

# Sinteza konjugata D-glukoze i kolesterola

---

**Novaković, Marko**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:460884>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-27**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Marko Novaković

# Sinteza konjugata D-glukoze i kolesterola

## Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra kemije

Zagreb, 2022.



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

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta pod nazivom Sinteza i strukturna analiza biološki aktivnih peptida, heterocikličkih spojeva i njihovih glikokonjugata (potpora Sveučiliša u Zagrebu, izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković).



## Zahvale

*Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Daniju Škalameri na pruženoj prilici, vrhunskom mentorstvu, ugodnoj atmosferi u laboratoriju, uloženom trudu i vremenu te brojnim savjetima koji su mi uvelike olakšali izradu diplomskog rada. Također, hvala na prenesenom znanju i vještinama rada u laboratoriju.*

*Hvala svim prijateljima i kolegama, posebice Mislavu, Franu, Ivanu F., Ivanu G. i Leonu na uspomenama i druženju kroz sve godine studiranja.*

*Posebno hvala Antoniji na strpljenju, motivaciji i pomoći oko svih prepreka tijekom studija te na svemu što smo zajedno prošli.*

*Na kraju, najveće hvala roditeljima, sestri Tihani te bakama Gordani i Antoniji na beskrajnoj podršci i ljubavi te pruženoj mogućnosti studiranja .*

*Zagreb, listopad 2022.*

*Marko*



# Sadržaj

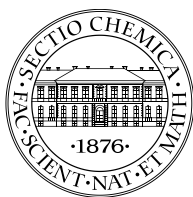
|                                                                                                    |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>SAŽETAK.....</b>                                                                                | <b>X</b>   |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                              | <b>XII</b> |
| <b>§ 1. UVOD.....</b>                                                                              | <b>1</b>   |
| <b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>                                                              | <b>3</b>   |
| <b>2.1. Glukoza .....</b>                                                                          | <b>3</b>   |
| 2.1.1. Svojstva glukoze .....                                                                      | 3          |
| 2.1.2. Reakcije oksidacije i redukcije.....                                                        | 5          |
| 2.1.3. Reakcije hidroksilnih skupina .....                                                         | 6          |
| 2.1.4. Reakcije na anomernom centru.....                                                           | 11         |
| 2.1.5. Biološka uloga glukoze .....                                                                | 11         |
| <b>2.2. Kolesterol .....</b>                                                                       | <b>12</b>  |
| 2.2.1. Svojstva kolesterola.....                                                                   | 12         |
| 2.2.2. Biološka uloga kolesterola.....                                                             | 15         |
| <b>2.3. Primjena konjugata D-glukoze i kolesterola .....</b>                                       | <b>17</b>  |
| <b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>                                                              | <b>20</b>  |
| <b>3.1. Materijali i metode.....</b>                                                               | <b>20</b>  |
| <b>3.2. Sintetski put II.....</b>                                                                  | <b>21</b>  |
| 3.2.1. Sinteza 1,2,3,4,6-penta-O-benzil glukopiranoze (1) .....                                    | 21         |
| 3.2.2. Sinteza 6-O-acetil-1,2,3,4-tetra-O-benzil glukopiranoze (2).....                            | 22         |
| 3.2.3. Sinteza 1,2,3,4-tetra-O-benzil glukopiranoze (3).....                                       | 22         |
| 3.2.4. Sinteza kolesteril-tosilata (4) .....                                                       | 23         |
| 3.2.5. Sinteza trietilen-glikol-kolesteril-etera (5).....                                          | 23         |
| 3.2.6. Sinteza tosilata kolesteril-trietilen-glikol-etera (6).....                                 | 24         |
| 3.2.7. Sinteza konjugata benzilirane glukoze i tosilata kolesterol-trietilen-glikol-etera (7)..... | 25         |



---

|                                                                                                  |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.8. <i>Sinteza konačnog produkta (8)</i> .....                                                | 26         |
| <b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>                                                           | <b>28</b>  |
| 4.1. <b>Uvod .....</b>                                                                           | <b>28</b>  |
| 4.2. <b>Retrosintetska analiza ciljne molekule .....</b>                                         | <b>28</b>  |
| 4.3. <b>Sintetski put I .....</b>                                                                | <b>30</b>  |
| 4.3.1. <i>Sinteza dimetilenskog acetala glukoze .....</i>                                        | <i>30</i>  |
| 4.3.2. <i>Sinteza trietilen-glikol-ditosilata.....</i>                                           | <i>31</i>  |
| 4.3.3. <i>Sinteza konjugata dimetilenskog acetala glukoze i trietilen-glikol ditosilata.....</i> | <i>31</i>  |
| 4.4. <b>Sintetski put II.....</b>                                                                | <b>33</b>  |
| 4.4.1. <i>Povezivanje kolesterola i trietilen-glikola .....</i>                                  | <i>33</i>  |
| 4.4.2. <i>Povezivanje konjugata kolesterola i trietilen-glikola s glukozom.....</i>              | <i>35</i>  |
| 4.4.3. <i>Uklanjanje zaštitnih skupina s glukoze .....</i>                                       | <i>37</i>  |
| <b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>                                                                      | <b>40</b>  |
| <b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>                                                 | <b>41</b>  |
| <b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>                                                              | <b>43</b>  |
| <b>§ 8. DODATAK .....</b>                                                                        | <b>XLV</b> |
| <b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>                                                                      | <b>LI</b>  |





Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Kemijski odsjek

Diplomski rad

## SAŽETAK

### Sinteza konjugata D-glukoze i kolesterola

Marko Novaković

U sklopu ovog diplomskog rada pripremljen je konjugat kolesterola i D-glukoze, kojim se mogu modificirati liposomi u svrhu ciljane dostave lijeka stanicama raka. Tako modificirani liposomi obećavajuća su metoda selektivnog i učinkovitog tretiranja raka s minimalnim ili nikakvim nuspojavama. Konjugat se sastoji od dvije jedinice, kolesterola i D-glukoze, koje su međusobno povezane trietilen-glikolnom poveznicom. Ispitana je uspješnost dva predložena sintetska puta. Rad uključuje izolaciju i karakterizaciju prirodnih spojeva te uobičajene metode sintetske organske kemije. Cilj ovog diplomskog rada je što jednostavnijim sintetskim putem uz što veće iskorištenje doći do ciljnog konjugata. Međuprodukti sinteze, kao i konačni produkt, okarakterizirani su spektroskopskim tehnikama (IR, NMR).

(44+XX stranica, 26 slika, 7 tablica, 38 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: D-glukoza, kolesterol, liječenje raka, liposom, trietilen-glikol

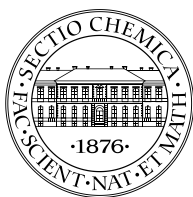
Mentor i neposredni voditelj: doc. dr. sc. Đani Škalamera

Ocjenitelji:

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

Datum diplomskog ispita: 21.10.2022.





University of Zagreb

Faculty of Science

**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## **ABSTRACT**

### **Synthesis of D-glucose and cholesterol conjugate**

Marko Novaković

In this diploma thesis, a conjugate of cholesterol and D-glucose was prepared, which can be used to modify liposomes for the purpose of targeted drug delivery to cancer cells. Liposomes modified in this way are a promising method of selective and effective cancer treatment with minimal or no side effects. The conjugate consists of two units, cholesterol and D-glucose, which are connected to each other by a triethylene glycol link. The performance of two proposed synthetic routes was tested. The work includes the isolation and characterization of natural compounds and the usual methods of synthetic organic chemistry. The goal of this thesis is to obtain the target conjugate by the simplest possible synthetic route with the greatest possible yield. The prepared intermediates, as well as the final product, were characterized by spectroscopic techniques (IR, NMR).

(44+XX pages, 26 figures, 7 tables, 38 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: cancer treatment, cholesterol, D-glucose, liposome, triethylene glycol

Mentor: Dr. Đani Škalamera, Assist. Prof.

Reviewers:

1. Dr. Đani Škalamera, Assist. Prof.
  2. Dr. Aleksandra Maršavelski, Assist. Prof.
  3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Prof.
- Substitute: Dr. Vesna Petrović Peroković, Assoc. Prof.

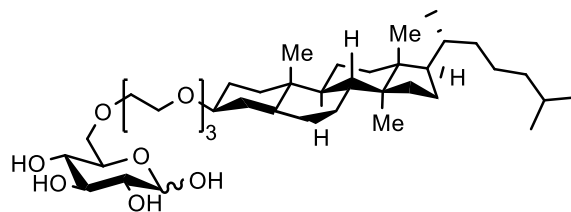
Date of exam: 21.10.2022.



## § 1. UVOD

Najveći izazov s kojim se zdravstvena zajednica suočava zadnjih desetljeća sve je veća učestalost tumorskih oboljenja. Tumori su najčešći uzrok smrti na svijetu, samo u 2020. godini uzrokovali su oko 10 milijuna smrti, odnosno 1 od 6 smrti u svijetu posljedica je tumorskih oboljenja.<sup>38</sup> No, još uvijek ne postoji zlatni standard za učinkovito tretiranje tumora s minimalnim nuspojavama. Istraživanja su pokazala da bi upravo tu ulogu mogle ispuniti metode za isporuku lijekova protiv raka posredovane glikozilacijom. Jedan od sustava osmišljenih na ovom principu su modificirani liposomi.<sup>37</sup> Metaboličke karakteristike stanica raka temeljene su na većoj potražnji za energijom i stoga povećanim unosom glukoze, zbog čega na površini imaju nadekspimirane transportere glukoze u odnosu na normalne stanice, uključujući: rak jetre, gušterače, dojke, jednjaka, mozga, bubrega, pluća, kože, debelog crijeva, endometrija, jajnika i vrata maternice.<sup>24</sup> Pokazalo se da upravo iz navedenih razloga, liposomi modificirani glukozom mogu poslužiti kao sustavi za specifično ciljanje stanica raka i dostavu potencijalnog lijeka.<sup>22</sup>

Cilj ovog diplomskog rada je sinteza konjugata D-glukoze i kolesterola povezanih trietilen-glikolnom poveznicom (slika 1.), u kojem kolesterolna jedinica služi kao svojevrsno sidro kojim se molekula može ugraditi u lipidni dvosloj liposoma, pri čemu će molekule glukoze ostati izložene na vanjskoj strani, okrenute prema vodenom mediju. Na ovaj način površina liposoma obloži se molekulama glukoze. Transporteri glukoze prepoznaju glukozne jedinice te na taj način olakšavaju ulazak takvog liposoma u stanicu, a zajedno s njim unosi se i ono što je u njegovoj unutrašnjosti – potencijalni lijek. U okviru ovog rada biti će provedena sinteza navedenog konjugata, a istraživanja koja uključuju ugradnju u liposome i ciljanu dostavu lijeka bit će provedena naknadno. Prilikom sinteze ciljnog derivata koristit će se uobičajene metode sintetske organske kemije, metode izolacije i pročišćavanja produkata. Konačni produkt, kao i međuprodukti sintetskog puta, bit će karakterizirani upotrebom spektroskopskih tehnika (NMR, IR).



**Slika 1.** Struktura ciljne molekule

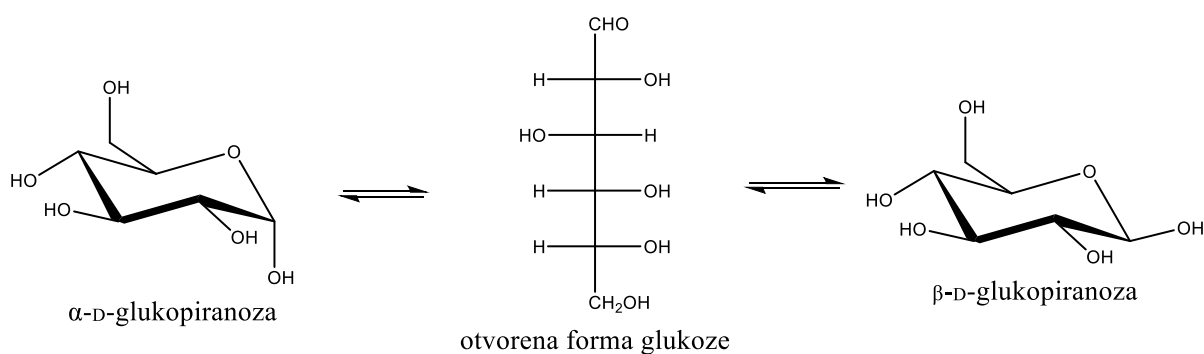


## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Glukoza

#### 2.1.1. Svojstva glukoze

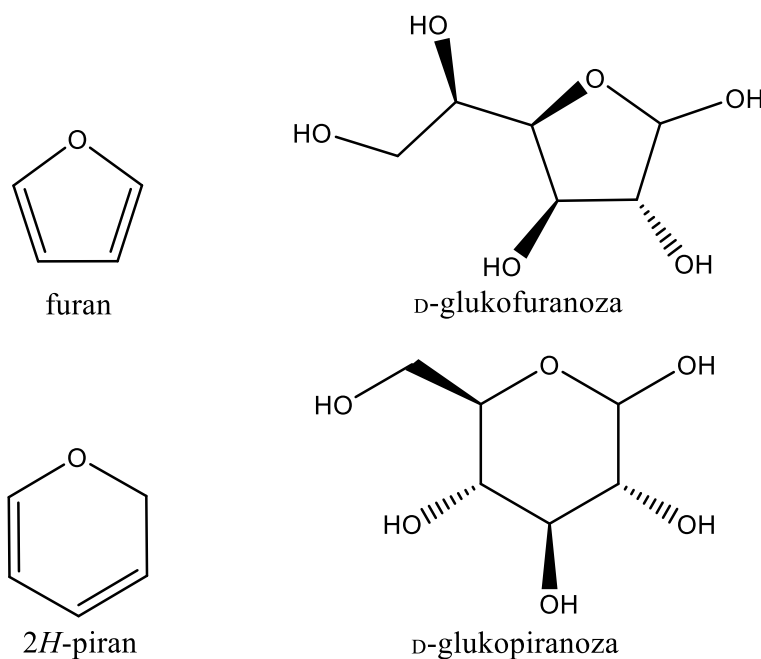
Glukoza je jednostavan šećer molekulske formule  $C_6H_{12}O_6$ . Jedan je od najzastupljenijih ugljikohidrata iz skupine monosaharida. Ime joj potječe od grčke riječi *glykys* što znači slatko.<sup>1</sup> Glukoza je aldoheksoza što znači da sadrži šest ugljikovih atoma i aldehidnu skupinu. U ravnolančastoj strukturi sadrži 4, a u cikličkoj 5 asimetrično supstituiranih C atoma te je glukoza jedan od 16 mogućih diastereomera iz niza aldoheksoza. Na slici 2 prikazane su strukture ravnolančaste i cikličke forme glukoze. U prirodi se javlja gotovo isključivo u obliku D-glukoze. Oznaka D- odnosi se na konfiguraciju referentnog ugljikovog atoma, tj. asimetričnog C atoma koji je najudaljeniji od karbonilne skupine, a u usporedbi prema D-gliceraldehidu. Drugi izomer, L-glukoza, vrlo se rijetko može pronaći u prirodnim spojevima, već se njezini derivati uglavnom sintetički pripremaju.<sup>2</sup>



**Slika 2.** Ravnoteža između ravnolančaste i šesteročlanih cikličkih struktura glukoze

Kao i ostali monosaharidi, glukoza u otopini može postojati u otvorenoj ravnolančastoj formi i zatvorenoj cikličkoj formi. Kristalični oblik glukoze sastoji se isključivo od cikličke forme, dok u otopinama lančasta forma postoji u ravnotežnoj smjesi s cikličkom formom.<sup>2</sup> U otvorenoj lančastoj formi sastoji se od nerazgranatog lanca koji sadrži 6 C atoma. Na C-1 atomu nalazi se aldehidna skupina koja glukozu čini reducirajućim šećerom. Na ostale C atome vezane su OH skupine kojih je ukupno 5. Reakcijom aldehidne skupine i jedne od OH skupina glukoze može nastati zatvoreni peteročlani ili šesteročlani ciklički poluacetal. Naime,

takvi prstenovi stabilniji su od forme lanca te je zato udio otvorene forme u otopinama izrazito mali u odnosu na udio zatvorene forme. Također, uočeno je da je kod glukoze favoriziran nastanak šesteročlanog cikličkog poluacetal. Šesteročlani ciklički poluacetali nazivaju se piranoze. Njihovo ime izvedeno je iz šesteročlanog cikličkog etera pirana. Peteročlani ciklički poluacetali zovu se furanoze zbog korelacije u strukturi s peteročlanim cikličkim eterom furanom (slika 3).<sup>2</sup>

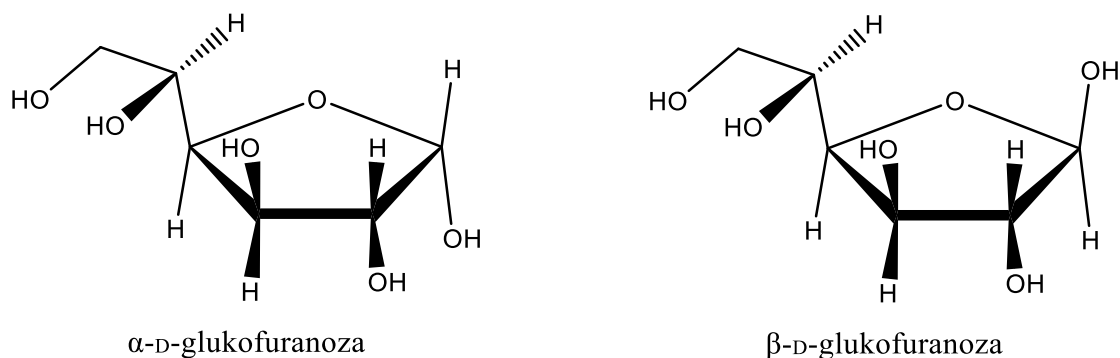


**Slika 3.** Peteročlani i šesteročlani ciklički poluacetali glukoze i odgovarajući ciklički eteri

Prilikom zatvaranja u cikličku strukturu reakcijom aldehidne i hidroksilne skupine, planarna aldehidna skupina prelazi u novi asimetrično supstituirani C atom, koji se naziva anomerni C atom. Lako ga je identificirati u strukturi jer je jedini direktno vezan na dva atoma kisika. Ovisno o tome s koje strane planarne karbonilne skupine je izvršen nukleofilni napad, anomerna OH skupina nastalog poluacetal može poprimiti dvije orijentacije koje rezultiraju diastereomernim produktima koji se zovu anomeri i označavaju se slovima  $\alpha$  i  $\beta$ . Anomer kod kojeg je anomerna OH skupina usmjerena aksijalno zove se  $\alpha$ -anomer te referentni i anomerni C atomi tada imaju različite konfiguracije. Kada je anomerna OH skupina usmjerena ekvatorijalno, odnosno kada referentni i anomerni C atomi imaju istu konfiguraciju, govorimo o  $\beta$ -anomeru.<sup>2</sup>

Otvorena forma glukoze najčešće se prikazuje Fischerovom projekcijom (slika 2). Ciklička forma može se prikazati pomoću Hawthorne projekcije, koja pretpostavlja da je

prsten planaran, što on naravno nije. U stvarnosti glukopiranozni prsten može poprimiti nekoliko neplanarnih konformacija, analogih konformacijama stolca i čamca kod cikloheksana (slika 2). Slično, glukofuranozni prsten se može prikazati oblikom analognim konformaciji omotnice, kao kod ciklopentana (slika 4).<sup>2</sup>

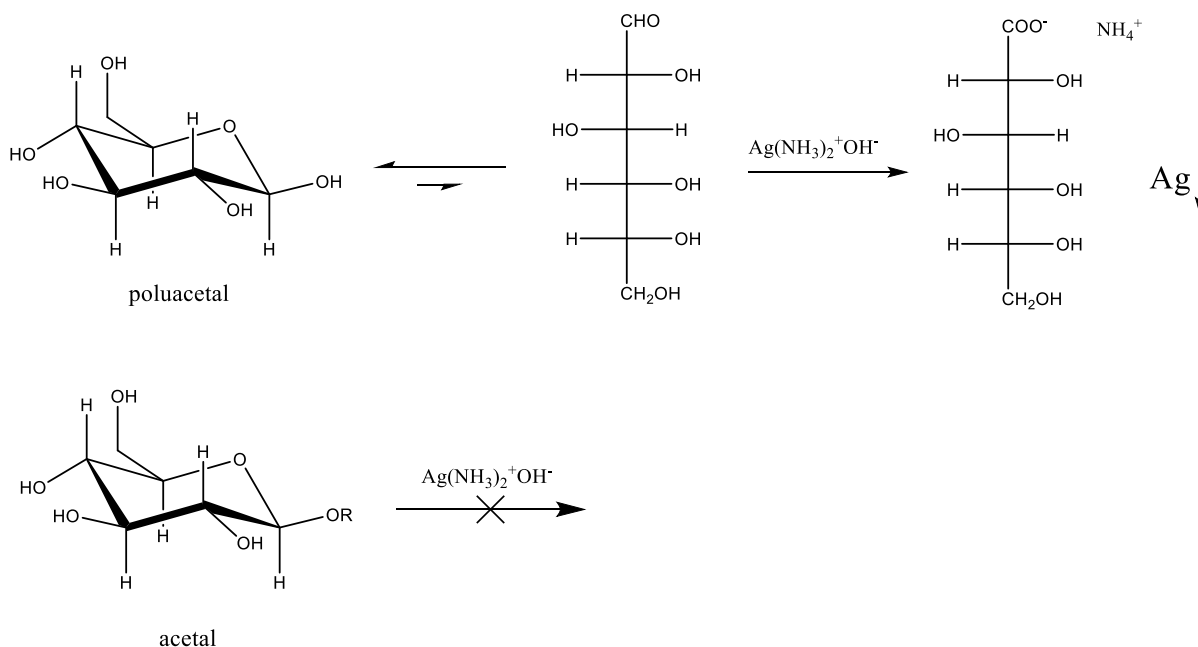


**Slika 4.** Peteročlane cikličke strukture glukoze

### 2.1.2. Reakcije oksidacije i redukcije

Kemija glukoze, odnosno kemija ugljikohidrata općenito, je kemija alkoholne i aldehidne (karbonilne) skupine. Poput aldehida, glukoza se može reducirati i oksidirati korištenjem odgovarajućih reagensa. Redukcijom glukoze nastaje odgovarajući alditol koji se zove sorbitol, šećerni alkohol koji na svakom C atomu ima vezanu OH skupinu. Za redukciju najčešće se koristi NaBH<sub>4</sub> ili katalitičko hidrogeniranje uz Ni kao katalizator. Sorbitol se inače koristi kao zamjena za šećer, sredstvo za zadržavanje vlage i kao ishodni materijal za dobivanje vitamina C.<sup>2</sup> Oksidacija glukoze može se provesti nizom različitih reagensa. Aldehidna skupina šećera lako se može oksidirati. Takve reakcije često služe za identifikaciju funkcijskih skupina šećera. Također, određeni reagensi mogu selektivno oksidirati terminalnu -CH<sub>2</sub>OH skupinu, jer je to jedini primarni alkohol u strukturi. Jedan od oksidirajućih reagensa je Tollensov reagens ([Ag(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>OH<sup>-</sup>), koji se koristi za detekciju aldehidne skupine pri čemu nastaje karboksilatni ion i elementarno srebro u obliku zrcala pa se zato Tollensov test naziva i test srebrnog zrcala. Šećeri koji reduciraju Tollensov reagens zovu se reducirajući šećeri. Treba napomenuti da Tollensov reagens može reagirati s glukozom kada se ona nalazi u otvorenoj formi gdje ima slobodnu aldehidnu skupinu. Poluacetali se lako mogu pretvoriti u lančastu formu, ali acetali su stabilni u neutralnim i bazičnim uvjetima. Ako je aldehidna skupina vezana u formu cikličkog acetala, glukoza neće dati pozitivan Tollensov test

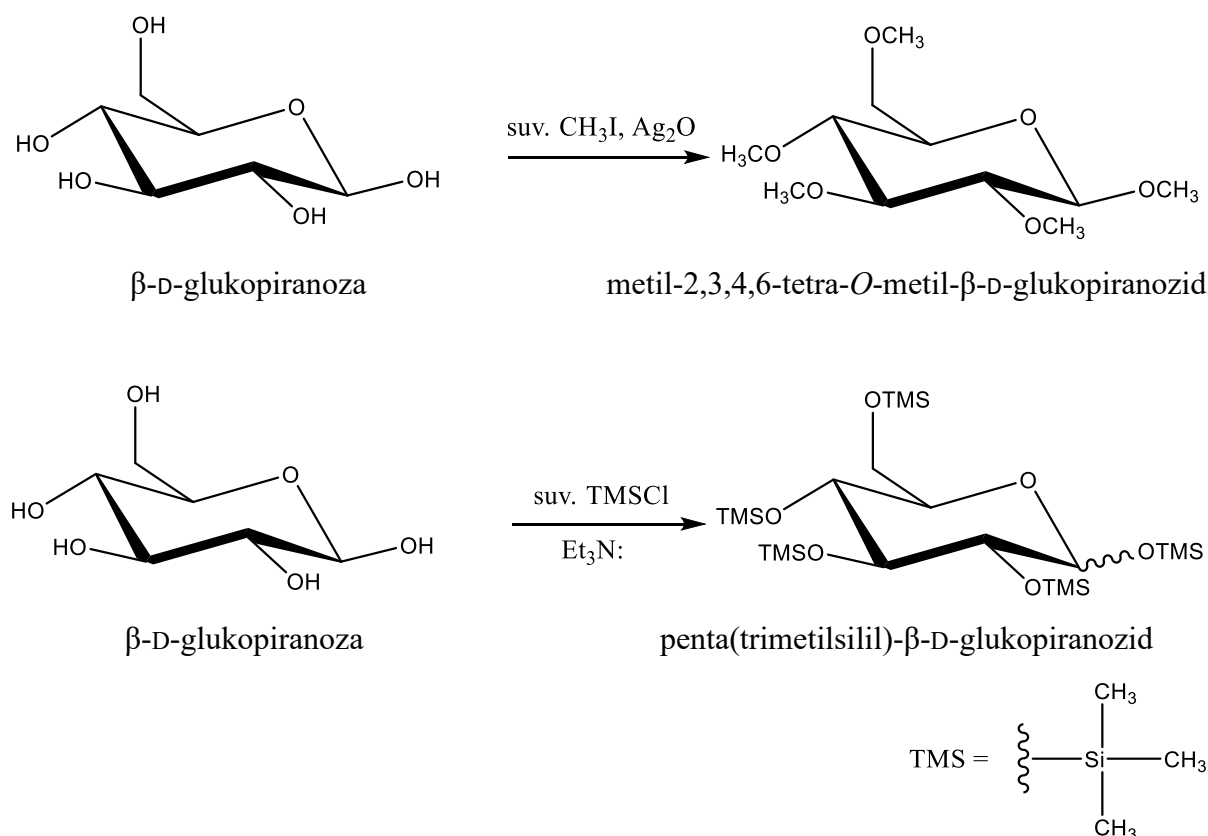
(slika 5).<sup>2</sup> Šećerni acetali koji ne reagiraju s Tollenšovim reagensom su nereducirajući šećeri i zovu se glikozidi. Osim Tollenšovog reagensa, za dokazivanje aldehydne skupine koriste se još Benedictov, Fehlingov i Barfoedov reagens.



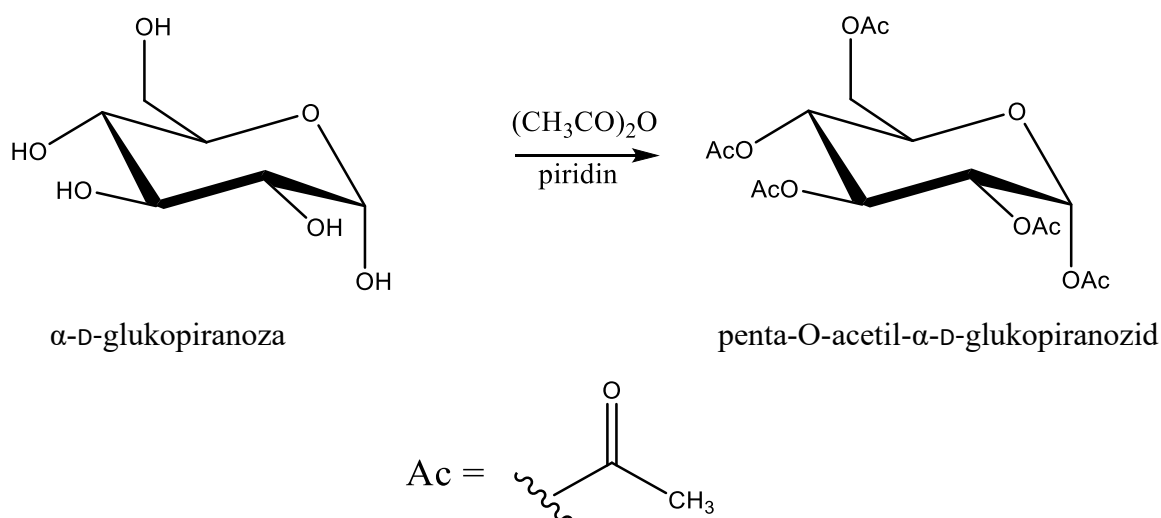
**Slika 5.** Reakcija glukoze s Tollenšovim reagensom u formi poluacetala i acetala <sup>2</sup>

### 2.1.3. Reakcije hidroksilnih skupina

Zbog prisutnosti nekoliko OH skupina glukoza je, poput ostalih šećera, dobro topljiva u vodi, ali slabo topljiva u organskim otapalima.<sup>2</sup> Hidroksilne skupine mogu se efikasno alkilirati i acilirati pri čemu nastaju odgovarajući eteri, odnosno esteri. Alkiliranje hidroksilnih skupina može se provesti tretiranjem glukoze metil-jodidom uz srebrov(I) oksid, koji polarizira vezu C–I, što metilni ugljik čini izrazito elektrofilnim. Nukleofilnim napadom OH skupine i naknadnim deprotoniranjem nastaje metilni eter. Pažljivom kontrolom reakcijskih uvjeta stereokemija anomernog C atoma može se očuvati. Hidroksilne skupine se također vrlo lako mogu pretvoriti u sililne etere korištenjem trialkilsilil–klorida, poput trimetilsilil–klorida (TMSCl) uz terciarni amin kao bazu, primjerice trietilamin ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) (slika 6).<sup>2</sup>

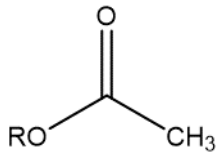
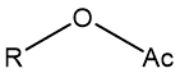
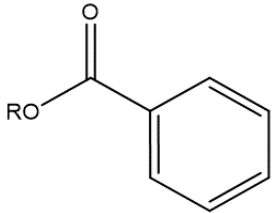
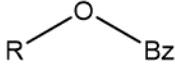
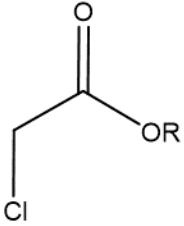
Slika 6. Alkiliranje hidroksilnih skupina glukoze.<sup>2</sup>

Aciliranjem hidroksilnih skupina glukoze nastaje odgovarajući šećerni ester. Tipična reakcija uključuje tretiranje šećera acetanhidridom uz piridin koji djeluje kao baza. Ovom reakcijom acetiliraju se sve OH skupine uključujući i onu na anomernom ugljiku (slika 7). Anomerna C–O veza ne puca tijekom aciliranja pa stereokemija pripadajućeg ugljika ostaje očuvana.<sup>2</sup>

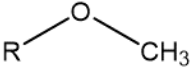
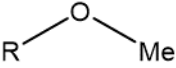
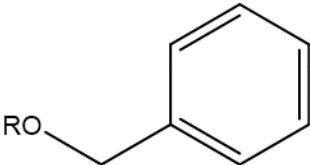
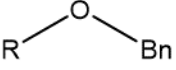
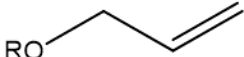
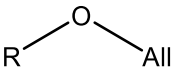
Slika 7. Acetiliranje hidroksilnih skupina glukoze <sup>2</sup>

Glavni problem koji se javlja kod reakcija hidroksilnih skupina glukoze je kako postići selektivnu reakciju na točno određenoj skupini, a da pritom preostale ne reagiraju. Jedan način je korištenje reagensa koji će selektivno reagirati sa željenom skupinom. Drugi način iziskuje da se ostale skupine nekako „blokiraju“ te tako ne ulaze u reakciju s korištenim reagensom. U tu svrhu se koriste zaštitne skupine. Zaštitna skupina se kovalentno veže na hidroksilnu skupinu šećera i na taj način blokira njezinu aktivnost. Odabir zaštitne skupine naravno ovisi o supstratu i daljnjim reakcijama tako da ne postoji idealna skupina koja se može uvijek primijeniti. Važno je napomenuti da uvođenje i uklanjanje tih skupina mora biti jednostavno, reakcije moraju imati visoki prinos i ne smiju interferirati s ostalim reakcijskim centrima. Kod reakcija šećera najčešće se koriste esterske, eterske i acetalne zaštitne skupine. Esterske skupine se lakše uvode i uklanjaju od eterskih, ali su eterske skupine stabilnije u širem spektru reakcijskih uvjeta, a eteri su i reaktivniji u daljnjim reakcijama glikozilacije od estera. Acetalne skupine omogućuju zaštitu dvije susjedne OH skupine istovremeno. U Tablicama 1, 2 i 3 prikazane su najčešće zaštitne skupine koje se koriste u reakcijama šećera, kao i one koje se koriste u sklopu ovog diplomskog rada.

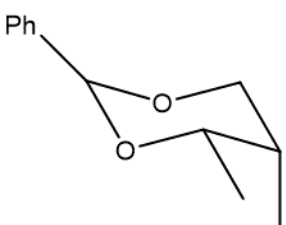
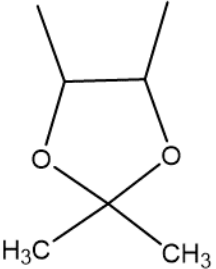
**Tablica 1.** Esterske zaštitne skupine

| Zaštitna skupina    | Struktura                                                                           | Skraćenica                                                                          | Uvođenje                            | Uklanjanje                              |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|
| Acetatni esteri     |  |  | Ac <sub>2</sub> O ili<br>AcCl/NaOAc | NaOMe/MeOH ili<br>NH <sub>3</sub> /MeOH |
| Benzoatni esteri    |  |  | BzCl/piridin                        | NaOMe/MeOH                              |
| Kloracetatni esteri |  |                                                                                     | kloracetyl-<br>klorid/piridin       | tiourea                                 |

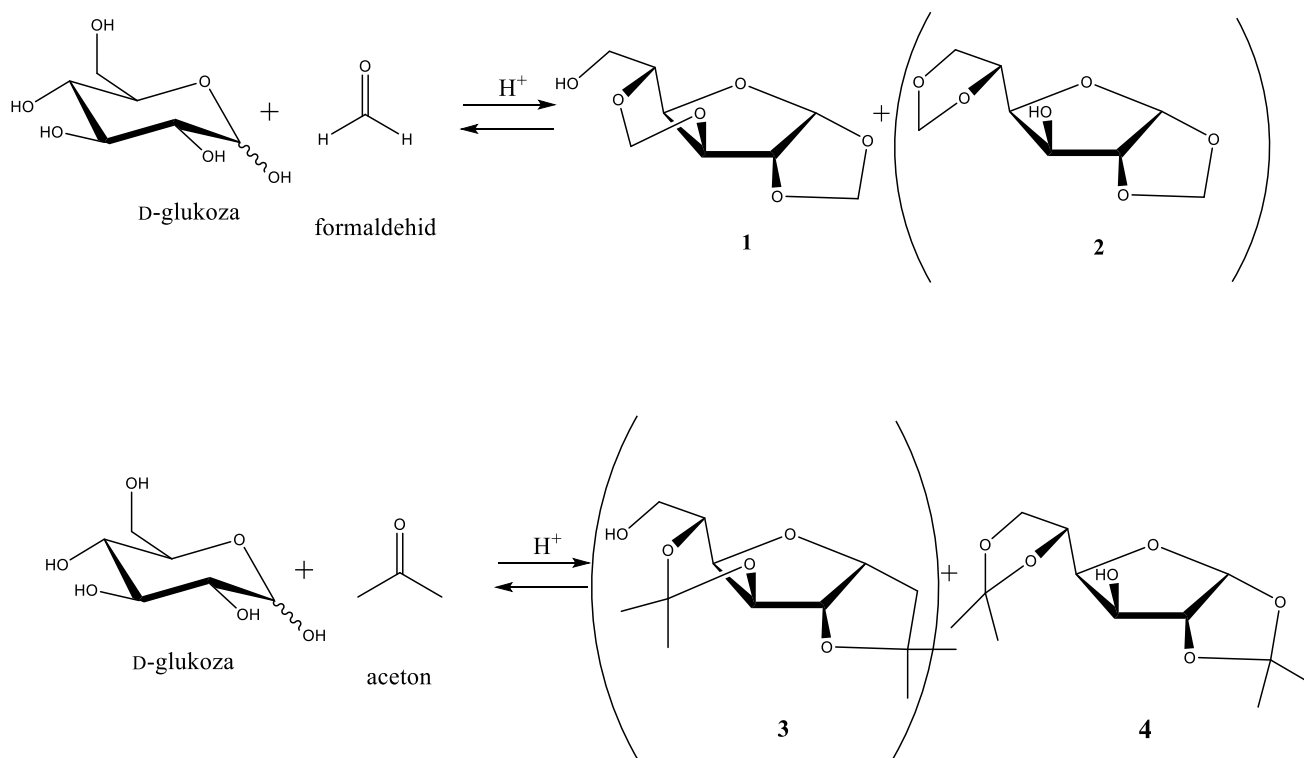
**Tablica 2.** Eterske zaštitne skupine

| Zaštitna skupina | Struktura                                                                         | Skraćenica                                                                        | Uvođenje                         | Uklanjanje                                                                   |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Metilni eteri    |  |  | $\text{CH}_3\text{I}/\text{NaH}$ | $\text{AlBr}_3, \text{AlI}_3$                                                |
| Benzilni eteri   |  |  | $\text{BnBr}/\text{NaH}$         | katalitičko<br>hidrogeniranje<br>$\text{H}_2/\text{Pd-C}$                    |
| Alilni eteri     |  |  | alil-bromid/ $\text{NaH}$        | izomerizacija,<br>kisela hidroliza<br>$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4/\text{H}^+$ |

**Tablica 3.** Acetalne zaštitne skupine

| Zaštitna skupina         | Struktura                                                                           | Uvođenje                                                                                               | Uklanjanje       |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Benzilidenski acetali    |  | benzaldehyd ili<br>benzaldehyd-<br>dimetilacetal uz<br>Lewisovu<br>kiselinu (npr.<br>$\text{ZnCl}_2$ ) | kisela hidroliza |
| Izopropilidenski acetali |  | aceton ili 2,2-<br>dimetoksipropan<br>uz Lewisovu<br>kiselinu (npr.<br>$\text{ZnCl}_2$ )               | kisela hidroliza |

U kontekstu acetalne zaštite ugljikohidrata zanimljivo je proučiti nastajanje cikličkih acetala iz glukoze i formaldehida te glukoze i acetona. Slika 8 prikazuje nastanak spomenutih acetala.



**Slika 8.** Dobivanje cikličkih acetala glukoze s formaldehydom i acetonom

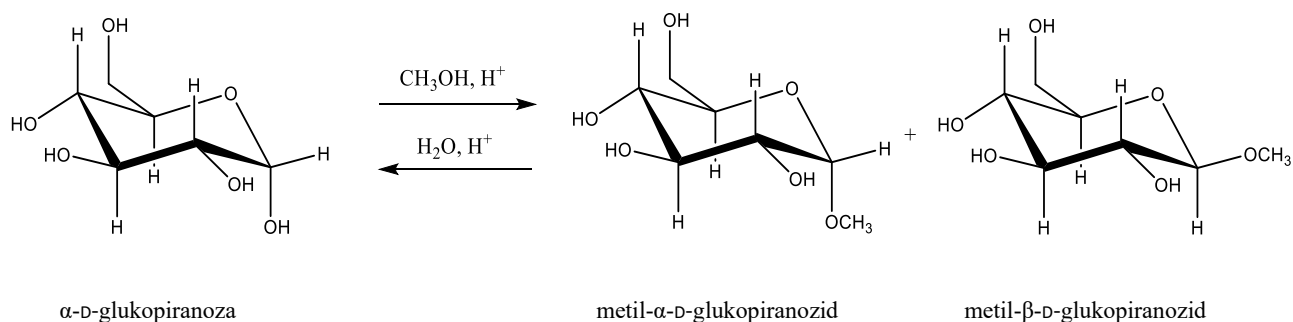
Metilenski acetali najstabilniji su acetali s obzirom na kiselu hidrolizu. Poteškoće u njihovom uklanjanju vjerojatno su razlog zašto ovi spojevi nemaju širu primjenu. Uklanjanje se obično odvija u jako kiselim ili Lewisovim kiselim uvjetima. Acetonidna zaštita je najčešće korištena zaštita za 1,2- i 1,3 diole. Acetonidi se intenzivno koriste u kemiji ugljikohidrata za selektivno maskiranje OH skupina različitih šećera. U pripremi acetonida, 1,2-derivat općenito ima prednost u odnosu na 1,3-derivat dok 1,3-derivat ima prednost u odnosu na 1,4-derivat, ali stupanj u kojem je 1,2-acetonid favoriziran ovisi o strukturi. U slučajevima gdje su moguća dva 1,2 acetonida, prevladava termodinamički najpovoljniji. Sekundarni alkoholi imaju veću tendenciju stvaranja cikličkih acetala nego primarni alkoholi. Supstrati koji imaju više od jednog acetonida, najmanje sterički ometen acetonid koji je bogatiji elektronima može se hidrolizirati selektivno. Općenito *trans*-acetonidi cijepaju se brže od *cis*-acetonida.<sup>3</sup> Na slici 7 može se uočiti da obje reakcije mogu rezultirati s 2 produkta, kod jednog je slobodna OH skupina na položaju 6 (**1** i **3**) dok je kod drugog slobodna ona na položaju 3 (**2** i **4**). Zanimljivo je to što nisu isti izomeri najstabilnije vrste za oba slučaja acetala. Nastanak različitih produkata, **1** i **4**, ukazuje na to da se radi o termodinamički najstabilnijim



izomerima. Metilne skupine acetona očigledno čine veliku razliku u odnosu na H formaldehida.

#### 2.1.4. Reakcije na anomernom centru

Aldoze, poput glukoze, tvore acetale (glikozide) u reakciji s alkoholom uz kiseli katalizator. U glikozidima je prisutna kovalentna veza između anomernog ugljika i ostatka molekule, a ta veza se naziva glikozidna veza. Ona molekulu dijeli na glikanski i aglikanski dio. Ovisno o heterotomu koji je vezan na anomerni C atom, postoji više tipova glikozidne veze, pa razlikujemo O–glikozide, N–glikozide, C–glikozide i ostale. Sinteza O–glikozida odvija se u uvjetima sličnim Fischerovoj esterifikaciji. Proučimo li reakciju glukoze s alkoholom metanolom uz kiseli katalizator možemo uočiti da neovisno o polaznom anomeru nastaje smjesa anomera metil–glikozida (slika 9).<sup>2</sup> Treba naglasiti da se navedene reakcije odvijaju isključivo na anomernom ugljiku zbog njegove veće reaktivnosti u odnosu na ostale ugljike u molekuli.



**Slika 9.** Sinteza metil–glikozida glukoze <sup>2</sup>

#### 2.1.5. Biološka uloga glukoze

Ugljikohidrati su najmnogobrojnija skupina organskih spojeva u prirodi. Sve biljke i životinje sintetiziraju i metaboliziraju ugljikohidrate.<sup>2</sup> Ugljikohidrati imaju nekoliko važnih uloga. Prvo, služe kao izvor energije i kao pričuvena energija koja se po potrebi oslobađa u stanicama biljaka i životinja. Drugo, polisaharidi su strukturni elementi staničnih stijenki bakterija i biljaka te egzoskeleta u člankonožaca. Treće, ugljikohidrati mogu biti vezani na mnoge proteine i lipide i kao takvi imaju važnu ulogu u komunikaciji među stanicama i u interakcijama između stanica i elemenata u staničnom okruženju.<sup>4</sup>

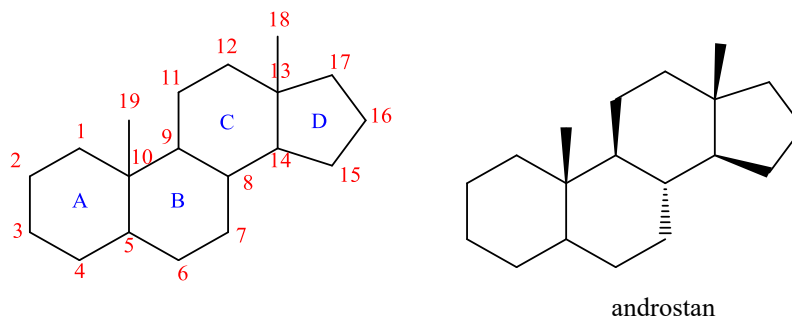
Biljke u procesu fotosinteze, koji se sastoji od niza složenih reakcija, uz pomoć sunčeve energije pretvaraju ugljikov dioksid i vodu u glukozu i kisik. Mnogi sisavci glukozu koriste kao izvor energije. Naime, procesom glikolize u nizu reakcija u anaerobnim uvjetima dolazi do razgradnje jedne molekule glukoze što rezultira proizvodnjom 2 molekule ATP-a. U aerobnoj razgradnji glukoze, nakon glikolize, zatim niza reakcija koje čine ciklus limunske kiseline te u procesu oksidacijske fosforilacije, dobiva se glavna molekula ATP-a koja nastaje u metabolizmu. Biosinteza glukoze u organizmu sisavaca se pak vrši procesom glukoneogeneze.<sup>4</sup>

Povezivanjem većeg broja glukoznih jedinica O–glikozidnim vezama nastaju homopolimerni polisaharidi koji u biljkama i životinjama imaju važnu strukturnu i skladišnu ulogu. Skladišni oblik glukoze u životinjskim stanicama je glikogen. Skladišni oblik u hrani biljnog podrijetla je škrob, koji se sastoji iz nerazgranate amiloze i razgranatog amilopektina. Celuloza je drugi glavni polimer glukoze nađen u biljkama. Njezina uloga je strukturna. Sastavni je dio staničnih stijenki bakterija i biljaka. Hitin, polimer koji nastaje povezivanjem niza amidnih derivata glukoze, također ima važnu strukturnu ulogu. On je sastavni dio staničnih stijenki gljiva i lišajeva te egzoskeleta člankonožaca.<sup>4</sup>

## 2.2. Kolesterol

### 2.2.1. Svojstva kolesterola

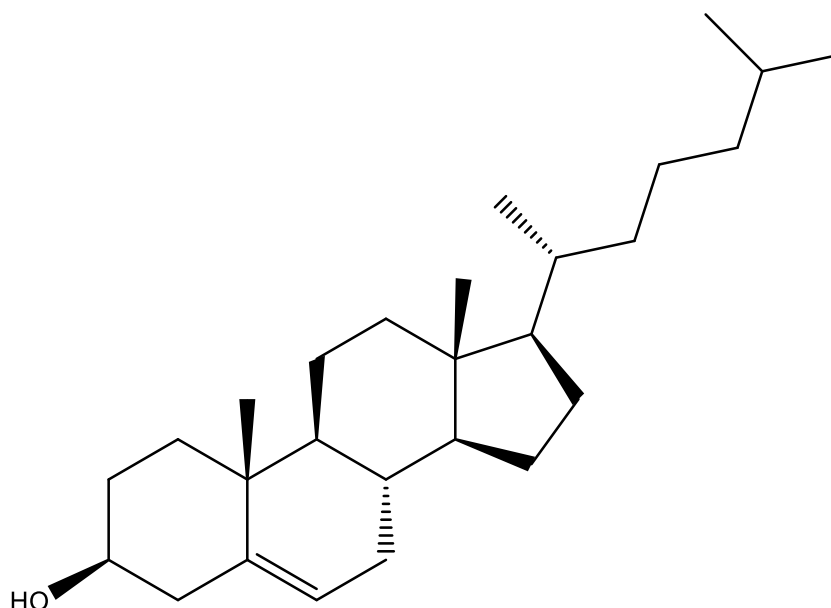
Kolesterol, čija je molekulska formula  $C_{27}H_{46}O$ , je organski spoj koji spada u skupinu steroida. Čisti kolesterol je bijela kristalinična tvar bez mirisa i okusa. Steroidi su složene policikličke molekule koje se mogu pronaći u svim vrstama biljaka i životinja. Klasificiraju se kao jednostavni lipidi zato što za razliku od masti i ulja ne podliježu hidrolizi. Struktura steroida bazira se na tetracikličkom androstanskom sustavu. Taj se sustav sastoji od ukupno 3 šesteročlana prstena i jednog peteročlanog prstena. Prstenovi se označavaju slovima A, B, C i D (slika 10).<sup>2</sup>



**Slika 10.** Označavanje i numeracija prstenova androstanskog sustava<sup>2</sup>

Sustavi fuzioniranih prstenova, kao što je androstan, na svakom mjestu spajanja prstenova mogu imati cis ili trans konfiguraciju. Kod androstana sva mjesta na kojima se prstenovi spajaju posjeduju trans konfiguraciju što rezultira krutom, gotovo planarnom strukturom s dvije aksijalne metilne skupine okomite na ravninu u kojoj leži molekula.<sup>2</sup>

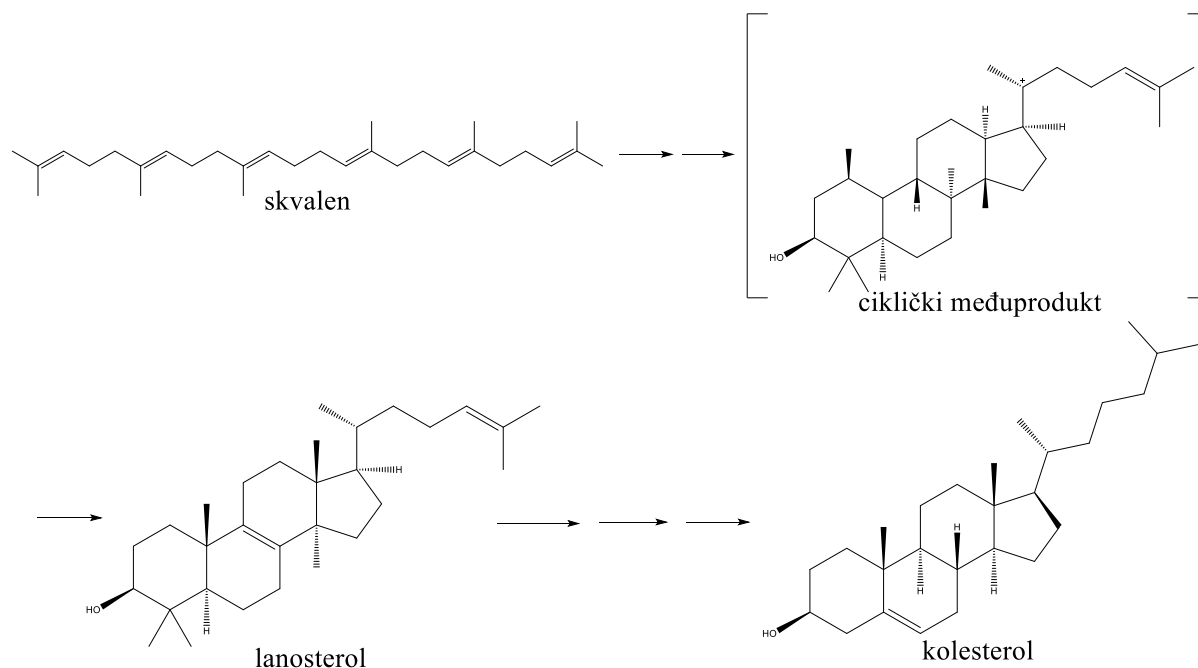
Kolesterol, kao i ostali steroidi, posjeduje androstanski sustav, ali s određenim modifikacijama. Na C3 ima vezanu polarnu hidroksilnu skupinu, od tuda i nastavak -ol koji je karakterističan za alkohole. Na C17 atom kovalentno je vezan kratak ugljikovodični lanac, koji za razliku od rigidnog steroidnog sustava pokazuje značajnu konformacijsku fleksibilnost. Tako je analizom kristalne strukture kolesterola uočeno 6 različitih konformacija vezanog lanca.<sup>5</sup> Između C5 i C6 ima dvostruku vezu (slika 11). Budući da sadrži polarnu OH skupinu i nepolarni steroidni sustav te ugljikovodični lanac, kolesterol je amfipatska molekula.



**Slika 11.** Struktura kolesterola

Zbog svoje amfipatske prirode, kolesterol je sastavni dio staničnih membrana životinjskih stanica. Kolesterol se u ljudski organizam unosi prehranom i to uglavnom konzumacijom mesa, peradi, jaja, mliječnih proizvoda i plodova mora. Kolesterol se u ljudskom organizmu prenosi putem krvi uz pomoć lipoproteina niske gustoće (LDL, engl. *low-density lipoprotein*) i unosi se u stanice preko receptora za LDL na površini stanice.<sup>4</sup> Tijelo sintetizira adekvatnu razinu kolesterola kako bi zadovoljilo sve fiziološke potrebe. Postoje dokazi da kod određenih pojedinaca prekomjerna konzumacija kolesterola u prehrani može povisiti serumski LDL kolesterol, čime se povećava rizik od kardiovaskularnih bolesti. Zbog toga su Ministarstvo poljoprivrede SAD-a i Ministarstvo zdravstva i socijalnih usluga SAD-a u svojim smjernicama iz 2010. preporučili konzumaciju do 300 mg kolesterola dnevno radi održavanja normalne razine kolesterola u serumu kao i zdravog omjera HDL/LDL kolesterola (HDL, engl. *high-density lipoprotein*).<sup>6</sup>

Glavno mjesto sinteze kolesterola u tijelu je jetra. Kod zdravih ljudi dnevno se sintetizira oko 15 mg/kg tjelesne mase.<sup>7</sup> Sinteza se odvija u citoplazmi i endoplazmatskom retikulumu stanica. Svih 27 C atoma kolesterola potječu od acetil-CoA, a sinteza se odvija u tri stupnja. U prvom stupnju nastaje izopentenil-pirofosfat koji je ključni gradivni element kolesterola i taj se korak odvija u citoplazmi. Drugi korak uključuje kondenzaciju 6 molekula izopentenil-pirofosfata u skvalen, taj se korak odvija u endoplazmatskom retikulumu. U trećem koraku skvalen ciklizira, a tetraciklički produkt se prevodi u kolesterol.<sup>4</sup> Princip ciklizacije skvalena i konačno dobivanje kolesterola prikazan je na slici 12. Pretvorba skvalena u lanosterol uključuje 1,2-metilni pomak 2 metilne skupine s C8 na C14 i s C14 na C13. Na kraju se metilne skupine na C14 i C4 uklanjaju, dvostruka veza na bočnom ogranku se reducira, a dvostruka veza u sustavu prstena formalno se transferira s 8,9 pozicije na 5,6 poziciju.<sup>8</sup>



**Slika 12.** Ciklizacija skvalena i pretvorba u kolesterol <sup>2</sup>

### 2.2.2. Biološka uloga kolesterola

Glavna uloga kolesterola u ljudskom organizmu je održavati integritet i fluidnost staničnih membrana. Također, služi kao prekursor za sintezu tvari koje su od vitalne važnosti za organizam, kao što su vitamin D, žučna kiselina i hormoni na steroidnoj bazi.<sup>9</sup>

Mnogi membranski procesi, kao što su transport i prijenos signala ovise o fluidnosti membranskih lipida, koja pak ovisi o svojstvima lanaca masnih kiselina. U membranskom dvosloju lanci masnih kiselina mogu biti u vrlo uređenom, krutom stanju ili u neuređenom fluidnom stanju. Prijelaz iz krutog u fluidno stanje zbiva se prilično naglo kada se temperatura podigne iznad temperature mekšanja membrane,  $T_m$ . Glavni regulator fluidnosti membrane kod sisavaca je upravo kolesterol. Struktura kolesterola je takva da sadrži glomaznu steroidnu jezgru s polarnom hidroksilnom skupinom na jednom kraju i fleksibilnim ugljikovodičnim lancem na drugom kraju. Kolesterol se ugrađuje u membranu tako da mu je duža os okomita na ravninu membrane. Hidrofilna hidroksilna skupina okrenuta je prema vodenoj otopini dok se hidrofobni ugljikovodični lanac smješta u unutrašnjost fosfolipidnog dvosloja membrane. Oblik kolesterola bitno se razlikuje od oblika fosfolipida što dovodi do poremećaja pravilnog rasporeda lanaca masnih kiselina.<sup>4</sup> Fluidnost membrane regulira dvojako, pri visokim temperaturama smanjuje fluidnost dok pri niskim temperaturama povećava fluidnost membrane. Pri visokim temperaturama, planarna, kruta struktura kolesterola ograničava

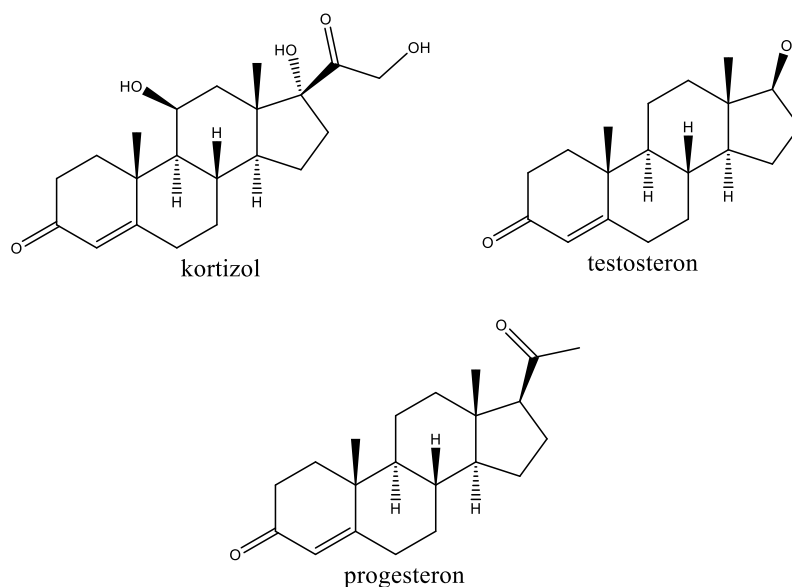
kretanje fosfolipida. Steroidni prsten stupa u interakciju s regijama fosfolipidnih lanaca masnih kiselina koje su najbliže grupama polarnih glava i djelomično ih imobilizira. Smanjenjem pokretljivosti prvih nekoliko  $-CH_2-$  skupina u lancima masnih kiselina, kolesterol čini to područje lipidnog dvosloja manje podložnim deformacijama. Na taj način se fluidnost membrane smanjuje. Kolesterol sprječava da se ugljikovodični lanci lipida pakiraju zajedno i formiraju uređene, kristalima nalik, strukture. Ova interferencija s pakiranjem proširuje fazni prijelaz koji se događa tijekom zamrzavanja, eliminirajući brzu promjenu fluidnosti membrane koja bi se inače dogodila blizu  $T_m$ . Učinci kolesterola na niskim temperaturama mogu se pripisati savijenom repu kolesterola, koji remeti pakiranje lipida. Stoga se kolesterol može smatrati puferskom molekulom u membranama životinjskih stanica koja sprječava nagle promjene u fluidnosti membrane u rasponu temperatura.<sup>10</sup>

Kolesterol također igra važnu ulogu u embrionalnom razvoju gdje, kao u svakom tkivu, potječe ili iz *de novo* sinteze ili iz egzogenih izvora. Tijekom fetalnog razvoja primijećeno je da je sinteza kolesterola povećana, a mogući razlog za to bi mogla biti faza brzog rasta kroz koju fetus prolazi. Kolesterol u embrionalnom razvoju također pomaže u proizvodnji žučnih kiselina, steroidnih hormona i oksisterola djelujući kao prekursor. Za razliku od tkiva odrasle osobe gdje su stanice u stabilnom stanju s priljevom kolesterola jednakom odljevu, fetus nije u stabilnom stanju i nakuplja kolesterol. Budući da fetus brzo raste, velika količina nakupljenog kolesterola se koristi za održavanje i formiranje stanične membrane. Dok u zdravom tkivu odrasle osobe postoji regulatorni sustav koji djeluje kad god dođe do male promjene razine kolesterola, u fetalnim stanicama ista regulacija se ne događa u istoj mjeri. Stoga svaka promjena u koncentraciji kolesterola može drastično utjecati na metaboličke procese. Nedostaci kolesterola tijekom embriogeneze i organogeneze mogu uzrokovati ozbiljne abnormalnosti.<sup>11</sup>

Središnji živčani sustav (CNS, engl. *central nervous system*) ima najveću prosječnu koncentraciju kolesterola u odnosu na bilo koje drugo tkivo u ljudskom organizmu. Iako CNS čini samo 2% ukupne tjelesne mase, oko 25% neesterificiranog kolesterola u cijelom ljudskom tijelu prisutno je u mozgu i leđnoj moždini. Utvrđeno je da je kolesterol uglavnom prisutan u dva bazena, u plazma membranama glijalnih stanica i neurona te u specijaliziranim membranama mijelina. Glavna svrha kolesterola je formiranje mijelinske ovojnice koja oblaže aksone neurona. Glijalne stanice i neuroni sintetiziraju više kolesterola nego što je potrebno

mozgu, a višak se oslobađa iz mozga izravno kroz krvno–moždanu barijeru (BBB, engl. *brain–blood barrier*).<sup>11</sup>

Kolesterol služi kao prekursor za sintezu steroidnih hormona koji imaju čitav niz važnih uloga u ljudskom tijelu. Steroidni se hormoni mogu podijeliti u 2 skupine, kortikosteroidi koji nastaju u kori nadbubrežne žlijezde i spolni hormoni koji nastaju u spolnim žlijezdama. U te 2 skupine razlikujemo 5 tipova hormona prema vrsti receptora na koje se vežu. To su glukokortikoidi i mineralokortikoidi (oboje kortikosteroidi) te androgeni, estrogeni i progestogeni (spolni hormoni).<sup>12</sup> Na slici 13 prikazani su neki od hormona čiji je sintetski prekursor kolesterol.

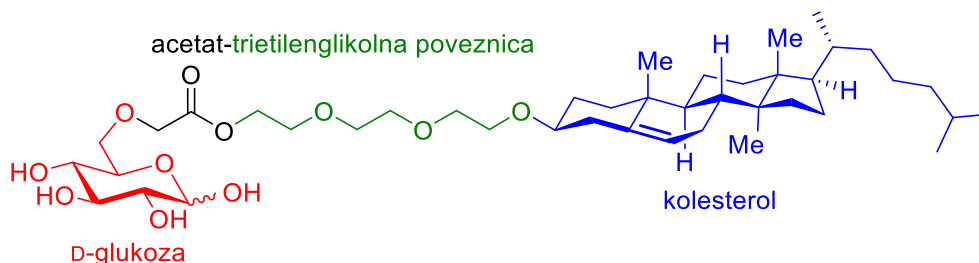


**Slika 13.** Neki od hormona čiji je sintetski prekursor kolesterol

### 2.3. Primjena konjugata D-glukoze i kolesterola

Glukoza je, kao što je već navedeno, glavni izvor energije za sve stanice sisavaca, pa tako i za tumorske stanice. Naime, tumorske stanice u odnosu na normalne stanice imaju veću potražnju za energijom zbog toga što tumorsko tkivo nije dobro prokrvljeno. Naime, razvoj krvožilnog sustava ne može pratiti razvoj tumorskog tkiva pa tumorske stanice nemaju dostavu kisika te imaju anaerobni metabolizam. Troši se puno ATP-a pa se i velika količina glukoze oksidira kroz anaerobni metabolizam.<sup>13</sup> Promijenjen metabolizam glukoze u tumorskim tkivima može se promatrati pozitronskom emisijskom tomografijom (PET) nakon

intravenoznog unošenja analoga glukoze  $^{18}\text{F}$ -2-fluorodeoksi-D-glukoze (FDG). Tumorske stanice apsorbiraju FDG u većoj mjeri nego normalne stanice što omogućuje njihovu vizualizaciju putem PET.<sup>14</sup> Danas smo još uvijek daleko od zlatnog standarda za učinkovito liječenje raka s minimalnim ili nikakvim nuspojavama. Iz tog razloga, u istraživanjima sve više pažnje dobivaju različite metode za isporuku lijekova protiv raka posredovane glikozilacijom. One su obećavajući alat koji omogućuje učinkovitu dijagnozu i terapiju tumora putem prepoznavanja između ugljikohidrata i specifičnih staničnih receptora.<sup>15-18</sup> Jedan od sustava osmišljenih na ovom principu su modificirani liposomi. Liposomi su sferične nanostrukture s jednim ili više lipidnih dvosloja koji okružuju unutarnju vodenu jezgru.<sup>19</sup> U vodenoj unutrašnjosti moguća je inkapsulacija molekula lijeka sa svrhom njegove zaštite od procesa u organizmu, poput enzimske razgradnje te imunološke i kemijske inaktivacije. Liposomski sustav za isporuku lijeka oslanja se isključivo na pasivni unos liposoma u tumorsku stanicu. Dodatna funkcionalizacija liposoma, s ciljanim ligandom na površini membrane, olakšava akumulaciju u tumoru zbog selektivnog unosa preko specifičnih staničnih receptora prisutnih na površini stanica raka.<sup>20,21</sup> Pokazano je da je jedan od mogućih načina modifikacije liposoma korištenjem konjugata glukoze i kolesterola, gdje su te dvije komponente povezane preko etilen-glikolne poveznice (slika 14).

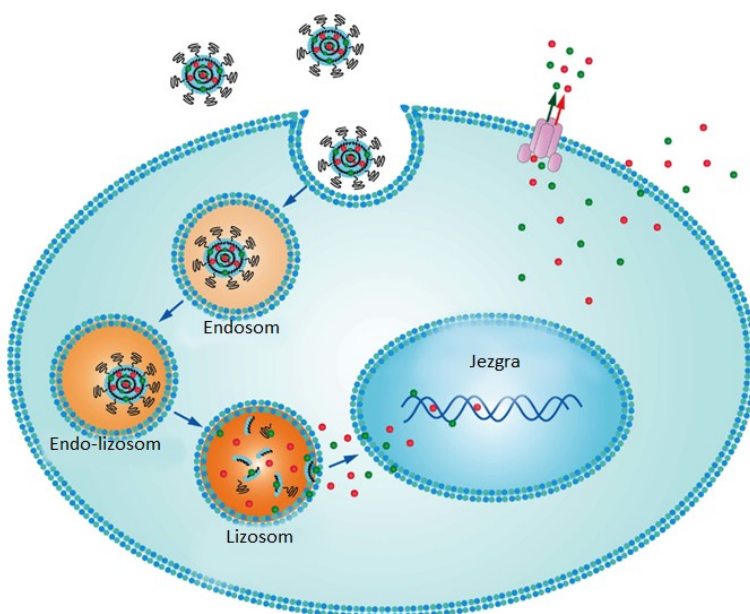


**Slika 14.** Struktura spoja za modifikaciju liposoma<sup>22</sup>

Zbog svoje amfipatske prirode, kolesterol služi kao idealan alat koji omogućuje usidrenje spoja u lipidni dvosloj liposoma. Prednosti korištenja kolesterola u navedene svrhe su činjenica da je električki neutralna molekula, kemijski je stabilan i relativno pristupačne cijene. Etilen-glikoli imaju funkciju poveznice između kolesterola, koji se ugradio u dvosloj liposoma, i glukoze. Glukoza je tada, zbog svoje hidrofilne prirode, okrenuta prema vanjskoj strani liposoma gdje se nalazi vodeni medij. Etilen-glikoli s duljim lancima mogu smanjiti učinkovitost modificiranog liposoma zbog steričkih smetnji, dok etilen-glikoli s kraćom duljinom lanca mogu ometati izlaganje glukoze.<sup>23</sup> Budući da se glukoza nalazi na površini liposoma i okrenuta je prema vodenom mediju, to omogućuje da je transporter glukoze, koji



su na deksprimirani na površini tumorskih stanica zbog povećane potrebe za energijom, prepoznaju i na taj način olakšavaju unos lijeka koji se nalazi u unutrašnjosti liposoma u tumorsku stanicu.<sup>24</sup> Transporteri dakle, prepoznaju i vežu na sebe glukozu što posljedično veže liposom na membranu stanice. Zatim može doći do fuzije membrane stanice i lipidnog dvosloja liposoma, što omogućuje unošenje i potencijalnog lijeka koji se nalazi u unutrašnjosti liposoma. Studije terapijskog potencijala novodizajniranih liposoma namijenjenih transportu lijekova provode se tehnikom radioaktivnog obilježavanja.<sup>25,26</sup> Ova tehnika je pouzdana i precizna metoda za *in vitro* i *in vivo* studije biodistribucije novorazvijenih nanostrukture.<sup>25</sup> Liposomi se mogu radioaktivno obilježiti raznim radionuklidima, bilo površinskim vezanjem ili inkapsulacijom.<sup>27</sup> Liposomi se općenito smatraju biorazgradivima budući da su njihovi lipidni dvosloji sastavljeni od prirodnih lipida poput fosfolipida, sfingolipida i glikolipida, koji su podvrgnuti lipolitičkoj razgradnji pomoću enzima koji se nalaze u tijelu sisavaca. Nakon ekstravazacije u tumorsko tkivo, liposomi neko vrijeme ostaju unutar tumorske strome kao skladišta puna lijeka. Liposomi na kraju postaju podložni enzimatskoj razgradnji, što dovodi do oslobađanja lijeka uz naknadnu difuziju u jezgru tumorske stanice.<sup>28</sup> Stanica uvijek posjeduje mehanizam kojim izbacuje višak tvari ili nepoznate tvari (roza pumpa na slici 15). Na slici 15 prikazan je okvirni princip mehanizma liposomom potpomognute dostave lijeka tumorskim stanicama.



**Slika 15.** Princip liposomom potpomognute dostave lijeka<sup>29</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

Sva korištena otapala i reagensi analitičke su čistoće i komercijalno su dostupni. Glukoza (*Sigma-Aldrich*), kolesterol (*Sigma-Aldrich*), trietilen-glikol (*Sigma-Aldrich*), dioksan (*Kemika*), etil-acetat (EtOAc, *Fluka*), bezvodni magnezijev sulfat (MgSO<sub>4</sub>, *Sigma-Aldrich*), petroleter (PE, *Fluka*), natrijev hidrid (NaH, 60%-tna suspenzija u mineralnom ulju, *Fluka*), tetrahidrofuran (THF, *Sigma-Aldrich*), 10% paladij na ugljiku (Pd/C, *Fluka*), etanol (EtOH, *Kemika*), *p*-toluensulfonil klorid (*p*-TsCl, *Merck*), diklormetan (DCM, *Lach-Ner*), piridin (py, *Kemika*), metanol (MeOH, *Fluka*), benzil-bromid (BnBr, *Merck*), *N,N*-dimetilformamid (DMF, *Sigma-Aldrich*), natrijev klorid (NaCl, *Kemika*), bezvodni natrijev sulfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, *Merck*), cinkov klorid (ZnCl<sub>2</sub>, *Calbiochem*), octena kiselina (HOAc, *Kemika*), acetanhidrid (Ac<sub>2</sub>O, *Kemika*), natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO<sub>3</sub>, *Gram mol*), 25% natrijev metoksid u metanolu (NaOMe/MeOH, *Sigma-Aldrich*), jod (I<sub>2</sub>, *Gram mol*), kloroform (CHCl<sub>3</sub>, *Kemika*), dietil-eter (Et<sub>2</sub>O, *Fluka*), 90% trifluoroctena kiselina (TFA, *Sigma-Aldrich*), benzen (*Sigma-Aldrich*), toluen (*Kemika*), dimetil-sulfoksid (DMSO, *Gram mol*), klorovodična kiselina (HCl, *Kemika*), trimetilsilil-triflat (TMSOTf, *Sigma-Aldrich*), 2,2'-bipiridin (*Merck*), natrijev hidroksid (NaOH, *Kemika*), toluen (*Kemika*), imidazol (*Fluka*), trifenilfosfin (PH<sub>3</sub>P, *Fluka*). Korištena suha otapala pripremljena su standardnim literaturnim metodama.<sup>30</sup>

Provedene reakcije, sastav frakcija i čistoća sintetiziranih spojeva praćene su tankoslojnom kromatografijom (TLC, engl. *thin-layer chromatography*) na pločicama silikagela na staklu (Macherey-Nagel, Sil G-25). Sustavi otapala za razvijanje TLC-pločica navedeni su uz pojedini propis. Za detekciju spojeva korišten je Hanessianov reagens uz zagrijavanje. Sirovi produkti su pročišćeni kromatografijom na stupcu silikagela (0,063-0,200 mm, *Merck*) kao stacionarnoj fazi te sustavom otapala (mobilnom fazom) navedenim uz pojedini propis.

Sintetizirani spojevi okarakterizirani su infracrvenom spektroskopijom (IR) te spektroskopijom nuklearne magnetne rezonancije (NMR). Za snimanje IR spektara korišten je instrument Perkin Elmer FT-IR C89391 u ATR načinu rada. Valni brojevi ( $\tilde{\nu}$ ) su izraženi u recipročnim centimetrima (cm<sup>-1</sup>). <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C (DEPT-Q) NMR spektri snimljeni su na Bruker

Avance III HD spektrometru pri 400 MHz ( $^1\text{H}$ ), odnosno 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) u deuteriranim otapalima navedenim u tekstu. Kao unutarnji standard korišten je tetrametilsilan (TMS) prema kojem su izraženi kemijski pomaci ( $\delta$ ) u ppm. Konstante sprege ( $J$ ) izražene su u Hz. Optičko zakretanje spojeva mjereno je na polarimetru Schmidt + Haensch Polartronic NH8 pri sobnoj temperaturi.

## 3.2. Sintetski put II

### 3.2.1. Sinteza 1,2,3,4,6-penta-O-benzil glukopiranoze (1)

U okruglu tikvicu dodana je glukoza (3,0 g, 0,017 mol) i suhi DMF (80 mL). Reakcijska smjesa je zatim ohlađena u ledenoj kupelji. U ohlađenu reakcijsku smjesu dodan je natrijev hidrid (4 g, 60% NaH u mineralnom ulju, 0,100 mol). Tako dobivena smjesa miješana je na magnetskoj miješalici oko 30 minuta. Reakcijska smjesa je zatim ponovno ohlađena u ledenoj kupelji te je u smjesu dodan benzil-bromid (15 mL, 0,126 mol) kap po kap. Reakcijska smjesa miješana je na magnetskoj miješalici pod argonom slijedećih 48 h pri sobnoj temperaturi. Reakcija je praćena na TLC-om (petroleter / etil-acetat 9:1 v/v). Nakon što je utvrđeno da je reakcija gotova, dodan je metanol (20 mL) kap po kap, te je reakcijska smjesa miješana još 1 h pri sobnoj temperaturi. Nakon toga, reakcijska smjesa je pomoću EtOAc (200 mL) prebačena u lijevak za ekstrakciju. Organski sloj je ispran vodom (5×100 mL) kako bi se uklonila glavnina DMF-a. Zadnje ispiranje izvršeno je sa zasićenom otopinom NaCl-a. Spojeni organski ekstrakti osušeni su na bezvodnom  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i upareni na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Kako bi se uklonili teško hlapljivi spojevi (benzil-bromid, benzilni alkohol, benzil-metil-eter, ostaci DMF-a) organski ekstrakt je postavljen na vakuumsku pumpu pri 50 °C preko noći. Dobiveni talog je zatim otopljen u vrućem metanolu, a bistra smjesa je puštena preko noći u frižideru da produkt kristalizira. Nastali talog filtriran je preko sinter lijevka. Dobiveno je 3,7 g (35%) produkta **1** u obliku bijele krutine.

$R_f = 0,41$  (petroleter / etil-acetat 9:1 v/v)

Spoj je od prije poznat, NMR spektar se slaže s literaturnim.<sup>31</sup>

### 3.2.2. Sinteza 6-O-acetil-1,2,3,4-tetra-O-benzil glukopiranoze (2)

U okruglu tikvicu dodan je  $\text{ZnCl}_2$  (2,80 g, 20, mmol), uspostavljen je vakuum te je potom rastaljen grijanjem pomoću puhalo vrućeg zraka. Nakon hlađenja u atmosferi argona, u tikvicu je dodana smjesa otapala  $\text{HOAc}$  /  $\text{Ac}_2\text{O}$  u volumnom omjeru 1:5 (15 mL). Reakcijska smjesa je zatim ohlađena na 0 °C. U ohlađenu reakcijsku smjesu je u malim obrocima dodavana perbenzilirana gukoza (**1**) (2,49 g, 3,95 mmol) koja je prethodno otopljena u 15 mL smjese otapala  $\text{HOAc}$  /  $\text{Ac}_2\text{O}$  u volumnom omjeru 1:5. Reakcija je ostavljena na magnetskoj miješalici pod argonom oko 60 min na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om (petroleter / etil-acetat 4:1 v/v). Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je prelivena preko smrvljenog leda te je uz  $\text{EtOAc}$  prenesena u lijevak za odjeljivanje. Isprana je s  $\text{NaHCO}_3$  (3×10 mL) kako bi se  $\text{HOAc}$  u potpunosti neutralizirala. Organski ekstrakti su spojeni, sušeni na bezvodnom  $\text{MgSO}_4$  i upareni na rotacijskom uparivaču pri sniženom tlaku. Dobiven je sirovi produkt koji je pročišćen *flash*-kromatografijom u sustavu otapala petroleter / etil-acetat. Dobiveno je 1,25 g (54,3%) produkta **2** u obliku sitnih kristalića bijele boje.

$R_f = 0,68$  (petroleter / etil-acetat 4:1 v/v)

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 7,38-7,24 (m, 20H, CH-Ar), 4,96 (d, 1H,  $J = 6,1$  Hz, H-1), 4,94 (s, 1H), 4,93 (d, 1H,  $J = 1,5$  Hz), 4,86 ( $\underline{\text{AB}}^1$ , 1H,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ,  $J = 10,9$  Hz), 4,78 ( $\underline{\text{AB}}^2$ , 1H,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ,  $J = 11,1$  Hz), 4,72 ( $\underline{\text{AB}}^1$ , 1H,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ,  $J = 10,9$  Hz), 4,66 ( $\underline{\text{AB}}^3$ , 1H,  $J = 11,8$  Hz), 4,56 ( $\underline{\text{AB}}^2$ , 1H,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ,  $J = 11,1$  Hz), 4,51 (d, 1H, H-5,  $J = 7,9$  Hz), 4,37 (dd, 1H,  $\text{CH}_2\text{-OAc}$ ,  $J_1 = 4,7$  Hz,  $J_2 = 7,1$  Hz), 4,24 (dd, 1H,  $\text{CH}_2\text{-OAc}$ ,  $J_1 = 9,9$  Hz,  $J_2 = 2,1$  Hz), 3,67 (t, 1H,  $J = 8,8$  Hz), 3,57 (d, 1H, H-4,  $J = 9,7$  Hz), 3,54-3,48 (m, 2H), 2,05 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 140,7 (C, Ar), 140,3 (C, Ar), 137,8 (C, Ar), 137,2 (C, Ar), 128,5-127,7 (20×CH, Ar), 102,5 (C1, CH), 84,7 (C3, CH), 82,2 (C2, CH), 75,6 ( $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 75,0 ( $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 74,9 ( $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 72,9 (C4, CH), 71,2 ( $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 63,1 ( $\text{CH}_2\text{-OAc}$ ), 20,9 ( $\text{CH}_3$ ).

Pik koji odgovara kvarternom ugljikovom atomu acetatne skupine ( $\text{C}=\text{O}$ ) nije uočen u spektru.

### 3.2.3. Sinteza 1,2,3,4-tetra-O-benzil glukopiranoze (3)

U okruglu tikvicu je dodan spoj **2** (1,20 g, 2,05 mmol). Zatim je dodan  $\text{MeOH}$  (10 mL), te nakon što se produkt **2** u potpunosti otopio dodana je i 25%-tna otopina  $\text{NaOMe}$  u  $\text{MeOH}$  (10 mL). Reakcija je vođena 1,5 h pri sobnoj temperaturi uz praćenje TLC-om (petroleter / etil-acetat 2:1 v/v). Nakon završetka reakcije reakcijska smjesa je s etil-acetatom prebačena u

lijevak za odjeljivanje gdje je isprana s vodom (3×15 mL) i zasićenom otopinom NaCl-a (1×20 mL). Organski ekstrakt je osušen na bezvodnom MgSO<sub>4</sub> i uparen na rotacijskom uparivaču pri sniženom tlaku. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala petroleter / etil-acetat 2:1. Dobiveno je 1,03 g (92,5%) produkta **3** u obliku sitnih kristalića bijele boje.

$R_f = 0,61$  (petroleter / etil-acetat 2:1 v/v)

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 7,38-7,26 (m, 20H, CH-Ar), 4,95 (AB<sup>1</sup>, 1H,  $J = 7,8$  Hz, CH<sub>2</sub>-Bn), 4,93 (s, 1H, H-1), 4,91 (d, 1H,  $J = 4,7$  Hz, CH<sub>2</sub>-Bn), 4,86 (AB<sup>2</sup>, 1H,  $J = 10,9$  Hz, CH<sub>2</sub>-Bn), 4,80 (AB<sup>2</sup>, 1H,  $J = 10,9$  Hz, CH<sub>2</sub>-Bn), 4,73 (AB<sup>3</sup>, 1H,  $J = 10,8$  Hz, CH<sub>2</sub>-Bn), 4,69 (d, 1H,  $J = 11,8$  Hz, CH<sub>2</sub>-Bn), 4,64 (AB<sup>3</sup>, 1H,  $J = 10,8$  Hz, CH<sub>2</sub>-Bn), 4,57 (AB<sup>1</sup>, 1H,  $J = 7,8$  Hz, CH<sub>2</sub>-Bn), 3,90-3,84 (m, 1H, H-2), 3,73-3,69 (m, 1H, H-3), 3,66 (d, 1H,  $J = 9,0$  Hz, H-5), 3,57 (t, 1H,  $J = 9,3$  Hz), 3,47 (dd, 1H,  $J_1 = 7,8$  Hz,  $J_2 = 1,2$  Hz), 3,38-3,34 (m, 1H, H-4).

#### 3.2.4. Sinteza kolesteril-tosilata (**4**)

U okruglu tikvicu je odvagan kolesterol (3,0 g, 7,76 mmol), dodan je suhi piridin (15 mL) te *p*-TsCl (2,2 g, 11,64 mmol). Reakcijska smjesa je ostavljena na magnetskoj miješalici preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcija je praćena TLC-om (petroleter / etil-acetat 3:7 v/v). Nakon završetka, reakcijska smjesa je s (50 mL) Et<sub>2</sub>O prenesena u lijevak za odjeljivanje i obrađena izmućivanjem s: vodom (2×50 mL), 1M HCl-om (2×30 mL), NaHCO<sub>3</sub>-om (30 mL) i zasićenom otopinom NaCl-a (30 mL). Organski ekstrakti su spojeni, osušeni na bezvodnom MgSO<sub>4</sub> i upareni na rotacijskom uparivaču pri sniženom tlaku. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je *flash*-kromatografijom u sustavu otapala petroleter / etil-acetat 3:7. Dobiveno je 3,9 g (93%) čistog produkta **4** u obliku kristalića bijele boje.

$R_f = 0,87$  (petroleter / etil-acetat 3:7 v/v)

Snimljeni NMR spektar slaže se s literaturnim podacima.<sup>32</sup>

#### 3.2.5. Sinteza trietilen-glikol-kolesteril-etera (**5**)

U okruglu tikvicu dodan je spoj **4** (1,9 g, 3,5 mmol), trietilen-glikol (2 mL, 0,015 mol) i dioksan (10 mL). Reakcijska smjesa ostavljena je u inertnoj atmosferi argona na refluksu preko noći. Tijek reakcije praćen je TLC-om (petroleter / etil-acetat 3:7 v/v). Nakon dovršetka reakcije, reakcijska smjesa je ukoncentrirana uparavanjem na rotacijskom uparivaču i prenesena u lijevak za odjeljivanje uz EtOAc (100 mL). Isprana je sa zasićenom otopinom

NaCl-a (2×40 mL). Organski ekstrakti su spojeni, osušeni na bezvodnom MgSO<sub>4</sub> i upareni na rotacijskom uparivaču pri sniženom tlaku. Dobiven je sirovi produkt u obliku smeđeg ulja. Produkt je pročišćen *flash*-kromatografijom u sustavu otapala petroleter / etil-acetat 3:7. Dobiveno je 1,12 g (62%) produkta **5** koji je uljasta tvar narančaste boje.

$R_f = 0,34$  (petroleter / etil-acetat 3:7 v/v)

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 5,34 (d, 1H, H-6,  $J = 5,2$  Hz), 3,74-3,61 (m, 12H, CH<sub>2</sub>-EG), 3,21-3,16 (m, 1H, H-3), 2,05-1,10 (m, 26H, Chol), 0,99 (s, 3H, H-10, CH<sub>3</sub>), 0,91 (d, 3H, H-21,  $J = 6,6$  Hz, CH<sub>3</sub>), 0,86 (dd, 6H, H-26,27,  $J_1 = 4,9$  Hz,  $J_2 = 1,7$  Hz, 2×CH<sub>3</sub>), 0,67 (s, 3H, H-18, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 141,1 (C, C=C), 121,7 (CH, C=C), 79,7 (C-3, CH), 72,6-61,9 (6×CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-EG), 56,9 (C-14, CH), 56,3 (C-17, CH), 50,3 (C-9, CH), 42,4 (C-13, C), 39,9 (C-24, CH<sub>2</sub>), 39,6 (C-12, CH<sub>2</sub>), 39,1 (C-4, CH<sub>2</sub>), 37,4 (C-10, C), 37,0 (C-1, CH<sub>2</sub>), 36,3 (C-22, CH<sub>2</sub>), 35,9 (C-20, CH), 32,1 (C-7, CH<sub>2</sub>), 32,0 (C-8, CH), 28,4 (C-2, CH<sub>2</sub>), 28,3 (C-15, CH<sub>2</sub>), 28,1 (C-25, CH), 24,4 (C-16, CH<sub>2</sub>), 23,9 (C-23, CH<sub>2</sub>), 22,9 (C-26, CH<sub>3</sub>), 22,7 (C-27, CH<sub>3</sub>), 21,2 (C-11, CH<sub>2</sub>), 19,5 (C-21, CH<sub>3</sub>), 18,4 (C-19, CH<sub>3</sub>), 11,9 (C-18, CH<sub>3</sub>).

### 3.2.6. Sinteza tosilata kolesteril-trietilen-glikol-etera (**6**)

U okruglu tikvicu dodan je spoj **5** (1,12 g, 2,17 mmol), suhi DCM (15 mL) i piridin (1 mL, 0,012 mol) nakon čega je reakcijska smjesa ohlađena na 0 °C u ledenoj kupelji. U ohlađenu reakcijsku smjesu zatim je dodan *p*-TsCl (703 mg, 3,69 mmol). Reakcija je vođena pri sobnoj temperaturi u inertoj atmosferi argona ukupno 72 h. Tijek reakcije praćen je TLC-om (petroleter / etil-acetat 7:3 v/v). Nakon zaustavljanja reakcije, reakcijska smjesa je ukoncentrirana na rotacijskom uparivaču te je produkt pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala petroleter / etil-acetat 7:3. Dobiveno je 1,22 g (84%) produkta **6** u obliku uljaste tvari žute boje.

$R_f = 0,43$  (petroleter / etil-acetat 7:3 v/v)

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 7,80 (d, 2H, CH-Ar,  $J = 7,9$  Hz), 7,34 (d, 2H, CH-Ar,  $J = 7,9$  Hz), 5,33 (d, 1H, H-6,  $J = 5,19$  Hz), 4,16 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-OTs,  $J = 4,9$  Hz), 3,69 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-EG,  $J = 4,9$  Hz), 3,61-3,59 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-EG), 3,19-3,13 (m, 1H, H-3), 2,45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ts), 2,38-2,33 (m, 1H, H-4), 2,23-2,17 (m, 1H, H-7), 2,03-1,94 (m, 2H, H-4',7'), 1,91-1,78 (m, 3H, Chol), 1,53-1,05 (m, 21H, Chol), 0,99 (s, 3H, H-19, CH<sub>3</sub>), 0,91 (d, 3H,  $J = 6,7$  Hz, H-21, CH<sub>3</sub>), 0,86 (dd, 6H, H-26,27,  $J_1 = 7,8$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz, 2×CH<sub>3</sub>), 0,67 (s, 3H, H-18, CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 144,7 (C, Ar), 141,0 (C, C=C), 140,1 (C, Ar), 129,8 ( $2\times\text{CH}$ , Ar), 128,0 ( $2\times\text{CH}$ , Ar), 121,6 (CH, C=C), 79,5 (C-3, CH), 70,9-67,3 ( $6\times\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{-EG}$ ), 56,8 (C-14, CH), 56,2 (C-17, CH), 50,2 (C-9, CH), 42,4 (C-13, C), 39,8 (C-24,  $\text{CH}_2$ ), 39,5 (C-12,  $\text{CH}_2$ ), 39,1 (C-4,  $\text{CH}_2$ ), 37,3 (C-10, C), 36,9 (C-1,  $\text{CH}_2$ ), 36,2 (C-22,  $\text{CH}_2$ ), 35,8 (C-20, CH), 32,0 (C-7,  $\text{CH}_2$ ), 31,9 (C-8, CH), 28,4 (C-2,  $\text{CH}_2$ ), 28,3 (C-15,  $\text{CH}_2$ ), 28,0 (C-25, CH), 24,3 (C-16,  $\text{CH}_2$ ), 23,9 (C-23,  $\text{CH}_2$ ), 22,8 (C-26,  $\text{CH}_3$ ), 22,6 (C-27,  $\text{CH}_3$ ), 21,7 ( $\text{CH}_3$ , OTs), 21,1 (C-11,  $\text{CH}_2$ ), 19,4 (C-21,  $\text{CH}_3$ ), 18,7 (C-19,  $\text{CH}_3$ ), 11,9 (C-18,  $\text{CH}_3$ ).

### 3.2.7. Sinteza konjugata benzilirane glukoze i tosilata kolesterol-trietilen-glikol-etera (7)

U okruglu tikvicu je dodan spoj **3** (500 mg, 0,92 mmol), suhi THF (3 mL) i NaH (125 mg, 60% u mineralnom ulju, 5,21 mmol). Tako pripremljena reakcijska smjesa miješana je oko 30 min na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi u inertnoj atmosferi argona. Zatim je u tikvicu pomoću THF-a (6 mL) prenesen spoj **6** (620 mg, 0,92 mmol). Reakcijska smjesa je ostavljena pri sobnoj temperaturi pod inertnom atmosferom argona preko noći. Tijek reakcije praćen je TLC-om (petroleter / etil-acetat 2:1 v/v). Nakon zaustavljanja reakcijska smjesa je uparena te je produkt pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala petroleter / etil-acetat 2:1. Dobiveno je 314 mg (33%) produkta **7** u obliku bezbojnih kristalića.

$R_f$  = 0,51 (petroleter / etil-acetat 2:1 v/v)

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 7,37-7,27 (m, 20H, CH-Ar), 5,32 (d, 1H, H-6-chol,  $J$  = 5,1 Hz), 4,96 (d, 1H, H1-gluk,  $J$  = 4,2 Hz), 4,93-4,90 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 4,84 ( $\text{AB}^1$ , 1H,  $J$  = 10,8 Hz,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 4,79 (d, 1H,  $J$  = 11,0 Hz,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 4,71 ( $\text{AB}^1$ , 1H,  $J$  = 10,8 Hz,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 4,67-4,64 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 4,49 (d, 1H,  $J$  = 7,7 Hz,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 3,78 (dd, 1H,  $J_1$  = 9,1 Hz,  $J_2$  = 1,8 Hz, H5-gluk), 3,74-3,69 (m, 2H, H2,3-gluk), 3,67 (s, 1H, H4-gluk), 3,66-3,58 (m, 12H,  $6\times\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{-EG}$ ), 3,51-3,47 (m, 1H, H6-gluk), 3,45-3,42 (m, 1H, H6'-gluk), 3,17-3,11 (m, 1H, H3-chol), 2,36-2,33 (m, 1H, H4-chol), 2,22-2,16 (m, 1H, H7-chol), 2,02-1,93 (m, 2H, H4',7'-chol), 1,89-1,82 (m, 3H, Chol), 1,55-1,01 (m, 21H, Chol), 0,98 (s, 3H, H19-chol,  $\text{CH}_3$ ), 0,91 (d, 3H,  $J$  = 6,6 Hz, H21-chol,  $\text{CH}_3$ ), 0,86 (dd, 6H, H26,27-chol,  $J_1$  = 7,8 Hz,  $J_2$  = 1,8 Hz,  $2\times\text{CH}_3$ ), 0,67 (s, 3H, H18-chol,  $\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 141,0 (C, C=C), 138,6 (C, Ar), 138,4 (C, Ar), 138,3 (C, Ar), 137,5 (C, Ar), 128,4-127,6 ( $20\times\text{CH}$ , Ar), 121,5 (CH, C=C), 102,6 (C1-gluk, CH), 84,7 (C3-gluk, CH), 82,3 (C2-gluk, CH), 79,5 (C3-chol, CH), 77,9 (C4-gluk, CH), 77,2 (C5-gluk, CH), 75,7

(C6-gluk, CH<sub>2</sub>), 75,0 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-Bn), 74,9 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-Bn), 71,2 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-Bn), 71,1 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-Bn), 70,9-67,3 (6×CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-EG), 56,8 (C14-chol, CH), 56,2 (C17-chol, CH), 50,2 (C9-chol, CH), 42,3 (C13-chol, C), 39,8 (C24-chol, CH<sub>2</sub>), 39,5 (C12-chol, CH<sub>2</sub>), 39,1 (C4-chol, CH<sub>2</sub>), 37,2 (C10-chol, C), 36,9 (C1-chol, CH<sub>2</sub>), 36,2 (C22-chol, CH<sub>2</sub>), 35,8 (C20-chol, CH), 32,0 (C7-chol, CH<sub>2</sub>), 31,9 (C8-chol, CH), 28,4 (C2-chol, CH<sub>2</sub>), 28,2 (C15-chol, CH<sub>2</sub>), 28,0 (C25-chol, CH), 24,3 (C16-chol, CH<sub>2</sub>), 23,8 (C23-chol, CH<sub>2</sub>), 22,8 (C26-chol, CH<sub>3</sub>), 22,6 (C27-chol, CH<sub>3</sub>), 21,1 (C11-chol, CH<sub>2</sub>), 19,4 (C21-chol, CH<sub>3</sub>), 18,7 (C19-chol, CH<sub>3</sub>), 11,9 (C18-chol, CH<sub>3</sub>)

### 3.2.8. Sinteza konačnog produkta (8)

Odvagan je produkt **7** (153 mg, 0,17 mmol) koji je zatim otopljen u etanolu (15 mL) i etil-acetatu (2 mL). U smjesu je dodan katalizator Pd-C (150 mg). Reakcijska smjesa je postavljena na uređaj za hidrogeniranje (Parr). Reakcija hidrogeniranja je puštena preko noći ( $p = 57$  Psi). Tijek reakcije praćen je TLC-om (DCM / metanol, 9:1 v/v). Nakon što je reakcija dovršena, reakcijska smjesa je profiltrirana i uparena na rotacijskom uparivaču. Produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela. Prvo je za eluiranje korišten sustav otapala DCM / metanol gdje je udio metanola bio 10%, a zatim je taj udio povećan na 15%. Dobiveno je 56 mg (55%) produkta **8** u obliku sitnih kristalića bijele boje.

$R_f = 0,34$  (DCM / metanol 9:1 v/v)

IR  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3500 (O-H), 2973 (C-H, CH<sub>3</sub>), 2920 (C-H, CH<sub>2</sub>), 1217 (C-O-C)

$[\alpha]_D^{20} = +2,09^\circ$  (c 2,2, MeOH)

<sup>1</sup>H NMR (MeOD)  $\delta/\text{ppm}$ : 5,08 (d, 1H,  $\alpha$ -anomer, H1-gluk,  $J = 3,4$  Hz), 4,57 (s, 1H), 4,45 (d, 1H,  $\beta$ -anomer, H1-gluk,  $J = 7,8$  Hz), 3,90-3,86 (m, 1H, H2-gluk), 3,79 (dd, 1H,  $J_1 = 9,1$  Hz,  $J_2 = 1,7$  Hz, H5-gluk), 3,73-3,68 (m, 4H, H-gluk), 3,40-3,31 (m, 12H, 6×CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-EG), 3,12 (m, 1H, H3-chol), 2,00 (m, 2H, H15,16-chol), 1,89-1,53 (m, 14H, H-chol), 0,93 (d, 6H,  $J = 6,5$  Hz, H26,27-chol, 2×CH<sub>3</sub>), 0,89-0,87 (m, 12H, H-chol), 0,83 (s, 5H, H-chol), 0,69 (s, 6H, H-chol, 2×CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C NMR (MeOD)  $\delta/\text{ppm}$ : 96,8 (C1-gluk,  $\beta$ -anomer, CH), 92,6 (C1-gluk,  $\alpha$ -anomer, CH), 79,1 (C3-gluk, CH), 76,7 (C2-gluk, CH), 75,5 (C3-chol, CH), 74,9 (C4-gluk, CH), 73,4 (C5-gluk, CH), 72,4 (C6-gluk, CH<sub>2</sub>), 70,5-67,0 (CH<sub>2</sub>-EG), 56,5 (C14-chol, CH), 56,4 (C17-chol, CH), 54,5 (C9-chol, CH), 44,8 (C5-chol, CH), 42,4 (C13-chol, C), 40,0 (C24-chol, CH<sub>2</sub>), 39,3 (C12-chol, CH<sub>2</sub>), 36,8 (C1-chol, CH<sub>2</sub>), 36,0 (C22-chol, CH<sub>2</sub>), 35,8 (C20-chol, CH), 35,5 (C8-



chol, CH), 34,5 (C4-chol, CH<sub>2</sub>), 32,0 (C7-chol, CH<sub>2</sub>), 29,4 (C10-chol, C), 28,6 (C6-chol, CH<sub>2</sub>), 28,0 (C2-chol, CH<sub>2</sub>), 27,9 (C15-chol, CH<sub>2</sub>), 27,8 (C25-chol, CH), 23,9 (C16-chol, CH<sub>2</sub>), 23,6 (C23-chol, CH<sub>2</sub>), 21,8 (C26-chol, CH<sub>3</sub>), 21,6 (C27-chol, CH<sub>3</sub>), 21,0 (C11-chol, CH<sub>2</sub>), 17,9 (C21-chol, CH<sub>3</sub>), 11,4 (C19-chol, CH<sub>3</sub>), 11,2 (C18-chol, CH<sub>3</sub>)

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Uvod

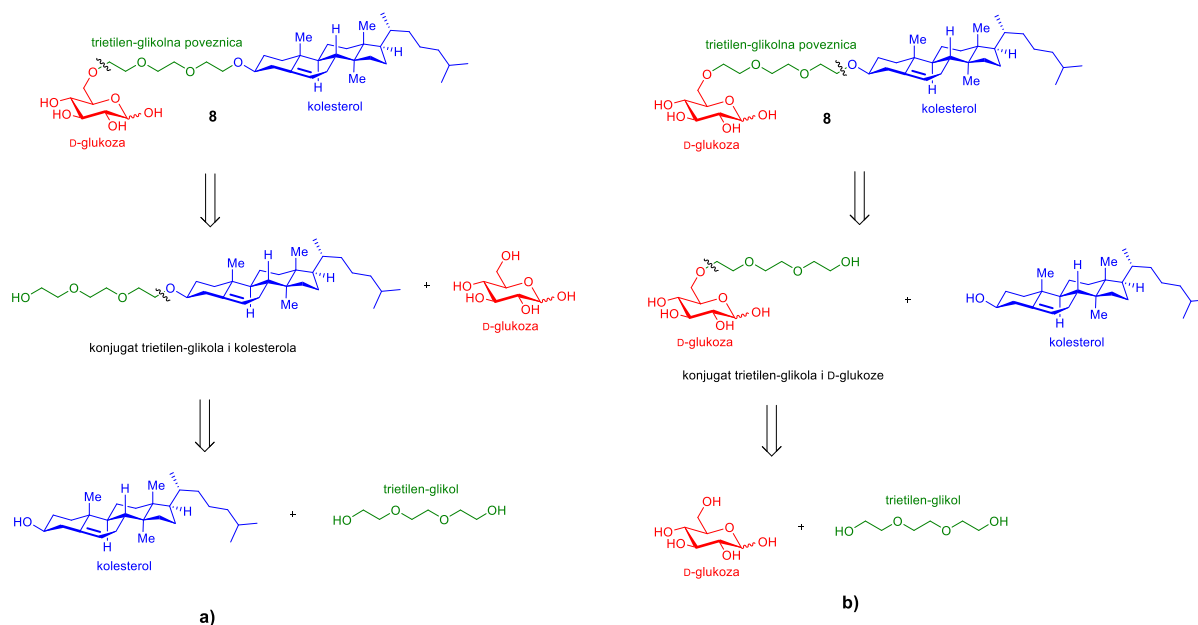
U sklopu ovog diplomskog rada sintetiziran je konjugat kolesterola i D-glukoze **8** koji se može koristiti za modifikaciju liposoma u svrhu specifične i učinkovite dostave lijeka stanicama raka. Jedan od gorućih problema zdravstvenog sustava u svijetu je sve veći broj tumorskih oboljenja populacije. Do sada poznate metode liječenja tumora uglavnom su invazivne i mogu uzrokovati niz nuspojava. Suvremena istraživanja okrenuta su pronalasku liječenja s minimalnim ili nikakvim nuspojavama na organizam. Obećavajućim su se pokazale metode dostave lijeka putem sustava modificiranih glikozilacijom. Pripravljeni konjugat stoga svoju primjenu potencijalno može naći upravo u tom polju. Konkretno, liposomi modificirani sintetiziranim spojem omogućuju učinkovitu i specifičnu dostavu lijeka tumorskim stanicama. Navedeno je razlog odabira upravo strukture konjugata **8** za ciljnu molekulu.

Sinteza ciljne molekule planirana je iz kolesterola i D-glukoze te trietilen-glikola kao poveznice između te dvije jedinice. Kako bi se sinteza usmjerila na željeni način, prvo su zaštićene sve hidroksilne skupine glukoze, potom je ona na položaju 6 deprotektirana jer je potrebna za reakciju. Također, kolesterol je prije sinteze konjugata aktiviran, tj. uvedena je dobra izlazeća skupina u njegovu strukturu.

### 4.2. Retrosintetska analiza ciljne molekule

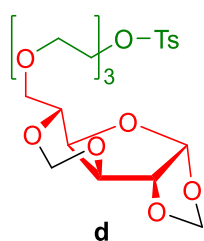
Retrosintetsko razmatranje ciljne molekule, konjugata kolesterola i D-glukoze (**8**), dovodi do 3 sintona, a može se provesti na dva načina (slika 16 a i b), na temelju kojih su osmišljena dva moguća sintetska puta za sintezu ciljnog spoja. (a) Diskonekcija glikozidne veze između trietilen-glikola i glukoze rezultira konjugatom kolesterola i trietilen-glikola te komercijalno dostupnom glukozom. U drugom koraku kidanjem eterske veze kolesterola i trietilen-glikola dobivaju se komercijalno dostupni kolesterol i trietilen-glikol. Sintetski put II prati ovaj princip povezivanja sintona. (b) Kad se retrosintetska analiza provede na drugi način, u prvom koraku, kidanje eterske veze kolesterola i trietilen-glikola rezultira komercijalno dostupnim

kolesterolom te konjugatom D-glukoze i trietilen-glikola. U drugom koraku, diskonekcijom veze između D-glukoze i trietilen-glikola nastaju glukoza i trietilen-glikol koji su komercijalno dostupni. Sintetski put I prati ovaj princip povezivanja sintona.



**Slika 16.** Retrosintetska analiza ciljne molekule **8**

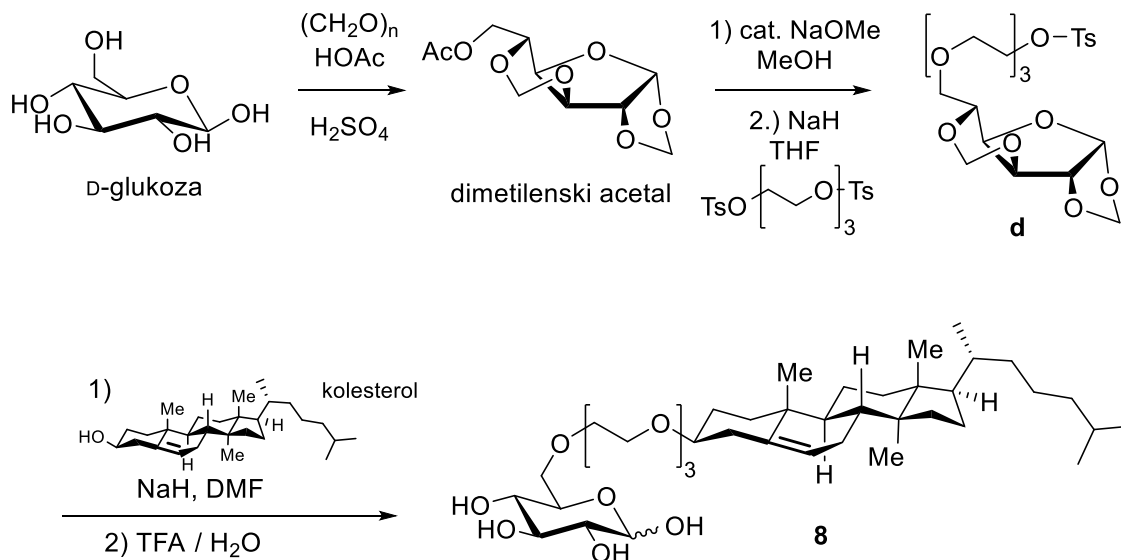
Razmatrajući retrosintetsku analizu, sintezi ciljne molekule moguće je pristupiti na 2 načina: 1.) glukoza + trietilenglikol, 2.) kolesterol ili 1.) kolesterol + trietilenglikol, 2.) glukoza. Prednost je dana prvom navedenom načinu, jer omogućuje pripravu spoja **d** (slika 17), koji je potencijalno vrlo koristan prekursor za sintezu drugačijeg tipa glukozom obilježenih spojeva, npr. liganada za  $^{177}\text{Lu}$  (ili neki drugi radionuklid), što u budućnosti omogućuje proširenje područja ovog istraživanja. Kako bi se sinteza usmjerila na željeni način potrebno je koristiti primjerene zaštitne skupine.



**Slika 17.** Struktura konjugata dimetilenskog acetala glukoze i trietilen-glikol-ditosilata (**d**)

### 4.3. Sintetski put I

Shema 18 prikazuje planirani Sintetski put I za sintezu ciljnog spoja **8**.

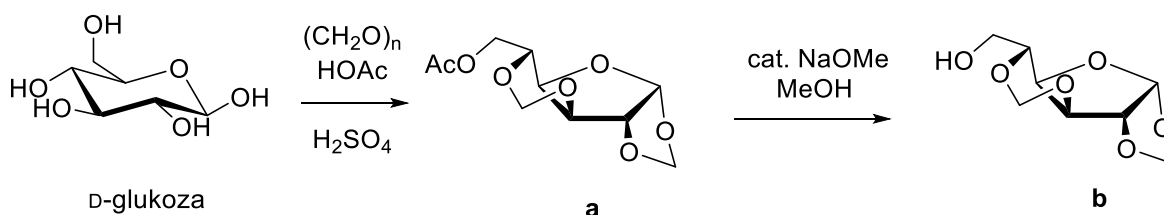


Shema 18. Sintetski put I za sintezu spoja **8**.

#### 4.3.1. Sinteza dimetilenskog acetala glukoze

Sintetski put I predviđa sintezu ciljne molekule tako da se u prvom stupnju povežu glukoza i trietilen-glikol, a zatim se u drugom stupnju dodaje kolesterol. Kako bi se postigla regioselektivnost vezanja na glukozu i time sintetski put usmjerio u željenom smjeru, prije povezivanja glukoze i trietilen-glikola potrebno je glukozu zaštititi zaštitnim skupinama. Česta zaštitna skupina u kemiji šećera je acetalna zaštita, najčešće acetonična, pri čemu u tvorbu acetala ulaze dvije vicinalne *cis*-OH skupine. Međutim, glukoza s acetonom tvori diacetoničnu u kojoj kao slobodna OH skupina ostaje ona na položaju 3. Kad se umjesto acetona koristi formaldehid, dolazi do stvaranja 1,2:3,5-diacetala, gdje slobodna ostaje OH skupina položaja 6.<sup>33</sup>

Acetalna zaštita je uvedena uz formaldehid, octenu kiselinu i sumpornu kiselinu, koja je dodavana u polako u obrocima (shema 19). Reakcija je grijana na 100 °C (1 h) te je nakon obrade i prekrizalizacije iz metanola dobiven je acetat **a** koji je preveden u produkt **b** dodatkom NaOMe/MeOH u njegovu metanolnu otopinu uz iskorištenje od 74%.

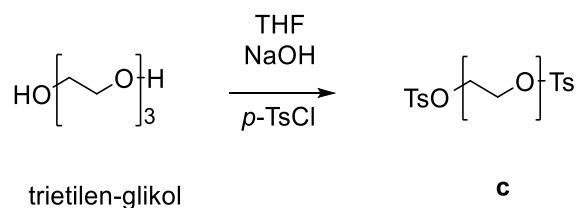


**Shema 19.** Sinteza dimetilenskog acetala glukoze (**b**)

#### 4.3.2. Sinteza trietilen-glikol-ditosilata

Prilikom povezivanja glukoze i trietilen-glikola potrebno je prethodno trietilen-glikol aktivirati kako bi se osiguralo da reakcija teče u željenom smjeru i to uz što veće iskorištenje. Aktivacija se obično provodi uvođenjem dobre izlazne skupine kod reakcija nukleofilne supstitucije. Poznato je da OH skupine u reakciji s *p*-TsCl tvore odgovarajuće estere (tosilate) koji su izrazito dobre izlazne skupine u reakcijama s nukleofilima.<sup>34</sup>

Reakcija uvođenja tosilne skupine u strukturu trietilen-glikola provedena je s *p*-TsCl u THF-u uz NaOH kao bazu. Reakcija je uz konstantno hlađenje vođena 2 h, nakon čega je produkt pročišćen prekrizacijom iz metanola. Dobiven je produkt uz iskorištenje od 84% (shema 20). Provedeno je neselektivno tosilitiranje, odnosno obje OH skupine na krajevima strukture trietilen-glikola su tosilitirane. Na taj način osigurava se aktivacija za reakciju trietilen-glikola s glukozom, ali i za kasnije povezivanje s kolesterolom.



**Shema 20.** Sinteza ditosilata trietilen-glikola

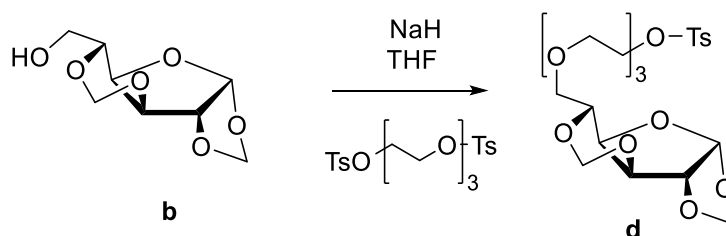
#### 4.3.3. Sinteza konjugata dimetilenskog acetala glukoze i trietilen-glikol ditosilata

Slijedeći korak Sintetskog puta I je spajanje adekvatno zaštićene glukoze i aktivirane trietilen-glikolne jedinice. Sama reakcija isprobana je uz nekoliko različitih reakcijskih uvjeta i reagensa (tablica 4), no ti su pokušaji većim dijelom bili bez značajnih uspjeha.

**Tablica 4.** Isprobani uvjeti reakcije dobivanja konjugata dimetilenskog acetala glukoze i trieten-glikol-ditosilata.

| Reagensi    | Reakcijski uvjeti                        | Uspješnost |
|-------------|------------------------------------------|------------|
| NaH, DMF    | 25 °C, 16 h; 40 °C, 16 h                 | -          |
| KH, THF/DMF | 25 °C, 16 h                              | -          |
| NaH, THF    | 25 °C, 3 h; 60 °C, 3 h;<br>80 °C, 30 min | +          |

Uspjeh je pokazala jedino reakcija u kojoj su korišteni NaH i THF (shema 21) pri povišenoj temperaturi, no i u ovom slučaju iskorištenje je iznosilo samo 3,2%.

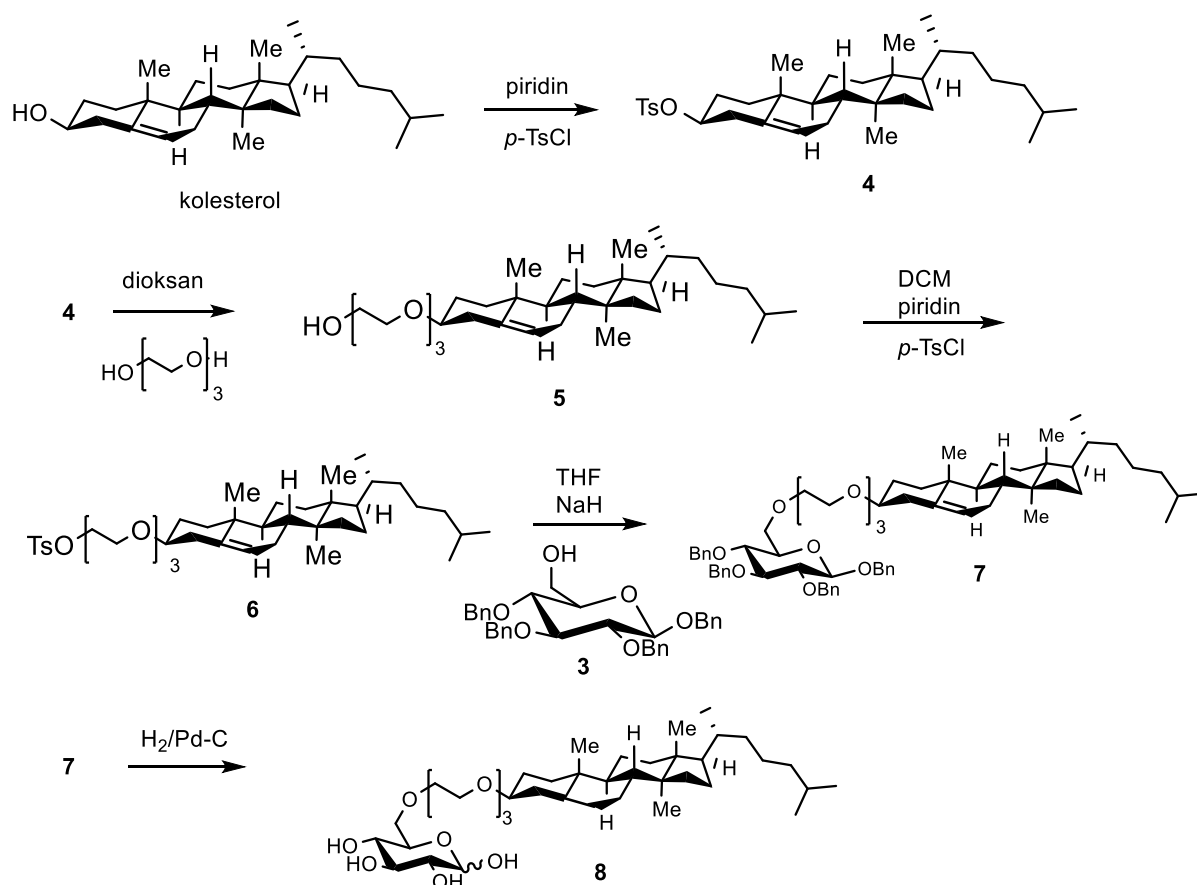


**Shema 21.** Sinteza konjugata dimetilenskog acetala glukoze i trieten-glikol-ditosilata (**d**)

Razlog iznimno malog iskorištenja može biti prisutnost vlage u reakcijskoj smjesi i korištenim otapalima, iako su poduzete sve mjere kako bi se postigli bezvodni uvjeti (sušenje aparature, azeotropiranje reaktanata, sušenje otapala). Prema literaturi<sup>35</sup> jedan od najboljih načina za postizanje bezvodnih reakcijskih uvjeta je korištenje Schlenkove linije. Općenito, kod reakcija opisanih u ovom radu, inertna atmosfera u reakcijskom sustavu postignuta je korištenjem balona ispunjenih inertnim plinom argonom. Takvi baloni mogu potencijalno i sami biti izvor male količine vlage. Reakcija je provedena na maloj skali pa i minimalna prisutnost vode može značajno smanjiti njezino iskorištenje. Zbog malog iskorištenja metoda se nije pokazala zadovoljavajućom pa je odabran drugačiji sintetski put.

#### 4.4. Sintetski put II

Shema 22 prikazuje planirani Sintetski put II za sintezu ciljnog spoja **8**.



Shema 22. Sintetski put II za sintezu ciljnog spoja **8**.

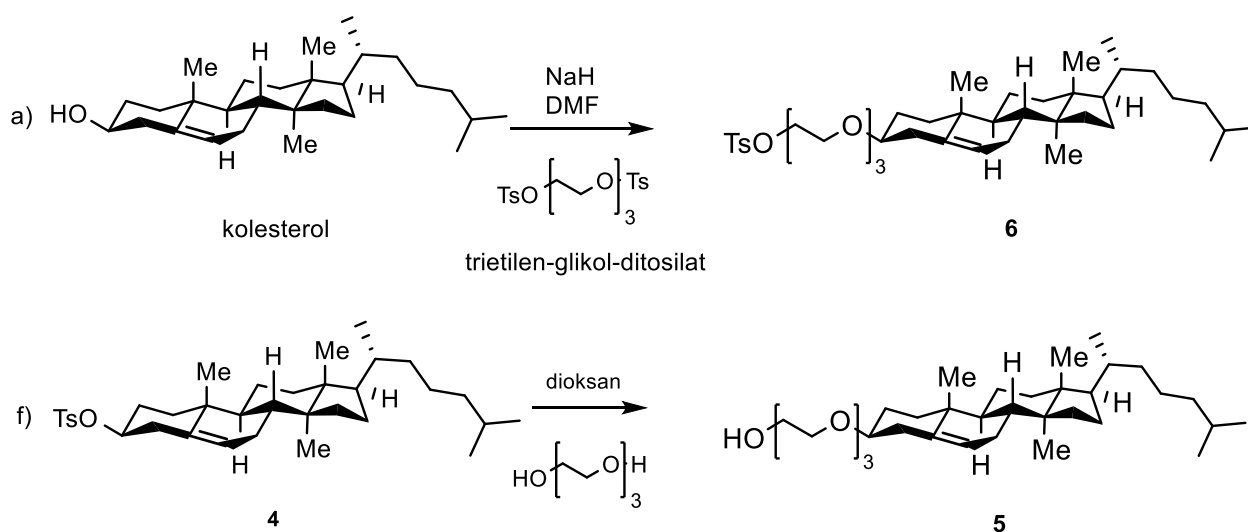
##### 4.4.1. Povezivanje kolesterola i trietilen-glikola

Budući da sintetski put I nije dao zadovoljavajuće rezultate, fokus je u daljnjem istraživanju dan sintetskom putu II, koji predviđa povezivanje kolesterola i trietilen-glikola u prvom stupnju, a u drugom stupnju se na tako dobiveni konjugat veže glukoza.

Povezivanju kolesterola i trietilen-glikola pristupljeno je na dva načina. Dobra izlazna (tosilna) skupina može se uvesti u strukturu kolesterola te kasnijim nukleofilnim napadom trietilen-glikola stvara se eterska veza između te dvije jedinice. Moguće je krenuti i obrnutim putem, tosilna skupina prvo se uvede u strukturu trietilen-glikola, a zatim u reakciji nukleofilne supstitucije s kolesterolom nastaje željeni spoj. Isprobano je jedno i drugo uz nekoliko različitih reakcijskih uvjeta i reagenasa, što je prikazano u tablici 5.

**Tablica 5.** Isprobani uvjeti u sintezi kolesterol-trietilen-glikol-etera (**5**)

| Sinton s tosilnom skupinom | Reagensi i otapalo | Reakcijski uvjeti             | Uspješnost (iskorištenje) |
|----------------------------|--------------------|-------------------------------|---------------------------|
| a) trietilen-glikol        | NaH, DMF           | 25 °C, 48 h                   | 18%                       |
| b) trietilen-glikol        | NaH, THF/DMF       | 25 °C, 4 dana                 | -                         |
| c) trietilen-glikol        | NaH, THF           | 25 °C, 16 h; 85 °C<br>48 h    | -                         |
| d) trietilen-glikol        | NaH, DMSO          | 25 °C, 48 h                   | -                         |
| e) trietilen-glikol        | NaH, toluen        | 25 °C, 48 h;<br>refluks, 48 h | -                         |
| f) kolesterol              | dioksan            | refluks, 16 h                 | 62%                       |

**Shema 23.** Isprobani uvjeti za sintezu etera kolesterola i trietilen-glikola (**5**), odnosno odgovarajućeg tosilata (**6**) iz tablice 5

U slučaju da se tosilna skupina nalazi u strukturi trietilen-glikola, jedina reakcija koja se pokazala uspješnom je ona u DMF-u (shema 23, reakcija a) iz tablice 5), no iskorištenje reakcije iznosilo je samo 18%. Kod svih ostalih isprobanih uvjeta nije utvrđen nastanak željenog produkta. Kada se tosilna skupina uvede u strukturu kolesterola, odnosno kada je trietilen-glikol nukleofil u reakciji nukleofilne supstitucije, iskorištenje iznosi zadovoljavajućih 62% (shema 23, reakcija f) iz tablice 5). Razlog tome može biti činjenica da

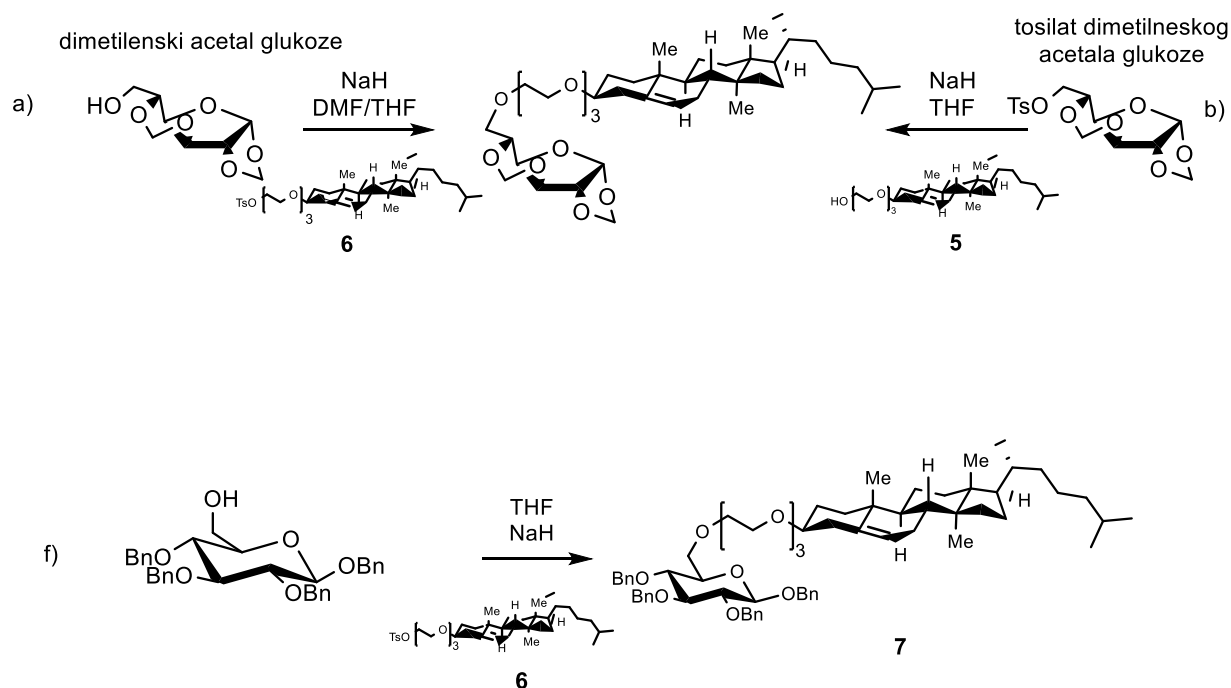


je kolesterol kao nukleofil sterički ometen pa će reakcija s trietilen-glikolom u ulozi nukleofila imati veće iskorištenje.

#### 4.4.2. Povezivanje konjugata kolesterola i trietilen-glikola s glukozom

Drugi stupanj Sintetskog puta II zahtjeva povezivanje kolesterol-trietilen-glikol-etera s glukoznom jedinicom. Prije same reakcije, glukozu je potrebno zaštititi odgovarajućim zaštitnim skupinama. U tu svrhu korištene su dvije različite vrste zaštitnih skupina: acetalna zaštita (dimetilenski acetali) i eterska zaštita (benzilni eteri). Uvođenje acetalne zaštite već je objašnjeno u §4.3.1. Uvođenje benzilnih etera kao zaštitne skupine odvija se u nekoliko koraka. Prvo se provodi sinteza perbenzilirinae glukoze **1** dodatkom NaH i BnBr u malim obrocima u otopinu glukoze u suhom DMF-u. Tako postavljena reakcija provodila se u inertoj atmosferi argona pri sobnoj temperaturi 48 h. Nakon prekristalizacije iz metanola dobiven je produkt **1** uz iskorištenje od 35%. Nadalje, benzilni eter na položaju 6 može se selektivno ukloniti uz  $\text{ZnCl}_2$  / HOAc /  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,<sup>36</sup> što rezultira spojem koji na položaju 6 ima acetatni ester (**2**) uz iskorištenje 54%. U završnom koraku, acetat se hidrolizira uz NaOMe/MeOH, pri čemu nastaje glukoza sa slobodnom OH skupinom na položaju 6, dok su sve ostale OH skupine zaštićene benzilnim eterima (**3**), uz iskorištenje koraka reakcije od 93% (shema 24). Ukupno iskorištenje uvođenja benzilne zaštite u ovom slučaju iznosi svega 11%, dok iskorištenje uvođenja acetalne zaštite iznosi 74%. Razlog tome je svakako veći broj koraka kod uvođenja benzilne zaštite, a također je uočeno da se međuprodukti reakcijskog niza djelomično otapaju u metanolu što daje svoj obol u vidu smanjenja ukupnog iskorištenja. Opravdanje za korištenje tako zaštićene glukoze, unatoč manjem iskorištenju, daje činjenica da je uklanjanje metilenskih acetala problematično, o čemu će biti više govora u nastavku poglavlja.





**Shema 25.** Uspješne reakcije i pripadajući reakcijski uvjeti iz tablice 6

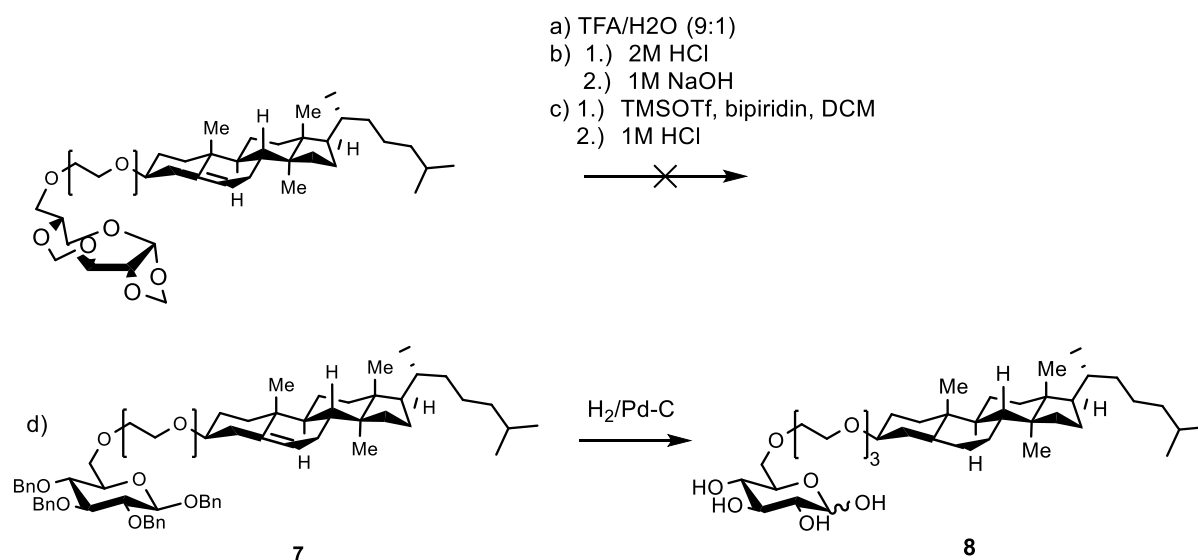
Iz tablice 6 vidljivo je da su pojedine reakcije rezultirale željenim produktom dok neke nisu pokazale zadovoljavajući ishod. Kada se uspoređi uspješnost s obzirom na položaj aktivirajuće izlazne skupine (tosilne), bolje rezultate pokazale su reakcije u kojima se ona nalazi na slobodnom kraju trietilen-glikola u kolesteril-trietilen-glikol-eteru (shema 25, reakcije a) i f) iz tablice 6). S obzirom na vrstu zaštite na glukozi, veće iskorištenje ima reakcija s benziliranom glukozom, koje iznosi 33% (shema 25, reakcija f) iz tablice 6), u odnosu na reakcije s acetalno zaštićenom glukozom (shema 25, reakcije a) i b) iz tablice 6) gdje je najveće dobiveno iskorištenje iznosilo 19%. Dakle, reakcija s benziliranom glukozom pokazala se uspješnijom, što daje dodatno opravdanje za korištenje iste u sintezi, unatoč kompleksnijem dobivanju s relativno niskim iskorištenjem.

#### 4.4.3. Uklanjanje zaštitnih skupina s glukoze

Završni korak sinteze konačnog produkta uključuje uklanjanje zaštitnih skupina koje se nalaze na glukozi. Ovisno o korištenim zaštitnim skupinama, u tu svrhu je isprobano nekoliko različitih reagenasa i reakcijskih uvjeta. Svi uvjeti i reagensi korišteni u provedenim reakcijama deprotekcije sumirani su u tablici 7.

**Tablica 7.** Isprobani uvjeti reakcije uklanjanja zaštitnih skupina s glukoze (shema 26)

| Vrsta zaštitne skupine na glukozi | Reagensi                                 | Reakcijski uvjeti                | Uspješnost (iskorištenje) |
|-----------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| a) Acetalna                       | TFA/H <sub>2</sub> O (9:1)               | 25 °C, 45 min                    | -                         |
| b) Acetalna                       | 1.) 2M HCl<br>2.) 1M NaOH                | 100 °C, 1 h                      | -                         |
| c) Acetalna                       | 1.) TMSOTf, bipiridin, DCM<br>2.) 1M HCl | 1.) 0 °C, 2 h<br>2.) 25 °C, 48 h | -                         |
| d) Eterska                        | H <sub>2</sub> /Pd-C                     | $p = 57$ Psi, 24 h               | 55%                       |

**Shema 26.** Isprobani uvjeti za uklanjanje zaštitnih skupina na glukozi iz tablice 7

Kao što je i ranije navedeno, uklanjanje acetalne zaštite pokazalo se problematično. Isprobano je nekoliko različitih uvjeta deprotekcije (shema 26, reakcije a), b) i c) iz tablice 7), ali niti jedna reakcija nije rezultirala potpunim uklanjanjem zaštitnih skupina, već je jedna zaštitna skupina uklonjena dok druga nije, čak ni uz jače reakcijske uvjete, što je utvrđeno analizom snimljenih <sup>1</sup>H NMR spektara. Za razliku od acetalnih skupina, uklanjanje eterskih (benzilnih) zaštitnih skupina pokazalo se uspješnim. Benzilni eteri uklonjeni su katalitičkim hidrogeniranjem koje je provedeno 24 h pri  $p = 57$  Psi (shema 26, reakcija d) iz tablice 7).

Nastanak konačnog produkta utvrđen je analizom snimljenih  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektara. Treba napomenuti da snimljeni NMR spektri upućuju na to da je, osim benzilnih etera, hidrogenirana i dvostruka veza koja se nalazi u strukturi kolesterola, no to u konačnici neće utjecati na daljnju primjenu i funkciju sintetiziranog produkta u funkcionalizaciji liposoma za ciljano tretiranje tumorskih stanica. Činjenica da se u ovom slučaju uklanjanje benzilne zaštite pokazalo uspješnije u odnosu na acetalnu zaštitu daje dodatan argument u prilog benzilnim zaštitnim skupinama.

Qin i suradnici<sup>37</sup> proveli su sintezu sličnog spoja kod kojeg je povezivanje trietilenglikola na glukoznu jedinicu provedeno preko acetatne podjedinice, što u strukturu uvodi estersku vezu. Zbog prisutnosti esteraza u biološkim uvjetima ta je veza sklona hidrolizi. Iz tog razloga, spoj **8** sintetiziran u ovom radu u poveznici sadrži isključivo eterske veze koje su stabilnije u biološkim uvjetima.

## § 5. ZAKLJUČAK

Sintetiziran je konjugat kolesterola i D-glukoze s trietilen-glikolnom poveznicom između te dvije jedinice (**8**). Od dva zamišljena i isprobana sintetska puta, konačnim produktom rezultirao je samo sintetski put II, dok se sintetski put I nije pokazao uspješnim.

### 1. Sintetski put II:

a) Vežanje trietilen-glikola na kolesterol odvija se u dioksanu. Reakcijom nastaje kolesteril-trietilen-glikol-eter (**5**) u iskorištenju od 62%. Reakcija je uspješnija kada se aktivirajuća izlazna skupina prije povezivanja uvede na kolesterol u odnosu na slučaj kada se uvede na trietilen-glikol.

b) Zaštita hidroksilnih skupina glukoze benzilnim eterima provedena je u tri koraka:

1. Reakcijom D-glukoze i benzil-bromida u DMF-u uz dodatak NaH nastaje šećer **1** sa svim zaštićenim OH skupinama uz iskorištenje 35%.
2. Na položaju 6 selektivno je uklonjen benzilni eter što je rezultiralo uvođenjem acetatne skupine reakcijom šećera **1** u HOAc / Ac<sub>2</sub>O uz dodatak ZnCl<sub>2</sub> pri čemu nastaje 6-*O*-acetil-1,2,3,4-tetra-*O*-benzil glukopiranoza **2** uz iskorištenje od 54%.
3. Acetatna skupina acetata **2** hidrolizirana je u uvjetima MeOH / NaOMe. Dobiven je šećer **3** sa slobodnom hidroksilnom skupinom na položaju 6 uz iskorištenje od 93%.

c) Povezivanje kolesteril-trietilen-glikol-etera i glukoze provedeno je reakcijom etera **5** i šećera **3** u THF-u uz dodatak NaH. Nastao je konjugat **7** u iskorištenju od 33%.

d) Uklanjanje zaštitnih skupina provedeno je katalitičkim hidrogeniranjem konjugata **7**. Nastao je konačni produkt, konjugat **8**, u iskorištenju od 55%.

U okviru ovog diplomskog rada razrađen je sintetski put priprave ciljne molekule **8**, koja je po strukturi konjugat D-glukoze i kolesterola, a čija primjena u funkcionalizaciji liposoma u svrhu selektivne dostave lijekova tumorskim stanicama potencijalno može imati važnu ulogu u pronalasku učinkovite i neinvazivne metode kliničkog liječenja tumorskih oboljenja.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AB - AB kvartet

Ac - acetatna skupina

Ar - aril

Bn - benzil

BnBr - benzil bromid

CDCl<sub>3</sub> - deuterirani kloroform

d - dublet

dd - dublet dubleta

DCM - diklormetan

DMF - dimetilformamid

DMSO - dimetil-sulfoksid

EtOAc - etil-acetat

HOAc - octena kiselina

IR - infracrveno

m - multiplet

MeOD - deuterirani metanol

MeOH - metanol

NaOMe - natrijev metoksid

NMR - nuklearna magnetska rezonancija

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

Pd/C - paladij na ugljiku

*p*-TsCl - *para*-toluensulfonil-klorid

py - piridin

*R<sub>f</sub>* - faktor zaostajanja

s - singlet

t- triplet

TFA - trifluorooctena kiselina

THF - tetrahidrofuran

---

TLC - tankoslojna kromatografija

TMS - tetrametilsilan

TMS - trimetilsililna zaštitna skupina

TMSOTf – trimetilsilil-triflat

Ts - tosilna skupina



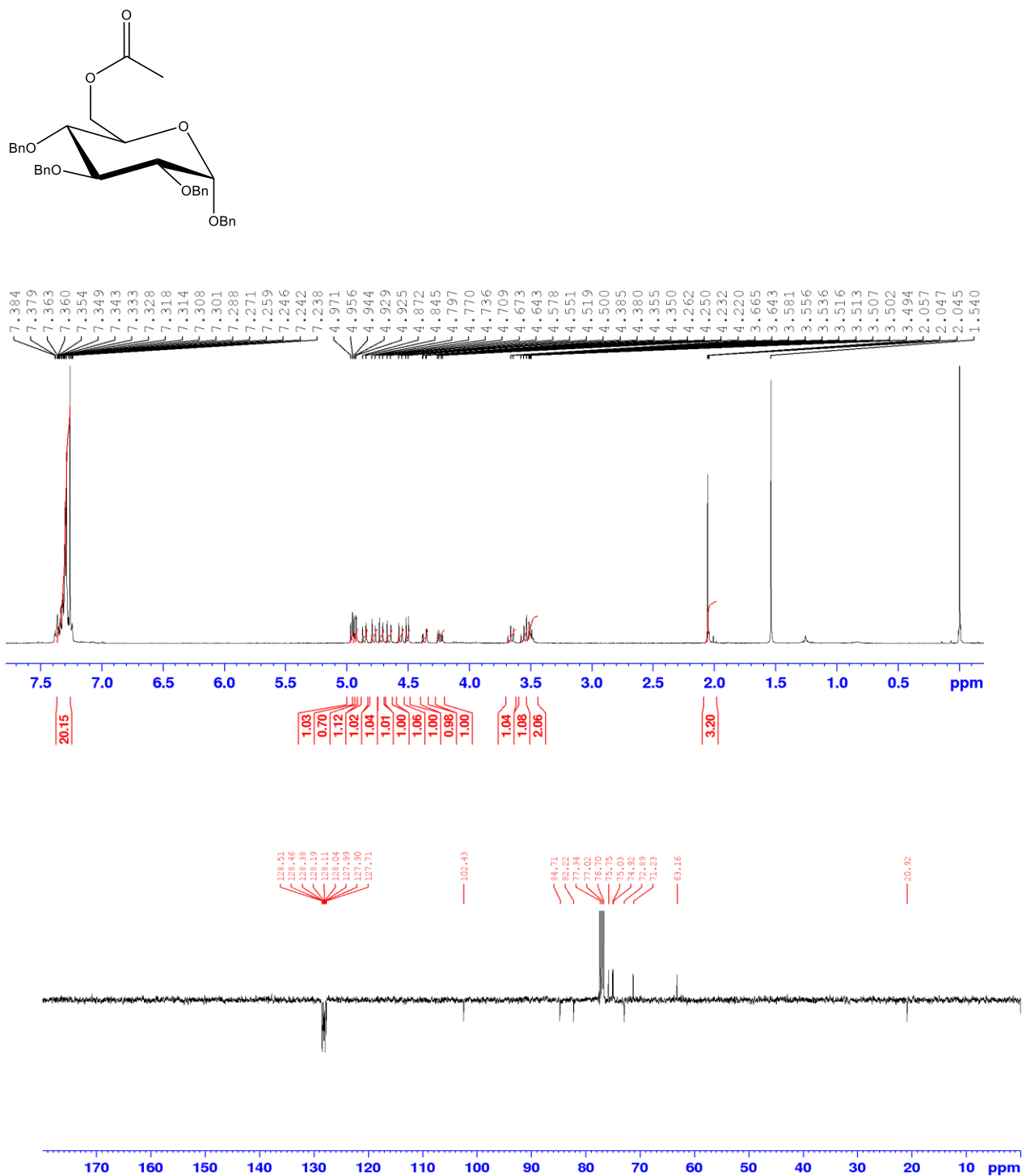
## § 7. LITERATURNI IZVORI

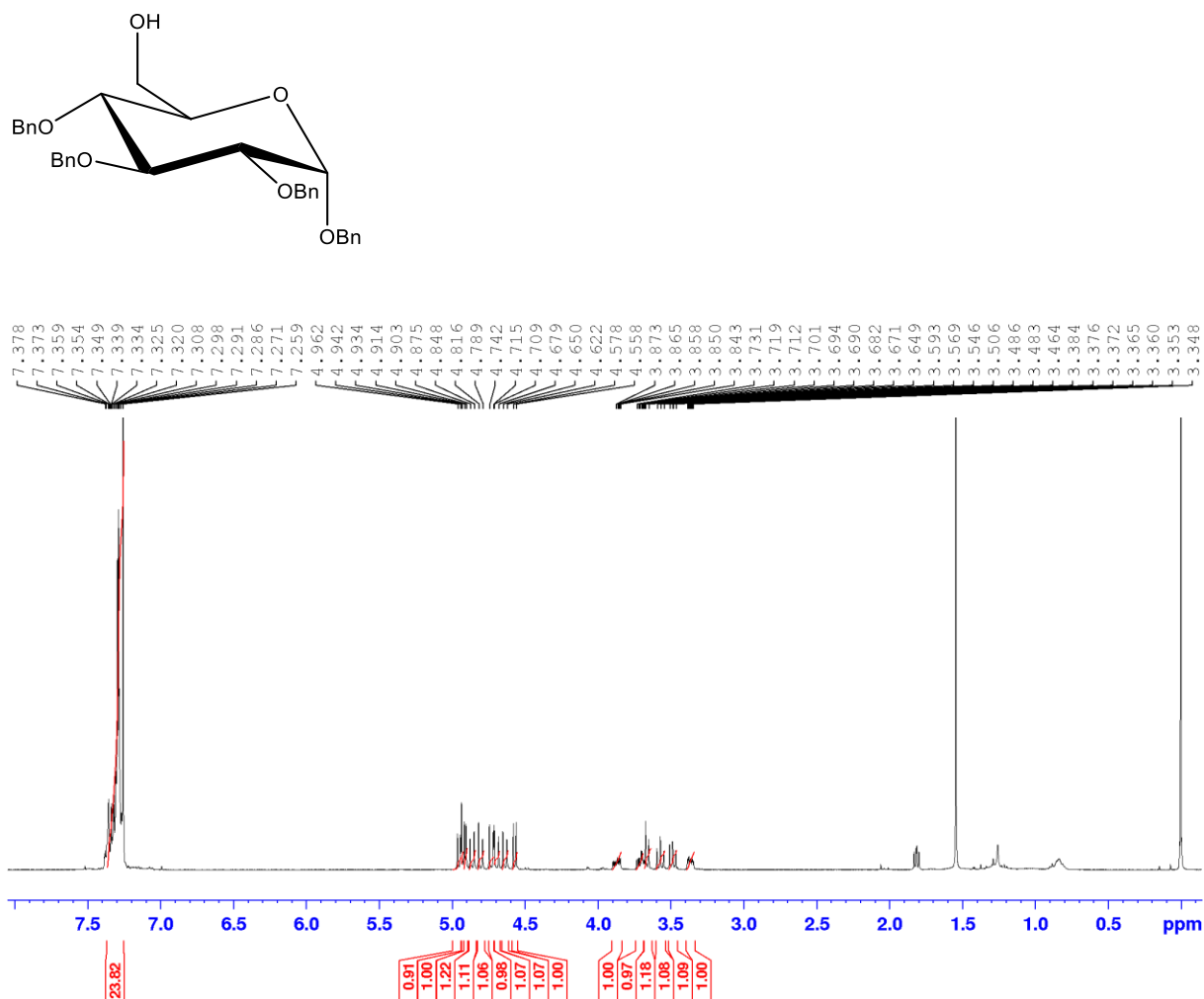
1. <https://www.britannica.com/science/glucose> (datum pristupa 18. lipnja 2022.)
2. L. G. Wade Jr., *Organic Chemistry*, 8th Edition, Pearson Education, UK, 2013., str. 1101–1217.
3. P. G. M. Wuts, *Greene's Protective Group sin Organic Synthesis*, 5th Edition, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2014., str. 375–447.
4. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013., str. 303–745.
5. P. L. Yeagle, *The Membranes of Cells*, Elsevier Science, USA, 2016, str. 189–218
6. T. Dinh, L. Thompson, u B. Caballero, P. M. Finglas, F. Toldra (ur.), *The Encyclopedia of Food and Health*, Elsevier Science, Oxford, 2016, str. 60–69.
7. M. Kohlmeier, *Nutrient Metabolism*, 6th Edition, Academic Press, London, 2003, str. 511–526.
8. K. Bloch, *Science* **150** (1965) 19–28.
9. A. Zampelas, E. Magriplis, *Nutrients* **11** (2019) 1645.
10. <https://www.labxchange.org> (datum pristupa 27. lipnja 2022.)
11. M. Sonal Sekhar, S. Marupuru, B. Shrikar Reddy, S. Jacob Kurian, M. Rao, u H. G. Preuss, D. Bagchi (ur.), *Dietary Sugar, Salt and Fat in Human Health*, Academic Press, UK, 2020, str. 453–481.
12. <https://www.britannica.com/science/steroid-hormone> (datum pristupa 28. lipnja 2022.)
13. N. Hay, *Nat. Rev. Cancer* **16** (2016) 635–649.
14. T. Ido, C. N. Wan, J. S. Fowler, A. P. Wolf, *J. Org. Chem.* **42** (1977) 2341–2342.
15. L. Cai, Z. Gu, J. Zhong, D. Wen, G. Chen, L. He, Z. Gu, *Drug Discov.* **23** (2018) 1126–1138.
16. F. Chen, G. Huang, *Eur. J. Med. Chem.* **182** (2019) 111612.
17. S. Kawakami, M. Hashida, *J. Control. Release* **190** (2014) 542–555.
18. G. Huang, H. Huang, *J. Control. Release* **278** (2018) 122–126.
19. Y. Zhang, S. Xuan, O. Owoseni, M. Omarova, X. Li, M. E. Saito, V. T. John, *Langmuir* **33** (2017) 2780–2789.

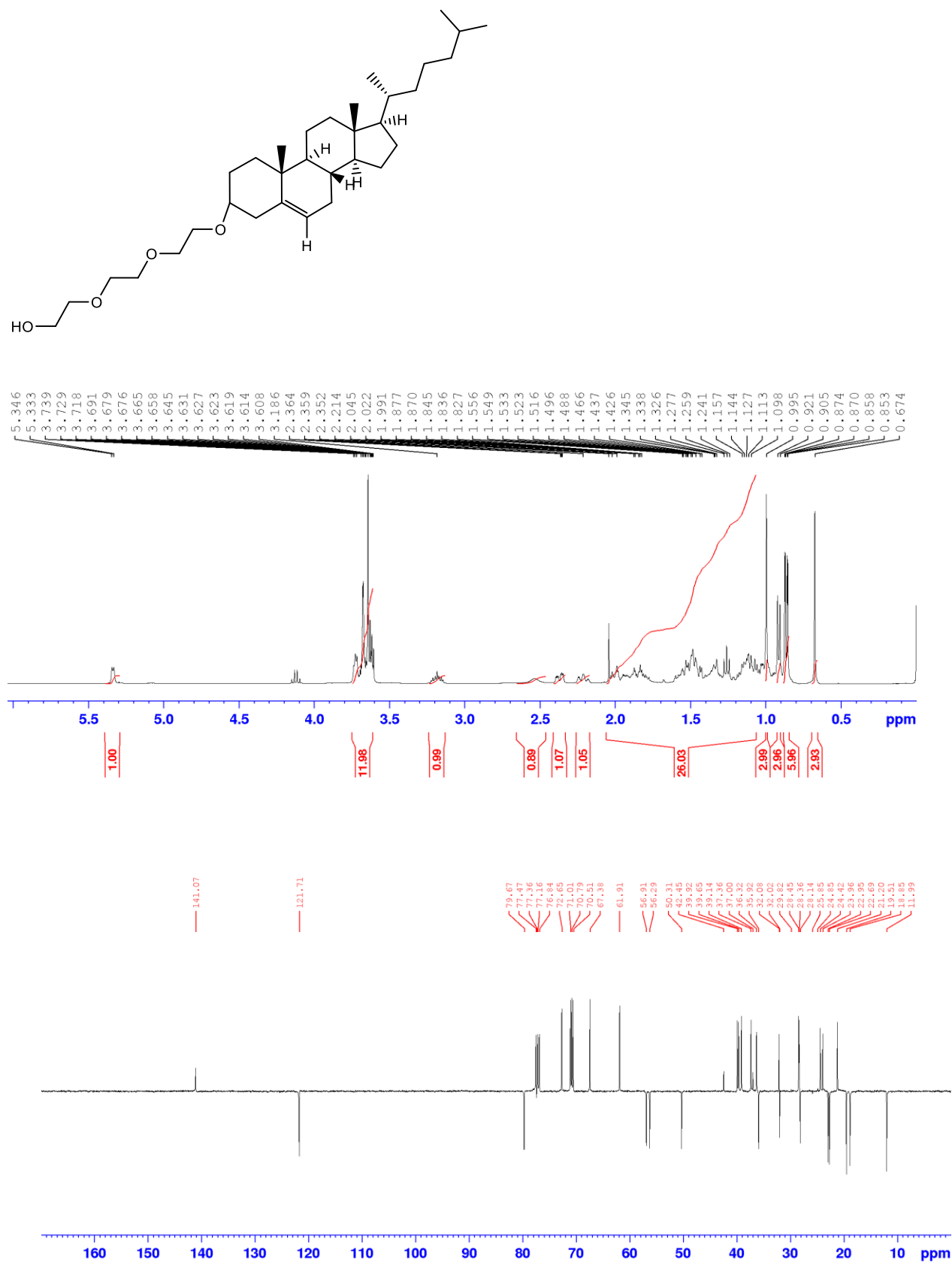
20. K. Maruyama, *Adv. Drug Del. Rev.* **63** (2011) 161-169.
21. S. Wilhelm, A. J. Tavares, Q. Dai, S. Ohta, J. Audet, H. F. Dvorak, W. C. Chan, *Nat. Rev. Mat.* **1** (2016) 1-12.
22. Đ. Cvjetinović, Ž. Prijović, D. Janković, M. Radović, M. Mirković, Z. Milanović, M. Mojović, Đ. Škalamera, S. Vranješ-Đurić, *J. Control. Release* **332** (2021) 301–311.
23. F. Xie, N. Yao, Y. Qin, Q. Zhang, H. Chen, M. Yuan, J. Tang, X. Li, W. Fan, Q. Zhang, Y. Wu, L. Hai, Q. He, *Int. J. Nanomed.* **7** (2012) 163-175.
24. R. A. Medina, G. I. Owen, *Biol. Res.* **35** (2002) 9-26.
25. S. V. Spirou, S. A. Costa Lima, P. Bouziotis, S. Vranješ-Đurić, E. K. Efthimiadou, A. Laurenzana, O. L. Gobbo, *Nanomaterials* **8** (2018) 306.
26. M. Mirković, M. Radović, D. Stanković, Z. Milanović, D. Janković, M. Matović, S. Vranješ-Đurić, *Mater. Sci. Eng. C* **102** (2019) 124-133.
27. N. Lamichhane, T. S. Udayakumar, W. D. D'Souza, I. I. Simone, B. Charles, S. R. Raghavan, J. Mahmood, *Molecules* **23** (2018) 288.
28. G. Sharma, S. Anabousi, C. Ehrhardt, R. Kumar, *J. Drug Target.* **14** (2006) 301–310.
29. Y. Liu, J. Rohrs, *Curr. Drug Metab.* **15** (2014) 818–828.
30. A. I. Vogel, *Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th Edition, Pearson, 1996.
31. W. Lu, L. Navidpour, S. D. Taylor, *Carbohydr. Res.* **340** (2005) 1213-1217.
32. Z. Wang, J. Sun, M. Li, T. Luo, Y. Shen, A. Cao, R. Sheng, *RSC Adv.* **11** (2021) 19450-19460.
33. L. Hough, J. K. N. Jones, M. S. Magson, *J. Chem. Soc.* **1525** (1952) 1525-1527.
34. K. Nilsson, K. Mosbach, *Eur. J. Biochem.* **112** (1980) 397-402.
35. T. Chandra, J. Zebrowski, *J. Chem. Health Saf.* **21** (2014) 22-28.
36. W. Lu, L. Navidpour, S. D. Taylor, *Carbohydr. Res.* **340** (2005) 1213-1217.
37. Y. Qin, W. Fan, H. Chen, N. Yao, W. Tang, J. Tang, W. Yuan, R. Kuai, Z. Zhang, Y. Wu, Q. He, *J. Drug Target.* **18** (2010) 536–549.
38. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (pristupljeno 12.8.2022.)

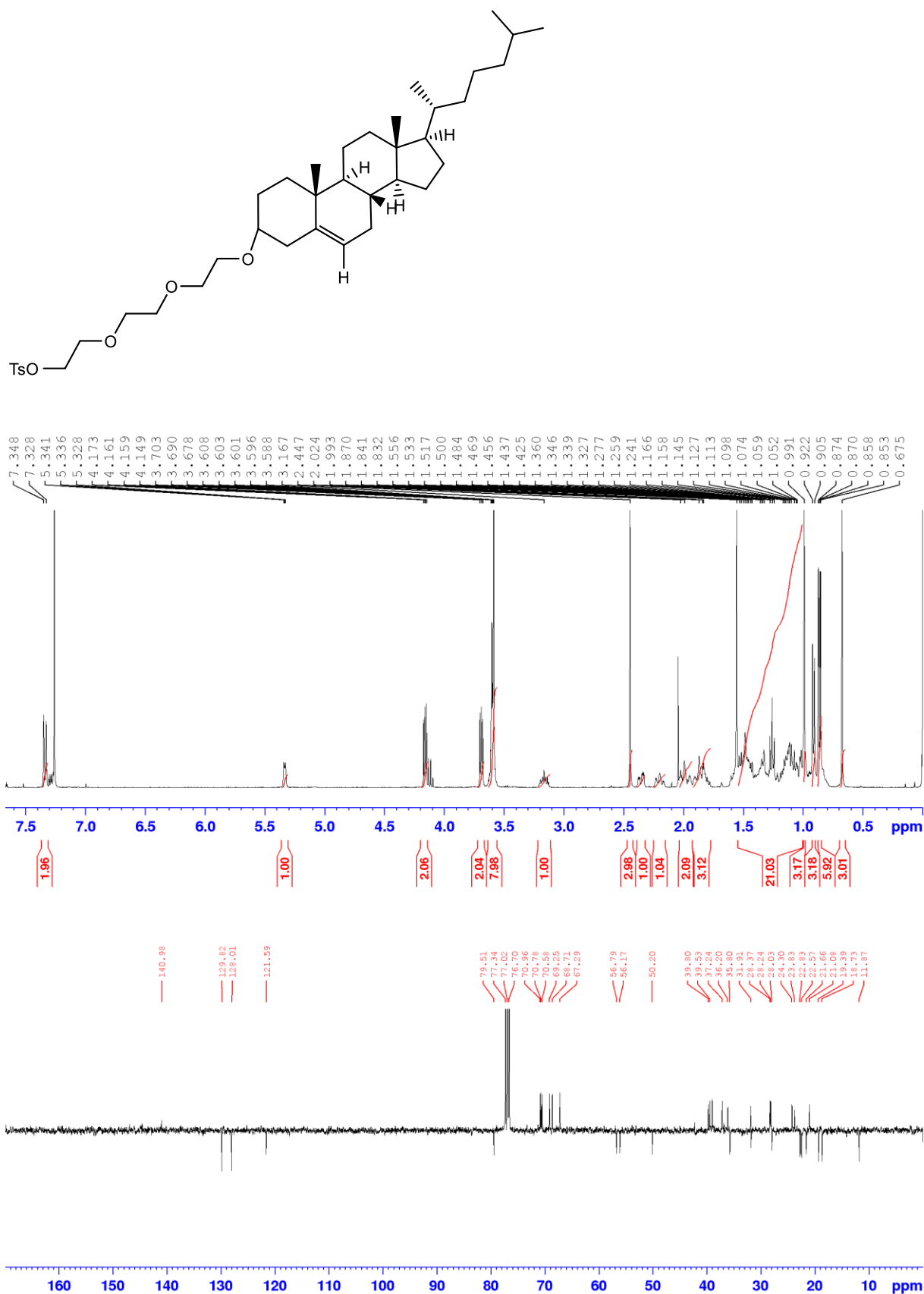
## § 8. DODATAK

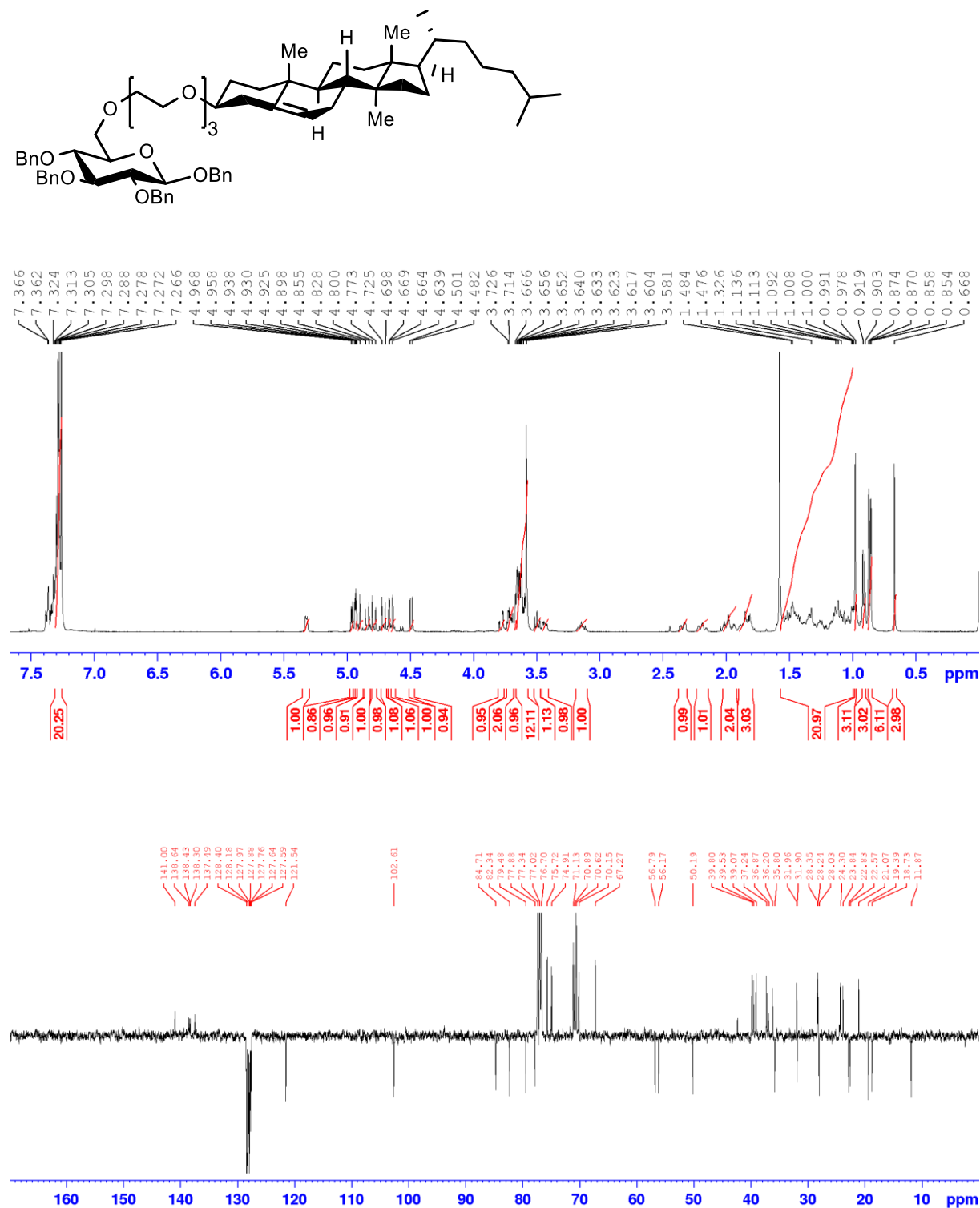
**Dodatak 1.**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) i  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) NMR spoja 2

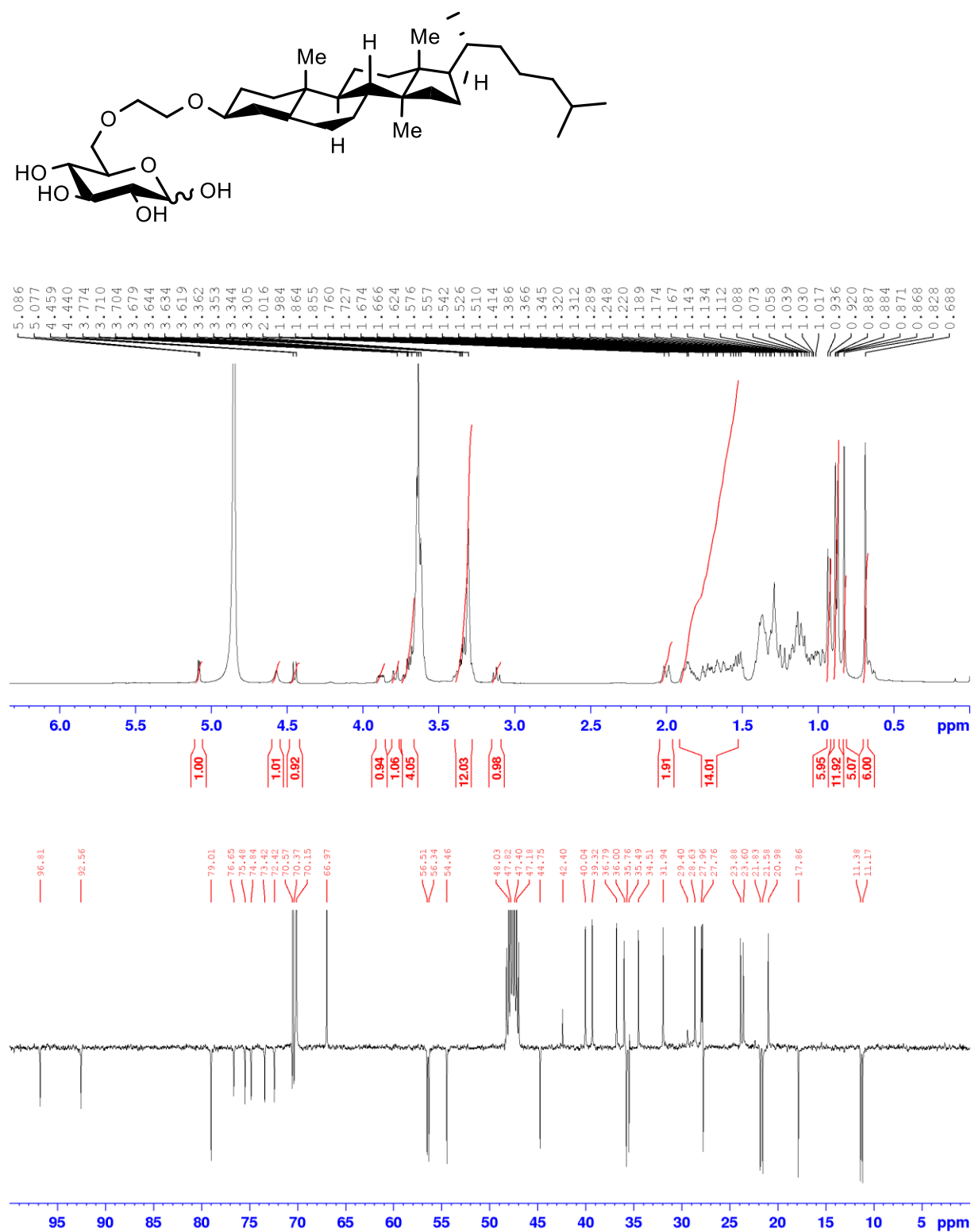


**Dodatak 2.**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) NMR spoja **3**

**Dodatak 3.**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) i  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) NMR spoja **5**


**Dodatak 4.**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) i  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) NMR spoja **6**


Dodatak 5.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) i  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) NMR spoja 7

Dodatak 6.  $^1\text{H}$  NMR (MeOD, 400 MHz) i  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD, 100 MHz) NMR spoja 8



## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Marko Novaković

Datum rođenja: 28. srpnja 1997.

Mjesto rođenja: Zagreb

### Obrazovanje

2004.-2012. Osnovna škola Jordanovac, Zagreb

2012.-2016. XV. Gimnazija, Zagreb

2016.-2020. Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

2020.-2022. Diplomski sveučilišni studij Kemija, istraživački smjer, grane: analitička i organska kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2017. Otvoreni dan kemije