

# Sinteza konjugata manozne i O-glikolil-desmuramilpeptida

---

**Pavić, Doroteja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:663767>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KEMIJSKI ODSJEK

DOROTEJA PAVIĆ

SINTEZA KONJUGATA MANOZE I *O*-GLIKOLIL-  
DESMURAMILPEPTIDA

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2016.**

DOROTEJA PAVIĆ

SINTEZA KONJUGATA MANOZE I *O*-GLIKOLIL-  
DESMURAMILPEPTIDA

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog stupnja

magistra kemije

**Zagreb, 2016.**

*Ovaj diplomski rad izrađen je pod mentorstvom doc. dr. sc. Rosane Ribić (nastavnik: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković) na Zavodu za organsku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.*

### **Zahvala**

*Neizmjereno sam zahvalna svojoj mentorici, doc. dr. sc. Rosani Ribić, na pruženoj prilici, strpljenju, uloženom trudu, susretljivosti, povjerenju i mnogobrojnim savjetima prilikom izrade diplomskog rada. Najveće Vam hvala na ugodnoj i poticajnoj radnoj atmosferi u labosu te na svom posvećenom vremenu. Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Vesni Petrović Peroković i svim djelatnicima Zavoda za organsku kemiju te hvala prof. dr. sc. Srđanki Tomić-Pisarović na mogućnosti izrade diplomskog rada u njenom laboratoriju.*

*Veliko hvala mojoj najboljoj prijateljici Nataliji, koja je uvijek bila uz mene i na svim životnim savjetima i potpori te na ovih predivnih pet godina prijateljstva kojemu se nisam mogla ni nadati.*

*Hvala svim mojim prijateljima i kolegama, a najviše Luki, Ivani, Magdaleni, Dorji i Deanu uz koje je ovih pet godina proletjelo.*

*Hvala najboljoj ekipi iz labosa 306 na nezaboravnim danima i najboljoj atmosferi u labosu.*

*Posebno sam zahvalna svojoj obitelji, a najviše svojoj mami i bratu, na podršci tijekom studija.*

# Sadržaj

---

SAŽETAK.....	VII
ABSTRACT .....	VIII
1. UVOD .....	1
2. LITERATURNI PREGLED .....	3
2.1. Muropeptidi.....	3
2.1.1. Muramildipeptidi i njegovi derivati .....	3
2.1.2. Desmuramildipeptidi i njegovi derivati.....	7
2.1.4. Manozilirani derivati desmuramildipeptida .....	9
2.1.5. Manozni receptori .....	9
2.2. Kemijska sinteza <i>O</i> -glikozida .....	11
2.2.1. Zaštita slobodnih hidroksilnih skupina .....	12
2.2.2. Selektivna anomerna deacetilacija .....	16
2.2.3. Stereokemija kemijske sinteze <i>O</i> -glikozida .....	17
2.3. Metode priprave <i>O</i> -glikozida .....	19
2.3.1. Direktna metoda .....	20
2.3.2. Trikloracetimidatna metoda .....	21
2.3.3. Koenigs-Knorr metoda.....	22
2.4. Sintaza peptida .....	23
2.4.1. Zaštitne skupine u sintezi peptida .....	25
2.4.2. Reakcije kondenzacije aminokiselina .....	26
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	30
3.1. Materijali i metode .....	30
3.2. Sintaza <i>O</i> -manozilirane kiseline.....	31
3.2.1. <i>1,2,3,4,6-Penta-O-acetil-<math>\alpha</math>-D-manopiranoza (1)</i> .....	31
3.2.2. <i>2,3,4,6-Tetra-O-acetil-<math>\alpha</math>-D-manopiranoza (2)</i> .....	32
3.2.3. <i>Benzil-bromacetat (3)</i> .....	32

3.2.4. Priprema <i>O</i> -manozida nukleofilnom supstitucijom .....	33
3.2.4.1. <i>Benzil</i> -2-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ - <i>D</i> -manopiranoziloksi)acetat ( <b>4</b> ).....	33
3.2.4.2. <i>Tert-butil</i> -2-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ - <i>D</i> -manopiranoziloksi)acetat ( <b>5</b> ) .....	34
3.2.5. 2-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ - <i>D</i> -manopiranoziloksi)octena kiselina ( <b>6</b> ).....	34
3.3. Opći postupak uklanjanja <i>tert</i> -butoksikarbonil (Boc) zaštite.....	35
3.3.1. <i>Trifluoroacetat benzilnog estera L-alanil-D-izoglutamina</i> ( <b>7</b> ).....	35
3.3.2. (2 <i>S</i> )-1-({(2 <i>R</i> )-5-[( <i>Adamantan-1-il</i> )amino]-1-amino-1,5-dioksopentan-2-il}amino)-1-oksopropan-2-amonijev 2,2,2-trifluoroacetat ( <b>13</b> ) .....	36
3.3.3. (2 <i>S</i> )-1-({(2 <i>R</i> )-5-[1-( <i>Adamant-1-il</i> )-1,2,3-triazol-4-il]metoksi-1-amino-1,5-dioksopentan-2-il}amino)-1-oksopropan-2-amonijev 2,2,2-trifluoroacetat ( <b>17</b> ).....	36
3.4. Opći postupak stvaranja amidne veze .....	37
3.4.1. <i>Benzilni ester</i> (4 <i>R</i> )-5-amino-4-([(2 <i>S</i> )-2-{{2-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ - <i>D</i> -manopiranoziloksi)etanoil}amino}propanoil]amino)-5-oksopentanske kiseline ( <b>8</b> ).....	37
3.4.2. (4 <i>R</i> )- <i>N</i> -( <i>Adamantan-1-il</i> )-5-amino-4-[(2 <i>S</i> )-2-{{( <i>tert-butoksikarbonil</i> )amino}propanoil}amino]-5-oksopentanamid ( <b>12</b> ) .....	38
3.4.3. (4 <i>R</i> )- <i>N</i> -( <i>Adamantan-1-il</i> )-5-amino-4-([(2 <i>S</i> )-2-{{2-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ - <i>D</i> -manopiranoziloksi)etanoil}amino}propanoil]amino)-5-oksopentanamid ( <b>14</b> ) .....	38
3.4.4. 1-( <i>Adamantan-1-il</i> )-1,2,3-triazol-4-il]metilni ester (4 <i>R</i> )-5-amino-4-([(2 <i>S</i> )-2-{{2-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ - <i>D</i> -manopiranoziloksi)etanoil}amino}propanoil]amino)-5-oksopentanske kiseline ( <b>18</b> ).....	39
3.5. Sinteza adamantil-triazolnog derivata desmuramildipeptida .....	39
3.5.1. (4 <i>R</i> )-[1-( <i>Adamantan-1-il</i> )-1,2,3-triazol-4-il]metil-5-amino-4-[(2 <i>S</i> )-2-{{( <i>tert-butoksikarbonil</i> )amino}propanoil}amino]-5-oksopentanoat ( <b>16</b> ) .....	39
3.6. Opći postupak hidrogenolize.....	40
3.6.1. (4 <i>R</i> )-5-Amino-4-([(2 <i>S</i> )-2-{{2-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ - <i>D</i> -manopiranoziloksi)etanoil}amino}propanoil]amino)-5-oksopentanska kiselina ( <b>9</b> ).....	40
3.6.2. (4 <i>R</i> )-5-Amino-4-[(2 <i>S</i> )-2-{{( <i>tert-butoksikarbonil</i> )amino}propanoil}amino]-5-oksopentanska kiselina ( <b>11</b> ) .....	41
3.7. Opći postupak deacetiliranja .....	41

# Sadržaj

---

3.7.1.	(4R)-5-Amino-4-([(2S)-2-[[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)etanoil]amino]propanoil]amino)-5-oksopentanska kiselina ( <b>10</b> ) .....	42
3.7.2.	(4R)-N-(Adamantan-1-il)-5-amino-4-([(2S)-2-[[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)etanoil]amino]propanoil]amino)-5-oksopentanamid ( <b>15</b> ) .....	42
3.7.3.	1-(Adamantan-1-il)-1,2,3-triazol-4-il]metilni ester (4R)-5-amino-4-([(2S)-2-[[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)etanoil]amino]propanoil]amino)-5-oksopentanske kiseline ( <b>19</b> ) .....	43
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	44
4.1.	Sinteza O-manozilirane glikolne kiseline (6) .....	44
4.2.	Sinteza manoziliranog O-glikolil-desmuramildipeptida (10) .....	47
4.3.	Sinteza konjugata manoze i adamantil-desmuramilpeptida .....	49
4.4.	Sinteza manokonjugata (adamant-1-il)-1,2,3-triazolnih derivata desmuramilpeptida ..	51
5.	ZAKLJUČAK .....	54
6.	LITERATURNNA VRELA .....	55
7.	PRILOZI .....	IX
7.1.	Popis kratica i simbola .....	IX
8.	ŽIVOTOPIS .....	XII



## SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Kemijski odsjek

Diplomski rad

SINTEZA KONJUGATA MANOZE I *O*-GLIKOLIL-DESMURAMILPEPTIDA

DOROTEJA PAVIĆ

Zavod za organsku kemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,

Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Muramildipeptid (MDP), *N*-acetilmuramil-*L*-alanil-*D*-izoglutamin, fragment je peptidoglikana koji pojačava imunološki odgovor na specifični antigen. MDP se klinički ne upotrebljava zbog pirogenosti i brze eliminacije te se pripremaju novi derivati s poboljšanim farmakološkim svojstvima. Osobito se ističu lipofilniji derivati MDP-a poput desmuramildipeptida (derivata bez šećerne podjedinice). Nadalje, dobre rezultate pokazali su manozni analozi MDP-a koji vjerojatno radi interakcije s manoznim receptorima imunokompetentnih stanica pokazuju pojačanu aktivnost.

U okviru ovog diplomskog rada sintetizirani su novi konjugati manoze i *O*-glikolil-desmuramildipeptida koji se međusobno razlikuju po skupinama vezanima na C-kraju peptida (hidroksilna, adamantilna i adamantil-triazolna). Prvo je sintetizirana 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -*D*-manopiranoziloksi)octena kiselina supstitucijom broma iz *t*-butil-bromacetata s tetraacetiliranom manozom  $\alpha$ -konfiguracije. Dobivenom manozidu je uklonjena esterska zaštita s karboksilne skupine preko koje je potom karbodiimidnom metodom uz EDC/HOBt aktivaciju vezan desmuramildipeptid s odgovarajućom skupinom na C-kraju. U posljednjoj fazi selektivno su uklonjene zaštitne acetatne skupine s manozne podjedinice. Svi sintetizirani spojevi su strukturno okarakterizirani NMR spektroskopijama, spektrometrijom masa, a neki od njih i IR spektroskopijom.

(XIII + 56 stranica, 17 slika, 23 shema, 3 tablice, 38 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Kemijškog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska

**Ključne riječi:** adamantan, adjuvant, desmuramildipeptid, manozna

**Mentor:** Doc. dr. sc. Rosana Ribić

**Ocjenitelji:** Izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Pekorović

Izv. prof. dr. sc. Željka Soldin

Izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević

**Zamjena:** Prof. dr. sc. Srđanka Tomić-Pisarović

**Rad je prihvaćen:** 8. prosinca 2016.

**ABSTRACT**

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Chemistry

Diploma Thesis

**SYNTHESIS OF *O*-GLYCOLYL DESMURAMYLPEPTIDE MANNOCONJUGATES**

DOROTEJA PAVIĆ

Division of Organic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science,  
University of Zagreb, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Croatia

Muramyl dipeptide (MDP), *N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, is the fragment of peptidoglycan which added to vaccines prolongate or enhance a specific immune response to a specific antigen. Since MDP can not be clinically used because side effects such as pyrogenic activity, numerous MDP derivatives and analogues with improved pharmacological properties were synthesized, including derivatives without sugar part known as desmuramydipeptides. Furthermore, mannose analogues of MDP have showed better adjuvant activity, probably due to interactions of mannose with mannose receptors present on immunocompetent cells.

In the scope of this Diploma Thesis novel desmuramylpeptide mannocojugates with potential adjuvant activity were synthesized. Desmuramylpeptide mannoconjugates have different groups (hydroxy, adamantyl, adamantyl triazole) attached to carboxy group in C-terminus. First 2-(2,3,4,6-*tetra*-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)acetic acid was synthesized. The bromine in *tert*-butyl bromoacetate was substituted with the 2,3,4,6-*tetra*-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranose. Ester group of the prepared *O*-mannoside was hydrolyzed and obtained carboxylic acid was then coupled to corresponding desmuramyldipeptide derivative using EDC / HOBt carbodiimide method. In the last step protective groups from mannose were selectively removed. All the synthesized compounds were characterized by NMR spectroscopy and mass spectrometry, and some of them were additionally analyzed by IR spectroscopy.

(XIII + 56 pages, 17 figures, 23 schemes, 3 tables, 38 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Croatia

**Keywords:** adamantine, adjuvant, desmuramyldipeptide, mannose**Mentor:** Dr. Rosana Ribić, Asst. Prof.**Reviewers:** Dr. Vesna Petrović Pekorović, Assoc. Prof.

Dr. Željka Soldin, Assoc. Prof.

Dr. Sanda Rončević, Assoc. Prof.

**Replacement:** Prof. Dr. Srđanka Tomić-Pisarović**Thesis accepted:** 8<sup>th</sup> December 2016.

## **1. UVOD**

## 1. UVOD

Muropeptidi su razgradni produkti prirodnih polimera peptidoglikana koji izgrađuju stanične stijenke bakterija. Najmanja strukturna jedinica peptidoglikanskog lanca koja pokazuje adjuvantsku aktivnost je *N*-acetilmuramil-L-alanin-D-izoglutamin, tj. muramildipeptid (MDP). Adjuvanti (imunostimulatori) su tvari koje ubrzavaju, produljuju ili pojačavaju specifičnu imunoreakciju na određeni antigen. Muramildipeptid se zbog svojih nuspojava te zbog smanjene intracelularne penetracije u makofage i brze eliminacije ne upotrebljava u kliničke svrhe. Stoga su sintetizirani brojni derivati i analozi MDP radi poboljšanja njegove imunostimulatorne aktivnosti i poboljšanja farmakoloških svojstava. Pokazalo se da je lipofilnost ključan parametar kod dizajna novih adjuvanata. Jedni od perspektivnih analoga MDP su desmuramilpeptidi, analozi bez šećerne podstrukture. Adamantilni desmuramilpeptidi te adamantilamid-dipeptid (AdDP) pokazali su se učinkovitim adjuvantima u eksperimentima *in vivo* u miševima i kunićima. Uvođenjem manoze u strukturu adamantil-desmuramilpeptida dolazi do povećanja imunostimulirajuće aktivnosti polaznog spoja. Kod navedenih derivata adamantan omogućuje ugradnju spojeva u liposome koji omogućuju olakšanu dostavu spojeva do imunokompetentnih stanica. Prilikom ugradnje adamantan ulazi u lipidni dvosloj, dok hidrofilna manozna ostaje na površini liposoma što može dovesti do interakcije s komplementarnim proteinima. Pretpostavlja se da uveden monosaharid manozna aktivira imunološki sustav zbog specifičnih interakcija sa manoznim receptorima (MR).

Cilj ovog diplomskog rada je sinteza te karakterizacija tri nova derivata desmuramilpeptida, (4*R*)-5-amino-4-([(2*S*)-2-{[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)etanoil]amino}propanoil]amino)-5-oksopentanska kiselina (**10**), (4*R*)-*N*-(adamantan-1-il)-5-amino-4-([(2*S*)-2-{[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi) etanoil]amino}propanoil]amino)-5-oksopentanamid (**15**) i 1-(adamantan-1-il)-1,2,3-triazol-4-il]metilni ester (4*R*)-5-amino-4-([(2*S*)-2-{[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)etanoil]amino}propanoil]amino)-5-oksopentanske kiseline (**19**), s potencijalnom adjuvantskom aktivnošću. Sva tri spoja u svojoj strukturi sadrže D-manopiranozu na *N*-terminalnom kraju desmuramildipeptida, L-Ala-D-isoGln. Veza između manoze i peptida ostvarena je posredno, preko glikolne poveznice koja je prethodno pripravljena *O*-glikozilacijom octene kiseline. D-manopiranoza služi za prepoznavanje glikokonjugata od strane manoznih receptora. U sintezi ciljnih spojeva korišteni su standardni postupci pripreme

peptida i *O*-glikozida. Identifikacija ciljnih molekula, kao i svih međuprodukata, napravljena je spektrometrijom masa te spektroskopijama IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR.

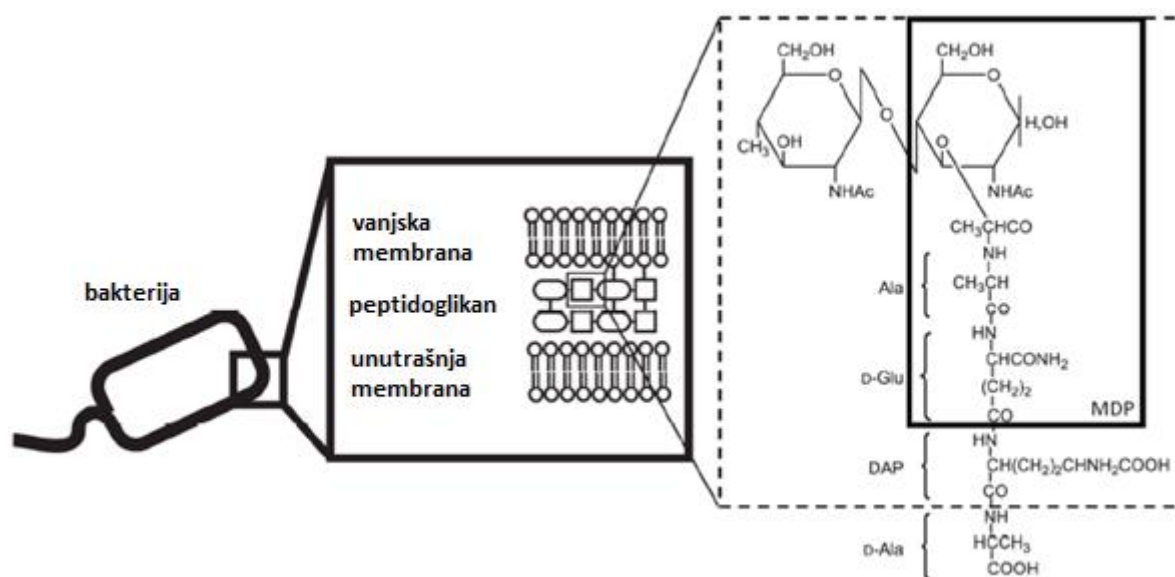
## **2. LITERATURNI PREGLED**

### 2. LITERATURNI PREGLED

#### 2.1. Muropeptidi

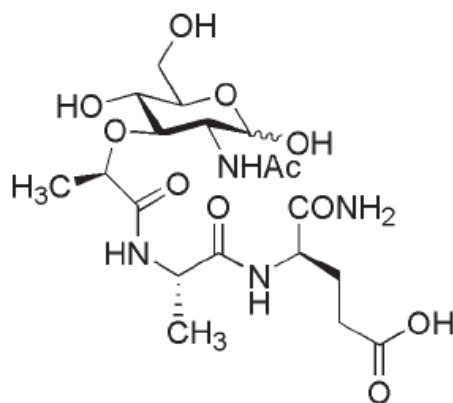
##### 2.1.1. Muramildipeptidi i njegovi derivati

Muramildipeptid je komponenta peptidoglikana koja stimulira nespecifičnu otpornost domaćina na brojne mikroorganizme.<sup>2</sup> Peptidoglikani grade stanične stijenke Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, a uloga peptidoglikana je očuvanje integriteta stanice, njihovog oblika i važan skelet za prihvaćanje drugih komponenata kao što su lipoproteini. Peptidoglikani su prirodni polimeri građeni od molekula *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i *N*-acetilmuraminske kiseline (MurNAc) koje su povezane  $\beta(1\rightarrow4)$  glikozidnim vezama, a umrežene preko kratkih peptida vezanih na MurNAc.<sup>3,4</sup> Taj lanac peptida sastoji se od četiri do pet aminokiselina, od kojih su prve dvije L-Ala i D-Glu, a na trećem mjestu nalazi se L-Lys ili *meso*-diaminopimelinska kiselina (DAP) (slika 1).<sup>3</sup>



Slika 1: Muramildipeptid (MDP) kao dio peptidoglikanske stanične stijenke bakterija

Najmanja strukturna jedinica peptidoglikanskog lanca koja, pokazuje adjuvantsku aktivnost, je *N*-acetilmuramil-L-alanin-D-izoglutamin, tj. muramildipeptid (MDP) (slika 2).<sup>3,4</sup>



Slika 2: Muramildipeptid (MDP)

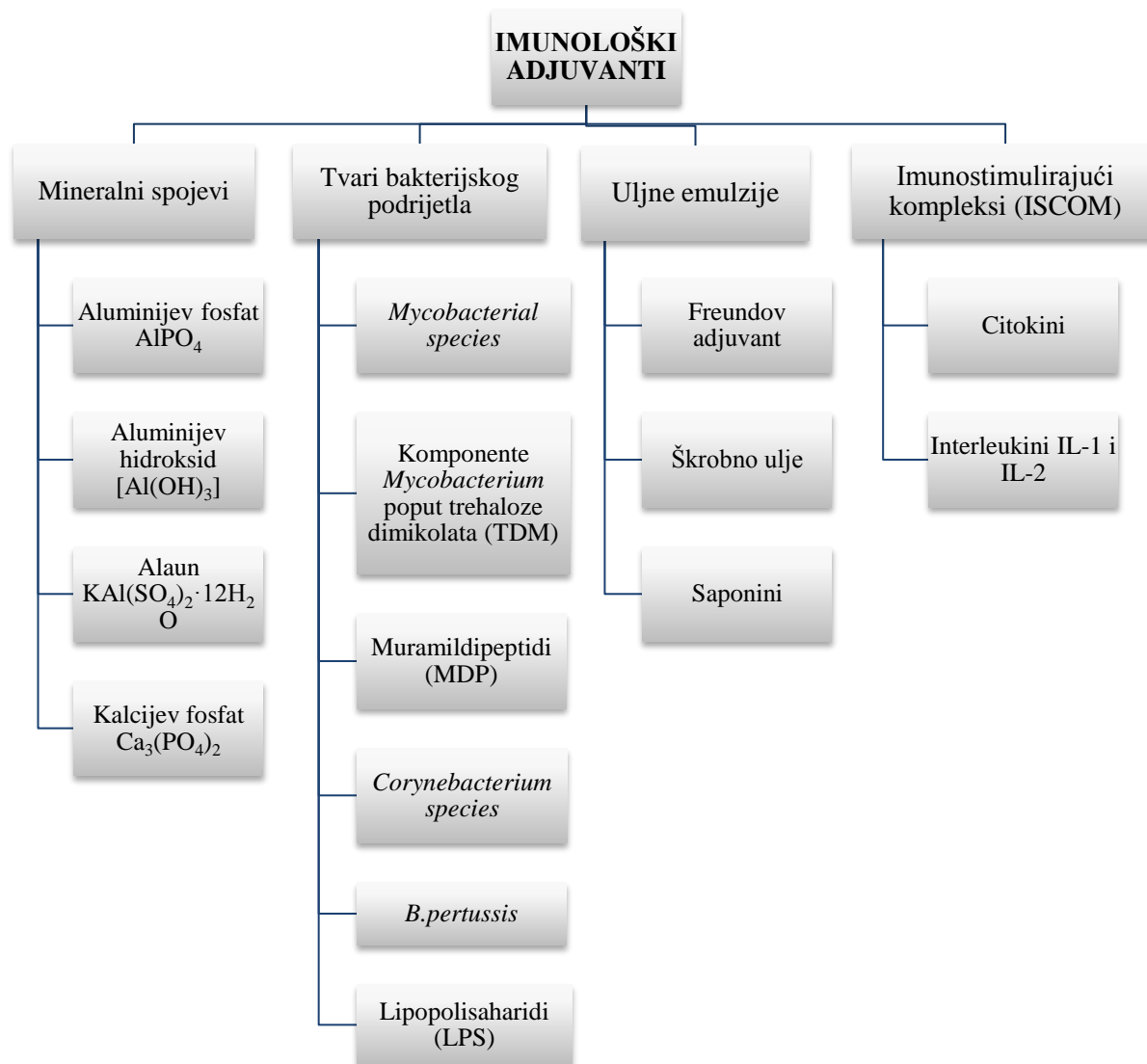
Adjuvanti (imunostimulatori) su tvari koje ubrzavaju, produljuju ili pojačavaju specifičnu imunoreakciju na određeni antigen. Omogućuju bolju obranu organizma od patogenih organizama što je razlog njihovog dodatka u cjepivima koja nisu dovoljno imunogenična.<sup>4</sup> Adjuvanti se klasificiraju obično u nekoliko kategorija, a to su: mineralni spojevi, tvari bakterijskog podrijetla, uljne emulzije, imunostimulirajući kompleksi (ISCOM) i liposomi (slika 3).<sup>5</sup> Tvari bakterijskog podrijetla, među kojima se nalaze i peptidni adjuvanti tj. derivati muramildipeptida, smatraju se dobrim izvorom imunoloških adjuvanata zbog imunostimulirajuće sposobnosti. Aluminijske soli, kao što su aluminijev hidroksid i aluminijev fosfat, su najčešće korišteni adjuvanti u ljudskim cjepivima.<sup>5</sup>

Muramildipeptid se pokazao kao dobar imunostimulator nespecifične imunosti na različite vrste virusa, kao što je HIV, ali se klinički ne upotrebljava zbog svojih nuspojava (artritogenost i pirogenost) koje izaziva.<sup>4,6</sup> Kako bi se poboljšala imunostimulacijska aktivnost MDP i smanjile nuspojave koje izaziva, sintetizirani su brojni derivati i analozi MDP. Uvođenje modifikacija na MurNAc, L-Ala i D-isoGln dijelovima MDP i proučavanje utjecaja strukture na aktivnost spoja utvrđeno je da se adjuvantska aktivnost ne umanjuje ako na šećernom dijelu nema anomerne hidroksilne skupine ili ako se anomerna hidroksilna skupina zamijeni  $\alpha$ - ili  $\beta$ -metilnom skupinom. Amidna skupina na položaju C-2 šećernog dijela je obavezna, ali se može zamijeniti acetamid s nekom drugom acilamido-skupinom. Također, N-acetilglukozamin može biti zamijenjen nekim ugljikohidratnim konformacijskim izomerom, kao što je manozni izomer. Aktivnost se ne gubi ako se primarna hidroksilna skupina na C-6 atomu acilira ili zamijeni s amino- ili acilamino-skupinom. Ukoliko se L-alanina zamijeni s glicinom ili nekom drugom L-aminokiselinom, derivati i dalje pokazuju adjuvantsku

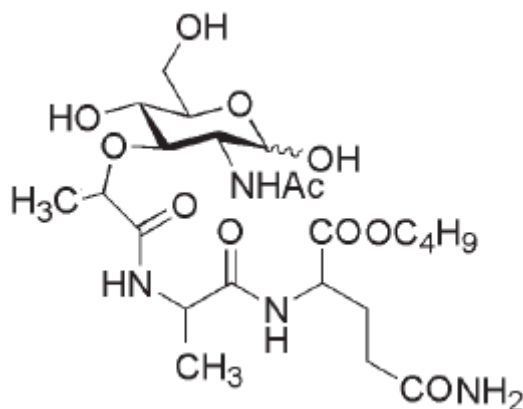


## 2. Literaturni pregled

aktivnost, ali zamjenom s D-alaninom, imunostimulacijska aktivnost se drastično gubi. Za glutaminski dio važno je da sadrži D-konformaciju na  $\alpha$ -ugljkovom atomu i da ima fragment od dvije metilenske skupine, koji razdvaja karboksilne skupine koje mogu biti i supstituirane.<sup>4</sup> Sinergistički učinak s lipopolisaharidima (LPS) koji se nalaze u vanjskoj membrani Gram-negativnih bakterija i prepoznati od strane receptora Toll-like-4 (TLR4) pokazao je MDP.<sup>3</sup> Jedan od derivata koji ima supstituirane karboksilne skupine je murabutid (MB) koji ne izaziva nuspojave i primjenjiv je kod ljudi (slika 4).<sup>4</sup> On poboljšava nespecifičnu otpornost bakterijske i virusne infekcije, djeluje sinergistično kod antivirusnih i antiupalnih citokina i povećava antitumorske učinke IFN-a i IL-2. Murabutid regulira proizvodnju citokina bez ozbiljnijih izazivanja proinflamatornih posrednika.<sup>3</sup> Lipofilnost derivata bitan je parametar u dizajnu potencijalnih imunomodulatora obzirom na nepropusnost membrana prema hidrofiličnim molekulama.

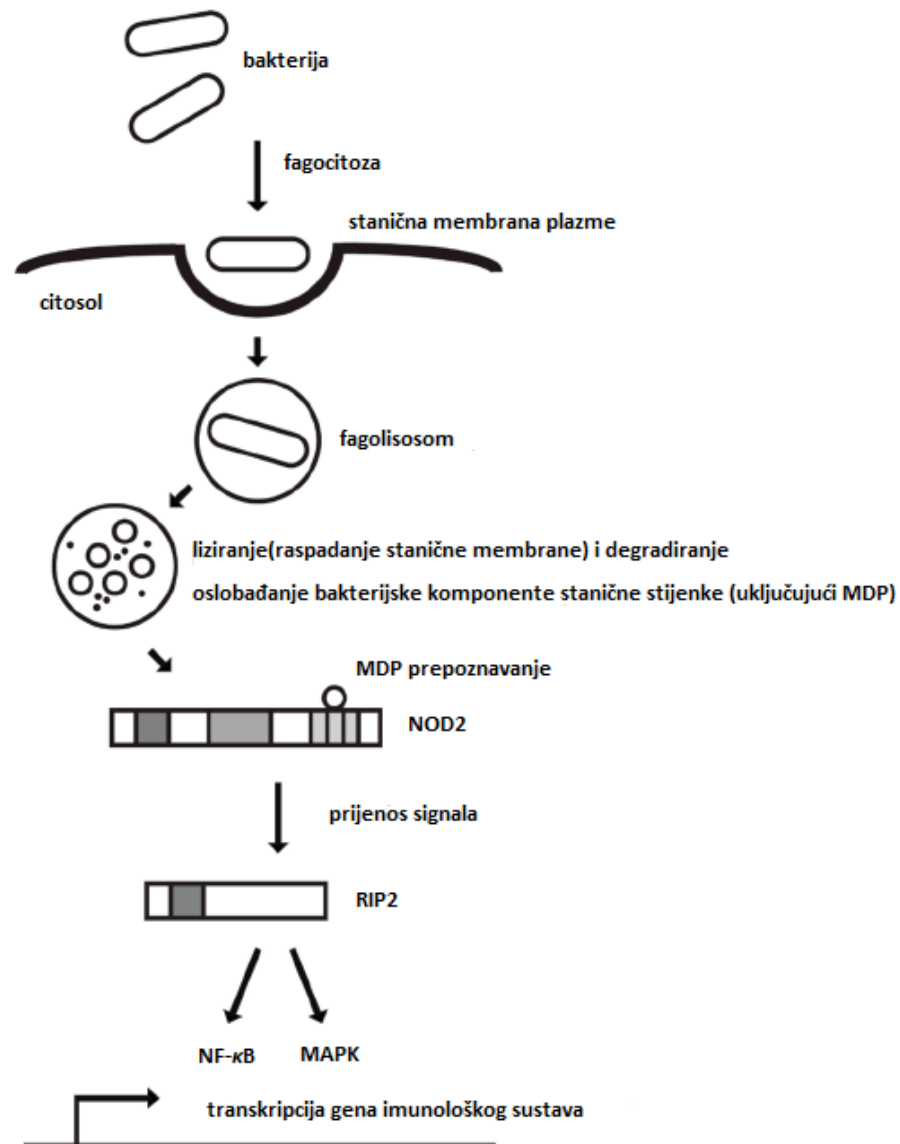


Slika 3: Klasifikacija adjuvanata



Slika 4: Murabutid (derivat muramildipeptida s adjuvantskom aktivnošću)

Poznato je da MDP i njegovi derivati prepoznaju NOD2 (CARD15) receptor koji je odgovoran za fragment MurNAc-L-Ala-D-isoGln. Receptor NOD2 pripada porodici NLR proteina, skupine nukleotid-vezujućih proteina bogatih leucinskim ponavljajućim slijedom (eng. *Nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat protein*). Receptor NOD2 karakteriziraju tri proteinske domene: N-terminalne efektorske domene koja sadrži aktivacijsku domenu za kaspazu (CARD), nukleotid-vezujuće domene (NBD) koja ima mjesto za vezanje ATP-a i potrebna za oligomerizacije; i domene bogate leucinskim ponavljajućim slijedovima (LRR). Nakon detektiranja MDP-a, NOD2 se veže za RIP2 kinazu CARD-CARD interakcijama. Kinaza RIP2 djeluje kao transkripcijski aktivator NF- $\kappa$ B (eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) proteinskog kompleksa. Transkripcijski aktivator NF- $\kappa$ B je kompleks proteina koji kontrolira transkripciju DNA, proizvodnju citokina i opstanak stanica (slika 5). Igra ključnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora na infekciju tako da utječe na produkciju određenih citokina i kemokina.<sup>3,7,8</sup>



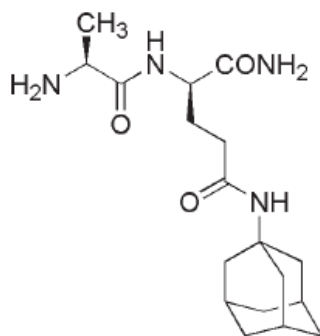
Slika 5: Pojednostavljeni prikaz aktivacije i regulacije NOD2 receptora

### 2.1.2. Desmuramildipeptidi i njegovi derivati

Istraživanja su pokazala da *N*-acetilglukozamin (GlcNAc) u strukturi MDP nije ključan za njegov imunostimulatorni učinak, te su sintetizirani lipofilniji adjuvanti iz MDP koji uključuju modifikaciju šećernog dijela ili potpunu zamjenu acilnim skupinama na *N*-kraju *L*-Ala-*D*-*iso*Gln.<sup>4</sup> Pripravljene su imunološki aktivni MDP analozi bez *N*-acetilmuraminske kiseline i ti analozi se nazivaju desmuramildipeptidi. Za pripravu lipofilnijih biološki aktivnih desmuramildipeptida, *N*-acetilmuraminska kiselina zamjenjena je s ftalimidnom ili adamantilnom skupinom.<sup>9</sup> Adamantil-desmuramildipeptidi dobiveni su vezanjem lipofilne adamantanske podjedinice na *L*-Ala-*D*-*iso*Gln iz muramildipeptida. Adamantilamid-dipeptid

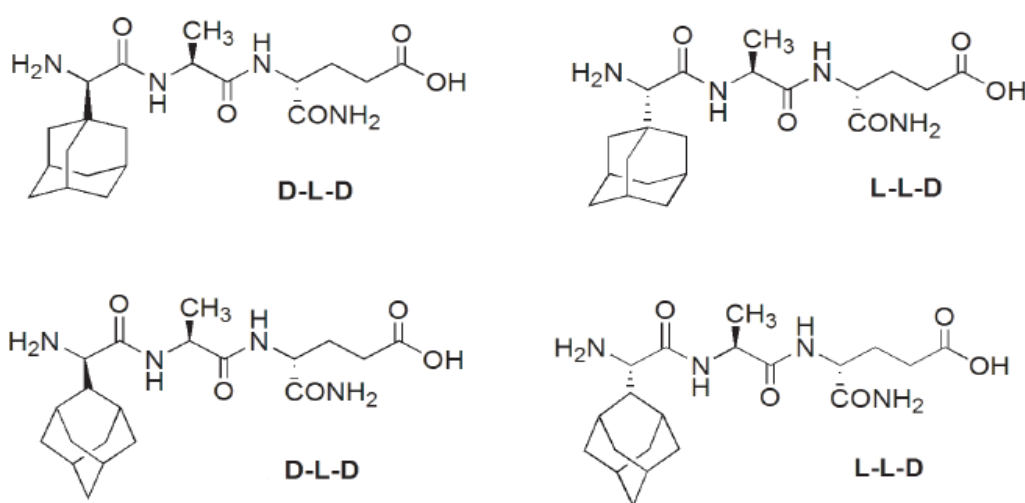
## 2. Literaturni pregled

(AdDP) dobiven je vezanjem 1-aminoadamantana na karboksilnu skupinu izoglutamina (slika 6). Pokazao se vrlo učinkovitim adjuvantom u eksperimentima *in vivo* u miševima i kunićima.<sup>10</sup> Pojačava humoralni odgovor na ovalbumin prilikom oralne primjene te imunološku reakciju usmjerava prema tipu odgovora Th2.<sup>4,11</sup>



Slika 6: Adamantilamid-dipeptid (AdDP)

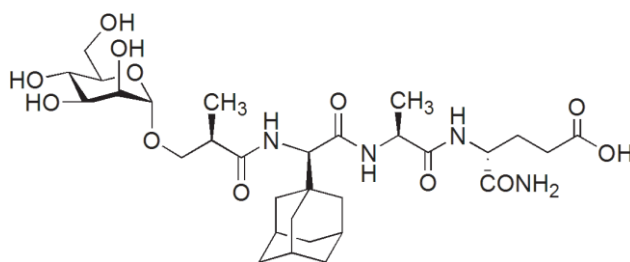
Vezanjem racemičnog adamantilglicina (adamant-1-ilglicin i adamant-2-ilglicin) na amino-kraj dipeptida u MDP umjesto *N*-acetilmuraminske kiseline dobiveni su apirogeni i netoksični diastereomeri adamantil-tripeptida. Dijastereomeri su priređeni racemičnom kondenzacijom i iz dobivene smjese izomera uspješno su odvojeni čisti diastereomeri.<sup>4</sup> Izomeri adamantil-tripeptida pokazali su slabiju biološku adjuvantsku aktivnost te se ugrađuju u liposome kako bi se ta biološka aktivnost poboljšala.<sup>12</sup> (Adamant-2-il)tripeptidima potvrđeno je antivirusno djelovanje na virus gripe tipa A.<sup>13</sup>



Slika 7: Dijastereoisomeri (adamant-1-il)tripeptida i (adamant-2-il)tripeptida

### 2.1.4. Manozilirani derivati desmuramildipeptida

Dobiveni (adamant-1-il)tripeptidi i (adamant-2-il)tripeptidi (slika 7) konjugirani s  $\alpha$ -manozom koja je vezana na njihove terminalne amino skupine. Konjugacija  $\alpha$ -D-manopiranoze ide preko (*R*)- i (*S*)-3-hidroksi-2-metilpropionske poveznice. Dobiveni su glikokonjugati kod kojih je ispitan utjecaj manoze na njihovu adjuvantsku aktivnost i uočeno je da je za stimulaciju imunološkog odgovora poželjna (*R*)-apsolutna konfiguracija na poveznici. Usporedbom aktivnosti D-L-D izomera adamant-1-ila sa slike 7 i njegovog manoliziranog derivata sa spojnicom (*R*) konfiguracije, uočena je pojačana adjuvantska aktivnost manoliziranog tripeptida (slika 8). Manozilacijom adamantiltripeptida preko poveznice (*R*) konfiguracije povećava se imunostimulacijska aktivnost polaznog spoja što je vrlo važno. Manozilirani (adamant-1-il)tripeptid je stabilan, apirogen, netoksičan i topljiv u vodi te ga to čini potencijalno primjenjivim adjuvantom u cjepivima.<sup>4,14</sup>

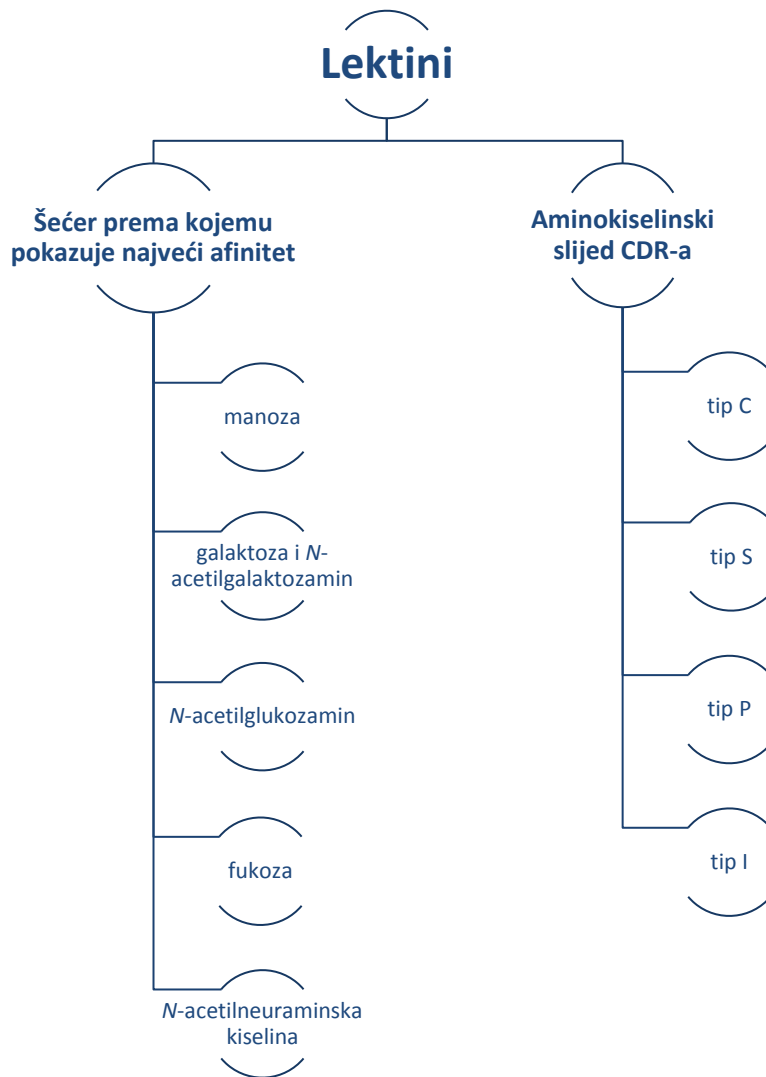


Slika 8: Najučinkovitiji manozilirani (adamant-1-il)tripeptid

Manozilirani adamantil-tripeptidi se mogu upotrijebiti i za pripremu manoziliranih liposoma koji mogu poslužiti kao nosači za ciljanu dostavu aktivnih tvari, lijekova i antigena do stanica s eksprimiranim manoznim receptorima na njihovoj površini. Adamantan se pri tome ugrađuje u lipidni dvosloj, a hidrofilna manozna ostaje na površini liposoma što može dovesti do interakcije s komplementarnim proteinima, lektinima.<sup>4</sup>

### 2.1.5. Manozni receptori

Lektini su proteini koji specifično i reverzibilno vežu šećerne strukture (monosaharide i oligosaharide) te ne pokazuju katalitičku aktivnost. Sudjeluju u različitim biološkim procesima (imunološki odgovor, stanična adhezija, sinteza glikoproteina, regulacija razine proteina u krvi). Lektini su podijeljeni u 5 osnovnih skupina s obzirom na šećer, prema kojemu pokazuju najveći afinitet, i 4 skupine s obzirom na aminokiselinski slijed CDR-a (slika 9). Domena CDR (eng. *carbohydrate-recognition domain*) je aktivni dio lektina koji veže šećer.<sup>4</sup>

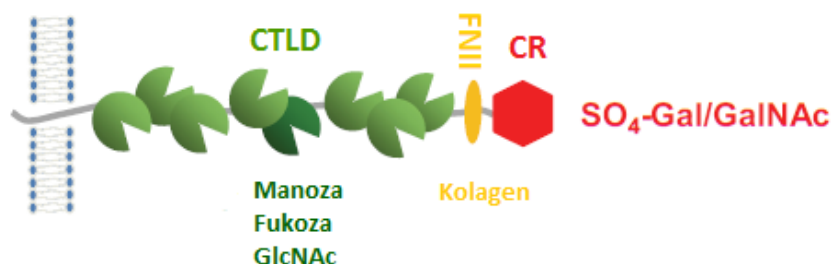


Slika 9: Podjela lektina

Manozni receptori (MR) nalaze se na površini endotelnih stanica, makrofaga i dendritičkih stanica koje prepoznaju antigen T-stanica imunološkog sustava. Pripadaju najvećoj skupini lektina, a to su lektini tipa-C kojima je za vezanja ugljikohidrata potreban ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Manozni receptor je transmembranski protein s ekstracelularnim *N*-krajem, preko kojeg veže makrofage, i intracelularnim *C*-krajem, preko kojeg veže patogene. Ekstracelularni dio receptora s *N*-krajem sadrži tri vrste domena: osam uzastopnih lektinskih domena tipa-C (eng. *C-type lectin-like domain*, CTLD), zatim domena slična fibronektinu tipa II (eng. *fibronectin type II domain*, FNII) i *N*-terminalna domena bogata cisteinom (eng. *cysteine-rich domain*, CR domain). Domena CR veže galaktozu ili *N*-acetil-D-galaktozamin (GalNAc) sa sulfatnim skupinama na položajima C-3 ili C-4 uz prisutnost  $\text{Ca}^{2+}$  iona i jedino ju sadrži manozni receptor. Domena FNII visoko sačuvana kod različitih pripadnika MR veže kolagen I, II, III i

## 2. Literaturni pregled

IV, a slabo kolagen V, dok Endo 180 FNII kolagen I i VI (slika 10).<sup>15</sup> Manozni receptor specifično veže glikokonjugate s terminalnim molekulama manoze, fukoze i GlcNAc preko CTLD domene u procesu ovisnom o  $\text{Ca}^{2+}$  ionima. Od osam CTLD domena prisutnih u MR-u, samo je CTLD4 sposoban za samostalno vezanje šećera. Aktivnost lektina kod Endo 180 olakšava unos glikoziliranih formi kolagena, pokazuje kooperativni efekt između FNII i CTLD2 domena.

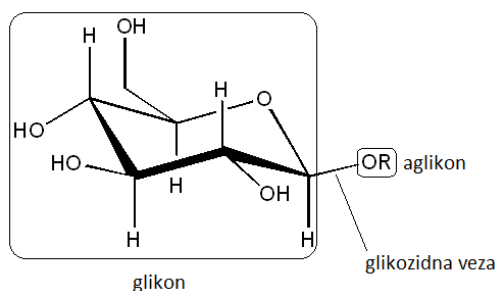


Slika 10: Struktura manoznog receptora

Manozni receptor može poprimiti savijeni oblik konformacije u kojoj su CR domena i CTLD4 u neposrednoj blizini i ovisne su o pH, a aktivnost vezanja MR je prilagođena glikozilaciji. Također se može proteolitički obraditi što dovodi do formiranja funkcionalne topljive forme MR (eng *soluble MR*, sMR).<sup>15</sup>

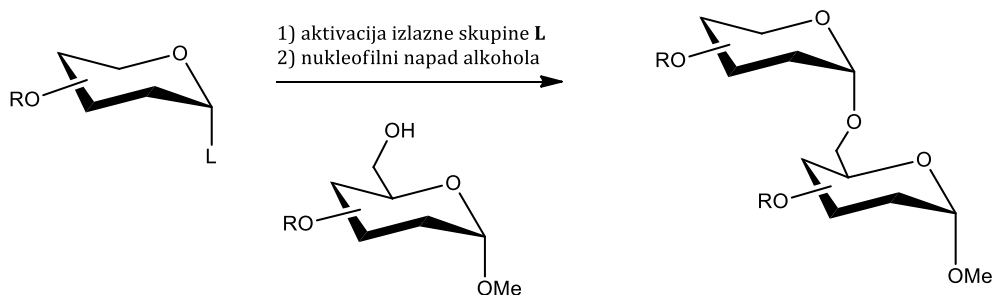
### 2.2. Kemijska sinteza O-glikozida

Glikozidi su acetali ili ketali cikličkih aldoza ili ketoza kod kojih je ugljikohidratni (glikonski) dio tj. molekula šećera glikozidnom vezom preko anomernog ugljikovog atoma povezana s neugljikohidratnim (aglikonskim) dijelom (slika 11). Glikozidna veza može biti ostvarena preko različitih heteroatoma, pa ovisno o aglikonskoj skupini razlikujemo O-glikozide, tioglikozide, glikozilamine i C-glikozilirane spojeve koji sadrže O-, S-, N- ili C-glikozidne veze. Ovisno o položaju glikozidne veze tj. o relativnoj konfiguraciji anomernog ugljikovog atoma glikona razlikujemo  $\alpha$ - i  $\beta$ -glikozidnu vezu. Ako je glikozidna veza usmjerena ispod ravnine prstena tada se radi o  $\alpha$ -glikozidnoj vezi, a ako je veza usmjerena iznad prstena govorimo o  $\beta$ -glikozidnoj vezi.<sup>16</sup>



Slika 11: Struktura *O*-glikozida

Od samog početka kemijske sinteze glikozida do danas razvijeno je mnoštvo metoda u pripravi glikozida. Postupak sinteze oligosaharida zahtjeva aktivaciju anomerne hidroksilne skupine prevođenjem šećera u pogodan glikozilni donor s dobrom izlaznom skupinom te stereoselektivni i katalitički prijenos glikozilnog donora na akceptor. Kao glikozilni donori, prilikom pripreve *O*-glikozida, najčešće se koriste glikozil-halogenidi, tioglikozidi, a kao glikozilni akceptori mogu biti alkoholi, fenoli ili druga molekula šećera koja sadrži samo jednu slobodnu hidroksilnu skupinu.<sup>17,18</sup>



Shema 1: Shematski prikaz reakcije glikozilacije

### 2.2.1. Zaštita slobodnih hidroksilnih skupina

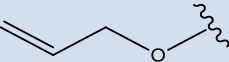
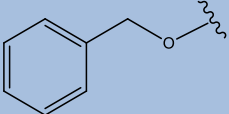
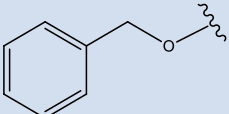
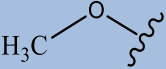
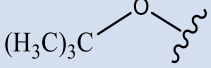
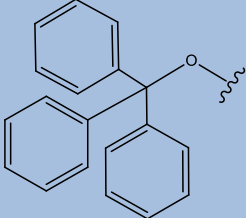
Na konformaciju željenog produkta reakcije s obzirom na glikozidnu vezu utječe dosta faktora. Da bi se reakcija glikozilacije odvijala na anomernom ugljikovom atomu, potrebno je zaštititi ostale slobodne hidroksilne skupine šećera. Kod odabira zaštitne skupine treba uzeti u obzir da neke zaštitne skupine često povećavaju ili smanjuju reaktivnost šećera i utječu na stereokemijski ishod reakcije te je potrebno odabrati pogodnu metodu koja će dati ciljani produkt i željenu konformaciju jer ne postoji univerzalna metoda pripreve glikozida. Kod planiranja sintetskog puta prvi korak je odabir pogodnog glikozidnog donora i njegovog aktivatora. Potom treba odabrati metodu zaštite slobodnih hidroksilnih skupina tako da bude



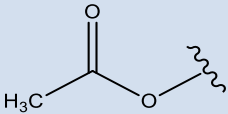
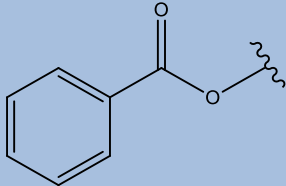
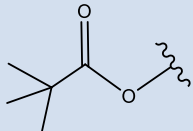
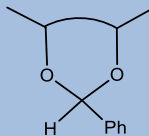
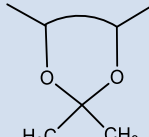
## 2. Literaturni pregled

selektivna tj. da se odvija na anomernom C-atomu i uzeti u obzir utjecaj susjedne skupine na C-2 atomu. U tablici 1 prikazan je kratki pregled zaštitnih skupina u kemiji ugljikohidrata.<sup>17, 19</sup>

Tablica 1: Pregled najčešće korištenih zaštitnih skupina u kemiji ugljikohidrata

GLIKOZIDNA ZAŠTITA		
Zaštitna skupina	Način uvođenja	Način uklanjanja
 <p><b>alil glikozid</b></p>	alilni alkohol, H <sup>+</sup> , refluks	izomerizacija, kisela hidroliza: Pd/C, <i>p</i> -TsOH, refluks
 <p><b>benzil glikozid</b></p>	benzilni alkohol	katalitičko hidrogeniranje: Pd/C, H <sub>2</sub>
ETERSKA ZAŠTITA		
Zaštitna skupina	Način uvođenja	Način uklanjanja
 <p><b>benzilni eter</b></p>	benzil-klorid, NaH, Δ	katalitičko hidrogeniranje: Pd/C, H <sub>2</sub>
 <p><b>metilni eter</b></p>	metil-jodid, NaH, THF	BCl <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
 <p><b>tert-butilni eter</b></p>	izobuten, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	HCOOH
 <p><b>tritolni eter</b></p>	Ph <sub>3</sub> CCl, DMAP ili DBU, piridin	HOAc/H <sub>2</sub> O

## 2. Literaturni pregled

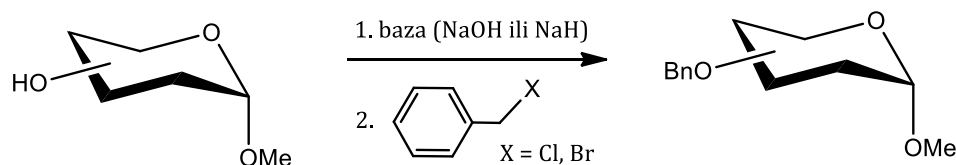
ESTERSKA ZAŠTITA		
Zaštitna skupina	Način uvođenja	Način uklanjanja
 <p><b>acetatni ester</b></p>	acetanhidrid ili acetyl-klorid, piridin, DMAP	NaOMe, MeOH
 <p><b>benzoatni ester</b></p>	benzoil-klorid, piridin ili trietilamin	LiAlH <sub>4</sub> , NaOMe, MeOH
 <p><b>pivalatni ester</b></p>	pivaloil-klorid, piridin	DIBAL-H
ACETALNA ZAŠTITA		
Zaštitna skupina	Način uvođenja	Način uklanjanja
 <p><b>benzilidenski acetal</b></p>	Ph-CHO, ZnCl <sub>2</sub>	katalitičko hidrogeniranje: Pd/C, H <sub>2</sub>
 <p><b>izopropilidenski acetal</b></p>	aceton, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , CuSO <sub>4</sub>	AcOH/H <sub>2</sub> O

Eterska zaštita je jedna od najčešće korištenih zaštitnih skupina u organskoj sintezi. Alkilni eteri, otporni su i u kiselim i u baznim uvjetima te se stoga u kemiji glikozida koriste jedino kao privremene zaštitne skupine.

Najčešće korištena eterska zaštitna skupina je benzilna zaštita tj. benzilni eteri jer su stabilni i u kiselim i u baznim uvjetima i ne podliježu reakcijama oksidacije i redukcije. Benzilni eteri pripremaju se postupkom Williamsonove sinteze etera ili alkiliranjem

## 2. Literaturni pregled

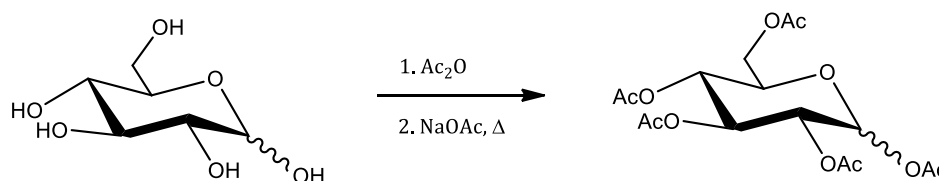
alkoksida metala s benzil-kloridom ili benzil-bromidom u prisutnosti baze u polarnom aprotonskom otapalu, npr. DMF (shema 2).<sup>16, 20</sup>



Shema 2: Uvođenje benzilne zaštitne skupine

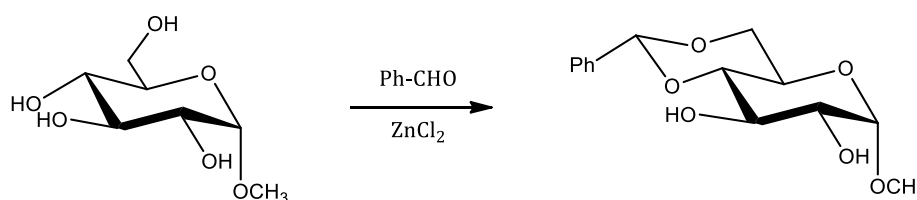
Esteri pružaju jednostavnu i efikasnu zaštitu u reakcijama oksidacije, glikozilacije i sinteze peptida jer su vrlo stabilne zaštitne skupine.

Najčešće korištena esterska zaštitna skupina je acetat koji se u molekulu uvodi reakcijom acetanhidrida u natrijevom acetatu (shema 3). Acetat u obliku zaštitne skupine može u polifunkcionalnim sustavima imati tendenciju prema intramolekularnoj transesterifikaciji, što dovodi do migracije acetata na susjednu hidroksilnu skupinu.<sup>16, 20</sup>



Shema 3: Uvođenje acetatne zaštitne skupine

Ciklički acetali koriste se za zaštitu dviju hidroksilnih skupina na položaju C-4 i C-6 u ugljikohidratnom prstenu. 4,6-*O*-benzilidenski acetali, najčešće korištena acetalna zaštita, uvode se kiselo kataliziranim reakcijama s aldehidima ili ketonima (shema 4), a uklanjaju u kiselim uvjetima. Prilikom uvođenja benzilidenske zaštite kod šesteročlanih prstenova nastaje termodinamički povoljniji produkt s fenilnim supstituentom u ekvatorijanom položaju tj. *trans*-srašteni produkt.<sup>20</sup>

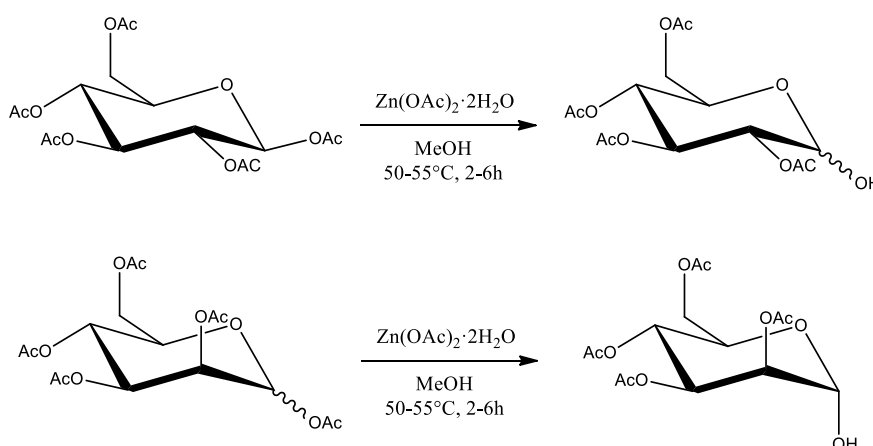


Shema 4: Uvođenje benzilidenske zaštitne skupine

### 2.2.2. Selektivna anomerna deacetilacija

Selektivna anomerna deacetilacija ključni je korak u sintezi acetiliranih glikokonjugata. Koristi se i u pripremi glikozil-donora poput trikloracetimida, glikozil-fluorida i glikozil-jodida. Poznato je nekoliko metoda za selektivno deprotektiranje acetata na anomernom centru glukopiranoze. Upotrebljavaju se kiseli ili bazni reagensi poput hidrazin hidrata, hidrazin acetata, amonijaka, kalijeva karbonata, trifluoroctene kiseline, živin(II) oksid/živin(II) klorid. Međutim, potrebne su stehiometrijske ili prekomjerne količine reagensa i duže vrijeme reakcije.

Anomerna deacetilacija peracetiliranog šećera u kojoj se kao katalizator koristi cinkov acetat dihidrat ( $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) rezultira regioselektivnom deacetilacijom peracetiliranih monosaharida (shema 5).<sup>21</sup> Cinkov acetat dihidrat djeluje kao slaba Lewisova kiselina. Ovo je učinkovita alternativna metoda za selektivnu anomernu deacetilaciju ugljikohidrata koja koristi blage reakcijske uvjete, eksperimentalno je vrlo jednostavna, prihvatljivi prinosi reakcije i ekološki prihvatljive prirode.<sup>21</sup>

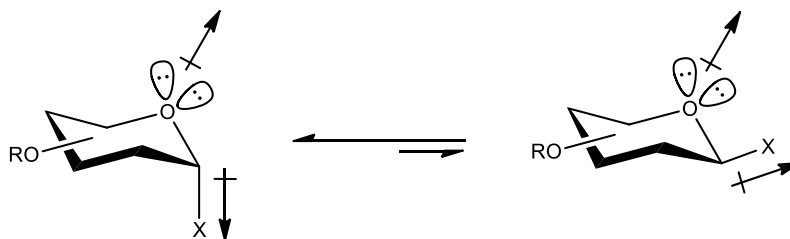


Shema 5: Selektivna deacetilacija anomernih acetatnih skupina pomoću cinkovog acetata kao katalizatora

Kod manoze zbog snažnog anomernog efekta ova reakcija deacetiliranja je ujedno i stereoselektivna. Anomerni efekt uključuje dipol-dipol elektrostatske interakcije u blizini anomernog centra (shema 6).<sup>16</sup> Što je supstituent na anomernom C-atomu elektronegativniji, anomerni efekt je jači te je derivat u  $\alpha$ -konfiguraciji termodinamički stabilniji. Prisutnost supstituenta na C-2 atomu šećera također ima utjecaj na anomerni efekt.<sup>22</sup> Anomerni efekt je jači kada je supstituent u aksijalnom položaju, kao što je to slučaj kod manoze, za razliku od glukoze i galaktoze kod kojih je supstituent u ekvatorijalnom položaju. Položaj supstituenata

## 2. Literaturni pregled

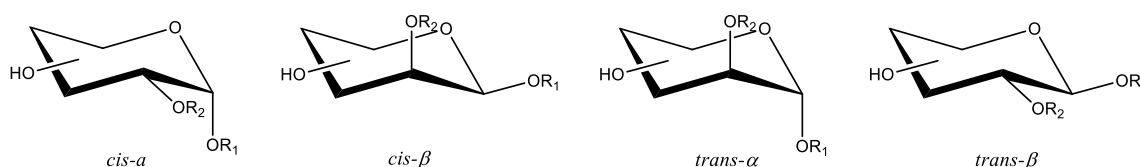
na anomernom atomu u slučaju kada se dva dipola međusobno poništavaju povoljniji je od konfiguracije anomernog centra koja dovodi do njihovog zbrajanja.<sup>17</sup>



Shema 6: Anomerni efekt

### 2.2.3. Stereokemija kemijske sinteze O-glikozida

Glikozilacijom najčešće nastaje smjesa izomera što rezultira malim iskorištenjem reakcije. Glikozilacija je jedna od složenijih reakcija kod sinteze prirodnih spojeva. U određenim uvjetima može biti stereoselektivna tj. može doći do nastajanja samo jednog izomera. Stereokemijski imamo četiri glavna tipa glikozida: 1,2-*cis*  $\alpha$ - i  $\beta$ - te 1,2-*trans*  $\alpha$ - i  $\beta$ -glikozidi (slika 12). Manopiranozidi mogu postojati u dvije konformacije: 1,2-*cis*, odnosno  $\beta$ -te 1,2-*trans*, odnosno  $\alpha$ -konfiguraciji. Na stereoselektivnost utječu temperatura, tlak, koncentracija ili redoslijed dodavanja reaktanata u reakcijsku smjesu, izbor aktivatora i otapala za reakciju, strukture glikozilnog donora i akceptora.<sup>17</sup>

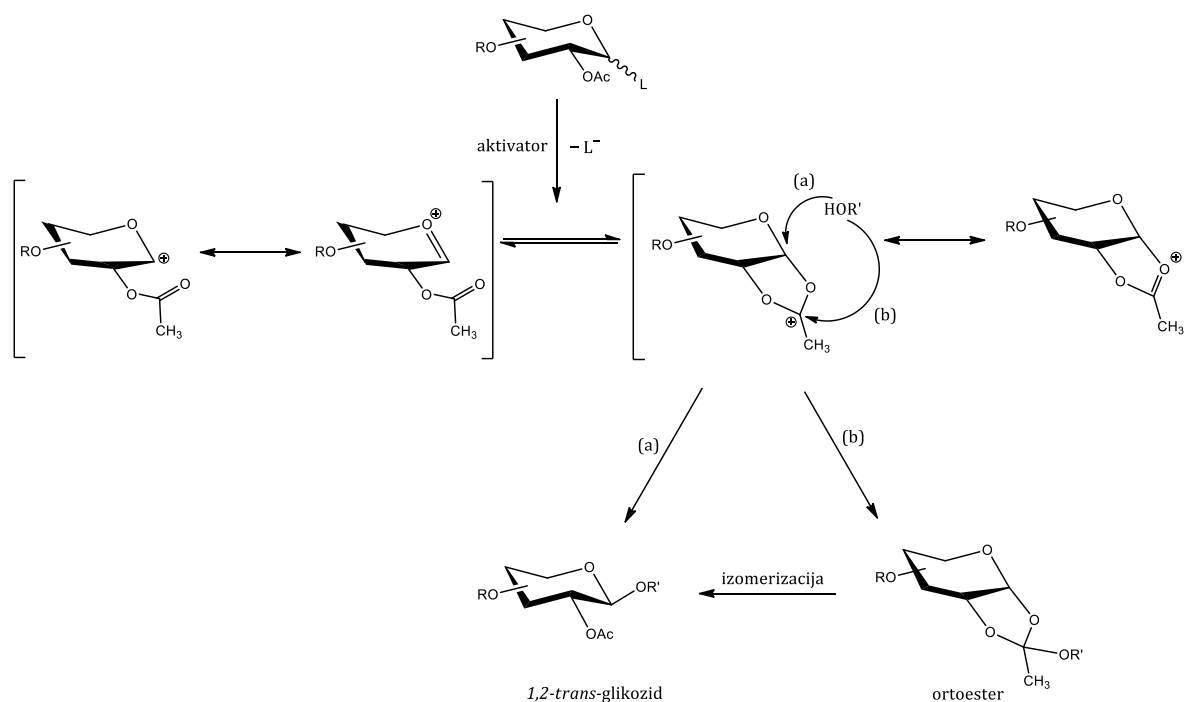


Slika 12: Tip glikozida u odnosu na položaj glikozidne veze

Stereokemija glikozilacije ovisi o zaštitnoj skupini na C-2 atomu. Uz participaciju susjedne skupine na C-2 atomu dolazi do 1,2-*trans*-glikozilacije, a ako nema participacije susjedne skupine dolazi do formiranja 1,2-*trans* i 1,2-*cis*-glikozidne veze. Stereoselektivnu 1,2-*trans*-glikozilaciju lako je postići kod glukoznih i manoznih šećera u prisustvu acilnih skupina, kao što su acetil ili benzoil, na C-2 atomu. Ako je na susjednom C-2 atomu acilna skupina, participacijom dolazi do formiranja acetiloksonijevog iona, a aktivatorom izazvan izlazak izlazne skupine dovodi do formiranja oksokarbenijevog iona što vodi nastanku 1,2-*trans* produkta. Nukleofilni napad alkohola na ugljikov atom dioksalanskog prstena dovodi do

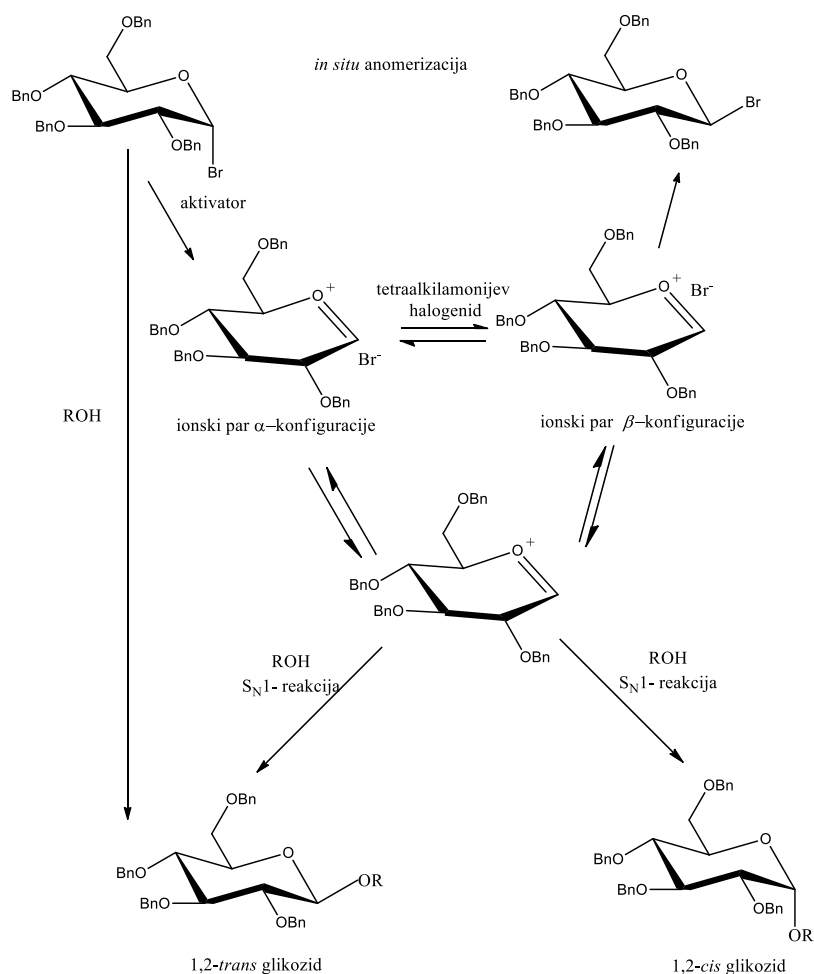
## 2. Literaturni pregled

stvaranja ortoestera, koji može izomerizirati i preći u odgovarajući glikozid (shema 7).<sup>16, 22, 23, 24</sup>



Shema 7: Stereoselektivna 1,2-trans-glikozilacija potpomognuta participacijom susjedne skupine

Za nastajanje 1,2-*cis*-glikozida koristi se *in situ* anomerizacija  $\alpha$ -piranozil-halogenida u prisutnosti tetraalkilamonijeve soli. Nastali nestabilni  $\beta$ -piranozil-halogenid reagira puno brže i u kinetički kontroliranoj reakciji daje 1,2-*cis*-glikozid (shema 8). Prilikom glikozilacije potrebno je uzeti u obzir željenu konfiguraciju glikozidne veze i prema tome odabrati najpovoljniju metodu sinteze i zaštitne skupine monosaharida.



Shema 8: 1,2-*cis* glikozilacija

### 2.3. Metode priprave *O*-glikozida

Od samog začetka kemijske sinteze glikozida i radova Michaela i Emila Fischera te značajnih postignuća Koenigsa i Knorra, do danas je razvijeno mnoštvo metoda i pristupa u kemijskoj sintezi glikozida. U nastavku su detaljnije opisane tri glavne i najčešće korištene metode u pripravi *O*-glikozida, a ostale metode su sažeto prikazane u tablici 2.<sup>16, 19</sup>

Tablica 2: Pregled metoda priprave *O*-glikozida

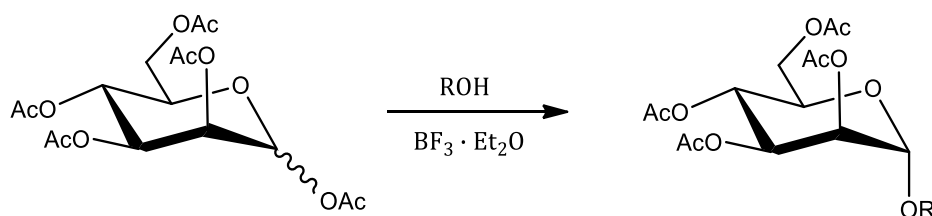
Metoda	Izlazna skupina (L)	Aktivator	Komentar
Helferichova metoda	Br, Cl	Hg(CN) <sub>2</sub> , HgBr <sub>2</sub> ili HgI <sub>2</sub>	Modifikacija Koenigs-Knorr metode. Prinosi reakcije su iznad 70%, ali često nastaje smjesa anomera.

## 2. Literaturni pregled

<b>Michaelova metoda</b>	Br, Cl	NaH K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , NaOH	Koristi 2,3,4,6-tetraacetilglukozil-halogenid kao donor. Nastaje isključivo β-O-glikozid.
<b>Fischerova metoda</b>	OH	HCl (g) ili <i>p</i> -TsOH	Koristi nezaštićeni donor. Dobra za glikozilaciju malih alifatskih alkohola. Reakcija nije stereoselektivna.
<b>Tioglikozilacija</b>	SCH <sub>3</sub> , SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NIS-TfOH NBS TMSOTf	Pogodni za pripremu složenijih šećera. Stabilni glikozidi, mogu biti i glikozilni akceptori.
<b>n-pentenil-glikozilacija</b>	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH=CH <sub>2</sub>	NIS-TfOH, NIS-TMSOTf, NIS-Sn(OTf) <sub>2</sub> ili NIS-BF <sub>3</sub> · Et <sub>2</sub> O	Pogodni za pripremu složenijih šećera. Stabilni glikozidi, mogu biti i glikozilni akceptori.

### 2.3.1. Direktna metoda

Direktna metoda glikozilacije koristi se za pripremu jednostavnih glikozida iz peracetiliranih šećera kao glikozil donora uz dodatak Lewisove kiseline, najčešće borov trifluorid eterat (BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O) koji služi kao aktivator. Acetat na anomernom C-atomu djeluje kao izlazna skupina pri čemu nastaje intermedijerni karbokation koji je stabiliziran kisikovim atomom u prstenu (shema 7). Povoljnom nastajanju acetiloksonijevog iona pridonosi participacija susjedne acetatne skupine s C-2 atoma zbog reverznog anomernog efekta.<sup>25</sup> Nukleofilnim napadom hidroksilne skupine na anomerni C-atom nastaje 1,2-*trans*-glikozid, a napadom na acetiloksonijev ion nastaje ortoester koji izomerizira također u 1,2-*trans*-glikozid. Direktnom metodom moguće je pripremiti α-O-manopiranozide (shema 9) i β-O-galaktopiranozide, dok je priprema β-O-manopiranozida i α-O-galaktozida problem.<sup>16, 22, 23, 24</sup>

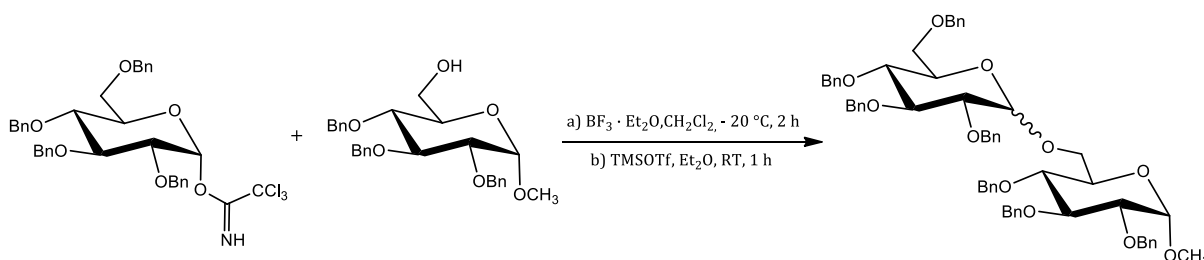


Shema 9: Direktna metoda glikozilacije



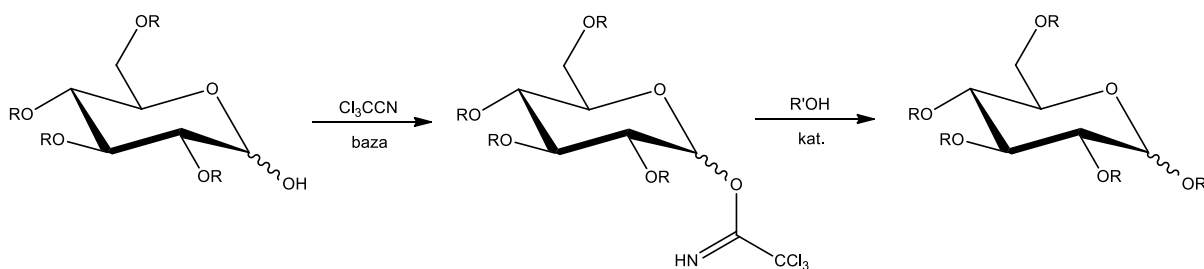
### 2.3.2. Trikloracetimidatna metoda

Začetnikom metode smatra se Schmidt koji je priredio *O*-glikozil-trikloracetimide kao glikozilne donore s vrlo dobrom izlaznom skupinom. *O*-glikozil-trikloracetimidati kao glikozilni donori stabilniji su od analognih glikozil-halogenida, a aktiviraju se pomoću Lewisove kiseline, kao što su  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  ili trimetilsilil-trifluormetansulfonat (TMSOTf).  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  najčešće daje *trans*-glikozide, a TMSOTf *cis*-glikozide (shema 10).



Shema 10: Stereoselektivna glikozilacija trikloracetimidatom

Metoda se temelji na primjeni trikloracetoniirila koji reagira sa slobodnom anomernom hidroksilnom skupinom šećera. Kisik iz anomerne hidroksilne skupine šećera u prisustvu baze ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DBU, NaH) adira se na ugljik iz nitrilne skupine. Nastaje  $\beta$ -glikozil-trikloracetimidat koji je stabilniji od odgovarajućeg glikozil-bromida na niskoj temperaturi, ali zbog osjetljivosti na vlagu iz zraka potrebno ga koristi odmah nakon pripreve (shema 11).<sup>16, 17,</sup>  
26

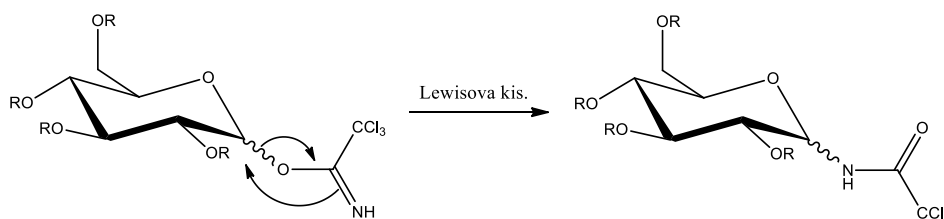


Shema 11: Trikloracetimidatna metoda glikozilacije

U prisustvu Lewisove kiseline glikozil-trikloracetimidati reagiraju s nukleofilima, dok su u baznim i neutralnim uvjetima stabilni. Kod ove metode također je dominantan efekt participacije susjedne skupine na C-2 atomu koji utječe na anomernu konfiguraciju produkta tj. usmjerava prema nastajanju *trans*-glikozida. Ako nema participacije susjedne skupine na

C-2 atomu,  $S_N2$ -reakcijom iz  $\beta$ -trikloracetimidata nastaju  $\alpha$ -glikozidi, a iz  $\alpha$ -trikloracetimidata nastaju  $\beta$ -glikozidi.<sup>16, 17</sup>

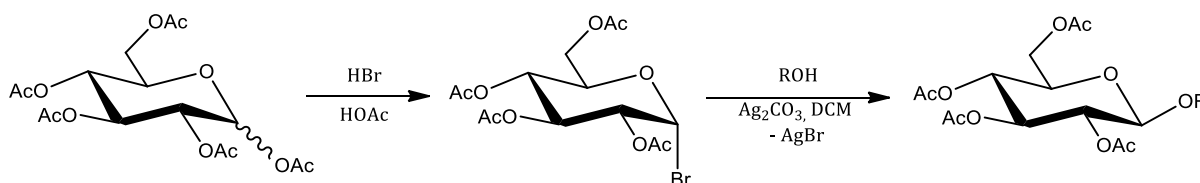
U prisutnosti Lewisove kiseline uvjeti ponekad pogoduju i neželjenoj Chapmanovoj pregradnji trikloracetimidata (shema 12).<sup>19</sup>



Shema 12: Chapmanova pregradnja

### 2.3.3. Koenigs-Knorr metoda

Koenigs-Knorr metoda je jedna od najstarijih i najjednostavnijih metoda pripreve *O*-glikozida koju su predložili Koegnis i Knorr davne 1901. godine kada su reakcijom acetobromglukoze, metanola i srebrvog karbonata dobili metil-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glukopiranozid.<sup>16</sup> Danas je vrlo često korištena metoda za pripremu raznovrsnih *O*-glikozida, kao npr. za pripremu alkil- i aril-glikozida. Kao glikozilni donori koriste se glikozil-bromidi i glikozil-kloridi, priređeni *in situ* reakcijom peracetiliranog šećera i HBr, odnosno kositrovog(IV) klorida u octenoj kiseline. U metodi kao aktivatori koriste se srebrove soli, kako netopljive kao što su srebrov(I) oksid ( $Ag_2O$ ) i srebrov(I) karbonat ( $Ag_2CO_3$ ), tako i topljive kao što su srebrov(I) triflat ( $AgOTf$ ) i srebrov(I) klorat ( $AgClO_3$ ) (shema 13).<sup>16</sup> Kako reakcija zahtjeva suhe uvjete koriste se sredstva za sušenje, a to su kalcijev sulfat, kalcijev klorid i molekulska sita. Iskorištenje reakcije može se povećati dodatkom joda, snažnim miješanjem reakcijske smjese i zaštitom od svjetlosti.<sup>19</sup>



Shema 13: Koenigs-Knorr metoda glikozilacije

Uz participaciju susjedne skupine na C-2 atomu dolazi isključivo do nastanka 1,2-*trans* glikozida osobito kad se kao promotori koriste netopljive soli srebra. U tom slučaju se reakcija zbiva na površini čestica soli uz nastanak  $\beta$ -anomera. Nedostatak Koenigs-Knorr metode je upotreba soli teških metala kao aktivatora, u ekvimolarnim količinama, i nestabilnost  $\beta$ -glikozil-bromida, što je posljedica anomernog efekta.<sup>16, 19</sup>

### 2.4. Sinteza peptida

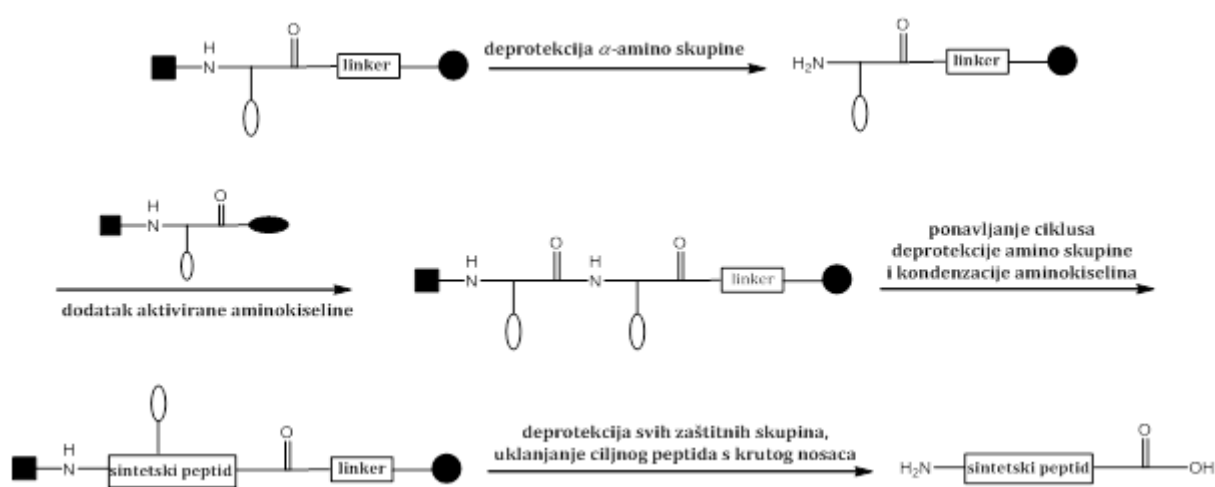
Theodor Curtius je 1881. godine sintetizirao prvi *N*-zaštićeni dipeptid, benzoilglicilglicin, koristeći metodu azidne poveznice kod koje srebrna sol glicina reagira s benzoilkloridom. Međutim, prvi objavljeni sintetski dipeptid, glicilglicin, sintetizirao je Emil Fischer 1901. godine, hidrolizom glicina s diketopiperazinom. Ta sinteza smatra se početkom razvitka peptidne kemije.<sup>27</sup> Prirodni spojevi kao što su hormoni, antibiotici, neuropeptidi i enzimi u svojoj strukturi sadrže aminokiselinske slijedove. Sintetski peptidi danas imaju veliku primjenu u različitim granama znanosti poput farmakologije, molekularne biologije, enzimologije i imunologije. Za dobivanje sintetskih peptida danas se koriste dvije glavne metode: sinteza u otopini i sinteza na čvrstom nosaču.<sup>28</sup>

Općenita sinteza peptida u otopini zahtijeva zaštitu karboksilne skupine (C-terminalni kraj) jedne aminokiseline i zaštitu amino skupine (N-terminalni kraj) druge aminokiseline. Aktivacijom slobodne karboksilne kiseline dolazi do stvaranja amidne veze između dvije aminokiseline čime nastane peptidni fragment, a selektivnim uklanjanjem zaštitnih skupina dovodi do nastanka željenog dipeptida. Kondenzacijom peptidnih fragmenata sintetiziraju se polipeptidi. Prednost metode je mogućnost deprotekcije i pročišćavanja međuprodukta čime se dobiva željeni peptid visoke čistoće, ali metoda je izrazito zahtjevna i dugotrajna jer se svaki međuprodukt prije sljedeće reakcije kondenzacije treba izolirati, pročistiti i okarakterizirati. Reakcije kondenzacije daju male prinose, ali nije moguća ni sinteza velikih oligopeptida jer povećanjem aminokiselinskog slijeda u peptidu dolazi do smanjenja njegove topljivosti u organskim otapalima zbog čega se ova metoda ne koristi često. Metoda je dobra za pripravu manjih oligopeptida, ali je dosta zamijenjena metodom sinteze peptida na čvrstom nosaču.<sup>27</sup>

Američki biokemičar Robert Merrifield je 1959. godine uveo metodu sinteze peptida na čvrstom nosaču (eng. *solid phase peptide synthesis*, SPPS). 1963. godine opisao je sintezu tetrapeptida L-leucil-L-alanilglicil-L-valina metodom gdje je na C-kraj peptida vezan inertni

## 2. Literaturni pregled

polistirenski nosač, a sinteza rastućeg peptida provedena je od C-kraja prema N-kraju. Merrifield je za ovaj izum 1984. godine dobio Nobelovu nagradu za kemiju.<sup>27, 29</sup> Princip metode temelji se na ponavljanju ciklusa „kondenzacija-ispiranje-deprotekcija-ispiranje“. Aminokiselina se preko C-terminalnog kraja povezuje na netopljivi i inertni nosač i kondenzira s drugom aminokiselinom koja ima aktiviranu karboksilnu skupinu i zaštićenu amino skupinu na N-terminalnom kraju. Nakon ispiranja, uklanja se zaštitna skupina s N-terminalnog kraja novonastalog dipeptida, koji u sljedećem ciklusu kondenzacijom stvori novu peptidnu vezu s idućom aminokiselinom. Nakon završetka sinteze u posljednjem ciklusu uklanjaju se zaštitne skupine i dobiveni peptid s čvrstog nosača.



Shema 14: Prikaz sinteze peptida na čvrstom nosaču; ● čvrsti nosač, ■ zaštita amino skupine, ○ zaštitna skupina bočnog lanca, ● aktivirana karboksilna skupina

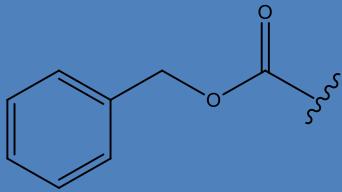
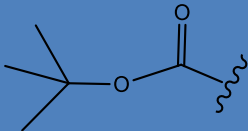
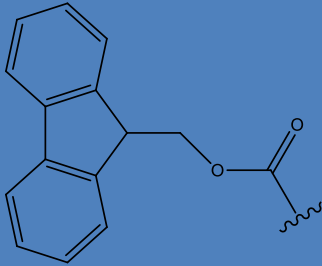
Čvrsti nosači koji se koriste su različite vrste smola, kao npr. polistiren, hidroksimetil, fenilacetamidometil, 4-metilbenzhidrilaminska smola.<sup>29</sup> Za zaštitu bočnog lanca korištene su zaštitne skupine Boc i Fmoc koje se uklone TFA ili 20%-tnim piperidinom u dimetilformamidu.<sup>27, 31</sup> Prednost metode sinteze peptida na krutom nosaču je mogućnost ispiranja neizreagiranih reaktanata i međuprodukata tijekom samog postupka, bez narušavanja kovalentno vezanog rastućeg peptidnog lanca na čvrsti nosač. Uklanjanje ciljnog peptida s čvrstog nosača provodi se u jednom koraku, a korišteni čvrsti nosač moguće je reciklirati. Za veliki prinos reakcija kondenzacije potrebno je svaku aminokiselinu dodati u velikom suvišku, oko 10 ekvivalenata.<sup>32</sup> Metoda je danas automatizirana, ali ima ograničenja - glavni nedostatak je nemogućnost pripreme peptida duljih od 40 aminokiselinskih sekvenci.

### 2.4.1. Zaštitne skupine u sintezi peptida

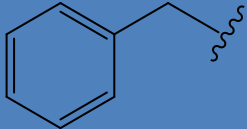
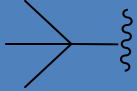
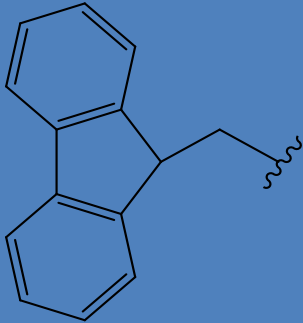
Emil Fischer prvi je prepoznao važnost korištenja privremenih zaštitnih skupina kako bi se postigla regioselektivnost prilikom stvaranja veza u sintezi ugljikohidrata. Bergmann i Zervas razvili su prvu zaštitnu skupinu, koja se i danas koristi u sintetskoj organskoj kemiji, benziloksikarbonilnu skupinu (Cbz ili Z). Zaštitna skupina mora zadovoljavati određene uvjete, a to su: lako uvođenje u molekulu, stabilnost u reakcijskim uvjetima te lako uklanjanje, bilo usred ili na kraju sintetskog postupka.<sup>33</sup>

Kako bi sinteza peptida bila selektivna potrebno je korištenje zaštitnih skupina budući da aminokiseline sadrže dvije vrlo reaktivne skupine, amino i karboksilne skupine. Većina aminokiselina sadrži i reaktivne skupine na bočnim ograncima koje mogu uzrokovati nastanak razgranatih peptida. Zaštitne skupine podijeljene su u tri glavne skupine s obzirom na to zaštićuju li N-kraj, C-kraj ili bočni ogranak. U tablici 3 prikazane su najčešće korištene zaštitne skupine u sintezi peptida.<sup>33</sup>

Tablica 3: Pregled najčešće korištenih zaštitnih skupina u sintezi peptida

Zaštitna skupina	Način uvođenja	Način uklanjanja	Mjesto zaštite
 <b>benziloksikarbonil- (Cbz, Z)</b>	Cbz-Cl ili Cbz-OSu, NaHCO <sub>3</sub> , dioksan, H <sub>2</sub> O	Pd-C / H <sub>2</sub> HBr / HOAc BBr <sub>3</sub>	$\alpha$ -amino skupina
 <b>tert-butoksikarbonil- (Boc)</b>	Boc <sub>2</sub> O, NaHCO <sub>3</sub> , dioksan, H <sub>2</sub> O	25 – 50% TFA / DCM HCl u dioksanu	$\alpha$ -amino skupina
 <b>9-fluorenilmetoksikarbonil- (Fmoc)</b>	Fmoc-Cl ili Fmoc-OSu, NaHCO <sub>3</sub> , dioksan, H <sub>2</sub> O	<u>Kruti nosač:</u> 20% piperidin / DMF 1 – 5% DBU / DMF Morfolin:DMF (1 : 1) <u>Otopina:</u> NH <sub>3</sub> (l) / morfolin 10% dietilamin	$\alpha$ -amino skupina

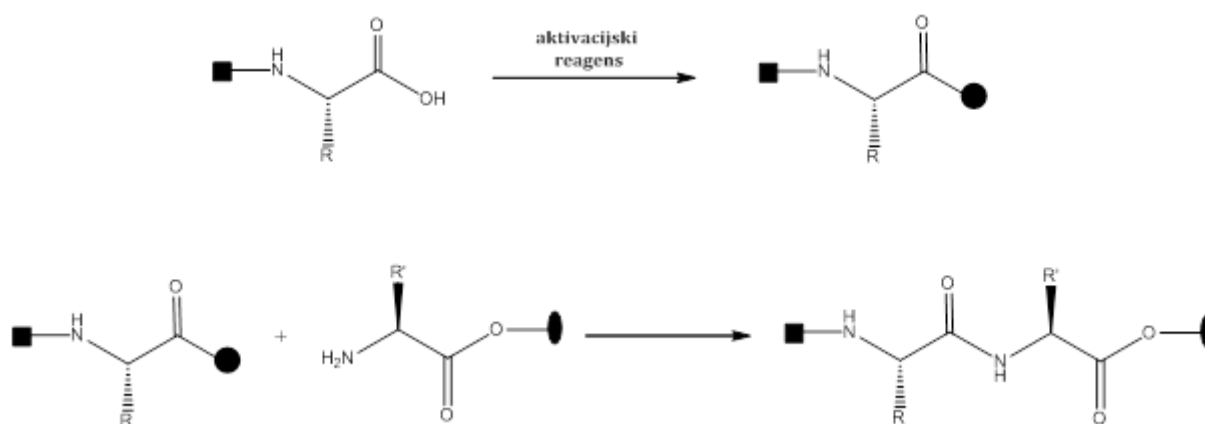
## 2. Literaturni pregled

 benzil- (Bn)	<i>O</i> -benzil- <i>N,N'</i> -diizopropilizourea , THF	Pd-C / H <sub>2</sub> HF TFMSA	$\alpha$ - karboksilna skupina
 <i>tert</i> -butil- ( <i>t</i> Bu)	<i>t</i> -BuOH, EDC·HCl, DMAP, DCM	90% TFA / DCM ( <i>kruti nosač i otopina</i> ) 4 mol dm <sup>-3</sup> HCl / dioksan ( <i>otopina</i> )	$\alpha$ - karboksilna skupina
 9-fluorenilmetil- (Fm)	FmOH, EDC·HCl, DMAP, DCM	20% piperidin / DMF Pd-C / H <sub>2</sub> ( <i>otopina</i> )	$\alpha$ - karboksilna skupina
metiloksikarbonil- (COOMe), etiloksikarbonil- (COOEt)	ClCO <sub>2</sub> Me / K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ClCO <sub>2</sub> Et / K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	LiOH NaOH KOH	$\alpha$ - karboksilna skupina

### 2.4.2. Reakcije kondenzacije aminokiselina

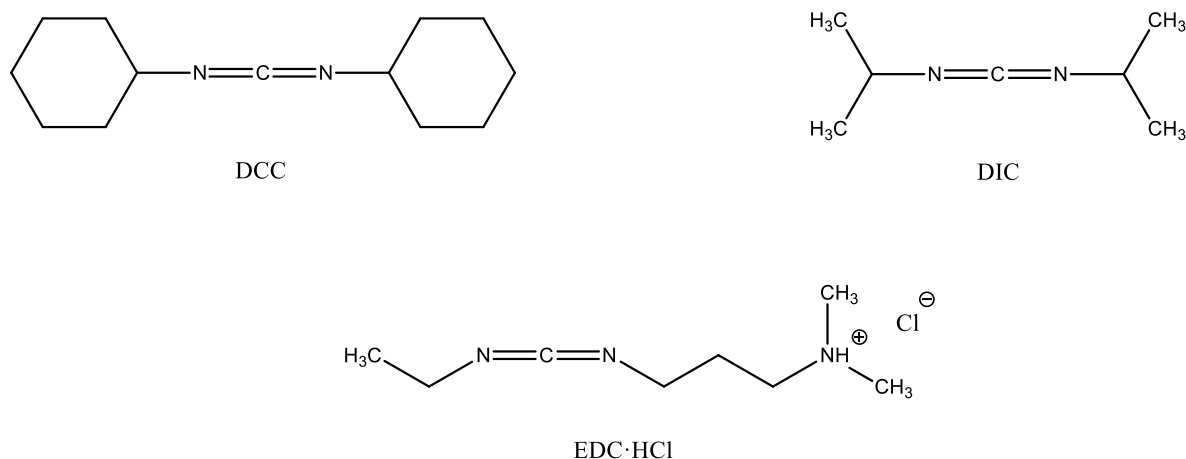
Peptidna veza nastaje nukleofilnim napadom amino skupine jedne aminokiseline na aktiviranu karboksilnu skupinu druge aminokiseline, tj. kondenzacijom dviju aminokiselina (shema 15). U sintezi peptida ključni korak je aktivacija karboksilne kiseline zbog povećanja elektrofilnosti karbonilnog C-atoma te prevođenje hidroksilne skupine u bolju izlaznu skupinu. Dvije metode kondenzacije aminokiselina: u jednoj metodi karboksilna skupina se aktivira *in situ*, a u drugoj se izolira aktivirani ester aminokiseline.

## 2. Literaturni pregled



Shema 15: Reakcija kondenzacije aminokiselina; ■ zaštitna amino skupine, ● aktivator, ○ zaštitna karboksilne skupine

Za aktivaciju  $\alpha$ -karboksilne skupine koriste se aktivatori, a to su: karbodiimidni kao npr. *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC), *N,N'*-diizopropilkarbodiimid (DIC) i *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC·HCl) (slika 13).<sup>34</sup>



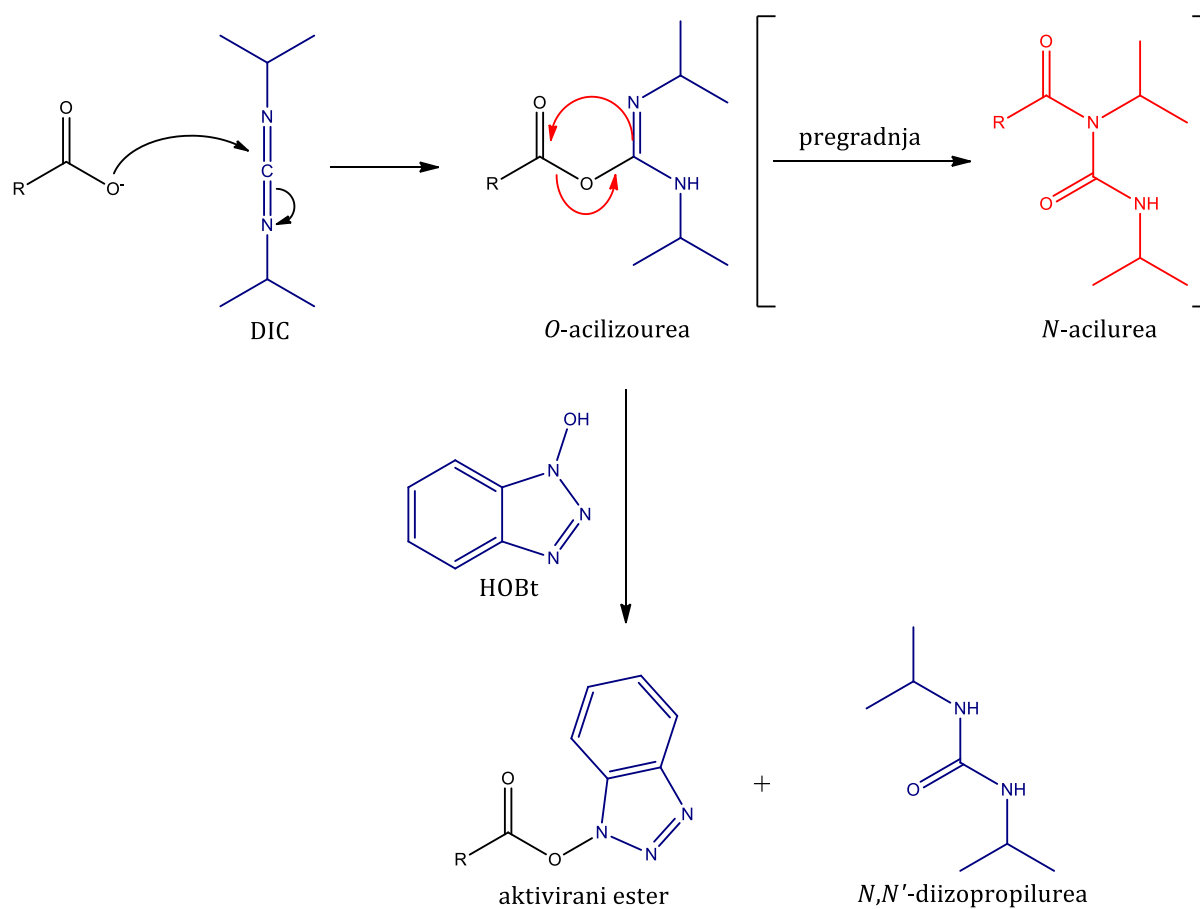
Slika 13: Karbodiimidni aktivatori  $\alpha$ -karboksilne skupine

Prvi karboimid koji se koristio u sintezi peptida na čvrstom nosaču ili u otopini je DCC, uz dodatak aditiva 1-hidroksibenzotriazol (HOBt) ili *N*-hidroksisukcinimid (HOSu). Koristi se za aktivaciju od 1950-tih godina. Unatoč velikim prinosima DCC je danas uvelike zamjenjen aktivatorima DIC i EDC·HCl jer korištenjem DCC tijekom sinteze na krutom nosaču nastaje *N,N'*-dicikloheksilurea koja je netopljiva u većini otapala te ju je teško ukloniti iz reakcijske smjese. Pokazalo se da je DCC i potencijalni alergen. Upotrebom DIC i

## 2. Literaturni pregled

EDC·HCl, kao aktivatora, nusprodukti koji nastaju su topljiviji u vodi i vrlo lako se uklanjaju ekstrakcijom.

Karboksilna skupina nukleofilno napada karbodiimidni C-atom pri čemu nastaje vrlo reaktivni međuprodukt, *O*-acilizourea, koji je podložan nukleofilnom napadu primarne amino skupine. U reakciju se uvode aditivi kao pomoćni reagensi kako bi reagirali s *O*-acilizouream dajući stabilniji međuprodukt. *O*-acilizourea reakcijom pregradnje može prijeći u nereaktivni i stabilni nusprodukt *N*-acilureu. Taj mehanizam prikazan je na shemi 16.<sup>35</sup>

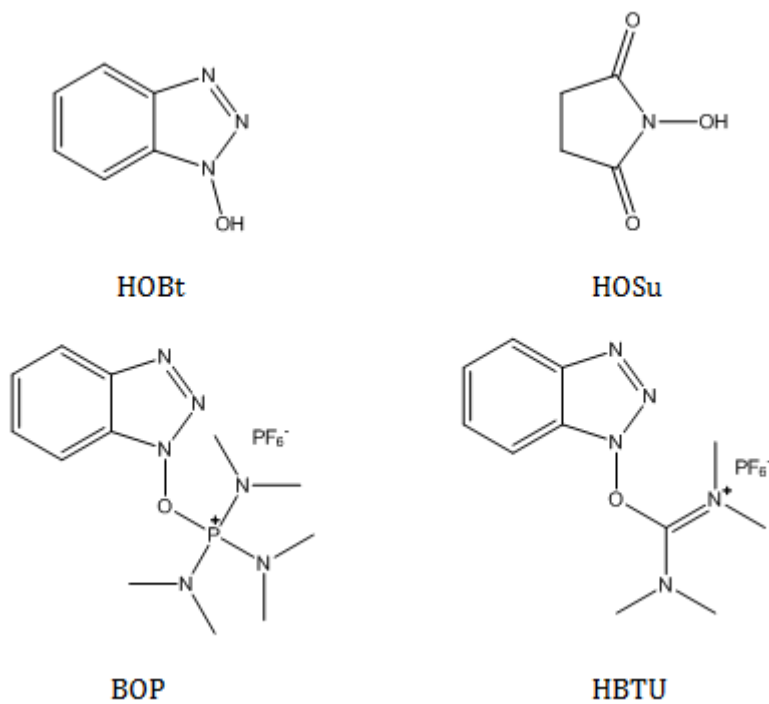


Shema 16: Aktivacija  $\alpha$ -karboksilne skupine aminokiselina pomoću DIC kao karbodiimidni reagens i HOBT kao aktivator

Kao pomoćni reagensi koriste se 1-hidroksibenzotriazola (HOBT) i *N*-hidroksisukcinimida (HOSu), a osim karbodiimida, kao aktivatori mogu se koristiti fosfonijeve i aminijeve soli kao što su benzotriazol-1-il-oksi-tris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat (BOP) i 2-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev heksafluorofosfat (HBTU) (slika 14).



## 2. Literaturni pregled



Slika 14: Strukture kondenzacijskih reagensa (HOBt i HOSu) i aktivatora (BOP i HBTU) koji se često koriste u reakcijama kondenzacije aminokiselina

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

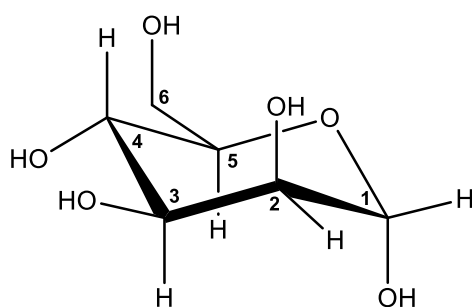
### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali i metode

Svi reagensi i kemikalije korišteni u sintezi bili su analitičke čistoće. Otapala korištena prilikom sinteze pročišćena su prema standardnim literaturnim postupcima.<sup>1</sup>

Tijek reakcija, sastav frakcija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva ispitani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama sa silikagelom i fluorescentnim indikatorom 60 F 254 (5 x 10 cm, 0,25 mm, Fluka). Za kromatografska pročišćavanja na stupcu korišten je silikagel 60 (0,063-0,200 mm, Merck). Za tankoslojnu preparativnu kromatografiju korišten je silikagel Kieselgel 60 HF254, Merck. Detekcija spojeva na TLC pločicama provedena je ultraljubičastim zračenjem, jodom, prskanjem s 0,25 %-tnom otopinom ninhidrina u apsolutnom etanolu uz zagrijavanje te prskanjem s 10 %-tnom vodenom otopinom sumporne kiseline uz zagrijavanje.

Spektri  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR snimljeni su na spektrometru Bruker AV600 (600 MHz za  $^1\text{H}$ , 150 MHz za  $^{13}\text{C}$ ). Kemijski pomaci ( $\delta$ ) izraženi su prema tetrametilsilanu (TMS,  $[(\text{CH}_3)_4\text{Si}]$ ) kao unutarnjem standardu. Ukoliko se vrijednosti pojedinih izomera u spektru NMR adamantil-triazolnih derivata razlikuju, pokraj vrijednosti za jedan izomer u uglatoj zagradi navedena je i vrijednost za drugi izomer. Prilikom asignacije spektara korištena je konvencionalna numeracija vodikovih i ugljikovih atoma u manozu, prema IUPAC-ovim smjernicama (slika 15). Za spektrometriju masa korišten je MS 6410 Triple Quadrupole LC/MS Agilent Technologies instrument, uz elektroraspršenje kao način ionizacije.



Slika 15: Asignacija ugljikovih atoma manoze

## 3. Eksperimentalni dio

Infracrveni spektri (IR-spektri) snimljeni su pomoću instrumenta PerkinElmer Spectrum Two tehnikom KBr pastile za krute uzorke te pomoću pločica NaCl za tekuće uzorke ( $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  uz razlučivanje  $2\text{ cm}^{-1}$ ).

Optičko skretanje je izmjereno na uređaju Schmidt + Haensch Polartronic NH8 pri sobnoj temperaturi.

### 3.2. Sinteza *O*-manozilirane kiseline

#### 3.2.1. 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetil- $\alpha$ -*D*-manopiranoza (**1**)

Manozi (1,001 g, 5,559 mmol) doda se acetanhidrid (8 mL) i jod (~ 60 mg). Na tikvicu se stavi klor-kalcijeva cjevčica i reakcijska smjesa se miješa 110 min pri sobnoj temperaturi. Reakcija se kontrolira postupkom TLC u sustavu otapala kloroform : acetonitril = 3 : 1. Po završetku reakcije reakcijska smjesa se razrijedi diklormetanom ( $V = 50\text{ mL}$ ) i prebaci u lijevak za odjeljivanje u kojem je otopina natrijeva tiosulfata ( $c = 2,5\text{ mol dm}^{-3}$ ,  $V = 50\text{ mL}$ ) i usitnjeni led. Slojevi se odvoje, a organski sloj ekstrahira zasićenom otopinom natrijeva karbonata ( $V = 50\text{ mL}$ ). Organski sloj se odvoji, a vodeni sloj ekstrahira diklormetanom ( $V = 50\text{ mL}$ ). Organski slojevi se spoje, isperu zasićenom otopinom natrijeva hidrogenkarbonata ( $V = 50\text{ mL}$ ) i suše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Sredstvo za sušenje se odfiltrira i otapalo upari na rotacijskom uparivaču. Dobiveno je 2,12 g (98%) čistog produkta spoja **1** u obliku žutog ulja.

$R_f = 0,66$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{CN} = 3 : 1$ )

**IR (NaCl)  $\tilde{\nu}_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$ :** 3062, 2991, 2961, 2941 ( $\text{CH}_{\text{alifatski}}$ ); 1752 (C=O).

**$^1\text{H NMR (CDCl}_3)$   $\delta / \text{ppm}$ :** 6,09 (d, 1H,  $J = 1,8\text{ Hz}$ , H-1 $\alpha$ ); 5,88 (d, 1H,  $J = 1,2\text{ Hz}$ , H-1 $\beta$ ); 5,35 (m, 2H, H-3, H-4); 5,26 (m, 1H, H-2); 4,29 (dd, 1H,  $J = 4,8\text{ Hz}$ ,  $J = 12,4\text{ Hz}$ , H-6a); 4,06-4,14 (m, H-5, H-6b); 2,18 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2,17 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2,10 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2,06 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2,01 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C NMR (CDCl}_3)$   $\delta / \text{ppm}$ :** 170,64; 169,99; 169,74; 169,55; 168,09 (5 C=O; Ac); 90,61 (C1); 70,62; 68,76; 68,35; 65,55 (C2-C5); 62,11 (C6); 20,85; 20,76; 20,71; 20,66; 20,63 (5  $\text{CH}_3$ ; Ac).

**ESI-MS:** izračunato za  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  390,1; dobiveno  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  na  $m/z$  413,1.

#### 3.2.2. 2,3,4,6-Tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoza (2)

1,2,3,4,6-Penta-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoza (2,1227 g, 5,441 mmol) i cinkov acetat dihidrat (0,119 g) zagrijavaju se u suhom metanolu ( $V = 50$  mL) 24 sata na vodenoj kupelji uz miješanje pri temperaturi  $50 - 55$  °C. Reakcija se kontrolira postupkom TLC u sustavu otapala kloroform : acetonitril = 3 : 1. Po završetku reakcije otapalo se upari, a ostatku se doda etil-acetat ( $V = 30$  mL) i ekstrahira se dva puta s vodom ( $V = 20$  mL). Organski sloj suši se na bezvodnom natrijevom sulfatu. Sredstvo za sušenje se odfiltrira i otapalo upari. Sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : acetonitril = 3 : 1 kao eluens. Dobiveno je 0,45 g (24%) čistog produkta spoja **2**  $\alpha$ -konfiguracije u obliku žute uljaste tekućine.

$R_f = 0,46$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{CN} = 3 : 1$ )

**IR (NaCl)  $\tilde{\nu}_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$ :** 3487 (OH); 3068, 2991, 2961 ( $\text{CH}_{\text{alifatski}}$ ); 1752 (C=O).

**$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta / \text{ppm}$ :** 5,42 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 3,2$  Hz,  $J_{3,4} = 10,0$  Hz, H-3); 5,34-5,24 (m, 3H, H1, H-4, OH); 4,29-4,12 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b); 3,71 (d, 1H,  $J_{2,3} = 3,9$  Hz, H2); 2,17 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,11 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,06 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,01 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta / \text{ppm}$ :** 170,86; 170,21; 170,05; 169,80 (4 C=O; Ac); 92,13 (C1); 70,00; 68,73; 68,44; 66,14 (C2-C5); 62,54 (C6); 20,88; 20,74; 20,68; 20,67 (4  $\text{CH}_3$ ; Ac).

**ESI-MS:** izračunato za  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$  348,1; dobiveno  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  na  $m/z$  371,1.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +23,6$  ( $c = 1,2$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

#### 3.2.3. Benzil-bromacetat (3)

U okrugloj tikvici otopi se 2-bromoctena kiselina (10 g, 71,98 mmol) u suhom toluenu ( $V = 20$  mL), doda se benzilni alkohol ( $V = 14,81$  mL, 2 ekvivalenta) i koncentrirana sumporna kiselina ( $V = 46$   $\mu\text{L}$ ) koja služi kao katalizator. Na okruglu tikvicu stavi se Dean – Starkov nastavak koji služi za uklanjanje vode iz reakcijske smjese te se reakcijska smjesa refluksira 24 sata. Reakcija se kontrolira postupkom TLC u sustavu otapala kloroform : metanol = 9 : 1. Na rotacijskom uparivaču upari se toluen i dobije se sirovi produkt. Produkt se destilira vakuum destilacijom. Dobiveno je 7,89 g (96%) produkta **3** u obliku žute tekućine.

$R_f = 0,75$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} = 9 : 1$ )

### 3. Eksperimentalni dio

$t_v = 120\text{ }^\circ\text{C}$  ( $p = 12\text{ Torr}$ ); literaturno<sup>36</sup>  $78\text{-}81\text{ }^\circ\text{C}$  ( $0,09\text{ Torr}$ ).

**IR (NaCl)  $\tilde{\nu}_{\text{max}}$  /  $\text{cm}^{-1}$ :** 3092, 3067, 3031 ( $\text{CH}_{\text{aromatski}}$ ); 2954, 2893 ( $\text{CH}_{\text{alifatski}}$ ); 1737 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{COOBn}}$ ).

**$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  /  $\text{ppm}$ :** 7,38-7,33 (m, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ); 5,20 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ; Bn); 3,87 (s, 2H,  $\text{BrCH}_2$ ).

$[\alpha]_D^{25} = +30,7$  ( $c = 1,7$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

#### 3.2.4. Priprema *O*-manozida nukleofilnom supstitucijom

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoza **2** otopi se u *N,N*-dimetilformamidu ( $V = 7\text{ mL}$ ). Doda se *tert*-butilbromacetat ili benzil-bromacetat (1,5 ekvivalent), kalijev karbonat (5 ekvivalenata) i miješa 2 h pri sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa profiltrira se preko Hirschvogovog lijevka pri sniženom tlaku. Tikvica se pritom ispere s eterom ( $V = 20\text{ mL}$ ). Filtrat se prebaci u lijevak za odjeljivanje i ekstrahira tri puta s vodom ( $V = 45\text{ mL}$ ). Organski sloj se odvoji, a vodeni sloj ekstrahira s eterom ( $V = 15\text{ mL}$ ). Spojeni organski slojevi suše se na bezvodnom  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Sredstvo za sušenje se odfiltrira i otapalo upari na rotacijskom uparivaču. Sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : acetonitril = 3 : 1 kao eluens. Dobiveni je čisti produkt spoja **4**, ako se koristi benzil-bromacetat, ili spoj **5**, ako se koristi *tert*-butilbromacetat.

##### 3.2.4.1. Benzil-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetat (**4**)

Iz 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoze **2** (260,8 mg, 0,749 mmol) i benzil-bromacetata **3** (0,257 g, 1,123 mmol) dobiveno je 0,344 g (92,6%) čistog spoja **4** u obliku žute uljaste tekućine.

$R_f = 0,69$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{CN} = 3 : 1$ )

**$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  /  $\text{ppm}$ :** 7,36 (s, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ); 5,41-5,26 (m, 3H, H-2, H-3, H-4); 5,20 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ; Bn); 4,96 (d, 1H,  $J_{1,2} = 1,1\text{ Hz}$ ; H-1); 4,35-4,13 (m, 4H, H-5, H-6a,  $\text{OCH}_2$ ); 4,04 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 2,1\text{ Hz}$ ,  $J_{6a,6b} = 12,1\text{ Hz}$ , H-6b); 2,15 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2,08 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2,04 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,99 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

### 3. Eksperimentalni dio

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 170,58; 169,78; 169,76; 169,67; 168,86 (5 C=O; Ac); 135,1 (C; Ar); 128,66; 128,58; 128,44 (CH; Ar); 97,98 (C1); 69,20; 69,16; 68,83; 65,85 (C2, C3, C4, C5); 66,91; 64,69; 62,24 (C6, OCH<sub>2</sub>; linker; OCH<sub>2</sub>; Bn); 20,83; 20,71; 20,67; 20,64 (4 CH<sub>3</sub>).

ESI-MS: izračunato za C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>O<sub>12</sub> 496,2; dobiveno [M+Na]<sup>+</sup> na  $m/z$  519,2.

#### 3.2.4.2. Tert-butil-2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetat (5)

Iz 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoze **2** (378,5 mg, 1,087 mmol) i tert-butil-bromacetata (317,9 mg, 1,63 mmol) dobiveno je 0,418 g (83,3%) čistog spoja **5** u obliku žute uljaste tekućine.

$R_f$  = 0,64 (CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>CN = 3 : 1)

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 5,41-5,28 (m, 3H, H-2, H-3, H-4); 4,96 (d, 1H,  $J_{1,2}$  = 1,0 Hz; H-1); 4,30 (dd, 1H,  $J_{5,6}$  = 4,8 Hz,  $J_{6a,6b}$  = 12,2 Hz, H-6b); 4,20 - 4,02 (m, 4H, H-5, H-6a, OCH<sub>2</sub>); 2,26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,48 (s, 9H; CH<sub>3</sub>; *t*-Bu).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 170,62; 169,78; 169,75; 169,69; 168,17 (5 C=O); 97,70 (C1); 82,30 (C; *t*-Bu); 69,32; 69,03; 68,87; 65,92 (C2, C3, C4, C5); 64,89; 62,29 (C6, OCH<sub>2</sub>); 28,03 (CH<sub>3</sub>; *t*-Bu); 20,84; 20,73; 20,68; 20,64 (4 CH<sub>3</sub>).

ESI-MS: izračunato za C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>12</sub> 462,2; dobiveno [M+Na]<sup>+</sup> na  $m/z$  485,2.

#### 3.2.5. 2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octena kiselina (6)

Spoj **5** (418,2 mg, 0,905 mmol) otopi se u suhom diklormetanu ( $V$  = 2 mL) te se doda trifluorooctena kiselina ( $V$  = 1 mL). Na tikvicu stavi se klor-kalcijeva cjevčica. Reakcijska smjesa miješa se 90 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije doda se dietil-eter ( $V$  = 20 mL). Otapalo se upari na rotacijskom uparivaču. Dobiveni sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : acetonitril = 3 : 1 kao eluens. Dobiveno je 0,304 g (83%) čistog produkta spoja **6** u obliku žute uljaste tekućine.

$R_f$  = 0,23 (CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>CN = 3 : 1)

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 5,35-5,25 (m, 3H, H-2, H-3, H-4); 4,95 (d, 1H,  $J_{1,2}$  = 0,9 Hz; H-1); 4,58 (s, <1H, OH); 4,32-4,16 (m, 4H, H-5, H-6a, OCH<sub>2</sub>); 4,11 (dd, 1H,  $J_{5,6}$  = 1,7 Hz,  $J_{6a,6b}$  = 11,5 Hz, H-6b); 2,14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

### 3. Eksperimentalni dio

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 172,45; 172,57; 171,50 (5 C=O); 99,17 (C1); 70,69; 70,49; 70,42; 67,16 (C2, C3, C4, C5); 63,50 (C6,  $\text{OCH}_2$ ); 20,68; 20,65; 20,60 (4  $\text{CH}_3$ ).

ESI-MS: izračunato za  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$  406,1; dobiveno  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  na  $m/z$  429,2.

#### 3.3. Opći postupak uklanjanja *tert*-butoksikarbonil (Boc) zaštite

Spoj kojemu se uklanja zaštita Boc s *N*-terminalnog kraja L-alanin-D-izoglutamina otopi se u suhom diklormetanu ( $V = 2$  mL) i trifluoroctenoj kiselini ( $V = 1$  mL). Na tikvicu stavi se klor-kalcijeva cjevčica i reakcijska smjesa miješa se 1 h pri sobnoj temperaturi. Nakon završetka, reakcijska smjesa razrijedi se dietil-eterom ( $V = 20$  mL). Dodatkom dietil-etera nastaje bijeli talog ili suspenzija. Ako nastaje bijeli talog, otopina iznad taloga ukloni se kapalicom, a ostatak se upari na rotacijskom uparivaču. U slučaju kada nastaje bijela suspenzija tada se otapalo odmah uparava pomoću rotacijskog uparivača. Nakon uklanjanja otapala dobije se sirovi produkt.

##### 3.3.1. Trifluoacetat benzilnog estera L-alanil-D-izoglutamina (7)

Iz benzilnog estera Boc-L-alanil-D-izoglutamina (0,427 g, 1,08 mmol) dobiveno je 0,340 g čistog spoja **7** u kvantitativnom iskorištenju u obliku bijelog taloga.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ /ppm: 7,36-7,30 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ); 5,13 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ; Bn); 4,41 (dd,  $J = 5,1, 9,0$  Hz, 1H, CH *iso*Gln); 3,87 (q,  $J = 7,0$  Hz, 1H, CH Ala); 2,48 (pt,  $J = 7,5, 7,7$  Hz, 2H;  $\text{CH}_2$  *iso*Gln); 2,24-2,13 (m, 1H, CH- $\beta$  *iso*Gln); 2,03-1,91 (m, 1H, CH- $\beta$  *iso*Gln); 1,44 (d,  $J = 7,0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ; Ala).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ /ppm: 193,85, 192,40 (C=O); 129,61; 129,30 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ); 67,56 ( $\text{CH}_2$ ; Bn); 53,72; 50,56 (CH Ala, CH *iso*Gln); 31,42 ( $\text{CH}_2$  *iso*Gln); 28,43 ( $\text{CH}_2$  *iso*Gln); 18,32 ( $\text{CH}_3$ ; Ala).

ESI-MS: izračunato za  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4$  307,2; dobiveno  $[\text{M}]^+$  na  $m/z$  308,1.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +9,3$  ( $c = 0,8$ , MeOH)



#### 3.3.2. (2S)-1-(((2R)-5-[(Adamantan-1-il)amino]-1-amino-1,5-dioksopentan-2-il)amino)-1-oksopropan-2-amonijev 2,2,2-trifluoroacetat (13)

Iz spoja **12** (214,5 mg, 0,476 mmol) dobiveno je 0,357 g čistog spoja **13** u kvantitativnom iskorištenju u obliku bijelog taloga.

$R_f = 0,13$  (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 5 : 1)

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ /ppm: 4,33 (dd, 1H,  $J = 5,10; 8,88$  Hz, CH *iso*Gln), 3,97 (q, 1H,  $J = 7,06$  Hz, CH Ala), 2,23 (pt, 2H,  $J = 7,10; 7,47$  Hz, CH<sub>2</sub> *iso*Gln), 2,14-2,08 (m, 1H, CH- $\beta$  *iso*Gln), 2,06-2,02 (m, 9H, CH Ad, CH<sub>2</sub> Ad), 1,96-1,82 (m, 1H, CH- $\beta$  *iso*Gln), 1,71 (bs, 6H, CH<sub>2</sub> Ad), 1,53 (d, 3H,  $J = 7,07$  Hz, CH<sub>3</sub> Ala);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ /ppm: 176,07 (C=O), 173,87 (C=O), 171,07 (C=O), 54,09 (CH *iso*Gln), 52,86 (C Ad), 50,34 (CH Ala), 42,31 (CH<sub>2</sub> Ad), 37,48 (CH<sub>2</sub> Ad), 33,79 (CH<sub>2</sub> *iso*Gln), 30,90 (CH Ad), 29,18 (CH<sub>2</sub> *iso*Gln), 17,63 (CH<sub>3</sub> Ala).

ESI-MS: izračunato za C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>351,5, dobiveno [M + H]<sup>+</sup> na  $m/z$  351,3.

$[\alpha]_D^{25} = +3,2$  ( $c = 1,6$ , MeOH)

#### 3.3.3. (2S)-1-(((2R)-5-[1-(Adamant-1-il)-1,2,3-triazol-4-il]metoksi-1-amino-1,5-dioksopentan-2-il)amino)-1-oksopropan-2-amonijev 2,2,2-trifluoroacetat (17)

Iz spoja **16** (127,1 mg, 0,239 mmol) dobiveno je 0,194 g čistog spoja **17** u kvantitativnom iskorištenju u obliku bijelog taloga.

$R_f = 0,17$  (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 5 : 1)

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ /ppm: 8,09 (s, 1H, CH triazol), 5,20 (dd, 2H,  $J = 9,2; 12,8$  Hz, CH<sub>2</sub>), 4,40 (dd, 1H,  $J = 4,6; 5,1$  Hz, CH *iso*Gln), 3,97 (q, 1H,  $J = 7,1$  Hz, CH Ala), 2,45 (dt, 2H,  $J = 1,6; 7,5$  Hz, CH<sub>2</sub> *iso*Gln), 2,26 (bs, 9H, CH Ad, CH<sub>2</sub> Ad), 2,21-2,14 (m, 1H, CH- $\beta$  *iso*Gln), 1,99-1,92 (m, 1H, CH- $\beta$  *iso*Gln), 1,84 (m, 6H, CH<sub>2</sub> Ad), 1,49 (d, 2H,  $J = 7,0$  Hz, CH<sub>3</sub> Ala).

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ /ppm: 175,76 (C=O), 173,75 (C=O), 171,15 (C=O), 143,10 (C triazol), 122,35 (CH triazol), 61,27 (C Ad), 58,45 (CH<sub>2</sub>), 53,62 (CH *iso*Gln), 50,32 (CH Ala), 43,88 (CH<sub>2</sub> Ad), 36,86 (CH<sub>2</sub> Ad), 31,20 (CH<sub>2</sub> *iso*Gln), 30,99 (CH Ad), 28,30 (CH<sub>2</sub> *iso*Gln), 17,62 (CH<sub>3</sub> Ala).

ESI-MS: izračunato za C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> 433,5, dobiveno [M + H]<sup>+</sup> na *m/z* 433,3.

#### 3.4. Opći postupak stvaranja amidne veze

Manozilirana glikolna kiselina otopi se u diklormetanu, doda se HOBt (1 ekvivalent) i EDC·HCl (1,2 ekvivalent). Reakcijska smjesa miješa se 20 minuta u ledenoj kupelji. Doda se derivat L-alanil-D-izoglutamina u *N,N*-dimetilformamidu. Volumni omjer diklormetana i *N,N*-dimetilformamida iznosi 1 : 1. Reakcijskoj smjesi potom se doda trietilamin (2-5 ekvivalenata). Smjesa se miješa 1 h u ledenoj kupelji i 47 h pri sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije, smjesa se razrijedi s etil-acetatom (*V* = 20 mL) i ekstrahira dva puta s destiliranom vodom (*V* = 20 mL) ili jednom s 0,5 mol dm<sup>-3</sup> vodenom otopinom HCl-a (*V* = 1 mL). Vodeni sloj ekstrahira se s etil-acetatom (*V* = 10 mL). Organski slojevi se spoje, suše na bezvodnom Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Sredstvo za sušenje se odfiltrira i otapalo upari. Dobiveni sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 5 : 1 kao sustav otapala.

##### 3.4.1. Benzilni ester (4R)-5-amino-4-([(2S)-2-{{2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)etanoil]amino}propanoil]amino)-5-oksopentanske kiseline (8)

Iz spoja **6** (132,2 mg, 0,326 mmol) i spoja **7** (100 mg, 0,326 mmol) dobiveno je 123,8 mg (54,7%) čistog spoja **8** u obliku žute uljaste tekućine.

*R<sub>f</sub>* = 0,73 (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 5 : 1)

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ /ppm: 7,36 – 7,30 (m, 5H, CH<sub>arom</sub>; Bn); 5,41 – 5,36 (m, 2H, H-2, H-3); 5,26 (pt, 1H, *J* = 9,7 Hz, H-4); 5,13 (s, 2H, CH<sub>2</sub>; Bn); 4,93 (s, 1H, H-1); 4,39 – 4,32 (m, 2H, CH Ala i *iso*Gln); 4,28 – 4,07 (m, 5H, H-5, H-6, OCH<sub>2</sub>); 2,49 (pt, 2H, *J* = 7,4 Hz, CH<sub>2</sub> *iso*Gln); 2,30 – 2,19 (m, 1H, CH *iso*Gln); 2,14 (s, 2H, CH<sub>3</sub> Ac); 2,05 (s, 2H, CH<sub>3</sub> Ac); 2,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac); 1,97 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac); 1,98 – 1,88 (m, 1H, CH *iso*Gln); 1,39 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz, CH<sub>3</sub> Ala).

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ /ppm: 176,22; 175,16; 174,34; 172,43; 171,61; 171,58; 171,55; 171,35 (8 C=O); 129,60; 129,31; 129,27 (CH<sub>arom</sub>; Bn); 99,26 (C1); 70,68; 70,47; 70,38; 67,17 (C2, C3, C4, C5); 67,54; 67,43; 63,45 (C6, OCH<sub>2</sub>; Bn, OCH<sub>2</sub>; glikol); 53,78; 50,69 (CH- $\alpha$ ; Ala i *iso*Gln); 31,54; 27,87 (CH<sub>2</sub>- $\beta$  i  $\gamma$ ; *iso*Gln); 20,70; 20,67; 20,65; 20,63 (4 CH<sub>3</sub>; Ac); 17,80 (CH<sub>3</sub>; Ala).

### 3. Eksperimentalni dio

**ESI-MS:** izračunato za C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>15</sub> 695,3; dobiveno [M+H]<sup>+</sup> na *m/z* 696,1.

#### 3.4.2. (4R)-N-(Adamantan-1-il)-5-amino-4-[(2S)-2-[(tert-butoksikarbonil)amino]propanoil]amino]-5-oksopentanamid (12)

Iz spoja **11** (200 mg, 0,631 mmol) i 1-aminoadamantan hidroklorida (130 g, 1,1 ekvivalent) dobiveno je 0,22 g (77,5%) čistog spoja **12** u obliku žute uljaste tekućine.

*R<sub>f</sub>* = 0,2 (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 5 : 1)

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ/ppm:** 4,30 (dd, 1H, *J* = 3,5; 10,8 Hz, CH *iso*Gln), 4,00 (q, 1H, *J* = 7,2 Hz, CH Ala), 2,23-2,12 (m, 3H, *iso*Gln), 2,02 (bs, 9H, CH Ad, CH<sub>2</sub> Ad), 1,91-1,79 (m, 1H, *iso*Gln), 1,71 (bs, 6H, CH<sub>2</sub> Ad), 1,44 (s, 9H, Boc), 1,32 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>3</sub> Ala).

**<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ/ppm:** 176,44 (C=O), 176,20 (C=O), 174,11 (C=O), 174,03 (C=O), 80,82 (C Boc), 53,60 (CH *iso*Gln), 52,94 (C Ad), 52,30 (CH Ala), 42,32 (CH<sub>2</sub> Ad), 37,52 (CH<sub>2</sub> Ad), 34,11 (CH<sub>2</sub> *iso*Gln), 30,93 (CH Ad), 29,06 (CH<sub>2</sub> *iso*Gln), 28,72 (CH<sub>3</sub> Boc), 17,65 (CH<sub>3</sub> Ala).

**ESI-MS:** izračunato za C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> 450,3, dobiveno [M + H]<sup>+</sup> na *m/z* 451,3.

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -5,2 (*c* = 0,7, MeOH)

#### 3.4.3. (4R)-N-(Adamantan-1-il)-5-amino-4-[(2S)-2-[[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-manopiranoziloksi)etanoil]amino]propanoil]amino]-5-oksopentanamid (14)

Iz spoja **6** (138,5 mg, 0,341 mmol) i spoja **13** (158,3 mg, 0,341 mol) dobiveno je 66 mg (26%) čistog spoja **14** u obliku žute uljaste tekućine.

*R<sub>f</sub>* = 0,71 (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 5 : 1)

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ / ppm:** 7,31 (s, 1H, CH); 5,40-5,30 (m, 2H, H-2, H-3); 5,26 (pt, 1H, *J* = 9,7 Hz, H-4); 4,93 (s, 1H, H-1); 4,35 (q, 1H, *J* = 7,1 Hz, CH Ala); 4,39 – 4,08 (m, 5H, *iso*Gln, H-5, H-6, OCH); 3,75 – 3,63 (m, 1H, OCH); 2,45 – 2,36 (m, 1H, CH<sub>2</sub> *iso*Gln); 2,22 – 2,14 (m, 3H, CH<sub>2</sub> *iso*Gln); 2,14 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac); 2,06 – 2,02 (m, 15H; Ad); 1,97 (s, 2H, CH<sub>3</sub> Ac); 1,71 (s, 6H, CH<sub>3</sub> Ac); 1,43 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz, CH<sub>3</sub> Ala).

**<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ / ppm:** 176,49; 175,10; 174,22; 172,42; 171,61; 171,58; 171,54; 171,48 (8 C=O); 99,28 (C1); 70,67; 70,49; 70,39; 67,18 (C2, C3, C4, C5); 67,52; 63,45 (C6, OCH<sub>2</sub>; linker); 54,01; 50,90 (CH-α; Ala i *iso*Gln); 53,01 (C; Ad); 42,37; 37,57 (CH<sub>2</sub>; Ad);

### 3. Eksperimentalni dio

34,17; 28,93 (CH<sub>2</sub>-β i γ; *iso*Gln); 30,97 (CH; Ad); 20,70; 20,68; 20,66; 20,63 (4 CH<sub>3</sub>; Ac); 17,74(CH<sub>3</sub>; Ala).

ESI-MS: izračunato za C<sub>34</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>14</sub> 738,3; dobiveno [M+H]<sup>+</sup> na *m/z* 739,4.

#### 3.4.4. 1-(Adamantan-1-il)-1,2,3-triazol-4-il]metilni ester (4R)-5-amino-4-([(2S)-2-[[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-manopiranoziloksi)etanoil]amino}propanoil]amino)-5-oksopentanske kiseline (18)

Iz spoja **6** (127,3 mg, 0,313 mmol) i spoja **17** (193,8 g, 0,364 mol) dobiveno je 127,5 g (50%) čistog spoja **18** u obliku žute uljaste tekućine. (Kemijski pomaci signala NMR manje zastupljenijeg izomera navedni su u uglatoj zagradi.)

R<sub>f</sub> = 0,73 (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 5 : 1)

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ/ppm: 7,98 (s, 1H, CH triazol) [8,09 (s, 0,3H, CH triazol)]; 5,40 – 5,20 (m, H-2, H-3, H-4); 4,93 (s, H-1); 4,57 (s, CH<sub>2</sub>; triazol); 4,38-4,07 (m, CH Ala, CH *iso*Gln, H-5, H-6, OCH<sub>2</sub>); 2,46 (pt, CH<sub>2</sub> *iso*Gln), 2,26 (bs, H Ad); 2,20 – 1,89 (m, CH<sub>2</sub> *iso*Gln), 1,84 (bs, H Ad), 1,39 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz, CH<sub>3</sub> Ala); [1,29 (d, 1,1 H, *J* = 7,1 Hz, CH<sub>3</sub> Ala)];

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ/ppm: 176,91; 175,16; 174,11; 172,39; 171,59; 171,56; 171,54; 171,33 (C=O), 143,21 (C; triazol), [122,42 (CH; triazol)]; 120,66 (CH; triazol); 99,26 (C1); 70,67; 70,46; 70,38; 67,19 (C2, C3, C4, C5); 67,42; 63,46; 58,60; 56,59 (C6, OCH<sub>2</sub>; glikol, CH<sub>2</sub>; triazol, C; Ad); 53,71; 50,71 (CH-α; Ala i *iso*Gln); 43,98; 43,91; 36,97 (CH<sub>2</sub>; Ad); 31,04 (CH; Ad); 31,37; 27,80 (CH<sub>2</sub>-β i γ; *iso*Gln); 20,71; 20,68; 20,66; 20,64 (4 CH<sub>3</sub>; Ac); 17,80 (CH<sub>3</sub>; Ala).

ESI-MS: izračunato za C<sub>37</sub>H<sub>52</sub>N<sub>6</sub>O<sub>15</sub> 820,4; dobiveno [M+H]<sup>+</sup> na *m/z* 821,4.

### 3.5. Sinteza adamantil-triazolnog derivata desmuramildipeptida

#### 3.5.1. (4R)-[1-(Adamantan-1-il)-1,2,3-triazol-4-il]metil-5-amino-4-([(2S)-2-[(*tert*-butokarbonil)amino]propanoil]amino]-5-oksopentanoat (16)

Spoj **11** (175 mg, 1 ekvivalent) otopi se u suhom dioksanu (*V* = 5 mL). Doda se adamantil-triazolni alkohol (129 mg, 0,553 mmol) otopljen u suhom diklormetanu (*V* = 5 mL) i 4-dimetilaminopiridin (6,75 mg, 0,1 ekvivalent). Reakcijska smjesa miješa se 15 minuta u

### 3. Eksperimentalni dio

ledenoj kupelji i zatim se doda EDC·HCl (116,4 mg, 1,1 ekvivalent). Reakcijska smjesa miješa se 1 h u ledenoj kupelji i 47 h pri sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije, smjesa se razrijedi s etil-acetatom ( $V = 20$  mL) i ekstrahira s  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl ( $V = 10$  mL). Organski sloj ekstrahira se zasićenom vodenom otopinom  $\text{NaHCO}_3$  ( $V = 10$  mL). Spojeni organski slojevi suše se na bezvodnom  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Sredstvo za sušenje se profiltrira i otapalo upari. Dobiveni sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 5 : 1 kao eluens. Dobiveno je 127,1 mg (43%) čistog spoja **16**.

$R_f = 0,47$  ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 5 : 1)

**$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ :** 8,08 (s, 1H, triazol), 7,89 (s, 1H, NH), 5,19 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4,37 (bd, 1H,  $J = 5,0$  Hz, CH *iso*Gln), 4,00 (q, 1H,  $J = 7,1$  Hz, CH Ala), 2,44 (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{CH}_2$  *iso*Gln), 2,34-2,28 (m, 1H, *iso*Gln), 2,26 (bs, 9H, CH Ad,  $\text{CH}_2$  Ad), 1,95-1,86 (m, 1H, *iso*Gln), 1,84 (bs, 6H,  $\text{CH}_2$  Ad), 1,42 (s, 9H, Boc), 1,28 (d, 2H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_3$  Ala).

**$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ :** 176,23 (C=O), 176,20 (C=O), 173,94 (C=O), 143,30 (C triazol), 122,35 (CH triazol), 80,64 (C Boc), 61,47 (C Ad), 58,51 ( $\text{CH}_2$ ), 53,35 (CH *iso*Gln), 52,06 (CH Ala), 43,88 ( $\text{CH}_2$  Ad), 36,89 ( $\text{CH}_2$  Ad), 31,20 ( $\text{CH}_2$  *iso*Gln), 30,97 (CH Ad) 28,69 ( $\text{CH}_3$  Boc), 27,95 ( $\text{CH}_2$  *iso*Gln), 17,71 ( $\text{CH}_3$  Ala).

**ESI-MS:** izračunato za  $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_6$  532,3; dobiveno  $[\text{M}+\text{H}]^+$  na  $m/z$  533,3.

#### 3.6. Opći postupak hidrogenolize

Spoju otopljenom u metanolu doda se 10% Pd/C. Hidrogenoliza se odvija od 1,5 do 24 h pod tlakom vodika od 33-38 PSI. Nakon hidrogenolize, reakcijska se smjesa profiltrira te se filtrat upari.

##### 3.6.1. **(4R)-5-Amino-4-([(2S)-2-[[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)etanoil]amino]propanoil]amino)-5-oksopentanska kiselina (9)**

Iz spoja **8** (50,5 mg, 0,073 mmol) uz 10% Pd/C (15 mg), u reakciji vođenoj 1,5 h pod tlakom vodika od 33 PSI dobiveno je 40,4 g (92%) čistog spoja **9** u obliku uljaste tekućine.

$R_f = 0,12$  ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 9 : 1)

**$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ :** 5,41 – 5,37 (m, 2H, H-2, H-3); 5,30 – 5,25 (t, 1H,  $J = 9,8$  Hz, H-4); 4,93 (s, 1H, H-1); 4,41 – 4,34 (m, 2H, CH Ala i *iso*Gln); 4,27 – 4,09 (m, 5H, H-5, H-6,  $\text{OCH}_2$ ); 2,43 – 2,39 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  *iso*Gln); 2,25 – 2,17 (m, 1H, CH *iso*Gln); 2,15 (s, 3H,  $\text{CH}_3$

### 3. Eksperimentalni dio

Ac); 2,06 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac); 2,04 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac); 1,99-1,85 (m, 1H, CH *iso*Gln); 1,98 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac); 1,43 – 1,41 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz, CH<sub>3</sub> Ala).

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ /ppm: 175,11; 174,92; 173,75; 170,13; 169,93 (C=O); 97,82 (C1); 69,27; 69,05; 68,95; 65,75 (C2, C3, C4, C5); 66,04; 62,03 (C6, OCH<sub>2</sub>; linker); 52,58; 49,27 (CH- $\alpha$ ; Ala i *iso*Gln); 29,95; 26,49 (CH<sub>2</sub>- $\beta$  i  $\gamma$ ; *iso*Gln); 19,19 (4 CH<sub>3</sub>; Ac); 16,35 (CH<sub>3</sub>; Ala).

ESI-MS: izračunato za C<sub>24</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>15</sub> 605,2; dobiveno [M-H]<sup>-</sup> na *m/z* 603,9.

#### 3.6.2. (4R)-5-Amino-4-[(2S)-2-[(tert-butoksikarbonil)amino]propanoil]amino]-5-oksopentanska kiselina (11)

Iz benzilnog estera Boc-L-alanil-D-izoglutamina (600 mg, 1,47 mmol) uz 10% Pd/C (280 mg), u reakciji vođenoj 24 h pod tlakom vodika od 38 PSI dobiveno je 302 mg (65%) čistog spoja **11** u oblik bijelog taloga.

*R<sub>f</sub>* = 0,52 (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 2 : 1)

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ /ppm: 4,36 (dd, 1H, *J* = 4,26; 10,25 Hz, CH *iso*Gln), 4,02 (q, 1H, *J* = 7,15 Hz, CH Ala), 2,38 (pt, 2H, *J* = 7,80; 7,30 Hz, CH<sub>2</sub> *iso*Gln), 2,20 (m, 1H, CH *iso*Gln), 1,90 (m, 1H, CH *iso*Gln), 1,43 (s, 9H, Boc), 1,30 (d, 3H, *J* = 7,16 Hz, CH<sub>3</sub> Ala);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ /ppm: 176,50 (C=O), 176,47 (C=O), 176,42 (C=O), 176,40 (C=O), 80,79 (C Boc), 53,70 (CH *iso*Gln), 52,09 (CH Ala), 31,29 (CH<sub>2</sub> *iso*Gln), 28,74 (CH<sub>3</sub> Boc), 28,15 (CH<sub>2</sub> *iso*Gln), 17,73 (CH<sub>3</sub> Ala).

ESI-MS: izračunato za C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> 317,2; dobiveno [M+Na]<sup>+</sup> na *m/z* 340,1.

#### 3.7. Opći postupak deacetiliranja

Spoj kojem se uklanjaju acetatne zaštitne skupine s D-manoze otopi se u suhom metanolu (*V* = 1 mL) te se doda otopina natrijevog metoksida u metanolu (*c* = 4,36 mol dm<sup>-3</sup>, *w* = 25%, 0,1 ekvivalent). Reakcija se vodi 1,5 h pri sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije, smjesa se propusti kroz kraći stupac silikagela i eluira sa smjesom otapala kloroform : metanol = 5 : 1. Navedenim eluensom uklanjaju se onečišćenja i neizreagirani reaktanti, a nakon toga čistim metanolom konačni produkt. Otapalo se upari na rotacijskom uparivaču i u tikvici zaostaje čisti produkt.

#### 3.7.1. (4R)-5-Amino-4-([(2S)-2-[[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)etanoil]amino]propanoil]amino)-5-oksopentanska kiselina (10)

Iz spoja **9** (40,4 g, 0,067 mol) dobiveno je 26,1 mg (89%) čistog spoja **10** u obliku uljaste tekućine.

$R_f = 0,31$  ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 5 : 1)

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 4,85 (d, 1H,  $J = 1,6$  Hz, H-1); 4,42 (q, 1H,  $J = 7,0$  Hz, CH Ala); 4,27 – 4,24 (dd, 1H,  $J = 9,4$  Hz,  $J = 4,3$  Hz CH *iso*Gln); 4,23 – 4,06 (m, 2H, H-3, H-4); 3,97 – 3,96 (dd, 1H,  $J = 3,4$  Hz,  $J = 1,7$  Hz, H-2); 3,86 – 3,54 (m, 5H, H-5, H-6, OCH<sub>2</sub>); 2,30 – 2,26 (m, 2H, CH<sub>2</sub> *iso*Gln); 2,17 – 2,08 (m, 1H, CH *iso*Gln); 1,99 – 1,90 (m, 1H, CH *iso*Gln); 1,41 (d, 3H,  $J = 7,1$  Hz, CH<sub>3</sub> Ala).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 181,36; 177,02; 174,88; 171,78 (C=O); 101,76 (C1); 75,35; 72,38; 71,73; 68,66 (C2, C3, C4, C5); 66,92; 62,88 (C6, OCH<sub>2</sub>; linker); 55,18; 50,39 (CH- $\alpha$ ; Ala i *iso*Gln); 35,13; 29,31 (CH<sub>2</sub>- $\beta$  i  $\gamma$ ; *iso*Gln); 18,22 (CH<sub>3</sub>; Ala).

ESI-MS: izračunato za  $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_{11}$  437,2; dobiveno  $[\text{M}-\text{H}]^-$  na  $m/z$  435,9.

#### 3.7.2. (4R)-N-(Adamantan-1-il)-5-amino-4-([(2S)-2-[[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)etanoil]amino]propanoil]amino)-5-oksopentanamid (15)

Iz spoja **14** (55 mg, 0,074 mmol) dobiveno je 32,6 mg (77%) čistog spoja **15** u obliku uljaste tekućine.

$R_f = 0,62$  ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 1 : 1)

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta / \text{ppm}$ : 4,84 (d, 1H,  $J = 6,3$  Hz, H-1); 4,39 (q, 1H,  $J = 7,1$  Hz; CH Ala); 4,30 (dd, 1H,  $J = 9,4$  Hz,  $J = 4,4$  Hz, CH *iso*Gln); 4,25 – 4,08 (m, 2H, H-3, H-4); 3,96 – 3,95 (dd, 1H,  $J = 3,4$  Hz,  $J = 1,7$  Hz, H-2); 3,86 – 3,52 (m, 5H, H-5, H-6, OCH<sub>2</sub>); 2,22 – 2,18 (pt, 2H,  $J = 7,1$ ; 7,5 Hz, CH<sub>2</sub> *iso*Gln); 2,16 – 2,08 (m, 1H, CH *iso*Gln); 2,05 – 2,02 (m, 9H, Ad); 1,93 – 1,83 (m, 1H, CH *iso*Gln); 1,71 (s, 6H, Ad); 1,42 (d, 3H,  $J = 7,1$  Hz CH<sub>3</sub> Ala).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta / \text{ppm}$ : 176,45; 174,92; 174,09; 171,97 (4 C=O); 101,81 (C1); 75,44; 72,45; 71,75; 68,62 (C2, C3, C4, C5); 66,91; 62,94 (C6, OCH<sub>2</sub>; linker); 54,02; 50,57 (CH- $\alpha$ ; Ala i *iso*Gln); 52,90 (C; Ad); 42,34; 37,56 (CH<sub>2</sub>; Ad); 34,08; 29,00 (CH<sub>2</sub>- $\beta$  i  $\gamma$ ; *iso*Gln); 30,95 (CH; Ad); 18,06 (CH<sub>3</sub>; Ala).

ESI-MS: izračunato za  $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{10}$  570,3; dobiveno  $[\text{M}+\text{H}]^+$  na  $m/z$  571,3.

#### 3.7.3. 1-(Adamantan-1-il)-1,2,3-triazol-4-il]metilni ester (4R)-5-amino-4-([(2S)-2-[[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)etanoil]amino]propanoil]amino)-5-oksopentanske kiseline (19)

Iz spoja **18** (50 mg, 0,061 mmol) dobiveno je 21,4 g (54%) čistog spoja **19** u obliku uljaste tekućine. Ispisani su kemijski pomaci smjese izomera tako da nisu integrirane površine u  $^1\text{H}$  NMR ispod preklopljenih signala vodikovih atoma, a u  $^{13}\text{C}$  NMR su u ispisani signali manje zastupljenog izomera u uglatoj zagradi.

$R_f = 0,51$  ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH) = 1 : 1

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 7,88 (s, CH triazol); 4,73 (d,  $J = 1,6$  Hz, H-1); 4,57 (s,  $\text{CH}_2$  triazol); 4,38-4,24 (m, CH Ala, CH *iso*Gln); 4,15 – 3,97 (m, H-3, H-4); 3,86 (dd,  $J = 3,4$  Hz,  $J = 1,7$  Hz, H-2); 3,76– 3,42 (m, H-5, H-6,  $\text{OCH}_2$ ); 2,33 (t,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{CH}_2$  *iso*Gln), 2,16 (bs, Ad); 2,22 – 2,02 (m, CH *iso*Gln); 1,92 – 1,78 (m, CH *iso*Gln); 1,75 (bs, Ad); 1,29 (d,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_3$  Ala).

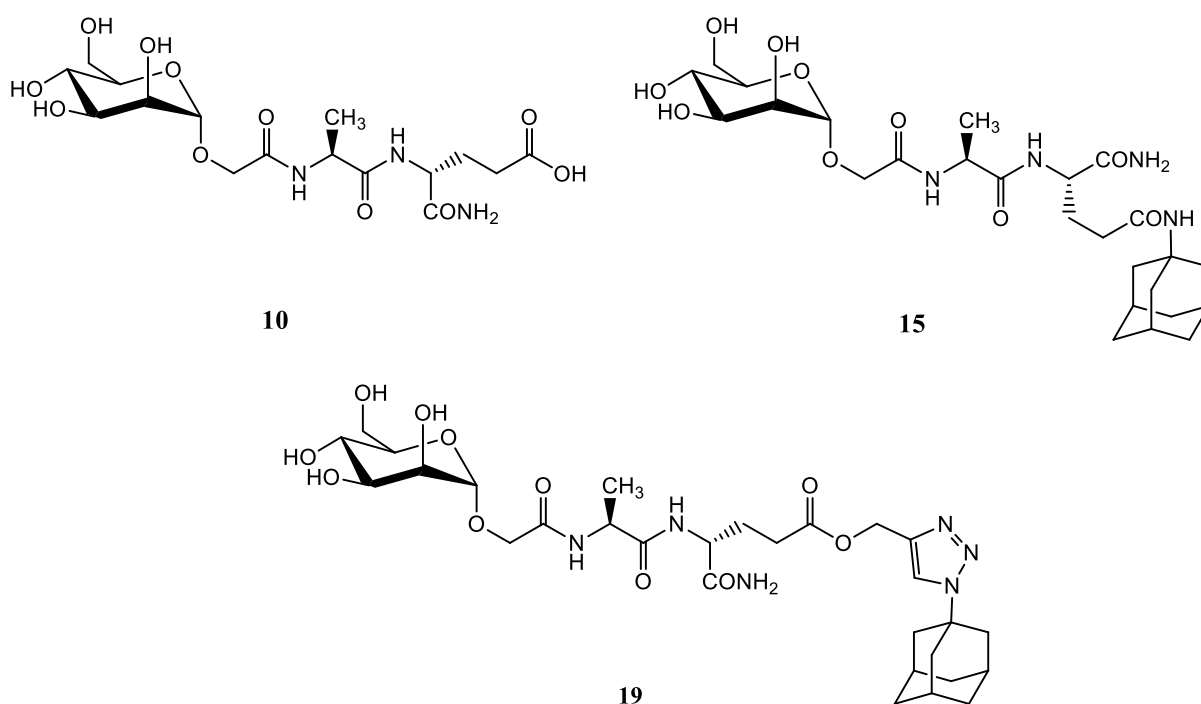
$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 176,31; 176,22; 175,23; 175,00; 172,03; 171,87 (C=O); 120,68 (CH; triazol); 101,81 (C1); 75,42; 72,45; 71,74; 68,61 (C2, C3, C4, C5); 68,86; 62,94; 56,59 (C6,  $\text{OCH}_2$ ; glikol,  $\text{CH}_2$ ; triazol); 53,75; 50,39 (CH- $\alpha$ ; Ala i *iso*Gln); [52,31; 49,90 (CH- $\alpha$ ; Ala i *iso*Gln)]; 43,98; 36,97 ( $\text{CH}_2$ ; Ad); 31,05 (CH; Ad); 31,23; 27,98 ( $\text{CH}_2$ - $\beta$  i  $\gamma$ ; *iso*Gln); [32,39; 27,82 (CH- $\alpha$ ; Ala i *iso*Gln)]; 18,13 ( $\text{CH}_3$ ; Ala); [18,53 ( $\text{CH}_3$ ; Ala)].



## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

### 4. REZULTATI I RASPRAVA

U okviru ovog diplomskog rada sintetizirana su tri manozilirana derivata desmuramilpeptida **10**, **15** i **19**. Dobivene ciljne molekule s potencijalnom adjuvantskom aktivnošću su produkti više uzastopnih sintetskih koraka: povezivanje dipeptida, s modificiranim C-krajem, i manoze. Manozna i peptidni dio nisu povezani direktno već preko kraće poveznice od svega dva ugljikova atoma, takozvane glikolne kiseline. Manozna omogućuje ciljanu dostavu biološki aktivne komponente do manoznog receptora na makrofazima, dok lipofilna adamantanska podjedinica u spoju **15** i **19** održava balans između hidrofilnosti i lipofilnosti te omogućuje ugradnju biološki aktivnog spoja u membranske lipidne slojeve, odnosno ugradnju u liposome.



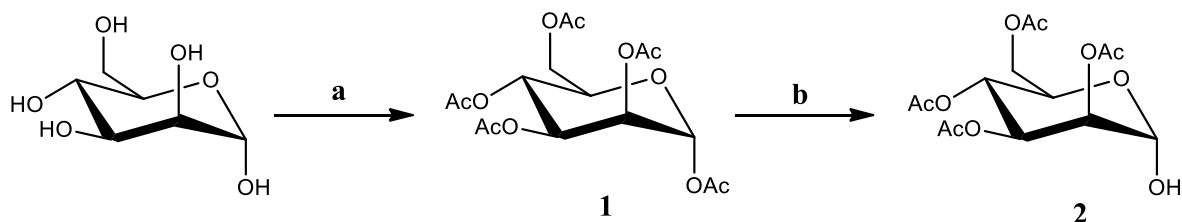
Slika 16: Strukture sintetiziranih manoziliranih derivata desmuramildipeptida

#### 4.1. Sinteza *O*-manozilirane glikolne kiseline (**6**)

Polazni spoj u pripravi 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoze, tj. u sintezi lipofilnih *O*-manozida bila je D-manoza. U prvom koraku zaštićene su hidroksilne skupine u obliku acetatnih estera te je kao produkt reakcije dobiven 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoza **1** (shema 17). Produkt **1** dobiven je u kvantitativnom iskorištenju (98%) već nakon 20 minuta miješanja reakcijske smjese pri sobnoj temperaturi. Struktura spoja **1** potvrđena je

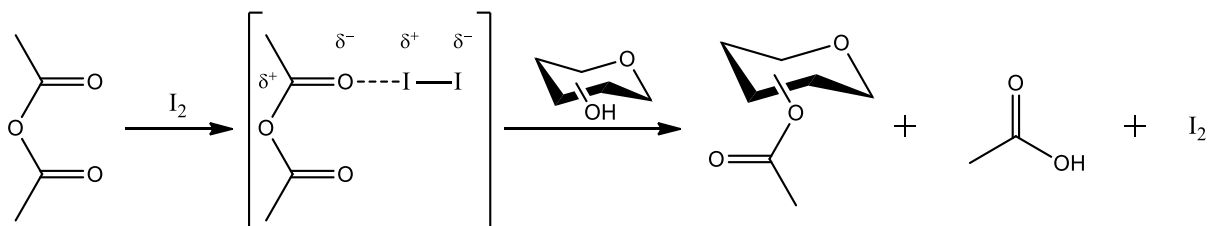
## 4. Rezultati i rasprava

spektrometrijom masa (dobiven je molekularni ion  $[M+Na]^+$  na  $m/z$  413,1), spektroskopijom IR te  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR, i dodatno tankoslojnom kromatografijom usporedbom sa standardom.



Shema 17: Zaštita hidroksilnih skupina na D-manozi; a)  $Ac_2O$ ,  $I_2$ , sobna temp., 20 min; b)  $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ ,  $CH_3OH$  aps., sobna temp., 20 h

Reakcija acetiliranja provedena je uz upotrebu acetanhidrida uz jod kao katalizator koji je jeftin i jednostavan za rukovanje. Jod s kisikovim atomom karbonilne skupine acetanhidrida tvori interakciju, što dovodi do polarizacije  $C=O$  veze i olakšanog napada hidroksilnih skupina monosaharida na karbonilnu skupinu acetanhidrida (shema 18).<sup>37</sup>



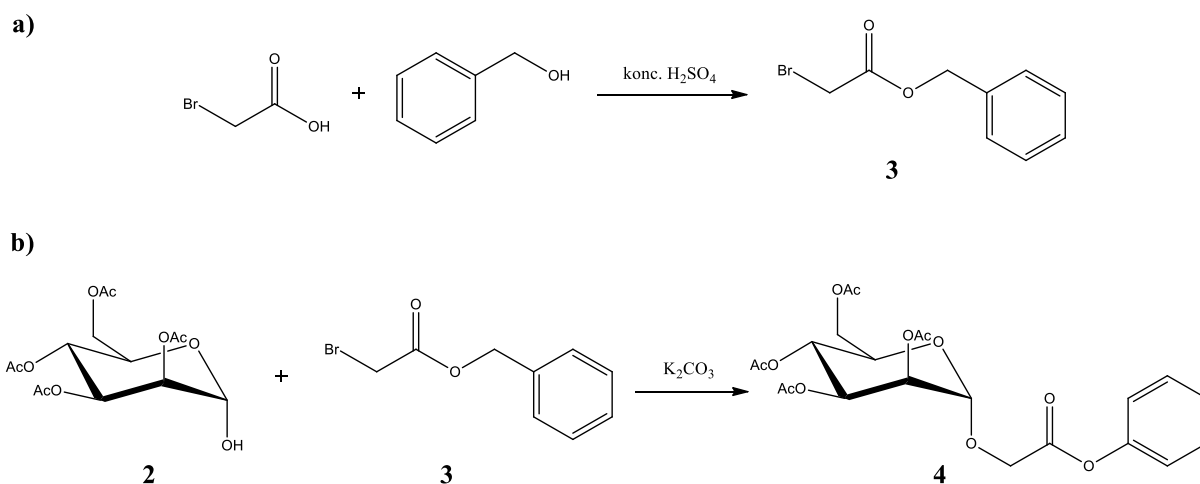
Shema 18: Interakcija joda u reakciji acetiliranja

Dobivenoj 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranozi **1** selektivno je uklonjena anomerna acetatna zaštita pomoću cinkova acetata dihidrata u apsolutnom metanolu pri sobnoj temperaturi. Produkt reakcije je 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoza **2** pretežno  $\alpha$ -anomerne konfiguracije dobiven u 24%-tnom iskorištenju. Konfiguracija na anomernom C-atomu potvrđena je tankoslojnom kromatografijom na kojoj je dobiveni produkt **2** uspoređen sa standardom te infracrvenom spektroskopijom, spektroskopijom  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR i spektrometrijom masa (dobiven je molekularni ion  $[M+Na]^+$  na  $m/z$  371,1). Tijek reakcije potrebno je kontrolirati obzirom da je uočeno kako daljnjim napredovanjem reakcije (vođenjem reakcije duže od 20 h) dolazi do postepenog uklanjanja i preostalih acetata što dovodi do nastanka triacetiliranih produkata. Dužim vođenjem reakcije također se povećava i udio  $\beta$ -anomera tetraacetilirane manoze. Iz navedenih razloga reakcija se zaustavlja nakon 20

## 4. Rezultati i rasprava

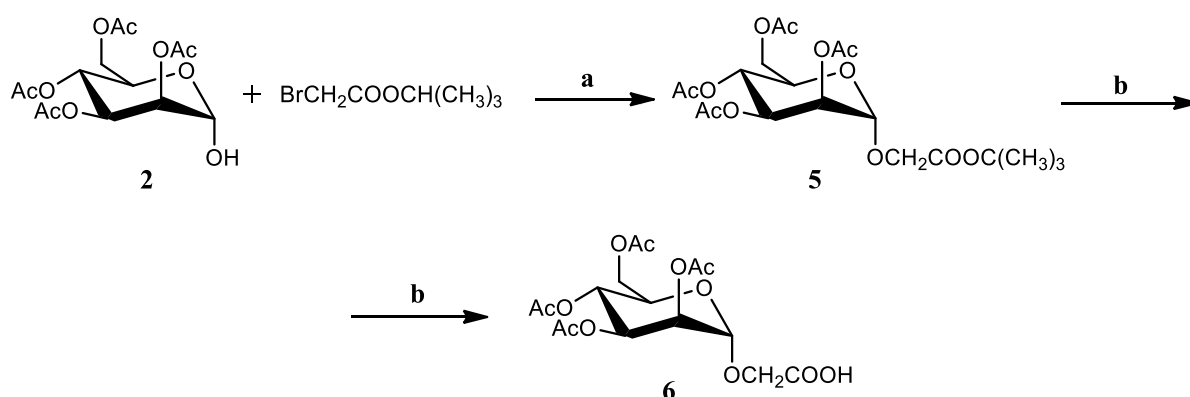
h te se neizreagirana pentaacetilirana manozna **1** odvaja prilikom kromatografskog pročišćavanja spoja **2** i ponovo koristi u sljedećoj selektivnoj deprotekciji.

U sljedećem koraku bilo je potrebno na manozu vezati poveznicu od dva ugljikova atoma koja će biti funkcionalizirana karboksilnom skupinom preko koje će se konjugirati peptidni dio. Nakon neuspješno provedenih metoda manozilacije glikolne kiseline (direktnom i trikloracetimidatnom metodom), pristupilo se metodi pripreme *O*-glikozida na alternativan način, povezivanjem tetraacetilirane manoze s aglikonom na način da se u aglikon uvede dobra izlazna skupina. Naime, kod najčešće korištenih metoda glikolizacije izlazna skupina nalazi se na šećeru (glikozil-donoru), dok se ovdje ona nalazi na glikozil-akceptoru (aglikonskom dijelu). Prvo je pokušana *O*-glikozilacija benzilnog estera bromoctene kiseline. Sintetizirani benzilni ester 2-bromoctene kiseline pripremljen je Fischerovom esterifikacijom 2-bromoctene kiseline benzilnim alkoholom uz koncentriranu sumpornu kiselinu kao katalizator (shema 19. a)). Prilikom te kondenzacije kao produkti nastaju odgovarajući ester i voda.<sup>36</sup> Kako bi se ravnoteža reakcije pomaknula prema nastanku esterskog produkta **3**, voda se kontinuirano uklanja pomoću Dean-Starkovog nastavka iz reakcijske smjese. Dobiveni benzil-bromacetat **3** okarakteriziran je spektroskopijom <sup>1</sup>H NMR i IR. U IR spektru spoja **3** prisutna je vrpca na 1737 cm<sup>-1</sup> koja odgovara istežanju karbonilne skupine estera (C=O<sub>COOBn</sub>). Reakcijom 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoze **2** i benzil-bromacetata **3** uz K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> nastaje benzil-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi) acetat **4** nukleofilnom supstitucijom (S<sub>N</sub>2 reakcijom) broma u benzilbromacetatu s kisikom vezanim na anomernom C1-atomu spoja **2** stvorena je  $\alpha$ -*O*-glikozidna veza (shema 19. b)). Benzil-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi) acetat **4** dobiven je u 92,6%-tnom iskorištenju i potvrđen je spektroskopijom <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR te spektrometrijom masa. Obzirom da je kasnije debenziliranje spoja **4** bilo neuspješno, umjesto benzilnog estera priprema *O*-manozilirane glikolne kiseline provedena je kondenzacijom *tert*-butilnog estera, koji je ujedno i kupovna kemikalija, s 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranozom **2**. Navedenom reakcijom u istim uvjetima dobiven je *tert*-butil-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi) acetat **5** u dobrom iskorištenju od 83,3% (shema 20).



Shema 19: a) Priprava benzil-bromacetata; suhi toluen, refluks, 24 h; b) Sinteza benzil-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi) acetat; suhi DMF, sobna temp., 2 h

U sljedećem koraku, u reakciji *tert*-butil-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetata **5** s trifluoroctenom kiselinom (TFA) pri sobnoj temperaturi u diklormetanu dobiven je željeni *O*-glikozid 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octena kiselina **6** u 83%-tnom iskorištenju (shema 20). Sintetizirani esteri **4** i **5** te manozilirana kiselina **6** dobiveni su u odličnim iskorištenjima i potvrđeni su spektroskopijom  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR i spektrometrijom masa.



Shema 20: *O*-glikozilacija i uklanjanje *tert*-butilne zaštite u kiselim uvjetima; a)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , suhi DMF, sobna temp., 2 h; b) TFA, suhi DCM, sobna temp., 1,5 h

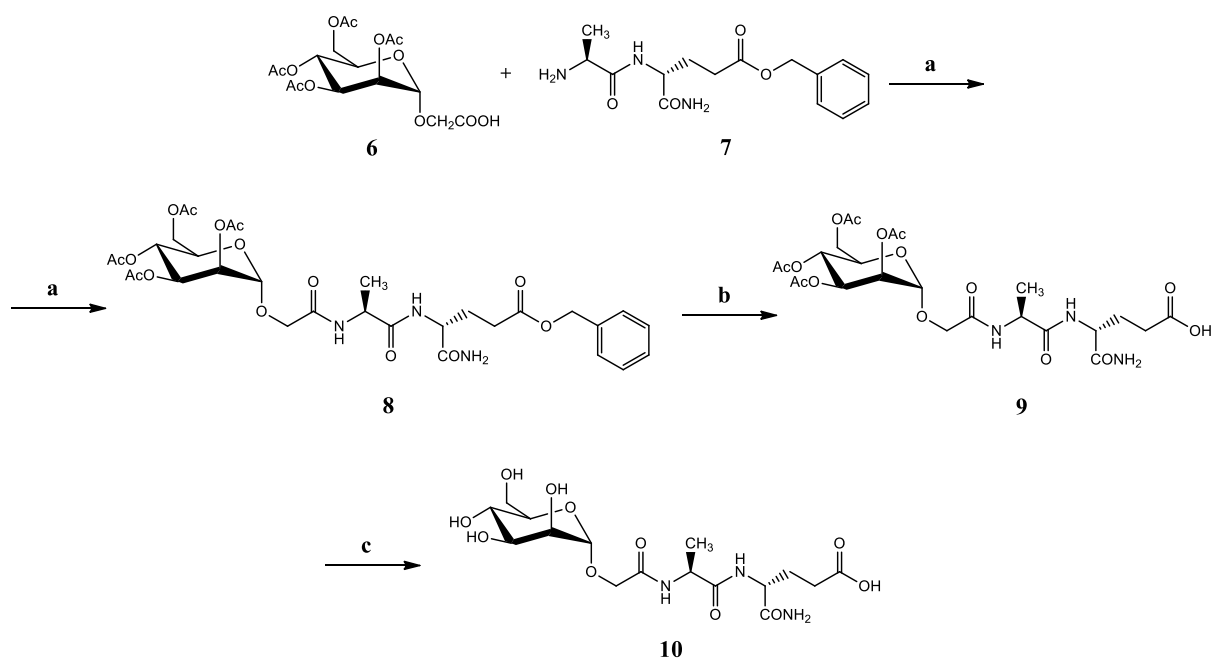
### 4.2. Sinteza manoziliranog *O*-glikolil-desmuramidipeptida (**10**)

Kondenzacija, priređene *O*-manozilirane glikolne kiseline **6** i benzilnog estera *L*-alanil-*D*-izoglutamina **7** provedena je karbodiimidnom metodom uz *N*-(3-dimetilaminopropil-

## 4. Rezultati i rasprava

---

*N'*-etilkarbodiimid hidroklorid (EDC·HCl) i 1-hidroksibenzotriazol (HOBt) kao kondenzacijske reagense te trietilamin kao bazu. Baza je dodana u katalitičkoj količini zbog deprotonacije amino skupine peptida, a time je omogućen i nukleofilni napad amina na aktiviranu karboksilnu skupinu. Tokom reakcije nastaje nusprodukt, *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilurea, koji se lako uklanja ekstrakcijom reakcijske smjese vodenom otopinom klorovodične kiseline i zasićenom vodenom otopinom natrijeva hidrogenkarbonata. Kondenzacijom spojeva **6** i **7** dobivena je sirova smjesa koja je pročišćena kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 9 : 1 kao eluens. Čisti produkt **8**, nakon kromatografskog pročišćavanja dobiven je u 55%-tnom iskorištenju. Idući korak u sintezi je katalitička hidrogenoliza međuprodukta **8** čime se oslobađa  $\gamma$ -karboksilna skupina. Katalitička hidrogenoliza provedeno je se u metanolu uz 10% paladij na ugljiku i atmosferi vodika pod tlakom od 33 PSI. Čisti produkt **9** dobiven je u odličnom iskorištenju od 92%. Zadnji korak u sintezi bio je uklanjanje acetatne zaštite sa D-manoze kako bi se dobile slobodne hidroksilne skupine. Reakcija deacetilacije provedena je takozvanom Zemlenovom metodom koja se temelji na upotrebi katalitičke količine natrijevog metoksida u metanolu. Reakcijska smjesa kromatografski se pročišti kroz malu kolonu punjenu silikagelom uz kloroform : metanol = 5 : 1 kao eluens. Izolirana ciljna molekula **10** dobivena je u 84%-tnom iskorištenju (shema 21). Međuprodukti **8** i **9** u pojedinim koracima kao i sami ciljni produkt **10** identificirani su na temelju tankoslojne kromatografije, spektroskopije  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR i spektrometrije masa. Obzirom da su djelovanjem natrijevog metoksida pokidane samo esterske veze, dok su ostale veze ostale nepromijenjene, može se zaključiti da je Zemlenova metoda dovoljno blaga i selektivna za deprotekciju i složenijih glikopeptidnih struktura.



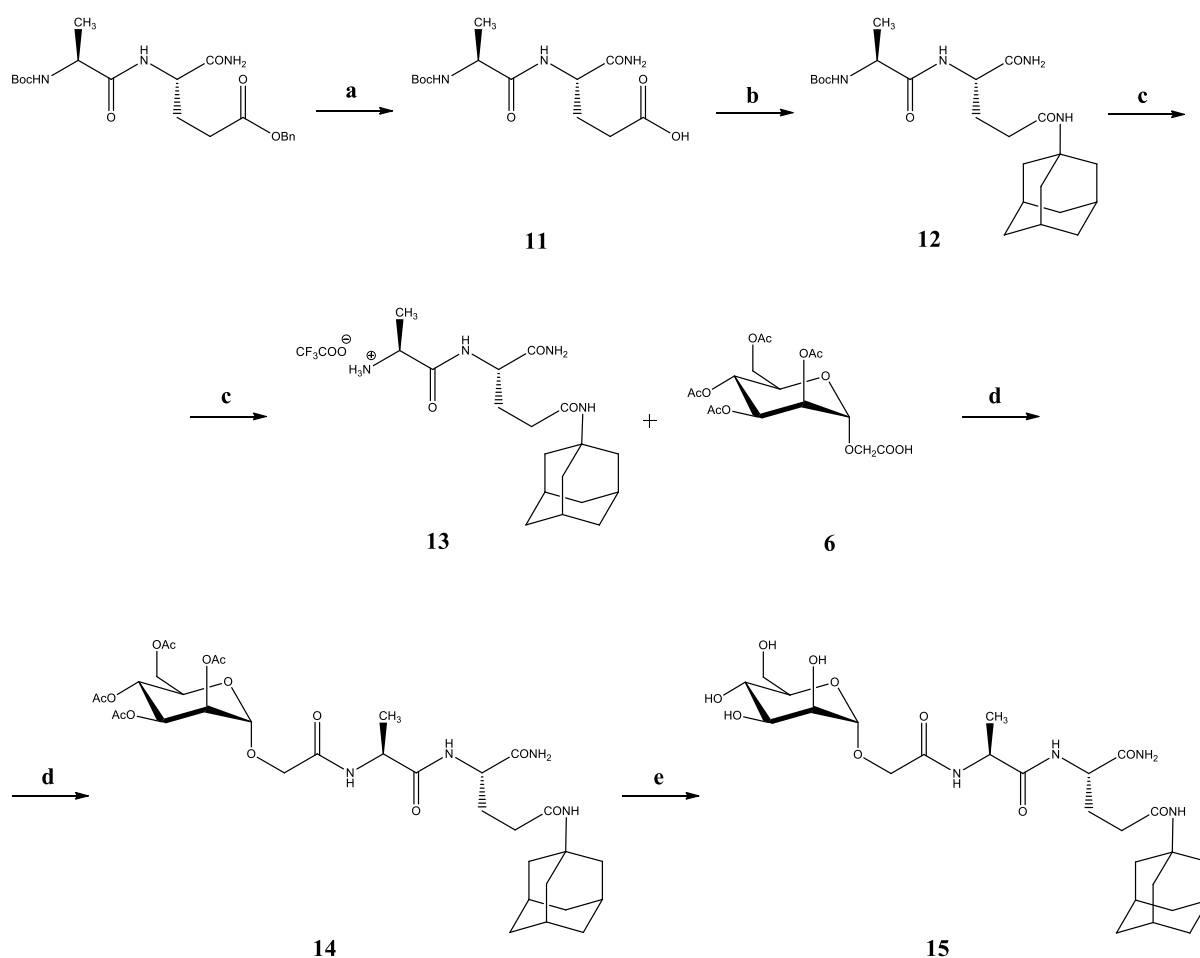
Shema 21: Sinteza manoziliranog *O*-glikolil-desmuramildipeptida;  
 a) HOBt, EDC·HCl, Et<sub>3</sub>N, DCM : DMF = 1 : 1, 0 °C → sobna temp., 48 h; b) H<sub>2</sub>, 10% Pd/C, MeOH, 33 PSI, sobna temp., 1,5 h; c) NaOMe/MeOH, sobna temp., 1 h

### 4.3. Sinteza konjugata manoze i adamantil-desmuramilpeptida

Komercijalno dostupnom zaštićenom desmuramildipeptidu, Boc-*N*-L-Ala-*D*-isoGln-OBn, katalitičkom hidrogenolizom u etanolu uz 10% paladij na ugljiku i atmosferi vodika pod tlakom od 38 PSI, oslobođena je  $\gamma$ -karboksilna skupina izoglutamina u 65%-tnom iskorištenju. Produkt **11** kondenziran je potom s 1-aminoadamantan hidrokloridom karbodiimidnom metodom uz EDC·HCl i HOBt kao kondenzacijske reagense te u prisustvu baze, trietilamina (shema 22). Navedena metoda je optimirana i u prethodnim istraživanjima pokazala se najpogodnijom metodom za sintezu ove klase spojeva. Produkt **12** dobiven je u 77,5%-tnom iskorištenju. Nakon uklanjanja *N*-Boc zaštitne skupine pomoću trifluoroctene kiseline u kvantitativnom iskorištenju, dobiveni produkt **13** je preko slobodne  $\alpha$ -amino skupine konjugiran s manoznom podjedinicom funkcionaliziranom karboksilnom skupinom. Slobodna  $\alpha$ -amino skupina spoja **13** je u obliku trifluoroacetatne soli, ali to ne predstavlja problem u reakciji kondenzacije s *D*-manozom jer se kondenzacija odvija u prisutnosti dovoljne količine baze koja omogućuje deprotonaciju amino skupine i nukleofilni napad na karboksilnu skupinu. Kondenzacija priređene *O*-manozilirane glikolne kiseline **6** i (2*S*)-1-((2*R*)-5-[(adamantan-1-il)amino]-1-amino-1,5-dioksopentan-2-il)amino)-1-oksopropan-2-amonijev 2,2,2-trifluoroacetat **13** provedena je također EDC/HOBt karbodiimidnom

## 4. Rezultati i rasprava

metodom. Reakcijska smjesa miješana je 72 sata pri sobnoj temperaturi. Dobiven sirov produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 9 : 1 kao eluens i dobiven je produkt **14** u 26%-tnom iskorištenju. Spoju **14** u posljednjem koraku uklonjene su acetatne zaštitne skupine s manoze Zemplenovom deacetilacijom. Produkt **15** dobiven je u dobrom prinosu (77%) (shema 22). Svi međuprodukti u pojedinim koracima kao i sami ciljani produkt **15** identificirani su na temelju tankoslojne kromatografije, spektroskopije  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR te spektrometrije masa. Za međuprodukte **12** i **13** dodatno su određene specifične rotacije.



Shema 22: Sinteza konjugata manoze i adamantil-desmuramilpeptida;

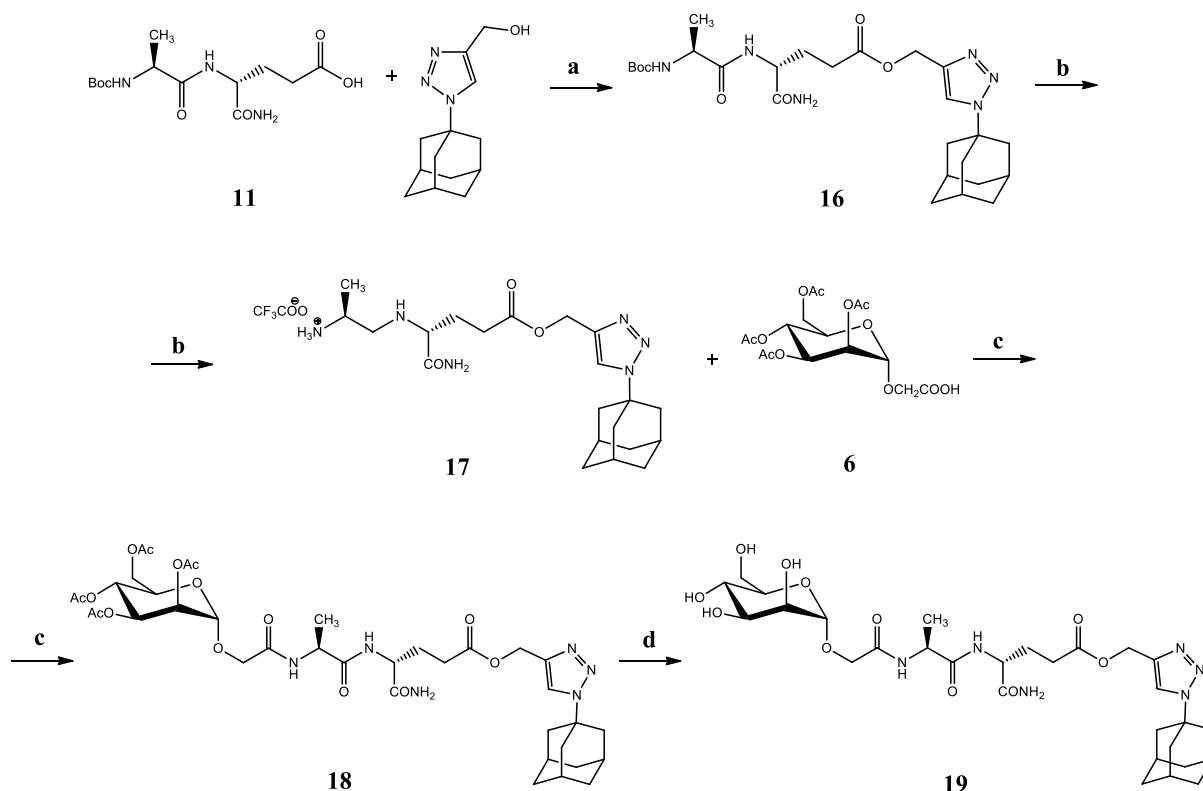
a)  $\text{H}_2$ , 10% Pd/C, 96% EtOH, 38 PSI, sobna temp., 24 h; b) 1-aminoadamantan hidroklorid, EDC·HCl, HOBt,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DCM : dioksan = 1 : 1, 0 °C → sobna temp., 48 h; c) TFA : DCM = 1 : 2, sobna temp., 1 h; d) EDC·HCl, HOBt,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DCM : DMF = 1 : 1, 0 °C → sobna temp., 72 h; e) NaOMe/MeOH, sobna temp., 1 h



### 4.4. Sinteza manokonjugata (adamant-1-il)-1,2,3-triazolnih derivata desmuramilpeptida

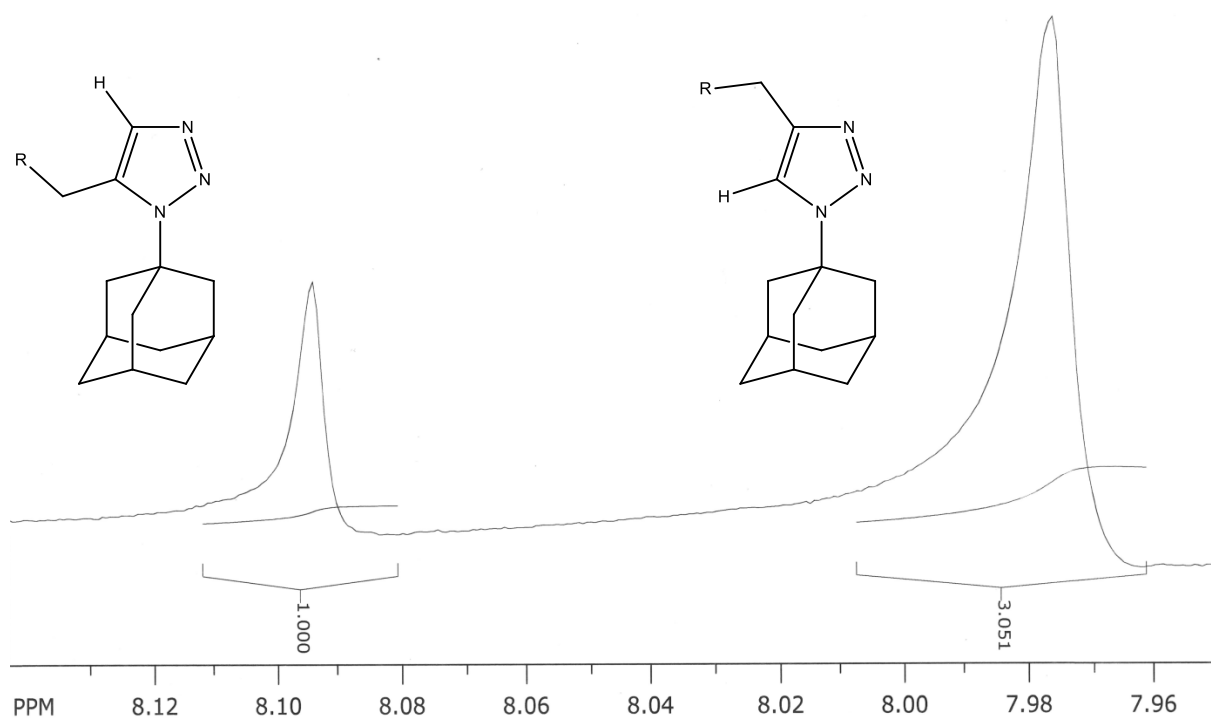
Na tržištu je dostupan zaštićeni dipeptid, Boc-*N*-L-Ala-*D*-isoGln-OBn, kojemu je katalitičkom hidrogenolizom u etanolu uz 10% Pd/C oslobođena  $\gamma$ -karboksilna skupina. Kondenzacijom dipeptida **11**, s oslobođenom karboksilnom skupinom, s 1-adamantil-1,2,3-triazolnim alkoholom dobiven je spoj **16**. Treća ciljana molekula koja je sintetizirana u okviru diplomskog rada je manokonjugat (adamant-1-il)-1,2,3-triazol-desmuramilpeptida. U navedenoj molekuli također je prisutna lipofilna adamantanska skupina, obzirom da omogućuje ugradnju spoja u lipidni dvosloj liposoma. Međutim, adamantan je ovdje vezan direktno na C-kraj desmuramildipeptida već preko 1,2,3-triazolnog prstena. U pripravi ciljne molekule korišten je alkohol [1-(adamantan-1-il)-1,2,3-triazol-4-il]metanol koji je prethodno sintetiziran u laboratoriju Zavoda za organsku kemiju bakar(I) kataliziranom cikloadicijom između azida i alkina, točnije 1-azidoadamantana i propargila. Bakar(I) katalizirana cikloadicija između azida i alkina jedna je od najznačajnijih primjera takozvanih „klik“ reakcija koja odlikuje jednostavnost, selektivnost i brzina nastanka produkta.<sup>38</sup> Kondenzacijom 1-adamantil-1,2,3-triazolnog alkohola s oslobođenom karboksilnom skupinom dipeptida **11** dobiven je spoj **16** (shema 23). Kondenzacija je provedena uz EDC·HCl kao kondenzacijski reagens i 4-dimetilaminopiridin (DMAP) kao bazu. Baza DMAP se lako uklanja iz reakcijske smjese, primjerice ekstrakcijom s vodenom otopinom klorovodične kiseline i zasićene vodene otopine natrijeva hidrogenkarbonata. Nakon pročišćavanja kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 5 : 1 kao eluens dobiven je produkt **16** u 43%-tnom iskorištenju. Potom je s *N*-terminalnog kraja dipeptida uklonjena Boc zaštitna skupina djelovanjem TFA. Dobiven je produkt **17** sa slobodnom  $\alpha$ -amino skupinom koja je u obliku trifluoracetatne soli i preko koje će se ostvariti veza s *O*-manoziliranom glikolnom kiselinom **6**. Spojevi **6** i **17** kondenzirani su već opisanom karbodiimidnom metodom. Sirov produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 5 : 1 kao eluens. Čisti produkt **18** dobiven je u 50%-tnom iskorištenju.

## 4. Rezultati i rasprava



Shema 23: Sinteza manokonjugata (adamant-1-il)-1,2,3-triazolnih derivata desmuramilpeptida; a) EDC·HCl, DMAP, DCM : dioksan = 1 : 1, 0 °C → sobna temp., 48 h; b) TFA, DCM, 2 h; c) EDC·HCl, HOBT, Et<sub>3</sub>N, DCM : DMF = 1 : 1, 0 °C → sobna temp., 48 h; d) NaOMe/MeOH, sobna temp., 1 h

Struktura spoja **18** potvrđena je metodom ESI-MS (molekulski ion  $[M+H]^+$  na  $m/z$  821,4) i spektroskopijama NMR. U spektrima  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spoja **18** vidljivi su dvostruki signali vodikovih i ugljikovih atoma iz peptidne i triazolne podjedinice što upućuje da je polazni adamantil-triazolni alkohol iz kojeg je sintetiziran peptid **16** zapravo smjesa izomera. Naime, u određenim reakcijskim uvjetima bakar(I) kataliziranom cikloadicijom između azida i alkina može nastati smjesa 1,4- i 1,5-disupstituiranih 1,2,3-triazola. Kod dipeptida **16** nisu uočene razlike u kemijskim pomacima u spektrima NMR, već se dvostruki signali pojavljuju nakon kondenzacije s šećernom komponentom koja ima veći broj stereogenih centara koji vjerojatno jače utječu na dijastereotopne skupine i atome. Na temelju opisanog pretpostavljamo da je spoj **18** zapravo smjesa izomera. Omjer izomera određen je iz spektra  $^1\text{H}$  NMR integriranjem površina ispod signala koji odgovara vodikovom atomu iz triazolne podjedinice (slika 17). Omjer izomera odgovara omjeru površina ispod označenih signala CH, a koji iznosi 1 : 3. U nastavku istraživanja planira se razvoj metode za učinkovito odvajanje izomera, kao i njihova temeljita strukturna karakterizacija.



Slika 17: Signali vodikovih atoma 1,4- i 1,5-triazolnih izomera

Zadnji korak sinteze ciljne molekule je uklanjanje acetatne zaštite s manoze. Deaciliranje je provedeno djelovanjem natrijevog metoksida u metanolu. Konačni produkt **19** dobiven je u 54%-tnom iskorištenju (shema 23). Svi međuprodukti u pojedinim koracima kao i sama ciljna molekula **19** identificirani su na temelju tankoslojne kromatografije, na temelju spektrometrije masa te spektroskopije  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR. U spektrima  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR ciljne molekule **19** su uočeni dvostruki signali kao i u spektrima spoja **18**. Omjer izomera također oznosi 1 : 3.

## **5. ZAKLJUČAK**

### 5. ZAKLJUČAK

- Sintetizirana su tri nova manozna derivata desmuramildipeptida s potencijalnom adjuvantskom aktivnošću: (4*R*)-5-amino-4-([(2*S*)-2-{[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)etanoil]amino}propanoil]amino)-5-oksopentanska kiselina (**10**), (4*R*)-*N*-(adamantan-1-il)-5-amino-4-([(2*S*)-2-{[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)etanoil]amino}propanoil]amino)-5-oksopentan-amid (**15**) i 1-(adamantan-1-il)-1,2,3-triazol-4-il]metilni ester (4*R*)-5-amino-4-([(2*S*)-2-{[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)etanoil]amino}propanoil]amino)-5-oksopentanske kiseline (**19**). Uvođenjem manoze omogućuje se ciljana dostava spojeva do manoznih receptora na imunokompetentnim stanicama.
- U prvom koraku dobivena je 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoza regio- i stereoselektivnom deacetilacijom 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoze uz pomoć cinkova(II) acetata dihidrata te je potom stereospecifičnom reakcijom nukleofilne supstitucije vezana na poveznicu od dva ugljikova atoma funkcionaliziranu karboksilnom skupinom. Uvedena poveznica je prirodna glikolna kiselina također prisutna u prirodnim derivatima muramilpeptida koji pokazuju imunomodulacijsku aktivnost. Uvođenjem navedne poveznice ujedno se omogućilo i kondenziranje šećerne i peptidne podstrukture stabilnom amidnom vezom.
- Desmuramildipeptidne podstrukture s hidroksilnom, adamantilnom i adamantil-triazolnom skupinom na C-kraju su prethodno sintetizirane poznatim metodama te su potom konjugirane s *O*-manoziliranom glikolnom kiselinom optimiranom karbodiimidnom EDC/HOBt metodom.
- Manoziliranim desmuramildipeptidima u posljednjem koraku uklonjene su acetatne zaštitne skupine s manoze pomoću natrijevog metoksida u metanolu, takozvanom Zemlenovom metodom.
- Strukture ciljnih molekula, kao i svih međuprodukata u pojedinim reakcijskim koracima, potvrđene su spektrometrijom masa te spektroskopijama <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR. Neki od međuprodukata dodatno su potvrđeni i spektroskopijom IR.

## **6. LITERATURNÁ VRELA**

### 6. LITERATURNA VRELA

1. A. I. Vogel's, *Textbook of Practical Organic Chemistry*, 4th Edition, Longman, 1978
2. K. Dzierzbicka, A. Wardowska, M. Rogalska, P. Trzonkowski, *Pharmacol. Rep.* **64** (2012) 217–223.
3. C. Ogawa, Y.-J. Liu, K. S. Kobayashi, *Curr. Bioact. Compd.* **7** (2011) 180–197.
4. R. Ribić, S. Tomić, *Kem. Ind.* **62** (2013) 19–31.
5. A. Harini, A. Kumar, G. P. Kumar, S. Neeta, *J. Vaccin.* **4** (2013) 167–171.
6. K. N. Mashiki, W. Lange, B. Rodhe-Schulz, L. Chedid, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6** (1990) 363–399.
7. B. Kelsall, *Nat. Med.* **11** (2005) 383–384.
8. C. L. Grimes, L. De Z. Ariyananda, J. E. Melnyk, E. K. O'Shea, *J. Am. Chem. Soc.* **134** (2012) 13535–13537.
9. S. Gobec, U. Urleb, *Molecules* **7** (2002) 394–404.
10. P. D. Becker, M. Nörder, C. A. Guzmán, S. Grinstein, *Clin. Vaccine Immunol.* **14** (2007) 538–543.
11. P. D. Becker, R. S. Corral, C. A. Guzmán, S. Grinstein, *Vaccine* **19** (2001) 4603–4609.
12. A. Štimac, S. Šegota, M. D. Sikirić, R. Ribić, L. Frkanec, V. Svetličić, S. Tomić, B. Vranešić, R. Frkanec, *Biochim. Biophys. Acta* **1818** (2012) 2252–2259.
13. B. Vranešić, J. Tomašić, S. Smerdel, D. Kantoci, F. Benedetti, *Helv. Chim. Acta* **76** (1993) 1752–1758.
14. R. Ribić, L. Habjanec, R. Frkanec, B. Vranešić, S. Tomić, *Chem. Biodiv.* **9** (2012) 1373–1381.
15. L. Martinez-Pomares, *J. Leukoc. Biol.* **92** (2002) 1177–1186.
16. T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2nd Edition, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, 2002., pp. 15–118.
17. D. E. Levy, P. Fügedi, *The Organic Chemistry of Sugars*, CRC Press Taylor & Francis Group, 2006.
18. A. T. Carmona, A. J. Moreno-Vargas, I. Robina, *Curr. Org. Synt.* **5** (2008) 81–116.
19. M. Brito-Arias, *Synthesis and Characterization of Glycosides*, Springer Science+Business Media, New York, 2007., pp. 43–134.

20. P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, 3<sup>rd</sup> Edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005., pp. 187–333.
21. E. Kaya, F. Sonmez, M. Kucukislamoglu, M. Nebioglu, *Chem. Pap.* **66** (2012) 312–315.
22. V. Demchenko, *Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008.
23. H. G. Garg, M. K. Cowman, C. A. Hales, *Carbohydrate Chemistry, Biology and Medical Applications*, 1<sup>st</sup> Edition, Elsevier Ltd., Oxford, 2008., pp. 59–83.
24. J. Guo, X.-S. Ye, *Molecules* **15** (2010) 7235–7265.
25. C. L. Perrin, *Pure & Appl. Chem* **67** (1995) 719–728.
26. A. Furstner, T. Muller, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1991) 7814–7821.
27. S. Chandrudu, P. Simerska, I. Toth, *Molecules* **18** (2013) 4373–4388.
28. E. Fischer, E. Fourneau, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **34** (1901) 2668.
29. R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **85** (1963) 2145.
30. B. L. Nilsson, M. B. Soellner, R. T. Raines, *Annu. Rev. Biophys.* **34** (2005) 91–118.
31. G.W. Anderson, A.C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* **79** (1957) 6180–6183.
32. S. B. H. Kent, *Ann. Rev. Biochem.* **57** (1988) 957–989.
33. A. Isidro-Llobet, M. Álvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **109** (2009) 2455–2504.
34. P. Y. Bruice, *Organic Chemistry*, Fourth Edition, pp 959–982.
35. M. Bodanszky, *Peptide Chemistry: A Practical Textbook*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1988., pp. 158–162.
36. U. Osamu, T. Koji, K. Sakae, *Process for the preparation of bromoacetic acid and esters therefore* (1978) US Patent 4123443.
37. K. P. Ravindranathan Kartha, R. A. Field, *Tetrahedron* **53** (1997) 11753–11766.
38. M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **108** (2008) 2952–3015.



## **7. PRILOZI**

### 7. PRILOZI

#### 7.1. Popis kratica i simbola

AdDP- adamantilamid-dipeptid

AgOTf - srebrov triflat

Ala - alanin

BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O - borov trifluorid eterat

Bn - benzil

Boc - *tert*-butoksikarbonil

BOP - benzotriazol-1-il-oksi-tris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat

Bz - benzoil

CARD - eng. *caspase activation and recruitment domain*

Cbz ili Z - benziloksikarbonilnu skupinu

CDR - eng. *carbohydrate-recognition domain*

CR domain - *N*-termalna domena bogata cisteinom (eng. *cysteine-rich domain*,)

CTLD - osam uzastopnih lektinskih domena tipa-C (eng. *C-type lectin-like domain*)

DAP - *meso*-diaminopimelinska kiselina

DBU - 1,8-diazabicikloundec-7-en

DCC - *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid

DCM - diklormetan

DIC - *N,N'*-diizopropilkarbodiimid

DMAP - 4-dimetilamino piridin

DMF - *N,N*-dimetilformamid

EDC·HCl - *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid

Fm - 9-fluorenilmetil

Fmoc - 9-fluorenilmetoksikarbonil

FNII - domena slična fibronektinu tipa II (eng. *fibronectin type II domain*)

GalNAc - *N*-acetil-D-galaktozamin

GlcNAc - *N*-acetilglukozamina

HBTU - 2-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev heksafluorofosfat

HOBt - 1-hidroksibenzotriazol

HOSu - *N*-hidroksisukcinimid

IR – infracrvena spektroskopija

ISCOM - imunostimulirajući kompleksi

*iso*Gln - izoglutamin

LPS - lipopolisaharidi

MB - murabutid

MDP – muramildipeptid

MR - manozni receptor

MS - masena spektrometrija

MurNAc - *N*-acetilmuraminske kiseline

NBS - *N*-bromosukcinimid

NF- $\kappa$ B - eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NIS - *N*-jodosukcinimid

NLR protein - skupine nukleotid-vezujućih proteina bogatih leucinskim ponavljajućim slijedom (eng. *Nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat protein*)

NMR - nuklearna magnetska rezonancija

NOD2 - eng. *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*

*p*-TsOH - para-toluensulfonska kiselina

$R_f$  – faktor zaostajanja

sMR - topljiva forma manoznog receptora (eng. *soluble MR*)

SPPS - sinteza peptida na krutom nosaču (eng. *solid phase peptide synthesis*)

<sup>t</sup>Bu - *tert*-butil

TFA - trifluoroctena kiselina

TfOH - trifluormetansulfonska kiselina

THF - tetrahidrofuran

TLC - tankoslojna kromatografija

TLR4 - Toll-like-4

TMS - tetrametilsilan

TMSOTf - trimetilsilil-trifluormetansulfonat

## **8. ŽIVOTOPIS**

### 8. ŽIVOTOPIS

#### Osobni podaci

Ime i prezime: Doroteja Pavić  
Datum i mjesto rođenja: 20. prosinca 1992., Zagreb, Hrvatska  
E-mail: tejapavic@gmail.com

#### Obrazovanje

- 2014. – 2016.** Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek, Sveučilište u Zagrebu  
Diplomski sveučilišni studij kemije, istraživački smjer, grane: Organska i analitika kemija
- 2011. – 2014.** Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilišni preddiplomski studij kemije  
Završni rad: „*Potenciometrijska karakterizacija interakcije amiloze i oktadecil-trimetil amonijevog bromida*“, mentor: doc. dr. sc. Nikola Sakač
- 2007. – 2011.** Srednja škola Pregrada, farmaceutski tehničar  
Završni rad: "*Polučvrsti ljekoviti pripravci*", mentor: mr. pharm. Vlasta Orehovec, mr. pharm. Kristina Bele
- 1999. – 2007.** Osnovna škola Augusta Cesarca, Krapina

#### Sudjelovanje na znanstvenim i stručnim skupovima

- 23. – 25. rujna 2015.** Znanstvena konferencija Application of NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Industry (Pharma NMR), Crveni otok, Rovinj
- 18. i 19. veljače 2016** XI. Susret mladih kemijskih inženjera, Zagreb  
(postersko priopćenje: M. Čičak, D. Pavić, R. Ribić; *Sinteza manoznih derivata O-glikolil-desmuramilpeptida*)

### Sudjelovanje u aktivnostima na fakultetu

- |                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>7. i 8. prosinca 2012.</b>  | 16. Smotra Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku |
| <b>6. i 7. prosinca 2013.</b>  | 17. Smotra Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku |
| <b>22. – 27. travnja 2013.</b> | 11. Festival znanosti, Osijek                              |
| <b>2016.</b>                   | Otvoreni dani Kemijskog odsjeka                            |