

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARICA KRALJ

MAGISTRSKA NALOGA

PODIPLOMSKI MAGISTRSKI ŠTUDIJ INDUSTRIJSKE
FARMACIJE

LJUBLJANA, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARICA KRALJ

**SINTEZA GLIKOMIMETIČNIH ANTAGONISTOV RECEPTORJA
DC-SIGN Z DIARILAMIDOPROPANOLOMANOZIDNO
STRUKTURO**

**SYNTHESIS OF THE DC-SIGN RECEPTOR'S GLICOMIMETIC
ANTAGONISTS WITH DIARYLAMIDOPROPANOLOMANOSID
STRUCTURE**

PODIPLOMSKI MAGISTRSKI ŠTUDIJ INDUSTRIJSKE
FARMACIJE

LJUBLJANA, 2014

Magistrsko delo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo in na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Marku Anderluhu za razumevanje in za vse strokovne nasvete pri praktičnem delu v laboratorju, kot tudi pri pisanju ter za popravljanje magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem tudi članoma komisije za pregled naloge ter gospe Damjani Zalar za praktične nasvete in popestritev dela v laboratoriju.

Zahvaljujem se prijateljem ter vsem ostalim, ki so mi kakorkoli pomagali tekom študija.

Hvala tudi bratom in staršema, ki so mi ves čas študija stali ob strani. Še prav posebej se moram zahvaliti Anžetu za vso pomoč, razumevanje in spodbujanje na poti do cilja.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm.

Marica Kralj

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Stanko Srčič

Član magistrske komisije: doc. dr. Tomaž Bratkovič

VSEBINA

1	UVOD	1
1.1	DENDRITIČNE CELICE.....	1
1.2	RECEPTOR DC-SIGN.....	2
1.2.1	Vloga DC-SIGN pri okužbi z virusom HIV-1.....	3
1.2.2	Struktura DC-SIGN	3
1.3	GLIKOMIMETIČNI ANTAGONISTI	5
1.3.1	Glikomimetični antagonisti DC-SIGN	5
1.3.2	Sinteza monovalentnih glikomimetikov	7
2	NAMEN DELA.....	10
3	MATERIALI IN METODE	12
3.1	MATERIALI	12
3.1.1	Reagenti in topila.....	12
3.1.2	Laboratorijski pribor.....	12
3.1.3	Aparature	12
3.1.4	Oprema	12
3.2	METODE.....	13
3.2.1	Kromatografske metode	13
3.2.2	Jedrsko magnetna resonanca.....	13
3.2.3	Masna spektrometrija	13
4	EKSPERIMENTALNO DELO	14
4.1	REAKCIJSKE SCHEME.....	14
4.1.1	Trikloroacetimidatna sinteza	16
4.1.2	Sinteza 1. intermediata	17
4.1.3	Sinteza 2. intermediata	19
4.1.4	Odščita hidroksilne skupine na 2. intermediatu.....	20
4.2	SINTEZNI POSTOPKI IN REZULTATI ANALIZ	21
4.2.1	Sintezni postopki in rezultati analiz AKM-1	21
4.2.2	Sintezni postopki in rezultati analiz AKM-2.....	22
4.2.3	Sintezni postopki in rezultati analiz AKM-4.....	23
4.2.4	Sintezni postopki in rezultati analiz AKM-3.....	24
4.2.5	Sintezni postopki in rezultati analiz AKM-7.....	25

4.2.6	Sintezni postopki in rezultati analiz AKM-5.....	26
4.2.7	Sintezni postopki in rezultati analiz AKM-8.....	28
4.2.8	Sintezni postopki in rezultati analiz AKM-6.....	29
4.2.9	Sintezni postopki in rezultati analiz AKM-9.....	30
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	32
5.1	ANALIZA SINTEZNIH POSTOPKOV	32
5.1.1	Trikloroacetimidatna sinteza	32
5.1.2	Sinteza 1. intermediatov	33
5.1.3	Sinteza 2. intermediatov	34
5.1.4	Sinteza končnih spojin.....	35
5.2	BIOLOŠKO TESTIRANJE.....	36
5.2.1	Kompetitivni vezavni test izpodrivanja vezave gp120 na DC-SIGN.....	36
5.2.1.1	Antagonisti DC-SIGN z distančnikom 1,3-diaminopropan-2-ol.....	36
5.2.1.2	Antagonisti DC-SIGN z distančnikom glicerolom.....	40
5.2.2	Citotoksičnost antagonistov DC-SIGN	44
6	ZAKLJUČEK.....	45
7	LITERATURA.....	46

POVZETEK

DC-SIGN (Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin) je lektinski receptor tipa C, ki se nahaja na površini dendritičnih celic (DC).

Za preprečevanje infekcijskih obolenj lahko uporabimo glikomimetične antagoniste, ki preprečijo vezavo patogena na DC-SIGN. Monovalentni glikomimetični antagonisti so nizkomolekularne molekule, ki lahko zavzamejo samo eno DC-SIGN CRD. Strukturno so ponavadi sorodni oligosaharidom, oblikujemo jih z ustrezno izbiro monosaharidne enote ali glikozidnega nadomestka in dodatnih struktur, ki prispevajo k skupni vezavni afiniteti.

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali potencialne glikomimetične antagoniste receptorja DC-SIGN. Na osnovni propanoldiaminski distančnik smo pripeli aromatske karboksilne kisline z amidno vezjo ter tako pripravljene gradnike pripeli na D-manozo z α -glikozidno vezjo. Na ta način smo dobili manozilirane ligande, ki so ob ohranjenem jedrnem monosaharidu imeli v svoji strukturi tudi lipofilne dele, ki lahko z receptorskim mestom tvorijo dodatne interakcije.

Sintetiziranim spojinam smo določili afiniteto z *in vitro* kompetitivnim vezavnim testom, kjer smo ovrednotili njihovo izpodrivanje vezave HIV-1 površinskega glikoproteina gp120 na DC-SIGN. Določili smo tudi vrednosti IC_{50} , ki so bile v milimolarnem območju za spojini AKM-6 in AKM-9. Najmočnejši monovalentni glikomimetični antagonisti DC-SIGN so spojine, ki imajo v strukturi dva naftilna obroča.

Ključne besede: DC-SIGN, DC-SIGN antagonist, D-manoza, 1,3-diaminopropan-2-ol, HIV-1, glikomimetik

ABSTRACT

DC-SIGN (Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin) is a C-type lectin receptor which is present on surface of dendritic cells (DC).

Glycomimetic antagonists that inhibit adhesion of pathogens to DC-SIGN can be used for preventing infectious diseases. Monovalent glycomimetic antagonists are low-molecular-weight molecules that can occupy only one DC-SIGN carbohydrate recognition domain. Structurally, they often resemble oligosaccharides and are designed by appropriately selected monosaccharide unit or glycoside surrogate and additional structures, which contribute to common binding affinity.

Within this thesis we have synthesised potential glycomimetic DC-SIGN receptor antagonists. We have attached aromatic carboxylic acids to the propanol diaminic spacer via amide bond and have coupled these structures to a D-mannose via α -glycoside bond. In this way we have obtained mannosylated ligands that possessed lipophilic parts which can engage in additional interactions with the receptor.

For the synthesized compounds, the affinity was determined by employing *in-vitro* competitive binding test based on capability of tested compounds to displace HIV-1 surface glycoprotein gp120 from DC-SIGN. The determined IC_{50} values for compounds AKM-6 and AKM-9 were in millimolar range. Most potent were found to be monovalent glycomimetic DC-SIGN antagonists, i.e., compounds with two naphthyl rings.

Key words: DC-SIGN, DC-SIGN antagonist, D-mannose, 1,3-diaminopropane-2-ol, HIV-1, glycomimetic

SEZNAM OKRAJŠAV

AcOH	etanojska kislina
Ac ₂ O	acetanhidrid
APC	antigen-predstavitvene celice
CCR5	peti kemokinski receptor
CLR	lektinski receptor tipa C (C-type lectin receptor)
CRD	domena za prepoznavanje ogljikovih hidratov (carbohydrate recognition domain)
CTL	citotoksična celica T
CTLD	domena lektina tipa C (C-type lectin domain)
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-en
DC	dendritične celice
DC-SIGN	»dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin«
DKM	diklorometan
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamid
ECD	zunajcelična domena (extracellular domain)
EDC	1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarbodiimid
EtOAc	etilacetat
gp 120	plaščni glikoprotein gp120, ki se nahaja na površini virusa HIV
HIV	virus humane imunske pomanjkljivosti (human immunodeficiency virus)
HOBt	1-hidroksibenzotriazol

ICAM	medcelična adhezijska molekula (intercellular adhesion molecule)
IL-1 (2, 3)	interlevkin-1 (2, 3)
MeOH	metanol
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
PI	propidijev jodid
PHK	poglavitni histokompatibilnostni kompleks
PRR	receptor, ki prepoznava različne molekularne vzorce patogenov (pattern recognition receptor)
TLC	tankoplastna kromatografija (thin layer chromatography)
TLR	toll-u podobni receptor (toll-like receptor)
TMSOTf	trimetilsilil trifluorometansulfonat
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze α

1 UVOD

1.1 DENDRITIČNE CELICE

Dendritične celice (DC) so antigen-predstavitvene celice (APC), ki prenašajo antigenske informacije celicam pridobljenega imunskega sistema. (3) DC privzemajo, predelajo in predstavijo antigene ter potujejo skozi tkiva in sodelujejo z limfociti. Vzdržujejo toleranco na lastne antigene. (4, 5) DC je leta 1868 v epidermisu kože odkril P. Langerhans in jih predstavil kot celice s številnimi izrastki. R. Steinman s sod. je leta 1978 razvil postopke, s katerimi so osamili tovrstne celice v zadostnem številu in pokazali, da lahko DC izovejo najmočnejši proliferacijski odziv limfocitov T (1) in vplivajo na njihovo diferenciacijo, s čimer začrtajo značilnosti nastajajočega imunskega odziva. (5) DC nastanejo v kostnem mozgu, kjer se najprej iz krvotvorne pluripotentne matične celice razvijeta multipotentna matična celica limfoidne vrste in multipotentna matična celica mieloidne vrste. Iz prve se razvijejo plazmacitoidne DC, iz druge Langerhansove celice ter intersticijske oz. dermalne DC. (10, 30) Za obrambo telesa pred patogenimi organizmi so ključne Langerhansove celice ter dermalne oz. intersticijske DC, ki naseljujejo periferna tkiva. Tam privzemajo antigene, nato pa se preselijo v sekundarne limfne organe, kjer jih prepoznajo limfociti T. (4, 10, 30)

DC se nahajajo v vsaj dveh aktivacijskih stanjih: kot nezrele in zrele DC. Nezrele oz. neaktivirane DC so prve APC, ki pridejo v stik z različnimi patogeni. Njihovo prisotnost zaznajo s pomočjo nepolimorfnih, skozi evolucijski razvoj ohranjenih receptorjev PRR (angl. *pattern-recognition receptors*), ki prepoznavajo značilne strukturne molekulske vzorce posameznih vrst mikroorganizmov. (4, 10, 30) Mednje uvrščamo različne receptorje TLR, ki omogočajo, da se nezrele DC po stiku z bakterijami in virusi hitro aktivirajo in dozoriijo ter postanejo zrele oz. aktivirane DC. (11) Te izražajo kostimulacijske molekule in proizvajajo prosvetne citokine, med katerim sta najpomembnejša interleukin 12 (IL-12) in dejavnik tumorske nekroze α (TNF- α). Zaradi teh lastnosti DC zelo učinkovito aktivirajo antigensko specifične klone limfocitov T v področnih bezgavkah. Zrele DC v bezgavkah aktivirajo limfocite T CD4+ do Th1, ki pomagajo pri aktiviranju makrofagov in dozorevanju citotoksičnih limfocitov T CD8+. Limfociti T CD4+ Th2 so nujni za nastanek humoralne imunosti oz. tvorbo antigensko specifičnih protiteles. (12, 21, 22) Na površini DC se nahaja receptor DC-SIGN, ki vpliva na imunski odziv DC z »lovljenjem« patogenov, aktivacijo ter z migracijo DC. (7)

1.2 RECEPTOR DC-SIGN

DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin) je lektinski receptor tipa C (CLR). Oznaka za ta receptor je tudi CD209. Najdemo ga na specializiranih APC kot so DC. (9) Poimenovanje DC-SIGN lahko pojasnimo kot HIV-1 gp120 vezoči lektin tipa C, ki posreduje vezavo DC na ICAM-3, ta se pa veže na površino T-celic s Ca^{2+} ioni brez integrinskih receptorjev. (7) DC-SIGN prepozna predvsem manozne in fukozne ogljikohidratne ostanke ter vzorce, ki so skupni različnim patogenom, kot je npr. bakterijski lipopolisaharid (LPS). (15, 31) Receptor DC-SIGN je ključnega pomena pri vezavi endogenih ligandov. Vezava ligandov na DC-SIGN povzroči dozorevanje DC. DC-SIGN veže znotrajcelične adhezijske molekule ICAM-2 in ICAM-3. ICAM-2 je izražen na žilnem in limfatičnem endoteliju in omogoči gibanje DC iz perifernih tkiv v bezgavke. Interakcija med DC-SIGN in ICAM-3 posreduje antigensko-nespecifičen stik med DC in celicami T v bezgavki. DC-SIGN sodeluje tudi pri prilagoditvi imunskega odziva na različne povzročitelje bolezni preko ko-stimulacije signalov, posredovanih preko PRR. (9, 13, 16, 17)

DC-SIGN je pogosto prvi receptor, s katerim patogeni pridejo v stik pri vdoru v telo. V normalnih okoliščinah ta interakcija vodi v internalizacijo patogena in njegovo razgradnjo v DC, v določenih primerih pa DC-SIGN deluje kot vstopna točka za različne patogene ter tako kot posrednik okužbe. DC-SIGN prepozna in veže različne **viruse** kot so *HIV-1*, *virus hepatitisa C*, *citomegalovirus*, *Dengue*, *Ebola*, *SARS*, *herpes simpleks*, *koronavirusi*, *H5N1*, *virus zahodnega Nila*, *virus ošpic*, **bakterije** *H. pylori*, *M. tuberculosis*, *L. interrogans*, **glive** *C. albicans*, *A. fumigatus* in **parazite** *Leishmania*, *S. mansoni*. (13, 15, 32) Patogeni *M. tuberculosis* in HIV-1, ki vsebujejo v svoji strukturi manozo, ob vezavi na DC-SIGN vodijo TLR izločanju IL-10, IL-12 in IL-6. (9, 13)

DC-SIGN lahko sodeluje pri začetku in razširjanju okužbe, zato bi lahko okužbo s taistimi patogeni zavirali preko DC-SIGN na naslednje načine:

- inhibicija vezave patogenov na DC-SIGN s specifičnimi ligandi - majhnimi antagonisti DC-SIGN,
- inhibicija vezave patogenov na DC-SIGN s specifičnimi polivalentnimi ligandi na osnovi ogljikovih hidratov,
- inhibicija vezave patogenov na DC-SIGN s specifičnimi protitelesi proti DC-SIGN,

- uporaba specifičnih DC-SIGN ciljanih vektorjev, ki kodirajo proteine patogenov, da bi povzročili imunizacijo. (9)

1.2.1 Vloga DC-SIGN pri okužbi z virusom HIV-1

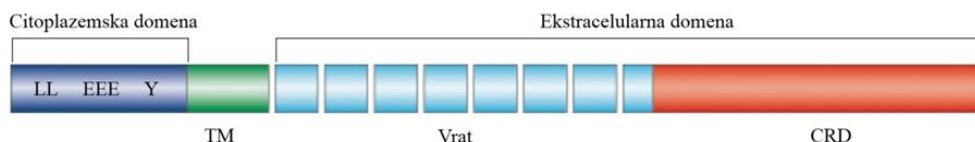
HIV-1 lahko vstopi v DC s pomočjo vezave na DC-SIGN. Prva interakcija med HIV-1 in DC se zgodi preko glikoproteina gp120 na ovojnici HIV-1, ki se veže na DC-SIGN. Rezultat tega je v večini primerov internalizacija, degradacija ter izpostavljanje patogena T-celicam CD4⁺ in s tem začetek humoralnega imunskega odziva. DC pa lahko predstavljajo trojanskega konja, ki omogoči prenos HIV-1 do T-celic CD4⁺ in tako varuje HIV-1 pred imunskim sistemom gostitelja. Večina HIV-1 virionov, ki so vezani na DC-SIGN, podleže degradaciji in procesiranju. Nekaj jih ostane vezanih na DC-SIGN tudi intracelularno in so zato zavarovani pred imunskim sistemom gostitelja. Delci HIV-1 ohranijo svojo infektivnost in ostanejo na DC skriti več dni. (13) Taista DC dozori in potuje v limfne vozle, kjer okuži limfocite CD4⁺. To pot imenujemo tudi "trans" pot prenosa HIV-1, kjer DC delujejo kot prenašalke HIV-1 ne da bi HIV-1 dejansko okužil DC. Podoben mehanizem okužbe gostitelja imajo verjetno tudi ostali patogeni. (2, 32)

Po interakciji HIV-1 z DC-SIGN lahko pride tudi do alternativne poti oz. do t.i. "cis" prenosa na CXCR4 in/ali CCR5 receptorje, ki so izraženi na nezrelih DC. Nato pride do zlitja virusne ovojnice s celično membrano in do okužbe DC s HIV-1. Tako okužene DC ravno tako potujejo v limfne vozle, kjer okužijo limfocite CD4⁺ in omogočijo razširjeno in trajno okužbo s HIV-1. (9)

1.2.2 Struktura DC-SIGN

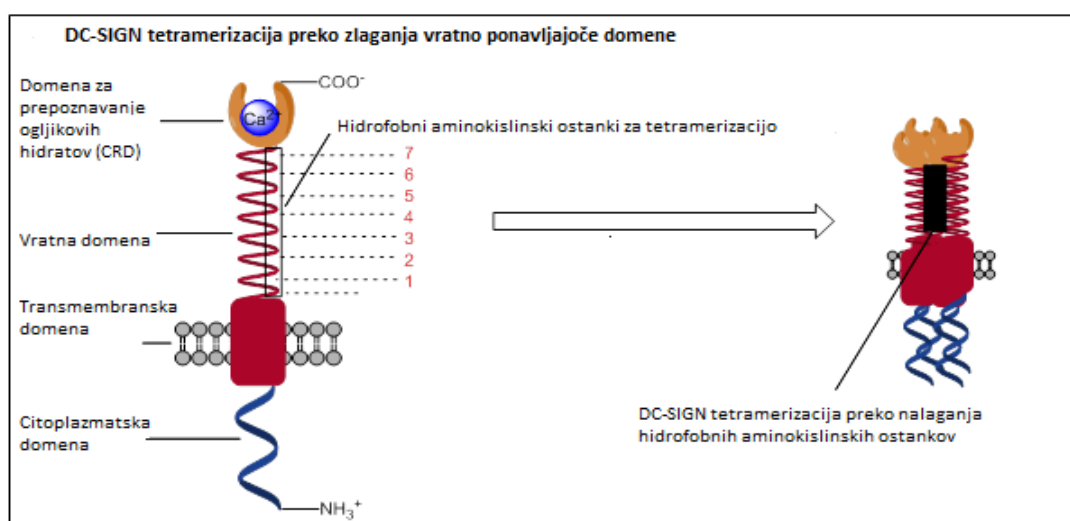
DC-SIGN je transmembranski protein tipa II z molekularno maso 44 kD in je sestavljen iz treh delov: zunajceličnega, transmembranskega in citoplazemskega dela (slika 1). (7) Zunajcelični del vsebuje domeno za prepoznavanje ogljikovih hidratov (CRD), ki omogoča vezavo ogljikovih hidratov. (9, 31) CRD receptorja DC-SIGN je globularna struktura sestavljena iz 2 α -vijačnic, 12 β -verig in 3 disulfidnih mostičkov. Del proteina tvori zanko, na kateri sta dve mesti za vezavo Ca²⁺, ki določata zgradbo CRD. (9) Eno izmed teh mest je odgovorno za konformacijo CRD-ja, drugo pa za tvorbo koordinacijskih vezi z ogljikohidratnimi strukturami. Interakcije s Ca²⁺ v tem vezavnem mestu tvorijo tudi štirje aminokislinski ostanki (Glu347, Asn349, Glu354 in Asn365) in uravnavajo prepoznavanje specifičnih ogljikohidratnih struktur. (9, 23, 24) V zunajceličnem delu najdemo tudi vrat

DC-SIGN, ki omogoča tvorbo stabilnih tetramerov in je sestavljen iz sedmih popolnih in ene nepopolne tandemske ponovitve. Temu sledi transmembranski del (TM), ki je ključen za lokalizacijo DC-SIGN na površini celic. (7) Transmembranskemu delu sledi citoplazemski del oziroma domena, ki je sestavljena iz di-levcinskega motiva (LL), tri-kislinskih skupkov (EEE) in aktivacijskega motiva ITAM (Y) (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), ki omogočajo recikliranje, internalizacijo in intracelularno signaliziranje. (7, 9, 20)



Slika 1: Struktura DC-SIGN-a. (20)

Pomembna naloga hidrofobnega področja vratu je stabilizacija in ločevanje CRD od celične površine, kar omogoči večvalentno interakcijo z glikanskimi ligandi (slika 2). (9)



Slika 2: DC-SIGN tetramerizacija preko ponavljajoče se vratne domene. Vratna domena je sestavljena iz ponovitve vijačnice z interakcijami hidrofobnih aminokislinskih ostankov. (2)

Vezavno mesto DC-SIGN nudi 6 koordinacijskih vezi za Ca^{2+} ione in 2 koordinacijski vezi, ki jih tvorijo molekule vode v nevezanem stanju ali pa ogljikohidratni ostanki v vezanem stanju. (25) DC-SIGN vsebuje Glu347-Pro348-Asn349-Asn350 zaporedje v CRD, ki omogoča vezavo monosaharidov s hidroksilnimi skupinami na mestih 3 in 4 v ekvatorialni legi. (9)

1.3 GLIKOMIMETIČNI ANTAGONISTI

Glikomimetiki so zasnovani z namenom, da posnemajo strukturo naravnih ogljikovih hidratov, ki bi jih bilo težavno izolirati iz naravnih virov, zaradi omejene dostopnosti in tudi zaradi dolgotrajnosti postopka. (19)

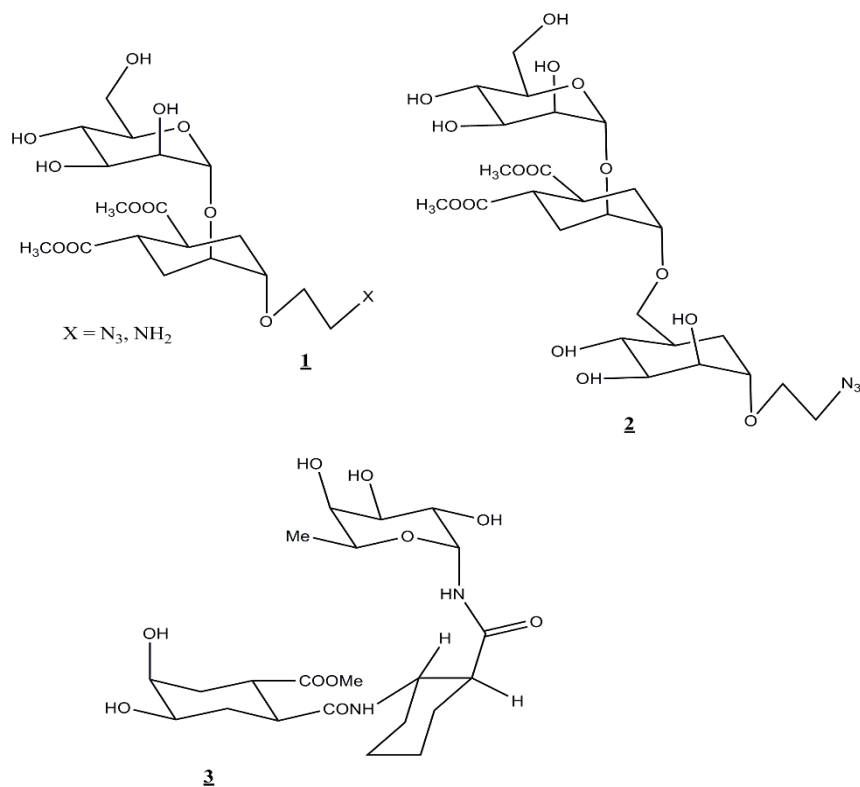
Sinteza glikomimetikov ima številne prednosti:

- zasnovati jih je mogoče tako, da so v organizmu nerazgradljivi,
- njihovo strukturo je mogoče spreminjati z vezavo različnih funkcionalnih skupin,
- pripraviti jih je mogoče kot spojine z nizko molekulsko maso. (19)

Dodatna prednost glikomimetikov je, da imajo lahko višjo afiniteto vezave na receptor v primerjavi z naravno prisotnimi spojinami. (19) Slabosti potencialnih zdravil z ogljikohidratno strukturo so večinoma slabe farmakokinetične lastnosti zaradi njihove visoke polarnosti. Pojavi se vprašanje, ali je mogoče te snovi uporabiti kot DC-SIGN antagoniste. (9)

1.3.1 Glikomimetični antagonisti DC-SIGN

Za preprečevanje infekcijskih obolenj lahko uporabimo antagoniste, ki preprečijo vezavo patogena na DC-SIGN. Zmerno visoko afiniteto vezave na DC-SIGN imajo oligosaharidi, ki vsebujejo manozo in fukozo (slika 3). Monosaharida manozna in fukoza se vežeta le s šibko afiniteto K_i (D-manoze) = 13,1 mM in K_i (L-fukoze) = 6,7 mM. (6, 9, 13, 20)



Slika 3: Glikomimetični antagonisti DC-SIGN: ligandi na osnovi manoze (1, 2) in na osnovi fukoze (3). (6)

DC-SIGN CRD oblikuje kompleks s terminalnimi oligosaharidi. Hidroksilni skupini na ekvatorialnem mestu 3 in 4 oblikujeta koordinativni vezi s Ca^{2+} v vezavnem mestu, kar je skupno vsem lektinom tipa C. Ključna strukturna značilnost manoznega ostanka je hidroksilna skupina na mestu 2 v aksialni legi. To omogoča površinsko komplementarnost t.i. “jedrne manoze” z vezavnim mestom, ki ni lastna večini monosaharidov, ki imajo na mestu 2 hidroksilno skupino v ekvatorialni legi. Ekvatorialno mesto 2 z vezano hidroksilno skupino bi verjetno preprečilo tesno vezavo zaradi steričnih ovir, zato taka heksapiranoza ne bi tvorila močnih interakcij z DC-SIGN. Afiniteta vezave se lahko poveča, če polisaharidne enote oblikujejo interakcije z veznim mestom, medtem ko vezavna specifičnost temelji na prostorskih omejitvah. Manoja kot jedrni monosaharid v Man4 zasuka preostanek molekule proti Phe313. Vezna konformacija, ki je predstavljena za Man4, v kateri Phe313 oblikuje sterično oviro, je prevladujoča za oligosaharide, ki vsebujejo manozo. Ostanek Phe313 je precej fleksibilen in omogoča dve ločeni vezavni konformaciji, ki pa vključujeta koordinacijo Ca^{2+} z enim manoznim ostankom. (13)

Afiniteto vezave lahko izboljša dodajanje aromatskega obroča z ali brez majhnih substituentov, kar povzroča močne interakcije z DC-SIGN. Dokazano je bilo, da dodatno afiniteto omogoča predvsem hidrofobna interakcija. (6)

Tetramerizacija DC-SIGN ima tudi ključen vpliv na afiniteto vezave; afiniteta vezave se močno poveča za glikane s ponavljajočimi sladkorji in z manoznimi ali fukoznimi N-povezanimi oligosaharidi, ki se lahko vežejo na več monomernih enot DC-SIGN hkrati. (13)

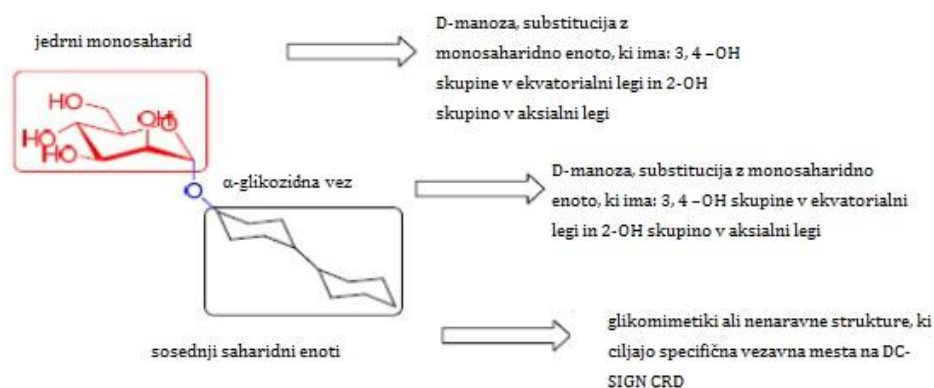
Zasnova terapevtsko uporabnih DC-SIGN antagonistov je zahtevna. Uporabljajo se trije koncepti za oblikovanje selektivnih DC-SIGN antagonistov:

- a) načrtovanje monovalentnih glikomimetikov, ki temelji na v naravi prisotnih DC-SIGN-vezočih oligosaharidih,
- b) multimerna predstavitev monosaharidov/oligosaharidov ali glikomimetikov,
- c) pridobivanje antagonistov DC-SIGN s pregledovanjem knjižnic spojin, ki v svoji strukturi ne vsebujejo ogljikovih hidratov. (9)

1.3.2 Sinteza monovalentnih glikomimetikov

Monovalentni glikomimetiki so nizkomolekularne molekule, ki lahko zasedejo samo eno DC-SIGN CRD in imajo v svoji strukturi bodisi samo nesaharidno ali saharidno in nesaharidno strukturo. Pri načrtovanju antagonistov DC-SIGN so se poslužili koncepta, kjer ohranijo t.i. jedrni monosaharid (manozo ali fukožo), »preostanek« oligosaharidne strukture pa zamenjajo z različnimi strukturami. Zasnova oblikovanja monovalentnih glikomimetikov je torej lahko strukturno ločena (slika 4) in odvisna od izbire:

- monosaharidne enote,
- nadomestka glikozidne vezi,
- struktur, ki predstavljajo zamenjavo za druge monosaharidne enote in prispevajo k skupni vezavni afiniteti. (13)

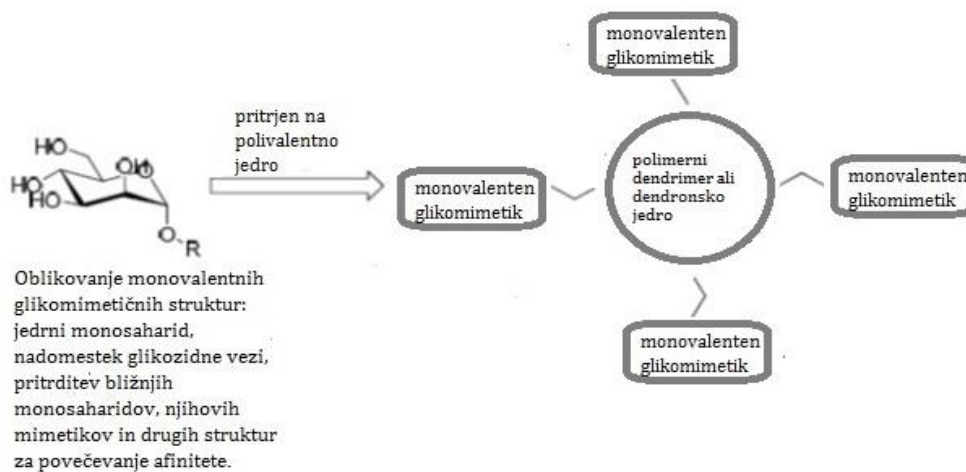


Slika 4: Shematska predstavitev oblike monovalentnih glikomimetikov kot so DC-SIGN antagonisti: sistematske zamenjave v strukturi, ki vodijo k učinkovitim ligandom DC-SIGN. (13)

Substituirano D-manozo kot jedrni monosaharid najdemo v knjižnici 2-C substituiranih D-manoznih analogov, od katerih ima spojina 2-C amino-D-manoza 48-krat večjo afiniteto vezave na DC-SIGN kot D-manoza; K_i (2-C amino-D-manoze) = 0,35 mM, K_i (manoze) = 17,1 mM. (9)

Zaradi metabolične nestabilnosti glikozidnih vezi lahko le-te nadomestimo pri načrtovanju metabolno stabilnih glikomimetikov. Oligosaharidi, ki vsebujejo L-fukozo ali D-manozo, imajo t.i. jedrni monosaharid z α -glikozidno vezjo vezan na preostanek strukture, to vez pa lahko nadomeščamo z bolj stabilno α -glikozilamidno strukturo.

Polivalentne molekule z reverzibilnim mehanizmom vezave imajo višjo verjetnost, da bodo vezane na vsaj eno receptorsko mesto CRD. Zelo pomembne za izbor polivalentnih struktur so prostorske razporeditve med posameznimi monovalentnimi ligandi (slika 5). Monovalentni ligandi morajo biti primerno razporejeni med seboj, da omogočajo vezavo na vsaj dve vezni mesti (CRD), drugače ne moremo doseči avidnosti vezave.

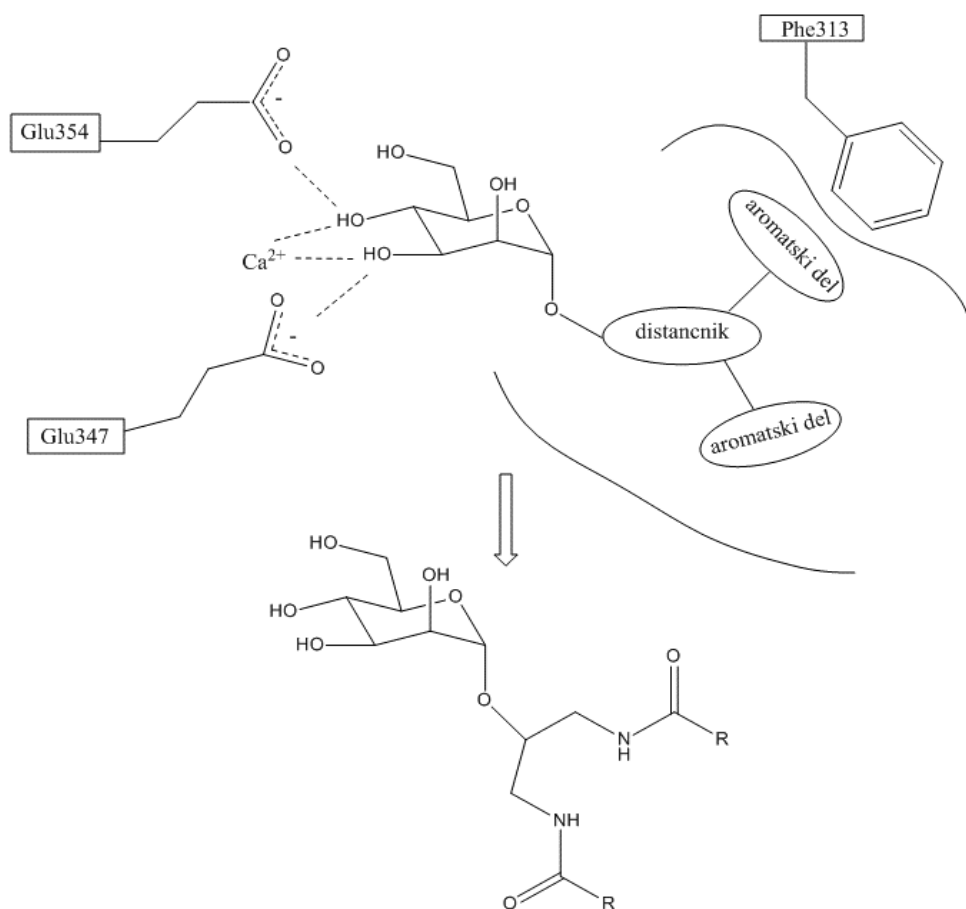


Slika 5: Strategija za povečevanje afinitete/avidnosti DC-SIGN antagonistov: monosaharidi ali monovalentni glikomimetiki so pritrjeni na polivalentne dendrimere ali dendronska jedra.

(13)

2 NAMEN DELA

Namen našega dela je sinteza potencialnih glikomimetičnih antagonistov receptorja DC-SIGN. Na osnovni propanoldiaminski distančnik bomo pripeli aromatske karboksilne kisline z amidno vezjo ter dobljene spojine s prosto hidroksilno skupino vezali na peracetilirano D-manozo z α -glikozidno vezjo. Na ta način bomo dobili manozilirane ligande, ki bodo imeli ob ohranjenem jedrnem monosaharidu v svoji strukturi tudi lipofilne dele, ki lahko z receptorskim mestom tvorijo nove interakcije (slika 6).



Slika 6: Zasnova potencialnih na D-manozi temelječih DC-SIGN antagonistov, ki vsebujejo aromatske dele, namenjene ciljanju hidrofobnih žepov CRD receptorja DC-SIGN. (27)

Na propanoldiaminski distančnik bomo vezali različno substituirane aromatske skupine zato, da bi dosegli mogoče lipofilne in/ali π - π interakcije v lipofilnih delih CRD receptorja DC-SIGN in da bi posledično povečali vezavno afiniteto spojin. Lipofilni del receptorja je opredeljen s stransko verigo Phe313, ki oblikuje dva lipofilna žepa. Aminokislinski ostanek

Phe313 predvidoma predstavlja prostorsko oviro za vezavo linearnih oligosaharidov, poveča pa afiniteto razvejanemu oligosaharidu.

Sintetiziranim spojinam bomo določili afiniteto z *in vitro* kompetitivnim vezavnim testom, kjer bomo ovrednotili njihovo izpodrivanje vezave HIV-1 površinskega glikoproteina gp120 na DC-SIGN ter izmerili DC adhezijo pri koncentraciji 0,5 mM.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti in topila

Uporabljali smo reagente in topila naslednjih proizvajalcev:

- Acros Organics, Alfa Aesar GmbH, Fluka Chemicals GmbH, Sigma-Aldrich in Merck.

3.1.2 Laboratorijski pribor

Za delo v laboratoriju smo potrebovali naslednji pribor:

- erlenmajerice, čaše, merilne valje, urna stekla, bučke z okroglim dnom, lije ločnike, lije, kolone, pipete, kapalke z mešičkom, palčke, presesalne erlenmajerice;
- digestorij, balone, polnjene z argonom, termometre, igle, pincete, puhalke, nastavek za pipetiranje, obroč za filtriranje, filtrirni papir.

3.1.3 Aparature

- Analitska tehtnica: Mettler Toledo AG245
- Tehtnica: Mettler Toledo PB403-S
- Magnetno mešalo z grelnikom
- Vibracijski mešalnik: Vibromix 10
- UV-lučka
- Hladilnik
- Zamrzovalnik

3.1.4 Oprema

- Programska oprema

Za risanje molekularnih struktur smo uporabili programski paket ChemBioDraw, 11.0 (CambridgeSoft).

3.2 METODE

3.2.1 Kromatografske metode

Tankoplastna komatografija

S tankoplastno kromatografijo (TLC) smo spremljali potek reakcij in izolacij produktov ter izbrali ustrezno mobilno fazo za čiščenje s kolonsko kromatografijo, katere potek smo prav tako spremljali s TLC. Kot stacionarno fazo smo uporabljali plošče (Kiselgel 60 F₂₅₄) izdelovalca Merck z 0,25 mm nanosom silikagela na aluminijevem nosilcu in dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Mobilne faze so navedene v sinteznih postopkih posameznih spojin. Za detekcijo lis smo uporabljali UV-lučko ($\lambda = 254$ nm) in orositvena reagenta fosfomolibdat in ninhidrin.

Kolonska kromatografija

Po končani izolaciji smo spojine čistili s “flash” kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel proizvajalca Merck velikosti 0,040 do 0,063 mm, ki smo ga polnili v steklene kolone, katerih velikost smo izbrali glede na pričakovano količino produkta.

Za čiščenje smo uporabili tudi Biotage Isolera Flash Purification System, kromatografski sistem za avtomatizirano čiščenje z reverzno fazno kromatografijo.

3.2.2 Jedrska magnetna resonanca

¹H-NMR spektri so bili posneti na Bruker Avance III 400 MHz spektrometru na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v topilih DMSO-d₆, CDCl₃ ali MeOD. Spektre smo analizirali s programom MestRe-C 4.8.6. proizvajalca Mesterlab Research S. L.

3.2.3 Masna spektrometrija

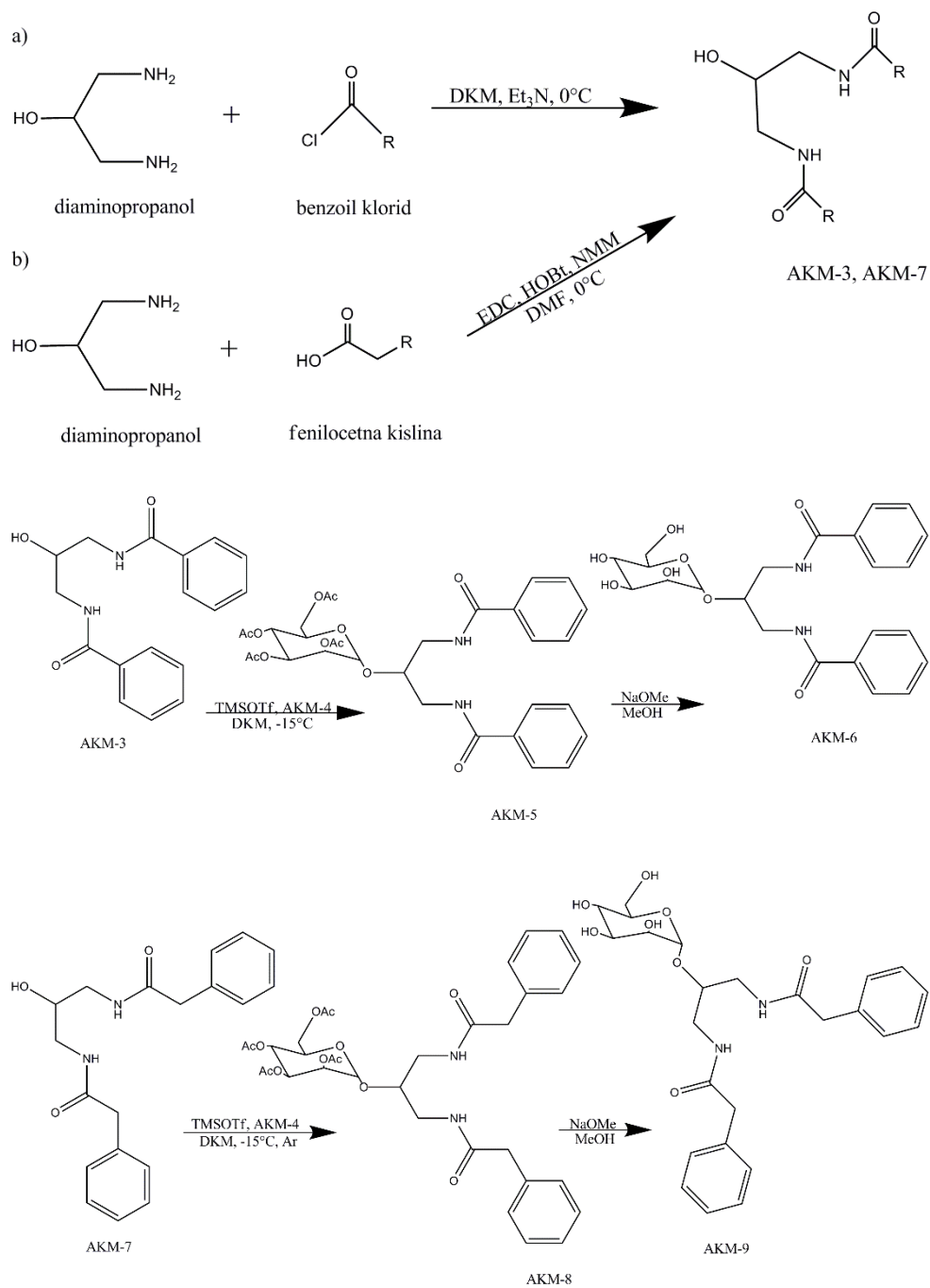
Masni spektri so bili posneti na masnem spektrometru VG-Analytical Autospec Q-TOF Premier na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 REAKCIJSKE SCHEME

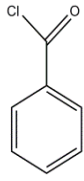
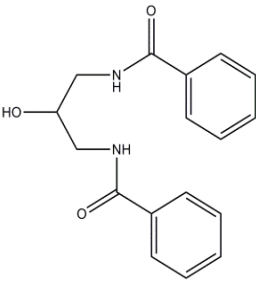
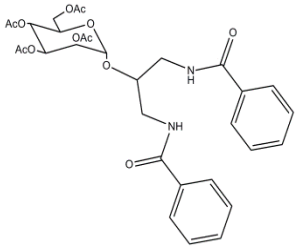
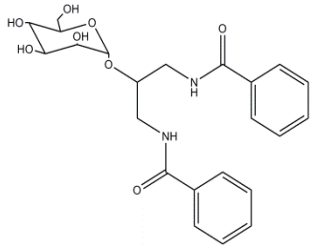
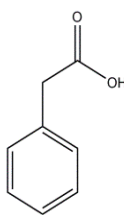
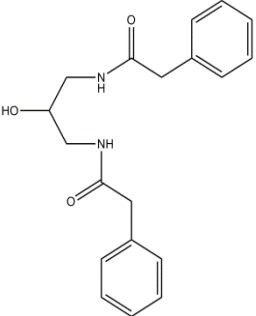
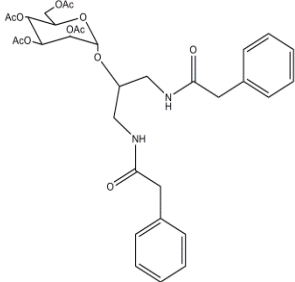
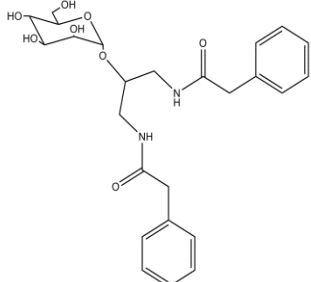
Sinteza spojin, ki delujejo kot glikomimetični antagonisti receptorja DC-SIGN, je potekala preko več zaporednih stopenj (slika 7). Prva stopnja je bila sinteza trikloroacetimidatnega manoznega derivata (AKM-4), ki smo ga uporabili v reakciji glikozilacije. V drugi stopnji je bil sintetiziran 1. intermediat (AKM-3, AKM-7), to sintezo smo izvedli preko dveh različnih metod. Tretji del sintezne poti je bila sklopitev AKM-4 in 1. intermediata (AKM-3, AKM-7) in nastanek (AKM-5, AKM-8). Zadnja stopnja pri sintezi je bila odščita z acetilno zaščito zaščitene hidrosilnih skupin na manoznem ostanku in nastanek končne spojine (AKM-6, AKM-9). Strukture reagentov, intermediatov in končnih spojin so predstavljene v preglednici I.

Kralj M. Sinteza glikomimetičnih antagonistov receptorja DC-SIGN z diarilamidopropanolomanozidno strukturo



Slika 7: Reakcijska shema reagentov, intermediatov in končnih spojin.

Preglednica I: Reagenti, intermediati in končne spojine.

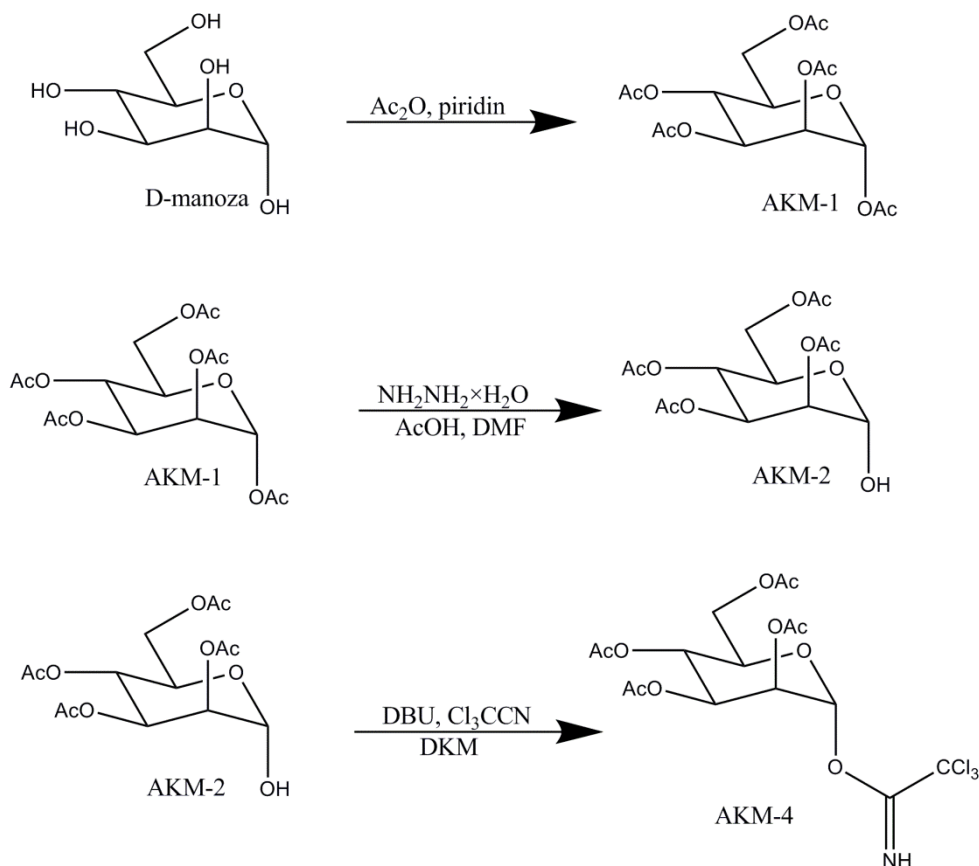
Začetna spojina (reagent)	1. intermediat	2. intermediat	končna spojina
benzoil klorid 	AKM-3 	AKM-5 	AKM-6 
fenilacetna kislina 	AKM-7 	AKM-8 	AKM-9 

4.1.1 Trikloroacetimidatna sinteza

Trikloroacetimidatno metodo za sintezo glikozidov je razvil Schmidt s sodelavci. (19)

O-glikozil trikloroacetimidate smo pripravili z adicijo trikloroacetonitrila (Cl_3CCN). O-glikozil trikloroacetimidati so donorji, ki jih lahko aktivirajo Lewisove kisline kot katalizatorji, kot sta TMSOTf ali $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$.

Sintezo trikloroacetimidata (AKM-4) smo začeli z acetiliranjem OH skupin na molekuli D-manoze. Temu je sledila selektivna deprotekcija (odščita) anomerne acetilirane OH skupine na mestu 1 ter nato adicija trikloroacetonitrila na anomerno OH skupino z dodatkom baze 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en (DBU), pri čemer smo selektivno sintetizirali α -trikloroacetimidatni izomer (slika 8). (19)



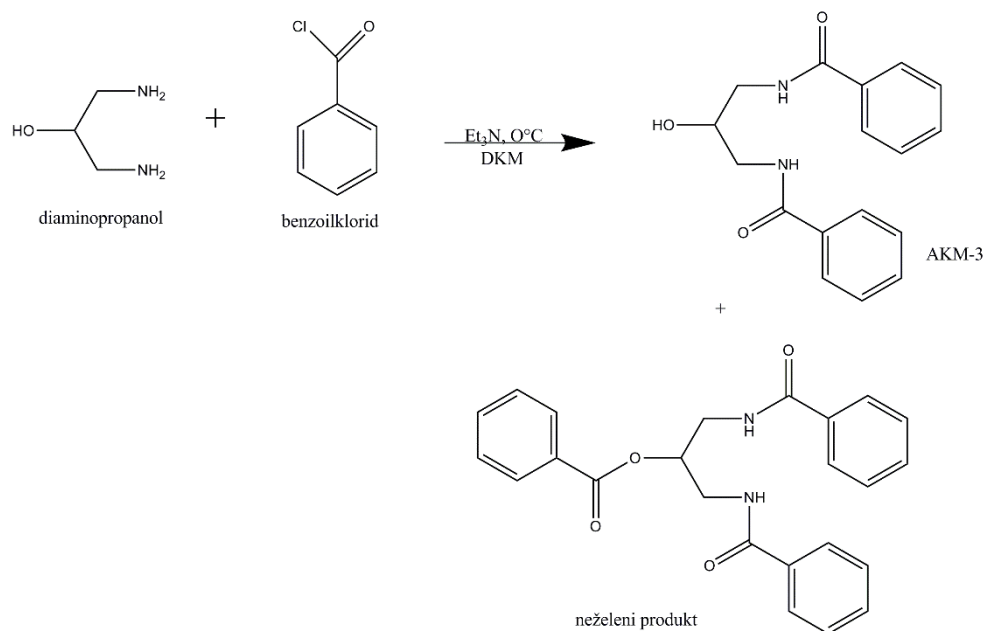
Slika 8: Reakcijska shema sinteze α -trikloroacetimidata (AKM-4).

4.1.2 Sinteza 1. intermediata

1. intermediate smo sintetizirali z amino skupinami 1,3-diamino-2-propanola ter z različno substituiranimi benzojskimi kislinami ali kislinskimi kloridi. V nadaljevanju sta prikazani dve različni sintezni poti.

ACILKLORIDNA SINTEZA

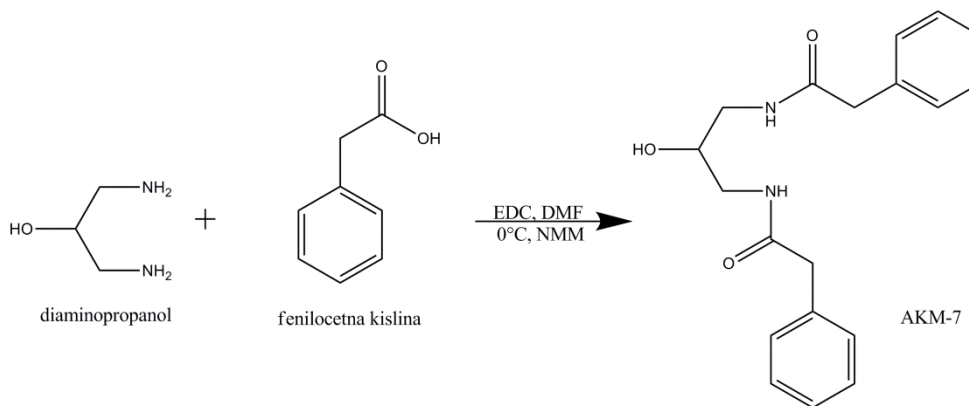
Reakcija med 1,3-diamino-2-propanolom in benzoilkloridom je nukleofilna substitucija na karbonilne spojine preko tetraedričnega intermediata. Prisotnost Et_3N nevtralizira med reakcijo nastali HCl in s tem omogoči kvantitativen nastanek produkta. Pri tej reakciji je potrebno brezvodno okolje, zato smo uporabili razmeroma nepolarno, aprotično topilo DKM z nizkim vreliščem. Produkta te reakcije sta lahko bi- oz. trisubstituirana derivata 1,3-diamino-2-propanola (slika 9). (19)



Slika 9: Reakcijska shema sinteze 1. intermediata (AKM-3) z uporabo kislinskih kloridov.

SINTEZA Z UPORABO KARBOKSLINIH KISLIN IN SKLOPITVENIH REAGENTOV

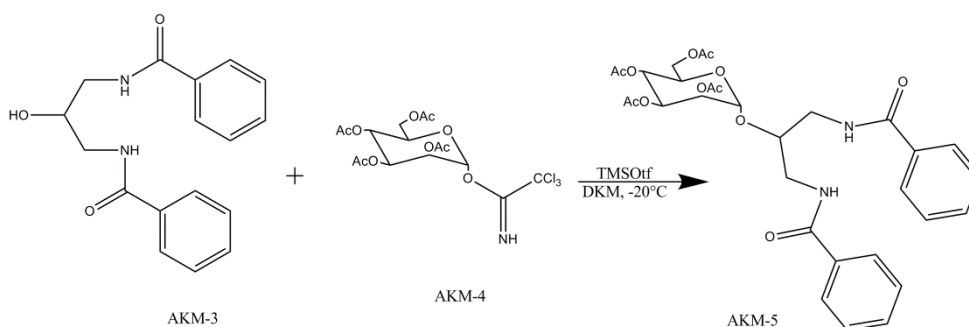
Preostali 1. intermediat smo sintetizirali z uporabo arilkarboksilnih kislin, kot je fenilacetna kislina. Ta reakcija je podobna sintezi s kislinskimi kloridi, vendar moramo najprej aktivirati fenilacetno kislino, ki nato reagira z amino skupinami (slika 10). Pri sintezi uporabimo EDC/HOBT kot t.i. sklopitvena reagenta. Etildimetilaminopropilkarbodiimid hidroklorid (EDC) je sklopitveni reagent, ki aktivira prosto karboksilno skupino do aktiviranega derivata O-acil sečnine. 1-hidroksibenzotriazol (HOBT) v reakciji nastopa kot pomožni nukleofil in kot šibka kislina, ki zmanjšuje bazičnost reakcijske zmesi. *N,N'*-dimetilformamid (DMF) je polarno aprotično topilo, ki ga zelo pogosto uporabljamo pri tej metodologiji. *N*-metilmorfolin (NMM) je šibka organska baza, uporabljena za vzdrževanje ustrezno bazičnega medija ($\text{pH} \approx 8$); pH ne moremo določiti v nevodnem mediju, zato smo uporabili moker lakmusov papir. (19)



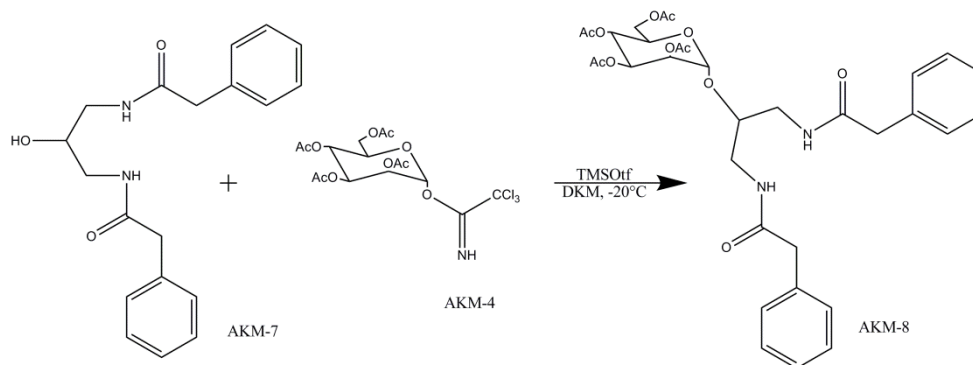
Slika 10: Reakcijska shema sinteze 1. intermediata (AKM-7) z uporabo fenilacetne kisline.

4.1.3 Sinteza 2. intermediata

2. intermediat smo sintetizirali z glikozilacijo 1. intermediata s trikloroacetimidatom (AKM-4) (sliki 11 in 12). Glikozilni donor in akceptor sta bila v inertnem topilu DKM. Reakcija se je začela z dodajanjem Lewisove kisline trimetilsilil trifluorometansulfonata (TMSOTf). TMSOTf je aktiviral trikloroacetimidat z odstranjevanjem trikloroacetonitrilne skupine, pri tem pa pustil glikozil C1 nevezan in močno elektrofilen. V teh razmerah se hidroksilna skupina in 1. intermediat povežeta s C1 z α -konformacijo – ta vezava je najbolj ugodna. Da bi povečali α -stereoselektivnost reakcije in se izognili prisotnosti vode, smo uporabili argonovo atmosfero in nizko temperaturo $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. (19)



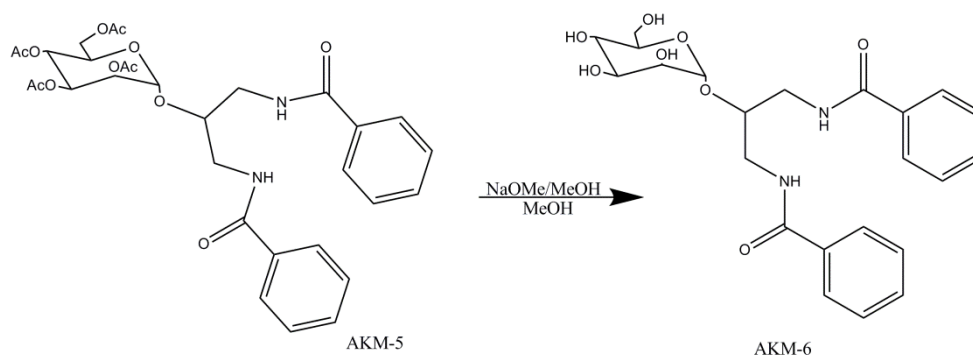
Slika 11: Reakcijska shema glikozilacije 1. intermediata (AKM-3) z trikloroacetimidatom (AKM-4) ter nastanek AKM-5.



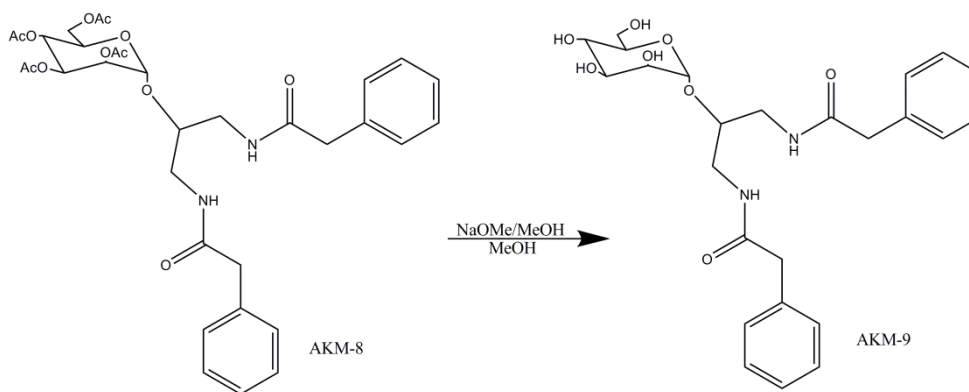
Slika 12: Reakcijska shema glikozilacije 1. intermedijata (AKM-7) z trikloroacetimidatom (AKM-4) ter nastanek AKM-8.

4.1.4 Odščita hidroksilne skupine na 2. intermedijatu

Zadnji korak pri sintezi končnih spojin je odstranitev acetilnih zaščitnih skupin in odščita hidroksilnih skupin prisotnih v manoznem ostanku. Reakcije odščite smo izpeljali po Zemlénovem postopku z 1 M raztopino NaOMe/MeOH (sliki 13 in 14). (19)



Slika 13: Reakcijska shema odstranitve zaščite hidroksilnih skupin na 2. intermedijatu (AKM-5) ter nastanek končne spojine AKM-6.



Slika 14: Reakcijska shema odstranitve zaščite hidroksilnih skupin na 2. intermediatu (AKM-8) ter nastanek končne spojine AKM-9.

4.2 SINTEZNI POSTOPKI IN REZULTATI ANALIZ

TRIKLOROACETIMIDATNA SINTEZA

4.2.1 Sintezni postopki in rezultati analiz AKM-1

(2R,3S,4S,5R,6R)-6-(acetoksimetil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetraacetat

Preglednica II: Reagenti za sintezo AKM-1.

reagenti	M (g/mol)	ρ (g/cm ³)	Eq	n (mmol)	m (g)	V (mL)
D-manoza	180	-	1,0	27,8	5,0	-
Ac ₂ O	102	1,087	5,5	152,9	15,6	14,4
piridin	-	-	-	-	-	50,0

V bučko smo natehtali manozo (5,00 g, 27,8 mmol) in dodali piridin. Reakcijsko zmes smo ohladili na 0 °C. Nato smo vanjo po kapljicah med mešanjem dodali acetanhidrid (15,60 g, 152,9 mmol). Pri 0 °C smo mešali 3 ure, nato smo dodali metanol za deaktivacijo acetanhidrida in rotavapirali, da bi odstranili piridin. Surov preostanek smo raztopili v etilacetatu (100 mL) in sprali z 2 x 25 mL etilacetata. Nato smo AKM-1 prenesli v lij ločnik in sprali s klorovodikovo kislino (1 M, 50 mL). Po vsakem spiranju smo ločili spodnjo vodno od zgornje organske faze. Vodno fazo smo sprali še z nasičeno raztopino natrijevega klorida (50 mL) ter jo shranili. Organsko fazo smo sprali z 2 x 10 mL etilacetata ter jo sušili z Na₂SO₄, odfiltrirali smo sušilno sredstvo in na rotavaporju odparili topilo. Potek reakcije smo spremljali s TLC (MF: EtOAc/heksan=1/1) in za določitev uporabili orositveni reagent

fosformolibdat. Produkt smo čistili s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo EtOAc/heksan=1/2. Izkoristek reakcije je bil 96,7 %.

Opis: viskozna snov

Molekulska formula: C₁₆H₂₂O₁₁

Molska masa: 390,0 g/mol

TLC: EtOAc/heksan=1/1; R_f = 0,29

MS (TOF ES⁺): 392 (MH⁺)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= (ppm) 2,027 [d, J = 0,8 Hz, -CH₃], 2,073 [d, J = 1,2 Hz, -CH₃], 2,115 [s, -CH₃], 2,194 [dd, J₁ = 1,2 Hz, J₂ = 3,2 Hz, 2-CH₃], 4,105 [m, 2-CH-], 4,303 [dd, J₁ = 4,8 Hz, J₂ = 12 Hz, 1-CH], 5,279 [s, 1-CH-], 5,366 [t, 2-CH-], 6,105 [s, 1-CH-].

4.2.2 Sintezni postopki in rezultati analiz AKM-2

(2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-(acetoksimetil)-6-hidroksitetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetat

Preglednica III: Reagenti za sintezo AKM-2.

reagenti	M (g/mol)	ρ (g/cm ³)	Eq	n (mmol)	m (g)	V (mL)
AKM-1	390	-	1,0	11,91	4,765	-
NH ₂ NH ₂ ·H ₂ O	32	1,023	1,1	13,10	0,419	0,41 (35%; 1,17 ml)
AcOH	60	1,05	1,1	13,10	0,786	0,75
DMF	-	-	-	-	-	20

AKM-1 (4,765 g, 11,91 mmol) smo raztopili v DMF, s pipeto smo dodali hidrazin hidrat (1,17 mL, 13,10 mmol) in očetno kislino (0,75 mL, 13,10 mmol), da smo dobili hidrazin acetat, ki pa je selektivno odščitil hidroksilno skupino na mestu 1. Reakcija je potekala približno 2 uri. Po končani reakciji smo AKM-2 raztopili v etilacetatu (150 mL) ter 3 x ekstrahirali z 30 mL vode in 1 x z 30 mL nasičene vodne raztopine NaCl in ločili vodno od organske faze. V organsko fazo smo dodali nekaj Na₂SO₄, premešali in odfiltrirali sušilno sredstvo ter na rotavaporju odparili topilo. Potek reakcije smo spremljali s TLC (MF:

EtOAc/heksan=1/1) in za določitev smo uporabili orositveni reagent fosformolibdat. Izkoristek reakcije je bil 71,3 %.

Opis: rumena viskozna snov

Molekulska formula: C₁₄H₂₀O₁₀

Molska masa: 348,0 g/mol

TLC: EtOAc/heksan=1/1; R_f = 0,21

MS (TOF ES⁺): 349 (MH⁺)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= (ppm) 2,017 [d, J = 0,8 Hz, 1-CH₃], 2,066 [d, J = 0,8 Hz, 1-CH₃], 2,122 [s, 1-CH₃], 2,178 [d, J = 0,8 Hz, 1-CH₃], 3,65 [s (širok), -OH], 4,13-4,17 [m, -CH-], 4,24-4,30 [m, 2-CH-], 5,26-5,35 [m, 3-CH-], 5,43-5,46 [m, -CH-].

4.2.3 Sintezni postopki in rezultati analiz AKM-4

(2R,3R,4S,5S,6R)-2-(acetoksimetil)-6-(2,2,2-trikloro-1-iminoetoksi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil triacetat

Preglednica IV: Reagenti za sintezo AKM-4.

reagenti	M (g/mol)	ρ (g/cm ³)	Eq	n (mmol)	m (g)	V (mL)
AKM-2	348,11	-	1,00	8,787	3,058	-
Cl ₃ C-CN	144,39	1,440	12,00	105,444	15,230	10,570
DBU	152,24	1,019	0,28	2,460	0,375	0,368
DKM (brezvoden)	-	-	-	-	-	13

AKM-2 (3,058 g, 8,787 mmol) smo 3x sprali z 20 mL toluena, po vsakem spiranju smo na rotavaporju odpareli topilo. AKM-2 smo raztopili v DKM in ohladili na ledeni kopeli. Preko septuma smo z injekcijsko iglo dodali Cl₃CCN (10,570 mL, 105,444 mmol) in nato še DBU (0,368 mL, 2,460 mmol) v predhodno preprihano reakcijsko zmes z argonom. Reakcijsko zmes smo 2 uri mešali na ledeni kopeli. Ko je reakcija potekla, smo odparili topilo na rotavaporju. Potek reakcije smo spremljali s TLC (MF: EtOAc/heksan=1/1) in za določitev uporabili orositveni reagent fosformolibdat. Nastali produkt smo čistili s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo EtOAc/heksan=1/2. Izkoristek reakcije je bil 89,9 %.

Opis: temnorjava viskozna snov

Molekulska formula: C₁₆H₂₀NO₁₀C₁₃

Molska masa: 492,5 g/mol

TLC:EtOAc/heksan=1/1; R_f = 0,38

MS (TOF ES⁺): 493 (MH⁺)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= (ppm) 2,03 [s, 3H, -COCH₃], 2,08 [s, 3H, -COCH₃], 2,10 [s, 3H, -COCH₃], 2,22 [s, 3H, -COCH₃], 4,16-4,22 [m, 2H, 2-CH-], 4,28-4,32 [m, 1H -CH-], 5,41-5,43 [m, 2H, -CH₂-O-], 5,48-5,50 [m, 1H, -CH-], 6,297-6,301 [d, J = 2 Hz, 1H, -O-CH-O-], 8,81 [s, 1H, -NH-].

SINTEZA 1. INTERMEDIATOV

4.2.4 Sintezni postopki in rezultati analiz AKM-3

N,N'-(2-hidroksipropan-1,3-diil)dibenzamid

Preglednica V: Reagenti za sintezo AKM-3.

reagenti	M (g/mol)	ρ (g/cm ³)	Eq	n (mmol)	m (g)	V (mL)
1,3-diamino-2-propanol	90,12	-	1,0	5,55	0,50	-
benzoilklorid	140,57	1,212	2,0	11,10	1,56	1,29
Et ₃ N	101,19	0,726	2,2	12,21	1,24	1,70
DKM	-	-	-	-	-	15

1,3-diamino-2-propanol (0,5 g, 5,55 mmol) smo raztopili v 10 mL DKM, dodali smo Et₃N (1,70 mL, 12,21 mmol) in ohladili na -15 °C. V čaši smo raztopili benzoil klorid v 5 mL DKM in zmes po kapljicah dodajali k ohlajeni zmesi. Ko smo dodali celotno količino zmesi (benzoil klorida in DKM), smo odstranili ledeno kopel ter mešali nekaj časa pri sobni temperaturi. Vsebino iz bučke smo prenesli v lij ločnik, dodali 20 mL DKM in 20 mL vode. Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄, odfiltrirali smo sušilno sredstvo in na rotavaporju odparili topilo. Potek reakcije smo spremljali s TLC (MF: DKM/MeOH=9/1) in za določitev

uporabili orositveni reagent ninhidrin. Nastali produkt smo čistili s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo DKM/MeOH=20/1. Izkoristek reakcije je bil 81,0 %.

Opis: bela amorfna snov

Molekulska formula: C₁₇H₁₈N₂O₃

Molska masa: 298,0 g/mol

TLC: DKM/MeOH=9/1; R_f = 0,49

MS (TOF ES⁺): 299,1 (MH⁺)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = (ppm) 3,60-3,73 [m, 4H, 2-CH₂-], 4,02-4,08 [m, 1H, -CH-], 4,38 [dd, J = 5 Hz, 1H, -CH-], 7,32-7,35 [2H, 2-CONH-], 7,45-7,49 [m, 4H, 4-Ar-H], 7,52-7,57 [m, 2H, 2-Ar-H], 7,86-7,89 [m, 4H, 4-Ar-H].

4.2.5 Sintezni postopki in rezultati analiz AKM-7

N,N'-(2-hidroksipropan-1,3-diil)bis(2-fenilacetamid)

Preglednica VI: Reagenti za sintezo AKM-7.

reagenti	M (g/mol)	ρ (g/cm ³)	Eq	n (mmol)	m (g)	V (mL)
1,3-diamino-2-propanol	90,12	-	1,0	7,35	0,66	-
fenilocetna kislina	136,15	-	2,0	14,69	2,00	-
EDC·HCl	191,71	-	2,6	19,10	3,66	-
HOBT	135,12	-	2,4	17,63	2,38	-
N-metilmorfolin	101,15	0,920	4,0	29,38	2,97	-
DMF	73,09	-	-	-	-	25

1,3-diamino-2-propanol (0,66 g, 7,35 mmol) in fenilocetno kislino (2,00 g, 14,69 mmol) smo natehtali v bučko in raztopili v DMF (25 mL) ter mešali na ledeni kopeli (0 °C). N-metilmorfolin (2,97 g, 29,38 mmol) in HOBT (2,38 g, 17,63 mmol) smo dodali v bučko. Preverili smo acidobazične lastnosti raztopine z vlažnim pH-papirčkom, ki je pokazal vrednost približno pH=8. Dodali smo EDC·HCl (3,66 g, 19,10 mmol) ter še naprej mešali na ledeni kopeli. Potem smo naredili TLC (DKM/MeOH=9/1) in za določitev uporabili orositveni reagent ninhidrin. Odparili smo topilo DMF na rotavaporju. AKM-7 smo čistili s

kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo DKM/MeOH=20/1. Izkoristek je bil 82,0 %.

Opis: bel prah

Molekulska formula: C₁₉H₂₂N₂O₃

Molska masa: 326,0 g/mol

MS (TOF ES⁺): 327 (MH⁺)

TLC: DKM/MeOH=9/1; R_f = 0,42

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= (ppm) 2,96-3,02 [m, 2H, -CH₂NH], 3,07-3,13 [m, 2H, -CH₂NH], 3,43 [s, 4H, 2-COCH₂-], 3,51-3,56 [m, 1H, -CH-(CH₂)₂], 5,02 [d, J = 5,2 Hz, 1H, -OH], 7,20-7,31 [m, 10H, -Ar-H], 8,02-8,05 [t, J = 5,6 Hz, 2H, 2-CONH-].

SINTEZA 2. INTERMEDIATOV

4.2.6 Sintezni postopki in rezultati analiz AKM-5

(2R,3R,4S,5S,6S)-2-(acetoksimetil)-6-(1,3-bis(benzamid)propan-2-iloksi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil triacetat

Preglednica VII: Reagenti za sintezo AKM-5.

reagenti	M (g/mol)	ρ (g/cm ³)	Eq	n (mmol)	m (g)	V (mL)
AKM-4	492,50	-	1,48	0,8614	0,450	-
AKM-3	298,13	-	1,02	0,5937	0,177	-
TMSOTf	222,26	1,225	1,02	0,5937	0,132	0,108
Et ₃ N	101,19	0,726	-*	-	0,118	0,162
DKM (brezvodni)	-	-	-	-	-	5

*Et₃N: 2eq glede na TMSOTf

Raztopili smo AKM-3 (0,177 g, 0,5937 mmol) in kvantitativno prenesli v bučko, kjer je bil natehtan AKM-4 (0,450 g, 0,8614 mmol). Na rotavaporju smo odparili DKM in koevaporirali s 3 x10 mL toluena. Bučko smo zaprli s septumom in dodali 5 mL predestiliranega DKM. Vsebino v bučki smo prepihali z argonom ter zmes ohladili na -15 °C, dodali TMSOTf (0,108 mL) ter odstranili ledeno kopel. Reakcijsko zmes smo pustili na sobni temperaturi čez noč. Reakcijo smo prekinili z dodatkom Et₃N (0,162 mL). Potek

reakcije smo spremljali s TLC (MF: DKM/MeOH=20/1), za določitev smo uporabili orositveni reagent fosformolibdat. Na rotavaporju smo odparili topilo. Nastali produkt smo čistili s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo EtOAc/Heksan=3/1. Izkoristek reakcije je bil 73,8 %.

Opis: bel prah

Molekulska formula: C₃₁H₃₆N₂O₁₂

Molska masa: 628,0 g/mol

TLC: DKM/MeOH=20/1; R_f = 0,29

MS (TOF ES⁺): 627,2 (MH⁺)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ= (ppm) 1,88 [s, 3H, -CH₃], 1,92 [s, 3H, -CH₃], 1,95 [s, 3H, -CH₃], 2,08 [s, 3H, -CH₃], 3,20-3,35 [m, 4H, 2-CH₂-NH], 3,38-3,53 [m, 4H, 2-CH₂-NH], 3,46-3,50 [dd, J₁ = 4 Hz, J₂ = 12 Hz 1H, -CH-], 3,64-3,68 [dd, J₁ = 4 Hz, J₂ = 12 Hz, 1H, -CH-], 3,56-3,60 [dd, J₁ = 4 Hz, J₂ = 12 Hz, 1H, -CH-], 3,74-3,88 [dd, J₁ = 4 Hz, J₂ = 12 Hz, 1H, -CH-], 3,82-3,92 [m, 4H, 2-CH-, -CH₂-O], 4,00-4,10 [m, 4H, 2-CH-, -CH₂-O], 5,02-5,09 [m, 3H(1H), -O-CH-(CH₂)₂-], 5,20-5,24 [m, 3H(1H), -O-CH-O], 7,45-7,57 [m, 6H, 6-Ar-H, (7,45-7,50 [4H, 4-Ar-H], 7,52-7,57 [2H, 2-Ar-H]), 7,82-7,88 [m, 4H, 4-Ar-H], 8,31 [s, 1H, 2H-CH₂-], 8,43 [s, 1H, 2H-CH₂-], 8,69-8,72 [t, J = 5,6 Hz, 1H, -CONH-], 8,78-8,81 [t, J = 5,6 Hz, 1H, -CONH-].

4.2.7 Sintezni postopki in rezultati analiz AKM-8

(2R,3R,4S,5S,6S)-2-(acetoksimetil)-6-(1,3-bis(2-fenilacetamid)propan-2-iloksi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil triacetat

Preglednica VIII: Reagenti za sintezo AKM-8.

reagenti	M (g/mol)	ρ (g/cm ³)	Eq	n (mmol)	m (g)	V (mL)
AKM-4	492,50	-	1,48	2,297	1,200	-
AKM-7	326,00	-	1,02	1,583	0,513	-
TMSOTf	222,26	1,225	1,02	3,104	0,352	0,287
Et ₃ N	101,19	0,726	-	-*	0,314	0,433
DKM	-	-	-	-	-	10

*Et₃N: 2eq glede na TMSOTf

Raztopili smo AKM-4 (1,200 g, 2,297 mmol) v 30 mL DKM in kvantitativno prenesli v bučko in dodali smo AKM-7 (0,513 g, 1,583 mmol) ter premešali. Na rotavaporju smo odparili DKM in koevaporirali s 2 x 20 mL toluena. Bučko smo zaprli s septumom in dodali 10 mL predestiliranega DKM. Vsebino v bučki smo prepihali z argonom ter ohladili na -15 °C in dodali TMSOTf (0,287 mL) ter odstranili ledeno kopel. Reakcijsko zmes smo pustili na sobni temperaturi čez noč. Reakcijo smo prekinili z dodatkom Et₃N (0,433 mL). V reakcijsko zmes smo dodali 40 mL DKM in 20 mL H₂O, premešali ter izvedli vakuumsko filtracijo preko zeolita. Nato smo vsebino prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z 2 x 20 mL H₂O. V organsko fazo smo dali Na₂SO₄, premešali in filtrirali ter uparili DKM. Potek reakcije smo spremljali s TLC (MF: DKM/MeOH=9/1) in za določitev uporabili orositveni reagent fosformolibdat. Nastali produkt smo čistili s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo DKM/MeOH=20/1. Izkoristek reakcije je bil 75,7 %.

Opis: bel prah

Molekulska formula: C₃₃H₄₀N₂O₁₂

Molska masa: 656,0 g/mol

TLC: DKM/MeOH=9/1; R_f = 0,49

MS (TOF ES⁺): 657 (MH⁺)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ= (ppm) 1,95 [s, 3H, -CH₃], 2,02 [s, 3H, -CH₃], 2,03 [s, 3H, -CH₃], 2,11 [s, 3H, -CH₃], 3,36 [s, 4H, 2-COCH₂], 3,37-3,44 [m, 4H, 2-CH₂-NH-], 3,51-3,61 [dd, *J*₁ = 15,2 Hz, *J*₂ = 24,4 Hz, 2H, -CH₂-O], 3,71-3,76 [m, 1H, -CH-], 4,01-4,04 [m, 1H, -CH-], 4,10-4,14 [m, 1H, -CH-], 4,53-4,57 [m, 1H, -CH-], 5,02-5,03 [m, 1H, -O-CH-(CH₂)₂], 5,20-5,25 [m, 1H, -O-CH-O], 7,22-7,31 [m, 10H, Ar-H], 8,31 [s-(širok), 1H, -CONH-], 8,43 [s-(širok), 1H, -CONH-].

SINTEZA KONČNIH SPOJIN

4.2.8 Sintezni postopki in rezultati analiz AKM-6

N,N'-(2-((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-iloksi)propan-1,3-diil)dibenzamid

Preglednica IX: Reagenti za sintezo AKM-6.

reagenti	M (g/mol)	c (mol/l)	Eq	n (mmol)	m (g)	V (mL)
AKM-5	628,0	0,05	1	0,2723	0,164	-
NaOMe	32,0	1,00	1	0,2723	-	0,2723
MeOH (brezvodni)	-	-	-	-	-	10

Pripravili smo 1 M raztopino NaOMe (0,272 mL, 1 eq) in jo prepihali z argonom. AKM-5 (0,164 g, 0,272 mmol) smo natehtali in raztopili v brezvodnem MeOH (10 mL), pokrili s septumom ter prepihali z argonom. Nato smo dodali 1 M raztopino NaOMe (0,272 mL) ter mešali pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes prefiltrirali z Amberlitom IR 120 in tako smo odstranili bazične snovi. Potem smo odparili topilo na rotavaporju in dobili AKM-6. Potek reakcije smo spremljali s TLC (MF: DKM/MeOH=9/1; DKM/MeOH=4/1). Izkoristek reakcije je bil 80,6 %.

Opis: bela kristalinična snov

Molekulska formula: C₂₃H₂₈N₂O₈

Molska masa: 460,0 g/mol

TLC: DKM/MeOH=9/1; $R_f = 0,38$, DKM/MeOH=4/1; $R_f = 0,75$

MS (TOF ES⁺): 459,2 (MH⁺)

¹H NMR (400 MHz, MeOH): $\delta =$ (ppm) 2,56 [s-(širok), 4H, 4-OH], 3,42-3,83 [m, 7H, -CH-], 5,09-5,32 [m, 5H, -CH-], 7,18-7,35 [m, 6H, Ar-H], 7,71-7,82 [m, 4H, Ar-H], 8,20 [s-(širok), 2H, -CONH-].

4.2.9 Sintezni postopki in rezultati analiz AKM-9

N,N'-(2-((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-iloksi)propan-1,3-diil)bis(2-fenilacetamid)

Preglednica X: Reagenti za sintezo AKM-9.

reagenti	M (g/mol)	c (mol/l)	Eq	n (mmol)	m (g)	V (mL)
AKM-8	656,68	-	1,0	0,515	0,338	-
NaOMe	32,00	1,00	0,2	0,103	-	0,103
MeOH (brezvodni)	-	-	-	-	-	10

AKM-8 (0,338 g, 0,515 mmol) smo natehtali in raztopili v MeOH (10 mL). Nato smo dodali 1 M raztopino NaOMe (0,103 mL, 0,2 eq) ter mešali pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo v reakcijsko zmes dodali Amberlite IR 120+ v majhnih količinah, dokler ni bil pH \approx 5. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes prefiltrirali in nato odparili topilo na rotavaporju in dobili AKM-9. Potek reakcije smo spremljali s TLC (MF: EtOAc). Izkoristek reakcije je bil 110,0 %.

Opis: brezbarvno olje

Molekulska formula: C₂₅H₃₂N₂O₈

Molska masa: 488,0 g/mol

TLC: EtOAc

MS (TOF ES⁺): 489,2 (MH⁺)

^1H NMR (400 MHz, MeOH): δ = (ppm) 3,24-3,26 [dd, 1H, -CH-], 3,55 [s, 2H, -CH₂-], 3,56 [s, 2H, -CH₂-], 3,59-3,72 [m, 4H, 2(-CH₂)], 3,76-3,77 [dd, 1H, -CH-], 3,82-3,84 [m, 1H, -O-CH-(CH₂)₂], 3,86-3,89 [dd, 1H, -CH-], 4,89 [d, J=2,00 Hz, 1H, 1-CH-], 7,23-7,36 [m, 10H, Ar-H].

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 ANALIZA SINTEZNIH POSTOPKOV

V okviru eksperimentalnega dela smo sintetizirali 9 spojin, od tega sta bili 2 končni spojini. Reakcijska pot je bila sestavljena iz 4 stopenj.

5.1.1 Trikloroacetimidatna sinteza

V prvi reakcijski stopnji smo izvedli O-acetilacijo na molekuli D-manoze z uporabo anhidrida oetne kisline in brezvodnega piridina. Temu je sledila selektivna odščita anomerne acetilirane hidroksilne skupine na mestu 1, s hidrazin hidratom v *N,N*-dimetilformamidu (DMF). Dobljeno spojino smo aktivirali s trikloroacetonitrilom in nato je potekla adicija trikloroacetonitrila na anomerno hidroksilno skupino, v prisotnosti baze DBU (1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-en) in dobili smo α -trikloroacetimidat. (19)

AKM-1

Reakcijsko zmes smo ekstrahirali (3 x 50 mL 1 M HCl) in organsko fazo 2x sprali z 10 mL EtOAc. Odfiltrirali smo sušilno sredstvo Na₂SO₄ iz organske faze ter odparili topilo. Iz NMR analize smo ugotovili, da vsebuje vzorec nečistote, zato smo izvedli kolonsko kromatografijo z mobilno fazo EtOAc/heksan=1/2. Sintetizirali smo 4,84 g spojine brez prisotnih nečistot. Izkoristek reakcije je bil 96,7 %.

AKM-2

Reakcijsko zmes smo ekstrahirali (150 mL EtOAc, 3 x 30 mL H₂O, 1 x 30 mL nasičene raztopine NaCl) in organski fazi odparili topilo, predtem pa smo odfiltrirali sušilno sredstvo Na₂SO₄. Izkoristek reakcije je bil 71,3 %, čistost spojine je bila ustrezna, kar smo preverili z NMR-analizo.

AKM-4

Za sintezo α -trikloroacetimidata smo potrebovali AKM-2. Nastali produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo z mobilno fazo EtOAc/heksan=1/2. Sintetizirali smo 2,75 g spojine. Izkoristek reakcije je bil 89,9 %, čistost spojine smo preverili z NMR-analizo in je bila ustrezna.

5.1.2 Sinteza 1. intermediatov

V drugi reakcijski stopnji smo uporabili acilkloridno sintezo in sintezo z uporabo karboksilnih kislin in sklopitvenih reagentov. Pri acilkloridni sintezi je potekla nukleofilna substitucija med 1,3-diamino-2-propanolom in benzoilkloridom. Pri tej reakciji je bilo potrebno brezvodno okolje, zato smo uporabili nepolaro aprotično topilo z nizkim vreliščem, kot je DKM. Kvantitativen nastanek produkta je bil omogočen s prisotnostjo Et_3N , ki je med reakcijo odstranil nastalo HCl. Produkta te reakcije sta lahko bi- oz. trisubstituirana derivata 1,3-diamino-2-propanola. Pri drugi sintezni poti smo uporabili 1,3-diamino-2-propanol in fenilocetno kislino ter sklopitvena reagenta EDC/HOBt. EDC aktivira prosto karboksilno skupino, HOBt je pomožni nukleofil in šibka kislina, ki zmanjšuje bazičnost reakcijske zmesi. Uporabili smo polaro aprotično topilo *N,N'*-dimetilformamid (DMF) in *N*-metilmorfolin (NMM), ki je šibka organska baza uporabljena za vzdrževanje ustrezno bazičnega medija. Produkt te reakcije je bisubstituiran derivat 1,3-diamino-2-propanola (19)

AKM-3

Za ločevanje smo uporabili metodo ekstrakcije (20 mL DKM + 20 mL H_2O). Organski fazi smo z namenom odstranitve vode dodali Na_2SO_4 in po mešanju odfiltrirali ter odparili topilo. Potek reakcije smo spremljali s TLC, najbolj ustrezna mobilna faza je bila DKM/MeOH=9/1. AKM-3 je vsebovala nečistote, zato smo izvedli kolonsko kromatografijo z mobilno fazo DKM/MeOH=20/1. Sintetizirali smo 0,41 g spojine. Izkoristek reakcije je bil 81,0 %, ustreznost spojine smo preverili z NMR-analizo.

AKM-7

Pri prvem sinteznem postopku smo spojino raztopili v 1 M HCl in poskušali izvesti ekstrakcijo (10 mL, 1 M HCl), vendar smo bili neuspešni. Dobili smo mazljivo snov, ki smo jo vakuumsko filtrirali. Nastalo oborino smo raztopili v 100 mL DKM in ekstrahirali (100 mL nasičene raztopine NaHCO_3). Postopek ekstrakcije smo večkrat ponovili in dobili tri faze. Spojina je bila v srednji in spodnji fazi. Srednjo fazo smo ponovno ekstrahirali (50 mL nasičene raztopine NaHCO_3). Odstranili smo topilo obema fazama in dobili samo 0,17 g čiste spojine. Največ težav je bilo s topnostjo spojine in s tem z izbiro ustreznega topila in postopka odstranjevanja nečistot. Pri drugem sinteznem postopku smo izvedli kolonsko kromatografijo z mobilno fazo DKM/MeOH=20/1 ter združili ustrezne frakcije in odparili

topilo ter dobili 0,54 g spojine, z ustrežno stopnjo čistote, ki smo jo preverili s NMR-analizo. Izkoristek reakcije je bil 82,0 %.

5.1.3 Sinteza 2. intermediatov

V tretji reakcijski stopnji je potekla glikozilacija med α -trikloroacetimidatom in produktom 2. reakcijske stopnje, bisubstituiranim derivatom 1,3-diamino-2-propanola. Reakcija se je začela z dodajanjem Lewisove kisline trimetilsilil trifluorometansulfonatom (TMSOTf). TMSOTf je aktiviral trikloroacetimidat z odstranjevanjem trikloroacetonitrilne skupine in pri tem pustil glikozil C1 nevezan in močno elektrofilen. V teh razmerah sta se hidroksilna skupina in bisubstituiran derivat 1,3-diamino-2-propanola povezala s C1 z α -konfiguracijo, ki je najbolj ugodna. (19)

AKM-5

Sintezni postopek smo ponovili dvakrat. Pri prvem sinteznem postopku smo po 24 urah prekinili reakcijo z dodatkom trietilamina. TLC smo izvedli v mobilni fazi EtOAc/heksan=3/1, kjer pa nismo zaznali nobene lise, zato smo nadaljevali s postopkom iskanja ustrezne mobilne faze in izbrali DKM/MeOH=20/1. Izvedli smo kolonsko kromatografijo z mobilno fazo DKM/MeOH=20/1 in odparili topilo ustreznim frakcijam. Iz NMR-analize je bilo mogoče razbrati, da spojina vsebuje nečistote. Postopek odstranjevanja nečistot smo nadaljevali na Isoleri. Analiza NMR je ponovno pokazala prisotnost nečistot v AKM-5. Pri drugem sinteznem postopku smo prav tako po 24 urah prekinili reakcijo z dodatkom trietilamina. Reakcijski zmesi smo odparili topilo in izvedli kolonsko kromatografijo z mobilno fazo EtOAc/heksan=3/1. Po združitvi frakcij smo jim odstranili topilo in dobili 0,23 g spojine brez prisotnosti nečistot, kar smo preverili z analizo NMR. Izkoristek reakcije je bil 73,8 %.

AKM-8

Pri sinteznem postopku smo po 24 urah prekinili reakcijo z dodatkom trietilamina. Potek reakcije smo spremljali s TLC v različnih mobilnih fazah EtOAc/heksan=3/1, EtOAc/heksan=1/1, DKM/MeOH=20/1 in DKM/MeOH=9/1, ki je bila najbolj ustrezna. Reakcijski zmesi smo dodali 40 mL DKM in vakuumsko filtrirali preko zeolita. Izvedli smo ekstrakcijo (2 x 20 mL H₂O). K organski fazi s spojino smo dodali Na₂SO₄, premešali in ga odfiltrirali. Reakcijski zmesi smo odparili topilo in izvedli kolonsko kromatografijo z

mobilno fazo DKM/MeOH=20/1. Izkoristek reakcije je bil 75,7 %. Pridobili smo 0,66 g AKM-8 brez prisotnih nečistot, kar smo preverili z NMR-analizo.

5.1.4 Sinteza končnih spojin

V četrti reakcijski stopnji je potekla deacetilacija z uporabo Zemplén-ovih pogojev z 1 M raztopino NaOMe/MeOH in tako smo dobili spojini α -D-manozida AKM-6 in AKM-9, ki sta potencialna glikomimetična antagonista receptorja DC-SIGN.

AKM-6

Za sintezo AKM-6 smo porabili 0,16 g AKM-5 ter spremljali potek reakcije s TLC v mobilni fazi DKM/MeOH=4/1. Reakcija je bila zaključena po 45 min in reakcijsko zmes smo prefiltrirali z Amberlitom IR120, z namenom odstranitve bazičnih snovi. S pH-lističem smo spremljali vrednost pH in ugotavljali uspešnost odstranjevanja bazičnih snovi. Reakcijski zmesi smo odparili topilo in dobili 0,14 g spojine. Izkoristek reakcije je bil 80,6 %. Z analizo NMR smo ugotovili, da spojina AKM-6 ne vsebuje nečistot.

AKM-9

Za sintezo AKM-9 smo porabili 0,3 g AKM-8 in z izvedbo TLC v mobilni fazi EtOAc ugotovili, da je bila odščita hidroksilnih skupin zaključena po 30 min. Reakcijsko zmes smo prefiltrirali z Amberlitom IR120, v majhnih količinah, dokler ni bil pH \approx 5 in nato smo odparili topilo. V vseh naslednjih sinteznih postopkih smo pridobili 0,254 g spojine. Izkoristek reakcije je bil 110,0 %, kar kaže na prisotnost nečistot. Da bi odstranili nečistote, smo izvedli reverzno fazno kromatografijo. Pridobili smo samo 0,047 g prečiščene spojine, ker je bila znatna količina spojine izgubljena med postopkom prečiščevanja.

5.2 BIOLOŠKO TESTIRANJE

5.2.1 Kompetitivni vezavni test izpodrivanja vezave gp120 na DC-SIGN

Kompetitivni vezavni test izpodrivanja vezave gp120 na DC-SIGN je izvedel David Hajšek, mag. farm. na Fakulteti za farmacijo.

Afiniteto antagonistov za vezavo na DC-SIGN smo določili z *in vitro* testnim sistemom. Primerjali smo vezavo med potencialnimi antagonisti DC-SIGN in z biotinom konjugirano HIV-1 gp120 za vezavo na CRD DC-SIGN-a.

Na mikrotitrsko ploščico smo vezali ECD receptorja DC-SIGN in blokirali prosta vezavna mesta. Na ploščico smo nato nanесли raztopino naravnega liganda (biotiniliran rekombinanten gp120) in volumsko enako količino potencialnega antagonista s koncentracijami 1 mM, 0,3 mM, 0,1 mM, 0,03 mM, 0,01 mM, 0,003 mM, 0,001 mM. Temu je sledil nanos protiteles proti biotinu, konjugiranih s peroksidazo. Po določenem času smo ploščico sprali in na njej so ostala vezana protitelesa, h katerim so dodali kemiluminiscenčni reagent, ki se je po poteku reakcije razgradil in sprostila se je svetloba, ki smo jo zaznali z luminometrom. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili L-fukozo, ki prepreči vezavo gp120 na CRD domeno DC-SIGN z vrednostjo $IC_{50} = 2,95$ mM. Odstotek vezave naravnega liganda smo določili na podlagi kemiluminiscenčnega odziva. Določili smo tudi 50 % inhibicijo vezave naravnega liganda gp120 na receptor DC-SIGN.

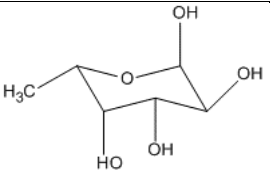
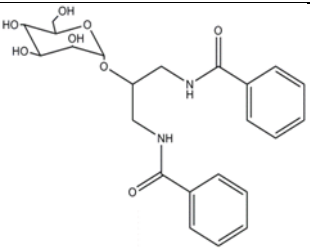
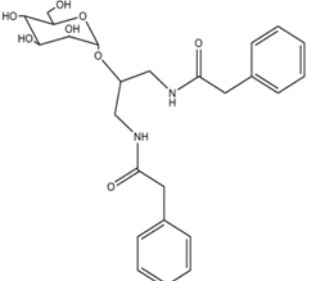
Posledica slabe topnosti testiranih spojin je bilo pojavljanje skupkov oz. agregatov in s tem določitev višjih IC_{50} , kot bi bile dejanske vrednosti zaradi nižjih koncentracij pripravljenih raztopin. V ta namen smo uporabili 0,1 % površinsko aktivne snovi Tween[®] 20, ki nima statistično značilnega vpliva na določanje IC_{50} . (27, 29)

5.2.1.1 Antagonisti DC-SIGN z distančnikom 1,3-diaminopropan-2-ol

Potencialna antagonista AKM-6 in AKM-9

Spojini AKM-6 in AKM-9 sta v svoji strukturi vsebovali distančnik 1,3-diaminopropan-2-ol. Distančnik ima nalogo povezovanja ogljikovega hidrata D-manoze z aromatskima deloma. V preglednici XI so podane vrednosti IC_{50} in test DC adhezije za spojini AKM-6 in AKM-9.

Preglednica XI: Vrednosti IC_{50} za L-fukozo in potencialne antagoniste v izolirani zunajcelični domeni DC-SIGN ter test DC adhezije. (27)

spojina	formula spojine	DC-SIGN IC_{50} [mM]	DC adhezija [%] pri $c = 0,5$ mM
L-fukoza		$2,95 \pm 0,24$	/
AKM-6		$8,79 \pm 0,81$	$100 \pm 0,13$
AKM-9		$14,94 \pm 2,26$	$73,0 \pm 0,21$

Spojina AKM-6, ki ima v svoji strukturi fenilni obroč, se je vezala na ECD DC-SIGN z $IC_{50} = 8,79$ mM, kar je dokaj šibka afiniteta v primerjavi z vrednostjo pri L-fukozi. Z namenom izboljšanja afinitete vezave na DC-SIGN smo oblikovali spojino AKM-9 tako, da smo med 1,3-diaminopropan-2-ol in fenilni obroč dodali metilensko skupino in dobili benzilni obroč ter izmerili $IC_{50} = 14,94$ mM. Dobili smo spojino AKM-9 s šibkejšo afiniteto vezave kot jo ima spojina AKM-6.

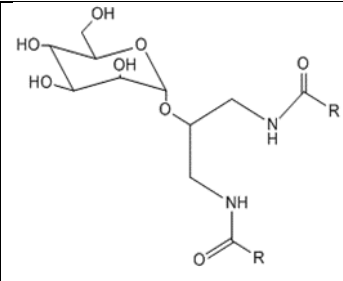
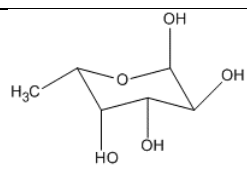
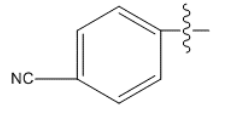
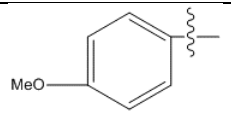
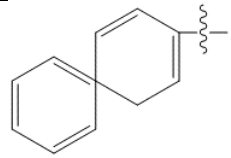
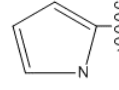
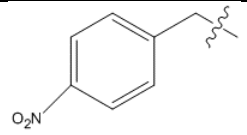
Antagoniste DC-SIGN smo ovrednotili *in vitro*, tj. v kolikšni meri zavirajo vezavo DC na z mananom prevlečene plošče, pri koncentraciji 0,5 mM. Vrednosti DC-adhezije sta bili za AKM-6 = 100 % in nekoliko boljša za AKM-9 = 73 %.

Amidna vez, ki povezuje distančnik z aromatskim delom pri spojinah AKM-6 in AKM-9, je toga. Domnevamo, da se zaradi tega aromatski deli ne orientirajo optimalno v hidrofobni žep, ki ga oblikuje aminokislinski ostanek Phe313 in ne tvorijo hidrofobnih interakcij. (27)

Potencialni antagonisti 1a-e

V nadaljnjih raziskavah so prav tako uporabili distančnik 1,3-diaminopropan-2-ol. Distančnik ima nalogo povezovanja ogljikovega hidrata D-manoze s fenilnima obročema s različnimi substituenti na mestu para, piroloma ali pa naftilnima obročema. V preglednici XII so podane vrednosti IC_{50} in test DC adhezije za spojine 1a-e.

Preglednica XII: Vrednosti IC_{50} za L-fukozo in potencialne antagoniste v izolirani zunajcelični domeni DC-SIGN ter test DC adhezije. (27)

			
1a-e			
spojina	formula spojine	DC-SIGN IC_{50} [mM]	DC adhezija [%] pri $c = 0,5$ mM
L-fukoza		$2,95 \pm 0,24$	/
1a		$4,37 \pm 0,24$	$89,6 \pm 0,11$
1b		$3,89 \pm 0,18$	$95,5 \pm 0,24$
1c		$1,34 \pm 0,08$	$95,2 \pm 0,10$
1d		$13,25 \pm 0,28$	$95,7 \pm 0,22$
1e		$6,49 \pm 0,10$	$81,2 \pm 0,16$

Distančnik, ki povezuje D-manozo z arilnim delom, so v tem primeru povezali s fenilnim obročem, na katerega so na para mesto pripeli ciano skupino in dobili spojino 1a z $IC_{50} = 4,37$ mM, v drugem primeru so na para mesto pripeli metoksi skupino in dobili spojino 1b z $IC_{50} = 3,89$ mM. Vezava skupin na para mesto fenilnega obroča v obeh primerih približno dvakrat poveča afiniteto. V naslednjem primeru so na enak distančnik pripeli pirolni obroč

in dobili spojino 1d s šibkejšo afiniteto ($IC_{50} = 13,25$ mM). Pri spojini 1e je bila na para mesto benzilnega obroča pripeta nitro skupina, ki je nekoliko povečala afiniteto ($IC_{50} = 6,49$ mM). V tej seriji spojin se je kot najmočnejši antagonist DC-SIGN izkazala spojina 1c z $IC_{50} = 1,34$ mM, kjer je bil fenilni obroč zamenjan z 2-naftilnim obročem. DC adhezija za spojine 1a-e je bila šibka v koncentraciji 0,5 mM. (27)

5.2.1.2 Antagonisti DC-SIGN z distančnikom glicerolom

V nadaljevanju razvoja antagonistov DC-SIGN so distančnik 1,3-diaminopropan-2-ol zamenjali z glicerolom in tako dobili bolj fleksibilno etersko skupino in zaradi te so se aromatski deli optimalno orientirali v hidrofobni žep, ki ga je oblikoval aminokislinski ostanek Phe313 in tvoril hidrofobne interakcije, kar pa je izboljšalo afiniteto vezave.

Potencialni antagonisti 2a-f

Spojine 2a-e so vsebovale v svoji strukturi simetrično 1,3-diariloksiopropan-2-ol skupino. V preglednici XIII so podane vrednosti IC_{50} in test DC adhezije za spojine 2a-e.

Preglednica XIII: Vrednosti IC_{50} za L-fukozo in potencialne antagoniste v izolirani zunajcelični domeni DC-SIGN ter test DC adhezije. (27)

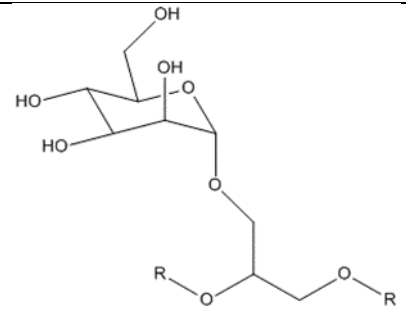
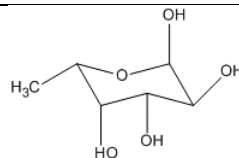
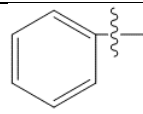
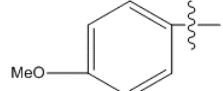
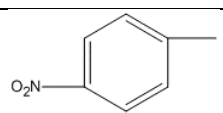
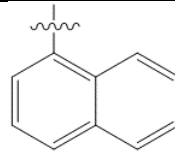
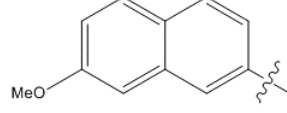
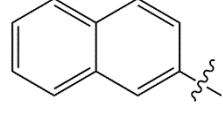
2a-e		2f	
spojina	formula spojine	DC-SIGN IC_{50} [mM]	DC adhezije [%] pri $c = 0,5$ mM
L-fukoza		$2,95 \pm 0,24$	/
2a		$2,41 \pm 0,15$	$102 \pm 0,07$
2b		$5,15 \pm 1,72$	$83,3 \pm 0,15$
2c		$>0,5$	$59,0 \pm 0,14$
2d		$0,04 \pm 0,03$	$0,904 \pm 0,23$
2e		$0,05 \pm 0,01$	$7,55 \pm 0,11$
2f		$7,16 \pm 0,73$	$80,4 \pm 0,09$
	/		

Spojina 2a je vsebovala fenilni obroč in zanjo so izmerili $IC_{50} = 2,41$ mM. Učinek elektron donorske metoksi skupine na mestu para fenilnega obroča je odvisen od simetrije diarilne skupine. V primeru simetrične spojine 2b se je afiniteta zmanjšala na $IC_{50} = 5,15$ mM. Aktivnosti spojine 2c ni bilo mogoče določiti zaradi njene slabe topnosti. Spojini, ki vsebujeta v svoji strukturi naftil, sta zavirali vezavo gp120 na ECD DC-SIGN spojina 2d z $IC_{50} = 40$ μ M, spojina 2e pa z $IC_{50} = 50$ μ M. Pri spojini 2f so uporabili 2-nafilno in etilno skupino in v tem primeru ni bilo zaznati aktivnosti. DC adhezija, izmerjena pri koncentraciji 0,5 mM, za spojini 2d in 2e je bila zelo dobra v primerjavi s spojinami 2a-c in 2f. (27)

Potencialni antagonisti 3a-f

Spojine 3a-f so vsebovale v svoji strukturi asimetrični 2,3-diariloksipropan-1-ol in tako so dobili mešanico dveh diastereomer. V preglednici XIV so podane vrednosti IC_{50} in test DC adhezije za spojine 3a-f.

Preglednica XIV: Vrednosti IC_{50} za L-fukozo in potencialne antagoniste v izolirani zunajcelični domeni DC-SIGN ter test DC adhezije. (27)

			
3a-f			
spojina	formula spojine	DC-SIGN IC_{50} [mM]	DC adhezije [%] pri $c = 0,5$ mM
L-fukoza		$2,95 \pm 0,24$	/
3a		$8,64 \pm 5,77$	$104 \pm 0,06$
3b		$1,01 \pm 0,19$	$80,7 \pm 0,18$
3c		$5,73 \pm 1,32$	$76,2 \pm 0,03$
3d		$>0,5$	$3,73 \pm 0,54$
3e		$>0,5$	$5,29 \pm 0,17$
3f		$0,395 \pm 0,08$	$87,6 \pm 0,12$

Spojina 3a je vsebovala fenilni obroč in zanjo so izmerili afiniteto $IC_{50} = 8,64$ mM, ki je bila dokaj podobna kot pri spojini AKM-6. Spojina 3b je vsebovala fenilni obroč z metoksi

skupino na para mestu in izmerili so $IC_{50} = 1,01$ mM, kar 8 krat večja jakost kot pri spojini 3a. Spojina 3c je imela na fenilnem obroču na para mestu nitro skupino in izmerili so afiniteto $IC_{50} = 5,73$ mM in ta je šibkejša kot pri spojini 3b. Pri koncentraciji 0,5 mM ne kažejo aktivnosti spojina 3d, ki vsebuje 1-naftil, in spojina 3e, ki vsebuje 7-metoksi-2-naftil. DC adhezija, ki so jo izmerili pri koncentraciji 0,5 mM, za spojini 3d in 3e je bila zelo dobra v primerjavi s spojinami 3a-c in 3f. (27)

Spojine 2d, 2e, 3f, ki imajo v svoji strukturi dinaftilni obroč, imajo afiniteto do CRD receptorja DC-SIGN in zavirajo DC adhezijo pri koncentraciji 0,5 mM. Te spojine so doslej najmočnejši na osnovi ogljikovih hidratov zasnovani monovalentni antagonisti DC-SIGN. (27)

Glikomimetični antagonisti receptorja DC-SIGN AKM-6, AKM-9, 1a-e, 2a-f in 3a-f so se z relativno visoko afiniteto v nanomolarnem območju vezali na CRD lektina FimH uropatogene enterobakterije *Escherichiae coli*, katera je pogosto razlog za okužbo urinarnega trakta. (28)

5.2.2 Citotoksičnost antagonistov DC-SIGN

Potencialno citotoksičnost antagonistov DC-SIGN na DC so ovrednotili z metodo pretočne citometrije, pri kateri so uporabili fluorescenčno barvilo propidijev jodid (PI), ki lahko vstopa samo v celice s poškodovano membrano. Kulturo DC so 24 ur tretirali s spojinami 1a, 1c, 2d, 2e, 3b, 3f različnih koncentracij (50 μ M, 100 μ M in 250 μ M) ter inkubirali s PI za 15 min. Na koncu so celice analizirali in določili odstotek PI-pozitivnih celic, ki je enak odstotku mrtvih celic v kulturi.

Testirane spojine niso bile citotoksične na DC pri koncentraciji 50 μ M. Zmerna citotoksičnost na DC je bila opažena za spojini 2d in 2e pri koncentraciji 100 μ M, medtem ko so bile 1c, 2d, 2e in 3f citotoksične na DC pri najvišji testirani koncentraciji 250 μ M. (27)

Rezultati prikazujejo, da bi antagonistični učinek na DC-SIGN dendritičnih celicah, lahko bil posledica citotoksičnega učinka. Citotoksičnost se meri po 24 urah, medtem ko je adhezija DC izmerjena nič več kot pri 90 minutah in med tem časom so opazili le zanemarljivo citotoksičnost, četudi pri najvišji testirani koncentraciji. Zatorej sklepamo, da testirane spojine, četudi citotoksične pri najvišjih testiranih koncentracijah in v podaljšanem obdobju, služijo tudi kot zaviralci DC adhezije.

6 ZAKLJUČEK

Potencialne glikomimetične antagoniste receptorja DC-SIGN z diarilamidopropanolomanozidno strukturo smo uspešno sintetizirali. Prednost uporabe teh spojin je, da zasedejo vezavna mesta receptorja DC-SIGN pred različnimi patogeni, kot je virus HIV-1, in s tem preprečijo infekcijska obolenja. DC-SIGN je pogosto prvi receptor, s katerim patogeni pridejo v stik pri vdoru v telo, v določenih primerih pa deluje kot vstopna točka za različne patogene ter tako kot posrednik okužbe.

V eksperimentalnem delu smo sintetizirali 9 spojin: AKM-1, AKM-2, AKM-3, AKM-4, AKM-5, AKM-6, AKM-7, AKM-8 in AKM-9. Največ težav smo imeli s topnostjo spojin, z izbiro postopka ločevanja pri spojnini AKM-7 ter z odstranjevanjem neželenih primesi pri spojnini AKM-5 in AKM-9. Rezultati masne spektrometrije in $^1\text{H-NMR}$ so potrdili, da so bile sintetizirane spojine prave, s stopnjo čistote, ki je zadostovala za nadaljnje eksperimentalno delo, kot tudi za oceno njihove afinitete vezave na CRD receptorja DC-SIGN.

Potencialna glikomimetična antagonista DC-SIGN AKM-6 in AKM-9 sta bili končni spojini, sintetizirani iz α -trikloroacetimidata in distančnika 1,3-diaminopropan-2-ola, substituiranega z aromatskima deloma. Izmerjeni vrednosti IC_{50} sta bili v milimolarnem območju, in sicer 8,79 mM za AKM-6 ter 14,94 mM za AKM-9, kar kaže na boljši antagonistični učinek spojine AKM-6. Zaviranje adhezije DC s pomočjo teh spojin, izmerjeno pri koncentraciji 0,5 mM, je bilo šibko. V seriji spojin, ki vsebujejo distančnik 1,3-diaminopropan-2-ol, je bila najboljši potencialni glikomimetični antagonist spojina 1c, ki v svoji strukturi vsebuje 1-naftilni obroč, z izmerjeno afiniteto $\text{IC}_{50} = 1,34$ mM.

Glikomimetične antagoniste receptorja DC-SIGN lahko uporabljamo za zdravljenje okužb z virusom HIV-1. Predstavljajo pa tudi nove alternativne terapevtske pristope, predvsem antibiotikom in vse pogostejšemu pojavu odpornih bakterijskih sevov na le-te.

V prihodnosti bodo raziskave glikomimetičnih antagonistov verjetno potekale na drugih lektinskih receptorjih, ki imajo domeno za prepoznavo ogljikovih hidratov, in na lektinih patogenov, kot so različne bakterije, virusi, glive in paraziti.

7 LITERATURA

1. Steinman RM, Wittmer MD: Limfoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leucocyte reaction in mice. *Zdravniški vestnik* 2004; 73:69-72.
2. Švajger U, Anderluh M, Jeras M, Obermajer N: C-type lectin DC-SIGN: An adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cellular Signalling* 2010; 22 (10):1397-1405.
3. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252.
4. Švajger U, Jeras M: Tolerogenic dendritic cell therapy-causal treatment of autoimmune diseases. *Zdrav Vestn* 2013; 82:47-54.
5. Repnik U, Bergant M, Jeras M: Lastnosti in možnosti uporabe DC, antigensko specifičnih modulatorjev imunskega odziva. *Zdrav Vestn* 2004; 73: 69-72.
6. 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. *Molecular Diversity* 2010; 15, 2: 347-360.
7. Zhou T, Chen Y, Hao L, Zhang Y: DC-SIGN and immunoregulation. *Cellular and Molecular Immunology* 2006; 3, 4: 279-283.
8. Wang Jian-Hua, Kwas Constance, Wu Li: Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), but Not ICAM-2 and - 3, Is Important for Dendritic Cell-Mediated Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission. *Journal of virology* 2009; 83, 9:4195-4204.
9. Anderluh M, Jug G, Svajger U, Obermajer N: DC-SIGN antagonists, a potential new class of anti-infectives. *Curr Med Chem* 2012; 19: 992-1007.
10. Kadowaki N, HoS, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F: Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194: 863-869.
11. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y: Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.

12. Lanzavecchia A, Sallusto F: Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 2001; 106: 263-266.
13. Anderluh M: DC-SIGN Antagonists - A Paradigm of C-type Lectin Binding Inhibition. *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. InTech 2012.
14. Obermajer N, Švajger U, Jeras M, Sattin S, Bernardi A, Anderluh M: An assay for functional dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN) inhibitors of human dendritic cell adhesion. *Analytical Biochemistry* 2010; 406: 222-229.
15. Ernst B, Magnani JL: From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. *Drug discovery* 2009; 8: 661-677.
16. Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demaurex N, Lanzavecchia A, Fransen J, Figdor CG, Piguet V, van Kooyk Y: The Dendritic Cell-Specific Adhesion Receptor DC-SIGN Internalizes Antigen for Presentation to T Cells. *Journal of Immunology* 2002; 168: 2118-2126.
17. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG: Identification of DC-SIGN, a Novel Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Receptor that Supports Primary Immune Responses. *Cell* 2000; 100: 575-585.
18. Finkelstein J: *Glycochemistry & Glycobiology*. *Nature* 2007; 446: 999.
19. Lindhorst TK: *Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry*. 2000.
20. Van Kooyk Y, Geijtenbeek TB: DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nature reviews Immunology*. 2003; 3: 697-709.
21. Jeras M, Švajger U: Immune tolerance. *Zdrav Vestn* 2011; 80: 944-956.
22. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A: Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current Opinion in Immunology* 1997; 9: 10-16.
23. Feinberg H, Mitchell DA, Drickamer K, Weis WI: Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* 2001; 294: 2163-2166.

24. Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, Krieger E, Vriend G, Figdor CG, van Kooyk Y: Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J Biol Chem* 2002; 277: 11314-11320.
25. Mitchell DA, Fadden AJ, Drickamer K: A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem* 2001; 276: 28939-28945.
26. Weis WI, Drickamer K, Hendrickson WA: Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* 1992; 360: 127-134.
27. Tomašić T, Hajšek D, Švajger U, Luzar J, Obermajer N, Petit-Haertlein I, Fieschi F, Anderluh M: Monovalent mannose-based DC-SIGN antagonists: Targeting the hydrophobic groove of the receptor. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 75: 308-326.
28. Tomašić T, Rabbani S, Gobec M, Mlinarič Raščan I, Podlipnik Č, Ernst B, Anderluh M: Branched α -D-mannopyranosides: a new class of potent FimH antagonists. *MedChemComm* 2014; 20: 1-7.
29. Hajšek D: Testni sistem za določanje afinitete antagonistov receptorja DC-SIGN in vitro. Diplomsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo 2012.
30. Vozelj M: Temelji imunologije. DZS, Ljubljana, 2000; 1-21: 159-194.
31. <http://www.invivogen.com/review-clr.pdf>; dostopano 23. 7. 2014.
32. Serrano-Gomez D, MartinezNunez T. Rocio, Sierra-Filardi Elena, Izquierdo Nuria, Colmenares Maria in sodelavci: AM3 Modulates Dendritic Cell Pathogen Recognition Capabilities by Targeting DC-SIGN. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American society for microbiology. 2007; 51(7): 2313.