

# Razvoj sintetskog puta za pripremu lipofilnih derivata desmuramil-dipeptida

---

**Nuić, Laura**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:728416>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-30**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Laura Nuić

# **Razvoj sintetskog puta za pripravu lipofilnih derivata desmuramil-dipeptida**

## **Diplomski rad**

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

Zagreb, 2021.



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



## Zahvale

*Sve ima svoj početak i kraj. Došlo je vrijeme da zatvorim jedno neprocjenjivo životno poglavlje. Postoje ljudi koji su mi pomogli da dođem do ovog mjesta na kojem stojim ponosno i da postanem ono što sam danas i želim im se od srca zahvaliti.*

*Riječima ne mogu opisati zahvalnost koju osjećam prema mentorici doc. dr. sc. Željki Car. Hvala Vam ponajviše na povjerenju koje ste mi pružili da se igram, učim i rastem. Pokazali ste mi kako pristupiti znanstvenom pitanju i pronaći odgovore, kako razmišljati kao znanstvenica kao i postati jedna. Uz Vaše mentorstvo izrada ovog rada bilo je predivno iskustvo koje me uveliko svakodnevno ispunjavalo. Vaša energija i strast prema znanosti neizmjerena su motivacija. Hvala Vam na nesebičnom prijenosu znanja i iskustava, strpljivom usmjeravanju kako u znanosti tako i u životu. Veliko Vam hvala što ste vjerovali u mene kao i pruženju utjesi u manje uspješnim trenucima.*

*Posebnu zahvalu upućujem izv. prof. dr. sc. Vesni Petrović Peroković na povjerenju, omogućenom volontiranju, uloženom vremenu, razgovorima, ugodnoj i poticajnoj radnoj atmosferi, ohrabivanju te prenesenom znanju tijekom čitavog studiranja. Vaša ljubav prema poslu i želja da prenesete znanje potaknule su me da se dodatno trudim i da rastem kao znanstvenica.*

*Od srca Vam se zahvaljujem, doc. dr. sc. Željka Car i izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković, na svemu što ste napravile za mene, na Vašem vodstvu te što sam mogla biti Vaše laboratorijsko dijete. Hvala Vam na znanstvenom odgoju kojeg ste uložili u mene i inspirirali da se nastavim dalje baviti znanošću. Moja ljubav prema kemiji, prema znanosti općenito, zbog Vas je dosegla nebesa i uvijek ćete imati posebno mjesto u mom srcu.*

*Hvala svim zaposlenicima Zavoda za organsku kemiju što ste mi ovaj dugogodišnji put učinili zabavnim i poučnim.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Ivanki Jerić na pruženju prilici kao i cijelom laboratoriju za biomimetičku kemiju na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju na Institutu Ruđer Bošković na iskustvu koje sam stekla i dodatno proširila svoje znanje.*

*Hvala svim prijateljima koji su uz mene, svim 'mojima' zbog kojih sam uvijek svoja. Hvala Vam za sva druženja, smijeh, uspomene, podrške i savjete. Hvala vam što ste dijelili ovo putovanje sa mnom i ispunili ga radosnim i nezaboravnim trenucima.*

*Hvala Matiji na neizmjernom strpljenju, podršci i svim predivnim trenucima. Hvala ti što si dio mog života i što sam uz tebe najbolja verzija sebe.*

*Najveće zahvale upućene su mojim predivnim roditeljima na nesebičnosti, požrtvovnosti i velikom odricanju za mene tijekom cijelog života. Hvala Vam na bezuvjetnoj ljubavi i podršci, moj ste najveći oslonac. Hvala Vam na najboljem poklonu, mojoj sestri Petri koja mi uvijek čuva leđa. Hvala ti Petra što mi život činiš ljepšim i nasmijanim.*

Laura



# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Imunološka uloga derivata muramil-dipeptida.....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Muramil-dipeptidi .....	3
2.1.1.1. Mehanizam imunostimulirajućeg djelovanja muramil-dipeptida.....	5
2.1.2. Desmuramil-dipeptidi .....	6
2.1.2.1. Adamantilni derivati desmuramil-dipeptida.....	7
<b>2.2. Sinteza peptida .....</b>	<b>9</b>
2.2.1. Značaj peptida.....	9
2.2.2. Zaštitne skupine u sintezi peptida .....	11
2.2.3. Kondenzacija aminokiselina .....	13
2.2.3.1. Metoda I: Kondenzacija preko mješovitog anhidrida .....	15
2.2.3.2. Metoda II: Kondenzacija preko simetričnog anhidrida ili aktiviranog estera .....	16
2.2.3.3. Metoda III: Kondenzacija preko aktiviranog estera .....	19
<b>2.3. Sinteza triazola klik-reakcijom.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4. Sinteza amina.....</b>	<b>23</b>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. Materijali i metode.....</b>	<b>26</b>
3.1.1. Kemikalije i otapala .....	26
3.1.2. Metode.....	27
<b>3.2. Sinteza lipofilnih aminskih prekursora.....</b>	<b>28</b>
3.2.1. Sinteza (adamantil-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-ilmetanamina.....	28
3.2.1.2. Priprava tert-butil-((1-adamantan-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metilkarbamata (2) <sup>26</sup> .....	29
3.2.1.3. Priprava (adamantan-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metilamonijevog trifluoracetata (3) <sup>26</sup> .....	30
3.2.2. Sinteza dodecilamina .....	31
3.2.2.1. Priprava dodecil-azida (4) <sup>27</sup> .....	31
3.2.2.2. Priprava dodecilamina (5) <sup>28</sup> .....	32
3.2.3. Sinteza 3 $\beta$ -amino-kolest-5-ena.....	33
3.2.3.1. Priprava 3 $\beta$ -mesiloksikolesta-5-ena (6) <sup>29</sup> .....	33
3.2.3.2. Priprava 3 $\beta$ -azidokolest-5-ena (7) <sup>29</sup> .....	34



3.2.3.3. Pokušaj pripreve $3\beta$ -aminokolest-5-ena ( <b>8</b> ) redukcijom azida <b>7</b> <sup>29</sup> .....	35
3.2.3.4. Pokušaj pripreve $3\beta$ -aminokolest-5-ena ( <b>8</b> ) iz kolesterola <sup>30</sup> .....	36
<b>3.3. Uklanjanje benzilne zaštite s dipeptida Boc-L-Ala-D-isoGln-OBn</b> <sup>31</sup> .....	<b>36</b>
<b>3.4. Metode amidacije Boc-L-Ala-D-isoGln-OH (9) lipofilnim prekursorima</b> .....	<b>37</b>
3.4.1. Metoda I.....	37
3.4.2. Metoda II.....	38
3.4.3. Metoda III.....	39
<b>3.5. Priprava adamantilnog derivata Boc-L-Ala-D-isoGln-OH (11) iz Boc-D-isoGln-OH</b> .....	<b>41</b>
3.5.1. Priprava adamantilnog derivata Boc-D-isoGln-OH ( <b>13</b> ) metodama amidacije II i III.....	41
3.5.2. Priprava adamantilnog derivata D-isoGln-OH u obliku TFA soli ( <b>14</b> ).....	43
3.5.3. Kondenzacija spoja <b>14</b> i Boc-L-Ala-OSu.....	44
<b>3.6. Opći postupak uklanjanja Boc zaštite s lipofilnih derivata dipeptida 10, 11 i 12 dobivenih različitim metodama amidacije</b> .....	<b>45</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>48</b>
<b>4.1. Uvod</b> .....	<b>48</b>
<b>4.2. Sinteza lipofilnih prekursora</b> .....	<b>49</b>
4.2.1. Sinteza adamantil-triazolnog prekursora <b>3</b> .....	49
4.2.2. Sinteza dodecilnog prekursora <b>5</b> .....	50
4.2.3. Pokušaj sinteze kolesterolskog amina <b>8</b> .....	50
<b>4.3. Sinteza adamantil-triazolnog derivata desmuramil-dipeptida</b> .....	<b>52</b>
<b>4.4. Sinteza adamantilnog derivata desmuramil-dipeptida</b> .....	<b>55</b>
<b>4.5. Sinteza dodecilnog derivata desmuramil-dipeptida</b> .....	<b>61</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>64</b>
<b>§ 6. LITERATURNI IZVORI</b> .....	<b>67</b>
<b>§ 7. DODATAK</b> .....	<b>XV</b>
<b>§ 8. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>XXXVI</b>



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### RAZVOJ SINTETSKOG PUTA ZA PRIPRAVU LIPOFILNIH DERIVATA DESMURAMIL-DIPEPTIDA

Laura Nuić

U sklopu diplomskog rada optimirana je metoda amidacije *tert*-butiloksikarbonil (Boc) zaštićenog dipeptida L-alanil-D-izoglutamina lipofilnim aaminskim prekursorima. Lipofilne su podjedinice (adamantil-triazolna, adamantilna, dodecilna) uvedene na bočni lanac D-izoglutamina (D-isoGln). Adamantilna podjedinica je uvedena na dipeptid preko komercijalno dostupnog 1-aminoadamantan hidroklorida i preko 1,2,3-triazolnog prstena, dobivenog bakrom(I) kataliziranom cikloadicijskom reakcijom iz Boc zaštićenog propargilamina. U toj reakciji je Boc zaštita uvedena *in situ* te naknadno uklonjena s trifluorocetenom kiselinom. Dodecilamin je pripremljen redukcijom odgovarajućeg azida s LiAlH<sub>4</sub>. Ispitane su tri metode amidacije. Osim iz kupovnog dipeptida adamantilna ciljna molekula izgrađena je potpuno drugačijim sintetskim pristupom uvođenjem 1-aminoadamantan hidroklorida na bočni ogranak Boc zaštićenog D-isoGln pomoću dvije najučinkovitije metode amidacije iz prethodnog pristupa. Zatim je uklonjena Boc zaštita te je lipofilni desmuramil-dipeptid dobiven konjugacijom s Boc zaštićenim *N*-hidroksisukcinimidnim esterom L-alanina. Kao i u koracima prije, Boc zaštita uklonjena je standardnim postupkom.

(102 stranica, 49 slika, 7 tablica, 32 literaturnih 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, adjuvanti, amidacija, desmuramil-dipeptid, dodecilamin, klik-reakcija

Mentor: doc. dr. sc. Željka Car

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Željka Car
  2. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
  3. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Datum diplomskog ispita: 15. 07. 2021.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF THE SYNTHETIC ROUTE FOR THE PREPARATION OF LIPOPHILIC DESMURAMYL DIPEPTIDE DERIVATIVES

Laura Nuić

In this Thesis the synthetic route for amidation of *tert*-butyloxycarbonyl (Boc) protected dipeptide L-alanyl-D-isoglutamine with lipophilic amine precursors was optimized. Lipophilic subunits (adamantyl triazolyl, adamantyl, dodecyl) were introduced at the D-isoglutamine (D-*iso*Gln) side chain. For the incorporation of adamantyl subunit commercially available 1-aminoadamantane hydrochloride was used. The same subunit was also incorporated through 1,2,3-triazole ring obtained *via* Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition from Boc protected propargylamine. Boc protection was achieved *in situ* and then removed with trifluoroacetic acid. Dodecylamine was obtained by reduction of corresponding azide derivative with LiAlH<sub>4</sub>. Three amidation methods were investigated next. Adamantyl desmuramyl dipeptide was also prepared by completely different route starting from the Boc protected D-*iso*Gln. Two most efficient, previously investigated, amidation methods were used for coupling of D-*iso*Gln side chain with 1-aminoadamantane hydrochloride in the first step. Boc protection was removed and dipeptide prepared by condensation with Boc protected *N*-hydroxysuccinimide ester of L-alanine. As in previous steps, Boc group was removed using standard procedure.

(102 pages, 49 figures, 7 tables, 32 references, original in Croatian)

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

Keywords: adamantane, adjuvants, amidation, click reaction, desmuramyl dipeptide, dodecylamine

Mentor: doc. dr. sc. Željka Car

Reviewers:

1. dr. sc. Željka Car, Assistant Professor
  2. dr. sc. Iva Juranović Cindrić, Professor
  3. dr. sc. Biserka Prugovečki, Professor
- Substitute: dr. sc. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor

Date of exam: 15 July 2021

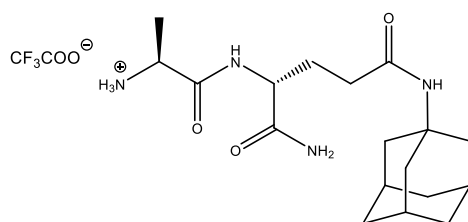


## § 1. UVOD

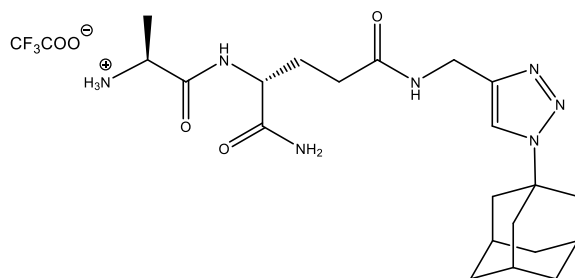
Imunostimulatori ili adjuvanti se definiraju kao tvari koje se dodaju cjepivima jer pojačavaju specifičnu imunoreakciju na određeni antigen. Muramil-dipeptid, *N*-acetilmuramil-*L*-alanil-*D*-izoglutamin, predstavlja najmanju strukturnu jedinicu peptidoglikana, građivnog materijala stanične stijenke bakterija, koja pokazuje imunostimulacijsku aktivnost. Međutim, zbog raznih nuspojava muramil-dipeptid se ne upotrebljava u kliničke svrhe zbog čega su pripremljeni brojni njegovi derivati i analozi. Istraživanja su pokazala da *N*-acetilmuramilni dio muramil-dipeptida nije ključan za imunostimulacijsku aktivnost i time otvorila vrata u svijet pripreve potencijalnih adjuvanata, desmuramil-dipeptida. Pažnju su privukli derivati koji sadrže lipofilne jedinice koje se mogu ugraditi u lipidni dvosloj membrana i liposoma, moćnog alata za olakšanu dostavu lijekova.<sup>1-4,6</sup> Dodatno se pokazalo da su lipofilni derivati muramil-dipeptida uspješni stimulatori NOD2 receptora, proteina ključnih za prepoznavanje patogena i regulaciju imunološkog odgovora.<sup>7</sup>

Cilj ovog diplomskog rada je razvoj metode za pripravu lipofilnih derivata desmuramil-dipeptida s potencijalnom imunostimulacijskom aktivnošću (slika 1). Velika pažnja se pridaje pronalasku najučinkovitije metode amidacije pripremljenih lipofilnih prekursora i karboksilne skupine izoglutamina te na optimizaciju sinteze lipofilnih prekursora. Desmuramil-dipeptid modificirat će se na bočnom lancu aminokiseline izoglutamina, a sadržavat će različite lipofilne supstituente: adamantansku jezgru, alifatski lanac i kolesterolsku jezgru. Adamantanska jezgra će biti uvedena direktno iz komercijalno dostupnog 1-aminoadamantan hidroklorida te u obliku (adamantan-1-il)-1,2,3-triazolne skupine koja će se pripremiti pomoću bakar(I) katalizirane cikloadicijske reakcije između 1-azidoadamantana i terminalnog alkina, propargilamina. U svrhu sinteze alifatskog i kolesterolskog prekursora reakcijom nukleofilne supstitucije će se prvotno transformirati funkcijske skupine odgovarajućih polaznih spojeva u azidni oblik kako bi se njihovom redukcijom dobili amini, dodecilamin i 3β-amino-kolest-5-en. Ispitat će se tri metode amidacije: *n*-butil-klorformijat uz *N*-metilmorfolin (NBCF/NMM), *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimid hidroklorid uz 1-hidroksibenzotriazol (EDC/HOBt) te *N*-[(dimetilamino)-1*H*-1,2,3-triazolo-[4,5-*b*]piridin-1-ilmetilen]-*N*-metilmetanaminijev heksafluorofosfat *N*-oksid uz diizopropiletilamin (HATU/DIPEA).

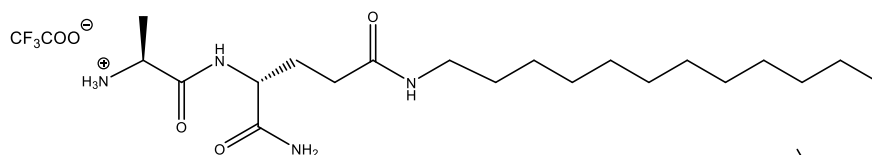
A)



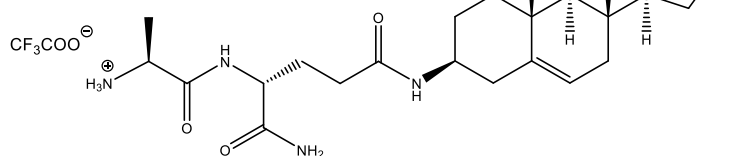
B)



C)



D)



Slika 1. Strukturne formule ciljnih molekula: A) adamantilni derivat desmuramil-dipeptida, B) adamantil-triazolni derivat desmuramil-dipeptida, C) dodecilni derivat desmuramil-dipeptida, D) kolesterolski derivat desmuramil-dipeptida.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

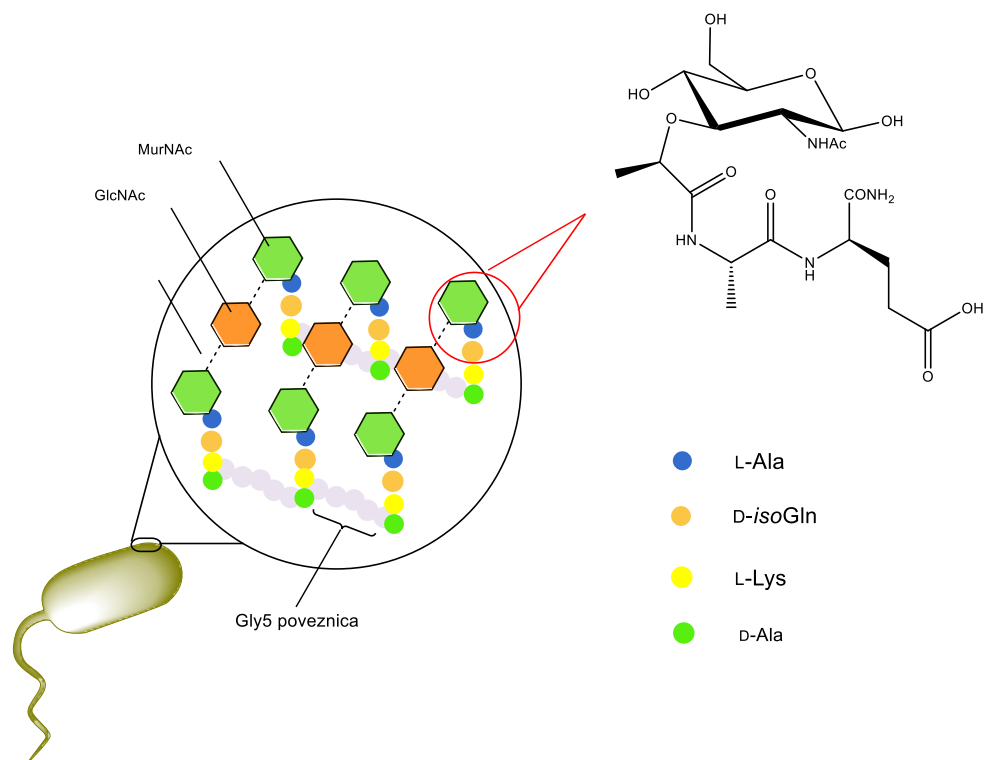
### 2.1. Imunološka uloga derivata muramil-dipeptida i desmuramil-dipeptida

#### 2.1.1. Muramil-dipeptidi

Imunizacijom, koja predstavlja preventivnu mjeru zaštite zdravlja pojedinca, stimulira se imunološki sustav čovjeka kako bi se razvio imunitet protiv određene zarazne bolesti. Davanje cjepiva, biološkog preparata koji pomaže u stvaranju otpornosti prema određenoj bolesti, najučinkovitija je metoda imunizacije. Cjepivo sadrži u osnovi oslabljene ili mrtve mikroorganizme, njihove dijelove ili toksine. Upotreba mrtvih organizama u cjepivima obično zahtijeva dodatak pomoćnih tvari, imunostimulatora, kako bi ona bila učinkovitija. Imunostimulatori ili adjuvanti pojačavaju imunogeničnost cjepiva, odnosno imunološki odgovor na određeni antigen. Postoji širok spektar spojeva koji pokazuju imunostimulirajuću aktivnost. Spojevi na bazi aluminijske soli, poput aluminijske hidroksida i aluminijske fosfata, su najčešće korišteni imunostimulatori u ljudskim cjepivima. Dobrim se izvorom adjuvanata, zbog učinkovitije i snažnije imunostimulirajuće aktivnosti, smatraju tvari bakterijskog podrijetla među kojima su i derivati muramil-peptida.<sup>1-3</sup>

Muramil-peptidi su fragmenti peptidoglikana, prirodnih polimera koji izrađuju stanične stijenke bakterija. Peptidoglikani su građeni od alternirajućih molekula *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i *N*-acetilmuraminske kiseline (MurNAc) međusobno povezanih  $\beta(1\rightarrow4)$  glikozidnom vezom te umreženi peptidnom (pentaglicinskom) poveznicom preko kratkih tetrapeptida vezanih na molekule *N*-acetilmuraminske kiseline. Muramil-dipeptid, *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin, predstavlja najmanju strukturnu jedinicu peptidoglikana koja pokazuje imunostimulirajuću aktivnost (slika 2), ali se klinički ne upotrebljava zbog svoje pirogenosti, artritogenosti, toksičnosti i slabe biodostupnosti. Priređeni su brojni derivati i analozi muramil-dipeptida kako bi se umanjile nuspojave koje izaziva te poboljšala imunostimulirajuća aktivnost. Postoji nekoliko derivata muramil-dipeptida koji se danas klinički upotrebljavaju kao imunostimulatori poput murabutida i mifamurtida.<sup>1,3-5</sup>



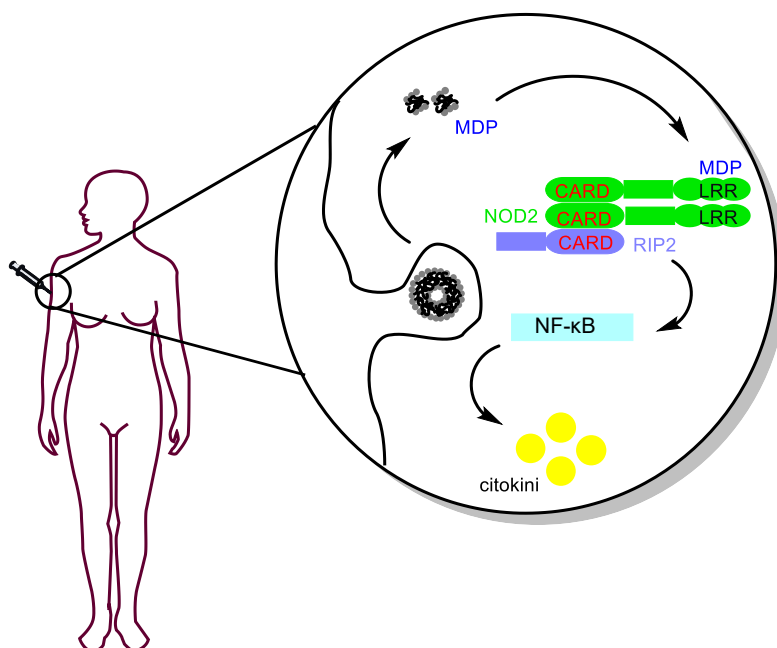


Slika 2. Muramil-dipeptid kao dio peptidoglikanske stanične stijenke bakterija

Sintezom mnoštva derivata muramil-dipeptida te ispitivanjem njihove imunostimulirajuće aktivnosti došlo se do nekoliko ključnih smjernica za dizajniranje adjuvanata temeljenih na muramil-dipeptidu. Promjena konfiguracije alanina rezultira nastankom inaktivnog spoja, dok zamjenom nekom drugom L-aminokiselinom, derivati i dalje pokazuju imunostimulirajuću aktivnost. Pozitivne rezultate pokazala je i zamjena D-izoglutamina nekom drugom D-aminokiselinom, ali je ključno i postojanje fragmenta od dvije metilenske skupine koje odvajaju slobodne ili supstituirane karboksilne kiseline. Uklanjanjem anomerne hidroksilne skupine ili zamjena iste s  $\alpha$ - ili  $\beta$ -metilnom skupinom ne dolazi do smanjenja imunostimulirajuće aktivnosti. Ukoliko se primarna hidroksilna skupina acilira ili zamijeni s amino- ili acilamino-skupinom, spojevi ne gube aktivnost. Amidna skupina na C-2 položaju N-acetilmuraminske kiseline je nužna, ali postoji i mogućnost zamjene nekom drugom acilamido-skupinom. Modifikacijom laktinog dijela N-acetilmuraminske kiseline ne dolazi do smanjenja imunostimulirajuće aktivnosti te su se tako priređeni spojevi pokazali manje toksičnim od muramil-dipeptida. Također se lipofilnost derivata pokazala kao bitan parametar u dizajniranju potencijalnih imunostimulatora.<sup>3,5</sup>

### 2.1.1.1. Mehanizam imunostimulirajućeg djelovanja muramil-dipeptida

Porodica citoplazmatskih proteina, NOD-proteini (proteini oligomerizacijske domene koji vežu nukleotide) predstavlja skupinu receptora koji prepoznaju patogene dospjele u stanice te igraju ključnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora. NOD1 specifično prepoznaje sekvenciju L-Ala-D-isoGln-mesoDAP, dok NOD2 prepoznaje fragment MurNAc-L-Ala-D-isoGln, odnosno muramil-dipeptid. Receptor NOD2 sastoji se od tri domene: aktivacijske domene za kaspazu (CARD), oligomerizacijske domene koja veže nukleotide i domene bogate leucinom (LRR) koja djeluje kao senzor muramil-dipeptida. Vežanje muramil-dipeptida odvija se u hidrofobnom utoru domene bogate leucinom te je za samu interakciju muramil-dipeptida i NOD2 receptora bitna uloga bočnih ogranaka aminokiselina arginina (Arg857), triptofana (Trp911) i serina (Ser913). Nakon detekcije muramil-dipeptida dolazi do složenih konformacijskih promjena receptora koje rezultiraju samooligomerizacijom, a time i CARD-CARD interakcijama sa enzimom RIP2 kinazom koja aktivira NF- $\kappa$ B proteinski kompleks. Aktivacija NF- $\kappa$ B kompleksa rezultira proizvodnjom citokina, odnosno imunološkim odgovorom (slika 3).<sup>1,3,4</sup>

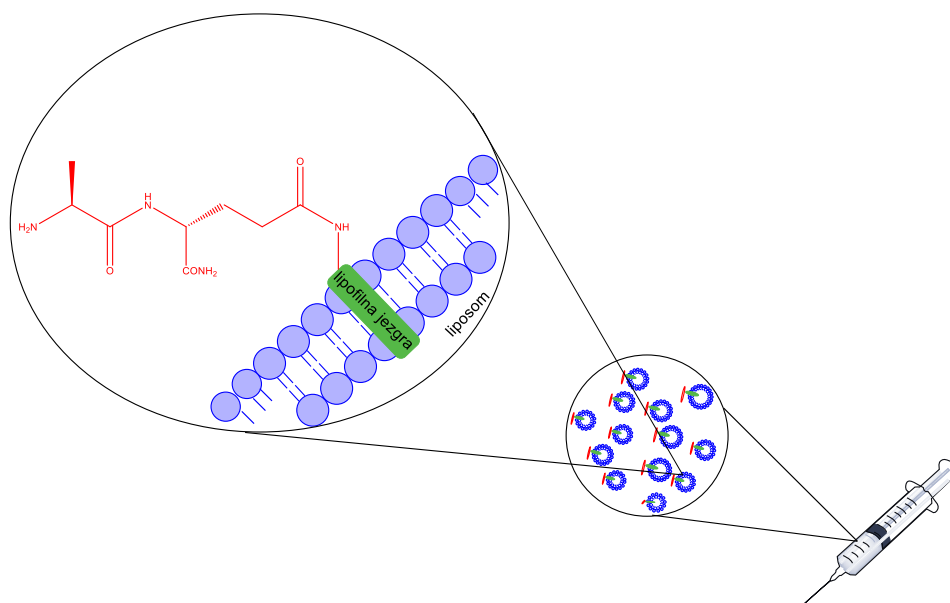


Slika 3. Prikaz imunostimulirajućeg djelovanja muramil-dipeptida

### 2.1.2. Desmuramil-dipeptidi

Istraživanja odnosa strukture i pripadne aktivnosti pokazala su da je farmakofor L-Ala-D-isoGln esencijalan za imunostimulirajuću aktivnost što je otvorilo vrata dizajnu i sintezi novih biološki aktivnih analoga muramil-dipeptida koji u svojoj strukturi ne sadrže *N*-acetilmuramilni dio, poznatijih kao desmuramil-dipeptidi.<sup>4</sup>

Ulazak desmuramil-dipeptida u stanicu odvija se pasivnom apsorpcijom koja je direktno ovisna o lipofilnosti molekule. Uvođenjem lipofilne jedinice u strukturu desmuramil-dipeptida je omogućena ugradnja u lipidni dvosloj membrana stanica i liposoma te dolazi do poboljšanja imunostimulirajuće aktivnosti. Liposomi su biorazgradive i netoksične fosfolipidne molekule koje se koriste kao nosači lijekova zbog sličnosti s biološkim membranama te sposobnosti ulaska u stanice. Strukturna svojstva liposoma omogućuju ugradnju hidrofилnih, hidrofobnih i amfifilnih lijekova raznovrsnih veličina molekula. Sastav, veličina, učinkovitost ugradnje i stabilnost važni su faktori za pripremu odgovarajućih formulacija nosača koji mogu utjecati na fizikalno-kemijska svojstva liposoma što se može odraziti na imunološki odgovor. Istraživanjima je potvrđeno kako liposomska formulacija (slika 4) može poboljšati biološku aktivnost tvari te su liposomi pronašli široku primjenu u cjepivima obzirom na njihovu sposobnost da stimuliraju imunološki sustav i olakšavaju dostavu lijekova.<sup>1,3-6,8,9</sup>



Slika 4. Prikaz liposomske formulacije korištene u cjepivima kao način dostave lijekova

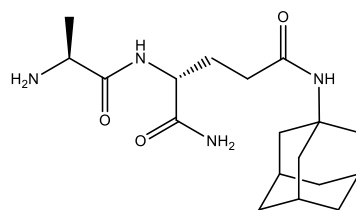
Jedan od razloga uvođenja lipofilnih podjedinica (adamantanska jezgra, alifatski lanac, kolesterolska jezgra) u strukturu desmuramil-dipeptida jest poboljšanje njihovih farmakoloških svojstava i njihove lipofilnosti čime bi se omogućila njihova ugradnja u lipidni dvosloj biomembrana ili sustava za dostavu lijekova, liposoma.<sup>10</sup> Time se omogućava uspješnost dostave potencijalnih imunostimulatora do stanica te je samim time njihova sinteza i ispitivanje opravdano.

### 2.1.2.1. Adamantilni derivati desmuramil-dipeptida

Adamantan je policiklička kavezasta molekula visoke simetrije te je najmanji predstavnik dijamantoida, skupine spojeva čija struktura nalikuje strukturi dijamanta.

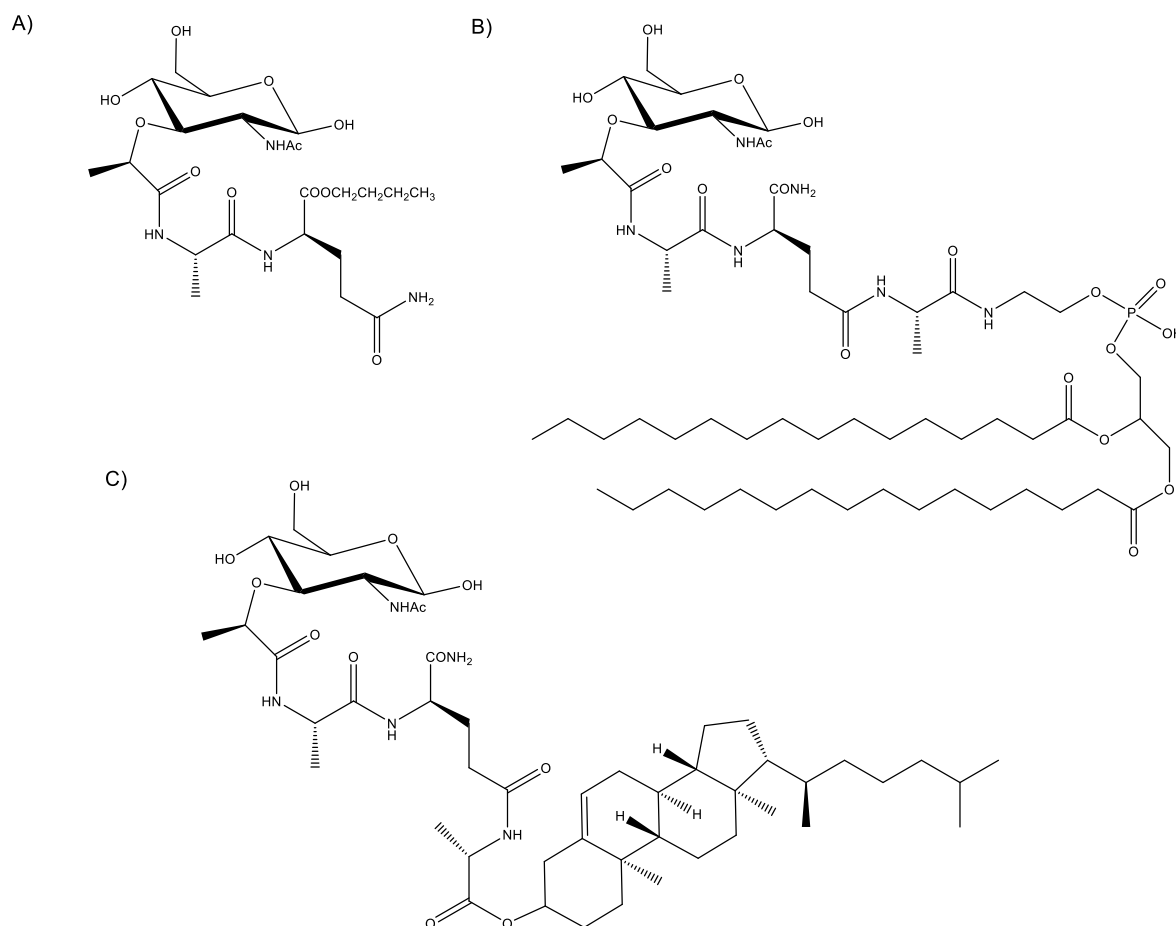
Istraživanja na adamantilnim derivatima danas su vrlo popularna jer ih je moguće primijeniti kao lijekove. Prvi adamantanski spoj primijenjen kao lijek bio je amantadin (1-aminoadamantan) koji je pokazao antivirusno djelovanje na virus gripe tipa A. Lijekovi na bazi adamantana koriste se kao antivirusna sredstva te u liječenju Parkinsonove i Alzheimerove bolesti. Jedinstvenost adamantanske jezgre za njezino uvođenje u strukturu raznih spojeva leži u njezinoj sposobnosti povećanja lipofilnosti i stabilnosti molekula te u poboljšanju njihovih farmakoloških svojstva. Dodatno, lipofilna adamantanska jezgra djeluje kao „sidro“ u lipofilnom dvosloju sustava za dostavu lijekova, liposoma pospješujući time prijenos lijeka preko staničnih membrana i dostavu aktivnih tvari do stanica.<sup>8,9</sup>

Literaturno je poznato nekoliko adamantilnih derivata desmuramil-dipeptida koji posjeduju imunostimulirajuću aktivnost. Uvođenjem lipofilne adamantanske jezgre na karboksilnu skupinu izoglutamina priređen je adamantilamid-dipeptid (AdDP, slika 5) koji se pokazao vrlo učinkovitim i netoksičnim imunostimulatorom u *in vivo* eksperimentima na miševima i kunićima.<sup>1,3</sup> *In vivo* učinak novih lipofilnih derivata usporedit će se sa aktivnošću AdDP koji se za provođenje eksperimenata treba pripremiti jer se ne radi o komercijalno dostupnom spoju.



Slika 5. Strukturna formula adamantilamid-dipeptida (AdDP)

Adamantilni desmuramil-dipeptidi do sada su bili vrlo proučavani za razliku od desmuramil-dipeptida s alifatskim lancem i kolesterolskom jezgrom kao lipofilnim jedinicama. Međutim, poznato je nekoliko derivata muramil-peptida sa spomenutim lipofilnim jedinicama koji se koriste u kliničke svrhe poput murabutida, mifamurtida i muramil-tripeptid-kolesterola (slika 6). Nepirogeni imunostimulator murabutid, derivat muramil-dipeptida s alifatskim lancem, poboljšava otpornost na mikrobne infekcije zbog mogućnosti interakcije sa stanicama koje sudjeluju u imunološkim reakcijama. Također se koristi i u eksperimentalnim cjevivima protiv tetanusa i virusa hepatitisa B. Mifamurtid, liposomski muramil-tripeptid fosfatidiletanolamin, koristi se za liječenje nemetastaziranog osteosarkoma.<sup>1,3,8</sup> Muramil-tripeptid-kolesterol je sposoban aktivirati citostatsku aktivnost makrofaga koji su odgovorni za antimikrobno, antiparazitno i antitumorsko djelovanje.<sup>11,12</sup>



Slika 6. Prikaz strukturnih formula: A) murabutida, B) mifamurtida, C) muramil-tripeptid-kolesterola

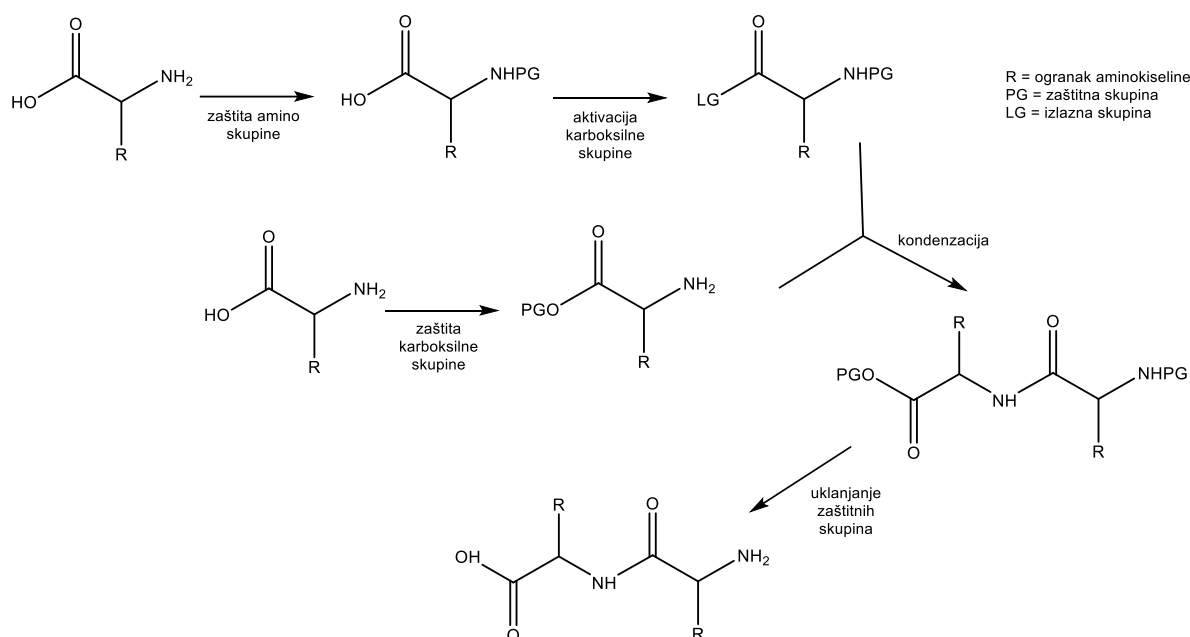
## 2.2. Sinteza peptida

### 2.2.1. Značaj peptida

Proteini i peptidi imaju ključnu ulogu u oblikovanju života obzirom da su sastavni dijelovi svake stanice. Sudjeluju u životno važnim biološkim procesima poput prijenosu tvari preko membrana, međustaničnoj komunikaciji, imunološkoj zaštiti organizma, staničnom disanju, prijenosu živčanih impulsa i brojnim drugim. Njihov veliki značaj razlog je sve većeg broja istraživanja za brzom i učinkovitom metodologijom njihove sinteze. Pronalaze primjenu u biomedicini, farmakologiji te prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.

Početak peptidne kemije obilježio je Emil Fischer, 1901. godine, sintetizirajući prvi nezaštićeni dipeptid, glicilglicin, reakcijom hidrolize diketopiperazina. Iako je Theodor Curtius, 1881. godine, sintetizirao prvi zaštićeni dipeptid, Emil Fischer uveo je pojam „peptid“ postajući tako ocem peptidne kemije i omogućio otvaranje vrata k istraživanju novog područja organske kemije. Bivši student E. Fischera, Max Bergmann, i Leonidas Zervas, 1932. godine, predstavili su novi pristup sintetske metode pripreme peptida upotrebom zaštitnih skupina.

Danas postoje dva glavna pristupa u sintezi peptida: sinteza u otopini i sinteza na krutom nosaču, iako se u osnovi oba temelje na istom principu, kondenzaciji aminokiselina. Postupak započinje zaštitom onih skupina koje ne sudjeluju u formiranju peptidne veze, odnosno zaštitom amino skupine jedne aminokiseline te zaštitom karboksilne skupine druge aminokiseline (slika 7). Aktivacijom karboksilne skupine pomoću kondenzacijskog reagensa te kondenzacijom s drugom zaštićenom aminokiselinom dolazi do formiranja peptidne veze, a potom se selektivnim uklanjanjem zaštitnih skupina sintetizira željeni dipeptid. Navedena metoda je zahtjevna i dugotrajna jer svaki korak u sintezi zahtijeva izoliranje, pročišćivanje i karakterizaciju produkta. Primjena navedenog pristupa pogodna je za sintezu manjih peptida, a glavna prednost leži u dobivanju konačnog produkta visoke čistoće. Navedeni nedostaci razlog su okretanju drugom pristupu sinteze peptida na krutom nosaču.



Slika 7. Shematski prikaz sinteze peptida u otopini

Revolucionarna metodologija sinteze peptida na krutom nosaču koju je razvio Robert. B. Merrifield, 1963. godine, omogućila je praktičniju sintezu peptida, pogotovo onih koji se sastoje od više aminokiselina. Sintetska metoda se temelji na konstrukciji peptida na aminokiselini pričvršćenoj na netopljivi inertni nosač. Prva aminokiselina koja je imobilizirana C-krajem na kruti nosač stupa u reakciju s drugom aminokiselinom koja ima aktiviranu karboksilnu skupinu i zaštićenu amino skupinu. Nakon reakcije kondenzacije slijedi uklanjanje zaštitne skupine s dobivenog peptida koji će u sljedećem ciklusu stvoriti peptidnu vezu sa novom aminokiselinom. Svaki pojedini korak u sintezi zahtijeva ispiranje. Princip metode temelji se na ponavljanju ciklusa „kondenzacija-ispiranje-uklanjanje zaštite-ispiranje“. Nakon završetka sinteze željenog peptida u posljednjem ciklusu cijepa se veza peptida i krutog nosača. Opisana metoda sinteze peptida danas je automatizirana, ali potreba za većim količinama aminokiselina i kondenzacijskih reagenasa kako bi se postiglo veće iskorištenje predstavlja ograničenje same metode. Obzirom na ograničenje broja aminokiselina, veće peptide moguće je sintetizirati korištenjem hibridnog postupka, kombinacije sinteze peptida u otopini i sinteze peptida na krutom nosaču, tako da se prvo na krutom nosaču sintetizira nekoliko manjih fragmenata peptida koji se potom spajaju u otopini.<sup>13,14,15</sup>

### 2.2.2. Zaštitne skupine u sintezi peptida

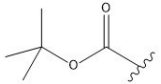
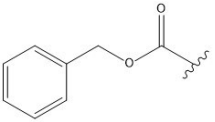
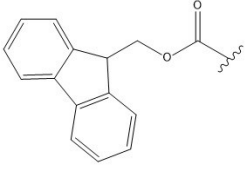
U mnogim sintezama osjetljivih organskih spojeva poput peptida, određeni dijelovi molekula odnosno funkcijske skupine ne mogu preživjeti kemijsko okruženje zbog čega ih je potrebno zaštititi. Potreba za zaštitnim skupinama, reverzibilno formiranih derivata određenih funkcijskih skupina u molekuli, posljedica je niske kemoselektivnosti većine reagenasa. Zaštitna skupina uvodi se s ciljem smanjenja reaktivnosti funkcijske skupine kako ne bi reagirale u sintetskim uvjetima kojima je molekula podvrgnuta što bi vodilo nastanku brojnih sporednih produkata i smanjenom iskorištenju željenog produkta. Priroda zaštitne skupine mora se pažljivo odabrati kako bi se osigurala odgovarajuća stabilnost u planiranim sintetskim koracima. Idealna zaštitna skupina mora zadovoljiti nekoliko uvjeta: jednostavno i selektivno uvođenje u visokom iskorištenju, stabilnost u širokom području reakcijskih uvjeta te jednostavno uklanjanje u visokom iskorištenju bez utjecaja na ostatak molekule s obnavljanjem polazne funkcijske skupine. Ne postoji idealna zaštitna skupina za zaštićivanje određene funkcijske skupine, već izbor ovisi o pojedinom spoju i njegovoj sintezi.<sup>16,17</sup>

Emil Fischer prvi je prepoznao važnost privremenog maskiranja funkcijskih skupina kako bi se postigla regioselektivnost. Međutim, prvu zaštitnu skupinu koja se i danas koristi u sintetskoj organskoj kemiji, benziloksikarbonilna skupina (Cbz ili Z), razvili su M. Bergmann i L. Zervas. Upotreba zaštitnih skupina je nužna u sintezi peptida kako bi se postigla selektivnost obzirom da aminokiseline sadrže dvije reaktivne funkcijske skupine, amino i karboksilnu skupinu. Određene aminokiseline sadrže i reaktivne skupine na bočnim ograncima koje mogu biti uzrok nastanku neželjenih produkata. Zaštitne skupine koje se primjenjuju u peptidnoj kemiji mogu se podijeliti u tri skupine obzirom zaštićuje li se njima  $\alpha$ -amino skupina, bočni ogranak ili  $\alpha$ -karboksilna skupina.<sup>16</sup>

Zaštita  $\alpha$ -amino skupine aminokiselina neophodna je u peptidnoj kemiji kako bi se blokirala reaktivnost, odnosno spriječile nepoželjne reakcije obzirom na bazičnost i nukleofilnost amino skupine. Najčešće korištena vrsta zaštite je karbamatna (uretanska), koja blokira amino skupinu da ne reagira s kiselinama i elektrofilima jer dolazi do delokalizacije elektronskog para s atoma dušika. Najčešći primjeri karbamatnih zaštitnih skupina su *tert*-butiloksikarbonilna (Boc), benziloksikarbonilna (Cbz) i 9-fluorenilmetiloksikarbonilna (Fmoc) skupina (tablica 1).

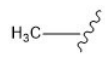

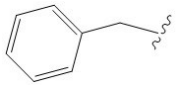


Tablica 1. Pregled najčešće korištenih zaštitnih skupina za  $\alpha$ -amino skupinu aminokiselina

Zaštitna skupina	Način uvođenja	Način uklanjanja
 <i>tert</i> -butiloksikarbonil- (Boc)	1) Boc <sub>2</sub> O, TEA-dioksan/H <sub>2</sub> O 2) Boc-ON, TEA-dioksan/H <sub>2</sub> O	1) TFA-DCM 2) HCl-dioksan 3) MeSO <sub>3</sub> H-dioksan
 benziloksikarbonil (Cbz)	1) CbzCl, NaOH/H <sub>2</sub> O 2) CbzOSu, NaOH-dioksan/H <sub>2</sub> O	1) H <sub>2</sub> -Pd/C 2) HBr-AcOH 3) BBr <sub>3</sub>
 9-fluorenilmetoksikarbonil (Fmoc)	1) FmocCl, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -dioksan/H <sub>2</sub> O 2) FmocOSu, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -dioksan/H <sub>2</sub> O	1) piperidin-DMF 2) morfolin-DMF 3) DEA-DMA

Također je potrebno zaštititi i  $\alpha$ -karboksilnu skupinu aminokiselina budući da je karbonilni ugljikov atom karboksilne skupine podložan nukleofilnom napadu, a vodikov atom kiselo-baznoj reakciji. Zaštita karboksilne skupine najčešće se provodi pripremom stabilnih estera koji ne hidroliziraju u uvjetima stvaranja peptidne veze. Najčešće korišteni su metilni (Me), *tert*-butilni (*t*-Bu) i benzilni (Bn) esteri (tablica 2).<sup>16,17</sup>

Tablica 2. Pregled najčešće korištenih zaštitnih skupina za  $\alpha$ -karboksilnu skupinu aminokiselina

Zaštitna skupina	Način uvođenja	Način uklanjanja
 metil- (Me)	1) MeOH, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2) Me <sub>3</sub> SiCl, MeOH	1) LiOH 2) NaOH
 <i>tert</i> -butil- (Boc)	1) izobuten, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2) <i>t</i> -BuOH, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /MgSO <sub>4</sub>	1) TFA-DCM 2) HCl-dioksan
 benzil- (Bn)	1) BnOCOCi/py/DMAP 2) BnOH/py	1) H <sub>2</sub> -Pd/C 2) HF

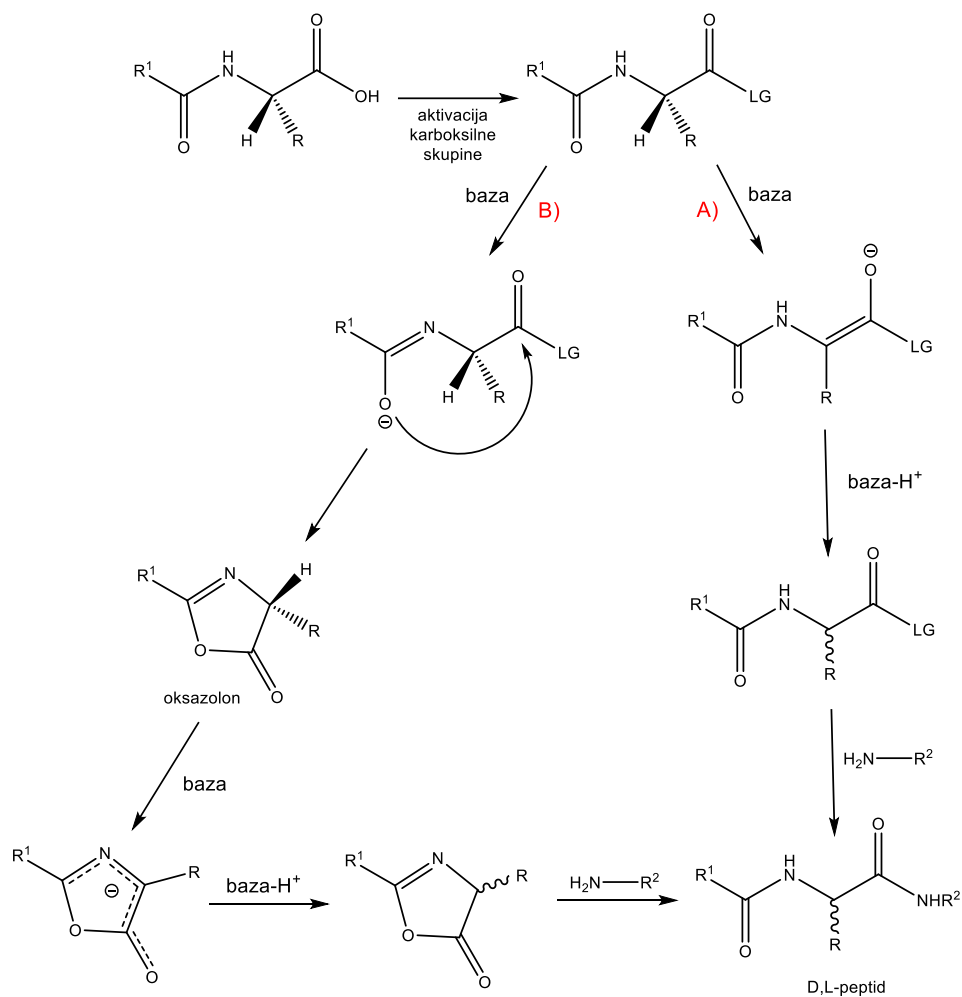
### 2.2.3. Kondenzacija aminokiselina

Stvaranje amidne veze fundamentalno je važna reakcija u organskoj sintezi te ima značajnu ulogu u biološkom svijetu. Peptidna veza je po svojoj kemijskoj prirodi amidna veza i definira se kao poveznica građivnih blokova peptida, aminokiselina. Peptidna veza se može sintetizirati kondenzacijskom reakcijom karboksilne i amino skupine aminokiselina, no njihovo spajanje praćeno gubitkom vode spontano je samo pri visokim temperaturama ( $> 200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) pri kojima je i veća vjerojatnost odvijanja neželjenih reakcija.

Aktivacija karboksilne skupine, proces prevođenja hidroksilne skupine u bolju izlaznu skupinu kako bi se povećala elektrofilnost karbonilnog ugljikovog atoma prije nukleofilnog napada amino skupine druge aminokiseline, ključan je korak u sintezi peptida kako bi došlo do nastanka peptidne veze. Aktivacija podrazumijeva prevođenje karboksilne funkcijske skupine u acil-halogenid, anhidrid, ester ili drugi reaktivniji derivat pomoću kondenzacijskog reagensa. Širok je spektar postojećih kondenzacijskih reagenasa, a idealnim se smatra jeftini, široko dostupni, netoksični, sigurni, jednostavni za rukovanje te jednostavni za uklanjanje iz reakcijske smjese. Pravilan odabir odgovarajućeg kondenzacijskog reagenasa ovisi o polaznim spojevima te je pri izboru potrebno uravnotežiti prethodno spomenute uvjete s ponovljivošću reakcije, visokim iskorištenjem i selektivnošću.<sup>18,19,20</sup>

Reakciju kondenzacije uz aktivaciju karboksilne skupine aminokiseline moguće je provesti na nekoliko načina. Jedan način aktivira karboksilnu skupinu *in situ*, dok drugi podrazumijeva pripremu i prethodnu izolaciju aktiviranog karbonilnog spoja.<sup>21</sup>

Mogućnost racemizacije u koraku aktivacije karboksilne skupine aminokiseline predstavlja veliki problem te se javlja potreba za njenom kontrolom. Uzrok racemizacije leži u potencijalnom gubitku kiralnosti  $\alpha$ -ugljikovog atoma aminokiseline. Dva su najčešća mehanizma racemizacije aminokiselina u baznim uvjetima: mehanizam direktne enolizacije (slika 8, A) i mehanizam stvaranja oksazolona (slika 8, B).<sup>20,21</sup>

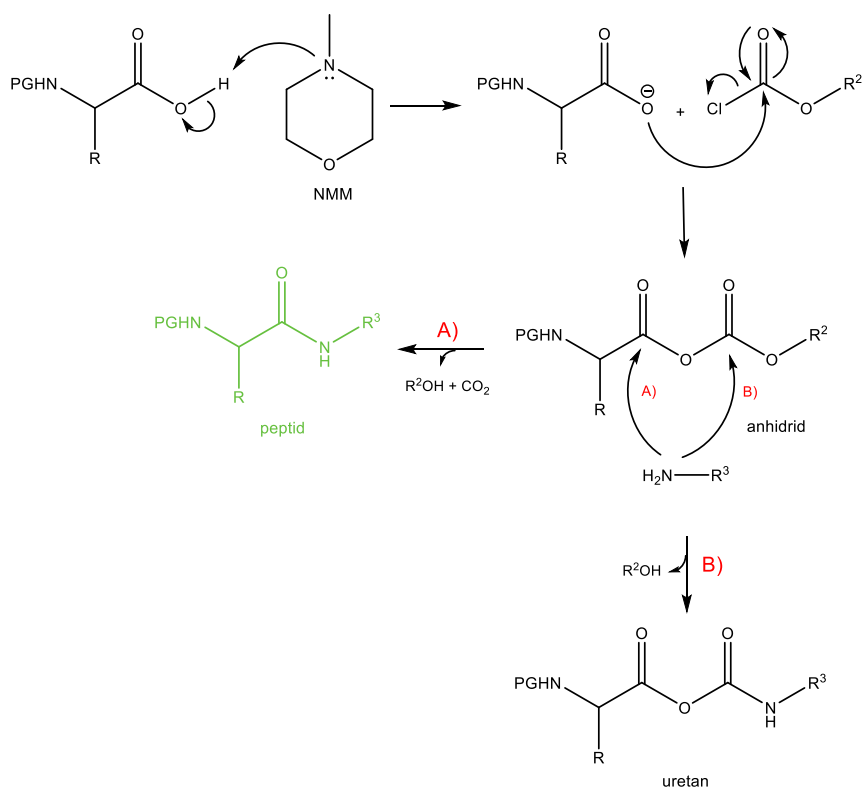


Slika 8. Shematski prikaz racemizacijskih mehanizama koji se često javljaju u reakcijama kondenzacije aminokiselina: A) direktna enolizacija, B) stvaranje oksazolona

Postoje brojne vrste kondenzacijskih reagenasa koje je moguće koristiti u svrhu aktivacije karboksilne skupine aminokiselina kao i samih metoda na kojima se određeni reagensi temelje. U daljnjem tekstu detaljnije će se obraditi oni koji su korišteni u ovom radu kako bi se pronašla najbolja sintetska metoda za pripremu ciljnih lipofilnih derivata desmuramil-dipeptida.

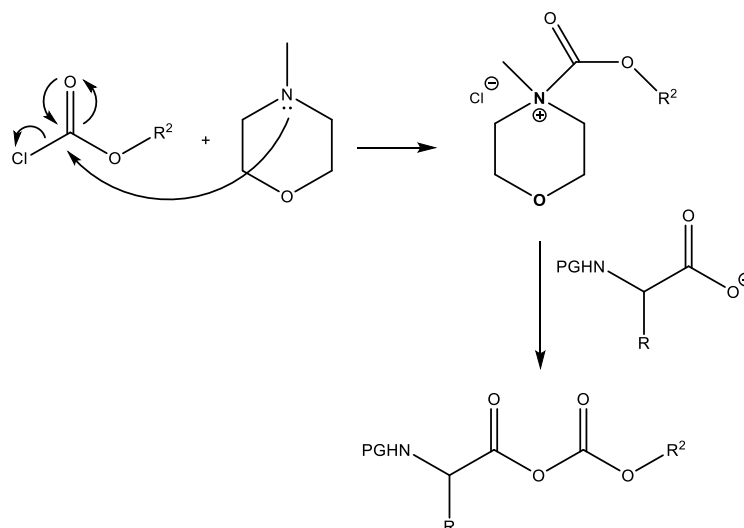
## 2.2.3.1. Metoda I: Kondenzacija preko mješovitog anhidrida

Metoda pripreme peptidne veze pretvorbom karboksilne skupine u mješoviti anhidrid koju je razvio J. R. Vaughan, koristi odgovarajući klorformijat i terciarni amin poput *N*-metilmorfolina (NMM) kao bazu. Aktivacija i nastanak anhidrida odvija se vrlo brzo, u nekoliko minuta, nakon čega slijedi i brza kondenzacijska reakcija. Navedena metoda osim željenog peptida rezultira i formiranjem uretana koji je nastao nukleofilnim napadom amino skupine aminokiseline na dio anhidrida koji potječe od klorformijatnog reagensa (slika 9) što može i do 10 % smanjiti iskorištenje reakcije. Uspjeh metode ovisi o uvjetima pri kojima se reakcija provodi. Mnogo pažnje je bilo posvećeno definiranju uvjeta koji minimiziraju racemizaciju te je opaženo da je najpogodnije provođenje reakcije pri niskim temperaturama pri svim fazama reakcije s kratkotrajnom aktivacijom koristeći *N*-metilmorfolin kao bazu. Također, utvrđeno je da korištenje slabije i manje sterički ometene baze rezultira slabijom izomerizacijom  $\alpha$ -ugljikovih atoma zbog čega se često koristi upravo *N*-metilmorfolin kao baza.<sup>20</sup>



Slika 9. Prikaz mehanizma stvaranja peptidne veze uz odgovarajući klorformijat kao kondenzacijski reagens: A) željeni peptid, B) nastajanje sporednog produkta (uretana)

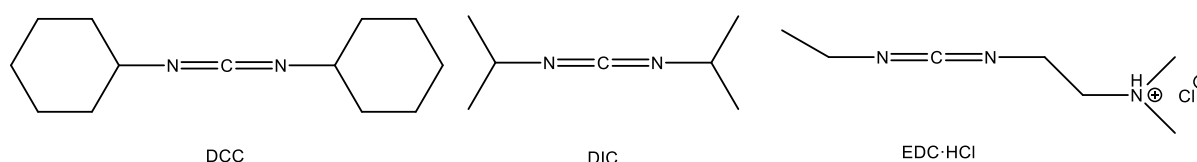
Postoje dokazi koji podržavaju još jedan mogući mehanizam navedene metode gdje korišteni tercijarni amin može biti nukleofil te napadom na klorformijatni reagens daje acil-morfolinijev kation koji potom može reagirati s karboksilatom dajući mješoviti anhidrid (slika 10).<sup>20</sup>



Slika 10. Prikaz drugog mogućeg mehanizma aktivacije karboksilne skupine u metodi I

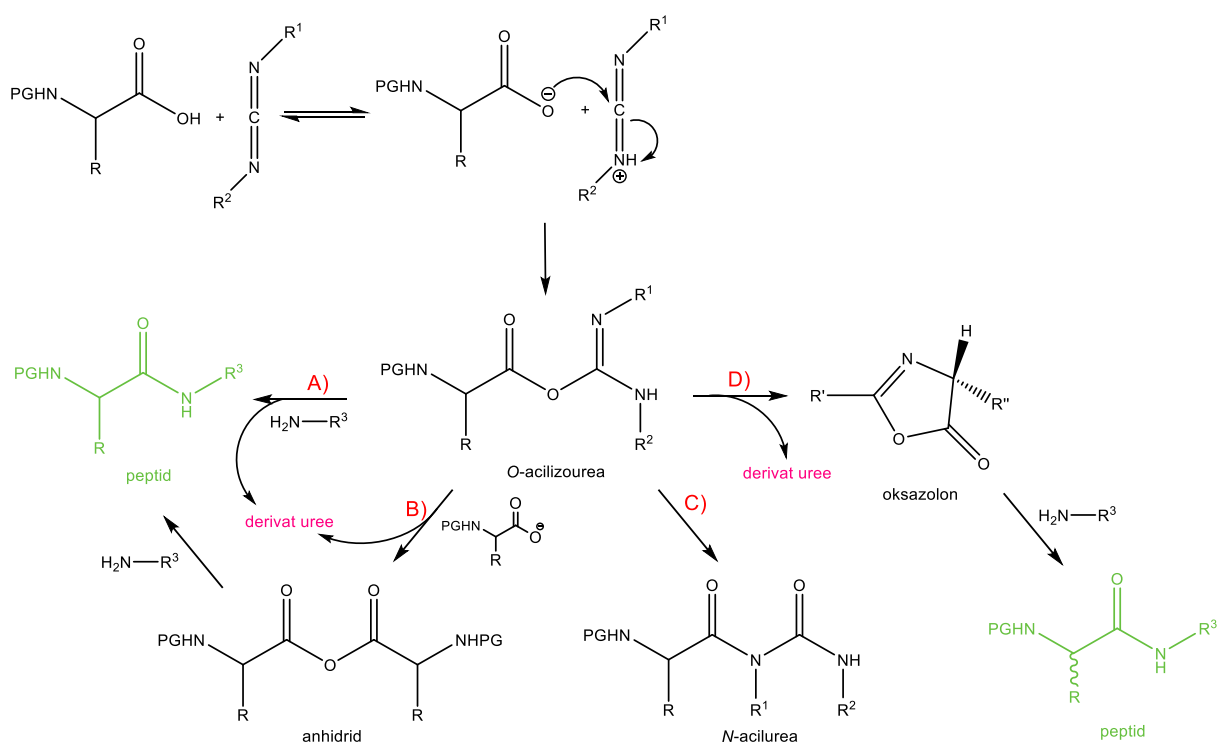
### 2.2.3.2. Metoda II: Kondenzacija preko simetričnog anhidrida ili aktiviranog estera

Najčešće korišteni pristup za formiranje peptidne veze primjenjuje karbodiimidne reagense za aktivaciju karboksilne skupine aminokiselina koji su u upotrebi još od 1955. godine. Karbodiimidi predstavljaju važnu klasu spojeva za pripravu amidne veze prevođenjem karboksilne kiseline u simetrični anhidrid ili u aktivirani ester. Prvi karbodiimid koji je svoju upotrebu pronašao u sintezi peptida bio je *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC) koji je danas znatno zamijenjen drugim aktivacijskim reagensima poput *N,N'*-diizopropilkarbodiimida (DIC) i *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimid hidroklorida (EDC · HCl) (slika 11).



Slika 11. Prikaz strukturnih formula najčešće korištenih karbodiimidnih reagenasa

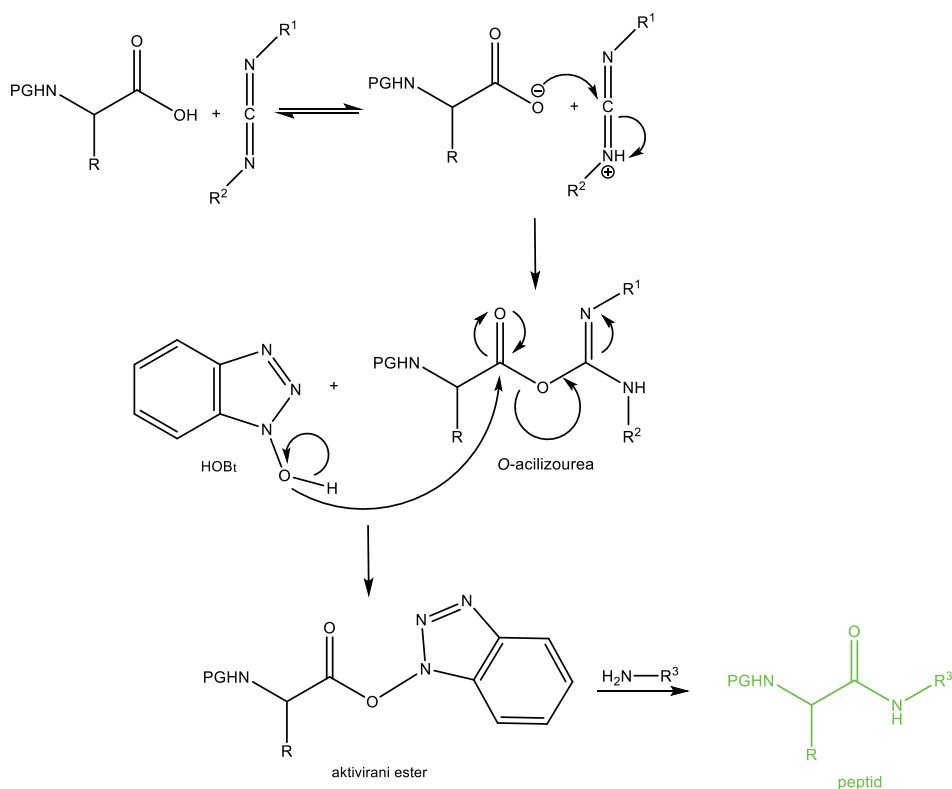
Mehanizam započinje prijenosom protona s karboksilne skupine na karbodiimidni dušikov atom dajući ionski par nakon čega slijedi nukleofilni napad karboksilata na karbodiimidni ugljikov atom što rezultira nastankom vrlo reaktivnog međuprodukta, *O*-acilizouree, koji može reagirati na nekoliko načina (slika 12). Nukleofilnim napadom amino skupine na reaktivni međuprodukt nastaje željeni peptid i odgovarajuća urea kao sporedni produkt (slika 12, A). Reaktivni međuprodukt može biti podvrgnut i nukleofilnom napadu karboksilata što rezultira nastankom simetričnog anhidrida koji u reakciji s amino skupinom kao nukleofilom također daje željeni peptid (slika 12, B). Moguća je i ireverzibilna reakcija pregradnje *O*-acilizouree kojoj nastaje neželjeni produkt, *N*-acilurea (slika 12, C), koju je moguće usporiti provođenjem reakcije pri sniženim temperaturama i odabirom otapala niže dielektrične konstante poput diklormetana. Korištenjem nekih karbodiimida poput *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimida postoji mogućnost dodatnog puta gdje dolazi do ciklizacije reaktivnog međuprodukta koji rezultira nastankom oksazolona (slika 12, D). Nastajanje oksazolonskog prstena rezultirati će željenim peptidom u reakciji s amino skupinom kao nukleofilom, ali kao što je već spomenuto uzrokuje racemizaciju.



Slika 12. Mogući mehanizmi aktivacije karboksilne skupine karbodiimidnim reagensom

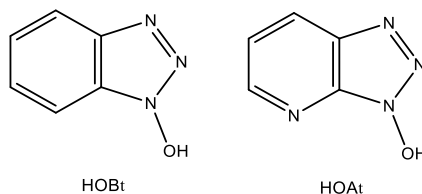
Pogonska sila kondenzacijske reakcije aminokiselina uz karbodiimidni reagens je nastanak odgovarajućeg derivata uree. Međutim, nastanak spomenutog sporednog produkta može predstavljati problem prilikom izolacije željenog produkta. *N,N'*-dicikloheksilurea, glavni nusprodukt koji nastaje u reakcijama s *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimidom, ima vrlo ograničenu topljivost u većini organskih otapala zbog čega se koriste drugi karbodiimidni kondenzacijski reagensi. Derivat uree koji nastaje u reakcijama s EDC reagensom topljiv je u vodi te se vrlo lako uklanja ekstrakcijom.

Dodavanjem pomoćnih reagenasa ili aditiva smanjuje se udio neželjenog nusprodukta *N*-aciluree i mogućnost racemizacije zbog povećanja brzine kondenzacijske reakcije aminokiselina. Aditivi imaju sposobnost protoniranja međuprodukta, *O*-acilizouree, generirajući odgovarajući aktivni ester koji u reakciji s amino skupinom druge aminokiseline kao nukleofilom daje željeni peptid (slika 13). Upotrebom aditiva povećava se iskorištenje reakcije.



Slika 13. Mehanizam aktivacije karboksilne skupine karbodiimidom uz HOBt kao aditiv

Najčešće korišteni aditivi su 1-hidroksibenzotriazol (HOBt) i 1-hidroksi-7-azabenzotriazol (HOAt) čije su strukturne formule prikazane na slici 14. Međutim, benzotriazolni derivati vrlo su eksplozivni zbog čega je njihova upotreba ograničena.<sup>18,19,20,21</sup>



Slika 14. Strukturne formule najčešće korištenih aditiva

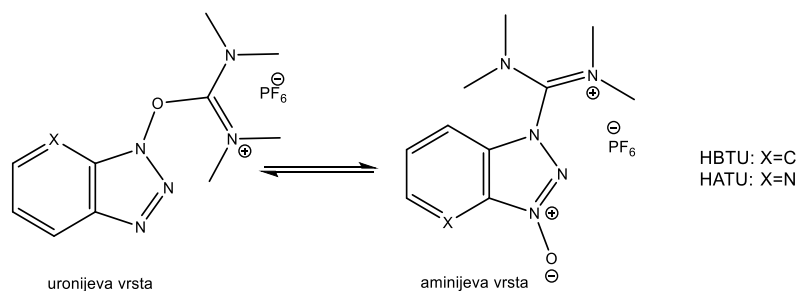
U današnje vrijeme karbodiimidni reagensi sve se više zamjenjuju fosfonijevim solima i aminijevim/uronijevim solima koje već u strukturi sadrže aditive.

#### 2.2.3.3. Metoda III: Kondenzacija preko aktiviranog estera

Reakciju kondenzacije aminokiselina moguće je provesti prevođenjem karboksilne skupine u aktivirani ester korištenjem reagenasa koji u svojoj strukturi sadrže benzotriazolnu podjedinicu u obliku soli. Aktivirani aromatski esteri jednostavnije se hidroliziraju od alkilnih estera te su skloniji reakcijama s nukleofilima zbog povećane elektrofilnosti karbonilnog ugljikovog atoma. Postoji nekoliko vrsta soli na bazi benzotriazola među kojima se ističu soli s fosfonijevim te aminijevim/uronijevim kationom.

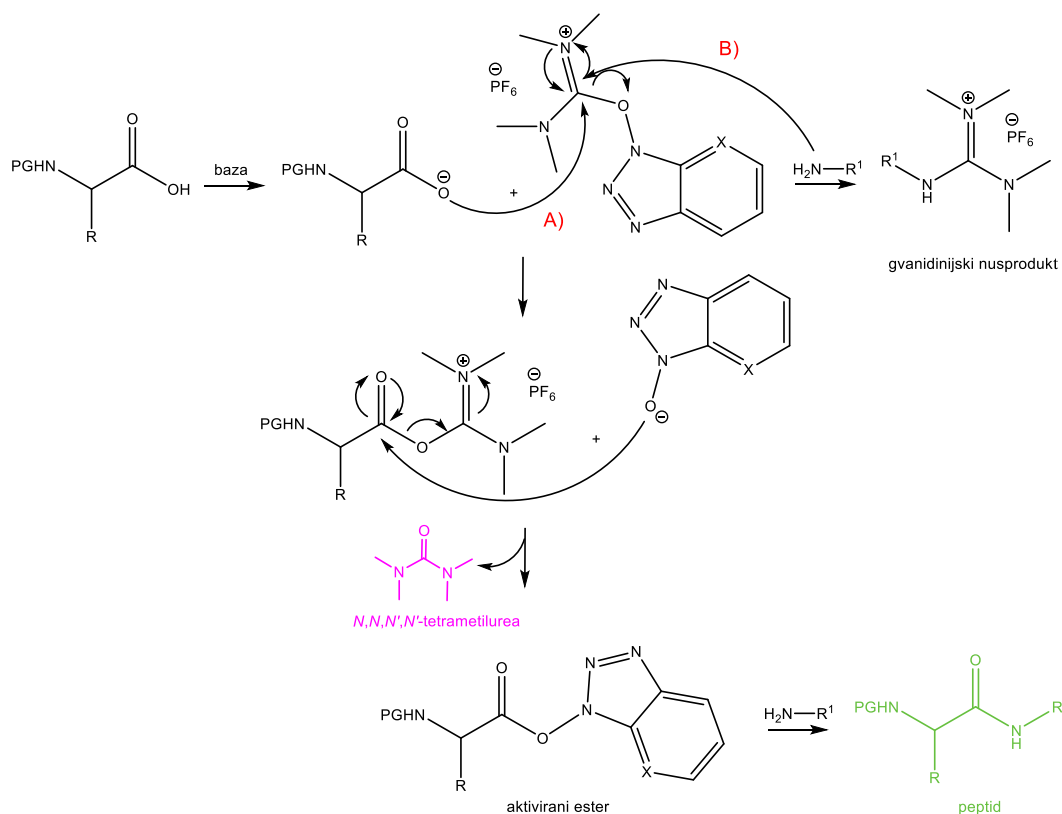
Nova obitelj kondenzacijskih reagenasa razvila se oko benzotriazola na bazi uronijeve soli, odnosno njihovih izomera benzotriazola na bazi aminijeve soli među kojima se ističu *O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronijev heksafluorofosfat (HBTU) i *N*-[(dimetilamino)-1*H*-1,2,3-triazolo-[4,5-*b*]piridin-1-ilmetilen]-*N*-metilmetanaminijev heksafluorofosfat *N*-oksid (HATU). Reagens HATU omogućava bržu kondenzaciju s većim iskorištenjima i minimalnom racemizacijom te je vrlo učinkovit za kondenzaciju sterički ometanih molekula. U otopini se, uronijeva vrsta nalazi u ravnoteži s aminijevom vrstom (slika 15). Istraživanjima je pokazano kako protuion nema utjecaja na ishod reakcije.





Slika 15. Prikaz ravnoteže između uronijeve i aminijeve vrste

Aktivacija karboksilne skupine aminokiseline pomoću kondenzacijskih reagenasa na bazi uronijeve/aminijeve soli započinje formiranjem karboksilata pomoću baza poput trietilamina (TEA) ili *N,N*-diizopropiletilamina (DIPEA). Nastali karboksilat će potom nukleofilno napasti kondenzacijski reagens što rezultira nastankom aktiviranog estera koji u reakciji s amino skupinom druge aminokiseline kao nukleofilom daje željeni peptid (slika 16, A). Pokretačka sila za aktivaciju je nastanak nusprodukta *N,N,N',N'*-tetrametiluree. Moguća je i neželjena reakcija nukleofilnog napada amino skupine na kondenzacijski reagens koja rezultira nastankom gvanidinijskog nusprodukta (slika 16, B).<sup>18,19,21</sup>

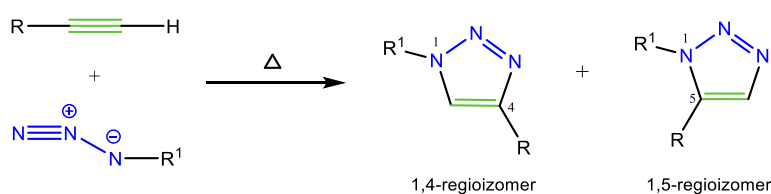


Slika 16. Mehanizam aktivacije karboksilne skupine s uronijevom/aminijevom soli

### 2.3. Sinteza triazola klik-reakcijom

Pojam klik-kemije uveli su znanstvenici K. B. Sharpless, M. G. Finn i H. C. Kolb početkom 21. stoljeća definirajući uvjete koje je potrebno zadovoljiti kako bi se neka reakcija smatrala klik-reakcijom. Riječ je o reakcijama širokog raspona primjene i visokog iskorištenja koje se odvijaju u jednostavnim uvjetima te koje su stereospecifične (ne nužno i enantioselektivne). Polazni materijali moraju biti pristupačni, a korištena otapala neškodljiva i lako uklonjiva, dok produkti moraju biti stabilni, a njihova izolacija jednostavna. Postoji široka paleta kemijskih reakcija koje zadovoljavaju definirane uvjete, no najzastupljenija i reprezentativan primjer klik-reakcije je 1,3-dipolarna cikloadicija azida i terminalnih alkina.

Reakcija terminalnog alkina kao dipolarofila i azida kao 1,3-dipola uz nastajanje peteročlanog triazolnog prstena, poznatija kao Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija, je u odsutnosti pogodnog katalizatora prilično spora, zahtijeva visoke temperature te rezultira nastankom smjese dva regioizomera, 1,4- i 1,5-disupstituiranog 1,2,3-triazola (slika 17).

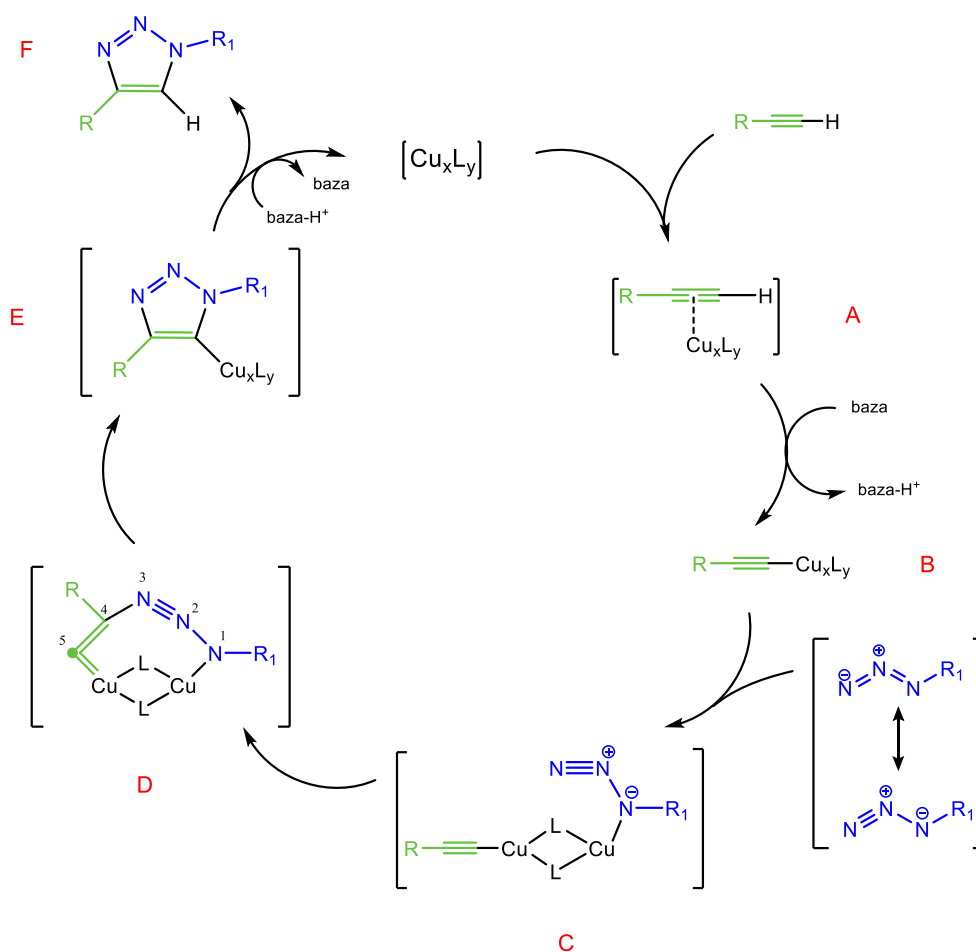


Slika 17. Nekatalizirana Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija

Uvođenje bakra kao katalizatora predstavlja ključ poboljšanja regioselektivnosti Huisgenove cikloadicije zbog značajnog povećanja brzine reakcije čime kao glavni produkti sinteze nastaju 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli. Azid-alkinska cikloadicija katalizirana bakrom(I) (CuAAC, engl. *Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*) utjelovljuje koncept klik-kemije u potpunosti te je postala sinonim brze i jednostavne sintetske metode sa širokim područjem primjene.

Svestranost azid-alkinske cikloadicije katalizirane bakrom(I) koja se može odvijati unutar širokog raspona temperatura i pH vrijednosti izazvala je veliki interes za objašnjenjem mehanizma reakcije.

Prema pretpostavljenom mehanizmu u prvom koraku nastaje  $\pi$ -kompleks bakra(I) i alkina (slika 19, A) nakon čega slijedi deprotoniranje terminalnog alkina i nastanak međuprodukta, bakrova(I) acetilida (slika 19, B). Međuprodukt koordinira azid formirajući azid-acetilidni kompleks (slika 19, C) koji će potom biti nukleofilno napadnut od strane terminalnog dušikovog atoma azida. Navedenom reakcijom nastaje šesteročlana metalociklička struktura (slika 19, D) čijom pregradnjom nastaje bakrov triazolilni kompleks (slika 19, E). Protoniranjem triazolila oslobađa se bakar te nastaje željeni produkt 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazol (slika 19, F).



Slika 19. Pretpostavljeni mehanizam 1,3-dipolarne cikloadicije azida i alkina katalizirane bakar(I) ionima

Bakrom(I) kataliziranu cikloadiciju azida i alkina moguće je provesti u širokom spektru različitih uvjeta kao i s različitim izvorima bakra(I). Najvažniji faktor pri samoj izvedbi reakcije je očuvati ione bakra u oksidacijskom stanju (I) zbog čega se najčešće koriste soli bakra(II) poput bakrova(II) sulfata pentahidrata uz dodatak reducirajućeg sredstva poput natrijevog askorbata. Reakcije u kojima se koristi navedeni katalitički sustav, odnosno *in situ* priprava bakrovih(I) iona, ne zahtijevaju inertnu atmosferu te se najčešće provode u vodenom mediju čime se otklanja potreba za bazom i smanjuje zagađivanje okoliša. Bakar(I) se u reakcijsku smjesu može uvesti i direktno, u obliku soli kao što su bakrov jodid, CuI, ili bakrov bromid, CuBr. Reakcije sa solima bakra najčešće se provode u organskom otapalu u inertnoj atmosferi zbog činjenice da je bakar(I) osjetljiv na prisutnost kisika. U odsutnosti baze reakcije imaju tendenciju da se odvijaju sporo zbog otežanog formiranja međuprodukta, bakrovog acetilida. Kako bi se ubrzale koriste se aminske baze poput *N,N*-diizopropiletilamina (DIPEA).<sup>22</sup>

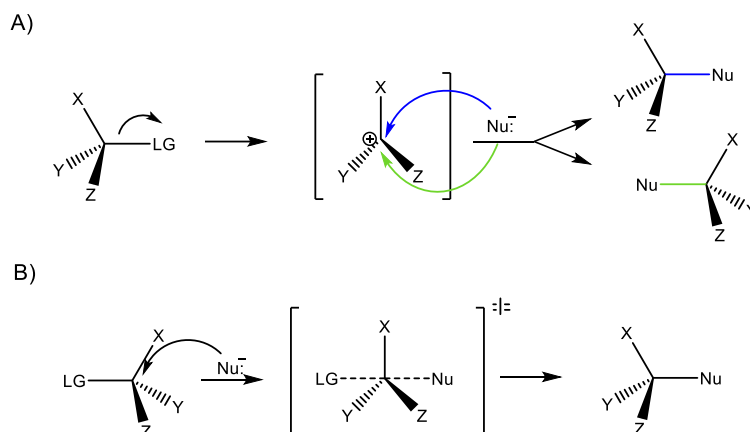
## 2.4. Sinteza amina

Nukleofilna supstitucija na zasićenom ugljikovom atomu predstavlja važan tip reakcije u sintetskoj organskoj kemiji. U toj reakciji dolazi do zamjene izlazne skupine vezane na ugljikov atom nukleofilnom vrstom. Nukleofil svojim slobodnim elektronskim parom napada pozitivno polariziran zasićen ugljikov atom stvarajući vezu, a izlazna skupina napušta molekulu s elektronskim parom. Poznavanje nukleofilnosti nukleofila kao i poznavanje reaktivnosti izlazne skupine omogućava bolje razumijevanje ovih reakcija (tablica 3).

Tablica 3. Jačina nukleofila i sposobnost odlaska izlaznih skupina

Nukleofili	Jakost	Izlazna skupina
I <sup>-</sup> , HS <sup>-</sup> , RS <sup>-</sup>	↑	TfO <sup>-</sup>
Br <sup>-</sup> , HO <sup>-</sup> , N <sub>3</sub> <sup>-</sup> ,		MsO <sup>-</sup> , TsO <sup>-</sup>
NH <sub>3</sub> , Cl <sup>-</sup> , F <sup>-</sup>		Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O

Nukleofilne supstitucijske reakcije se mehanistički dijele na  $S_N1$  i  $S_N2$  reakcije. Reakcija sa  $S_N1$  mehanizmom podrazumijeva odvijanje u dva stupnja gdje u prvom nastaje odgovarajući karbokation koji potom podliježe nukleofilnom napadu (slika 20, A). Reakcija nukleofilne  $S_N2$  supstitucije odvija se usklađenim mehanizmom u jednom stupnju preko prijelaznog stanja (slika 20, B).



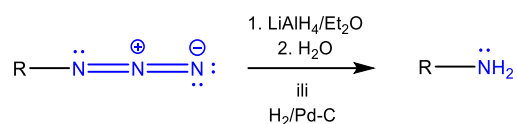
Slika 20. Prikaz A)  $S_N1$  i B)  $S_N2$  mehanizma reakcija nukleofilne supstitucije

Nukleofilne supstitucije  $S_N2$  tipa su stereospecifične i rezultiraju inverzijom konfiguracije dok stereokemijski ishod  $S_N1$  reakcije varira od racemizacije do inverzije ovisno o strukturi supstrata te reakcijskim uvjetima (slika 20).

Razumijevanje mehanizma omogućava odabir najprikladnijih eksperimentalnih uvjeta za provođenje određene transformacije. Mjesto supstitucije važan je čimbenik u određivanju mehanizma reakcije. Reaktanti s tercijskim ugljikovim atomom podliježu  $S_N1$  mehanizmu obzirom da je odvijanje reakcije ovisno o stabilnosti nastalog karbokationa. Povećanjem broja supstituenata na zasićenom ugljikovom atomu povećava se sterička ometenost reakcijskog središta te se smanjuje vjerojatnost reakcija  $S_N2$  tipa. Dodatni čimbenik koji igra ključnu ulogu je karakter korištenog otapala. Otapala s većom dielektričnom konstantom pogoduju  $S_N1$  mehanizmu zbog mogućnosti stabilizacije karbokationa samim time i snižavanjem energije prijelaznog stanja koje mu prethodi što ubrzava reakciju. Međutim, povećana stabilizacija nukleofila polarnim protičnim otapalom rezultira smanjenom reaktivnošću. Reakcije  $S_N2$  tipa provode se u polarnim aprotičnim otapalima gdje je stabilizacija, odnosno solvatacija nukleofila minimalna čime je osigurana njegova nukleofilnost za provođenje reakcije.<sup>23</sup>

Azidi su vrlo korisni međuprodukti u organskoj sintezi obzirom da su prekursori sinteze spojeva koji sadrže dušik te mogu poslužiti kao preteča biološki aktivnim spojevima. Na raspolaganju je nekoliko metoda sinteze azida, a uobičajeni i najčešće korišteni sintetski put podrazumijeva reakciju nukleofilne supstitucije odgovarajućih halogenida, mesilata ili tosilata s azidima alkalijskih metala, uglavnom natrijevim azidom.<sup>24</sup>

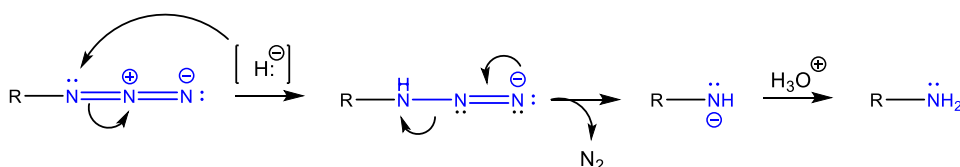
Alkil-azidi pripremljeni reakcijom nukleofilne supstitucije mogu se reducirati katalitičkim hidrogeniranjem ili koristeći litijev aluminijev hidrid kao redukcijsko sredstvo prilikom čega nastaje odgovarajući alkilamin (slika 21).<sup>23</sup> Sintaza amina reduktivnim reakcijama ovisi o dostupnosti prikladnih prekursora te o izboru odgovarajućeg redukcijskog sredstva.



Slika 21. Shematski prikaz redukcije alkil-azida u alkilamin

Litijev aluminijev hidrid predstavlja snažan reagens koji reducira različite funkcionalne skupine te je jedan od najvažnijih izvora hidrida uz natrijev borov hidrid. Budući da je aluminij manje elektronegativan od bora, Al-H veza je slabija i time manje stabilnija od B-H veze što čini litijev aluminijev hidrid u usporedbi s natrijevim borovim hidridom jačim redukcijskim sredstvom. Velika reaktivnost litijeva aluminijeva hidrida za posljedicu ima njegovu slabu kemoselektivnost. Također, burno reagira s vodom i alkoholima te je s njim potrebno raditi u suhim uvjetima.<sup>25</sup>

Nukleofilni napad hidridnog aniona na azid dobije se odgovarajući primarni amin, a mehanizam redukcije prikazan je na slici 22.



Slika 22. Mehanizam redukcije azida u primarni amin s litijevim aluminijev hidridom kao izvor hidridnog aniona

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

#### 3.1.1. Kemikalije i otapala

Svi reagensi korišteni u sintezi komercijalno su dostupni i analitičke čistoće: adamantan-1-ol (*Sigma-Aldrich*), bakrov(II) sulfat pentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , *Kemika*), benzilni ester *N*-Boc-*L*-alanil-*D*-izoglutamina (*Bachem*), borov trifluorid eterat ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , *Sigma-Aldrich*), di-*tert*-butil-dikarbonat ( $\text{Boc}_2\text{O}$ , *Fluka*), dodecil-bromid (*Sigma-Aldrich*), dodekanol (*Sigma-Aldrich*), hidroksibenzotriazol (HOBt, *Sigma-Aldrich*), kalijev karbonat ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ , *Kemika*), klorovodična kiselina (HCl, *Carlo Erba*), kolesterol (*Sigma-Aldrich*), litijev aluminijev hidrid ( $\text{LiAlH}_4$ , *Sigma-Aldrich*), metansulfonil-klorid (MsCl, *Fluka*), natrijev *L*-askorbat (*Sigma-Aldrich*), natrijev azid ( $\text{NaN}_3$ , *Sigma-Aldrich*), natrijev hidrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ , *Gram mol*), natrijev klorid (NaCl, *Kemika*), natrijev sulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , *Gram mol*), *n*-butil-klorformijat (*Sigma-Aldrich*), *N,N*-diizopropiletilamin (DIPEA, *Merck*), *N*-[(dimetilamino)-1*H*-1,2,3-triazolo-[4,5-*b*]piridin-1-ilmetilen]-*N*-metilmetanaminijev heksafluorofosfat *N*-oksid (HATU, *Sigma-Aldrich*), *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC · HCl, *Sigma-Aldrich*), *N*-(*t*-butiloksikarbonil)-*L*-alanin-hidroksisukcinimidni ester (Boc-*L*-Ala-OSu, *Sigma-Aldrich*), *N*-(*t*-butiloksikarbonil)-*D*-izoglutaminska kiselina (Boc-*D*-isoGln-OH, *Bachem*), *N*-metilmorfolin (NMM, *Sigma-Aldrich*), propargilamin (*Sigma-Aldrich*), sumporna kiselina ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , *Fluka*), *tert*-butilbromacetat (*Sigma-Aldrich*), trietilamin (TEA, *Sigma-Aldrich*), trifluorocena kiselina (TFA, *Merck*), trifenilfosfin ( $\text{PPh}_3$ , *Merck*), trimetilsilil-azid ( $\text{TMSN}_3$ , *Fluka*).

Korištena otapala komercijalno su dostupna te su prema potrebi sušena prema uobičajenim literaturnim postupcima: dietil-eter ( $\text{Et}_2\text{O}$ , *J. T. Baker*), diklormetan (DCM, *Carlo Erba*), 1,4-dioksan (*Kemika*), etanol ( $\text{EtOH}$ , *Kemika*), etil-acetat ( $\text{EtOAc}$ , *Carlo Erba*), kloroform ( $\text{CHCl}_3$ , *Carlo Erba*), metanol ( $\text{MeOH}$ , *Fluka*), *N,N*-dimetilformamid (DMF, *Fisher Chemical*), *n*-heksan (*Scharlau*), tetrahidrofuran (THF, *Sigma-Aldrich*), tetraklormetan ( $\text{CCl}_4$ , *Kemika*).

### 3.1.2. Metode

Tijek reakcija, sastav frakcija kod kromatografskog pročišćavanja na stupcu i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (60 F<sub>254</sub>, 0,25 mm, *Fluka*). Detekcija spojeva na TLC pločicama provedena je ultraljubičastim zračenjem ( $\lambda = 254$  nm), prskanjem vodenom otopinom sumporne kiseline ( $w = 10$  %) uz zagrijavanje te prskanjem otopinom ninhidrina uz zagrijavanje. Za kromatografska pročišćavanja na stupcu korišten je silikagel 60 veličine zrna 0,063-0,200 mm (*Sigma-Aldrich*). Flash kromatografija spoja (**13**) provedena je na CombiFlash R<sub>f</sub>+ Lumen automatiziranom sustavu za flash kromatografiju (*Teledyne ISCO*) uz UV/VIS detektor.

Postupak hidrogeniranja (debenziliranja) je proveden u Parrovom uređaju.

Identifikacija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva provedena je pomoću infracrvene spektroskopije (IR), nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i spektrometrije masa (MS). Infracrveni spektri su snimljeni na FT-IR uređaju PerkinElmer Spectrum Two tehnikom KBr pastile za krute uzorke te pomoću NaCl pločica za tekuće uzorke (4000-400 cm<sup>-1</sup> uz razlučivanje od 4 cm<sup>-1</sup>). Spektri <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C DEPTQ nuklearne magnetske rezonancije (NMR) snimljeni su pomoću instrumenta Avance III HD (Bruker) pri 400 MHz (<sup>1</sup>H) i 100 MHz (<sup>13</sup>C) u deuteriranim otapalima navedenim dalje u tekstu. Kemijski pomaci ( $\delta$ ) u <sup>1</sup>H NMR spektrima izraženi su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS, 0 ppm) kao unutarnjem standardu, dok su <sup>13</sup>C NMR spektri kalibrirani prema srednjem signalu otapala. Multipliciteti signala navedeni su kao: s-singlet, d-dublet, t-triplet, q-kvartet i m-multiplet. Maseni spektri pripremljenih spojeva snimljeni su pomoću uređaja Agilent 6410 uz elektroraspršenje kao način ionizacije (ESI-MS).

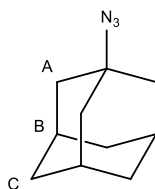


## 3.2. Sinteza lipofilnihaminskih prekursora

### 3.2.1. Sinteza (adamantil-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-ilmetanamina

#### 3.2.1.1. Priprava 1-azidoadamantana (**1**)<sup>26</sup>

Komercijalno dostupan adamantan-1-ol (1 g, 6,57 mmol) se otopi u smjesi kloroforma (14 mL) i otopine sumporne kiseline ( $w = 57\%$ , 14 mL). Reakcijska smjesa se ohladi na  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  te se u malim obrocima uz minutnu vremensku odgodu dodaje natrijev azid (854,2 mg, 13,14 mmol). Reakcijska smjesa se miješa 3 h na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije, reakcijskoj smjesi se doda ohlađena voda (20 mL) te se ekstrahira s diklormetanom ( $4 \times 50\text{ mL}$ ). Spojeni organski slojevi se isperu vodenom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata ( $w = 5\%$ , 50 mL) i vodom (50 mL) te suše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Sredstvo za sušenje se profiltrira, a otapalo se upari na rotacijskom uparivaču. Dobiveno je 900,6 mg ( $\eta = 78\%$ ) spoja **1** (slika 23) u obliku krutine karakterističnog mirisa čija je struktura potvrđena IR spektroskopijom i spektroskopijom NMR.



Slika 23. Strukturna formula spoja **1**

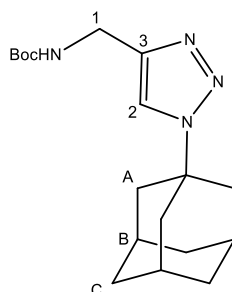
**IR** (KBr pastila)  $\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$ : 2915 ( $\nu_{\text{as}} \text{C-H (CH}_2\text{)}$ ); 2853 ( $\nu_{\text{s}} \text{C-H (CH}_2\text{)}$ ); 2140 ( $\nu \text{N}\equiv\text{N}$ ); 2085 ( $\nu \text{N}\equiv\text{N}$ ); 1453 ( $\delta_{\text{sc}} \text{C-H (CH}_2\text{)}$ ); 1305 ( $\delta_{\text{wg}} \text{C-H (CH}_2\text{)}$ ).

**$^1\text{H}$  NMR** (DMSO- $d_6$ )  $\delta / \text{ppm}$ : 2,10 (s, 3H, H-B); 1,76 (d,  $J = 3,1\text{ Hz}$ , 6H, H-A); 1,64 (s, 6H, H-C)

**$^{13}\text{C}$  NMR** (DMSO- $d_6$ )  $\delta / \text{ppm}$ : 59,0 (C); 40,8 ( $\text{CH}_2\text{-A}$ ); 35,1 ( $\text{CH}_2\text{-C}$ ); 29,1 (CH-B)

3.2.1.2. Priprava *tert*-butil-((1-adamantan-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)karbamata (**2**)<sup>26</sup>

Svježe predestilirani propargilamin (120  $\mu$ L, 1,86 mmol) se otopi u smjesi dioksana i vode (3,5 mL;  $V(\text{dioksan}) : V(\text{voda}) = 4 : 3$ ). Reakcijska smjesa se ohladi na 0 °C te se doda di-*tert*-butil dikarbonat ( $\text{Boc}_2\text{O}$ , 579,9 mg, 2,66 mmol) i TEA (387  $\mu$ L, 2,78 mmol). Reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj miješalici 1,5 h pri sobnoj temperaturi, nakon čega se doda spoj **1** (300,0 mg, 1,69 mmol), vodena otopina natrijeva L-askorbata (1,52 mL,  $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i vodena otopina bakrova(II) sulfata pentahidrata (474  $\mu$ L,  $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Reakcijska smjesa se zagrijava 24 h na uljnoj kupelji u atmosferi argona pri temperaturi od 35 °C. Tijek reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala  $V(\text{DCM}) : V(\text{EtOAc}) = 3 : 1$  uz prskanje ninhidrinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se upari do suha. Upareni ostatak se otopi u vodi (20 mL) te ekstrahira etil-acetatom ( $3 \times 25 \text{ mL}$ ). Organski slojevi se spoje, isperu vodom (50 mL) i suše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Sredstvo za sušenje se profiltrira, a otapalo se upari na rotacijskom uparivaču. Suhi sirovi produkt se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz  $V(\text{DCM}) : V(\text{EtOAc}) = 3 : 1$  kao eluens. Dobiveno je 436,8 mg ( $\eta = 82 \%$ ) spoja **2** (slika 24) u obliku tirkizne krutine karakterističnog mirisa čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Slika 24. Strukturna formula spoja **2**

$R_f = 0,35$  ( $V(\text{DCM}) : V(\text{EtOAc}) = 3 : 1$ )

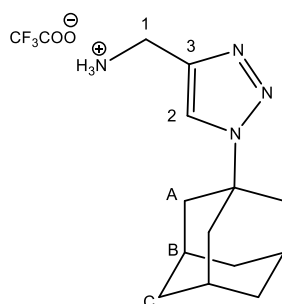
$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 7,59 (s, 1H, CH-2); 5,13 (s, 1H, NH); 4,40 (d, 2H,  $J = 5,1 \text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -1); 2,26-2,22 (m, 9H, 6 H-C, 3 H-B); 1,83-1,75 (m, 6H, H-A); 1,45 (s, 9H,  $3 \times \text{CH}_3$ , Boc)

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 155,8 (CH-2); 79,5 (C-3); 59,6 (C-Boc); 43,0 ( $\text{CH}_2$ -1); 36,3 ( $\text{CH}_2$ -A); 35,9 ( $\text{CH}_2$ -C); 29,5 ( $\text{CH}_3$ -Boc); 28,4 (CH-B)

ESI-MS:  $m/z$  333,1  $[\text{M}+\text{H}]^+$

3.2.1.3. Priprava (adamantan-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metilamonijevog trifluoracetata (**3**)<sup>26</sup>

Spoj **2** (370,0 mg, 1,11 mmol,) se otopi u suhom diklormetanu (4 mL). U otopinu se doda trifluoroctena kiselina (TFA, 2 mL). Reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj miješalici 2 h pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala  $V(\text{DCM}) : V(\text{MeOH}) = 3 : 1$  uz prskanje ninhidrinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijskoj smjesi se doda vodena otopina natrijeva hidrogenkarbonata ( $w = 5\%$ , 25 mL) te se ekstrahira diklormetanom (25 mL). Potom se organski sloj ispere vodenom otopinom natrijeva hidrogenkarbonata ( $w = 5\%$ , 25 mL). Vodeni slojevi se spoje te ponovno ekstrahiraju diklormetanom (25 mL). Spojeni organski slojevi se suše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Sredstvo za sušenje se profiltrira, a otapalo se upari na rotacijskom uparivaču. Dobiveno je 224,9 mg ( $\eta = 87\%$ ) spoja **3** (slika 25) u obliku bijele krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Slika 25. Strukturna formula spoja **3**

$R_f = 0,57$  ( $V(\text{DCM}) : V(\text{MeOH}) = 3 : 1$ )

$T_m = 98 - 100\text{ }^\circ\text{C}$

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 7,50 (s, 1H, CH-2); 3,99 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-1); 2,22-2,25 (m, 9H, 6H-C, 3H-B); 1,82-1,74 (m, 6H, H-A); 1,62 (s, 2H, NH<sub>2</sub>).

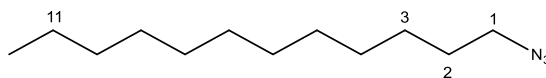
$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 117,6 (CH-2); 59,5 (CH<sub>2</sub>-1); 43,0 (CH<sub>2</sub>-A); 35,9 (CH<sub>2</sub>-C); 29,5 (CH-B).

ESI-MS:  $m/z$  233,3 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>

## 3.2.2. Sinteza dodecilamina

3.2.2.1. Priprava dodecil-azida (**4**)<sup>27</sup>

Natrijev azid (521,7 mg, 8,02 mmol) se otopi u metanolu (15 ml). U otopinu se doda dodecilbromid (1,93 mL, 8,02 mmol). Reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj miješalici 24 h na uljnoj kupelji pri temperaturi od 60 °C. Tijek reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom u *n*-heksanu uz prskanje sumpornom kiselinom ( $w = 10\%$ ) i zagrijavanje. Nakon 24 h u reakcijsku smjesu se doda natrijevog azida (521,7 mg, 8,02 mmol) te se nastavi miješati 24 h na uljnoj kupelji pri temperaturi od 60 °C. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se upari te profiltrira ispirući nastali talog kloroformom. Potom se filtrat upari na rotacijskom uparivaču. Suhi sirovi produkt se pročisti kromatografijom na kratkom stupcu silikagela gradijentno počevši od *n*-heksana do etil-acetata. Dobiveno je 1,57 g (kvantitativno) spoja **4** (slika 26) u obliku bezbojne tekućine koji se čuva u vakuumiranom eksikatoru te čija je struktura potvrđena IR spektroskopijom i spektroskopijom NMR.

Slika 26. Strukturna formula spoja **4**

$R_f = 0,4$  (*n*-heksan)

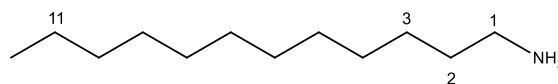
**IR** (NaCl pločica)  $\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$ : 2926 ( $\nu_{\text{as}} \text{C-H (CH}_2\text{)}$ ); 2856 ( $\nu_{\text{s}} \text{C-H (CH}_2\text{)}$ ); 2096 ( $\nu \text{N}\equiv\text{N}$ ); 1462 ( $\delta_{\text{sc}} \text{C-H (CH}_2\text{)}$ ); 1349 ( $\delta_{\text{s}} \text{CH}_3$ ); 1260 ( $\delta_{\text{tw}} \text{CH}_2$ ).

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta / \text{ppm}$ : 3,30 (t, 2H,  $J = 6,9 \text{ Hz}$ , CH<sub>2</sub>-1); 1,55-1,48 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-2); 1,32-1,24 (m, 18H,  $9 \times \text{CH}_2$ ); 0,86 (t, 3H,  $J = 6,9 \text{ Hz}$ , CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta / \text{ppm}$ : 50,5 (CH<sub>2</sub>-1); 31,2 (CH<sub>2</sub>-2); 28,9, 28,85, 28,83, 28,6, 28,4, 28,1, 26,0, 22,0 (CH<sub>2</sub>-(3-11)); 13,9 (CH<sub>3</sub>).

3.2.2.2. Priprava dodecilamina (**5**)<sup>28</sup>

Spoj **4** (258 mg, 1,22 mmol) se otopi u suhom dietil-eteru (3 mL). Prethodno pripravljena suspenzija LiAlH<sub>4</sub> (69,49 mg, 1,83 mmol) i suhog dietil-etera (7 mL) postepeno se dodaje otopini dodecil-azida tolikom brzinom da se održava temperatura reakcijske smjese. Ukoliko se reakcijska smjesa zagrije potrebno ju je hladiti. Nakon dodane suspenzije, reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj miješalici 3 h pri sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Tijekom reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala  $V(\text{EtOAc}) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$  uz prskanje ninhidrinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se ohladi na 0 °C te se pažljivo, kap po kap, dodaje ohlađena voda (5 mL). Potom se pripravljena smjesa prebaci u lijevak za odjeljivanje i dodaje voda (20 mL) te ekstrahira s dietil-eterom (20 mL). Organski sloj se suši na bezvodnom natrijevom sulfatu. Sredstvo za sušenje se profiltrira, a otapalo se upari na rotacijskom uparivaču. Suhi sirovi produkt se pročisti kromatografijom na kratkom stupcu silikagela gradijentno počevši od etil-acetata do metanola. Dobiveno je 130,2 mg ( $\eta = 58\%$ ) spoja **5** (slika 27) u obliku svijetložute krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Slika 27. Strukturna formula spoja **5**

$R_f = 0,11$  ( $V(\text{EtOAc}) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$ )

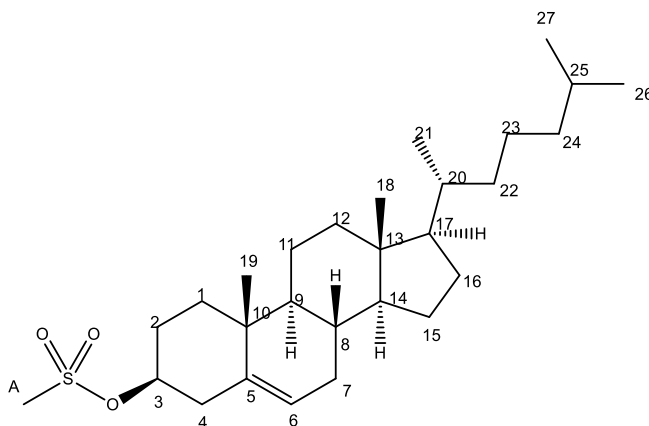
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  / ppm: 2,68 (t, 2H,  $J = 6,9$  Hz, CH<sub>2</sub>-1); 1,44 (t, 2H,  $J = 6,9$  Hz, CH<sub>2</sub>-2); 1,38 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 1,32-1,26 (m, 18H,  $9 \times \text{CH}_2$ ); 0,88 (t, 3H,  $J = 6,9$  Hz, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  / ppm: 42,3 (CH<sub>2</sub>-1); 33,9 (CH<sub>2</sub>-2); 31,9, 29,6, 29,5, 29,3, 26,9, 22,7 (CH<sub>2</sub>-3-11); 14,1 (CH<sub>3</sub>).

ESI-MS:  $m/z$  186,2 [M+H]<sup>+</sup>

3.2.3. Sinteza 3 $\beta$ -amino-kolest-5-ena3.2.3.1. Priprava 3 $\beta$ -mesiloksikolesta-5-ena (**6**)<sup>29</sup>

Komercijalno dostupan kolesterol (1 g, 2,59 mmol) se otopi u suhom diklormetanu (11 mL). Reakcijska smjesa se ohladi na 0 °C te se doda TEA (815,4  $\mu$ L, 5,85 mmol) i metansulfonil-klorid (MsCl, 318  $\mu$ L, 4,11 mmol). Reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj miješalici 30 minuta pri temperaturi od 0°C, a zatim 5 h pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala  $V(n\text{-heksan}) : V(\text{EtOAc}) = 5 : 1$  uz prskanje sumpornom kiselinom ( $w = 10\%$ ) i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se upari do suha. Upareni ostatak se otopi u diklormetanu (5 mL) te dodatkom metanola (15 mL) uz hlađenje dolazi do nastanka bijelih kristala produkta. Otopina se profiltrira preko Büchnerovog lijevka uz ispiranje taloga metanolom. Dobiveni kristali produkta se suše u vakuumiranom eksikatoru. Dobiveno je 1,18 g (kvantitativno) spoja **6** (slika 28) u obliku bijelih kristala čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR.

Slika 28. Strukturna formula spoja **6**

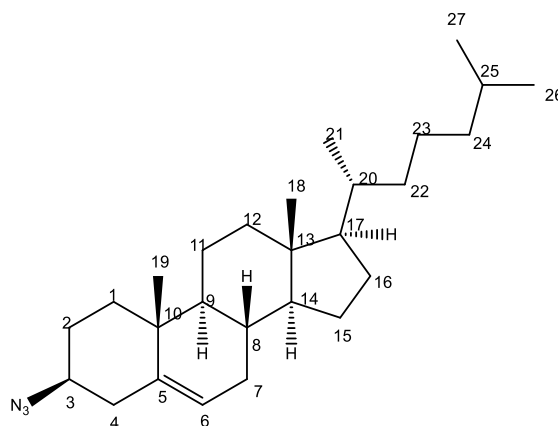
$R_f = 0,30$  ( $V(n\text{-heksan}) : V(\text{EtOAc}) = 5 : 1$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 5,42-5,40 (m, 1H, H-6); 4,56-4,48 (m, 1H, H-3); 3,00 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-A}$ ); 2,57- 2,45 (m, 2H, H-4); 2,02-1,04 (m, 26H kolesterol); 1,02 (s, 3H, H-19); 0,91 (d, 3H,  $J = 6,6$  Hz, H-21); 0,87 (d, 3H,  $J = 1,7$  Hz, H-26); 0,86 (d, 3H,  $J = 1,7$  Hz, H-27); 0,68 (s, 3H, H-18).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 138,7 (C-5); 123,8 (CH-6); 82,1 ( $\text{CH}_3\text{-A}$ ); 56,6, 56,1 (CH-14, CH-17); 49,9 (CH-9); 42,3, 39,7, 39,5, 39,2, 38,76, 36,9, 36,4, 36,2, 35,8, 31,9, 31,8, 29,0, 28,2, 28,0, 24,3, 23,8, 22,8, 22,6, 21,0, 19,2, 18,7 (21C kolesterol); 11,8 ( $\text{CH}_3\text{-18}$ ).

3.2.3.2. Priprava 3 $\beta$ -azidokolest-5-ena (7)<sup>29</sup>

Spoj **6** (852 mg, 1,83 mmol) se otopi u suhom diklormetanu (6 mL). U otopinu se doda trimetilsilil-azid (TMSN<sub>3</sub>, 265  $\mu$ L, 2,02 mmol) i borov trifluorid eterat (BF<sub>3</sub> · OEt<sub>2</sub>, 675  $\mu$ L, 5,47 mmol). Reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj miješalici 5 h pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala  $V(n\text{-heksan}) : V(\text{EtOAc}) = 5 : 1$  uz prskanje sumpornom kiselinom ( $w = 10\%$ ) i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijskoj smjesi se doda voda (15 mL) uz 5 minutno miješanje. Pripravljena smjesa prebaci se u lijevak za odjeljivanje i ekstrahira s diklormetanom ( $2 \times 10$  mL). Organski slojevi se spoje i suše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Sredstvo za sušenje se profiltrira, a otapalo se upari na rotacijskom uparivaču. Suhi sirovi produkt se pročisti kromatografijom na kratkom stupcu silikagela gradijentno počevši od  $n$ -heksana do diklormetana. Dobiveno je 609,1 mg ( $\eta = 81\%$ ) spoja **7** (slika 29) u obliku bijele krutine koji se čuva u vakuumiranom eksikatoru. Struktura mu je potvrđena IR spektroskopijom, spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Slika 29. Strukturna formula spoja **7**

$R_f = 0,69$  ( $V(n\text{-heksan}) : V(\text{EtOAc}) = 5 : 1$ )

**IR** (KBr pastila)  $\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$ : 2935 ( $\nu_{\text{as}} \text{C-H (CH}_2\text{)}$ ); 2868 ( $\nu_{\text{s}} \text{C-H (CH}_3\text{)}$ ); 2098 ( $\nu \text{N}\equiv\text{N}$ ); 1640 ( $\nu \text{C}=\text{C}$ ); 1467 ( $\delta_{\text{sc}} \text{CH}_2$ ); 1376 ( $\delta_{\text{s}} \text{CH}_3$ ); 1244 ( $\delta_{\text{tw}} \text{CH}_2$ ).

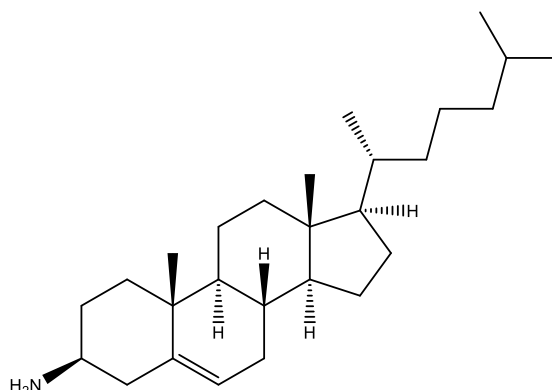
**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta / \text{ppm}$ : 5,39 (d, 1H,  $J = 4,7$  Hz, H-6); 3,24-3,16 (m, 1H, H-3); 2,29 (d, 2H,  $J = 7,9$  Hz, H-4); 2,04-1,02 (m, 26H kolesterol); 1,00 (s, 3H, H-19); 0,92 (d, 3H,  $J = 6,5$  Hz, H-21); 0,87 (d, 3H,  $J = 1,7$  Hz, H-26); 0,86 (d, 3H,  $J = 1,7$  Hz, H-27); 0,68 (s, 3H, H-18).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 139,8 (C-5); 122,5 (CH-6); 61,2 (CH-8); 56,7, 56,2 (CH-14, CH-17); 50,10 (CH-9); 42,3, 39,7, 39,5, 38,2, 37,6, 36,6, 36,2, 35,8, 31,9, 31,8, 28,2, 28,0, 27,9, 24,3, 23,8, 22,8, 22,6, 21,0, 19,3, 18,7 (20C, kolesterol); 11,6 ( $\text{CH}_3$ -18).

ESI-MS:  $m/z$  369,2  $[\text{M}-\text{N}_3]^+$

### 3.2.3.3. Pokušaj pripreve $3\beta$ -aminokolest-5-ena (**8**) redukcijom azida **7**<sup>29</sup>

Spoj **7** (180 mg, 0,437 mmol) se otopi u suhom dietil-eteru (8 mL). Prethodno pripravljena suspenzija  $\text{LiAlH}_4$  (24,89 mg, 0,656 mmol) i suhog dietil-etera (6 mL) postepeno se dodaje otopini  $3\beta$ -azidokolest-5-ena tolikom brzinom da se održava temperatura reakcijske smjese. Ukoliko se reakcijska smjesa zagrije potrebno ju je hladiti. Nakon dodane suspenzije, reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj miješalici 3 h pri sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Tijekom reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala  $V(n\text{-heksan}) : V(\text{EtOAc}) = 5 : 1$  uz prskanje ninhidrinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se ohladi na  $0\text{ }^\circ\text{C}$  te se pažljivo, kap po kap, dodaje ohlađena voda (5 mL). Potom se pripravljena smjesa prebaci u lijevak za odjeljivanje i dodaje voda (10 mL) te ekstrahira s etil-acetatom (10 mL). Organski slojevi se spoje i isperu sa zasićenom vodenom otopinom natrijeva klorida (15 mL) te suše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Sredstvo za sušenje se profiltrira, a otapalo se upari na rotacijskom uparivaču. Suhi sirovi produkt se pročisti kromatografijom na kratkom stupcu silikagela gradijentno počevši od etil-acetata do metanola. Dobiveno je 124,6 mg ( $\eta = 74\%$ ) spoja (slika 30) u obliku bijele krutine u čijem je  $^1\text{H}$  NMR spektru još uvijek bilo prisutno onečišćenja te je spoj podvrgnut ponovnom kromatografskom pročišćavanju. Struktura ipak nije potvrđena obzirom da se željeni spoj raspao.



Slika 30. Strukturna formula spoja **8**

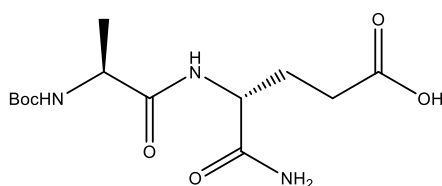


3.2.3.4. Pokušaj pripreve 3 $\beta$ -aminokolest-5-ena (**8**) iz kolesterola<sup>30</sup>

Kolesterol (100 mg, 0,259 mmol), natrijev azid (20,18 mg, 0,311 mmol) i trifenilfosfin (PPh<sub>3</sub>, 142,5 mg, 0,543 mmol) se otope u smjesi tetraklormetana i *N,N*-dimetilformamida (5 mL,  $V(\text{CCl}_4) : V(\text{DMF}) = 1 : 4$ ). Reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj miješalici 24 h na uljnoj kupelji pri temperaturi od 90 °C. Tijek reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala  $V(n\text{-heksan}) : V(\text{EtOAc}) = 7 : 3$  uz prskanje sumpornom kiselinom ( $w = 10\%$ ) i zagrijavanje te uz prskanje ninhidrinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se ohladi na sobnu temperaturu te se doda voda (5 mL) uz 10 minutno miješanje. Pripravljena smjesa se prebaci u lijevak za odjeljivanje i ekstrahira s dietil-eterom (25 mL). Hlađenjem organskog sloja na 0 °C kristalizira trifenilfosfin-oksidi te se otopina profiltrira preko Büchnerovog lijevka. Filtrat se suši na bezvodnom natrijevom sulfatu. Sredstvo za sušenje se profiltrira, a otapalo se upari na rotacijskom uparivaču. Suhi sirovi produkt se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz  $V(n\text{-heksan}) : V(\text{EtOAc}) = 7 : 3$  kao eluens. Opisanim postupkom spoj **8** nije uspješno pripremljen.

### 3.3. Uklanjanje benzilne zaštite s dipeptida Boc-L-Ala-D-isoGln-OBn<sup>31</sup>

Komercijalno dostupan benzilni ester *N*-Boc-L-alanil-D-izoglutamin (Boc-L-Ala-D-isoGln-OBn, 400,5 mg, 0,736 mmol) se otopi u 96 % etanolu (20 mL). U otopinu se doda 10 %-tni paladij na ugljiku (200,2 mg). Reakcijska smjesa se miješa 18 h pod tlakom vodika od 34 PSI. Tijek reakcije se provjeri tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 2 : 1$  uz prskanje ninhidrinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se profiltrira ispirući talog etanolom, a filtrat se upari na rotacijskom uparivaču. Dobiveno je 314,2 mg (kvantitativno) spoja **9** (slika 31) u obliku bezbojne pahuljaste krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR.

Slika 31. Strukturna formula spoja **9**

$R_f = 0,28$  ( $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 2 : 1$ )

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

**$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 4,36 (dd, 1H,  $J = 4,2, J = 9,24$ , Hz,  $\text{CH}\alpha\text{-isoGln}$ ); 4,02 (q, 1H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}\alpha\text{-Ala}$ ); 2,38 (t, 2H,  $J = 7,6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-isoGln}$ ); 2,26-2,17 (m, 1H,  $\text{isoGln}$ ); 1,94-85 (m, 1H,  $\text{isoGln}$ ); 1,43 (s, 9H,  $3 \times \text{CH}_3\text{-Boc}$ ); 1,30 (d, 3H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-Ala}$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 175,02-174,98 ( $3 \times \text{C}=\text{O}$ ); 156,6 ( $\text{C}=\text{O}$ , Boc); 79,5 ( $\text{C-Boc}$ ); 52,1 ( $\text{CH}\alpha\text{-isoGln}$ ); 50,6 ( $\text{CH}\alpha\text{-Ala}$ ); 29,7 ( $\text{CH}_2\text{-isoGln}$ ); 27,3 ( $\text{CH}_3\text{-Boc}$ ); 26,7 ( $\text{CH}_2\text{-isoGln}$ ); 16,1 ( $\text{CH}_3\text{-Ala}$ ).

### 3.4. Metode amidacije Boc-L-Ala-D-isoGln-OH (9) lipofilnim prekursorima

#### 3.4.1. Metoda I

Spoj **9** (50 mg, 0,160 mmol) se otopi u suhom tetrahidrofuranu (0,5 mL). Reakcijska smjesa se ohladi na  $-10$  °C te se doda *N*-metilmorfolin (NMM, 19,4  $\mu\text{L}$ , 0,176 mmol) i *n*-butil-klorformijat (NBCF, 23,6  $\mu\text{L}$ , 0,160 mmol). Nakon tri minute se doda lipofilni aminski prekursor (1,3 ekv.). Reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj miješalici 1,5 h pri temperaturi od  $-10$  °C, a zatim 1,5 h pri sobnoj temperaturi uz dodatak vodene otopine natrijeva hidrogenkarbonata ( $w = 5$  %, 10 mL). Tijek reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$  uz prskanje ninhidrinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se prebaci u lijevak za odjeljivanje i ekstrahira s diklormetanom ( $3 \times 10$  mL). Spojeni organski slojevi se isperu s vodenom otopinom natrijeva hidrogenkarbonata ( $w = 5$  %,  $2 \times 10$  mL) te suše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Sredstvo za sušenje se profiltrira, a otapalo se upari na rotacijskom uparivaču. Suhi sirovi produkt se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$  kao eluens.

Metodom I dobiveno je:

58,8 mg ( $\eta = 69$  %) adamantil-triazolnog derivata Boc-L-Ala-D-isoGln-OH **10** (slika 32) u obliku bijele krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa;

12,8 mg onečišćenog produkta adamantilnog derivata Boc-L-Ala-D-isoGln-OH **11** što je utvrđeno pomoću spektroskopije  $^1\text{H}$  NMR.

### 3.4.2. Metoda II

Spoj **9** (50 mg, 0,158 mmol) se otopi u smjesi suhog diklormetana i suhog dioksana (6 mL,  $V(\text{DCM}) : V(\text{dioksan}) = 1 : 1$ ). Reakcijska smjesa se ohladi na 0 °C te se doda HOBt (21,29 mg, 0,158 mmol) i EDC · HCl (36,25 mg, 0,189 mmol). Nakon nekoliko minuta doda se lipofilni aaminski prekursor (1,1 ekv.) te TEA (43,9 µL, 0,315 mmol). Reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj miješalici 1 h pri temperaturi od 0 °C, a zatim 48 h pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$  uz prskanje ninhidrinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se razrijedi s etil-acetatom (20 mL) te ekstrahira otopinom klorovodične kiseline (10 mL,  $c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i zasićenom vodenom otopinom natrijeva hidrogenkarbonata (10 mL). Organski sloj se suši na bezvodnom natrijevom sulfatu. Sredstvo za sušenje se profiltrira, a otapalo se upari na rotacijskom uparivaču. Suhi sirovi produkt se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 10 : 1$  (za spojeve **10** i **11**) te  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 2 : 1$  (za spoj **12**) kao eluense.

Metodom II dobiveno je:

59,4 mg ( $\eta = 71 \%$ ) spoja **10** (slika 32) u obliku bijele krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa;

46,2 mg ( $\eta = 65 \%$ ) spoja **11** (slika 33) u obliku bijele krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

65,3 mg ( $\eta = 86 \%$ ) spoja **12** (slika 34) u obliku bijele krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

## 3.4.3. Metoda III

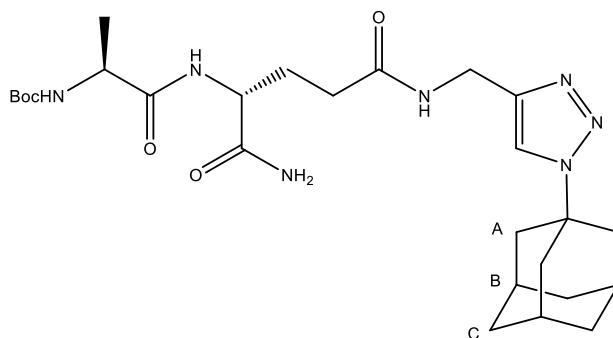
Spoj **9** (50 mg, 0,158 mmol) se otopi u *N,N*-dimetilformamidu (0,8 mL). U otopinu se doda HATU (59,91 mg, 0,158 mmol), DIPEA (54,89  $\mu$ L, 0,315 mmol) te lipofilni aaminski prekursor (1,1 ekv.). Reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj miješalici 18 h pri sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Tijek reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$  uz prskanje ninhidrinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se upari do suha. Uparenom ostatku se doda voda (20 mL) te se pripravljena smjesa ekstrahira s diklormetanom ( $3 \times 20$  mL). Spojeni organski slojevi se isperu s hladnom zasićenom vodenom otopinom natrijeva klorida (5 mL) te se suše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Sredstvo za sušenje se profiltrira, a otapalo se upari na rotacijskom uparivaču. Suhi sirovi produkt se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 10 : 1$  (za spoj **10**) ili  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$  (za spojeve **11** i **12**) kao eluense.

Metodom III dobiveno je:

67,6 mg ( $\eta = 81\%$ ) spoja **10** (slika 32) u obliku bijele krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa;

63,4 mg ( $\eta = 89\%$ ) spoja **11** (slika 33) u obliku bijele krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa;

68,5 mg ( $\eta = 90\%$ ) spoja **12** (slika 34) u obliku bijele krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Spoj **10**

Slika 32. Strukturna formula spoja **10**

$R_f = 0,43$  ( $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$ );  $0,34$  ( $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 10 : 1$ )

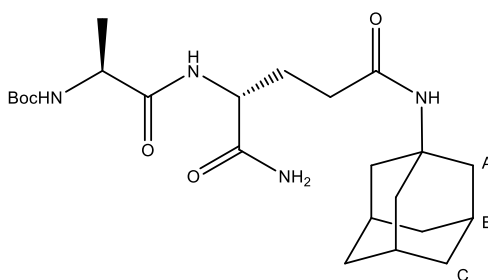
$^1\text{H NMR}$  i **DEPTQ**: Dodatak 2

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 7,65 (d, 1H, CH-triazol); 4,59-4,41 (m, 3H,  $\text{CH}_2$ -triazol,  $\text{CH}\alpha$ -*iso*Gln,); 4,17-4,11 (m, 1H,  $\text{CH}\alpha$ -Ala); 2,39-2,32 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 2,24 (s, 3H, CH-B); 2,21 (s, 6H,  $\text{CH}_2$ -C); 2,15 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 2,09-2,00 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 1,81-1,74 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ -A); 1,40 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ -Boc); 1,34 (d, 3H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_3$ -Ala).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 174,2 (C=O); 173,7 (C=O); 172,9 (C=O); 155,8 (C=O, Boc); 143,7 (C-triazol); 118,6 (CH-triazol); 80,0 (C-Boc); 59,6 (C-Ad); 52,4 ( $\text{CH}\alpha$ -*iso*Gln); 50,7 ( $\text{CH}\alpha$ -Ala); 42,9 ( $\text{CH}_2$ -A); 35,8 ( $\text{CH}_2$ -C); 35,0 ( $\text{CH}_2$ -triazol); 32,3 ( $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 29,4 (CH-B); 28,3 ( $3 \times \text{CH}_3$ -Boc); 28,1 ( $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 18,0 ( $\text{CH}_3$ -Ala).

**ESI-MS**:  $m/z$  532,1  $[\text{M}+\text{H}]^+$

### Spoj 11



Slika 33. Strukturna formula spoja **11**

$R_f = 0,52$  ( $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$ )

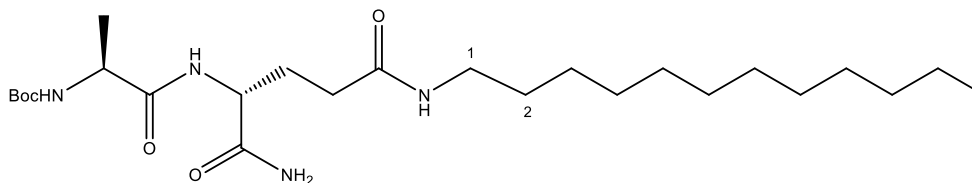
$^1\text{H NMR}$  i **DEPTQ**: Dodatak 3

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 4,42-4,37 (m, 1H,  $\text{CH}\alpha$ -*iso*Gln); 4,12-4,05 (m, 1H,  $\text{CH}\alpha$ -Ala); 2,36-2,22 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 2,21-1,99 (m, 11H, CH-B,  $\text{CH}_2$ -C,  $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 1,68 (s, 6H,  $\text{CH}_2$ -A); 1,43 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ -Boc); 1,37 (d, 3H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_3$ -Ala).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 173,8 (C=O); 173,1 (C=O); 172,2 (C=O); 80,0 (C-Boc); 52,4 ( $\text{CH}\alpha$ -*iso*Gln); 51,0 ( $\text{CH}\alpha$ -Ala); 41,5 ( $\text{CH}_2$ -A); 36,3 ( $\text{CH}_2$ -C); 33,6 ( $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 29,4 (CH-B); 27,7 ( $3 \times \text{CH}_3$ -Boc); 17,8 ( $\text{CH}_3$ -Ala).

**ESI-MS**:  $m/z$  451,2  $[\text{M}+\text{H}]^+$

## Spoj 12



Slika 34. Strukturna formula spoja 12

$R_f = 0,56$  ( $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$ );  $0,81$  ( $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 2 : 1$ )

$^1\text{H NMR}$  i DEPTQ: Dodatak 4

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 4,44-4,39 (m, 1H,  $\text{CH}\alpha$ -isoGln); 4,12-4,05 (m, 1H,  $\text{CH}\alpha$ -Ala); 3,25-3,19 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -1); 2,41-2,28 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -isoGln); 2,19-2,12 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ -isoGln); 2,10-2,03 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ -isoGln); 1,51-1,48 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -2); 1,43 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ -Boc); 1,36 (d, 3H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_3$ -Ala); 1,28-1,26 (m, 18H,  $\text{CH}_2$ -lanac); 0,88 (t, 3H,  $J = 6,9$  Hz,  $\text{CH}_3$ -lanac).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 173,9 (C=O); 173,4 (C=O); 172,8 (C=O); 155,9 (C=O, Boc); 80,3 (C-Boc); 52,4 ( $\text{CH}\alpha$ -isoGln); 51,0 ( $\text{CH}\alpha$ -Ala); 32,6 ( $\text{CH}_2$ -isoGln); 31,9-29,31 ( $11 \times \text{CH}_2$ -lanac); 28,3 ( $3 \times \text{CH}_3$ -Boc); 27,7 ( $\text{CH}_2$ -isoGln); 17,8 ( $\text{CH}_3$ -Ala); 14,1 ( $\text{CH}_3$ -lanac).

ESI-MS:  $m/z$  485,2 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$

### 3.5. Priprava adamantilnog derivata Boc-L-Ala-D-isoGln-OH (11) iz Boc-D-isoGln-OH

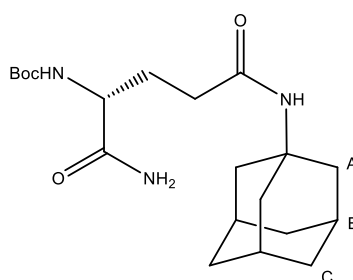
#### 3.5.1. Priprava adamantilnog derivata Boc-D-isoGln-OH (13) metodama amidacije II i III

##### Metoda II

Metoda je provedena na komercijalno dostupnom Boc-D-isoGln-OH (150 mg, 0,609 mmol) prema prethodno opisanom postupku (3.4.2., str. 39). Tijek reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 2 : 1$  uz prskanje ninhidrinom i zagrijavanje. Suhi sirovi produkt se nakon obrade reakcijske smjese ekstrakcijom pročisti automatiziranom flash kromatografijom uz  $V(\text{DCM}) : V(\text{MeOH}) = 15 : 1$  te nakon toga dodatno na stupcu silikagela uz  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$  kao eluens. Dobiveno je 214,1 mg ( $\eta = 93$  %) spoja 13 (slika 35) u obliku bijele krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Metoda III

Metoda je provedena na komercijalno dostupnom Boc-D-*iso*Gln-OH (150 mg, 0,609 mmol) prema prethodno opisanom postupku (3.4.3., str. 40). Tijek reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$  uz prskanje ninhidrinom i zagrijavanje. Suhi sirovi produkt se nakon obrade reakcijske smjese ekstrakcijom pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$  te uz  $V(\text{DCM}) : V(\text{MeOH}) = 15 : 1$  kao eluens. Dobiveno je 161,4 mg ( $\eta = 70\%$ ) spoja **13** (slika 35) u obliku bijele krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Slika 35. Strukturna formula spoja **13**

$R_f = 0,52$  ( $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$ );  $0,37$  ( $V(\text{DCM}) : V(\text{MeOH}) = 15 : 1$ )

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

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 4,16-4,05 (m, 1H,  $\text{CH}\alpha$ -*iso*Gln); 2,27-2,22 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  *iso*Gln); 2,08-1,93 (m, 11H, CH-B,  $\text{CH}_2$ -C,  $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 1,68 (s, 6H,  $\text{CH}_2$ -A); 1,44 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ -Boc).

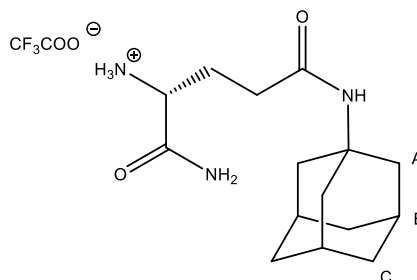
$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 174,7 (C=O); 172,0 (C=O); 155,9 (C=O, Boc); 79,8 (C-Boc); 53,5 ( $\text{CH}\alpha$ -*iso*Gln); 51,95 (C-Ad); 41,3 ( $\text{CH}_2$ -A), 36,2 ( $\text{CH}_2$ -C); 33,6 ( $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 29,3 (CH-B); 29,0 ( $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 28,2 ( $3 \times \text{CH}_3$  Boc).

**ESI-MS**:  $m/z$  380,1 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$

3.5.2. Priprava adamantilnog derivata *D*-isoGln-OH u obliku TFA soli (**14**)

Spoj **13** dobiven metodom II i spoj **13** dobiven metodom III (1,0 ekv) otope se u suhom diklormetanu. U otopinu se doda TFA (20,0 ekv.,  $V(\text{DCM}) : V(\text{TFA}) = 3 : 1$ ). Reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj miješalici 2,5 h pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$  uz prskanje ninhidrinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se ispere dietil-eterom i upari do suha. Suhi ostatak se pročisti kromatografijom na kratkom stupcu silikagela uz  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$  kao eluens.

Dobiveno je 211,59 mg (kvantitativno) spoja **14** (slika 36) iz spoja **13** pripremljenog metodom II (203,6 mg, 0,544 mmol) i 110,9 mg (kvantitativno) spoja **14** (slika 36) iz spoja **13** pripremljenog metodom III (106,8 mg, 0,281 mmol) u obliku bijele krutine čije su strukture potvrđene spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Slika 36. Strukturna formula spoja **14**

$R_f = 0,18$  ( $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$ )

$^1\text{H NMR}$  i  $\text{DEPTQ}$ : Dodatak 6

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 3,49 (m, 1H,  $\text{CH}\alpha\text{-isoGln}$ ); 2,25 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-isoGln}$ ); 2,04-2,02 (9H, CH-B,  $\text{CH}_2\text{-C}$ ); 1,98-1,93 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{-isoGln}$ ); 1,88-81 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{-isoGln}$ ); 1,71 (s, 6H,  $\text{CH}_2\text{-A}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 178,0 (C=O); 174,3 (C=O); 55,0 ( $\text{CH}\alpha\text{-isoGln}$ ); 52,89 (C-Ad); 42,3 ( $\text{CH}_2\text{-A}$ ); 37,5 ( $\text{CH}_2\text{-C}$ ); 33,9 ( $\text{CH}_2\text{-isoGln}$ ); 31,6 (CH-B); 30,9 ( $\text{CH}_2\text{-isoGln}$ ).

$\text{ESI-MS}$ :  $m/z$ : 280,3 [ $\text{M-TFA}$ ] $^+$



### 3.5.3. Kondenzacija spoja **14** i Boc-L-Ala-OSu

Spoj **14** (1,0 ekv) se otopi u suhom tetrahidrofuranu. Reakcijska smjesa se ohladi na 0 °C te se doda TEA (1,9 ekv.) i Boc-L-Ala-OSu (0,97 ekv.). Reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj miješalici 30 minuta pri temperaturi od 0 °C, a zatim 24 h pri sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Tijek reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 10 : 1$  uz prskanje ninhidrinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se upari do suha, a upareni ostatak se otopi u etil-acetatu (20 mL). Pripravljena smjesa se ispere otopinom klorovodične kiseline (20 mL,  $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ), a potom se vodeni sloj ekstrahira s etil-acetatom ( $2 \times 20 \text{ mL}$ ). Spojeni organski slojevi se isperu zasićenom vodenom otopinom natrijeva klorida ( $2 \times 30 \text{ mL}$ ) i suše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Sredstvo za sušenje se profiltrira, a otapalo se upari na rotacijskom uparivaču. Suhi sirovi produkt se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 7 : 1$  kao eluens.

Dobiveno je 89,1 mg ( $\eta = 69 \%$ ) spoja **11** (slika 33) iz spoja **14** pripremljenog uklanjanjem Boc zaštite s produkta metode II (117,0 mg, 0,297 mmol) i 35 mg ( $\eta = 61 \%$ ) spoja **11** (slika 33) iz spoja **14** pripremljenog uklanjanjem Boc zaštite s produkta metode III (50 mg, 0,127 mmol) u obliku bijele krutine čije su strukture potvrđene spektroskopijom NMR.

NMR spektri spoja **11** pripremljenog na ova dva opisana načina te izravnom amidacijom spoja **9** metodama II i III se poklapaju.

$R_f = 0,39$  ( $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 7 : 1$ )

**<sup>1</sup>H NMR i DEPTQ:** Dodatak 7

**<sup>1</sup>H NMR** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta / \text{ppm}$ : 4,42-4,37 (m, 1H,  $\text{CH}\alpha\text{-isoGln}$ ); 4,12-4,05 (m, 1H,  $\text{CH}\alpha\text{-Ala}$ ); 2,36-2,22 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-isoGln}$ ); 2,21-1,99 (m, 11H, CH-B,  $\text{CH}_2\text{-C}$ ,  $\text{CH}_2\text{-isoGln}$ ); 1,68 (s, 6H,  $\text{CH}_2\text{-A}$ ); 1,43 (s, 9H,  $\text{CH}_3\text{-Boc}$ ); 1,37 (d, 3H,  $J = 7,1 \text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_3\text{-Ala}$ ).

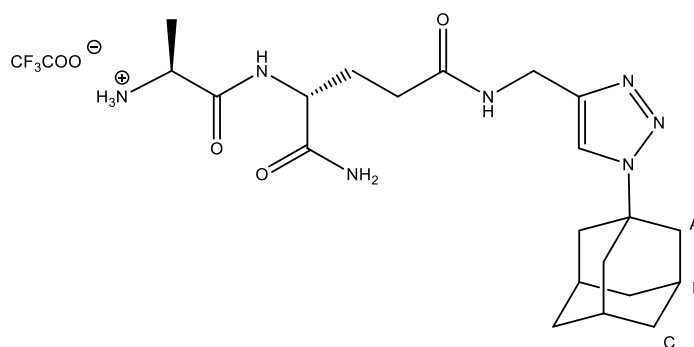
**<sup>13</sup>C NMR** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta / \text{ppm}$ : 173,8 (C=O); 173,1 (C=O); 172,2 (C=O); 80,0 (C-Boc); 52,4 ( $\text{CH}\alpha\text{-isoGln}$ ); 51,0 ( $\text{CH}\alpha\text{-Ala}$ ); 41,5 ( $\text{CH}_2\text{-A}$ ); 36,3 ( $\text{CH}_2\text{-C}$ ); 33,6 ( $\text{CH}_2\text{-isoGln}$ ); 29,4 (CH-B); 27,7 ( $3 \times \text{CH}_3\text{-Boc}$ ); 17,8 ( $\text{CH}_3\text{-Ala}$ ).

### 3.6. Opći postupak uklanjanja Boc zaštite s lipofilnih derivata dipeptida 10, 11 i 12 dobivenih različitim metodama amidacije

Spojevi **10**, **11** ili **12** (50 mg) otope se u suhom diklormetanu (0,6 mL). U otopinu se doda TFA (20 ekv.). Reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj miješalici 2,5 h pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$  uz prskanje ninhidrinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se ispere dietil-eterom i upari do suha. Suhi ostatak se pročisti kromatografijom na kratkom stupcu silikagela uz  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$  kao eluens.

#### Spoj 15

Dobiveno je 59,7 mg (kvantitativno) spoja **15** (slika 37) u obliku bezbojne krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 37. Strukturna formula spoja **15**

$R_f = 0,06$  ( $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$ )

$^1\text{H NMR}$  i DEPTQ: Dodatak 8

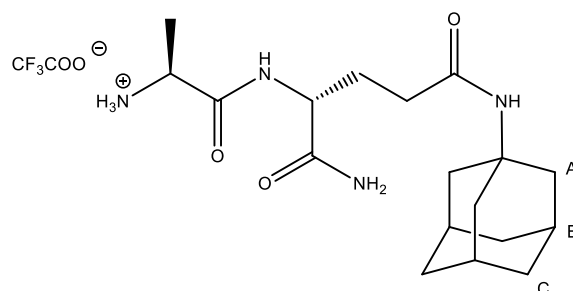
$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 7,95 (s, 1H, CH-triazol); 4,43 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -triazol); 4,38 (dd, 1H,  $J = 4,8$  Hz,  $J = 9,1$  Hz,  $\text{CH}\alpha$ -isoGln); 3,97 (q, 1H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}\alpha$ -Ala); 2,34 (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{CH}_2$ -isoGln); 2,25 (s, 9H, CH-B,  $\text{CH}_2$ -C); 2,19-2,10 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ -isoGln); 2,01-1,91 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ -isoGln); 1,84 (t, 6H,  $J = 14,2$  Hz,  $\text{CH}_2$ -A); 1,51 (d, 3H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_3$ -Ala).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 176,0 (C=O); 174,6 (C=O); 171,1 (C=O); 145,2 (C-triazol); 120,8 (CH-triazol); 61,2 (C-Ad); 54,1 ( $\text{CH}\alpha$ -isoGln); 50,4 ( $\text{CH}\alpha$ -Ala); 43,9 ( $\text{CH}_2$ -A); 36,9 ( $\text{CH}_2$ -C); 35,7 ( $\text{CH}_2$ -triazol); 32,9 ( $\text{CH}_2$ -isoGln); 31,0 (CH-B); 29,0 ( $\text{CH}_2$ -isoGln); 17,7 ( $\text{CH}_3$ -Ala).

ESI-MS:  $m/z$  432,2  $[\text{M-TFA}]^+$

## Spoj 16

Dobiveno je 43,5 mg ( $\eta = 84\%$ ) spoja **16** (slika 38) u obliku bijele krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Slika 38. Strukturna formula spoja **16**

Snimani su samo neki NMR spektri TFA soli adamantilnog derivata dipeptida **16** dobivenog različitim metodama i pristupima obzirom da su se NMR spektri adamantilnog derivata *N*-zaštićenog dipeptida **11** koji im je u sintezi prethodio, poklapali. Stoga su u dodatku 9 prikazani NMR spektri spoja **16** dobivenog metodom amidacije koja se pokazala najprikladnijom za određeni sintetski pristup (za put A snimljen je spoj **16** dobiven iz spoja **11** pripravljenog HATU/DIPEA metodom i za put B snimljen je spoj **16** dobiven iz spoja **11** pripravljenog EDC/HOBt metodom).

$R_f = 0,09$  ( $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$ )

$^1\text{H NMR}$  i **DEPTQ**: Dodatak 9

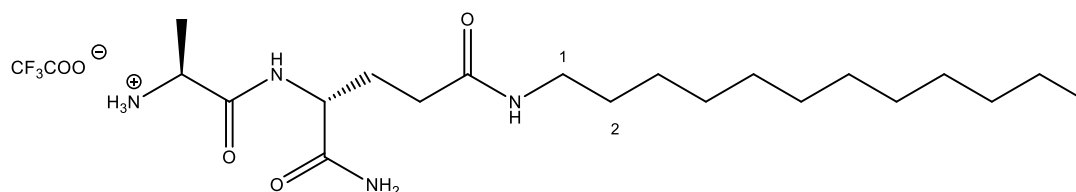
$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 4,31 (dd, 1H,  $J = 8,9$  Hz,  $J = 5,0$  Hz,  $\text{CH}\alpha$ -*iso*Gln); 3,6 (q, 1H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}\alpha$ -Ala); 2,23-2,18 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 2,13-2,02 (m, 10H, CH-B,  $\text{CH}_2$ -C,  $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 1,93-1,83 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 1,71 (s, 6H,  $\text{CH}_2$ -A); 1,34 (d, 3H,  $J = 6,9$  Hz,  $\text{CH}_3$ -Ala).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 176,9 (C=O); 176,4 (C=O); 174,1 (C=O); 53,9 ( $\text{CH}\alpha$ -*iso*Gln); 51,3 ( $\text{CH}\alpha$ -Ala); 42,3 ( $\text{CH}_2$ -A); 37,5 ( $\text{CH}_2$ -C); 34,0 ( $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 30,9 (CH-B); 29,4 ( $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 20,6 ( $\text{CH}_3$ -Ala).

**ESI-MS**:  $m/z$  351,3  $[\text{M-TFA}]^+$

## Spoj 17

Dobiveno je 52,15 mg (kvantitativno) spoja **17** (slika 39) u obliku bijele krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Slika 39. Strukturna formula spoja **17**

$R_f = 0,10$  ( $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$ )

$^1\text{H NMR}$  i DEPTQ: Dodatak 10

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 4,33 (dd, 1H,  $J = 8,8$  Hz,  $J = 4,9$  Hz,  $\text{CH}\alpha$ -*iso*Gln); 3,52 (q, 1H,  $J = 6,9$  Hz,  $\text{CH}\alpha$ -Ala); 3,15 (t, 2H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_2$ -1); 2,28 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 2,16-2,08 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 1,97-1,87 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 1,48 (t, 2H,  $J = 6,7$  Hz,  $\text{CH}_2$ -2); 1,31 (d, 3H,  $J = 6,9$  Hz,  $\text{CH}_3$ -Ala); 1,29 (s, 18H,  $\text{CH}_2$ -lanac); 0,89 (t, 3H,  $J = 6,9$  Hz,  $\text{CH}_3$ -lanac).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 177,5 (C=O); 176,4 (C=O); 174,7 (C=O); 53,9 ( $\text{CH}\alpha$ -*iso*Gln); 51,4 ( $\text{CH}\alpha$ -Ala); 40,6 ( $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 33,2 - 23,8 (11  $\times$   $\text{CH}_2$ -lanac); 28,1 ( $\text{CH}_2$ -*iso*Gln); 20,5 ( $\text{CH}_3$ -Ala); 14,5 ( $\text{CH}_3$ -lanac).

ESI-MS:  $m/z$  385,3  $[\text{M-TFA}]^+$

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Uvod

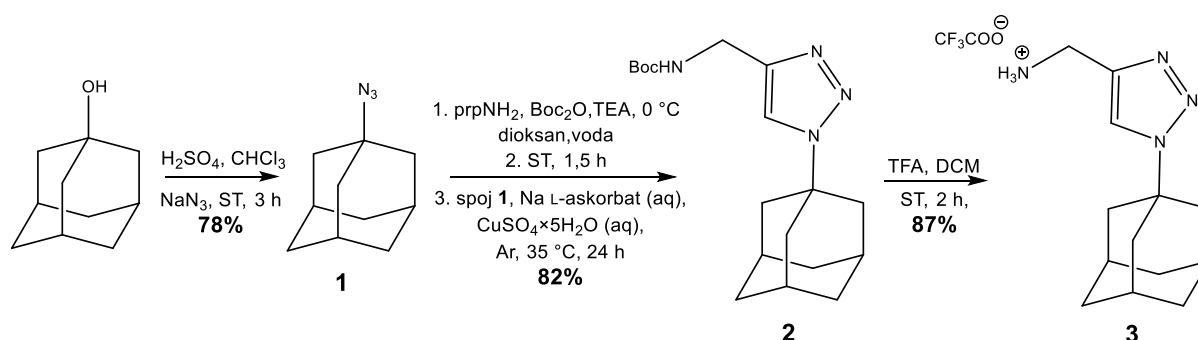
Imunizacija predstavlja preventivnu mjeru zaštite zdravlja pojedinca koju je moguće provesti cijepljenjem. Imunostimulatori ili adjuvanti su tvari koje se dodaju cjepivima u svrhu povećanja imunonološkog odgovora na određeni antigen. Imunostimulacijsku aktivnost pokazuju različite skupine spojeva među kojima su i derivati desmuramil-dipeptida koji su tema ovog diplomskog rada. Različitim strukturnim modifikacijama desmuramil-dipeptida nastoji se postići snažnija i učinkovitija imunostimulirajuća aktivnost. Istraživanja u laboratoriju na Zavodu za organsku kemiju, Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta usmjerena su na uvođenje različitih podjedinica u strukturu desmuramil-dipeptida te ispitivanje njihovog utjecaja na imunostimulirajuću aktivnost.

U sklopu diplomskog rada priređeni su derivati desmuramil-dipeptida s lipofilnim modifikacijama na bočnom lancu aminokiseline izoglutamina. Ispitana je mogućnost pripreve adamantil-triazolnog, adamantilnog te dodecilnog derivata desmuramil-dipeptida. Uvođenjem lipofilne podjedinice omogućena je ugradnja željenog spoja u lipidni dvosloj membrana stanica i liposoma povećavajući time uspješnost dostave potencijalnih imunostimulatora do stanica. Naglasak diplomskog rada je na razvoju i optimiziranju metode amidacije lipofilnih aaminskih prekursora i desmuramil-dipeptida. Ispitane su tri metode amidacije, a za adamantilni derivat dodatno je ispitan i sintetski put koji uključuje sintezu adamantilnog derivata s jednom aminokiselinom, izoglutaminom te njegovu kondenzaciju s drugom aminokiselinom, alaninom. Također, u svrhu dobivanja željenih derivata pokušale su se pronaći i optimizirati metode sinteze lipofilnih prekursora; dodecilnog amina te kolesterolskog amina.

## 4.2. Sinteza lipofilnih prekursora

### 4.2.1. Sinteza adamantil-triazolnog prekursora 3

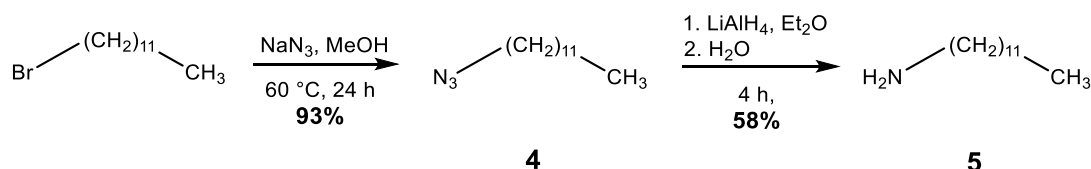
Sinteza adamantil-triazolnog prekursora **3** provedena je u tri koraka (slika 40), a započela je pripravom 1-azidoadamantana **1** iz komercijalno dostupnog adamantan-1-ola i natrijeva azida uz sumpornu kiselinu s iskorištenjem od 78 %. Prisutnost azido skupine na spoju **1** potvrđena je IR spektroskopijom. Sljedeći korak je zanimljiva „one-pot“ sinteza<sup>26</sup> zaštićenog 1,4-supstituiranog adamantil-triazolnog amina **2** iz prethodno pripremljenog 1-azidoadamantana **1** i komercijalno dostupnog propargilamina koja je provedena uz iskorištenje od 82 %. Navedena „one-pot“ sinteza sastoji se od dva koraka. U prvom koraku se zaštiti propargilamin s di-*tert*-butil-dikarbonatom i trietilaminom kao bazom, dok se u drugom koraku pripremlja 1,2,3-triazolni prsten sintetiziran bakrom(I) kataliziranom cikloadicijskom reakcijom između netom prije zaštićenog propargilamina i prethodno pripremljenog 1-azidoadamantana **1**. Azid-alkinska cikloadicija katalizirana bakrom(I) jedna je od najznačajnijih primjera klik-reakcija zbog brzine nastanka produkta, jednostavnosti te selektivnosti. Literaturno je poznato mnoštvo reagensa kao izvor bakrova(I) iona, a u navedenoj reakciji korišteni katalizator je *in situ* generirani bakar(I) pripremljen reakcijom bakrova(II) sulfata pentahidrata i reducirajućeg sredstva, natrijeva L-askorbata. Nastalom spoju s triazolnim prstenom je potom uklonjena *tert*-butiloksikarbonilna zaštitna skupina (Boc) pomoću trifluoroctene kiseline čime je priređen adamantil-triazolni amin **3** u obliku TFA soli s iskorištenjem od 87 %. Struktura dobivenog spoja potvrđena je spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 40. Shematski prikaz pripreve adamantil-triazolnog prekursora **3**

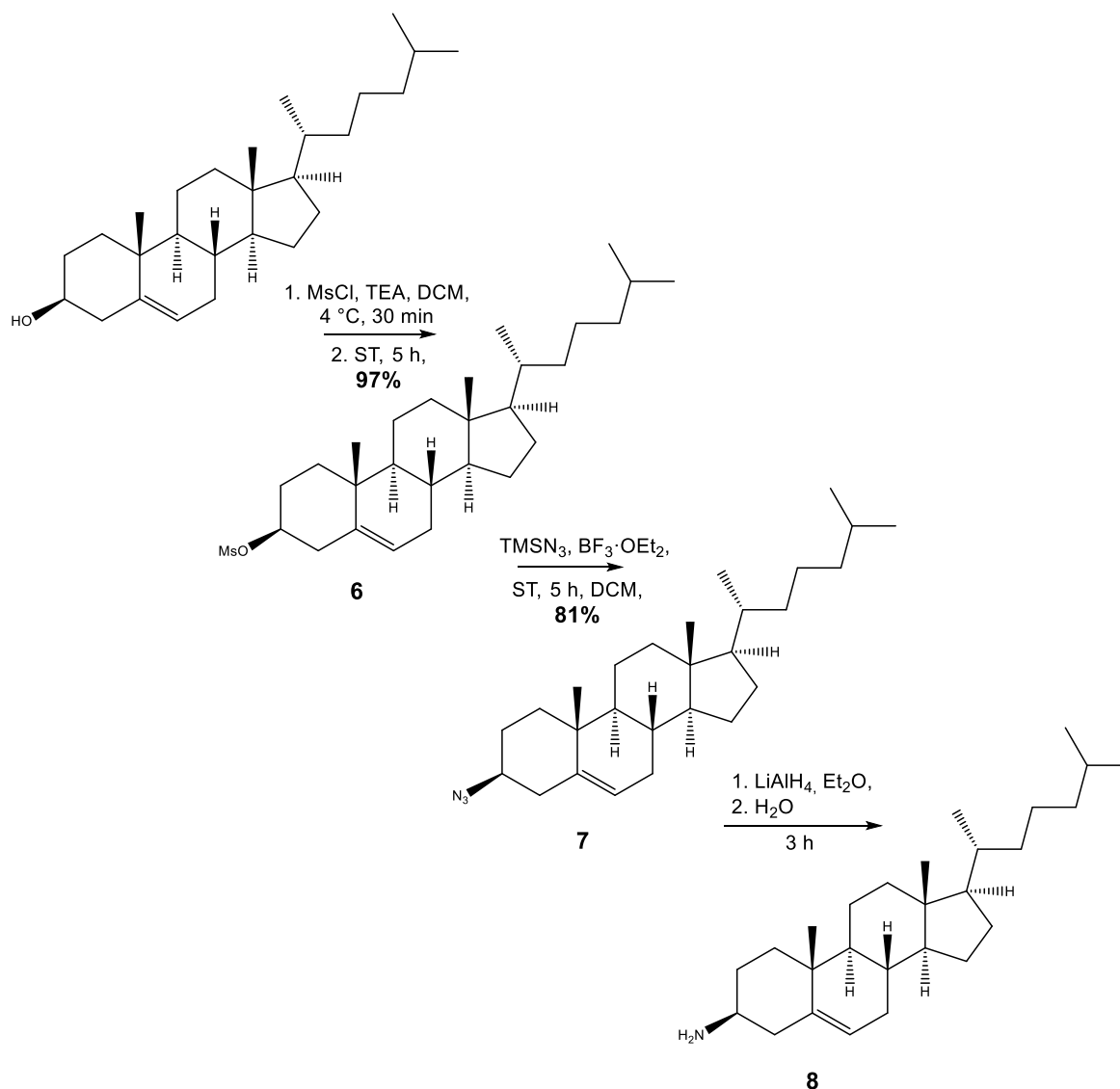
4.2.2. *Sinteza dodecilnog prekursora 5*

Sinteza dodecilnog prekursora **5** provedena je u dva koraka (slika 41). Lipofilni amin dobiven je redukcijom prethodno pripremljenog dodecil-azida **4** supstitucijskom reakcijom iz komercijalno dostupnog dodecil-bromida i natrijeva azida s visokim iskorištenjem od 93 %. Priprava dodecil-azida odvija se usklađenim S<sub>N</sub>2 supstitucijskim mehanizmom gdje azidni anion nukleofilno napada sterički neometen ugljikov atom uz izlazak bromidnog aniona. Prisutnost azido skupine potvrđena je IR spektroskopijom. Sljedeći korak je reakcija redukcije uspješno pripremljenog dodecil-azida **4** pomoću litijeva aluminijeva hidrida kao redukcijskog sredstva u suhom dietil-eteru uz naknadnu obradu reakcijske smjese vodom.<sup>28</sup> Ovaj postupak je rezultirao iskorištenjem od 58 %. Struktura dobivenog spoja potvrđena je spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Slika 41. Shematski prikaz pripreme dodecilnog prekursora **5**4.2.3. *Pokušaj sinteze kolesterolskog amina 8*

Sinteza kolesterolskog amina **8** provedena je u tri koraka (slika 42) te je kao i sinteza dodecilamina uključivala redukciju prethodno pripremljenog azida uz litijev aluminijev hidrid kao redukcijsko sredstvo u suhom dietil-eteru uz naknadnu obradu reakcijske smjese vodom. Kolesteril-azid **7** sintetiziran je iz kolesteril-mesilata **6** kojeg je prethodno bilo potrebno pripremiti za razliku od dodecil-azida čija je sinteza krenula iz komercijalno dostupnog spoja. Obzirom da je hidroksilna skupina općenito loša izlazna skupina, kolesterol je preveden u reaktivniji derivat s boljom izlaznom skupinom koju će azidni anion lakše zamijeniti u S<sub>N</sub>2 reakciji. Kolesteril-mesilat **6** je pripremljen otapanjem kolesterola u suhom diklormetanu uz dodatak metansulfonil-klorida i trietilamina kao baze s kvantitativnim iskorištenjem. Uspješno sintetiziran kolesteril-mesilat je potom korišten u supstitucijskoj reakciji s trimetilsilil-azidom uz borov trifluorid eterat što je rezultiralo nastankom kolesteril-azida **7** s iskorištenjem od 81 %. Struktura dobivenih produkata **6** i **7** potvrđena je spektroskopijom NMR i spektrometrijom

masa (spoj 7). Struktura željenog spoja **8** nije uspješno potvrđena zbog njegovog raspada tijekom kromatografskog pročišćavanja.



Slika 42. Shematski prikaz priprave kolesterolskog amina **8**

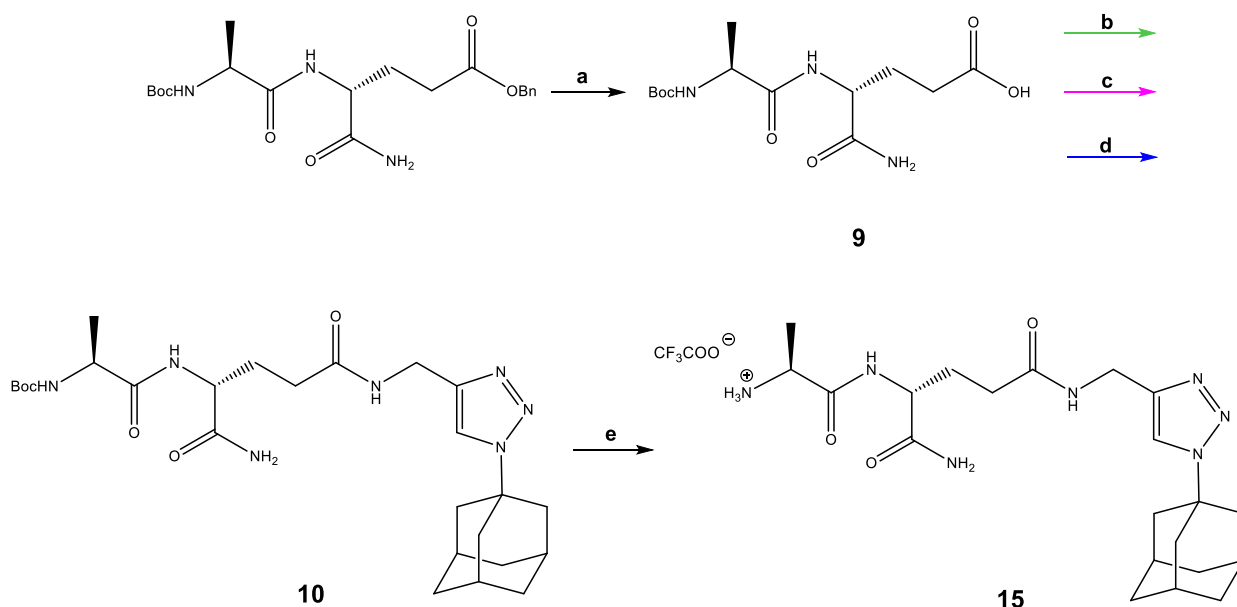
Najčešći pristup priprave amina uključuje nekoliko koraka u sintezi kako bi se pripravo željeni spoj, a korišteni su i u ovom diplomskom radu: (a) pretvorba alkohola u odgovarajući halogenid ili sulfonat; (b) nukleofilna  $\text{S}_{\text{N}}2$  supstitucija s azidnim anionom te (c) redukcija azida u amin. Obzirom da provedena metoda preko sulfonatnog prekursora nije rezultirala željenim produktom isprobana je i „one-pot“ sinteza kolesterolskog amina **8** izravno iz kolesterola. Ova metoda isprobana je ujedno s ciljem da se smanji ukupni broj prethodno opisanih koraka među



kojima je i onaj koji uključuje rukovanje s opasnim azidnim prekursorom. Prema literaturno opisanom postupku<sup>25</sup> reakcija se provodi u smjesi tetraklormetana i *N,N*-dimetilformamida uz dodatak natrijevog azida i dva ekvivalenta trifenilfosfina pri temperaturi od 90 °C što rezultira nastankom odgovarajućeg amina. Nastanak amina navedenim putem uključuje prvotni nastanak azida *in situ* nakon čega slijedi reakcija adicije drugog ekvivalenta trifenilfosfina na azid pri čemu nastaje iminofosforan čijom bi se hidrolizom trebao pripremiti odgovarajući amin. Međutim, opisanim postupkom željeni produkt **8** nije uspješno pripremljen.

### 4.3. Sinteza adamantil-triazolnog derivata desmuramil-dipeptida

Sinteza adamantil-triazolnog derivata desmuramil-dipeptida provedena je u nekoliko koraka (slika 43), a glavni zadatak bio je pronaći učinkovitu metodu amidacije kojom bi se direktno na desmuramil-dipeptid uspješno uvela adamantil-triazolna podjedinica kao i ostali lipofilni prekursori. Učinkovitom metodom se smatra ona koja rezultira dobrim iskorištenjem, što manjim brojem sporednih produkata, te ona kod koje ne dolazi do promjene konfiguracije stereogenih središta.



Slika 43. Shematski prikaz pripreve ciljne molekule **15**:

(a) H<sub>2</sub>, 10 % Pd/C, 96 % EtOH, 34 PSI, ST, 18 h, 97 %; (b) 1. NBCF, NMM, THF, spoj **3**, -10 °C, 1 h; 2. NaHCO<sub>3</sub>, ST, 1 h, 69 %; (c) 1. EDC·HCl, HOBt, 0 °C, DCM : dioksan = 1:1; 2. spoj **3**, TEA, 0 °C, 1 h 3. ST, 72 h, 71 %; (d) 1. HATU, DIPEA, DMF; 2. spoj **3**, Ar, ST, 18 h, 81 %; (e) TFA, DCM, ST, 2,5 h, 97 %

Komercijalno dostupnom zaštićenom dipeptidu, Boc-L-Ala-D-isoGln-OBn, oslobođena je  $\gamma$ -karboksilna skupina katalitičkom hidrogenolizom u etanolu uz 10 % Pd/C. Produkt **9** nastao je u kvantitativnom iskorištenju te je u sljedećem koraku kondenziran s prethodno pripremljenim adamantil-triazolnim prekursorom **3**. Kondenzacija je uspješno provedena sa sve tri ispitane metode.

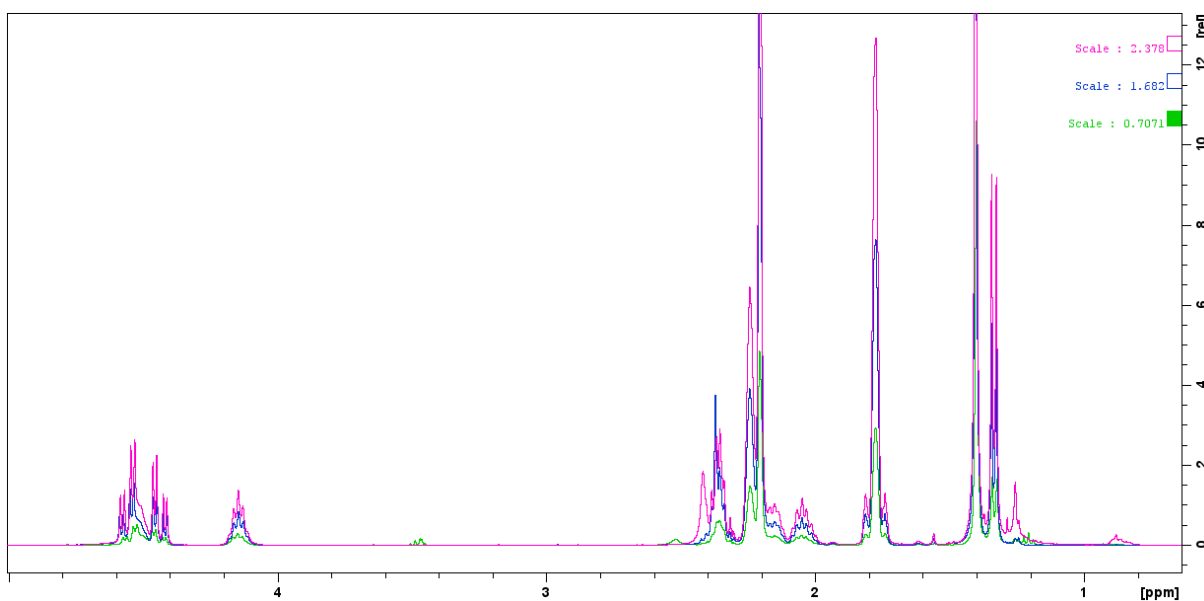
Reakcija kondenzacije uz NBCF/NMM rezultirala je nastankom željenog spoja **10** s iskorištenjem od 69 %. Struktura i diastereoizomerna čistoća priređenog spoja potvrđene su spektroskopijom NMR. Navedena reakcija pokazala se odličnom u smislu iskorištenja i diastereoizomerne čistoće produkta dobivenog vezanjem aaminskih derivata na  $\alpha$ -kraju istog aminokiselinskog dijela molekule<sup>22</sup> u istraživanju koje je prethodilo ovome radu. Međutim, reakcija provedena vezanjem željenog prekursora na  $\gamma$ -kraj opisanom metodom rezultirala je slabijim iskorištenjem (69 %) te vrlo onečišćenom reakcijskom smjesom koja se zbog bliske  $R_f$  vrijednosti komponenata teško pročišćavala kromatografskim postupcima te se stoga javila potreba za novom, adekvatnijom metodom kondenzacije.

Druga metoda sinteze željenog spoja **10** pokazala se uspješnijom od prethodne, a korištena je EDC · HCl / HOBt kombinacija kondenzacijskih reagensa uz trietilamin kao baza. Navedena metoda pokazala se u prethodnim istraživanjima<sup>27,29</sup> na sintezi desmuramil-dipeptidnih analoga vrlo pogodnom metodom za kondenzacijsku reakciju zbog čega je i odabrana. U svrhu dobivanja većeg iskorištenja naknadno, nakon 48 sati, dodano je još 0,5 ekvivalenata kondenzacijskih reagensa i baze. Provođenjem reakcije ukupno 72 sata nastao je željeni spoj **10** što je potvrđeno spektroskopijom NMR s iskorištenjem od 71 %. Usprkos jednostavnoj izolaciji željenog spoja i diastereoizomernoj čistoći, dugo vrijeme provođenja reakcije kondenzacije te zanemarivo mali porast iskorištenja uz dodatak reagenasa doprinijelo je potrazi za novim postupkom kondenzacije.

Treća, posljednja metoda pokazala se najprikladnijom za pripravu željenog spoja **10** gdje je kao kondenzacijski reagens korišten HATU te diizopropiletilamin kao baza. Reakcija je provedena 18 sati i rezultirala je nastankom spoja **10** u iskorištenju od 81 %. Jedini nedostatak ove metode je korišteno otapalo (DMF) koje se otežano uklanja iz reakcijske smjese tijekom pročišćavanja. Struktura i diastereoizomerna čistoća priređenog spoja potvrđene su spektroskopijom NMR.

Nakon obrade reakcijskih smjesa i identifikacije produkta **10** dobivenog svim ispitanim metodama može se zaključiti da se HATU/DIPEA metoda ističe visokim iskorištenjem, relativno kratkim vremenom provođenja reakcije te dijastereoizomernom čistoćom. Iako je za EDC/HOBt metodu potrebno dulje vrijeme provođenja reakcije s manjim iskorištenjem u odnosu na HATU/DIPEA metodu, EDC/HOBt metoda se pokazala odličnom u smislu izolacije željenog spoja iz reakcijske smjese.

Usporedbom  $^1\text{H}$  NMR spektara spoja **10** ispitanih metoda uočeni su isti kemijski pomaci i cijepanja ključnih signala poput, primjerice, multipleta  $\alpha$ - ugljikovog atoma alanina na  $\sim 4,13$  ppm (slika 44) što upućuje na nastanak istog dijastereoizomera svim opisanim metodama. U tablici 4 sumarno su prikazane metode korištene za sintezu adamantil-triazolnog derivata Boc-L-Ala-D-isoGln-OH **10** te njihov rezultat s odgovarajućim iskorištenjem.



Slika 44. Preklopljene ključne regije u  $^1\text{H}$  NMR spektrima spoja **10** dobivenog različitim metodama amidacije: metoda I (zeleno), metoda II (ružičasto), metoda III (plavo)

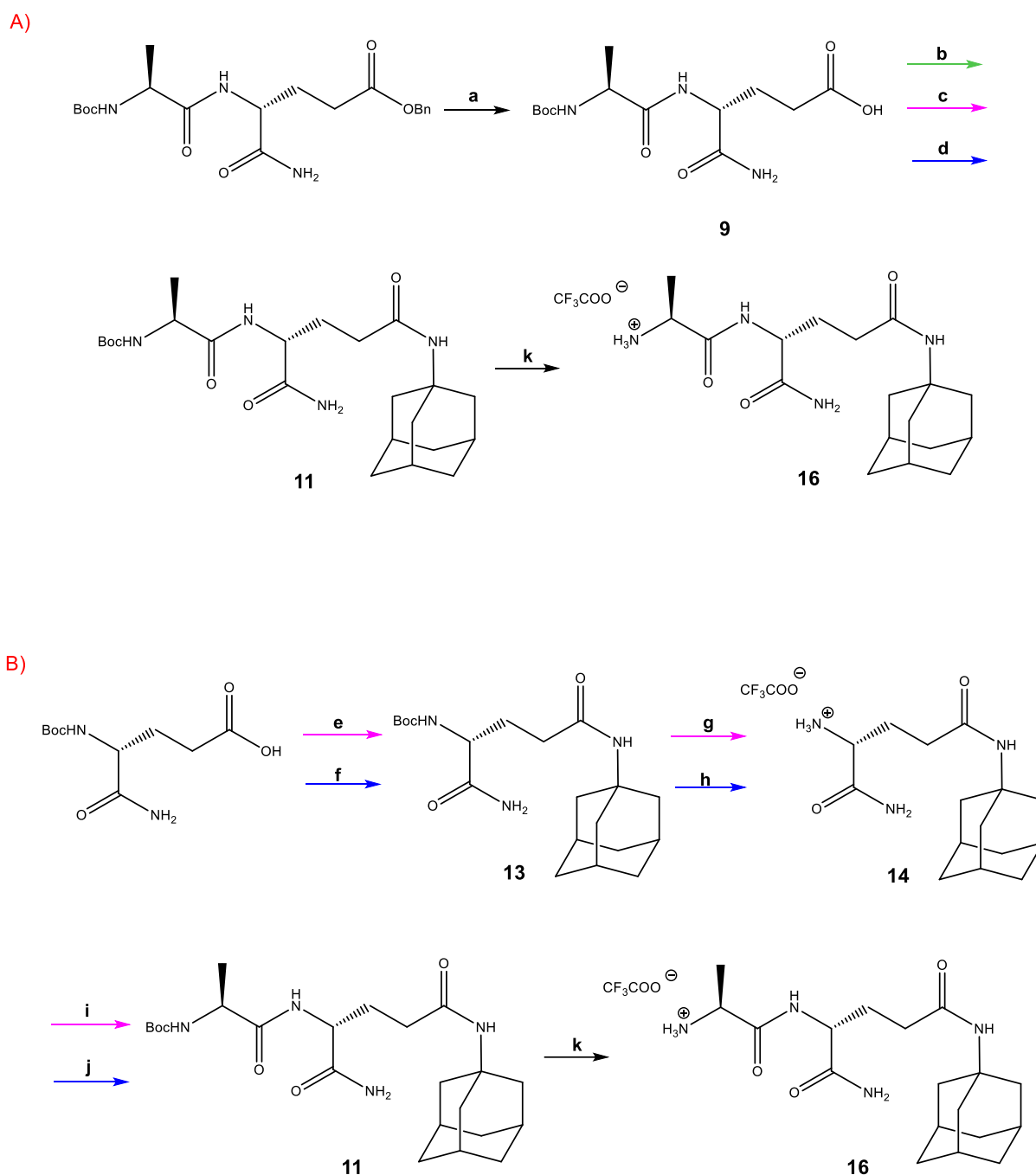
Tablica 4. Pregled korištenih metoda amidacije za pripravu adamantil-triazolnog derivata Boc-L-Ala-D-isoGln-OH **10**

Metoda amidacije	Vrijeme reakcije	Iskorištenje/%	Produkt
NBCF/NMM	2 h	69	spoj <b>10</b>
EDC·HCl/HOBt	72 h	71	spoj <b>10</b>
HATU/DIPEA	18 h	81	spoj <b>10</b>

Posljednji korak u pripravi jedne od ciljnih molekula **15** uključivao je uklanjanje *tert*-butiloksikarbonilne zaštitne skupine. Produktu **10** koji je nastao u svim ispitanim metodama je naposljetku uklonjena Boc zaštitna skupina pomoću trifluoroctene kiseline čime je nastala TFA sol adamantil-triazolnog derivata desmuramil-dipeptida **15** s kvantitativnim iskorištenjem.

#### 4.4. Sinteza adamantilnog derivata desmuramil-dipeptida

Sintezi adamantilnog derivata desmuramil-dipeptida pristupilo se na dva načina (slika 45): (A) direktna modifikacija komercijalno dostupnog zaštićenog dipeptida s adamantanskom jezgrom te (B) uvođenje adamantanske jezgre na *N*-zaštićeni D-izoglutamin nakon čega slijedi kondenzacija s *N*-zaštićenim L-alaninom čime se dobije adamantilni desmuramil-dipeptid. Tri metode amidacije koje su se pokazale uspješnima u sintezi spoja **10** isprobane su za uvođenje adamantilne podjedinice u A i B putu priprave spoja **11**.



Slika 45. Shematski prikazi sintetskih puteva A i B u pripravi ciljne molekule **16**:

(a) H<sub>2</sub>, 10 % Pd/C, 96 % EtOH, 34 PSI, ST, 18 h, 97 %; (b) 1. **NBCF**, **NMM**, THF, AdNH<sub>2</sub>·HCl, -10 °C, 1 h; 2. NaHCO<sub>3</sub>, ST, 1 h; (c) 1. **EDC·HCl**, **HOBT**, 0 °C, DCM : dioksan = 1:1; 2. AdNH<sub>2</sub>·HCl, TEA, 0 °C, 1 h; 3. ST, 48 h; 65 % (d) 1. **HATU**, **DIPEA**, DMF; 2. AdNH<sub>2</sub>·HCl, Ar, ST, 18 h, 89 %; (e) 1. **EDC·HCl**, **HOBT**, 0 °C, DCM : dioksan = 1:1; 2. AdNH<sub>2</sub>·HCl, TEA, 0 °C, 1 h; 3. ST, 48 h, 93 %; (f) 1. **HATU**, **DIPEA**, DMF; 2. AdNH<sub>2</sub>·HCl, Ar, ST, 18 h, 70 %; (g) TFA, DCM, ST, 2,5 h, 97 %; (h) TFA, DCM, ST, 2,5 h, 97 %; (i) 1. Boc-L-Ala-OSu, TEA, THF, Ar, 0 °C, 30 min; 2. ST, 24 h, 69 %; (j) 1. Boc-L-Ala-OSu, TEA, THF, Ar, 0 °C, 30 min; 2. ST, 24 h, 61 %; (k) TFA, DCM, ST, 2,5 h, 84 %

Prvi pristup sintezi adamantilnog derivata iz zaštićenog komercijalno dostupnog dipeptida (slika 45, A) obuhvaća modifikaciju bočnog lanca aminokiseline izoglutamina na dipeptidu s adamantanskom jezgrom prethodno ispitanim metodama amidacije. Sinteza je započela oslobađanjem  $\gamma$ -karboksilne skupine komercijalno dostupnog dipeptida, Boc-L-Ala-D-isoGln-OBn, katalitičkom hidrogenolizom u etanolu uz 10 % Pd/C koja je rezultirala kvantitativnim iskorištenjem. Nastali dipeptid s oslobođenom karboksilnom skupinom **9** je potom kondenziran s komercijalno dostupnim 1-aminoadamantan hidrokloridom.

Reakcija kondenzacije uz NBCF/NMM nakon kromatografskog čišćenja rezultirala je izrazito niskim iskorištenjem spoja **11** (18 %). Navedena metoda je, uz nisko iskorištenje, imala poteškoće s izolacijom čistog spoja te nije uspješno dobiven  $^1\text{H}$  NMR spektar čistog uzorka (Dodatak 3, *Metoda I*). Kao jedan od sporednih produkata koji onečišćuje spoj **11** je uretanski derivat nastao napadom 1-aminoadamantana na dio mješovitog anhidrida koji potječe od klorformijatnog reagensa (slika 9).

Potom je isprobana kondenzacijska reakcija s karbodiimidnom metodom uz EDC · HCl i HOBt kao aditiv u prisustvu baze trietilamina, koja je nakon 48 h rezultirala nastankom željenog spoja **11** s iskorištenjem od 65 %. Struktura i diastereoizomerna čistoća priređenog spoja potvrđene su spektroskopijom NMR.

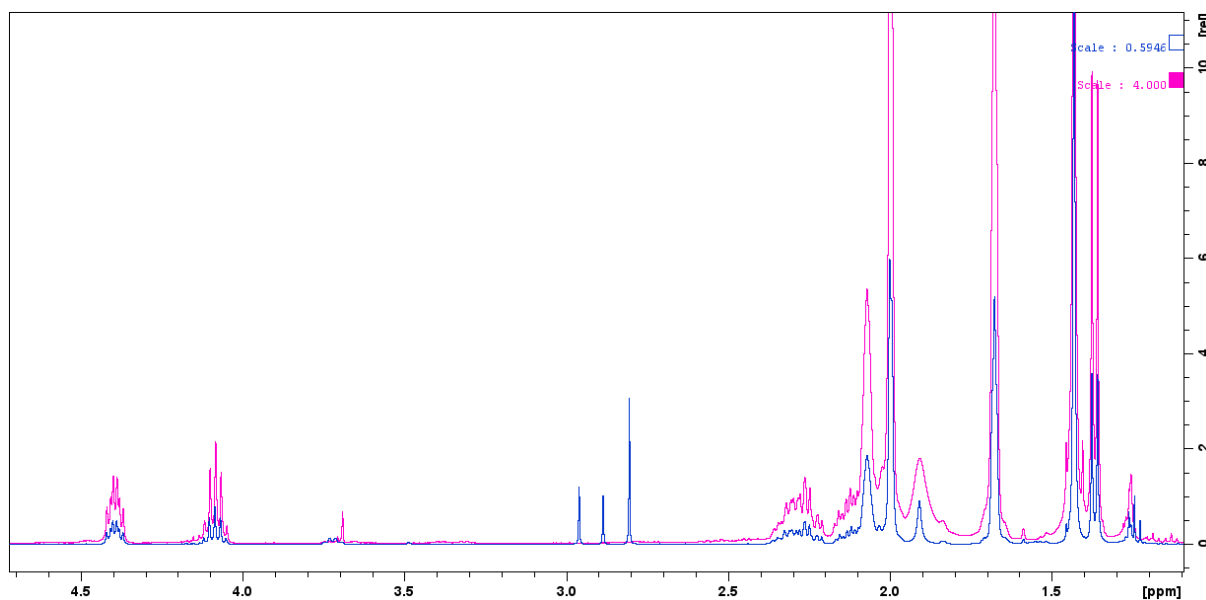
Zadnja ispitana metoda opisanog pristupa sintezi, HATU/DIPEA metoda, pokazala se i u slučaju adamantilnog derivata najprikladnijom za pripravu željenog spoja **11** i rezultirala je iskorištenjem od 89 %. Slično kao i u sintezi adamantil-triazolnog derivata **10** jedini nedostatak je otapalo (DMF) u kojem se provodi reakcija koje se otežano uklanja iz reakcijske smjese. Struktura i diastereoizomerna čistoća priređenog spoja potvrđene su spektroskopijom NMR.

Nakon obrade reakcijskih smjesa i identifikacije produkta **11** može se zaključiti da je HATU/DIPEA metoda ponovno najprikladnija, a ističe se visokim iskorištenjem i relativno kratkim vremenom provođenja reakcije.

Prva isprobana NBCF/NMM metoda rezultirala je nižim iskorištenjem, otežanim kromatografskim čišćenjem kao i nastankom smjese željenog produkta i nusprodukata te je zaključeno kako je navedena metoda neprikladna za vezanje aaminskih derivata na  $\gamma$ -kraju aminokiseline izoglutamina zbog čega u daljnjim eksperimentima nije više korištena.

Kao što je spomenuto u literaturnom dijelu, a pokazalo se i u provedenim eksperimentima, reagens HATU omogućava bržu kondenzaciju s visokim iskorištenjima i minimalnom racemizacijom te je vrlo učinkovit za kondenzaciju peptida i sterički zahtjevnijih molekula poput 1-aminoadamantana. Isti lipofilni prekursor NBCF/NMM metodom nije uspješno vezan dok triazolni prekursor **3** u kojem je adamantanska jezgra udaljenija od amino skupine, primjerice, jest. Sama činjenica da je u NBCF/NMM metodi nastao sporedni uretanski produkt napadom 1-aminoadamantana na manje ometenu stranu mješovitog anhidrida dodatno potvrđuje da sterički faktori, pored elektronskih, itekako utječu na ishod opisanih kondenzacijskih reakcija. Jedan od razloga zašto se HATU metoda pokazala toliko uspješnom, ne samo u ovom radu već i u eksperimentima opisanim u literaturi, jest uloga piridinijevog dušika HATU reagensa koji ostvaruje vodikovu vezu s aminom kao nukleofilom što vodi stabilizaciji prijelaznog stanja.<sup>32</sup>

Usporedbom <sup>1</sup>H NMR spektara pripravljenog spoja **11** metodama II i III puta A uočeni su isti kemijski pomaci i cijepanja ključnih signala (slika 46) što dovodi do zaključka da HATU/DIPEA i EDC/HOBt metodama nastaje isti dijastereoizomer. U tablici 5 sumarno su prikazani rezultati i uvjeti ispitanih amidacijskih metoda.



Slika 46. Preklopljene ključne regije u <sup>1</sup>H NMR spektrima spoja **11** dobivenog različitim metodama amidacije: metoda II (ružičasto), metoda III (plavo)

Tablica 5. Pregled korištenih metoda amidacije u putu A sinteze adamantilnog derivata Boc-L-Ala-D-*iso*Gln-OH **11**

Metoda amidacije	Vrijeme reakcije	Iskorištenje/%	Produkt
NBCF/NMM	2 h	18	onečišćeni spoj <b>11</b>
EDC·HCl/HOBt	48 h	65	spoj <b>11</b>
HATU/DIPEA	18 h	89	spoj <b>11</b>

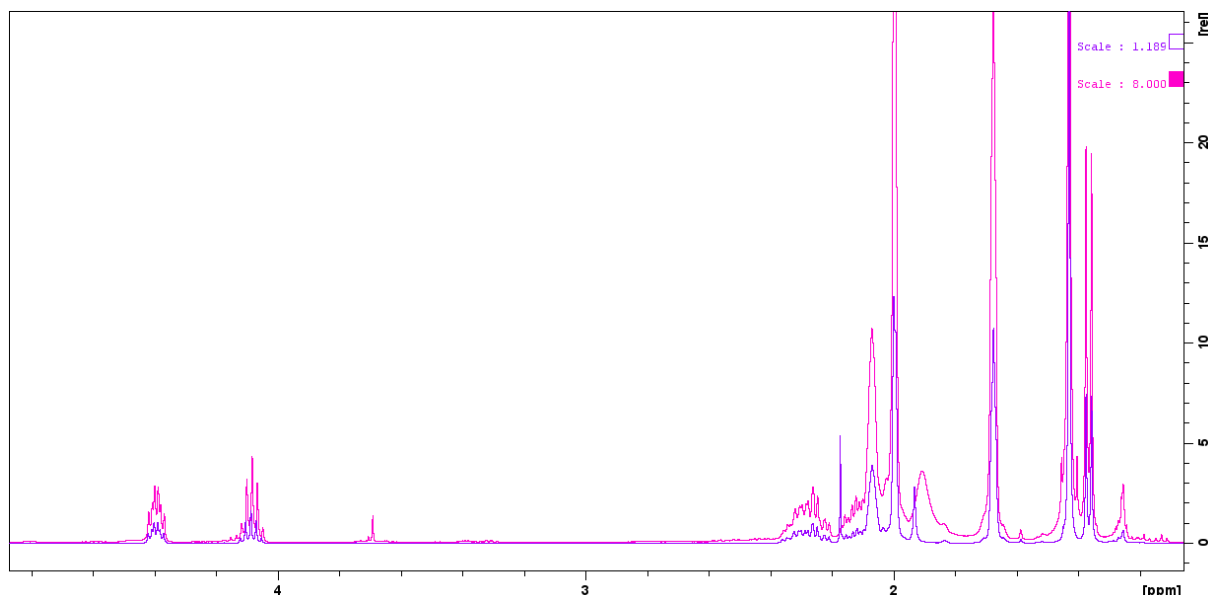
Drugi pristup sintezi adamantilnog derivata zaštićenog dipeptida sastoji se od tri koraka (slika 45, B): (a) reakcija *N*-zaštićene aminokiseline *D*-izoglutamina s komercijalno dostupnim 1-aminoadamantan hidrokloridom, (b) uklanjanje *tert*-butiloksikarbonilne zaštitne skupine s prethodno pripremljenog amida te (c) kondenzacija TFA soli *D*-izoglutamina s modificiranim bočnim lancem i komercijalno dostupnog *N*-hidroksisukcinimidnog estera Boc-L-alanina (Boc-L-Ala-OSu).

Modifikacija bočnog lanca Boc-*D-iso*Gln-OH provedena je dvjema metodama koje su uspješno rezultirale željenim produktom u prethodnom pristupu sintezi spoja **11**, EDC/HOBt i HATU/DIPEA metodama amidacije. Nakon kromatografske obrade EDC/HOBt metodom dobiven je produkt **13** s iskorištenjem od 93 %, dok je HATU/DIPEA metodom dobiven s iskorištenjem od 70 %. Struktura priređenog spoja **13** u obje metode potvrđena je spektroskopijom NMR. Prije kondenzacije nastalog modificiranog derivata *D*-izoglutamina s hidroksisukcinimidnim esterom Boc-L-alanina provedeno je uklanjanje Boc zaštitne skupine pomoću trifluoroctene kiseline te je pripremljen adamantilni derivat *D-iso*Gln-OH **14** u obliku TFA soli uz kvantitativno iskorištenje u obje metode. Sljedećim korakom, reakcijom kondenzacije s Boc-L-Ala-OSu pripremljen je željeni spoj **11** s iskorištenjem od 69 % (sinteza iz spoja **13** dobivenog EDC/HOBt metodom) i 61 % (sinteza iz spoja **13** dobivenog HATU/DIPEA metodom).



Nakon obrade reakcijskih smjesa i identifikacije produkta **11** nastalog drugim pristupom sintezi željenog spoja može se zaključiti da se EDC/HOBt metoda ističe u putu B nešto većim iskorištenjem, jednostavnom izolacijom čistog spoja te diastereoizomernom čistoćom. Iako je EDC/HOBt metoda dulja u odnosu na HATU/DIPEA metodu, pokazala se odličnom za navedeni pristup sintezi.

Usporedbom  $^1\text{H}$  NMR spektara spoja **11** dobivenog različitim sintetskim pristupima i istom metodom amidacije, pogotovo ključnih regija u kojima se nalaze signali  $\alpha$ -ugljikovih atoma alanina (multiplet  $\sim 4,1$  ppm) i izoglutamina (multiplet  $\sim 4,4$  ppm) te diastereoizotopni vodikovi atomi izoglutamina (multipleti  $\sim 2,1$  i  $2,3$  ppm) (slika 47) zaključeno je da je u svim slučajevima nastao isti diastereoizomer.

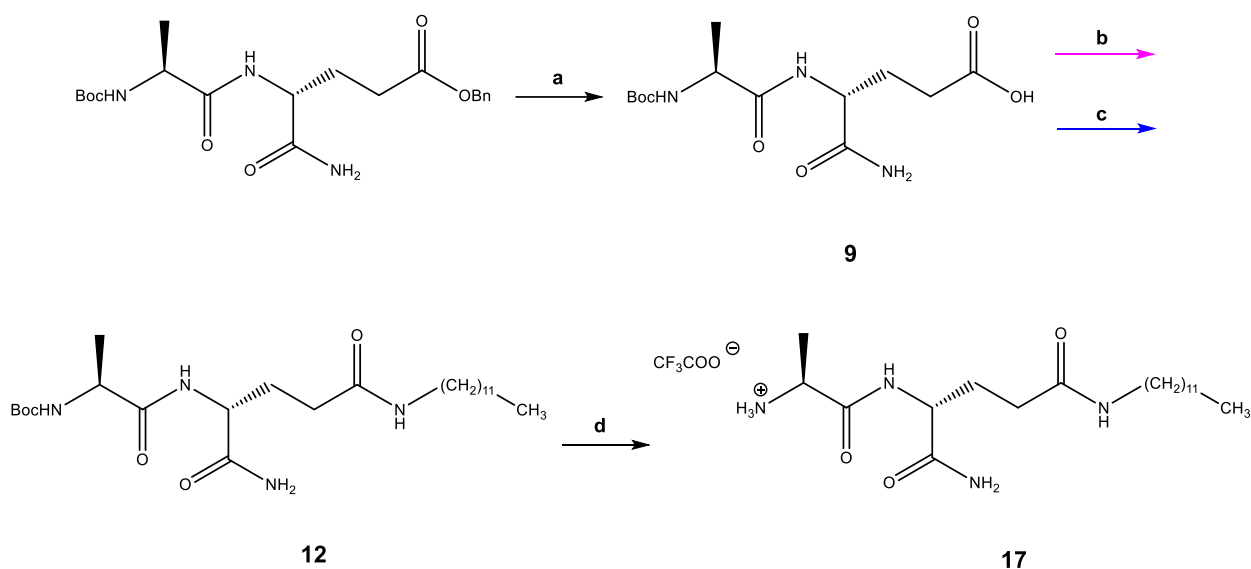


Slika 47. Preklopljene ključne regije u  $^1\text{H}$  NMR spektrima spoja **11** dobivenog različitim sintetskim putevima istom metodom II: put A (ružičasto) i put B (ljubičasto)

Nakon uklanjanja Boc zaštitne skupine pomoću trifluoroctene kiseline u iskorištenju od 84 % dobivena je druga ciljna molekula **16**, adamantilni derivat desmuramil-dipeptida.

#### 4.5. Sinteza dodecilnog derivata desmuramil-dipeptida

Sinteza dodecilnog derivata desmuramil-dipeptida provedena je u nekoliko koraka (slika 48), a ispitane su metode amidacije koje su se pokazale najoptimalnijima u prethodnim sintezama (EDC/HOBt i HATU/DIPEA).



Slika 48. Shematski prikaz pripreve ciljne molekule **17**:

(a) H<sub>2</sub>, 10 % Pd/C, 96 % EtOH, 34 PSI, ST, 18 h, 97 %; (b) 1. EDC·HCl, HOBt, 0 °C, DCM : dioksan = 1:1; 2. spoj **5**, TEA, 0 °C, 1 h; 3. ST, 48 h, 86 %; (c) 1. HATU, DIPEA, DMF; 2. spoj **5**, Ar, ST, 18 h, 90 %; (d) TFA, DCM, ST, 2,5 h, 97 %

Priprava dodecilnog derivata desmuramil-dipeptida je započela, kao i sinteze prethodno pripremljenih derivata, hidrogenolizom na Parrovom uređaju čime je uspješno uklonjena benzilna zaštitna skupina s komercijalno dostupnog zaštićenog dipeptida, Boc-L-Ala-D-isoGln-OBn. Kondenzacijom nastalog dipeptida **9** s prethodno pripremljenim lipofilnim prekursorom, dodecilaminom **5** uspješno je dobiven, s obje metode, produkt **12**.

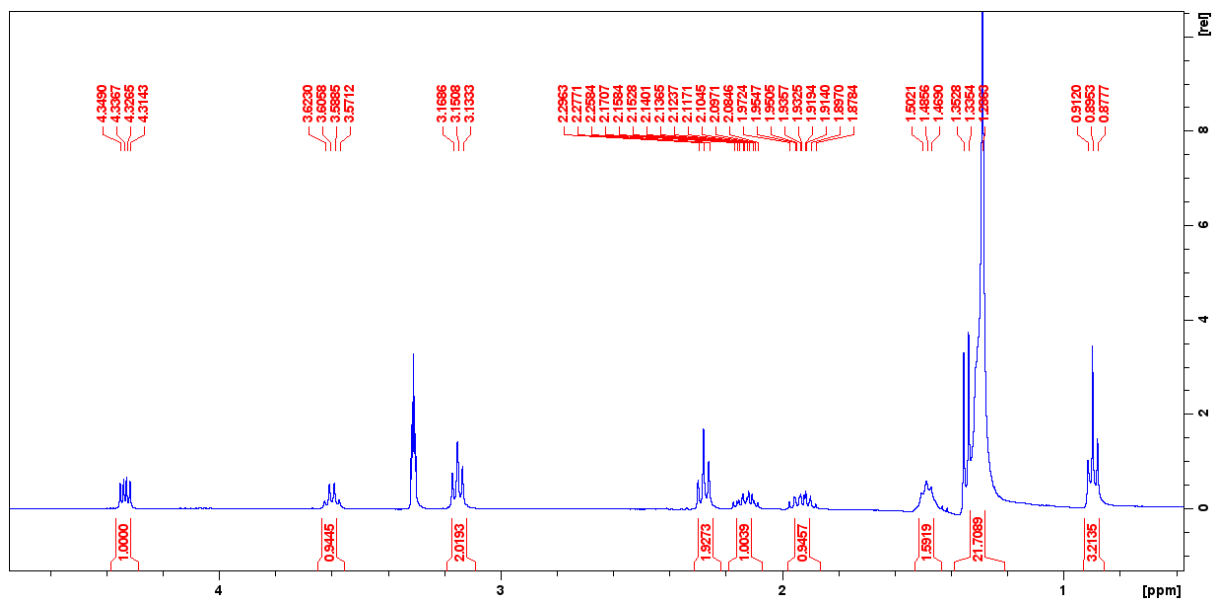
EDC/HOBt i HATU/DIPEA metode rezultirale su nastankom spoja **12** s visokim iskorištenjima od 86 %, odnosno 90 %. Struktura i dijastereoizomerna čistoća produkta dobivenog navedenim metodama potvrđene su spektroskopijom NMR. Ranije upotrijebljene metode amidacije za pripremu spojeva **10** i **11** još su se jednom pokazale učinkovitim prilikom pripreve dodecilnog derivata zaštićenog dipeptida **12**. Iako EDC/HOBt metodu odlikuje velika čistoća i jednostavna izolacija željenog spoja, zbog duljeg vremena provođenja reakcije i nešto manjeg iskorištenja, prikladnijom metodom se ponovno pokazala HATU/DIPEA metoda.

Usporedbom  $^1\text{H}$  NMR spektara ciljnog spoja **12** uočavaju se ponovo u ključnim regijama isti kemijski pomaci i cijepanja te je zaključeno da HATU/DIPEA i EDC/HOBt metodama nastaje isti diastereoizomer. U tablici 6 sumarno su prikazane metode korištene za sintezu dodecilnog derivata Boc-L-Ala-D-*iso*Gln-OH **12** te njihov rezultat s odgovarajućim iskorištenjem.

Tablica 6. Pregled korištenih metoda za pripravu dodecilnog derivata Boc-L-Ala-D-*iso*Gln-OH **12**

Metoda amidacije	Vrijeme reakcije	Iskorištenje/%	Produkt
EDC-HCl/HOBt	48 h	86	spoj <b>12</b>
HATU/DIPEA	18 h	90	spoj <b>12</b>

Posljednji korak u pripravi zadnje ciljne molekule **17** u obliku TFA soli obuhvaćao je uklanjanje *tert*-butiloksikarbonilne zaštitne skupine sa spoja **12**, već uhodanim postupkom pomoću trifluoroctene kiseline te rezultirao kvantitativnim iskorištenjem. Spoju **12** koji je dobiven metodom II dodan je isti spoj pripravljen metodom III te se pristupilo posljednjem koraku kojim je dobivena ciljna molekula **17** u obliku TFA soli. Uzorku je snimljen  $^1\text{H}$  NMR spektar (slika 49) koji je ukazivao na postojanje jednog izomera konačnog spoja čime je još jednom potvrđeno da su u dvije prethodno ispitane metode amidacije na dodecilnom derivatu nastali isti diastereoizomerni produkti.



Slika 49.  $^1\text{H}$  NMR spektar ciljnog spoja 17 u obliku TFA soli

## § 5. ZAKLJUČAK

1. Uspješno su pripremljeni lipofilni aminski prekursori (spojevi **3** i **5**) potrebni za sintezu lipofilnih derivata desmuramil-dipeptida. Problematičnim se jedino pokazao spoj **8** zbog svoje nestabilnosti. No, u sintetskom putu njegove pripreme uspješno su pripremljeni mesilatni derivat **6** te azidni derivat kolesterola **7**.

2. U potrazi za najadekvatnijom metodom za vezanje lipofilnih amina na  $\gamma$ -kraj aminokiseline D-izoglutamina debenziliranog dipeptida, Boc-L-Ala-D-isoGln-OH **9**, ispitane su tri metode amidacije: NBCF/NMM; EDC/HOBt i HATU/DIPEA.

NBCF/NMM metoda se pokazala neprikladnom zbog loših iskorištenja i otežanih kromatografskih pročišćavanja produkta. Metode EDC/HOBt i HATU/DIPEA su se pokazale vrlo pogodnim obzirom na iskorištenje te čistoću ciljnih molekula. Iako EDC/HOBt metoda rezultira većom čistoćom i jednostavnijom izolacijom željenog produkta zbog duljeg vremena provođenja reakcije (48 h) i manjih iskorištenja (71 % za **10**; 65 % za **11** i 86 % za **12**), kao najpogodnija metoda amidacije se pokazala HATU/DIPEA metoda s relativno kratkim vremenom provođenja reakcije (18 h) i većim iskorištenjima (81 % za **10**; 89 % za **11** i 90 % za **12**).

3. Strukture svih produkata su potvrđene spektroskopijom NMR te spektrometrijom masa. Iako prethodno navedenim metodama nastaju dijastereoizomerno čisti produkti, spektroskopijom NMR nije moguće utvrditi koji od dijastereoizomera nastaje, no kako je početnom korištenom reagensu, komercijalno dostupnom Boc-L-Ala-D-isoGln-OBn, konfiguracija poznata, pretpostavljeno je da su priređeni spojevi jednake konfiguracije kao početni dipeptid.

4. Obzirom da navedene sinteze započinju korištenjem komercijalno dostupnog, no skupog zaštićenog dipeptida, Boc-L-Ala-D-isoGln-OBn, ispitan je drugi sintetski pristup za samo jedan, adamantilni derivat desmuramil-dipeptida kako bi se usporedio s prethodnim. Ovaj pristup sintezi ciljne molekule **16** započeo je kondenzacijskom reakcijom N-zaštićenog D-isoGln-OH s komercijalno dostupnim 1-aminoadamantan hidrokloridom. Korištene su dvije uspješnije metode amidacije prethodnog pristupa, EDC/HOBt i HATU/DIPEA. Boljom

metodom se pokazala EDC/HOBt koja je rezultirala većim iskorištenjem i većom čistoćom produkta. Navedenim pristupom uspješno je dobiven, s obje metode amidacije, isti diastereoizomer **11** koji je dobiven i s prvim pristupom sinteze iz kupovnog dipeptida.

5. Oba pristupa sintezi ciljne molekule **16** su uspoređeni i izvedeno je nekoliko zaključaka (tablica 7). Manje ukupno iskorištenje drugog pristupa sinteze (put B) adamantilnog derivata dipeptida **16** (52 % za sintezu u kojoj je korištena EDC/HOBt metoda; 35 % za sintezu u kojoj je korištena HATU/DIPEA metoda) te dodatni korak s otežanom izolacijom čistog spoja zbog onečišćenja Boc-Ala-OH nastalog hidrolizom Boc-L-Ala-OSu u reakciji kondenzacije lipofilnih D-izoglutaminskih derivata daju prednost prvom pristupu sinteze. Ukupno iskorištenje prvog pristupa sinteze (put A) adamantilnog derivata **16** iznosi 53 % za sintezu u kojoj je korištena EDC/HOBt metoda, odnosno 73 % za sintezu u kojoj je korištena HATU/DIPEA metoda. Međutim, u slučaju nestašice kupovnog dipeptida, moguće je koristiti i navedeni drugi pristup kojim je uspješno dobiven željeni diastereoizomer adamantilnog desmuramil-dipeptida.

Tablica 7. Kratki pregled korištenih metoda amidacija za pripravu lipofilnih derivata desmuramil-dipeptida

Metoda amidacije	Vrijeme reakcije	Derivati DMP	Sintetski put A (dipeptid)		Sintetski put B (aminokiselina)	
			Iskorištenje	Rezultat	Iskorištenje	Rezultat
NBCF/NMM	2 h	Ad	-	onečišćeni spoj <b>11</b>	-	-
		TAd	69%	spoj <b>10</b>	-	-
		C <sub>12</sub>	-	-	-	-
EDC-HCl/HOBt	48 h	Ad	65%	spoj <b>11</b>	93%	spoj <b>11</b>
	72 h	TAd	71%	spoj <b>10</b>	-	-
	48 h	C <sub>12</sub>	86%	spoj <b>12</b>	-	-
HATU/DIPEA	18 h	Ad	89%	spoj <b>11</b>	70%	spoj <b>11</b>
		TAd	81%	spoj <b>10</b>	-	-
		C <sub>12</sub>	90%	spoj <b>12</b>	-	-

6. Sa svih *N*-zaštićenih derivata u sintezama *tert*-butiloksikarbonilna zaštitna skupina uspješno je uklonjena u gotovo kvantitativnim iskorištenjima. Time su dobiveni spojevi **3**, **14-17** čije su strukture i visoka čistoća potvrđeni spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

## § 6. LITERATURNI IZVORI

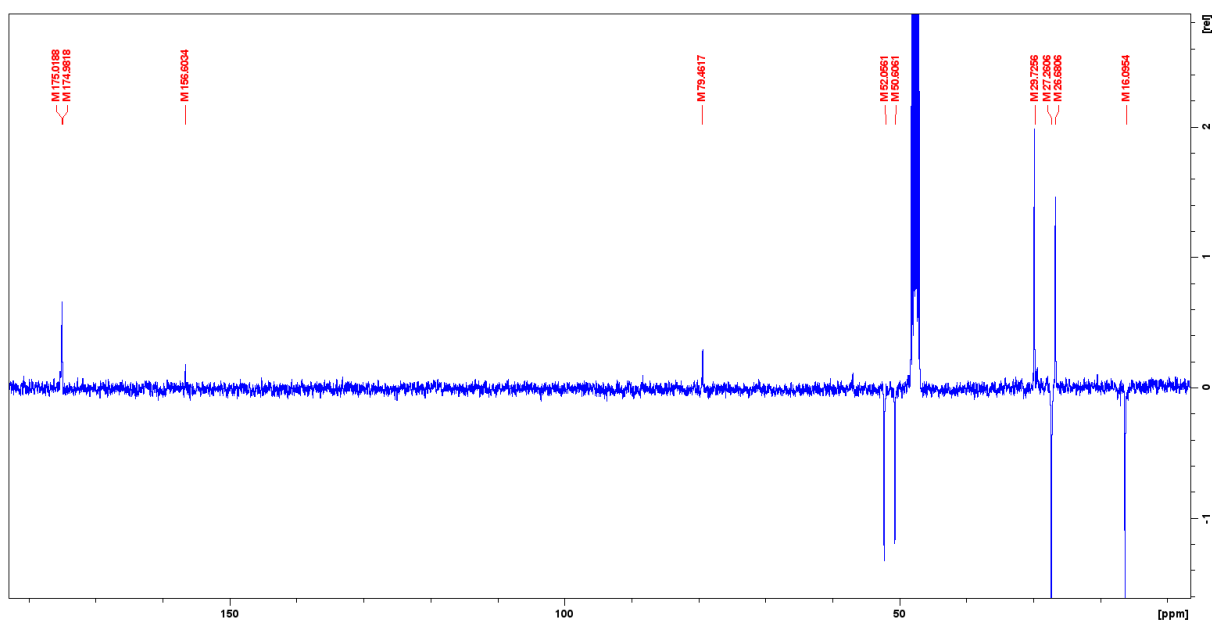
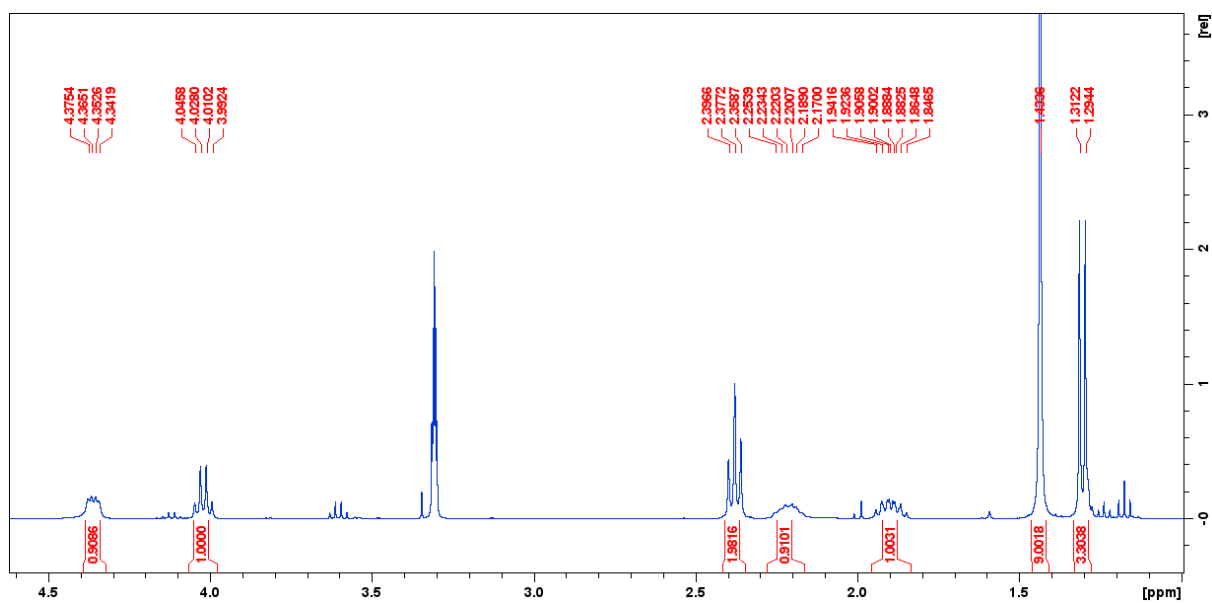
1. R. Ribić, M. Paurević, S. Tomić, *Croat. Chem. Acta* **92** (2019) 153–161.
2. J. C. Aguilar, E. G. Rodriguez, *Vaccine* **25** (2007) 3752–3762.
3. R. Ribić, S. Tomić, *Kem. Ind.* **62** (2013) 19–31.
4. R. Ribić, R. Stojković, L. Milković, M. Antica, M. Cigler, S. Tomić, *Beilstein J. Org. Chem.* **15** (2019) 1805–1814.
5. A. Adam, J. F. Petit, P. Lefrancier, E. Lederer, *Mol. Cell. Biochem.* **41** (1981) 27–47.
6. M. Manček-Keber, R. Ribić, F. Chain, D. Sinnaeve, J. C. Martins, R. Jerala, S. Tomić, K. Feher, *Molecules* **25** (2020) 3707–3717.
7. W. Cheng, T. You, Z. Teo, A. A. Sayyad, J. Maharana, C. Guo, P. Liang, C. Lin, F. Meng, *Chem. Asian J.* **15** (2020), 3836–3844.
8. R. Ribić, M. Manček-Keber, F. Chain, D. Sinnaeve, J. C. Martins, R. Jerala, S. Tomić, K. Feher, *J. Phys. Chem. B* **124** (2020) 4132–4145.
9. A. Štimac, M. Šekutor, K. Mlinarić-Majerski, L. Frkanec, R. Frkanec, *Molecules* **22** (2017) 297–310.
10. A. Štimac, S. Šegota, M. D. Sikirić, R. Ribić, L. Frkanec, V. Svetličić, S. Tomić, B. Vranešić, R. Frkanec, *BBA-Biomembranes*, **1818** (2012) 2252–2259.
11. F. A. Khan, N. Nasim, Y. Wang, A. Alhazmi, M. Sanam, Z. Ul-Haq, D. Yalamati, M. Ulanova, Z. H. Jiang, *Eur. J. Med. Chem.* (2020) 1–47.
12. C. Ogawa, Y. J. Liu, K. S. Kobayashi, *Curr. Bioact. Compd.* **7** (2011) 180–197.
13. D. M. M. Jaradat, *Amino Acids* **50** (2018) 39–68.
14. C. Petrou, Y. Sarigiannis, *Elsevier, Pept. Appl. Biomed., Biotechnol. Bioeng.* (2018) 1–21.
15. S. Chandrudu, P. Simerska, I. Toth, *Molecules* **18** (2013) 4373–4388.
16. A. I. Llobet, M. Alvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **109** (2009) 2455–2504.
17. P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, Thieme, Stuttgart, 2005.
18. E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **38** (2009) 606–631.
19. J. R. Dunetz, J. Magano, G. A. Weisenburger, *Org. Process Res. Dev.* **20** (2016) 140–177.
20. A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **111** (2011) 6557–6602.
21. C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **61** (2005) 10827–10852.



22. L. Nuić, *Klik-kemija, cikloadicija azida i alkina*, Završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019.
23. F. A. Carey, *Organic Chemistry*, McGraw Hill, New York, 1937, str. 326–357, 931–935.
24. S. Bräse, K. Banert, *Organic Azides: Syntheses and Applications*, John Wiley & Sons, 2010, str. 53–94.
25. V. Petrović-Peroković, D. Kidemet, R. Odžak, D. Parat, I. Primožić, V. Šimunić, *Praktikum za organsku kemiju*, **V** (2004) 37–39.
26. J. Draženović, *Novi postupci priprave adamantil-triazolnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2020.
27. M. Sohail, R. De Marco, Z. Jarolimova, M. Pawlak, E. Bakker, N. He, R. M. Latonen, T. Lindfors, J. Bobacka, *American Chemical Society*, **31** (2015) 10599–10609.
28. J. H. Boyer, *J. Am. Chem. Soc.*, **73** (1951) 5865–5866.
29. Q. Sun, S. Cai, B. R. Peterson, *Organic Letters*, **11** (2009) 567–570.
30. G. Vidya Sagar Reddy, G. Venkat Rao, R. V. K. Subramanyam, D. S. Iyengar, *Synth. Commun*, **30** (2000) 2233–2237.
31. M. Cigler, *SINTEZA KONJUGATA MANOZE I ADAMANTANSKIH DESMURAMIL-DIPEPTIDA*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2014.
32. L. A. Carpino, H. Imazumi, B. M. Foxman, M. J. Vela, P. Henklein, A. El-Faham, J. Klose, M. Bienert, *Org. Lett.*, **2** (2000) 2253–2256.

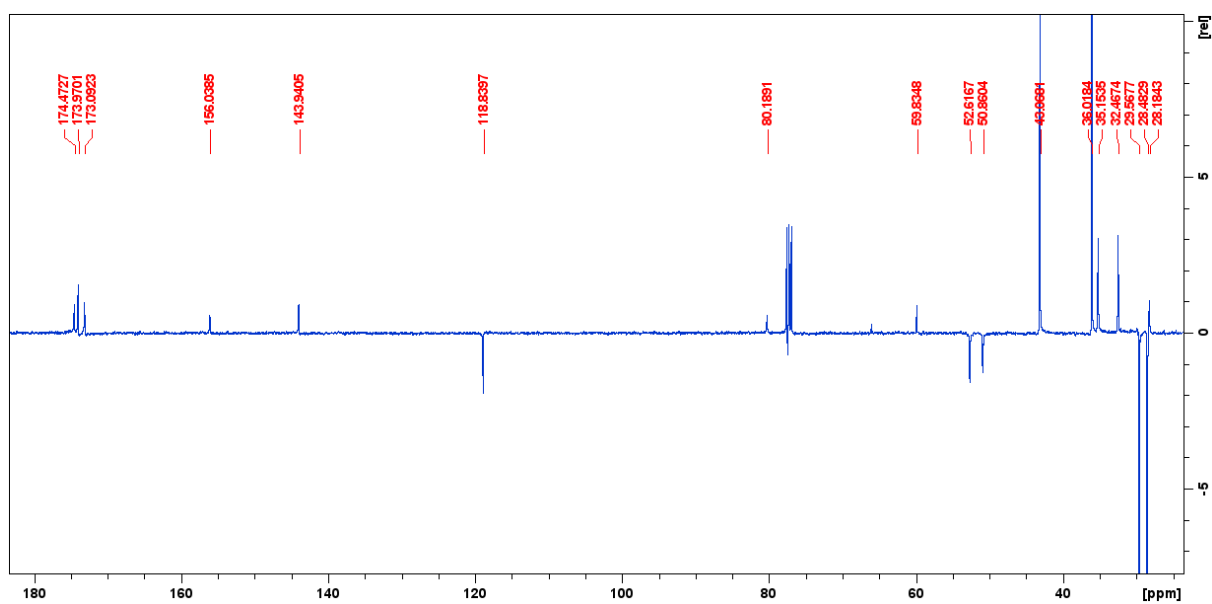
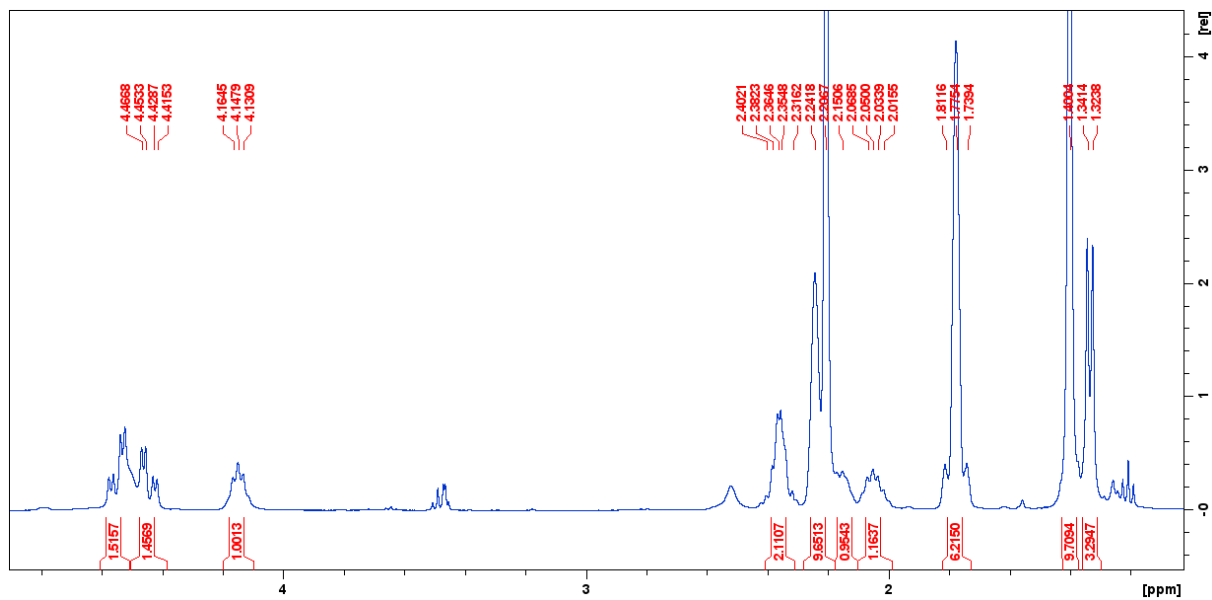
## § 7. DODATAK

Dodatak 1:  $^1\text{H}$  NMR i DEPTQ spoja 9

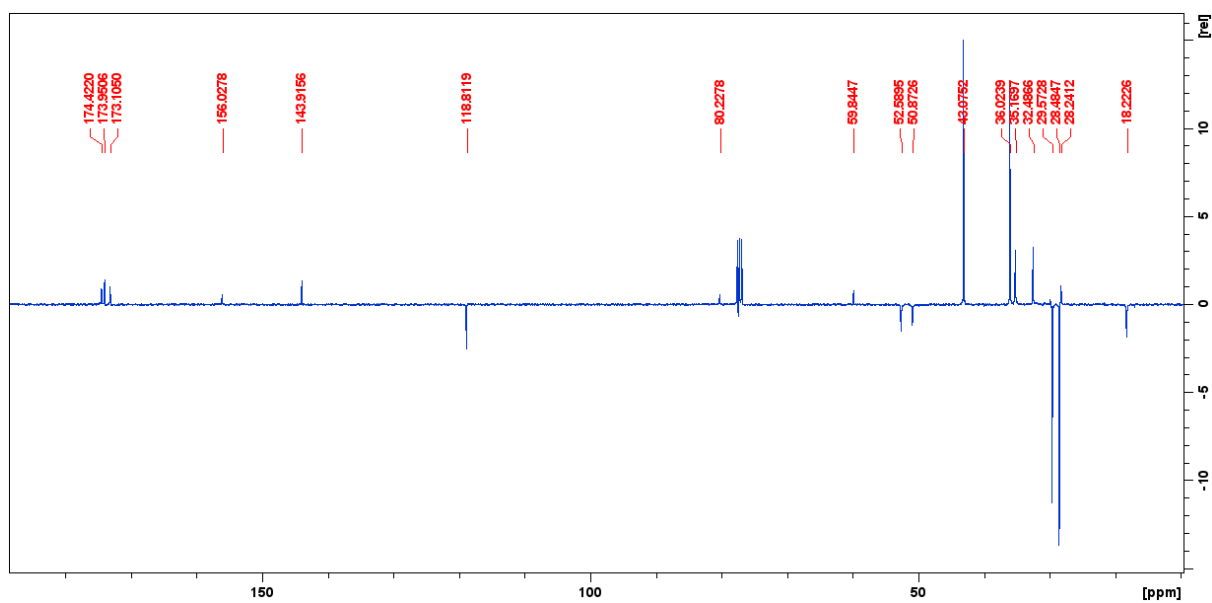
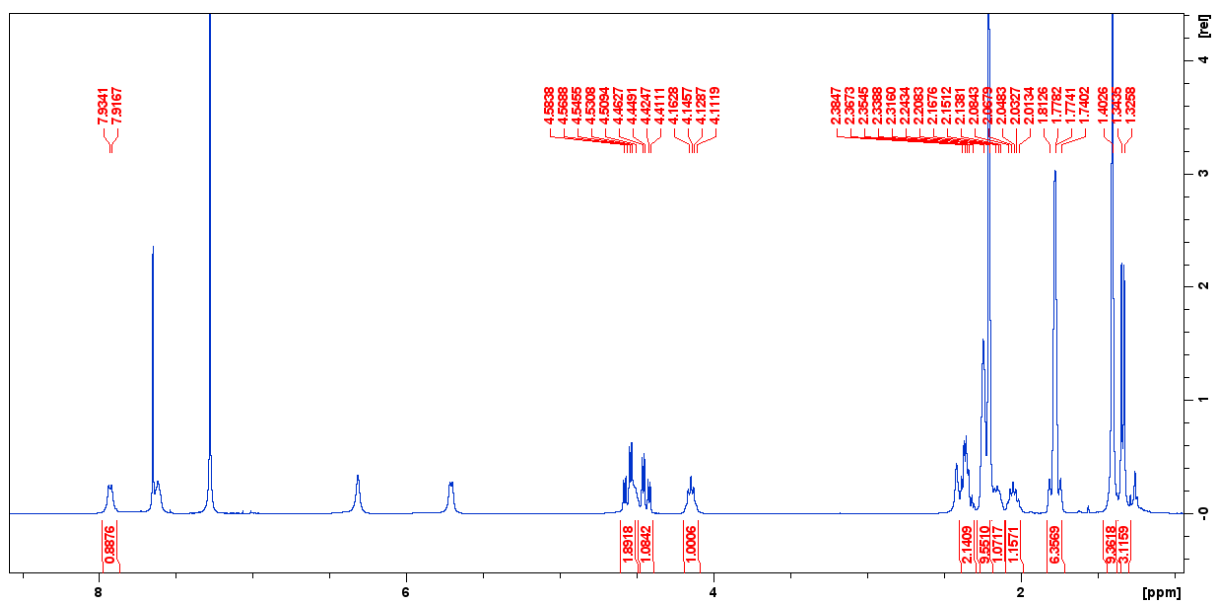


Dodatak 2:  $^1\text{H}$  NMR i DEPTQ spoja **10**

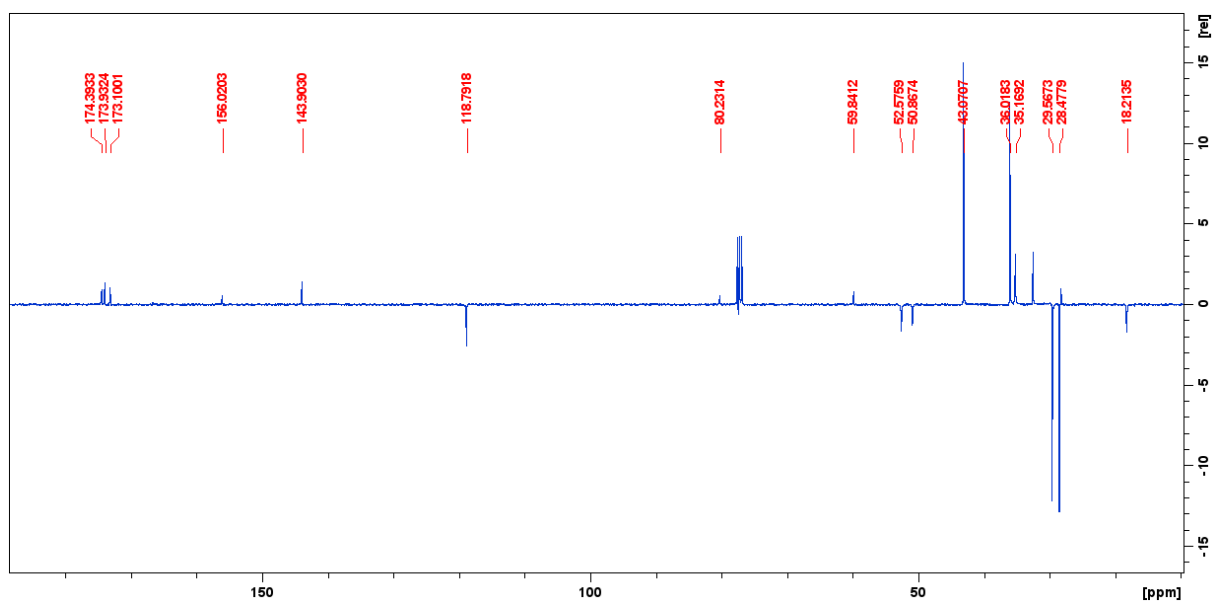
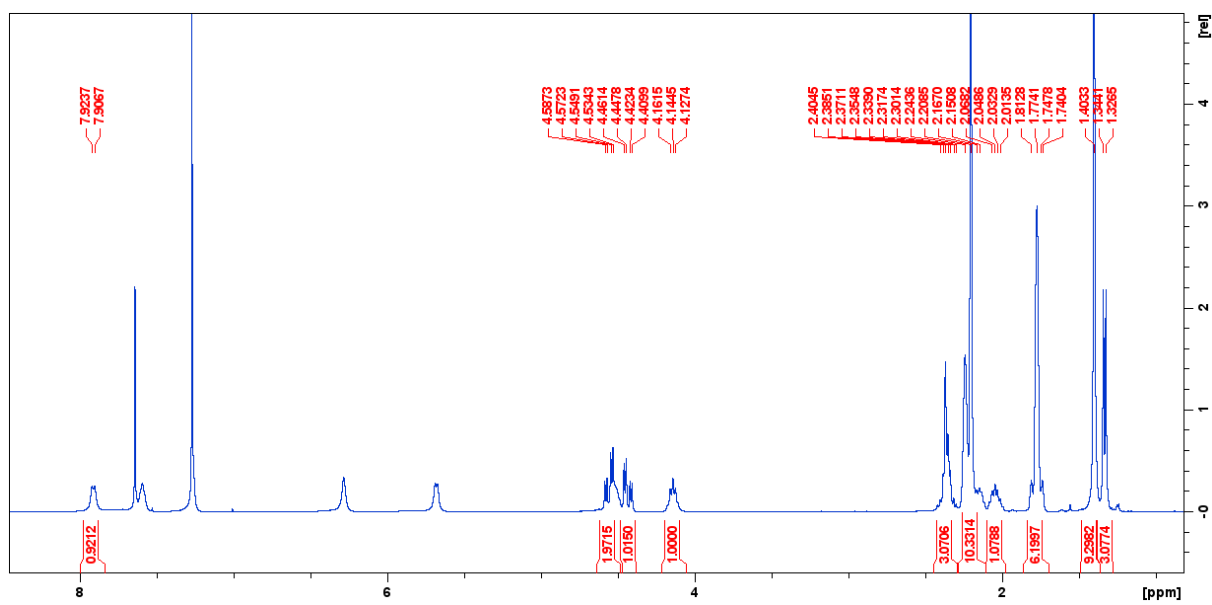
## Metoda I



Metoda II

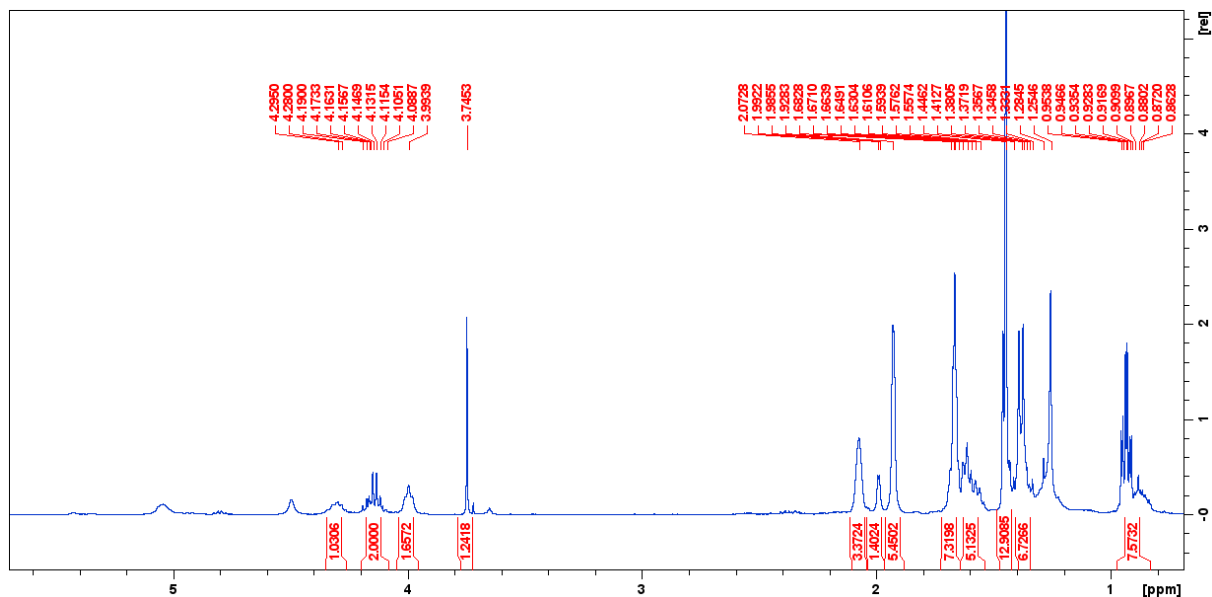


Metoda III

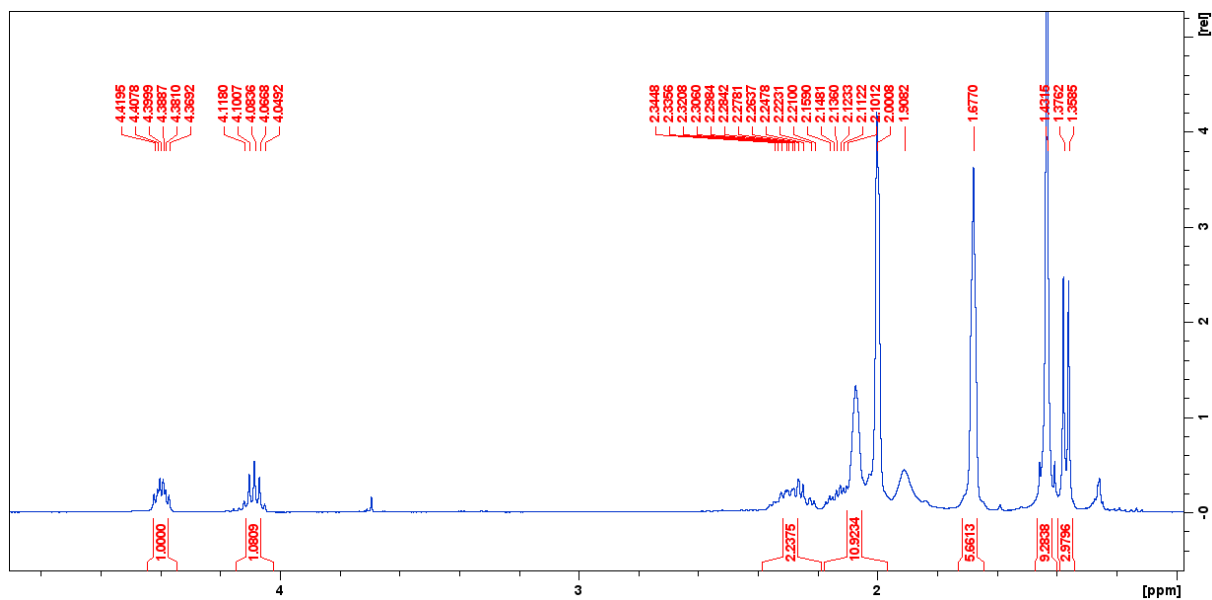


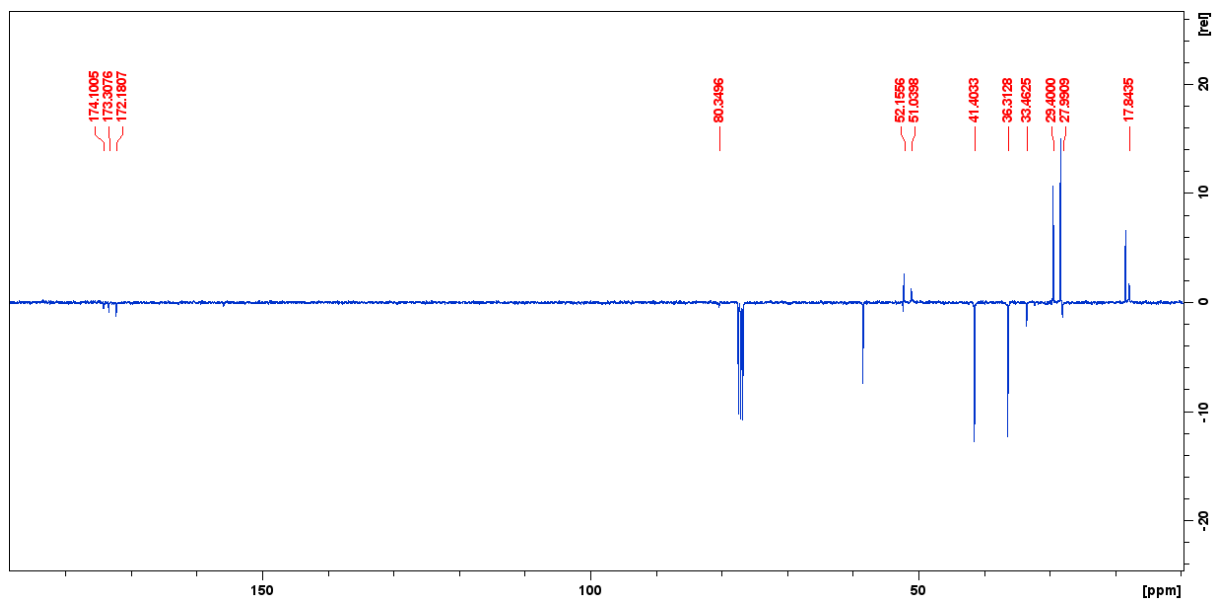
Dodatak 3:  $^1\text{H}$  NMR i DEPTQ spoja **11** (put A)

## Metoda I

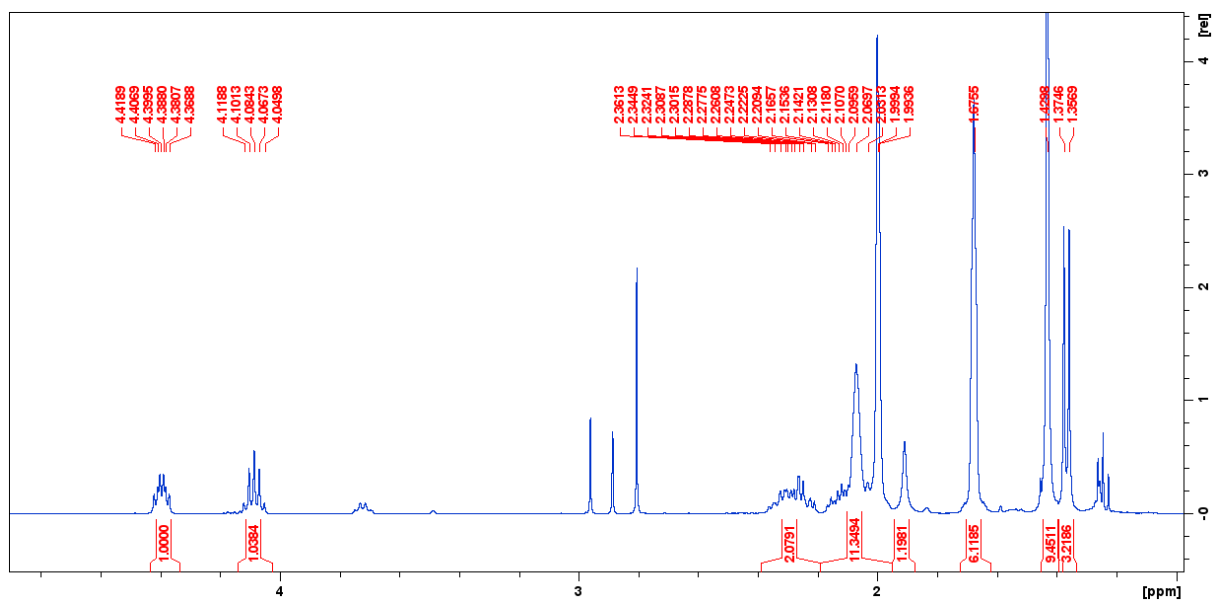


## Metoda II



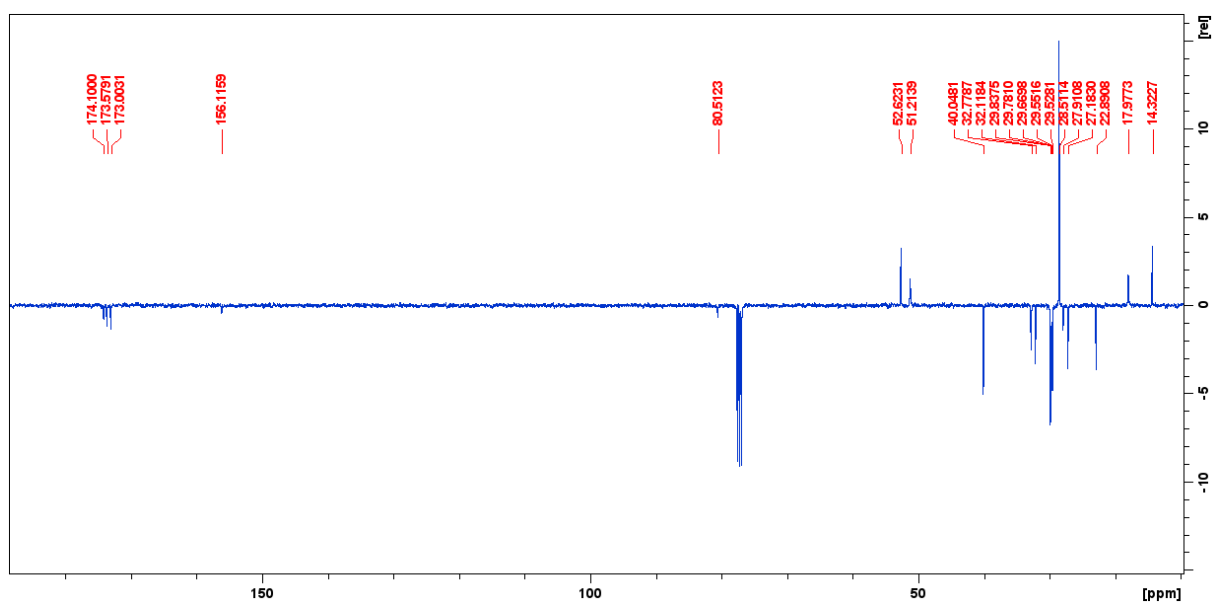
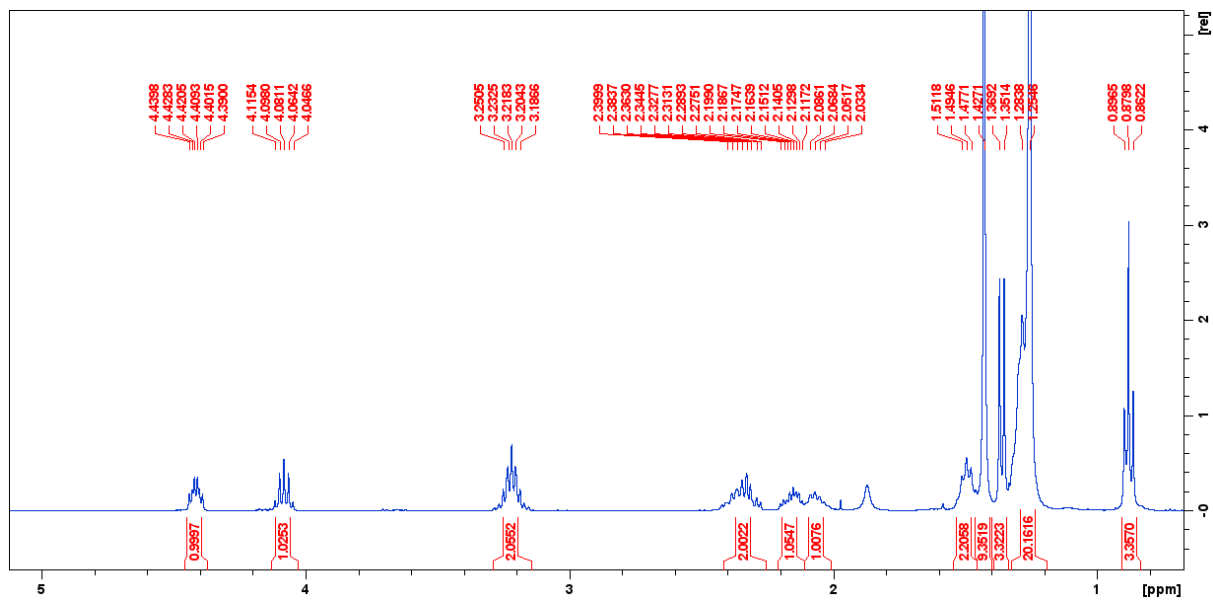


Metoda III



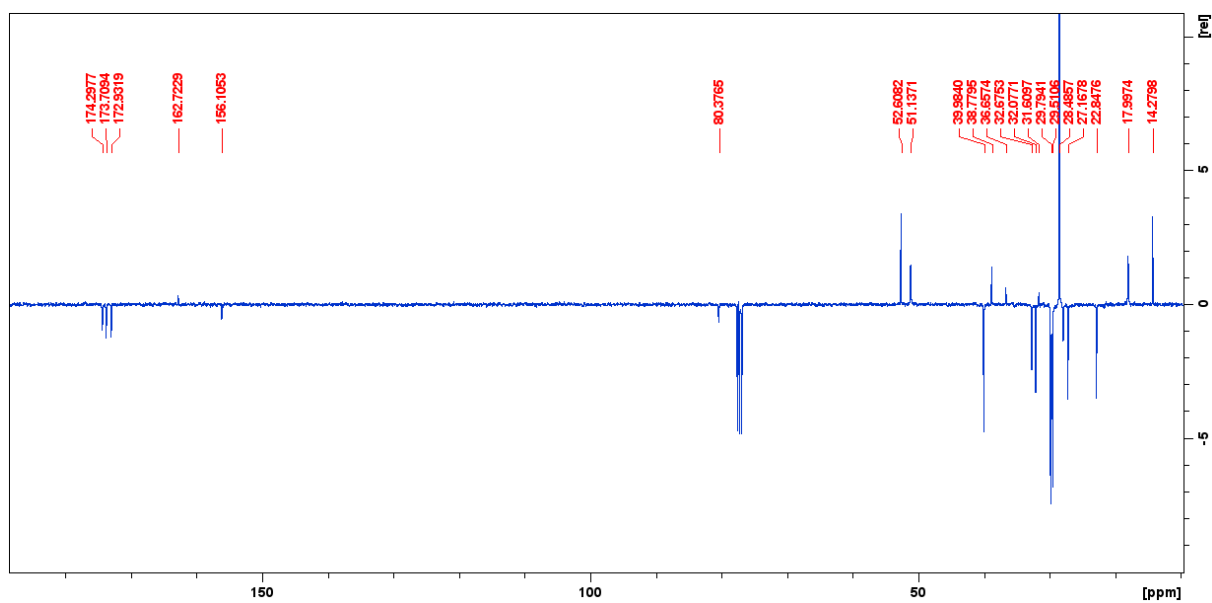
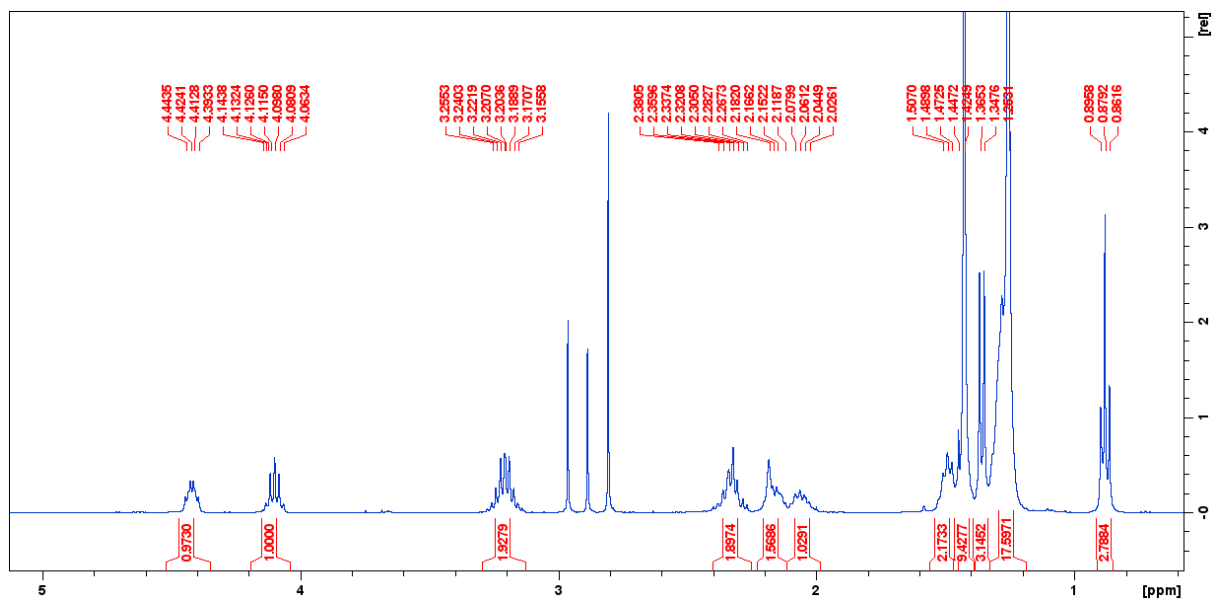
Dodatak 4:  $^1\text{H}$  NMR i DEPTQ spoja 12

## Metoda II



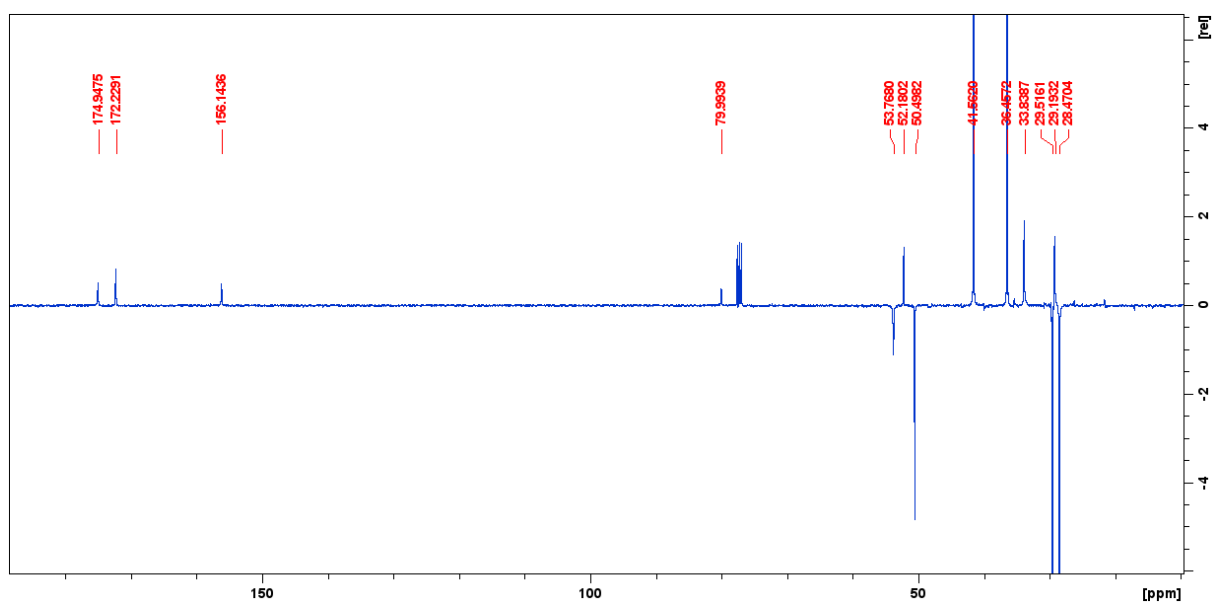
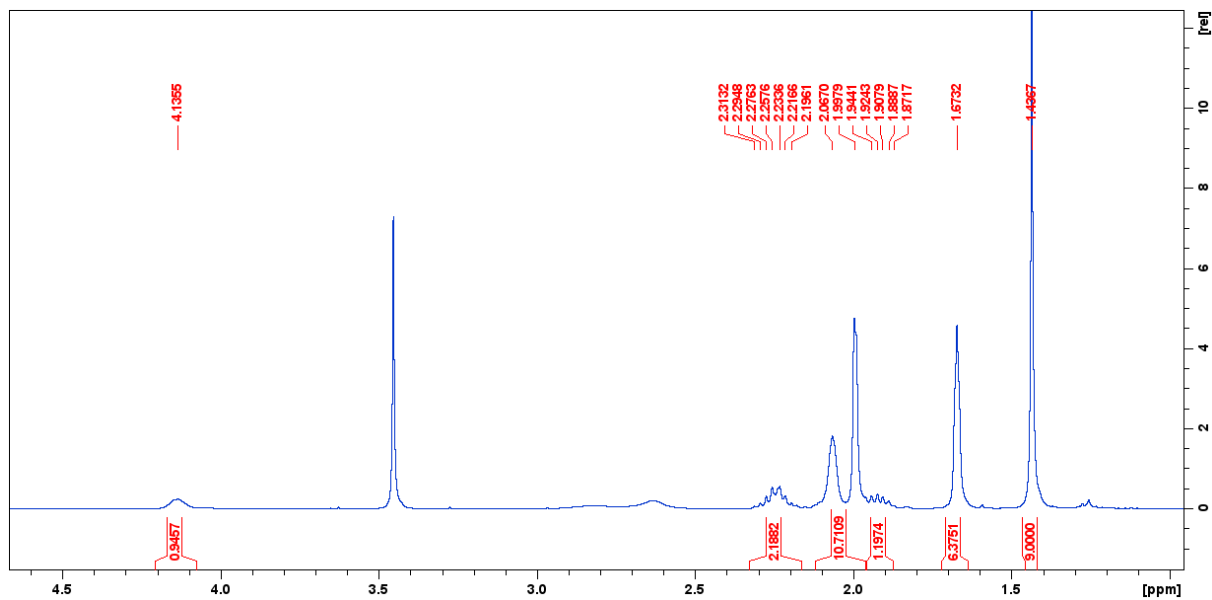


Metoda III

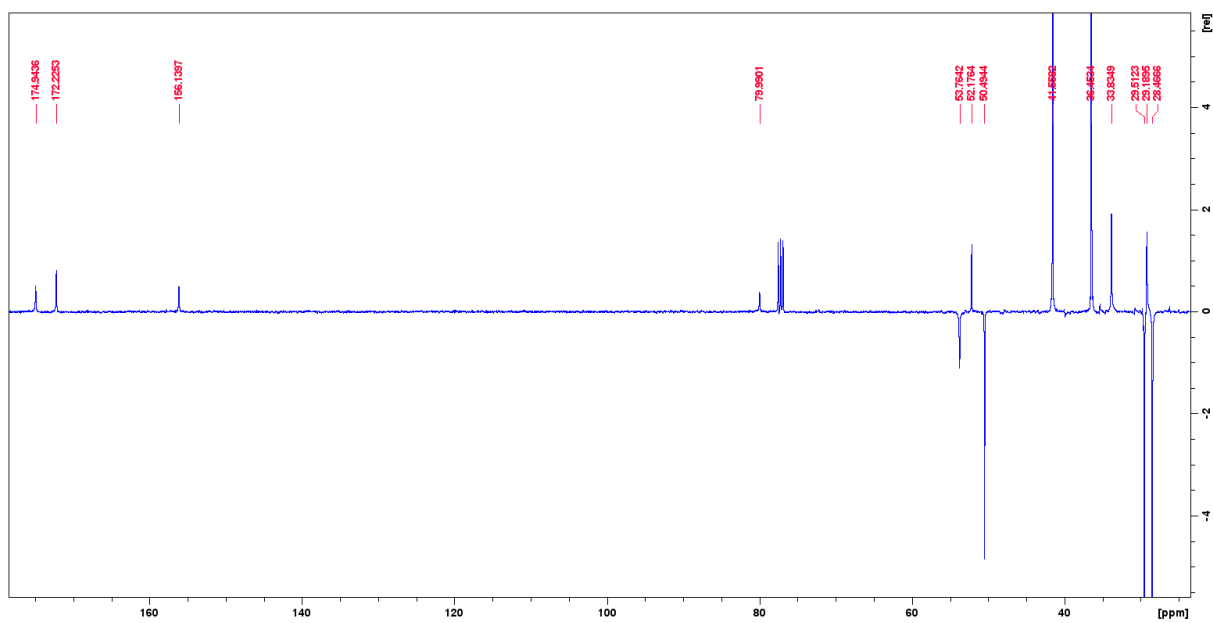
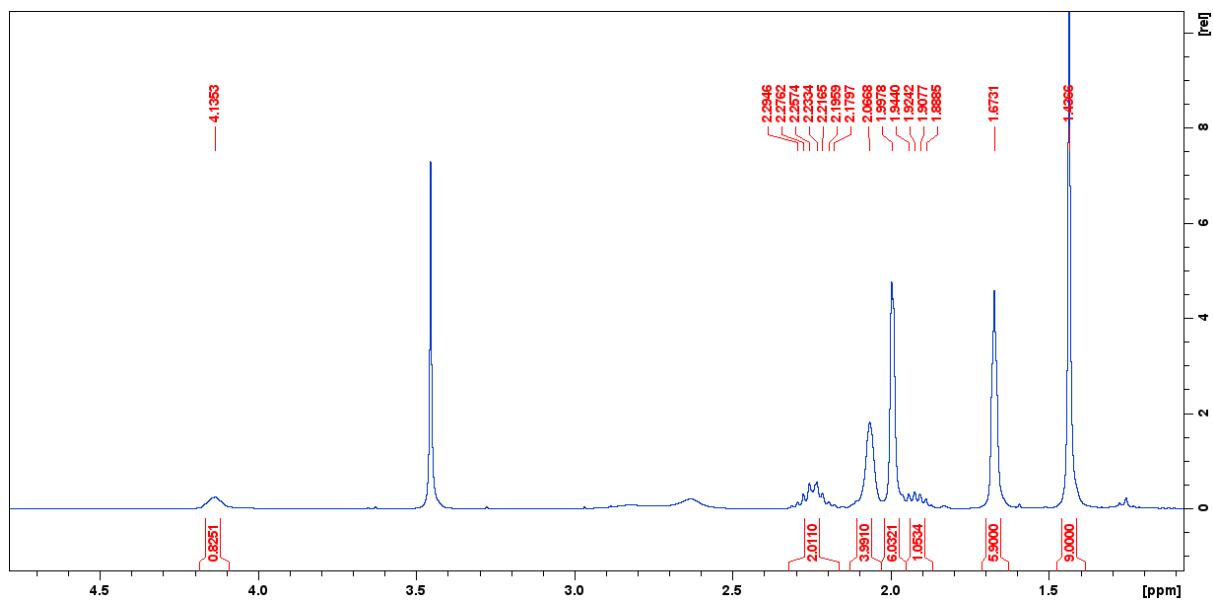


Dodatak 5:  $^1\text{H}$  NMR i DEPTQ spoja 13

## Metoda II

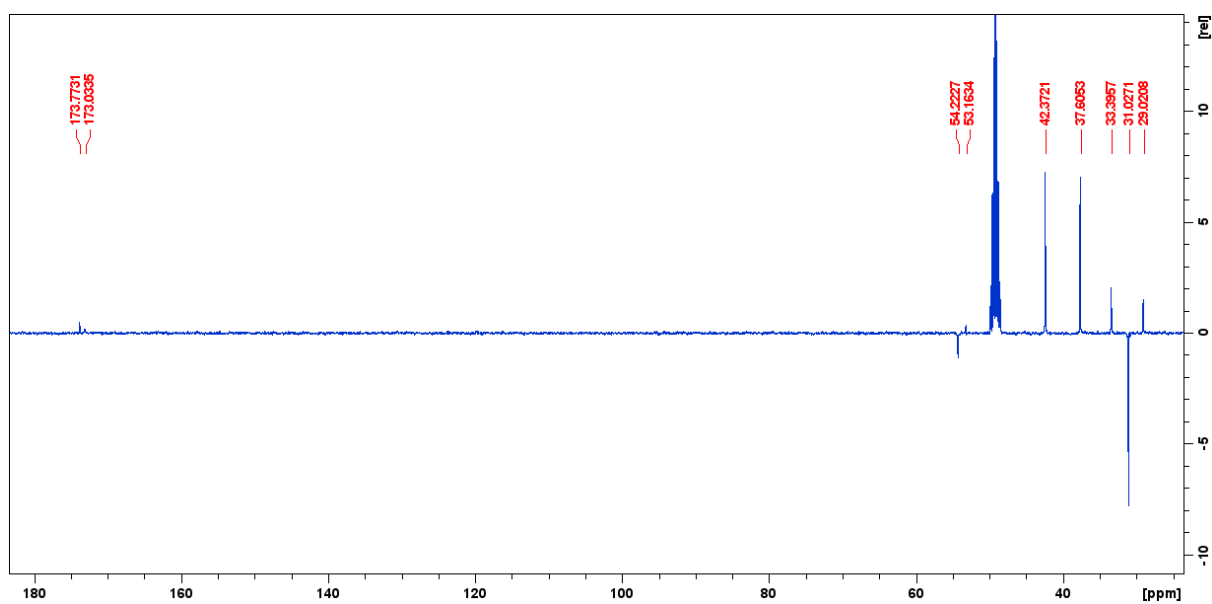
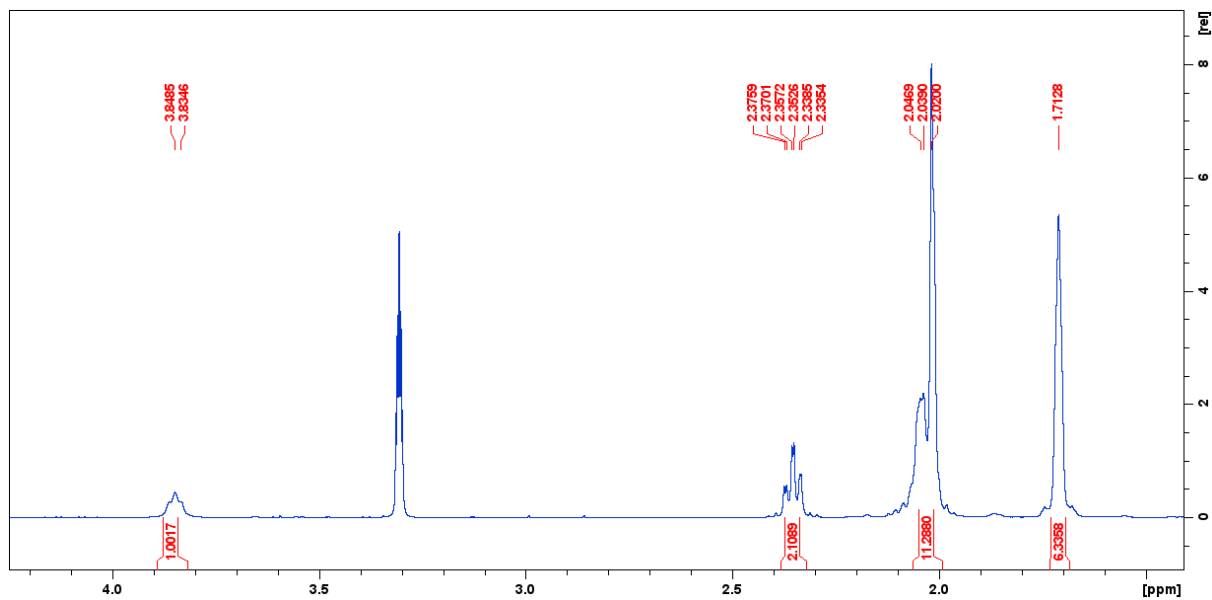


## Metoda III

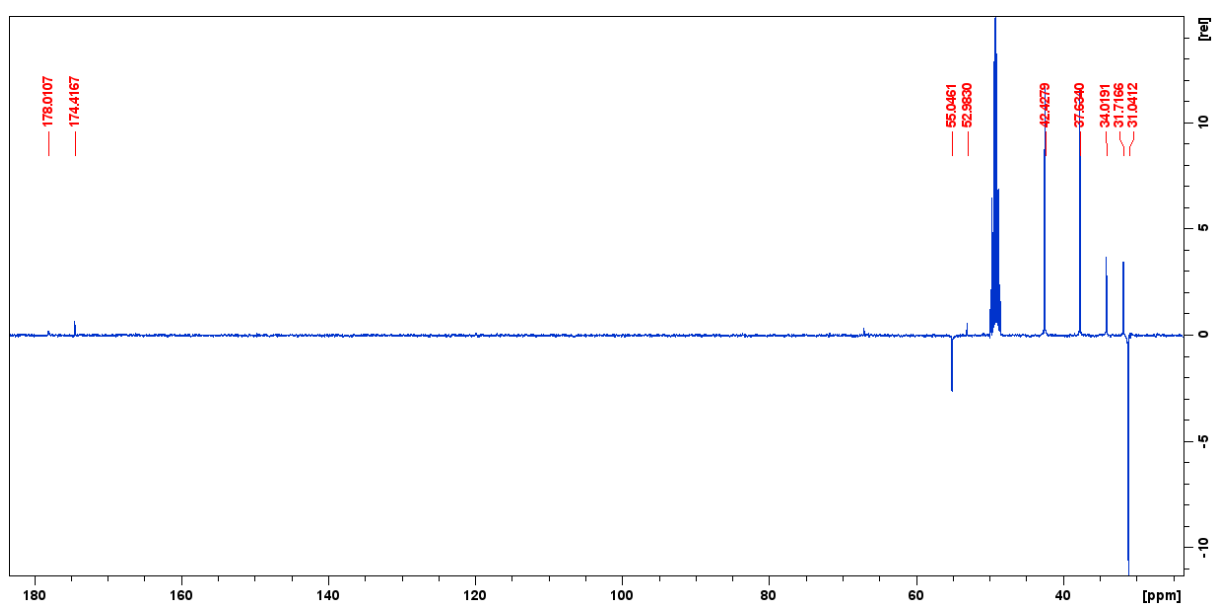
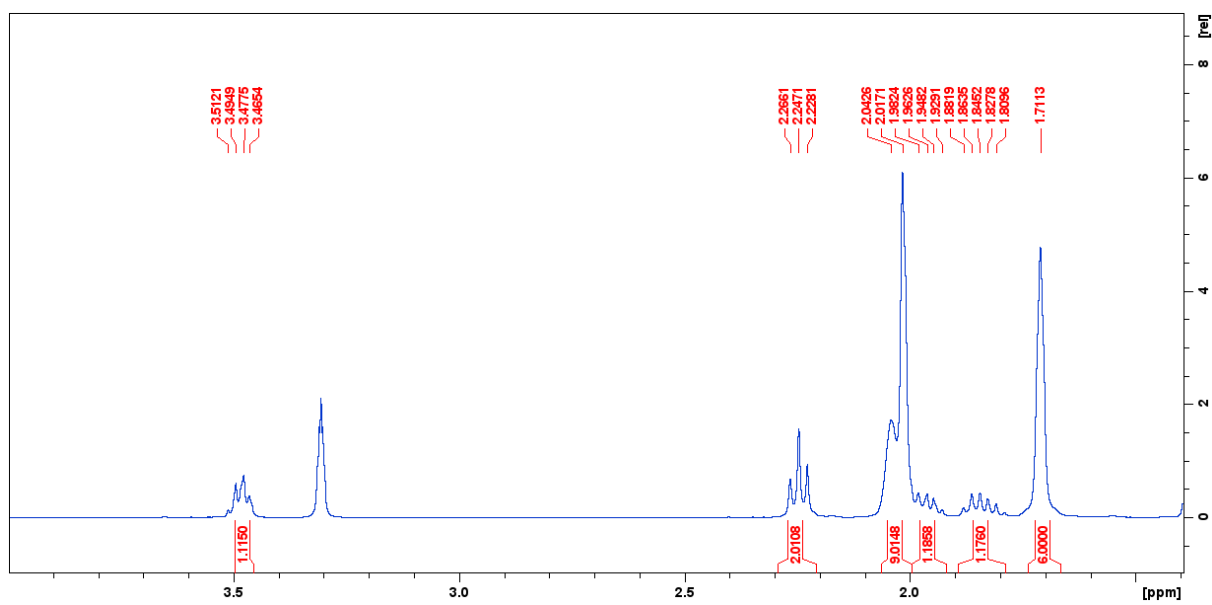


Dodatak 6:  $^1\text{H}$  NMR i DEPTQ spoja 14

## Metoda II

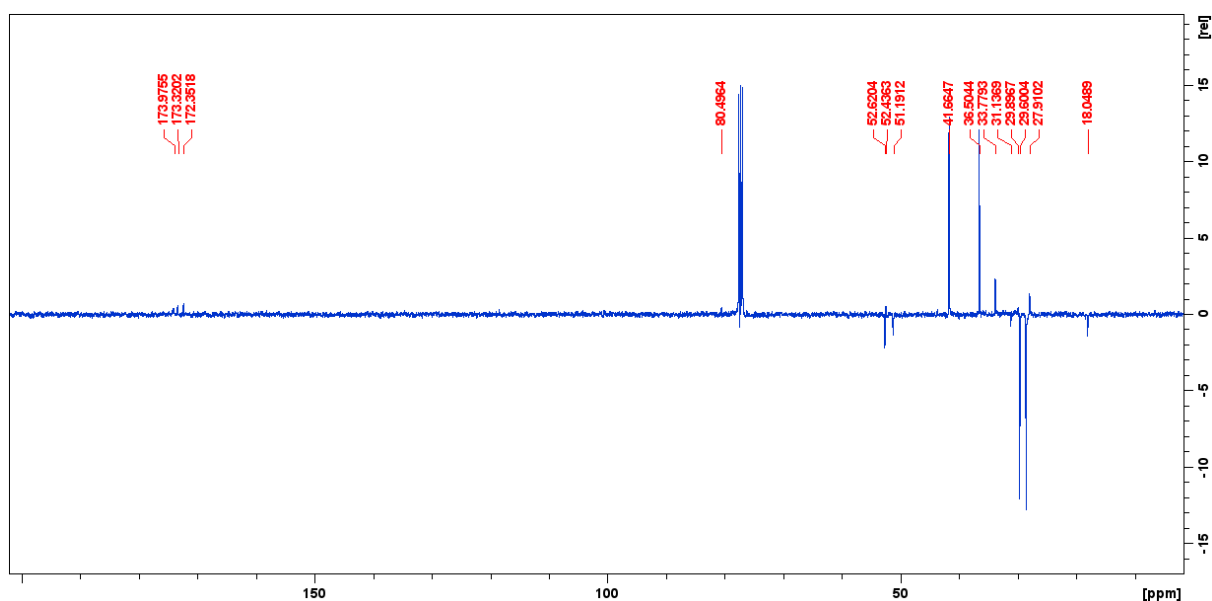
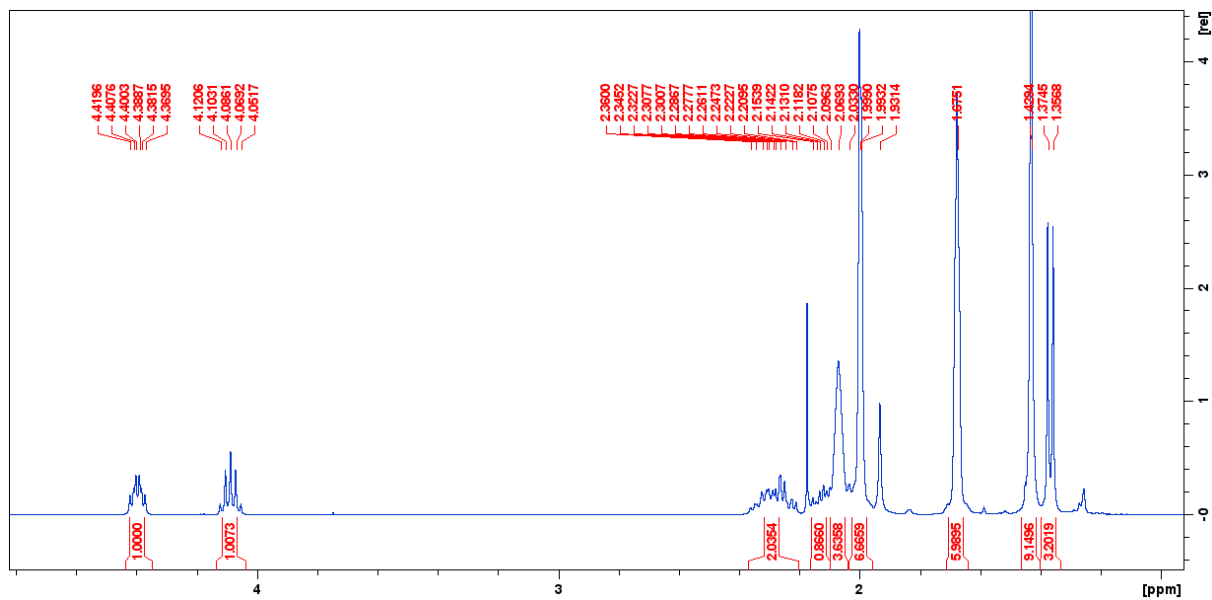


Metoda III

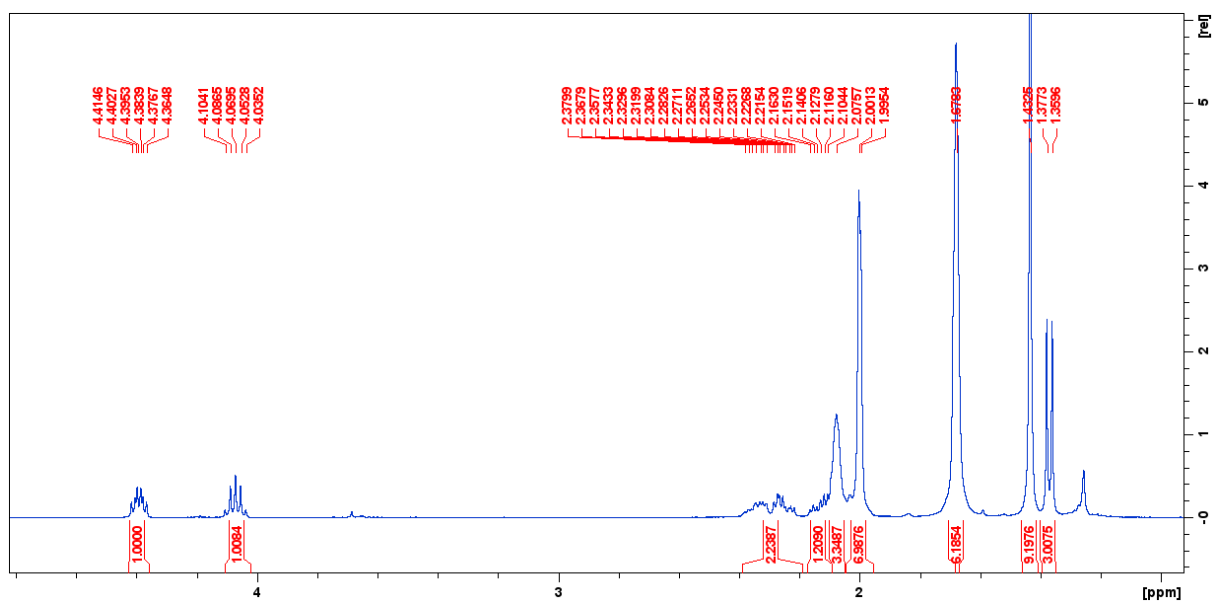


Dodatak 7:  $^1\text{H}$  NMR i DEPTQ spoja **11** (put B)

## Metoda II

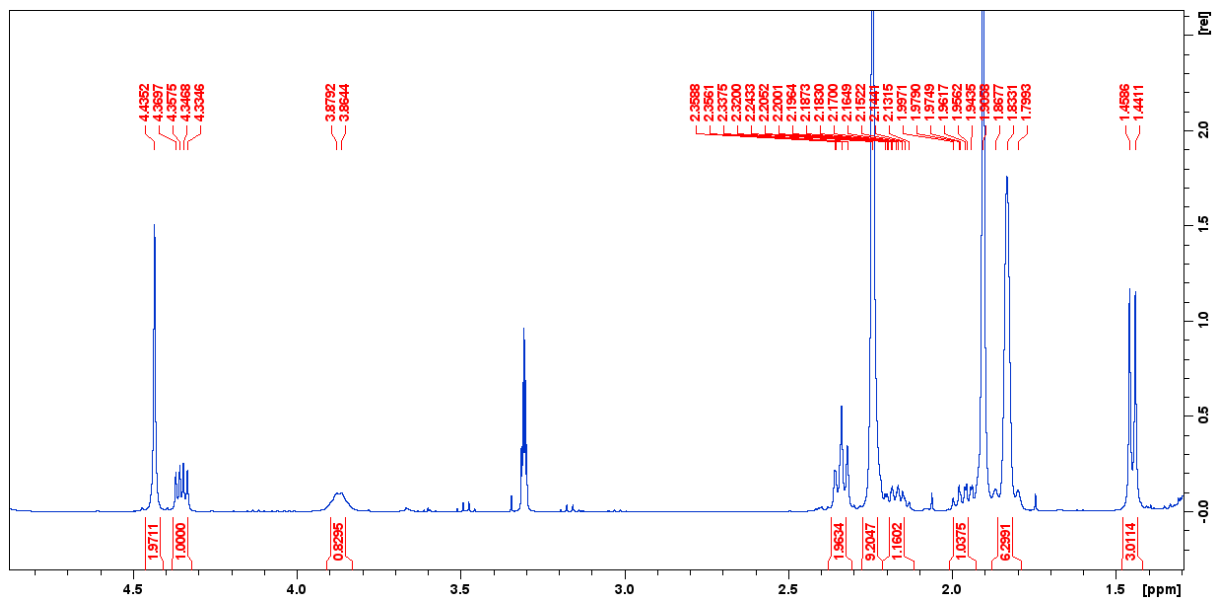


## Metoda III

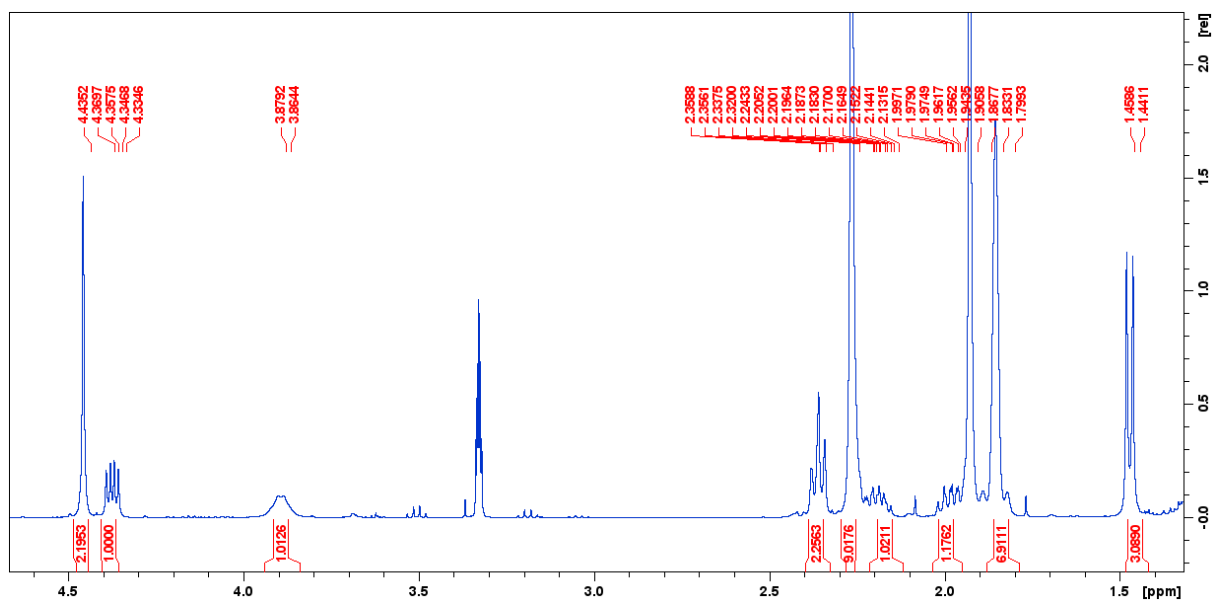


Dodatak 8: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 15

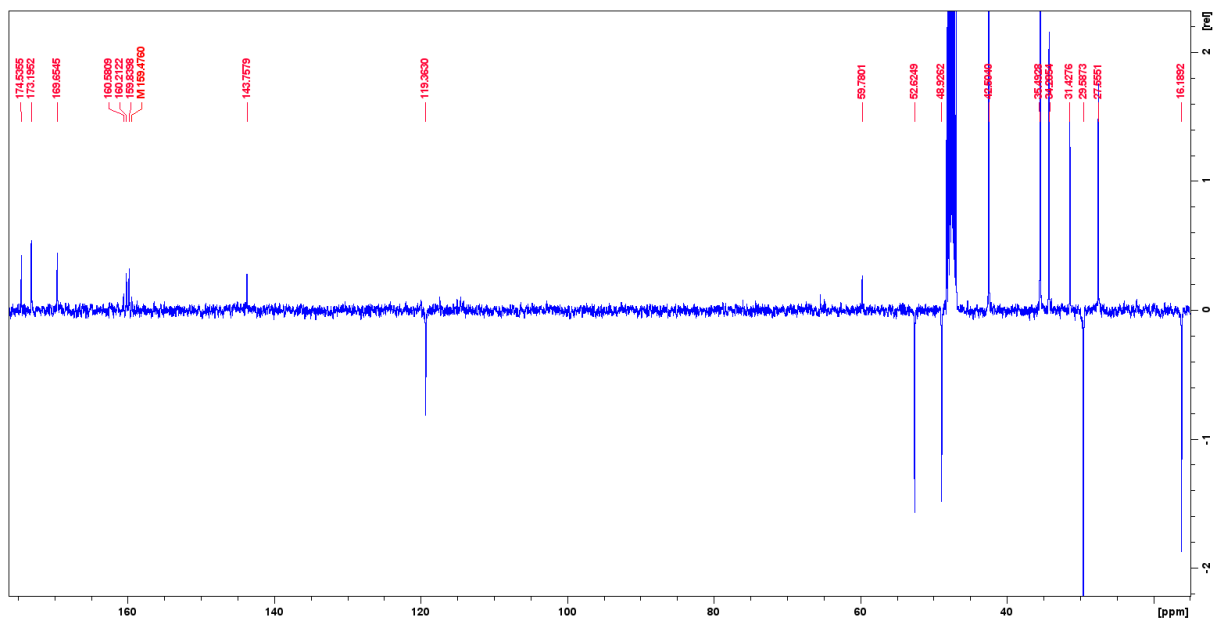
Metoda I



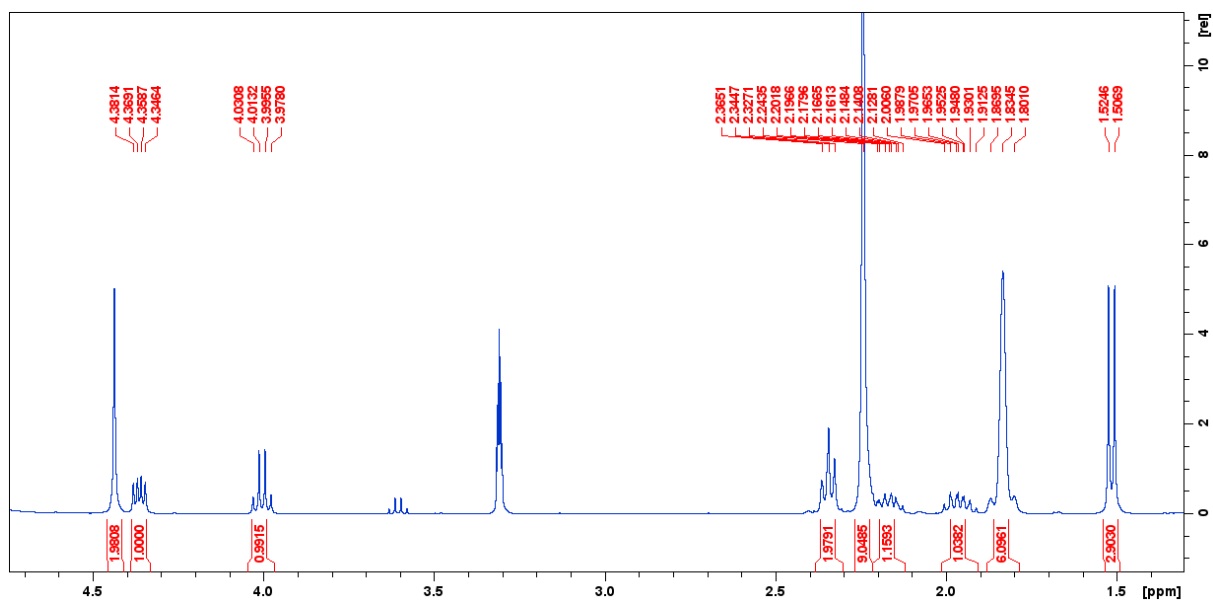
Metoda II

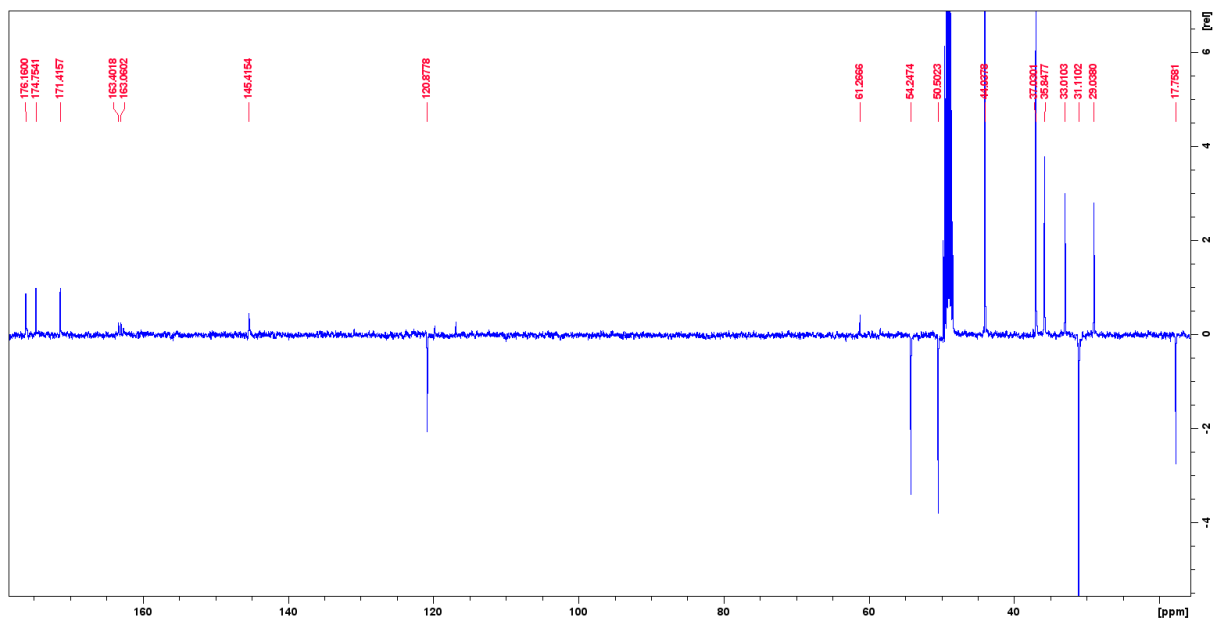






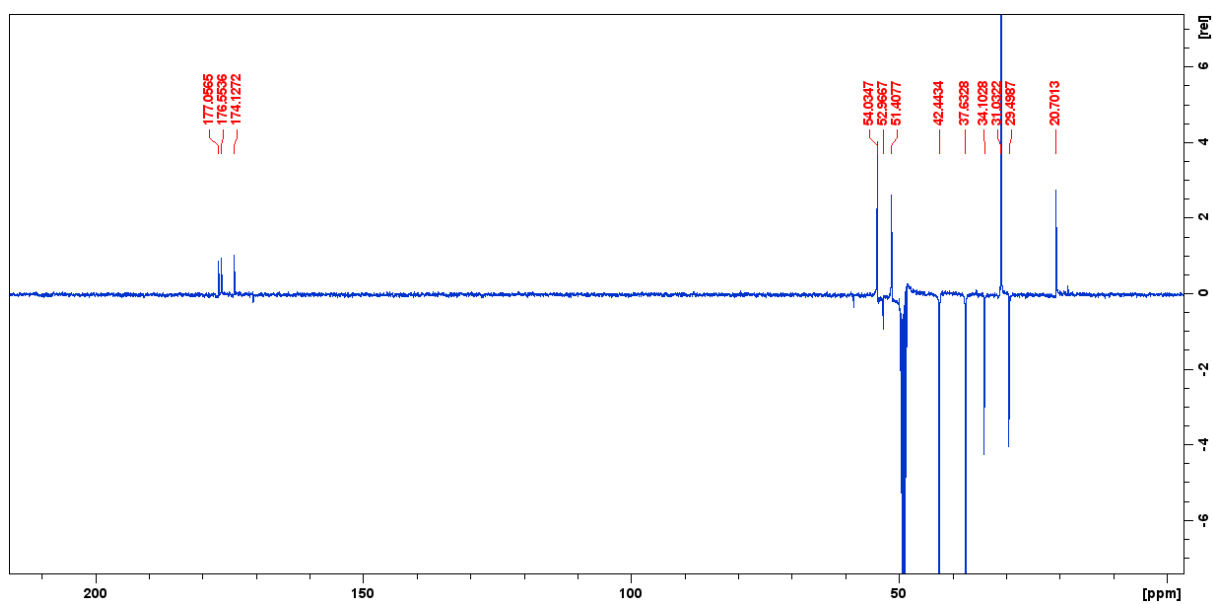
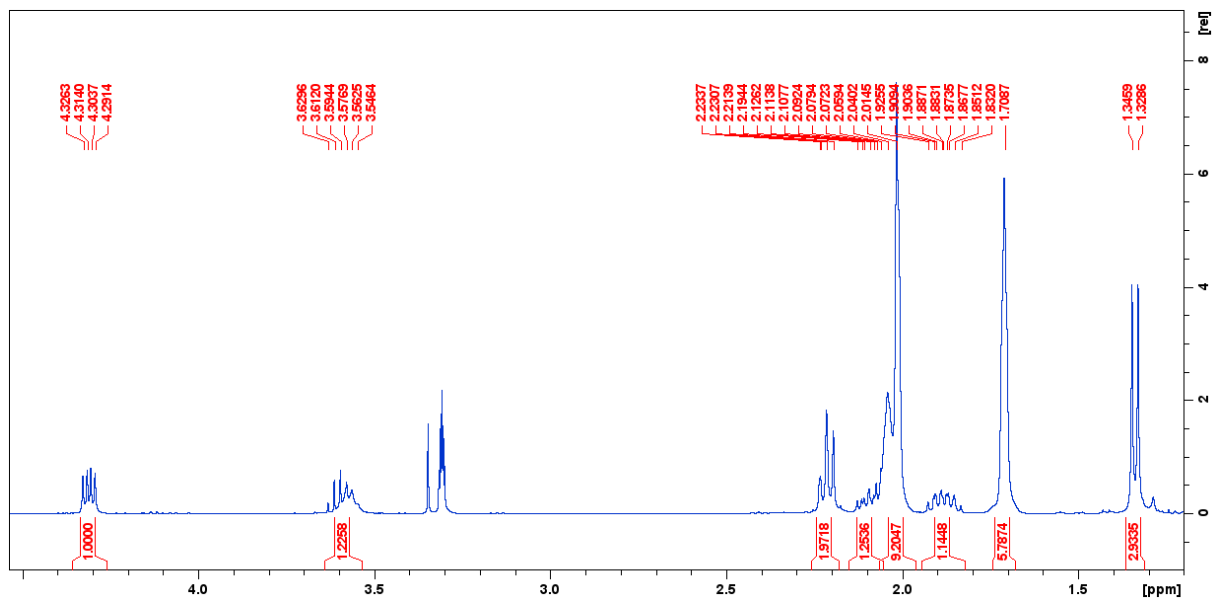
Metoda III



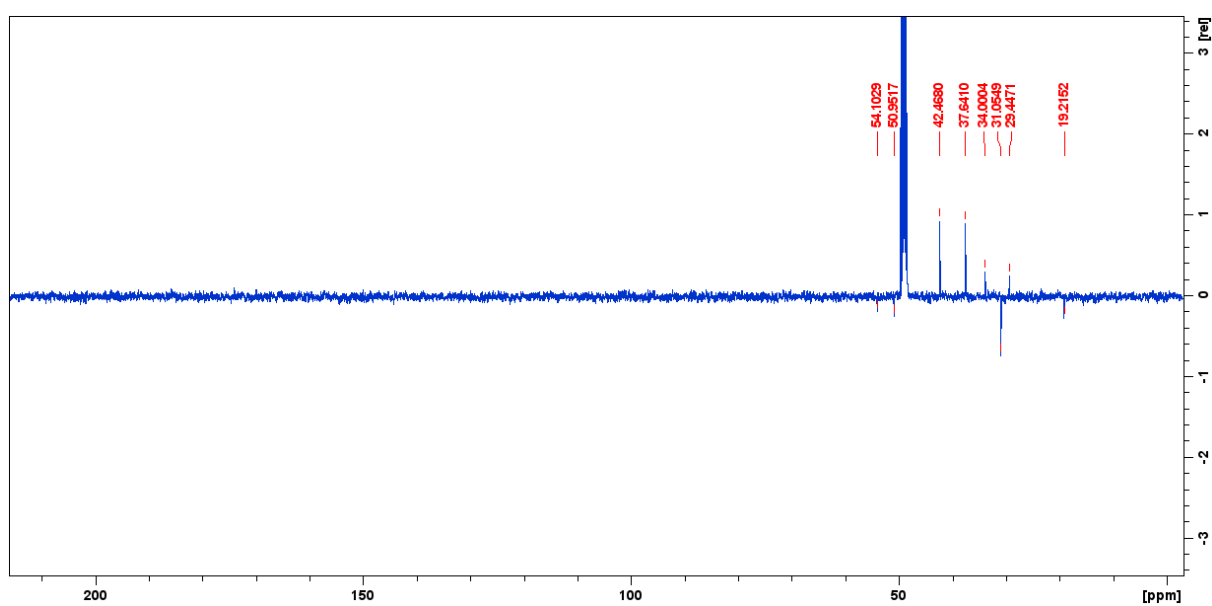
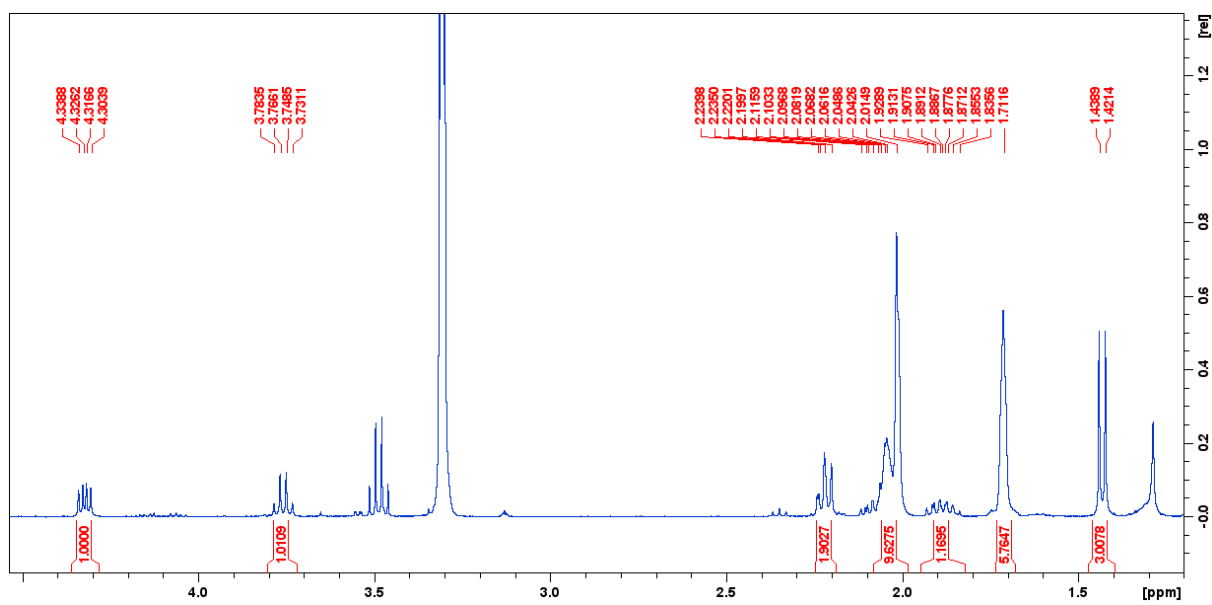


Dodatak 9:  $^1\text{H}$  NMR i DEPTQ spoja 16

## Metoda III (put A)

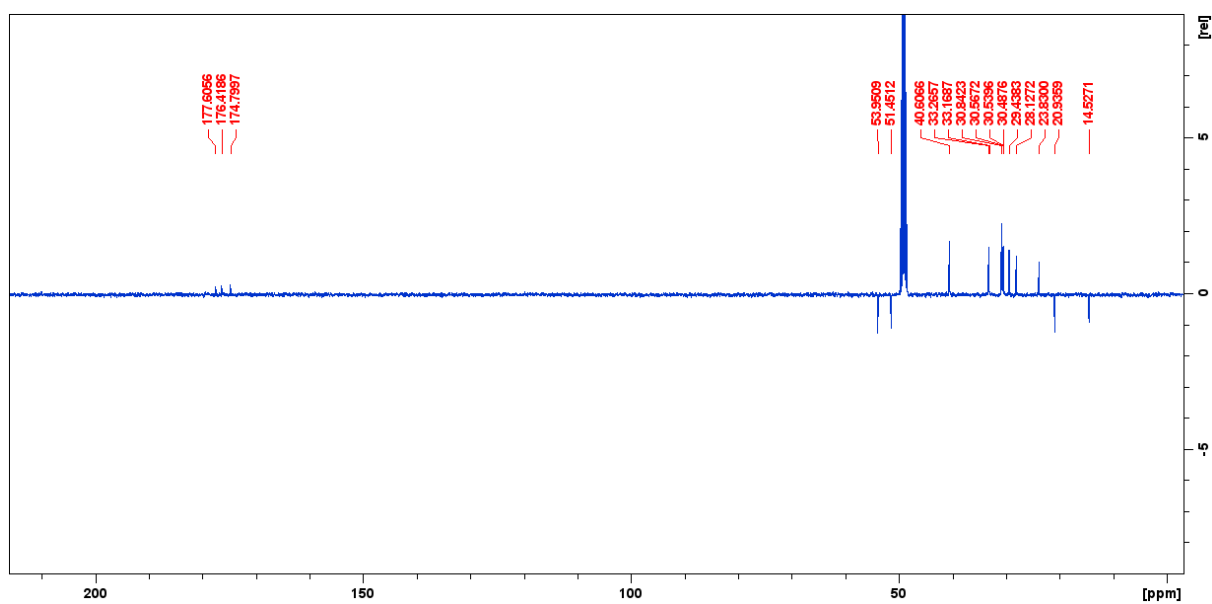
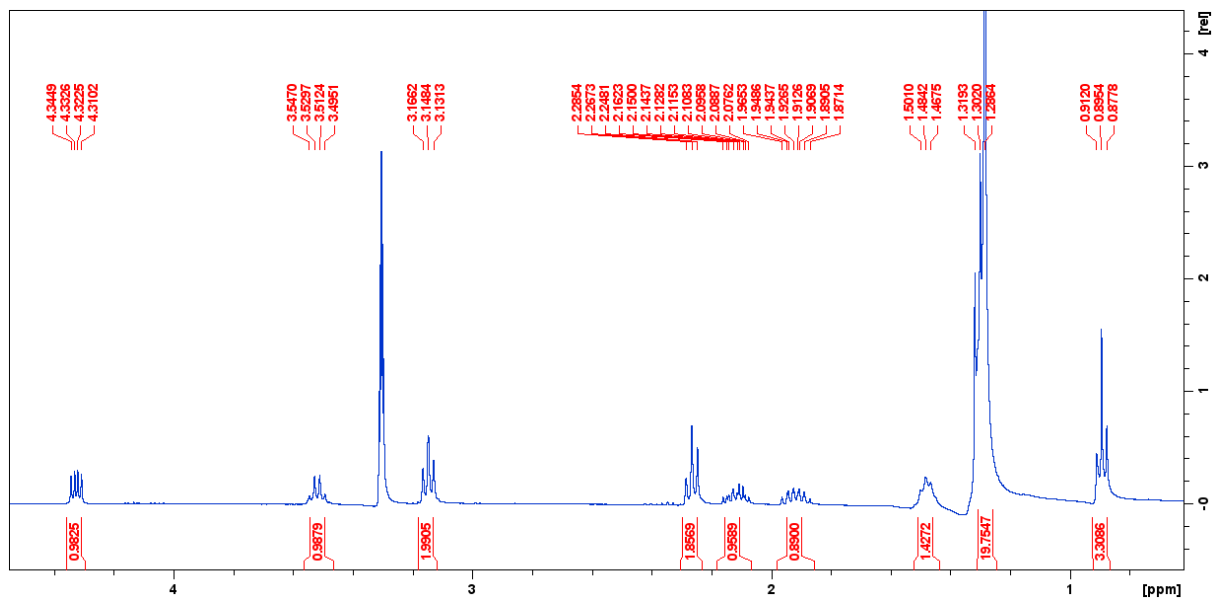


Metoda II (put B)

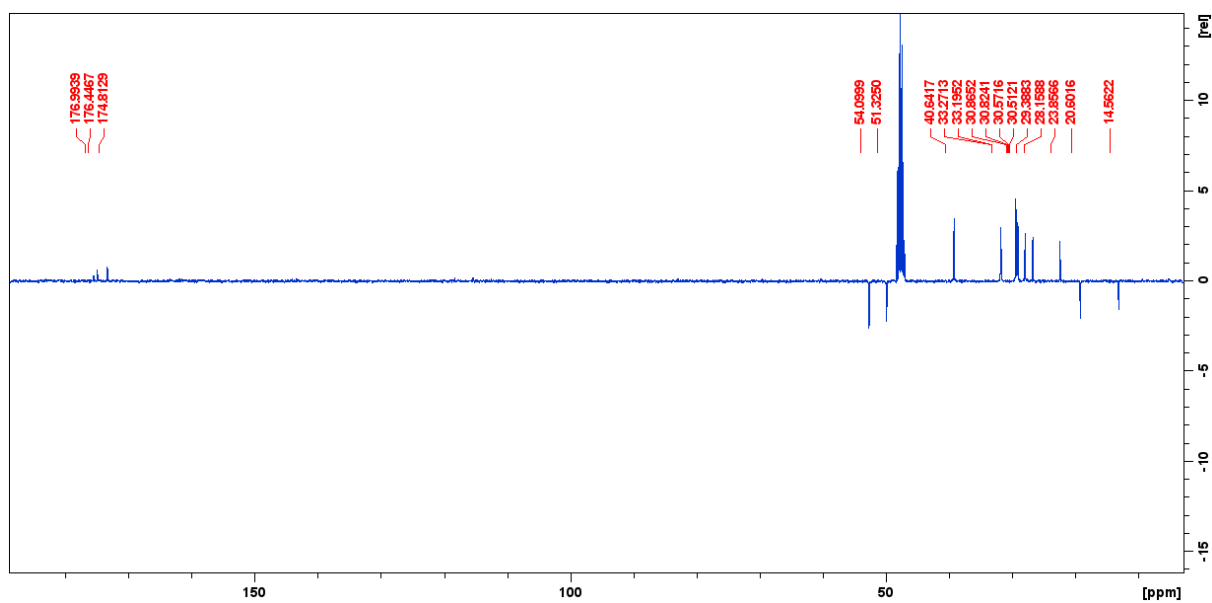
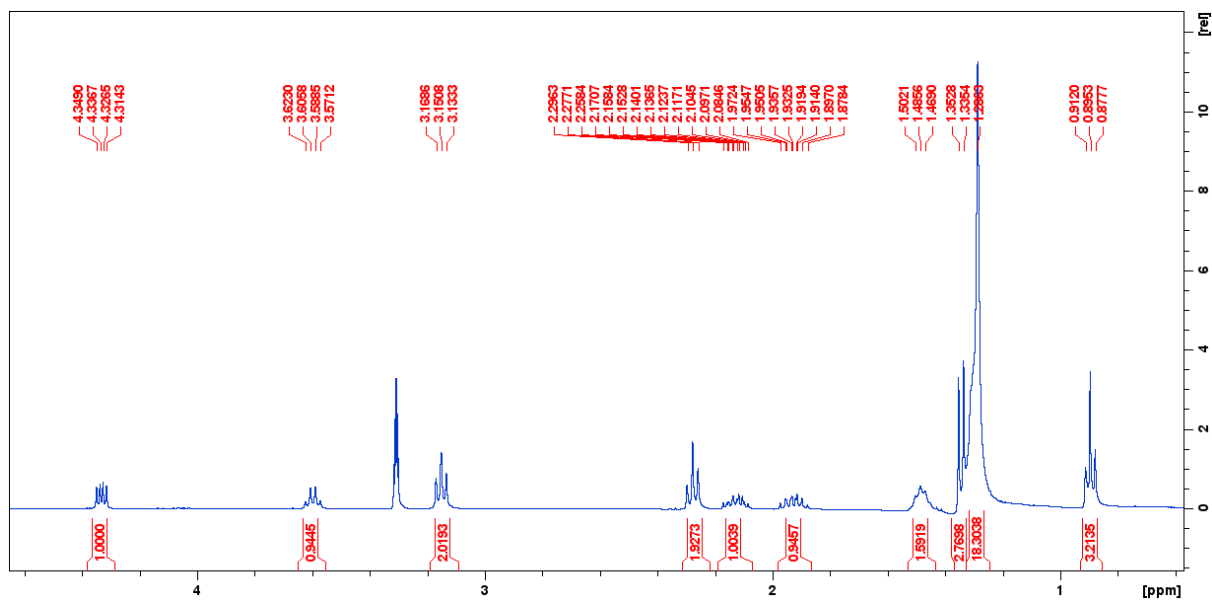


Dodatak 10:  $^1\text{H}$  NMR i DEPTQ spoja 17

## Metoda II



Metoda III



## § 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Laura Nuić

Datum rođenja: 06. veljače 1997.

Mjesto rođenja: Split

### Obrazovanje

2003.-2007. Osnovna škola Split 3, Split

2007.-2011. Osnovna škola Spinut, Split

2011.-2015. Opća gimnazija Vladimir Nazor, Split

2015.-2019. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2021. Stručna praksa na Institutu Ruđer Bošković, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Laboratorij za biomimetičku kemiju

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2018. Demonstrator kolegija: Praktikum organske kemije 2, preddiplomskog studija kemije, PMF Zagreb

2019. Smotra Sveučilišta u Zagrebu

2016.-2019. Otvoreni dani Kemijskog odsjeka

### Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Ž. Car, L. Nuić, V. Petrović Peroković, R. Ribić, *Preparation of novel amphiphilic desmuramyl peptide derivatives*, RICT 2021 - Interfacing Chemical Biology and Drug Discovery, 2021, postersko priopćenje