ [mM]	FimH IC ₅₀ [nM]
<u>26</u>		5.15 ± 1.72	ni inhibicije
<u>27</u>		> 0.5	/*
<u>28</u>		/*	/*

<u>29</u>		8.64 ± 5.77	144
<u>30</u>		5.73 ± 1.32	105
<u>31</u>		> 0.5	/*

*Spojine še niso bile testirane.

Preglednica II. Rezultati biološkega testiranja že znanih spojih na receptorjih DC-SIGN in FimH.
(33)

Oznaka	Struktura	DC-SIGN IC ₅₀ [mM]	FimH IC ₅₀ [nM]
<u>TSZ-15</u>		0.04 ± 0.03	58
<u>TSZ-19</u>		2.41 ± 0.15	450
<u>TSZ-20</u>		0.05 ± 0.01	593
<u>TTD-09</u>		1.01 ± 0.19	208

<u>TTD-17</u>		> 0.5	/*
<u>TTD-21</u>		0.395 ± 0.08	/*

*Spojine še niso bile testirane.

Sintetizirane končne spojine smo biološko ovrednotili in dobili podatke o aktivnosti sintetiziranih spojin na receptorjih DC-SIGN in FimH. Določili smo biološko aktivnost na obeh receptorjih, tako da smo določili vrednosti IC_{50} , ki pomenijo 50% inhibicijo vezave gp120 na CRD DC-SIGN oziroma 50% inhibicijo vezave metil α -D-manopiranozida na FimH. Biološko smo ovrednotili šest končnih spojin. Od tega so spojine **26**, **27**, **28** s simetričnimi diarilgliceroli, spojine **29**, **30** in **31** pa z nesimetričnimi.

a) DC-SIGN

Biološko aktivnost sintetiziranih končnih spojin smo ovrednotili v *in vitro* testnem sistemu, ki ga je postavil David Hajšek tekom svojega diplomskega dela pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm (33). V testnem sistemu na izolirani zunajcelični domeni DC-SIGN smo testirali kompetitivnost za vezavo naših spojin na CRD DC-SIGN napram naravnemu ligandu glikoproteinu gp120 virusa HIV-1. Končne spojine smo testirali v prisotnosti površinsko aktivne snovi Tween[®]-20, s čimer smo se želeli izogniti lažno pozitivnim rezultatom zaradi tvorbe agregatov spojin. Osnovne raztopine sintetiziranih spojin so bile pripravljene v DMSO. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili L-fukozo, saj so ugotovili, da prepreči vezavo gp120 na CRD DC-SIGN z IC_{50} vrednostjo 2.95 mM (33). Rezultati kažejo zelo slabo aktivnost sintetiziranih spojin na receptorju DC-SIGN. Pri

večini spojin je bila problem slaba topnost, tako da pri nekaterih spojinah nismo mogli določiti IC_{50} vrednosti, saj spojina ni bila topna v tako visokih koncentracijah, kot bi jih potrebovali za določitev aktivnosti. Spojine **26**, **29** in **30** imajo vrednosti IC_{50} v milimoranem območju. Če primerjamo spojine s simetričnim in nesimetričnim diarilglicerolom lahko ugotovimo, da imajo spojine z nesimetričnimi še nekoliko slabšo afiniteto za receptor DC-SIGN. To je lahko posledica bodisi različne razporeditve aromatskih struktur v prostoru, ki ni ugodna za vezavo na receptor, bodisi tudi dejstva, da so spojine zmesi dveh enantiomerov (spojine so racemati), od katerih ima lahko samo eden možnost vezave na CRD DC-SIGN. Spojina **TSZ-19** s fenilnim substituentom simetričnega diarilglicerola ima šibko aktivnost z $IC_{50}= 2.41$ mM (33), spojina **29** pa je praktično brez aktivnosti z $IC_{50}= 8.64$ mM. V tem primeru pomeni zamenjava simetričnega za nesimetrični difenilglicerol izgubo aktivnosti za določen manozid. Simetrija diarilne strukture vpliva tudi na učinek elektron donorske metoksi skupine na *para* položaju fenilnega obroča. Simetrična spojina **26** ($IC_{50}= 5.15$ mM) ima veliko slabšo aktivnost kot pa nesimetrična spojina **TTD-09** ($IC_{50}= 1.01$ mM) (33). Ugotovili smo, da ni bistvene razlike v aktivnosti pri *p*-metoksi in *p*-nitro substituciji, saj je tudi aktivnost spojine **30** slaba ($IC_{50}= 5.73$ mM). Spojinama **27** in **31** nismo mogli določiti aktivnosti zaradi slabe topnosti. Najvišja koncentracija, pri kateri smo lahko pripravili omenjeni spojini, je bila 0.5 mM, pri tej koncentraciji pa ni bilo aktivnosti. Z monomernimi antagonisti težko dosežemo višje afinitete, vendar kot so ugotovili pri spojinah **TSZ-15** ($IC_{50}= 40$ μ M) in **TSZ-20** ($IC_{50}= 50$ μ M), kjer sta IC_{50} v nižjem mikromolarnem območju (33), je bila želja pri sintezi naših novih potencialnih antagonistov doseči aktivnost vsaj v mikromolarnem območju. Glede na strukturo spojin **TSZ-15** in **TSZ-20** lahko sklepamo, da imajo spojine s simetričnimi diarilgliceroli večjo afiniteto na receptor DC-SIGN. Spojini **TSZ-20** in **31** imata obe metoksi naftilni substituent, razlika je v tem, da ima spojina **31** nesimetrični glicerol, medtem ko ima spojina **TSZ-20** simetričnega. Nesimetrični diarilglicerol je v tem primeru pomenil izgubo aktivnosti, vendar točne IC_{50} vrednosti spojine **31** nismo uspeli določiti zaradi slabe topnosti. Spojina **28** žal še ni bila testirana za antagonistično aktivnost na receptorju DC-SIGN, vendar spojina **TTD-21** z nesimetričnim glicerolom izkazuje IC_{50} vrednost 395 μ M (33). Na splošno velja, da se lahko z monovalentnimi glikomimetiki doseže aktivnosti v mikromolarnem območju, saj lahko zasedemo samo eno CRD na tetrameru DC-SIGN. Večjo avidnost vezave lahko dosežemo s polivalentnimi ligandi, ki nosijo po več kopij monomernih glikomimetikov na ustreznem nosilcu.

b) FimH

V kristalni strukturi receptorja FimH se prav tako nahaja področje, kamor se lahko vežejo hidrofobne strukture – tirozinska vrata. Ta del je sestavljen iz dveh tirozinov (Tyr48 in Tyr137) in enega izolevcina (Ile52) (24). Podobnost znanih antagonistov FimH z našimi načrtovanimi potencialnimi antagonisti DC-SIGN nas je stimulirala za testiranje spojin tudi na receptorju FimH. V času pošiljanja spojin k prof. dr. Beatu Ernstu na Institute of Molecular Pharmacy na University of Basel v Švici so bile sintetizirane le spojine **26**, **29** in **30**, medtem ko bodo novo sintetizirane spojine **27**, **28** in **31** testirane v bližnji prihodnosti. Z dobljenimi rezultati smo lahko zelo zadovoljni, saj sta imeli spojini **29** in **30** aktivnost v nanomolarnem območju. Obe spojini imata v svoji strukturi nesimetričen diarilglicerol. Spojina **30**, ki je 4-nitrofenilni derivat in ima boljšo aktivnost kot spojina **29**, ki ima samo fenilni fragment. Glede na to, da sta v nM območju aktivni spojini **29** in **30** z nesimetričnim diarilglicerolom, lahko sklepamo, da simetrija pomembno vpliva na aktivnost spojin na FimH. Primerjamo lahko tudi spojino **TSZ-19** in **29**, slednja vsebuje nesimetričen diarilglicerol in ima veliko boljšo aktivnost ($IC_{50} = 144$ nM), kot pa spojina **TSZ-19** ($IC_{50} = 450$ nM) (36), ki vsebuje simetrični diarilglicerol. Spojina **TSZ-20** z simetričnim 7-metoksi-2-naftilnim fragmentom izkazuje najslabšo aktivnost med testiranimi spojinami ($IC_{50} = 593$ nM) (36). Spojina **31** vsebuje isti fragment, vendar z nesimetričnim diarilglicerolom, zato lahko pričakujemo, da bo aktivnost spojine **31** dosti boljša, saj imajo spojine z nesimetričnim diarilglicerolom boljšo aktivnost na receptorju FimH. Spojina **26** v nM območju ni izkazovala aktivnosti, zato bi jo bilo potrebno testirati pri višjih koncentracijah. Na izgubo aktivnosti je morda vplivala elektron donorska metoksi skupina na fenilnem obroču ali pa simetričnost diarilglicerola. Na drugi strani spojina **TTD-09** vsebuje isti fragment, vendar z nesimetričnim diarilglicerolom in aktivnost spojine z nesimetričnim diarilglicerolom je tudi v tem primeru boljša ($IC_{50} = 208$ nM) (36). Presenetljiv rezultat pa je dobra aktivnost spojine **TSZ-15** ($IC_{50} = 58$ nM) (36), ki vsebuje simetrični dinaftilglicerol, zato lahko pričakujemo še boljše rezultate aktivnosti spojine **TTD-17**, ki vsebuje nesimetrični dinaftilni fragment.

Pri zasnovanju načrta magistrske naloge smo se najprej osredotočili na receptor DC-SIGN, kjub temu sintetizirane končne spojine kažejo boljšo aktivnost na receptor FimH. Vrednosti IC_{50} na receptorju FimH so v nanomolarnem območju, kar si lahko z monovalentnimi glikomimetiki zaenkrat pri DC-SIGN samo želimo. Potrebno je tudi poudariti, da ima večina testiranih in že objavljenih potencialnih antagonistov FimH vrednosti IC_{50} v nanomolarnem območju. To je tudi posledica dejstva, da je vezavno mesto pri FimH veliko manjše in oblikovano v žep, kamor se ligand lahko tesno sidra in interagira s proteinom. Po drugi strani pa je vezavno mesto pri DC-SIGN veliko bolj ravno in ne omogoča tako tesne vezave liganda, ampak je ta v veliki meri v kontaktu s topilom in ne s proteinom.

6. ZAKLJUČEK

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali šest novih glicerolomanozidov z razvejanima hidrofobnima ostankoma. Sintetizirane spojine so bi bile načrtovane kot potencialni antagonisti receptorja DC-SIGN, vendar smo jih zaradi podobnih lastnosti z znanimi antagonisti FimH testirali tudi na tem lektinskem receptorju. Končnim spojinam smo določili aktivnost na obeh receptorjih, tako da smo določili vrednosti IC_{50} , ki pomenijo 50% inhibicijo vezave gp120 na CRD DC-SIGN oziroma 50% inhibicijo vezave metil α -D-manopiranozida na FimH. Sintetizirane spojine praktično niso bile aktivne na receptorju DC-SIGN, kažejo pa obetavno aktivnost na receptorju FimH v nanomolarnem območju.

Spojine smo sintetizirali v več stopnjah. Izhodna spojina je bila D-manoza, ki smo ji v prvi stopnji zaščitili vse hidroksilne skupine in nato odščitili anomerno hidroksilno skupino, ki smo jo nato aktivirali v obliki trikloroacetimidata. Ločeno smo sintetizirali različno razvejane diarilglicerole, ki smo jih v stopnji glikozilacije stereoselektivno pripeli na D-manozo v α konfiguraciji. V zadnji stopnji smo odščitili preostale zaščitene hidroksilne skupine in dobili končne spojine. Največ težav smo imeli pri sintezi spojine **10**, saj smo kar nekaj časa optimizirali postopek, ker reakcija po običajnem postopku ni potekla. Spojino smo želeli sintetizirati z nukleofilno substitucijo 2-naftola in 1,3-dikloroacetona, v naslednji stopnji pa bi sledila redukcija ketona do alkohola, vendar reakcija ni potekla. V zadnjem poskusu smo se lotili sinteze po patentnem postopku (31). Reakcija je potekla, vendar smo morali patentni postopek dodatno optimizirati. V drugi stopnji sinteze spojine **10** je namreč ključno, da 2-naftol pretvorimo v kalijevo sol, preden ga združimo s spojino **11**.

Sintetizirane spojine se razlikujejo v strukturi pripetih diarilglicerolov in njihovi simetriji. Končne spojine ne kažejo aktivnosti na receptor DC-SIGN, saj je ta v milimolarnem območju, izkazujejo pa obetavno aktivnost na receptor FimH. Veliko težav pri testiranju na receptor DC-SIGN je predstavljala slaba topnost sintetiziranih spojin, zato je bilo težko pripraviti raztopine spojin v ustrezno visokih koncentracijah. Vzrok za slabšo aktivnost so verjetno tudi neoptimalne interakcije aromatskih substituentov sintetiziranih spojin s hidrofobno regijo, ki jo definira Phe313 v vezavnem mestu CRD DC-SIGN. Kot najbolj aktivna spojina na FimH se je izkazala spojina **30**, ki je izkazovala IC_{50} vrednost 105 nM, kar je primerljivo z že znanimi antagonisti tega receptorja.

Za nadaljnje načrtovanje in sintezo potencialnih antagonistov DC-SIGN in FimH je ključno izboljšanje topnosti spojin, kar bi lahko dosegli z uvedbo bolj polarnih skupin na aromatskih obročih. Aktivnost antagonistov DC-SIGN bi lahko izboljšali s sintezo polivalentnih glikomimetikov, ki bi tvorili ustrezne interakcije na vseh štirih CRD DC-SIGN tetramera. Pri FimH bi lahko preučili vezavo odkritih antagonistov s pomočjo sidranja molekul v vezavno mesto, s čimer bi dobili ideje za nadaljnje načrtovanje in sintezo optimiziranih spojin. Prav tako bi bilo smiselno razmisliti o spojinah, ki ne vsebujejo ogljikovih hidratov, s čimer bi se izboljšala stabilnost in farmakokinetične lastnosti spojin.

7. LITERATURA

1. Hartmann M, Lindhorst TK: The bacterial lectin FimH, a target for drug discovery – Carbohydrate inhibitors of type 1 fimbriae-mediated bacterial adhesion. *Eur J Org Chem* 2011; 2011: 3583-3609.
2. Vazquez-Mendoza A, Carrero JC, Rodriguez-Sosa M: Parasitic infections: A role for C-type lectins receptors. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 1-11.
3. Kiran KK, Lalith PCK, Sumanthi J, Sridhar RG, Chandra SP, Reddy BVR: Biological role of lectins: *J Orofasc Sci* 2012; 4: 20-25.
4. Ernst B, Magnani JL: From carbohydrate leads to glycomimetic drug. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 661-677.
5. van Kooyk Y, Geijtenbeek TB: DC-SIGN escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 697-709.
6. van Vliet SJ, Garcia-Vallejo JJ, van Kooyk Y: Dendritic cells and C-type lectin receptors: Coupling innate to adaptive immune responses. *Immunol Cell Biol* 2008; 86: 580-587.
7. Cambi A, Koopman M, Figdor CG: How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol* 2005;7(4): 481-488.
8. Zelensky AN, Gready JE: The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J* 2005; 272: 6179-6217.
9. Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI: Signalling through C-type lectin receptors: Shaping immune responses. *Nat Rev* 2009; 9: 465-479.
10. Anderluh M: DC-SIGN antagonists - A paradigm of C-type lectin binding inhibition. *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology* 2012 Prof. Chuan-Fa Chang (Ed.), ISBN: 978-953-51-0864-1, InTech, DOI: 10.5772/50627.
11. Geijtenbeek TBH, Engering A, van Kooyk Y: DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *J Leukocyte Biol* 2002; 71: 921-930.
12. Obermajer N, Sattin S, Colombo C, Bruno M, Švajger U, Anderluh M, Bernardi A: Design, synthesis and activity evaluation of mannose-based DC-SIGN antagonists. *Mol Divers* 2011; 15: 347-360.

13. Engering A, Geijtenbeek TBH, van Kooyk Y: Immune escape through C-type lectins on dendritic cells. *TRENDS Immunol* 2002; 23: 480-485.
14. Kerrigan AM, Brown GD: C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* 2009; 214: 562-575.
15. Anderluh M, Jug G, Švajger U, Obermajer N: DC-SIGN antagonists, a potential new class of anti-infectives. *Curr Med Chem* 2012; 19: 992-1007.
16. Sharon N: Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious disease. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 527-537.
17. Tchesnokova V, Aprikian P, Kisiela D, Gowey S, Korotkova N, Thomas W, Sokurenko E: Type 1 fimbrial adhesin FimH elicits an immune response that enhances cell adhesion of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2011; 79: 3895-3904.
18. Schembri MA, Kjaergaard K, Sokurenko EV, Klemm P: Molecular characterization of the *Escherichia coli* FimH adhesin. *J Infect Dis* 2001; 183: S28-S31.
19. Ofek I, Hasty DL, Sharon N, Anti-adhesion therapy of bacterial disease: prospects and problems, *FEMS Immunol Med Mic* 2003; 38: 181-191.
20. Schwardt O, Rabbani S, Hartmann M, Abgottspon D, Wittwer M, Kleeb S, Zalewski A, Smiesko M, Cutting B, Ernst B: Design, synthesis and biological evaluation of mannosyl triazoles as FimH antagonists. *Bioorg Med Chem* 2011; 19: 6454-6473.
21. Han Z, Pinkner JS, Ford B, Chorell E, Crowley JM, Cusumano CK, Campbell S, Henderson JP, Hultgren SJ, Janetka JW: Lead optimization studies on FimH antagonists: Discovery of potent and orally bioavailable ortho-substituted biphenyl mannosides. *J Med Chem* 2012; 55: 3945-3959.
22. Pang L, Kleeb S, Lemme K, Rabbani S, Scharenberg M, Zalewski A, Schadler F, Schwardt O, Ernst B: FimH antagonists: Structure-activity and structure-property relationship for biphenyl alfa-D-mannopyranosides. *ChemMedChem* 2012; 7: 1404-1422.
23. Klein T, Abgottspon D, Wittwer M, Rabbani S, Herold J, Jiang X, Kleeb S, Lüthi C, Scharenberg M, Bezencom J, Gubler E, Pang L, Smiesko M, Cutting B, Schwardt O, Ernst B: FimH antagonists for the oral treatment of urinary tract infections: From design and synthesis to in vitro evaluation. *J Med Chem* 2012; 53: 8627-8641.

24. Jiang X, Abgottspon D, Kleeb S, Rabbani S, Scharenberg M, Wittwer M, Haug M, Schwardt O, Ernst B: Antiadhesion therapy for urinary tract infections - A balanced PK/PD profile proved to be key for success. *J Med Chem* 2012; 55: 4700-4713.
25. Hewson T, Lone N, Moore M, Howie S: Interactions of HIV-1 with antigen-presenting cells. *Immunol Cell Biol* 1999; 77: 289-303.
26. Švajger U, Obermajer N, Anderluh M, Kos J, Jeras M: DC-SIGN ligation greatly affects dendritic cell differentiation from monocytes compromising their normal function. *J Leukocyte Biol* 2011; 89: 1-13.
27. Steinman R: DC-SIGN: A guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell* 2000; 100: 491-494.
28. Chen Y, Hwang S-L, Chan VSF, Chung NPY, Wang S-R, et.al.: Binding of HIV-1 gp120 to DC-SIGN promotes ASK-1-dependent activation-induced apoptosis of human dendritic cells. *PLOS Pathog* 2013; 9: 1-17.
29. Zhou T, Chen Y, Hao L, Zhang Y: DC-SIGN and immunoregulation. *Cel Mol Immunol* 2006; 3: 279-283.
30. Scharenberg M, Schwardt O, Rabbani S, Ernst B: Target selectivity of FimH antagonists. *J Med Chem* 2012; 55: 9810-9816.
31. Rhee HJ, Bae JE: Highly refractive acrylate and the method for preparing the same. United States Patent, Patent number US 2012/0010315 A1, Date of patent Jan. 12, 2012.
32. Cambi A, Figdor CG: Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 539-546.
33. Hajšek D, Testni sistem za določanje afinitete antagonistov receptorja DC-SIGN in vitro, Diplomsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
34. Lindhorst TK: *Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry*, 2. izdaja, Wiley-VCH, 2003: 39-89.
35. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: *Farmacevtska kemija III Vaje in Seminarji*, 1. izdaja, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2010: 65
36. Tomašič T, Anderluh M, Ernst B, neobjavljeni rezultati.