

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ORGANICKÉ A JADERNÉ CHEMIE

DIZERTAČNÍ PRÁCE

SYNTÉZA OLIGOSACHARIDŮ D-HEXOSAMINOVÉHO TYPU –
POTENCIÁLNÍCH LIGANDŮ AKTIVAČNÍCH RECEPTORŮ NK BUNĚK

PRAHA 2006

ANNA KOVALOVÁ

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně pod odborným vedením RNDr. Miroslava Ledviny, CSc., a že řádně cituji všechna převzatá data a skutečnosti

V Praze dne 12. května 2006

Anna Kovalová

A. Kovalová
.....

Obsah:

1 ÚVOD	2
2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	3
2.1 BIOCHEMICKÉ POZADÍ PRÁCE	3
2.1.1 <i>Výskyt a funkce 2-amino-2-deoxysacharidů</i>	3
2.1.2 <i>Přirozené zabíječské buňky a jejich receptory</i>	4
2.2 TRENDY V CHEMICKÉ SYNTÉZE OLIGOSACHARIDŮ	6
2.2.1 <i>Glykosidická vazba u 2-amino-2-deoxysacharidů</i>	7
2.2.2 <i>Glykosylační metody využitelné pro 2-amino-2-deoxyhexopyranosové stavební jednotky</i>	9
2.2.3 <i>Nejčastěji používané glykosyldonory</i>	15
2.2.4 <i>Strategie přípravy oligosacharidů</i>	17
3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	18
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	20
4.1 SYNTÉZA OLIGOSACHARIDOVÝCH MIMETIK.....	20
4.1.1 <i>Příprava oligosacharidů obsahujících 2-amino-2-deoxyglukopyranosové jednotky</i>	20
4.1.2 <i>Příprava oligosacharidů obsahujících 2-amino-2-deoxygalaktopyranosové jednotky</i>	27
4.2 VÝSLEDKY AFINITNÍCH TESTŮ	39
4.2.1 <i>Afinitní testy s proteinem NKR-p1A</i>	41
4.2.2 <i>Afinitní testy s proteinem CD69</i>	41
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
5.1.1 <i>Obecné experimentální metody</i>	43
5.1.2 <i>Metodika testů afinity k aktivačním receptorům NK buněk NKR-PA a CD69</i>	44
5.2 EXPERIMENTÁLNÍ POSTUPY	46
5.2.1 <i>NMR data připravených látek</i>	85
6 ZÁVĚR	112
6.1 VYUŽITÍ VÝSLEDKŮ A DALŠÍ PERSPEKTIVY.....	114
6.2 SEZNAM ZKRATEK	115
6.3 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	120

1 ÚVOD

Za posledních několik desítek let je pozorován zvýšený výskyt onemocnění spojených s poruchami funkce imunitního systému, který souvisí s výraznými změnami životního prostředí a civilizačních návyků v moderní společnosti. Cesty k jejich léčbě jsou předmětem intenzivního výzkumu. Deriváty sacharidů, jejich oligomery a konjugáty se dostávají v této souvislosti právem do středu pozornosti, která jim byla dlouho upírána, přestože jako častá součást signálních mechanismů v organismu jsou právě sacharidy velmi vhodným prostředkem specifické modulace aktivity jednotlivých částí imunitního systému.

Jedním z potenciálních nástrojů pro terapii nádorových a virových onemocnění jsou přirozené zabíječské buňky (NK buňky). Na jejich povrchu se nacházejí aktivační a deaktivující receptory interagující mimo jiné s 2-amino-2-deoxyhexopyranosovými jednotkami, které jsou součástí jejich přirozených ligandů. Pokud by se podařilo najít způsob, jak posunout rovnováhu mezi přijímanými signály a aktivovat tak NK buňky, měla by medicína k dispozici velmi univerzální nástroj k léčení infekcí a nádorových onemocnění.

Předkládaná disertační práce se zabývá syntézou potenciálních ligandů aktivačních receptorů NK buněk – oligosacharidových mimetik odvozených od 2-amino-2-deoxyglukopyranosy a 2-amino-2-deoxygalaktopyranosy.

2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

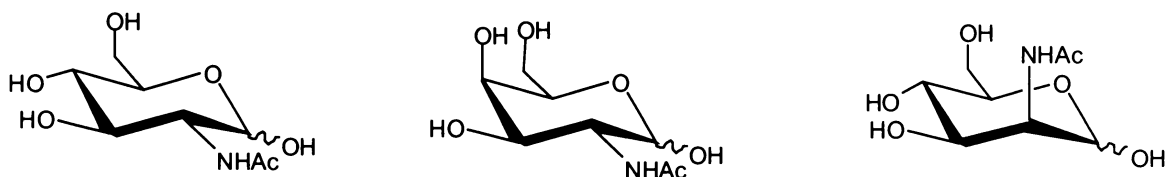
2.1 BIOCHEMICKÉ POZADÍ PRÁCE

2.1.1 Výskyt a funkce 2-amino-2-deoxysacharidů

S přibývajícím množstvím informací, které o biologických dějích probíhajících v živých organismech máme, se čím dál zřetelněji ukazuje, že vedle ostatních významných biopolymerů (proteiny, nukleové kyseliny apod.) hrají oligosacharidy daleko důležitější roli, než se předpokládalo¹. Podílejí se na klíčových procesech – mají funkci stavební, jsou zásobárnou energie a díky své značné diverzitě jsou důležitým zdrojem informací pro biologický systém. Vedle sacharidů nesoucích standardní kyslíkaté funkční skupiny jsou zastoupeny i jejich 2-amino-2-deoxyderiváty, někdy označované jako aminosacharidy.

N-acetyl-D-hexosaminové (zejména *N*-acetyl-D-glukosaminové, *N*-acetyl-D-galaktosaminové a *N*-acetyl-D-mannosaminové) jednotky (Obr. 1) se vyskytují v mnoha biologicky významných oligosacharidech a glykokonjugátech. *N*-acetylglukosaminové jednotky vázané $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidickou vazbou tvoří např. polysacharid chitin, jsou součástí peptidoglykanu bakteriálních stěn, obsahuje je základní jádro (*core*) sacharidových řetězců glykoproteinů, kde zásadně ovlivňují jejich prostorové uspořádání². Kromě toho plní oligosacharidy obsahující 2-amino-2-deoxyhexopyranosy mnoho dalších funkcí spojených s rozpoznáváním na molekulární úrovni, transmembránovým transportem, transkripcí či regulací růstu a proliferace buněk¹.

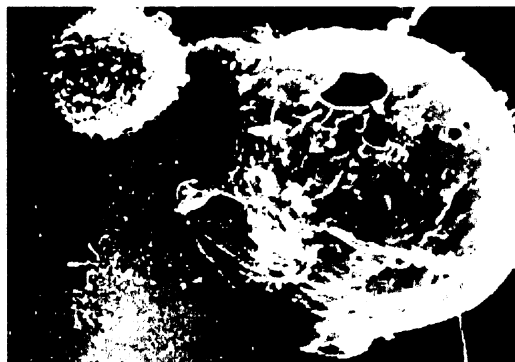
Jednou z oblastí, kde 2-amino-2-deoxysacharidy hrají významnou úlohu, je imunitní systém. Jsou rozpoznávány specifickými receptory na povrchu zdravých i poškozených buněk, tvoří součást některých nádorových antigenů (např. Lewis X). Aminosacharidy jsou předmětem intenzivního výzkumu v souvislosti s vývojem vakcín proti nádorovým onemocněním².



Obr. 1: *N*-acetyl-D-glukosamin, *N*-acetyl-D-galaktosamin a *N*-acetyl-D-mannosamin

2.1.2 Přírodní zabíječské buňky a jejich receptory

Přírodní zabíječské buňky (NK buňky, Obr. 2) jsou jednou z důležitých součástí imunitního systému. Tvoří přibližně 5–10% hlavních jednojaderných buněk v krvi. NK buňky dokáží rozpoznat a zničit poškozené, infikované nebo apoptické buňky³, jejich hlavní funkcí je kontrola infekcí⁴, která je do jisté míry komplementární s rozpoznávacími mechanismy typickými pro cytotoxické



Obr. 2: NK buňka ničí cílovou buňku

T lymfocyty. Imunitní odpověď zprostředkovaná NK buňkami je rychlá, nevyžaduje předcházející imunizaci antigenem ani žádný jiný signál od imunitního systému. Závisí pouze na interakcích mezi strukturami na povrchu cílové buňky a receptory nesenými NK buňkou. Tyto receptory přijímají podle své funkce buď inaktivující nebo stimulační signály, jejichž vzájemná rovnováha určuje aktivitu NK buněk, tj. jejich schopnost zničit cílovou buňku. Vazby mezi receptory NK buněk a jejich ligandy jsou vysoce specifické. Typickými deaktivujícími ligandy, exprimovanými na povrchu zdravých buněk, jsou struktury hlavního histokompatibilního komplexu první třídy. Přítomnost normálního množství těchto struktur zastaví cytotoxické působení NK buňky, na jejíž inaktivující receptory se naváží. Pokud nejsou inaktivujícími receptory rozpoznány, převáží aktivující signály a NK buňka cíl zničí. Aktivujících receptorů a koreceptorů NK buněk je známo značné množství^{5,6,7,8,9}, znalosti o jejich ligandech však zdaleka nejsou tak rozsáhlé. Pro některé z těchto receptorů dokonce ligandy nejsou známy vůbec – na zdravých buňkách takové struktury buď chybí, nebo jsou málo zastoupené či nepřístupné.

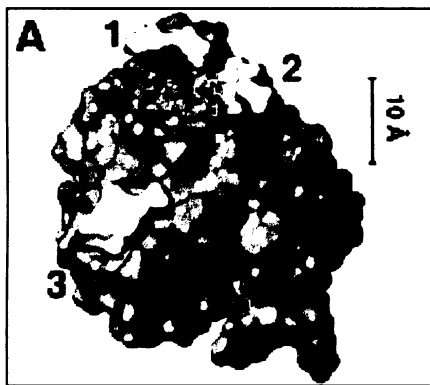
Je všeobecně známo, že NK buňky dokáží rozeznat některé typy nádorů. Na druhou stranu některé nádorové buňky (např. buňky určitých typů nádorů vaječníků) dokáží vylučovat látky inhibující působení NK buněk⁴. Dalším omezením obranné funkce je, že za určitých patologických podmínek nebo při podávání některých léků může dojít k potlačení exprese aktivačních receptorů na povrchu NK buněk a tím i ke snížení jejich aktivity⁶. Dosud uskutečněné pokusy o aktivaci NK buněk méně specifickými aktivátory nebyly úspěšné – např. při experimentech s interleukinem 18 (IL 18) významně vzrostla

aktivita NK buněk, ale zároveň i cytotoxických T lymfocytů. Výše popsaný mechanismus by byl analogií přirozené aktivace NK buněk pomocí aktivačních faktorů (např. IL 12)⁴.

Díky širokému spektru cílových struktur, které jsou NK buňky schopné rozpoznat a zničit, se jeví možnost jejich cílené aktivace, případně ovlivnění jejich funkce *via* aktivační receptory jako velmi perspektivní. Staly by se v takovém případě velmi účinným nástrojem pro léčbu infekčních a nádorových onemocnění. Nezbytnou podmínkou pro takový přístup je však hlubší znalost funkce, vazebných preferencí a ligandů aktivačních receptorů NK buněk.

Předkládaná práce se zabývá přípravou ligandů dvou aktivačních receptorů NK buněk: NKR-p1 a CD69. Tyto receptory jsou specifické tím, že rozpoznávají sacharidové struktury a *N*-acetylovou skupinu sacharidů hexosaminového typu^{10,11}. Přirozené

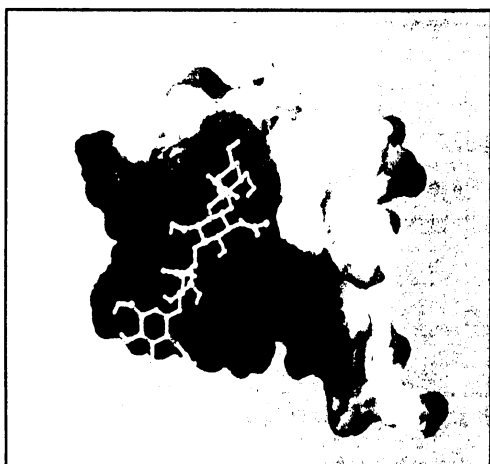
aktivující ligandy, které jsou rozpoznávány receptory NKR-p1 a CD69 na povrchu rakovinných buněk, nejsou známy – jejich protinádorová specificita není dosud určena^{3,12}.



Obr. 3: Receptor CD69 se třemi navázanými monosacharidy

CD69 je důležitý aktivační receptor leukocytů (T lymfocytů, B lymfocytů, NK buněk), který je exprimován v rané fázi jejich aktivace. Řadí se k lektinům C-typu a je dokázáno, že ovlivňuje nejen aktivitu NK buněk, ale i jejich proliferaci nebo tvorbu některých

důležitých molekul (např. CD25)¹³. Fyziologické ligandy tohoto proteinu ještě nebyly identifikovány, je však známa jeho krystalová struktura¹⁴⁻¹⁶ a také fakt, že tento lektin váže *N*-acetylhexosy, zvláště *N*-acetylglukosamin, ve třech oddělených vazebných místech¹⁴ (Obr. 3). Nejlepší dosud nalezený ligand je pentaantenární oligosacharid, získaný z glykoproteinu ovomukoidu⁹. Z těchto znalostí lze odvodit, že vysoce vhodným ligandem pro aktivační receptor CD69 mohou být větvené oligosacharidy, obsahující *N*-acetylglukosaminové jednotky v terminální pozici. V přírodě takové struktury odpovídají například vysoce větveným glykanům, které byly nalezeny na povrchu maligně pozměněných buněk¹³.



Obr. 4: Receptor NKR-p1 s navázaným lin. tetrasacharidem

Aktivační receptor NKR-p1 (CD161) patří rovněž k lektinům C-typu. U člověka je známa pouze jediná forma tohoto proteinu, u myši se vyskytuje ve třech izoformách, z nichž jedna je dokonce inhibující (NKR-p1B)³. Jako testovací systém pro látky připravené v rámci této práce byla použita jeho dimerní rozpustná izoforma NKR-p1A¹⁰ (Obr. 4). Jako ligandy se kromě složitých přirozených oligosacharidů ukázaly opět *N*-acetylhexosaminy, přičemž v řadě *N*-acetylglukosamin, *N*-acetylgalaktosamin, *N*-

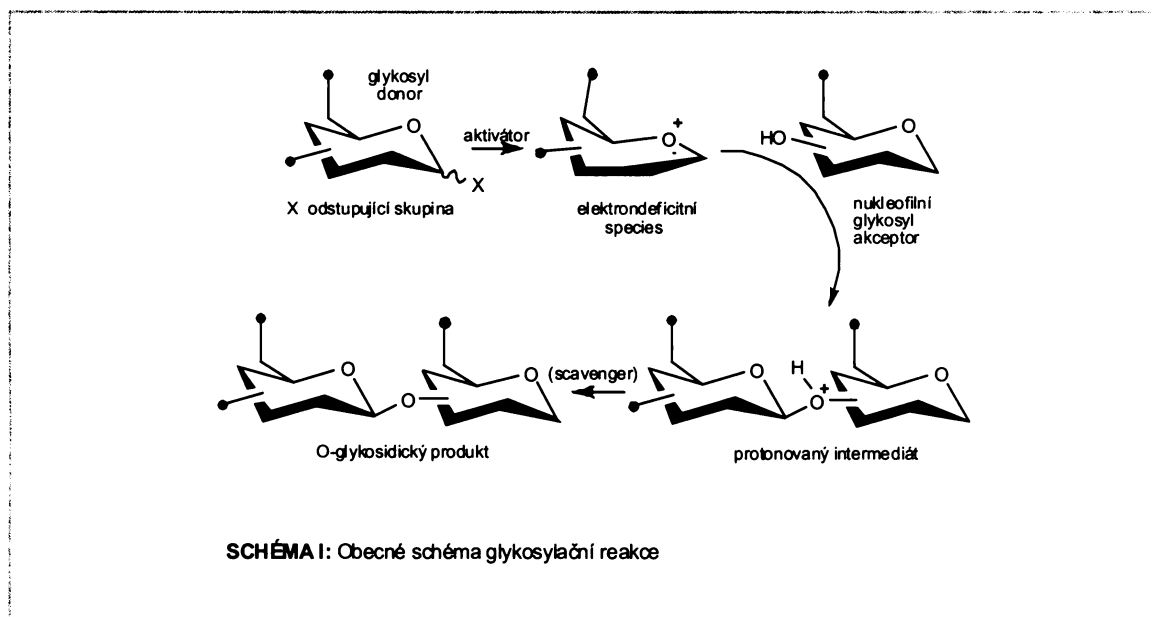
acetylmannosamin se vazebná afinita zvyšuje. Vazebné místo NKR-p1 receptoru má tvar žlábků¹⁷, do kterého se váží lineární oligosacharidy. Jako dosud nejlepší ligand tohoto typu byla nalezena „chitotetraóza“- lineární oligosacharid obsahující čtyři *N*-acetylglukosaminové jednotky spojené $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidickými vazbami.¹⁸

Všechny oligosacharidy, které byly dosud testovány jako ligandy receptorů NKR-p1 nebo CD69, byly získány z přírodních zdrojů nebo byly připraveny enzymatickou syntézou^{13,18,19}. Ne všechny typy oligosacharidů a glykosidických vazeb jsou však tímto způsobem dostupné. Problémem je jak obtížné dělení směsí nechráněných oligosacharidů, tak omezená schopnost enzymů vytvářet nepřirozené glykotypy (sacharidové epitopy) a akceptovat širší spektrum modifikovaných sacharidových substrátů. Organická syntéza *de novo* je alternativou, která nabízí řešení těchto problémů.

2.2 TRENDY V CHEMICKÉ SYNTÉZE OLIGOSACHARIDŮ

Oligosacharidy jsou syntetizovány spojením sacharidových stavebních jednotek – glykosyldonoru a glykosylakceptoru (nebo aglykonu) – pomocí glykosylačních reakcí, tedy nukleofilní substitucí probíhající na anomerním uhlíku glykosyldonoru za vzniku acetalové vazby (tzv. glykosidické vazby). Při její tvorbě je odstupující skupina na uhlíku C(1) nahrazena volnou hydroxylovou skupinou glykosylakceptoru. Cukerné stavební

jednotky jsou však typické tím, že nesou několik hydroxylových skupin, které je nutno

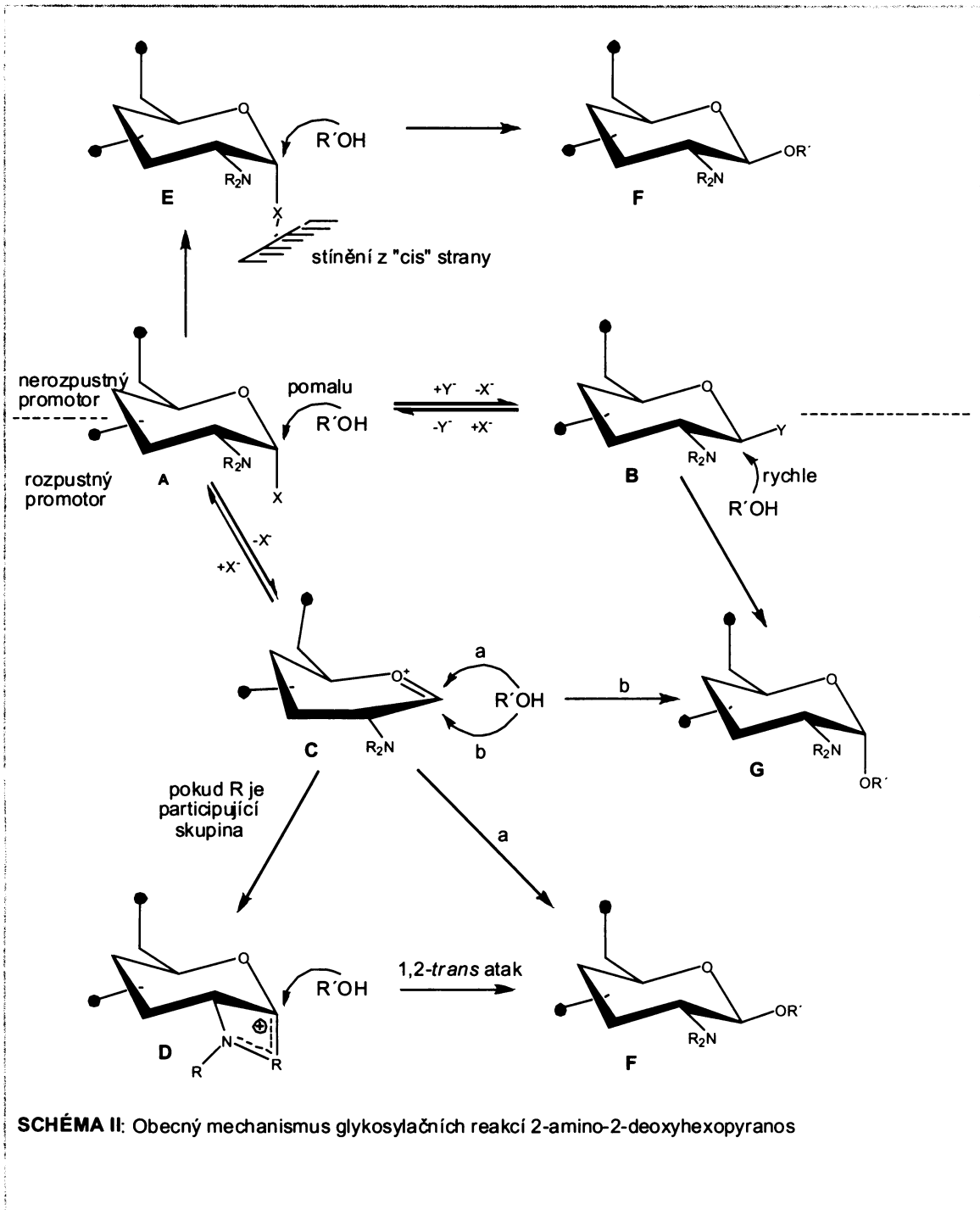


vzájemně odlišit za účelem regiospecifické tvorby glykosidické vazby. K tomu jsou využívány buď různé koncepty ortogonálního a semiortogonálního chránění nebo, ve specifických případech, odlišná reaktivita těchto hydroxylových skupin při určitém uspořádání glykosylační reakce²⁰.

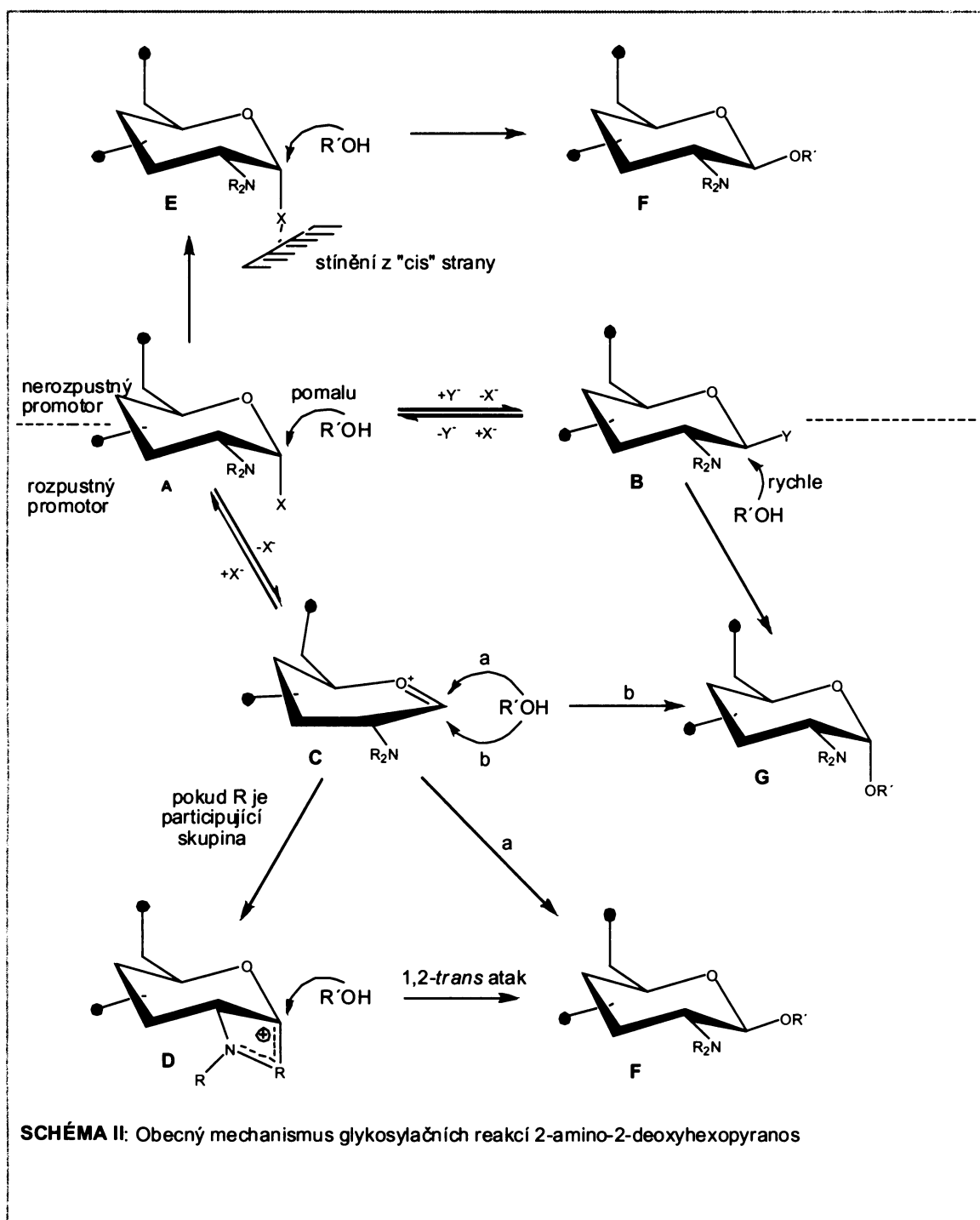
2.2.1 Glykosidická vazba u 2-amino-2-deoxysacharidů

O-glykosidická vazba vzniká nukleofilní substitucí probíhající na anomerním uhlíku glykosyldonoru za tvorby acetalové vazby (Schéma I). Je zahájena aktivací glykosyldonoru použitím vhodného glykosylpromotoru za současné tvorby kladně nabitě částice – oxokarbeniového iontu. Ten je vzápětí atakován hydroxylovou skupinou glykosylakceptoru za vzniku protonovaného intermediátu, který odštěpením protonu přechází na produkt glykosylace.

Důležitým faktorem při tvorbě glykosidické vazby jsou sterické a elektronické vlivy funkčních skupin, přítomných na sacharidovém skeletu (Schéma II)²¹. Zvláště významná je skupina R_2N na uhlíku C(2), který přímo sousedí s reakčním centrem. Tato skupina může participovat na glykosylační reakci, což výrazně ovlivňuje stereoselektivitu reakce, tj. poměr vznikajících produktů – 1,2-*cis*- a 1,2-*trans*-glykosidu. Pokud k takové participaci dochází, vzniká cyklický meziprodukt **D**, kterým je glykosylační reakce řízena směrem k tvorbě 1,2-*trans*-glykosidu **F**. Pokud k participaci nedochází, reakce není stereospecifická.



Dalším faktorem, který ovlivňuje tvorbu glykosidické vazby, je charakter glykosyldonoru a glykosylpromotoru. Interakce odstupující skupiny X s nerozpustným promotorem brání přístupu akceptoru z „cis“ strany a vede k tvorbě *trans*-glykosidu F. *Cis*-glykosid G je možno připravit použitím rozpustného promotoru a glykosyl donoru A s neparticipujícím substituentem v poloze C(2). Glykosyldonor je anomerizací *in situ* převeden na derivát B s 1,2-*trans* orientací odstupující skupiny Y. Pokud je glykosylační



Dalším faktorem, který ovlivňuje tvorbu glykosidické vazby, je charakter glykosyldonoru a glykosylpromotoru. Intereakce odstupující skupiny X s nerozpustným promotorem brání přístupu akceptoru z „cis“ strany a vede k tvorbě *trans*-glykosidu **F**. *Cis*-glykosid **G** je možno připravit použitím rozpustného promotoru a glykosyl donoru **A** s neparticipujícím substituentem v poloze C(2). Glykosyldonor je anomerizací *in situ* převeden na derivát **B** s 1,2-*trans* orientací odstupující skupiny Y . Pokud je glykosylační

reakce rychlejší než anomerizace na uhlíku C(1) glykosyldonoru, může toto uspořádání vykázat dobrou stereoselektivitu.

Reaktivita glykosylakceptoru je důležitá, protože ovlivňuje mechanismus glykosylační reakce. Pro reaktivní akceptory probíhá jako nukleofilní S_N2 substituce, s velmi krátkou dobou života oxokarbeniového iontu C. Mechanismus S_N2 výrazně posunuje rovnováhu vznikajících produktů směrem k 1,2-*trans*-glykosidu F. Pokud je však glykosylakceptor méně reaktivní, převládá mechanismus S_N1 , který je spojen s delším poločasem života oxokarbeniového iontu. Reakce je výrazněji ovlivňována jak výše uvedenými faktory, tak i použitým rozpouštědlem nebo teplotou. Polární rozpouštědla (např. THF), vyšší teploty (nad $-30\text{ }^\circ\text{C}$) a delší reakční doba vedou ke vzniku termodynamicky preferovanému α -anomeru – vznikne 1,2-*cis*-glykosid G.

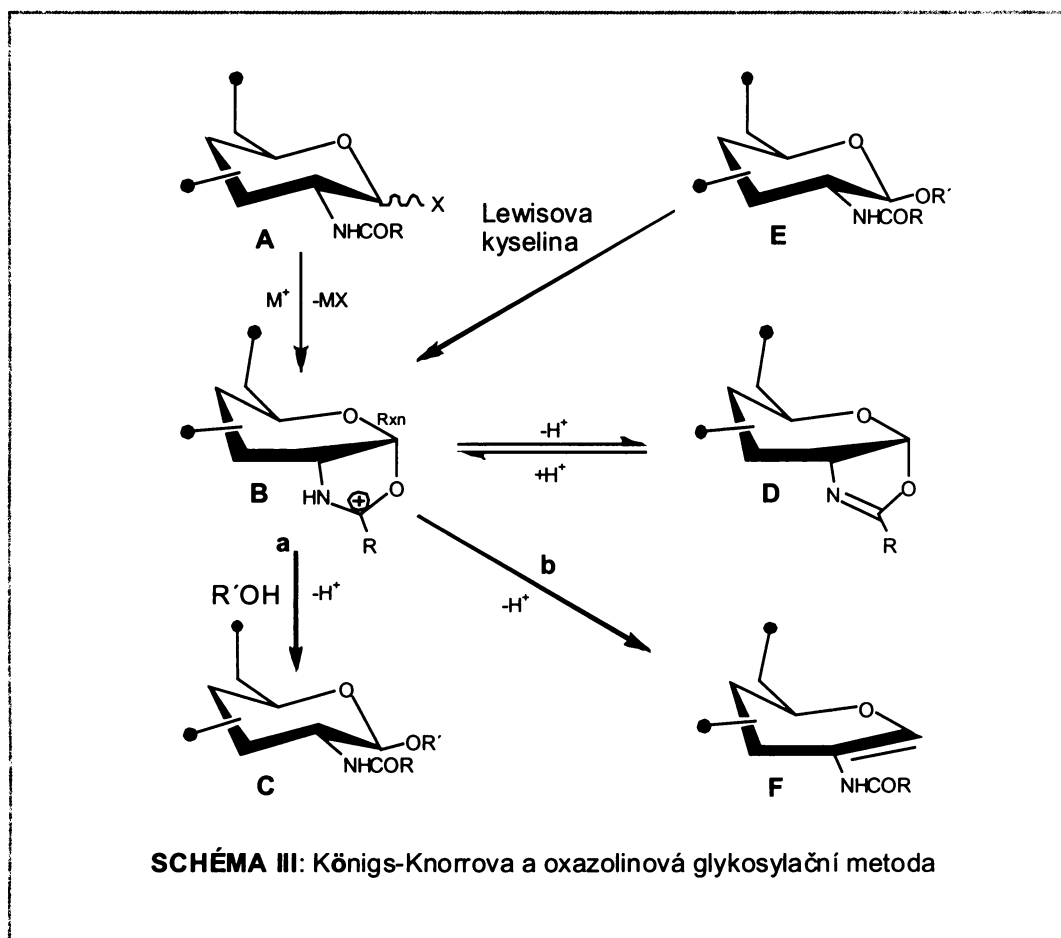
2.2.2 Glykosylační metody využitelné pro 2-amino-2-deoxyhexopyranosové stavební jednotky

Skutečnost, že dusík přítomný ve 2-deoxy-2-aminohexosách má vyšší vaznost a je silnější nukleofil než kyslík, je využívána pro některé glykosylační metody. Vedle těchto specifických přístupů jsou použitelné i některé nadstavby metod, vytvořených pro standardní bezdusíkaté sacharidy.

2.2.2.1 Metody využívající participaci funkční skupiny na uhlíku C(2) v glykosylačním procesu

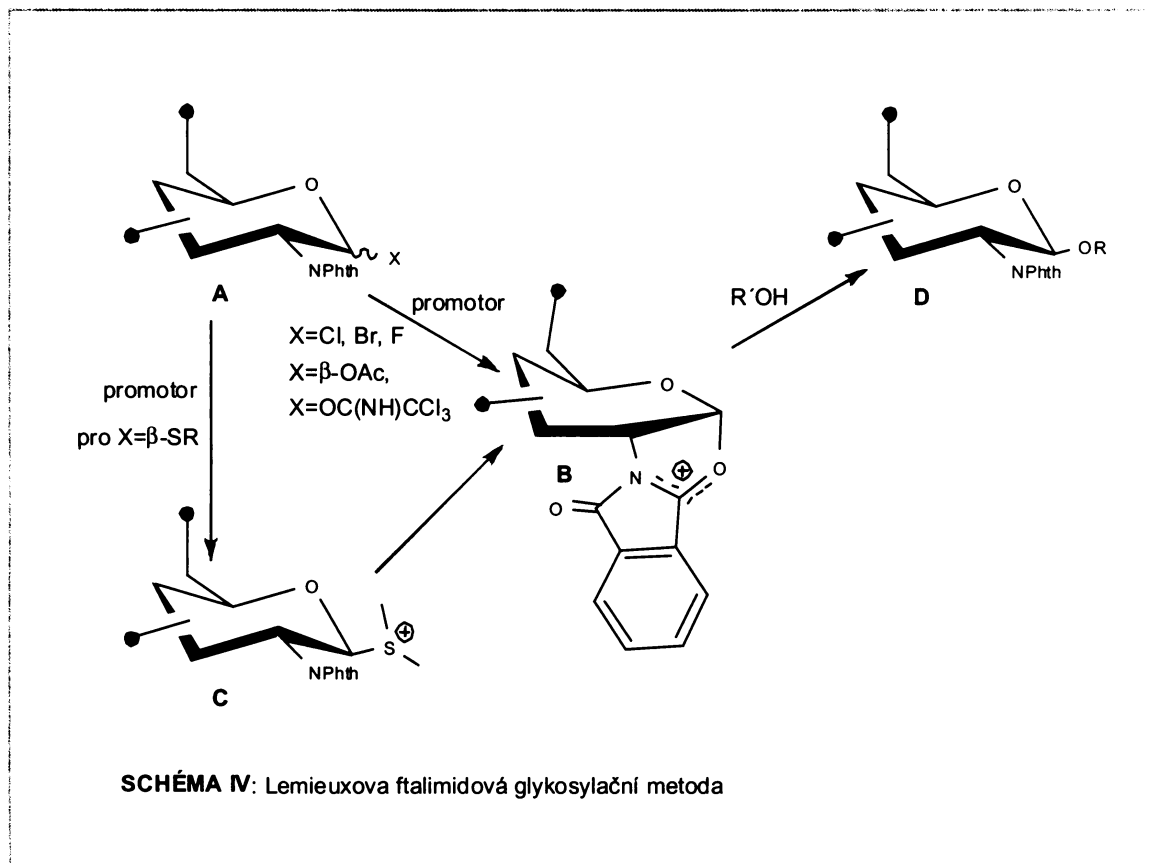
Königsova-Knorrova a s ní spojená oxazolinová glykosylační metoda (Schéma III) jsou jedněmi z nejstarších známých metod. Per-*O*-acetylované glykosylhalogenidy (chloridy nebo bromidy) jsou aktivovány stříbrnými nebo rtuťnatými solemi. V případě 2-amino-2-deoxyhexos je aminoskupina chráněna *N*-acetylovou skupinou, která se může během glykosylační reakce účastnit tvorby stabilních oxazolinů (D) *via* oxazoliniový ion (B)^{22,23}. Tato vedlejší reakce může být potlačena nadbytkem reaktivních glykosylakceptorů²⁴. I samotné oxazolininy však lze po zpětné protonizaci v kyselém prostředí využít jako glykosyldonory poskytující 1,2-*trans*-glykosidy²⁵. Působením Lewisových kyselin lze oxazoliniové ionty připravit *in situ*, např. z 1-*O*-acetátů (E)²⁶⁻²⁹.

Nejčastěji používané glykosyldonory tohoto typu jsou methyloxazoliny, prekurzory 2-acetamido-2-deoxyhexos běžných v přírodních glykosidech. Další mohou být např.



fenyl-, chlormethyl- a benzyloxazoliny. Pro méně reaktivní akceptory – např. sekundární alkoholy – tyto dvě výše popsané metody neposkytují dobré výsledky, mohou však být do určité míry regioselektivní – umožňují např. tvorbu (1→6)-glykosidické vazby vedle nechráněné hydroxylové skupiny na uhlíku C(4)³⁰⁻³².

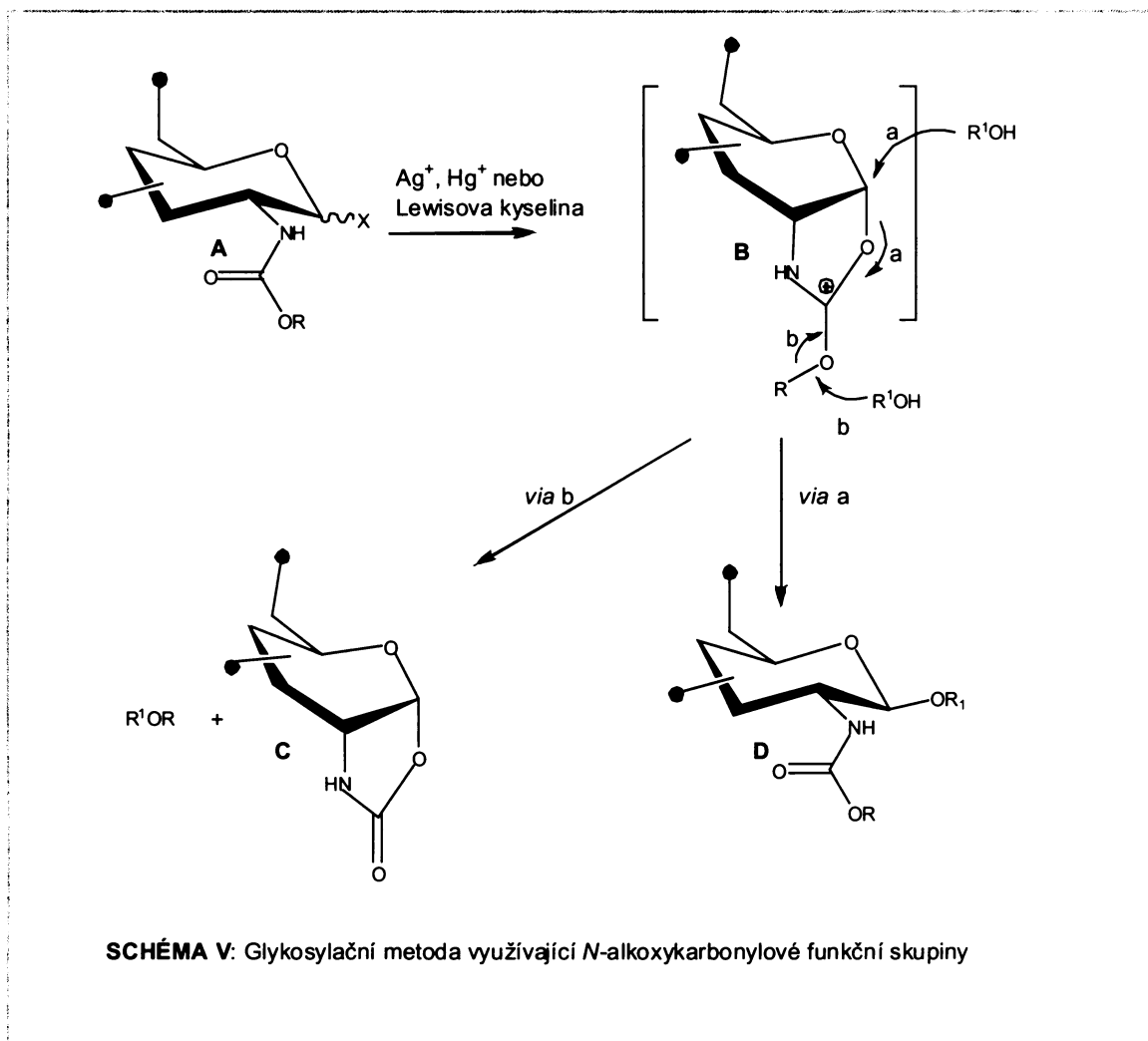
Velmi výrazným příspěvkem ke glykosylačním metodám specifickým pro 2-amino-2-deoxyhexosy je ftalimidová metoda³³ (Schéma IV). Participace ftalimidové skupiny na uhlíku C(2) glykosyldonoru na glykosylačním procesu vylučuje tvorbu stabilního oxazolinu. Vznik iontu **B** stabilizovaného delokalizací náboje, který je přístupný z „*trans*-strany“ vede k téměř výlučné tvorbě 1,2-*trans*-glykosidů. Jako odstupující skupina X se používají buď halogenidy (Br, Cl, F) v kombinaci se stříbrnými nebo rtuťnatými solemi jako promotory nebo trichloracetimidátová skupina v kombinaci s Lewisovými kyselinami (SnCl₄, TMSOTf, BF₃·Et₂O) jako promotory³⁴. Často jsou používány *O*-acetylová skupina (s 1,2-*trans*-konfigurací na glykosyldonoru) za aktivace Lewisovými kyselinami nebo aryl- či alkylsulfanylové odstupující skupiny (taktéž v uspořádání *trans*),



kteří jsou aktivovány *via* sulfoniový iont generovaný elektrofilními činidly (NBS³⁵, MeOTf³⁶, DMTST³⁷). Jako další, ne však zatím tak často používané glykosyldonory, jsou v souvislosti s ftalimidovou metodou uváděny *O*-4-pentenylglykosidy³⁸ nebo fenylselenylglykosidy³⁹. K odštěpení ftalimidové skupiny se používá butylamin v MeOH^{40,41}, hydrazinolýza⁴² nebo redukční odstranění ftalimidové skupiny pomocí NaBH₄, probíhající *via* hydroxybenzamid štěpený za kyselé katalýzy⁴³. Ftalimidová metoda poskytuje přijatelné výtěžky i pro méně reaktivní glykosylakceptory, např. stericky bráněnou axiální 4-OH skupinu na galaktopyranosovém skeletu. V poslední době se ovšem ukazuje, že ftalimidová metoda neposkytuje vždy stereoselektivní výsledky, zvláště pro stericky náročné glykosylační procesy^{44,45}. Nadstavbou této metody jsou v poslední době nové participující skupiny, jako je například lépe odštěpitelná tetrachlorftalimidová skupina⁴⁶ nebo objemnější naftylimidová skupina⁴⁷.

Vedle ftalimidové metody je další specifickou a pro selektivní přípravu oligosacharidů obsahujících 1,2-*trans*-vázané 2-amino-2-deoxyhexosy hojně využívanou metodou přístup, kde roli řídicí skupiny hraje karbamátová funkční skupina (Schéma V). Ta je po aktivaci schopna utvořit cyklický azadioxokarbeniový iont **B**, přístupný pro akceptor z „*trans*-polohy“. Pro stericky náročné akceptory byla pozorována tvorba

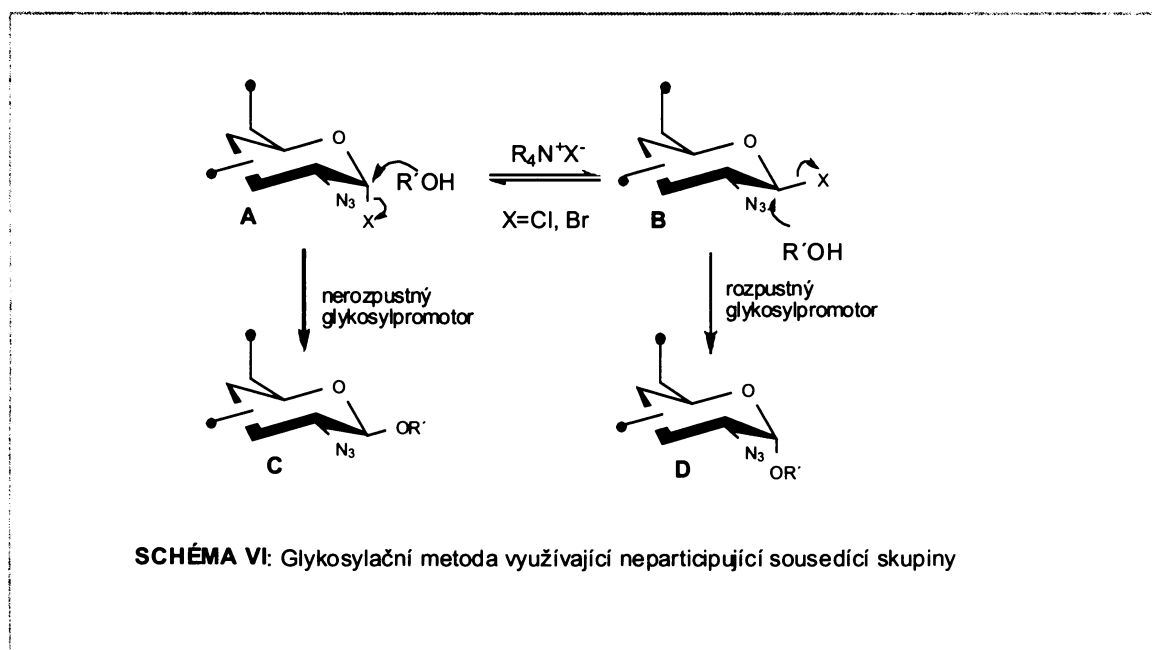
nežádoucího



oxazolidinonu **C**, produktu nukleofilního ataku glykosylakceptoru na alkylový substituent **R** azidioxokarbeniového derivátu **B**⁴⁸. Nejběžněji používané *N*-alkoxykarbonylové skupiny pro glykosylační reakce jsou: „Z“ – benzyloxykarbonylová⁴⁹, „PNZ” – para-nitrobenzyloxokarbonylová^{50,51}, „alloc“ – allyloxykarbonylová⁵² a „troc“ – 2,2,2-trichlorethyloxykarbonylová⁵³ skupina. Jako glykosyldonory se osvědčily glykosylbromidy a glykosylchloridy v kombinaci s rtuťnatými nebo stříbrnými solemi jako promotory, dále pak β-*O*-acetylová a trichloracetimidátová odstupující skupina za aktivace Lewisovými kyselinami (TMSOTf, BF₃·Et₂O).

2.2.2.2 Ostatní glykosylační metody

Za použití participace sousední skupiny je možno připravit 1,2-*trans*-glykosidy, pro tvorbu 1,2-*cis*-glykosidů však žádná adekvátní metoda neexistuje. Jedinou cestou je

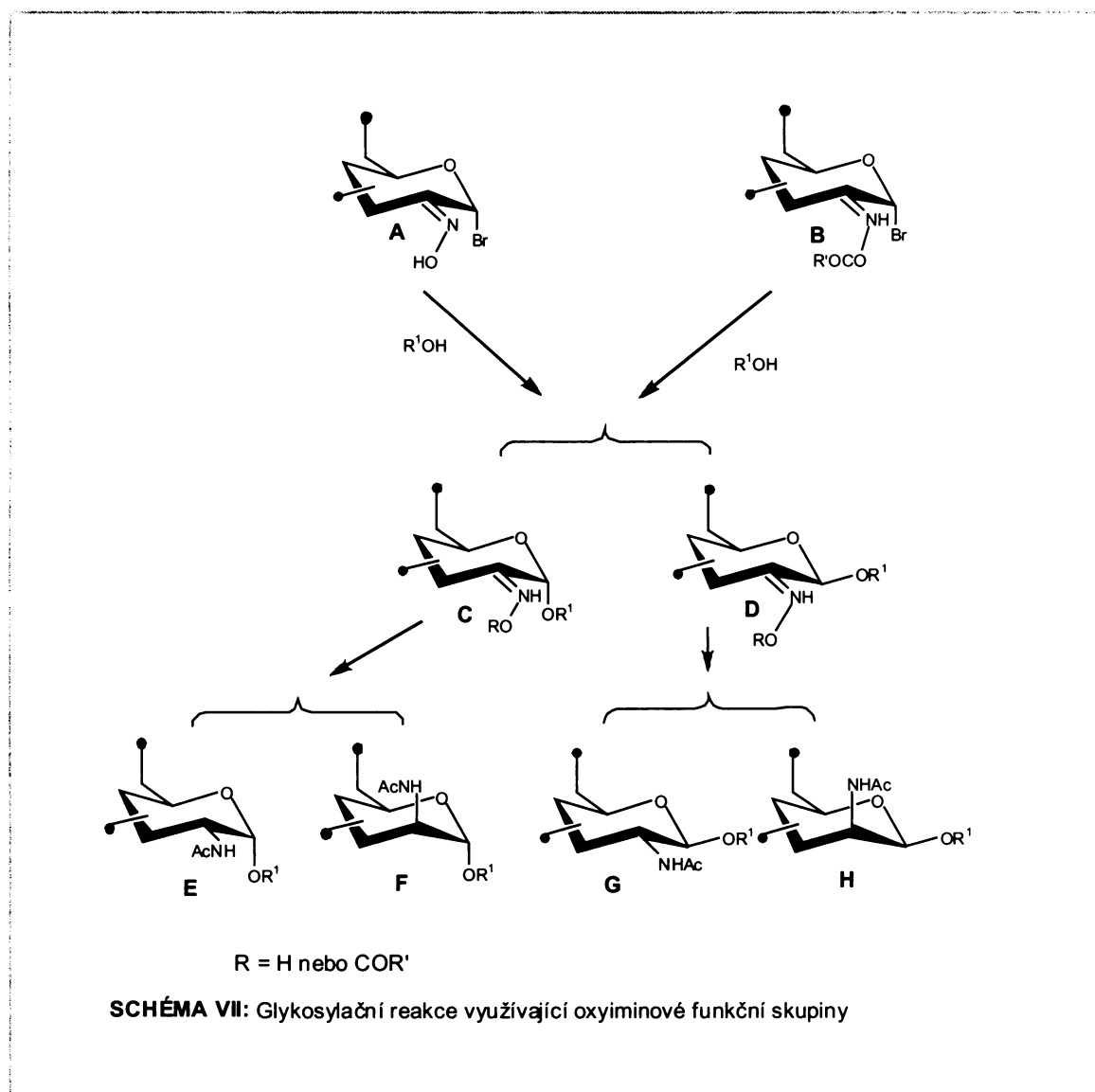


použití neparticující skupiny na uhlíku C(2), což ve většině případů znamená výrazně nižší selektivitu reakce, kde poměr vznikajících produktů je mnohem výrazněji ovlivňován reakčními podmínkami, charakterem odstupující skupiny apod.

Nejčastěji využívanou neparticující skupinou je azidoskupina. Je poměrně málo objemná, a proto poskytuje dobré výsledky i tam, kde ostatní selhávají. Výjimkou je např. námi v lit.⁵⁴ popsaná významná sterická interakce mezi axiální azidoskupinou v poloze C(2) a ekvatoriálně orientovanou alkylsulfanylovou skupinou v poloze C(1) na mannopyranosovém skeletu, která vede k deaktivaci alkylsulfanylové skupiny při glykosylačním procesu. Současně za podmínek redukce azidoskupiny dochází k intramolekulárnímu přesmyku substituentů v polohách C(1) a C(2) s retencí konfigurace. Pokud používáme glykosylhalogenidy, je možno připravit 1,2-*trans*-glykosid pouze z donoru s *cis*-konfigurací (Schéma VI). Tvorba „*trans*“ produktu je podpořena použitím heterogenního glykosylpromotoru, např. silikátu stříbrného, který brání přístupu akceptoru ze strany odstupující skupiny. 1,2-*cis*-glykosid se připravuje z donoru s uspořádáním „*trans*“ za použití rozpustného glykosylpromotoru^{55,56}. Nestabilní 1,2-*trans*-glykosylbromidy jsou připravovány *in situ* anomerizací pomocí tetrabutylammoniumbromidu zavedenou Lemieuxem⁵⁷.

Další vhodnou odstupující skupinou je trichloracetimidátová skupina v kombinaci s Lewisovými kyselinami nebo alkylsulfanylová skupina. Pro přípravu 1,2-*cis*-glykosidů je též možné použít *S*-xanthátovou odstupující skupinu za aktivace pomocí $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ ⁵⁸. Použití azidoskupiny je jednou z mála cest, umožňujících syntézu obecně nejobtížněji dostupného 1,2-*cis*-vázaného D-mannopyranosidu⁵⁹⁻⁶², jehož stereospecifickou tvorbu nepodporuje žádný sterický ani elektronický vliv.

Alternativní přístup, využívající neparticipující skupinu na uhlíku C(2), je další Lemieuxova metoda zapojující *O*-substituovanou oxyiminovou skupinu (Schéma VII).



Nejčastěji se využívá reakce 2-oximinoglykosylbromidů **A** nebo 2-acyloxyiminoglykosylbromidů **B** s glykosylakceptory v kombinaci se solemi těžkých kovů jako promotorů, jejichž výběrem lze ovlivnit stereoselektivitu reakce⁶³⁻⁶⁵. Redukcí 2-oximinoglykosidů **C** a **D** a následnou acetylací lze připravit 2-amino-2-deoxyglykosidy

E, F, G a H. Nejlepší stereoselektivity při přípravě β -D-mannopyranosidu H bylo dosaženo použitím kombinace diboranu v oxolanu a acetylovaných nebo benzoylovaných 2-oxyiminoglykosidů D^{66,67}. Nezbytnou podmínkou pro zdárný průběh glykosylace je však vysoká stereoselektivita následné redukce. V tomto uspořádání byla metoda použita pro přípravu mnoha oligosacharidů obsahujících D-mannosaminové jednotky^{68,69}.

Význam dalších přístupů není tak obecný jako u uvedených metod, byly použity spíše okrajově nebo ve speciálních případech – viz lit.²¹. Dále je třeba poznamenat, že vedle klasických syntetických metod jsou k přípravě glykosidických vazeb používány enzymatické, chemoenzymatické, fotochemické či elektrochemicky katalyzované procesy, které přesahují rámec této práce a nejsou zde diskutovány.

2.2.3 Nejčastěji používané glykosyldonory

V následující části budou uvedeny nejčastěji používané glykosyldonory a velmi stručně popsán i vliv rozpouštědla na glykosylace.

2.2.3.1 Glykosylhalogenidy

Tato nejstarší známá skupina glykosyldonorů je dodnes hojně využívána. Uplatňují se pro přípravu 1,2-*cis*-glykosidů, jsou vhodnými donory i pro metody uplatňující participaci sousední skupiny, a tedy pro přípravu 1,2-*trans*-glykosidů. Nejčastěji používané glykosylpromotory jsou soli těžkých kovů (AgOTf, AgClO₄, Hg(CN)₂, HgBr₂ atd.), např. tetrabutylammonium bromidu⁷⁰, či Lewisovy kyseliny (SnCl₄, BF₃·OEt₂, Sn(OTf)₂)^{71,72}. Kromě běžně užívaných glykosylbromidů a chloridů se začínají ve větším měřítku používat též glykosylfluoridy⁷³. Jsou to poměrně stabilní a snadno dostupné deriváty. Připravují se reakcí volných⁷⁴ nebo 1-*O*-acetyl-derivátů s Olahovým činidlem⁷⁵ (HF·py), DAST^{76,77}, nebo TiF₄⁷⁸. Aktivátory glykosylfluoridů jsou Lewisovy kyseliny^{79,80}, nebo stříbrné sole v přítomnosti sloučenin prvků IV.B skupiny vykazující afinitu k fluoru (Cp₂HfCl₂/AgClO₄, Cp₂ZrCl₂/AgClO₄)⁸²⁻⁸⁴ (jako první aktivační systém byl Mukaiyamou použit SnCl₂/AgClO₄)⁸¹. Glykosylační reakce glykosylfluoridů jsou, pomineme-li participaci sousední skupiny, výrazně ovlivňovány použitým rozpouštědlem. Acetonitril či pivalonitril výrazně podporují vznik β -glykosidické vazby (tzv. nitrilový efekt), stejně jako benzen⁸³, zatímco v diethyletheru přednostně vznikají α -glykosidy⁸⁵.

Nejreaktivnější, avšak také nejméně stabilní glykosylhalogenidy jsou glykosyljodidy, jejichž význam je navzdory nízké stereoselektivitě glykosylační reakce nezanedbatelný⁸⁶.

2.2.3.2 Thioglykosidy

Thioglykosidy se dají využít přímo jako glykosyl donory za aktivace *via* sulfoniový iont nebo transformovat na jiný typ glykosyldonoru (glykosylbromidy, glykosylfluoridy⁸⁷ nebo např. trichloracetimidáty⁸⁸). Thioglykosidy jsou aktivovány například pomocí HgSO₄⁸⁹, HgCl₂⁹⁰, Cu(OTf)₂⁹¹, Pd(OCl₄)₂⁹², NIS/TFA, AgOTf, AgOTf/Br₂⁹³, NBS³⁵, MeOTf⁹⁴, DMTST⁹⁵. Kromě thioglykosidů se k sirným glykosyldonorům řadí i sulfonové a sulfoxidové glykosidy^{96,97} s uplatněním zejména pro koncept ortogonálních glykosylací (kap. 2.2.4)⁹⁸.

2.2.3.3 Trichloracetimidáty

Výhodou tohoto typu glykosyldonorů jsou poměrně mírné podmínky glykosylačních reakcí v přítomnosti katalyzátorů jako BF₃·OEt₂⁹⁹, TMSOTf¹⁰⁰ nebo CCl₃CHO¹⁰¹ a jejich snadná příprava reakcí volné anomerní hydroxylové skupiny s trichloracetonitrem v přítomnosti báze (K₂CO₃, NaH, DBU)¹⁰². Stereoselektivita glykosylačních reakcí může být stejně jako v případě glykosylhalogenidů výrazně ovlivněna rozpouštědlem: nepolární rozpouštědla při teplotě nižší než -40 °C podporují reakční mechanismus S_N2, při vyšší teplotě a v polárních rozpouštědlech vznikají termodynamicky stabilnější produkty (s konfigurací *α-manno*, *α-gluko*, atd.). Byl popsán nitrilový a diethyletherový efekt^{103,104}. Trichloracetimidáty byly použity při přípravě komplexních oligosacharidů a některých od nich odvozených antibiotik¹⁰⁵.

2.2.3.4 4-Pentenylglykosidy

4-Pentenylglykosidy jsou stabilní v bazickém a mírně kyselém prostředí. Jsou aktivovány bromoniovým, popř. jodoniovým iontem (NIS/TfOH, NIS/Et₃SiOTf, IDCP, IDCT) a ve srovnání s glykosylhalogenidy poskytují často vyšší výtěžky^{106,107}.

2.2.3.5 Další typy glykosyldonorů

Kromě již dříve zmíněných oxazolinů se uplatňují např. snadno synteticky dostupné 1,2-*trans*-acetáty¹⁰⁸ (*O*-acetylová, *O*-bromacetylová) a *O*-benzoylová skupina. Jako glykosylpromotory se používají Lewisovy kyseliny (SnCl₄, BF₃·OEt₂, TMSOTf, TrClO₄ – chloristan trifenylmethylnatý atd.). Pro přípravu jednoduchých glykosidů lze použít deriváty s volnou anomerní hydroxylovou skupinou, dále glykaly, termodynamicky

stabilní 1-*O*-silyl glykosidy (TMS a TBS glykosidy), 1-*O*-vinyl glykosidy, 1-*O*- a 1-*S*-karbonáty a 1-*O*-fosfáty, viz lit.^{98,109}. Specifické použití mají také selenoglykosidy a glykosylkarbeny¹¹⁰, a dále 2-chloroethyl-1-thio-β-*D*-hexopyranosidy, aktivované *via* episulfoniové soli, které byly použity pro přípravu glykokonjugátů^{111,112}.

2.2.4 Strategie přípravy oligosacharidů

Základní strategie při syntéze oligosacharidů jsou v zásadě dvě: kroková a bloková (konvergentní) syntéza.

Při krokové syntéze se k sacharidovému řetězci přidává monosacharidová stavební jednotka, a to buď na jeho redukujícím, nebo neredukujícím konci. Obecně jsou možné oba přístupy, platí však, že složité glykosyldonory jsou méně reaktivní. Kroková syntéza oligosacharidů je výhodná i pro syntézu na pevné fázi^{20,113,114}.

Bloková syntéza naproti tomu spojuje celé oligosacharidové stavební bloky. Výhodou takového přístupu je méně reakčních kroků s oligosacharidovými synthony, nevýhodou naopak horší reaktivita objemnějších reakčních bloků.

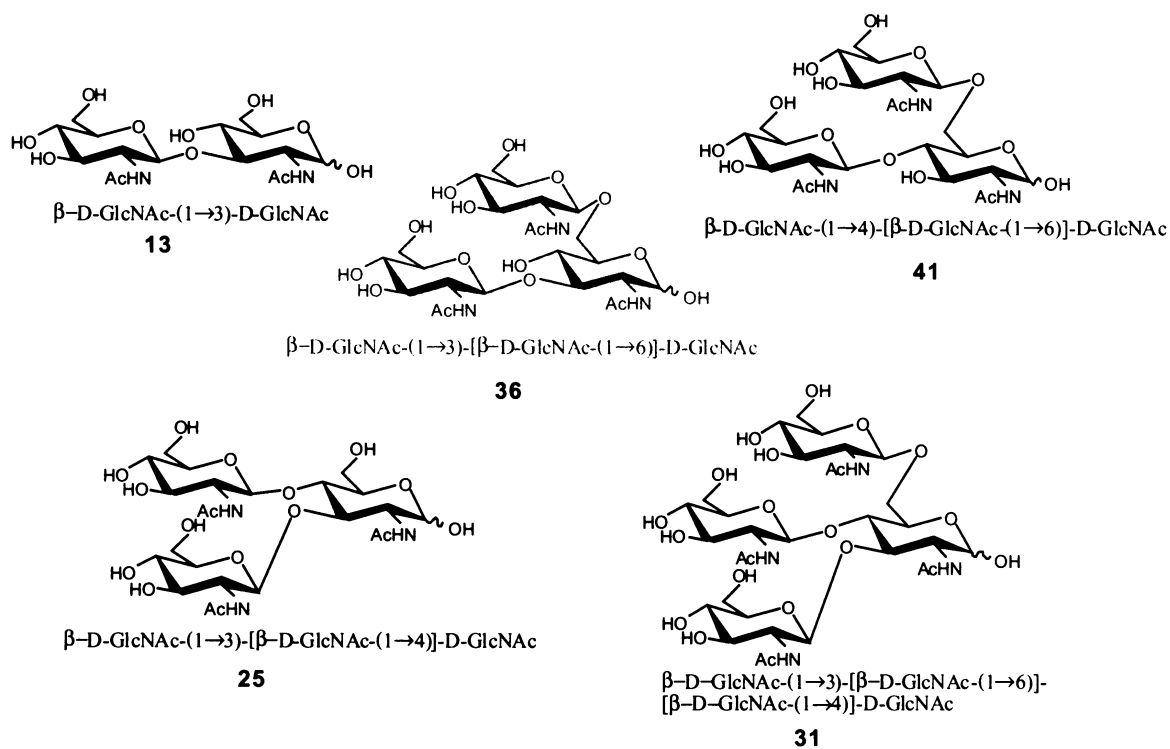
Vedle těchto základních strategií se začínají objevovat jejich zajímavé varianty. Tyto syntézy využívají různých konceptů, zahrnujících chránicí skupiny a metody glykosylace, které umožňují aktivace donorů *in situ* a modulaci jejich reaktivity. „Armed-disarmed“ koncept k tomu využívá chránicí skupinu v jiné, většinou sousední poloze – ether, např. benzyl, odstupující skupinu v poloze C(1) aktivuje, zatímco acylová skupina ji deaktivuje. Se změnou sousedící chránicí skupiny se změní i reaktivita donoru, aniž je třeba změnit odstupující skupinu. Dalším používaným konceptem je „ortogonální glykosylace“, kde se využívají dva nezávislé glykosylační systémy, např. pro dvojici donorů fluorid/thiofenyl glykosid se dají použít systémy NIS/AgOTf a Cp₂HfCl₂/AgClO₄. „Aktivní a latentní“ koncept využívá transformovatelnou odstupující skupinu, například konverzi neaktivního allylu na dobře odstupující vinylether²⁰.

3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

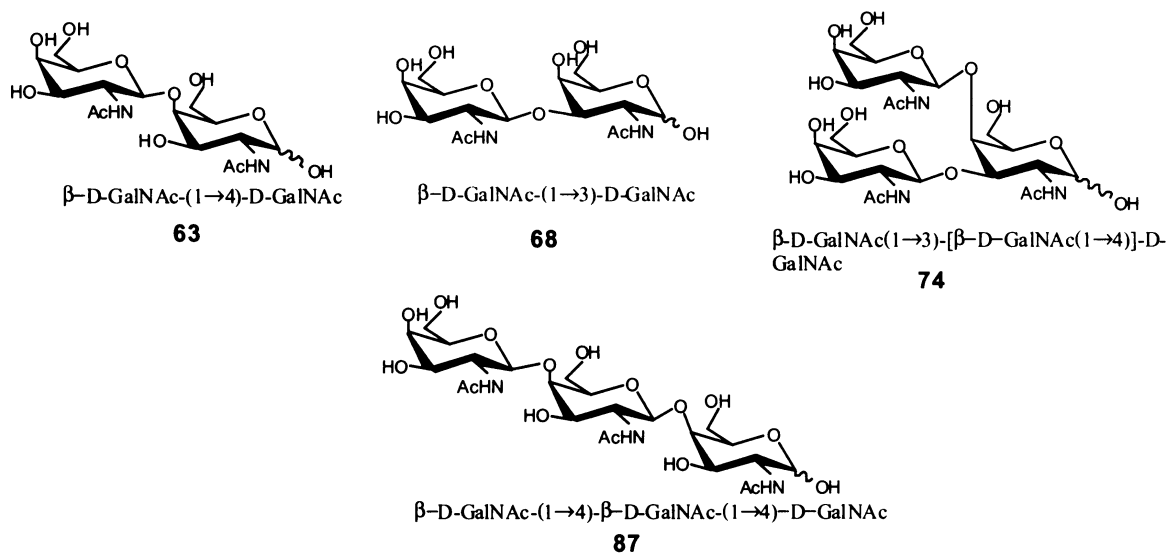
Úkolem této práce je připravit sérii lineárních a větvených oligosacharidů obsahujících 2-acetamido-2-deoxyhexopyranosové jednotky (Obr. 5 a Obr. 6), které coby „jednoduché“ struktury mohou nahradit dosud známé komplexní ligandy aktivačních receptorů NKR-p1 a CD69 s cílem přesněji vymezit strukturní nároky jmenovaných receptorů. S ohledem na variabilitu možných struktur jsme se v této práci omezili na syntézu lineárních a větvených homooligosacharidů tvořených 2-acetamido-2-deoxyglukopyranosovými a 2-acetamido-2-deoxygalaktopyranosovými jednotkami. Byly stanoveny tyto konkrétní cíle:

- 1) Syntéza stavebních bloků vhodných pro přípravu lineárních i větvených oligosacharidů tvořených 2-deoxy-glukosaminovými jednotkami.
- 2) Syntéza cílových oligosacharidů tvořených 2-deoxy-glukosaminovými jednotkami (Obr. 5)
- 3) Navržení a syntéza stavebních bloků vhodných pro přípravu lineárních i větvených oligosacharidů tvořených 2-deoxy-galaktosaminovými jednotkami.
- 4) Syntéza cílových oligosacharidů tvořených 2-deoxy-galaktosaminovými jednotkami (Obr. 6)
- 5) Získání a vyhodnocení výsledků afinitních testů (provedených skupinou prof. Bezoušky na MBÚ a PřF UK) a nalezení možných vztahů mezi strukturou testovaných látek a obecnými vazebnými preferencemi zvolených receptorů.

Se syntézou oligosacharidových mimetik přirozeně souvisí optimalizace glykosylačních reakcí, a to zejména násobných glykosylací při přípravě větvených oligosacharidů, optimalizace deprotekčních kroků a vypracování metodiky purifikace výsledných ochráněných oligosacharidů.



Obr. 5: Cílové oligosacharidy obsahující 2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosové stavební jednotky



Obr. 6: Cílové oligosacharidy obsahující 2-acetamido-2-deoxy-D-galaktopyranosové stavební jednotky

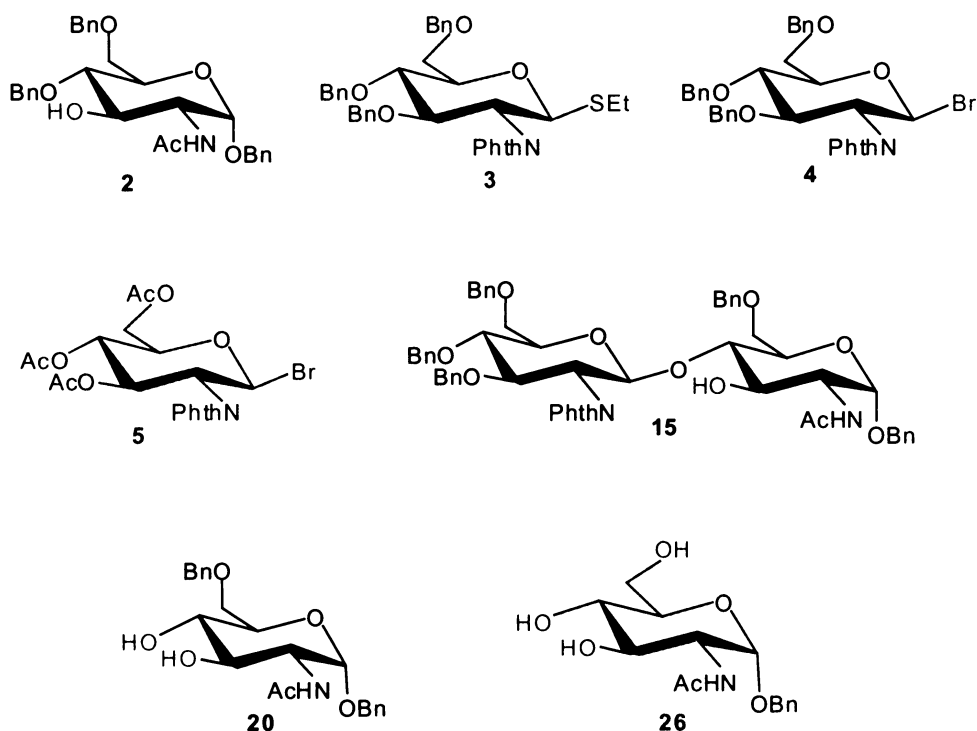
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 SYNTÉZA OLIGOSACHARIDOVÝCH MIMETIK

4.1.1 Příprava oligosacharidů obsahujících 2-amino-2-deoxyglukopyranosové jednotky

4.1.1.1 Příprava stavebních bloků odvozených od 2-amino-2-deoxyglukopyranosy

Stavební jednotky s *gluko*-konfigurací byly připraveny podle známých postupů¹¹⁵ (Obr. 7). Do polohy C(2) glykosyldonorů **3**, **4** a **5** byla zavedena ftalimid skupina, která umožňuje stereoselektivní přípravu 1,2-*trans*-glykosidů. Jako



Obr. 7: Stavební jednotky s *gluko*-konfigurací

odstupující skupina byla využita ethylthioskupina, která je sama o sobě výbornou odstupující skupinou a je ji možno snadno převést na jiný typ glykosyldonoru, například glykosylbromid, pokud to řešení syntézy vyžaduje. Chránění zbývajících hydroxylových skupin bylo zajištěno kombinací *O*-benzylových, *O*-acetylových a *O*-allylových skupin, které jsou stabilní za podmínek glykosylační reakce.

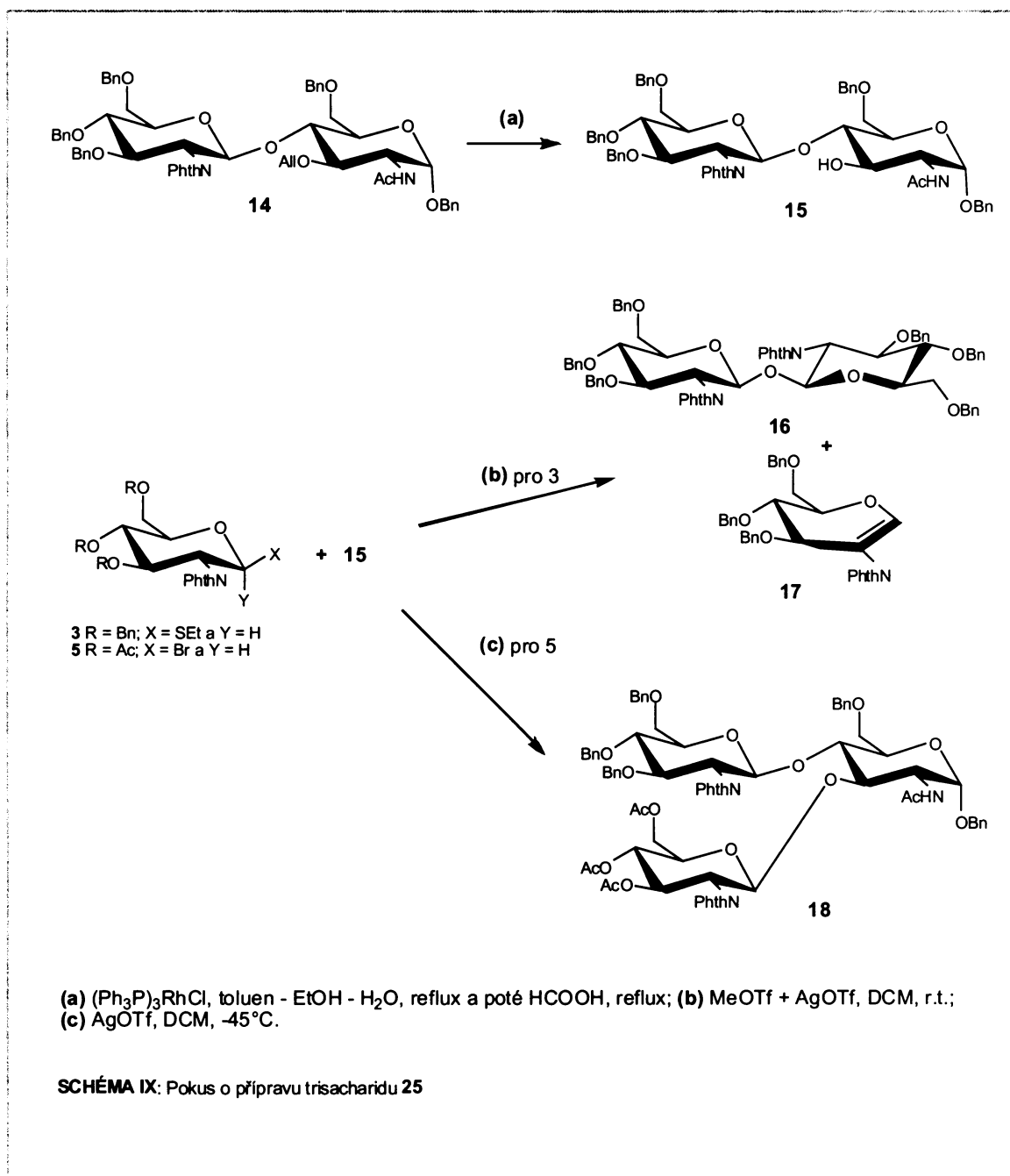
4.1.1.2 Syntéza disacharidu obsahujícího $\beta(1\rightarrow3)$ vázané jednotky odvozené od *D*-glukosaminu

Syntéze oligosacharidů obsahujících 2-acetamido-2-deoxyglukopyranosové jednotky spojené $\beta(1\rightarrow3)$ glykosidickou vazbou byla dosud věnována pouze nepatrná pozornost ve srovnání s těmi, které obsahují $\beta(1\rightarrow4)$ vazby²¹. Při syntéze analogů chitobiosy byly aplikovány metody pro tvorbu 1,2-*trans*-glykosidů, tj. Königs-Knorrova¹¹⁶, oxazolinová¹¹⁷⁻¹¹⁹ a ftalimidová metoda^{120,121}, a dále glykosyldonory s 2,2,2-trichlorethylkarbamátovou skupinou v poloze C(2)¹²⁰. Použit byl i postup uplatňující glykosyldonory s neparticipující azido- nebo 2,5-dimethylpyrrolovou skupinou v poloze C(2) a (trichloracetimidoyl)oxy skupinou v poloze C(1) jako odstupující skupinou^{122,123}.

Při syntéze cílového disacharidu β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc **13** (Schéma VIII) byla v analogii s lit.¹¹⁷ použita ftalimidová metoda. Jako glykosylakceptor byl použit benzyl-2-acetamido-4,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (**2**), připravený z dle lit.⁴¹ dostupné látky **1** odštěpením allylové skupiny katalytickou izomerací na prop-1-enylovou skupinu pomocí Wilkinsonova katalyzátoru [RhCl(Ph₃P)₃] a její následnou kyselou hydrolyzou. Glykosylace látky **2** s ethyl-thio-glykosidem **3** (lit.¹²⁴), promotovaná MeOTf v přítomnosti AgOTf, poskytla disacharid **6** v 59% výtěžku. Nežádoucí *O*-methylace volné hydroxylové skupiny akceptoru MeOTf¹⁵ byla potlačena nadbytkem AgOTf. Reakce glykosyl bromidu¹²⁴ **4** (získaného z látky **3** reakcí s bromem bezprostředně před glykosylační reakcí) s akceptorem **2** v přítomnosti AgOTf jako glykosylpromotoru nevedla k výrazně vyššímu výtěžku. Reakce byla provedena bez přítomnosti báze při -15 °C (lit.⁴¹), protože báze může inhibovat glykosylace méně reaktivních hydroxylových skupin^{125,126}. Reakce glykosylbromidu **5**, chráněného méně objemnými *O*-acetylovými skupinami, s glykosyl akceptorem **2** za stejných podmínek poskytla disacharid **7** ve výtěžku 72%. S ohledem na přítomnost alkali-stabilní benzylové chránicí skupiny na vicinální OH skupině v poloze C(3), která znemožňuje participaci tohoto hydroxyly během obvykle používaného odštěpení ftalimidoskupiny butylaminem ve vroucím MeOH, byl disacharid **6** reduktivně deftaloylován¹²⁴ (NaBH₄). Získaný surový amin **8** byl bez dalšího čištění *N*-acetylován Ac₂O v pyridinu. Získaný acetylovaný derivát **10** následnou hydrogenolýzou benzylových skupin na Pd/C katalyzátoru poskytl

4.1.1.3 Metoda násobné glykosylace pro přípravu větvených oligosacharidů

Při syntéze stericky bráněného větveného trisacharidu β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)-[β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)]-D-GlcNAc (**25**) byla opět použita ftalimidová metoda, vhodná pro stereoselektivní přípravu 1,2-*trans*-glykosidické vazby s málo reaktivní sekundární hydroxylovou skupinou. Nejdříve byl jako glykosylakceptor použit disacharid **15** (Schéma IX). Ftalimidoskupina na vedlejší jednotce eliminuje vliv nežádoucích intra-

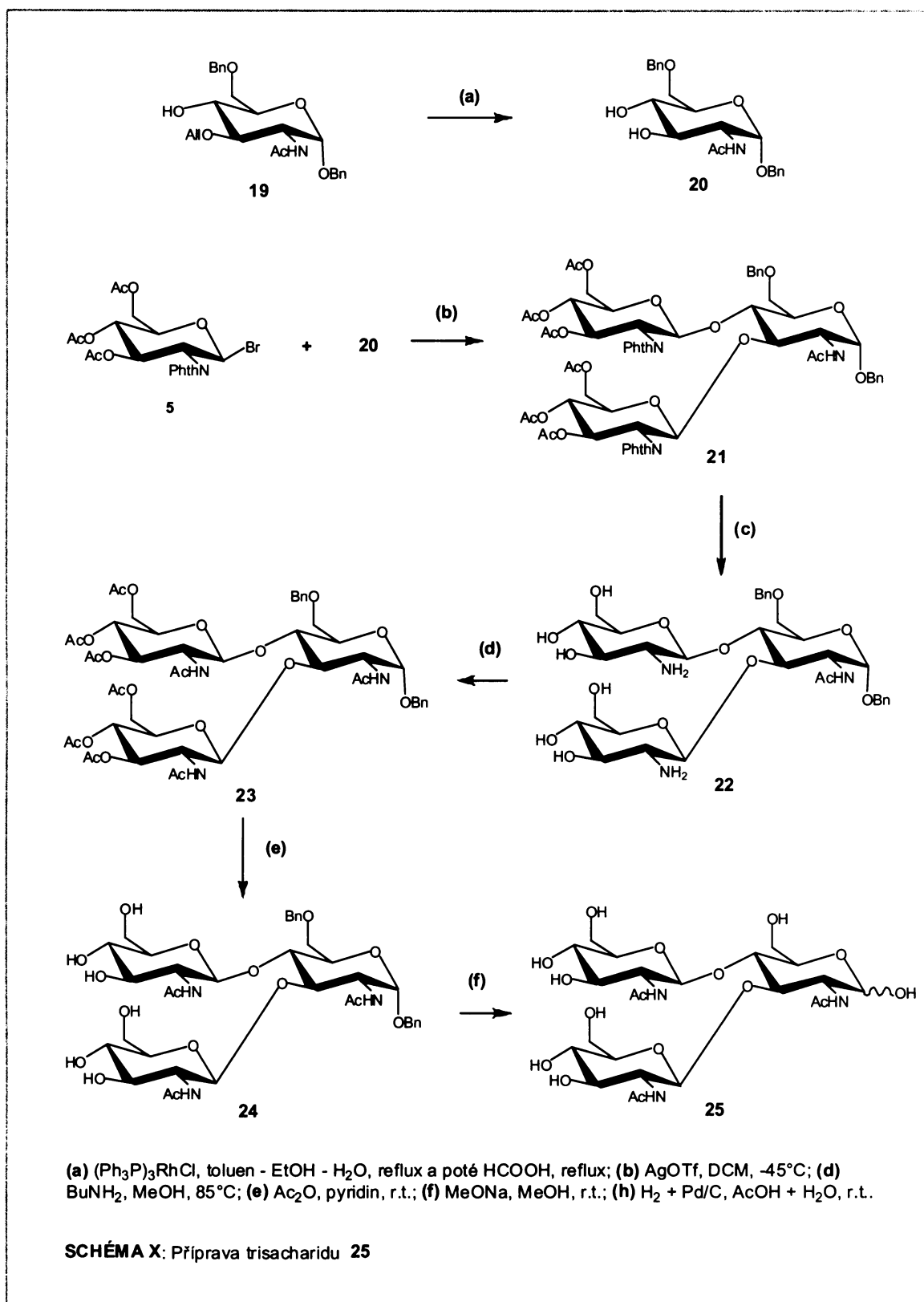


a intermolekulárních vodíkových můstků. Ty mohou být tvořeny hydroxylovými nebo acetamidovými skupinami¹²⁷⁻¹²⁹, někdy dokonce i π -elektronovými systémy benzylových skupin. Tvorba můstků posledně jmenovaného typu byla prokázána v IČ spektrech látek

48 (3566 cm^{-1}) a **49** (3587 cm^{-1}). Oba tyto monosacharidy jsou potenciální glykosylakceptory. Existence této vodíkové vazby mezi π -elektronovým systémem benzylové skupiny (pravděpodobně v poloze C(6)) a hydroxylovou skupinou glykosylakceptoru nebyla v souvislosti s glykosylačními reakcemi dosud popsána, přestože může výrazně ovlivnit průběh glykosylace sterickým bráněním akceptorové hydroxylové skupiny. Další vodíkové interakce hydroxylových a *N*-acetylových skupin byly pozorovány u látek **32**, **35**, **62**, **68** a **86**, pro látku **70** byl rovněž prokázán π -el^lmůstek (3576 cm^{-1}).

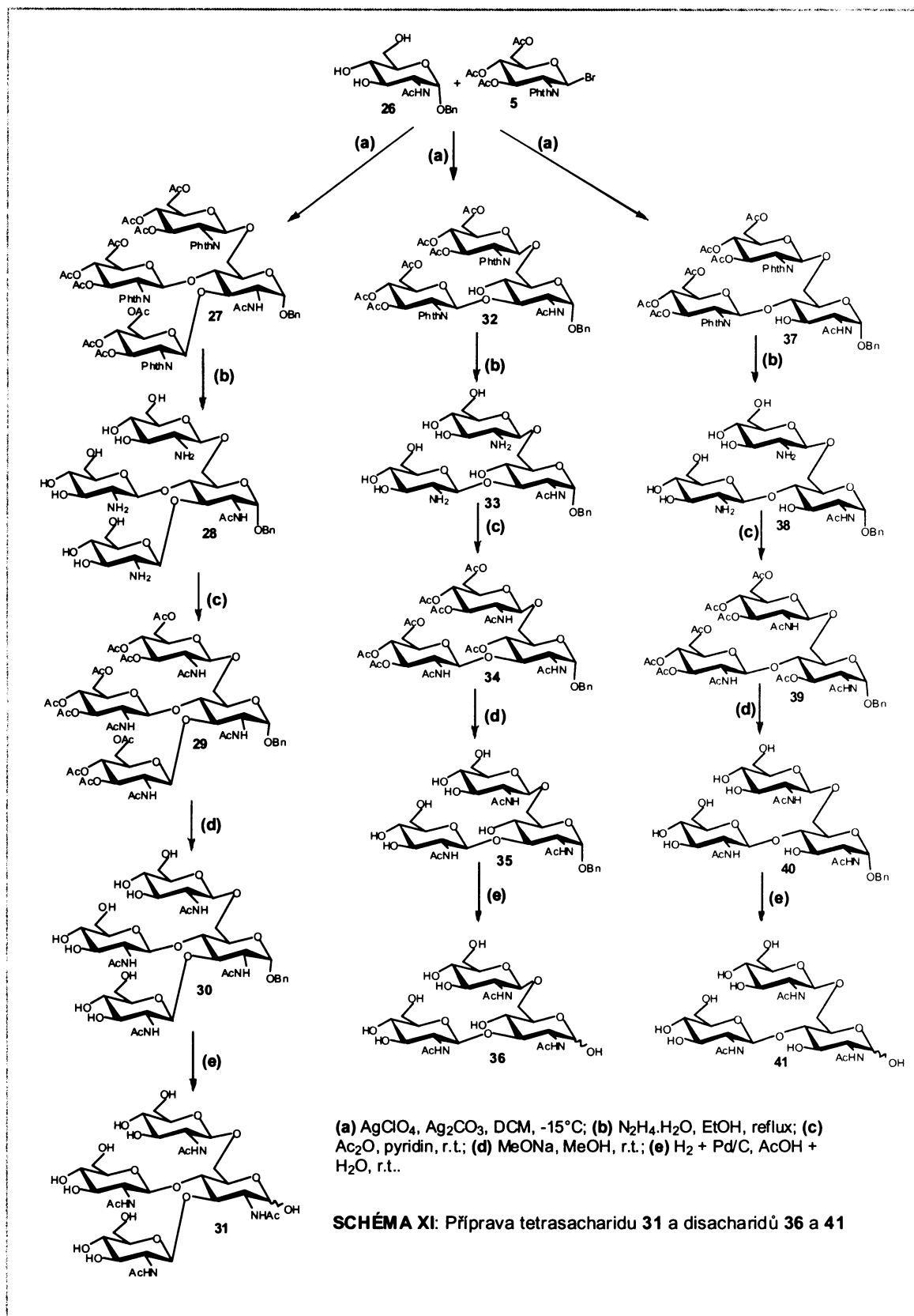
Glykosylakceptor **15** byl získán z 3-*O*-allyl-derivátu **14** (lit¹²⁴) deallylací popsanou výše. Glykosylační reakce mezi disacharidem **15** a *O*-benzylovaným ethyl-1-thioglykosidem **3**, promotovaná MeOTf v přítomnosti AgOTf, poskytla komplexní směs (Schéma X). Jako hlavní reakční produkt byl izolován disacharid trehalózového typu **16**, vznikající reakcí dvou molekul glykosyldonoru s molekulou vody, a 1,5-anhydro-tri-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido-*D*-arabino-hex-enitol (**17**) jako produkt eliminace glykosyldonoru. Vznik enitolu a symetrického disacharidu s $\beta,\beta(1\leftrightarrow 1)$ glykosidickou vazbou, podobně jako u β,β -trehalózy a glykalu vznikajících z 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido-*D*-glukopyranosy^{130,131} je dán malou reaktivitou akceptoru. Dále byl v nízkém výtěžku izolován 3-*O*-methyl derivát glykosylakceptoru, látka **15**. Reakce s glykosyl donorem **5**, chráněným méně objemnými *O*-acetylovými skupinami, poskytla požadovaný trisacharid **18** v nízkém výtěžku (11%), spolu s nezreagovaným glykosyl akceptorem a ostatními neidentifikovanými produkty.

Problém s efektivní syntézou větveného trisacharidu **25** byl nakonec vyřešen postupem založeným na současné dvojnásobné glykosylaci monosacharidového akceptoru s volnými hydroxylovými skupinami v polohách C(3) a C(4) méně objemným glykosyl donorem (Schéma X). Glykosyl akceptor **20** byl připraven z benzyl-2-acetamido-3-*O*-allyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy- α -*D*-glukopyranosidu⁴¹ **19** deallylací výše zmíněným postupem. Glykosylace akceptoru **20** *O*-acetylovaným glykosyl donorem **5**, promotovaná AgOTf, poskytla žádaný trisacharid **21** v dobrém výtěžku (64%). Chránič íftalimidové skupiny trisacharidu **21** byly odstraněny reakcí s butylaminem a získaný surový diamin **22** byl peracetylován za vzniku látky **23**. *O*-deacetylace a následná hydrogenolýza ($\text{H}_2/\text{Pd-C}$) získané látky **24** poskytla volný větvený



trisacharid 25.

Úspěšná metoda násobné glykosylace byla uplatněna i při syntéze stericky náročného triantenárního tetrasacharidu, 2-acetamido-2-deoxy- β -D-



glukopyranosyl-[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosy (**31**, Schéma XI). Glykosylakceptor **26** (lit.¹³² obsahující tři volné hydroxylové skupiny v polohách C(3), C(4) a C(6) byl trojnásobně glykosylován per-*O*-acetylovaným glykosyldonorem **5**

za přítomnosti AgOCl_4 jako promotoru a Ag_2CO_3 , který plnil úlohu báze-scavengeru (kyseliny chloristé). Za těchto podmínek dochází k menší degradaci glykosyldonorů než v přítomnosti AgOTf . Získán byl nejen požadovaný chráněný tetrasacharid **27** (15%), ale i „deleční“ trisacharidy **32** (8%) a **37** (17%), produkty dvojnásobné glykosylace. Všechny tyto látky byly rozděleny pomocí preparativní HPLC na reverzní fázi (C18), jejich struktura potvrzena pomocí NMR a k jejich deprotekcí na cílové tri- a diantenární oligosacharidy **31**, **35** a **41** byl použit podobný sled reakcí jako v případě trisacharidu **25** (Schema X). Ftalimidové skupiny byly odstraněny reakcí s hydrazin hydrátem v EtOH a získané surové volné aminy byly dále acetylovány Ac_2O v pyridinu za vzniku odpovídajících plně *O*- a *N*-acetylovaných oligosacharidů **29**, **34** a **39**. Následná Zemplénova *O*-deacetylace methanolátem sodným v MeOH poskytla deriváty **30**, **36** a **40**. Jako poslední byly hydrogenolýzou ($\text{H}_2/\text{Pd-C}$) odstraněny *O*-benzylové chránicí skupiny. Získané volné cílové oligosacharidy **31**, **41** a **36** byly finálně čištěny gelovou permeační chromatografií (Bio-Gel P-2).

4.1.2 Příprava oligosacharidů obsahujících 2-amino-2-deoxygalaktopyranosové jednotky

4.1.2.1 Příprava stavebních bloků odvozených od 2-amino-2-deoxygalaktopyranosy

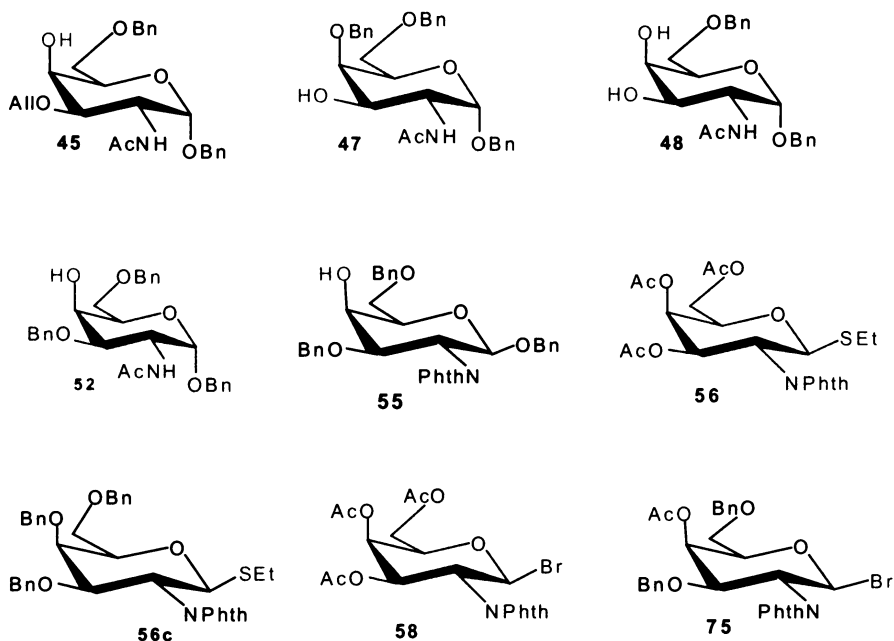
Stavební jednotky byly navrženy s ohledem na tři hlavní hlediska:

a) „Stavebnicový“ charakter výchozích látek – cílem bylo maximální zjednodušení a zkrácení syntézy tak, aby jedna výchozí látka mohla být použita pro přípravu několika monosacharidových jednotek a dále aby stejná stavební jednotka posloužila pro syntézu více oligosacharidů.

b) Nároky glykosylačních reakcí, které nepřipouštějí některé kombinace chránicích skupin, ať už kvůli sterickému bránění, stabilitě nebo kvůli specifickým interakcím (např. H-můstky).

c) Snadné odchránění oligosacharidu po glykosylační reakci.

Obecně byly stavební bloky s konfigurací *galakto* (Obr. 8) opět chráněny systémem *O*-acetylových, *O*-benzylových a *O*-allylových chránicích skupin, které jsou stabilní za

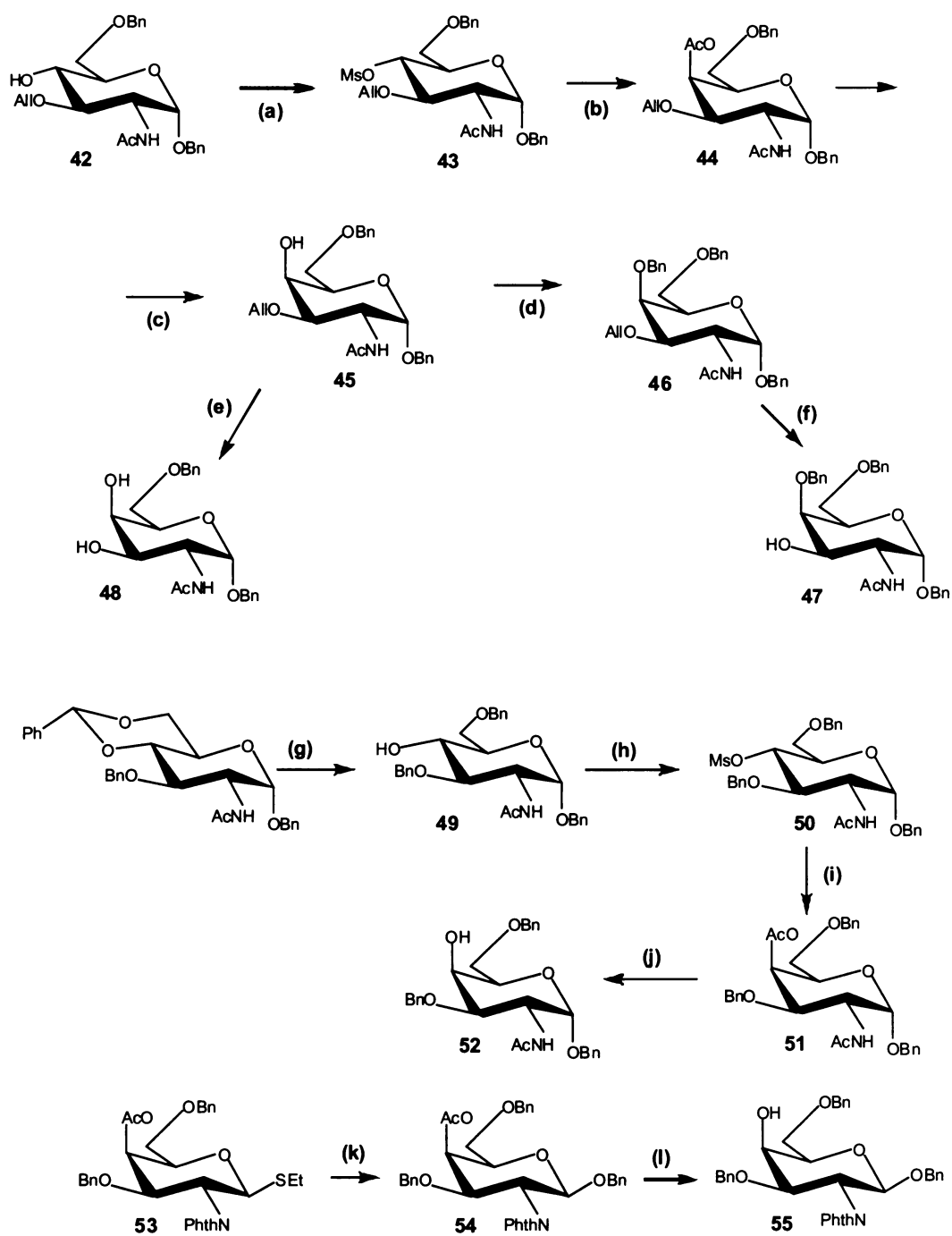


Obr. 8: Stavební jednotky s *galakto*-konfigurací

podmínek glykosylačních reakcí a které se osvědčily při přípravě oligosacharidů obsahujících jednotky odvozené od D-glukosaminu. Pro tvorbu β -glykosidických vazeb byla ponechána ftalimidová metoda, kdy ftalimidoskupina v poloze C(2) nejen chrání, ale i řídí glykosylační reakce směrem ke stereoselektivní tvorbě 1,2-*trans*-glykosidů, přestože v případě málo reaktivní axiální hydroxylové skupiny v poloze C(4) galaktopyranosového skeletu je toto tvrzení problematické⁴⁵. Jako glykosyldonory byly opět zvoleny glykosylbromidy, které jsou připravovány bezprostředně před glykosylační reakcí z odpovídajících stabilnějších ethylthioglykosidů.

Glykosylakceptory s *galakto*-konfigurací byly získány z monosacharidů konfigurace „*gluko*“ postupem založeným na epimerizaci příslušných synthonů s *gluko*-konfigurací v poloze C(4) popsaným v literatuře⁴⁴. Jako odstupující skupina byla použita *O*-Methansulfonylová skupina a jako nukleofil octan sodný v DMSO při 130 °C. Tento přístup je výhodný z ekonomického hlediska, dalším důvodem je nižší stereoselektivita benzyldenační reakce během selektivního chránění poloh C(3), C(4) a C(6) galaktopyranosového skeletu, kdy vedle očekávaného 4,6-*O*-benzyliden-derivátu se jako

vedlejší produkt tvoří i 3,4-derivát^{133,134}. Z výchozí látky, benzyl-2-acetamido-3-*O*-allyl-



(a) MsCl, pyridin, r.t.; (b) AcONa, DMSO, 130°C; (c) MeONa, MeOH, r.t.; (d) BnBr, NaH, DMF, r.t.; (e, f) $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCl}$, toluen - EtO - H₂O, reflux a poté HCOOH, reflux; (g) NaBH₃CN, HCl/Et₂O, THF, r.t.; (h) MsCl, pyridin, r.t.; (i) AcONa, DMSO, 130°C; (j) MeONa, MeOH, r.t.; (k) benzylalkohol, DMTST, DCM - diethylether - toluen, r.t.; (l) MeONa, MeOH, r.t.

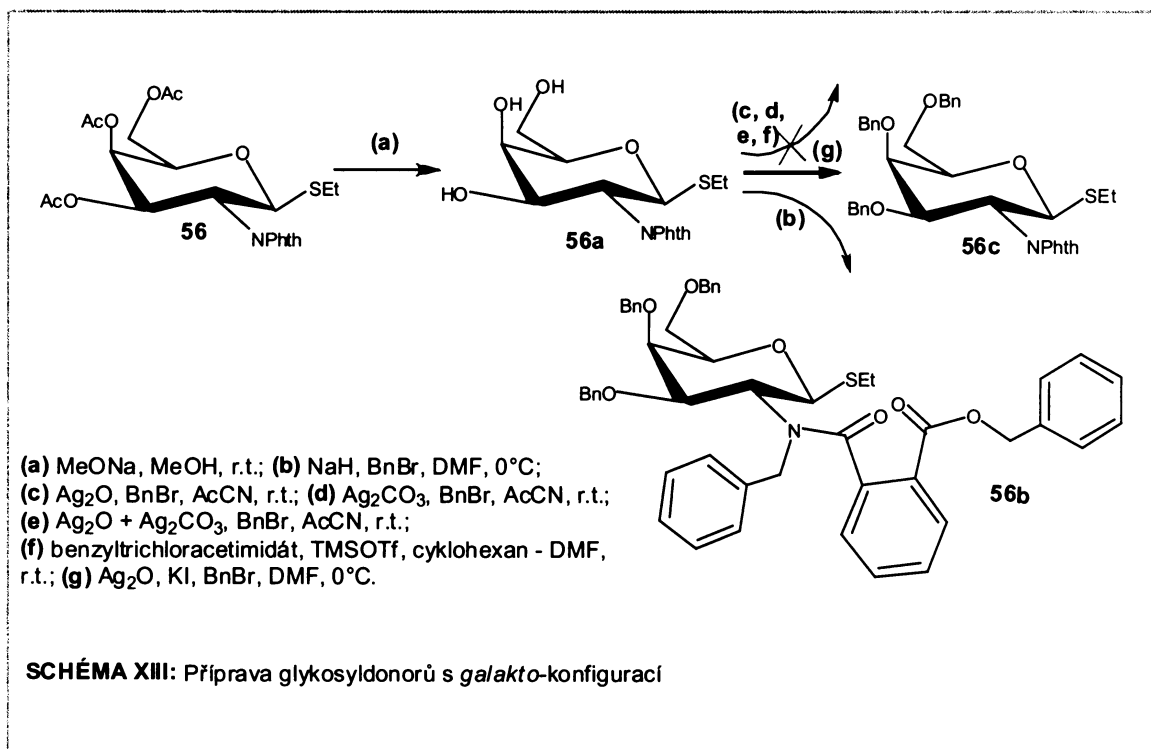
SCHEMA XII: Příprava glykosylakceptorů s galakto-konfigurací

6-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosidu¹¹⁵ (**42**, Schéma XII) byl reakcí s methansulfonylchloridem v pyridinu připraven 4-*O*-methansulfonyl derivát **43**. Jeho epimerizace poskytla *galakto*-derivát **44** ve výtěžku 73%. Z látky **44** jsou snadno dostupné všechny typy glykosylakceptorů, potřebné pro syntézu oligosacharidů obsahujících *N*-acetyl-galaktosaminové jednotky. Ortogonální chránění v polohách C(3) a C(4) umožňuje selektivně získat volnou hydroxyskupinu v každé z těchto pozic nebo odchránit obě zároveň. Zemplénovou *O*-deacetylací v methanolátu sodném, která pro *galakto*-deriváty obecně probíhá pomaleji než v *gluko*-řadě, bylo získáno 82% glykosylakceptoru **45**, stavební jednotky vhodné pro tvorbu (1 \rightarrow 4) glykosidických vazeb. Benzylace látky **45** benzylbromidem za přítomnosti NaH poskytla derivát **46** chráněný *O*-benzylovými skupinami v polohách C(4) a C(6), ze kterého byl deallylací Wilkinsonovým katalyzátorem a HCOOH, popsanou výše, připraven glykosylakceptor **47** (65%). Látka **45** byla využita rovněž pro přípravu akceptoru **48**, substrátu dvojnásobné glykosylace vedoucí k přípravě trisacharidu větveného v polohách C(3) a C(4). Deallylace poskytla benzyl-2-acetamido-6-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (**48**) ve výtěžku 76%.

Pro syntézu lineárního trisacharidu **87** (Schéma XVIII) byly připraveny glykosylakceptory: **52** a **55**. Příprava monosacharidu **52** vycházela z látky **49**(lit.¹³⁵), ze které byl reakcí s 4-methansulfonylchloridem připraven 4-*O*-methansulfonylderivát **50**, a jeho epimerizací NaOAc v poloze C(4) v DMSO byl získán 4-*O*-acetylderivát **51**, který byl převeden na glykosylakceptor **52** *O*-deacetylací. Glykosylakceptor **55** byl připraven z látky **53** (lit.^{44,45}) glykosylací s benzylalkoholem za přítomnosti DMTST postupem dle lit (¹³⁶) a následnou *O*-deacetylací v poloze C(4).

Glykosyldonor **56** byl připraven podle postupu v lit.^{108,137,138}. Popsaný „one-pot“ přístup umožňuje přípravu ve větším měřítku, což je v případě látky **56** používané pro syntézu více oligosacharidů nezbytná podmínka. Z *O*-acetylovaného derivátu **56** byl Zemplénovou *O*-deacetylací v methanolátu sodném připraven derivát **56a** (Schéma XIII), který měl být v dalším kroku *O*-benzylován. Tato reakce se ukázala jako značně problematická. Za standardních podmínek (benzylbromid, NaH) došlo k otevření a dvojnásobné benzylaci ftalimidové skupiny a jako hlavní produkt vznikla látka **56b** (98%). Tri-*O*-benzylovaný derivát **56c** by byl velmi vhodným donorem z hlediska stability výsledného oligosacharidu během deprotekčních reakcí a jejich počtu, a proto

bylo vyzkoušeno množství benzylačních podmínek: benzylbromid + Ag₂O,

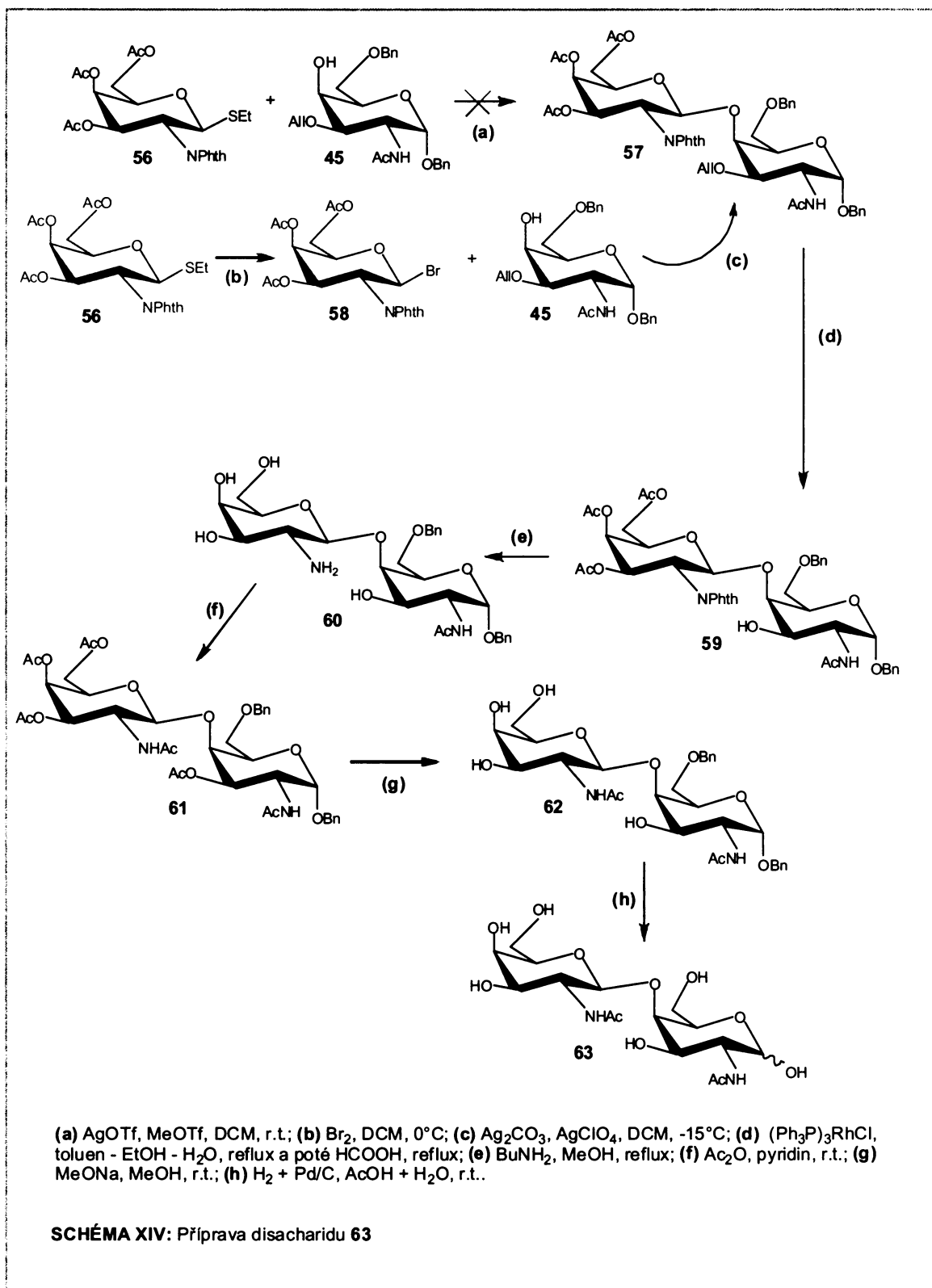


benzylbromid + Ag₂CO₃, benzylbromid + Ag₂O + Ag₂CO₃ a benzyltrichloroacetimidát + TMSOTf. K výsledku nakonec vedlo použití benzylbromidu v kombinaci s oxidem stříbrným v přítomnosti jodidu draselného⁹⁵ – tato reakce poskytla 14% výsledné látky **56c**, z důvodu nízkého výtěžku však bylo od použití tohoto donoru upuštěno. Získané akceptory **45**, **47**, **48**, **52** a **55** a donor **56** byly dále použity pro přípravu oligosacharidů obsahujících 2-amino-2-deoxygalaktopyranosové jednotky.

4.1.2.2 Syntéza disacharidu obsahujícího $\beta(1\rightarrow4)$ vázané jednotky odvozené od *D*-galaktosaminu

Lineární oligosacharidy tvořené $\beta(1\rightarrow4)$ vázanými *N*-acetylgalaktosaminovými jednotkami byly dosud připraveny pouze ftalimidovou metodou z akceptoru s azidoskupinou v poloze C(2), která byla později převedena na *N*-acetylovou skupinu reakcí s trifenylofosfinem¹³⁹. Tento fakt je vzhledem ke značnému významu 2-amino-2-deoxygalaktopyranos v organismu překvapivý – důvodem malé pozornosti, která byla dosud této oblasti věnována, je pravděpodobně náročnost samotné syntézy. Tvorba glykosidické vazby je v tomto případě obtížnější než u *N*-acetylglukosaminových stavebních jednotek, a to z důvodu velmi nízké reaktivity axiální hydroxylové skupiny v poloze C(4), která je výrazně stericky bráněna zvláště interakcemi se substituenty

v polohách C(3), C(6) a C(1) sacharidového kruhu a pravděpodobně též



intramolekulárními vodíkovými můstky (kap. 4.1.1.3). V této práci byly použity podmínky glykosylačního kroku, které se ukázaly jako nejvhodnější dle studie glykosylačních reakcí *N*-acetylgalaktosaminových jednotek, vypracované J. Veselým^{44,45}.

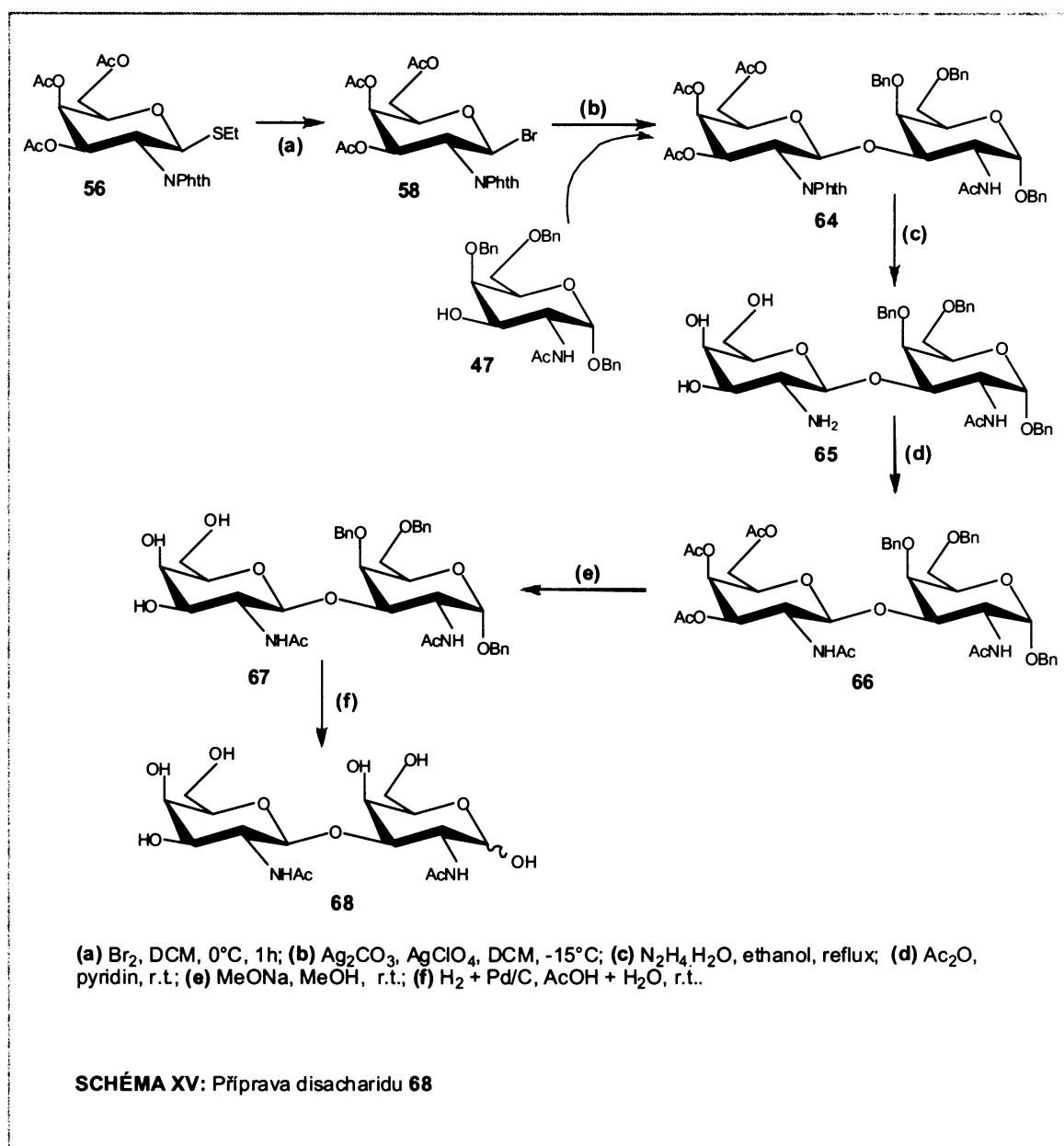
Syntéza 2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-galaktopyranosy (**63**, Schéma XIV) byla zahájena glykosylační reakcí mezi glykosylakceptorem **45** a glykosylbromidem **58** nesoucím řídicí ftalimidovou skupinu v poloze C(2). Jako glykosylpromotor byl použit AgClO_4 v kombinaci s Ag_2CO_3 ve funkci báze-scavengeru (vznikajících molekul HClO_4). Produktem byl chráněný disacharid **57** ve výtěžku 37%. Výchozí glykosylbromid **58** byl připraven bezprostředně před samotnou glykosylací reakcí ethylthioglykosidu¹³⁷ **56** s 1 M roztokem bromu v DCM. Alternativní příprava disacharidu **57**, t.j. reakce ethylthioglykosidu **56** s akceptorem **45** využívající jako glykosylpromotor MeOTf v kombinaci s AgOTf , neposkytla žádaný produkt. Deprotekce, která byla zahájena odstraněním allylové skupiny Wilkinsonovým katalyzátorem a HCOOH , poskytla nejprve látku **59**. Pokračovala deftaloylací hydrazin hydrátem v EtOH a následnou *N*- a *O*-acetylací pomocí Ac_2O v pyridinu, kterou byl připraven derivát **61**. *O*-deacetylace methanolátem sodným v MeOH poskytla disacharid **62** a jako poslední byl hydrogenolýzou na Pd/C v 90% AcOH získán volný disacharid **63**, který byl purifikován gelovou permeační chromatografií na Bio-Gelu P-2.

4.1.2.3 Syntéza disacharidu obsahujícího $\beta(1\rightarrow3)$ vázané jednotky odvozené od *D*-galaktosaminu

Přestože je hydroxylová skupina v poloze C(3) glykosylakceptoru mnohem reaktivnější než axiální hydroxylová skupina v poloze C(4), která byla glykosylována v předchozím případě, ani $\beta(1\rightarrow3)$ glykosidická vazba spojující *N*-acetylgalaktosaminové jednotky není příliš často připravovaný strukturní motiv. Byl syntetizován pomocí ftalimidové metody jako součást složitější struktury, z azido-akceptoru a glykosylbromidu za aktivace AgOTf ^{140,141} nebo pomocí participující karbamátové PNZ skupiny za aktivace triethylsilyl triflátem¹⁴².

Příprava 2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-deoxy-D-galaktopyranosy (**68**, Schéma XV) byla analogická s předchozím případem. Chráněný disacharid **64** byl připraven reakcí glykosylakceptoru **47** a glykosylbromidu **58** za přítomnosti Ag_2CO_3 a AgClO_4 ve výtěžku 70%. Deftaloylace látky **64** hydrazin hydrátem a následná *N*- a *O*-acetylace Ac_2O poskytla látku **66**, ze které byla Zemplénovou *O*-

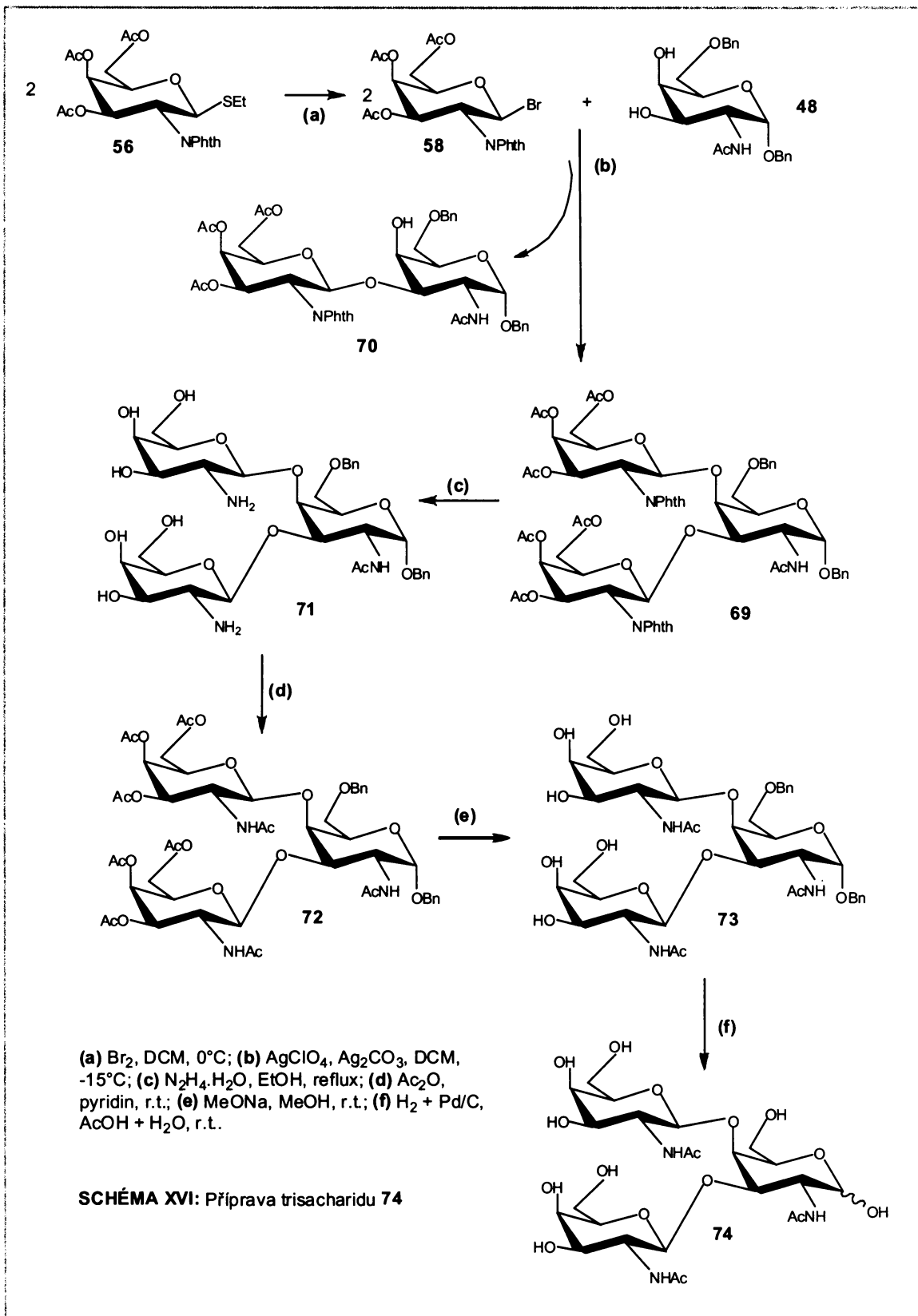
deacetylací methanolátem sodným připravena látka **67**. Hydrogenolýza *O*-benzylových skupin na Pd/C v 90% AcOH poskytla volný disacharid **68** ve výtěžku 50%.



4.1.2.4 Syntéza „větveného“ oligosacharidu obsahujícího $\beta(1\rightarrow3)$ a $\beta(1\rightarrow4)$ vázané jednotky odvozené od *D*-galaktosaminu

Pro syntézu větveného oligosacharidu 2-acetamido-2-deoxy- β -*D*-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[2-acetamido-2-deoxy- β -*D*-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-2-deoxy-*D*-galaktopyranosy (**74**, Schéma XVI) byla aplikována metoda násobné glykosylace, kterou byly připraveny větvené oligosacharidy se stavebními jednotkami s konfigurací „gluko“.

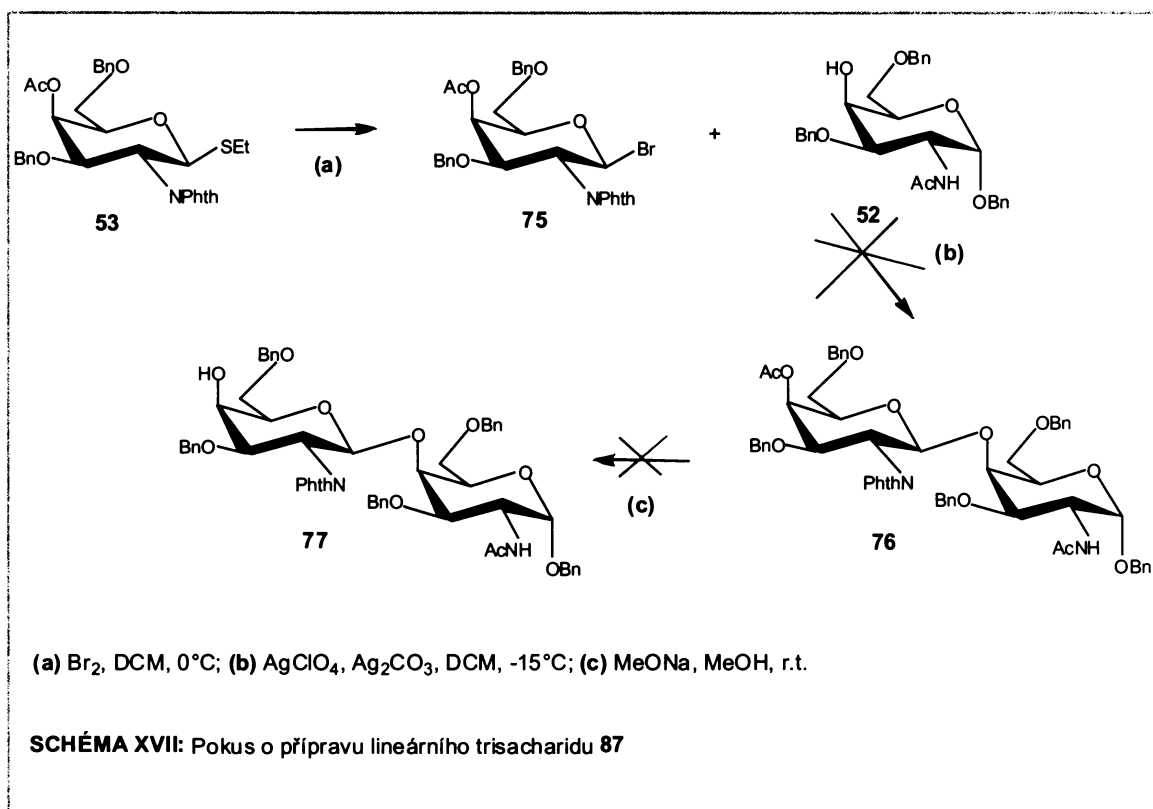
Akceptor **48** se dvěma volnými hydroxylovými skupinami byl glykosylován za aktivace AgClO_4 jako glykosylpromotoru a Ag_2CO_3 v roli báze-scavengeru. Požadovaný trisacharid **69** byl získán v poměrně nízkém výtěžku 9%, který byl pravděpodobně



zapříčiněn špatnou sterickou přístupností glykosylovaných hydroxylových skupin akceptoru a dále obtížnou purifikací pomocí RP HPLC. Jako vedlejší produkt reakce byl získán „deleční“ disacharid **70** (17%), jako výsledek glykosylační reakce pouze na reaktivnější hydroxylové skupině v poloze C(3). Následovaly obvyklé deprotekcí kroky: (a) deftaloylace a *O*- a *N*-acetylace které poskytly látku **72**; (b) *O*-deacetylace, kterou byl získán trisacharid **73**; (c) hydrogenolyza, která poskytla žádaný trisacharid **74**, jenž byl opět purifikován gelovou permeační chromatografií (Bio-Gel P-2).

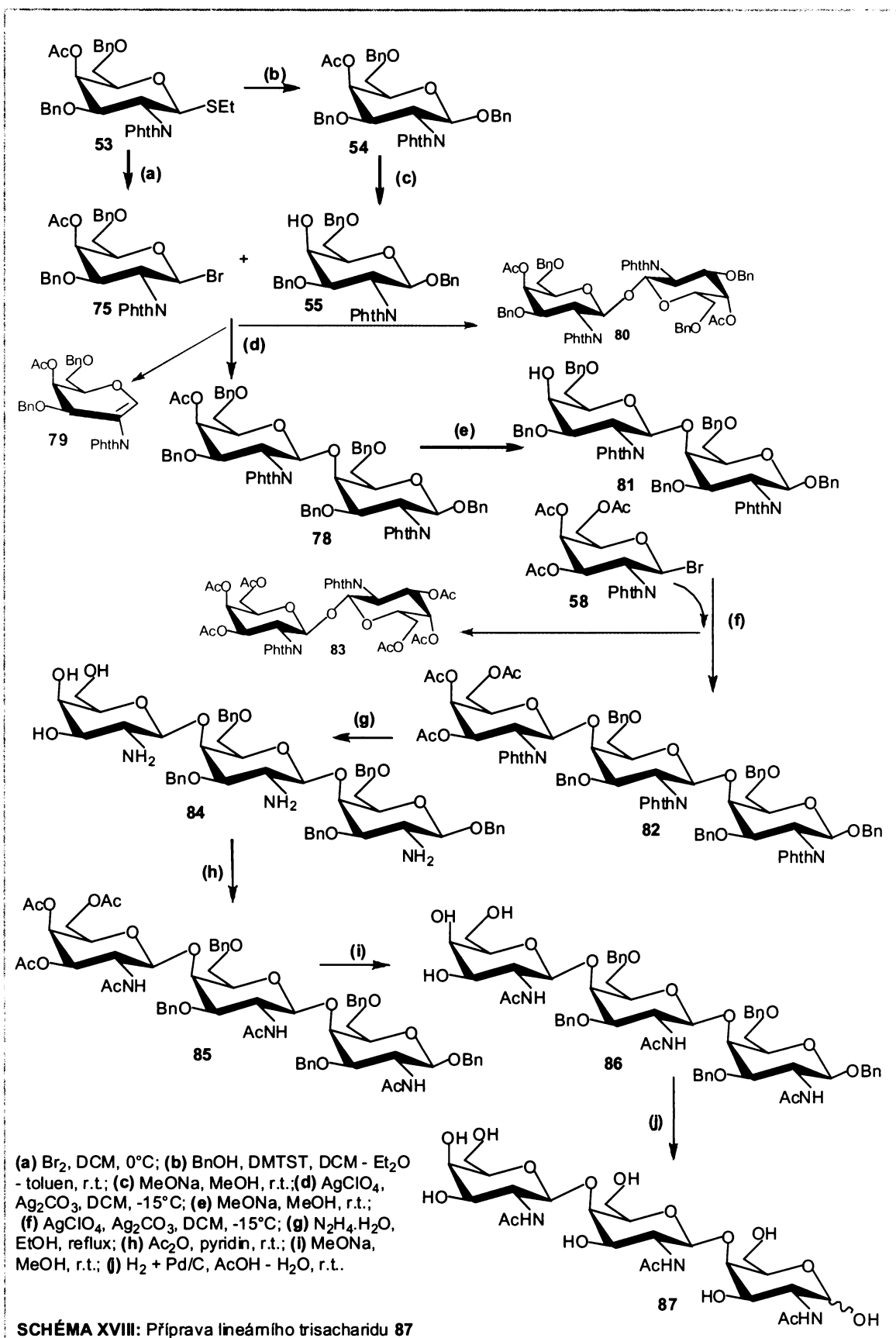
4.1.2.5 Syntéza lineárního trisacharidu obsahujícího $\beta(1\rightarrow4)$ vázané *N*-acetylgalaktosaminové jednotky

První strategie syntézy lineárního trisacharidu **86** vycházela z reakce akceptoru **52** a glykosyldonoru **53** (lit.^{44,45}), který byl bezprostředně před glykosylační reakcí převeden na bromid **75**, za přítomnosti stříbrných solí (Schéma XVII).



Vznikající disacharid **76** pak má v poloze C'(4) *O*-acetylovu skupinu, kterou lze selektivně odštěpit methanolátem sodným a získat tak akceptor pro další glykosylační reakci s glykosyldonorem **75**. NMR spektra disacharidu **76** i akceptoru **77** však byla interpretována jako spektra směsí nejméně dvou blíže neurčených látek oligosacharidového typu. Jelikož nebylo možné tyto látky od sebe oddělit, nebyl tento postup dále využit. Důvodem nejednoznačného průběhu reakce byla pravděpodobně

nížká reaktivita glykosylakceptoru **52**. Ten byl v další syntéze (Schéma XVII) nahrazen reaktivnějším akceptorem **55**, s β -konfigurací a ftalimid skupinou, která se neúčastní



tvorby nežádoucích vodíkových můstků. Akceptor **55** byl použit v glykosylační reakci s glykosyldonorem **75** za přítomnosti AgOCl_4 a Ag_2CO_3 . Glykosylace poskytla požadovaný disacharid **78** a kromě něj ještě galaktal **79** – produkt eliminace glykosyldonoru – a disacharid trehalózového typu **80**. Disacharid **78** byl *O*-deacetylován v poloze C'(4) methanolátem sodným. Takto připravený glykosylakceptor **81** byl znovu použit do glykosylační reakce s donorem **58**, která poskytla lineární trisacharid **82** ve výtěžku 52%, jako vedlejší produkt opět vznikl odpovídající disacharid trehalózového typu **83**. Trisacharid **82** byl deftaloylován hydrazin hydrátem v EtOH, *N*- a *O*-acetylován Ac_2O v pyridinu (získán byl trisacharid **85**). Následná *O*-deacetylace methanolátem sodným poskytla látku **86**, která byla hydrogenolyzována nad Pd/C v 90% AcOH. Čištění gelovou permeační chromatografií (Bio-Gel P-2) poskytlo volný trisacharid **87**.

4.2 VÝSLEDKY AFINITNÍCH TESTŮ

Připravené oligosacharidy (Obr. 9) byly testovány jako inhibitory vazby rozpustné dimerické formy potkaního receptoru NKR-p1A a lidského CD69 k vysokoafinitnímu ligandu, neoglykoproteinu GlcNAc₂₃BSA.

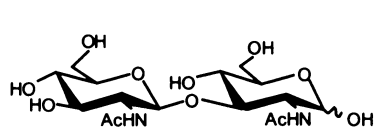
Mikrotitrační destičky byly pokryty vysokoafinitním ligandem, vazba radioaktivně

Tabulka 1: výsledky afinitních testů

	Látka	IC ₅₀ , NKR-p1A [M]	IC ₅₀ , CD69 [M]
kontrola	D-GlcNAc	1×10 ⁻⁷ (20)*	1×10 ⁻⁵ (15)
	β-D-GlcNAc-D-GlcNAc (Chitobiosa)	2×10 ⁻⁸ (5)	3×10 ⁻⁶ (6)
	Chitotriosa	9×10 ⁻⁹ (5)	1×10 ⁻⁶ (6)
	Chitotetraosa	3×10 ⁻⁹ (5)	1×10 ⁻⁶ (6)
	D-GalNAc	3×10 ⁻⁸ (10)	3×10 ⁻⁵ (8)
	GlcNAc ₂₃ BSA (vysokoafinitní ligand)	3×10 ⁻¹² (5)	1×10 ⁻¹⁰ (10)
testované látky	13	8×10 ⁻⁵ (4)	6×10 ⁻⁴ (6)
	25	2×10 ⁻⁴ (5)	1×10 ⁻⁶ (4)
	30	1×10 ⁻⁵ (3)	1×10 ⁻¹⁰ (3)
	31	1×10 ⁻⁴ (3)	1×10 ⁻⁹ (4)
	36	2×10 ⁻⁵ (3)	2×10 ⁻⁷ (4)
	41	2×10 ⁻⁵ (3)	2×10 ⁻⁸ (4)
	63	1×10 ⁻⁷ (3)	1×10 ⁻⁴ (4)
	68	1×10 ⁻⁴ (3)	1×10 ⁻³ (4)
	74	1×10 ⁻⁵ (3)	3×10 ⁻⁶ (6)
	87	2×10 ⁻⁸ (3)	6×10 ⁻⁴ (3)
* čísla v závorce značí počet opakování experimentu			

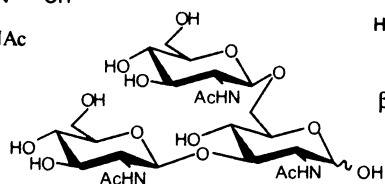
značených proteinů NKR-p1A a CD69 k tomuto neoglykoproteinu byla inhibována sérií zředěných vzorků testovaných oligosacharidů, jak je popsáno v experimentální části (kap.

5.1.2).



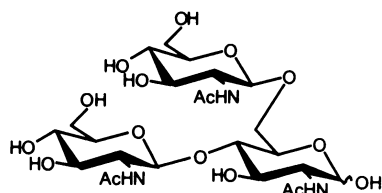
β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc

13



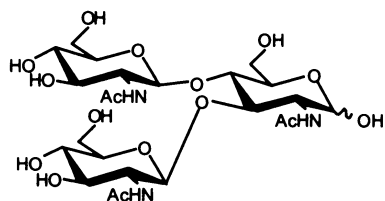
β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)-[β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 6)]-D-GlcNAc

36



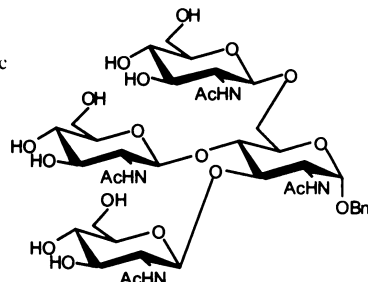
β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-[β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 6)]-D-GlcNAc

41



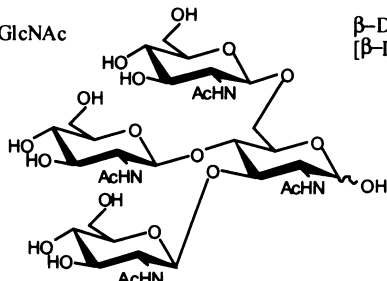
β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)-[β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)]-D-GlcNAc

25



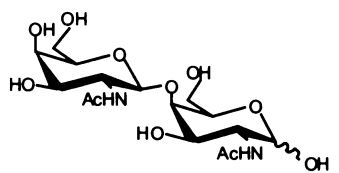
β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)-[β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 6)]-
[β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)]- α -D-GlcNAc-OBn

30



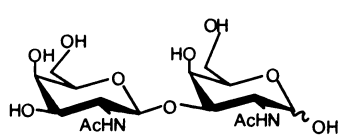
β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)-[β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 6)]-
[β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)]-D-GlcNAc

31



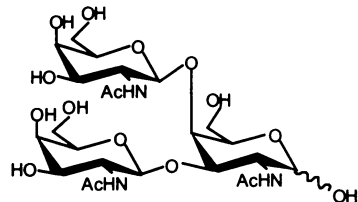
β -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GalNAc

63



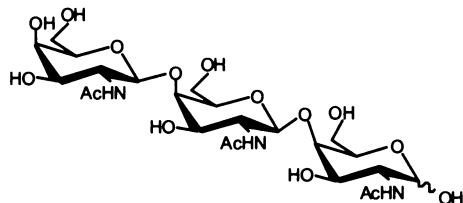
β -D-GalNAc-(1 \rightarrow 3)-D-GalNAc

68



β -D-GalNAc(1 \rightarrow 3)-[β -D-GalNAc(1 \rightarrow 4)]-D-
GalNAc

74



β -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GalNAc

87

Obr 9: Struktury testovaných oligosacharidů

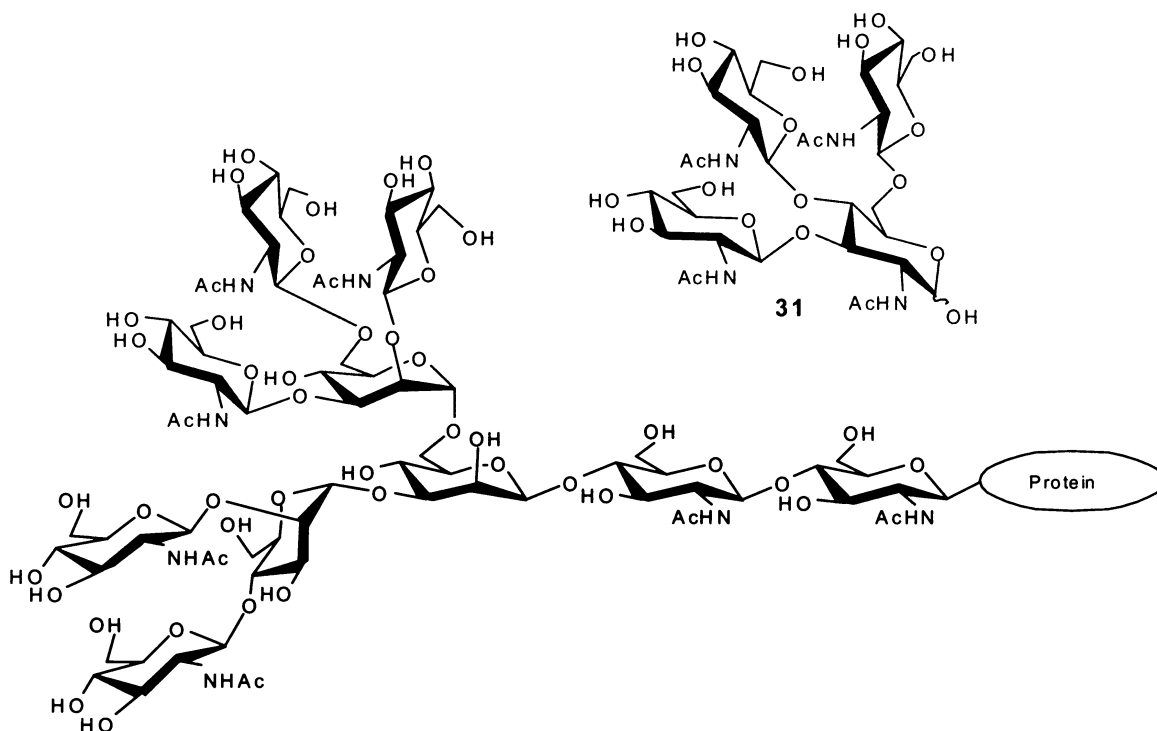
4.2.1 Afinitní testy s proteinem NKR-p1A

Protein NKR-p1A vykazuje silnou interakci s monosacharidy jako GlcNAc ($IC_{50} = 10^{-7}$ M; Tab. 1) a tato interakce se dále zesiluje s elongací chitooligomerů lineárního typu, jako například chitobiosa ($IC_{50} = 3 \times 10^{-8}$ M; Tab. 1). Tato tendence odpovídá existenci vazebného místa v molekule receptoru, které má tvar žlábků¹⁷(kap. 2.1.2). Disacharid obsahující $\beta(1\rightarrow3)$ vazbu β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc (**13**) je mnohem horší inhibitor ve srovnání s $\beta(1\rightarrow4)$ vázanou chitobiosou β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc i s poměrně dobrým ligandem, lineárním trisacharidem **87** rovněž obsahujícím vazby $\beta(1\rightarrow4)$ ($IC_{50} = 2 \times 10^{-8}$ M), což značí, že patrně svým tvarem vazebnému žládku nevyhovuje. Relativně flexibilní vazba $\beta(1\rightarrow6)$ sice nevylučuje zcela vazbu k receptoru, ale větvené či málo flexibilní oligosacharidy obsahující $\beta(1\rightarrow3)$ glykosidickou vazbu jsou velmi špatnými ligandy receptoru NKR-p1A, jako v našem případě trisacharid β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)-[β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)]-D-GlcNAc (**25**, Tab. 1) ($IC_{50} = 2 \times 10^{-4}$ M) nebo tetrasacharid **31** ($IC_{50} = 1 \times 10^{-4}$ M). Dále lze konstatovat, že nahrazení *N*-acetylglukosaminových jednotek v oligosacharidech lineárního typu jednotkami *N*-acetylgalaktosaminovými snižuje vazebnou afinitu k receptoru (viz vazebné afinity chitotriózy a jejího galaktoanalogu, trisacharidu **87**, Tab 1), zatímco u větvených oligosacharidů tato změna nehraje žádnou významnější roli, což lze doložit vazebnými afinitami trisacharidů **25**, **36**, **41** a **74** (Tab. 1). Tato skutečnost by mohla naznačovat, že v případě větvených oligosacharidů se vazby k proteinu účastní přednostně terminální sacharidové jednotky, které se vazebnému žládku mohou přizpůsobit flexibilněji než součástí lineárního řetězce.

4.2.2 Afinitní testy s proteinem CD69

Cílové látky byly též testovány jako potenciální mimetika aktivačního receptoru CD69, pro který vykázal dianterní trisacharid **25** významnou vazebnou afinitu. Ve výše zmíněném inhibičním experimentu se jako velmi účinné inhibitory ukázala větvená mimetika. Zvláště triantenární tetrasacharid **31** ($IC_{50} = 1 \times 10^{-9}$ M) má vazebnou afinitu k receptoru CD69 srovnatelnou s o mnoho komplexnějšími oligosacharidy, jako je například pentaantenární dekasacharid, získaný z glykoproteinu ovomukoidu⁹ (Obr. 10). Ještě lepší vlastnosti má překvapivě jeho α -benzylglykosid **30**, jehož hodnota IC_{50} (1×10^{-10} M) leží v oblasti nanomolárních koncentrací (Tab. 1), a je tak srovnatelná s vysokoafinitním ligandem. Benzylová skupina pravděpodobně zvyšuje celkovou rigiditu

struktury tetrasacharidu, brání některým rotacím a může tvořit vodíkové můstky



Obr. 10: Srovnání struktury tetrasacharidu 31 s pentaantenárním oligosacharidem získaným z ovomukoidu

s hydroxylovými skupinami. Dále je možné, že se sama účastní ještě dalších interakcí, které dále zesilují vazbu k proteinu (hydrofóbní interakce) a že α -glykosidické uspořádání receptoru vyhovuje. Tyto předpoklady budou ověřovány v budoucnu připravenými strukturami (β -glykosid apod.)

I v tomto případě zjištěné hodnoty odpovídají faktu, že molekula CD69 obsahuje tři oddělená vazebná místa pro *N*-acetylglukosamin (kap. 2.1.2). Oligosacharidy sestávající z *N*-acetylgalaktosaminových jednotek vykazují celkově nižší afinitu. I zde, stejně jako v minulém případě, se flexibilita $\beta(1\rightarrow6)$ glykosidické vazby projevuje zvýšením afinity mimetik, ve kterých se nachází (např. větvených trisacharidů 36 a 41), k proteinu. Jako relativně horší ligandy se naopak jeví lineární typy oligosacharidů, lineární di- a trisacharidy.

V souhrnu, látky připravené v rámci této práce umožnily získat nové poznatky o strukturních nárocích lektinových receptorů NKR-p1 a CD69. V případě receptoru CD69 se podařilo připravit vůbec první efektivní oligosacharidová mimetika jeho přirozených ligandů. Tyto výsledky otevírají cestu k návrhu a syntéze nových ligandů s vysokou afinitou k těmto dvěma lektinovým receptorům.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST:

5.1.1 *Obecné experimentální metody*

Body tání byly určeny na Koflerově bloku a nejsou korigovány. Měrné optické otáčivosti byly měřeny polarimetrem Perkin Elmer 141 při 25 °C a jsou udány v 10^{-1} deg.cm³.g⁻¹.dm⁻¹. Elementární analýzy byly stanoveny na přístroji Perkin Elmer 2400 II. Infračervená spektra byla měřena na spektrometru Bruker IFS 88 (FTIR) a vlnočty jsou uvedeny v cm⁻¹. NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker Avance v FT modu při 25 °C a 500.1 MHz (¹H) nebo 125.8 MHz (¹³C) v CDCl₃, D₂O nebo DMSO. Byl použit (CH₃)₄Si jako vnitřní standard pro ¹H NMR spektra a signál CDCl₃ (δ 77.0) pro standardizaci ¹³C NMR spekter. Pro jednoznačné přiřazení signálů v ¹³C NMR spektrech byla HMQC technikou změřena ¹H, ¹³C-heterokorelovaná 2D NMR spektra použitím standardní pulzní sekvence dodané výrobcem spektrometru. Byly užity následující typické parametry: spektrální šířka v rozsazích f_1 a f_2 : 4500 Hz a 17000 Hz, počet snímání: 32, počet přírůstků v rozsahu f_1 : 256, prodlení zpětného cyklu: 1 s, sběrný čas: 0.2 s, 90° pulz pro ¹H: 12.5 μs, data matrix pro zpracování: 2048 × 2048 datových bodů, pro zpracování byla použita vážící funkce (shifted sinebell). Chemické posuny jsou uvedeny v ppm (δ-stupnice) a interakční konstanty (J) v Hz. NMR data (pokud se nenalézají přímo v textu) jsou uvedena v tabulkách 2-22. Positivní iontová hmotnostní FAB spektra byla naměřena na spektrometru (s BEqG geometrií) ZAB-EQ (VG Analytical, Manchester, UK) s užitím M-Scan FAB zdroje (Xe, energie 8 keV). Vzorby byly rozpuštěny v CHCl₃ nebo MeOH a jako matrice byl použit DMSO, směs glycerol-thioglycerol nebo 3-nitrobenzylalkohol. Pro analýzu směsí byl využit kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem (Finnigan, Inc., U.S.A.) ve složení: kvartérní gradientová pumpa P4000, vakuové odplyňovací zařízení SCM 1000, automatický dávkovač AS3000 a hmotnostní spektrometr LCQ classic s analyzátozem typu iontová past (Thermo Finnigan). Mobilní fáze byla směs MeOH a vody (9:1, v/v). Látky byly ionizovány pomocí zdroje pro APCI (chemická ionizace za atmosferického tlaku), teplota odpařovače byla 475 °C, teplota vstupní kapiláry 200 °C. Spektra byla snímána v rozsahu 50-2000u. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na silikagelových deskách “DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄” (Merck) nebo “Silufol UV₂₅₄” (Kavalier). Preparativní TLC byla prováděna na skleněných deskách Kieselgel 60 F₂₅₄₊₃₅₆, 20 × 20 cm, 2 mm vrstva (Merck) nebo TLC hliníkových foliích pokrytých silikagelem Kieselgel 60 F₂₅₄,

20 × 20 cm, 0.2 mm vrstva (Merck). Látky na TLC deskách byly detekovány UV světlem (254 nm) a tepelnou karbonizací. Pro preparativní sloupcovou chromatografii byl používán silikagel “Fluka Silica gel 60” (40 – 63 µm; Fluka, Neu-Ulm, Switzerland). Analytická RP HPLC byla prováděna na přístroji “Waters Alliance HPLC System” (PDA 996 detektor, Waters) vybaveném kolonou (150.0 × 3.9 mm) plněnou sorbentem X-Terra C18 (4 µm; Waters). Pro analýzu volných cukrů byla použita kolona (250.0 × 4 mm) plněná sorbentem LiChrospher 100 Diol (5µm, Merck). Pro preparativní RP HPLC byla použita kolona (250 × 25 mm) plněná sorbentem LiChrosorb RP-18 (5 µm; Merck). Pro gelovou permeační chromatografii byl použit Toyopearl HW 40F (Sigma) a Bio-Gel[®] P-2 Gel Fine (Bio-Rad). Rozpouštědla byla odpařována na rotační vakuové odparce. Vzorky na analýzu byly sušeny 8 h při tlaku 6.5 Pa a pokojové teplotě. DCM byl destilován z oxidu fosforečného a uchováván nad molekulovými sítí 4Å. V případě glykosylačních reakcí bylo dávkování činidel a reagensů prováděno septovou technikou.

5.1.2 Metodika testů afinity k aktivačním receptorům NK buněk NKR-PA a CD69

Afinita látek **13, 25, 30, 31, 36, 41, 63, 68, 74 a 87** byla testována v laboratořích UK Praha a Mikrobiologického ústavu (prof. Bezouška) vůči dvěma aktivačním receptorům NK-buněk, proteinům NKR-p1A a CD69. NKR-p1A protein byl exprimován a purifikován dle lit.^{10,18}. CD69 (CWTY) protein, obsahující rozpustnou ligand-vážečnou doménu antigenu CD69, byl připraven dle lit.¹⁴. Proteiny byly purifikovány z inkluzních tělísek, která byla rozpuštěna v 6 M guanidin-HCl a 100 mM DTT, a znovu složeny postupným přidáním do stonásobného objemu 50 mM Tris-HCl pufru (pH 8.5), obsahujícího 0.4 M arginin, redoxní pufr (10 mM cysteamin a 1 mM cystamin), 1 mM PMSF, 1 µM leupeptin a 1 µM pepstatin. Složené proteiny byly dialyzovány proti „low-salt“ pufru a purifikovány kombinací ionexové chromatografie, chromatografie na reverzní fázi a gelové permeační chromatografie. Identita a homogenita proteinů byla ověřena pomocí SDS-PAGE za redukujících i neredukujících podmínek, N-terminální sekvenací (10 cyklů automatizovaného Edmanova odbourávání) a MALDI MS¹⁴. Proteiny byly označeny Na¹²⁵I použitím Iodogenu (Pierce).

Vazebné a inhibiční testy byly provedeny způsobem popsaným v lit.¹⁰, s malými obměnami. PVC mikrodestičky (Titertek Immuno Assay-Plate, ICN Flow) byly přes noc pokryty při 4 °C s 50 µl GlcNAc₂₃BSA (50µg/ml, Sigma) v TBS+C pufru (10 mM Tris-HCl pH 8.0 se 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, a 1 mM NaN₃). Destičky byly zablokovány

1% BSA (Sigma) v TBS+C při 4 °C po 2 h a inkubovány s množstvím ¹²⁵I-značeného proteinu odpovídajícím polovině saturačního množství pro různá zředění testovaných inhibitorů v totálním reakčním objemu 100 μl. Destičky byly 3 × promyty TBS+C, vysušeny a do každé jamky byl přidán scintilační roztok (100 μl). Radioaktivita v jamkách byla určena přístrojem β-counter Microbeta (Wallac).

Všechny experimenty byly provedeny duplicitně. Stupeň inhibice byl spočítán relativně s ohledem na kontrolní uspořádání bez inhibitoru (byla přidána voda). Výsledné hodnoty jsou průměrem výsledků dvou nebo více experimentů (Tab. 1).

5.2 EXPERIMENTÁLNÍ POSTUPY:

Benzyl-2-acetamido-4,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (2)

Benzyl-2-acetamido-3-*O*-allyl-4,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosid⁴¹ (1; 1.035 g, 2 mmol) a (PPh₃)₃RhCl (233 mg, 0.25 mmol) byly za míchání 4 h zahřívány k varu ve směsi EtOH – toluen – voda (7:3:2; 60 ml). Byla přidána HCOOH (2 ml) a zahřívání pokračovalo 3 h. Reakční směs byla zahuštěna a pevný zbytek byl chromatografován na koloně silikagelu (40 ml) ve směsi *rozpouštědel* toluen – EtOAc (2:1). Purifikace poskytla 698 mg (71%) látky **2**. Analytický vzorek byl připraven krystalizací ze směsi EtOAc – petrolether; b.t. 134–135 °C, [α]_D +69° (*c* 0.4, CHCl₃); {lit.¹⁴³ uvádí: [α]_D +65° (*c* 1.1, CHCl₃)}. IČ: 3578 (OH), 3437, 1662, 1509, 601 (NH), 3090, 1608 (arom.), ¹H NMR spektrum odpovídá údajům pro standardní vzorek připravený postupem popsaným v lit.¹⁴³. Pro **2** (C₂₉H₃₃NO₆) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 491.6, monoizotopická molekulová hmotnost 491.2. FAB MS, *m/z*: 492 [M + H]⁺. Pro C₂₉H₃₃NO₆ (491.6) vypočteno: 70.86% C, 6.77% H, 2.85% N; nalezeno: 70.77% C, 6.82% H, 2.78% N.

Benzyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl-(1→3)-2-acetamido-4,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (6)

Metoda A: Ethyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido-1-thio- β -D-glukopyranosid¹²⁴ (**3**; 624 mg, 1 mmol), látka **2** (246 mg, 0.5 mmol), AgOTf (129 mg, 0.5 mmol) a aktivovaná práškovaná molekulová síta (4Å, 1 g) byla 10 h sušena při pokojové teplotě a tlaku 1.32 Pa. Byl přidán suchý DCM (5 ml) a směs byla míchána 1 h za pokojové teploty. Byl přidán MeOTf (3 × 113 μ l, 1 mmol), vždy po 12 h. Směs byla ochlazená na –20 °C, byl přidán suchý pyridin (1 ml) a vše mícháno 30 min při –15 °C a 1 h při pokojové teplotě. Směs byla zředěna CHCl₃ (150 ml) a zfiltrována přes křemelinu. Filtrát byl promyt 10% vodným roztokem NaHSO₄, nasyceným roztokem NaHCO₃ a 5% vodným roztokem NaCl (vždy 30 ml). Organický podíl byl usušen MgSO₄ a zahuštěn. Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (70 ml) ve směsi *rozpouštědel* toluen – EtOAc (2:1) následovaná HPLC chromatografií na reverzní fázi

C18 v soustavě rozpouštědel voda – MeOH (lineární gradient 75→90%/70 min) poskytla 310 mg (59%) pevné látky **6**.

Metoda B: Ethyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido-1-thio-β-D-glukopyranosid¹²⁴ (**3**; 624 mg, 1 mmol) byl 10 h sušen při pokojové teplotě a tlaku 1.32 Pa. Byl přidán suchý DCM (2.3 ml), roztok byl ochlazen na 0 °C a byl přidán 1M roztok bromu v suchém DCM (1.1 ml). Směs reagovala 1 h při 0 °C a 1 h za pokojové teploty. Pak byla zahuštěna za vyloučení vlhkosti (vodní vývěva), kodesťilována s toluenem (3 × 2 ml) a pevný zbytek byl rozpuštěn v suchém DCM (1.3 ml). Roztok glykosyl bromidu¹²⁴ **4** byl použit ke kondenzaci s látkou **2**.

Látka **2** (246 mg, 0.5 mmol) a AgOTf (129 mg, 0.5 mmol) byly 10 h sušeny. Byl přidán suchý DCM (1.3 ml), směs byla ochlazená na –15 °C a v průběhu 1 h byl za míchání přidán roztok glykosyl bromidu **4**. Směs byla míchána dalších 30 min při –45 °C a pak 1 h při –20 °C. Byl přidán pyridin (0.4 ml) a směs byla míchána 20 min při –20 °C. Po dosažení pokojové teploty byla směs zředěna CHCl₃ (100 ml), zfiltrována a filtrát byl promyt nasyceným vodním roztokem NaHCO₃ (25 ml) a vodou (3 × 25 ml). Organický podíl byl sušen MgSO₄, zahuštěn a zbytek byl kodesťilován s toluenem (2 ×). Dále byl purifikační postup shodný s postupem použitým v metodě **A**. Výtěžek byl 331 mg (63%) pevné látky **6**, b.t. 150 °C, [α]_D +41° (*c* 0.3, CHCl₃). NMR data viz tab. 2 a 3. Pro **6** (C₆₄H₆₄N₂O₁₂) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1053.2, monoizotopická molekulová hmotnost 1052.5. FAB MS, *m/z*: 1053.4 [M + H]⁺, 1075.3 [M + Na]⁺. Pro C₆₄H₆₄N₂O₁₂ (1053.2) vypočteno: 72.99% C, 6.12% H, 2.66% N; nalezeno: 72.71% C, 6.29% H, 2.48% N.

Benzyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido-β-D-glukopyranosyl-(1→3)-2-acetamido-4,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glukopyranosid (7**)**

Látka **2** (492 mg, 1 mmol) a AgOTf (520 mg, 2.02 mmol) byly 10 h sušeny při pokojové teplotě a tlaku 1.32 Pa. Byl přidán suchý DCM (2 ml), směs byla ochlazená na –45 °C a během 1 h byl přidán roztok 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido-β-D-glukopyranosyl bromidu⁴¹ (**5**; 2 ml, 2 mmol) v suchém DCM. Směs byla míchána dalších 30 min při –15 °C a 1 h při –20 °C. Byl přidán pyridin (0.4 ml) a směs byla míchána 20 min při –20 °C. Po dosažení pokojové teploty byla směs zředěna CHCl₃ (250 ml), zfiltrována a filtrát byl promyt nasyceným roztokem NaHCO₃ (50 ml) a vodou

(3 × 50 ml). Organická fáze byla usušena MgSO₄, zahuštěna a kodestilována s toluenem (2 ×). Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (60 ml) v soustavě rozpouštědel toluen – EtOAc (1:1) poskytla 657 mg (72%) pevné pěny látky **7**; [α]_D +11° (c 0.2, CHCl₃). NMR data viz 2 a 3. Pro **7** (C₄₉H₅₂N₂O₁₅) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 908.9, monoizotopická molekulová hmotnost 908.3. FAB MS, *m/z*: 909 [M + H]⁺ a 932 [M + Na]⁺. Pro C₄₉H₅₂N₂O₁₅ (908.9) vypočteno: 64.75% C, 5.77% H, 3.08% N; nalezeno: 64.59% C, 5.87% H, 2.95% N.

Benzyl-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-deoxy-β-D-glukopyranosyl-(1→3)-2-acetamido-4,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glukopyranosid (10)

K míchané suspenzi látky **6** (480 mg, 0.46 mmol) ve směsi propan-2-ol – voda (6:1; 20 ml) byl během 20 min přidáván borohydrid sodný (287 mg, 7.6 mmol). Po 6 h míchání při pokojové teplotě byl přidán další podíl borohydridu sodného (28.7 mg, 0.76 mmol) a míchání pokračovalo dalších 6 h. Pak byla směs zahuštěna a pevný zbytek byl rozpuštěn v CHCl₃ (50 ml) a promyt 5% vodným roztokem NaCl (5 ml). Organická fáze byla promyta 5% vodným roztokem NaCl (2 × 5 ml), usušena MgSO₄ a odpařena za sníženého tlaku. Odparek byl kodestilován s toluenem (2 × 5 ml) a rozpuštěn ve směsi toluen – AcOH (6:1, 7 ml) a tento roztok byl 6 h zahříván při 70 °C. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a pevný zbytek kodestilován s toluenem (2 × 5 ml), což poskytlo surový benzyl-2-amino-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-deoxy-β-D-glukopyranosyl-(1→3)-2-acetamido-4,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glukopyranosid (**8**), který byl bez dalšího čištění použit pro přípravu látky **10**.

Látka **8** byla rozpuštěna ve směsi DCM – pyridin (10:1; 5 ml). K roztoku byl přidáván Ac₂O (0.2 ml) a směs reagovala 2 h. Pak byla odpařena za sníženého tlaku a odparek byl kodestilován s toluenem (2 × 5 ml). Chromatografie na sloupci silikagelu (50 g) v soustavě rozpouštědel toluen – EtOAc (1:1) poskytla 270 mg (61%) pevné látky **10**. Analytický vzorek byl připraven krystalizací z toluenu – petroletheru; b.t. 164–166 °C, [α]_D +41° (c 0.4, CHCl₃). NMR data viz tab. 2 a 3. Pro **10** (C₅₈H₆₄N₂O₁₁) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 965.1, monoizotopická 964.5. FAB MS, *m/z*: 965.0 [M + H]⁺ a 987 [M + Na]⁺. Pro C₅₈H₆₄N₂O₁₁ (965.1) vypočteno: 72.18% C, 6.68% H, 2.90% N; nalezeno: 72.27% C, 6.76% H, 2.79% N.

Benzyl-2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-4,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (9)

Benzyl-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-4,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (11)

Roztok látky **7** (650 mg, 0.72 mmol) ve směsi absolutní MeOH – butylamin (4:1; 15 ml) byl v autoklávu 10 h zahříván na 85 °C. Po ochlazení byla směs odpařena za sníženého tlaku a pevný zbytek byl extrahován Et₂O (3 × 50 ml). Pevný podíl byl rozpuštěn ve směsi MeOH – voda (9:1; 5 ml), pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 4 pomocí HCOOH a roztok byl nalit na kolonu Dowexu 50 (v H⁺ cyklu) (150 ml). Kolona byla promyta směsí MeOH – voda (9:1; 250 ml) a produkt byl eluován směsí MeOH – 25% vodný roztok NH₃ (7:1; 500 ml). Odpaření roztoku poskytlo 241 mg (51%) surového benzyl-2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-4,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosidu (**9**), který byl bez další purifikace použit pro přípravu látky **11**. Pro **9** (C₃₅H₄₅N₂O₁₀) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 652.7, monoizotopická molekulová hmotnost 652.3. FAB MS, *m/z*: 653 [M + H]⁺.

Roztok látky **9** (210 mg, 0.32 mmol) ve směsi pyridin – Ac₂O (2:1; 5 ml) reagoval 20 h při pokojové teplotě, poté byl při 0 °C přidán EtOH (5 ml). Po 20 min stání při pokojové teplotě byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku a odparek kodedilován s toluenem (3 × 10 ml). Chromatografie na koloně silikagelu (60 ml) ve soustavě rozpouštědel CHCl₃ – EtOAc (3:2) následovaná krystalizací z EtOAc – CHCl₃ poskytla 180 mg (68%) látky **11**; b.t. 165–167 °C; [α]_D +52° (*c* 1, MeOH). NMR data viz tab. 2 a 3. Pro **11** (C₄₃H₅₂N₂O₁₄) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 820.9, monoizotopická molekulová hmotnost 820.3. FAB MS, *m/z*: 821 [M + H]⁺, 843 [M + Na]⁺, 713 [M – OBn + H]⁺. Pro C₄₃H₅₂N₂O₁₄ (820.9) vypočteno: 62.92% C, 6.38% H, 3.41% N; nalezeno: 62.78% C, 6.45% H, 3.30% N.

Benzyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-4,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (12)

Suspenze látky **11** (130 mg, 0.16 mmol) v 0.01 M MeONa v MeOH (4 ml) byla při pokojové teplotě míchána 2 h a reakční směs byla přes noc uchována při –3 °C. Směs byla zneutralizována přidáním Dowexu 50 (v py⁺ cyklu), iontoměnič byl odfiltrován, promyt MeOH (20 ml) a filtrát byl odpařen za sníženého tlaku. RP HPLC v soustavě

rozpuštědel voda – MeOH (lineární gradient 55→75%/60 min) poskytla 109 mg (99%) pevného zbytku látky **12**; $[\alpha]_D +73^\circ$ (c 0.4, MeOH). NMR data viz tab. 2 a 3. Pro **12** $C_{37}H_{46}N_2O_{11}$ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 694.8, monoizotopická molekulová hmotnost 694.3. FAB MS, m/z : 695 $[M + H]^+$. Pro $C_{37}H_{46}N_2O_{11}$ (694.8) vypočteno: 63.96% C, 6.67% H, 4.03% N; nalezeno: 64.08% C, 6.73% H, 3.88% N.

2-Acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1→3)-2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosa (13)

Látka **10** (193 mg, 0.2 mmol) či látka **12** (139 mg, 0.2 mmol) byla 20 h hydrogenolizována 10% Pd/C (200 mg) v 90% AcOH (15 ml) při pokojové teplotě. Pak byla reakční nádoba vypláchnuta argonem, katalyzátor odfiltrován, promyt 50% AcOH (30 ml) a filtrát byl odpařen za sníženého tlaku. Pevný zbytek byl čištěn RP HPLC (voda) následovanou gelovou permeační chromatografií na Toyopearl HW 40F (450 ml, voda). Získána byla látka **13** (56 mg (66%)), pro výchzí látku **10** byl výtěžek 65 mg (76%). $[\alpha]_D -17^\circ$ (c 0.2, H₂O); {lit.⁴⁸ uvádí $[\alpha]_D +14.5^\circ \rightarrow +6.5^\circ$ (H₂O) a lit.¹¹⁷ $[\alpha]_D +40 \rightarrow +4$ (voda)} . ¹H NMR (500 MHz, D₂O, 300 K): 5.20 d (1H, $J = 3.5$, H-1), 4.74 d (1H, $J = 8.3$, H-1), 4.67 d (1H, $J = 8.3$, H-1'), 4.66 d (1H, $J = 8.3$, H-1'), 4.06 m (1H, H-2), 3.81 m (1H, H-2), 3.78 m (2H, H-2'), 3.53-4.02 m (10H, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b, H-3', H-4', H-5', H-6'a, H-6'b), 2.31 s, 2.30 s, 2.21 s, 2.18 s (4 × 3H, NHAc). ¹³C NMR (125 MHz, D₂O, 300 K): 174.50 s, 174.46 s, 173.80 s (2C), 101.14 d (2C, C-1'), 95.08 d (C-1), 90.94 d (C-1), 81.53 d, 79.02 d, 75.86 d, 75.79 d, 75.50 d, 73.37 d, 73.35 d, 71.19 d, 69.85 d (2C), 68.61d, 68.60 d, 60.85 t (C-6), 60.71 t (2C, C-6), 60.64 t (C-6), 55.81 d (C-2'), 55.78 d (C-2'), 55.68 d (C-2), 53.03 d (C-2), 22.39 q, 22.38 q, 22.33 q, 22.15 q. Pro **13** ($C_{16}H_{28}N_2O_{11}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 424.4, monoizotopická molekulová hmotnost 424.2. FAB MS, m/z : 425 $[M + H]^+$. Pro $C_{16}H_{28}N_2O_{11}$ (424.4) vypočteno: 45.28% C, 6.65% H, 6.60% N; nalezeno: 45.13% C, 6.76% H, 6.48% N.

Benzyl-3,4,6-tri-O-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-6-O-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (15)

Benzyl-3,4,6-tri-O-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-3-O-allyl-6-O-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosid¹²⁴ (**14**; 1 g, 1 mmol)

a $(\text{PPh}_3)_3\text{RhCl}$ (0.1 g, 0.11 mmol) byly 5 h zahřívány za varu ve směsi EtOH – toluen – voda (7:3:2; 30 ml) za míchání. Byla přidána HCOOH (0.7 ml) a zahřívání pokračovalo další 2 h. Reakční směs byla odpařena za sníženého tlaku a odparek chromatografován na koloně silikagelu (120 ml) v soustavě toluen – EtOAc (10:4). Bylo získáno 482 mg (50%) pěny látky **15**; $[\alpha]_{\text{D}} +99^\circ$ (c 0.3, CHCl_3). IČ: 3478 (OH), 3446, 1677, 1514, 1271 (NH), 1777 (CO NPhth), 3090, 1587 (arom.), NMR data viz tab. 4 a 5. Pro **15** ($\text{C}_{57}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_{12}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 963.1, monoizotopická molekulová hmotnost 962.4. FAB MS, m/z : 963.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Pro $\text{C}_{57}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_{12}$ (963.1) vypočteno: 71.09% C, 6.07% H, 2.91% N; nalezeno: 70.90% C, 6.12% H, 3.02% N.

Pokus o přípravu benzyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-6-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosidu

Ethyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido-1-thio- β -D-glukopyranosid¹²⁴ (3; 262 mg, 0.42 mmol), AgOTf (54 mg, 0.21 mmol) a prášková molekulová síta 4 Å (0.3 g) byla 10 h sušena při pokojové teplotě a 1.32 Pa. Ke směsi byl přidán roztok látky **15** (200 mg, 0.21 mmol) v suchém DCM (3 ml) a směs byla míchána 1 h při pokojové teplotě. Byl přidán MeOTf (4 \times 0.05 ml, 0.42 mmol), vždy po 12 h. Po ochlazení na -15°C byl přidán suchý pyridin (0.63 ml) a reakční směs byla 30 min míchána při -15°C a 1 h při pokojové teplotě. Směs byla zředěna CHCl_3 (80 ml), zfiltrována přes křemelinu, filtrát byl promyt 10% NaHSO_4 (30 ml), nasyceným roztokem NaHCO_3 (30 ml) a 5% NaCl (30 ml). Organická fáze byla usušena MgSO_4 a odpařena za sníženého tlaku. Chromatografie odparku na koloně silikagelu (600 ml) v toluenu následovaná RP HPLC v soustavě voda – MeOH (lin. gradient 75 \rightarrow 90%/70 min) poskytla 120 mg (59%) glykosylakceptoru **15**, 82 mg (17%) sirupu látky **16** a 33 mg (14%) látky **17**.

3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl 3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosid (16)

Sirup: $[\alpha]_{\text{D}} +30^\circ$ (c 0.4, CHCl_3). Pro látku **16** ($\text{C}_{70}\text{H}_{64}\text{N}_2\text{O}_{13}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1141.3, monoizotopická molekulová hmotnost 1140.4. FAB MS, m/z : 1142 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 1163.7 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. NMR data viz tab. 4 a 5. Pro $\text{C}_{70}\text{H}_{64}\text{N}_2\text{O}_{13}$ (1141.3) vypočteno: 73.67% C, 5.65% H, 2.45% N; nalezeno: 73.55% C, 5.71% H, 2.38% N.

1,5-anhydro-tri-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido-*D*-arabino-hex-1-enitol (17)

Sirup: $[\alpha]_D +52^\circ$ (c 0.4, CHCl_3). Pro **17** ($\text{C}_{35}\text{H}_{31}\text{NO}_6$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 561.6, monoizotopická molekulová hmotnost 561.2. FAB MS, m/z : 561 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 584.6 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. NMR data viz tab. 4 a 5. Pro $\text{C}_{35}\text{H}_{31}\text{NO}_6$ (561.6) vypočteno: 74.85% C, 5.56% H, 2.49% N; nalezeno: 75.11% C, 5.63% H, 2.43% N.

Benzyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -*D*-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -*D*-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-6-*O*-benzyl-2-deoxy- α -*D*-glukopyranosid (18)

Látka **15** (200 mg, 0.21 mmol) a AgOTf (126 mg, 0.5 mmol) byly 20 h sušeny při pokojové teplotě a tlaku 1.32 Pa. Byl přidán suchý DCM (1 ml). Směs byla ochlazená na -45°C a během dvou hodin byl za míchání přidán roztok 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -*D*-glukopyranosyl bromidu⁴¹ (**5**; 1 ml, 0.42 mmol) v suchém DCM. Směs byla míchána 30 min při -15°C a 1 h při -20°C . Při -20°C byl přidán suchý pyridin (0.2 ml) a po dosažení pokojové teploty byla směs zředěna CHCl_3 (150 ml) a zfiltrována. Filtrát byl promyt nasyceným roztokem NaHCO_3 (40 ml) a vodou (2×40 ml), sušen MgSO_4 , odpařen za sníženého tlaku a odparek kodesilován s toluenem ($2 \times$). Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (80 ml) v soustavě toluen – EtOAc (10:1) následovaná RP HPLC v soustavě rozpouštědel voda – MeOH (85% MeOH/20 min a pak lin. gradient 85 \rightarrow 90%/60 min) poskytla 35 mg (11%) pevné látky **18**; b.t. 103–105 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D +44^\circ$ (c 0.14, CHCl_3). NMR data viz tab. 6 a 7. Pro **18** ($\text{C}_{77}\text{H}_{77}\text{N}_3\text{O}_{21}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1380.4, monoizotopická molekulová hmotnost 1379.5. FAB MS, m/z : 1402.5 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Pro $\text{C}_{77}\text{H}_{77}\text{N}_3\text{O}_{21}$ (1380.4) vypočteno: 66.99% C, 5.62% H, 3.04% N; nalezeno: 66.79% C, 5.68% H, 2.96% N.

Benzyl-2-acetamido-6-*O*-benzyl-2-deoxy- α -*D*-glukopyranosid (20)

Benzyl-2-acetamido-3-*O*-allyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy- α -*D*-glukopyranosid⁴¹ (**19**; 5 g, 11.33 mmol) a $(\text{PPh}_3)_3\text{RhCl}$ (1.2 g, 1.34 mmol) byl 4 h zahříván k varu ve směsi EtOH – toluen – voda (7:3:2, 300 ml). Byla přidána HCOOH (10 ml) a zahřívání pokračovalo další 2 h. Směs byla odpařena za sníženého tlaku. Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (500 ml) ve směsi CHCl_3 – MeOH (30:1) následovaná krystalizací

z EtOH poskytla 3.45 g (76%) látky **20**; b.t. 187–188 °C, $[\alpha]_D +52^\circ$ (c 0.3, MeOH); {lit.¹⁴⁴: b.t. 183 °C (EtOH), $[\alpha]_D +45^\circ$ (c 1.0, MeOH)}. ¹H NMR spektrum souhlasí s daty uvedenými v lit.¹⁴⁴. IČ: 3470 (OH), 3299, 1650, 1546, 1308, 603 (NH), 3088, 1650 (NPhth). Pro **20** (C₂₂H₂₇NO₆) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 401.5, monoizotopická molekulová hmotnost 401.2. FAB MS, m/z : 402 [M + H]⁺. Pro C₂₂H₂₇NO₆ (401.5) vypočteno: 65.82% C, 6.78% H, 3.49% N; nalezeno: 65.70% C, 6.83% H, 3.54% N.

Benzyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido-β-D-glukopyranosyl-(1→3)-[3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido-β-D-glukopyranosyl-(1→4)]-2-acetamido-6-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glukopyranosid (21**)**

Látka **20** (100 mg, 0.25 mmol) a AgOTf (257 mg, 0.1 mmol) byly 20 h sušeny při pokojové teplotě a tlaku 1.32 Pa. Byl přidán suchý DCM (1 ml). Směs byla ochlazena na –15 °C a během 1 h byl přidán roztok 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido-β-D-glukopyranosyl bromidu⁴¹ (**5**; 2 mmol) v suchém DCM (1 ml). Pak byla směs míchána 30 min při –45 °C a 1 h při –20 °C. Při –20 °C byl přidán suchý pyridin (0.4 ml) a po dosažení pokojové teploty byla směs zředěna CHCl₃ (150 ml) a zfiltrována. Filtrát byl promyt nasyceným roztokem NaHCO₃ (30 ml), vodou (2 × 30 ml), usušen MgSO₄, odpařen za sníženého tlaku a odparek byl kodedistilován s toluenem (2 × 20 ml). Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (60 ml) v soustavě toluen – EtOAc (3:1) následovaná lyofilizací z benzenu poskytla 238 mg (64%) látky **21**; $[\alpha]_D +12^\circ$ (c 0.25, CHCl₃). NMR data viz tab. 6 a 7. Pro látku **21** (C₆₂H₆₅N₃O₂₄) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1236.2, monoizotopická molekulová hmotnost 1235.4 FAB MS, m/z : 1258.5 [M + Na]⁺. Pro C₆₂H₆₅N₃O₂₄ (1236.2) vypočteno: 60.24% C, 5.30% H, 3.40% N; nalezeno: 60.19% C, 5.38% H, 3.33% N.

Benzyl-2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-6-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (22)

Benzyl-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-6-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (23)

Roztok látky **21** (600 mg, 0.49 mmol) ve směsi suchý MeOH – butylamin (4:1; 10 ml) byl zahříván 7 h v autoklávu při 85 °C. Reakční směs byla odpařena za sníženého tlaku a odparek byl extrahován etherem (3 \times 30 ml). Pevný podíl byl rozpuštěn ve směsi MeOH – voda (9:1; 5 ml), pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 4 pomocí HCOOH a směs byla nalita na kolonu Dowexu 50 (v H⁺ cyklu; 150 ml). Kolona byla promyta směsí MeOH – voda (9:1; 500 ml) a produkt byl eluován směsí MeOH – 25% vodný roztok amoniaku (7:1; 500 ml). Po odpaření eluátu bylo získáno 271 mg (77%) surového benzyl-2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-6-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosidu (**22**), který byl bez dalšího čištění použit pro přípravu látky **23**. Pro látku **22** (C₃₄H₄₉N₃O₁₄) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 723.8, monoizotopická molekulová hmotnost 723.3. FAB MS, *m/z*: 724 [M + H]⁺.

Roztok látky **22** (260 mg, 0.36 mmol), ve směsi pyridin – Ac₂O (2:1, 8 ml) byl 20 h míchán při pokojové teplotě. Po ochlazení na 0 °C byl přidán MeOH (5 ml) a směs byla míchána 20 min při pokojové teplotě. Pak byla odpařena za sníženého tlaku a odparek kódestilován s toluenem (3 \times 20 ml). Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (60 ml) v soustavě rozpouštědel toluen – aceton (2:1) následovaná RP HPLC v soustavě voda – MeOH (lin. gradient 63 \rightarrow 70%/30 min, pak 70% MeOH/30 min a nakonec lin. gradient 70 \rightarrow 75%/30 min) poskytla 250 mg (66%) látky **23**, [α]_D +19° (c 0.7, MeOH). NMR data viz tab. 6 a 7. Pro látku **23** (C₅₀H₆₅N₃O₂₂) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1060.1, monoizotopická molekulová hmotnost 1059.4. FAB MS, *m/z*: 1082.1 [M + Na]⁺. Pro C₅₀H₆₅N₃O₂₂ (1060.1) vypočteno: 56.65% C, 6.18% H, 3.96% N; nalezeno: 56.78% C, 6.13% H, 3.88% N.

Benzyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-6-O-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (24)

Suspenze látky **23** (200 mg, 0.189 mmol) v 0.01 M MeONa v MeOH (4 ml) byla míchána 2 h při pokojové teplotě a ponechána stát přes noc při -3 °C. Směs byla zneutralizována přidáním Dowexu 50 (v py^+ cyklu). Iontoměnič byl odfiltrován, promyt MeOH (20 ml) a filtrát byl odpařen za sníženého tlaku. RP HPLC v soustavě rozpouštědel voda – MeOH (lin. gradient 50 \rightarrow 60%/60 min) poskytla 118 mg (77%) sirupovité látky **24**; $[\alpha]_D +34^\circ$ (c 0.5, MeOH). NMR data viz tab. 6 a 7. Pro **24** ($\text{C}_{38}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_{16}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 807.8, monoizotopická molekulová hmotnost 807.3. FAB MS, m/z : 808 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 830 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Pro $\text{C}_{38}\text{H}_{53}\text{N}_6\text{O}_{13}$ (807.8) vypočteno: 56.50% C, 6.61% H, 5.20% N; nalezeno: 56.48% C, 6.75% H, 5.28% N.

2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosa (25)

Látka **24** (88 mg, 0.11 mmol) byla 20 h hydrogenolizována v přítomnosti 10% Pd/C (100 mg) v 90% AcOH (10 ml) při pokojové teplotě. Reakční nádoba byla vypláchnuta argonem, katalyzátor odfiltrován, promyt AcOH (30 ml) a filtrát odpařen za sníženého tlaku. Pevný zbytek byl čištěn RP HPLC (voda), následně gelovou permeační chromatografií na Toyopearl HW 40F (450 ml, voda). Na HPLC získaná homogenní frakce byla lyofilizována z vody. Bylo získáno 46 mg (67%) látky **25**; $[\alpha]_D -52^\circ$ (c 0.7, voda). ^1H NMR (500 MHz, D_2O , 300 K): 5.15 d (1H, $J = 3.1$, H-1), 4.78 d (1H, $J = 8.4$), 4.738 d (1H, $J = 8.3$), 4.733 d (1H, $J = 8.1$), 4.717 d (1H, $J = 8.1$), 4.704 d (1H, $J = 8.3$) – H-1' a H-1'', 3.42-4.37 m (18 H, H-2, 3, 4, 5, 6, 2', 3', 4', 5', 6', 2'', 3'', 4'', 5'' a 6''), 2.18 s, 2.15 s, 2.140 s, 2.136 s, 2.136 s, 2.126 s ($6 \times 3\text{H}$, NHAc). ^{13}C NMR (125 MHz, D_2O , 300 K): 174.92 s, 174.76 s, 174.57 s, 174.54 s, 174.27, 173.84 s, 102.71 d, 101.34 d, 99.91 d, 99.91 d, 98.97 d, 94.76 d, 79.06 d, 76.95 d, 75.98 d, 75.92 d, 75.83 d, 75.83 d, 75.76 d, 75.73 d, 75.58 d, 74.25 d, 74.16 d, 73.88 d, 73.82 d, 73.73 d, 73.68 d, 73.63 d, 73.55 d, 73.40 d, 62.49 t, 60.83 t, 60.79 t, 60.71 t, 60.71 t, 60.59 t, 55.93 d, 55.90 d, 55.81 d, 55.80 d, 51.89 d, 51.79 d, 22.35 q, 22.32 q, 22.31 q, 22.30 q, 22.24 q, 22.21 q. Pro **25** ($\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_{16}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 627.6, monoizotopická

molekulová hmotnost 627.3. FAB MS, m/z : 628 $[M + H]^+$. Pro $C_{24}H_{41}N_3O_{16}$ (627.6) vypočteno: 45.93% C, 6.58% H, 6.70% N; nalezeno: 45.99% C, 6.53% H, 6.78% N.

Benzyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-[3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (27)

Benzyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (32)

Benzyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (37):

Látka **27** byla připravena postupem dle lit.^{44,45,45}. Látka **26** (156 mg, 0.5 mmol, lit.¹³²), Ag_2CO_3 (2.43 g, 8.7 mmol), $AgClO_4$ (0.5 g, 1.6 mmol) a 4Å molekulová síta byla 48 h sušena při pokojové teplotě a 1.32 Pa. Byl přidán suchý DCM (4 ml), směs byla míchána 1 h při pokojové teplotě a ochlazena na $-15\text{ }^\circ\text{C}$. V průběhu 1 h byl přidán roztok 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl bromidu⁴¹ (**5**) (1.12 g, 2.25 mmol) v suchém DCM (2 ml). Pak byla reakční směs míchána 30 min při $-15\text{ }^\circ\text{C}$ a 24 h při pokojové teplotě. Byl přidán suchý pyridin (2.5 ml) a směs byla míchána další 1 h při pokojové teplotě, poté byla zředěna $CHCl_3$ (300 ml), promyta HCl (0.1 M; 1×80 ml), nasyceným roztokem $NaHCO_3$ (2×80 ml) a vodou (2×80 ml), sušena $MgSO_4$, odpařena za sníženého tlaku a pyridin byl odstraněn kódestilací s toluenem (2×50 ml). Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (300 ml) v $CHCl_3$ následovaná RP HPLC v soustavě rozpouštědel voda – MeOH (70% MeOH/60 min a pak lin. gradient 50 \rightarrow 100%/60 min) poskytla 120 mg (15%) látky **27** minimálně 97 mg (17%) látky **37** a 46 mg (8%) látky **32**, oba trisacharidy byly krystalizovány z MeOH. Pro látku **27**: $[\alpha]_D^{+23}$ (c 0.2, $CHCl_3$). NMR data viz tab. 17 a 18. Pro **27** ($C_{75}H_{78}N_4O_{33}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1563.4, monoizotopická hmotnost 1562.5. FAB MS, m/z : 1563.4 $[M + H]^+$. Pro $C_{75}H_{78}N_4O_{33}$ (1563.4) vypočteno: 57.62% C, 5.03% H, 3.58% N; nalezeno: 57.53% C, 5.18% H, 3.43% N.

Pro benzyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (**32**): b.t. 140–142 °C; $[\alpha]_D^{25} +54^\circ$ (*c* 0.3, CHCl₃). IČ: 3489 (OH), 3437, 1686, 1508 (NH), 1779 (CO NhPht), 3090, 1594 (arom). NMR data viz tab. 13 a 14. Pro **32** (C₅₅H₅₉N₃O₂₄) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1146.1, monoizotopická hmotnost 1145.4. MS (EI), *m/z*: 1168 [M + Na]⁺. Pro C₅₅H₅₉N₃O₂₄ (1146.1) vypočteno: 57.64% C, 5.19% H, 3.67% N; nalezeno: 57.49% C, 5.12% H, 3.72% N.

Pro benzyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (**37**): b.t. 139–141 °C; $[\alpha]_D^{25} +43^\circ$ (*c* 0.2, CHCl₃). IČ: 3491, 3445 (OH), 1778 (CO NPhth), 1750 (CO NHAc), 1678, 1513 (NH), 1549, 1455 (arom). NMR data viz tab. 13 a 14. Pro **37** (C₅₅H₅₉N₃O₂₄) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1146.1, monoizotopická hmotnost 1145.4. FAB MS, *m/z*: 1146.3 [M + H]⁺. Pro C₅₅H₅₉N₃O₂₄ (1146.1) vypočteno: 57.64% C, 5.19% H, 3.67% N; nalezeno: 57.55% C, 5.28% H, 3.56% N.

Benzyl-2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-[2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (28**)**

Benzyl-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-[2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (29**)**

Roztok látky **27** (335 mg, 0.46 mmol) byl 5 h zahřívám k varu ve směsi EtOH – N₂H₄·H₂O (2:1; 15 ml). Pak byla směs odpařena za sníženého tlaku a kodestilována s toluenem, odparek byl rozpuštěn ve směsi voda – MeOH (1:1; 5 ml), pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 4 pomocí HCOOH a roztok byl nanesen na kolonu (Dowex 50 v H⁺ cyklu; 100 ml). Kolona byla vymyta směsí MeOH – voda (4:1; 500 ml) a produkt byl eluován soustavou 40% MeOH ve vodě – 25% vodný roztok amoniaku (4:1; 500 ml). Odpařením eluátu bylo získáno 530 mg surové látky **28**, která byla bez čištění použita

v dalším kroku – přípravě látky **29**. Pro **28** ($C_{33}H_{54}N_4O_{18}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 794.8, monoizotopická hmotnost 794.3. FAB MS, m/z : 795.4 $[M + H]^+$.

Roztok surové látky **28** (530 mg, 0.14 mmol) ve směsi pyridin – Ac_2O (2:1; 30 ml) reagoval 24 h za pokojové teploty. Byl přidán EtOH (10 ml), po 20 min byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku a kodestilována s toluenem (3×50 ml). Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (100 ml) v soustavě rozpouštědel $CHCl_3$ – MeOH (9:1) následovaná RP HPLC v soustavě rozpouštědel voda – MeOH (voda 20 min, pak lin. gradient 0→40%/20 min, pak lin. gradient 40→100%/60 min) poskytla 155 mg (85%) látky **29**, $[\alpha]_D -9^\circ$ (c 0.3, H_2O). NMR data viz tab. 17 a 18. Pro **29** ($C_{57}H_{78}N_4O_{30}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1299.3, monoizotopická hmotnost 1298.5. MS (EI), m/z : 1321 $[M + Na]^+$. Pro $C_{57}H_{78}N_4O_{30}$ (1299.3) vypočteno: 52.69% C, 6.05% H, 4.31% N; nalezeno: 52.71% C, 6.03% H, 4.28% N.

Benzyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1→3)-[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1→4)]-[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1→6)]-2-acetamido-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (30)

Roztok látky **29** (225 mg, 0.17 mmol) v 0.01 M MeONa v MeOH (30 ml) byl za pokojové teploty míchán 60 h. Směs byla zneutralizována přidáním Dowexu 50 (v py^+ cyklu). Iontoměnič byl odfiltrován a filtrát byl zahuštěn. Pevný zbytek byl rozpuštěn ve vodě a zfiltrován přes sloupec reverzní fáze C18. Následná lyofilizace poskytla 132 mg (83%) látky **30**, $[\alpha]_D -41^\circ$ (c 0.2, H_2O). NMR data viz tab. 17 a 18. Pro **30** ($C_{39}H_{60}N_4O_{21}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 920.9, monoizotopická hmotnost 920.4. MS (EI), m/z : 943.4 $[M + Na]^+$. Pro $C_{39}H_{60}N_4O_{21}$ (920.9) vypočteno: 50.86% C, 6.57% H, 6.08% N; nalezeno: 50.98% C, 6.64% H, 5.96% N.

2-Acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1→3)-[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1→4)]-[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1→6)]-2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosa (31)

Látka **30** (25 mg, 0.03 mmol) byla 24 h hydrogenolizována ve směsi AcOH – voda (9:1; 20 ml) pomocí 10% Pd/C (50 mg) za pokojové teploty. Reakční nádoba byla

vypláchnuta argonem (2 ×), katalyzátor byl odfiltrován, promyt AcOH (50%; 30 ml) a filtrát byl odpařen za sníženého tlaku. Pevný zbytek byl zfiltrován přes sloupec reverzní fáze C18 ve vodě, zahuštěn a dále čištěn gelovou permeační chromatografií na Bio-Gelu P-2 (180 ml, voda). Lyofilizací z vody bylo získáno 119 mg (66%) α/β -anomerické směsi látky **31**, $[\alpha]_D^{-25^\circ}$ (*c* 0.2, H₂O). ¹H NMR: 5.07 d (1H, *J* = 3.0, H-1), 4.82 d (1H, *J* = 8.3, H-1'), 4.75 d (1H, *J* = 8.3, H-1'), 4.70 d (1H, *J* = 8.4, H-1''), 4.68 d (1H, *J* = 8.4, H-1'''), 4.68 d (1H, *J* = 8.4, H-1), 4.59 d (1H, *J* = 8.5, H-1'''), 4.58 d (1H, *J* = 8.5, H-1'''), 4.26 m (1H, H-2), 4.06 m (2H, H-2, 3), 3.65 – 3.86 m (3H, H-2, 2', 2''), 3.47 – 4.07 m (18H, 3', 3'', 3''', 4', 4'', 4''', 5', 5'', 5''', 6', 6'', 6'''). ¹³C NMR: 102.50 d (C-1''), 102.12 d (C-1'''), 101.44 d (C-1'''), 101.13 d (C-1''), 100.41 d (C-1'), 98.45 d (C-1'), 94.59 d (C-1), 88.85 d (C-1), 75.97 d, 75.89 d, 75.78 d, 75.76 d, 75.68 d, 75.56 d, 74.76 d, 74.41 d, 73.92, 73.79, 73.79, 73.79, 73.67 d, 73.54 d, 73.43 d, 70.78 t, 70.42 d, 70.11 t, 69.98 d, 69.92 d, 69.89 d, 69.89 d, 69.84 d, 69.73 d, 69.48 d, 68.22 d, 60.91 t, 60.76 t, 60.76 t, 60.76 t, 60.70 t, 60.22 t, 56.17, 55.9, 55.86, 55.74, 55.7, 55.48 d, 52.55 d (C-2), 51.47 d (C-2).

Pro **31** (C₃₂H₅₄N₄O₂₁) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 830.8, monoizotopická hmotnost 830.3. FAB MS, *m/z*: 853.5 [M + Na]⁺. Pro C₃₂H₅₄N₄O₂₁ (830.8) vypočteno: 46.26% C, 6.55% H, 6.74% N; nalezeno: 46.09% C, 6.53% H, 6.78% N.

Benzyl-2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1→3)-[2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1→6)]-2-acetamido-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (33)

Benzyl-2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1→3)-[2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1→6)]-2-acetamido-4-O-acetyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (34)

Roztok látky **32** (260 mg, 0.23 mmol) ve směsi EtOH – N₂H₄·H₂O (2:1; 30 ml) byl 3 h refluxován. Směs byla odpařena za sníženého tlaku a kodestilována s toluenem, rozpuštěna ve směsi voda – MeOH (1:1; 5 ml), pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 4 pomocí HCOOH a roztok byl nanesen na kolonu Dowexu 50 (v H⁺ cyklu; 30 ml). Kolona byla vymyta směsí MeOH – voda (4:1; 500 ml) a produkt byl eluován soustavou 40% MeOH ve vodě – 25% vodný roztok NH₃ (4:1; 500 ml). Odpařením eluátu bylo získáno 282 mg surové látky **33**, která byla bez čištění použita v dalším kroku – přípravě

látky **34**. Pro látku **33** ($C_{33}H_{43}N_3O_{14}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 633.6, monoizotopická hmotnost 633.3. FAB MS, m/z : 634.1 $[M + H]^+$.

Roztok surové látky **33** (282 mg, 0.23 mmol) ve směsi pyridin – Ac_2O (2:1; 21 ml) reagoval 3 h za pokojové teploty. Za míchání byl přidán EtOH (15 ml). Po 20 min byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku a kdestilována s toluenem (3×20 ml). Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (40 ml) v soustavě rozpouštědel $CHCl_3$ – MeOH (40:1) poskytla 175 mg (75%) látky **34**, $[\alpha]_D +33^\circ$ (c 0.2, $CHCl_3$). NMR data viz tab. 13 a 14. Pro látku **34** ($C_{45}H_{61}N_4O_{23}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1012.0, monoizotopická hmotnost 1011.4. FAB MS, m/z : 1012 $[M + H]^+$. Pro $C_{45}H_{61}N_4O_{23}$ (1012.0) vypočteno: 53.41% C, 6.08% H, 4.15% N; nalezeno: 53.52% C, 6.03% H, 4.08% N.

Benzyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (35)

Roztok látky **34** (160 mg, 0.16 mmol) v 0.01 M MeONa v MeOH (30 ml) byl 4 dny míchán za pokojové teploty. Směs byla zneutralizována přidáním Dowexu 50 (v py^+ cyklu). Iontoměnič byl odfiltrován a filtrát byl zahuštěn. Pevný zbytek byl rozpuštěn ve vodě, zfiltrován přes sloupec reverzní fáze C18 a zlyofilizován. Bylo získáno 101 mg (89%) látky **35**, $[\alpha]_D +48^\circ$ (c 0.2, H_2O). IČ: 3493, 3430 (OH), 3290, 1652, 1560 (NH), 3035, 1499, 1454 (arom), 1060 (C-OH). NMR data viz tab. 13 a 14. Pro látku **35** ($C_{31}H_{47}N_3O_{16}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 717.7, monoizotopická hmotnost 717.3. FAB MS, m/z : 718.3 $[M + H]^+$. Pro $C_{31}H_{47}N_3O_{16}$ (717.7) vypočteno: C, 51.88% C, 6.60% H, 5.85% N; nalezeno: 51.77% C, 6.73% H, 5.81% N.

2-Acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosa (36)

Látka **35** (90 mg, 0.13 mmol) byla 18 h hydrogenolyzována ve směsi AcOH – voda (9:1; 30 ml) nad 10% Pd/C (50 mg) za pokojové teploty. Reakční nádoba byla vypláchnuta argonem (2 \times), katalyzátor byl odfiltrován, promyt AcOH (50%; 60 ml) a filtrát byl zahuštěn. Pevný zbytek byl rozpuštěn ve vodě a zfiltrován přes sloupec reverzní fáze C18 (voda), zlyofilizován a dále čištěn gelovou permeační chromatografií

na Bio-Gelu P-2 (180 ml, voda). Lyofilizací z vody bylo získáno 12 mg (15%) α/β -anomerické směsi látky **36**, $[\alpha]_D -93^\circ$ (c 0.1, H₂O). ¹H NMR: 5.12 d (1H, $J = 2.6$, H-1), 4.68 d (1H, $J = 8.2$, H-1), 4.62 d ($J = 8.3$, H-1''), 4.61 d ($J = 8.3$, H-1'''), 4.59 d ($J = 8.5$, H-1'), 4.58 d ($J = 8.4$, H-1'), 4.21 dd ($J = 1.9, 11.6$, H-6), 4.13 dd ($J = 1.9, 11.6$, H-6), 3.97 – 3.99 m (H-5), 3.96 – 4.01 m (H-6', 6''), 3.94 dd ($J = 2.6, 10.5$, H-2), 3.93 dd ($J = 8.5, 10.5$, H-3), 3.88 dd ($J = 3.9, 11.6$, H-6), 3.83 dd ($J = 3.9, 11.6$, H-6), 3.75 – 3.83 m (H-6', 6''), 3.74 – 3.65 m (6H, H-3', 4', 5', 3'', 4'', 5''), 3.73 – 3.78 m (H-3), 3.70 – 3.80 m (H-2, 2'), 3.47 – 3.65 m (H-4). ¹³C NMR: 174.62 s, 174.60 s, 174.38 s, 174.29 s, 173.98 s, 173.69 s, 102.11 d, 102.08, 101.11, 95.06 d, 90.97, 81.33 d, 78.71, 75.82 d, 75.75 d, 73.62, 73.59 d, 73.33, 73.30 d, 70.11 d, 69.87 d, 69.60 d, 68.87, 68.65, 68.30 d, 68.26, 60.72 t, 60.62 t, 55.72 d, 55.69 d, 55.59 d, 52.99, 22.35 q, 22.33 q, 22.31 q, 22.30 q, 22.25 q, 22.11 q.

Pro látku **36** (C₂₄H₄₁N₃O₁₆) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 627.6, monoizotopická hmotnost 627.2. MS (EI), m/z : 650.3 [M + Na]⁺. Pro C₂₄H₄₁N₃O₁₆ (627.6) vypočteno 45.93% C, 6.58% H, 6.70% N; nalezeno: 45.89% C, 6.53% H, 6.78% N.

Benzyl-2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (38)

Benzyl-2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-3-O-acetyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (39)

Látka **37** (606 mg, 0.53 mmol) byla 6 h refluxována ve směsi EtOH – N₂H₄·H₂O (2:1; 60 ml). Pak byla směs odpařena za sníženého tlaku a kodedistilována s toluenem, rozpuštěna ve směsi voda – MeOH (1:1; 5 ml), pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 4 pomocí HCOOH a roztok byl nanesen na kolonu (Dowex 50 v py⁺ cyklu; 30 ml). Kolona byla vymyta směsí MeOH – voda (4:1; 500 ml) a produkt byl eluován soustavou 40% MeOH ve vodě – 25% vodný roztok amoniaku (4:1; 500 ml). Odpařením eluátu bylo získáno 795 mg surové látky **38**, která byla bez čištění použita v dalším kroku – přípravě látky **39**. Pro látku **38** (C₂₇H₄₃N₃O₁₄) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 633.6, monoizotopická hmotnost 633.3. FAB MS, m/z : 634.1 [M + H]⁺.

Roztok surové látky **38** (795 mg, < 0.53 mmol) ve směsi pyridin – Ac₂O (2:1; 45 ml) reagoval 24 h za pokojové teploty, poté byl přidán EtOH (40 ml). Po 20 min byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku a kodestilována s toluenem (3 × 30 ml). Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (100 ml) v soustavě rozpouštědel CHCl₃ – MeOH (20:1) následovaná krystalizací z EtOH poskytla 388 mg (72%) látky **39**, [α]_D +38° (*c* 0.2, CHCl₃). NMR data viz tab. 13 a 14. Pro látku **39** (C₄₅H₆₁N₃O₂₃) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1012.0, monoizotopická hmotnost 1011.4. FAB MS, *m/z*: 1034.6 [M + Na]⁺. Pro C₄₅H₆₁N₃O₂₃ (1012.0) vypočteno: 53.41% C, 6.08% H, 4.15% N; nalezeno: 53.30% C, 6.13% H, 4.27% N.

Benzyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukopyranosyl-(1→4)-[2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukopyranosyl-(1→6)]-2-acetamido-2-deoxy-α-D-glukopyranosid (40)

Roztok látky **39** (350 mg, 0.35 mmol) v 0.01 M MeONa v MeOH (30 ml) byl za pokojové teploty míchán 14 h. Získaná suspenze byla zneutralizována přidáním Dowexu 50 (v py⁺ cyklu). Iontoměnič byl odfiltrován a filtrát byl zahuštěn. Pevný zbytek byl rozpuštěn ve vodě, zfiltrován přes sloupec reverzní fáze C18 a zlyofilizován. Bylo získáno 237 mg (96%) látky **40**, [α]_D +71° (*c* 0.1, H₂O). NMR data viz tab. 13 a 14. Pro látku **40** (C₃₁H₄₇N₃O₁₆) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 717.7, monoizotopická hmotnost 717.3. FAB MS, *m/z*: 717.8 [M + H]⁺. Pro C₃₁H₄₇N₃O₁₆ (717.7) vypočteno: C, 51.88% C, 6.60% H, 5.85% N; nalezeno: 51.77% C, 6.75% H, 5.91% N.

2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukopyranosyl-(1→4)-[2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukopyranosyl-(1→6)]-2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosa (41)

Látka **40** (230 mg, 0.32 mmol) byla 24 h hydrogenolizována ve směsi AcOH – voda (9:1; 30 ml) pomocí 10% Pd/C (40 mg) za pokojové teploty. Reakční nádoba byla vypláchnuta argonem (2 ×), katalyzátor byl odfiltrován, promyt AcOH (50%; 60 ml) a filtrát zfiltrován přes sloupec reverzní fáze C18 (voda), zlyofilizován a dále čištěn gelovou permeační chromatografií na Bio-Gelu P-2 (180 ml, voda). Lyofilizací z vody bylo získáno 133 mg (66%) α/β-anomerické směsi látky **41**, [α]_D –65° (*c* 0.2, H₂O). ¹H NMR: 5.22 d (1H, *J* = 3.0, H-1), 4.63 d (*J* = 8.4, H-1''), 4.62 d (*J* = 8.4, H-1'''), 4.61 d (*J* = 8.4, H-1'), 4.60 d (*J* = 8.4, H-1'), 4.09 dd (*J* = 1.8, 11.5, H-6), 4.06 dd (*J* = 1.8, 12.2, H-6'''), 4.06 dd (*J* = 1.8, 11.7, H-6), 4.04 dd (*J* = 1.8, 12.2, H-6'''), 4.02 – 4.07 m (H-3),

3.94 – 4.03 m (H-6'), 3.92 – 3.95 m (H-2, 3), 3.78 – 3.82 m (2H, H-6', 6''), 3.75 – 3.80 m (H-6), 3.73 – 3.81 m (2H, H-2', 2''), 3.73 – 3.79 m (H-5), 3.60 – 3.68 m (2H, H-3', 3''), 3.59 – 3.67 m (H-4), 3.48 – 3.56 m (4H, H-4', 5', 4'', 5''), 2.13 s (NHAc), 2.11 s (NHAc), 2.11 s (NHAc), 2.09 s (NHAc), 2.09 s (NHAc). ¹³C NMR: 101.66 d, 101.43 d, 101.31 d, 101.29 d, 94.80 d, 90.44 d, 79.96 d, 79.68 d, 75.95 d, 75.95 d, 73.80 d, 73.67 d, 73.31 d, 72.44 d, 69.82 d, 69.80 d, 69.69 d, 69.29 t, 69.20 d, 69.09 d, 67.78 t, 60.66 t, 60.62 t, 60.52 t, 60.52 t, 56.10 d, 55.80 d, 55.74 d, 55.63 d, 55.61 d, 53.57 d, 22.37 q (NHAc), 22.33 q (NHAc), 22.33 q (NHAc), 22.31 q (NHAc), 22.18 q (NHAc), 21.90 q (NHAc). Pro látku **41** (C₂₄H₄₁N₃O₁₆) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 627.6, monoizotopická hmotnost 627.2. FAB MS, *m/z*: 628 [M + H]⁺. Pro C₂₄H₄₁N₃O₁₆ (627.6) vypočteno 45.93% C, 6.58% H, 6.70% N; nalezeno: 45.79% C, 6.73% H, 6.59% N.

Benzyl-2-acetamido-3-O-allyl-6-O-benzyl-2-deoxy-4-O-methansulfonyl- α -D-glukopyranosid (43)

Látka **43** byla připravena postupem dle lit.^{44,45}. K benzyl-2-acetamido-3-O-allyl-6-O-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosidu (**42** (lit.⁴¹); 20 g; 0.045 mol) byl přidán pyridin (270 ml) a methansulfonyl chlorid (22.6 ml; 292 mmol) a reakční směs byla 24 h míchána za pokojové teploty. Pak byla zředěna toluenem (1000 ml), vytřepána studeným 1M vodným roztokem HCl (3 × 300 ml), vodou (3 × 300 ml), usušena MgSO₄ a odpařena za sníženého tlaku. Pevný zbytek byl chromatografován na koloně silikagelu (600 ml) v soustavě toluen – EtOAc (2:1) a krystalizován z toluenu. Bylo získáno 17.18 g (73%) látky **43**, b.t. 153–157 °C, [α]_D +89° (*c* 0.3, CHCl₃). NMR data viz tab. 8 a 9. Pro látku **43** (C₂₆H₃₃NO₈S) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 519.6, monoizotopická hmotnost 519.1. FAB MS, *m/z*: 520 [M + H]⁺. Pro C₂₆H₃₃NO₈S (519.6) vypočteno: 60.10% C, 6.40% H, 2.70% N, 6.17% S; nalezeno: 60.28% C, 6.33% H, 2.85% N.

Benzyl-2-acetamido-4-O-acetyl-3-O-allyl-6-O-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (44)

Látka **44** byla připravena postupem dle lit.^{44,45}. Látka **43** (15.5 g; 29.8 mmol) a čerstvě tavený octan sodný (156.2 g; 1.9 mol) byly sušeny 8 h za pokojové teploty a tlaku 20 Pa. Byl přidán suchý DMSO (1700 ml) a reakční směs byla 24 h míchána při 130 °C. Rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku, pevný zbytek rozpuštěn

v toluenu (1000 ml) a promyt vodou (600 ml). Organická vrstva byla promyta vodou (3 × 500 ml), sušena MgSO₄ a odpařena za sníženého tlaku. Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (1000 ml) v soustavě toluen – ethylacetát (1:1) poskytla 7.81 g (54%) látky **44**, [α]_D +115° (*c* 0.2, CHCl₃). NMR data viz tab. 8 a 9. Pro látku **44** (C₂₇H₃₃NO₇) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 483.6, monoizotopická hmotnost 483.2. FAB MS, *m/z*: 484 [M + H]⁺. Pro C₂₇H₃₃NO₇ (483.6) vypočteno: 67.06% C, 6.88% H, 2.90% N; nalezeno: 66.98% C, 6.73% H, 2.78% N.

Benzyl-2-acetamido-3-*O*-allyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (45)

Roztok látky **44** (8.2 mg, 17.0 mmol) v 0.01 M MeONa v MeOH (250 ml) byl 3 dny míchán za pokojové teploty. Směs byla zneutralizována přidáním Dowexu 50 (v py⁺ cyklu), iontoměnič byl odfiltrován a filtrát zahuštěn. Pevný zbytek byl chromatografován na koloně silikagelu (1000 ml) v soustavě rozpouštědel toluen – EtOAc (1:2) a krystalizován z toluenu. Bylo získáno 5.8 g (82%) bílých krystalů látky **45**, b.t. 128 °C, [α]_D +123° (*c* 0.4, CHCl₃). {Lit.¹⁴⁵ uvádí b.t. 119–121 °C, [α]_D +103° (*c* 1, MeOH – CHCl₃ (1:1))}. IČ: 3570 (OH), 3444, 1677, 1513, 1304 (NH), 3090, 3068, 3032, 1608, 1587, 1455, 699 (arom). NMR data viz tab. 8 a 9, ¹H NMR data odpovídají lit.¹⁴⁵. Pro látku **45** (C₂₅H₃₁NO₆) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 441.5, monoizotopická hmotnost 441.2. FAB MS, *m/z*: 442 [M + H]⁺. Pro C₂₅H₃₁NO₆ (441.5) vypočteno: 68.01% C, 7.08% H, 3.17% N; nalezeno: 68.18% C, 6.97% H, 3.28% N.

Benzyl-2-acetamido-4,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (46)

Roztok látky **45** (2.65 g, 6.0 mmol) a benzylbromidu (4.4 ml, 12.0 mmol) v suchém DMF (35 ml) byl ochlazen na 0 °C. Směs byla přikapána k hydridu sodnému (60% suspenze v minerálním oleji, 0.5 g; 12.0 mmol) a míchána 1 h při 0 °C. Pak směs reagovala dalších 12 h za pokojové teploty. Pak byl přidán Ac₂O (5.62 ml, 60 mmol) a směs reagovala další 3 h. Po rozložení nadbytečného hydridu byla reakční směs nalita do studeného nasyceného roztoku NaHCO₃ (500 ml) a byl přidán toluen (3 × 200 ml). Organická vrstva byla promyta vodou (300 ml), usušena MgSO₄ a odpařena za sníženého tlaku. Odparek byl chromatografován na koloně silikagelu (700 ml) v soustavě toluen – EtOAc (2:1) a krystalizován z toluenu. Bylo získáno 1.99 g (62%) látky **46** b.t. 155–157 °C; [α]_D +96° (*c* 0.3, CHCl₃). {Lit.¹⁴⁶ uvádí b.t. 155–156 °C; [α]_D +94.7° (*c* 1.3,

CHCl₃}. NMR data viz tab. 9 a 10, ¹H NMR odpovídá lit.¹⁴⁶. Pro látku **46** (C₃₂H₃₇NO₆) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 531.6, monoizotopická hmotnost 531.3. FAB MS, *m/z*: 532 [M + H]⁺. Pro C₃₂H₃₇NO₆ (531.6) vypočteno: 72.29% C, 7.01% H, 2.63% N; nalezeno: 72.38% C, 7.12% H, 2.54% N.

Benzyl-2-Acetamido-4,6-di-O-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (47)

Benzyl-2-acetamido-3-O-allyl-4,6-di-O-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (**46**; 2 g, 3.7 mmol) a (PPh₃)₃RhCl (242 mg, 0.26 mmol) byly 12 h zahřívány k varu ve směsi rozpouštědel EtOH – toluen – voda (7:3:2; 70 ml). Byla přidána HCOOH (20 ml) a směs reagovala za varu další 4 h. Pak byla rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku a pevný zbytek byl chromatografován na koloně silikagelu (350 ml) v CHCl₃. Krystalizace ze směsi CHCl₃ – EtOH poskytla 1.19 g (65%) bezbarvých jehlicovitých krystalů látky **47**, b.t. 183–184 °C; [α]_D +80° (*c* 0.3, CHCl₃). {Lit.¹⁴⁶ uvádí b.t. 176–177 °C; [α]_D +81.3° (*c* 0.4, DMSO)}. IČ: 3555 (OH), 3440, 1666, 1511, 1048 (NH), 3090, 3068, 3032, 1608, 1455, 1081, 911, 699 (arom). NMR data odpovídají lit.¹⁴⁶. Pro látku **47** (C₂₉H₃₃NO₆) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 491.6, monoizotopická hmotnost 491.2. FAB MS, *m/z*: 492 [M + H]⁺. Pro C₂₉H₃₃NO₆ (491.6) vypočteno: 70.86% C, 6.77% H, 2.85% N; nalezeno: 70.69% C, 6.92% H, 2.73% N.

Benzyl-2-acetamido-6-O-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (48)

Látka **45** (2 g, 4.5 mmol) a (PPh₃)₃RhCl (286 mg, 0.31 mmol) byly 8 h zahřívány k varu ve směsi rozpouštědel EtOH – toluen – voda (7:3:2; 85 ml). Pak byla přidána HCOOH (2 ml) a směs reagovala za varu další 3 h. Směs byla zahuštěna za sníženého tlaku a pevný zbytek byl chromatografován na koloně silikagelu (250 ml) v soustavě CHCl₃ – MeOH (40:1) a krystalizován z EtOH. Bylo získáno 1.38 g (76%) látky **48**, b.t. 187–188 °C; [α]_D +102° (*c* 0.2, CHCl₃). {Lit.¹⁴⁷ uvádí b.t. 183–184 °C; [α]_D +151° (*c* 1, DMSO)}. IČ: 3566, 3360 (OH), 3437, 1655, 1511 (NH), 3090, 3068, 1498, 1455, 699 (arom). NMR odpovídá lit.^{146,147}. Pro látku **48** (C₂₂H₂₇NO₆) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 401.5, monoizotopická hmotnost 401.2. FAB MS, *m/z*: 402 [M + H]⁺. Pro C₂₂H₂₇NO₆ (401.5) vypočteno: 65.82% C, 6.78% H, 3.49% N; nalezeno: 65.90% C, 6.72% H, 3.52% N.

Benzyl-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosid (49)

K míchané směsi benzyl-2-acetamido-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzyliden-2-deoxy- α -D-glukopyranosidu¹³⁵ (12 g, 24.5 mmol), NaBH₃CN (6.12 g, 98.4 mmol) a práškovaných 4Å molekulových sít (24 g) v suchém THF (250 ml) byl za laboratorní teploty přidán roztok HCl v suchém Et₂O (2.5 M, cca 30 ml) do kyselé reakce (pH 1-2). Po 30 min byl přidán další podíl NaBH₃CN (6.12 g; 98.4 mmol) a reakční směs byla opět okyselena roztokem HCl v suchém Et₂O. Pak byla míchána 30 min, zfiltrována a filtrát byl neutralizován 20% vodným roztokem octanu sodného (pH 6, pufr), odpařen za sníženého tlaku a extrahován mezi CHCl₃ (800 ml) a vodu (300 ml). Organická vrstva byla oddělena a promyta vodou (2 × 200 ml), sušena MgSO₄ a odpařena za sníženého tlaku. Chromatografií odparku na sloupci silikagelu (875 ml) ve směsi CHCl₃ – MeOH (50:1) a následnou krystalizací z hexanu bylo získáno 10.2 g (85%) bezbarvé krystalické látky **49**; b.t. 144–146 °C; [α]_D +128° (*c* 0.2, CHCl₃). {Lit.¹⁴⁸ uvádí b.t. 145–146 °C; lit.¹⁴⁹ uvádí [α]_D +127° (*c* 0.5, CHCl₃)}. IČ: 3161, 3587, 3488 (OH), 3440, 3350, 1675, 1513, 1307, 599 (NH), 3090, 3068, 3033, 1607, 1587, 1498, 1455, 699, 467 (arom). NMR data odpovídají lit.¹³⁵. Pro látku **49** (C₃₂H₃₇NO₆) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 491.6, monoizotopická hmotnost 491.2. FAB MS, *m/z*: 492 [M + H]⁺. Pro C₂₉H₃₃NO₆ (491.6) vypočteno: 70.86% C, 6.77% H, 2.85% N; nalezeno: 70.97% C, 6.74% H, 2.92% N.

Benzyl-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-4-*O*-methansulfonyl- α -D-glukopyranosid (50)

K benzyl-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosidu (**49**; 6.44 g, 12.11 mmol) byl přidán pyridin (75 ml) a po rozpuštění výchozí látky byl přidán methansulfonyl chlorid (5.56 ml; 84.77 mmol). Reakční směs byla míchána dalších 24 h za pokojové teploty. Pak byla směs zředěna toluenem (500 ml) a vytřepána studeným 1M vodným roztokem HCl (3 × 150 ml), vodou (3 × 150 ml), usušena MgSO₄ a odpařena za sníženého tlaku. Pevný zbytek byl chromatografován na koloně silikagelu (530 ml) v soustavě toluen – EtOAc (2:1) a krystalizován z EtOAc. Bylo získáno 4.66 g (68%) látky **50** b.t. 168–170 °C, [α]_D +103° (*c* 0.4, CHCl₃). {Lit.¹⁵⁰ uvádí b.t. 176–177 °C; [α]_D +110° (*c* 1, CHCl₃)}. NMR data odpovídají lit.¹⁵¹. Pro **50** (C₃₀H₃₅NO₈S) vypočteno:

relativní molekulová hmotnost 569.7, monoizotopická hmotnost 569.2. FAB MS, m/z : 570.2 $[M + H]^+$. Pro $C_{30}H_{35}NO_8S$ (569.7) vypočteno: 63.25% C, 6.19% H, 2.46% N, 5.63% S; nalezeno: 63.08% C, 6.23% H, 2.38% N, 5.72% S.

Benzyl-2-acetamido-4-*O*-acetyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (51)

Látka **51** byla připravena postupem dle lit.⁴⁵. Látka **50** (3 g, 5.26 mmol) a čerstvě tavený octan sodný (27.6 g, 338 mmol) byly 8 h sušeny za pokojové teploty a tlaku 20 Pa. Byl přidán suchý DMSO (300 ml) a reakční směs byla míchána 39 h při 130 °C. Rozpouštědlo bylo odpařeno, pevný zbytek rozpuštěn v toluenu (500 ml) a vodě (200 ml). Organická vrstva byla oddělena, promyta vodou (3 \times 200 ml), sušena $MgSO_4$ a odpařena za sníženého tlaku. Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (250 ml) v $CHCl_3$ a krystalizace ze směsi propan-2-ol – petrolether poskytla 1.642 g (59%) látky **51**, b.t. 134–135 °C, $[\alpha]_D +138^\circ$ (c 0.2, $CHCl_3$). NMR data viz tab. 9 a 10. Pro látku **51** ($C_{31}H_{35}NO_7$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 533.6, monoizotopická hmotnost 533.2. FAB MS, m/z : 534 $[M + H]^+$. Pro $C_{31}H_{35}NO_7$ (533.6) vypočteno: 69.78% C, 6.61% H, 2.62% N; nalezeno: 69.62% C, 6.71% H, 2.78% N.

Benzyl-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (52)

Roztok látky **51** (1.6 g, 3.0 mmol) v 0.07 M MeONa v MeOH (64 ml) byl 12 dní míchán za pokojové teploty. Směs byla zneutralizována přidáním Dowexu 50 (v py^+ cyklu). Iontoměnič byl odfiltrován a filtrát byl zahuštěn. Pevný zbytek byl chromatografován na koloně silikagelu (200 ml) v soustavě rozpouštědel toluen – EtOAc (1:1) a krystalizován ze směsi EtOAc – heptan. Bylo získáno 1.17 g (79%) látky **52**, b.t. 144–146 °C, $[\alpha]_D +133^\circ$ (c 0.3, $CHCl_3$). {Lit.¹⁵⁰ uvádí b.t. 148–149 °C, lit.¹⁴⁶ uvádí $[\alpha]_D +121.6^\circ$ (c 1.4, $CHCl_3$)}. IČ: 3442 (NH), 1675, 1514, 1498, 1455 (arom), 989 (OH). NMR data odpovídají lit.^{146,150}. Pro látku **52** ($C_{29}H_{33}NO_6$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 491.6, monoizotopická hmotnost 491.2. FAB MS, m/z : 492 $[M + H]^+$. Pro $C_{29}H_{33}NO_6$ (491.6) vypočteno: 70.86% C, 6.77% H, 2.85% N; nalezeno: 71.08% C, 6.69% H, 2.77% N.

Benzyl-4-*O*-acetyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosid

(54)

Látka **54** byla připravena postupem vycházejícím z lit.¹³⁶: směs ethyl-4-*O*-acetyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido-1-thio- β -D-galaktopyranosidu⁴⁵ (**53**; 400 mg, 0.7 mmol), benzylalkoholu (110 ml, 1.06 mmol) a práškovanych 4Å molekulových sít ve směsi rozpouštědel suchý DCM – Et₂O – toluen (5.3 : 3.8 : 3.8 ml) byla míchána 5 min za pokojové teploty. Poté byl během 1.5 h přidán roztok DMTST ve směsi rozpouštědel DCM – Et₂O – toluen (6.2 : 4.4 : 4.4 ml) a reakční směs byla míchána 30 min. Po přidání pyridinu (0.5 ml) byla reakční směs zředěna Et₂O, zfiltrována, zahuštěna a kdestilována s toluenem (2 × 10 ml). Pak byl odparek rozpuštěn ve směsi Et₂O – voda (100 ml), organická fáze byla promyta 2M H₂SO₄ (30 ml), nasyceným roztokem NaHCO₃ (2 × 30 ml), vodou (2 × 30 ml), usušena MgSO₄ a odpařena. Chromatografie na silikagelu (65 ml) v CHCl₃ poskytla 404 mg (94%) látky **54**, [α]_D +13° (*c* 0.4, CHCl₃). NMR data viz tab. 9 a 10, dále ¹H data odpovídají lit.¹³⁶. Pro látku **54** (C₃₇H₃₅NO₈) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 621.7, monoizotopická hmotnost 621.3. MS (EI), *m/z*: 644.2 [M + Na]⁺. Pro C₃₇H₃₅NO₈ (621.7) vypočteno: 71.48% C, 5.67% H, 2.25% N; nalezeno: 71.57% C, 5.78% H, 2.19% N.

Benzyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosid (55)

Roztok látky **54** (1 g, 1.61 mmol) v 0.01 M MeONa v MeOH (30 ml) byl 2 dny míchán za pokojové teploty. Směs byla zneutralizována přidáním Dowexu 50 (v py⁺ cyklu). Iontoměnič byl odfiltrován a filtrát byl zahuštěn. Pevný zbytek byl čištěn chromatografií na silikagelu (230 ml) v CHCl₃. Bylo získáno 705 mg (76%) látky **55**, [α]_D +3° (*c* 0.2, CHCl₃). IČ: 3568 (OH), 1776, 1716 (CO), 1593, 1497 (arom). NMR data viz tab. 9 a 10, dále ¹H data odpovídají lit.¹³⁶. Pro látku **55** (C₃₅H₃₃NO₇) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 579.6, monoizotopická hmotnost 579.2. FAB MS, *m/z*: 602.5 [M + Na]⁺. Pro C₃₅H₃₃NO₇ (579.6) vypočteno: 72.52% C, 5.74% H, 2.42% N; nalezeno: 72.48% C, 5.76% H, 2.49% N.

Ethyl-2-deoxy-2-ftalimido-1-thio- β -D-galaktopyranosid (**56a**)

Látka **56** (6.34 g, 13.22 mmol) v 0.01 M MeONa v MeOH (210 ml) byla 2.5 h míchána při pokojové teplotě. Reakční směs byla zneutralizována přidáním Dowexu 50 (v py⁺ cyklu), iontoměnič byl odfiltrován a filtrát byl odpařen za sníženého tlaku. Chromatografie odparku na koloně silikagelu (500 ml) v soustavě rozpouštědel CHCl₃ – MeOH (5:1) poskytla 3 g (64%) pevného zbytku látky **56a**; $[\alpha]_D +21^\circ$ (*c* 0.5, CHCl₃). IČ: 3442 (OH), 1773, 1711 (C=O), 1468, 1088 (NPhth), 701 (C-S). NMR data viz tab. 8 a 9. Pro látku **56a** (C₁₆H₁₉NO₆S) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 353.4, monoizotopická molekulová hmotnost 353.1. FAB MS, *m/z*: 292 [M – SEt]⁺. Pro C₁₆H₁₉NO₆S (353.4) vypočteno: 54.38% C, 5.42% H, 3.96% N, 9.07% S; nalezeno: 54.26% C, 5.50% H, 3.88% N, 8.96% C.

Ethyl-2-amino-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2- $\{N$ -[2-(benzyloxykarbonyl)benzoyl]-*N*-benzyl}- β -D-galaktopyranosid (**56b**)

Látka **56b** byla připravena postupem dle lit.¹²⁴. K roztoku látky **56a** (1 g, 2.83 mmol) v suchém DMF (15 ml) byl přidán NaH (60% v minerálním oleji; 0.68 g, 16.98 mmol) a míchán 30 min za pokojové teploty. Pak byla směs ochlazená na 0 °C, během 30 min byl přidán benzylbromid (2.02 ml, 16.98 mmol) a reakční směs byla míchána 5 h při pokojové teplotě. Poté byl přidán Ac₂O (8.25 ml, 87.26 mmol), směs byla nalita do nasyceného roztoku NaHCO₃ (70 ml) vychlazeného na 0 °C a extrahována toluenem (3 × 70 ml). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (3 × 80 ml) a odpařeny. Pevný zbytek byl čištěn na koloně silikagelu (1000 ml) v soustavě rozpouštědel toluen – EtOAc (10:1). Bylo získáno 1.73 g (98%) látky **56b**; $[\alpha]_D -23^\circ$ (*c* 0.2, CHCl₃). IČ: 1723 (ester), 1433 (COOMe), 1635 (NH), 3090, 3067 1586, 1455, 913, 699 (arom), 648 (SEt), NMR data viz tab. 8 a 9. Pro látku **56b** (C₅₁H₅₁NO₇S) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 822.0, monoizotopická molekulová hmotnost 821.3. FAB MS, *m/z*: 844.7 [M + Na]⁺. Pro C₅₁H₅₁NO₇S (822.0) vypočteno: 74.52% C, 6.25% H, 1.70% N, 3.90% S; nalezeno: 74.58% C, 6.23% H, 1.66% N, 3.85% C.

Ethyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido-1-thio- β -D-galaktopyranosid (56c)

Roztok látky **56a** (500 mg, 1.41 mmol), Ag₂O (3.93 g, 16.95 mmol), KI (1.54 g, 9.25 mmol) a 4Å molekulových sít (0.5 g) v suchém DMF (30 ml) byl ochlazen na 0 °C. Za míchání byl přidán benzylbromid (1.5 ml, 12.6 mmol) a směs reagovala 5 h při pokojové teplotě. Pak byla zředěna suchým DCM (100 ml), zfiltrována přes sloupec křemeliny, promyta 10% vodným roztokem Na₂S₂O₃ (3 × 30 ml), vodou (2 × 50 ml), usušena MgSO₄ a odpařena za sníženého tlaku. Pevný zbytek byl čištěn chromatografií na sloupci silikagelu (800 ml) v soustavě rozpouštědel toluen – EtOAc (20:1) následovanou RP HPLC v soustavě rozpouštědel voda – MeOH (60% MeOH izokraticky 30 min, pak lin. gradient 60→100%/60 min), která poskytla 123 mg (14%) látky **56c**, [α]_D +44° (*c* 0.1, CHCl₃). NMR data viz tab. 8 a 9. Pro látku **56c** (C₃₇H₃₇NO₆S) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 623.8, monoizotopická molekulová hmotnost 623.2. FAB MS, *m/z*: 844.7 [M + Na]⁺. Pro C₃₇H₃₇NO₆S (623.8) vypočteno: 71.24% C, 5.98% H, 2.25% N, 5.14% S; nalezeno: 71.18% C, 5.93% H, 2.29% N, 5.02% S.

Benzyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-3-*O*-allyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (57)

Látka **57** byla připravena postupem dle lit.^{44,45}. Látka **45** (1 mg, 2.27 mmol), Ag₂CO₃ (3.62 g, 13.13 mmol), AgClO₄ (762.6 mg, 2.42 mmol) a 4Å molekulová síta byla 48 h sušena při pokojové teplotě a tlaku 1.32 Pa. Po přidání suchého DCM (13 ml) byla směs míchána 1 h při pokojové teplotě a ochlazená na -15 °C. V průběhu 1 h byl přidán roztok 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosyl bromidu (**58**) (6 ml, 3.40 mmol) v suchém DCM (6 ml). Pak byla reakční směs míchána 30 min při -15 °C a 24 h při pokojové teplotě. Byl přidán suchý pyridin (16 ml) a směs reagovala další 1 h při pokojové teplotě. Byla zředěna CHCl₃ (500 ml), zfiltrována, promyta HCl (0.1 M; 1 × 100 ml), nasyceným roztokem NaHCO₃ (2 × 100 ml) a vodou (2 × 100 ml), usušena MgSO₄, odpařena za sníženého tlaku a pevný zbytek byl kodestilován s toluenem (2 × 70 ml). Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (190 ml) v CHCl₃ následovaná krystalizací ze směsi EtOAc – petroleter poskytla 724 mg (37%) látky **57**, b.t. 188–190 °C; [α]_D +57° (*c* 0.3, CHCl₃). NMR data viz tab. 11 a 12. Pro **57** (C₄₅H₅₀N₂O₁₅) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 858.9, monoizotopická hmotnost

858.3. FAB MS, m/z : 859.5 $[M + H]^+$. Pro $C_{45}H_{50}N_2O_{15}$ (858.9) vypočteno: 62.93% C, 5.87% H, 3.26% N; nalezeno: 62.79% C, 5.92% H, 2.18% N.

Benzyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-6-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (59)

Benzyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3-*O*-allyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (**57**; 646 mg, 075 mmol) a $(PPh_3)_3RhCl$ (48.5 mg, 0.05 mmol) byly 24 h za intenzivního míchání zahřívány k varu ve směsi rozpouštědel EtOH – toluen – voda (7:3:2; 15 ml). Byla přidána HCOOH (6 ml) a směs reagovala dalších 5 h za varu. Pak byla odpařena a pevný zbytek byl chromatografován na koloně silikagelu (60 ml) v $CHCl_3$ a krystalizován z MeOH. Bylo získáno 305 mg (50%) látky **59**, b.t. 191–193 °C; $[\alpha]_D^{20} +26^\circ$ (c 0.4, $CHCl_3$). IČ: 3477, 3438 (OH), 1747 (C=O v -OAc), 1777, 1718 (C=O v -NPhth), 1661, 1507 (NH), 1615, 1592, 3031 (arom – NPhth), 3090, 3067, 1497, 1455 (arom). NMR data viz tab. 11 a 12. Pro **59** ($C_{42}H_{46}N_2O_{15}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 818.8, monoizotopická hmotnost 818.2. FAB MS, m/z : 819 $[M + H]^+$. Pro $C_{42}H_{46}N_2O_{15}$ (818.8) vypočteno: 61.61% C, 5.66% H, 3.42% N; nalezeno: 61.49% C, 5.70% H, 3.32% N.

Benzyl-2-amino-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-6-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (60)

Benzyl-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-6-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (61)

Roztok suché látky **59** (280 mg, 0.43 mmol) ve směsi absolutního MeOH a butylaminu (4:1; 15 ml) byla 4.5 h zahřívána v autoklávu při 105 °C. Po ochlazení byla směs odpařena za sníženého tlaku a rozpuštěna v MeOH (5 ml), pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 4 pomocí HCOOH a roztok byl nanesen na kolonu (Dowex 50 (v H^+ cyklu); 120 ml). Kolona byla promyta MeOH (500 ml) a produkt byl eluován 5% roztokem TEA v MeOH (500 ml). Odpařením eluátu bylo získáno 154 mg surové látky **60**, která byla bez čištění použita v dalším kroku – přípravě látky **61**. Pro látku **60** ($C_{29}H_{36}N_2O_9$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 520.6, monoizotopická hmotnost 520.2. FAB MS, m/z : 563.2 $[M + H]^+$.

Roztok surové látky **60** (154 mg, 0.27 mmol) ve směsi pyridin – Ac₂O (2:1; 6 ml) reagoval 20 h za pokojové teploty. Byl přidán EtOH (12 ml) a po 20 min byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku a kodesťilována s toluenem (3 × 20 ml). Chromatografie pevného zbytku na preparativní desce MERCK (3 mm) v soustavě rozpouštědel CHCl₃ – MeOH (20:1) poskytla 224 mg (95%) látky **61**, [α]_D +46° (*c* 0.3, CHCl₃). NMR data viz tab. 11 a 12. Pro látku **61** (C₃₈H₄₈N₂O₁₅) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 772.8, monoizotopická hmotnost 772.3. FAB MS, *m/z*: 773.2 [M + Na]⁺. Pro C₃₈H₄₈N₂O₁₅ (772.8) vypočteno: 59.06% C, 6.26% H, 3.62% N; nalezeno: 59.18% C, 6.13% H, 3.68% N.

Benzyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-6-O-benzyl-2-deoxy-α-D-galaktopyranosid (62)

Roztok látky **61** (151 mg, 0.20 mmol) v 0.01 M MeONa v MeOH (5.5 ml) byl míchán 3 h za pokojové teploty. Směs byla zneutralizována přidáním Dowexu 50 (v py⁺ cyklu). Iontoměnič byl odfiltrován a filtrát byl zahuštěn, krystalizace z propan-2-olu poskytla 77 mg (65%) precipitátu látky **62**, [α]_D +35° (*c* 0.4, CHCl₃). IČ: 3054 (OH), 3431 (NH), 1685, 1649, 1512, 1539 (NH), 3090, 3068, 1498, 699 (arom). NMR data viz tab. 11 a 12. Pro látku **62** (C₃₀H₄₀N₂O₁₁) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 604.7, monoizotopická hmotnost 604.2. FAB MS, *m/z*: 605.3 [M + H]⁺. Pro C₃₀H₄₀N₂O₁₁ (604.7) vypočteno: 59.59% C, 6.67% H, 4.63% N; nalezeno: 59.38% C, 6.75% H, 4.48% N.

2-acetamido-2-deoxy-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-2-deoxy-D-galaktopyranosa (63)

Látka **62** (50 mg, 0.08 mmol) byla hydrogenolyzována ve směsi AcOH – voda (9:1; 10 ml) nad 10% Pd/C (40 mg) za pokojové teploty 22 h. Reakční nádoba byla vypláchnuta argonem (2 ×), katalyzátor byl odfiltrován, promyt AcOH (50%; 30 ml) a filtrát byl lyofylizován z vody. Pevný zbytek byl čištěn RP HPLC (voda), následně gelovou permeační chromatografií na Bio-Gelu P-2 (180 ml, voda). Na HPLC homogenní frakce byly odpařeny a pevný zbytek lyofilizován z vody. Bylo získáno 25 mg (74%) α/β-anomerické směsi látky **63**, [α]_D –98° (*c* 0.2, H₂O). α-anomer: ¹H NMR: 5.19 d (1H, *J* = 3.4, H-1), 4.65 d (1H, *J* = 8.5, H-1'), 4.17 dd (1H, *J* = 1.0, 2.6, H-4), 4.07 dd (1H, *J* =

3.4, 11.1, H-2), 4.03 dd (1H, $J=2.6$, 11.1, H-3), 3.91 dd (1H, $J=8.5$, 10.9, H-2'), 3.90 bd ($J=3.4$, H-4'), 3.64 – 3.85 m (H-5, 6, 3', 5', 6',), 3.64 – 3.85 m (H-3'). ^{13}C NMR: 105.08 (C-1'), 93.81 (C-1), 78.25 (C-4), 77.59 (C-5'), 73.70 (C-3'), 73.62 (C-5), 70.59 (C-4'), 70.24 (C-3), 63.79 (C-6'), 63.19 (C-6), 55.43 (C-2'), 55.38 (C-2'), 53.04 (C-2). β -anomer: ^1H NMR: 4.65 d (1H, $J=8.5$, H-1'), 4.61 d (1H, $J=8.3$, H-1), 4.10 dd (1H, $J=0.9$, 2.6, H-4), 3.91 dd (1H, $J=8.5$, 10.9, H-2'), 3.90 bd ($J=3.4$, H-4'), 3.64 – 3.85 m (H-5, 6, 3', 5', 6',), 3.64 – 3.85 m (H-3'), 3.64 – 3.85 m (H-2', 3). ^{13}C NMR: 105.08 (C-1'), 93.24 (C-1), 77.59 (C-5'), 77.38 (C-4), 74.10 (C-5), 73.70 (C-3'), 72.54 (C-3), 70.59 (C-4'), 63.79 (C-6'), 63.40 (C-6), 56.32 (C-2), 55.43 (C-2'), 55.38 (C-2') (přřazení provedeno na základě analogie s lit.¹⁵²). Pro **63** ($\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{11}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 424.4, monoizotopická hmotnost 424.2. FAB MS, m/z : 425.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Pro $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{11}$ (424.4) vypočteno: 45.28% C, 6.65% H, 6.60% N; nalezeno: 45.13% C, 6.76% H, 6.51% N.

Benzyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-4,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (64**)**

Látka **64** byla připravena postupem dle lit.^{44,45}. Látka **47** (400 mg, 0.82 mmol), Ag_2CO_3 (1.33 g, 4.76 mmol), AgClO_4 (412 mg, 1.3 mmol) a 4Å molekulová síta byla 48 h sušena při pokojové teplotě a tlaku 1.32 Pa. Byl přidán suchý DCM (4 ml), směs byla míchána 1 h při pokojové teplotě, ochlazená na $-15\text{ }^\circ\text{C}$ a v průběhu 1 h byl přidán roztok 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosyl bromidu **58** (3 ml, 1.2 mmol) v suchém DCM. Směs byla míchána 30 min při $-15\text{ }^\circ\text{C}$ a 24 h při pokojové teplotě. Byl přidán suchý pyridin (8 ml) a směs reagovala další 1 h při pokojové teplotě. Byla zředěna CHCl_3 (300 ml), zfiltrována, promyta HCl (0.1 M; 1×70 ml), nasyceným roztokem NaHCO_3 (2×70 ml) a vodou (2×70 ml), usušena MgSO_4 , odpařena za sníženého tlaku a pevný zbytek byl kodedilován s toluenem (2×50 ml). Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (120 ml) v CHCl_3 následovaná RP HPLC v soustavě rozpouštědel voda – MeOH (70% MeOH/10 min a pak lin. gradient 70 \rightarrow 90%/70 min) poskytla 524 mg (70%) látky **64**, $[\alpha]_{\text{D}} +12^\circ$ (c 0.2, CHCl_3). NMR data viz tab. 11 a 12. Pro **64** ($\text{C}_{49}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_{15}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 908.9, monoizotopická hmotnost 908.3. FAB MS, m/z : 909 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Pro $\text{C}_{49}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_{15}$ (908.9) vypočteno: 64.75% C, 5.77% H, 3.08% N; nalezeno: 64.59% C, 5.93% H, 2.95% N.

Benzyl-2-amino-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-4,6-di-O-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (65)

Benzyl-2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-4,6-di-O-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (66)

Látka **64** (480 mg, 0.53 mmol) byla 5 h refluxována pod zpětným chladičem ve směsi EtOH – N₂H₄·H₂O (2:1; 60 ml). Po ochlazení byla směs odpařena za sníženého tlaku a kodestilována s toluenem, rozpuštěna ve směsi voda – MeOH (1:1; 5 ml), pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 4 pomocí HCOOH a roztok byl nanesen na kolonu Dowexu 50 (v H⁺ cyklu; 100 ml). Kolona byla vymyta směsí rozpouštědel MeOH – voda (4:1; 500 ml) a produkt byl eluován soustavou 40% MeOH ve vodě – 25% vodný roztok amoniaku (4:1; 500 ml). Odpařením eluátu bylo získáno 340 mg surové látky **65**, která byla bez čištění použita v dalším kroku – přípravě látky **66**. Pro látku **65** (C₃₅H₄₄N₂O₁₀) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 652.7, monoizotopická hmotnost 652.3. FAB MS, *m/z*: 653.3 [M + H]⁺.

Roztok surové látky **65** (330 mg, 0.51 mmol) ve směsi pyridin – Ac₂O (2:1; 40 ml) reagoval za pokojové teploty 24 h. Pak byl přidán EtOH (25 ml) a po 25 min byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku a kodestilována s toluenem (3 × 20 ml). Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (70 ml) v soustavě rozpouštědel CHCl₃ – MeOH (30:1) následovaná RP HPLC v soustavě rozpouštědel voda – MeOH (lin. gradient 60 \rightarrow 100%/60 min) poskytla 266 mg (64%) látky **66**, b.t. 176–178 °C; [α]_D +42° (c 0.2, CHCl₃). NMR data viz tab. 11 a 12. Pro látku **66** (C₄₃H₅₂N₂O₁₄) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 820.9, monoizotopická hmotnost 820.3. FAB MS, *m/z*: 821 [M + H]⁺. Pro C₄₃H₅₂N₂O₁₄ (820.9) vypočteno: 62.92% C, 6.38% H, 3.41% N; nalezeno: 62.78% C, 6.45% H, 3.30% N.

Benzyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-4,6-di-O-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (67)

Roztok látky **66** (240 mg, 0.29 mmol) v 0.01 M MeONa v MeOH (10 ml) byl 3.5 h míchán za pokojové teploty. Směs byla zneutralizována přidáním Dowexu 50 (v py⁺ cyklu). Iontoměnič byl odfiltrován, promyt MeOH (50 ml) a filtrát byl zahuštěn. RP HPLC v soustavě rozpouštědel voda – MeOH (lin. gradient 70 \rightarrow 90%/90 min) poskytla

114 mg (56%) sirupu látky **67**, $[\alpha]_D +74^\circ$ (c 0.5, MeOH). NMR data viz tab. 11 a 12. Pro látku **67** ($C_{37}H_{46}N_2O_{11}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 694.8, monoizotopická hmotnost 694.3. FAB MS, m/z : 695 $[M + H]^+$, 717 $[M + Na]^+$. Pro $C_{37}H_{46}N_2O_{11}$ (694.8) vypočteno: 63.96% C, 6.67% H, 4.03% N; nalezeno: 64.08% C, 6.73% H, 3.88% N.

2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-deoxy-D-galaktopyranosa (68)

Látka **67** (100 mg, 0.14 mmol) byla hydrogenolyzována ve směsi AcOH – voda (9:1; 11 ml) a 10% Pd/C (50 mg) 20 h za pokojové teploty. Reakční nádoba byla vypláchnuta argonem (2 \times), katalyzátor byl odfiltrován, promyt AcOH (50%; 50 ml) a filtrát byl odpařen za sníženého tlaku. Pevný zbytek byl čištěn pomocí RP HPLC (voda). Na HPLC získaná homogenní frakce byla odpařena za sníženého tlaku a lyofilizována z vody. Bylo získáno 30 mg (50%) α/β -anomerické směsi látky **68**, $[\alpha]_D +56^\circ$ (c 0.1, H_2O). IČ: 3434 (OH), 1626, 1619, 1561, 1311 (NH), 1067 (C-OH); α -anomer: 1H NMR: 4.60 d (1H, $J = 8.4$, H-1), 4.49 d (1H, $J = 8.3$, H-1'), 4.15 dd (1H, $J = 1.0$, 3.2, H-4), 3.90 dd (1H, $J = 8.4$, 11.0, H-2), 3.90 dd (1H, $J = 0.9$, 3.3, H-4'), 3.84 dd (1H, $J = 8.3$, 10.9, H-2'), 3.80 dd (1H, $J = 3.2$, 11.0, H-3), 3.70 dd (1H, $J = 3.3$, 10.9, H-3'), 3.68 – 3.78 m (4H, H-6, 6'), 3.60 – 3.65 m (2H, H-5, 5'), 2.01 s (3H, NHAc), 2.01 s (3H, NHAc). ^{13}C NMR: 102.71 (C-1'), 95.36 (C-1), 79.08 (C-3), 74.89 (C-5'), 74.68 (C-5), 70.51 (C-3'), 68.11 (C-4), 67.74 (C-4'), 61.12 (C-6), 60.90 (C-6'), 52.47 (C-2'), 52.25 (C-2), 22.25 (NHAc), 22.23 (NHAc); β -anomer: 1H NMR: 5.14 d (1H, $J = 3.7$, H-1), 4.52 d (1H, $J = 8.3$, H-1'), 4.21 dd (1H, $J = 1.0$, 3.1, H-4), 4.20 dd (1H, $J = 3.7$, 11.1, H-2), 4.11 dt (1H, $J = 1.0$, 6.2, 6.2, H-4), 3.96 dd (1H, $J = 3.1$, 11.1, H-3), 3.90 dd (1H, $J = 0.9$, 3.3, H-4'), 3.85 dd (1H, $J = 8.3$, 10.9, H-2'), 3.70 dd (1H, $J = 3.3$, 10.9, H-3'), 3.68 – 3.78 m (4H, H-6, 6'), 3.60 – 3.65 m (1H, H-5'), 2.01 s (3H, NHAc), 2.00 s (3H, NHAc). ^{13}C NMR: 102.74 (C-1'), 91.12 (C-1), 76.04 (C-3), 74.85 (C-5'), 70.58 (C-3'), 69.99 (C-5), 68.78 (C-4), 67.74 (C-4'), 60.94 (C-6), 60.90 (C-6'), 52.47 (C-2'), 48.79 (C-2), 22.25 (NHAc), 22.03 (NHAc).

Pro látku **68** ($C_{16}H_{28}N_2O_{11}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 424.4, monoizotopická hmotnost 424.2. FAB MS, m/z : 425 $[M + H]^+$. Pro $C_{16}H_{28}N_2O_{11}$ (424.4) vypočteno: 45.28% C, 6.65% H, 6.60% N; nalezeno: 45.13% C, 6.76% H, 6.48% N.

Benzyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- α -D-galaktopyranosid (69)

Látka **69** byla připravena postupem dle lit.^{44,45}. Látka **48** (1.1 g, 2.74 mmol), Ag₂CO₃ (8.83 g, 31.6 mmol), AgClO₄ (1.83 g, 5.8 mmol) a 4Å molekulová síta byla 48 h sušena při pokojové teplotě a tlaku 1.32 Pa. Byl přidán suchý DCM (15 ml), směs byla míchána 1 h při pokojové teplotě a ochlazena na -15 °C. Během 1 h byl přidán roztok 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosyl bromidu **58** (8 ml, 8.22 mmol) v suchém DCM. Pak byla reakční směs míchána 30 min při -15 °C a 24 h při pokojové teplotě. Byl přidán suchý pyridin (20 ml) a směs reagovala 1 h při pokojové teplotě. Pak byla zředěna CHCl₃ (500 ml), promyta HCl (0.1 M; 1 \times 100 ml), nasyceným roztokem NaHCO₃ (2 \times 100 ml), vodou (2 \times 100 ml), usušena MgSO₄, odpařena za sníženého tlaku a pevný zbytek byl kodestilován s toluenem (2 \times 50 ml). Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (200 ml) v CHCl₃ následovaná RP HPLC v soustavě rozpouštědel voda – MeOH (70% MeOH/10 min a pak lin. gradient 70 \rightarrow 100%/60 min) poskytla 305 mg (9%) látky **69**, jako vedlejší produkt vznikl benzyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- α -D-galaktopyranosid **70** (281 mg, 13%).

Pro látku **69**: $[\alpha]_D +47^\circ$ (*c* 0.41, CHCl₃, orientační hodnota). NMR data: látku nebylo možné dostatečně purifikovat pro naměření NMR dat. Struktura byla jednoznačně ověřena při analýze látky **72** (viz tab. 15 a 16). Pro látku **69** (C₆₂H₆₅N₃O₂₄) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1236.2, monoizotopická hmotnost 1235.4. FAB MS, *m/z*: 1236 [M + H]⁺. Pro C₆₂H₆₅N₃O₂₄ (1236.2) vypočteno: 60.24% C, 5.30% H, 3.40% N.

Pro benzyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- α -D-galaktopyranosid (**70**): $[\alpha]_D +61^\circ$ (*c* 0.3, CHCl₃). IČ: 3576, 3439 (OH), 1778, 1719 (CO NPht), 1510, 1300 (NHAc), 3090, 1499, 913 (arom). NMR data viz tab. 15 a 16. Pro látku **70** (C₄₂H₄₆N₂O₁₅) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 818.8, monoizotopická hmotnost 818.3. FAB MS, *m/z*: 819.3 [M + H]⁺. Pro C₄₂H₄₆N₂O₁₅ (818.8) vypočteno: 61.61% C, 5.66% H, 3.42% N; nalezeno: 61.49% C, 5.58% H, 3.33% N.

Benzyl-2-amino-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[2-amino-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-2-amino-6-O-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (71)

Benzyl-2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-6-O-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (72)

Roztok suché látky **69** (250 mg, 0.20 mmol) ve směsi EtOH – N₂H₄·H₂O (2:1; 20 ml) byl 5 h refluxován pod zpětným chladičem. Směs byla odpařena za sníženého tlaku a kodestilována s toluenem (2 × 20 ml), rozpuštěna ve směsi voda – MeOH (1:1; 5 ml), pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 4 pomocí HCOOH a roztok byl nanesen na kolonu Dowexu 50 (v H⁺ cyklu; 100 ml). Kolona byla promyta směsí MeOH – voda (4:1; 500 ml) a produkt byl eluován soustavou 40% MeOH ve vodě – 25% vodný roztok amoniaku (4:1; 500 ml). Odpařením eluátu bylo získáno 345 mg látky **71**, která byla bez čištění použita v dalším kroku – přípravě látky **72**. Pro látku **71** (C₃₄H₄₉N₃O₁₄) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 723.8, monoizotopická hmotnost 723.3. FAB MS, *m/z*: 724 [M + H]⁺.

Roztok surové látky **71** (335 mg, 0.46 mmol) ve směsi pyridin – Ac₂O (2:1; 9 ml) byl za pokojové teploty míchán 48 h. Pak byl přidán EtOH (12 ml) a po 20 min stání byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku a kodestilována s toluenem (3 × 20 ml). Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (160 ml) v soustavě rozpouštědel CHCl₃ – MeOH (8:1) následovaná RP HPLC v soustavě rozpouštědel voda – MeOH (lin. gradient 63 \rightarrow 70%/30 min, pak 70% MeOH/30 min a nakonec lin. gradient 60 \rightarrow 90%/60 min) poskytla 167 mg (77%) látky **72**, [α]_D +28° (*c* 0.2, CHCl₃). NMR data viz tab. 15 a 16. Pro látku **72** (C₅₀H₆₅N₃O₂₂) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1060.1, monoizotopická hmotnost 1059.4. FAB MS, *m/z*: 1060.1 [M + H]⁺. Pro C₅₀H₆₅N₃O₂₂ (1060.1) vypočteno: 56.65% C, 6.18% H, 3.96% N; nalezeno: 56.71% C, 6.13% H, 4.08% N.

Benzyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-6-O-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (73)

Suspenze látky **72** (130 mg, 0.122 mmol) v 0.01 M MeONa v MeOH (10 ml) byla 2.5 h míchána za pokojové teploty. Směs byla zneutralizována přidáním Dowexu 50 (v py^+ cyklu). Iontoměnič byl odfiltrován a filtrát zahuštěn. RP HPLC v soustavě rozpouštědel voda – MeOH (lin. gradient 70→100%/60 min) poskytla 39 mg (40%) sirupu látky **73**, $[\alpha]_{\text{D}} -1.85^\circ$ (*c* 0.1, CHCl_3). NMR data viz tab. 15 a 16. Pro látku **73** ($\text{C}_{38}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_{16}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 807.8, monoizotopická hmotnost 807.3. FAB MS, *m/z*: 808 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 830 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Pro $\text{C}_{38}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_{16}$ (807.8) vypočteno: 56.50% C, 6.61% H, 5.20% N; nalezeno: 56.48% C, 6.75% H, 5.28% N.

2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1→3)-[2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1→4)]-2-acetamido-2-deoxy-D-galaktopyranosa (74)

Látka **73** (28 mg, 0.04 mmol) byla hydrogenolizována ve směsi AcOH – voda (9:1; 10 ml) a 10% Pd/C (50 mg) 22 h za pokojové teploty. Reakční nádoba byla vypláchnuta argonem (2 ×), katalyzátor byl odfiltrován, promyt AcOH (50%; 30 ml) a filtrát byl odpařen za sníženého tlaku. Pevný zbytek byl čištěn RP HPLC (voda). Na HPLC získaná homogenní frakce byla odpařena za sníženého tlaku a lyofilizována z vody. Bylo získáno 14 mg (64%) α/β -anomerické směsi látky **74**, $[\alpha]_{\text{D}} +25.77^\circ$ (*c* 0.3, H_2O). ^1H NMR (D_2O , 500 MHz): 5.14 d (1H, *J* = 3.7, H-1), 4.96 d (1H, *J* = 8.6, H-1''), 4.96 d (1H, *J* = 8.6, H-1'''), 4.59 d (1H, *J* = 8.3, H-1), 4.52 d (1H, *J* = 8.4, H-1'), 4.48 d (1H, *J* = 8.4, H-1'), 4.44 bd (1H, *J* = 2.8, H-4), 4.36 bd (1H, *J* = 2.8, H-4), 4.16 dd (1H, *J* = 3.7, 11.2, H-2), 4.14 bt (1H, *J* = 6.5, H-5), 4.03 dd (1H, *J* = 2.8, 11.2, H-3), 3.98 dd (1H, *J* = 8.3, 11.0, H-2), 3.95 – 4.01 m (2H, H-2', 2''), 3.83 dd (1H, *J* = 2.8, 11.0, H-3), 3.78 – 3.83 m (2H, H-6), 3.68 – 3.72 m (2H, H-6), 3.63 – 3.82 m (10H, H-2', 3', 4', 5', 6', 2'', 3'', 4'', 5'', 6''), 2.12 s, 2.08 s, 2.05 s, 2.05 s, 2.04 s, 1.92 s, 1.92 s (6 × 3H, NHAc). ^{13}C NMR (D_2O , 125.8 MHz): 174.32 s, 174.27 s, 174.27 s, 173.70 s, 173.43 s, 173.43 s, 103.11 d (C-1'), 103.07 d (C-1'), 101.19 d (C-1''), 101.17 d (C-1'''), 95.66 d (C-1), 91.26 d (C-1), 79.12 d (C-3), 75.96 d (C-3), 74.98 d (C-5''), 74.98 d (C-4), 74.94 d (C-5'), 74.94 d (C-4), 74.9 d (C-5'), 74.9 d (C-3''), 74.61 d (C-5'), 74.61 d (C-3'), 74.02 d (C-3''), 73.7 d (C-3'), 71.15 d (C-4'), 71.1 d (C-4'), 70.76 d (C-5), 70.76 d (C-4''), 70.68 d (C-4'), 69.71 d (C-5), 61.2 t (C-6'), 61.16 t (C-6'), 61.09 t (C-6''), 61.09 t (C-6''), 60.67 t (C-6), 60.49 t (C-6), 52.43 d (C-2''), 52.4 d (C-2''), 52.34 d (C-2'), 52.22 d (C-2'), 52.22 d (C-2), 49.12 d (C-2), 22.41 q, 22.38 q, 22.36 q, 22.31 q, 22.23 q, 21.99 q. Pro látku **74** ($\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_{16}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 627.6, monoizotopická hmotnost 627.3. FAB MS, *m/z*:

628 $[M + H]^+$. Pro $C_{24}H_{41}N_3O_{16}$ (627.6) vypočteno: 45.93% C, 6.58% H, 6.70% N; nalezeno: 45.89% C, 6.63% H, 6.78% N.

Benzyl-4-*O*-acetyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (76)

Látka **76** byla připravena postupem dle lit.^{44,45}. Látka **52** (200 mg, 0.41 mmol), Ag_2CO_3 (663 mg, 2.38 mmol), $AgClO_4$ (206 mg, 0.66 mmol) a 4Å molekulová síta byla 48 h sušena při pokojové teplotě a 1.32 Pa. Po přidání suchého DCM (2 ml) byla směs míchána 1 h při pokojové teplotě a ochlazena na $-15^\circ C$. V průběhu 1 h byl za míchání přidán roztok 4-*O*-acetyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosyl bromidu (**75**; 466 mg, 0.81 mmol) v suchém DCM (2 ml). Směs reagovala 30 min při $-15^\circ C$ a 24 h při pokojové teplotě. Byl přidán suchý pyridin (4 ml) a směs reagovala další hodinu při pokojové teplotě. Poté byla zfiltrována, zředěna $CHCl_3$ (100 ml), promyta HCl (0.1 M; 1×30 ml), nasyceným roztokem $NaHCO_3$ (2×30 ml) a vodou (2×30 ml), usušena $MgSO_4$, odpařena za sníženého tlaku a pevný zbytek byl kodestilován s toluenem (2×30 ml). Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (250 ml) v soustavě rozpouštědel toluen – EtOAc (1:2) následovaná RP HPLC v soustavě rozpouštědel voda – MeOH (lin. gradient 80 \rightarrow 100%/40 min) poskytla 115 mg (28%) látky **76**, $[\alpha]_D +102^\circ$ (c 0.1, $CHCl_3$). NMR data odpovídají směsi látek. Pro **76** ($C_{59}H_{60}N_2O_{13}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1005.1, monoizotopická hmotnost 1004.4. FAB MS, m/z : 1027 $[M + Na]^+$.

Benzyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid (77)

Roztok látky **76** (115 mg, 0.114 mmol) v 0.13 M MeONa v MeOH (30 ml) byl za pokojové teploty míchán 3.5 dne. Směs byla zneutralizována přidáním Dowexu 50 (v py⁺ cyklu). Iontoměnič byl odfiltrován a filtrát byl zahuštěn. RP HPLC v soustavě rozpouštědel voda – MeOH (70% MeOH/10 min, pak lin. gradient 70 \rightarrow 100%/60 min) poskytla 91 mg (83%) látky **77**, $[\alpha]_D +151^\circ$ (c 0.1, $CHCl_3$). IČ: 3441, 1679, 1514 (NH), 1776, 1715 (CO), 1497, 1455 (arom), 1061. NMR data odpovídají směsi látek. Pro **77**

(C₅₇H₅₈N₂O₁₂) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 963.1, monoizotopická hmotnost 962.4. FAB MS, *m/z*: 963.1 [M + H]⁺.

Benzyl-4-*O*-acetyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido-β-D-galaktopyranosid (78)

Látka **78** byla připravena postupem dle lit.^{44,45}. Látka **55** (680 mg, 1.17 mmol), Ag₂CO₃ (1.89 g, 6.79 mmol), AgClO₄ (588.8 mg, 1.87 mmol) a 4Å molekulová síta (1 g) byla 48 h sušena při pokojové teplotě a tlaku 1.32 Pa. Byl přidán suchý DCM (8 ml), směs byla míchána 1 h při pokojové teplotě, ochlazena na -15 °C a v průběhu 1 h byl přidán roztok 4-*O*-acetyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido-β-D-galaktopyranosyl bromidu **75** (4 ml, 2.34 mmol) v suchém DCM. Pak byla směs míchána 30 min při -15 °C a 24 h při pokojové teplotě. Byl přidán suchý pyridin (12 ml) a směs reagovala další 1 h při pokojové teplotě. Poté byla zředěna CHCl₃ (500 ml), zfiltrována, promyta HCl (2M; 1 × 100 ml), nasyceným roztokem NaHCO₃ (2 × 100 ml) a vodou (2 × 100 ml), usušena MgSO₄, odpařena za sníženého tlaku a pevný zbytek byl kodestilován s toluenem (2 × 70 ml). Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (300 ml) v soustavě rozpouštědel toluen – EtOAc (1:1) následovaná RP HPLC v soustavě MeOH – voda (85% MeOH izokraticky) poskytla 586 mg (48%) látky **78**, 170 mg (14% počítáno na donor) látky **79** a 341 mg (15% počítáno na donor) sacharidu trehalózového typu **80**.

Pro **78**: [α]_D -10° (*c* 0.1, CHCl₃). NMR data viz tab. 19 a 20. Pro **78** (C₆₅H₆₀N₂O₁₄) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1093.2, monoizotopická hmotnost 1092.4. FAB MS, *m/z*: 1115.3 [M + Na]⁺. Pro C₆₅H₆₀N₂O₁₄ (1092.4) vypočteno: 71.42% C, 5.53% H, 2.56% N; nalezeno: 71.59% C, 5.47% H, 2.65% N.

Pro 4-*O*-acetyl-1,5-anhydro-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido-D-*xylo*-hex-enitol (**79**): b.t. 183–185 °C; [α]_D +73° (*c* 0.5, CHCl₃). IČ: 3593, 3565 (OH), 1776 (CO NPhth), 1741 (CO OAc), 3090, 3066, 1593 (arom). NMR data viz tab. 9 a 10, dále NMR data viz tab. 9 a 10, ¹H data odpovídají lit.¹⁵³. Pro látku **79** (C₃₀H₂₉NO₈) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 531.6, monoizotopická hmotnost 531.2. FAB MS, *m/z*: 554 [M + Na]⁺. Pro C₃₀H₂₉NO₈ (531.6) vypočteno: 67.79% C, 5.50% H, 2.64% N; nalezeno: 67.62% C, 5.57% H, 2.55% N.

Pro 4-*O*-acetyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosid-(1 \leftrightarrow 1)-4-*O*-acetyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosid (**80**): b.t. 220–222 °C; $[\alpha]_D +42^\circ$ (*c* 0.4, CHCl₃). NMR data viz tab. 21 a 22. Pro látku **80** (C₆₀H₅₆N₂O₁₅) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1045.1, monoizotopická hmotnost 1044.4. FAB MS, *m/z*: 1045.3 [M + H]⁺. Pro C₆₀H₅₆N₂O₁₅ (1045.1) vypočteno: 68.95% C, 5.40% H, 2.68% N; nalezeno: 69.10% C, 5.47% H, 2.55% N.

Benzyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosid (81**)**

Roztok látky **80** (377 mg, 0.35 mmol) v 0.01 M MeONa v MeOH (30 ml) byl za pokojové teploty míchán 2 dny. Směs byla zneutralizována přidáním Dowexu 50 (v py⁺ cyklu). Iontoměnič byl odfiltrován, promyt MeOH (80 ml) a filtrát byl zahuštěn. Pevný zbytek byl čištěn chromatografií na silikagelu (100 ml) v soustavě rozpouštědel toluen – EtOAc (10:2). Bylo získáno 355 mg (98%) látky **81**, $[\alpha]_D -29^\circ$ (*c* 0.1, CHCl₃). IČ: 3546, 997 (OH), 1777, 1717 (CO NPhth), 3090, 1497, 1455 (arom). NMR data viz tab. 19 a 20. Pro látku **81** (C₆₃H₅₈N₂O₁₃) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1051.2, monoizotopická hmotnost 1050.4. FAB MS, *m/z*: 1073 [M + Na]⁺. Pro C₆₃H₅₈N₂O₁₃ (1051.2) vypočteno: 71.99% C, 5.56% H, 2.67% N; nalezeno: 71.86% C, 6.73% H, 2.73% N.

Benzyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosid (82**)**

Látka **57** byla připravena postupem dle lit.^{44,45}. Látka **81** (373 mg, 0.36 mmol), Ag₂CO₃ (2.5 g, 8.97 mmol), AgClO₄ (542 mg, 1.16 mmol) a 4Å molekulová síta (1.5 g) byla 48 h sušena při pokojové teplotě a tlaku 1.32 Pa. Byl přidán suchý DCM (10 ml) a směs byla míchána 20 min při pokojové teplotě. Po ochlazení na –15 °C byl v průběhu 2 h přidán roztok 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-galaktopyranosyl bromidu **58** (5 ml, 2.08 mmol) v suchém DCM. Pak byla reakční směs míchána 1 h při –15 °C a 24 h při pokojové teplotě. Byl přidán suchý pyridin (5 ml) a směs reagovala další 1 h při pokojové teplotě. Pak byla zředěna CHCl₃ (400 ml), zfiltrována, promyta vodou

(1 × 100 ml), nasyceným roztokem NaHCO₃ (2 × 100 ml) a vodou (3 × 100 ml), usušena MgSO₄, odpařena za sníženého tlaku a pevný zbytek byl kodestilován s toluenem (3 × 70 ml). Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (300 ml) v soustavě rozpouštědel toluen – EtOAc (5:3) následovaná RP HPLC v soustavě MeOH – voda (85% MeOH izokraticky) poskytla 273 mg (52%) látky **82** a 541 mg (61%, počítáno pro glykosyl donor) trehalózového typu **83**.

Pro **82**: [α]_D -58° (*c* 0.2, CHCl₃). NMR data viz tab. 19 a 20. Pro látku **82** (C₈₃H₇₇N₃O₂₂) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1468.5, monoizotopická hmotnost 1467.5. MS (EI), *m/z*: 1490 [M + Na]⁺. Pro C₈₃H₇₇N₃O₂₂ (1468.5) vypočteno: 67.88% C, 5.29% H, 2.86% N; nalezeno: 68.02% C, 5.27% H, 2.95% N.

Pro 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido-β-D-galaktopyranosid-(1↔1)-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-ftalimido-β-D-galaktopyranosid **83**: b.t. 278–280 °C; [α]_D -52° (*c* 0.4, CHCl₃). NMR data viz tab. 21 a 22. Pro látku **83** (C₄₀H₄₀N₂O₁₉) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 852.8, monoizotopická hmotnost 852.2. MS (EI), *m/z*: 875.4 [M + Na]⁺. Pro C₄₀H₄₀N₂O₁₉ (852.8) vypočteno: 56.34% C, 4.73% H, 3.29% N; nalezeno: 56.29% C, 4.82% H, 3.21% N.

Benzyl-2-amino-2-deoxy-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2-amino-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2-amino-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-β-D-galaktopyranosid (84)

Benzyl-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-β-D-galaktopyranosid (85)

Roztok suché látky **82** (250 mg, 0.17 mmol) ve směsi EtOH – N₂H₄·H₂O (2:1; 18 ml) byl 5 h refluxován pod zpětným chladičem. Po ochlazení byla směs odpařena za sníženého tlaku a kodestilována s toluenem (2 × 10 ml), rozpuštěna ve směsi voda – MeOH (1:1; 5 ml), pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 4 pomocí HCOOH a roztok byl nanesen na kolonu Dowexu 50 (v py⁺ cyklu; 80 ml). Kolona byla vymyta směsí MeOH – voda (4:1; 500 ml) a produkt byl eluován soustavou 40% MeOH ve vodě – 25% vodný roztok amoniaku (4:1; 500 ml) a pak 5% NH₃ v MeOH (200 ml). Odpařením eluátu bylo získáno 196 mg surové látky **84**, která byla bez čištění použita v dalším kroku – přípravě

látky **85**. Pro **84** ($C_{53}H_{65}N_3O_{13}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 952.1, monoizotopická hmotnost 951.5. FAB MS, m/z : 952 $[M + H]^+$.

Roztok surové látky **84** (195 mg, 0.17 mmol) ve směsi pyridin – Ac_2O (2:1; 30 ml) byl 72 h míchán za pokojové teploty. Byl přidán EtOH (20 ml) a po 20 min byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku a kodesťilována s toluenem (3×50 ml). Chromatografie pevného zbytku na koloně silikagelu (40 ml) v EtOAc následovaná RP HPLC v soustavě rozpouštědel voda – MeOH (75% MeOH izokraticky 30 min, pak lin. gradient 75→90%/30 min, pak 100% MeOH 30 min) poskytla 117 mg (57%) látky **85**, $[\alpha]_D - 10^\circ$ (c 0.2, $CHCl_3$). NMR data viz tab. 19 a 20. Pro látku **85** ($C_{65}H_{77}N_3O_{19}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1204.3, monoizotopická hmotnost 1203.5. MS (EI), m/z : 1227.6 $[M + Na]^+$. Pro $C_{65}H_{77}N_3O_{19}$ (1204.3) vypočteno: 52.69% C, 6.05% H, 4.31% N; nalezeno: 52.62% C, 6.14% H, 3.45% N.

Benzyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-O-benzyl-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-O-benzyl-2-deoxy- β -D-galaktopyranosid (86)

Roztok látky **85** (110 mg, 0.09 mmol) v 0.01 M MeONa v MeOH (30 ml) byl míchán 18 h při pokojové teplotě. Směs byla zneutralizována přidáním Dowexu 50 (v py^+ cyklu). Iontoměnič byl odfiltrován, promyt MeOH (150 ml) a filtrát byl odpařen za sníženého tlaku. Bylo získáno 88 mg (89%) látky **86**. $[\alpha]_D - 10^\circ$ (c 0.1, $CHCl_3$). IČ: 3333 (OH), 3451, 3434, 1676, 1522, 1293 (NH), 3090, 1498, 1455, 915 (arom). NMR data viz tab. 19 a 20. Pro látku **86** ($C_{59}H_{71}N_3O_{16}$) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 1078.2, monoizotopická hmotnost 1077.5. MS (EI), m/z : 1100.7 $[M + Na]^+$. Pro $C_{59}H_{71}N_3O_{16}$ (1078.2) vypočteno: 65.72% C, 6.64% H, 3.90% N; nalezeno: 65.88% C, 6.57% H, 3.85% N.

2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-2-deoxy-D-galaktopyranosa (87)

Látka **86** (85 mg, 0.08 mmol) byla hydrogenolizována ve směsi AcOH – voda (9:1; 30 ml) a 10% Pd/C (50 mg) 23 h za pokojové teploty. Reakční nádoba byla vypláchnuta argonem ($2 \times$), katalyzátor byl odfiltrován, promyt AcOH (50%; 100 ml) a filtrát byl

odpařen za sníženého tlaku. Pevný zbytek byl zfiltrován přes sloupec reverzní fáze C18 (voda), zahuštěn a dále čištěn gelovou permeační chromatografií na Bio-Gelu P-2 (180 ml, voda). Lyofilizací z vody bylo získáno 42 mg (85%) α/β -anomerické směsi látky **87**, $[\alpha]_D +10^\circ$ (c 0.3, H₂O). ¹H NMR: 5.26 d (1H, $J = 3.4$, H-1), 4.78 d (1H, $J = 8.3$, H-1'), 4.75 d (1H, $J = 8.5$, H-1''), 4.67 d (1H, $J = 8.3$, H-1), 4.23 dd (1H, $J = 1.2, 2.7$, H-4), 4.15 d (1H, $J = 3.4, 11.1$, H-2), 4.14 – 4.17 m (H-3), 4.10 d (1H, $J = 2.7, 11.1$, H-3), 3.97 dd (1H, $J = 1.0, 3.2$, H-4''), 3.88 – 3.97 m (H-2', 2''), 3.82 – 3.87 m (H-2), 3.81 – 3.99 m, 3.78 dd (2H, $J = 7.2, 11.8$, H-6''), 3.70 – 3.75 m (H-5', 5''), 2.13 s, 2.13 s, 2.11 s, 2.09 s, 2.09 s, 2.08 s. ¹³C NMR: 175.21 s, 175.17 s, 175.16 s, 175.10 s, 174.90 s, 174.51 s, 102.36 d (C-1'), 102.31 d (C-1''), 95.55 d (C-1), 91.11 d (C-1), 75.78 d (C-4), 74.94 d (2C), 74.88 d, 74.73 d, 74.66 d, 74.34 d, 74.21 d, 71.74 d, 71.64 d, 71.55 d, 71.00 d (2C), 69.98 d, 67.69 d (C-3), 61.11 t (2C), 60.97 t, 60.79 t, 60.65 t (2C), 53.69 d (C-2), 53.02 d, 52.94 d, 52.81 d, 52.80 d, 50.35 d (C-2), 22.41 q, 22.40 q, 22.36 q, 22.25 q, 22.18 q, 21.94 q. Pro látku **87** (C₂₄H₄₁N₃O₁₆) vypočteno: relativní molekulová hmotnost 627.6, monoizotopická hmotnost 627.2. MS (EI), m/z : 650.5 [M + Na]⁺. Pro C₂₄H₄₁N₃O₁₆ (627.6) vypočteno 45.93% C, 6.58% H, 6.70% N; nalezeno: 46.08% C, 6.53% H, 6.73% N.

5.2.1 NMR data připravených látek

Tabulka 2:

¹H NMR parametry látek **6**, **7**, **10** – **12**

Parametr	6	7	10	11	12
δ(H-1)	4.63 d	4.64 d	4.78 d	4.79 d	4.81 d
δ(H-2)	4.01 ddd	4.04-4.07 m	4.24 dt	4.25 ddd	4.31 ddd
δ(H-3)	4.15 dd	4.04-4.07 m	4.14 dd	4.06 dd	4.04 dd
δ(H-4)	3.44 dd	3.51 dd	3.58 dd	3.59 dd	3.66 dd
δ(H-5)	3.80 dt	3.80 ddd	3.85 ddd	3.84 ddd	3.84 ddd
δ(H-6a)	3.60 d	3.58 dd	3.65 dd	3.63 dd	3.66 dd
δ(H-6b)	3.60 d	3.62 dd	3.72 dd	3.70 dd	3.78 dd
δ(H-1')	5.29 d	5.47 d	4.68 d	4.67 d	4.39 d
δ(H-2')	4.16 dd	4.28 dd	3.72 dd	3.95 dt	3.47 dd
δ(H-3')	4.44-4.46 m	5.86 dd	3.61 dd	5.01 dd	3.37 ddd
δ(H-4')	3.62-3.65 m	5.12 dd	3.72 dd	5.09 t	3.41 ddd
δ(H-5')	3.62-3.65 m	3.83 ddd	3.46 ddd	3.60 ddd	3.27 ddd
δ(H-6a')	3.51-3.54 m	4.05 dd	3.55 dd	4.04 dd	3.46 dd
δ(H-6b')	3.78 dd	4.30 dd	3.75 dd	4.25 dd	3.76 dd
J(1,2)	3.8	3.8	4.0	4.1	4.1
J(2,3)	10.5	a	9.9	9.8	9.9
J(3,4)	8.5	8.4	8.4	8.4	8.7
J(4,5)	10.1	10.1	10.2	10.1	10.1
J(5,6a)	3.3	2.2	2.1	2.1	1.9
J(5,6b)	3.3	4.2	4.3	4.3	3.8
J(6a,6b)	a	10.6	10.7	10.7	10.6
J(1',2')	8.3	8.3	8.3	8.4	8.1
J(2',3')	10.7	10.7	9.5	10.4	9.5
J(3',4')	a	9.0	8.5	9.3	8.4
J(4',5')	a	10.2	9.5	9.8	9.2
J(5',6a')	a	2.6	2.2	2.7	3.4
J(5',6b')	1.3	4.5	5.5	4.4	6.4
J(6a',6b')	10.5	12.2	10.6	12.2	11.9

a: hodnota nabyla určena;

Další NMR parametry a parametry substituentů: **6** – arom. H: 6.86-7.33 m, NHAc: 5.58 d (1H, J = 9.8), OCH₂C₆H₅: 5.01 d (1H, J = 11.1), 4.81 d (1H, J = 11.0), 4.76 d (1H, J = 11.9), 4.60 d (1H, J = 11.8), 4.60 d (1H, J = 11.8), 4.50 d, (1H, J = 12.2), 4.49 d (1H, J = 11.6), 4.48 d (1H, J = 11.1), 4.42 d (1H, J = 11.6), 4.41 d (1H, J = 12.2), 4.40 d (1H, J = 11.9), 4.34 d (1H, J = 11.8),

Tabulka 2 – pokračování: **9** – arom. H: 7.24-7.89 m, NHAc: 5.45 d (1H, J = 9.8), OCH₂C₆H₅: 5.02 d (1H, J = 11.1), 4.64 d (1H, J = 11.6), 4.52 d (1H, J = 12.1), 4.48 d (1H, J = 11.1), 4.46 d (1H, J = 12.1), 4.35 d, (1H, J = 11.6), OAc: 2.00 s (3H), 1.93 s (3H), 1.92 s (3H), NHAc: 1.84 s (3H); **10** – arom. H: 7.12-7.35 m, NHAc: 6.07 d (1H, J = 7.8), 5.58 d (1H, J = 9.2), OCH₂C₆H₅: 4.99 d (1H, J = 10.9), 4.77 d (1H, J = 10.9), 4.76 d (1H, J = 11.0), 4.70 d (1H, J = 11.0), 4.69 d (1H, J = 11.7), 4.59 d, (1H, J = 12.1), 4.53 d, (1H, J = 10.9), 4.52 d (1H, J = 12.1), 4.46 d (1H, J = 12.1), 4.44 d (1H, J = 10.9), 4.43 d (1H, J = 11.7), 4.41 d (1H, J = 12.1), NHAc: 1.97 s (3H), 1.90 s (3H); **11** – arom. H: 7.20-7.39 m, NHAc: 6.22 d (1H, J = 8.2), 5.94 d (1H, J = 9.3), OCH₂C₆H₅: 4.97 d (1H, J = 10.7), 4.70 d (1H, J = 11.6), 4.58 d (1H, J = 12.1), 4.51 d (1H, J = 12.1), 4.43 d (1H, J = 11.6), 4.41 d, (1H, J = 10.7), OAc: 2.01 s (3H), 2.00 s (3H), 1.99 s (3H), NHAc: 1.98 s (3H), 1.93 s (3H); **12** – arom. H : 7.18-7.40 m, 3'-OH: 6.42 d (1H, J = 2.1), NHAc: 6.11 d (1H, J = 9.3), OCH₂C₆H₅: 4.84 d (1H, J = 10.4), 4.72 d (1H, J = 11.7), 4.64 d (1H, J = 12.1), 4.53 d (1H, J = 12.1), 4.47 d (1H, J = 11.7), 4.43 d, (1H, J = 10.4), 4'-OH: 3.00 d (1H, J = 2.0), NHAc: 2.17 s (3H), 1.96 s (3H).

Tabulka 3:

¹³C NMR signály látek **6**, **7**, **10** – **12**^a

uhlík	látka				
	6	7	10	11	12
1	96.73	96.89	96.78	96.78	96.63
2	52.76	52.63	53.31	53.30	53.08
3	76.47	77.75	77.66	79.08	79.20
4	76.17	76.17	76.09	72.02	72.72
5	70.70	70.70	70.49	70.21	70.43
6	68.90	68.74	68.73	68.40	68.30
1'	97.11	97.64	99.12	99.55	99.60
2'	56.76	55.14	56.62	54.23	58.27
3'	79.21	70.23	78.56	73.49	77.72
4'	80.00	69.27	82.49	68.61	75.52
5'	75.08	71.39	75.67	75.60	75.43
6'	69.11	62.17	69.46	62.08	62.59

^a signály aromatických uhlíků nebyly přiřazeny;

Další ¹³C NMR signály substituentů: **6** - OCH₂C₆H₅: 75.11 t, 74.92 t, 74.92 t, 73.47 t, 73.33 t, 69.46 t, NHAc: 169.82 s, 23.32 q; **7** - OCH₂C₆H₅: 75.14 t, 73.39 t, 69.67 t, NHAc: 169.54 s, 23.46 q, OAc: 170.67 s, 170.14 s, 170.00 s, 20.60 q, 20.60 q, 20.40 q; **10** - OCH₂C₆H₅: 75.11 t, 74.92 t, 74.81 t, 73.52 t, 73.52 t, 69.65 t, NHAc: 171.18 s, 170.49 s, 23.63 q, 23.52 q; **11** - OCH₂C₆H₅: 75.21 t, 73.56 t, 69.79 t, NHAc: 169.27 s, 170.74 s, 23.85 q, 23.15 q, OAc: 171.41 s, 170.74 s, 170.74 s, 20.69 q, 20.61 q, 20.58 q; **12** - OCH₂C₆H₅: 75.30 t, 73.61 t, 69.87 t, NHAc: 173.29 s, 171.43 s, 23.68 q, 22.65 q.

Tabulka 4:

 ^1H NMR parametry látek **15** – **17**

Parametr	15	16	17
$\delta(\text{H-1})$	4.91 d	5.34 d	6.67 d
$\delta(\text{H-2})$	4.03 ddd	4.03 dd	-
$\delta(\text{H-3})$	3.78 dd	4.30 dd	4.55 dt
$\delta(\text{H-4})$	3.60 dd	3.63 dd	4.06 dd
$\delta(\text{H-5})$	3.64 ddd	3.47 ddd	4.38 bddd
$\delta(\text{H-6a})$	3.10 dd	3.37 dd	3.83 dd
$\delta(\text{H-6b})$	3.18 dd	3.65 dd	3.93 dd
$\delta(\text{H-1}')$	5.30 d	5.34 d	-
$\delta(\text{H-2}')$	4.20 dd	4.03 dd	-
$\delta(\text{H-3}')$	4.39 dd	4.30 dd	-
$\delta(\text{H-4}')$	3.70 dd	3.63 dd	-
$\delta(\text{H-5}')$	3.74-3.76 m	3.47 ddd	-
$\delta(\text{H-6a}')$	3.64-3.66 m	3.37 dd	-
$\delta(\text{H-6b}')$	3.74-3.76 m	3.65 dd	-
J(1,2)	3.7	8.7	-
J(2,3)	10.6	10.7	-
J(3,4)	7.9	8.7	5.3
J(4,5)	9.9	9.9	7.3
J(5,6a)	1.6	1.9	3.4
J(5,6b)	4.1	3.4	5.5
J(6a,6b)	11.0	11.2	10.8
J(1',2')	8.5	8.7	-
J(2',3')	10.7	10.7	-
J(3',4')	8.5	8.7	-
J(4',5')	9.6	9.9	-
J(5',6a')	a	1.9	-
J(5',6b')	a	3.4	-
J(6a',6b')	a	11.2	-

a: hodnota není určena;

Další NMR parametry a parametry substituentů: **15** – arom. H : 6.79-7.38 m, NHAc: 5.53 d (1H, J = 8.4), OCH₂C₆H₅: 4.81 d (1H, J = 11.0), 4.77 d (1H, J = 12.1), 4.59 d (1H, J = 11.9), 4.59 d (1H, J = 11.0), 4.57 d, (1H, J = 11.7), 4.50 d (1H, J = 11.9), 4.40 d (1H, J = 12.1), 4.33 d (1H, J = 11.7), 3.94 d (1H, J = 12.0), 3.88 d (1H, J = 12.0), NHAc: 1.91 s (3H); **16** - arom. H : 6.80-7.32 m, OCH₂C₆H₅: 4.68 d (1H, J = 12.3), 4.68 d (1H, J = 10.9), 4.53 d (1H, J = 10.9),

Tabulka 4 – pokračování: 4.36 d (1H, J = 12.3), 4.20 d (1H, J = 11.8), 4.05 d, (1H, J = 11.8); **17** – $J_{1,3} = 1.2$, $J_{3,5} = 0.8$, arom. H : 6.92-7.80 m, $\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 4.78 d (1H, J = 11.5), 4.68 d (1H, J = 11.5), 4.60 s (2H), 4.57 d, (1H, J = 12.0), 4.31 d (1H, J = 12.0).

Tabulka 5:

^{13}C NMR signály látek **15** – **17**^a

Uhlík	Látka		
	15	16	17
1	96.46	96.88	146.50
2	53.03	55.49	107.96
3	70.53	78.83	74.13
4	81.37	78.93	77.65
5	69.58	75.29	74.26
6	68.34	68.62	67.93
1'	98.86	96.88	-
2'	55.92	55.49	-
3'	79.50	78.83	-
4'	78.93	78.93	-
5'	74.32	75.29	-
6'	68.76	68.62	-

^a signály aromatických uhlíků nebyly přiřazeny;

Další ^{13}C NMR signály substituentů: **15** - $\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 75.00 t, 74.95 t, 73.45 t, 72.67 t, 69.60 t, NHAc: 170.10 s, 23.34 q; **16** - $\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 74.77 t, 74.53 t, 73.54 t; **17** - $\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 73.51 t, 73.27 t, 72.35 t.

Tabulka 6:

¹H NMR parametry látek **18, 21, 23 – 24**

Parametr	18	21	23	24
δ(H-1)	4.54 d	4.58 d	4.82 d	4.77 d
δ(H-2)	3.97 ddd	3.97 ddd	4.20 dt	4.19 dd
δ(H-3)	3.80 dd	3.70 dd	3.92 dd	4.21 dd
δ(H-4)	3.89 dd	3.86 dd	3.85 dd	4.00 dd
δ(H-5)	3.53 ddd	3.47 ddd	3.76 ddd	3.91 ddd
δ(H-6a)	3.92 dd	3.38 dd	3.57 dd	3.74 dd
δ(H-6b)	4.05 dd	3.42 dd	3.65 dd	3.79 dd
δ(H-1')	5.14 d	5.29 d	4.82 d	4.80 d
δ(H-2')	4.40 dd	4.39 dd	3.60 ddd	3.63 dd
δ(H-3')	5.82 dd	5.83 dd	5.34 dd	3.51 dd
δ(H-4')	5.39 dd	5.33 dd	5.02 dd	3.27 dd
δ(H-5')	3.81 ddd	3.56 ddd	3.63 ddd	3.24 ddd
δ(H-6a')	4.34 dd	4.22 dd	3.96 dd	3.65 dd
δ(H-6b')	4.72 dd	4.81 dd	4.53 dd	3.87 dd
δ(H-1'')	5.37 d	5.30 d	4.61 d	4.69 d
δ(H-2'')	4.44 dd	4.40 dd	3.69 ddd	3.63 dd
δ(H-3'')	4.25 dd	5.84 dd	5.15 dd	3.51 dd
δ(H-4'')	3.80dd	5.35 dd	4.98 dd	3.40 dd
δ(H-5'')	3.49 dt	3.83 ddd	3.51 ddd	3.22 ddd
δ(H-6a'')	3.36-3.38 m	4.29 dd	4.05 dd	3.76 dd
δ(H-6b'')	3.36-3.38 m	4.87 dd	4.54 dd	3.82 dd
J(1,2)	3.9	3.9	3.9	3.8
J(2,3)	9.7	10.5	9.7	9.7
J(3,4)	8.6	8.6	8.7	7.3
J(4,5)	9.8	10.1	9.5	8.9
J(5,6a)	3.9	3.5	2.1	2.3
J(5,6b)	1.8	1.6	3.4	4.5
J(6a,6b)	10.5	10.9	10.8	10.9
J(1',2')	8.2	7.3	8.1	8.3
J(2',3')	10.9	11.0	10.7	10.5
J(3',4')	9.2	9.2	9.2	9.3
J(4',5')	10.0	10.0	10.0	9.8
J(5',6a')	2.1	1.5	2.2	2.1
J(5',6b')	3.6	3.1	5.0	6.1
J(6a',6b')	12.3	12.6	12.3	12.1

Tabulka 6 – pokračování:

Parametr	18	21	23	24
J(1'',2'')	8.1	8.2	8.3	8.2
J(2'',3'')	10.8	10.9	10.7	10.4
J(3'',4'')	8.2	9.3	9.2	8.7
J(4'',5'')	9.0	10.0	10.1	9.7
J(5'',6a'')	3.4	1.6	2.4	2.3
J(5'',6b'')	3.4	3.1	5.5	4.6
J(6a'',6b'')	a	12.6	12.3	11.9

a: hodnota nebyla určena;

Další NMR parametry a parametry substituentů: **18** – arom. H : 6.82-7.83 m, NHAc: 5.36 d (1H, J = 9.7), OCH₂C₆H₅: 5.01 d (1H, J = 12.0), 4.73 d (1H, J = 11.9), 4.66 d (1H, J = 11.8), 4.64 d (1H, J = 12.0), 4.50 d (1H, J = 11.8), 4.41 d, (1H, J = 11.9), 4.38 d (1H, J = 12.0), 4.38 d (1H, J = 11.8), 4.38 d (1H, J = 11.8), 4.20 d (1H, J = 12.0), OAc: 2.17 s (3H), 2.03 s (3H), 1.66 s (3H), NHAc: 1.84 s (3H); **21** - arom. H : 7.13-7.88 m, NHAc: 5.30 d (1H, J = 9.8), OCH₂C₆H₅: 4.63 d (1H, J = 11.8), 4.52 d (1H, J = 11.8), 4.48 d (1H, J = 12.0), 4.27 d (1H, J = 12.0), OAc: 2.31 s (3H), 2.30 s (3H), 2.02 s (3H), 2.01 s (3H), 1.81 s (3H), 1.79 s (3H), NHAc: 1.87 s (3H); **23** – arom. H : 7.23-7.48 m, NHAc: 6.40 bd (1H, J = 8.3), 2-NHAc: 5.93 bd (1H, J = 9.2), 2''-NHAc: 5.55 bd (1H, J = 8.9), OCH₂C₆H₅: 4.75 d (1H, J = 12.0), 4.68 d (1H, J = 11.8), 4.52 d, (1H, J = 12.0), 4.46 d (1H, J = 11.8), OAc: 2.14 s (3H), 2.07 s (3H), 2.03 s (3H), 2.00 s (3x3H), NHAc: 1.98 s (3H), 1.93 s (3H), 1.84 s (3H); **24** – arom. H : 7.25-7.41 m, OCH₂C₆H₅: 4.68 d (1H, J = 12.1), 4.64 d (1H, J = 11.8), 4.60 d, (1H, J = 11.8), 4.49 d (1H, J = 12.1), NHAc: 1.98 s (3H), 1.97 s (2x3H).

Tabulka 7:

¹³C NMR parametry látek **18**, **21**, **23** – **24**^a

Parametr	18	21	23	24
δ(C-1)	95.98	96.51	96.60	96.97
δ(C-2)	52.24	52.43	52.64	54.36
δ(C-3)	75.66	75.75	73.64	74.75
δ(C-4)	73.23	72.85	73.39	74.10
δ(C-5)	70.86	70.34	70.58	73.02
δ(C-6)	68.31	68.00	67.74	70.03
δ(C-1')	97.83	98.01	98.81	99.64
δ(C-2')	54.79	54.37	54.78	57.81
δ(C-3')	71.09	70.64	71.58	75.68
δ(C-4')	68.76	68.26	68.93	72.20
δ(C-5')	72.62	71.85	72.45	78.04
δ(C-6')	61.95	61.28	61.83	62.67
δ(C-1'')	97.00	96.95	98.43	100.68
δ(C-2'')	56.32	54.66	55.01	57.92
δ(C-3'')	79.63	70.94	71.90	75.68
δ(C-4'')	79.61	68.43	68.89	71.74
δ(C-5'')	71.70	71.74	72.16	77.77
δ(C-6'')	68.96	61.52	61.91	62.04

^a signály aromatických uhlíků nebyly přiřazeny;

Další ¹³C NMR signály substituentů: **18** - OCH₂C₆H₅: 75.11 t, 74.92 t, 74.49 t, 72.76 t, 69.45 t, NHAc: 170.02 s, 23.29 q, OAc: 171.33 s, 169.81 s, 169.38 s, 21.03 q, 20.69 q, 20.29 q; **21** - OCH₂C₆H₅: 72.64 t, 69.66 t, NHAc: 169.88 s, 23.35 q, OAc: 171.54 s, 171.47 s, 169.88 s, 169.81 s, 169.46 s, 164.41 s, 20.95 q, 20.95 q, 20.64 q, 20.63 q, 20.42 q, 20.40 q; **23** - OCH₂C₆H₅: 73.44 t, 69.90 t, NHAc: 170.16 s, 169.54 s, 169.45 s, 23.53 q, 23.31 q, 23.23 q, OAc: 171.22 s, 171.14 s, 170.91 s, 170.55 s, 170.51 s, 170.47 s, 20.84 q, 20.75 q, 20.67 q, 20.64 q, 20.64 q, 20.62 q; **24** - OCH₂C₆H₅: 74.35 t, 70.63 t, NHAc: 173.91 s, 173.78 s, 173.55 s, 23.42 q, 23.27 q, 22.82 q.

Tabulka 8:

¹H NMR parametry látek **43-45, 56-59**

Parametr	43	44	45	56	56a	56b	56c
δ(H-1)	4.88 d	5.04 d	4.96 d	5.47 d	5.13 d	5.83 d	5.25 d
δ(H-2)	4.39 ddd	4.43 ddd	4.51 dddt	4.61 t	4.30 t	3.80 t	4.78 t
δ(H-3)	3.72 dd	3.59 dd	3.52 dd	5.84 dd	4.25 ddd	4.92 bd	4.34 dd
δ(H-4)	4.68 t	5.51 dd	4.10 dt	5.52 dd	3.85 dd	4.10 bd	4.10 dd
δ(H-5)	3.97 ddd	4.10 dt	3.97 dt	4.12 dt	3.51 – 3.59 m	3.80 t	3.79 dt
δ(H-6a)	3.70 dd	3.48 dd	3.71 dd	4.17 dd	3.51 – 3.59 m	3.60 dd	3.64 dd
δ(H-6b)	3.78 dd	3.52 dd	3.79 dd	4.22 dd	3.51 – 3.59 m	3.64 dd	3.68 dd
J(1,2)	3.8	3.8	3.8	10.5	10.0	8.5	10.6
J(2,3)	10.6	11.0	10.7	11.0	10.1	9.0	10.7
J(3,4)	9.5	3.2	3.1	3.4	3.0	2.6	2.9
J(4,5)	9.7	1.5	0.7	1.2	a	0	1.1
J(5,6a)	5.1	6.3	6.1	6.5	a	5.7	6.5
J(5,6b)	2.4	6.2	5.9	6.6	a	7.2	6.6
J(6a,6b)	11.0	9.6	9.9	11.1	a	9.3	10.3

a: hodnota není určena; další ¹H NMR parametry a parametry substituentů: **43** - OSO₂CH₃: 3.06 s (3H), OCH₂CH=CH₂: 4.13 ddt (1H, J = 1.5, 1.5, 5.8, 12.0), 4.17 ddt (1H, J = 1.4, 1.4, 5.8, 12.0), 5.85 ddt (1H, J = 5.8, 5.8, 10.4, 17.2), 5.17 dq (1H, J = 3 x 1.3, 10.4), 5.25 dq (1H, J = 3 x 1.6, 17.2), -CH₂C₆H₅: 4.57 d (1H, J = 11.8) + 4.64 d (1H, J = 11.8), 4.47 d (1H, J = 11.7) + 4.73 d (1H, J = 11.7), NH: 5.58 bd (1H, J = 9.8), NAc: 1.95 s (3H), arom. H: 7.25 – 7.40 m, **44** - OCH₂CH=CH₂: 4.84 ddt (1H, J = 1.3, 1.3, 6.2, 13.0), 4.16 ddt (1H, J = 1.6, 1.6, 4.9, 13.0), 5.79 dddd (1H, J = 4.9, 6.2, 10.4, 17.2), 5.14 ddt (1H, J = 1.3, 1.3, 1.7, 10.4), 5.23 dq (1H, J = 3 x 1.7, 17.2), -CH₂C₆H₅: 4.71 d (1H, J = 11.7) + 4.48 d (1H, J = 11.7), 4.56 d (1H, J = 11.8) + 4.46 d (1H, J = 11.8), NH: 5.47 bd (1H, J = 9.0), NAc: 1.95 s (3H), OAc: 2.08 s (3H), arom. H: 7.26 – 7.39 m, **45** - OCH₂CH=CH₂: 3.96 ddt (1H, J = 1.5, 1.5, 5.9, 12.9), 4.16 ddt (1H, J = 1.5, 1.5, 5.3, 12.9), 5.85 dddd (1H, J = 5.3, 5.9, 10.4, 17.2), 5.18 dq (1H, J = 3 x 1.3, 10.4), 5.26 dq (1H, J = 3 x 1.6, 17.2), -CH₂C₆H₅: 4.47 d (1H, J = 11.7) + 4.72 d (1H, J = 11.7), 4.59 d (1H, J = 11.9) + 4.62 d (1H, J = 11.9), NH: 5.52 bd (1H, J = 9.6), NAc: 1.95 s (3H), arom. H: 7.27 – 7.38 m, **56** - SCH₂CH₃: 2.66 dq (1H, J = 3 x 7.5, 12.7), 2.47 dq (1H, J = 3 x 3.5, 12.7), 1.23 t (3H, J = 7.5), arom. H: 7.72 – 7.77 m, 7.84 – 7.89 m, OAc: 1.85 s (3H), 2.06 s (3H), 2.20 s (3H), **56a** - SCH₂CH₃: 2.52 dq (1H, J = 3 x 7.4, 12.7), 2.63 dq (1H, J = 3 x 7.4, 12.7), 1.09 t (3H, J = 7.4), arom. H: 7.85 – 7.94 m, (3 - OH): 5.29 d (1H, J = 5.3), (4 - OH): 4.75 d (1H, J = 4.2), (6 - OH): 4.64 m (1H), **56b** - SCH₂CH₃: 2.69 m, 2.55 m, 1.25 t (3H, J = 7.4), -CH₂C₆H₅: 4.49 d (1H, J = 11.3), 4.80 d (1H, J = 11.3), 4.44 d (1H, J = 11.8), 4.51 d (1H, J = 11.8), 4.84 s (2H), 5.20 bs (2H), -NCH₂C₆H₅: 4.42 bd (1H, J = 12.7), 4.52 bd (1H, J = 12.7), arom. H: 7.06 – 7.47 m, **56c** - SCH₂CH₃: 2.60 dq (1H, J = 3 x 7.5, 12.4), 2.70 dq (1H, J = 3 x 7.5, 12.4), 1.16 t (3H, J = 7.5), -CH₂C₆H₅: 4.98 d (1H, J = 11.7), 4.61 d (1H, J = 11.7), 4.45 d (1H, J = 11.7), 4.48 d (1H, J = 11.7), 4.60 d (1H, J = 12.2), 4.30 d (1H, J = 12.2), arom. H: 6.97 – 7.10 m, 7.27 – 7.40 m, 7.66 – 7.74 m, 7.83 – 7.86 m.

Tabulka 9:

Charakteristické ¹³C NMR signály monosacharidů **43-46, 51 – 59, 79**^a

Látka	Uhlík					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
43	96.65	52.14	77.83	77.91	69.69	68.37
44	97.26	48.97	74.00	66.47	68.39	68.52
45	97.36	48.15	76.36	66.09	69.23	69.50
46	97.54	49.14	77.44	70.02	72.73	69.50
51	97.12	48.82	73.72	66.24	68.35	68.24
54	97.42	52.95	72.72	65.86	72.29	68.02
55	97.18	25.31	74.60	65.46	73.25	69.06
56	81.71	50.16	68.76	66.97	74.54	61.66
56a	80.66	52.88	68.51	67.71	79.84	60.59
56b	82.44	58.91	79.63	73.29	77.35	68.98
56c	81.13	51.49	77.21	71.84	77.17	68.46
79	93.20	54.61	72.76	65.86	72.45	68.06

^a signály aromatických uhlíků nebyly přiřazeny

Další ¹³C NMR signály substituentů: **43** – OSO₂CH₃: 38.74 q, OCH₂C₆H₅: 73.62 t, 69.87 t, OCH₂CH=CH₂: 72.49 t, 133.99 d, 117.76 t, NAc: 23.34 q, 169.50 s, arom. C: 137.96 s, 136.63 s, 128.67 d (2C), 128.36 d, 128.29 d (4C), 127.79 d (2C), 127.59 d, **44** – OCH₂C₆H₅: 69.97 t, 73.66 t, OCH₂CH=CH₂: 69.97 t, 134.36 d, 117.23 t, NAc: 23.33 q, 169.87 s, OAc: 20.83 q, 170.36 s, arom. C: 137.73 s + 137.15 s, 128.56 d, 128.12 d, 128.15 d, 128.13 d, 128.87 d, 127.78 d, **45** – OCH₂CH=CH₂: 70.20 t, 134.33 d, 117.52 t, OCH₂C₆H₅: 69.74 t, 73.68 t, NAc: 23.41 q + 169.79 s, arom. C: 138.10 s + 137.27 s, 128.55 d + 128.39 d, 128.18 d + 128.09 d, 127.70 d + 127.69 d, **46** – OCH₂C₆H₅: 74.41 t, 69.80 t, 73.58 t, OCH₂CH=CH₂: 70.50 t, 134.54 d, 117.03 t, NAc: 23.47 q, 169.74 s, arom. C: 138.66 s, 138.02 s, 137.54 s, **51** – OCH₂C₆H₅: 70.70 t, 69.75 t, 73.64 t, NAc: 23.33 q, 170.47 s, OAc: 20.89 q, 169.76 s, arom. C: 137.06 s, 137.64 s, 137.93 s, 128.51 d (2C), 128.43 d, 128.37 d, 127.96 d (2C), 127.91 d, 127.89 d, 128.05 d, 127.81 d, 127.78 d, **54** – OCH₂C₆H₅: 70.83 t, 73.66 t, 71.00 t, OAc: 20.94 q, 170.50 s, arom. C: 167.80 s + 167.063 s, 137.63 s + 137.39 s + 136.96 s + 133.79 + 133.59 + 123.01 + 123.32, 128.48 d, 128.11 d, 128.07 d, 128.00 d, 127.098 d, 127.075 d, 127.062 d, 127.56 d, 127.52 d, **55** – OCH₂C₆H₅: 70.44 t, 73.66 t, 71.18 t, arom. C: 167.99 s + 167.75 s, 137.94 s + 137.13 s + 137.10, 133.81 + 133.60, 123.36 + 123.00, 128.44 d, 128.22 d, 128.06 d, 127.86 d, 127.79 d, 127.77 d, 127.76 d, 127.58 d, 127.46 d, **56** – SCH₂CH₃: 24.58 t, 14.93 q, OAc: 20.49 q + 169.71 s, 20.65 q + 170.26 s, 20.70 q + 170.37 s, arom. C: 167 s + 167.93 s, 134.35 d + 134.26 d, 131.56 s + 131.28 s, 123.71 d + 123.59 d, **57** – SCH₂CH₃: 23.16 t, 14.91 q, arom. C: 168.03 s, 167.75 s, 134.65 d, 134.54 d, 131.44 s, 131.05 s, 123.25 d, 122.93 d, **58** – SCH₂CH₃: 24.76 t, 15.05 q, -CH₂C₅H₆: 74.47 t, 73.50 t, 71.45 t, 66.75 t, 56.92 t, arom. C: 164.97 s, 172.28 s, 130.17 d, 132.70 s, 135.68 s, 135.93 s,

Tabulka 9 – pokračování: 138.08 s, 138.95 s, 127.20 d (2C), 127.61 d (4C), 127.69 d (2C), 127.79 d, 127.83 d (2C), 128.00 d, 128.05 d (2C), 128.10 d, 128.16 d (2C), 128.21 d (4C), 128.38 d (4C), 128.53 d (2C), **59** – SCH₂CH₃: 23.71 t, 14.80 q, -CH₂C₆H₅: 74.40 t, 73.46 t, 71.18 t, arom. C: 167.75 s, 168.31 s, 123.11 d, 123.51 d, 133.76 s, 133.91 s, 131.58 s, 131.68 s, 137.53 s, 1317.75 s, 138.57 s, 127.48 d, 127.54 d, 127.62 d (2C), 127.82 d, 127.96 d (2C), 128.05 d (2C), 128.17 d (2C), 128.18 d (2C), 128.43 d (2C), **79** – OCH₂C₆H₅: 73.63 t, 71.13 t, OAc: 20.88 q, 170.42 s, arom. C: 168.20 s, 137.46 s, 137.30 s, 133.93 s, 131.60 s, 123.44 d, 123.18 d, 128.47 d, 128.13 d, 128.03 d, 128.02 d, 127.89 d, 127.61 d.

Tabulka 10:

¹H NMR parametry látek **46, 51, 54, 55, 79**

Parametr	46	51	54	55	79
δ(H-1)	5.01 d	5.05 d	5.12 d	5.10 d	5.33 t
δ(H-2)	4.69 ddd	4.44 ddd	4.43 dd	4.49 dd	4.32 dd
δ(H-3)	3.58 dd	3.60 dd	4.23 dd	4.24 dd	3.39 dd
δ(H-4)	3.93 – 3.96 m	5.63 dd	5.66 dd	4.16 dd	5.64 bd
δ(H-5)	3.93 – 3.96 m	4.09 dt	3.92 bt	3.98 dt	3.97 dt
δ(H-6a)	3.53 dd	3.48 – 3.53 m	3.61 dd	3.82 dd	3.55 dd
δ(H-6b)	3.62 dd	3.48 – 3.53 m	3.67 dd	3.90 dd	3.63 dd
J(1,2)	3.7	3.7	8.6	8.6	8.2
J(2,3)	11.0	11.0	11.0	10.8	11.0
J(3,4)	2.5	3.2	3.4	3.4	3.3
J(4,5)	a	1.3	1.2	1.1	1.2
J(5,6a)	5.7	6.4	5.9	5.9	6.4
J(5,6b)	7.2	6.4	5.9	5.9	6.3
J(6a,6b)	9.3	a	9.5	9.7	9.5

a: hodnota není určena;

Další ¹H NMR parametry a parametry substituentů: **46** – OCH₂CH=CH₂: 3.93 ddt (1H, J = 1.5, 1.5, 5.7, 13.0), 4.15 ddt (1H, J = 1.6, 1.6, 5.1, 13.0), 5.86 dddd (1H, J = 5.1, 5.7, 10.4, 17.2), 5.17 dg (1H, J = 3 x 1.4, 10.4), 5.28 dq (1H, J = 3 x 1.7, 17.2), -CH₂C₆H₅: 4.93 d (1H, J = 11.6) + 4.56 d (1H, J = 11.6), 4.68 d (1H, J = 11.5) + 4.46 d (1H, J = 11.5), 4.48 d (1H, J = 11.9) + 4.42 d (1H, J = 11.9), NH: 5.50 bd (1H, J = 9.0), NAc: 1.95 s (3H), arom. H: 7.22 – 7.37 m, **51** – CH₂C₆H₅: 4.33 d (1H, J = 12.3) + 4.72 d (1H, J = 12.2), 4.45 d (1H, J = 11.8) + 4.67 d (1H, J = 11.8), 4.47 d (1H, J = 11.9) + 4.57 d (1H, J = 11.9), NH: 5.24 bd (1H, J = 9.0), NAc: 1.88 s (3H), OAc: 2.09 s (3H), arom. H: 7.22 – 7.39 m, **54** – CH₂C₆H₅: 4.82 d (1H, J = 12.4) + 4.49 d (1H, J = 12.4), 4.62 d (1H, J = 11.9) + 4.52 d (1H, J = 11.9), 4.58 d (1H, J = 12.4) + 4.23 d (1H, J = 12.4), OAc: 2.15 s (3H),

Tabulka 10 – pokračování: arom. H: 6.87 – 7.08 m, 7.30 – 7.39 m, **55** – CH₂C₆H₅: 4.82 d (1H, J = 12.3) + 4.49 d (1H, J = 12.3), 4.64 s (2H), 4.62 d (1H, J = 12.3) + 4.31 d (1H, J = 12.3), arom. H: 6.93 – 7.10 m, 7.30 – 7.40 m, **79** – CH₂C₆H₅: 4.60 d (1H, J = 12.0) + 4.48 d (1H, J = 12.0), 4.60 d (1H, J = 12.1) + 4.25 d (1H, J = 12.1), OAc: 2.05 s (3H), 1(OH): 3.45 bd (1H, J = 8.0), arom. H: 6.93 – 7.07 m, 7.28 – 7.38 m, 7.63 – 7.74 m, 7.80 – 7.85 m.

Tabulka 11:

¹H NMR parametry látek **57, 59, 61, 62, 64, 66 a 67**

Parametr	57	59	61	62	64	66	67
δ(H-1)	4.89 d	4.78 d	4.90 d	4.73 d	4.80 d	4.90 d	4.81 d
δ(H-2)	3.89 ddd	3.86 ddd	4.68 ddd	4.06 ddd	4.50 ddd	4.64 ddd	4.49 ddd
δ(H-3)	3.31 dd	3.69 ddd	5.20 dd	3.86 bddd	3.85 dd	3.91 dd	4.09 dd
δ(H-4)	3.97 dd	3.99 dd	4.12 m	3.96 dd	3.97 dd	3.95 dd	4.07 dd
δ(H-5)	3.92 bdd	3.94 bdd	4.09 – 4.11 m	3.94 ddd	3.92 dt	3.97 dt	4.05 dddd
δ(H-6a)	3.63 dd	3.71 dd	3.65 dd	3.52 dd	3.44 dd	3.46 dd	3.44 dd
δ(H-6b)	3.78 dd	3.78 dd	3.70 dd	3.72 dd	3.51 dd	3.54 dd	3.52 dd
δ(H-1')	5.30 d	5.58 d	5.11 d	4.61 d	5.44 d	5.03 d	4.66 d
δ(H-2')	4.58 dd	4.58 dd	3.54 ddd	3.59 ddd	4.57 dd	3.65 ddd	3.84 dd
δ(H-3')	5.98 dd	5.80 dd	5.79 dd	3.42 dd	5.75 dd	5.35 dd	3.76 dd
δ(H-4')	5.47 dd	5.45 dd	5.38 dd	3.63 dd	5.49 dd	5.35 dd	3.86 dd
δ(H-5')	4.03 ddd	4.01 dt	3.90 ddd	3.32 ddd	4.09 dt	3.92 dt	3.53 ddd
δ(H-6a')	4.07 dd	4.06 dd	3.98 dd	3.45 dd	4.19 dd	4.13 dd	3.78 dd
δ(H-6b')	4.09 dd	4.16 dd	4.07 dd	3.58 dd	4.21 dd	4.17 dd	3.83 dd
J(1,2)	3.7	4.0	3.7	3.6	3.9	3.9	3.8
J(2,3)	11.2	10.7	11.1	11.2	11.0	10.7	11.0
J(3,4)	2.7	3.1	2.5	2.9	2.8	2.9	2.9
J(4,5)	1.1	0.5	-	1.2	1.2	1.2	1.4
J(5,6a)	6.3	4.8	6.7	6.8	6.1	6.3	5.5
J(5,6b)	5.5	7.1	5.0	4.3	6.1	6.2	6.7
J(6a,6b)	10.0	10.4	10.4	10.6	9.6	9.5	9.8
J(1',2')	8.5	8.2	8.1	8.4	8.3	8.2	8.2
J(2',3')	11.6	11.4	11.3	10.4	11.5	11.8	10.8
J(3',4')	3.5	3.4	3.4	3.1	3.4	3.4	3.3
J(4',5')	1.1	1.1	1.2	1.0	1.3	1.2	1.1
J(5',6a')	7.1	6.4	6.4	6.6	6.6	6.9	5.0
J(5',6b')	5.9	6.6	6.7	6.0	6.9	6.8	6.9
J(6a',6b')	10.6	10.7	11.1	10.6	11.1	11.2	11.3

Tabulka 11 – pokračování: Další ^1H NMR parametry a parametry substituentů: **57** – $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$: 3.93 ddt (1H, J = 1.4, 1.4, 6.4, 13.4), 3.59 ddt (1H, J = 1.3, 1.3, 5.3, 13.4), $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$: 5.57 dddd (1H, 5.3, 6.4, 10.3, 17.1), $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$: 5.05 dq (1H, J = 3 x 1.5, 17.1), 5.10 ddt (1H, J = 1.1, 1.1, 1.7, 10.3), OAc: 2.19 s, 2.01 s, 1.85 s (all 3H), NAc: 1.58 s, NH: 4.90 bd (1H, J = 8.5), $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 4.61 d (1H, J = 11.9), 4.38 d (1H, J = 11.9), 4.57 s, arom. H: 7.19 – 7.37 m, **59** – NH: 5.58 bd (1H, J = 7.9), $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 4.70 d (1H, J = 11.8) + 4.42 d (1H, J = 11.8), 4.62 d (1H, J = 11.8) + 4.56 d (1H, J = 11.8), NAc: 1.74 s (3H), OAc: 1.84 s, 2.02 s, 2.20 s, (all 3H), Phth: 7.95 – 7.72 m (2H), 7.82 – 7.87 m (2H), arom. H: 7.23 – 7.38 m (10H), **61** – NH: 5.61 bd (1H, J = 10.1), NH': 5.90 bd (1H, J = 7.4), OAc: 1.89 s, 1.99 s, 1.99 s, 2.01 s, 2.11 s, 2.13 s (all 3H), $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 4.50 d (1H, J = 11.7), 4.77 d (1H, J = 11.7), 4.55 d (1H, J = 12.0), 4.58 d (1H, J = 12.0), arom. H: 7.24 – 7.39 m, **62** – $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 4.64 d (1H, J = 12.5) + 4.44 d (1H, J = 12.5), 4.52 d (1H, J = 12.1) + 4.49 d (1H, J = 12.1) arom. H: 7.25 – 7.37 m, NH: 7.73 bd (1H, J = 8.6), NH': 7.84 bd (1H, J = 6.3), NAc: 1.82 s (3H), 1.84 s (3H), (3-OH): 5.11 bd (1H, J = 5.9). **64** – NH: 5.31 bd (1H, J = 9.5), NAc: 1.82 s (3H), OAc: 1.45 s, 1.98 s, 2.17 s (3H), $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 4.65 d (1H, J = 11.7), 4.98 d (1H, J = 11.7), 4.38 d (1H, J = 11.6), 4.64 d (1H, J = 11.6), 4.37 d (1H, J = 11.9), 4.45 d (1H, J = 11.9), arom. H: 7.24 – 7.43 m, **66** – $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ - 4.93 d (1H, J = 11.7), 4.64 d (1H, J = 11.7), 4.70 d (1H, J = 11.7), 4.45 d (1H, J = 11.7), 4.46 d (1H, J = 11.8), 4.36 d (1H, J = 11.8), OAc: 1.93 s, 1.95 s, 1.97 s, 1.98 s, 2.13 s (all 3H), NH: 5.80 bd (1H, J = 9.2), NH': 5.85 bd (1H, J = 7.8), arom. H: 7.24 – 7.41 m, **67** – NAc: 1.94 s (3H), 1.98 s (3H), $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ - 4.99 d (1H, J = 11.7), 4.61 d (1H, J = 11.7), 4.69 d (1H, J = 12.2), 4.48 d (1H, J = 12.2), 4.48 d (1H, J = 12.1), 4.40 d (1H, J = 12.1), arom. H: 7.21 – 7.40 m.

Tabulka 12:

Charakteristické ^{13}C NMR signály látek **57**, **59**, **61**, **62**, **64**, **67** a **67**^a

Uhlík	Látka						
	57	59	61	62	64	66	67
1	96.80	95.90	96.90	96.34	97.15	97.07	98.58
2	48.81	50.82	47.88	49.78	48.67	49.33	51.25
3	75.77	71.78	71.16	67.54	78.14	77.06	77.49
4	75.16	76.62	73.68	76.99	75.54	75.45	78.21
5	69.64	69.52	70.18	69.40	70.05	69.90	71.68
6	69.78	70.03	69.66	70.06	69.40	69.15	71.34
1'	99.73	99.70	99.37	102.01	99.71	100.39	103.81
2'	51.14	51.40	53.15	54.17	51.55	52.81	55.73
3'	67.60	68.10	68.67	73.23	67.79	69.31	72.72
4'	66.49	66.68	66.90	67.06	66.68	66.79	70.22
5'	70.31	70.60	70.37	75.32	70.83	70.68	77.41
6'	69.61	61.47	61.41	60.13	61.25	61.23	63.27

^a signály aromatických uhlíků nebyly přiřazeny;

Další ¹³C NMR signály substituentů: **57** – CH₂CH=CH₂: 71.13 t, –CH₂CH=CH₂: 134.69 d, –CH₂CH=CH₂: 117.82 t, OCH₂C₆H₅: 69.61 t, 73.43 t, OAc: 22.88 q, 20.72 q, 20.63 q, 20.54 q, NAc: 168.28 s, 169.82 s, NH: 170.32 s, 170.37 s, arom. C: 134.69 s, 138.42 s, 127.43 d, 127.54 d (2C), 127.87 d, 128.03 d (2C), 128.39 (4C), **59** – OCH₂C₆H₅: 69.19 t, 73.39 t, OAc: 20.51 q, 20.67 q, 20.75 q, 169.79 s, 170.34 s, 170.34 s, NAc: 22.91 q, 171.74 s, Phth: 167.00, 123.68 d, 133.77 d, 133.93 d, 131.73 d, 131.47 d, arom. C: 138.32 s, 136.85, 128.59 d (2C), 128.41 d (2C), 128.14 d (3C), 127.60 d, 127.45 d (2C), **61** – OCH₂C₆H₅: 69.63 t, 73.41 t, OAc: 23.37 q, 23.48 q, 20.64 q, 20.76 q, , 20.61 q, 20.61 q, arom. C: 138.24 s, 136.80 s, 128.60 d (2C), 128.38 d (2C), 128.25 d, 128.19 d, 127.61 d, 127.46 d, **62** – NAc: 22.55 q + 169.56 s, 22.59 q + 171.96 s, OCH₂C₆H₅: 68.13 t, 72.16 t arom. C: 128.16 d (2C), 128.13 d (2C), 127.48 d (2C), 127.41 d, 127.29 d (2C), 127.25 d, **64** – NAc: 20.43 q + 170.35 s, OAc: 22.78 q + 170.20 s, 20.54 q + 169.77 s, 20.66 q + 169.16 s, OCH₂C₆H₅: 74.36 t, 69.71 t, 73.41 t, arom. C: 138.75 s, 138.10 s, 137.18 s, 134.31 d, 133.98 d, 131.61 s, 123.96 d, 123.18 d, 128.71 d (2C), 128.57 d (2C), 128.35 d (2C), 128.16 d, 128.13 d (2C), 127.67 d (2C), 127.64 d, 127.54 d, **66** – OAc: 23.70 q + 171.08 s, 23.47 q + 170.42 s, 20.70 q + 170.19 s, 20.63 q + 170.15 s, 20.58 q + 170.11 s, OCH₂C₆H₅: 74.60 t, 69.72 t, 73.43 t, arom. C: 138.70 s, 137.95 s, 136.99 s, 128.64 d (2C), 128.41 d (2C), 128.37 d (3C), 128.26 d, 128.16 d (2C), 127.70 d(2C), 127.56 d, **67** – NAc: 23.51 q, 173.66 s, 23.78 q, 174.48 s, OCH₂C₆H₅: 76.28 t, 70.94 t, 74.85 t, arom. C: 139.42 s, 104.03 s, 140.92 s, 128.96 d, 129.21 d, 129.41 d (2C), 129.50 d, 129.61 d (2C), 129.88 d (2C), 129.93 d (2C), 130.01 d, 130.34 d (2C).

Tabulka 13:

¹H NMR parametry látek 32 – 40

Parametr	32	34	35	37	39	40
δ(H-1)	4.33 d	4.84 d	4.84 d	4.57 d	4.85 d	4.90 d
δ(H-2)	3.80 ddd	4.21 ddd	3.93 dd	3.083 ddd	4.21 ddd	3.84 – 3.86 m
δ(H-3)	3.42 dd	3.89 dd	3.87 dd	3.65 ddd	5.21 dd	3.84 – 3.86 m
δ(H-4)	3.14 dd	5.00 dd	3.52 dd	3.31 dd	5.13 t	3.57 dd
δ(H-5)	3.65 ddd	3.82 dt	3.86 ddd	3.59 ddd	3.79 ddd	3.84 ddd
δ(H-6a)	3.75 dd	3.33 dd	3.79 dd	3.21 dd	3.74 dd	3.63 dd
δ(H-6b)	4.22 dd	4.10 dd	4.12 dd	3.51 dd	3.94 dd	3.99 dd
δ(H-1')	5.29 d	4.61 d	4.53 d	5.11 d	4.73 d	4.51 d
δ(H-2')	4.19 dd	3.61 ddd	3.67 dd	4.17 dd	3.95 ddd	3.68 dd
δ(H-3')	5.64 dd	5.15 dd	3.56 dd	5.72 dd	5.21 t	3.54 dd
δ(H-4')	5.06 dd	5.09 t	3.43 – 3.47 m	5.10 dd	3.83 – 3.87 m	3.55 – 3.57 m
δ(H-5')	3.86 ddd	3.65 ddd	3.43 – 3.47 m	4.02 ddd	3.83 – 3.87 m	3.55 – 3.57 m
δ(H-6a')	3.14 dd	4.14 dd	3.75 dd	4.21 dd	4.21 dd	3.76 dd
δ(H-6b')	4.15 dd	4.23 dd	3.91 dd	4.26 dd	4.34 dd	3.86 dd
δ(H-1'')	5.40 d	4.36 d	4.54 d	5.39 d	4.80 d	4.54 d
δ(H-2'')	4.37 dd	4.11 dt	3.74 dd	4.26 dd	3.77 ddd	3.72 dd
δ(H-3'')	5.84 dd	5.15 dd	3.57 dd	5.56 dd	5.36 dd	3.55 dd
δ(H-4'')	5.17 dd	5.07 dd	3.43 – 3.47 m	5.11 dd	5.03 dd	3.55 – 3.57 m
δ(H-5'')	3.89 ddd	3.63 ddd	3.43 – 3.47 m	3.70 ddd	3.71 ddd	3.55 – 3.57 m
δ(H-6a'')	4.18 dd	4.02 dd	3.75 dd	4.10 dd	4.02 dd	3.76 dd
δ(H-6b'')	4.33 dd	4.38 dd	3.94 dd	4.29 dd	4.38 dd	3.92 dd
J(1,2)	3.9	3.9	3.2	3.7	3.8	2.8
J(2,3)	10.2	9.9	10.6	10.6	10.8	a
J(3,4)	8.4	8.9	8.4	8.3	9.5	8.9
J(4,5)	9.9	10.3	10.1	10.0	9.6	10.0
J(5,6a)	6.7	2.8	4.6	6.3	5.0	5.7
J(5,6b)	1.6	2.3	1.8	2.0	2.9	1.8
J(6a,6b)	10.7	11.2	11.5	11.2	11.5	11.3
J(1',2')	8.4	8.5	8.3	8.2	7.3	8.5
J(2',3')	10.7	10.4	10.5	10.7	10.1	10.4

Tabulka 13 – pokračování:

parametr	32	34	35	37	39	40
J(3',4')	9.1	9.4	8.8	9.0	a	8.8
J(4',5')	10.3	9.7	-	10.3	a	a
J(5',6a')	3.3	2.6	4.5	2.5	2.9	4.2
J(5',6b')	5.3	4.5	1.6	5.8	5.0	1.9
J(6a',6b')	12.3	12.2	12.2	12.4	12.3	12.4
J(1'',2'')	8.4	8.4	8.4	8.4	8.2	8.5
J(2'',3'')	10.8	10.3	10.4	10.7	10.5	10.4
J(3'',4'')	9.0	9.2	8.7	9.0	9.2	8.8
J(4'',5'')	10.2	10.0	-	10.1	10.0	a
J(5'',6a'')	2.3	2.5	4.1	2.7	2.4	4.0
J(5'',6b'')	4.4	4.1	1.6	4.6	4.2	1.5
J(6a'',6b'')	12.3	12.4	12.4	12.2	12.4	12.2

a: hodnota není určena;

Další ¹H NMR parametry a parametry substituentů: **32** – CH₂C₆H₅: 3.91 d (1H, J = 11.5), 4.33 d (1H, J = 11.5), NH: 5.18 bd (1H, J = 9.8), OAc: 1.31 s, 1.82 s, 1.86 s, 2.03 s, 2.03 s, 2.11 s, 2.11 s, arom. H: 7.13 – 7.15 m, 7.29 – 7.35 m, 7.70 – 7.92 m, **34** – NH': 5.80 bd (1H, J = 9.2), NH'': 6.20 bd (1H, J = 7.5), NH''': 6.20 bd (1H, J = 8.9), -CH₂C₆H₅: 4.47 d (1H, J = 11.6) + 4.70 d (1H, J = 11.6), OAc: 1.99 s, 1.99 s, 2.01 s, 2.03 s, 2.04 s, 2.08 s, 2.08 s (all 3H), NAc: 1.94 s, 1.95 s, 1.97 s (all 3H), arom. H: 7.33 – 7.43 m, **35** – NAc: 1.98 s, 1.99 s, 2.04 s (all 3H), -CH₂C₆H₅: 4.53 d (1H, J = 11.6), 4.72 d (1H, J = 11.6), arom. H: 7.39 – 7.48 m, **37** – CH₂C₆H₅: 4.07 d (1H, J = 11.8) + 4.40 d (1H, J = 11.8), arom. H: 7.15 – 7.32 m, 7.67 – 7.70 m, 7.77 – 7.91 m, OAc: 1.85 s, 1.191 s, 2.05 s, 2.06 s, 2.09 s, 2.15 s (all 3H), NH: 5.50 bd (1H, J = 8.8), NAc: 1.83 s, (3-OH): 3.88 d (1H, J = 1.5), **39** – NAc: 1.87 s, 1.96 s, 2.00 s, NH: 5.64 bd (1H, J = 9.5), NH': 6.02 bd (1H, J = 8.0), NH'': 6.43 bd (1H, J = 8.7), OAc: 2.00 s, 2.01 s, 2.02 s, 2.05 s, 2.07 s, 2.07 s, 2.09 s (all 3H), -CH₂C₆H₅: 4.45 d (1H, J = 12.0), 4.67 d (1H, J = 12.0), arom. H: 7.28 – 7.39 m, **40** – NAc: 1.93 s, 1.98 s, 2.05 s, -CH₂C₆H₅: 4.49 d (1H, J = 11.6) + 4.67 d (1H, J = 11.6), arom. H: 7.36 – 7.45 m.

Tabulka 14:

Charakteristické ¹³C NMR signály látek **32**, **34**, **35**, **37**, **39** a **40**^a

Uhlík	Látka					
	32	34	35	37	39	40
1	96.12	96.73	95.78	95.98	96.31	95.45
2	51.19	52.36	52.55	52.73	52.08	53.07
3	83.21	76.53	78.92	70.38	72.26	69.53
4	68.84	68.11	68.26	81.34	68.10	79.64
5	70.40	68.23	70.52	68.64	72.67	69.70
6	70.13	67.87	68.48	68.27	67.16	67.55
1'	98.42	99.23	101.80	98.65	101.40	101.09
2'	54.30	54.75	55.60	54.56	55.00	55.48
3'	70.29	73.01	73.66	70.63	71.34	73.20
4'	68.65	68.53	69.88	69.04	69.63	69.21
5'	71.69	71.93	75.79	72.07	75.88	75.81
6'	61.76	62.04	60.67	61.78	62.46	60.54
1''	99.16	102.10	101.93	98.17	100.60	101.29
2''	54.61	54.00	55.56	54.53	55.16	55.65
3''	70.60	72.93	73.19	70.47	72.32	73.20
4''	68.99	68.45	69.78	68.79	68.30	69.46
5''	71.84	71.75	75.66	71.62	71.51	75.81
6''	61.98	61.85	60.54	62.07	61.77	60.37

^a signály aromatických uhlíků nebyly přiřazeny;

Další ¹³C NMR signály substituenů: **32** – OCH₂C₆H₅: 69.08 t, OAc: 20.30 q + 169.24 s, 20.49 q + 169.39 s, 20.57 q + 169.51 s, 20.64 q + 169.99 s, 20.65 q + 170.14 s, 20.79 q + 170.55 s, 22.57 q + 170.77 s, arom. C: 169.80 s, 136.63 s, 134.28 d (2C), n 131.43 s (2C), 128.55 d (2C), 128.34 d (2C), 128.25 d, 123.57 (2C), **34** – OCH₂C₆H₅: 70.16 t, OAc: 20.61 q + 170.48 s, 20.65 q + 170.51 s, 20.66 q + 170.56 s, 20.70 q + 170.57 s, 20.73 q + 170.76 s, 20.75 q + 170.85 s, 20.80 q + 171.19 s, NAc: 23.12 q + 169.35 s, 23.12 q + 169.35 s, 23.77 q + 169.37 s, arom. C: 136.38 s, 128.59 d (2C), 128.71 d, 128.87 d (2C), **35** – NAc: 21.94 q + 170.50 s, 22.15 q + 170.63 s, 22.28 q + 171.12 s, OCH₂C₆H₅: 69.54 t, arom. C: 136.79 s, 128.72 d (2C), 128.62 d (2C), 128.40 d, **37** – OCH₂C₆H₅: 69.23 t, OAc: 20.86 q + 169.42 s, 20.70 q + 169.95 s, 20.64 q + 169.98 s, 20.61 q + 170.19 s, 20.48 q + 170.68 s, 20.36 q + 170.82 s, NAc: 23.31 q + 169.52 s, arom. C: 136.94 s, 134.76 d, 134.34 d, 131.42 s, 131.12 s, 128.47 d (2C), 127.98 d, 127.81 d (2C), 123.93 d, 168.53 s, 169.02 s, 123.48 d, **39** – NAc: 23.13 q + 171.22 s, 23.40 q + 171.06 s, 23.42 q + 170.64 s, OAc: 20.62 q + 170.59 s, 20.63 q + 170.57 s, 20.65 q + 170.53 s, 20.69 q + 170.23 s, 20.71 q + 169.82 s, 20.72 q + 169.45 s, 20.81 q + 169.32 s, OCH₂C₆H₅: 69.73 t, arom. C: 136.69 s, 128.59 d (2C), 128.22 d, 128.10 d (2C), **40** – NAc: 21.68 q + 174.09 s, 22.24 q + 174.18 s, 22.27 q + 174.45 s, arom. C: 136.73 s, 128.37 d (2C), 128.57 d (2C), 128.67 d.

Tabulka 15:

¹H NMR parametry látek **70**, **72** a **73**

Parametr	70	72	73
δ(H-1)	4.80 d	4.90 d	4.78 d
δ(H-2)	4.42 ddd	4.44 ddd	4.33 dd
δ(H-3)	3.70 dd	3.82 dd	3.95 dd
δ(H-4)	4.12 bd	4.22 dd	4.39 dd
δ(H-5)	4.00 bt	4.01 ddd	4.10 ddd
δ(H-6a)	3.70 dd	3.70 dd	3.70 dd
δ(H-6b)	3.76 dd	3.72 dd	3.81 dd
δ(H-1')	5.43 d	4.68 d	4.38 d
δ(H-2')	4.59 dd	4.06 bddd	4.08 dd
δ(H-3')	5.69 dd	5.18 dd	3.53 dd
δ(H-4')	5.44 dd	5.36 dd	3.82 dd
δ(H-5')	4.06 dt	3.90 ddd	3.46 ddd
δ(H-6a')	4.12 dd	4.09 dd	3.70 dd
δ(H-6b')	4.15 dd	4.12 dd	3.82 dd
δ(H-1'')	-	5.25 d	5.09 d
δ(H-2'')	-	4.17 bddd	4.08 dd
δ(H-3'')	-	5.27 dd	3.60 ddd
δ(H-4'')	-	5.37 dd	3.83 dd
δ(H-5'')	-	3.95 bdt	3.46 dt
δ(H-6a'')	-	4.07 dd	3.72 d
δ(H-6b'')	-	4.17 dd	3.81 dd
J(1,2)	3.9	3.8	3.8
J(2,3)	10.7	10.9	11.2
J(3,4)	3.0	2.8	2.9
J(4,5)	≠ 0	1.3	1.3
J(5,6a)	6.5	6.2	7.2
J(5,6b)	5.8	5.0	3.7
J(6a,6b)	10.0	10.5	11.0
J(1',2')	8.4	8.2	8.3
J(2',3')	11.5	11.6	10.8
J(3',4')	3.4	3.4	3.2
J(4',5')	1.3	1.1	1.1

Tabulka 15 - pokračování

Parametr	70	72	73
J(5',6a')	5.9	6.4	7.3
J(5',6b')	6.0	7.4	4.3
J(6a',6b')	11.2	11.3	11.7
J(1'',2'')	-	8.5	8.7
J(2'',3'')	-	11.3	10.8
J(3'',4'')	-	3.5	3.3
J(4'',5'')	-	1.1	1.1
J(5'',6a'')	-	6.3	6.0
J(5'',6b'')	-	7.1	6.1
J(6a'',6b'')	-	11.2	11.5

^a: hodnota není určena;

Další ¹H NMR parametry a parametry substituentů: **70** – NH: 5.22 d (1H, J = 9.6), NAc: 1.82 s (3H), OAc: 1.4 s, 1.97 s, 2.20 s (all 3H), -CH₂C₆H₅: 4.96 d (1H, J = 11.6), 4.40 d (1H, J = 11.6), 4.62 d (1H, J = 12.0), 4.55 d (1H, J = 12.0), arom. H: 7.25 – 7.37 m, 7.72 – 7.77 m, 7.80 – 7.89 m, **72** – CH₂C₆H₅: (OH-1): 4.71 d (1H, J = 11.5), 4.46 d (1H, J = 11.5), -CH₂C₆H₅ (OH – 6): 4.62 d (1H, J = 11.9), 4.59 d (1H, J = 11.9), arom. H: 7.27 – 7.38 m, OAc + NAc: 2.20 s, 2.18 s, 2.12 s, 2.01 s, 1.98 s, 1.97 s, 1.94 s, 1.93 s, 1.92 s (all 3H), NH: 6.00 bd (1H, J = 9.8), NH': 6.42 bd (1H, J = 9.2), NH'': (1H, J = 9.4), **73** – NAc: 1.95 s, NAc': 1.97 s, NAc'': 2.12 s (all 3H), -CH₂C₆H₅ (OH - 6): 4.58 s (2H), -CH₂C₆H₅ (OH -1): 4.70 d (1H, j = 11.7), 4.46 d (1H, j = 11.7), arom. H: 7.24 – 7.38 m.

Tabulka 16:

¹³C NMR signály látek **70**, **72** a **73**

Uhlík	Látka		
	70	72	73
1	96.99	97.16	97.99
2	47.59	48.11	50.14
3	78.82	76.45	77.19
4	68.51	73.87	75.71
5	69.04	69.95	71.16
6	69.53	69.99	72.07
1'	99.35	102.31	104.72
2'	51.11	50.51	53.81
3'	67.80	68.87	72.19
4'	66.53	66.63	69.57
5'	70.97	70.69	76.52
6'	61.44	61.48	62.93
1''	-	100.73	102.30
2''	-	51.24	54.04
3''	-	70.92	74.40
4''	-	66.70	70.02
5''	-	70.78	76.93
6''	-	61.11	62.56

Další ¹³C NMR signály substituenů: **70** – NAc: 22.48 q + 169.16 s, OAc: 20.69 q + 169.78 s, 20.53 q + 170.24 s, 20.44 q + 170.36 s, OCH₂C₆H₅: 69.60 t, 73.54 t, arom. C: 123.39 d, 123.92 d, 127.62 d (2C), 127.67 d, 128.22 d, 128.37 d (2C), 128.39 d (2C), 128.59 d (2C), 131.44 s, 134.19 d, 134.41 d, 136.99 s, 138.10 s, **72** – OCH₂C₆H₅ (OH – 6): 69.61 t, OCH₂C₆H₅ (OH – 1): 73.48 t, OAc + NAc: 20.77q, 20.73 q, 20.71 q, 20.58 q, 20.53 q, 20.50 q, 23.44 q, 23.34 q, 23.29 q, 170.40 s, 170.87 s, 170.87 s, 170.50 s, 170.46 s, 170.31 s, 170.18 s, 170.04 s, 169.28 s, arom. C: 138.40 s, 137.06 s, 128.60 d (2C), 128.34 d (3C), 128.21 d, 127.57 d (2C), 127.53 d (2C), **73** – NAc: 22.79 q + 174.09 s, 23.31 q + 172.74 s, 23.49 q + 172.74 s, OCH₂C₆H₅ (OH – 6): 74.34 t, OCH₂C₆H₅ (OH – 1):70.39 t, arom. C: 138.87 s, 139.93 s, 129.64 d (2C), 129.42 d (2C), 129.36 d (2C), 128.93 d, 128.78 d (2C), 128.60 d (2C).

Tabulka 17:

¹H NMR parametry látek **27**, **29** a **30**

Parametr	27	29	30
δ(H-1)	4.24 d	4.70 d	4.81 d
δ(H-2)	3.66 ddd	4.03 – 4.07 m	4.00 dd
δ(H-3)	3.59 dd	4.03 – 4.07 m	4.38 t
δ(H-4)	3.36 dd	3.64 dd	3.77 t
δ(H-5)	3.43 dd	3.93 ddd	4.17 ddd
δ(H-6a)	3.36 dd	3.73 dd	3.91 dd
δ(H-6b)	3.69 dd	4.03 dd	4.07 dd
δ(H-1')	5.22 d	4.75 d	4.71 d
δ(H-2')	4.39 dd	3.92 dd	3.59 – 3.62 m
δ(H-3')	5.82 dd	5.29 dd	3.59 – 3.62 m
δ(H-4')	5.36 dd	5.10 dd	3.44 – 3.56 m
δ(H-5')	3.79 ddd	3.80 ddd	3.44 – 3.56 m
δ(H-6a')	4.20 dd	4.15 dd	3.76 dd
δ(H-6b')	4.86 dd	4.62 dd	3.96 dd
δ(H-1'')	5.17 d	4.88 d	4.85 d
Parametr	27	29	30
δ(H-2'')	4.35 dd	3.72 dd	3.75 dd
δ(H-3'')	5.65 dd	5.40 dd	3.55 dd
δ(H-4'')	5.34 dd	5.09 dd	3.48 dd
δ(H-5'')	4.02 ddd	3.73 ddd	3.38 ddd
δ(H-6a'')	4.33 dd	4.12 dd	3.74 dd
δ(H-6b'')	5.02 dd	4.62 dd	3.76 dd
δ(H-1''')	5.35 d	4.73 d	4.55 d
δ(H-2''')	4.27 dd	3.93 dd	3.78 dd
δ(H-3''')	5.76 dd	5.23 dd	3.55 dd
δ(H-4''')	5.15 dd	5.01 dd	3.44 – 3.56 m
δ(H-5''')	3.69 ddd	3.85 ddd	3.41 ddd
δ(H-6a''')	4.18 dd	4.17 dd	3.88 dd
δ(H-6b''')	4.31 dd	4.38 dd	3.92 dd
J(1,2)	3.8	3.0	3.5
J(2,3)	10.6	a	9.2
J(3,4)	8.2	8.3	9.2

Tabulka 17 - pokračování

Parametr	27	29	30
J(4,5)	10.2	10.0	9.4
J(5,6a)	5.2	6.1	4.9
J(5,6b)	1.8	2.2	1.9
J(6a,6b)	11.3	11.0	11.6
J(1',2')	8.2	8.5	8.3
J(2',3')	10.9	10.7	a
J(3',4')	9.3	9.3	a
J(4',5')	10.0	10.0	a
J(5',6a')	1.5	2.1	4.2
J(5',6b')	3.0	3.4	2.0
J(6a',6b')	12.6	12.3	12.2
J(1'',2'')	8.2	8.3	8.4
J(2'',3'')	10.8	10.7	10.3
J(3'',4'')	9.2	9.2	9.4
J(4'',5'')	10.1	10.2	9.7
J(5'',6a'')	1.2	1.9	4.4
J(5'',6b'')	3.2	3.7	2.9
J(6a'',6b'')	12.6	12.5	12.2
J(1''',2''')	8.3	8.4	8.5
J(2''',3''')	10.7	10.4	10.5
J(3''',4''')	9.0	9.3	9.5
J(4''',5''')	10.1	10.1	9.6
J(5''',6a''')	2.7	2.4	4.2
J(5''',6b''')	4.5	4.5	2.5
J(6a''',6b''')	12.2	12.5	12.2

a: hodnota není určena;

Další ^1H NMR parametry a parametry substituentů: **27** – NH: 5.24 bd (1H, $J = 9.5$), OAc: 1.78 s, 1.79 s, 1.83 s, 1.87 s, 2.00 s, 2.06 s, 2.07 s, 2.10 s, 2.32 s, 2.32 s (vše 3H), $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 4.02 d (1H, $J = 12.0$), 4.32 d (1H, $J = 12.0$), arom. H: 7.09 – 7.12 m, 7.23 – 7.32 m, 7.59 – 7.84 m, 7.93 – 7.97 m, **29** – OAc + NAc: 1.85 s, 1.86 s, 1.95 s, 1.96 s, 1.97 s, 1.98 s, 1.98 s, 1.98 s, 1.99 s, 2.02 s, 2.08 s, 2.15 s, 2.16 s, (vše 3H), $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 4.45 d (1H, $J = 12.0$), 4.69 d (1H, $J = 12.0$), arom. H: 7.09 – 7.12 m, 7.23 – 7.32 m, 7.59 – 7.84 m, 7.93 – 7.97 m, **30** – NAc: 1.98 s, 1.99 s, 2.04 s, 2.09 s (all 3H), $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 4.68 d (1H, $J = 11.5$), 4.53 d (1H, $J = 11.5$), arom. H: 7.40 – 7.49 m.

Tabulka 18:

Charakteristické ^{13}C NMR signály látek **27**, **28** a **30** ^a

Uhlík	Látka		
	27	29	30
1	95.94	97.06	95.45
2	52.09	54.54	53.69
3	75.46	75.40	71.25
4	74.04	76.56	74.22
5	69.58	72.54	70.62
6	68.36	70.08	68.55
1'	98.04	100.94	100.26
2'	54.19	56.05	55.91
3'	70.58	74.25	73.35
4'	68.17	70.23	69.84
5'	71.69	73.11	75.87
6'	61.29	63.00	60.70
1''	97.21	100.99	97.26
2''	54.49	56.42	55.91
3''	70.92	73.84	73.84
4''	68.10	70.23	69.44
5''	71.78	73.16	75.49
6''	61.32	63.00	60.44
1'''	98.86	103.00	102.03
2'''	54.54	55.82	55.40
3'''	70.76	74.59	73.98
4'''	69.04	70.37	69.50
5'''	71.65	73.46	75.55
6'''	61.92	63.47	59.91

^a signály aromatických uhlíků nebyly přiřazeny;

Další ^{13}C NMR signály substituentů: **27** – $\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 69.20 t, OAc: 20.39 q + 169.78 s, 20.39 q + 169.72 s, 23.32 q + 169.85 s, 20.47 q + 170.18 s, 20.62 q + 169.72 s, 20.67 q + 169.51 s, 20.71 q + 169.39 s, 20.80 q + 170.73 s, 20.93 q + 171.55 s, 20.99 q + 171.59 s, arom. C: 168.29 s, 168.15 s, 167.24 s, 167.08 s, 136.70 s, 134.57 d, 134.30 d, 134.00 d, 133.87 d, 131.88 s, 131.34 s, 131.26 s, 131.15 as, 128.52 d (2C), 128.16 d, 127.99 d, 123.86 d, 123.62 d, 123.45 d, 123.19 d. **29** – $\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 70.82 t, OAc + NAc: 136.51 s, 128.48 d, 128.55 d, 128.77 d, 171.67 s, 171.22 s, 170.87 s, 170.83 s, 170. s, 170.60 s, 170.58 s, 170.56 s, 170.56 s, 170.54 s, 170.48 s, 169.44 s, 20.80 q, 20.75 q, 20.72 q, 20.79 q, 20.71 q, 20.68 q, 20.56 q, 20.62 q, 20.60 q, 20.60 q, 20.60 q, 20.56 q, 20.56q, **30** – $\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 69.80 t, NAc: 20.39 q + 169.78 s, 20.39 q + 169.72 s, 23.32 q + 169.85 s, 20.47 q + 170.18 s, 20.62 q + 169.72 s, 22.05 q + 170.13 s, 22.23 q + 170.56 s, 22.28 q + 170.63 s, 22.65 q + 171.12 s, arom. C: 136.70 s, 128.77 d (2C), 128.64 d (2C), 128.50 d.

Tabulka 19:

¹H NMR parametry látek **78**, **81**, **82**, **85** a **86**

Parametr	78	81	82	85	86
δ(H-1)	4.86 d	4.88 d	4.87 d	4.47 d	4.37 d
δ(H-2)	4.04 dd	4.05 dd	3.88 dd	3.91 dt	4.03 dt
δ(H-3)	3.96 dd.	4.00 dd	3.96 dd	3.68 dd	3.58 dd
δ(H-4)	3.92 dd	3.96 dd	3.98 dd	4.07 bd	4.06 dd
δ(H-5)	3.60 dt	3.60 dt	3.58 dt	3.54 bt	3.50 dt
δ(H-6a)	3.76 dd	3.76 dd	3.78 dd	3.71 dd	3.63 dd
δ(H-6b)	3.92 dd	3.92 dd	3.82 dd	3.82 dd	3.78 dd
δ(H-1')	5.27 d	5.27 d	5.14 d	4.70 d	4.84 d
δ(H-2')	4.54 dd	4.56 dd	4.01 dd	3.74 dd	3.58 ddd
δ(H-3')	4.41 dd	4.42 dd	4.28 dd	3.78 dd	4.23 dd
δ(H-4')	5.68 dd	4.17 bd	3.98 dd	4.03 bd	4.00 dd
δ(H-5')	3.89 ddd	3.74 dt	3.57 ddd	3.50 dt	3.50 ddd
δ(H-6a')	3.49 dd	3.65 dd	3.56 dd	3.54 dd	3.37 dd
δ(H-6b')	3.52 dd	3.84 dd	3.79	3.73 dd	4.09 dd
δ(H-1'')	-	-	5.49 d	4.80 d	4.29 d
δ(H-2'')	-	-	4.70 dd	4.13 dt	3.65 dd
δ(H-3'')	-	-	6.07 dd	4.86 dd	3.40 dd
δ(H-4'')	-	-	5.54 dd	5.28 dd	3.76 dd
δ(H-5'')	-	-	4.05 ddd	3.71 ddd	3.44 dd
δ(H-6a'')	-	-	4.11 dd	4.01 dd	3.65 dd
δ(H-6b'')	-	-	4.24 dd	4.10 dd	3.72 dd
J(1,2)	8.4	8.0	8.3	8.4	8.4
J(2,3)	10.9	11.0	10.7	10.8	10.8
J(3,4)	2.8	2.7	2.9	2.7	2.5
J(4,5)	0.9	1.1	1.1	0.9	1.0
J(5,6a)	5.9	5.9	6.0	5.8	5.3
J(5,6b)	5.9	5.6	5.9	5.8	6.6
J(6a,6b)	10.0	10.1	10.2	10.1	9.5
J(1',2')	8.5	8.4	8.4	7.9	8.4
J(2',3')	11.0	10.8	11.1	11.0	10.5
J(3',4')	3.5	3.4	3.1	2.8	3.3
J(4',5')	1.0	0.9	1.0	0.9	1.2
J(5',6a')	6.0	5.5	5.9	6.4	4.5
J(5',6b')	7.0	5.5	7.4	7.8	8.6

Tabulka 19 - pokračování

Parametr	78	81	82	85	86
J(6a',6b')	9.1	9.2	10.7	10.2	10.5
J(1'',2'')	-	-	8.4	8.5	8.6
J(2'',3'')	-	-	11.6	11.0	9.3
J(3'',4'')	-	-	3.5	3.4	3.6
J(4'',5'')	-	-	1.1	1.1	1.2
J(5'',6a'')	-	-	5.9	6.0	7.9
J(5'',6b'')	-	-	7.3	8.3	3.4
J(6a'',6b'')	-	-	10.8	11.0	10.5

Další ^1H NMR parametry a parametry substituentů: **78** – $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 4.68 d (1H, J = 12.3), 4.37 d (1H, J = 12.3), 4.60 d (1H, J = 12.4), 4.28 d (1H, J = 12.4), 4.28 d (1H, J = 12.8), 3.92 d (1H, J = 12.8), 4.58 d (1H, J = 11.9), 4.56 d (1H, J = 11.9), 4.51 d (1H, J = 12.6), 4.27 d (1H, J = 12.6), OAc: 2.18 s (3H), arom. H: 6.49 – 7.80 m, **81** – $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 4.65 d (1H, J = 12.4), 4.36 d (1H, J = 12.4), 4.63 d (1H, J = 12.4), 4.37 d (1H, J = 12.4), 4.58 d (1H, J = 11.9), 4.54 d (1H, J = 11.9), 4.55 d (1H, J = 11.9), 4.50 d (1H, J = 11.9), 4.32 d (1H, J = 12.6), 3.95 d (1H, J = 12.6), arom. H: 6.58 – 6.62 m, 6.69 – 6.74 m, 6.82 – 6.87 m, 6.92 – 7.09 m, 7.27 – 7.41 m, 7.50 – 7.72 m, **82** – OAc: 1.90 s, 2.04 s, 2.20 s (all 3H), $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 4.72 d (1H, J = 11.6), 4.69 d (1H, J = 11.6), 4.56 d (1H, J = 12.2), 4.35 d (1H, J = 12.2), 4.45 d (1H, J = 11.9), 4.39 d (1H, J = 11.9), 4.41 d (1H, J = 12.7), 4.11 d (1H, J = 12.7), 4.29 d (1H, J = 12.8), 3.89 d (1H, J = 12.8), arom. H: 6.50 – 6.60 m, 6.68 – 6.73 m, 6.80 – 7.08 m, 7.27 – 7.63 m, 7.68 – 7.72 m, 7.78 – 7.82 m, **85** – NAc: 1.90 s, 1.90 s, 1.91 s, (all 3H), NH: 5.10 bd (1H, J = 8.6), NH': 6.05 bd (1H, J = 6.3), NH'': 6.06 bd (1H, J = 8.2), OAc: 1.96 s, 1.99 s, 2.14 s (vše 3H), $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 4.83 d (1H, J = 12.3), 4.54 d (1H, J = 12.3), 4.50 s (2H), 4.57 s (2H), 4.42 d (1H, J = 11.9), 4.60 d (1H, J = 11.9), 4.42 d (1H, J = 11.9), 4.47 d (1H, J = 11.9), $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: arom. H: 7.23 – 7.41 m, **86** – NH: 6.34 bd (1H, J = 7.0), 5.10 bd (1H, J = 8.4), NAc: 1.80 s, 1.90 s, 1.94 s (3H), $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 4.84 d (1H, J = 12.3) + 4.53 d (1H, J = 12.3), 4.65 d (1H, J = 12.0) + 4.38 d (1H, J = 12.0), 4.58 d (1H, J = 10.5) + 4.54 d (1H, J = 10.5), 4.52 d (1H, J = 12.1) + 4.51 d (1H, J = 12.1), 4.49 d (1H, J = 12.2) + 4.47 d (1H, J = 12.2), arom. H: 7.24 – 7.39 m.

Tabulka 20:

Charakteristické ^{13}C NMR signály látek **78**, **81**, **82**, **85** a **86**^a

Uhlík	Látky				
	78	81	82	85	86
1	96.80	96.91	96.86	99.30	99.35
2	52.09	52.01	51.74	52.87	52.39
3	74.89	75.16	75.14	78.43	78.06
4	74.59	73.64	73.74	72.22	72.50
5	73.45	73.79	73.63	73.72	71.36
6	69.61	69.85	69.60	69.52	68.89
1'	99.92	99.64	98.67	101.10	100.63
2'	52.79	52.39	52.55	50.82	54.73
3'	72.42	74.60	74.93	79.82	78.69
4'	69.58	65.24	71.52	72.94	75.44
5'	71.50	72.74	73.04	73.60	73.33
6'	67.96	69.01	69.69	69.26	67.57
1''	-	-	99.57	101.61	102.76
2''	-	-	51.18	53.48	56.08
3''	-	-	67.63	71.53	75.21
4''	-	-	66.59	66.69	67.76
5''	-	-	70.37	70.74	75.29
6''	-	-	61.32	61.28	62.34

^a signály aromatických uhlíků nebyly přiřazeny;

Další ^{13}C NMR signály substituentů: **78** - $\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 69.90 t, 70.84 t, 71.47 t, 73.38 t, 73.61 t, OAc: 21.14 q + 170.75 s, arom. C: 168.87 s, 137.70 s, 138.49 s, 137.68 s, 137.61 s, 137.52 s, 137.29 s, 133.17 s, 132.96 s, 132.83 s, 132.16 s, 124.83 d, 122.91 d, 122.59 d, 122.08 d, 128.59 d (2C), 128.48 d (2C), 128.11 d (4C), 127.99 d (4C), 127.96 d (2C), 127.89 d, 127.84 d, 127.69 d, 127.67 d (4C), 127.61 d (2C), 127.50 d (2C), **81** - $\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 71.20 t, 69.53 t, 73.41 t, 73.79 t, 71.53 t, arom. C: 166.26 s, 167.72 s, 138.63 s, 138.01 s, 137.64 s, 137.46 s, 137.44 s, 133.33 s, 133.02 s, 132.83 s, 132.17 s, 124.71 d, 122.87 d, 122.59 d, 122.19 d, 126.26 d, 127.32 d, 127.55 d, 127.63 d (2C), 127.71 d (2C), 127.73 d, 127.77 d (2C), 127.81 d, 127.85 d (2C), 127.86 d (2C), 127.89 d (2C), 127.95 d (2C), 128.25 d (2C), 128.40 d (2C), 128.50 d (2C), **82** - OAc: 169.92 s + 20.62 q, 170.40 s + 20.70 q, 170.47 s + 20.83 q, $\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 73.70 t, 69.12 t, 73.37 t, 71.83 t, 71.16 t, arom. C: 122.33 d, 122.66 d, 123.68 d, 125.21 d, 131.60 s, 131.83 s, 132.57 s, 133.12 s, 133.62 d (2C), 133.42 d (2C), 137.52 s, 137.63 s, 138.27 s, 138.82 s, 137.43 s, 127.16 d, 127.27 d, 127.29 d, 127.49 d, 127.61 d, 127.55 d (2C), 127.66 d (2C), 127.76 d (4C), 127.95 dt (2C), 127.96 d (2C), 128.04 d (2C), 128.33 d (2C), 128.39 d (2C), 128.41 d (2C), **85** - OAc: 20.65 q + 171.26 s, 20.68 q + 171.51 s, 20.79 q + 171.51 s, NAc: 23.38 q + 170.35 s,

Tabulka 20 – pokračování: 23.64 q + 170.35 s, 23.67 q + 170.38 s, OCH₂C₆H₅: 70.14 t, 72.94 t, 73.60 t, 72.16 t, 73.46 t, arom. C: 137.37 s, 137.51 s, 137.56 s, 138.19 s, 138.48 s, 127.57 d (2C), 127.62 d, 127.70 d, 127.82 d, 127.89 d, 128.09 d (4C), 128.17 d (2C), 128.37 d (4C), 128.41 d (2C), 128.43 d (2C), 128.67 d (2C), 128.81 d, **86** – NAc: 22.53 q + 170.40 s, 23.60 q + 172.05 s, 23.79 q + 175.05 s, OCH₂C₆H₅: 70.21 t, 71.77 t, 74.11 t, 73.41 t, 73.22 t, arom. C: 136.71 s, 137.18 s, 127.61 s, 137.78 s, 138.16 s, 127.65 d (2C), 127.82 d (2C), 128.03 d, 127.95 d, 128.00 d (2C), 128.36 d (2C), 128.38 d, 128.42 d (4C), 128.49 d, 128.53 d, 128.62 d (2C), 128.75 d (2C), 128.78 d (4C).

Tabulka 21:

¹H NMR parametry sacharidů trehalózového typu **80** a **83**

Parametr	80	83
δ(H-1)	5.23 d	5.46 d
δ(H-2)	4.17 dd	4.37 dd
δ(H-3)	4.21 dd	5.77 dd
δ(H-4)	5.51 dd	5.33 dd
δ(H-5)	3.71 ddd	3.96 dt
δ(H-6a)	2.94 dd	3.59 dd
δ(H-6b)	3.01 dd	3.64 dd
J(1,2)	8.0	8.6
J(2,3)	11.0	11.5
J(3,4)	2.9	3.4
J(4,5)	1.0	1.0
J(5,6a)	8.1	6.7
J(5,6b)	5.3	6.9
J(6a,6b)	9.4	11.1

Další ¹H NMR parametry a parametry substituentů: **80**: -CH₂C₆H₅: 4.53 d (1H, J = 12.3), 4.18 d (1H, J = 12.3), 4.39 d (1H, J = 12.3), 4.25 d (1H, J = 12.3), OAc: 1.93 s (3H), arom. H: 6.87 – 7.02 m, 7.21 – 7.23 m, 7.29 – 7.38 m, **83** – OAc: 1.82 s, 2.02 s, 2.06 (all 3H), arom. H: 7.74 – 7.79 m, 7.81 – 7.87 m, 7.89 – 7.92 m.

Tabulka 22:Charakteristické ^{13}C NMR signály látek **80** a **83**^a

Uhlík	Látka	
	80	83
1	97.82	97.48
2	52.68	51.00
3	72.73	67.64
4	65.24	66.13
5	72.02	70.72
6	66.87	60.79

^a signály aromatických uhlíků nebyly přiřazeny;

Další ^{13}C NMR signály substituentů: **80** – $\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$: 70.97 t, 73.41 t, OAc: 20.78 q + 170.24 s, arom. C: 168.12 s, 167.35 s, 137.63 s, 137.43 s, 133.55 d, 133.40 d, 131.92 s, 131.86 s, 123.36 d, 122.72 d, 128.42 d (2C), 128.03 d (2C), 127.88 d (2C), 127.83 d (2C), 127.79 d, 127.45 d, **83** – OAc: 20.45 q + 169.69 s, 20.56 q + 170.07 s, 20.65 q + 170.33 s, arom. C: 168.09 s + 167.37 s, 134.29 d + 134.06 d, 131.56 s + 131.54 s, 123.48 d + 123.45 d.

6 ZÁVĚR

V rámci této disertační práce bylo připraveno 10 oligosacharidů, které byly testovány jako ligandy aktivačních receptorů NKR-p1 a CD69 přirozených zabíječských buněk.

První část práce (kap. 4.1.1) se zabývá syntézou *de novo* disacharidu **13**, trisacharidů **25**, **36** a **41** a tetrasacharidu **31**, které jsou složeny z D-glukosaminových jednotek. Monosacharidové stavební bloky byly vesměs připraveny známými postupy podle lit.^{41,115,124,132}. Pro tvorbu glykosidických vazeb byla využita Lemieuxova glykosylační metoda, kde participující ftalimidová skupina v poloze C(2) hexopyranos řídí glykosylační proces směrem ke vzniku 1,2-*trans*-glykosidů. Kombinace glykopyranosylbromidů a stříbrných solí se ukázala jako dostatečně reaktivní systém, který poskytl selektivně produkty obsahující požadované β -glykosidické vazby. Pro větvené oligosacharidy byla vypracována metodika násobných glykosylací, která umožnila současné zavedení až tří molekul glykosyldonoru na jediný akceptor. Tento přístup je řešením problému s nízkou reaktivitou disacharidových akceptorů, ať už způsobenou sterickým bráněním nebo vodíkovými můstky. Byla vypracována též metodika deprotekcí reakcí a purifikace volných oligosacharidů kombinací HPLC a gelové permeační chromatografie.

V druhé části práce (kap. 4.1.2) je popsána syntéza oligosacharidů **63**, **68**, **74** a **87**, odvozených od D-galaktosaminu. Příprava stavebních bloků byla vypracována jako modifikace postupu dle lit.^{44,45}, založeného na epimerizaci vhodně chráněného *gluko* derivátu v poloze C(4). Pro tvorbu β -glykosidických vazeb oligosacharidů byla opět využita ftalimidová metoda a pro větvený trisacharid násobná glykosylace, stejně jako v předchozím případě. V molekulách glykosyldonorů **48** a **49** byl nalezen v souvislosti s problematikou glykosylačních reakcí dosud nepopsaný typ vodíkového můstku, který se tvoří mezi π -elektronovým systémem benzylových chránících skupin a volnou hydroxylovou skupinou glykosylakceptoru.

V poslední části práce (kap. 4.2) jsou zařazeny výsledky afinitních testů připravených oligosacharidových mimetik k receptorům NK buněk NKR-p1 a CD69. Testy byly prováděny v laboratoři prof. Bezoušky na MBÚ v Krči a na Karlově univerzitě a mimo jiných důležitých poznatků z nich vyplývá, že tetrasacharid **31** a jeho benzylderivát **30** jsou dosud nejlepšími připravenými mimetiky ligandů aktivačního

receptoru CD69, srovnatelné svou vazebnou afinitou s vysokoafinitním ligandem nesoucím 23 cukerných jednotek.

V rámci práce bylo připraveno více než 60 nových sloučenin, z nichž naprostá většina byla plně charakterizována a jejich struktura ověřena kombinací NMR měření, hmotnostní spektrometrie, infračervené spektrometrie a elementární analýzy. Dosažené výsledky byly průběžně prezentovány na konferencích a publikovány^{10,18,54,154}.

6.1 VYUŽITÍ VÝSLEDKŮ A DALŠÍ PERSPEKTIVY

Dosažené výsledky ukazují, že v rámci této práce syntetizované oligosacharidy jsou bezpochyby účinnými ligandy aktivačních receptorů NK buněk. Na druhou stranu, i přes optimistické výsledky afinitních testů je zřejmé, že funkce izolovaného receptoru se může výrazně lišit od receptoru inkorporovaného v kompletní NK buňce. Jako příklad lze uvést třeba to, že NKR-p1 receptor obsahuje vazebné místo pro molekulu p56^{lck}, která za normálního stavu s receptorem interaguje a ovlivňuje jeho funkci³ nebo to, že NKR-p1 se u myši vyskytuje ve třech izoformách, z nichž jedna je dokonce inhibující. Možnost testování připravených látek na kompletních NK buňkách je proto předmětem jednání a podávaných projektů (GAV, MŠMT – národní program pro výzkum).

Přestože byly popsány oligosacharidy cíleně navrženy jako mimetika pro lektinové receptory NK buněk, není to zdaleka jediná oblast, ve které se dají látky tohoto typu využít. V budoucnu se počítá např. se zavedením ramének na redukující konec oligosacharidů tak, aby byla umožněna jejich prezentace na dendrimerních strukturách s cílem simulovat přirozené multiantennární ligandy. Předpokládá se, že oligosacharidy tohoto typu budou též využity jako součást vektorových systémů při konstrukci nové generace cílených kombinovaných chemo- a imunoterapeutik.

6.2 SEZNAM ZKRATEK

Ac	acetát
Ac ₂ O	anhydrid kyseliny octové
AcOH	kyselina octová
AgOTf	trifluormethansulfonát stříbrný, triflát stříbrný
All	allyl
alloc	allyloxykarbonyl
Bn	benzyl
BSA	hovězí serový albumin (bovine serum albumine <i>angl.</i>)
Bu	butyl
CD	cluster of differentiation (<i>angl.</i>)
CDCl ₃	deuteriochloroform
d	dublet
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DCM	dichlormethan
DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimethyl)aminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DMTST	dimethyl(methylthio)sulfonium-trifluormethansulfonát
DTT	dithiotreitol
EI	electron impact (<i>angl.</i>)
ESI	electron spray ionisation (<i>angl.</i>)
Et	ethyl
Et ₂ O	diethylether
EtOAc	ethyl-acetát

EtOH	ethanol
Et ₃ SiOTf	triethylsilyl trifluormethansulfonát, triethylsilyl triflát
FAB MS	fast atom bombardement mass spectrometry (<i>angl.</i>)
Gal	D-galaktosa
GalN	D-galaktosamin
Glc	D-glukosa
GlcN	D-glukosamin
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence (<i>angl.</i>)
HPLC	high performance liquid chromatography
IČ	infračervená spektroskopie
IDCP	bis(2,4,6-collidine)iodonium perchlorate (<i>angl.</i>)
IDCT	bis(2,4,6-collidine)iodonium trifluoromethansulfonate
IL 12	interleukin 12
Ly 49	aktivační receptor NK buněk
Me	methyl
MeOTf	trifluormethansulfonát methylnatý, triflát methylnatý
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex <i>angl.</i>)
Ms	mesyl, methansulfonyl
NBS	N-bromsuccinimide (<i>angl.</i>)
NIS	N-iodosuccinimide (<i>angl.</i>)
NK buňky	přirozené zabíječské buňky (natural killer cells)
NK	natural killer
NKG2	aktivační receptor NK buněk
NKR-p1	natural killer cell receptor – P1
NMR	nukleární magnetická rezonance

NPhth	phthalimidyl (<i>angl.</i>)
p56 ^{lck}	kofaktor NKR-p1 receptoru
PDA	photodiode array (<i>angl.</i>)
Ph	phenyl (<i>angl.</i>)
Phth	phthaloyl (<i>angl.</i>)
PMSF	phenyl methylsulfonyl fluoride (<i>angl.</i>)
PNZ	4-nitro-benzoyl
py ⁺	pyridinium
q	quadruplet
RP HPLC	reverse phase HPLC (<i>angl.</i>)
s	singlet
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza, s dodecylsulfonátem sodným
SEt	ethylsulfanyl
t	triplet
TBS + C	tris-buffered saline (+ Ca, (<i>angl.</i>))
TEA	triethylamin
Tf	trifluormethansulfonát, triflát
TFA	trifluoroacetic acid (<i>angl.</i>)
TfOH	kyselina trifluormethansulfonová
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin layer chromatography (<i>angl.</i>)
TMS	tetramethyl silan, trimethylsilyl
TMSOTf	trimethylsilyl trifluormethansulfonát, trimethylsilyl triflát
Tr	trityl, trifenylmethyl
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

Troc 2,2,2-trichloroethoxykarbonyl
UV ultrafialové, ultrafialové spektrum

Poděkování:

Ráda bych poděkovala všem, bez jejichž pomoci by nebylo možné získat výsledky, které tvoří základ této disertační práce. V první řadě za vedení a velmi podnětnou podporu děkuji svému školiteli, RNDr. Miroslavu Ledvinovi, CSc. Dále děkuji svým spolupracovníkům, paní Věře Součkové, Mgr. Martině Džoganové, RNDr. Danielu Zykovi, PhD. a Janu Veselému, PhD. za ochotnou pomoc, spolupráci, diskuse a za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Dík patří též pracovníkům analytických laboratoří ÚOCHB AV ČR za změření elementárních analýz, hmotnostních spekter a pomoc při přípravě vzorků pro biologické testy, Ing. Davidu Šamanovi za změření a interpretaci NMR spekter, Ing. Fiedlerovi za změření a interpretaci IČ spekter a paní Věře Holoubkové za měření optických rotací.

Velký dík patří rovněž prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, CSc. a jeho spolupracovníkům za zprostředkování a provedení afinitních testů a pomoc při jejich interpretaci a při publikační činnosti.

Velmi příjemná byla též spolupráce s katedrou chemie PŘF UK, jmenovitě s prof. RNDr. Tomášem Trnkou, CSc. a paní Ludmilou Petrákovou, kteří pomohli s vedením grantů a s formálními záležitostmi kolem této práce.

Velký dík patří také mému manželovi a rodině, kteří mne neochvějně podporují a shovívavě přijímají všechny výstřelky spojené s prací v chemické laboratoři.

Tato práce byla podporována grantovými projekty GAUK číslo 241/2003/B-CH/PřF, 416/2004/B-CH/PřF, grantem ministerstva zemědělství č. QF3115/2003, grantem Grantové agentury ČR č. 203/00/0071, výzkumným záměrem Z4 055 0506 a byla rovněž finančně podporována v rámci mezinárodní spolupráce s Výzkumným ústavem veterinárního lékařství v Brně a Imperial College v Londýně (prof. A. Miller).

6.3 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

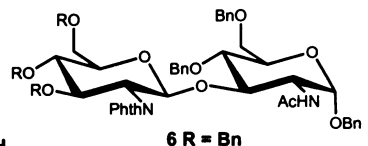
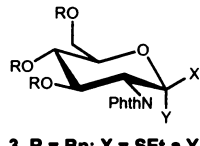
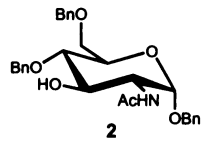
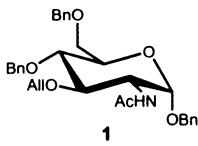
- 1 *Essentials of Glycobiology*, Varki A. (ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York , 1999.
- 2 Macmillan D., Daines A. M.: *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 2733.
- 3 Diefenbach A., Raulet D. H.: *Immunol. Rev.* **2001**, *181*, 170.
- 4 Miller J. S.: *Exp. Hematol.* **2001**, *29*, 1157.
- 5 Hořejší V., Bartůňková J.: *Základy Imunologie*. Triton, Praha 2005.
- 6 Moretta L., Bottino C., Pende D., Vitale M. et al.: *Immunol. Lett.* **2005**, *100*, 7.
- 7 Biassoni R., Cantoni C., Pende D., Sivori S. et al.: *Immunol. Rev.* **2001**, *181*, 203.
- 8 Srivastava R. M., Savithri B., Khar A.: *Ind. J. Biochem. Biophys.* **2003**, *40*, 291.
- 9 Bezouška, K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2004**, *69*, 535.
- 10 Bezouška K., Vlahas G., Horváth O., Jinochová G. et al.: *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 16945.
- 11 Bezouška K., Nepovím A., Horváth O., Pospíšil M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *208*, 68.
- 12 Backström E., Kristensson K., Ljunggren H. G.: *Scand. J. Immunol.* **2004**, *60*, 14.
- 13 Pavlíček J., Bezouška K., Ettrich R., Kavan D. et al.: *V tisku*.
- 14 Pavlíček J., Sopko B., Ettrich R., Kopecký V. et al.: *Biochemistry* **2003**, *42*, 9295.
- 15 Natarajan K., Sawicki M. W., Margulies D. H., Mariuzza R. A.: *Biochemistry* **2000**, *39*, 14779.
- 16 Llera A. S., Viedma F., Sanchez-Madrid F., Tormo J.: *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 7312.
- 17 Pavlíček J., Bezouška K.: *Chem. Pap.* **1998**, *52*, 327.
- 18 Krist P., Herkommerová-Rejnochová E., Rauvolfová J., Semeňuk T. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *287*, 11.
- 19 Křen V., Dvořáková J., Gambert U., Sedmera P. et al.: *Carbohydr. Res.* **1997**, *305*, 517.
- 20 *Carbohydrate-Based Drug Discovery*, Wong C. H. (ed.). Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- 21 Banoub J., Boullanger P., Lafont D.: *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1167.
- 22 Königs W., Knorr E.: *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 957.
- 23 Horton D.: *Met. Carbohydr. Chem.* 1972, str. 282.
- 24 Lee R. T., Lee Y. C.: *Carbohydr. Res.* **1974**, *37*, 193.
- 25 Salo W. L., Fletcher H. G., Jr.: *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3189.
- 26 Nakabayashi S., Warren C. D., Jeanloz R. W.: *Carbohydr. Res.* **1986**, *150*, C7-C10.
- 27 Srivastava V. K.: *Carbohydr. Res.* **1982**, *103*, 286.
- 28 Osawa T.: *Chem. Pharm. Bull.* **1960**, *8*, 597.
- 29 Kiso M., Anderson L.: *Carbohydr. Res.* **1979**, *72*, C12.
- 30 Kusumoto S., Inage M., Chaki H., Imoto M. et al.: *ACS Symp. Ser.* **1983**, *231*, 237.
- 31 Inage M., Chaki H., Kusumoto S., Shiba T.: *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 3889.
- 32 David S., Veyrieres A.: *Carbohydr. Res.* **1975**, *23*.
- 33 Lemieux R. U., Takeda T., Chung B. Y.: *ACS Symp. Ser.* **1976**, *39*, 90.
- 34 Schmidt R. R., Gründler G.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1983**, *22*, 776.
- 35 Nicolaou K. C., Seitz S. P., Papahatjis D. P.: *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2430.
- 36 Jain R. K., Matta K. L.: *Carbohydr. Res.* **1992**, *226*, 91.
- 37 Lönn H.: *Carbohydr. Res.* **1985**, *139*, 105.
- 38 Mootoo D. R., Fraser-Reid B.: *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2363.

- 39 Mehta S., Pinto B. M.: *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 4435.
- 40 Durette P. L., Meitzner E. P., Shen T. Y.: *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 4013.
- 41 Farkaš J., Ledvina M., Brokeš J., Ježek J. et al.: *Carbohydr. Res.* **1987**, 163, 63.
- 42 Lee H. H., Schwartz D. A., Harris J. F., Carver J. P. et al.: *Can. J. Chem.* **1986**, 64, 1912.
- 43 Ito Y., Sato S., Mori M., Ogawa T.: *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, 7, 359.
- 44 Veselý, J.: *Disertační práce*, UK, **2005**.
- 45 Veselý J., Ledvina M., Jindřich J., Trnka T. et al.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2004**, 69, 1914.
- 46 Olsson L., Jia Z. J., Fraser-Reid B.: *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 3790.
- 47 Csiki, Z.; Fügedi, P. *Abstract book of 13th European Carbohydrate Symposium*, Bratislava, P140, 2005. Bratislava.
- 48 Heyns K., Harrison R., Paulsen H.: *Chem. Ber.* **1967**, 100, 271.
- 49 Hashimoto S., Honda T., Ikegami S.: *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1653.
- 50 Boullanger P., Jouineau M., Bouammali B., Lafont D. et al.: *Carbohydr. Res.* **1990**, 202, 151.
- 51 Qian X. P., Hindsgaul O.: *Chem. Commun.* **1997**, 1059.
- 52 Lafont D., Boullanger P., Banoub J., Descotes G.: *Can. J. Chem.* **1990**, 68, 828.
- 53 Paulsen H., Helpap B.: *Carbohydr. Res.* **1991**, 216, 289.
- 54 Veselý J., Rohlenová A., Džoganová M., Trnka T. et al.: *Synthesis* **2006**, 699.
- 55 Kunz H., Birnbach S.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 360.
- 56 Paulsen H., Schultz M., Klamann J. D., Waller B. et al.: *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 2028.
- 57 Lemieux R. U., Hendricks K. B., Stick R., James K.: *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 4056.
- 58 Marra A., Gauffeny F., Sinay P.: *Tetrahedron* **1991**, 47, 5149.
- 59 Litjens R. E. J. N., Leeuwenburgh M. A., van der Marel G. A., van Boom J. H.: *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 8693.
- 60 Paulsen H., Lorentzen J. P.: *Carbohydr. Res.* **1984**, 133, C1-C4.
- 61 Sugawara T., Irie K., Iwasawa H., Yoshikawa T. et al.: *Carbohydr. Res.* **1992**, 230, 117.
- 62 Litjens R. E. J. N., van den Bos L. J., Codee J. D. C., van den Berg R. J. B. H. et al.: *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 918.
- 63 Kaji E., Lichtenthaler F. W., Osa Y., Takahashi K. et al.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, 68, 2401.
- 64 Lichtenthaler F. W., Kaji E., Weprek S.: *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 3505.
- 65 Lichtenthaler F. W., Kaji E.: *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 1659.
- 66 Kaji E., Lichtenthaler F. W., Nishino T., Yamane A. et al.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, 61, 1291.
- 67 Lemieux R. U., James K., Nagabhushan T. L., Ito Y.: *Can. J. Chem.* **1973**, 51, 48.
- 68 Kaji E., Osa Y., Takahashi K., Hirooka M. et al.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, 67, 1130.
- 69 Ennis S. C., Gridley J. J., Osborn H. M. I., Spackman D. G.: *Synlett* **2000**, 1593.
- 70 Lemieux R. U., Hayami J. I.: *Can. J. Chem.* **1965**, 43, 2162.
- 71 Lubineau A., Malleron A.: *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 1713.
- 72 Ogawa T., Matsui M.: *Carbohydr. Res.* **1976**, 51, C13.
- 73 Cumpstey I., Fairbanks A. J., Redgrave A. J.: *Org. Lett.* **2001**, 3, 2371.
- 74 Szarek W. A., Gryniewicz G., Doboszewski B., Hay G. W.: *Chem. Lett.* **1984**, 1751.
- 75 Hayashi M., Hashimoto S., Noyori R.: *Chem. Lett.* **1984**, 1747.
- 76 Posner G. H., Haines S. R.: *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 5.
- 77 Nicolaou K. C., Randall J. L., Furst G. T.: *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 5556.
- 78 Mietchen R., Hager C., Hein M.: *Synthesis* **1997**, 159.

- 79 Hashimoto S., Hayashi M., Noyori R.: *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 1379.
- 80 Kreuzer M., Thiem J.: *Carbohydr. Res.* **1986**, 149, 347.
- 81 Mukaiyama T., Murai Y., Shoda S.: *Chem. Lett.* **1981**, 431.
- 82 Matsumoto T., Katsuki M., Suzuki K.: *Chem. Lett.* **1989**, 437.
- 83 Matsumoto T., Maeta H., Suzuki K., Tsuchihashi G.: *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 3567.
- 84 Suzuki K., Maeta H., Matsumoto T.: *Tetrahedron Lett.* **2001**, 30, 4853.
- 85 Shimizu M., Togo H., Yokoyama M.: *Synthesis* **1998**, 799.
- 86 Gervay J., Hadd M. J.: *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6961.
- 87 Nicolaou K. C., Dolle R. E., Papahatjis D. P., Randall J. L.: *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4189.
- 88 Schmidt R. R., Kinzy W.: *Anomeric-Oxygen Activation for Glycoside Synthesis - the Trichloroacetimidate Method.* 1994, str. 21.
- 89 Ferrier R. J., Hay R. W., Vethaviasar N.: *Carbohydr. Res.* **1973**, 27, 55.
- 90 Tsai T. Y. R., Jin H., Wiesner K.: *Can. J. Chem.* **1984**, 62, 1403.
- 91 Mukaiyama T., Nakatsuki T., Shoda S.: *Chem. Lett.* **1979**, 8, 487.
- 92 Woodward R. B., Logusch E., Nambiar K. P., Sakan K. et al.: *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 3215.
- 93 Kihlberg J. O., Leigh D. A., Bundle D. R.: *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 2860.
- 94 Lönn H.: *Carbohydr. Res.* **1985**, 139, 115.
- 95 Fügedi P., Garreg P. J.: *Carbohydr. Res.* **1986**, 149, C9.
- 96 Kahne D., Walker S., Cheng Y., Vanengen D.: *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6881.
- 97 Brown D. S., Ley S. V., Vile S.: *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4873.
- 98 Osborn H. M. I.: *Best Synthetic Methods*, Harwood L. M., Ed. (ed.). Academic Press, Oxford 2003.
- 99 Schmidt R. R.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 212.
- 100 Schmidt R. R., Michel J.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1980**, 19, 731.
- 101 Schmidt R. R., Gaden H., Jatzke H.: *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 327.
- 102 *Preparative Carbohydrate Chemistry*, Hanessian S. (ed), str. 289. Marcel Dekker, INC., New York, 1997.
- 103 Vankar Y. D., Vankar P. S., Behrendt M., Schmidt R. R.: *Tetrahedron* **1991**, 47, 9985.
- 104 Lemieux R. U.: *Pure Appl. Chem* **1971**, 25, 527.
- 105 Maloisel J. L., Vasella A., Trost B. M., Vanvraken D. L.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1099.
- 106 Merritt J. R., Naisang E., FraserReid B.: *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 4443.
- 107 Arasappan A., FraserReid B.: *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2401.
- 108 Veselý J., Ledvina M., Jindřich J., Šaman D. et al.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2003**, 68, 1264.
- 109 Toshima K., Tatsuta K.: *Chem. Rev.* **1993**, 93, 1503.
- 110 Briner K., Vasella A.: *Helv. Chim. Acta* **1992**, 75, 621.
- 111 Černý M., Trnka T., Buděšínský M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1996**, 61, 1489.
- 112 Tichá M., Černý M., Trnka T.: *Glycoconjugate J.* **1996**, 13, 681.
- 113 Palmacci E. R., Plante O. J., Hewitt M. C., Seeberger P. H.: *Helv. Chim. Acta* **2003**, 86, 3975.
- 114 Seeberger P. H.: *Chem. Commun.* **2003**, 1115.
- 115 Zyka, D.: *Disertační práce*, UK, **2000**.
- 116 Excoffier G., Gagnaire D., Utile J. P., Vignon M.: *Tetrahedron* **1975**, 31, 549.
- 117 Zurabyan S. E., Antonenko T. S., Khorlin A. Y.: *Carbohydr. Res.* **1970**, 15, 21.
- 118 Blatter G., Beau J. M., Jacquinet J. C.: *Carbohydr. Res.* **1994**, 260, 189.

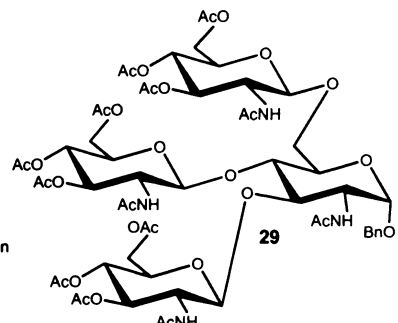
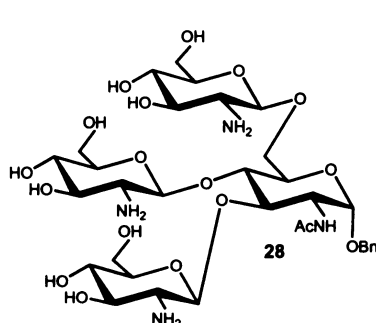
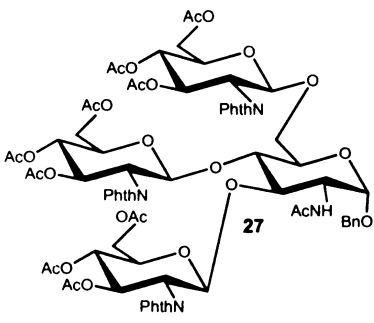
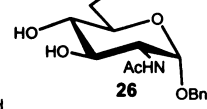
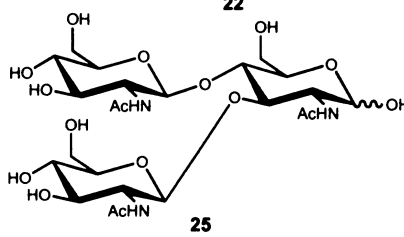
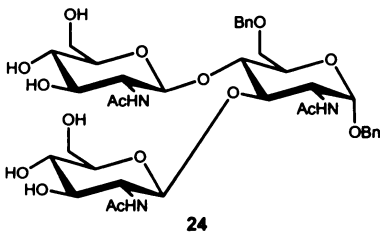
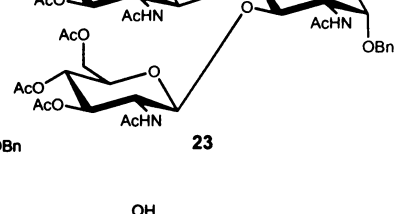
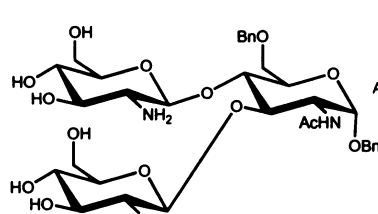
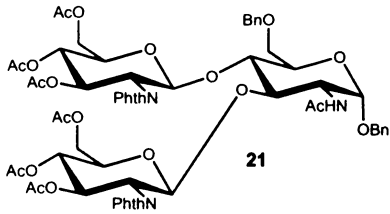
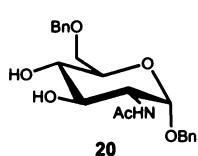
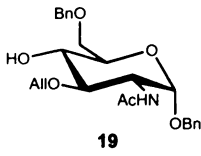
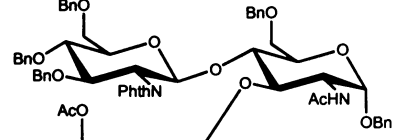
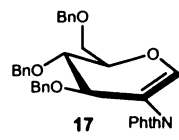
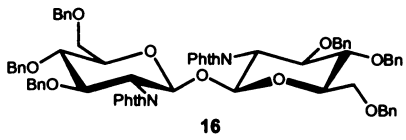
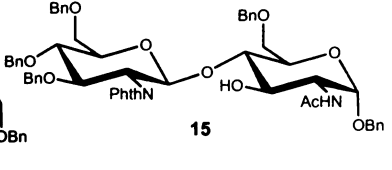
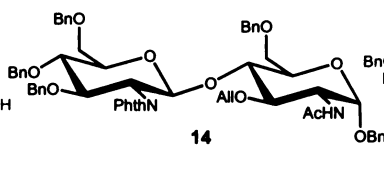
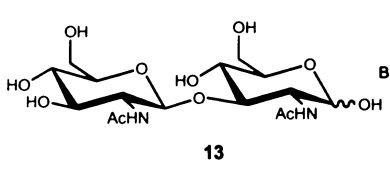
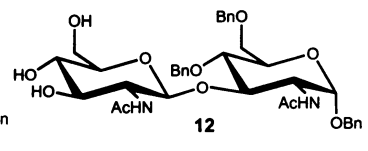
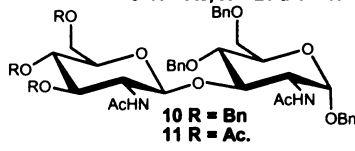
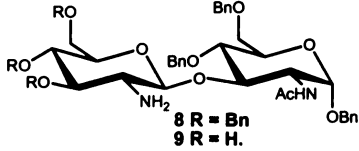
- 119 Kiso M., Anderson L.: *Carbohydr. Res.* **1985**, 136, 309.
- 120 Hashimoto S., Umeo K., Sano A., Watanabe N. et al.: *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 2251.
- 121 Mehta S., Pinto B. M.: *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 3269.
- 122 Kinzy W., Schmidt R. R.: *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 1537.
- 123 Bowers S. G., Coe D. M., Boons G. J.: *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 4570.
- 124 Ledvina M., Zyka D., Ježek J., Trnka T. et al.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1998**, 63, 577.
- 125 Paulsen H., Himpkamp P., Peters T.: *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 664.
- 126 van Boeckel C. A. A., Beetz T., Vos J. N., Dejong A. J. M. et al.: *J. Carbohydr. Chem.* **1985**, 4, 293.
- 127 Crich D., Dudkin V.: *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6819.
- 128 Fowler P., Bernet B., Vasella A.: *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 269.
- 129 Vasella A., Witzig C.: *Helv. Chim. Acta* **1995**, 78, 1971.
- 130 Maloisel J. L., Vasella A.: *Helv. Chim. Acta* **1992**, 75, 1491.
- 131 Kantoci D., Keglevic D., Derome A. E.: *Carbohydr. Res.* **1987**, 162, 227.
- 132 Zaoral M., Ježek J., Rotta J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1982**, 47, 2989.
- 133 Patroni J. J., Stick R. V., Skelton V. B., White A. H.: *Aust. J. Chem.* **1988**, 41, 91.
- 134 Langlois V., Williams J. M.: *J. Chem. Soc., Perkin. Trans. 1* **1994**, 15, 2103.
- 135 Bjurling E., Jansson P. E., Lindqvist B.: *Acta Chem. Scand.* **1994**, 48, 589.
- 136 Westerlind U., Hagback P., Duk M., Norberg T.: *Carbohydr. Res.* **2002**, 337, 1517.
- 137 Veselý, J.: *Diplomová práce*, UK, **2001**.
- 138 Wong T. C., Townsend R. R., Lee Y. C.: *Carbohydr. Res.* **1987**, 170, 27.
- 139 Hansson J., Garegg P. J., Oscarson S.: *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 6234.
- 140 Nunomura S., Mori M., Ito Y., Ogawa T.: *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 5619.
- 141 Paulsen H., Bünsch A.: *Liebigs Ann. Chem.* **1981**, 2204.
- 142 Liao W. S., Piskorz C. F., Locke R. D., Matta K. L.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 793.
- 143 Udodong U. E., Srinivas-Rao C., Fraser-Reid B.: *Tetrahedron* **1992**, 48, 4713.
- 144 Becker B., Thiem J.: *Tetrahedron: Assymetry* **1994**, 5, 2339.
- 145 Thomas M. R., Abbas S. A., Piskorz C. F., Matta K. L. et al.: *Carbohydr. Res.* **1988**, 175, 158.
- 146 Rana S. S., Matta K. L.: *Carbohydr. Res.* **1983**, 116, 71.
- 147 Rochepeau-Jobron L., Jacquinet J. C.: *Carbohydr. Res.* **1997**, 305, 181.
- 148 Lee H. H., Congson L. N., Whitfield D. M., Radics L. R. et al.: *Can. J. Chem.* **1992**, 70, 2607.
- 149 Kiso M., Kaneda Y., Goh Y., Hasegawa A. et al.: *Agric. Biol. Chem.* **1980**, 44, 1971.
- 150 Sharma M., Bernacki R. J., Paul B., Korytnyk W.: *Carbohydr. Res.* **1990**, 198, 205.
- 151 Berkin A., Szarek W. A., Kisilevsky R.: *Carbohydr. Res.* **2000**, 326, 250.
- 152 Gronberg G., Nilsson U., Bock K., Magnusson G.: *Carbohydr. Res.* **1994**, 257, 35.
- 153 Vandana, Hindsgaul O., Baenziger J. U.: *Can. J. Chem.* **1987**, 65, 1645.
- 154 Rohlenová A., Ledvina M., Šaman D., Bezouška K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2004**, 69, 1781.

Látky 1 - 29

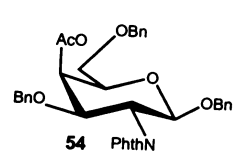
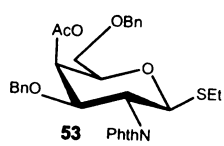
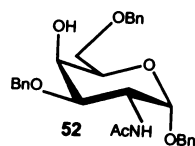
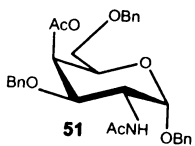
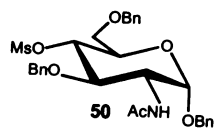
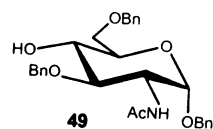
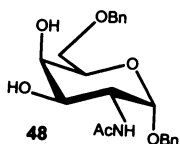
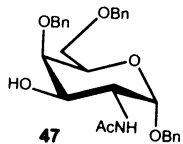
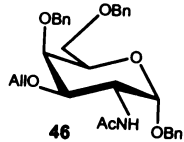
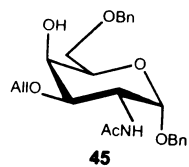
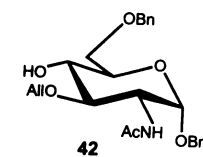
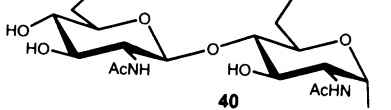
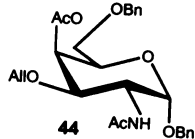
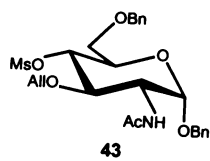
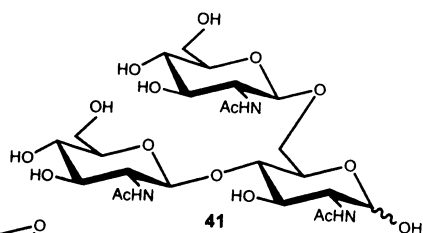
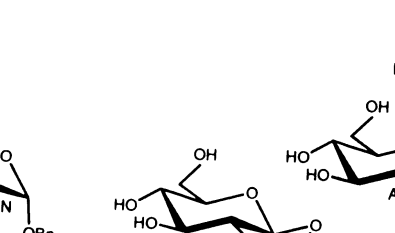
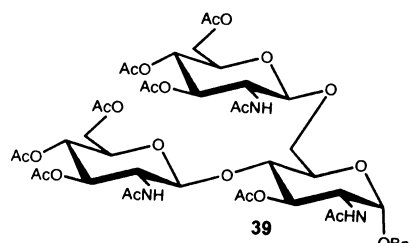
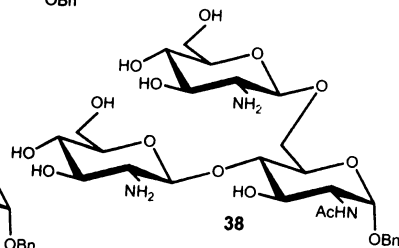
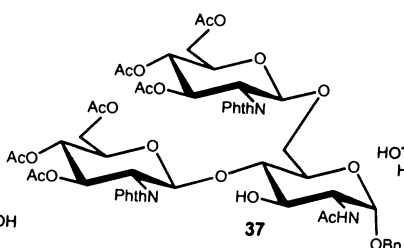
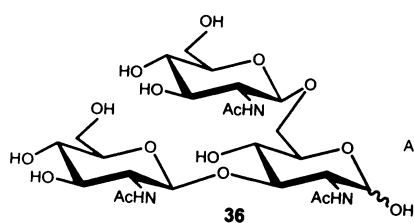
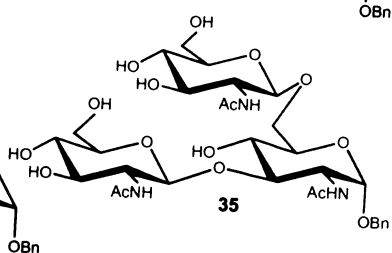
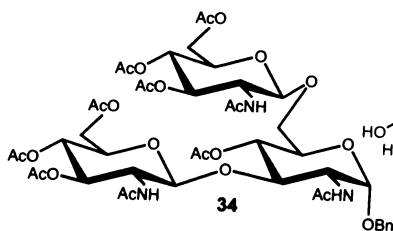
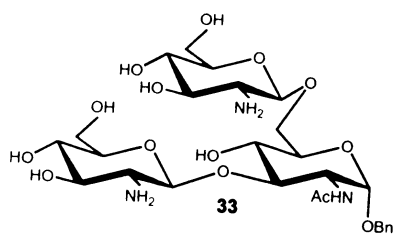
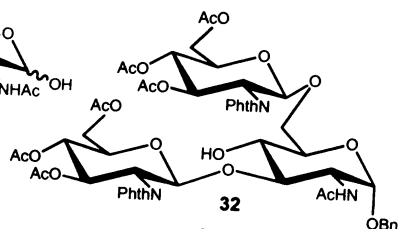
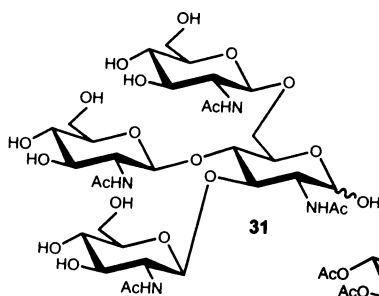
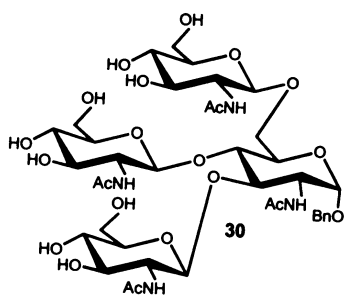


3 R = Bn; X = SEt a Y = H
 4 R = Bn; X = Br a Y = H, resp.
 5 R = Ac; X = Br a Y = H

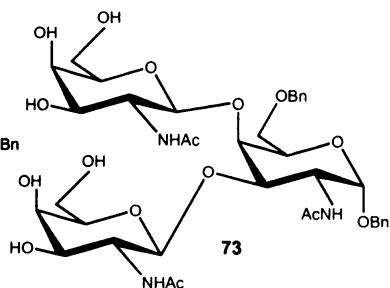
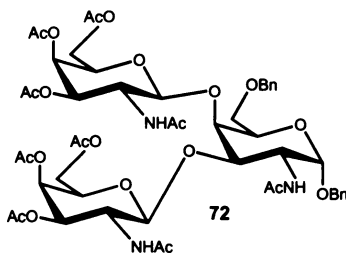
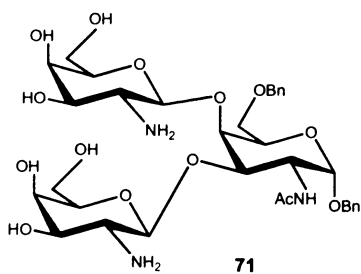
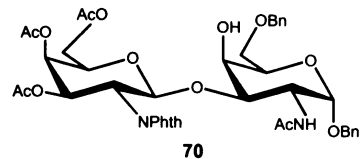
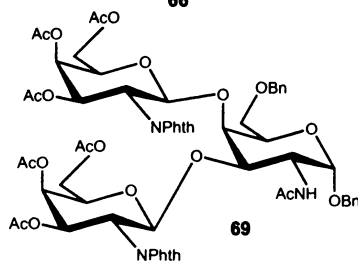
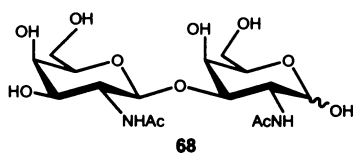
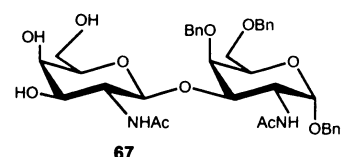
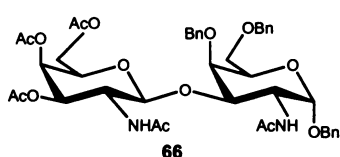
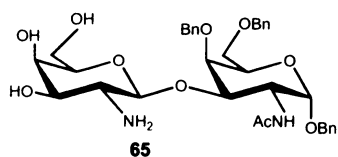
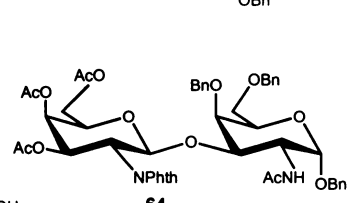
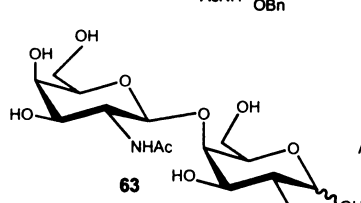
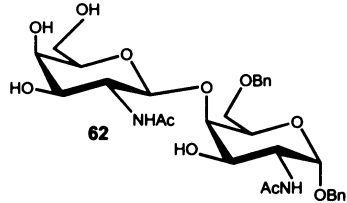
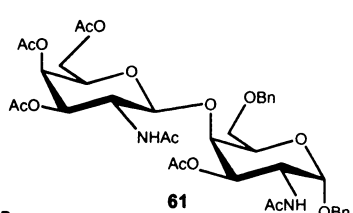
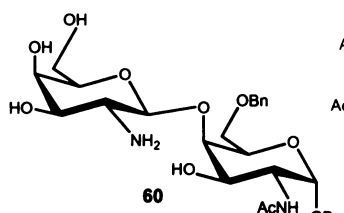
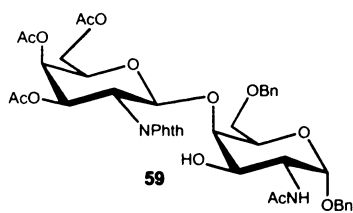
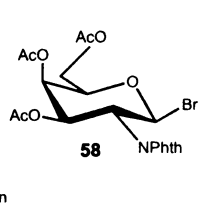
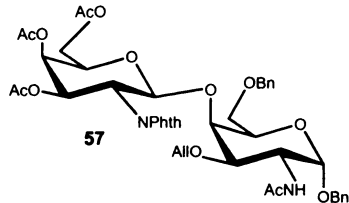
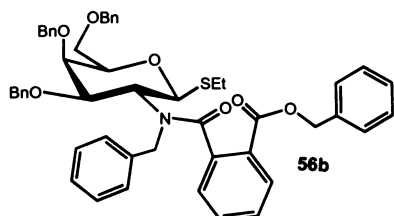
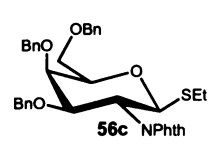
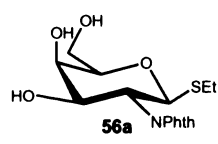
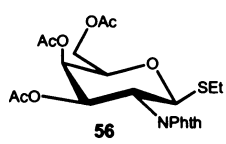
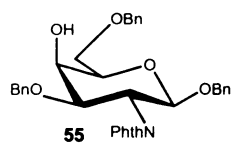
6 R = Bn
 7 R = Ac.



Látky 30 - 54



Látky 55 - 73



Látky 74 - 87

