

# Glikozilacija upotrebom alil-glikozida

---

**Prosinečki, Marko**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:959222>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-24**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Marko Prosinečki

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **GLIKOZILACIJA UPOTREBOM ALIL-GLIKOZIDA**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju

Mentor rada: Doc. dr. sc. Đani Škalamera

Zagreb, 2020.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

9. srpnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

30. rujna 2020.

Mentor rada: Doc. dr. sc. Đani Škalamera

Potpis:



# Sadržaj

|   |              |
|---|--------------|
| <b>§ SAŽETAK.....</b>   | <b>VI</b>    |
| <b>§ 1. UVOD.....</b>   | <b>VII</b>   |
| <b>1.1. Ugljikohidrati u svakodnevnom životu .....</b>          | <b>vii</b>   |
| <b>1.2. Glikozidna veza .....</b>                               | <b>viii</b>  |
| <b>1.3. Uobičajene metode pripreme glikozida.....</b>           | <b>xi</b>    |
| <i>1.3.1. Koenigs-Knorr .....</i>                               | <i>xii</i>   |
| <i>1.3.2. Imidatna metoda .....</i>                             | <i>xiii</i>  |
| <i>1.3.3. Izravna metoda.....</i>                               | <i>xiv</i>   |
| <i>1.3.4. Enzimaska sinteza .....</i>                           | <i>xiv</i>   |
| <b>1.4. Problemi uobičajenih metoda pripreme glikozida.....</b> | <b>xv</b>    |
| <b>§ 2. GLIKOZILACIJA UPOTREBOM ALIL-GLIKOZIDA.....</b>         | <b>XVI</b>   |
| <b>2.1. Povijesni pregled .....</b>                             | <b>xvi</b>   |
| <b>2.2. Glavne značajke reakcije.....</b>                       | <b>xvi</b>   |
| <i>2.2.1. One-pot strategija .....</i>                          | <i>xviii</i> |
| <i>2.2.2. Primjer reakcije .....</i>                            | <i>xix</i>   |
| <b>2.3. Mehanizam .....</b>                                     | <b>xix</b>   |
| <b>2.4. Optimizacija .....</b>                                  | <b>xxiii</b> |
| <i>2.4.1. Glavne značajke .....</i>                             | <i>xxiv</i>  |
| <b>2.5. Primjena.....</b>                                       | <b>xxiv</b>  |
| <b>2.6. Zaključak.....</b>                                      | <b>xxv</b>   |
| <b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>                             | <b>XXVI</b>  |



## § Sažetak

Razvoj novih metoda glikozilacije već je dugo vrlo aktualno područje istraživanja. Nekoliko je najčešće upotrebljivanih metoda, no one imaju određene nedostatke koje se u novim metodama nastoji zaobići. Glikozilacija upotrebom alil-glikozida je metoda kemijske sinteze koja koristi *O*-alil kao zaštitnu skupinu na anomernom ugljikovom atomu, koja se vrlo jednostavnom izomerizacijom u vinil, lako prevodi u dobru izlaznu (aktivacijsku) skupinu, a da pritom ne zahtjeva međukorake pročišćavanja. Metoda ima iznimnu vrijednost u sintezi oligosaharida, jer, nakon svakog koraka glikozilacije, ima već postavljeni *O*-alil spreman za izomerizaciju u slijedećem krugu glikozilacije. Unatoč svojoj dokazanoj jednostavnosti i funkcionalnosti, još uvijek nije doživjela široku primjenu.

## § 1. UVOD

### 1.1. Ugljikohidrati u svakodnevnom životu

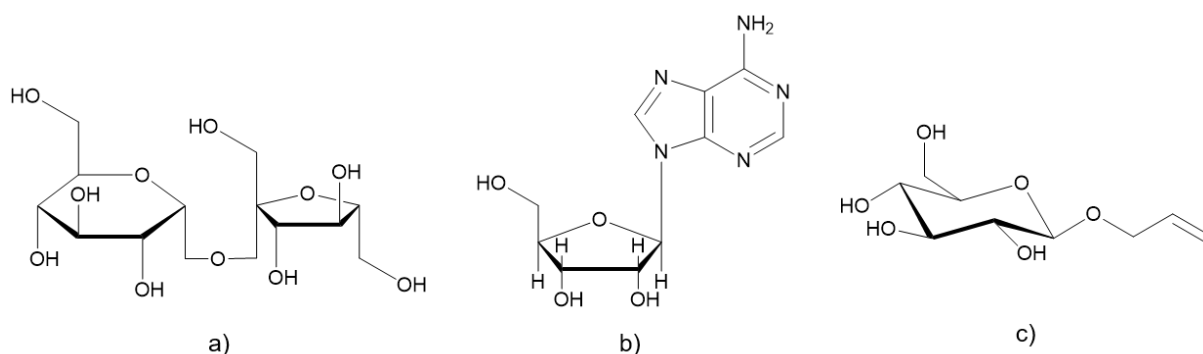
Ugljikohidrati su biomolekule sveprisutne u biološkim sustavima gdje imaju svakojaku ulogu. U sisavaca, glikogen je izvor energije, celuloza gradi staničnu stijenku biljke, a hitin oklope kukaca i rakova. U organizmu su najčešće vezani za neku drugu molekulu gradeći glikoproteine, glikolipide i slično, gdje se prefiks gliko- odnosi na ugljikohidratni dio molekule odnosno glikokonjugat. Osim u biološkim sustavima, ugljikohidrati imaju vitalnu ulogu u prirodnim znanostima kao što su glikoznanosti, biomedicina... Upotrebljavaju se za sintezu lijekova baziranih na ugljikohidratima, nekada su sami po sebi lijek, npr. heparin - negativno nabijeni polimer saharida koji se koristi kao antikoagulacijsko sredstvo, a u novije vrijeme počeli su se koristiti kao prijenosnici lijekova u organizmu. Nadalje, koriste se za razvoj cjepiva, kao adjuvanti, kemijsku sintezu glikoproteina, itd. Zbog svoje široke primjene, sustavna proizvodnja velike količine strukturno dobro definiranih i enantiomerno čistih ugljikohidrata je od ključne važnosti. U kemijskoj sintezi ugljikohidrata, koristi se nekoliko uobičajenih metoda, ali neprestanim radom na razvoju novih metoda, osmišljeni su novi načini sinteze. U ovom radu bit će opisana jednostavna i praktična metoda glikozilacije upotrebom alil-glikozida.<sup>1,2</sup>

Iako je postignut značajan napredak u kemijskoj sintezi ugljikohidrata, ona ostaje vrlo aktualno područje istraživanja. Odgovor, zašto je tome tako, leži u karakteristikama složenih ugljikohidrata odnosno polisaharidima. U prirodi nalazimo 4 vrste makromolekula: nukleinske kiseline, proteine, lipide i polisaharide. Sve vrste makromolekula osim polisaharida su uglavnom lančasti polimeri koji tvore isključivo jedan tip veze na jednom mjestu, dok polisaharidi imaju sposobnost stvaranja veze s bilo kojom hidroksilnom skupinom monosaharida. Uz to, veza se može uspostaviti preko različitih elemenata. Ta kompleksnost njihove strukture im daje gotovo beskonačnu raznolikost svojstava, a shodno tome i široku primjenu, ali upravo ih te karakteristike čine posebno izazovnim u organskoj sintezi.<sup>3,4</sup>



## 1.2. Glikozidna veza

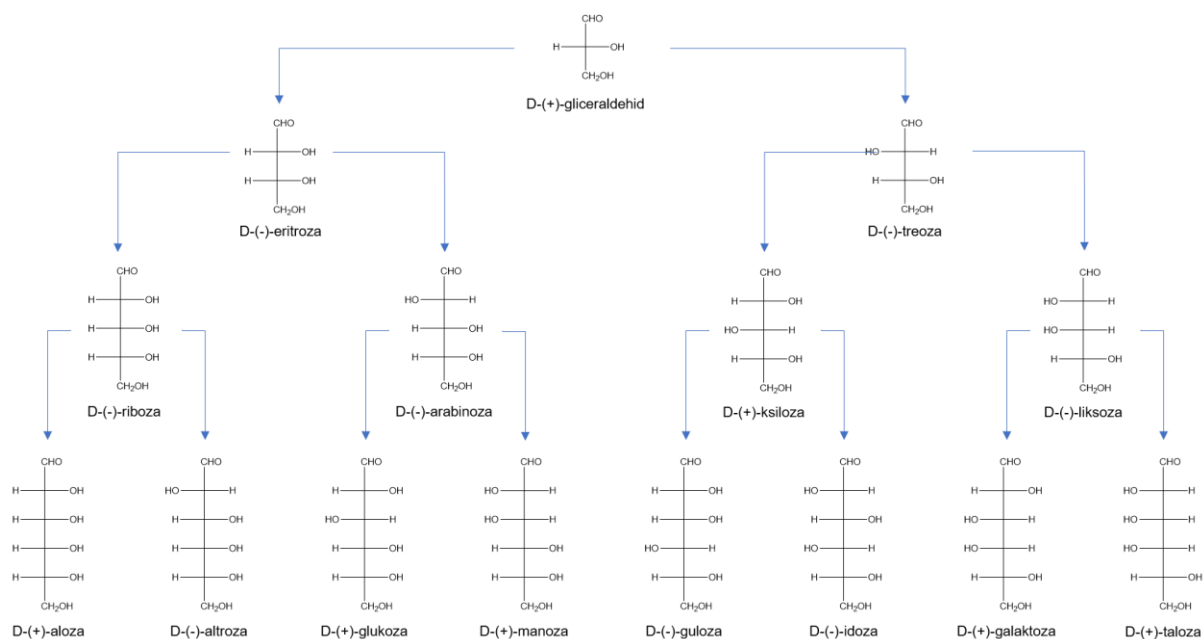
Polisaharidi su polimerni ugljikohidrati koji se sastoje od monomernih jedinica monosaharida. Monosaharidi su unutar polisaharida međusobno povezani kovalentnom vezom, koju nazivamo glikozidnom vezom (slika 1, a). Glikozidna veza nastaje u reakciji glikozilacije u kojoj reducirajući kraj glikozidnog donora (ugljikohidrata) reagira s hidroksilnom skupinom glikozidnog akceptora. Glikozidni akceptor može, ali i ne mora biti ugljikohidrat. Ukoliko je ugljikohidrat, dobiveni produkt je složeni saharid (slika 1, a), pri čemu su oligosaharidi sastavljeni od 2 do 10 monosaharida, a polisaharidi od više od 10 monosaharidnih jedinica. Pod pojmom glikozid smatra se svaki spoj koji posjeduje glikozidnu vezu na reducirajućem kraju, ali u nekim terminologijama, misli se na spoj između glikozidnog donora (glikona) i neugljikohidratne funkcionalne skupine (aglikona). Možda su najbitniji primjer neugljikohidratne glikozidne veze nukleozidi (slika 1, b), većinski dio gradivne jedinice DNA i RNA u kojemu je ribeza glikozidni donor, a purinska ili pirimidinska baza glikozidni akceptor. Također, glikozidni akceptor može posjedovati različite funkcionalne skupine koje kasnije ulaze u glikozidnu vezu tako da razlikujemo 3 najbitnije vrste glikozidnih veza: *O*-, *S*-, *N*-glikozidna veza. Već spomenuti nukleozidi su primjer *N*-glikozidne veze. Primjer neugljikohidratne *O*-glikozidne veze je *O*-alil- $\beta$ -D-galaktopiranozid (slika 1, c). U nastavku ovog teksta fokusirat ćemo se isključivo na *O*-glikozidnu vezu.



Slika 1. Primjeri glikozida: a) saharoza, b) adenzin, c) *O*-alil- $\beta$ -D-galaktopiranozid.

Monosaharidi se međusobno razlikuju na 3 načina. Ako u svojem lančastom obliku imaju aldehidnu skupinu, onda su aldoze, ako imaju keto-skupinu, onda su ketoze. Glukoza je primjer aldoze sa 6 C-atoma, a fruktoza je njezin ekvivalent ketoze. Također, razlikuju se prema broju C-atoma. Glicerinaldehid je sa svoja 3 C-atoma najjednostavnija aldoza. Ugljikovi atomi koji

čine unutarnji dio ugljikove okosnice monosaharida su stereogeni centri tako da se monosaharidi međusobno razlikuju i po konfiguraciji stereogenih centara. To je ilustrativno prikazano slikom 2. Par monosaharida koji se razlikuju prema konfiguraciji samo jednog ugljikovog atoma zovu se epimeri.



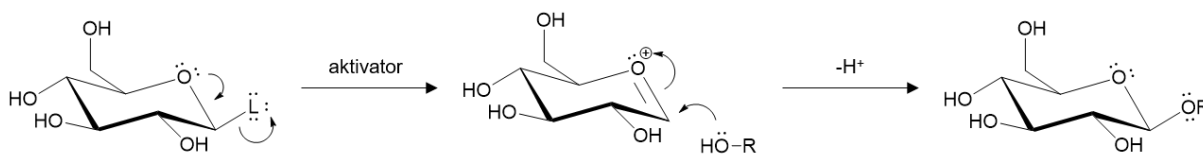
Slika 2. D-Serija aldoza.

U otopini, monosaharidi se nalaze kao smjesa dvaju oblika - lančastog i cikličkog. Favorizirani oblik kod većine monosaharida je ciklički, koji nastaje intramolekulskom reakcijom karbonilne i hidroksilne skupine pri čemu se formira anomerni ugljikov atom. Anomerni C-atom je onaj ugljikov atom koji je direktno vezan na 2 različita atoma kisika, a u saharidima ga najčešće nalazimo u obliku poluacetalata ili acetalata. Posebno bitni epimeri u organskoj sintezi su upravo oni na anomernom ugljikovom atomu pa tako razlikujemo  $\alpha$ - i  $\beta$ -konfiguraciju glikozidne veze, ovisno o tome je li glikozidni akceptor vezan na aksijalni ili ekvatorijalni položaj. U kiseljoj otopini, anomerni C-atom iz poluacetalata reagira s alkoholom i pritom nastaje odgovarajući acetal s  $\alpha$ - ili  $\beta$ -glikozidnom vezom. Iako je ekvatorijalni položaj manje sterički ometen, zbog takozvanog anomernog efekta, saharidi preferiraju da se heteroatomni supstituent nalazi na aksijalnom položaju, odnosno tvore  $\alpha$ -glikozidnu vezu. U kiseljoj vodenoj otopini događa se povratna reakcija u kojoj dolazi do otvaranja cikličke forme, pa su  $\alpha$ - i  $\beta$ -oblik u otopini u

ravnoteži. Suptilna razlika u reaktivnosti anomernog C-atoma od ostalih ugljikovih atoma u molekuli je temeljni fenomen koji omogućava razvijanje glikozilacijskih metoda.<sup>5</sup>

Svojstva složenih saharida uvelike ovise o konfiguraciji glikozidne veze tako da stereoselektivnost predstavlja jedan od glavnih izazova prilikom njihove sinteze. Razvijene su različite reakcije kojima se postiže nastanak produkta željene konfiguracije. Glikozidna veza se može uspostaviti preko funkcionalnih skupina različitih ugljikovih atoma monsaharida. Preferirani ishod kemijske reakcije naspram svih ostalih mogućnosti naziva se kemoselektivnost. Kemoselektivnost ima bitnu ulogu u kemijskoj sintezi i optimizaciji sinteze glikozida. Iz tog razloga, u gotovo svim metodama glikozilacije, polazni ugljikohidrat je alkiliran ili aciliran, ovisno o specifičnim zahtjevima metode. Za potpuno alkilirane saharide kaže se da su A (engl. *armed*), a za potpuno acilirane da su DA (engl. *disarmed*). Samoglikozilacija DA saharida je sporija nego kod A saharida, jer elektronski efekt esterske grupe destabilizira oksokarbenijev međuprodukt na glikozidnom donoru, stoga se u nekim metodama strateški koriste kao glikozidni akseptori. Novonastale veze između ugljikohidrata i alkila ili acila služe kao zaštitne skupine jer ne reagiraju lako. Alkiliranje se može postići u suvišku metil jodida sa srebrovim(I) oksidom ili sa suviškom dimetil-sulfata u natrijevom hidroksidu, a aciliranje u suvišku acetanhidrida uz piridin. Nešto kasnije će biti opisana razlika između tih dvaju kemijskih procesa.<sup>3,6</sup>

Općenito, glikozilacija se odvija S<sub>N</sub>1 mehanizmom tako da najprije izlazna skupina disocira s glikozidnog donora uz pomoć aktivatora, čime nastaje elektrofilna oksokarbenijeva vrsta, a zatim glikozidni akceptor nukleofilno napada elektrofilnu vrstu i stvara glikozid. Uz krajnji produkt, najčešće nastaje voda (shema 1). Polimerni ugljikohidrati nastaju kada je nukleofil istovjetan ugljikohidrat kao glikozidni donor. Duljina lanca kod takve reakcije kontrolira se vremenskim periodom trajanja reakcije.<sup>5</sup>

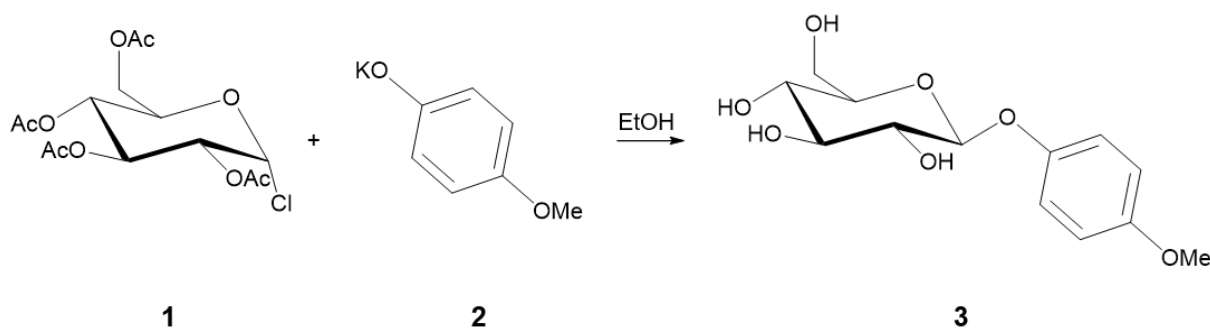


Shema 1. Osnovne značajke mehanizma kemijske glikozilacije.

### 1.3. Uobičajene metode priprave glikozida

Tri su načina sinteze glikozidnih veza: kemijska, enzimska i kemoenzimatska sinteza. Kemijska sinteza koristi znanje organske kemije za sintezu produkta, dok enzimska sinteza podrazumijeva upotrebu (isključivo) enzima. Shodno tome, kemoenzimatska sinteza je kombinacija oba pristupa. Kemijska sinteza se može provoditi u potpunosti u otopini ili uključujući krutu fazu (engl. *solid-phase*). Za sve navedene metode u ovom radu podrazumijeva se da su isključivo u otopini.

Prva, kemijska, ali i općenita sinteza glikozida je zabilježena još 1879. godine kada je Michael tretirao 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glukopiranozil-klorid (**1**) s kalijevim 4-metoksifenolatom (**2**) u apsolutnom etanolu. Reakcijom je nastao  $\beta$ -D-*O*-4-metilfenil glikozid (**3**) (shema 2).



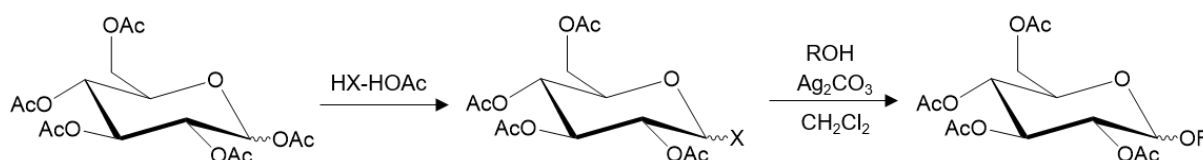
Shema 2. Michaelova metoda.

Zbog lužnate sredine, acetil (Ac) koji je služio kao PG (engl. *protecting group*, hrv. zaštitna skupina) je vrlo lako hidrolizirao. Iako je korisno moći lako hidrolizirati PG, takav scenarij nije poželjan u sintezi složenih saharida jer je potrebno nastaviti štiti spoj od neželjenih kemijskih reakcija u koracima koji slijede.

Michaelova metoda ima neke osnovne značajke koje svaka kemijska glikozilacija treba imati. Tijekom reakcije, piranozni i furanozni prsteni su očuvani, reakcija teži prema supstituciji aglikona na anomerni ugljik te rezultira isključivo  $\beta$ -*O*-glikozidnom vezom, a ne neželjenom smjesom  $\alpha$ - i  $\beta$ -glikozida, ali usprkos pogodnostima i primjeni u biokemijskim laboratorijima za mjerenje enzimske aktivnosti glikozidaza, ovom metodom se mogu sintetizirati isključivo aril-glikozidi pa je bilo potrebno modificirati metodu.<sup>4,7,8</sup>

## 1.3.1. Koenigs-Knorr

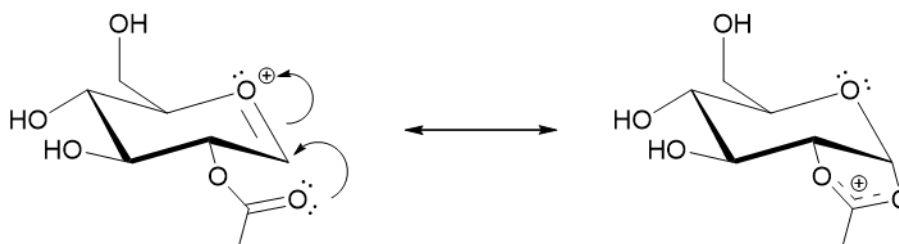
Koenigs i Knorr su 1901. godine, više od 20 godina nakon Michaelove prve sinteze, modificirali originalni postupak tako što su tretirali acetobromglukozu sa suviškom srebrovog karbonata u metanolu pri čemu su dobili odgovarajući  $\beta$ -D-O-metil glikozid. Time je prvi puta provedena Koenigs-Knorrrova reakcija, supstitucijska reakcija nastajanja O-glikozida iz glikozid halogenida i alkohola (ili fenola) u prisutnosti soli teških metala ili Lewisovih kiselina. Najčešće se koriste srebrove soli kao što su karbonati, oksidi, nitrati i triflati. Najvažnije razlike između Koenigs-Knorrrove i Michaelove metode su to što u Koenigs-Knorrrovoj reakciji PG ostaju netaknute te je moguće sintetizirati alkil-glikozide kao i složene saharide.



Shema 3. Koenigs-Knorrrova metoda.

Koenigs-Knorrrova reakcija odvija se u nekoliko faza (shema 3). Najprije se u fazi pripreme potpuno acetilira monosaharid. Zatim se umjesto acetilne skupine na anomernom položaju jednostavnom supstitucijskom reakcijom u kiseljoj otopini uvede halogenid. U sljedećem koraku se, uz već spomenute soli teških metala ili Lewisovih kiselina, željeni glikozidni akceptor uvodi na anomerni položaj i stvara O-glikozidnu vezu. Bitno je napomenuti da reaktivnost i stabilnost glikozid halogenida uvelike ovisi o prirodi halogenida, izboru otapala, temperaturi reakcijske smjese i prirodi koaktivatora. Mijenjanjem tih varijabli mijenja se kemo-, stereo- i regioselektivnost reakcije. Također, produkt i prinos reakcije ovise o prirodi PG.

Iako je moguće koristiti benzil kao PG, kao i neki drugi supstituenti koji tvore etersku vezu, preferiraju se acilne PG, jer one, kao susjedne skupine, sudjeluju u intramolekulskom, nukleofilnom usmjeravanju stereokemije reakcije tako što tvore 1,2-trans ortoesterski međuprodukt (slika 3, desno) pa rezultiraju čistim  $\beta$ -O-glikozidnim produktom, dok alkilne PG rezultiraju smjesom  $\alpha$ - i  $\beta$ -anomera.



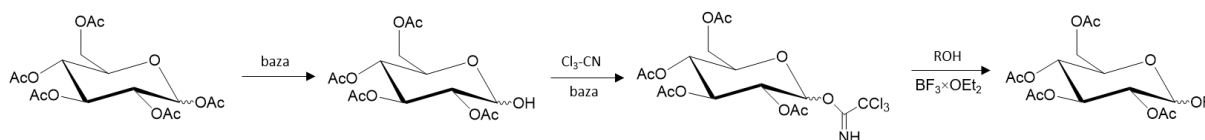
Slika 3. Ortoesterski međuprodukt.

Nedavno je pokazano da se  $\alpha$ -glikozidi mogu pripraviti upotrebom (1*S*)-fenil-2-(fenilsulfanil)etila na C-2 atomu glikozidnog donora. Osim upotrebom odgovarajućih PG, prinos se može poboljšati korištenjem jodida kao LG (engl. *leaving group*, hrv. izlazna skupina), energičnim miješanjem i provođenjem reakcije u tami.<sup>6,7</sup>

Ako se umjesto srebrovih koriste živine ili cinkove soli te polarnije otapalo, kao acetonitril, govorimo o Helferichovoj modifikaciji Koenigs-Knorrove reakcije.<sup>6</sup>

### 1.3.2. Imidatna metoda

Michel i sur. su 1980. godine objavili rad na temu sinteze  $\alpha$ - i  $\beta$ -*O*-glikozidne veze pomoću imidatnog međuprodukta. Danas, imidatna metoda je najpouzdanija i najčešće korištena metoda kemijske sinteze glikozida. Temelji se na upotrebi trikloroacetimidata kao dobre izlazne skupine za koju nije potreban aktivator sačinjen od teških metala. Već od prije je bilo poznato da nitrili u reverzibilnoj reakciji s alkoholom daju imidate, stoga je u imidatnoj metodi prvo potrebno hidrolizirati acetilnu zaštitu na anomernoj OH skupini (shema 4). Supstitucija se postiže upotrebom baze u diklormetanu kao otapalu, nakon čega slijedi dobivanje imidatnog međuprodukta iz trikloroacetonitrila također u bazičnoj otopini.



Shema 4. Imidatna metoda upotrebom trikloroacetimidata.

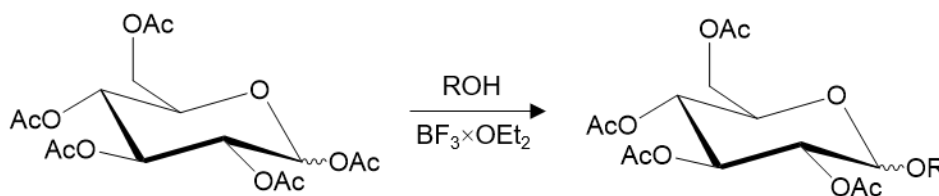
Trikloroacetonitril se može adirati tako da nastane  $\alpha$ - ili  $\beta$ -anomer, ovisno o korištenim bazama. Ukoliko se koristi natrijev hidrid nastaje  $\alpha$ -anomer, a upotrebom slabe baze kalijevog karbonata nastaje  $\beta$ -anomer. Zadnji korak je glikozilacija u kojoj je trikloroacetimidat podvrgnut

nukleofilnom napadu odgovarajućeg glikozidnog akceptora uz Lewisovu kiselinu i pritom nastaje konačni produkt i trikloracetamid. Kao Lewisove kiseline se tipično koriste koordinacijski kompleks borov trifluorid dietil eterat ( $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$ ) ili trimetilsilil-trifluormetansulfonat (TMSOTf).

Razne pogodnosti čine ovu metodu boljom od prethodno navedenih. Kao što je već spomenuto, ne koriste se teški metali, koji su otrovni. Međuprodukt *O*-glikozil-trikloracetimidat je stabilan na sobnoj temperaturi, iako relativno nestabilan na zraku pa je potrebno s njime krenuti u reakciju glikozilacije odmah nakon što je pripravljen. Nastali nusprodukt u zadnjem koraku metode je nebazična molekula trikloracetamid koja ne „troši“ katalizator Lewisovu kiselinu, stoga je dovoljno upotrijebiti ekvimolarnu količinu katalizatora. Također, trikloracetamid nije niti kisela molekula pa se tijekom reakcije ne smanjuje pH. Trikloracetamid se može izdvojiti iz smjese i prevesti natrag u trikloracetonitril, što čini metodu jeftinijom u industrijskoj primjeni. Naposljetku, u metodi nije potrebno sredstvo za sušenje jer voda nastala kondenzacijom se veže na trikloracetonitril.<sup>9,10</sup>

### 1.3.3. Izravna metoda

Izravna metoda glikozilacije se odvija u svega jednom koraku kao što je prikazano na shemi 5. Potpuno acetilirani ili benzoilirani saharid se tretira alkoholom u suvišku uz prisustvo Lewisove kiseline, na primjer već spomenuti borov trifluorid dietil eterat.



Shema 5. Izravna metoda.

### 1.3.4. Enzimska sinteza

Enzimska sinteza, kao što joj samo ime govori, je metoda koja koristi enzime za sintezu glikozida. Ima nekoliko prednosti nad kemijskom sintezom. Izbjegava se potreba za korištenjem PG što ušteduje puno truda i vremena te enzimi formiraju isključivo jednu vrstu anomera pa nije potrebno odvajati produkte kao u kemijskoj sintezi. Najveći nedostatak

enzimske sinteze je nepristupačnost specifičnih enzima. Enzimi koji se koriste u metodi dijele se na glikozidaze i glikoziltransferaze.<sup>3</sup>

#### 1.4. Problemi uobičajenih metoda pripreve glikozida

Svaka od spomenutih metoda ima svoje specifične nedostatke. Spomenuto ih je već nekoliko, kao na primjer spontana hidroliza zaštitnih skupina, upotreba teških soli kao aktivatora, itd. Općenito, kako bi metoda bila primjenjiva, treba zadovoljavati nekoliko kriterija. Prvo, stereokemijski prinos reakcije mora biti vrlo visok, što znači da je moguće sintetizirati željeni anomer u visokom iskorištenju, čime je bolje iskorišten početni materijal i izbjegava/umanjuje se potreba za koracima pročišćavanja. Već u ovom koraku mnoge metode ne zadovoljavaju kriterij izuzev par specifičnih reakcija. Nadalje, reakcija se mora moći skalirati tako da se mogu dobiti značajne količine produkta te, na kraju, potrebno je izbjegavati upotrebu reagensa koji se ne mogu reciklirati, jer bi time skaliranje reakcije dovelo do velikih količina otpadnog materijala. Što metoda ima manje koraka i reagensa, to je njezina praktičnost bolja.<sup>10</sup>

Od svih navedenih metoda, imidatna metoda najbolje zadovoljava kriterije, stoga ne čudi da je najčešće upotrebljavana, ali i ona ima svoje nedostatke. U prisustvu Lewisovih kiselina često dolazi do neželjene sporedne reakcije - Chapmanove pregradnje, ali još važnije, imidatna metoda zahtjeva postavljanje LG netom prije glikozilacije, jer su trikloracetimidati relativno nestabilni. Najveći nedostatak svih dosad navedenih metoda je njihova slaba primjenjivost na kemijsku sintezu oligosaharida. Pri sintezi oligosaharida, nužno je izbjeći postavljanje izlaznih skupina nakon svakog kruga glikozilacije. Nijedna od ovih metoda nije uspješna u tome.<sup>10</sup>



## § 2. GLIKOZILACIJA UPOTREBOM ALIL-GLIKOZIDA

### 2.1. Povijesni pregled

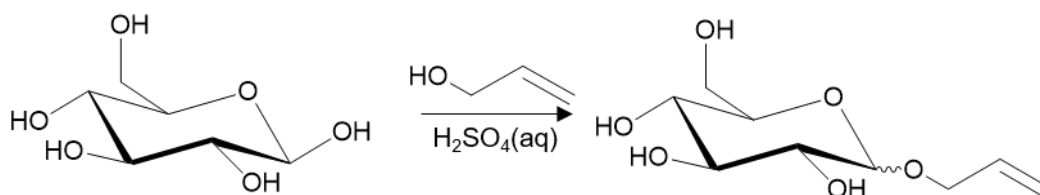
Glikozilacija upotrebom alil-glikozida se prvi puta spominje u radu 1992. godini kada su Sinay i sur. pokazali da se *O*-alil, na anomernom ugljikovom atomu, može aktivirati u *O*-vinil i kao takav iskoristi za sintezu odgovarajućeg disaharida. Rezultati su pokazivali potencijal, ali svejedno, u godinama što slijede, samo nekoliko znanstvenika je bezuspješno istraživalo o funkcionalnosti glikozidnog donora srodnih alil-glikozidu. Vinil glikozid se slijedeći put spominje 2007. godine kada je Wang objavio rad u kojem opisuje optimizaciju metode.<sup>11,12</sup>

Od tada, pa sve do danas, metoda je privukla samo dio pažnje znanstvene zajednice. Šest godina nakon objavljivanja svog prvog rada, Wang i sur. su objavili rad u kojem opisuju studij mehanizma ove reakcije. U proteklom desetljeću, svega nekoliko znanstvenika se okušalo u optimizaciji metode te su u tome djelomično uspjeli. Metoda ima nedostatke, ali njezine prednosti ih nadilaze. Svejedno, njezina praktičnost i jednostavnost još uvijek nije prepoznata do mjere da je postala uobičajena i široko primjenjivana metoda pripreve glikozida.<sup>13</sup>

### 2.2. Glavne značajke reakcije

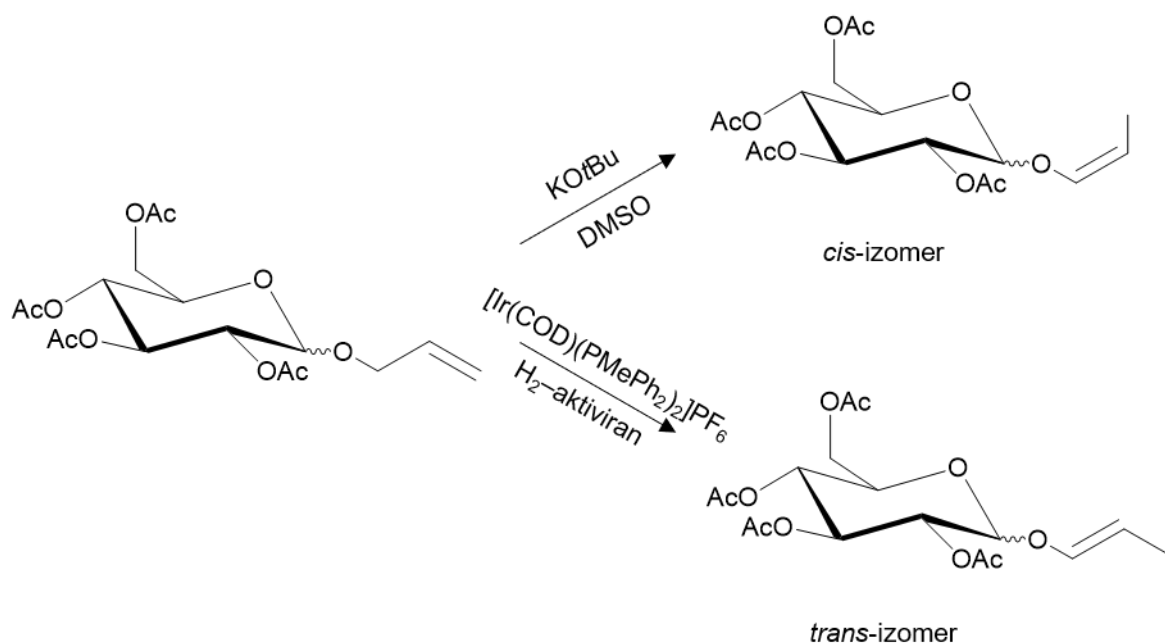
U prvoj optimizaciji 2007. godine, glikozilacija upotrebom alil-glikozida je odrađena *one-pot* sintezom tako da je prvo potpuno acetilirani glikozidni donor izomeriziran u svoj aktivan oblik (vinil) pa mu je dodan glikozidni akceptor uz NIS (*N*-jodosukcinimid) pri sobnoj temperaturi. *One-pot* sinteza je strategija u kojoj se reaktant, u jednoj posudi, podvrgne sukcesivnim kemijskim reakcijama. Metoda ne odstupa od generalnog principa glikozilacijskih metoda. Odvija se  $S_N1$  mehanizmom, što znači da se reakcija temelji na stvaranju oksokarbenijevog iona kao u shemi 1. Glavna razlika između glikozilacije upotrebom alil-glikozida i uobičajenih metoda je alilna zaštitna skupina koja se lako pretvara u LG. Kod uobičajenih metoda, potrebno je prvo ukloniti zaštitu, npr. Ac, na anomernoj OH skupini pa onda postaviti LG. Oba koraka će potrošiti vrijeme, a uz to je potrebno paziti da su ostale zaštitne skupine stabilne u uvjetima kojima se uklanja anomerna zaštita. Dakle, glikozilacija upotrebom alil-glikozida smanjuje broj koraka te ih uz to i pojednostavljuje.<sup>12</sup>

Nadalje, glikozilacija upotrebom alil-glikozida je jedinstvena po tome što se alilna PG postavlja na anomerni ugljikov atom potpuno nezaštićenog saharida, a tek tada se postavljaju PG na ostalim ugljikovim atomima. Uz navedenu glavnu prednost, *O*-alil ima još nekoliko bitnih karakteristika. Izvor alila je alilni alkohol koji je jeftini komercijalno dostupni reagens, jer već ima široku komercijalnu upotrebu. Primarno se proizvodi reakcijom alil-klorida i natrijeve lužine. Također, alilni alkohol, u reakciji s glikozidom, rado daje stabilan alil-glikozid (shema 6). Naziv ove reakcije je Fischerova glikozilacija. Fischerova glikozilacija je metoda koja se koristi za sintezu jednostavnih glikozida. Nezaštićeni saharid u „Fischerovim uvjetima“ (alkohol uz npr. par kapi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) daje odgovarajući glikozid.<sup>6</sup>



Shema 6. Fischerova reakcija nastajanja alil-glikozida.

Nakon pripreme alil-glikozida, slijedi izomerizacija *O*-alila u *O*-vinil. Izomerizacija se može odvijati uz pomoć mnogih reagensa. Dvije glavne metode su reakcija s kalijevim *tert*-butoksidom (KO*t*Bu) u DMSO i reakcija katalizirana kompleksom [Ir(COD)(PMePh<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>, predaktiviranim s vodikom. Jedina razlika između te dvije metode je konfiguracija nastalog vinila (shema 7).



Shema 7. Usporedba izomerizacije alil-glikozida upotrebom KOtBu i [Ir(COD)(PMePh<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>.

Aktivacijom nastalog *O*-vinil-glikozida te dodavanjem otopine glikozidnog akceptora, koji je istovjetan alil-glikozidu, u svega nekoliko minuta može se pripraviti odgovarajući disaharid.

### 2.2.1. One-pot strategija

*One-pot* strategija se odnosi na redosljed i način miješanja reaktanata. U uobičajenim metodama, potrebno je, nakon svakog koraka glikozilacije, pročititi dobiveni produkt od suviška reagensa i nusprodukata, a zatim selektivno ukloniti PG s jedne hidroksilne skupine. Kada se na to nadodaju koraci potrebni za pripremu selektivno zaštićenih monosaharidnih podjedinica, cjelokupni proces postaje kompliciran i spor. *One-pot* strategija zasniva se na principu da se svi koraci odvijaju u istoj posudi (tikvici), bez izolacije i pročišćavanja međuprodukata između nekoliko reakcijskih koraka. U posudi se nalazi otopina aktiviranog glikozidnog donora i u njoj će se odvijati reakcija. Toj otopini se, u više navrata, po redu dodaju glikozidni akceptori. Redosljed dodavanja je definiran reakcijskim profilom zaštićenih monosaharida. Najreaktivnija vrsta se dodaje prva pa tako u nizu do najmanje reaktivne vrste. Na taj način uspješno se kontrolira redosljed stvaranja glikozidnih veza te se uvelike smanjuje broj koraka u sintezi. *One-pot* strategija nije nužna prilikom korištenja alilne metode, ali je, zbog svoje jednostavnosti, gotovo uvijek primijenjena.<sup>3</sup>

### 2.2.2. Primjer reakcije

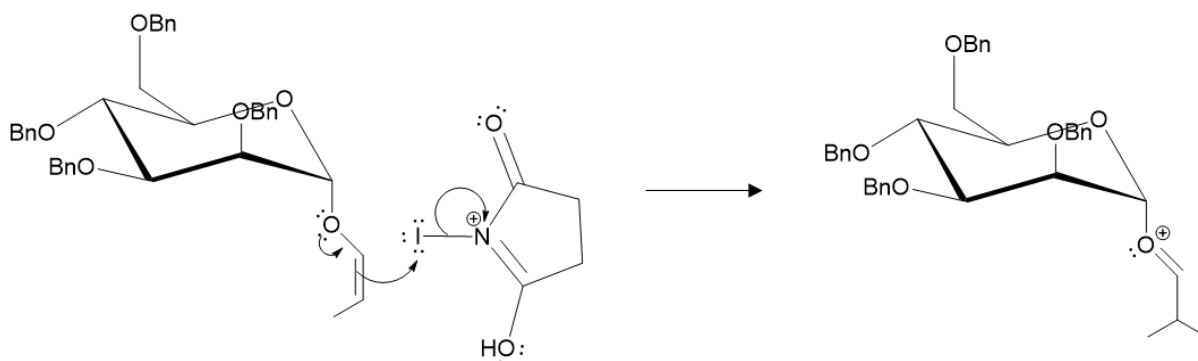
U samom radu, Wang i sur. su tretirali *O*-alil-2,3,4-tri-*O*-benzil-D-ksilopiranozid s  $[\text{Ir}(\text{COD})(\text{PMePh}_2)_2]\text{PF}_6$ , predaktiviranim s vodikom, u THF-u pri sobnoj temperaturi. Nastao je izomer, *O*-prop-1-enil-glikozid. Izomerizacija je trajala 90 minuta. Iz otopine je uklonjen THF nakon čega je u nju dodan već prije pripremljen glikozidni akceptor otopljen u acetonitrilu (MeCN). Glikozilacija je nastupila dodatkom NIS i trajala je svega nekoliko minuta. NIS je aktivirao *O*-vinil na glikozidnom donoru. Predloženi mehanizam aktivacije odvija se preko jodoksokarbenijevog, odnosno oksokarbenijevog međuprodukta (detaljnije o mehanizmu u sljedećem poglavlju). Odmah nakon nastajanja, slobodna OH skupina alil-glikozida prisutnog u otopini nukleofilno napada oksokarbenijev ion i stvara željeni disaharid. Eksperimenti su provedeni s raznim glikozidnim akceptorima i drukčijim molarnim odnosima glikozidni donor/NIS/akceptor. Prinos reakcije je ovisio o izboru glikozidnog akceptora, a kretao se između 62-85%, što ukazuje na potencijalne nedostatke metode u sintezi pojedinih glikozida. Izbor glikozidnog akceptora imao je još veći utjecaj na omjer  $\beta/\alpha$  sintetiziranih glikozidnih veza. U najekstremnijem slučaju sintetizirano je 4 puta više  $\beta$ -glikozida, nego  $\alpha$ -glikozida. U svim ostalim slučajevima, favoriziran je  $\beta$ -glikozid.

Kod svih dobivenih disaharida, alilna skupina, vezana na anomerni ugljik bivšeg glikozidnog akceptora, je ostala nepromijenjena, što ju čini spremnom za izomerizaciju u sljedećem krugu glikozilacije. To je ključno kako bi se brzo i jednostavno uspjelo sintetizirati oligosaharide. U ovom radu, Wang je uspio sintetizirati trisaharid alilnom metodom krenuvši od reducirajućeg i nereducirajućeg kraja, a u protekle 2 godine, u dva navrata, sintetizirao je i razgranate pentasaharide.<sup>14,15</sup>

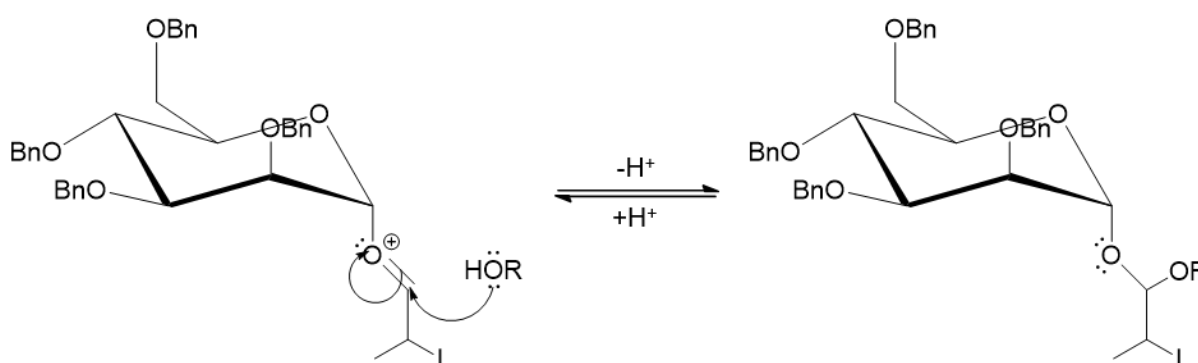
## 2.3. Mehanizam

U svom radu objavljenom 2013. godine, Wang je detaljnije istražio mehanizam reakcije. Prije svega, uvidio je nedostatke prvotne optimizacije. Neki potpuno benzilirani prop-1-enil-glikozidni donori, uz NIS u acetonitrilu, su rezultirali prinosom od 62-68%, a vinil-manoza, vinil-ramnoza i DA saharidi, znatnom količinom adicijskog nusprodukta, tako da su u novoj optimizaciji, umjesto NIS, koristili NIS u kombinaciji s trifluorometansulfonskom kiselinom

(TfOH) čime su se značajno popravili rezultati. Naime, razlog niskog prinosa u slučaju nekih benziliranih glikozida je taj što uz adiciju joda na dvostruku vezu vinila (shema 8), adira se i glikozidni akceptor dajući adicijski nusprodukt (shema 9).<sup>13</sup>

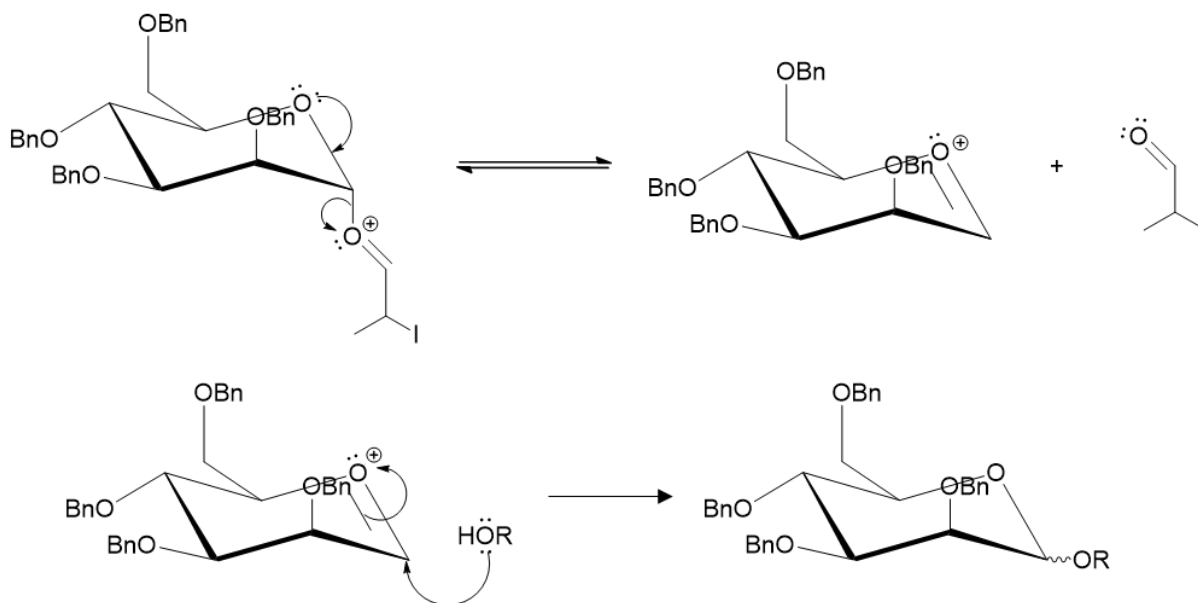


Shema 8. Adicija joda na dvostruku vezu vinila.



Shema 9. Nastajanje adicijskog nusprodukta.

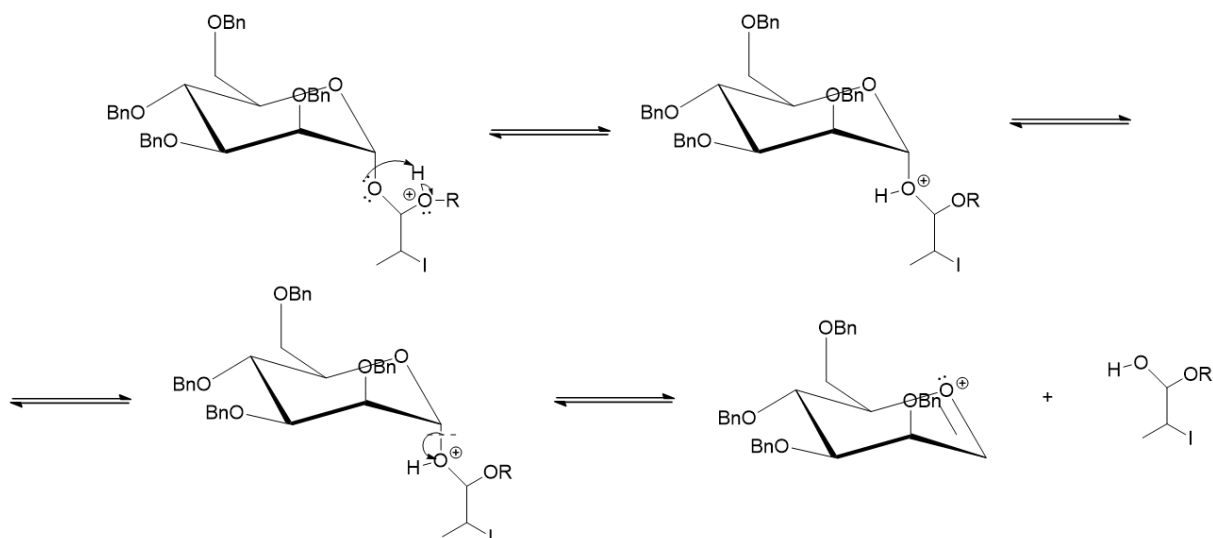
Ostatak mehanizma se odvija isto kao i u općem slučaju preko oksokarbenijevog međuprodukta kojeg nukleofilno napada glikozidni akceptor (shema 10).



Shema 10. Mehanizam reakcije glikozilacije.

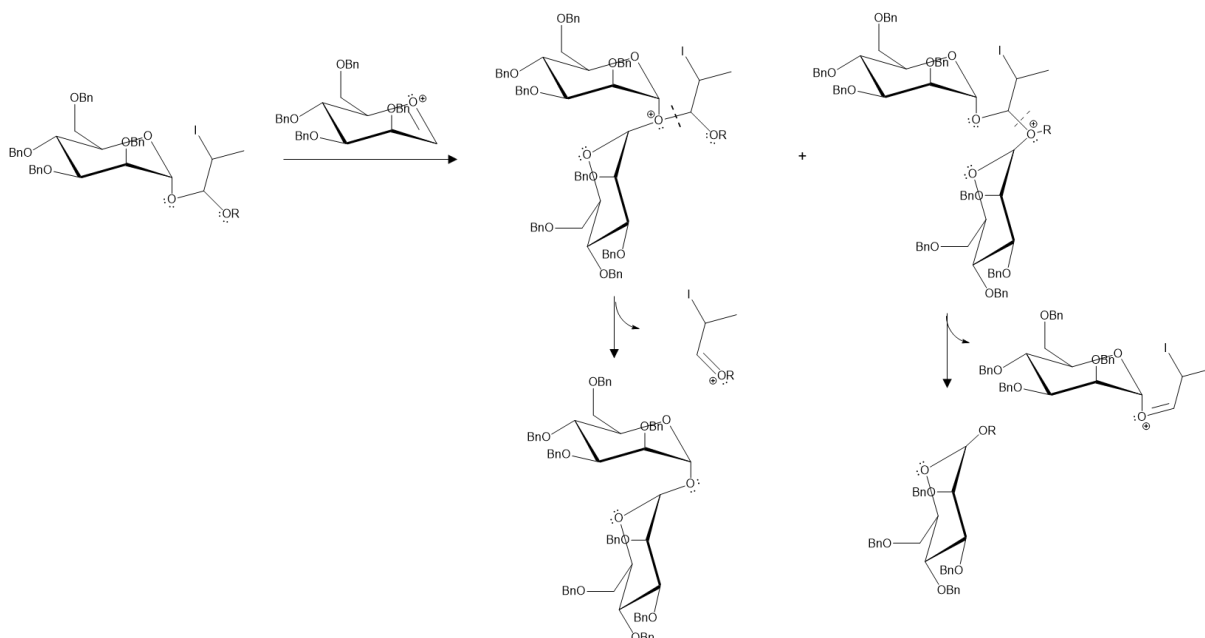
Kada se u reakciji koristio TfOH, nije nastao adicijski produkt, nego željeni glikozid i nereducirajući dimer u omjeru 9:1 (zanimljivo je da je anomerni omjer željenog glikozida  $\alpha/\beta=98/2$ , što je vjerojatno rezultat stabilnosti  $\alpha$ -anomera u kiseljoj otopini). U zasebnom eksperimentu potvrđeno je da je upravo dodatak TfOH uzrok opaženih promjena, a ne neki drugi faktor, tako da samo ostaje pitanje kojim mehanizmom TfOH pretvara adicijski produkt u željeni glikozid i opaženi dimer?

Predložena su 2 mehanizma s nekoliko reakcijskih puteva koji vjerojatno koegzistiraju. Prvi mehanizam uključuje pretpostavku da su jodoksokarbenijev ion i adicijski produkt u kemijskoj ravnoteži (shema 9). Jodoksokarbenijev ion rezultira glikozidom mehanizmom opisanim u shemi 10, a adicijski produkt može dati glikozid tako da se cijepa glikozidna veza njegovog tautomera (shema 11). Produkti cijepanja su oksokarbenijev ion i hemiacetal. Oksokarbenijev ion dalje u reakciji sa alkoholom formira glikozid.



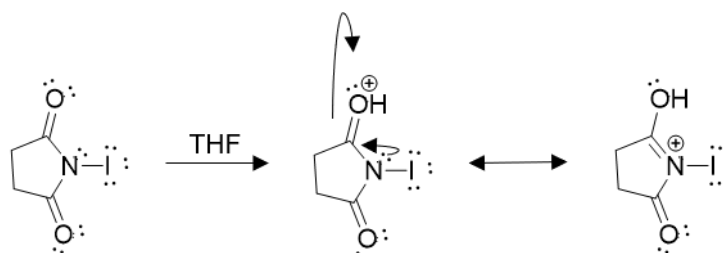
Shema 11. Mehanizam dobivanja glikozida cijepanjem adicijskog produkta.

Vjerojatnije objašnjenje je mehanizam transferiranja aglikona (shema 12). Mehanizam transferiranja aglikona podrazumijeva vezanje oksokarbenijeve vrste na jedan od geminalnih kisika adicijskog produkta čime, daljnje cijepanje veza, rezultira željenim glikozidom ili dimerom.



Shema 12. Mehanizam transferiranja aglikona.

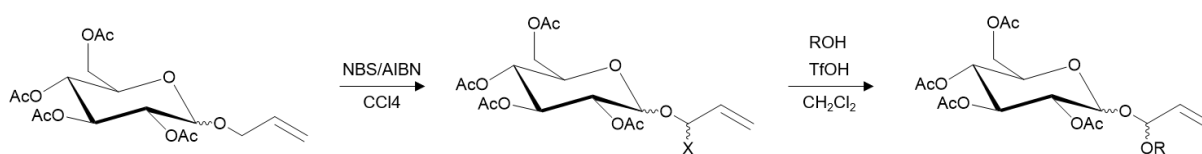
Nadalje, u novom nizu pokusa, dokazano je da prisutnost IOTf (nastalog reakcijom NIS i TfOH) u otopini, ne mijenja 1:1 omjer nastalog željenog glikozida i adicijskog produkta, već se isključivo ubrzava adiranje joda. Iz toga zaključujemo da je uloga TfOH u otopini dvojaka. Glavna uloga mu je u *in situ* reakciji s NIS proizvesti vrlo reaktivan jodonium-triflat (IOTf) (shema 13) koji je odličan izvor elektrofilnog joda u otopini. Druga uloga mu je pretvoriti adicijski nusprodukt u željeni glikozid (shema 11 i 12).



Shema 13. Mehanizam nastajanja IOTf.

## 2.4. Optimizacija

Wang nije jedini optimizirao metodu. U 2017. godine, Jayaraman i sur. su testirali latentno-aktivnu glikozilaciju upotrebom alil-glikozida posredovanu radikalnom halogenacijom. Dosad je bila riječ isključivo o aktivaciji *O*-alil izomerizacijom u *O*-vinil. Radikalnim halogeniranjem, taj korak se izbjegava, jer iz alil-glikozida nastaje alil-halogenid. Nadalje, alil-halogenid se aktivira Lewisovom kiselinom te, analognim mehanizmom, formira glikozid duži za jedan monosaharid (shema 14). Ovim pristupom, latentno-aktivna svojstva i *one-pot* strategija su očuvane.<sup>16,17</sup>



Shema 14. Reakcija latentno-aktivne glikozilacije upotrebom alil-glikozida posredovanu radikalnim halogeniranjem.

Nakon testiranja nekoliko katalizatora i otapala, postupak su okvirno podesili tako da se najprije glikozidni donor tretira s NBS u CCl<sub>4</sub>. Uklone se otopljeni plinovi (kisik) u atmosferi argona,



pa se doda AIBN katalizator i sve zajedno refluksira nekoliko minuta. U ovom trenutku u otopini se nalazi alil-halogenid. Zatim, slijedi zamjena otapala. Ukloni se  $\text{CCl}_4$  te doda  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  koji je pokazao bolja svojstva za ono što slijedi, a to je dodavanje TfOH te glikozidnog akceptora.

#### 2.4.1. Glavne značajke

Gotovo isključivo nastaju  $\beta$ -anomeri što upućuje na mehanizam reakcije preko oksokarbenijevog iona stabiliziranih sudjelovanjem susjednih funkcionalnih skupina. Tijekom reakcije bilo je neophodno ukloniti vlagu iz otopine kako ne bi nastao laktol (hemiacetal). Zanimljivo je napomenuti da je u slučaju acetilne i sililne PG zapažen slabiji prinos, a povećani prinos u slučaju benzoilne PG. Najbitnija značajka reakcije je ta da *O*-alil na anomernom ugljikovom atomu glikozidnog akceptora ne utječe na tijek glikozilacije. Kao i u prethodnim optimizacijama, novonastali, složeni saharid je odmah spreman za aktivaciju u sljedećem krugu glikozilacije.

Prednost aktivacije alil-glikozida radikalnim halogeniranjem, nad klasičnom izomerizacijskim pristupom, je ta da se izbjegava korištenje skupocjenih metala, koji s vremenom gube svoja katalitička svojstva (engl. *catalyst poisoning*). Također, prinosi reakcije radikalskog halogeniranja su često izvrsni, a u najmanju ruku dobri. Unatoč brojnim prednostima ove metode, još uvijek je nejasno kako sintetizirati  $\alpha$ -anomere te upotreba trenutnih otapala nije ekološki prihvatljiva, tako da preostaje prostora za dodatnim optimizacijama metode.

## 2.5. Primjena

Nekoliko godina nakon što su po prvi puta sintetizirali glikozid upotrebom alil-glikozidnog pristupa, Wang i sur. demonstrirali su primjenjivost metode iskoristivši je za sintezu saharida koji su važni zbog njihove potencijalne primjene.

2010. godine, sintetizirali su potpuno zaštićeni *Shigella flexneri* serotip Y *O*-antigen koristeći NIS/TfOH za aktivaciju vinila. Bakterije roda *Shigella* uzrok su više od 160 milijuna oboljenja i više od milijun smrtnih slučajeva godišnje, stoga je od iznimne važnosti moći brzo i jeftino doći do odgovarajućih antigena kako bi se razvila cjepiva i ostale dijagnostičke potrepštine za tretiranje bolesti. Tetrasaharid su uspješno sintetizirali, već opisanim postupkom

u 2 faze i 7 koraka. U prvoj fazi, sintetizirali su disaharid, koji je kasnije poslužio kao glikozidni akceptor. U drugoj fazi sintetizirali su drugi disaharid, koji u reakciji s prvim saharidom dao željeni tetrasaharid uz prinos od 74%. Prinos reakcije dobivanja prvog, tj. drugog disaharida iznosio je 82%, odnosno 83%.<sup>18</sup>

Nešto više od godinu dana kasnije, metodu su primijenili za sintezu antigena bitnog za razvoj cjepiva protiv bakterije *Bacillus anthracis*, koja uzrokuje antraks. Antraks je fatalna, akutna, septikemijska, nekontagiozna zarazna bolest u ljudima i drugim sisavcima. Bakterija u tijelo ulazi preko hrane i vode zagađene njezinim sporama. U najvećoj opasnosti zaraze su ljudi koji rade sa životinjama. Postoji nekoliko načina prevencije bolesti, a jedno od njih je cijepljenje. Wang i sur. uspjeli su umanjili broj koraka potrebnih za sintezu kostura tetrasaharida iz komercijalno, lako dostupnih monosaharida. Bilo im je potrebno 17 koraka, dok, za sintezu kostura slične kompleksnosti upotrebom nekih osnovnih metoda, potrebno je više od 30 koraka.<sup>19</sup>

## 2.6. Zaključak

Glikozilacija upotrebom alil-glikozida pokazuje mnoge prednosti u kemijskoj sintezi oligosaharida nad uobičajenim metodama glikozilacije. Prvo, *O*-alil se može direktno izomerizirati u svoj aktivan oblik (vinil) i tako vršiti dualnu ulogu bez vremenski skupih zamjena anomernih skupina i pročišćavanja međuprodukta. Drugo, postoji veliki broj vrlo jednostavnih, efikasnih metoda izomerizacije. Treće, alil-glikozid i njegove komponente nije teško nabaviti, jer već imaju široku primjenu u organskoj sintezi. Naposljetku, upotreba alil-glikozida kao gradivnih jedinica u sintezi oligosaharida ne zahtjeva selektivno modificiranje zaštitnih skupina nakon svake iteracije kao što to zahtijevaju metode s A/DA pristupom. Najnoviji pristup, u kojem se alil-glikozid aktivira radikalnim halogeniranjem, razrješava potrebe metalnih katalizatora i formira gotovo isključivo  $\beta$ -anomer. Unatoč svim prednostima upotrebe alil-glikozida, to nije univerzalno najbolja metoda. Kod upotrebe nekih glikozidnih donora, rezultira skromnim prinosom, te često produkt nastaje kao smjesa, stoga i dalje postoji potreba za dodatnim optimizacijama reakcije ili pribjegavanju drugim metodama glikozilacije.

Nedavno, došlo je do značajnih pomaka u kemijskoj sintezi glikozida što nam je omogućilo bolji uvid u prirodu glikozidnog donora i akceptora. Razvijeni su novi sustavi aktiviranja LG, koji rezultiraju boljom stereoselektivnošću. One-pot strategija minimizirala je

trud potreban za sintezu oligosaharida. Međutim, izazovi kemijske sinteze oligosaharida nisu završili. Ne postoji univerzalni propis kemijske sinteze, a broj ekološki prihvatljivih reakcija je vrlo malen.

## § 3. LITERATURNI IZVORI

1. B. Lapanies, J. Yin, P. H. Seeberger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14** (2010) 404-411.
2. T. J. Boltje, T. Buskas, G.-J. Boons, *Nat. Chem.* **1** (2009) 611-622.
3. W. J. Lennarz, M. D. Lane, *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Vol. 2, Elsevier Academic Press, Cambridge, 2013, str. 362-367.
4. R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **96** (1996) 683-720.
5. R. Das, B. Mukhopadhyay, *ChemistryOpen.* **5** (2016) 401-433.
6. M. Brito-Arias, *Synthesis and Characterization of Glycoside*, Springer, Boston, 2016.
7. L. Kurti, B. Czako, *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, Elsevier Academic Press, Cambridge, 2005, str. 246-247.
8. K. J. Jensen, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1** (2002) 2219-2233.
9. B. O. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem, *Glycoscience*, Vol. 2, Springer, Berlin, 2008.
10. R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew Chem Inr. Ed. Engl.* **19** (1980) 731-732.
11. A. Marra, J. Esnault, A. Veyrieres, P. Sinay, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, **114**, 6354-6360.
12. P. Wang, P. Haldar, Y. Wang, H. Hu, *J. Org. Chem.* **72** (2007) 5870-5873.
13. H. Yang, P. Wang, *J. Org. Chem.* **78** (2013) 1858-1863.
14. P. Wang, Đ. Škalamera, X. Sui, P. Zhang, S. M. Michalek, *J. Med. Chem.* **62** (2019) 1669-1676.
15. P. Wang, Đ. Škalamera, X. Sui, P. Zhang, S. M. Michalek, *ACS Infect. Dis.* **5** (2019) 974-981.
16. R. Pal, A. Das, N. Jayaraman, *Chem. Commun.* **54** (2018) 588-590.
17. R. Pal, A. Das, N. Jayaraman, *Pure Appl. Chem.* **91** (2019) 1-20.
18. Y. Wang, X. Zhang, P. Wang, *Org. Biomol. Chem.* **8** (2010) 4322-4328.
19. Y. Wang, X. Liang, P. Wang, *Tetrahedron Lett.* **52** (2011) 3912-3915.

- 
- <sup>1</sup> B. Lapanies, J. Yin, P. H. Seeberger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14** (2010) 404-411.
  - <sup>2</sup> T. J. Boltje, T. Buskas, G.-J. Boons, *Nat. Chem.* **1** (2009) 611-622.
  - <sup>3</sup> W. J. Lennarz, M. D. Lane, *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Vol. 2, Elsevier Academic Press, Cambridge, 2013, str. 362-367.
  - <sup>4</sup> R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **96** (1996) 683-720.
  - <sup>5</sup> R. Das, B. Mukhopadhyay, *ChemistryOpen*. **5** (2016) 401-433.
  - <sup>6</sup> M. Brito-Arias, *Synthesis and Characterization of Glycoside*, Springer, Boston, 2016.
  - <sup>7</sup> L. Kurti, B. Czako, *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, Elsevier Academic Press, Cambridge, 2005, str. 246-247.
  - <sup>8</sup> K. J. Jensen, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1** (2002) 2219-2233.
  - <sup>9</sup> B. O. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem, *Glycoscience*, Vol. 2, Springer, Berlin, 2008.
  - <sup>10</sup> R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew Chem Inr. Ed. Engl.* **19** (1980) 731-732.
  - <sup>11</sup> A. Marra, J. Esnault, A. Veyrieres, P. Sinay, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, **114**, 6354-6360.
  - <sup>12</sup> P. Wang, P. Haldar, Y. Wang, H. Hu, *J. Org. Chem.* **72** (2007) 5870-5873.
  - <sup>13</sup> H. Yang, P. Wang, *J. Org. Chem.* **78** (2013) 1858-1863.
  - <sup>14</sup> P. Wang, Đ. Škalamera, X. Sui, P. Zhang, S. M. Michalek, *J. Med. Chem.* **62** (2019) 1669-1676.
  - <sup>15</sup> P. Wang, Đ. Škalamera, X. Sui, P. Zhang, S. M. Michalek, *ACS Infect. Dis.* **5** (2019) 974-981.
  - <sup>16</sup> R. Pal, A. Das, N. Jayaraman, *Chem. Commun.* **54** (2018) 588-590.
  - <sup>17</sup> R. Pal, A. Das, N. Jayaraman, *Pure Appl. Chem.* **91** (2019) 1-20.
  - <sup>18</sup> Y. Wang, X. Zhang, P. Wang, *Org. Biomol. Chem.* **8** (2010) 4322-4328.
  - <sup>19</sup> Y. Wang, X. Liang, P. Wang, *Tetrahedron Lett.* **52** (2011) 3912-3915.