

# Priprava ključnih prekursora za sintezu potencijalnog imunoadjuvanta - konjugata quillaja saponina i desmuramil-dipeptida

---

**Biškup, Andrej**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:437206>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-26**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Andrej Biškup

**PRIPRAVA KLJUČNIH PREKURSORA ZA  
SINTEZU POTENCIJALNOG  
IMUNOADJUVANTA - KONJUGATA  
*QUILLAJA* SAPONINA I  
DESMURAMIL-DIPEPTIDA**

**Diplomski rad**

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

Zagreb, 2020.



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

Diplomski rad izrađen je u okviru projekata:

Sinteza i strukturna analiza biološki aktivnih peptida, heterocikličkih spojeva i njihovih  
glikokonjugata (potpora, izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković)

HRZZ – 7899: Sinteza, strukturna analiza i biološka evaluacija peptidomimetika i  
glikokonjugata (prof. dr. sc. Srđanka Tomić-Pisarović)



## **Zahvale**

*Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Đaniju Škalameri na vrhunskom mentorstvu, uloženom vremenu, trudu i strpljenju te nesebičnoj pomoći. Također, hvala na prenesenom znanju i vještinama rada u laboratoriju.*

*Najveće hvala roditeljima i bratu na beskrajnoj podršci te na pruženoj mogućnosti studiranja.*

*Hvala Dariji i svim mojim prijateljima na motivaciji i pomoći oko svih prepreka tijekom studija.*

*Zagreb, rujan 2020.*

*Andrej*



# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>13</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1. Imunoadjuvanti.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2. Saponini .....</b>	<b>16</b>
2.2.1. <i>Triterpenski saponini .....</i>	<i>17</i>
2.2.2. <i>Quillaja saponini.....</i>	<i>18</i>
2.2.3. <i>Sinteza saponina .....</i>	<i>21</i>
<b>2.3. Sinteza peptida .....</b>	<b>21</b>
2.3.1. <i>Zaštitne skupine u peptidnoj kemiji.....</i>	<i>23</i>
2.3.2. <i>Aktivirajući reagensi i kondenzacija aminokiselina.....</i>	<i>26</i>
2.3.3. <i>Desmuramil-dipeptid .....</i>	<i>28</i>
<b>2.4. Sinteza saharida .....</b>	<b>30</b>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1. Materijali i metode.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2. Sinteza saharidnog prekursora .....</b>	<b>33</b>
3.2.1. <i>Sinteza 1,2,3,4-tetra-O-acetil-<math>\alpha</math>-D-galaktopiranozne kiseline (2).....</i>	<i>33</i>
3.2.2. <i>Sinteza alilnog estera 1,2,3,4-tetra-O-acetil-<math>\alpha</math>-D-galaktopiranozne kiseline (3).....</i>	<i>34</i>
3.2.3. <i>Sinteza alilnog estera 2,3,4-tri-O-acetil-D-galaktopiranozne kiseline (4).....</i>	<i>35</i>
3.2.4. <i>Sinteza alilnog estera 1-O-trikloracetimidat-2,3,4-tri-O-acetil-<math>\alpha</math>-D-galaktopiranozne kiseline (5).....</i>	<i>35</i>
<b>3.3. Triterpenski prekursor .....</b>	<b>36</b>
3.3.1. <i>Izolacija Quillajakiseline (6).....</i>	<i>36</i>
3.3.2. <i>Sinteza alilnog estera Quillaja kiseline (7).....</i>	<i>37</i>
3.3.3. <i>Sinteza alilnog estera di-O-benzilirane Quillaja kiseline (8) .....</i>	<i>37</i>
<b>3.4. Sinteza peptidnog prekursora .....</b>	<b>38</b>
3.4.1. <i>Sinteza H-D-Glu(OBn)-OH (9) .....</i>	<i>38</i>
3.4.2. <i>Sinteza Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH (10) .....</i>	<i>39</i>
3.4.3. <i>Sinteza Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-NH<sub>2</sub>(11) .....</i>	<i>39</i>
3.4.4. <i>Sinteza L-Ala-D-Glu(OBn)-NH<sub>2</sub>(12).....</i>	<i>40</i>
3.4.5. <i>Sinteza Boc-Gly-L-Ala-D-Glu(OBn)-NH<sub>2</sub>(13).....</i>	<i>41</i>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>42</b>



---

4.1. Uvod .....	42
4.2. Retrosintetska analiza.....	43
4.3. Sintaza saharidnog prekursora.....	45
4.4. Triterpenski prekursor.....	48
4.5. Sintaza peptidnog prekursora.....	50
§ 5. ZAKLJUČAK .....	53
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI) .....	55
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	57
§ 8. DODATAK.....	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS .....	XXVI



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

Diplomski rad

## SAŽETAK

### PRIPRAVA KLJUČNIH PREKURSORA ZA SINTEZU POTENCIJALNOG IMUNOADJUVANTA - KONJUGATA *QUILLAJA* SAPONINA I DESMURAMIL-DIPEPTIDA

Andrej Biškup

U sklopu ovog diplomskog rada pripravljena su tri ključna prekursora za sintezu konjugata *Quillaja* saponina i desmuramil-dipeptida. Saharidni prekursor pripremljen je iz D-galakturonske kiseline, triterpenski izolacijom iz komercijalno dostupnog ekstrakta kore drveta *Quillaja saponaria*, a peptidni iz odgovarajućih aminokiselina. Rad uključuje izolaciju i karakterizaciju prirodnih spojeva te sintetske metode peptidne i ugljikohidratne kemije. Sva tri prekursora zahtijevaju odgovarajući odabir zaštitnih skupina (ortogonalnost i neortogonalnost), kako bi se broj koraka njihovog uvođenja i uklanjanja minimizirao. Cilj ovog diplomskog rada jest pronalazak sintetskog puta do ključnih prekursora u pripremi konjugata *Quillaja* saponina i desmuramil-dipeptida. Za navedene dvije jedinice poznato je da svaka zasebno posjeduje izraženu imunoadjuvantsku aktivnost pa je pretpostavka da bi njihovo povezivanje dovelo do sinergističkog efekta u povećanju te aktivnosti. Dodatno, osim pripreme ciljanog konjugata, prekursori pripremljeni u ovom radu omogućuju pripremu serije derivata različitih strukturnih karakteristika, čime se otvara mogućnost ispitivanja korelacije struktura-imunoadjuvantska aktivnost (eng. *structure-activity relationship*, SAR).

(58+XXVI stranica, 24 slike, 3 tablice, 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: cjepiva, derivati prirodnih spojeva, desmuramil-dipeptid, imunoadjuvantska aktivnost, *Quillaja* saponini

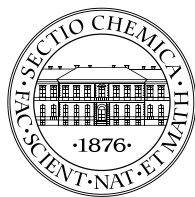
Mentor: doc. dr. sc. Đani Škalamera

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Đani Škalamera
  2. doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
  3. prof. dr. sc. Predrag Novak
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Datum diplomskog ispita: 28. 09. 2020.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Chemistry

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### PREPARATION OF KEY INTERMEDIATES FOR THE SYNTHESIS OF POTENTIAL IMMUNOADJUVANT – CONJUGATE OF *QUILLAJA* SAPONIN AND DESMURAMYL DIPEPTIDE

Andrej Biškup

In this diploma thesis, three key intermediates needed for the synthesis of *Quillaja* saponin and desmuramyl dipeptide conjugate were prepared. The saccharide precursor is prepared starting from D-galacturonic acid, the triterpene precursor by isolation from the commercially available *Quillaja* saponaria tree bark extract, and the peptide precursor by coupling the corresponding amino acids. This work includes the isolation and characterization of natural compounds and synthetic methods of peptide and carbohydrate chemistry. All three precursors need the convenient selection of the protective groups (orthogonality and non-orthogonality), in order to reduce the number of steps for their introduction and cleavage. The goal of this work is to find a synthetic pathway toward key intermediates in the synthesis of *Quillaja* saponin and desmuramyl dipeptide precursor. It is known that those two units show high immunoadjuvant activity, thus the working hypothesis is that their linking will lead to the synergistic effect in the enhancement of that activity. Additionally, besides the preparation of the target compound, the precursors prepared in this work will enable the preparation of a series of derivatives of different structural characteristics, which will open the possibility of the investigation of the correlation between structure and immunoadjuvant activity (SAR).

(58+XXVI pages, 24 figures, 3 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: desmuramyldipeptide, immunoadjuvant activity, natural compound derivates, *Quillaja* saponins, vaccines

Mentor: Dr. Đani Škalamera, Assist. Prof.

Reviewers:

1. Dr. Đani Škalamera, Assist. Prof.
  2. Dr. Aleksandra Maršavelski, Assist. Prof.
  3. Dr. Predrag Novak, Prof.
- Substitute: Dr. Vesna Petrović Peroković, Assoc. Prof.

Date of exam: 28. 09. 2020.

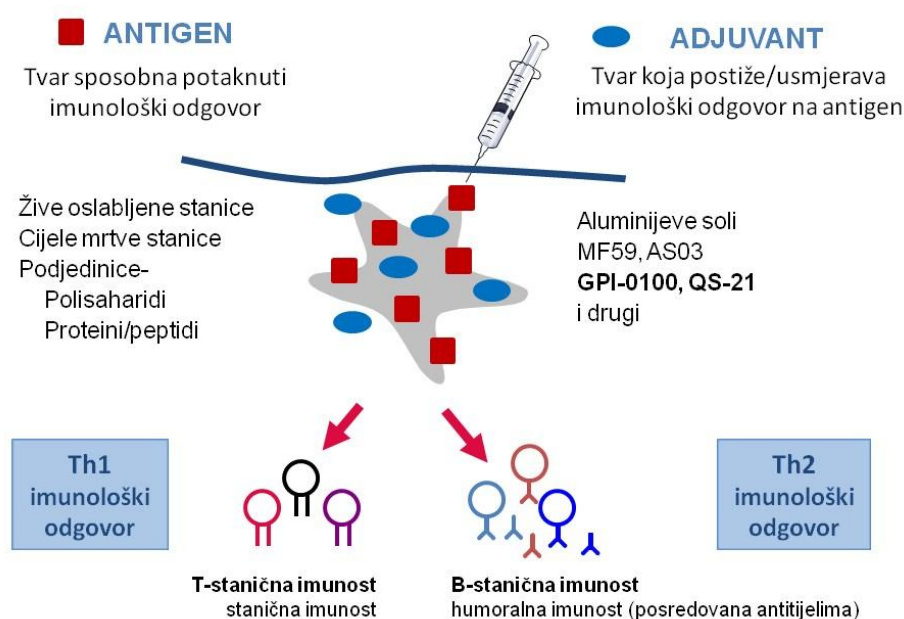




## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Imunoadjuvanti

Adjuvanti su tvari koje se dodaju cjepivima kako bi se postigao ili usmjerio imunološki odgovor na prisutni antigen. Antigen je osnovni i najvažniji dio svakog cjepiva. To mogu biti oslabljene (atenuirane) stanice uzročnika, mrtve stanice bakterija ili virusa, ili njihovi dijelovi (npr. specifični polisaharidi ili peptidi/proteini).<sup>1</sup> Zadnjih godina su vrlo aktualna istraživanja u razvoju cjepiva protiv raka, gdje je oporavak rezultat imunološkog odgovora organizma na prisutnu malignu bolest. Poznato je da, za razliku od normalnih stanica, stanice raka ekspimiraju specifične polisaharide, koji se u takvim cjepivima koriste kao antigeni.<sup>4</sup> Međutim, neovisno o vrsti cjepiva, antigeni sami po sebi najčešće nisu dovoljno imunogenični, tj. ne uzrokuju stvaranje dovoljne količine antitijela te stoga ne dovode do stvaranja željene trajne imunosti. Iz tog razloga se u cjepivu zajedno s antigenom nalazi i adjuvant, koji značajno pojačava imunološki odgovor na antigen (slika 2). Osim poticanja stvaranja antitijela, djelovanje adjuvanta je i imunomodulatorno, tj. on imunološku reakciju usmjerava u željenom smjeru. Postoje dva tipa imunosti - stanična i humoralna, a razlikuju se prema citokinima koji nastaju kao odgovor imunološkog sustava. Citokini su glasničke (signalne) peptidne molekule koje se proizvode u stanicama imunološkog sustava npr. u T limfocitima, a odgovorni su za većinu bioloških efekata u imunološkom sustavu, kao što su npr. stanična imunost ili alergijske reakcije. Iako ih ima puno vrsta, citokini se prema funkciji mogu podijeliti na dvije vrste: proinflamatorne i antiinflamatorne, te se s obzirom na to mogu razlikovati imunološki odgovori posredovani  $T_h1$  stanicama (stanična imunost) koje primarno aktiviraju makrofage, odnosno odgovor posredovan  $T_h2$  stanicama (humoralna imunost) koje primarno stimuliraju B stanice na produkciju antitijela. Imunološki odgovor usmjeren prema  $T_h1$  rezultira stvaranjem nespecifičnih antitijela i upalnim procesom, dok  $T_h2$  rezultira stvaranjem B stanica i inducira proizvodnju antitijela-interleukina, koja ujedno predstavljaju i svojevrsnu memoriju imunološkog sustava.



**Slika 2.** Sastav i način djelovanja cjepiva

Optimalan ishod primjene cjepiva je balansiran Th1/Th2 odgovor, no to nije lako postići. Primjenom odgovarajućeg adjuvanta može se postići željeni smjer i intenzitet imunološkog odgovora, ali je broj dostupnih adjuvanata odobrenih za humanu upotrebu relativno mali. Aluminijeve soli (alum) ili njihove smjese s drugim adjuvantima (AS04) te emulzije skvalena u vodi (MF59, AS03) najčešći su adjuvanti koji se danas koriste, iako nemaju idealan profil aktivnosti te se povezuju s različitim nuspojavama. Svejedno, u današnje vrijeme svjedočimo sve većoj odbojnosti populacije prema cjepivima, otvaraju se pitanja prava na izbor kod cijepljenja, što rezultira sve većim postotkom necijepljenosti populacije. Mali broj i neidealna svojstva dostupnih adjuvanata za humanu upotrebu, kao i nuspojave za koje postoji vjerovanje da ih uzrokuju, postavljaju imperativ za razvoj novih adjuvanata, posebno onih koji će rezultirati balansiranim Th1/Th2 imunološkim odgovorom. Kombinacija antitijelima i stanicama posredovanih imunoloških odgovora nužna je za stvaranje zaštite od unutarstaničnih patogena odgovornih za zarazne bolesti, ali također i u borbi protiv raka te degenerativnih bolesti.<sup>1,5</sup>

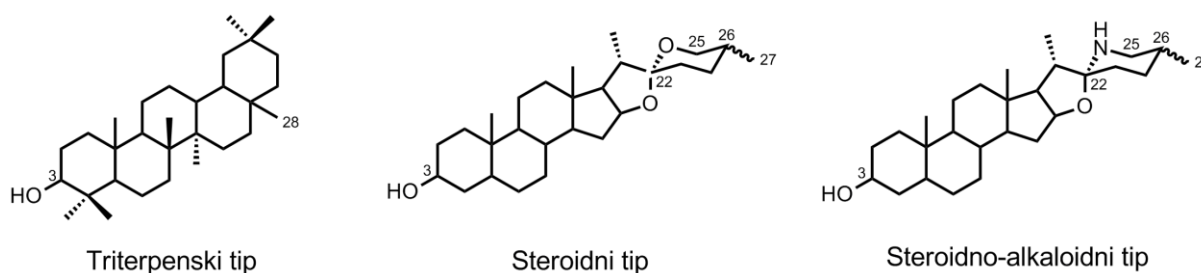


## 2.2. Saponini

Saponini su glikozidi velike molekulske mase koji se sastoje od saharidne (šećerne) podjedinice vezane na triterpenski ili steroidni aglikon. Naziv saponini potječe od lat. *sapo, saponis* – sapun, odnosno njihovih fizikalno-kemijskih karakteristika kao što su svojstvo deterdženata (šećerni dio molekule saponina je topljiv u vodi, dok je aglikon topljiv u mastima) te stvaranje stabilnih pjena u vodenom mediju. U prirodi se najvećim dijelom nalaze u drveću, no i u morskim organizmima, primjerice u morskom krastavcu i morskoj zvijezdi. Također, nalaze se i u mnogim biljkama koje se koriste u prehrani (grah, špinat, rajčica, luk, itd.).

Saharidni dio saponina sastoji se od linearnog ili razgranatog lanca monosaharidnih podjedinica od kojih su najčešće D-galaktoza, D-glukoza, D-galakturonska kiselina, D-glukuronska kiselina, L-ramnoza, L-arabinoza, D-ksiloza i D-fukoza. Vrste saponina koje se najučestalije pojavljuju u prirodi sadrže od dvije do pet monosaharidnih podjedinica koje su međusobno u nerazgranatoj formi.

Aglikon, odnosno ne-saharidni dio molekule saponina naziva se genin ili sapogenin. Ovisno o vrsti genina, saponini se dijele u tri cjeline, a to su: triterpenski glikozidi, steroidni glikozidi i steroidno-alkaloidni glikozidi (slika 3).

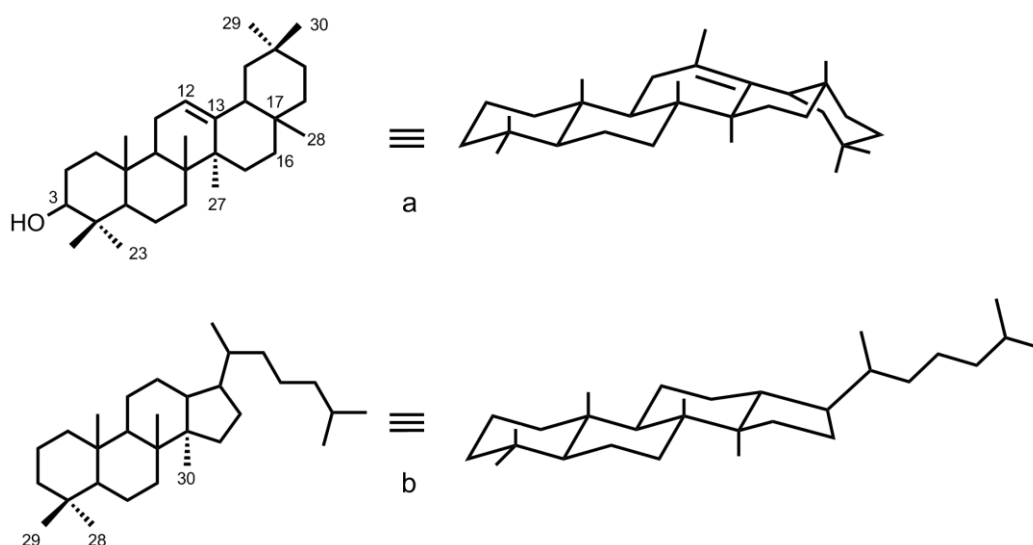


**Slika 3.** Strukture glavnih tipova saponina

Sapogenini su obično hidroksilirani na ugljikovom atomu broj 3 (slika 3), dok su neke od metilnih skupina često oksidirane do hidroksimetilne, aldehidne ili karboksilne skupine, dajući tako dodatnu raznolikost ovoj klasi spojeva. Izraz *esterski saponin* koristi se za opis glikozida koji su acilirani na aglikonu ili šećernom dijelu s kiselinskim dijelom.<sup>6</sup>

## 2.2.1. Triterpenski saponini

S više od 750 vrsta, triterpenski saponini najveća su podvrsta saponina. Na aglikon je vezan najčešće jedan šećerni lanac (engl. *monodesmosidic*) preko ugljika na položaju broj 3, no postoje i triterpenski saponini s dva (engl. *bidesmosidic*) i tri (engl. *tridesmosidic*) šećerna lanca. Bisdezmozidi se lako prevode u monodezmozidne saponine hidrolizom esterske poveznice šećernog lanca i triterpenskog dijela na ugljikovom atomu C-28.



**Slika 4.** Numeracija i stereokemija pentacikličkih (a) i tetracikličkih (b) triterpena

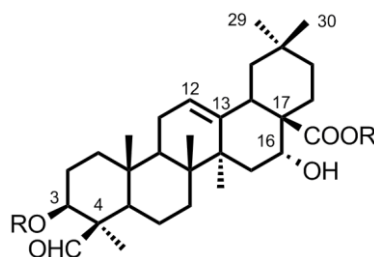
Tetraciklički triterpeni sadrže karakterističnu strukturu damarana, dok su najučestaliji pentaciklički triterpeni oni sa strukturom β-amirina (Slika 4, a). Važni strukturni elementi triterpenskih saponina su nezasićena ugljik-ugljik veza na C-12 i C-13, funkcionalizacija metilne skupine na C-23, C-28 i C-30, hidroksilacija na C-2, C-7, C-11, C-15, C-16, C-19, itd.

Udio triterpenskog saponina u nekim biljkama može biti i do 13%. Primjerice u kori drveća *Quillaja*, udio smjese saponina je oko 10 %.<sup>6</sup>

2.2.2. *Quillaja saponini*

Američka sapunika, *Quillaja saponaria* Molina, Rosaceae vazdazeleno je stablo koje raste na području Čilea, Bolivije i Perua. Prvi puta je opisana 1782. godine te zbog relativno visokog udjela saponina (9-10%) od davnina predstavlja potencijalno korisnu biljku. *Quillaja* saponin je bijeli prah, slatko-gorkog okusa, koji prilikom udisanja izaziva kihanje. Koristi se u kozmetičkoj industriji te industriji hrane i pića. Također, u natrag 70-tak godina, poznata je imunoadjuvantska aktivnost smjese *Quillaja* saponina, no zbog vrlo složene molekularne strukture predstavlja veliki izazov u daljnjem istraživanju. Početci korištenja *Quillaja* saponina kao imunoadjuvanata jesu u veterini, preciznije u antiparazitnim cjepivima za malariju, babeziozu i tripanosomijazu. Livingston i sur. prvi su autori koji spominju korištenje pročišćenog ekstrakta *Quillaja* saponina na ljudima u svrhu liječenja melanoma.<sup>7</sup>

Molekularna struktura *Quillaja* saponina poznata je kao bisdezmozidna, što znači da su šećerne podjedinice vezane za aglikon (*Quillaja* kiselina, 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroksi-23-oksolean-12-en-28-ska kiselina) na dvije pozicije. Jedna od šećernih podjedinica vezana je acetalnom vezom na triterpen na ugljikov atom broj 3, dok je druga šećerna podjedinica vezana esterskom vezom na ugljikov atom broj 28 (slika 5). Strukturne značajke koje razlikuju *Quillaja* saponine od većine ostalih bijnih vrsta su domena masne kiseline te triterpenska aldehidna skupina na položaju 4.<sup>7</sup> Zbog svoje površinske aktivnosti, *Quillaja* saponini imaju mogućnost vezanja na kolesterol (slobodnim ili vezanim za membranu).<sup>8</sup>



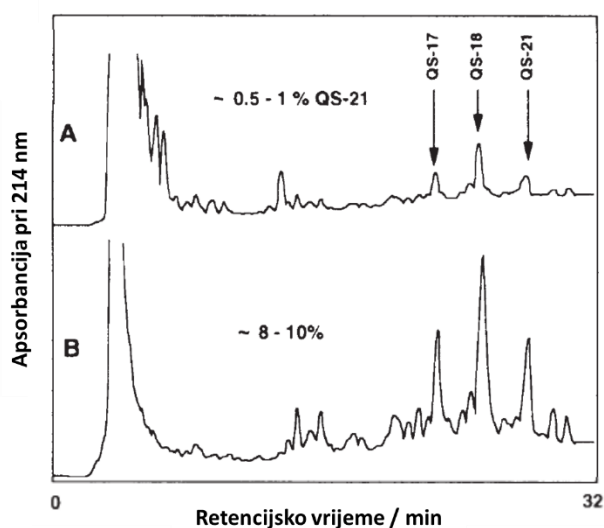
**Slika 5.** *Quillaja* kiselina (R, R' = H). U strukturi saponina R i R' su razgranati glikozidni bočni lanci

Vjerojatno najvažniji predstavnik ove serije spojeva je QS-21, čija je adjuvantska aktivnost i potencijalna primjena proučavana u više od 100 kliničkih studija, što je rezultiralo nedavnim odobrenjem za upotrebu ovog spoja u humanim cjepivima (cjepivo Shingrix, proizvođača

GlaxoSmithKline). Međutim, QS-21 ima nekoliko velikih nedostataka: nije kemijski stabilan, izvor mu je prilično limitiran te je potrebno vrlo zahtjevno pročišćavanje, čije iskorištenje je nisko.

QS-21 se iz prirodnog materijala izolira kao smjesa dvaju izomera, koji se razlikuju samo po jednoj saharidnoj jedinici (ksilozu umjesto apioze). Pokazano je da oba izomera imaju ista farmakološka svojstva.<sup>9</sup> QS-21 stimulira jak, balansiran Th1/Th2 imunološki odgovor. Primijećeno je da u vodenoj otopini nije stabilan; čak i pri pH vrijednosti 7 dolazi do hidrolize acilnog lanca, pri čemu se oslobađaju OH skupine fukoze.<sup>10</sup> Pokazana je jedna vrlo zanimljiva korelacija imunološke aktivnosti i stanja aciliranosti fukoze: ako je fukoza acilirana, onda spoj daje balansirani Th1/Th2 imunološki odgovor, dok je u slučaju kad su OH skupine fukoze slobodne imunološki odgovor usmjeren isključivo prema Th2.<sup>11</sup> Hidrolitički nestabilne esterske veze mogu se zamijeniti stabilnijim amidnim vezama bez gubitka aktivnosti.<sup>12</sup>

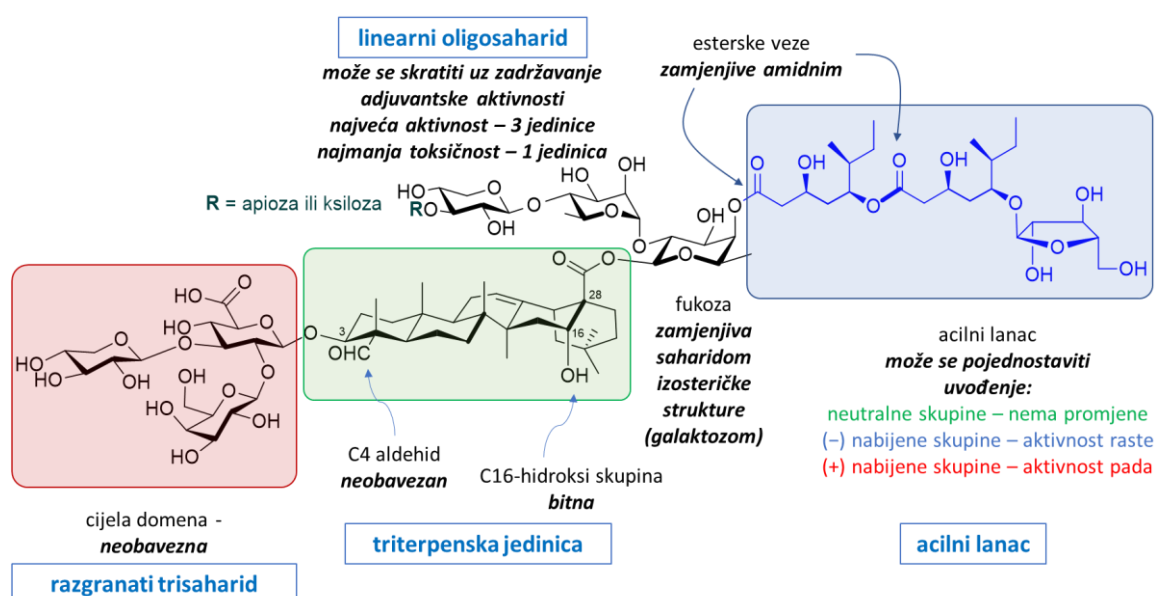
Osim QS-21, ekstrakt kore *Quillaje* sadrži i brojne druge saponine (slika 6), od kojih su samo neki izolirani u čistom stanju, okarakterizirani i evaluirana im je imunoadjuvantska aktivnost. Pod imenom QuilA®, komercijalno je dostupan djelomično pročišćeni ekstrakt kore. Upotrebljava se kao adjuvant u nekim cjevivima za veterinarsku upotrebu. Upotreba u humanim cjevivima nije odobrena jer se radi o smjesi spojeva (slika 6, B), od kojih mnogi još nisu okarakterizirani i nepoznata su im svojstva.



**Slika 6.** HPLC kromatogram sirovog i djelomično pročišćenog ekstrakta kore drveta *Quillaja saponaria*. (A) Vodeni ekstrakt kore; (B) Djelomično pročišćeni vodeni ekstrakt (QuilA®).

Prilagođeno i preuzeto iz ref. 10. Navedena je približna čistoća QS-21 u oba slučaja.

Cijelim nizom dugogodišnjih sustavnih istraživanja Fernandez-Tejada, Tani Gin došli su do vrlo važnih zaključaka o korelaciji strukture i biološke aktivnosti saponina kvilaje.<sup>12</sup> Opisana je sinteza i ispitivanje imunoadjuvantske aktivnosti derivata s hidrolitički stabilnijim amidnim vezama umjesto esterskih,<sup>13</sup> derivata sa skraćenim lancima linearne saharidne podjedinice,<sup>14</sup> modificirana je duljina, stereokemija i fleksibilnost središnje glikozidne veze,<sup>15</sup> pripremljeni su derivati bez razgranatog trisaharida,<sup>16</sup> konjugati sa skupinama koje su pri fiziološkom pH pozitivno, neutralno ili negativno nabijene,<sup>14</sup> te derivati sa i bez aldehidne skupine i hidroksilnih skupina na središnjoj triterpenskoj jedinici.<sup>16</sup> Radi se o vrlo vrijednim rezultatima, jer omogućuju racionalniji dizajn potencijalnih novih adjuvanata temeljenih na strukturi saponina *Quillaje*. Svakako, dizajn novih spojeva mogao bi biti dodatno racionaliziran kad bi se poznavao točan mehanizam djelovanja. Vežanjem fluorescentne oznake i radioobilježavanjem omogućeno je praćenje lokalizacije saponina u tijelu/stanicama miša.<sup>16</sup> Utvrđeno je da saponini kvilaje na neki način interreagiraju s dendritičkim stanicama te antigen usmjeravaju prema limfnim čvorovima, za koje je poznato da su mjesto sazrijevanja imunoloških stanica. Svim derivatima pripremljenim u navedenim istraživanjima određena je adjuvantska aktivnost te je na temelju toga izveden cijeli niz zaključaka o korelaciji strukture i biološke aktivnosti, koji su prikazani na slici 7.



Slika 7. Utjecaj strukturnih modifikacija QS-21 na adjuvantsku aktivnost.<sup>13</sup>

### 2.2.3. Sinteza saponina

Karakteristika triterpenskih i steroidnih saponina je građa od najviše šest izoprenskih podjedinica te im biosineza započinje ciklizacijom molekule skvalena.

Zbog vrlo složene molekularne strukture, totalna sinteza analoga QS-21A (slika 7), s nešto više od 30 koraka, prvi put je objavljena tek 2008. godine.<sup>17</sup>

Izolacija složenih *Quillaja* saponina iz prirodnog materijala izuzetno je zahtjevna metoda te daje mala iskorištenja. Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid phase extraction*, *SPE*) u sprezi s NMR spektroskopijom izuzetno je korisna metoda za identifikaciju i izolaciju pojedinih kemijskih spojeva u složenim smjesama, naročito iz prirodnih izvora.<sup>18</sup> Alternativni pristup kod sinteze ovakve klase spojeva, ujedno i najčešće primjenjivan, je semisintetski put. Takvim pristupom iz prirodnog materijala se izolira neki od pristupačnih polaznih spojeva za daljnju sintezu derivata *Quillaja* saponina. Sinteza različitih analoga QS znatno je pojednostavljena zbog mogućnosti izolacije zajedničke strukturne jedinice većine saponina – *Quillaja* kiseline (QA). Iz komercijalno dostupnog ekstrakta kore *Quillaje*, u kojoj se nalazi složena smjesa saponina, moguće je izolirati QA u iskorištenju od oko 10 %.

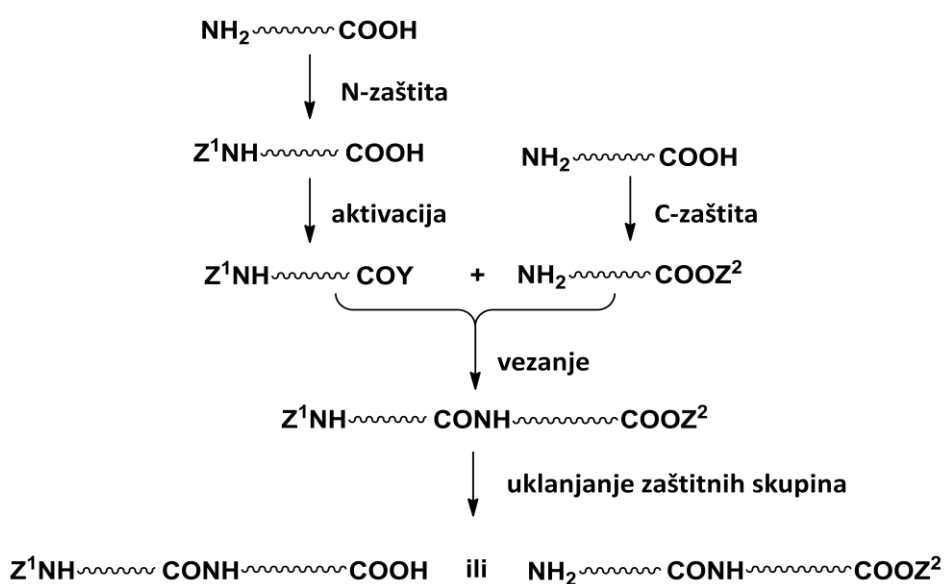
## 2.3. Sinteza peptida

Razvoj peptidne kemije od velike je važnosti za suvremeni život. Brojni sintetički peptidi, bilo komercijalni ili farmaceutski, pronalaze primjenu u rasponu od prehrambenih proizvoda (dipeptid aspartam kao zamjena za šećer) do kompleksnih klinički korištenih hormona (okситocin, adrenokortikotropni hormon i kalcitonin). Prema tome, potrebno je razviti učinkovitu, pouzdanu i brzu metodologiju za sintezu takvih spojeva.

Najvažnije metode za sintezu peptida su sinteza peptida u otopini (engl. *solution phase synthesis*, SPS) i sinteza peptida na čvrstom nosaču (engl. *solid phase peptide synthesis*, SPPS).

Postupak stupnjevite „gradnje“ peptida u otopini iz pojedinih aminokiselina poznat je više od stotinjak godina. Fischer i Fourneau uveli su pojam „peptid“ i sintetizirali prvi peptid davne 1901. godine. Tridesetak godina kasnije (1932.) Bergman i Zervas priredili su prvu reverzibilnu  $\alpha$ -amino zaštitnu skupinu za sintezu peptida, benziloksikarbonilnu (Cbz) skupinu. Takav rutinski postupak produljivanja peptidnog lanca u otopini odvija se u nekoliko osnovnih koraka, a to su (slika 8):

- zaštićivanje  $\alpha$ -amino skupine i aktivacija  $\alpha$ -karboksilne skupine jedne od aminokiselina u reakciji te zaštićivanje  $\alpha$ -karboksilne skupine druge aminokiseline koja sudjeluje u reakciji
- kondenzacija dviju zaštićenih odnosno aktiviranih aminokiselina uz pomoć kondenzacijskog reagensa
- selektivno uklanjanje zaštitnih skupina na C-terminusu i N-terminusu novonastalog peptida



**Slika 8.** Shema sinteze peptida u otopini ( $Z^1, Z^2$  = zaštitna skupina, Y=aktivirajuća skupina)

Sinteza peptida u otopini dobra je metoda za sintezu manjih peptida, koji se mogu dobiti u visokim čistoćama. Prije svake kondenzacijske reakcije, novonastali peptid je potrebno pročistiti te mu potvrditi strukturu, što predstavlja znatan utrošak vremena. Iz tog razloga, sinteza većih peptida, u današnjici je zamijenjena sintezom peptida na čvrstom nosaču.<sup>19</sup>

Revoluciju u sintezi peptida dogodila se početkom 1960-tih godina, kada Merrifield predlaže korištenje polistirenskih čvrstih nosača za sintezu peptida, tj. koncept sinteze peptida na čvrstom nosaču. Prvi peptid (tetrapeptid) sintetiziran je na ovaj način 1963. godine korištenjem Cbz kao  $\alpha$ -amino zaštitne skupine, DCC kao kondenzacijskog reagensa i HBr za oslobađanje peptida s nosača.<sup>20</sup> Ova metoda temelji se na istoj kemijskoj logici kao i sinteza peptida u otopini, uz dodatak koraka kovalentnog vezanja rastućeg peptidnog lanca s netopljivim polimernim nosačem, tj. smolom. Aminokiselina čija je

$\alpha$ -amino skupina zaštićena Boc ili Fmoc zaštitnom skupinom, a bočni lanac nekom drugom zaštitnom skupinom, na čvrsti nosač veže se karbamatnom vezom preko C-terminusa. Idući korak je uklanjanje  $\alpha$ -amino zaštitne skupine aminokiseline na nosaču, a zatim kondenzacijska reakcija (uz pomoć kondenzacijskog reagensa) s idućom aminokiselinom zaštićenom na N-kraju te aktiviranom na C-kraju pri čemu nastaje N-zaštićeni dipeptid. Dobivenom dipeptidu ukloni se zaštitna skupina na N-kraju, dodaje se nova aminokiselina za kondenzacijsku reakciju i takav postupak ponavlja se do pripreve određenog peptida. Nakon pripreve željenog peptida uklanjaju se zaštitne skupine na bočnim ograncima aminokiselina te zaštitna skupina na N-kraju posljednje aminokiseline u lancu. Posljednji korak je ispiranje novonastalog peptida s čvrstog nosača. Prednost SPPS-a je znatno veća brzina u odnosu na SPS, provođenje reakcija uz vrlo topljive reagense koji se nakon završetka sinteze peptida vrlo lako uklanjaju filtracijom i ispiranjem bez gubitaka produkta.<sup>19</sup>

### 2.3.1. Zaštitne skupine u peptidnoj kemiji

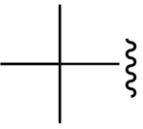
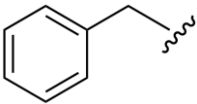
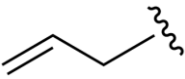
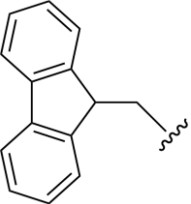
Kako bi se spriječile neželjene reakcije poput polimerizacije i nastajanje nusprodukata, u metodama sinteze peptida (ali i općenito u sintezi) koriste se tzv. zaštitne skupine. To su skupine koje se kovalentno vežu za neku (inače reaktivnu) funkcionalnu skupinu kojoj je potrebno osigurati nereaktivnost u uvjetima u kojim se reakcija provodi. Svaka aminokiselina sadrži amino skupinu i karboksilnu skupinu, a neke aminokiseline na svojim bočnim ograncima sadrže i reaktivne skupine poput  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SH}$ . Prema tome, iznimno je važno znanje o korištenju zaštitnih skupina koje moraju posjedovati određene karakteristike kako bi se mogle koristiti u sintezi. Prije svega, zaštitnu skupinu potrebno je lako i uspješno uvesti na funkcionalnu skupinu. Nadalje, zaštitna skupina mora biti stabilna u uvjetima provođenja reakcije. Zadnja, no ne i manje važna karakteristika je mogućnost sigurnog i selektivnog uklanjanja zaštitne skupine na kraju sinteze ili u trenutku kada funkcionalna skupina zahtjeva dodatnu manipulaciju.

Zaštita C-terminalne karboksilne skupine razlikuje se u metodi sintezi peptida u otopini (SPS) i metodi sinteze peptida na čvrstom nosaču (SPPS). U SPPS metodi C-terminalni kraj vezan je na čvrsti nosač koji ujedno ima ulogu zaštitne skupine. Postoje SPPS metode u kojima je peptid vezan na čvrsti nosač preko bočnog lanca ili preko N-terminalne skupine. U tim slučajevima potrebno je zaštititi C-terminalnu karboksilnu kiselinu. Sinteza peptida u otopini zahtjeva zaštitu C-terminalne karboksilne kiseline one



aminokiseline koja je donor  $-NH_2$  skupine u stvaranju amidne veze. Karboksilna skupina je podložna nukleofilnim napadima te sadrži kiseli proton pa ju je iz tog razloga potrebno zaštititi. Najčešće korištene zaštitne skupine za  $\alpha$ -karboksilnu kiselinu navedene su u tablici 1.<sup>21</sup>

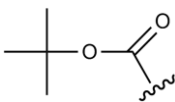
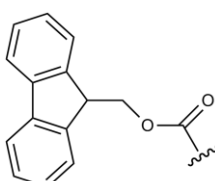
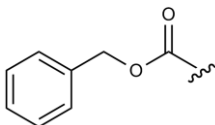
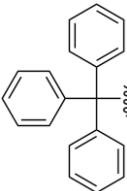
**Tablica 1.** Najčešće korištene zaštitne skupine za  $\alpha$ -karboksilnu kiselinu

Zaštitna skupina	Uvjeti uvođenja	Uvjeti uklanjanja	Skupine koje su stabilne u uvjetima uklanjanja
 t-Bu	<i>t</i> -BuOH, EDC, DMAP	4 M HCl / dioksan ili TFA/ DCM	Fmoc, Trt
 Bn	BnBr, NaH / DMF	HF ili $H_2$ / Pd-C	Boc, Fmoc, Trt
 All	AlOH, py / DCM, (COCl) <sub>2</sub> , DMF ili AllBr, KHCO <sub>3</sub> / DMF	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> / DCM	Boc, Fmoc, Trt
 Fm	FmOH, EDC/DCM	20 % piperidin / DCM	Boc, Trt

Važan korak u sintezi peptida je zaštita  $\alpha$ -amino skupine kojim se sprečava polimerizacija aminokiseline. Kako se većina peptida sintetizira (u otopini i na čvrstom nosaču) od C-kraja prema N-kraju,  $\alpha$ -amino zaštitne skupine uklanjaju se više puta tijekom sinteze. Uklanjanje

takvih skupina mora biti izvedeno u blagim reakcijskim uvjetima kako ne bi došlo do nepoželjnih reakcija na peptidnom lancu ili na preostalim zaštitnim skupinama bočnih lanaca. Nadalje, takve skupine trebale bi spriječiti epimerizaciju tijekom kondenzacije, pridonjeti topljivosti peptida u većini otapala, a njihovo uklanjanje moralo bi biti brzo i selektivno. Najčešće korištene  $\alpha$ -amino zaštitne skupine su Boc za sintezu u otopini te Fmoc za sintezu na čvrstom nosaču (tablica 2).<sup>21</sup>

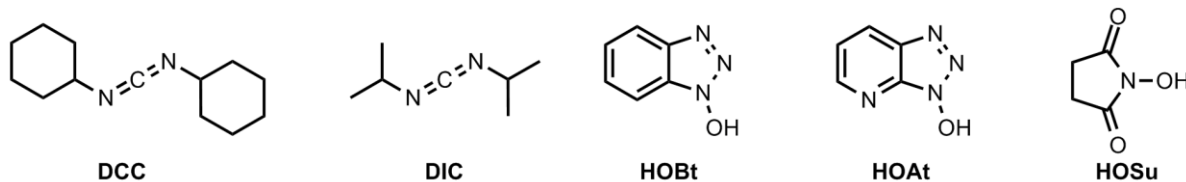
**Tablica 2.** Najčešće korištene zaštitne skupine za  $\alpha$ -amino skupinu

Zaštitna skupina	Uvjeti uvođenja	Uvjeti uklanjanja	Skupine koje su stabilne u uvjetima uklanjanja
 Boc	Boc <sub>2</sub> O, NaHCO <sub>3</sub> / dioksan	20-50 % TFA/ DCM ili 4 M HCl / dioksan	Fmoc, Trt
 Fmoc	Fmoc-OSu ili Fmoc-Cl, NaHCO <sub>3</sub> /dioksan	Otopina : NH <sub>3</sub> / morfolin ili SPPS: Piperidin / DMF	Boc, Trt
 CBz	CBz-OSu ili CBz-Cl, NaHCO <sub>3</sub> / dioksan	HBr / HOAc ili H <sub>2</sub> / Pd-C	Boc, Fmoc, Trt
 Trt	TrtCl, AgNO <sub>3</sub>	1% TFA / DCM  0,2 % TFA, 1% H <sub>2</sub> O/DCM	Fmoc

### 2.3.2. Aktivirajući reagensi i kondenzacija aminokiselina

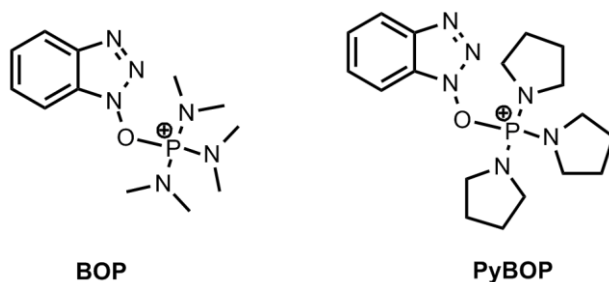
Postupak spajanja dviju aminokiselina u peptid, pri čemu nastaje peptidna veza, naziva se kondenzacijska reakcija. Takva reakcija podrazumijeva napad amino skupine jedne od aminokiselina na ugljikov atom karbonilne skupine druge aminokiseline koja je prethodno aktivirana uvođenjem elektron-odvlačeće skupine. Na taj način postiže se veća elektrofilnost karbonilnog ugljikovog atoma. Neki od načina aktivacije karboksilne skupine su prevođenje iste u kiselinski halogenid, azid, anhidrid ili primjerice u ester.<sup>22</sup>

Izbor odgovarajućeg kondenzacijskog reagensa (slika 9) također je važan korak jer vrlo često on smanjuje ili u potpunosti sprečava proces racemizacije kiralnih centara. Najkorištenija metoda u sintezi peptidne veze je karbodiimidna metoda u kojoj se koristi dicikloheksilkarbodiimid (DCC) ili diizopropilkarbodiimid (DIC) kao kondenzacijski reagensi, uz dodatak 1-hidroksibenzotriazola (HOBt), 1-hidroksi-7-azabenzotriazola (HOAt) ili *N*-hidroksisukcinimida (HOSu) radi smanjenja prethodno spomenute racemizacije.



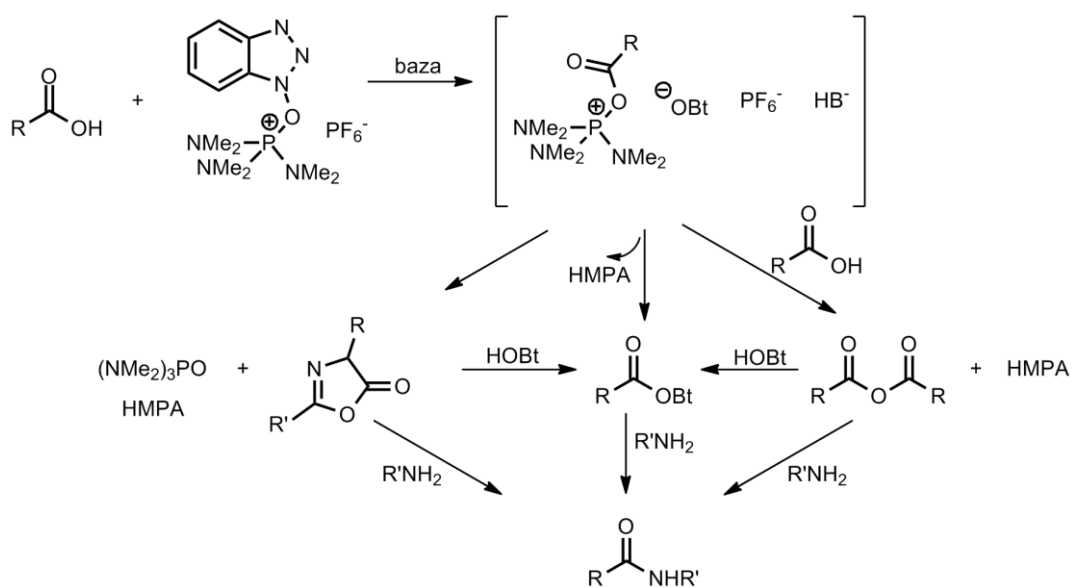
**Slika 9.** Strukturne formule kodenzacijskih reagensa DCC, DIC i HOBt, HOAt, HOSu

Kenner i suradnici prvi su opisali korištenje acil-fosfonijevih soli kao kondenzacijskih reagensa.<sup>23</sup> Kako fosfonijeve soli reagiraju s karboksilatom, nužno je prisutstvo barem jednog ekvivalenta baze. Najčešće korištene fosfonijeve soli kao kondezacijski reagensi (slika 10) su benzotriazol-1-iloksitris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat (BOP) i benzotriazol-1-iloksitri(pirolidino)fosfonijev heksafluorofosfat (PyBOP).



Slika 10. Strukturne formule BOP, PyBOP

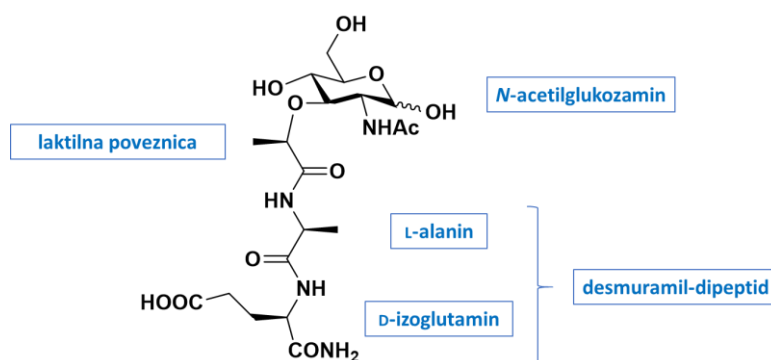
Mehanizam reakcije posredovan BOP-om uz HOBt dan je na slici 11. Kao nusprodukt nastaje heksametilfosforamid (HMPA), otrovna i kancerogena tvar. Kako bi se doskočilo stvaranju nepoželjnog HMPA, koristi se PyBOP u kojem su dimetilamino skupine zamijenjene pirolidinom.<sup>22</sup>



Slika 11. Mehanizam reakcije posredovan BOP-om uz HOBt, preuzeto i prilagođeno prema ref. 22

## 2.3.3. Desmuramil-dipeptid

**Muramil-dipeptid**, *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin (**MDP**), najmanji je dio bakterijskog peptidoglikana koji pokazuje adjuvantsku aktivnost (slika 12). Peptidoglikani su prirodni polimeri koji se nalaze u staničnim stijenkama Gram-negativnih (tanki sloj) i Gram-pozitivnih bakterija (deblji sloj). Analози muramil-dipeptida bez hidrofilne *N*-acetilmuramil podjedinice nazivaju se desmuramil-peptidi.

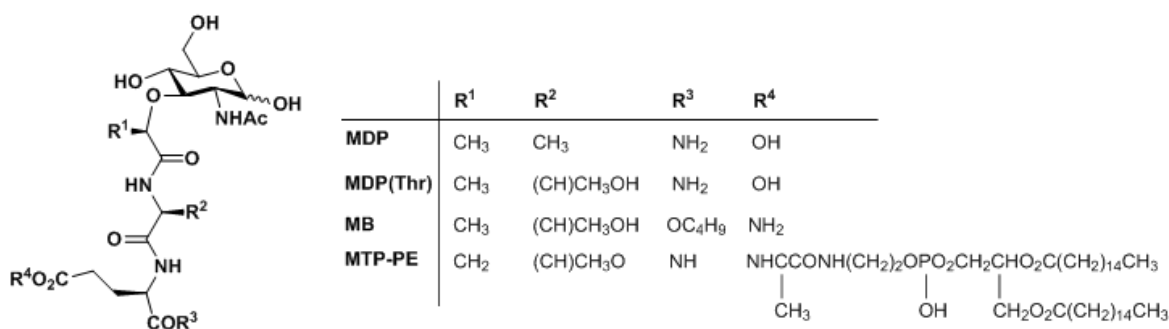


**Slika 12.** Struktura desmuramil-dipeptida

Pokazano je da nakon modifikacije lipofilnim supstituentima (npr. adamantanom) pokazuju vrlo visoku adjuvantsku aktivnost. Iako posjeduje visoku adjuvantsku aktivnost, MDP je pirogen, artritogen i toksičnost mu je visoka, što uvelike ograničava njegovu upotrebu. Mehanizam djelovanja MDP-a i njegovih derivata još uvijek nije potpuno razjašnjen, iako se sustavno proučava još od 1970-ih. Do sada je poznato da se polimerni peptidoglikani vežu na *Toll-like* receptore (TLR), a manji peptidoglikanski fragmenti na unutarstanične NOD-proteine (*Nucleotide-binding oligomerization domain*).<sup>24</sup>

SAR studije na derivatima MDP-a pokazale su da *N*-acetil-D-glukozamin nije nužan za imunostimulatorno djelovanje<sup>25</sup> pa je to otvorilo mogućnosti za modifikacije na tom dijelu molekule. U brojnim SAR studijama, sintetski su modificirani svi dijelovi MDP-a (MurNAc-a, L-Ala i D-isoGln) te je zaključeno kako se adjuvantska aktivnost MDP-a ne umanjuje ukoliko na šećernom dijelu nema anomerne hidroksilne skupine ili je zamijenjena  $\alpha$ - ili  $\beta$ -metilnom skupinom. Moguća je zamjena *N*-acetilglukozamina nekim drugim ugljikohidratom. Tako je pokazano da su derivati s D-mano- i D-galakto-tipom (stereokemijom) strukture jednako aktivni kao i D-gluko-tipovi MDP-a.<sup>26</sup> Ukoliko se primarna hidroksilna skupina šećera na C-6 zamijeni amino- ili acilamino-skupinom, ne dolazi do gubitka aktivnosti. No, ukoliko se kiralno središte u laktilnoj poveznici, koje je

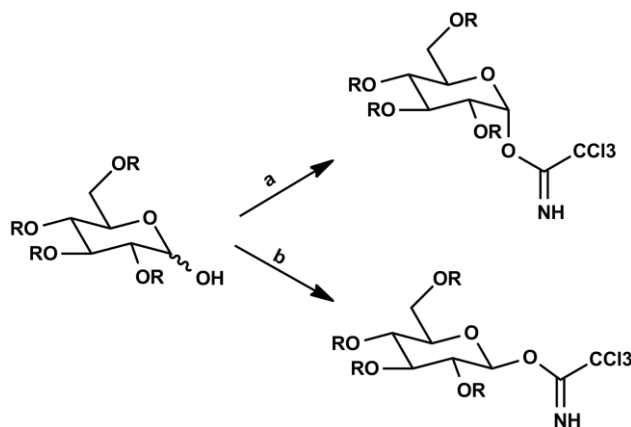
*R*-konfiguracije, promijeni u *S*-konfiguraciju, gubi se adjuvantska aktivnost.<sup>27</sup> Uklanjanjem metilne skupine iz laktalne poveznice dobiva se akiralna glikolna poveznica, pri čemu ne dolazi do gubitka adjuvantske aktivnosti, a istovremeno takav spoj pokazuje i nižu toksičnost.<sup>28</sup> Zamjenom L-alanina D-alaninom gubi se aktivnost, dok zamjena nekom drugom L-aminokiselinom ili glicinom ne rezultira gubitkom aktivnosti. Tako je temurtid netoksičan i aktivan adjuvant dobiven zamjenom L-alanina s L-treoninom (MDP(Thr), slika 13).<sup>29</sup> Za glutaminski dio dipeptida bitno je da zadrži D-konfiguraciju na aminokiselini te da karboksilne skupine, koje mogu biti supstituirane ili slobodne, budu razdvojene s dva metilenska ugljikova atoma. Murabutid (MB, slika 13) primjer je derivata MDP-a kojem su karboksilne skupine supstituirane, a pokazao se učinkovitijim od MDP-a jer ne izaziva nuspojave i primjenjiv je kod ljudi.<sup>29</sup> Primjer imunomodulatora odobrenog za humanu upotrebu je muramil-tripeptid-fosfatidiletanolamin (MTP-PE, slika 13), koji je, nakon ugrađivanja u liposom, poznat pod nazivom mifamurtid, a koristi se u liječenju nemetastaziranog osteosarkoma.<sup>30</sup> To je primjer derivata MDP-a u kojem je došlo do konjugacije lipofilnih skupina preko  $\gamma$ -karboksilne skupine, čime je postignuta bolja adjuvantska aktivnost jer je olakšan ulazak molekule u stanicu obzirom na semipermeabilnost stanične membrane (nepropusnost prema hidrofilnim molekulama).



**Slika 13.** Strukturne formule odabranih derivata MDP-a.

## 2.4. Sinteza saharida

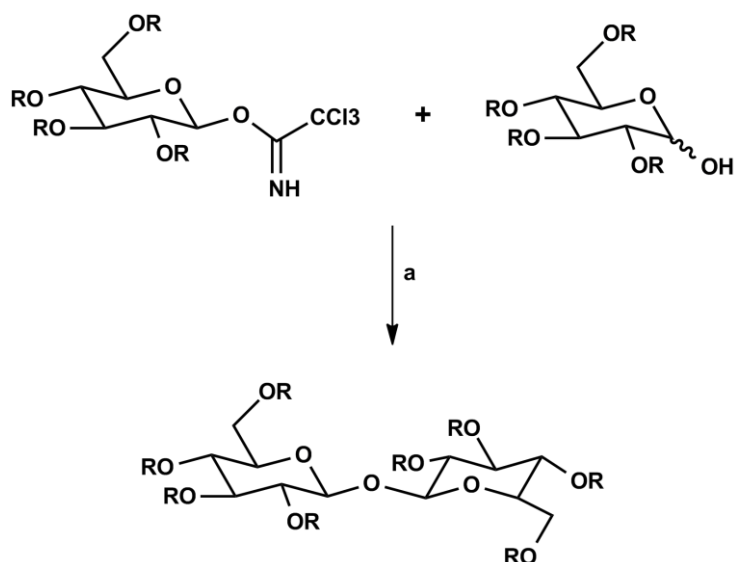
Postoje tri osnovne metode sinteze saharida, to su Königs-Knorr metoda, izravna metoda i imidatna metoda. Königs-Knorr metoda je najstarija metoda sinteze saharida. Uključuje kondenzaciju lako dostupnih 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-2-deoksi- $\alpha$ -D-glikopiranozil halida (donori) sa spojevima koji sadrže primarne OH skupine (reaktivni akseptori) u prisutnosti  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  ili  $\text{AgOTf}$  kao promotora. Reakcija je korisna za sintezu glikozida s jednostavnim primarnim alkoholima te  $\beta$ -(1-6) disaharida,<sup>31</sup> ali se sve manje koristi jer zahtijeva upotrebu soli teških metala kao promotora (Ag, Hg). Izravna metoda sinteze saharida podrazumijeva reakciju *O*-alkiliranih (ili *O*-aciliranih) furanoza i piranoza s anomernom OH skupinom drugog saharida koji je u suvišku, a reakcija je katalizirana Lewisovom kiselinom (najčešće  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ). R. Schmidt zajedno sa suradnicima opisao je selektivnu aktivaciju anomernog ugljikovog atoma zaštićenih pentopiranoza, pentofuranoza, heksopiranoza i heksofuranoza uz trikloroacetimidat u kiselim uvjetima ( $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ). Ovisno o izboru baze, nastaju  $\alpha$  odnosno  $\beta$ -trikloroacetimidati (slika 14).<sup>32</sup>



**Slika 14.** Načini pripreme  $\alpha$  i  $\beta$ -trikloroacetimidata. a)  $\text{CCl}_3\text{CN}$ ,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  ili  $\text{NaH}$ ,  
b)  $\text{CCl}_3\text{CN}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$

Korištenjem kalijevog karbonata postiže se kinetička kontrola reakcije uz preferentno nastajanje  $\beta$ -trikloroacetimidata, dok korištenjem cezijeve karbonata ili natrijevog hidrida dolazi do termodinamičke kontrole reakcije uz nastajanje  $\alpha$ -trikloroacetimidata. Glikozilacija zaštićenog i aktiviranog saharida provodi se u DCM-u, najčešće pri sobnoj temperaturi. Zbog

inverzije konfiguracije na anomernom centru u reakciji glikozidacije, korištenjem  $\alpha$ -trikloroacetimidata nastaju  $\beta$ -*O*-glikozidi (slika 15).<sup>32</sup>



Slika 15. Način priprave  $\beta$ -*O*-glikozida



## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

Sva korištena otapala i reagensi analitičke su čistoće i komercijalno su dostupni. Galakturonska kiselina monohidrat (*Sigma-Aldrich*), acetanhidrid ( $\text{Ac}_2\text{O}$ , *Kemika*), sumporna kiselina ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , *Fluka*), perklorna kiselina ( $\text{HClO}_4$ , *Sigma-Aldrich*), metanol ( $\text{MeOH}$ , *Fluka*), etanol ( $\text{EtOH}$ , *Kemika*), kloroform ( $\text{CHCl}_3$ , *Kemika*), toluen (*Kemika*), etil-acetat ( $\text{EtOAc}$ , *Fluka*), octena kiselina ( $\text{HOAc}$ , *Kemika*), bezvodni magnezijev sulfat ( $\text{MgSO}_4$ , *Sigma-Aldrich*), jod ( $\text{I}_2$ , *Gram mol*), n-heptan (*Sigma-Aldrich*), diklormetan ( $\text{DCM}$ , *Lach-Ner*), oksalil-klorid ( $(\text{COCl})_2$ , *Sigma-Aldrich*), *N,N*-dimetilformamid ( $\text{DMF}$ , *Sigma-Aldrich*), alilni alkohol ( $\text{AlOH}$ , *Sigma-Aldrich*), piridin ( $\text{py}$ , *Kemika*), natrijev hidrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ , *Gram mol*), morfolin (*Fluka*), tetrahidrofuran ( $\text{THF}$ , *Sigma-Aldrich*), klorovodična kiselina ( $\text{HCl}$ , *Kemika*), petroleter ( $\text{PE}$ , *Fluka*), trikloroacetonitril ( $\text{CCl}_3\text{CN}$ , *Fluka*), cezijev karbonat ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , *Sigma-Aldrich*), heksan (*Kemika*), QuilA® (*Sigma-Aldrich*), dietil-eter (*Fluka*), aktivni ugljen (*Kemika*), alil-bromid ( $\text{AlBr}$ , *Sigma-Aldrich*), kalijev hidrogenkarbonat ( $\text{KHCO}_3$ , *Sigma-Aldrich*), natrijev klorid ( $\text{NaCl}$ , *Kemika*), D-glutaminska kiselina (*Sigma-Aldrich*), benzilni alkohol ( $\text{BnOH}$ , *Fluka*), borov trifluorid dietil eterat ( $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$ , *Sigma-Aldrich*), *N*-(tert-butoksikarbonil)-L-alanin-sukcinimidni ester ( $\text{Boc-L-Ala-Osu}$ , *Sigma-Aldrich*), di-tert-butil-dikarbonat ( $\text{Boc}_2\text{O}$ , *Fluka*), amonijev hidrogenkarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , *Fluka*), trifluoroctena kiselina ( $\text{TFA}$ , *Sigma-Aldrich*), benzen (*Sigma-Aldrich*), *N*-(tert-butoksikarbonil)-glicin ( $\text{Boc-Gly-OH}$ , *Fluka*), 1-hidroksibenzotriazol ( $\text{HOBt}$ , *Fluka*), (benzotriazol-1-iloksi)-tris-(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat ( $\text{BOP}$ , *Sigma-Aldrich*), trietilamin ( $\text{TEA}$ , *Fluka*), dioksan (*Kemika*). Korištena suha otapala pripravljena su standardnim literaturnim metodama.<sup>33</sup>

Provedene reakcije praćene su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela na staklu (Macherey-Nagel, Sil G-25 / UV<sub>254</sub>, 0,25 mm). Sustavi otapala za razvijanje TLC-pločica navedeni su uz pojedini propis. Detekcija spojeva vršena je Hanesianovim reagensom uz zagrijavanje ili ninhidrinom uz zagrijavanje. Produkti su

pročišćeni kromatografijom na silikagelu (0,063-0,200 mm, *Merck*) kao stacionarnoj fazi te sustavom otapala (mobilnom fazom) navedenim uz pojedini propis.

Pripravljene spojevi okarakterizirani su infracrvenom spektroskopijom (IR) te spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR). Za snimanje IR spektara uzorci su pripremljeni u obliku KBr pastile (omjer KBr/uzorak 100:1). Korišten je instrument Perkin Elmer FT-IR C89391.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  (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 u ppm. Talište je određeno instrumentom Büchi Melting point B-540.

## 3.2. Sinteza saharidnog prekursora

### 3.2.1. Sinteza 1,2,3,4-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galaktopiranozne kiseline (**2**)

U okruglu tikvicu dodan je acetanhidrid (35 mL, 0,37 mol) i 70%-tna perklorna kiselina (225  $\mu\text{L}$ , 3,7 mmol). Otopina je miješana na magnetskoj mješalici pri 0 °C te je dodavana D-galakturonska kiselina monohidrat (5,45 g, 28 mmol) u malim obrocima. Miješanje je nastavljeno pri 0 °C kroz 30 minuta, a zatim pri sobnoj temperaturi još 3 h. Reakcija je praćena TLC-om (toluen / etanol / etil-acetat / octena kiselina 4:2:2:1). Reakcija je prekinuta polaganim dodatkom metanola (8 mL) pri 0 °C. Nakon 30 minuta, reakcijska smjesa je dodana u ledenu vodu (80 mL). Vodeni sloj ekstrahiran je kloroformom (3 $\times$ 15 mL). Spojeni organski ekstrakti ispiranisu ledenom vodom (3 $\times$ 3 mL), osušeni na bezvodnom  $\text{MgSO}_4$ , profiltrirani i upareni na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Talog je prekrizaliziran iz sustavaetil-acetat/heptan. Dobiveno je 7,5 g (74 %) produkta **2** u obliku bijele krutine.

$R_f = 0,60$  (toluen / etanol / etil-acetat / octena kiselina, 4:2:2:1).

Talište: 172-174 °C (raspad)

IR (KBr) $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3289 (OH), 2944 (C-H), 1754 (C=O), 1222 (C-O).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 7,91 (s, 1H, OH), 6,50 (d, 1H,  $J=3,1$  Hz, H-1), 5,86 (t, 1H,  $J=2,1$  Hz, H-4), 5,40-5,39 (m, 2H, H-2,3), 4,79 (d, 1H,  $J=1,5$  Hz, H-5), 2,02, 2,03, 2,10, 2,17 (4 s, 12H, 4 $\times$ OAc).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 170,3, 170,0, 169,0 ( $4\times\text{CH}_3\text{CO}$ ), 168,8 (C6), 89,4 (C1), 70,6, 68,5, 67,1, 66,0 (C2-C5), 20,9, 20,7, 20,6 ( $4\times\text{CH}_3\text{CO}$ ).

### 3.2.2. Sinteza alilnog estera 1,2,3,4-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galaktopiranozne kiseline (3)

1,2,3,4-Tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galaktopiranozna kiselina (2) (1,55 g, 4,28 mmol) otopljena je u suhom diklormetanu (40 mL) i otopina ohlađena na 0 °C. Reakcija je provedena u atmosferi argona. Zatim je u reakcijsku smjesu dodan oksalil-klorid (0,37 mL, 4,28 mmol) i DMF (0,15 mL). Otopina je miješana na magnetskoj mješalici 30 min pri 0 °C, a zatim 1,5 h pri sobnoj temperaturi. U zasebnoj epruveti, u atmosferi Ar i uz prisutstvo 4 Å molekularnih sita pripremljena je otopina alilnog alkohola (0,30 mL, 4,41 mmol), suhog piridina (0,71 mL, 8,78 mmol) u suhom diklormetanu (5 mL). Otopina s kiselinskim kloridom ohlađena je na 0 °C te joj je polako dodavana otopina alkohola i piridina. Reakcijska smjesa je miješana 30 min pri 0 °C, a zatim još 1,5 h pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om (toluen / etanol / etil-acetat / octena kiselina 4:2:2:1). Reakcijska smjesa isprana je zasićenom otopinom  $\text{NaHCO}_3$  (40 mL). Organski ekstrakt ispran je klorovodičnom kiselinom (0,1 M,  $3\times 20$  mL), osušen na bezvodnom  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , profiltriran i uparen na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Dobiveno je 1,4 g (81 %) produkta 3 u obliku bezbojne uljaste tekućine.

$R_f = 0,90$  (toluen / etanol / etil-acetat / octena kiselina, 4:2:2:1).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 6,52-6,51 (m, 1H, H-1), 5,92-5,82 (m, 2H, CH(All), CH), 5,39 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ , H-2,3), 5,37-5,27 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ , All), 4,76 (d, 1H,  $J=1,5$  Hz, H-5), 4,70-4,60 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ , All), 2,15, 2,10, 2,02, 2,01 (4 s, 12H,  $4\times\text{OAc}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 170,2, 169,8, 168,6 ( $4\times\text{CH}_3\text{CO}$ ), 165,9 (C6), 131,0 (C-H, All), 120,2 ( $=\text{CH}_2$ ), 89,7 (C1), 70,1, 68,7, 67,1 (C3-C5) 66,7 ( $\text{CH}_2$ ), 66,1 (C2), 20,9, 20,7, 20,6 ( $4\times\text{CH}_3\text{CO}$ ).

### 3.2.3. Sinteza alilnog estera 2,3,4-tri-*O*-acetil-*D*-galaktopiranozne kiseline (**4**)

U otopinu alilnog estera 1,2,3,4-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -*D*-galaktopiranozne kiseline (**3**) (475 mg, 1,18 mmol) u THF-u (1,2 mL), dodan je morfolin (154  $\mu$ L, 1,77 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi kroz 2 h. Tijek reakcije praćen je TLC-om (etil-acetat / petroleter, 1:1). U ohlađenu reakcijsku smjesu pri 0 °C dodan je etil-acetat (60 mL) i HCl (0,1 M, 15 mL). Organski ekstrakt ispran je vodom (20 mL) i 1 %-tnom otopinom NaHCO<sub>3</sub> (20 mL), osušen na bezvodnom MgSO<sub>4</sub> i uparen na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala etil-acetat/heksan, 1:1. Dobiveno je 250 mg (70 %) produkta **4** u obliku bezbojnog viskoznog ulja.

$R_f = 0,35$  (etil-acetat / heksan, 1:1).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm:

odabrani podatci za  $\alpha$  anomer: 5,66 (d, 1H,  $J=3,7$  Hz, H-1), 4,91 (d, 1H,  $J=4,6$  Hz, H-5).

odabrani podatci za  $\beta$  anomer: 5,76-5,75 (m, 1H, H-4), 4,93 (d, 1H,  $J=1,5$  Hz, H-5).

smjesa anomera, 2,11, 2,10, 2,09 (3s, 6H, 2 $\times$ OAc), 2,00, 2,01 (2s, 3H, OAc).

### 3.2.4. Sinteza alilnog estera 1-*O*-trikloracetimidat-2,3,4-tri-*O*-acetil- $\alpha$ -*D*-galaktopiranozne kiseline (**5**)

Poluacetal **4** (152 mg, 0,42 mmol) otopljen je u suhom DCM-u (10 mL). U otopinu je zatim dodan trikloracetonitril (2 mL, 20 mmol) i cezijev karbonat (96 mg, 0,294 mmol). Reakcijska smjesa je miješana na magnetskoj mješalici, u atmosferi argona, preko noći (16 h) pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om (heksan / etil-acetat, 2:1). Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa profiltrirana je kroz vatu i uparena. Produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala heksan / etil-acetat, 2:1  $\rightarrow$  1:1. Dobiveno je 122 mg (58 %) smjese stereoizomera produkta **5** u omjeru  $\alpha/\beta = 1:0,05$ , u obliku žućkastog viskoznog ulja.

$R_f = 0,30$  (etil-acetat / heksan, 2:1).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 6,76 (d, 1H,  $J=3,4$  Hz, H-1- $\alpha$ ), 6,60 (d, 1H,  $J=4,8$  Hz, H-1- $\beta$ ), 5,92-5,82 (m, 2H, CH(All), CH), 5,51-5,14 (m, 4H,  $\text{CH}_2(\text{All})$ , 2 C $\times$ H), 4,83 (d, 1H,  $J=1,4$  Hz, H-5), 4,83-4,60 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ , All), 2,11 (s, 3H, OAc), 2,02 (s, 6H, 2 $\times$ OAc).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 170,0 ( $\text{CCl}_3$ ), 169,7, 165,7, 160,7 (3 $\times$  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 131,0 (C-H, All), 120,1 ( $\text{CH}_2$ , All), 119,0 (C=NH), 93,4 (C1), 70,9, 68,7, 67,1, 66,6 (4 $\times$  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 66,5 ( $\text{CH}_2$ , All).

### 3.3. Triterpenski prekursor

#### 3.3.1. Izolacija Quillaja kiseline (6)

U okruglu tikvicu od 250 mL opremljenu s povratnim hladilom dodan je ekstrakt kore QA (5,13 g). Ekstrakt je otopljen u destiliranoj vodi (25 mL) i koncentriranoj klorovodičnoj kiseline (17 mL). Smjesa je polako grijana na uljnoj kupelji (150 °C) uz blagi refluks kroz 7 h. Reakcijska smjesa je zatim profiltrirana kroz filter papir, a smeđi talog ispran vrućom destiliranom vodom (2 x 50 mL). Talog je osušen u evakuiranom eksikatoru iznad silikagela i KOH (preko noći). Suha krutina postavljena je u aparaturu za ekstrakciju po Soxhletu te je provedena kontinuirana ekstrakcija dietil-eterom (250 mL) u trajanju od 24 h. Dobivena otopina uparena je do suha, suhi ostatak otopljen u metanolu (20 mL), a zatim je u otopinu dodan aktivni ugljen (5 g). Smjesa je profiltrirana kroz kratki stupac celita (2 cm) na sinter lijevku, a krutina isprana metanolom (70 mL). Otapalo je upareno na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak, pri čemu je dobiven sirovi produkt u obliku žućkaste krutine. Produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/metanol, 30:1  $\rightarrow$  20:1  $\rightarrow$  10:1. Dobiveno je 650 mg (12,7 %, iskorištenje po masi) produkta 6 u obliku žućkaste krutine.

$R_f=0,45$  (kloroform / metanol, 20 : 1).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 9,35 (s, 1H, CHO), 5,39 (t, 1H,  $J=3,4$  Hz, H-12), 4,44 (t, 1H,  $J=3,5$  Hz, H-16), 3,79-3,75 (m, 1H, H-3), 3,06-3,01 (m, 1H, H-18), 2,16 (t, 1H,  $J=13,9$  Hz), 1,37, 1,26, 1,05, 0,97, 0,91, 0,80 (6s, 18H, 6 $\times$  $\text{CH}_3$ ).

### 3.3.2. Sinteza alilnog estera *Quillaja* kiseline (7)

U okrugloj tikvici od 50 mL otopljena je *Quillaja* kiselina **6** (108 mg, 0,22 mmol), u DMF-u (5 mL) i smjesa je ohlađena na 0 °C. Zatim je u ohlađenu reakcijsku smjesu dodan kalijev hidrogenkarbonat (205 mg, 2,05 mmol) i alil-bromid (200 µL, 2,35 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala heksan / etil-acetat, 2:1. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je razrijeđena vodom (20 mL) te ekstrahirana etil-acetatom (50 mL). Spojeni organski ekstrakti prani su 1 M klorovodičnom kiselinom (2 mL), zatim vodom (3×20 mL) i na kraju zasićenom otopinom natrijeva klorida (20 mL). Nakon sušenja na bezvodnom natrijevom sulfatu i filtriranja, otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala heksan / etil-acetat, 8:1 → 4:1 → 2:1. Dobiveno je 73 mg (63 %) produkta **7** u obliku bijele krutine.

$R_f = 0,27$  (heksan / etil-acetat, 2:1).

IR(KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3449 (OH), 2926 (C-H), 2699 (C-H, aldehyd), 1722 (CHO).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 9,40 (s, 1H, CHO), 5,91-5,82 (m, 1H, CH-All), 5,40 (t, 1H,  $J=3,5$  Hz, H-12), 5,33-5,28 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ -All), 5,23-5,20 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ -All), 4,56-4,53 (m, 1H, H-16), 4,52-4,48 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -All), 3,80-3,76 (m, 1H, H-3), 3,08 (dd, 1H,  $J=4,4$  Hz, H-18), 2,17 (t, 1H,  $J=13,7$  Hz), 1,94-0,98 (m, 21H), 1,38, 1,06, 0,98, 0,97, 0,91, 0,74 (6s, 18H,  $6\times\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 207,2, 176,5, 143,0, 132,3, 122,6, 118,3, 75,0, 72,0, 65,3, 55,4, 48,9, 48,4, 46,8, 46,5, 41,6, 40,8, 40,0, 38,2, 36,1, 35,6, 35,5, 32,9, 32,5, 30,9, 30,5, 27,1, 26,2, 24,7, 23,4, 20,9, 17,2, 15,9, 9,1.

### 3.3.3. Sinteza alilnog estera *di-O-benzilirane Quillaja* kiseline (8)

Spoj **7** (35 mg, 0,72 mmol) otopljen je u suhom DMF-u (1 mL) i smjesa je ohlađena na 0 °C. Dodana je 50%-tna suspenzija NaH u mineralnom ulju (35 mg, 0,72 mmol). Nakon pola sata miješanja pod atmosferom Ar pri 0 °C, dodan je benzil-bromid (171 µL, 1,44 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 1 h pri 0 °C, potom preko noći pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala heksan / etil-acetat, 20:1. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je razrijeđena vodom (10 mL) i ekstrahirana etil-acetatom (20 mL). Spojeni organski ekstrakti prani su vodom (3×10 mL) i na kraju zasićenom otopinom

natrijeva klorida (20 mL). Nakon sušenja na bezvodnom natrijevom sulfatu i filtriranja, otapalo je upareno na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala heksan / etil-acetat, 20:1. Dobiveno je 33 mg (70 %) produkta **8** u obliku bijele krutine.

$R_f = 0,4$  (heksan / etil-acetat, 20:1)

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 9,28 (s, 1H, CHO), 7,34-7,23 (m, 10H, Ar), 5,91-5,81 (m, 1H, CH-All), 5,36-5,35 (m, 1H, H-12), 5,32-5,27 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-All), 5,22-5,19 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-All), 4,70 ( $\underline{\text{AB}}^1$ , 1H,  $J=11,4$  Hz, CH<sub>2</sub>, Bn), 4,55 ( $\underline{\text{AB}}^2$ , 1H,  $J=12,0$  Hz, CH<sub>2</sub>, Bn), 4,36 ( $\underline{\text{AB}}^2$ , 1H,  $J=12,0$  Hz, CH<sub>2</sub>, Bn), 4,35 ( $\underline{\text{AB}}^1$ , 1H,  $J=11,2$  Hz, CH<sub>2</sub>, Bn), 3,55-3,51 (m, 1H, H-3), 3,07-3,02 (m, 1H, H-18), 2,22 (t, 1H,  $J=13,6$  Hz), 1,92-0,90 (m, 21 H), 1,35, 1,13, 0,98, 0,94, 0,80, 0,72 (6s, 18H, 6 $\times$ CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 207,1, 198,8, 176,2, 143,2, 138,6, 132,2, 128,5, 128,3, 127,7, 127,67, 127,6, 127,4, 122,4, 118,2, 82,5, 80,0, 71,9, 70,6, 65,3, 55,2, 49,0, 48,2, 46,8, 46,4, 41,6, 40,6, 40,0, 38,1, 36,3, 35,3, 32,9, 32,6, 32,0, 30,6, 28,8, 26,0, 24,5, 23,5, 22,0, 20,5, 17,1, 15,9, 10,1.

### 3.4. Sinteza peptidnog prekursora

#### 3.4.1. Sinteza H-D-Glu(OBn)-OH (**9**)

Glutaminska kiselina (4 g, 27,2 mmol) je otopljena u benzilnom alkoholu (28,3 mL, 273 mmol). Nakon 15 min miješanja, u otopinu je polako dokapavan borov trifluorid dietil eterat (7 mL, 56 mmol). Reakcijska smjesa je miješana preko noći na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi. U bistru žućkastu otopinu dodan je THF (85 mL) i polako dokapavan TEA (7,6 mL, 54,5 mmol), pri čemu je došlo do stvaranja veće količine bijelog taloga. Reakcijska smjesa je uparena na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak do volumena od oko 30 mL (to je neizreagirani BnOH koji se ne da upariti). U smjesu je dodan EtOAc-heksan 1:1 (50 mL) pri čemu talog prelazi iz želatinoznog u praškasti, pa je omogućeno filtriranje. Smjesa je profiltrirana, a talog ispran sa smjesom EtOAc-heksan 1:1 (3 $\times$ 10 mL). Sirovi produkt je preko noći osušen u evakuiranom eksikatoru nad SiO<sub>2</sub> i KOH. Produkt je pročišćen

prekristalizacijom iz EtOH-H<sub>2</sub>O 1:9 (50 mL). Dobiveno je 4,34 g (67 %) produkta **9** u obliku bijele krutine.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 7,25-7,21 (m, 5H, Ar), 4,98 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Bn), 3,94 (t, 1H, *J*=6,8 Hz, C-H), 2,51-2,47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,12-1,99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>).

#### 3.4.2. Sinteza Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH (**10**)

Zaštićena D-glutaminska kiselina **9** (997 mg, 4,2 mmol) otopljena je u THF-u (30 mL) i dobivena otopina je ohlađena na ledenoj kupelji. U takvu otopinu dodan je TEA (1,12 mL, 8 mmol) u atmosferi argona. Zatim je dodan Boc-L-Ala-OSu (1,15 g, 4 mmol). Miješanje je nastavljeno 30 min pri 0 °C, a zatim preko noći na sobnoj temperaturi. Mutna otopina je uparena do uljastog ostatka, dodan je EtOAc (50 mL) i otopina je prebačena u lijevak za odjeljivanje. Otopini je dodana HCl (60 mL, 0,1 M), a vodeni sloj ekstrahiran s EtOAc (2×10 mL). Spojeni organski ekstrakti isprani su zasićenom otopinom natrijeva klorida (2×30 mL) i sušeni nad bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nakon filtriranja, otapalo je upareno na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala DCM-MeOH 95:5. Dobiveno je 1,10 g (65 %) produkta **10** u obliku bijele krutine.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 7,36-7,30 (m, 5H, Ar), 5,10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4,58 (s, 1H, CH, Glu), 4,40-4,14 (m, 1H, CH, Ala), 2,55-2,38 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, Glu), 2,34-2,25 (m, 1H, CH<sub>2</sub>, Glu), 2,07-1,98 (m, 1H, CH<sub>2</sub>, Glu), 1,40 (s, 9H, Boc), 1,33 (d, 3H, *J*=5,4 Hz, CH<sub>3</sub>, Ala).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 173,6, 173,0 (3×CO), 156,1 (COOH), 135,8 (C, Ar), 128,7, 128,4 (CH, Ar), 80,8 (C,Boc), 66,7 (CH<sub>2</sub>, Bn), 51,9 (CH, Glu), 50,0 (CH, Ala), 30,4, 27,4 (2×CH<sub>2</sub>, Glu), 28,4 (Boc), 19,0 (CH<sub>3</sub>, Ala).

#### 3.4.3. Sinteza Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-NH<sub>2</sub> (**11**)

Boc<sub>2</sub>O (369 mg, 1,69 mmol) je vagan u tikvici. Peptid **10** (531 mg, 1,3 mmol) je otopljen u suhom dioksanu (10 mL) i dodan na Boc<sub>2</sub>O. Smjesa je ohlađena na ledenoj kupelji te joj je



dodan  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (134 mg, 1,69 mmol) i dokapana otopina piridina u suhom dioksanu (5 mL). Reakcijska smjesa je miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije, smjesa je uparena do uljastog ostatka. Dodan je EtOAc (35 mL), otopina je prebačena u lijevak za odjeljivanje i isprana zasićenom otopinom  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 10$  mL) i potom zasićenom otopinom NaCl (20 mL). Spojeni organski ekstrakti sušeni su na  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , profiltrirani i upareni na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Sirovi uljasti produkt prekrizaliziran je iz diklormetana (7 mL) i dokapavanjem heksana do blagog bijelog zamućenja. Dobiveno je 490 mg (92 %) produkta **11** u obliku bijele krutine.

IR(KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3394 (N-H), 3335 (N-H), 2981 (C-H), 1726 (C=O), 1687 (CONH), 1660 (C-H, Ar).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 7,36-7,32 (m, 5H, Ar), 5,12 (d, 2H,  $J=3,5\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ , Bn), 4,51-4,46 (m, 1H, CH, Glu), 4,10-4,03 (m, 1H, CH, Ala), 2,61-2,42 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ , Glu), 2,27-2,19 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , Glu), 2,06-1,97 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , Glu), 1,41 (s, 9H, Boc), 1,32 (d, 3H,  $J=7,1\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ , Ala).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 173,4, 173,3 (CO), 155,9 (COOH), 135,6 (C, Ar), 128,6, 128,3 (CH, Ar), 80,4 (C, Boc), 66,6 ( $\text{CH}_2$ , Bn), 52,3 (CH, Glu), 50,6 (CH, Ala), 30,6, 28,3 ( $2 \times \text{CH}_2$ , Glu), 26,8 ( $\text{CH}_3$ , Boc), 17,7 ( $\text{CH}_3$ , Ala).

#### 3.4.4. Sinteza L-Ala-D-Glu(OBn)-NH<sub>2</sub> (**12**)

Zaštićeni dipeptid Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-NH<sub>2</sub> **11** (171 mg, 0,42 mmol) otopljen je u suhom diklormetanu (4 mL) i zatim je dodana trifluoroctena kiselina (0,8 mL). Reakcijska smjesa je miješana 2 h pri sobnoj temperaturi na magnetskoj mješalici uz klor kalcijevu cjevčicu. Reakcija je praćena TLC-om u sustavu otapala kloroform / metanol, 5:1. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je uparena na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak do suha, a zatim su tragovi TFA uklonjeni uparavanjem s benzenom ( $3 \times 2$  mL). Dobiveno je 165 mg (92 %) produkta **12** u obliku TFA soli, koja je bez pročišćavanja upotrijebljena u sljedećem koraku.

$R_f=0,26$  (kloroform / metanol, 5:1).

### 3.4.5. Sinteza Boc-Gly-L-Ala-D-Glu(OBn)-NH<sub>2</sub> (**13**)

Boc-Gly-OH (90 mg, 0,51 mmol) otopljen je u suhom diklormetanu (5 mL). Reakcijska smjesa je ohlađena na 0 °C te joj je dodan HOBt (80 mg, 0,51 mmol) i BOP (270 mg, 0,61 mmol). Nakon 1 h miješanja pri 0 °C, u reakcijsku smjesu dokapan je dipeptid L-Ala-D-Glu(OBn)-NH<sub>2</sub> **12** (165 mg, 0,39 mmol) prethodno otopljen u suhom dioksanu (5 mL), a zatim i TEA (290 µL, 2 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 1 h pri 0 °C, a zatim još 48 h na sobnoj temperaturi. Reakcija je praćena TLC-om u sustavu otapala diklormetan / metanol, 10:1. Pri završetku reakcije reakcijska smjesa je uparena te joj je dodan etil-acetat (20 mL). Organski sloj je ekstrahiran klorovodičnom kiselinom (0,1 M, 10 mL) i otopinom natrijevog hidroksida (0,1 M, 10 mL). Nakon sušenja organskog ekstrakta na bezvodnom Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i filtriranja, otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala diklormetan / metanol, 10:1. Dobiveno je 115 mg (60 %) produkta **13** u obliku bijele krutine.

$R_f = 0,36$  (diklormetan / metanol, 10:1).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 7,37-7,31 (m, 5H, Ar), 5,10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, Bn), 4,56-4,44 (m, 2H, 2×C\*H), 3,87-3,73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, Gly), 2,56-2,14 (m, 4H, 2×CH<sub>2</sub>, *iso*Gln), 1,42 (s, 9H, Boc), 1,34 (d, 3H,  $J=7,0$  Hz, CH<sub>3</sub>, Ala).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 174,0, 173,4, 173,1, 170,2 (4×CO), 156,4 (CONH<sub>2</sub>), 135,7 (C,Ar), 128,7, 128,5, 128,4 (CH, Ar), 80,5 (C,Boc), 66,8 (CH<sub>2</sub>, Bn), 52,7 (CH, Glu), 49,3 (CH, Ala), 44,3 (CH<sub>2</sub>, Gly), 30,7, 27,0 (2×CH<sub>2</sub>, Glu), 28,4 (CH<sub>3</sub>, Boc), 18,2 (CH<sub>3</sub>, Ala).

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Uvod

Poznato je da su *Quillaja* saponini te desmuramil-dipeptidi dvije klase spojeva koje zasebno posjeduju značajnu imunoadjuvantsku aktivnost. Dizajn ciljne molekule osmišljen je upravo na toj činjenici, jer je očekivan porast imunoadjuvantske aktivnosti nakon konjugacije navedenih dviju struktura. Takve dvije podjedinice potrebno je povezati odgovarajućom poveznicom. U sklopu ovog istraživanja kao poveznica je odabrana D-galakturonska kiselina, strukturni analog D-fukoze – prvog šećera u lancu povezan s triterpenskim dijelom u strukturi molekule QS-21.

Sinteza ciljne molekule planirana je iz četiriju osnovnih prekursora – triterpenske karboksilne kiseline dostupne hidrolizom iz komercijalno dostupnog ekstrakta kore drveta *Quillaja saponaria* (QuilA®), desmuramil-dipeptida čija je relativno jednostavna sinteza poznata od ranije,<sup>37</sup> te D-galakturonske kiseline i glicina kao poveznice između ova dva farmakofora.

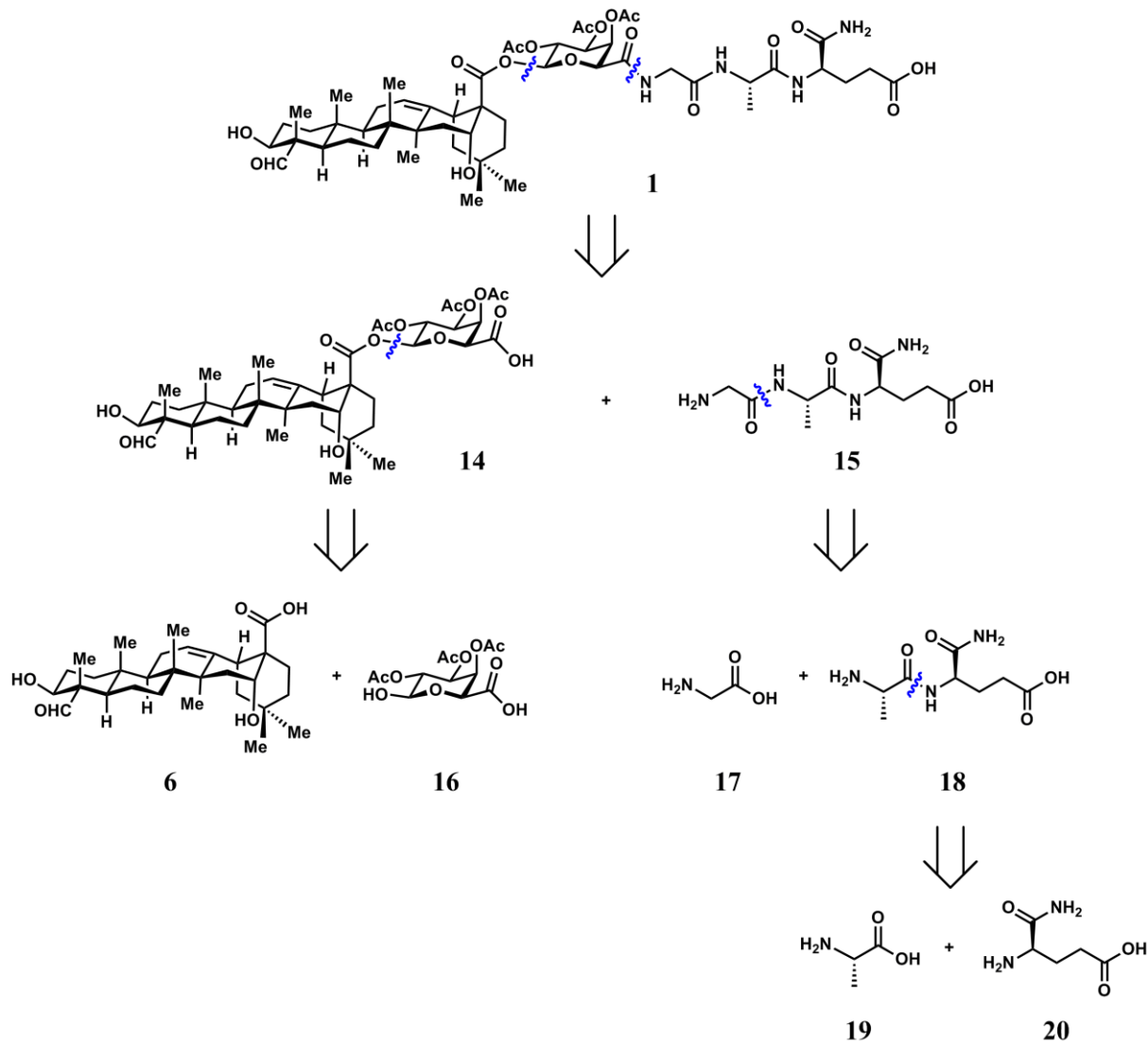
Saharidni prekursor pripremljen je iz D-galakturonske kiseline koja je u prvom koraku zaštićena acetatnom zaštitnom skupinom (2), a zatim i alilnom zaštitnom skupinom na karboksilnoj skupini, spoj 3. Idući korak je selektivno uklanjanje acetatne zaštitne skupine na anomernom ugljikovom atomu, spoj 4, i konačno priprava imidata 5.

Triterpenski prekursor pripremljen je izolacijom iz ekstrakta kore drveta *Quillaja saponaria*. U kiselim uvjetima izolirana je *Quillaja* kiselina 6, zatim je karboksilna skupina zaštićena alilnom zaštitnom skupinom (7), a preostale dvije hidroksilne skupine benzilnom zaštitnom skupinom (8).

U prvom koraku pripreve peptidnog prekursora, karboksilna skupina na bočnom ogranku D-glutaminske kiseline zaštićena je benzilnom zaštitnom skupinom (9), zatim slijedi kondenzacija sa zaštićenim i aktiviranim alaninom pri čemu je dobiven spoj 10. Peptid 10 preveden je u amin 11. Uklanjanjem Boc zaštitne skupine peptidu 11 nastaje spoj 12, koji u kondenzaciji s glicinom daje konačan peptid 13.

## 4.2. Retrosintetska analiza

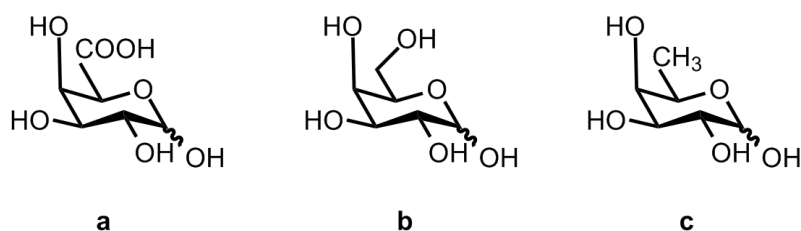
Retrosintetsko razmatranje ciljne molekule, konjugata *Quillaja* saponina i desmuramil-dipeptida **1**, rezultira konvergentnim pristupom sintezi te dovodi do četiri logična osnovna sintona (slika 16). Diskonekcija amidne veze u prvom koraku rezultira nastankom dva sintona: konjugata triterpena i D-galakturonske kiseline **14** te tripeptida **15**. Daljnja diskonekcija C-O esterske veze konjugata triterpena i šećera **14** rezultira triterpenskom kiselinom **6** i tri-acetiliranom D-galakturonskom kiselinom **16**. Diskonekcija amidne veze tripeptida **15** vodi do glicina **17** i desmuramil-dipeptida, L-Ala-D-*iso*Gln (**18**). Konačna diskonekcija amidne veze dipeptida **18** vodi do dviju komercijalno dostupnih aminokiselina, L-alanina **19** te D-izoglutamina **20**.



Slika16. Retrosintetska analiza ciljne molekule 1

### 4.3. Sinteza saharidnog prekursora

D-Fukoza, prvi šećer u saharidnom lancu glikozidnom vezom povezanim s triterpenskim dijelom saponina kvilaje (QS-21 analog), izuzetno je važna za smjer i intenzitet imunološkog odgovora. Međutim, pokazano je da ju je moguće zamijeniti konfiguracijski jednakom šećernom jedinicom, kao što je galaktoza.<sup>13</sup> Dodatna OH skupina koju na položaju 6 posjeduje galaktoza (za razliku od fukoze) omogućuje derivatizaciju, dok su ostale OH skupine acetilirane jer se, kako je ranije opisano, pokazalo da to bitno utječe na željeni smjer imunološkog odgovora. Derivatizacija je još jednostavnija ukoliko je ugljikov atom položaja 6 dio karboksilne skupine, te se primjerice može lako prevesti u amid. Iz tog razloga je kao poveznica odabrana D-galakturonska kiselina, koja je konfiguracijski analog D-fukoze, s karboksilnom skupinom na položaju 6 (slika 17).



**Slika 17.** Strukturne formule D-galakturonske kiseline (a), D-galaktoze (b) i D-fukoze (c)

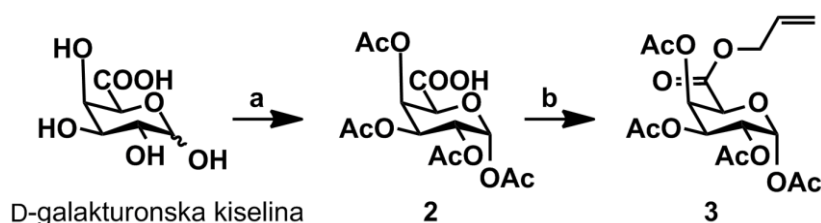
Kako bi se postigla regioselektivnost, a sintetski put usmjerio u željenom smjeru, početni spoj, D-galakturonsku kiselinu, u prvoj je reakciji potrebno zaštititi određenim zaštitnim skupinama. Za tu svrhu odabrana je acetatna skupina  $-C(O)CH_3$  (Ac). Acetatni esteri kroz sintezu imaju ulogu zaštitnih skupina, da bi na kraju ipak bili zadržani, jer je poznato da je aciliranost šećernog dijela (fukoze) od presudne važnosti za smjer imunološkog odgovora kod derivata *Quillaja* saponina.<sup>34</sup> U reakciji D-galakturonske kiseline s acetanhidridom ( $Ac_2O$ ) uz 70 %-tnu perklornu kiselinu nastaje tetraacetilirani produkt **2** (slika 18, a). Tijekom reakcije nastaje i potpuno zaštićeni šećer (penta-acetilirani), no zbog nestabilnosti miješanog anhidrida nastalog karboksilnom skupinom galakturonske kiseline ( $-COOH$ ), on brzo hidrolizira u karboksilnu kiselinu. Acetiliranje D-galakturonske kiseline pokušano je uz nekoliko različitih reagensa i modifikacija opisanih u literaturi, no ti pokušaji su većim dijelom bili bezuspješni (tablica 3). U prva tri slučaja nastaje kompleksna smjesa

spojeva koja nakon pročišćavanja kromatografijom na stupcu silikagela daje vrlo mala iskorištenja na željenom produktu.

**Tablica 3.** Isprobani uvjeti acetiliranja D-galakturonske kiseline

Reagensi	Reakcijski uvjeti	Uspješnost
Ac <sub>2</sub> O, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (konc.)	60 °C, 1 h	-
Ac <sub>2</sub> O, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (konc.)	25 °C, 16 h	-
Ac <sub>2</sub> O, I <sub>2</sub>	0 °C - 25 °C, 3 h	-
Ac <sub>2</sub> O, HClO <sub>4</sub>	0 °C - 25 °C, 3 h	+

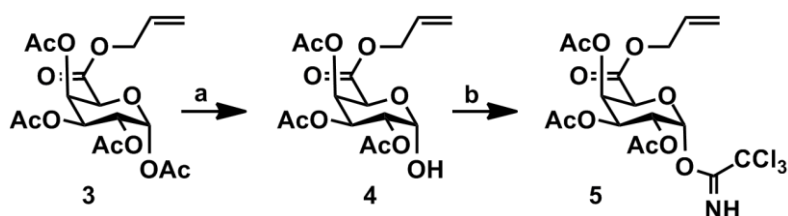
Da bi se osigurala inertnost karboksilne skupine, također je potrebno provesti zaštićivanje iste. U ovom koraku (slika 18, b) karboksilna kiselina zaštićena je alilnom esterskom zaštitnom skupinom. Alilna zaštita na tetra-acetiliranu D-galakturonsku kiselinu **2** uvedena je reakcijom uz oksalil-klorid i alilni alkohol (slika 18, b) dajući potpuno zaštićen saharid **3**.



**Slika 18.** Priprava šećerne komponente, prvi dio. (a) 1.) Ac<sub>2</sub>O/HClO<sub>4</sub>, 2.) MeOH, 98%;  
(b) AlOH, (COCl)<sub>2</sub> / DMF

Kako će u budućim istraživanjima biti potrebno provesti kondenzaciju šećerne i triterpenske komponente, zaštitna skupina karboksilne kiseline na šećernom prekursoru mora biti selektivno uklonjiva. Na taj način nastati će produkt sa slobodnom karboksilnom skupinom koja će biti u slobodna za daljnje derivatizacije, tj. kondenzacije. Alilnu zaštitu moguće je selektivno ukloniti uz paladij kao katalizator. Reagens u takvoj reakciji je kompleks tetrakis(trifenilfosfin)paladij(0), [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]. Acetatni esteri prisutni na šećernoj komponenti stabilni su u uvjetima uklanjanja alilne zaštitne skupine pa je upravo zato odabrana alilna zaštita. U sklopu ovog istraživanja ispitana je takva reakcija na spoju **3** uz uspješan rezultat koji je dokazan spektroskopijom NMR.

Kako bi se u budućim istraživanjima provela glikozilacija šećerne i peptidne komponente potrebno je šećernu komponentu aktivirati za reakciju glikozilacije. Prije toga, potrebno je selektivno ukloniti acetatnu zaštitu na anomernom ugljikovom atomu šećerne komponente. U reakciji potpuno zaštićenog šećera **3** s morfolinom u THF-u (slika 19, a) selektivno je uklonjena anomerna acetatna zaštitna skupina što rezultira nastankom spoja **4**. Navedenu reakciju potrebno je provoditi pri sobnoj temperaturi uz maksimalno trajanje od 2 h da bi se spriječilo nastajanje nusprodukata. Naime, ukoliko se reakcija provodi više od 2 h, dolazi do uklanjanja preostalih acetatnih zaštitnih skupina pa tako reakcija više nije selektivna i rezultira smjesom iz koje je teško pročistiti željeni produkt.



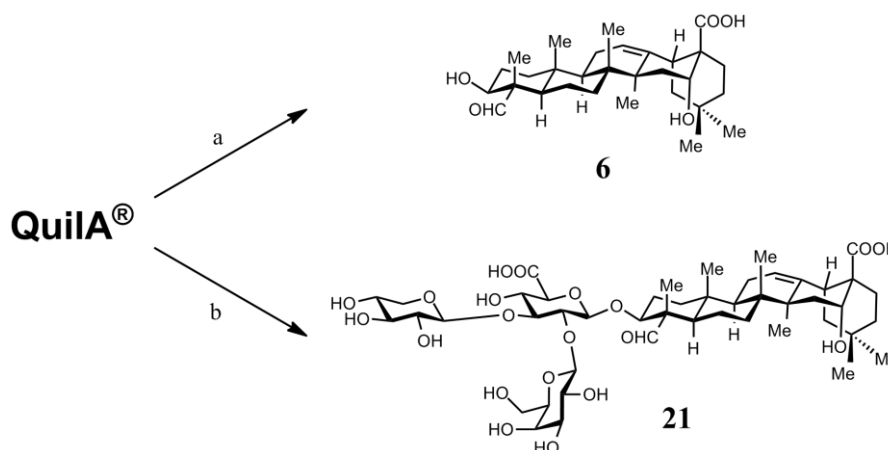
**Slika 19.** Priprava šećerne komponente, drugi dio. (a) 1.) morfolin / THF; (b)  $\text{CCl}_3\text{CN}$ ,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  /DCM.

Nakon selektivnog uklanjanja acetatne zaštitne skupine na anomernom ugljikovom atomu, slijedi zadnji korak u pripravi šećernog prekursora (slika 19, b), a to je sinteza imidata **5**. Reakcijom slobodne alkoholne skupine spoja **4** s trikloroacetimidom ( $\text{CCl}_3\text{CN}$ ) i cezijevim karbonatom u ulozi jake baze, nastaje imidat **5** pretežno u očekivanoj  $\alpha$ -konfiguraciji na anomernom ugljikovom atomu. Iz NMR spektra određen je omjer anomera te on iznosi  $\alpha : \beta = 1 : 0,05$ . Trikloroacetimidatna metoda je poznata kao najpouzdanija metoda glikozilacije te je zbog toga odabrana za reakciju u kojoj će se povezati karboksilna skupina *Quillaja* kiseline sa šećernim dijelom iz imidata. Očekuje se da će glavni (a možda i jedini) produkt biti sa željenom  $\beta$ -konfiguracijom na anomernom ugljikovom atomu šećerne jedinice, jer je na položaju 2-šećera vezana participirajuća acetilna skupina, koja utječe na stereokemijski ishod reakcije.



#### 4.4. Triterpenski prekursor

Sinteza analoga QS-21 ili totalna sinteza ostalih konstituenata ekstrakta kore *Quillaja* uvelike je pojednostavljena time što različiti *Quillaja* saponini posjeduju istu strukturnu jedinicu. Tako je središnji dio, triterpen, isti za cijelu ovu skupinu saponina, što uvelike povećava njegovu dostupnost. Naime, hidrolizom komercijalno dostupnog djelomično pročišćenog ekstrakta (QuilA®), svi saponini koji čine smjesu dati će isti produkt – triterpensku karboksilnu kiselinu, koju posljedično možemo smatrati pristupačnim polaznim materijalom. Ovisno o tome provodi li se hidroliza u lužnatim, odnosno kiselim uvjetima, moguće je izolirati triterpenski dio sa ili bez razgranatog trisaharida (slika 20).<sup>35</sup>

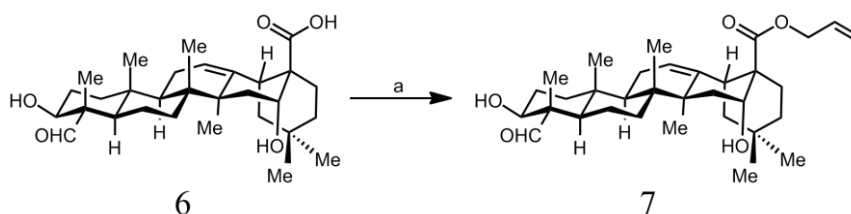


**Slika 20.** Priprava triterpenskih prekursora **6** i **21**.

- (a) 1.) 5M HCl, refluks, 2.) Soxhlet ekstrakcija, 3.) Kromatografsko pročišćavanje;  
 (b) 1.) KOH, H<sub>2</sub>O/EtOH, 80 °C, 2.) Kromatografsko pročišćavanje

Iz literaturnih podataka poznato je da razgranati trisaharid nema značajnog utjecaja na imunostimulatornu aktivnost (slika 7)<sup>16</sup> pa je upravo iz toga razloga odabrana izolacija, tj. hidroliza u kiselim uvjetima, pri čemu je dobiven terpen bez razgranatog trisaharida **6**. Na ovaj način triterpenska struktura je uvelike pojednostavljena, što pojednostavljuje i sintezu i korake pročišćavanja. Hidroliza komercijalno dostupnog ekstrakta provedena je s koncentriranom HCl uz refluks. Idući korak je kontinuirana ekstrakcija po Soxhletu u trajanju od 24 h. Nastali produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela te je dobiven čisti produkt u 10%-tnom iskorištenju (računato prema masi), što je u skladu s literaturnim podacima.<sup>35</sup>

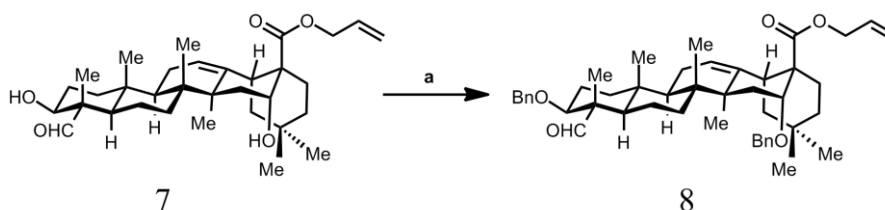
Izolirana triterpenska *Quillaja* kiselina **6** sadrži nekoliko funkcijskih skupina koje je potrebno zaštititi kako bi se uspješno proveli idući koraci u sintezi. Karboksilna skupina na ugljikovom atomu C28 u reakciji s alil bromidom, uz kalijev hidrogenkarbonat kao bazu, uspješno je zaštićena alilnom zaštitom dajući ester **7** (slika 21.).



**Slika 21.** Zaštićivanje karboksilne skupine alilnom zaštitom.

(a) Alil-Br,  $\text{KHCO}_3$ /DMF

Preostale dvije hidroksilne skupine na ugljikovim atomima C3 i C16 u reakciji s BnBr i NaH u DMF-u, zaštićene su benzilnim skupinama dajući potpuno zaštićeni triterpen **8** (slika 22.).



**Slika 22.** Zaštićivanje hidroksilnih skupina benzilnom zaštitom.

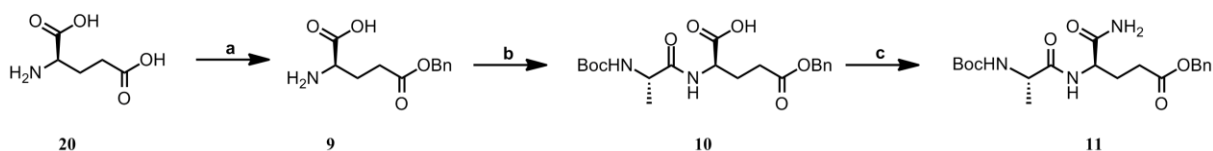
(a) BnBr, NaH / DMF

Za zaštitu karboksilne skupine na C28 triterpena odabrana je alilna zaštitna skupina. Kako će se kondenzacija triterpenskog i saharidnog prekursora u budućim istraživanjima izvršiti preko upravo te karboksilne skupine, potrebno je biti u mogućnosti selektivno ukloniti alilnu zaštitnu skupinu bez narušavanja ostatka strukture triterpena. Stoga je za zaštitu alkoholnih skupina triterpenskog dijela odabranazaštitna skupina ortogonalna s alilom. Alilna zaštitna skupina može se selektivno ukloniti paladijem kataliziranom reakcijom, uz reagens  $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ , dok benzilne zaštitne skupine u tim uvjetima ostaju nepromijenjene.<sup>38</sup> Benzilne zaštitne skupine će na kraju biti uklonjene hidrogeniranjem uz paladij kao katalizator, također bez narušavanja ostatka strukture. U literaturi<sup>35</sup> je opisano korištenje sililnih zaštitnih skupina,

ali takav pristup zahtijeva dva koraka pri konačnoj (globalnoj) deprotekciji ciljne molekule. Benzilne zaštitne skupine korištene su i u pripravi peptidnog prekursora pa će se globalna deprotekcija izvršiti u jednom koraku. Nadalje, sililne skupine uklanjaju se uz TFA-H<sub>2</sub>O, uvjetima pri kojima potencijalno može doći do neželjenih reakcija, npr. promjene konfiguracije anomernog centra na saharidu ili hidrolize estera. Triterpenski dio molekule također sadrži dvostruku vezu, ali ne očekuje se da će doći do njezinog hidrogeniranja, izomerizacije ili bilo koje druge nusreakcije. Naime, poznato je da je ova veza izuzetno nereaktivna, ostaje nepromijenjena hidrogeniranjem uz Pd-katalizator ili u uvjetima izomerizacije alilne skupine upotrebom Ir(I) katalizatora.<sup>2,34</sup>

#### 4.5. Sinteza peptidnog prekursora

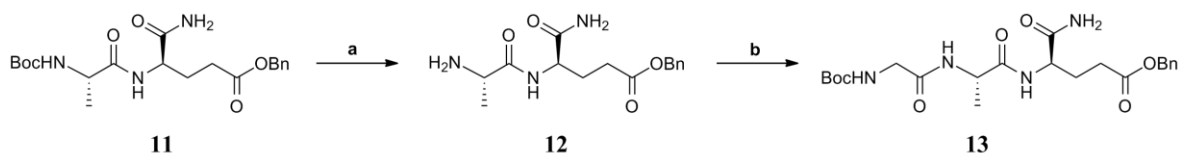
Zaštićeni tripeptid **13** pripremljen je uobičajenim postupcima u peptidnoj kemiji polazeći iz tri aminokiseline, a to su D-glutaminska kiselina (**20**), L-alanin (**19**) i glicin (**17**). Na bočnom ogranku D-glutaminske kiseline nalazi se karboksilna skupina koju je u prvom koraku potrebno selektivno zaštititi u benzilni ester **9** kako ne bi smetala u daljnjim reakcijama sinteze peptida. Reakcija zaštićivanja karboksilne skupine D-glutaminske kiseline (slika 23, a) provedena je uz benzilni alkohol te borov trifluorid dietil eterat (BF<sub>3</sub>×OEt<sub>2</sub>). Iduća reakcija je kondenzacija tako pripravljenog  $\gamma$ -estera **9** s L-alaninom (slika 23, b). Alanin je u ovoj reakciji korišten u obliku sukcinimidnog estera, Boc-L-Ala-OSu, odnosno alanin zaštićen Boc zaštitnom skupinom na amino kraju te aktiviran aktivirajućom skupinom OSu (sukcinimidni ester) na  $\alpha$ -karboksilnoj skupini. Nastali dipeptid Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH (**10**) pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela i dobiven u dobrom iskorištenju od 65 %. U strukturi desmuramil-dipeptida,  $\alpha$ -karboksilna skupina prevedena je u amidnu skupinu pa je tako u reakciji (slika 23, c) Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH s NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, Boc<sub>2</sub>O i piridinom dobiven dipeptid Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-NH<sub>2</sub> (**11**). Nakon prekrizalizacije produkt **11** (Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-NH<sub>2</sub>) dobiven je u izvrsnom iskorištenju (95 %) i u visokoj čistoći.



Slika 23. Sinteza peptidnog prekursora, prvi dio

(a) BnOH,  $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$ , TEA ; (b) Boc-L-Ala-OSu, TEA / THF ;(c)  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , py / dioksan

Da bi se pripremljeni dipeptid mogao kondenzirati s D-glicinom u idućoj reakciji, prethodno je potrebno ukloniti Boc zaštitnu skupinu s amino kraja L-alanina. Postupak uklanjanja Boc zaštite (slika 24, a) proveden je uz trifluoroctenu kiselinu (TFA). Nastali dipeptid **12** sa slobodnim amino krajem u idućoj reakciji (slika 24, b) reagira s kupovnim Boc-Gly-OH te tako nastaje ciljani tripeptid Boc-Gly-L-Ala-D-Glu(OBn)-NH<sub>2</sub> (**13**) u dobrom iskorištenju od 60 %. U toj reakciji korišten je BOP u svrhu kondenzacijskog reagensa te HOBt kao aktivirajući reagens. Kondenzacija je isprobana s još dva kondenzacijska reagensa; DCC i EDC, no u tim je slučajevima produkt dobiven u malim iskorištenjima (10-20 %) pa metoda nije bila zadovoljavajuća. Struktura dobivenog tripeptida potvrđena je <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektroskopijom.



Slika 24. Sinteza peptidnog prekursora, drugi dio

(a) TFA / DCM ; (b) Boc-Gly-OH, BOP, HOBt

Poznato je da je poveznica između šećernog dijela i desmuramil-dipeptida izuzetno važna za adjuvantsku aktivnost. U ovom slučaju kao poveznica odabran je glicin, koji nema kiralno središte i može stvoriti hidrolitički stabilne amidne veze s D-galakturonskom kiselinom s jedne strane i s desmuramil-dipeptidom s druge. Glicinska poveznica je strukturni analog glikolilne poveznice, za koju se pokazalo da djeluje povoljno na adjuvantska svojstva desmuramil-dipeptidnih derivata.<sup>36</sup>

Struktura desmuramil-dipeptida sadrži karboksilnu skupinu na kraju bočnog lanca D-glutamina, koja je pri fiziološkim uvjetima disocirana te nosi negativan naboj ( $pK_a$  ( $\gamma$ -COOH glutamina) = 4,25). Poznato je da negativni naboj u acilnom lancu kod derivata saponina *Quillaje* pojačava njihova imunostimulatorna svojstva,<sup>14</sup> pa je za očekivati da će to biti i slučaj kod derivata **1**. Također je poznato da lipofilni supstituenti vezani za N-kraj desmuramil-dipeptida pojačavaju njegovo imunostimulatorno djelovanje i znatno umanjuju njegovu toksičnost. Iz tih razloga očekivano je da će desmuramil-dipeptid u konjugaciji s nepolarnom triterpenskom podjedinicom pokazati pojačanu imunostimulatornu aktivnost.

## § 5. ZAKLJUČAK

Pripravljena su tri ključna prekursora za sintezu ciljanog spoja - potencijalnog imunoadjuvanta **1**.

1. Saharidni prekursor **5** pripremljen je u četiri koraka polazeći iz D-galakturonske kiseline, u ukupnom iskorištenju od 27 %.

a) Galakturonska kiselina u reakciji s acetanhidridom uz perklornu kiselinu zaštićena je acetatnim zaštitnim skupinama dajući 1,2,3,4-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D galaktopiranoznu kiselinu (**2**) u iskorištenju od 74 %.

b) Karboksilna skupina spoja **2** prevedena je u alilni ester u reakciji s oksalil-koridom/DMF-om, alilnim alkoholom i piridinom, uz nastajanje alilnog estera 1,2,3,4-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-galaktopiranozne kiseline (**3**) u iskorištenju od 81 %.

c) Potpuno zaštićenom saharidu **3**, uz morfolin i THF, selektivno je uklonjena acetatna zaštitna skupina anomernog centra uz nastajanje alilnog estera 2,3,4-tri-*O*-acetil-D-galaktopiranozne kiseline (**4**) u iskorištenju od 70 %.

d) Aktivacija anomernog centra izvršena je prevođenjem spoja **4** u imidat **5** uz iskorištenje od 58 %.

2. Triterpenski prekursor **8** pripremljen je u tri koraka iz komercijalno dostupnog ekstrakta kore drveta *Quillaja saponaria* (QuilA®) u ukupnom iskorištenju od 6 %.

a) Hidrolizom komercijalno dostupnog ekstrakta QuilA® u kiselim uvjetima, zatim kontinuiranom ekstrakcijom te kromatografskim pročišćavanjem, izolirana je *Quillaja* kiselina **6** u iskorištenju od 12,7 %.

b) Karboksilna skupina spoja **6** zaštićena je alilnom esterskom zaštitom u reakciji s alil-bromidom i kalijevim hidrogenkarbonatom u ulozi baze, uz nastanak alilnog estera *Quillaja* kiseline **7** u iskorištenju od 63 %.

c) Preostale dvije alkoholne skupine spoja **7** prevedene su u benzilne etere pri čemu je dobiven potpuno zaštićeni triterpen alilni ester di-*O*-benzilirane *Quillaja* kiseline **8** u iskorištenju od 70 %.

3. Peptidni prekursor **13** pripremljen je u pet koraka iz D-glutaminske kiseline, u ukupnom iskorištenju od 30 %.

- a) Selektivnim zaštićivanjem karboksilne skupine D-glutaminske kiseline pripremljen je H-D-Glu(OBn)-OH (**9**) u iskorištenju od 67 %.
- b) Kondenzacijskom reakcijom spoja **9** i aktiviranog/zaštićenog alanina (Boc-L-Ala-OSu) uz trietilamin dobiven je dipeptid Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH (**10**) u iskorištenju od 65 %.
- c) Karboksilna skupina spoja **10** prevedena je u amid, pri čemu je dobiven desmuramil-dipeptid, Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-NH<sub>2</sub> (**11**) u iskorištenju od 92 %.
- d) Uklanjanjem Boc zaštitne skupine dipeptida **11** i kondenzacijom s Boc-Gly-OH uz BOP i HOBt, dobiven je tripeptid Boc-Gly- L-Ala-D-Glu(OBn)-NH<sub>2</sub> (**13**) u iskorištenju od 60 %.

U okviru ovog diplomskog rada razrađeni su sintetski postupci priprave prekursora **5**, **8** i **13** potrebnih za sintezu ciljne molekule **1**. Primjena ovih prekursora može se vrlo lako i proširiti, jer oni predstavljaju vrlo korisne gradivne blokove za sintezu niza različitih derivata *Quillaja* saponina i/ili desmuramil-dipeptida.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AB - AB kvartet

All - alil

Ar - aril

Bn - benzil

BOP - benzotriazol-1-iloksitris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat

CBz- benziloksikarbonil

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

d - dublet

dd - dublet dubleta

DCC - dicikloheksilkarbodiimid

DCM - diklormetan

DMAP – 4-dimetilaminopiridin

DMF- dimetilformamid

EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid

EtOAc - etil-acetat

Fm - fluorenilmetil

Fmoc - fluorenilmetoksikarbonil

HMPA - heksametilfosforamid

HOAc – octena kiselina

IR - infracrveno

m - multiplet

MDP - muramil-dipeptid

NMR - nuklearna magnetska rezonancija

ppm - dijelovi na milijun

py - piridin

QA - *Quillaja* kiselina

QS - *Quillaja* saponin

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

s - singlet



SAR - odnos strukture i reaktivnosti (engl. *Structure-Activity Relationship*)

SPE - ekstrakcija na čvrstoj fazi

t - triplet

TEA - trietilamin

TFA – trifluoroctena kiseina

THF – tetrahidrofuran

TLC - tankoslojna kromatografija

TMS - tetrametilsilan

Trt - trifenilmetil

## § 7. LITERATURNI IZVORI

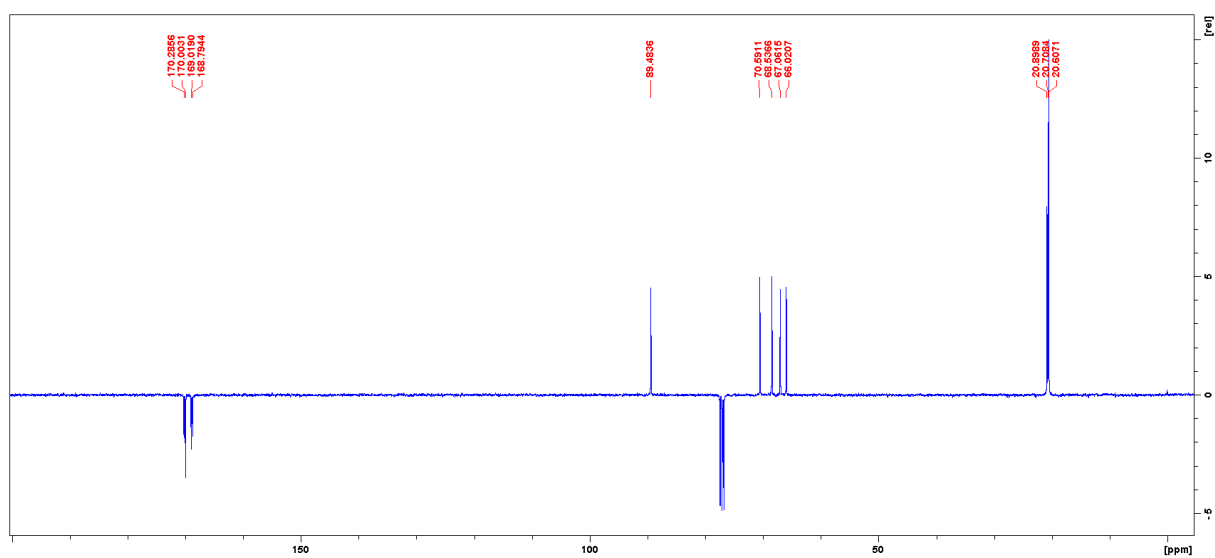
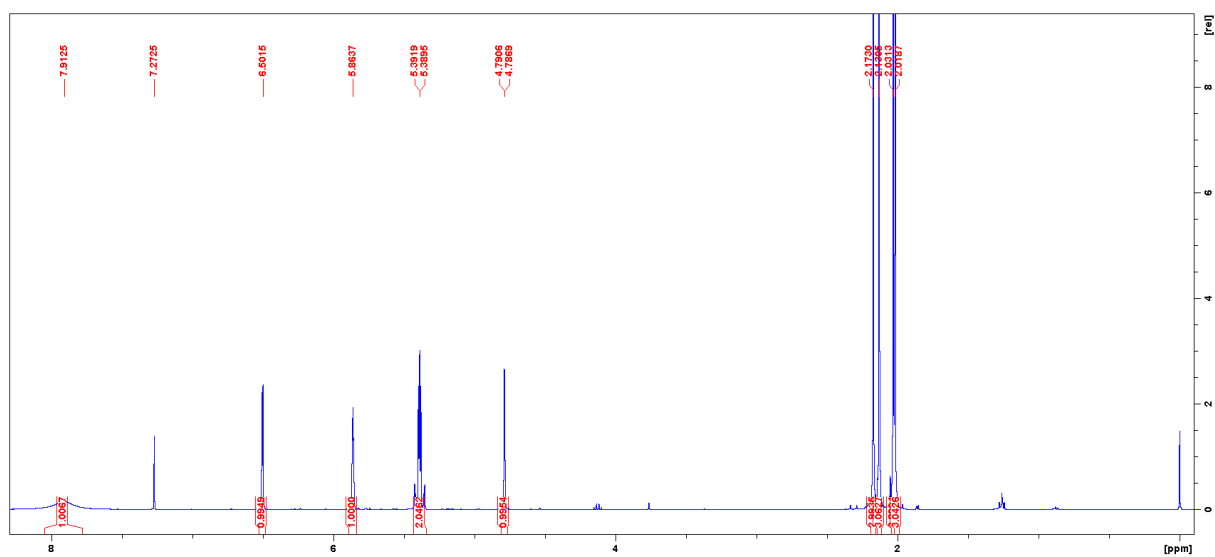
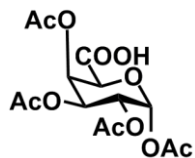
1. A. Di Pasquale, S. Preiss, F. Tavares Da Silva, N. Garçon, *Vaccines* **3** (2015) 320–343.
2. P. Wang, Đ. Škalamera, X. Sui, P. Zhang, S. M. Michalek, *J. Med. Chem.* **62** (2019) 1669–1676.
3. R. Ribić, M. Paurević, S. Tomić, *Croat. Chem. Acta* **92** (2019) 153–161.
4. (a) D. Feng, A. S. Shaikh, F. Wang, *ACS Chem. Biol.* **11**(2016) 850-863; (b) L. Cipolla, F. Peri, C. Airoidi, *Anti-Cancer Agent. Me.* **8** (2008) 92-121; (c) T. Buskas, P. Thompson, G.-J. Boons, *Chem. Commun.* (2009) 5335-5349.
- 5.(a) L. A. Brito, D. T. O'Hagan, *J. Control. Release* **190** (2014) 563–579; (b) R. Brunner, E. Jensen-Jarolim, I. Pali-Schöll, *Immunol. Lett.* **128** (2010) 29–35; (c) A. M. Didierlaurent, B. Laupèze, B.; A. Di Pasquale, N. Hergli, C. Collignon, N. Garçon, *Expert Rev. Vaccines* **16** (2017) 55–63.
6. K. Hostettmann, A. Marston, *Saponins*, Cambridge University, Cambridge, 1995, str. 10-40.
7. D. C. van Setten, G. van de Werken (ur.), *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 404, Springer, Boston, 1996, str. 185-193.
8. J. B. Campbell, Y. A. Peerbaye, *Res. Immunol.* **143** (1992), 526-530.
9. (a) G. Ragupathi, P. Damani, K. Deng, M. M. Adams, J. Hang, C. George, P. O. Livingston, D. Y. Gin, *Vaccine* **28** (2010)4260-4267; (b) C. R. Kensil, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **13** (1996) 1-55.
10. C. R. Kensil, J.-Y. Wu, S. Soltysik, iz knjige *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, ur. M. F. Powell, Mark. J. Newman, Plenum Press, New York, 1995.
11. D. J. Marciani, *Int. Immunopharmacol.* **29** (2015) 908-913.
12. A. Fernández-Tejada, D. S. Tan, D. Y. Gin, *Acc. Chem. Res.* **49** (2016) 1741-1756.
13. M. M. Adams, P. Damani, N. R. Perl, A. Won, F. Hong, P. O. Livingston, G. Ragupathi, D. Y. Gin, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 1939–1945.
- 14.E. K. Chea, A. Fernández-Tejada, P. Damani, M. M. Adams, J. R. Gardner, P. O. Livingston, G. Ragupathi, D. Y. Gin, *J. Am. Chem. Soc.* **134** (2012) 13448–13457.

- 15.W. E. Walkowicz, A. Fernández-Tejada, C. George, F. Corzana, J. Jiménez-Barbero, G. Ragupathi, D. S. Tan, D. Y. Gin, *Chem. Sci.* **7** (2016) 2371–2380.
- 16.A. Fernández-Tejada, E. K. Chea, C. George, N. Pillarsetty, J. R. Gardner, P. O. Livingston, G. Ragupathi, J. S. Lewis, D. S. Tan, D. Y. Gin, *Nat. Chem.* **6** (2014) 635–643.
- 17.P. Wang, Y. J. Kim, M. Navarro-Villalobos, B. D. Rohde, D. Y. Gin, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 3256-3257.
- 18.N. T. Nyberg, H. Baumann, L. Kenne, *Anal. Chem.* **75**(2003) 268-274.
- 19.G.B. Fields, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **26** (2001) 18.1.1-18.1.9.
- 20.R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **85** (1963) 2149–2154.
- 21.A. Isidro-Llobet, M. Alvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **109** (2009)2455–2504.
- 22.A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **111** (2011) 6557–6602.
23. G. Gawne, G. W. Kenner, R. C. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **91** (1969) 5670.
24. L. Szilágyi, P. Pristovšek, *Mini-Rev. Med. Chem* **7** (2007) 861-870.
25. P. Lefrancier, E. Lederer, *Pure & Appl. Chem.* **59** (1987) 449–454.
26. I. Azuma, H. Okumura, I. Saiki, M. Kiso, A. Hasegawa, Y. Tanio, Y. Yamamura, *Infect Immun.* **33** (1981) 834–839.
- 27.(a) R. Ribić, L. Habjanec, B. Vranešić, R. Frkanec, S. Tomić, *Chem. Biodiv.* **9** (2012) 777-788; (b)R. Ribić, L. Habjanec, R. Frkanec, B. Vranešić, S. Tomić, *Chem. Biodiv.* **9**(2012) 1373-1381.
28. N. E. Byars, *Infect. Immun.* **44** (1984) 344–350.
29. R. Ribić, S. Tomić, *Kem. Ind.* **62** (2013) 19-31.
30. G. M. Bahr, *J. Antimicrob. Chemother.* **51** (2003) 5–8.
- 31.M. R. El S. Aly, El S. H. El Ashry, *A.C.C.B.* **73** (2016) 117-224.
32. R. R. Schmidt, *A.C.C.B.* **50** (1994) 21-123.
33. A. I. Vogel, *Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th edition, Pearson, 1996.
- 34.P. Wang, Đ. Škalamera, X. Sui, P. Zhang, S. M. Michalek, *ACS Infect. Dis.* **5** (2019 ) 974-981.
- 35.A. Fernández-Tejada, W. E. Walkowicz, D. S. Tan, D. Y. Gin, *Methods Mol Biol.* **1494** (2017) 45–71.
- 36.R. Ribić, R. Stojković, L. Milković, M. Antica, M. Cigler, S. Tomić. Design, *Beilstein J. Org. Chem.* **15** (2019) 1805–1814.

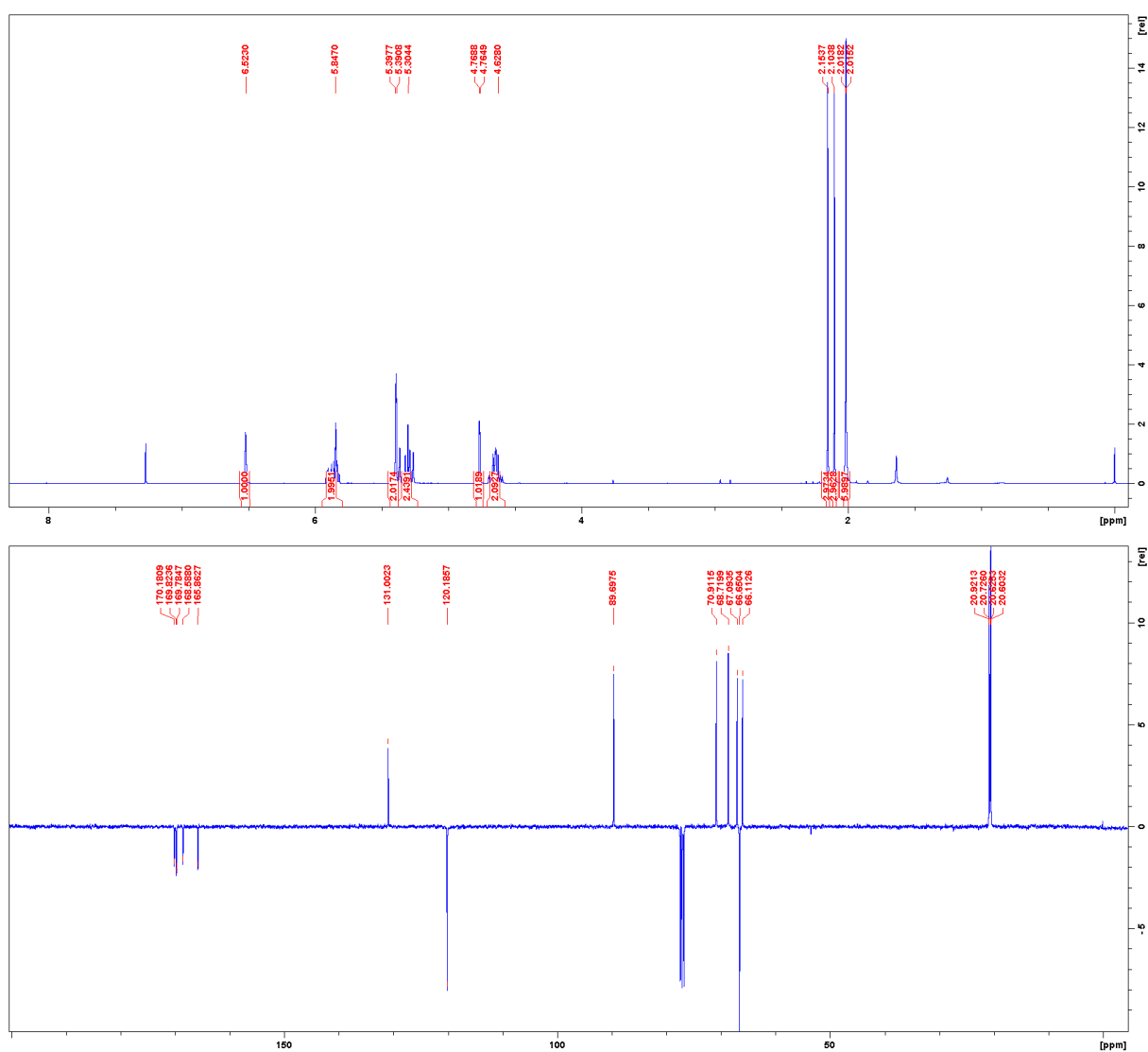
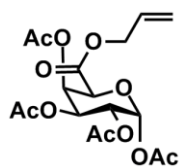
- 
37. A. Ožegović, (2019) *Razvoj sintetskih metoda za pripravu triazolnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida*, Diplomski rad, Zagreb, Prirodoslovno-matematički fakultet.
38. P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Green's protective groups in organic chemistry*, 4th edition, Wiley & Sons, 2006.

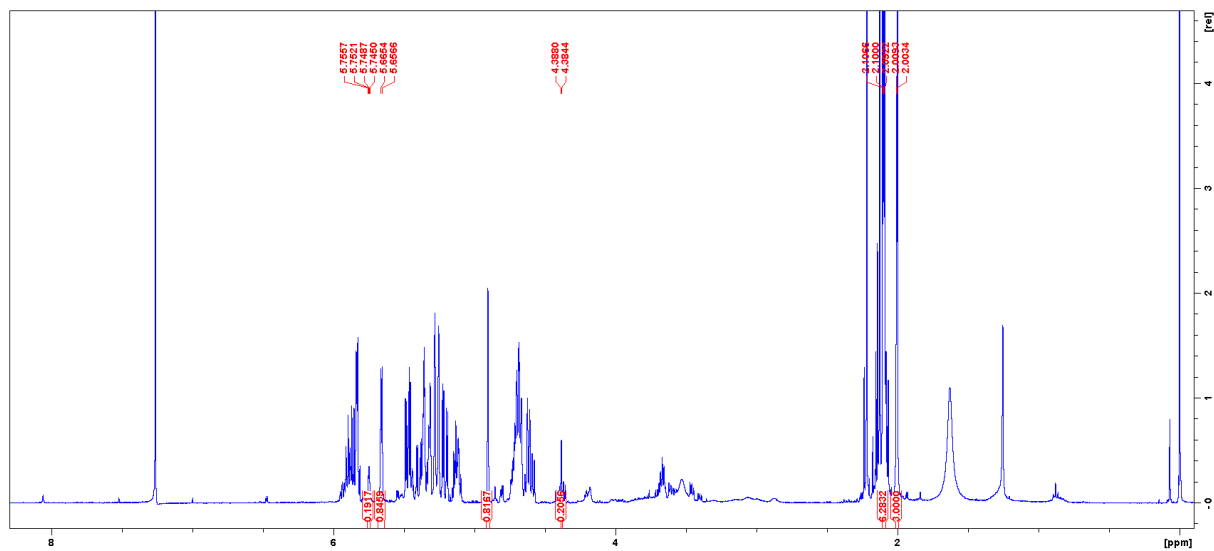
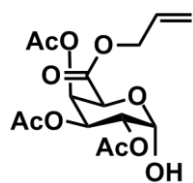
## § 8. DODATAK

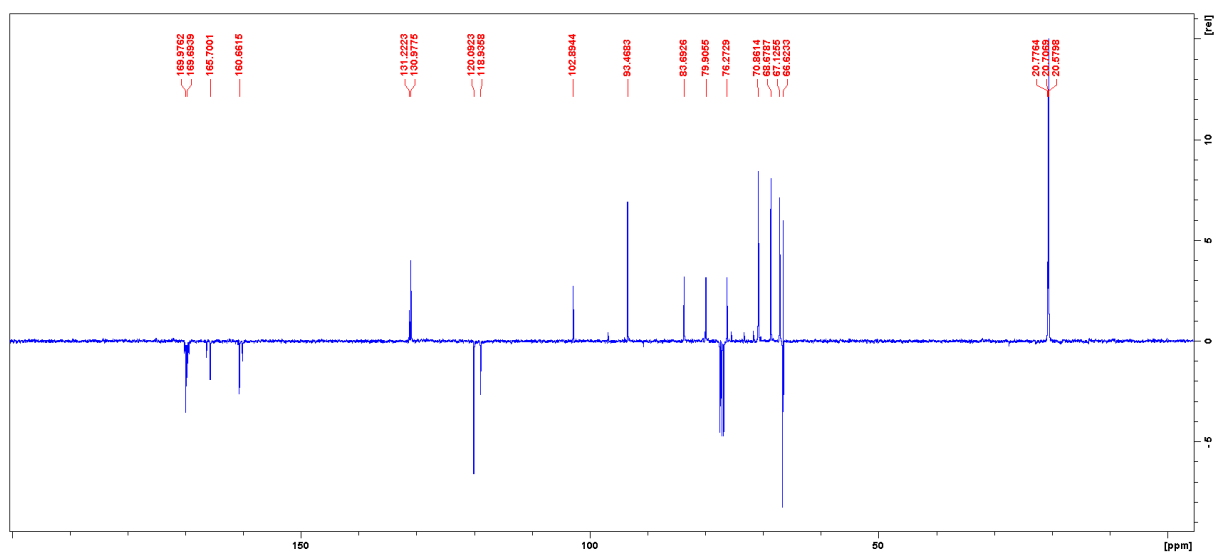
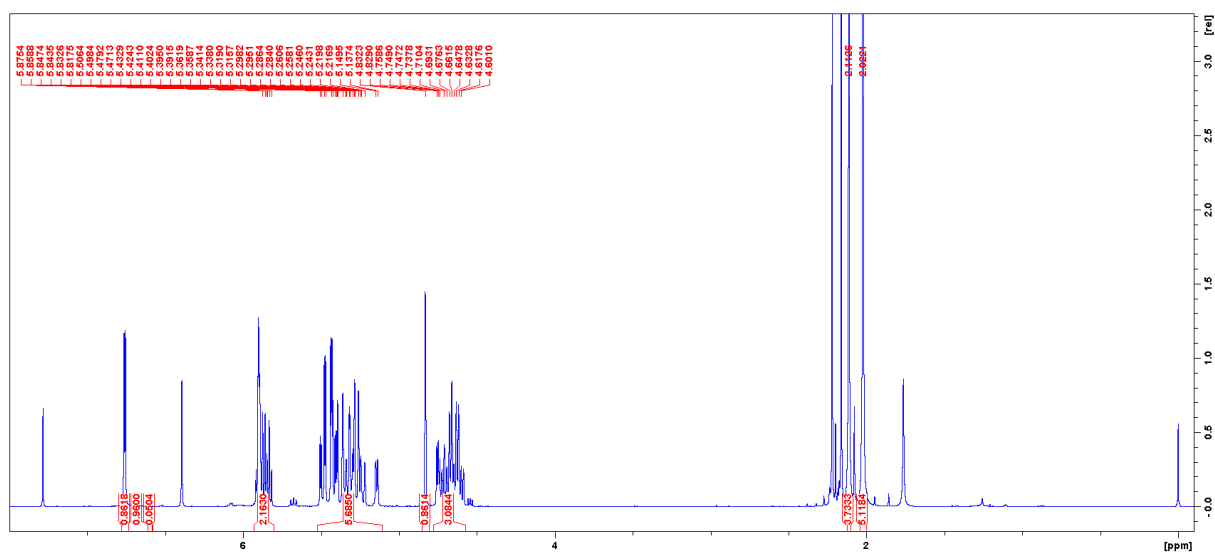
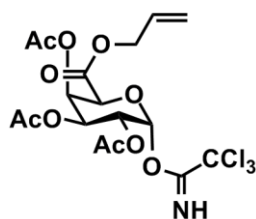
Dodatak 1.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) i  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) NMR spoja **2**



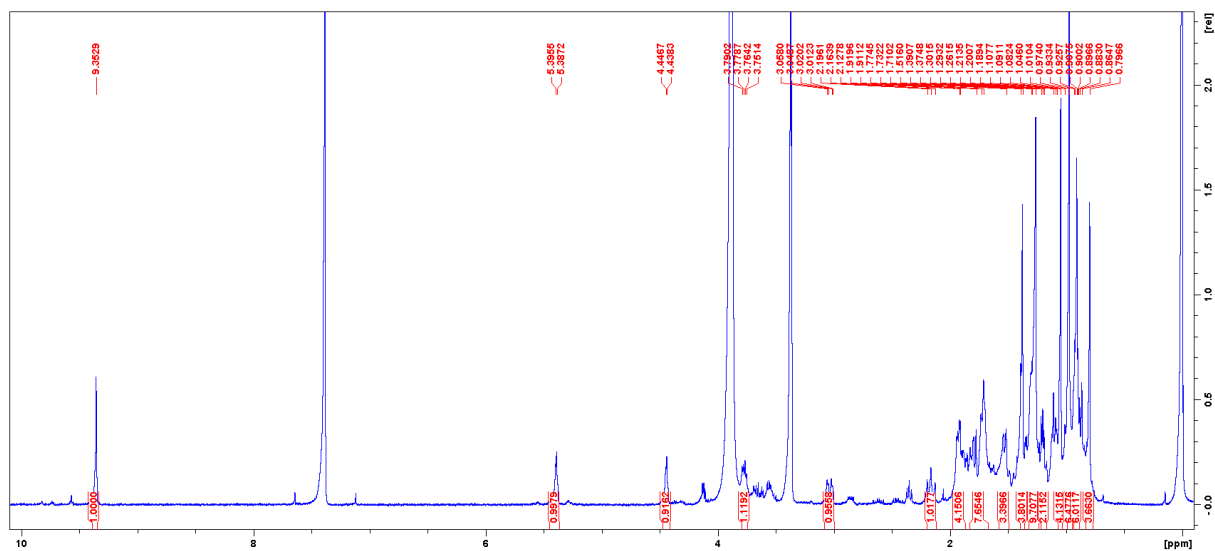
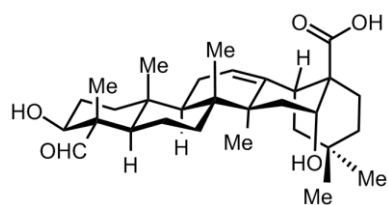
Dodatak 2.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) i  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) NMR spoja **3**

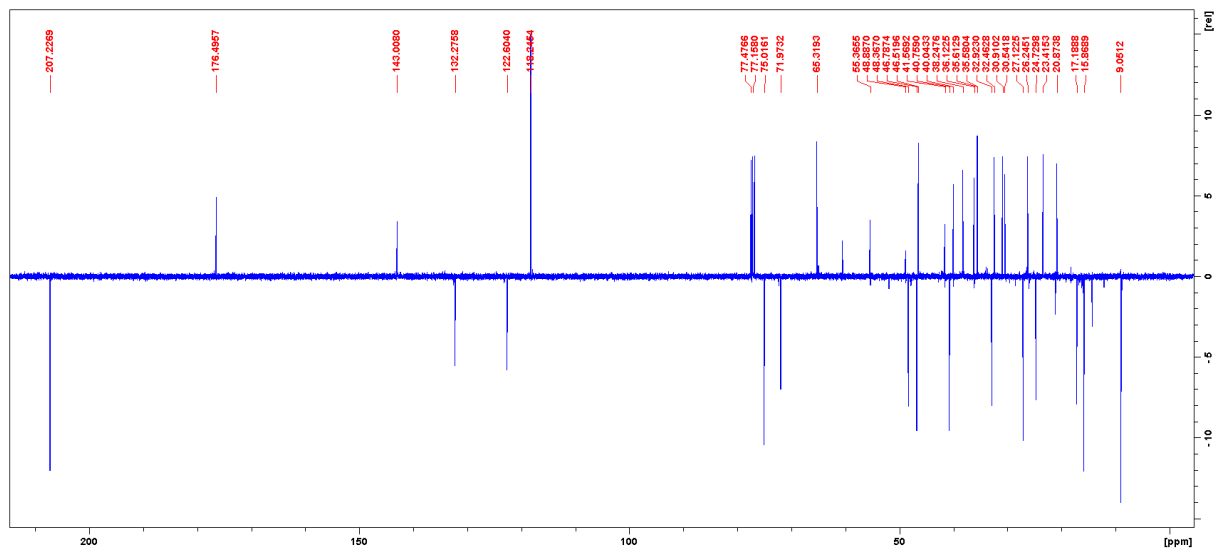
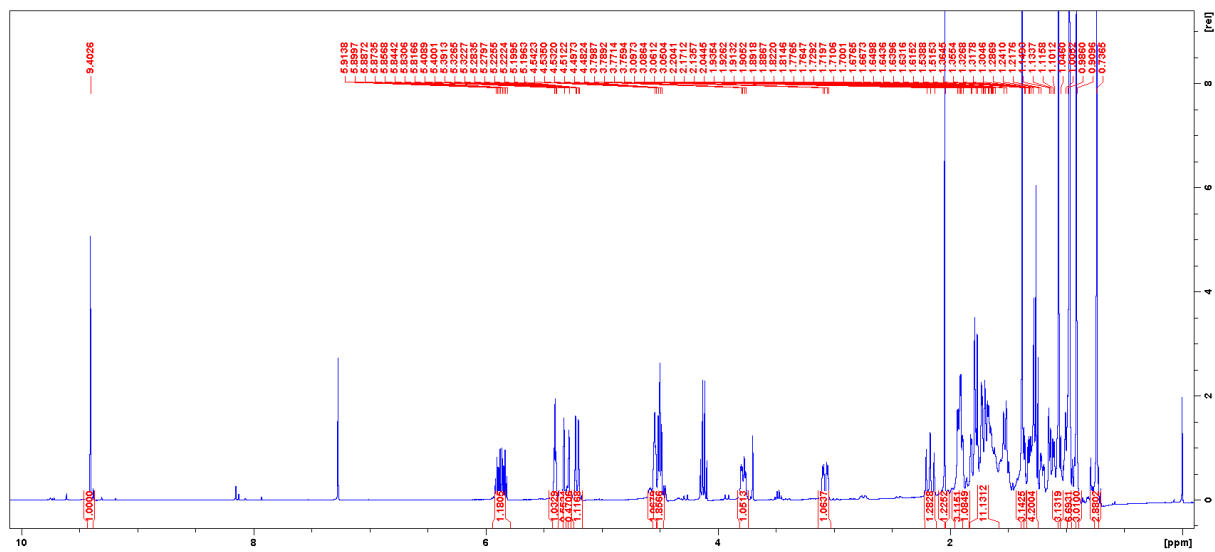
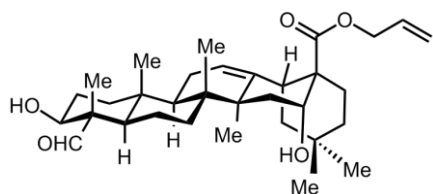


Dodatak 3.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) i NMR spoja 4

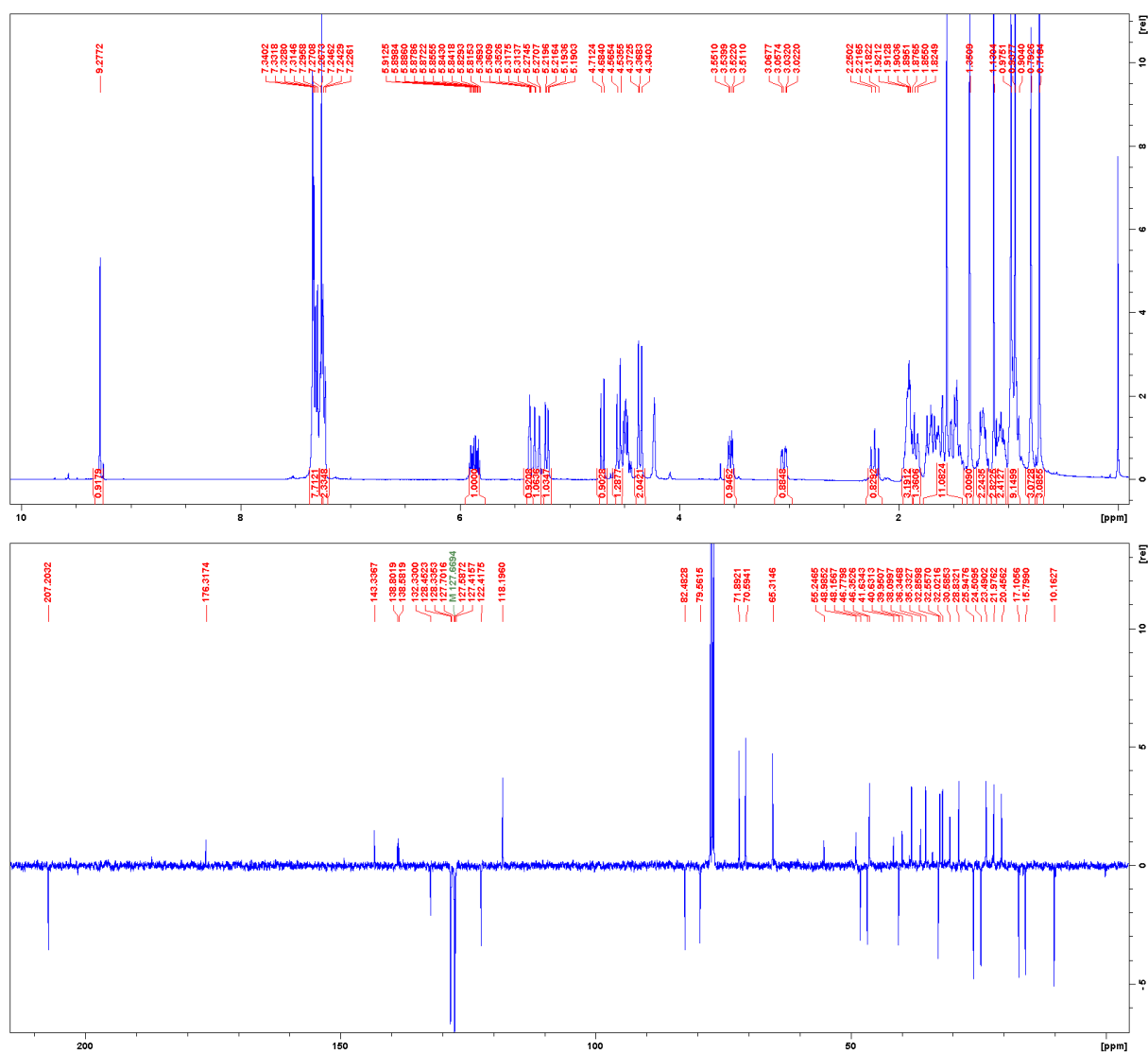
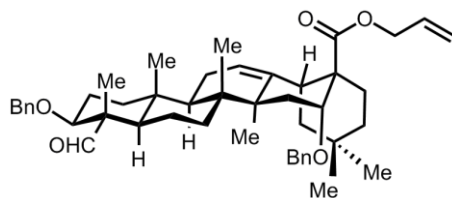
Dodatak 4.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) i  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) NMR spoja **5**

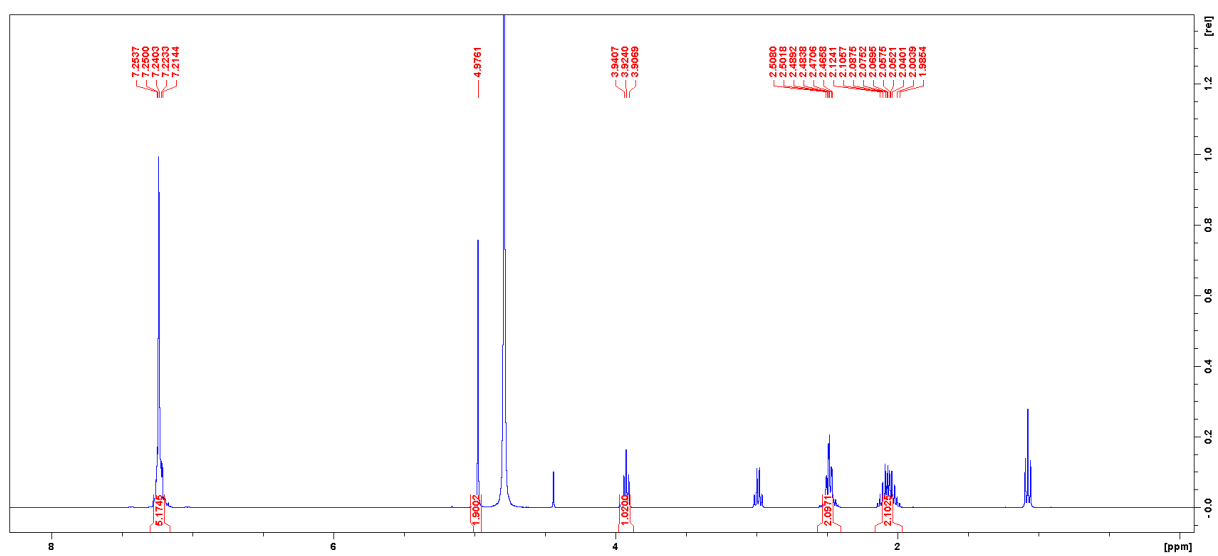
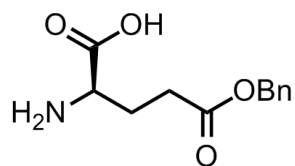


Dodatak 5.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) NMR spoja 6

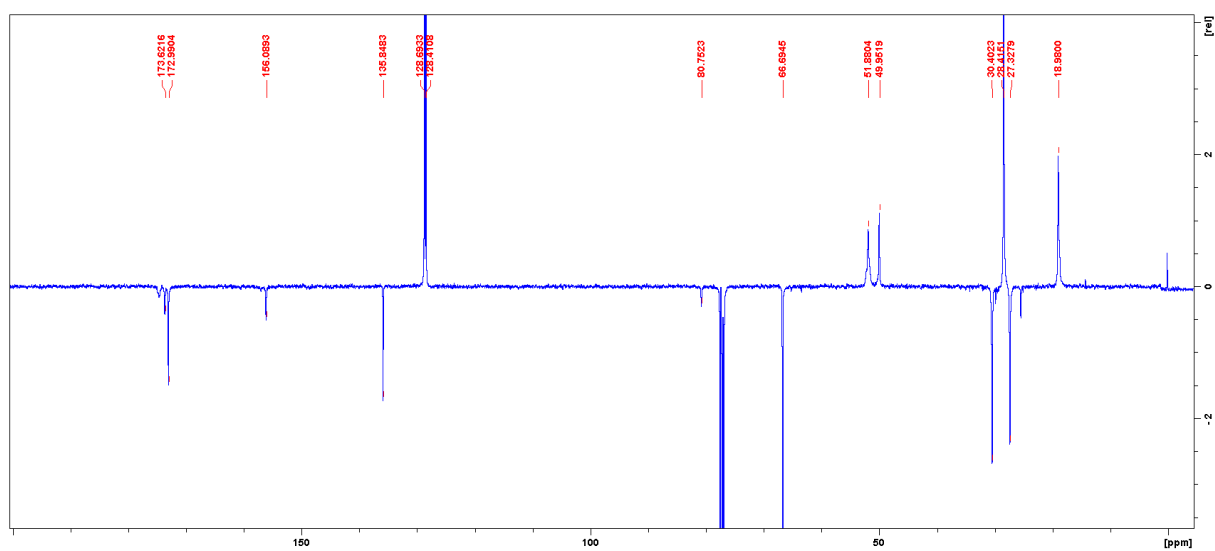
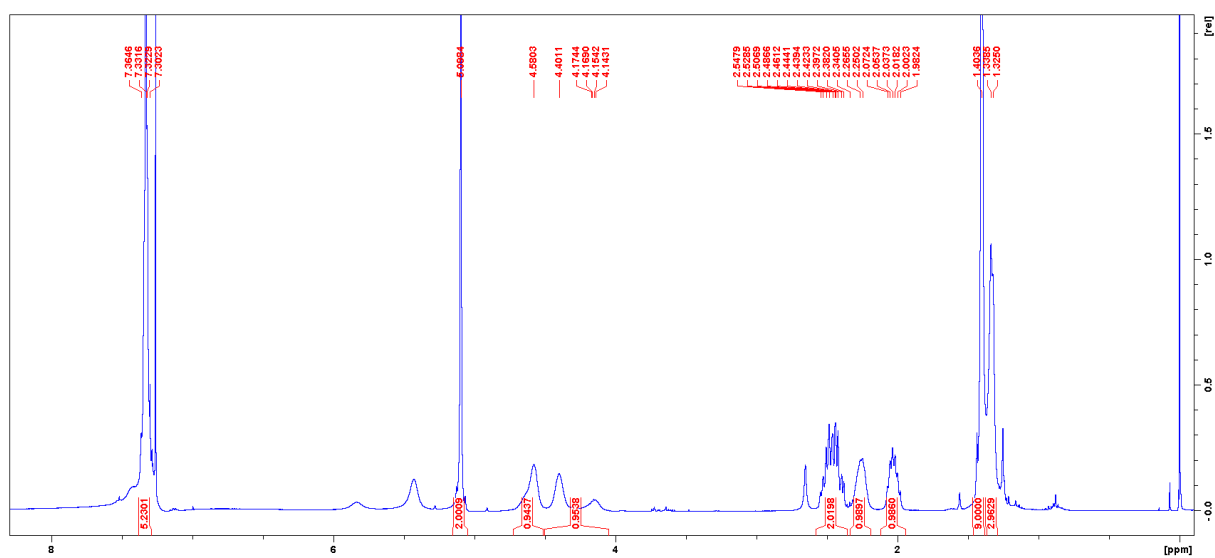
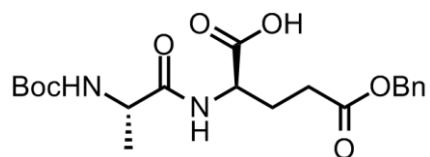
Dodatak 6.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) i  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) NMR spoja 7

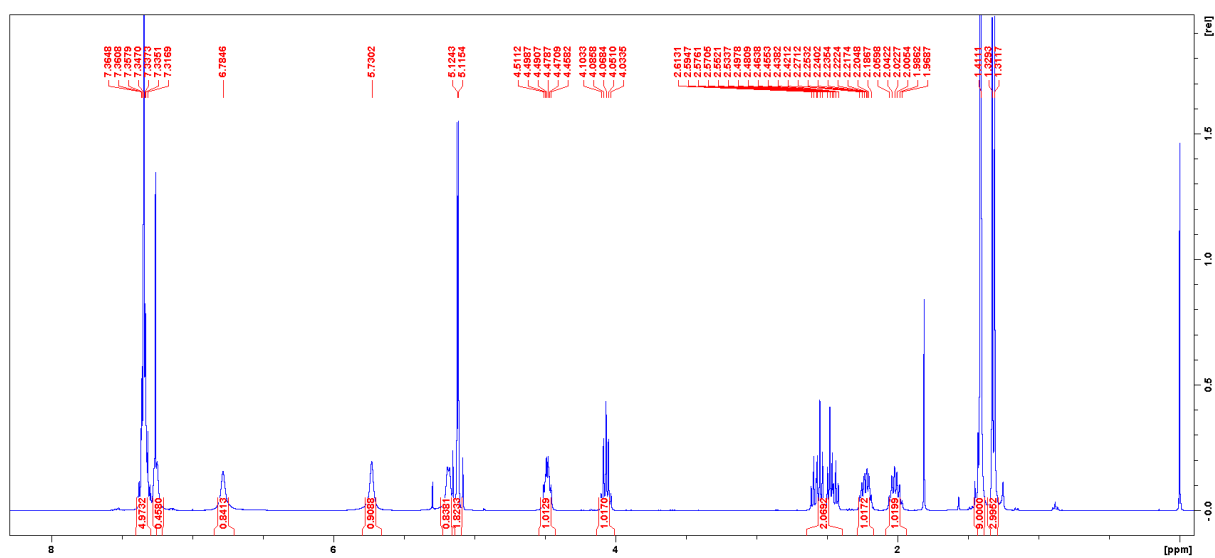
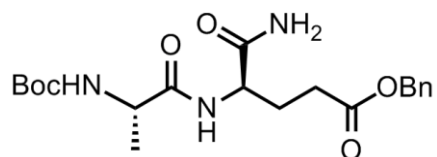
Dodatak 7.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) i  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) NMR spoja **8**

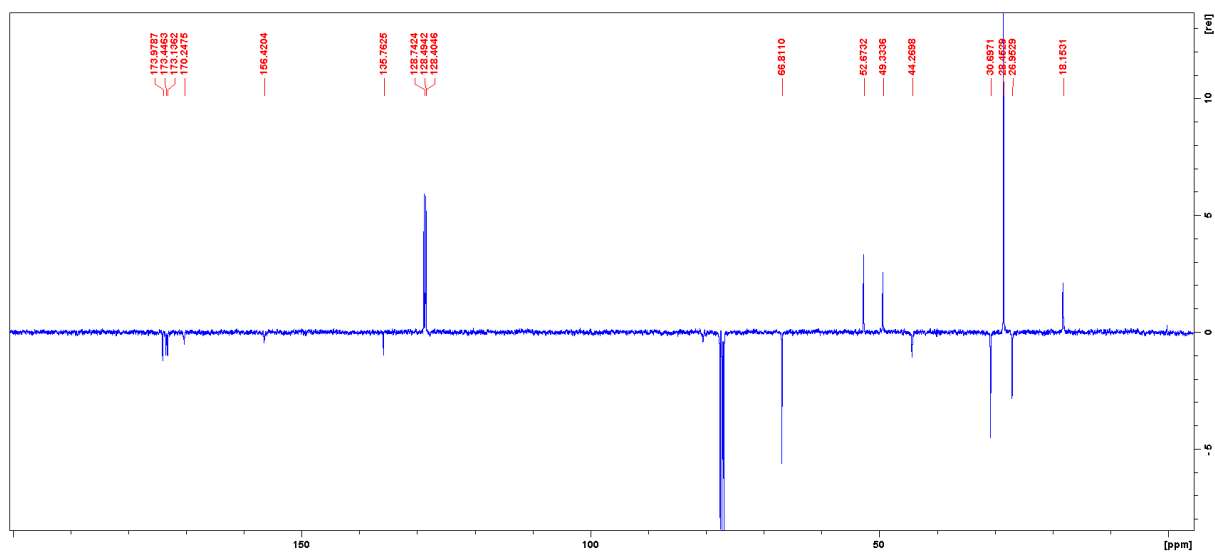
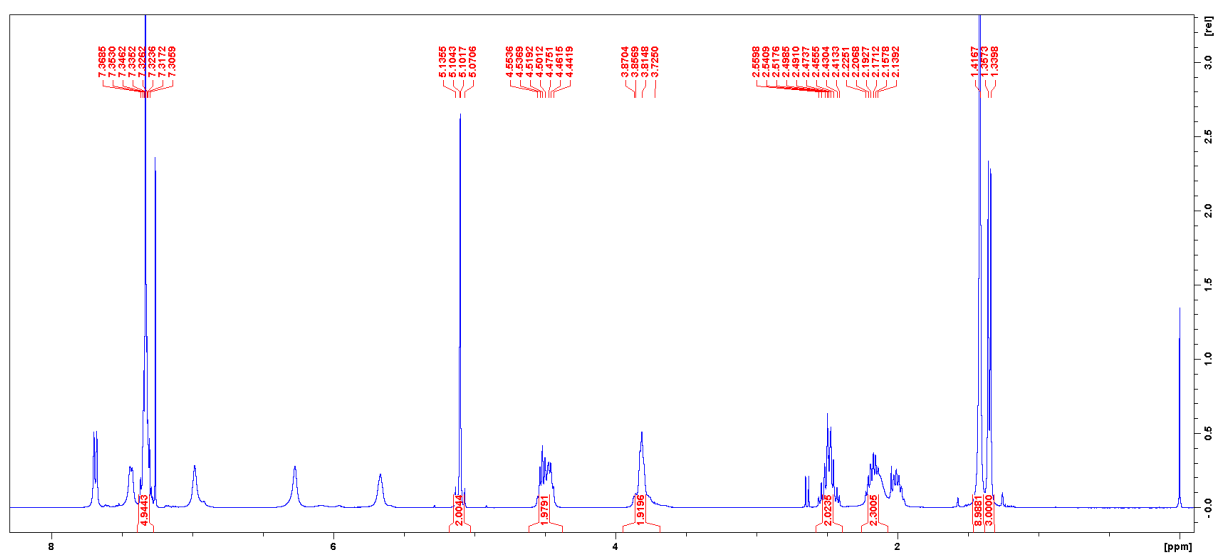
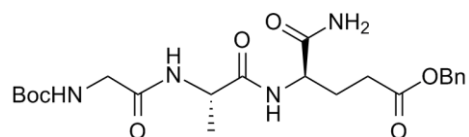


Dodatak 8.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) NMR spoja **9**

Dodatak 9.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) i  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) NMR spoja **10**



Dodatak 10.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) NMR spoja **11**

Dodatak 11.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) NMR spoja 13

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Andrej Biškup

Datum rođenja: 29. lipnja 1996.

Mjesto rođenja: Varaždin

### Obrazovanje

2003–2011 Osnovna škola Metel Ožegović, Radovan

2011–2015 Druga gimnazija Varaždin

2015–2018 Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

2018-2020 Diplomski sveučilišni studij Kemija, istraživački smjer, grane: analitička i organska kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

### Nagrade i priznanja

2018, 2020 Stipendija grada Ivanca

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2017-2019 Otvoreni dan kemije

### Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. A. Biškup, Đ. Škalamera, Synthesis of a Potential Vaccine Adjuvant – Conjugate of Quillaja Saponin and Desmuramyl Dipeptide // *13.susret mladih kemijskih inženjera (XIII. SMLKI 2020)*, 20.-21.02.2020,Zagreb, Hrvatska. (postersko priopćenje)
2. 2018, 2019 - *Simpozij Studenata Kemičara*