

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ELVEDIN DRNDALAJ

**SINTEZA TETRAVALENTNIH DIARILGLICEROLOMANOZIDOV  
Z ETILENGLIKOLNIM DISTANČNIKOM KOT POTENCIALNIH  
ANTAGONISTOV RECEPTORJA DC-SIGN**

**SYNTHESIS OF TETRAVALENT  
DIARYLGLYCEROLOMANNOSIDES WITH ETHYLENE GLYCOL  
LINKER AS POTENTIAL ANTAGONISTS OF DC-SIGN RECEPTOR**

Ljubljana, 2015

Magistrsko naložko sem opravljal 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 Univerze v Ljubljani.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm., za vse nasvete in strokovno pomoč tako pri praktičnem delu v laboratoriju kot tudi pri pisanju magistrske naloge. Zahvaljujem se izr. prof. dr. Marku Anderluhu, mag. farm., in Andražu Lamutu, mag. farm., za biokemijsko vrednotenje spojin.

Posebna zahvala gre mojim staršem in bratu, ki so skozi celoten študij zaupali vame in me podpirali.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

Elvedin Drndalaj

Ljubljana, 2015

# VSEBINA

<b>POVZETEK .....</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>V</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 LEKTINI TIPA C .....	2
1.2 DC – SIGN .....	4
1.2.1 Vloga v celični imunosti .....	4
1.2.2 Vezava patogenov .....	5
1.2.3 Vezava virusa HIV – 1 .....	5
1.2.4 Struktura DC – SIGN .....	6
1.2.5 Vezavno mesto .....	8
1.3 ANTAGONISTI DC – SIGN .....	10
1.3.1 Monovalentni antagonisti .....	10
1.3.2 Polivalentni antagonisti .....	11
1.4 SELEKTIVNOST VEZAVE ANTAGONISTOV DC – SIGN .....	12
<b>2 NAČRT DELA.....</b>	<b>13</b>
2.1 SINTEZA DISTANČNIKA .....	14
2.2 SINTEZA MONOVALENTNIH GLICEROLOMANOZIDOV .....	15
2.3 SINTEZA POLIVALENTNIH GLICEROLOMANOZIDOV .....	17
<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 Mikrovalovni reaktor .....	20
3.2.5 Poimenovanje in risanje spojin .....	20
3.2.6 Biološko testiranje .....	21
<b>4 EKSPERIMENTALNO DELO.....</b>	<b>22</b>
4.1 Sinteza 2-(((naftalen-2-il)oksi)metil)oksisirana .....	22
4.2 Sinteza metil 6-hidroksi-2-naftoata .....	23
4.3 Sinteza metil 6-(2-hidroksi-3-((naftalen-2-il)oksi)propoksi)-2-naftoata .....	24
4.4 Sinteza 1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -acetil-D-manopiranoze .....	25
4.5 Sinteza 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoze .....	25

4.6 Sinteza 2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etan-1-ola.....	26
4.7 Sinteza 2-(2-(2-aminoetoksi)etoksi)etan-1-ola .....	26
4.8 Sinteza <i>terc</i> -butil (2-(2-(2-hidroksietoksi)etoksi)etil)karbamata .....	27
4.9 Sinteza 2,2-dimetil-4-okso-3,8,11-trioksa-5-azatridekan-13-il metansulfonata .....	28
4.10 Sinteza <i>terc</i> -butil (2-(2-(4-(2-azidoetil)piperazin-1-il) etoksi)etoksi)etil)karbamata .....	28
4.11 Sinteza 2-(2-(2-(4-(2-azidoetil)piperazin-1-il) etoksi)etoksi)etan-1-amonijevega klorida .	29
4.12 Sinteza 2-(acetoksimetil)-6-((1-((6-(metoksikarbonil)naftalen-2-il)oksi)-3-(naftalen-2-iloksi)propan-2-il)oksi)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-3,4,5-triil triacetata.....	30
4.13 Sinteza 6-(3-(naftalen-2-iloksi)-2-((-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidroksi-2 <i>H</i> -piran-2-il)oksi)propoksi)-2-naftojske kisline .....	31
4.14 Sinteza metil 6-(3-(naftalen-2-iloksi)-2-((-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)oksi)propoksi)-2-naftoata .....	32
4.15 Sinteza <i>N</i> -(2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etil)-6-(3-(naftalen-2-iloksi)-2-((-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)oksi)propoksi)-2-naftalamida .....	33
4.16 Sinteza 2-(acetoksimetil)-6-((1-((6-(2-(2-azidoetoksi) etoksi)etil)karbamoil)naftalen-2-iloksi)-3-(naftalen-2-iloksi)propan-2-il)oksi)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-3,4,5-triil triacetata.....	34
4.17 Sinteza tetrivalentnega dendrona.....	35
4.18 Odščita acetilnih skupin .....	36
<b>5 REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>38</b>
5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV .....	38
5.1.1 Sinteza diarilglicerolov .....	38
5.1.2 Sinteza distančnika .....	40
5.1.3 Glikozilacija.....	41
5.1.4 Sinteza spojin 13 in 14.....	42
5.1.5 Reakcija spojine 13 z distančnikom.....	43
5.1.6 reakcija Klik.....	45
5.2 REZULTATI BIOLOŠKEGA VREDNOTENJA.....	48
5.2.1 DC – SIGN .....	50
<b>6 SKLEP .....</b>	<b>52</b>
<b>7 LITERATURA .....</b>	<b>53</b>

## POVZETEK

DC – SIGN (za dendritske celice specifični, medcelično adhezijsko molekulo-3-vezoči ne-integrin) je lektin tipa C tipa II, ki se izraža izključno na dendritičnih celicah (DC). Kot adhezijska molekula omogoča celično migracijo in zorenje, kot receptor pa prepozna različne molekularne vzorce številnih patogenov, omogoči njihovo internalizacijo, predelavo in nazadnje vezavo na celice T. Na ta način pomembno sodeluje pri oblikovanju specifičnega imunskega odziva proti patogenom. DC – SIGN tvori močne interakcije s plaščnim glikoproteinom gp120 virusa HIV – 1. Poteče endocitoza virusa, vezanega na DC – SIGN, kjer del virusa uide razgradnji virusa v lizosomih. Zaščiten je tako, da se tvorijo endosomska multivezikularna telesca, ki splavajo na površino DC in z eksocitozo dosežejo infekcijsko sinapso. Tam lahko tvori interakcije s T celicami CD4+, kjer se razmnožuje in razsiri. DC – SIGN zato predstavlja potencialno terapevtsko tarčo v razvoju učinkovin, ki bi z antagonističnim delovanjem na receptor DC – SIGN preprečile vstop patogena v DC in posledično tudi okužbo tarčnih limfocitov CD4+.

Na osnovi dejstva, da DC – SIGN specifično prepozna D-manozne ligande, smo v okviru magistrske naloge sintetizirali monovalentne in tetrivalentne glicerolomanozide kot potencialne glikomimetične antagoniste receptorja DC – SIGN. Sladkorne enote naravnih ligandov smo deloma zamenjali z glikomimetičnimi gradniki. Ker aktivnost izkazujejo le  $\alpha$ -D-manozidi, smo z ustrezнимi reakcijskimi pogoji sintezo usmerili v selektivno tvorbo  $\alpha$ -anomerov. V nadaljevanju smo želeli s sintezo tetrivalentnega dendrona povečati avidnost. Preko vezave na ustrezen distančnik smo na nosilec za vezavo tetrivalentnega dendrona želeli pripeti štiri enote monovalentnega glicerolomanozida, kar nam je tudi 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 lektina DC – SIGN, aktivnim spojinam pa določili vrednosti IC<sub>50</sub>. Spojine so imele aktivnost v mikromolarnem območju, kar je primerljivo najmočnejšim znanim monovalentnim antagonistom DC – SIGN. Sintetizirani tetrivalentni dendroni pa so bili slabo topni, da bi lahko njihova aktivnost bila relevantna in zato vrednosti IC<sub>50</sub> niti nismo določali. Sam postopek sinteze dendronov je bil še nedavno razvit, izboljšanje topnosti pa predstavlja nov izziv za bodoče raziskovanje.

**Ključne besede:** DC – SIGN, antagonist, tetrivalentni dendron, D-manoza, HIV - 1

## ABSTRACT

Dendritic cell-specific, intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) is a type II C-type lectin expressed exclusively by dendritic cells (DC). As an adhesion molecule it enables cell migration and maturation. Furthermore, as a pattern recognition receptor 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 where part of a virus escapes lysosomal degradation. By formation of multivesicular bodies it is protected and reaches infectious synapse with exocytosis. There the virus can interact with CD4+ T-cells where it is multiplied and spreaded. Therefore, DC-SIGN represents a promising therapeutic target in the design of antagonists that would, when bound to DC-SIGN, inhibit pathogen entry in DC and consequently CD4+ cells infection.

Based upon the fact that DC-SIGN specifically binds D-mannose-based ligands, we synthesised monovalent and tetravalent 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  $\alpha$ -anomeres using suitable reaction conditions. Later on, we tried to improve the binding avidity of one of the synthesised monovalent glycerolomannosides by attaching four monovalent ligands to a tetravalent dendron core through a suitable linker. 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 of an isolated DC-SIGN extracellular domain was determined and IC<sub>50</sub> values were calculated for active compounds. With activities in the micromolar concentration, the results of activity of synthesised compounds are comparable to those of the most potent already known monovalent DC-SIGN antagonists. Synthesised tetravalent dendrons were poorly soluble, so their activity could not be determined. The procedure itself was recently developed, improving the solubility represents a new challenge for future research.

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

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>APC</b>	antigen predstavljivne celice
<b>CCR5</b>	C-C kemokinski receptor tipa 5
<b>CLEC-1</b>	lektin tipa C 1 (C-type lectin receptor 1)
<b>CRD</b>	domena za prepoznavo ogljikovih hidratov (carbohydrate recognition domain)
<b>DC</b>	dendritične celice
<b>DCIR</b>	imunoreceptor dendritičnih celic (dendritic cell immunoreceptor)
<b>DC-SIGN</b>	za dendritske celice specifični, medcelično adhezijsko molekulo-3-vezoči ne-integrin (dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non-integrin)
<b>DKM</b>	diklorometan
<b>DLEC</b>	lektin dendritičnih celic (dendritic cell lectin)
<b>EDC</b>	3-(((etilimino)metilen)amino)-N,N-dimetilpropan-1-amonijev klorid
<b>HCV</b>	hepatitis C virus
<b>HIV</b>	virus humane imunske pomanjkljivosti (human immunodeficiency virus)
<b>HOtB</b>	1-hidroksibenzotriazol
<b>ICAM</b>	medcelična adhezijska molekula (intercellular adhesion molecule)
<b>ITAM</b>	aktivacijski motiv s strukturo imunskega receptorja, ki temelji na tirozinu (immunoreceptor tyrosine based activation motif)
<b>MeOH</b>	metanol
<b>MMR</b>	manozni receptor (macrophage mannose receptor)
<b>PAMPs</b>	molekularni vzorci, značilni za patogene (pathogen associated molecular patterns)
<b>PKH</b>	poglavitni kompleks tkivne skladnosti

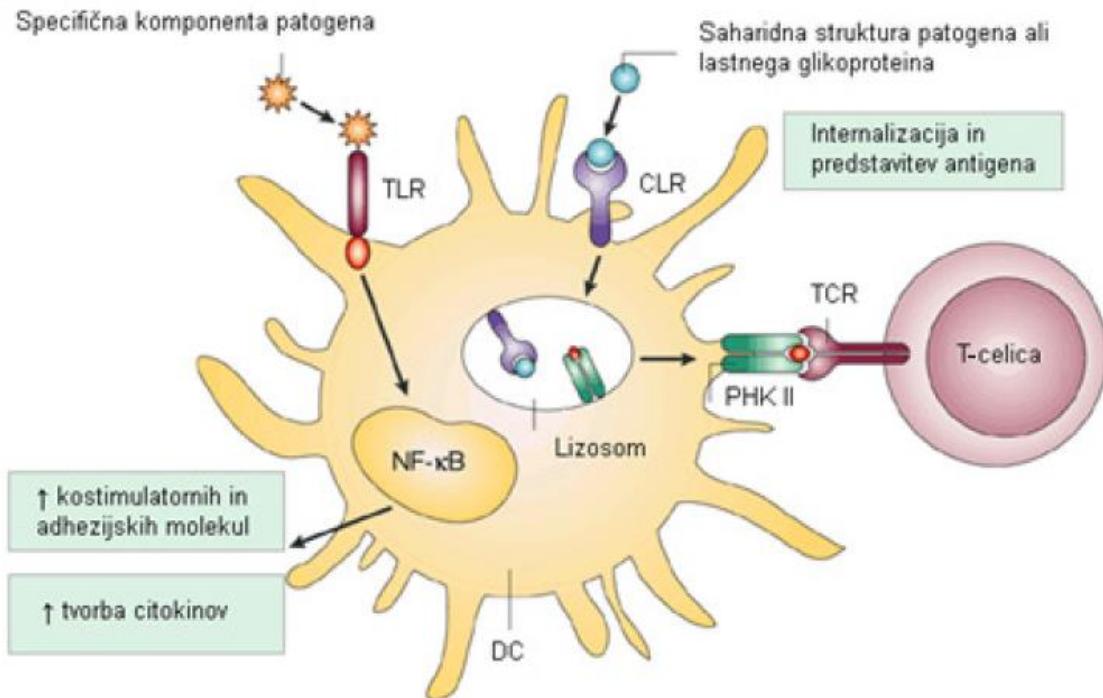
<b>PRR</b>	vzorčno prepoznavni receptor (pattern recognition receptor)
<b>TBAB</b>	tetrabutilamonijev bromid
<b>TCR</b>	receptor celic T
<b>TLC</b>	thin layer cromatography – tankoplastna kromatografija
<b>TLR</b>	tollu podobni receptorji (toll-like receptors)
<b>TMSOTf</b>	trimetilsilil trifluorometansulfonat

# 1 UVOD

Organizem se pri obrambi pred škodljivimi vplivi okolja zanaša na skupno delovanje prirojenega (nespecifičnega) in pridobljenega (specifičnega) imunskega sistema. Glavne lastnosti prirojenega imunskega sistema so sposobnost, da hitro prepozna patogen in/ali poškodbo tkiva in sposobnost, da pošlje signal prisotnosti nevarnosti celicam pridobljenega imunskega sistema. V ta sistem spadajo fagocitne celice, naravne celice ubijalke (NK), komplement in interferoni. Te celice uporabljajo raznolike receptorje, ki prepoznavajo različne molekularne vzorce, značilne za patogene (PAMPs), kot so na primer bakterijski lipopolisaharid (LPS), ogljikovi hidrati in dvojno zavita virusna RNA.

Evolucijski pritiski so priveli do razvoja pridobljenega imunskega sistema, katerega glavne lastnosti so zmožnost prerazporejanja genov družine imunoglobulinov, zaradi česar pride do velike raznolikosti za antigen (Ag) specifičnih klonov in imunološki spomin. Vendarle pa je ta visoko dovršen in močan sistem uravnavan s strani antigen predstavitevih celic (APC), med katere spadajo makrofagi, dendritične celice (DC) in limfociti B (1, 2).

Dendritične celice so profesionalne APC, ki se nahajajo na periferiji in mukoznih tkivih in delujejo kot »stražarji« proti invazivnim patogenom ter so ključne pri razvoju specifičnega imunskega odziva. DC, kot ključne APC, prepozna patogene preko receptorjev, ki prepozna različne vzorce patogenov (PRR), med katere uvrščamo tollu podobne receptorje (TLR) in lektine tipa C. Medtem, ko so TLR ključni receptorji za zorenje DC po prepoznavi patogena, kar privede do robustne aktivacije imunskega sistema, pa lektini tipa C (**Slika 1**) sodelujejo pri dodatnem oblikovanju imunskega odziva z različnimi vlogami, kot so prepoznavanje patogenov, lajšanje predstavitev antigenov, moduliranje s strani TLR inducirane aktivacije in vežejo tudi lastne antigene, kar privede do imunske tolerance (3, 4, 5).



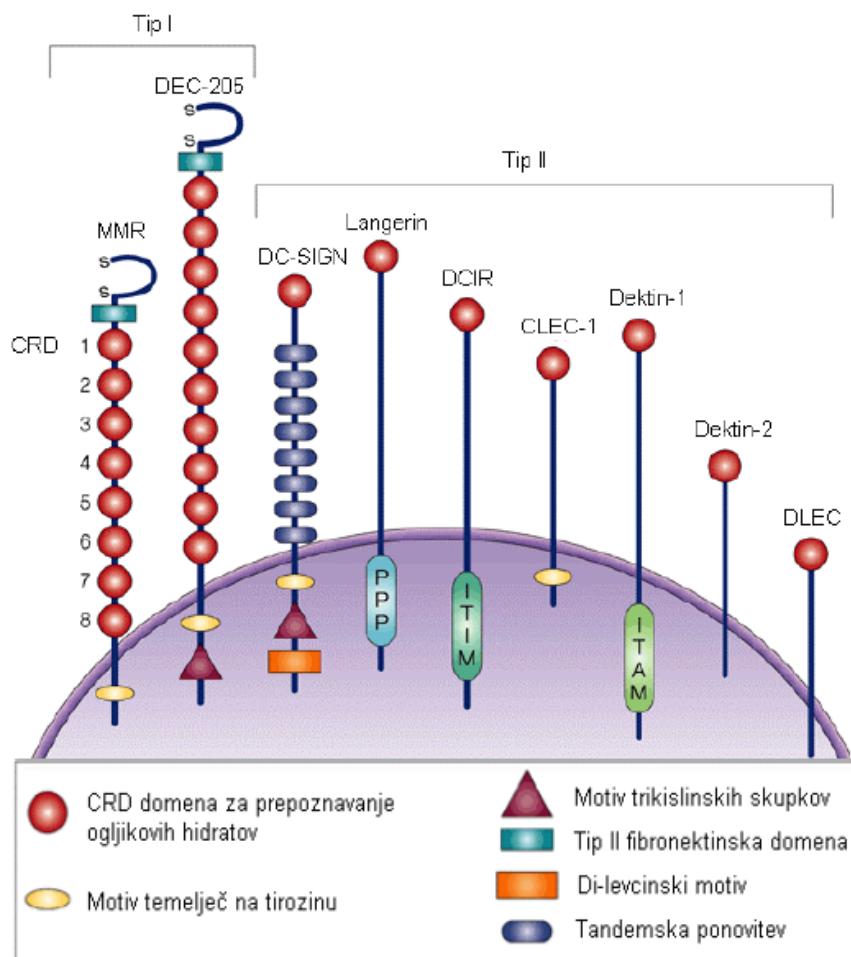
**Slika 1:** Lektini tipa C in tollu podobni receptorji, ki se nahajajo na površini DC (prirejeno po 4). Nezrele DC izražajo TLR in lektine tipa C, ki vežejo specifične komponente patogenov in ogljikove hidrate, s čimer prepozna mikroorganizme. Po prepoznavi s strani TLR se sproži signalna transdukcijska kaskada, ki preko aktivacije jedrnega dejavnika κB (NF-κB) povzroči povečano izražanje ko-stimulatorjev in adhezijskih molekul ter tvorbo citokinov, kar vodi do zorenja DC. Prepoznavanje s strani lektinov tipa C pa privede do internalizacije patogenov in znotrajceličnega procesiranja za predstavitev receptorju celic T (TCR), kar poteka preko molekul poglavitnega kompleksa tkivne skladnosti (PHK).

## 1.1 LEKTINI TIPA C

Ena izmed največjih družin lektinov, kamor spadajo razni endocitozni receptorji, proteoglikani in vsi koletkini in selektini, ki jih poznamo do danes. So poglavitnega pomena za normalno delovanje imunskega sistema, saj posredujejo prirojeno imunost, vnetje in imunost tumorskih ali z virusi okuženih celic.

Lektini tipa C, ki jih izražajo DC, so transmembranski proteini tipa I (manozni receptor (MMR) in receptor dendritičnih celic za endocitozo (DEC205)) ali tipa II za dendritske celice specifični, medcelično adhezijsko molekulo-3-vezovi ne-integrin (DC – SIGN), Langerin, dektin – 1, dektin – 2, lektin dendritičnih celic (DLEC), lektin tipa C 1 (CLEC – 1) in imunoreceptor dendritičnih celic (DCIR) (**Slika 2**). Za vse lektine tipa C je značilno, da vsebujejo domeno za prepoznavo ogljikovih hidratov (CRD). Medtem ko

manozni receptor (MMR) vsebuje 8 domen CRD, DEC205 pa 10 (tip I), imajo vsi lektini tipa C tipa II eno domeno CRD. To je kompaktna globularna struktura, ki je odgovorna za prepoznavo končnih enot velikih molekul ogljikovih hidratov. Edinstvena lastnost CRD je, da veže ogljikove hidrate preko  $\text{Ca}^{2+}$  iona, ki deluje kot most med proteinom in jedrnim monosaharidom. Aminokislinski ostanki prispevajo 6 koordinacijskih vezi, monosaharid pa prispeva 2 preko hidroksilnih skupin, tako da je  $\text{Ca}^{2+}$  ion oktakoordiniran. Na specifičnost vezave vplivajo značilni aminokislinski preostanki v CRD in struktura vratne domene, ki je odgovorna za oligomerizacijo receptorja. Kljub temu, da DC – SIGN, manozni receptor, Langerin in antigen 2 v krvnih dendritskih celicah (BDCA2) prepoznavajo različne manozne strukture, ki se razlikujejo v prostorski ureditvi in razvejanosti, vsi vsebujejo Glu – Pro – Asn v CRD. Za to je odgovorna različna stopnja oligomerizacije, saj manozni receptor tvori trimere, DC – SIGN pa tetramere (4, 7).



**Slika 2:** Lektini tipa C na površini DC. Aktivacijski motiv s strukturo imunskega receptorja, ki temelji na tirozinu (ITAM), inhibitorni motiv s strukturo imunskega receptorja, ki temelji na tirozinu (ITIM), motiv bogat s prolinom (PPP) (prirejeno po 6).

## 1.2 DC – SIGN

DC – SIGN (za dendritske celice specifični, medcelično adhezijsko molekulo-3-vezoči ne-integrin) je lektin tipa C tipa II, ki je izražen izključno na dendritičnih celicah. Ima ključno vlogo v celični imunosti, saj deluje kot adhezijska molekula, ki omogoči migracijo in zorenje DC, prepoznavanje patogenov preko PAMPs, njihovo internalizacijo in procesiranje ter vezavo na celice T. Ob vezavi liganda, DC – SIGN sproži signalne poti, ki modulirajo zorenje DC in izražanje citokinov. Veliko je takih patogenov, ki se vežejo na DC – SIGN, se internalizirajo v DC, ampak se izognejo normalni litični predelavi v endosomih DC. Ker so zaščiteni v DC, lahko preživijo neugodne razmere, dokler ne dosežejo tarčnih celic, kot so to na primer limfociti CD4+. Zaradi tega je DC – SIGN kot receptor zanimiv za razvoj novih protibakterijskih in protivirusnih učinkovin. Ker prepozna različne patogene, bi lahko učinkovina, ki se veže na DC – SIGN s svojim antagonističnim delovanjem preprečila vstop patogena v DC in posledično tudi okužbo tarčnih limfocitov CD4+ (8).

### 1.2.1 Vloga v celični imunosti

Glavna naloga DC – SIGN kot PRR je interakcija s PAMPs patogenov in njihova internalizacija, da lahko procesira, razgradi in nazadnje predstavi antigene in s tem sproži imunski odziv. Za internalizacijo patogenov vsebuje DC – SIGN različne internalizacijske motive, kot je dilevcinski motiv (Leu – Leu) in trikislinski skupek (Glu – Glu – Glu). Internalizirani patogeni so tarča lizosomov in poznih endosomov PHK razreda II, kateri potem predstavijo antigene na površini DC.

DC – SIGN tudi modulira druge PRR in s tem nadzoruje zorenje DC ob vezavi patogena. Na drugi strani pa veže adhezijske proteine, kot sta medcelična adhezijska molekula 2 in 3 (ICAM – 2 in ICAM – 3), za vzpostavitev celičnih interakcij med migracijo DC in interakcije s celicami T. DC – SIGN veže adhezijsko molekulo ICAM – 2 na vaskularnem in limfoidnem endoteliju in s tem omogoči celične interakcije med migracijo DC proti celicam T. Vezava ICAM – 3 pa omogoči antigensko nespecifičen kontakt med DC in celicami T v bližnjih limfnih vozlih in s tem stabilizira interakcije med

DC in celicami T. S tem je omogočeno, da TCR pregleda površino DC in vzpostavi interakcije z antigeni, ki so predstavljeni na PHK razreda II. DC – SIGN je ključni receptor, ki z vezavo endogenih ligandov posreduje normalne funkcije DC in tudi sodeluje v oblikovanju imunskega odziva proti različnim patogenom preko interakcij s PRR (4, 7, 8).

### **1.2.2 Vezava patogenov**

DC – SIGN prepozna glikane, ki vsebujejo manozo ali fukozo in so različno izraženi na širokem spektru bakterij, virusov, parazitov in plesni. Pri virusih, kot sta HIV – 1 in ebola, DC – SIGN prepozna plaščni glikoprotein gp120, ki vsebuje manozo v svojem N-končnem delu. Pri bakterijah, kot je *Helicobacter pylori*, DC – SIGN prepozna lipopolisaharid (LPS), ki vsebuje fukozo, pri *Mycobacterium tuberculosis* pa prepozna lipoarabinomanan, ki vsebuje manozo. Skupna lastnost teh patogenov je, da lahko povzročajo kronične infekcije, ki lahko trajajo celo življenje ter manipulirajo z razmerjem celic T pomagalk 1 in 2 (Th1/Th2), kar je ključno pri vztrajanju infekcije. DC lahko sprožijo različne efektorske mehanizme celic T, ki pa so odvisni od profila citokinov, ki se sprostijo po aktivaciji DC. Tako vezava patogenov, ki vsebujejo PAMPs z manozo, kot sta *M. tuberculosis* in HIV – 1, sproži povečano sekrecijo IL – 10, IL – 12 in IL – 6, vezava patogenov, ki vsebujejo PAMPs s fukozo, kot je *H. pylori*, pa poveča sekrecijo IL – 10, zmanjša pa sekrecijo IL – 12 in IL – 6. IL – 10 ima imunosupresivno delovanje. Zaradi tega se razmerje pomakne v smeri proti celicam Th2, kar se kaže v izmiku imunskega sistema in vztrajanju infekcije. Z antagonisti DC – SIGN bi lahko vplivali na razmerje celic Th1/Th2 v korist Th1, s čimer bi aktivirali imunski sistem, ki bi napadel in izločil patogene (4, 8, 9).

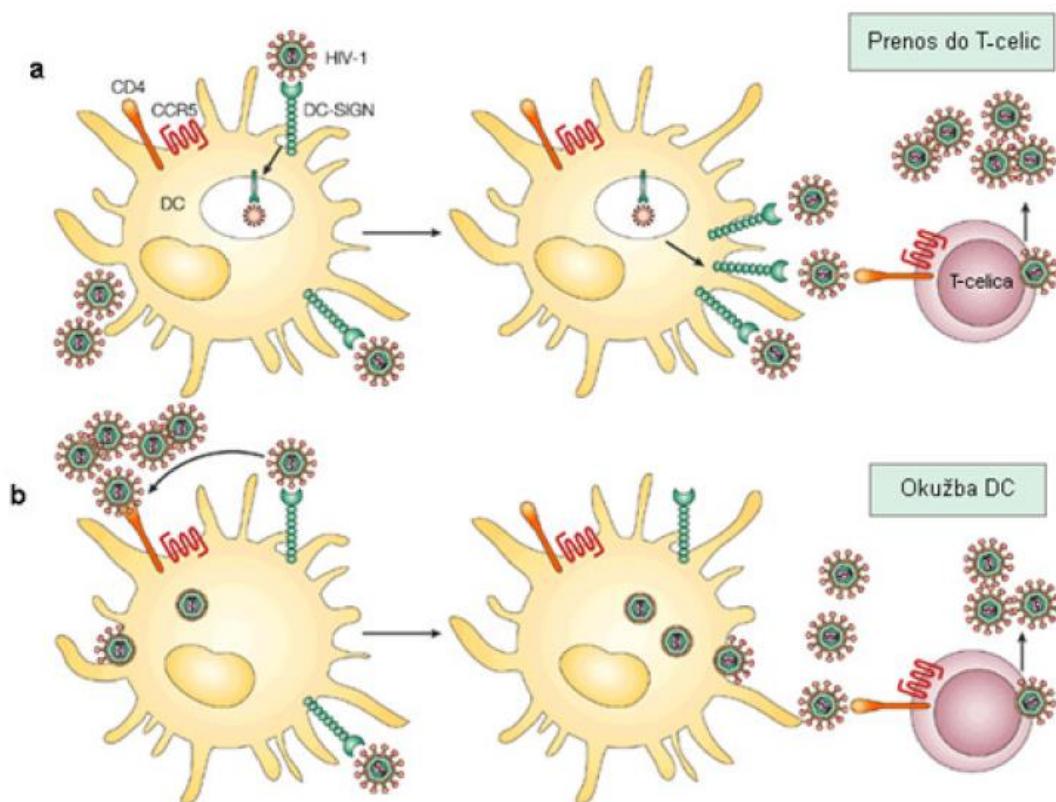
### **1.2.3 Vezava virusa HIV – 1**

Nezrele DC so ene izmed prvih celic, ki interagirajo z HIV – 1 na mestu infekcije in so glavni posredniki virusa HIV – 1 T celicam CD4+, kjer poteka razmnoževanje virusa in njegovo razširjanje. Obstaja več potencialnih mehanizmov posredovanja virusa HIV – 1.

*Trans infekcija* (**Slika 3**) poteka takrat, ko je koncentracija virusa HIV – 1 nizka. DC – SIGN tvori močne interakcije s plaščnim glikoproteinom gp120 virusa HIV – 1. Poteče endocitoza virusa, vezanega na DC – SIGN, kjer del virusa uide internalizaciji v lizosomih in posledični razgradnji virusa. Zaščiten je tako, da se tvorijo endosomska multivezikularna telesca, ki splavajo na površino DC in z eksocitozo dosežejo infekcijsko

sinapso. Tam lahko tvori interakcije s T celicami CD4+, kjer se razmnožuje in razširi. S takšnim načinom prenosa DC – SIGN poveča infekcijo celic T na hiter in efektiven način, DC pa same ostanejo neokužene. Zaradi tega se je DC prijelo ime »trojanski konj« pri okužbi z virusom HIV – 1.

Pri visokih koncentracijah virusa poteka *cis infekcija* (**Slika 3**), kjer pride do okužbe samih DC. Virus HIV – 1 najprej pride v stik z DC – SIGN, potem pa se lateralno prenese na receptor CD4+ in C-C kemokinski receptor tipa 5 (CCR5), ki sta izražena na isti DC. Posledično pride do okužbe v samih DC, razmnoževanja virusa in prenosa na T celice CD4+ (4, 10).



**Slika 3:** Okužba celic CD4+ z virusom HIV – 1 (prijejeno po 4); **a)** DC v vlogi »trojanskega konja«, kjer prenesejo in okužijo T celice CD4+ z virusom HIV – 1; **b)** direktna okužba DC preko CD4+ in CCR5 receptorja in prenos razmnoženega virusa na celice CD4+.

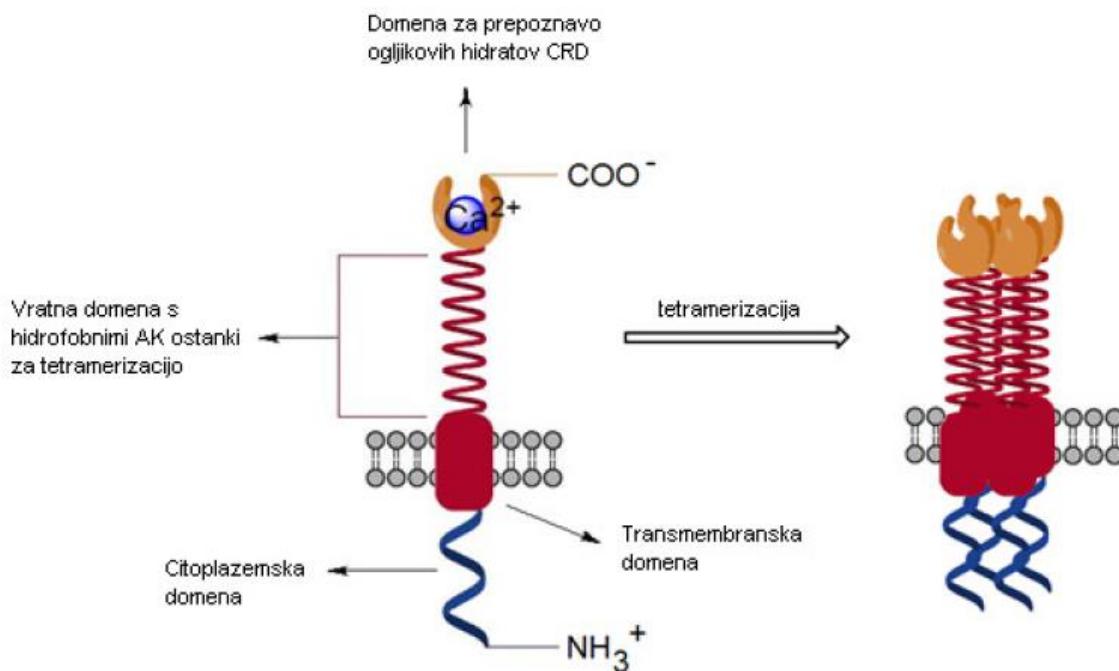
#### 1.2.4 Struktura DC – SIGN

DC – SIGN je transmembranski receptor, ki vsebuje eno CRD, ki definira specifičnost liganda, vratno domeno ter transmembranski del, ki mu sledi citoplazemski rep z internalizacijskimi in signalnimi motivi (**Slika 4**).

CRD je globularna struktura, ki je sestavljena iz 12  $\beta$ -struktur, dveh  $\alpha$ -vijačnic in treh disulfidnih mostov. Iz površine proteina štrli hidrofilna zanka, ki tvori dve vezavni mesti za  $\text{Ca}^{2+}$ , od katerih je eno ključno za konformacijo CRD, drugo pa za tvorbo koordinacijskih vezi z ogljikovimi hidrati. Štirje aminokislinski ostanki (Glu347, Asn349, Glu354 in Asn365) interagirajo s  $\text{Ca}^{2+}$  in so ključni za prepoznavanje specifičnih ogljikovih hidratov.

Vratna domena je sestavljena iz štirih povezanih verig, vsaka je sestavljena iz sedmih zaključenih in ene nezaključene tandemske ponovitve. Vratna domena je odgovorna za tetramerizacijo receptorjev, s čimer se poveča avidnost interakcij. Vratne domene imajo tudi vlogo kot pH senzor, saj skrbi za ravnotežje med monomernim in tetramernim stanjem. To pomeni, da s spremembo pH močno vplivamo na afiniteto glikanov in s tem na sprostitev patogena v kislo endosomsko okolje, kjer poteka degradacija. Tetramerizacija vratnih domen ima tudi vlogo stabilizacije CRD-jev in njihovo ločitev s površine celice, kar omogoči multivalentne interakcije z ligandi. Zaradi te organizacije in konformacijske fleksibilnosti je omogočena učinkovita in selektivna vezava različnih oligosaharidov.

Citoplazemska domena vsebuje internalizacijske motive, kot so dilevcinski motiv (Leu – Leu), trikislinski skupki (Glu – Glu – Glu) in eden nezaključeni aktivacijski motiv s strukturo imunskega receptorja, ki temelji na tirozinu (ITAM). Ti motivi prispevajo k internalizaciji virusa HIV – 1 (4, 7, 8).



**Slika 4:** Struktura DC – SIGN in tetramerizacija (povzeto po 8).

### 1.2.5 Vezavno mesto

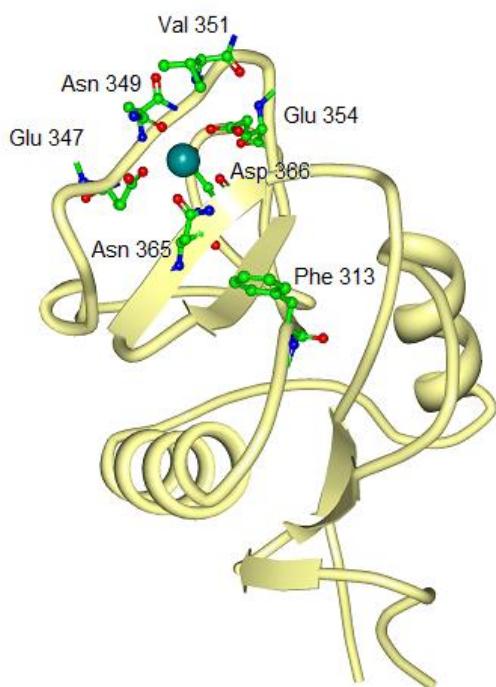
Prisotnost CRD v DC – SIGN je v skladu z vlogo receptorja pri prepoznavi ogljikohidratnih ligandov. Vezava oligosaharidov, ki imajo visoko vsebnost manoze, kaže na interakcije s patogeni, kot so HIV, ebola in virus hepatitisa C (HCV). Prepoznavanje glikanov, ki vsebujejo manozo, kaže na interakcije z *Mycobacterium tuberculosis*, glivo *Candida albicans* ali paraziti iz rodu *Leishmania*. DC – SIGN pa veže tudi fukozo vsebujoče oligosaharide, kot je lipopolisaharid, ki se nahaja na bakteriji *Helicobacter pylori*. (11).

Za razvoj specifičnih antagonistov DC – SIGN je ključno razumevanje mehanizma vezave ligandov. Ker je DC – SIGN lektin tipa C, je vezava ogljikohidratnih ligandov pogojena s  $\text{Ca}^{2+}$  ionom. Medtem ko vezavno mesto CRD nudi šest koordinacijskih vezi s  $\text{Ca}^{2+}$ , dodatni dve tvorita hidroksilni skupini na mestih tri in štiri glikanskega ostanka manoze. CRD DC – SIGN vsebuje Glu347 – Pro348 – Asn349 – Asn350 zaporedje, ki razkriva preferenco vezave monosaharidov. Z ekvatorialno lego hidroksilnih skupin na mestih tri in štiri kaže na specifičnost manozo vsebujočih ogljikovih hidratov. Ekvatorialni hidroksilni skupini poleg interakcij s  $\text{Ca}^{2+}$  ionom, tvorita tudi vodikove vezi z aminokislinskimi ostanki, ki tudi služijo kot ligandi  $\text{Ca}^{2+}$  iona. Ključna struktturna lastnost

manoznega ostanka je aksialna lega hidroksilne skupine na mestu dve. S tem je omogočena bolj tesna površinska komplementarnost med jedrno manozo in vezavnim mestom, saj je ostanek liganda bolj pomaknjen proti aminokislinskemu preostanku Phe313, ki tvori sekundarno vezavno mesto (**Slika 5**). Močnejše interakcije se zato tvorijo z razvejanimi oligosaharidi, vendar je Phe313 dokaj fleksibilen in tvori malo šibkejše interakcije tudi z linearimi oligosaharidi (7, 8).

Pri fukozo vsebujočih oligosaharidih je hidroksilna skupina na mestu 3 v ekvatorialni legi, na mestu 4 pa v aksialni legi. Zaradi tega je fukozni obroč pomaknjen bližje aminokislinskemu ostanku Val351, ki tvori van der Waalsove vezi z obema hidroksilnima skupinama. Posledično se preostali del molekule odmakne od površine proteina in ne tvori interakcij s Phe313 (11).

Način vezave ni odvisen samo od specifičnega jedrnega oligosaharida, ampak je visoko občutljiv na substituente hidroksilnih skupin in 3D strukturo sosednjih oligosaharidov. Vezavni mesti za fukozo in manozo vsebujoče oligosaharide sta si podobni in se delno prekrivata (7, 8).



**Slika 5:** Kristalna struktura CRD (prizadeleno po (11)). Peptidno ogrodje je predstavljeno z rumenim trakom, modrozeleni krogla je  $\text{Ca}^{2+}$ , aminokislinski ostanki pa so predstavljeni kot palčke, ki določajo primarno vezavno mesto in koordinativno vežejo  $\text{Ca}^{2+}$  ter Phe313 in Val351, sekundarni vezavni mesti različnih ligandov.

## 1.3 ANTAGONISTI DC – SIGN

Inhibicija interakcij glikanov na površini patogenov z antagonisti DC – SIGN je ena izmed obetavnih poti razvoja novih protimikrobnih učinkovin. Kot je bilo že omenjeno, je vezava ligandov odvisna od prisotnosti L – fukoze ali D – manoze. Njihove pomanjkljivosti, kot sta šibka aktivnost in slabe lastnosti, značilne za učinkovine (»drug-like«), lahko izboljšamo z razvojem glikomimetikov – spojin, ki posnemajo vezavo nativnih ogljikovih hidratov z veliko boljšimi »drug-like« lastnostmi. Eksperimenti na DC – SIGN so do sedaj potekali samo *in vitro*, vendar je njegov potencial kot tarča nesporen, saj bi z močnim antagonistom ne samo omogočili *in vivo* validacijo receptorja, ampak tudi popolnoma razkrili njegovo fiziološko funkcijo. Do danes so potencialni antagonisti imeli šibko vezavno afiniteto v milimolarnem, namesto v nano- oziroma mikromolarnem območju, kot je praksa pri terapevtsko uporabnih učinkovinah. Monovalentni antagonisti tvorijo interakcije z eno CRD receptorja, ki pa, kot je omenjeno zgoraj, tetramerizira. Eden izmed načinov za povečanje afinitete interakcij bi bil s sintezo polivalentnih antagonistov, ki bi teoretično lahko zasedli štiri domene CRD receptorja.

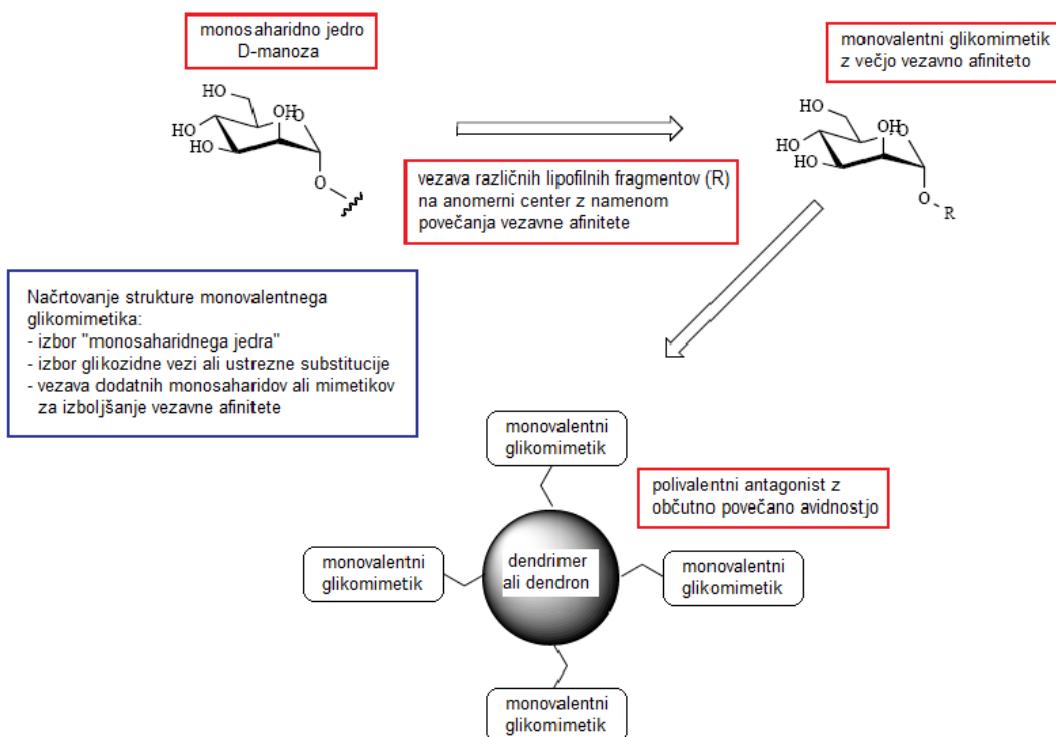
Z upoštevanjem, da je primarni kontakt med HIV – 1 in DC – SIGN vaginalna mukoza med spolnimi odnosi, bi lahko antagoniste DC – SIGN aplicirali topikalno in na ta način preprečili okužbo (7, 8).

### 1.3.1 Monovalentni antagonisti

Glavna lastnost nativnih ligandov je fukozna ali manozna monosaharidna enota, ki kompleksira  $\text{Ca}^{2+}$  ion v CRD in s tem tvori najpomembnejše interakcije v vezavnem mestu DC – SIGN. Torej se tudi pri načrtovanju antagonistov DC – SIGN zanašamo na uporabo manozidnih ali fukozidnih glikomimetikov. Med omenjenimi monosaharidi se je izkazalo, da imajo največjo afiniteto za receptor glikomimetiki na osnovi fukoze, saj edina tvori močne interakcije s CRD. Razlog za to je zgoraj omenjeni način vezave, saj postavi sekundarni saharid stran od površine proteina in s tem preostanek molekule ne more tvoriti interakcij z receptorjem. Kot alternativa pa je bila uspešno uporabljena tudi reducirana šikimska kislina, saj nudi enako prostorsko razporeditev hidroksilnih skupin na mestih 2, 3 in 4 kot D – manzo (7, 8, 14).

Kljub temu pa je razvoj antagonistov DC – SIGN potekal večinoma v smeri ligandov z D – manozo kot osnovo. To lahko pripišemo temu, da večina nativnih ligandov

ali vsebuje manozo, ali pa ima visoko vsebnost manoze. Monosaharidne enote, vezane na jedrni monosaharid, tvorijo dodatne interakcije z vezavnim mestom. Prav tako pa vplivajo na vezavno specifičnost, saj s svojo prostorsko ureditvijo premaknejo dele molekule proti ali stran od površine proteina. Sosednje monosaharidne enote ne tvorijo istih interakcij kot jedrni monosaharid, ampak tvorijo mrežo vodikovih vezi preko molekul vode. Druga možnost je, da se sosednji monosaharid prilagaja površini receptorja in z njim tvori hidrofobne interakcije. Z večanjem lipofilnosti strukturnih elementov, ki so vezani na jedrni manozi, lahko tvorimo dodatne hidrofobne interakcije s Phe313 in hidrofobnim žepom za njim. Ta pristop se pogosto uporablja za večanje afinitete antagonistov DC – SIGN (**Slika 6**) (7, 8, 13).



**Slika 6:** Razvoj večanja afinitete monovalentnih antagonistov s pripenjanjem lipofilnih fragmentov na jedrno manozo in njihova pretvorba v polivalentne antagoniste z visoko afiniteto (prirejeno po 7, 8).

### 1.3.2 Polivalentni antagonisti

Glavna slabost monovalentnih antagonistov DC – SIGN je njihova nizka afiniteta do receptorja, saj imajo tudi najmočnejše spojine inhibitorne konstante v spodnjem mikromolarnem območju. S sintezo polivalentnih antagonistov bi ta ovira lahko bila

premagana, saj bi lahko tvorili interakcije z vsemi štirimi domenami CRD tetramera DC – SIGN (**Slika 6**). Na isti način jih tvorijo tudi nativni ligandi, kot je gp120 virusa HIV – 1, ki so visoko glikozilirani in tvorijo multivalentne interakcije ter s tem povečajo avidnost. Za povečanje avidnosti bi morali polivalentni antagonisti tvoriti interakcije z vsaj dvema CRD tetramera DC – SIGN. Da bi to dosegli, je ključnega pomena prostorska razporeditev monovalentnih ligandov na polivalentnem nosilcu. Idealna izbira so dendrimeri, makromolekule z definirano globularno strukturo in zmožnostjo vezave številnih monovalentnih ligandov, ali manjši dendroni. Da bi se izognili sintezi ogromnih dendrimernih struktur, bi bila najboljša možnost tetravalentna prezentacija najbolj aktivnih monovalentnih antagonistov, saj bi bila s tem očitno povečana avidnost in preprečena interakcija receptorja s patogeni (7, 8, 13).

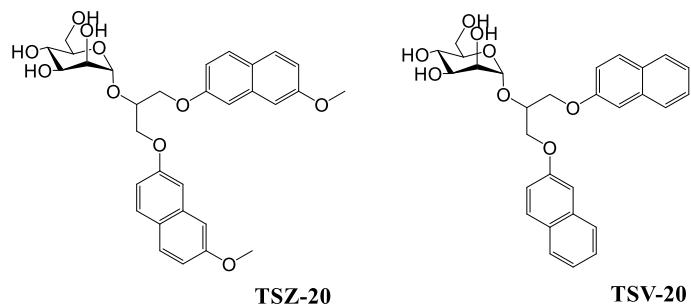
#### 1.4 SELEKTIVNOST VEZAVE ANTAGONISTOV DC – SIGN

Pri načrtovanju antagonistov DC – SIGN imamo lahko težave s selektivnostjo vezave na receptor, saj obstaja več sorodnih lektinov tipa C, ki pravtako prepozna D – manozo ali L – fukozo vsebujoče glikane na površini številnih patogenov. Dva takšna lektina, ki imata visoko afiniteto do gp120 virusa HIV – 1, sta Langerin, ki se nahaja na Langerhansovih celicah, in manozni receptor na dermalnih DC. Pri infekciji se njihova vloga razlikuje; interakcija HIV – 1 z DC – SIGN omogoči preživetje virusa, pri Langerinu pa pride do tvorbe tako imenovanih Birbeckovih granul, ki sodelujejo pri atipičnemu procesiranju antigenov. Vezava HIV – 1 na Langerin se kaže v internalizaciji in razgradnji virusa, zato ima protektivni učinek. Na drugi strani pa manozni receptor olajša infekcijo DC po CD4+/CCR5 poti. Torej prava strategija razvoja antagonistov za preprečevanje vstopa virusa HIV – 1 v DC in s tem infekcijo bi bila selektivna vezava na manozni receptor in DC – SIGN z zanemarljivo afiniteto za Langerin.

Selektivnost proti Langerinu je dosegljiva, saj se vezavno mesto razlikuje od vezavnega mesta DC – SIGN. Oba prepoznata manozo vsebujoče glikane, med njimi tudi več takih z visoko vsebnostjo manoze. Medtem ko DC – SIGN prednostno veže notranje manozne ostanke, Langerin veže tiste s končno vezano manozo s preferenco do manjših linearnih struktur. To gre pripisati različni prostorski razporeditvi CRD Langerina in DC – SIGN, saj Langerin tvori trimere, DC – SIGN pa tetramere, kot je bilo že omenjeno (7, 8, 15).

## 2 NAČRT DELA

Cilj magistrskega dela bo sinteza dendronskih tetravalentnih antagonistov receptorja DC – SIGN na osnovi do sedaj najmočnejših spojin (**Slika 7**), ki vezavo plaščnega glikoproteina gp120 virusa HIV – 1 na CRD domeno preprečujejo v nizkem mikromolarnem koncentracijskem območju. Spojine so bile sintetizirane na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.



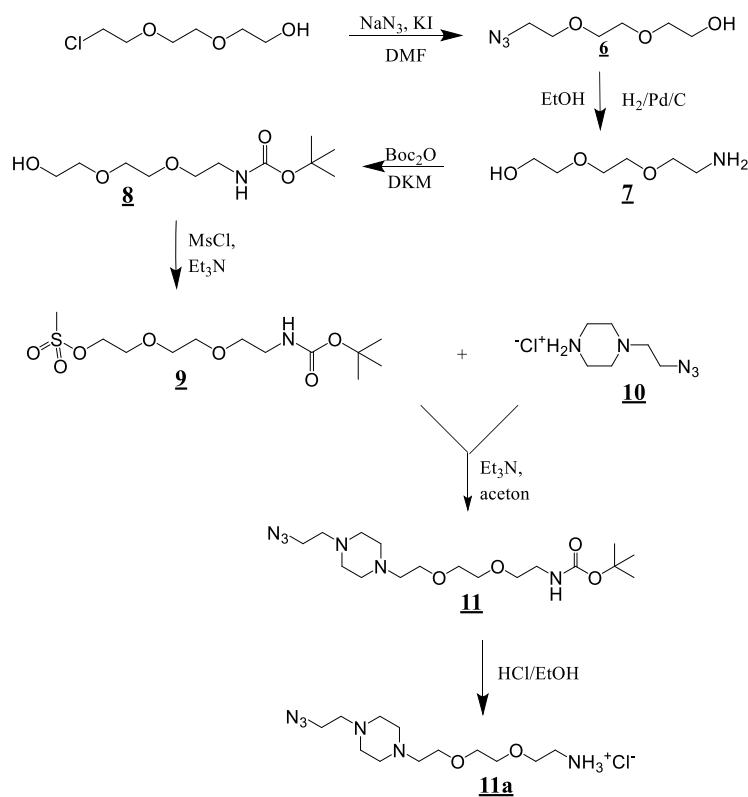
**Slika 7:** Osnovni spojini TSZ – 20 in TSV – 20 (prirejeno po 16, 17). D – manozni ostanek tvori koordinacijske vezi s  $\text{Ca}^{2+}$  v primarnem vezavnem mestu CRD, z aminokislinskimi ostanki Glu347 in Glu354 pa tvori vodikove vezi. Glicerolni del ima vlogo distančnika, da lahko aromatski enoti spojine tvorita hidrofobne in/ali  $\pi$ - $\pi$  interakcije s stransko verigo Phe313.

Torej D – manoza bo osnovna struktturna enota sintetiziranih spojin, saj tvori koordinacijske vezi s  $\text{Ca}^{2+}$  v primarnem vezavnem mestu CRD DC – SIGN. Za povečanje vezavne afinitete bomo preko glicerolnega veznika pripeli dve naftilni enoti, od katerih bo ena imela karboksilno skupino. Naftilni enoti bosta imeli vlogo tvorbe hidrofobnih in/ali  $\pi$ - $\pi$  interakcij z aminokislinskim ostankom Phe313 in hidrofobnim žepom za njim (16, 17).

Pričakujemo, da bo imel monovalentni glikomimetik s karboksilno skupino ali njenim estrom antagonistično aktivnost na DC – SIGN. Karboksilna kislina tega monovalentnega antagonista pa nam bo preko tvorbe amidne vezi omogočala vezavo distančnika, ki ga bomo v končnih stopnjah sinteze pripeli na nosilec za tvorbo tetrivalentnega dendrona, s čimer želimo povečati avidnost vezave.

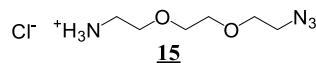
## 2.1 SINTEZA DISTANČNIKA

Najprej bomo kloridno skupino pretvorili v azidno, ki jo bomo nadalje z metodo katalitskega hidrogeniranja reducirali v spojino **7**. Aminsko skupino bomo zaščitili v obliki *t*-butilkarbamata (Boc) in dobili spojino **8**, ki ji bomo hidroksilno skupino z metansulfonil kloridom (MsCl) pretvorili v dobro izstopajočo metansulfonatno skupino in tako dobili spojino **9**. V naslednji stopnji bomo dodali spojino **10** in trietilamin ter dobili spojino **11**. Sledila bo samo še odščita Boc s plinastim HCl v etanolu in dobili bomo distančnik **11a** (**Shema 1**).



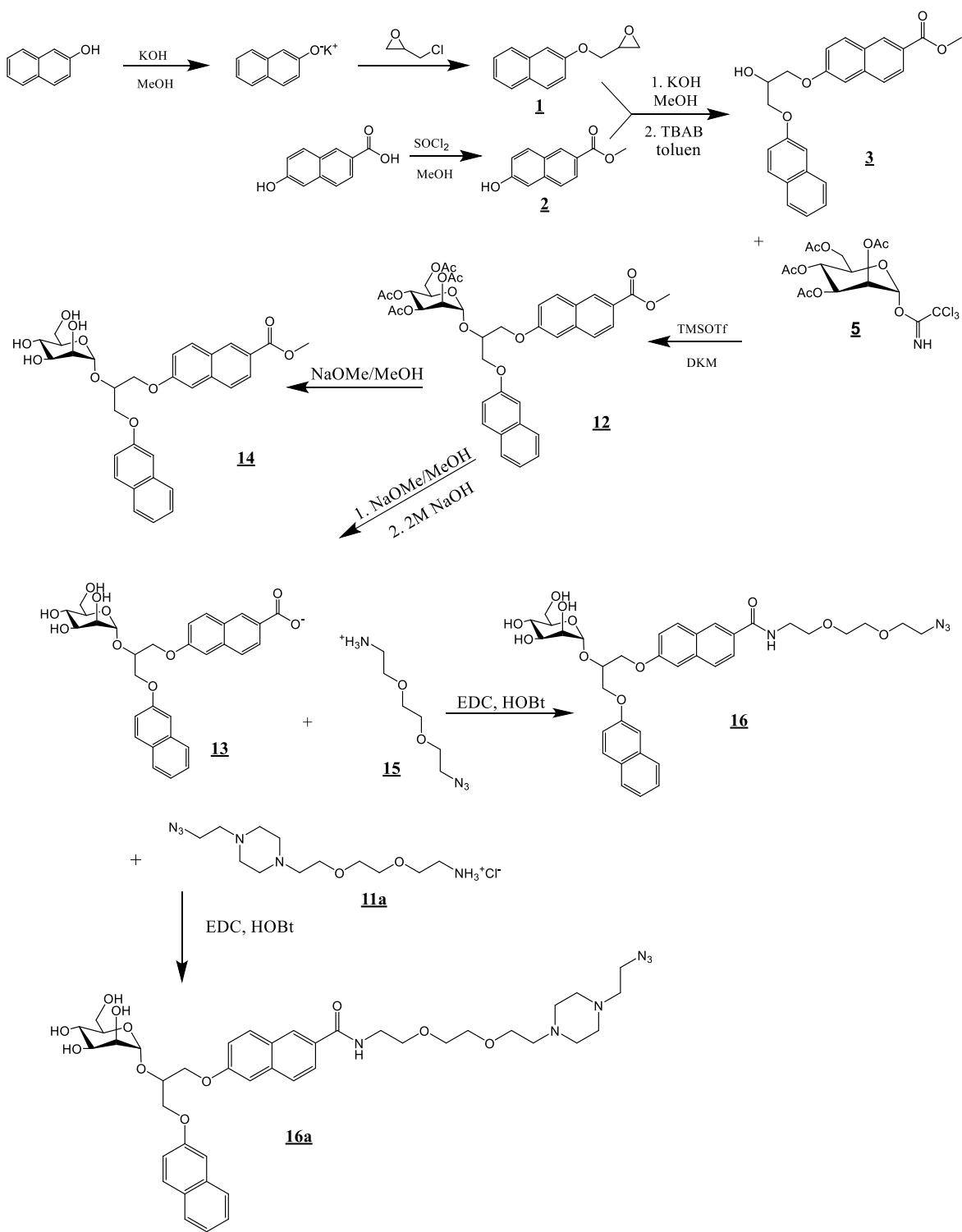
**Shema 1:** Sinteza distančnika **11a**, preko katerega bomo monovalentni glicerolomanozid pripeli na nosilec za tetravalentni dendron.

Na voljo pa imamo tudi že pripravljen distančnik **15**, ki je bil sintetiziran v okviru druge magistrske naloge (30).



## 2.2 SINTEZA MONOVALENTNIH GLICEROLOMANOZIDOV

Najprej bomo na 2-hidroksi-naftolu tvorili močnejši nukleofil s KOH, ki bo napadel sterično manj ovirano in bolj elektrofilno CH<sub>2</sub> skupino epiklorhidrina in tako dobili spojino **1**. Spojino **2** bomo dobili tako, da bomo karboksilno skupino s pomočjo SOCl<sub>2</sub> in MeOH pretvorili v metilni ester. Nato bomo hidroksilno skupino spojine **2** s KOH pretvorili v močnejši nukleofil, ki bo lahko napadel aktivirano CH<sub>2</sub> skupino oksiranskega obroča spojine **1**. 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranozo bomo vezali na nastali diariglicerol **3** v prisotnosti aktivatorja trimetilsilil trifluorometansulfonata (TMSOTf) in dobili spojino **12**. Delu nastale spojine bomo z Zemplénovo metodo odščitili acetilne skupine manopiranoze in dobili spojino **14**, preostalemu delu spojine pa bomo poleg odščite acetilnih skupin hidrolizirali še metilni ester v karboksilat z 2 M NaOH in dobili spojino **13**, katero bomo uporabili za pripenjanje dveh različnih distančnikov. S pomočjo 3-(((etilimino)metilen)amino)-*N,N*-dimetilpropan-1-amonijevega klorida (EDC) bomo karboksilno skupino pretvorili v aktivirani ester, ki bo lahko tvoril amidno vez z distančnikom **15** in dobili spojino **16** oziroma bomo tvorili amidno vez z distančnikom **11a** in dobili spojino **16a**. Potencialni monovalentni antagonisti DC – SIGN so spojine **16**, **16a**, **13** in **14** (**Shema 2**).

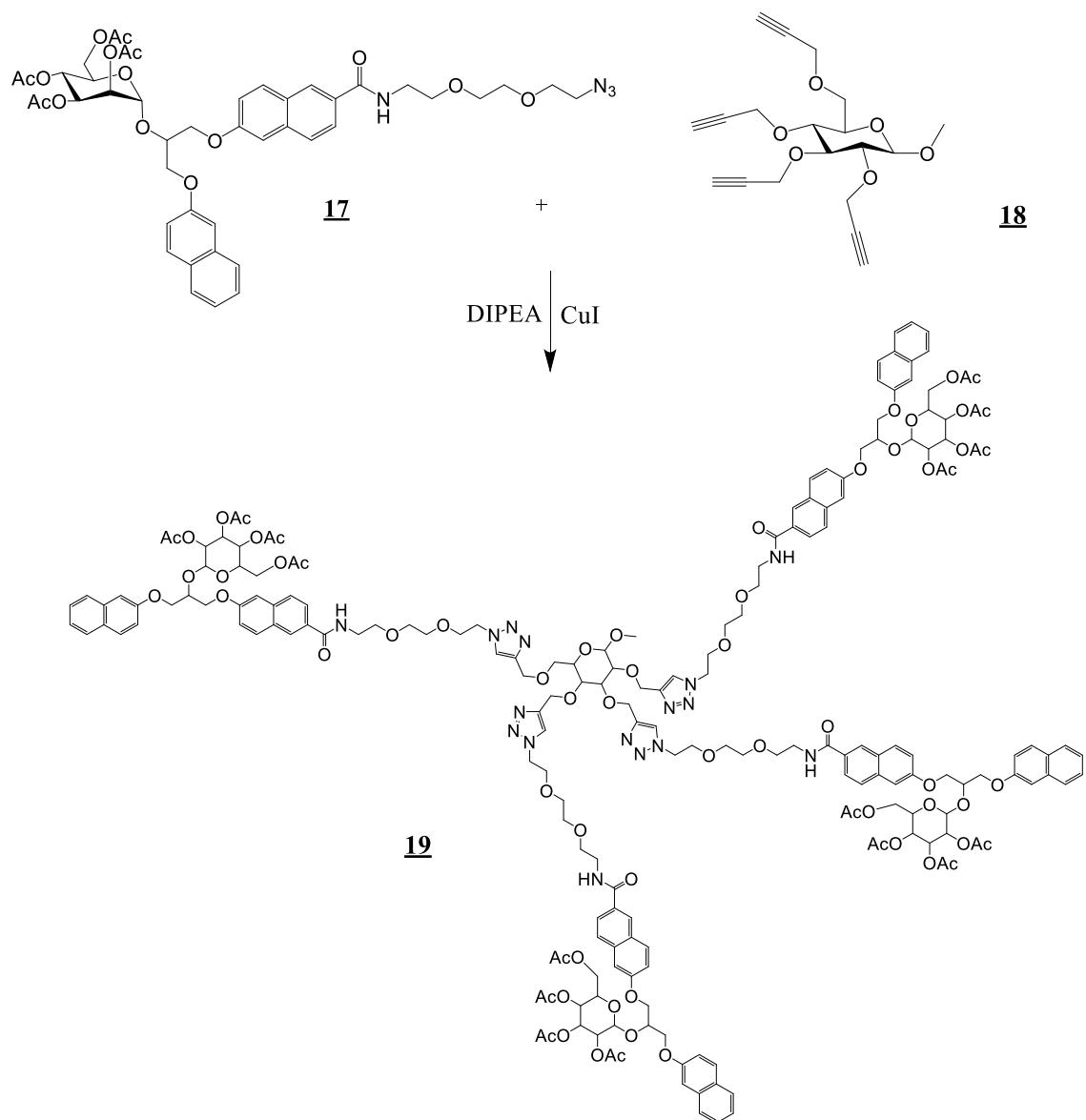


**Shema 2:** Sinteza potencialnih monovalentnih antagonistov DC – SIGN.

## 2.3 SINTEZA POLIVALENTNIH GLICEROLOMANOZIDOV

Spojinama **16** in **16a** bomo ponovno zaščitili hidroksilne skupine manoze z acetilnimi skupinami s pomojo acetanhidrida in dobili spojino **17** oziroma **17a**, da bomo lahko sintetizirali tetrivalentni dendron. Štiri enote spojine bomo pripeli na nosilec **18** s katalizatorjem CuI in *N,N*-diizopropiletaminom (DIPEA) v mikrovalovnem reaktorju. Spojinama **19** in **19a** (**Shema 3**) bo potrebno odščititi še acetilne skupine s pomočjo NaOMe in MeOH, tako bomo dobili končni spojini **20** in **20a**. S tetrivalentno predstavljivijo monovalentnega glicerolomanozida bomo poskusili doseči večjo avidnost vezave na receptor DC – SIGN.

Sintetizirane končne spojine bomo biokemijsko ovrednotili z *in vitro* testnim sistem, ki ga je razvil David Hajšek v okviru svojega diplomskega dela. Antagonistom receptorja DC – SIGN bomo najprej z dvotočkovnim testom določili, katere spojine so sploh aktivne. Aktivnim spojinam pa bomo potem še določili vrednost IC<sub>50</sub>, to je koncentracija spojine, ki povzroči 50% inhibicijo vezave nativnega liganda gp120 virusa HIV – 1 na DC – SIGN (16).



**Shema 3:** Sinteza tetrivalentnega dendrona - kot primer je prikazana shema z uporabo distančnika **15**.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu v laboratoriju smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, TCI in Sigma – Aldrich. Brezvodni metanol smo pripravili predhodno z destilacijo v prisotnosti KOH v argonovi atmosferi ter ga shranjevali nad aktiviranimi molekularnimi siti. Brezvodni DKM smo pripravili tik pred uporabo v argonovi atmosferi in v prisotnosti CaH<sub>2</sub> ter ga destilirali direktno v bučko k izhodnim reagentom.

### 3.2 METODE

#### 3.2.1 *Kromatografske metode*

- *Kolonska kromatografija*

Končne spojine posameznih stopenj smo čistili s »flash« kolonsko kromatografijo. Glede na količino posameznih reagentov in pričakovano količino 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 spojin smo uporabili različne mobilne faze, katerih pretok smo pospešili z uvajanjem nadtlaka.

- *Tankoplastna kromatografija*

Tankoplastno kromatografijo (TLC) smo uporabili za spremljanje poteka reakcij in izolacije produktov, na podlagi TLC smo izbrali tudi 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 F254 z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu, same mobilne faze so bile različne, navedene so pri sinteznih postopkih posameznih spojin. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabili UV – svetlobo z valovno dolžino  $\lambda = 254$  nm ali  $\lambda = 366$  nm ter orositvena reagenta ninhidrin in fosfomolibdensko kislino.

### **3.2.2 Spektroskopske metode**

- **Jedrska magnetna resonanca (NMR)**

$^1\text{H}$  in  $^{13}\text{C}$  – NMR spektre sintetiziranih spojin smo posneti na Bruker Avance III 400 MHz spektrofotometru na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorce spojin smo raztopili v devteriranih topilih  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{MeOD}-d_4$  ali  $\text{DMSO}-d_6$ . Kot interni standard je bil uporabljen tetrametilsilan (TMS), spektre pa smo reševali s programom MestRe-C 4.8.6. proizvajalca Mestrelab Research S. L.

- **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.

- **Infrardeča spektroskopija**

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

### **3.2.3 Temperatura tališča**

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

### **3.2.4 Mikrovalovni reaktor**

Za nekatere sinteze smo uporabili mikrovalovni reaktor CEM Discover z IR načinom merjenja temperature.

### **3.2.5 Poimenovanje in risanje spojin**

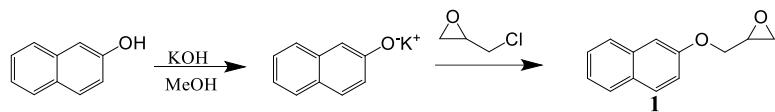
Za poimenovanje in risanje struktturnih formul spojin smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 12.0 proizvajalca CambridgeSoft.

### **3.2.6 Biološko testiranje**

Afiniteta spojin za vezavo na DC-SIGN je bila določena z *in vitro* testnim sistemom, ki ga je razvil David Hajšek (16) pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm. Na mikrotitrsko ploščico smo najprej vezali ekstracelularno domeno receptorja DC – SIGN in s tem blokirali prosta vezavna mesta. Nato smo nanesli raztopine antagonistov, takoj za tem pa v najkrajšem možnem času še z biotinom konjugirani gp120. Nato je sledil nanos protiteles proti biotinu, ki je bil konjugiran s hrenovo peroksidazo, nazadnje pa še nanos substrata za peroksidazo. Na podlagi kemiluminiscenčnega odziva smo določili odstotek vezave naravnega liganda. Kot pozitivna kontrola je bila uporabljena L – fukoza, ki je preprečila vezavo gp120 na CRD receptorja DC – SIGN z vrednostjo  $IC_{50} = 2,95$  mM. Z računalniškim programom Microsoft Excel smo obdelali rezultate in določili vrednosti  $IC_{50}$ , to je 50% inhibicijo vezave naravnega liganda gp120 na receptor DC – SIGN (16, 17).

## 4 EKSPERIMENTALNO DELO

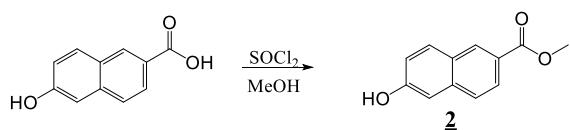
### 4.1 Sinteza 2-(((naftalen-2-il)oksi)metil)oksirana



V bučko smo natehtali 2-naftol (2,959 g, 20,5 mmol, 1 ekv) in ga raztopili v metanolu (30 mL). Dodali smo KOH (1,152 g, 20,5 mmol, 1 ekv), počakali, da se je raztopil in nato raztopini pod znižanim tlakom uparili topilo. Nastali kalijevi soli 2-naftola smo dodali epiklorhidrin (16,1 mL, 205 mmol, 10 ekv) in na oljni kopeli mešali pri 60 °C 30 minut. Ko se je reakcijska zmes ohladila, smo pod znižanim tlakom uparili topilo, preostanek pa raztopili v 50 mL nasičene raztopine NaCl in ekstrahirali z DKM (2 × 100 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Sledila je prekristalizacija, kjer smo preostanek med segrevanjem raztopili v minimalni količini etilacetata, nato pa dodajali heksan. Ko se je začela pojavljati oborina, smo postopek zaključili, bučko pa čez noč postavili v hladilnik, da je izpadlo več produkta. Izpadli produkt smo odfiltrirali z odsesavanjem in sprali s heksanom. Matičnici smo uparili topilo in ponovili postopek prekristalizacije. Dobili smo 3,287 g spojine **1**.

2-(((naftalen-2-il)oksi)metil)oksiran	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	<b>Izgled:</b> beli kristali
M <sub>r</sub> = 200,24 g/mol	R <sub>f</sub> : 0,40 (MF: heksan/etilacetat = 1/1)
<b>Izkoristek:</b> 80,0 %	<b>Tališče:</b> 90 ± 2 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ 7.74-7.81 (m, 3H, Ar-H), 7.47 (ddd, 1H, J <sub>1</sub> = 1.3 Hz, J <sub>2</sub> = 6.9 Hz, J <sub>1</sub> = 8.2 Hz, Ar-H), 7.37 (ddd, 1H, J <sub>1</sub> = 1.2 Hz, J <sub>2</sub> = 6.9 Hz, J <sub>3</sub> = 8.1 Hz, Ar-H), 7.21 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 2.6 Hz, J <sub>2</sub> = 8.9 Hz, Ar-H), 7.17 (m, 1H, Ar-H), 4.38 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 3.1 Hz, J <sub>2</sub> = 11.0 Hz, OCH <sub>2</sub> -H <sub>B</sub> ), 4.11 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 5.7 Hz, J <sub>2</sub> = 11.0 Hz, OCH <sub>2</sub> -H <sub>A</sub> ), 3.44-3.48 (m, 1H, oksiran-CH), 2.98 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 4.1 Hz, J <sub>2</sub> = 4.9 Hz, oksiran-CH <sub>2</sub> -H <sub>B</sub> ), 2.85 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 2.7 Hz, J <sub>2</sub> = 4.9 Hz, oksiran-CH <sub>2</sub> -H <sub>A</sub> ) ppm	
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ 44.8, 50.1, 68.7, 106.8, 118.8, 123.8, 126.4, 126.8, 127.7, 129.1, 129.5, 134.4, 156.4 ppm	

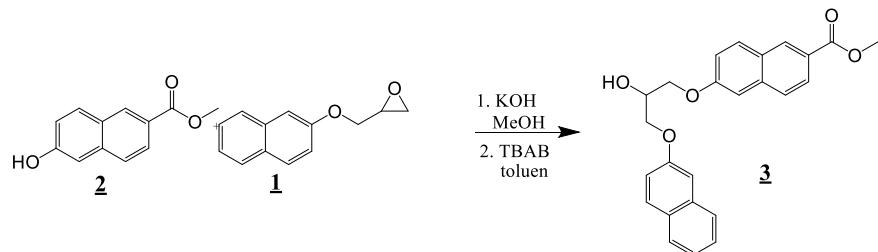
## 4.2 Sinteza metil 6-hidroksi-2-naftoata



V bučko smo natehtali 6-hidroksi-2-naftojsko kislino (10,056 g, 53,4 mmol, 1 ekv) in jo raztopili v 100 mL metanola. Ohladili smo na 0 °C in počasi dokapavali tionil klorid (9,69 mL, 133,5 mmol, 2,5 ekv) ter nato mešali 2 uri pri temperaturi refluksa. Ko se je reakcijska zmes ohladila, smo pod znižanim tlakom uparili topilo. Sledila je prekristalizacija, kjer smo preostanek segrevali in mešali ter raztopili v minimalni količini metanola. Bučko smo postavili na led, kjer so se začeli tvoriti kristali. Čez noč smo pustili na ledeni kopeli, da je izpadlo več kristalov. Naslednji dan smo produkt odfiltrirali z odsesavanjem, matičnici smo pod znižanim tlakom uparili topilo in ponovili postopek prekristalizacije. Dobili smo 7,778 g spojine **2**.

metil 6-hidroksi-2-naftoat	
<b>Elementna sestava:</b> $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_3$	<b>Izgled:</b> svetlo rumeni kristali
<b>Mr</b> = 202,06 g/mol	<b>Rf:</b> 0,44 (MF: DKM/metanol = 20/1)
<b>Izkoristek:</b> 72,0 %	
<b><math>^1\text{H-NMR}</math> (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>):</b> $\delta$ 10.21 (s, 1H, OH), 8.50 (d, 1H, $J$ = 1.6 Hz, Ar-H), 7.98 (d, 1H, $J$ = 8.9 Hz, Ar-H), 7.86 (dd, 1H, $J_1$ = 1.8 Hz, $J_2$ = 8.6 Hz, Ar-H), 7.77 (d, 1H, $J$ = 8.9 Hz, Ar-H), 7.15-7.19 (m 2H, 2 × Ar-H), 3.88 (s, 3H, $\text{CH}_3$ ) ppm	

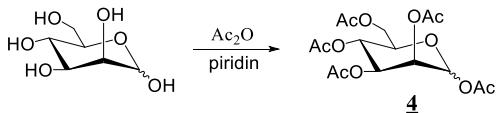
### 4.3 Sinteza metil 6-(2-hidroksi-3-((naftalen-2-il)oksi)propoksi)-2-naftoata



V 250 mL bučko smo natehtali spojino **2** (1,308 g, 6,467 mmol, 1 ekv), dodali 40 mL metanola in KOH (0,363 g, 6,467 mmol, 1 ekv) ter mešali, da se je vse raztopilo. Nastali kalijevi soli spojine **2** smo pod znižanim tlakom uparili topilo in preostanek sušili pod vakuumom približno 2 uri. Suhi preostanek smo nato suspendirali v 50 mL toluena ter dodali spojino **1** (1,295 g, 6,467 mmol, 1 ekv) in tetrabutilamonijev bromid (TBAB) (0,208 g, 0,6467 mmol, 0,1 ekv). Da bi preprečili lepljenje reakcijske zmesi na steno bučke, smo dodali 15 mL DMF in segrevali 48 ur pri  $T = 110\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po dveh dneh smo pod znižanim tlakom uparili topilo in preostanek raztopili v 100 mL etilacetata ter spirali z 10% citronsko kislino ( $2 \times 50\text{ mL}$ ), nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 50\text{ mL}$ ) in nasičeno raztopino  $\text{NaCl}$  (50 mL). Združenim organskim fazam smo pod znižanim tlakom uparili topilo, produkt pa očistili s kolonsko kromatografijo. Uporabili smo MF: heksan/etilacetat = 1/1 in dobili 0,75 g spojine **3**.

metil 6-(2-hidroksi-3-((naftalen-2-il)oksi)propoksi)-2-naftoat	
<b>Elementna sestava:</b> $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{O}_5$ <b>M<sub>r</sub></b> = 402,45 g/mol <b>Izkoristek:</b> 29,0 %	<b>Izgled:</b> oranžno – rumeno strjeno olje <b>R<sub>f</sub>:</b> 0,32 (MF: heksan/etilacetat = 1/1) <b>Tališče:</b> $121 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> $\delta$ 8.56 (d, 1H, $J = 1.4\text{ Hz}$ , Ar-H), 8.06 (dd, 1H, $J_1 = 1.7\text{ Hz}$ , $J_2 = 8.6\text{ Hz}$ , Ar-H), 7.89 (d, 1H, $J = 9.1\text{ Hz}$ , Ar-H), 7.75-7.82 (m, 4H, Ar-H), 7.48 (ddd, 1H, $J_1 = 1.3\text{ Hz}$ , $J_2 = 6.9\text{ Hz}$ , $J_3 = 8.2\text{ Hz}$ , Ar-H), 7.39 (ddd, 1H, $J_1 = 1.3\text{ Hz}$ , $J_2 = 6.9\text{ Hz}$ , $J_3 = 8.1\text{ Hz}$ , Ar-H), 7.26-7.28 (m, 1H, Ar-H), 7.21-7.25 (m, 3H, Ar-H), 4.58 (m, 1H, CH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> ), 4.33-4.42 (m, 4H, CH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> ), 4.00 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.75 (s, 1H, OH) ppm	
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>) za <math>\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{O}_5</math> ([M+H]<sup>+</sup>):</b> izračunan 403.1545; izmerjen 403.1552	
<b>IR (ATR):</b> $\nu$ 3276, 3059, 1715, 1624, 1598, 1509, 1438, 1370, 1337, 1270, 1218, 1119, 1032, 963, 865, 781 $\text{cm}^{-1}$	

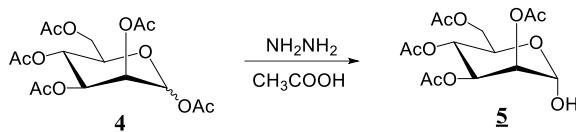
#### 4.4 Sinteza 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-D-manopiranoze



V 250 mL bučki smo v 50 mL brezvodnega piridina raztopili D – manozo (10,066 g, 55,89 mmol, 1 ekv). Nato smo na ledeni kopeli in v argonovi atmosferi po kapljicah dodali 40 mL acetanhidrida in pustili, da se meša čez noč. Naslednji dan smo reakcijski zmesi dodali 100 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 2 × 80 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 2 × 80 mL 1 M HCl in 80 mL nasičene raztopine NaCl. Sušili smo nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in filtrirali. Organski fazi smo pod znižanim tlakom uparili in dobili 18,251 g spojine 4.

1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-D-manopiranoze	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> <b>M<sub>r</sub>:</b> 390,34 g/mol <b>Izkoristek:</b> 83,7 %	<b>Izgled:</b> beli kristali <b>R<sub>f</sub>:</b> 0,26 (MF: heksan/etilacetat = 1/1)
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> signali za α-anomer, δ 5.84 (d, 1H, J <sub>1</sub> = 1.2 Hz, H-1), 5.46 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 1.2 Hz, J <sub>2</sub> = 3.3 Hz, H-2), 5.27 (t, 1H, J <sub>1</sub> = 10.0 Hz, H-4), 5.11 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 3.3 Hz, J <sub>2</sub> = 10.0 Hz, H-3), 4.28 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 5.3 Hz, J <sub>2</sub> = 12.4 Hz, H-6'), 4.11 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 2.4 Hz, J <sub>2</sub> = 12.4 Hz, H-6), 3.79 (ddd, 1H, J <sub>1</sub> = 2.4 Hz, J <sub>2</sub> = 5.3 Hz, J <sub>3</sub> = 9.9 Hz, H-5), 2.16 (s, 3H, COCH <sub>3</sub> ), 2.15 (s, 3H, COCH <sub>3</sub> ), 2.07 (s, 3H, COCH <sub>3</sub> ), 2.03 (s, 3H, COCH <sub>3</sub> ), 1.98 (s, 3H, COCH <sub>3</sub> ) ppm	

#### 4.5 Sinteza 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-manopiranoze



Spojino 4 (18,251 g, 46,76 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 10 mL DMF in jo dodali zmesi 5 mL hidrazina (1,2 ekv), 20 mL DMF in 3,75 mL ocetne kisline (1,4 ekv). Reakcijsko zmes smo segrevali pri 50 °C in pustili, da se meša čez noč. Naslednji dan smo reakcijsko zmes uparili pod znižanim tlakom in dodali 70 mL vode. Sledila je ekstrakcija s 3 × 100 mL etil acetata in spiranje organske faze s 3 × 100 mL 1 M HCl, 2 × 100 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in 100 mL nasičene raztopine NaCl. Sušili smo nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,

filtrirali in združenim organskim fazam pod znižanim tlakom uparili topilo. Dobili smo 9,354 g spojine **5**.

<b>2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-<math>\alpha</math>-D-manopiranoza</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 348,11 g/mol <b>Izkoristek:</b> 57,5 %	<b>Izgled:</b> svetlo – rumeno olje <b>R<sub>f</sub>:</b> 0,21 (MF: heksan/etilacetat = 1/1)
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ 8.79 (s, 1H, NH), 6.29 (d, 1H, J <sub>1</sub> = 1.8 Hz, H-1), 5.47-5.48 (m, 1H, H-2), 5.40-5.42 (m, 2H, H-3, H-4), 4.28 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 4.7 Hz, J <sub>2</sub> = 12.0 Hz, H-6’), 4.15-4.22 (m, 2H, H-5, H-6), 2.20 (s, 3H, COCH <sub>3</sub> ), 2.09 (s, 3H, COCH <sub>3</sub> ), 2.07 (s, 3H, COCH <sub>3</sub> ), 2.01 (s, 3H, COCH <sub>3</sub> ) ppm	

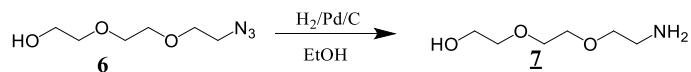
#### 4.6 Sinteza 2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etan-1-ola



2-(2-(2-kloroetoksi)etoksi)etan-1-ol (10,63 g, 63,04 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 30 mL DMF, dodali NaN<sub>3</sub> (8,196 g, 126,1 mmol, 2 ekv) in kristalček KI. Reakcijsko zmes smo mešali približno 1 uro na oljni kopeli pri 100 °C in prepihavali z argonom. Po koncu reakcije smo reakcijsko zmes pustili, da se ohladi ter pod znižanim tlakom uparili topilo. Dobili smo 10,561 g spojine **6**, ki smo jo brez čiščenja uporabili v naslednji stopnji reakcije.

<b>2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etan-1-ol</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 175,12 g/mol <b>Izkoristek:</b> 95,6 %	<b>Izgled:</b> rumenkasta tekočina <b>R<sub>f</sub>:</b> 0,41 (MF: heksan/etilacetat = 1/1)
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ 4.59 (t, 1H, J = 5.5 Hz, OH), 3.60-3.62 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.54-3.57 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 3.47-3.50 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.39-3.45 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> ) ppm	
<b>IR (ATR):</b> ν 3483, 2868, 2099, 1740, 1664, 1585, 1556, 1458, 1388, 1345, 1284, 1117, 1066, 932, 885, 824 cm <sup>-1</sup>	

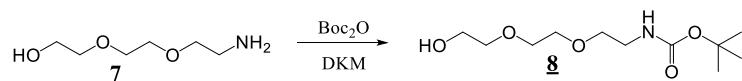
#### 4.7 Sinteza 2-(2-(2-aminoetoksi)etoksi)etan-1-ola



V nadaljevanju smo v bučko dodali 100 mL absolutnega etanola in prepihali z argonom, da smo izgnali zrak. Previdno smo dodali Pd/C (1,04 g), sistem zaprli in preko igle z napolnjenim balonom najprej prepihali z H<sub>2</sub>, da smo izgnali argon. Reakcijsko zmes smo nato mešali v vodikovi atmosferi čez noč. Naslednji dan smo odfiltrirali Pd/C z odsesavanjem, matičnici pa smo pod znižanim tlakom uparili topilo. Dobili smo 8,8 g spojine **7**, ki smo jo direktno uporabili v naslednji stopnji reakcije.

2-(2-(2-aminoetoksi)etoksi)etan-1-ol	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> <b>M<sub>r</sub>:</b> 149,19 g/mol <b>Izkoristek:</b> 98,1 %	<b>Izgled:</b> rumenkasto strjeno olje <b>R<sub>f</sub>:</b> 0,0 (MF: heksan/etilacetat = 1/1)
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> δ 3.48-3.62 (m, 8H, 4 × CH <sub>2</sub> ), 3.39-3.44 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 2.65 (t, 1H, J = 5.8 Hz, OH) ppm, signal za NH <sub>2</sub> skupino se prekriva s signalom za H <sub>2</sub> O pri 3.3 ppm	
<b>IR (ATR):</b> ν 3509, 3039, 2867, 2362, 2340, 2102, 1653, 1586, 1557, 1511, 1463, 1346, 1294, 1115, 1061, 982, 891, 821, 716 cm <sup>-1</sup>	

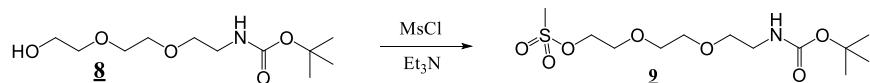
#### 4.8 Sinteza *terc*-butil (2-(2-(2-hidroksietoksi)etoksi)ethyl)karbamata



Spojino **7** (8,7 g, 58,31 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 100 mL DKM in počasi dokapavali *t*-butil dikarbonat (Boc<sub>2</sub>O) (13,81 g, 63,26 mmol, 1,1 ekv), ki smo ga predhodno raztopili v 50 mL DKM. Reakcijsko zmes smo mešali na ledeni kopeli čez noč. Naslednji dan smo pod znižanim tlakom uparili topilo in dobili 8,1 g spojine **8**.

<i>tert</i> -butil (2-(2-(2-hidroksietoksi)etoksi)ethyl)karbamat	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> <b>M<sub>r</sub>:</b> 249,31 g/mol <b>Izkoristek:</b> 55,1 %	<b>Izgled:</b> rumenkasto strjeno olje <b>R<sub>f</sub>:</b> 0,56 (MF: DKM/metanol = 9/1)
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> δ 6.78 (t, 1H, J = 5.8 Hz, NH), 4.61 (t, 1H, J = 5.3 Hz, OH), 4.09-4.12 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.49-3.62 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 3.35-3.45 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 3.06 (q, 2H, J = 6.0 Hz, CH <sub>2</sub> ), 1.38 (s, 9H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ) ppm	
<b>IR (ATR):</b> ν 3288, 2974, 2103, 1740, 1712, 1586, 1512, 1457, 1367, 1166, 1117, 1041, 966, 916, 849, 791, 756, 724 cm <sup>-1</sup>	

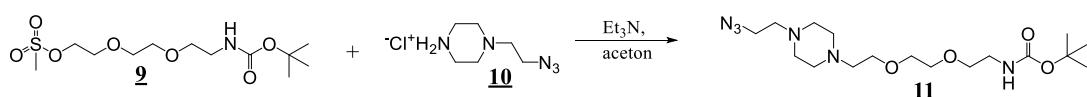
## 4.9 Sinteza 2,2-dimetil-4-okso-3,8,11-trioksa-5-azatridekan-13-il metansulfonata



Spojino **8** (8,1 g, 32,49 mmol, 1 ekv) smo raztopili v bučki v 100 mL DKM. Dodali smo trietilamin (5,85 mL, 1,3 ekv) in prepihali z argonom. Nato smo bučko ohladili na ledeni kopeli in počasi dokapavali metansulfonil klorid (2,78 mL, 1,1 ekv) in pustili mešati čez noč. Naslednji dan smo reakcijsko zmes sprali z  $3 \times 50$  mL nasičene raztopine NaCl. Organski fazi smo pri znižanem tlaku uparili topilo, produkt pa očistili s kolonsko kromatografijo. Uporabili smo MF: heksan/etilacetat = 1/1 in dobili 1,7 g spojine **9**.

2,2-dimetil-4-okso-3,8,11-trioksa-5-azatridekan-13-il metansulfonat	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>7</sub> S	<b>Izgled:</b> rumeno strjeno olje
M <sub>r</sub> = 327,39 g/mol	R <sub>f</sub> : 0,72 (MF: DKM/metanol = 9/1)
<b>Izkoristek:</b> 16,0 %	
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> δ 6.79 (t, 1H, J = 5.6 Hz, NH), 4.30-4.32 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.66-3.69 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.55-3.58 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.50-3.53 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.38 (t, 2H, J = 6.2 Hz, CH <sub>2</sub> ), 3.19 (s, 3H, S-CH <sub>3</sub> ), 3.07 (d, 2H, J = 5.9 Hz, CH <sub>2</sub> ), 1.38 (s, 9H, CH <sub>3</sub> ) ppm	
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> δ 28.1, 36.7, 39.4, 68.2, 69.1, 69.4, 69.6, 77.5, 155.5 ppm	
<b>IR (ATR)</b> ν 3290, 2872, 2362, 2102, 1586, 1513, 1456, 1392, 1251, 1107, 971, 861, 728 cm <sup>-1</sup>	

## 4.10 Sinteza *terc*-butil (2-(2-(4-(2-azidoetyl)piperazin-1-il)etoksi)etoksi)etil)karbamata



Spojino **9** (1,700 g, 5,193 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 30 mL acetona in dodali spojino **10** (0,994 g, 5,193 mmol, 1 ekv) in trietilamin (7,87 mL, 3,3 ekv) ter mešali pri temperaturi refluksa 2 dni. Po poteku reakcije smo pod znižanim tlakom uparili topilo, preostanek raztopili v 50 mL DKM in organsko fazo sprali s  $3 \times 40$  mL nasičene raztopine NaCl, da smo se znebili preostanka spojine **10**, Et<sub>3</sub>N in Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>. Organski fazi smo pod znižanim tlakom uparili topilo. Dobili smo 1,82 g spojine **11**.

***terc*-butil (2-(2-(4-(2-azidoetil)piperazin-1-il)etoksi)etoksi)etil)karbamat**

<b>Elementna sestava:</b> C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> <b>M<sub>r</sub>:</b> 386,50 g/mol <b>Izkoristek:</b> 91,0 %	<b>Izgled:</b> rumeno strjeno olje <b>R<sub>f</sub>:</b> 0,47 (MF: DKM/metanol = 9/1)
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> δ 6.77 (t, 1H, J = 5.6 Hz, NH), 3.48-3.51 (m, 6H, 3 × CH <sub>2</sub> ), 3.38 (t, 2H, J = 6.1 Hz, CH <sub>2</sub> ), 3.32-3.33 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.06 (q, 2H, J = 6.1 Hz, CH <sub>2</sub> ), 2.44 (m, 12H, 6 × CH <sub>2</sub> ), 1.38 (s, 9H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ) ppm	
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>) za C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> ([M+H]<sup>+</sup>):</b> izračunan 387.2720; izmerjen 387.2731	
<b>IR (ATR) v</b> 3370, 2946, 2868, 2363, 1738, 1586, 1554, 1512, 1390, 1253, 1177, 1114, 1043, 940, 904, 860, 725, 662 cm <sup>-1</sup>	

**4.11 Sinteza 2-(2-(2-(4-(2-azidoetil)piperazin-1-il)etoksi)etoksi)etan-1-amonijevega klorida**

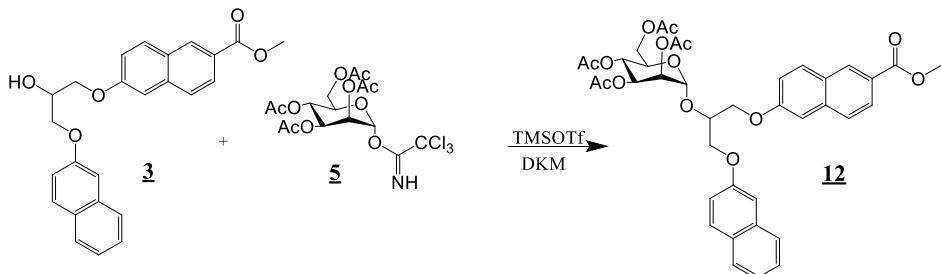


50 mL absolutnega etanola smo prepihali s HCl, da je raztopina postala nasičena. Dodali smo spojino **11** (0,42 g, 1,087 mmol, 1 ekv) in pustili mešati čez noč na ledeni kopeli. Naslednji dan smo pod znižanim tlakom uparili topilo in dobili 0,351 g spojine **11a**.

**2-(2-(2-(4-(2-azidoetil)piperazin-1-il)etoksi)etoksi)etan-1-amonijev klorid**

<b>Elementna sestava:</b> C <sub>12</sub> H <sub>27</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <b>M<sub>r</sub>:</b> 322,84 g/mol <b>Izkoristek:</b> 8,6 %	<b>Izgled:</b> rumeno strjeno olje <b>R<sub>f</sub>:</b> 0,27 (MF: DKM/metanol = 9/1) <b>Tališče:</b> 131 ± 2 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> δ 8.05 (s, 3H, NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ), 3.84-3.85 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.61-3.66 (m, 20H, 10 × CH <sub>2</sub> ), 2.98 (dd, 2H, J <sub>1</sub> = 5.4 Hz, J <sub>2</sub> = 11.0 Hz, CH <sub>2</sub> ) ppm	
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>) za C<sub>12</sub>H<sub>27</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> ([M+H]<sup>+</sup>):</b> izračunan 287.2195; izmerjen 287.2191	
<b>IR (ATR) v</b> 3276, 3015, 2949, 2924, 2621, 2364, 1628, 1557, 1523, 1406, 1349, 1246, 1226, 1183, 1062, 1015, 986, 951, 893, 821, 638 cm <sup>-1</sup>	

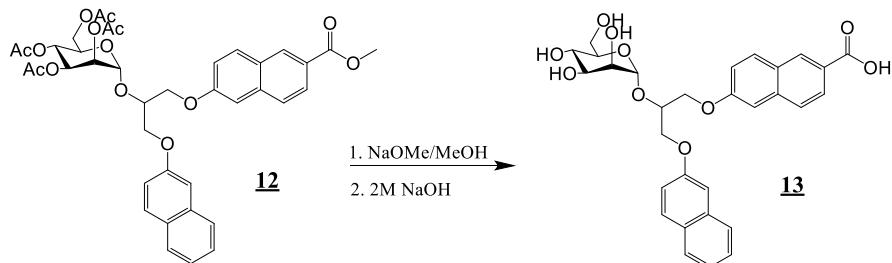
## 4.12 Sinteza 2-(acetoksimetil)-6-((1-((6-(metoksikarbonil)naftalen-2-il)oksi)-3-(naftalen-2-iloksi)propan-2-il)oksi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil triacetata



250 mL bučko smo priklopili na vakuumsko črpalko, jo prežarili in napolnili z argonom. Vanjo smo natehtali spojino **3** (0,675 g, 1,677 mmol, 1 ekv) in spojino **5** (0,826 g, 1,677 mmol, 1 ekv). Direktno v bučko smo destilirali približno 40 mL DKM. Ko sta se spojini raztopili, smo bučko ohladili na ledeni kopeli in po kapljicah dodajali TMSOTf (365 µl, 1,2 ekv). Reakcijsko zmes smo pustili na ledeni kopeli še 1 uro, nato pa na sobni temperaturi preko noči, med mešanjem. Naslednji dan smo reakcijo ustavili z dodatkom Et<sub>3</sub>N (606 µl, 2,6 ekv), uparili topilo pod znižanim tlakom, produkt pa očistili s kolonsko kromatografijo. Uporabili smo MF: heksan/etilacetat = 3/1 in dobili 0,7 g spojine **12**.

2-(acetoksimetil)-6-((1-((6-(metoksikarbonil)naftalen-2-il)oksi)-3-(naftalen-2-iloksi)propan-2-il)oksi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil triacetat	
Elementna sestava: C <sub>39</sub> H <sub>40</sub> O <sub>14</sub>	Izgled: rumena trdna snov
M <sub>r</sub> = 732,74 g/mol	R <sub>f</sub> : 0,17 (MF: DKM/metanol = 9/1)
Izkoristek: 57,0 %	Tališče: 61 ± 2 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ 8.57 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 1.5 Hz, J <sub>2</sub> = 3.9 Hz, Ar-H), 8.07 (ddd, 1H, J <sub>1</sub> = 1.7 Hz, J <sub>2</sub> = 3.7 Hz, J <sub>3</sub> = 8.6 Hz, Ar-H), 7.90 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 5.6 Hz, J <sub>2</sub> = 9.0 Hz, Ar-H), 7.76-7.81 (m, 4H, 4 × Ar-H), 7.46-7.51 (m, 1H, Ar-H), 7.36-7.41 (m, 1H, Ar-H), 7.16-7.28 (m, 4H, 4 × Ar-H), 5.43 (ddd, 1H, J <sub>1</sub> = 2.1 Hz, J <sub>2</sub> = 3.3 Hz, J <sub>3</sub> = 10.1 Hz, manoza-CH), 5.30-5.38 (m, 2H, 2 × manoza-CH), 5.30 (t, 1H, J = 1.7 Hz, manoza-CH), 4.60-4.65 (m, 1H, CH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> ), 4.31-4.44 (m, 6H, CH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> , 2 × manoza-CH), 4.09-4.11 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 2.1 Hz, J <sub>2</sub> = 10.0 Hz, manoza-CH), 3.99 (d, 1H, J = 1.3 Hz, COOCH <sub>3</sub> ), 2.21 (2 × s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.03 (m, 9H, 3 × CH <sub>3</sub> ) ppm	
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b> za C <sub>39</sub> H <sub>41</sub> O <sub>14</sub> ([M+H] <sup>+</sup> ): izračunan 733.2496; izmerjen 733.2490	
<b>IR (ATR)</b> v 3284, 3059, 2848, 2362, 1715, 1598, 1509, 1438, 1370, 1337, 1271, 1218, 1181, 1119, 1098, 1032, 963, 916, 865, 781, 727, 654 cm <sup>-1</sup>	

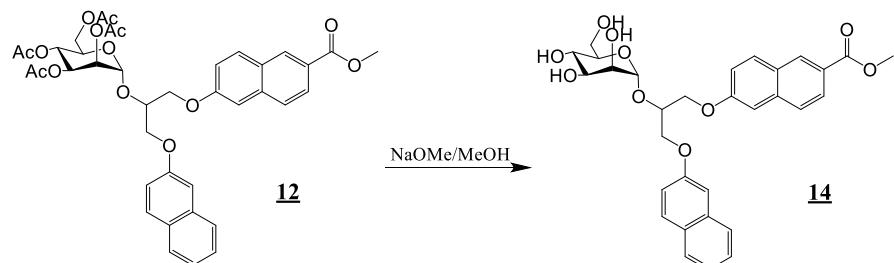
#### 4.13 Sinteza 6-(3-(naftalen-2-iloksi)-2-((-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidroksi-2H-piran-2-il)oksi)propoksi)-2-naftojske kislina



Spojino **12** (0,569 g, 0,7765 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 40 mL brezvodnega metanola in dodali približno 20 kapljic NaOMe ter pustili, da se meša 1 uro. Nato smo v bučko dodali za konico spatule ionsko izmenjevalne smole Amberlite IR 120 H in mešali 15 minut. Smolo smo nato odfiltrirali z odsesavanjem, sprali z brezvodnim MeOH in matičnici pod znižanim tlakom uparili topilo. Sledila je druga stopnja reakcije, kjer smo v bučko najprej dodali 5 mL 1,4 – dioksana, nato pa po kapljicah dodajali 2 M NaOH (2,28 mL, 4 ekv). Ker po dveh dneh reakcija še vedno ni potekla, smo dodali še 2 ekvivalenta 2 M NaOH (1,14 ml). Ko je reakcija potekla, smo oborino odfiltrirali z odsesavanjem, matičnico pa smo pod znižanim tlakom uparili do suhega. Dobili smo 0,251 g spojine **13**.

<b>6-(3-(naftalen-2-iloksi)-2-((-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidroksi-2H-piran-2-il)oksi)propoksi)-2-naftojska kislina</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub> <b>M<sub>r</sub></b> = 550,56 g/mol <b>Izkoristek:</b> 46,0 %	<b>Izgled:</b> rumenkasta trdna snov <b>R<sub>f</sub></b> : 0,34 (MF: DKM/metanol = 7/1 + ocetna kislina) <b>Tališče:</b> razpadne
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> δ 8.28 (s, 1H, Ar-H), 7.96 (d, 1H, J = 9.0 Hz, Ar-H), 7.80-7.85 (m, 4H, 4 × Ar-H), 7.64 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 6.3 Hz, J <sub>2</sub> = 8.1 Hz, Ar-H), 7.45-7.48 (m, 1H, Ar-H), 7.42-7.43 (m, 1H, Ar-H), 7.34-7.37 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7.21-7.25 (m, 1H, Ar-H), 7.14-7.18 (m, 1H, Ar-H), 5.06 (s, 1H, manoza-CH), 4.81-4.99 (m, 3H, 3 × manoza-OH/CH), 4.59 (s, 1H, manoza-OH), 4.31-4.49 (m, 5H, CH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> ), 3.65-3.69 (m, 3H, 3 × manoza-OH/CH), 3.44-3.54 (m, 3H, 3 × manoza-OH/CH) ppm	
<b>HRMS (ESI)</b> za C <sub>30</sub> H <sub>29</sub> O <sub>10</sub> ([M-H] <sup>-</sup> ): izračunan 549.1761; izmerjen 549.1749	
<b>IR (ATR)</b> ν 3288, 3059, 2945, 2340, 1758, 1715, 1557, 1509, 1452, 1389, 1270, 1182, 1099, 1033, 916, 865, 812, 750, 646 cm <sup>-1</sup>	

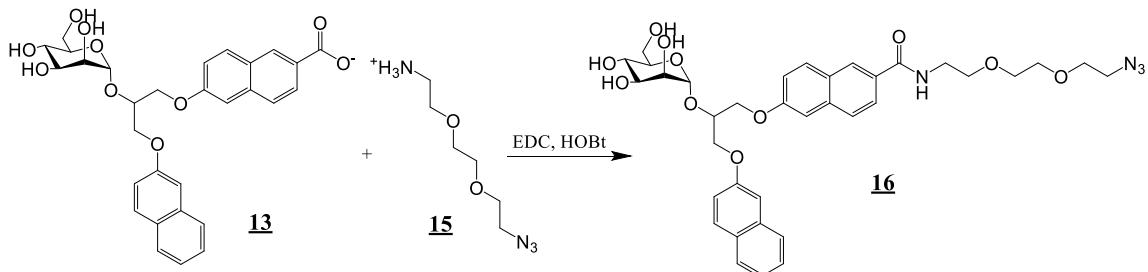
#### 4.14 Sinteza metil 6-(3-(naftalen-2-iloksi)-2-((*-*3,4,5-trihidroksi-6-hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)oksi)propoksi)-2-naftoata



Ponovili smo prvo stopnjo prejšnje reakcije. Spojino **12** (0,093 g, 0,1269 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 10 mL brezvodnega metanola in 3 mL DKM in dodali 5 kapljic NaOMe/MeOH ter pustili mešati 1,5 h. Nato smo dodali za konico spatule ionsko izmenjevalne smole Amberlite IR 120 H in pustili, da se meša približno 10 minut. Smolo smo odfiltrirali z odsesavanjem, sprali z brezvodnim MeOH in matičnici pod znižanim tlakom uparili topilo. Dobili smo 0,100 g spojine **14**.

metil 6-(3-(naftalen-2-iloksi)-2-(( <i>-</i> 3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)oksi)propoksi)-2-naftoat	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>31</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>	<b>Izgled:</b> rumenkasta trdna snov
M <sub>r</sub> = 564,49 g/mol	R <sub>f</sub> : 0,06982 (MF: etil acetat/ heksan = 1:3)
<b>Izkoristek:</b> 97,5 %	<b>Tališče:</b> razpadne
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):</b> δ 8.48 (2×s, 1H, Ar-H), 7.73-8.04 (m, 6H, 6 × Ar-H), 7.21-7.45 (m, 6H, 6 × Ar-H), 5.25 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 1.7 Hz, J <sub>2</sub> = 3.6 Hz, manzo-CH), 4.61-4.65 (m, 1H, CH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> ), 4.38-4.53 (m, 4H, CH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> ), 3.97 (s, 1H, manzo-CH), 3.88-3.94 (m, 2H, 2 × manzo-CH), 3.67-3.85 (m, 3H, 3 × manzo-CH), 3.38 (m, 3H, CH <sub>3</sub> ) ppm	
<b>HRMS (ESI) za C<sub>31</sub>H<sub>31</sub>O<sub>10</sub> ([M-H]<sup>-</sup>):</b>	
<b>IR (ATR) v</b> 3370, 3276, 2958, 2341, 1739, 1556, 1510, 1433, 1306, 1256, 1214, 1182, 118, 1043, 972, 912, 831, 729 cm <sup>-1</sup>	

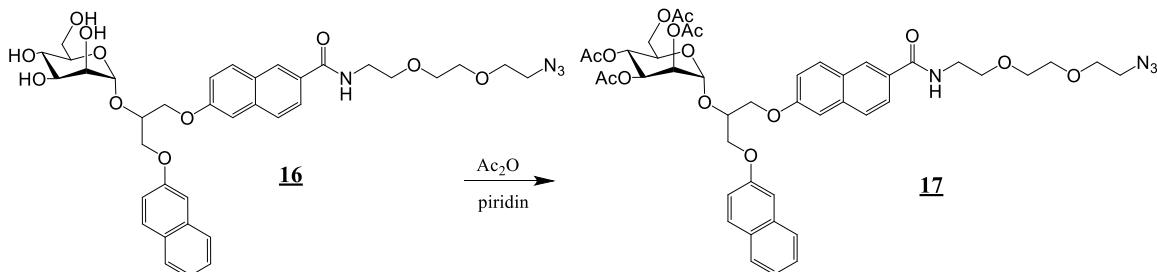
#### 4.15 Sinteza *N*-(2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etil)-6-(3-(naftalen-2-iloksi)-2-((*-*3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)oksi)propoksi)-2-naftalamida



Spojini **13** (0,251 g, 0,4384 mmol, 1 ekv) in **15** (0,0924 g, 0,4384 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 5 mL DMF, naravnali pH na vrednost 8 z DIPEA ter dodali EDC (0,1051 g, 1,25 ekv) in 1-hidroksibenzotriazol (HOBr) (0,077 g, 1,3 ekv). Mešali smo na ledeni kopeli in pustili, da se preko noči ogreje na sobno temperaturo. Pod znižanim tlakom smo uparili DMF, preostanek pa raztopili v 20 mL etil acetata. Sledilo je spiranje z 1 M HCl ( $2 \times 10$  mL), 1 M NaOH ( $2 \times 10$  mL) in nasičeno raztopino NaCl (10 mL). Organsko fazo smo sušili nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrirali, uparili topilo pod znižanim tlakom, produkt pa očistili s kolonsko kromatografijo. Uporabili smo MF: DKM/metanol = 20/1 in dobili 0,163 g spojine **16**.

<b><i>N</i>-(2-(2-(2-azidoetoksi)etoksi)etil)-6-(3-(naftalen-2-iloksi)-2-((<i>-</i>3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2<i>H</i>-piran-2-il)oksi)propoksi)-2-naftalamid</b>	
<b>Elementna sestava:</b> $\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{11}$	<b>Izgled:</b> bela trdna snov
$M_r = 706,75$ g/mol	$R_f$ : 0,26 (MF: DKM/ metanol = 9:1)
<b>Izkoristek:</b> 27,6 %	<b>Tališče:</b> razpadne
<b><math>^1\text{H-NMR}</math> (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>):</b> $\delta$ 8.60 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz, CONH), 8.39 (s, 1H, Ar-H), 7.80-7.96 (m, 6H, 6 × Ar-H), 7.45-7.49 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7.41-7.43 (m, 1H, Ar-H), 7.36 (td, 1H, $J_1 = 1.3$ Hz, $J_2 = 9.4$ Hz, Ar-H), 7.29 (ddd, 1H, $J_1 = 2.5$ Hz, $J_2 = 3.9$ Hz, $J_3 = 8.9$ Hz, Ar-H), 7.22 (ddd, 1H, $J_1 = 2.5$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, $J_3 = 9.0$ Hz, Ar-H), 5.06 (s, 1H, manoza-CH/OH), 4.82 (dd, 1H, $J_1 = 0.9$ Hz, $J_2 = 4.1$ Hz, manoza-CH/OH), 4.79 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, manoza-CH/OH), 4.62 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz, manoza-CH/OH), 4.56-4.58 (m, 1H, manoza-CH/OH), 4.31-4.50 (m, 5H, CH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> ), 3.37-3.71 (m, 17H, 5 × manoza-CH/OH, 6 × CH <sub>2</sub> ), 3.01 (s, 1H, manoza-OH) ppm	
<b>HRMS (ESI<sup>+</sup>)</b> za $\text{C}_{36}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_{11}$ ([M+H] <sup>+</sup> ): izračunan 707.2928; izmerjen 707.2941	

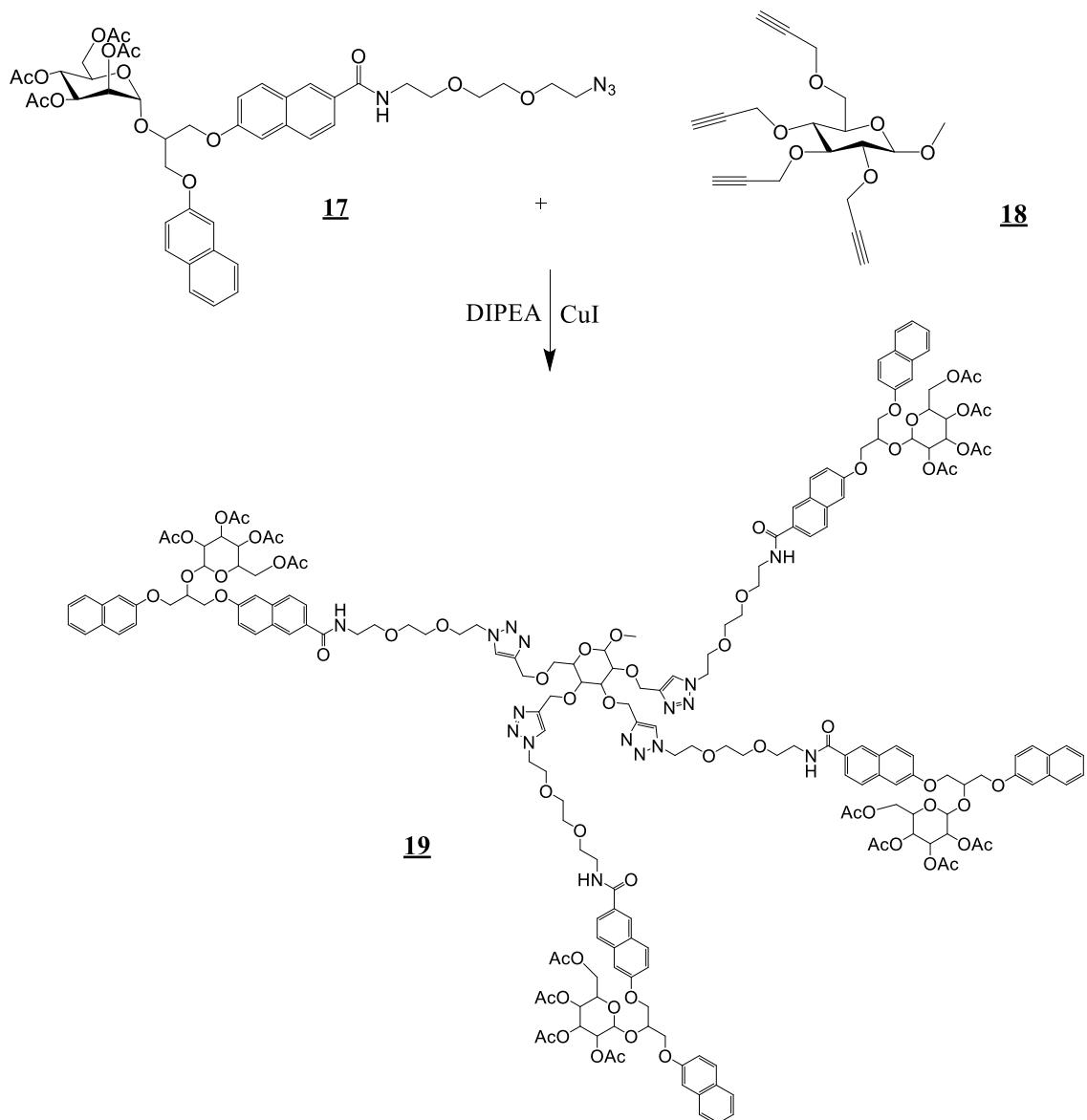
#### 4.16 Sinteza 2-(acetoksimetil)-6-((1-((6-((2-(2-azidoetoksi)etoksi)etil)karbamoil)naftalen-2-il)oksi)-3-(naftalen-2-iloksi)propan-2-il)oksi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil triacetata



Bučko s spojino **16** smo zamašili s septumom in prepihali z argonom. Nato smo skozi septum s brizgo dodali brezvodni DKM (10 mL). Bučko smo ohladili na ledeni kopeli in dodali najprej 0,5 mL piridina, nato pa smo dodali še acetanhidrid (94  $\mu\text{l}$ , 4,5 ekv). Reakcijska zmes se je najprej mešala na ledeni kopeli, čez noč pa se je ogrela na sobno temperaturo. Naslednji dan smo pod znižanim tlakom uparili topilo in izvedli ekstrakcijo s 30 mL etil acetata, spirali smo z  $3 \times 15$  mL  $\text{NaHCO}_3$ , sušili nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrirali in pod znižanim tlakom uparili topilo. Dobili smo 0,073 mg spojine **17**.

2-(acetoksimetil)-6-((1-((6-((2-(2-azidoetoksi)etoksi)etil)karbamoil)naftalen-2-il)oksi)-3-(naftalen-2-iloksi)propan-2-il)oksi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil triacetat	
<b>Elementna sestava:</b> $\text{C}_{44}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_{15}$	<b>Izgled:</b> rumeno olje
$M_r = 874,90 \text{ g/mol}$	$R_f: 0,38$ (MF: DKM/ metanol = 9:1)
<b>Izkoristek:</b> 24,3 %	
<b><math>^1\text{H-NMR}</math> (400 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>):</b> $\delta$ 8.28 (dd, 1H, $J_1 = 0.6$ Hz, $J_2 = 4.1$ Hz, Ar-H), 7.76-7.90 (m, 6H, 6 $\times$ Ar-H), 7.46-7.51 (m, 1H, Ar-H), 7.36-7.41 (m, 1H, Ar-H), 7.16-7.28 (m, 4H, 4 $\times$ Ar-H), 6.82 (s, 1H, NH), 5.30-5.44 (m, 4H, 4 $\times$ manzo-CH), 4.62 (dd, 1H, $J_1 = 5.6$ Hz, $J_2 = 10.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 4.32-4.43 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 4.09-4.12 (m, 1H), 3.65-3.75 (m, 10H), 3.37-3.40 (m, 2H), 2.21 (2 $\times$ s, 3H, $\text{CH}_3$ ), 2.02-2.04 (m, 9H, 3 $\times$ $\text{CH}_3$ ) ppm	
<b>HRMS (ESI<math>^+</math>)</b> za $\text{C}_{44}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_{15}$ ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): izračunan 875.3351; izmerjen 875.3342	
<b>IR (ATR)</b> v 3290, 2924, 2360, 2105, 1743, 1628, 1601, 1510, 1464, 1370, 1182, 1116, 1042, 979, 911, 813, 750 $\text{cm}^{-1}$	

#### 4.17 Sinteza tetravalentnega dendrona



V bučko s spojino **17** (102,02 mg, 0,1166 mmol, 4,1 ekv) smo dodali spojino **18** (9,85 mg, 0,02844 mmol, 1 ekv), CuI (2,166 mg, 0,01137 mmol, 0,4 ekv), DIPEA (56,4 µl, 12 ekv) in približno 1 mL DMF. Zmes smo prenesli v poseben vsebnik za mikrovalovni reaktor, zatesnili z zamaškom s septumom in mešali 20 min v mikrovalovnem reaktorju pri 30 W in 110 °C. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo z mobilno fazo DKM/metanol = 40/1, kjer smo postopoma večali delež metanola. Dobili smo 33 mg, spojine **19**.

Zaščiteni tetravalentni dendron

**Elementna sestava:** C<sub>195</sub>H<sub>222</sub>N<sub>16</sub>O<sub>66</sub>

**M<sub>r</sub>** = 3845,97 g/mol

**Izkoristek:** 31,2 %

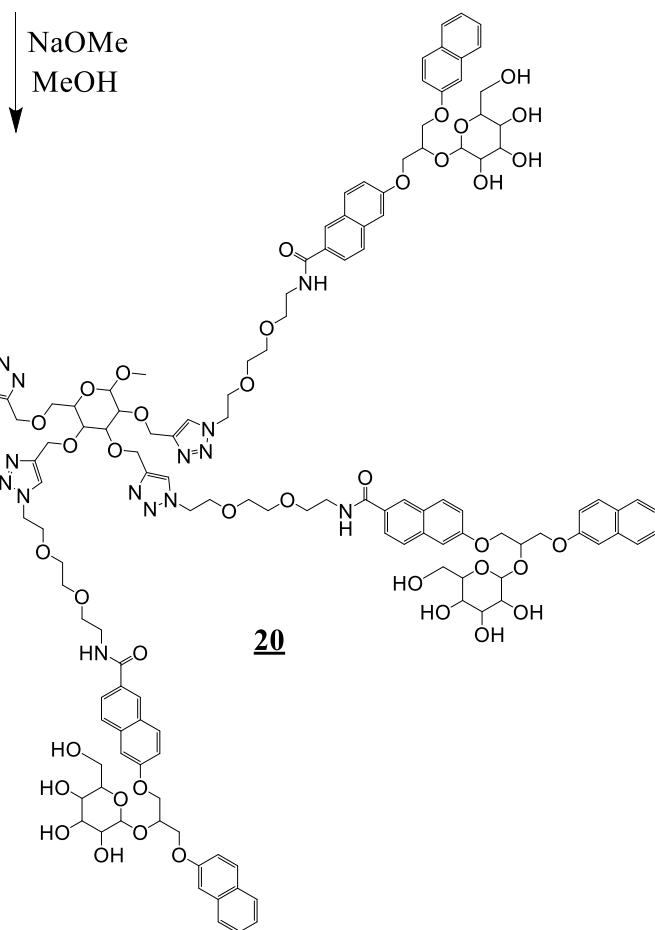
**Izgled:** rumeno olje

**R<sub>f</sub>:** 0,43 (MF: DKM/ metanol = 9:1)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.33 (s, 4H, 4 × NH), 7.72-7.92 (m, 28H, 28 × Ar-H), 7.43-7.51 (m, 6H, 6 × Ar-H), 7.34-7.42 (m, 6H, 6 × Ar-H), 7.14-7.26 (m, 16H, 16 × Ar-H), 5.34-5.45 (m, 12H), 5.33 (s, 4H), 5.28-5.30 (br s, 4H), 4.55-4.66 (br s, 8H), 4.26-4.64 (m, 32H), 4.08-4.12 (m, 4H), 3.76-3.94 (m, 12H), 3.36-3.74 (m, 38H), 2.20 (s, 12H, 4 × CH<sub>3</sub>), 2.01-2.03 (m, 36H, 12 × CH<sub>3</sub>) ppm

MS (ESI<sup>+</sup>): m/z = 1923.9 ([M+2H]<sup>2+</sup>)

#### 4.18 Odščita acetilnih skupin



V bučko s spojino **19** smo nalili brezvodni metanol (5 mL). Bučko smo zaprli s septumom in sistem prepihali z argonom. Skozi septum smo dodali kapljico NaOMe in pustili, da se meša čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo oborino odfiltrirali s

presesavanjem, matičnici smo dodali za konico spatule ionsko izmenjevalne smole Amberlite IR 120 H, mešali 30 min, nato pa smolo odfiltrirali s presesavanjem. Matičnici smo pod znižanim tlakom uparili topilo in dobili končno spojino **20**.

Odščiten tetravalentni dendron	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>163</sub> H <sub>190</sub> N <sub>16</sub> O <sub>50</sub>	<b>Izgled:</b> rumena trdna snov
M <sub>r</sub> = 3173,38 g/mol	R <sub>f</sub> : 0,0 (MF: DKM/ metanol = 9:1)
<b>Izkoristek:</b> 14,3 %	<b>Tališče:</b> razpadne
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> δ 8.60 (s, 4H, 4 × NH), 8.33-8.38 (m, 8H, 8 × Ar-H), 7.79-8.14 (m, 28H, 28 × Ar-H), 7.20-7.56 (m, 20H, 20 × Ar-H), 3.68-5.05 (m, 130H) ppm	
<b>MS (ESI<sup>+</sup>): m/z = 1609.3 ([M+2H]<sup>2+</sup>)</b>	
<b>IR (ATR) v</b> 3367, 3276, 2947, 2341, 1731, 1741, 1588, 1556, 1509, 1436, 1387, 1340, 1291, 1215, 1182, 1118, 1035, 976, 942, 913, 813, 754, 728, 669 cm <sup>-1</sup>	

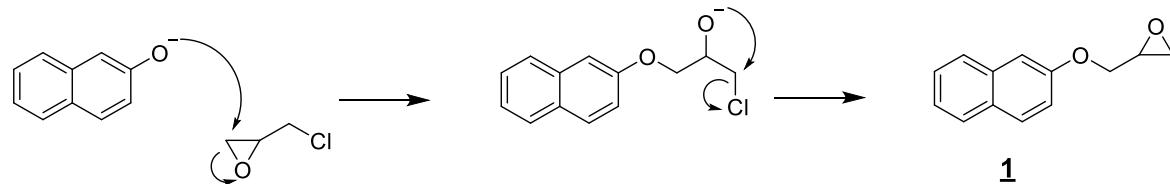
## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

#### 5.1.1 Sinteza diarilglicerolov

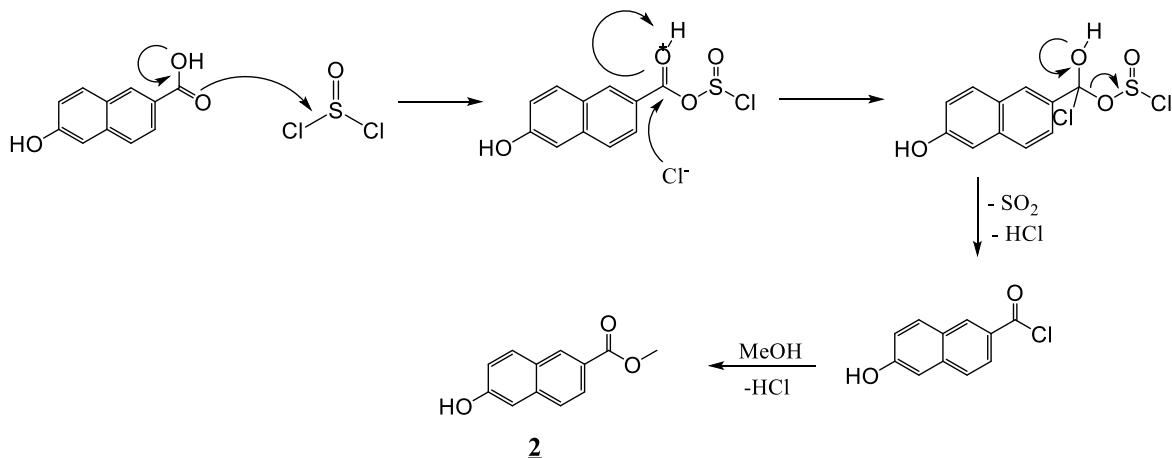
Eksperimentalno delo smo začeli z Williamsovo sintezo etra (**Shema 4**). Iz 2-naftola smo s KOH pripravili močnejši nukleofil, ki napade sterično manj oviran ogljikov atom epoksidnega obroča epiklorhidrina, pri čemer se epoksidni obroč odpre. V nadaljevanju poteče intramolekularna Williamsova sinteza etra (18,19).

Po reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo, sledila je ekstrakcija, pri kateri smo dodali nasičeno raztopino NaCl, da smo se znebili natrijevega naftolata in KOH, produkt pa smo ekstrahirali z DKM. Produkt smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparili topilo. TLC kromatogram je pokazal, da je produkt dokaj čist, zato smo se namesto kolonske kromatografije odločili za kristalizacijo iz zmesi etil acetata in heksana. Ko se je pojavila oborina, smo postopek zaključili, bučko pa postavili v hladilnik, da je izpadlo več produkta. Reakcija je bila zelo uspešna, saj smo imeli 80% izkoristek.



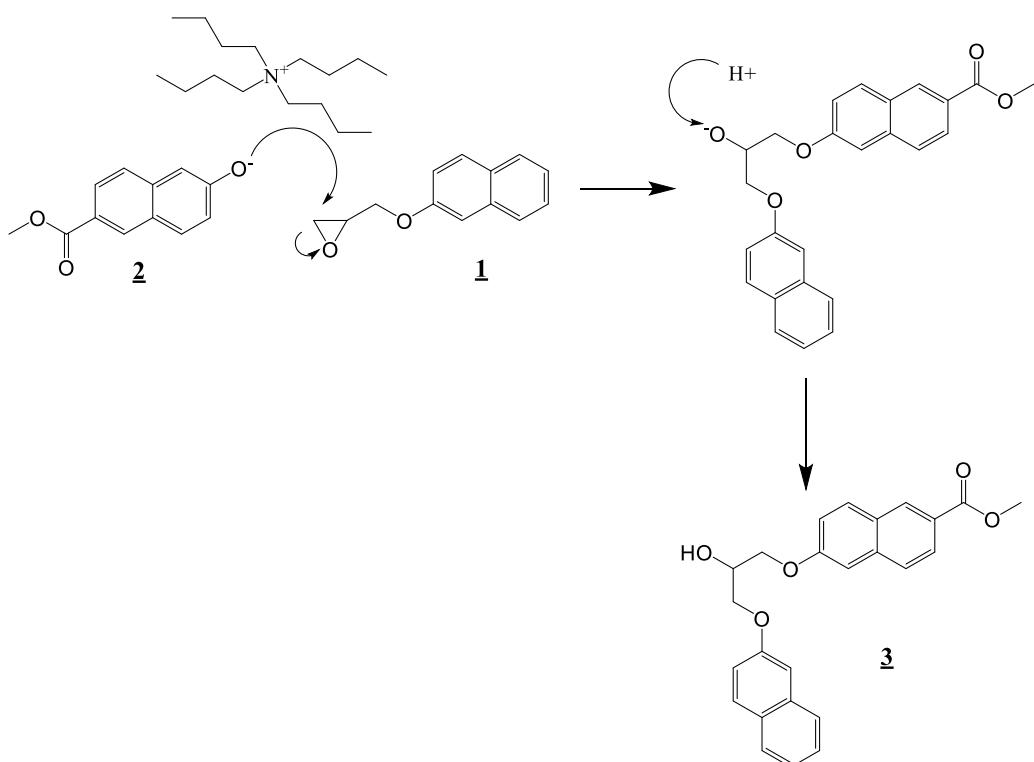
**Shema 4:** Williamsonova sinteza etra

Nadaljevali smo s sintezo spojine **2**. Najprej je nastal kislinski klorid po mehanizmu nukleofilne substitucije preko nestabilnega tetraedričnega intermediata (**Shema 5**). Izhodno spojino smo ohladili na 0 °C in počasi dokapavali tionil klorid. Plina SO<sub>2</sub> in HCl, ki sta izhajala, sta zelo dražeča, zato je bilo potrebno reakcijo izvajati v digestoriju. Kislinski klorid, ki je zelo reaktiv, je potem zlahka reagiral z metanolom in tvoril ester. TLC kromatogram je pokazal dokaj čist produkt, zato smo po uparevanju topila surov produkt čistili s prekristalizacijo, po kateri smo imeli 72% izkoristek.



**Shema 5:** Mehanizem nastanka estra

Enako kot pri sintezi spojine **1** smo tudi tukaj hidroksilno skupino spojine **2** s KOH pretvorili v močnejši nukleofil. Karboksilna skupina je bila zaščitena kot metilni ester, zato ni reagirala. Ker je nukleofil spojine **2** v obliki soli, ni topen v toluenu, v katerem je topna spojina **1**. Zato smo uporabili tetra-*n*-butilamonijev bromid (TBAB), ki deluje kot katalizator faznega prenosa nukleofila spojine **2** v organsko fazo, kjer lahko napade elektrofilni ogljikov atom epoksida. Reakcija je potekala 48 ur pri temperaturi 110 °C, po uparevanju topila pod znižanim tlakom smo izvedli ekstrakcijo. Produkt ni bil čist, zato smo ga morali očistiti kolonsko kromatografijo in dobili 29% izkoristek (**Shema 6**).



**Shema 6:** Sinteza diarilglicerola

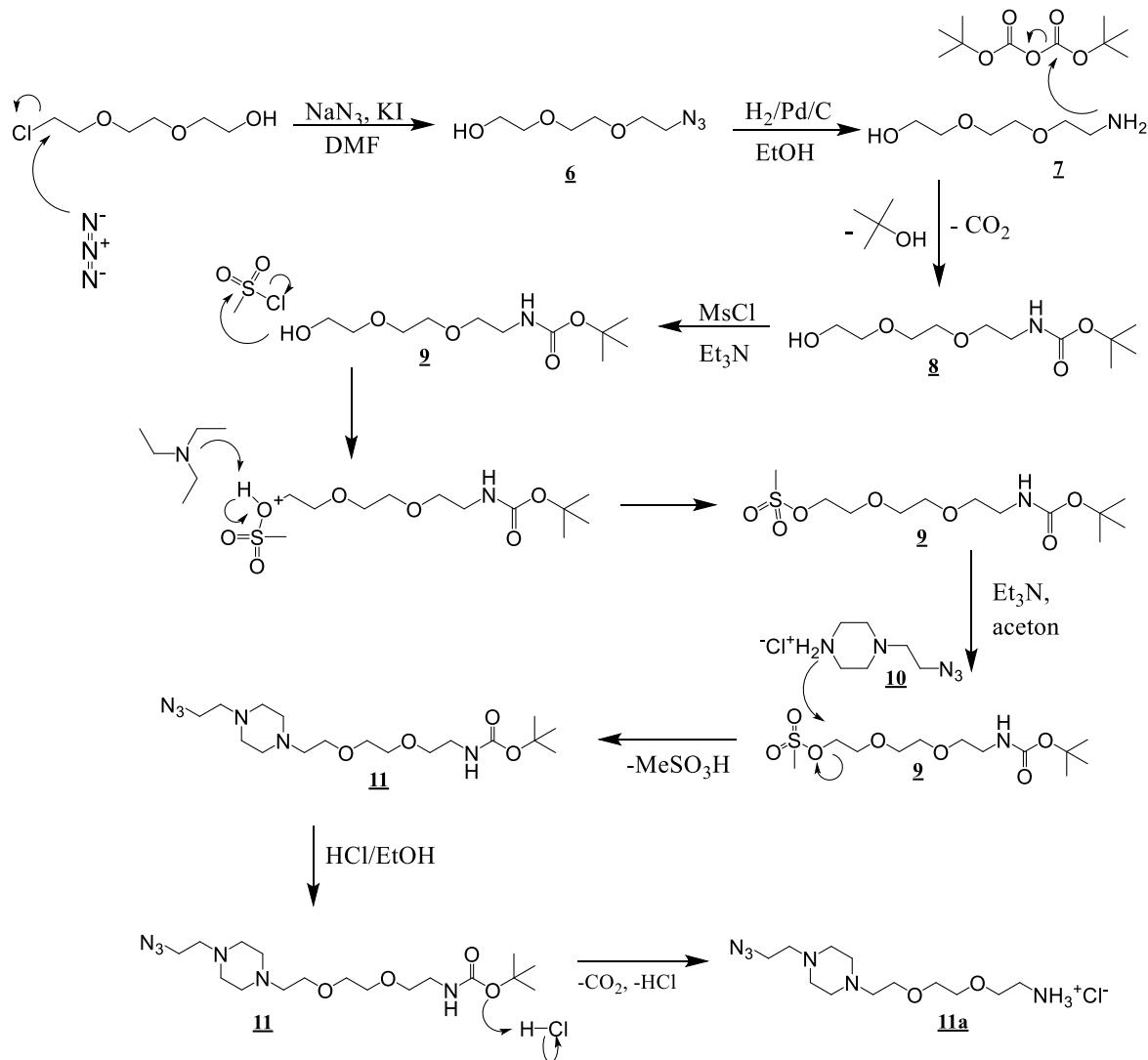
### 5.1.2 Sinteza distančnika

Sintezo distančnika (**Shema 7**) smo pričeli iz 2-(2-(2-kloroetoksi)etoksi)etan-1-ola, pri katerem smo kloridno skupino pretvorili v azidno s pomočjo dodatka  $\text{NaN}_3$  in KI kot katalizatorja, ki pretvori kloridno skupino v boljšo izstopajočo jodidno skupino. Reakcija je potekala po mehanizmu nukleofilne bimolekularne substitucije ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ), kjer ni vmesnega intermediata, ampak produkt nastaja direktno z izstopanjem kloridnega ali jodidnega iona in hkratno tvorbo kovalentne vezi z azidnim ionom.

Spojini **6** smo potem s katalitskim hidrogeniranjem azidno skupino reducirali v aminsko. Reakcija je potekala v vodikovi atmosferi ob prisotnosti katalizatorja Pd/C, ki je heterogeni katalizator in se v reakcijski zmesi ne razaplja. Gre za skeletni katalizator, ki ima zaradi velikega števila por ogromno specifično površino, ki je na voljo za adsorpcijo  $\text{H}_2$ . Ko je masa izhodne spojine manjša ali enaka 2 g, uporabimo 10% m/m Pd/C, sicer pa 5% m/m, kajti Pd je zelo reaktiv in zahteva previdnost pri delu (18, 19). Sama reakcija je potekla zelo hitro in učinkovito z visokim izkoristkom. Reakcijo smo izvajali v trogrli bučki, kjer je bil prvi korak zagotoviti brezračne pogoje. Ko smo spojino **6** raztopili v absolutnem etanolu, smo vsa tri grla zatesnili s septami. Namestili smo dve injekcijski igli in na eno iglo namestili balon napoljen z argonom, iglo pa potopili v raztopino in prepihali bučko. Argon je težji od zraka in je zrak izpodrinil, ta pa je sistem zapustil preko druge injekcijske igle. Nato smo dodali Pd/C in bučko prepihali s  $\text{H}_2$ , da smo izgnali argon, ki bi motil stik med reaktantom in  $\text{H}_2$ . V sistem smo nato še enkrat uvedli  $\text{H}_2$  in pustili mešati čez noč v vodikovi atmosferi. Naslednji dan smo Pd/C odfiltrirali z odsesavanjem, matičnici pa smo pod znižanim tlakom uparili topilo. Dobili smo 98% izkoristek.

V naslednji stopnji smo na aminsko skupino spojine **7** uvajali *t*-butilkarbamatno (Boc) zaščitno skupino z uporabo di-*t*-butil dikarbonata ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ). Reakcija poteka tako, da aminska skupina kot dober nukleofil napade elektrofilni karbonilni ogljik  $\text{Boc}_2\text{O}$ . V nadaljevanju pride do razpada preostalega dela molekule na *t*-butanol in ogljikov dioksid in nastanka spojine **8**, ki ji v naslednji stopnji hidroksilno skupino pretvorimo v dobro izstopajočo metansulfonsko skupino. Kisikov atom vzpostavi vez s svojim prostim elektronским parom z žveplom metansulfonil (mezil) klorida, ki ima kot elektrofilni center primanjkljaj elektronov. Izstopita kloridni ion in kasneje tudi proton, pri čemer nastane  $\text{HCl}$ , ki jo nevtralizira šibka baza  $\text{Et}_3\text{N}$ . Kot že rečeno, nastala metansulfonska skupina spojine **9** kot dobro izstopajoča skupino reagira v nukleofilni substituciji z aminsko skupino spojine **10**, ki jo iz oblike soli z dodatkom  $\text{Et}_3\text{N}$  pretvorimo v prosti amin. V zadnji

stopnji sinteze distančnika poteče odščita Boc zaščitne skupine z acidolizo s pomočjo plinastega HCl. Kisikov atom se najprej protonira, izstopi pa *t*-butilni karbokation. Nastala karbaminska kislina je nestabilna, zato ob njenem razpadu izhaja CO<sub>2</sub>. Ker imamo pogoje, dobimo končno spojino distančnika **11a** v obliki soli s HCl.

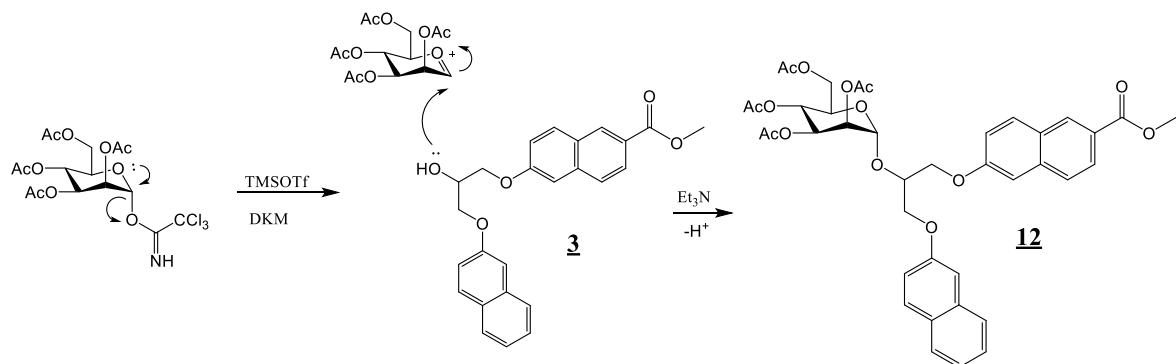


**Shema 7:** Sinteza distančnika **11a**

### 5.1.3 Glikozilacija

Pri reakciji glikozilacije smo najprej bučko priklopili na vakuumsko črpalko, jo prežarili in napolnili z argonom. Vanjo smo natehtali diarilglicerol in 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranozil trikloroacetimidat. Direktno v bučko smo destilirali DKM in ko sta se spojini raztopili, smo bučko ohladili na ledeni kopeli. Sledil je dodatek TMSOTf, ki deluje kot aktivator sladkorja v ustrezenu glikozilnemu donorju, ki ima dobro izstopajočo skupino

na anomerni hidroksilni skupini, ostale hidroksilne skupine pa so zaščitene z acetilno skupino. V drugi stopnji reakcije pride do učinkovite in stereoselektivne reakcije z glikozilnim akceptorjem. Mehanizem je soroden bimolekularni nukleofilni substituciji S<sub>N</sub>2 (**Shema 8**) (23). Stereoselektivnost reakcije zagotovimo z ustreznimi reakcijskimi pogoji, kot je nizka temperatura in izbira diklorometana kot topila.

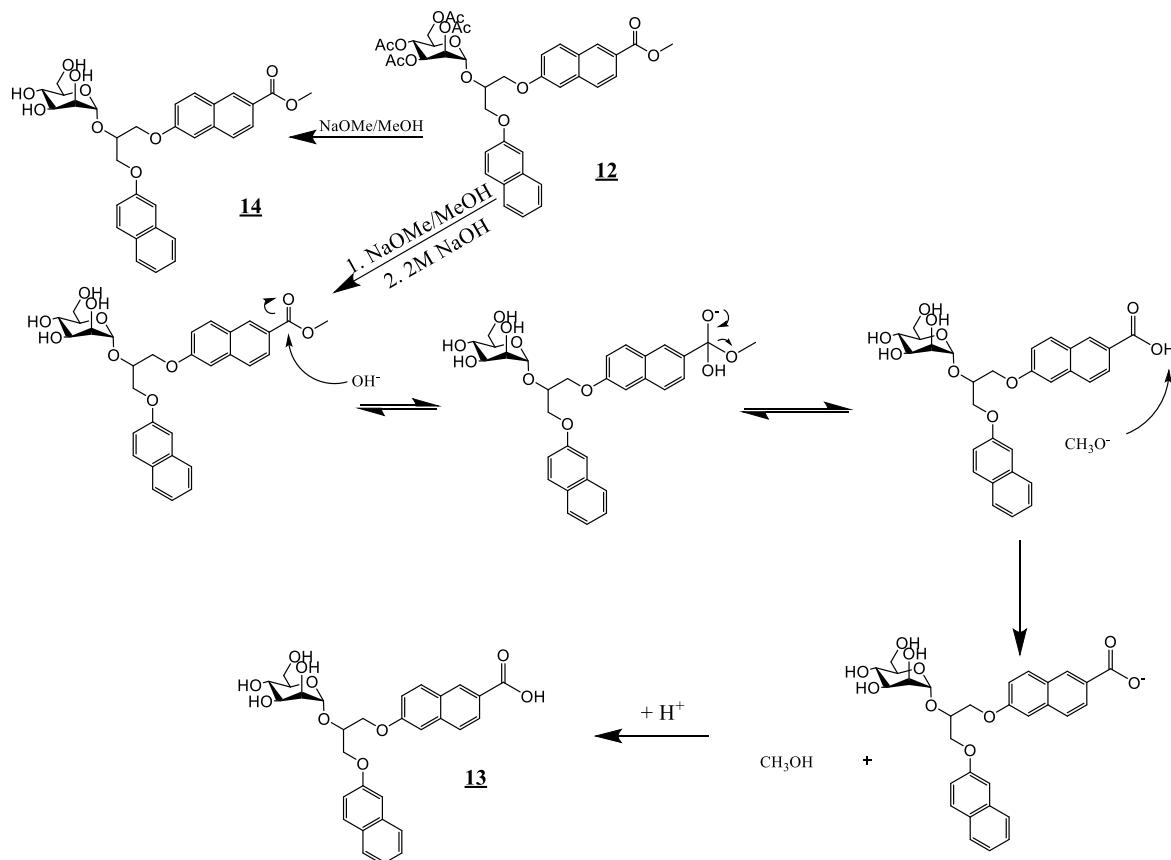


**Shema 8:** Glikozilacija

#### 5.1.4 Sinteza spojin 13 in 14

V nadaljevanju smo spojini 12 po Zemplénovi metodi odstranili acetilne estre sladkornega obroča (**Shema 9**). Pri tem je potekla reakcija preestrenja, pri kateri smo uporabili katalitično količino NaOMe v brezvodnem MeOH (24). Na ta način smo dobili prvi monomerni antagonist – spojino 14, ki smo ji selektivno odstranili acetilne skupine, pri čemer metilni ester ni reagiral. Večjemu delu spojine pa smo še dodatno hidrolizirali metilni ester pod alkalnimi pogoji (**Shema 9**) in dobili spojino 13, ki je drugi potencialni antagonist DC – SIGN, del spojine 13 pa smo nadalje uporabili za pripenjanje distančnika.

Pri alkalni hidrolizi metilnega estra gre za nukleofilno substitucijo, pri kateri ima baza vlogo katalizatorja. Sicer baza v tem primeru nima vloge pravega katalizatorja, saj se med reakcijo porablja. Nukleofilna hidroksilna skupina napade karbonilni ogljikov atom estra, ki je elektrofilni center – ima pomanjkanje elektronov, pri tem nastane nestabilni tetraedrični intermedijat. Metilatni anion se odcepi, pride do nastanka karboksilne kisline, od tu naprej pa je reakcija ireverzibilna, saj metilatni anion karboksilni skupini odtegne proton. Z dodatkom kisline pretvorimo karboksilat nazaj v neionizirano obliko (25).

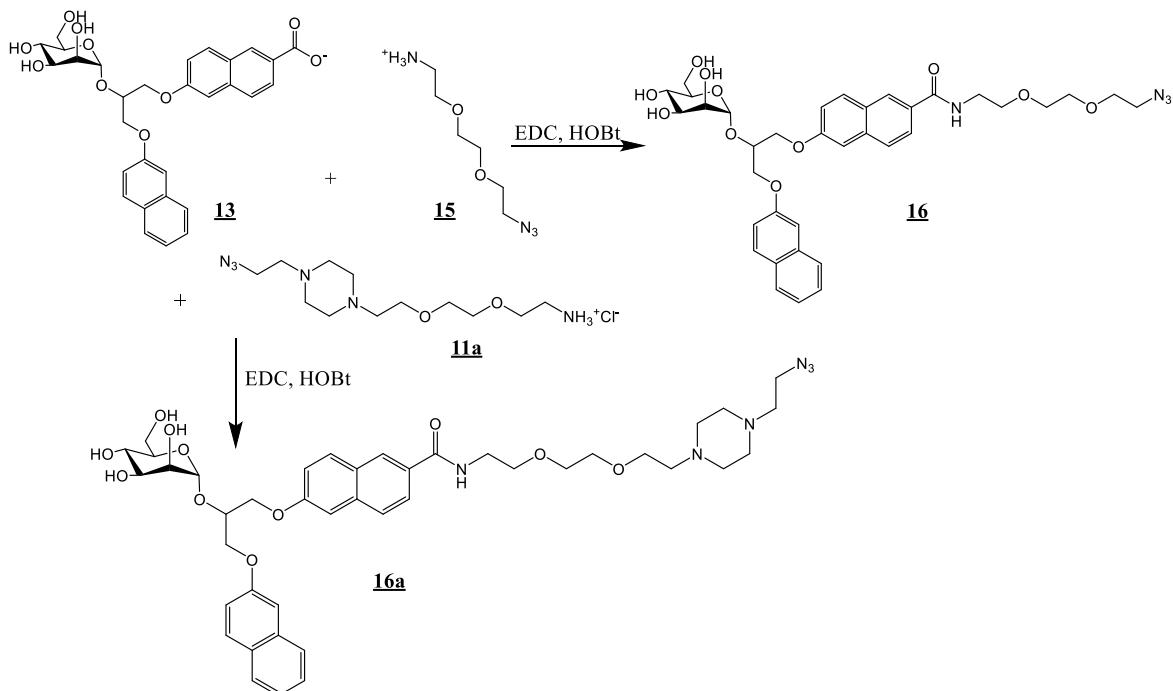


**Shema 9:** Sinteza spojin 13 in 14.

### 5.1.5 Reakcija spojine 13 z distančnikom

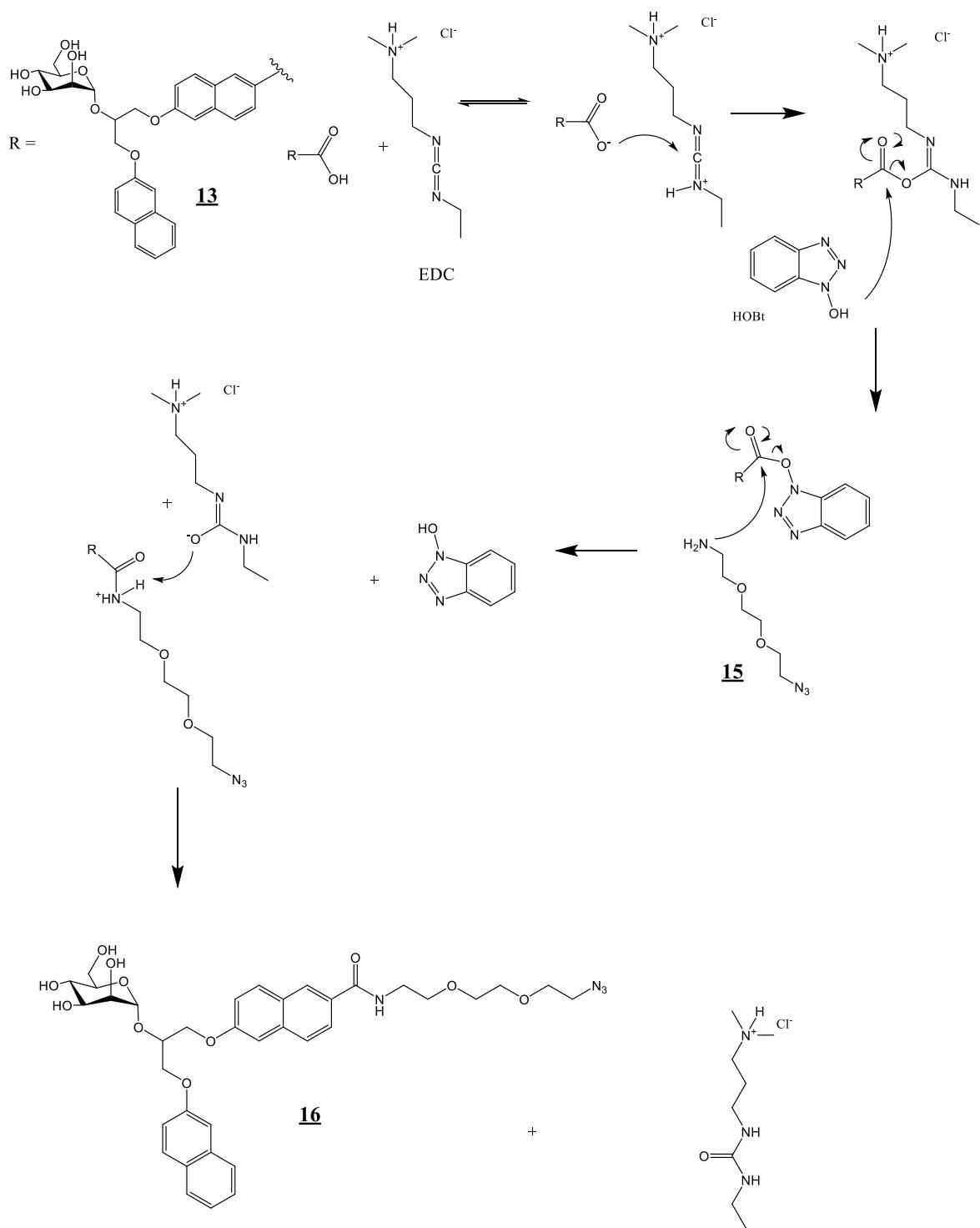
Spojini 13 smo želeli pripeti distančnik 15 oziroma 11a (Shema 10). Z dvema različnima distančnikoma smo želeli imeti večjo raznovrstnost samih monovalentnih antagonistov, kot tudi tetravalentnih antagonistov DC – SIGN. Zanimalo nas je tudi, kakšna je tista optimalna dolžina distančnika, s katerim bi tetravalentni antagonist tvoril močnejše interakcije s tetramerom receptorja DC – SIGN.

Sintezo smo si zastavili tako, da smo polovico količine spojine 13 želeli sintetizirati z distančnikom 15, preostalo polovico pa z distančnikom 11a. Ker je sinteza z distančnikom 15 zelo slabo potekla in smo imeli zelo slab izkoristek, smo se odločili sintetizirati tudi preostalo količino spojine 13 z istim distančnikom. Tako smo celotno reakcijo preusmerili samo v sintezo z distančnikom 15, da bi imeli dovolj veliko količino spojine za sintezo končnega dendrona. S tem smo spremenili načrt same magistrske naloge, sam pa vidim to stopnjo sinteze kot ključno pri samem eksperimentalnem delu.



**Shema 10:** Prvoten načrt sinteze z dvema distančnikoma

Distančnik smo pripeli na spojino **13** s pomočjo 3-(((etilimino)metilen)amino)-N,N-dimetilpropan-1-amonijevega klorida (EDC), da smo lahko tvorili amid (Shema 11). EDC olajša sintezo amidne vezi, saj se uporablja kot sklopitveni reagent, ki aktivira karboksilno kislino. Najprej odtegne karboksilni skupini proton H<sup>+</sup>, s čimer poveča njeno nukleofilnost, sam pa postane močan elektrofil s protoniranjem karbodiimidnega dušikovega atoma. Karboksilatni nukleofil napade kation dvojne vezi, pri čemer nastane aktiviran ester. Optimizacija sinteze amidne vezi poteka z dodatkom pomožnega nukleofila 1-hidroksibenzotriazola (HOBr), ki skrajša dolg reakcijski čas in omeji tvorbo stranskih produktov. HOBr napade nestabilni intermediat O-acilno sečnino in tvori bolj stabilen aktiviran ester, s čimer se poveča izkoristek, sama reakcija potem poteka v smeri sinteze amida z distančnikom **15**. Z dodatkom HOBr se izognemo premestitveni reakciji nastanka N-acilsečnine, do katere pride zaradi intramolekularnega napada sosednje amino skupine na karbonilno skupino aktiviranega estra. N-acilsečnina je šibek elektrofil in zaradi tega tvorba amidne vezi ne poteče.(18).

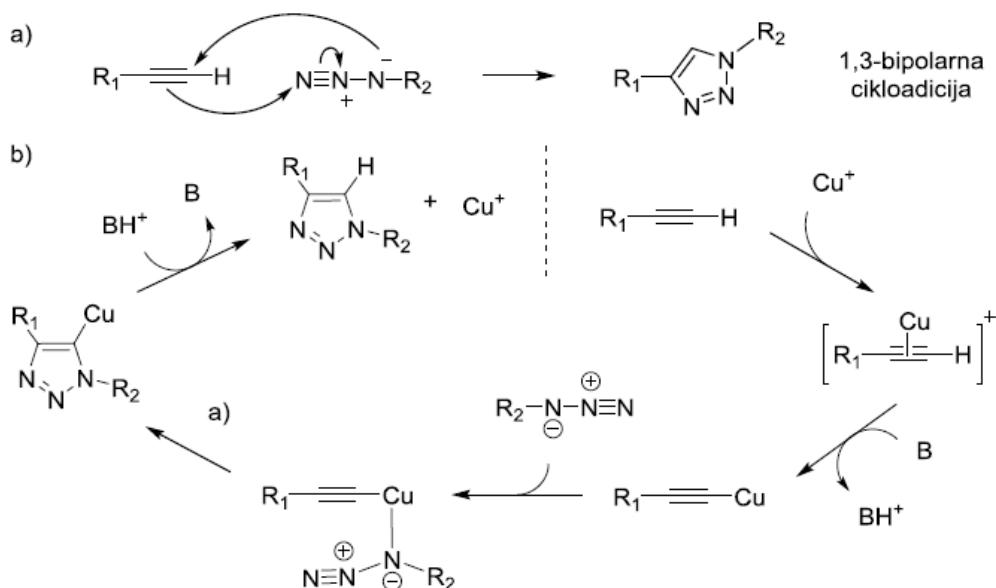


**Shema 11:** Sinteza amida s pomočjo EDC in HOBT

### 5.1.6 reakcija Klik

Potem ko smo sintezo spojine **16** ponovili s preostalo količino in združeni količini spojine zaščitili hidrosilne skupine manoznega jedra z acetilnimi skupinami, je sledila sinteza dendrona. Reakcija spada v področje organskih sintez, ki ga imenujemo klik

kemija. V našem primeru gre za klik reakcijo s  $\text{Cu}^+$  katalizirano azid – alkin ligacijo. Gre za sintezo 1,2,3-triazolov, ki je podobna Huisgenovi različici sinteze azid-alkinov (26, 27). Z dodatkom  $\text{Cu}^+$  smo aktivirali acetilenske skupine spojine **18** za reakcijo 1,3-bipolarne cikloadicije z organskim azidom spojine **17**, pri čemer je nastal izključno 1,4-disubstituiran regioizomer 1,2,3-triazolnega heterocikličnega obroča (**Shema 12**). Mehanizem reakcije vključuje prisotno bazo, v našem primeru je to DIPEA, ki odtegne kisel proton acetilenske skupine. Ko pride do koordinacijske vezave katalizatorja na trojno vez, se acetilenskemu protonu močno zniža  $\text{pK}_\text{a}$ , kar omogoči odcep  $\text{H}^+$  s pomočjo baze (**Shema 12**). Katalizator nadalje poveže azid s substratom preko tvorbe koordinativne vezi. Vezava poteka preko dušikovega atoma, ki je vezan direktno na ogljikov atom. Potem sledi 1,3-bipolarna cikloadicija, pri čemer pride do tvorbe 1,4-disubstituiranega 1,2,3-triazolnega obroča. Na koncu elektrofilni donor ujame triazolil-bakov intermediat, pri čemer nastane končni produkt reakcije, katalizator pa izstopi iz molekule (se regenerira) (28).



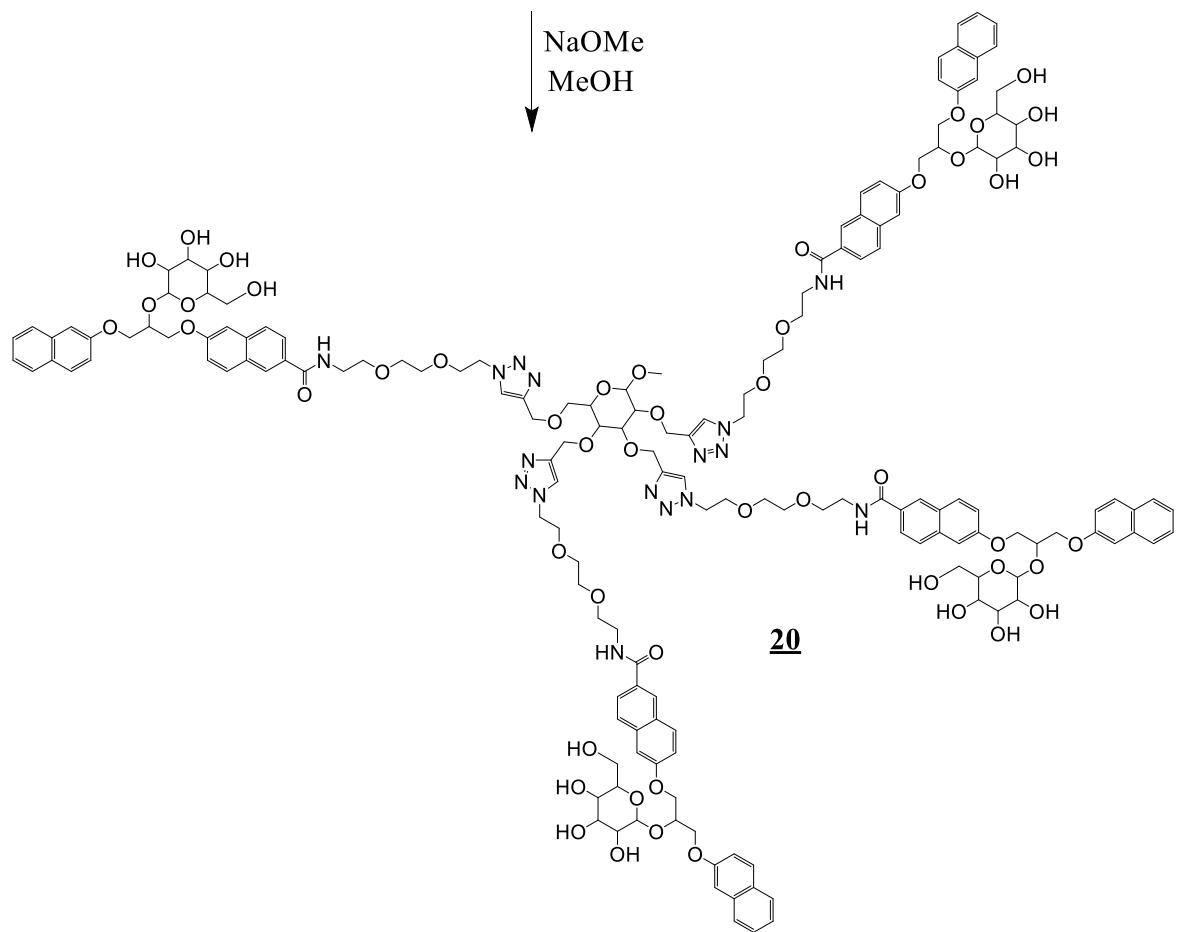
**Shema 12:** a) Smer premika elektronov pri 1,3-bipolarni cikloadiciji.

b) Mehanizem reakcije in vloga katalizatorja. Povzeto po (29).

Sinteza tetravalentnega dendrona nam je uspela, kar so nam pokazali NMR in masni spekter. Sicer je iz NMR spektra veliko težje določiti strukturo, saj gre za spojino z ogromno molsko maso, pri kateri se signali v spektru prekrivajo, pri masnem spektru pa je viden masni fragment, s katerim smo potrdili nastanek naše spojine. Sledila je še odščita acetilnih skupin z Zemplénovo metodo s pomočjo  $\text{NaOMe}/\text{MeOH}$ , s čimer smo dobili končno spojino **20** (**Shema 13**).



↓  
NaOMe  
MeOH

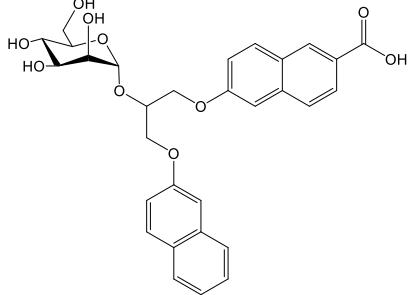
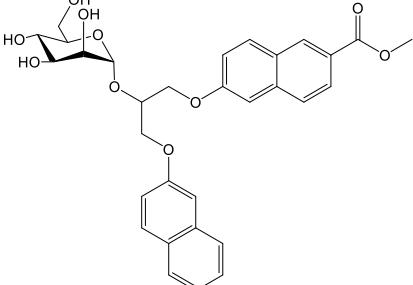
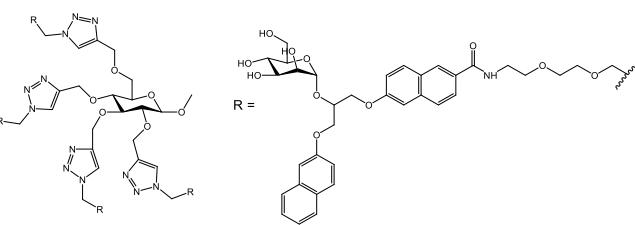
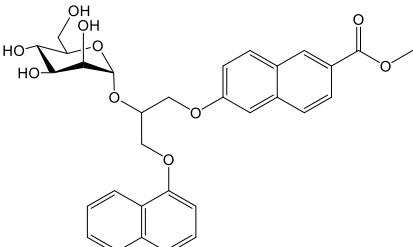


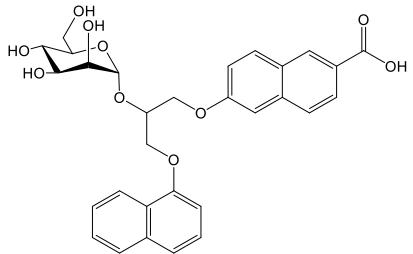
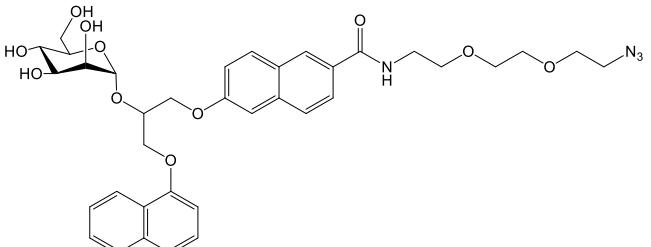
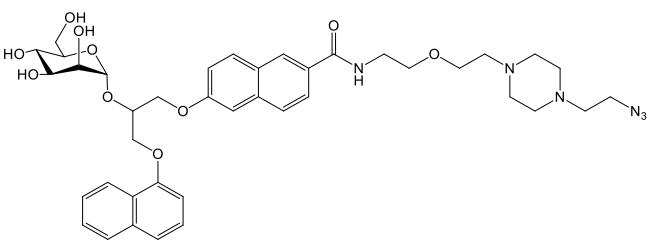
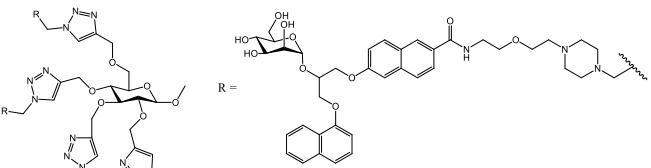
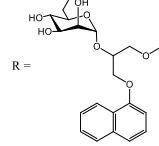
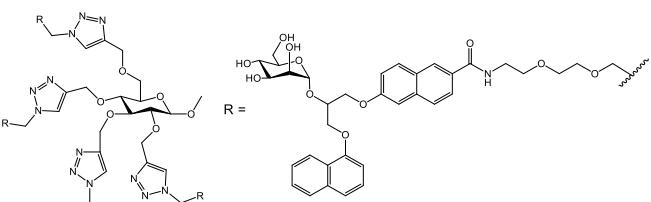
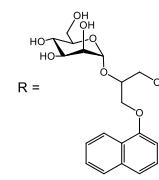
**Shema 13:** Končni tetravalentni dendron.

## 5.2 REZULTATI BIOLOŠKEGA VREDNOTENJA

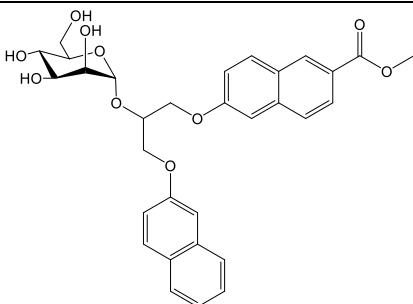
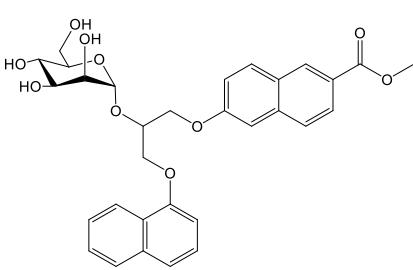
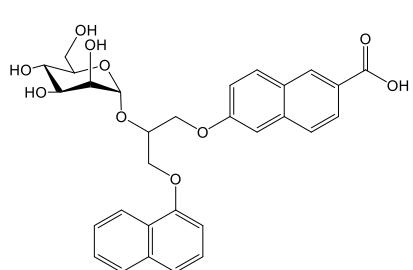
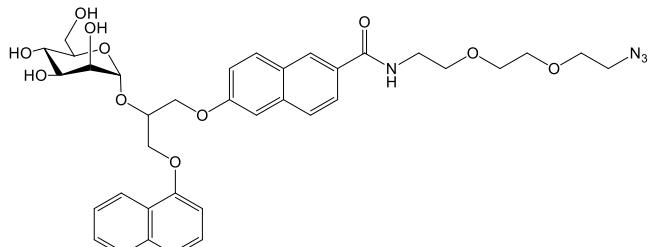
Ovrednotili smo odstotek vezave sintetiziranim spojinam **13**, **14** in **20** na receptorju DC – SIGN in jih primerjali s spojinami **TTJ-12**, **TTJ-13**, **TTJ-20**, **TTJ-18**, **TTJ-24** in **TTJ-25**, ki jih je istočasno sintetizirala Tjaša Jeke (30), in so prikazane v *Preglednici 1*. Najboljšim spojinam smo določili vrednosti IC<sub>50</sub>, ki so prikazane v *Preglednici 2*.

*Preglednica 1:* Rezultati vrednotenja sintetiziranih spojin na receptorju DC – SIGN.

Spojina	Struktura	Koncentracija (mM)	% vezave
<b>13</b>		0,5	- 54
		0,1	- 5
<b>14</b>		0,5	58
		0,1	5
<b>20</b>		0,5	5
		0,1	1
<b>TTJ-13</b>		0,5	67
		0,1	39

<u>TTJ-12</u>		0,5	75
		0,1	6
<u>TTJ-20</u>		0,5	64
		0,1	27
<u>TTJ-18</u>		0,5	22
		0,1	14
<u>TTJ-24</u>	 R = 	0,5	25
		0,1	26
<u>TTJ-25</u>	 R = 	0,5	1
		0,1	12

**Preglednica 2:** Spojine, ki smo jim določili vrednosti IC<sub>50</sub>.

Spojina	Struktura	DC – SIGN IC <sub>50</sub> [mM]
<b>14</b>		0,433 ± 0,016
<b>TTJ-13</b>		0,100 ± 0,0097
<b>TTJ-12</b>		0,224 ± 0,021
<b>TTJ-20</b>		0,107 ± 0,016

### 5.2.1 DC – SIGN

Med vsemi spojinami, ki smo jim določali IC<sub>50</sub>, kaže največjo aktivnost spojina **TTJ-13**. Če jo primerjamo s spojino **TTJ-20**, vidimo skoraj enako vrednost IC<sub>50</sub>, kar pomeni, da distančnik ne tvori interakcij z receptorjem, ampak je usmerjen izven površine proteina. Razlika med spojinama **TTJ-13** in **TTJ-12** je v metilnem estru karboksilne skupine. Karboksilna skupina spojine **TTJ-12** vpliva negativno na IC<sub>50</sub>, saj je vrednost več

kot dvakrat večja v primerjavi s spojino **TTJ-13**. To lahko razložimo s tem, da ima karboksilna skupina večji elektronegativen učinek in zmanjša hidrofobne interakcije naftalenskega obroča s Phe313 receptorja, metilni ester ta učinek zmanjša, saj zmanjša polarnost spojine.

Razlika med spojinama **TTJ-13** in **14** je samo v mestu substitucije naftalenskega obroča. Spojina **14** ima naftalenski obroč na mestu dva, **TTJ-13** pa na mestu ena, in vendarle ima spojina **14** vrednost  $IC_{50}$   $0,433 \pm 0,016$  mM, kar je več kot štirikratnik vrednosti spojine **TTJ-13**. To nam pove, da je substitucija na mestu ena, izhodna spojina je bila 1-naftol, bolj ugodna za interakcije z receptorjem DC – SIGN, saj je bolj ugodno orientirana v prostoru.

$IC_{50}$  vrednost spojine **13** bi morala imeti podoben odnos do spojine **14**, na enak način kot ga imata spojini **TTJ-13** in **TTJ-12**, kjer je razlika samo v metilnem estru. Vendar do vezave spojine na receptor sploh ni prišlo (negativen odstotek vezave, verjetno zaradi agregacije), zato vrednosti  $IC_{50}$  nismo mogli določiti.

Dendronske spojine **20**, **TTJ-24**, in **TTJ-25** imajo zelo nizke odstotke vezave, ker se v testnem sistemu slabo raztapljamjo. Spojina **20** je bila še posebej slabo topna in zato sami rezultati vezave niso relevantni in vrednosti  $IC_{50}$  nismo določili. Pričakovali bi, da se bo dendron topil, glede na število hidroksilnih skupin, vendar je treba upoštevati tudi število naftalenskih obročev in samo molsko maso, ki je večja kot 3000 g/mol, s čimer lahko razložimo slabo topnost dendronskih spojin. Postopek sinteze dendronov je bil šele nedavno razvit in bo omogočil pripravo novih dendronskih antagonistov. Zagotavljanje njihove topnosti pa predstavlja nov izziv za bodoče raziskovanje na tem področju. Topnost dendronske spojine in ustrezno hidrolipofilno ravnotežje je ključen farmakokinetičen parameter, ki bi zagotovil tudi *in vivo* biološki učinek in terapevtsko uporabnost. Zdi se, da je ustrezno visoko afiniteto vezave v nanomolarnem področju možno doseči le z multimerno predstavljivijo ligandov, saj monomerni antagonisti zaenkrat nimajo dovolj visoke afinitete do vezavnega mesta DC – SIGN (29). Do sedaj najmočnejša antagonista sta spojini **TSZ-20**, ki ima vrednost  $IC_{50}$  53  $\mu$ M in **TSV-20**, ki ima vrednost  $IC_{50}$  34  $\mu$ M (**Slika 7**) (16, 17). Zavedati se je potrebno, da so tovrstne spojine namenjene topikalni aplikaciji na vaginalno sluznico, kar zmanjša potrebo po visokih odmerkih peroralne aplicirane učinkovine. Pri lokalni uporabi namreč lažje dosežemo visoko koncentracijo učinkovine na mestu delovanja. Učinkovine, ki bi inhibirale vezavo virusa na DC-SIGN, bi tako sočasno preprečevale lokalizirano okužbo in raztros virusa HIV po telesu gostitelja.

## 6 SKLEP

Receptor DC – SIGN je prisoten izključno na površini nezrelih dendritičnih celic. Gre za vzorčno prepoznavni receptor, ki prepozna manozo ali fukozo vsebujoče PAMPs številnih mikroorganizmov. Pri tem pomembno sodeluje pri oblikovanju imunskega odziva in posledično predstavlja potencialno tarčo v razvoju protimikrobnih učinkovin.

V okviru magistrske naloge smo želeli sintetizirati potencialne monovalentne antagoniste receptorja DC – SIGN **13**, **14**, **16** in **16a**. Spojini **16** in **16a** smo v nadaljevanju želeli uporabiti za sintezo tetrivalentnih dendronov, z namenom povečanja avidnosti na receptorju DC – SIGN. Pri sintezi določenih vmesnih produktov smo imeli zelo slab izkoristek, zato smo načrt preusmerili v sintezo spojine **16**, ki nam jo je nadaljnje uspelo uporabiti pri sintezi tetrivalentnega dendrona.

Spojine **14**, **TT-12**, **TTJ-13** in **TTJ-20** izkazujejo afiniteto za vezavo na CRD domeno receptorja DC – SIGN v mikromolarnem območju, kar je za monovalentne antagoniste največ, kar je trenutno dosegljivo, saj zasedejo zgolj eno CRD domeno tetramerja DC – SIGN. Do sedaj najmočnejša antagonista sta spojini **TSZ-20**, ki ima vrednost IC<sub>50</sub> 53 µM in **TSV-20**, ki ima vrednost IC<sub>50</sub> 34 µM (**Slika 7**) (16, 17). Pri tetrivalentnih dendronih **20**, **TTJ-24** in **TTJ-25** je bila pri testiranju največji problem topnost, sploh spojina **20** se je zelo slabo raztopljalna pri pogojih v testnem sistemu. Zaradi tega tudi sami rezultati vezave niso relevantni in vrednosti IC<sub>50</sub> nismo določili. Kljub temu nam je kompleksna sinteza tetrivalentnega dendrona uspela, v nadaljevanju pa bi lahko po analogni sintezni metodologiji sintetizirali sorodne derivate z zmanjšano lipofilnostjo in s tem boljšo topnostjo. S tem bi lahko uresničili potencial, ki ga predstavlja tetrivalentna predstavitev spojin in posledična vezava na več CRD domen tetramera DC – SIGN, za učinkovito inhibicijo interakcij med gp120 virusa HIV – 1 in DC – SIGN.

## 7 LITERATURA

1. Bancherau, J., Briere, F., Caux F, Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y., in drugi. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18:767–811.
2. Repnik, U., Bergant, M., & Jeras M. (2004). Lastnosti in možnosti uporabe dendritičnih celic, antigensko specifičnih modulatorjev imunskega odziva. *Zdrav Ves*, 73: 69-72.
3. Geijtenbeek, T., Engering, A., & van Kooyk, Y. (2002). DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *J Leukocyte Biol*, 71: 921-931.
4. Geijtenbeek, T., & van Kooyk, Y. (2003). DC-SIGN: Escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol*, 3: 697-709.
5. Švajger, U., Obermajer, N., Anderluh, M., Kos, J., & Jeras, M. (2011). DC-SIGN ligation greatly affects dendritic cell differentiation from monocytes compromising their normal function. *J Leukocyte Biol*, 89: 893-905.
6. Figdor, C., van Kooyk, Y., & Adema, G. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Nat Rev Immunol*, 2: 77-84.
7. Anderluh, M. (2012). A paradigm of C-type lectin binding inhibition. *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. Chapter 7; Prof. Chuan-Fa Chang (Ed.), ISBN: 978-953-51-0864-1, InTech
8. Anderluh, M., Jug, G., Švajger, U., & Obermajer, N. (2012). DC-SIGN antagonists, a potential new class of anti-infectives. *Curr Med Chem*, 19: 992-1007.
9. Appelmelk, B., van Die, I., & van Vliet, S. (2003). Cutting Edge: Carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with Dendritic Cells-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin on Dendritic Cells. *J Immunol*, 170: 1635-1639.
10. Wu, L., & Kewal Ramani, V. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol*, 6: 859-868.
11. Guo, Y., Feinberg, H., Conroy, E., Mitchell, D., Alvarez, R., Blixt, O., in drugi. (2004). Structural basis for distinct ligand-binding and targetting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat Struct Mol Biol*, 11: 591-598.

12. Reina, J., Diaz, I., Nieto, P., Campillo, N., Paez, J., Tabarani, G., in drugi. (2008). Docking, synthesis and NMR studies of mannosyl trisaccharide ligands for DC-SIGN lectin. *Org Biomol Chem*, 6: 2743-2754.
13. Obermajer, N., Sattin, S., Colombo, C., Bruno, M., Švajger, M., Anderluh, M., in drugi. (2011). Design, synthesis and activity evaluation of mannose-based DC-SIGN antagonists. *Mol Divers*, 15: 347-360.
14. Andreini, M., Doknic, D., Sutkeviviute, I., Reina, J., Duan, J., Chabrol, E., in drugi. (2011). Second generation of fucose-based DC-SIGN ligands: affinity improvement and specificity versus Langerin. *Org Biomol Chem*, 9: 5778-5786.
15. Holla, A., & Skerra, A. (2011). Comparative analysis reveals selective recognition of glycans by the dendritic cell receptors DC-SIGN and Langerin. *Oxford Uni Press*, 659-669.
16. Hajšek, D. (2012). Testni sistem za določanje afinitete antagonistov receptorja DC-SIGN in vitro, Diplomsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
17. Tomašič, T., Hajšek, D., Švajger, U., Luzar, J., Obermajer, N., Petit-Hartlein, I., in drugi. (2014). Monovalent mannose-based DC-SIGN antagonists: Targeting the hydrophobic groove of the receptor. *Eur J Med Chem*, 75: 308-326.
18. Anderluh, M., Mravljak, J., Perdih, A., Sova, M., & Pečar, S. (2010). *Farmacevtska kemija III Vaje in Seminarji*, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani.
19. Smith, M. (2013). *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanism and Structure, 7th Edition*; 373-568, 859-1252. John Wiley & Sons.
20. [http://highered.mheducation.com/sites/dl/free/0073402745/990527/sample\\_chapter.pdf](http://highered.mheducation.com/sites/dl/free/0073402745/990527/sample_chapter.pdf). (dostopano 7.9.2015).
21. [http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn\\_Pages/Boc\\_Protection/Boc\\_Protection\\_HCl\\_Mech.htm](http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_HCl_Mech.htm). (dostopano 7.9.2015).
22. <http://www.masterorganicchemistry.com/organic-1/>. (dostopano 2.9.2015).
23. <http://ion.chem.usu.edu/~tchang/Chem7300/Carbohydrate/Chapter%205%20Glycosylation.pdf>. (dostopano 8.9.2015).
24. Lindhorst, T. (2003). *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2. izdaja; 39-77. WILEY-VCH
25. Dewick, P. (2006). *Essentials of Organic Chemistry: For Students of Pharmacy, Medicinal Chemistry and Biological Chemistry*; 221-282. John Wiley & Sons.

26. Rostovtsev, V., Green, L., Fokin, V., & Sharpless, K. (2002). A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective ligation of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 41(14): 2596-3005.
27. Huisgen, R. (1984). *Introduction, survey and mechanism. Poglavlje 1, str. 1-176 v knjigi: 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry (Vol 1).* Uredil Padwa A. Wiley-Interscience. New York. 1984; 1-176.
28. Himo, F., Lovell, T., Hilgraf, R., Rostovtsev, V., Noddleman, L., Sharpless, K., in drugi. (2005). Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *J Am Chem Soc*, 127(1): 210-216.
29. Lamut, A. (2014). Sinteza in biološko vrednotenje dendronskih antagonistov receptorja DC-SIGN, Diplomsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
30. Jeke, T. (2015). Sinteza in biološko vrednotenje glicerolomanozidnih dendronov kot potencialnih antagonistov receptorja DC-SIGN. Magistrsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.