

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA VRTAČNIK

**SINTEZA MONOVALENTNIH IN TETRAVALENTNIH  
GLICEROLOMANOZIDOV KOT POTENCIALNIH  
ANTAGONISTOV RECEPTORJA DC-SIGN**

**SYNTHESIS OF MONOVALENT AND TETRAVALENT  
GLYCEROLOMANNOSIDES AS POTENTIAL ANTAGONISTS OF  
RECEPTOR DC-SIGN**

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo in na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani. Biološko testiranje je bilo opravljeno na Fakulteti za farmacijo in na Institute of Molecular Pharmacy, University of Basel v Švici.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm., za potrpežljivost, nasvete in strokovno pomoč tako pri praktičnem delu v laboratoriju kot tudi pri pisanju magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi asist. dr. Roku Frlanu, mag. farm., za vso pomoč pri laboratorijskem delu.

Posebna zahvala gre mami Mariji, ki je skozi celoten študij zaupala vame in me podpirala. Na koncu bi se zahvalila še bratu Petru, ki me je v času študija spodbujal in mi pomagal s praktičnimi nasveti.

### **Izjava**

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

Katja Vrtačnik

Ljubljana, 2014

# VSEBINA

<b>POVZETEK</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 LEKTINI TIPA C .....	2
1.2 DC-SIGN .....	3
1.2.1 Vloga v celični imunosti .....	4
1.2.2 Vezava patogenov .....	4
1.2.3 Vezava virusa HIV-1 .....	5
1.2.4 Struktura DC-SIGN .....	6
1.2.5 Vezavno mesto .....	8
1.3 DC-SIGN ANTAGONISTI .....	9
1.3.1 Monovalentni antagonisti .....	10
1.3.2 Polivalentni antagonisti .....	11
1.4 SELEKTIVNA VEZAVA LIGANDOV .....	12
1.5 BAKTERIJSKI ADHEZIN FimH .....	12
1.5.1 Struktura FimH .....	13
1.5.2 Antagonisti FimH .....	14
<b>2 NAČRT DELA</b> .....	<b>15</b>
2.1 SINTEZA DISTANČNIKA .....	16
2.2 SINTEZA MONOVALENTNIH GLICEROLOMANOZIDOV .....	16
2.3 SINTEZA POLIVALENTNEGA GLICEROLOMANOZIDA .....	18
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>19</b>
3.1 MATERIALI .....	19
3.2 METODE .....	19
3.2.1 Kromatografske metode .....	19
3.2.2 Spektroskopske metode .....	20
3.2.3 Temperatura tališča .....	20
3.2.4 Poimenovanje in risanje spojin .....	20
3.2.5 Biološko testiranje .....	21

<b>4</b>	<b>EKSPERIMENTALNO DELO .....</b>	<b>22</b>
4.1	Sinteza 2-(((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)metil)oksirana.....	22
4.2	Sinteza benzil 6-hidroksi-2-naftoata .....	23
4.3	Sinteza benzil 6-(2-hidroksi-3-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi) propoksi)-2-naftoata .....	24
4.4	Sinteza 6-(2-hidroksi-3-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propoksi)-2-naftojske kisline .....	26
4.5	Sinteza 3-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)propanojske kisline.....	27
4.6	Sinteza benzil 3-(3-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)propanamido) propanoata .....	28
4.7	Sinteza 3-(3-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)propanamido) propanojske kisline.....	30
4.8	Sinteza benzil (2-aminoetil)karbamata.....	30
4.9	Sinteza <i>terc</i> -butil (3,8,12-triokso-1-fenil-2-oksa-4,7,11-triazatetradekan-14-il)karbamata	31
4.10	Sinteza <i>terc</i> -butil (3-((3-((2-aminoetil)amino)-3-oksopropil)amino)-3-oksopropil) karbamata.....	33
4.11	Sinteza <i>terc</i> -butil (3-((3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)amino)-3-oksopropil)karbamata .....	34
4.12	Sinteza 3-((3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)amino)-3-oksopropan-1-amonijevega klorida .....	35
4.13	Sinteza <i>N</i> -(3-((3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)amino)-3-oksopropil)-6-(2-hidroksi-3-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propoksi)-2-naftamida .....	35
	<b>SPLOŠNI POSTOPEK REAKCIJE GLIKOZILACIJE.....</b>	<b>37</b>
4.14	Poskus sinteze 3-((6-((3-((3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)amino)-3-oksopropil) karbamoi)naftalen-2-il)oksi)-1-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-manopiranozida .....	38
4.15	Sinteza 3-((6-((benziloksi)karbonil)naftalen-2-il)oksi)-1-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi) propan-2-il 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-manopiranozida .....	38
4.16	Sinteza 3-((6-(karboksi)naftalen-2-il)oksi)-1-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-manopiranozida .....	41
4.17	Sinteza 3-((6-(metoksikarbonil)naftalen-2-il)oksi)-1-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-2-il $\alpha$ -D-manopiranozida.....	41
4.18	Sinteza 3-((6-(karboksi)naftalen-2-il)oksi)-1-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-2-il $\alpha$ -D-manopiranozida.....	43
4.19	Sinteza 3-((6-((3-((3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)amino)-3-oksopropil) karbamoi) naftalen-2-il)oksi)-3-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-2-il $\alpha$ -D-manopiranozida .....	44
4.20	Poskus sinteze dendrona .....	46

<b>5</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>48</b>
5.1	KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV .....	48
5.1.1	Sinteza diarilglicerolov .....	48
5.1.2	Sinteza distančnika.....	50
5.1.3	Odstranitev zaščite karboksilne skupine diarilglicerolov.....	53
5.1.4	Sinteza spojine 19 .....	54
5.1.5	Sinteza dendrona .....	57
5.2	REZULTATI BIOLOŠKEGA VREDNOTENJA.....	59
5.2.1	DC-SIGN .....	61
5.2.2	FimH .....	62
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČEK.....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>65</b>

## POVZETEK

DC-SIGN (angl. Dendritic cell-specific, intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) je lektin tipa C, ki ga najdemo izključno na površini nezrelih dendritičnih celic (DC). Kot adhezijska molekula omogoča celično migracijo, kot vzorčno prepoznavni receptor (PRR) pa prepozna različne molekularne vzorce številnih patogenov, omogoči njihovo internalizacijo, predelavo in nazadnje predstavitev T-celicam. Tako pomembno sodeluje pri oblikovanju specifičnega imunskega odziva proti patogenom. DC-SIGN izkazuje veliko vezavno afiniteto za plaščni glikoprotein gp120 virusa HIV-1. Virus HIV-1 v DC vstopi vezan na DC-SIGN in ostane znotraj multivezikularnega telesa nepoškodovan. Zaščiteno pred litičnim ciklom se virus HIV-1 izogne predstavitvi T-celicam, s tem pa obrambnemu mehanizmu imunskega sistema. DC-SIGN zato predstavlja potencialno terapevtsko tarčo v razvoju učinkovin, ki bi z vezavo na receptor DC-SIGN preprečile njegovo interakcijo z virusom HIV-1 in drugimi patogeni, ki se na enak način izognejo imunskemu odzivu.

Na osnovi dejstva, da DC-SIGN specifično prepozna D-manozne ligande, smo v okviru magistrske naloge sintetizirali monovalentne glicerolomanozide kot potencialne glikomimetične antagonist receptorja DC-SIGN. Sladkorne enote naravnih ligandov smo deloma zamenjali z glikomimetičnimi gradniki. Ker aktivnost izkazujejo le  $\alpha$ -D-manozidi, smo z ustreznimi reakcijskimi pogoji sintezo usmerili v stereoselektivno tvorbo  $\alpha$ -anomerov. V nadaljevanju smo afiniteto ene izmed spojin želeli povečati s tvorbo polivalentnega glicerolomanozida. Preko vezave na ustrezen distančnik smo na nosilec za vezavo tetravalentnega dendrona poskušali pripeti štiri enote izbranega monovalentnega glicerolomanozida, a nam to žal ni uspelo. Sintetizirane spojine smo biološko ovrednotili z *in vitro* testnim sistemom. Določali smo sposobnost spojin, da tekmujejo z gp120 virusa HIV-1 za vezavo na domeno za prepoznavo ogljikovih hidratov (CRD) lektina DC-SIGN in jim določili vrednosti  $IC_{50}$ . Z aktivnostjo v mikromolarnem območju so sintetizirane spojine primerljive najmočnejšim že znanim monovalentnim antagonistom DC-SIGN.

Monomerni glicerolomanozidi, sintetizirani kot potencialni antagonisti DC-SIGN, so se v preteklosti izkazali kot učinkoviti antagonisti receptorja FimH. Enako velja za dve izmed sintetiziranih spojin, ki smo ju biološko ovrednotili na receptorju FimH in izkazujeta inhibitorni učinek v nanomolarnem območju. FimH je za  $\alpha$ -D-manozo specifičen lektin, značilen za enterobakterije, med katere sodi uropatogena *Escherichia coli*. Preko vezave na

uroplakin Ia omogoči adhezijo *E. coli* na urotelij. Spojine, ki bi z vezavo na FimH preprečile adhezijo bakterij, predstavljajo potencialno alternativo v zdravljenju okužb urinarnega trakta.

***Ključne besede:*** DC-SIGN, DC-SIGN antagonisti, D-manoza, FimH, HIV-1

## ABSTRACT

Dendritic cell-specific, intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) is a C-type lectin expressed exclusively by immature dendritic cells (DC). As an adhesion molecule it enables cell migration. Furthermore, as a pattern recognition receptor (PRR) it plays an important role in formation of specific immune response against pathogens. It enables pathogen recognition, internalisation, degradation and antigen presentation to T cells. DC-SIGN recognises and binds HIV-1 envelope glycoprotein gp120 with high affinity. HIV-1 enters DC bound to DC-SIGN and remains hidden in multivesicular bodies. Protected from the lytic cycle, HIV-1 escapes T cell presentation as well as the immune system's defence mechanisms. Therefore, DC-SIGN represents a promising therapeutic target in the design of compounds that would, when bound to DC-SIGN, inhibit its interaction with HIV-1 and other pathogens that escape the immune response in a similar way.

Based upon the fact that DC-SIGN specifically binds D-mannose-based ligands, we synthesised monovalent glycerolomannosides as potential glycomimetic DC-SIGN antagonists. We partially replaced the saccharide units of DC-SIGN natural ligands with suitable glycomimetic moieties. As  $\alpha$ -glycosidic bond is crucial for the activity of D-mannose-based ligands, we achieved the stereoselective synthesis of  $\alpha$ -anomers using suitable reaction conditions. Later on, we tried to improve the binding affinity of one of the synthesised monovalent glycerolomannosides by attaching four monovalent ligands to a polyvalent dendron core through a suitable linker. Unfortunately, we were not able to produce a tetramer. Synthesised glycomimetics were biologically evaluated using an *in vitro* assay. The ability of the synthesised compounds to compete with HIV-1 gp120 for binding to a carbohydrate recognition domain (CRD) of an isolated DC-SIGN extracellular domain was determined and  $IC_{50}$  values were calculated. With activities in the micromolar concentrations, synthesised compounds are comparable to the most potent already known monovalent DC-SIGN antagonists.

In the past, monovalent glycerolomannosides synthesised as potential DC-SIGN antagonists proved to be efficient antagonists of FimH, an  $\alpha$ -D-mannose specific lectin. Therefore, the antagonistic activity of the final compounds on receptor FimH was evaluated. With inhibitory effects in the nanomolar range, they turned out to be potential FimH antagonists. FimH is a representative of bacterial lectins, typical for enterobacteria,



including uropathogenic *Escherichia coli*. By binding to uroplakin Ia FimH enables adhesion of *E. coli* to urothelial cells. Blocking FimH with a glycomimetic and consequently inhibiting bacterial adhesion represents a potential alternative in the treatment of urinary tract infections.

**Keywords:** DC-SIGN, DC-SIGN antagonists, D-mannose, FimH, HIV-1

## SEZNAM OKRAJŠAV

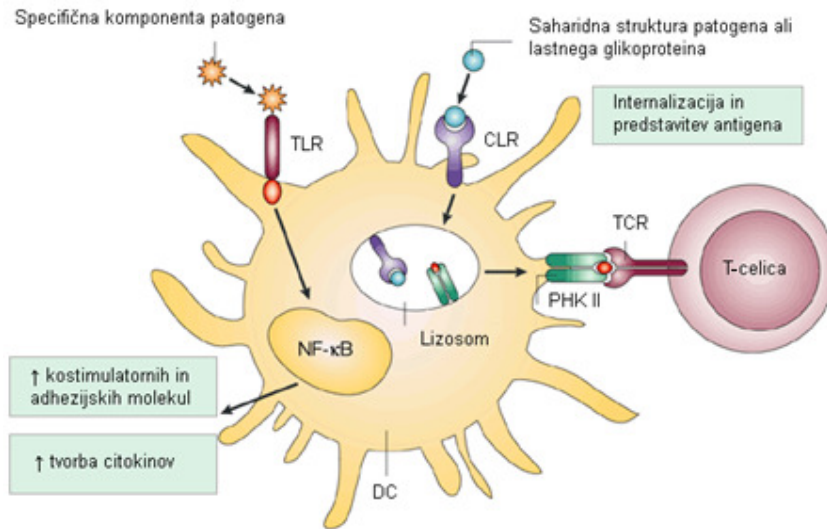
<b>AK</b>	aminokislina, aminokislinski
<b>APC</b>	antigen predstavitvene celice
<b>CCR5</b>	peti kemokinski receptor
<b>CLEC-1</b>	C-type lectin receptor 1 – lektin tipa C 1
<b>CLR</b>	C-type lectin receptor – lektin tipa C
<b>CRD</b>	carbohydrate recognition domain – domena za prepoznavo ogljikovih hidratov
<b>DC</b>	dendritične celice
<b>DCIR</b>	dendritic cell immunoreceptor – imunoreceptor dendritičnih celic
<b>DC-SIGN</b>	dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non-integrin
<b>DKM</b>	diklorometan
<b>DLEC</b>	dendritic cell lectin – lektin dendritičnih celic
<b>DMAP</b>	4-dimetilaminopiridin
<b>EDC</b>	3-(((etilimino)metilen)amino)- <i>N,N</i> -dimetilpropan-1-amonijev klorid
<b>EtOAc</b>	etilacetat
<b>HCV</b>	hepatitis C virus
<b>HATU</b>	1-[bis(dimetilamino)metilen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i> ]piridinijev 3-oksid heksafluorofosfat
<b>HIV</b>	human immunodeficiency virus – virus humane imunske pomanjkljivosti
<b>HOBt</b>	1-hidroksibenzotriazol
<b>ITAM</b>	immunoreceptor tyrosine based activation motif – aktivacijski motiv s strukturo imunskega receptorja, ki temelji na tirozinu
<b>MeOH</b>	metanol

<b>MMR</b>	macrophage mannose receptor – manozni receptor
<b>NMM</b>	<i>N</i> -metilmorfolin
<b>PAMPs</b>	pathogen associated molecular patterns – molekularni vzorci, značilni za patogene
<b>PHK</b>	poglavitni kompleks tkivne skladnosti
<b>PRR</b>	pattern recognition receptor – vzorčno prepoznavni receptor
<b>TBAB</b>	tetrabutilamonijev bromid
<b>TBTU</b>	<i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N,N</i> -tetrametiluronijev tetrafluoroborat
<b>TCR</b>	T-celični receptor
<b>TLC</b>	thin layer chromatography – tankoplastna kromatografija
<b>TLR</b>	toll-like receptors – tollu podobni receptorji
<b>TMSOTf</b>	trimetilsilil trifluorometansulfonat

# 1 UVOD

V obrambi pred številnimi škodljivimi vplivi so sesalci razvili več vrst učinkovitih mehanizmov. Mednje sodi prirojena imunost, ki vključuje genetske dejavnike, biokemijske in fizikalne pregrade, ki preprečijo vstop potencialnega patogena v organizem, nespecifične baktericidne snovi telesnih tekočin in različne efektorske mehanizme. Kljub temu mehanizmi naravne odpornosti velikokrat ne zadoščajo v obrambi pred patogenimi mikrobi. Takrat organizem v odgovor na vdor povzročitelja razvije mehanizme specifične imunosti. Specifični imunski odziv razlikuje med telesu lastnimi in tujimi molekulami, vsako srečanje s tujim antigenom pa si zapomni. Posledično se pri ponovnem stiku z enakim antigenom odzove hitreje in učinkoviteje. Osrednje celice specifičnega imunskega odziva so limfociti T, ki posredujejo celično, in limfociti B, ki posredujejo humoralno imunost. Limfocite T, ki v nadaljevanju pomagajo pri aktivaciji in dozorevanju limfocitov B, lahko aktivirajo le antigen predstavitvene celice (APC). Celično posredovana imunost spodbudi humoralni imunski odziv, znotrajcelično razgradnjo mikrobov oz. uničenje okuženih celic (1, 2).

Med APC sodijo makrofagi, celice B in dendritične celice. Slednje imajo ključno vlogo pri specifičnem imunskem odzivu, saj v primerjavi z drugimi APC učinkoviteje privzamejo, predelajo in predstavijo antigen. Nezrele dendritične celice vežejo patogene preko ohranjenih vzorčno prepoznavnih receptorjev (PRR), ki prepoznajo značilne molekularne vzorce na površini mikrobov (PAMPs). Mednje sodijo tollu podobni receptorji (TLR), ki prepoznajo specifične komponente patogena, lipoproteine, lipopolisaharide ali bakterijsko DNA in lektini tipa C (CLR), ki prepoznajo saharidne strukture na površini patogenov (3, 4). Medtem ko so receptorji TLR ključni za sprožitev zorenja nezrelih DC, njihovo aktivacijo po prepoznavi patogena in s tem aktivacijo imunskega sistema, pa lektini tipa C pomembno sodelujejo pri oblikovanju imunskega odziva (**Slika 1**). To dosežejo s prepoznavo patogenov, predstavitevjo antigenov, modulacijo s TLR sprožene aktivacije in z vezavo endogenih proteinov, ki vodi v toleranco do lastnih antigenov (2, 5).

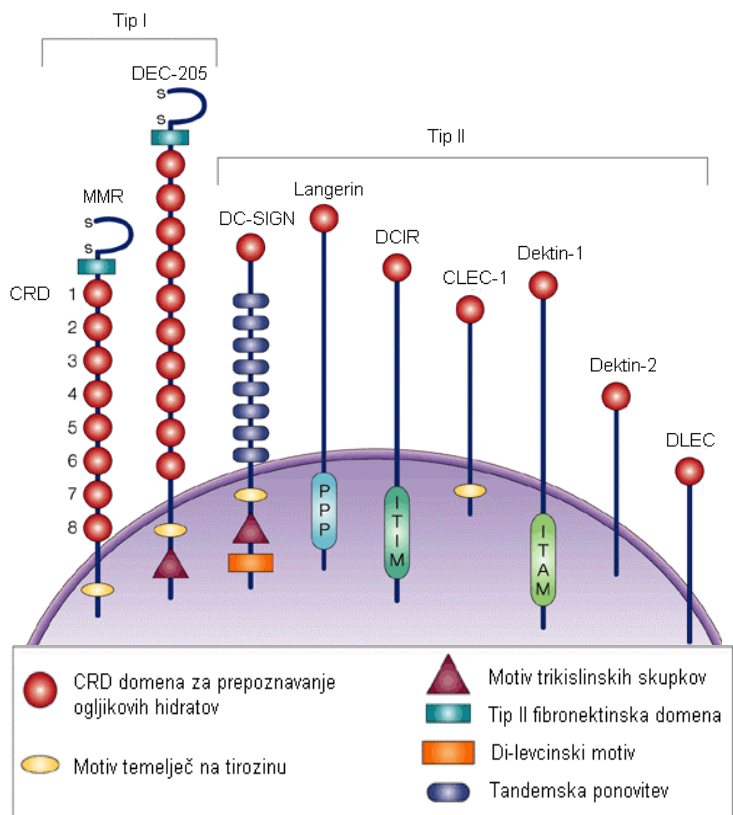


**Slika 1:** Lektini tipa C in tollu podobni receptorji na površini dendritične celice (prirejeno po 4). Nezrele dendritične celice za prepoznavo mikroorganizmov na svoji površini izrazijo tollu podobne receptorje, ki vežejo specifične komponente patogenov, in lektine tipa C, ki prepoznavajo saharidne strukture. Receptorji TLR po prepoznavi sprožijo signalno transdukcijo, ki preko aktivacije jedrnega dejavnika NF-κB poveča izražanje kostimulatornih in adhezijskih molekul in tvorbo citokinov, kar vodi v zorenje DC. Prepoznavanje patogenov s strani lektinov tipa C vodi v njihovo internalizacijo in znotrajcelično procesiranje za predstavitev celicam T z molekulami poglobavitnega kompleksa tkivne skladnosti (PHK).

## 1.1 LEKTINI TIP A C

Lektine tipa C, izražene na površini dendritičnih celic, delimo na tip I (MMR in DEC-205) in tip II (DC-SIGN, Langerin, DCIR, CLEC-1, dektin-1, dektin-2 in DLEC) transmembranske proteine (**Slika 2**). Kljub temu, da so si med seboj strukturno precej različni, je vsem lektinom tipa C skupna domena za prepoznavo ogljikovih hidratov (CRD). Manozni receptor ima osem in DEC-205 deset CRD, vsi tip II lektini tipa C pa imajo zgolj eno CRD. Gre za zgoščeno globularno strukturo, hidrofilno zanko, ki štrli iz površja proteina in selektivno prepozna ter veže le eno saharidno enoto liganda. Struktura preostalega dela molekule se komplementarno prilega domeni CRD in tvori dodatne interakcije. Strukturna značilnost CRD so  $\text{Ca}^{2+}$ , ki preko kompleksnih interakcij s hidroksilnimi skupinami tvorijo most med proteinom in glavnim monosaharidom. Na vezavno specifičnost lektina vplivajo aminokislinski ostanki domene CRD, ki tvorijo interakcije z glavnim monosaharidom, in struktura vratne domene, ki narekuje oligomerizacijo receptorja. DC-SIGN, Langerin, MMR in BDCA-2 v svojih domenah

vsebujejo Glu-Pro-Asn regijo, ki določa vezavno specifičnost za manozo, kljub temu pa vežejo različne manozne ligande, ki se razlikujejo v razvejanosti in prostorski razporeditvi. Razlog za to je lahko različna stopnja oligomerizacije, ki je odvisna od števila vijačnih ponovitev posamezne verige vratne domene. Manozni receptor namreč tvori trimere, DC-SIGN pa tetramere (4, 6).



**Slika 2:** Lektini tipa C na površini dendritične celice (prirejeno po 7).

## 1.2 DC-SIGN

Receptor DC-SIGN je tip II CLR, ki ga najdemo izključno na površini dendritičnih celic. Igra ključno vlogo v celični imunosti, saj kot vzorčno prepoznavni receptor omogoča prepoznavo antigenov, njihovo internalizacijo ter predelavo in nazadnje predstavitev T-celicam. Kot adhezijska molekula sodeluje pri migraciji DC. Vezava liganda na DC-SIGN povzroči aktivacijo signalnih poti, ki uravnavajo zorenje dendritične celice in izražanje citokinov. Številni patogeni zaobidejo imunski odziv, saj v dendritično celico vstopijo vezani na DC-SIGN. Na ta način se izognejo litičnemu ciklu, s tem pa predstavitvi T-celicam ter tako ostanejo zaščiteni do vstopa v tarčne celice. Receptor DC-SIGN zato predstavlja potencialno terapevtsko tarčo v razvoju protivirusnih in protimikrobnih

učinkovin. Slednje bi z vezavo na DC-SIGN preprečile njegovo interakcijo s številnimi patogeni. Ti posledično v dendritično celico ne bi vstopili vezani na DC-SIGN in na tak način ne bi mogli zaobiti imunskega odziva (3).

### ***1.2.1 Vloga v celični imunosti***

Glavna naloga DC-SIGN v vlogi PRR na površini DC je njegova interakcija z ohranjenimi PAMP različnih mikroorganizmov, njihova internalizacija, degradacija, predelava in nazadnje predstavitev antigena, s tem pa sprožitev imunskega odziva proti patogenu. Za internalizacijo patogenov vsebuje internalizacijske motive, dilevcinski motiv in motiv trikislinskih skupkov, s katerim usmeri internaliziran antigen v lizosom, kjer poteče njegova degradacija (4). Po ugreznitvi celične membrane v citosol se oblikuje zgodnji endosom, iz katerega se v nadaljevanju razvije pozni endosom z značilno kislim pH. Molekule PHK razreda II se združijo s poznim endosomom, ki se v nadaljevanju zlije z lizosomom. Po degradaciji patogena molekule PHK razreda II vežejo antigenske peptide, ki jih nato prenesejo na celično površino, kjer jih spoznajo celice T CD4<sup>+</sup> (2).

Po drugi strani DC-SIGN z vezavo adhezijskih proteinov vzpostavlja celične interakcije med migracijo dendritične celice. Vezava DC-SIGN na znotrajcelično adhezijsko molekulo ICAM-2, izraženo na žilnem in limfatičnem endoteliju, spodbudi migracijo DC iz perifernih tkiv do sekundarnih limfnih organov, kjer se DC-SIGN veže na ICAM-3 in s tem omogoči zgodnji antigensko nespecifičen stik med dendritično in T-celico. Prehodna vezava DC-SIGN in ICAM-3 T-celici omogoči vzorčenje kompleksov peptid-PHK in stabilizira stično območje med DC ter T-celičnim receptorjem. To omogoča prepoznavo antigena s strani T-celice in posledično učinkovit imunski odziv. DC-SIGN je torej ključni receptor, ki omogoča normalno delovanje dendritičnih celic z vezavo endogenih ligandov, hkrati pa sodeluje pri oblikovanju imunskega odgovora na različne patogene preko njihovih interakcij s PRR (3, 4).

### ***1.2.2 Vezava patogenov***

DC-SIGN specifično veže glikane, ki v svoji strukturi vsebujejo D-manozo ali L-fukozo, ti pa so različno izraženi na površini številnih mikroorganizmov. Vrsta patogena, ki ga DC-SIGN veže, določa citokinski odziv tollu podobnih receptorjev in pomembno oblikuje imunski odziv. Vezava patogenov, ki na svoji površini izražajo D-manozo (*Mycobacterium tuberculosis*, HIV-1), vodi v povečano izražanje mediatorjev vnetja IL-

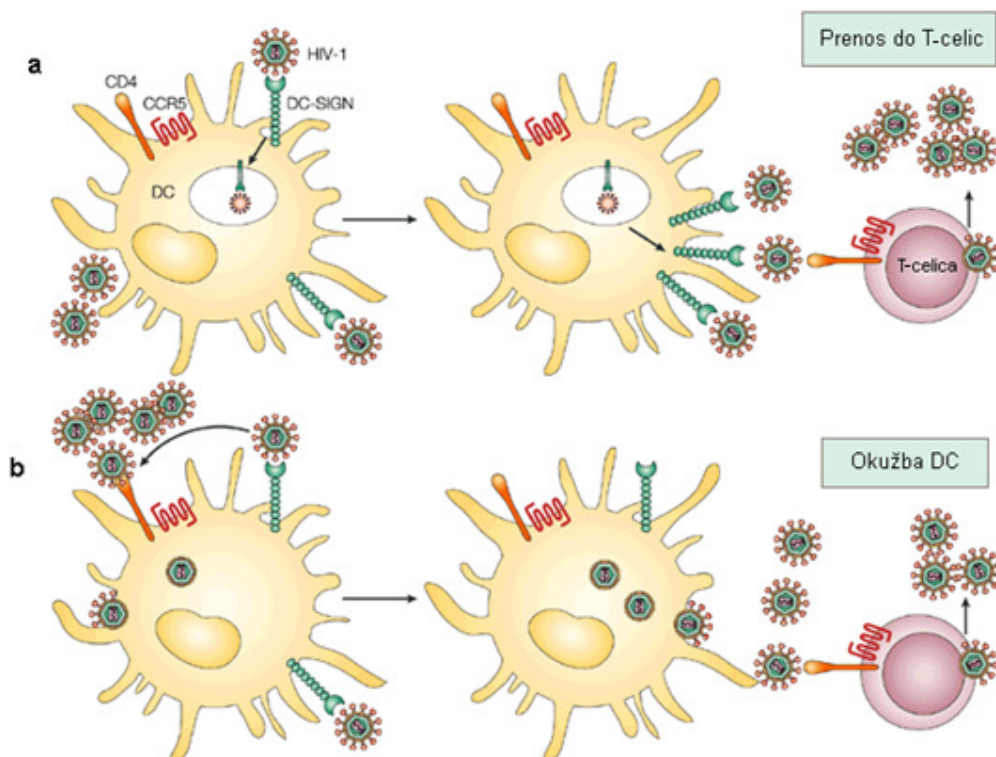
10, IL-12 in IL-6, medtem ko vezava patogenov z L-fukozo (*Helicobacter pylori*) poveča ekspresijo IL-10 in zmanjša ekspresijo IL-12 in IL-6. Inhibitorni in protivnetni IL-10 močno uravnava diferenciacijo dendritičnih celic. Učinkovito zavira zvišanje ravni izražanja kostimulatornih molekul, sekrecijo proinflammatoryh citokinov, kot sta IL-12 in TNF, in zavira sposobnost DC, da aktivirajo T-celice. To, poleg manipulacije razmerja med  $T_H1$  in  $T_H2$ , s katero se tovrstni patogeni izognejo imunskemu odzivu, omogoči preživetje patogena (3, 4, 8). Glede na pomen vloge, ki jo ima DC-SIGN v posredovanju okužbe, predstavlja inhibicija interakcije s patogenom potencial za razvoj protivirusnih in protibakterijskih učinkovin, s katerimi bi lahko preprečili okužbo dendritičnih celic in diseminacijo patogena (3).

### **1.2.3** *Vezava virusa HIV-1*

Virus HIV vstopi v stik z dendritičnimi celicami preko vezave na receptor DC-SIGN, ki izkazuje veliko vezavno afiniteto za njegov plaščni glikoprotein gp120. Ker pri tem ne pride do prostorske spremembe virusne transmembranske beljakovine gp41, ključne za vstop virusa v celico, ostane ta v večji meri v kompleksu z receptorjem na površini DC. Del virusa vstopi v celico, vendar ostane znotraj multivezikularnega telesa nepoškodovan in se izogne združitvi z lizosomom. Dendritične celice virus prenesejo do limfatičnih tkiv, kjer ga ponovno izpostavijo na celično površino in okužijo  $CD4^+$  T-celice (**Slika 3**). Same ostanejo neokužene, saj virus izkoristi njihovo fiziološko funkcijo zgolj za lažji in hitrejši dostop do tarčnih celic. Tam se nenadzorovano razmnožuje in povzroči široko razširjeno okužbo. Iz tega razloga so dendritične celice dobile oznako »trojanski konj za HIV« (4, 9).

Prisotnost virusa HIV-1 v visokih koncentracijah dovoljuje okužbo dendritičnih celic. Po primarnem stiku z DC-SIGN pride do bočnega prenosa virusa HIV-1 do receptorjev CD4 in CCR5, izraženih na isti nezreli dendritični celici. Temu sledi zlitje virusne ovojnice s plazemsko membrano celice, pri čimer pride do njene okužbe. Okužene DC prenesejo HIV-1 do  $CD4^+$  T-celic z uravnavanjem imunskega odziva in tvorbe infekcijske sinapse (**Slika 3**) (4, 10).





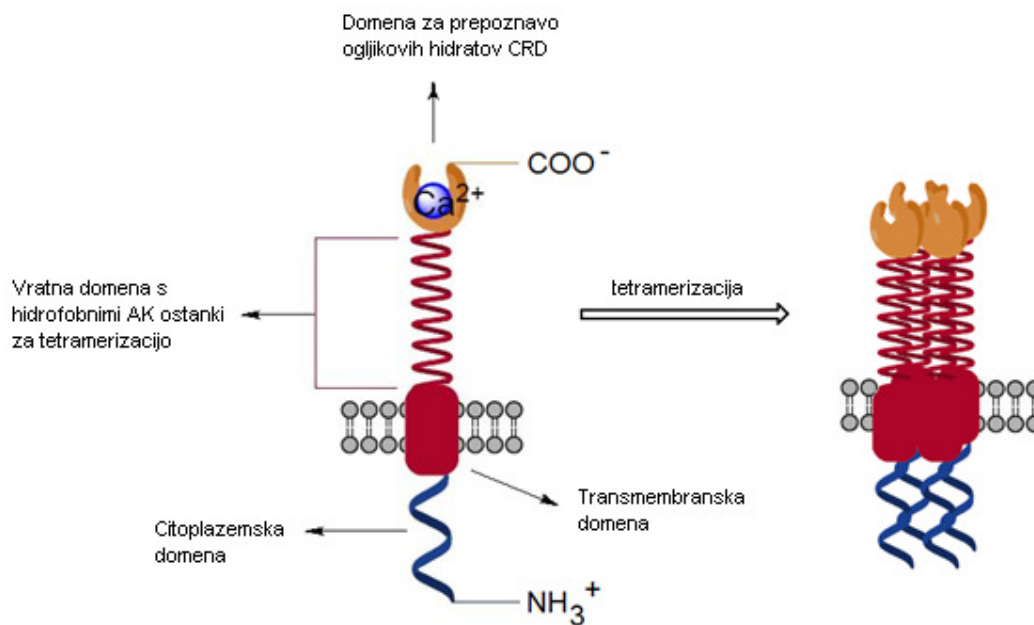
**Slika 3:** Okužba CD4<sup>+</sup> T-celic z virusom HIV-1 (prirejeno po 3); **a** Virus HIV-1 za prenos do CD4<sup>+</sup> T-celic izkoristi dendritične celice, brez da bi jih pri tem okužil; **b** Z vezavo na receptor CD4, HIV-1 najprej okuži dendritično celico, nato pa preko infekcijske sinapse še CD4<sup>+</sup> T-celice.

#### 1.2.4 Struktura DC-SIGN

Vezavno specifičnost receptorja DC-SIGN, transmembranskega lektina tipa C, določa domena CRD. Je globularna struktura, ki je sestavljena iz 12  $\beta$ -struktur, dveh  $\alpha$ -vijačnic in treh disulfidnih mostov. Hidrofilna zanka štrli iz površja proteina in poleg karboksilata vsebuje dve vezavni mesti za Ca<sup>2+</sup>. Od teh je eno odgovorno za konformacijo domene CRD, drugo pa za tvorbo koordinacijskih vezi s saharidnim delom liganda. Vezavno specifičnost domene določajo štirje aminokislinski ostanki, ki na eni strani koordinativno vežejo Ca<sup>2+</sup>, na drugi pa s hidroksilnimi skupinami saharidnega liganda tvorijo H-vezi. CRD je preko vratne domene pripeta na transmembransko domeno receptorja. Ta se na drugi strani nadaljuje v citoplazemsko domeno. Vratno domeno tvorijo štiri povezane verige, vsaka sestavljena iz sedmih zaključenih in ene nezaključene tandemske ponovitve s hidrofobnimi aminokislinskimi ostanki, izpostavljenimi za tetramerizacijo. Citoplazemsko domeno sestavljajo dilevcinski motiv (Leu-Leu) in trikislinski skupki (Glu-Glu-Glu), internalizacijska motiva, odgovorna za predelavo in

internalizacijo, ter nepopolni ITAM-motiv. Slednji je aktivacijski motiv, ki ima strukturo nepopolnega imunskega receptorja, temelječega na tirozinu, in je ključni posredovalec znotrajceličnih signalov potrebnih za zorenje in delovanje B- in T-celic specifične imunosti (**Slika 4**) (3, 4, 11).

Združevanje aminokislinskih ostankov posameznih vratnih domen omogoča tetramerizacijo receptorja DC-SIGN in ima ključni vpliv na vezavno afiniteto. CRD tetramera zaradi številnih ponavljajočih se enot zagotavlja večjo specifičnost nastalega vezavnega mesta in tako določi nabor patogenov, ki jih bo receptor prepoznal. Poleg tega, da omogoča tetramerizacijo, vratna domena DC-SIGN deluje kot pH senzor, ki uravnava ravnotežje med monomerno in tetramerno obliko. Posledica spremembe pH je sprememba vezavne afinitete za ogljikove hidrate, kar povzroči sprostitvev patogena iz receptorja v kislo endosomsko okolje, kjer poteče njegova degradacija in vezava na molekule PHK razreda II. Vratna domena stabilizira CRD tetramera in poveča avidnost vezave (10). Razdalja med posameznimi CRD tetramera je približno 5 nm, vendar pa vezava liganda povzroči konformacijsko spremembo. Receptor se prilagodi tarčnim monosaharidom, s tem pa je omogočena interakcija vseh CRD z njihovimi ligandi. Multimerna ureditev in konformacijska fleksibilnost molekul DC-SIGN na površini dendritične celice omogočata učinkovito in selektivno vezavo številnih oligosaharidnih vzorcev (3, 6).



**Slika 4:** Struktura receptorja DC-SIGN in tetramerizacija (prirejeno po 6).

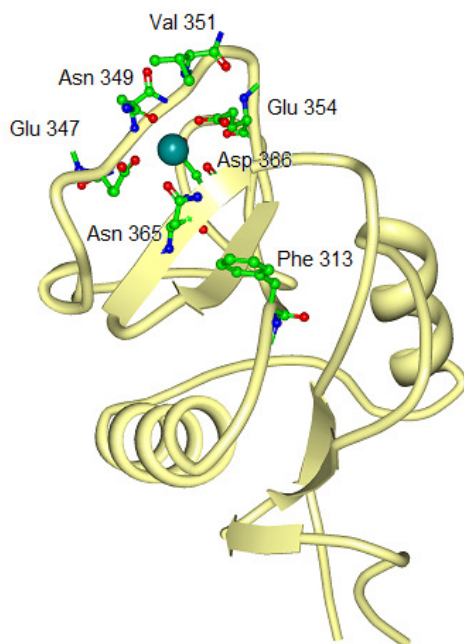
### 1.2.5 Vezavno mesto

DC-SIGN, lektin tipa C, prisoten na površini nezrelih dendritičnih celic, kot vzorčno prepoznavni receptor predstavlja potencialno tarčo v razvoju protimikrobnih učinkovin. Sposobnost, da veže oligosaharide z visoko vsebnostjo D-manoze, receptorju DC-SIGN omogoča vezavo manoziliranih PAMP virusov HIV, HCV in Ebola virusa. Na interakciji z glikani, ki vsebujejo manozo, pa temelji vezava *M. tuberculosis*, glive *Candida albicans* in parazitov iz rodu *Leishmania*. DC-SIGN veže tudi glikane, ki v svoji strukturi vsebujejo L-fukozo, vključno z lipopolisaharidom *H. pylori*. Razumevanje, kako receptor DC-SIGN veže in prepozna antigene, je zato v razvoju selektivnih in učinkovitih protimikrobnih ligandov ključnega pomena (3, 12, 13).

Manozo ali fukozo vsebujoči oligosaharidi se vežejo na DC-SIGN s srednjo do visoko afiniteto, medtem ko imata monosaharida D-manoza in L-fukoza šibko afiniteto (14). Vezavno specifičnost receptorja DC-SIGN za ligande, ki v svoji strukturi vsebujejo manozo, določajo aminokislinski ostanki Glu347-Pro348-Asn349-Asn350. V vezavno mesto prednostno vežejo monosaharide, ki imajo v ekvatorialni legi hidroksilni skupini na mestih tri in štiri. Poleg tega s tremi karboksilnimi skupinami (Glu347, Glu354, Asp366) in tremi karbonilnimi skupinami (Asn349, Asn365, Asp366) v domeno CRD koordinativno vežejo  $\text{Ca}^{2+}$  ione, ki na drugi strani, prav tako koordinativno, vežejo obe ekvatorialni hidroksilni skupini monosaharida. Slednji z aminokislinskimi ostanki tvorita vodikove vezi. Poleg ekvatorialnih hidroksilnih skupin na mestih 3 in 4 je za uspešno vezavo glavne manoze ključen aksialni položaj hidroksi skupine na mestu 2, saj omogoča strukturno komplementarnost monosaharida z vezavnim mestom (3, 6). Poleg koordinativne vezave glavnega monosaharida s  $\text{Ca}^{2+}$ , izpostavljenimi na površini proteina, dodatni vezavni mesti znotraj CRD ponujata hidrofobna regija opredeljena s fenilnim obročem Phe313 in hidrofobni žep za njim (**Slika 5**) (12, 14). Ostale saharidne enote oligosaharidov, ki tvorijo interakcije s sekundarnim vezavnim mestom, zagotovijo večjo vezavno afiniteto, pri čemer je vezavna specifičnost prostorsko pogojena.

Nasprotno ima fukoza hidroksilno skupino na mestu 4 v aksialnem položaju in pri vezavi  $\text{Ca}^{2+}$  v primarnem vezavnem mestu zavzame drugačen položaj kot manosa. Približa se Val351, s katerim hidroksilna skupina na mestu 2 tvori van der Waalsove vezi, preostali del liganda pa usmeri stran od površine proteina. Posledično ligandi na osnovi fukoze s Phe313 ne tvorijo interakcij (12).

Razlika v afiniteti med posameznimi oligosaharidi temelji na različni prostorski ureditvi manoznih in fukoznih ligandov. Kljub skupnemu primarnemu vezavnemu mestu ligandi na osnovi manoze in fukoze zaradi različne vezavne geometrije glavnega monosaharida zasedejo različna sekundarna vezavna mesta. Zaradi fleksibilnosti Phe313 vezavni način specifičnega oligosaharida ne temelji zgolj na glavnem monosaharidu, ampak je visoko občutljiv na substituentne OH-skupin in 3D-strukturo sosednjih monosaharidov. Pri tem je za uspešno vezavo liganda ključna tvorba koordinacijskih vezi med  $\text{Ca}^{2+}$  ioni primarnega vezavnega mesta in ustreznim monosaharidom (6, 13, 14).



**Slika 5:** CRD-domena receptorja DC-SIGN, kristalna struktura (Slika je bila narejena s programom Protein Workshop [15]; prirejeno po 12). Rumeni trak predstavlja peptidno ogrodje, modrozeleni krogla  $\text{Ca}^{2+}$ , paličice pa aminokislinske ostanke, ki določajo primarno vezavno mesto in koordinativno vežejo  $\text{Ca}^{2+}$  ter Phe313 in Val351, sekundarni vezavni mesti različnih ligandov.

### 1.3 DC-SIGN ANTAGONISTI

Vezavo nativnih ligandov na DC-SIGN pogojuje prisotnost L-fukoze ali D-manozne heksapiranozne enote. V razvoju selektivnih in učinkovitih antagonistov DC-SIGN lahko slabosti nativnih oligosaharidov, kot so šibka aktivnost in slabe lastnosti, značilne za učinkovine («drug-like»), izboljšamo z razvojem monovalentnih glikomimetikov, spojin, ki posnemajo bioaktivno vlogo ogljikovih hidratov. Ker zasedejo

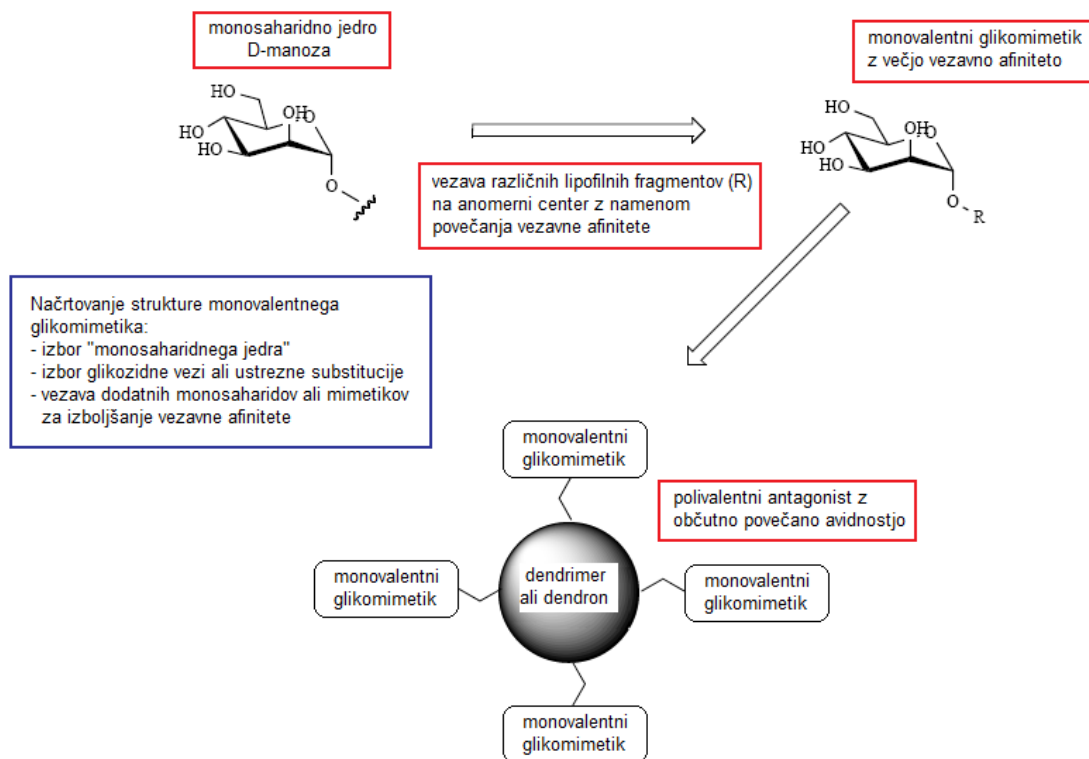
le eno CRD-domeno tetramera DC-SIGN, očitno pomanjkljivost monovalentnih antagonistov predstavlja šibka afiniteta za vezavno mesto receptorja in posledično šibko antagonistično delovanje. Rešitev nudi polivalentna predstavitev monosaharidov, oligosaharidov ali glikomimetikov, saj imajo polivalentni ligandi potencial, da zasedejo vse CRD tetramera DC-SIGN.

Ker pride do primarnega stika med virusom HIV-1 in receptorjem DC-SIGN v večini primerov na vaginalni sluznici med spolnim odnosom, so antagonisti DC-SIGN namenjeni topikalni aplikaciji v preventivi okužbe z virusom HIV-1 (3, 6).

### ***1.3.1 Monovalentni antagonisti***

Večina znanih monovalentnih antagonistov DC-SIGN v svoji strukturi kot glavni monosaharid vsebuje D-manozo, kljub temu da ima L-fukoza med monosaharidi najvišjo afiniteto za vezavo na omenjeni receptor. Izkazalo se je, da v primeru glikomimetikov na osnovi fukoze močne interakcije s CRD-domeno tvori le glavni monosaharid (16). Razlog za to je lahko prej omenjeni vezavni način fukoze, ki preostanek liganda usmeri stran od površine proteina. Posledično preostanek molekule ne more tvoriti močnih interakcij s proteinom. CRD receptorja DC-SIGN je namreč ploščata in za močno vezavo zahteva precejšnjo strukturno komplementarnost liganda. Učinkovito alternativo glavnemu monosaharidu predstavlja reducirana šikimska kislina, ki ponuja enako prostorsko razporeditev hidroksilnih skupin na mestih 2, 3 in 4 kot D-manoza in jo nadomesti v interakciji s  $\text{Ca}^{2+}$  (3, 6).

Preostali monosaharidi ali njihovi mimetiki, ki poleg glavnega monosaharida sestavljajo antagoniste DC-SIGN, tvorijo z vezavnim mestom dodatne interakcije. Posamezne enote s svojo prostorsko razporeditvijo pomembno vplivajo na vezavno specifičnost liganda, saj preostale dele molekule usmerijo bodisi proti bodisi stran od površine proteina. Dodatni strukturni deli liganda z vezavnim mestom ne tvorijo enakih interakcij kot glavni monosaharid. K vezavni afiniteti prispevajo s tvorbo mreže vodikovih vezi ali pa zasedejo sekundarna vezavna mesta in tvorijo hidrofobne interakcije (3, 6). Ligandi na osnovi manoze s strukturnimi fragmenti, ki zasedejo območje Phe313 in hidrofobni žep za njim, imajo potencial, da se na DC-SIGN vežejo z visoko afiniteto. Pripenjanje lipofilnih fragmentov na sladkorno osnovo z namenom tvorbe dodatnih hidrofobnih interakcij se pogosto uporablja za izboljšanje afinitete glikomimetikov (**Slika 6**) (14).



**Slika 6:** Uspešen pristop k razvoju monovalentnih glikomimetikov in njihova pretvorba v polivalentne antagoniste DC-SIGN z visoko afiniteto (prirejeno po 3 in 6).

### 1.3.2 Polivalentni antagonisti

Visoko glikozilirani nativni ligandi DC-SIGN z multivalentno prezentacijo monosaharidnih enot dosežejo visoko avidnost vezave. Najmočnejši monovalentni antagonisti DC-SIGN preprečijo vezavo patogena na receptor v mikromolarnih koncentracijah, medtem ko terapevtsko uporabne učinkovine dosežejo enak učinek v nano- ali celo pikomolarnih koncentracijah. To je izrednega pomena pri načrtovanju antagonistov DC-SIGN, saj lahko slabo vezavno afiniteto izboljšamo le s polivalentno prezentacijo monovalentnih ligandov (**Slika 6**). Za avidnost vezave je potrebna vezava najmanj dveh CRD tetramera DC-SIGN, zato je izbira optimalnega polivalentnega nosilca, ki zagotavlja ustrezno prostorsko razporeditev med monovalentnimi ligandi, bistvenega pomena. Idealno izbiro predstavljajo dendrimeri, makromolekule z definirano globularno strukturo, ki omogočajo nizanje večjega števila monovalentnih ligandov. Za učinkovito inhibicijo interakcije patogen-DC-SIGN je potrebna tetravalentna prezentacija skrbno načrtovanih močnih monovalentnih antagonistov (3, 6, 14).

## 1.4 SELEKTIVNA VEZAVA LIGANDOV

Poleg receptorja DC-SIGN tudi Langerin, značilen za Langerhansove celice, in manozni receptor, značilen za dermalne dendritične celice, vežeta plaščni glikoprotein virusa HIV-1 gp120 z visoko afiniteto. Kljub temu se vloga receptorjev v okužbi z virusom HIV-1 razlikuje. Za razliko od manoznega receptorja, ki olajša okužbo DC preko CD4/CCR5 vstopne poti, Langerin okužbo Langerhansovih in posledično T-celic prepreči. Vezava HIV-1 namreč vodi v njegovo internalizacijo v Birbekove granule, kjer poteče degradacija virusnih delcev. Kadar so Langerhansove celice aktivirane s strani drugega patogena, lahko namesto degradacije virusa HIV-1, Langerin posreduje *trans*-infekcijo. Antagonistično delovanje na Langerin ima torej škodljiv učinek na virusni očistek in dovoljuje okužbo s HIV-1. Posledično bi se ligand, ki bi preprečil vstop virusa HIV-1 v dendritične celice, moral vezati na manozni receptor in DC-SIGN, pri tem pa ohraniti selektivnost proti Langerinu.

Težavo pri načrtovanju antagonistov DC-SIGN z manoznim jedrom predstavlja nizka selektivnost proti Langerinu, saj oba receptorja vežeta glikane s strukturno precej podobno od  $\text{Ca}^{2+}$  odvisno CRD-domeno. Vendar pa CRD Langerina vsebuje dve vezavni mesti za glikan, od katerih je eno neodvisno od  $\text{Ca}^{2+}$ , drugo pa ima kljub podobnosti s primarnim vezavnim mestom DC-SIGN drugačno vezavno topologijo. Pri vezavi visokomanoznih ogljikovih hidratov DC-SIGN prednostno veže notranje manozne ostanke, Langerin pa saharide s terminalno vezano manozo. To je eden izmed načinov, s katerim lahko dosežemo selektivnost antagonistov DC-SIGN proti Langerinu (3, 6).

## 1.5 BAKTERIJSKI ADHEZIN FimH

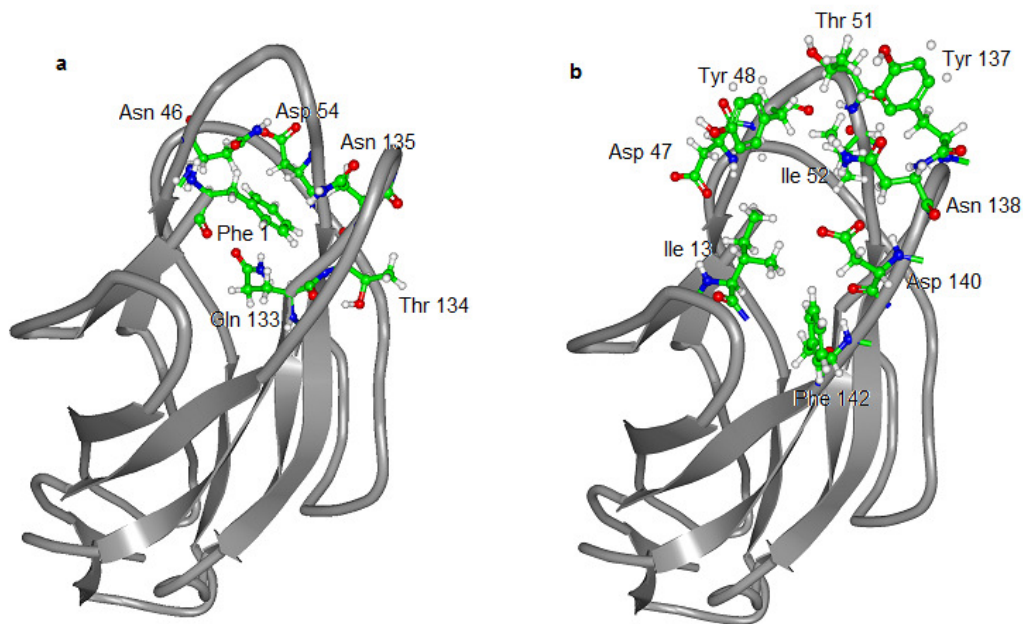
Poleg zgoraj omenjenih za manozo specifičnih vzorčno prepoznavnih lektinov tipa C specifičnost za  $\alpha$ -D-manozide izkazuje tudi protein FimH, predstavnik bakterijskih lektinov. Nahaja se na konici fimbrij tipa 1, proteinogenih izrastkov na površini enterobakterij, ki preko vezave na  $\alpha$ -D-manozne ostanke, izražene na površini gostiteljevih celic, omogoči njihovo adhezijo (17).

Fimbriji tipa 1 so značilni za številne enterobakterije, vključno z uropatogeno *Escherichia coli*, najpogostejšo povzročiteljico okužb urinarnega trakta. Uropatogene bakterije največkrat izhajajo iz črevesne mikroflore in iz perianalnega dela preko sečnice vstopijo v sicer sterilni sečni mehur. Z vezavo na uroplakin Ia omogoči FimH njihovo adhezijo na urotelijo. Pred pretokom urina zaščitene bakterije lažje okužijo gostiteljeve

celice in povzročijo vnetje, cistitis. Učinkovine, ki bi z vezavo lektina FimH preprečile bakterijsko adhezijo, predstavljajo potencial v preventivi in zdravljenju okužb urinarnega trakta. S tem nudijo alternativo antibiotičnemu zdravljenju, ki lahko zaradi ponavljajočih se okužb vodi v razvoj bakterijskih sevov, odpornih na antibiotike (18, 19).

### 1.5.1 Struktura FimH

Za bakterijski adhezin FimH je značilna domena za prepoznavo ogljikovih hidratov v velikosti monosaharidne enote, ki se popolnoma prilega  $\alpha$ -D-manoznemu ostanku liganda. Primarno vezavno mesto, poleg asparaginske kisline Asp54 in N-terminalnega fenilalanina Phe1, sestavljajo aminokisline s hidrofilnimi stranskimi verigami, ki s hidroksilnimi skupinami  $\alpha$ -D-manoze na mestih 2, 3, 4 in 6 tvorijo mrežo vodikovih vezi. Zunanost domene CRD v obliki hidrofobnega grebena tvorijo aminokisline z lipofilnimi stranskimi verigami (**Slika 7**). Vstop do vezavnega mesta opredeljujejo tirozinska vrata, ki jih, poleg Ile52, tvorita aminokislini Tyr48 in Tyr137 in omogočata tvorbo hidrofobnih interakcij (17, 18).



**Slika 7:** Kristalna struktura CRD-domene lektina FimH (Slika je bila narejena s programom Protein Workshop [15]; prirejeno po 20 in 17); **a** primarno vezavno mesto z AK-ostanki, ki preko H-vezi vežejo  $\alpha$ -D-manozo, **b** okolica domene CRD, opredeljena z aminokislinami, ki tvorijo hidrofobni greben in tirozinska vrata.



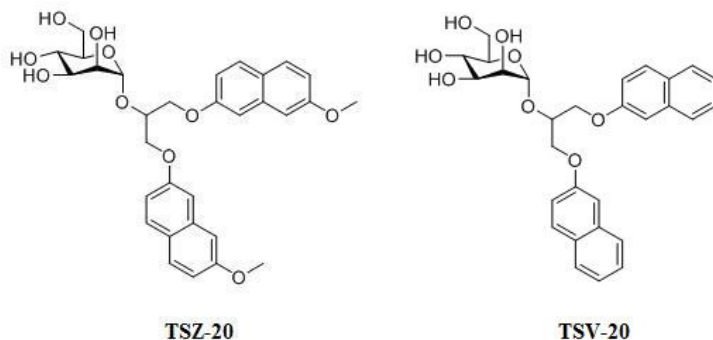
### 1.5.2 Antagonisti *FimH*

Pri razvoju učinkovitih antagonistov *FimH* se uporablja več pristopov. Najpomembnejša sta načrtovanje ligandov na osnovi kristalne strukture *FimH* in multivalentna predstavitev  $\alpha$ -manozidnega epitopa. V obeh primerih predstavlja osnovo  $\alpha$ -D-manoza, ki tvori mrežo vodikovih vezi s CRD-domeno proteina *FimH*. Ustrezni aromatski aglikoni  $\alpha$ -D-manoznih ligandov lahko tvorijo dodatne interakcije tudi s hidrofobno okolico domene CRD. Pri tem gre predvsem za energetsko ugodne  $\pi$ - $\pi$  interakcije s Tyr48 in Tyr137 na vstopu do vezavnega mesta, ki znatno prispevajo k vezavni afiniteti. Nasprotno lahko aglikon, kadar je prevelik, vzpostavi toliko interakcij s hidrofobno okolico vezavnega mesta, da pride do ločitve  $\alpha$ -manoze od CRD-domene, kar posledično zniža vezavno afiniteto liganda (17, 18).

Poleg visoke afinitete je prav tako pomembna selektivnost vezave antagonista na *FimH*. Vsi so namreč  $\alpha$ -D-manopiranozidi in posledično potencialni ligandi manozno specifičnih lektinov gostiteljevega sistema, ki sodelujejo v številnih bioloških procesih ali pa s prepoznavo molekularnih vzorcev patogenov sodelujejo pri imunskem odzivu. Posledično lahko neselektivna vezava antagonistov *FimH* povzroči resne neželene učinke. Medtem ko monovalentna predstavitev  $\alpha$ -D-manopiranozidov zadošča za učinkovito inhibicijo adhezije bakterij na urotelij, je zaradi multimerične ureditve CRD-domen za inhibicijo manozno specifičnih lektinov gostitelja potrebna multimerna predstavitev. Neselektivna vezava monovalentnih  $\alpha$ -D-manopiranozidov zato v tem primeru ni problematična (21).

## 2 NAČRT DELA

Cilj magistrskega dela je sinteza glikomimetičnih antagonistov receptorja DC-SIGN na osnovi znanih spojin (**Slika 8**), sintetiziranih na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Slednje vezavo gp120 virusa HIV-1 na CRD-domeno DC-SIGN preprečujejo v mikromolarnem koncentracijskem območju.



**Slika 8:** Spojini TSZ-20 in TSV-20 (prirejeno po 22, 23).

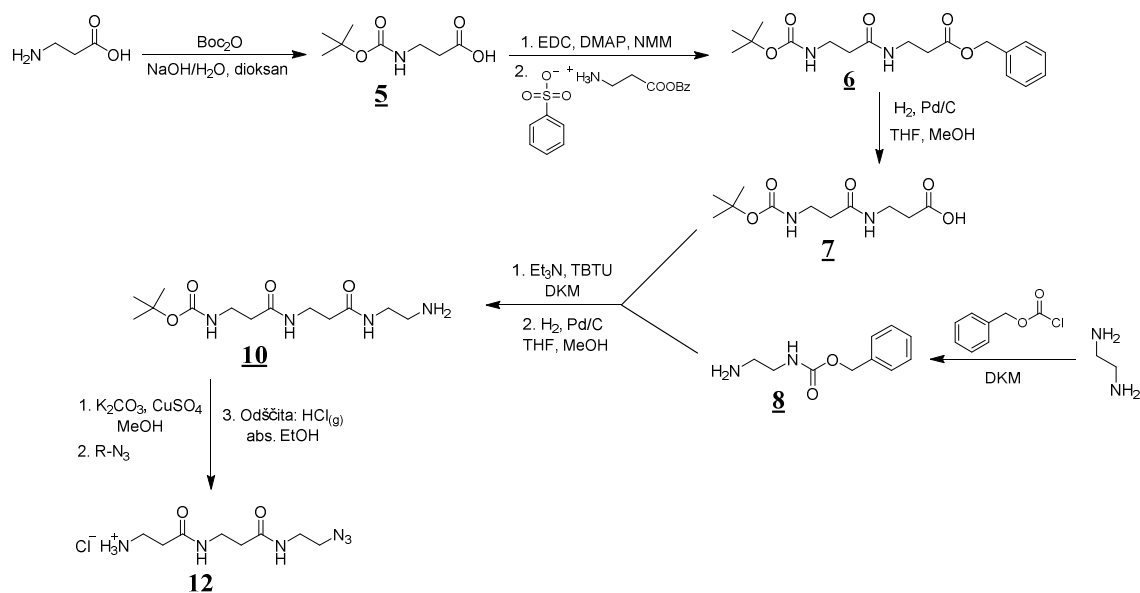
D-manozni ostanek se prilega primarnemu vezavnemu mestu domene CRD, kjer koordinativno veže  $\text{Ca}^{2+}$ , s karboksilatoma aminokislinskih ostankov Glu347 in Glu354 pa tvori vodikove vezi. Obe aromatski enoti spojine s stransko verigo Phe313 tvorita hidrofobne in/ali  $\pi$ - $\pi$  interakcije.

Osnovna strukturna enota sintetiziranih spojin bo D-manoza, ki z vezavo  $\text{Ca}^{2+}$  zasede primarno vezavno mesto CRD-domene DC-SIGN. Z namenom izboljšanja vezavne afinitete bomo na monosaharidno osnovo preko glicerolnega veznika pripeli dve različno substituirani naftilni enoti. Na ta način bomo poskušali zagotoviti tvorbo hidrofobnih in/ali  $\pi$ - $\pi$  interakcij z aminokislinskim ostankom Phe313 in hidrofobnim žepom za njim (22, 23).

Avidnost vezave bomo poskušali doseči z multimerno predstavitvijo enega izmed sintetiziranih monovalentnih antagonistov DC-SIGN. Preko ustreznega distančnika ga bomo poskušali pripeti na nosilec za tvorbo tetravalentnega dendrona.

## 2.1 SINTEZA DISTANČNIKA

Na amsko skupino  $\beta$ -alanina bomo uvedli *t*-butiloksikarbonilno zaščito. Z metodo N-aciliranja z uporabo sklopitvenega reagenta bomo med spojino **5** (Shema 1) in benzilnim estrom  $\beta$ -alanina tvorili amid **6**. Zaščito karboksilne skupine v obliki benzilnega estra bomo selektivno odstranili s katalitskim hidrogeniranjem. Reakcijo N-aciliranja s pomočjo sklopitvenega reagenta bomo ponovili med spojinama **7** in **8**, benzil karbamatno zaščito pa v nadaljevanju selektivno odstranili s katalitskim hidrogeniranjem. Nastali amin **10** bomo pretvorili v azid, *t*-butil karbamatno zaščito amske skupine pa odstranili s plinastim HCl v brezvodnih pogojih (Shema 1).

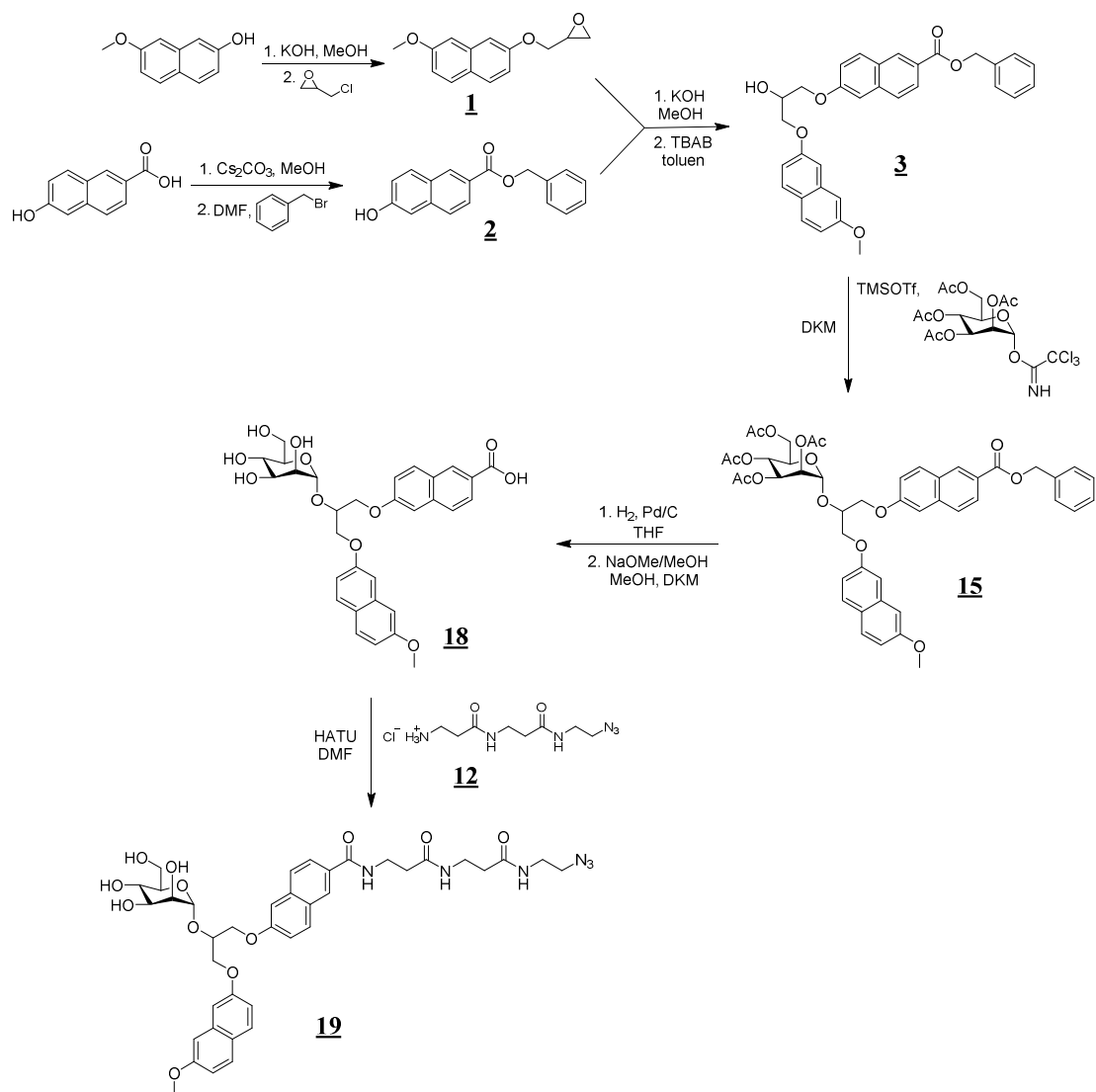


**Shema 1:** Sinteza distančnika **12**, preko katerega bomo na nosilec za tetravalentni dendron poskusili pripeti monovalentni glicerolomanozid.

## 2.2 SINTEZA MONOVALENTNIH GLICEROLOMANOZIDOV

Spojino **2** bomo raztopili v metanolu in s pomočjo  $\text{KOH}$  tvorili močnejši nukleofil kalijev 6-(benziloksikarbonil)-2-naftolat, ki bo napadel aktivirano  $-\text{CH}_2$  skupino oksiranskega obroča spojine **1**. Nastali diarilglicerol **3** bomo v prisotnosti aktivatorja  $\text{TMSOTf}$  vezali na 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranozo. Z ustreznimi reakcijskimi pogoji bomo sintezo usmerili v stereoselektivno tvorbo  $\alpha$ -anomera. Nastali spojini **15** bomo v prvi stopnji s katalitskim hidrogeniranjem selektivno odstranili benzilni ester,

zaščito karboksilne skupine. V drugi stopnji bomo z Zemplénovim preestrenjem s sladkorja odstranili acetilno zaščito in dobili končno spojino **18**. Slednjo bomo v nadaljevanju z metodo N-aciliranja v prisotnosti sklopitvenega reagenta preko amidne vezi pripravili na distančnik **12**, pri tem pa dobili končno spojino **19** (Shema 2).



**Shema 2:** Sinteza potencialnih monovalentnih antagonistov DC-SIGN **18** in **19**.

## 2.3 SINTEZA POLIVALENTNEGA GLICEROLOMANOZIDA

Štiri enote nastale spojine **19** bomo raztopili v etilacetatu in jih s  $\text{Cu}^+$  katalizirano Huisgen azid-alkin 1,3-dipolarno cikloadicijo pripeli na nosilec za tvorbo tetravalentnega dendrona. Z multimerno predstavitvijo monovalentnega glicerolomanozida **18** bomo skušali doseči večjo avidnost vezave na DC-SIGN.

Sintetizirane glicerolomanozide **18**, **19** in **20** bomo biokemijsko ovrednotili z *in vitro* testnim sistemom za določanje antagonistov receptorja DC-SIGN, ki ga je razvil David Hajšek v okviru svojega diplomskega dela. Aktivnim spojinam bomo določili vrednost  $\text{IC}_{50}$ , koncentracijo antagonista, ki povzroči 50-odstotno inhibicijo vezave naravnega liganda gp120 virusa HIV-1 na DC-SIGN (22).

Diarilglicerolomanozidi, sintetizirani na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, so se v preteklosti izkazali za učinkovite antagoniste za  $\alpha$ -D-manozo specifičnega bakterijskega lektina FimH, z  $\text{IC}_{50}$  vrednostmi v nanomolarnem območju (24). Iz tega razloga bomo končnim spojinam določili biološko aktivnost tudi na receptorju FimH.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

Pri laboratorijskem delu smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Fluka, Merck in Sigma-Aldrich. Brezvodni metanol smo predhodno pripravili z destilacijo v prisotnosti KOH v argonovi atmosferi in ga shranjevali nad aktiviranimi molekularnimi siti. Brezvodni diklorometan smo pripravili tik pred uporabo in ga v prisotnosti  $\text{CaH}_2$  v argonovi atmosferi destilirali direktno v bučko k izhodnim spojinam.

### 3.2 METODE

#### 3.2.1 Kromatografske metode

- *Tankoplastna kromatografija*

S tankoplastno kromatografijo (TLC) smo spremljali potek reakcij in izolacij produktov, izbrali ustrezno mobilno fazo za čiščenje s kolonsko kromatografijo, ki smo jo prav tako spremljali s TLC. Kot stacionarno fazo smo uporabljali plošče proizvajalca Merck, TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu, mobilne faze pa so navedene v sinteznih postopkih posameznih spojin. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabili UV-svetilko z valovno dolžino  $\lambda = 254 \text{ nm}$  ali  $\lambda = 366 \text{ nm}$  in orositvena reagenta, ninhidrin ter fosfomolibdensko kislino.

- *Kolonska kromatografija*

Po končani izolaciji smo spojine čistili s »flash« kolonsko kromatografijo. Odvisno od pričakovane količine produkta smo uporabili steklene kolone različnih velikosti, ki smo jih napolnili s silikagelom Merck Silica Gel 60 z velikostjo delcev 0,04–0,063 mm, kot stacionarno fazo. Za elucijo smo uporabili različne mobilne faze, katerih pretok smo pospešili z uvajanjem zračnega nadtlaka.

### 3.2.2 *Spektroskopske metode*

- ***Jedrska magnetna resonanca (NMR)***

$^1\text{H}$ -NMR in  $^{13}\text{C}$  spektre sintetiziranih spojin smo posneli na Bruker Avance III 400 MHz spektrometru na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v devteriranih topilih  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-}d_6$  ali  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Kot interni standard je bil uporabljen tetrametilsilan (TMS). Spektre smo reševali s programom MestRe-C 4.8.6. proizvajalca Mesterlab Research S. L.

- ***Infrardeča spektroskopija***

Spektre IR smo posneli na Nicolet Nexus 470 FT-IR spektrometru na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

- ***Masna spektrometrija***

Masni spektri so bili posneti na masnem spektrometru VG-Analytical AutoSpec Q s tehniko ESI v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

### 3.2.3 *Temperatura tališča*

Tališča smo določali na Kofflerjevem mikroskopu z ogrevalno mizico Leica na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in so nekorrigirana.

### 3.2.4 *Poimenovanje in risanje spojin*

Za poimenovanje in risanje strukturnih formul spojin smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 12.0 proizvajalca Cambridge Soft.

### 3.2.5 *Biološko testiranje*

- ***DC-SIGN***

Afiniteto spojin za vezavo na DC-SIGN so določili z *in vitro* testnim sistemom, ki ga je razvil David Hajšek pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm. Na mikrotitrsko ploščico so najprej vezali ekstracelularno domeno receptorja DC-SIGN in blokirali prosta vezavna mesta. Nato so nanесли raztopine antagonista, za njim pa v najkrajšem možnem času še z biotinom konjugiran gp120. Sledil je nanos protiteles proti biotinu, konjugiranih s hrenovo peroksidazo, nazadnje pa še nanos substrata za peroksidazo. Odstotek vezave naravnega liganda so določili na podlagi kemiluminiscenčnega odziva. Kot pozitivna kontrola je bila uporabljena L-fukoza, ki prepreči vezavo gp120 na CRD-domeno DC-SIGN z vrednostjo  $IC_{50} = 2.95$  mM. Rezultate so obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel in določili vrednosti  $IC_{50}$ , 50-odstotno inhibicijo vezave naravnega liganda gp120 na receptor (22, 23).

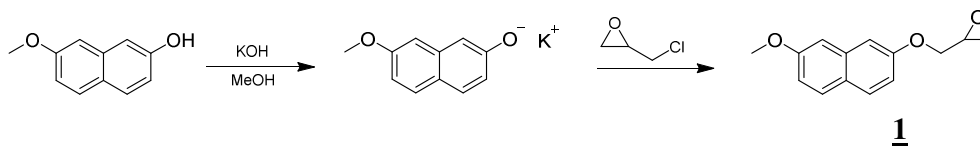
- ***FimH***

Afiniteto spojin za vezavo na receptor FimH so testirali s testom fluorescenčne polarizacije na Institute of Molecular Pharmacy, Pharmacenter, University of Basel v Švici. Spojinam so bile določene vrednosti  $IC_{50}$ , ki pomenijo 50-odstotno inhibicijo vezave metil  $\alpha$ -D-manopiranozida na FimH.



## 4 EKSPERIMENTALNO DELO

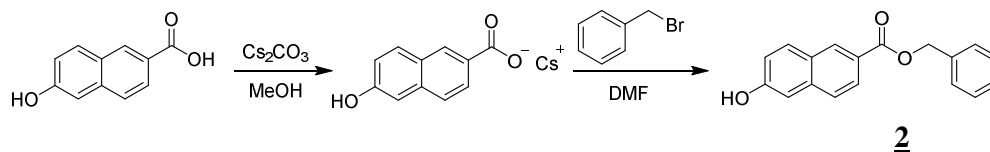
### 4.1 Sinteza 2-(((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)metil)oksirana



V metanolu (40 mL) smo raztopili 7-metoksi-2-naftol (4.004 g, 23.0 mmol, 1 ekv) in KOH (1.299 g, 23.0 mmol, 1 ekv), nato pa raztopini pod znižanim tlakom uparili topilo. Nastali kalijevi soli 7-metoksi-2-naftola smo dodali epiklorhidrin (18.0 mL, 230 mmol, 10 ekv) in zmes mešali na oljni kopeli pri 60 °C 30 minut. Ohlajeni reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom uparili topilo, preostanek pa raztopili v nasičeni raztopini NaCl (50 mL), ki smo jo ekstrahirali z DKM (2 × 100 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Preostanek smo med segrevanjem raztopili v minimalni količini etilacetata, nato pa po kapljicah dodajali heksan. Ko se je ob dodatku heksana pričela pojavljati oborina, smo postopek zaključili, bučko pa za dva dni postavili v hladilnik. Izpadli produkt smo odfiltrirali z odsesavanjem in sprali z ohlajenim heksanom. Matičnici smo uparili topilo in še dvakrat ponovili postopek prekrystalizacije. Dobili smo 3.577 g spojine **1**.

<b>2-(((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)metil)oksiran</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 230.26 g/mol <b>Izkoristek:</b> 67.6 %	<b>Izgled:</b> beli kristali <b>R<sub>f</sub>:</b> 0.33 (MF: heksan/etilacetat = 1/1) <b>Tališče:</b> 92 ± 2 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ 2.84 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 4.9 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2.7 Hz, oksiran-CH <sub>2</sub> -H <sub>A</sub> ), 2.97 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 4.9 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 4.1 Hz, oksiran-CH <sub>2</sub> -H <sub>B</sub> ), 3.45 (dddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 5.7 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 4.1 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 3.2 Hz, <i>J</i> <sub>4</sub> = 2.7 Hz, oksiran-CH), 3.93 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.10 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 11.0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 5.7 Hz, OCH <sub>2</sub> -H <sub>A</sub> ), 4.35 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 11.0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 3.2 Hz, OCH <sub>2</sub> -H <sub>B</sub> ), 7.02–7.10 (m, 4H, Ar-H), 7.68 (d, 1H, <i>J</i> = 3.5 Hz, Ar-H), 7.70 (d, 1H, <i>J</i> = 3.7 Hz, Ar-H) ppm
<b><sup>13</sup>C-NMR</b> (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ 44.8, 50.1, 55.2, 68.7, 105.2, 106.3, 116.1, 116.3, 124.5, 129.1, 129.3, 135.7, 157.0, 158.2 ppm
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b>	izračunan 231.1021; izmerjen 231.1018
<b>IR (ATR)</b>	ν 3058, 3005, 2965, 2939, 1627, 1608, 1514, 1464, 1426, 1384, 1348, 1333, 1252, 1219, 1208, 1185, 1170, 1137, 1117, 1081, 1024, 974, 950, 910, 860, 837, 804, 762, 752, 688, 630, 613, 565 cm <sup>-1</sup>

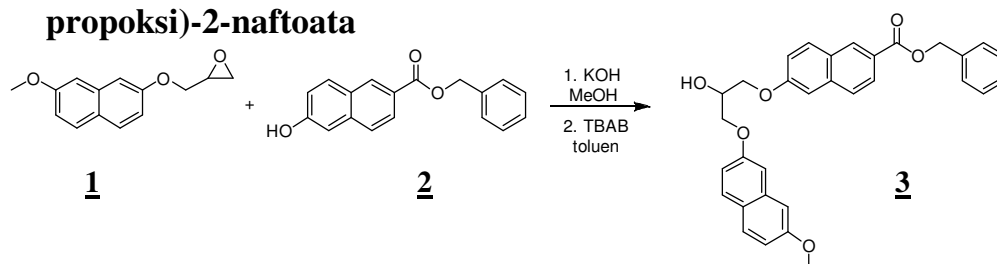
## 4.2 Sinteza benzil 6-hidroksi-2-naftoata



V 90-odstotnem metanolu (100 mL) smo raztopili 6-hidroksi-2-naftojsko kislino (4.907 g, 26.1 mmol, 1 ekv), dodali  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (2.516 g, 13.0 mmol, 0.5 ekv) in reakcijsko zmes mešali 30 minut pri sobni T. Po končani reakciji smo nastali cezijevi soli 6-hidroksi-2-naftola pod znižanim tlakom uparili topilo, preostanek sprali s toluenom ( $2 \times 15$  mL) in ponovili uparevanje. Osušeno sol smo raztopili v DMF (25 mL), raztopino ohladili na  $0^\circ\text{C}$  in med mešanjem dodali benzil bromid (3.097 mL, 26.1 mmol, 1 ekv). Reakcija je potekala najprej eno uro na ledu, nato pa še 24 ur pri sobni T. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili topilo, preostanku pa dodali  $\text{H}_2\text{O}$  (60 mL) in ekstrahirali z etilacetatom ( $3 \times 60$  mL). Združene organske faze smo sprali z 10-odstotno citrsko kislino (100 mL), nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  (100 mL) in z nasičeno raztopino  $\text{NaCl}$  (100 mL), sušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Spojino **2** smo očistili s kolonsko kromatografijo. Uporabili smo MF: heksan/etilacetat = 2/1 in ko so se s kolone sprale nečistote z višjim  $R_f$ , smo spiranje spojine **2** pospešili z MF: heksan/etilacetat = 1/1. Dobili smo 3.325 g spojine **2**.

<b>benzil 6-hidroksi-2-naftoat</b>	
<b>Elementna sestava:</b> $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_3$ <b><math>M_r</math></b> = 278.31 g/mol <b>Izkoristek:</b> 45.8 %	<b>Izgled:</b> rumeni svetleči kristali <b><math>R_f</math>:</b> 0.48 (MF: heksan/etilacetat = 20/1) <b>Tališče:</b> $107 \pm 2^\circ\text{C}$
<b><math>^1\text{H-NMR}</math> (400 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>)</b>	$\delta$ 5.46 (s, 2H, Ph- $\underline{\text{CH}_2}$ ), 5.84 (br s, 1H, $\underline{\text{OH}}$ ), 7.18–7.21 (m, 2H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7.39–7.46 (m, 3H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7.51–7.54 (m, 2H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7.71 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7.87 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 8.07 (dd, 1H, $J_1 = 8.6$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 8.59–8.60 (m, 1H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ) ppm
<b><math>^{13}\text{C-NMR}</math> (100 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>)</b>	$\delta$ 67.1, 109.7, 119.0, 124.7, 125.9, 126.7, 127.7, 128.3, 128.4, 128.7, 131.5, 131.6, 136.0, 137.4, 156.2, 167.6 ppm
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b>	izračunan 279.1021; izmerjen 279.1024
<b>IR (ATR)</b>	$\nu$ 3369, 3026, 1693, 1622, 1601, 1586, 1499, 1482, 1453, 1435, 1351, 1293, 1198, 1128, 1103, 1029, 992, 965, 942, 914, 882, 861, 830, 777, 767, 753, 732, 694, 652, 629, 604, 586 $\text{cm}^{-1}$

### 4.3 Sinteza benzil 6-(2-hidroksi-3-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propoksi)-2-naftoata

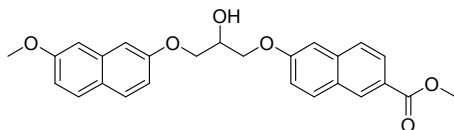


V 250 mL bučko smo natehtali spojini **2** (1.697 g, 6.10 mmol, 1.2 ekv) in KOH (0.344 g, 6.13 mmol, 1.2 ekv) in ju med mešanjem raztopili v metanolu (70 mL). Nastali kalijevi soli spojine **2** smo pod znižanim tlakom uparili topilo, suhi preostanek pa sprali s toluenom (3 × 15 ml) in ponovili uparevanje. Bučko smo nato za približno 2.5 ure priklopili na vakuumsko črpalko. Medtem smo spojini **1** (1.170 g, 5.08 mmol, 1 ekv) in TBAB (0.164 g, 0.508 mmol, 0.1 ekv) raztopili v toluenu (45 mL), raztopino pa med mešanjem kvantitativno prenesli v bučko s kalijevo soljo spojine **2**. Da bi preprečili lepljenje reakcijske zmesi na stene bučke, smo dodali še DMF (5 mL) in segrevali 48 ur pri T = 100 °C. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili topilo in preostanek raztopili v etilacetatu (100 mL). Organsko fazo smo sprali z nasičeno raztopino NaCl (2 × 100 mL). Pri tem je nastala v obeh fazah netopna oborina, ki smo jo odnučali. Združenim organskim fazam smo pod znižanim tlakom uparili topilo, produkt pa očistili s kolonsko kromatografijo. Uporabili smo MF: heksan/etilacetat = 1/1 in dobili 1.093 g čiste spojine **3** in 0.268 g zmesi spojin **3** in **3a**.

<b>benzil 6-(2-hidroksi-3-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propoksi)-2-naftoat</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>32</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 508.57 g/mol <b>Izkoristek:</b> 42.3 %	<b>Izgled:</b> oranžno-rumeno strjeno olje <b>R<sub>f</sub>:</b> 0.19 (MF: heksan/etilacetat = 1/1)
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> <b>(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)</b>	δ 3.92 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 4.33–4.38 (m, 4H, 2 × OCH <sub>2</sub> ), 4.56–4.58 (m, 1H, CH), 5.32 (s, 1H, OH) 5.45 (s, 2H, Ph-CH <sub>2</sub> ), 7.03–7.08 (m, 3H, Ar-H), 7.15 (d, 1H, J = 2.5 Hz, Ar-H), 7.23–7.29 (m, 2H, Ar-H), 7.39–7.47 (m, 3H, Ar-H), 7.51–7.54 (m, 2H, Ar-H), 7.69 (d, 1H, J = 4.9 Hz, Ar-H), 7.71 (d, 1H, J = 5.2 Hz, Ar-H), 7.77 (d, 1H, J = 8.7 Hz, Ar-H), 7.88 (d, 1H, J = 9.1 Hz, Ar-H), 8.10 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 8.6 Hz, J <sub>2</sub> = 1.7 Hz, Ar-H), 8.60 (d, 1H, J = 1.4 Hz, Ar-H) ppm
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b>	izračunan 509.1964; izmerjen 509.1979
<b>IR (ATR)</b>	v 2933, 1708, 1628, 1608, 1515, 1480, 1463, 1389, 1340, 1271, 1197, 1159, 1136, 1096, 1031, 954, 911, 856, 826, 765, 748, 697, 646, 630 cm <sup>-1</sup>

## STRANSKI PRODUKT:

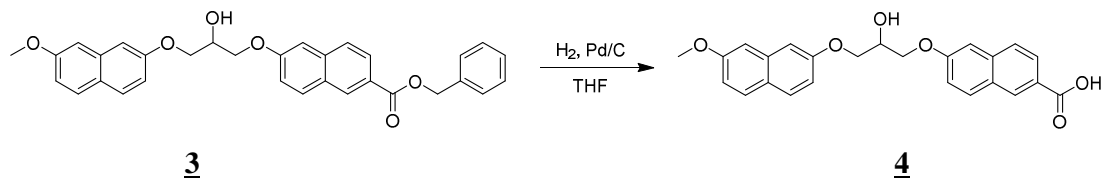
## metil 6-(2-hidroksi-3-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propoksi)-2-naftoat

**3a**

metil 6-(2-hidroksi-3-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propoksi)-2-naftoat	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 432.47 g/mol	<b>Izgled:</b> umazano belo strjeno olje <b>R<sub>f</sub></b> : 0.30 (MF: DKM/metanol = 40/1)
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> <b>(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)</b>	δ 3.92 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.99 (s, 3H, COOCH <sub>3</sub> ), 4.33–4.37 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 4.54–4.60 (m, 1H, CH), 7.03–7.08 (m, 3H, Ar-H), 7.14 (d, 1H, J = 2.4 Hz, Ar-H), 7.23–7.29 (m, 2H, Ar-H), 7.68 (d, 1H, J = 4.8 Hz, Ar-H), 7.70 (d, 1H, J = 4.8 Hz, Ar-H), 7.76 (d, 1H, J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.87 (d, 1H, J = 8.9 Hz, Ar-H), 8.06 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 8.6 Hz, J <sub>2</sub> = 1.7 Hz, Ar-H), 8.55 (d, 1H, J = 1.2 Hz, Ar-H) ppm, signala za OH skupino v spektru ne vidimo
<b><sup>13</sup>C-NMR</b> <b>(100 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>)</b>	52.0 (COOCH <sub>3</sub> ), 55.0 (OCH <sub>3</sub> ), 67.3, 69.1, 69.5 (CH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> ), 105.3, 106.2, 106.7, 115.8, 115.9, 119.8, 123.7, 124.5, 125.3, 127.1, 127.4, 128.9, 129.0, 130.3, 131.0, 135.7, 136.8, 156.9, 157.7, 158.5 (20 × Ar-C), 166.4 (CO) ppm
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b>	izračunan 433.1651; izmerjen 433.1659
<b>IR (ATR)</b>	ν 2952, 1716, 1625, 1603, 1514, 1429, 1388, 1368, 1337, 1291, 1254, 1204, 1158, 1126, 1094, 1028, 962, 951, 916, 850, 822, 792, 768, 753, 698, 660, 641, 631, 613, 582, 558 cm <sup>-1</sup>

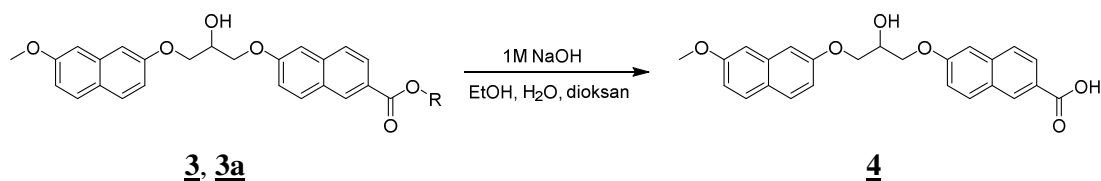
#### 4.4 Sinteza 6-(2-hidroksi-3-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propoksi)-2-naftojske kisline

##### KATALITSKO HIDROGENIRANJE



Spojino **3** (0.900 g, 1.77 mmol) smo raztopili v THF (100 mL) in bučko prepihali z argonom. Dodali smo katalizator Pd/C (0.090 g, 10 % m/m), in bučko prepihali s H<sub>2</sub>. Sistem smo nato zaprli in vanj preko igle dovajali H<sub>2</sub>, s katerim smo napolnili balon. Po končani reakciji (24 ur, sobna T) smo s presesavanjem odfiltrirali Pd/C, matičnico pa uparili pod znižanim tlakom. Preostanku v bučki smo dodali H<sub>2</sub>O (15 mL) in zmes naalkalili z 1 M NaOH (1.77 mL, 1.77 mmol) do pH = 12. Vodno fazo smo sprali z etilacetatom (3 × 20 mL), združene organske faze-OF<sub>1</sub> pa ponovno s H<sub>2</sub>O, ki smo jo predhodno naalkalili z 1 M NaOH (5 × 20 mL, pH = 12). Združene vodne faze smo z 1 M HCl nakisali do pH = 2, izpadlo oborino odfiltrirali s presesavanjem, matičnico pa ekstrahirali z etilacetatom-OF<sub>2</sub> (100 mL). OF<sub>2</sub> smo pod znižanim tlakom uparili topilo, preostanek pa združili z oborino. Dobili smo 0.552 g spojine **4**.

##### ALKALNA HIDROLIZA



**3**: R = benzil

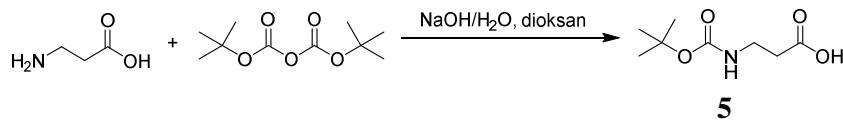
**3a**: R = metil

Po uparitvi topila OF<sub>1</sub> smo preostanku v bučki, zmesi spojin **3** in **3a** (0.178 g, ~0.350 mmol, ~1 ekv), dodali H<sub>2</sub>O (5 mL), 96 % (v/v) etanol (15 mL) in 1,4-dioksan (5 mL). Med mešanjem smo v bučko dokapavali 1 M NaOH (0.700 mL, 0.700 mmol, 2 ekv). Reakcija je potekala pri sobni T približno 48 ur. Po končani reakciji smo pod znižanim

tlakom uparili 1,4-dioksan in etanol, preostanku dodali H<sub>2</sub>O (10 mL) in spirali z etilacetatom (3 × 15 mL). Vodno fazo smo z 1 M HCl nakisali do pH = 2 in izpadlo oborino odnučali. Matičnico smo ekstrahirali z etilacetatom, ki smo ga v nadaljevanju pod znižanim tlakom uparili, suhi preostanek pa združili z oborino. Dobili smo 0.072 g spojine **4**.

<b>6-(2-hidroksi-3-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propoksi)-2-naftojska kislina</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 418.44 g/mol <b>Izkoristek:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• katalitsko hidrogeniranje: 74.5 %</li> <li>• alkalna hidroliza: ~ 49.2 %</li> </ul>	<b>Izgled:</b> umazano-beli kristali <b>R<sub>f</sub>:</b> 0.37 (MF: DKM/metanol = 9/1) <b>Tališče:</b> 191 ± 2 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ 3.85 (s, 3H, 3 × OCH <sub>3</sub> ), 4.17–4.35 (m, 5H, 2 × OCH <sub>2</sub> , CH), 5.56 (d, 1H, <i>J</i> = 5.2 Hz, OH), 6.99 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8.9 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2.6 Hz, Ar-H), 7.04 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8.9 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2.5 Hz, Ar-H), 7.23 (d, 1H, <i>J</i> = 2.6 Hz, Ar-H), 7.30 (dd, 2H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8.8 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2.5 Hz, Ar-H), 7.48 (d, 1H, <i>J</i> = 2.4 Hz, Ar-H), 7.73 (d, 1H, <i>J</i> = 4.2 Hz, Ar-H), 7.75 (d, 1H, <i>J</i> = 4.2 Hz, Ar-H), 7.89 (d, 1H, <i>J</i> = 8.7 Hz, Ar-H), 7.94 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8.7 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 1.7 Hz, Ar-H), 8.04 (d, 1H, <i>J</i> = 9.1 Hz, Ar-H), 8.53 (d, 1H, <i>J</i> = 1.50 Hz, Ar-H), 12.90 (s, 1H, COOH) ppm
<b><sup>13</sup>C-NMR</b> (100 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ 55.0, 67.3, 69.2, 69.5, 105.4, 106.2, 106.7, 115.8, 116.0, 119.6, 123.8, 125.7, 125.8, 126.9, 127.5, 129.0, 129.1, 130.3, 130.9, 135.7, 136.7, 157.0, 157.7, 158.3, 167.5 ppm
<b>HRMS (ESI)</b>	izračunan 417.1338; izmerjen 417.1329
<b>IR (ATR)</b>	v 2937, 2566, 1680, 1628, 1607, 1514, 1427, 1385, 1343, 1302, 1252, 1206, 1168, 1129, 1027, 1002, 978, 939, 905, 859, 847, 824, 802, 763, 749, 646, 632, 607, 576, 559 cm <sup>-1</sup>

#### 4.5 Sinteza 3-((*tert*-butoksikarbonil)amino)propanojske kisline

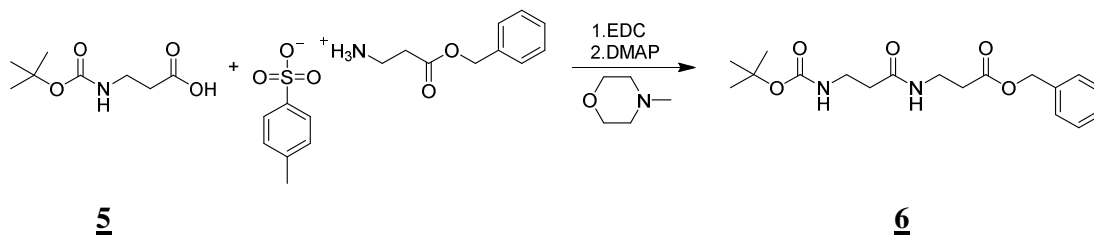


V zmesi H<sub>2</sub>O (90 mL), 1,4-dioksana (90 mL) in 1 M NaOH (112.3 mL, 112 mmol, 1 ekv) smo raztopili β-alanin (10.003 g, 112 mmol, 1 ekv) in raztopino na ledeni kopeli ohladili na ~10 °C. Med mešanjem smo počasi, preko kapalnika, dokapavali di-*tert*-butil dikarbonat (29.49 g, 135 mmol, 1.2 ekv), raztopljen v 1,4-dioksanu (90 mL). Reakcijsko zmes smo pri sobni T mešali 24 ur. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili 1,4-dioksan, preostanek pa prelili v lij ločnik in ga sprali z dietiletom (3 × 200 mL).

Vodno fazo smo nato z 1 M HCl nakisali do pH = 2–3 in jo ekstrahirali z etilacetatom (3 × 200 mL). Dobljeno organsko fazo smo sprali z nasičeno raztopino NaCl (600 mL), sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in filtrirali. Matičnici smo pod znižanim tlakom uparili topilo. Dobili smo 18.21 g spojine **5**.

<b>3-((<i>tert</i>-butoksikarbonil)amino)propanojska kislina</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 189.21 g/mol <b>Izkoristek:</b> 85.7 %	<b>Izgled:</b> bela oborina <b>R<sub>f</sub>:</b> 0.60 (MF: DKM/MeOH/CH <sub>3</sub> COOH = 9/1/0.1) <b>Tališče:</b> 75–77 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ 1.38 (s, 9H, 3 × CH <sub>3</sub> ), 2.35 (t, 2H, <i>J</i> = 7.1 Hz, CH <sub>2</sub> COO), 3.10–3.15 (dd, 2H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 12.8 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 7.1 Hz, NHCH <sub>2</sub> ), 6.82 (t, 1H, <i>J</i> = 5.2 Hz, NH), 12.18 (s, 1H, COOH) ppm
<b><sup>13</sup>C-NMR</b> (100 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ 28.2, 34.2, 36.1, 77.6, 155.4, 172.8 ppm
<b>HRMS (ESI)</b>	izračunan 188.0923; izmerjen 188.0920
<b>IR (ATR)</b>	ν 3439, 2966, 2911, 1698, 1509, 1456, 1439, 1407, 1392, 1377, 1365, 1352, 1291, 1236, 1215, 1159, 1083, 1033, 995, 978, 936, 890, 862, 837, 780, 761, 726, 644 cm <sup>-1</sup>

#### 4.6 Sinteza benzil 3-(3-((*tert*-butoksikarbonil)amino)propanamido)propanoata



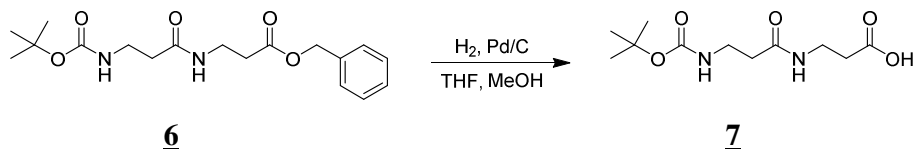
Spojino **5** (3.010 g, 15.9 mmol, 1 ekv) smo raztopili v DMF (200 mL) in raztopino ohladili na ledeni kopeli. V ohlajeno raztopino smo najprej dodali EDC (3.649 g, 19.0 mmol, 1.2 ekv), nato pa DMAP (0.195 g, 1.60 mmol, 0.1 ekv). Reakcijsko zmes smo v nadaljevanju naalkalili z NMM (3.5 mL, 31.8 mmol, 2 ekv) in 20 minut mešali na ledeni kopeli. V nadaljevanju smo pH reakcijske zmesi z NMM (prbl. 5 mL) uravnali na 8, nato pa dodali 3-(benziloksi)-3-oksopropan-1-amonijev *p*-toluensulfonat (5.574 g, 15.9 mmol, 1 ekv). Reakcijsko zmes smo mešali 48 ur, pri čemer se je postopoma segrela na sobno T. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili topilo, preostanku v bučki pa dodali etilacetat (50 mL). Organsko fazo smo najprej sprali s 5-odstotno citronsko kislino (2 × 50

mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 50 mL) in nazadnje z nasičeno raztopino NaCl (2 × 50 mL). Po končani ekstrakciji smo organsko fazo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali, matičnici pa pod znižanim tlakom uparili topilo. Dobili smo 3.957 g spojine **6**.

<b>benzil 3-(3-((<i>tert</i>-butoksidkarbonil)amino)propanamido)propanoat</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 350.41 g/mol <b>Izkoristek:</b> 71.0 %	<b>Izgled:</b> rumeno-beli kristali <b>R<sub>f</sub>:</b> 0.43 (MF: DKM/MeOH = 9/1; orositveni reagent: ninhidrin) <b>Tališče:</b> 79–81 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ 1.37 (s, 9H, 3 × CH <sub>3</sub> ), 2.20 (t, 2H, <i>J</i> = 7.4 Hz, CH <sub>2</sub> ), 2.52 (d, 2H, CH <sub>2</sub> , signal je delno prekrit z DMSO- <i>d</i> <sub>5</sub> ), 3.10 (dd, 2H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 13.4 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 7.0 Hz, CH <sub>2</sub> ), 3.29 (dd, 2H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 12.5 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 6.8 Hz, CH <sub>2</sub> ), 5.10 (s, 2H, PhCH <sub>2</sub> ), 6.75 (t, 1H, <i>J</i> = 5.5 Hz, <i>t</i> -BuOCONH), 7.35–7.39 (m, 5H, Ar-H), 8.00 (t, 1H, <i>J</i> = 5.5 Hz, CONH) ppm
<b><sup>13</sup>C-NMR</b> (100 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ 28.4, 34.0, 34.8, 36.2, 36.6, 66.6, 77.2, 128.3, 128.5, 128.7, 154.7, 168.6, 172.4 ppm
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b>	izračunan 351.1920; izmerjen 351.1926
<b>IR (ATR)</b>	ν 3350, 2983, 2938, 2359, 1733, 1685, 1646, 1530, 1455, 1414, 1387, 1356, 1298, 1275, 1249, 1218, 1167, 1140, 1117, 1058, 1017, 1001, 978, 962, 927, 906, 890, 864, 804, 781, 755, 697, 643, 576, 552 cm <sup>-1</sup>



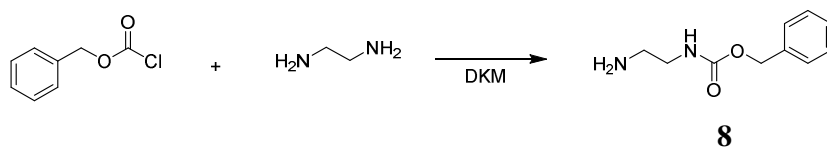
#### 4.7 Sinteza 3-(3-((*tert*-butoksikarbonil)amino)propanamido)propanojske kisline



Spojino **6** (3.787 g, 10.8 mmol) smo raztopili v zmesi topil MeOH/THF = 1/1 (100 mL) in bučko prepihali z argonom. Dodali smo katalizator Pd/C (0.208 g, 5 % m/m) in bučko prepihali s H<sub>2</sub>. Sistem smo nato zaprli in vanj preko igle dovajali H<sub>2</sub>, s katerim smo napolnili balon. Po končani reakciji (24 ur, sobna T) smo s presesavanjem odfiltrirali Pd/C, matičnico pa uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 2.850 g spojine **7**.

<b>3-(3-((<i>tert</i>-butoksikarbonil)amino)propanamido)propanojska kislina</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 260.29 g/mol <b>Izkoristek:</b> 100 %	<b>Izgled:</b> beli kristali sprijeti v lističe <b>R<sub>f</sub>:</b> 0.21 (MF: DKM/MeOH/CH <sub>3</sub> COOH = 7/1/0.1; orositveni reagent: ninhidrin) <b>Tališče:</b> 99–101 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ 1.37 (s, 9H, 3 × CH <sub>3</sub> ), 2.20 (t, 2H, <i>J</i> = 7.4 Hz, CH <sub>2</sub> ), 2.36 (t, 2H, <i>J</i> = 7.0 Hz, CH <sub>2</sub> ), 3.10 (dd, 2H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 13.4 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 7.2 Hz, CH <sub>2</sub> ), 3.22 (dd, 2H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 12.6 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 6.9 Hz, CH <sub>2</sub> ), 6.73 (t, 1H, <i>J</i> = 5.5 Hz, <i>t</i> -BuOCONH), 7.93 (t, 1H, <i>J</i> = 5.5 Hz, CONH), 12.22 (s, 1H, COOH) ppm
<b><sup>13</sup>C-NMR</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ 28.2, 33.8, 34.6, 35.6, 36.7, 77.5, 155.4, 170.3, 172.9 ppm
<b>HRMS (ESI)</b>	izračunan 259.1294; izmerjen 259.1291
<b>IR (ATR)</b>	ν 3315, 2977, 2934, 1686, 1645, 1536, 1432, 1385, 1364, 1340, 1279, 1248, 1219, 1166, 1105, 1041, 973, 924, 872, 782, 670, 630, 578, 560 cm <sup>-1</sup>

#### 4.8 Sinteza benzil (2-aminoetil)karbamata

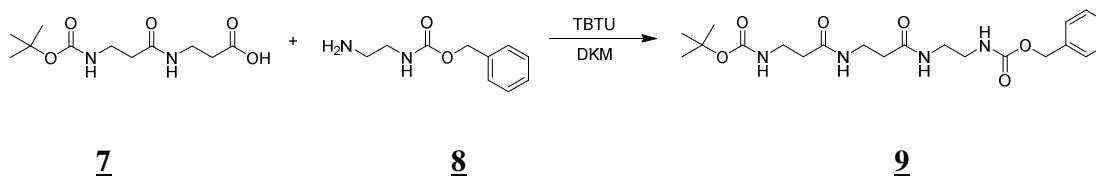


Raztopino etilendiamina (33.4 mL, 500 mmol, 1 ekv) v diklorometanu (500 mL) smo ohladili na 0 °C in med mešanjem v obdobju osmih ur dokapavali raztopino benzil *o*-kloroformiata (7.11 mL, 50 mmol, 0.1 ekv) v diklorometanu (250 mL). Po končanem dokapavanju smo reakcijsko zmes mešali nadaljnih 24 ur pri sobni T. Po končani reakciji

smo reakcijsko zmes sprali z nasičeno raztopino NaCl ( $5 \times 100$  mL) in s H<sub>2</sub>O (100 mL). Nato smo organsko fazo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in matičnici uparili topilo. Po ohladitvi je iz olja izpadla prosojno bela oborina. Dobili smo 8.662 g spojine **8**.

<b>benzil (2-aminoetil)karbamat</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 194.23 g/mol <b>Izkoristek:</b> 89.2 %	<b>Izgled:</b> prosojno bela oborina <b>R<sub>f</sub></b> : 0.11 (MF: DKM/MeOH = 9/1; orositveni reagent: ninhidrin)
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ 1.65 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 2.56 (t, 2H, <i>J</i> = 6.5 Hz, H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> ), 3.00 (dd, 2H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 12.3 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 6.4 Hz, OCONHCH <sub>2</sub> ), 5.01 (s, 2H, PhCH <sub>2</sub> ), 7.23 (t, 1H, <i>J</i> = 5.4 Hz, NH), 7.31–7.38 (m, 5H, Ar-H) ppm
<b><sup>13</sup>C-NMR</b> (100 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ 41.2, 43.3, 65.2, 127.7, 128.3, 137.2, 156.2 ppm
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b>	izračunan 195.1134; izmerjen 195.1131
<b>IR (ATR)</b>	v 3319, 3062, 2944, 2116, 1992, 1690, 1534, 1499, 1453, 1361, 1250, 1137, 1080, 1027, 980, 908, 842, 779, 746, 696, 639, 619, 573 cm <sup>-1</sup>

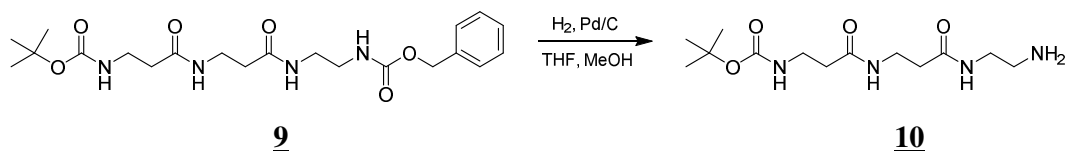
#### 4.9 Sinteza *terc*-butil (3,8,12-triokso-1-fenil-2-oksa-4,7,11-triazatetradekan-14-il)karbamata



Spojino **7** (1.164 g, 4.47 mmol, 1 ekv) smo raztopili v DKM (50 mL) in med mešanjem dodali Et<sub>3</sub>N (1.24 mL, 8.92 mmol, 2 ekv), nato pa še TBTU (1.580 g, 4.92 mmol, 1.1 ekv). Reakcijsko zmes smo mešali 30 minut pri sobni T, nato pa ponovno dodali Et<sub>3</sub>N (0.622 mL, 4.47 mmol, 1 ekv) in spojino **8** (0.869 g, 4.47 mmol, 1 ekv). Reakcija je potekala pri sobni T 72 ur. Pri tem je nastala oborina, ki smo jo po končani reakciji odfiltrirali pod znižanim tlakom. Matičnico smo sprali z raztopino 0.1 M HCl (50 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) in nazadnje še z nasičeno raztopino NaCl (50 mL). Po končani ekstrakciji smo organsko fazo filtrirali pod znižanim tlakom, oborini pa združili. Dobili smo 1.10 g spojine **9**.

<b><i>tert</i>-butil (3,8,12-triokso-1-fenil-2-oksa-4,7,11-triazatetradekan-14-il)karbamat</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 436.51 g/mol <b>Izkoristek:</b> 56.4 %	<b>Izgled:</b> beli kristali sprijeti v grudice <b>R<sub>f</sub>:</b> 0.23 (MF: DKM/MeOH = 9/1) <b>Tališče:</b> 155–157 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ 1.37 (s, 9H, 3 × CH <sub>3</sub> ), 2.18–2.22 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 3.04–3.12 (m, 6H, 3 × CH <sub>2</sub> ), 3.20–3.25 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5.01 (s, 2H, PhCH <sub>2</sub> ), 6.74 (t, 1H, <i>J</i> = 5.6 Hz, <i>t</i> -BuOCONH), 7.27 (t, 1H, <i>J</i> = 5.6 Hz, BzOCONH), 7.27–7.39 (m, 5H, Ar-H), 7.88 (t, 1H, <i>J</i> = 5.7 Hz, CONH), 7.92 (t, 1H, <i>J</i> = 5.4 Hz, CONH) ppm
<b><sup>13</sup>C-NMR</b> (100 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ 28.4, 34.7, 35.5, 35.9, 36.5, 42.6, 43.7, 67.0, 77.2, 128.2, 128.3, 128.6, 156.3, 156.7, 169.7, 172.3 ppm
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b>	izračunan 437.2400; izmerjen 437.2412
<b>IR (ATR)</b>	ν 3309, 3066, 2945, 2359, 1691, 1638, 1530, 1453, 1365, 1255, 1155, 1080, 982, 871, 779, 744, 695, 663, 620, 574 cm <sup>-1</sup>

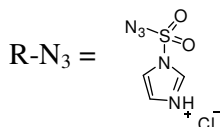
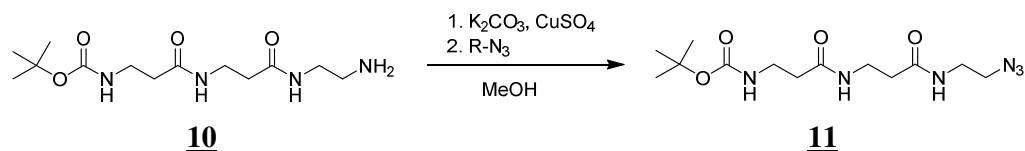
#### 4.10 Sinteza *tert*-butil (3-((3-((2-aminoetil)amino)-3-oksopropil)amino)-3-oksopropil)karbamata



Spojino **9** (1.80 g, 4.12 mmol) smo raztopili v zmesi topil MeOH/THF = 1/1 (100 mL) in bučko prepihali z argonom. Dodali smo katalizator Pd/C (0.192 g, 10 % m/m) in bučko prepihali s H<sub>2</sub>. Sistem smo nato zaprli in vanj preko igle dovajali H<sub>2</sub>, s katerim smo napolnili balon. Po končani reakciji (24 ur, sobna T) smo s presesavanjem odfiltrirali Pd/C, matičnico pa uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 1.182 g spojine **10**.

<b><i>tert</i>-butil (3-((3-((2-aminoetil)amino)-3-oksopropil)amino)-3-oksopropil)karbamata</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 302.38 g/mol <b>Izkoristek:</b> 94.9 %	<b>Izgleed:</b> rumeni kristali <b>R<sub>f</sub>:</b> 0.00 (MF: DKM/MeOH = 9/1) <b>Tališče:</b> 115 ± 2 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ 1.37 (s, 9H, 3 × CH <sub>3</sub> ), 2.18–2.24 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 2.56 (t, 2H, <i>J</i> = 6.4 Hz, CH <sub>2</sub> ), 3.02–3.12 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 3.22 (q, 2H, <i>J</i> = 7.0 Hz, CH <sub>2</sub> ), 6.76 (t, 1H, <i>J</i> = 5.4 Hz, <i>t</i> -BuOCONH), 7.86–7.95 (m, 2H, 2 × CONH) ppm, signala za NH <sub>2</sub> skupino v spektru ne vidimo
<b><sup>13</sup>C-NMR</b> (100 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ 28.2, 35.3, 35.5, 35.7, 36.7, 38.6, 40.1, 77.6, 155.4, 170.3, 170.9 ppm
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b>	izračunan 303.2032; izmerjen 303.2038
<b>IR (ATR)</b>	ν 3292, 3080, 2975, 2933, 2362, 1685, 1635, 1532, 1449, 1385, 1364, 1277, 1240, 1172, 1108, 1039, 973, 873, 616, 575 cm <sup>-1</sup>

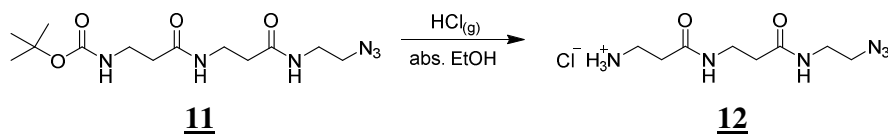
#### 4.11 Sinteza *tert*-butil (3-((3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)amino)-3-oksopropil)karbamata



V bučko smo natehtali spojino **10** (0.815 g, 2.70 mmol, 1 ekv), dodali (n(**10**) + 0.5 mmol)<sup>2</sup> K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.411 g, 10.2 mmol) in CuSO<sub>4</sub> × 5H<sub>2</sub>O (0.007 g, 0.0280 mmol, 0.01 ekv). V erlenmajerico z destiliranim metanolom smo preko septuma z injekcijsko brizgo uvajali argon, z drugo pa odmerili MeOH (15 mL) in ga dodali v bučko k natehtanim spojinam. Zmes smo mešali približno deset minut, nato pa dodali še R-N<sub>3</sub> (0.679 g, 3.24 mmol, 1.2 ekv). Čez 1.5 ure smo reakcijo ustavili in topilo uparili pod znižanim tlakom. Preostanku v bučki smo dodali H<sub>2</sub>O (30 mL) in raztopino nakisali z 2 M HCl do pH = 2–3. Vodno fazo smo nato ekstrahirali z etilacetatom (6 × 40 mL) in združenim organskim fazam topilo uparili pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Uporabili smo MF: DKM/MeOH = 30/1. Dobili smo 0.372 g spojine **11**.

<i>tert</i> -butil (3-((3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)amino)-3-oksopropil)karbamata	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 328.37 g/mol <b>Izkoristek:</b> 42.0 %	<b>Izgled:</b> rumeno-beli kristali sprijeti v lističe <b>R<sub>f</sub>:</b> 0.36 (MF: DKM/MeOH = 9/1; orositveni reagent: ninhidrin) <b>Tališče:</b> 138–141 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ 1.37 (s, 9H, 3 × CH <sub>3</sub> ), 2.18 (t, 2H, <i>J</i> = 7.1 Hz, CH <sub>2</sub> ), 2.23 (t, 2H, <i>J</i> = 7.1 Hz, CH <sub>2</sub> ), 3.09 (dd, 2H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 13.5 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 6.9 Hz, CH <sub>2</sub> ), 3.19–3.26 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 3.71 (s, 2H, N <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ), 6.73 (t, 1H, <i>J</i> = 5.5 Hz, <i>t</i> -BuOCONH), 7.89 (t, 1H, <i>J</i> = 5.6 Hz, CONH), 8.13 (t, 1H, <i>J</i> = 5.5 Hz, CONH) ppm
<b><sup>13</sup>C-NMR</b> (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ 28.4, 35.5, 35.7, 36.4, 36.8, 38.9, 50.6, 79.4, 156.1, 171.8, 171.9 ppm
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b>	izračunan 329.1937; izmerjen 329.1936
<b>IR (ATR)</b>	ν 3304, 3079, 2980, 2934, 2091, 1685, 1636, 1534, 1453, 1388, 1365, 1347, 1279, 1237, 1166, 1114, 1048, 978, 912, 870, 781, 670, 596 cm <sup>-1</sup>

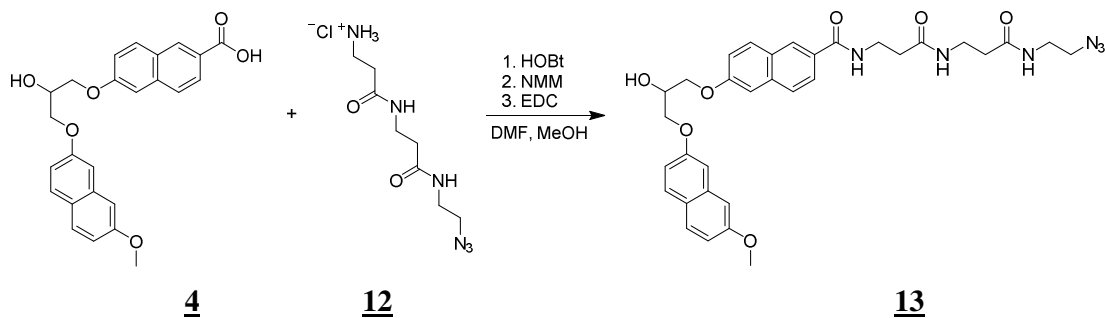
#### 4.12 Sinteza 3-((3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)amino)-3-oksopropan-1-amonijevega klorida



Absolutni etanol (100 mL) smo 20 minut prepihovali s plinastim HCl, da smo pripravili nasičeno raztopino. Dodali smo ga, v minimalni količini absolutnega etanola raztopljeni, spojini **11**. Po končani reakciji, ki je potekla v 40 minutah, smo topilo uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 0.438 g spojine **12**.

<b>3-((3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)amino)-3-oksopropan-1-amonijev klorid</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 264.71 g/mol <b>Izkoristek:</b> 100.0 %	<b>Izgled:</b> umazano belo strjeno olje <b>R<sub>f</sub></b> : 0.00 (MF: DKM/MeOH = 9/1; orositveni reagent: ninhidrin)
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ 2.27 (t, 2H, <i>J</i> = 7.1 Hz, CH <sub>2</sub> ), 2.46 (t, 2H, <i>J</i> = 7.1 Hz, CH <sub>2</sub> ), 2.91–2.99 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.22–3.29 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 3.35 (t, 2H, <i>J</i> = 5.7 Hz, CH <sub>2</sub> ), 7.99 (s, 3H, <sup>-</sup> Cl <sup>+</sup> NH <sub>3</sub> ), 8.21–8.26 (m, 2H, 2 × NH) ppm
<b><sup>13</sup>C-NMR</b> (100 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ 32.0, 35.1, 35.2, 38.1, 49.8, 169.2, 170.7 ppm
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b>	izračunan 229.1413; izmerjen 229.1410
<b>IR (ATR)</b>	ν 3280, 2952, 2114, 1717, 1633, 1603, 1545, 1515, 1429, 1388, 1337, 1291, 1255, 1232, 1207, 1160, 1125, 1094, 1030, 972, 951, 936, 823, 794, 769, 754, 701, 661, 631, 584, 564 cm <sup>-1</sup>

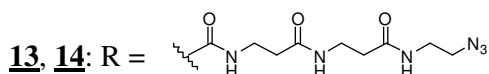
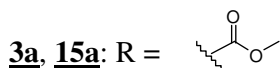
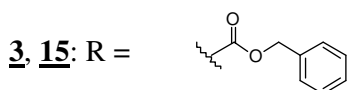
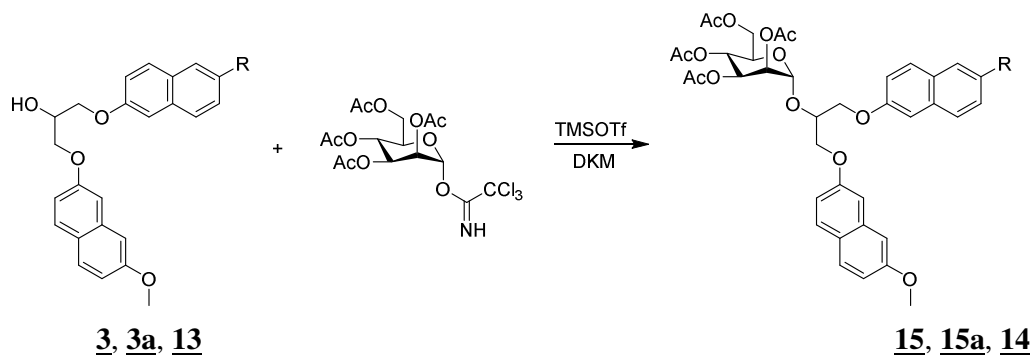
#### 4.13 Sinteza *N*-3-((3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)amino)-3-oksopropil)-6-(2-hidroksi-3-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propoksi)-2-naftamida



V bučko smo natehtali spojine **4** (0.100 g, 0.239 mmol, 1 ekv), **12** (0.063 g, 0.238 mmol, 1 ekv), HOBt (0.039 g, 0.287 mmol, 1.2 ekv) in jih raztopili v DMF (3 mL). Med mešanjem smo dodali NMM (0.105 mL, 0.955 mmol, 4 ekv) in pH uravnali na 8, tako da smo dodali še par kapljic NMM. Tako pripravljeno raztopino smo na ledeni kopeli ohladili na 0 °C, dodali DKM (2 mL), nazadnje pa še EDC (0.060 g, 0.313 mmol, 1.3 ekv). Reakcija je potekala 72 ur. Sprva pri 0 °C, potem se je ledena kopel postopoma segrela na sobno T, po 24 urah od začetka pa smo reakcijsko zmes na oljni kopeli segreli na 40 °C. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili topilo, preostanku pa dodali etilacetat (20 mL). Organsko fazo smo sprali z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 5 mL). V sistem smo dodali nasičeno raztopino NaCl (5 mL), nato pa celotno vsebino lija ločnika spustili preko nuče. Oborino smo posušili, matičnico pa v liju ločniku ločili na vodno in organsko fazo. Slednji smo pod znižanim tlakom uparili topilo. Dobili smo 0.097 g čiste spojine **13**.

<b><i>N</i>-(3-((3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)amino)-3-oksopropil)-6-(2-hidroksi-3-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propoksi)-2-naftamid</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>33</sub> H <sub>36</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 628.69 g/mol <b>Izkoristek:</b> 66.4 %	<b>Izgled:</b> umazano beli kristali sprijeti v grudice <b>R<sub>f</sub>:</b> 0.49 (MF: DKM/MeOH/CH <sub>3</sub> COOH = 7/1/0.1) <b>Tališče:</b> 197 ± 2 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> <b>(400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>)</b>	δ 2.27 (t, 2H, <i>J</i> = 7.0 Hz, CH <sub>2</sub> ), 2.39 (t, 2H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH <sub>2</sub> ), 3.20–3.33 (m, 8H, 3 × CH <sub>2</sub> , N <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ), 3.85 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 4.17–4.34 (m, 5H, 2 × OCH <sub>2</sub> , CH), 5.59 (s, 1H, OH), 6.99 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8.9 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2.5 Hz, Ar-H), 7.04 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 9.0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2.5 Hz, Ar-H), 7.22 (d, 1H, <i>J</i> = 2.4 Hz, Ar-H), 7.28 (dd, 2H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8.9 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2.4 Hz, Ar-H), 7.45 (d, 1H, <i>J</i> = 2.1 Hz, Ar-H), 7.73 (d, 1H, <i>J</i> = 3.8 Hz, Ar-H), 7.75 (d, 1H, <i>J</i> = 3.9 Hz, Ar-H), 7.84–7.90 (m, 2H, Ar-H), 7.93 (d, 1H, <i>J</i> = 9.0 Hz, Ar-H), 8.01 (d, 1H, <i>J</i> = 5.6 Hz, NH), 8.17 (t, 1H, <i>J</i> = 5.3 Hz, NH), 8.37 (s, 1H, Ar-H), 8.60 (t, 1H, <i>J</i> = 5.5 Hz, NH) ppm
<b><sup>13</sup>C-NMR</b> <b>(100 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>)</b>	δ 35.2, 35.4, 36.2, 38.1, 49.8, 55.0, 67.3, 69.2, 69.4, 105.3, 106.2, 106.6, 115.8, 115.9, 119.5, 123.7, 124.6, 126.6, 127.2, 127.4, 128.9, 129.0, 129.5, 130.4, 135.6, 135.7, 156.9, 157.6, 157.7, 166.2, 170.4, 170.7 ppm
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b>	izračunan 629.2724; izmerjen 629.2710
<b>IR (ATR)</b>	ν 3285, 3064, 2938, 2100, 1733, 1628, 1537, 1516, 1467, 1429, 1388, 1350, 1257, 1212, 1181, 1161, 1116, 1096, 1029, 904, 866, 833, 794, 664, 637 cm <sup>-1</sup>

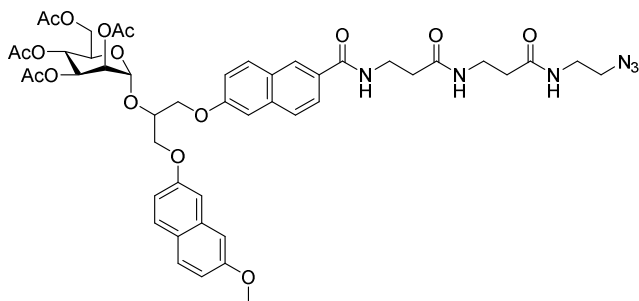
## SPLOŠNI POSTOPEK REAKCIJE GLIKOZILACIJE



Bučko smo predhodno priklopili na vakuumsko črpalko, prežarili, nato pa jo napolnili z argonom. Vanjo smo natehtali izhodni glicerol **3**, **3a** ali **13** (1 ekv) in 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranozil trikloroacetimidat (1 ekv). Medtem smo čistemu diklorometanu dodali  $\text{CaH}_2$  in zmes refluktirali 20 minut. Diklorometan smo nato destilirali direktno v bučko z izhodnima spojinama. Ko sta se ti raztopili, smo bučko ohladili na ledu, nato pa po kapljicah dodajali TMSOTf (1.2 ekv). Reakcijsko zmes smo pustili na ledu 45 minut, nato pa na sobni T preko noči. Reakcijo smo ustavili z dodatkom  $\text{Et}_3\text{N}$  (2.6 ekv) in topilo uparili pod znižanim tlakom.



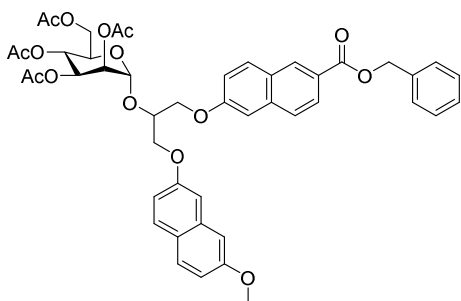
#### 4.14 Poskus sinteze 3-((6-((3-((3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)amino-3-oksopropil)karbamoil)naftalen-2-il)oksi)-1-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranozida



**14**

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku reakcije glikozilacije iz spojine **13** (0.497 g, 0.791 mmol, 1 ekv) in 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranozil trikloroacetimidata (0.413 g, 0.791 mmol, 1 ekv). Zaradi težav s topnostjo smo poleg destiliranega metanola (40 mL), v reakcijsko zmes dodali destiliran THF (10 mL). Med reakcijo je izpadla oborina, ki smo jo odfiltrirali pod znižanim tlakom in sprali z DKM. Analiza NMR je pokazala, da gre za izhodno spojino **13** in reakcija ni potekla.

#### 4.15 Sinteza 3-((6-((benziloksi)karbonil)naftalen-2-il)oksi)-1-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranozida



**15**

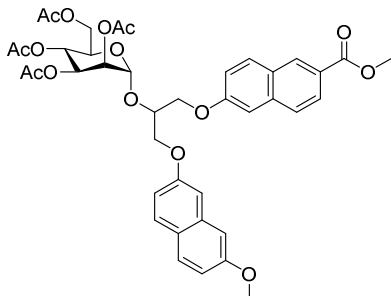
Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku reakcije glikozilacije iz zmesi spojin **3** in **3a** (0.592 g, ~1.16 mmol, 1 ekv) in 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranozil trikloroacetimidata (0.75 g, 1.44 mmol, 1.2 ekv), ki smo ju raztopili v ~ 20 mL destiliranega diklorometana. Spojini **15** in **15a** smo čistili s kolonsko kromatografijo.

Spiranje kolone smo začeli z MF: heksan/etilacetat = 3/1 in nadaljevali z MF: heksan/etilacetat = 2/1, ko smo se znebili nečistot z višjim  $R_f$ . Dobili smo 0.251 g zmesi spojin **15** in **15a** in 0.113 g čiste **15a**.

<b>3-((6-((benziloksi)karbonil)naftalen-2-il)oksi)-1-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra-O-acetil-<math>\alpha</math>-D-manopiranozid</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>46</sub> H <sub>46</sub> O <sub>15</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 838.86 g/mol <b>Izkoristek:</b> 26 %	<b>Izgled:</b> oranžno strjeno olje <b>R<sub>f</sub>:</b> 0.41 (MF: heksan/etilacetat = 1/1)
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> <b>(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)</b>	$\delta$ 2.02–2.04 (m, 9H, 3 $\times$ OCOCH <sub>3</sub> ), 2.19–2.22 (m, 3H, OCOCH <sub>3</sub> ), 3.93 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 4.08–4.11 (m, 1H, manozna-H), 4.28–4.46 (m, 6H, 2 $\times$ CH <sub>2</sub> , 2 $\times$ manozna-H), 4.59–4.63 (m, 1H, CH), 5.28–5.43 (m, 4H, 4 $\times$ manozna-H), 5.45 (s, 2H, CH <sub>2</sub> Ph), 7.00–7.08 (m, 3H, Ar-H), 7.13–7.28 (m, 3H, Ar-H), 7.39–7.53 (m, 5H, Ph), 7.67–7.72 (m, 2H, Ar-H), 7.79 (dd, 1H, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, Ar-H), 7.90 (dd, 1H, $J_1 = 9.0$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, Ar-H), 8.07 (ddd, 1H, $J_1 = 8.6$ Hz, $J_2 = 3.2$ Hz, $J_3 = 1.7$ Hz, Ar-H), 8.59 (dd, 1H, $J_1 = 3.6$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, Ar-H) ppm
<b>HRMS ESI<sup>+</sup></b>	izračunan 839.2915; izmerjen 839.2912

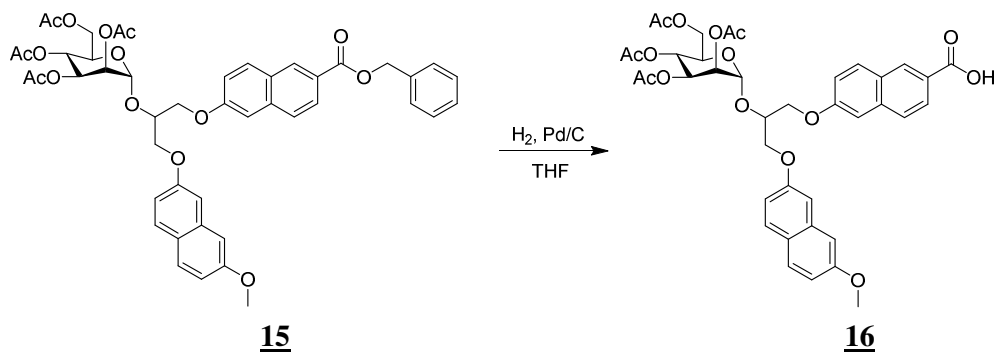
## STRANSKI PODUKT:

**3-((6-(metoksikarbonil)naftalen-2-il)oksi)-1-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranozid**

**15a**

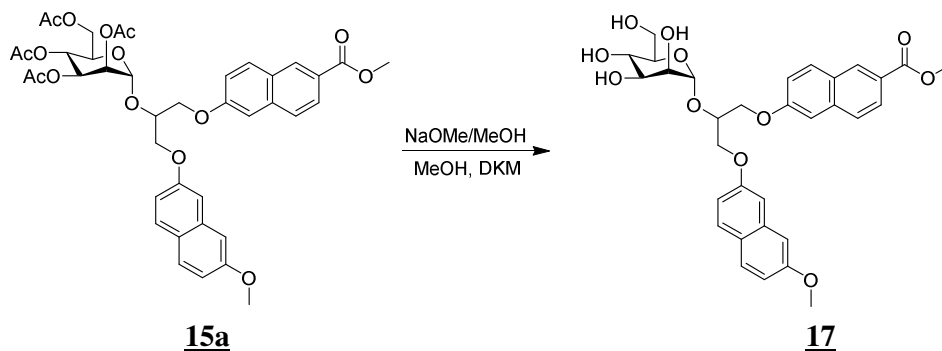
<b>3-((6-(metoksikarbonil)naftalen-2-il)oksi)-1-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra-<i>O</i>-acetil-<math>\alpha</math>-D-manopiranozid</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>40</sub> H <sub>42</sub> O <sub>15</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 762.76 g/mol <b>Izkoristek:</b> 11.2 %	<b>Izgled:</b> rumeni svetleči kristali <b>R<sub>f</sub>:</b> 0.37 (MF: heksan/etilacetat = 1/1) <b>Tališče:</b> 61 ± 2 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ 2.02–2.04 (m, 9H, 3 × OCOCH <sub>3</sub> ), 2.21 (d, 3H, <i>J</i> = 1.2 Hz, OCOCH <sub>3</sub> ), 3.93 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.99 (2 × s, 3H, COOCH <sub>3</sub> ), 4.09–4.12 (m, 1H, manozna-H), 4.32–4.43 (m, 6H, 2 × CH <sub>2</sub> , 2 × manozna-H), 4.59–4.64 (m, 1H, CH), 5.29 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 5.8 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 1.7 Hz, H-1), 5.33–5.44 (m, 3H, 3 × manozna-H), 7.00–7.09 (m, 3H, Ar-H), 7.14 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 6.2 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2.4 Hz, Ar-H), 7.21–7.28 (m, 2H, Ar-H), 7.67–7.72 (m, 2H, Ar-H), 7.79 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8.8 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2.1 Hz, Ar-H), 7.90 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 9.1 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 5.5 Hz, Ar-H), 8.07 (ddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8.6 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 3.3 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 1.7 Hz, Ar-H), 8.56 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 3.6 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 1.5 Hz, Ar-H) ppm
<b><sup>13</sup>C-NMR</b> (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ 20.6, 20.9 (4 × COCH <sub>3</sub> ), 52.0, 52.1, 55.2 (OCH <sub>3</sub> , COOCH <sub>3</sub> ), 62.2, 62.3, 65.8, 65.9, 66.9, 67.3, 67.5, 67.8, 68.8, 68.9, 69.6, 69.7, 74.7, 74.9, 97.2, 97.4 (CH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> , 6 × manozna-C), 105.2, 106.3, 106.4, 106.6, 115.7, 115.9, 116.4, 116.5, 119.3, 119.5, 124.4, 124.5, 125.5, 125.6, 126.0, 126.1, 126.9, 128.0, 128.1, 129.1, 129.4, 129.5, 130.8, 131.1, 131.2, 135.6, 135.7, 136.8, 136.9, 156.7, 156.8, 158.0, 158.1, 158.2, 158.3 (20 × Ar-C), 167.2, 167.3, 169.7, 169.9, 170.0, 170.1, 170.6, 170.7 (4 × COCH <sub>3</sub> , COOCH <sub>3</sub> ) ppm
<b>HRMS ESI<sup>+</sup></b>	izračunan 763.2602; izmerjen 763.2607
<b>IR (ATR)</b>	$\nu$ 2952, 2322, 2084, 1989, 1745, 1716, 1627, 1608, 1515, 1457, 1436, 1387, 1368, 1340, 1200, 1164, 1136, 1035, 979, 910, 857, 831, 808, 695, 631, 600, 564, 552 cm <sup>-1</sup>

#### 4.16 Sinteza 3-(((6-(karboksi)naftalen-2-il)oksi-1-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-2-il 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranozida



Spojino **15** (0.061 g, 0.0727 mmol) smo raztopili v THF (10 mL) in bučko prepihali z argonom. Dodali smo katalizator Pd/C (0.006 g, 10 % m/m) in bučko prepihali s H<sub>2</sub>. Sistem smo nato zaprli in vanj preko igle dovajali H<sub>2</sub>, s katerim smo napolnili balon. Po 24 urah je bilo iz kromatograma razvidno, da reakcija ni potekla do konca. V sistem smo zato med mešanjem dodali CH<sub>3</sub>COOH (5 mL) in THF (10 mL) in reakcijo pustili nadaljnjih 24 ur. Nato smo reakcijo ustavili, s presesavanjem odfiltrirali Pd/C, matičnico pa uparili pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Spiranje kolone smo začeli z MF: DKM/MeOH = 30/1, zaradi slabega izkoristka pa nadaljevali z bolj polarno MF: DKM/MeOH/CH<sub>3</sub>COOH = 9/1/0.1. Dobili smo 0.007 g spojine **16**. Ker je reakcija slabo potekla, analiz nismo izvajali.

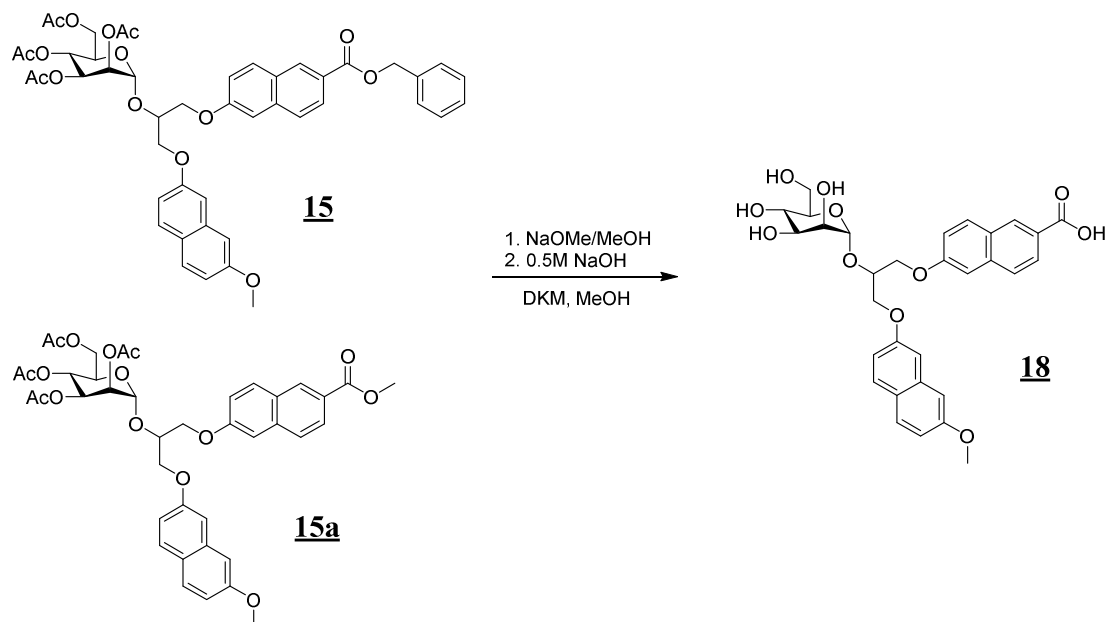
#### 4.17 Sinteza 3-(((6-(metoksikarbonil)naftalen-2-il)oksi-1-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-2-il $\alpha$ -D-manopiranozida



Spojino **15a** (0.061 g, 0.0800 mmol) smo raztopili v zmesi topil MeOH in DKM (6.1 mL + 1 mL), dodali 3 kapljice NaOMe v MeOH (30 % m/m) in reakcijo spremljali 3 ure. Nato smo v reakcijsko zmes dodali za konico spatule ionsko izmenjevalne smole Amberlit IR 120 in mešali 20 minut. Ionsko izmenjevalno smolo smo nato odfiltrirali s presesavanjem, sprali z MeOH in matičnici uparili topilo. Dobili smo 0.052 g spojine **17**.

<b>3-((6-(metoksikarbonil)naftalen-2-il)oksi)-1-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-2-il <math>\alpha</math>-D-manopiranozid</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>32</sub> H <sub>34</sub> O <sub>11</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 594.61 g/mol <b>Izkoristek:</b> 100 %	<b>Izgled:</b> svetleči oranžni kristali <b>R<sub>f</sub>:</b> 0.29 (MF: DKM/MeOH = 9/1)
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> <b>(400MHz, CD<sub>3</sub>OD)</b>	$\delta$ 3.67–3.84 (m, 5H, H-3, H-4, H-6, H-6'), 3.89–3.92 (m, 5H, OCH <sub>3</sub> , H-2, H-5), 3.97 (s, 3H, COOCH <sub>3</sub> ), 4.36–4.54 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 4.61–4.64 (m, 1H, CH), 5.24 (t, 1H, J = 1.9 Hz, H-1), 6.97 (ddd, 1H, J <sub>1</sub> = 8.9 Hz, J <sub>2</sub> = 2.5 Hz, J <sub>3</sub> = 1.2 Hz, Ar-H), 7.05 (ddd, 1H, J <sub>1</sub> = 8.9 Hz, J <sub>2</sub> = 2.5 Hz, J <sub>3</sub> = 1.1 Hz, Ar-H), 7.15 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 7.0 Hz, J <sub>2</sub> = 2.5 Hz, Ar-H), 7.25 (d, 1H, J = 2.5 Hz, Ar-H), 7.31 (ddd, 1H, J <sub>1</sub> = 8.9 Hz, J <sub>2</sub> = 4.2 Hz, J <sub>3</sub> = 2.5 Hz, Ar-H), 7.41 (d, 1H, J = 2.1 Hz, Ar-H), 7.65–7.69 (m, 2H, Ar-H), 7.84 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 8.7 Hz, J <sub>2</sub> = 6.4 Hz, Ar-H), 7.93 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 9.1 Hz, J <sub>2</sub> = 2.2 Hz, Ar-H), 8.00 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 9.1 Hz, J <sub>2</sub> = 2.2 Hz, Ar-H), 8.54 (s, 1H, Ar-H) ppm
<b><sup>13</sup>C-NMR</b> <b>(100MHz, CD<sub>3</sub>OD)</b>	$\delta$ 52.7, 55.7, 62.8 (62.9), 68.4 (68.5), 68.7 (68.8), 69.1 (69.2), 72.3, 72.4, 75.1, 75.3 (75.4), 101.7 (101.8), 106.3, 106.4, 107.5 (107.6), 107.9 (108.0), 117.0 (117.1), 117.2 (117.3), 120.9, 121.0, 125.9 (126.0), 126.6 (126.7), 128.3, 130.0, 130.2 (130.3), 131.8, 132.1 (132.2), 137.5, 138.8, 158.5 (158.6), 159.7, 160.1 (160.2), 168.9 ppm
<b>HRMS (ESI)</b>	izračunan 593.2023; izmerjen 593.2010
<b>IR (ATR)</b>	$\nu$ 3392, 2931, 2111, 1710, 1628, 1608, 1515, 1480, 1389, 1340, 1256, 1201, 1160, 1135, 1096, 1020, 977, 913, 855, 829, 678, 630 cm <sup>-1</sup>

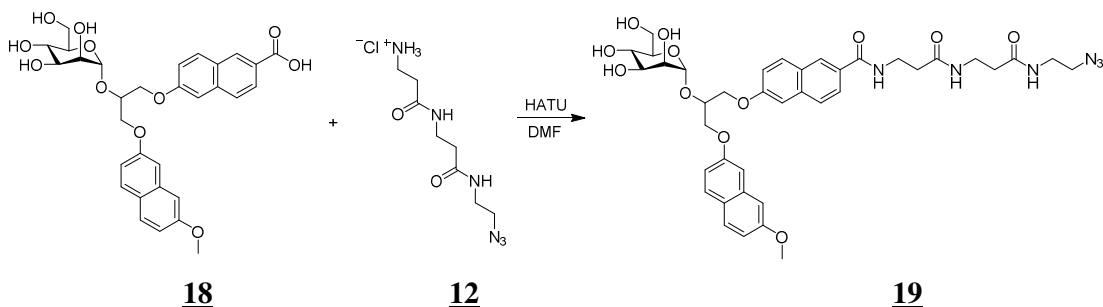
#### 4.18 Sinteza 3-(((6-(karboksi)naftalen-2-il)oksi-1-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-2-il $\alpha$ -D-manopiranozida



V bučko smo natehtali čisto **15a** (0.052 g, 0.0682 mmol) in zmes spojin **15** in **15a** (0.201 g, 0.24 mmol) in ju raztopili v zmesi topil MeOH in DKM (15 + 5 mL). Dodali smo deset kapljic NaOMe v MeOH (30 % m/m) in reakcijo spremljali 3 ure. Reakcijsko zmes smo nato skoncentrirali in ker je pričela izpadati oborina, preostanek v bučki raztopili v 1,4-dioksanu (5 mL) in med mešanjem dodali 0.5 M NaOH (2.5 mL). Reakcijo smo pustili preko noči pri sobni T. Nato smo reakcijski zmesi dodali za konico spatule ionsko izmenjevalne smole Amberlit IR 120, mešali 20 minut in pH uravnali na 3. Smolo smo nato s presesavanjem odfiltrirali, sprali z MeOH, matičnici pa pod znižanim tlakom uparili topilo. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Spiranje smo začeli z MF: DKM/MeOH = 9/1 in nadaljevali z MF: DKM/MeOH/CH<sub>3</sub>COOH = 9/1/0.1. Dobili smo 0.178 g spojine **18**.

<b>3-(((6-(karboksi)naftalen-2-il)oksi-1-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-2-il <math>\alpha</math>-D-manopiranozid</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>31</sub> H <sub>32</sub> O <sub>11</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 580.59 g/mol <b>Izkoristek:</b> 96.0 %	<b>Izgled:</b> oranžno-rjavo strjeno olje <b>R<sub>f</sub></b> : 0.18 (MF: DKM/MeOH/CH <sub>3</sub> COOH = 9/1/0.1)
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	$\delta$ 3.62–3.66 (m, 1H, H-4), 3.80–3.84 (m, 3H, H-3, H-6, H-6'), 3.86 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.95 (d, 1H, <i>J</i> = 11.1 Hz, H-5), 4.01 (s, 1H, H-2), 4.33–4.45 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 4.54–4.59 (m, 1H, CH), 5.22 (s, 1H, H-1), 6.93 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8.9 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2.4 Hz, Ar-H), 6.98 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8.9 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2.4 Hz, Ar-H), 7.06 (d, 1H, <i>J</i> = 2.4 Hz, Ar-H), 7.15 (d, 1H, <i>J</i> = 2.0 Hz, Ar-H), 7.21 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 9.1 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2.2 Hz, Ar-H), 7.29 (d, 1H, <i>J</i> = 2.0 Hz, Ar-H), 7.63 (t, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz, Ar-H), 7.69–7.72 (m, 1H, Ar-H), 7.85 (d, 1H, <i>J</i> = 9.1 Hz, Ar-H), 8.03 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8.6 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 1.4 Hz, Ar-H), 8.43 (s, 1H, Ar-H) ppm
<b><sup>13</sup>C-NMR</b> (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	$\delta$ 56.0, 63.0, 68.5, 68.9, 69.1, 72.4, 72.5, 75.2, 75.3, 101.8, 106.5, 106.6, 107.7, 108.1, 117.4, 117.5, 120.2, 120.3, 125.9, 127.5, 128.4, 130.3, 130.4, 130.6, 131.9, 137.5, 137.6, 158.7, 159.2, 159.8, 168.4 ppm
<b>HRMS (ESI)</b>	izračunan 579.1866; izmerjen 579.1880
<b>IR (ATR)</b>	v 3263, 2935, 1701, 1628, 1607, 1541, 1515, 1463, 1387, 1255, 1208, 1133, 1096, 1053, 1019, 976, 916, 856, 829, 772, 660, 611, 552 cm <sup>-1</sup>

#### 4.19 Sinteza 3-(((6-(((3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)amino-3-oksopropil)karbamoil)naftalen-2-il)oksi)-3-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-2-il $\alpha$ -D-manopiranozida



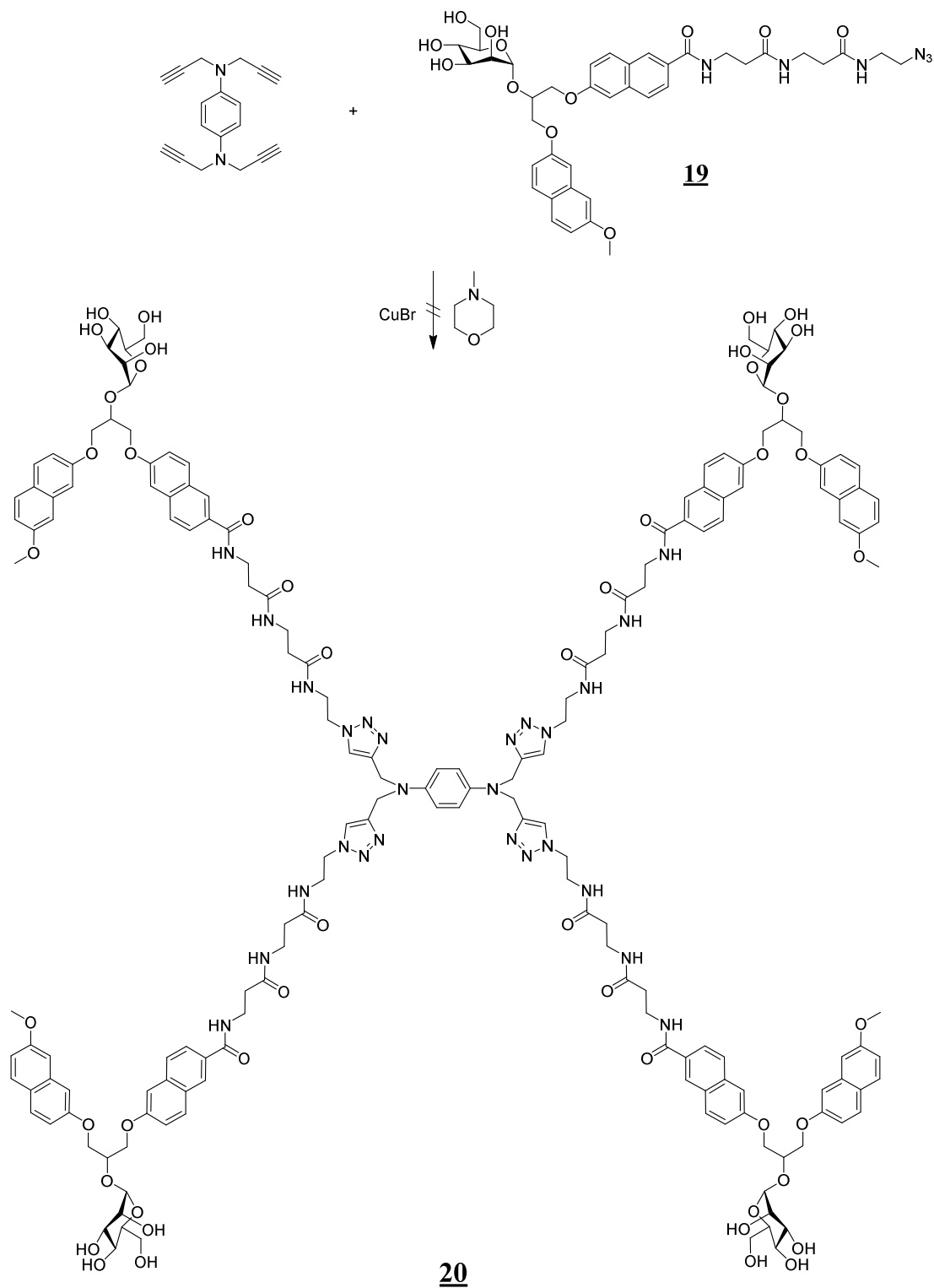
V bučko k spojini **18** (0.077 g, 0.133 mmol, 1 ekv) smo natehtali spojino **12** (0.053 g, 0.200 mmol, 1.5 ekv) in ju raztopili v DMF (4 mL). pH smo z *N,N*-diizopropiletilaminom uravnali na 8 in zmes ohladili na 0 °C. Po 15 minutah na ledu smo v bučko dodali HATU (0.066 g, 0.174 mmol, 1.3 ekv), nato pa reakcijsko zmes še 15 minut pustili na ledu. 30 minut po dodatku HATU smo izmerili pH, ki je padel na 4, zato smo ga ponovno uravnali na 8. Reakcija je pri sobni T potekala preko noči. Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom uparili topilo, preostanku v bučki pa dodali etilacetat (10 mL) in 1 M

HCl (10 mL). Zmes smo nato prelili v lij ločnik in fazi ločili. Organsko fazo smo še enkrat sprali z 1 M HCl (10 mL), nato z 1 M NaOH (20 mL), nazadnje pa še z nasičeno raztopino NH<sub>4</sub>Cl (20 mL). Organski fazi smo pod znižanim tlakom uparili topilo in produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Spiranje s kolone smo začeli z MF: DKM/MeOH = 4/1, na koncu pa smo uporabili MF: DKM/MeOH/CH<sub>3</sub>COOH = 4/1/0.1. Dobili smo 0.005 g spojine **19**.

<b>3-((6-((3-((3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)amino)-3-oksopropil)karbamoi)naftalen-2-il)oksi)-3-((7-metoksinaftalen-2-il)oksi)propan-2-il α-D-manopiranozid</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>39</sub> H <sub>46</sub> N <sub>6</sub> O <sub>12</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 790.83 g/mol <b>Izkoristek:</b> 4.76 %	<b>Izgled:</b> belo strjeno olje <b>R<sub>f</sub>:</b> 0.10 (MF: DKM/MeOH/CH <sub>3</sub> COOH = 7/1/0.1)
<b><sup>1</sup>H-NMR</b> <b>(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)</b>	δ 2.43 (t, 2H, <i>J</i> = 6.7 Hz, CH <sub>2</sub> ), 2.56 (t, 2H, <i>J</i> = 6.7 Hz, CH <sub>2</sub> ), 3.30–3.35 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 3.48 (t, 2H, <i>J</i> = 6.7 Hz, CH <sub>2</sub> ), 3.68–3.81 (m, 6H, N <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> , H-3, H-4, H-6, H-6'), 3.87–3.93 (m, 5H, OCH <sub>3</sub> , H-2, H-5), 4.35–4.52 (m, 4H, 2 × OCH <sub>2</sub> ), 4.59–4.63 (m, 1H, CH), 5.24 (t, 1H, <i>J</i> = 1.5 Hz, H-1), 6.97 (ddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8.9 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2.5 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 1.3 Hz, Ar-H), 7.04 (ddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 9.0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2.5 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 0.8 Hz, Ar-H), 7.15 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 6.9 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2.6 Hz, Ar-H), 7.24 (d, 1H, <i>J</i> = 2.5 Hz, Ar-H), 7.30 (ddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 9.0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 3.8 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 2.5 Hz, Ar-H), 7.39 (d, 1H, <i>J</i> = 2.2 Hz, Ar-H), 7.65–7.69 (m, 2H, Ar-H), 7.82–7.87 (m, 2H, Ar-H), 7.90 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 9.1 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 1.8 Hz, Ar-H), 8.31 (s, 1H, Ar-H) ppm, signala za CONH skupino v spektru ne vidimo
<b><sup>13</sup>C-NMR</b> <b>(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)</b>	δ 36.6, 36.9, 37.0, 37.8, 39.9, 51.4, 55.7, 62.8 (62.9), 68.4 (68.5), 68.7 (68.8), 69.0 (69.1), 72.3, 72.5, 75.1, 75.4 (75.5), 101.7 (101.8), 106.3, 106.4, 107.5 (107.6), 107.8 (107.9), 117.0 (117.1), 117.2 (117.3), 120.8, 120.9, 125.4 (125.5), 125.9 (126.0), 128.3, 128.7, 130.0, 130.2 (130.3), 131.7 (131.8), 137.5, 137.9, 158.5 (158.6), 159.6 (159.7), 160.0, 170.3, 174.1 ppm
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b>	izračunan 791.3252; izmerjen 791.3262



## 4.20 Poskus sinteze dendrona

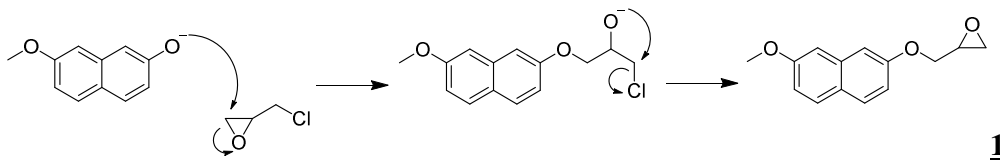


Na analitski tehtnici smo natehtali 4-(hepta-1,6-diin-4-il)-*N,N*-di(prop-2-in-1-il)anilin (0.00248 g, 0.00953 mmol, 1 ekv), dodali spojino **19** (0.03 g, 0.0379 mmol, 4 ekv) in NMM (1.04  $\mu$ L, 0.00946 mmol, 1 ekv) in jih raztopili v minimalnem volumnu etilacetata. Med mešanjem smo dodali CuBr (0.0015 g, 0.0105 mmol, 1.1 ekv) in reakcijo pustili 30 minut pri sobni T. Zaradi slabe topnosti smo reakcijski zmesi dodali nekaj kapljic DMF in H<sub>2</sub>O, nato pa še za konico spatule askorbinske kisline. Reakcijo smo spremljali s tankoplastno kromatografijo in jo po 72 urah ustavili. Pod nižanim tlakom smo uparili topilo in preostanku v bučki dodali etilacetat (5 mL), MeOH (5 mL) in organsko fazo ekstrahirali s H<sub>2</sub>O (5 mL). V organski fazi so ostale nečistote in nezreagirana izhodna spojina **19**, v vodni fazi pa je nastala siva oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem. Analiza NMR je pokazala, da oborina ni pričakovana spojina **20**.

## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

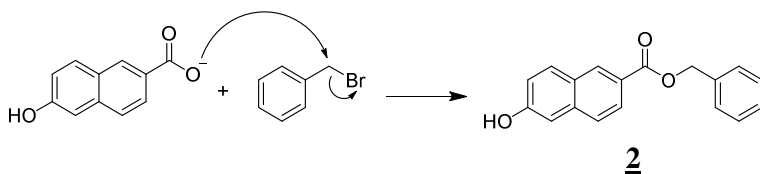
#### 5.1.1 Sinteza diarilglicerolov



**Shema 3:** Williamsonova sinteza etra

Sintezo smo začeli z Williamsonovo sintezo etra (**Shema 3**). Iz 7-metoksi-2-naftola smo s KOH pripravili 7-metoksi-2-naftolat. Slednji kot nukleofil napade sterično manj oviran ogljikov atom epoksidnega obroča epiklohidrina. V nadaljevanju ponovno poteče Williamsonova sinteza etra, tokrat intramolekularno (25, 26).

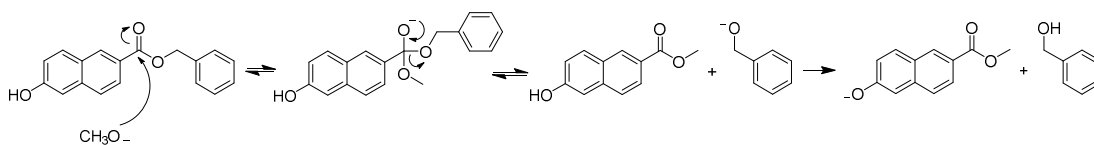
Spojino **1** smo prvič sintetizirali v dvakrat manjši količini. Po končani ekstrakciji smo organski fazi pod nižanim tlakom uparili topilo, preostanek pa raztopili v minimalni količini etilacetata in raztopino nanесли na kolono. Za spiranje smo uporabili MF: heksan/etilacetat = 4/1. V drugem primeru smo postopek želeli ponoviti, vendar se tokrat skoncentrirana organska faza v etilacetatu ni topila, ampak se je spojina oborila. Na tej stopnji smo se odločili za prekriztalizacijo spojine **1** iz etilacetata. Prekriztalizacijo smo ponovili trikrat, pri tem pa je oborina v zadnjem primeru že vsebovala sledi nečistot, zato smo prekriztalizacijo zaključili. Izkoristka sta bila v primeru čiščenja s kolonsko kromatografijo (65.6 %) in prekriztalizacije (67.5 %) primerljiva. S prekriztalizacijo bi sicer lahko še nadaljevali in produkt očistili s kolonsko kromatografijo.



**Shema 4:** Mehanizem nastanka etra

Nadaljevali smo s sintezo spojine **2**. Reakcija nastanka etra poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije preko nestabilnega tetraedričnega intermedija (**Shema 4**). Najprej smo s pomočjo cezijevega karbonata tvorili cezijevo sol 6-hidroksi-2-naftojske kisline, ki smo jo želeli osušiti in čim bolj učinkovito odstraniti vodo, saj ta lahko vstopa v reakcijo z





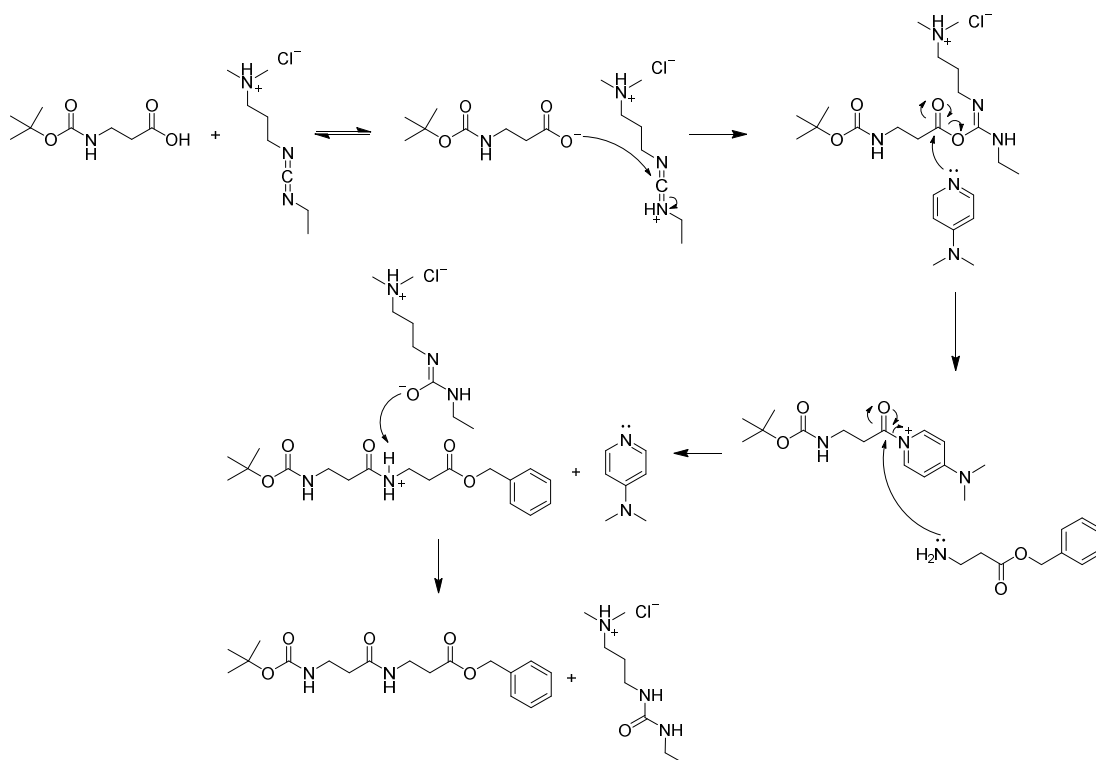
**Shema 6:** Mehanizem reakcije preestrenja

### 5.1.2 Sinteza distančnika

Na  $\text{NH}_2$  skupino aminokislina (AK) smo uvedli karbamatno zaščito. Gre za nukleofilno substitucijo, ki poteče preko nastanka nestabilnega tetraedričnega intermedata. Z dodatkom 1 M NaOH smo  $\beta$ -alanin pretvorili v natrijevo sol, ki je dobro topna vodi.  $\text{Boc}_2\text{O}$  se v vodi slabo raztaplja, dobro pa je topen v 1,4-dioksanu. Ker se topili med seboj dobro mešata, smo za reakcijo uporabili zmes vode in 1,4-dioksana. Na ta način smo zagotovili dober stik med izhodnima spojinama.

Pred dodatkom raztopine  $\text{Boc}_2\text{O}$  v reakcijsko zmes smo raztopino AK ohladili na  $10^\circ\text{C}$ . S tem smo zagotovili manjšo reaktivnost anhidrida, ki bi pri sobni T lahko reagiral z vodo, s tem pa bi prišlo do izgube reagenta.  $\text{Boc}_2\text{O}$  smo zato dodali v prebitku, v reakcijsko zmes pa smo ga dodajali po kapljicah. Če bi ga v zmes dodali naenkrat, bi lahko hkrati reagiral z AK in vodo, možna pa je tudi reakcija z nastalim karboksilatom  $\beta$ -alanina. Ker smo  $\text{Boc}_2\text{O}$  dodajali po kapljicah, je zreagiral z najboljšim nukleofilom, amino skupino  $\beta$ -alanina. Med izolacijo smo vodno fazo nakisali s HCl, da smo spojino **5** iz Na-soli pretvorili v neionizirano obliko, ki smo jo ekstrahirali v organsko fazo.

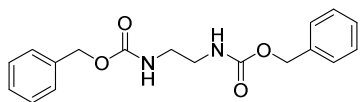
V nadaljevanju smo s pomočjo 3-(((etilimino)metilen)amino)-*N,N*-dimetilpropan-1-amonijevega klorida (EDC) s spojino **5** tvorili amid (**Shema 7**). EDC je sklopitveni reagent, ki se uporablja za aktivacijo karboksilne kisline v sintezi amidne vezi. Karboksilni skupini najprej odtegne  $\text{H}^+$ , s čimer poveča njeno nukleofilnost, sam pa s protoniranjem iminske skupine pridobi značaj močnega elektrofila. Karboksilatni nukleofil nato preko C-N dvojne vezi napade kation, pri tem pa nastane aktiviran ester. Sintezo amidne vezi lahko na tem mestu optimiziramo z uporabo pomožnega nukleofila DMAP. Šibko bazičen nukleofil s prostim elektronskim parom aromatskega dušika napade karbonilno skupino *O*-acilsečnine in tvori *N*-acil-4-dimetilaminopiridinijevo sol. Slednja je zaradi manjše elektronske gostote na karbonilnem ogljiku bolj reaktivna in hitreje reagira z aminom, ki ga šele na tem mestu dodamo reakcijski zmesi. Z uporabo DMAP se torej skrajša reakcijski čas, s tem pa tvorba stranskih produktov. Med reakcijo se obnavlja, zato ga dodamo približno 0.1 ekv (25).



**Shema 7:** Mehanizem nastanka amida z uporabo EDC

Sledila je sinteza spojine **8**. Pri reakciji med primarnim aminom in benzil kloroformiatom nastane karbamat. Reakcija je nukleofilna substitucija, ki poteče preko nestabilnega tetraedričnega intermedija. Z dodajanjem kloroformiata po kapljicah pri nizki T reakcijo usmerimo na boljši nukleofil, s tem pa zmanjšamo nastanek stranskih produktov. Raztopino benzil kloroformiata smo dokapavali 8 ur. Če bi dokapavanje pospešili ali zvišali T, bi tvegali nastanek dikarbamatnega stranskega produkta **8a** (Slika 9), za katerega glede na kromatogram predvidevamo, da je v manjši meri tudi nastal.

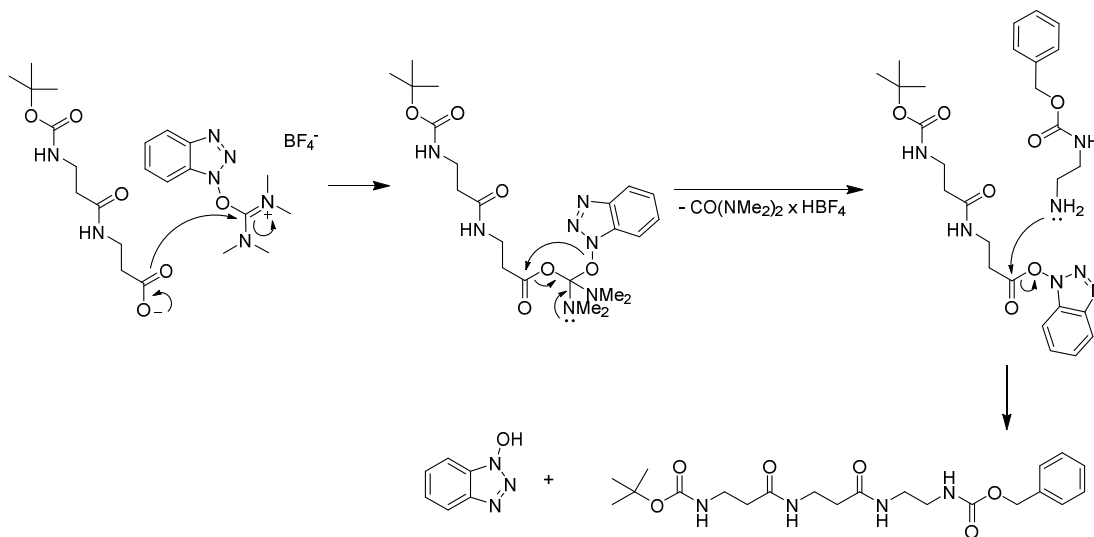
Benzil kloroformiat se uporablja za zaščito aminske skupine, pri čimer nastane benzil karbamat ali Cbz. Omogoča selektivno in kvantitativno odstranitev zaščite s katalitskim hidrogeniranjem ( $H_2$ , Pd/C). V splošnem se karbamati za zaščito aaminskih skupin uporabljajo pogosteje kot amidi, saj se odstranjujejo pri milejših pogojih (25).



**8a**

**Slika 9:** Dikarbamatni stranski produkt **8a**

Med spojinama **7** in **8** smo tvorili amidno vez, tokrat s pomočjo učinkovitega sklopitvenega reagenta *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronijevega tetrafluoroborata (TBTU). Karboksilno kislino s pomočjo baze pretvorimo v ionizirano obliko. Nastali nukleofil napade elektrofilni center TBTU-ja. Pri tem pride do odcepite 1,1,3,3-tetrametilsečnine in  $\text{HBF}_4$  ter nastane aktiviran ester. V tej stopnji v reakcijsko zmes dodamo amin, ki napade karbonilni ogljik aktiviranega estra. Odcepi se 1-hidroksibenzotriazol (HOBt) in nastane amid (**Shema 8**).



**Shema 8:** Mehanizem nastanka amida z uporabo TBTU

S katalitskim hidrogeniranjem smo z aminske skupine spojine **9** odstranili benzil karbamatno zaščito. Nastali primarni amin spojine **10** smo pretvorili v azid s pomočjo diazotransfer reagenta imidazol-1-sulfonyl azid hidroklorida. Slednji je učinkovit in za razliko od sorodnega trifilazida stabilen. Posledično ne zahteva *in situ* sinteze (28). Med reakcijo poteče prenos  $\text{N}_2$  skupine z diazotransfer reagenta na primarni amin. Reakcija poteka v bazičnih pogojih, dodatek katalitične količine  $\text{Cu}^{2+}$  pa omogoča hitrejši in zaneslivejši potek reakcije (29).

V zadnji stopnji smo azidu selektivno odstranili *tert*-butil karbamatno zaščito z acidolizo. Ker je reakcija potekala v brezvodnih pogojih, ni bilo nevarnosti za kislno hidrolizo amidov. Dobili smo spojino **12**, distančnik za vezavo monovalentnih glicerolomanozidov na nosilec za tvorbo tetravalentnega dendrona.

### 5.1.3 Odstranitev zaščite karboksilne skupine diarilglicerolov

#### KATALITSKO HIDROGENIRANJE

Reakcija poteka v vodikovi atmosferi ob prisotnosti katalizatorja. Uporabili smo Pd/C, heterogeni katalizator, ki se v reakcijskem mediju ne raztaplja. Je skeletni katalizator, ki ima zaradi številnih por veliko specifično površino na voljo za adsorpcijo H<sub>2</sub>. Kadar je masa izhodne spojine manjša ali enaka 2 g, uporabimo 10 % m/m Pd/C, v nasprotnem primeru 5 % m/m. Pd je zelo reaktiven in zahteva pozornost pri delu (25, 26).

Katalitsko hidrogeniranje smo uporabili za hidrogenolizo benzilnega estra/karbamata, selektivno odstranitev zaščite karboksilne skupine/primarnega amina. Reakcija poteče hitro in učinkovito in daje visoke izkoristke. Reakcijo smo izvajali v trogrli bučki, kjer smo skušali zagotoviti brezračne pogoje. Vanjo smo natehtali izhodno spojino in jo raztopili v ustreznem topilu, nato pa vsa tri grla zatesnili s septumi. Preko levega in desnega septuma smo namestili injekcijski igli. Z zunanje strani smo na eno iglo namestili z argonom napolnjen balon, iglo pomočili v raztopino in tako prepihali bučko. Argon je zrak izpodrinil, ta pa je sistem zapustil preko druge injekcijske igle, ki ni bila zatesnjena. V bučko smo nato dodali katalizator Pd/C in jo prepihali s H<sub>2</sub>. Argon smo izgnali zato, ker je težji od H<sub>2</sub> in bi motil stik med reaktantom in H<sub>2</sub>. Sistem smo nato zaprli in vanj uvajali H<sub>2</sub>.

Reakcijo katalitskega hidrogeniranja smo nastavili s spojino **3** v prepričanju, da gre za čisto spojino. Spojini **3** in **3a** sta namreč strukturno zelo podobni in imata posledično zelo podoben retencijski faktor. Čiščenje spojine **3** smo spremljali s tankoplastno kromatografijo in ob prisotnosti ene same lise zmotno predpostavili, da je spojina čista. Ker je v nadaljevanju izkoristek katalitskega hidrogeniranja znašal zgolj 74.5 % smo predpostavili, da je v reakcijski zmesi prisotna tudi spojina **3a**, kar smo potrdili tudi z analizo NMR. S katalitskim hidrogeniranjem spojine **3** smo želeli dobiti spojino **4**. Zaradi prisotnosti spojine **3a** reakcija ni v celoti potekla. Po končani reakciji smo zato katalizator Pd/C odfiltrirali s presesavanjem, nato pa z ekstrakcijo v etilacetat nezreagirani izhodni spojini **3** in **3a** ločili od nastalega produkta **4**. S suhim preostankom organske faze – spojinama **3** in **3a** – smo nastavili reakcijo alkalne hidrolize, pri tem pa dobili spojino **4**.

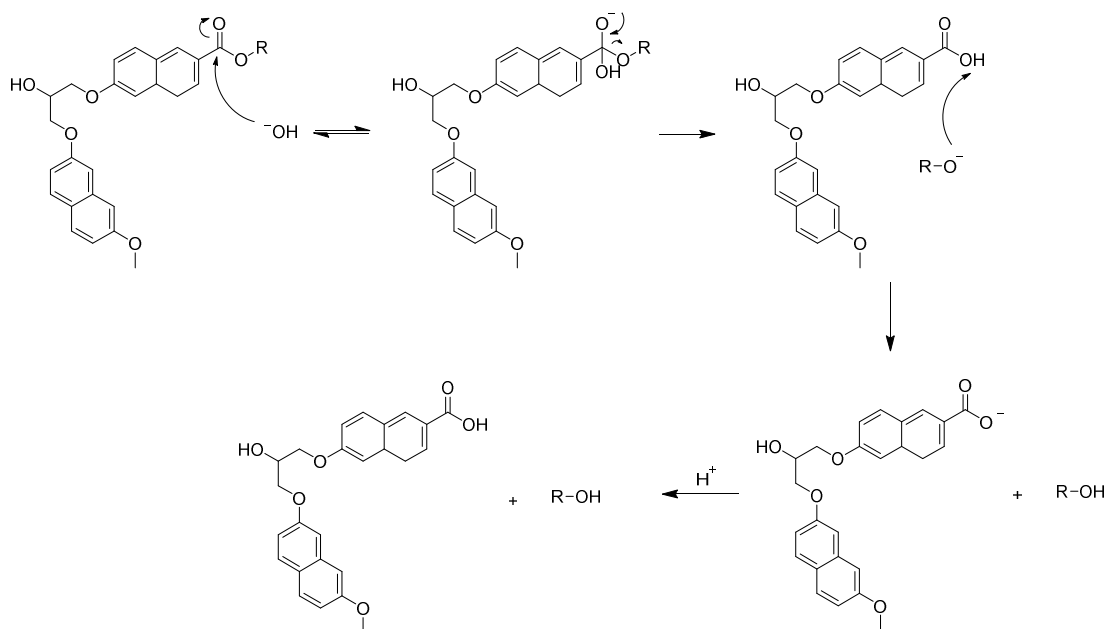
#### ALKALNA HIDROLIZA

Alkalna hidroliza estra je nukleofilna substitucija, ki poteče v prisotnosti baze v vlogi katalizatorja. Baza v tem primeru ni katalizator v pravem pomenu besede, saj se kot



reaktant med reakcijo porablja. Nukleofilna OH-skupina napade karbonilni C atom estra, pri čemer nastane nestabilni tetraedrični intermediat. Alkoholatni anion se nato odcepi, nastane karboksilna kislina, na tem mestu pa reakcija postane ireverzibilna. Alkoholatni anion karboksilni skupini odtegne proton. Z dodatkom kisline karboksilat pretvorimo nazaj v neionizirano obliko (30).

Kot topilo za reakcijo lahko uporabimo vodo, etanol in druga polarna protična topila. Zaradi težav s topnostjo smo v sistem dodali 1,4-dioksan, inertno topilo, ki se meša z vodo in etanolom (**Shema 9**).



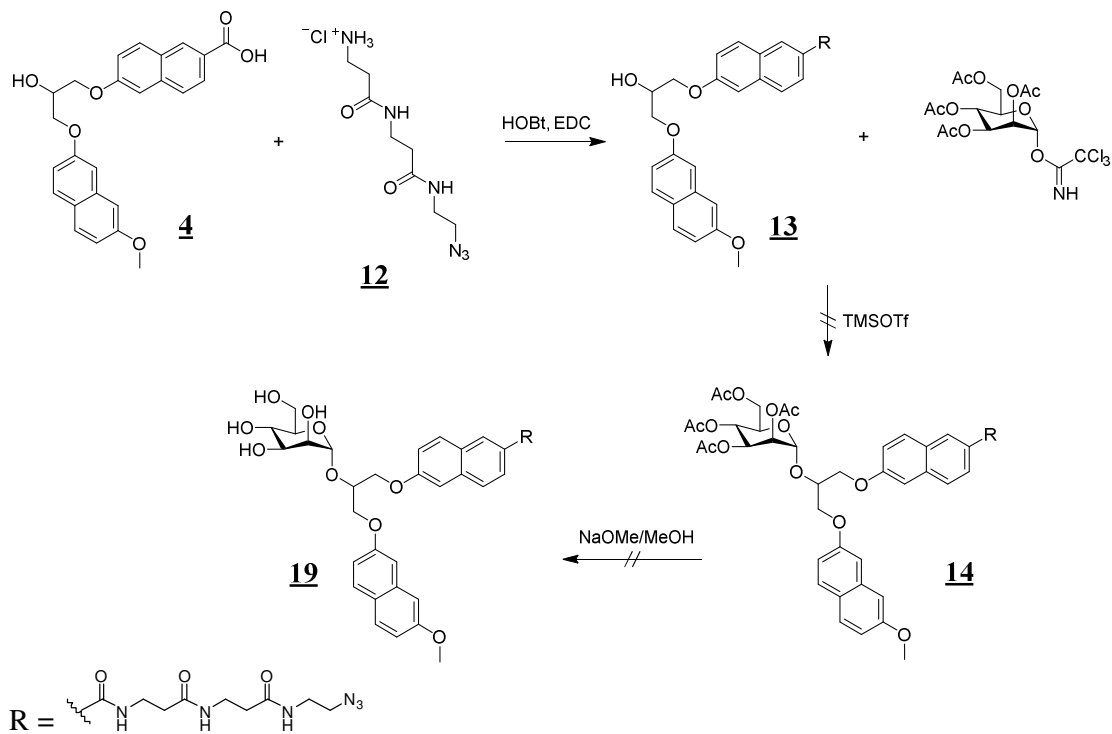
**Shema 9:** Mehanizem alkalne hidrolize estra

#### 5.1.4 Sinteza spojine **19**

Prvotni sintezni načrt se je razlikoval od načrta, ki smo mu nato sledili. Sintezo spojine **19** smo začeli z odstranitvijo zaščitne karboksilne skupine spojin **3** in **3a**. V naslednji stopnji smo med spojinama **4** in **12** v prisotnosti aktivacijskega reagenta EDC-ja in nukleofilnega katalizatorja HOBt-a tvorili amid **13**. Izolacija spojine **13** nam je povzročala veliko težav. Med ekstrakcijo se fazi v liju ločniku nista lepo ločili. Nastala je gosta emulzija, ki se je vlekla preko obeh faz. Težavo smo skušali rešiti z dodatkom trdnega NaCl. Namen je bil spremeniti ionsko moč in na ta način razbiti emulzijo. Stanja nismo izboljšali, zato smo vsebino lija ločnika spustili preko Büchnerjevega lija (nuče). V

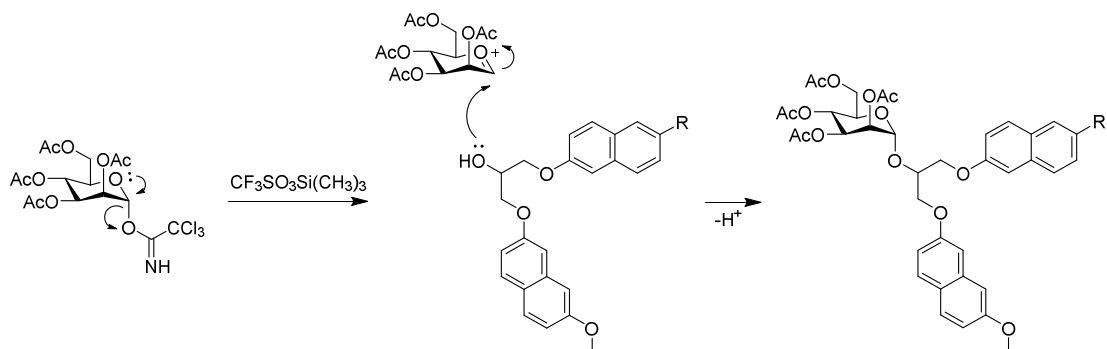
matičnici sta se, tokrat bistri, organska in vodna faza lepo ločili, na filter papirju pa je ostala oborina.

Nadalje smo načrtovali glikozilacijo glicerolne OH-skupine spojine **13**, nazadnje pa še Zemplénovo deacetilacijo OH-skupin sladkorja in s tem nastanek spojine **19**. Težave so se pojavile pri O-glikozilaciji, saj ta ni potekla (**Shema 10**). Razlog za to bi lahko bila slaba topnost spojine **13** v topilu, brezvodnem diklorometanu, ki vpliva na stereoselektivnost glikozilacije.

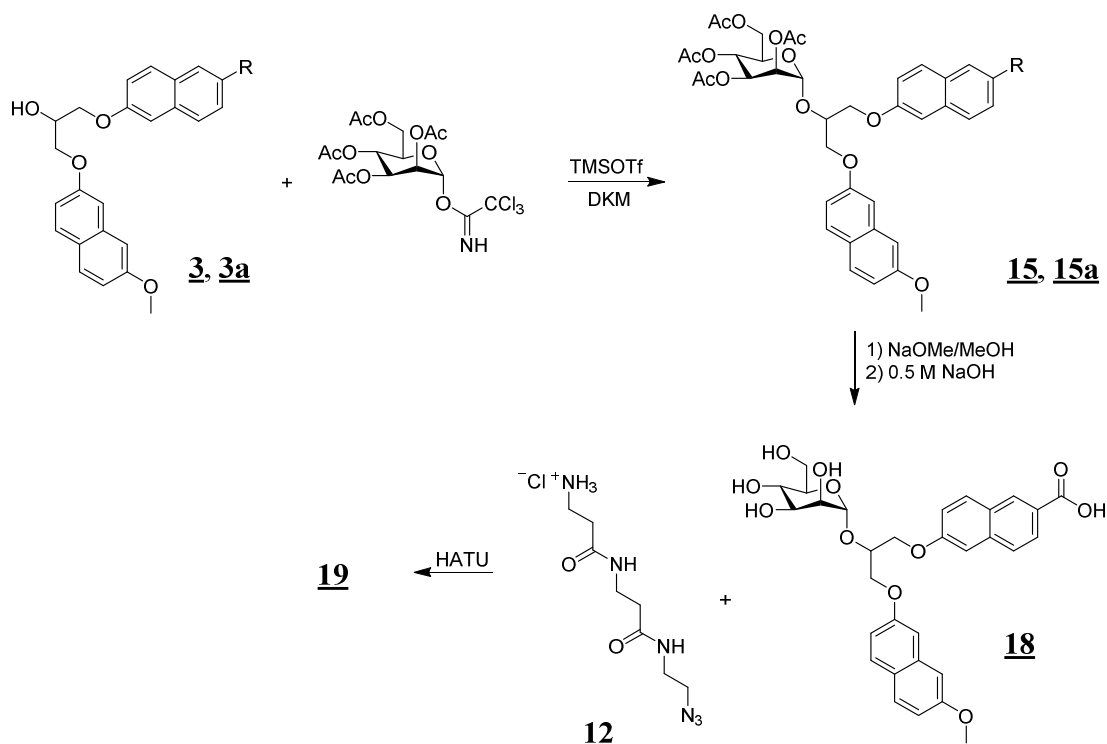


**Shema 10:** Prvotni načrt sinteze spojine **19**

Ker po začrtani poti ne bi prišli do željene spojine, smo sintezni načrt temu primerno prilagodili (**Shema 12**). Na diarilglicerol z zaščiteno karboksilno skupino smo vezali 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranozo. Reakcija glikozilacije zajema v prvi stopnji aktivacijo sladkorja v ustrezen glikozilni donator z dobro izstopajočo skupino na anomerni OH-skupini in v drugi stopnji učinkovito in stereoselektivno reakcijo z glikozilnim akceptorjem. Slednji mora imeti vse OH, razen anomerne zaščitene. Reakcijo spodbudimo z uporabo aktivatorja (**Shema 11**). Mehanizem je soroden nukleofilni substituciji  $S_N2$  (31).



Shema 11: Glikozilacija

3, 15a: R = COOCH<sub>2</sub>Ph3a, 15a: R = COOCH<sub>3</sub>Shema 12: Končni načrt sinteze spojine **19**

Kot glikozilni donor smo uporabili 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manipiranozil trikloroacetimidat, kot aktivator pa TMSOTf. Nastala glikozida **15** in **15a** sta služila kot izhodišče za sintezo spojin **17**, **18** in **20**. Čisti **15a** spojini smo acetilne estre sladkornega obroča odstranili po Zemplénovi metodi. Gre za reakcijo preestrenja, kjer uporabimo katalitično količino Na-metanolata v brezvodnem MeOH (32). Pri tem nastaneta sladkorni alkohol in metil acetat. Zaradi slabe topnosti izhodnih spojin smo v našem primeru

namesto MeOH uporabili zmes topil DKM in MeOH. Reakcija je potekla kvantitativno, čiščenje ni bilo potrebno. Dobili smo končno spojino **17**.

V nadaljevanju smo s katalitskim hidrogeniranjem čisti spojini **15** odstranili benzilni ester in načrtovali Zemplénovo deacetilacijo OH-skupin sladkorja. Tako bi sintetizirali spojino **18**. Reakcija katalitskega hidrogeniranja je potekla zelo slabo. Dobili smo zgolj 0.007 g produkta, kar pa je bilo premalo, da bi nadaljevali z deacetilacijo OH-skupin. Zmesi spojin **15** in **15a** smo v prvi stopnji z Zemplénovim preestrenjem s sladkorja odstranili acetilno zaščito, v drugi stopnji pa z alkalno hidrolizo odstranili zaščito v obliki benzilnega oz. metilnega estera. Dobili smo končno spojino **18**, ki smo jo deloma uporabili za nadaljno sintezo. V prisotnosti sklopitvenega reagenta 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinijevega 3-oksida heksafluorofosfata (HATU) smo jo preko tvorbe amidne vezi pripeli na distančnik **12**. Dobili smo spojino **19**, ki smo jo v nadaljevanju želeli pripeti na nosilec za tvorbo tetravalentnega dendrona **20**.

Sintezo smo izvajali trikrat pod različnimi pogoji z različnimi sklopitvenimi reagenti. V prvem primeru smo uporabili TBTU in po končani izolaciji dobili precejšen delež nezreagirane izhodne spojine **18**, s katero smo ponovno nastavili reakcijo. Tokrat smo skušali izboljšati pogoje z uporabo EDC v prisotnosti HOBt-a. Situacija je bila po izolaciji produkta podobna kot v prvem primeru. Zopet smo z nečisto spojino **18** nastavili reakcijo. Kot sklopitveni reagent smo uporabili HATU. Produkt smo izolirali z ekstrakcijo, nato pa ga očistili s kolonsko kromatografijo. Prisotnost sledov očetne kisline iz mobilne faze po čiščenju spojine **18** s kolonsko kromatografijo je najverjetneje razlog za slab potek reakcije. Sklopitveni reagent namesto, da bi aktiviral COOH-skupino spojine **18**, aktivira COOH-skupino očetne kisline, ki reagira z amino skupino distančnika in jo acetilira.

Ob vsaki izolaciji je na stenah bučke, v kateri je potekala reakcija, ostala neraztopljena prosojno bela oborina, ki se ni raztapljala ne v etilacetatu ne v vodi. Pred nanosom produkta na kolono pa se ni raztopila niti v MF za spiranje. S pomočjo tankoplastne kromatografije smo ugotovili, da je prosojno bela oborina nečista spojina **19**, s katero smo nastavili sintezo spojine **20**.

### 5.1.5 Sinteza dendrona

S  $\text{Cu}^+$  katalizirana Huisgen azid-alkin 1,3-dipolarna cikloadicija je klasična reakcija »klik« kemije, ki označuje hitre ireverzibilne povezave izhodnih spojin z namenom gradnje večjih učinkovitih in selektivnih molekul s pomočjo heteroatomarnih veznikov. Za tovrstne

reakcije je značilen visok izkoristek, neškodljivi stranski produkti, ki jih lahko odstranimo z nekromatografskimi metodami, regio- in stereospecifičnost, nezahtevni reakcijski pogoji, neobčutljivost na H<sub>2</sub>O in O<sub>2</sub>, lahko dostopne izhodne spojine, uporaba lahko odstranljivih topil in enostavna izolacija produkta. Reakcije potečejo hitro in kvantitativno.

V primerjavi s klasično Huisgenovo azid-alkin cikloadicijo dodani katalizator Cu<sup>+</sup> močno aktivira končni acetilen za napad na 1,3-dipol organskega azida. Pri tem za razliko od klasične Huisgenove reakcije nastane izključno 1,4-disubstituiran regioizomer. Reakcija poteče pod blagimi pogoji pri sobni T in z visokim izkoristkom. Izolacija je enostavna in temelji na uporabi nekromatografskih metod (33).

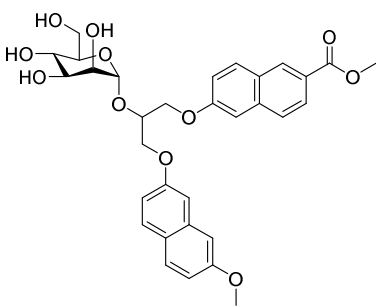
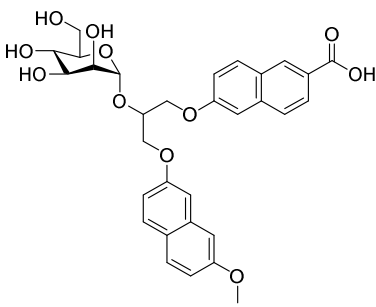
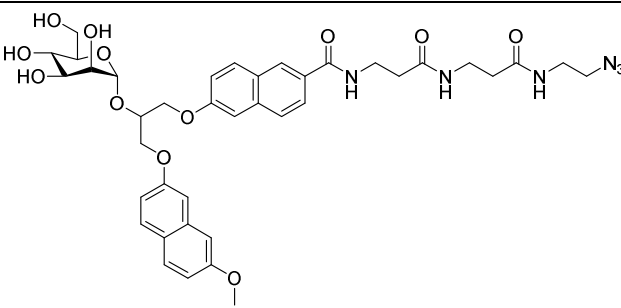
Pogoj, da reakcija dobro poteče, je raztopljenost izhodnih spojin in reagentov. V našem primeru se v etilacetatu zmes ni dobro topila. Ker lahko reakcija poteka tudi v kombinaciji topil voda/organsko topilo (alkoholi, DMSO, DMF, *t*-BuOH, aceton), smo v reakcijsko zmes dodali DMF, nato pa še vodo in natrijev askorbat. Cu<sup>+</sup> je v vodi namreč nestabilen in ga askorbinska kislina pretvarja iz Cu<sup>2+</sup> nazaj v Cu<sup>+</sup> obliko. Topnost kljub zamenjavi topila ni bila v celoti dosežena, reakcija pa ni uspešno potekla. V kolikor bi močno povečali volumen topila, bi znižali koncentracije reagentov, kar pa negativno vpliva na potek »klik« reakcije.

Po končani reakciji smo reakcijski zmesi uparili topilo, preostanek poskušali raztopiti v etilacetatu, in ker se ni raztapljal, v bučko dodali MeOH. Organsko fazo smo nato ekstrahirali z vodo, saj smo pričakovali prehod spojine **20**. Izkazalo se je, da reakcija ni bila uspešna in produkt ni nastal.

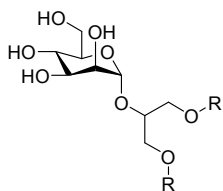
## 5.2 REZULTATI BIOLOŠKEGA VREDNOTENJA

Ovrednotili smo biološko aktivnost sintetiziranih spojin **17**, **18** in **19** na receptorjih DC-SIGN in FimH in jim določili vrednosti  $IC_{50}$ , ki so prikazane v *Preglednici 1*. Spojine smo primerjali z znanimi simetričnimi glicerolomanozidi, prikazanimi v *Preglednici 2*.

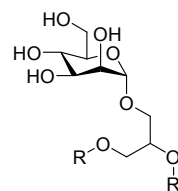
*Preglednica 1*: Rezultati vrednotenja aktivnosti spojin **17**, **18** in **19** na receptorjih DC-SIGN in FimH.

Oznaka spojine	Strukturna formula	DC-SIGN $IC_{50}$ [ $\mu$ M]	FimH $IC_{50}$ [nM]
<b>17</b>		$37 \pm 8$	79.0
<b>18</b>		$88 \pm 11$	42.0
<b>19</b>		$62 \pm 11$	/

**Preglednica 2:** Rezultati vrednotenja aktivnosti znanih simetričnih in nesimetričnih glicerolomanozidov na receptorjih DC-SIGN in FimH (22).



**TSZ-20, TSV-20, TSZ-15**



**TTD-19, TTD-21, TTD-17**

Oznaka spojine	R	DC-SIGN IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	FimH IC <sub>50</sub> [nM]
<b><u>TSZ-20</u></b>		53 $\pm$ 10	593
<b><u>TSV-20</u></b>		34 $\pm$ 8	255.2
<b><u>TSZ-15</u></b>		40 $\pm$ 30	58
<b><u>TTD-19</u></b>		> 500	63.8
<b><u>TTD-21</u></b>		395 $\pm$ 80	87.3
<b><u>TTD-17</u></b>		> 500	131.4

### 5.2.1 DC-SIGN

Med do sedaj načrtovanimi in sintetiziranimi monovalentnimi antagonisti DC-SIGN so 1,3-diariloksipropan-2-il  $\alpha$ -D-manozidi **TSZ-20**, **TSV-20** in **TSZ-15** izkazali največjo afiniteto za vezavo na CRD-domeno receptorja DC-SIGN z  $IC_{50}$  vrednostmi v mikromolarnem območju. Nasprotno njihovi nesimetrični derivati 2,3-diariloksipropan-2-il  $\alpha$ -D-manozidi aktivnosti na receptorju DC-SIGN praktično ne izkazujejo. Na podlagi tega smo se odločili za sintezo simetričnih glicerolomanozidov **17** in **18**, spojina **19** pa je nastala kot vmesna stopnja v sintezi tetravalentnega dendrona, ki ga nismo uspeli sintetizirati.

Spojina **TSV-20** izkazuje največjo aktivnost na receptorju DC-SIGN z  $IC_{50} = 34 \pm 8 \mu\text{M}$ . Uvedba elektron donorske metoksi skupine na mesto 7 obeh naftilnih enot je na afiniteto vplivala negativno, spojina **TSZ-20** vezavo gp120 na DC-SIGN zavira z vrednostjo  $IC_{50} = 53 \pm 10 \mu\text{M}$ . Zamenjava enega 7-metoksi-2-naftilnega fragmenta s 6-(metoksikarbonil)-2-naftilnim je afiniteto ponovno izboljšala, spojina **17** pa vezavo liganda zavira z vrednostjo  $IC_{50} = 37 \pm 8 \mu\text{M}$  in je primerljiva spojin **TSV-20**. Da bi izboljšali topnost, ki je v primeru znanih glicerolomanozidov slaba, smo 6-metoksikarbonilno skupino spojine **17** zamenjali s karboksilno skupino. Topnost nastale spojine **18** ( $IC_{50} = 88 \pm 11 \mu\text{M}$ ) je sicer boljša, afiniteta za vezavo na DC-SIGN pa skoraj 2.5-krat slabša v primerjavi s spojino **17**. Na karboksilno skupino spojine **18** smo preko amidne vezi pripeli distančnik. Štiri ekvivalente spojine **19** smo poskušali vezati na nosilec za tvorbo tetravalentnega dendrona in tako izboljšati afiniteto vezave liganda. Sinteza dendrona žal ni potekla, spojin **19** pa smo vseeno ovrednotili biološko aktivnost na receptorju DC-SIGN. Spojina izkazuje visoko vezavno afiniteto za DC-SIGN in je z vrednostjo  $IC_{50} = 62 \pm 11 \mu\text{M}$  primerljiva spojin **TSZ-20**. Iz tega sklepamo, da distančnik najverjetneje ne tvori interakcij s proteinom, ampak je usmerjen proti topilu. Tako omogoča pripenjanje na jedro za sintezo dendrona, ne da bi sam vplival na vezavno afiniteto.

Z monomernimi antagonisti, ki zasedejo zgolj eno domeno tetramera DC-SIGN, lahko dosežemo aktivnosti v mikromolarnem območju (3). To nam je v primeru spojin **17**, **18** in **19** uspelo in so primerljive najmočnejšim znanim monovalentnim antagonistom DC-SIGN. Ker izkazujejo visoko vezavno afiniteto, njihova polivalentna prezentacija in s tem vezava več CRD-domen tetramera DC-SIGN predstavlja potencial za učinkovito inhibicijo interakcije med gp120 virusa HIV-1 in DC-SIGN.



### 5.2.2 *FimH*

Bakterijski lektin FimH s CRD-domeno v velikosti monosaharidne enote specifično prepozna  $\alpha$ -D-manozne ostanke ligandov. Hidrofobna okolica domene CRD omogoča tvorbo dodatnih hidrofobnih interakcij s preostankom liganda. Monomerni glicerolomanozidi, ki so bili načrtovani in sintetizirani kot potencialni monovalentni antagonisti receptorja DC-SIGN, so se v preteklosti izkazali kot učinkoviti inhibitorji vezave metil  $\alpha$ -D-manopiranozida na FimH protein z aktivnostjo v nanomolarnem območju. Za razliko od receptorja DC-SIGN sta nesimetrična glicerolomanozida **TTD-19** in **TTD-21** izkazala kar 10-krat večjo aktivnost na receptorju FimH kot njuna simetrična derivata **TSZ-20** in **TSV-20** (24). Zaradi strukturne podobnosti spojin **17** in **18** z znanimi učinkovitimi antagonisti receptorja FimH smo ju biološko ovrednotili tudi na tem receptorju. Spojini **17** in **18** sta bili načrtovani in sintetizirani kot potencialna antagonista receptorja DC-SIGN in zaradi pričakovanega pomanjkanja aktivnosti, nesimetričnih derivatov nismo sintetizirali.

V primerjavi s spojino **TSV-20** ( $IC_{50} = 255.2$  nM) izkazuje spojina **TSZ-20** ( $IC_{50} = 593$  nM) z elektrondonorsko metoksi skupino na mestu 7 obeh 2-naftilnih fragmentov precej slabšo aktivnost na receptorju FimH. Z zamenjavo enega 7-metoksi-2-naftilnega fragmenta s 6-(metoksikarbonil)-2-naftilnim smo dosegli občutno povečanje aktivnosti, spojina **17** pa vezavo liganda zavira z vrednostjo  $IC_{50} = 79.0$  nM. Zamenjava metilnega estra spojine **17** s karboksilno kislino je aktivnost spojine še izboljšala, izboljšala pa se je tudi topnost. Spojina **18** vezavo metil  $\alpha$ -D-manopiranozida na FimH zavira z vrednostjo  $IC_{50} = 42.0$  nM, kar je primerljivo znanim spojinam **TSZ-15**, **TTD-19** in **TTD-21** z aktivnostjo v nizkem nanomolarnem območju. Razlog za visoko aktivnost spojin **17** in **18** je najverjetneje tvorba dodatnih interakcij z aminokislinskimi ostanki proteina FimH.

Na podlagi ugotovitve, da nesimetrična glicerolomanozida **TTD-19** in **TTD-21** v primerjavi s simetričnima **TSZ-20** in **TSV-20** izkazujejo občutno večjo aktivnost na FimH receptorju, pričakujemo, da bi s sintezo nesimetričnih derivatov spojin **17** in **18** na receptorju FimH lahko dosegli aktivnosti v še nižjih koncentracijah. Za razliko od dinaftilglicerolomanozidov, ki v svoji strukturi vsebujejo 2-naftilni fragment, smo v primeru spojin **TSZ-15** ( $IC_{50} = 58$  nM) in **TTD-17** ( $IC_{50} = 131.4$  nM), ki v svoji strukturi vsebujeta 1-naftilni fragment, ugotovili, da simetrična **TSZ-15** zavira vezavo metil  $\alpha$ -D-manopiranozida na FimH v dvakrat nižjih koncentracijah kot **TTD-17**. Med znanimi glicerolomanozidi, sintetiziranimi na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, spojina

**TSZ-15** izkazuje največjo afiniteto za vezavo na FimH, primerljivo aktivnost pa dosejata tudi sintetizirani spojini **17** in **18**.

## 6 ZAKLJUČEK

Lektin tipa C DC-SIGN je prisoten izključno na površini nezrelih dendritičnih celic. Kot vzorčno prepoznavni receptor prepozna manozo ali fukozo vsebujoče PAMP številnih mikroorganizmov in pomembno sodeluje v oblikovanju imunskega odziva. Posledično predstavlja potencialno tarčo v razvoju protimikrobnih učinkovin.

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali potencialne monovalentne antagoniste receptorja DC-SIGN, glicerolomanozide **17**, **18** in **19**. Pri eksperimentalnem delu nam je največ težav povzročala sinteza spojine **3**. Zaradi predpostavke, da preestrenje poteče v drugi stopnji reakcije, po dodatku spojine **1** h kalijevi soli spojine **2**, smo se reševanja problema lotili na napačen način, v reakcijo glikozilacije pa vstopali z zmesjo spojin **3** in **3a**. Razlog, da smo za zaščito karboksilne kisline izbrali benzilni ester, je enostavna in selektivna odstranitev zaščite s katalitskih hidrogeniranjem, ki poteče kvantitativno in ne zahteva čiščenja. Ker smo zaščito v obliki estra s karboksilne kisline odstranjevali z alkalno hidrolizo zmesi spojin **15** in **15a**, prednosti odstranitve zaščite v obliki benzilnega estra nismo mogli izkoristiti. To težavo bi lahko rešili tako, da bi že v osnovi v primeru spojine **2** namesto benzilnega tvorili metilni ester. Težave smo imeli tudi pri O-glikozilaciji spojine **13**. Ta ni potekla, zato smo morali sintezni načrt temu primerno prilagoditi, saj v nasprotnem primeru ne bi prišli do načrtovanih končnih spojin.

Sintetizirane spojine **17**, **18** in **19** izkazujejo visoko afiniteto za vezavo na CRD-domeno receptorja DC-SIGN. Aktivnost izkazujejo v mikromolarnem območju, kar je za monovalentne antagoniste, ki zasedejo zgolj eno CRD-domeno tetramera DC-SIGN, največ, kar je trenutno dosegljivo. Spojine **17**, **18** in **19** so tako primerljive najmočnejšim znanim monovalentnim antagonistom receptorja DC-SIGN. Verjamemo, da njihova tetravalentna predstavitev in posledična vezava več CRD-domen tetramera predstavlja potencial za učinkovito inhibicijo interakcije med gp120 virusa HIV-1 in DC-SIGN.

Ker so se monomerni glicerolomanozidi sintetizirani kot potencialni DC-SIGN antagonisti v preteklosti izkazali kot učinkoviti antagonisti bakterijskega lektina FimH, smo spojini **17** in **18** biološko ovrednotili tudi na tem receptorju. Spojini sta se z aktivnostjo v nanomolarnem območju izkazali kot učinkovita inhibitorja vezave metil  $\alpha$ -D-manopiranozida na FimH. Pričakujemo, da bi s sintezo nesimetričnih derivatov spojin **17** in **18** dosegli še boljšo aktivnost na receptorju FimH.

## 7 LITERATURA

1. Repnik U, Bergant M, Jeras M: Lastnosti in možnosti uporabe dendritičnih celic, antigensko specifičnih modulatorjev imunskega odziva. *Zdrav Vestn* 2004; 73: 69–72.
2. Vozelj M: Temelji imunologije, DZS, Ljubljana, 2000: 1–21, 159–194.
3. 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.
4. van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH: DC-SIGN: Escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 697–709.
5. 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 Leukoc Biol* 2011; 89: 893–905.
6. 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.
7. Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ: C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 77–84.
8. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vlist M, Geijtenbeek TB: Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to *Mycobacterium tuberculosis*, HIV-1 and *Helicobacter pylori*. *Nat Immunol* 2009; 10: 1081–1088.
9. Petrovec M, Poljak M: *Medicinska virologija, Medicinski razgledi*, Ljubljana, 2011: 219–228.
10. Wu L, KewalRamani VN: Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 859–868.
11. Humphrey MB, Lanier LL, Nakamura MC: Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone. *Immunol Rev* 2005; 208: 50–65.
12. Guo Y, Feinberg H, Conroy E, Mitchell DA, Alvarez R, Blixt O, Taylor ME, Weis WI, Drickamer K: Structural basis for distinct ligand-binding and targeting

- properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 591–598.
13. Reina JJ, Díaz I, Nieto PM, Campillo NE, Pérez JA, Tabarani G, Fieschi F, Rojo J: Docking, synthesis, and NMR studies of mannosyl trisaccharide ligands for DC-SIGN lectin. *Org Biomol Chem* 2008; 6: 2743–2754.
  14. Obermajer N, Sattin S, Colombo C, Bruno M, Švajger M, Anderluh M, Bernardi A: Design, synthesis and activity evaluation of mannose-based DC-SIGN antagonists. *Mol Divers* 2011; 15: 347–360.
  15. Moreland JL, Gramada A, Buzko OV, Zhang Q, Bourne PE: The Molecular Biology Toolkit (MBT): A modular platform for developing molecular visualization applications. *BMC Bioinformatics* 2005, 6: 21.
  16. Andreini M, Doknic D, Sutkeviciute I, Reina JJ, Duan J, Chabrol E, Thepaut M, Moroni E, Doro F, Belvisi L, Weiser J, Rojo J, Fieschi F, Bernardi A: Second generation of fucose-based DC-SIGN ligands: affinity improvement and specificity versus Langerin. *Org Biomol Chem* 2011; 9: 5778–5786.
  17. Sperling O, Fuchs A, Lindhorst TK: Evaluation of the carbohydrate recognition domain of the bacterial adhesin FimH: design, synthesis and binding properties of mannoside ligands. *Org Biomol Chem* 2006; 4: 3913–3922.
  18. Ernst B, Magnani JL: From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 661–677.
  19. Pang L, Kleeb S, Lemme K, Rabbani S, Scharenberg M, Zalewski A, Schadler F, Schwärdt O, Ernst B: FimH antagonists: Structure–activity and structure–property relationships for biphenyl  $\alpha$ -D-mannopyranosides. *ChemMedChem* 2012; 7: 1404–1422.
  20. Vanwetswinkel S, Volkov AN, Sterckx YGJ, Garcia-Pino A, Buts L, Vranken WF, Bouckaert J, Roy R, Wyns L, van Nuland NAJ: Study of the structural and dynamic effects in the FimH adhesin upon  $\alpha$ -D-heptyl mannose binding. *J Med Chem* 2014; 57: 1416–1427.
  21. Scharenberg M, Schwärdt O, Rabbani S, Ernst B: Target selectivity of FimH antagonists. *J Med Chem* 2012; 55: 9810–9816.
  22. Hajšek D, Testni sistem za določanje afinitete antagonistov receptorja DC-SIGN in vitro, Diplomsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo 2012.

23. 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. *Eur J Med Chem* 2014; 75: 308–326.
24. Vučko S, Sinteza in biološko vrednotenje glicerolomanozidov kot potencialnih antagonistov lektinov DC-SIGN in FimH, Diplomsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo 2013.
25. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmacevtska kemija III Vaje in Seminarji, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2010.
26. Smith MB: *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 7th Edition, John Wiley & Sons, 2013: 373–568, 859–1252.
27. Zeng W, Hemmasi B, Bayer E: Transesterification of the benzyl ester protecting group during purification of a protected pentapeptide. *Tetrahedron Lett* 1992; 33: 5945–5946.
28. Goddard-Borger ED, Stick RV: An efficient, inexpensive, and shelf-stable diazotransfer reagent: imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride. *Org Lett* 2007; 9: 800–3797.
29. Bräse S; Banert K: *Organic Azides: Syntheses and Applications*. John Wiley & Sons 2010: 472.
30. Dewick PM: *Essentials of Organic Chemistry: For Students of Pharmacy, Medicinal Chemistry and Biological Chemistry*, John Wiley & Sons, 2006: 221–282.
31. <http://ion.chem.usu.edu/~tchang/Chem7300/Carbohydrate/Chapter%205%20Glycosylation.pdf>, dostopano 19. 12. 2013.
32. Lindhorst TK: *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2. izdaja, WILEY-VCH, 2003: 39–77.
33. Sharpless WD, Wu P, Hansen TV: Just Click It: Undergraduate procedures for the copper(I)-catalyzed formation of 1,2,3-triazoles from azides and terminal acetylenes. *J Chem Educ* 2005; 82: 1833–1836.