

# Novi postupci pripreve adamantil-triazolnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida

---

**Draženović, Josip**

**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:217:218690>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-04**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Josip Draženović

# **Novi postupci pripreve adamantil-triazolnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida**

## **Diplomski rad**

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

Zagreb, 2020. godina.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za organsku Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Vesne Petrović Peroković i neposrednim voditeljstvom Danijele Mihelec, mag. chem.

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



## Zahvale

*Posebnu zahvalu upućujem izv. prof. dr. sc. Vesni Petrović Peroković na stručnom mentorstvu i svesrdnoj pomoći prilikom izrade diplomskog rada te omogućenom volontiranju i prenesenom znanju tijekom čitavog studiranja i tijekom priprema za Kemijsku olimpijadu u Bakuu. Zahvaljujem se dr. sc. Željki Car na iskazanoj pomoći tijekom čitavog studiranja, a posebice izrade diplomskog rada, na prenesenom znanju i korisnim savjetima te informacijama. Također se zahvaljujem Danijeli Mihelec na neposrednom voditeljstvu. Svima Vam hvala na stručnim savjetima i uložnim trudu, strpljenju i podršci.*

*Zahvaljujem se i ostalim profesorima, docentima i asistentima na studiju koji su svojim djelovanjem sudjelovali u mojem stjecanju znanja.*

*Zahvaljujem se tehničarkama Organskog i Fizikalnog zavoda na puno strpljenja, ali i za posuđen pribor i instrumente.*

*Zahvaljujem se svim kolegama i kolegicama sa studija, a posebno Anastaziji, Josipi, Lauri, Luciji, Barbari, Matiji i Tei na podršci tijekom čitavog studiranja, a posebno tijekom pisanja diplomskog rada. Hvala Vam što ste studiranje učinili zabavnijim i posebnijim jer svakako bez vas ono ne bi bilo isto.*

*Zahvaljujem se nastavnici kemije u osnovnoj školi Ankici Veseljić što je prepoznala moj talent i profesorici u srednjoj školi Jasminki Žiži koja ga je nastavila njegovati. Hvala im na prenesenom temeljnom znanju iz ovog područja.*

*Na kraju, najveća zahvala ide mojim prijateljima, obitelji i djevojci na podršci tijekom pisanja diplomskog rada i čitavog obrazovanja.*

*Hvala Vam svima!*



# Sadržaj

<b>SAŽETAK</b> .....	<b>X</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XII</b>
<b>§ 1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Muramil-peptidi</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. <i>Desmuramil-dipeptid</i> .....	5
<b>2.2. Sinteza peptida</b> .....	<b>8</b>
2.2.1. <i>Zaštitne skupine</i> .....	11
2.2.2. <i>Kondenzacija aminokiselina</i> .....	15
2.2.3. <i>Modifikacije peptida</i> .....	19
<b>2.3. Klik-kemija</b> .....	<b>22</b>
2.3.1. <i>Azid-alkin cikloadicija</i> .....	23
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1. Materijali i metode</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2. Priprava adamantil-triazolnog prekursora</b> .....	<b>30</b>
3.2.1. <i>Priprava 1-azidoadamantana A</i> .....	30
3.2.2. <i>Priprava t-butil-((1-(adamantan-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metil)-karbamata B</i> .....	31
3.2.3. <i>Pokušaj priprave (adamantan-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-ilmetanamina C</i> .....	32
3.2.4. <i>Priprava (adamantan-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-ilmetanamina C</i> .....	32
<b>3.3. Priprava propargilamin-hidroklorida D</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4. Priprava peptidnih prekursora 5 i 6</b> .....	<b>33</b>
3.4.1. <i>Priprava H-D-Glu(OBn)-OH 1</i> .....	33
3.4.2. <i>Pokušaj priprave Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-NH-Prp</i> .....	34
3.4.3. <i>Priprava Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH 2</i> .....	37
3.4.4. <i>C-terminalna modifikacija Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH</i> .....	38
3.4.5. <i>Uklanjanje Boc zaštite s dipeptida</i> .....	40
<b>3.5. Kondenzacija peptidnog i manoznog prekursora</b> .....	<b>42</b>
3.5.1. <i>Općeniti postupak priprave konjugata 2-(2,3,4,6-tetra-O-benzil-<math>\alpha</math>-D-manopiranoziloksi)octene kiseline i derivata desmuramil-dipeptida</i> .....	42
3.5.2. <i>Pokušaj priprave konjugata 2-(2,3,4,6-tetra-O-benzil-<math>\alpha</math>-D-manopiranoziloksi)octene kiseline i triazolnog derivata dipeptida 8</i> .....	45
<b>3.6. Uklanjanje benzilnih zaštitnih skupina i priprava ciljne molekule 9</b> .....	<b>45</b>



---

<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>46</b>
4.1. Uvod .....	46
4.2. Priprava adamantil-triazolnog prekursora.....	49
4.3. Priprava peptidnih prekursora 5 i 6.....	51
4.3.1. Priprava zaštićenog propargiliranog desmuramil-dipeptida 3.....	51
4.3.2. Priprava adamantil-triazolnog derivata desmuramil-dipeptida 4.....	56
4.3.3. Uklanjanje Boc zaštite s peptidnih prekursora 3 i 4.....	57
4.4. Kondenzacija peptidnih prekursora 5 i 6 s manoznom podjedinicom .....	58
4.5. Uklanjanje benzilnih zaštitnih skupina i priprava ciljne molekule 9 .....	59
<b>§ 5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>61</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA .....</b>	<b>64</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>66</b>
<b>§ 8. DODATAK .....</b>	<b>XV</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XXVI</b>





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

Diplomski rad

## SAŽETAK

### Novi postupci pripreme adamantil-triazolnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida

Josip Draženović

U sklopu diplomskog rada ispitana je mogućnosti pripreme adamantil-triazolnog derivata desmuramil-dipeptida, L-Ala-D-*iso*Gln, koji je dodatno modificiran uvođenjem manozne podjedinice vezane za dipeptid preko acetilne poveznice. Kao peptidni prekursor pripravljen je zaštićeni dipeptid Boc-L-Ala-D-Glu(OBn), a na istome je uspješno provedena reakcija amidacije s propargilaminom uz *N*-metilmorfolin te *n*-butil-klorformijat kao kondenzacijski reagens. Metoda amidacije optimirana je i uspješno iskorištena i prilikom uvođenja adamantil-triazolne podjedinice u strukturu dipeptida. Adamantil-triazolna podjedinica pripravljena je „one-pot“ sintezom iz komercijalno dostupnog propargilamina i prethodno pripravljenog 1-azidoadamantana. Optimirana „one-pot“ sinteza uspješno je upotrijebljena u laboratoriju za pripremu novih 1,4-supstituiranih triazolnih derivata propargilamina. U klik-reakciji koja je dio „one-pot“ sinteze kao katalizator korišten je *in situ* generirani bakar(I). Prethodno pripravljena benzilima zaštićena manozna preko acetilne poveznice u reakciji kondenzacije povezana je s propargiliranim dipeptidom i adamantil-triazolnim derivatom desmuramil-dipeptida. Konačni cilj diplomskog rada je pripravljanje izomerno čistog manoziliranog adamantil-triazolnog derivata desmuramil-dipeptida kojem je po pripremi potrebno *in vivo* ispitati adjuvantsku aktivnost.

(68 + xxvii stranica, 36 slika, 2 tablice, 52 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: adamantan, adjuvanti, desmuramil-dipeptid, klik-kemija, manokonjugat, triazol

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković  
Neposredni voditelj: Danijela Mihelec, mag. chem.

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
  2. prof. dr. sc. Davor Kovačević
  3. prof. dr. sc. Predrag Novak
- Zamjena: doc. dr. sc. Ivana Biljan

Datum diplomskog ispita: 19. 06. 2020.





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

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### A novel synthetic route to adamantyltriazole derivative of mannosylated desmuramyldipeptide

Josip Draženović

In this diploma thesis, the possibilities of preparation of the adamantyltriazole derivative of desmuramyldipeptide, which was further modified by the introduction of a mannose subunit bound to the dipeptide via an acetyl linker, were investigated. The protected dipeptide Boc-L-Ala-D-Glu-(OBn) was prepared first as a peptide precursor and then modified successfully in the amidation reaction with propargylamine. In this reaction *n*-butyl chloroformate was used as the condensing reagent and *N*-methylmorpholine as a base. The amidation method was optimized and successfully applied for the introduction of the adamantyltriazole subunit into the structure of the dipeptide. The adamantyltriazole subunit was prepared by one-pot synthesis from commercially available propargylamine and previously prepared azidoadamantane. Optimized one-pot synthesis has been successfully used in the laboratory for the preparation of new 1,4-substituted triazole propargylamine derivatives. As a part of the one-pot synthesis *in situ*-generated copper(I) was used as a catalyst. Previously prepared benzyl-protected mannose in the penultimate step of the overall synthesis is connected to a propargylated dipeptide and an adamantyltriazole derivative of desmuramyldipeptide. The final goal of the diploma thesis is the preparation of an isomerically pure deprotected mannosylated adamantyltriazole derivative of desmuramyldipeptide. Adjuvant activity will be tested *in vivo* on the prepared target molecule.

(68 + xxvii pages, 36 figures, 2 tables, 52 references, original in Croatian)

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

Keywords: adamantane, adjuvant, desmuramyldipeptide, click-chemistry, mannoconjugates, triazole

Mentor: Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor

Assistant mentor: Danijela Mihelac, mag. chem.

Reviewers:

1. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor

2. Dr. Davor Kovačević, Professor

3. Dr. Predrag Novak, Professor

Substitute: Dr. Ivana Biljan, Assistant Professor

Date of exam: 19. 06. 2020.



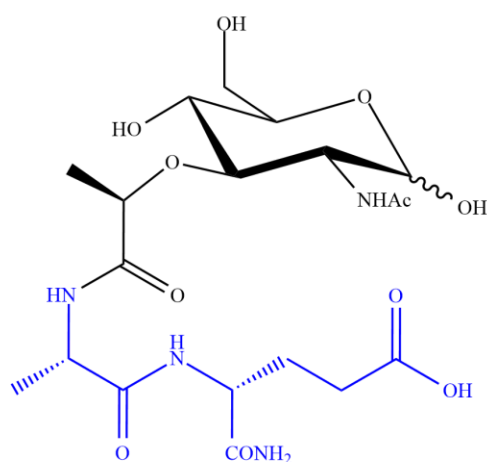
## § 1. UVOD

Tvari koje se inkorporiraju u formulaciju cjepiva, a kao cilj imaju povećanje njihove imunogeničnosti tj. izazivanje jačeg imunološkog odgovora nazivaju se adjuvansima. Adjuvantsku aktivnost pokazuju različite skupine spojeva među kojima su i derivati muramil-dipeptida (MDP), koji su tema ovog diplomskog rada. Muramil-peptidi dio su strukture peptidoglikana, građivnog materijala stijenki Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, a MurNAc-L-Ala-D-*iso*Gln tj. MDP (slika 1.a)) najmanja je strukturna jedinica peptidoglikana koja pokazuje adjuvantsku aktivnost. Iako posjeduje adjuvantsku aktivnost, uporaba MDP-a može uzrokovati razne nuspojave, zbog čega su sintetizirani brojni derivati i analozi navedenog spoja, a studije odnosa strukture i aktivnosti pokazale su da *N*-acetilmuraminska kiselina, MurNAc kao dio strukture muramil-dipeptida nije ključna za adjuvantsku aktivnost. Različitim strukturnim modifikacijama dipeptidnog dijela molekule, L-alanil-D-izoglutamina (L-Ala-D-*iso*Gln) koji se naziva desmuramil-dipeptid, nastoji se postići što bolji imunološki odgovor, a neki adamantilni derivati desmuramil-dipeptida sa i bez dodatka manozne podjedinice pripremljeni su i u laboratoriju Zavoda za organsku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a. Uvođenje manoze u strukturu desmuramil-dipeptida pokazalo se povoljnim zbog moguće interakcije molekule s manoznim receptorima, a uvođenje adamantilne jedinice povećava lipofilnost molekule čime se olakšava ulazak desmuramil-dipeptida u stanicu kroz lipidni dvosloj.<sup>1-4</sup>

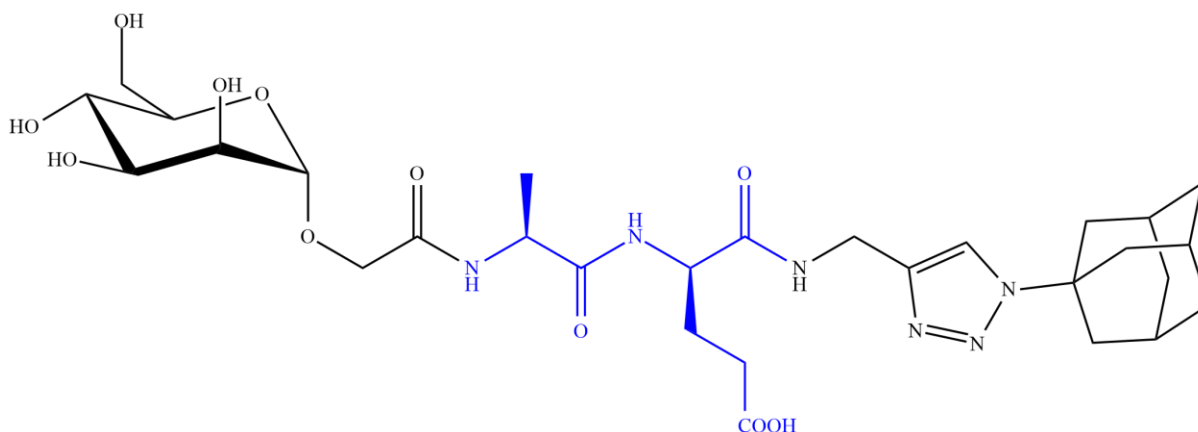
Cilj ovog rada jest razvoj metoda priprave adamantil-triazolnih derivata manoliziranog desmuramil-dipeptida (slika 1.b)) s naglaskom na optimiranje i razvoj metode propargiliranja odnosno amidacije dipeptida te optimiranje klik-reakcije kojom se selektivno dobiva 1,4-supstituirani adamantil-triazolni segment. Kao polazni dipeptid pripremit će se zaštićena L-alanil-D-glutaminska kiselina (Boc-L-Ala-D-Glu) nakon čega će se ispitati nekoliko metoda amidacije slobodne karboksilne skupine. Propargilirani derivat Boc-L-Ala-D-Glu pokušat će se pripremiti i neizravno, kondenzacijom prethodno propargilirane glutaminske kiseline s odgovarajućim aktiviranim derivatom alanina. Pripremljeni propargilirani dipeptid potom će se podvrgnuti klik-reakciji s 1-azidoadamantanom. Osim toga, pokušat će se provesti i

modifikacija samog propargilamina klik-reakcijom s već spomenutim 1-azidoadamantanom nakon čega će uslijediti amidacija dipeptida s tako pripremljenim aminom. U svim slučajevima triazolni prsten pripremit će se azid-alkin cikloadicijom između odgovarajućeg terminalnog alkina i azida u prisutnosti bakra(I), a kao katalizator bit će isproban i srebrov klorid. Prethodno pripremljeni manozni prekursor vezat će se preko poveznice od dva ugljikova atoma na terminalnu amino-skupinu dipeptida, a konačnom spoju kojemu su uklonjene sve zaštitne skupine ispitat će se *in vivo* adjuvantski učinak.

a)



b)



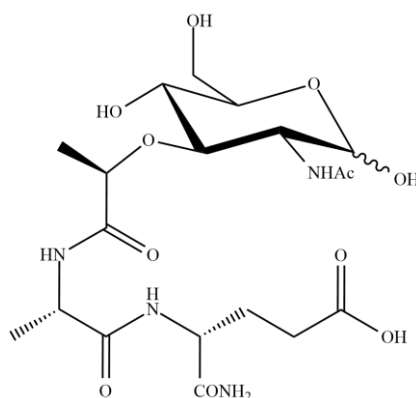
Slika 1. Strukturne formule: a) muramil-dipeptida (MDP) i b) ciljne molekule adamantil-triazolnog derivata manoliziranog desmuramil-dipeptida. Dipeptidni fragment koji odgovara desmuramil-dipeptidu označen je plavo.<sup>1</sup>



## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Muramil-peptidi

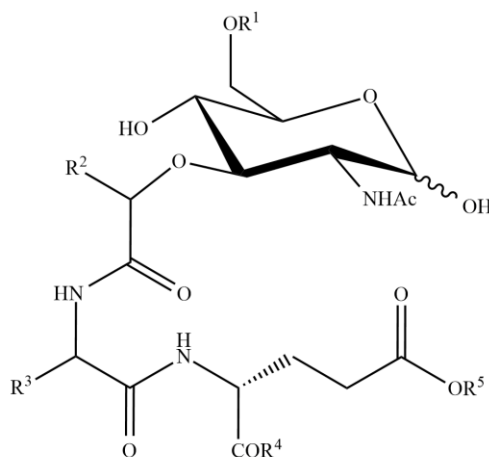
Cijepljenje ili vakcinacija protiv zarazne bolesti definira se kao postupak planskog izazivanja specifičnog zaštitnog imunološkog odgovora protiv uzročnika bolesti, a lijekovi biološkog podrijetla korišteni radi izazivanja spomenutog odgovora nazivaju se cjepivima. Imunološki odgovor moguće je regulirati imunomodulatorima koji se mogu podijeliti na imunostimulatore (adjuvanske) i imunosupresive. Adjuvansi (lat. *adiuvare* - pomagati) su tvari koje se inkorporiraju u formulaciju cjepiva kako bi povećali njihovu imunogeničnost tj. izazvali jači imunološki odgovor, a muramil-dipeptid (MDP) i njegovi derivati jedna su od mnoštva skupina spojeva koji posjeduju adjuvantsku aktivnost. Muramil-peptidi dio su strukture peptidoglikana, gradivnog materijala stijenki Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Peptidoglikan je prirodni polimer građen od okosnice koju čine molekule *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i *N*-acetilmuraminske kiseline (MurNAc) povezane  $\beta$ -glikozidnom vezom i peptidnih poveznica koje spajaju polisaharidne lance. Osnovna ponavljajuća jedinica peptidoglikana je peptidoglikan monomer (PGM), disaharid-pentapeptid sastava  $\beta$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 4)-D-MurNAc-L-Ala-D-*izo*Gln-*mezo*DAP( $\epsilon$ NH<sub>2</sub>)-D-Ala-D-Ala. Muramil-dipeptid najmanja je strukturna jedinica peptidoglikana koja pokazuje adjuvantsku aktivnost, a sastoji se od dipeptida L-alanina i D-izoglutamina koji je amidnom vezom povezan s laktinim dijelom *N*-acetilmuraminske kiseline (slika 2).<sup>1,5</sup>



Slika 2. Strukturna formula molekule muramil-dipeptida (MDP).<sup>1</sup>

Manji peptidoglikanski fragmenti djeluju tako da se vežu na unutarstanične NOD-proteine. Tako NOD2-protein specifično prepoznaje fragment MurNAc-L-Ala-D-isoGln tj. MDP. Ovaj protein, poznat i kao NLRC2 i CARD15, uključen je u signalni odgovor u kojem se peptidoglikanski fragment, u ovom slučaju MDP, prepoznaje kao molekularni uzorak povezan s patogenom (engl. *pathogen-associated molecular pattern*, PAMP). NOD2 sastoji se od nekoliko domena, a za onu bogatu leucinom (engl. *leucine rich repeat domain*, LRR) vjeruje se da igra ulogu senzora MDP-a. Lauro i suradnici zaključili su da je za prepoznavanje MDP-a tj. interakciju NOD2-MDP bitna uloga bočnih ogranaka aminokiselina Arg877, Trp931 i Ser933. Vežanje MDP-a na NOD2 potvrđeno je biofizikalnim i biokemijskim testovima. Grimes i suradnici pokazali su da ovo vežanje ovisi o promjeni pH vrijednosti te da je optimalan pH između 5,0 i 6,5.<sup>2,6</sup>

Iako posjeduje adjuvantsku aktivnost, uporaba MDP-a može uzrokovati razne nuspojave, zbog čega su sintetizirani brojni derivati i analozi navedenog spoja. Strukturne promjene rađene su na *N*-acetilmuraminskoj kiselini, ali i na dipeptidnom dijelu, a na temelju analize povezanosti strukture i aktivnosti izvedeno je nekoliko zaključaka; (i) uklanjanjem hidroksilne skupine na anomernom ugljikovom atomu ili zamjenom iste s metilnom skupinom u  $\alpha$ - ili  $\beta$ -položaju ne dolazi do smanjenja adjuvantske aktivnosti; (ii) amidna skupina *N*-acetilmuraminske kiseline (položaj C2) nužna je za aktivnost, ali acetamidna skupina može biti zamjenjena nekom drugom acilamido-skupinom; (iii) zamjena GlcNAc nekim drugim ugljikohidratnim konfiguracijskim izomerom ne dovodi do gubitka aktivnosti; (iv) do gubitka aktivnosti ne dolazi aciliranjem hidroksilne skupine na C6 kao ni zamjenom iste amino- ili acilamino-skupinom; (v) zamjenom metilne skupine laktinog dijela *N*-acetilmuraminske kiseline ne dolazi do smanjenja aktivnosti, a tako priređeni spojevi pokazali su se manje toksičnima od MDP-a; (vi) promjena konfiguracije alanina rezultira nastankom inaktivnog spoja dok zamjenom istog nekom drugom L-aminokiselinom ne dolazi do gubitka aktivnosti; (vii) kod glutaminskog dijela bitna je D-konfiguracija, ali i postojanje dvije metilenske skupine koje odvajaju karboksilne skupine; karboksilne skupine mogu biti slobodne ili supstituirane. Na slici 3. prikazane su strukture MDP-a i nekih njegovih derivata i analoga s adjuvantskom aktivnošću.<sup>1</sup>



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>
MDP	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	OH
L18-MDP	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> CO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	OH
3'-propil-MDP	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	OH
MDP(Thr)	H	CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> )OH	NH <sub>2</sub>	OH
MB	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	NH <sub>2</sub>

Slika 3. MDP i njegovi derivati i analozi s adjuvantskom aktivnošću.<sup>1</sup>

### 2.1.1. Desmuramil-dipeptid

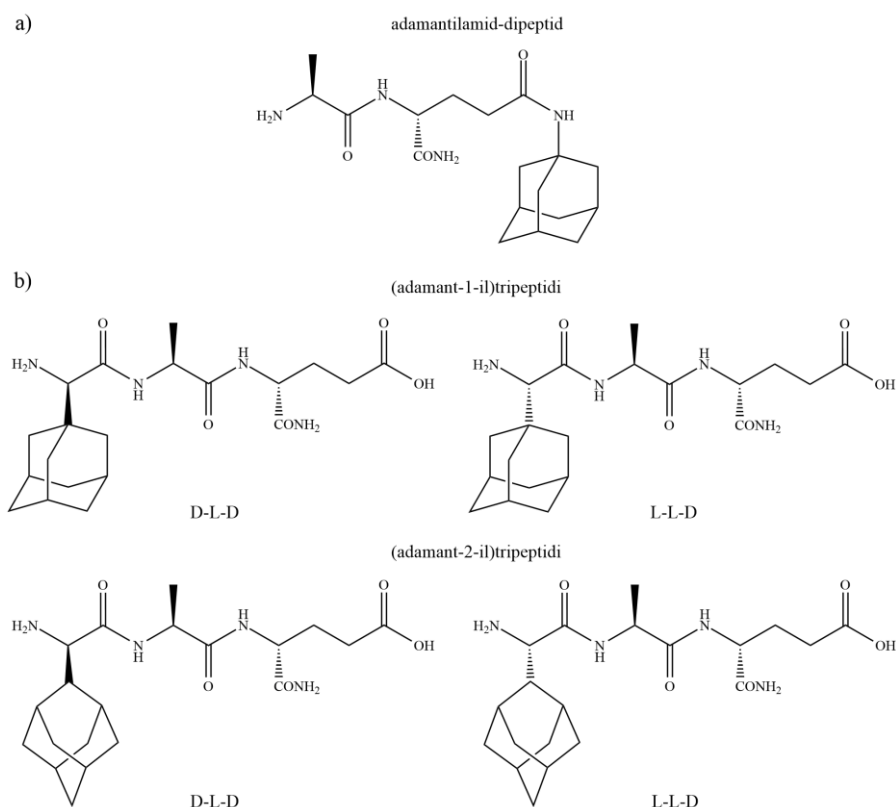
Studije odnosa strukture i aktivnosti pokazale su da MurNAc kao dio strukture muramil-dipeptida nije ključan za adjuvantsku aktivnost. Analozi MDP-a koji u svojoj strukturi ne sadrže spomenuti šećer nazivaju se desmuramil-dipeptidi (DMP), a oni opisani u literaturi često umjesto MurNAc sadrže lipofilne dijelove.<sup>1</sup>

#### 2.1.1.1. Adamantilni desmuramil-dipeptidi

Adamantan, policiklička kavezasta molekula visoke simetrije, najmanja je molekula predstavnik skupine spojeva čija struktura nalikuje strukturi dijamanta. Adamantilni privjesak danas se često uvodi u strukturu spojeva ne bi li se na taj način povećala lipofilnost molekula te samim time omogućila bolja interakcija s lipidnim dvoslojem stanice i poboljšala njena farmakološka svojstva. S obzirom da su prethodna istraživanja pokazala kako se ulazak desmuramil-dipeptida u stanicu događa pasivnom apsorpcijom koja je direktno ovisna o

lipofilnosti molekule, opravdano je uvođenje lipofilnog adamantilne jedinice u strukturu desmuramil-peptida.<sup>2,3</sup>

Adamantilamid-dipeptid (slika 4. a)) dobiven je vezanjem 1-aminoadamantana na karboksilnu skupinu izoglutamina, a pripravljeni spoj pokazao se učinkovitim i netoksičnim adjuvansom. Nadalje, vezanje adamantilne skupine na jezgru DMP-a iskorišteno je i za pripravu tripeptida koji posjeduju adjuvantsku aktivnost. U sintetiziranim tripeptidima *N*-acetilmuraminska kiselina zamjenjena je adamantil-glicinom, a spomenuti spojevi (slika 4. b)) u eksperimentima *in vivo* na miševima također su pokazali imunomodulatorsku aktivnost. Svi priređeni tripeptidi pokazali su slabiju aktivnost od peptidoglikan monomera, a uočena je i razlika u djelovanju s obzirom na slijedove D-L-D i L-L-D. U slučaju izomera (adamant-1-il)tripeptida aktivnijim se, u oba genska soja miševa (sojevi CBA(H-2<sup>k</sup>) i NIH/OlaHsd(H-2<sup>q</sup>)), pokazao D-L-D. U slučaju (adamant-2-il)tripeptida kod miševa soja CBA(H-2<sup>k</sup>) boljim se pokazao izomer L-L-D dok je kod soja NIH/OlaHsd(H-2<sup>q</sup>) aktivniji bio D-L-D.<sup>1,2</sup>

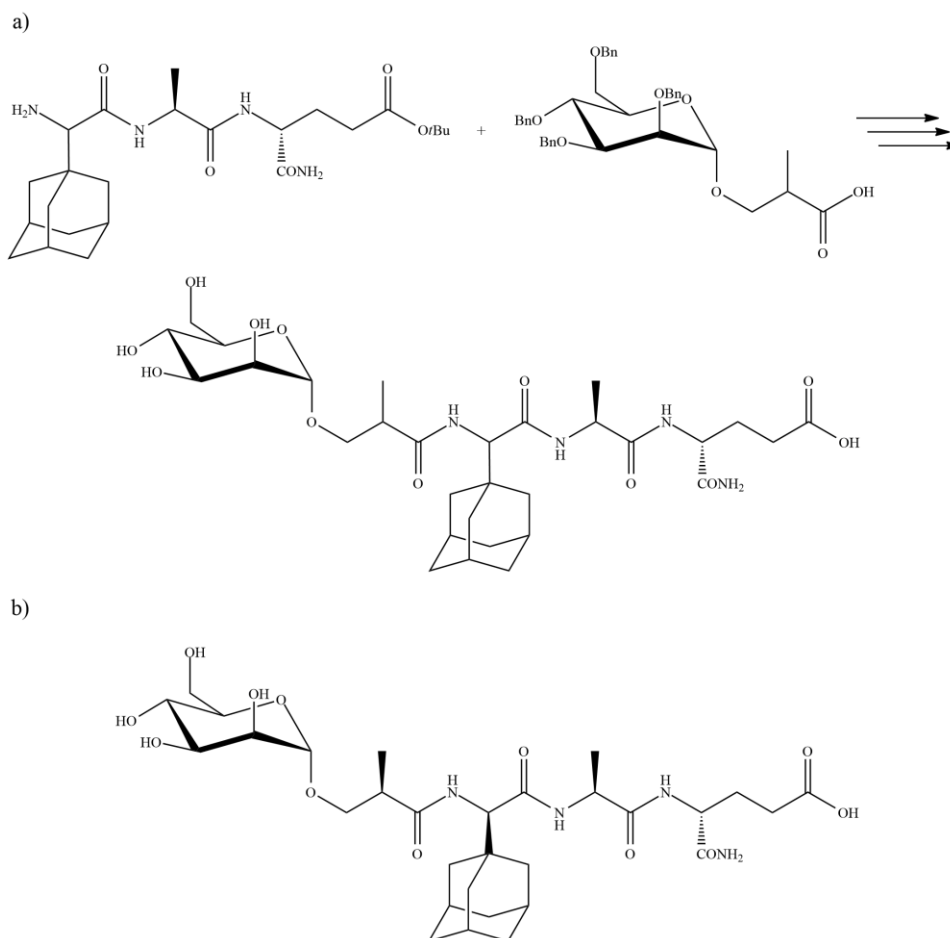


Slika 4. Strukturne formule desmuramil-peptida modificiranih uvođenjem adamantilne skupine: a) adamantilamid-dipeptid; b) dijastereoizomeri (adamant-1-il)tripeptida i (adamant-2-il)tripeptida.

### 2.1.1.2. Manozni receptori i manozilirani derivati desmuramil-dipeptida

Proteini koji specifično i reverzibilno vežu ugljikohidrate (monosaharide i oligosaharide), ali ne pokazuju katalitičku aktivnost nazivaju se lektinima (lat. *legere* - izabrati). Od mnoštva prirodnih monosaharida lektini prepoznaju samo nekolicinu: D-manozu, D-glukožu, *N*-acetil-D-glukozamin, *N*-acetil-D-galaktozamin, L-fukozu, *N*-acetilneuraminsku kiselinu i D-ksilozu. Osim navedenih monosaharida, lektini prepoznaju i oligosaharide u kojima se ovi monosaharidi nalaze, a dijele se na 5 osnovnih skupina s obzirom prema kojem ugljikohidratu pokazuju najveći afinitet. Tako se izdvajaju lektini specifični za manozu, galaktozu i *N*-acetilgalaktozamin, *N*-acetilglukozamin, fukozu te *N*-acetilneuraminsku kiselinu. Na temelju aminokiselinskog slijeda domene zadužene za vezanje ugljikohidrata (engl. *carbohydrate-recognition domain*, CRD) i ostalih biokemijskih svojstava lektini se mogu podijeliti na 4 tipa: tip C, tip S, tip P i tip I. U skupini lektina C tipa, najvećoj od nabrojanih, među ostalima nalaze se manozni receptor (MR) te lektin koji veže manozu (engl. *mannose-binding lectin*, MBL) poznat i kao protein koji veže manozu (engl. *mannose-binding protein*, MBP). MBP omogućuje fagocitozu istovremenim vezanjem patogenih organizama preko jednog i makrofaga preko drugog dijela polipeptidnog lanca te tako sudjeluje u obrani organizma tj. aktivaciji urođenog imunološkog sustava. Manozni receptori smatraju se zaduženima za prepoznavanje PAMP komponente na mikroorganizmima, a posreduju i pri endocitozi i fagocitozi te otpuštanju citokina kojima se utječe na stečenu imunost.<sup>1</sup>

Činjenica da manozna prisutna u strukturi molekule adjuvansa može pridonijeti prepoznavanju molekule od strane receptora na stanicama imunološkog sustava dovela je do derivatizacije desmuramil-dipeptida uvođenjem upravo ovoga šećera. Nekoliko takvih derivata pripravljeno je kondenzacijskom reakcijom (adamant-1-il)- i (adamant-2-il)tripeptida tj. terminalnih amino-skupina spomenutih tripeptida i (2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-2-metilpropanske kiseline nakon čega je uslijedilo uklanjanje zaštitnih skupina (slika 5. a)). Ovo istraživanje pokazalo je da spojevi *R* konfiguracije dijela koji dolazi od 2-metilpropanske kiseline pokazuju veću adjuvantsku aktivnost od onih *S* konfiguracije, ali i od polaznih tripeptida koji nisu sadržavali manozu. Od pripremljenih derivata najučinkovitijim se pokazao spoj čija je strukturna formula prikazana na slici 5. b), a u korist prikazanom derivatu ide i to što je stabilan, apirogen, netoksičan te u vodi topljiv spoj.<sup>1</sup>



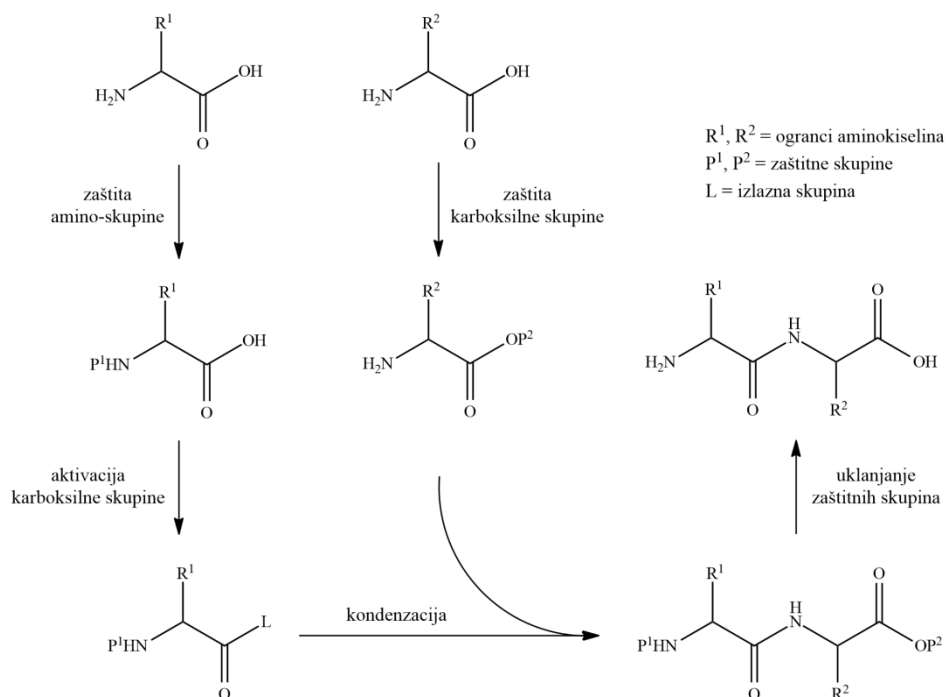
Slika 5. Manozilirani derivati desmuramil-dipeptida: a) sinteza u tri koraka iz adamantiltripeptida i (2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-2-metilpropanske kiseline ; b) strukturna formula najučinkovitijeg pripravljenog derivata.<sup>1</sup>

## 2.2. Sinteza peptida

Proteini i peptidi biološki su važni spojevi koji se mogu pronaći u svakom živom biću. Uključeni su u velik broj procesa kao što su: prijenos tvari preko membrane, međustanična komunikacija, zaštita organizma, stanično disanje i mnoge druge. Stoga ne iznenađuje velik interes znanstvenika za područje sinteze peptida i proteina. Povijest sinteze peptida duga je otprilike 140 godina, a danas je jedno od rijetkih područja kemije u kojem se neki spojevi mogu sintetizirati strojno, bez ljudske intervencije. Prvi *N*-zaštićeni dipeptid sintetizirao je 1881. godine T. Curtius, a tek 20 godina kasnije E. Fischer uspio je hidrolizom diketopiperazina glicina sintetizirati prvi nezaštićeni sintetizirani dipeptid. Razvojem nove

metodologije i primjenom zaštitnih skupina u sintezi peptida, M. Bergmann (bivši student E. Fischera) i L. Zervas otvorili su 1932. godine novo poglavlje u ovom području organske kemije. Prvi su to znanstvenici koji su sintetizirali peptid koristeći prethodno pripravljenu zaštićenu aminokiselinu te nakon sinteze uklonili zaštitu s peptida.<sup>7,8</sup>

Danas se metode sinteze peptida mogu podijeliti u dvije glavne skupine: sinteza u otopini ili SPS (engl. *solution phase synthesis*) i sinteza na čvrstom nosaču ili SPPS (engl. *solid phase peptide synthesis*). SPS klasičan je pristup sintezi koji se sastoji od nekoliko koraka: (i) aminokiseline i/ili fragmenti koji se žele kondenzirati moraju se zaštititi tj. zaštićuju se karboksilna i amino-skupina koje neće sudjelovati u formiranju peptidne veze; (ii) zaštićene aminokiseline i/ili fragmenti kondenziraju se uporabom kondenzacijskog reagensa. (kondenzacijski reagens aktivira karboksilnu skupinu koja će biti nukleofilno napadana, a potom reagira s nukleofilom tj. amino-skupinom); (iii) ukoliko je dobiveni peptid konačni spoj uklanjaju se sve zaštitne skupine, a ukoliko nije uklanja se zaštitna skupina s termina na kojem će biti nastavljena sinteza tj. s one skupine s kojom će se dogoditi slijedeća kondenzacijska reakcija (slika 6.). Svaki korak sinteze u otopini zahtjeva izolaciju te pročišćavanje i u konačnici karakterizaciju produkta, a ovaj postupak dugotrajan je pogotovo ako se željeni peptid sastoji od velikog broja aminokiselina i/ili fragmenata koji se na ovaj način trebaju povezati. Ovaj pristup omogućuje sintezu manjih peptida, a prednost ovakve sinteze je visoka čistoća konačnog produkta. Zbog navedenih nedostataka SPS pristupa sinteza peptida koji se sastoje od više aminokiselina danas se često provodi SPPS metodama.<sup>7,9</sup>



Slika 6. Shematski prikaz sinteze dipeptida u otopini.

SPPS pristup osmislio je 1963. godine R. B. Merrifield, a temelji se na „izgradnji“ peptida na aminokiselini pričvršćenoj na kruti nosač. U originalnom radu *C*-terminus budućeg peptida pričvršćen je za podlogu, a amino-skupina pričvršćene aminokiseline napada slobodnu karboksilnu skupinu druge aminokiseline kojoj je amino-skupina zaštićena. Osim za *C*-terminus, budući peptid može se za kruti nosač pričvrstiti i *N*-terminusom, ali i bočnim ogrankom kao i okosnicom peptida. Nakon reakcije kondenzacije višak aminokiseline se ispire, a s dobivenog dipeptida potom se uklanja zaštitna skupina. Nakon uklanjanja zaštitne skupine sve se ponovo ispire i može se krenuti u slijedeći krug „kondenzacija-ispiranje-uklanjanje zaštite-ispiranje“. Nakon sinteze željenog peptida uklanja se posljednja zaštita i cijepa se veza peptida i nosača (u originalnom radu otopinom natrijeva hidroksida). Opisani postupak tj. sinteza željenog peptida danas je automatizirana, ali je zbog iskorištenja ograničena na sintezu peptida koji se sastoje od nekoliko desetaka aminokiselina. Primjerice, pretpostavi li se da je iskorištenje svakog koraka sinteze peptida od 51 aminokiseline 99,8 %, ukupno iskorištenje za sintezu takvog peptida bit će 90 %, no pretpostavi li se da je iskorištenje svakog koraka 96,0 % tj. tek neznatno manje od 99,8 % ukupno iskorištenje sinteze bit će tek 13 %. Osim što je smanjeno iskorištenje samo po sebi loše, u slijedećem koraku sinteze peptid koji nije izreagirao bit će kraći i kao takav u reakciji s novom



aminokiselinom daje nusprodukt. Peptidi veći od tehnikom ograničenog broja aminokiselina mogu se sintetizirati kondenzacijom prethodno pripremljenih manjih fragmenata.<sup>7,9,10</sup>

### 2.2.1. Zaštitne skupine

Prilikom organske sinteze, a posebno sinteze peptida, često se javlja potreba za uporabom zaštitnih skupina. Kada se reakcija želi provesti kemoselektivno, što je cilj u većini slučajeva, spoj s više funkcijskih skupina mora se „zaštititi“ od neželjenih reakcija tj. potrebno je smanjiti reaktivnost funkcijskih skupina koje se, u uvjetima provođenja reakcija, mogu kemijski transformirati, a čija je reakcija neželjena. Mnoštvo različitih zaštitnih skupina razvijeno je u tu svrhu. Idealna zaštitna skupina mora zadovoljiti nekoliko uvjeta: (i) mora se jednostavno i s velikim iskorištenjem uvesti na željene funkcijske skupine, a mogući nusprodukti reakcije moraju se moći jednostavno ukloniti; (ii) mora biti stabilna u uvjetima provođenja reakcije; (iii) nakon provedenih transformacija mora se jednostavno i s velikim iskorištenjem ukloniti; (iv) uvedene zaštitne skupine trebale bi imati minimalan utjecaj na reaktivnost ostatka molekule; (v) reagensi koji se koriste za uvođenje i nusprodukti koji nastaju uklanjanjem zaštitnih skupina moraju biti bezopasni za ljude i prirodu. Uzimajući sve ove uvjete u obzir jasno je da se ne može definirati jedna, idealna zaštitna skupina za zaštićivanje određene funkcijske skupine (ako idealna zaštitna skupina uopće postoji), već da je ovisno o pojedinom spoju i funkcijskim skupinama koje se na spoju nalaze potrebno izabrati adekvatnu zaštitnu skupinu.<sup>11</sup>

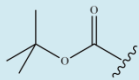
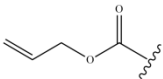
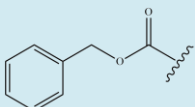
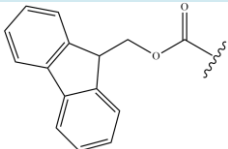
Kao što je ranije rečeno, sinteza peptida često i gotovo uvijek zahtjeva korištenje zaštitnih skupina, a velik broj njih upravo je razvijen za potrebe peptidne kemije. Zaštitne skupine koje se primjenjuju u peptidnoj kemiji dijele se s obzirom na to zaštićuju li  $\alpha$ -amino-,  $\alpha$ -karboksilnu ili skupinu u bočnom ogranku aminokiselina.<sup>11,12</sup>

#### 2.2.1.1. Zaštita amino-skupine aminokiseline

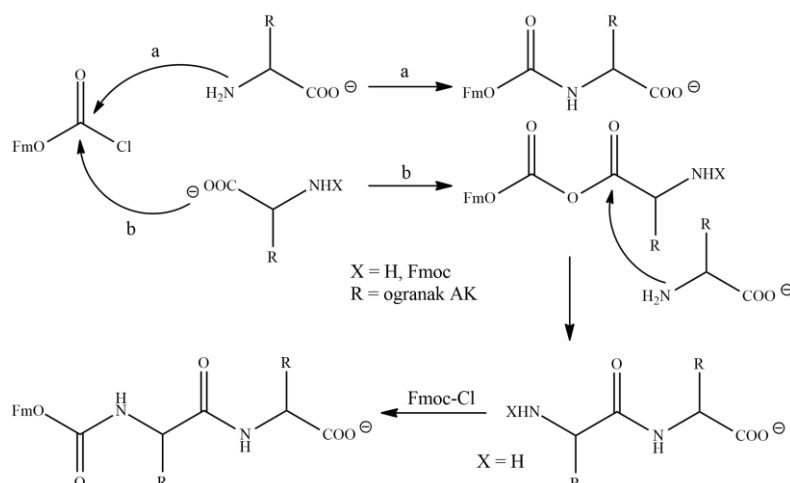
Prilikom sinteze peptida javlja se potreba za zaštitom  $\alpha$ -amino-skupine koja, ukoliko je nezaštićena, reagira kao baza, ali i kao nukleofil. Nukleofilni napad nezaštićene amino-skupine kao posljedicu može imati i neželjenu polimerizaciju aminokiselina. Uvođenje zaštitne skupine koja delokalizira elektrone s dušika uklanja oba problema, i bazičnost i

nukleofilnost. Najčešće skupine koje na taj način zaštićuju dušik amino-skupine su karbamatna i amidna skupina. Osim delokalizacije elektrona valja spomenuti i alkiliranje (i ariliranje) dušika kao jednu od vrsta zaštite no treba reći i kako je ona, u odnosu na delokalizaciju, rjeđe korištena vrsta zaštite. Neke od karbamatnih zaštitnih skupina prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Pregled odabranih karbamatnih zaštita amino-skupine.

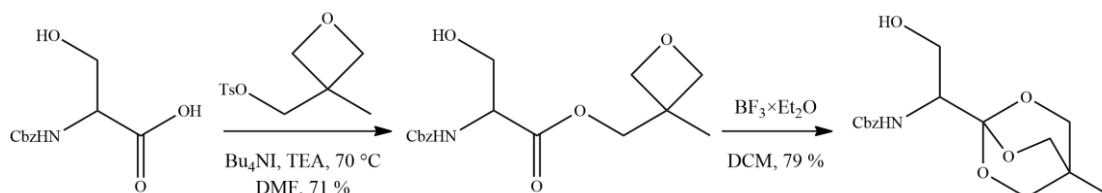
Zaštitna skupina	Način uvođenja	Način uklanjanja
 <i>tert</i> -butiloksikarbonil (Boc)	1) Boc <sub>2</sub> O, TEA-DMF, H <sub>2</sub> O <sup>13</sup> 2) 1-( <i>t</i> -butiloksikarbonil)benzotriazol, NaOH-dioksan <sup>14</sup> 3) Boc-OSu-DCM <sup>15</sup>	1) 25-50 % TFA-DCM <sup>13</sup> 2) HCl-dioksan <sup>16</sup> 3) MeSO <sub>3</sub> H-dioksan <sup>11</sup> 4) TMS-Cl, fenol-DCM <sup>20</sup>
 aliloksikarbonil (Alloc)	1) Alloc <sub>2</sub> O-dioksan, H <sub>2</sub> O <sup>16</sup> 2) PPL, Alloc <sub>2</sub> O-dioksan <sup>16</sup> 3) CAL B, Alloc <sub>2</sub> O, mol. sita (4 Å)-THF <sup>16</sup>	1) Pd(Ph <sub>3</sub> P) <sub>4</sub> , Me <sub>2</sub> NH×BH <sub>3</sub> -DMF <sup>16</sup> 2) Ni(CO) <sub>4</sub> -DMF, H <sub>2</sub> O <sup>16</sup> 3) I <sub>2</sub> -MeCN, H <sub>2</sub> O <sup>21</sup> 4) [Ni(bipy) <sub>3</sub> ](BF <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , Zn anoda-DMF <sup>16</sup>
 benziloksikarbonil (Cbz)	1) Cbz-Cl, MgO-H <sub>2</sub> O <sup>12</sup> 2) 1-benziloksikarbonilbenzotriazol, NaOH-dioksan <sup>17</sup> 3) Cbz-OSu, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -aceton, H <sub>2</sub> O <sup>18</sup>	1) H <sub>2</sub> -Pd/C <sup>11</sup> 2) HBr-AcOH <sup>11</sup> 3) BBr <sub>3</sub> <sup>11</sup>
 9-fluorenilmetiloksikarbonil (Fmoc)	1) Fmoc-Cl, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -dioksan, H <sub>2</sub> O <sup>19</sup> 2) Fmoc-OSu, TEA-DCM <sup>18</sup> 3) Fmoc-N <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -dioksan, H <sub>2</sub> O <sup>19</sup>	1) 20 % piperidin-DMF <sup>16</sup> 2) 10 % DEA-DMA <sup>11</sup> 3) TBAF-DMF <sup>16</sup> 4) H <sub>2</sub> -Pd/C <sup>16</sup>

Prilikom uvođenja Boc zaštitne skupine često se zbog reaktivnosti reagensa izbjegava korištenje *t*-butil-klorformijata. Problem kod korištenja klorformijatnih reagensa javlja se i prilikom uvođenja Alloc i Fmoc zaštite. Reakcije uvođenja ovih zaštitnih skupina pomoću klorformijatnih reagensa osim zaštitine aminokiseline (slika 7., put a) kao nusprodukte ponekad daju dipeptide korištenih aminokiselina koji nastaju nukleofilnim napadom nezaštićene karboksilne skupine aminokiseline (slika 7., put b). Navedena kondenzacija može se spriječiti privremenim zaštićivanjem karboksilne skupine ili korištenjem manje elektrofilnog reagensa za uvođenje zaštite. Takav, manje elektrofilan reagens je primjerice *N*-hidroksisukcinimidni ester.<sup>16,22</sup>

Slika 7. Nastanak dipeptida prilikom korištenja klorformijatnih reagensa.<sup>11,22</sup>

### 2.2.1.2. Zaštita karboksilne skupine aminokiselina

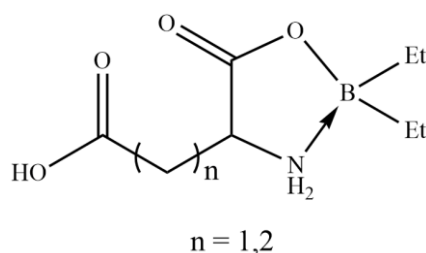
Osim da bi se spriječio nukleofilni napad karboksilata spomenut u prethodnom poglavlju, karboksilna skupina zaštićuje se i da bi se uklonili kiseli protoni te kako bi se spriječio nukleofilni napad na karbonilnu skupinu. Ponekad je cilj zaštićivanja karboksilne skupine povećanje topljivosti spoja u organskim otapalima radi provođenja reakcije ili snimanja spektra NMR. U nekim slučajevima, kada se u blizini karboksilne skupine nalazi kiralni centar, zaštitu je na karboksilnu skupinu potrebno uvesti i kako bi se spriječila enolizacija, a koja kao posljedicu može imati promjenu stereokemije na kiralnom atomu. Svi navedeni problemi vezani za karboksilnu skupinu mogu se eliminirati uvođenjem ortoesterske zaštite. Primjer uvođenja ortoesterske zaštite na benziloksikarbonilom zaštićeni serin prikazan je na slici 8.<sup>23</sup>

Slika 8. Primjer uvođenja ortoesterske zaštite na Cbz skupinom zaštićeni serin.<sup>23</sup>

Zbog jednostavnosti uvođenja, niske cijene reagensa, stabilnosti u raznim uvjetima te relativno jednostavnog skidanja češće od ortoesterske zaštite koristi se esterska zaštita

karboksilne skupine. Često korištene esterske zaštitne skupine za zaštićivanje karboksilnih skupina su 9-fluorenilmetilna (Fm), *t*-butilna (*t*-Bu) i benzilna (Bn) zaštita.

Novi problem javlja se prilikom zaštićivanja karboksilnih kiselina s dvije ili više karboksilnih skupina. Problem selektivnosti uvođenja zaštite na takve karboksilne kiseline, u kontekstu prirodnih aminokiselina, pojavljuje se prilikom zaštićivanja glutaminske i asparaginske kiseline te ga je zbog problematike ovog rada nužno razmotriti. Sinteza peptida koje uključuje nezaštićene spomenute aminokiseline može dovesti do nastanka razgranatog peptida, ali i do intramolekulske ciklizacije. Selektivno zaštićivanje karboksilne skupine u bočnom ogranku aminokiselina moguće je provesti prevođenjem kiseline u kompleks bakra ili bora nakon čega slijedi esterifikacija. Bakar/bor koordiniran je  $\alpha$ -amino- i  $\alpha$ -karboksilnom skupinom dok karboksilna skupina u bočnom ogranku ostaje slobodna (slika 9.). Slobodna karboksilna skupina nakon toga reagira s alkoholom<sup>24</sup> ili alkil-halogenidom<sup>25</sup> dajući odgovarajući zaštićeni ester.



Slika 9. Strukturna formula kompleksa bora nastalog prilikom zaštićivanja karboksilne skupine u bočnom ogranku.<sup>24</sup>

Zaštićivanje  $\alpha$ -karboksilne skupine glutaminske i asparaginske kiseline moguće je provesti koristeći nekoliko strategija od kojih su, u nastavku, opisane dvije: (i) neizravno zaštićivanje: selektivno zaštićivanje karboksilne skupine u bočnome ogranku nakon čega slijedi zaštićivanje  $\alpha$ -karboksilne skupine i uklanjanje zaštite s bočnog ogranka; (ii) izravno zaštićivanje: selektivno zaštićivanje  $\alpha$ -karboksilne skupine reakcijom pripremljenog cikličkog anhidrida aminokiseline s odgovarajućim alkoholom ili reakcijom aminokiseline s alkil-halogenidom u prisutnosti baze. Obje izravne metode kao polazni spoj koriste *N*-zaštićenu aminokiselinu, a selektivnost metoda temelji se na razlici u reaktivnosti karboksilnih skupina čemu je uzrok različiti utjecaj amino-skupine (različita udaljenost karboksilnih skupina od amino-skupine).<sup>11</sup>

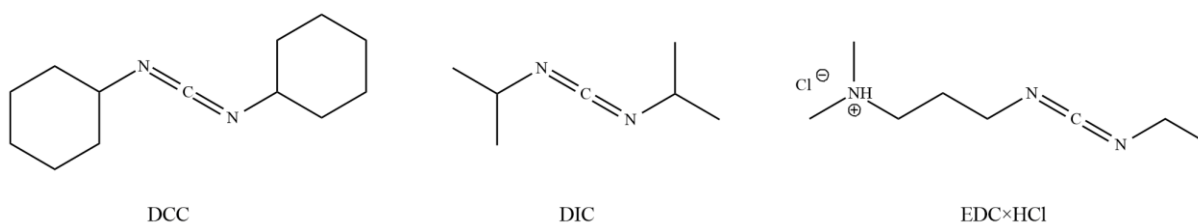
### 2.2.2. Kondenzacija aminokiselina

Amidi tj. peptidi mogu se pripraviti kondenzacijskom reakcijom karboksilne i amino-skupine aminokiselina, ali se ova reakcija ne događa spontano pri sobnoj temperaturi (reakcija karboksilne i amino-skupine pri sobnoj temperaturi rezultira nastankom soli). Kondenzacija aminokiselina uz izdvajanje vode događa se na relativno visokim temperaturama (160-180 °C)<sup>26</sup> pri kojima je i veća vjerojatnost događanja neželjenih reakcija. Navedeni problemi mogu se riješiti aktivacijom karboksilne skupine tj. prevođenjem –OH u bolju izlaznu skupinu prije nukleofilnog napada amina. To je moguće učiniti prevođenjem karboksilne kiseline u acil-halogenid, acil-azid, anhidrid, ester te mnoge druge derivate. Reagensi koji se koriste u reakcijama pretvorbe kiseline u spomenute derivate nazivaju se kondenzacijskim reagensima (engl. *coupling reagent*). Zbog svoje uloge u prevođenju kiseline u spojeve s boljom izlaznom skupinom kondenzacijski reagensi nazivaju se i aktivacijskim sredstvima.<sup>27</sup>

Kondenzacija uz aktivaciju karboksilne skupine može se provesti na tri načina: (i) pripravljeni aktivirani karbonilni spoj izolira se iz reakcijske smjese te potom reagira s aminom; (ii) aktivirani spoj se pripravlja odvojeno, ali se ne izolira te se u istu reakcijsku smjesu dodaje amin; (iii) aktivirani spoj pripravlja se u prisutnosti amina.<sup>28</sup>

#### 2.2.2.1. Karbodiimidni reagensi

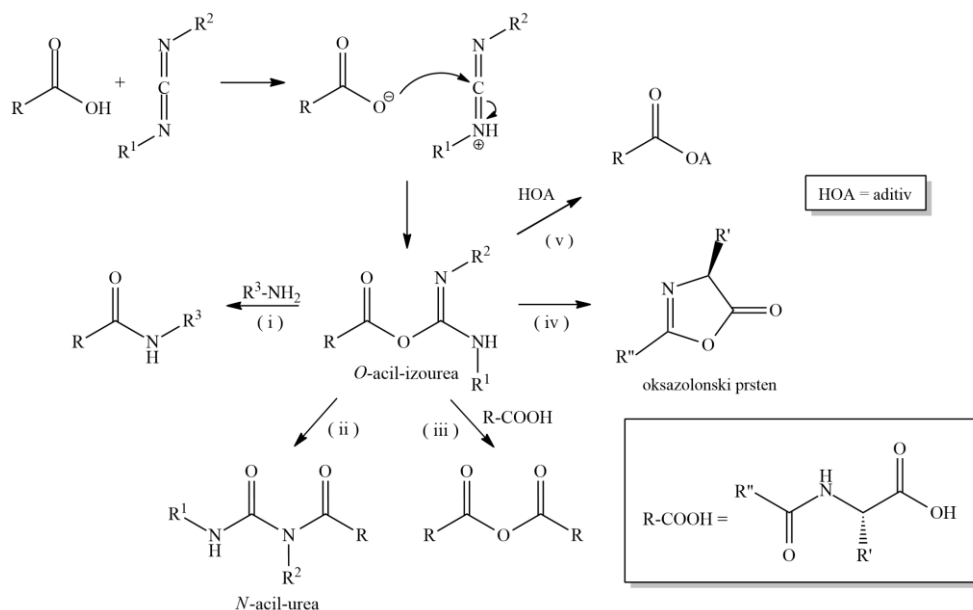
Karbodiimidni reagensi u upotrebi su od sredine prošlog stoljeća (1955. god.), a koriste se za prevođenje karboksilne kiseline u simetrični anhidrid koji po pripravi reagira s nukleofilom tj. amino-skupinom.<sup>27</sup> Dicikloheksilkarbodiimid (DCC), diizopropilkarbodiimid (DIC) i *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimid hidroklorid (EDC×HCl) često su korišteni karbodiimidni reagensi čije su strukturne formule prikazane na slici 10.<sup>28</sup>



Slika 10. Strukturne formule često korištenih karbodiimidnih reagensa.<sup>28</sup>

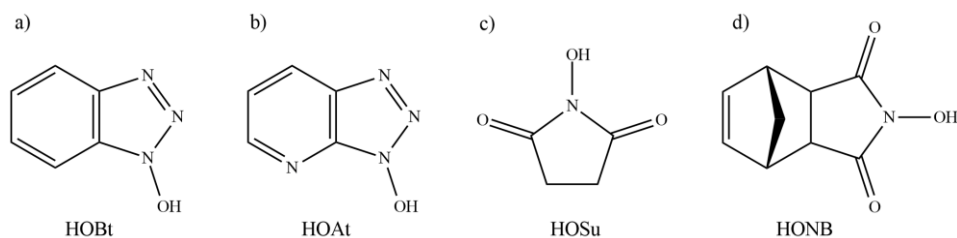
Mehanizam nastanka anhidrida, kao i strukturne formule mogućih nusprodukata, prikazani su na slici 11. U prvom koraku (nakon izmjene protona) karboksilat nukleofilno napada karbodiimidni reagens prilikom čega nastaje *O*-acil-izourea, međuprodukt koji može reagirati na nekoliko načina. Nukleofilnim napadom amina na *O*-acil-izoureu kao produkt nastaje željeni peptid i *N,N'*-disupstituirana urea kao nusprodukt (i), dok pregrađivanjem iz *O*-acil-izouree može nastati *N*-acil-urea (ii). Pregrađivanje se može usporiti odabirom otapala; brže je u otapalima visoke dielektrične konstante kao što je DMF, a sporije u otapalima niže dielektrične konstante kao što je DCM. Napadom karboksilata na *O*-acil-izoureu kao produkt nastaje željeni anhidrid (iii). Dobiveni anhidrid tada može reagirati s aminom kao nukleofilom i dati željeni peptid. Koristi li se kao karbodiimidni reagens DCC vjerojatan je i put (iv) u kojem iz *O*-acil-izouree nastaje oksazolonski prsten koji dovodi do epimerizacije.<sup>27,29</sup> Da bi se spriječila epimerizacija W. König i R. Geiger u sintezu peptida potpomognutu karbodiimidnim reagensima uvode aditiv, u njihovom slučaju 1-hidroksi-1*H*-benzotriazol (HOBt).<sup>30</sup> Osim što smanjuju udio nastalog epimera, aditivi povećavaju iskorištenje reakcije i smanjuju udio nastale *N*-acil-uree. Nabrojana višestruka korist ostvaraju se zahvaljujući putu (v) tj. nastanku aktiviranog estera iz *O*-acil-izouree. Aktivirani ester aminokiseline potom može reagirati s amino-skupinom druge aminokiseline što rezultira nastankom željenog peptida.<sup>29</sup>

Pogonska sila reakcije kondenzacije aminokiselina uz karbodiimidne reagense je nastanak disupstituirane uree, no treba reći i kako u nekim slučajevima nastanak spomenute uree predstavlja velik problem prilikom izolacije željenog produkta. Primjerice, korištenjem dicikloheksilkarbodiimida kao nusprodukt nastaje dicikloheksilurea koja je topljiva u većini otapala. Zbog navedenog problema pribjegava se korištenju kondenzacijskih reagensa kao što su EDC×HCl, a koji kao nusprodukt daju ureu topljivu u vodi.<sup>28,29</sup>



Slika 11. Mehanizam aktivacije karboksilne skupine karbodiimidnim reagensom i mogući nusprodukti.<sup>27,29</sup>

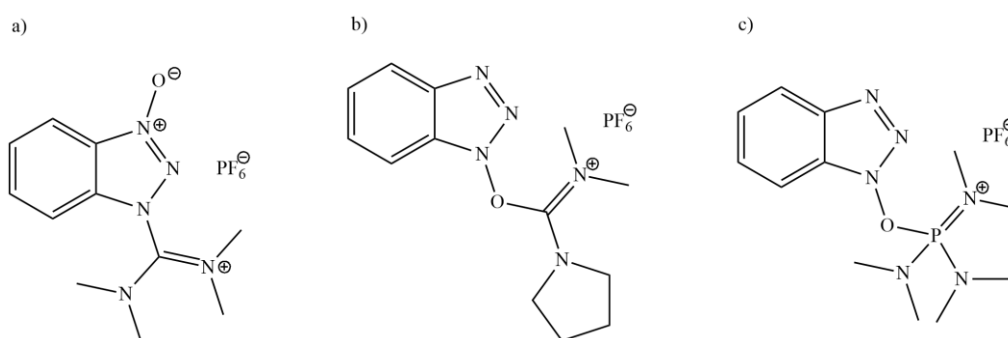
Dvadesetak godina nakon otkrića i uspješne upotrebe HOBt-a kao aditiva zamjenom jednog od ugljikovih atoma u bezotriazolnom prstenu dušikom dobiven je 1-hidroksi-7-azabenzotriazol (HOAt). Spomenuti spoj pokazao se još učinkovitijim od svog prethodnika; dodatno je smanjio udio nastalog epimera i povećao iskorištenje reakcije. Ipak, zbog eksplozivnosti benzotriazolnih derivata njihova upotreba i dostupnost su ograničeni. Za razliku od prethodno spomenutih spojeva *N*-hidroksisukcinimid (HOSu) nije eksplozivan, a njegovi su aktivirani esteri stabilni što omogućuje njihovu izolaciju. Derivat *N*-hidroksisukcinimida, imid *N*-hidroksi-5-norbornen-2,3-dikarboksilne kiseline (HONB) navodi se kao najbolji izbor prilikom sinteze peptida na čvrstom nosaču u vodi. Strukturne formule navedenih aditiva prikazane su na slici 12.<sup>27, 29, 31</sup>



Slika 12. Strukturne formule aditiva: a) HOBt, b) HOAt, c) HOSu i d) HONB.<sup>29</sup>

2.2.2.2. Kondenzacijski reagensi na bazi 1-hidroksi-1*H*-benzotriazola

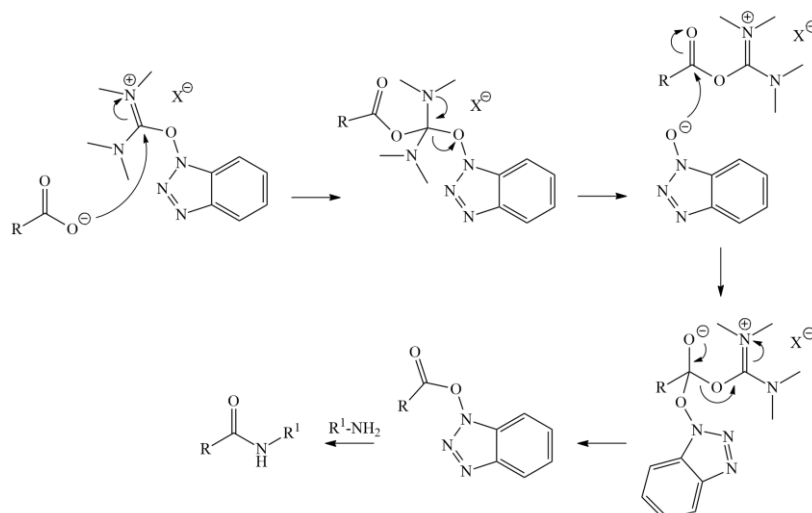
Upotreba kondenzacijskih reagensa koji u svojoj strukturi sadržavaju benzotriazolnu podjedinicu još je jedan od načina kako se iz aminokiselina mogu pripremiti aktivirani esteri potrebni za kondenzaciju. Kao velika skupina kondenzacijskih reagensa na bazi benzotriazola izdvajaju se soli koje se dijele prema kationskoj vrsti koju sadržavaju. Često korištene soli su one s aminijevim, uronijevim i fosfonijevim kationom, a strukturne formule reagensa koje sadrže nabrojane katione prikazane su na slici 13.<sup>27</sup>



Slika 13. Strukturne formule kondenzacijskih reagensa na bazi 1-hidroksi-1*H*-benzotriazola: a) HBTU, b) HBM<sub>2</sub>PyU i c) BOP.<sup>27</sup>

Mehanizam aktivacije karboksilne skupine pomoću kondenzacijskog reagensa koji sadrži uronijev kation prikazan je na slici 14. U prvom koraku karboksilat nastao disocijacijom aminokiseline nukleofilno napada kondenzacijski reagens prilikom čega nastaje nestabilna *O*-acil-izouronijeva sol. Nastala sol brzo reagira s anionom 1-hidroksi-1*H*-benzotriazola što daje aktivirani ester koji reakcijom s amino-skupinom druge aminokiseline kao produkt daje željeni peptid. Nusprodukt kondenzacije je urea čiji je nastanak ujedno i pokretačka sila reakcije. Umjesto napada karboksilata kao neželjena reakcija može se dogoditi i nukleofilni napad amino-skupine što rezultira nastankom gvanidinskog nusprodukta.<sup>27</sup>





Slika 14. Mehanizam aktivacije karboksilne kiseline reagensom koji sadrži uronijev kation.<sup>27</sup>

Mehanizam aktivacije aminijevim solima analogan je prethodno opisanom te rezultira nastankom uree, a kao i kod uronijevih soli moguć je nastanak gvanidinskog nusprodukta. Za razliku od upotrebe uronijevih i aminijevih soli, upotreba fosfonijevih soli ne rezultira nastankom gvanidinskog nusprodukta što se ističe kao prednost navedenih reagensa. Nusprodukt korištenja fosfonijevih reagensa je odgovarajući oksid fosfina čiji je nastanak, kao i u mnogim drugim reakcijama s istim nusproduktom, pokretačka sila reakcije. Nastanak spomenutog oksida istovremeno može predstavljati i veliki problem pa tako korištenje primjerice benzotriazol-1-iloksi-tris(dimetilamino)fosfonijeva heksafluorofosfata (BOP) rezultira nastankom izuzetno toksičnog heksametil-fosforamida (HMPA). BOP, poznat i kao Castrov reagens, prva je sol na bazi 1-hidroksi-1*H*-benzotriazola korištena kao kondenzacijski reagens, a navedeni problem vezan uz njegovo korištenje kao posljedicu je imao rad na sintezi reagensa čije korištenje kao nusprodukte ima manje toksične ili u potpunosti netoksične spojeve.<sup>27, 29, 31</sup>

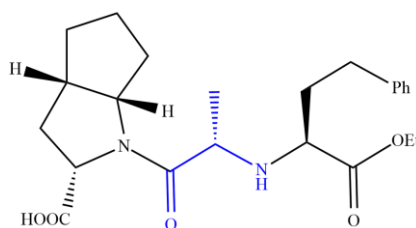
### 2.2.3. Modifikacije peptida

Modifikacije peptida mogu se podijeliti na: (i) modifikacije C-terminusa (najčešća je amidacija); (ii) modifikacije N-terminusa (najčešće je aciliranje) i (iii) modifikacije koje se ne događaju na krajevima peptida (fosforilacija, izotopno obilježavanje, stvaranje disulfidnih

veza itd.). Modifikacije krajeva peptida eliminiraju pozitivan odnosno negativan naboj te često utječu na strukturu, a mogu i usporiti enzimsku razgradnju ciljanog peptida.<sup>32</sup>

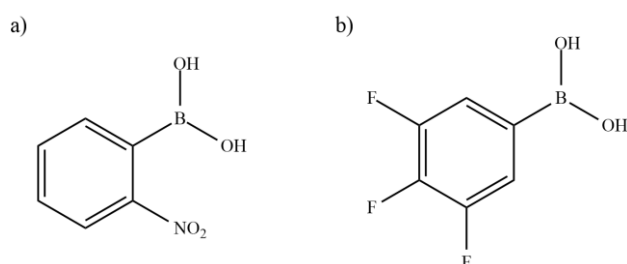
### 2.2.3.1. Amidacija C-terminusa

Kao što je prethodno rečeno, amidacija je najčešća modifikacija C-terminusa, a amidi aminokiselina dio su brojnih struktura spojeva važnih u industriji lijekova. Struktura jednog od njih, ramiprila, prikazana je na slici 15. Navedeni spoj derivat je alanina, a djeluje kao inhibitor angiotenzin-konvertirajućeg enzima.<sup>33</sup>



Slika 15. Strukturna formula ramiprila, C- i N-modificirane aminokiseline korištene kao inhibitor angiotenzin konvertirajućeg enzima.<sup>33</sup>

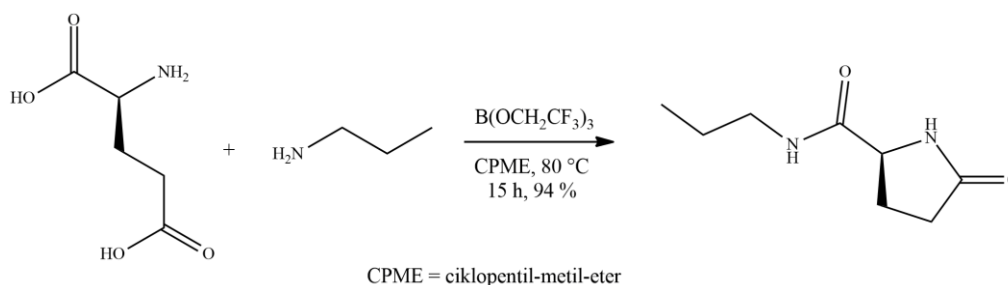
A. Whiting i suradnici nedavno su predstavili sintezu amida iz N-zaštićenih aminokiselina i odgovarajućeg amina koristeći aril-boronske reagense. Kao najučinkovitije reagense u amidaciji N-zaštićenog prolina izdvojili su o-nitrofenil-boronsku kiselinu i 3,4,5-trifluorfenil-boronsku kiselinu (slika 16.).<sup>34</sup>



Slika 16. Strukturne formule aril-boronskih reagensa korištenih za amidaciju aminokiselina: a) o-nitrofenil-boronska kiselina i b) 3,4,5-trifluorfenil-boronska kiselina.<sup>34</sup>

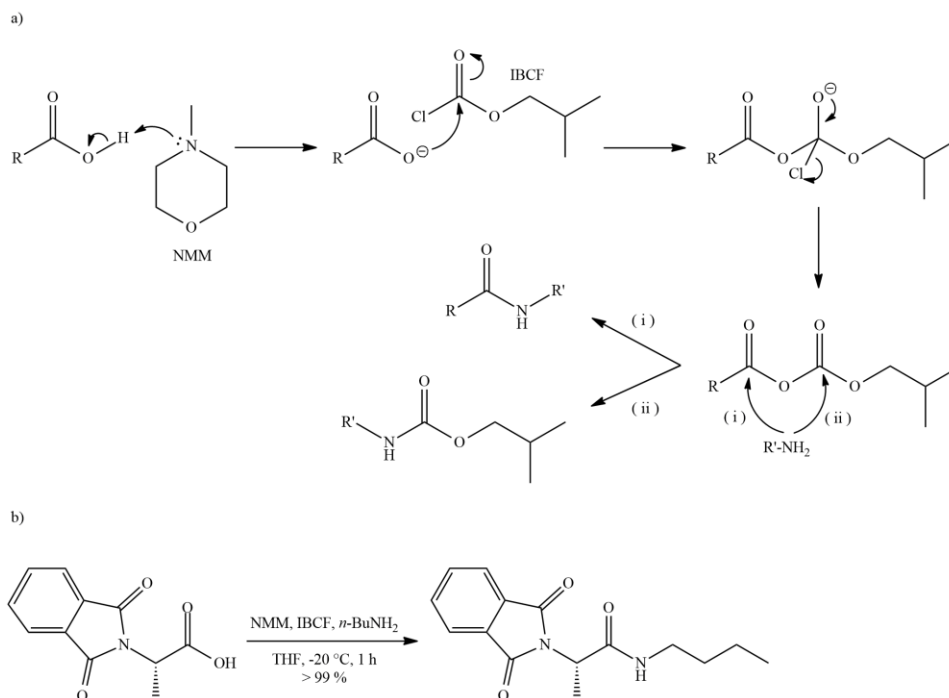
Nekoliko godina kasnije T. D. Sheppard i suradnici predstavili su metodu direktne amidacije nezaštićenih aminokiselina uz korištenje boratnog estera kao katalizatora. Navedeni reagens, ester boratne kiseline i 2,2,2-trifluoetanol, pokazao se učinkovitijim od analognog

estera metilnog alkohola. Navedena skupina znanstvenika u istom radu navodi kako se kao najbolje otapalo pokazao ciklopentil-metil-eter (CPME), a temperatura provođenja reakcije bila je 80 °C. Iako se metoda pokazala efikasnom, prilikom sinteze amida nekoliko aminokiselina amidacija nezaštićene glutaminske kiseline, koju je zbog tematike ovog rada nužno razmotriti, nije rezultirala očekivanim amidom kao produktom. Umjesto toga, amidacija je rezultirala nastankom laktama (slika 17.).<sup>33</sup>



Slika 17. Amidacija nezaštićene glutaminske kiseline.<sup>33</sup>

Ranije spomenuti kondenzacijski reagensi (poglavlje 2.2.2.) djeluju tako da aktiviraju karboksilnu skupinu tj. postojeću izlaznu skupinu zamjenjuju boljom. Na identičan način funkcionira i slijedeća metoda pripreme amida temeljena na prevođenju karboksilne skupine u mješoviti anhidrid koji potom reagira sa željenim aminom. Metodu je osmislio J. R. Vaughan, a kao reagens za sintezu anhidrida tj. aktivaciju karboksilne skupine koristi se odgovarajući klorformijat i tercijarni amin kao baza (često *N*-metilmorfolin). Navedena metoda kao polazni spoj koristi *N*-zaštićenu aminokiselinu, a mehanizam i primjer ove reakcije prikazani su na slici 18. Aktivacija i nastanak anhidrida događa se u nekoliko minuta, a nastali anhidrid može s nukleofilom dati dva produkta: (i) željeni modificirani peptid i (ii) uretan nastao napadom nukleofila na dio anhidrida koji potječe od klorformijatnog reagensa. Nastajanje uretana u većini slučajeva nije zamjetno, no ponekad može i za do 10 % smanjiti prinos reakcije. Nastajanje spomenutog uretana razlog je zašto se nukleofil tj. amin ne dodaje u reakcijsku smjesu prije aktivacije reakcijom amino-skupine i klorformijata nastao bi isti produkt. Postoje i dokazi da tercijarni amin korišten u reakciji osim za uklanjanje klorovodika služi i kao nukleofil koji napadom na klorformijatni reagens kao produkt daje acil-morfolinijev kation. Dobiveni kation potom može reagirati s karboksilatom što rezultira nastankom prethodno spomenutog mješovitog anhidrida.<sup>27, 29, 35-38</sup>



Slika 18. a) Mehanizam amidacije uz IBCF kao kondenzacijski reagens i b) primjer amidacije *N*-zaštićenog alanina metodom s IBCF reagensom.

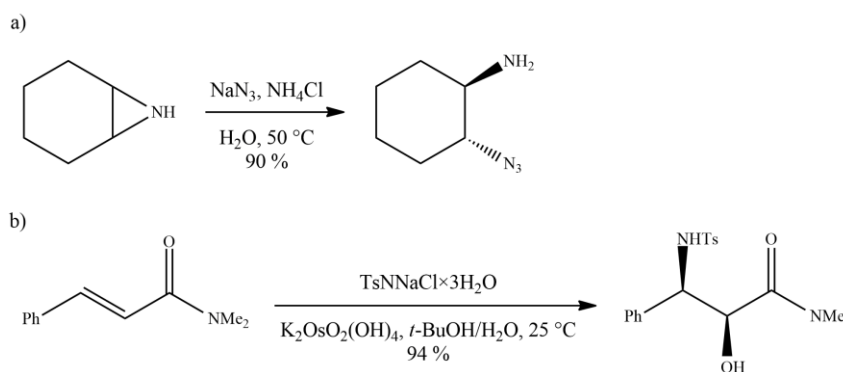
Osim korištenja klasičnih reagensa za amidaciju aminokiselina kao što su BOP i onih koji su relativno nedavno prvi puta upotrijebljeni u te svrhe kao što su boratni reagensi, literatura navodi i primjere korištenja enzima kao i metalnih katalizatora u reakcijama amidacije.<sup>39</sup>

### 2.3. Klik-kemija

Termin klik-kemija prvi su 2001. godine definirali H. C. Kolb, M. G. Finn i K. Barry Sharpless, a definicija je obuhvaćala niz uvjeta koje reakcija mora zadovoljiti kako bi se smatrala klik-reakcijom. Navode kako su to široko primjenjive reakcije visokog iskorištenja koje kao nusprodukte imaju bezopasne spojeve koje je moguće ukloniti nekromatografskim tehnikama. Također, reakcije moraju biti stereospecifične (ne nužno i enantioselektivne), a u idealnom slučaju i neosjetljive na kisik i vodu. Polazni spojevi i reagensi moraju biti lako dostupni, a ukoliko je neophodno korištenje otapala ona moraju biti bezopasna ili barem lako

uklonjiva. Izolacija produkta mora biti jednostavna, a dobiveni produkti moraju biti stabilni u fiziološkim uvjetima.<sup>40</sup>

U nastavku je izdvojeno nekoliko vrsta reakcija koje, bolje od ostalih, pristaju uz termin klik-kemija: (i) cikloadicija nezasićenih vrsta; (ii) nukleofilna supstitucija prilikom koje dolazi do otvaranje napetih heterocikličkih struktura (epoksid, aziridin itd.); (iii) nealdolne reakcije karbonilne kemije (nastanak urea, oksima, hidrazona itd.); (iv) adicija na nezasićenu ugljik-ugljik vezu (dihidroksilacija, epoksidacija, aziridinacija itd.). Primjeri nekih od spomenutih reakcija prikazani su na slici 19.<sup>40, 41</sup>



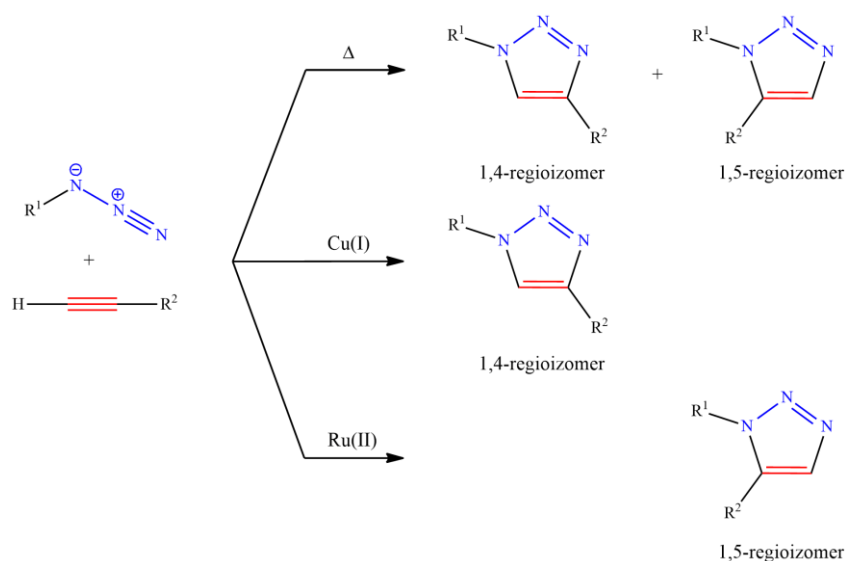
Slika 19. Primjeri klik reakcija: a) otvaranje aziridinskog prstena nukleofilnim napadom azida i b) reakcija adicije na dvostruku vezu-aminohidroksilacija.<sup>40</sup>

Katalizirana Huisgenova 1,3-dipolarna azid-alkin cikloadicija nesumnjivo je idealan primjer klik-kemije pa se upravo zbog toga termin klik-reakcija često koristi i kao sinonim za spomenutu cikloadiciju.

### 2.3.1. Azid-alkin cikloadicija

Reakcija terminalnog alkina kao dipolarofila i azida kao 1,3-dipola tipična je 1,3-dipolarna cikloadicija prilikom koje nastaje peteročlani 1,2,3-triazolni prsten. Prije otkrića bakrovih katalizatora 1,3-dipolarna azid-alkin cikloadicija provodila se pri povišenoj temperaturi (često refluks toluena ili tetraklorugljika), a kako nije regiospecifična, rezultirala je nastankom dva produkta; 1,4- i 1,5-regioizomera. Otkriće katalizatora koje sadrže bakar(I) promijenilo je ovu cikloadiciju omogućujući regioselektivno provođenje reakcije (nastanak 1,4-disupstituiranog

triazola) u blažim uvjetima (niže temperature). Iako je bakrom(I) katalizirana azid-alkin cikloadicija ili CuAAC (engl. *Cu catalyzed azide-alkyne cycloaddition*) najčešće korištena metoda pripreve 1,4-dispustituiranih triazola, spomenuti regioizomeri mogu se pripremiti i korištenjem srebrnih katalizatora (AgAAC). Osim 1,4-regioizomera regioselektivno se može pripremiti i 1,5-dispustituirani 1,2,3-triazol. Ovaj regioizomer može se pripremiti u reakciji kataliziranoj rutenijevim kompleksom (RuAAC).

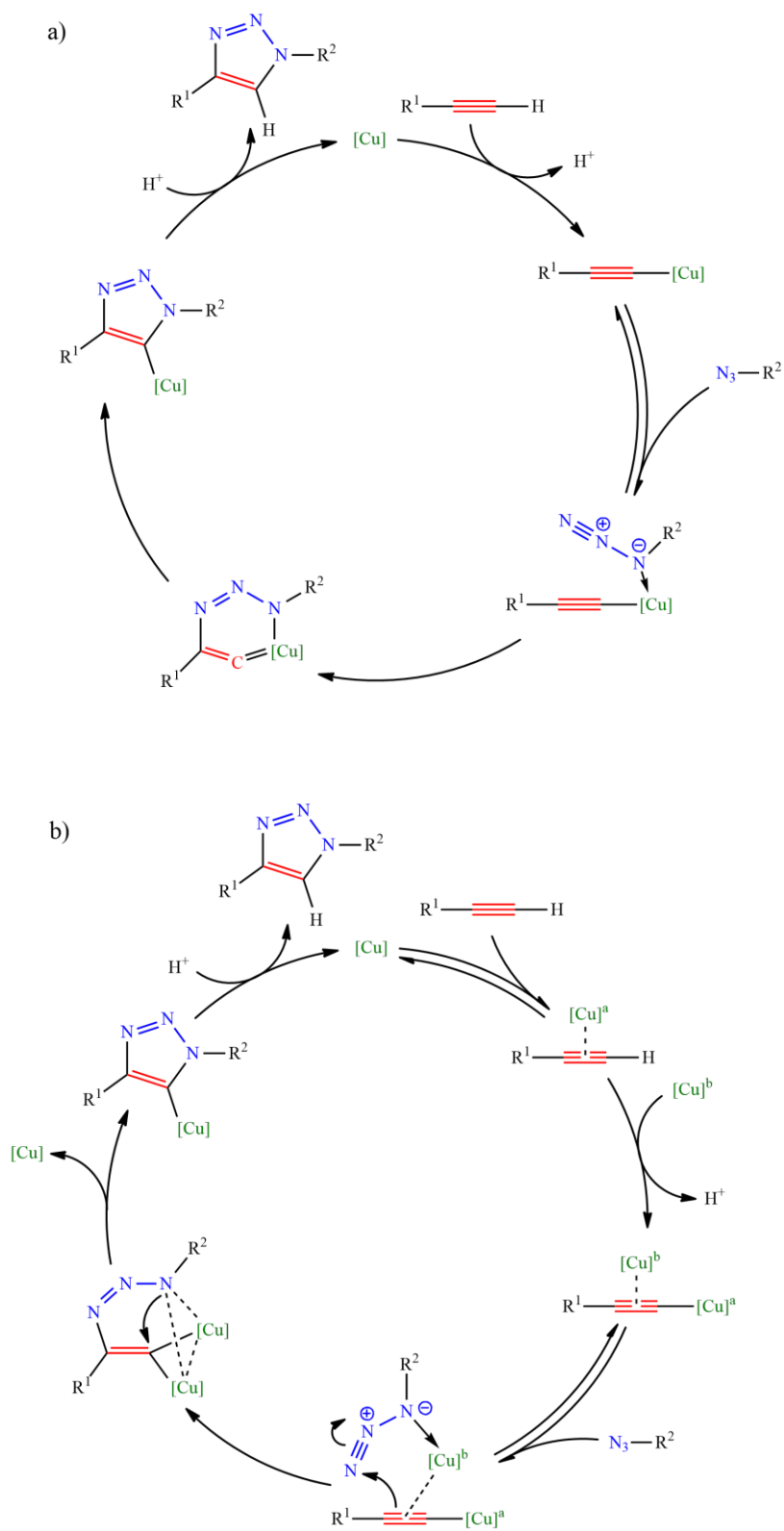


Slika 20. Produkti nastali nekataliziranom Huisgenovom cikloadicijom te cikloadicijama uz dodatak bakrovog(I) odnosno rutenijevog(II) katalizatora.

### 2.3.1.1. Bakrom katalizirana azid-alkin cikloadicija (CuAAC)

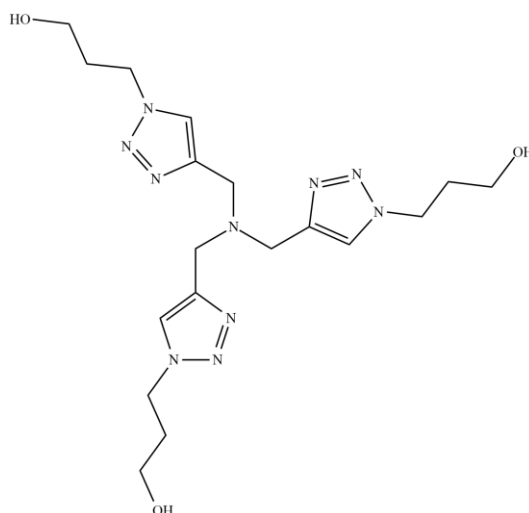
Osim što su omogućili regioselektivno provođenje reakcije, bakrovi katalizatori su i višestruko ubrzali azid-alkin cikloadiciju. Iako često ne zahtjeva povišenu temperaturu, bakrom katalizirana Huisgenova cikloadicija može se provoditi u prilično širokom temperaturnom rasponu (0-160 °C).<sup>41</sup>

Iako je prvotno predloženi mehanizam uključivao participaciju samo jednog atoma bakra (slika 21. a)), istraživanja među kojima je i praćenje izotopnog sastava definitivno su isključila tu mogućnost. B. T. Worrel i suradnici u radu objavljenom u časopisu *Science* predlažu mehanizam koji uključuje nastanak dinuklearnog bakrovog kompleksa (slika 21. b)).

Slika 21. Mehanizam CuAAC s: a) jednim bakrovim atomom i b) dva bakrova atoma.<sup>42,43</sup>

U prvom koraku mehanizma dolazi do nastanka kompleksa u kojem  $\pi$ -veza alkina koordinira prvi atom bakra. U slijedećem koraku alkin se deprotonira, prvi atom bakra zamjenjuje otpušteni proton prilikom čega nastaje bakrov acetilid, a drugi atom bakra stvara kompleks s  $\pi$ -vezom spomenutog acetilida. Nastali dinuklearni kompleks stvara interakciju s azidom i usmjerava ga, a nakon čega dolazi do stvaranja prve C-N veze između  $\beta$ -ugljika alkina i terminalnog dušikovog atoma azida. Zatvaranjem prstena i stvaranjem druge C-N veze dolazi do odlaska jednog od bakrovih atoma. Protoniranjem nastalog spoja izlazi i drugi atom bakra, a kao produkt opisanog katalitičkog ciklusa dobiva se 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazol.<sup>42, 43</sup>

Jedna od metoda dodatka katalizatora je generiranje bakra(I) *in situ* reducirajući bakar(II) prisutan u njegovim solima (npr.  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) koristeći reducens, primjerice natrijev askorbat. Prednosti ove strategije pred unošenjem bakra(I) u obliku soli su mogućnost provođenja reakcije u vodenom mediju i niska cijena potrebnih reagensa, a osim navedenog reakciju nije potrebno provoditi u atmosferi koja ne sadrži kisik. Nedostatak ove tehnike mogućnost je neželjene redukcije bakra(II) do elementarnog bakra, a koja se može spriječiti podešavajući omjer reducensa i izvora bakra i/ili dodavajući bakar-stabilizirajući agens kao što je tris-(hidroksipropiltriazolilmetil)amin (THPTA) čija je strukturna formula prikazana na slici 22.<sup>41</sup>



Slika 22. Strukturna formula tris-(hidroksipropiltriazolilmetil)amina (THPTA).<sup>41</sup>

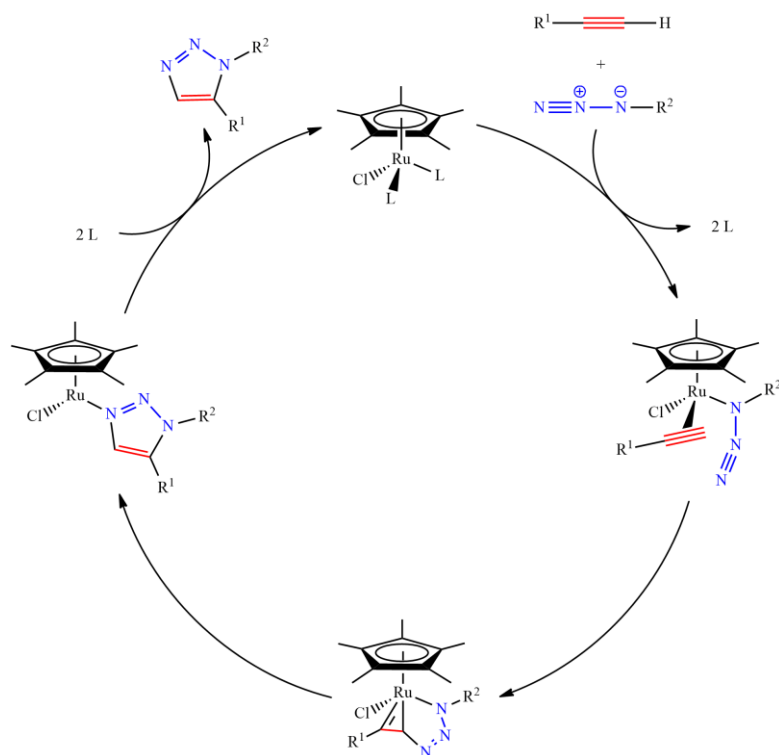


Osim što se može generirati *in situ*, bakar(I) se u reakcijsku smjesu može unijeti i izravno, u obliku soli. U ovu svrhu često su korišteni triflat, jodid, bromid, acetat, ali i mnoge druge soli bakra(I). Rad sa solima bakra(I) zahtjeva korištenje organskih otapala i provođenje reakcije u atmosferi bez kisika.<sup>41, 44</sup>

### 2.3.1.2. Rutenijem katalizirana azid-alkin cikloadicija (RuAAC)

Razvoj klik-kemije tj. kemije koja proučava azid-alkin 1,3-cikloadiciju uslijedio je nakon otkrića bakrovih(I) katalizatora. Nedugo nakon otkrića spojeva koji učinkovito kataliziraju regioselektivnu sintezu 1,4-disupstituiranih triazola pronađeno je da se za učinkovitu regioselektivnu sintezu 1,5-regioizomera mogu koristiti kompleksi rutenija(II). Osim 1,5-disupstituiranih, koristeći ove spojeve kao katalizatore mogu se pripraviti i trisupstituirani triazoli. Naime, rutenijem katalizirana azid-alkin cikloadicija može se provoditi s terminalnim kao i s alkinima koji to nisu. Reakcija terminalnog alkina daje spomenuti 1,5-regioizomer, a reakcija alkina u kojem trostruka veza nije terminalna kao produkt daje 1,4,5-trisupstituirani triazol.<sup>45</sup>

Kao katalizatori rutenijem katalizirane cikloadicije učinkovitim su se pokazali kompleksi rutenija(II) s pentametilklopentadienilnim i kloridnim anionom, a predloženi mehanizam RuAAC opisan je u nastavku (slika 23.). Katalitički ciklus počinje otpuštanjem odnosno zamjenom dva liganda azidom i alkinom. U slijedećem koraku, koji ujedno kontrolira regioselektivnost procesa, dolazi do oksidativne kondenzacije azida i alkina prilikom čega nastaje rutenaciklički međuprodukt. Nakon nastanka prve C-N veze metalociklički međuprodukt podliježe reduktivnoj eliminaciji, a na samom kraju katalitičkog ciklusa dolazi do oslobađanja triazolnog produkta i regeneriranja katalizatora čime ovaj ciklus i završava.<sup>45</sup>

Slika 23. Predloženi mehanizam RuAAC.<sup>45</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

Spoj 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octena kiselina, korišten u sintezi, prethodno je pripremljen u laboratoriju literaturno opisanim postupcima, a svi ostali reagensi i otapala komercijalno su dostupni i analitičke su čistoće: adamantan-1-ol (*Sigma-Aldrich*), kloroform (*Carlo Erba*), sumporna kiselina ( $H_2SO_4$ , *Fluka*), natrijev azid ( $NaN_3$ , *Sigma-Aldrich*), diklormetan (DCM, *Carlo Erba*), natrijev hidrogenkarbonat ( $NaHCO_3$ , *Gram mol*), natrijev sulfat ( $Na_2SO_4$ , *Gram mol*), propargilamin (*Sigma-Aldrich*), 1,4-dioksan (*Kemika*), di-*t*-butil-dikarbonat ( $Boc_2O$ , *Fluka*), trietilamin (TEA, *Sigma-Aldrich*), natrijev L-askorbat (*Sigma-Aldrich*), bakrov(II) sulfat pentahidrat ( $CuSO_4 \times 5H_2O$ , *Kemika*), etil-acetat (EtOAc, *Carlo Erba*), trifluorocetna kiselina (TFA, *Merck*), metanol (MeOH, *Fluka*), klorovodična kiselina (HCl, *Carlo Erba*), dietil-eter ( $Et_2O$ , *J. T. Baker*), D-glutaminska kiselina (H-D-Glu-OH, *Bachem*), benzilni alkohol (BnOH, *Sigma-Aldrich*) borov trifluorid eterat ( $BF_3 \times Et_2O$ , *Sigma-Aldrich*), tetrahidrofuran (THF, *Sigma-Aldrich*), heksan (*Scharlau*), etanol (EtOH, *Kemika*), natrijev klorid (NaCl, *Kemika*), *N,N*-dimetilformamid (DMF, *Fisher Chemical*), benzotriazol-1-iloksi-tris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat (BOP, *Sigma-Aldrich*), *N,N*-diizopropiletilamin (DIPEA, *Merck*), aceton (*Gram mol*), kalijev hidrogensulfat ( $KHSO_4$ , *Kemika*), *n*-butil-klorformijat (*Sigma-Aldrich*), hidroksibenzotriazol (HOBt, *Sigma-Aldrich*), *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid ( $EDC \times HCl$ , *Sigma-Aldrich*), *N*-(*t*-butiloksikarbonil)-L-alanin-hidroksisukcinimidni ester (Boc-L-Ala-OSu, *Sigma-Aldrich*), *N*-metilmorfolin (NMM, *Sigma-Aldrich*), srebrov klorid ( $AgCl$ , *Sigma-Aldrich*). Otapala su po potrebi sušena uobičajenim literaturnim postupcima. Hidrogenoliza (debenziliranje) je provedena u Parrovu uređaju.

Tijek reakcija, sastav frakcija i čistoća sintetiziranih spojeva praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (60 F 254, 0,25 mm, *Fluka*). Za kromatografska pročišćavanja na stupcu korišten je silikagel 60 (0,063-0,200 mm, *Sigma-Aldrich*). Detekcija spojeva na TLC pločicama provedena je ultraljubičastim zračenjem ( $\lambda =$

254 nm), prskanjem 10 %-tnom vodenom otopinom sumporne kiseline uz zagrijavanje te prskanjem otopinom ninhidrina uz zagrijavanje.

Jednodimenzijски  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  DEPTQ spektri nuklearne magnetske rezonancije (NMR) u deuteriranim otapalima navedenima u tekstu snimljeni su pomoću instrumenta Avance III HD (Bruker) pri 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) i 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Kemijski pomaci ( $\delta$ ) u  $^1\text{H}$  NMR izraženi su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS, 0 ppm) kao unutarnji standard, dok su  $^{13}\text{C}$  spektri kalibrirani prema srednjem signalu otapala. Multipliciteti signala navedeni su kao: s-singlet, d-dublet, t-triplet, q-kvartet i m-multiplet. Maseni spektri (MS) pripremljenih spojeva snimani su pomoću uređaja Agilent 6410 uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI). Tališta pripremljenih spojeva određena su na uređaju Büchi B-540.

## 3.2. Priprava adamantil-triazolnog prekursora

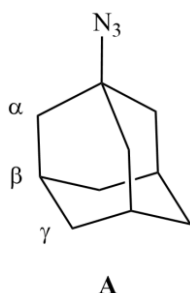
### 3.2.1. Priprava 1-azidoadamantana A

Komercijalno dostupan adamantan-1-ol (500,4 mg, 3,29 mmol) otopi se u smjesi kloroforma (7 mL) i otopine sumporne kiseline (7 mL,  $w = 57\%$ ). Pripravljena smjesa ohladi se na  $0\text{ }^\circ\text{C}$  te se u nju, u malim obrocima, kroz pola sata dodaje natrijev azid (426,9 mg, 6,57 mmol). Reakcijska smjesa miješa se 3 sata na sobnoj temperaturi nakon čega se izlije u, na ledu ohlađenu, vodu (20 mL). Pripravljena smjesa ekstrahira se diklormetanom ( $4 \times 50\text{ mL}$ ), a spojeni organski slojevi isperu se vodenom otopinom  $\text{NaHCO}_3$  (50 mL,  $w = 5\%$ ) i vodom (50 mL) te suše nad natrijevim sulfatom. Osušeni organski ekstrakt upari se na rotacijskom uparivaču.<sup>4</sup> Dobiveno je 510,0 mg (87 %) spoja A u obliku bijele krutine karakterističnog mirisa čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR.

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

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ / ppm: 2,10 (s, 3H, H- $\beta$ ); 1,76 (d,  $J = 3,06\text{ Hz}$ , 6H, H- $\alpha$ ); 1,64 (s, 6H, H- $\gamma$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ / ppm: 58,95 (C); 40,81 ( $\text{CH}_2\ \alpha$ ); 35,11 ( $\text{CH}_2\ \gamma$ ); 29,13 (CH  $\beta$ ).



Slika 24. Strukturna formula 1-azidoadamantana **A**.

### 3.2.2. Priprava *t*-butil-((1-(adamantan-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metil)-karbamata **B**

Svježe predestilirani propargilamin (125,0  $\mu\text{L}$ , 107,5 mg, 1,95 mmol) otopi se u smjesi dioksana i vode (3,5 mL,  $V(\text{dioksan}) : V(\text{voda}) = 4 : 3$ ). Pripravljena smjesa ohladi se na 0 °C te se potom u nju dodaju  $\text{Boc}_2\text{O}$  (608,2 mg, 2,79 mmol) i TEA (405  $\mu\text{L}$ , 294,0 mg, 2,91 mmol). Nakon 90 min miješanja pri sobnoj temperaturi u reakcijsku smjesu dodaju se spoj **A** (315,4 mg, 1,78 mmol), vodena otopina natrijeva L-askorbata (798  $\mu\text{L}$ ,  $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i vodena otopina bakrova(II) sulfata pentahidrata (266  $\mu\text{L}$ ,  $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Reakcijska smjesa zagrije se do 35 °C, a reakcija se nastavi voditi u atmosferi argona. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu DCM : EtOAc = 3 : 1. Nakon 24 h pri 35 °C reakcija se prekine, a reakcijska smjesa upari do suha. Upareni ostatak otopi se (suspendira) u vodi (20 mL) te ekstrahira etil-acetatom (3×25 mL). Spojeni organski slojevi isperu se vodom (50 mL) nakon čega se suše nad natrijevim sulfatom. Osušeni organski sloj upari se na rotacijskom uparivaču, a dobiveni suhi ostatak pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela gradijentno počevši od sustava DCM : EtOAc = 20 : 1 do sustava DCM : EtOAc = 1 : 1.<sup>46</sup> Dobiveno je 547,5 mg (97 %) spoja **B** u obliku bijele krutine karakterističnog mirisa čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR.

$R_f = 0,31$  (DCM : EtOAc = 3 : 1).

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

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 7,56 (s, 1H, CH, triazol); 5,10 (br s, 1H, NH, amin); 4,40 (d, 2H,  $J = 5,9$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 2,26-2,22 (m, 9H, 6H- $\gamma$ , 3H- $\beta$ ); 1,83-1,74 (m, 6H, H- $\alpha$ ); 1,45 (s, 9H,  $3 \times \text{CH}_3$ , Boc).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 155,84 (CH, triazol); 79,54 (C, Boc); 59,54 ( $\text{CH}_2$ ); 42,94 ( $\text{CH}_2$   $\alpha$ ); 35,85 ( $\text{CH}_2$   $\gamma$ ); 29,39 ( $3 \times \text{CH}_3$ , Boc); 28,35 (CH  $\beta$ ).

### 3.2.3. Pokušaj pripreve (adamantan-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-ilmetanamina C

Prethodno pripravljeni spoj **A** (213,6 mg, 1,205 mmol) otopi se u smjesi diklormetana i dioksana (4 mL,  $V(\text{DCM}) : V(\text{dioksan}) = 1 : 1$ ) nakon čega se u priređenu otopinu dodaju propargilamin ( $2 \times 32,8$   $\mu\text{L}$ , 56,4 mg, 1,024 mmol) te vodene otopine bakrova(II) sulfata pentahidrata (38,1 mg, 153  $\mu\text{mol}$  u 1 mL vode) i natrijeva L-askorbata (90,1 mg, 458  $\mu\text{mol}$  u 1 mL vode). Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 3 : 1$ . Nakon 5 h miješanja pri sobnoj temperaturi reakcija se prekine, a reakcijska smjesa upari do suha. Suhi ostatak suspendira se u vodi (20 mL) te ekstrahira etil-acetatom ( $3 \times 50$  mL). Spojeni organski slojevi osuše se nad natrijevim sulfatom te upare na rotacijskom uparivaču.<sup>4</sup> Opisanim postupkom spoj nije uspješno pripravljen.

### 3.2.4. Priprava (adamantan-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-ilmetanamina C

Otopini spoja **B** (199,3 mg, 630  $\mu\text{mol}$ ) u suhom diklormetanu (1,9 mL) doda se TFA (1 mL), a tako pripravljena smjesa miješa se 2 sata pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu  $\text{DCM} : \text{MeOH} = 3 : 1$ . Nakon 2 h reakcijskoj smjesi dodana je vodena otopina  $\text{NaHCO}_3$  (25 mL,  $w = 5\%$ ) nakon čega je vodeni sloj ekstrahiran DCM-om (25 mL). Dobiveni organski sloj ispere se vodenom otopinom  $\text{NaHCO}_3$  (25 mL) nakon čega se vodeni slojevi spoje te ponovo ekstrahiraju DCM-om (25 mL). Spojeni organski slojevi osuše se nad natrijevim sulfatom te upari na rotacijskom uparivaču.<sup>4</sup> Dobiveno je 126,8 mg (87 %) spoja **C** u obliku svijetlo smeđe krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

$R_f = 0,65$  (DCM : MeOH = 3 : 1)

$T_m = 98-100$  °C

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

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 7,50 (s, 1H, CH, triazol); 3,99 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,22-2,25 (m, 9H, 6H- $\gamma$ , 3H- $\beta$ ); 1,82-1,74 (m, 6H, H- $\alpha$ ); 1,62 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 117,63 (CH, triazol); 59,52 ( $\text{CH}_2$ ); 43,00 ( $\text{CH}_2$   $\alpha$ ); 35,94 ( $\text{CH}_2$   $\gamma$ ); 29,47 (CH  $\beta$ ).

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

### 3.3. Priprava propargilamin-hidroklorida D

Komercijalno dostupnom propargilaminu (50,1 mg, 910  $\mu\text{mol}$ ) doda se uz miješanje pri 0 °C kroz 10 min koncentrirana klorovodična kiselina (6 $\times$ 25  $\mu\text{L}$ , 1,81 mmol,  $w = 37$  %). Dobivena smjesa miješa se još 10 min na sobnoj temperaturi nakon čega se na rotacijskom uparivaču upari u kodestilaciji s metanolom, a potom i dietil-eterom.<sup>4</sup> Dobiveno je 69,6 mg (84 %) smeđeg taloga produkta D čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 3,81 (d, 2H,  $J = 2,5$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 3,11 (t, 1H,  $J = 2,5$  Hz, CH).

### 3.4. Priprava peptidnih prekursora 5 i 6

#### 3.4.1. Priprava H-D-Glu(OBn)-OH 1

H-D-Glu-OH (2,02 g, 13,7 mmol) suspendira se u svježe destiliranom benzilnom alkoholu (15 mL) te se u tako priređenu suspenziju kroz jedan sat i u atmosferi argona kap po kap dodaje  $\text{BF}_3 \times \text{Et}_2\text{O}$  (7 $\times$ 0,5 mL). Reakcija se miješa u atmosferi argona 20 sati nakon čega se u reakcijsku smjesu doda THF (45 mL) i TEA (3,8 mL) pri čemu nastaje mliječno bijela smjesa. Otapalo se nakon toga upari do suha na rotacijskom uparivaču, a uparenom ostatku doda se smjesa heksan : EtOAc = 3 : 2 (10 mL). Dobivena smjesa promješa se i profiltrira kroz sinterirani lijevak (pore 3). Zaostali talog ispere se s smjesom heksan : EtOAc = 3 : 1 (10 mL) te suši na zraku. Spoj se prekrystalizira iz smjese  $\text{H}_2\text{O}$  : EtOH = 9 : 1 (50 mL) i ofiltrira

pri sniženom tlaku.<sup>4</sup> Dobiveno je 2,00 g (61 %) produkta **1** u obliku bijele krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

$R_f = 0,18$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 3 : 1$ ).

$T_m = 157,5\text{-}159\text{ }^\circ\text{C}$

<sup>1</sup>H NMR i DEPTQ: Dodatak 4

<sup>1</sup>H NMR ( $\text{D}_2\text{O} + \text{TFA}$ )  $\delta / \text{ppm}$ : 7,38-7,32 (m, 5H, 5×CH); 5,10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>, Bn); 4,04 (t, 1H,  $J = 6,8$  Hz, CH, Glu); 2,65-2,58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, Glu); 2,24-2,12 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, Glu).

<sup>13</sup>C NMR ( $\text{D}_2\text{O} + \text{TFA}$ )  $\delta / \text{ppm}$ : 174,0, 171,3 (2×C=O); 135,3 (C, Bn); 128,8, 128,6, 128,3 (5×CH, Bn); 67,2 (CH<sub>2</sub>, Bn); 51,9 (CH, Glu); 29,5 (CH<sub>2</sub>, Glu); 24,7 (CH<sub>2</sub>, Glu).

ESI-MS:  $m/z$  260,2 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 3.4.2. Pokušaj pripreve Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-NH-Prp

#### 3.4.2.1. Priprava Boc-D-Glu(OBn)-OH **a**

##### Metoda I

Otopini spoja **1** (101,1 mg, 426  $\mu\text{mol}$ ) u dioksanu i vodi (2,6 mL, 1 : 1) pri 0 °C dodaje se Boc<sub>2</sub>O (259,6 mg, 1,189 mmol) te kroz 5 minuta TEA (84,0  $\mu\text{L}$ , 61,0 mg, 603  $\mu\text{mol}$ ). Pripravljena smjesa miješa se 4 dana, a tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 3 : 1$ . Po završetku reakcije smjesa se upari do suha, a ostatak se suspendira u etil-acetatu (10 mL) te zakiseli otopinom HCl ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) do pH = 2 vodenog sloja. Organski sloj odvoji se od vodenog, a vodeni sloj potom se ekstrahira etil-acetatom (2×20 mL). Spojeni organski slojevi isperu se zasićenom vodenom otopinom NaCl, osuše na natrijevom sulfatu i upare na rotacijskom uparivaču.<sup>47</sup> Dobiveno je 105,4 mg (73 %) produkta **a** u obliku bezbojnog ulja čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



$R_f = 0,42$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 3 : 1$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta / \text{ppm}$ : 7,37-7,28 (m, 5H,  $5 \times \text{CH}$ , Bn); 5,13 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ , Bn); 4,17-4,13 (m, 1H, CH, Glu); 2,50-2,46 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ , Glu); 2,23-2,14 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , Glu); 1,96-1,87 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , Glu); 1,43 (s, 9H,  $3 \times \text{CH}_3$ , Boc).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta / \text{ppm}$ : 175,65, 174,26 ( $2 \times \text{C}=\text{O}$ ); 158,13 ( $\text{C}=\text{O}$ , Boc); 137,63 (C, Bn); 129,57, 129,20 ( $5 \times \text{CH}$ , Bn); 80,61 (C, Boc); 67,41 ( $\text{CH}_2$ , Bn); 54,19 (CH, Glu); 31,45 ( $\text{CH}_2$ , Glu); 28,75 ( $3 \times \text{CH}_3$ , Boc); 28,05 ( $\text{CH}_2$ , Glu).

ESI-MS:  $m/z$  360,2 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ .

## Metoda II

Otopini spoja **1** (103,1 mg, 435  $\mu\text{mol}$ ) u dimetilformamidu i vodi (2,5 mL, 1 : 1) pri 0 °C dodaje se  $\text{Boc}_2\text{O}$  (149,3 mg, 684  $\mu\text{mol}$ ) i TEA (60,2  $\mu\text{L}$ , 43,7 mg, 432  $\mu\text{mol}$ ). Pripravljena smjesa miješa se 48 h, a tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 3 : 1$ . Po završetku reakcije smjesa se upari do suha, a ostatak se suspendira u etil-acetatu (10 mL) te zakiseli otopinom HCl ( $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) do  $\text{pH} = 1,9$ . Vodeni sloj potom se ekstrahira etil-acetatom ( $3 \times 20 \text{ mL}$ ), a spojeni organski slojevi isperu vodom, suše na natrijevom sulfatu i upare na rotacijskom uparivaču.<sup>48</sup> Dobiveno je 146,6 mg (kvantitativno) produkta **a** u obliku bezbojnog ulja čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR.

NMR spektri odgovaraju prethodno snimljenim spektrima produkta dobivenog metodom I.

### 3.4.2.2. Priprava Boc-D-Glu(OBn)-NH-prp **b**

Spoj **a** (119,1 mg, 353  $\mu\text{mol}$ ) otopi se u diklormetanu (4 mL) nakon čega se u dobivenu smjesu dodaju BOP (156,9 mg, 355  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (239,4  $\mu\text{L}$ , 1,376 mmol) i spoj **D** (42,5 mg, 464  $\mu\text{mol}$ ). Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu  $\text{CHCl}_3 : \text{acetone} = 5 : 1$ . Nakon 48 h na magnetskoj mješalici, otapalo se upari, a suhi ostatak otopi u etil-acetatu (20 mL). Priređena otopina ispere se otopinom  $\text{KHSO}_4$  ( $5 \times 15 \text{ mL}$ ,  $1 \text{ mol dm}^{-3}$ ), vodom (20 mL), otopinom  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 20 \text{ mL}$ ,  $w = 5 \%$ ) i zasićenom vodenom otopinom NaCl (20 mL), a dobiveni organski ekstrakt suši se na natrijevu sulfatu, filtrira i upari na rotacijskom uparivaču. Ostatak se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela s čistim kloroformom kao

otapalom.<sup>49</sup> Dobiveno je 90,9 mg (69 %) spoja **b** u obliku sive krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR.

$R_f = 0,63$  ( $\text{CHCl}_3$  : aceton = 5 : 1)

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 7,39-7,30 (m, 5H, 5×CH, Bn); 6,61 (br s, 1H, NH); 5,30 (d, 1H,  $J = 8,1$  Hz, NH); 5,13 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ , Bn); 4,20-4,18 (m, 1H, CH, *iso*Gln); 4,03 (dd, 2H,  $J = 5,2$  Hz,  $J = 2,4$  Hz,  $\text{CH}_2$ , propargil); 2,59-2,41 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 2,21 (t, 1H,  $J = 2,5$  Hz, CH, propargil); 2,19-2,11 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 1,99-1,90 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 1,43 (s, 9H, 3× $\text{CH}_3$ , Boc).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 173,07, 171,20 (2×C=O); 155,72 (C=O, Boc); 135,63 (C, Bn); 128,57, 129,31, 128,23 (5×CH, Bn); 71,68 (C, propargil); 66,59 ( $\text{CH}_2$ , Bn); 53,48 (CH, *iso*Gln); 30,44 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 28,28 (3× $\text{CH}_3$ , Boc); 27,79 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Gln,  $\text{CH}_2$ , propargil).

#### 3.4.2.3. Priprava D-Glu(OBn)-NH-prp×TFA **c**

Spoj **b** (72,3 mg, 193  $\mu\text{mol}$ ) otopi se u suhom diklormetanu (750  $\mu\text{L}$ ), a u pripravljenu otopinu doda se TFA (500  $\mu\text{L}$ ). Pripravljena smjesa miješa se 2 h pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu kloroform : metanol = 3 : 1. Nakon završetka reakcije u smjesu se doda dietil-eter te se upari do suha na rotacijskom uparivaču. Dobiveni ostatak pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela gradijentno počevši od čistog kloroforma kao sustava do sustava kloroform : metanol = 3 : 1.<sup>4</sup> Dobiveno je 68,5 mg spoja **c** (91 %).

$R_f = 0,63$  ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 3 : 1)

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 7,36-7,30 (m, 5H, 5×CH, Bn); 5,13 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ , Bn); 4,19-4,15 (m, 1H, CH, *iso*Gln); 3,99-3,98 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ , propargil); 2,61 (t, 1H,  $J = 2,6$  Hz, CH, propargil); 2,51-2,25 (m, 3H, 2× $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 2,09-2,01 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln).

#### 3.4.2.4. Pokušaj kondenzacije spoja **c** i Boc-L-Ala-OSu

Spoj **c** (60,7 mg, 156  $\mu\text{mol}$ ) otopi se u suhom tetrahidrofuranu (2 mL), a u tako pripravljenu otopinu ohlađenu na 0 °C u atmosferi argona dodaju se TEA (6×56  $\mu\text{L}$ , 243,9 mg, 2,410 mmol kroz 15 min) i komercijalno dostupan *t*-Boc-L-Ala-OSu (119,2 mg, 416  $\mu\text{mol}$ ).

Pripravljena smjesa nastavi se miješati još 30 min u ledenoj kupelji, a potom 40 h pri sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Tijek reakcije praćen TLC-om u sustavu  $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 3 : 1. Nakon 40 h reakcijska smjesa se upari do suha, a upareni ostatak otopi se u etil-acetatu (20 mL). Dobivena otopina ispere se otopinom HCl (20 mL,  $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ), a vodeni sloj ekstrahira se etil-acetatom ( $2 \times 20 \text{ mL}$ ). Spojeni organski slojevi isperu se zasićenom otopinom NaCl ( $2 \times 20 \text{ mL}$ ), suše nad natrijevim sulfatom i upare na rotacijskom uparivaču.<sup>4</sup> Opisanim postupkom spoj nije uspješno izoliran.

#### 3.4.3. Priprava Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH **2**

Spoj **1** (203 mg, 856  $\mu\text{mol}$ ) otopi se u suhom tetrahidrofuranu (6 mL), a u tako pripravljenu otopinu ohlađenu na  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  u atmosferi argona dodaju se TEA ( $2 \times 114 \mu\text{L}$ , 165,5 mg, 1,636 mmol kroz 5 min) i *t*-Boc-L-Ala-OSu (238 mg, 831  $\mu\text{mol}$ ). Pripravljena smjesa nastavi se miješati još 30 min u ledenoj kupelji, a potom 24 h pri sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Tijek reakcije praćen TLC-om u sustavu  $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 3 : 1. Nakon 24 h reakcijska smjesa se upari do suha, a upareni ostatak otopi se u etil-acetatu (20 mL). Dobivena otopina ispere se otopinom HCl (20 mL,  $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ), a vodeni sloj ekstrahira se etil-acetatom ( $2 \times 20 \text{ mL}$ ). Spojeni organski slojevi isperu se zasićenom otopinom NaCl ( $2 \times 30 \text{ mL}$ ), suše nad natrijevim sulfatom i upare na rotacijskom uparivaču.<sup>4</sup> Dobiveno je 339 mg (kvantitativno) produkta **2** u obliku bezbojne staklaste krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

$R_f = 0,33$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 3 : 1$ )

$T_m = 77-78$  °C

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

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 7,34-7,31 (m, 5H, 5 $\times$ CH, Bn); 5,11 (s, 2H, CH<sub>2</sub>, Bn); 4,62 (br s, 1H, CH, Glu); 4,38-4,30 (m, 1H, CH, Ala); 2,56-2,39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, Glu); 2,32-2,23 (m, 1H, CH<sub>2</sub>, Glu); 2,09-2,00 (m, 1H, CH<sub>2</sub>, Glu); 1,41 (s, 9H, 3 $\times$ CH<sub>3</sub>, Boc); 1,33 (d, 3H,  $J = 5,0$  Hz, CH<sub>3</sub>, Ala).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 176,52, 174,16, 173,37, 172,75 (4 $\times$ C=O); 135,65 (C, Bn); 128,53, 128,25 (5 $\times$ CH, Bn); 80,68 (C, Boc); 66,57 (CH<sub>2</sub>, Bn); 51,50 (CH, Glu); 49,78 (CH, Ala); 30,21 (CH<sub>2</sub>, Glu); 28,25 (3 $\times$ CH<sub>3</sub>, Boc); 27,15 (CH<sub>2</sub>, Glu); 18,32 (CH<sub>3</sub>, Ala).

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

#### 3.4.4. C-terminalna modifikacija Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH

##### 3.4.4.1. Priprava Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-NH-Prp 3

###### Metoda I

Spoj **2** (99,6 mg, 244  $\mu\text{mol}$ ) otopi se u diklormetanu (4 mL) nakon čega se u dobivenu smjesu dodaju BOP (133,1 mg, 301  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (166,0  $\mu\text{L}$ , 953  $\mu\text{mol}$ ) i spoj **D** (29,5 mg, 324  $\mu\text{mol}$ ). Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu  $\text{CHCl}_3 : \text{acetone} = 5 : 1$ . Nakon 48 h na magnetskoj mješalici, otapalo se upari, a suhi ostatak otopi u etil-acetatu (20 mL). Priređena otopina ispere se otopinom  $\text{KHSO}_4$  (5 $\times$ 15 mL, 1 mol  $\text{dm}^{-3}$ ), vodom (20 mL), otopinom  $\text{NaHCO}_3$  (2 $\times$ 20 mL,  $w = 5\%$ ) i zasićenom vodenom otopinom  $\text{NaCl}$  (20 mL), a dobiveni organski ekstrakt suši se na natrijevu sulfatu, filtrira i upari na rotacijskom uparivaču. Ostatak se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela u navedenom sustavu otapala.<sup>49</sup> Dobiveno je 93,7 mg (86 %) produkta u obliku bijele krutine za koju je spektroskopijom NMR utvrđeno da sadrži smjesu stereoizomera propargiliranog dipeptida približnog omjera 1:1.

###### Metoda II

U otopinu spoja **2** (100,4 mg, 246  $\mu\text{mol}$ ) u suhom tetrahidrofuranu (0,5 mL) dodaju se pri  $-10$  °C *N*-metilmorfolin (30  $\mu\text{L}$ , 27,6 mg, 273  $\mu\text{mol}$ ) i *n*-butil-klorformijat (31,3  $\mu\text{L}$ , 33,6 mg, 246

μmol). Nakon 3 minute dokapa se otopina propargilamina (20,5 μL, 17,6 mg, 320 μmol) u suhom THF-u (0,2 mL). Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 3 : 1. Nakon sat vremena miješanja na -10 °C reakcija se miješa još sat vremena na sobnoj temperaturi uz dodatak vodene otopine NaHCO<sub>3</sub> (10 mL, w = 5 %). Vodeni sloj nakon toga ekstrahira se diklormetanom (3×10 mL), a spojeni organski ekstrakti isperu se otopinom NaHCO<sub>3</sub> (2×10 mL, w = 5 %), osuše nad natrijevim sulfatom te upare na rotacijskom uparivaču. Sui ostatak pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela u navedenom sustavu otapala.<sup>50</sup> Dobiveno je 104,8 mg (96 %) produkta **3** u obliku blijedo-žutog praha čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

$R_f = 0,80$  (kloroform : MeOH = 3 : 1)

$T_m = 140,5-142$  °C

<sup>1</sup>H NMR i DEPTQ: Dodatak 6

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

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ / ppm: 173,50, 173,15, 170,57 (4×C=O); 135,58 (C, Bn); 128,58, 128,34, 128,25 (5×CH, Bn); 80,50 (C, Boc); 71,34 (C, propargil); 66,68 (CH<sub>2</sub>, Bn); 52,51 (CH, propargil, CH, *iso*Gln); 50,78 (CH, Ala); 30,52 (CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 29,11 (CH<sub>2</sub>, propargil); 28,28 (3×CH<sub>3</sub>, Boc); 26,88 (CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 17,77 (CH<sub>3</sub>, Ala).

ESI-MS:  $m/z$  468,4 [M+Na]<sup>+</sup>.

#### 3.4.4.2. Pokušaj pripreve triazolnog derivata Boc-L-Ala-D-Glu(OBn) **4**

U otopinu spoja **3** (170 mg, 382 μmol) u suhom tetrahidrofuranu (5 mL) dodaju se AgCl (21,5 mg, 150 μmol), TEA (2×134 μL, 194,6 mg, 1,923 mmol) te spoj **A** (158,4 mg, 894 μmol). Pripravljena smjesa zagrije se na 60 °C i miješa. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 3 : 1. Nakon 8 sati reakcija se prekine, otapalo upari, a dobiveni suhi ostatak otopi u vodi (20 mL). Dobivena otopina ekstrahira se etil-acetatom nakon čega se organski sloj ispere zasićenom vodenom otopinom NaCl, osuši nad natrijevim sulfatom te upari na rotacijskom uparivaču.<sup>51</sup> Opisanim postupkom spoj nije uspješno pripremljen.

#### 3.4.4.3. Priprava triazolnog derivata Boc-L-Ala-D-Glu(OBn) **4**

Otopini prethodno pripravljenog dipeptida **2** (138,7 mg, 340  $\mu\text{mol}$ ) u suhom tetrahidrofuranu (1 mL) dodaju se pri  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  *N*-metilmorfolin (37,4  $\mu\text{L}$ , 340  $\mu\text{mol}$ ) i *n*-butil-klorformijat (43,2  $\mu\text{L}$ , 46,4 mg, 340  $\mu\text{mol}$ ). Nakon 3 minute doda se otopina spoja **C** (102,6 mg, 442  $\mu\text{mol}$ ) u suhom DCM-u (2 mL). Reakcija je provedena u atmosferi argona, a tijekom reakcije praćen je TLC-om u sustavu  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 3 : 1$ . Nakon 2 h miješanja na  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  reakcija se miješa još sat vremena na sobnoj temperaturi uz dodatak vodene otopine  $\text{NaHCO}_3$  (5 mL,  $w = 5\%$ ). Vodeni sloj nakon toga ekstrahira se diklormetanom ( $3 \times 15\text{ mL}$ ), a spojeni organski ekstrakti isperu se otopinom  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 40\text{ mL}$ ,  $w = 5\%$ ), osuše nad natrijevim sulfatom te upare na rotacijskom uparivaču. Suhi ostatak pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu kloroform :  $\text{MeOH} = 10 : 1$ .<sup>50</sup> Dobiveno je 211,5 mg (kvantitativno) produkta **4** u obliku bijele krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

$R_f = 0,85$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 3 : 1$ ),  $0,62$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 10 : 1$ )

**$^1\text{H}$  NMR i DEPTQ:** Dodatak 7

**$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ / ppm:** 7,89 (br s, 1H, CH, triazol); 7,35-7,29 (m, 5H,  $5 \times \text{CH}$ , Bn); 5,12 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ , Bn); 4,45 (d, 2H,  $J = 6,9\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ , poveznica amid-triazol); 4,38-4,35 (m, 1H, CH, *iso*Gln); 4,00 (q, 1H,  $J = 7,1\text{ Hz}$ , CH, Ala); 2,46 (t, 2H,  $J = 7,5\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 2,23 (s, 9H, 6H- $\gamma$ , 3H- $\beta$ ); 2,00-1,91 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 1,86-1,79 (m, 7H, 6H- $\alpha$ , 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 1,35 (s, 9H,  $3 \times \text{CH}_3$ ; Boc); 1,28 (d, 3H,  $J = 7,1\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ , Ala).

**$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ / ppm:** 176,58, 174,15, 173,74 ( $3 \times \text{C}=\text{O}$ ); 145,68 ( $\text{C}=\text{O}$ , Boc); 137,58 (C, Bn); 129,59, 129,26 ( $5 \times \text{CH}$ , Bn); 120,68 (CH, triazol); 80,78 (C, Boc); 67,56 ( $\text{CH}_2$ , Bn); 61,11 (C, triazol); 54,25 (CH, *iso*Gln); 52,19 (CH, Ala); 43,97 ( $\text{CH}_2\ \alpha$ ); 36,96 ( $\text{CH}_2\ \gamma$ ); 36,08 ( $\text{CH}_2$ , poveznica amid-triazol); 31,39 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 31,03 (CH  $\beta$ ); 28,74 ( $3 \times \text{CH}_3$ , Boc); 27,78 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 17,70 ( $\text{CH}_3$ , Ala).

**ESI-MS:**  $m/z$  623,6 [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>.

#### 3.4.5. Uklanjanje Boc zaštite s dipeptida

##### 3.4.5.1. Priprava L-Ala-D-Glu(OBn)-NH-Prp u obliku TFA soli **5**

Spoj **3** (250,0 mg, 562  $\mu\text{mol}$ ) pripravljen metodom **II** suspendira se u suhom diklormetanu (3 mL), a u pripravljenu suspenziju doda se TFA (1,25 mL) pri čemu nastaje bistra žuta otopina.

Pripravljena smjesa miješa se 2 h pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu  $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 3 : 1. Nakon završetka reakcije u smjesu se doda dietil-eter te se upari do suha na rotacijskom uparivaču.<sup>4</sup> Dobiveno je 257,2 mg (kvantitativno) produkta **5** u obliku blijedo-smeđe krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

$R_f = 0,53$  ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 3 : 1)

$T_m = 142-144$  °C

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

<sup>1</sup>H NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 7,37-7,32 (m, 5H, 5×CH, Bn); 5,13 (s, 2H, CH<sub>2</sub>, Bn); 4,42-4,37 (m, 1H, CH, *iso*Gln); 3,97-3,92 (m, 1H, CH, Ala); 3,95 (d, 2H,  $J = 2,5$  Hz, CH<sub>2</sub>, propargil); 2,59 (t, 1H,  $J = 2,5$  Hz, CH, propargil); 2,48-2,44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 2,18-2,09 (m, 1H, CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 2,01-1,94 (m, 1H, CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 1,48 (d, 3H,  $J = 7,0$  Hz, CH<sub>3</sub>, Ala).

<sup>13</sup>C NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 173,92, 172,96, 171,16 (3×C=O); 137,52 (C, Bn); 129,60, 129,31 (5×CH, Bn); 72,44 (C, propargil); 67,57 (CH<sub>2</sub>, Bn); 53,90 (CH, propargil, CH, *iso*Gln); 50,32 (CH, Ala); 31,27 (CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 29,59 (CH<sub>2</sub>, propargil); 28,38 (CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 17,70 (CH<sub>3</sub>, Ala).

ESI-MS:  $m/z$  346,2 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 3.4.5.2. Priprava triazolnog derivata L-Ala-D-Glu(OBn) u obliku TFA soli **6**

Spoj **4** (157,8 mg, 253  $\mu\text{mol}$ ) suspendira se u suhom diklormetanu (1,5 mL), a u pripravljenu suspenziju doda se TFA (0,75 mL). Pripravljena smjesa miješa se 5 h pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu kloroform : metanol = 3 : 1. Nakon završetka reakcije u smjesu se doda dietil-eter te se upari do suha na rotacijskom uparivaču. Suhi ostatak pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela gradijentno počevši od čistog kloroforma do sustava  $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 5 : 1.<sup>4</sup> Dobiveno je 130,6 mg (81 %) produkta **6** u obliku bijele krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

$R_f = 0,69$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 3 : 1$ )

$T_m = 142-144$  °C

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

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 7,94 (s, 1H, CH, triazol); 7,37-7,28 (m, 5H, 5×CH, Bn); 5,12 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ , Bn); 4,44 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ , poveznica amid-triazol); 4,40-4,36 (m, 1H, CH, *iso*Gln); 3,95 (q, 1H,  $J = 7,0$  Hz, CH, Ala); 2,44 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 2,23 (br s, 9H, 6H- $\gamma$ , 3H- $\beta$ ); 2,19-2,11 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 2,03-1,94 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 1,87-1,79 (m, 6H, H- $\alpha$ ); 1,48 (d, 3H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_3$ , Ala).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 173,25, 171,21 (3×C=O); 137,53 (C, Bn); 129,62, 129,32, 129,27 (5×CH, Bn); 120,85 (CH, triazol); 67,56 ( $\text{CH}_2$ , Bn); 61,19 (C, triazol); 54,16 (CH, *iso*Gln); 50,33 (CH, Ala); 43,96 ( $\text{CH}_2$   $\alpha$ ); 36,94 ( $\text{CH}_2$   $\gamma$ ); 35,81 ( $\text{CH}_2$ , poveznica amid-triazol); 31,26 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Glu); 31,03 (CH  $\beta$ ); 28,23 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Glu); 17,67( $\text{CH}_3$ , Ala).

ESI-MS:  $m/z$  523,6  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### 3.5. Kondenzacija peptidnog i manoznog prekursora

#### 3.5.1. Općeniti postupak pripreve konjugata 2-(2,3,4,6-tetra-O-benzil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octene kiseline i derivata desmuramil-dipeptida

2-(2,3,4,6-tetra-O-benzil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octena kiselina otopljena je u suhom diklormetanu (5 mL). Pripravljena otopina ohladi se na 0 °C te se u nju dodaju HOBt (1,0 ekv.) i EDC×HCl (1,2 ekv.) nakon čega se smjesa miješa 15 minuta na 0 °C. Nakon 15 minuta u ohlađenu smjesu je dodana otopina derivata desmuramil-dipeptida (1,1 ekv.) u suhom dioksanu (5 mL). Posljednji je u reakcijsku smjesu, kapajući, dodan TEA (2,0 ekv) nakon čega se smjesa nastavi miješati sat vremena na 0 °C, a potom još 24 sata na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 9 : 1$ . Nakon završetka reakcije reakcijska smjesa se upari, a upareni ostatak otopi se u etil-acetatu (20 mL). Tako dobivena otopina ispere se vodenom otopinom klorovodične kiseline (20 mL,  $c = 0,1$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) i zasićenom otopinom natrijeva karbonata (20 mL) te suši nad natrijevim sulfatom. Osušeni organski sloj upari se na rotacijskom uparivaču, a dobiveni ostatak pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela u navedenom sustavu otapala.<sup>4</sup>



3.5.1.1. Priprava konjugata 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octene kiseline i propargiliranog dipeptida **7**

Reakcijom 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octene kiseline (145,5 mg, 243  $\mu$ mol) i spoja **5** (122,8 mg, 268  $\mu$ mol) uz HOBt (32,9 mg, 243  $\mu$ mol), EDC $\times$ HCl (56,0 mg, 292  $\mu$ mol) i TEA (67,8  $\mu$ L, 49,2 mg, 486  $\mu$ mol) dobiveno je, nakon čišćenja kromatografijom na stupcu silikagela uz sustav CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 9 : 1 kao eluens, 185,4 mg (82 %) spoja **7** u obliku žute uljaste tekućine čija struktura je potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

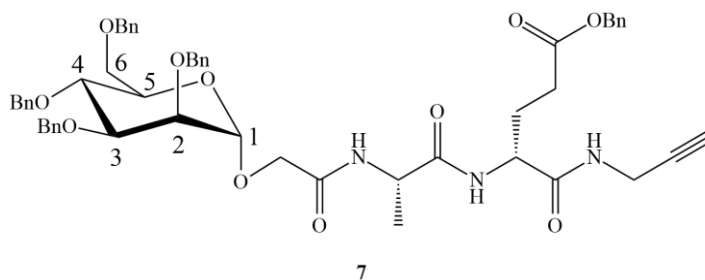
$R_f = 0,79$  (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 9 : 1)

<sup>1</sup>H NMR i DEPTQ: Dodatak 10

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 7,38 -7,24 (m, 25H, 25 $\times$ CH, Bn); 5,12 (AB<sup>1</sup>, 1H,  $J_{gem} = 12,3$  Hz, CH<sub>2</sub>, Bn); 5,08 (AB<sup>1</sup>, 1H,  $J_{gem} = 12,3$  Hz, CH<sub>2</sub>, Bn); 4,88 (d, 1H,  $J_{1,2} = 2,2$  Hz, H-1); 4,82 (AB<sup>2</sup>, 1H,  $J_{gem} = 10,9$  Hz, CH<sub>2</sub>, Bn); 4,76 (AB<sup>3</sup>, 1H,  $J_{gem} = 12,3$  Hz, CH<sub>2</sub>, Bn); 4,69 (AB<sup>4</sup>, 1H,  $J_{gem} = 11,6$  Hz, CH<sub>2</sub>, Bn); 4,68 (AB<sup>3</sup>, 1H,  $J_{gem} = 12,4$  Hz, CH<sub>2</sub>, Bn); 4,64 (AB<sup>4</sup>, 1H,  $J_{gem} = 11,8$  Hz, CH<sub>2</sub>, Bn); 4,62 (AB<sup>5</sup>, 1H,  $J_{gem} = 12,1$  Hz, CH<sub>2</sub>, Bn); 4,50 (AB<sup>5</sup>, 1H,  $J_{gem} = 12,2$  Hz, CH<sub>2</sub>, Bn); 4,49 (AB<sup>2</sup>, 1H,  $J_{gem} = 10,9$  Hz, CH<sub>2</sub>, Bn); 4,46-4,41 (m, 1H, CH, Ala); 4,33 (t, 1H,  $J = 6,9$  Hz, CH, *iso*Gln); 4,16 (AB<sup>6</sup>, 1H,  $J_{gem} = 15,6$  Hz, CH<sub>2</sub>, acetilna poveznica); 3,99 (app t, 1H,  $J = 8,9$  Hz,  $J = 8,7$  Hz, H-4); 3,96 (AB<sup>6</sup>, 1H,  $J_{gem} = 15,6$  Hz, CH<sub>2</sub>, acetilna poveznica); 3,89 (dd, 1H,  $J = 3,0$  Hz,  $J = 8,7$  Hz, H-3); 3,78 (app t, 1H,  $J = 2,6$  Hz,  $J = 2,7$  Hz, H-2); 3,76-3,66 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b); 2,59-2,52 (m, 1H, CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 2,47-2,39 (m, 1H, CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 2,18-2,09 (m, 1H, CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 2,16 (t, 1H,  $J = 2,5$  Hz, CH, propargil); 2,06-1,97 (m, 1H, CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 1,32 (d, 3H,  $J = 7,0$  Hz, CH<sub>3</sub>, Ala).

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 173,59, 172,08, 170,37, 169,28 (4 $\times$ C=O); 138,26, 138,15, 138,05 137,98, 135,47 (5 $\times$ C, Bn); 128,31-127,56 (25 $\times$ CH, Bn); 98,52 (C1); 79,22, 74,80, 74,64, 72,64 (C2-C5); 74,85, 73,36, 72,78, 72,56, 68,89 (5 $\times$ CH<sub>2</sub>, Bn); 71,50 (C, propargil); 66,73 (C6); 66,41 (CH<sub>2</sub>, acetilna poveznica); 52,68 (CH, *iso*Gln); 48,97 (CH, Ala); 30,52 (CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 29,12 (CH<sub>2</sub>, propargil); 26,76 (CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 17,83, (CH<sub>3</sub>, Ala).

ESI-MS:  $m/z$  926,8 [M+H]<sup>+</sup>.



Slika 25. Strukturna formula konjugata 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octene kiseline i propargiliranog dipeptida **7**.

### 3.5.1.2. Priprava konjugata 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octene kiseline i triazolnog derivata dipeptida **8**

Reakcijom 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octene kiseline (96,0 mg, 160  $\mu$ mol) i spoja **6** (112,3 mg, 176  $\mu$ mol) uz HOBt (21,8 mg, 161  $\mu$ mol), EDC $\times$ HCl (36,6 mg, 191  $\mu$ mol) i TEA (44,8  $\mu$ L, 32,5 mg, 321  $\mu$ mol) dobiveno je, nakon čišćenja kromatografijom na stupcu silikagela uz sustav CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 9 : 1 kao eluens, 176,9 mg (kvantitativno) spoja **8** u obliku žute uljaste tekućine čija struktura je potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

$R_f = 0,75$  (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 9 : 1)

<sup>1</sup>H NMR i DEPTQ: Dodatak 11

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 7,82 (s, 1H, triazol); 7,39-7,16 (m, 25H, 25 $\times$ CH, Bn); 5,09 (s, 2H, CH<sub>2</sub>, Bn ester); 4,99 (d, 1H,  $J_{1,2} = 1,7$  Hz, H-1); 4,69 (s, 2H, CH<sub>2</sub>, poveznica amid-triazol); 4,60-4,34 (m, 10H, 4 $\times$ CH<sub>2</sub>, Bn, CH, Ala, CH, *iso*Gln); 4,16-3,90 (m, 5H, CH<sub>2</sub>, acetilna poveznica, H-2, H-3, H-4); 3,77-3,74 (m, 1H, H-5); 3,71-3,63 (m, 2H, H-6a, H-6b); 2,44 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz, CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 2,34 -2,15 (m, 10H, 6H- $\gamma$ , 3H- $\beta$ , 1H, CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 2,01-1,90 (m, 1H, CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 1,79-1,72 (m, 6H, H- $\alpha$ ); 1,35 (d, 3H,  $J = 7,1$  Hz, CH<sub>3</sub>, Ala).

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 175,04, 174,33, 173,58, 171,79 (4 $\times$ C=O); 139,93, 139,72 (5 $\times$ C, Bn); 129,60-128,66 (25 $\times$ CH, Bn); 120,73 (CH, triazol); 99,64 (C1); 81,00, 76,03, 75,83, 73,72 (C2-C5); 75,89, 74,46, 73,82, 73,08 (4 $\times$ CH<sub>2</sub>, Bn); 70,36 (C6); 67,56 (CH<sub>2</sub>, Bn ester); 67,19 (CH<sub>2</sub>, acetilna poveznica); 61,06 (C, triazol); 54,29 (CH, *iso*Gln); 50,48 (CH, Ala); 43,91 (CH<sub>2</sub>  $\alpha$ ); 36,92 (CH<sub>2</sub>  $\gamma$ ); 36,01 (CH<sub>2</sub>, poveznica amid-triazol); 31,45 (CH<sub>2</sub>, *iso*Glu); 30,96 (CH  $\beta$ ); 27,75 (CH<sub>2</sub>, *iso*Glu); 17,97 (CH<sub>3</sub>, Ala).

ESI-MS:  $m/z$  1103,5 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3.5.2. Pokušaj pripreve konjugata 2-(2,3,4,6-tetra-O-benzil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octene kiseline i triazolnog derivata dipeptida **8**

Prethodno pripravljeni spoj **7** (95,0 mg, 103  $\mu$ mol) otopi se u smjesi diklormetana i dioksana (4 mL,  $V(\text{DCM}) : V(\text{dioksan}) = 1 : 1$ ) nakon čega se u priređenu otopinu doda spoj **A** (21,6 mg, 122  $\mu$ mol). U nastalu smjesu potom se doda vodena otopina (2 mL) bakrova(II) sulfata pentahidrata (8,0 mg, 32  $\mu$ mol) i natrijeva L-askorbata (18,1 mg, 91  $\mu$ mol). Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 9 : 1$ . Nakon 4 dana miješanja pri sobnoj temperaturi reakcija se prekine, a reakcijska smjesa upari do suha. Suhi ostatak pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela u navedenom sustavu otapala.<sup>4</sup> Opisanim postupkom spoj nije uspješno pripravljen.

### 3.6. Uklanjanje benzilnih zaštitnih skupina i priprava ciljne molekule **9**

Spoj **8** (39,0 mg, 35,3  $\mu$ mol) otopi se u etanolu (3 mL) nakon čega se u tako dobivenu otopinu doda paladij na ugljiku (27 mg, 25,4  $\mu$ mol,  $w(\text{Pd}) = 10\%$ ). Tako pripremljena smjesa miješa se 48 h u atmosferi vodika ( $p = 2,8$  bar), a tijekom reakcije prati se TLC-om u sustavu  $\text{MeCN} : \text{H}_2\text{O} = 5 : 1$ . Po završetku reakcije smjesa se profiltrira, a dobiveni filtrat upari do suha. Dobiveno je 17 mg produkta u obliku žute uljaste tekućine. Spektroskopijom NMR potvrđeno je uklanjanje svih benzilnih zaštitnih skupina i nastanak spoja **9**, a spoj je preostalo pročistiti od prisutnih nečistoća. Nastanak molekulskog iona potvrđen je i spektrometrijom masa.

**ESI-MS:**  $m/z$  653,7  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

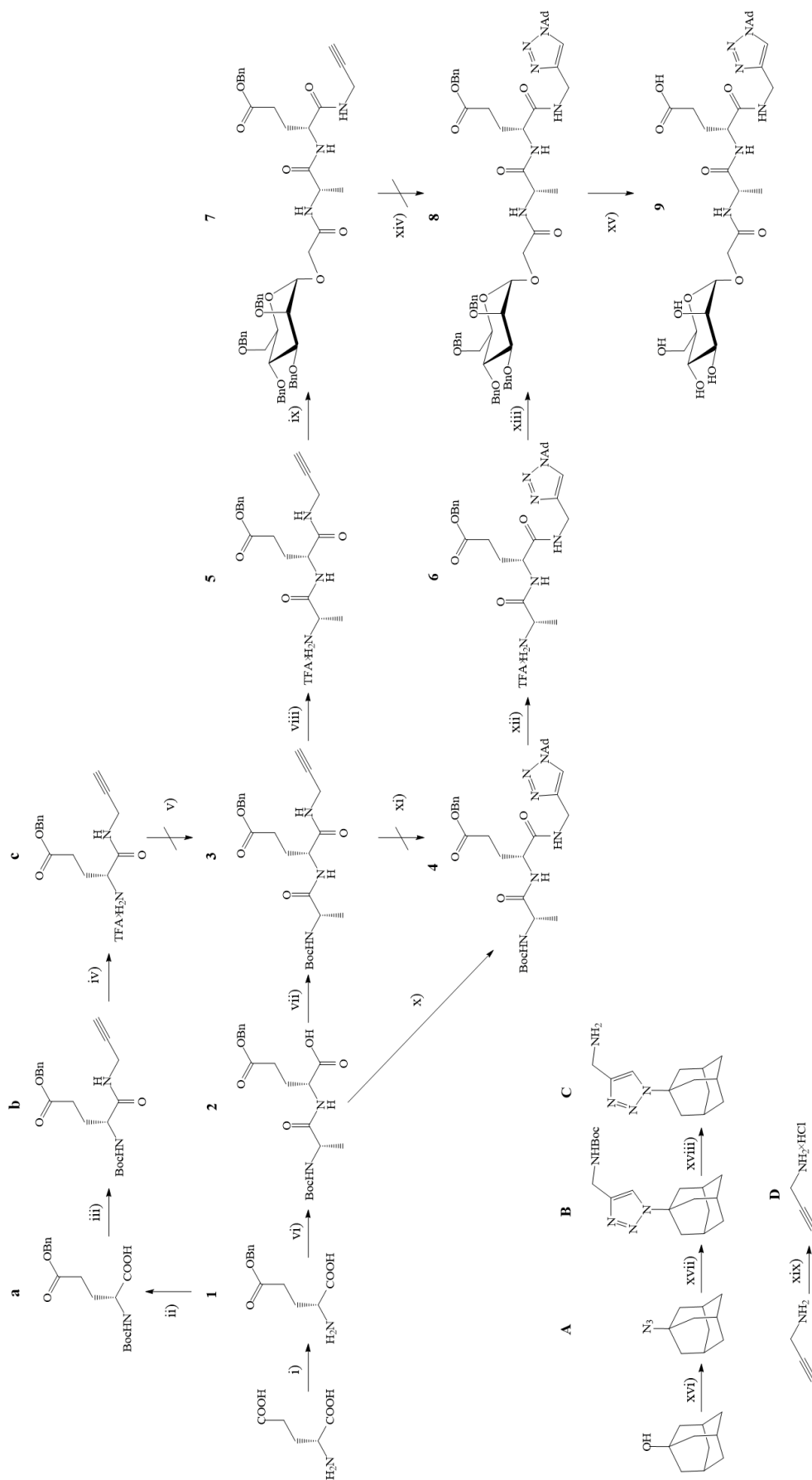
## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Uvod

U sklopu diplomskog rada ispitana je mogućnost pripreme adamantil-triazolnog derivata desmuramil-dipeptida koji je dodatno modificiran uvođenjem manozne podjedinice. Iako sam posjeduje adjuvantsku aktivnost, korištenje desmuramil-dipeptida kao posljedicu ima neželjene nuspojave, a uvedene strukturne modifikacije kao cilj imaju pripravu adjuvansa s boljim biološkim svojstvima. Razlog uvođenja adamantilnog privjeska u strukturu molekule je povećanje interakcije ciljane molekule s lipidnim dvoslojem stanice tj. povećanje lipofilnosti kako bi se pospješila pasivna apsorpcija željenog spoja. Adamantilni privjesak u strukturu molekule uveo se u obliku prethodno sintetiziranog adamantil-triazolnog prekursora, a osim što mu je uloga povezati adamantilnu jedinicu i ostatak dipeptida, triazolni prsten i sam posjeduje određenu biološku aktivnost. Manozna podjedinica odvojena preko acetilne poveznice uvedena je u strukturu priređenog manokonjugata radi boljeg prepoznavanja molekule od strane receptora na stanicama imunološkog sustava.

Za pripravu ciljane molekule upotrijebljen je kombinirani divergentno-konvergentni pristup (slika 26.). Tako je prvi pripremljeni spoj, benzilom zaštićena D-glutaminska kiselina **1** (H-D-Glu(OBn)-OH) korištena u dvije reakcije tj. dva različita sintetska puta pripreme propargiliranog desmuramil-dipeptida **3**. U prvom, dužem sintetskom putu spoj **3** pokušao se pripremiti na način da se propargilna skupina ne uvodi na dipeptid već na glutaminsku kiselinu, a koja potom u reakciji s Boc-L-Ala-OSu daje željeni spoj. U ovom sintetskom putu bilo je potrebno prije amidacije zaštititi amino-skupinu benzilirane glutaminske kiseline **1**, a nakon amidacije istu ukloniti kako bi slobodna amino-skupina mogla reagirati s aktiviranim alaninom. Iako su prva tri koraka bila uspješno provedena, posljednji korak nije rezultirao izolacijom spoja **3**. U drugom sintetskom putu prvo je reakcijom kondenzacije Boc-L-Ala-OSu i prethodno pripravljene benzilom zaštićene glutaminske kiseline **1** uspješno pripremljen dipeptid **2**, a potom je pripremljeni dipeptid reagirao s propargilaminom i kao produkt dao željeni spoj **3**. U ovom radu korištene su dvije metode amidacije, prva koja kao kondenzacijski reagens koristi BOP i druga koja koristi *n*-butil-klorformijat. Iako su obje

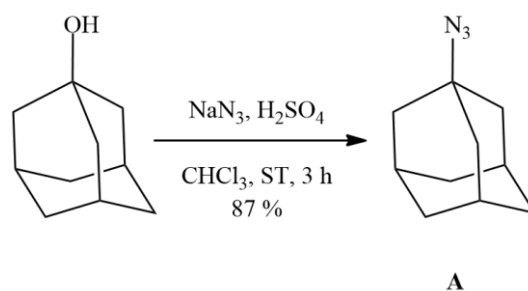
rezultirale nastankom propargiliranog dipeptida, produkt prve metode bio je smjesa dijastereoizomera što je potvrđeno spektroskopijom NMR. 1-azidoadamantan **A** pripremljen je supstitucijskom reakcijom iz adamantan-1-ola, a priređeni spoj potom je reagirao s propargiliranim dipeptidom **3** u 1,3-dipolarnoj cikloadiciji uz srebro(I) kao katalizator. Nakon provedene reakcije željeni adamantil-triazolni derivat desmuramil-dipeptida, spoj **4**, nije uspješno izoliran te se isti potom pokušao pripremiti reakcijom ranije pripremljenog adamantil-triazola **C** i dipeptida **2**. Reakcija je provedena uz *n*-butil-klorformijat kao kondenzacijski reagens, a željeni derivat **4** ovim je načinom uspješno pripremljen. Bitno je napomenuti kako je spoj **C** pripremljen u dva koraka iz ranije pripremljenog 1-azidoadamantana. Prvi korak pripreme bila je tzv. „one-pot“ sinteza Boc skupinom zaštićenog adamantil-triazola iz 1-azidoadamantana i komercijalno dostupnog propargilamina. U istoj tikvici prvo je pripremljen Boc skupinom zaštićeni propargilamin koji potom uz *in situ* generirani bakar(I) kao katalizator reagira s naknadno dodanim 1-azidoadamantanom. Tako pripremljenom zaštićenom adamantil-triazolu **B** potom je uklonjena, u prethodnom koraku uvedena, Boc zaštita čime je pripremljen spoj **C**. Uvođenjem adamantilne podjedince preko prethodno sintetiziranog spoja **C** izbjegava se mogući problem nastanka smjese 1,4- i 1,5-regioizomera kod strukturno zahtjevnijih derivata desmuramil-dipeptida koji, kao što je od ranije poznato, nisu kromatografski odvojivi. U koracima koji su slijedili pripremljenim spojevima **3** i **4** u kiselom mediju uklonjene su zaštite s amino-skupina nakon čega su, u reakciji kondenzacije, reagirali s manoznim prekursorom. Spomenuti manozni prekursor ranije je, u istom laboratoriju, pripremljen literaturno opisanim postupcima, a kondenzacija s TFA solima **5** i **6** rezultirala je nastankom i uspješnom izolacijom te karakterizacijom manoznih konjugata **7** i **8**. U posljednjem koraku iz spoja **8** hidrogenolizom na Parrovu uređaju uklonjene su zaštitne skupine s glutaminske kiseline peptidnog dijela molekule i hidroksilnih skupina šećernog dijela manokonjugata što je rezultiralo nastankom ciljne molekule **9**. Važno je napomenuti da je mogućnost uklanjanja svih zaštitnih skupina u jednom, zadnjem koraku razlog zašto su baš te zaštitne skupine i uvedene, a posebno je važno da je odabrana ona zaštitna skupina koja se može ukloniti uglavnom nedestruktivnom metodom kao što je hidrogenoliza.



Slika 26. Shematski prikaz pripreve ciljane molekule: i) BnOH,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , TEA, THF, Ar, ST, 20 h; ii) metoda **I**:  $\text{Boc}_2\text{O}$ , TEA, dioksan, voda, ST, 4 d ili metoda **II**:  $\text{Boc}_2\text{O}$ , TEA, DMF, BOP, DIPEA, DCM, ST, 2 d; iii) spoj **D**, BOP, DIPEA, DCM, ST, 2 d; iv) TFA, DCM, ST, 2 h; v) 1. Boc-L-Ala-OSu, TEA, THF, Ar, 0 °C, 30 min, 2. ST, 40 h; vi) 1. Boc-L-Ala-OSu, TEA, THF, Ar, 0 °C, 30 min, 2. ST, 24 h; vii) metoda **I**: spoj **D**, BOP, DIPEA, DCM, ST, 2 d ili metoda **II**: 1.  $\text{prpNH}_2$ , NMM, NBCF, THF, -10 °C, 1 h, 2.  $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ , ST, 1 h; viii) TFA, DCM, ST, 2 h; ix) 1. EDC $\times$ HCl, HOBt, DCM, manozni prekursor, 0 °C, 2. spoj **5**, TEA, dioksan, 0 °C, 1 h, 3. ST, 24 h; x) 1. spoj **C**, NMM, NBCF, THF, Ar, -10 °C, 2 h, 2.  $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ , ST, 1 h; xi) spoj **A**, AgCl, TEA, THF, 60 °C, 8 h; xii) TFA, DCM, ST, 5 h; xiii) 1. EDC $\times$ HCl, HOBt, DCM, manozni prekursor, 0 °C, 2. spoj **6**, TEA, dioksan, 0 °C, 1 h, 3. ST, 24 h; xiv) spoj **A**, Na L-askorbat(aq),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}(\text{aq})$ , DCM, dioksan, ST, 4 d; xv)  $\text{H}_2$ , Pd/C, EtOH, 2,8 bar, 48 h; xvi)  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$ , ST, 3 h; xvii) 1.  $\text{Boc}_2\text{O}$ , TEA, dioksan, voda, 0 °C, 2. ST, 90 min, 3. spoj **A**, Na L-askorbat(aq),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}(\text{aq})$ , Ar, 35 °C, 24 h; xviii) TFA, DCM, ST, 2 h; xix) 1. HCl(konc), 0 °C, 2. ST, 10 min.

## 4.2. Priprava adamantil-triazolnog prekursora

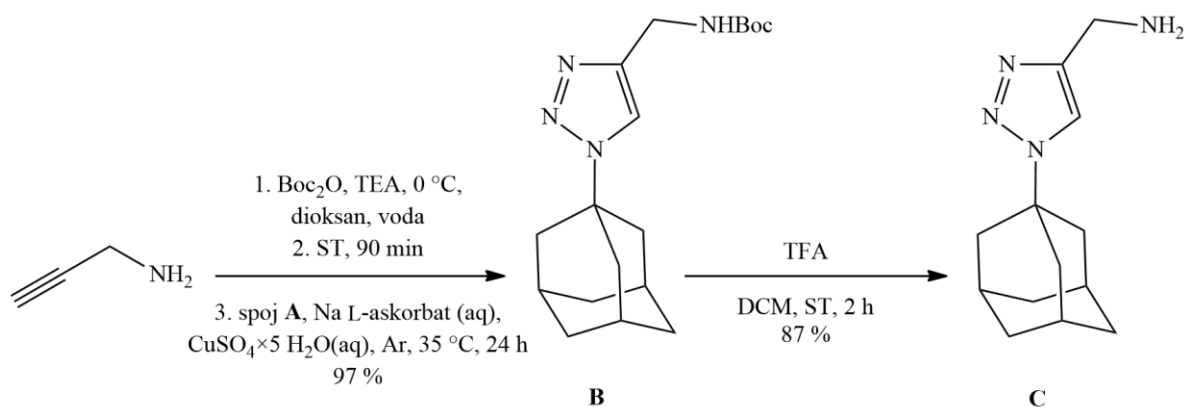
Sinteza adamantil-triazolnog prekursora **C** provedena je u 3 koraka. U prvom je koraku iz adamantan-1-ola i natrijeva azida uz sumpornu kiselinu uspješno pripremljen 1-azidoadamantan **A** (slika 27.). Ova reakcija provedena je na skali od 500 mg uz iskorištenje od 87 % te na skali od 2 g uz iskorištenje od 69 %. Struktura dobivenog spoja potvrđena je spektroskopijom NMR.



Slika 27. Shematski prikaz priprave 1-azidoadamantana.

U drugom koraku provedena je „one-pot“ sinteza 1,4-supstituiranog adamantil-triazola zaštićenog Boc skupinom iz prethodno pripremljenog 1-azidoadamantana **A** i komercijalno dostupnog propargilamina uz visoko iskorištenje od 97 %. Ova sinteza sastoji se od dva koraka. U prvom se koraku propargilamin u reakciji s anhidridom  $\text{Boc}_2\text{O}$  i trietilaminom zaštićuje Boc skupinom, a u drugom tako pripremljeni zaštićeni propargilamin reagira s dodanim 1-azidoadamantanom u kataliziranoj 1,3-dipolarnoj cikloadiciji. Katalizator ove klik-reakcije je *in situ* generirani bakar(I), a spomenuti katalizator pripremljen je reakcijom bakrova(II) sulfata pentahidrata s natrijevim L-askorbatom kao reducensom. Reakcija je provedena u smjesi dioksan-voda pri temperaturi od 35 °C. Provođenje sinteze na višoj temperaturi (>50 °C) rezultiralo je ubrzanjem reakcije, ali i nastankom zamjetne količine onečišćenja tj. neželjenog 1,5-regioizomera. Iako su regioizomeri ponekad teško odvojivi pomoću klasične kromatografije na stupcu silikagela, regioizomeri priređenog spoja relativno su se lako odvojili gradijentno s korištenim sustavima otapala. Ova činjenica važna je zbog rezultata ranije provedenih eksperimenata koji su pokazali da regioizomeri dobiveni klik-reakcijom sa strukturno kompliciranijim propargiliranim derivatima desmuramil-dipeptida nisu odvojivi pomoću kromatografije na stupcu silikagela. Treba spomenuti i činjenicu da se u originalnom propisu<sup>46</sup> u 1,3-dipolarnoj cikloadiciji sinteze triazola ne koristi katalizator već je riječ o nekataliziranoj, termičkoj, Huisgenovoj cikloadiciji. Uporaba katalizatora ne samo da

značajno smanjuje vrijeme reakcije već i utječe na selektivnost reakcije. Uvođenjem katalizatora u ovu sintezu i optimizacijom postupka variranjem temperature osmišljen je postupak pripreve supstituiranog triazolnog fragmenta kojeg karakterizira visoko iskorištenje, relativno kratko vrijeme provođenje reakcije te regioselektivnost u smislu preferencijalnog nastanka jednog regioizomera. U prilog upravo spomenutom ide i činjenica da je opisana “one pot” sinteza naknadno validirana korištenjem drugih azida te je postala dio standardne laboratorijske procedure za sintezu supstituiranih derivata triazolnih amina. U posljednjem koraku sinteze spoja **C** pomoću trifluoroctene kiseline u suhom diklormetanu uklonjena je Boc zaštitna skupina s iskorištenjem od 87 % (slika 28.).



Slika 28. Shematski prikaz pripreve adamantil-triazolnog prekursora **C**.

S ciljem pripreve spoja **C** u ovome radu isprobana je klik-reakcija nezaštićenog propargilamina i 1-azidoadamantana uz *in situ* generirani bakar(I). Bakar(I) generiran je na identičan način kao i u gore opisanoj „one-pot“ sintezi, a ova reakcija provedena je pri sobnoj temperaturi. Očekivani spoj na opisani način nije uspješno izoliran, a pretpostavka je da dolazi do interakcije elektronskog para atoma dušika slobodne amino-skupine i bakra(I) kao katalizatora što onemogućuje uključivanje bakra u ranije opisani katalitički ciklus (poglavlje 2.3.1.1.), ali i povoljno pozicioniranje svih vrsta potrebnih za ovu reakciju. U prilog ovoj tvrdnji ide i činjenica da je reakcija karbamatom skupinom zaštićenog amina tj. amina u kojem je elektronski par s dušika delokaliziran, provedena s vrlo visokim iskorištenjem.



### 4.3. Priprava peptidnih prekursora 5 i 6

#### 4.3.1. Priprava zaštićenog propargiliranog desmuramil-dipeptida 3

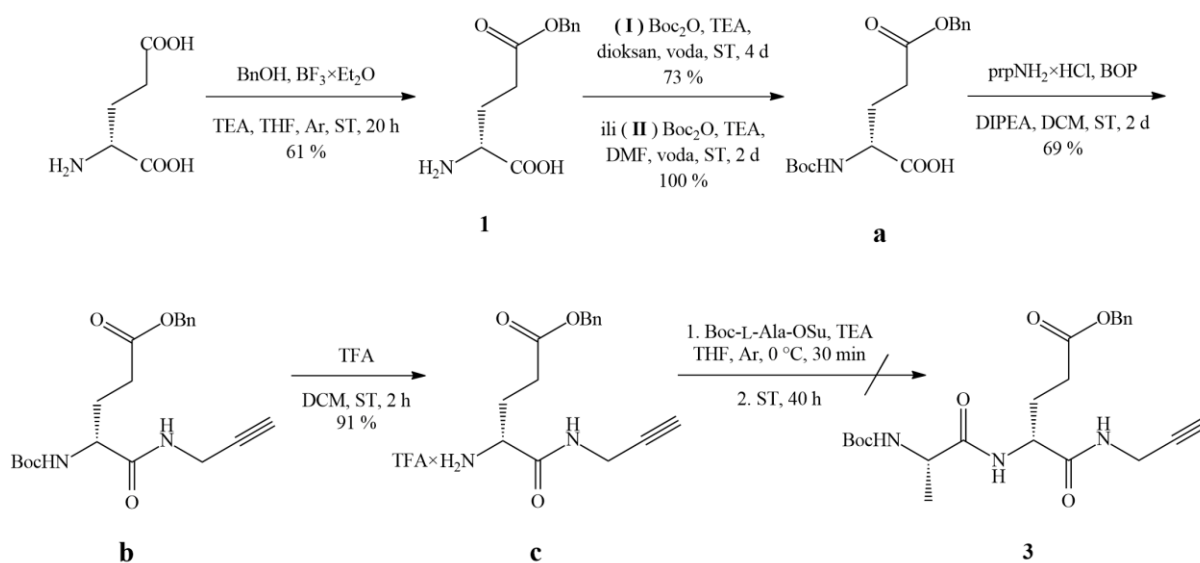
Sinteza peptidnog prekursora može se podijeliti na nekoliko dijelova, a u prvome od njih važno je bilo pronaći odgovarajuću metodu sinteze propargiliranog desmuramil-dipeptida **3**, tj. metodu koja bez promjene konfiguracije na stereogenim centrima modificira C-kraj desmuramil-dipeptida. U istraživanju koje je prethodilo ovome radu ispitano je nekoliko metoda modificiranja C-kraja (tablica 2.)<sup>4</sup>, a izdvojene su dvije u kojima su dobiveni dijastereoizomerno čisti produkti. Ipak, zbog relativno niskog iskorištenja (61 %) i trajanja eksperimenta (7 dana) u jednoj te niskog iskorištenja (23 %), uvjeta koji su uključivali povišenu temperaturu (70 °C) i veliki suvišak reagensa (124 ekvivalenta) u drugoj metodi odlučilo se krenuti u pronalazak nove, adekvatnije metode.<sup>4</sup> Isprobana su dva pristupa sinteze spomenutog propargiliranog derivata **3**: prvi u kojem je zaštićena glutaminska kiselina **1** prvo propargilirana, a potom kondenzirana s alaninom i drugi u kojem je prvo kondenzirana s alaninom nakon čega je nastali dipeptid **2** modificiran uvođenjem propargilamina na C-kraj.

Tablica 2. Pregled ranije korištenih metoda priprave propargiliranog desmuramil-dipeptida.<sup>4</sup>

Metoda / reagensi i otapalo	Uvjeti i vrijeme reakcije	Iskorištenje / %	Produkt/i
<b>Metoda I</b> propargilamin hidroklorid, t-Boc <sub>2</sub> O, piridin, dioksan	1,3 ekv. piridina, 1 dan	34	jedan dijastereoizomer
	6,5 ekv. piridina, 3 dana	45	
	11,7 ekv. piridina, 7 dana	61	
<b>Metoda II</b> propargilamin, piridin, TiCl <sub>4</sub>	124 ekv. piridina, 3 ekv. TiCl <sub>4</sub> , 70 °C, 2 h	23	jedan dijastereoizomer
<b>Metoda III</b> propargilamin, Boc <sub>2</sub> O, piridin, DMAP, THF	1,1 ekv. piridina, 0,17 ekv. DMAP, 1 dan	56	smjesa dijastereoizomera

U prvom pristupu propargilirani desmuramil-dipeptid **3** pokušao se pripremiti kondenzacijskom reakcijom prethodno propargilirane i zaštićene glutaminske kiseline **c** s

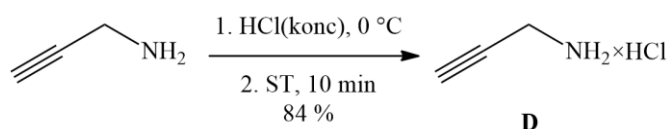
komercijalno dostupnim Boc-L-Ala-OSu. Ovaj pristup sastoji se od pet koraka (slika 29.): (1) uvođenje benzilne zaštite na karboksilnu skupinu u bočnom ogranku D-glutaminske kiseline (spoj **1**); (2) uvođenje Boc skupine na amino-skupinu D-glutaminske kiseline (spoj **a**); (3) reakcija pripravljene zaštićene D-glutaminske kiseline **a** s propargilaminom tj. priprava amida **b**; (4) uklanjanje Boc skupine s propargilirane i benzilnom zaštitom zaštićene D-glutaminske kiseline **b** i u konačnici (5) kondenzacija TFA soli propargilirane te benzilom zaštićene D-glutaminske kiseline **c** s Boc-L-Ala-OSu.



Slika 29. Shematski prikaz prvog pristupa korištenog u sintezi propargiliranog desmuremid-dipeptida **3**.

Kako se reakcija propargiliranja želi provesti selektivno tj. cilj je pripraviti derivat izoglutamina, potrebno je selektivno zaštititi karboksilnu skupinu u bočnom ogranku polazne glutaminske kiseline. To je učinjeno literaturno poznatim postupkom<sup>4</sup> uz benzilni alkohol i  $\text{BF}_3 \times \text{Et}_2\text{O}$ , a reakcija je nakon pročišćavanja prekrizacijom iz smjese otapala vode i etanola rezultirala nastankom željenog H-D-Glu(OBn)-OH (**1**) uz iskorištenje od 61 % na skali od 2 g. Selektivnost tj. zaštićivanje samo karboksilne skupine bočnog ogranka aminokiseline posljedica je stvaranja kompleksa bora i  $\alpha$ -amino- te  $\alpha$ -karboksilne skupine glutaminske kiseline. Kako je  $\alpha$ -karboksilna skupina dio kompleksa, jedina skupina koja može sudjelovati u reakciji esterifikacije benzilnim alkoholom je slobodna karboksilna skupina bočnog ogranka. Osim uvođenja zaštite na jednu od karboksilnih skupina

glutaminske kiseline s ciljem usmjeravanja reakcije propargiliranja, bitno je zaštititi i amino-skupinu glutaminske kiseline. Naime, uvjeti reakcije propargiliranja odgovaraju uvjetima u kojima je, ukoliko je amino-skupina nezaštićena, moguća samokondenzacija aminokiselina. U ovom slučaju moguća je neželjena oligomerizacija (polimerizacija) glutaminske kiseline kojom se troši reaktant i smanjuje iskorištenje reakcije. Amino-skupina glutaminske kiseline zaštićena je Boc skupinom, a isprobana su dva postupka koja su se razlikovala u korištenom otapalu: u prvome je korištena smjesa dioksana i vode dok je u drugome kao otapalo korištena smjesa *N,N*-dimetilformamida i vode. U oba je postupka kao izvor acila korišten anhidrid  $\text{Boc}_2\text{O}$  i TEA kao baza te su oba rezultirala nastankom produkta Boc-D-Glu(OBn)-OH (**a**) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR. Reakcija provedena u smjesi DMF-voda rezultirala je iskorištenjem od 100 %, a reakcija provedena u smjesi dioksan-voda iskorištenjem od 73 %. Treba napomenuti i kako se u originalnom propisu<sup>47</sup> za reakciju uvođenja Boc skupine u smjesi otapala dioksana i vode ne koristi baza tj. TEA bez dodatka kojeg se ne događa zamjetna kemijska transformacija. Iz tog razloga originalni propis je modificiran i kao baza je uveden TEA. U slijedećem koraku C-kraj spoja **a** modificiran je uvođenjem propargilamina. Reagens za uvođenje propargilamina, hidroklorid **D**, pripremljen je reakcijom propargilamina i koncentrirane klorovodične kiseline (slika 30.). Sinteza hidroklorida nakon uparavanja u kodestilaciji s metanolom, a potom i dietil-eterom rezultirala je iskorištenjem od 84 %.



Slika 30. Shematski prikaz pripreve propargilamin hidroklorida.

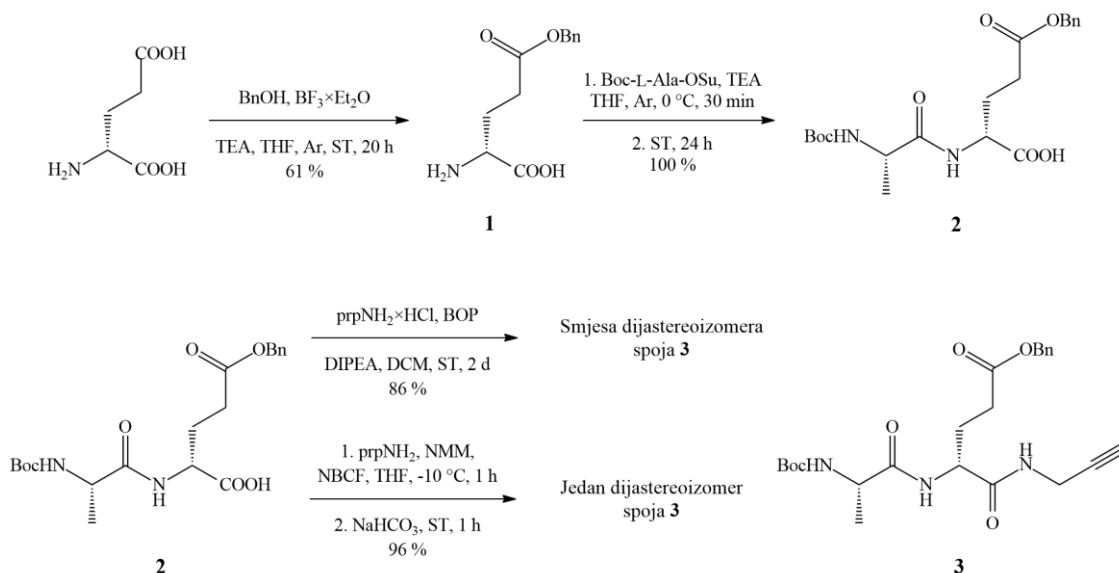
Propargilirani derivat spoja **a**, spoj **b**, sintetiziran je reakcijom prethodno pripremljenih spojeva **a** i **D** uz BOP kao kondenzacijski reagens i diizopropiletilamin (DIPEA) kao bazu uz iskorištenje od 69 %. Iako je struktura pripremljenog spoja potvrđena spektroskopijom NMR, zbog nemogućnosti razlikovanja enantiomera ovom tehnikom nije moguće utvrditi enantiomernu čistoću priređenog spoja. Snimanje spektra NMR u kiralnom mediju u kojem dolazi do različite interakcije različitih enantiomera sa spomenutim medijem način je na koji

bi se moglo odrediti koliki je udio pojedinog enantiomera odnosno enantiomerni višak. Prije kondenzacije propargiliranog derivata D-glutaminske kiseline **b** s Boc-L-Ala-OSu bilo je potrebno ukloniti Boc zaštitu s amino-skupine što je učinjeno u kiselom mediju (TFA), a nakon kromatografskog čišćenja priređen je spoj D-Glu(OBn)-NH-prp u obliku TFA soli (**c**) uz iskorištenje od 91 %. Pokušaj kondenzacije tako priređene TFA soli **c** s komercijalno dostupnim alaninom na *N*-kraju zaštićenim Boc skupinom i aktiviranim prevođenjem u *N*-hidroksisukcinimidni ester (Boc-L-Ala-OSu) u posljednjem koraku nije bio uspješan što je kao posljedicu imalo razvoj drugog pristupa sintezi propargiliranog derivata desmuramil-dipeptida **3**.

Drugi pristup pripreve propargiliranog desmuramil-dipeptida **3** pokazao se uspješnijim od prethodnog, a sastoji se od tri koraka (slika 31.): (1) uvođenje benzilne zaštite na karboksilnu skupinu u bočnom ogranku D-glutaminske kiseline (spoj **1**); (2) kondenzacija pripremljene benzilom zaštićene D-glutaminske kiseline **1** s Boc-L-Ala-OSu; (3) reakcija pripremljenog dipeptida **2** s propargilaminom tj. priprema amida **3**. Uvođenjem benzilne zaštite na karboksilnu skupinu pripremljena je H-D-Glu(OBn)-OH **1** koja je u slijedećem koraku reagirala s Boc-L-Ala-OSu pri čemu je pripremljen dipeptid **2**, Boc-L-Ala-D-Glu(OBn)-OH. Kao baza korišten je TEA, a reakcija je provedena kvantitativno i bez potrebe za kromatografskim čišćenjem. Iako je problem u istraživanju koje je prethodilo ovome bila izolacija čistog spoja **2** zbog onečišćenja alaninom nastalog hidrolizom Boc-L-Ala-OSu,<sup>4</sup> u ovome radu željeni dipeptid **2** sintetiziran je i izoliran u čistomu obliku. Važno je napomenuti kako su za provođenje ove kondenzacije nužni suhi uvjeti, u ovom slučaju suhi THF i inertna atmosfera argona. Reakcija je provedena i u uvjetima koji sadržavaju vodu tj. smjesi 1,2-dimetoksietana i vode (1:1), a rezultirala je nastankom višekomponentne smjese iz koje spoj **2** nije uspješno izoliran.<sup>52</sup>

U posljednjem koraku preostalo je modificirati *C*-kraj dobivenog *N*-zaštićenog dipeptida **2**, a isprobane su dvije metode. Prva metoda analogna je ranije opisanom propargiliranju spoja **a** te kao kondenzacijski reagens koristi BOP, a kao bazu diizopropiletilamin. Nakon kromatografske obrade ovom metodom dobiven je produkt s iskorištenjem od 86 %. Ipak, spektar NMR sadržavao je dvostruki signal vodikovih atoma Boc skupine čiji je omjer površina gotovo 1:1, a što ukazuje na nastanak para

dijastereoizomera spoja **3**. Nastanak dijastereoizomernog para u ovoj reakciji ide u prilog pretpostavci da i u reakciji propargiliranja zaštićene D-glutaminske kiseline **a** metodom koja koristi BOP i diizopropiletilamin dolazi do nastanka enantiomera koji zbog ograničenja NMR nisu razlučivi u akiralnom mediju tj. daju signale pri istim kemijskim pomacima.



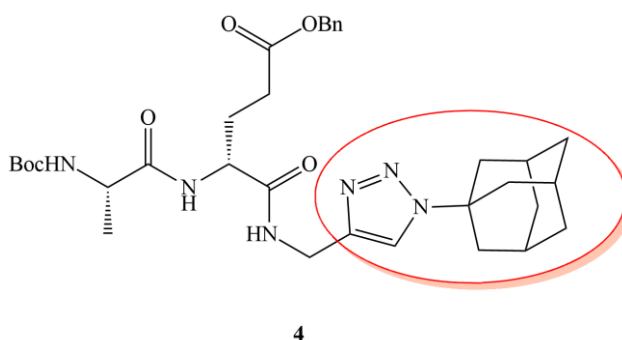
Slika 31. Shematski prikaz drugog pristupa korištenog u sintezi propargiliranog desmuramil-dipeptida **3**.

Druga metoda propargiliranja poznata je dugi niz godina, a kao reagens koristi amin, u ovom slučaju propargilamin te *N*-metilmorfolin i klorformijatni reagens. *N*-metilmorfolin i klorformijatni reagens korišteni su za pripremu mješovitog anhidrida koji, kao vrsta reaktivnija od karboksilne kiseline, potom reagira s aminom. U originalnom propisu<sup>50</sup> prema kojem je ova reakcija provedena vrijeme aktivacije je 3 min, a treba napomenuti i kako se u spomenutom propisu kao klorformijatni reagens koristi izobutil-klorformijat dok je u ovom radu korišten *n*-butil-klorformijat. Reakcija je provedena u suhom THF-u, a nakon kromatografskog čišćenja rezultirala je nastankom propargiliranog desmuramil-dipeptida **3** s vrlo visokim iskorištenjem od 96 %. Struktura, ali i dijastereoizomerna čistoća priređenog spoja potvrđene su spektroskopijom NMR. Iako je dijastereoizomerna čistoća velika, ovom tehnikom nije moguće utvrditi koji je od dijastereoizomera zaista nastao, no kako je korištena metoda u originalnom radu naslovljena kao stereokonzervativna pretpostavka je da priređeni spoj jednake konfiguracije kao početni dipeptid. Korištena metoda superiorna je u odnosu na

sve metode prethodno ispitane u ovom laboratoriju, a ističe se visokim iskorištenjem, relativno kratkim vremenom provođenja reakcije te dijastereoizomernom čistoćom.

#### 4.3.2. Priprava adamantil-triazolnog derivata desmuramil-dipeptida **4**

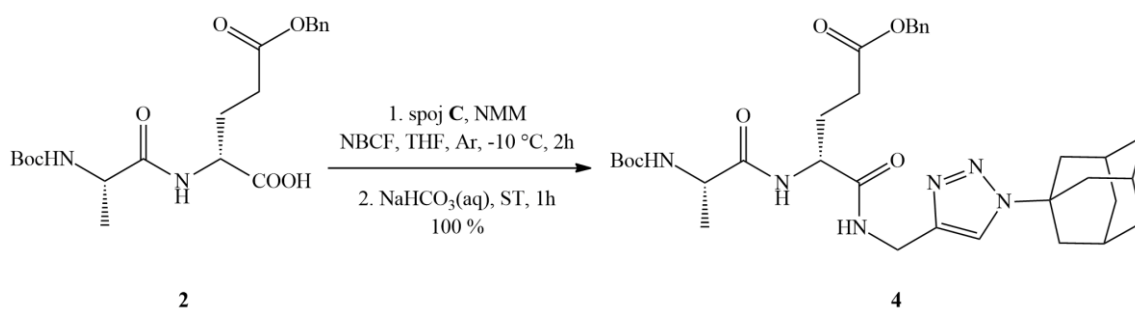
U sljedećem dijelu sinteze peptidnog prekursora **4** važno je bilo pronaći metodu kojom se na desmuramil-dipeptid **2** uspješno uvodi adamantilna skupina tj. C-kraj desmuramil-dipeptida bilo je potrebno modificirati tako da sadrži adamantil-triazolnu podjedinicu (slika 32.). Nadalje, kako uvedena triazolna podjedinica može biti 1,4- ili 1,5-supstituirana potrebno je razviti metodu koja rezultira nastankom isključivo 1,4-regioizomera. Do navedene modifikacije moglo se doći koristeći nekoliko pristupa od kojih su dva korištena u ovom radu. Prvi pristup koristi već modificirani desmuramil-dipeptid **3** na čijem se C-kraju nalazi propargilna skupina amidnom vezom povezana s ostatkom dipeptida (poglavlje 4.3.1.) dok drugi pristup polazi iz desmuramil-dipeptida **2** kojemu je primarna karboksilna skupina slobodna.



Slika 32. Strukturna formula spoja **4** – adamantil-triazolnog derivata zaštićenog desmuramil-dipeptida.

Prvim pristupom adamantil-triazolna podjedinica željela se uvesti klik-reakcijom već postojećeg propargilnog fragmenta spoja **3** i 1-azidoadamantana. U prethodnim istraživanjima isprobana je klik-reakcija uz *in situ* generirani bakar(I), a reakcija je rezultirala nastankom smjese 1,4- i 1,5-regioizomera u omjeru 1:0,16. U ovom istraživanju spomenuti triazol pokušao se sintetizirati klik-reakcijom kataliziranom srebrom, a kao izvor srebrovog atoma korišten je srebrov klorid. Očekivani spoj na ovaj način nije uspješno sintetiziran te se iz tog razloga krenulo u razvoj drugog pristupa.

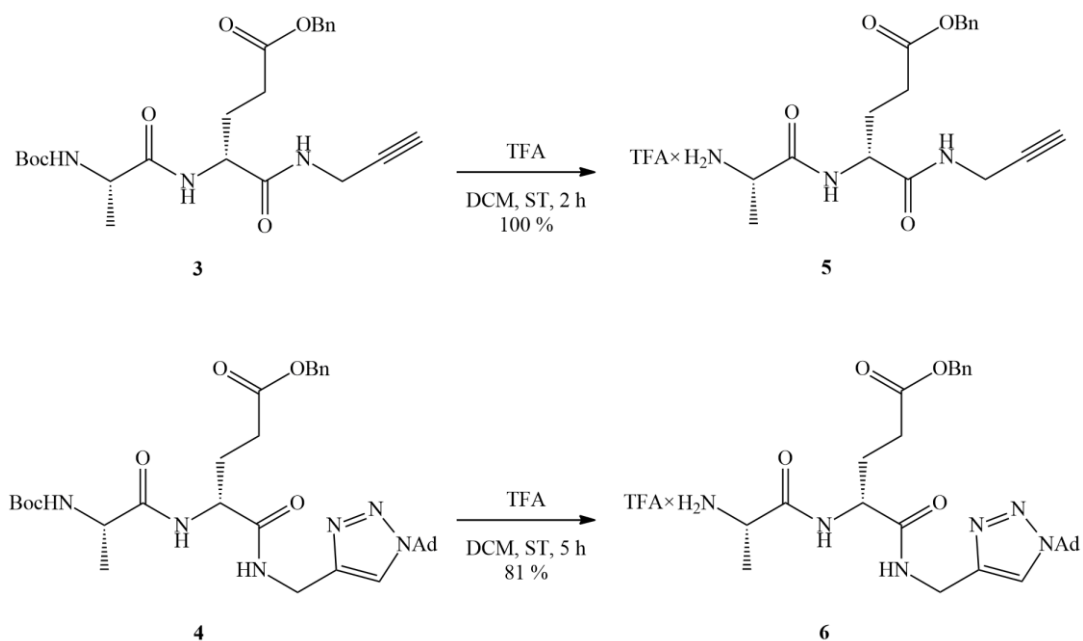
Drugi pristup obuhvaća ranije opisanu sintezu adamantil-triazola i vezanje dobivenog spoja **C** na dipeptid **2**. S obzirom da spoj **C** sadrži slobodnu amino-skupinu, kondenzacija ovog spoja s dipeptidom **2** pokušala se provesti uz prethodno korištene uvjete amidacije (slika 33.). Reakcija kondenzacije uz *N*-metilmorfolin i *n*-butil-klorformijat nakon kromatografskog čišćenja rezultirala je kvantitativnim prinosom produkt **4** čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR. Na ovaj način uspješno je u strukturu dipeptida odnosno na *C*-kraj dipeptida uveden adamantil-triazolni fragment s 1,4-supstitucijom triazolnog prstena. Ranije upotrijebljena metoda amidacije za pripremu spoja **3** još se jednom pokazala učinkovitom prilikom pripreve amida desmuramil-dipeptida **4**. Ranijom pripravom triazolnog derivata **C** čiju su regioizomeri odvojivi kromatografijom na stupcu silikagela i kondenzacijom istog s dipeptidom **2** izbjegnuto je dobivanje smjese regioizomera spoja **4** za koje je od ranije poznato da nisu odvojivi ovom tehnikom.<sup>4</sup>



Slika 33. Shematski prikaz reakcije spoja **2** s adamantil-triazolnim aminom **C** – priprava spoja **4**.

#### 4.3.3. Uklanjanje Boc zaštite s peptidnih prekursora **3** i **4**

Prije kondenzacije peptidnih prekursora **3** i **4** s manoznom podjedinicom tj. karboksilnom skupinom acetilne poveznice, priređenim dipeptidima **3** i **4** bilo je potrebno ukloniti Boc zaštitu s amino-skupine. To je učinjeno u kiselom mediju (TFA), a reakcija je rezultirala nastankom TFA soli odgovarajućih deprotektiranih dipeptida **5** i **6** s iskorištenjem od 100 % za dipeptid **5** i 81 % za dipeptid **6** (slika 34.). Treba napomenuti kako je spoj **3** prethodno pripremljen metodom **II** tj. stereokonzervativnom metodom uz *N*-metilmorfolin i *n*-butil-klorformijat, a spektri NMR dobivenih soli, kao i oni polaznih spojeva, nisu sadržavali signale koji bi upućivali na smjesu dijastereoizomera.

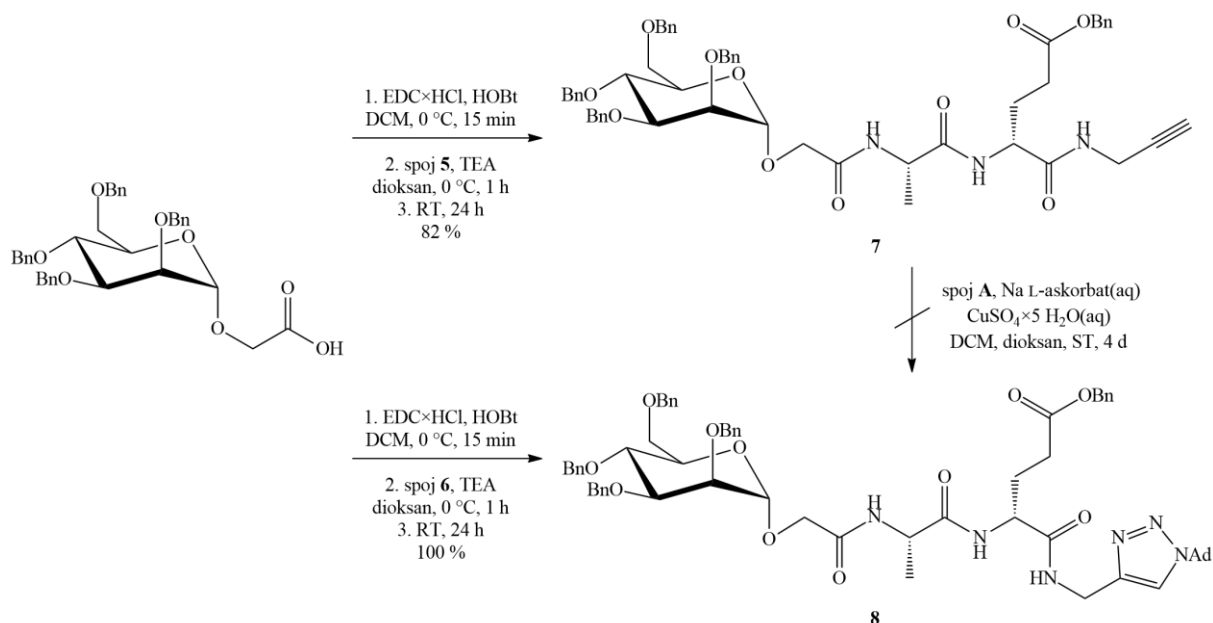


Slika 34. Shematski prikaz uklanjanja Boc zaštite s amino-skupine spojeva **3** i **4** – priprava spojeva **5** i **6**.

#### 4.4. Kondenzacija peptidnih prekursora **5** i **6** s manoznom podjedinicom

U nastavku diplomskog rada pripravljene TFA soli peptidnih prekursora **5** i **6** kondenzirane su s manoznom podjedinicom tj. 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octenom kiselinom, prethodno pripremljenom u istome laboratoriju (slika 35.). Kao što je ranije rečeno, hidroksilne skupine ovog šećera zaštićene su benzilnim skupinama kao i karboksilna skupina bočnog ogranka glutaminske kiseline kako bi se u posljednjem koraku hidrogenolizom zajedno uklonile. Kondenzacije šećerne karboksilne kiseline i peptidnih prekursora provedene su uz EDC $\times$ HCl kao kondenzacijski reagens i HOBt kao aditiv te TEA kao bazu. Na ovaj način pripravljeni su spojevi **7** i **8** uz iskorištenje od 82 % za spoj **7** i 100 % za spoj **8**. Spoj **8** pokušao se pripraviti i klik-reakcijom propargilnog fragmenta spoja **7** s azidoadamantanom uz bakar(I) kao katalizator, no opisanim postupkom spoj nije uspješno pripremljen.

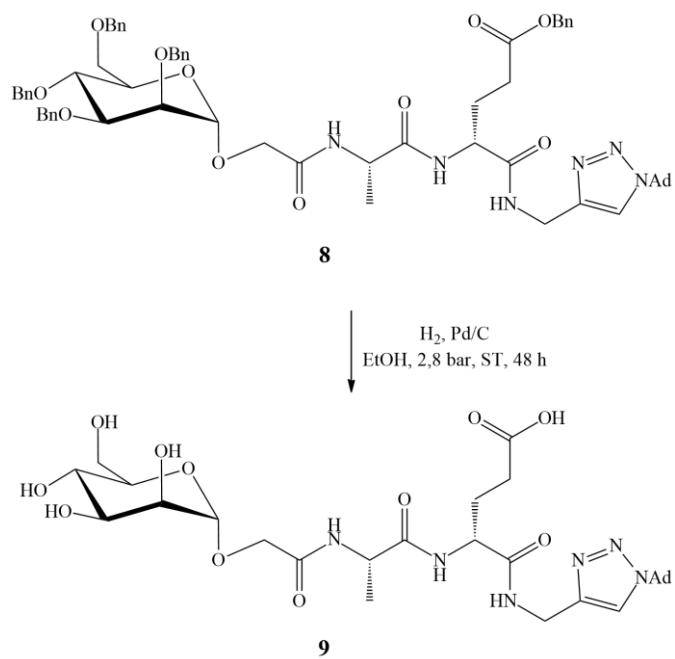




Slika 35. Shematski prikaz pripreve spojeva 7 i 8 kondenzacijom manoznog prekursora i spojeva 5 i 6.

#### 4.5. Uklanjanje benzilnih zaštitnih skupina i priprava ciljne molekule 9

U posljednjem koraku, hidrogenolizom provedenom na Parrovom uređaju uspješno su uklonjene sve benzilne zaštitne skupine sa spoja 8 čime je pripravljena ciljna molekula 9 (slika 36.). Reakcija je provedena na miligramskoj skali (39 mg), a kao katalizator u ovoj reakciji korišten je paladij na ugljiku. Nastanak spoja 9 i uklanjanje zaštitnih skupina potvrđeno je spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa, a prije *in vivo* testiranja adjuvantske aktivnosti preostalo je pripremiti dovoljnu količinu ciljanog spoja 9 zadovoljavajuće čistoće.

Slika 36. Shematski prikaz pripreve ciljne molekule **9** hidrogenolizom spoja **8**.

## § 5. ZAKLJUČAK

1. Nakon korištenja različitih pristupa i procedura uspješno je optimiran postupak pripreve adamantil-triazolnog amina – strukturne podjedinice koja će se implementirati u strukturu desmuramil-dipeptida. Adamantil-triazol **C**, komponenta biološki važna zbog lipofilnog adamantilnog i biološki aktivnog triazolnog dijela sintetizirana je u dva koraka:

- (i) prvo je „one-pot“ sintezom iz propargilamina i anhidrida  $\text{Boc}_2\text{O}$  pripremljen zaštićeni propargilamin nakon čega je uslijedila klik-reakcija s prethodno pripremljenim 1-azidoadamantanom uz *in situ* generirani bakar(I) kao katalizator. Iskorištenje opisane sinteze je 97 %;
- (ii) uspješno je uz trifluoroctenu kiselinu u diklormetanu uklonjena u prvom koraku uvedena karbamatna zaštita s iskorištenjem od 87 %.

Opisana „one-pot“ sinteza naknadno je uspješno validirana korištenjem drugih azida te je postala dio standardne laboratorijske procedure za pripremu novih derivata triazolnih amina koji će se u nastavku istraživanja ugrađivati u strukturu desmuramil-dipeptida.

2. Sinteza spoja **C** pokušala se provesti i kraćim sintetskim putem iz nezaštićenog propargilamina i azidoadamantana uz *in situ* generirani bakar(I), no postupak nije bio uspješan. Kao obrazloženje neuspjelog pokušaja na temelju dosad pretpostavljenog i prihvaćenog mehanizma, ali i eksperimenata provedenih u ovom laboratoriju, nametnula se pretpostavka da dolazi do interakcije elektronskog para atoma dušika slobodne amino-skupine i bakra(I) kao katalizatora što onemogućuje uključivanje bakrova atoma u katalitički ciklus, ali i povoljno pozicioniranje svih potrebnih vrsta.

3. Dipeptid Boc-L-Ala-D-Glu(OBn) **2** koji je u ovome radu korišten kao preteća desmuramil-dipeptida, uspješno je pripremljen u dva koraka:

- (i) s relativno dobrim iskorištenjem (61 %) uz benzilni alkohol i  $\text{BF}_3 \times \text{Et}_2\text{O}$  kao Lewisovu kiselinu pripremljena je D-glutaminska kiselina s benzilnom zaštitom karboksilne skupine u bočnom ogranku (spoj **1**);
- (ii) provedena je kondenzacijska reakcija prethodno pripremljene zaštićene D-glutaminske kiseline **1** i kupovnog L-alanina na *N*-kraju zaštićenog Boc zaštitom i

aktiviranog *N*-hidroksisukcinimidom. Reakcija je provedena uz trietilamin kao bazu s iskorištenjem od 100 %. Metoda kondenzacije koja kao otapalo koristi vodu nije se pokazala uspješnom, a kao obrazloženje uzima se pretpostavka da dolazi do hidrolize aktiviranog *N*-hidroksisukcinimidnog estera alanina.

4. Reakcija amidacije dipeptida Boc-L-Ala-D-Glu(OBn) **2** propargilaminom provedena je uz *N*-metilmorfolin i *n*-butil-klorformijat što je rezultiralo nastankom diastereomerno čistog amida **3** s vrlo visokim iskorištenjem (96 %). Navedeni uvjeti korišteni su i u reakciji istog dipeptida s prethodno pripremljenim adamantil-triazolnim aminom **C**. U ovoj reakciji, uz kvantitativan prinos, priređen je diastereomerno čisti spoj **4**. Propargiliranje dipeptida provedena je i uz BOP kao kondenzacijski reagens te diizopropiletilamin kao bazu, a rezultirala je nastankom smjese diastereoizomera u približnom omjeru 1:1 što je potvrđeno spektroskopijom NMR.

5. Sinteza propargiliranog dipeptida **3** pokušala se provesti i paralelnim sintetskim putem. U okviru ovog sintetskog puta, u prvom koraku provedena je reakcija uvođenja Boc skupine na benzilom zaštićenu glutaminsku kiselinu **1**, a isprobane su dvije metode koje su se razlikovale po sastavu smjese otapala korištenih u reakciji. Reakcija provedena u smjesi dioksana i vode rezultirala je prinosom od 73 % dok je reakcija u smjesi DMF-a i vode provedena uz kvantitativan prinos. Ključnim se u navedenoj sintezi pokazao i dodatak baze, u ovom slučaju TEA, bez koje nije došlo do kemijske reakcije. Tako sintetizirani spoj **a** potom je u reakciji amidacije uz BOP kao kondenzacijski reagens i DIPEA kao bazu preveden u propargilni derivat **b** uz iskorištenje od 69 %. Nakon uklanjanja Boc zaštitne skupine s tako dobivenog spoja uspješno je pripravljena TFA sol **c**, no pokušaj kondenzacije priređene soli s Boc-L-Ala-OSu u svrhu pripreme spoja **3** nije bio uspješan.

6. Spoj **4** pokušao se pripraviti i klik-reakcijom prethodno pripremljenih propargiliranog dipeptida **3** i 1-azidoadamantana **A**. Kao katalizator korišten je srebrov klorid, a adamantil-triazolni derivat dipeptida ovim postupkom nije uspješno pripremljen.

7. Nakon uklanjanja Boc zaštite s propargiliranog dipeptida **3** i adamantil-triazolnog derivata dipeptida **4**, kondenzacijska reakcija tako priređenih spojeva **5** i **6** u obliku TFA soli s

prethodno pripremljenim manoznim prekursorom rezultirala je nastankom spojeva **7** i **8**. Kao kondenzacijski reagens u ovim reakcijama korišten je EDC×HCl dok je kao aditiv korišten HOBt. Reakcije su provedene sa zadovoljavajućim prinosom od 82 % za spoj **7** i kvantitativnim prinosom za spoj **8**.

8. Spoj **8** pokušao se pripremiti i klik-reakcijom prethodno pripremljenih spoja **7** i 1-azidoadamantana **A** *in situ* generirani bakar(I) kao katalizator. Ovim postupkom spoj **8** nije uspješno pripremljen.

9. Posljednji korak sinteze tj. uklanjanje benzilne eterske zaštite sa šećernog dijela te benzilne esterske zaštite karboksilne skupine bočnog ogranka izoglutamina spoja **8** proveden je na miligramskoj skali, a nastanak ciljne molekule **9** potvrđen je spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa. Konačni cilj ovog diplomskog rada jest priprava manoziliranog adamantil-triazolnog derivata desmuramil-dipeptida **9** zadovoljavajuće čistoće te u količinama dovoljnim za *in vivo* ispitivanje adjuvantske aktivnosti. Važno je spomenuti da je mogućnost uklanjanja svih zaštitnih skupina u jednom, zadnjem koraku razlog zašto su baš te zaštitne skupine i uvedene.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Ac	acetil
Alloc	aliloksikarbonil
Bn	benzil
Boc	<i>t</i> -butiloksikarbonil
BOP	benzotriazol-1-iloksi-tris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat
CuAAC	bakrom katalizirana azid-alkin cikloadicija (engl. <i>Cu catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i> )
DCC	dicikloheksilkarbodiimid
DCM	diklormetan
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DMAP	4- <i>N,N</i> -dimetilaminopiridin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
EDC×HCl	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilkarbodiimid hidroklorid
ESI-MS	masena spektroskopija uz ionizaciju elektroraspršenjem
EtOAc	etil-acetat
Fmoc	9-fluorenilmetiloksikarbonil
HOBt	1-hidroksi-1 <i>H</i> -benzotriazol
HOSu	<i>N</i> -hidroksisukcinimid
MDP	muramil-dipeptid
Me	metil
NBCF	<i>n</i> -butil-klorformijat
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
PGM	peptidoglikan monomer
Ph	fenil
prp	propargil
SPPS	sinteza na čvrstom nosaču (engl. <i>solid phase peptide synthesis</i> )
SPS	sinteza u otopini (engl. <i>solution phase synthesis</i> )
TEA	trietilamin
TFA	trifluoroctena kiselina

---

THF	tetrahidrofur
TLC	tankoslojna kromatografija (eng. <i>thin-layer chromatography</i> )
TMS	tetrametilsilan

## § 7. LITERATURNI IZVORI

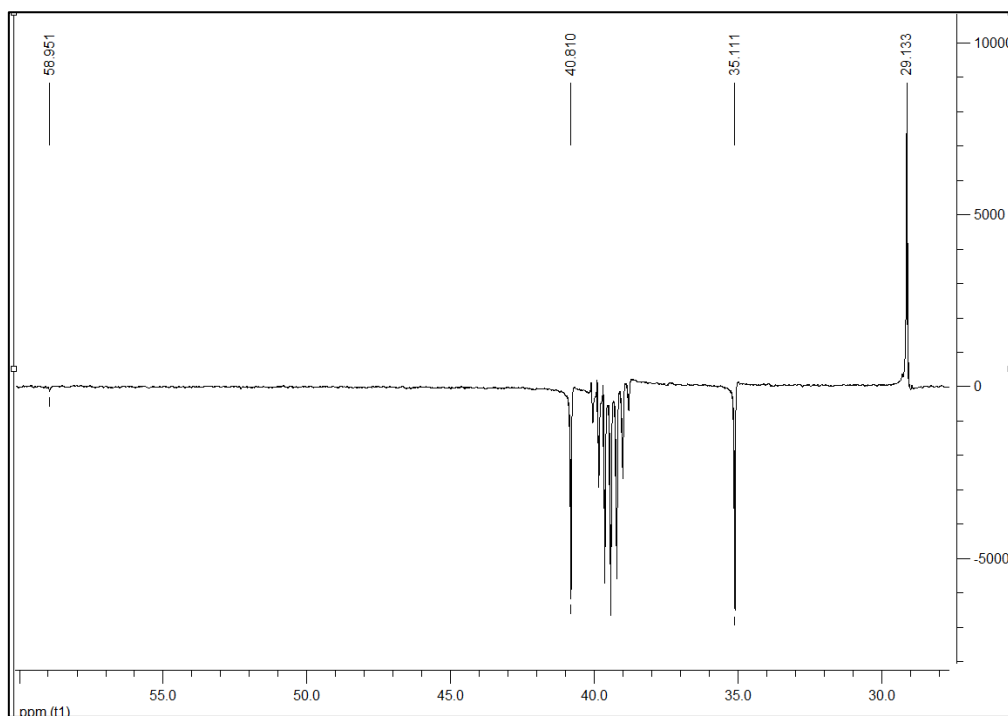
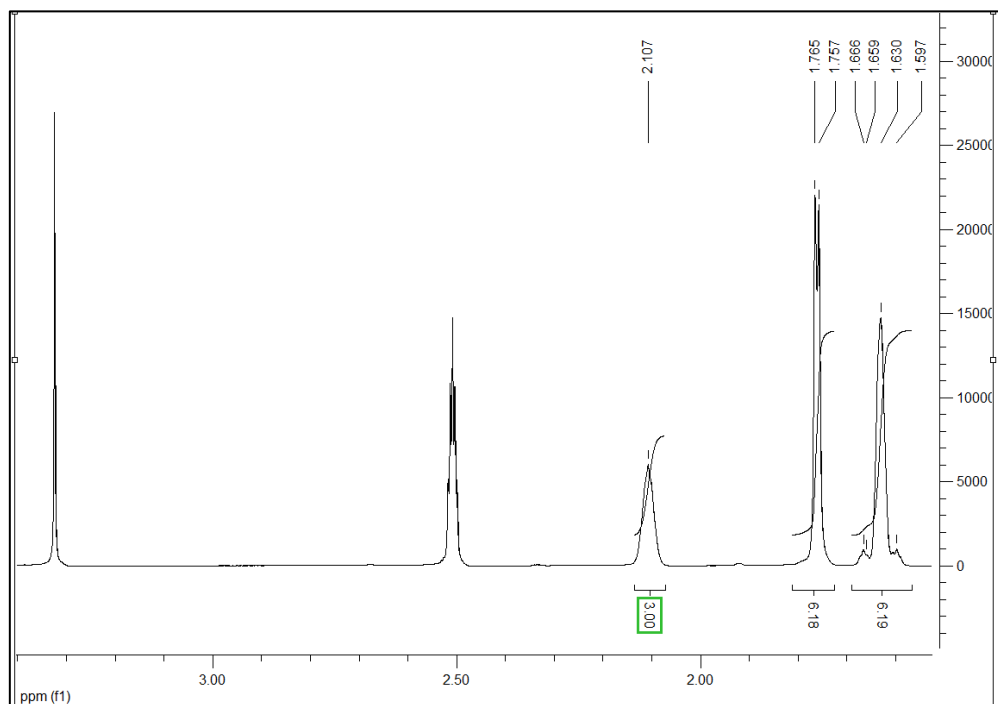
1. R. Ribić, S. Tomić, *Kem. Ind.* **62** (2013) 19-31.
2. R. Ribić, M. Paurević, S. Tomić, *Croat. Chem. Acta* **92** (2019) 153-161.
3. A. Štimac, M. Šekutor, K. Mlinarić-Majerski, L. Frkanec, R. Frkanec, *Molecules* **22** (2017) 297-310.
4. A. Ožegović, *Razvoj sintetskih metoda za pripremu triazolnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida*, Diplomski rad, Prirodoslovo-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019.
5. D. Mardešić i sur., *Pedijatrija*, Školska knjiga, Zagreb, 2016, str. 554-556.
6. M. L. Lauro, E. A. D'Ambrosio, B. J. Bahnson, C. Leimkuhler Grimes, *ACS Infect. Dis.* **3** (2017) 264-270.
7. D. M. M. Jaradat, *Amino Acids* **50** (2018) 39-68.
8. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic Chemistry*, 2nd Edition, Oxford University Press, 2012, str. 553.
9. S. Chandrudu, P. Simerska, I. Toth, *Molecules* **18** (2013) 4373-4388.
10. D. L. Nelson, M. Cox, A. L. Lehninger, *Principles of Biochemistry*, 7th Edition, Springer Nature, 2017.
11. A. Isidro-Llobet, M. Álvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **109** (2009) 2455-2504.
12. M. Bergmann, L. Zervas, *Ber.* **65** (1932) 1192-1201
13. T. Min, B. Yi, P. Zhang, J. Liu, C. Zhang, H. Zhou, *Med. Chem. Res.* **18** (2009) 495-510.
14. A. R. Katritzky, C. N. Fali, J. Li, D. J. Ager, I. Prakesh, *Synth. Commun.* **27** (1997) 1623-1630.
15. M. Adamczyk, J. R. Fishpugh, K. J. Heuser, *Org. Prep. Proced. Int.* **30** (1998) 339-348.
16. T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 5th Edition, John Wiley & Sons, 2014.
17. E. Wünsch, W. Graf, O. Keller, W. Keller, G. Wersin, *Synthesis* 1986 (1986) 958-960.
18. A. Paquet, *Can. J. Chem.* **60** (1982) 976-980.
19. L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **37** (1972) 3404-3409.



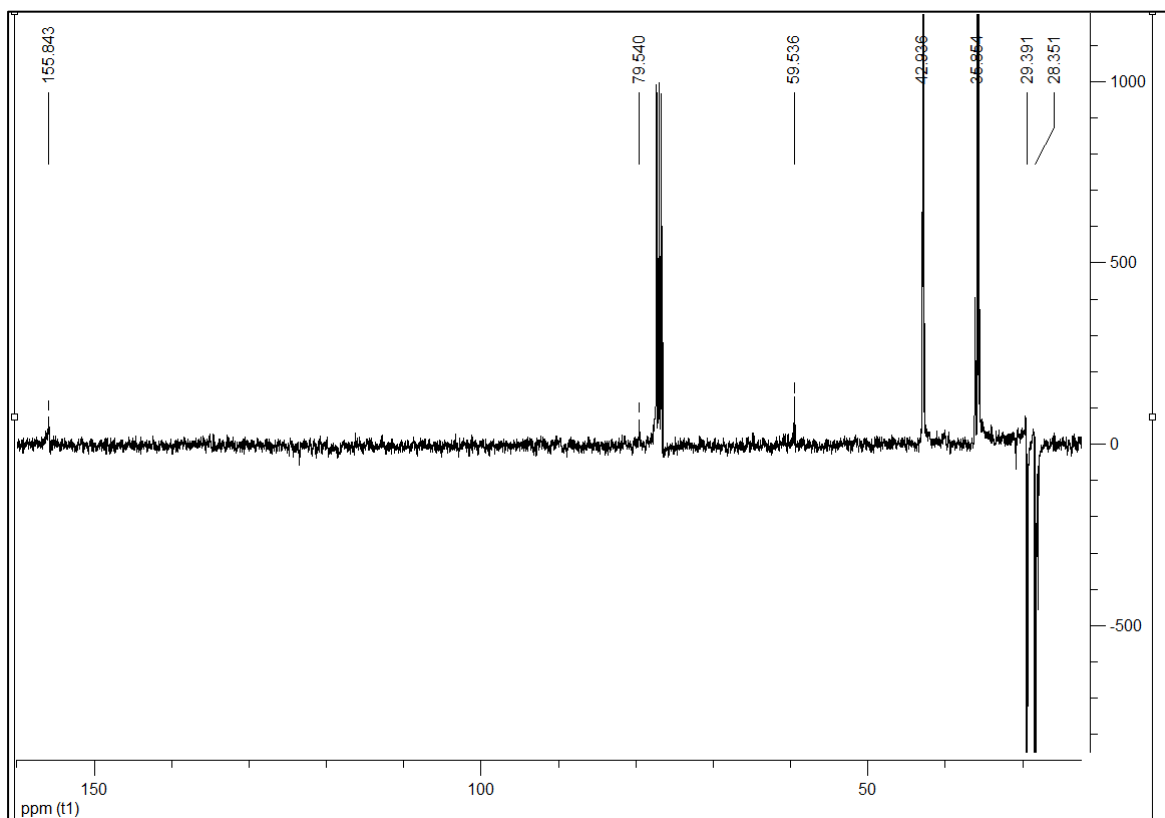
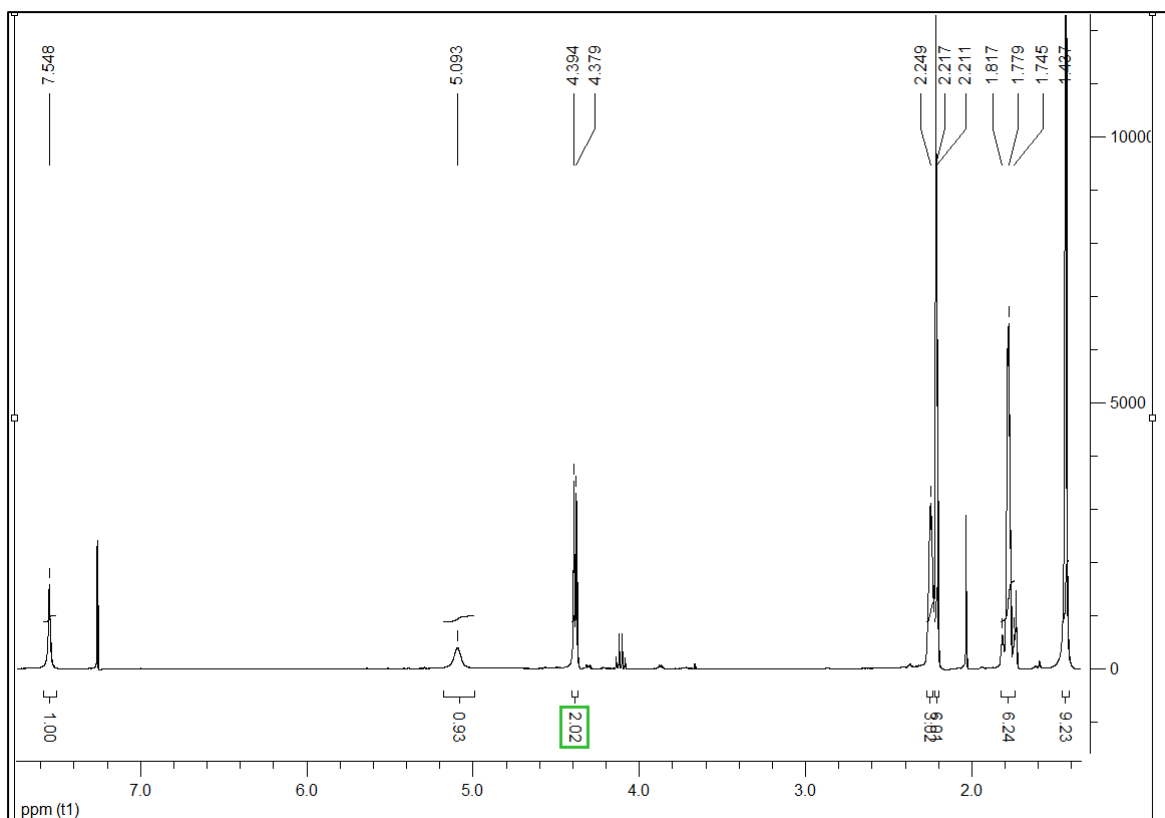
20. E. Kaiser, F. Picart, T. Kubiak, J. P. Tam, R. B. Merrifield, *J. Org. Chem.* **58** (1993) 5167-5175.
21. R. H. Szumigala, Jr., E. Onofiook, S. Karady, J. D. Armstrong, III, R. A. Miller, *Tetrahedron Lett.* **46** (2005) 4403-4405.
22. A. Isidro-Llobet, X. Just-Baringo, A. Ewenson, M. Álvarez, F. Albericio, *Biopolymers* **88** (2007) 733-737.
23. D. B. Hansen, X. Wan, P. J. Carroll, M. M. Joullie, *J. Org. Chem.* **70** (2005) 3120-3126.
24. F. Albericio, E. Nicolás, J. Rizo, M. Ruiz-Gayo, E. Pedroso, E. Giralt, *Synthesis* 1990 (1990) 119-122.
25. W. A. R. van Heeswijk, M. J. D. Eenink, J. Feijen, *Synthesis* 1982 (1982) 744-747.
26. B. S. Jursic, Z. Zdravkovski, *Synth. Commun.* **23** (1993) 2761-2770.
27. E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **38** (2009) 606-631.
28. C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **61** (2005) 10827-10852.
29. A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **111** (2011) 6557-6602.
30. W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **103** (1970) 788-798.
31. [http://documents.bachem.com/coupling\\_reagents.pdf](http://documents.bachem.com/coupling_reagents.pdf) datum pristupa: 23.04.2020.
32. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/peptide-modifications-n-terminal-internal-and-c-terminal.html> datum pristupa: 28.04.2020.
33. R. M. Lanigan, V. Karaluka, M. T. Sabatini, P. Starkov, M. Badland, L. Boulton, T. D. Shepard, *Chem. Commun.* **52** (2016) 8846-8849.
34. S. Liu, Y. Yang, X. Liu, F. K. Ferdousi, A. S. Batsanov, A. Whiting, *Eur. J. Org. Chem.* **2013** (2013) 5692-5700.
35. F. M. F. Chen, Y. Lee, R. Steinauer, N. L. Benoiton, *Can. J. Chem.* **65** (1987) 613-618.
36. J. R. Dunetz, J. Magano, G. A. Weisenburger, *Org. Process Res. Dev.* **20** (2016) 140-177.
37. M. Prashad, K. Prasad, O. Repic, T. J. Blacklock, *Org. Process. Res. Dev.* **3** (1999) 409-415.
38. J. R. Vaughan, *J. Am. Chem. Soc.* **73** (1951) 3547-3547.
39. H. Lundberg, F. Tinnis, N. Selander, H. Adolfsson, *Chem. Soc. Rev.* **43** (2013) 2714-2742.
40. H. C. Kolb, M. G. Finn, K. Barry Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **40** (2001) 2004-2021.

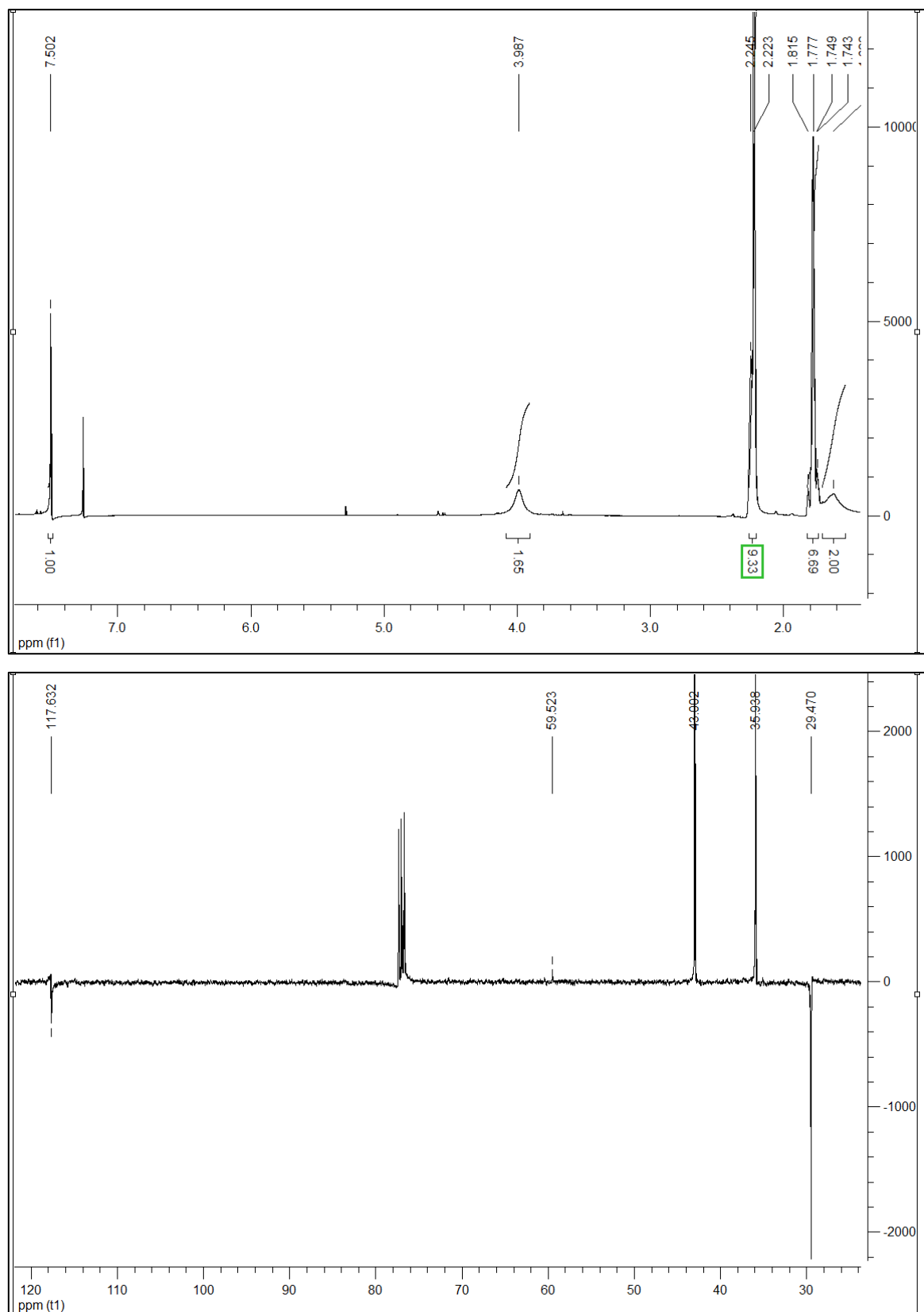
41. C. D. Hein, X.-M. Liu, D. Wang, *Pharm. Res.* **25** (2008) 2216-2230.
42. F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. Barry Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 210-216.
43. B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science* **340** (2013) 457-460.
44. L. Liang, D. Astruc, *Coord. Chem. Rev.* **255** (2011) 2933-2945.
45. B. C. Boren, S. Narayan, L. K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 8923-8930.
46. G. D. Probst, S. Bowers, J. M. Sealy, B. Stupi, D. Dressen, B. M. Jagodzinska, J. Aquino, A. Gailunas, A. P. Truong, L. Tso, Y.-Z. Xu, R. K. Hom, V. John, J. S. Tung, M. A. Pleiss, J. A. Tucker, A. W. Konradi, H. L. Sham, J. Jagodzinski, G. Toth, E. Brecht, N. Yao, H. Pan, M. Lin, D. R. Artis, L. Ruslim, M. P. Bova, S. Sinha, T. A. Yednock, S. Gauby, W. Zmolek, K. P. Quinn, J.-M. Sauer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20** (2010) 6034-6039.
47. M. Craighead i sur., Preparation and use of redox derivatives of known pharmaceutical compounds, WO2012063085, 2012.
48. T. Min, B. Yi, P. Zhang, J. Liu, *Med. Chem. Res.* **18** (2009) 495-510.
49. M. van Dijk, K. Mustafa, A. C. Dechesne, C. F. van Nostrum, W. E. Hennink, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, *Biomacromolecules* **8** (2007) 327-330.
50. D. M. Shendage, R. Fröhlich, G. Haufe, *Org. Lett.* **6** (2004) 3675-3678.
51. <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsos.160090> datum pristupa: 28.04.2020.
52. D. Goleš, L. Tomić, D. Keglević, *Croat. Chem. Acta* **48** (1976) 365-378.

## § 8. DODATAK

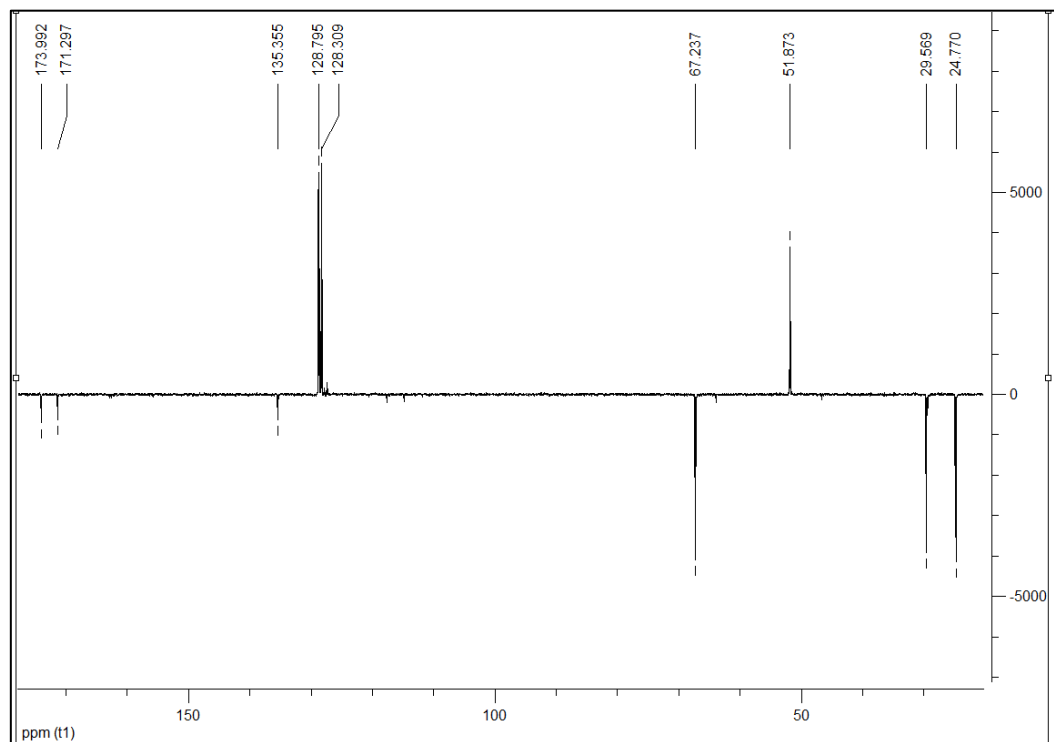
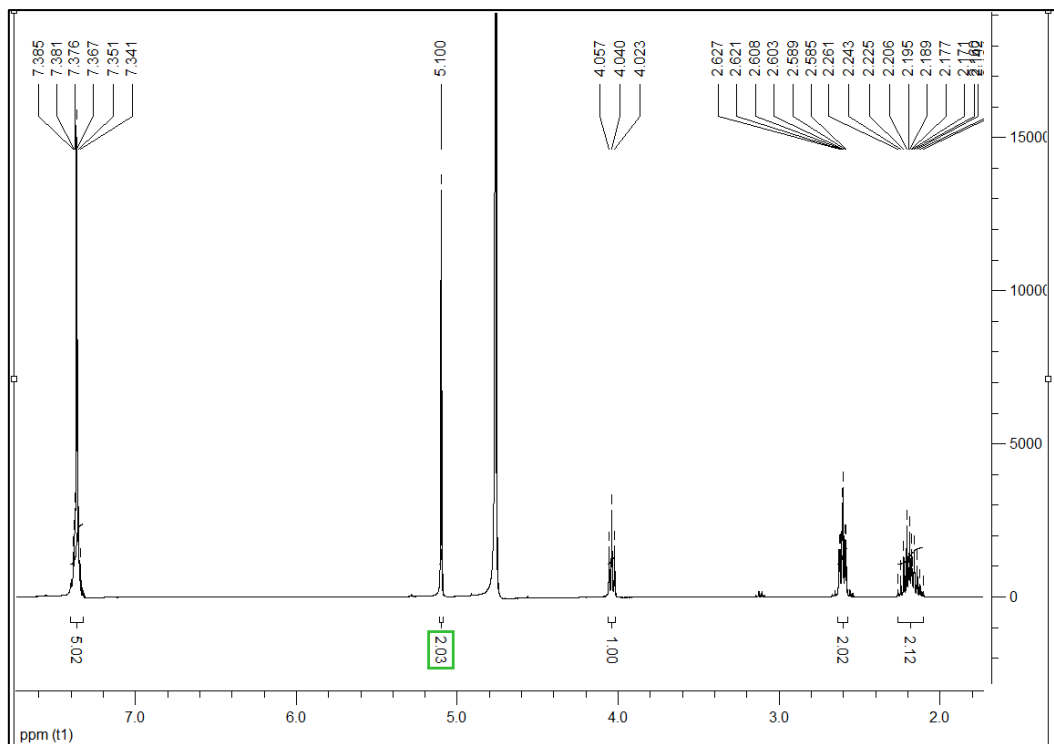
Dodatak 1:  $^1\text{H}$  NMR i DEPTQ spoja A

Dodatak 2: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja B

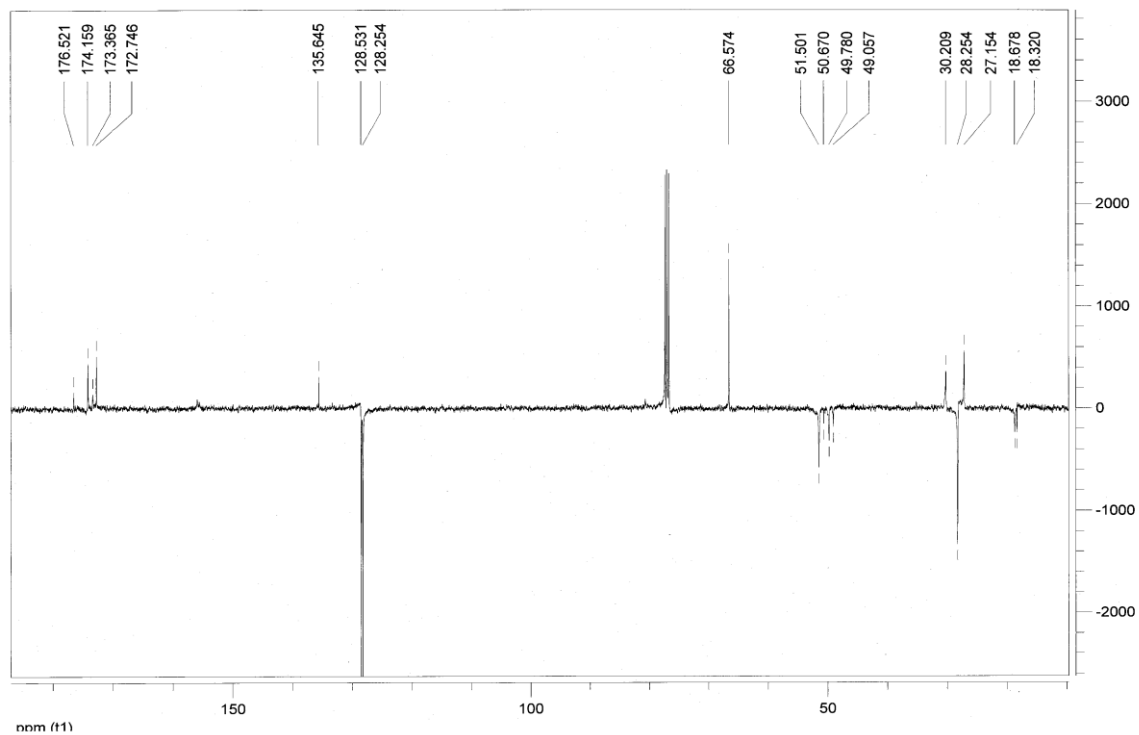
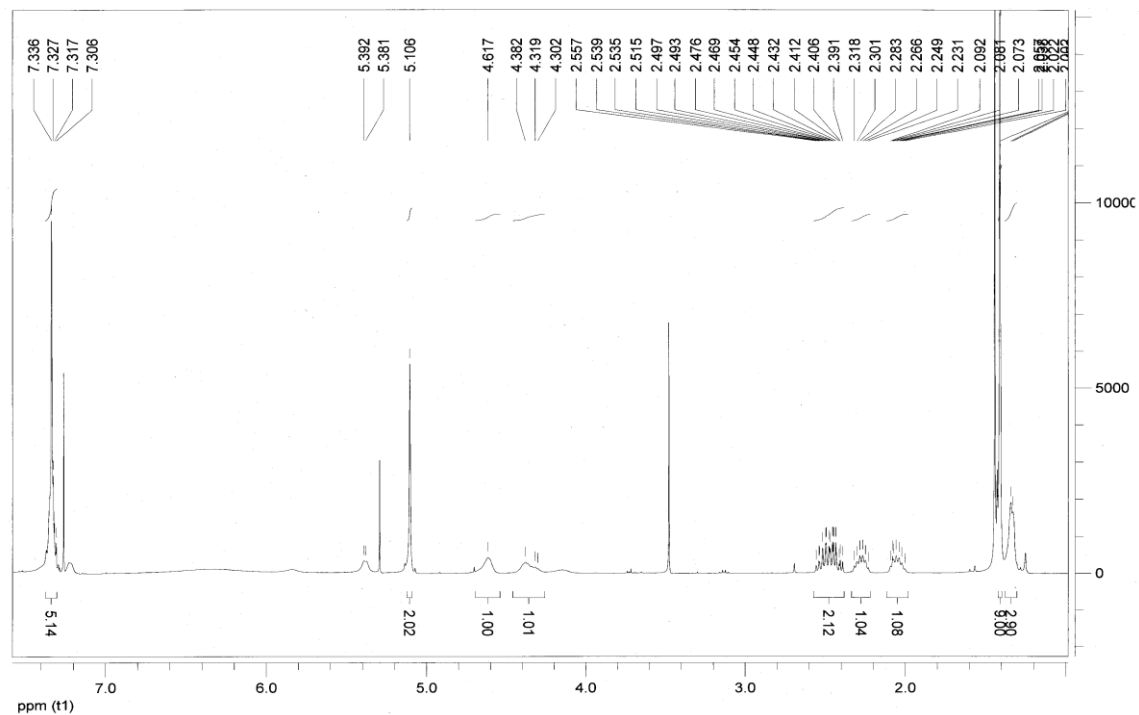


Dodatak 3:  $^1\text{H}$  NMR i DEPTQ spoja C

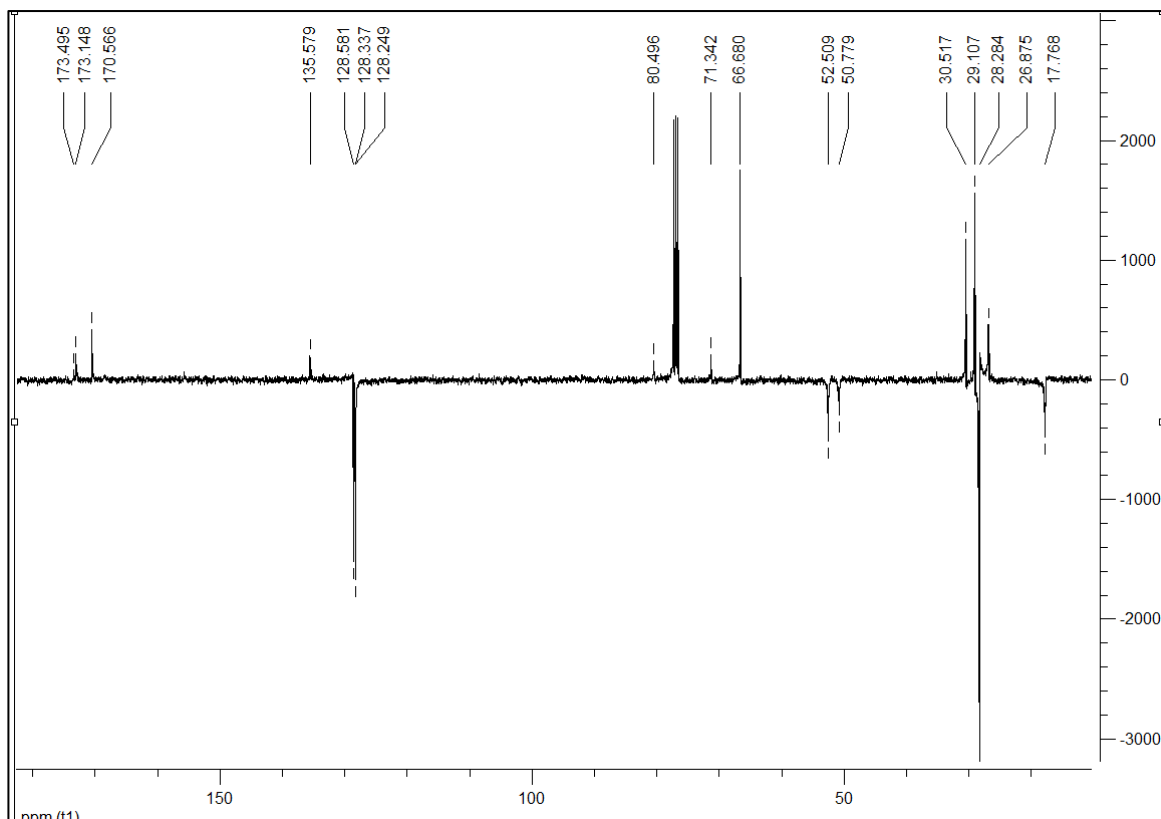
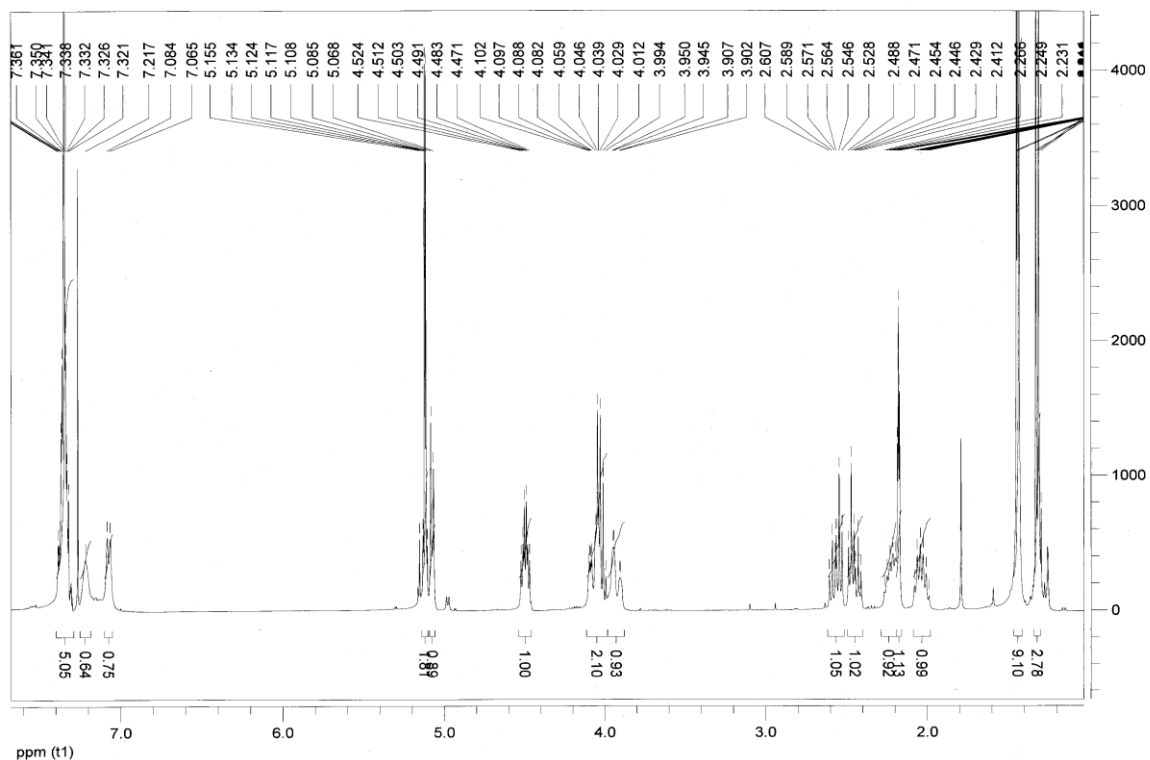
Dodatak 4: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 1



Dodatak 5: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 2

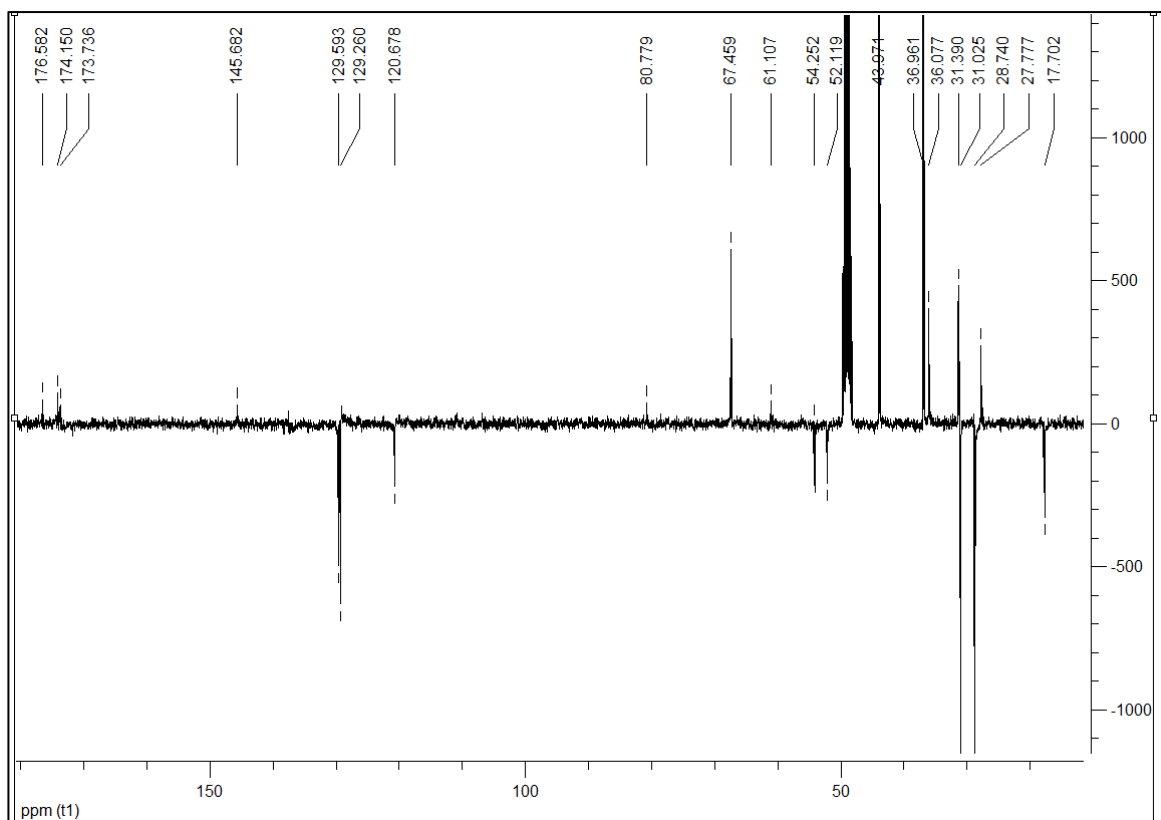
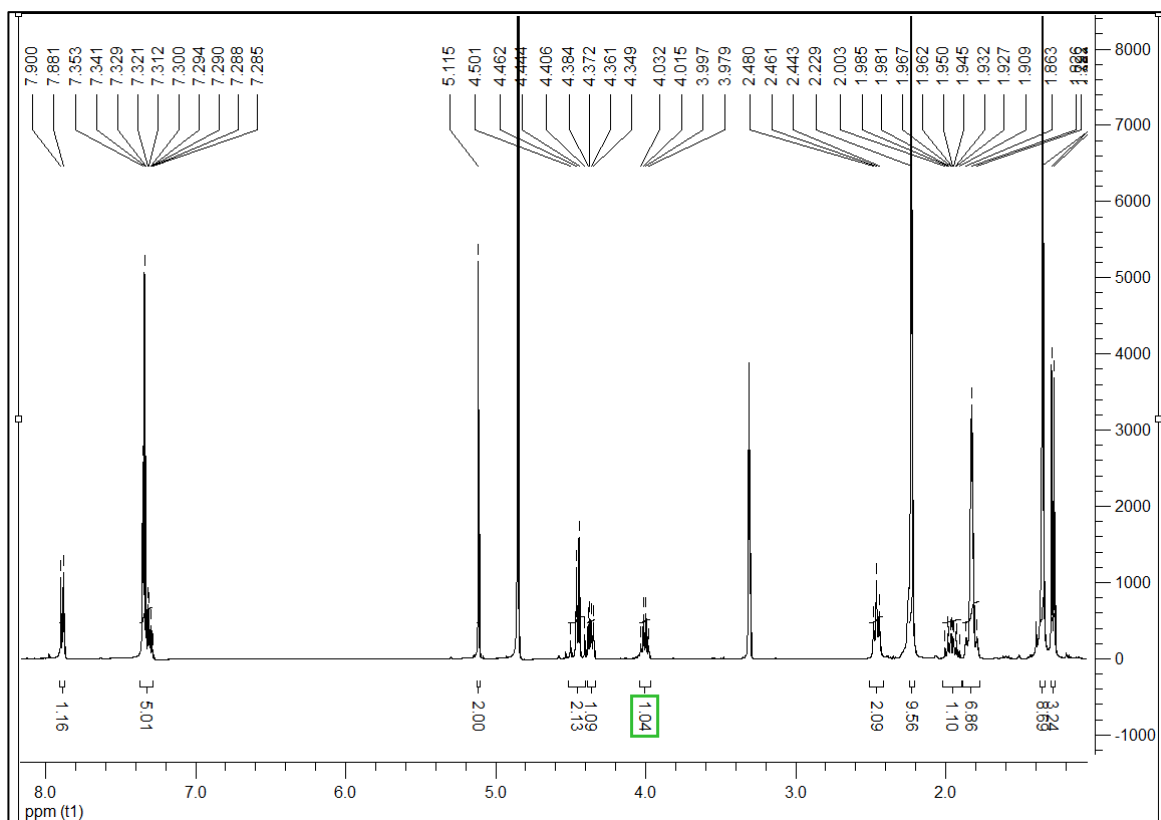


Dodatak 6: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 3

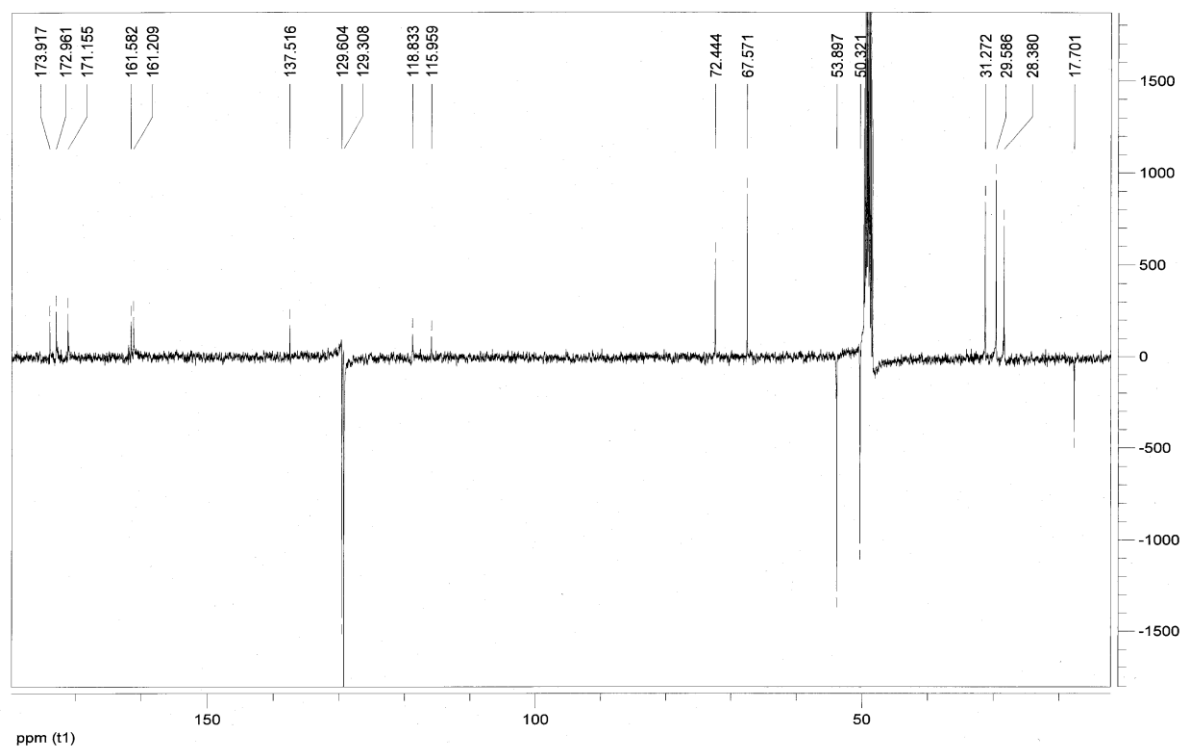
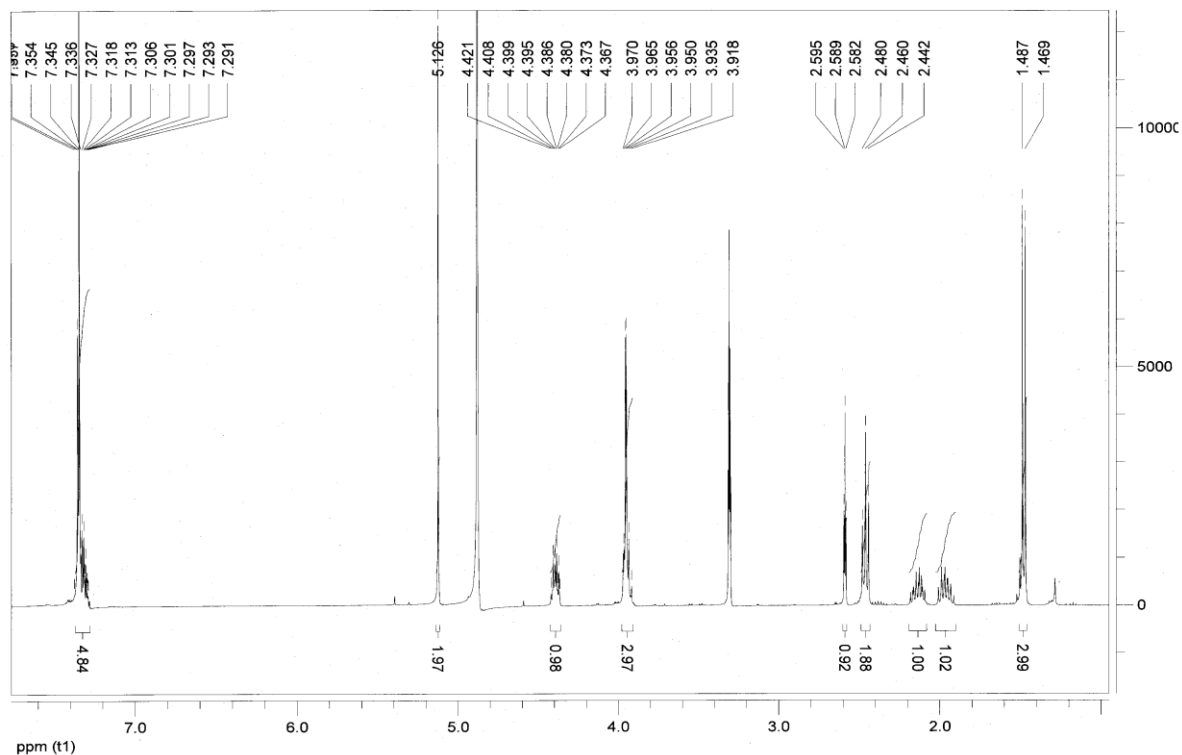




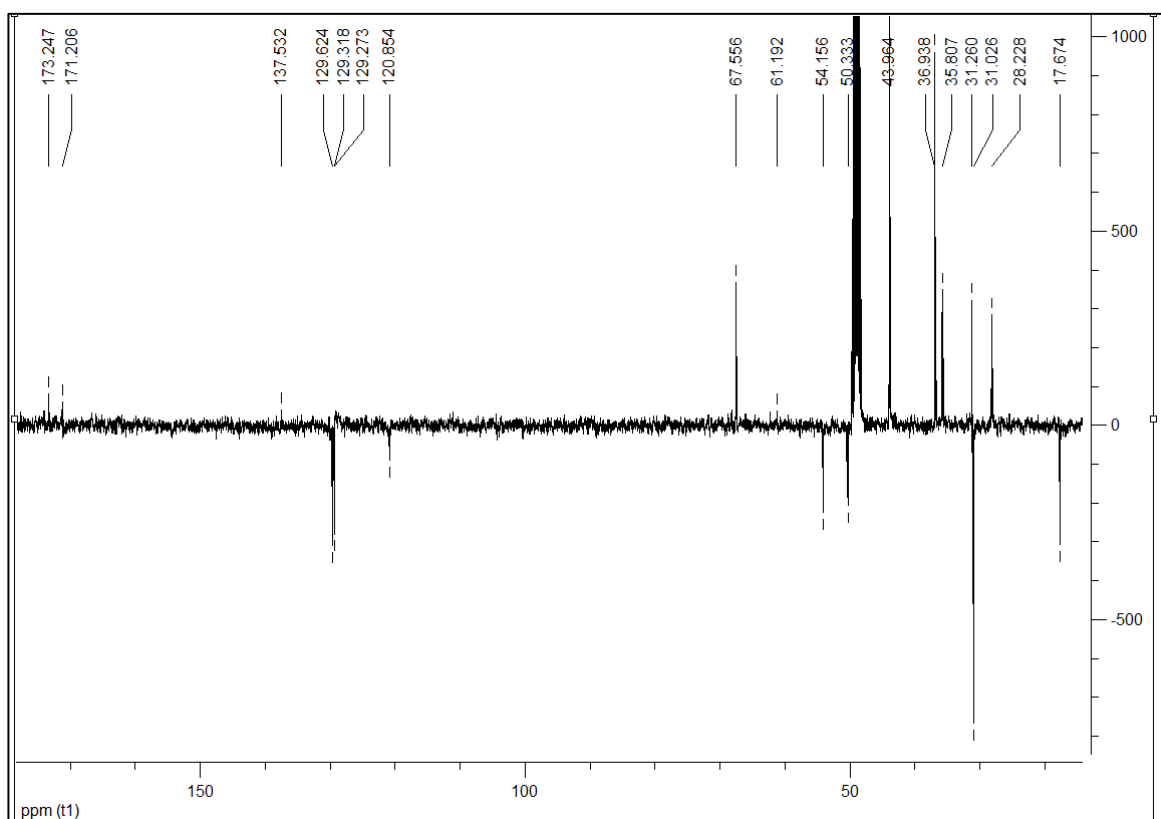
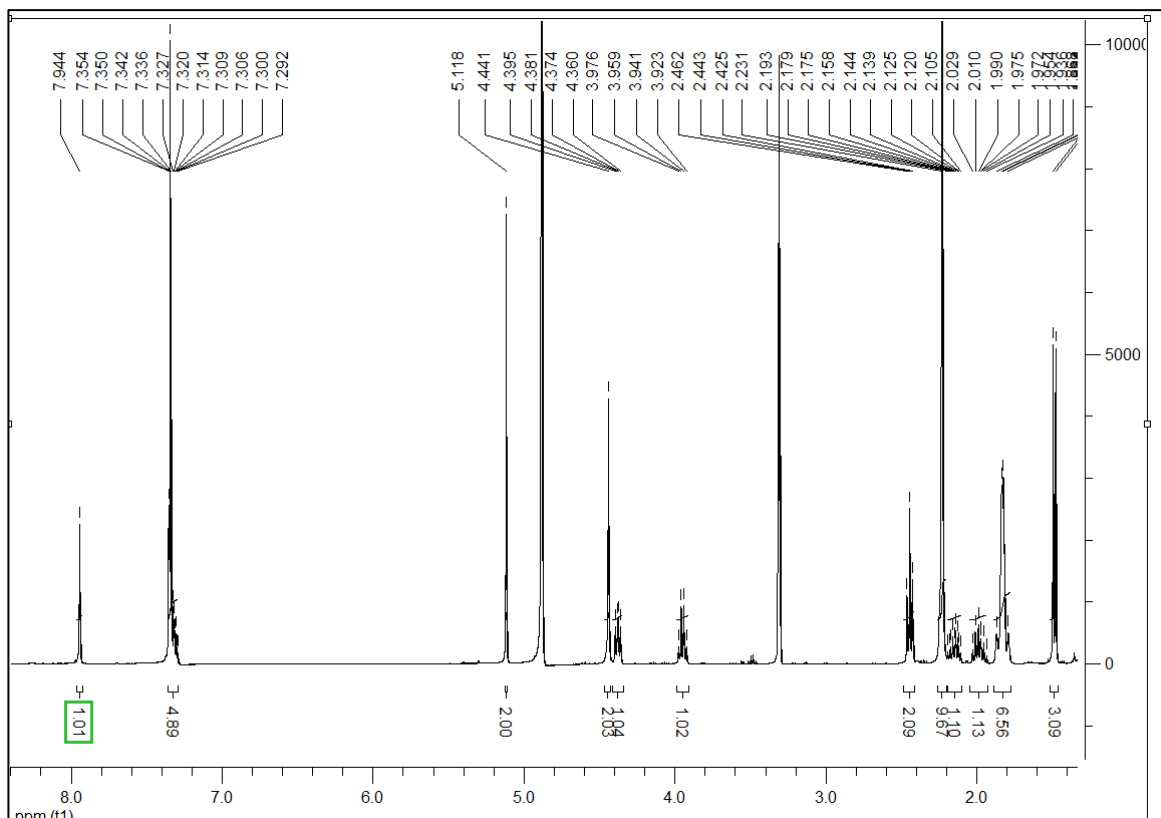
Dodatak 7: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 4



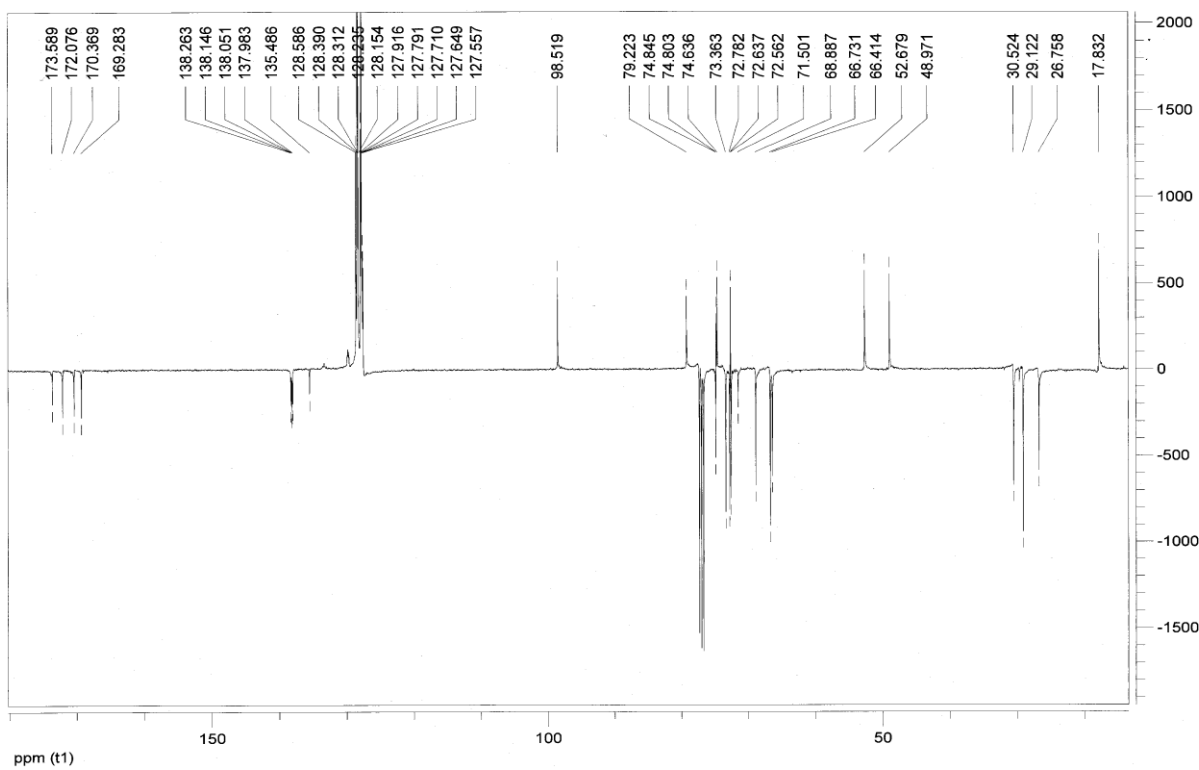
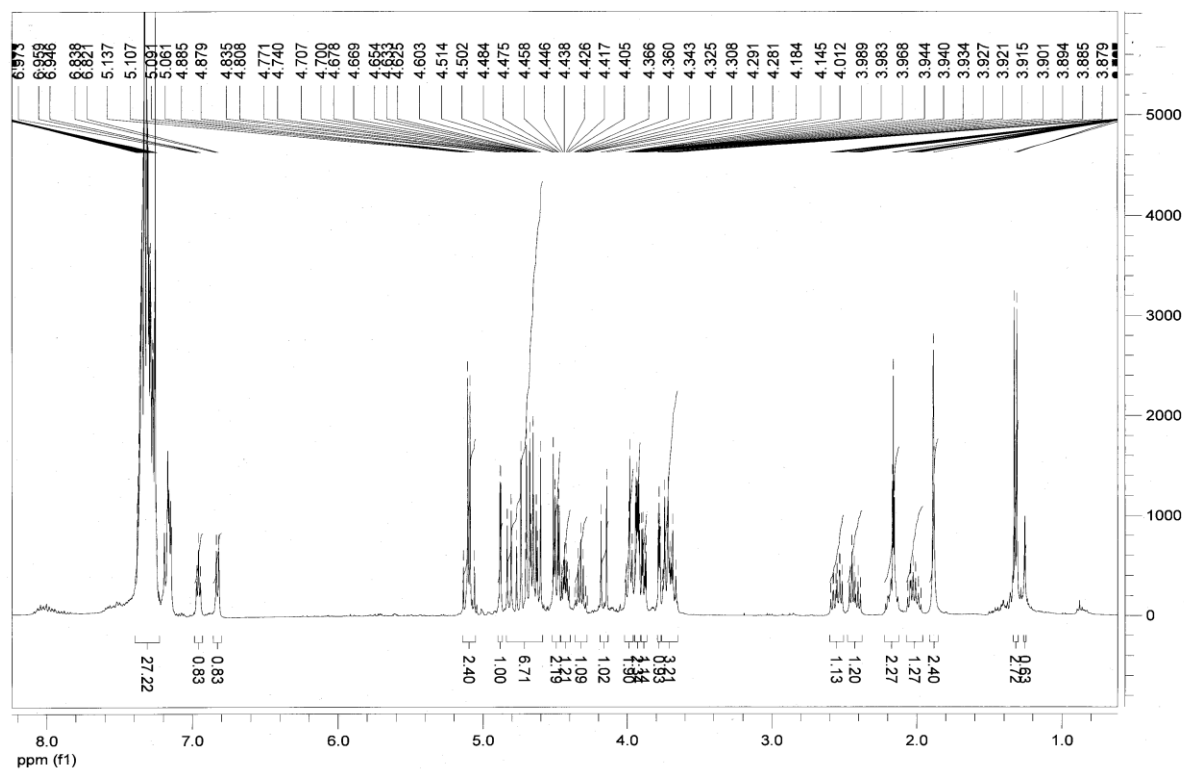
Dodatak 8: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 5



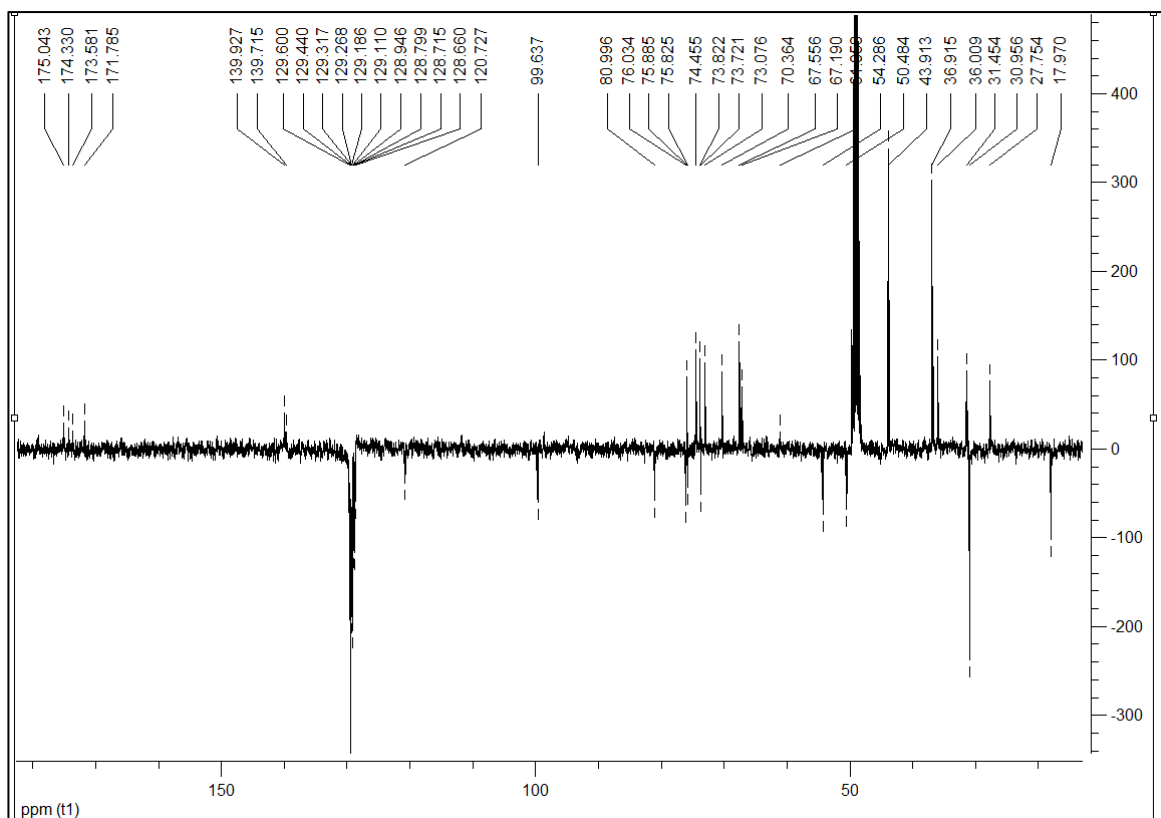
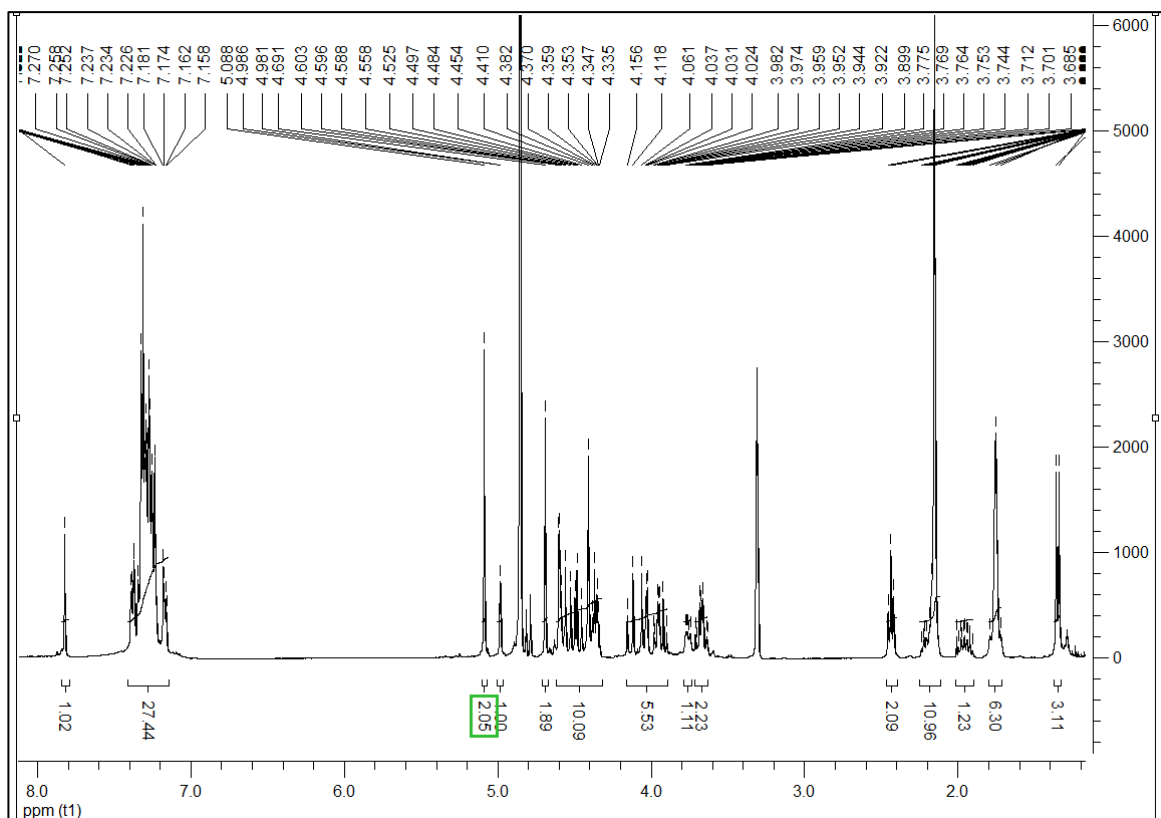
Dodatak 9: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 6



Dodatak 10: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 7



Dodatak 11: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 8



## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Josip Draženović

Datum rođenja: 29. srpnja 1996.

Mjesto rođenja: Karlovac

### Obrazovanje

2003.–2011. Osnovna škola Banija, Karlovac

2011.–2015. Gimnazija Karlovac, Karlovac

2015.–2018. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

### Nagrade i priznanja

2020. Pohvalnica za izuzetan uspjeh u sveučilišnom diplomskom studiju kemije, smjer: istraživački

2018. Pohvalnica za izuzetan uspjeh u sveučilišnom preddiplomskom studiju kemije

2018. Rektorova nagrada za individualni rad

2015. Međunarodna kemijska olimpijada (IChO), Baku, Azerbajdžan

2011.-2015. Državno natjecanje iz kemije, 2011. g. (1. mjesto), 2012. g. (5. mjesto), 2013. g. (5. mjesto), 2014. g. (3. mjesto), 2015. g. (1. mjesto).

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2016.-2017. Otvoreni dan Kemije

2016. Festival znanosti „Teslini dani“

## Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. A. Usenik, J. Draženović, K. Leko, J. Požar, Ž. Car, V. Petrović Peroković, *Synthesis of novel lipophilic mannosides and their complexation with  $\beta$ -cyclodextrin*, 25th Croatian meeting of chemists and chemical engineers with international participation; 3rd symposium „Vladimir Prelog“, Zagreb, 2017, knjiga sažetaka str. 150-150.
2. J. Draženović, Ž. Car, K. Leko, K. Pičuljan, J. Požar, V. Petrović Peroković, *Calorimetric and NMR Studies of Inclusion Complexes of  $\beta$ -Cyclodextrin with Novel Amphiphilic Mannosides*, 7th EuCheMS Chemistry Congress, Liverpool, 2018, poster.
3. J. Požar, K. Leko, Ž. Car, K. Pičuljan, J. Draženović, V. Petrović Peroković, R. Ribić, *The Solvent Influence on the Complexation of Amphiphilic Mannosides with  $\beta$ -cyclodextrin*, 3rd International Congress of Chemists and Chemical Engineers of Bosnia and Herzegovina, Sarajevo, 2018, poster.
4. J. Draženović, Ž. Car, V. Petrović Peroković, *Novi amfifilni manozidi: sinteza i kompleksiranje s  $\beta$ -ciklodekstrinom*, 5. SISK-5. Simpozij studenata kemičara, Zagreb, 2018, knjiga sažetaka str. 34-34.
5. K. Leko, V. Petrović Peroković, Ž. Car, K. Pičuljan, J. Draženović, N. Cindro, J. Požar, *The Solvent Influence on the Complexation of Amphiphilic Mannosides with  $\beta$ -Cyclodextrin and Cucurbit[7]uril*, 47th IUPAC World Chemistry Congress, Pariz, 2019, poster.
6. J. Draženović, A. Ožegović, D. Mihelec, Ž. Car, Đ. Škalamera, V. Petrović Peroković, R. Ribić, *Priprava propargilnog derivata desmuramil-dipeptida*, XIII. susret mladih kemijskih inženjera, Zagreb, 2020, knjiga sažetaka str. 155-155.