

Izolacija i derivatizacija saponina iz ekstrakta kore drveta *Quillaja saponaria* u svrhu pripreve konjugata s desmuramil-dipeptidom

Logožar, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:578503>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-19**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Ivan Logožar

**IZOLACIJA I DERIVATIZACIJA
SAPONINA IZ EKSTRAKTA KORE
DRVETA *QUILLAJA SAPONARIA* U SVRHU
PRIPRAVE KONJUGATA S DESMURAMIL-
DIPEPTIDOM**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistra kemije

Zagreb, 2021

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom
doc. dr. sc. Đanija Škalamere.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekata:

Sinteza i ispitivanje imunoadjuvantske aktivnosti konjugata desmuramil-dipeptida i saponina
kvilaje (*Quillaja saponaria*) (voditelj: doc.dr.sc. Đani Škalamera)

Sinteza i strukturna analiza biološki aktivnih peptida, heterocikličkih spojeva i njihovih
glikokonjugata (Sveučilišna potpora, voditelj: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković)

Zahvale

Zahvaljujem se, u prvom redu, doc. dr. sc. Đaniju Škalameri na mentorstvu, strpljenju, vremenu, trudu, nesebičnoj pomoći i svim uložnim i omogućenim sredstvima potrebnim za izradu ovog diplomskog rada. Osim toga, zahvaljujem se i prenesenim vještinama i znanju, kao i životnim lekcijama koje sam stekao radom u laboratoriju.

Zahvaljujem se roditeljima i obitelji na podršci, a posebno Petri na motivaciji i toplim riječima koje su mi pomogle prebroditi sve prepreke tokom studija.

Zagreb, listopad 2021.

Ivan

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	XIII
§ 2. LITERATURNI PREGLED	15
2.1. Adjuvanti u cjevovima	15
2.1.1. <i>Imunoadjuvanti temeljeni na saponinima iz kore drveta Quillaja saponaria.....</i>	<i>16</i>
2.1.2. <i>QS-21</i>	<i>18</i>
2.2. Peptidna kemija.....	19
2.2.1. <i>Zaštitne skupine i aktivirajući reagensi</i>	<i>22</i>
2.2.2. <i>Reakcije kondenzacije aminokiselina.....</i>	<i>24</i>
2.2.3. <i>Desmuramil-dipeptid</i>	<i>24</i>
2.3. Kemija ugljikohidrata	26
2.3.1. <i>Reakcije na anomernom položaju – sinteza glikozida</i>	<i>26</i>
2.3.2. <i>Reakcije hidroksilnih skupina</i>	<i>27</i>
2.3.3. <i>Reakcije oksidacije šećera</i>	<i>29</i>
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	31
3.1. Materijali i metode.....	31
3.2. Saharidni prekursor	32
3.2.1. <i>Sinteza 1,2,3,4-tetra-O-acetil-α-D-galaktopiranozne kiseline (1).....</i>	<i>32</i>
3.2.2. <i>Sinteza alilnog estera 1,2,3,4-tetra-O-acetil-α-D-galaktopiranozne kiseline(2).....</i>	<i>33</i>
3.2.3. <i>Sinteza alilnog estera 2,3,4-tetra-O-acetil-α-D-galaktopiranozne kiseline (3).....</i>	<i>34</i>
3.2.4. <i>Sinteza alilnog estera 1-O-trikloacetimidat-2,3,4-tri-O-acetil-α-D-galaktopiranozne kiseline (4).....</i>	<i>34</i>
3.3. Triterpenski prekursor.....	35
3.3.1. <i>Izolacija Quillaja kiseline (5).....</i>	<i>35</i>
3.3.2. <i>Sinteza trietilsilil (TES) zaštićene Quillaja kiseline (6)</i>	<i>35</i>
3.3.3. <i>Sinteza benzilnog estera trietilsilil (TES) zaštićene Quillaja kiseline (7).....</i>	<i>36</i>
3.4. Peptidni prekursor	37
3.4.1. <i>Sinteza Boc-Gly-L-Ala-D-Glu(OBn)-NH₂ (8)</i>	<i>37</i>
3.5. Povezivanje prekursora.....	38
3.5.1. <i>Pokušaj sinteze konjugata galakturonske kiseline (4) i Quillaja kiseline (7)</i>	<i>38</i>
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	39
4.1. Uvod	39

4.2. Dizajn ciljne molekule	40
4.3. Retrosintetska analiza.....	42
4.4. Sinteza	43
4.4.1. <i>Triterpenski prekursor</i>	43
4.4.2. <i>Peptidni prekursor</i>	45
4.4.3. <i>Šećerni prekursor.....</i>	46
4.4.4. <i>Sinteza ciljne molekule.....</i>	48
§ 5. ZAKLJUČAK	51
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI)	53
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	55
§ 8. DODATAK.....	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXVI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

IZOLACIJA I DERIVATIZACIJA SAPONINA IZ EKSTRAKTA KORE DRVETA *QUILLAJA SAPONARIA* U SVRHU PRIPRAVE KONJUGATA S DESMURAMIL-DIPEPTIDOM

Ivan Logožar

Za sintezu konjugata Quillaja saponina i desmuramil-dipeptida u ovom diplomskom radu pripravljena su tri ključna prekursora. Konjugacija triterpenskog saponina i desmuramil dipeptida planirana je preko D-galakturonske kiseline, koja je izosterička s D-fukozom, prisutnom u prirodnom QS-21. Derivat D-galakturonse kiseline potreban za sintezu konjugata bit će pripremljen u nekoliko koraka polazeći iz komercijalno dostupne D-galakturonske kiseline monohidrata. Triterpenski saponin biti će izoliran iz komercijalno dostupnog ekstrakta kore QS, nakon čega će biti zaštićen odgovarajućim zaštitnim skupinama. Desmuramil dipeptid sintetizirat će se polazeći iz odgovarajućih amonikiselina. Rad će uključivati izolaciju, derivatizaciju i karakterizaciju prirodnih spojeva sintetske metode peptidne ugljikohidratne kemije. Cilj rada je pronalazak efikasnog sintetskog puta do ključnih prekursora potrebnih za pripremu konjugata *Quillaja* saponina i desmuramil-dipeptida. Ove dvije jedinice zasebno posjeduju izraženu imunoadjuvantsku aktivnost pa je pretpostavka da će njihovo povezivanje dovesti do sinergističkog efekta u povećanju aktivnosti. Također, uloga šećernog dijela nije zanemariva, jer je poznato da oblik u kojem se nalazi šećer kod derivata *Quillaja* saponina (slobodne OH skupine ili u obliku acetilnih estera) može značajno promijeniti smjer imunološkog odgovora (Th1/Th2).

(58+XX stranica, 25 slika, 3 tablica, 36 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagrebi Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: cjepiva, derivati prirodnih spojeva, desmuramil-dipeptid, imunoadjuvanti, *Quillaja* saponini

Mentor: doc. dr. sc. Đani Škalamera

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Đani Škalamera
 2. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
 3. doc. dr. sc. Jana Pisk
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Datum diplomskog ispita: 17.11.2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

ISOLATION AND DERIVATIZATION OF SAPONINS FROM THE EXTRACT OF *QUILLAJA SAPONARIA* TREE BARK FOR THE SYNTHESIS OF CONJUGATES WITH DESMURAMYL DIPEPTIDE

Ivan Logožar

Three key intermediates needed for the synthesis of *Quillaja* saponin and desmuramyldipeptide conjugate were prepared in this diploma thesis. Conjugation of the triterpene precursor and desmuramyldipeptide was planned through D-galacturonic acid, which is isosteric with D-fucose, which occurs naturally in QS-21. D-Galacturonic acid derivative needed for this synthesis will be prepared in a few steps, starting from commercially available D-galacturonic acid monohydrate. The triterpene precursor will be isolated from commercially available *Quillaja* saponaria tree bark extract, after which it will be protected by appropriate protective groups. Desmuramyldipeptide will be prepared from its corresponding aminoacids. This thesis will include isolation, derivatization and characterization of natural compounds, as well as, synthetic methods of peptide and carbohydrate chemistry. The goal of this thesis was to find the most efficient synthetic pathway to these precursors needed to prepare *Quillaja* saponin and desmuramyldipeptide conjugate. These two precursors have extraordinary immunoadjuvant activity by themselves, and the ultimate goal is to show the synergistic effect by combining the two. The sugar component is also crucial in this conjugate, as it can drastically change the direction of the immune response (Th1/Th2).

(58+XX pages, 25 figures, 3 tables, 36 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: desmuramyldipeptide, immunoadjuvant activity, natural compound derivates, *Quillaja* saponins, vaccines.

Mentor: Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
2. Dr. Jana Pisk, Assistant Professor
3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Prof.

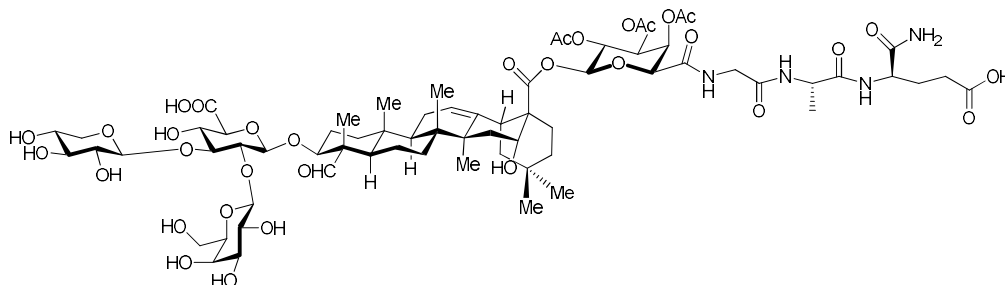
Substitute: Dr. Vesna Petrović Peroković, Assoc. Prof.

Date of exam: Nov 17, 2021

§ 1. UVOD

Tvari koje se dodaju cjepivima kako bi se pojačao imunološki odgovor na antigen nazivaju se adjuvanti. Takvih tvari je za humanu upotrebu odobren vrlo ograničen broj, a često su povezane s pojmom toksičnosti i različitim nuspojavama, što daje dodatnu motivaciju razvoju novih, učinkovitijih adjuvanata. Posebno su zanimljivi spojevi skupine saponina izoliranih iz kore drveta *Quillaja saponaria* (QS) Molina, koji su se dosad pokazali kao jedni od najučinkovitijih adjuvanata. Detaljnije su istražena četiri spoja iz te serije, QS-7, QS-17, QS-18 te vodeći od njih, QS-21, koji je nedavno i odobren za humanu upotrebu (cjepivo Shingrix[®], GSK). Izuzev njegovim učinkovitim svojstvima, nedostaci su mu da je kemijski nestabilan, zahtjevan za pročititi i ograničenog izvora, stoga je razvoj novih i jednostavnijih adjuvanata baziranih na njegovoj strukturi motivacija za nova istraživanja.¹ Peptidoglikani su prirodni polimeri koji se nalaze u staničnim stijenkama Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija. Muramil-dipeptid (*N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin) najmanji je dio bakterijskog peptidoglikana koji pokazuje adjuvantsku aktivnost. Njegovi analozi bez *N*-acetilmuramilne podjedinice nazivaju se desmuramil-peptidi, a za njih je pokazano da nakon modifikacije s lipofilnim supstituentima pokazuju vrlo visoku adjuvantsku aktivnost. Upotreba MDP-a kao adjuvanta ograničena je zbog toksičnosti, a osim toga, spoj je pirogeni artritogen.²

Cilj diplomskog rada je pronalazak efikasnog sintetskog puta do ključnih prekursora potrebnih za pripravu konjugata *Quillaja* saponina i desmuramil-dipeptida (slika 1). Ove dvije jedinice zasebno posjeduju izraženu imunoadjuvantsku aktivnost pa je pretpostavka da će njihova konjugacija dati sinergistički efekt u povećanju adjuvantske aktivnosti.



Slika 1. Struktura ciljne molekule

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Adjuvanti u cjepivima

Antigen je tvar koja potiče na stvaranje antitijela i kao takva je najvažnija sastavnica cjepiva. Kada je imunološki sustav izložen antigenu, limfociti štite organizam poticanjem na stvaranje antitijela. Skup takvih obrambenih mehanizama koji se odvijaju u tijelu nazivamo imunost. Jedan od učinkovitijih i sigurnijih načina stjecanja imunosti je izlaganje imunološkog sustava patogenu ili frakciji istog putem cijepjenja. Sami po sebi, antigeni najčešće nisu dovoljno imunogenični i ne dovode do stvaranja odgovarajućeg imunološkog odgovora koji rezultira trajnom imunošću. Zbog toga se u cjepivu nalaze i adjuvanti – spojevi ili smjese spojeva koje pojačavaju odgovor imunološkog sustava na prisutni antigen. Cjepiva mogu biti aktivirana ili inaktivirana, ovisno o obliku u kojem je prisutan antigen. Aktivirana sadrže žive patogene, koji su oslabljeni pa ne mogu uzrokovati bolest, dok neaktivirana sadrže mrtve patogene ili njihove dijelove (npr. specifične proteine).

Inaktivirana cjepiva su općenito manje opasna, ali su i slabiji imunogeni, pa je zbog toga u cjepivu uz antigen potreban i adjuvant koji će pojačati i usmjeriti imunološki odgovor. Kod takvih cjepiva, antigen aktivira imunološki sustav, a adjuvant pojačava imunološki odgovor i/ili ga usmjerava u željenom smjeru, tako da imunološki odgovor može biti usmjeren prema Th1 (stanična imunost) ili Th2 (humoralna imunost). Dakle, možemo reći da je djelovanje adjuvanta imunostimulatorno i imunomodulatorno.

Iako Th1 imunost razara tumorske stanice i viruse, također i razara tkivo, pa je uvijek popraćena s Th2 imunosti koja takvu štetu popravlja. Idealno cjepivo bi, prema tome, bilo ono koje će izazvati balansiran Th1/Th2 odgovor, što nije lako postići, budući da je broj adjuvanata odobrenih za humanu upotrebu vrlo ograničen. Saponin izoliran iz kore drveta *Quillaja saponiaria* Molina, QS-21⁴ pokazao je izuzetno dobra imunoadjuvantska svojstva, što će detaljnije biti opisano u nastavku rada.

Saponini, lat. *sapo* što označava sapun, pojavljuju se u raznim biljkama i nekim morskim organizmima, poput morskih krastavaca i morskih zvijezda, a njihova biološka upotreba je toliko značajna da su stoljećima u upotrebi kao surfaktanti – stvaraju stabilne pjene te imaju svojstva slična sapunima i deterdžentima. Osim toga, imaju i značajnu

primjenu u farmaceutici, npr., steroidni saponini se koriste kao oralni kontraceptik. Također ih nalazimo i u brojnim drugim lijekovima, te su identificirani kao aktivna tvar u nekim pripravcima iz narodne medicine. Farmakolog Ludwig Kofler, 1927. godine, detaljno je opisao svojstva i farmakološku aktivnost saponina, ali tada nijedan saponin još nije bio potpuno karakteriziran. U kontrast tome, do 1987. godine otkrivene su strukture preko 360 sapogenina (aglikoni, odnosno ne-saharidni dio molekule saponina) i 750 triterpenskih glikozida.

Saponini su posebno zanimljivi postali zbog svojih adjuvantskih svojstava i potencijalne primjene u cjepivima. Najvažniji predstavnik ove klase spojeva s adjuvantskom aktivnošću je QS-21, čija je primjena proučavana u više od 100 kliničkih studija, što je rezultiralo time da je odobren za upotrebu u cjepivu za humanu upotrebu (Shingrix®, cjepivo za herpes zoster od proizvođača GSK).

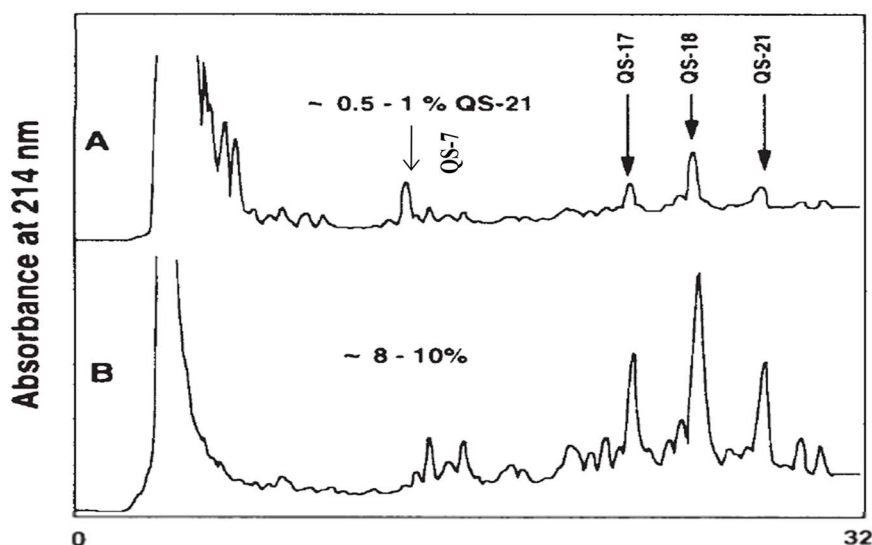
2.1.1. Imunoadjuvanti temeljeni na saponinima iz kore drveta *Quillaja saponaria*

Mnogi od saponina pokazali su jaku adjuvantsku aktivnost, ali posebno se ističu saponini izolirani iz kore drveta *Quillaja saponaria* (QS) Molina, koje raste u Južnoj Americi. Espinet - 1951. godine primjećuje adjuvantsku aktivnost saponina izoliranog iz kore tog drveta i koristi ga kako bi pojačao aktivnost tadašnjih cjepiva testiranih na životinjama.³

Nisu svi saponini učinkoviti adjuvanti. Dalsgaard, 1970. godine pokazuje korelaciju između adjuvantske aktivnosti i vrste saponina, odnosno, pokazao je da od tada poznatih saponina najveću imunoadjuvantsku aktivnost pokazuju upravo saponini izolirani iz kore drveta QS.⁴

Sirovi ekstrakt kore QS pročišćen je dijalizom, ionskom izmjenom i gel filtracijskom kromatografijom kako bi se dobila djelomično pročišćena saponinska frakcija Quil A®, čija je učinkovitost bila veća od učinkovitosti sirovog ekstrakta.⁵ Tako izolirana frakcija koristi se kao adjuvant za cjepiva u veterini, a također je korištena i ispitivana u imunostimulirajućim kompleksima ISCOM (engl. *Immune Stimulating Complexes*), koji su sadržavali antigen, lipid i saponin.⁶

Nešto kasnije, analizom pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), pokazano je da je ekstrakt naziva Quil A® zapravo smjesa velikog broja strukturno sličnih spojeva.⁷ U kasnijim istraživanjima također je otkriveno da ne pokazuju svi saponini iz



Slika 3. HPLC kromatogram (A) vodenog ekstrakta kore QS i (B) djelomično pročišćenog ekstrakta (QuilA®). Preuzeto i prilagođeno prema ref. 19.

2.1.2. QS-21

QS-21 je triterpenski glikozid, čija je kompleksna struktura određena masenom spektrometrijom i NMR analizom spoja te njegovih fragmenata,¹¹ kao i usporedbom s ostalim saponinima slične strukture izoliranim iz drveta *Quillaja saponaria*.¹² Struktura je naknadno potvrđena 2-D NMR analizom i utvrđeno je da je triterpenska domena (Slika 2, crno) glikozilirana na atomima C-3 i C-28. Dvije strukturne značajke koje QS-21 saponin čine različitim od saponina neke druge vrste biljaka su prisutnost kiralnog acilnog lanca (Slika 2, plavo) i aldehidne skupine na poziciji C-4 triterpenske jezgre. Prirodni QS-21 sastoji se od četiri glavne strukturne domene: razgranatog trisaharida, triterpenske jedinice, linearnog oligosaharida i acilnog lanca.

Spoj je amfipatskog karaktera zbog prisutnosti hidrofobne i hidrofilne domene, a to su triterpen, odnosno šećerne jedinice. Zbog tog svojstva QS-21 može tvoriti micelle veličine do 35 Å.⁹ Sklonost spoja da formira micelle potaknula je istraživanje aktivne forme spoja, odnosno je li ona monomerna ili micelarna. Studijom na miševima dokazano je da je monomerna forma aktivna za koncentracije ispod kritične micelarne koncentracije.¹³

Izolacijom iz prirodnog materijala dobiva se smjesa dvaju izomera QS-21, od kojih jedan u saharidnoj jedinici sadrži ksilozu, a drugi apiozu, u omjeru $QS-21_{\text{api}}:QS-21_{\text{xyI}} = 2:1$. Pokazalo se da je aktivnost oba izomera jednaka, stoga nije potrebno njihovo odjeljivanje.

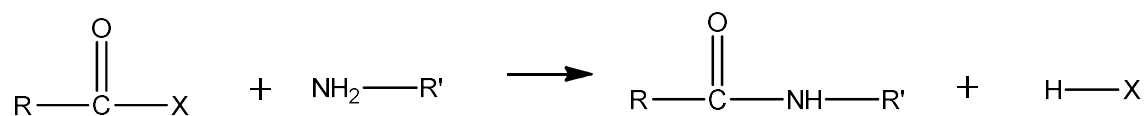
Iako je QS-21 moćan adjuvant, njegova široka uporaba ograničena je nedostacima poput relativno malog udjela u kori drveta,¹⁴ kemijske nestabilnosti¹⁵ i ograničenog raspona primjenjivih koncentracija zbog toksičnosti.¹⁶

2.2. Peptidna kemija

Proteini su najrasprostranjeniji organski spojevi u životinjskom svijetu i kao takvi imaju vrlo važnu ulogu u svim aspektima staničnih struktura i funkcija. Građeni su od α -aminokiselina povezanih amidnim, odnosno peptidnim vezama. Fizikalna i kemijska svojstva proteina proizlaze iz sastavnih aminokiselina. Najvažnija reakcija aminokiselina je tvorba peptidnih veza, a budući da aminokiseline sadrže amino-skupinu i karboksilnu skupinu izvrsni su supstrati za tvorbu amidne veze. Nastali produkt se naziva dipeptidom jer se sastoji od dviju aminokiselina, a nastala amidna veza naziva se peptidnom vezom (slika 4). Na sličan način moguće je povezati više aminokiselina preko peptidne veze i dobiti veći peptid. Dio peptidne molekule koji završava amonijevom skupinom ($-NH_3^+$) naziva se N-krajem, a dio na kojem je slobodna karboksilatna skupina ($-COO^-$) naziva se C-krajem.¹⁷

Razvoj peptidne kemije posebno je važan za suvremeni život jer su brojni sintetski peptidi našli primjenu u raznim industrijama poput prehrambene (aspartam kao umjetni zaslađivač) i farmaceutske (oksitocin, kalcitonin). Najvažnije metode za sintezu peptida su sinteza u otopini (engl. *solution phase synthesis*, SPS) i sinteza na čvrstom nosaču (engl. *solid phase peptide synthesis*, SPPS).¹⁸

Totalna sinteza proteina najčešće nije isplativ postupak, stoga se važni proteini dobivaju iz bioloških izvora (npr. inzulin za dijabetičare dobiva se iz svinjske gušterače). Razvitkom tehnike rekombinantne DNA poboljšana je kvaliteta i dostupnost peptidnih lijekova. Upravo tom tehnikom moguće je izdvojiti genski kod za određeni protein, umetnuti ga u bakteriju i potaknuti je na proizvodnju tog proteina. Laboratorijska sinteza proteina je od posebne važnosti jer je moguće dobiti peptid s izmijenjenim slijedom aminokiselina kojemu se biološka aktivnost razlikuje u usporedbi s prirodnim proteinom. Sintezu peptida potrebno je osmisлити tako da se omogućí nastajanje amidnih veza određenih aminokiselina željenim slijedom.



Slika 4. Primjer nastajanja amidne veze

Metodu produljivanja lanca u otopini možemo podijeliti u par koraka:

- 1) Zaštita α -amino skupine i aktivacija α -karboksilne skupine jedne od aminokiselina te zaštita α -karboksilne skupine druge aminokiseline u reakciji.
- 2) Kondenzacija dviju zaštićenih i aktiviranih aminokiselina uz pomoć kondenzacijskog reagensa
- 3) Selektivno uklanjanje zaštitnih skupina na C i N-kraju nastalog peptida.

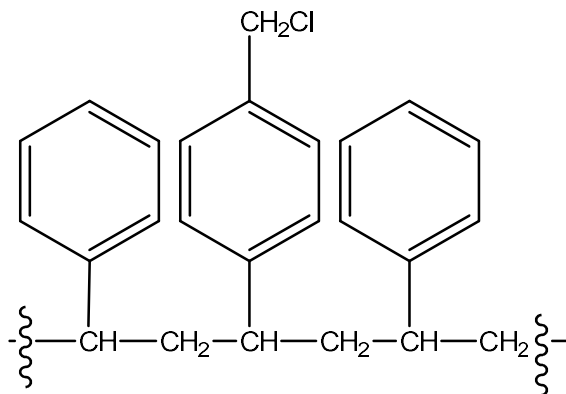
Sinteza u otopini (SPS) obično se primjenjuje za pripravu kraćih peptida. S obzirom da je nužno provesti izolaciju i pročišćavanje nakon svakog reakcijskog koraka, ova metoda nije pogodna za sintezu peptida duljih od 5 aminokiselinskih jedinica. Dodatno, nakon svakog koraka pročišćavanja potrebno je potvrditi strukturu dobivenog peptida, što značajno troši vrijeme, zbog čega je za pripravu dužih peptida i proteina primjerenija metoda sinteze na čvrstoj fazi (SPPS), koja se može ujedno i automatizirati.

Sinteza peptida na čvrstoj fazi ima istu kemijsku logiku kao sinteza peptida u otopini, ali kovalentno vezanje rastućeg peptidnog lanca na čvrstom nosaču (netopljiva polimerna smola) omogućuje ispiranje nusprodukata, nečistoća i suviška reagensa, što otklanja uvjet za pročišćavanjem nakon svakog provedenog koraka.¹

Metodu produljivanja lanca na čvrstoj fazi možemo podijeliti u par koraka:

- 1) Zaštićena aminokiselina, čiji su α -amino skupina i bočni lanac zaštićeni zaštitnom skupinom, veže se za čvrsti nosač karbamatnom vezom preko C-kraja.
- 2) Ukloni se α -amino zaštitna skupina s aminokiseline vezane za nosač.
- 3) Kondenzacijska reakcija (uz pomoć kondenzacijskog reagensa) s drugom aminokiselinom zaštićenom na N-kraju i istovremeno aktiviranom na C-kraju. U ovom koraku dobiven je N-zaštićeni dipeptid
- 4) Dipeptidu se uklanja zaštitna skupina na N-kraju te se dodaje nova aminokiselina za kondenzacijsku reakciju. Taj proces se ponavlja do željene duljine lanca.
- 5) Željenom peptidu uklanjaju se zaštitna skupina na bočnim ograncima aminokiselina i zaštitna skupina na N-kraju posljednje aminokiseline u nizu.
- 6) Posljednji korak uključuje kidanje veze između peptida i čvrstog nosača te eluciju peptida i njegovo pročišćavanje (obično HPLC).

Čvrsti se nosač sastoji od zrnaca polistirena u kojemu su neki aromatski prstenovi derivatizirani klormetilnim skupinama (Merrifieldova smola, slika 5).



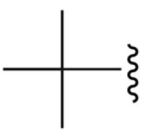
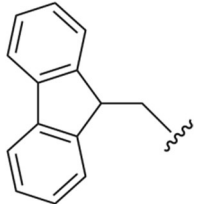
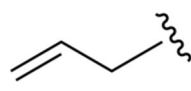
Slika 5. Merrifieldova smola (polimer).

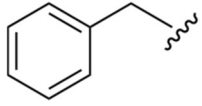
Najveća razlika između sinteze u otopini (SPS) i na čvrstoj fazi (SPPS) je ta što je sinteza na čvrstoj fazi znatno brža, može se koristiti za sintezu dužih peptida, pa čak i manjih proteina, koristi topljive reagense za provođenje reakcija, koje je lako ukloniti filtracijom i sama metoda može biti automatizirana.

2.2.1. Zaštitne skupine i aktivirajući reagensi

Zaštitne skupine se kovalentno vežu za neku reaktivnu funkcionalnu skupinu koju je potrebno deaktivirati za vrijeme provođenja reakcije. Prije svega, uvođenje zaštitne skupine mora se odvijati u određenim uvjetima kako bi reakcija zaštite bila optimalna (bez nusreakcija), kako bi nastao željeni produkt i kako bi iskorištenje bilo što veće. Također, nakon provođenja reakcijskog koraka potrebno je skupinu ukloniti, a da pritom ne dođe do neželjenih reakcija ili uklanjanja drugih zaštitnih skupina koje nismo htjeli ukloniti. Budući da aminokiseline sadrže amino i karboksilnu skupinu, obje skupine mogu reagirati. Upravo zato postoje zaštitne skupine koje su karakteristične za oba kraja. Također postoje i zaštitne skupine koje se koriste za zaštitu bočnih ogranaka kod aminokiselina koje imaju reaktivnu skupinu u bočnom ogranaku.

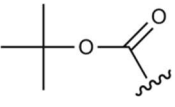
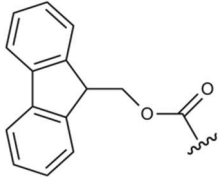
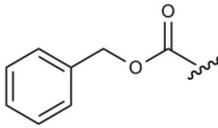
Tablica 1. Najčešće korištene zaštitne skupine za α -karboksilnu kiselinu aminokiselina.

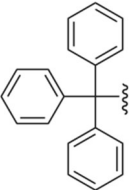
Zaštitna skupina	Uvjeti uvođenja	Uvjeti uklanjanja	Skupine koje su stabilne u uvjetima uklanjanja
 <i>t</i> -Bu	<i>t</i> -BuOH, EDC, DMAP	4 mol/dm ⁻³ HCl / dioksanili TFA/ DCM	Fmoc, Trt
 Fm	FmOH, EDC/DCM	20% piperidin/DCM	Boc, Trt
 All	AlOH, py / DCM, (COCl) ₂ , DMF ili AllBr, KHCO ₃ / DMF	Pd(PPh ₃) ₄ / DCM	Boc, Fmoc, Trt

 Bn	BnBr, NaH / DMF	HF ili H₂/Pd-C	Boc, Fmoc, Trt
--	----------------------------------	--	-----------------------

Vrlo važan korak u sintezi peptida je, naravno, i zaštita α -amino skupine. Pregled najčešće korištenih zaštitnih skupina za amino skupinu dan je u Tablici 2.

Tablica 2: Najčešće korištene zaštitne skupine za α -amino skupinu.

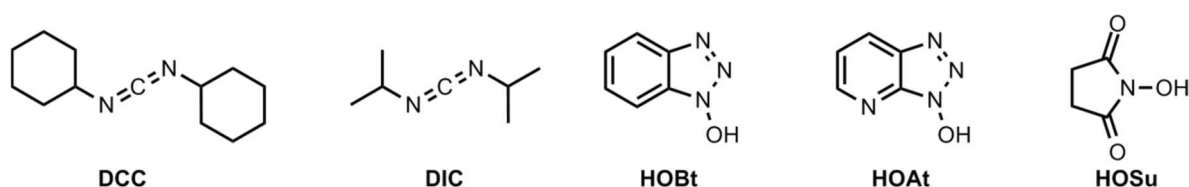
Zaštitna skupina	Uvjeti uvođenja	Uvjeti uklanjanja	Skupine koje su stabilne u uvjetima uklanjanja
 Boc	Boc₂O, NaHCO₃ / dioksan	20-50 % TFA/ DCM ili 4 mol/dm⁻³ HCl / dioksan	Fmoc, Trt
 Fmoc	Fmoc-OSu ili Fmoc- Cl, NaHCO₃/dioksan	Otopina: NH₃/morfolin ili SPSS: Piperidin/DMF	Boc, Trt
 CBz	CBz-OSu ili CBz-Cl, NaHCO₃ / dioksan	HBr / HOAcili H₂ / Pd-C	Boc, Fmoc, Trt

 <p style="text-align: center;">Trt</p>	TrtCl, AgNO ₃	1% TFA / DCM 0,2 % TFA, 1% H ₂ O/DCM	Fmoc
--	--------------------------	---	------

2.2.2. Reakcije kondenzacije aminokiselina

Kondenzacijska reakcija je spajanje dviju aminokiselina u peptid, pri čemu nastaje amidna (peptidna) veza. Da bi se takva reakcija dogodila, potrebno je aktivirati karbonilnu skupinu aminokiseline na koju će se vršiti napad od strane amino skupine druge aminokiseline. Takva aktivacija postiže se uvođenjem elektron-odvlačeće skupine, a to se radi kako bi se povećala elektrofilnost karbonilnog ugljikovog atoma.¹⁹

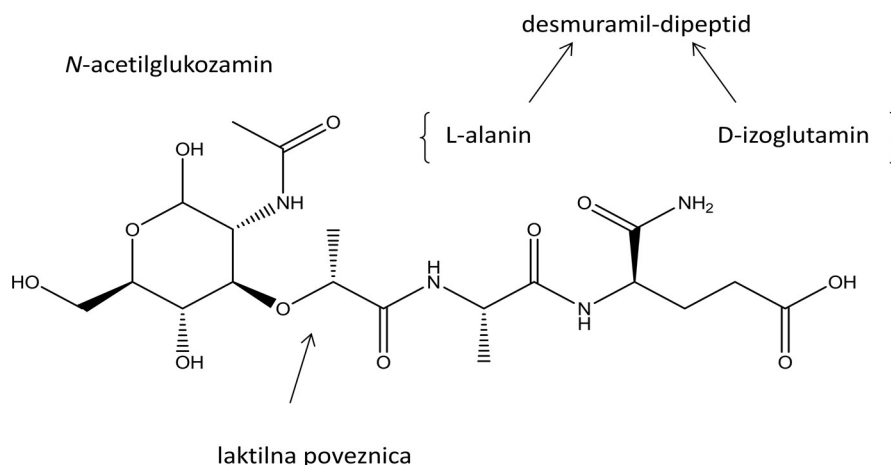
Kondenzacijski reagens također smanjuje ili sprječava racemizaciju kiralnih centara. Najčešće korištena metoda u sintezi amidne veze je karbodiimidna metoda koja koristi dicikloheksilkarbodiimid (DCC) ili diizopropilkarbodiimid (DIC) uz 1-hidroksibenzotriazol (HOBt), 1-hidroksi-7-azabenzotriazola (HOAt) ili *N*-hidroksisukcinimida (HOSu) (Slika 6.).



Slika 6. Strukturne formule kondenzacijskih reagensa DCC, DIC, HOBt, HOAt i HOSu

2.2.3. Desmuramil-dipeptid

Peptidoglikani su prirodni polimeri koji se nalaze u staničnim stijenkama Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija. Muramil-dipeptid (*N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin) je najmanji dio bakterijskog peptidoglikana koji pokazuje adjuvantsku aktivnost. Njegovi analozi bez *N*-acetilmuramilne podjedinice nazivaju se desmuramil-peptidi (slika 7).



Slika 7. Struktura muramil-dipeptida

Upotreba MDP-a kao adjuvanta ograničena je zbog toksičnosti, a osim toga, spoj je pirogen i artritogen. Mehanizam djelovanja MDP-a i njegovih derivata nije potpuno razjašnjen, ali poznato je da se peptidoglikani sastavljeni od više polimera vežu za TLR (*Toll-like*) receptore, a manji fragmenti na NOD – proteine (*Nucleotide-binding oligomerization domain*). Pokazano je da *N*-acetil-D-glukozamin nije nužan za imunoadjuvantsko djelovanje, štoviše, zaključeno je kako se adjuvantska aktivnost MDP-a ne umanjuje ukoliko na šećernom dijelu nema anomerne hidroksilne skupine ili je zamijenjena α - ili β -metilnom skupinom.²⁰

Također, zamjena primarne hidroksilne skupine šećera na C-6 atomu ne utječe na aktivnost, ali ako se kiralno središte na laktilnoj poveznici promijeni iz konfiguracije R- u S-, gubi se adjuvantska aktivnost.²¹ Zamjena L-alanina s D-alaninom rezultira gubitkom aktivnosti, ali zamjena s nekom drugom L-aminokiselinom ili glicinom ne utječe na aktivnost. Što se glutaminskog dijela tiče, bitno je da sadrži D-konfiguraciju na aminokiselini te da karboksilne skupine budu razdvojene s dva metilenska ugljika. Neki od derivata MDP-a su murabutid, koji je siguran sintetski imunomodulator korišten u cjepivima za humanu upotrebu²², temurtid, koji je netoksičan i aktivan adjuvant dobiven zamjenom L-alanina s L-treoninom (MDP(Thr))²², te muramil-tripeptid-fosfatidiletanolamin (MTP-PE), koji se koristi u liječenju osteosarkoma.²³

2.3. Kemija ugljikohidrata

Ugljikohidrati su vrlo raširena grupa organskih spojeva u prirodi, koju sintetiziraju, odnosno metaboliziraju sve biljke i životinje. Općenito, ovisno o strukturi, razlikujemo jednostavne šećere (monosaharide, disaharide) i složenije šećere (oligo- i polisaharide). Njihova svojstva su raznolika, a protežu se od skladišnih svojstava (fotosintetski procesi pretvorbe energije u ugljikohidrate u biljkama), pa do strukturnih svojstava (celuloza koja daje čvrstoću biljkama, hitin koji daje tvrdoću oklopu kukaca). U različitim industrijama kemičari ugljikohidrate koriste u svrhu prerade istih u hranu, materijale itd.

Ugljikohidrati su polihidroksialdehidi, polihidroksiketoni ili spojevi koji u njih lako hidroliziraju. Polihidroksialdehidi nazivaju se aldozama (ald- označava aldehidni dio, a –oza šećerni dio molekule), dok su polihidroksiketoni ketoze (ket- za keton, a –oza za šećer). Monosaharidi su najjednostavniji ugljikohidrati koji ne mogu hidrolizirati u jednostavnije spojeve (glukoza i fruktoza). Disaharid je šećer čija molekula može hidrolizirati u dvije molekule monosaharida (saharoza). Monosaharidi i disaharidi su dobro topljivi u vodi i imaju karakterističan slatki okus. Polisaharidi se pojavljuju u prirodi kao ugljikohidratni biopolimeri, od kojih su najpoznatiji škrob i celuloza, koji su sastavljeni od molekula glukoze. Škrob je polisaharid koji služi kao skladište energije koja se u stanicama može lako osloboditi, a celuloza je glavna strukturna komponenta biljaka.²⁴

2.3.1. Reakcije na anomernom položaju – sinteza glikozida

Šećerni acetali nazivaju se glikozidima, a njihova imena završavaju sufiksom –ozid. Primjerice, glikozid koji je izveden iz glukoze naziva se glukozid, a ukoliko je riječ o šesteročlanom prstenu, naziva se glukopiranozidom. Općenito, šećer čije ime završava sufiksom –oza je reducirajući, a ako završava na –ozid je nereducirajući.

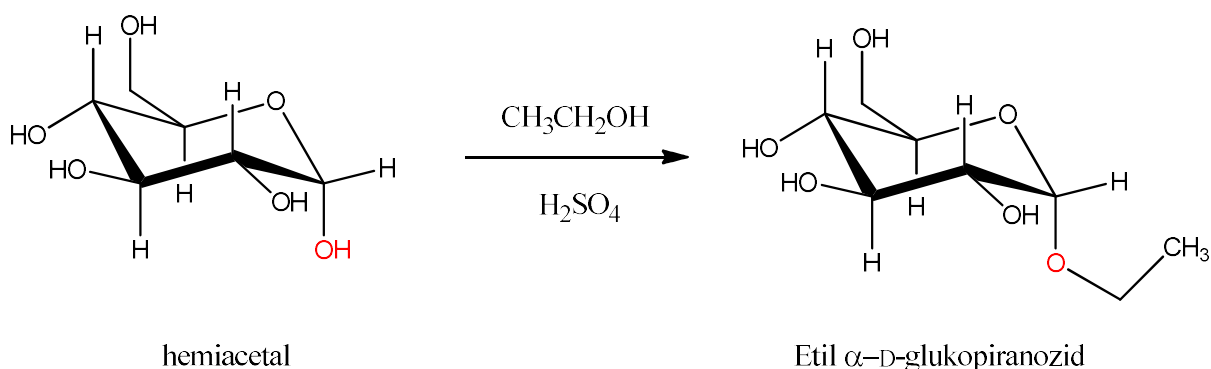
Poznato je mnogo metoda sinteze glikozida, ali najčešće korištene su neke od ove tri: izravna metoda, imidatna metoda i Koenigs-Knorrova metoda. **Izravna metoda** sinteze koristi se za pripremu glikozida s jednostavnim alkoholima (npr. metanolom, etanolom, alilnim ili benzilnim alkoholom). Reakcija je katalizirana Lewisovom kiselinom, najčešće $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. **Koenigs Knorrova** metoda je najstarija od tri navedene, a uključuje kondenzaciju halogenida sa spojevima koji sadrže OH skupine (najčešće alkoholi ili saharidi). Reakcija se odvija u prisutnosti Ag_2CO_3 ili AgOTf kao promotora. Ta reakcija se sve manje koristi jer

zahtijeva upotrebu soli teških metala kao promotora (Ag, Hg), ali je korisna za sintezu glikozida s jednostavnim primarnim alkoholima te β -(1,6) disaharida.²⁵ **Imidatna metoda**, bazira se na selektivnoj aktivaciji anomernog ugljikovog atoma zaštićenih piranoza ili furanoza uz trikloroacetonitril u baznim uvjetima. Izbor baze pritom definira hoće li nastati α - ili β -trikloracetimidati. Najčešće je korištena metoda i često spominjana kao najpouzdanija.²⁶

2.3.2. Reakcije hidroksilnih skupina

Kod šećera razlikujemo reakcije anomerne hidroksilne skupine i ostalih hidroksilnih skupina. Reakcije na anomernom ugljikovom atomu uključuju formiranje već navedenih acetala (glikozida) i hidrolizu istih, dok ostatak hidroksilnih skupina, slično reakcijama s alkoholima, podliježe reakcijama formiranja etera i estera.

Jednostavni šećeri imaju hemiacetalnu funkcijsku skupinu koja može biti prevedena u acetalnu skupinu s alkoholom uz prisutnost kiseline. Rezultat takve pretvorbe je glikozid (slika 8).

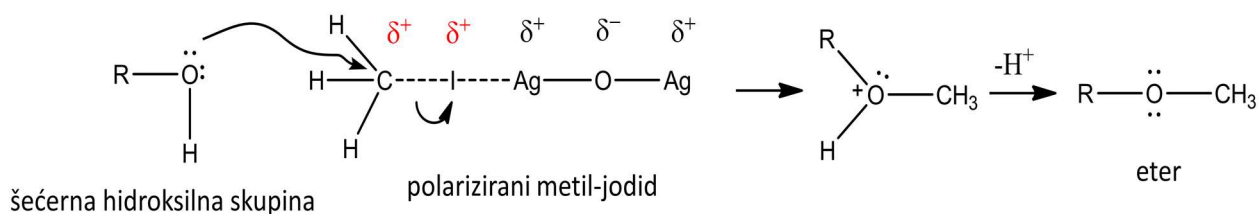


Slika 8. Reakcija pretvorbe hemiacetala u glikozid

Nastanak glikozida sprječava mutorotaciju („zaključava“ prsten) i glikozid više nije u ravnoteži sa svojom otvorenom formom te ga to čini nereducirajućim šećerom. Svi ovako nastali acetali mogu hidrolizirati u kiselim uvjetima i vratiti se natrag u reaktante (hemiacetal).

Zbog prisutnosti više hidroksilnih skupina šećeri su dobro topljivi u vodi, a gotovo netopljivi u organskim otapalima. Šećere je teško prekrystalizirati iz vode jer tvore prezasićene sirupe konzistencije meda, ali pretvorbom hidroksilnih skupina u alkilne etere, šećeri se ponašaju kao jednostavniji organski spojevi, koji se mogu pročistiti metodom prekrystalizacije ili kromatografijom. Djelovanjem metil-jodida uz srebrov oksid na šećer njegove se

hidroksilne skupine pretvaraju u metilne etere. Srebrov oksid u toj reakciji potiče polarizaciju veze C-I u metil jodidu, pa ugljik postaje elektrofilniji (slika 9).



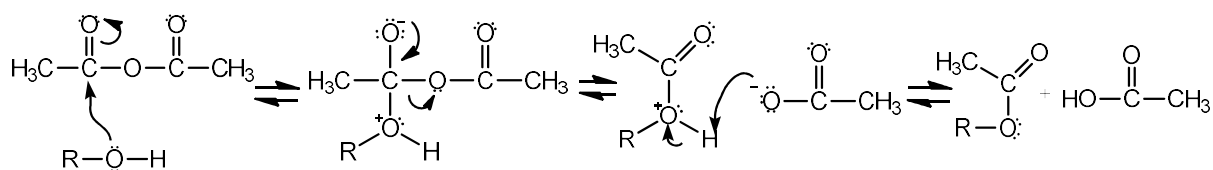
Slika 9. Mehanizam tvorbe metilnih etera uz srebrov(I) oksid i metil jodid.

(Preuzeto i prilagođeno prema ref. 27a)

Williamsonova sinteza mogla bi biti uobičajeni postupak za dobivanje etera, ali zbog jako bazičnog alkoksidnog iona jednostavni šećer bi se izomerizirao i raspao. Također, Williamsonova sinteza nije selektivna. Zbog toga je šećer prvo potrebno pretvoriti u glikozid, koji je kao acetal stabilan u bazičnim uvjetima (slika 10).

Slika 10. Reakcija tvorbe metiliranog ugljikohidrata iz metil-glikozida uz natrijev hidroksid i metil-jodid ili dimetil-sulfat. (Preuzeto i prilagođeno prema ref. 27b)

Šećeri se pretvaraju u acetatne estere u reakciji šećera i acetanhidrida uz piridin kao slabu bazu.^{27c} Sve hidroksilne skupine se acetiliraju, a anomerna veza C-O se ne cijepa pa je stereokemija anomernog atoma očuvana. Aciliranjem hidroksilnih skupina šećera dobivaju se esteri koji se lako pročišćavaju kristalizacijom iz uobičajenih organskih otapala (slika 11).

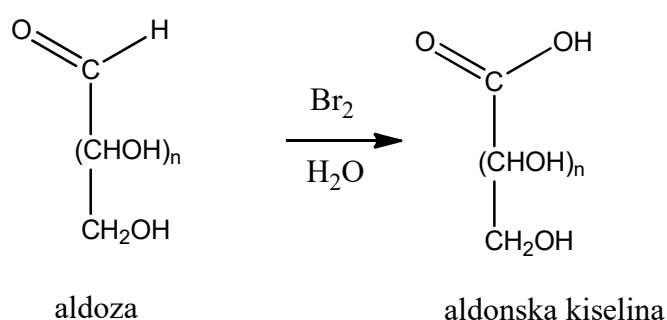


Slika 11. Tvorba acetatnih estera (preuzeto i prilagođeno prema ref. 27c)

2.3.3. Reakcije oksidacije šećera

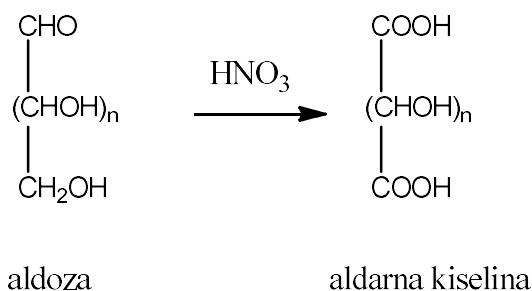
Jednako kako se aldehidi i ketoni mogu reducirati, tako se aldoze i ketoze mogu reducirati u odgovarajuće poliole, koji se nazivaju šećernim alkoholima ili alditolima. Takve reakcije se najčešće izvode s natrijevim borhidridom ili hidrogeniranjem uz nikal kao katalizator. Također, monosaharidi se mogu oksidirati s mnogim reagensima, a takvoj reakciji lako podliježe aldehydna skupina aldoza. Nekim se reagensim čak može i selektivno oksidirati terminalna alkoholna skupina, $-\text{CH}_2\text{OH}$, jer se radi o primarnom alkoholu.

Otopina broma u vodi oksidira aldehydnu skupinu aldoza u karboksilnu skupinu. Pritom, ne djeluje na hidroksilne skupine šećera i ne oksidira ketoze. Reagens je dovoljno kiseo da ne dolazi do epimerizacije ni pregrađivanja šećera. U reakciji aldehyda s vodenom otopinom broma nastaju aldonske kiseline (glikonske kiseline), pa tako npr. glukoza prelazi u glukonsku kiselinu (slika 12).



Slika 12. Reakcija oksidacije aldoze bromnom vodom.

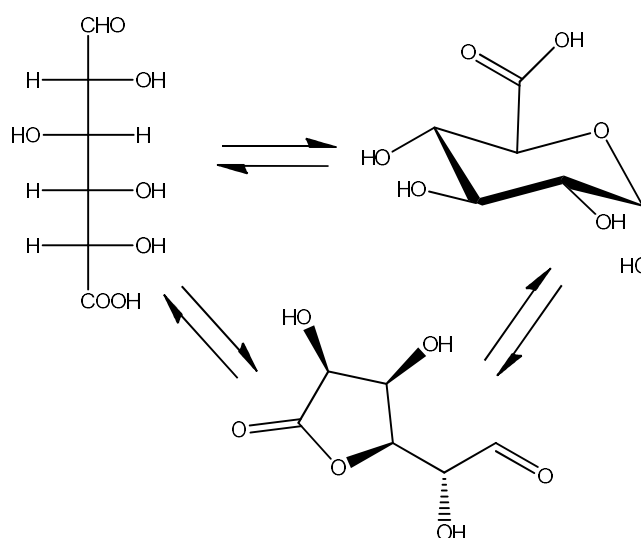
Dušična kiselina jači je oksidans od otopine broma u vodi, pa će uz aldehydnu skupinu aldoze oksidirati i njenu terminalnu $-\text{CH}_2\text{OH}$ u karboksilnu skupinu. Nastala dikarboksilna kiselina naziva se aldarnom kiselinom (glikarnom) (slika 13).



Slika 13. Reakcija oksidacije aldoze dušičnom kiselinom.

Aldehidnu skupinu možemo dokazati Tollensovim reagensom, pri čemu nastaju karboksilatni ion i elementarno srebro, koje se izlučuje u obliku zrcala na unutarnjoj strani epruvete. Tollensov reagens je bazičan i nije moguće pomoću njega razlikovati aldoze i ketoze jer se u reakcijskim uvjetima događa endiolno pregrađivanje; lančasti oblik ketoze izomerizira u aldozu, koja daje pozitivni Tollensov test. Šećeri koji reduciraju Tollensov reagens na opisani način nazivaju se reducirajućim šećerima.^{27d}

Glukuronska kiselina je karboksilna kiselina dobivena oksidacijom glukoze dušičnom kiselinom. Dostupna je kao poluacetal, ali i u obliku laktone, ovisno o uvjetima u kojima je dobivena. Zato je pri radu s glukuronskom kiselinom potrebno paziti jer u bilo kojem trenu može prelaziti iz jednog oblika u drugi (slika 14).



Slika 14. D-Glukuronska kiselina u otvorenoj formi(lijevo), kao hemiacetal(desno) i kao lakton(dolje).

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

Otapala i reagensi korišteni u svrhu izrade diplomskog rada analitičke su čistoće i komercijalno su dostupni. Galakturonskakiselinamonohidrat (*Sigma-Aldrich*), acetanhidrid (Ac_2O , *Kemika*), sumpornakiselina (H_2SO_4 , *Fluka*), perklorokiselina (HClO_4 , *Sigma-Aldrich*), metanol (MeOH , *Fluka*), etanol (EtOH , *Kemika*), kloroform (CHCl_3 , *Kemika*), toluen (*Kemika*), etil-acetat (EtOAc , *Fluka*), octenakiselina (HOAc , *Kemika*), bezvodnimagnezijevsulfat (MgSO_4 , *Sigma-Aldrich*), jod (I_2 , *Gram mol*), heptan (*Sigma-Aldrich*), diklormetan (DCM , *Lach-Ner*), oksalil-klorid ($(\text{COCl})_2$, *Sigma-Aldrich*), *N,N*-dimetilformamid (DMF , *Sigma-Aldrich*), alilnialkohol (AlIOH , *Sigma-Aldrich*), piridin (py , *Kemika*), natrijevhidrogenkarbonat (NaHCO_3 , *Gram mol*), morfolin (*Fluka*), tetrahidrofuran (THF , *Sigma-Aldrich*), klorovodičnakiselina (HCl , *Kemika*), petroleter (PE , *Fluka*), trikloroacetonitril (CCl_3CN , *Fluka*), cezijevkarbonat (Cs_2CO_3 , *Sigma-Aldrich*), heksan (*Kemika*), QuilA® (*Sigma-Aldrich*), dietil-eter (*Fluka*), aktivniugljen (*Kemika*), alil-bromid (AlIBr , *Sigma-Aldrich*), kalijevhidrogenkarbonat (KHCO_3 , *Sigma-Aldrich*), natrijevklorid (NaCl , *Kemika*), benzilnialkohol (BnOH , *Fluka*), borovtrifluoriddietileterat ($\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$, *Sigma-Aldrich*), *N*-(*tert*-butoksikarbonil)-*L*-alanin-sukcinimidni ester (Boc-L-Ala-Osu , *Sigma-Aldrich*), di-*tert*-butil-dikarbonat (Boc_2O , *Fluka*), amonijevhidrogenkarbonat (NH_4HCO_3 , *Fluka*), trifluorooctenakiselina (TFA , *Sigma-Aldrich*), benzen (*Sigma-Aldrich*), *N*-(*tert*-butoksikarbonil)-glicin (Boc-Gly-OH , *Fluka*), 1-hidroksibenzotriazol (HOBt , *Fluka*), (benzotriazol-1-iloksi)-tris-(dimetilamino)fosfonijevheksafluorofosfat (BOP , *Sigma-Aldrich*), trietilamin (TEA , *Fluka*), dioksan (*Kemika*). Korištena suha otapala pripremljena su standardnim literaturnim metodama.²⁸

Pripravljene spojevi okarakterizirani su infracrvenom spektroskopijom (IR) te spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR). Za snimanje IR spektara uzorci su pripremljeni u obliku KBr pastile (omjer KBr/uzorak 100:1). Korišten je instrument Perkin Elmer FT-IR C89391. ^1H i ^{13}C (DEPT-Q) NMR spektri snimljeni su na Bruke Avance III HD spektrometru pri 400 MHz (^1H) odnosno 100 MHz (^{13}C) u navedenim deuteriranim otapalima. Kao unutarnji standard korišten je tetrametilsilan (TMS) prema kojem su izraženi

kemijski pomaci u ppm. Talište je određeno instrumentom Büchi Meltin point B-450 u otvorenim kapilarama. Optičko skretanje određeno je instrumentom Schmidt+ Haensch Polartronic NH8.

3.2. Saharidni prekursor

3.2.1. Sinteza 1,2,3,4-tetra-O-acetil- α -D-galaktopiranozne kiseline (**1**)

U okrugloj tikvici pomiješani su acetanhidrid (30 mL, 0,32 mol) i 70%-tna perklorna kiselina (195 μ L, 3,2 mmol). Otopina je miješana na magnetskoj mješalici pri 0 °C te joj je dodavana D-galakturonska kiselina monohidrat (4,67 g, 24 mmol) u malim obrocima. Reakcija je miješana pri 0 °C 30 minuta, a zatim pri sobnoj temperaturi još 3 h. Reakcija je praćena TLC-om u sustavu toluen/etanol/etil-acetat/octenakiselina = 4:2:2:1. Polaganim dodatkom metanola (6 mL) pri 0 °C, reakcija je prekinuta, a 30 minuta nakon toga je reakcijska smjesa dodana u 60 mL ledene vode. Provedena je ekstrakcija, pri čemu se vodeni sloj ekstrahirao kloroformom (3 \times 10 mL). Organski ekstrakti spojeni su, prani ledenom vodom (3 \times 5 mL), zatim osušeni na bezvodnom MgSO₄, profiltrirani i upareni na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Dobiveni talog je prekristaliziran iz smjese etil-acetat/heptan. Dobiveno je 6,3 g (73%) produkta **1** u obliku bijele krutine. Karakterizacija spoja slaže se s podacima u literaturi.²⁹

$R_f = 0,63$ (toluen/etanol/etil-acetat/octena kiselina, 4:2:2:1).

Talište = 171-173 °C (raspad)

$[\alpha]_D^{26} = +57,5^\circ$

IR ($\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$, KBr) : 3285 (OH), 2944 (C-H), 1754 (C=O), 1222 (C-O).

¹H NMR (δ/ppm , CDCl₃): 7,90 (s, 1H, OH), 6,50 (d, 1H, $J = 3,1$ Hz, H-1), 5,86 (t, 1H, $J=2,1$ Hz, H-4), 5,40-5,38 (m, 2H, H-2,3), 4,79 (d, 1H, $J=1,5$ Hz, H-5), 2,02, 2,03, 2,10, 2,17 (4 s, 12H, 4 \times OAc).

^{13}C NMR ($\delta/\text{ppm}, \text{CDCl}_3$): 170,3, 170,1, 169,0 ($4 \times \text{CH}_3\text{CO}$), 168,9 (C6), 89,4 (C1), 70,6, 68,5, 67,1, 66,0 (C2-C5), 20,9, 20,7, 20,6 ($4 \times \text{CH}_3\text{CO}$).

3.2.2. Sinteza alilnog estera 1,2,3,4-tetra-O-acetil- α -D-galaktopiranozne kiseline(2)

U tikvici od 25 mL u 10 mL suhog DMF-a (2,4 mL/mmol kiseline) otopljena je 1,2,3,4-tetra-O-acetil- α -D-galaktopiranozna kiselina (**1**) (1,46 g, 4 mmol). U smjesu je dodana katalitička količina NaI, koji je prethodno zagrijan i posušen na vakuumu, kako bi se potpuno uklonili tragovi vlage. Na kraju su dodani baza KHCO_3 (883mg, 10mmol) i alil-bromid (690 μL , 8mmol, 2ekv.) Reakcija je provedena u atmosferi argona te je ostavljena na magnetskoj mješalici preko noći. Tijek reakcije praćenje TLC-om u sustavu toluen/etanol/etil-acetat/octena kiselina = 4:2:2:1. Reakcijskoj smjesi dodan je etil-acetat (10 mL) i voda (30 mL) te je prenesena u lijevak za odjeljivanje. Nakon mućkanja i odvajanja slojeva, organski sloj pran je s vodom ($3 \times 30\text{mL}$) te na kraju zasićenom otopinom NaCl (30mL). Organski ekstrakt posušen je na bezvodnom Na_2CO_3 i uparen. Produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela(1,5 \times 30cm), u sustavu etil-acetat/petroleter = 1:1. Dobiveno je 1,47 g (90%) produkta **2** u obliku bezbojnog ulja.

$R_f = 0,86$ (toluen/etanol/etil-acetat/octena kiselina = 4:2:2:1)

IR ($\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$, KBr) : 2974 (=CH), 1738 (C=O), 1370 (CH_3).

^1H NMR ($\delta/\text{ppm}, \text{CDCl}_3$): 6,52-6,51 (m, 1H, H-1), 5,92-5,82 (m, 2H, CH(All), CH), 5,39(m, 2H, CH_2 , H-2,3), 5,37-5,27 (m, 2H, CH_2 , All), 4,76 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz, H-5), 4,70-4,60 (m, 2H, CH_2 , All), 2,15, 2,10, 2,02, 2,01 (4s, 12H, $4 \times \text{OAc}$).

^{13}C NMR ($\delta/\text{ppm}, \text{CDCl}_3$): 170,3, 169,5, 168,4 ($4 \times \text{CH}_3\text{CO}$), 165,9 (C6), 132,0 (C-H, All), 120,2 (=CH $_2$), 89,6 (C1), 70,2, 68,7, 67,1 (C3-C5), 66,7 (CH_2), 66,1 (C2), 20,9, 20,7, 20,6 ($4 \times \text{CH}_3\text{CO}$).

3.2.3. Sinteza alilnog estera 2,3,4-tetra-*O*-acetil- α -D-galaktopiranozne kiseline (3)

Alilni ester 1,2,3,4-tetra-*O*-acetil- α -D-galaktopiranozne kiseline (**2**) (1,37 g, 3,4 mmol) otopljen je u THF-u (3,5 mL) te je smjesi dodan morfolin (445 μ L, 5,1 mmol, 1,5 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana na magnetskoj mješalici 1 h pri sobnoj temperaturi. Reakcija je praćena TLC-om u sustavu etil-acetat/petroleter = 1:1. Produkt (**3**) je ekstrahiran etil-acetatom (60 mL), a ekstrakt pran s HCl(20mL), H₂O (20mL), NaHCO₃(20mL). Organski ekstrakt je posušen na bezvodnom MgSO₄ i uparen na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala etil-acetat/petroleter = 7:3. Dobiveno je 0,7 g (57%) produkta **3** u obliku žutog ulja.

R_f = 0,30 (etil-acetat/petroleter = 7:3).

¹H NMR (δ /ppm, CDCl₃):

α – anomer: 5,66 (d, 1H, J = 3,7 Hz, H-1), 4,91 (d, 1H, J = 4,6 Hz, H-5).

β – anomer: 5,76 – 5,74 (m, 1H, H-4), 4,93 (d, 1H, J = 1,5 Hz, H-5).

smjesa anomera: 2,11, 2,10, 2,09 (3s, 6H, 2×OAc), 2,01, 2,00 (2s, 3H, OAc).

3.2.4. Sinteza alilnog estera 1-*O*-trikloacetimidat-2,3,4-tri-*O*-acetil- α -D-galaktopiranozne kiseline (4)

U suhom DCM-u (10 mL) otopljen je hemiacetal (**3**) (772 mg, 2,14 mmol, 1 ekv.). Otopini je zatim dodan trikloracetonitril (2,14 mL, 21,4 mmol, 10 ekv.) i cezijev karbonat (529 mg, 1,5 mmol, 0,7 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana preko noći na magnetskoj mješalici u atmosferi inertnog argona pri sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je profiltrirana preko filter papira i potom uparena na rotacijskom uparivaču pod sniženim tlakom. Produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala etil-acetat/petroleter = 1:3. Dobiveno je 660 mg (61 %) čistog spoja **3** u obliku bezbojnog ulja.

R_f = 0,30 (etil-acetat/petroleter = 1:1)

^1H NMR (δ /ppm, CDCl_3): 6,65 (d, 1H, $J = 3,4$ Hz, H-1- α), 6,59 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz, H-1- β), 5,92 – 5,84 (m, 2H, CH(All), CH), 5,50-5,14 (m, 2H, CH_2 (All), 2 CH), 4,83 (d, 1H, $J = 1,4$ Hz, H-5), 4,80-4,60 (m, 2H, CH_2 , All), 2,11 (s, 3H, OAc), 2,01 (s, 6H, $2 \times \text{OAc}$).

^{13}C NMR (δ /ppm, CDCl_3): 171,2 (CCl_3), 168,7, 165,7, 161,7 ($3 \times \text{CH}_3\text{CO}$), 131,0 (C-H, All), 120,1 (CH_2 , All), 119,0 (C=NH), 92,4 (Cl), 70,8, 68,5, 67,1, 65,6 ($4 \times \text{CH}_3\text{CO}$), 66,5 (CH_2 , All).

3.3. Triterpenski prekursor

3.3.1. Izolacija *Quillaja* kiseline (**5**)

U okruglu tikvicu od 250 mL opremljenu s povratnim hladilom dodana je smjesa saponina-liofilizirani ekstrakt kore QS (3.52 g). Ekstrakt je otopljen u 20 mL otopine EtOH/ H_2O , a zatim je dodan KOH (2,92g, 51,9 mmol) i smjesa je zagrijavana preko noći na uljnoj kupelji (75 °C). Smjesa je idući dan uparena na rotacijskom uparivaču do suha, a zatim pročišćena kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu A/ CHCl_3 / $\text{MeOH} = 2/2,5/1$ (A= $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH} = 15/9/2/1$). Spojene frakcije koje sadrže čisti spoj uparena su na rotacijskom uparivaču pod sniženim tlakom. Dobiveno je 1,55 g (60%) spoja **5** u obliku bijelog praha.

$R_f = 0,40$ (A/ CHCl_3 / $\text{MeOH} = 2/2,5/1$)

^1H NMR (δ /ppm, CDCl_3): 9,35 (s, 1H, CHO), 5,39 (t, 1H, $J = 3,4$ Hz, H-12), 5,03 (m, 1H, CH), 4,45 (t, 1H, $J = 3,5$ Hz, H-16), 3,77-3,74 (m, 1H, H-3), 3,65-3,58 (m, 1H, OH), 3,06-3,01 (m, 1H, H-18), 2,15 (t, 1H, $J = 13,9$ Hz), 1,37, 1,25, 1,05, 0,99, 0,90, 0,80 (6s, 18H, $6 \times \text{CH}_3$)

3.3.2. Sinteza trietilsilil (TES) zaštićene *Quillaja* kiseline (**6**)

U Schlenkovoju tikvici otopljena je *Quillaja* kiselina **5** u DCM-u (1 mL). Dodan je toluen i cijela smjesa je uparena do suha, kako bi se osigurali suhi uvjeti. Zatim je dodan piridin (5 mL, veliki suvišak) i TESOTf (120 μL , 0,5 mmol, 5 ekv.) sve pod argonom. Pri dodavanju, Schlenkova tikvica je cijelo vrijeme bila uronjena u led. Nakon dodavanja, reakcija se nastavila na sobnoj temperaturi 2 dana. Reakcijska smjesa je ekstrahirana u 8 mL H_2O s

EtOAc (3×8mL), a zatim je osušena na Na₂SO₄ i uparena. U zadnjem koraku smjesa je pročišćena kromatografijom na silikagelu u sustavu PE:aceton = 10:1, te je dobiveno 24 mg (19%) čiste bijele krutine.

¹H NMR (δ/ppm,CDCl₃): 9,26 (s, 1H, CHO), 7,32-7,22 (m, 10H, Ar), 5,45-5,35 (m, 1H, H-12), 4,70 (1H, *J* = 11,4 Hz, CH₂, Bn), 3,55-3,52 (m, 1H, H-3), 3,08-3,02 (m, 1H, H-18), 2,21 (t, 1H, *J* = 13,6 Hz), 1,92–0,89 (m, 21H), 1,36, 1,13, 0,99, 0,95, 0,91, 0,72 (6s, 18H, 6×CH₃)

¹³C NMR (δ/ppm,CDCl₃): 207,2, 198,9, 176,2, 143,2, 138,8, 133,2, 129,6, 128,2, 127,7, 127,6, 127,5, 127,3, 122,4, 118,2, 83,5, 80,0, 71,9, 70,5, 65,3, 55,2, 49,0, 48,2, 46,8, 46,4, 41,6, 40,6, 40,0, 38,1, 36,3, 35,3, 32,9, 32,5, 32,0, 28,8, 26,0, 24,5, 23,6, 22,0, 20,5, 1,2, 15,8, 10,1

3.3.3. Sinteza benzilnog estera trietilsilil (TES) zaštićene *Quillaja* kiseline (7)

U okrugloj tikvici od 50 mL otopljena je zaštićena *Quillaja* kiselina **6** (100 mg, 0,05 mmol) u suhom DCM-u (5 mL). Zatim su dodani DMAP (12,4 mg, 0,06 mmol, 1,2 ekv.), benzilni alkohol (52μL, 0,5 mmol, 10 ekv.) i DCC (1,22 mg, 0,06 mmol, 1,2 ekv.). Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu PE/EA = 6:1. Sirovi produkt, dobiven sušenjem i uklanjanjem otapala na rotacijskom uparivaču, pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala etil-acetat/petroleter = 1:6. Dobiveno je 70 mg (67%) čistog spoja u obliku bijele krutine.

R_f = 0,3 (petroleter / etil-acetat = 2:1)

IR (ν̄/cm⁻¹, KBr): 2972 (=CH), 1742 (C=O), 1370 (CH₃).

¹H NMR (δ/ppm,CDCl₃): 9,41 (s, 1H, CHO), 5,40 (t, 1H, *J*=3,5 Hz, H-12), 5,33-5,27, 5,03(m, 1H, CH), 4,70 (1H, *J* = 11,4 Hz, CH₂, Bn), 4,55-4,52 (m, 1H, H-16), 3,80-3,76 (m, 1H, H-3), 3,06 (dd, 1H, *J*=4,4 Hz, H-18), 2,17 (t, 1H, *J*=13,5 Hz), 1,94-0,99 (m, 21H), 1,36, 1,08, 0,98, 0,96, 0,91, 0,77 (6s, 18H, 6×CH₃)

3.4. Peptidni prekursor

3.4.1. Sinteza Boc-Gly-L-Ala-D-Glu(OBn)-NH₂ (8)

U okruglu tikvicu (50 mL) dodan je zaštićeni dipeptid Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-NH₂ (204mg, 0,5 mmol), otopljen u diklormetanu (4 mL). Dodana je TFA (1 mL). Smjesa je miješana 2 h na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi, nakon čega je otapalo upareno, tragovi TFA uklonjen i uparavanjem s benzenom (3×5 mL), a sirovi produkt potom otopljen u 5 mL suhog diklormetana. Smjesi je dodan Boc-Gly-OH (111 mg, 0,6 mmol, 1,2ekv.), te je smjesa ohlađena na 0 °C, a zatim su dodani još i reagensi HOBt (94 mg, 0,61mmol, 1,2 ekv), BOP (325 mg, 0,73 mmol, 1,4 ekv) i TEA (350 µL, 2,5 mmol, 5 ekv.). Smjesa je ostavljena na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi preko vikenda. Reakcija je praćena TLC-om u sustavu kloroform:metanol = 5:1. Produkt je ekstrahiran s etil-acetatom (100 mL), a ekstrakt pran redom s: otopinom limunske kiseline (10%, 2×50mL), zasićenom otopinom NaHCO₃ (2×50mL) i zasićenom otopinom NaCl (2×50mL), te je sušen na bezvodnom Na₂SO₄, profiltrirani uparen na rotacijskom uparivaču. Produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikegela u sustavu kloroform/metanol = 5:1, te je dobiveno 162 mg (79%) čistog dipeptida u obliku bijele krutine.

$R_f = 0,52$ (kloroform:metanol = 5:1)

¹H NMR (δ /ppm, CDCl₃): 7,36–7,31 (m, 5H, Ar), 5,10 (m, 2H, CH₂, Bn), 4,55-4,43 (m, 2H, 2×CH), 3,87-3,72 (m, 2H, CH₂, Gly), 2,57-2,14 (m, 4H, 2×CH₂, *iso*Glu), 1,42 (s, 9H, Boc), 1,34 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH₃, Ala).

¹³C NMR (δ /ppm, CDCl₃): 174,0, 173,4, 173,0, 170,2 (4×CO), 155,4 (CONH₂), 135,6 (C, Ar), 128,7, 128,6, 128,4 (CH, Ar), 80,4 (C, Boc), 66,9 (CH₂, Bn), 52,7 (CH, Glu), 49,3 (CH, Ala), 44,3 (CH₂, Gly), 30,7, 27,0 (2×CH₂, Glu), 28,4 (CH₃, Boc), 18,2 (CH₃, Ala).

3.5. Povezivanje prekursora

3.5.1. Pokušaj sinteze konjugata galakturonske kiseline (4) i Quillaja kiseline (7)

Za ovu reakciju korištena je Schlenkova tikvica spojena na liniju s argonom/vakuuumom kako bi se osigurali bezvodni uvjeti. Prije provođenja reakcije vakuumirana tikvica sušena je plamenom i potom ohlađena u atmosferi argona. U tikvicu su stavljeni spoj 7, prethodno zaštićen trietilsililnim skupinama (52 mg, 0,025 mmol, 1 ekv) i imidat 4 (50 mg, 0,115 mmol, 4,6 ekv), otopljeni su u suhom benzenu (3 mL) i ostavljeni preko noći na vakuumu uz miješanje kako bi se tragovi vlage uklonili kao azeotrop s benzenom. Tako osušeni reaktanti otopljeni su u suhom DCM (1,1 mL) pod atmosferom argona, te je tikvica uronjena u smjesu aceton/suhi led na $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. U tim uvjetima, smjesi je dodan $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$ (3,8 μL , 0,03 mmol, 1,2 ekv.) i reakcija je vođena 3 h uz praćenje TLC-om u sustavu petroleter:etil-acetat = 6:1. Reakcija je prekinuta dodatkom 1 kapi TEA kad je TLC-om utvrđen nestanak početnih spojeva. Nakon pokušaja pročišćavanja spoja kromatografijom na stupcu silikagela, utvrđeno je da nije nastao željeni produkt, već smjesa većeg broja produkata koje nije bilo moguće odijeliti standardnom kromatografijom.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

Struktura ciljne molekule predložena je na činjenici da su *Quillaja* saponini i desmuramil-dipeptidi klase spojeva koje same po sebi posjeduju imunoadjuvantsku aktivnost, ali kao takve imaju određene nedostatke. Konjugacijom istih otvara se potencijal stvaranja sinergističkog utjecaja na porast imunoadjuvantske aktivnosti. Dodamo li takvoj strukturi još i šećerni dio, znatno povećavamo topljivost takve velike molekule u vodi.

Sinteza ciljne molekule planirana je iz tri osnovna prekursora. Prvi prekursor je triterpenska karboksilna kiselina koja nosi razgranati trisaharid. Drugi prekursor je desmuramil-dipeptid, peptid čija je sinteza već poznata.³⁰ Treći i zadnji prekursor služi kao poveznica između prva dva, a radi se o acetiliranoj D-galakturonskoj kiselini koja predstavlja saharidnu komponentu.

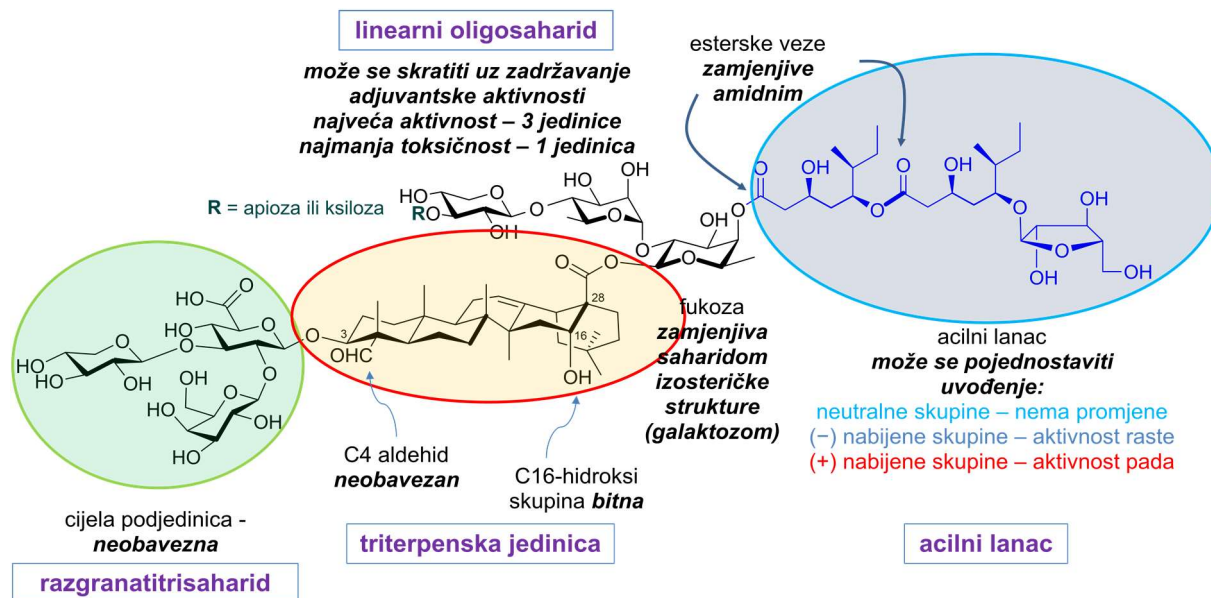
Triterpenski prekursor pripremljen je izolacijom i kromatografskim pročišćavanjem iz komercijalno dostupnog ekstrakta kore drveta *Quillaja saponaria* (QuilA®). Hidrolizom u baznim uvjetima izoliran je spoj **5** (prikazano slikom 21.), čije su hidroksilne skupine zaštićene trietilsililnim (TES) zaštitnim skupinama te je dobiven spoj **6** (prikazano slikom 22.). Karboksilna skupina na šećernoj komponenti kemoselektivno je zaštićena benzilnom skupinom i na taj način je dobiven spoj **7** (prikazano slikom 23.).

Peptidni prekursor dobiven je kondenzacijom odgovarajućih aminokiselina, čije su skupine koje ne sudjeluju u reakciji blokirane odgovarajućim zaštitnim skupinama. Provedena je kondenzacija γ -benzil-D-glutaminske kiseline i Boc-Ala-OSu, nakon čega je γ -karboksilna skupina glutamata prevedena u amid. Uklanjanjem Boc zaštite s N-kraja dipeptida i kondenzacijom s Boc-Gly-OH dobiven je odgovarajući potpuno zaštićeni tripeptid **8**.

Saharidni prekursor pripremljen je uvođenjem acetatnih zaštitnih skupina na D-galakturonsku kiselinu (spoj **1**, prikazano slikom 26.), a zatim uvođenjem alilne zaštitne skupine na karboksilnu skupinu tako dobivenog spoja (**2**, prikazano slikom 26.). Zadnji korak je bio selektivno uklanjanje acetatne zaštitne skupine s anomernog ugljikovog atoma (spoj **3**, prikazano slikom 27.) i prevođenje u imidat (**4**, prikazano slikom 27.).

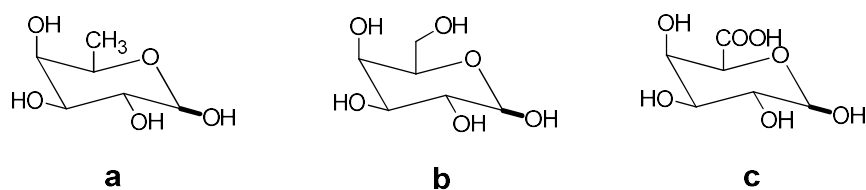
4.2. Dizajn ciljne molekule

Ciljna molekula sastoji se od tri glavne podjedinice, a to su: razgranati trisaharid, središnji triterpen i acilni lanac (slika 15).



Slika 15. Utjecaj strukturnih komponenata na imunoadjuvantsku aktivnost QS-21.

Za QS-21 i njegove analoge, prisutnost domene s razgranatim trisaharidom naizgled nema značajan utjecaj na imunostimulatornu aktivnost.³¹ Međutim, razgranati trisaharid utječe na topljivost spoja u vodi, na način da omogućuje dodatnu funkcionalizaciju preko OH skupina. Tako će spoj biti bitno topljiviji u vodi kad sadrži navedenu trisaharidnu domenu. Iz navedenih razloga, ova domena zadržana je u konačnom spoju. Prvi šećer u saharidnom lancu, D-fukoza, koji je povezan glikozidnom vezom s triterpenskim dijelom saponina kvilaje vrlo je važan za smjer i intenzitet imunološkog odgovora. Pokazalo se da je moguće D-fukožu zamijeniti konfiguracijski jednakom jedinicom, npr. D-galaktozom, a da se aktivnost zadrži.³²



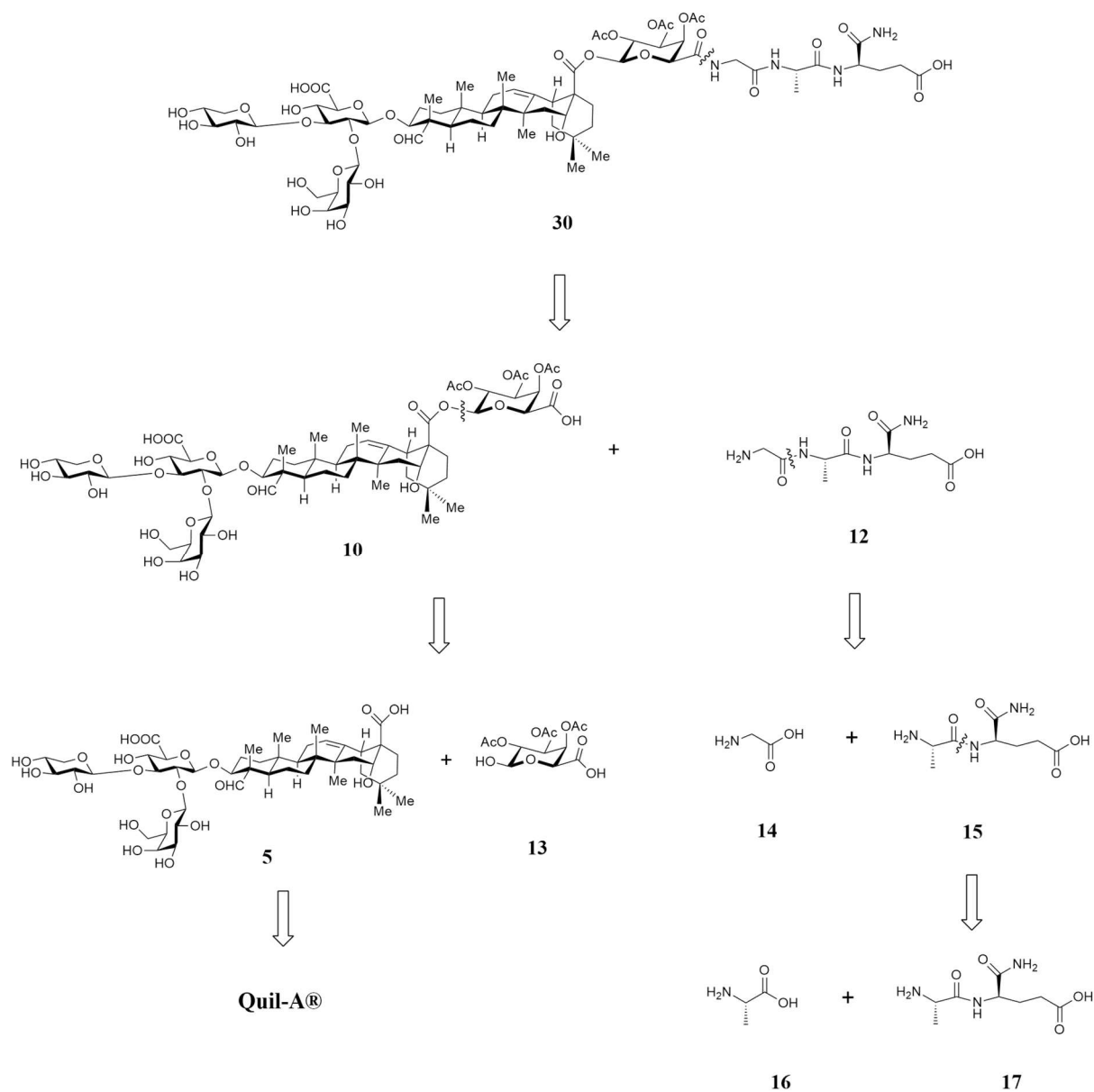
Slika 16. Strukturne formule (a) D-fukoze, (b) D-galaktoze, (c) D-galakturonske kiseline.

Središnji, triterpenski dio, kao što je već opisano u poglavlju 2.1.2, vrlo je bitan za aktivnost i služi kao poveznica za razgranati trisaharid i acilnu skupinu. Na slici 15. nalazi se oligosaharid koji je zbog jednostavnosti u ciljnoj molekuli skraćen u monosaharid, što u konačnici rezultira smanjenjem toksičnosti, ali i aktivnosti. Na taj monosaharid, D-galakturonske kiseline, uvedene su acetilne skupine radi boljeg usmjerenja imunološkog odgovora (poglavlje 2.1). Također, galakturonska kiselina ima COOH skupinu (slika 16.) koja omogućuje daljnju funkcionalizaciju, tj. vezanje peptidnog dijela amidnom vezom.

Poveznica šećerne komponente i desmuramil-dipeptida važna je za adjuvantsku aktivnost. Glicin je dobra poveznica u ovom slučaju jer nema kiralno središte, a može stvoriti stabilne amidne veze s D-galakturonskom kiselinom s jedne strane i s desmuramil-dipeptidom s druge strane. Za razliku od laktata nije kiralan, a osim toga vezan je amidnom, a ne esterskom vezom, zbog čega je otporniji na hidrolizu. Također, literaturno je pokazano da glicinska poveznica, kao strukturni analog glikolilne poveznice, djeluje povoljno na adjuvantska svojstva desmuramil-dipeptida i njegovih derivata.³³ Također, poznato je da lipofilni supstituenti vezani za N-kraj desmuramil-dipeptida pojačavaju njegovo imunološko djelovanje i umanjuju njegovu toksičnost, što se zapravo i očekuje od ciljne molekule **1** (poglavlje 2.2.3).

Na drugom kraju spoja, nalazi se desmuramil-dipeptid, koji je analog bakterijskog peptidoglikana muramil-dipeptida i kao zasebna jedinica pokazuje adjuvantsku aktivnost. (poglavlje 2.2.3).

4.3. Retrosintetska analiza

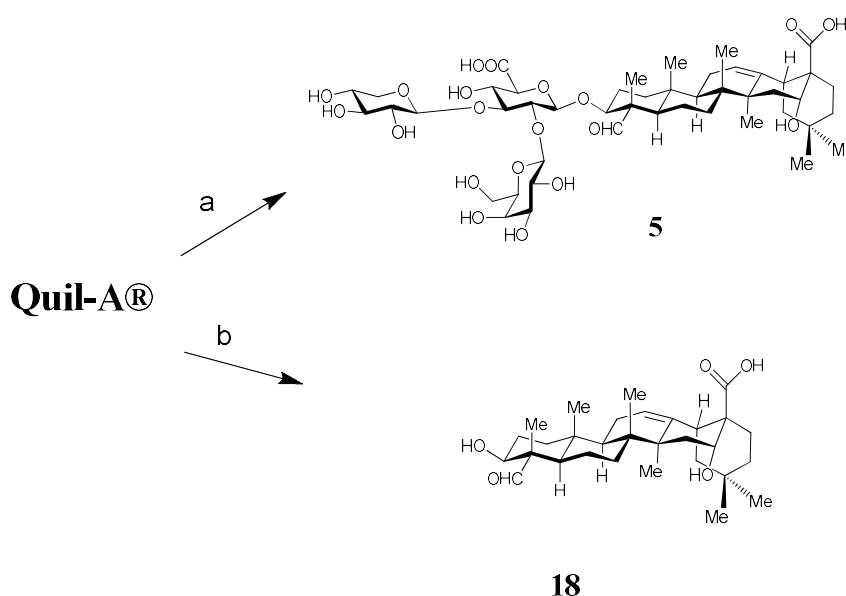


Slika 17. Retrosintetska analiza ciljne molekule 1.

4.4. Sinteza

4.4.1. Triterpenski prekursor

Svi saponini sadržani u kori drveta QS sadrže isti središnji dio – triterpen. Dakle, hidrolizom komercijalno dostupnog djelomično pročišćenog ekstrakta (QuilA®) dobiti ćemo smjesu spojeva čija je zajednička struktura triterpenska karboksilna kiselina i to nam daje odličnu, pristupačnu polaznu točku. Ovisno o tome provodi li se hidroliza u kiselim ili bazičnim uvjetima, moguće je izolirati triterpen bez ili s razgranatim trisaharidom (slika 18).



Slika 18. Sinteza triterpenskih prekursora **5** i **18**.

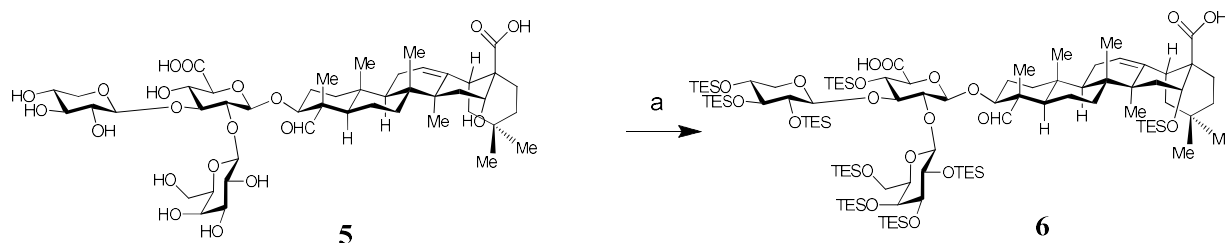
(a) 1.) KOH, H₂O/EtOH, 80 °C, 2.) Pročišćavanje kromatografijom;

(b) 1.) 5M HCl, refluks, 2.) Soxhlet ekstrakcija, 3.) Pročišćavanje kromatografijom;

Hidroliza je provedena u baznim uvjetima u otopini KOH u EtOH/H₂O uz zagrijavanje na uljnoj kupelji preko noći. U idućem koraku smjesa je uparena, i potom pročišćena kromatografijom na stupcu silikagela. Tako je dobiven čisti produkt **5** u 60%-tnom iskorištenju, što je u skladu s literaturnim podacima.³⁴

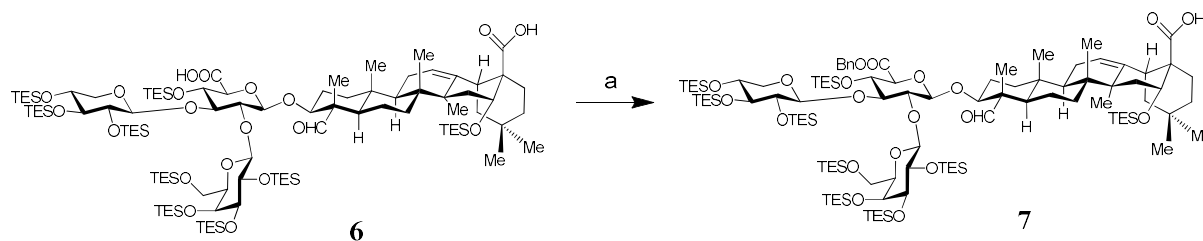
Izolirani produkt **5** sadrži sadrži hidroksilne i karboksilne funkcijske skupine koje je potrebno zaštititi kako bi se mogli provesti daljnji koraci. Ukupno devet hidroksilnih skupina zaštićeno je TES zaštitnim skupinama uz TESOTf i piridin kao slabu bazu. Ovdje je piridin

ujedno korišten i kao otapalo, u velikom je suvišku kako bi se osiguralo da su uvjeti u svakom trenutku bazični, jer kiseli uvjeti mogu dovesti do hidrolize glikozidnih veza. Spoj **6** dobiven je u iskorištenju od 19% u obliku bijele krutine, što odgovara literaturnim podacima (slika 19).³⁴



Slika 19. Uvođenje TES zaštitnih skupina na hidroksilne skupine.

(a) TESOTf, Py, 25 °C.



Slika 20. Uvođenje benzilne zaštitne skupine na karboksilnu skupinu.

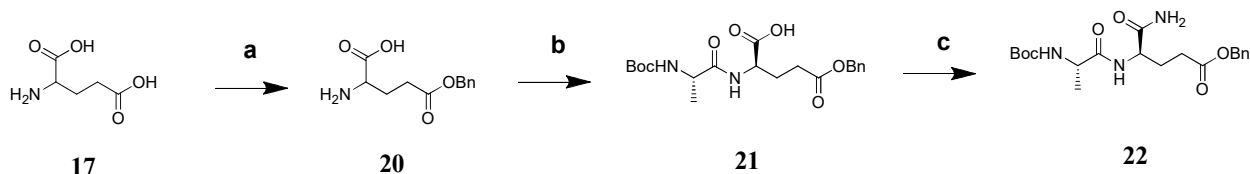
(a) BnOH, DCC, DMAP.

Benzilna zaštitna skupina odabrana je za zaštitu karboksilne skupine na šećernoj komponenti. Reakcija je kemoselektivna i odvija se u visokom iskorištenju jer je ta karboksilna skupina reaktivnija, te je dobiven je spoj **7** u iskorištenju od 67%, što se podudara sa sintezom iz literature (slika 20).³⁴ Benzilnu skupinu moguće je kasnije ukloniti hidrogeniranjem uz paladij kao katalizator bez narušavanja strukture (dvostruka veza triterpenskog dijela neće se hidrogenirati).³⁵

4.4.2. Peptidni prekursor

Ciljni tripeptid **12** (slika 17.) sintetiziran je iz tri aminokiseline – D-glutaminske kiseline (**17**, slika 21.), L-alanina (**16**, slika 21.) i glicina (**14**, slika 17.). U prvom koraku zaštićena je karboksilna skupina na bočnom ogranku D-glutaminske kiseline na način da je kiselina prevedena u benzilni ester **20** (slika 21a). Reakcija je provedena uz benzilni alkohol i borov trifluorid dietil-eterat($\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$).

Iduća reakcija je kondenzacija estera (**20**) i L-alanina(**16**) (slika 21b). Korišteni alanin u ovoj reakciji zaštićen je Boc zaštitnom skupinom na amino kraju i aktiviran je OSu skupinom (sukcinimidni ester) na α -karboksilnoj skupini. Dobiveni dipeptid (**21**) dobiven je u iskorištenju od 60% nakon pročišćavanja kromatografijom na stupcu silikagela. α -Karboksilna kiselina desmuramil dipeptida prevedena je u amidnu skupinu u reakciji Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH (**21**) s NH_4HCO_3 , Boc_2O i piridinom, te je dobiven dipeptid Boc-L-Ala-D-Gln(OBn)- NH_2 (**22**) (slika 21c).



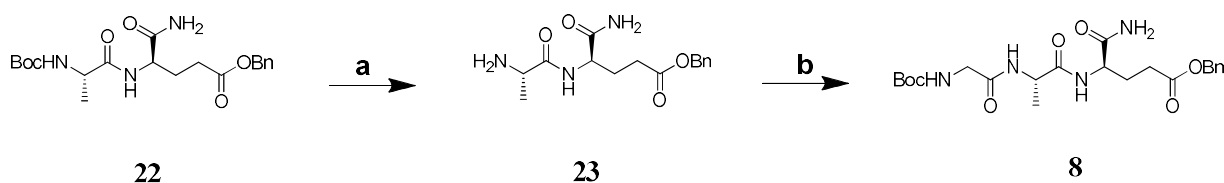
Slika 21. Sinteza peptidnog prekursora, prvi dio:

(a) BnOH, $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$; (b) Boc-L-Ala-OSu, TEA/THF;

(c) Boc_2O , NH_4HCO_3 , py/dioksan

Pripravljeni dipeptid ima zaštićen amino kraj s Boc zaštitnom skupinom koja se mora ukloniti prije kondenzacije s glicinom. Uklanjanje Boc zaštite provedeno je uz trifluoroctenu kiselinu (TFA) pri čemu je nastala TFA sol dipeptida **23** (slika 22a).²⁹

U konačnici je dipeptid **23** kondenziran s Boc-Gly-OH uz BOP, HOBt i TEA, zatim ekstrahiran i na kraju pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela. Dobiven je čisti tripeptid Boc-Gly-L-Ala-D-Glu(OBn)- NH_2 (**8**) u obliku bijele krutine u iskorištenju od 79%.



Slika 22. Sinteza peptidnog prekursora, drugi dio:

(a) TFA/DCM; (b) Boc-Gly-OH, BOP, HOBt, TEA;

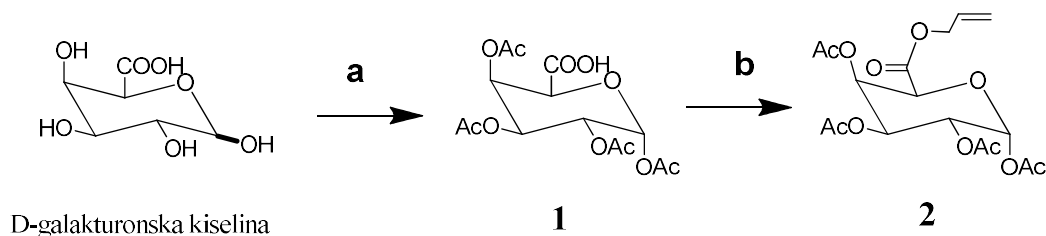
4.4.3. Šećerni prekursor

Kao što je već navedeno, D-fukoza je kao prvi šećer u saharidnom lancu izuzetno važna za smjer i intenzitet imunostimulatornog odgovora kod QS (vidi 4.2.1). Fukoza je povezana glikozidnom vezom s triterpenskim dijelom saponina kvilaje (QS-21 analog). Zanimljivo je da postoji korelacija između imunološke aktivnosti i stanja aciliranosti fukoze. Kada je fukoza acilirana, onda spoj pokazuje balansirani Th1/Th2 odgovor, a kada su OH skupine fukoze slobodne, onda je imunološki odgovor usmjeren potpuno prema Th2. Stoga su hidroksilne skupine galakturonske kiseline u konačnom spoju u obliku acetatnih estera.³⁶ Pokazano je da je moguće D-fukozu zamijeniti konfiguracijski jednakom jedinicom, npr. galaktozom, a da se aktivnost zadrži.

Hidroksilna skupina na položaju 6 koju galaktoza posjeduje (za razliku od fukoze) omogućuje derivatizaciju, a ostale hidroksilne skupine su pritom acetilirane, jer kako je ranije rečeno, to je vrlo bitno za smjer imunološkog odgovora. Derivatizacija je jednostavnija ako je na položaju 6 karboksilna skupina, koja se lako može prevesti u amid, što je i glavni razlog zašto je odabrana D-galakturonska kiselina (konfiguracijski analog D-fukoze).

Prvi korak sinteze je reakcija zaštite D-galakturonske kiseline jer je potrebno usmjeriti sintetski put u željenom smjeru i pritom postići regioselektivnost. Kao zaštita odabrana je acetatna skupina $-C(O)CH_3$. U reakciji D-galakturonske kiseline s acetanhidridom (Ac_2O) uz 70%-tnu perklornu kiselinu nastaje tetraacetilirani spoj **1** (slika 23a). Uvjeti acetiliranja su ovdje jako bitni, kako bi dobili dobra iskorištenja na produktu, jer se ranije pokazalo da neki od literaturno navedenih uvjeta ne daju produkt ili postupak njegovog pročišćavanja nije reproducibilan. Korišteni su prethodno isprobani uvjeti provođenja reakcije pri $0^\circ C - 25^\circ C$ kroz 3h, opisani u diplomskom radu A. Biškupa.²⁹ U ovoj reakciji također nastaje i penta-acetilirani šećer koji zbog nestabilnosti anhidrida nastalog s karboksilnom skupinom galakturonske kiseline brzo hidrolizira u karboksilnu kiselinu, te tako ne stvara problem u

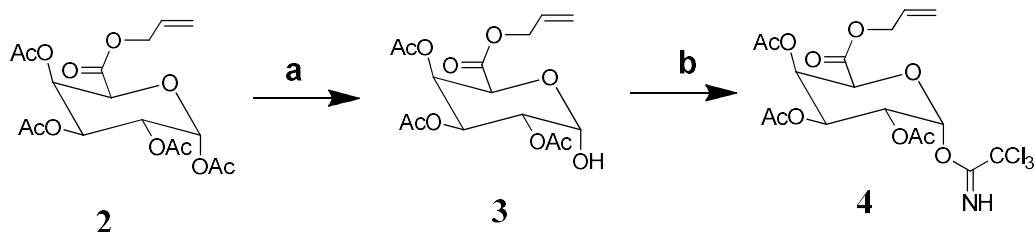
izolaciji. Da bi se osigurala inertnost karboksilne skupine u sljedećim koracima, potrebno je zaštititi tetraacetiliranu D-galakturonsku kiselinu **1** alilnom esterskom zaštitnom skupinom. Ona je uvedena u reakciji spoja **1** s alil-bromidom uz KHCO_3 u DMF-u dajući potpuno zaštićeni saharid **2** (slika 23b) u iskorištenju od 82%.



Slika 23. Sinteza šećerne komponente, prvi dio: (a) 1.) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{HClO}_4$, 2.) MeOH , 98%;
(b) All-Br , KHCO_3/DMF .

U kasnijim koracima, nakon što su kondenzirane šećerna i triterpenska komponenta, zaštitnu skupinu karboksilne kiseline na šećernom prekursoru potrebno je moći selektivno ukloniti kako bi se mogla provesti kondenzacija s peptidnim dijelom. Alilnu zaštitu moguće je ukloniti selektivno s paladijem kao katalizatorom (reagens $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$). Tijekom takve reakcije, acetatni esteri prisutni na šećernoj komponenti kao zaštita su stabilni. Također, kako bi se u budućim koracima moglaprovesti reakcija glikozilacije između šećerne i triterpenske komponente, potrebno je moći aktivirati anomerni položaj šećerne komponente. Da bi to bilo moguće, potrebno je prvo selektivno ukloniti acetatnu zaštitu na anomernom ugljikovom atomu šećerne komponente. U reakciji zaštićenog spoja **2** s morfolinom u THF-u selektivno je uklonjena anomerna acetatna zaštitna skupina, pri čemu je nastao spoj **3** (slika 24a). Navedena reakcija mora se odvijati u inertnim uvjetima (atmosfera argona) i mora biti brza (maks. 2h) kako nebi došlo do uklanjanja ostalih acetatnih zaštitnih skupina. To bi rezultiralo dobivanjem smjese spojeva, što bi dodatno otežalo pročišćavanje.

Zadnji korak u pripravi šećernog prekursora bila je sinteza imidata u reakciji slobodne anomerne OH skupine spoja **3** s trikloacetonitrilom (CCl_3CN) uz cezijev karbonat kao jaku bazu. Nastali produkt je imidat **4**, pretežno u α -konfiguraciji na anomernom ugljikovom atomu (prema NMR-u $\alpha : \beta = 1 : 0,05$) (slika 24).



Slika 24. Sinteza šećerne komponente, drugi dio: (a) morfolin/THF;
(b) CCl_3CN , $\text{Cs}_2\text{CO}_3/\text{DCM}$.

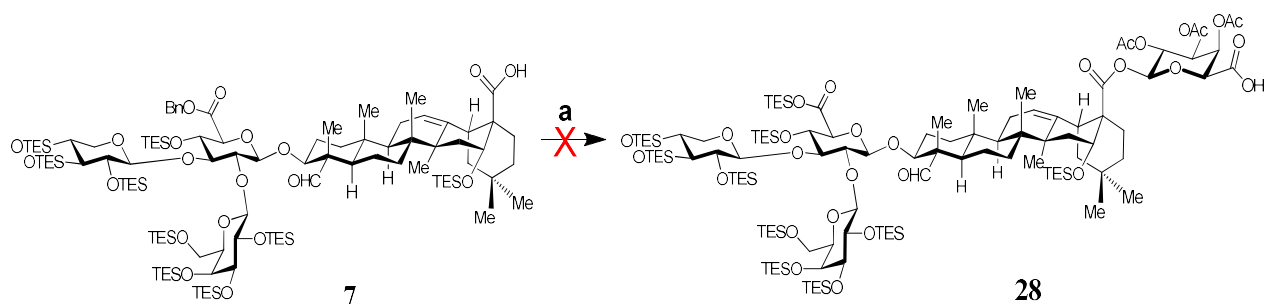
4.4.4. Sinteza ciljne molekule

Kao metoda glikozilacije odabrana je trikloracetimidatna metoda spomenuta već kao najpouzdanija metoda (vidi 2.3.1).²⁶ U pokušaju sinteze ciljne molekule isprobani su razni uvjeti, budući da je sama sinteza vrlo zahtjevna i osjetljiva zbog veličine molekule i prisutnosti mnogih funkcijskih skupina (iako zaštićenih) (Tablica 3). Reakcija kondenzacije odvijala se uplamenom sušenoj Schlenkovoju tikvici. Spoj 7 (slika 20.) i spoj 4 (slika 24.) pomiješani su u suhom benzenu i ostavljeni su na vakuumu preko noći kako bi se u potpunosti osigurali suhi uvjeti (tragovi vlage odlaze kao azeotrop s benzenom). Zatim je smjesa spojeva otopljena u suhom DCM-u i dodana je Lewisova kiselina ($\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$) pri -78°C . Reakcija je vođena 3 h, praćena je TLC kromatografijom u sustavu PE:EA = 3:1. Dobivena smjesa je naizgled prema TLC-u sadržavala potencijalni produkt, zbog čega je reakcija prekinuta dodatkom TEA. Sirovi produkt podvrgnut je pročišćavanju kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu PE:EA = 4:1 do 1:1.

Tablica 3. Isprobani uvjeti kondenzacije spojeva 7 i 4.

Reagensi	Reakcijski uvjeti	Uspješnost
suhi DCM, $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$ (1 ekv.), imidat (1,2 ekv.) (I)	aceton + suhi led (-78 °C), 3h	TLC pokazao kompleksnu smjesu produkata, ali ne i željeni produkt
suhi DCM, $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$ (1,2 ekv.), imidat u suvišku (4,6 ekv.) (II)	aceton + suhi led (-78 °C), 1,5 h	TLC pokazao kompleksnu smjesu produkata, ali ne i željeni produkt
suhi DCM, $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$ (1.2 ekv.), imidat u suvišku (5 ekv.) (III)	acetonitril + suhi led (-41 °C), 2 h	TLC pokazao potencijalni produkt, ali kromatografijom nije izoliran

U reakciji **I** nije se ništa značajno dogodilo, a vrijeme reakcije je relativno vrlo dugo za takav tip reakcije, ukoliko usporedimo s reakcijama na sličnim supstratima.³⁵ Nakon što TLC nije pokazao nastanak produkta, pokušao je dodatak dodatne količine $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$, ali to nije dovelo do nikakvih promjena pa je reakcija obustavljena. U reakciji **II** dodan je imidat u velikom suvišku i reakcija je uspjela, međutim, nakon pročišćavanja kromatografijom na stupcu silikagela dobiven je spoj čiji TLC pokazuje samo 1 mrlju, ali njegov NMR pokazuje da se radi o smjesi spojeva. Prisutni su signali tri aldehidne skupine. Ovdje je moguće da je došlo do djelomične deprotekcije TES-etera, te je tako dobiveni produkt stavljen u uvjete uvođenja TES skupina (TESOTf /piridin), međutim, to je također rezultiralo nastankom smjese produkata (i dalje tri aldehidne skupine), što znači da je pretpostavka o djelomičnoj hidrolizi bila pogrešna. Reakcija **III** izvedena je pri nešto višoj temperaturi (-41 °C) i već nakon 1h pokazala je nastanak novog spoja (TLC), pri R_f vrijednosti koju se može očekivati za ciljni spoj. Nakon 2h reakcija je prekinuta dodatkom TEA, a sirovi produkt pročišćen na stupcu silikagela u sustavu PE:EA = 6:1 do 2:1.



Slika 25. Sinteza ciljne molekule, drugi dio – (a) suhi DCM, $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$.

U konačnici NMR je pokazao tri alhidne skupine umjesto očekivane jedne, što bi značilo da su se dogodile neželjene nusreakcije. Moguće objašnjenje za to je duljina trajanja reakcije ili neodgovarajuća temperatura. Ako gledamo kinetiku reakcije, možemo varirati tri varijable – koncentraciju reaktanata, temperaturu ili vrijeme. Na temelju svega navedenog, valjalo bi isprobati reakciju sa suviškom reaktanta kojeg u tom trenu nismo imali, odnosno varirati temperature dok se ne nađu optimalni uvjeti za dobivanje ciljne molekule.

§ 5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog diplomskog rada pripravljena su tri prekursora ključna za sintezu potencijalnog imunoadjuvanta **30**.

1. Triterpenski prekursor **7** pripremljen je u tri koraka iz komercijalno dostupnog ekstrakta kore *Quillaja saponaria* (QuilA®) u iskorištenju od 67%.

a) Hidrolizom navedenog ekstrakta u baznim uvjetima, zatim ekstrakcijom te konačno kromatografijom, izolirana je i pročišćena *Quillaja* kiselina koja sadrži razgranati trisaharid **5** u iskorištenju od 60%.

b) U drugom koraku zaštićeno je TES skupinama ukupno devet hidroksilnih funkcijskih skupina spoja **5**. Dobiven je zaštićeni spoj **6** u iskorištenju od 19% u obliku bijele krutine.

c) Karboksilna skupina šećerne komponente spoja **6** zaštićena je benzilnom zaštitnom skupinom u reakciji s benzilnim alkoholom, DCC i DMAP. U konačnici, nastao je spoj **7**, benzilni ester spoja **6** u iskorištenju od 67%.

2. Saharidni prekursor **4** pripremljen je u četiri koraka polazeći od D-galakturonske kiseline, u iskorištenju od 61%.

a) Galakturonska kiselina je zaštićena s acetatnim skupinama u reakciji s acetanhidridom uz perklornu kiselinu pri čemu je dobiven spoj **1**, 1,2,3,4-tetra-*O*-acetil- α -D-galaktopiranoznakiselina, u iskorištenju od 73%.

b) Karboksilna skupina spoja **1** prevedena je u alilni ester uz alil-bromid, NaHCO₃ kao bazu i NaI kao katalizatoru DMF-u. Dobiven je spoj **2** u iskorištenju od 90%.

c) Potpuno zaštićenom spoju **2** selektivno je uklonjena acetatna skupina anomernog centra uz morfolin u THF-u, pri čemu je nastao alilni ester 2,3,4-tri-*O*-acetil-D-galaktopiranozne kiseline (**3**) u iskorištenju od 57%.

d) Anomerni centar spoja **3** aktiviran je prevođenjem spoja u imidat (**4**) u iskorištenju od 61%.

3. Peptidni prekursor **8** pripremljen je u četiri koraka u ukupnom iskorištenju od 79%.

- a) Karboksilna skupina na bočnom ogranku D-glutaminske kiseline zaštićena je prevođenjem aminokiseline u benzilni ester **20** (slika 21.) uz benzilni alkohol i $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$.
- b) U idućoj reakciji kondenzirani su L-alanin (**16**) i prethodno zaštićena D-glutaminska kiselina (**20**). Korišteni alanin u ovoj reakciji zaštićen je Boc zaštitnom skupinom na amino kraju i aktiviran je OSu skupinom (sukcinimidni ester) na α -karboksilnoj skupini. Dobiven je dipeptid **21** (slika 21.) u iskorištenju od 60%.
- c) Dobiveni dipeptid Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH (**21**) izreagiran je s NH_4HCO_3 , Boc_2O i piridinom, te je dobiven dipeptid Boc-L-Ala-D-Gln(OBn)- NH_2 (**22**). Dipeptidu je uklonjena Boc zaštitna skupina u reakciji s trifluoroocetnom kiselinom (TFA) te je dobiven spoj **23**.
- d) U zadnjoj reakciji, spoj **23** kondenziran je s glicinom u reakciji s BOP, HOBT i TEA, pri čemu je dobiven čisti tripeptid Boc-Gly-L-Ala-D-Glu(OBn)- NH_2 (**8**) u obliku bijele krutine u iskorištenju od 79%.

U zadnjem dijelu eksperimentalnog rada pokušana je kondenzacija prekursora **7** i **4** u reakciji glikozilacije trikloroacetimidatnom metodom, pri čemu nije dobiven željeni produkt. U svrhu sinteze željenog ciljnog produkta potrebno je provesti optimizaciju reakcije glikozilacije između spoja **7** i **4**, što može biti vrlo vremenski zahtjevno te stoga nadilazi okvire ovog diplomskog rada. Iako nije dobivena ciljna molekula **30**, spoznaje proizašle iz ovog istraživanja u tom su smislu vrlo korisne jer su odlična polazišna točka za daljnju optimizaciju ove reakcije

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

AB – AB kvartet

All – alil

Ar – aril

Bn – benzil

BOP – benzotriazol-1-iloksitris(dimetilamino)fosfonijevheksafluorofosfat

CBz – benziloksikarbonil

CDCl₃ – deuterirani kloroform

d – dublet

dd – dublet dubleta

DCC – dicikloheksilkarbodiimid

DCM – diklormetan

DMAP – 4-dimetilaminopiridin

DMF – dimetilformamid

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid

EtOAc – etil-acetat

Fm – fluorenilmetil

Fmoc – fluorenilmetoksikarbonil

HOAc – octena kiselina

IR – infracrveno

m – multiplet

MDP – muramil-dipeptid

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

ppm – dijelovi na milijun

py – piridin

QA – *Quillaja* kiselina

QS – *Quillaja* saponin

R_f – faktor zaostajanja

s – singlet

SPE – ekstrakcijanačvrstojfazi

t – triplet

TEA – trietilamin

TFA – trifluoroctenakiselina

THF – tetrahidrofuran

TLC – tankoslojnakromatografija

TMS – tetrametilsilan

Trt – trifenilmetil

§ 7. LITERATURNI IZVORI

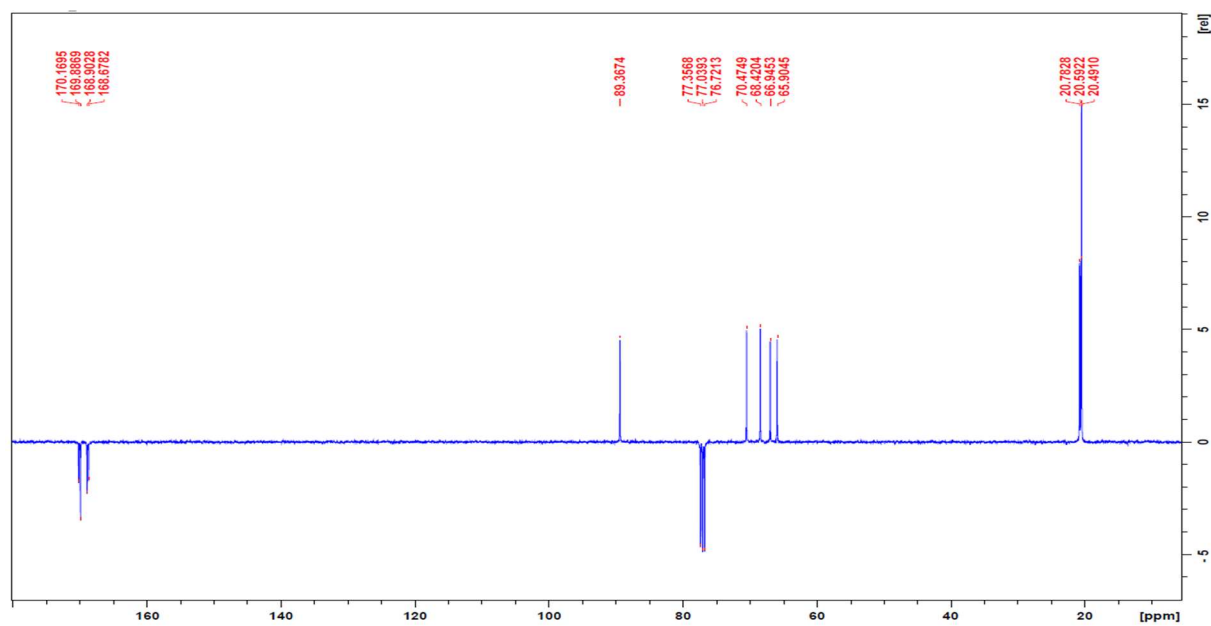
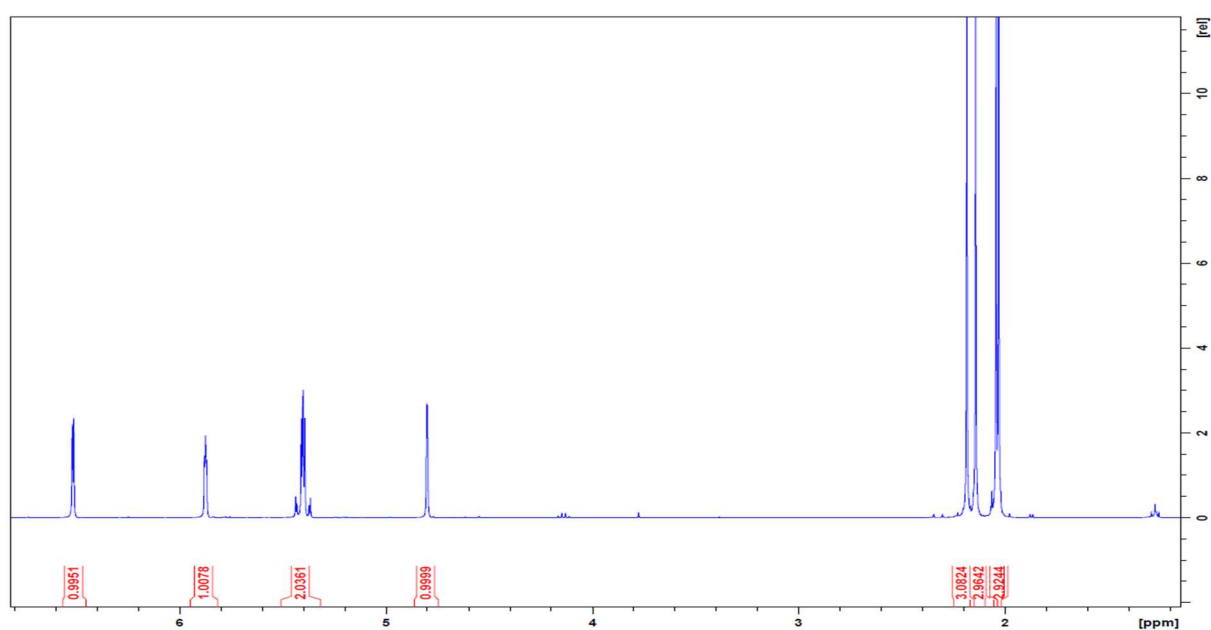
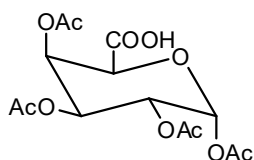
1. P. Wang, Đ. Škalamera, X. Sui, P. Zhang, S. M. Michalek, *ACS Infect. Dis.* **5** (2019) 974-981.
2. R. Ribić, M. Paurević, S. Tomić, *Croat. Chem. Acta* **92** (2019) 153–161.
3. Espinet RG. Nouveau vaccin antiaphteux a complexe glucoviral. *Gac Vet (B. Aires)* 1951;13:268.
4. Dalsgaard K. Saponin adjuvants. III. Isolation of a substance from *Quillaja saponaria* Molina with adjuvant activity in food-and-mouth disease vaccines. *Arch Gesamte Virusforsch.* **44** (1974.) 243–254.
5. Dalsgaard, K., Thin-layer chromatographic fingerprinting of commercially available saponins, *Dan. Tidsskr. Farm.* **44** (1970.) 327-331.
6. Morein, B., Sundquist, B., Hoglund, S., Dalsgaard, K., and Osterhaus, A., Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses, *Nature* **308** (1984.) 457-460
7. Kersten G, Hirschberg H. *Expert Rev Vaccines* **3** (2004.) 453–462.
8. Kensil CR, Wu JY, Anderson CA, Wheeler DA, Amsden J. QS-21 and QS-7: Purified saponin adjuvants. *J Dev Biol Stand.* **92** (1998.) 41–47.
9. Sun HX, Xie Y, Ye YP. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine* **27** (2009.) 1787–1796.
10. C-R- Kensil, J.-Y. Wu, S. Soltysik, *Vaccine Design: The Subunit and adjuvant Approach*, ur. M.F. Powell, Mark, J. Newman, Plenum Press, New York, 1995.
11. Kensil, C.R., Soltysik, S., Patel, U., and Marciani, D.J., Structure/function relationship in adjuvants from *Quillaja saponaria* Molina, *Vaccines* **92** (F.Brown, R.M.Chanock, H.S.Ginsberg, and R.A. Lerner, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. (1992) 35-40.
12. Higuchi, R., Tokimitsu, Y., and Komori, T., An acylated triterpenoid saponin from *Quillaja saponaria*, *Phytochemistry* **27** (1988.) 1165-1168.
13. Kensil, C.R., Newman, M.j., Coughlin, R.t., Soltysik, S., Bedore, D., Recchia, J., Wu, J.-Y., and Marciani, D. J., The use of Stimulon adjuvant to boost vaccine response, *Vaccine Res.* **2** (1993.) 273-281.

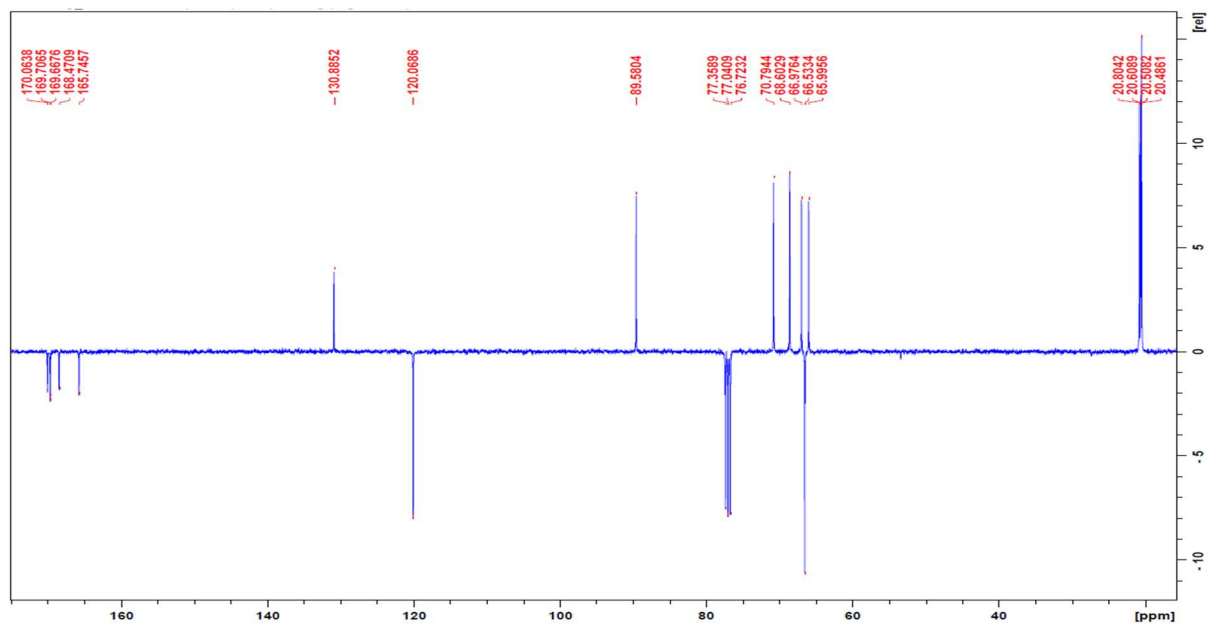
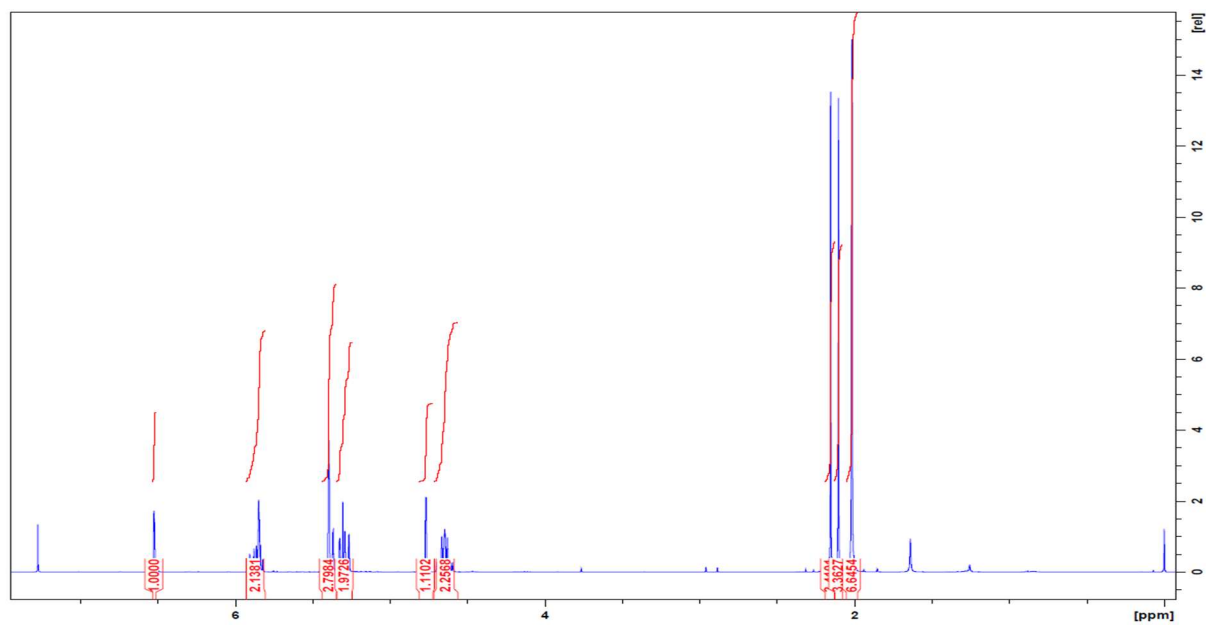
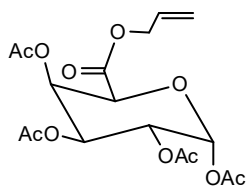
14. Kensil, C. R.; Patel, U.; Lennick, M.; Marciani, D. *J. Immunol.* **146**, (1991.) 431-437.
15. Cleland, J. L.; Kensil, C.r.; Lim, A.; Jacobsen, N.E.; Basa, L.; Spellman, M.; Wheeler, D.A.; Wu, J.-Y.; Powell, M.F. *J. Pharm. Sci.*, **85** (1996.) 22-28.
16. Ragupathi, G.; Gardner, J. R.; Livingston, P. O.; Gin, D. Y. *Expert Rev. Vaccines* **10** (2011.) 463-470.
17. L.G. Wade, Jr.: *Organic Chemistry, Seventh Edition*, Prentice Hall, (2010.), str 1153-1173.
18. G.B. Fields, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **26** (2001) 18.1.1 – 18.1.9.
19. A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **111** (2011) 6557-6602.
20. L. Szilágyi, P. Pristovšek, *Mini-Rev. Med. Chem* **7** (2007) 861-870.
21. R. Ribić, L. Habjanec, B. Vranešić, R. Frkanec, S. Tomić, *Chem. Biodiv.* **9** (2012) 777-788
22. R. Ribić, S. Tomić, *Kem. Ind.* **62** (2013)19-31.
23. G. M. Bahr, *J. Antimicrob. Chemother.* **51** (2003) 5–8.
24. L.G. Wade, Jr.: *Organic Chemistry, Seventh Edition*, Prentice Hall, (2010.), str 1197.
25. M. R. El S. Aly, El S. H. El Ashry, *A.C.C.B.* **73** (2016) 117-224.
26. R.R. Schmidt, *A.C.C.B.* **50** (1994.) 21-123.
27. (a) L.G. Wade, Jr.: *Organic Chemistry, Seventh Edition*, Prentice Hall, (2010.), str 1118. Slika 23.14. (b) L.G. Wade, Jr.: *Organic Chemistry, Seventh Edition*, Prentice Hall, (2010.), str 1119. Slika 23.15. (c) L.G. Wade, Jr.: *Organic Chemistry, Seventh Edition*, Prentice Hall, (2010.), str 1118. (d) L.G. Wade, Jr.: *Organic Chemistry, Seventh Edition*, Prentice Hall, (2010.), str 1113-1114.
28. A. I. Vogel, *Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th edition, Pearson, 1996.
29. Biškup, A. (2020.) Priprava ključnih prekursora za sintezu potencijalnog imunoadjuvanta-konjugata Quillaja saponina i desmuramil-dipeptida. Diplomski rad, Zagreb, Prirodoslovno-matematički fakultet, str 33.
30. A. Ožegović, (2019.) Razvoj sintetskih metoda za pripravu triazolnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida, Diplomski rad, Zagreb, Prirodoslovno-matematički fakultet.
31. A. Fernández-Tejada, E. K. Chea, C. George, N. Pillarsetty, J. R. Gardner, P. O. Livingston, G. Ragupathi, J. S. Lewis, D. S. Tan, D. Y. Gin, *Nat. Chem.* **6** (2014) 635.-643.

32. M.M. Adams, P. Damani, N.R. Perl, A. Won, F. Hong, P. O. Livingston, G. Ragupathi, D, Y, Gin, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 1939-1945.
33. R. Ribić, R. Stojković, L. Milković, M. Antica, M. Cigler, S. Tomić, Design, *Beilstein J. Org. Chem.* **15** (2019) 1805-1814.
34. A. Fernández-Tejada, W. E. Walkowicz, D. S. Tan, D. Y. Gin, *Methods Mol Biol.* **1494** (2017) 45-71.
35. P. Wang, Đ. Škalamera, X. Sui, P. Zhang, S. M. Michalek, *J. Med. Chem.* **62** (2019) 1669-1676.
36. D.J. Marciani, *Int. Immunopharmacol.* **29** (2015) 908-913.

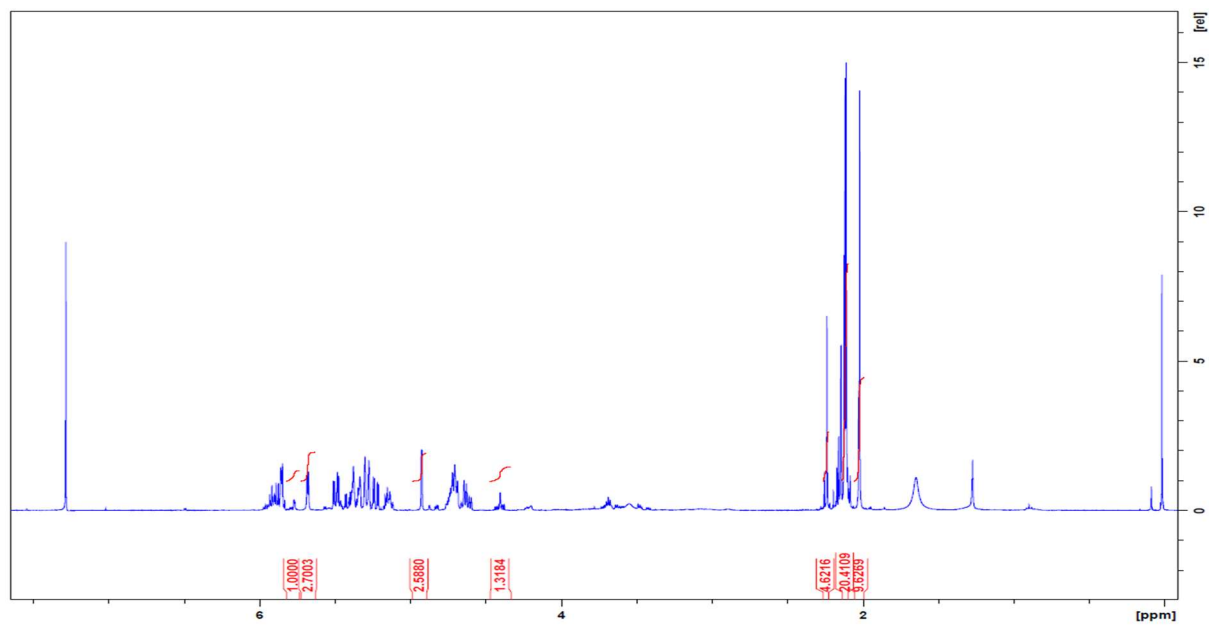
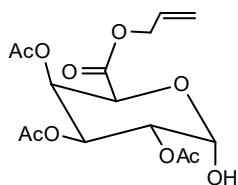
§ 8. DODATAK

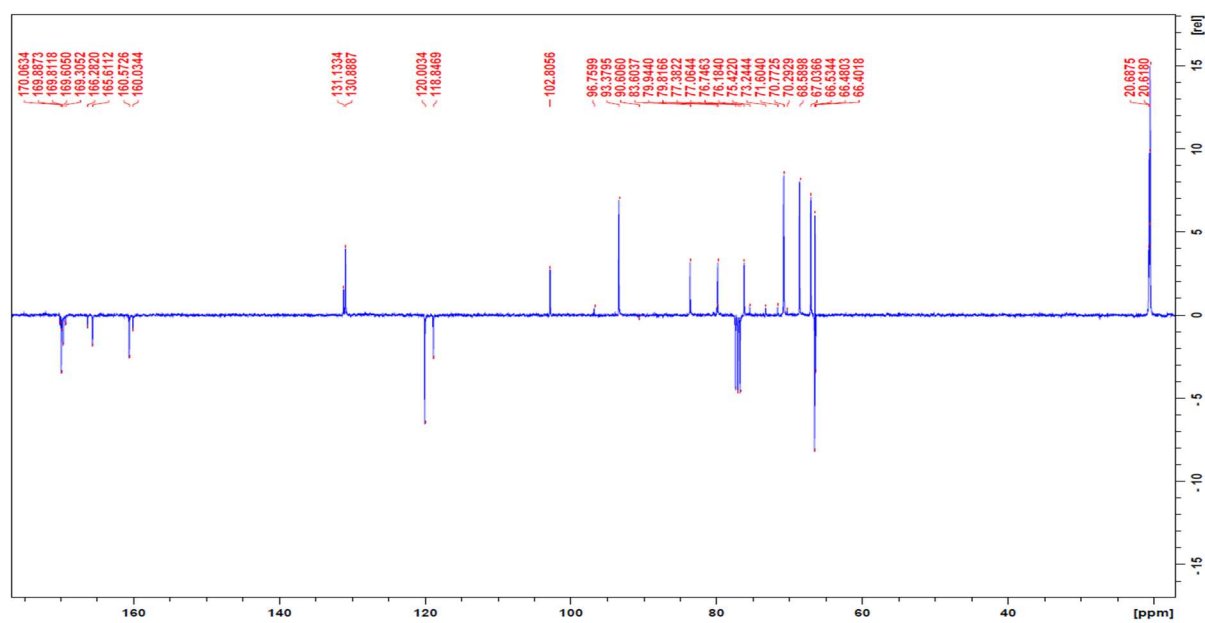
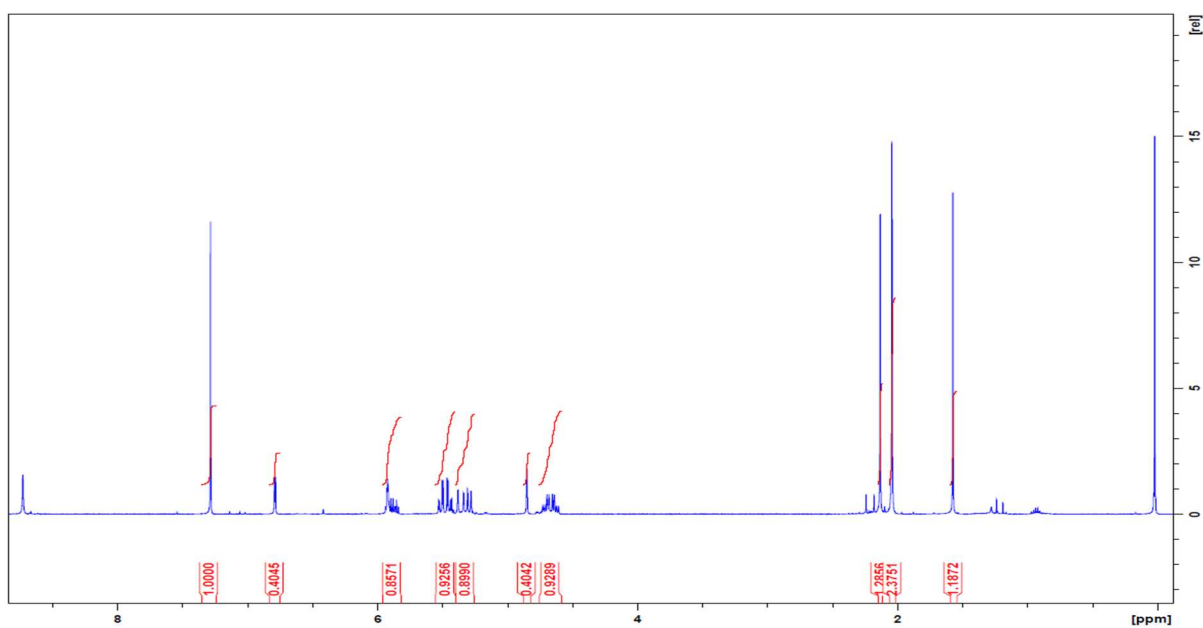
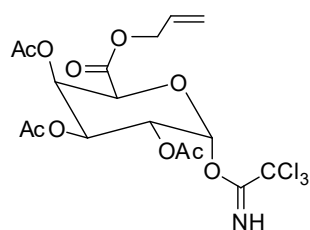
Dodatak 1. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) NMR spoja **1**



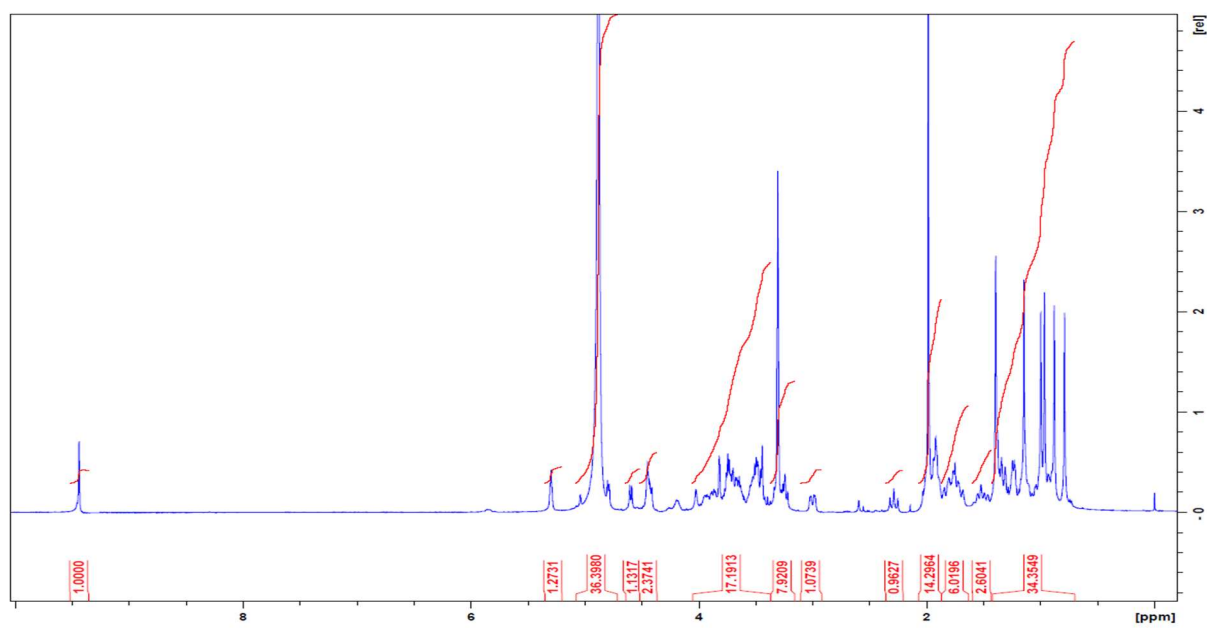
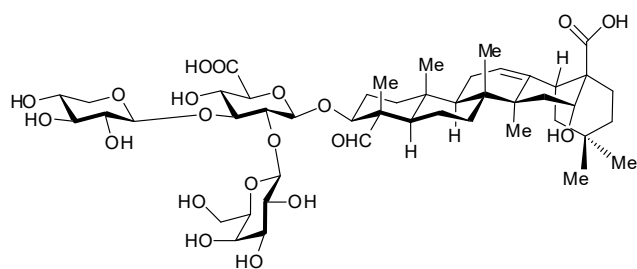
Dodatak 2. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) NMR spoja 2

Dodatak 3. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) NMR spoja **3**

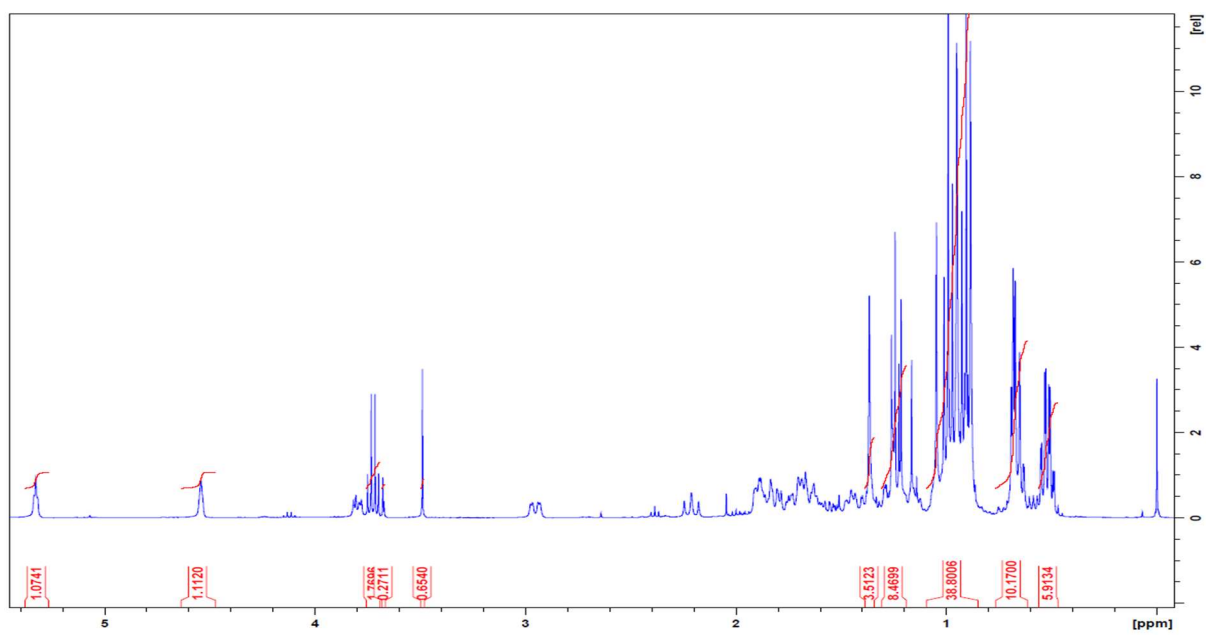
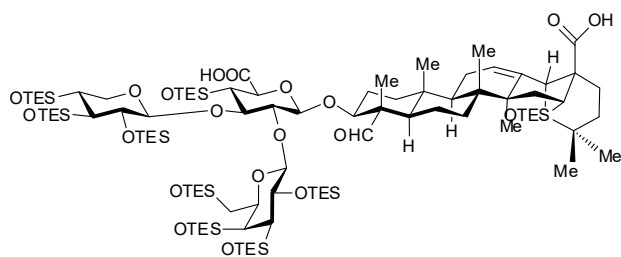


Dodatak 4. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) NMR spoja 4

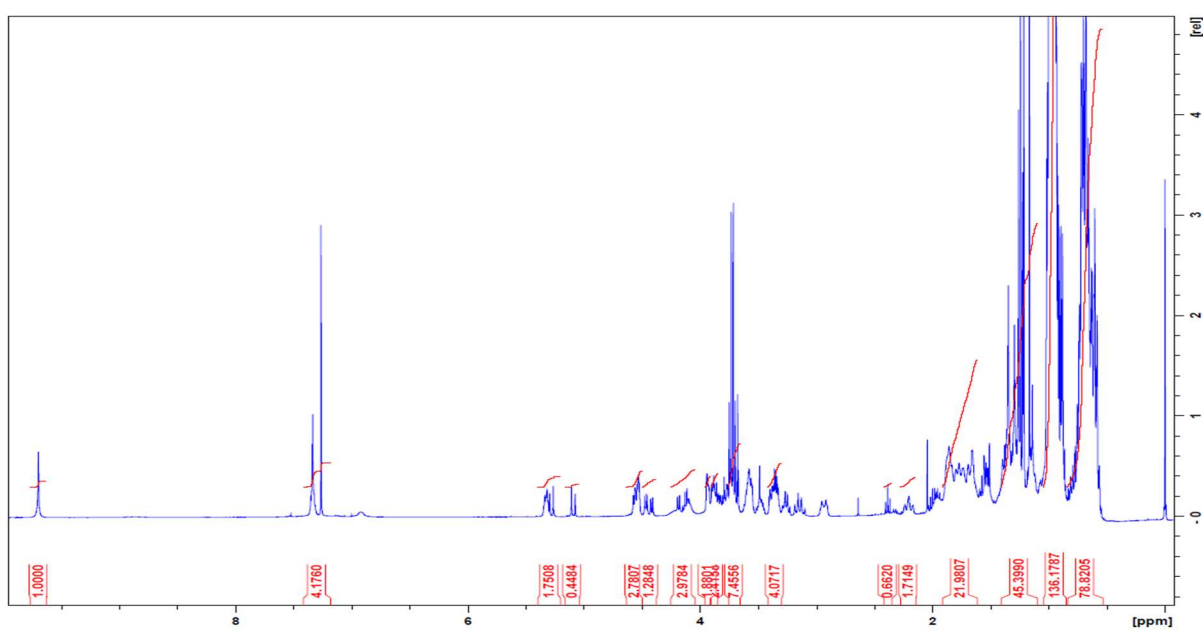
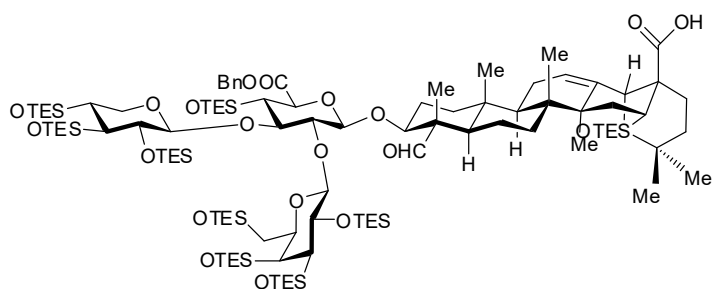
Dodatak 5. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) NMR spoja 5



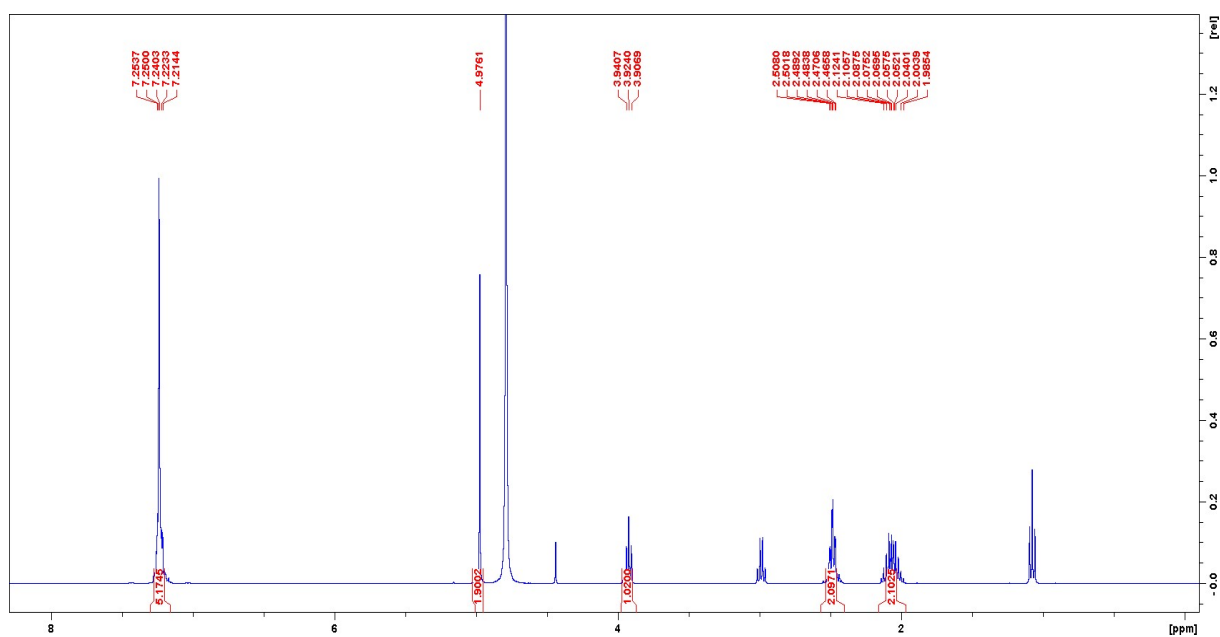
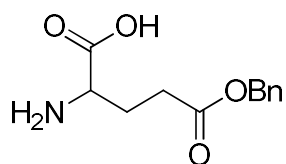
Dodatak 6. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) NMR spoja 6

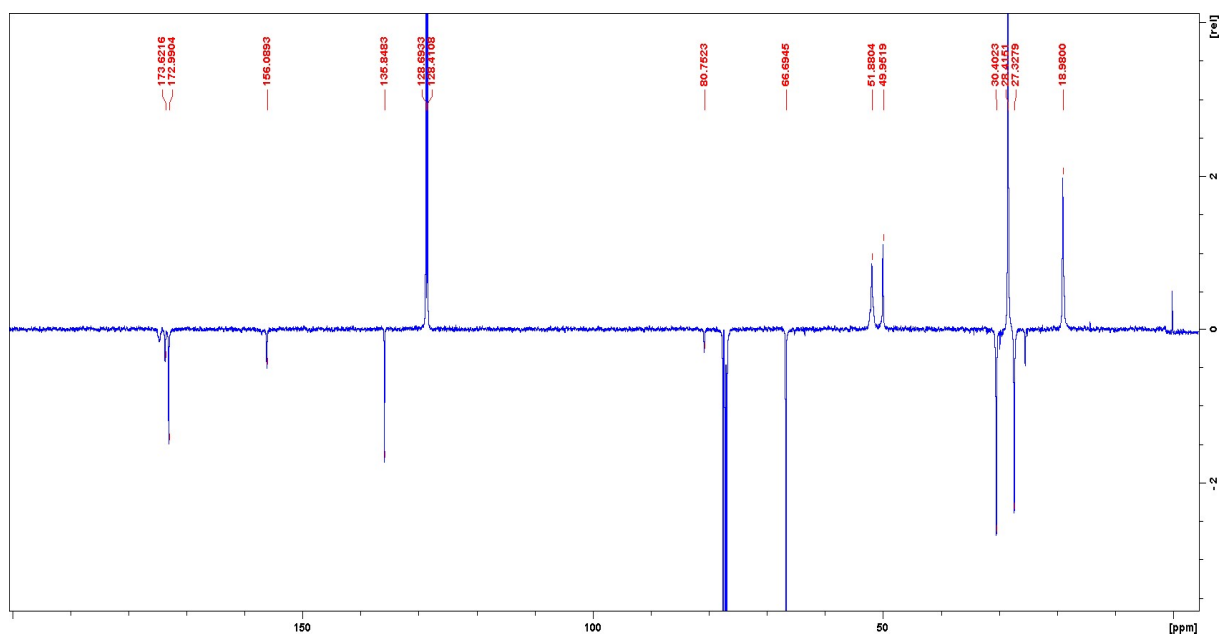
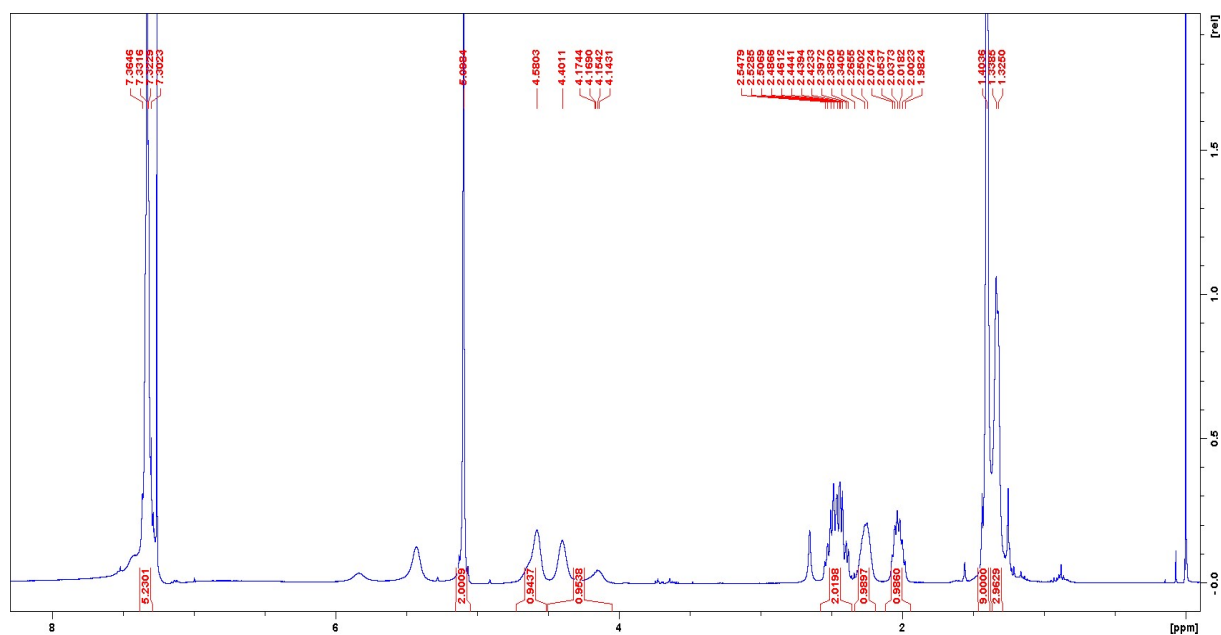
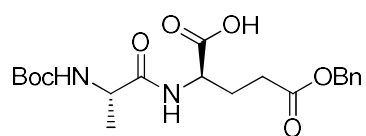


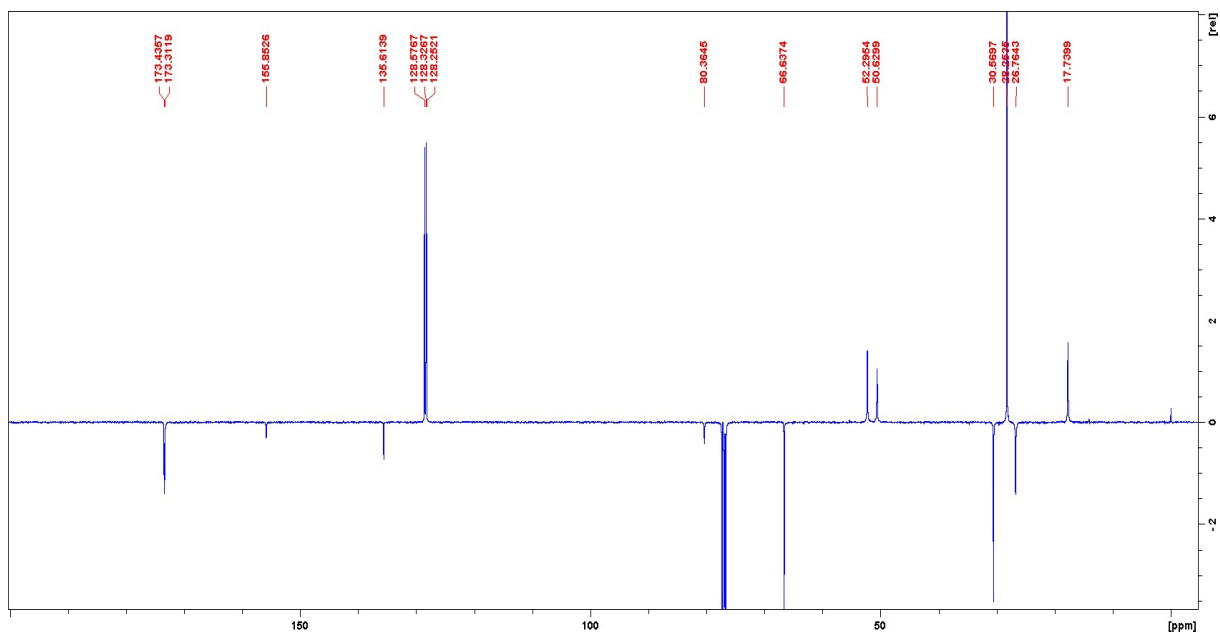
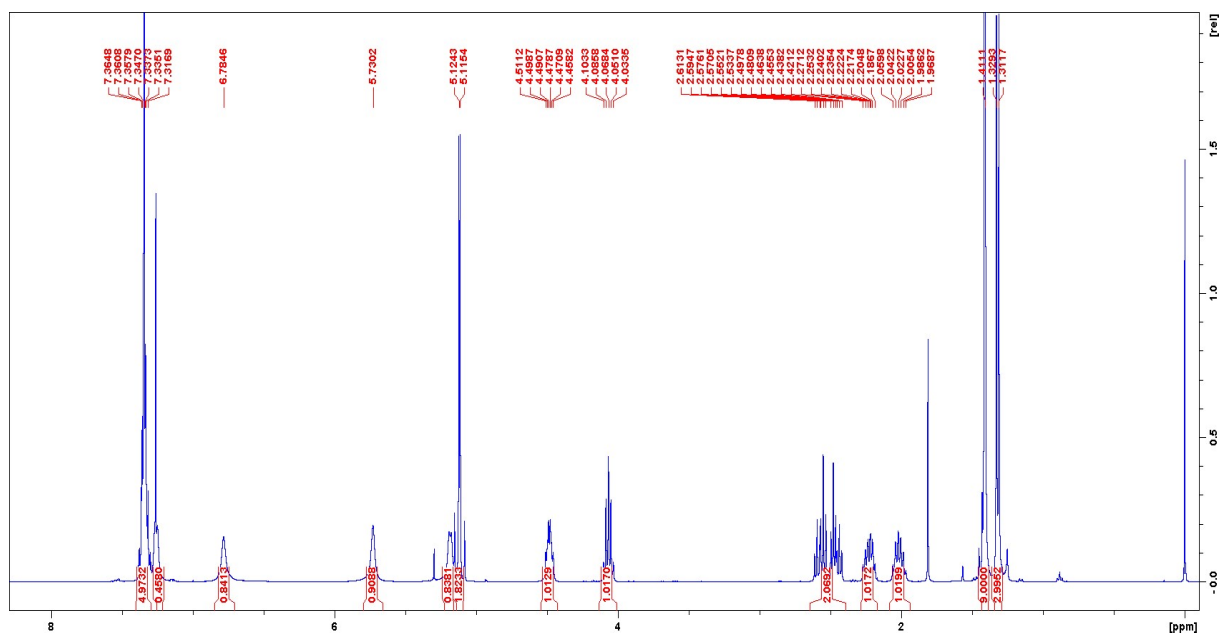
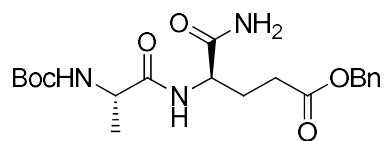
Dodatak 7. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) NMR spoja 7

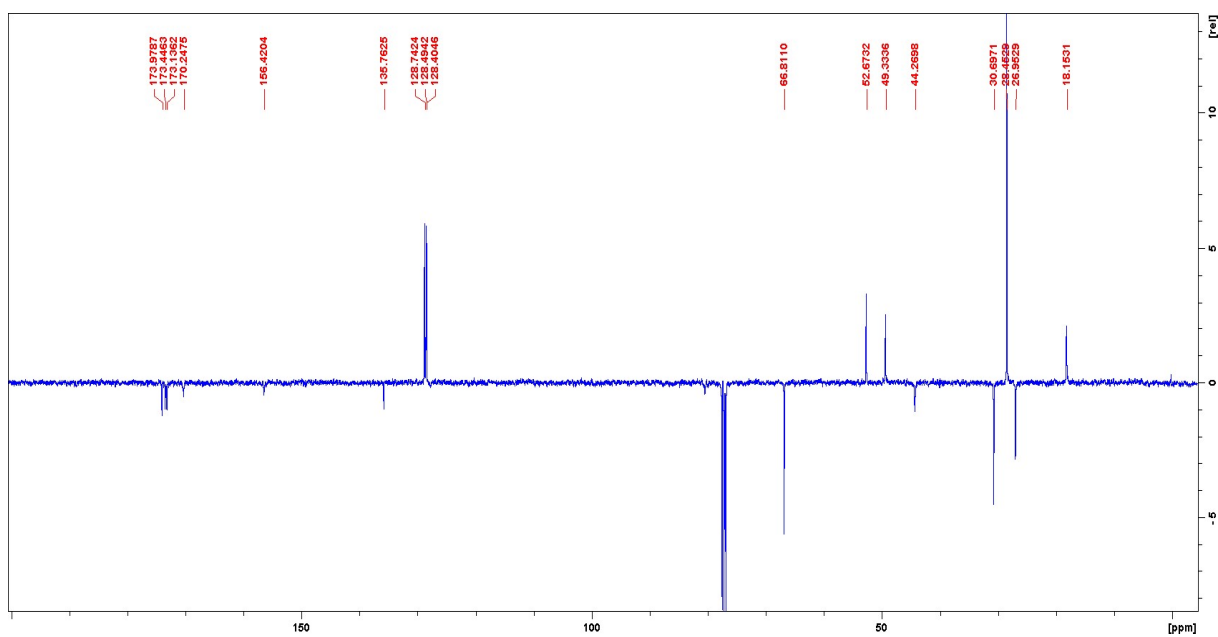
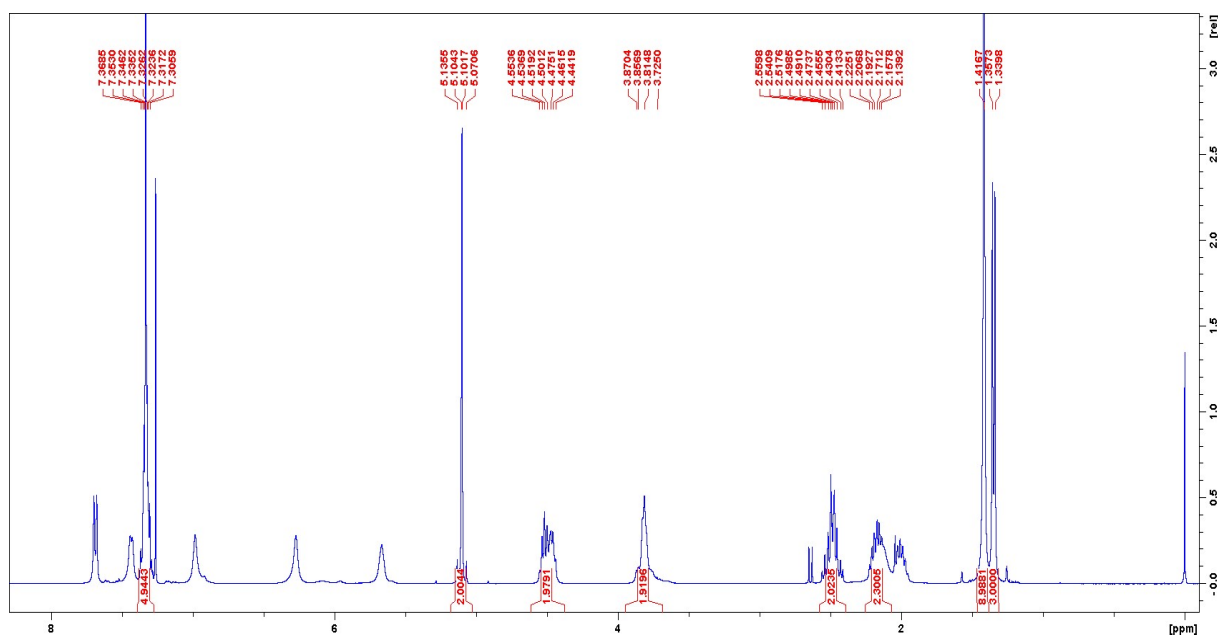
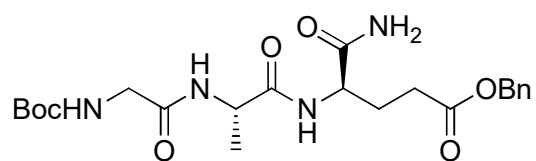


Dodatak 8. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) NMR spoja **20**



Dodatak 9. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) NMR spoja **21**

Dodatak 10. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) NMR spoja **22**

Dodatak 11. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) NMR spoja **8**

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ivan Logožar

Datum rođenja: 16. lipnja 1996.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2003–2011 Osnovna škola Bukovac, Zagreb

2011–2015 XV.gimnazija (MIOC), Zagreb

2015–2019 Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

2019-2021 Diplomski sveučilišni studij Kemija, istraživački smjer, grane: analitička i organska kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2019. Otvoreni dan kemije

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Đ.Škalamera, I. Logožar, **Isolation and derivatization of saponin from *Quillaja saponaria* tree bark for the synthesis of a conjugate with desmuramyl dipeptide // 27.hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, 5.-8.10.2021., Veli Lošinj, Hrvatska (postersko priopćenje)**