



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Antonija Ožegović

**RAZVOJ SINTETSKIH METODA ZA PRIPRAVU TRIAZOLNIH DERIVATA
MANOZILIRANOG DESMURAMIL-DIPEPTIDA**

Diplomski rad

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

Zagreb, 2019.

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 doc. dr. sc. Đanija Škalamere i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Željke Car.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta *HRZZ – 7899: Sinteza, strukturna analiza i biološka evaluacija peptidomimetika i glikokonjugata* (prof.dr.sc. Srdanka Tomić-Pisarović).

Zahvale

Velika hvala izv. prof. dr. sc. Vesni Petrović Peroković na mentorstvu, savjetima, uloženom trudu i strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada. Mnogobrojne ideje i motivacija neizmjereno su pomogli i olakšali izradu i pisanje rada.

Također velika hvala doc. dr. sc. Đaniju Škalameri na mentorstvu i samoj ideji za rad. Strpljenje kojim mi je na samom početku objašnjavao sve nejasnoće, pokazivao metode, tehnike i zapravo sam način rada u laboratoriju uvelike su doprinijeli da bez straha krećem u nove korake sinteze.

Neposrednoj voditeljici dr. sc. Željki Car također neizmjereno hvala na trudu i strpljenju s kojim je odgovarala na mnoga pitanja. Brojne ideje, savjeti, objašnjenja i promišljanja o raznim koracima i metodama značajno su doprinijeli izradi i pisanju rada.

Stoga, mentorima i neposrednoj voditeljici iznimno zahvaljujem na trudu, svim idejama i motivaciji koji su ovih nekoliko mjeseci izrade i pisanja rada učinili jako zanimljivim, poučnim i ugodnim.

Mojim roditeljima, bratu i sestri najveća hvala na podršci kroz sve ove godine. Bez njihove vjere u uspjeh i razumijevanja sve bi bilo puno teže.

Također, hvala mojim prijateljima, FeMo-vcima te Deborah i Tomislavu na podršci, razumijevanju i guranju prema naprijed kada bi entuzijazam i volja splasnuli.

Još jednom, svima vama neizmjereno hvala što ste ovo putovanje zvano studiranje učinili lakšim, zabavnim i sretnim.

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	13
§ 2. LITERATURNI PREGLED	15
2.1. Muropeptidi.....	15
2.2. Sinteza dipeptida	26
2.3. Klik-reakcije	34
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	41
3.1. Materijali i metode.....	41
3.2. Priprava manoznog prekursora.....	42
3.3. Priprava dipeptida	45
3.4. Priprava propargiliranog desmuramil-dipeptida	46
3.5. Kondenzacija propargiliranog desmuramil-dipeptida i manoznog prekursora	49
3.6. Klik-reakcije	50
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	53
4.1. Uvod	53
4.2. Priprava manoznog prekursora.....	56
4.3. Priprava peptidne komponente	57
4.4. Priprava manoziliranog propargiliranog dipeptida 10	61
4.5. Klik-reakcije	62
§ 5. ZAKLJUČAK	65
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI)	67
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	69
§ 8. DODATAK.....	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

RAZVOJ SINTETSKIH METODA ZA PRIPRAVU TRIAZOLNIH DERIVATA MANOZILIRANOG DESMURAMIL-DIPEPTIDA

Antonija Ožegović

U sklopu diplomskog rada ispitana je mogućnost strukturnog modificiranja desmuramil-dipeptida uvođenjem manozne i triazolne podjedinice supstituirane adamantanom. Kao polazni dipeptid pripremljen je Boc-L-alanil-D-glutaminska kiselina **6** (Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH). Adamantom supstituirana triazolna podjedinica uvedena je na dipeptid azid-alkin cikloadicijom (klik-reakcija). Terminalna alkinska komponenta za klik-reakciju pripremljena je propargiliranjem α -karboksilne skupine glutaminske kiseline dipeptida **6** s propargilaminom pri čemu je dobiven propargilirani dipeptid **8**, dok je 1-azidoadamantan (**11**) pripremljen iz adamantan-1-ola. Klik-reakcijom spojeva **8** i **11** dobiven je adamantom modificiran dipeptid **12**. Benzilima zaštićena manozna podjedinica **4** sintetizirana je u nekoliko koraka iz polaznog metil- α -D-manopiranozida i vezana preko glikolne poveznice na terminalnu amino-skupinu alanina spoja **8**, s kojeg je prethodno uklonjena Boc zaštita, dajući zaštićeni manozilirani propargilirani dipeptid **10**. Klik-reakcijom spojeva **10** i **11** pripremljena je zaštićena ciljna molekula **13**. Konačni cilj diplomskog rada jest optimizirati ključne korake u sintezi (priprava dipeptida, propargiliranje, klik-reakcija, vezanje manozne podjedinice) u smislu pripreme izomerno čistih spojeva što će se primijeniti za pripremu različitih triazolnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida u svrhu pripreme novih adjuvanata.

(57 + xxiii stranica, 31 slika, 4 tablice, 27 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: adamantan, adjuvantska aktivnost, desmuramildipeptid, klik-reakcija, manokonjugati

Mentori: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković i doc. dr. sc. Đani Škalamera

Neposredni voditelj: dr. sc. Željka Car, stručni savjetnik

Ocjenitelji:

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

Datum diplomskog ispita: 20. 9. 2019.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF SYNTHETIC METHODS FOR THE PREPARATION OF TRIAZOLE DERIVATIVES OF MANNOSYLATED DESMURAMYL DIPEPTIDE

Antonija Ožegović

Structural modification of desmuramyl dipeptide by incorporation of mannose and adamantyl triazole subunit was investigated in this diploma thesis. Dipeptide Boc-L-alanyl-D-glutamic acid **6** (Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH) was prepared first. Adamantyl triazole subunit was incorporated to peptide structure by azide-alkyne cycloaddition (the click-reaction). Terminal alkyne part for the click reaction was prepared by propargylation of α -carboxyl group of glutamic acid on dipeptide **6** using propargyl amine. Thus, propargylated dipeptide **8** was obtained. Azide component, 1-azidoadamantane (**11**), was prepared from adamantan-1-ol. Click-reaction of compounds **8** and **11** resulted in adamantyl dipeptide conjugate **12**. Benzylated mannose unit **4** was prepared in few steps from methyl- α -D-mannopyranoside. It was connected to terminal amino group of alanine in **8** through glycolic acid which gave benzylated mannosylated propargyl dipeptide **10**. Boc protection was removed from compound **8** prior to that step. Click-reaction of **10** and **11** gave target compound **13**. The aim of this thesis was to optimize the key synthetic steps (preparation of dipeptide, propargylation, click-reaction, incorporation of mannose unit) in order to obtain pure isomers. This optimized steps will be applied in the preparation of various triazole derivatives of mannosylated desmuramyl dipeptide as potential new adjuvants.

(57 + xxiii pages, 31 figures, 4 tables, 27 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: adamantane, adjuvant activity, click chemistry, desmuramyl dipeptide, mannoconjugates

Mentor: Dr. Vesna Petrović Peroković, Assoc. Prof. and Dr. Đani Škalamera, Assist. Prof.

Assistant mentor: Dr. Željka Car, expert advisor

Reviewers:

1. Dr. Vesna Petrović Peroković, Assoc. Prof.
2. Dr. Željka Soldin, Prof.
3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Prof

Substitute: Dr. Đani Škalamera, Assist. Prof.

Date of exam: 20. 9. 2019.

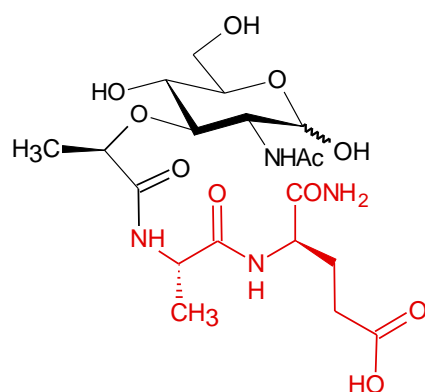
§ 1. UVOD

Spojevi koji reguliraju imunološki odgovor nazivaju se imunomodulatorima, a dijele se na imunostimulatore i imunosupresive. Imunostimulatori ili adjuvanti produljuju, pojačavaju ili ubrzavaju specifičnu imunoreakciju na određeni antigen. Postoje različiti spojevi koji pokazuju imunomodulirajući učinak, a među njima posebno se ističu derivati muramildipeptida.

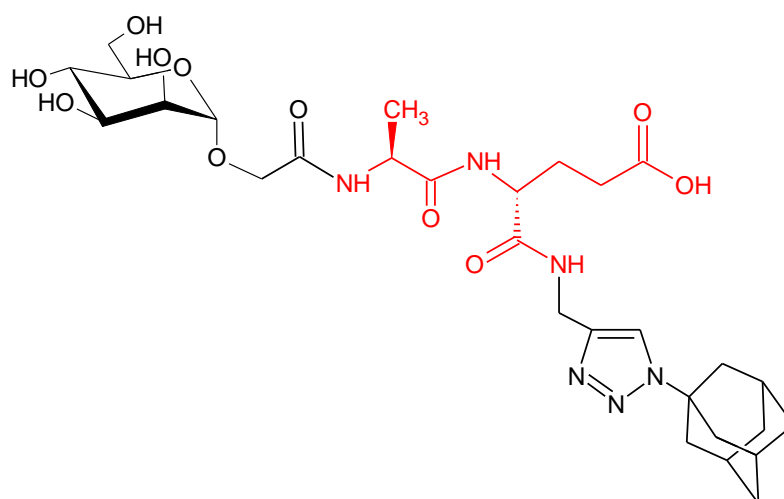
Muramil-dipeptid, *N*-acetilmuramil-*L*-alanil-*D*-izoglutamin (MDP), najmanji je dio peptidoglikana bakterijskih staničnih stijenki koji pokazuje adjuvantsku aktivnost (slika 1a). Zbog pirogenosti i ostalih nuspojava koje izazva, muramil-dipeptid se ne može klinički upotrebljavati, stoga su priređeni brojni derivati muramil-dipeptida kao i desmuramil-dipeptida, analoga bez šećerne strukturne podjedinice. Posebno korisnom pokazala se manozilacija desmuramil-dipeptida čime su sintetizirani apirogeni i netoksični spojevi koji mogu interagirati s manoznim receptorima uključenim u imunološki odgovor. Derivati koji uz manozu sadrže i adamantansku podjedinicu pokazali su se iznimno učinkovitima. Adamantanske skupine mogu se ugraditi u lipidni dvosloj membrana i liposoma dok manozna na površini može stvarati interakcije s manoznim receptorima čime je omogućena ciljana dostava aktivnih tvari do stanica.¹

Cilj ovog rada jest razvoj sintetske metode za pripravu derivata desmuramil-dipeptida s potencijalnom adjuvantskom aktivnošću. Ciljna molekula bi u svojoj strukturi trebala sadržavati *D*-manopiranozu vezanu na *N*-terminalni kraj dipeptida *L*-Ala-*D*-Glu preko poveznice od dva ugljikova atoma dobivene *O*-glikozilacijom zaštićene manoze esterom bromoctene kiseline. Spoj bi također trebao imati vezanu adamantansku skupinu u obliku 1-(adamantan-1-il)-1,2,3-triazolne skupine dobivene reakcijom 1-azidoadamantana i propargilamida pripremljenog propargiliranjem slobodne karboksilne skupine glutaminske kiseline polaznog dipeptida (slika 1b). U ciljnoj molekuli uklonjene su sve zaštitne skupine čime je osigurana zadovoljavajuća topljivost spoja potrebna za biološka ispitivanja. Svrha uvođenja manozne podjedinice jest omogućiti prepoznavanje spoja od strane manoznih receptora, dok bi adamantanska skupina povećavala lipofilnost što bi olakšalo unos spoja u stanicu. Identifikacija ciljne molekule i svih međuprodukata napraviti će se spektrometrijom masa te spektroskopijom NMR (¹H i ¹³C).

a)



b)



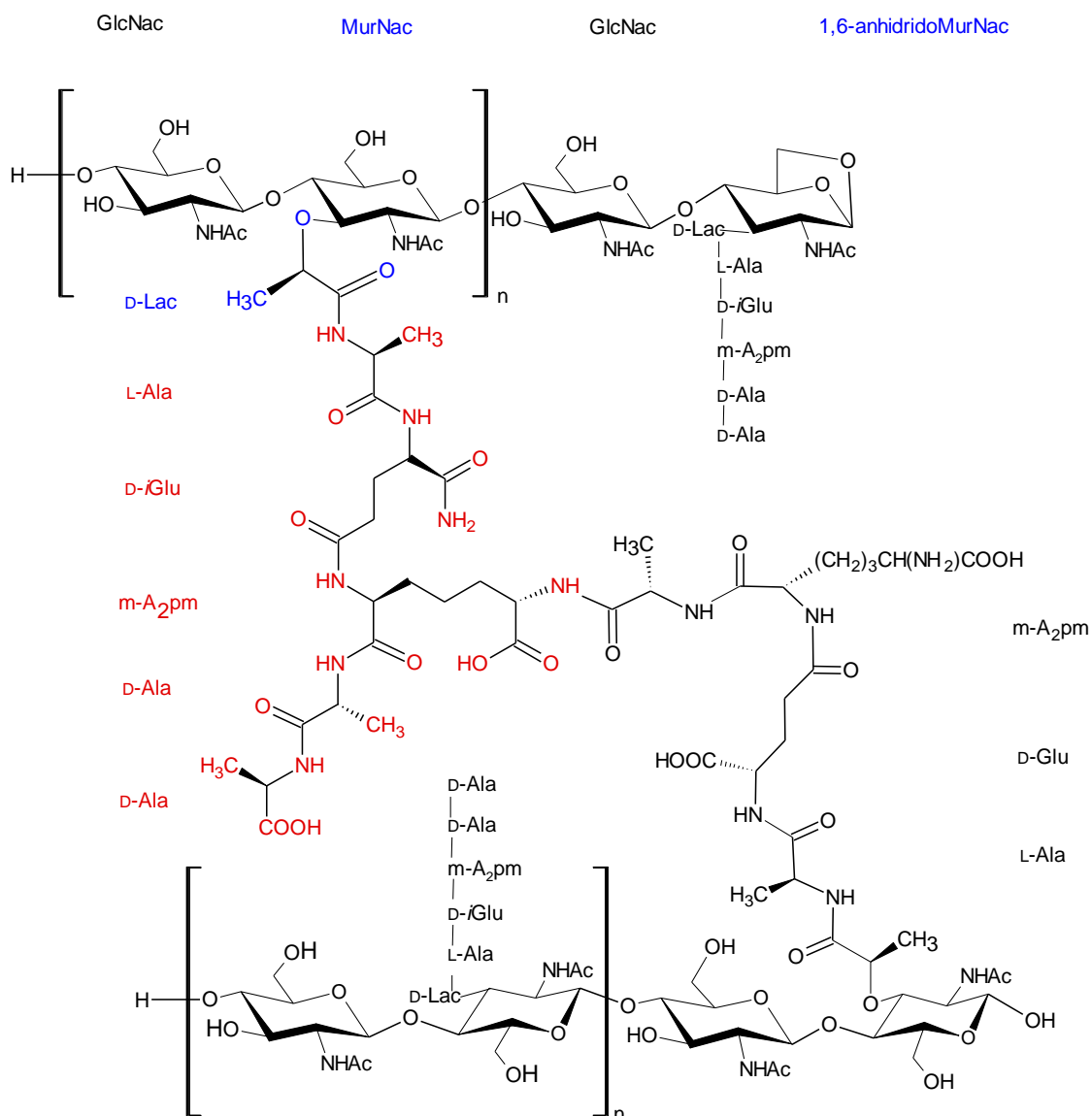
Slika 1. Strukturne formule a) muramil-dipeptida i b) ciljne molekule diplomskog rada. Karakterističan dipeptidni fragment L-Ala-D-isoGln označen je crveno.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Muropeptidi

Tvari koje reguliraju imunološki odgovor nazivaju se imunomodulatorima. Dije se na imunosupresore i imunostimulatore koji se još nazivaju adjuvanti (lat. *adiuvare* - pomagati). Adjuvanti produžuju, ubrzavaju ili pojačavaju imunoreakciju na određeni antigen i iz tog razloga se dodaju cjepivima koja nisu dovoljno imunogenična.¹

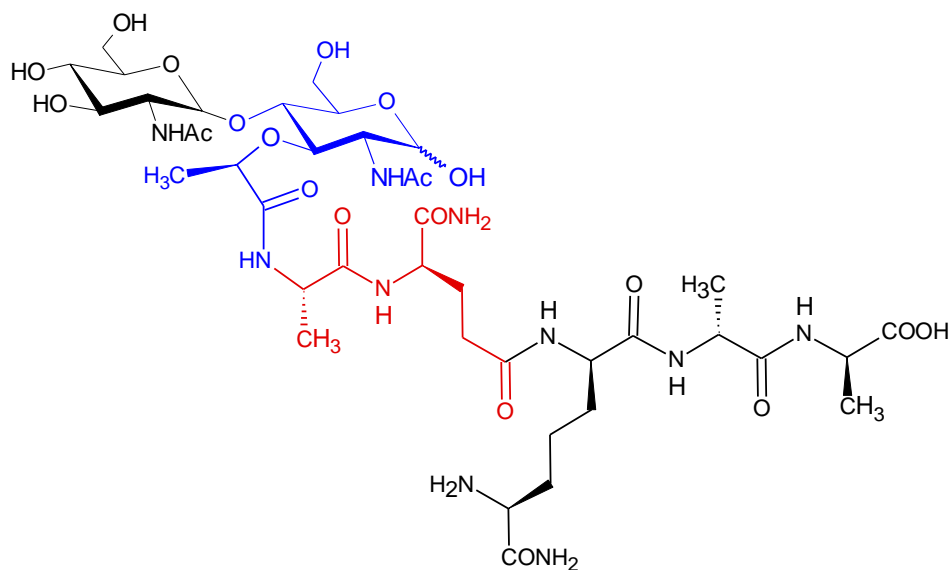
Postoji više različitih klasa spojeva koji pokazuju adjuvantsku aktivnost, a jednu od njih čine peptidni adjuvanti, derivati muramil-dipeptida. Muramilpeptidi su sastavni dijelovi peptidoglikana koji grade stanične stijenke Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Peptidoglikani posjeduju razne biološke aktivnosti ovisno o veličini i strukturi pojedinih fragmenata. To su prirodni polimeri građeni od alternirajućih molekula *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i *N*-acetilmuraminske kiseline (MurNAc) međusobno povezanih $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidnom vezom umreženih preko kratkih peptida vezanih na MurNAc (slika 2).¹



Slika 2. Strukturna formula peptidoglikan bakerije *Escherichia coli*.

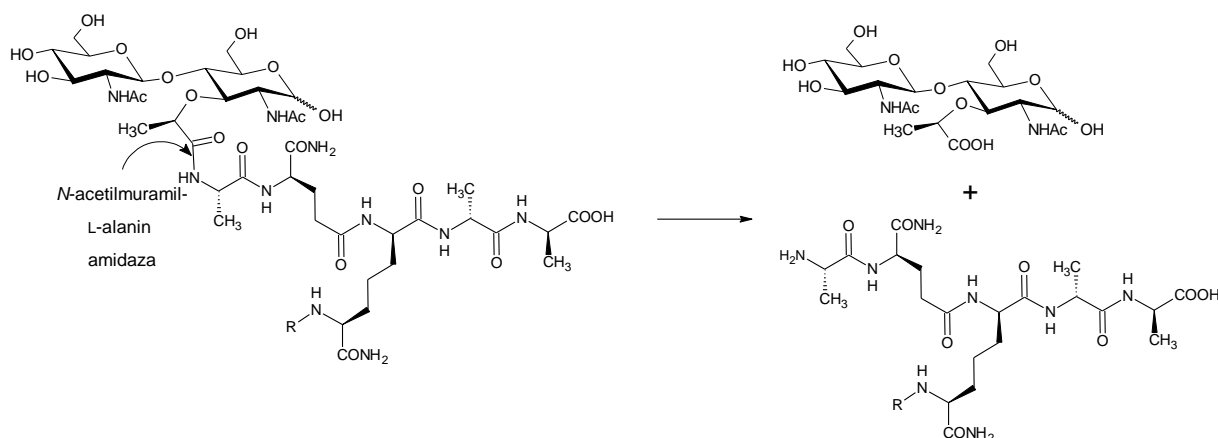
(Modificirano prema referenci 7)

Muropeptidi su strukturni fragmenti peptidoglikan-monomera (slika 3), a *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin, muramil-dipeptid (MDP), najmanji je sintetički adjuvant (slika 1a).³



Slika 3. Strukturna formula peptidoglikana monomera (PGM). Muramil-dipeptid (MDP) je označen plavo-crveno.

Peptidoglikan-monomer (PGM) (slika 3) je disaharid-pentapeptid koji u svojoj strukturi sadrži L-Ala-D-isoGln-mesoDAP(ϵ NH₂)-D-Ala-D-Ala. Analizom strukture dokazan je njegov amfipatski karakter s odvojenim lipofilnim i hidrofilnim dijelovima. Nije dokazano koliko to svojstvo pomaže u adjuvantskoj aktivnosti, ali je pokazano kako lipofilni supstituenti na MDP-u pospješuju aktivnost.⁵ U testovima *in vivo* i *in vitro* PGM je pokazao antitumorsku i antimetastatsku aktivnost kao i adjuvantsku aktivnost.¹ Biološka aktivnost u uvjetima *in vivo* ograničena je njegovom razgradnjom do koje dolazi zbog djelovanja *N*-acetilmuramil-L-alanin-amidaze iz ljudskog seruma koja razgrađuje PGM na disaharid i pentapeptid hidrolizom laktilamidne veze s L-alaninom (slika 4). Modifikacijom amino-skupine na diaminopimelinskoj kiselini sintetizirani su lipofilni derivati PGM-a čime se pokušalo olakšati ulazak PGM-a u stanicu i tako poboljšati njegovu aktivnost.¹



Slika 4. Shematski prikaz hidrolize PGM-a N-acetilmuramil-L-alanin-amidazom.

(Prilagođeno prema referenci 1)

2.1.1. Derivati muramil-dipeptida

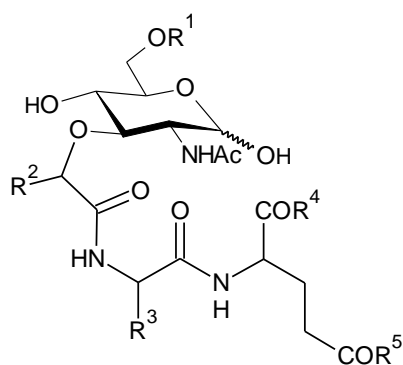
Kako bi se umanjile nuspojave poput pirogenosti, artritogenosti i toksičnosti koje izaziva MDP te također poboljšala imunostimulacijska aktivnost MDP-a, sintetizirani su njegovi brojni analozi. Točan mehanizam djelovanja MDP-a i njegovih derivata nije u potpunosti razjašnjen, no poznato je da se polimerni peptidoglikani vežu na receptore *Toll-like* (TLR), a manji peptidoglikanski fragmenti na unutarstanične NOD-proteine (*eng. Nucleotide-binding oligomerization domain*). NOD proteini su receptori koji prepoznaju strane strukture peptidoglikana koje se ne vežu na TLR i ne aktiviraju proteine za mijeloidno razlikovanje (*eng. Myeloid differentiation primary-response protein 88, MyD88*). NOD1 specifično prepoznaje L-Ala-D-isoGln-mDap sekvencu, karakterističnu za Gram-negativne bakterije dok NOD2 prepoznaje MDP. Pošto se MDP sekvencu pojavljuje i u Gram-negativnim i Gram-pozitivnim bakterijama, receptor NOD2 služi za prepoznavanje svih bakterija. Kako bi došlo do prepoznavanja peptidoglikana NOD receptorima, peptidoglikani trebaju ući u stanicu i aktivirati NOD receptore, a to je moguće samo nekim bakterijama. Ovo pokazuje koliko male promjene u primarnoj peptidoglikanskoj strukturi mogu biti važne u procesu prepoznavanja koji vodi do imunoreakcije.⁵

Sintetski su modificirani svi dijelovi MDP-a (MurNAc-a, L-Ala i D-isoGln) te je zaključeno kako se adjuvantska aktivnost MDP-a ne umanjuje ukoliko na šećernom dijelu nema anomerne hidroksilne skupine ili je zamijenjena α - ili β -metilnom skupinom. Moguća je zamjena N-acetilglukoamina nekim ugljikohidratnim konfiguracijskim izomerom poput manoze. Ukoliko se primarna hidroksilna skupina šećera na C-6 zamijeni amino- ili acilamino-

skupinom, ne dolazi do gubitka aktivnosti.² No, ukoliko se kiralno središte u laktatnom dijelu MurNAc-a, koje je *R*-konfiguracije, promijeni u *S*-konfiguraciju, gubi se aktivnost molekule. Uklanjanjem stereogenog centra dobiva se spoj manje toksičnosti, a slične biološke aktivnosti.¹ Zamjenom L-alanina D-alaninom gubi se aktivnost spoja dok zamjena nekom drugom L-aminokiselinom ili glicinom ne rezultira gubitkom aktivnosti. Tako je temurtid (MDP(Thr)) **2** (slika 5) netoksičan i aktivan adjuvant dobiven zamjenom L-alanina s L-treoninom.¹

Za glutaminski dio dipeptida bitno je da zadrži D-konfiguraciju na aminokiselini te da karboksilne skupine, koje mogu biti supstituirane ili slobodne, budu razdvojene s dva metilenska ugljikova atoma. Murabutid **3** (slika 5) primjer je derivata MDP-a kojem su karboksilne skupine supstituirane, a pokazao se učinkovitijim od MDP-a jer ne izaziva nuspojave i primjenjiv je kod ljudi.¹

Primjer priznatog i odobrenog imunomodulatora je muramiltripeptid-fosfatidiletanolamin **4** (slika 5), koji je, nakon ugrađivanja u liposom, poznat pod nazivom mifamurtid, a koristi se u liječenju nemetastaziranog osteosarkoma. To je primjer derivata MDP-a u kojem je došlo do konjugacije lipofilnih skupina preko γ -karboksilne skupine, čime je postignuta bolja adjuvantska aktivnost jer je olakšan ulazak molekule u stanicu obzirom na semipermeabilnost stanične membrane (nepropusnost prema hidrofilnim molekulama).



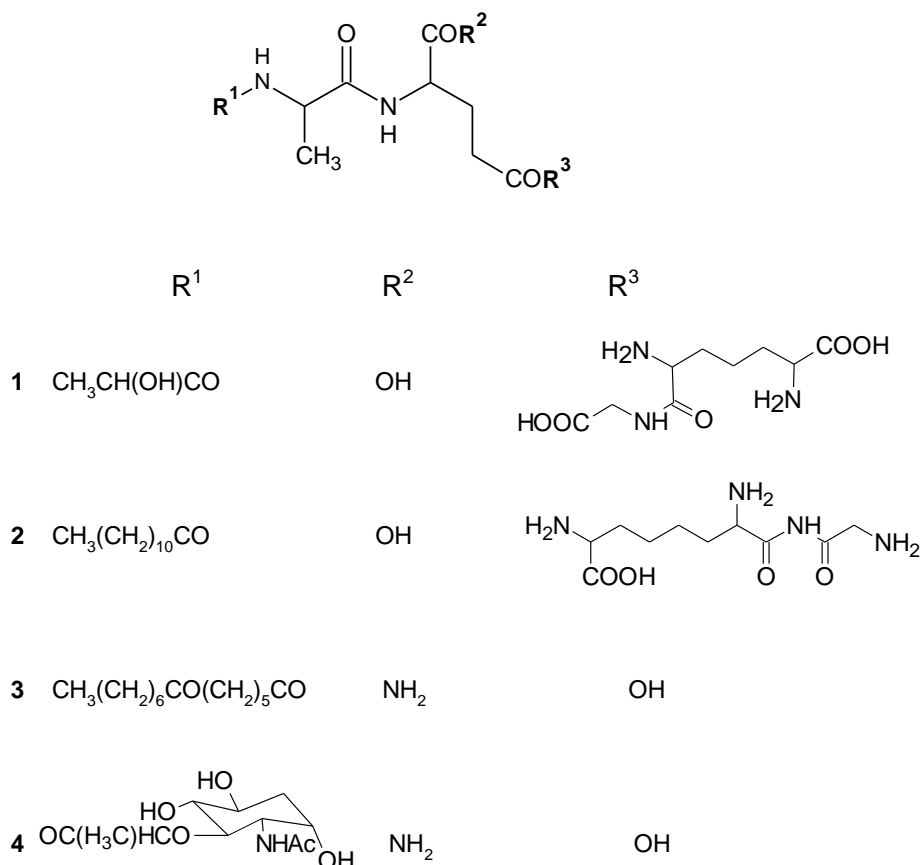
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
MDP 1	H	CH ₃	CH ₃	NH ₂	OH
MDP(Thr) 2	H	CH ₃	CH(CH ₃)OH	NH ₂	OH
MB 3	H	CH ₃	CH ₃	OC ₄ H ₉	NH ₂
MTP-PE 4	H	CH ₃	CH ₃	NH ₂	NHCHCONH(CH ₂) ₂ OPO ₂ CH ₂ CHO ₂ C(CH ₂) ₁₄ CH ₃ <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> <div style="text-align: center;"> CH₃</div> <div style="text-align: center;"> OH</div> <div style="text-align: center;"> CH₂O₂C(CH₂)₁₄CH₃</div> </div>

Slika 5. Strukturne formule odabranih derivata muramil-dipeptida.

(Prilagođeno prema referenci 1)

2.1.2. Desmuramil-dipeptid i adamantanski derivati desmuramil-dipeptida

Istraživanja su pokazala kako *N*-acetil-D-glukozamin, prisutan u strukturi MDP-a, nije ključan za njegov imunostimulirajući učinak, što je omogućilo sintezu novih adjuvanata, derivata MDP-a, u kojima je šećerni dio modificiran ili u potpunosti zamijenjen acilnom skupinom.¹ Takvi spojevi, imunološki aktivni MDP analozi bez *N*-acetilmuraminske kiseline, nazivaju se desmuramil-dipeptidi (slika 6).

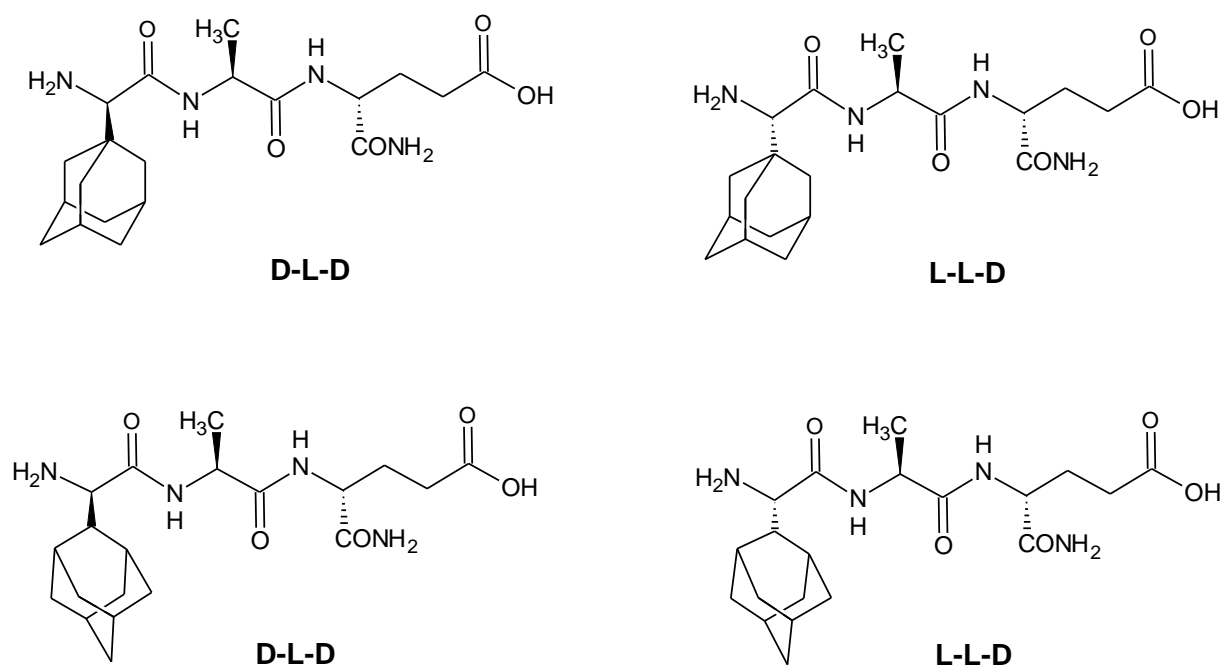


Slika 6. Strukturne formule odabranih derivata desmuramil-dipeptida.

(Prilagođeno prema referenci 1)

Kako bi se povećala lipofilnost dipeptida i time olakšao prolaz kroz staničnu membranu, sintetizirani su desmuramil-dipeptidi s adamantilnom skupinom. Prijašnjim istraživanjima dokazano je kako spojevi koje sadrže adamantilnu skupinu posjeduju razne biološke aktivnosti te se koriste u prevenciji virusnih oboljenja, u procesu liječenja *Parkinsonove* bolesti i depresije. Također, poznato je kako uvođenje adamantilnog dijela u biološki aktivnu supstancu poboljšava njena farmakološka svojstva i pojačava njezinu aktivnost.^{2,3}

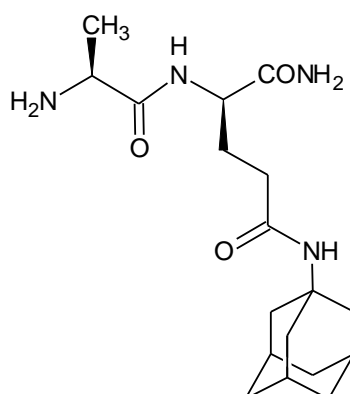
Uvođenjem adamantana u obliku racemičnih adamantilglicina, (adamantan-1-il)glicina i (adamantan-2-il)glicina, na amino-kraj desmuramil-dipeptida dobiveni su apirogeni i netoksični spojevi smanjene adjuvantske aktivnosti u odnosu na peptidoglikan-monomer (slika 7).⁶



Slika 7. Strukturne formule adamantilnih tripeptida.

(Prilagođeno prema referenci 2)

Adamantilamid-dipeptid, dobiven vezanjem 1-aminoadamantana na karboksilnu skupinu izoglutamina, pokazao se kao vrlo dobar adjuvant u eksperimentima *in vivo* na miševima i kunićima (slika 8),¹ a zbog pozitivnih rezultata i lipofilnosti adamantanske skupine sintetizirani su razni spojevi kojima su ispitivana biološka svojstva s naglaskom na adjuvantsku aktivnost.



Slika 8. Strukturna formula adamantilamid dipeptida.

(Preuzeto iz reference 1)

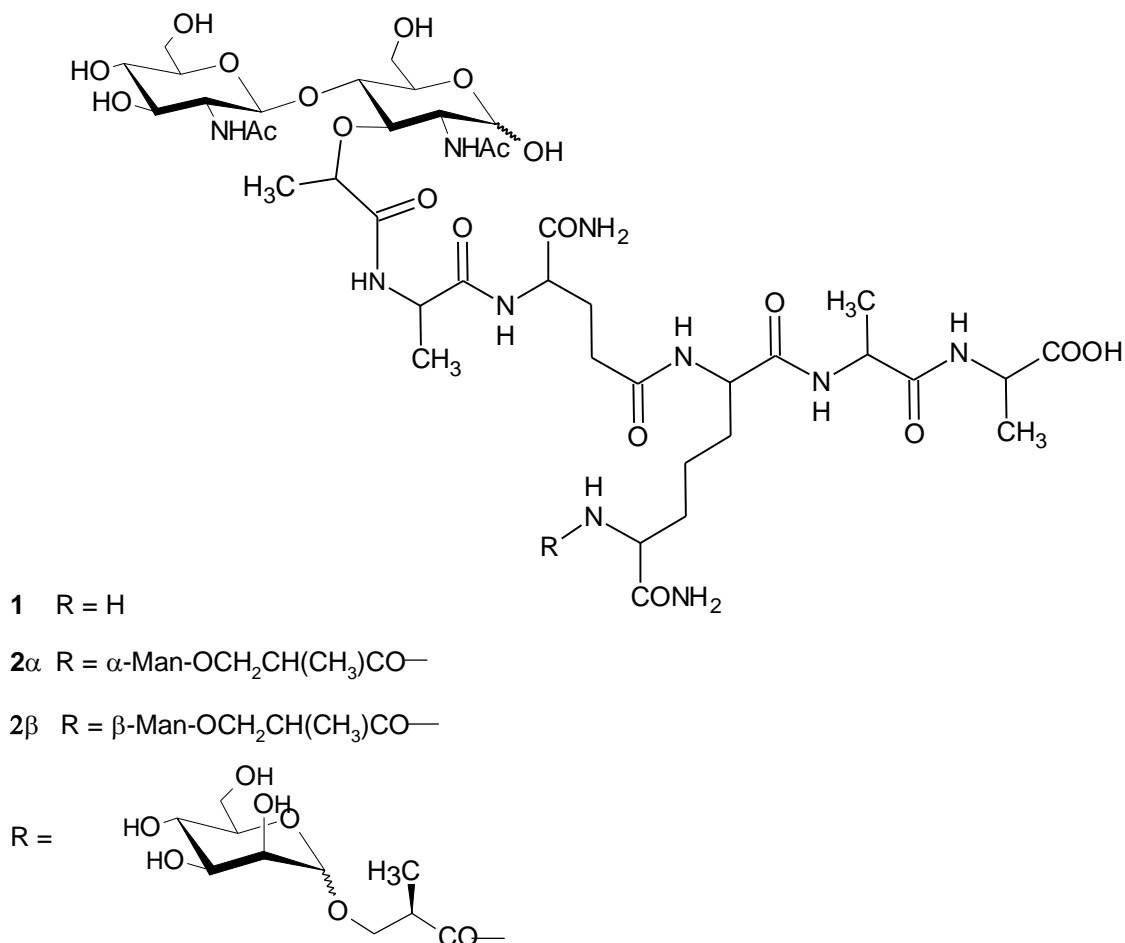
2.1.3. Manozni receptori i manozilirani muropeptidi

Manoza je važan šećer čiji se receptori, manozni receptori (MR), nalaze na površini makrofaga i dendritičnih stanica koje sudjeluju u imunološkom odgovoru organizma. Receptori za manozu pripadaju skupini C-tipa lektina, proteina koji specifično i reverzibilno vežu šećerne strukture, a ne pokazuju katalitičku aktivnost. Lektini se dijele u nekoliko osnovnih skupina s obzirom na šećer koji prepoznaju, a ti šećeri su: D-manoza, D-glukoza, D-galaktoza, L-fukoza, *N*-acetilmuraminska kiselina ili D-ksiloza. Obzirom na aminokiselinski slijed aktivnog dijela lektina koji veže šećer (*eng. Carbohydrate-recognition domain, CRD*), lektini se dijele na četiri velike skupine: tip C, tip S, tip P i tip I. Skupini C-tipa pripadaju lektini koji vežu manozu, MBL (*eng. mannose-binding lectin*) te manozni receptori. MBL služe za obranu domaćina od patogenih organizama vezanjem patogena preko C-kraja polipeptidnog lanca, dok se preko N-kraja veže na makrofage čime je omogućena fagocitoza. MR-i su receptori za prepoznavanje patogena (*engl. pathogen recognition receptors, PRR*), odnosno tzv. PAMP komponenti (*eng. pathogen associated molecular patterns*) na mikroorganizmima. Također, posreduju pri endocitozi, fagocitozi i otpuštanju citokina, kojima se utječe na stečenu imunost, te na taj način predstavljaju vezu između urođene i stečene imunosti.^{1,4,6}

Brojna istraživanja pokazala su kako konjugacija MDP-a s manoziliranim proteinima povećava antitumorska i imunoaktivirajuća svojstva. Manoziliranjem antigena postiže se njihovo bolje prepoznavanje čime se potencijalno može utjecati na imunoreakciju organizma. Vezanjem MDP-a na manozilirani serumski albumin dolazi do značajnog porasta aktivnosti makrofaga koji na svojoj površini ima receptor za manozu, a manoziliranjem liposoma u koje je ugrađen MDP dolazi do učinkovite inhibicije metastaza na jetri. Manoziliranjem liposoma i njihovom interakcijom s lektinima koji specifično vežu manozu pokazano je kako takvi liposomi mogu služiti kao potencijalni nosači lijekova, gena ili antigena do ciljanih stanica koje imaju eksprimirane manozne receptore na svojoj površini. Ukoliko se u takve manozilirane liposome ugrade adjuvanti, moguće je dobiti učinkovite sustave za antitumorska cjepiva.¹

Manoziliranjem PGM-a dobiven je derivat PGM-a s manozom vezanom preko kiralne poveznice na amino-skupinu *meso*-diaminopimelinske kiseline (slika 9). Kad je takav derivat PGM-a podvrgnut hidrolizi *N*-acetilmuramil-L-alanin amidazom, pokazano je kako se regioselektivno hidrolizira laktamidna veza u prisutnosti amidne veze između *meso*-DAP-a i kiralne poveznice vezane na manozu. Također, pokazano je kako manoziliranje PGM-a mijenja

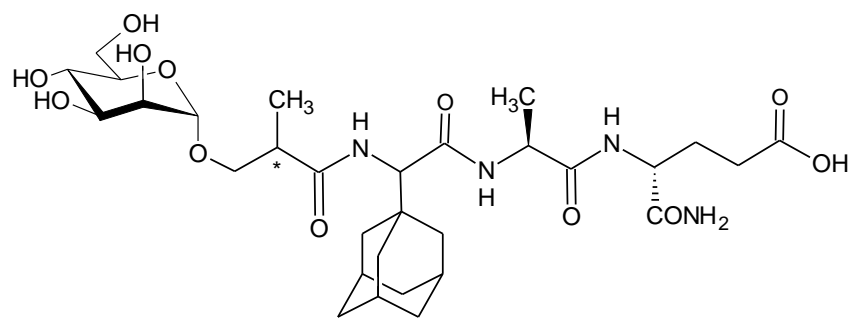
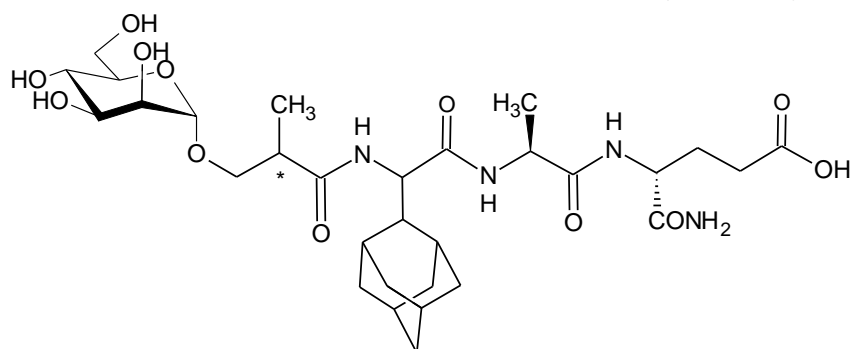
njegovu biološku aktivnost. Manozilirani derivati PGM-a ne pokazuju adjuvantsku aktivnost, no dokazano je kako dolazi do promjene smjera imunoreakcije.



Slika 9. Strukturne formule peptidoglikan monomera 1 i manoziliranog peptidoglikan monomera 2.

(Preuzeto iz reference 4)

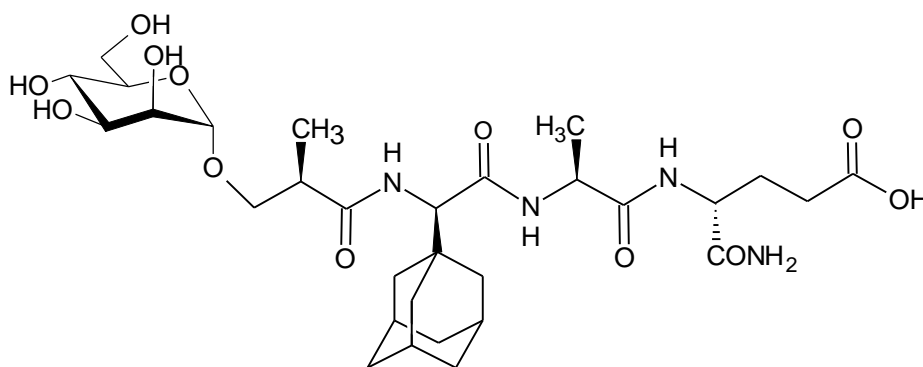
Adamantilglicil-desmuramilpeptidi, (adamantan-1-il)tripeptid i (adamantan-2-il)tripeptid, modificirani su s α -D-manozom tako da je na terminalnu amino-skupinu tripeptida vezana (*R*)-, odnosno (*S*)-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranoziloksi)-2-metilpropanska kiselina (slika 10).

**1a, 1b** (R, D, L-L-D)**1c, 1d** (S, D, L-L-D)**2a, 2b** (R, D, L-L-D)**2c, 2d** (S, D, L-L-D)

Slika 10. Strukturne formule adamantan-1-il tripeptida s kiralnom poveznicom (*R*) konfiguracije i *D*-*L*-*D* ili *L*-*L*-*D* konfiguracijom tripeptida, **1a** i **1b**; adamantan-1-il tripeptida s kiralnom poveznicom (*S*) konfiguracijom i *D*-*L*-*D* ili *L*-*L*-*D* konfiguracijom tripeptida, **1c** i **1d**; adamantan-2-il tripeptida s kiralnom poveznicom (*R*)-konfiguracije i *D*-*L*-*D* ili *L*-*L*-*D* konfiguracijom tripeptida, **2a** i **2b**; adamantan-2-il tripeptida s kiralnom poveznicom (*S*) konfiguracijom i *D*-*L*-*D* ili *L*-*L*-*D* konfiguracijom tripeptida, **2c** i **2d**.

(Modificirano prema referenci 2)

Istraživanja su pokazala kako manoziliranje pojačava imunostimulirajuću aktivnost adamantil-tripeptida u usporedbi s tripeptidom bez manoze te da ona ovisi o apsolutnoj konfiguraciji na kiralnoj poveznici. Spojevi kojima kiralna poveznica ima (*R*)-konfiguraciju pokazuju veću aktivnost od spojeva (*S*)-konfiguracije. Najučinkovitijim se pokazao (adamantan-1-il)tripeptid s poveznicom (*R*)-konfiguracije jer je apirogen, stabilan, netoksičan i topljiv u vodi, što ga čini potencijalnim adjuvantom u cjepivima (slika 11).^{1,2}



Slika 11. Strukturna formula najučinkovitijeg manoziliranog (adamantan-1-il)tripeptida.

(Preuzeto iz reference 1)

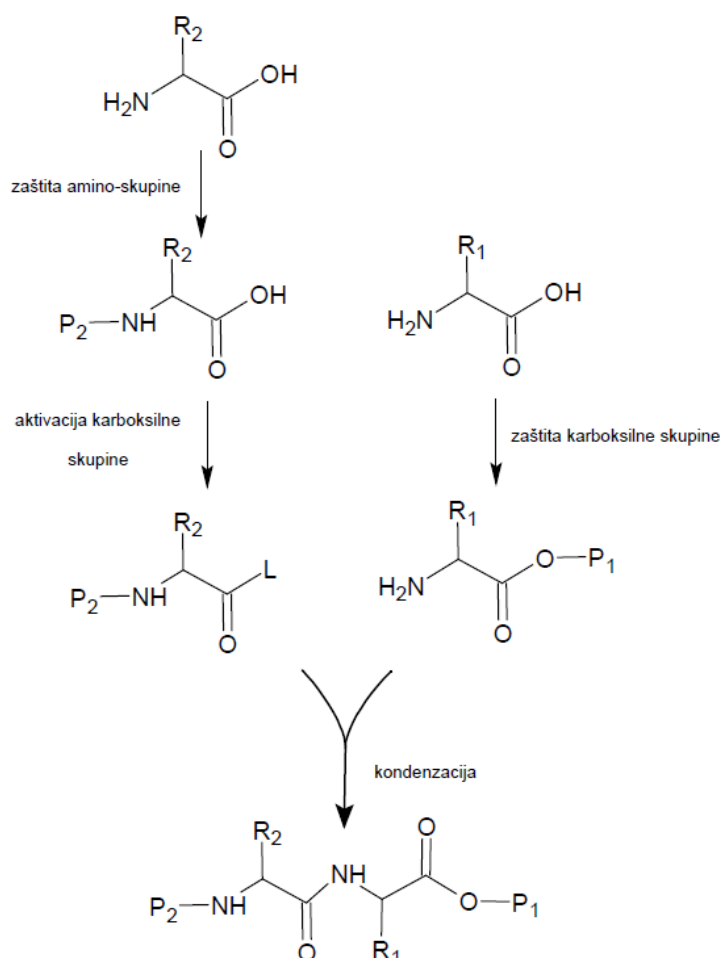
Manozilirani (adamantan-2-il)tripeptidi mogu se ugraditi u liposome pri čemu adamantanska podjedinica ulazi u lipidni dvosloj, a manozu se nalazi na površini liposoma što omogućuje ciljanu dostavu aktivne tvari i pojačanu aktivnost u odnosu na polazni tripeptid. Dobiveni rezultati pokazuju kako manozilacija ima veliku ulogu u poticanju imunološkog odgovora organizma.¹

2.2. Sinteza dipeptida

Peptidi, bilo prirodni, bilo sintetski, čine veliku i važnu skupinu molekula koji svoju primjenu nalaze u raznim područjima poput farmakologije, molekularne biologije, enzimologije, imunologije i brojnim drugim. Mnogi prirodni peptidi djeluju kao hormoni, neurotransmiteri ili citokini. Sintetički se peptidi koriste kao lijekovi jer su selektivni i efikasni, a na svoje mete djeluju u malim koncentracijama. Peptidi pronalaze primjenu u liječenju raka i metaboličkih poremećaja kao i kod raznih alergija, imunoloških poremećaja i kardiovaskularnih bolesti, stoga je njihova brza, efikasna i pouzdana kemijska sinteza predmet brojnih istraživanja.

Dva glavna pristupa kemijskoj sintezi peptida su sinteza u otopini (*eng. solution phase synthesis*, SPS) i sinteza na čvrstom nosaču (*eng. solid phase peptide synthesis*, SPPS). Sintaza u otopini uključuje zaštitu α -amino-skupine aminokiseline čija se α -karboksilna skupina aktivira za reakciju s α -amino-skupinom druge aminokiseline čija je α -karboksilna skupina zaštićena (slika 12). Nakon sinteze, zaštitne skupine selektivno se uklanjaju kako bi se dobio željeni peptid. SPS metoda je dugotrajna i zahtjevana jer je svaki međuprodukt prije sljedeće reakcije kondenzacije potrebno izolirati, pročitati i okarakterizirati, no ovom metodom se u

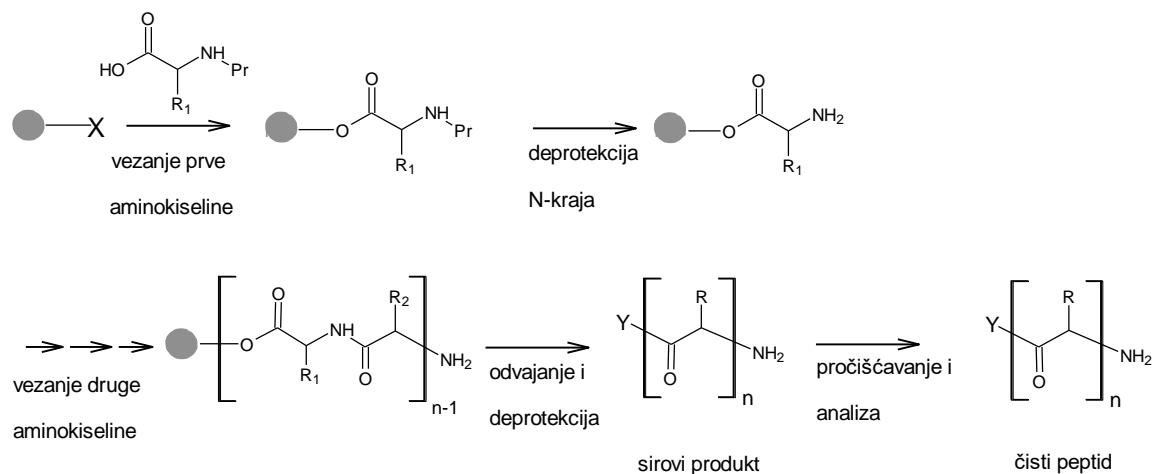
konačnici mogu dobiti peptidi visoke čistoće. Metoda je dobra za sintezu manjih oligopeptida, ali je zbog dugotrajnosti postupno zamijenjena sintezom na čvrstom nosaču.⁹



Slika 12. Shematski prikaz kemijske sinteze dipeptida, P_1 , P_2 -zaštitne skupine, L -aktivacijska skupina.

Sinteza peptida na čvrstom nosaču načinjenom od polistirena (Merrifieldov pristup) ili poliamida (Sheppardov pristup) znatno je ubrzala i olakšala postupak sinteze peptida. Temelji se na ponavljanju ciklusa „kondenzacija-ispiranje-deprotekcija-ispiranje“. Aminokiselina, kojoj su bočni ogranci zaštićeni t -Bu skupinom, na kruti se nosač veže C-krajem preko karbamatne poveznice stabilne u blago kiselim i lužnatim uvjetima. Ta aminokiselina ulazi u reakciju s drugom aminokiselinom, zaštićenom na N-kraju i aktiviranom na C-kraju, koju je potrebno dodati u velikom suvišku. Nakon ispiranja, kojim se uklanjaju neizreagirani reaktanti i soli, uklanja se zaštitna skupina s N-kraja novog dipeptida i cijeli postupak se ponavlja s novom aminokiselinom. Nakon završetka sinteze uklanjaju se zaštitne skupine, a peptid se

skida s čvrstog nosača propuštanjem trifluorooctene kiseline (slika 13). Metoda je danas automatizirana, ali ograničena na duljinu lanca od 50 aminokiselina.^{8,9}



Slika 13. Shematski prikaz sinteze peptida na čvrstom nosaču, Pr-zaštitna skupina.

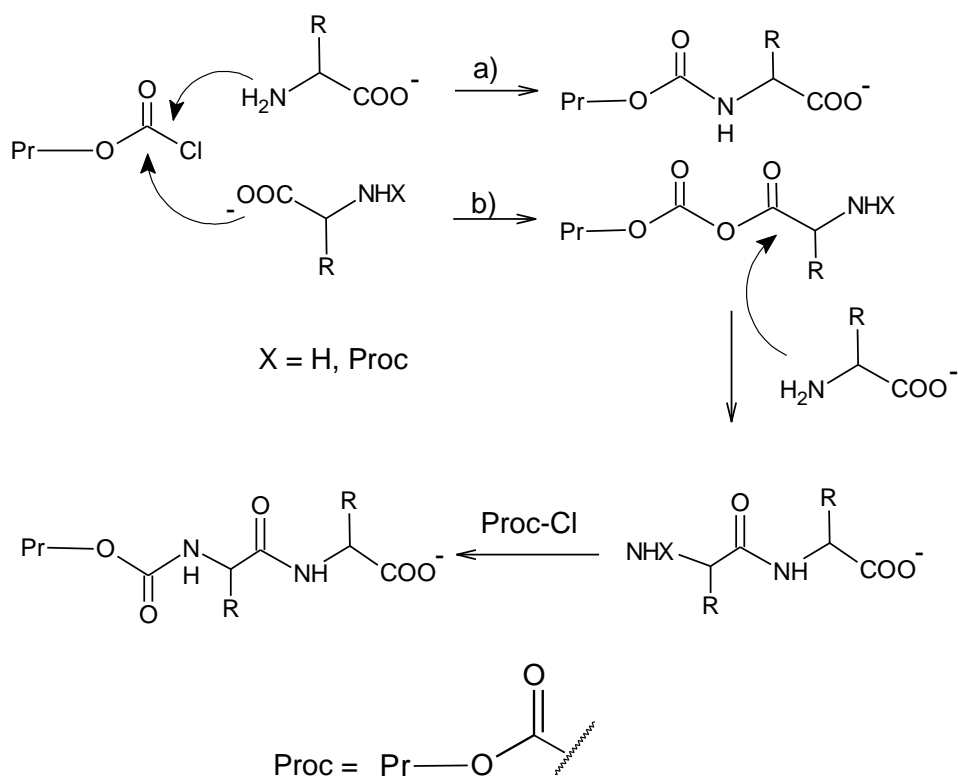
(Modificirano prema referenci 10)

2.2.1. Zaštitne skupine u sintezi peptida

Kako bi se postigla sinteza željenih peptida, bez neželjenih dodatnih reakcija ili formiranja raznih veza, potrebno je u sintezu uključiti zaštitne skupine. Prvi koji je to primijetio bio je Emil Fischer koji je davne 1901. godine zaključio kako je za regioselektivnu sintezu ugljikovodika potrebno „maskirati“ određenu funkcijsku skupinu. Nešto kasnije, Bergmann i Zervas osmislili su prvu N^α-zaštitnu skupinu s karakteristikama koje su i danas bitne za zaštitne skupine, a to su: lako uvođenje u molekulu, stabilnost u reakcijskim uvjetima i lako uklanjanje usred ili na kraju sintetskog postupka. Obzirom da aminokiseline sadrže dvije reaktivne funkcijske skupine, amino-skupinu i karboksilnu skupinu, a neke aminokiseline posjeduju i reaktivne skupine na bočnim ograncima, zaštitne skupine podijeljene su u tri skupine ovisno o tome zaštićuje li se N-kraj, C-kraj ili bočni ogranak.¹¹

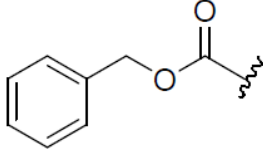
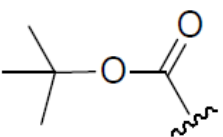
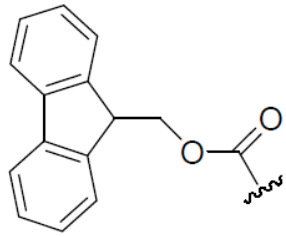
Zaštita amino-skupine jedan je od bitnijih koraka prilikom sinteze peptida jer se time sprječava polimerizacija aminokiselina. Najčešći način zaštićivanja amino-skupine jest karbamatna (uretanska) zaštita kojom se amino-skupina blokira kako ne bi reagirala s kiselinama ili elektrofilima. Te zaštitne skupine trebale bi spoj učiniti topljivim u većini otapala i trebale bi se uklanjati brzo u blagim uvjetima kako ne bi došlo do promjene na ostalim zaštitnim skupinama. U nekim slučajevima prisutnost slobodne α-karboksilne skupine može

uzrokovati nastanak dipeptida (slika 14, put b). Taj problem se rješava uvođenjem zaštite karboksilne skupine ili korištenjem manje reaktivnog elektrofila na spojevima korištenim za zaštitu amino-skupine. Primjer takvih spojeva su trimetilsililni esteri aminokiselina ili derivati *N*-hidroksisukcinimida.¹¹ U tablici 1 dan je prikaz najčešćih zaštinih skupina za amino-skupinu te načini uvođenja i uklanjanja.



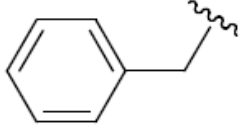
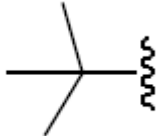
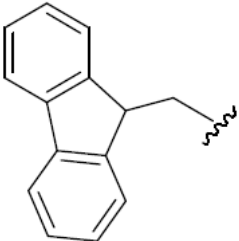
Slika 14. Shematski prikaz: a) mehanizma zaštite amino-skupine peptida i (b) nastanka dipeptida nusreakcijom, Pr-zaštitna skupina. (Modificirano prema referenci 11)

Tablica 1. Najčešće korištene skupine za zaštitu α -amino-skupine

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

Zaštita karboksilne skupine provodi se iz nekoliko razloga: kako bi se uklonili kiseli protoni koji bi smetali u kiselo-baznim reakcijama, kako ne bi došlo do nukleofilnog napada na karbonilnu skupinu te kako bi se olakšalo provođenje same reakcije. Najčešće se provodi pripremom stabilnih estera koji ne hidroliziraju u uvjetima stvaranja peptidne veze.¹² Neki od najčešće korištenih zaštitnih skupina za α -karboksilnu skupinu dani su u tablici 2.

Tablica 2. Najčešće korištene skupine za zaštitu α -karboksilne skupine.

Zaštitna skupina	Način uvođenja	Način uklanjanja
 Benzil - (Bn)	<i>O</i> -benzil- <i>N,N</i> - diizopropilizourea THF	Pd-C/H ₂ HF
 <i>tert</i> -butil - (<i>t</i> -Bu)	<i>t</i> -BuOH, EDC·HCl, DMAP, DCM	90 % TFA/DCM (čvrsti nosač i otopina) 4M HCl/dioksan (otopina)
 9-fluorenilmetil - (Fm)	FmOH, EDC·HCl, DMAP, DCM	20 % piperidin/DMF Pd-C/H ₂ (otopina)
Metiloksikarbonil - (COOMe) Etiloksikarbonil - (COOEt)	ClCO ₂ Me/K ₂ CO ₃ ClCO ₂ Et/K ₂ CO ₃	LiOH NaOH KOH

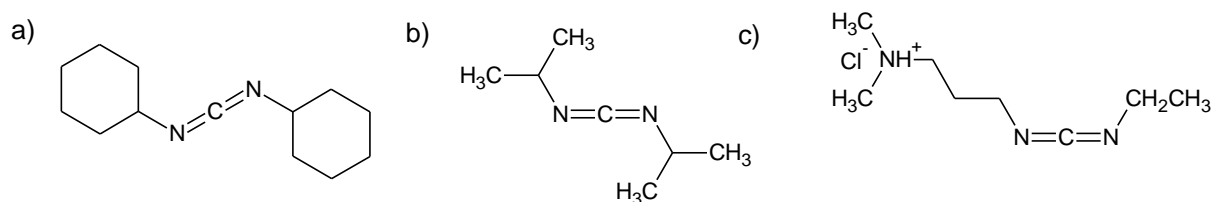
2.2.2. Kondenzacija aminokiselina

Reakcije kondenzacija aminokiselina su reakcije između amino-skupine jedne aminokiseline i karboksilne skupine druge aminokiseline pri čemu dolazi do nastajanja peptidne veze. Kako bi se proces nastajanja peptidne veze ubrzao i kako bi se smanjila količina nusprodukata potrebno je koristiti aktivacijske skupine tj. skupine koje aktiviraju karboksilnu skupinu i tako povećavaju elektrofilnost karbonilnog ugljikovog atoma. Karboksilnu skupinu moguće je aktivirati prevođenjem u acil-halogenid, acil-azid, acil-imidazol, anhidrid, ester i na mnoge druge načine. Dva su glavna načina kondenzacije reaktivnih karboksilnih derivata s aminom: 1) nastali acilirani međuprodukt se izolira i potom ulazi u reakciju s aminom i 2) reaktivni

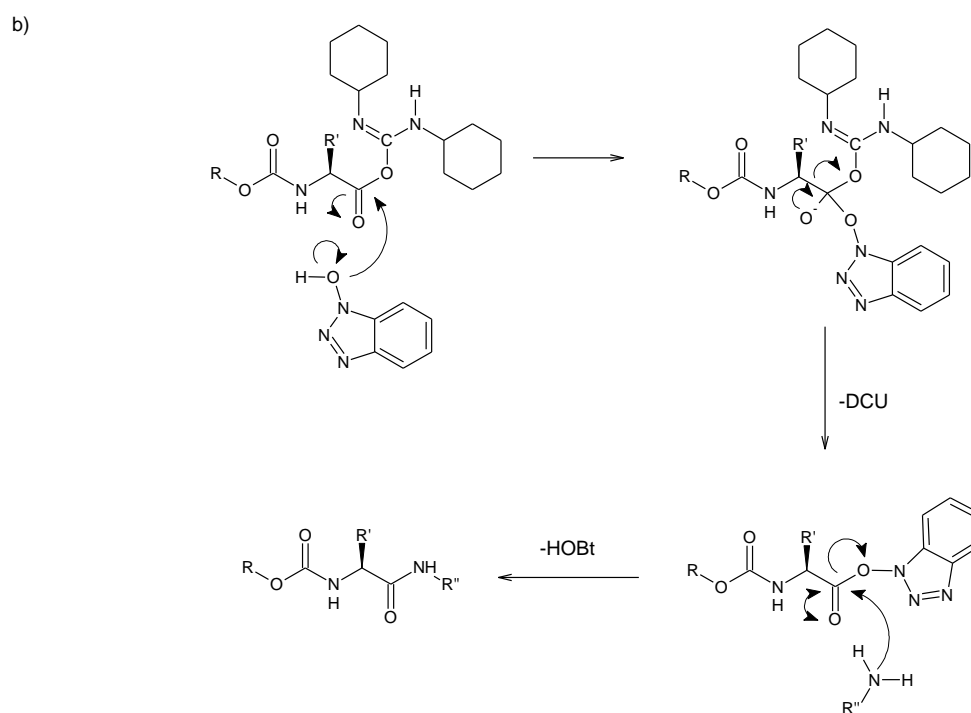
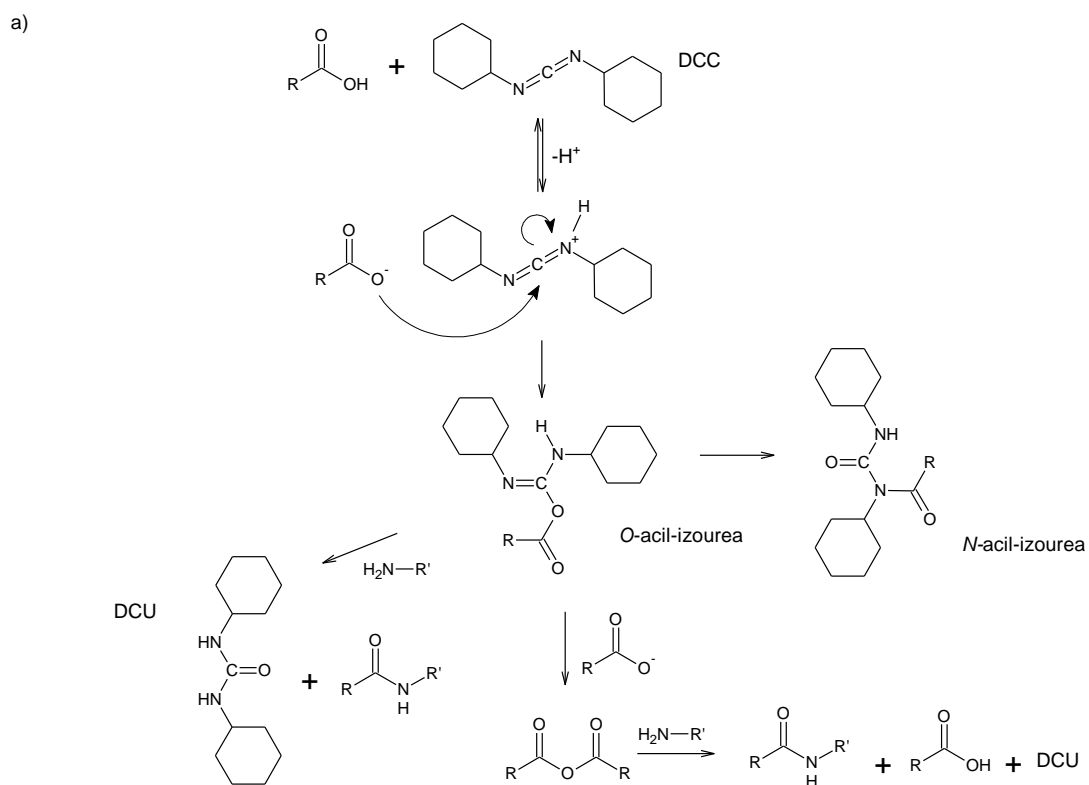
acilirani međuprodukt, dobiven *in situ* dodatkom aktivirajućeg sredstva, odmah ulazi u reakciju s aminom.¹³

Nastajanje peptidne veze nije jednostavan postupak jer često dolazi do racemizacije, degradacije, poteškoća pri čišćenju produkta ili jednostavno nastane mala količina produkta. Stoga, mnogi reagensi za kondenzaciju ne služe samo za povećanje prinosa već pomažu i pri sprječavanju racemizacije kiralnih centara.

Aktivirani esteri aminokiselina poput pentafluorofenilnog estera i hidroksisukcinimidnog estera imaju široku primjenu u sintezi peptida. Karbodiimidi, dicikloheksilkarbodiimid (DCC) ili diizopropilkarbodiimid (DIC), najčešće su korišteni aktivatori u sintezi peptida na čvrstom nosaču i sintezi peptida u otopini (slika 15). DCC je jedan od najčešćih kondenzacijskih reagensa, a obično se koristi uz dodatak 1-hidroksibenzotriazola (HOBt) ili *N*-hidroksisukcinimida (HOSu) kako bi se smanjila racemizacija (slika 16). Također, u reakciji dolazi do nastajanja dicikloheksilureje (DCU), koja je topljiva u većini otapala i teško ju je ukloniti iz reakcijske smjese, stoga je DCC bolje zamijeniti DIC-om jer derivat ureje, koji nastaje u tom reakcijom, nije topljiv u većini organskih otapala i lako se može ekstrakcijom ukloniti iz reakcijske smjese (slika 15).^{8,14} *N*-(3-Dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC×HCl) reagens je koji se uglavnom koristi za kondenzaciju peptida u polarnim otapalima poput DMF-a ili diklormetana dajući u vodi topljiv derivat ureje koji se lako uklanja ekstrakcijom (slika 15).



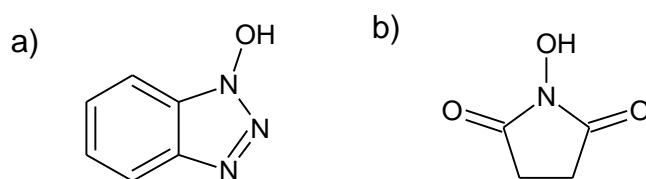
Slika 15. Strukturne formule najčešće korištenih karbodiimida u sintezi peptida: a) DCC, b) DIC, c) EDC×HCl.



Slika 16. Mehanizam a) aktivacije karboksilne skupine DCC-om uz nastanak dipeptida i nusprodukata: DCU-a, anhidrida kiseline i N-acil ureje zbog O-N migracije; b) aktivacije karboksilne skupine korištenjem DCC-a i HOBt-a.

(Modificirano prema referenci 14)

Svi karbodiimidi su kondenzacijski reagensi i moguće su sporedne reakcije s nezaštićenim bočnim ograncima aminokiselina. Stoga je potrebno uvesti zaštitu bočnih ogranaka. Također, moguća je neželjena migracija O-N-skupine i nastajanje *N*-acil-ureje čije nastajanje ovisi o temperaturi, pa je reakcije s karbodiimidima poželjno izvoditi pri nižim temperaturama. Kako bi se povećala reaktivnost i smanjilo stvaranje epimera, prilikom reakcije kondenzacije s karbodiimidnim reagensima poželjno je koristiti dodatne reagense poput HOBt-a ili HOSu-a (slika 17). HOBt se najčešće koristi kao dodatak u reakcijama kondenzacije aminokiselina, no može biti eksplozivan u suhim uvjetima. HOSu je u potpunosti stabilan i tvori stabilne estere koje je moguće izolirati. Najčešće su loše topljivi u organskim otapalima pa talože iz reakcijske smjese. Danas postoji tendencija zamjene karbodiimidnih aktivatora drugim kondenzacijskim reagensima poput fosfonijevih i amonijevih reagensa koje prati manje nepoželjnih reakcija i rezultiraju visokim iskorištenjima.¹⁴



Slika 17. Strukturne formule a) *N*-hidroksibenzotriazola i b) *N*-hidroksisukcinimida.

2.3. Klik-reakcije

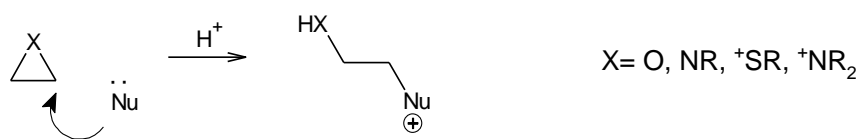
Modularne, stereospecifične, široko primjenjive reakcije visokih iskorištenja, koje se odvijaju u jednostavnim uvjetima i daju bezopasne sporedne produkte koji se mogu ukloniti nekromatografskim metodama nazivaju se klik-reakcijama. Polazni materijali za takve reakcije moraju biti lako dostupni; otapala, ako su potrebna, moraju biti lako uklonjiva i ne štetna; produkti moraju biti stabilni u fiziološkim uvjetima i moraju se moći lako izolirati i pročistiti nekromatografskim metodama.¹⁵

Primjeri reakcija koje zadovoljavaju gore navedene uvjete su cikloadicije, posebno 1,3-dipolarne cikloadicije i Diels-Alderova reakcija; nukleofilne supstitucije kojima dolazi do otvaranja prstena napetih heterocikličkih elektrofila poput epoksida, aziridina, aziridinijevih iona; reakcije na karbonilnim spojevima nealdolnog tipa poput nastajanja ureje, tioureje,

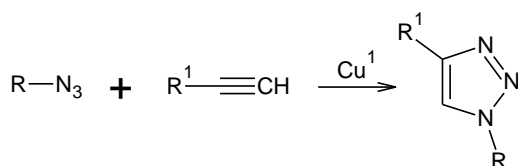
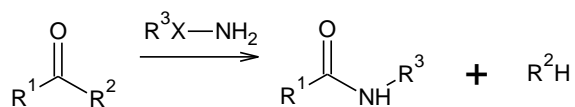
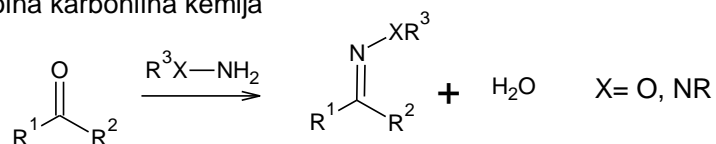
aromatskih heterocikla i adicija na ugljik-ugljik višestruke veze poput epoksidacije, dihidroksiliranja, aziridiniranja, Michaelove adicije (slika 18).^{15,16}

Klik-reakcije sve se više koriste za sintezu analoga prirodnih supstrata tako da se u što manje koraka i uz što veće iskorištenje u jednoj reakciji dobije nova veza između atoma ugljika i heteroatoma. Sve veća primjena klik-reakcija proizlazi iz samih uvjeta koji zahtijevaju smanjivanje uporabe štetnih kemikalija i na takav način usmjeravanje ka „zelenoj kemiji“. Najčešće korištena klik reakcija je bakrom(I) katalizirana azid-alkin cikloadicija (CuAAC).¹⁷

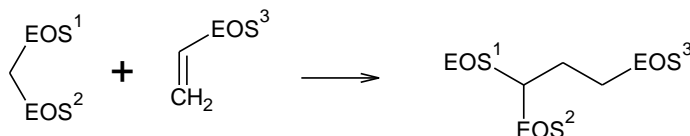
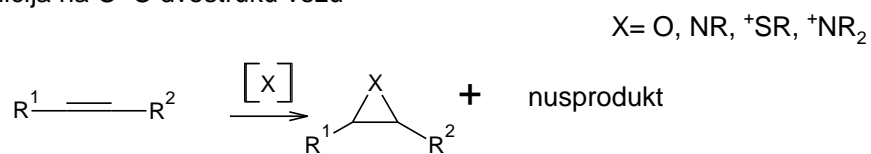
1. Nukleofilno otvaranje prstena



2. Nealdolna karbonilna kemija



4. Adicija na C=C dvostruku vezu

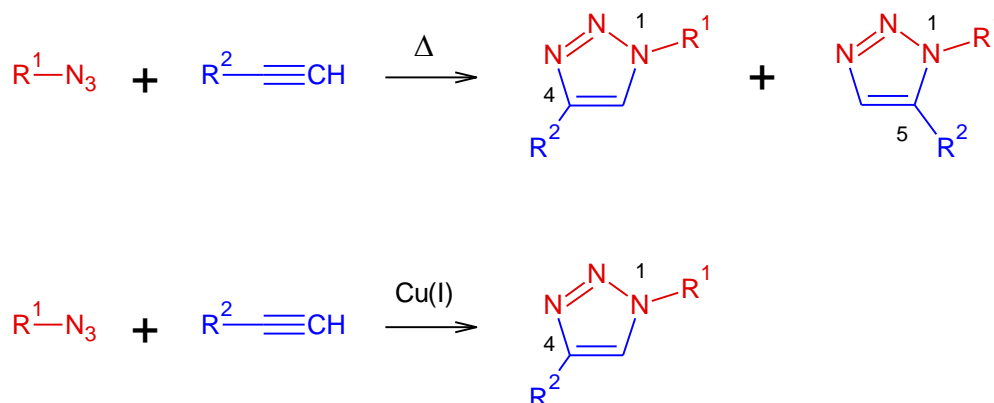


EOS= elektron-odvlačeća skupina

Slika 18. Shematski prikaz primjera klik-reakcija.
(Modificirano prema referenci 16)

2.3.1. Bakrom katalizirana azid-alkin cikloadicija

Nekatalizirana azid-alkin reakcija poznata je još od 1893. godine kada je otkriveno da dietilaceten-dikarboksilat u reakciji s fenilazidom daje 1,2,3-triazole. Ta reakcija, poznata i kao Huisgenova reakcija, daje smjesu 1,4 i 1,5-disupstituiranih produkata, dok dodatkom bakra(I) kao katalizatora reakcija postaje potpuno selektivna te nastaje 1,4-disupstituirani triazol (slika 19).¹⁷



Slika 19. Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija i bakrom katalizirana 1,3-cikloadicija.

(Preuzeto iz reference 18)

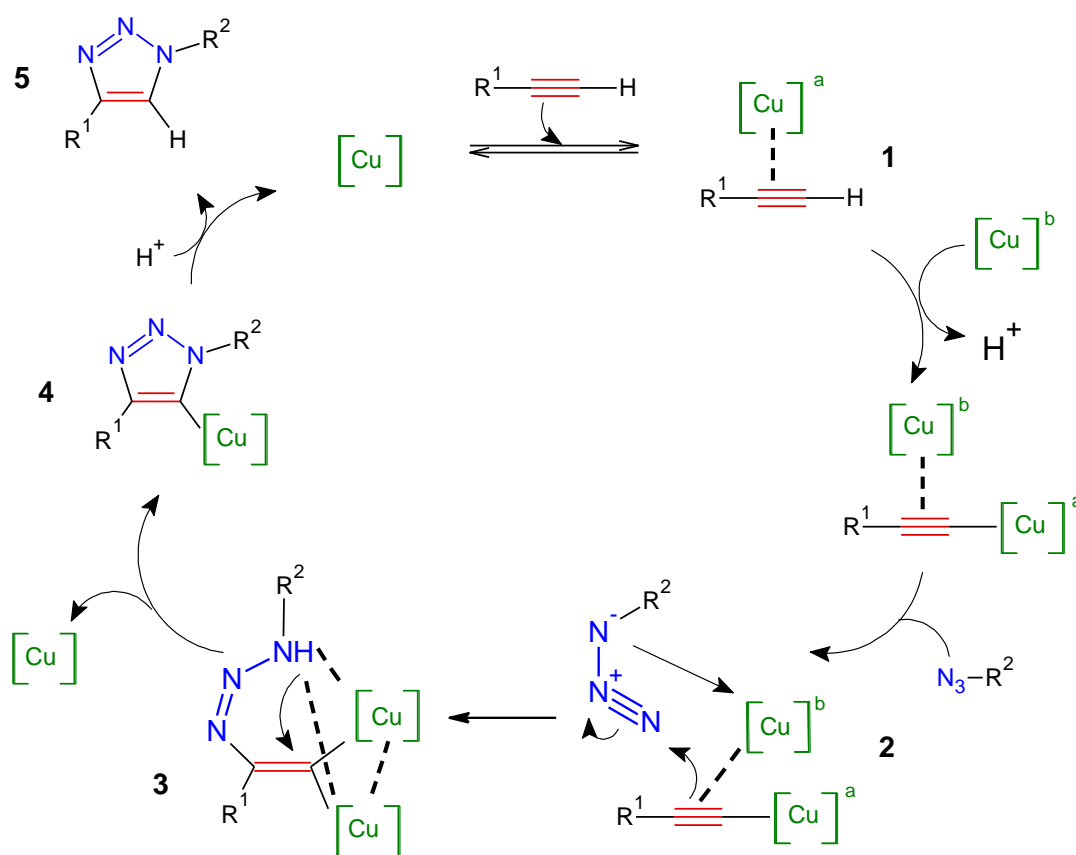
Ova klik-reakcija široko je primjenjiva zbog svoje jednostavnosti, neosjetljivosti na većinu funkcijskih skupina, mogućnosti korištenja raznih otapala i izvora bakra(I) kao katalizatora. Nije ju potrebno zagrijavati, štoviše, moguće je izvođenje pri različitim temperaturama od 0 °C do 160 °C, a produkt je jednostavno izolirati i pročistiti filtracijom.¹⁶

1,2,3-Triazoli koji nastaju CuAAC reakcijom imaju različite biološke aktivnosti, kemijski su inertni prema oksidaciji, redukciji i hidrolizi pri kiselim ili baznim uvjetima čime odlično oponašaju amidnu vezu. Ovi spojevi mogu sudjelovati u stvaranju vodikovih veza i u dipol-dipol interakcijama, što CuAAC otvara mogućnost primjene u područjima otkrivanja novih lijekova, biokemiji, kemiji polimera i općenito pri otkrivanju i stvaranju novih materijala.¹⁸

2.3.1.1. Mehanizam bakrom(I) katalizirane cikloadicije

Cikloadicije se uglavnom odvijaju usklađenim mehanizom, no temeljem kinetičkih eksperimenata i DFT računa zaključeno je kako je mehanizam CuAAC reakcije stupnjevit i uključuje dva atoma bakra. Prvi korak uključuje π kompleksaciju bakra(I) s alkinom pri čemu

nastaje Cu-acetilid **1**, a potom interakciju drugog iona Cu(I) s nastalim Cu-acetilidom. Time se pK_a terminalnog alkina smanji za 9,8 pH jedinica i omogući deprotoniranje u otapalima bez dodatka baze. U sljedećem koraku azid koordinira s istim atomom bakra i nastaje međuprodukt **2** koji dodatno povećava elektrofilnost terminalnog kraja azida. Idućim korakom dolazi do stvaranja C-N veze pri čemu nastaje bakrov(III) metalocikl **3**. Nastali međuprodukt potom iz šesteročlanog prelazi u peteročlani prsten **4** koji procesom protonolize postaje 1,2,3-triazolni produkt **5** (slika 20).^{16,17}



Slika 20. Shematski prikaz predloženog mehanizma CuAAC reakcije.

(Modificirano prema referenci 27)

2.3.1.2. Katalizatori CuAAC reakcije

Mnogo različitih katalizatora, koji daju Cu(I), moguće je koristiti u CuAAC reakcijama. Jedna od najčešćih tehnika je reduciranje Cu(II) soli, poput $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, *in situ* do Cu(I) soli korištenjem reducensa. Natrijev askorbat jedan je od najčešće korištenih reducensa, no osim njega moguće je korištenje hidrazina i tris(2-karboksietil)fosfina (TCEP). Ovakav pristup je jeftin, ne zahtjeva deoksigeniranu atmosferu i omogućava prisutnost vode. Vodena otapala uklanjaju potrebu za bazom kao i potrebu za zaštitnim skupinama, a takvi uvjeti olakšavaju biokemijske kondenzacije ili organske sinteze. Ono što je nedostatak ovakvog pristupa jest mogućnost redukcije Cu(II) do Cu(0). To je moguće spriječiti dobrim izračunom potrebne količine bakra kao katalizatora ili dodatkom stabilizatora bakra poput tris-(hidroksipropiltriazolmetil)amina.

Drugi način je direktan dodatak Cu(I) soli poput CuBr, CuI, CuOAc itd. Ova metoda ne zahtjeva dodatak redukcijskog sredstva, ali je potrebno izvođenje u deoksigeniranoj atmosferi, u organskom otapalu uz dodatak baze. Istraživanja su pokazala kako dodatak suviška diizopropiletilamina kao baze rezultira dobrim iskorištenjem i smanjenjem količine nusprodukata, ali i dalje metoda nije toliko pouzdana poput one korištenjem Cu(II) soli.^{16,17}

2.3.2. Primjena klik-kemije

Otkako se počela primjenjivati, klik-kemija se pokazala korisnom u brojnim područjima od mikroelektronike, obilježavanja virusa do liječenja raka. Koristi se u sintezi polimernih lijekova kod kojih je aktivna supstanca lijeka kovalentno vezana za neki polimer topiv u vodi. Ovakav pristup liječenju raznih oboljenja pokazao se znatno boljim i sigurnijim.

Osim za razvoj lijekova, klik kemija se uvelike primjenjuje u sintezi polimera: blok polimera, linearnih multifunkcionalnih kopolimera, dendrimera itd., čime se olakšala sinteza i proces pročišćavanja. Zbog iznimno velikih iskorištenja i neosjetljivosti prema raznim funkcijskim skupinama, klik-reakcije su postale vodeći tip reakcija u sintezi tj. spajanju raznih dijelova molekula. Klik-kemijom gotovo da je moguće bilo koja dva homopolimera spojiti u blok polimer, što je prije bilo otežano zbog razlike u reaktivnosti i topljivosti njih samih.

Osim gore navedenih primjena, klik-reakcije koriste se i u biokondenzacijskim reakcijama. Jedan od razloga je taj što su 1,2,3-triazoli idealne poveznice. Topljivi su u vodi, što znatno olakšava *in vivo* primjenu, imaju sličnosti s amidnom vezom, no ne podliježu istoj reakciji hidrolize, stabilni su u biološkim uvjetima i rigidni su, što onemogućava interakciju

dviju skupina spojenih na njih. Činjenica da su azidi i alkini relativno nereaktivni prema ostalim funkcijskim skupinama osigurava da se biokonjugacija dogodi na željenom mjestu. Također, moguće je korištenje raznih azida i alkina: primarnih, sekundarnih, tercijskih, aromatskih.¹⁶

Klik-reakcija, konkretno CuAAC, često je primjenjivana u organskoj sintezi. Kemičari su je spregnuli s drugim reakcijama poput Pd-kataliziranog alilnog prijenosa ili Pd(OAc)₂-katalizirane Heckove reakcije. Brojne funkcije peptida poboljšane su uvođenjem triazolnog prstena u molekulu jer triazoli oponašaju peptidnu vezu čime nastaju inhibitori ključnih bakterijskih i virusnih proteaza. Nastajanje triazola korisna je metoda učvršćivanja katalizatora na čvrstu površinu, a osim za modifikacije peptida koristi se i za modifikacije molekula DNA. Klik-reakcije imaju primjenu i u kemiji šećera. Šećeri se modificiraju vezanjem raznih organskih skupina, stvaranjem klastera i vezanjem na razne biomolekule.¹⁷

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

Svi reagensi i otapala korišteni u sintezi komercijalno su dostupni i analitičke su čistoće: *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC×HCl, *Sigma-Aldrich*), 4-dimetilaminopiridin (DMAP, *Sigma-Aldrich*), trietilamin (*Sigma-Aldrich*), trifluorocetna kiselina (*Sigma-Aldrich*), kalijev karbonat (K₂CO₃, *Kemika*), klorovodična kiselina (HCl, *Sigma-Aldrich*), bezvodni natrijev sulfat (Na₂SO₄, *Merck*), metanol (MeOH, *Fluka*), dietil-eter (*Merck*), aceton (*Sigma-Aldrich*), etil-acetat (EtOAc, *Fluka*), natrijev azid (NaN₃, *Sigma-Aldrich*), diklormetan (DCM, *Lach-Ner*), heksan (*Kemika*), *N,N*-dimetilformamid (DMF, *Kemika*), metil- α -D-manopiranozid (*Fluka*), dioksan (*Kemika*), kalijev hidroksid (KOH, *Kemika*), benzil-bromid (*Merck*), benzen (*T.T.T.*), octena kiselina (*Merck*), sumporna kiselina (H₂SO₄, *Fluka*), *tert*-butil-bromacetat (*Sigma-Aldrich*), kloroform (*Carlo Erba*), glutaminska kiselina (H-D-Glu-OH, *Bachem*), borov trifluorid eterat (BF₃×Et₂O, *Sigma-Aldrich*), tetrahidrofuran (THF, *Sigma-Aldrich*), *N*-(*tert*-butoksikarbonil)-L-alanin-hidroksisukcinimidni ester (Boc-L-Ala-OSu, *Sigma-Aldrich*), bezvodni magnezijev sulfat (MgSO₄, *Sigma-Aldrich*), propargilamin (*Sigma-Aldrich*), di-*tert*-butil-dikarbonat (Boc₂O, *Fluka*), piridin (*Kemika*), titanijev tetraklorid (TiCl₄, *Sigma-Aldrich*), natrijev karbonat (Na₂CO₃, *Sigma-Aldrich*), natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO₃, *Gram mol*), hidroksibenzotriazol (HOBt, *Fluka*), adamantan-1-ol (*Sigma-Aldrich*), natrijev askorbat (*Sigma-Aldrich*), bakrov(II) acetat (Cu(OAc)₂, *Kemika*). Otapala su po potrebi sušena uobičajenim literaturnim postupcima.²³

Tijek reakcije, sastav frakcija i čistoća sintetiziranih spojeva praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (60 F 254, 0,25 mm, *Fluka*) uz detekciju UV lampom ($\lambda = 254$ nm), prskanjem 10 %-tnom sumpornom kiselinom uz zagrijavanje ili prskanjem ninhidrinom uz zagrijavanje. Sustavi otapala korišteni prilikom razvijanja pločica navedeni su u tekstu. Spojevi su pročišćavani kromatografijom na stupcu silikagela (0,063-0,200 mm, *Merck*) kao stacionarne faze.

Sintetizirani spojevi identificirani su spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i spektrometrijom masa (MS). ¹H, DEPT-Q i HSQC spektri NMR snimljeni su na instrumentu Bruker Avance III HD pri 400 MHz u deuteriranim otapalima koja su navedena u

tekstu. Kemijski pomaci izraženi su prema tetrametilsilanu ((CH₃)₄Si, TMS) kao unutarnjem standardu u ppm vrijednostima. Multiplicitet signala naveden je kao: s – singlet, d – dublet, t – triplet, q – kvartet, m – multiplet, AB – AB kvartet. Spektri masa snimljeni su na uređaju Agilent 6410 uz ionizaciju raspršenjem (ESI).

3.2. Priprava manoznog prekursora

3.2.1. Priprava metil-2,3,4,6-tetra-O-benzil- α -D-manopiranozida **1**

Metil- α -D-manopiranozid (5,0 g, 0,026 mol) otopi se u suhom dioksanu (50 mL) u okrugloj tikvici. Otopina se miješa na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi te joj se postupno dodaje kalijev hidroksid (25,3 g, 0,451 mol). Benzil-bromid (26 mL, 0,219 mol) dokapava se u reakcijsku smjesu kroz 1 sat, a potom se cijela smjesa zagrije na 100 °C i refluksira 24 h. Tijek reakcije praćen je TLC-om (benzen : etil-acetat = 10 : 1) uz prskanje 10 %-tnom sumpornom kiselinom uz zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, u tikvicu se doda voda (50 mL) te se sadržaj tikvice prebaci u lijevak za odjeljivanje, a tikvica se ispere eterom. Ekstrahira se eterom (2 × 50 mL), a sakupljeni eterski ekstrakti isperu se vodom (50 mL) i upare na rotacijskom uparivaču te se destilacijom pri sniženom tlaku ukloni benzilni alkohol. Dobiveno je 8,7 g (61 %) produkta **1** u obliku žute, uljaste tekućine.

$R_f = 0,50$ (benzen : etil-acetat = 10 : 1).

¹H NMR (CDCl₃): δ / ppm: 7,38-7,19 (m, 20H, CH, Ar), 4,81 (s, 1H, H-1), 4,79-4,47 (m, 8H, 4 CH₂, Bn), 3,88 (br s, 1H, H-2), 3,77 (app t, 1H, $J = 9,4$ Hz, $J = 9,5$ Hz, H-4), 3,73 (dd, 1H, $J_{2,3} = 2,8$ Hz, $J_{3,4} = 9,3$ Hz, H-3), 3,68-3,63 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3,57-3,54 (m, 1H, H-5), 3,27 (s, 3H, OCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃), δ / ppm: 138,44, 138,35, 138,29, 138,19 (4C, Ar), 128,33-127,29 (CH, Ar), 98,90 (C1), 80,15, 74,85, 74,55, 71,64 (C2-C5), 74,94, 73,26, 72,51, 72,02 (4 CH₂, Bn), 69,27 (C6), 54,59 (OCH₃).

3.2.2. Priprava 2,3,4,6-tetra-O-benzil- α -D-manopiranoze **2**

Metil-2,3,4,6-tetra-O-benzil- α -D-manopiranozidu (5,0 g, 9,01 mmol) doda se ledena octena kiselina (24,9 mL) i sumporna kiselina (7,8 mL, $c = 3$ mol dm⁻³). Otopina se miješa u okrugloj tikvici uz refluks 5,5 sati pri temperaturi od 90 °C. Tijek reakcije praćen je TLC-om (benzen : etil-acetat = 5 : 1) uz prskanje 10 %-tnom sumpornom kiselinom i zagrijavanje. Nakon

završetka reakcije u lijevak za odjeljivanje doda se zasićena otopina NaCl (30 mL) te je reakcijska smjesa prebačena u lijevak i ekstrahirana dietil-eterom (2 × 30 mL). Eterski ekstrakti suše se na bezvodnom Na₂SO₄, profiltriraju i upare na rotacijskom uparivaču do suha. Produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala benzen: etil-acetat = 5 : 1. Dobiveno je 1,46 g (30 %) čistog produkta **2** u obliku žute, uljaste tekućine.

$R_f = 0,34$ (benzen : etil-acetat = 5 : 1).

¹H NMR (CDCl₃) δ / ppm: 7,38-7,27 (m, 20H, CH, Ar), 4,94 (AB, 1H, $J_{gem} = 11,5$ Hz, CH₂, Bn), 4,86-4,66 (m, 4H, 2 CH₂, Bn), 4,68 (d, 1H, $J_{1,2} = 3,6$ Hz, H-1), 4,57 (AB, 1H, $J_{gem} = 11,5$ Hz, CH₂, Bn), 4,49-4,37 (m, 2H, CH₂, Bn), 4,06-4,01 (m, 1H, H-2), 3,94-3,87 (m, 3H, H-3, H-4, H-5), 3,60-3,51 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3,36 (s, 3H, OCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ / ppm: 138,77, 138,59, 138,46, 137,93 (4C, Ar), 128,43-127,31 (CH, Ar), 98,74 (C1), 79,05, 76,40, 75,13, 69,18 (C2-C5), 74,67, 73,50, 73,42, 73,22 (4 CH₂, Bn), 69,03 (C6), 55,28 (OCH₃).

3.2.3. Priprava tert-butil-2-(2,3,4,6-tetra-O-benzil- α -D-manopiranoziloksi)etanoata **3**

U okrugloj tikvici otopi se 2,3,4,6-tetra-O-benzil- α -D-manopiranozid (249 mg, 0,46 mmol) u suhom DMF-u (2,5 mL). Otopini se doda svježije žareni kalijev karbonat (318 mg, 2,30 mmol) i tert-butil-bromacetat (102 μ L, 0,69 mmol). Smjesa se miješa 6 dana na magnetskoj miješalici uz klor kalcijevu cijev na tikvici. Tijek reakcije prati se TLC-om (benzen : etil-acetat = 5 : 1). Nakon završetka reakcije reakcijska smjesa se profiltrira preko vate u Erlenmeyerovu tikvicu uz ispiranje dietil-eterom (20 mL), te se filtrat prebaci u lijevak za odjeljivanje i ispere destiliranom vodom (3 × 15 mL). Organski sloj se prebaci u tikvicu i suši na bezvodnom Na₂SO₄, filtrira i upari na rotacijskom uparivaču. Spoj je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala benzen : etil-acetat = 10 : 1. Dobiveno je 188 mg (62 %) čistog produkta **3** u obliku žutog ulja.

$R_f = 0,46$ (benzen : etil-acetat = 10 : 1).

¹H NMR i DEPTQ: Dodatak 1

¹H NMR (CDCl₃) δ / ppm: 7,40-7,14 (m, 20H, CH, Ar), 5,08 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,7$ Hz, H-1), 4,88 (AB¹, 1H, $J_{gem} = 10,8$ Hz, CH₂, Bn), 4,74 (s, 2H, CH₂, Bn), 4,65 (AB², 1H, $J_{gem} = 12,1$ Hz, CH₂, Bn), 4,59 (s, 2H, CH₂, Bn), 4,53 (AB², 1H, $J_{gem} = 12,1$ Hz, CH₂, Bn), 4,49 (AB¹, 1H, $J_{gem} = 10,8$ Hz, CH₂, Bn), 4,02-3,93 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 4,11 (AB³, 1H, $J_{gem} = 16,6$ Hz, CH₂,

poveznica), 3,99 (\underline{AB}^3 , 1H, $J_{gem} = 16,5$ Hz, CH_2 , poveznica), 3,80-3,69 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 1,46 (s, 9 H, *t*-Bu).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ / ppm: 169,03 (C=O), 138,50, 138,46, 138,29, 138,26 (4C, Ar), 128,28-127,47 (CH, Ar), 97,33 (C1), 79,91, 74,69, 74,46, 72,22 (C2-C5), 75,06, 73,34, 72,62, 71,96 (4 CH_2 , Bn), 69,16 (C6), 63,45 (CH_2 , poveznica), 28,08 (*t*-Bu).

ESI-MS: m/z 677,4 [$\text{M}+\text{Na}^+$].

3.2.4. Priprava 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranoziloksi)octene kiseline **4**

tert-Butil-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranoziloksi)etanoat (177 mg, 0,27 mmol) otopi se u suhom diklormetanu (2 mL) i otopini se doda trifluorocтена kiselina (225 μL). Sve se miješa 24 h na magnetskoj miješalici uz klor kalcijevu cijev na tikvici. Reakcija je praćena TLC-om (kloroform : metanol = 10 : 1). Nakon završetka reakcije u smjesu se doda diklormetan (30 mL) i prebaci u lijevak za odjeljivanje. Tikvica se ispere s vodom (20 mL) te se vodeni sloj prebaci također u lijevak. Nakon ekstrakcije vodeni se sloj ispere s diklormetanom (20 mL) te se organski ekstrakti spoje, suše na Na_2SO_4 , filtriraju i upare. Produkt je proćišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform : metanol = 10 : 1. Dobiveno je 123 mg (76 %) čistog spoja **4** u obliku blijedožutog ulja.

$R_f = 0,19$ (kloroform : metanol = 10 : 1).

^1H NMR i DEPTQ: Dodatak 2

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

^{13}C NMR (CDCl_3) δ / ppm: 173,81 (C=O), 138,34, 138,24, 138,08, 138,03 (4C, Ar), 128,33-127,57 (CH, Ar), 97,83 (C1), 79,61, 74,64, 74,28, 72,42 (C2-C5), 75,04, 73,35, 72,71, 72,12 (4 CH_2 , Bn), 69,07 (C6), 63,17 (CH_2 , poveznica).

ESI-MS: m/z 621,2 [$\text{M}+\text{Na}^+$].

3.3. Priprava dipeptida

3.3.1. Priprava H-D-Glu(OBn)-OH **5**

H-D-Glu-OH (D-Glu) (4,0 g, 0,027 mol) otopi se u benzilnom alkoholu (30 mL) i postavi na magnetsku miješalicu. Otopini se polagano, kroz lijevak za dokapavanje, dokapava $\text{BF}_3 \times \text{Et}_2\text{O}$ (7 mL) u struji argona. Reakcijska smjesa miješa se 20 sati u inertnim uvjetima. U reakcijsku smjesu se zatim doda tetrahidrofuran (85 mL) i trietilamin (7,6 mL). Nastala bijela, viskozna otopina upari se na rotacijskom uparivaču kako bi se uklonilo otapalo, a potom se smjesi doda otopina heksan : etil-acetat = 3 : 2 (15 mL), snažno promiješa i profiltrira uz sniženi tlak. Nastali bijeli talog ispere se otopinom heksan : etil-acetat = 3 : 1, (15 mL), te suši u eksikatoru preko noći. Spoj se prekrizalizira iz smjese vode (90 mL) i etanola (10 mL). Iskristalizirani produkt profiltrira se pri sniženom tlaku i ispere matičnicom. Dobiveno je 3,42 g (53 %) produkta **5** u obliku bijele krutine čija je struktura potvrđena NMR spektroskopijom i spektrometrijom masa.

^1H NMR (D_2O) δ / ppm: 7,22-7,18 (m, 5H, CH, Ar), 4,94 (s, 2H, CH_2 , Bn), 3,88 (t, 1H, $J = 6,8$ Hz, CH), 2,47-2,43 (m, 2H, CH_2), 2,07-1,98 (m, 2H, CH_2).

ESI-MS: m/z 238,1 [$\text{M}+\text{H}^+$].

Priprava Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH **6**

Spoj **5** (1 g, 4,20 mmol) otopi se u suhom tetrahidrofuranu (30 mL) i u atmosferi argona miješa na magnetskoj miješalici u ledenoj kupelji. Doda se trietilamin (1,12 mL u dva navrata kroz 5 min) i Boc-L-Ala-OSu (1,15 g, 4,02 mmol) te se smjesa miješa 30 min u ledenoj kupelji, a potom dva dana na magnetskoj miješalici u inertnoj atmosferi. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu kloroform : metanol = 3 : 1. Nakon dva dana reakcijska smjesa je uparena do suha, a upareni ostatak je otopljen u etil-acetatu (50 mL) te je ispran otopinom klorovodične kiseline (60 mL, $c = 0,16 \text{ mol dm}^{-3}$). Vodeni sloj se ekstrahira s etil-acetatom ($2 \times 10 \text{ mL}$). Spojeni organski ekstrakti isperu se zasićenom otopinom NaCl ($2 \times 30 \text{ mL}$), suše iznad bezvodnog MgSO_4 , profiltriraju i upare. Dobiveni produkt **6** (743 mg, 43 %) je krutina bijele boje.

$R_f = 0,32$ (kloroform : metanol = 3 : 1).

^1H NMR i DEPTQ: Dodatak 3

^1H NMR (CDCl_3) δ / ppm: 7,36 -7,33 (m, 5H, CH, Ar), 5,11 (s, 2H, CH_2 , Bn), 4,62 (br s, 1 H, CH, Glu), 4,38-4,30 (m, 1H, CH, Ala), 2,56-2,39 (m, 2H, CH_2 , Glu), 2,32-2,23 (m, 1H, CH_2 , Glu), 2,09-2,00 (m, 1H, CH_2 , Glu), 1,41 (s, 9H, Boc), 1,33 (d, 3H, $J = 5,0$ Hz, CH_3 , Ala).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ / ppm: 176,52, 174,16, 173,37, 172,75 (4 C=O), 135,65 (C, Ar), 128,53, 128,25 (CH, Ar), 80,68 (C, Boc), 66,57 (CH_2 , Bn), 51,50 (CH, Glu), 49,78 (CH, Ala), 30,21, 27,15 (2 CH_2 , Glu), 28,25 (CH_3 , Boc), 18,32 (CH_3 , Ala).

ESI-MS: m/z 431,2 [$\text{M}+\text{Na}^+$].

3.4. Priprava propargiliranog desmuramil-dipeptida

3.4.1. Priprava propargilamin-hidroklorida 7

Komercijalno dostupnom propargilaminu (128 μL , 2,00 mmol) u okrugloj tikvici dodaje se, uz miješanje i povremeno hlađenje, 37 %-tna klorovodična kiselina (2 ekv.). Potom se talog posuši uparavanjem na rotacijskom uparivaču uz kodestilaciju, prvo s metanolom, a potom i dietil-eterom. Zaostaje suhi talog produkta 7 bež boje (138 mg, 75 %).

^1H NMR (CD_3OD) δ /ppm: 3,11 (t, $J = 2,6$ Hz, 1H, CH), 3,80 (d, $J = 2,3$ Hz, 2H, CH_2).

3.4.2. Priprava propargiliranog dipeptida Boc-L-Ala-D-Gln(OBn)-NH-Prp 8

Sve metode propargiliranja dipeptida Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH 6 sažeto su prikazane u tablici 3.

Tablica 3. Metode propargiliranja dipeptida.

metoda / reagensi i otapalo	uvjeti i vrijeme reakcije	iskorištenje / %
metoda I propargilamin-hidroklorid, Boc ₂ O, piridin, dioksan	1,3 ekv. piridina, 1 dan	34
	6,5 ekv. piridina, 3 dana	45
	11,7 ekv. piridina, 7 dana	61
metoda II propargilamin, piridin, TiCl ₄	124 ekv. piridina, 3 ekv. TiCl ₄ , 70 °C, 2 h	23
metoda III propargilamin, Boc ₂ O, piridin, DMAP, THF	1,1 ekv. piridina, 0,17 ekv. DMAP, 1 dan	56

Metoda I

Dipeptid Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH **6** (278 mg, 0,68 mmol) otopljen je u suhom dioksanu (9 mL) te mu je dodan propargilamin-hidroklorid (1,3 ekv.). Dobivena smjesa ohlađena je na ledenoj kupelji nakon čega je dodan Boc₂O (1,3 ekv.) prethodno otopljen u suhom dioksanu (2 mL). Na kraju je dodano 1,3 ekv. suhog piridina (1,3 ekv.) te je reakcijska smjesa miješana u atmosferi argona najprije na ledenoj kupelji (1 h), a potom na sobnoj temperaturi (1, 3 ili 7 dana). Kod reakcija koje su vođene više dana dodavani su dodatni ekvivalenti piridina (2 puta po 1,3 ekv. dnevno u razmaku od najmanje 6 sati). Ukupne dodane količine piridina u svakoj reakciji prikazane su u tablici 3. Tijek reakcija praćen je TLC-om u sustavu otapala kloroform : aceton = 5 : 1. Sve reakcije obrađene su na isti način, prvo uparavanjem dioksana, a potom ekstrakcijom. Uparenim reakcijskim smjesama dodan je etil-acetat (50 mL) te su otopine prebačene u lijevak za odjeljivanje i isprane prvo s otopinom klorovodične kiseline (30 mL, $c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$), potom zasićenom otopinom Na₂CO₃ (30 mL) i na kraju destiliranom vodom (30 mL). Organski sloj je sušen na bezvodnom Na₂SO₄ te je nakon filtracije sredstva za sušenje otapalo upareno. Dobiveni ostatak pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform : aceton = 5 : 1. Prinosi pojedinih reakcija također su prikazani u tablici 3. Iz svih reakcijskih smjesa kao glavni produkt izoliran je isti stereoizomer propargiliranog dipeptida **8** u obliku bijele krutine.

Metoda II

Otopini dipeptida Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH **6** (92,1 mg, 0,23 mmol) u suhom piridinu (2,25 mL) dodan je TiCl₄ (74 μL, 0,68 mmol) i propargilamin (14 μL, 0,23 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 2 h u struji argona pri 70 °C. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala kloroform : aceton = 5 : 1. Nakon završetka reakcije piridin je uparen na rotacijskom uparivaču uz kodelilaciju s toluenom. Uparenoj reakcijskoj smjesi dodana je otopina klorovodične kiseline (10 mL, $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$) te je smjesa prebačena u lijevak za odjeljivanje i ekstrahirana s diklormetanom (3 × 10 mL). Skupljeni organski ekstrakti isprani su zasićenom otopinom NaHCO₃ (3 × 10 mL), sušeni na bezvodnom Na₂SO₄ te je nakon filtracije sredstva za sušenje otapalo upareno. Dobiveni ostatak pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform : aceton = 5 : 1. Dobiveno je 23 mg (23 %) propargiliranog dipeptida **8** u obliku bijele krutine.

$R_f = 0,17$ (kloroform : aceton = 5 : 1).

^1H NMR i DEPTQ: Dodatak 4

^1H NMR (CDCl_3) δ / ppm: 7,39-7,32 (m, 5H, CH, Ar), 5,14 (AB, 1H, $J_{gem} = 12,3$ Hz, CH_2 , Bn), 5,10 (AB, 1H, $J_{gem} = 12,3$ Hz, CH_2 , Bn), 4,52-4,47 (m, 1H, CH, *iso*Gln), 4,10-3,90 (m, 3H, CH_2 , propargil, CH, Ala), 2,61-2,53 (m, 1H, CH_2 , *iso*Gln), 2,49-2,41 (m, 1H, CH_2 , *iso*Gln), 2,27-2,20 (m, 1H, CH_2 , *iso*Gln), 2,18 (t, 1 H, $J = 2,5$ Hz, CH, propargil), 2,08-1,99 (m, 1H, CH_2 , *iso*Gln), 1,44 (s, 9H, Boc), 1,32 (d, 3 H, $J = 7,0$ Hz, CH_3 , Ala).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ / ppm: 173,50, 173,15, 170,57 (4 C=O), 135,58 (C, Ar), 128,58, 128,34, 128,25 (CH, Ar), 80,50 (C, Boc), 71,34 (C, propargil), 66,68 (CH_2 , Bn), 52,51 (CH, propargil, CH, *iso*Gln), 50,78 (CH, Ala), 30,52, 26,88 (2 CH_2 , *iso*Gln), 28,28 (CH_3 , Boc), 29,11 (CH_2 , propargil), 17,77 (CH_3 , Ala).

ESI-MS: m/z 468,7 [$\text{M}+\text{Na}^+$].

Metoda III

Pri sobnoj temperaturi u suhom tetrahidrofuranu (5 mL) otopi se dipeptid Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH **6** (200 mg, 0,49 mmol). Otopini se doda suhi piridin (43 μL , 0,54 mmol), katalitička količina DMAP-a (9,80 mg, 0,08 mmol) i otopina Boc_2O (106,8 mg, 0,49 mmol) u tetrahidrofuranu (1 mL). Sadržaj tikvice miješa se 30 min u struji argona, a potom se doda propargilamin (1,62 mL, 0,54 mmol). Miješanje se nastavlja 24 h pri sobnoj temperaturi u inertnoj atmosferi. Tijek reakcija praćen je TLC-om u sustavu otapala kloroform : aceton = 5 : 1. Po završetku reakcije otapalo se upari, a uparenoj reakcijskoj smjesi se doda etil-acetat (30 mL) te se organski sloj prebaci u lijevak za odjeljivanje. Ekstrahira se prvo 10 %-tnom ledenom octenom kiselinom (2×10 mL), potom zasićenom otopinom NaHCO_3 (2×10 mL) te zasićenom otopinom NaCl (10 mL). Organski ekstrakti suše se na bezvodnom Na_2SO_4 te su nakon filtracije sredstva za sušenje upareni. Dobiveno je 157,3 mg (56 %) produkta u obliku bijele krutine, za koji je spektroskopijom ^1H NMR pokazano da se radi o smjesi dijastereoizomernih propragiliranih dipeptida. Tankoslojnom kromatografijom utvrđeno je da spojevi imaju iste R_f vrijednosti te stoga nije bilo moguće njihovo razdvajanje kolonskom kromatografijom.

3.5. Kondenzacija propargiliranog desmuramil-dipeptida i manoznog prekursora

3.5.1. Priprava *L-Ala-D-Glu(OBn)-NH-Prp* **9**

Propargilirani dipeptid **8** pripravljen metodom **I** (102 mg, 0,23 mmol) otopi se u suhom DCM-u (1,0 mL) i otopini se doda trifluoroctena kiselina (0,5 mL). Reakcijska smjesa miješa se 2 h pri sobnoj temperaturi uz klor kalcijevu cjevčicu. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala kloroform : metanol = 2 : 1. Nakon završetka reakcije u smjesu je dodan dietil-eter (15 mL) te je reakcijska smjesa uparena do suha na rotacijskom uparivaču. Dobiveno je 98,1 mg (93 %) produkta **9** u obliku TFA soli.

$R_f = 0,57$ (kloroform : metanol = 2 : 1).

$^1\text{H NMR}$ i DEPTQ: Dodatak 5

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ / ppm: 7,37-7,32 (m, 5H, CH, Ar), 5,13 (s, 2H, CH_2 , Bn), 4,42-4,37 (m, 1 H, CH, *iso*Gln), 3,97-3,92 (m, 1H, CH, Ala), 3,95 (d, 2H, $J = 2,5$ Hz, CH_2 , propargil), 2,59 (t, 1H, $J = 2,5$ Hz, CH, propargil), 2,48-2,44 (m, 2H, CH_2 , *iso*Gln), 2,18-2,09 (m, 1H, CH_2 , *iso*Gln), 2,01-1,94 (m, 1H, CH_2 , *iso*Gln), 1,48 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3 , Ala).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD) δ / ppm: 173,92, 172,96, 171,16 (4 C=O), 137,52 (C, Ar), 129,60, 129,31 (CH, Ar), 72,44 (C, propargil) 67,57 (CH_2 , Bn), 53,90 (CH, propargil, CH, *iso*Gln), 50,32 (CH, Ala), 31,27, 28,38 (2 CH_2 , *iso*Glu), 29,59 (CH_2 , propargil), 17,70 (CH_3 , Ala).

ESI-MS: m/z 346,2 [$\text{M}+\text{H}^+$].

3.5.2. Priprava konjugata manoze i propargiliranog dipeptida **10**

Manozni prekursor **4** (116 mg, 0,19 mmol) otopljen je u suhom diklormetanu (5 mL) te je u ohlađenu reakcijsku smjesu dodan HOBt (1 ekv.) i EDC \times HCl (1,2 ekv.). Nakon 15 minuta miješanja pri 0 °C reakcijskoj smjesi je kapalicom dokapavan *L-Ala-D-Glu(OBn)-NH-Prp* **9** u obliku TFA soli (1,1 ekv.) prethodno otopljen u suhom dioksanu (5 mL). Zatim je dodan trietilamin (2 ekv.) te je reakcijska smjesa miješana 1 sat pri temperaturi od 0 °C, a potom još 48 h pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala kloroform : metanol = 5 : 1. Nakon završetka reakcije reakcijska smjesa uparena je do suha te je dodan etil-acetat (20 mL). Organski sloj je ekstrahiran otopinom klorovodične kiseline (10 mL, $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$), a potom zasićenom otopinom NaHCO_3 (10 mL). Organski

ekstrakt je sušen na bezvodnom Na₂SO₄, profiltriran i uparen. Dobiveni ostatak pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform : metanol = 5 : 1. Dobiveno je 116,3 mg (65 %) spoja **10** u obliku žutog ulja.

$R_f = 0,91$ (kloroform : metanol = 5 : 1).

¹H NMR i DEPTQ: Dodatak 6

¹H NMR (CD₃OD) δ / ppm: 7,38 -7,24 (m, 25H, CH, Ar), 5,12 (AB¹, 1H, $J_{gem} = 12,3$ Hz, CH₂, Bn), 5,08 (AB¹, 1H, $J_{gem} = 12,3$ Hz, CH₂, Bn), 4,88 (d, 1H, $J_{1,2} = 2,2$ Hz, H-1), 4,82 (AB², 1H, $J_{gem} = 10,9$ Hz, CH₂, Bn), 4,76 (AB³, 1H, $J_{gem} = 12,3$ Hz, CH₂, Bn), 4,69 (AB⁴, 1H, $J_{gem} = 11,6$ Hz, CH₂, Bn), 4,68 (AB³, 1H, $J_{gem} = 12,4$ Hz, CH₂, Bn), 4,64 (AB⁴, 1H, $J_{gem} = 11,8$ Hz, CH₂, Bn), 4,62 (AB⁵, 1H, $J_{gem} = 12,1$ Hz, CH₂, Bn), 4,50 (AB⁵, 1H, $J_{gem} = 12,2$ Hz, CH₂, Bn), 4,49 (AB², 1H, $J_{gem} = 10,9$ Hz, CH₂, Bn), 4,46-4,41 (m, 1H, CH, Ala), 4,33 (t, 1H, $J = 6,9$ Hz, CH, *iso*Gln), 4,16 (AB⁶, 1H, $J_{gem} = 15,6$ Hz, CH₂, poveznica), 3,99 (app t, 1H, $J = 8,9$ Hz, $J = 8,7$ Hz, H-4), 3,96 (AB⁶, $J_{gem} = 15,6$ Hz, 1H, CH₂, poveznica), 3,89 (dd, 1H, $J = 3,0$ Hz, $J = 8,7$ Hz, H-3), 3,78 (app t, 1H, $J = 2,6$ Hz, $J = 2,7$ Hz, H-2), 3,76-3,66 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 2,59-2,52 (m, 1H, CH₂, *iso*Gln), 2,47-2,39 (m, 1H, CH₂, *iso*Gln), 2,18 -2,09 (m, 1H, CH₂, *iso*Gln), 2,16 (t, 1H, $J = 2,5$ Hz, CH, propargil), 2,06-1,97 (m, 1H, CH₂, *iso*Gln), 1,32 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH₃, Ala).

¹³C NMR (CD₃OD) δ / ppm: 173,59, 172,08, 170,37, 169,28 (4 C=O), 138,26, 138,15, 138,05, 137,98, 135,47 (5 C, Ar), 128,31-127,56 (CH, Ar), 98,52 (C1), 79,22, 74,80, 74,64, 72,64 (C2-C5), 74,85, 73,36, 72,78, 72,56, 68,89 (5 \times CH₂, Bn), 71,50 (C, propargil), 66,73 (C6), 66,41 (CH₂, poveznica), 52,68 (CH, *iso*Gln), 48,97 (CH, Ala), 30,52, 26,76 (2 \times CH₂, *iso*Gln), 29,12 (CH₂, propargil), 17,83, (CH₃, Ala).

ESI-MS: m/z 926,4 [M+H⁺].

3.6. Klik-reakcije

3.6.1. Priprava 1-azidoadamantana **11** za klik-reakciju

Adamantan-1-ol (1,044 g, 6,86 mmol) otopi se u kloroformu (14 mL) i sumpornoj kiselini (14 mL, $w = 57$ %) te se u ohlađenu otopinu, u malim obrocima kroz pola sata, dodaje natrijev azid (2 ekv.). Reakcijska smjesa miješa se 3 h na sobnoj temperaturi, a potom se izlije u ohlađenu vodu (20 mL). Smjesa se ekstrahira s DCM-om (4 \times 14 mL), a spojeni organski ekstrakti isperu

se otopinom NaHCO₃ (20 mL, $w = 5\%$) i vodom (14 mL), suše na bezvodnom natrijevom sulfatu, profiltriraju i upare. Dobiveno je 579 mg (47 %) spoja **11** u obliku bijele krutine.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ / ppm: 2,10 (s, 3H, H- β), 1,75 (d, $J = 3,06$ Hz, 6H, H- α), 1,62 (s, 6H, H- γ).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ / ppm: 58,95 (C), 40,81 (CH₂ α), 35,11 (CH₂ γ), 29,13 (CH β).

3.6.2. Klik-reakcija spojeva **8** i **10** s 1-azidoadamantanom **11** - Metoda I

Propargilirani dipeptid **8** (50 mg, 0,112 mmol) ili propargilirani manozilirani dipeptid **10** (55 mg, 0,059 mmol) i 1-azidoadamantan (1,2 ekv.) otope se u smjesi otapala dioksan : diklormetan = 1 : 1 (4 mL) te se otopini doda natrijev askorbat (0,45 ekv.) i CuSO₄·5 H₂O (0,15 ekv.) prethodno otopljeni u vodi (2 mL). Reakcijska smjesa miješa se 24 h na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala kloroform : aceton = 2 : 1 (reakcija s propargiliranim dipeptidom **8**) ili kloroform : metanol = 5 : 1 (reakcija s propargiliranim manoziliranim dipeptidom **10**). Nakon završetka reakcije smjesa se upari, potom se doda voda (10 mL) i ekstrahira etil-acetatom (3 × 10 mL). Ostatak nakon uparavanja pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u navedenim sustavima otapala.

Reakcijom 1-azidoadamantna **11** s propargiliranim dipeptidom **8** metodom i nastala je smjesa 1,4- i 1,5-regioizomera **12** (73 mg, 52 %) u omjeru 1 : 0,16 što je zaključeno na temelju ¹H NMR spektra. U nastavku su navedeni spektralni podaci za glavni 1,4-regioizomer. Spektralni podatak za triazolni CH naveden je u uglatoj zagradi.

$R_f = 0,27$ (kloroform : aceton = 2 : 1).

¹H NMR i DEPTQ: Dodatak 7

¹H NMR (CDCl₃) δ / ppm: 7,58 (s, 1H, CH, triazol) [8,12 (s, 0,16H, CH, triazol)]; 7,41-7,31 (m, 5H, CH, Ar), 5,12 (AB, 1H, $J_{gem} = 12,4$ Hz, CH₂, Bn), 5,08 (AB, 1H, $J_{gem} = 12,2$ Hz, CH₂, Bn), 4,50-4,47 (m, 3H, CH₂, triazol, CH, *iso*Gln), 4,09-4,02 (m, 1H, CH, Ala), 2,54-2,41 (m, 2H, CH₂, *iso*Gln), 2,24 (s, 3H, H- β), 2,21 (br s, 6H, H- α), 2,24-2,18 (m, 2H, CH₂, *iso*Gln), 2,06-1,97 (m, 1H, CH₂, *iso*Gln), 1,77 (br s, 6H, H- γ), 1,39 (s, 9H, Boc), 1,32 (d, 3H, $J = 7,1$ Hz, CH₃, Ala).

ESI-MS: m/z 623,3 [M+H⁺].

Reakcijom 1-azidoadamantna **11** s manoziliranim propargiliranim dipeptidom **10** metodom I nastao je produkt **13** u tragovima. Nastajanje produkta **13** potvrđena je spektrometrijom masa.

$R_f = 0,54$ (kloroform : aceton = 1 : 1).

ESI-MS: m/z 1103,6 [M+H⁺].

3.6.3. *Klik-reakcija spoja 10 s 1-azidoadamantanom 11 - Metoda II*

Propargilirani manozilirani dipeptid **10** (59 mg, 0,063 mmol) i 1-azidoadamantan (1,0 ekv.) otope se u metanolu (6 mL) te se otopini doda bakrov(II) acetat (0,05 ekv.). Reakcijska smjesa miješa se 24 h na magnetskoj miješalici uz refluks. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala kloroform : metanol = 10 : 1. Nakon završetka reakcije reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kromatografijom na stupcu silikagela u istom sustavu otapala. Produkt **13** nije uspješno izoliran u dovoljno čistom obliku, a njegovo nastajanje potvrđeno je spektrometrijom masa.

$R_f = 0,54$ (kloroform : aceton = 1 : 1).

ESI-MS: Dodatak 8

ESI-MS: m/z 1103,6 [M+H⁺].

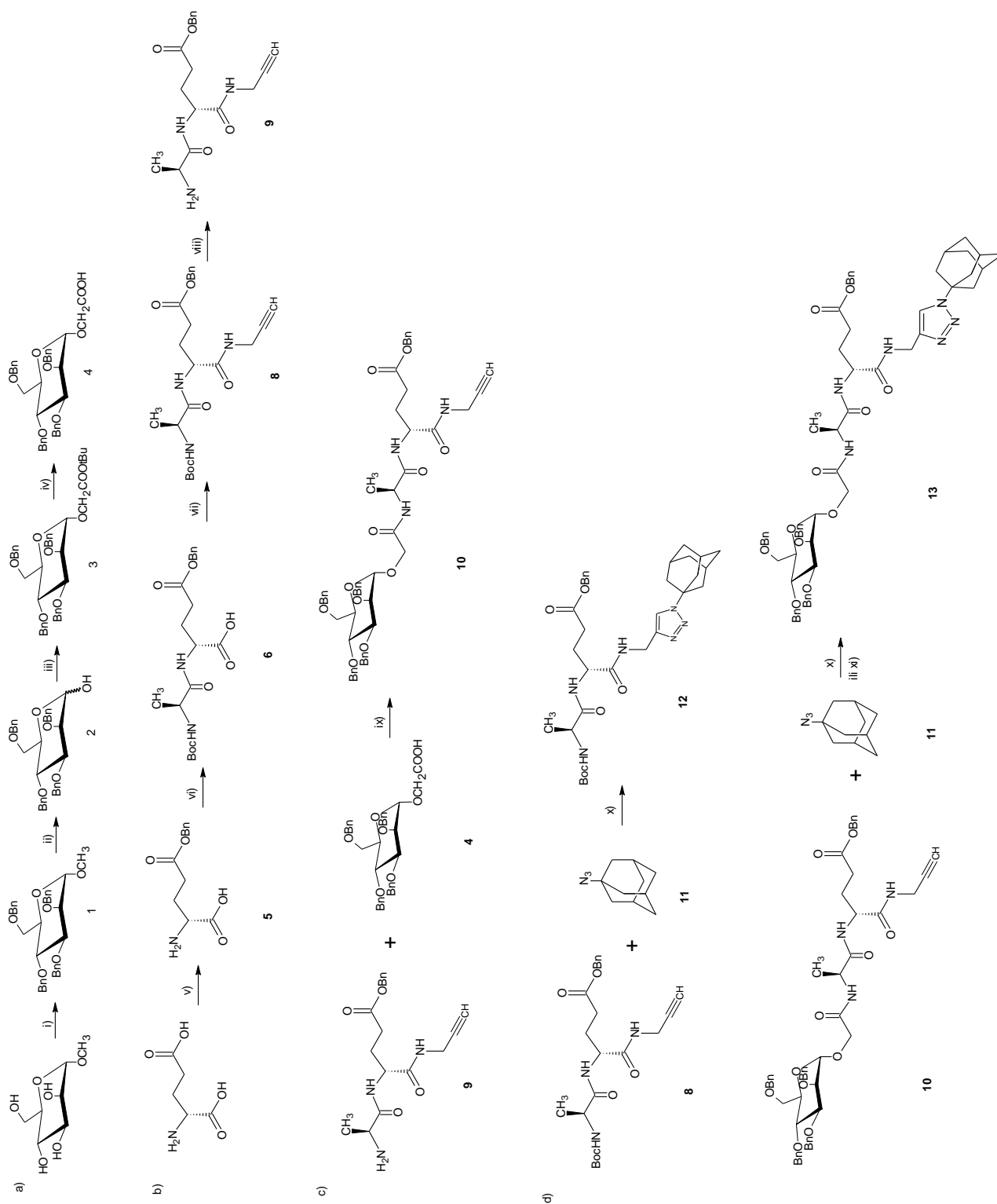
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

U sklopu diplomskog rada ispitana je mogućnost strukturnog modificiranja desmuramil-dipeptida uvođenjem manozne i supstituirane triazolne podjedinice, konkretno triazolne podjedinice supstituirane adamantanom (slika 21). Razlog odabira manoze kao šećera jest moguća interakcija s manoznim receptorima koji sudjeluju u imunološkom odgovoru organizma. S druge strane, uvođenjem adamantanske skupine povećava se lipofilnost, olakšava ugradnja u membranske lipidne slojeve kao i unos supstance u stanicu. Odabir triazolne poveznice između dipeptida i adamantana također nije slučajan jer je riječ o strukturnom motivu koji je prisutan u strukturama brojnih biološki aktivnih supstanci.

Za pripravu ciljne molekule korišten je konvergentni pristup što znači da su zasebno sintetizirane šećerna i peptidna komponenta koje su potom kondenzirane. Kao polazni dipeptid pripremljen je Boc-L-alanil-D-glutaminska kiselina **6** (Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH) kojem je bočni ogranak glutaminske kiseline zaštićen benzilnom esterskom skupinom, a amino-skupina alanina *tert*-butiloksikarbonilnom skupinom (Boc). Triazolna podjedinica uvedena je kataliziranom azid-alkin cikloadicijom između terminalnog alkina i odgovarajućeg azida (klik-reakcija). Terminalna alkinska komponenta pripremljena je propargiliranjem α -karboksilne skupine glutaminske kiseline dipeptida **6** s propargilaminom pri čemu je dobiven propargilirani dipeptid **8**, a kao modelni azid za optimiziranje klik-reakcije odabran je adamantan-1-ilazid **11** pripremljen iz adamantan-1-ola. Klik-reakcijom propargiliranog dipeptida **8** i i azida **11** nastaje triazolni derivat **12**, no osim 1,4-regioizomera spektroskopijom ^1H NMR ustanovljena je prisutnost, premda u znatno manjoj mjeri, i 1,5-regioizomera. Prije samog vezanja šećerne komponente ovaj je korak potrebno dodatno optimizirati, te je izabran drugačiji sintetski pristup. Benzilima zaštićena manozna podjedinica **4**, koja je sintetizirana u nekoliko koraka iz polaznog metil- α -D-manopiranozida, vezana je preko glikolne poveznice na terminalnu amino-skupinu alanina dipeptida **9**, priređenog iz spoja **8** uklanjanjem Boc zaštite, dajući manozilirani propargilirani dipeptid **10**. Klik-reakcija se u ovome pristupu provodi na manoziliranom propargiliranom dipeptidu **10** koji u reakciji sa azidom **11** daje ciljnu molekulu **13** kojoj je u posljednjem koraku potrebno ukloniti zaštitne skupine. Ovu klik-reakciju također

je potrebno dodatno optimizirati kako bi se priredila dovoljna količina i čistoća spoja **13** prije zadnjeg koraka sinteze. Cilj ovog diplomskog rada jest optimizirati neke od ključnih koraka u sintezi (priprava dipeptida, propargiliranje dipeptida, klik-reakcija, vezanje manozne podjedinice) u smislu priprave izomerno čistog manoziliranog desmuramil-dipeptida s adamantilnom supstituiranom triazolnom podjedinicom. Ovakav protokol koristit će se za pripravu različitih triazolnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida u svrhu priprave novih adjuvanata.



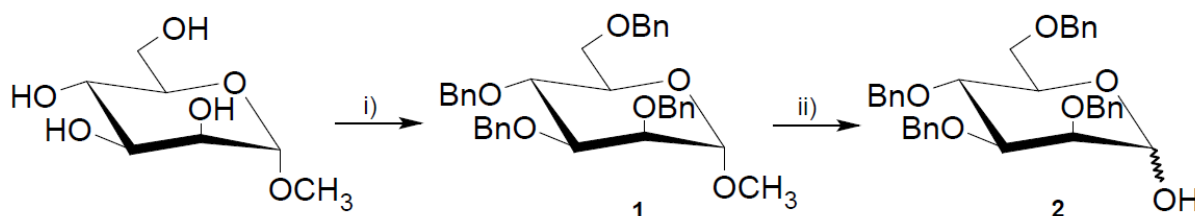
Slika 21. Shematski prikaz sinteze ciljnih molekule: a) priprava šećerne komponente: i) KOH, BnBr, 100 °C, 24 h; ii) HOAc, H₂SO₄, 90 °C, 5,5 h iii) BrCH₂COOt-Bu, K₂CO₃ (žarenj), DMF(suhi), 6 dana; iv) TFA, DCM, 42 h, sobna temperatura.
 b) priprava peptidne komponente: v) BnOH, BF₃·OEt₂, Ar, 20 h; vi) Boc-L-Ala-OSu, Et₃N, THF (suhi), 48 h; vii) PrpNH₂·HCl, piridin, tablica 4; viii) TFA, DCM (suhi), 2 h, sobna temperatura.
 c) priprava manoziliranog propargiliranog dipeptida: ix) HOBt, EDC × HCl, Et₃N, DCM (suhi), 48 h, sobna temperatura.
 d) klik-reakcije: x) natrijev askorbat, CuSO₄ · 5 H₂O, DCM : dioksan = 1 : 1, 24 h, sobna temperatura; xi) Cu(OAc)₂, 24 h, metanol, 60 °C.

4.2. Priprava manoznog prekursora

4.2.1. Priprava benzilirane D-manopiranoze (2)

Manoza, poput ostalih aldoheksoza, je polihidroksialdehid čije je hidroksilne skupine potrebno zaštititi kako bi se reakcija odvijala regioselektivno. Odabrana je benzilna eterska zaštita koja je korištena i na peptidnom dijelu molekule čime bi se smanjio broj reakcijskih koraka potrebnih radi uklanjanja zaštitnih skupina na kraju sinteze. Benzilna eterska zaštita jednostavno se i efikasno uklanjanja katalitičkom hidrogenolizom pri čemu ne dolazi do promjena na ostalim funkcijskim skupinama ciljne molekule.

Polazni spoj, metil- α -D-manopiranozid, u dva reakcijska koraka preveden je u tetrabenziliranu α -D-manopiranozu **2** (slika 22): na slobodne hidroksilne skupine metil- α -D-manopiranozida uvedena je benzilna zaštita pomoću benzil-bromida u prisutnosti kalijeva hidroksida dajući metil-2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranozid **1** koji je podvrgnut hidrolizi u smjesi ledene octene i sumporne kiseline²⁰ čime je došlo do hidrolize samo glikozidne veze tj. nastanka anomerne smjese 2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-D-manopiranoze **2**. Strukture spojeva **1** i **2** potvrđene su spektrometrijom masa, ¹H i ¹³C NMR spektroskopijom te tankoslojnom kromatografijom usporedbom sa uzorkom standarda.

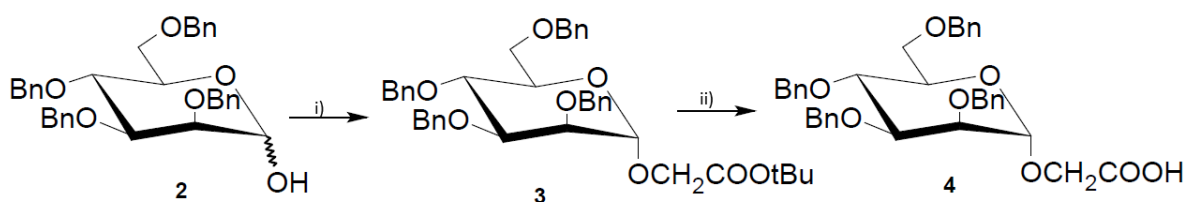


Slika 22. Shematski prikaz priprave 2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*D*-manopiranoze **2**: i) KOH, BnBr, 100 °C, 24 h; ii) HOAc, H₂SO₄, 90 °C, 5,5 h

4.2.2. Vezanje glikolne poveznice na tetrabenziliranu D-manopiranozu (2)

Kako bi se šećerna komponenta mogla povezati s amino-skupinom peptida, bilo je potrebno na položaj 1 šećera **2** uvesti poveznicu koja će to olakšati. Odabrana je poveznica od dva ugljikova atoma sa slobodnom karboksilnom skupinom na koju će se amidnom vezom vezati amino-skupina alanina iz dipeptida.

Reakcijom 2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranoze **2** i *tert*-butil-bromacetata uz kalijev karbonat u suhom *N,N*-dimetilformamidu (DMF) nastao je *tert*-butil-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranoziloksi)etanoat **3** u dobrom iskorištenju (62 %). U idućem koraku reakcijom spoja **3** i trifluoroctene kiseline pri sobnoj temperaturi u suhom diklormetanu nastao je željeni *O*-manozid, 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranoziloksi)octena kiselina **4** također u dobrom iskorištenju (76 %) (slika 23). Reakcija glikozidacije u navedenim uvjetima rezultirala je nastankom preferentno α -anomera što je rezultat njegove veće stabilnosti. Strukture sintetiziranog estera kao i manozilirane kiseline potvrđeni su spektrometrijom masa, ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom te tankoslojnom kromatografijom usporedbom sa uzorkom standarda.



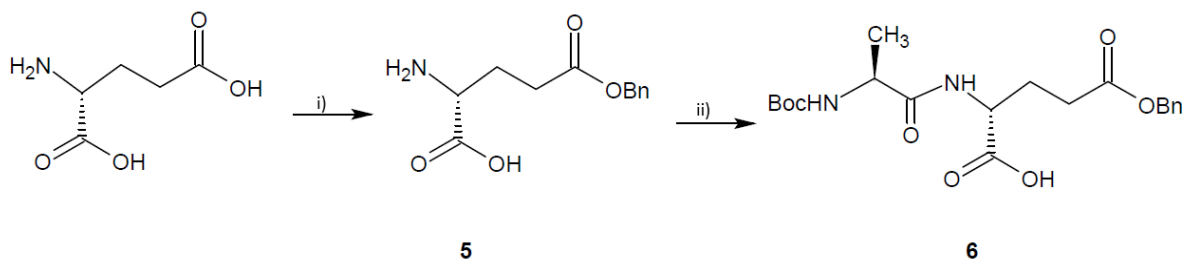
Slika 23. Shematski prikaz manozilacije octene kiseline: i) $\text{BrCH}_2\text{COO}t\text{-Bu}$, K_2CO_3 (žareni), DMF (suhi), 6 dana; ii) TFA, DCM (suhi), 42 h, s.t.

4.3. Priprava peptidne komponente

4.3.1. Priprava dipeptida Boc-*L*-Ala-*D*-Glu(OBn)-OH **6**

Dipeptid **6** dobiven je kondenzacijom glutaminske kiseline i alanina. S obzirom da glutaminska kiselina ima dvije karboksilne skupine, α -karboksilnu skupinu i karboksilnu skupinu na bočnome ogranku, prije kondenzacije bilo je potrebno selektivno zaštititi karboksilnu skupinu bočnog ogranka. Uobičajen način zaštite karboksilne skupine jest prevođenje u benzilni ester, što je korišteno i u ovom slučaju. Kako bi se selektivno zaštitila samo karboksilna skupina bočnog ogranka primijenjen je literaturno opisan postupak²⁵ korištenjem benzilnog alkohola uz $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (slika 24). Nakon obrade reakcijske smjese i izolacije zaštićene aminokiseline *D*-Glu(OBn)-OH **5** u dobrom iskorištenju (53 %) uslijedila je kondenzacija s alaninom, točnije s kupovnim Boc-*L*-Ala-OSu u kojem je amino-skupina alanina već zaštićena *tert*-butiloksikarbonilnom skupinom (Boc), a karboksilna skupina aktivirana sukcinimidnim esterom (slika 24). Struktura nastalog dipeptida Boc-*L*-Ala-*D*-Glu(OBn)-OH **6** potvrđena je ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom. Dipeptid **6** nastao ovom reakcijom u manjoj je mjeri onečišćen s Boc-*L*-Ala-OH, što je dokazano NMR spektroskopijom. Boc-*L*-Ala-OH dobiven je iz polaznog

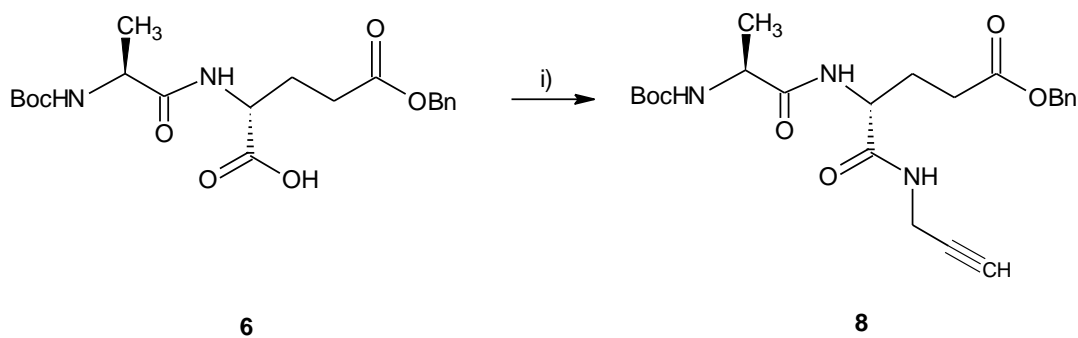
Boc-L-Ala-OSu kojem je u postupku obrade reakcijske smjese uklonjena sukcinimidna skupina. Pokušaji potpunog uklanjanja Boc-L-Ala-OH prekrizacijom ili kromatografijom u ovoj fazi sinteze nisu bili uspješni, te je dipeptid **6** u reakciji propargiliranja koja je slijedila korišten u manjoj mjeri onečišćen Boc-L-Ala-OH.



Slika 24. Shematski prikaz priprave dipeptida **6**: i) BnOH, $BF_3 \times OEt_2$, Ar, 20 h; ii) Boc-L-Ala-OSu, Et_3N , THF (suhi), 48 h.

4.3.2. Priprava propargiliranog dipeptida **8**

Idući korak sinteze bila je priprava amida na α -karboksilnoj skupini glutaminske kiseline reakcijom s propargilaminom (slika 25). Cilj je bio uvesti alkinsku komponentu u strukturu dipeptida kako bi se kasnije azid-alkin cikloadicijom vezala adamantanska skupina preko 1,2,3-triazolnog prstena (slika 30). U ovom diplomskom radu isprobano je nekoliko metoda propargiliranja radi usporedbe trajanja i prinosa reakcija, smanjenja nastajanja nusprodukata, ali i pojednostavljanja same obrade reakcijskih smjesa. U tablici 4 dan je pregled metoda te iskorištenja i produkata koji nastaju.



Slika 25. Shematski prikaz priprave propargiliranog dipeptida **8**: i) PrpNH₂×HCl, piridin, tablica 4.

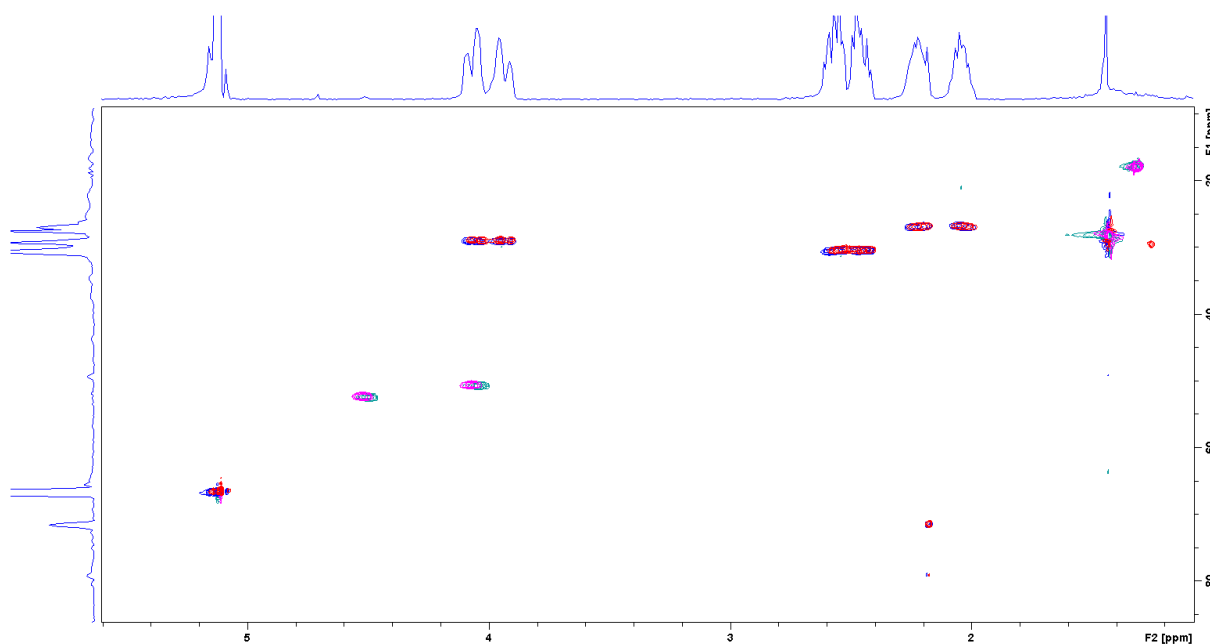
Tablica 4. Metode propargiliranja dipeptida **6** produkata koji nastaju

metoda / reagensi i otapalo	uvjeti i vrijeme reakcije	iskorištenje / %	produkt/i
metoda I propargilamin hidroklorid, Boc ₂ O, piridin, dioksan	1,3 ekv. piridina, 1 dan	34	dipeptid 8
	6,5 ekv. piridina, 3 dana	45	
	11,7 ekv. piridina, 7 dana	61	
metoda II propargilamin, piridin, TiCl ₄	124 ekv. piridina, 3 ekv. TiCl ₄ , 70 °C, 2 h	23	jedan dijastereoizomer
metoda III propargilamin, Boc ₂ O, piridin, DMAP, THF	1,1 ekv. piridina, 0,17 ekv. DMAP, 1 dan	56	smjesa dvaju dijastereoizomera

Metoda **I** uključivala je korištenje propargilamina u obliku hidroklorida kako bi se smanjila bazičnost, piridin, Boc₂O kao aktivator i dioksan kao otapalo. Reakcija je vođena 1, 3 i 7 dana uz postupno dodavanje manjih alikvota piridina kako bi se pokušala spriječiti izomerizacija i nastajanje dijastereoizomera. Produkt je izoliran nakon kromatografskog pročišćavanja u sustavu otapala kloroform : aceton = 5 : 1, pri čemu je uklonjen i Boc-L-Ala-NHPrp. Kao što je već prethodno napomenuto, Boc-L-Ala-OH zaostaje iz sinteze dipeptida. Kada je reakcija trajala samo 1 dan, uz 1,3 ekv. dodanog piridina, iskorištenje je bilo 34 %. Nakon 3 dana i ukupno 6,5 ekv. dodanog piridina iskorištenje je iznosilo 45 %, a nakon 7 dana i ukupnih 11,7 ekv. piridina 61 %. Metoda **I** u trajanju od 7 dana isprobana je i na nekoliko skala (50, 250 i 500 mg dipeptida **6**) pri čemu su iskorištenja bila u prosjeku slična. Na temelju usporedbe ¹H NMR spektara zaključeno je da neovisno o trajanju reakcije i ekvivalentima dodanog piridina uvijek nastaje isti izomer dipeptida **8**. Pretpostavljeno je da su konfiguracije na stereogenim centrima produkta **8** ostale nepromijenjene u odnosu na polazni dipeptid **6**.

Metoda **II**²² uključivala je propargilamin, piridin, titanijev tetraklorid, zagrijavanje i trajanje od samo dva sata. Piridin je ovdje djelovao kao otapalo i baza, a TiCl₄ je pomogao direktnoj kondenzaciji dipeptida tj. karboksilne skupine manokonjugata i amino-skupine amina stvarajući dobru izlaznu skupinu na karboksilnoj skupini i time olakšavajući kondenzaciju s aminom. Nakon kromatografskog pročišćavanja (kloroform : aceton = 5 : 1) i uklanjanja

nusprodukta, Boc-L-Ala-NHPrp, iz reakcijske smjese izoliran je propargilirani produkt, ali u iskorištenju od samo 23 %. Struktura produkta potvrđena je ^1H i HSQC NMR spektroskopijom. Usporedbom HSQC i ^1H NMR spektara dipeptida dobivenih metodom **I** i metodom **II** zaključeno je da ovim metodama nije nastao isti izomer dipeptida **8** (slike 26 i 27). Iz preklopljenih HSQC spektara produkata (slika 26) jasno se uočava korelacija dijastereotopnih protona metilenske skupine D-glutaminske kiseline (2 multiplleta od 2,4-2,6 ppm) s ugljikovim jezgrama koje se kod oba spoja nalaze na istom kemijskom pomaku (30,5 ppm). Međutim, u ovim kao i u preklopljenim ^1H NMR spektrima produkata (slika 27) dodatno se uočava razlika u kemijskom pomaku protona ključnih regija, kao što je, primjerice, proton na α -ugljikovom atomu *iso*Gln (multiplet na 4,5 ppm), što sugerira da produkti dobiveni s ove dvije metode nisu isti dijastereoizomeri. Osim u kemijskom pomaku, razlika postoji i u cijepanju te obliku nekih signala (regija 4,0-4,2 ppm koja obuhvaća proton α -ugljikovog atoma Ala i protone propargilne metilenske skupine) što dodatno potkrepljuje tu tvrdnju.



Slika 26. Preklopljeni HSQC spektri propargiliranog dipeptida **8** dobivenog metodom **I** (korelacijski signali označeni su plavom ili zelenom bojom ovisno o fazi) i metodom **II** (korelacijski signali označeni crvenom ili magenta bojom ovisno o fazi).



Slika 27. Preklopljeni ^1H NMR spektri propargiliranih dipeptida dobivenih metodama **I** (plavo) i **II** (crveno).

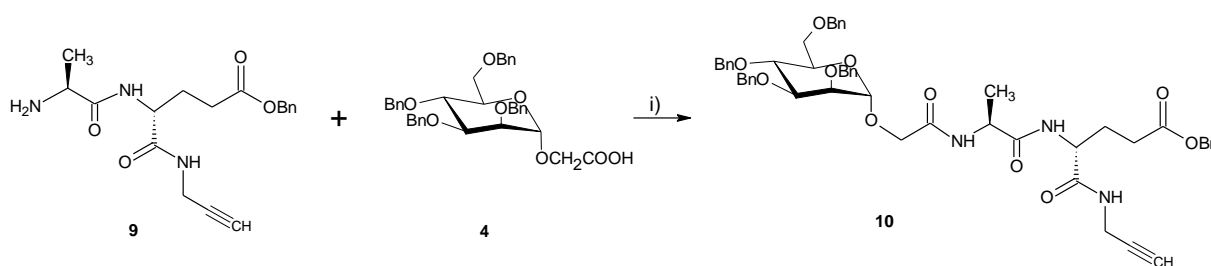
Metoda **III**²¹ sastojala se od upotrebe piridina, Boc_2O i propargilamina uz dodatak *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP). DMAP se koristio za aktivaciju Boc_2O tj. omogućio je nastajanje 1-*tert*-butiloksikarbonil-4-dimetilaminopiridin *tert*-butil karbonata koji je podložniji nukleofilnom napadu karboksilatnog aniona aminokiseline. Reakcija je trajala 24 h i nastala je smjesa dijastereoizomera u iskorištenju od 56 % što je potvrđeno ^1H NMR spektroskopijom. Odvajanje dijastereoizomera kolonskom kromatografijom nije bilo uspješno zbog njihovih izrazito bliskih R_f vrijednosti.

Metode **I** i **II** imaju najviše potencijala za dobivanje jednog izomera konačnog produkta. Dakle, navedene su se metode pokazale uspješne u smislu dijastereoizomerne čistoće produkata ali, naravno, ima prostora za njihovu daljnju optimizaciju u smislu dobivanja većih iskorištenja, pogotovo kod metode **II**.

4.4. Priprava manoziliranog propargiliranog dipeptida 10

Pripravom propargiliranog dipeptida **8** dobivena je jedna komponenta potrebna za azid-alkin cikloadiciju (klik-reakciju) kojom se planirala uvesti triazolna komponenta u molekulu dipeptida. Da se izbjegne mogućnost rada s različitim izomerima propargiliranog dipeptida **8** ili njihovim smjesama, u svim daljnjim eksperimentima korišten je spoj **8** dobiven metodom **I**.

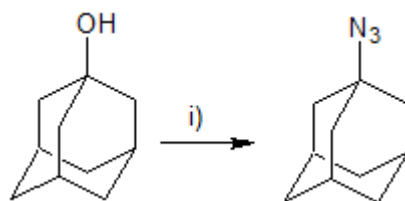
Samu klik-reakciju moguće je provesti ili na samom propargiliranom dipeptidu **8**, te nakon toga provesti manoziliranje triazolnog derivata desmuramil-dipeptida, ili propargilirani desmuramil-dipeptid **8** najprije vezati na manozni prekursor **4** te nakon toga provesti klik-reakciju. Manoziliranje spoja **8** uključivalo je povezivanje amino-skupine L-alanina dipeptida i karboksilne skupine manoznog prekursora **4** amidnom vezom. Za to je najprije trebalo ukloniti Boc zaštitu s amino-skupine L-alanina što je uspješno provedeno u prisutnosti trifluoroctene kiseline u suhom DCM-u (prinos 93 %) te je dobiven propargilirani dipeptid **9** u obliku trifluoracetatne soli. Za povezivanje manoznog prekursora **4** i dipeptida **9** korištena je standardna EDC-HOBt metoda pripreve amida te je dobiven manozilirani propargilirani desmuramil-dipeptid **10** u zadovoljavajućem prinosu (65 %) (slika 28).



Slika 28. Shematski prikaz pripreve manoziliranog propargiliranog dipeptida **10**: i) HOBt, EDC \times HCl, Et₃N, DCM (suhi), 48 h, sobna temperatura.

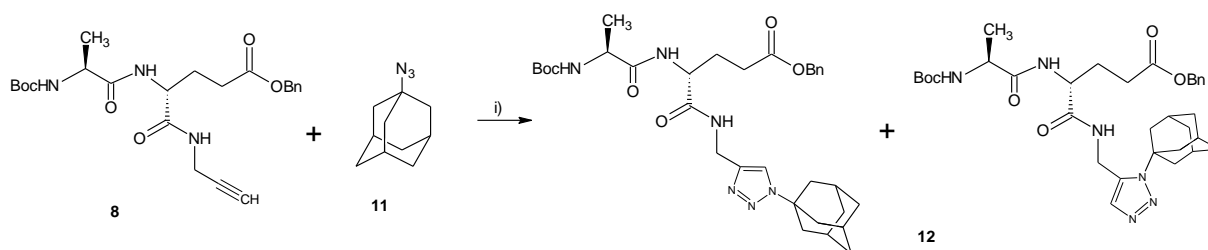
4.5. Klik-reakcije

Kao azidna komponenta za optimiziranje same klik-reakcije odabran je 1-azidoadamantan (**11**) koji je uspješno pripremljen iz adamantan-1-ola i natrijeva azida (slika 29) uz relativno dobro iskorištenje od 47 %.²⁴



Slika 29. Shematski prikaz pripreve 1-azidoadamantana **11**: i) natrijev azid, kloroform, H₂SO₄, 3 h, sobna temperatura.

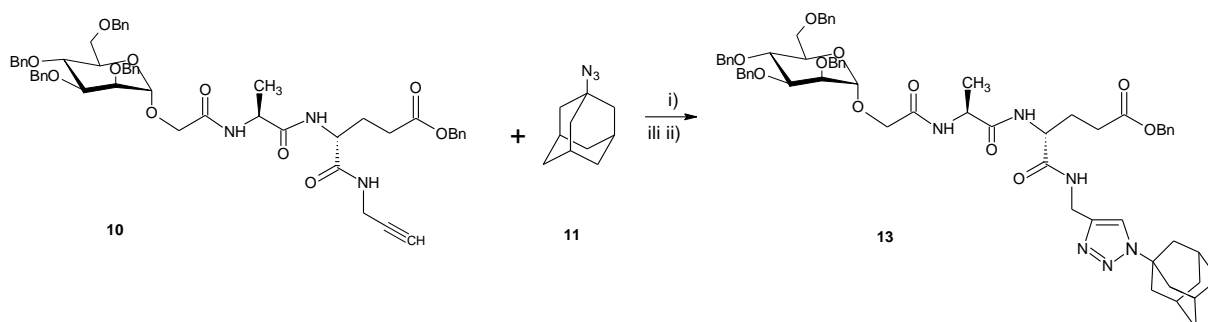
Klik-reakcija najprije je provedena između dipeptida **8** i azida **11** uz $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ kao katalizator i natrijev askorbat kao redukcijsko sredstvo (slika 30). Ovom je reakcijom nastala smjesa regioizomernih triazolnih derivata **12**, što je potvrđeno ^1H NMR spektroskopijom gdje su uočeni signali na pomacima 7,6 i 8,1 ppm, koji odgovaraju protonima vezanim na triazolni prsten. Na taj je način potvrđeno nastajanje 1,4- i 1,5-disupstituiranih triazola u omjeru 1 : 0,16 u korist 1,4-triazola.



Slika 30. Shematski prikaz pripreve regioizomernih triazolnih derivata **12**: i) natrijev askorbat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, DCM : dioksan : $\text{H}_2\text{O} = 1 : 1 : 1$, 24 h, sobna temperatura.

Da bi se provela reakcija manoziliranja propargiliranog dipeptida **12**, potrebno je ili optimizirati postupak pripreve u kojem bi nastao samo jedan regioizomer spoja **12**, očekivano 1,4-regioizomer, ili pronaći način njegovog odvajanja od 1,5-regioizomera. Navedeno će biti predmet daljnjih istraživanja koja prelaze širinu ovog diplomskog rada. U nastavku diplomskog rada, a nakon uspješnog manoziliranja propargiliranog dipeptida **8**, čime je pripremljen manozilirani propargilirani desmuramil-dipeptid **10**, odlučili smo se drugim sintetskim putem doći do ciljane molekule, odnosno provesti klik-reakciju na spoju **10**.

Druga klik-reakcija uključivala je manozilirani propargilirani dipeptid **10** i 1-azidoadamantan (**11**) uz upotrebu dvaju katalizatora: a) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ uz natrijev askorbat i b) $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (slika 31).²⁶ U oba slučaja nastale su složene smjese iz kojih konačni produkt **13** nije uspješno izoliran, ali je njegovo nastajanje potvrđeno spektrometrijom masa prisutnošću signala molekulskog iona pri m/z 1103,6 $[\text{M}+\text{H}^+]$.



Slika 31. Shematski prikaz pripreve manoziliranog desmuramil-dipeptida **13** s triazolnom podjedinicom supstituiranom adamantanom: i) natrijev askorbat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, $\text{DCM} : \text{dioksan} : \text{H}_2\text{O} = 1 : 1 : 1$, 24 h, sobna temperatura; ii) $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, metanol, 24 h, 60 °C.

Zbog zahtjevnosti cijelog sintetskog postupka i opsega istraživanja koja uvelike prelaze širinu jednog diplomskog rada, u ovom diplomskom radu spoj **13** nije izoliran u takvoj količini da bi se mogao provesti zadnji sintetski korak, koji bi bio istodobno uklanjanje zaštitnih skupina s manoze i hidroliza benzilnog estera s bočnog ogranka izoglutaminske kiseline. Daljnja istraživanja ići će u tom smjeru s konačnim ciljem dobivanja razrađenog sintetskog postupka za pripravu različito supstituiranih triazolnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida s potencijalnim adjuvantskim djelovanjem.

§ 5. ZAKLJUČAK

1. Šećerna (manozna) komponenta potrebna za reakciju s derivatima desmuramil-dipeptida uspješno je pripravljena u nekoliko koraka:

a) Polazni metil- α -D-manopiranozid zaštićen je benzilnom eterskom zaštitom reakcijom s benzil-bromidom u prisutnosti kalijeva hidroksida kao baze i dobiven je metil-2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranozid (**1**).

b) Spoj **1** preveden je u 2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-D-manopiranozu (**2**) hidrolizom metilne skupine na položaju 1 zagrijavanjem u smjesi octene i sumporne kiseline.

c) Spoj **2** podvrgnut je reakciji s *tert*-butil-bromacetatom u prisutnosti kalijeva karbonata kao baze pri čemu je dobiven *tert*-butil-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranoziloksi)acetat (**3**).

d) Hidrolizom *tert*-butilnog estera u prisutnosti trifluoroctene kiseline iz spoja **3** pripremljen je manozni prekursor 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranoziloksi)octena kiselina (**4**), koja će se vezati na amino-skupinu alanina odgovarajućeg derivata desmuramil-dipeptida.

2. Za pripremu derivata desmuramil-dipeptida uspješno je pripremljen zaštićeni dipeptid Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH (**6**) u nekoliko koraka:

a) Karboksilna skupina bočnog ogranka D-glutaminske kiseline selektivno je zaštićena prevođenjem u benzilni ester dajući H-D-Glu(OBn)-OH (**5**).

b) Reakcijom spoja **5** s kupovnim zaštićenim sukcinimidnim esterom alanina, Boc-L-Ala-OSu, u prisutnosti tretilamina pripremljen je dipeptid **6**.

3. Uspješno je optimiziran postupak pripreme propargiliranog desmuramil-dipeptida **8** reakcijom dipeptida **6** i propargilamin-hidroklorida **7**. Najboljim se pokazao postupak propargiliranja uz dodatak Boc₂O i suviška piridina (metoda **I**). Reakcija je trajala 7 dana i dobiven je izomerno čisti produkt **8** u zadovoljavajućem prinosu (61 %).

4. Klik-reakcijom propargiliranog desmuramil-dipeptida **8** s 1-azidoadamantanom (**11**) u prisutnosti bakrova(II) sulfata i natrijeva askorbata pripremljen je adamantilom supstituiran

triazolni derivat desmuramil-dipeptida, spoj **12**, kao smjesa 1,4- i 1,5-regioizomera. Ovaj postupak potrebno je dodatno optimizirati te je odabran drugačiji pristup sintezi ciljne molekule.

5. Nakon uklanjanja *tert*-butiloksikarbonilne zaštite s propargiliranog desmuramil-dipeptida **8** dobiven je spoj **9** koji je reakcijom s manoznim prekursorom **4** uz HOBt-a i EDC×HCl dao manozilirani propargilirani dipeptid **10** u zadovoljavajućem prinosu od 65 %.

6. Spoj **10** podvrgnut je klik-reakciji s 1-azidoadamantanom (**11**) dvjema metodama uz dva različita katalizatora: bakrov(II) sulfat uz natrijev askorbat i bakrov(II) acetat. U oba slučaja nastale su složene smjese iz kojih konačni produkt nije uspješno izoliran, ali je njegovo nastajanje potvrđeno spektrometrijom masa.

7. Nakon optimiziranog postupka pripreve dipeptida **6** i propargiliranog dipeptida **8**, istraživanja započeta u ovome diplomskome radu nastaviti će se dalje u smislu optimiziranja klik-reakcija i vezanja šećerne komponente. Konačni je cilj razraditi sintetski postupak za pripremu različito supstituiranih triazolnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida s potencijalnim adjuvantskim djelovanjem.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AB – AB kvartet

ADT – arildiazonijev tosilat

CDCl_3 – deuterirani kloroform

CuAAc – bakrom katalizirana cikloadicija alkina i azida (engl. *Cu catalyzed azide-alkyne cycloaddition*)

d – dublet

dd – dublet dubleta

DCM – diklormetan

DIPEA – *N,N*-diizopropiletilamin

DMF – *N,N*-dimetilformamid

$\text{DMSO-}d_6$ – deuterirani dimetilsulfoksid

ESI – ionizacija elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization*)

EtOAc – etil-acetat

EtOH – etanol

HOAc – octena kiselina

m – multiplet

MDP – muramil-dipeptid

MeOH – metanol

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija (engl. *minimum inhibitory concentration*)

MS – spektrometrija masa

MurNAc – *N*-acetilmuraminska kiselina

NHLF – normalne stanice humanih fibroblasta pluća (engl. *normal human lung fibroblasts*)

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

Nu – nukleofil

PGM – peptidoglikan monomer

p-TsOH – *para*-toluensulfonska kiselina

ppm – dijelovi na milijun (engl. *parts per million*)

QSAR – kvantitativni odnos strukture i reaktivnosti (engl. *Quantitative Structure-Activity Relationship*)

RaNi – Raney-nikal (eng. *Raney nickel*)

R_f – faktor zaostajanja

s – singlet

SPAAC – napetošću potpomognuta cikloadicija azida i alkina (eng. *strain-promoted azide-alkyne cycloaddition*)

t – triplet

TMS – tetrametilsilan

TLC – tankoslojna kromatografija

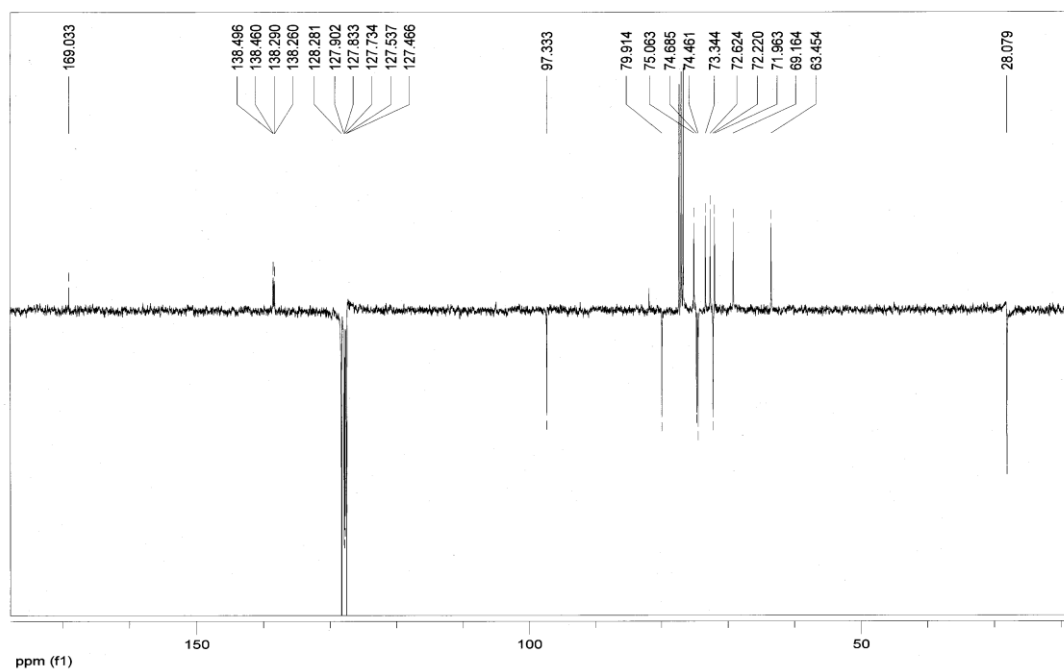
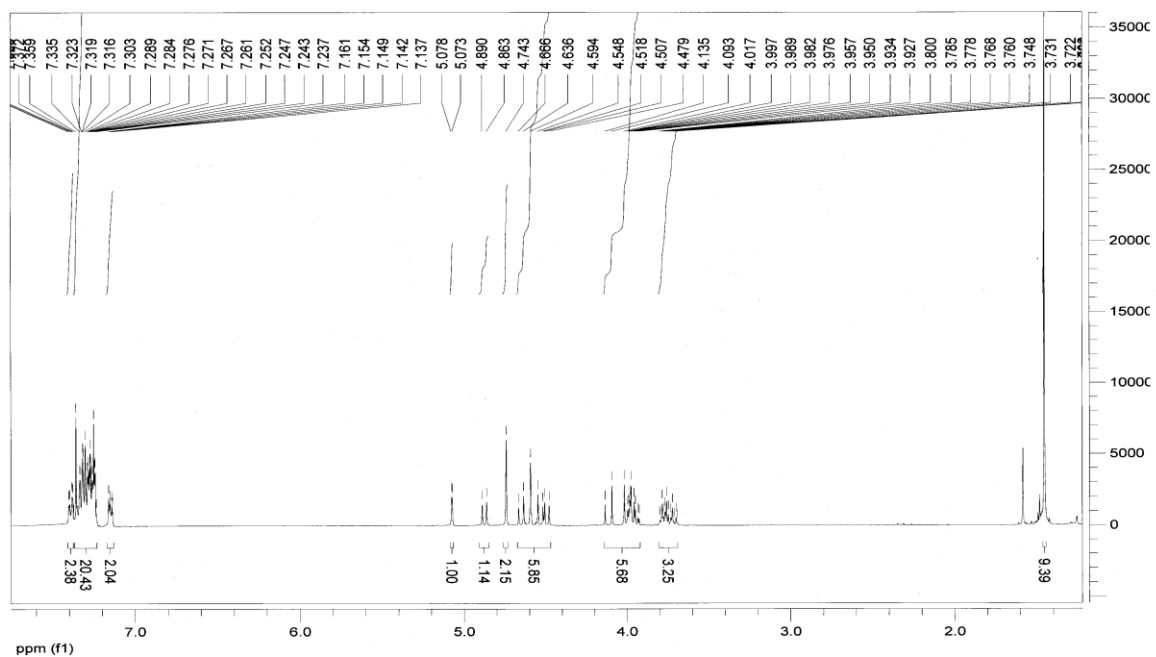
UV – ultraljubičasto (eng. *ultraviolet*)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

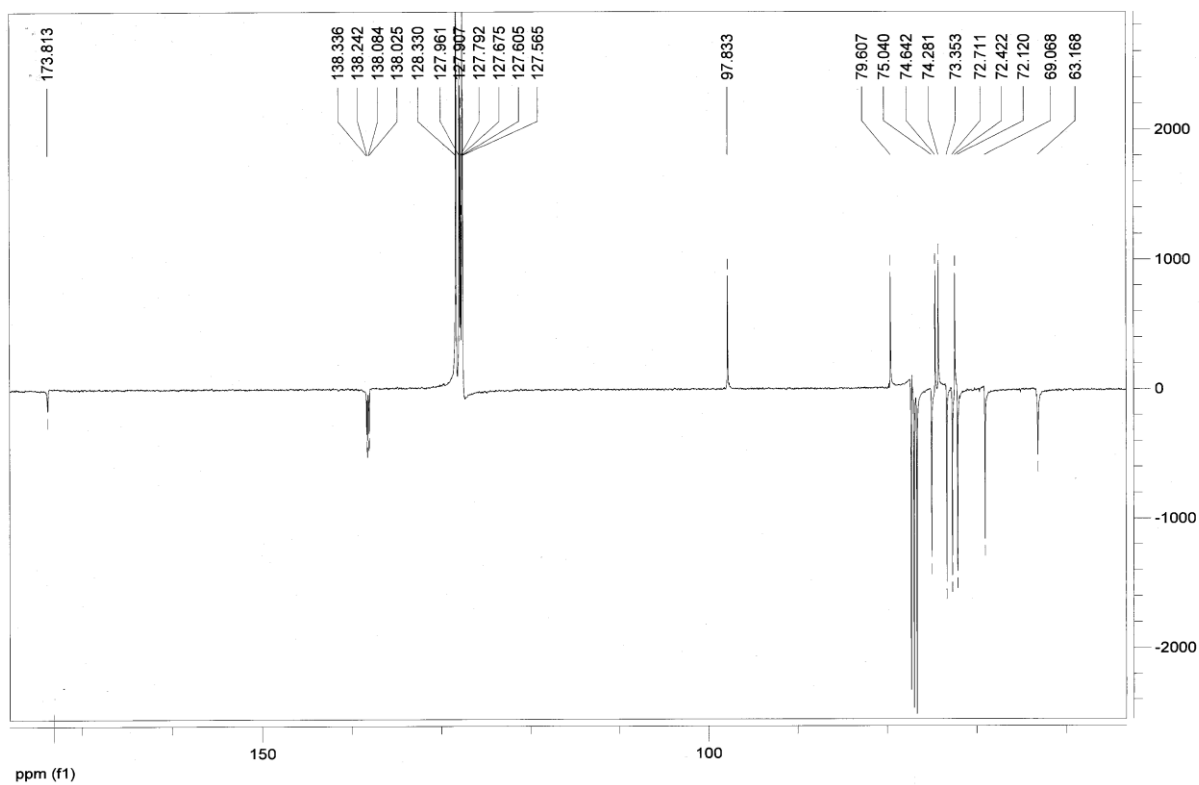
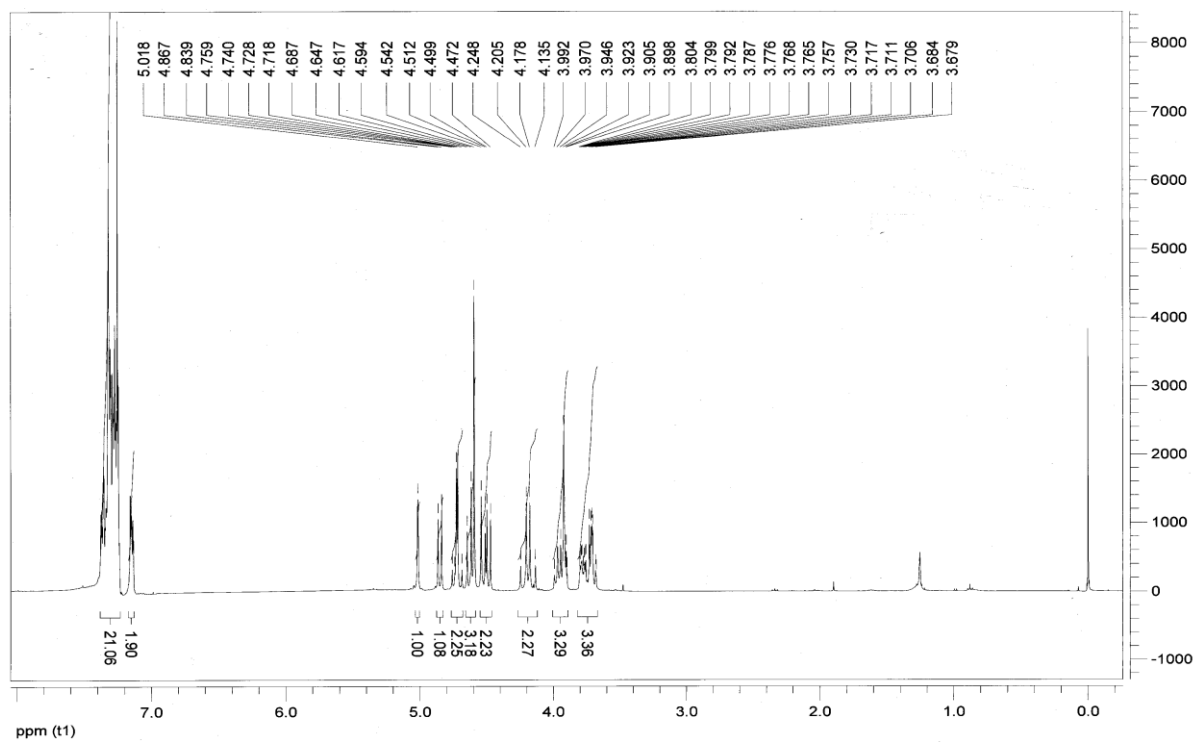
1. R. Ribić, S. Tomić, *Kem. Ind.* **62**(2013) 19–31.
2. R. Ribić, L. Habjanec, R. Frkanec, B. Vranešić, S. Tomić, *Chem. Biodiversity* **9** (2012) 1373–1381.
3. R. Ribić, L. Habjanec, B. Vranešić, R. Frkanec, S. Tomić, *Chem. Biodiversity* **9** (2012) 777–788.
4. R. Ribić, L. Habjanec, M. Brgles, S. Tomić, J. Tomašić, *Bio. Med. Chem.* **17** (2009) 6096–6105.
5. L. Szilágyi, P. Pristovšek, *Mini-Rev. Med. Chem* **7** (2007) 861–870.
6. R. Ribić, L. Habjanec, B. Vranešić, R. Frkanec, S. Tomić, *Croat. Chem. Acta* **84** (2011) 233–244.
7. <https://glycopedia.eu/e-chapters/the-structure-of-bacterial-cell/article/peptidoglycan-molecular-structure> (datum pristupa 24. veljače 2019.)
8. Clayden, Greeves, Warren, Wothers, *Organic chemistry*, Oxford University, 2001, str. 651–658.
9. S. Chandrudu, P. Simerska, I. Toth, *Molecules*, **18** (2013) 4373–4388.
10. https://www.researchgate.net/figure/Scheme-11-Solid-phase-peptide-synthesis-SPPS_fig59_319505714 (datum pristupa 26. veljače 2019.)
11. A. Isidro-Llobet, M. Álvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **109** (2009) 2455–2504.
12. T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, 1999, str. 372–373.
13. C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron*, **61** (2005) 10827–10852.
14. http://documents.bachem.com/coupling_reagents.pdf (datum pristupanja 1. ožujka 2019.)
15. H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40** (2001) 2004–2021.
16. C. D. Hein, X. M. Liu, D. Wang, *Pharmaceutical Research*, **25** (2008) 2216–2230.
17. L. Liang, D. Astruc, *Coord. Chem. Rev.*, **255** (2011) 2933–2945.
18. E. Haldon, M. C. Nicasio, P. J. Perez, *Org. Biomol. Chem.*, **00** (2012) 1–22.
19. J. E. Hein, V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.*, **39** (2010) 1302–1315.
20. R. R. Schmidt, M. Stumpp, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1249–1256.

21. D. K. Mohapatra, A. Datta, *J. Org. Chem.*, **64** (1999) 6879–6880.
22. A. Leggio, J. Bagalá, E. L. Belsito, A. Comandé, M. Greco, A. Liguori, *Chem. Cent. J.*, **11** (2017) 1–12.
23. Vogel's, *Textbook of Practical Organic Chemistry*, 4th ed., Longman, 1978.
24. Cigler, M. (2014) *Sinteza konjugata manoze i adamantanskih desmuramildipeptida*, Diplomski rad, Zagreb : Prirodoslovno-matematički fakultet.
25. G. Liu, N. Zhao, Y. Ma, *Chemical synthesis and anti-tumor and anti-metastatic effects of dual functional conjugate*, U.S. Patent 9085605B2, 2015.
26. M. Tireli, S. Maračić, S. Lukin, M. J. Kulcsar, D. Žilić, M. Cetina, I. Halasz, S. Raić-Malić, K. Užarević, *Beilstein J. Org. Chem.* **13** (2017) 2532–2363.
27. B. T. Worrel et. al, *Science*, **340** (2013) 457–460.

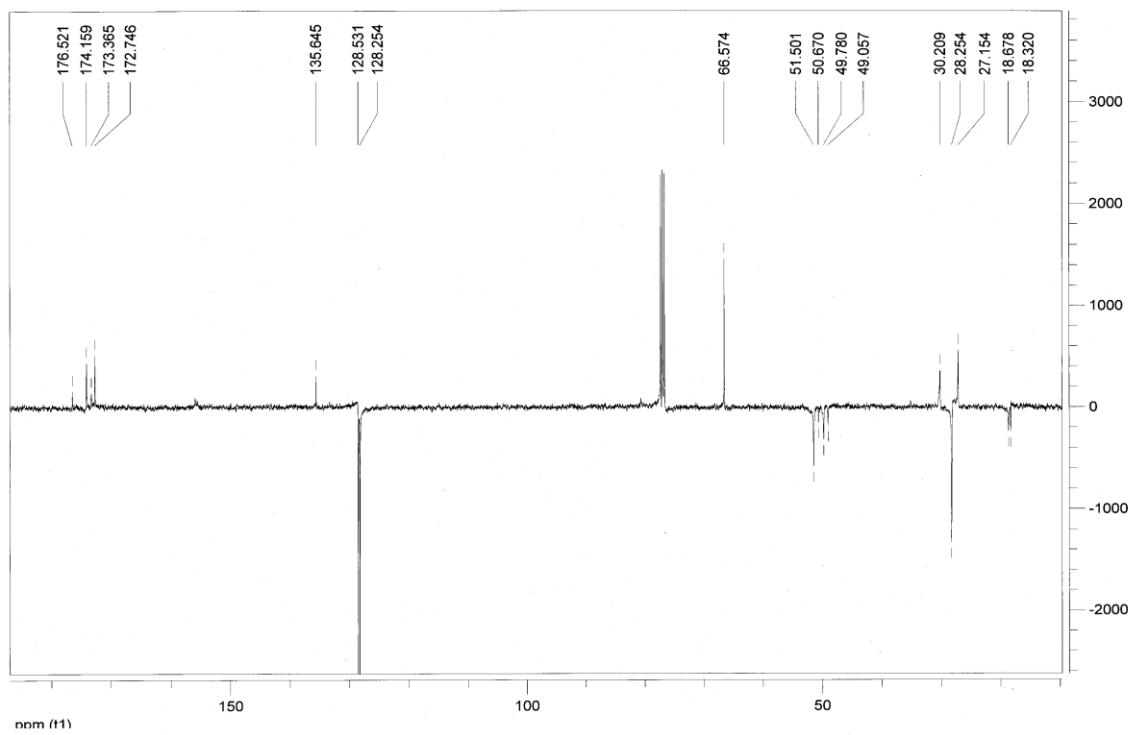
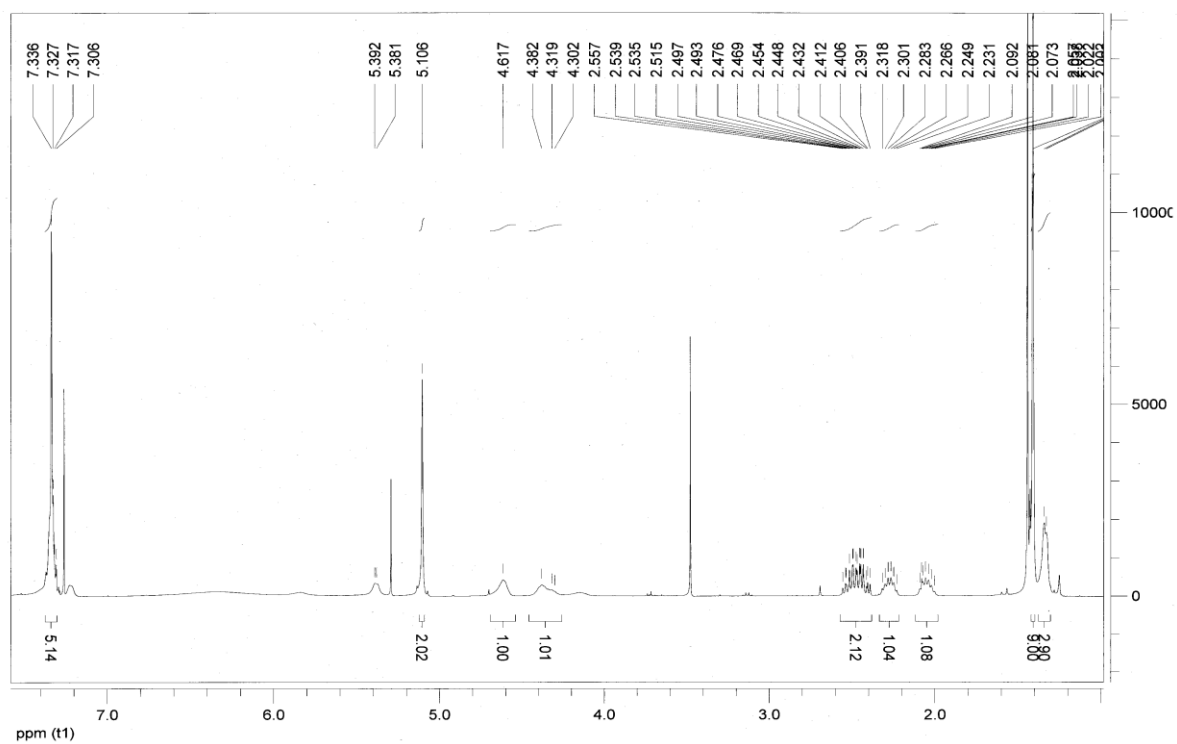
§ 8. DODATAK

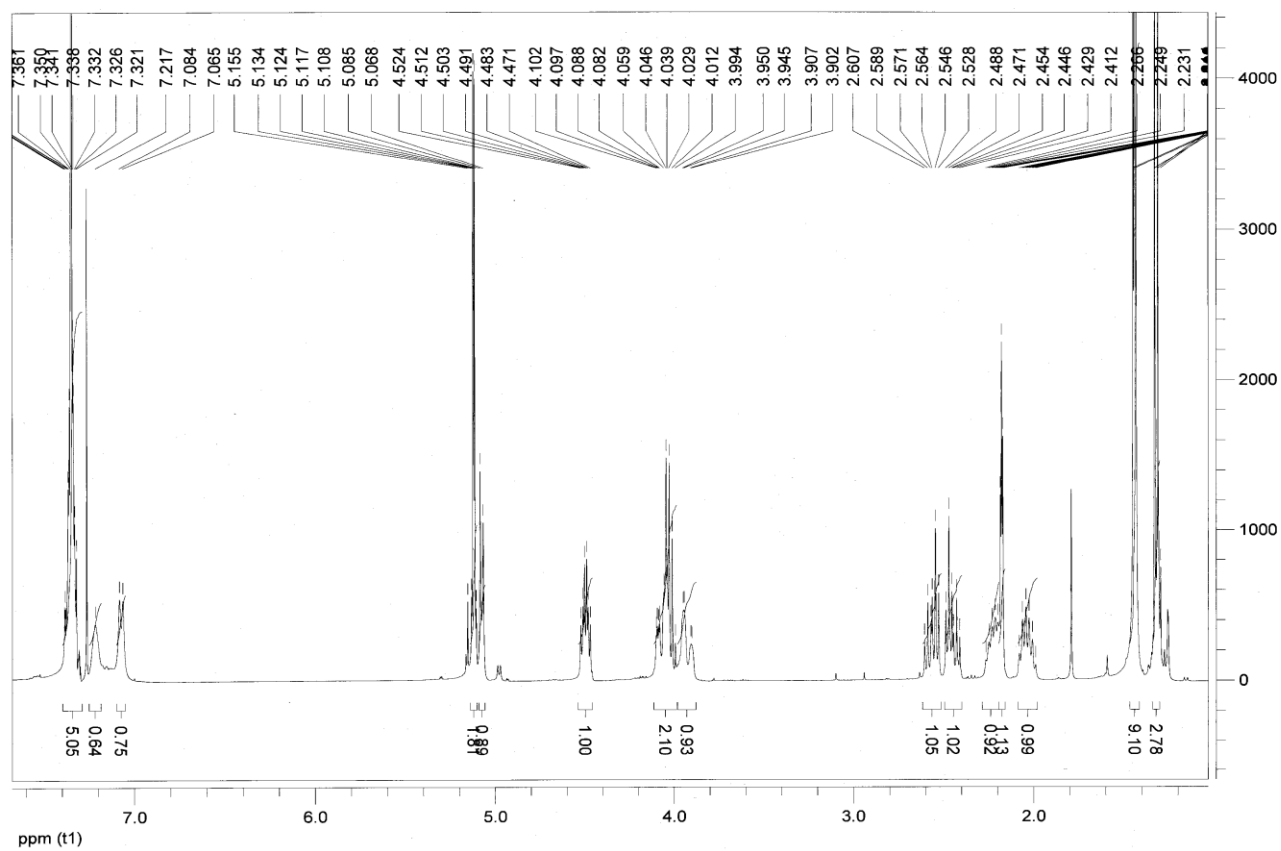
Dodatak 1: ^1H NMR i DEPTQ spoja 3

Dodatak 2: ¹H NMR i DEPTQ spoja 4

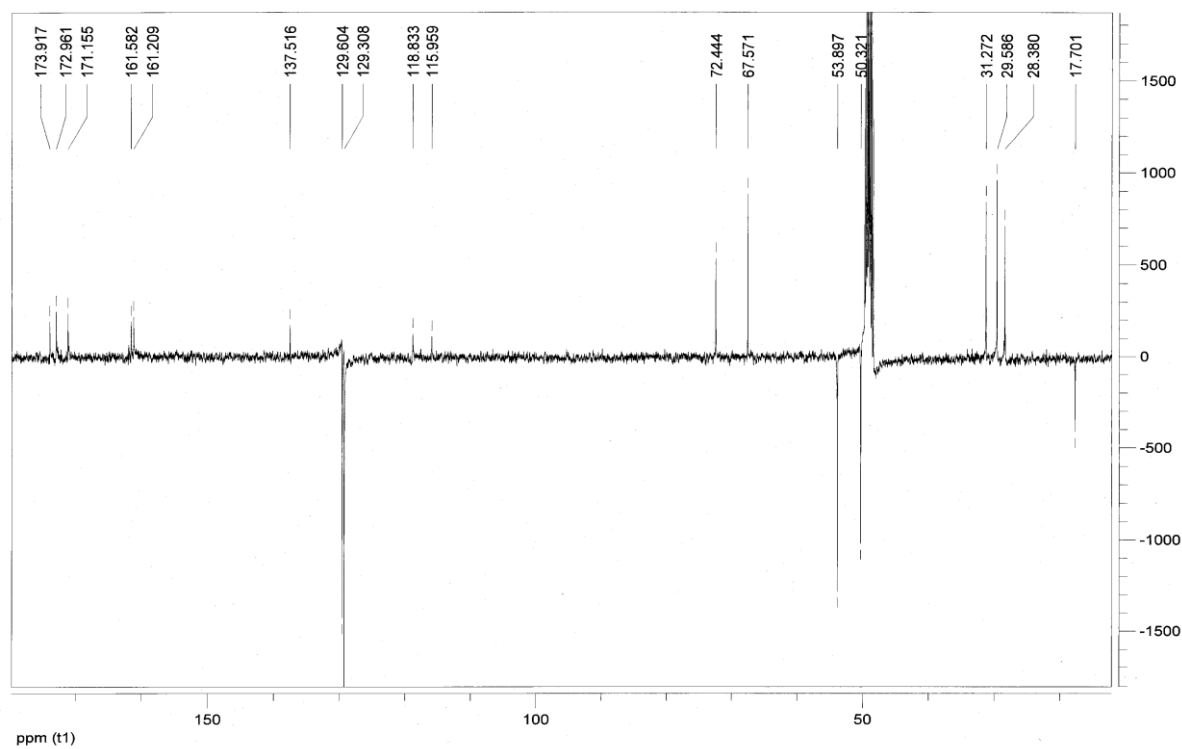
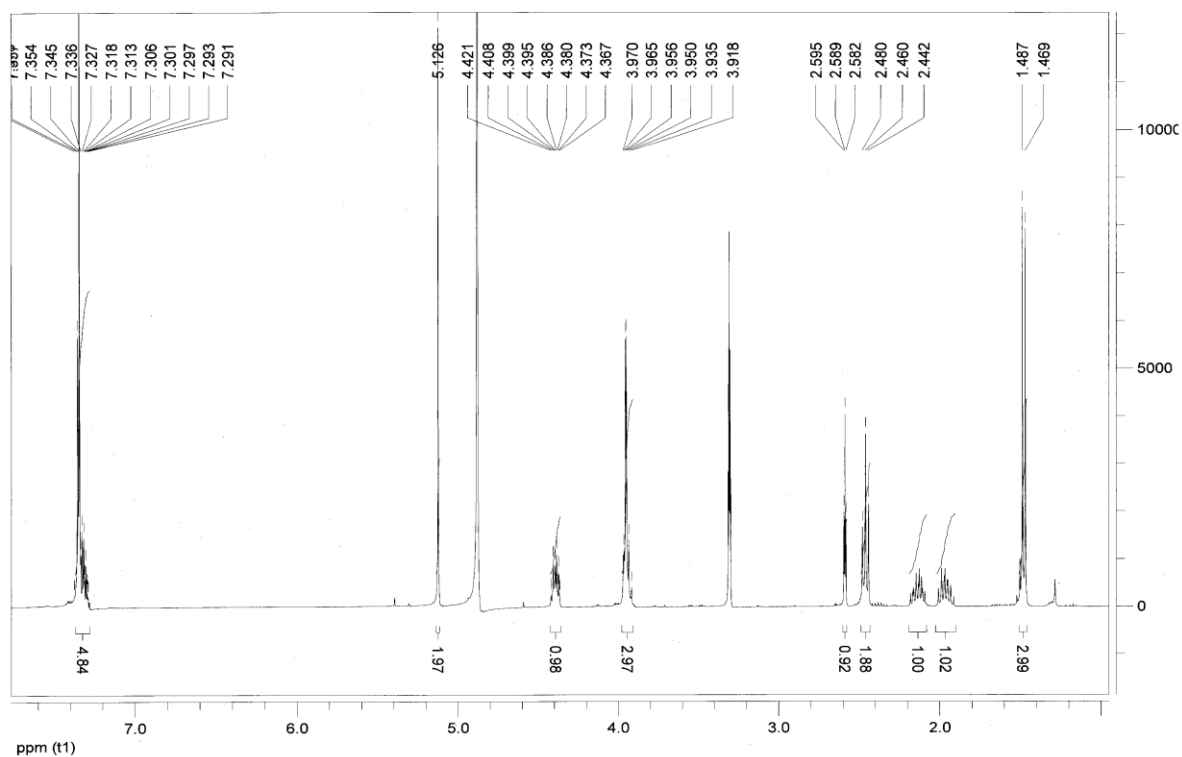


Dodatak 3: ¹H NMR i DEPTQ spoja 6

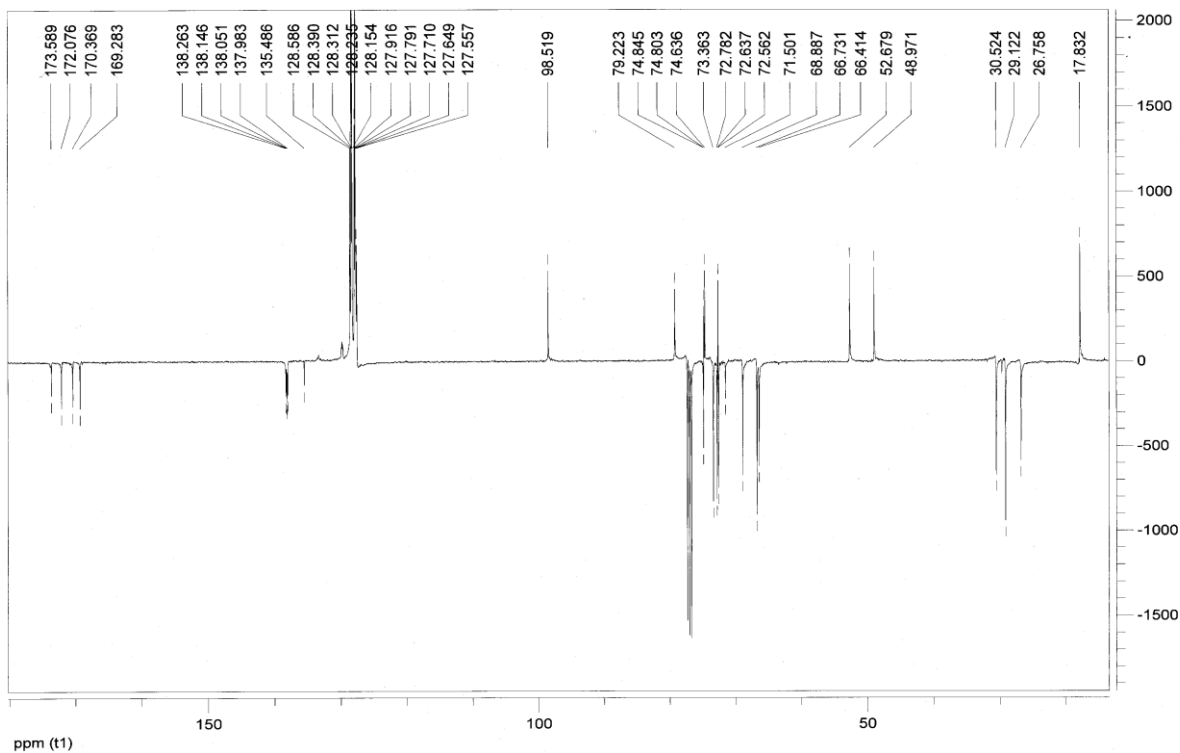
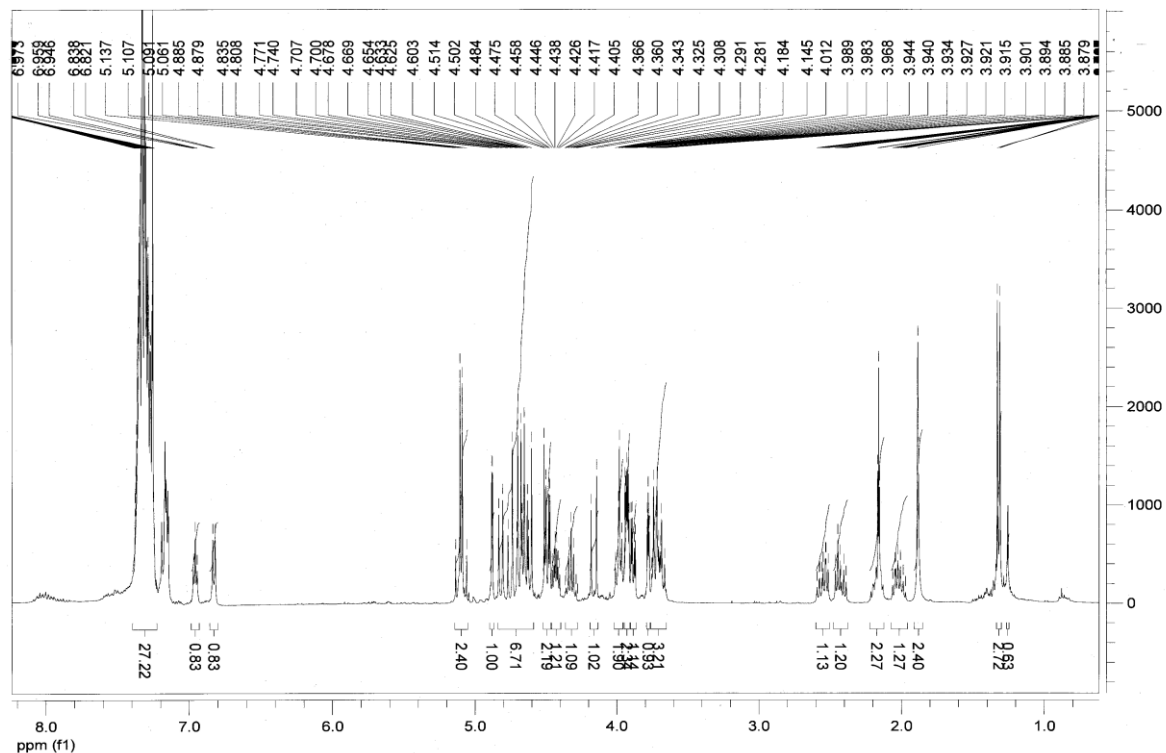


Dodatak 4: ^1H NMR spoja **8**

Dodatak 5: ¹H NMR spoja 9

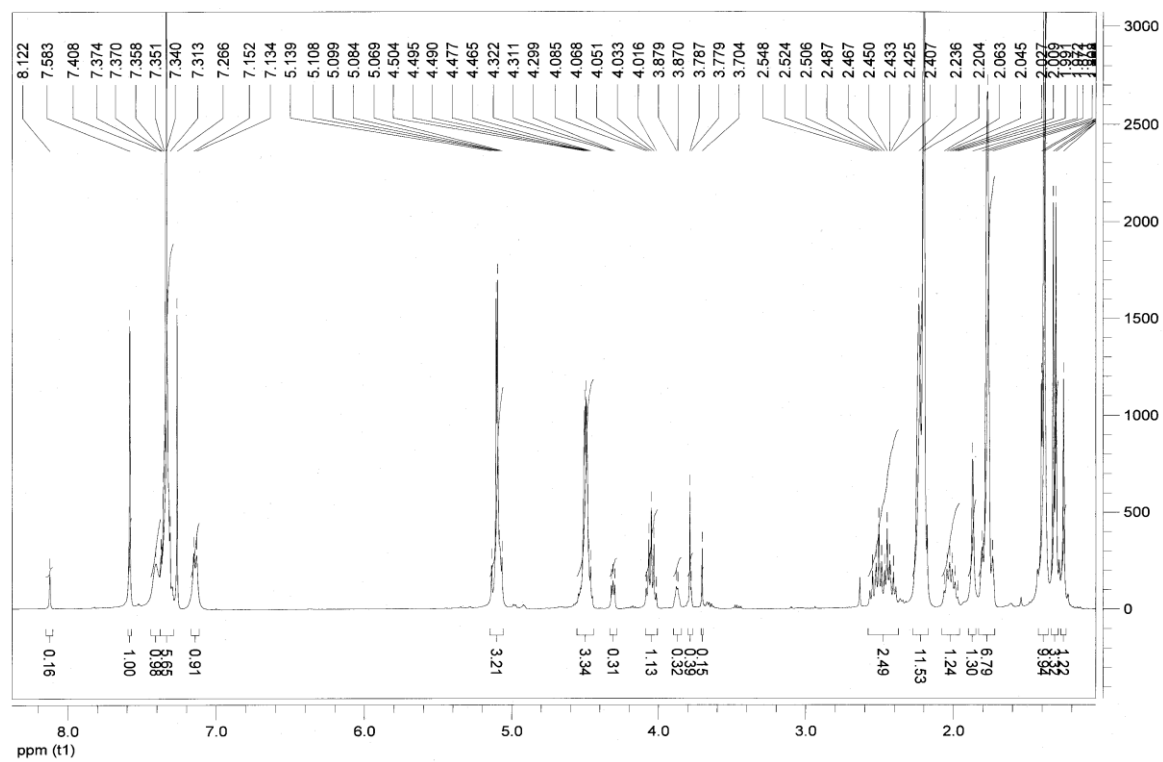


Dodatak 6: ¹H NMR spoja 10



Dodatak 7: ^1H NMR spoja **12**

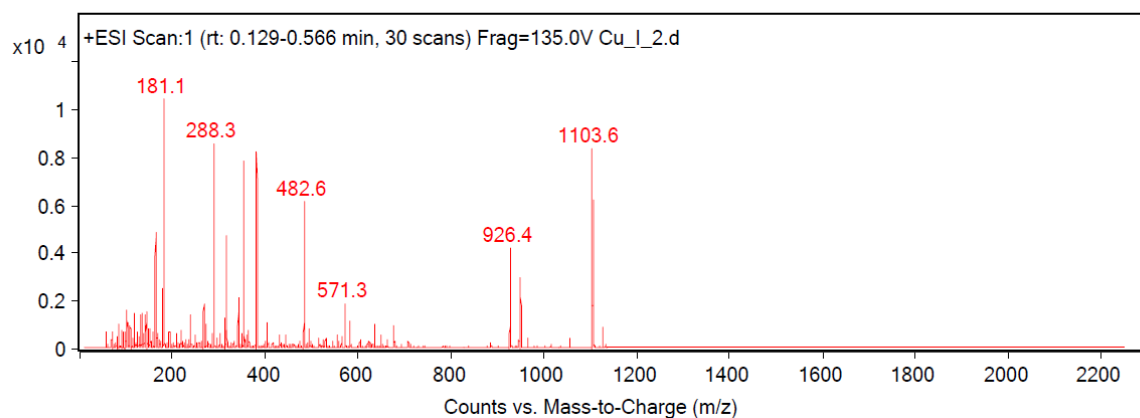
Metoda I (smjesa regioizomera)



Dodatak 8: ESI-MS spektri spoja 13

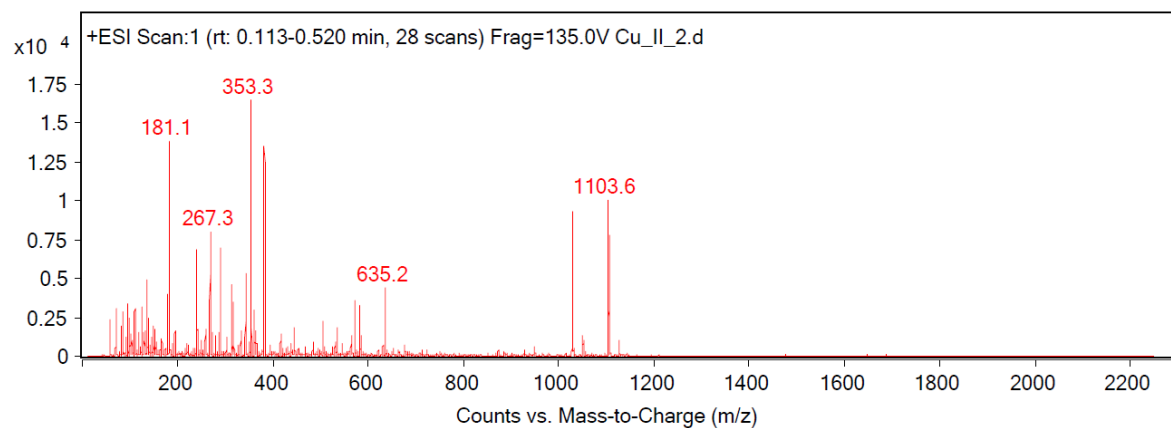
a) uz bakrov(II) sulfat i natrijev askorbat

Spectrum Source	Fragmentor Voltage	Collision Energy	Ionization Mode
Peak (1) in "+/- TIC Scan"		0	ESI



b) uz bakrov(II) acetat

Spectrum Source	Fragmentor Voltage	Collision Energy	Ionization Mode
Peak (1) in "+/- TIC Scan"		0	ESI



§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Antonija Ožegović

Datum rođenja: 16. siječnja 1995.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2001–2009 Osnovna škola Josipa Račića, Zagreb

2009–2013 V. gimnazija, Zagreb

2013–2017 Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
preddiplomski sveučilišni studij Kemija

2017-2019 Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, diplomski
sveučilišni studij Kemija, smjer: istraživački, grane: organska i
analitička kemija