Priprava alifatskih triazolnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida

Bušljeta, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:834212

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-18**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Mia Bušljeta

Priprava alifatskih triazolnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida

Diplomski rad

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

Zagreb, 2022. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Vesne Petrović Peroković i neposrednim voditeljstvom Danijele Mihelec, mag. chem.

Diplomski rad izrađen je u okviru potpore pod nazivom *Sinteza i strukturna analiza biološki aktivnih peptida, heterocikličkih spojeva i njihovih glikokonjugata* (potpora 20286414, voditeljica: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković).

Zahvale

Najprije se želim zahvaliti izv. prof. dr. sc. Vesni Petrović Peroković na ukazanoj prilici i povjerenju za izradu ovog diplomskog rada. Hvala Vam na svom prenesenom znanju, svim razgovorima, savjetima, šalama kao i na ugodnom društvu u labosu. Hvala Vam što ste trpili sve moje komentare koji nisu baš uvijek bili na mjestu i u skladu s prilikom. Također, hvala Vam što ste mi potvrdili da "organska" stvarno i je grana koju mogu nazvati svojom.

Također, veliko hvala i neposrednoj voditeljici Danijeli Mihelec. Hvala Vam što ste bili uz mene od samog početka, te što ste u konačnici od mene i napravili nekog 'ko zna, želi i može više. Danijela moja, hvala Vam na svemu. Na svakoj poruci, savjetu, kritici i pohvali…uistinu svemu. Zbog Vas sam bolji kemičar.

Veliko hvala doc. dr. sc. Željki Car na pomoći. Hvala Vam što ste bili tu svaki put kad je nešto zapelo. Hvala Vam na svakom savjetu, na svakoj odabranoj koloni te na tome što uvijek iznova pokazujete da za svaki problem postoji i rješenje.

Hvala teti Andreji, teti Marini te svim ostalim djelatnicima zavoda za organsku kemiju koji su na bilo koji način pomogli i uskočili kada je bilo potrebno.

Hvala Plivinom odjelu istraživanja i razvoja što su mi pružili priliku da proširim i upotpunim svoje znanje o organskoj sintezi. A, naročito hvala dr. sc. Maji Matanović Škugor. Hvala Vam što ste mi pružili priliku da učim od Vas, te što sam uz Vas uspjela zaokružiti ovu pet i po' godišnju priču na stvarno lijep način.

Hvala doc.dr.sc. Tomislavu Portadi, prof. dr. sc. Branki Zorc, prof. dr. sc Branimiru Bertoši i prof. dr.sc. Tajani Begović. Hvala vam što ste me uključili u sve te silne pripreme, testove, izlučne, škole kemije, organizacije i kvizove, te što ste mi dozvolili da i ja nekog dvije, tri pametne naučim. Znači mi.

Hvala mojim uhljebima - mojoj Dori, Dokiju, Vikiju, Tei i Vekiju. Hvala vam što ste mi uljepšali i upotpunili ove studentske dane.

Hvala mojim (do)cimericama, koje su zasigurno vidjele i najbolje, ali ponajviše najgore oblike mene, no bez obzira na sve, bile tu.

Na kraju se želim zahvaliti obitelji, koja je uvijek bila tu za mene i uz mene, te što mi je omogućila doslovno sve što sam im dozvolila da mi omogući.

Ipak najviše se želim zahvaliti mami. Hvala ti što mi svaki dan primjerom pokazuješ što i kako u životu. Počevši od toga kako se lijepo obući pa do onih pravih životnih vrijednosti. Hvala ti što si unatoč svemu u životu uvijek prava i žena i majka i kraljica, te iako je to teško priznati, (pogotovo meni) većinom u pravu.

Hvala i svima ostalima "mojima" koji ovdje nisu spomenuti, ali zbog kojih i jesam "svoja" i baš ovdje gdje jesam i kakva jesam.

Sadržaj

SAŽETAK ..... **XI**
ABSTRACT ..... **XIII**
§ 1. UVOD **1**
§ 2. LITERATURNI PREGLED **3**
2.1. Peptidni adjuvanti *3*
2.1.1. Adjuvanti *3*
2.1.2. Muramil-dipeptid kao adjuvant *5*
2.1.2.1. Mehanizam djelovanja muramil-dipeptida *6*
2.1.3. Desmuramil-dipeptid *7*
2.1.3.1. Lipofilni derivati desmuramil-dipeptida *8*
2.1.3.2. Manozilirani derivati desmuramil-dipeptida *10*
2.2. Načini priprave amida *12*
2.2.1. Struktura i važnost amida *12*
2.2.2. Kondenzacijski reagensi *13*
2.2.2.1. Tionil-klorid *13*
2.2.2.2. Karbodiimidi *14*
2.2.2.2.1. Sprječavanje racemizacije *17*
2.2.2.2. Kondenzacijski reagensi na bazi 1-hidroksi-1H-benzotriazola *17*
2.2.2.3. Kondenzacija preko mješovitog anhidrida *19*
2.2.3. Zaštitne skupine *20*
2.2.3.1. Zaštita amino-skupine *20*
2.2.3.2. Zaštita karboksilne skupine *21*
2.3. Azid-alkinska cikloadicija *22*
2.3.1. 1,2,3-Triazoli *22*
2.3.2. Bakrom(I) katalizirana azid-alkinska cikloadicija (CuAAC) *24*
2.3.2.1. Izvori bakra u azid-alkinskoj cikloadiciji *25*
2.3.3. Mehanizam Cu(I) azid-alkinske cikloadicije *26*
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **28**
3.1. Materijali i metode *28*
3.1.1. Kemikalije i otapala *28*
3.1.2. Metode *28*
3.2. Priprava peptidnog prekursora *29*

*3.2.1. Priprava spoja **1*** 29
3.3. Priprava 1,4-disupstituiranog 2-(adamantan-1-il)etil-triazolnog prekursora (3) 30
*3.3.1. Priprava spoja **2*** 30
*3.3.2. Priprava spoja **3*** 31
3.4. Priprava 1,4-disupstituiranog heksadecil-triazolnog prekursora (6) 32
*3.4.1. Priprava spoja **4*** 32
*3.4.2. Priprava spoja **5*** 33
*3.4.3. Priprava spoja **6*** 34
3.5. Priprava 2-(adamantan-1-il)etil-triazolnog derivata desmuramil-dipeptida (8) 35
*3.5.1. Priprava spoja **7*** 35
*3.5.2. Priprava spoja **8*** 37
3.6. Priprava heksadecil-triazolnog derivata desmuramil-dipeptida (10) 38
*3.6.1. Priprava spoja **9*** 38
*3.6.2. Priprava spoja **10*** 39
3.7. Priprava zaštićene manozne podjedinice (11) 41
*3.7.1. Priprava spoja **11*** 41
3.8. Kondenzacija peptidnih prekursora sa zaštićenom manoznom podjedinicom 42
*3.8.1. Priprava spoja **12*** 42
*3.8.2. Priprava spoja **13*** 43
*3.8.3. Priprava spoja **14*** 44
3.9. Uklanjanje benzilnih zaštitnih skupina sa spojeva 12, 13 i 14 i priprava ciljnih molekula 15, 16 i 17 46
*3.9.1. Općeniti postupak uklanjanja benzilnih zaštitnih skupina sa spojeva **12**, **13** i **14*** 46
*3.9.2. Priprava spoja **15*** 46
*3.9.3. Priprava spoaj **16*** 47
*3.9.4. Priprava spoja **17*** 48
3.10. Ispitivanje adjuvantskog djelovanja spojeva 15, 16 i 17 49
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 51
4.1. Uvod 51
4.2. Priprava dipeptida 1 53
4.3. Priprava alifatskih 1,4-disupstituiranih triazolnih prekursora 54
*4.3.1. Priprava heksadecil-azida (**4**)* 54
4.3.2. Priprava alifatskih triazolnih derivata propargilamina 1,3-cikloadicijskom reakcijom 54
*4.3.3. Uklanjanje Boc zaštitne skupine sa spojeva **2** i **5*** 55
4.4. Priprava alifatskih triazolnih derivata desmuramil-dipeptida 56
*4.4.1. Kondenzacija 2-(adamant-1-il)etil-triazolnog derivata **3** s dipeptidom **1*** 57

*4.4.2. Kondenzacija heksadecil-triazolnog derivata **6** s dipeptidom **1*** *57*
*4.4.3. Uklanjanje Boc-zaštitne skupina sa spojeva **7** i **9*** *58*
4.5. Kondenzacija triazolnih peptidnih prekursora s manoznom podjedinicom *59*
*4.5.1. Priprava manozne podjedinice **11*** *59*
*4.5.2. Kondenzacija manozne podjedinice **11** s peptidinim prekursorima* *60*
*4.5.3. Priprava ciljnih molekula **15**, **16** i **17*** *61*
4.6. Ispitivanje adjuvantskog djelovanja spojeva 15-17 u mišjem modelu *62*
§ 5. ZAKLJUČAK 64
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA 66
§ 7. LITERATURNI IZVORI 67
§ 8. DODATAK XV
§ 9. ŽIVOTOPIS XXXII

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

PRIPRAVA ALIFATSKIH TRIAZOLNIH DERIVATA MANOZILIRANOG DESMURAMIL-DIPEPTIDA

Mia Bušljeta

U sklopu diplomskog rada opisana je priprava triju novih alifatskih triazolnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida, L-Ala-D-*iso*Gln. U konvergentnom pristupu sintezi zasebno su pripravljene tri podjedinice: dipeptid, alifatski triazolni amin i manozna podjedinica, koje su zatim međusobno povezane amidnim vezama. Kao polazni dipeptid iz odgovarajućih zaštićenih aminokiselina pripravljen je Boc-L-Ala-D-Glu(OBn). Alifatske triazolne podjedinice pripravljene su klik-reakcijom, bakrom(I) kataliziranom azid-alkinskom cikloadicijom (CuAAC) Boc-zaštićenog propargilamina i odgovarajućih azida, heksadecil-azida i 2-(adamant-1-il)etil-azida. Nakon uklanjanja Boc zaštite dobiveni alifatski triazolni amini te prethodno pripravljen dodecilni analog vezani su amidnom vezom na α-karboksilnu skupinu dipeptida Boc-L-Ala-D-Glu(OBn). Benzilima zaštićena manozna podjedinica s acetilnom poveznicom pripravljena je hidrolizom odgovarajućeg estera. Alifatski triazolni derivati desmuramil-dipeptida nakon uklanjanja Boc zaštite vezani su preko amino-skupine alanina na karboksilnu skupinu manozne podjedinice. U zadnjem koraku reakcije uklanjanjem svih benzilnih zaštitnih skupina reakcijom katalitičke hidrogenolize uspješno su pripravljene ciljne molekule ovog rada kojima je konačni cilj ispitati *in vivo* adjuvantsku aktivnost.

(68 + xxxiii stranica, 46 slika, 2 tablice, 32 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: adjuvanti, alifatska podjedinica, desmuramil-dipeptid, manokonjugati, 1,2,3-triazoli

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
Neposredni voditelj: Danijela Mihelec, mag. chem.

Ocjenitelji:
1. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
2. prof. dr. sc. Tajana Begović
3. prof. dr. sc. Željka Soldin

Zamjena: doc. dr. sc. Željka Car

Datum diplomskog ispita: 21. veljače 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

PREPARATION OF ALIPHATIC TRIAZOLE DERIVATIVES OF MANNOSYLATED DESMURAMYL DIPEPTIDE

Mia Bušljeta

In this diploma thesis, the preparation of three new lipophilic aliphatic triazole derivatives of manosylated desmuramyl dipeptide, L-Ala-D-isoGln, were described. In the convergent synthesis approach, three subunits were prepared separately: the dipeptide, the aliphatic triazole amine, and the mannose subunit, which were then interconnected by amide bonds. Boc-L-Ala-D-Glu(OBn) was prepared as the starting dipeptide from the corresponding protected amino acids. Aliphatic triazole subunits were prepared by click reaction, copper(I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) of Boc-protected propargylamine and the corresponding azides, hexadecyl-azide and 2-(adamant-1-yl)ethyl-azide. After the removal of Boc, the resulting aliphatic triazole amines and the previously prepared dodecyl analog were attached by an amide bond to the α-carboxyl group of the dipeptide Boc-L-Ala-D-Glu(OBn). The benzyl-protected mannose subunit with an acetyl linker was prepared by hydrolysis of the corresponding ester. After removal of Boc-protection group aliphatic triazole derivatives of desmuramyl dipeptide were coupled through the carboxyl group of the mannose subunit and the amino groups of alanine. In the last reaction step, all benzyl protecting groups were removed by the catalytic hydrogenolysis reaction and the target molecules of this work were successfully prepared with the final goal of testing their *in vivo* adjuvant activity.

(68 + xxxiii pages, 43 figures, 2 tables, 32 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: adjuvants, aliphatic subunit, desmuramyl dipeptide, mannoconjugates, 1,2,3-triazoles

Mentor: Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
Assistant mentor: Danijela Mihelec, mag. chem.

Reviewers:

1. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
2. Dr. Tajana Begović, Professor
3. Dr. Željka Soldin, Professor

Substitute: Dr. Željka Car, Assistant Professor
Date of exam: 21 Februrary 2022

§ 1. UVOD

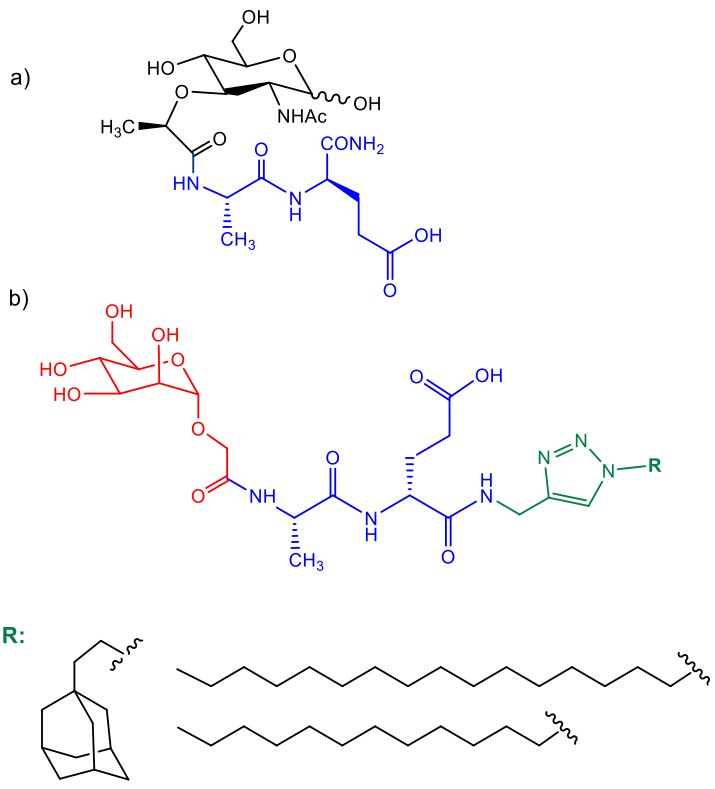
Adjuvanti su tvari koje se dodaju cjepivima kako bi se ubrzala, povećala ili pojačala imunosna reakcija organizma na određeni antigen čime se povećava njegova otpornost na određeni patogen. Ulogu adjuvanata mogu imati razne aluminjeve soli, bakterijski proizvodi, emulzije na bazi ulja te liposomi, ali i derivati muramil-dipeptida (MDP), koji su tema ovog diplomskog rada.

Muramil-peptidi su dijelovi peptidoglikana, prirodnih polimera koji izgrađuju stanične stijenke Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Iako sâm muramil-dipeptid pokazuje adjuvantsku aktivnost, njegova primjena uzrokuje određene nuspojave. Iz tog razloga, uporaba čistog muramil-dipeptida kao adjuvanta nikad nije zaživjela, ali je zato potaknula znanstvenike na sintezu brojnih njegovih derivata.

Istraživanjem odnosa strukture i aktivnosti (engl. *Structure Activity Relatioship*, SAR), utvrđeno je da *N*-acetilmuraminska kiselina, Mur*N*Ac, kao dio strukture muramil-dipeptida, nije ključna za njegovu adjuvantsku aktivnost. Iz tog razloga, različitim se strukturnih modifikacijama dipeptidnog dijela molekule L-alanil-D-izoglutamina, koji se naziva još i desmuramil-dipeptid (DMP), pokušava postići što bolji imunosni odgovor. Budući da je poznato da manoza zbog interakcije s manoznim receptorima koji se nalaze na površini stanica imunosnog sustava može povećati imunosni odgovor u organizmu, jedna od strukturnih modifikacija DMP-a provedena na Zavodu za organsku kemiju uključivala je uvođenje manozne podjedinice. Dodatno, pokazalo se da se uvođenjem alifatskih fragmenata u strukturu desmuramil-dipeptida, poput primjerice adamantana, može povećati njegova lipofilnost pa tako i ulaz u stanicu kroz lipidni dvosloj pasivnom apsorpcijom.[1-3] Uloga triazolne podjedinice kao poveznice između dipeptida i alifatskog dijela još nije u potpunosti istražena, no na temelju dosadašnjih rezultata čini se da povoljno utječe na imunosni odgovor.

Cilj ovog diplomskog rada jest priprava triju novih alifatskih triazolnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida (slika 1). Za pripravu navedenih ciljnih molekula koristit će se tzv. konvergentni pristup. Takav pristup uključuje zasebnu pripravu triju podjedinica, konkretno manoznog prekursora, odgovarajućih alifatskih triazolnih amina te dipeptida, koji će se pogodnim redoslijedom spajiti u ciljne molekule. Kao polazni dipeptid priredit će se L-alanil-D-glutaminska kiselina (Boc-L-Ala-D-Glu) u kojoj je karboksilna skupina u bočnome lanacu

glutaminske kiseline zaštićena benzilnom skupinom (Bn), a amino-skupina alanina *tert*-butilosikarbonilnom zaštitom (Boc). Tako priređeni dipeptid povezat će se amidnom vezom preko slobodne α-karboksilne skupine glutamata s amino-skupinom alifatskih triazolnih derivata dvjema različitim metodama amidacije. Triazolni alifatski amini priredit će se klik-reakcijom, bakar(I) kataliziranom azid-alkinskom cikloadicijom (CuAAC) odgovarajućeg terminalnog alkina, propargilamina, i alifatskih azida – 2-(adamant-1-il)etil-azida i heksadecil-azida. U radu će se koristiti i triazolni amin prethodno pripremljen klik-reakcijom dodecil-azida i propragilamina. Konačno, tri alifatska triazolna derivata desmuramil-dipeptida vezat će se amidnom vezom za prethodno priređeni zaštićeni manozni prekursor. Amidna će se veza ostvariti preko terminalne amino-skupine alanina alifatskih triazolnih dipeptida i karboksilne skupine manozne podjedinice smještene na acetilnoj poveznici vezanoj na C1 položaj manoze. Tako priređenim derivatima u zadnjem koraku bit će uklonjene benzilne zaštitne skupine katalitičkim hidrogeniranjem, te će im se ispitati *in vivo* adjuvantski učinak.



Slika 1. Strukturne formule molekula: a) muramil-dipeptida (MDP) i b) ciljnih molekula diplomskog rada – alifatskih triazolnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Peptidni adjuvanti

2.1.1. Adjuvanti

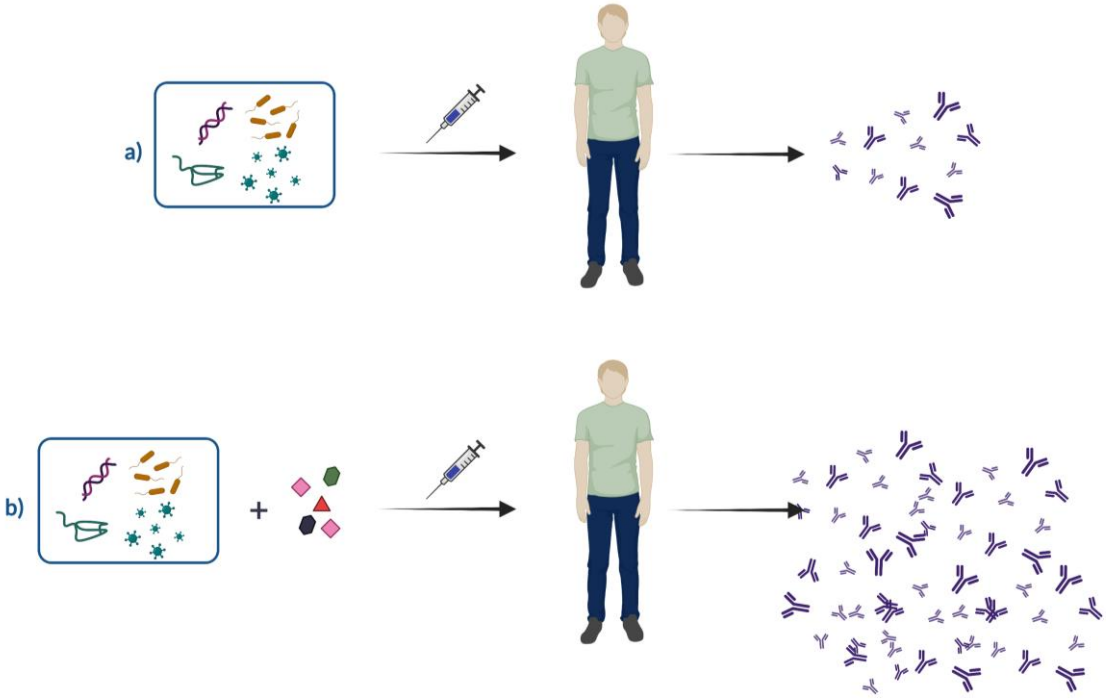
Cijepljenje se smatra najučinkovitijim pristupom prevencije zaraznih bolesti. Temeljna ideja cijepljenja jest unos oslabljenog ili inaktiviranog patogena ili neke njegove komponente u organizam koji tom prilikom ne podliježe zarazi niti bolesti, ali pokreće imunosni odgovor. Pokretanjem imunosnog odgovora stječu se memorijske imunosne stanice koje predstavljaju efikasnu obranu organizma ukoliko se on ponovno susretne s istim patogenom.[4,5]

Cjepiva se općenito mogu podijeliti na živa i neživa, odnosno cjepiva koja sadrže oslabljeni ili inaktivirani oblik određenog patogena te ona koja sadrže umrtvljeni patogen ili neku njegovu određenu komponentu, primjerice antigen. Osim navedenih tradicionalnih cjepiva posljednjih nekoliko desetljeća sve se više istražuju te uporabljuju cjepiva kao što su podjedinična cjepiva (pročišćeni ili rekombinantni protein), virusni vektori, mRNA cjepiva i slično.[6]

Za razliku od živih cjepiva, imunizacija pročišćenim proteinskim antigenima obično rezultira skromnijim imunosnim odgovorom, ponajviše zbog nemogućnosti antigena da inducira sazrijevanje dendritičkih stanica, primarnih stanica koje prezentiraju antigen i time utječu na aktivaciju imunosnog odgovora. Iz navedenog razloga, u sastav cjepiva se pokušavaju se uključiti pomoćne tvari kako bi se povećala učinkovitost slabih antigena, odnosno pojačao imunosni odgovor. Navedene pomoćne tvari nazivaju se imunomodulatorima ili adjuvantima.[4,7] Imunomodulatori su tvari koje utječu na imunosni odgovor u organizmu (slika 2). Osim gore opisanih imunostimulatora koji se dodaju cjepivima koja nisu dovoljno imunogenična, postoje i adjuvanti s imunosupresorskim svojstvima. Oni su također od velikog značaja jer se koriste u slučaju kada je potrebno smanjiti reakciju imunosnog sustava. To je potrebno u slučajevima kao što su razne transplatacije organa i tkiva ili autoimune bolesti.

Kao što je ranije rečeno, imunostimulatori pojačavaju imunosni odgovor organizma na određeni patogen. Osim toga, bitno je naglasiti da imaju i sposobnost povećanja stabilnosti određenog cjepiva, tj. čine ih manje sklonima degradaciji. Kao najčešće korišteni adjuvanti već

dugi niz godine koriste se aluminijevi spojevi poput aluminijevog hidroksida, aluminijevog fosfata te aluminijevog kalijevog fosfata. Ulogu adjuvanata mogu imati i razni bakterijski proizvodi, emulzije na bazi ulja te liposomi.[1-2,4,6-8]



Slika 2: Imunosni odgovor u organizmu: a) bez i b) uz dodatak adjuvanta

S druge strane, najsnažnijim adjuvantom te isto tako i zlatnim standardom adjuvantske aktivnosti smatra se Freundov potpuni adjuvant (engl. *Freud's Complete Ajuvant*, FCA). Glavni sastojak Freundovog adjuvanata su toplinski umrtvljene mikobakterije (*Mycobacterium tuberculosis*), a osim toga sadrži i emulziju vode i ulja. FCA može snažno izazvati i humoralni i stanični imunosni odgovor. Nažalost, visoka toksičnost onemogućuje njegovu uporabu u kliničke svrhe. Zanimljivo je to da navedeni adjuvant i bez dodatka bakterije pokazuje adjuvantski učinak i naziva se Freundov nepotpuni adjuvant (engl. *Incomplete Freud's adjuvant*, IFA).[8-10]

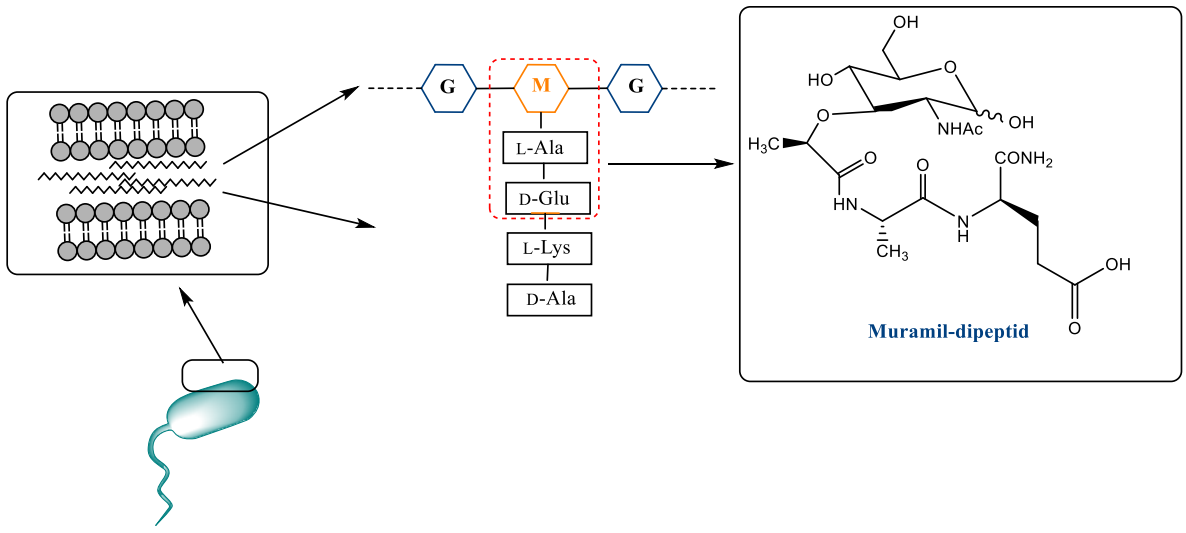
Zadnjih godina sve se više pažnje usmjerava i na adjuvante peptidnog porijekla, odnosno peptidne adjuvante. Do danas je otkriven veliki broj peptida i peptidnih derivata bilo sintetskog ili prirodnog porijekla koji mogu utjecati na imunosni odogovor kod sisavaca. Zbog navedenog svojstva, adjuvanti peptidnog porijekla predmet su brojnih znanstvenih istraživanja.

Neki poznati peptidni adjuvanti poput timopeptina tuftsina, muramil-dipeptida te rigina svoju su primjenu već pronašli u obliku raznih terapeutika. Samo porijeklo imunomodulacijskih proteina može biti raznoliko. Oni mogu izgrađivati stanične stijenke, biti razni mikrobni metaboliti, dijelovi imunoglobulina ili ostalih plazma proteina.[5,11]

2.1.2. Muramil-dipeptid kao adjuvant

U potrazi za novim i učinkovitijim adjuvantima veliki potencijal pokazali su derivati muramil-dipeptida. Još je 1974. godine dokazano da je muramil-dipeptid najmanji dio peptidoglikana koji ima sposobnost zamijeniti učinak cijele bakterije *Mycobacterium tuberculosis* u Freundovom adjuvantu.

Muramil-peptidi su dijelovi peptidoglikana (slika 3), prirodnih polimera koji izgrađuju stanične stijenke Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Peptidoglikani su građeni od alternirajućih molekula *N*-acetilglukozamina (Glc*N*Ac) i *N*-acetilmuraminske kiseline (Mur*N*Ac) povezanih β-glikozidnom vezom, te međusobno umreženih preko kratkih peptida vezanih na Mur*N*Ac.[1,9]



Slika 3: Muramil-dipeptid kao dio peptidoglikanske stanične stijenke bakterija

Muramil-dipeptid (MDP), odnosno *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin, najmanja je strukturna jedinica peptidoglikana koja posjeduje imunostimulacijsku aktivnost. Nažalost, sam muramil-dipeptid, osim imunostimulacijskog učinka, pokazuje i određenu pirogenost,

aritrogenost i toksičnost, kao i nezadovoljavajuću sposobnost prodiranja u stanicu. Zbog navedenih nedostataka, uporaba čistog MDP-a kao adjuvanta nikad nije zaživjela.

Kako bi se smanjile neželjene nuspojave te povećala imunostimulacijska uloga MDP-a, veliki je interes usmjeren prema sintezi novih derivata MDP-a. Proučavanjem odnosa strukture i adjuvatske aktivnosti raznih serija derivata muramil-dipeptida došlo se do nekoliko zaključaka o odnosu strukture i aktivnosti. Pokazalo se da slobodna anomerna hidroksilna skupina šećera nije ključna za adjuvatsku aktivnost te se može zamijeniti nekom drugom skupinom, poput metilne. Nadalje, na položaju C-2 šećera nužna je prisutnost amidne skupine, no ona može biti modificirana primjerice u acilamido-skupinu. Također, moguća je zamjena *N*-acetilglukozamina nekim drugim ugljikohidratnim izomerom. S druge strane, zamjena L-alanina D-alaninom dovodi do potpune inaktivacije spoja, dok zamjenom L-alanina drugom L-aminokiselinom, kao što je primjerice L-glicin i L-treonin, spoj ne gubi adjuvantsku aktivnost.[1,9]

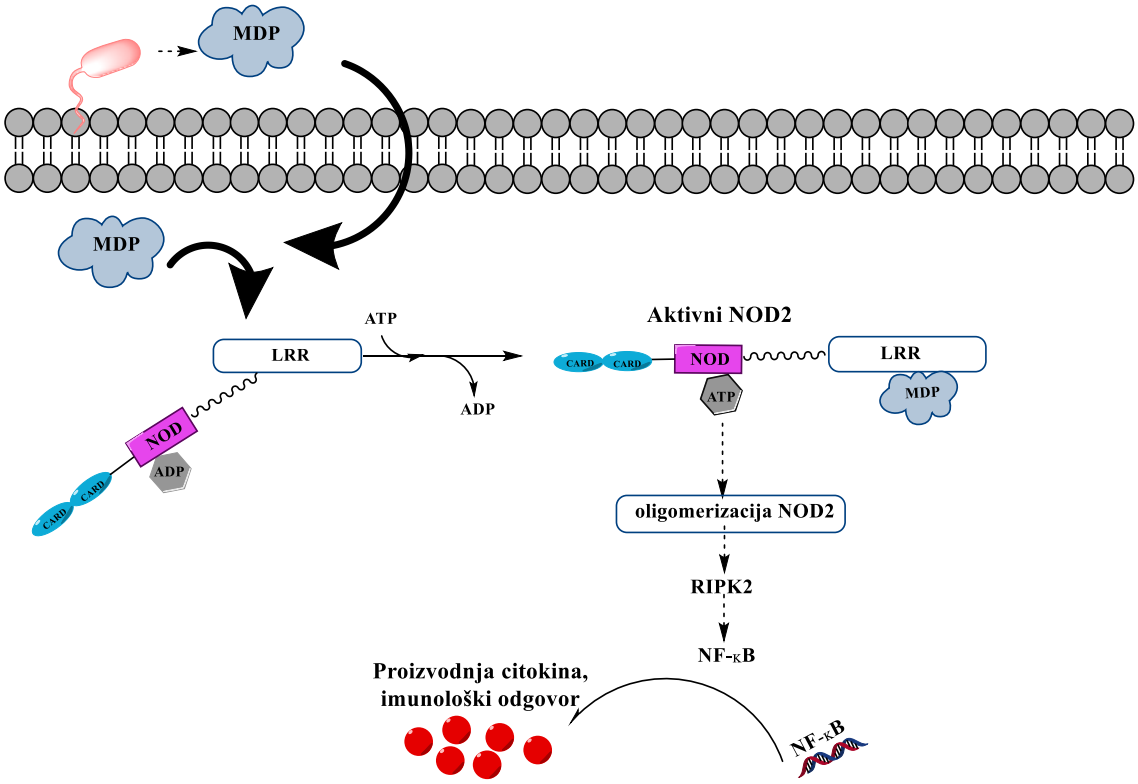
2.1.2.1. Mehanizam djelovanja muramil-dipeptida

MDP aktivira urođeni imunosni sustav na način da se veže za NOD receptore (engl. *Nucleotide Oligomerization Domain-containing*), porodicu citoplazmatskih proteina. Jedan od takvih proteina je i intracelularni protein NOD2. On pripada skupini evolucijski očuvanih receptorskih proteina (engl. *Pattern Recognition Receptors,* PRR), sudjeluje u staničnom prepoznavanju peptidnih fragmenta te pripada ljudskom urođenom imunosnom sustavu. NOD2 ima sposobnost prepoznavanja slijeda Mur*N*Ac-L-Ala-D-*iso*Gln, odnosno fragmenta prisutnog u muramil-dipeptidu, te se može reći da NOD2 protein zapravo sudjeluje u signaliziranju odgovora na peptidoglikanski fragment, fragment koji je prepoznat kao molekularni uzorak povezan s patogenom. Zanimljivo je da se NOD2 mutacije često uočavaju u bolesnika s Crohnovom bolešću, autoimunim poremećajem, što ukazuje na značaj MDP-NOD2 puta u aktiviranju imuniteta.

NOD2 pripada obitelji ATP-aza čija je uloga prijenos signala uz pomoć izmjene ADP-a za ATP te se sastoji od dvije *N*-terminalne domene za regrutiranje kaspaze (engl. *Caspase Activation and Recruitment Domain,* CARDs), oligomerizacijske domene koja veže nukleotide (NOD) i regije bogate leucinom (engl. *Leucine Rich Repeat Domain,* LRR) za koju se zna da djeluje kao senzor za MDP. Također, eksperimentalno je utvrđeno koji su aminokiselinski ostatci odgovorni za MDP-NOD2 interakciju. To su redom Phe831, Arg857, Trp911 i Ser913.

Osim toga, utvrđeno je da i šećerni i peptidni dio utječu na vezanje za NOD2 receptor i to uz pomoć aromatskog bočnog ogranka Trp911.

Nakon vezanja muramil-dipeptida za NOD protein odnosno LRR regiju, dolazi do složenih konformacijskih promjena kako bi se dogodila ADP-ATP izmjena. Ona omogućuje dodatne povoljne strukturne promjene u NOD proteinu koje rezultiraju oligomerizacijom proteina te CARD-CARD interakcijama s enzimom RIP2 (engl. *Receptore-Interaction Protein 2*, RIP2) - kinazom koji pak aktivira NF-κB (engl. *Nuclear Factor Kappa B*) proteinski kompleks. Aktivacija navedenog kompleksa rezultira proizvodnjom antigen specifičnih T-stanica, odnosno imunosnim odgovorom (slika 4).



Slika 4: Vezanje MDP-a na NOD2 protein[12]

2.1.3. Desmuramil-dipeptid

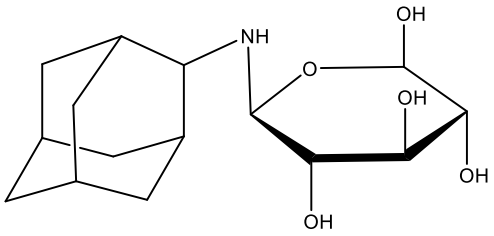
Kao što je ranije navedeno, prisutnost *N*-acetil-D-glukozamina u strukturi derivata MDP-a nije ključna za njihovu imunostimulirajuću aktivnost. Iz tog razloga, u novijim se istraživanjima navedeni dio strukture potpuno modificira ili zamjenjuje nekom drugom funkcijskom

skupinom. Tako su priređeni novi derivati MDP-a bez *N*-acetil-D-glukozamina, koji se nazivaju desmuramil-dipeptidi i najmanje su jedinice peptidoglikana koje posjeduje adjuvantsku aktivnost.[1,9]

2.1.3.1. Lipofilni derivati desmuramil-dipeptida

Dokazano je da molekule desmuramil-dipeptida (DMP) ulaze u stanicu pasivnom apsorpcijom, koja pak izravno ovisi o njihovoj lipofilnosti. Iz tog razloga, u strukturu desmuramil-dipeptida uvode se lipofilne jedinice čime se omogućuje bolja ugradnja u lipofilni dvosloj membrane, a samim time i bolja imunomodulacijska aktivnost. Jedan od načina poboljšavanja lipofilnosti desmuramil-dipeptida jest uvođenje adamantilne podjedinice ili ugljikovodičnog lanca. Poznato je da veliki broj spojeva koji u strukturi sadrže adamantilnu podjedinicu pokazuje različite biološke učinke. Naime, adamantilna strukturna jedinica odlikuje se dobro definiranom 3D konformacijom, hidrofobnošću i, možda najvažnije, lipofilnošću. Time spojevi s adamantilnom podjedinicom u svojoj strukturi posjeduju poboljšana svojstva transporta kroz biološke membrane.

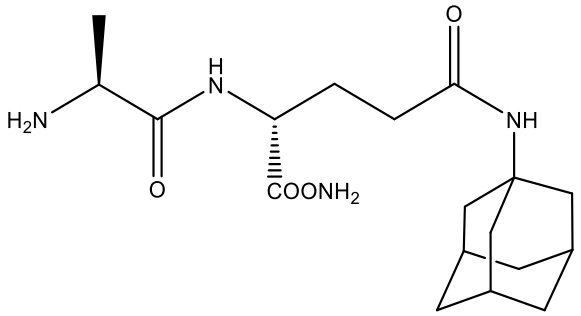
Jedan od najčešće korištenih biološki aktivnih spojeva koji u svojoj strukturi sadrži adamantilnu podjedinicu je Gludantan (slika 5), adamantaminski konjugat glukoronske kiseline koji se koristi kao antivirusno sredstvo, ali i kao lijek u liječenju Parkinsonove bolesti i depresije.[2,9,11,13]



Slika 5: Strukturna formula molekule Gludantana- lijeka za liječenje Parkinsonove bolesti i depresije

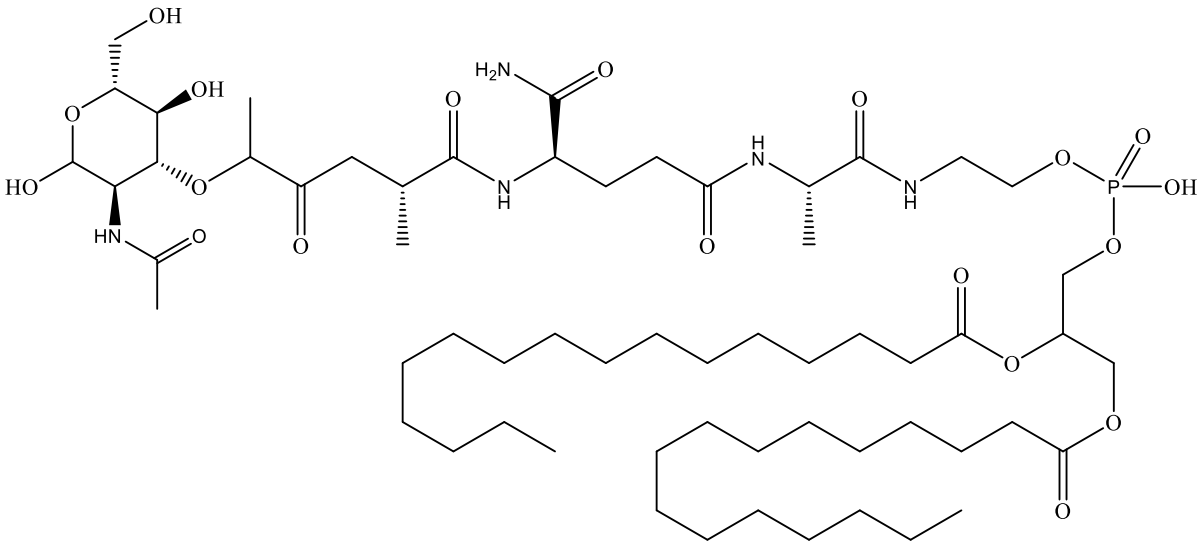
Uvođenje adamantilne podjedinice u strukturu desmuramil-dipeptida vrlo je dobro istraženo. Tako je, primjerice, sintetiziran adamantanom supstituirani desmuramil-dipeptid, adamantilamid-dipeptid (AdDP), koji u svojoj strukturi sadrži 1-adamantamin – poznato antivirusno sredstvo. Adamanilna podjedinica vezana je amidnom vezom preko karboksilne skupine bočnog ogranka D-izoglutamina (slika 6). AdDP se pokazao kao netoksičan i učinkovit

adjuvant. Nadalje, adamantanska skupina vezana je i na DMP u kojem je *N*-acetilglukozaminska jedinica iz MDP-a zamijenjena adamantilglicinom pri čemu su priređeni izomeri povezani preko atoma ugljika C-1 i C-2 adamantilnog prstena. Svi sintetizirani tripeptidi također su pokazali imunomodulatorsku aktivnost te je također uočena razlika u djelovanju s obzirom na slijedove D-L-D i L-L-D.



Slika 6: Strukturna formula molekule adamantilamid-dipeptida(AdDP), spoja s adjuvantskim svojstvima

Za razliku od derivata desmuramil-dipeptida koji u svojoj strukturi sadrže adamantilnu podjedinicu, uvođenje nerazgrananog ugljikovodičnog lanca u strukuru DMP-a znatno je manje istraženo. Poznato je nekoliko derivata DMP-a koji u svojoj strukturi posjeduju navedeni lanac te se koriste u kliničke svrhe. Tako je primjerice mifamurtid, koji je po strukturi liposomski muramil-tripeptid-fosfatidil-etanolamin, L-MTP-PE (engl. *Liposomal Muramyl Tripeptide Phosphatidyl Ethanolamine*, L-MTP-PE*)*, svoju primjenu pronašao u liječenju osteokarcinoma. Navedeni spoj povećava imunosni odgovor te se kao takav koristi kao adjuvant u standardnoj kemoterapiji.[9]



Slika 7: Strukturna formula molekule mifamurtida, lipofilnog derivata muramil-dipeptida, s medicinskom primjenom[14]

2.1.3.2. Manozilirani derivati desmuramil-dipeptida

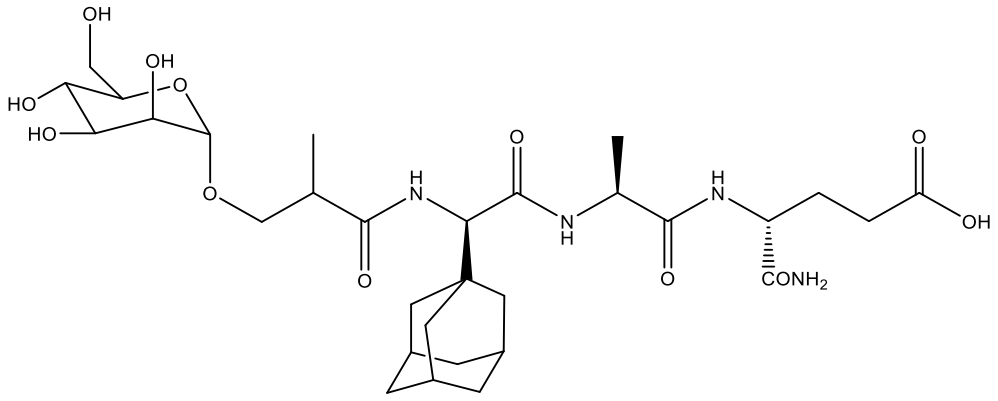
Lektini su proteini koji imaju sposobnost specifičnog i reverzibilnog vezanja šećerne strukture (monosaharide i oligosaharide), te sami ne pokazuju katalitičku aktivnost. Iako u prirodi postoji na stotine saharida, lektini imaju sposobnost prepoznavanja samo njih nekoliko. Aktivni dio lektina odgovoran za vezanje šećera naziva se i CRD (engl. *Carbohydrate-Recognition Domain*) te se on na temelju aminokiselinskog slijeda i biokemijskih svojstava može podijeliti na četiri tipa – C, S, P i I. Jedan od lektina je i protein specifičan za vezanje manoze ili MBP (engl. *Mannose-binding protein*), koji sadrži CRD tipa C.

MBP-i su široko rasprostranjeni u ljudskom serumu te imaju funkciju obrane domaćina od patogenih organizama. MBP ima sposobnost vezanja patogena preko C-kraja polipeptidnog lanca, dok preko N-kraja na sebe veže makrofage. Time omogućuje fagocitozu te aktivaciju urođenog imunosnog sustava. Manozni receptori nalaze se i na površini endotelnih stanica te na makrofazima što im daje ulogu u urođenoj imunosti. Manozni receptori također se nalaze i na dentritičkim stanicama koje prezentiraju antigen T-stanicama imunosnog sustava, nakon čega slijedi humoralni odgovor ili stanični imunosni odgovor. Iz tog razloga, manozni receptori smatraju se receptorima za prepoznavanje patogena budući da imaju sposobnost prepoznavanja komponenata povezanih s patogenima. Posreduju endocitozi i fagocitozi te otpuštanju citokina

kojima se utječe na stečenu imunost, odnosno predstavljaju vezu između urođene i stečene imunosti.

Istraživanja su pokazala da uvođenje manoze u strukturu desmuramil-dipeptida može imati značajnu ulogu u stimulaciji imunosnog odgovora. Naime, vezanje manoze na desmuramil-dipeptid može pridonijeti prepoznavanju desmuramil-dipeptida od strane već spomenutih specifičnih manoznih receptora eksprimiranih u imunosnim stanicama. Drugim riječima, uvođenje manoze u strukturu potencijalnog adjuvanta može uvelike pridonijeti prepoznavanju navedene molekule od strane staničnih receptora pa tako i povećati imunosni odgovor u organizmu.

Iz navedeno razloga, sintetiziran je niz derivata desmuramil-dipeptida koji u svojoj strukturi sadrže manoznu podjedinicu.[2] Također, ispitan je utjecaj manoze na adjuvantnu aktivnost adamantil-tripeptida. Kod navedenih spojeva mijenjana je stereokemija na poveznici između manoze i adamantil-tripeptida te stereokemija na aminokiselinskom dijelu molekule. Tako je utvrđeno da je za stimulaciju imunosnog odgovora poželjna *R*-konfiguracija na hidroksiizobutirilnoj poveznici. Najbolju adjuvantnu aktivnost u *in vivo* eksperimentima pokazao je derivat ManAdTP (slika 8) koji ima D-konfiguraciju na (adamant-1-il)glicinskom dijelu te očekivano *R*-konfiguraciju na hidroksiizobutirilnoj poveznici. Taj je glikopeptid pokazao jednako dobar imunostimulacijski učinak kao i PGM, koji je i sam učinkovit adjuvant. U prilog navedenom spoju ide i to što nije toksičan, pokazuje veliku stabilnost te dobru topljivost u vodi.[1,2,9]

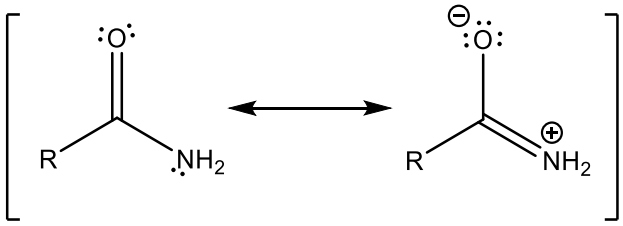


Slika 8: Strukturna formula molekule manoziliiranog adamantilnog derivata DMP-a s izrazito dobrim adjuvantnim svojstvima

2.2. Načini priprave amida

2.2.1. Struktura i važnost amida

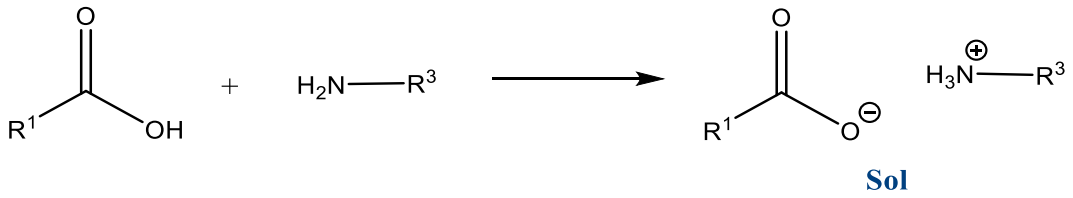
Amidi su derivati karboksilnih kiselina koji u svojoj strukuri, osim karbonilne, posjeduju i amino-skupinu izravno vezanu na karbonilni ugljikov atom. Naime, zbog rezonancijske stabilizacije zahvaljući elektron-donorskim svojstvima dušikova atoma te delokalizacijom njegovog slobodnog elektronskog para, amidi spadaju u najstabilnije derivate karboksilnih kiselina (slika 9).



Slika 9: Rezonancijska stabilizacija amida[15]

Najrasprostranjeniji i najpoznatiji primjer amidne veze svakako je peptidna veza, odnosno veza kojom se aminokiseline povezuju u veće strukture tvoreći peptide različitih veličina, pa sve do proteina. Osim u sastavu proteina te prirodnih i sintetičkih polimera, amidna veza prisutna je u strukturi brojnih bioaktivnih molekula, kako onih prirodnih tako i onih pripravljenih u laboratoriju. Povoljna svojstva kao što su visoka polarnost, već spomenuta visoka stabilnost, te konformacijska raznolikost, čine amidnu skupinu jednom od najpopularnijih funkcijskih skupina u svim granama organske kemije.

I dok u biološkim organizmima amidna veza može nastati u različitim biosintetskim putevima uključujući sintezu peptida koja se odvija na ribosomima, ATP-ovisnu sintezu te druge enzimske puteve temeljene na raznim enzimima, u organskoj sintezi nastanak amidne veze nije uvijek trivijalan. Naime, iako su amidi najstabilniji derivati karboksilnih kiselina, neće nastati reakcijom između amina i karboksilne kiseline. U takvoj će reakciji umjesto amida doći do izmjene protona te će u pravilu nastati vrlo stabilna sol (slika 10).[16-18] Nastajanje soli može se izbjeći provođenjem reakcije na visokoj temperaturi (160 °C – 180 °C), no budući da se veliki broj organskih spojeva raspada ili podliježe drugim neželjenim reakcijama već pri znatno nižim temperaturama, takav pristup sintezi amida uglavnom se izbjegava.



Slika10: Kiselo-bazna reakcija između karboksilne kiseline i amina

Dodatan problem kod nastanka amidne veze može stvarati i prisutnost drugih hidroksilnih ili amino-skupina u molekulama reaktanata koje je u pravilu potrebno zaštititi odgovarajućim zaštitnim skupinama. Također, uvijek je potrebno uzeti u obzir pitanje moguće racemizacije ukoliko se kao polazni reaktanti koriste kiralni, a ne racemični spojevi. Sve to tjera kemičare da se sve više priklanjaju egzotičnijim i skupljim reagensima za sintezu amida, a nove i inovativne metode amidacije sve su traženije u kemijskoj i farmaceutskoj industriji.[16-19]

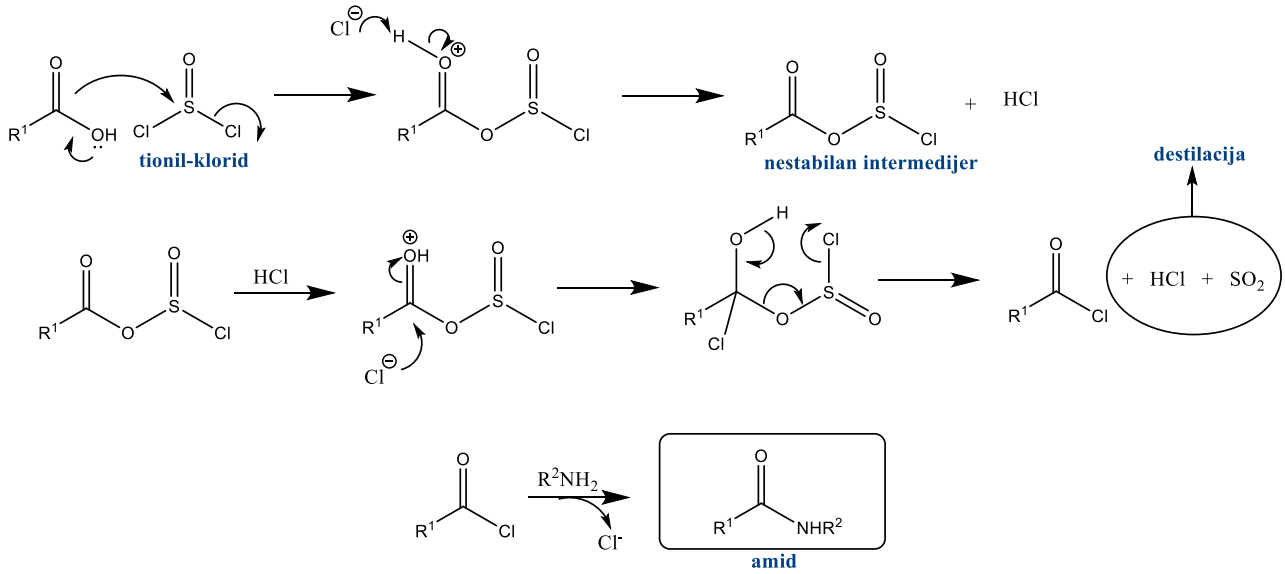
2.2.2. Kondenzacijski reagensi

Jedan od najčešćih pristupa u sintezi amidne veze je taj da se karboksilna kiselina prevede u neki svoj aktivirani oblik pomoću raznih reagensa. Nastali međuprodukt dalje može lako reagirati s aminom kao nukleofilom dajući amid. Aktivacija podrazumijeva prevođenje hidroksilne skupine karboksilne kiseline u bolju izlaznu skupinu prije reakcije s aminom. Tako se karboksilna kiselina može prevesti u reaktivne međuprodukte kao što su kiselinski halogenidi, mješoviti anhidridi, anhidridi ugljične kiseline ili aktivirani esteri koji se u nekim slučajevima mogu, a u drugima ne mogu izolirati. U nastavku ćemo razmotriti primjenu nekih od najpopularnijih kondenzacijskih reagensa.[20,21]

2.2.2.1. Tionil-klorid

Jedan od najjednostavnijih reagensa koji se koristi za pretvorbu karboksilnih kiselina u amide je tionil-klorid ($SOCl_2$). Budući da je tionil-klorid vrlo hlapljiva tekućina, njegov se suvišak može lako ukloniti destilacijom, a odlikuje se i pristupačnom cijenom. U navedenoj reakciji karboksilna kiselina prevodi se u svoj reaktivni derivat – acil-klorid koji dalje reagira s aminom kao nukleofilom dajući amid (slika 11).[15,19] Reakcija acil-klorida i amina odvija se mehanizmom nukleofilne supstitucije karakterističnim za karboksilne kiseline i derivate. Navedena reakcija u pravilu se provodi uz dodatak odgovarajuće nenukleofilne baze kao što je

trietilamin ili *N*-metilmorfolin kako bi se neutralizirao nastali klorovodik. Također, reakcija se često ubrzava dodatkom katalitičkih količina piridina ili *N*,*N*-dimetiaminopiridina (DMAP).

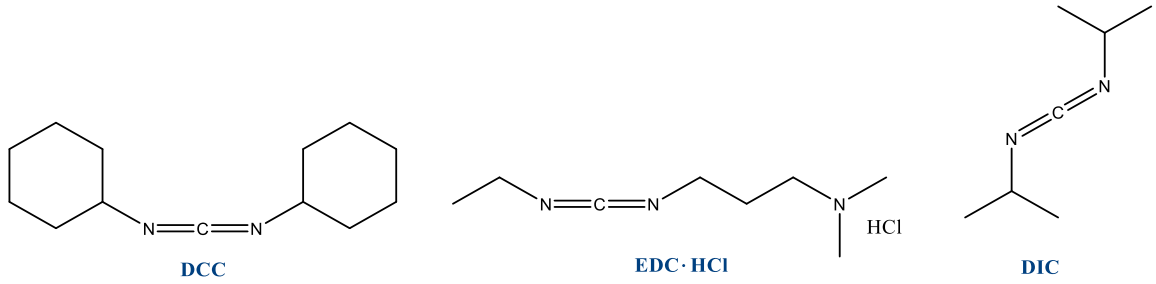


Slika 11: Nastanak amida iz karboksilne kiseline pomoću tionil-klorida

Međutim, iako je pretvorba karboksilnih kiselina u amide pomoću tionil-klorida u mnogim slučajevima vrlo uspješna, tionil-klorid ima i svoje loše strane. Glavni nedostatak tionil-klorida jest taj da je on iznimno nagrizujuća i korozivna tvar, pa se njegova uporaba, naročito u industriji, odnosno u radu na većim skalama, često izbjegava. Osim toga, u navedenoj reakciji dolazi do nastanka klorovodika, odnosno znatnog porasta kiselosti reakcijske smjese, čime može doći do raznih neželjenih reakcija. Također, u mnogim slučajevima dolazi i do racemizacije željenog spoja.[16]

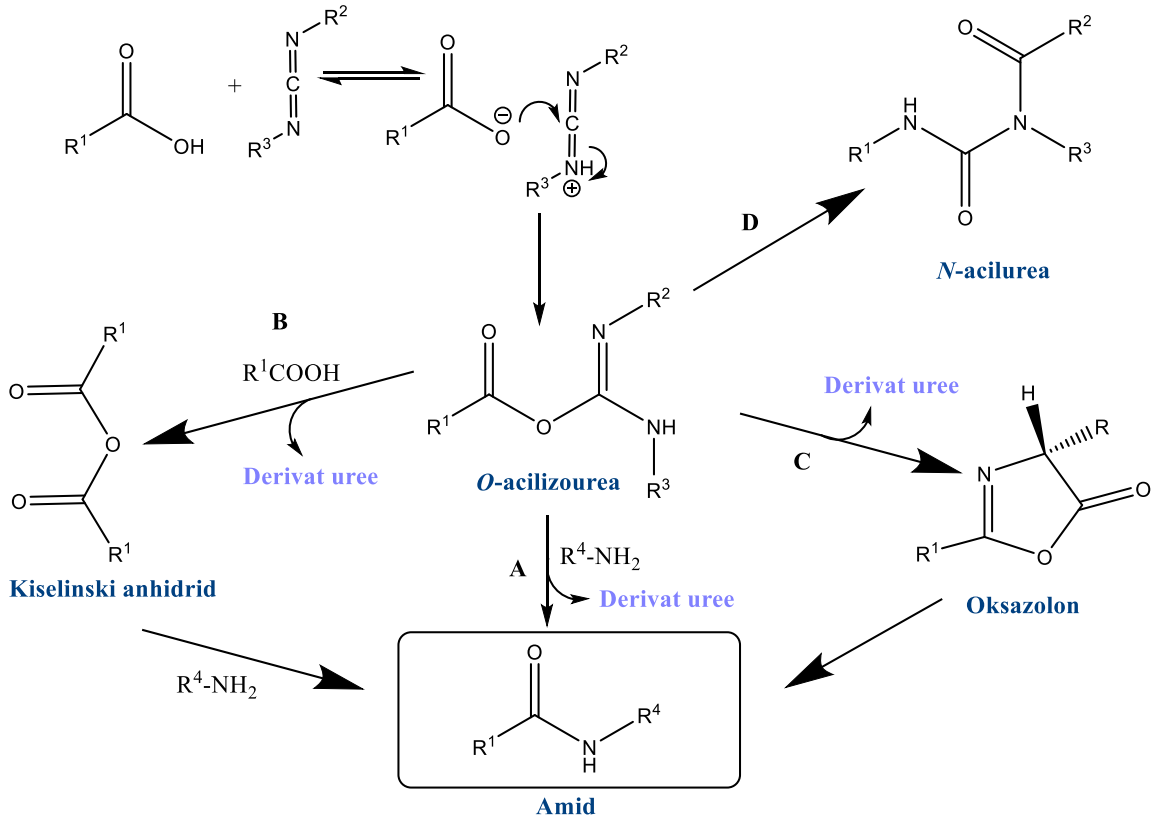
2.2.2.2. Karbodiimidi

Najpopularnija in-situ sredstva za kondenzaciju u pripravi amida su karbodiimidni reagensi. Jedan od prvih takvih reagensa je *N*,*N*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC, slika 12) koji se koristi kao kondenzacijski reagens od 1955 godine. Osim DCC-a, poznati kondenzacijski karbodiimidni reagensi su također i *N*,*N*'-diizopropilkarbodiimid (DIC) te *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilkarbodiimid-hidroklorid (EDC·HCl).



Slika 12: Strukturne formule molekula najčešćih karbodiimidnih kondenzacijskih reagensa

Djelovanje karbodiimida kao kondenzacijskog reagensa prikazano je na slici 13. U prvom koraku dolazi do reakcije između karbodiimida i karboksilne kiseline. Naime, u strukturi karbodiimida dva su slabo bazična dušikova atoma što je dovoljno kako bi se pokrenula reakcija i došlo do nastanka *O*-acilizouree. Ovaj međuprodukt može dalje reagirati na različite načine. Amid tako može nastati izravnim spajanjem s aminom uz odgovarajući derivat uree kao nusprodukt (put **A**). Osim toga, međuprodukt *O*-acilizourea može reagirati s drugom molekulom karboksilne kiseline dajući simetrični anhidrid (put **B**) koji daljnjom rekcijom s aminom daje željeni amid. Amid može nastati i na treći način, odnosno *O*-acilizourea može ciklizirati tvoreći odgovarajući oksazolon (put **C**) koji se prevodi u amid. U svim navedenim reakcijama dolazi do oslobađanja odgovarajućeg derivata uree koji se odlikuje visokom stabilnošću što je i pokretačka sila za provođenje ove reakcije. Osim željenog amida, moguća je i neželjena reakcija u kojoj dolazi do pregradnje *O*-acilizouree do *N*-aciluree (put **D**) koja dalje ne može reagirati.[16,20,22-23]



Slika 13: Nastanak amidne veze uz odgovarajući karbodiimidni kondenzacijski reagens

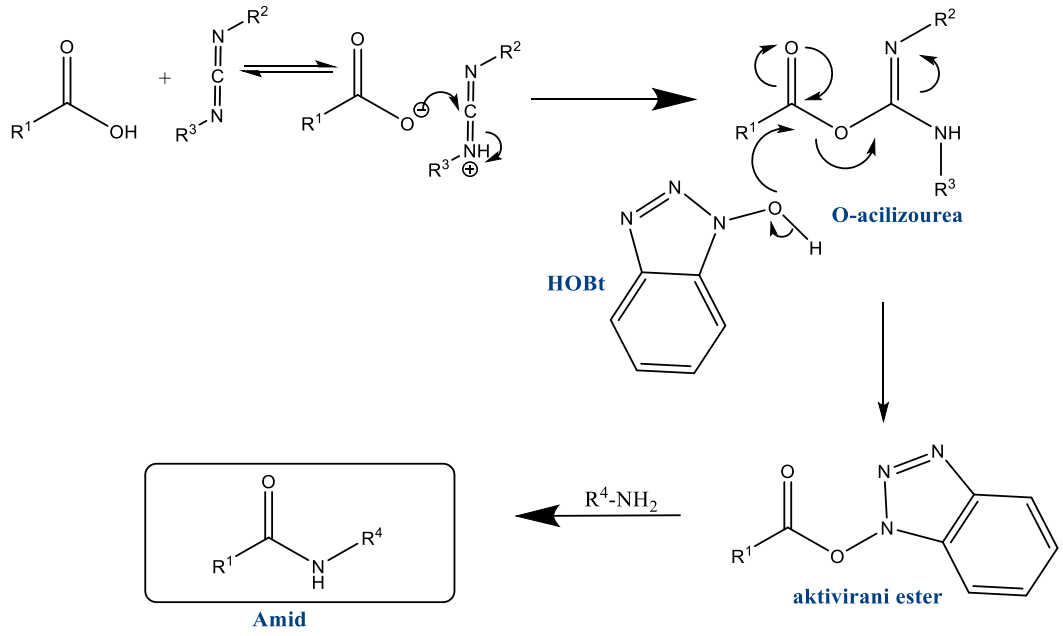
Svaki od karbodiimidnih reagensa ima određene prednosti, ali i nedostatke. Iako je DCC jedan od najdulje korištenih kondenzacijskih reagensa, njegova uporaba se smanjuje. Naime, tijekom kemijske reakcije kao nusprodukt nastaje dicikloheksilurea čija je topljivost u većini organskih otapala znatna, pa je njeno uklanjanje iz reakcijske smjese ekstrakcijom otežano. Međutim, DCC se i dalje intenzivno koristi prilikom sinteze peptida iz aminokiselina zaštićenih *tert*-butiloksikarbonilnom (Boc) zaštitnom skupinom. Naime, dicikloheksilurea se može ukloniti iz reakcijske smjese u prisutnosti trifluoroctene kiseline koja se uobičajno koristi za uklanjanje Boc zaštitne skupine.

DCC u sve više slučajeva u otopinskoj sintezi zamjenjuje EDC. Kod primjene EDC-a kao nusprodukt nastaje urea dobro topljiva u vodi, pa se lako može ukloniti iz reakcijske smjese ekstrakcijom. Za razliku od EDC-a, DIC je svoju primjenu kao kondenzacijski reagens pronašao u sintezi peptida na čvrstoj fazi.[20,24-25]

2.2.2.2.1. Sprječavanje racemizacije

Kao što je navedeno, u određenim slučajevima *O*-acilizolurea može tvoriti oksazolon pri čemu dolazi do epimerizacije što je osobito problematično kod aktivacije karboksilnih skupina koje sadrže stereokemijski definirani α-položaj, kao što su aminokiseline. Kako bi se smanjila epimerizacija u slučaju korištenja karbodiimida, Koenig i Geiger uveli su korištenje 1-hidroksi-1*H*-benzotriazola (HOBt) kao aditiva, odnosno sredstva za sprečavanje epimerizacije. Navedeni su aditivi upravo iz gore spomenutog razloga postali gotovo nezamjenjivi u sintezi peptida.[20]

Vjeruje se da HOBt djeluje tako da u početku reagira s *O*-acilizoureom dajući još reaktivniji oblik kiseline – aktivirani ester (slika 14). Navedeni ester može vrlo brzo reagirati sa željenim aminom budući da je pristup amina stabiliziran vodikovom vezom. Također, navedeni aditivi sprječavaju stvaranje *N*-aciluree, pa samim time povećavaju iskorištenje reakcije. Osim HOBt-a kao aditiv se može koristiti HOAt (1-hidroksi-7-azabenzotriazol) koji u određenim slučajevima daje bolje rezultate nego HOBt.[20,23,25]

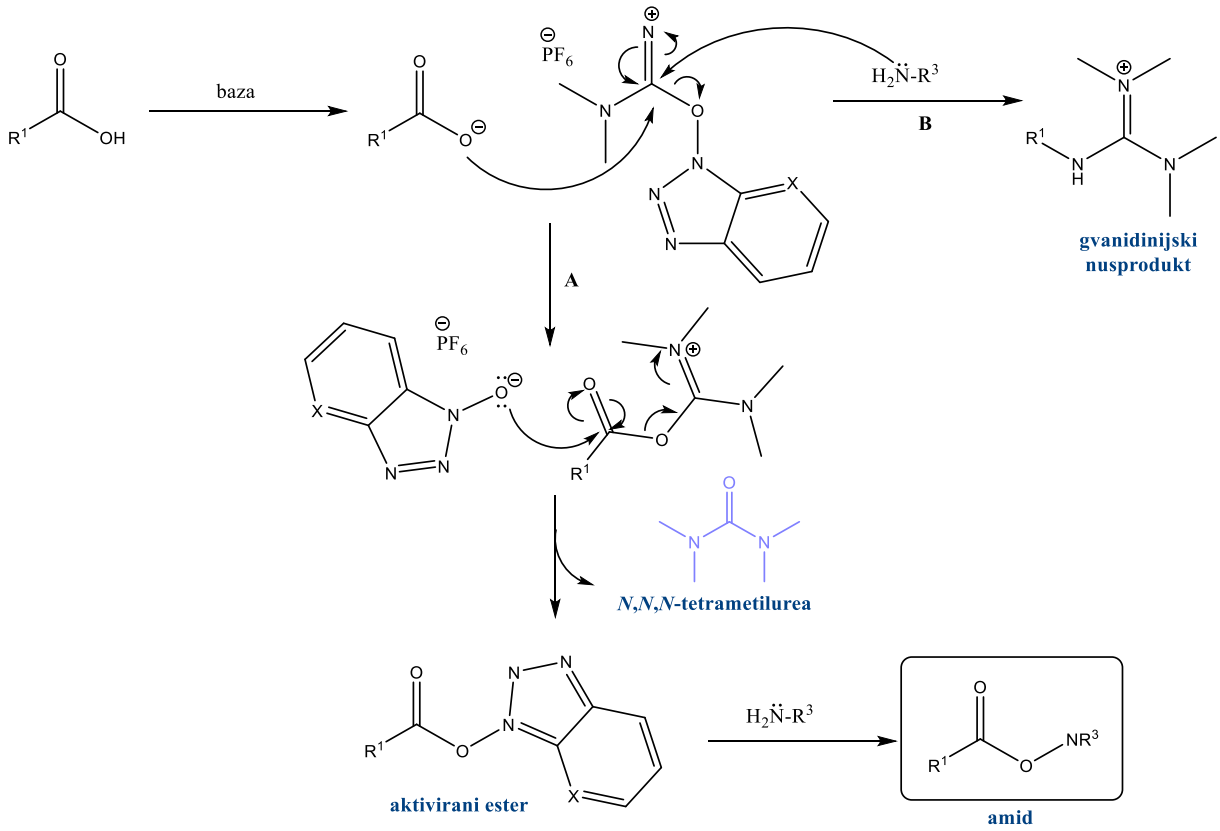


Slika 14: Uloga HOBt-a u sprječavanju racemizacije

*2.2.2.2. Kondenzacijski reagensi na bazi 1-hidroksi-1*H*-benzotriazola*

Bazirajući se na HOBt-u i ostalim aditivima za sprečavanje racemizacije, razvila se nova vrsta kondenzacijskih reagensa koji u svojoj strukturi sadrže benzotriazol te uronjievu/iminijevu ili

fosfonijevu sol. Najčešće korišteni reagensi ovog tipa su *O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetrametiluronijev haksafluorofosfat, odnosno HBTU, te slični spojevi kao ime (HATU) ili ime (TBTU). Navedeni reagensi djeluju na način da reagiraju s karboksilnim kiselinama stvarajući nestabilnu *O*-acilizouronijevu sol (slika 15). Ona dalje može reagirati s benzotriazolnim anionom dajući aktivirane estere koji reagiraju s aminima (put **A**). Tijekom kondenzacije estera aktiviranog benzotriazolom dolazi i do nastanka stabilnog nusprodukta tetrametiluree što je ujedno i pokretačka sila za provođenje ove reacije. Treba imati na umu da osim željene karboksilne kiseline i amin može reagirati s kondenzacijskim reagensom stvarajući gvanidin kao nusprodukt (put **B**). Iz tog razloga kod ovakvih reakcija redoslijed dodatka reaktanata u reakcijsku smjesu može biti od presudne važnosti, a reagensi se u pravilu dodaju u ekvimolarnom omjeru s karboksilnom kiselinom. HBTU i HATU vrlo su efikasni u sprječavanju racemizacije pri čemu HATU pokazuje nešto bolje rezultate sa sterički zahtjevnijim spojevima. Upravo zbog tog svojstva, primjena ovih reagensa je velika osobito u sintezi peptida gdje postoji najveća opasnost od racemizacije.[16,20,25]

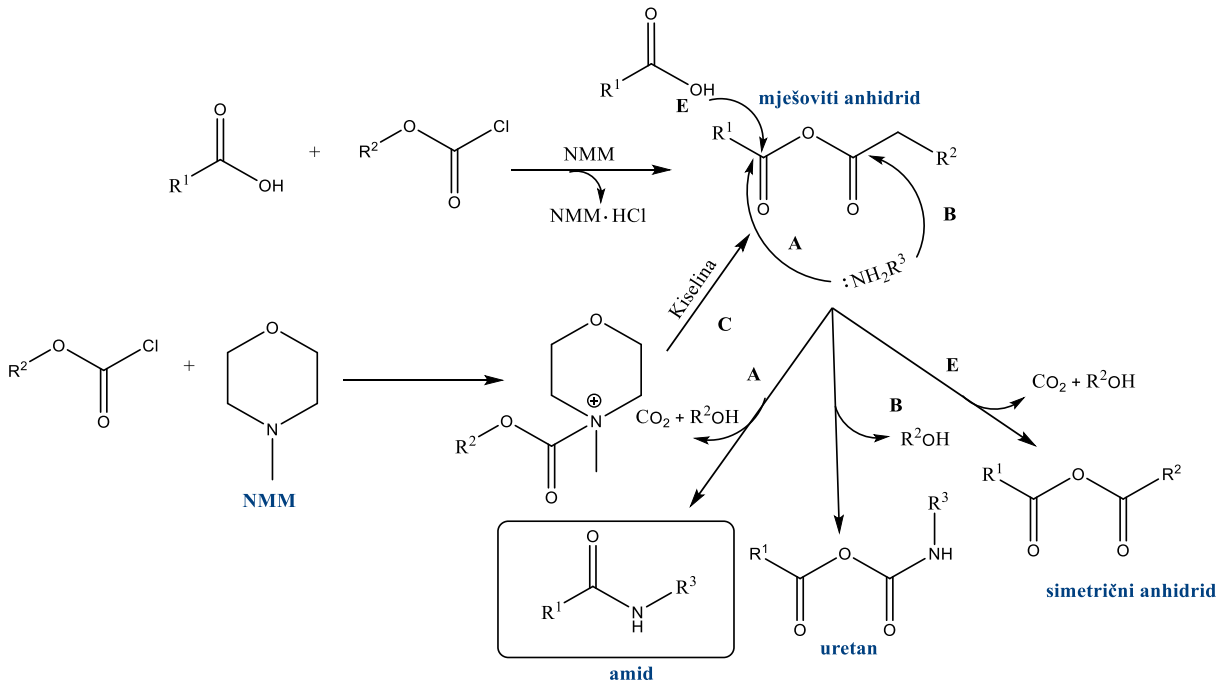


Slika 15: Mehanizam djelovanja kondenzacijskog reagensa HBTU[16]

2.2.2.3. Kondenzacija preko mješovitog anhidrida

Kondenzacija preko mješovitog anhidrida kao međuprodukta također je jedna od metoda formiranja amidne veze. Uobičajni reagensi koji se koriste u tu svrhu su klorformijatni reagensi poput *sec*-butil-klorformijata ili izobutil-klorformijata. Postoje dva različita tumačenja načina djelovanja klorformijatnog reagensa. U prvome, klorformijat reagira s karboksilnom kiselinom u prisutnosti baze kao što je *N*-metilmorfolin (NMM) tvoreći odgovarajući mješoviti anhidrid (slika 16). Po drugoj teoriji *N*-metilmofolin, osim što djeluje kao baza, ima ujedno i ulogu nukleofila te napada klorformijat dajući kvaternu sol koja u reakciji s kiselinom daje mješoviti anhidrid. Jednom kad nastane, mješoviti anhidrid može reagirati s aminima dajući amid (**A**). Također, treba obratiti pažnju da sam klorformijatni reagens može reagirati i s aminom kao nukleofilom, pa se amin dodaje u reakcijsku smjesu tek nakon aktivacije kiseline.

U opisanoj reakciji potencijalni problem može predstavljati i regioselektivnost jer amin može reagirati i s drugom karbonilnom skupinom mješovitog anhidrida (**B**) tvoreći uretan pri čemu se može smanjiti iskorištenje reakcije. Također, problem kod ove reakcije je i taj da karboksilna kiselina ima tendenciju stvaranja simetričnih anhidrida reakcijom druge molekule karboksilne kiseline i nastalog mješovitog anhidrida (**E**). Tim se problemima u određenoj mjeri može doskočiti provođenjem kondenzacije na niskoj temperaturi.[20,23]



Slika 16: Nastajanje amidne veze preko mješovitog anhidrida uz klorformijatni kondenzacijski reagens

2.2.3. Zaštitne skupine

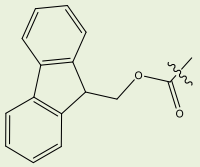
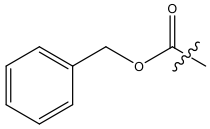
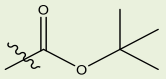
U velikom broju slučajeva željena se kemijska reakcija treba provesti selektivno na jednom reaktivnom mjestu u molekuli koja sadrži više funkcijskih skupina. Da bi se to postiglo, druga reaktivna mjesta moraju biti privremeno blokirana. Iz navedenog razloga, koriste se i razvijaju brojne zaštitne skupine. Reagens za uvođenje neke zaštitne skupine mora posjedovati određena svojstva. Primjerice, mora brzo i potpuno reagirati sa željenom funkcijskom skupinom, biti stabilan u širokom rasponu reakcijskih uvjeta te se moći sigurno i lako ukloniti na kraju sintetskog procesa ili u drugom željenom trenutku.[22,26]

2.2.3.1. Zaštita amino-skupine

Velik broj zaštitnih skupina prvotno je razvijen za potrebe sinteze peptida, no brzo je prilagođen zaštiti funkcijskih skupina različitih drugih molekula. Zaštita α-amino-skupine aminokiselina jedno je od najvažnijih pitanja u kemiji peptida te nužnost da bi se spriječila polimerizacija aminokiseline nakon aktivacije. Budući da se većina sinteza peptida, kako u otopini tako i na čvrstoj fazi, događa u smjeru od C-terminusa prema N-terminusu, zaštitne skupine na amino-skupinama uklanjaju se nekoliko puta tijekom sinteze. Iz tog razloga, njihovo se uklanjanje mora odvijati u blagim reakcijskim uvjetima koji ne utječu na preostale zaštitne skupine prisutne u molekuli koje se u pravilu uklanjaju na kraju sintetskog procesa. Također, reagensi za uvođenje zaštitnih skupina na amino-skupinu trebali bi biti topljivi u najčešće korištenim organskim otapalima te isto tako sprječavati ili minimizirati epimerizaciju tijekom reakcije. Konačno, uklanjanje zaštitnih skupima trebalo bi biti brzo i učinkovito.

U tablici 1 navedeno je nekoliko najčešćih zaštitnih skupina koje se koriste za zaštitu amino-skupine kako kod aminikiselina tako i kod drugih spojeva koji je sadrže u strukturi.[22]

Tablica 1: Najčešće korištene zaštitne skupine za amino-skupinu[15,22,26]

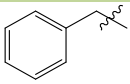
Zaštitna skupina	Struktura	Način uvođenja	Način uklanjanja	Karakteristike
9-fluorenilmetoksikarbonil (Fmoc)		Fmoc-Cl, Fmoc-Osu, Fmoc-N_3	20 % piperidin/DMF ili 1-5 % DBU/DMF ili morfolin/DMF (1:1)	Otpornost na kisele uvjete
Benzolikarbonil (Cbz)		Cbz-klorid/slaba baza	Katalitičko hidrogeniranje ili uz jake kiseline (HBr u octenoj kiselini)	Opornost prema elektrofilima i slabim kiselinama (primjerice TFA)
tert -butiloksikarbonil (Boc)		(*t*-BuOCO)$_2$O/ baza	25-50 % TFA/ DCM ili HCl (c = 4 mol dm^{-3}) /dioksan ili $MeSO_3H$/dioksan	Otpornost na baze, nukleofile te katalitičko hidrogeniranje

2.2.3.2. Zaštita karboksilne skupine

Zaštita karboksilne skupine provodi se iz više razloga. Osim što se primarno želi spriječiti konkurentnu reakciju nukleofilne supstitucije, u određenim je slučajevima potrebno spriječiti kiselo-baznu reakciju karboksilne skupine, osobito u reakcijama u kojima je potrebna bazna kataliza. Osim toga, zaštitom karboksilnih kiselina može se smanjiti njihova topljivost u vodi kao i povećati njihova hlapljivost u svrhu analize plinskom kromatografijom. Oba se aspekta reaktivnosti karboksilnih kiselina uspješno mogu blokirati prevođenjem kiselina u estere, pa je esterska zaštita karboksilne skupine najčešći način njihovog zaštićivanja.

Hidroliza je uobičajen način uklanjanja esterskih zaštitnih skupina. Približan redoslijed reaktivnosti uobičajnih estera koji se mogu koristit kao zaštitne skupine je sljedeći: OEt < OBn < OMe < OPh < SPh < OCH_2CN < O-4-nitrofenil < OSu < OC_6Cl_5< OC_6F_5. Ti čimbenici su važni u selektivnoj zaštiti spojeva koji sadrže dvije ili više karboksilnih skupina. Neke od najčešće korištenih zaštitnih skupina za karboksilnu skupinu navedene su u tablici 2.[26]

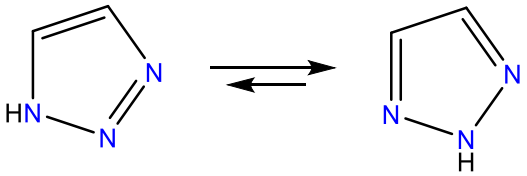
Tablica 2: Najčešće korištene zaštitne skupine za karboksilnu skupinu[15,22,26]

Zaštitna skupina	Struktura	Način uvođenja	Način uklanjanja	Karakteristike
Metil (Me)		$MeOH/H_2SO_4$ ili Me_3SiCl,MeOH	$LiOH/H_2O_2$	Otpornost na kisele uvjete
Bn (benzil)		BnOCOCl/py/DMAP	H_2, Pd/C ili HBr	U pravilu otpornost i na kiseline i na baze
tert -butil		Izobuten/H^+	TFA/DCM ili HCl/dioksan	Otpornost od nukleofila i baza

2.3. Azid-alkinska cikloadicija

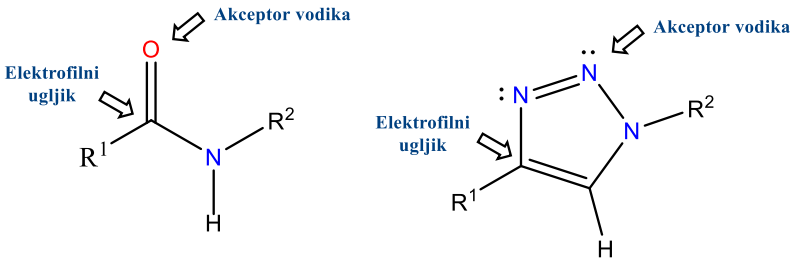
2.3.1. 1,2,3-Triazoli

Triazoli su heterociklički spojevi koji u svome prstenu imaju tri atoma dušika te dva atoma ugljika. Postoje dva strukturna izomera triazolnog prstena – 1,2,3-triazol i 1,2,4-triazol. 1,2,3-triazoli još se nazivaju i *v*-triazoli (slika 17).[15,27]



Slika 17: Strukturne formule tautomernih oblika 1,2,3-triazolnih prstena

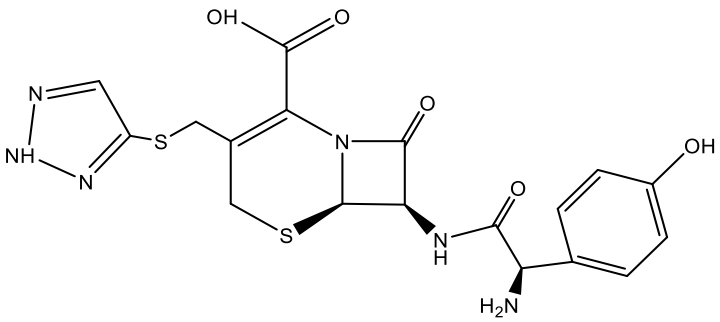
Ovi heterociklički spojevi imaju planarnu strukturu te takva elektronska svojstva i razmještaj atoma da mogu oponašati peptidnu ili fosfodiestersku vezu u biološkim sustavima. Triazoli imaju analogan profil vodikove veze kao i amidi (peptidi) (slika 18), pri čemu C2 atom djeluje kao donor vodikove veze, a atomi dušika na pozicijama 2 i 3 pomoću svojih slobodnih elektronskih parova kao njeni akceptori i to na isti način kao atomi dušika i kisika u peptidnoj vezi.[28,29]



Slika 18: Sličnost peptidne veze i 1,2,3-triazolnih prstena

Međutim, za razliku od peptidne veze, triazolni prstenovi pokazuju mnogo manju sklonost hidrolizi. Oni se zahvaljujući svojoj aromatskoj stabilizaciji odlikuju izuzetnom stabilnošću i u kiselim i u baznim uvjetima, te visokom otpornošću na oksidacijske i redukcijske uvjete. Dodatno, triazoli posjeduju i nešto veći dipolni moment u odnosu na peptidnu vezu. Zbog tog svojstva, triazoli mogu sudjelovati u stvaranju vodikovih veza te u dipol-dipol interakcijama što može uvelike utjecati na topljivost samog spoja, te isto tako i na njegovo vezanje na ciljnu molekulu u organizmu.

Navedena svojstva čine triazole vrlo zanimljivom potencijalnom strukturnom komponentom raznih biološki aktivnih spojeva te su poznati mnogi derivati 1,2,3-triazola s antimikrobnom, antitumorskom, antialergijskom te antivirusnom aktivnošću. Postoji čitav niz farmaceutski aktivnih spojeva koji u svojoj strukturi sadrže 1,2,3-triazolni prsten, a jedan od takvih je i β-laktamski antibiotik cefatrizin (slika 19), lijek koji se koristi za liječenje širokog spektra bakterijskih infekcija.[15,27-28]



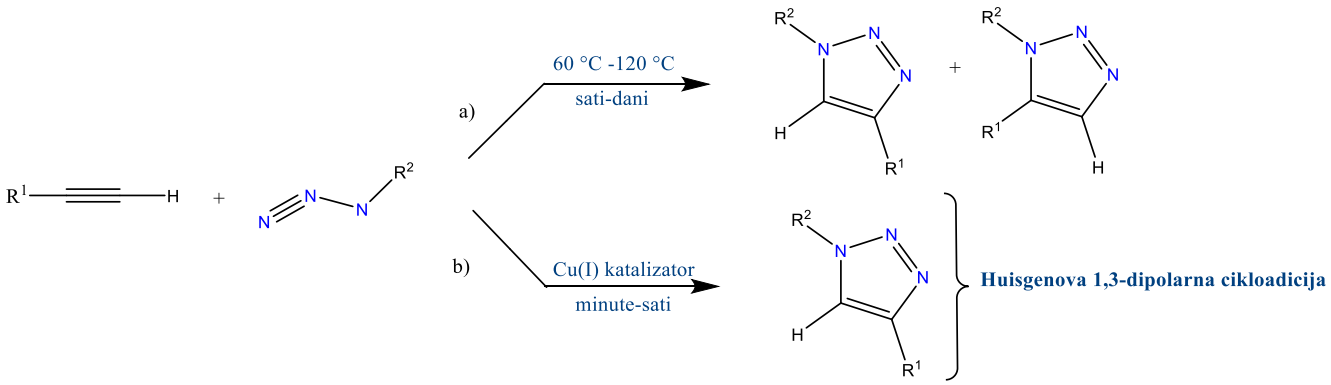
Slika 19: Strukurna formula molekule cefatrizina, biološki aktivnog spoja koji u svojoj strukturi sadrži 1,2,3-triazolni prsten[29]

2.3.2. Bakrom(I) katalizirana azid-alkinska cikloadicija (CuAAC)

Kao što je navedeno, triazoli izgrađuju strukture mnogih biološki važnih lijekova. No, zanimljivo je da se 1,2,3-triazoli ne mogu izolirati iz poznatih bioloških izvora, pa zbog nemogućnosti njihove izolacije iz prirodnih materijala, postoji dodatan interes za njihovom sintezom.[27]

Jedan od načina priprave triazolnih prstenova je reakcijom iz odgovarajućeg terminalnog alkina i azida. Međutim, iako posjeduju visokeenergijske kemijske veze, navedeni reaktanti poprilično su kinetički intertni u većini bioloških i organskih uvjeta, širokom rasponu funkcijskih skupina, te u velikom rasponu pH-vrijednosti i temperature.[28,30-31] Energija aktivacije nekataliziranog nastanka triazola iz odgovarajućeg alkina i metilazida vrlo je velika (E_a = 109 kJ/mol) te je takva reakcija na sobnoj temperaturi vrlo spora. Osim toga, kod takve reakcije postoji i problem stereoselektivnosti jer može doći do nastanka dvaju izomera: 1,4-disupstituiranog 1,2,3-triazola i 1,5-disupstituiranog 1,2,3-triazola. Budući da je u slučaju nekatalizirane reakcije energijska barijera za nastanak 1,4- i 1,5-disupstituiranih triazola vrlo slična i u pravilu dolazi do nastanka smjese produkata u omjeru 1:1, trebalo je pronaći odgovarajući katalizator za navedenu reakciju.

Jedan od vrlo učinkovitih načina stvaranja 1,4-disupstituiranih triazola jest azid-alkinska cikloadicija katalizirana bakrom(I) koja je poznata i pod nazivom Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija te spada u skupinu klik-reakcija (slika 20).[28,31-33]



Slika 20: Nastanak 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazola iz odgovarajućih azida i alkina a) bez i b) sa dodatka bakrovog(I) katalizatora

Cu(I)-katalizirana 1,3-cikloadicija je do 10^7 puta brža od nekatalizirane reakcije, a uvođenje bakra(I) u reakciju dovelo je i do drastičnog povećanja njezine selektivnosti, pa tako

u navedenoj reakciji dolazi do nastanka samo 1,4-disupstituiranog produkta. Navedena reakcija može se odvijati u vrlo velikom rasponu temperature uključujući i sobnu temperaturu te u nekim slučajevima čak i potpomognuta mikrovalnim zračenjem. Zanimljivo je i da sterička te elektronska svojstva supstituenata ne utječu bitno na tijek katalizirane reakcije. Osim toga, konačni produkt reakcije u pravilu nije potrebno značajno pročišćavati. Reakciju je najbolje provoditi u vodenom mediju, no uspješno se provodi i u drugim otapalima kao što su primjerice acetonitril, THF, *tert*-butilnol te aceton.

Klik-reakcija u pravilu pokazuje veliku toleranciju prema nezaštićenim alkoholima i karboksilnim kiselinama, kao i prema sterički ometanim spojevima. Upravo zbog toga triazolni se prsten nastao pomoću klik-reakcije, zahvaljujući svojoj stabilnosti, u velikom broju slučajeva koristi kao inertni linker, odnosno poveznica između različitih dijelova molekule. Ova značajka samo je pridonijela popularnosti klik-reakcije budući da omogućuje sintezu složenih organskih sustava čiji fragmenti u uvjetima u kojima se reakcija provodi ne mijenjaju svojstva.

Posljedično, potencijalna primjena Cu-kataliziranih klik-reakcija je velika. S jedne strane, navedena reakcija može se koristiti za povezivanje raznih peptida s ugljikohidratima te raznim drugim organskim molekulama te polimerima. S druge strane, 1,2,3-triazolne jezgre mogu činiti osnovu malih farmaceutski aktivnih molekula. Zbog toga je ova reakcija naišla na veliku primjenu u kemiji, biologiji te sintezi raznih materijala kao i bioloških važnih spojeva.[27-28,31-32]

2.3.2.1. Izvori bakra u azid-alkinskoj cikloadiciji

Budući da je bakar u oksidacijskom stanju (I) poprilično nestabilan, u azid-alkinskoj cikloadiciji određenu pažnju treba usmjeriti na odabir odgovarajućeg izvora bakra. Bakar(I) u reakciju se može uvoditi izravno ili se može generirati *in situ*. Bakar(I) vrlo se lako može oksidirati do bakra(II) koji je katalitički inaktivan. On pak može dodatno djelovati kao oksidacijsko sredstvo te uzrokovati nastanak neželjenih produkata.

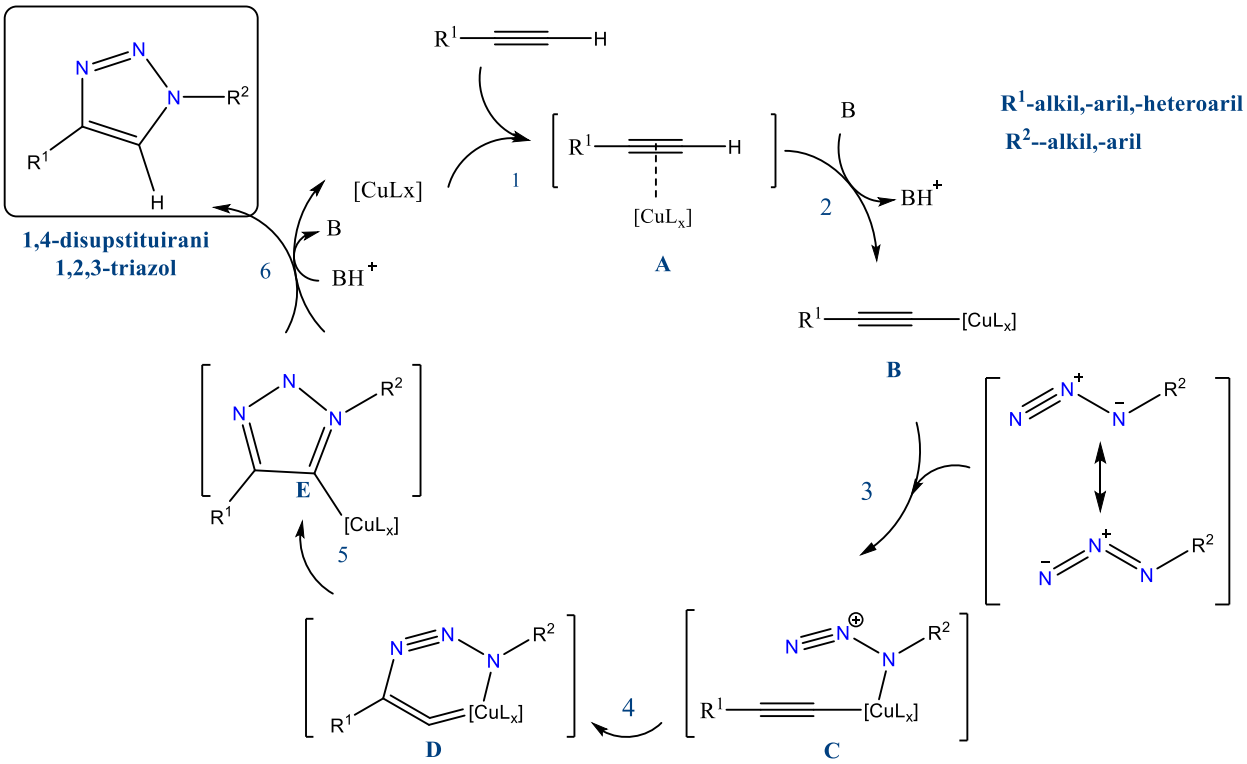
Odabir katalizatora jako ovisi o reakcijskim uvjetima. Primjerice, u slučaju polarnih supstrata kao otapalo se koristi voda, dok je izvor bakra bakrov(II) sulfat. U tom slučaju je bakar(II) potrebno prevesti do bakra(I) uz odgovarajuće redukcijsko sredstvo kao što je natrijev askorbat. Dodatno, bakar(I) se može u sustav uvoditi i izravno, no u tom slučaju poželjno je da bude koordiniran određenim ligandima koji sprječavaju njegovu oksidaciju, ali mogu i poboljšati katalitička svojstva. Neki od takvih liganda su TBTA (tris[(1-benzil-1*H*-1,2,3-

triazol-4-il)metil]amin), te batofenantrolin. Također, navedeni ligandi ponekad mogu djelovati kao akceptori protona, čime se smanjuje potreba za uporabom baze.

Zanimljivo, bakar(I) može se generirati i sinproporcioniranjem iz elementarnog bakra i bakra(II). Takva reakcija često se koristi ukoliko supstrati u reakciji posjeduju funkcijske skupine koje su osjetljive na askorbat ili produkte njegove oksidacije.[31,32]

2.3.3. Mehanizam Cu(I) azid-alkinske cikloadicije

Na slici 21 prikazan je pretpostavljeni mehanizam CuAAC reakcije. U prvom koraku reakcije Cu(I) koordinira π-elektrone terminalnog alkina pri čemu nastaje π-kompleks bakra i alkina (A). Pritom dolazi do izlaska jednog liganda iz koordinacijske sfere bakra. Taj ligand može biti i voda ukoliko se reakcija provodi u vodenom mediju. Budući da je otpuštanje vode iz koordinacijske sfere bakra egzotermno, to dodatno pogoduje reakciji. Navedenom koordinacijom bakra(I) na trostruku vezu ugljik-ugljik dolazi i do smanjenja pK_a-vrijednosti terminalnog vodikovog atoma alkina za do 10 pK_a jedinica. Time se omogućuje deprotoniranje te nastajanje odgovarajućeg acetilida (B) i bez uporabe dodatne baze. U sljedećem koraku dolazi do koordinacije azida na bakar pri čemu nastaje međuprodukt C, koji se zatim pregrađuje u šesteročani prsten D koji u svojoj strukturi sadrži i atom bakra. Iz prstena D daljnjom pregradnjom nastaje triazolil E. U zadnjem koraku dolazi do protoniranja triazolila E, nastanka odgovarajućeg 1,4-supstituiranog 1,2,3-triazola, te regeneracije bakra(I) koji potom može ući u novi katalitički ciklus.[27,31-32]



Slika 21: Mehanizam bakrom(I) katalizirane azid-alkinske cikloadicije (CuAAc)

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

3.1.1. Kemikalije i otapala

Spojevi 2-*tert*-butil-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-α-D-manopiranoziloksi)acetat, 2-(adamantan-1-il)etil-azid, te dodecilni triazolni derivat desmuramil-dipeptida korišteni u sintezi, prethodno su pripravljeni u laboratoriju literaturno opisanim postupcima, a svi ostali reagensi i otapala komercijalno su dostupni i analitičke su čistoće: bakrov(II) sulfat pentahidrat ($CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, *Kemika*), di-*tert*-butil-dikarbonat (Boc_2O, *Fluka*), ((2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronij) (HBTU, *Sigma-Aldrich*), heksadecil-bromid (*Fluka*), hidroksibenzotriazol (HOBt, *Sigma-Aldrich*), klorovodična kiselina (HCl, *Carlo Erba*), natrijev L-askorbat (*Sigma-Aldrich*), natrijev azid (NaN_3, *Sigma-Aldrich*), natrijev hidrogenkarbonat ($NaHCO_3$, *Gram mol*), natrijev klorid (NaCl, *Kemika*), natrijev sulfat (Na_2SO_4, *Gram mol*), *n*-butil-klorformijat (*SigmaAldrich*), *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC·HCl, *SigmaAldrich*), *N*-(*t*-butiloksikarbonil)-L-alanin-hidroksisukcinimidni ester (Boc-L-Ala-OSu, *SigmaAldrich*), *N*-metilmorfolin (NMM, *Sigma-Aldrich*), propargilamin (*Sigma-Aldrich*), sumporna kiselina (H_2SO_4, *Fluka*), trietilamin (TEA, *Sigma-Aldrich*), trifluoroctena kiselina (TFA, *Merck*).

Korištena otapala komercijalno su dostupna te su po potrebi sušena prema uobičajenim literaturnim postupcima: dietil-eter (Et_2O, *J. T. Baker*), diklormetan (DCM, *Carlo Erba*), 1,4-dioksan (*Kemika*), etanol (EtOH, *Kemika*), etil-acetat (EtOAc, *Carlo Erba*), kloroform ($CHCl_3$, *Carlo Erba*), metanol (MeOH, *Fluka*), *N*,*N*-dimetilformamid (DMF, *Fisher Chemical*), *n*-heksan (C_6H_{14}, *Scharlau*), tetrahidrofuran (THF, *Sigma-Aldrich*).

3.1.2. Metode

Tijek reakcija, sastav frakcija kod kromatografskog pročišćavanja na stupcu i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (60 F254, 0,25 mm, Fluka). Detekcija spojeva na TLC pločicama provedena je ultraljubičastim zračenjem (λ = 254 nm), prskanjem vodenom otopinom sumporne kiseline (w = 10 %) uz zagrijavanje te prskanjem otopinom ninhidrina uz zagrijavanje. Za kromatografska

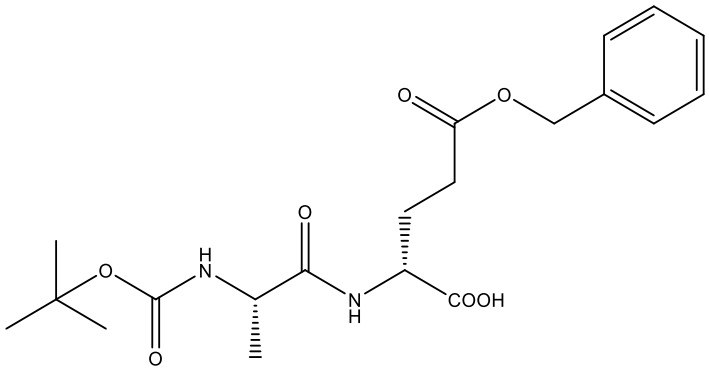
pročišćavanja na stupcu korišten je silikagel 60 veličine zrna 0,063-0,200 mm (Sigma-Aldrich). Flash kromatografije spoja provedene su na CombiFlash Rf+ Lumen automatiziranom sustavu za flash kromatografiju (Teledyne ISCO) uz UV/VIS detektor. Hidrogenolize (debenziliranja) su provedene u Parrovu uređaju.

Identifikacija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva provedena je pomoću infracrvene spektroskopije (IR), spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i spektrometrije masa (MS). IR spektri su snimljeni na uređaju FT-IR Perkin-Elmer Spectrum Two u području od 4000 do 400 cm−1 uz razlučivanje od 4 cm^{-1}. Spektri NMR(^{1}H i ^{13}C DEPTQ) snimljeni su pomoću instrumenta Avance III HD (Bruker) pri 400 MHz (^{1}H) i 100 MHz (^{13}C) u deuteriranim otapalima (navedeno u tekstu). Kemijski pomaci (δ) u spektrima ^{1}H NMR izraženi su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS, 0 ppm) kao unutarnji standard, dok su spektri ^{13}C NMR kalibrirani prema srednjem signalu otapala. Multipliciteti signala navedeni su kao: s-singlet, d-dublet, dd-dublet dubleta, t-triplet, q-kvartet i m-multiplet. Spektri masa pripravljenih spojeva snimljeni su pomoću uređaja Agilent 6410 uz elektroraspršenje kao način ionizacije (ESI-MS). Interval tališta čvrstih spojeva određen je pomoću uređaja *Büchi Melting Point* B-540.

3.2. Priprava peptidnog prekursora

*3.2.1. Priprava spoja **1** – Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH*

Prethodno sintetizirana D-Glu(OBn) (2,00 g 8,43 mmol) otopi se u suhom THF-u (35,0 mL). Reakcijska smjesa se ohladi na 0 °C u atmosferi argona. Nakon 10 minuta, u ohlađenu reakcijsku smjesu doda se Boc-L-Ala-OSu (2,34 g, 8,16 mmol) te TEA (3×0,75 mL, 16,1 mmol). Pripravljena smjesa nastavi se miješati još 30 min u ledenoj kupelji, a potom 24 h pri sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu otapala $CHCl_3$: MeOH = 3 : 1. Nakon 24 h reakcijska smjesa se upari do suha, a upareni ostatak otopi u EtOAc (70 mL). Dobivena otopina ispere se otopinom HCl-a (100 mL, c = 0,1 mol dm^{-3}), a vodeni sloj ekstrahira EtOAc (2×50 mL). Spojeni organski slojevi isperu se zasićenom otopinom NaCl-a (2×50 mL), suše nad magnezijevim sulfatom te upare na rotacijskom uparivaču. Dobiven je spoj **1** (slika 22) u obliku bezbojne praškaste krutine (3,224 g, 93 %), čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR.



Slika 22: Strukturna formula molekule spoja **1**

R_f = 0,33 ($CHCl_3$: MeOH = 3 : 1)

ϑ_t = 77-78 °C

^{1}H NMR i DEPTQ: Dodatak 1

^{1}H NMR (CD_3OD) δ/ppm: 7,35 – 7,29 (m, 5H, 5 × CH, Bn); 5,15 – 5,08 (m, 2H, CH_2, Bn); 4,47 – 4,43 (m, 1H, CH, Ala); 4,09 – 4,04 (m, 1H, CH, Glu); 2,46 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz, CH_2, Glu); 2,29 – 2,20 (m, 1H, CH_2, Glu); 2,02 – 1,92 (m, 1H, CH_2, Glu); 1,41 (s, 9H, 3 × CH_3, Boc); 1,29 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH_3, Ala).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ/ppm: 174,59, 173,12, 172,71, 156,19 (4 × C=O); 136,15 (C, Bn); 128,13, 127,84, 127,79 (CH, Bn); 79,30 (C, Boc); 66,00 (CH_2, Bn); 51,32 (CH, Glu); 50,49 (CH, Ala); 29,80 (CH_2, Glu); 27,29 (3 × CH_3, Boc); 26,44 (CH_2, Glu); 16,85 (CH_3, Ala).

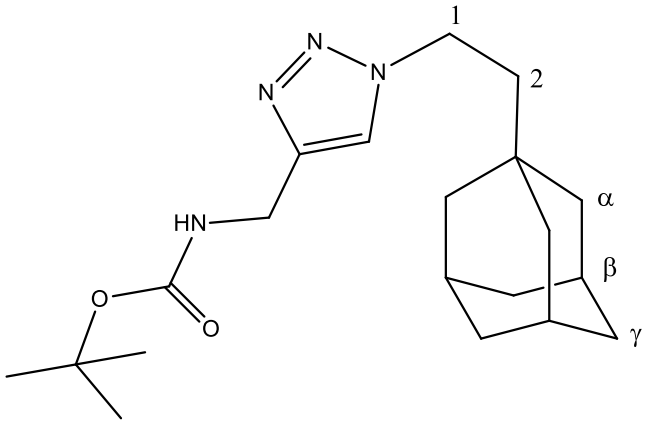
ESI-MS: *m/z* 431,2 $[M+Na]^+$

3.3. Priprava 1,4-disupstituiranog 2-(adamantan-1-il)etil-triazolnog prekursora (3)

*3.3.1. Priprava spoja **2*** – t-*butil-{1-[(2-(adamantan-1-il)etan-1-il]-1*H-*1,2,3-triazol-4-il}metil-karbamata*

U smjesu dioksana i vode (13 mL, 4 : 3) doda se propargilamin (340 μL, 5,36 mmol), Boc_2O (1,59 g, 7,31 mmol) i TEA (1,11 mL, 7,94 mmol). Nakon 90 minuta, u reakcijsku smjesu zaštićenog propargilamina doda se prethodno priređen 2-(adamantan-1-il)etil-azid (1,0 g, 4,87 mmol), otopina natrijeva L-askorbata (2,44 mL, *c* = 1 mol dm^{-3}) i otopina bakrova(II) sulfata pentahidrata (0,730 mL, *c* = 1 mol dm^{-3}). Reakcija se provodi na 35 °C u atmosferi argona. Tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu otapala DCM : EtOAc = 3 : 1. Nakon 24 sata u reakcijsku smjesu doda se još otopine natrijeva L-askorbata (1,22 mL, *c* = 1 mol dm^{-3}) i

bakrova(II) sulfata pentahidrata (0,365 mL, c = 1 mol dm^{-3}). Nakon 4 h reakcija se prekine. Reakcijska smjesa se djelomično upari te se nastali talog profiltrira preko Büchnerovog lijevka. Matičnica se nakon dodatka vode (30 mL) ekstrahira EtOAc-om (2 × 30 mL). Organski sloj se osuši nad magnezijevim sulfatom te upari. Organski ostatak i talog pročišćeni su automatiziranom flash kromatografijom gradijentnim eluiranjem počevši od čistog DCM-a do sustava DCM : EtOAc = 1 : 1. Dobiven je spoj **2** (slika 23), bijela čvrsta tvar (0,928 g, 53 %), čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR.



Slika 23: Strukturna formula molekule spoja **2**

$\boldsymbol{R}_f$ = 0,29 (DCM : EtOAc = 3 : 1)

^{1}H NMR i DEPTQ: Dodatak 2

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ/ppm: 7,52 (s, 1H, CH, triazol); 5,13 (s, 1H, NH); 4,38 (d, 2H, J = 5,6 Hz, CH_2, poveznica NH-triazol); 4,35 – 4,32 (m, 2H, C1-Et); 1,99 (s, 3H, H-β); 1,75 – 1,63 (m, 8H: 6H, H-γ; 2H, CH_2, C2-Et); 1,55 (d, 6H, J = 2,4 Hz, H-α); 1,44 (s, 9H, 3 × CH_3, Boc).

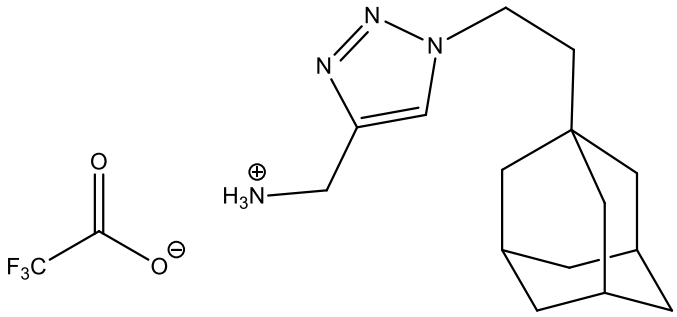
^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ/ppm: 155,89 (C, triazol); 79,62 (C, Boc); 45,80, 44,35 (2 × CH_2, Et); 42,12 (CH_2 γ); 36,85 (CH_2 α); 36,07 (CH_2, poveznica NH-triazol); 28,42 (CH β); 28,37 (3 × CH_3, Boc).

ESI-MS: *m/z* 361,2 $[M+H]^+$

*3.3.2. Priprava spoja **3** – {1-[2-(adamantan-1-il)etan-1-il]-1*H*-1,2,3-triazol-4-il}metilamonijevog trifluoracetata*

Uzorak spoja **2** (600 mg, 1,74 mmol) otopi se u suhom DCM-u (5 mL). Priređenoj otopini doda se TFA (2,00 mL, 26,1 mmol). Nakon 3 h miješanja na sobnoj temperaturi reakcijskoj smjesi doda se još TFA (0,5 mL, 6,53 mmol). Tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu otapala $CHCl_3$

: MeOH = 3 : 1. Nakon 90 minuta reakcija se prekine. Reakcijska smjesa se upari do suhoga te se organski ostatak ispere eterom (2 × 15 mL). Dodatkom etera dolazi do nastanka bijele krutine koja se profiltrira preko Büchnerovog lijevka. Izoliran je bijeli praškasti talog spoja **3** (450 mg, 75 %, slika 24) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR.



Slika 24: Strukturna formula molekule spoja **3**

$\boldsymbol{R_f}$ = 0,83 ($CHCl_3$: MeOH = 3 : 1)

$\boldsymbol{\vartheta_t}$ = 147 - 148 °C

^{1}H NMR i DEPTQ: Dodatak 3

^{1}H NMR (DMSO-*d*$_6$) *δ*/ppm: 8,23 (s, 3H, NH_3^+); 8,15 (s, 1H, CH, triazol); 4,43 – 4,38 (m, 2H, CH_2, C1-Et); 4,11 (s, 2H, CH_2, poveznica NH_3^+-triazol); 1,94 (s, 3H, H-β); 1,70 – 1,58 (m, 8H: 6H, H-γ; 2H, CH_2, C2-Et); 1,52 (d, 6H, *J* = 2,2 Hz, H-α).

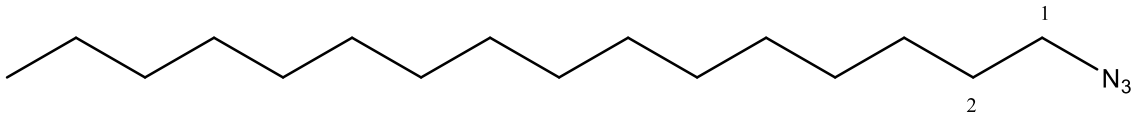
^{13}C NMR (DMSO-*d*$_6$) *δ*/ppm: 124,05 (CH, triazol); 44,95, 43,99 (2 × CH_2, Et); 41,32 (CH_2 γ); 36,32 (CH_2 α); 33,85 (CH_2, poveznica NH_3^+-triazol); 27,79 (CH β).

ESI-MS: *m/z* 261,2 $[M+H]^+$

3.4. Priprava 1,4-disupstituiranog heksadecil-triazolnog prekursora (6)

*3.4.1. Priprava spoja **4** – heksadecil-azida*

Natrijev azid (400 mg, 6,15 mmol) otopi se u 9 mL suhog DMF-a u što se doda heksadecil-bromid (2,26 mL, 7,39 mmol). Reakcijska smjesa se zagrijava na 60 °C. Nakon 24 h reakcija se zaustavi dodatkom vode (10 mL). Reakcijska smjesa se ekstrahira DCM-om (3 × 20 mL), organski sloj se ispere vodom (3 × 30 mL) i osuši nad natrijevim sulfatom. Nakon uparavanja na rotacijskom uparivaču dobiven je sirovi produkt **4** u obliku narančastog ulja (1,79 g, slika 25) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i IR spektroskopijom. Spoj **4** je bez dodatnog pročišćavanja korišten u daljnjoj sintezi.



Slika 25: Strukturna formula molekule spoja **4**

^{1}H NMR, DEPTQ: Dodatak 4

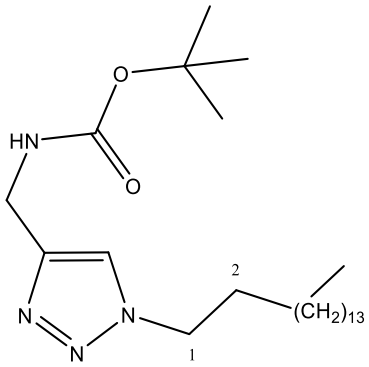
IR (NaCl pločica) $\tilde{\nu}$/cm^{-1}: 2925 (ν_{as} C-H (CH_2)); 2854 (ν_s C-H (CH_2)); 2096 (ν N≡N); 1467(δ_{sc} CH_2).

^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 3,30 (t, 2H, J = 6,9 Hz, CH_2, (C1) C_{16}); 1,55-1,48 (m, 2H, CH_2, (C2) C_{16}); 1,27-1,24 (br s, 26H, 13 × CH_2, (C3-C15) C_{16}); 0,85 (t, 3H, J = 6,9 Hz, CH_3).

^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 50,53 (C1); 31,21 (C2); 28,92, 28,82, 28,61, 28,42, 28,14, 26,03 (C3-C14); 22,01 (C15); 13,87 (C16).

*3.4.2. Priprava spoja **5*** – t-*butil-[1-(heksadeka-1-il)-1*H-*1,2,3-triazol-4-il]metil-karbamata*

Propargilamin (87,8 μL, 1,33 mmol) otopi se u smjesi dioksana i vode (7 mL, 4:3). Pripravljena smjesa ohladi se na 0 °C te se potom u nju dodaju Boc_2O (423 mg, 1,92 mmol) i TEA (276 μL, 1,98 mmol). Reakcijska smjesa se najprije miješa uz hlađenje ledom 10 minuta, a potom 90 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega se dodaju heksadecil-azid (**4**, 325 mg, 1,22 mmol), vodena otopina natrijeva L-askorbata (610 μL, c = 1 mol dm^{-3}) i vodena otopina bakrova(II) sulfata (183 μL, c = 1 mol dm^{-3}). Reakcijska smjesa zagrije se do 35 °C i nastavi miješati u atmosferi argona. Nakon 3 h, reakcijskoj smjesi doda se još otopine natrijeva L-askorbata (305 μL, c = 1 mol dm^{-3}) i bakrova(II) sulfata (91,5 μL, c = 1 mol dm^{-3}). Tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu otapala DCM : EtOAc = 3 : 1. Nakon 24 h reakcija se prekine. Reakcijska smjesa koja se sastoji od žuto-smeđeg taloga te smeđe matičnice profiltrirana je preko Bücherovog lijevka, a talog se osuši na zraku. Dobiveni talog nanese se na kolonu silikagela i pročisti automatiziranom flash kromatografijom gradijentnim eluiranjem od čistog DCM-a do sustava DCM : EtOAc = 1 : 1**.** Dobiven je bijeli kristalični spoj **5** (0,350 g, 68 %, slika 26), čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR.



Slika 26: Strukturna formula molekule spoja **5**

$\boldsymbol{R_f}$ = 0,28 (DCM : EtOAc = 3 : 1)

$\boldsymbol{\vartheta_t}$ = 76,5-78,4 °C

^{1}H NMR, DEPTQ: Dodatak 5

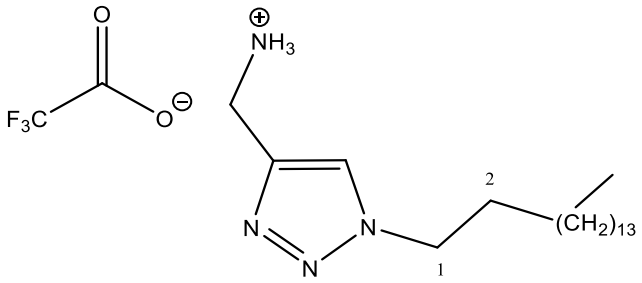
^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ/ppm: 7,49 (s, 1H, CH, triazol); 5,11 (br s, 1H, NH); 4,39 (s, 2H, CH_2, poveznica NH-triazol); 4,32 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz, CH_2, (C1) C_{16}); 1,90 – 1,86 (m, 2H, CH_2, (C2) C_{16}); 1,44 (s, 9H, 3 × CH_3, Boc); 1,30 – 1,25 (m, 26H, 13 × CH_2, (C3-C15) C_{16}); 0,88 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH_3, C_{16}).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ/ppm: 155,82 (C, triazol); 79,64 (C, Boc); 50,40 (CH_2, (C1) C_{16}); 36,22 (CH_2, poveznica NH-triazol); 31,91 (CH_2, (C2) C_{16}); 30,24, 29,64, 29,59, 29,50, 29,37, 29,34, 28,99, 26,49 (CH_2, (C3-C14) C_{16}); 28,36 (3 × CH_3, Boc); 22,68 (CH_2, (C15) C16); 14,11 (CH_3, C_{16}).

ESI-MS: *m/z* 423,3 $[M+H]^+$

*3.4.3. Priprava spoja **6** – [1-(heksadeka-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metilamonijevog trifluoracetata*

Uzorak spoja **5** (1,65 g, 3,77 mmol) otopi se u u suhom DCM-u (10 mL). Priređenoj otopini doda se TFA (4,331 mL, 0,057 mol). Tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu otapala $CHCl_3$: MeOH = 4 : 1. Nakon 4 h miješanja na sobnoj temperaturi reakcijska smjesa se upari te ispere eterom (2 × 10 mL). Žuto-smeđi uljasti produkt se automatiziranom flash kromatografijom gradijentnim eluiranjem od čistog $CHCl_3$-a do $CHCl_3$: CH_3OH = 4 : 1. Dobiven je bijeli praškasti talog spoja **6** (1,57 g, 95 %, slika 27) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR.



Slika 27: Strukturna formula molekule spoja **6**

R_f = 0,4 (DCM : EtOAc = 4 : 1)

ϑ_t = 91,8-93,6 °C

^{1}H NMR, DEPTQ: Dodatak 6

^{1}H NMR (CDCl3) δ/ppm: 8,30 (s, 3H, NH_3^+); 8,13 (s, 1H, CH, triazol); 4,38 (t, 2H, *J* = 7,1 Hz, CH_2, (C1) C_{16}); 4,12 (s, 2H, CH_2, poveznica NH_3^+-triazol); 1,83 – 1,75 (m, 2H, CH_2, (C2) C_{16}); 1,23 (br s, 26H, 13 × CH_2, (C3- C15) C_{16}); 0,85 (t, 3H, *J* = 6,8 Hz, CH_3, C_{16}).

^{13}C NMR (DMSO-d6) δ/ppm: 123,91 (CH, triazol); 49,35 (CH_2, (C1) C_{16}); 34,10 (CH_2, poveznica NH_3^+-triazol); 31,22 (CH_2, (C2) C_{16}); 29,72, 28,96, 28,81, 28,62, 28,33, 25,72 (CH_2, (C3-C14) C_{16}); 22,02 (CH_2, (C15) C_{16}); 13,88 (CH_3, C_{16}).

ESI-MS: *m/z* 423,3 $[M+H]^+$

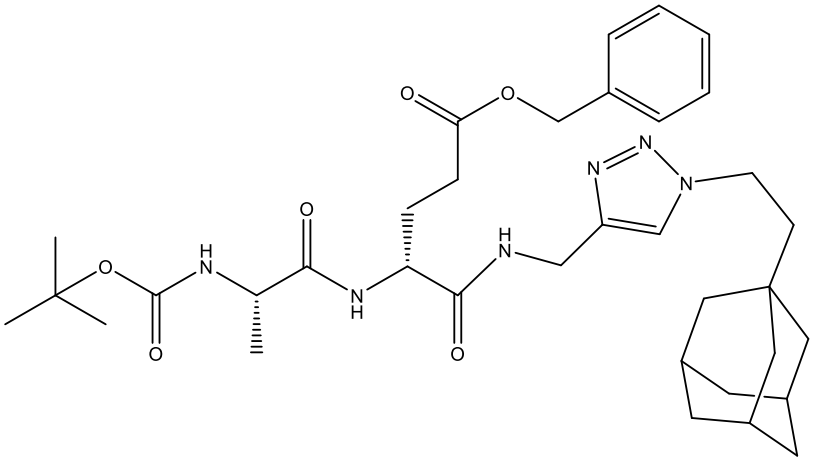
3.5. Priprava 2-(adamantan-1-il)etil-triazolnog derivata desmuramil-dipeptida (8)

*3.5.1. Priprava spoja **7** – benzil-(4*R*)-4-{1-[(2-(adamantan-1-il)etan-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metilaminokarbonil}-4-[(2*S*)-2-(*t*-butiloksikarbonilamino)propanamido]butanoata*

Metoda I

Uzorak dipeptida **1** (250 mg, 0,613 mmol) otopi se u suhom THF-u. Nastala otopina ohladi se na -5 °C. Nakon 10 minuta u reakcijsku smjesu doda se *n*-butil-klorformijat (155,5 μL, 1,23 mmol), NMM (134,8 μL, 1,23 mmol) te spoj **3** prethodno otopljen u DCM-u. Reakcijska smjesa miješa se 90 minuta na -5 °C u atmosferi argona te se nakon toga nastavi miješati na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu otapala $CHCl_3$: MeOH = 15 : 1. Nakon 3 h reakcija je prekinuta. Reakcijskoj smjesi doda se zasićena otopina natrijeva hidrogenkarbonata (10 mL) te se ekstrahira DCM-om (2 × 15 mL). Organski se sloj nakon sušenja nad natrijevim sulfatom upari na rotacijskom uparivaču. Organski ostatak pročisti se

kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala $CHCl_3$: MeOH = 15 : 1. Dobiven je bijeli praškasti produkt **7** (265 mg, 65 %, slika 28) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 28: Strukturna formula molekule spoja **7**

$\boldsymbol{R_f}$ = 0,37 (kloroform : MeOH = 15 : 1)

$\boldsymbol{\vartheta_t}$ = 71-72 °C

^{1}H NMR, DEPTQ: Dodatak 7

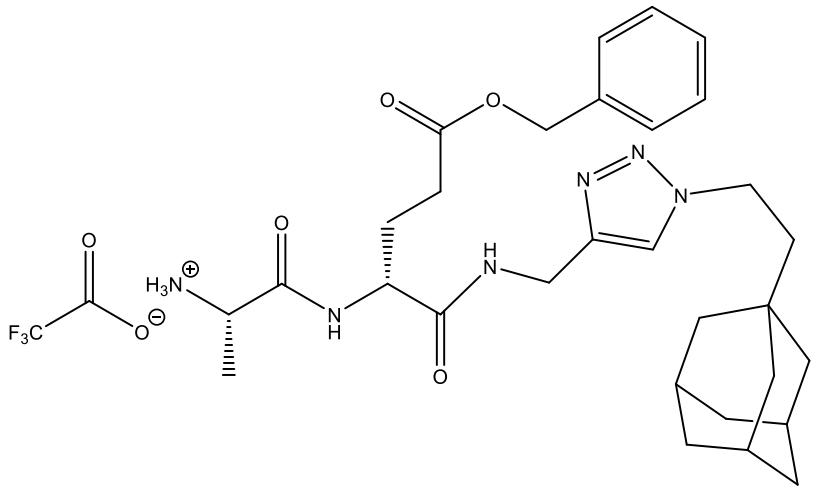
^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ/ppm: 7,51 (s, 1H, CH, triazol); 7,45 (s, 1H, NH); 7,36 – 7,32 (m, 5H, 5 × CH, Bn); 7,13 (d, 1H, *J* = 7,7 Hz, NH); 5,11 (d, 2H, *J* = 3,8 Hz, CH_2, Bn); 5,07 – 5,05 (m, 1H, NH); 4,54 – 4,43 (m, 3H: 2H, CH_2, poveznica amid-triazol; 1H, CH, *iso*Gln); 4,32 – 4,28 (m, 2H, CH_2, C1-Et); 4,06 – 4,00 (m, 1H, CH, Ala); 2,56 – 2,42 (m, 2H, CH_2, *iso*Gln); 2,24 – 2,20 (m, 1H, CH_2, *iso*Gln); 2,05 – 1,98 (m, 4H: 3H, H-β; 1H, CH_2, *iso*Gln); 1,74-1,62 (m, 8H: 6H, H-γ; 2H, CH_2, C2-Et); 1,54 (d, 6H, *J* = 2,4 Hz, H-γ); 1,38 (s, 9H, 3 × CH_3, Boc); 1,32 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz, CH_3, Ala).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ/ppm: 173,48, 173,14, 171,05 (3 × C=O); 144,84 (C=O, Boc); 135,64 (C, Bn); 128,61, 128,27 (CH, Bn); 121,89 (CH, triazol); 80,46 (C, Boc); 66,67 (CH_2, Bn); 52,85 (CH, *iso*Gln); 50,74 (CH, Ala); 45,74, 44,34 (2 × CH_2, Et); 42,14 (CH_2 γ); 36,88 (CH_2 α); 35,30 (CH_2, poveznica amid-triazol); 31,97 (C, triazol); 30,59 (CH_2, *iso*Gln); 28,45 (CH β); 28,27 (3 × CH_3, Boc); 26,91 (CH_2, *iso*Gln); 17,86 (CH_3, Ala).

ESI-MS: *m*/*z* 651,8 $[M+H]^+$

*3.5.2. Priprava spoja **8** – (1*S*)-1-{[*N*-(1*R*)-{3-benziloksilarbonil-1-{[1-(2-(adamantan-1-il)etan-1-il]-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metilaminokarbonil}propan-1-il]aminokarbonil}etilamonijevog trifluoracetata*

Uzorak spoja **7** (204 mg, 0,307 mmol) otopi se u suhom DCM-u (6 mL). U priređenu otopinu doda se TFA (362,7 μL, 4,73 mmol). Reakcija se miješa na sobnoj temperaturi, a tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu otapala $CHCl_3$: MeOH = 4 : 1. Nakon 4 h, reakcijskoj smjesi doda se još TFA (120 μL, 1,57 mmol). Nakon 2 h miješanja reakcijska smjesa se upari te ispere eterom (2 × 15 mL). Dobiveni smeđi ostatak pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala $CHCl_3$: MeOH = 4 : 1. Dobiven je spoj **8** u obliku blijedožutih kristala (181 mg, 89 %, slika 29) čija je strukura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 29: Strukturna formula molekule spoja **8**

$\boldsymbol{R_f}$ = 0,38 (kloroform : MeOH = 4 : 1)

$\boldsymbol{\vartheta_t}$ = 64-66 °C

^{1}H NMR, DEPTQ: Dodatak 8

^{1}H NMR (CD_3OD) $\boldsymbol{\delta}$/ ppm: 7,86 (s, 1H, CH, triazol); 7,34 – 7,29 (m, 5H, 5 × CH, Bn); 5,11 (s, 2H, CH_2, Bn); 4,43 – 4,36 (m, 5H: 2H, CH_2, poveznica amid-triazol; 2H, CH_2, C1-Et; 1H, CH, *iso*Gln); 3,98 – 3,93 (m, 1H, CH, Ala); 2,44 (t, 2H, CH_2, J = 7,5 Hz, *iso*Gln); 2,19 – 2,10 (m, 1H, CH_2, *iso*Gln); 2,01 – 1,96 (m, 4H: 3H, H-β; 1H, CH_2, *iso*Gln); 1,78 – 1,64 (m, 8H: 6H, H-γ; 2H, CH_2, C2-Et); 1,58 (s, 6H, H-γ); 1,48 (d, 3H, J = 7,0 Hz,CH_3, Ala).

^{13}C NMR (CD_3OD) $\boldsymbol{\delta}$/ ppm: 172,50, 171,84, 169,80 (3 × C=O); 136,09 (C, Bn); 128,18; 127,83 (CH, Bn); 66,09 (CH_2, Bn); 52,72 (CH, *iso*Gln); 48,89 (CH, Ala); 45,50, 44,12 (CH_2,

Et); 44,71 (CH β); 36,58 (CH_2 α); 34,28 (CH_2, poveznica amid-triazol); 31,63 (C, triazol); 29,84 (CH_2, *iso*Gln); 28,60 (CH_2 γ); 26,77 (CH_2, *iso*Gln); 16,22 (CH_3, Ala).

ESI-MS: *m*/*z* 551,7 $[M+H]^+$

3.6. Priprava heksadecil-triazolnog derivata desmuramil-dipeptida (10)

*3.6.1. Priprava spoja **9** – benzil-(4*R*)-4-{[1-(heksadeka-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metilaminokarbonil}-4-[(2*S*)-2-(*t*-butiloksikarbonilamino)propanamido]butanoata*

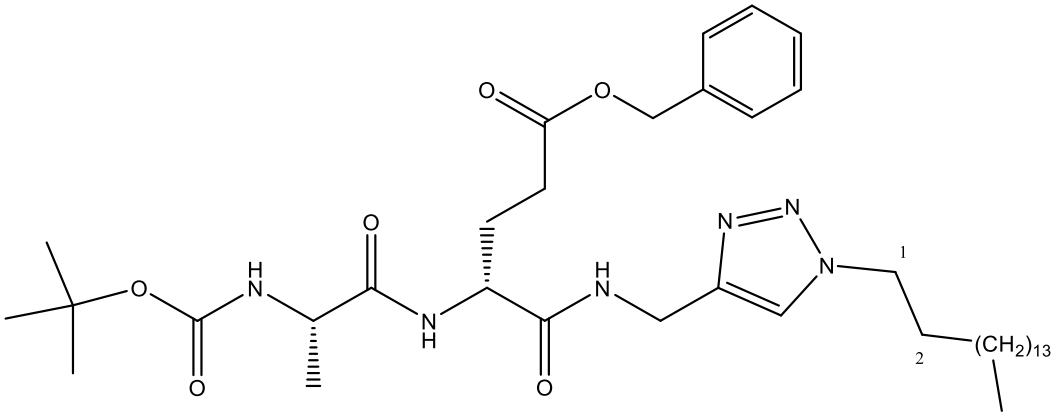
Metoda 1

Uzorak bociranog dipeptida **1** (73 mg, 0,179 mmol) otopi se u 2 mL suhog THF-a. Tako priređena otopina ohladi se na -5 °C te joj se doda NMM (39,2 μL, 0,358 mmol), *n*-butil-klorformijat (45,5 μL, 0,356 mmol) te spoj **6** (94 mg, 0,215 mmol) koji je prethodno otopljen u smjesi DCM-a i THF-a (0,5 mL, 1 : 1). Reakcijska smjesa miješa se 90 minuta na -5 °C u atmosferi argona te se nakon toga prebaci na sobnu temperaturu. Tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu otapala $CHCl_3$: MeOH = 15 : 1. Nakon 90 minuta reakcijskoj smjesi doda se još NMM-a (9,8 μL, 0,0895 mmol) i *n*-butil-klorformijata (11,4 μL, 0,089 mmol). Nakon još 60 minuta miješanja na sobnoj temperaturi reakcija se prekine dodatkom zasićene otopine natrijeva hidrogenkarbonata (20 mL) nakon čega je uslijedila ekstrakcija DCM-om (2 × 20 mL). Organski sloj se osuši nad natrijevim sulfatom te se upari na rotacijskom uparivaču. Dobiveni smeđi uljasti produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala $CHCl_3$: MeOH = 15 : 1. Spektroskopijom NMR utvrđeno je da navedeni produkt nije uspješno pripravljen.

Metoda II

Uzorak spoja **1** (263 mg, 0,645 mmol) otopi se u smjesi THF-a i DCM-a (10 mL, 1 : 1). Priređenoj otopini doda se HBTU (416 mg, 1,09 mmol), TEA (170 μL, 1,22 mmol) i spoj **6** (338 mg, 0,774 mmol) prethodno otopljen u smjesi THF-a i suhog DCM-a. Reakcijska smjesa miješa se 24 h u atmosferi argona, a tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu otapala $CHCl_3$: MeOH = 15 : 1. Po završetku reakcije, reakcijskoj smjesi se doda voda (20 mL) te se smjesa ekstrahira DCM-om (2 × 20 mL). Organski sloj se potom ispere zasićenom otopinom NaCl-a (15 mL), osuši nad natrijevim sulfatom i upari. Dobiveni narančasti ostatak pročisti se na kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala $CHCl_3$: MeOH = 15 : 1. Dobiven je

bijeli praškasti produkt **9** (455 mg, 97,0 %, slika 30) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 30: Strukturna formula molekule spoja **9**

$\boldsymbol{R_f}$ = 0,38 ($CHCl_3$: MeOH = 15 : 1)

$\boldsymbol{\vartheta_t}$ = 90-92 °C

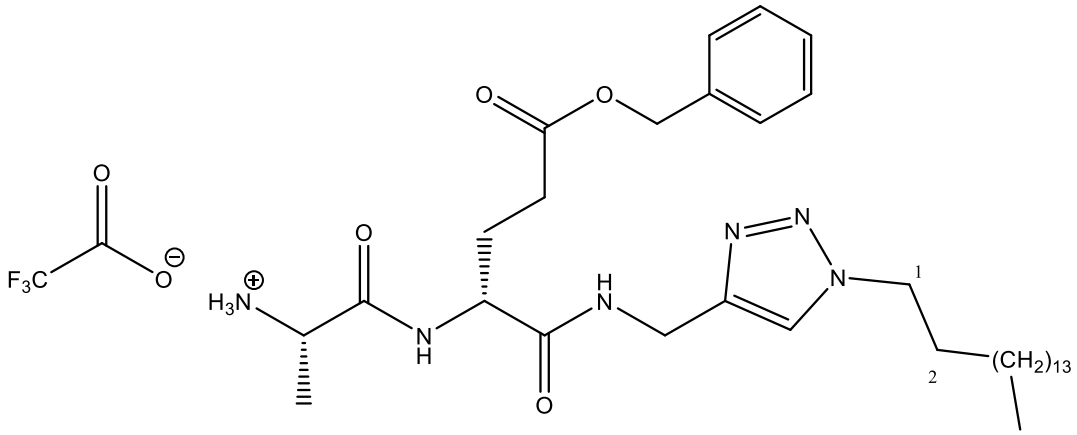
^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ/ppm: 7,50 (s, 1H, CH, triazol); 7,48 (br s, 1H, NH); 7,38 – 7,30 (m, 5H, 5 × CH, Bn); 7,16 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, NH); 5,14 – 5,07 (m, 3H: 2H, CH_2, Bn; 1H, NH); 4,55 – 4,44 (m, 3H: 2H, CH_2, poveznica amid-triazol; 1H, CH, Glu); 4,27 (t, 2H, CH_2, (C1) C_{16}); 4,06 – 3,99 (m, 1H, CH, Ala); 2,57 – 2,40 (m, 2H, CH_2, (C2) C_{16}); 2,27 – 2,18 (m, 1H, CH_2, Glu); 2,06 – 1,97 (m, 1H, CH_2, Glu); 1,86 (t, 2H, *J* = 6,9 Hz, CH_2, (C2) C_{16}); 1,38 (s, 9H, 3 × CH_3, Boc); 1,31 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz, CH_3, Ala); 1,30 – 1,25 (m, 26H, 13 × CH_2, Ala); 0,88 (t, 3H, CH_3, *J* = 6,8 Hz, Ala).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ/ppm: 173,47, 173,16, 171,05 (3 × C=O); 144,81 (C=O, Boc); 135,64 (C, Bn); 128,60, 128,35, 128,27 (CH, Bn); 121,97; (CH, triazol); 80,41 (C, Boc); 66,66 (CH_2, Bn); 52,85 (CH, Glu); 50,73 (CH, Ala); 50,36 (CH_2, (C1) C_{16}); 35,29 (CH_2, poveznica amid-triazol); 31,92 (CH_2, (C2) C_{16}); 30,58 (CH_2, Glu); 30,28, 29,68, 29,55, 29,41, 29,36, 29,03 (CH_2, (C3-C13) C_{16}); 28,25 (CH_3, Boc); 26,90 (CH_2, Glu,); 26,52 (CH_2, (C14) C_{16}); 22,69 (CH_2, (C15) C_{16}); 17,85 (CH_3, Ala); 14,13 (CH_3, C_{16})**.**

ESI-MS: *m/z* 714,0 $[M+H]^+$

*3.6.2. Priprava spoja **10** – (1S)-1-{[N-(1R)-{3-benziloksilarbonil-1-{[1-(heksadeka-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metilaminokarbonil}propan-1-il]aminokarbonil}etilamonijevog trifluoracetata*

Uzorak spoja **9** (435 mg, 0,613 mmol) otopi se u 5 mL suhog DCM-a te mu se doda TFA (703 μL, 919 mmol) Reakcijska smjesa miješa se na sobnoj temperaturi, a tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu otapala $CHCl_3$: MeOH = 4 : 1. Nakon 5 h, reakcija je prekinuta, a reakcijska smjesa uparena. Organski ostatak je ispran eterom (2 × 10 mL) te je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala $CHCl_3$: MeOH = 4 : 1. Dobiven je bijeli praškasti produkt **10**. (372 mg, 86 %, slika 31) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 31: Strukturna formula molekule spoja **10**

$\boldsymbol{R_f}$ = 0,51 ($CHCl_3$: MeOH = 4 : 1)

$\boldsymbol{\vartheta_t}$ = 75,2-77 °C

^{1}H NMR (CD_3OD) δ/ppm: 7,84 (s, 1H, CH, triazol); 7,35 – 7,31 (m, 5H, 5 × CH, Bn); 5,11 (s, 2H, CH_2, Bn); 4,43 (d, 2H, *J* =3,8 Hz, CH_2, poveznica amid-triazol), 4,39 – 4,23 (m, 3H: 2H, CH_2, (C1) C_{16}; 1H, CH, Glu); 3,97 – 3,93 (m, 1H, CH, Ala); 2,44 (t, 2H, CH_2, Glu); 2,18 – 2,09 (m, 1H, CH_2, Glu); 2,02 – 1,94 (m, 1H, CH_2, Glu); 1,90 – 1,83 (m, 2H, CH_2, (C2) C_{16}); 1,48 (d, 3H, CH_3, Ala); 1,27 (26 H, 13 × CH_2; C_{16}); 0,89 (t, 3H, CH_3, C_{16})

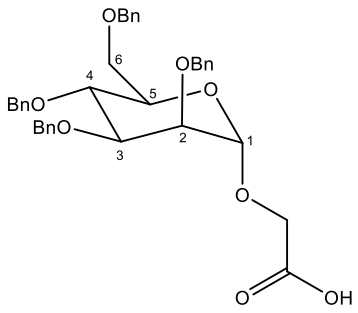
^{13}C NMR (CD_3OD) δ/ppm:172,47, 171,83, 169,79 (3 × C=O); 136,07 (C, Bn); 128,17, 127,86 (CH, Bn); 122,77 (CH, triazol); 66,10 (CH_2, Bn); 52,69 (CH, Glu); 49,97 (CH_2, (C1) C_{16}); 48,88 (CH, Ala); 34,28 (CH_2, poveznica amid-triazol); 31,66 (CH_2, (C2) C_{16}); 29,90 (CH_2, Glu); 29,83, 29,37, 29,25, 29,16, 29,06, 28,70 (CH_2, (C3-13) C_{16}); 26,77 (CH_2, Glu); 26,07 (CH_2, (C14) C_{16}); 22,33 (CH_2, (C15) C_{16}); 16,21 (CH_3, Ala); 13,03 (CH_3, C_{16})

ESI-MS: *m/z* 613,8 $[M+H]^+$

3.7. Priprava manozne podjedinice (11)

*3.7.1. Priprava spoja **11** – 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-α-D-manopiranoziloksi)octene kiseline*

Prethodno priređeni uzorak *tert*-butilnog estera šećera (305 mg, 0,466 mmol) otopi se u suhom DCM-u (5 mL). Priređenoj otopini doda se TFA (535 μL, 6,99 mmol). Reakcijska smjesa ostavi se miješati na sobnoj temperaturi te joj se nakon 2 h doda još TFA (54 μL, 0,699 mmol). Tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu otapala $CHCl_3$: CH_3CN = 3 : 1. Nakon 24 h u reakcijsku smjesu dodano je još TFA (54 μL, 0,699 mmol) te se reakcija nakon 4 h prekine. Reakcijskoj smjesa se nakon dodatka DCM-a (15 mL) upari na rotacijskom uparivaču. Organski ostatak ispere se eterom (2 × 15 mL). Suhi ostatak pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala $CHCl_3$: CH_3CN = 3 : 1. Dobiven je bezbojni uljasti produkt **11** (170 mg, 60 %, slika 32) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR.



Slika 32: Strukturna formula molekule spoja **11**

$\boldsymbol{R_f}$ = 0,62 ($CHCl_3$: CH_3CN = 3 : 1)

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ/ppm: 7,38-7,13 (m, 20H, CH, Bn), 5,02 (s, 1H, H-1); 4,85 (d, 1H, J_{gem} = 10,8 Hz, CH_2, Bn); 4,75 (d, 1H, J_{gem} = 12,4 Hz, CH_2, Bn); 4,72 (d, 1H, J_{gem} = 12,4 Hz, CH_2, Bn); 4,63 (d, 1H, J_{gem} = 12,2 Hz, CH_2, Bn); 4,59 (s, 2H, CH_2, Bn); 4,53 (d, 1H, J_{gem} = 12,2 Hz, CH_2, Bn); 4,49 (d, 1H, J_{gem} = 10,9 Hz, CH_2, Bn); 4,23 (d, 1H, J_{gem} = 17,0 Hz, CH_2, acetilna poveznica); 4,16 (d, 1H, J_{gem} = 17,0 Hz, CH_2, acetilna poveznica); 3,99–3,90 (m, 3H: H-2; H-3; H-4); 3,80–3,68 (m, 3H: H-5; H6a; H-6b).

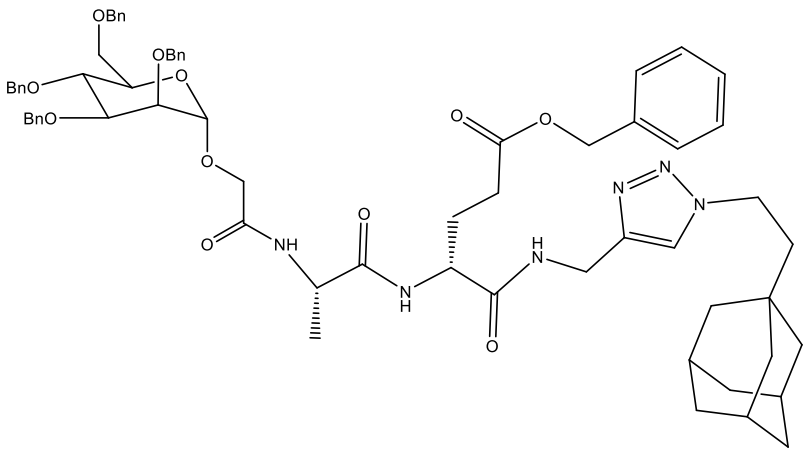
^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ/ppm: 173,9 (C=O); 138,4, 138,3, 138,1, 138,1 (4 × C, Bn); 128,4–127,6 (CH, Bn); 97,9 (C1); 79,6, 74,6, 74,3, 72,4 (C2-C5); 75,1, 73,4, 72,5, 72,1 (4 × CH_2, Bn); 69,1 (C6); 63,2 (CH_2, acetilna poveznica).

ESI-MS: *m/z* $[M + Na]^+$ 621,2.

3.8. Kondenzacija peptidnih prekursora s manoznom podjedinicom

*3.8.1. Priprava spoja **12** – benzil-(4*R*)-4-{*N*-{1-[(2-(adamantan-1-il)etan-1-il]-1*H*-1,2,3-triazol-4-il}metilkarbamoil}-4-{(2*S*)-2-[(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-α-D-manopiranoziloksi)etanamido]propanamido}butanoata*

Spoj **11** (158 mg, 0,264 mmol) otopi se u 6 mL suhog DCM-a. Priređena otopina se ohladi na 0 °C te joj se doda HOBT (35,6 mg, 0,264 mmol) i EDC·HCl (62,2 mg, 0,325 mmol) nakon čega se smjesa miješa 15 minuta na 0 °C. Nakon 15 minuta u ohlađenu smjesu se doda spoj **8** (135 mg, 0,203 mmol) otopljen u suhom DCM-u te TEA (56,6 μL, 0,406 mmol) Reakcijska smjesa nastavi miješati sat vremena na 0 °C, a potom još 24 h na sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Tijek reakcije prati se TLC-om u 6 % MeOH u $CHCl_3$-u. Nakon 24 h reakcijskoj smjesi dodano je još TEA (9 mL, 0,061 mmol) te je miješanje nastavljeno. Nakon još 24 sata, reakcija se prekine. Reakcijska smjesa je nakon dodatka vode (15 mL) esktrahirana EtOAc-om (3 × 10 mL). Sakupljeni organski slojevi suše se nad natrijevim sulfatom i upare na rotacijskom uparivaču. Dobiveni organski ostatak pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz gradijentnim eluiranjem od čistog DCM-a do sustava 3% MeOH u EtOAc-u. Dobiven je bezbojni staklasti produkt **12** (130 mg, 57 %, slika 33) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



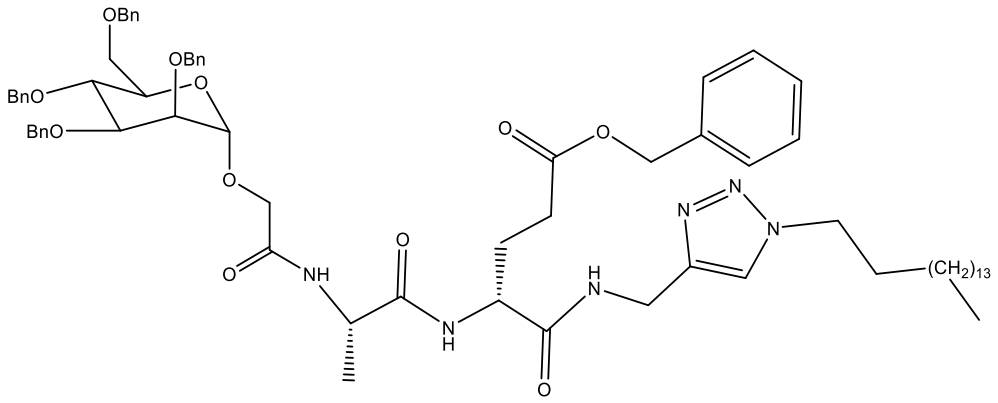
Slika 33: Strukturna formula molekule spoja **12**

R_f = 0,49 (6 % MeOH u DCM-u)

^{1}H NMR (CD_3OD) δ / ppm: 7,74 (s, 1H, triazol); 7,39 – 7,16 (m, 25H, 25 × CH, Bn); 5,09 (s, 2H, CH_2, Bn ester); 4,99 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1,3 Hz, H-1); 4,67 (s, 2H, CH_2, poveznica amid-triazol); 4,82 – 4,32 (m, 10H: 8H, 4 × CH_2, Bn; 1H, CH, Ala, 1H, CH, *iso*Gln); 4,29-4,25 (m, 2H, CH_2, C1-Et); 4,15 – 3,90 (m, 5H: 2H, CH_2, acetilna poveznica; 3H, H-2, H-3, H-4); 3,78 – 3,75 (m, 1H, H-5); 3,72 – 3,64 (m, 2H, H-6a, H-6b); 2,44 (t, 2H, J = 7,3 Hz, CH_2, *iso*Gln); 2,23 – 2,15 (m, 1H, CH_2, *iso*Gln); 1,98 – 1,91 (m, 1H, CH_2, *iso*Gln); 1,90 (br s, 3H, H-β); 1,73 – 1,62 (m, 6H, H-γ), 1,59 – 1,54 (m, CH_2, C2-Et); 1,50 (br s, 6H, H-α); 1,35 (d, 3H, J = 7,1 Hz, CH_3, Ala).
^{13}C NMR (CD_3OD) δ/ppm: 178,64, 177,86, 177,09, 175,33 (4 × C=O); 149,82, 143,48, 143,27, 143,16 (4 × C, Bn); 133,00-132,28 (CH, Bn); 127,64 (CH, triazol); 103,16 (C1); 84,55, 79,61, 79,39, 77,26 (C2-C5); 79,46, 78,02, 77,39, 76,63 (4 × CH_2, Bn); 73,93 (C6), 71,10 (CH_2, Bn-ester); 70,73 (CH_2, acetilna poveznica); 57,80 (CH, *iso*Gln); 54,04 (CH, Ala); 50,43, 49,05 (2 × CH_2, Et); 46,68 (CH_2 α); 41,57 (CH_2 γ); 39,47 (CH_2, poveznica amid-triazol); 35,01 (CH_2, *iso*Gln); 33,56 (CH β); 31,33 (CH_2, *iso*Gln); 21,51 (CH_3, Ala).
ESI-MS: *m/z* 1131,4 $[M+H]^+$

*3.8.2. Priprava spoja **13** – benzil-(4*R*)-4-{[1-(heksadeka-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metilaminokarbonil}-4-(2*S*)-2-[2,3,4,6-tetra*-O*-benzil-α-D-manopiranoziloksi)etanamido]propanamido}butanoata*

Spoj **11** (130 mg, 0,204 mmol) se otopi u 4 mL suhog DCM-a. Priređena otopina se ohladi se na 0 °C te joj se doda HOBT (27,6 mg, 0,204 mmol) i EDC·HCl (48,1 mg, 0,157 mmol) nakon čega se smjesa miješa 15 minuta na 0 °C. Nakon 15 minuta u ohlađenu smjesu doda se spoj **10** (149 mg, 0,204 mmol) otopljen u suhom DCM-u te TEA (43,7 μL, 0,314 mmol). Reakcijska smjesa nastavi se miješati sat vremena na 0 °C, a potom još 24 sata na sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu otapala 6 % MeOH u $CHCl_3$-u. Nakon završetka reakcije reakcijska smjesa se upari, a upareni ostatak otopi se u EtOAc-u (20 mL). Tako priređena otopina ekstrahira se vodom (2 × 15 mL). Organski sloj osuši se nad natrijevim sulfatom te upari na rotacijskom uparivaču. Dobiveni organski ostatak pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz gradijentnim eluiranjem od čistog DCM-a do sustava 3% MeOH u EtOAc-u. Dobiven je bezbojni uljasti produkt **13** (196 mg, 81 %, slika 34) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 34: Strukturna formula molekule spoja **13**

$\boldsymbol{R_f}$ = 0,38 (6 % MeOH u DCM-u)

^{1}H NMR (CD_3OD) δ / ppm: 7,72 (s, 1H, CH, triazol); 7,39 – 7,17 (m, 25H, 25 × CH, Bn); 5,09 (s, 2H, CH_2, Bn ester); 4,99 (s, 1H, H-1); 4,69 (s, 2H, CH_2, poveznica amid-triazol); 4,60 – 4,34 (m, 10H: 8H, 4 × CH_2, Bn; 1H, CH, Ala; 1H, CH, Glu); 4,24 (t, 2H, J = 7,0 Hz, CH_2, (C1) C_{16}); 4,15 – 3,90 (m, 5H: 2H, CH_2, acetilna poveznica; 3H, H-2, H-3, H-4); 3,76 – 3,72 (m, 1H, H-5); 3,69 – 3,64 (m, 2H: H-6a; H-6b); 2,44 (t, 2H, J = 7,2 Hz, CH_2, *iso*Gln); 2,21 – 2,17 (m, 1H, CH_2, *iso*Gln); 1,97 – 1,91 (m, 1H, CH_2, *iso*Gln); 1,79 – 1,76 (m, 2H, CH_2, (C2) C_{16}); 1,34 (d, 3H, J = 7,1 Hz, CH_3, Ala); 1,26 (br s, 26H, 13 × CH_2, (C3-C16) C_{16}); 0,89 (t, 3H, J = 6,3 Hz, CH_3, C_{16}).

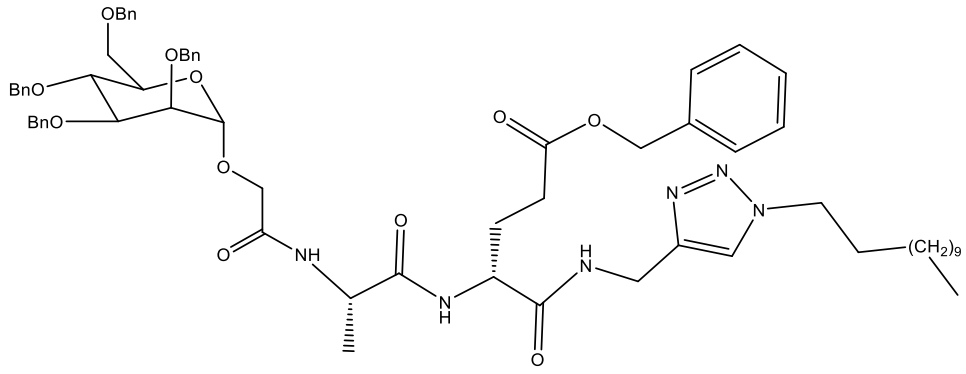
^{13}C NMR (CD_3OD) δ/ppm: 173,64, 172,85, 171,12, 170,32 (4 × C=O); 144,77, 138,48, 138,28, 138,16 (4 × C, Bn); 128,16-127,28 (CH, Bn); 122,68 (CH, triazol); 98,17 (C1); 79,55, 74,60, 74,39, 72,26 (C2-C5); 74,47, 73,03, 72,39, 71,63 (4 × CH_2, Bn); 68,93 (C6); 66,11 (CH_2, Bn-ester); 65,74 (CH_2, acetilna poveznica); 52,81 (CH, *iso*Gln); 49,92 (CH_2, (C1) C_{16}); 49,03 (CH, Ala); 34,46 (CH_2, poveznica amid-triazol); 31,67 (CH_2, (C2) C_{16}); 30,01-28,70 (CH_2: (C3-C13) C_{16}, 26,32 (CH_2, *iso*Gln); 26,06 (CH_2, (C14) C_{16}); 22,34 (CH_2, (C15) C_{16}); 16,53 (CH_3, Ala) 13,05 (CH_3, C_{16}).

ESI-MS: *m/z* 1194,5 $[M+H]^+$

*3.8.3. Priprava spoja **14** – benzil-(4R)-4-{[1-(dodeka-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metilaminokarbonil}-4-(2S)-2-[2,3,4,6-tetra-O-benzil-α-D-manopiranoziloksi)etanamido]propanamido}butanoata*

Prethodno priređeni šećer **11** (70 mg, 0,117 mmol) otopi se u 3 mL suhog DCM-a. Priređena otopina ohladi se na 0 °C te joj se doda HOBT (15,8 mg, 0,117 mmol) i EDC·HCl (27,6 mg,

0,144 mmol) nakon čega se smjesa miješa 15 minuta na 0 °C. Nakon 15 minuta u ohlađenu smjesu se doda se prethodno priređen dodecilni derivat triazolnog dipeptida (61 mg, 0,090 mmol) otopljen u suhom DCM-u te TEA (25,1 μL, 0,180 mmol). Reakcijska smjesa nastavi se miješati sat vremena na 0 °C, a potom još 24 sata na sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Tijek reakcije prati se TLC-om u 6 % MeOH u $CHCl_3$-u. Nakon 24 sata u reakcijsku smjesu doda se TEA (4,2 μl, 0,030 mmol), HOBT (3,6 mg, 0,021 mmol) i EDC·HCl (5,2 mg, 0,021 mmol). Reakcijska smjesa nastavi se miješati u atmosferi argona. Nakon još 24 h reakcija je prekinuta. Reakcijska smjesa se upari, a upareni ostatak otopi se u EtOAc-u (15 mL) i ekstrahira vodom (2 × 15 mL). Organski sloj osuši se nad natrijevim sulfatom te upari na rotacijskom uparivaču. Dobiveni ostatak pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz gradijentnim eluiranjem od čistog DCM-a do sustava 3% MeOH u EtOAc-u. Dobiven je bezbojni uljasti produkt **14** (70 mg, 69 %, slika 35) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 35: Strukturna formula molekule spoja **14**

$\boldsymbol{R_f}$ = 0,70 (9 % MeOH u DCM-u)

^{1}H NMR (CD_3OD) δ / ppm: 7,72 (s, 1H, CH, triazol); 7,40 – 7,16 (m, 25H, 25 × CH, Bn); 5,09 (s, 2H, CH_2, Bn ester); 4,99 (d, 1H, J = 1,8 Hz, H-1); 4,70 (s, 2H, CH_2, poveznica amid-triazol); 4,82 – 4,32 (m, 10H: 8H, 4 × CH_2, Bn; 1H, CH, Ala; 1H, CH, Glu); 4,24 (t, 2H, J = 7,1 Hz, CH_2, (C1) C_{12}); 4,15 – 3,92 (m, 5H: 2H, CH_2, acetilna poveznica; 3H, H-2, H-3, H-4); 3,77 – 3,74 (m, 1H, H-5); 3,72 – 3,64 (m, 2H: H-6a; H-6b); 2,44 (t, 2H, J = 7,3 Hz, CH_2, *iso*Gln); 2,22 – 2,16 (m, 1H, CH_2, *iso*Gln); 1,98 – 1,91(m, 1H, CH_2, *iso*Gln); 1,81 – 1,74 (m, 2H, CH_2, (C2) C_{12}); 1,35 (d, 3H, J = 7,1 Hz, CH_3, Ala); 1,28 – 1,24 (m, 18H, 9 × CH_2, (C3-C11) C_{12}); 0,88 (t, 3H, J = 6,9 Hz, CH_3, C_{12}).

^{13}C NMR 178,65, 177,86, 177,12, 175,33 (4 × C=O); 149,78, 143,49, 143,28, 143,17 (4 × C, Bn); 133,17-132,28 (CH, Bn); 127,68 (CH, triazol); 103,17 (CH, C1); 84,55, 79,60, 79,39 77,26, (CH, C2-C5); 79,47, 78,03, 77,39, 76,64 (CH_2, Bn); 73,93 (CH_2, C6); 71,11 (CH_2, Bn-ester); 70,75 (CH_2, acetilna poveznica); 57,82 (CH, *iso*Gln); 54,93 (CH_2, (C1) C_{12}); 54,03 (CH, Ala); 39,46 (CH_2, poveznica amid-triazol); 36,67 (CH_2, (C2) C_{12}); 35,02, 34,87, 34,35, 34,27, 34,17, 34,08, 33,71, 31,32, 31,07 (CH_2, (C3-C10) C_{12}; 2 × CH_2, *iso*Gln); 27,34 (CH_2, (C11) C_{12}); 21,53 (CH_3, Ala); 18,06 (CH_3, C_{12}).

ESI-MS: *m/z* 1137,5 $[M+H]^+$

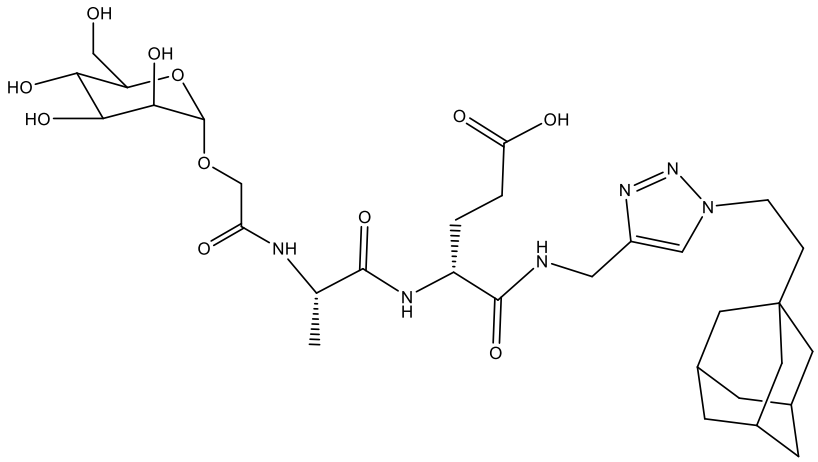
3.9. Uklanjanje benzilnih zaštitnih skupina sa spojeva 12, 13 i 14 i priprava ciljnih molekula 15, 16 i 17

*3.9.1. Općeniti postupak uklanjanja benzilnih zaštitnih skupina sa spojeva **12**, **13** i **14***

Konjugati benzilirane manoze i alifatskih triazolnih dipeptida **12**, **13** i **14** otope se u etanolu nakon čega se u otopinu doda paladij na ugljiku (*w*(Pd) = 10 %). Tako pripravljena smjesa miješa se 24 h u atmosferi vodika (*p* = 2,8 bar), a tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu otapala CH_3CN : H_2O = 5 : 1. Po završetku reakcije smjesa se profiltrira, a dobiveni filtrat upari do suha. Smjesa se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala CH_3CN : H_2O = 5 : 1.

*3.9.2. Priprava spoja **15** – (4*R*)-4-{N-{1-[(2-(adamantan-1-il)etan-1-il]-1*H*-1,2,3-triazol-4-il}metilkarbamoil}-4-{(2*S*)-2-[(α-*D*-manopiranoziloksi)etanamido]propanamido}butanske kiseline*

Spoj **12** (50,1 mg, 0,0444 mmol) otopljen je u EtOH (8 mL) u što je dodan Pd/C (25 mg). Nakon 24 h reakcija je prekinuta te je reakcijska smjesa profiltrirana u svrhu uklanjanja katalizatora. Matičnica je uparena te je nakon kromatografskog pročišćavanja dobiven spoj **15** (20,3 mg, 67 %, slika 35).



Slika 35: Strukturna formula molekule spoja **15**

$\boldsymbol{R_f}$ = 0,30 (CH_3CN : H_2O = 5 : 1)

^{1}H NMR (CD_3OD) δ/ppm: 7,86 (s, 1H, triazol); 4,83 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1,7 Hz, H-1); 4,45 (s, 2H, CH_2, poveznica amid-triazol); 4,42 – 4,38 (m, 3H: 1H, CH, Ala; 2H, CH_2, C1-Et); 4,37 – 4,33 (m, 1H, CH, *iso*Gln); 4,19 (d, 1H, J_{gem} = 15,2 Hz, CH_2, acetilna poveznica), 4,07 (d, 1H, J_{gem} = 15,2 Hz, CH_2, acetilna poveznica); 3,95 (dd, 1H, $J_{2,3}$ = 3,4 Hz, $J_{1,2}$ = 1,7 Hz, H-2); 3,84 (1H, dd, $J_{6a,6b}$ = 11,8 Hz, $J_{5,6a}$ = 2,1 Hz, H-6b); 3,79 (dd, 1H, $J_{3,4}$ = 9,0 Hz, $J_{2,3}$ = 3,4 Hz, H-3); 3,70 (dd, 1H, $J_{6a,6b}$ = 11,8 Hz, $J_{5,6b}$ = 5,7 Hz, H-6a); 3,63 (app t, 1H, J = 9,4 Hz, H-4); 3,60 – 3,55(m, 1H, H-5); 2,36 (t, 2H, J = 7,1 Hz, CH_2, *iso*Gln); 2,21 – 2,12(m, 1H, CH_2, *iso*Gln); 1,97 – 1,88 (br s, 4H: 3H, H-β; 1H, CH_2, *iso*Gln); 1,78 – 1,65 (m, 8H: 6H-γ; CH_2, C2-Et); 1,59 (br s, 6H, H-α); 1,40 (d, 3H, J = 7,1 Hz, CH_3, Ala).

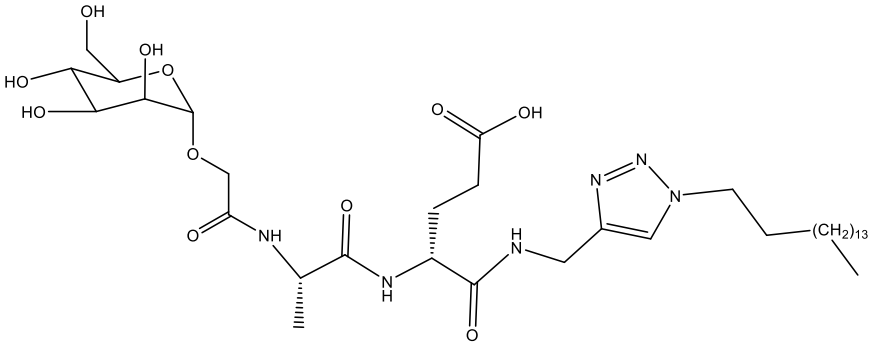
^{13}C NMR (CD_3OD) δ / ppm: 173,70, 172,33, 170,48 (4 × C=O); 122,80 (CH, triazol); 100,36 (C1); 73,89, 70,95, 70,27, 67,16 (C2-C5); 65,47 (C6), 61,42 (CH_2, acetilna poveznica); 53,07 (CH, *iso*Gln), 49,05 (CH, Ala); 45,51, 44,12 (2 × CH_2, Et); 41,72 (CH_2 α); 36,61 (CH_2 γ); 34,41 (CH_2, poveznica amid-triazol); 29,34 (CH_2, *iso*Gln); 28,62 (CH β); 26,58 (CH_2, *iso*Gln); 16,56 (CH_3, Ala).

ESI-MS: *m/z* 681,2 $[M+H]^+$

*3.9.3. Priprava spoaj **16** – (4R)-4-{N-[1-(heksadeka-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metilkarbamoil}-4-{(2S)-2-[(α-D-manopiranoziloksi)etanamido]propanamido}butanske kiseline*

Spoj **13** (44,5 mg, 0,0373 mmol) otopljen je u EtOH (8 mL) u što je dodan Pd/C (22 mg). Nakon 24 h reakcija je prekinuta te je reakcijska smjesa profiltrirana u svrhu uklanjanja katalizatora.

Matičnica je uparena te je nakon kromatografskog pročišćavanja dobiven spoj **16** (18,1 mg, 65 %, slika 36).



Slika 36: Strukturna formula molekule spoja **16**

$\boldsymbol{R_f}$ = 0,45 (CH_3CN : H_2O = 5 : 1)

^{1}H NMR (CD_3OD) δ / ppm: 7,84 (s, 1H, CH, triazol); 4,83 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1,7 Hz, H-1); 4,45 (d, 2H, J = 1,2 Hz, CH_2, poveznica amid-triazol); 4,42 – 4,35 (m, 3H: 2H, CH_2, (C1) C_{16}; 1H, CH, Ala); 4,34 – 4,30 (m, 1H, CH, *iso*Gln); 4,19 (d, 1H, J_{gem} = 15,2 Hz, CH_2, acetilna poveznica), 4,06 (d, 1H, J_{gem} = 15,2 Hz, CH_2, acetilna poveznica); 3,95 (dd, 1H, $J_{2,3}$ = 3,4 Hz, $J_{1,2}$ = 1,7 Hz, H-2); 3,84 (1H, dd, $J_{6a,6b}$ = 11,8 Hz, $J_{5,6a}$ = 2,0 Hz, H-6b); 3,79 (dd, 1H, $J_{3,4}$ = 8,8 Hz, $J_{2,3}$ = 3,4 Hz, H-3); 3,69 (dd, 1H, $J_{6a,6b}$ = 11,8 Hz, $J_{5,6b}$ = 5,6 Hz, H-6a); 3,64 – 3,54 (m, 2H: H-4, H-5); 2,34 (t, 2H, J = 7,2 Hz, CH_2, *iso*Gln); 2,18 – 2,10 (m, 1H, CH_2, *iso*Gln); 1,98 – 1,86 (m, 3H: 2H, CH_2, (C2) C_{16}; 1H, CH_2, *iso*Gln); 1,40 (d, 3H, J = 7,1 Hz, CH_3, Ala);1,32 – 1,28(m, 26H, 13 × CH_2, (C3-C15) C_{16}); 0,89 (t, 3H, J = 6,9 Hz, CH_3, C_{16}).

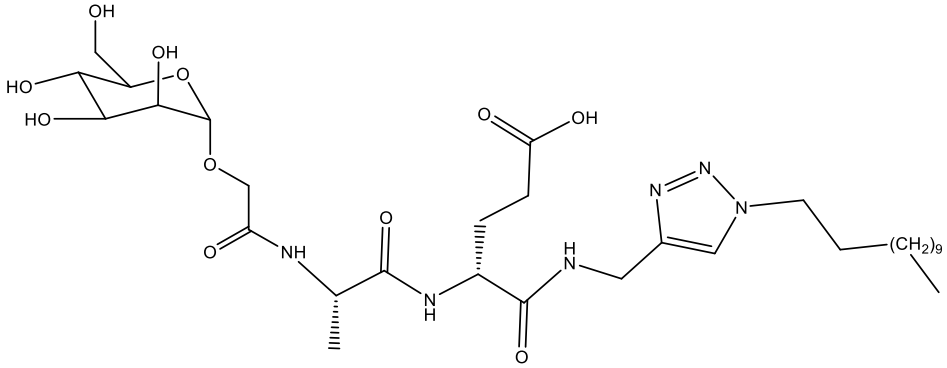
^{13}C NMR (CD_3OD) δ / ppm: 173,63, 172,41, 170,42, 144,84 (4 × C=O); 122,82 (CH, triazol); 101,37 (C1); 73,93, 70,98, 70,29, 67,21 (C2-C5); 65,46 (C6); 61,50 (CH_2, acetilna poveznica); 53,28 (CH, *iso*Gln); 49,99 (CH_2, (C1) C_{16}); 48,99 (CH, Ala); 34,44 (poveznica amid-triazol); 31,68 (CH_2, (C2) C_{16}); 30,81-26,10 (CH_2, (C3-C14) C_{16}; 2 × CH_2, *iso*Gln,); 22,33 (CH_2, (C15) C_{16}); 16,63 (CH_3, Ala), 13,04 (CH_3, C_{16}).

ESI-MS: *m/z* 743,9 $[M+H]^+$

*3.9.4. Priprava spoja **17** – (4R)-4-{N-[1-(dodeka-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metilkarbamoil}-4-{(2S)-2-[(α-D-manopiranoziloksi)etanamido]propanamido}butanske kiseline*

Spoj **14** (55 mg, 0,0483 mmol) otopljen je u EtOH (8 mL) u što je dodan Pd/C (27 mg). Nakon 24 h reakcija je prekinuta te je reakcijska smjesa profiltrirana u svrhu uklanjanja katalizatora.

Matičnica je uparena te je nakon kromatografskog pročišćavanja dobiven spoj **17** (25,2 mg, 76 %, slika 37).



Slika 37: Strukturna formula molekule spoja **17**

$\boldsymbol{R_f}$ = 0,53 (CH_3CN : H_2O = 5 : 1)

^{1}H NMR (CD_3OD) δ / ppm: 7,84 (s, 1H, CH, triazol); 4,83 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1,5 Hz, H-1); 4,45 (d, 2H, J = 2,6 Hz, CH_2, poveznica amid-triazol); 4,42 – 4,34 (m, 4H: 2H, CH_2, (C1) C_{12}; 1H, CH, Ala; 1H, CH, *iso*Gln); 4,19 (d, 1H, J_{gem} = 15,2 Hz, CH_2, acetilna poveznica), 4,06 (d, 1H, J_{gem} = 15,2 Hz, CH_2, acetilna poveznica); 3,95 (dd, 1H, $J_{2,3}$ = 3,3 Hz, $J_{1,2}$ = 1,7 Hz, H-2); 3,84 (1H, dd, $J_{6a,6b}$ = 11,8 Hz, $J_{5,6a}$ = 2,0 Hz, H-6b); 3,79 (dd, 1H, $J_{3,4}$ = 9,0 Hz, $J_{2,3}$ = 3,4 Hz, H-3); 3,69 (dd, 1H, $J_{6a,6b}$ = 11,8 Hz, $J_{5,6b}$ = 5,8 Hz, H-6a); 3,61 (app t, 1H, J = 9,4 Hz, H-4); 3,59 – 3,55 (m, 1H, H-5); 2,35 (t, 2H, J = 6,9 Hz, CH_2, *iso*Gln); 2,19 – 2,12 (m, 1H, CH_2, *iso*Gln); 1,98 – 1,86 (m, 3H: 2H, CH_2, (C2) C_{12}, 1H, CH_2, *iso*Gln); 1,40 (d, 3H, J = 7,1 Hz, CH_3, Ala); 1,32 – 1,28 (m, 18H, CH_2, (C3-C11) C_{12}); 0,89 (t, 3H, J = 6,9 Hz, CH_3, C_{12}).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ / ppm: 173,64, 172,39, 170,44 (4 × C=O); 122,83 (CH, triazol); 100,37 (C1); 73,94, 70,99, 70,29, 67,21 (C2-C5); 65,45 (C6); 61,62 (CH_2, acetilna poveznica); 53,21 (CH, *iso*Gln); 49,99 (CH_2, (C1) C_{12}); 48,99 (CH, Ala); 34,44 (poveznica amid-triazol); 31,67 (CH_2, (C2) C_{12}); 30,65-26,09 (8 × CH_2, (C3-C10) C_{12}; 2 × CH_2, *iso*Gln,); 22,33 (CH_2, (C11) C_{12}); 16,63 (CH_3, Ala), 13,04 (CH_3, C_{12}).

ESI-MS: *m/z* 687,3 $[M+H]^+$

3.10. Ispitivanje adjuvantskog djelovanja spojeva 15, 16 i 17

Testiranja na životinjama provedena su u Laboratoriju Instituta Ruđer Bošković u skladu s Hrvatskim zakonom o dobrobiti životinja (NN 19/1999). Imunizacijski protokol sastoji se od prvotne imunizacije kao i dva kasnija docijepljivanja u razmaku od 21 dan. Imunizacija je

provedena ovalbuminom (OVA) kao testnim antigenom. Vađenje krvi provodi se sedam dana nakon svakog docjepljivanja. Pokusne životinje (skupine od pet životinja) imunizirane su ovalbuminom uz dodatak ciljnih molekula **15**, **16** i **17** čiju adjuvantsku aktivnost ispitujemo. Prikupljeni serumi dekomplementirani su na 56 °C tijekom 30 min te su pohranjeni na -20 °C do ispitivanja. Eksperimentalne skupine od pet miševa cijepljene su subkutano (s.c.) u bazu repa sa 100 µLtestne otopine po mišu. U 100 µL fiziološke otopine aplicirano je ukupno 10 µg OVA i 200 µg testiranog spoja. Nakon toga, enzimskim imunotestom (ELISA, *engl. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) određena je količina antitijela i to ukupnih anti-OVA antitijela kao pokazatelja intenziteta ukupne imunoreakcije. Isto tako određena je i količina antitijela podtipa IgG1 i IgG2a kao pokazatelja smjera imunoreakcije. Rezultati provedenog ispitivanja nalaze se u fazi obrade u što je uključena doc. Rosana Ribić sa Sveučilišta Sjever, Varaždin.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

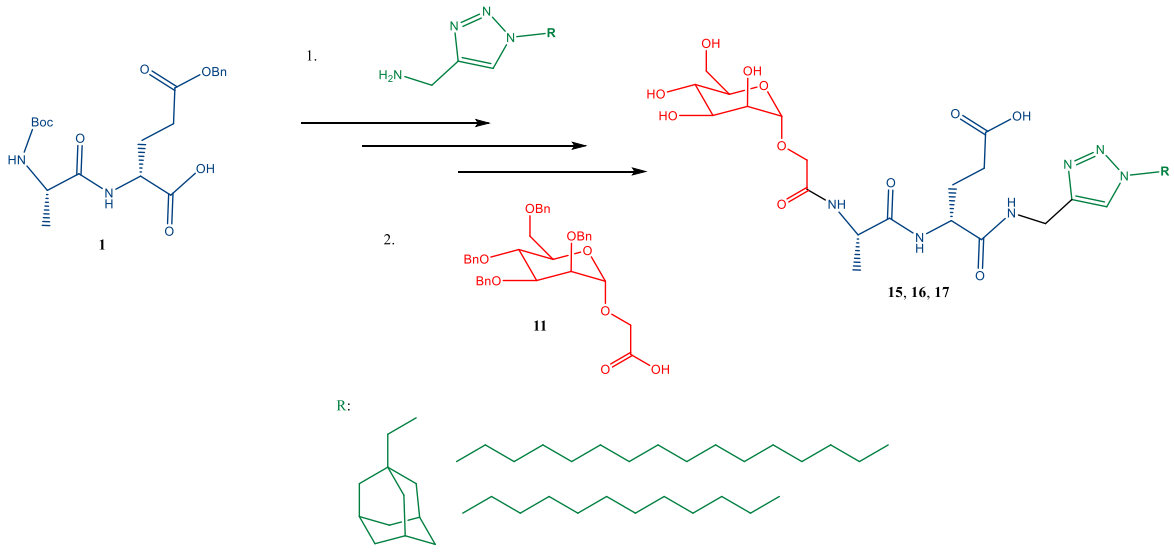
4.1. Uvod

U sklopu diplomskog rada uspješno su priređena tri alifatska triazolna derivata desmuramil-dipeptida, L-Ala-D-*iso*Gln, koji su dodatno modificirani uvođenjem manozne podjedinice. Poznato je da korištenje desmuramil-dipeptida kao adjuvanta ima neželjene nuspojave, pa se iz tog razloga ova molekula strukturno modificira u svrhu poboljšanja bioloških svojstava. Modifikacija provedena u sklopu ovoga rada uključivala je uvođenje alifatskih triazolnih podjedinica u strukturu molekule desmuramil-dipeptida na α-ugljikov atom glutaminske kiseline. Razlog uvođenja alifatskih podjedinica leži u njihovoj hidrofobnosti odnosno lipofilnosti, zbog koje mogu povećati interakciju s lipidnim dvoslojem te samim time poboljšati prijenos željenog spoja u stanicu pasivnom apsorpcijom. U tom smislu u sklopu ovog rada kao alifatske lipofilne podjedinice odabrane su adamantilna podjedinica s poveznicom od dva atoma ugljika te dva alifatska nerazgranana lanca različite duljine (C_{12} i C_{16}). Uloga triazolnog prstena je povezati dva različita fragmenta molekule, alifatsku podjedinicu i dipeptid, a kao strukturni motiv odabran je zato što i sam posjeduje biološku aktivnost. Konačno, u strukturu alifatskih triazolnih derivata desmuramil-dipeptida uvedena je i manozna podjedinica pomoću acetatne poveznice. Uvođenje manozne podjedinice omogućuje bolje prepoznavanje potencijalnog adjuvanta od strane receptora specifičnih za manozu smještenih na stanicama imunološkog sustava čime se može pospješiti i imunološki odgovor. Struktura ciljnih molekula ovog rada dizajnirana je na temelju nedavno objavljenih rezultata istraživanja provedenih na Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a u suradnji sa Sveučilištem Sjever, Varaždin, i Institutom Ruđer Bošković, Zagreb, koja su ukazala na potencijal uvođenja triazolne adamantile podjedinice u strukturu manoziliranog desmuramil-dipeptida u smislu povećanja adjuvantske aktivnosti ispitane u *in vivo* pokusima.[3]

Za pripravu ciljnih molekula upotrijebljen je konvergentni pristup sintezi (slika 36), odnosno spoj je priređen tako da se najprije sintetiziraju molekulski fragmenti koji se zatim povezuju logičnim redoslijedom. Konkretno, alifatski triazolni amin, dipeptid i manozna podjedinica priređeni su u tri različita sintetska puta te su međusobno povezani reakcijama amidacije i to najprije triazolni amin i dipeptid nakon čega je uvedena manozna podjedinica.

Polazni dipeptid **1,** Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH, priređen je reakcijom benzilom zaštićene D-glutaminska kiseline, D-Glu(OBn), i Boc-zaštićenog alanina s aktiviranom karboksilnom skupinom, Boc-L-Ala-OSu. Korištenje zaštićenih aminokiselina u navedenoj reakciji je nužno kako bi se izbjegle moguće neželjene reakcije. Alifatski triazolni amini **2** i **5** pripravljeni su reakcijom propargilamina s odabranim alifatskim azidima, heksadecil-azidom i 2-(adamant-1-il)etil-azidom, klik-reakcijom uz prethodno *in situ* zaštićivanje amino-skupine propargilamina Boc-zaštitnom skupinom. Riječ je o tzv. *one-pot* reakciji u kojoj se najprije zaštićuje amino-skupina propargilamina, a odmah potom, bez izolacije produkta, slijedi klik-reakcija s azidom. Klik-reakcijom, konkretno bakar(I) kataliziranom azid-alkinskom cikloadicijom (CuAAC), nastaju alifatski 1,4-triazolni derivati propargilamina. Azide potrebne za ovu reakciju bilo je potrebno sintetizirati iz odgovarajućih halogenalkana i natrijevog azida. U sklopu rada pripravljen je heksadecil-azid (**4**) dok je 2-(adamant-1-il)etil-azid prethodno sintetiziran u laboratoriju. U sljedećem koraku dodatkom trifluoroctene kiseline uklonjene su zaštitne skupine s amino-skupina pripravljenih alifatskih triazolnih derivata **2** i **5** pri čemu su dobiveni spojevi **3** i **6** u obliku odgovarajućih soli. Tako priređeni triazolni amini mogu preko slobodne amino-skupine reagirati s karboksilnom skupinom na α-ugljikovom atomu D-glutaminske kiseline ranije priređenog dipeptida **1**. I dok je spoj **3** uspješno reagirao s dipeptidom **1** uz dodatak *n*-butil-klorformijata kao kondenzacijskog reagensa i *N*-metilmorfolina kao baze dajući spoj **7**, navedena metoda nije se pokaza uspješna za kondenzaciju dipeptida **1** i triazola **6**. Navedeni spojevi uspješno su kondenzirani uz pomoć HBTU-a kao kondenzacijskog reagensa dajući produkt **9** u kvantitativnom prinosu. Tako priređenim spojevima **7** i **9** u nastavku sinteze uklonjena je Boc zaštitna skupina s amino-skupine alanina pri čemu su priređeni alifatski triazolni derivati desmuramil-dipeptida **8** i **10** u obliku soli trifluoroctene kiseline. Spojevi **8** i **10** te ranije priređeni dodecilni triazolni derivat sadrže slobodnu amino-skupinu koja može reagirati s karboksilnom skupinom benzilirane manozne podjedinice **11**. Manozna podjedinica **11** dobivena je hidrolizom ranije priređenog *tert*-butilnog estera uz dodatak trifluoroctene kiseline. Kondenzacija manozne podjedinice **11** i triazolnih derivata dipeptida provedena je uz kondenzacijski reagens EDC·HCl i dodatak HOBt-a u svrhu sprječavanja izomerizacije. Navedena metoda amidacije pokazala se uspješnom te su priređeni manozni konjugati desmuramil-dipeptida **12**-**14.** U posljednjem koraku hidrogenolizom su uklonjene benzilne zaštitne skupine s manozne podjedinice te benzilna zaštitna skupina na bočnom ogranku glutamata pri čemu su dobivene ciljne molekule

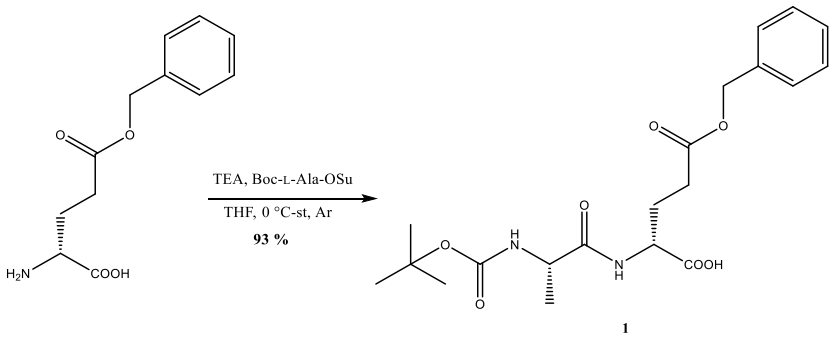
15-17. Važno je napomenuti da je mogućnost uklanjanja svih zaštitnih skupina u jednom, posljednjem koraku reakcije najvažniji razlog njihovog odabira. Valja također istaknuti da je odabrana ona zaštitna skupina koja se može ukloniti nedestruktivnom metodom kao što je katalitička hidrogenoliza čime je osigurana kemijska stabilnost i inertnost ostalih strukturnih fragmenata u molekuli.



Slika 36: Sažeti prikaz provedenih sinteza

4.2. Priprava dipeptida 1

Polazni dipeptid **1** pripravljen je kondenzacijskom reakcijom između D-glutamata u kojem je bočni ogranak prethodno zaštićen benzilnom skupinom, D-Glu(OBn), te komerijalno dostupnog sukcinimidnog estera alanina, Boc-L-Ala-OSu, zaštićenog na amino-kraju Boc-zaštitnom skupinom (slika 37). Ovakav derivat alanina idealan je za reakciju sa slobodnom amino-skupinom zaštićenog glutamata jer sadrži aktiviranu karboksilnu skupinu u obliku sukcinimidnog estera te zaštićenu amino-skupinu u svrhu sprječavanja samokondenzacije. Dipeptid **1** priređen je u THF-u uz iskorištenje od 93 % uz trietilamin kao bazu. Također, reakcija je provedena bez potrebe za kromatografskim pročišćavanjem produkta. Važno je napomenuti kako su za provođenje ove kondenzacije nužni suhi uvjeti, u ovom slučaju suhi THF, i inertna atmosfera argona.

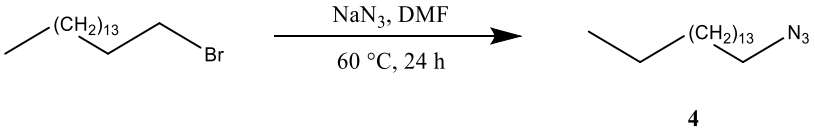


Slika 37: Shematski prikaz priprave dipeptida **1**

4.3. Priprava alifatskih 1,4-disupstituiranih triazolnih prekursora

*4.3.1. Priprava heksadecil-azida (**4**)*

Heksadecil-azid (**4**) priređen je supstitucijskom reakcijom između odgovarajućeg heksadecil-bromida i natrijevog azida (slika 38). U navedenoj reakciji dolazi do supstitucije atoma broma vezanog na primarni ugljikov atoma azidnim anionom. Budući da je azidni anion vrlo jaki nukleofil te se nukleofilni napad događa na primarnom, sterički neometanom ugljikovom atomu, reakcija slijedi S_N2 mehanizam. S obzirom da je poznato da navedeni reakcijski mehanizam preferira polarna aprotična otapala, kao otapalo u reakciji korišten je DMF. Reakcija je provedena uz zagrijavanje 24 h. Iz reakcijske smjese odgovarajući azid izoliran je ekstrakcijom uz veliku količinu vode u svrhu uklanjanja DMF-a iz reakcijske smjese. Nastanak azida praćen je IR spektroskopijom gdje je došlo do pojave karakteristične vrpce na 2100 cm^{-1} koja odgovara asimetričnom istezanju trostruke veze između atoma dušika.



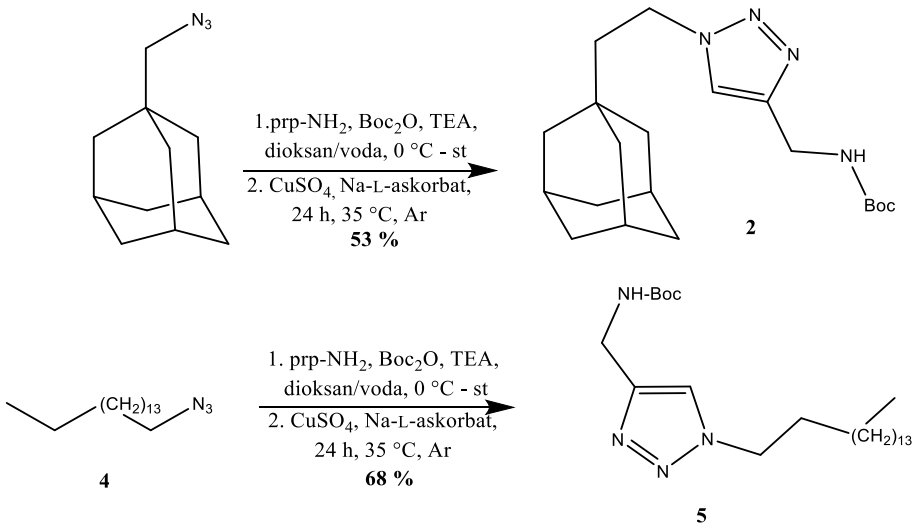
Slika 38: Shematski prikaz priprave heksadecilnog-azida **4**

4.3.2. Priprava alifatskih triazolnih derivata propargilamina 1,3-cikloadicijskom reakcijom

Spojevi **2** i **5** sintetizirani su bakrom(I) kataliziranom azid-alkinskom 1,3-dipolarnom cikloadicijom (CuAAC) kojom nastaje 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolnoi prsten. Reakcija je provedena između heksadecil-azida **4** odnosno ranije priređenog 2-(adamant-1-il)etil-azida i

propargilamina (slika 39). Prije dodatka odgovarajućih azida i katalizatora amino-skupina propargilamina zaštićena je Boc-zaštitom. Razlog zaštićivanja amino-skupine je taj što prethodno provedena klik-reakcija nezaštićenog propargilamina i 1-azidoadamantana uz *in situ* generirani bakar(I) nije rezultirala nastankom željenog supstituiranog triazola. Moguće objašnjenje nenastajanja očekivanog produkta jest to da dolazi do interakcije elektronskog para atoma dušika slobodne amino-skupine i bakra(I) kao katalizatora što onemogućuje uključivanje bakra(I) u ranije opisani katalitički ciklus (poglavlje 2.3.3) kao i povoljno pozicioniranje svih sudionika ove reakcije.[3]

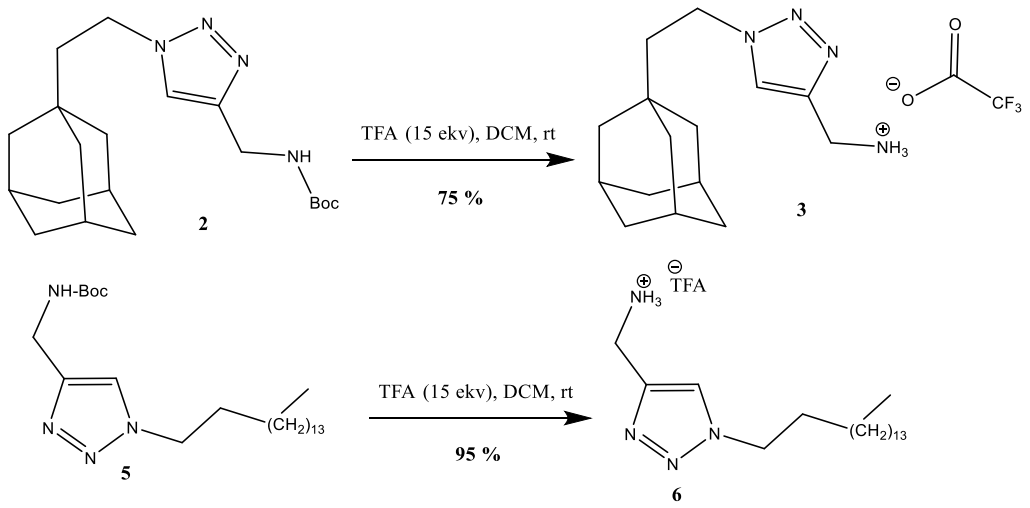
Uvođenje Boc-zaštitne skupine provedeno je uz di-*tert*-butil-dikarbonat kao izvor Boc-a i dodatak trietilamina kao baze. Bez izolacije zaštićenog produkta, u reakcijske smjese su zatim dodani odgovarajući azid, modra galica i natrijev L-askorbat kako bi *in-situ* došlo do generiranja bakra(I), katalizatora za klik-reakciju. Ovakve uzastopne reakcije u kojima se produkt prve reakcije bez izolacije koristi kao reaktant za sljedeći reakcijski korak zovu se *one-pot* reakcije. Vrijeme trajanja ovih reakcija bilo je oko 24 h, konačni produkt je izoliran kromatografskim pročišćavanjem, a ukupna iskorištenja su iznosila 53 % (**2**) i 68 % (**5**). Treba napomenuti da je u prethodnim istraživanjima 1,3-cikloadicijska reakcija na sličnom alkil-azidu isprobana uz srebro(I) kao katalizator, no triazolni prsten nije uspješno sintetiziran.[3]



Slika 39: Shematski prikaz sinteze spojeva **2** i **5** CuAAC klik-reakcijom

*4.3.3. Uklanjanje Boc zaštitne skupine sa spojeva **2** i **5***

Uklanjanje Boc zaštitne skupine s produkata **2** i **5** provedeno je u kiselim reakcijskim uvjetima uz dodatak trifluoroctene kiseline (TFA) u suhom dioklormetanu kao otapalu (slika 40). Kao što je ranije navedeno (poglavlje 2.2.3.1), za uklanjanje Boc zaštitne skupine potrebni su kiseli uvjeti, a trifluorctena kiselina se pokazala kao dovoljno jaka kiselina za željenu reakciju. Također, korištenju trifluorctene kiseline dodatno pogoduje njeno relativno nisko vrelište zbog čega se može lako ukloniti iz reakcijske smjese uparavanjem. U konkretnom slučaju za navedenu reakciju bilo je potrebno 15 molarnih ekvivalenata trifluoroctene kiseline. Minimalno vrijeme trajanja reakcija bilo je 3 h, a ovisno o napredovanju reakcije koje je praćeno tankoslojnom kromatografijom, prema potrebi je dodavana kiselina. Nakon kromatografskog pročišćavanja produkata iskorištenja reakcija su iznosila 75 % (**3**) i 95 % (**6**). Konačni produkti su dobiveni u obliku TFA soli što je i potvrđeno spektroskopijom NMR.



Slika 40: Shematski prikaz uklanjanja Boc-zaštitne skupine sa spojeva **2** i **5** i priprava spojeva **3** i **6**

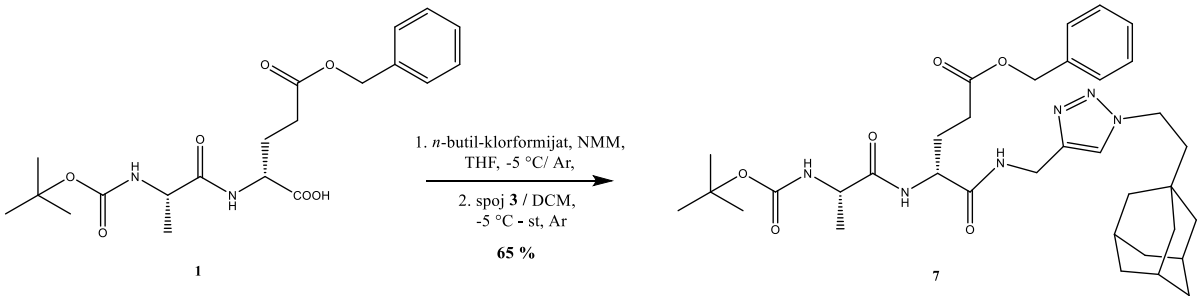
4.4. Priprava alifatskih triazolnih derivata desmuramil-dipeptida

U sljedećim stupnjevima sinteze bilo je potrebno alifatske triazolne podjedinice **3** i **6** uvesti na dipeptid **1** uz stvaranje amidne veze. Dipeptid je zaštićen Boc-zaštitnom skupinom kako prilikom kondenzacije s alifatskim triazolnim aminima **3** i **6** ne bi došlo do samokondenzacije dipeptida. Osim toga, prilikom nastanka amidne veze dodatno je trebalo vodit računa o kiralnim centrima u α-položaju u odnosu na karboksilne skupine aminokiselina prisutnih u dipeptidu.

Budući da je za reakcije u kojima nastaje amidna veza u pravilu potrebna baza, navedenom koraku sinteze trebalo je pristupiti s oprezom.

*4.4.1. Kondenzacija 2-(adamant-1-il)etil-triazolnog derivata **3** s dipeptidom **1***

Reakcija kondenzacije triazolnog derivata **3** s dipeptidom **1** provedena je metodom mješovitog anhidrida uz *n*-butil-klorformijat kao kondenzacijski reagens i bazu *N*-metilmorfolin (slika 41). Prvi korak reakcije je aktivacija karboksilne skupine na glutamatu reakcijom s *n*-butil-klorformijatom. Kao što je opisano u poglavlju 2.2.2.3, karboksilnu skupinu bilo je potrebno aktivirani prije dodatka odgovarajućeg nukleofila, triazolnog amina **3** sa slobodnom amino-skupinom. Ukoliko se spoj **3** doda ranije, umjesto reakcije karboksilne skupine dipeptida **1** s *n*-butil-klorformijatom može reagirati spoj **3**. Imajući to u vidu, reakcija je provedena na sniženoj temperaturi kako bi se izbjegle opisane neželjene reakcije. Dodatno, budući da voda također može imati ulogu nukleofila kao i pomicati ravnotežu prema reaktantima i time ometati sintezu amidne veze, reakcija je provedena u suhim uvjetima u atmosferi argona. Reakcija je trajala nekoliko sati, a prekinuta je u trenutku kada tankoslojnom kromatografijom nije više uočen napredak reakcije. Nastali produkt izdvojen je iz reakcijske smjese ekstrakcijom te pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela. Iskorištenje reakcije iznosilo je 65 %, a spektroskopijom NMR potvrđeno je da nije došlo do izomerizacije dipeptida.



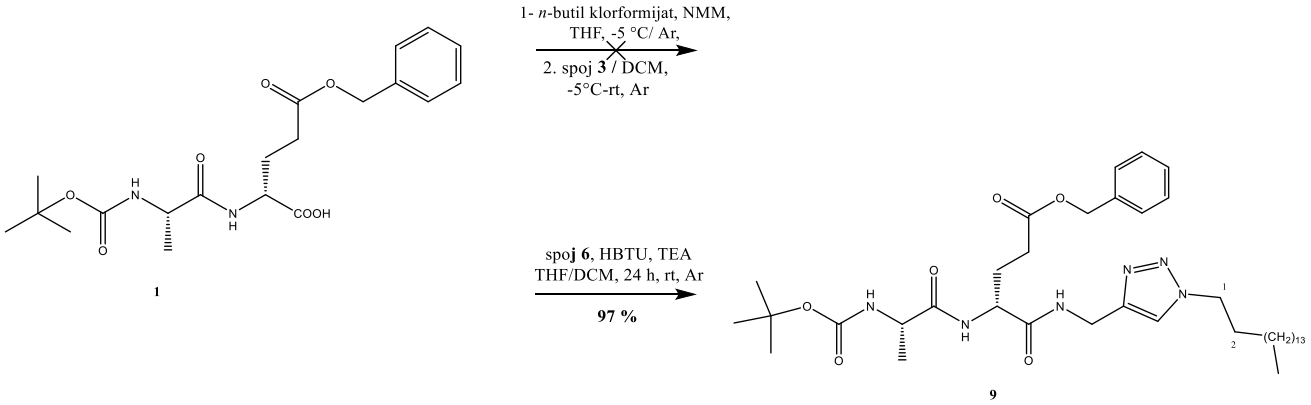
Slika 41: Shematski prikaz kondenzacije 2-(adamant-1-il)etil-triazolnog derivata **3** s dipeptidom **1**

*4.4.2. Kondenzacija heksadecil-triazolnog derivata **6** s dipeptidom **1***

Reakcija kondenzacije triazolnog derivata **6** s dipeptidom **1** najprije je provedena metodom mješovitog anhidrida uz *n*-butil-klorformijat kao kondenzacijski reagens te bazu *N*-metilmorfolin (slika 42). Reakcija je provedena nekoliko puta u jednakim uvjetima kao i

kondenzacija derivata **3** s dipeptidom **1**, međutim očekivani produkt **9** nije uspješno izoliran. Poteškoće koje su se javile su izomerizacija stereogenog centra na dipeptidu prilikom kondenzacije, što je ustanovljeno spektroskopijom NMR, ili velika količina neizreagiranog spoja **6** koji se od produkta nije mogao uspješno razdvojiti kromatografskim pročišćavanjem. Iz navedenih razloga bilo je potrebno razmotriti alternativne metode kondenzacije.

Druga metoda koja je isprobana za pripravu amidne veze između spojeva **1** i **6** bila je metoda koja uključuje dodatak HBTU-a kao kondenzacijskog reagensa i trietilamina kao baze. Reakcija je trajala 24 h, a provedena je u smjesi tetrahidrofurana i diklormetana kao otapala, te u atmosferi argona. Željeni produkt je izoliran ekstrakcijom i pročišćen kromatografijom na stupcu pri čemu je iskorištenje reakcije iznosilo 97 %. Navedena metoda pokazala se izvrsnom za nastajanje amidne veze između dipeptida **1** i triazolnog derivata **6**.

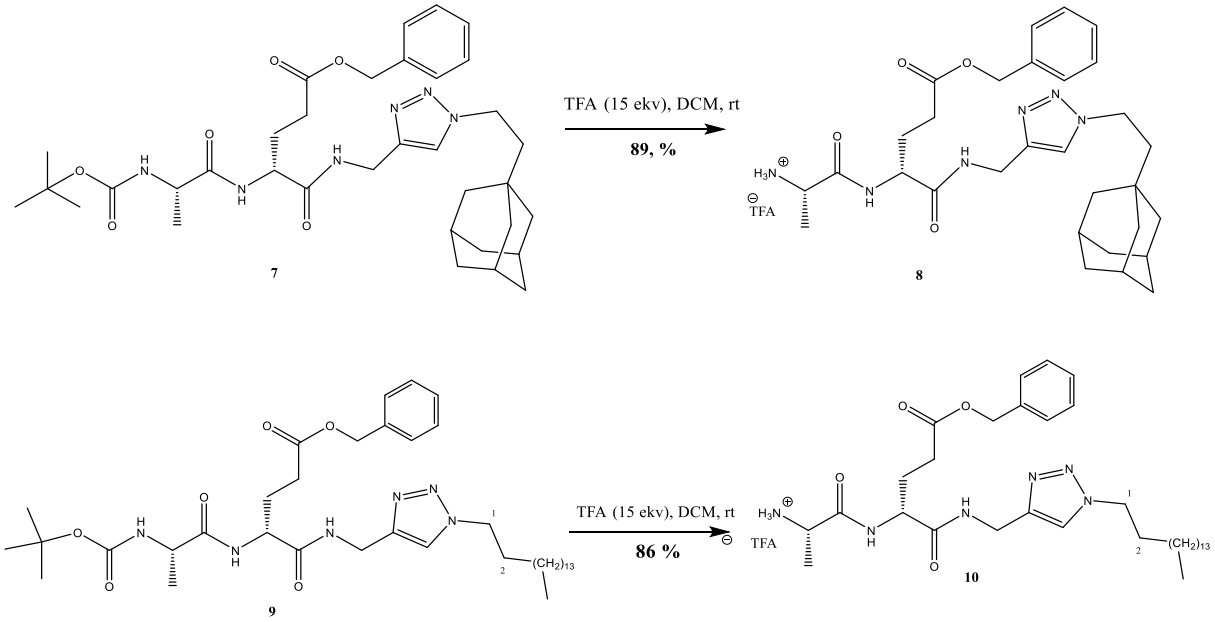


Slika 42: Shematski prikaz metoda kondenzacije heksadecil-triazolnog derivata **6** s dipeptidom **1**

*4.4.3. Uklanjanje Boc-zaštitne skupina sa spojeva **7** i **9***

Kako bi amino-skupina s *N*-terminalnog kraja pripravljenih triazolnih derivata desmuramil-dipeptida, spojeva **7** i **9**, mogla reagirati s karboksilnom skupinom manoznog prekursora, potrebno je s nje ukloniti Boc-zaštitnu skupinu. Prilikom navedene reakcije trebalo je obratiti pozornost i na benzilnu zaštitnu skupinu bočnog ogranka glutamata. Njenim slučajnim uklanjanjem došlo bi do nastanka još jedne karboksilne skupine koja bi ometala željenu reakciju u sljedećem koraku. Iz tog razloga, bilo je potrebno koristiti reakcijske uvjete koji neće hidrolizirati benzilni ester. Pogodni uvjeti za uklanjanje Boc-zaštitne skupine upravo su identični onima opisanim u poglavlju 4.3.3., dakle dodatak TFA (slika 43). Nakon provedene

reakcije i kromatografskog pročišćavanja na koloni uspješno su izolirani produkti **8** i **10** u obliku TFA soli što je potvrđeno spektroskopijom NMR. Iskorištenja reakcija iznosila su 89 % (spoj **8**) i 86 % (spoj **10**).

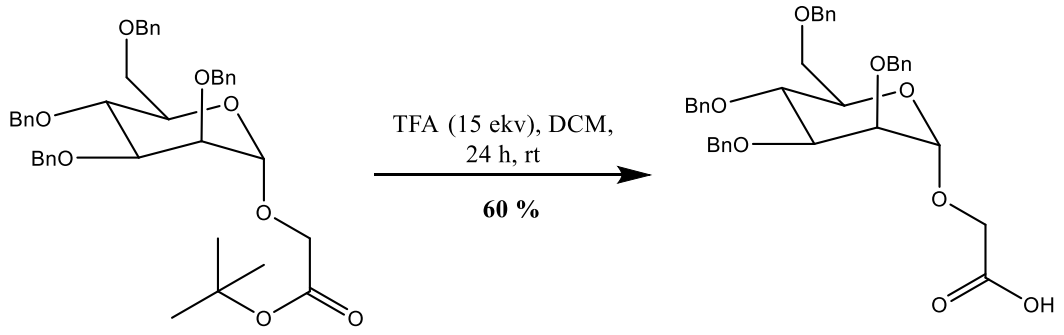


Slika 43: Shematski prikaz uklanjanja Boc-zaštitne skupine sa spojeva **7** i **9** i priprava spojeva **8** i **10**

4.5. Kondenzacija triazolnih peptidnih prekursora s manoznom podjedinicom

*4.5.1. Priprava manozne podjedinice **11***

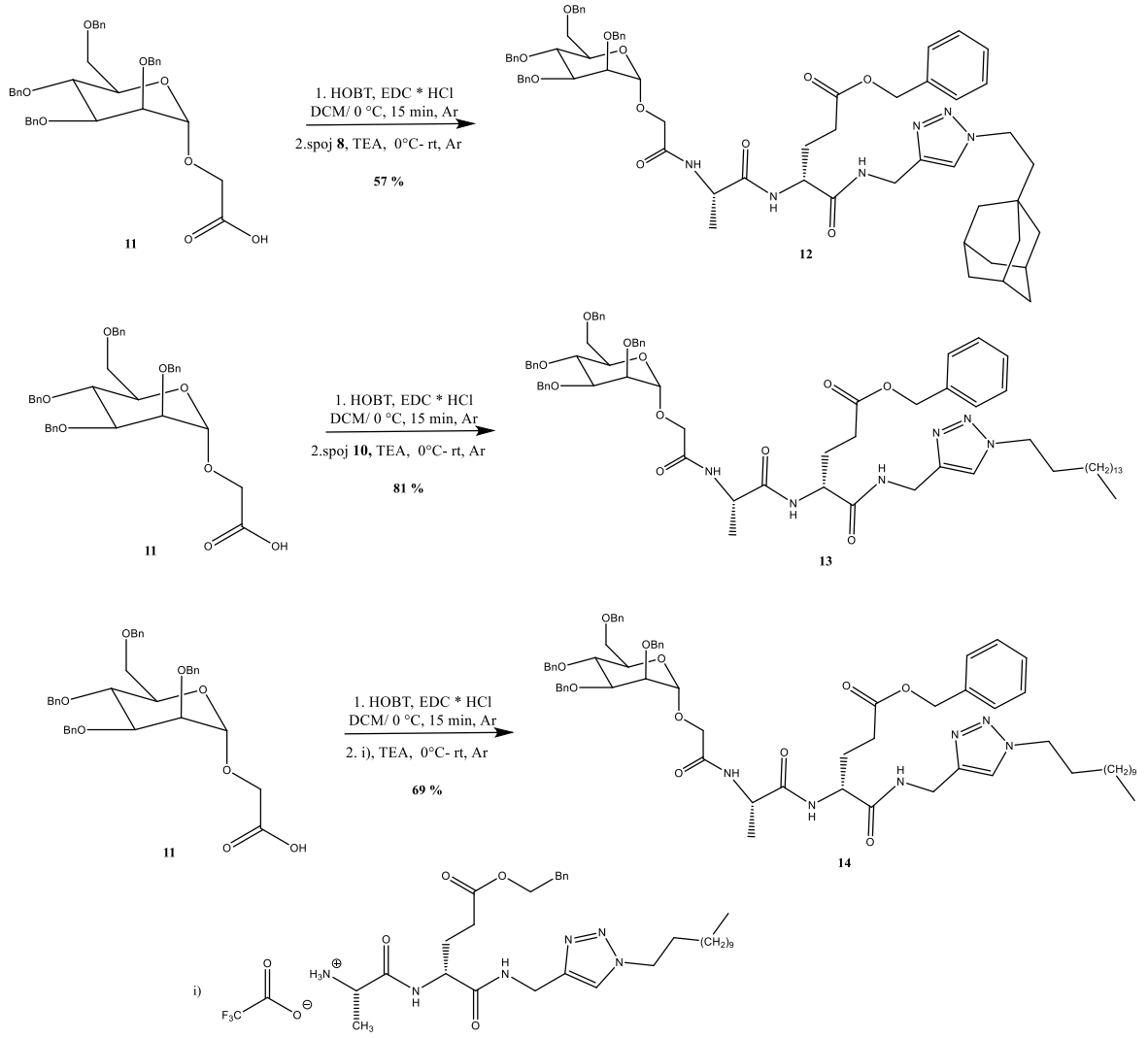
Neposredno prije kondenzacije s triazolnim peptidnim prekursorima hidrolizom manoznog *tert*-butilnog estera ranije sintetiziranog u istom laboratoriju (slika 44) priređena je manozna podjedinica **11**. Hidroliza je provedena uz dodatak trifluorctene kiseline pri čemu dolazi do nastanka karboksilne kiseline koja dalje može sudjelovati u reakciji amidacije u sljedećem koraku. Produkt **11** izoliran je uz iskorištenje od 60 %.



Slika 44: Shematski prikaz sinteze manoznog prekursora **11**

*4.5.2. Kondenzacija manozne podjedinice **11** s peptidinim prekursorima*

U nastavku diplomskog rada pripravljene TFA soli triazolnih peptidnih prekursora **8** i **10** te analogni triazolni peptidni prekursor s ugljikovodičnim lancem od 12 ugljikovih atoma ranije pripremljen u istom laboratoriju kondenzirane su s manoznom podjedinicom **11**, 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-α-D-manopiranoziloksi)octenom kiselinom (slika 45). Kao što je ranije rečeno, hidroksilne skupine manoze zaštićene su benzilnim skupinama kao i karboksilna skupina bočnog ogranka glutaminske kiseline dipeptida kako bi se u posljednjem koraku obje uklonile u istim reakcijskim uvjetima, reakcijom hidrogenolize. Kondenzacije manoznog prekursora **11** i triju triazolnih peptidnih prekursora provedenesu uz dodatak EDC·HCl kao kondenzacijskog reagensa, HOBt-a kao aditiva te TEA kao baze. Budući da prilikom aktivacije karboksilne kiseline kao nusprodukt može nastati *N*-acilurea (poglavlje 2.2.2.2) i smanjiti iskorištenje reakcije, u početku je reakciju potrebno provoditi na sniženoj temperaturi. Na ovaj način uspješno su priređeni spojevi **12** (57 %), **13** (81 %) i **14** (69 %).

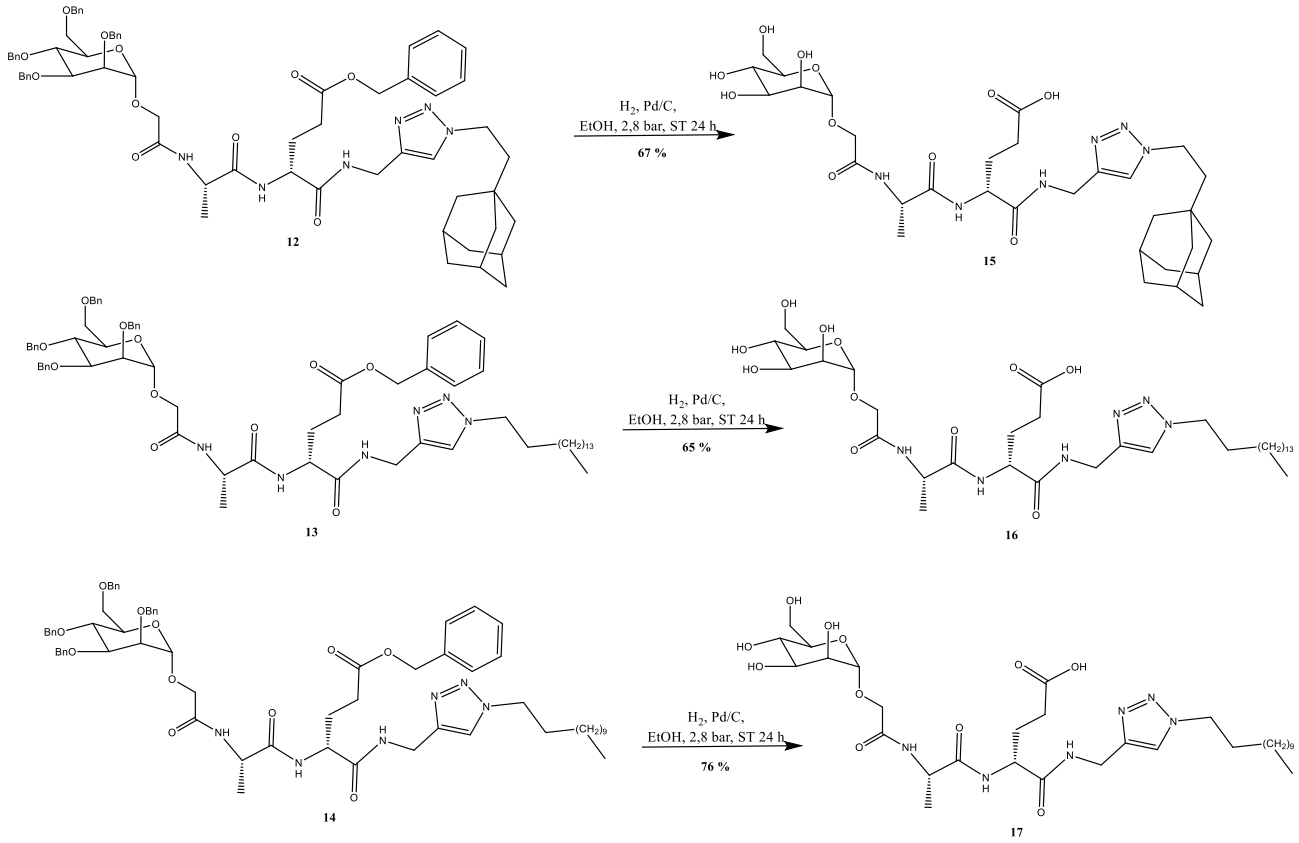


Slika 45: Shematski prikaz kondenzacije manoznog prekursora **11** s peptidnim prekursorima i priprava spojeva **12-14**

*4.5.3. Priprava ciljnih molekula **15**, **16** i **17***

Nakon kondenzacije triazolnih dipeptida s manoznom podjedinicom preostalo je ukloniti preostale zaštitne skupine prisutne u molekulama dobivenih manokonjugata **12-14**, odnosno ukloniti benzile s hidroksilnih skupina manoze te benzil s karboksilne skupine bočnog ogranka dipeptida. Trebalo je izabrati odgovarajuću metodu uklanjanja navedenih zaštitnih skupina kojom ne bi došlo do destrukcije cijele molekule. Kao metoda odabira pokazala se katalitička hidrogenoliza uz dodatak metalnog katalizatora. U reakciji koja se provodi u Parrovom uređaju uspješno su uklonjene sve benzilne zaštitne skupine s manoziliranih triazolnih derivata desmuramil-dipeptida **12-14** čime su priređene ciljne molekule **15**, **16** i **17** (slika 46). Reakcije

su provedene na miligramskoj skali (45 do 55 mg), a kao katalizator u reakcijama korišten je paladij na ugljiku (*w* = 10 %). Nastanak spojeva **15**, **16** i **17** kao i uklanjanje zaštitnih skupina potvrđeno je spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 46. Shematski prikaz sinteze ciljnih molekula **17**-**19** katalitičkom hidrogenolizom

4.6. Ispitivanje adjuvantskog djelovanja spojeva 15-17 u mišjem modelu

Kao što je ranije rečeno, adjuvanti su tvari koje se dodaju cjepivima kako bi se pojačala imunosna reakcija na specifični antigen, odnosno imunosnom reakcijom u organizmu dolazi do stvaranja karakterističnih antitijela (IgG, IgG1, IgG2a…). Osim što adjuvanti pojačavaju imunosnu reakciju, mogu je i usmjeriti prema Th1 ili Th2 tipu. Th1 karakterizira stanični odgovor i djelovanje T stanica (stanična imunost), dok u slučaju Th2 odgovora B stanice luče antitijela (humoralni imunosni odgovor). Mjerenjem količine pojedine vrste antitijela, odnosno njihovog omjera, moguće je pratiti vrstu imunosne reakcije. Općenito vrijedi sljedeće: što je omjer antitijela IgG1 / IgG2a manji, količina Ig2a antitijela je veća, a imunološka reakcija je više usmjerena prema Th1 tipu imunološkog odgovora (stanični tip imunološkog odgovora). S druge strane, u slučaju povišene količine IgG1 antitijela, imunološka reakcija je više usmjerena

prema Th2 tipu. Važno je napomenuti da je za čisti MDP poznato da imunosnu reakciju usmjerava prema Th2 tipu.[9,13]

Prilikom mjerenja adjuvantske aktivnosti spojeva **15-17** korišten je ovalbumin (OVA) dok su kao eksperimentalne životinje korišteni miševi CBA soja. OVA je proteinski antigen koji posjeduje relativno slabu imunogeničnost te se iz tog razloga koristi za ispitivanje potencijalnih adjuvanata. Uspješno djelovanje adjuvanta je u tom slučaju karakterizirano povišenom razinom anti-OVA antitijela u organizmu u odnosu na anti-OVA antitijela u slučaju čistog ovalbumina. Anti-OVA IgG, anti-OVA IgG1 i anti-OVA IgG2a određeni su u serumu miševa ELISA metodom nakon drugog docjepljivanja. Istraživanja su provedena u suradnji sa Sveučilištem Sjever, Varaždin i Institutom Ruđer Bošković, Zagreb, a rezultati navedenog istraživanja još su u fazi obrade.

§ 5. ZAKLJUČAK

1. Uspješno je provedena sinteza zaštićenog dipeptida **1,** Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH, iz benzilom zaštićenog D-glutamata, D-Glu(OBn), te sukcinimidnog estera Boc-zaštićenog alanina, Boc-L-Ala-OSu. Dipeptid **1** uspješno je izoliran uz iskorištenje od 93 % bez potrebe za dodatnim pročišćavanjem.

2. Iz propargilamina te odabranih alifatskih azida, heksadecil-azida **4** i 2-(admant-1-il)etil-azida, klik-reakcijom azid-alkinske cikloadicije uz bakar(I) kao katalizator (CuAAC) provedena je sinteza Boc-zaštićenih triazolnih amina, spojeva **2** i **5**, u zadovoljavajućem prinosu (53 % za spoj **2** i 68 % za spoj **5**). U navedenim klik-reakcijama bakra(I) uspješno je generiran *in situ* redukcijom bakrovog(II) sulfata uz pomoć natrijevog L-askorbata. Heksadecil-azid **4** pripravljen je reakcijom heksadecil-bromida i natrijeva azida, dok je 2-(admant-1-il)etil-azid prethodno pripravljen u laboratoriju.

3. Za kondenzaciju alifatskih triazolnih amina **3** i **6**, dobivenih uklanjanjem Boc-zaštite sa spojeva **2** i **5**, s dipeptidom **1** isprobane su dvije metode amidacije. Spoj **7** uspješno je priređen uz iskorištenje od 65 % uz *n*-butil-klorformijat kao kondenzacijski reagens i bazu *N*-metilmoroflin. Spoj **9** uspješno je pripravljen reakcijom amidacije uz dodatak HBTU-a kao kondenzacijskog reagensa uz visoko iskorištenje od 97 %.

4. Uklanjanje Boc-zaštitne skupine bilo je potrebno provesti u dva reakcijska stupnja, odnosno prilikom priprave spojeva **3** i **6** te **8** i **10**. U svim slučajevima trifluoroctena kiselina pokazala se kao dobar odabir za uklanjanje Boc-zaštite. Iskorištenja reakcija bila su od 75 % do 95%, a produkti su dobiveni u obliku TFA soli. U uvjetima uklanjanja Boc-zaštitne skupine nije se uklonila benzilna skupina prisutna u molekuli.

5. Kondenzacijom alifatskih triazolnih derivata desmuramilsipeptida **8**-**10** sa zaštićenom manoznom podjedinicom **11** uspješno su pripravljeni spojevi **12-14**. Pritom se kao

kondenzacijski reagens koristio EDC·HCl te HOBt kao aditiv. Produkti su uspješno izolirani uz iskorištenja između 57 % i 81 % uz očuvanje stereokemije.

6. Posljednji korak u sintezama bio je uklanjanje zaštitnih skupina sa spojeva **12-14**: benzilnih zaštitinih skupina s hidroksilnih skupina na manozi te s karboksilne skupine bočnog ogranka izoglutaminske kiseline reakcijom katalitičke hidrogenolize uz Pd/C kao katalizator. Ovom su reakcijom iz spojeva **12-14** uspješno pripravljene ciljne molekule **15-17** uz iskorištenja od 65 % do 76 %.

7. Strukture svih pripravljenih spojeva potvrđene su spektroskopijom NMR te spektrometrijom masa, te u odabranim slučajevima i IR spektroskopijom

8. Svrha priprave manoziliranih alifatskih triazolnih derivata desmuramil-dipeptida, spojeva **15-17**, bila je određivanje *in vivo* adjuvantske aktivnosti kako bi se ispitao utjecaj različitih lipofilnih podjedinica na imunološki odgovor. Kod ravnolančanih alifatskih lanaca istražit će se utjecaj duljine lanca, dok će se kod adamantilne podjedinice vezane preko poveznice od dva atoma ugljika načiniti usporedba s ranije pripravljenim adamantilnim derivatom u strukturi kojeg ugljikovodična poveznica između adamantanske i triazolne podjedinice nije bila prisutna. Obrada rezultata provedenih pokusa je u tijeku.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Ac	acetil
AcN	acetonitril
Bn	benzil
Boc	*t*-butiloksikarbonil
Cbz	benziloksikarbonil
CuAAC	bakrom katalizirana azid-alkin cikloadicija (engl. *Cu catalyzed azide-alkyne cycloaddition*)
DCC	dicikloheksilkarbodiimid
DCM	diklormetan
DMAP	dimetilamino piridin
DMP	desmuramil-dipeptid
DMF	*N*,*N*-dimetilformamid
EDC·HCl	*N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilkarbodiimid-hidroklorid
EtOAc	etil-acetat
EtOH	etanol
Fmoc	9-fluorenilmetiloksikarbonil
HOBt	1-hidroksi-1*H*-benzotriazol
HOSu	*N*-hidroksisukcinimid
MDP	muramil-dipeptid
Me	metil
MeOH	metanol
NMM	*N*-metilmorfolin
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
PGM	peptidoglikan monomer
TEA	trietilamin
TFA	trifluoroctena kiselina
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoslojna kromatografija (eng. *thin-layer chromatography*)
TMS	tetrametilsilan

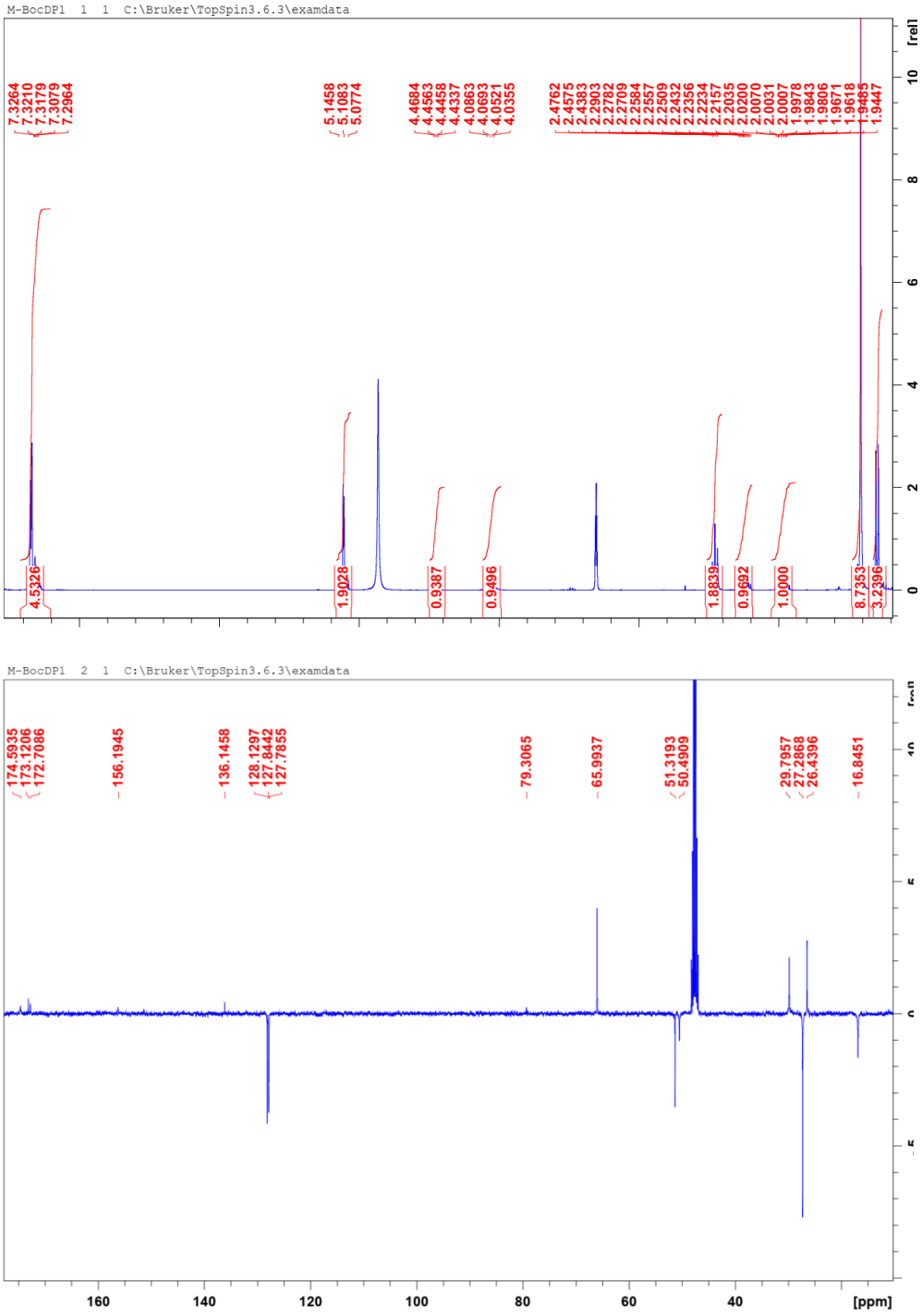
§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. R. Ribić, S. Tomić, *Kem. Ind.* **62** (2013) 1931.
2. 2. R. Ribić, M. Paurević, S. Tomić, *Croat. Chem. Acta* **92** (2019) 153-161.
3. V. Petrović Peroković, Ž. Car, J. Draženović, R. Stojković, L. Milković, M. Antica, Đ. Škalamera, S. Tomić, R. Ribić, *Molecules* **26** (2021) 6352
4. R. Bastola, G. Noh, T. Keum, S. Bashyal, J. Seo, J. Choi1, Y. Oh, Y. S. Cho, S. Lee. *Arch. Pharm. Res.* **40** (2017) 1238-1248.
5. A. J. Pollard, E. M. Bijker. *Nat. Rev. Immunol.* **21** (2021) 83-100.
6. L. Szilágyia, P. Pristovšek, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **7** (2007) 861-870.
7. https://www.cdc.gov/vaccinesafety/concerns/adjuvants.html (Datum pristupa 25. studeni 2021)
8. R. C. Dutta, *Immunol. Lett.* **83** (2002) 153-161.
9. R. Ribić, R. Stojković, L. Milković, M. Antica, M. Cigler, S. Tomić *Beilstein J. Org. Chem.* **15** (2019) 1805–1814.
10. C. Ogawa, Y. Liu, K. S. Kobayashi, *Curr. Bioact. Compd.* **7** (2011) 180-197
11. R. Ribić, L. Habjanec, B. Vranešić, R. Frkanec, S. Tomić, *Croat. Chem. Acta* **84** (2011) 233–244.
12. A. Maršavelski, M. Paurević, R. Ribić, *Org. Biomol. Chem*. **19** (2021) 7001–7012.
13. M. Paurević, Sinteza, Strukturna karakterizacija i biološko djelovanje manoliziranih derivata desmuramil-dipeptida, Diplomski rad, Prirodoslovo-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2021.
14. https://en.wikipedia.org/wiki/Mifamurtide (Datum pristupa 20. prosinac 2021)
15. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic Chemistry*, 2nd Edition, Oxford University Press, 2012, str. 553.
16. C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron*, **61** (2005) 10827-10852.
17. E. Massolo, M. Pirola, M. Benaglia, *Eur. J. Org. Chem.* **30** (2020) 4641-4651.
18. V. R. Pattabiraman1, J. W. Bode, *Nature* **480** (2011) 471–479.
19. A. Leggio, E. L. Belsito, G. De Luca, M. L. Di Gioia, V. Leotta, E. Romio, C. Sicilianoa, A. Liguori, *RSC Adv*. **6** (2016) 34468-34475.
20. E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **38** (2009) 606-631.

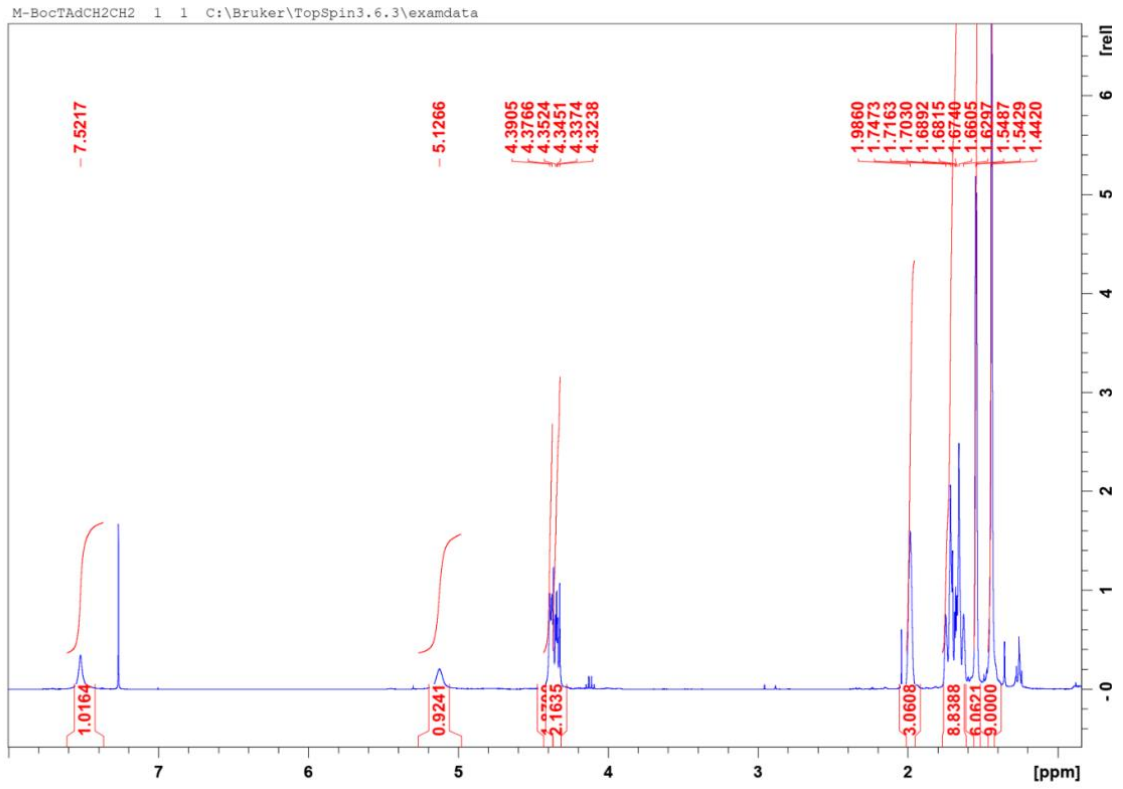
21. https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/technical-article/chemistry-and-synthesis/peptide-synthesis/coupling-reagents (Datum pristupa 15.12.2021)
22. A. I. Llobet, M. A. lvarez, F. Albericio, *Chem Rev.* **109** (2009) 2455-2506.
23. A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **111** (2011) 6557–6602.
24. L.A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee,B.M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert *Chem. Int. Ed*. **41** (2002) 441-445.
25. https://www.peptide.com/resources/solid-phase-peptide-synthesis/coupling-reagents/ (datum pristupa 18. prosinac 2021)
26. P. G. M. Wuts, *Protective groups is organic sythesis,* fifth edition, Wiley, 2014, 692-699.
27. V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2006** (2006) 51-68.
28. A. Trabocchi, A. Guarna, *Peptidomimetics in Organic and Medicinal chemistry,* Wiley, 2014.
29. H.C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug discov* **8** (2003) 1128-1137.
30. V. O. Rodionov, V. V. Fokin, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44** (2005) 2210-2215.
31. D. Saftić, L. Krstulović, M. Bajić i B. Žinić, *Kem. Ind.* **64** (2005) 481-498.
32. W. Dehaen, V. A. Bakulev, Chemistry of 1,2,3-triazoles first edition Springer 2015, 53-58.

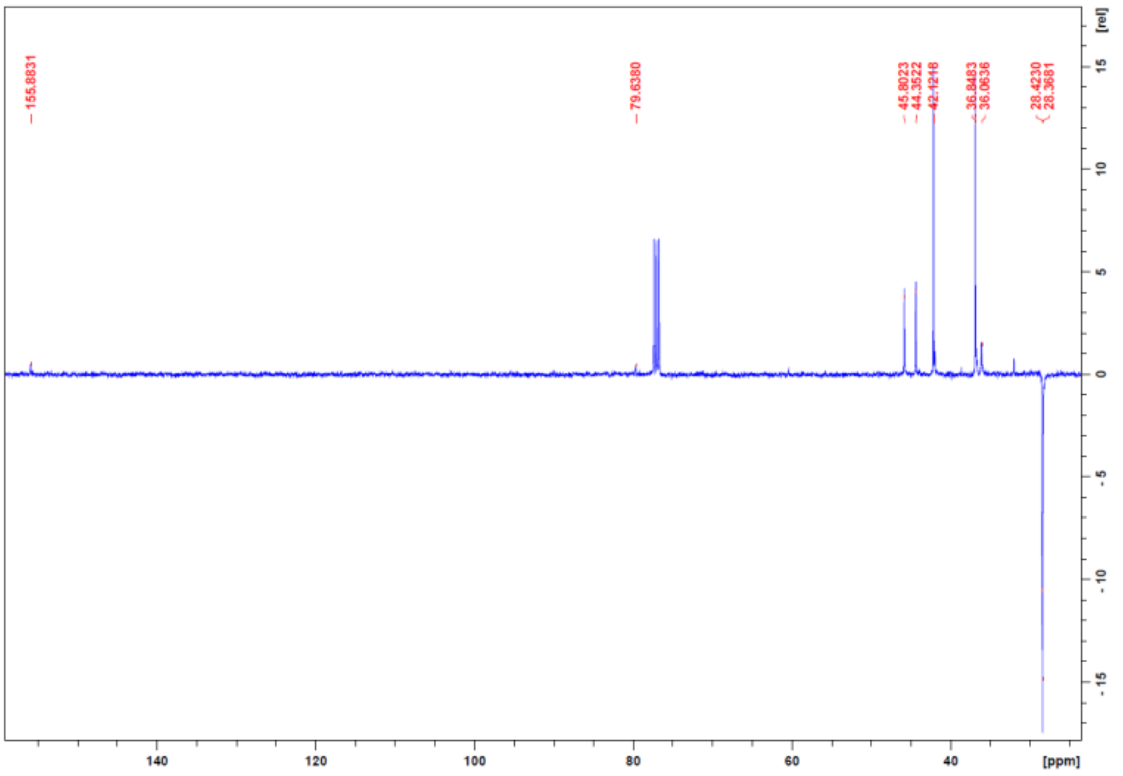
§ 8. DODATAK

Dodatak 1: ^{1}H NMR i DEPTQ spoja **1**

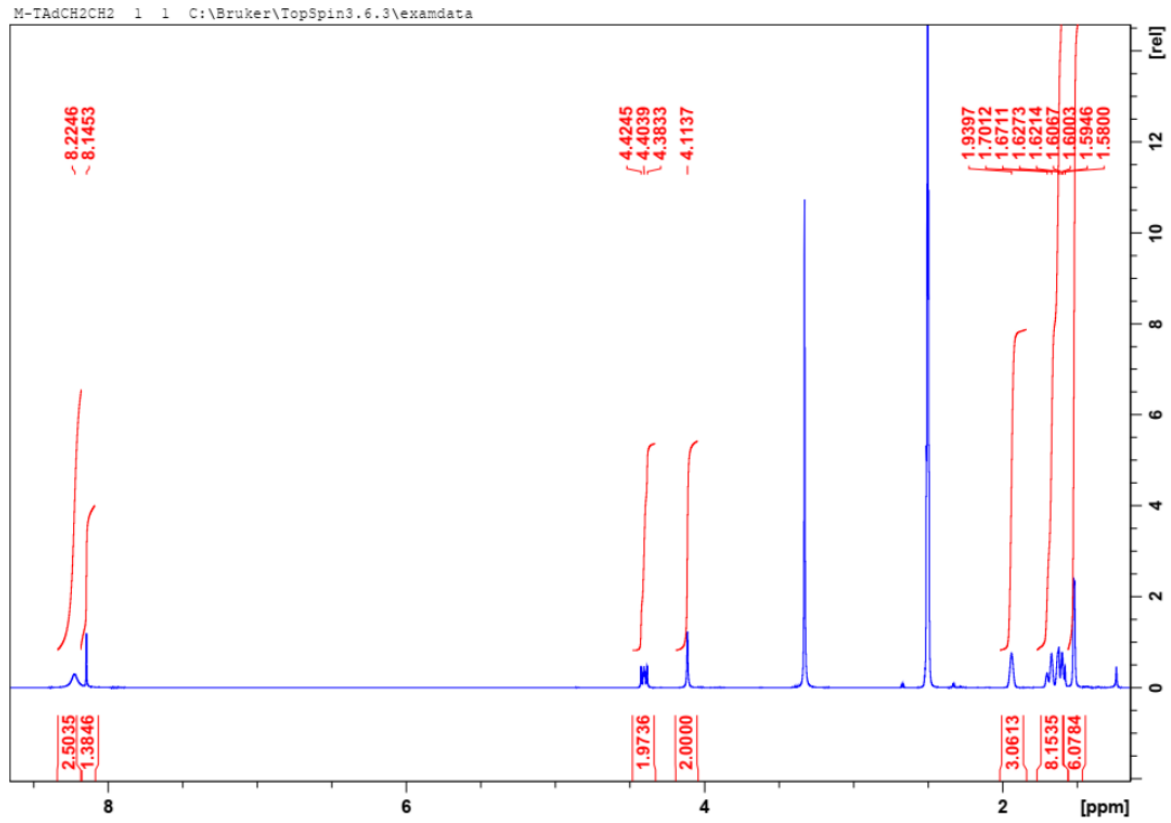


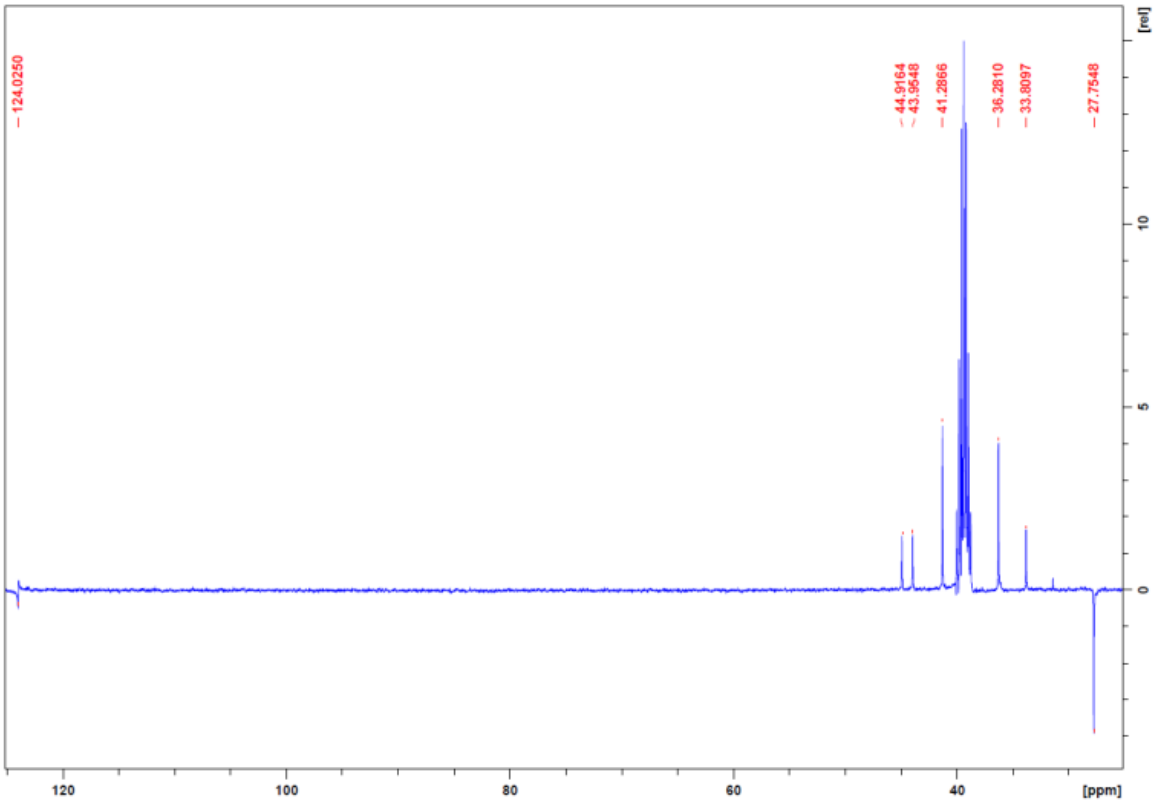
Dodatak 2: ^{1}H NMR i DEPTQ spoja **2**



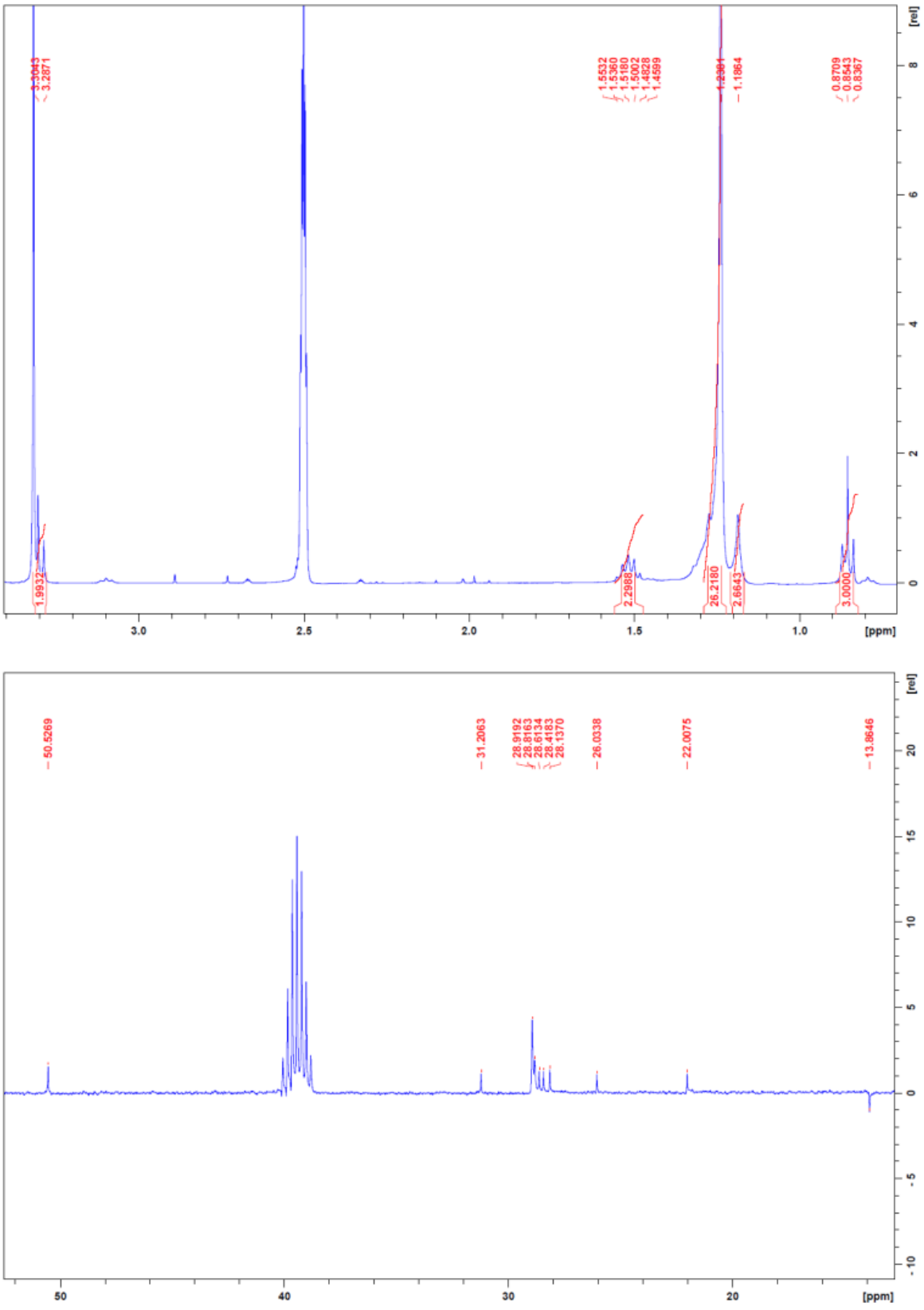


Dodatak 3: ^{1}H NMR i DEPTQ spoja **3**

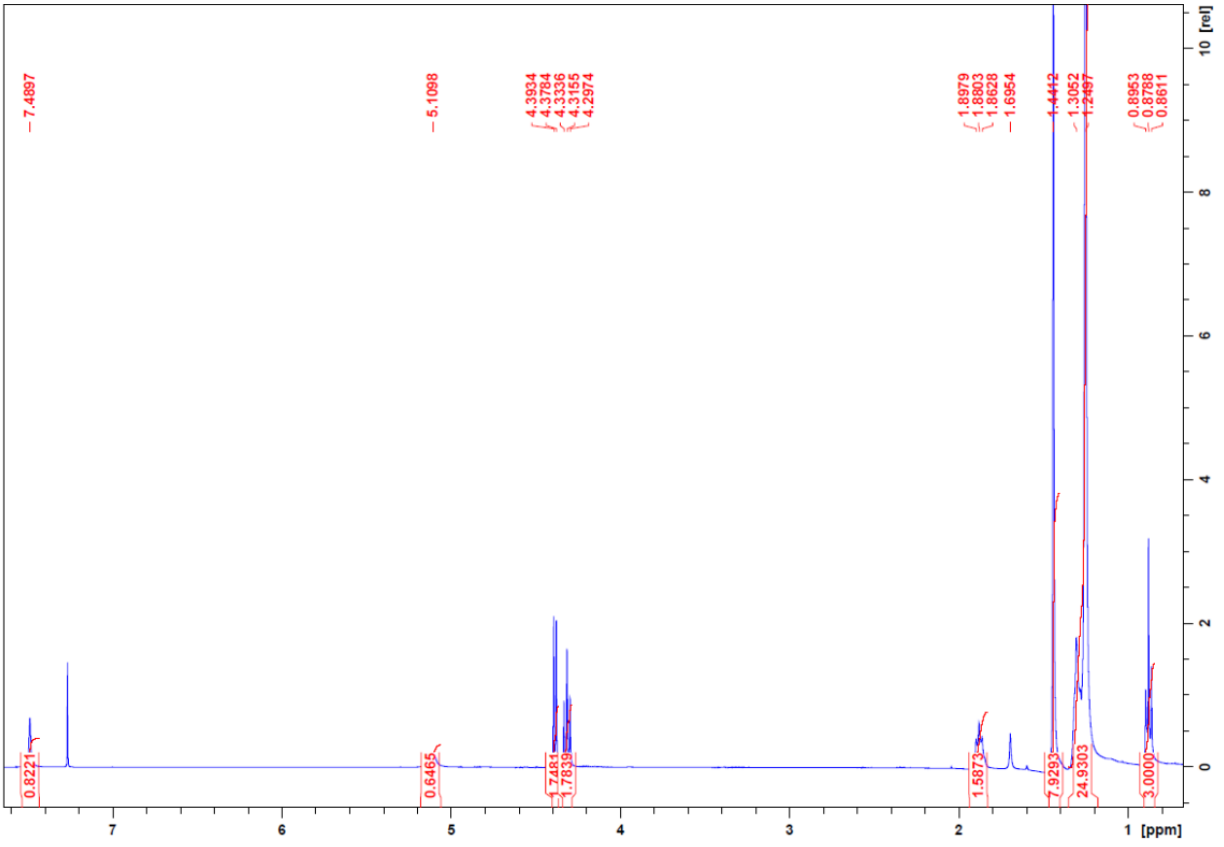


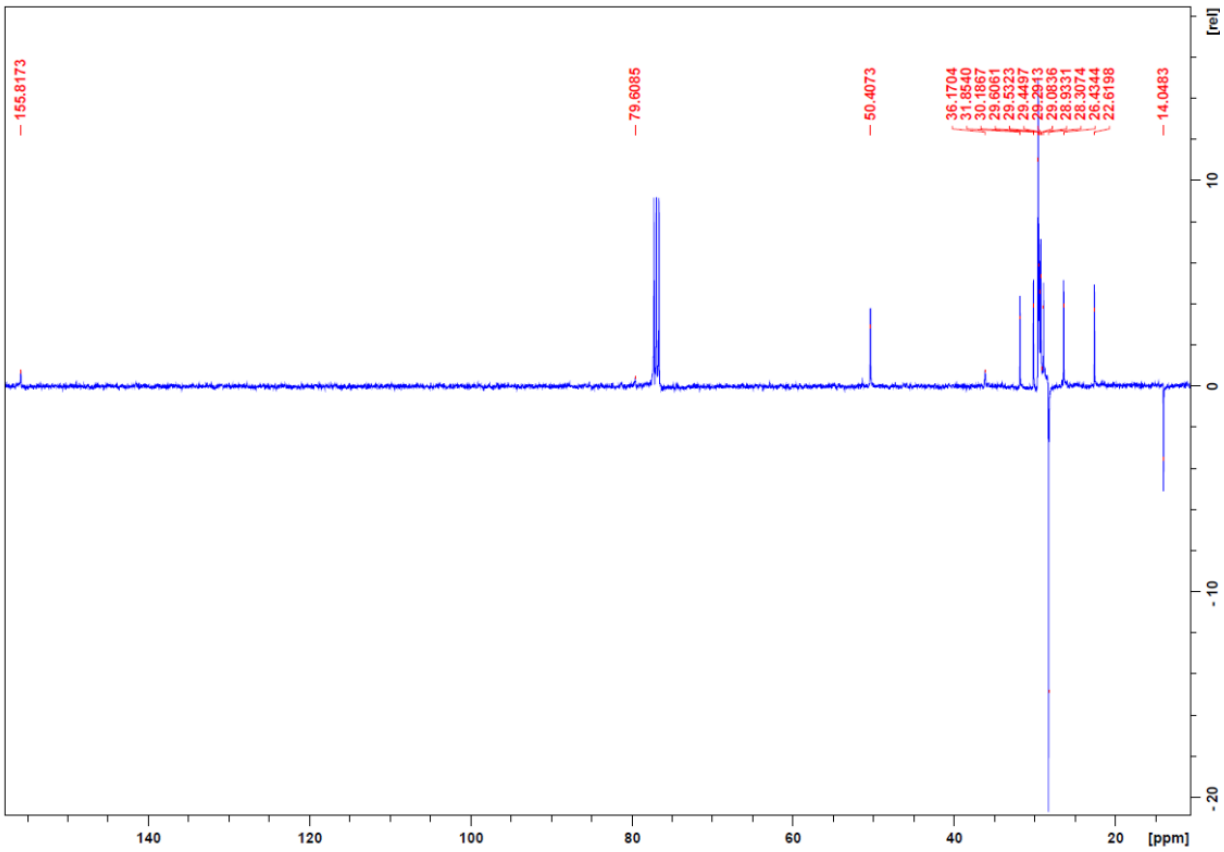


Dodatak 4: ^{1}H NMR i DEPTQ spoja **4**

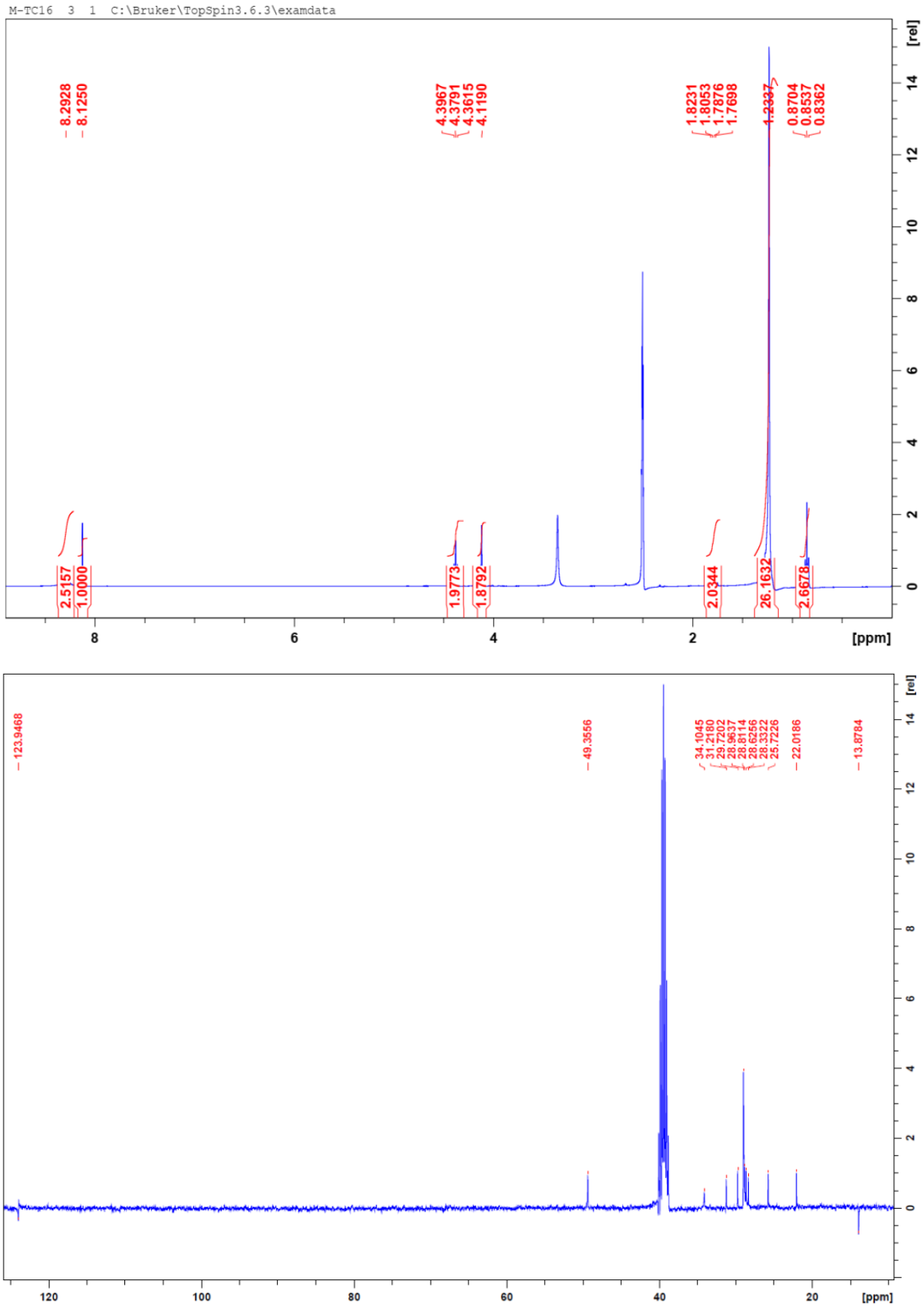


Dodatak 5: ^{1}H NMR i DEPTQ spoja **5**

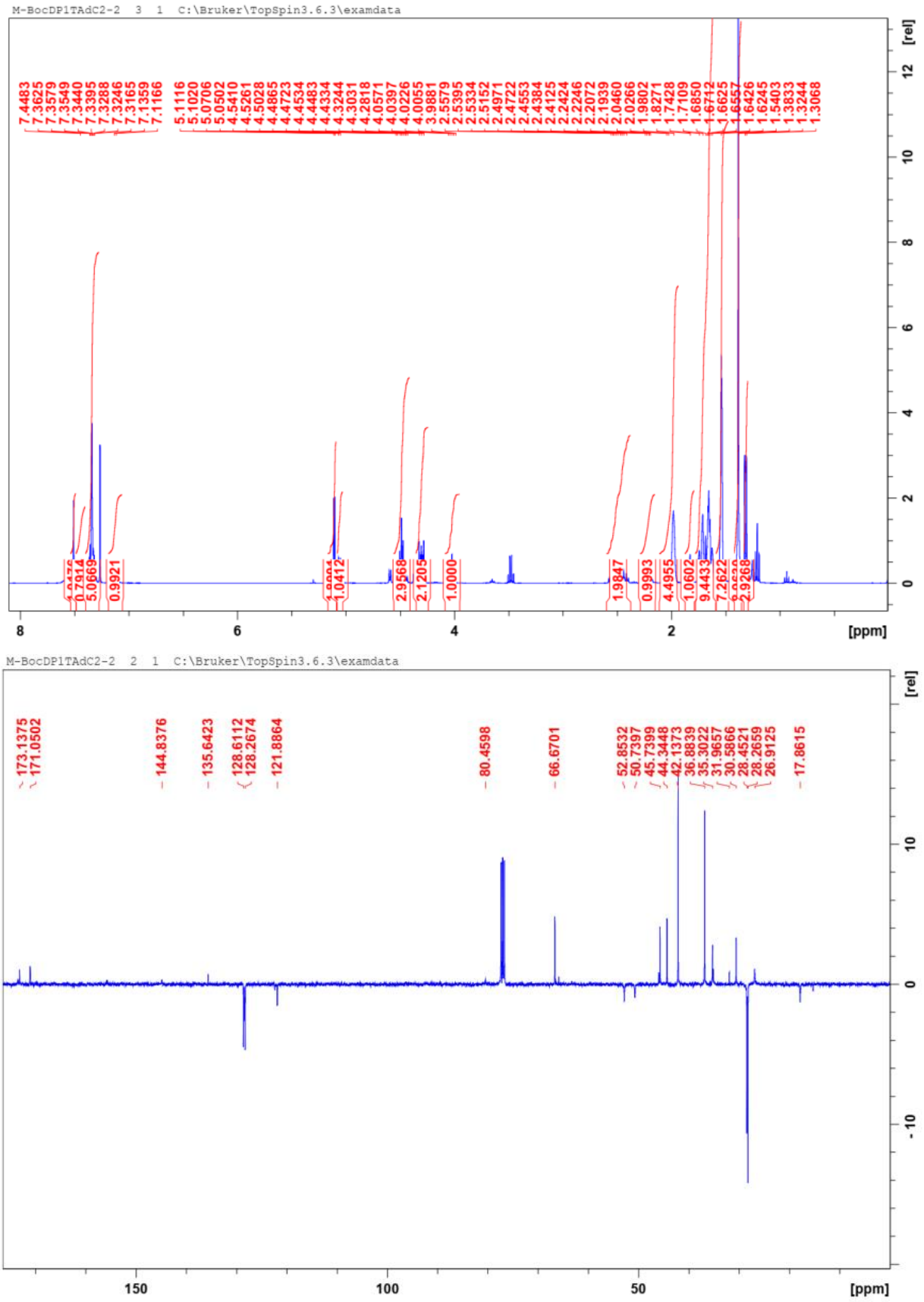




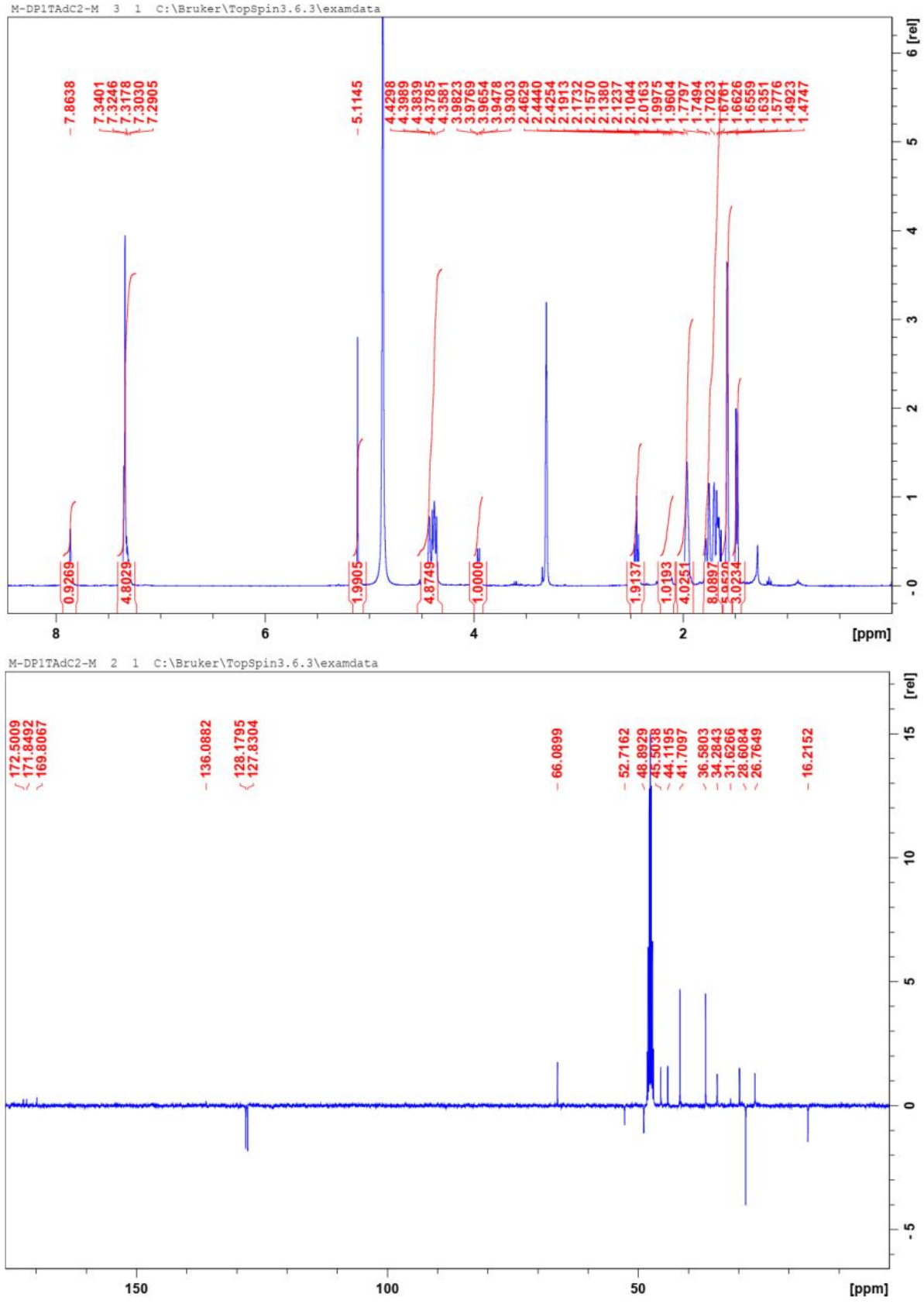
Dodatak 6: ^{1}H NMR i DEPTQ spoja **6**



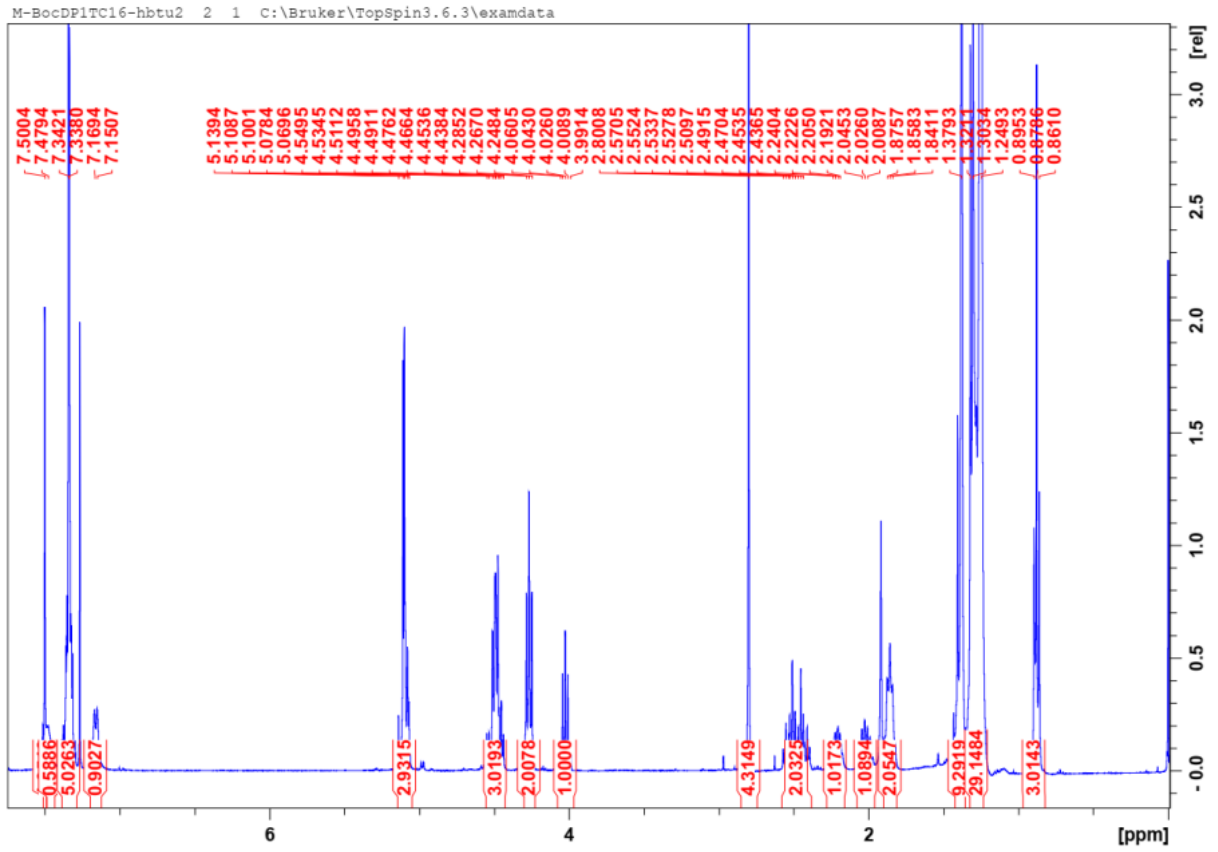
Dodatak 7: ^{1}H NMR i DEPTQ spoja **7**

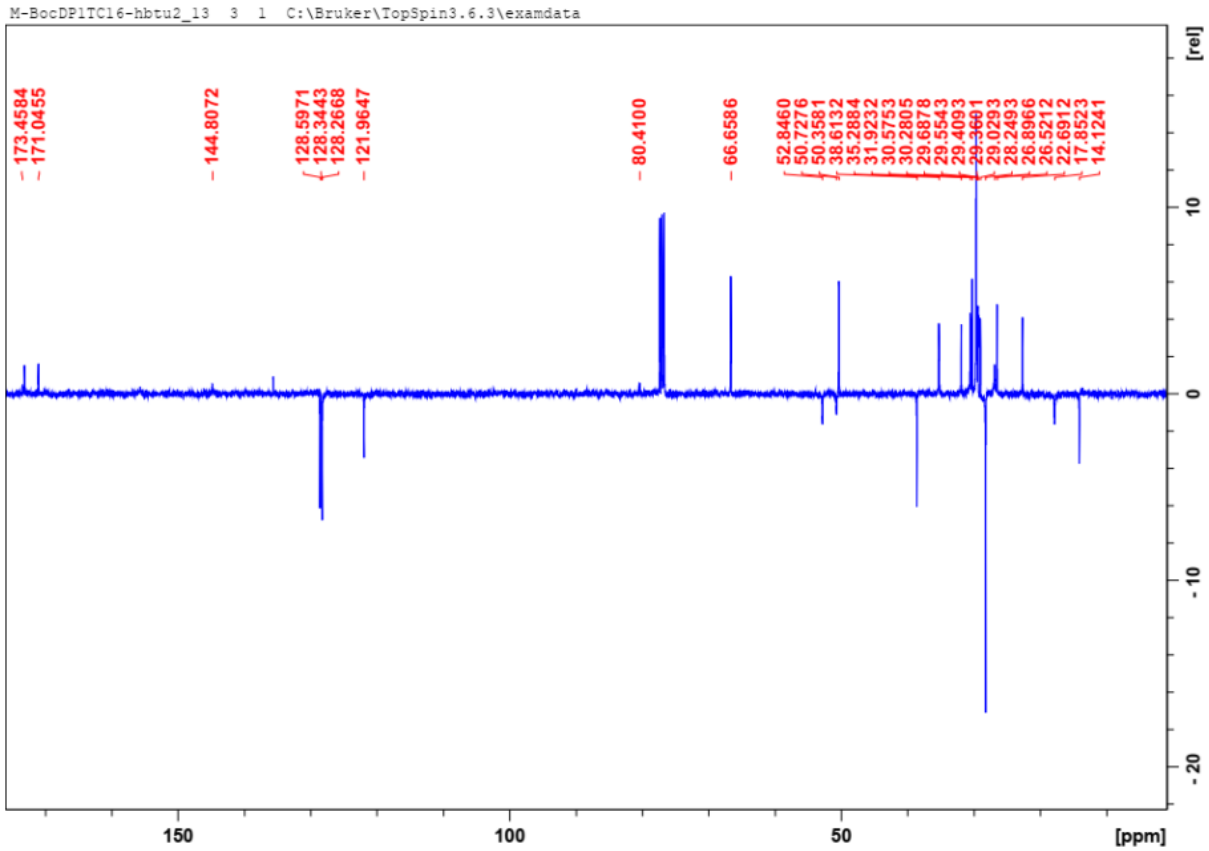


Dodatak 8: ^{1}H NMR i DEPTQ spoja **8**

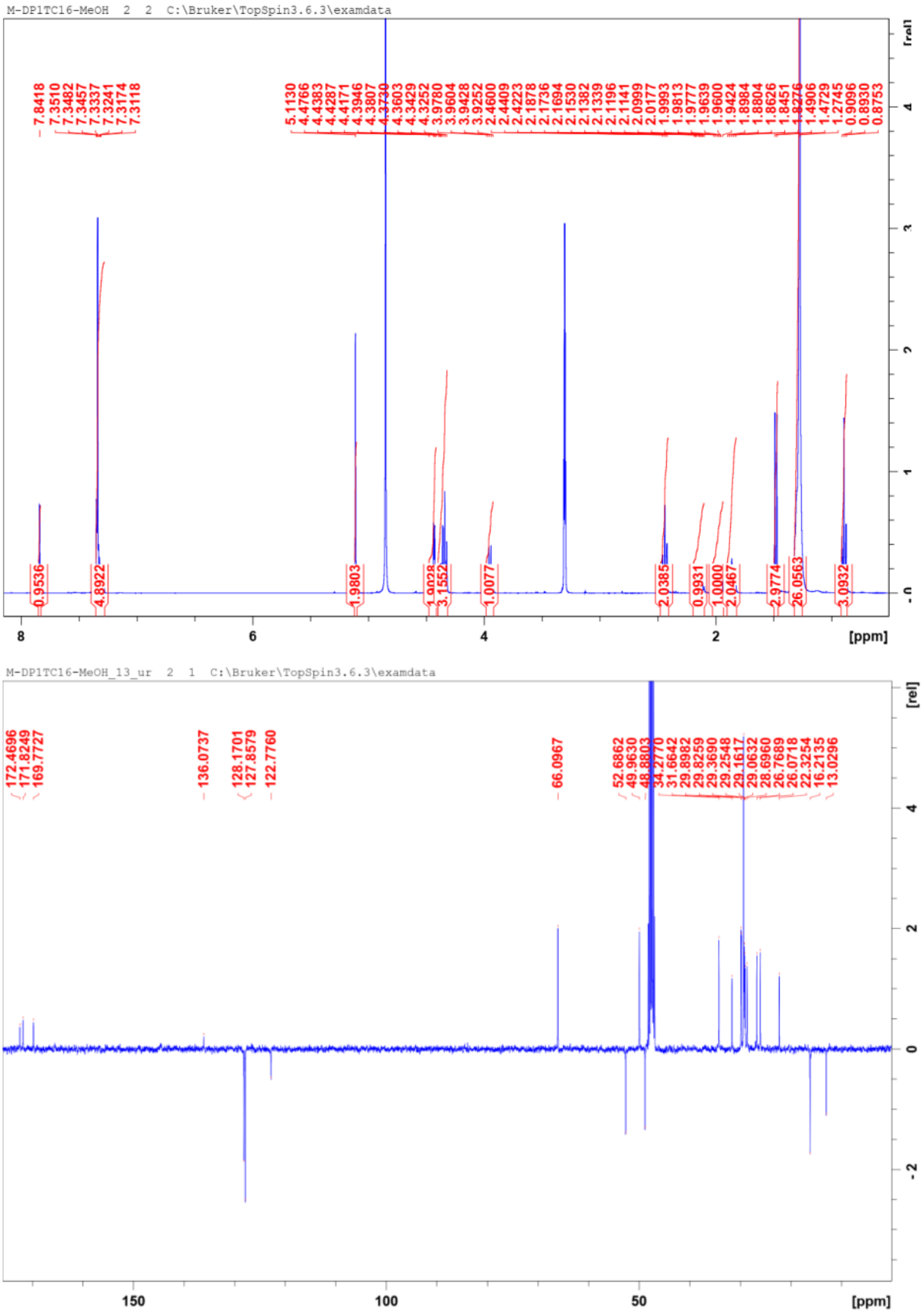


Dodatak 9: ^{1}H NMR i DEPTQ spoja **9**

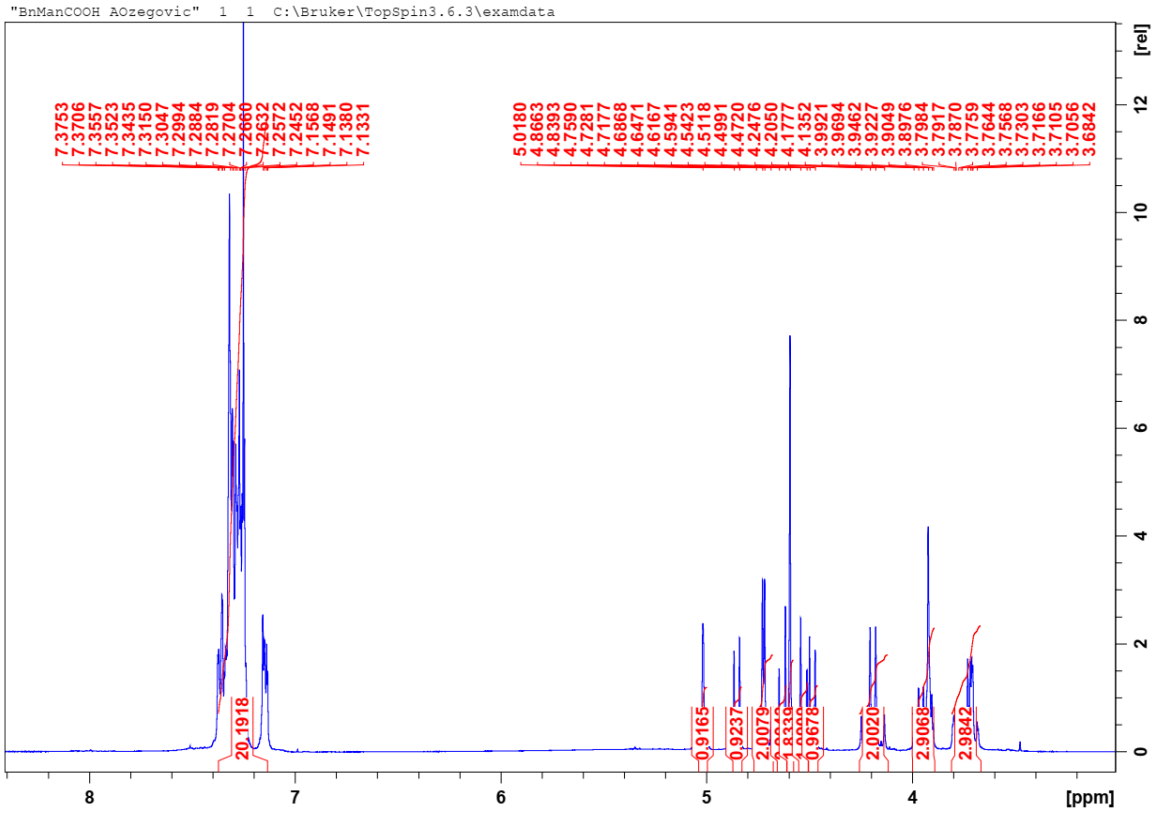


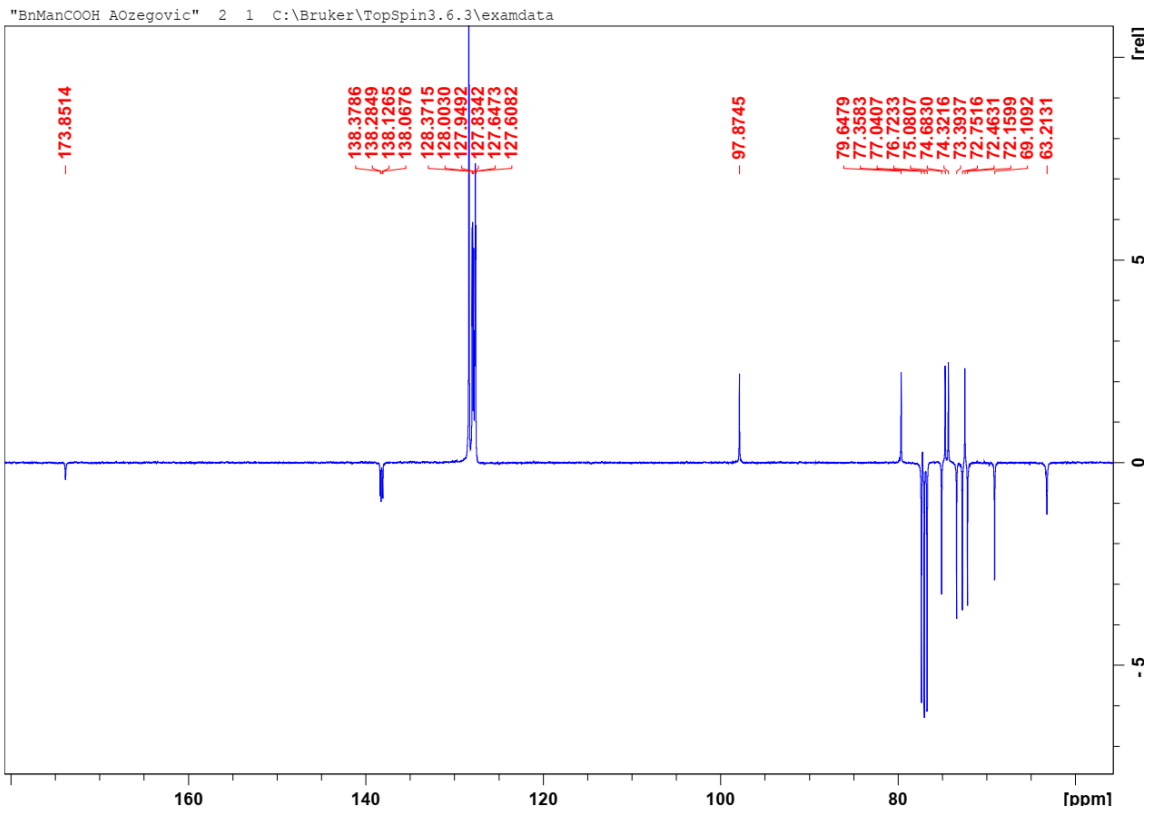


Dodatak 10: ^{1}H NMR i DEPTQ spoja **10**

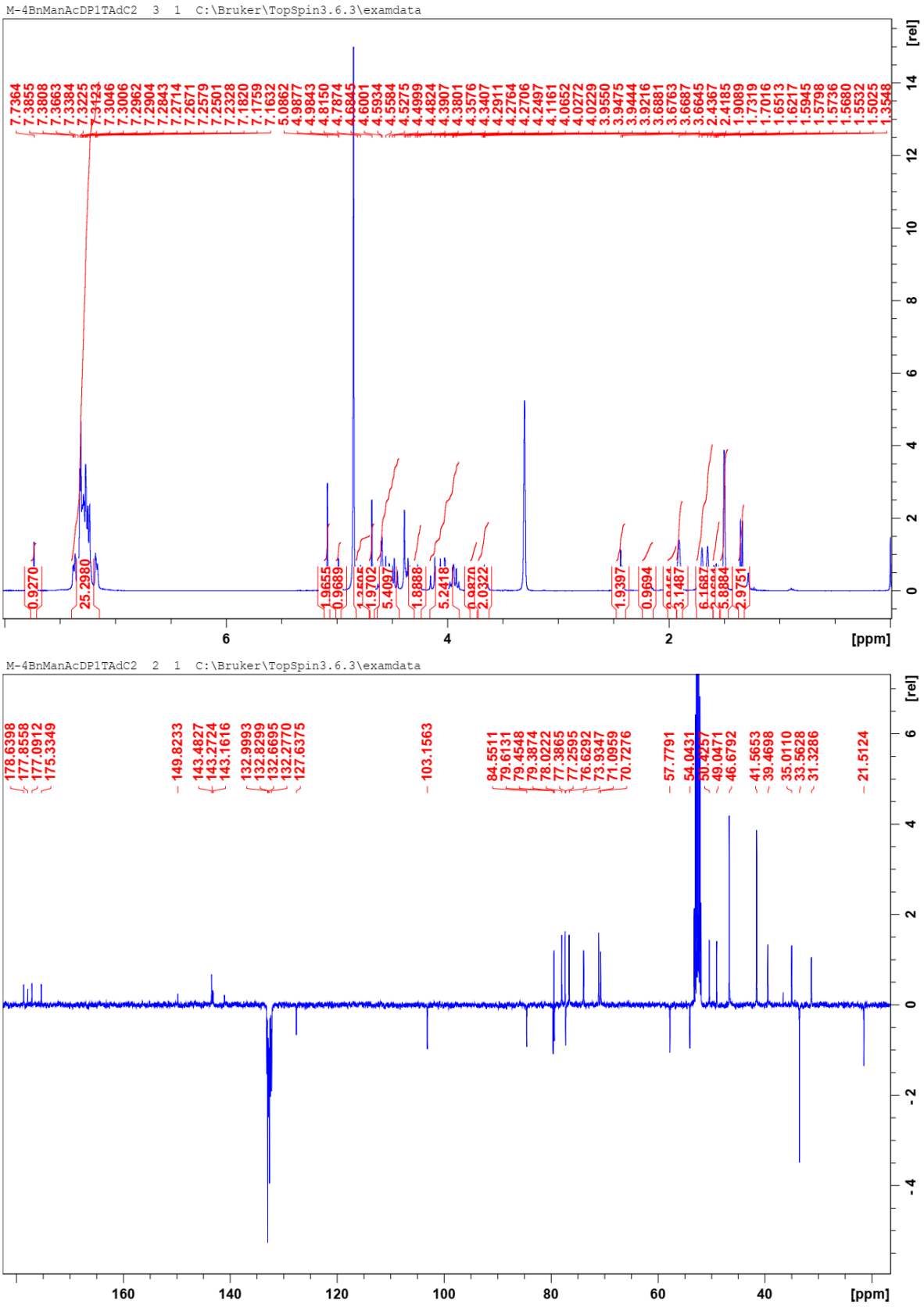


Dodatak 11: ^{1}H NMR i DEPTQ spoja **11**

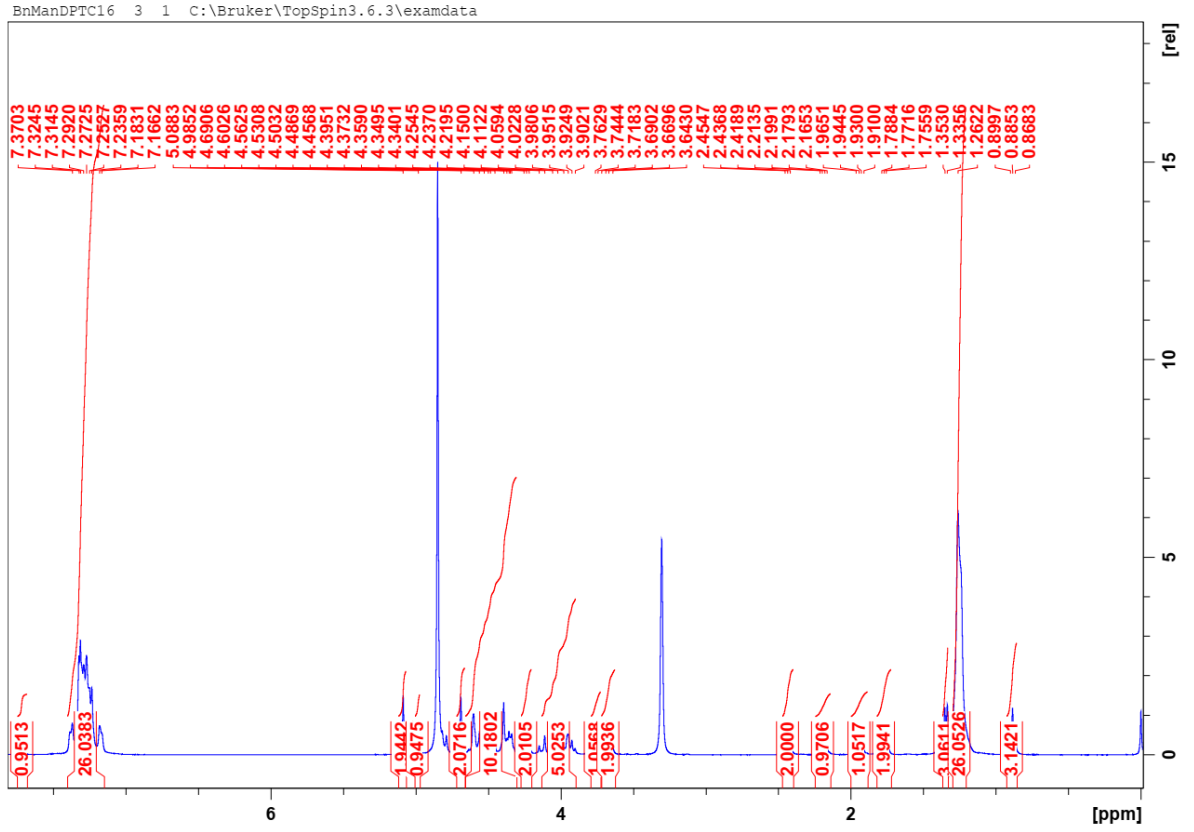


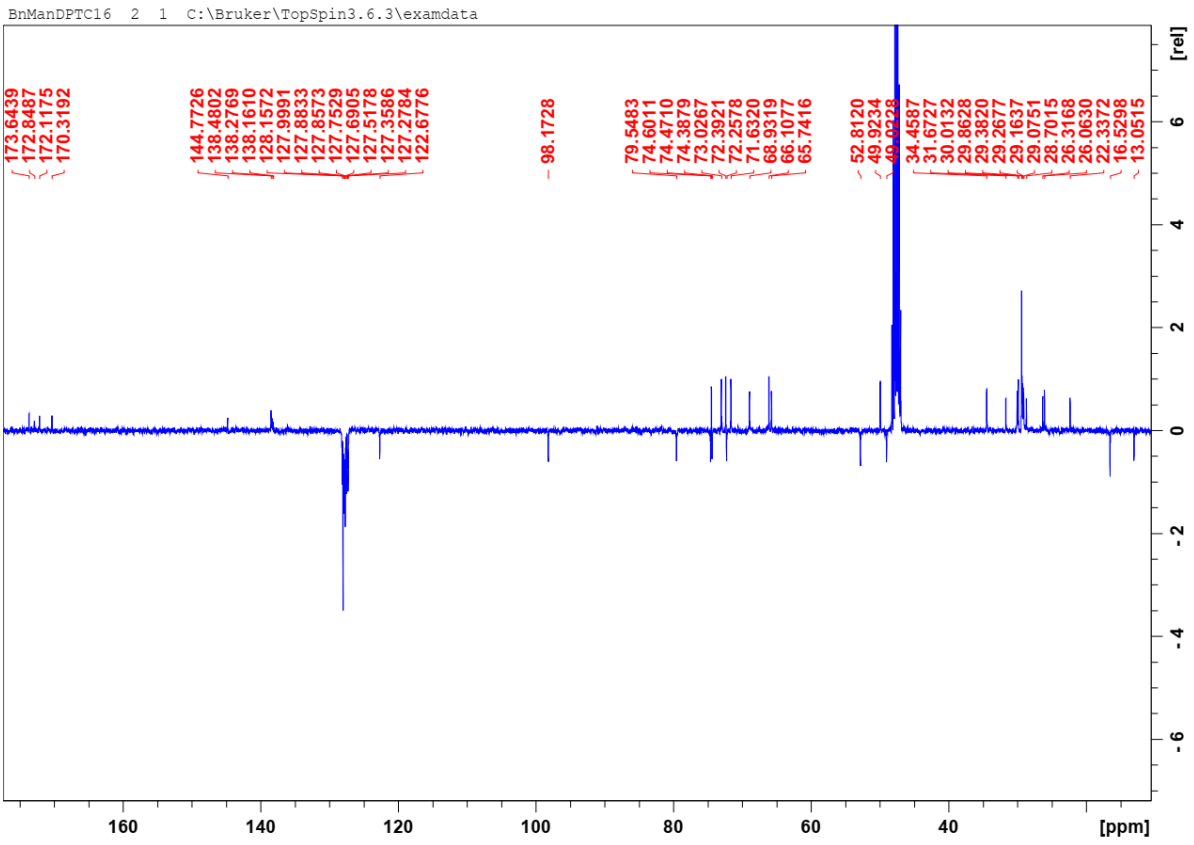


Dodatak 12: ^{1}H NMR i DEPTQ spoja **12**

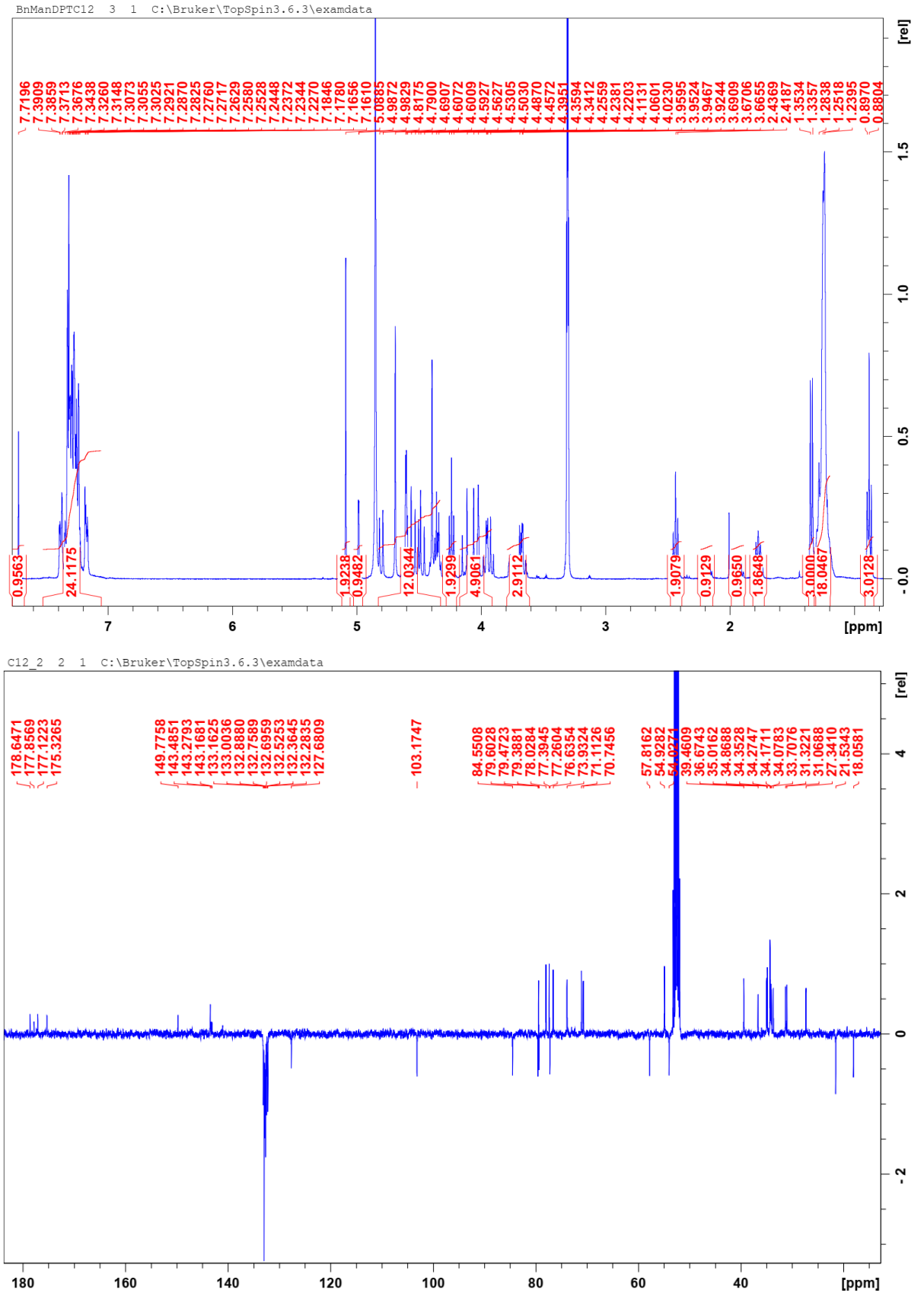


Dodatak 13: ^{1}H NMR i DEPTQ spoja **13**

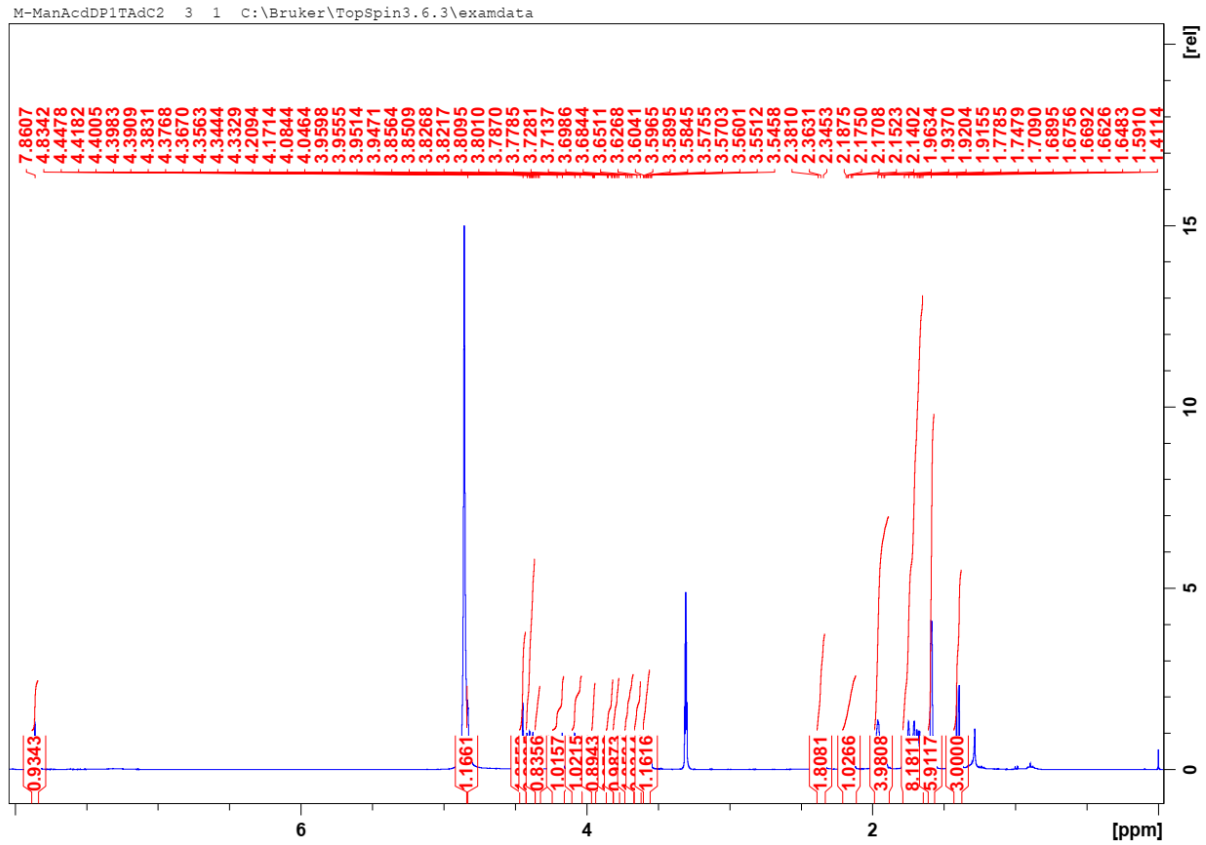


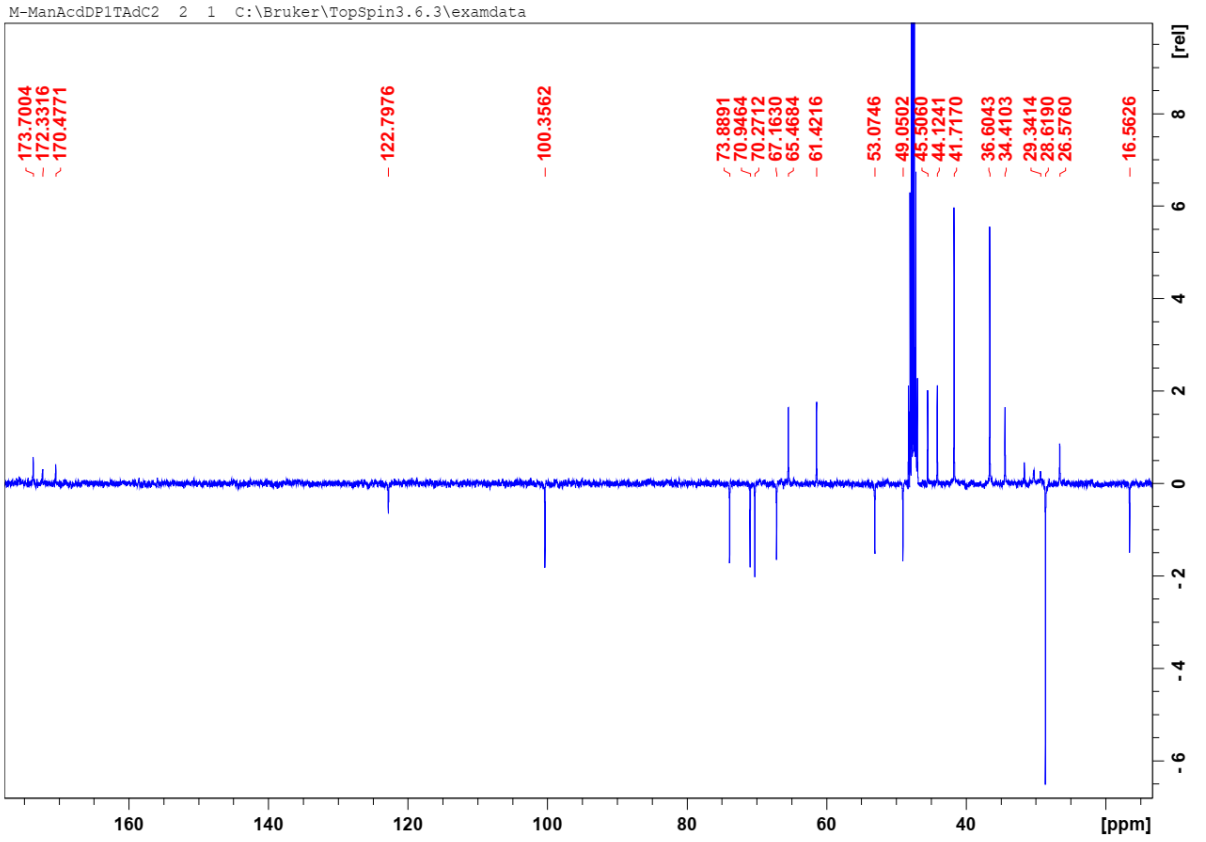


Dodatak 14: ^{1}H NMR i DEPTQ spoja **14**

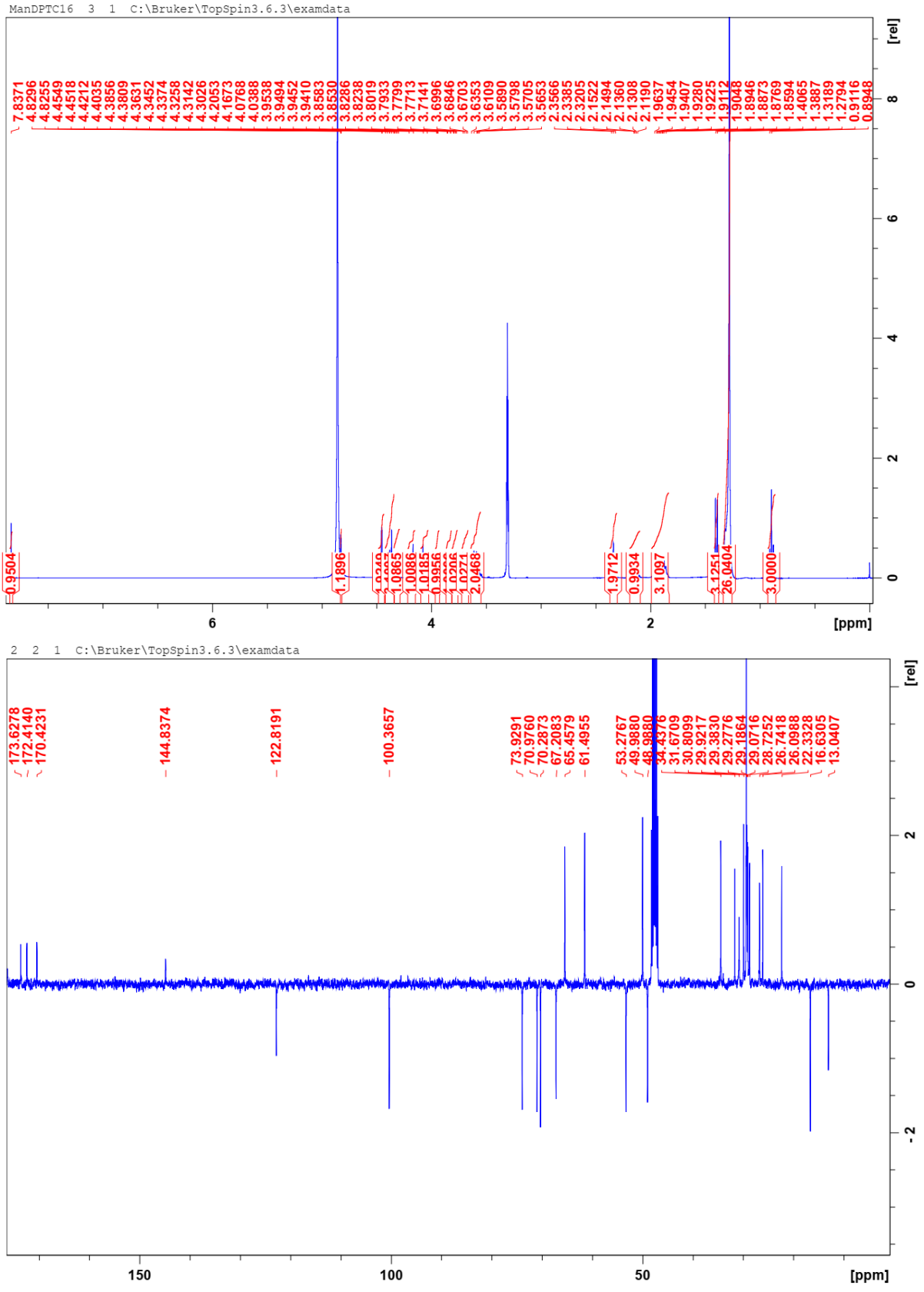


Dodatak 15: 1H NMR i DEPTQ spoja **15**

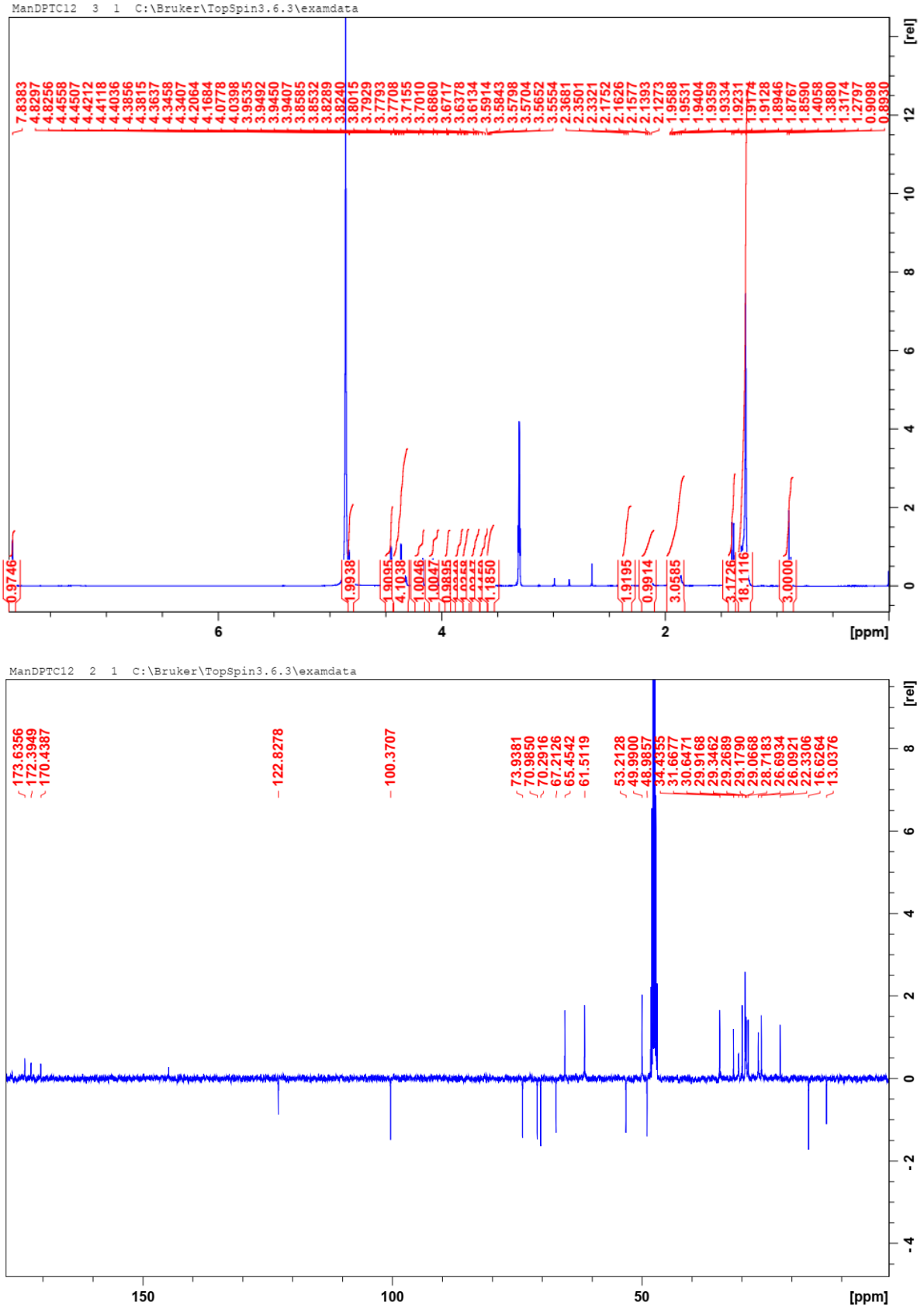




Dodatak 16: ^{1}H NMR i DEPTQ spoja **16**



Dodatak 17: ^{1}H NMR i DEPTQ spoja **17**



§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Mia Bušljeta

Datum rođenja: 23. prosinca 1997.

Mjesto rođenja: Rijeka

Obrazovanje

2004. – 2012.	Osnovna škola „Fran Krsto Frankopan“, Krk
2012. – 2016.	Srednja škola Hrvatski kralj Zvonimir, Krk
2016. – 2019.	Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2019. –	Diplomski sveučilišni studij Kemija, smjer: istraživački, grane: organska i anorganska kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2021. – 2022.	Stručna praksa, Pliva, TEVA Api-Kemija, istraživanje i razvoj u Zagrebu

Nagrade i priznanja

2021.	Medalja Kemijskog odsjeka PMF-a za izvrsnost tijekom studiranja
2016.	Honorable mention, Međunarodna kemijska olimpijada (IChO), Tbilisi, Gruzija
2012. – 2016.	Državno natjecanje iz kemije, 2012. g. (5. mjesto), 2013. god. (2. mjesto), 2014. god. (6. mjesto), 2015. god. (3. mjesto), 2016. god. (3. mjesto).

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2017. –	Pripremanje učenika za Međunarodna natjecanja iz prirodoslovlja te organizacija selekcijskih ispita koja prethode međunarodnom natjecanju
2022.	5. Zimska škola kemije, Rijeka

2021.	Demonstrator kolegija: Viši praktikum organske kemije, diplomski sveučilišni studij Kemija, Kemijski odsjek, PMF, Zagreb
2021.	5. Ljetna škola kemije, Rijeka
2020.	4. Zimska škola kemije, Rijeka
2019.	Jesenska škola kemije, Varaždin
2019.	3. Ljetna škola kemije, Rijeka
2018. – 2019.	Otvoreni dani kemijskog odsjeka
2018. – 2019.	Demonstrator kolegija: Opća kemija, preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Kemijski odsjek, PMF, Zagreb
2017.	Ljetna škola kemije, Varaždin
2017.	1. Zimska škola kemije, Rijeka

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Mihelec, Danijela; Bušljeta, Mia; Car, Željka; Petrović Peroković, Vesna; Ribić, Rosana, *Synthesis of new amphiphilic triazole derivatives of mannosylated desmuramyl dipeptide*, 27th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers with international participation, Hrvatsko kemijsko društvo, 2021. str. 233-233 (postersko priopćenje)