



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Barbara Bogović

SINTEZA C-GLIKOZILNIH α -AMINOKISELINA I C-GLIKOPEPTIDA

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Ivanka Jerić, zn. savj. u trajnom izboru

Zagreb, 2025.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Barbara Bogović

SYNTHESIS OF C-GLYCOSYL α -AMINO ACIDS AND C-GLYCOPEPTIDES

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Dr. Ivanka Jerić, Senior Scientist

Zagreb, 2025.

Doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za sintetske metodologije u organskoj kemiji, Zavoda za organsku kemiju i biokemiju, Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Ivanke Jerić, zn. savj. u trajnom izboru, u sklopu poslijediplomskog sveučilišnog studija Kemija pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Doktorska disertacija izrađena je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Neproteinogene aminokiseline za povećanje konformacijske raznolikosti peptida“ (IP-2022-10-9617; voditelj projekta: dr. sc. Ivanka Jerić).

Rad je također sufinanciran kroz projekt „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti” (DOK-2021-02-5260), dobiven temeljen projekta „Razvoj inovativnih formulacija kliničke prehrane“ (IRI 2 OP-KK.01.1.1.07) (operativni programa „Konkurentnost i kohezija 2014-2020“, KK.01.1.1.07 „Jačanje kapaciteta za istraživanje, razvoj i inovacije“)

ZAHVALA

Budućim čitateljima ovoga rada...bez obzira pristupaju li mu tražeći nove spoznaje, metodološke smjernice ili jasniji uvid u istraživačko područje...upućujem iskrenu želju da im njegov sadržaj potakne istraživačku znatiželju, pruži ohrabrenje u trenucima dvojbi...i, makar skromno, obogati njihov znanstveni put. Voljela bih da među ovim redcima pronađu barem jednu misao koja će ih nadahnuti, usmjeriti prema dubljem promišljanju te ih, onda kada im to bude najpotrebnije, inspirirati i motivirati kroz njihove daljnje istraživačke korake.

Neizmjereno sam zahvalna svojoj mentorici, dr. sc. Ivanki Jerić, koja me svojom stručnošću, profesionalnom sigurnošću i istraživačkom odlučnošću uvela u područje istraživanja čija me tematika, prožeta zanimljivošću, sadržajnom složenošću i misaonom izazovnošću, trajno nadahnjivala te poticala na dublje promišljanje i razvijala moju znanstvenu znatiželju. Mogućnost da ovu disertaciju izradim pod njezinim mentorstvom za mene je predstavljala veliku čast, neizmjernu sreću i dragocjenu privilegiju. Zahvalna sam joj što je u moj potencijal vjerovala od samoga početka te je s iskrenim zanimanjem i promišljenim preispitivanjem pristupala svim mojim idejama i nedoumicama. Svojim znanstvenim i stručnim usmjeravanjem, iskazanim razumijevanjem, dobronamjernošću i ljudskošću darivala mi je osjećaj podrške i povjerenja koji mi je mnogo značio. Podarila mi je slobodu i poticaj da slijedim vlastitu znanstvenu znatiželju, čime je uvelike utjecala na moj profesionalni razvoj. Od srca joj zahvaljujem na njezinoj brizi, svakoj lijepoj riječi, osmijehu i vječnom optimizmu, kao i na brojnim konstruktivnim diskusijama i dobronamjernim savjetima. Njezina iskrena podrška i nesebično prenošenje znanja predstavljaju dar koji smatram iznimno dragocjenim; znanje i iskustvo koje mi je prenijela doista su neprocjenjivi.

Zahvaljujem članovima Povjerenstva za ocjenu i obranu doktorske disertacije, izv. prof. dr. sc. Daniju Škalameri, prof. dr. sc. Ivi Juranović Cindrić i dr. sc. Davoru Margetiću, čije su konstruktivne primjedbe i promišljene sugestije dale vrijedan doprinos unaprijeđenju znanstvene kvalitete ovoga rada.

Zahvaljujem dr. sc. Vilku Smrečkom na snimanju NMR spektrara, dr. sc. Ivani Nikšić Franjić na doprinosu u računalnom dijelu istraživanja te dr. sc. Željki Ban na stručnoj podršci tijekom snimanja CD spektrara.

Od srca zahvaljujem našoj tehničarki, gospođi Milici Perc, na iskazanoj dobronamjernosti, ljudskosti, ustrajnoj vjeri u mene te na bezuvjetnoj pomoći, brizi i brojnim ohrabrujućim riječima u trenucima tuge i razočarenja. Vaša predanost radu i nepokolebljiva ljubav prema znanosti, očuvana i nakon tolikih godina provedenih u laboratoriju, za mene će uvijek biti neiscrpan izvor nadahnuća.

Od srca zahvaljujem Lidiji na odvojenom vremenu, strpljenju, iskazanoj dobronamjernosti i prenesenom znanju o kromatografskom pročišćavanju peptida.

Od srca zahvaljujem svim djelatnicima Laboratorija za biomimetičku kemiju / Laboratorija za sintetske metodologije u organskoj kemiji, kako sadašnjim tako i bivšim članovima. Jedna stranica pisane riječi, ma koliko pažljivo oblikovana, nije dostatna da izrazim zahvalnost koju dugujem svima vama, koji ste svatko na svoj način pridonijeli oblikovanju ovoga rada. Svaka stručna sugestija, ohrabrujuća riječ, iskazana ljudska dobrota, strpljenje i razumijevanje, kao i svaki prijateljski razgovor i ukazano povjerenje, veoma su mi dragocijeni. Od srca vam zahvaljujem na nezaboravnim trenucima provedenim zajedno i na prijateljstvu koje mi neizmjereno znači. ♥

Posebnu zahvalnost ipak dugujem svojoj najdražoj „cimerici u digestoru“, Ivani C., koja je svojom dobrotom i najljepšim osmijehom olakšala svaki naš „slatkı izazov“. Jednađo sam zahvalna i svojoj dragoj „prvoj susjedi“, Lei P., ĉija su brižnost i zarazna energija unosile radost i u najobiĉnije radne dane. Upravo zbog njih sam se svakoga dana s osmijehom vraćala na prvi kat. Hvala vam na svim našim znanstvenim i neznanstvenim raspravama, na brojnim internim šalama – onima koje će mi uvijek ponovno izmamiti osmijeh, a koje su često nastajale iz jedne rijeĉi, jednog pogleda ili jedne neoĉekıvane reakĉije – te na prijateljstvu i kolegijalnosti koja izvire iz dobrog srca i iskrene, nesebiĉne duše. Od srca vam hvala na svemu i radujem se svim zajedniĉĉim trenucima koji su pred nama. ♥

Stranica pisane rijeĉi nedostatna je da izrazim zahvalnost najdražim mi ljudima, koje imam ĉast zvati prijateljima. Hvala vam na svim lijepim trenucima, na radosti i toplini koje ste unijeli u moj život, kao i na nepokolebljivoj podršci koju ste mi pružali kroz sve ove godine. Beskrajno sam sretna i zahvalna što ste bili uz mene u trenucima uspjeha, ali i onda kada je bilo najteže. Preostaje mi nadati se da će i u godinama koje dolaze vaše prijateljstvo ostati moj siguran oslonac, jer istinsko prijateljstvo doista je neprocjenjivo bogatstvo. Moj svijet ne bi bio isti bez vas... da se zahvalim rijeĉi je premalo... ♥

Ovaj doktorskı rad posvećen je mojoj obitelji, njima dugujem najveću zahvalnost... Oni su moj životni oslonac i najzaslužniji za sve što danas jesam. Zahvalna sam im što su me, od najranijih dana, učili vrijednostima i načelima koja su mi bila tiha snaga i putokaz u tešĉim trenucima. Bez njihove podrške, razumijevanja, vjere u mene i sve što radim, bezuvjetne ljubavi te brojnih odricanja kako mi ništa ne bi nedostajalo, ovaj put zasigurno ne bih mogla prijeći. Neizmjereno sam im zahvalna što su me nebrojeno puta motivirali i nadahnjivali da slijedim ono što volim, da se borim za ono do ĉega mi je stalo i da nikada ne odustanem. Hvala im što su mi omogućili da sanjam – i da te snove ostvarujem. ♥

Beskrajno zahvaljujem mojoj sestri – mojoj najboljoj prijateljici i „suputnici u svim nestašlucima“ od djetinjstva. Hvala ti što moj preozbiljan svijet uvijek razvedriš onom svojom malom dozom kaosa, smijeha i radosti. Zahvaljujući tebi moj svijet nikada nije jednoliĉan ni bezliĉan – a nikako tihi, i baš zato si mi toliĉo dragocjena... ♥

Mama, bađo...zahvaliti vam se rijeĉima uvijek će biti premalo za svu ljubav, nježnost i dobrotu koju ste utkale u moj život... ♥

Tata, hvala ti za svu ljubav, toplinu i sigurnost koju si mi darovao, i što me, vjerujem, i dalje ĉuvaš... s nebesĉih visina koje može dosegnuti samo srce. Znam koliko bi bio ponosan i koliko si željno išĉekıvao ovaj trenutak; u mislima te vidim kako se iz prvog reda ponosno smiješiš. Ovaj rad posvećujem tebi... s beskrajnom zahvalnošću i ljubavlju koja ne prestaje, jer dio tvoje snage, mudrosti i dobrote i dalje živi u svakom mojem koraku – i tako ostaješ sa mnom, zauvijek... ♥

Barbara

Sadržaj

SAŽETAK.....	XIII
ABSTRACT.....	XV
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Cilj i svrha rada.....	7
§ 2. LITERATURNI PREGLED	9
2.1. Sinteza C-glikozilnih aminokiselina i C-glikopeptida	9
2.1.1. Klasične i suvremene metode sinteze.....	9
2.1.1.1. Streckerova reakcija.....	11
2.1.1.2. Višekomponentne reakcije.....	15
2.1.1.2.1. Višekomponentne reakcije temeljene na izocijanidima.....	20
2.1.1.3. Radikalna adicija dehidroalaninskih derivata.....	28
2.1.1.4. Reakcije unakrsnog povezivanja katalizirane prijelaznim metalima.....	29
2.1.1.5. Sekvencijalna sinteza C-glikozilnih gradivnih blokova.....	32
2.1.2. Moderne metode sinteze.....	34
2.1.2.1. Vidljivim svjetlom potaknute fotokatalitičke reakcije.....	34
2.1.2.2. Izravna C-H aktivacija.....	42
2.1.2.2.1. C(sp ²)-H glikozilacija aminokiselina.....	42
2.1.2.2.2. C(sp ³)-H glikozilacija aminokiselina.....	43
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	54
3.1. Materijali i metode.....	54
3.2. Sinteza konvertibilnog izocijanida	58
3.2.1. Sinteza i karakterizacija N-(4-metoksi-2-nitrofenil)formamida (1).....	58
3.2.2. Sinteza i karakterizacija 1-izocijano-4-metoksi-2-nitrobenzena (2).....	59
3.1. Sinteza aldehida odgovarajućih ugljikohidrata	60
3.3.1. Sinteza i karakterizacija (3aR,5aR,8aR,8bS)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-3aH-bis([1,3]dioksolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-3a-karbaldehida (4).....	61
3.3.2. Sinteza i karakterizacija (3aR,5S,5aR,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-5H-bis ([1,3]dioksolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-karbaldehida (5).....	62
3.3.3. Sinteza i karakterizacija (3aR,4S,6R,6aR)-6-metoksi-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-karbaldehida (7).....	63
3.3.4. Sinteza i karakterizacija (3aR,5S,6S,6aR)-6-(benziloksi)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[2,3-d][1,3]dioksol-5-karbaldehida (10).....	66
3.3.5. Sinteza i karakterizacija (3aS,3bR,7aS,8aR)-2,2,5,5-tetrametiltetrahidro-8aH-[1,3] dioksolo[4',5':4,5]furo[3,2-d][1,3]dioksin-8a-karbaldehida (11).....	67
3.3.6. Sinteza i karakterizacija (3aR,6R,6aR)-5-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioksolan-4-il)-2,2-dimetiltetrahidro furo [2,3-d][1,3]dioksol-6-karbaldehida (15).....	69
3.4. Sinteza C-glikozilnih α-aminokiselina.....	70
3.4.1. Sinteza α-aciloksiamida dobivenih Passerinijevom reakcijom.....	70
3.4.1.1. Sinteza i karakterizacija 2-((4-metoksi-2-nitrofenil)amino)-2-okso-1-((3aR,5aR,8aR, 8bS)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-3aH-bis([1,3]dioksolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-3a-il)etil acetata (16).....	70
3.4.1.2. Sinteza i karakterizacija 2-((4-metoksi-2-nitrofenil)amino)-2-okso-1-((3aR,5S,5aS,8aR, 8bR)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-5H-bis([1,3]dioksolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-il)etil acetata (17).....	72

3.4.1.3. Sinteza i karakterizacija 1-((3aR,4S,6R,6aR)-6-metoksi-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)-2-((4-metoksi-2-nitrofenil)amino)-2-oksoetil acetata (18).....	73
3.4.1.4. Sinteza i karakterizacija 1-((3aR,5S,6S,6aR)-6-(benziloksi)-2,2-dimetiltetrahidrofuro [2,3-d][1,3]dioksol-5-il)-2-((4-metoksi-2-nitrofenil)amino)-2-oksoetil acetata (19).....	74
3.4.1.5. Sinteza i karakterizacija 2-((4-metoksi-2-nitrofenil)amino)-2-okso-1-((3aS,3bR,7aS, 8aR)-2,2,5,5-tetrametiltetrahidro-8aH-[1,3]dioksolo[4',5':4,5]furo[3,2-d][1,3]dioksin-8a-il)etil acetata (20).....	75
3.4.1.6. Sinteza i karakterizacija 1-((3aR,5R,6aR)-5-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioksolan-4-il)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[2,3-d][1,3]dioksol-6-il)-2-((4-metoksi-2-nitrofenil)amino)-2-oksoetil acetata (21).....	76
3.4.2. Sinteza metilnih estera α -hidroksi C-glikozilnih kiselina.....	77
3.4.2.1. Sinteza i karakterizacija metil (S)-2-hidroksi-2-((3aS,5aR,8aR,8bS)-2,2,7,7-tetrametil tetrahidro-3aH-bis([1,3]dioksolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-3a-il)acetata (22).....	78
3.4.2.2. Sinteza i karakterizacija metil (S)-2-hidroksi-2-((3aR,5R,5aS,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametil tetrahidroksi-5H-bis([1,3]dioksolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-il)acetata (23).....	78
3.4.2.3. Sinteza i karakterizacija metil (S)-2-hidroksi-2-((3aR,4R,6R,6aR)-6-metoksi-2,2-dimetiltetrahidrofuro [3,4-d][1,3]dioksol-4-il)acetata (24).....	79
3.4.2.4. Sinteza i karakterizacija metil (S)-2-((3aR,5R,6S,6aR)-6-(benziloksi)-2,2-dimetil tetra hidrofuro[2,3-d][1,3]dioksol-5-il)-2-hidroksiacetata (25).....	79
3.4.2.5. Sinteza i karakterizacija metil (S)-2-hidroksi-2-((3aS,3bR,7aS,8aS)-2,2,5,5-tetrametil tetrahidro-8aH-[1,3]dioksolo[4',5':4,5]furo[3,2-d][1,3]dioksin-8a-il)acetata (26).....	80
3.4.2.6. Sinteza i karakterizacija metil (2S)-2-((3aR,5R,6aR)-5-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioksolan-4-il)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[2,3-d][1,3]dioksol-6-il)-2-hidroksiacetata (27).....	81
3.4.3. Sinteza metilnih estera α -azido C-glikozilnih kiselina.....	82
3.4.3.1. Sinteza i karakterizacija metil (S)-2-((3aR,5aR,8aR,8bS)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-3aH-bis([1,3]dioksolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-3a-il)-2-(((trifluorometil)sulfonyl)oksi)acetata (28).....	83
3.4.3.2. Sinteza i karakterizacija metil (R)-2-azido-2-((3aR,5R,5aS,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametil tetrahidro-5H-bis([1,3]dioksolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-il)acetata (29).....	83
3.4.3.3. Sinteza i karakterizacija metil (R)-2-azido-2-((3aR,4R,6R,6aR)-6-metoksi-2,2-dimetiltetrahidrofuro [3,4-d][1,3]dioksol-4-il)acetata (30).....	84
3.4.3.4. Sinteza i karakterizacija metil (R)-2-azido-2-((3aS,3bR,7aS,8aS)-2,2,5,5-tetrametil tetrahidro-8aH-[1,3]dioksolo [4',5':4,5]furo[3,2-d][1,3]dioksin-8a-il)acetata (31).....	84
3.4.3.5. Sinteza i karakterizacija metil (2R)-2-azido-2-((3aR,5R,6aR)-5-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioksolan-4-il)-2,2-dimetil tetrahidrofuro[2,3-d][1,3]dioksol-6-il)acetata (32).....	85
3.4.4. Sinteza Fmoc-zaštićenih C-glikozilnih α -aminokiselina.....	86
3.4.4.1. Sinteza i karakterizacija (R)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoksi)karbonil)amino)-2-((3aR,5R,5aS,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-5H-bis([1,3]dioksolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-il)octene kiseline; Fmoc-G _{Gal} -OH (33).....	87
3.4.4.2. Sinteza i karakterizacija (R)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoksi)karbonil)amino)-2-((3aR, 4R,6R,6aR)-6-metoksi-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)octene kiseline; Fmoc-G _{Rib} -OH (34).....	88
3.4.4.3. Sinteza i karakterizacija (R)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoksi)carbonil)amino)-2-((3aS,3bR,7aS,8aS)-2,2,5,5-tetrametiltetrahidro-8aH-[1,3]dioksolo[4',5':4,5]furo[3,2-d][1,3]dioksin-8a-il)octene kiseline; Fmoc-G _{Sor} -OH (35).....	89
3.4.4.4. Sinteza i karakterizacija (2R)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoksi)karbonil)amino)-2-((3aR,5R,6aR)-5-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioksolan-4-il)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[2,3-d][1,3]dioksol-6-il)octene kiseline; Fmoc-G _{All} -OH (36).....	90
3.5. Sinteza C-glikopeptida na čvstom nosaču.....	91
3.5.1. Sinteza i karakterizacija H ₂ N-Val-Val-D-Val-Val-Val-Val-OH (37).....	93
3.5.2. Sinteza i karakterizacija H ₂ N-Val-Val-G _{Gal} -Val-Val-Val-OH (38).....	96
3.5.3. Sinteza i karakterizacija H ₂ N-Val-Val-G _{Rib} -Val-Val-Val-OH (39).....	99
3.5.4. Sinteza i karakterizacija H ₂ N-Val-Val-G _{Sor} -Val-Val-Val-OH (40).....	102
3.5.5. Sinteza i karakterizacija H ₂ N-Val-Val-G _{All} -Val-Val-Val-OH (41).....	105
3.5.6. Sinteza i karakterizacija H ₂ N-Val-Val-G _{Sor} -G _{Sor} -Val-Val-Val-OH (42).....	108
3.5.7. Sinteza i karakterizacija H ₂ N-G _{Sor} -Val-G _{Sor} -Val-G _{Sor} -Val-OH (43).....	111
3.5.8. Sinteza i karakterizacija H ₂ N-Val-G _{All} -Val-Val-G _{All} -Val-OH (44).....	114
3.6. Deprotekcija C-glikopeptida.....	117
3.6.1. Deprotekcija C-glikopeptida 40 (45).....	117

3.6.2.	<i>Deprotekcija C-glikopeptida 41 (46).....</i>	<i>119</i>
§ 4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	120
4.1.	Uvod.....	120
4.2.	Metodologije sinteze C-glikozilnih α-aminokiselina	123
4.2.1.	<i>Višekomponentni pristup sintezi.....</i>	<i>124</i>
4.2.1.1.	<i>Priprava konvertibilnih izocijanida.....</i>	<i>126</i>
4.2.1.2.	<i>Priprava izopropilidenima zaštićenih aldehida iz odgovarajućih ugljikohidrata.....</i>	<i>128</i>
4.2.1.3.	<i>Priprava α-aciloksi amida dobivenih Passerinijevom reakcijom.....</i>	<i>129</i>
4.2.1.4.	<i>Priprava metilnih estera α-hidroksi C-glikozilnih kiselina.....</i>	<i>131</i>
4.2.1.5.	<i>Priprava metilnih estera α-azido C-glikozilnih kiselina.....</i>	<i>133</i>
4.2.1.6.	<i>Priprava Fmoc-zaštićenih C-glikozilnih α-aminokiselina.....</i>	<i>136</i>
4.2.2.	<i>Fotokemijski pristup sintezi.....</i>	<i>138</i>
4.3.	Sinteza peptida na čvrstom nosaču	140
4.3.1.	<i>Priprava modelnog heksapeptida 37.....</i>	<i>144</i>
4.3.2.	<i>Priprava C-glikopeptida 38 – 44.....</i>	<i>145</i>
4.4.	Konformacijska analiza	150
4.5.	Deprotekcija C-glikopeptida.....	165
§ 5.	ZAKLJUČAK.....	166
§ 6.	POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ (prema potrebi).....	169
§ 7.	LITERATURNI IZVORI.....	174
§ 8.	DODATAK.....	XVII
§ 9.	ŽIVOTOPIS.....	XX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

SINTEZA C-GLIKOZILNIH α -AMINOKISELINA I C-GLIKOPEPTIDA

Barbara Bogović

Institut Ruđer Bošković, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Laboratorij za sintetske metodologije
u organskoj kemiji, Bijenička cesta 54, Zagreb

Cilj istraživanja provedenih u okviru ove doktorske disertacije bio je ispitati utjecaj strukture, broja i raspodjele C-glikozilnih α -aminokiselina unutar peptidnog slijeda na konformacijska svojstva pripadajućih oligomera. U tu svrhu razvijena je nova sintetska metodologija koja omogućuje učinkovitu i kontroliranu ugradnju strukturno različitih C-glikozilnih α -aminokiselina na unaprijed definirane položaje unutar peptidne sekvence. Sintetizirane su četiri diastereomerno čiste C-glikozilne α -aminokiseline koje su poslužile kao gradivni blokovi u sintezi peptida uspješno provedenoj na čvrstom nosaču. Time je ostvaren značajan metodološki iskorak koji omogućuje sustavno istraživanje utjecaja C-glikozilnih α -aminokiselina na lokalne strukturne motive, sekundarnu strukturu i ukupnu konformaciju peptida. Konformacijskom analizom utvrđeno je da vodikove veze između amidnih skupina peptidne okosnice i ugljikohidratnih bočnih lanaca predstavljaju glavni čimbenik stabilizacije specifičnih konformacija. Razvijena metodologija pruža nove mogućnosti u dizajnu stabilnih, strukturno definiranih peptidomimetika s potencijalnom primjenom u medicinskoj kemiji, katalizi i razvoju funkcionalnih materijala.

(179 + XX stranica, 81 slika, 23 tablica, 157 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: C-glikopeptidi/ C-glikozilne α -aminokiseline/ konformacijska analiza/ nekovalentne interakcije/ sekundarna struktura/ sinteza peptida na čvrstom nosaču

Mentor: dr. sc. Ivanka Jerić, zn. savj. u trajnom izboru

Rad prihvaćen: 3.prosinca 2025.

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Đani Škalamera
2. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
3. dr. sc. Davor Margetić, zn. savj. u trajnom izboru



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

SYNTHESIS OF C-GLYCOSYL α -AMINO ACIDS AND C-GLYCOPEPTIDES

Barbara Bogović

Ruder Bošković Institute, Division of Organic Chemistry and Biochemistry, Laboratory for
Synthetic Methodologies in Organic Chemistry, Bijenička c. 54, Zagreb, Croatia

The aim of this doctoral dissertation was to investigate the influence of the structure, number, and distribution of C-glycosyl α -amino acids within peptide sequences on the conformational properties of the corresponding oligomers. For this purpose, a new synthetic methodology was developed, enabling efficient and controlled incorporation of structurally diverse C-glycosyl α -amino acids at predefined positions within peptide sequences. Four diastereomerically pure C-glycosyl α -amino acids were synthesized and used as building blocks in solid-phase peptide synthesis. This represents a significant methodological advance that allows systematic investigation of the effects of C-glycosyl α -amino acids on local structural motifs, secondary structure, and overall peptide conformation. Conformational analysis revealed that hydrogen bonds between peptide backbone amides and carbohydrate side chains are the main stabilizing factor of specific conformations. The developed methodology provides new opportunities for designing stable, structurally defined peptidomimetics with potential applications in medicinal chemistry, catalysis, and the development of functional materials.

(179 + XX pages, 81 figures, 23 tables, 157 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: C-glycopeptides/ C-glycosyl α -amino acids/ conformational analysis/ noncovalent interactions/ secondary structure/ solid-phase peptide synthesis

Supervisor: Dr. Ivanka Jerić, Senior Scientist

Thesis accepted: 03.12.2025.

Reviewers:

Dr. Đani Škalamera, Associate Professor
Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
Dr. Davor Margetić, Senior Scientist

§ 1. UVOD

Peptidi i proteini imaju ključnu ulogu u regulaciji brojnih imunoloških, neuroloških i metaboličkih procesa u organizmu. Djeluju kao neurotransmiteri, neuromodulatori, hormoni, antigeni i antibiotici, a disfunkcija u njihovoj biosintezi ili djelovanju često je povezana s razvojem kroničnih, autoimunih ili infektivnih oboljenja.¹

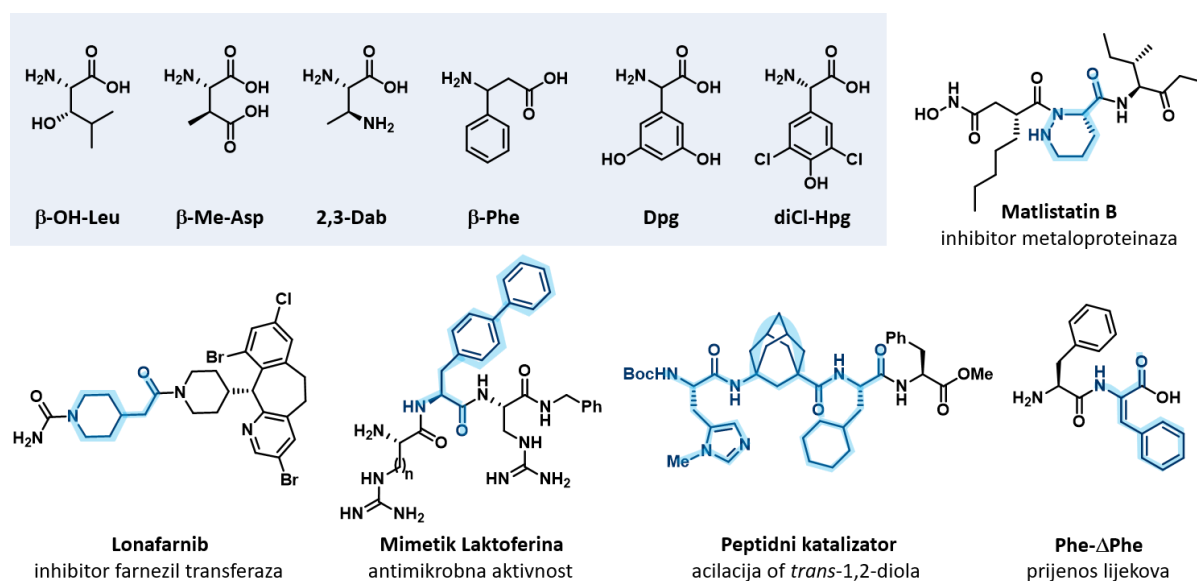
Unatoč biološkoj važnosti, klinička primjena peptida i proteina kao terapeutika ostaje ograničena, prvenstveno zbog njihovih nepovoljnih farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava. Vrijeme poluživota proteina u stanici često se kreće od svega nekoliko minuta do nekoliko sati, dok njihova izražena konformacijska fleksibilnost povećava sklonost nespecifičnim interakcijama s neželjenim biomolekulama. Dodatno, podložni su brzom razgradnji uslijed djelovanja proteolitičkih enzima, što znatno smanjuje njihovu biološku stabilnost. Nadalje, velika molekulska masa i izražen polarni karakter, uvelike ograničavaju permeabilnost kroz staničnu membranu, uključujući i krvno-moždanu barijeru.¹

Kako bi se prevladala navedena ograničenja, sve veći interes usmjeren je prema dizajnu peptidomimetika, strukturno modificiranih analoga peptida koji oponašaju njihovu biološku funkciju, ali istovremeno posjeduju poboljšana farmakodinamička i farmakokinetička svojstva.² Peptidomimetika predstavlja interdisciplinarno znanstveno područje koje objedinjuje principe organske kemije, biokemije, farmakologije i biotehnologije, s ciljem razvoja funkcionalno unaprijeđenih analoga prirodnih peptida.^{1,3,4}

Ranija istraživanja naglašavaju važnost implementacije tzv. „trodimenzionalne strukturne raznovrsnosti" u dizajn peptidomimetika, kako bi se obuhvatilo široko područje sekundarnih struktura peptida. Poznato je da ugradnja neproteinogenih aminokiselina (engl. „*non-proteinogenic amino acids*“, NPAAAs) u peptidne sekvence može modulirati njihove sekundarne strukture, što često rezultira poboljšanom selektivnošću, većom bioraspoloživošću te povećanom metaboličkom stabilnošću. Štoviše, dobivanje sekundarnih struktura koje se razlikuju od klasičnih strukturnih motiva prisutnih u prirodnim proteinima, otvara nove mogućnosti njihove primjene u različitim znanstvenim i biomedicinskim područjima.⁵⁻⁸

Ovaj potencijal dodatno dolazi do izražaja kada se uzme u obzir da se ribosomska sinteza proteina u gotovo svim živim organizmima temelji se na ograničenom skupu od svega 20 proteinogenih aminokiselina (engl. „*proteinogenic amino acids*“, *PAAs*). Međutim, funkcionalna raznolikost proteina zahtijeva višu razinu kemijske složenosti od one koju pruža isključivo ovaj skup aminokiselina, što se jasno potvrđuje raširenom prisutnošću post-translacijskih modifikacija.^{9,10} Sukladno navedenom, uvođenjem NPPAs u dizajn peptidnih i proteinskih sustava proširuje se skup raspoloživih gradivnih blokova, čime se dodatno povećava funkcionalna raznolikost proteina i otvaraju nove mogućnosti njihove primjene u području medicinske kemije, dizajnu katalizatora te znanosti o materijalima.

Strukturna obilježja NPAAAs mogu uvelike nalikovati onima karakterističnim za PAAs, ali isto tako mogu pokazivati znatna strukturna odstupanja. U prvom slučaju, najčešće se radi o derivatima koji sadrže dodatne funkcijske skupine, poput hidroksilnih ili metilnih supstituenata, dok šira skupina uključuje aminokiseline s modificiranim bočnim lancima, β -aminokiseline, fenilglicinske derivate te halogenirane analoge (Slika 1).¹¹



Slika 1. Repräsentativni primjeri: (A) NPAAAs strukturno slične proteinogenim analogima; (B) Odabrane strukture koje sadrže NPAAAs i njihove funkcije. NPAAAs su označene plavom bojom.

Tijekom proteklih desetljeća razvijen je značajan broj metodoloških pristupa usmjerenih na sintezu NPAAAs, što je uvelike pridonijelo proširenju njihove strukturne raznolikosti. Prisutnost

nestandardnih molekulskih okosnica, višestrukih kiralnih centara, donora i akceptora vodikovih veza te velikog izbora alifatskih, aromatskih ili heteroaromatskih bočnih lanaca, rezultira spojevima s raznolikim kemijskim i biološkim svojstvima.

Neproteinogene aminokiseline danas se često prepoznaju u strukturama farmaceutskih proizvoda, a procjenjuje se da više od 30 % lijekova malih molekula sadrži upravo NPAAAs ili njihove derivate.¹² U području medicinske kemije njihova ugradnja u peptidne i proteinske terapije pridonosi povećanoj stabilnosti, učinkovitosti, staničnoj permeabilnosti i bioraspoloživosti.¹³ Dodatno, prisutnost NPAAAs unutar peptidnih sekvenci omogućuju uvođenje ortogonalnih mjesta za selektivne biokonjugacijske reakcije s malim molekulama, biomolekulama, polimerima ili fluorescentnim bojama, čime se omogućuje sinteza funkcionalno specifičnih adukata.^{14,15}

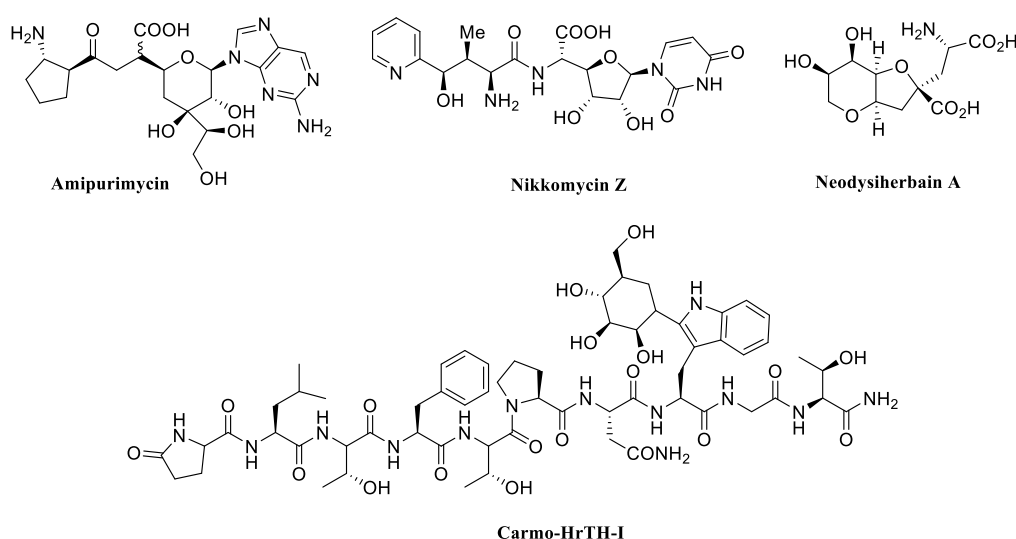
Nadahnuti djelotvornošću i selektivnošću prirodnih enzima, razvoj peptidnih katalizatora postao je važan smjer unutar sintetske katalize. Međutim, inherentna konformacijska fleksibilnost peptida može ograničiti specifičnost interakcije između katalizatora i supstrata. Spomenuta se ograničenja mogu prevladati uvođenjem NPAAAs s konformacijskim ograničenjima ili funkcijskim skupinama koje sudjeluju u vodikovom vezama.¹⁶ Primjeri uključuju, peptidne katalizatore s β -okretom¹⁷ te katalizatore s foldamernim strukturama građene od PAAAs i NPAAAs,¹⁸ koji su uspješno primijenjeni u brojnim asimetričnim transformacijama, uključujući reakcije acilacije i formiranja ugljik–ugljik veze (Slika 1). Navedeni primjeri jasno pokazuju da NPAAAs značajno doprinose razvoju i funkcionalnoj raznolikosti peptidnih katalizatora.

Unatoč postignutom napretku, šira i učinkovitija primjena NPAAAs i dalje je ograničena nedovoljnim razumijevanjem njihova utjecaja na konformaciju peptida, osobito u pogledu nekovalentnih interakcija koje stabiliziraju specifične konformacijske motive.

Značajan istraživački interes usmjeren je prema NPAAAs s ugljikohidratnom jedinicom u bočnom lancu, među kojima se posebno ističu C-glikozilne aminokiseline. One predstavljaju značajnu podskupinu funkcionalnih monomera, sve češće korištenih u sintezi glikomimetika, peptidomimetika i foldamera.⁶ Njihova jasno definirana konformacija, uvjetovana strukturnim

ograničenjima furanoznih i piranoznih prstenova, zajedno s mogućnošću podešavanja hidrofilnosti i ostalih fizikalno-kemijskih svojstava putem supstitucije i stereokemijske modulacije, čini ih izuzetno pogodnim gradivnim blokovima za razvoj uređenih peptidnih sustava.

C-glikozilne aminokiseline prepoznate su i kao ključni strukturni motivi u brojnim prirodnim produktima s izraženom biološkom aktivnošću. Kao reprezentativni primjeri navode se Amipurimycin, peptidil-nukleozidni antibiotik izoliran iz *Streptomyces novoguineensis* i srodnih sojeva,^{19,20} zatim Nikkomycin Z, Neodysiherbain A, te CAM-HrTH-I, dekamerni glikopeptidni hormon izoliran iz morskih organizama (Slika 2).^{17,21}

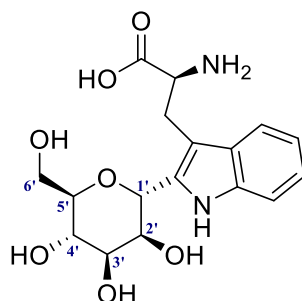


Slika 2. Strukture Amipurimicina, Nikkomycina Z, Neodysiherbaine A i Cam-HrTH-I.

Premda su u prirodi znatno rjeđe zastupljene od svojih O- i N-glikoziliranih analoga, C-glikozilne aminokiseline odlikuju se visokom kemijskom stabilnošću te nerijetko poboljšanom biološkom učinkovitošću. Nestabilnost O- i N-glikozida, koji podliježu kemijskoj i enzimskoj hidrolizi pod fiziološkim uvjetima, ograničava njihovu primjenu u razvoju potencijalnih terapeutika, što je dodatno potaknulo interes za istraživanje stabilnijih C-glikozida. Njihova praktična vrijednost potvrđena je, primjerice, u razvoju inhibitora SGLT2, gdje je zamjena O-glikozida C-glikozidom rezultirala značajnim poboljšanjem farmakokinetičkog profila i farmakoloških svojstava lijeka.²² Unatoč prepoznatom potencijalu, ugradnja C-glikozilnih jedinica u peptide i proteine ostaje metodološki znatno zahtjevnija u odnosu na O- i N-

glikozilacijske pristupe. Posljedično, područje C-glikozilacije još je uvijek nedovoljno istraženo i u razvoju zaostaje za drugim glikozilacijskim strategijama.²³

S druge strane, kada se sagleda prirodna zastupljenost C-glikozidnih veza, ističe se samo jedan potvrđeni primjer, zabilježen u motivu Man α 1-C2-Trp. U ovom slučaju C-manozilacija triptofana predstavlja jedini poznati oblik C-glikozilacije proteina u prirodi.²⁴ Ova jedinstvena modifikacija uključuje stvaranje stabilne ugljik–ugljik veze između C-2 atoma L-triptofana i anomerne pozicije D-manopiranoze, pri čemu nastaje 2-(α -D-manopiranozil)-L-triptofan, poznat i kao Trp(Man) (Slika 3). Za razliku od većine drugih manozida, koji preferiraju 4C_1 konformaciju, ovaj C-manozid usvaja neuobičajenu 1C_4 konformaciju.^{24,25}



Slika 3. Struktura 2'- α -D-manozil-L-triptofana.

C-manozilacija triptofana zabilježena je u velikom broju proteina, uključujući one s trombospodin ponavljajućom domenom (TSR),²⁶ receptore citokina tipa I,²⁷ RN-aze,²⁸ lipoprotein-liazu,²⁹ glikozid hidrolaze, glikoziltransferaze,³⁰ te različite virusne glikoproteine.³¹ Iako njezina biološka uloga još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, nedavna istraživanja ukazuju da Trp(Man) može imati važnu ulogu u stabilizaciji tercijarne strukture proteina, što je potvrđeno primjerice u TSR domenama,³² receptora citokina tip I³⁰ i RN-aze 2.³⁰ Međutim, ograničena dostupnost homogenih glikoformi i dalje onemogućuje kvantitativno ispitivanje utjecaja Trp(Man) na termodinamiku savijanja proteina i peptida. Daljnji napredak u ovom području zahtijeva razvoj pouzdanih sintetskih metodologija za dobivanje čistih glikoformi. Ključni izazovi uključuju pripravu Trp(Man) u dostatnim količinama za automatiziranu sintezu peptida na čvrstoj fazi (engl. „*Solid-Phase Peptide Synthesis*“, SPPS), kao i razvoj učinkovitih metodologija za ugradnju ove modifikacije u kasnijim fazama sinteze peptida.

Unatoč značajnom napretku u razvoju sintetskih metodologija, većina dosad opisanih protokola odnosi se na pripravu aminokiselina s ugljikohidratnom jedinicom smještenom na bočnom lancu,^{33–37} kao i na N- ili C-terminalnom kraju peptida i to najčešće putem amidne veze ili prethodno uvedenih reaktivnih skupina.^{33,38} Pregledom literature utvrđen je velik broj primjera C-glikozilnih β -aminokiselina,^{34,35,37,39–41} dok su C-glikozilne α -aminokiseline znatno rjeđe istražene.^{42–45} Nadovezujući se na prethodna saznanja, ograničena zastupljenost literaturno opisanih primjera C-glikozilnih α -aminokiselina ističe važnost daljnjih istraživanja usmjerenih na razvoj učinkovitih metoda njihove sinteze te njihovu detaljnu karakterizaciju. Takva nastojanja ujedno otvaraju mogućnost optimizacije metodologije sinteze pripadajućih oligomera, odnosno molekula s ugrađenim C-glikozilnim α -aminokiselinama. Navedene su strukture od osobitog značaja jer omogućuju detaljno proučavanje utjecaja ugrađenih ugljikohidratnih jedinica na konformacijska svojstva pripadajućih oligomera te stvaraju preduvjete za oblikovanje stabilnijih i strukturno definiranih C-glikopeptida s potencijalnom primjenom u razvoju bioaktivnih spojeva, katalitičkih sustava i funkcionalnih materijala.

1.1. Cilj i svrha rada

Primarni cilj ovog istraživanja je ispitati utjecaj strukture, broja te raspodjele C-glikozilnih α -aminokiselina unutar peptidnog slijeda na konformacijska svojstva pripadajućeg oligomera. Očekuje se da će oligomeri, građeni od stereokemijski definiranih C-glikozilnih jedinica i prirodnih α -aminokiselina, usvojiti jasno definirane sekundarne strukture. Nadalje, predviđa se bolje razumijevanje načina na koji odabir ugljikohidratnih okosnica modulira konformaciju peptida, što može pridonijeti rješavanju složenih izazova vezanih uz molekulske interakcije, uključujući protein–protein, ugljikohidrat–peptid i ugljikohidrat–ugljikohidrat interakcije. Oligomeri koji sadrže C-glikozilne α -aminokiseline odlikuju se izraženom stereokemijskom raznolikošću i visokim stupnjem trodimenzionalne strukturne uređenosti, što ih čini pogodnim gradivnim blokovima u razvoju funkcionalnih molekula koje objedinjuju specifičnu biološku aktivnost s unaprijeđenim fizikalno-kemijskim i farmakološkim svojstvima.^{5–8}

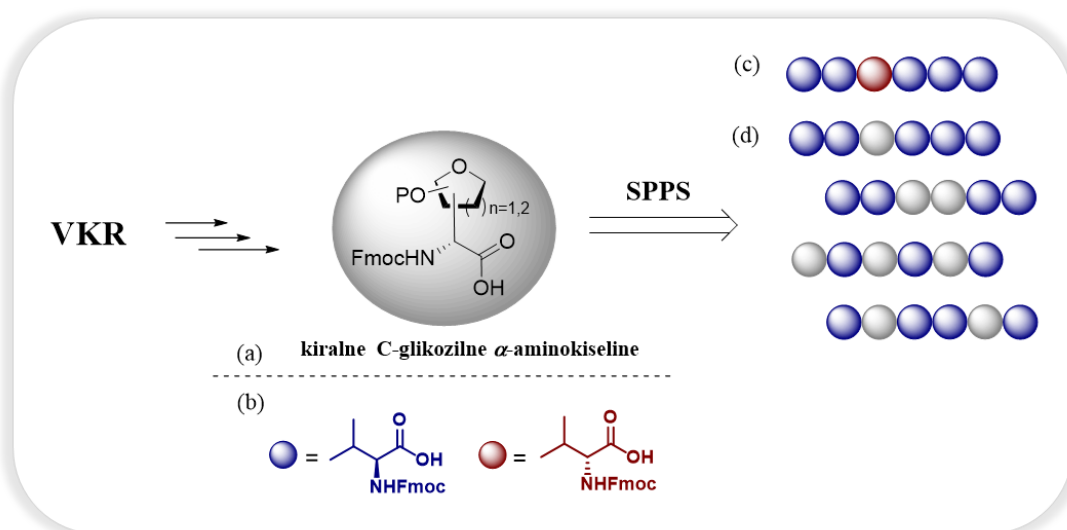
Glavna hipoteza istraživanja temelji se na pretpostavci da prisutnost sterički zahtjevne ugljikohidratne jedinice, kovalentno vezane izravno na α -ugljikov atom α -aminokiseline, može imati značajan utjecaj na konformacijska svojstva peptida. Dodatno, pretpostavlja se da strukturna raznolikost ugrađenih C-glikozilnih α -aminokiselina, njihov broj te raspodjela unutar peptidne sekvence moduliraju konformaciju peptida na jasno definiran i predvidljiv način, pri čemu se doprinosi stabilizaciji specifičnih strukturnih motiva u peptidomimeticima.

Istraživanje je provedeno kroz sljedeće metodološke korake:

1. Razvoj metodologije sinteze diastereomerno čistih C-glikozilnih α -aminokiselina, polazeći od strukturno definiranih ugljikohidratnih prekursora (Slika 4a).
2. Razvoj metodologije pripreme oligomera s različitim brojem i raspodjelom C-glikozilnih α -aminokiselina unutar peptidne sekvence (Slika 4b i 4c).
3. Detaljna strukturna karakterizacija i konformacijska analiza sintetiziranih C-glikopeptida, s ciljem utvrđivanja utjecaja ugrađenih C-glikozilnih jedinica na lokalne strukturne motive, sekundarnu strukturu i ukupnu konformaciju peptida.

Provedbom istraživanja nastoje se steći nove spoznaje o odnosu između strukture i konformacijskih svojstava sustava temeljenih na C-glikozilnim α -aminokiselinama, čime se doprinosi razvoju stabilnih, konformacijski definiranih i funkcionalno relevantnih struktura potencijalnih peptidomimetika.

Važno je istaknuti da utjecaj strukture ugrađenih C-glikozilnih aminokiselina na konformaciju i funkcionalna svojstva peptida dosad nije bio predmet sustavnog istraživanja. Dosadašnja istraživanja uglavnom su bila usmjerena na modifikaciju peptida s ciljem poboljšanja njihove stabilnosti ili afiniteta prema specifičnim biomolekulama.^{46,47}



Slika 4. Metodologija priprave C-glikozilnih α -aminokiselina i C-glikopeptida. (a) C-glikozilne α -aminokiseline, (b) Proteinogene aminokiseline. (c) Modelni valinski heksapeptid. (d) C-glikopeptidi.

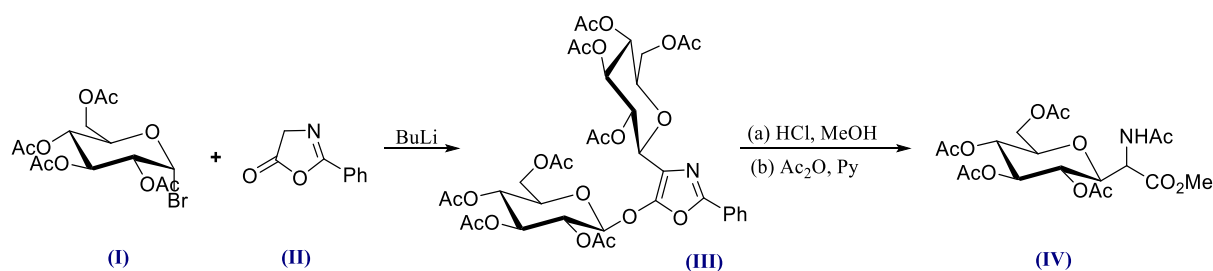
§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Sinteza C-glikozilnih aminokiselina i C-glikopeptida

U ovom su poglavlju prikazane značajnije metodologije pripreme C-glikozilnih aminokiselina i C-glikopeptida, razvrstane prema stupnju njihova razvoja u povijesnom i metodološkom kontekstu na klasične i suvremene metodologije te moderne sintetske pristupe. Poseban naglasak stavljen je na metodološki napredak, od klasičnih reakcija koje su omogućile pripravu prvih C-glikozilnih gradivnih blokova do suvremenih i modernih pristupa koji osiguravaju veću selektivnost i učinkovitost i širu primjenjivost u sintezi strukturno složenih glikopeptida.

2.1.1. Klasične i suvremene metode sinteze

Razvoj metoda za pripravu C-glikozilnih aminokiselina započeo je sredinom 20. stoljeća, s nastojanjem da se jednostavni sintetski postupci, izvorno razvijeni za α -aminokiseline, prenesu na strukturno složenije šećerne derivate. Prvi pokušaji sinteze C-glikozilnih α -aminokiselina zabilježeni su u literaturi krajem 1940-ih godina. Predložena je priprava glukozil- i laktozil-glicina kondenzacijom odgovarajućih ugljikohidratnih derivata s natrijevim *N*-formilamino-dietilmalonatom, nakon čega su uslijedile reakcije saponifikacije i dekarboksilacije.⁴⁸ Međutim, u kasnijim istraživanjima provedenima u različitim istraživačkim grupama, pokazalo se da navedeni postupak nije moguće reproducirati.⁴⁹ Stoga se prvom pouzdano dokumentiranom sintezom C-glikozil glicina smatra istraživanje Rosenthala i Brinka iz 1975. godine, u kojem je odgovarajući ugljikohidratni derivat **I** podvrgnut reakciji s oksazolinom **II** (Slika 5). Dobiveni bis-glikozilirani oksazol **III**, premda izoliran u vrlo niskom prinosu iz složene reakcijske smjese, uspješno je preveden u metil-(*R,S*)-2-(β -D-glukopiranozil)glicinat **IV** kiselom hidrolizom u metanolu.⁵⁰



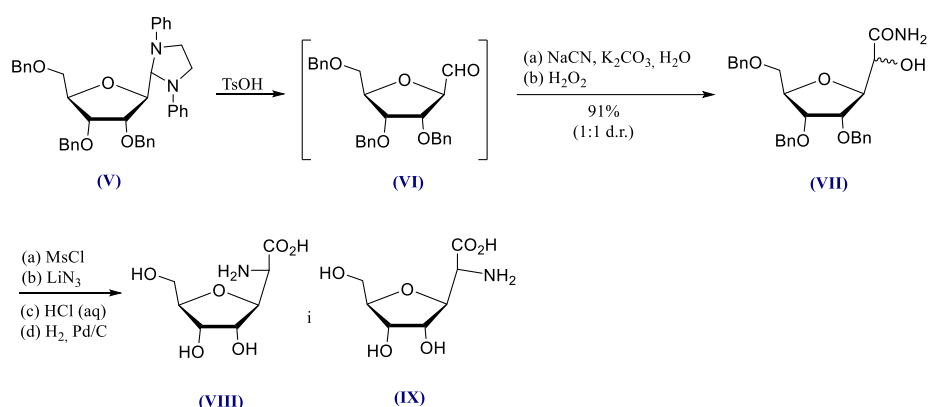
Slika 5. Prva pouzdano dokumentirana sinteza C-glikozilglicina.⁵⁰

U razdoblju koje je uslijedilo razvijen je niz klasičnih metodologija koje su oblikovale temelje suvremene sinteze C-glikozilnih aminokiselina i njihovih analoga. Među najznačajnijim pristupima u tom kontekstu ističu se Streckerova reakcija, transformacije dehidroaminokiselina, reduktivne animacije, višekomponentne reakcije poput Mannichove, Reformatskyjeve, Passerinijeve, Ugijeve i Hantzscheve reakcije, kao i klasične reakcije kondenzacije i olefinacije, uključujući Wittigovu te Horner–Wadsworth–Emmonsovu reakciju.

2.1.1.1. Streckerova reakcija

Streckerova reakcija ubraja se među prve razvijene metode pripreve α -aminokiselina, a vrlo brzo pronašla je primjenu i u sintezi C-glikozilnih derivata. U klasičnom pristupu C-glikozilni aldehidi podvrgavaju se kondenzaciji s amonijakom (ili aminom) i cijanidom, čime nastaju α -aminonitrili, koji se naknadnom hidrolizom prevode u odgovarajuće C-glikozilne aminokiseline.

Značajan doprinos u području kemije ugljikohidrata, dao je rad Robinsa i Parkera (1983. godine), u kojem je Streckerova reakcija korištena za sintezu 2-(β -D-ribofuranozil)-L- i D-glicina (**VIII** i **IX**). U toj je sintezi dobiven međuprodukt α -hidroksi amid (**VII**) s prinosom od 90 %, u obliku smjese diastereoizomera približno jednakog omjera. Pojedini diastereoizomeri razdvojeni su u fazi pripreve 2-O-mesil derivata, koji su potom služili kao supstrati za uvođenje amino skupine konverzijom odgovarajućih azida (Slika 6).⁵¹



Slika 6. Streckerova reakcija korištena za sintezu 2-(β -D-ribofuranozil)-L- i D-glicina.⁵¹

Glavno ograničenje primjene Streckerove reakcije očitivalo se u činjenici da su produkti najčešće dobiveni u obliku racemičnih α -aminokiselina. Ova nedostatnost potaknula je razvoj asimetričnih metodologija usmjerenih na postizanje enantioselektivne sinteze.

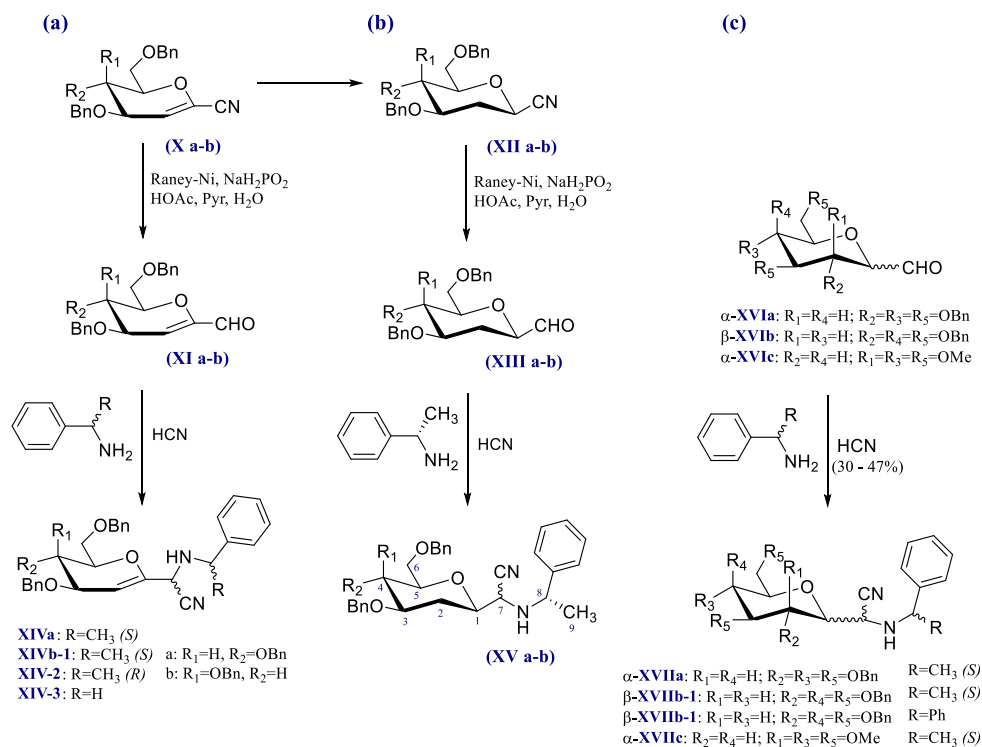
Slijedom toga, razvijena je stereoselektivna (asimetrična) Streckerova reakcija. Primjenom kiralnih pomoćnih sredstava ili kiralnih katalizatora omogućena je enantioselektivna adicija cijanida na imine, čime se osigurava priprava optički čistih α -aminonitrila, a posljedično i α -aminokiselina.

Najznačajniji doprinosi u tom području uključuju rad Ellmana i suradnika, u kojem je *tert*-butil-sulfinamid uveden kao kiralno pomoćno sredstvo,⁵² zatim rad Jacobsena i suradnika, u kojem je razvijena enantioselektivna varijanta katalizirana različitim kiralnim kompleksima,^{53,54} te rad O'Donnella, u kojem je primjenom katalizatora faznog prijenosa, kvaternih amonijevih soli izvedenih iz *cinchonina*, postignuta visoka enantioselektivnost.^{55,56}

Značajan doprinos razumijevanju i praktičnoj primjeni Streckerove reakcije u kemiji ugljikohidrata dali su Sipos i suradnici, koji su proveli sintezu i strukturnu karakterizaciju niza 2-amino-2-C-D-glikozil-acetonitrila polazeći od različitih C-glikozilnih aldehida, kiralnih amina i HCN (Slika 7).⁵⁷ Pokazano je da se aminonitrili dobiveni iz glikala **XI** (Slika 7a) i 2-deoksi-β-D-glikozilnih aldehida **XIII** (Slika 7b) mogu pripremiti u dobrim prinosima, dok reakcije s C-glikozilnim aldehydima **XVI** (Slika 7c) rezultiraju nižim prinosima zbog njihove sklonosti razgradnji putem β-eliminacije. Dobiveni aminonitrili **XIV**, **XV**, **XVII** predstavljaju vrijedne međuprodukte koji se hidrolizom mogu prevesti u odgovarajuće C-glikozilne aminokiseline.

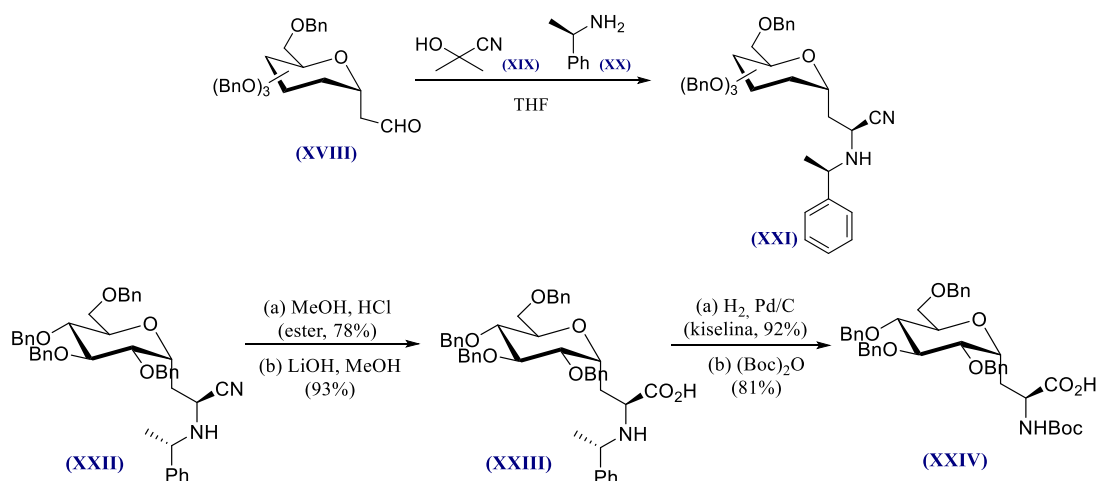
Određivanje konfiguracije novonastalog stereogenog centra predstavljalo je jedan od glavnih izazova. U većini slučajeva razdvajanje izomera nije bilo uspješno, a produkti su izolirani u obliku ulja neprikladnih za određivanje kristalne strukture rendgenskom kristalografijom. Samo je u pojedinim primjerima apsolutna konfiguracija glavnog diastereomera potvrđena rendgenskom kristalografijom i utvrđena kao *R*. Za preostale spojeve konfiguracija je određena analizom ¹H NMR spektara te usporedbom kemijskih pomaka metinskih protona (H-7) na novom kiralnom centru, slijedom literaturno opisanih metoda.^{58–60} Utvrđeno je da smjer nukleofilne adicije ovisi o konfiguraciji anomernog ugljika. Iako stereokemija prijelaznog stanja nije u potpunosti razjašnjena, konfiguracija glavnog produkta upućuje na to da reakcija u većini slučajeva slijedi Felkin–Ahnovu selektivnost.^{39,58}

Zaključno, istraživanje Siposa i suradnika potvrđuje potencijal stereoselektivne Streckerove reakcije u sintezi C-glikozilnih aminokiselina, ali i ističe potrebu za daljnjim metodološkim unapređenjima, osobito u pogledu kontrole stereoselektivnosti i stabilnosti reakcijskih međuprodukata.



Slika 7. Sinteza 2-amino-2-C-D-glikozil acetonitrila Streckerovom reakcijom.⁵⁷

Kao primjer stereoselektivnog pristupa sintezi C-glikozilnih aminokiselina, može se izdvojiti metodologija koju su razvili Vincent i suradnici.⁵⁸ Provedena je stereoselektivna Streckerova reakcija polazeći od C-glikozilnih aldehida XVIII, (S)- α -metilbenzilamina XX kao kiralnog pomoćnog sredstva te aceton cijanohidrina XIX kao izvora cijanidne skupine (Slika 8).



Slika 8. Sinteza C-gluko-L-alaninskog analoga.

Pokazano je da kiralnost šećernog fragmenta ne utječe značajno na stereokemijski ishod reakcije, već je stereoselektivnost uvjetovana kiralnim aminom. Nadalje, utvrđeno je da smjer stereoindukcije ovisi o reakcijskom mediju, točnije u THF-u reakcija se odvija prema Felkin–Ahnovu modelu, dok u DCM-u prevladava Cramov tip stereoindukcije, čime je omogućeno dobivanje oba epimera primjenom istog kiralnog inducirajućeg agensa. Radi potvrde stereokemijskog ishoda, provedena je konverzija aminonitrila **XXII** u poznati C-gluko-L-alaninski analog **XXIV**, čime je nedvojbeno potvrđeno da asimetrična Streckerova reakcija, uvođenjem kiralnog amina i C-glikozil acetaldehida u THF-u daje aminonitril (S)-konfiguracije **XXI** (Slika 8). Na ovaj su način sintetizirani C-fukozil-alaninski derivati, koji predstavljaju stabilne analoge prirodnih glikopeptida te potencijalne gradivne blokove za pripravu biološki relevantnih C-glikopeptida s povećanom otpornošću prema enzimatskoj razgradnji.

Time je potvrđeno da stereoselektivna Streckerova reakcija predstavlja učinkovit i prilagodljiv pristup između klasičnih i suvremenih sintetskih metodologija, omogućujući stereoselektivnu pripravu C-glikozilnih aminokiselina i srodnih peptidomimetika, čime se dodatno proširuju mogućnosti primjene ove povijesno značajne reakcije u suvremenoj glikokemiji.

2.1.1.2. Višekomponentne reakcije

Višekomponentne reakcije (VKR; engl., „*multicomponent reaction*“, *MCR*) zauzimaju posebno mjesto u organskoj sintezi zahvaljujući sposobnosti da u jednom sintetskom koraku objedine tri ili više jednostavnih supstrata u strukturno složeniji produkt. Ovim je pristupom omogućena jednostavna sinteza visoko funkcionaliziranih spojeva složene građe i velike strukturne raznolikosti, koja se provodi u jednom koraku, bez potrebe za izolacijom i karakterizacijom međuprodukata. Među dodatne prednosti ubrajaju se visoka selektivnost, jednostavnost provedbe reakcija te cjenovna pristupačnost. Nadalje, VKR se u pravilu provode pod blagim uvjetima i odlikuju se visokom tolerancijom prema širokom rasponu funkcijskih skupina, čime se u velikoj mjeri izbjegava potreba za njihovom prethodnom zaštitom. Njihova vrijednost dodatno je naglašena činjenicom da se često navode kao metodologije koje se približavaju konceptu „idealne sinteze“. Iako su navedene prednosti bile poznate i ranije, tek je 1961. godine Ivar Karl Ugi sustavno opisao najvažnije varijante četverokomponentne reakcije, čime je otvoren put široj primjeni VKR.⁶¹

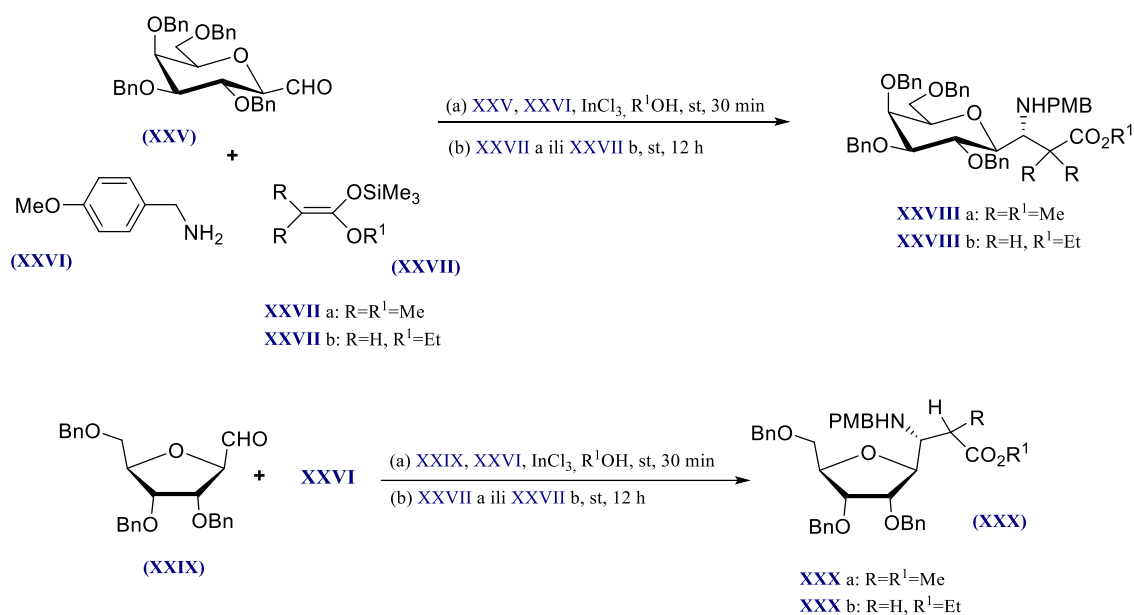
Streckerova reakcija, koja je detaljnije razmotrena u ranijem dijelu disertacije (2.1.1.1.), a uključuje tri komponente (aldehid, amonijak i cijanid), smatra se prvom dokumentiranom VKR, za razliku od ranijih pokušaja u kojima produkti nisu bili strukturno okarakterizirani. Time je obilježen stvarni početak razvoja ove metodologije.^{62,63}

U području sinteze C-glikozilnih aminokiselina VKR pokazale su se osobito vrijednima, budući da omogućuju izravnu i učinkovitu izgradnju aminokiselinskog skeleta polazeći od C-glikozilnih aldehida. Među najznačajnijim primjerima ističu se Passerinijska i Ugijeva reakcija, dok Mannichova i Hantzschova transformacija predstavljaju važne strategije koje značajno proširuju metodološki okvir.

Važno je istaknuti doprinos Dondonija i suradnika, koji su razvili čitav niz *one-pot* višekomponentnih pristupa usmjerenih na pripremu C-glikozilnih aminokiselina i potencijalnih glikomimetika, postavivši temelje za daljnji razvoj suvremenih metodologija.^{39,40,50,64–69}

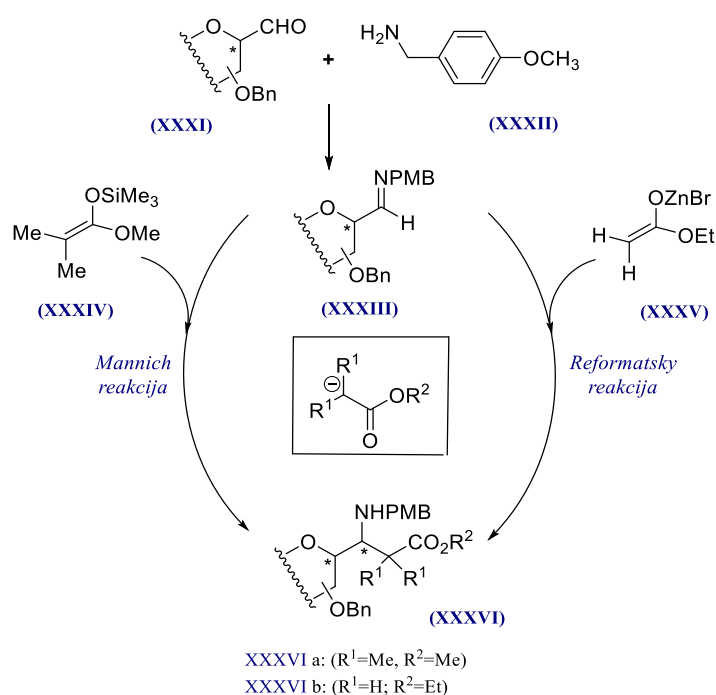
Jedan od ključnih izazova u ovom području odnosio se na kontrolu stereokemijskog ishoda reakcija. U tom je kontekstu 2004. godine Dondoni razvio asimetričnu Mannichovu

trokomponentnu reakciju za sintezu C-glikozil β -aminokiselina. C-galaktozilni **XXV** i C-ribozilni β -aminokiselinski derivati **XXIX** pripremljeni su *one-pot* Mannichovom reakcijom kataliziranom InCl_3 , kondenzacijom odgovarajućeg formil-C-glikozida, *p*-metoksibenzilamina **XXVI** i keten-silil-acetala **XXVII**. Reakcija se pokazala visoko stereoselektivnom, a produkti su dobiveni u dobrim do izvrsnim prinosima (60–80 %, Slika 9).⁶⁷



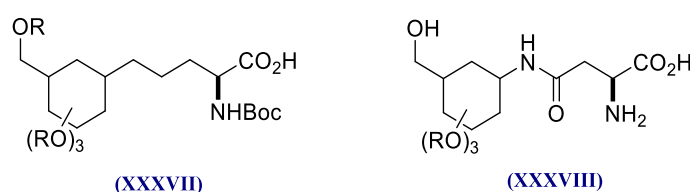
Slika 9. Asimetrična Mannichova trokomponentna reakcija za sintezu C-glikozil- β -aminokiselina.⁶⁷

Slijedeći ovo istraživanje, razvijen je komplementarni višekomponentni pristup sintezi C-glikozilnih β -aminokiselina, koji uključuje Mannichovu i Reformatsky trokomponentnu reakciju. U početnom koraku provodi se kondenzacija šećernog aldehida **XXXI** i *p*-metoksibenzilamina **XXXII**, što rezultira nastajanjem kiralnog međuprodukta C-glikozil imina **XXXIII**. Kao nukleofilna komponenta korišten je keten-silil-acetal **XXXIV** u slučaju Mannichove reakcije, odnosno brom-cink-enolat **XXXV** u slučaju Reformatskyjeve reakcije. Obje strategije rezultirale su C-glikozil β -aminoesterima **XXXVI** u obliku jednog diastereoizomera, s prinosima od 60 do 90 % (Slika 10). Uočeno je da upravo izbor šećernog aldehida (ribozni, galaktozni, manozni, glukozni ili arabinozni derivat) u značajnoj mjeri određuje tijek reakcije te omogućuje učinkovit i izravan pristup ovoj skupini spojeva.^{39,40,67}



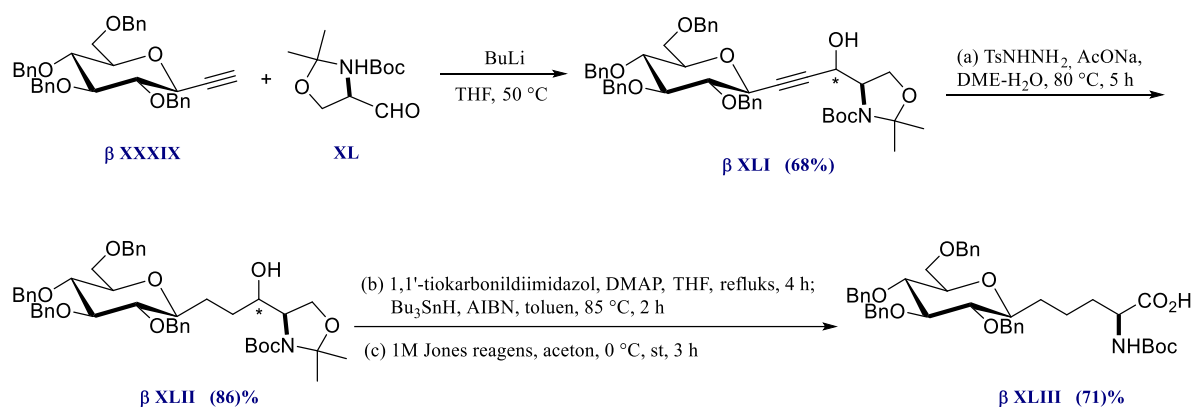
Slika 10. Mannich i Reformatsky one-pot trokomponentna sinteza C-glikozil- β -amino estera.^{39,40}

Nadovezujući se na prethodna saznanja isti su autori istaknuli da C-glikozilne aminokiseline, u kojima je glicinski ostatak povezan s anomernim ugljikovim atomom šećera putem ugljikovog mosta, predstavljaju važne prekursore glikopeptidnih mimetika te sve češće postaju predmetom sintetskih istraživanja. Za razliku od prirodnih glikopeptida, koji sadrže O-glikozilirani serin, O-glikozilirani treonin i N-glikozilirani asparagin, ugradnja C-glikozilnih aminokiselina u peptidnu okosnicu rezultira povećanom stabilnošću prema kemijskoj i enzimatskoj deglikozilaciji, što se povezuje s pojavom novih i potencijalno biološki značajnih svojstava. Unatoč postignutom napretku, razvoj metodologija koje bi istodobno omogućile široku primjenjivost i selektivnu pripremu α - i β -izomera i dalje predstavlja značajan izazov. U nastavku je stoga prikazana metodologija koja uključuje šećerne acetilene kao prekursore s ciljem sinteze izosternih mimetika N-glikozil asparagina **XXXVIII**, u kojima je amidna skupina zamijenjena etilenskim fragmentom (Slika 11).^{50,65}



Slika 11. N-glikozil asparagin te izosterni mimetik N-glikozil asparagina.⁶⁵

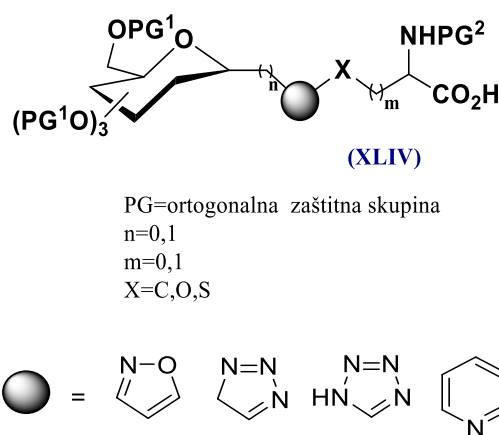
Slijedom ranije navedenog, predložena je sinteza C-glikozilnih aminokiselina kao etilen izostera α - i β -glikozilasparagina. Prikazana je modelna reakcija u kojoj je adicijom derivata šećernog acetilena tetra-*O*-benzil-C-glukopiranozida **β -XXXIX** na zaštićeni D-serinal **XL** pri niskoj temperaturi dobiven propargilni alkohol **β -XLI** u dobrom prinosu (Slika 12). Spoj je izoliran u obliku jednog diastereoizomera, (*S*)-konfiguracije na novonastalom kiralnom centru. Za daljnju modifikaciju bočnog lanca C-glikozida **β -XLI** primijenjen je niz standardnih reakcija koje su rezultirale visokim prinosima. Trostruka veza reducirana je *in situ* korištenjem diimida dobivenog iz *p*-toluensulfonil hidrazina i natrijeva acetata. Nastali zasićeni alkohol **β -XLII** deoksigeniran je Barton–McCombie metodom, dok je oksazolidinski prsten u jednom koraku otvoren i oksidiran Jonesovim reagensom. Na taj je način izolirana C-glikozilna α -aminopentanoična kiselina **β -XLIII** u prinosu od 61 %, a strukturno je okarakterizirana u obliku metilnog estera.^{50,65}



Slika 12. Stereoselektivna sinteza etilen izostera α - i β -glukozil asparagina.^{50,65}

Zaključno, kondenzacijom dvaju kiralnih gradivnih blokova, točnije šećernih acetilena i zaštićenog α -aminoaldehida, predložena je nova sintetska strategija za pripravu C-glikozilnih aminokiselina koje predstavljaju etilenske izostere *N*-glikozilasparagina. Metodologija se pokazala prikladnom za pripravu α - i β -D-anomera različitih šećera, polazeći od odgovarajućih šećernih acetilena. Metodologija je zatim prilagođena i za pripravu izosternih mimetika *O*-glikoziliranog serina i treonina.^{50,65}

Nedugo zatim, Dondoni i suradnici su opisali pripremu različitih C-glikozilnih aminokiselina definiranih kao spojevi u kojima su dvije biološki aktivne strukturne jedinice povezane rigidnim petero- ili šesteročlanim heterocikličkim prstenom **XLIV**. Potaknuti spoznajom da se potraga za strukturnim modifikacijama i novim biološkim svojstvima peptida već niz godina intenzivno usmjerava na ugradnju neprirodnih heterocikličkih aminokiselinskih fragmenata, predložena je sinteza četiri tipa hibridnih spojeva sastavljenih od ugljikohidratnog, heterocikličkog i aminokiselinskog segmenta. Kao rigidne poveznice između biološki aktivnih jedinica razmatrani su heteroaromatski petero- i šesteročlani prsteni (izoksazol, triazol, tetrazol i piridin) koji se mogu jednostavno konstruirati primjenom Huisgenove cikloadicije i Hantzschove višekomponentne reakcije. U svim je slučajevima ugljikohidratna jedinica bila anomerno vezana na heterociklički sustav putem ugljik–ugljik veze (Slika 13).⁶⁴



Slika 13. *Struktura dvije biološki aktivne strukturne jedinice povezane rigidnim petero- ili šesteročlanim heterocikličkim prstenom.*

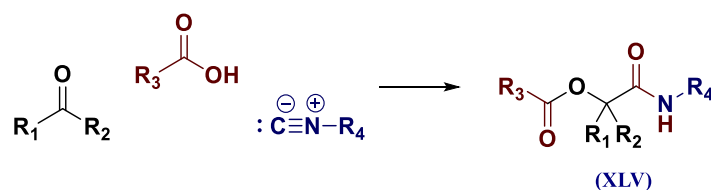
Polazišna ideja razvoja ovih pristupa temeljila se na ulozi dušikovih heterocikličkih prstena u strukturnoj modifikaciji peptida te u procesima molekulskog prepoznavanja. Na taj je način ostvarena sinteza nove skupine C-glikozilnih α -aminokiselina, derivata alanina, serina i cisteina, čija je struktura obilježena prisutnošću heterocikličkog prstena koji povezuje ugljikohidratni i aminokiselinski fragment. Primarna vrijednost ovih spojeva prepoznata je u njihovoj potencijalnoj primjeni kao gradivnih blokova za sintezu novih glikopeptida.⁶⁴

2.1.1.2.1 Višekomponentne reakcije temeljene na izocijanidima

Unutar skupine višekomponentnih reakcija posebno se izdvajaju one temeljene na izocijanidima (IVKR; engl. „*isocyanide-based multicomponent reaction*“, IMCR), koje su se pokazale iznimno vrijednima jer omogućuju pripravu strukturno složenih spojeva u jednom reakcijskom koraku, dok se usporedivi produkti konvencionalno mogu dobiti tek višestupanjskom sintezom. Njihova specifična reaktivnost proizlazi iz kemijske prirode izocijanida, stabilnih organskih spojeva u kojima ugljikov atom posjeduje formalno divalentni karakter. Zahvaljujući tom svojstvu, izocijanidi u reakcijama sudjeluju i kao nukleofilna i kao elektrofilna komponenta. Zbog toga se široko primjenjuju u organskoj sintezi, dok se slična reaktivnost opaža tek kod rijetkih spojeva, poput karbena i ugljikova(II) monoksida.^{62,70,71}

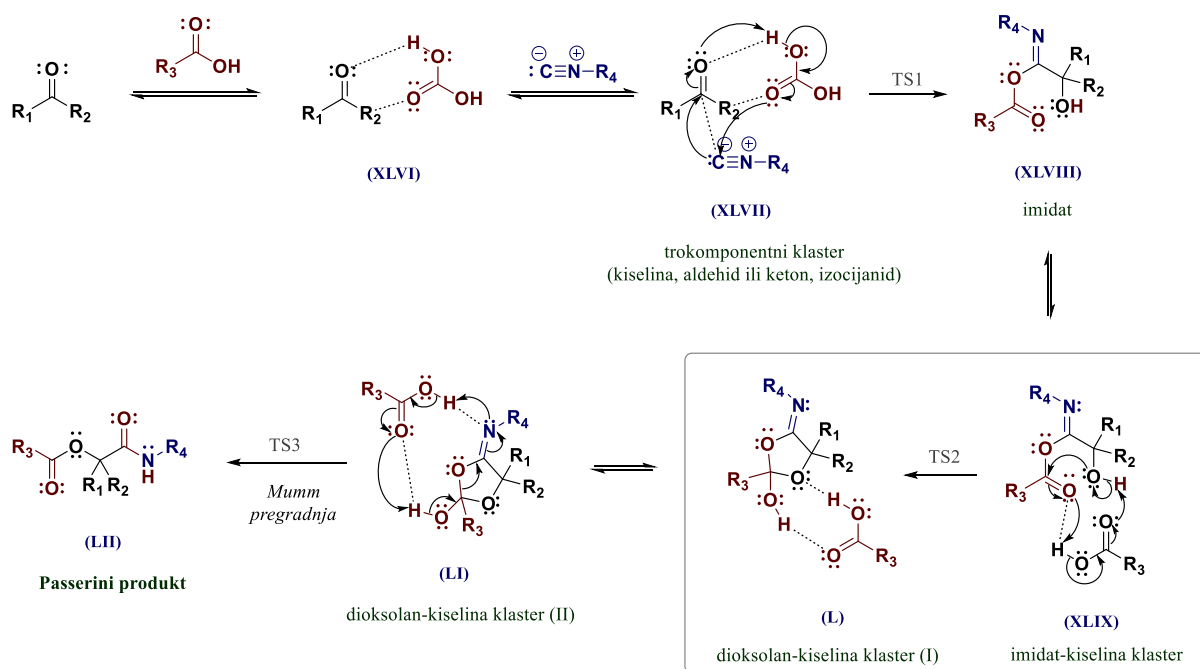
Prva višekomponentna reakcija u kojoj je izocijanid korišten kao jedna od komponenti poznata je kao Passerinijeva reakcija, nazvana prema talijanskom kemičaru Mariu Passeriniju, koji ju je prvi opisao 1921. godine.⁷² U navedenoj reakciji, osim izocijanida, sudjeluju i karbonilna te karboksilna komponenta (Slika 14).

Passerinijeva reakcija najčešće se provodi na sobnoj temperaturi u aprotičnim otapalima, kao što je diklormatan, dok je u protičnim i polarnim otapalima (metanol) kinetički nepovoljna. Vrijeme trajanja reakcije može varirati od nekoliko sati pa do nekoliko dana, osobito kada se kao supstrati koriste ketoni. Reakcija se odvija pod blagim uvjetima i karakterizira je široka tolerancija prema različitim funkcijskim skupinama. Reakcijski uvjeti mogu se dodatno prilagoditi ovisno o topljivosti i stabilnosti primijenjenih reagenasa. Kao karbonilne komponente mogu se koristiti različiti alifatski i aromatski aldehidi ili ketoni, dok karboksilne komponente uključuju alifatske i aromatske karboksilne kiseline. Nepovoljnima su se ipak pokazali elektronima siromašni fenoli te primarni i sekundarni amini, budući da dovode do neželjenih ishoda reakcije. Kombinacijom triju navedenih reaktanata nastaje α -aciloksi karboksiamid **XLV**, koji predstavlja konačni produkt Passerinijeve reakcije (Slika 14).^{73,74}



Slika 14. Nastajanje α -aciloksi karboksiamida trokomponentnom Passerinijevom reakcijom.

Mehanizam Passerinijeve reakcije prikazan je na Slici 15. U početnom koraku karbonilna se komponenta aktivira karboksilnom kiselinom putem vodikove veze, pri čemu nastaje adukt **XLVI**. Potom će uslijediti adicija izocijanida **XLVII**, što rezultira formiranjem imidata **XLVIII**; pritom je navedeni korak ireverzibilan. Dobiveni imidat stabilizira se dodatnom molekulom karboksilne kiseline, što dovodi do nastajanja adukta **XLIX**, koji se zatim pregrađuje u kompleks dioksolana i kiseline **L**. Navedeni reakcijski korak također je ireverzibilan i pored toga određuje brzinu reakcije. Nakon daljnje stabilizacije dodatnom molekulom karboksilne kiseline **LI**, u završnom ireverzibilnom koraku Mummmove pregradnje, nastaje Passerinijev produkt **LII**.



Slika 15. Mehanizam Passerinijeve reakcije.

Glavno ograničenje Passerinijeve reakcije odnosi se na kontrolu stereoselektivnosti, što i dalje predstavlja jedan od ključnih izazova u njezinoj primjeni. Složenost mehanizma, poteškoće u selektivnoj aktivaciji karbonilne komponente te inhibicija katalizatora produktom dodatno otežavaju optimizaciju ovog procesa. Formiranje novog stereogenog centra pri korištenju nesimetričnih karbonilnih spojeva zahtijeva razvoj strategija koje omogućuju učinkovitu kontrolu stereoselektivnosti. Unatoč brojnim izazovima, značajan napredak postignut je u razvoju asimetričnih pristupa reakcije te u boljem razumijevanju čimbenika koji određuju stereokemijski ishod. U nastavku su prikazani odabrani primjeri asimetričnih

Passerinijevih reakcija u kojima je navedeni izazov djelomično prevladan. Posebne je pozornost posvećena metodologijama koje omogućuju sintezu spojeva prikladnih za postkondenzacijske modifikacije, čime se otvara mogućnost sinteze C-glikozilnih aminokiselina i strukturno srodnih derivata od značaja za daljnje primjene u glikopeptidnoj kemiji.

Imajući na umu složenost stereoselektivne kontrole, u ranjim istraživanjima provedenim unutar naše istraživačke grupe, razmotrena je primjena ugljikohidratnih aldehida u Passerinijevoj reakciji. Kao primjer, ispitana je reaktivnost *bis*-izopropilidenima zaštićenog aldehida dobivenog iz D-fruktoze.⁷⁵ Na taj je način pripravljena biblioteka gusto funkcionaliziranih glikomimetika, u čijoj su strukturi prisutne do tri ugljikohidratne jedinice, uz postignutu visoku diastereoselektivnost (89:11–95:5 d.r.) te dobre do visoke prinose (57–83 %); (Slika 16a). (S)-konfiguracija novog kiralnog centra glavnog diastereoizomera, koji se formira tijekom Passerinijeve reakcije, potvrđena je rentgenskom kristalografijom.

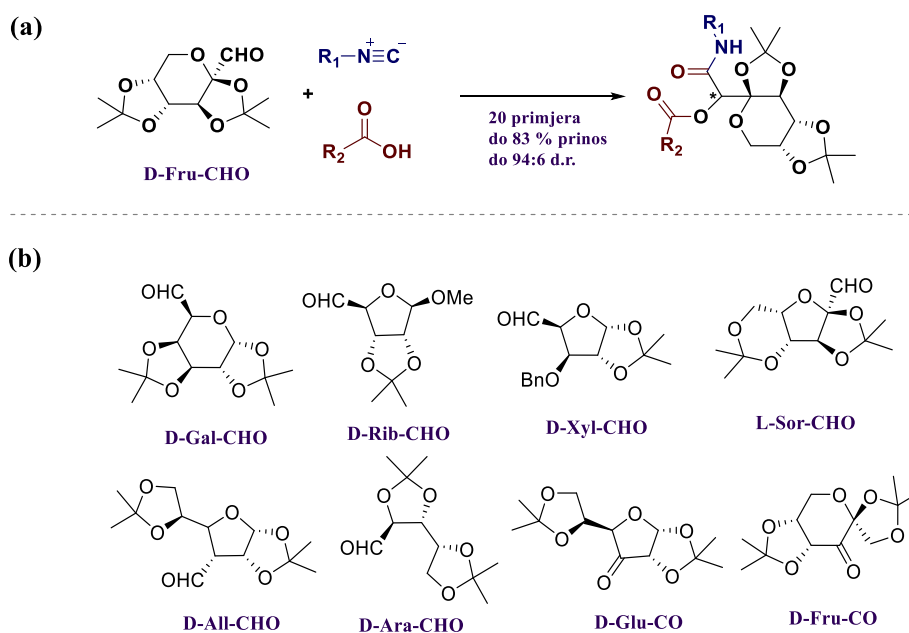
Nadovezujući se na prethodne rezultate, u sljedećem istraživanju metodologija je dodatno proširena primjenom strukturno različitih ugljikohidratnih aldehida i ketona kao karbonilnih komponenata u Passerinijevoj reakciji, s ciljem pripreme α -aciloksi karboksiamida koji u svojoj strukturi sadrže C-glikozilnu jedinicu.⁷⁶ U tu svrhu, korišteno je šest različitih aldehida odgovarajućih ugljikohidrata: galaktozni (**Gal-CHO**), ribozni (**Rib-CHO**), ksilozni (**Xyl-CHO**), sorbozni (**Sor-CHO**), alozni (**All-CHO**) i arabinozni (**Ara-CHO**) derivat; kao i dva ugljikohidratna ketona: glukozni (**Glu-CO**) i fruktozni (**Fru-CO**) derivat (Slika 16b). Kao izocijanidne komponente korišteni su cikloheksil-izocijanid, *tert*-butil-izocijanid i metil-izocijanoacetat, dok su od kiselinskih komponenti odabrane octena kiselina i N-terminalno zaštićene aminokiseline (fenilalanin, leucin i prolin). Passerinijeve reakcije su provedene u DCM-u pri sobnoj temperaturi i rezultirale su produktima s prinosima od 65 % do 83 %.

Reakcija se pokazala robusnom i visoko učinkovitom za različite ugljikohidratne supstrate, pri čemu je uočeno da diastereoselektivnost ovisi o prirodi karbonilne komponente. Najviša stereoselektivnost postignuta je s derivatima sorboze i aloze, uz omjer 90:10 d.r., dok su ribozni i ksilozni derivati dali nešto nižu selektivnost (77:23 d.r.). Nasuprot tome, arabinozni derivat, kao i reakcije s ugljikohidratnim ketonima, rezultirali su gotovo racemičnim smjesama

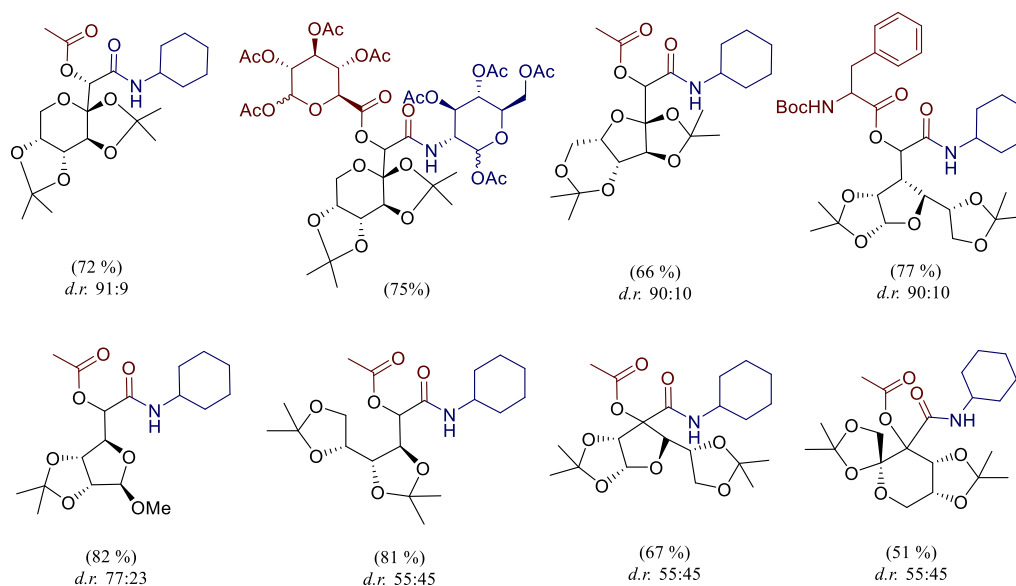
(~55:45 d.r.). Ketoni su se pritom pokazali manje reaktivnima u odnosu na aldehide, što je rezultiralo nižim prinosima izoliranih produkata, ili je pak pročišćavanje produkta bilo neuspješno (Slika 16c).

Prisutnost esterske skupine u Passerinijevim produktima, koja se može selektivno deprotektirati u bazičnim uvjetima, pokazala se potencijalno vrijednom za daljnje postkondenzacijske modifikacije, osobito u pripravi sintetski važnih α -hidroksi amida ili kiselina.^{77–79} Stoga je provedena deprotekcija acetilnih skupina Passerinijevih produkata korištenjem 1M NaOH. Sve reakcije rezultirale su pozitivnim ishodom, pri čemu su dobiveni C-terminalno zaštićeni dimeri, koji se sastoje od α -hidroksi C-glikozilne kiseline i glicina (Slika 16d). Nadalje, analizom NMR potvrđeno je očuvanje kiralne informacije proizašle iz diastereoselektivne Passerinijeve reakcije. Konformacijsko ograničenje koje nameće prisutnost furanoznog ili piranoznog prstena, prilagodljiva hidrofilnost te podesiva svojstva u pogledu supstituenata i stereokemije predstavljaju izrazito poželjne značajke, zbog čega C-glikozilne aminokiseline i njihovi derivati čine svestrane gradivne jedinice od značaja za različita područja istraživanja te se široko primjenjuju u sintezi glikomimetika, peptidomimetika i foldamera.⁸⁰

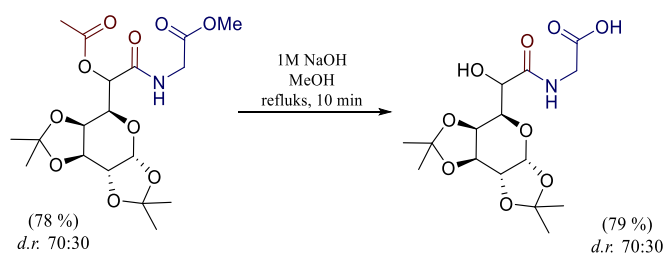
Ovi rezultati potvrđuju Passerinijevu reakciju kao učinkovit metodološki pristup u sintezi strukturno složenih i stereokemijski jasno definiranih glikomimetika.⁷⁵



(c) 23 primjera
do 82 % prinos
do 91:9 d.r.



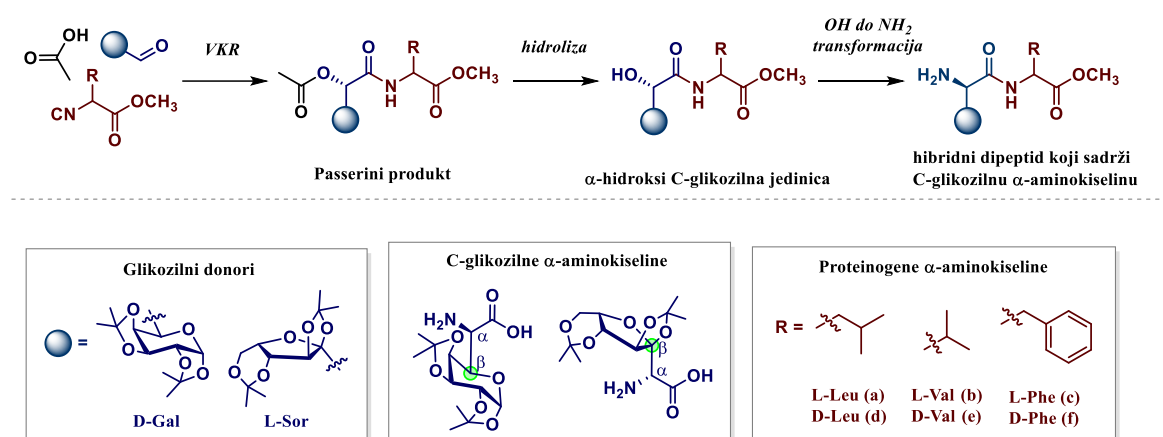
(d)



Slika 16. (A) Passerinijsva reakcija s bis-izopropilidenima zaštićenim aldehydom dobivenim iz *D*-fruktoze. **(B)** Odabir izopropilidenima zaštićenih ugljikohidratnih alhida i ketona kao karbonilnih komponenti Passerinijsve reakcije. **(C)** Odabrani produkti Passerinijsve reakcije. *d.r.* je određen asignacijom ^1H NMR reakcijske smjese; prinosi su navedeni u zagradama.⁷⁵ **(D)** Deprotekcija odabranog Passerinijsvog produkta, u bazičnim uvjetima.⁷⁶

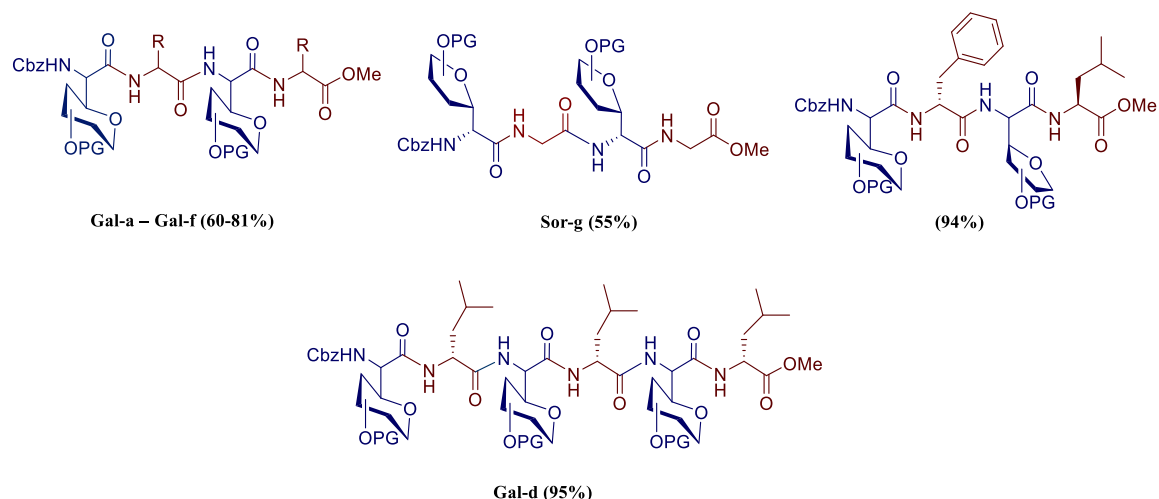
Iako se VKR povijesno ubrajaju među klasične metodološke pristupe sintezi, metodološke strategije koji rezultiraju visokom stereoselektivnošću, osobito u pogledu kontrole konfiguracije novog kiralnog centra koji nastaje VKR, označavaju važnu prekretnicu i početak suvremenog razvoja ove metodologije.

U tom kontekstu unutar naše istraživačke grupe nedavno je razvijena strategija pripreve dipeptidnih struktura primjenom diastereoselektivne Passerinijeve reakcije.⁸¹ Za priprevu dipeptidnih gradivnih blokova korišteni su ugljikohidratni aldehidi dobiveni iz α -D-galaktopiranoze i α -L-sorbofuranoze, zajedno s izocijanidima leucina, valina i fenilalanina u obje kiralne forme, kao i izocijanidom glicina. Naknadnim post-kondenzacijskim modifikacijama α -aciloksiamida omogućena je priprava C-glikozilnih α -aminokiselina, čime su formirani hibridni dipeptidi koji u svojoj strukturi sadrže C-glikozilne α -aminokiseline i proteinogene aminokiseline (Slika 17).



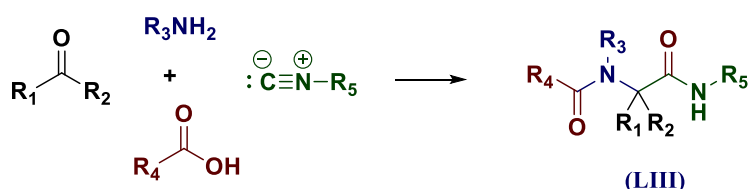
Slika 17. Opći pristup pripravi dipeptida koji sadrže C-glikozilne α -aminokiseline.

Glavno ograničenje razvijene metodologije odnosilo se na činjenicu da su reakcijski produkti dobiveni u obliku smjesa diastereoizomera, koje nije bilo moguće učinkovito razdvojiti tekućinskom kromatografijom na koloni silikagela. Postupak odvajanja je bio spor i nepotpun, što je rezultiralo značajnim gubicima produkata. Stoga su sve daljnje reakcije provedene s produktima u obliku smjese diastereoizomera. Unatoč nevedenom ograničenju, primjenom razvijenog pristupa omogućena je sinteza homo- i heterokiralnih tetramera te heterovalentnih tetramera koji sadrže alternirajuće C-glikozilne α -aminokiseline i proteinogene α -aminokiseline u vrlo dobrim prinosima (Slika 18).



Slika 18. Homo- i heterokiralni te heterovalentnih oligomeri.

Važnost daljnjeg razvoja kemije višekomponentnih reakcija temeljenih na izocijanidima u najvećoj je mjeri određena Ugijevom reakcijom, koju je 1959. godine opisao njemački kemičar Ivar Karl Ugi.^{61,82} Ova klasična četverokomponentna transformacija, u kojoj sudjeluju karboksilna kiselina, karbonilna komponenta (aldehid ili keton), primarni amin i izocijanid, pri čemu se formira odgovarajući α -acilamino amid **LIII**, smatra se jednom od najznačajnijih reakcija u razvoju IVKR (Slika 19).

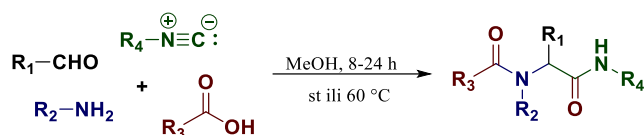


Slika 19. Nastajanje α -acilamino amida četverokomponentnom Ugijevom reakcijom.

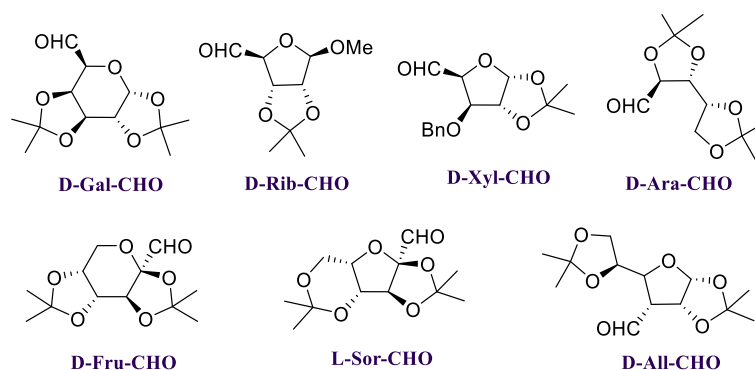
Međutim, razvoj enantioselektivnih varijanti Ugijeve reakcije pokazao se izrazito zahtjevnim, ponajprije zbog ograničenja sličnih onima koja prate Passerinijevu reakciju, a koja se odnose na kontrolu stereoselektivnosti novog kiralnog centra koji nastaje reakcijom. Unatoč navedenim izazovima, tijekom posljednjih desetljeća ostvaren je značajan napredak, a istraživanja usmjerena na razvoj asimetrične Ugijeve reakcije i dalje čine jedno od ključnih područja interesa unutar znanstvene zajednice.⁶¹

U okviru istraživanja provedenih u našoj istraživačkoj grupi razvijena je jednostupanjska *one-pot* četverokomponentna metodologija temeljena na Ugijevoj reakciji, kojom je pripravljena biblioteka N-alkiliranih C-glikozilnih aminokiselinskih derivata sa sedam različitih, izopropilidenima zaštićenih, ugljikohidratnih jedinica (Slika 20a).⁸³ Reakcija se pokazala robusnom i primjenjivom na različite amine i izocijanide, pri čemu su izolirani produkti u prinosima do 85 %. Stereokemijski ishod reakcije u najvećoj mjeri određuje priroda kiralnih, voluminoznih aldehydskih komponenata, a najbolja diastereoselektivnost (80:20 d.r.) postignuta je korištenjem galaktoznog derivata kao ugljikohidratnog aldehyda (Slika 20b).

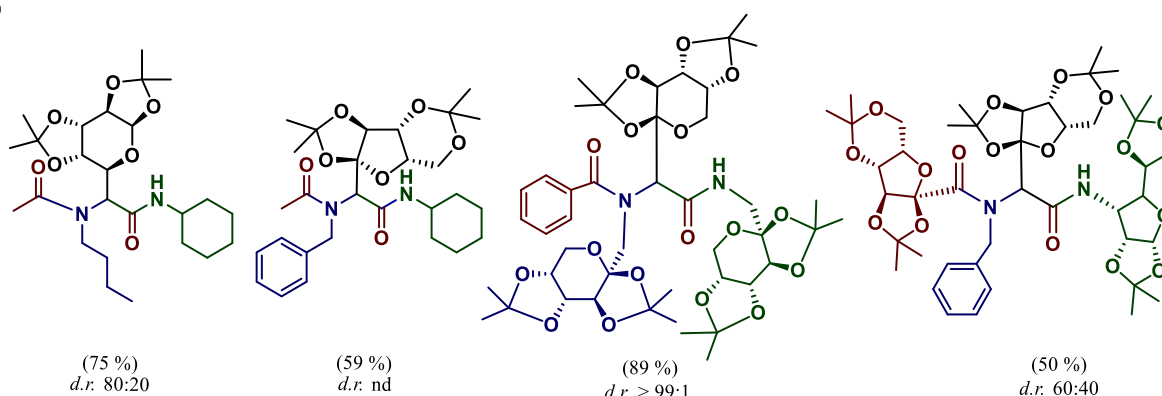
(a)



(b)



(c)



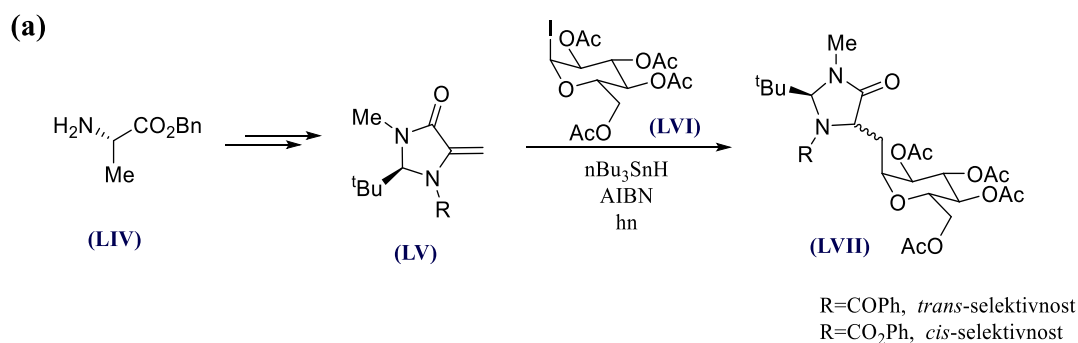
Slika 20. (A) Ugijeva reakcija s aldehydima dobivenim iz odgovarajućih ugljikohidrata. **(B)** Aldehydi odgovarajućih ugljikohidrata korišteni u Ugijevoj reakciji. **(C)** Odabrani produkti Ugijeve reakcije.⁸³

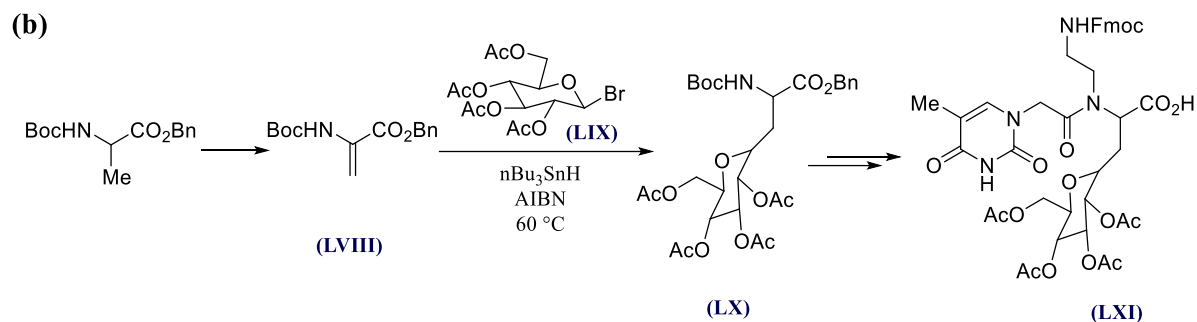
2.1.1.3 Radikalna adicija dehidroalaninskih derivata

Dehidroalanin (Dha) predstavlja post-translacijski modificiranu aminokiselinu koja nastaje enzimskom dehidratacijom serinskih ili treoninskih ostataka. Zbog svoje izražene elektrofilne prirode, Dha se široko primjenjuje u peptidnoj kemiji, osobito u Michaelovim adicijama, cikloadicijama, hidrogenacijama, reakcijama unakrsnog povezivanja, fotoredoks katalizama te reakcijama ciklopropanacije.⁸⁴

Adamson i suradnici 2004. godine prvi su sintetizirali imidazolidinon polazeći od alanina **LIV**, nakon čega su, pod katalitičkim uvjetima s kositrenim spojevima, proveli radikalnu adiciju derivata imidazolidinona **LV** s jodiranim šećerom **LVI**.⁸⁵ Ova transformacija rezultirala je *cis*-glikoziliranim derivatima imidazolidinona **LVII**, koji sadrže alaninsku jedinicu, uz visoku diastereoselektivnost (Slika 21a). Zanimljivo, stereoselektivnost reakcije pokazala se izrazito ovisnom o *N*-supstituentu imidazolidinonskog prstena. Točnije, za *N*-arilne supstrate dobiveni su *trans*-produkti, dok su *N*-ariloksikarbonilni supstrati doveli do *cis*-produkata (Slika 21a).

Nedugo nakon toga, 2006. godine Hamzavi i suradnici prvi su sintetizirali glikozilirani alanin putem radikalne adicije između Dha **LVIII** i galaktozil-bromida **LIX**.⁸⁶ Nadalje, dobiveni glikozilirani alanin **LX** mogao se prevesti u glikozilirani timinski monomer peptidne nukleinske kiseline (PNA) **LXI** (Slika 21b). Značajno je da ugradnja glikoziliranih timinskih PNA jedinica u oligomere rezultira povećanjem temperature taljenja (T_m) te poboljšanjem topljivosti oligomera u odnosu na uobičajene PNA oligomere.



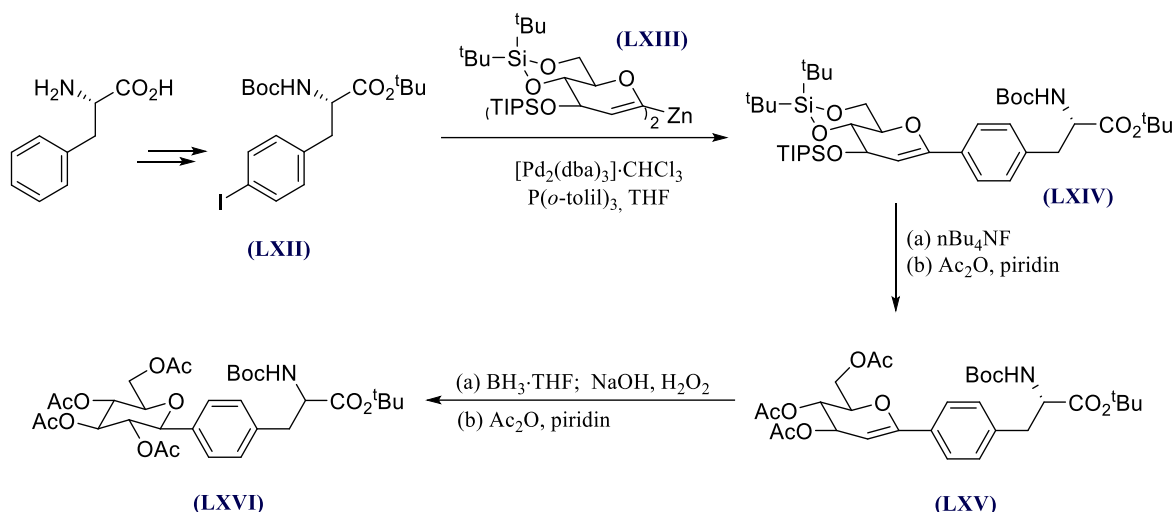


Slika 21. (A) Radikalna adicija derivata imidazolidinona.⁸⁵ (B) Radikalna adicija derivata dehidroalanina i njegova primjena u glikoziliranom timinskom monomeru peptidne nukleinske kiseline (PNA).⁸⁶

2.1.1.4. Reakcije unakrsnog povezivanja katalizirane prijelaznim metalima

Reakcije unakrsnog povezivanja (engl. „*cross-coupling reactions*“), među koje se ubrajaju Suzuki–Miyaura, Ullmann, Mizoroki–Heck, Stille, Sonogashira i Negishi reakcije, obilježile su razvoj suvremenih sintetskih metodologija. Ovi katalitički procesi omogućuju selektivno i učinkovito formiranje ključnih C–C veza, a odlikuju se širokom primjenjivošću u sintezi složenih organskih molekula i prirodnih produkata. Njihovo daljnje unapređenje primjenom modernih metoda sinteze omogućilo je prevladavanje ranijih ograničenja i značajno proširilo područje njihove primjene.

Relevantnost ovih metodologija potvrđuju i brojni primjeri iz literature. Jedan od značajnijih primjera primjene reakcija unakrsnog povezivanja u području sinteze C-glikozilnih aminokiselina predložili su Ousmer i suradnici 2006. godine. Razvijena je učinkovita Pd-katalizirana Negishi reakcija unakrsnog povezivanja između 4-jodofenilalanina **LXII** i Zn-glukala **LXIII**, koja rezultira nastajanjem *p*-(β-C-glukopiranozil)-fenilalaninskog derivata **LXIV**. Daljnja transformacija glikala **LXV** provedena je hidroboriranjem i naknadnom oksidacijom, pri čemu je dobiven odgovarajući glikozil **LXVI** (Slika 22).⁸⁷

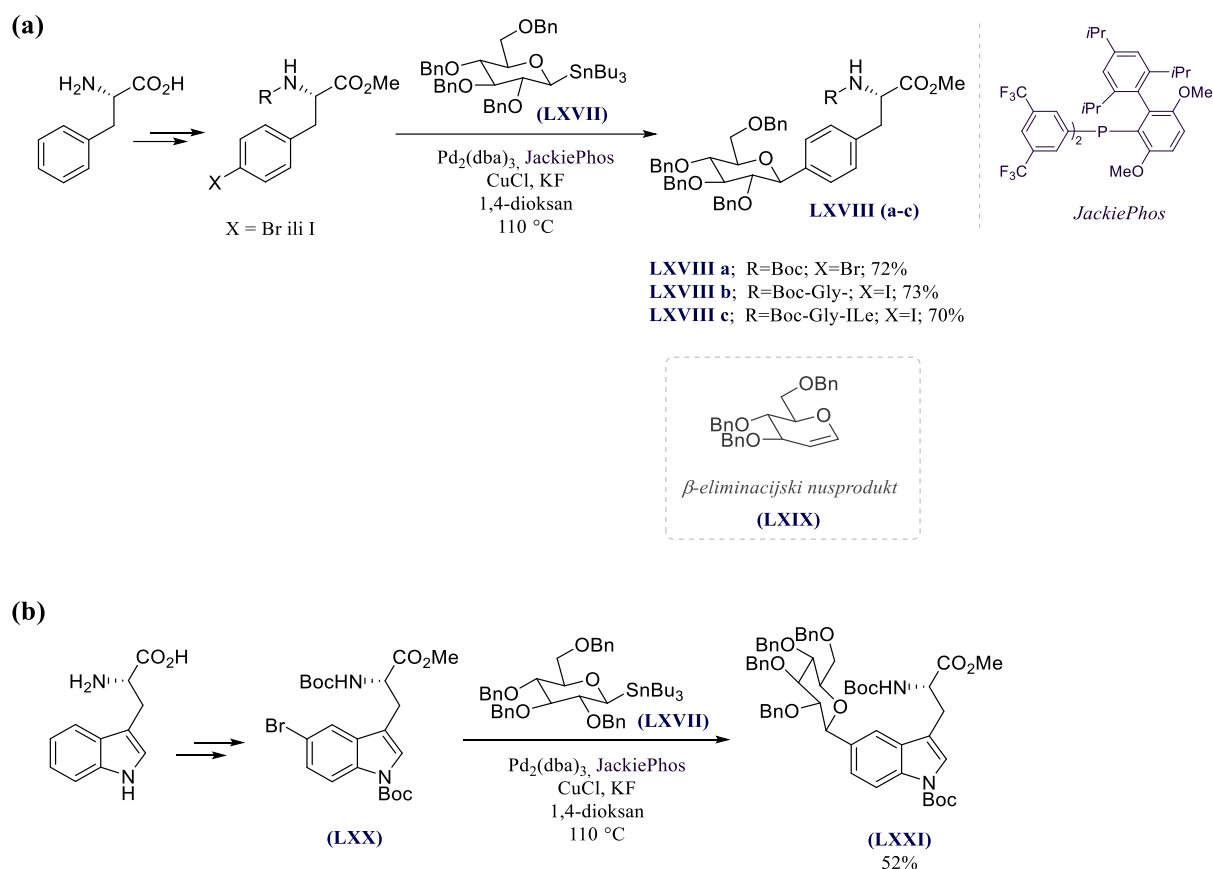


Slika 22. Pd-katalizirana Negishi reakcija unakrsnog povezivanja za sintezu glikozil fenilalanina.⁸⁷

Na temelju prethodnih istraživanja metodologija je dodatno proširena. Zhu i suradnici 2016. godine razvili su Pd-kataliziranu Stille-Migata reakciju unakrsnog povezivanja, koja nadilazi ograničenja ranijih strategija, zamjenom Zn-glukala konfiguracijski stabilnim glukala-stanonom **LXVII**, čime je omogućena učinkovita sinteza glikoaminokiselina (**LXVIIIa**) i glikopeptida (**LXVIIIb**, **LXVIIIc**) (Slika 23a).⁸⁸ Rezultirajuća visoka stereoselektivnost proizlazi iz sinergije konfiguracijske stabilnosti stanana i stereospecifične prirode reakcije unakrsnog povezivanja. Posebno je značajno da se kompetitivna β -eliminacija C2 benziloksi skupine, koja dovodi do nusprodukta **LXIX**, gotovo u potpunosti može spriječiti pažljivim odabirom voluminoznog fosfinskog liganda (JackiePhos) čime se ujedno poboljšava kemoselektivnost procesa (Slika 23a).

Osim toga, razvijena metodologija pokazala je široku primjenjivost na različite supstrate s raznovrsnim funkcijskim skupinama, pri čemu se ne bilježi značajno smanjenje prinosa ili selektivnosti. Primjerice, primjena bromiranog derivata triptofana **LXX** rezultirala je formiranjem triptofan-C2-glukozida **LXXI** uz prinos od 52 % (Slika 23b). Ovaj rezultat jasno potvrđuje potencijal Pd-kataliziranih reakcija unakrsnog povezivanja u stereokontroliranoj funkcionalizaciji strukturno složenih aminokiselinskih i peptidnih supstrata, otvarajući put razvoju novih bioaktivnih glikopeptidnih motiva. Razmatrana reakcija odlikuje se visokom tolerancijom prema različitim funkcijskim skupinama, što je od posebne važnosti u sintezi

glikopeptida, a ujedno omogućuje preciznu kontrolu anomerne konfiguracije zahvaljujući stereospecifičnoj prirodi unakrsnog povezivanja.



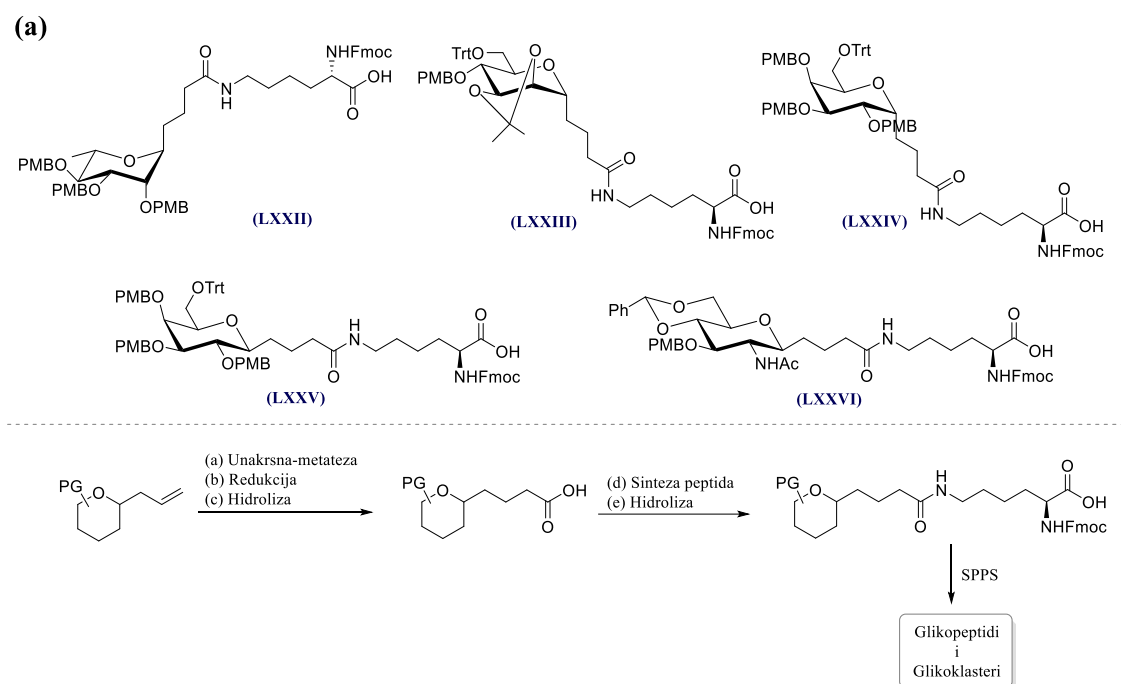
Slika 23. Pd-katalizirana Stille-Migata reakcija unakrsnog povezivanja za sintezu C-glikozinih aminokiselina. **(A)** Pd-katalizirana Stille-Migata reakcija unakrsnog povezivanja halogeniranih derivata fenilalanina. **(B)** Pd-katalizirana Stille-Migata reakcija unakrsnog povezivanja bromiranih derivata triptofana.⁸⁸

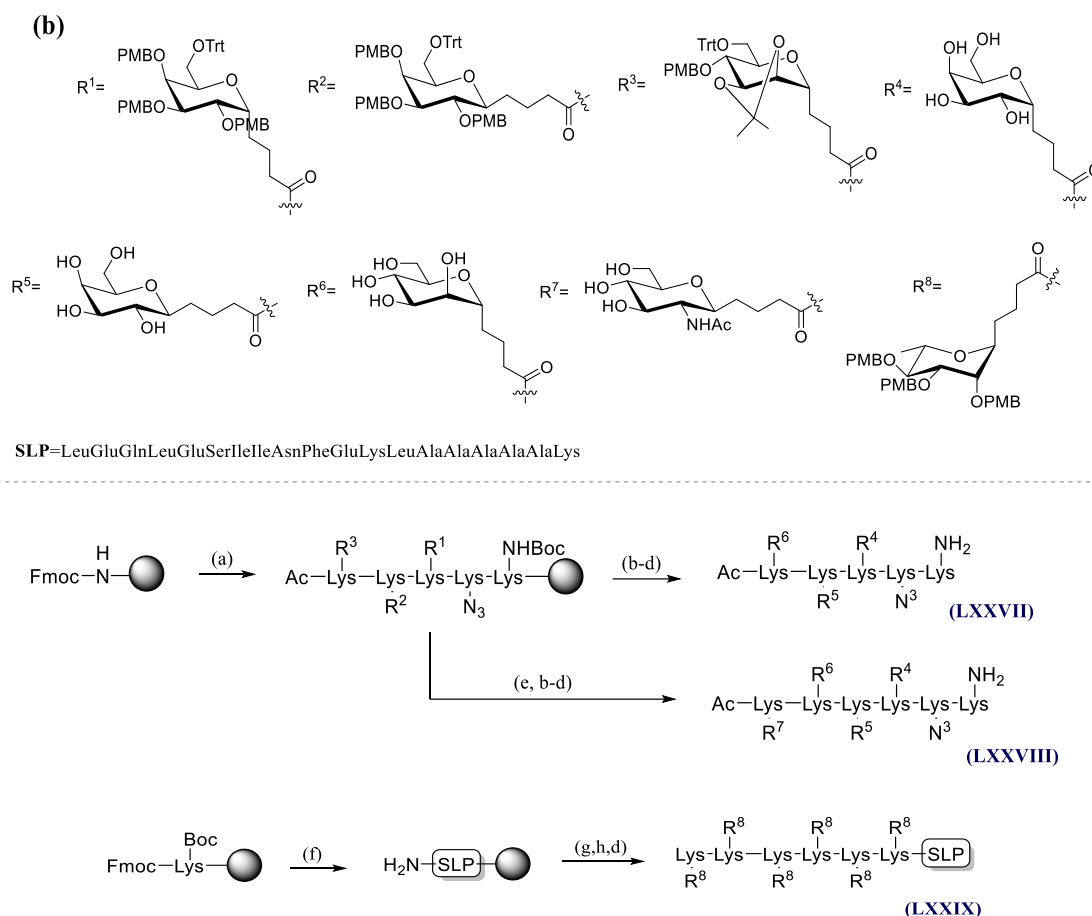
Oba primjera reakcija unakrsnog povezivanja, Negishi i Stille–Migata, zahtijevaju prethodno aktivirane Zn- ili Sn-glikozilne prekursore visoke reaktivnosti, što nameće potrebu za pažljivim odabirom reakcijskih uvjeta i primjenu složenih metoda pripreve. Posljedično, razvoj novih sintetskih metodologija koje ne zahtijevaju prethodnu aktivaciju glikozilnih partnera predstavlja istodobno značajan izazov i važnu smjernicu za daljnji napredak u modernoj glikokemiji.

2.1.1.5. Sekvencijalna sinteza C-glikozilnih gradivnih blokova

Reintjens i suradnici, 2020. godine dizajnirali su i sintetizirali C-glikozilne gradivne blokove lizina, funkcionaliziranih derivatima α -ramnoze, α -manoze, α - i β -galaktoze te β -*N*-acetilglukozamina.³⁶ Ovi derivati, koji u svojoj strukturi sadrže zaštitne skupine osjetljive na djelovanje kiselina, pokazali su se prikladnima za daljnju sintezu multivalentnih glikopeptida na čvrstoj fazi (SPPS). Polazeći od C-alil glikozida, navedeni gradivni blokovi dobiveni su Grubbsovom unakrsnom metatezom, praćenom redukcijom dvostruke veze u rezultirajućim α,β -nezasićenim esterima, nakon čega je uslijedilo oslobađanje karboksilata, što je u konačnici omogućilo njihovu kondenzaciju s bočnim lancem lizina (Slika 24a).

Dobiveni C-glikozidi korišteni su u SPPS sintezi glikopeptida, čime je potvrđen njihov potencijal za sintezu dobro definiranih mimetika homo- i heteromultivalentnih glikopeptida i glikoklastera (Slika 24b). Međutim, glavno ograničenje metodologije leži u niskom prinosu, odnosno nedostatnoj količini konačnih produkata (1,8–3,4 mg) potrebnj za detaljnu strukturnu karakterizaciju.





Slika 24. (A) Struktura C-glikozidnih gradivnih blokova za SPSS LXXII-LXXVI. Sinteza C-glikozidnih gradivnih blokova za SPSS; PG: zaštitna skupina. **(B)** SPSS sinteza glikopeptida LXXVII, LXXVIII, LXXIX. Reagensi i uvjeti: **a)** i. 20 % piperidin, DMF; **ii.** Fmoc SPSS sinteza za Lys(α -C-Man)-Lys(β -CGal)-Lys(α -C-Gal)-Lys(N₃)-Lys(Boc); **iii.** 20 % piperidin, DMF; **b)** Ac₂O, DIPEA, DMF; **c)** TFA/TIS/H₂O (95:2,5:2,5 v/v/v), 3 h; **d)** RP-HPLC; **e)** i. LXXVI, HCTU, DIPEA, DMSO, 50 °C, 2 h; **ii.** LXXVI, HCTU, DIPEA, DMSO, o/n; **iii.** 20 % piperidin, DMF; **f)** i. Fmoc SPSS sinteza za LEQLESIINFEKLAAAAA; **ii.** 20 % piperidin, NMP; **g)** i. LXXII, PyBOP, NMM, NMP; **ii.** 20 % piperidin, NMP; **iii.** ponoviti i. te **ii.** pet puta; **h)** TFA/TIS/H₂O (93:2:5 v/v/v). Prinos sintetiziranih glikopeptida: LXXVII 3,4 mg, 5 %; LXXVIII 1,8 mg, 2 %; LXXIX 2,6 mg, 6 %.³⁶

Klasične reakcije zauzimaju značajno mjesto u sintetskoj kemiji zahvaljujući svojoj robustnosti i pouzdanosti te mogućnosti provedbe na većoj skali. Dodatna prednost temelji se na korištenju lako dostupnih i cjenovno prihvatljivih polaznih reagensa, dok se sama provedba reakcija odlikuje reproducibilnošću i konzistentnim rezultatima. Međutim, navedene metodologije pokazuju ograničenja u pogledu kontrole stereokemijskog ishoda reakcije, budući da često rezultiraju smjesama stereoisomera koje je otežano učinkovito razdvojiti konvencionalnim kromatografskim tehnikama. Navedena ograničenja potaknula su razvoj

suvremenih sintetskih pristupa koji omogućuju postupnu funkcionalizaciju, prilagodljivost različitim supstratima te znatno bolju kontrolu stereokemijskog ishoda reakcije. Suvremene strategije predstavljaju važnu poveznicu između klasičnih i modernih metodologija, čime su bitno pridonijele razvoju učinkovitijih i selektivnijih sintetskih rješenja.

2.1.2. *Moderne metode sinteze*

2.1.2.1. Vidljivim svjetlom potaknute fotokatalitičke reakcije

Primjena vidljive svjetlosti u organskoj sintezi omogućila je razvoj novih metodoloških pristupa u skladu s načelima zelene kemije. Fotokataliza se pritom izdvojila kao široko primjenjiva sintetska strategija za provođenje fotoredoks reakcija, unakrsnog povezivanja te C–H funkcionalizacije, koje se odvijaju pod blagim reakcijskim uvjetima uz visoku selektivnost. Pobuđeni fotokatalizatori iniciraju prijenos elektrona i generiraju reaktivne radikalske međuprodukte, čime omogućuju kemijske transformacije teško izvedive konvencionalnim metodama.^{89–91} Zahvaljujući visokoj kemoselektivnosti, širokoj kompatibilnosti s funkcionalnim skupinama i jednostavnosti provedbe, fotokataliza vidljivim svjetlom danas predstavlja jedno od središnjih područja razvoja modernih sintetskih metodologija, s rastućim značajem u razvoju učinkovitih strategija glikozilacije.^{90,92}

Među glikopeptidima posebno se ističe manoziltriptofan, jedini do sada poznati prirodni C-glikopeptid. Budući da C-glikozilacija predstavlja rijetku i još uvijek nedovoljno istraženu posttranslacijsku modifikaciju, sinteza manoziltriptofana ima posebno značenje u razvoju sintetskih metoda usmjerenih na pripravu C-glikoziliranih peptida. Dosadašnja istraživanja pokazala su da ovaj peptidni motiv, osim što može poslužiti kao modelni sustav za proučavanje stabilnosti, konformacijskih obilježja i biološke uloge C-glikoziliranih peptida, ujedno predstavlja i vrijedan alat za ispitivanje učinkovitosti različitih sintetskih strategija. Stoga pregled pristupa njegovoj sintezi predstavlja važan doprinos razvoju metodologija za pripravu i daljnje istraživanje C-glikopeptida.

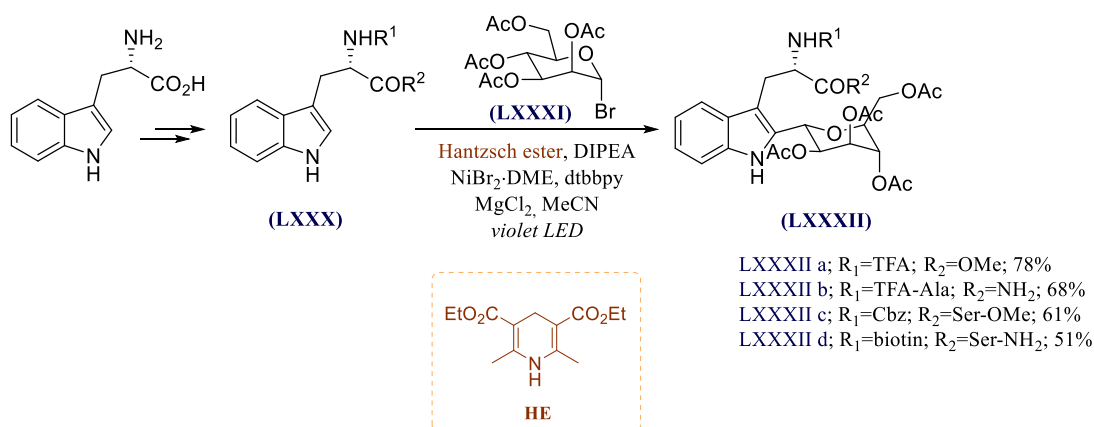
Brojni pristupi sintezi Trp(Man) opisani su u literaturi, no raniji metodološki pristupi zahtjevali su višestupanjske sinteze, a rezultirali su niskim iskorištenjem, čime je onemogućeno dobivanje produkta u gramskim količinama potrebnim za automatiziranu sintezu peptida na

čvrstoj fazi. Kasniji pristupi, temeljeni na primjeni pomoćnih usmjeravajućih skupina, omogućili su unaprijeđenje selektivnosti, ali su istodobno rezultirali anomerizacijom ciljanog spoja.^{93–96}

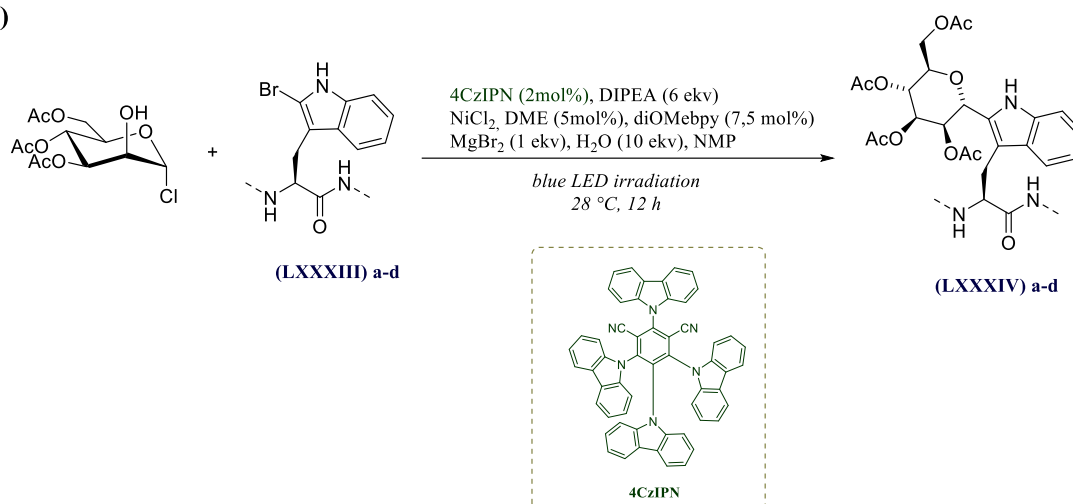
Značajan iskorak ostvaren je 2021. godine od strane Mao i suradnika, razvojem Ni-katalizirane reakcije unakrsnog povezivanja derivata 2-bromotriptofana **39** s komercijalno dostupnim manozil-bromidom **LXXXI**, kojom su postignuti prinosi od 72–78 % (Slika 25a). Metoda se odlikuje visokom stereokontrolom i tolerancijom prema različitim funkcijskim skupinama jasno demonstrirajući potencijal fotokatalitički induciranih procesa kataliziranih prijelaznim metalima za selektivnu i održivu sintezu glikopeptida.⁹⁷

Premda se tercijarni amin mogao koristiti kao terminalni reducens i baza u Ni/fotoredoks dualnoj katalizi, no valja naglasiti da se primjena isključivo DIPEA pokazala nedostatnom, rezultirajući niskim prinosima. Sustavna optimizacija reakcijskih uvjeta pokazala je da je najučinkovitiji aditiv dietil 1,4-dihidro-2,6-dimetil-3,5-piridin-karboksilat (engl. „*Hantzsch ester*“, HE), koji može istodobno djelovati kao fotoreducens i fotokatalizator. Fotoekscitirani HE bio je dovoljan za redukciju niklovih vrsta, čime se inicira katalitički ciklus bez potrebe za dodatnim redukcijskim agensima (Slika 25a). Kako bi se procijenila širina primjenjivosti metodologije, provedena su istraživanja na peptidima kao većim i strukturno složenijim supstratima. Dobiveni rezultati su pokazali da reakcija nije ograničena samo na dipeptide koji sadrže derivate 2-bromotriptofana, već je kompatibilna i s polipeptidima (Slika 25a-c).

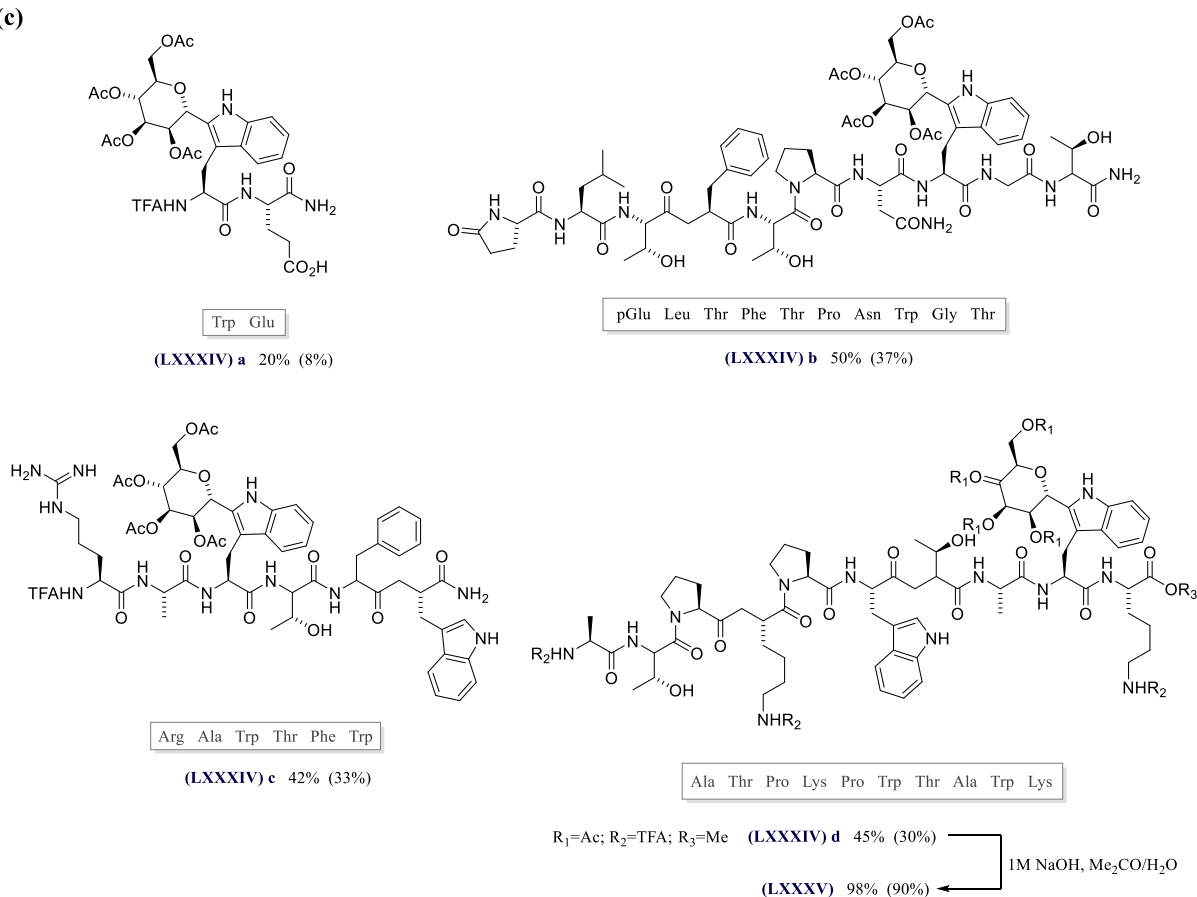
(a)



(b)



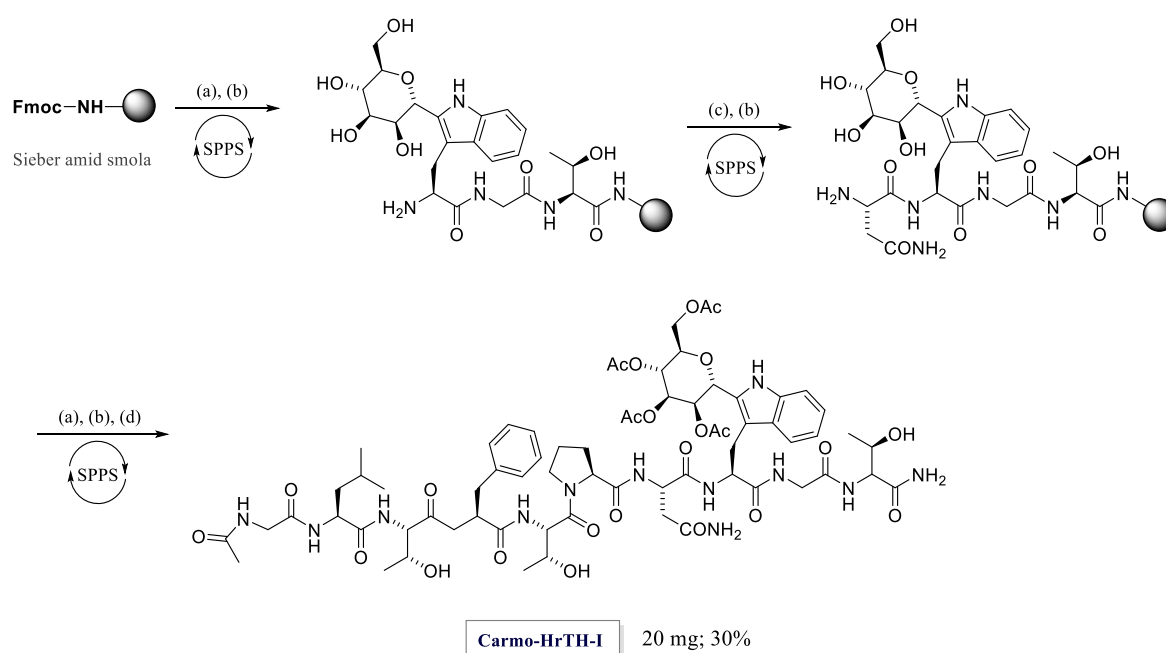
(c)



Slika 25. (A) Fotoredoks/Ni dualna katalitička reakcija unakrsnog povezivanja halogeniranih aminokiselina (Trp) s bromiranim ugljikohidratima uz fotokatalizator HE. **(B)** α -C-manozilacija peptida koji sadrže 2-bromo-L-triptofanski ostatak uz fotokatalizator 4CzIPN. **(C)** Odabrani primjeri glikoziliranih peptida LXXXIV (a-d); (prinos određen metodom HPLC prikazan je izvan zagrade; prinos nakon pročišćavanja peptida naveden je unutar zagrade).⁹⁷

Glavna prednost ranije opisanih metodologija proizlazi iz njihove cjenovne pristupačnosti, jer ne zahtijevaju korištenje fotokatalizatora (engl. „PC-free“), dok su istodobno ograničene slabom topljivošću supstrata u acetonitrilu (Slika 25a). S druge strane, metodologija koja uključuje fotokatalizator 4CzIPN, omogućuje učinkovitu C-manozilaciju većih i strukturno složenijih peptidnih supstrata zahvaljujući visokoj kompatibilnosti s polarnim aprotičnim otapalima te u prisutnosti vode (Slika 25b,c).

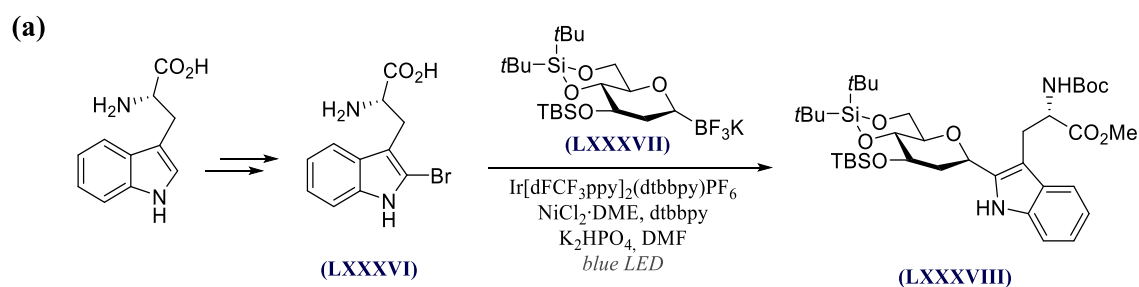
Zahvaljujući prethodno navedenim postignućima, provedena je automatizirana sinteza C-manoziliranih glikopeptida na čvrstoj fazi, što je omogućilo mapiranje epitopa specifičnog antitijela i rezultiralo prvom potvrđenom sintezom Carmo-HrTH-I (Slika 26), C-manoziliranog neuropeptidnog hormona (HrTH) identificiranog u *Carausius morosus*.⁹⁸



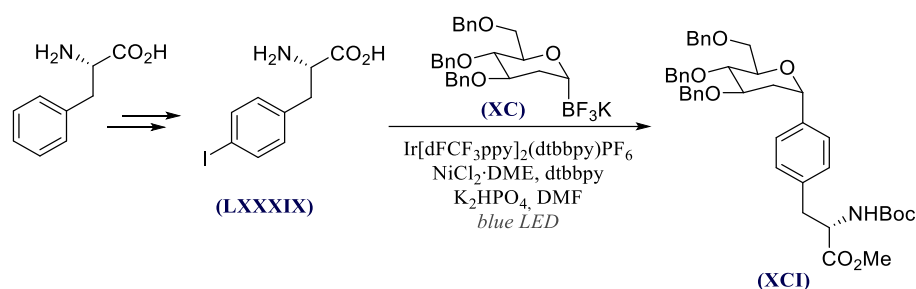
Slika 26. Totalna sinteza **Carmo-HrTH-I** (automatizirana SPPS). Reakcijski uvjeti: **(a)** 4 ekv Fmoc-Xxx-OH, 1,25 ekv DIPEA, 5 ekv DIC, 5 ekv Oxyma, mikrovalovi 50 °C, 10 min; **(b)** pirolidin/DMF (1:4), s.t. 5 min; **(c)** 4 ekv Fmoc-Asn-OH, 4 ekv DIPEA, 4 ekv HATU, 20 ekv HOBt, mikrovalovi 50 °C, 1 h; **(d)** TFA/TIPS/DMB/CH₂Cl₂ (1:4:5:90), s.t. 10 min.⁹⁷

Nadovezujući se na prethodna otkrića, Takeda i suradnici 2021. godine, proveli su fotoredoks/Ni dualnu katalitičku reakciju unakrsnog povezivanja između derivata 2-bromotriptofana **LXXXVI** i derivata 2-deoksiglikozilnih boronskih kiselina **LXXXVII** (Slika 27a). U usporedbi s drugim glikozilnim reagensima, glikozil-trifluoroborati ističu se kao ekološki prihvatljivi reagensi prilikom provođenja reakcija unakrsnog povezivanja. Reakcijski sustav pokazao je očuvanje stereo-konfiguracije te omogućio visoku anomernu selektivnost u sintezi derivata α -2-deoksi-C-manozil-triptofana **LXXXVIII** iz odgovarajućih β -glikozil-trifluoroborata.⁹⁹

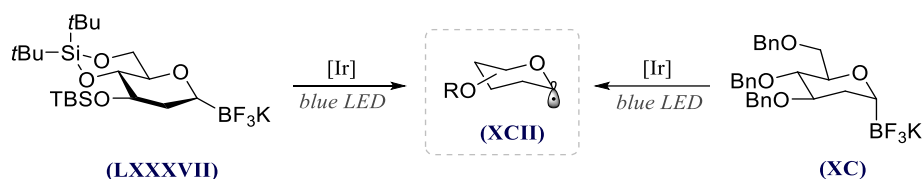
Slijedom otkrića Takeda i suradnika, nedugo zatim Miller i suradnici razvili su fotoredoks/Ni dualnu katalitičku reakciju unakrsnog povezivanja između derivata 4-jodofenilalanina **LXXXIX** i α -anomernog trifluoroboratsnog ugljikohidrata **XC**, što je omogućilo učinkovitu sintezu α -glikozida **XCI** (Slika 27b).¹⁰⁰ Za razliku od pristupa Takeda i suradnika, ranije navedena transformacija rezultira stereokemijskom inverzijom, koja proizlazi iz standardne konformacije stolca **XCII**, pri čemu je α -radikal stabiliziran intramolekulskom interakcijom s atomom kisika u piranoznoj konformaciji (Slika 27c).¹⁰⁰ Takva stereokemijska razlika posebno je značajna jer otvara nove mogućnosti za selektivnu sintezu C-glikozidnih veza s kontroliranom anomernom konfiguracijom, čime se ostvaruje značajan doprinos razvoju metoda za pripravu glikopeptida i drugih biološki relevantnih konjugata.^{25,101}



(b)



(c)



Slika 27. (A) Fotoredoks/Ni dualna katalitička reakcija unakrsnog povezivanja halogeniranih aminokiselina (bromo-triptofanski derivati) s ugljikohidratnim trifluoroboratima.⁹⁹ (B) Fotoredoks/Ni dualna katalitička reakcija unakrsnog povezivanja halogeniranih aminokiselina (jodo-fenilalaninski derivati) s ugljikohidratnim trifluoroboratima.¹⁰⁰ (C) Predložen ključni radikalski međuprodukt koji određuje stereoselektivnost reakcije.¹⁰⁰

Kombinacijom vidljivog svjetla i Ni-katalize omogućene su reakcije koje bi klasičnim metodama bile dugotrajne ili čak neizvedive, dok je uporabom lako dostupnih i ekonomski prihvatljivih reagenasa dodatno istaknuta održivost i praktična primjenjivost ovog pristupa u sintetskoj kemiji. Na taj način su otvorene nove perspektive u razvoju fotokatalitičkih metodologija za kompleksne bioaktivne molekule, uključujući stereospecifične glikopeptide, pri čemu je potreba za prethodnom aktivacijom glikozilnih partnera značajno smanjena.⁹⁷

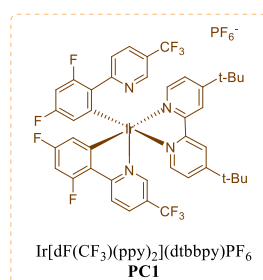
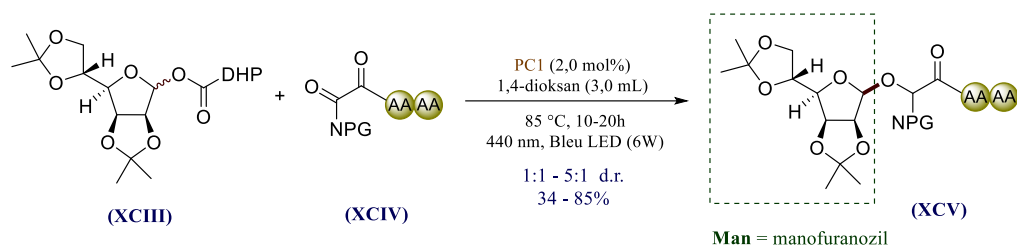
U sljedećem istraživanju, metodologija je dodatno proširena. Razvoj opće i učinkovite metode za sintezu alkil C-glikoaminokiselina ili C-glikopeptida iz lako dostupnih početnih materijala pri blagim reakcijskim uvjetima i dalje predstavlja značajan izazov. Radikalska glikozilacija istaknula se kao kao značajno istraživačko područje zbog visoke kemoselektivnosti i precizne kontrole konfiguracije na anomernom ugljiku šećera. Sve veći broj studija jasno potvrđuje da radikalska glikozilacija postpuno zauzima središnje mjesto među inovativnim strategijama u modernoj organskoj sintezi. Kao prekursori glikozilnih radikala intenzivno se istražuju različiti neprirodni glikozilni derivati, uključujući glikozil-halogenide,¹⁰² ksantate,¹⁰² sulfone,¹⁰³ glikozilne derivate dihidropiridina (DHP),^{96,104}

glikozilne karboksilne kiseline,^{105,106} redoks-aktivne estere,^{45,107} te anomerne nukleofile.^{99,100} Unatoč tome, višestupanjske sinteze, nestabilnost, specifični uvjeti pojedinih reakcija te ograničen raspon šećera i dalje predstavljaju ključne prepreke koje umanjuju praktičnu primjenjivost ovih neprirodnih glikozilnih derivata. Nesumnjivo, idealna strategija za generiranje glikozilnih radikala bila bi izravno homolitičko cijepanje anomernih C(sp³)–OH veza u prirodnim ugljikohidratima.¹⁰⁸

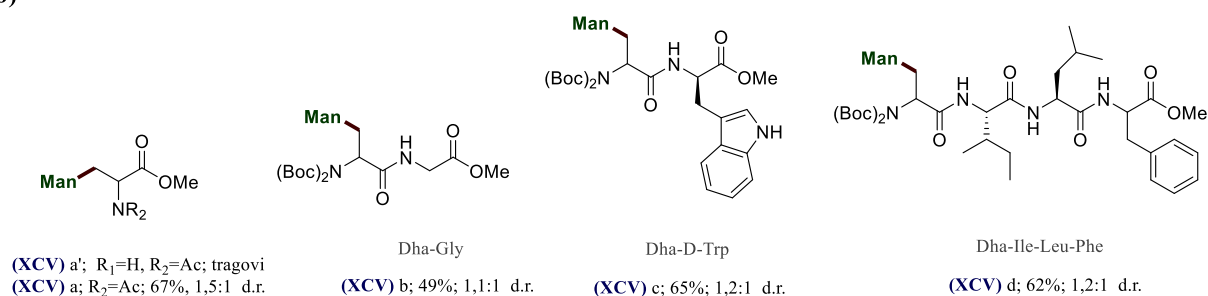
Slijedom ranije navedenog, Chen i suradnici 2023. godine razvili su prvi primjer vidljivim svjetlom potaknute fotoredoks-katalizirane C(sp³)-glikozilacije redoks-aktivnih glikozilnih DHP estera **XCIII** s derivatima dehidroalanina (Dha) **XCIV**, koja se odvija putem homolitičkog cijepanja anomerne C(sp³)–O veze i omogućuje učinkovitu sintezu alkil C-glikoaminokiselina i C-glikopeptida (Slika 28a).¹⁰⁸ Zahvaljujući blagim fotokatalitičkim uvjetima, ova transformacija pokazuje široku kompatibilnost s ugljikohidratnim supstratima i Dha-peptidima, rezultirajući pritom različitim C-glikozilnim aminokiselinama i C-glikopeptidima u dobrim prinosima, uz izvrsnu anomernu kontrolu i dobru dijastereoselektivnost. Posebno je značajno što se lako dostupni i stabilni glikozilni DHP esteri učinkovito uključuju u radikalsku glikozilaciju, čime se omogućuje priprava C-glikozil alaninskih jedinica koje sadrže i strukturno zahtjevnije šećere, poput 2-deoksiriboza i oligosaharida **XCv a-d** (Slika 28b). Stoga ova alkil C-glikozilacija glikozilnih estera putem homolize anomerne C–O veze ne samo da proširuje područje radikalske glikozilacije, već predstavlja i snažan alat u razvoju glikopeptidnih terapijskih kandidata.

Na temelju preliminarnih rezultata i dostupnih literaturnih podataka, predložen je mehanizam razmatrane radikalske reakcije (Slika 28c). Pod plavim LED zračenjem, fotokatalizator [PC] ekscitiran je u tripletno stanje [PC]*, čime je omogućena SET oksidacija supstrata **A** u međuprodukt **B**. Naknadna deprotonacija i radikalska fragmentacija rezultira nastajanjem alkoksikarbonilnog radikala **C** te Hantzschovog derivata piridina **D**. Slijedom dekarboksilacije, potaknute eliminacijom CO₂, generiran je aktivni glikozilni radikal **E**. Njegovom adicijom na kiralni dehidroalanin (Dha) dobiven je radikalski međuprodukt **F**. U završnom koraku, međuprodukt **F** podliježe SET procesu s reduciranim fotokatalizatorom [PC]^{•-} te je, nakon protonacije, dobiven željeni produkt **H**, čime je katalitički ciklus zatvoren.¹⁰⁸

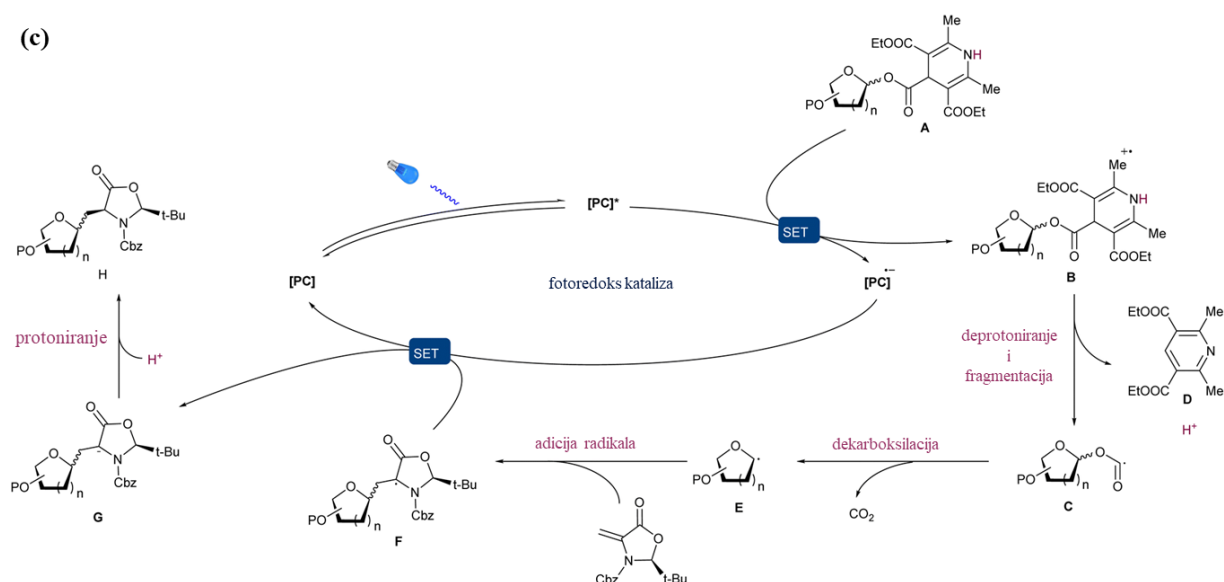
(a)



(b)



(c)



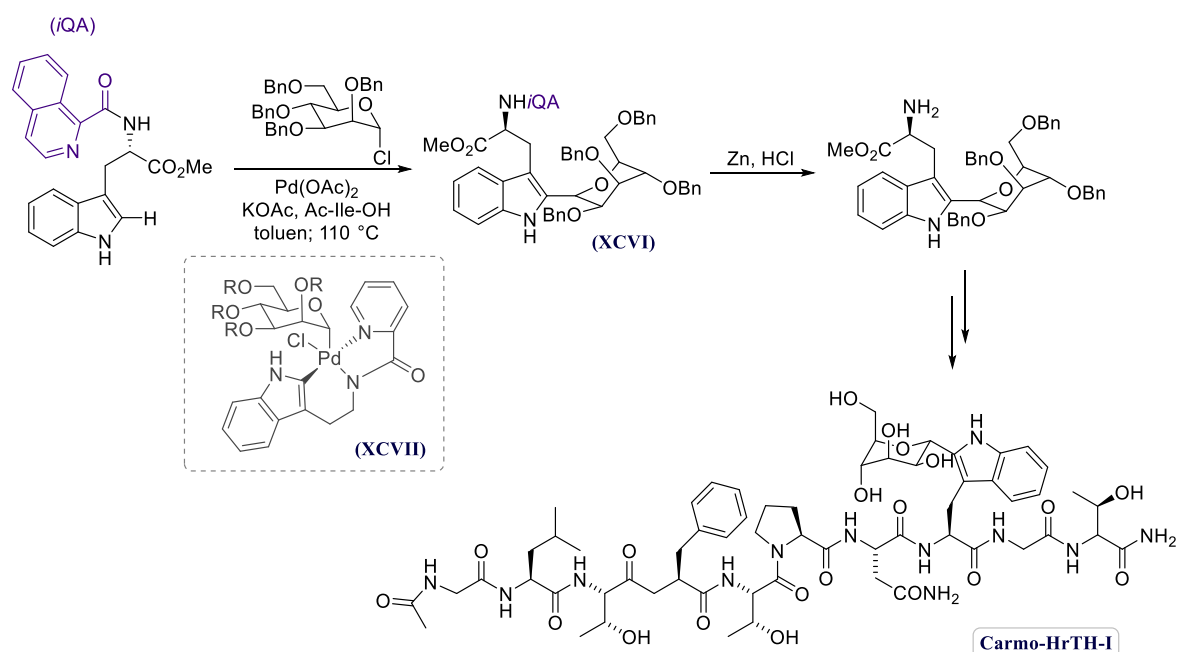
Slika 28. (A) Alkil C-glikozilacija glikozilnih estera homolitičkim cijepanjem anomerne $C(sp^3)$ -OH veze. **(B)** Odabrani primjeri produkata. **(C)** Predložen mehanizam.

2.1.2.2. Izravna C–H aktivacija

Izravne C–H aktivacijske reakcije razvijene su kao jedna od najefikasnijih strategija moderne organske kemije, budući da omogućuju selektivnu funkcionalizaciju aminokiselina bez potrebe za prethodnom aktivacijom ili zaštitom C–H veza, što je karakteristično za klasične reakcije unakrsnog povezivanja. Ovakav pristup sintezi značajno unapređuje ekonomičnost sintetskih koraka te ujedno smanjuje generiranje nusprodukata. Štoviše, izravna C–H aktivacija aminokiselina pokazala se vrlo učinkovitom i obećavajućom metodom za brzu i selektivnu sintezu različitih neprirodnih aminokiselina i derivatiziranih peptida, čime se otvaraju nove mogućnosti u dizajnu peptidnih lijekova i funkcionalizaciji biomolekula.^{109–116}

2.1.2.2.1. C(sp²)–H glikozilacija aminokiselina

Wang i suradnici 2021. godine predložili su Pd-kataliziranu C(sp²)–H glikozilaciju triptofana, koristeći *N,N*-bidentatni 8-aminokinolin (AQ) kao usmjeravajuću skupinu, što predstavlja prvi primjer izravne C(sp²)–H glikozilacije aminokiselina. Primjenom ovog pristupa uspješno je dobivena C2- α -manopiranozna (Man)–Trp jedinica **XCVI**, što ilustrira učinkovitost metode za selektivnu sintezu derivatiziranih peptida (Slika 29).⁹³



Slika 29. Pd-katalizirana C(sp²)–H glikozilacija triptofana s *N,N*-bidentatnim izokinolin-1-karboksamidom (iQA) i njena primjena u totalnoj sintezi Cam-HrTH-I.⁹³

Nadalje, uklanjanjem pomoćne skupine potvrđena je široka primjenjivost metode, koja se pokazala učinkovitom i u totalnoj sintezi dekamernog glikopeptida Cam-HrTH-I, pri čemu je zabilježena zanemariva racemizacija. Računalne studije temeljene na teoriji funkcionala gustoće (DFT) dodatno su razjasnile reakcijski mehanizam, ukazujući da reakcija napreduje usklađenim mehanizmom oksidativne adicije. U toj fazi dolazi do formiranja Pd(II) cikličkog međuprodukta **XCVII** u reakciji s α -manozil-kloridnim donatorom, što omogućuje stereospecifičnu funkcionalizaciju.⁹⁷

2.1.2.2.2. C(sp³)–H glikozilacija aminokiselina

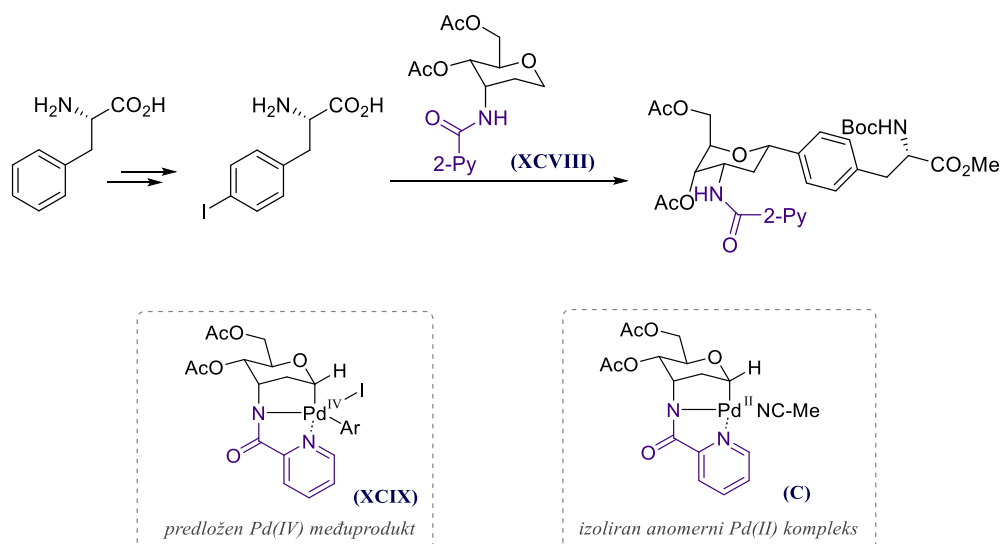
Za razliku od C(sp²)–H aktivacije, koja je tijekom proteklog desetljeća ostvarila značajan napredak i našla široku primjenu u funkcionalizaciji biomolekula, selektivna C(sp³)–H aktivacija i dalje ostaje iznimno zahtjevan metodološki izazov. Glavni razlog proizlazi iz slabe reaktivnosti alifatskih C–H veza, čije vrlo slične energijske barijere otežavaju diferencijaciju i selektivno usmjeravanje reakcije prema točno određenoj vezi unutar aminokiselina ili peptida. Dodatna razina složenosti proizlazi iz činjenice da razmatrani supstrati sadrže više potencijalno reaktivnih mjesta, što nerijetko dovodi do smanjene selektivnosti i pojave neželjenih sporednih reakcija.^{117–119}

U svrhu prevladavanja navedenih izazova, ključnu ulogu imaju usmjeravajuće skupine (engl. „*directing groups*“, DGs), koje djeluju kao koordinirajuće jedinice (tzv. „unutarnji ligandi“). Njihova sposobnost da usmjere metalni katalizator prema specifičnoj C–H vezi omogućuje selektivnu aktivaciju i funkcionalizaciju željenog položaja, što je osobito značajno prilikom sinteze strukturno složenih molekula.^{120,121} Ovaj pristup pokazao se iznimno učinkovitim u modifikaciji aminokiselina i peptida, gdje precizna funkcionalizacija alifatskih C–H veza stvara preduvjete za razvoj novih sintetskih strategija s ciljem pripreme neprirodnih aminokiselina i strukturno složenih peptida s potencijalno vrijednim biološkim svojstvima.^{122,123}

S obzirom na prethodno navedene izazove, napredak u ovom području zahtijeva kombinaciju eksperimentalnih i računalnih studija u svrhu optimizacije katalitičkih sustava, pri čemu su kombinacija steričkih i elektronskih učinaka DG-a te precizna optimizacija reakcijskih

uvjeta presudni za postizanje visoke selektivnosti i učinkovitosti. Takvi metodološki pomaci omogućili su razvoj novih strategija za posttranslacijsku modifikaciju peptida i proteina, kao i za sintezu glikopeptida i konjugata aminokiselina, čime se otvaraju mogućnosti za istraživanje biološke aktivnosti, dizajn novih lijekova te stvaranje biomimetika sa specifičnim funkcionalnim svojstvima. Na taj način, C–H funkcionalizacija nadilazi ulogu proširenja inovativnih sintetskih metodologija u organskoj kemiji te se razmatra kao strateški pristup u biomedicinskim istraživanjima i dizajnu novih terapijskih spojeva.^{124,125}

Jedan od značajnih primjera primjene izravne C–H aktivacije u sintezi glikoaminokiselina prikazan je u istraživanju Ghouilema i suradnika 2021. godine, koji su razvili Pd-kataliziranu diastereoselektivnu glikozilacijsku reakciju 4-jodofenilalanina, koja se odvija putem aktivacije anomerne C(sp³)–H veze šećera **XCVIII** koji u svojoj strukturi sadrži aksijalnu pikolin-amid usmjeravajuću skupinu.¹²⁶ Predloženi peteročlani Pd kompleks **XCIX**, kao ključni međuprodukt, ukazuje da anomerna α -stereokemija određuje konformaciju α -ariliranog glikozida. Nadalje, izolacija anomernog σ -organo-paladijevog kompleksa **C**, u kombinaciji s proračunima funkcionala gustoće (DFT), nedvojbeno potvrđuju preciznu kontrolu α -anomerne konfiguracije (Slika 30).



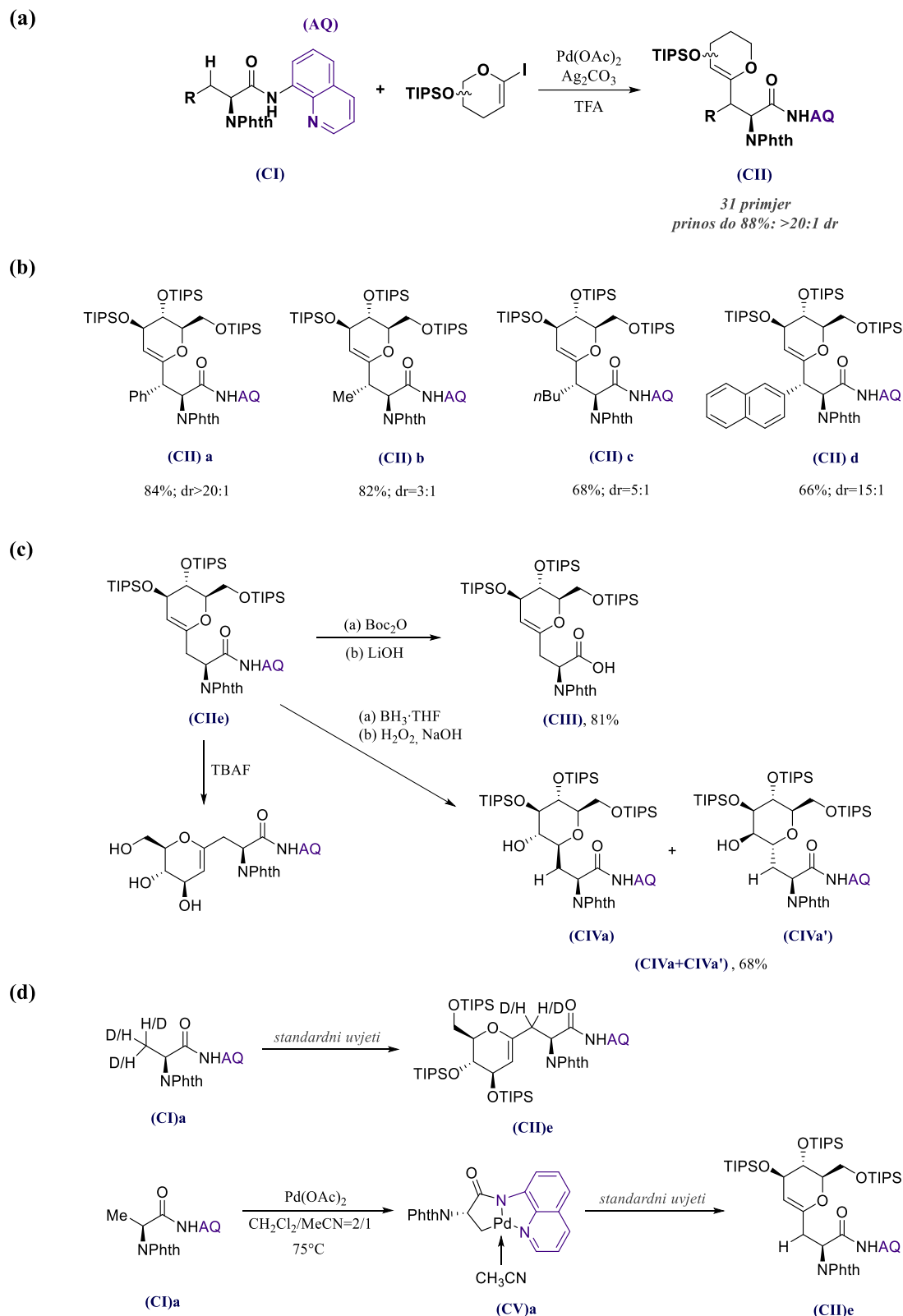
Slika 30. Pd-katalizirana reakcija unakrsnog povezivanja 4-jodo-fenilalanina s glikozidom koji sadrži aksijalnu pikolin-amid usmjeravajuću skupinu.¹²⁶

U nastavku je prikazan primjer $C(sp^3)$ –H aktivacije koja je omogućila je sintezu C-alkil glikozida. Liu i suradnici 2020. godine razvili su Pd-kataliziranu glikozilaciju slabo reaktivnih β - $C(sp^3)$ –H veza *N*-ftaloil α -aminokiselina, potaknutu trifluoracetatom i provedenu pod blagim reakcijskim uvjetima pri čemu je kao usmjeravajuća skupina korištena *N*-kinolilkarboksamidna skupina. Provedena je izravna $C(sp^3)$ –H glikozilacija aminokiselina **CI**, rezultirajući brzom i selektivnom sintezom β -supstituiranih C-alkil glikoaminokiselina **CII** uz dobru diastereoselektivnost (Slika 31a).

Predstavljena metoda omogućuje sintezu različitih β -supstituiranih C-alkil glikoaminokiselina te pruža vrijedan doprinos razvoju sintetskih strategija usmjerenih na sintezu glikopeptida.¹²⁷ U sklopu istraživanja pripravljen je niz derivata proteinogenih aminokiselina, uključujući alanin, fenilalanin i leucin, kao i skupina neproteinogenih analoga **CII(a–f)**. Posebna vrijednost ovog pristupa ogleda se u mogućnosti selektivne funkcionalizacije slabo reaktivnih alifatskih C–H veza, čime je značajno proširen repertoar sintetskih strategija u modifikaciji aminokiselina i peptida (Slika 31b).

Daljnje transformacije, uključujući uklanjanje usmjeravajuće skupine za dobivanje slobodne karboksilne kiseline **CIII** te reakciju hidroboriranja/oksidacije glukala do glukoze **CIV**, dodatno su potvrdile sintetsku vrijednost razvijene $C(sp^3)$ –H glikozilacijske metodologije (Slika 31c), ilustrirajući njezin potencijal za kontroliranu funkcionalizaciju aminokiselina i peptida.

Razmatranjem mehanizma reakcije utvrđeno je da izmjereni kinetički izotopni efekt (KIE, $k_H/k_D=1,2$) ukazuje da cijepanje $C(sp^3)$ –H veze ne predstavlja korak koji određuje brzinu reakcije. Nadalje, izolirani Pd-ciklički kompleks **CVa** pokazao je značajan katalitički potencijal i visoku učinkovitost u modelnim transformacijama, čime je dodatno potvrđena njegova uloga ključnog katalitičkog međuprodukta (Slika 31d). Istodobno, dobiveni rezultati naglašavaju praktičnu vrijednost razvijenog katalitičkog sustava za selektivnu funkcionalizaciju C–H veza.

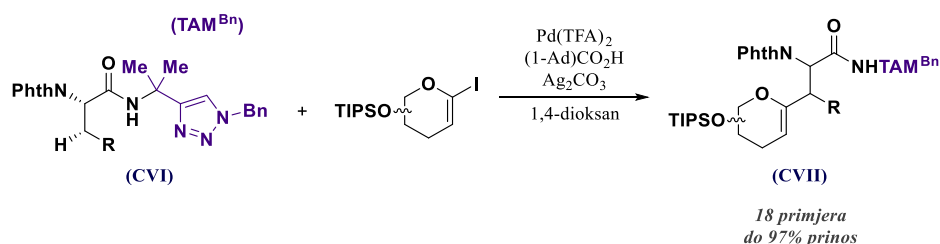


Slika 31. (A) Pd-katalizirana $C(sp^3)$ -H glikozilacija aminokiselina s 8-aminokinolinom (AQ). **(B)** Odabrani primjeri glikoaminokiselina. **(C)** Daljnje transformacije glikoaminokiselina. **(D)** Predloženi mehanizam paladijem katalizirane $C(sp^3)$ -H glikozilacije aminokiselina s AQ.¹²⁷

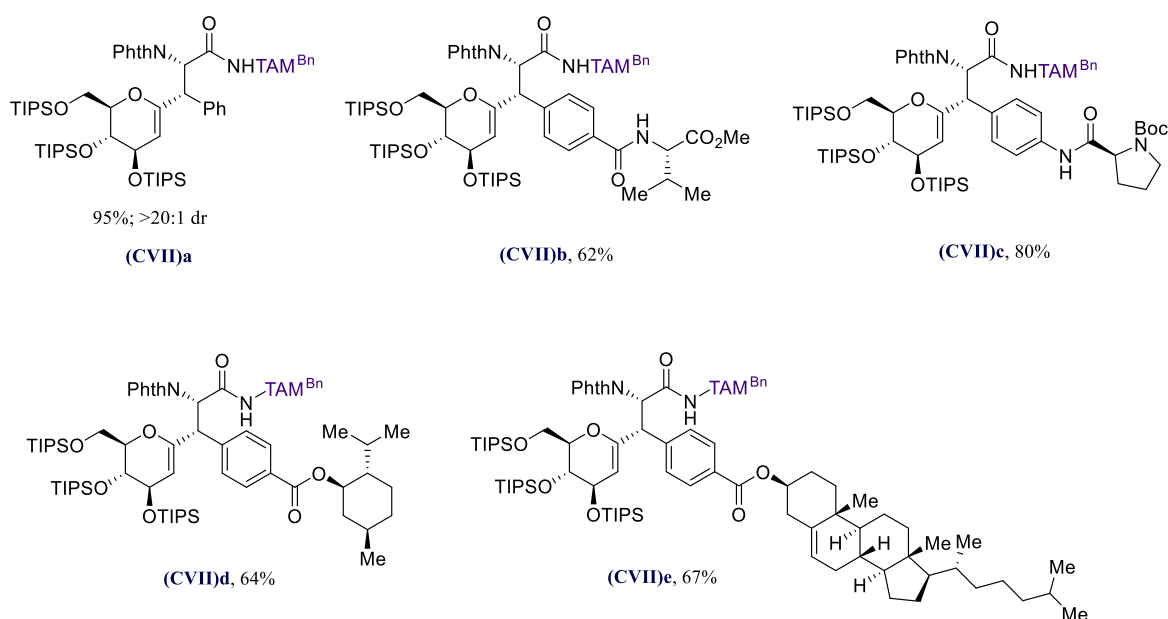
Iste godine razvijena je metodologija koju su proveli Wu i suradnici, a koja uključuje aminokiselinu **CVI** s triazolildimetilmetil (TAM) amidom kao usmjeravajućom skupinom, čime je omogućena paladijem katalizirana C(sp³)–H glikozilacija aminokiselina (Slika 32a).¹²⁸ Dobivene glikozilirane aminokiseline **CVIIa**, kao i terminalni peptidi **CVII(b-e)**, sintetizirani su u visokim prinosima te uz izvrsnu diastereoselektivnost. Nadovezujući se na prethodna otkrića, metodologija C–H glikozilacije proširena je na područje istraživanja biokonjugacije s ciljem sinteze različitih glikopeptida i hibridnih derivata (Slika 32b). Na taj je način jasno demonstriran potencijal razmatranog pristupa za sintezu strukturno složenih peptida, što stvara preduvjete za razvoj novih pristupa u području otkrivanja i razvoja lijekova.

Nadalje, potaknuti iznimnim potencijalom BODIPY derivata kao biokompatibilnih fluorescentnih probi, istražena je C(sp³)–H glikozilacija različitih BODIPY-obilježenih aminokiselina (Slika 32c). Ovim je pristupom po prvi put provedena učinkovita sinteza BODIPY-označenih glikoaminokiselina **CVIII(a-e)**, što pruža osnovu za razvoj novih fluorescentnih biokonjugata s potencijalnom primjenom u biomedicinskim istraživanjima.¹²⁹

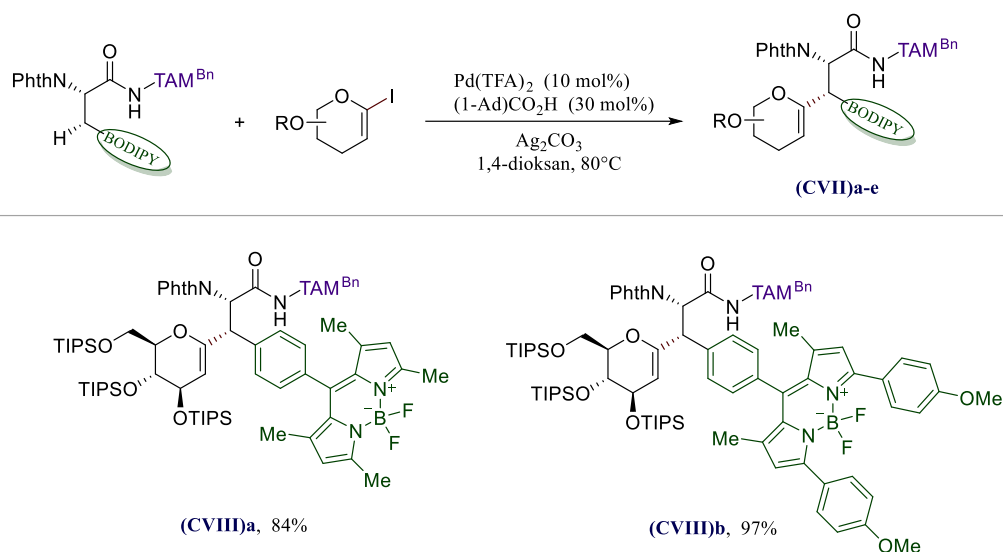
(a)



(b)



(c)



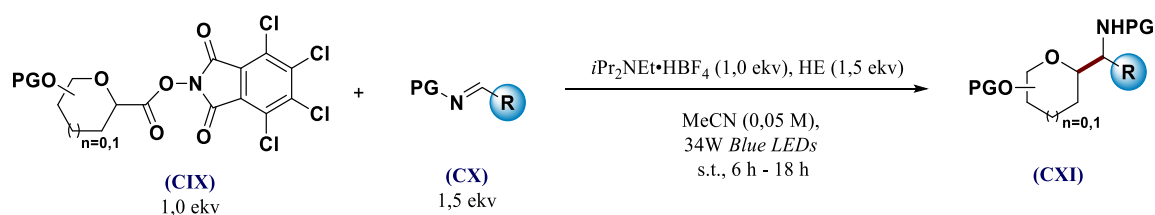
Slika 32. (A) Paladijem-katalizirana $C(sp^3)$ -H glikozilacija aminokiselina s TAM. **(B)** Odabrani primjeri glikoziliranih aminokiselina i peptida. **(C)** Odabrani primjeri BODIPY označenih aminokiselina.¹²⁸

Uz prethodno opisane primjere, važnu ulogu u reakcijama izravne C–H aktivacije imaju i iminoesteri, lako dostupni oksidacijom derivata glicina. Zbog svoje reaktivnosti, široko se primjenjuju u organskoj sintezi, osobito u pripravi različitih aminokiselina i njihovih derivata. Kao primjer, može se izdvojiti fotokatalitički proces generiranja glikozilnog radikala iz ugljikohidratnog redoks-aktivnog estera (engl. „*redox-active ester*“, RAE), pri čemu navedeni međuprodukt djeluje kao nukleofilna komponenta, dok α -iminoester sudjeluje kao elektrofil u reakciji formiranja C–C veze.⁴⁵

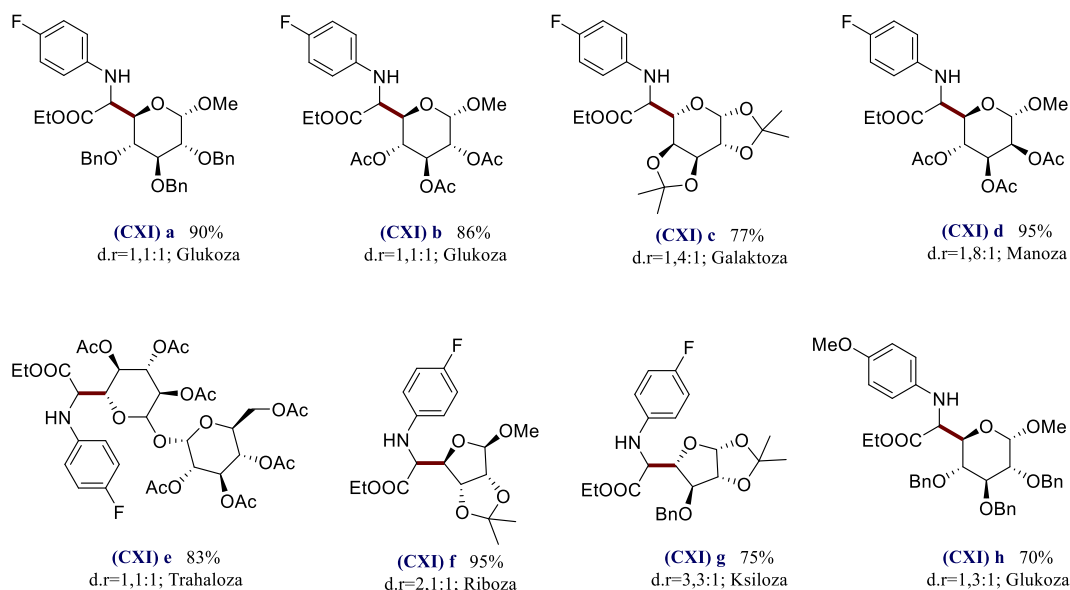
Godine 2019. Ji i suradnici proveli su učinkovit, vidljivim svjetlom potaknut pristup sintezi C-glikozilnih aminokiselina **CXI**, u kojem α -iminoesteri **CX** djeluju kao elektrofilni u reakciji s nukleofilnim glikozilnim radikalima **CIX** (Slika 33a).⁴⁵ U skladu s prethodno izloženim, ovim je radom po prvi je put uvedena nova skupina glikozilnih radikala dobivenih iz RAE. Ključnu ulogu pritom ima Hantzschov ester (HE), koji u odsutnosti dodatnih fotokatalizatora preuzima dualnu ulogu: služi kao svjetlom aktivirani donor elektrona RAE-u te istovremeno kao izvor protona. Metodologija se dodatno ističe širokom primjenjivošću, budući da su uspješno korišteni brojni ugljikohidratni derivati, uključujući glukozu, galaktozu, manozu, ribozu, ksilozu i trehalozu (Slika 33b).

Na temelju provedenih eksperimenata predložen je mehanizam fotokatalizirane radikalске adicije glikozilnog radikala, generiranog iz ugljikohidratnog RAE, na elektrofilni α -iminoester. Fotoekscitacija HE dovodi do formiranja odgovarajućeg pobuđenog stanja HE*, koje aktivira redoks-aktivni ester **A**, rezultirajući nastankom glikozilnog radikala **E**, tetrakloroftalimidnog aniona X⁻ i CO₂. Nastali glikozilni radikal **E** zatim se adira na kiselinom aktiviranu iminsku sol derivata **B**, dajući radikalski intermedijer **F**, dok konačni produkt **G** nastaje prijenosom vodikova atoma (HAT) iz HE* (Slika 33c).

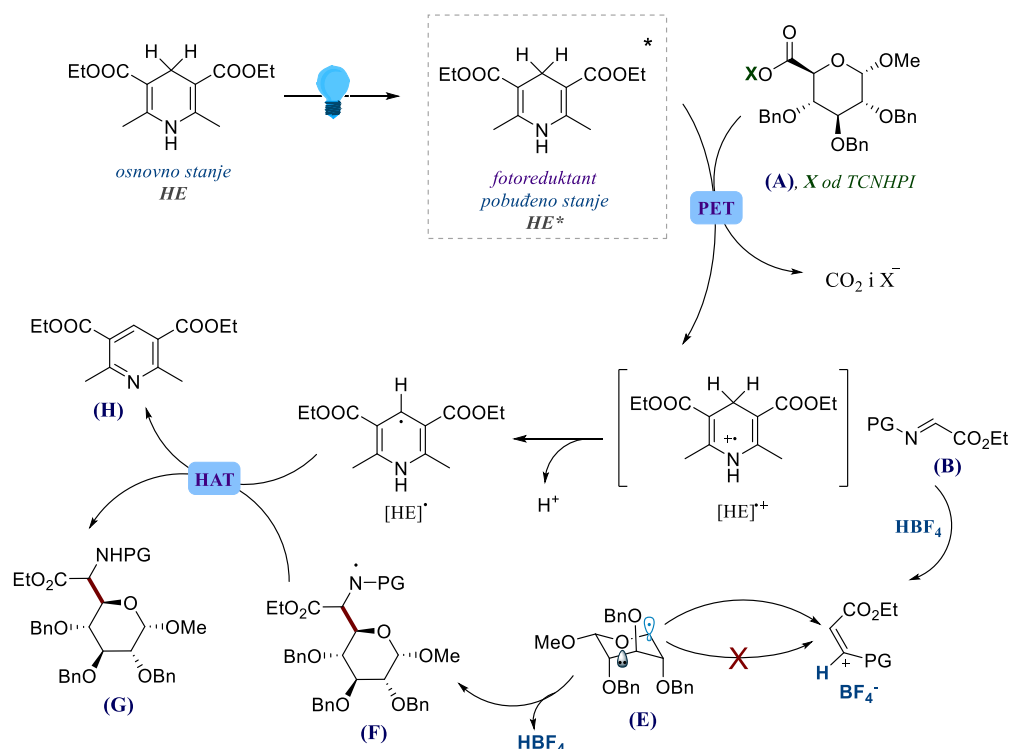
(a)



(b)



(c)



Slika 33. Vidljivim svjetlom potaknut, kemo- i stereoselektivan radikalski proces za sintezu C-glikozilaminokiselina. (A) Vidljivim svjetlom potaknuta adicija glikozilnog radikala ugljikohidratnog redoks-aktivnog estera na α -imino ester. (B) Odabrani primjeri glikoziliranih glicina. (C) Predložen mehanizam vidljivim svjetlom potaknute adicije glikozilnog radikala na α -imino ester.⁴⁵

Proširujući mogućnosti ranije opisanih metodologija, 2022. godine Xu i suradnici razvili su prvi primjer stereoselektivne $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$ glikozilacije derivata glicina i peptida koji sadrže glicin **CXII**, potaknute vidljivim svjetlom i katalizirane bakrom, pri čemu su kao supstrati korišteni ugljikohidratni *N*-hidroksiftalimidni (NHP) esteri **CXIII** (Slika 34a).⁴³ Kinolinska skupina (Q) spoja **CXII** koordinira Cu sol u prisutnosti kiralnog fosfornog liganda, pri čemu se *in situ* generira novi kiralni Cu kompleks. Razmatrani kompleks ne samo da katalizira intramolekulski fotoredoks proces, već ujedno ima ključnu ulogu u kontroli stereoselektivnosti kondenzacijske reakcije. Od velikog broja ispitanih kiralnih fosfornih liganada, *S*-PHANEPHOS se izdvojio kao najučinkovitiji, rezultirajući visoku diastereoselektivnošću i dobrim prinosom izoliranih produkata (Slika 34a).

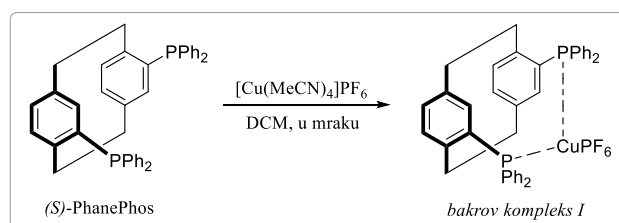
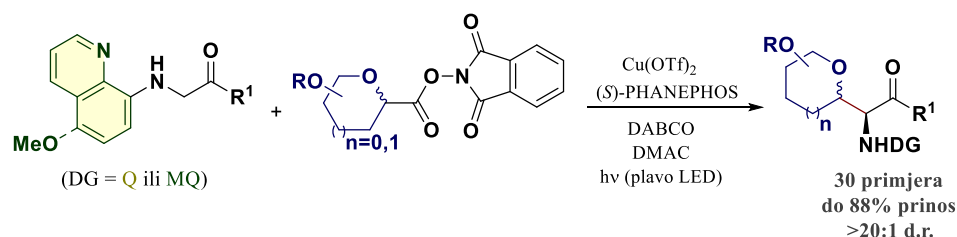
Značajno je naglasiti da predložena metodologija predstavlja temelj za daljnji metodološki razvoj u području C–H funkcionalizacije. Za razliku od ranije izloženih metodologija, razvijenih od strane Liuja i Ackermanna, ovim je pristupom omogućena C-glikozilacija na

α -položaju aminokiselina. Razvijena sintetska strategija pokazala je visoku prilagodljivost prema različitim funkcijskim skupinama, što omogućuje njezinu primjenu na širokom spektru ugljikohidratnih supstrata **CXIV(a-h)**, uključujući ribozu, ksilozu, manozu, galaktozu, glukozu i fruktozu, kao i na funkcionalno složenijim molekulama poput IPTG-a, arbutina i trehaloze (Slika 34b).

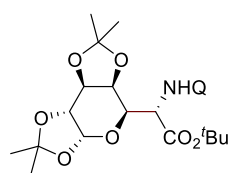
Štoviše, primjenom navedene metodologije uspješno su sintetizirani različiti C-glikopeptidi **CXV(g-j)** u dobrim do visokim prinosima, uz visoku stereoselektivnost, što dodatno potvrđuje inovativnost i značajan metodološki doprinos razvijene strategije (Slika 34c).

Polazeći od prethodnih istraživanja i dostupnih eksperimentalnih opažanja, predložen je mehanizam svjetlom potaknute, bakrom katalizirane stereoselektivne C(sp³)-H glikozilacije. U početnom koraku, fotosenzitivna specija **A** nastaje *in situ* koordinacijom kompleksa [L*Cu^I] s glicinatnim esterom (**i**). Pod plavim LED zračenjem, fotosenzitivna vrsta **A** prelazi u svoje ekscitirano stanje **B**, koje lako predaje elektron NHP-esteru (**ii**). na taj je način generiran ribozilni radikal specifične konfiguracije, uz istodobno oslobađanje CO₂ i NHP-aniona. Rekombinacijom ribozilnog radikala s Cu^{II} formiran je Cu^{III} kompleks **C**. LMCT prijenos naboja s liganda na metal (engl. „*ligand-to-metal charge transfer*“, LMCT) u kompleksu **C**, zajedno s deprotonacijom, rezultiralo je nastajanjem radikala **D**. Nakon toga, radikal **D** napada bakrov centar, što rezultira nastajanjem kiralnog međuprodukta **E**. U završnom koraku, stereoselektivnom reduktivnom eliminacijom dobiven je produkt C-glikozilacije **CXIV** (Slika 34d).⁴³

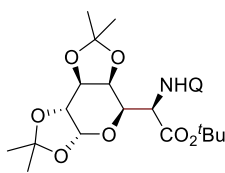
(a)



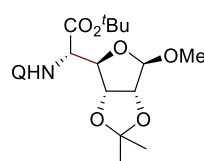
(b)



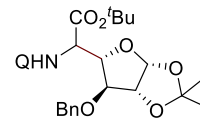
(CXIV) a
85%, >20:1 d.r.; galaktoza
korišten (S)-PHANEPHOS



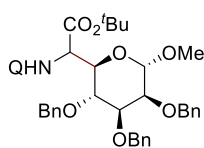
(CXIV) a'
70%, >20:1 d.r.; galaktoza
korišten (R)-PHANEPHOS



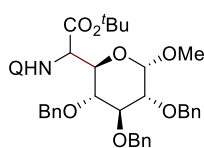
(CXIV) b
76%, >20:1 d.r.; riboza



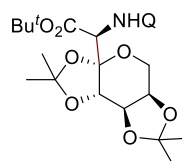
(CXIV) c
68%, >20:1 d.r.; ksiloza



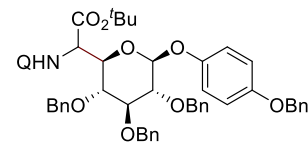
(CXIV) d
80%, >20:1 d.r.; manozo



(CXIV) e
76%, >20:1 d.r.; glukoza

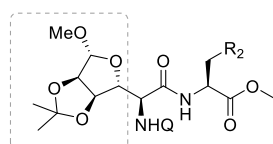


(CXIV) f
85%, >20:1 d.r.; fruktoza



(CXIV) h
78%, >20:1 d.r.; arbutin

(c)



(CXV) a-e

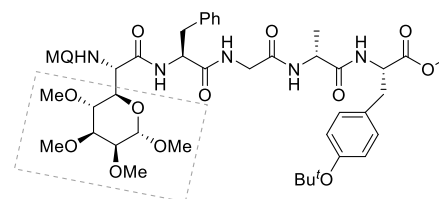
(CXV) a; Gly-Leu; 80%, >20:1 d.r.

(CXV) b; Gly-Phe; 88%, >20:1 d.r.

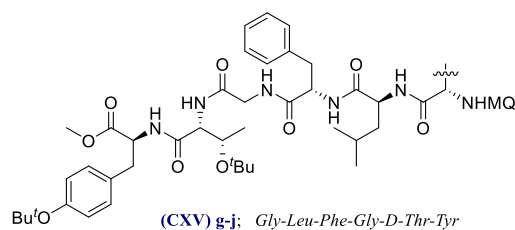
(CXV) c; Gly-Trp; 70%, >20:1 d.r.

(CXV) d; Gly-Ser; $R^2 = O^tBu$; 70%, >20:1 d.r.

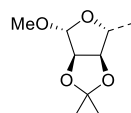
(CXV) e; Gly-Asp; $R^2 = CO_2Et$; 73%, 10:1 d.r.



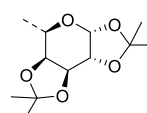
(CXV) f; Gly-Phe-Gly-D-Ala-Tyr
60%, >20:1 d.r.



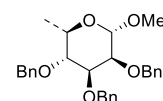
(CXV) g-j; Gly-Leu-Phe-Gly-D-Thr-Tyr



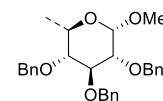
(CXV) g
63%, >20:1 d.r.,
riboza



(CXV) h
73%, >20:1 d.r.,
galaktoza

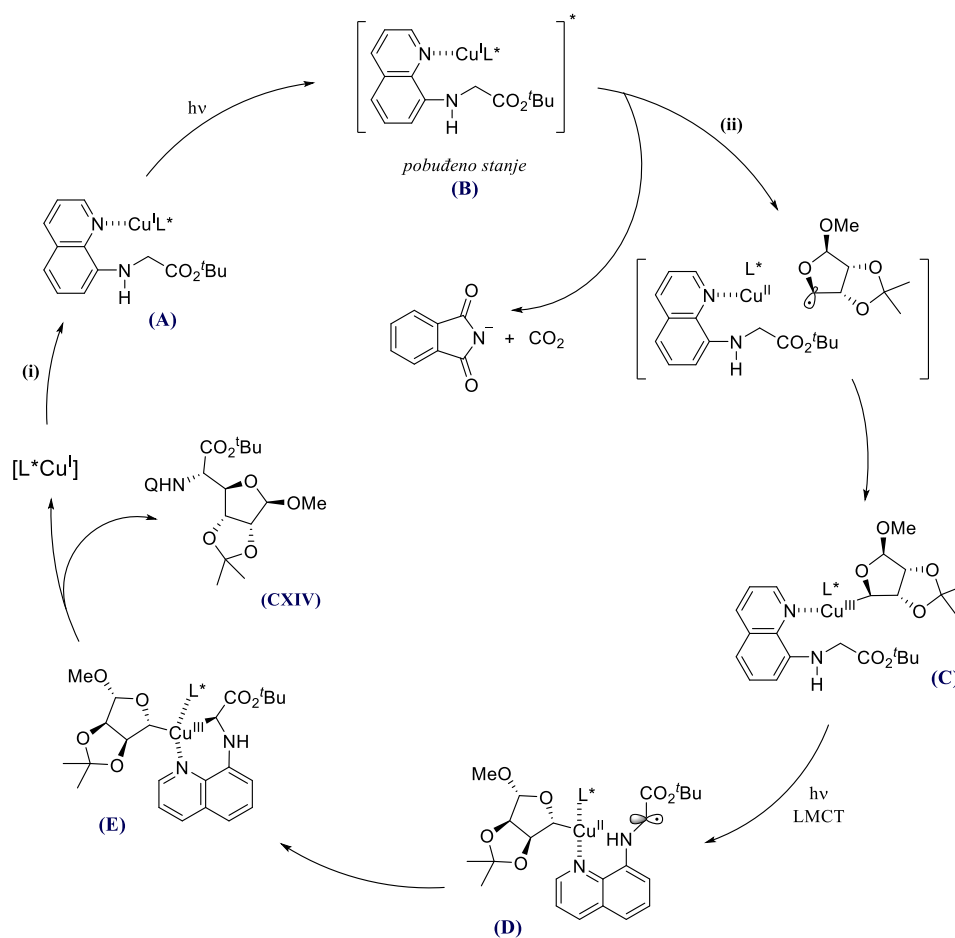


(CXV) i
69%, >20:1 d.r.,
manozo



(CXV) j
65%, >20:1 d.r.,
glukoza

(d)



Slika 34. (A) Vidljivim svjetlom potaknuta Cu-katalizirana C(sp³)-H glikozilacija derivata glicina.^{13,14} (B) Odabrani primjeri ugljikohidratnih supstrata. (C) Odabrani primjeri C-glikopeptida. (D) Predloženi mehanizam.⁴³

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

Korištene su komercijalno dostupne kemikalije i otapala analitičke ili HPLC čistoće, koja su, ako je bilo potrebno, pročišćena prema standardnim literaturnim postupcima.¹³⁰ Ukoliko nije drugačije navedeno, sastav eluensa (mobilnih faza) izražen je u volumnim omjerima (v/v). Za praćenje tijeka reakcije, kontrolu čistoće spojeva i preliminarnu identifikaciju produkata korištena je tankoslojna kromatografija (TSK) na pločicama silikagela (Kieselgel 60 F254 0,25 mm, Merck), a vizualizacija je provedena uz detekciju UV zračenjem ($\lambda = 254$ nm) i/ili otopinom kalijevog permanganata, *p*-anisaldehida, ninhidrina ili 10 % sumporne kiseline, uz zagrijavanje. Navedene otopine pripravljene su prema literaturno poznatim propisima.¹³⁰ Pripravljene spojevi su pročišćeni kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela (Kieselgel 60 F254 0,040-0,063 mm, Merck) te je određen retencijski faktor (R_f). Spektri masa (MS) snimljeni su na uređaju Shimadzu Nexera XR LCMS-2020, koji koristi vezani sustav tekućinske kromatografije - spektrometrije masa (LC-MS), uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI, engl. *Electrospray Ionisation*). Spektri su snimljeni u pozitivnom (ESI+) i negativnom (ESI-) načinu rada. Kao mobilna faza korištena je smjesa otapala 50 % MeOH/50 % mili-Q H₂O uz dodatak 0,1 % HCOOH, pri protoku od 0,2 mL/min.

Za analizu reakcijskih smjesa i sintetiziranih produkata korištena je sljedeća LC–MS metoda:

Metoda A:

ZORBAX XDB-C18 kolona (3,5 μ m; 4,6 $\times$ 75 mm); protok: 0,5 mL/min; $\lambda = 215$ nm.

0,10 $\rightarrow$ 12 min	10 % MeOH / 0,1 % HCOOH u mili-Q H ₂ O $\rightarrow$ 90 % MeOH / 0,1 % HCOOH u mili-Q H ₂ O
12 $\rightarrow$ 17 min	90 % MeOH / 0,1 % HCOOH u mili-Q H ₂ O
17 $\rightarrow$ 20 min	90 % MeOH / 0,1 % HCOOH u mili-Q H ₂ O $\rightarrow$ 10 % MeOH / 0,1 % HCOOH u mili-Q H ₂ O

Spektri masa visoke rezolucije (HRMS) snimljeni su na instrumentu Shimadzu LCMS-9030 Q-TOF, gdje se LC/Q-TOF odnosi na tekućinsku kromatografiju / kvadrupol - analizator masa vremena leta (engl. „*Liquid Chromatography / Quadrupole Time-of-Flight*“, LC/Q-TOF).

U svrhu karakterizacije, pročišćavanja i razdvajanja ciljanih produkata korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza (engl. „*High Performance Liquid Chromatography Reverse-Phase*“, RP-HPLC) na instrumentu Shimadzu (Shimadzu Scientific Instruments, SSI; North America, USA) opremljenom SPD-M20A detektorom s nizom dioda (engl. „*diode array detector*“, DAD) uz izokratno i/ili gradijentno eluiranje s odgovarajućim sustavom otapala (polarna mobilna faza). Gradijent protoka mobilne faze mijenjao se ovisno o svojstvima ispitivanog spoja i vrsti kolone (od 0,5 do 1,5 mL/min). UV detekcija provedena je na 254 nm i 215 nm. Volumen injektiranja pojedinačnih uzoraka kretao se u raponu od 10 do 600 μ L, ovisno o veličini petlje (engl. „*loop*“, 20 μ L ili 1 mL). Analitička kolona (Agilent ZORBAX XDB-C18; 3,5 μ m; 4,6 $\times$ 75 mm) korištena je za karakterizaciju spojeva, dok je pročišćavanje provedeno na semi-preparativnoj koloni (Agilent Eclipse XDB-C18; 5 μ m; 9,4 $\times$ 250 mm) s odgovarajućom predkolonom (Phenomenex, CA, USA; SecurityGuard SemiPrep Cartridges) i držačem (engl. „*holder*“, SecurityGuard Cartridges Holder 10 mm ID za predkolonu, proizvođača Phenomenex, CA, USA). Određena su retencijska vremena (t_R) pripremljenih produkata.

Korištene su sljedeće metode za RP-HPLC kromatografiju:

Metoda B

Agilent Eclipse XDB-C18 kolona (5 μ m; 9,4 $\times$ 250 mm) s odgovarajućom predkolonom (SecurityGuard SemiPrep Cartridge, Phenomenex); protok: 1,5 mL/min; λ = 215 nm.

0,10 $\rightarrow$ 22 min	50 % MeOH / 0,1 % TFA u mili-Q H ₂ O $\rightarrow$ 90 % MeOH / 0,1 % HCOOH u mili-Q H ₂ O
22 $\rightarrow$ 27 min	90 % MeOH / 0,1 % TFA u mili-Q H ₂ O
27 $\rightarrow$ 27,10 min	90 % MeOH / 0,1 % TFA u mili-Q H ₂ O $\rightarrow$ 50 % MeOH / 0,1 % TFA u mili-Q H ₂ O
27,10 $\rightarrow$ 30 min	50 % MeOH / 0,1 % TFA u mili-Q H ₂ O

Metoda C

Agilent Eclipse XDB-C18 kolona (5 μ m, 9,4 $\times$ 250 mm) s odgovarajućom predkolonom (SecurityGuard SemiPrep Cartridge, Phenomenex); protok: 1,5 mL/min; λ = 215 nm.

0,10 $\rightarrow$ 22 min	30 % MeOH / 0,1% TFA u mili-Q H ₂ O $\rightarrow$ 100 % MeOH
22 $\rightarrow$ 30 min	100 % MeOH
30 $\rightarrow$ 30,10 min	100 % MeOH $\rightarrow$ 30 % MeOH/ 0,1% TFA u mili-Q H ₂ O
30,10 $\rightarrow$ 35 min	30 % MeOH / 0,1 % TFA u mili-Q H ₂ O

Metoda D

Agilent Eclipse XDB-C18 kolona (5 μ m, 9,4 $\times$ 250 mm) s odgovarajućom predkolonom (SecurityGuard SemiPrep Cartridge, Phenomenex); protok: 1,5 mL/min; λ = 215 nm.

0,10 $\rightarrow$ 22 min	50 % MeOH u mili-Q H ₂ O $\rightarrow$ 100% MeOH
22 $\rightarrow$ 30 min	100 % MeOH
30 $\rightarrow$ 30,10 min	100 % MeOH $\rightarrow$ 50 % MeOH u mili-Q H ₂ O
30,10 $\rightarrow$ 35 min	50 % MeOH u mili-Q H ₂ O

NMR spektri snimljeni su u odgovarajućim deuteriranim otapalima (DMSO-*d*₆, CDCl₃, CD₃CN) pri temperaturi od 298 K uz tetrametilsilan ((CH₃)₄Si) kao unutarnji standard na instrumentu Bruker Avance 300 (300,13 MHz (¹H) i 75,47 MHz (¹³C)), te Bruker Avance 600 (600,13 MHz (¹H) i 150,92 MHz (¹³C)). Snimljeni NMR spektri obrađeni su u programu MestReNova (verzija 6,0,2-5475, Mestrelab Research S,L; 2009.). Uz jednodimenzionalne ¹H NMR i ¹³C NMR tehnike, za asignaciju signala u spektrima korištene su i dvodimenzionalne NMR tehnike: COSY (engl. „Correlation Spectroscopy“), HSQC (engl. „Heteronuclear Single Quantum Coherence“), HMBC (engl. „Heteronuclear Multiple Bond Correlation“) i NOESY (engl. „Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy“). Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm vrijednostima, relativno u odnosu na rezidualne pikove deuteriranih otapala. (¹H spektri prikazani su kako slijedi: ¹H NMR (frekvencija spektrometra, otapalo): δ kemijski pomak (multiplicitet, konstante sprege, broj protona). ¹³C spektri prikazani su kako slijedi: ¹³C NMR (frekvencija spektrometra, otapalo): δ kemijski pomak (konstante sprege, broj ugljikovih atoma (gdje je primjenjivo)). Multipliciteti signala izraženi su kao: s (singlet), brs (broad singlet), d (dublet), dd (dublet dubleta), td (triplet dubleta), t (triplet), dt (dublet tripleta), q (kvartet), dq (dublet kvarteta) i m (multiplet). Konstante sprege (*J*) izražene su u Hz.

Dijasteromerni omjer produkata određen je analizom integracija karakterističnih signala u ^1H NMR spektrima pojedinih reakcijskih smjesa (integral površine signala u protonskom spektru proporcionalan je broju protona).

Temperatura taljenja sintetiziranih produkata određena je korištenjem instrumenta Electrothermal 9100 u otvorenim kapilarama. Optičko skretanje odgovarajućih produkata mjereno je na instrumentu Autopol IV (Rudolf Research Analytical, Flanders, USA).

Spektri cirkularnog dikroizma (engl. „*circular dichroism*“, CD) modelnog heksapeptida **37** i C-glikopeptida **38–44** snimljeni na spektropolarimetru JASCO J-815 pri sobnoj temperaturi, koristeći kvarcne kivete duljine optičkog puta 0,1 cm i brzinom skeniranja od 200 nm min⁻¹, kao prosjek od tri uzastopno snimljena spektra. Uzorci heksapeptida pripremljeni su otapanjem u 2,2,2-trifluoroetanolu [c (**37**) = $1,6318 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³; c (**38**) = $1,1264 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³; c (**39**) = $3,4997 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³; c (**40**) = $2,6354 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³; c (**41**) = $2,8460 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³; c (**42**) = $1,1167 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³; c (**43**) = $3,6711 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³; c (**44**) = $1,9739 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³]

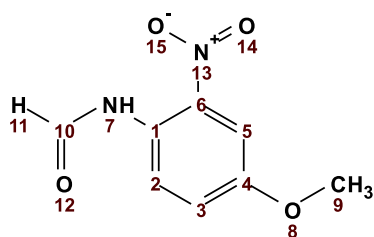
Računalno modeliranje provedeno je korištenjem programskog paketa *Gaussian 16*. Strukture modelnog peptida i C-glikopeptida najprije su optimizirane u plinskoj fazi na HF/3-21G razini teorije, a zatim u DMSO otapalu primjenom SMD implicitnog modela solvatacije. Najstabilnije konformacije reoptimizirane su na DFT razini teorije (SMD-M06-2X-D3/6-31+G(d,p)) uzimajući u obzir NOE ograničenja udaljenosti između odabranih parova protona, određena asignacijom 2D ^1H – ^1H NOSEY spektra (0–3 Å (s), 3–5 Å (m), > 5 Å (w)).¹³¹ Računalni dio istraživanja, koji obuhvaća optimizaciju struktura peptida **37–44**, proveden je u suradnji s dr. sc. Ivanom Nikšić Franjić (Institut Ruđer Bošković).

Aldehidi odgovarajućih ugljikohidrata, kao i korišteni izocijanidi pripremljeni su prema literaturno opisanim metodama u dva do pet sintetskih koraka, uz optimizaciju pojedinih reakcijskih uvjeta. Karakterizacija sintetiziranih spojeva pokazala je podudarnost s prethodno objavljenim literaturnim podacima. Spojevi su sintetizirani slijedeći pritom literaturno opisane metodologije, uz manje modifikacije i optimizaciju pojedinih reakcijskih koraka.^{132–135}

3.2. Sinteza konvertibilnog izocijanida

Produkti su sintetizirani prema prethodno objavljenim metodologijama, uz određene modifikacije, a njihova karakterizacija odgovara literaturno opisanim podacima.^{70,136}

3.2.1. Sinteza i karakterizacija N-(4-metoksi-2-nitrofenil)formamida (**1**)



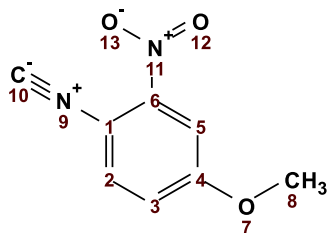
Mravlja kiselina (HCOOH; 31,2 ekv; 556,6 mmol) je polagano dokapana acetanhidridu (1,25 ekv; 22,3 mmol; 2,1 mL). Ohlađenoj otopini (0 °C) je dodan 4-metoksi-2-nitroanilin (3,0 g; 17,84 mmol). Miješanje je nastavljeno 3 sata na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije dodana je

hladna voda pri čemu nastaje gusta žuta suspenzija koja je profiltrirana uz vakuum preko sinter lijevka. Zaostali talog je prekrystaliziran iz etanola (EtOH). Dobiven je konačni produkt u obliku žutog praha (**1**; 3,2 g; η = 92 %).

$C_8H_8N_2O_4$; M_r = 196,16; R_f = 0,60 (PE:EtOAc = 1:1)

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm 10,05 (s, 1H, NH); 8,70 (d, J = 9,3 Hz, 1H, CHO); 8,52 (s, 1H, H_{Ar}); 7,70 (d, J = 3,0 Hz, 1H, H_{Ar}); 7,30 – 7,18 (m, 1H, H_{Ar}); 3,87 (br s, 3H, OMe).

3.2.2. Sinteza i karakterizacija 1-izocijano-4-metoksi-2-nitrobenzena (2)



Produkt prethodnog reakcijskog koraka **1** (2,31 g; 11,79 mmol; 1,0 ekv) je otopljen u suhom tetrahidrofuranu (THF; 118,0 mL). U ohlađenu otopinu (-20 °C) je dokapan *N*-metil-morfolin (NMM; 4,0 ekv; 47,15 mmol; 5,18 mL) i dodan trifosgen (0,5 ekv; 5,89 mmol; 1,75 g). Reakcija je prekinuta dodatkom zasićene vodene otopine natrijevog hidrogenkarbonata (NaHCO₃) te je provedena ekstrakcija s diklormetanom (DCM). Organski sloj je osušen iznad bezvodnog natrijevog sulfata (Na₂SO₄), nakon čega je profiltriran, a otapalo je upareno. Ostatak zaostao uparavanjem je pročišćen *flash* tekućinskom kromatografijom pri čemu je kao eluens korišten sustav otapala PE:EtOAc = 1:1. Izoliran je produkt u obliku crvene krutine (**2**; 1,83 g; η = 87 %).

C₈H₆N₂O₃; M_r = 178,15; R_f = 0,82 (PE:EtOAc = 1:1)

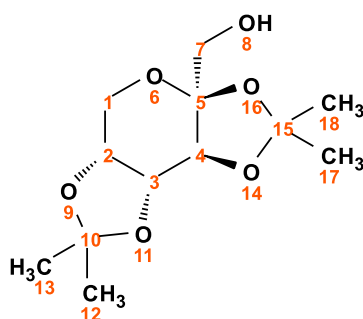
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ / ppm 7,57 (d, J = 2,8 Hz, 1H, H_{Ar}); 7,51 (d, J = 8,9 Hz, 1H, H_{Ar}); 7,18 (dd, J = 8,9 Hz; J = 2,8 Hz, 1H, H_{Ar}); 3,93 (s, 3H, OMe).

3.3. Sinteza aldehida odgovarajućih ugljikohidrata

Produkti su sintetizirani prema prethodno objavljenim metodologijama, uz određene modifikacije, a njihova karakterizacija odgovara literaturno dostupnim podacima.

3.3.1. Sinteza i karakterizacija (3aR,5aR,8aR,8bS)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-3aH-bis([1,3]dioksolo)[4,5-b: 4',5'-d]piran-3a-karbaldehida (**4**)¹³²

(a) 2,3:4,5-di-O-izopropiliden-β-D-fruktopiranoza (**3**)

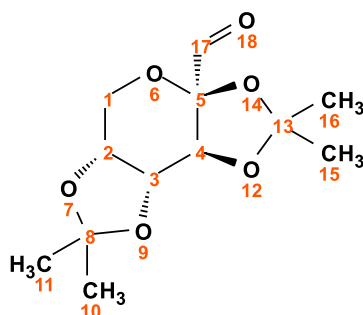


D-fruktoza (10,8 g; 41,5 mmol) je otopljena u acetonu ((CH₃)₂CO; 210 mL) i ohlađena na 0 °C, a potom je polagano dokapana koncentrirana sumprna kiselina (H₂SO₄; 10,5 mL) uz miješanje, sve dok se fruktoza u potpunosti ne otopi. Miješanje je nastavljeno na sobnoj temperaturi 90 minuta. Reakcijska smjesa je ohlađena na 0 °C, a zatim je polagano dokapana ohlađena vodena otopina NaOH (1,1 ekv; 22 g NaOH u 100 mL H₂O). Otapalo je upareno, a zaostala vodena suspenzija je ekstrahirana s diklormetanom (DCM). Organski sloj je ispran vodom, osušen iznad bezvodnog Na₂SO₄, nakon čega je profiltriran, a otapalo je upareno. Uparavanjem otapala zaostaje produkt u obliku žute krutine. Sirovi produkt je rekristaliziran iz vrijućeg etera (5 mL/g) dodatkom hladnog pentana pri čemu je dobiven produkt u obliku bijelog praha (**3**; 9,72 g; η = 90 %).

C₁₂H₂₀O₆; M_r = 260,29; R_f = 0,75 (PE:EtOAc = 1:1)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ / ppm 4,61 (dd, J = 7.9 Hz; J = 2.6 Hz, 1H, 3); 4,34 (d, J = 2.6 Hz, 1H, 4); 4,28 – 4,20 (m, 1H, 2); 3,92 (dd, J = 13,0 Hz; J = 1,9 Hz, 1H, 1); 3,77 (dd, J = 13,0 Hz, J = 0,7 Hz, 1H, 1); 3,74 – 3,61 (m, 2H, 7); 2,06 (s, 1H, 8); 1,55; 1,48; 1,40; 1,35 (s, 12H, (12, 13, 17, 18)).

(b) (3aR,5aR,8aR,8bS)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-3aH-bis([1,3]dioksolo)[4,5-b:4',5'd]piran-3a-karbaldehid (**4**)



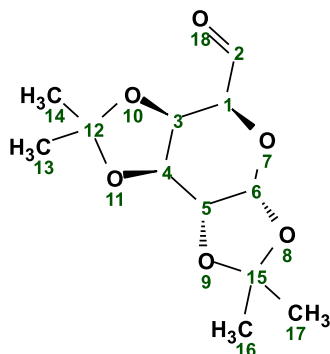
Produkt prethodnog reakcijskog koraka **3** (501 mg; 1,93 mmol; 1,0 ekv) je otopljen u suhom DCM (10 mL) te je dodan Dess-Martin perjodinan (DMP; 1,1 ekv; 2,12 mmol; 898,1 mg) u malim porcijama. Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena dodatkom zasićene vodene otopine natrijevog hidrogen karbonata (NaHCO_3) i vodene otopine natrijevog tiosulfata pentahidrata

($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), nakon čega je provedena ekstrakcija s DCM. Organski sloj je osušen iznad bezvodnog Na_2SO_4 , profiltriran, a otapalo je upareno. Ostatak zaostao uparavanjem otapala čišćen je *flash* tekućinskom kromatografijom pri čemu je kao eluens korišten sustav otapala $\text{PE}:\text{EtOAc} = 1:1$. Izoliran je produkt u obliku prozirnog ulja (**4**; 455,7 mg; $\eta = 92\%$).

$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6$; $M_r = 260,29$; $R_f = 0,62$ ($\text{PE}:\text{EtOAc} = 1:1$)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ / ppm 9,52 (s, 1H, 17); 4,61 (dd, $J = 7,9$; $J = 2,5$ Hz, 1H, 3); 4,49 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H, 4); 4,30 – 4,22 (m, 1H, 2); 3,95 (dd, $J = 12,9$ Hz, $J = 1,7$ Hz, 1H, 1); 3,87 (d, $J = 12,8$ Hz, 1H, 1); 1,55; 1,42; 1,39; 1,33 (s, 12H, (10, 11, 15, 16)).

3.3.2. Sinteza i karakterizacija (3aR,5S,5aR,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-5H-bis ([1,3]dioksolo) [4,5-b:4',5'-d]piran-5-karbaldehida (5)¹³⁵



1,2;3,4-di-*O*-izopropiliden- α -D-galaktopiranoza (500 mg; 1,92 mmol; 1,0 ekv) je otopljena u suhom DCM (10 mL) te je dodan DMP (1,1 ekv; 2,11 mmol; 896,3 mg) u malim porcijama. Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena dodatkom zasićene vodene otopine NaHCO₃ i vodene otopine Na₂S₂O₃·5H₂O te je provedena ekstrakcija s DCM. Organski sloj je osušen iznad bezvodnog Na₂SO₄, nakon čega je profiltriran, a otapalo je upareno. Ostatak

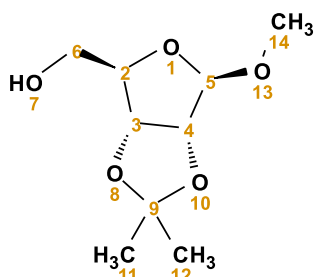
zaostao uparavanjem otapala čišćen je *flash* tekućinskom kromatografijom pri čemu je kao eluens korišten sustav otapala PE:EtOAc = 1:1. Izoliran je produkt u obliku prozirnog ulja (5; 467,0 mg; η = 94 %).

C₁₂H₁₈O₆; M_r = 260,29; R_f = 0,55 (PE:EtOAc = 1:1)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ / ppm 9,62 (s, 1H, 2); 5,67 (d, J = 4.9 Hz, 1H, 6); 4,65 (dd, J = 7,8 Hz; 2,4 Hz, 1H, 1); 4,60 (dd, J = 7, 8 Hz; J = 2.1 Hz, 1H, 5); 4,39 (dd, J = 4.9; J = 2.4 Hz, 1H, 3); 4,19 (d, J = 2,0 Hz, 1H, 4); 1,51; 1,44; 1,35; 1,32 (br s, 12H, (17, 16, 14, 13)).

3.3.3. Sinteza i karakterizacija (3aR,4S,6R,6aR)-6-metoksi-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-karbaldehida (7)¹³⁴

(a) Metil-2,3-O-izopropiliden- β -D-ribofuranoza (6)



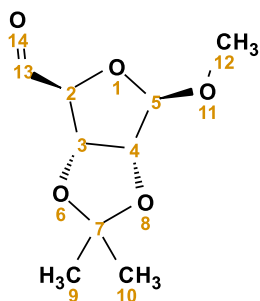
Smjesa D-riboze (2,5 g; 16,65 mmol; 1,0 ekv) i $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,0 ekv; 16,65 mmol; 3,76 g) je suspendirana u acetonu (50 mL) i metanolu (MeOH; 13 mL) uz dodatak katalitičke količine koncentrirane H_2SO_4 (0,11 ekv; 1,86 mmol; 99,4 μL). Miješanje je nastavljeno 24 sata pri temperaturi uljne kupelji od 45 °C. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je profiltrirana, a

filtrat je neutraliziran (pH 6–7) vodenom otopinom NaHCO_3 . Rezultirajuća otopina je profiltrirana preko stupca celita i uparena s ciljem uklanjanja acetona i metanola. Zaostala vodena otopina je ekstrahirana s EtOAc, isprana zasićenom vodenom otopinom NaCl, osušena iznad bezvodnog Na_2SO_4 , nakon čega je profiltrirana, a otapalo je upareno. Izoliran je produkt u obliku žutog ulja (**6**; 2,7 g; η = 81 %).

$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_5$; M_r = 204,22; R_f = 0,45 (PE:EtOAc = 1:1)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ / ppm 4,95 (s, 1H, 5); 4,81 (d, J = 5,9 Hz, 1H, 4); 4,57 (d, J = 5,9 Hz, 1H, 2); 4,41 (t, J = 2,7 Hz, 1H, 3); 3,68 (dd, J = 12,5, J = 2,3 Hz, 1H, 6); 3,60 (br d, 1H, 6'); 3,41 (s, 3H, 14); 1,47; 1,30 (s, 6H, (11, 12)).

(b) (3aR,4S,6R,6aR)-6-metoksi-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-karbaldehid (7)



Produkt prethodnog reakcijskog koraka **6** (1,02 g; 4,98 mmol; 1,0 ekv) je otopljen u suhom DCM (25 mL) te je dodan DMP (1,1 ekv; 5,48 mmol; 2,32 g) u malim porcijama. Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena dodatkom zasićene vodene otopine NaHCO_3 i vodene otopine $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ te je provedena ekstrakcija s DCM. Organski sloj je osušen iznad bezvodnog Na_2SO_4 , nakon čega je profiltriran, a otapalo je upareno.

Ostatak zaostao uparavanjem čišćen je brzom tekućinskom kromatografijom pri čemu je kao

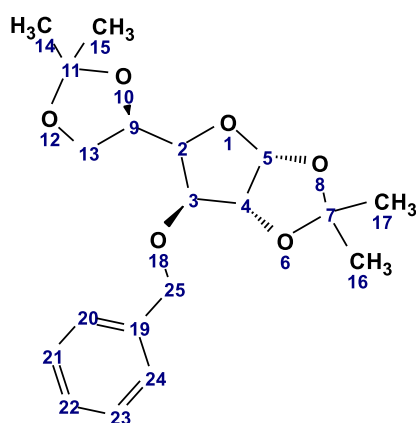
eluens korišten sustav otapala PE:EtOAc = 1:1. Izoliran je produkt u obliku bezbojnog ulja (**7**; 785,0 mg; η = 78 %).

$C_9H_{14}O_5$; M_r = 202,21; R_f = 0,62 (PE:EtOAc = 1:1)

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm 9,57 (s, 1H, 13); 5,07 (s, 1H, 5); 5,03 (d, J = 5,8 Hz, 1H, 2); 4,55 – 4,39 (m, 2H, 4, 3); 3,43 (s, 3H, 12); 1,47; 1,31 (s, 6H, (9, 10)).

3.3.4. Sinteza i karakterizacija (3aR,5S,6S,6aR)-6-(benziloksi)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[2,3-d][1,3]dioksol-5-karbaldehida (**10**)¹³³

(a) 3-O-benzil-1,2:5,6-O-di-izopropiliden- α -D-glukofuranoza (**8**)

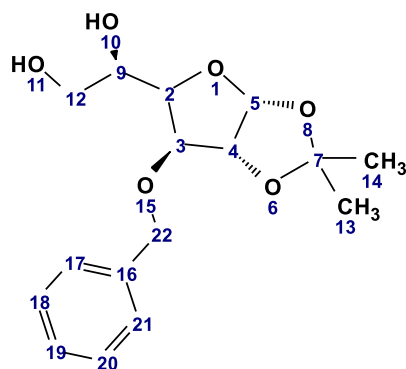


1,2;5,6-diizopropiliden-D-glukoza (1,0 g; 3,84 mmol; 1,0 ekv) je otopljena u dimetilformamidu (DMF; 2 mL). Dodan je benzil bromid (BnBr; 1,5 ekv; 5,76 mmol; 685 μ L) uz miješanje koje je nastavljeno sljedećih 5 minuta. Potom je reakcijska smjesa ohlađena na 0 °C. U ohlađenu otopinu dodan je natrij-hidrid (NaH; 2,17 ekv; 8,33 mmol; 200 mg) u malim porcijama, uz miješanje. Miješanje je nastavljeno 3 sata na sobnoj temperaturi.

Reakcija je zaustavljena dodatkom izopropanola (1 mL) pri 0 °C, nakon čega je dokapana H_2O (10 mL) pri 0 °C. Rezultirajuća smjesa je ekstrahirana s EtOAc. Organski sloj je osušen iznad bezvodnog Na_2SO_4 , nakon čega je profiltriran, a otapalo je upareno. Ostatak zaostao uparavanjem otapala je pročišćen tekućinskom kromatografijom na stupcu silikagela pri čemu je kao eluens korišten slijedeći sustav otapala: najprije PE:EtOAc = 10:1, a zatim PE:EtOAc = 3:1. Izoliran je produkt u obliku bezbojnog ulja (**8**; 1,26 g; η = 94%).

$C_{19}H_{26}O_6$; M_r = 350,41; R_f = 0,80 (PE:EtOAc = 1:1) ili R_f = 0,59 (PE:EtOAc = 3:1)

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm 7,27 – 7,20 (m, 5H, Bn (20-24)); 5,82 (d, J = 3,6 Hz, 1H, 5); 4,58 (q, J = 11,8 Hz, 2H, 25); 4,50 (d, J = 3,6 Hz, 1H, 4); 4,30 – 4,27 (m, 1H, 9); 4,07 (dd, J = 7,7 Hz; J = 3,0 Hz, 1H, 2); 4,05 – 4,01 (m, 1H, 13); 3,95 – 3,93 (m, 1H, 3); 3,93 – 3,90 (m, 1H, 13); 1,41; 1,35; 1,29; 1,23 (s, 12H, (17, 16, 15, 14)).

(b) 3-O-benzil-1,2-O-izopropiliden- α -D-glukofuranoza (**9**)

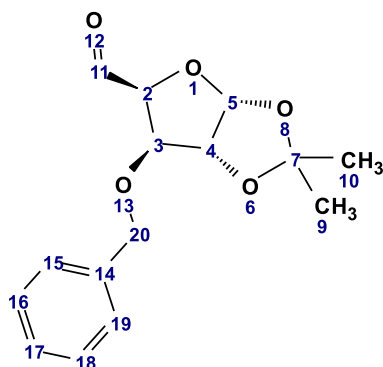
Produktu prethodnog reakcijskog koraka **8** (1,26 g; 3,60 mmol) je dodana octena kiselina (CH_3COOH ; 8,9 mL) i voda (3,8 mL). Reakcijska smjesa je miješana 4 sata pri temperaturi uljne kupelji od 55 °C. Po završetku reakcije, otapalo je upareno. Ostatak zaostao uparavanjem otapala pročišćen je tekućinskom kromatografijom na stupcu silikagela pri čemu je kao eluens korišten sljedeći sustav

otapala: najprije PE:EtOAc = 3:1, a potom PE:EtOAc = 1:1. Izoliran je produkt u obliku bezbojnog ulja (**9**; 982,0 mg; η = 88 %).

$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_6$; M_r = 310,35; R_f = 0,20 (PE:EtOAc = 1:1)

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ / ppm 7,30 – 7,16 (m, 5H, Bn (17-21)); 5,85 (d, J = 3,8 Hz, 1H, 5); 4,65 (d, J = 11,8 Hz, 1H, 22); 4,54 (d, J = 3,8 Hz, 1H, 22); 4,46 (d, J = 11,8 Hz, 1H, 4); 4,05 – 4,01 (m, 2H, 2, 12); 3,96 – 3,92 (m, 1H, 9); 3,73 (dd, J = 11,4 Hz, J = 3,5 Hz, 1H, 12); 3,61 (dd, J = 11,4 Hz, J = 5,7 Hz, 1H, 3); 1,40; 1,24 (s, 6H, (14, 13)).

(c) (3aR,4S,6R,6aR)-6-metoksi-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-karbaldehid (**10**)

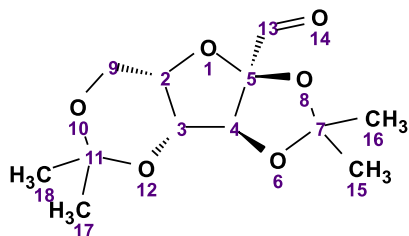


Produkt prethodnog reakcijskog koraka **9** (5,46 g; 17,59 mmol; 1,0 ekv) je otopljen u H₂O (38,4 mL) i DCM (38,4 mL). Zatim je dodan natrijev perjodat (NaIO₄; 1,54 ekv; 27,09 mmol; 5,79 g) u malim porcijama tijekom 20 minuta, uz miješanje. Miješanje je nastavljeno 1,5 h pri temperaturi uljne kupelji od 30 °C, a potom je dodan EtOH (63,4 mL). Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je profiltrirana te je isprana s H₂O. Filtrat je ekstrahiran s DCM, ispran s H₂O te je osušen iznad bezvodnog Na₂SO₄, nakon čega je profiltriran, a otapalo je upareno. Ostatak zaostao uparavanjem otapala pročišćen je tekućinskom kromatografijom na stupcu silikagela pri čemu je kao eluens korišten sustav otapala PE:EtOAc = 1,5:1. Izoliran je produkt u obliku prozirnog ulja (**10**; 4,01 g; η = 82 %).

C₁₅H₁₈O₅; M_r = 278,30; R_f = 0,70 (PE:EtOAc = 1:1)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ / ppm 9,69 (d, J = 1,5 Hz, 1H, 11); 7,38 – 7,29 (m, 4H, Bn(15, 16, 18, 19)); 7,25 (s, 1H, Bn(17)); 6,14 (d, J = 3,5 Hz, 1H, 5); 4,65 (d, J = 3,5 Hz, 1H, 2); 4,62 (d, J = 11,8 Hz, 1H, 20); 4,58 (dd, J = 3,7 Hz; J = 1,4 Hz, 1H, 20); 4,50 (d, J = 11,9 Hz, 1H, 4); 4,35 (d, J = 3,7 Hz, 1H, 3); 1,48; 1,35 (s, 6H, (9, 10)).

3.3.5. Sinteza i karakterizacija (3aS,3bR,7aS,8aR)-2,2,5,5-tetrametiltetrahidro-8aH-[1,3] dioksolo[4',5':4,5]furo[3,2-d][1,3]dioksin-8a-karbaldehida (**11**)¹³⁵



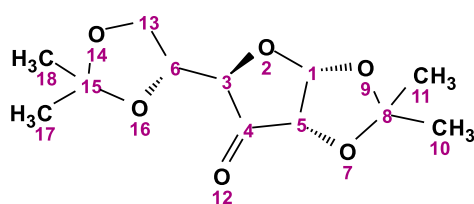
2,3;4,5-di-*O*-izopropiliden- α -L-sorbofuranoza (501 mg; 1,93 mmol; 1,0 ekv) je otopljena u suhom DCM (10 mL) te je dodan DMP (1,1 ekv; 2,12 mmol; 898,1 mg) u malim porcijama. Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena dodatkom zasićene vodene otopine NaHCO_3 i vodene otopine $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,

a potom je provedena ekstrakcija s DCM. Organski sloj je osušen iznad bezvodnog natrijevog sulfata (Na_2SO_4), nakon čega je profiltriran, a otapalo je upareno. Ostatak zaostao uparavanjem otapala čišćen je *flash* tekućinskom kromatografijom pri čemu je kao eluens korišten sustav otapala PE:EtOAc = 1:1. Izoliran je produkt u obliku bezbojnog ulja (**11**; 433,9 mg; η = 87 %).

$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_6$; M_r = 260,29; R_f = 0,35 (PE:EtOAc = 1:1)

3.3.6. Sinteza i karakterizacija (3aR,6R,6aR)-5-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioksolan-4-il)-2,2-dimetiltetrahidrofuro [2,3-d][1,3]dioksol-6-karbaldehida (**15**)¹³⁵

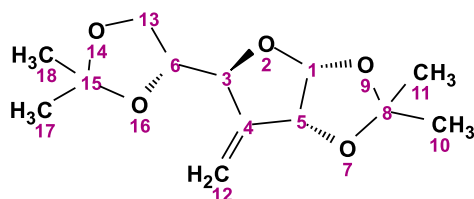
(a) 1,2;5,6-di-*O*-izopropiliden-3-keto- α -D-glukofuranoza (**12**)



1,2;5,6-di-*O*-izopropiliden- α -D-glukofuranoza (1,92 mmol; 1,0 ekv) je otopljena u DCM ($c \sim 0,2$ M). Potom je postepeno u malim obrocima dodan DMP (1,1 ekv). Miješanje je nastavljeno preko noći.

Reakcija je zaustavljena dodatkom zasićene vodene otopine NaHCO_3 i vodene otopine $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Miješanje je nastavljeno oko 30 minuta. Provedena je ekstrakcija s DCM. Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na_2SO_4 , nakon čega je profiltriran, a otapalo je upareno. Sirovi produkt **12** je korišten u narednom sintetskom koraku bez daljnjeg čišćenja.

$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_6$; M_r = 202,21; R_f = 0,38 (PE:EtOAc = 1:1)

(b) 1,2:5,6-di-O-izopropiliden-3-en- α -D-glukofuranoza (13)

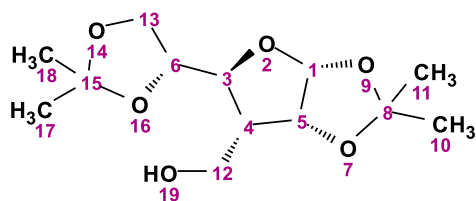
Metil-trifenil-fosfonijev bromid ($\text{PPH}_3\text{PCH}_3\text{Br}$; 2,0 ekv) je otopljen u suhom THF ($c \sim 0,6 \text{ M}$) i ohlađen na 0°C . Potom je dodana 2 M otopina $^t\text{BuOK}$ u THF (2,0 ekv). Miješanje je nastavljeno na sobnoj temperaturi oko 30 minuta. Zatim je reakcijska smjesa

ohlađena na 0°C te je dodan produkt prethodnog reakcijskog koraka (12; 1,0 ekv) otopljen u THF ($c \sim 0,6 \text{ M}$). Miješanje je nastavljeno oko 1 sat na 0°C , a potom 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon 2 sata reakcijska smjesa je ohlađena na 0°C te je dodan EtOAc i H_2O . Miješanje je nastavljeno oko 30 minuta. Provedena je ekstrakcija s EtOAc. Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na_2SO_4 , uparen te je čišćen tekućinskom kromatografijom koristeći pritom kao eluens sustav otapala $\text{PE}:\text{EtOAc} = 2:1$ pri čemu je izoliran produkt u obliku prozirnog ulja (13; 2,78 g; $\eta = 79 \%$).

$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_5$; $M_r = 202,21$; $R_f = 0,80$ ($\text{PE}:\text{EtOAc} = 1:1$)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ / ppm 5,81 (d, $J = 4,0 \text{ Hz}$, 1H, 1); 5,53 – 5,48 (m, 1H, 12); 5,47 – 5,42 (m, 1H, 12); 4,92 – 4,86 (m, 1H, 5); 4,70 – 4,62 (m, 1H, 6); 4,11 – 4,02 (m, 2H, (3, 13)); 3,98 – 3,90 (m, 1H, 13'); 1,52; 1,44; 1,37; 1,36 (s, 12H, (18, 17, 11, 10)).

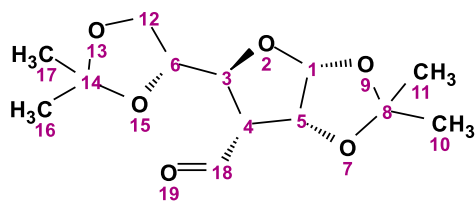
$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ / ppm 146,8 (4); 113,5 (12); 112,6 (8); 109,8 (15); 104,6 (1); 82,2 (3); 79,2 (5); 77,34 (6); 66,8 (13); 27,4; 27,1; 26,6; 25,4 (18, 17, 11, 10)).

(c) 1,2;5,6-di-O-izopropiliden-3-hidroksimetil- α -D-glukofuranoza (**14**)

Produkt prethodnog reakcijskog koraka (**13**; 1,0 ekv) je otopljen u suhom THF ($c \sim 0,13$ M) i ohlađen na 0 °C. Ohlađenoj otopini je dodan 2 M otopina boran-dimetilsulfid kompleksa u THF-u ($\text{BH}_3\text{-SMe}_2$; 6,0 ekv). Miješanje je nastavljeno na sobnoj

temperaturi (4–18 sati). Reakcijska smjesa je ohlađena na 0 °C te je uzastopno dodan $\text{THF:H}_2\text{O} = 1:1$, 2M NaOH i 30 % H_2O_2 . Miješanje je nastavljeno na sobnoj temperaturi oko 3 sata. Provedena je ekstrakcija sustavom DCM/ H_2O . Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na_2SO_4 , uparen, ali ne do suha već je produkt **14** korišten u slijedećem reakcijskom koraku bez daljnjeg čišćenja.

$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_6$; $M_r = 274,31$; $R_f = 0,38$ (PE:EtOAc = 1:1)

(d) (3aR,6R,6aR)-5-((S)-2,2-dimetil-1,3-dioksolan-4-il)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[2,3-d][1,3]dioksol-6-karbaldehid (**15**)

Otopini produkta **14** u DCM-u ($c \sim 0,20$ M) postepeno je u malim obrocima dodan DMP (1,1 ekv). Miješanje je nastavljeno 1–2 sata. Reakcija je zaustavljena dodatkom zasićene vodene otopine NaHCO_3 i vodene otopine $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Nakon 30 minuta provedena

je ekstrakcija s DCM. Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na_2SO_4 , uparen te je čišćen tekućinskom kromatografijom koristeći pritom kao eluens sustav otapala PE:EtOAc = 1:1. Izoliran je produkt u obliku prozirnog ulja (**15**; 939,1 mg; $\eta = 63$ %).

$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_6$; $M_r = 274,31$; $R_f = 0,60$ (PE:EtOAc = 1:1)

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ / ppm 9,72 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 18); 5,87 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H, 1); 5,00 (dd, $J = 5,4$ Hz; $J = 3,7$ Hz, 1H, 5); 4,57 (dd, $J = 9,4$ Hz; $J = 6,2$ Hz, 1H, 3); 4,17 – 4,04 (m, 2H, (6, 12)); 3,93 (dd, $J = 8,7$ Hz; $J = 5,0$ Hz, 1H, 12'); 2,95 – 2,85 (m, 1H, 4); 1,51; 1,39; 1,31 (s, 12H, CH_3 (17, 16, 11, 10)).

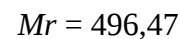
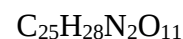
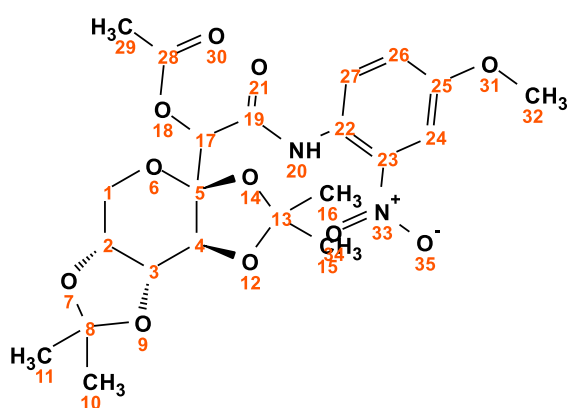
^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): δ / ppm 197,4 (18); 113, (8); 109,7 (14); 105,7 (1); 81,5 (5); 78,2 (3); 76,6 (6); 66,6 (12); 58,2 (4); 26,7; 26,4; 26,4; 24,8 (17, 16, 11, 10).

3.4. Sinteza C-glikozilnih α -aminokiselina

3.4.1. Sinteza α -aciloksiamida dobivenih Passerinijevom reakcijom

Aldehid odgovarajućeg ugljikohidrata (1,0 ekv) je otopljen u suhom DCM ($c = 0,5 \text{ M}$), a zatim je dodan izocijanid **2** (1,0 ekv) i octena kiselina (1,0 ekv). Miješanje je nastavljeno 12–24 sata na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije otapalo je upareno. Ostatak zaostao uparavanjem čišćen je brzom tekućinskom kromatografijom pri čemu je kao eluens korišten sustav otapala PE:EtOAc = 1:1. Izoliran je produkt u obliku crvenog ulja.

3.4.1.1. Sinteza i karakterizacija 2-((4-metoksi-2-nitrofenil)amino)-2-okso-1-((3aR,5aR,8aR,8bS)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-3aH-bis([1,3]dioksolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-3a-il)etil acetata (**16**)



crveno ulje; ($m = 2,39 \text{ g}$; 94 %)

$R_f = 0,61$ (PE:EtOAc=1:1)

Smjesa diastereoizomera 90:10 d.r. Navedeni su kemijski pomaci za oba diastereoizomera.

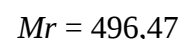
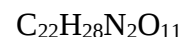
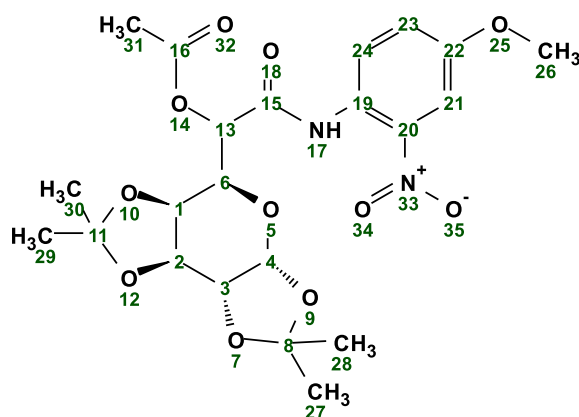
DS1, većinski diastereoizomer, (S)-**16**. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ / ppm 10,94 (s, 0,90H, NH(20)); 8,76 – 8,69 (m, 0,90H, 24); 7,67 (d, $J = 3,0 \text{ Hz}$, 0,90H, 27); 7,18 (dd, $J = 9,3 \text{ Hz}$; $J = 3,0 \text{ Hz}$, 0,90H, 26); 5,24 (s, 0,90H, 17); 4,65 (dd, $J = 7,8$; $J = 2,8 \text{ Hz}$, 0,90H, 3) ; 4,43 (d, $J = 2,8 \text{ Hz}$, 0,90H, 2); 4,29 – 4,25 (m, 0,90H, 4); 3,93 (d, $J = 1,1 \text{ Hz}$, 1,80H, 1, 1'); 3,84 (s, 2,70H, 32); 2,24 (s, 2,70H, 29); 1,55; 1,54; 1,35 (s, 10,80H, CH_3 (16, 15, 11, 10)).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ / ppm 169,10 (19); 164,43 (28); 154,93 (25); 128,29 (23); 123,86 (22, 27); 123,09 (26); 110,0 (13); 109,6 (8); 108,6 (24); 101,8 (5); 74,9 (17); 70,7 (4); 70,5 (3); 70,1 (2); 61,9 (1); 55,9 (32); 26,5; 26,1; 25,2; 24,4 (16, 15, 11, 10); 20,7 (29).

DS2, manjinski diastereoizomer, (*R*)-**16**. **¹H NMR** (600 MHz, CDCl₃): δ / ppm 11,03 (s, 0,10H, NH(20)); 8,76 – 8,69 (m, 0,10H, 24); 7,69 (d, J = 3,0 Hz, 0,10H, 27); 7,21 (dd, J = 9.3 Hz; J = 3,1 Hz, 0,10H, 26) ; 5,56 (s, 0,10H, 17); 4,62 (dd, J = 6,1 Hz; J = 2,5 Hz, 0,10H, 3); 4,49 (d, J = 2,6 Hz, 0,10H, 2); 4,23 – 4,20 (m, 0,10H, 4); 3,93 (d, J = 1,1 Hz, 0,20H, 1, 1'); 3,85 (s, 0,30H, 32), 2.30 (s, 0,30H, 29); 1,55; 1,54; 1,33 (s, 1,20H, CH₃(16, 15, 11, 10)).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ / ppm 169,7 (19); 164,8 (28); 155,1 (25); 127,9 (23); 123,6 (22, 27); 123,2 (26); 109,3 (13); 109,2 (8); 108,8 (24); 102,1 (5); 75,9 (17); 70,9 (4); 70,4 (3); 70,0 (2); 61,5 (1); 55,9 (32); 26,3; 25,7; 24,9; 23,8 (16, 15, 11, 10); 20,7 (29).

3.4.1.2. *Sinteza i karakterizacija 2-((4-metoksi-2-nitrofenil)amino)-2-okso-1-((3aR,5S,5aS,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-5H-bis([1,3]dioksolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-il) etil acetata (17)*



crveno ulje; ($m = 1,61$ g; 92 %)

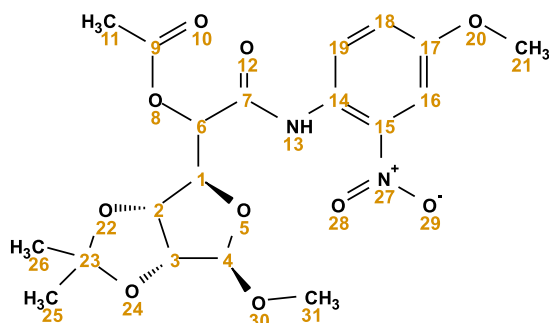
$R_f = 0,56$ (PE:EtOAc = 1:1)

Smjesa dijastereoizomera 65:35 d.r. Navedeni su kemijski pomaci za oba dijastereoizomera.

DS1, većinski dijastereoizomer, (*S*)-**17**. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ / ppm 10,61 (s, 0,65H, NH(17)); 8,62 (d, $J = 9,3$ Hz, 0,65H, 24); 7,65 (d, $J = 3,0$ Hz, 0,65H, 21); 7,23 – 7,16 (m, 0,65H, 23); 5,63 – 5,57 (m, 0,65H, 13); 5,21 (d, $J = 9,4$ Hz, 0,65H, 4); 4,66 (dd, $J = 7,8$ Hz; $J = 2,6$ Hz, 0,65H, 3); 4,40 – 4,33 (m, 0,65H, 2); 4,20 (dd, $J = 9,4$ Hz; $J = 1,8$ Hz, 0,65H, 1); 3,84 (s, 1,95H, $\text{OCH}_3(26)$); 2,20 (s, 1,95H, 31); 1,58 (s, 0,65H, $\text{CH}_3(30)$); 1,48 (s, 1,30H, $\text{CH}_3(30)$); 1,46 (s, 1,30H, $\text{CH}_3(29)$); 1,40 (s, 0,65H, $\text{CH}_3(29)$); 1,34 (s, 1,95H, $\text{CH}_3(28)$); 1,29 (s, 1,95H, $\text{CH}_3(27)$). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ / ppm 169,6 (16); 167,0 (15); 155,1 (20); 137,5 (22); 127,8 (19); 124,1 (24); 122,9 (23); 109,9 (11); 109,2 (8); 108,7 (21); 96,3 (4); 71,9 (2); 70,6 (1); 70,5 (3); 70,4 (6); 67,0 (13); 55,9 (26); 26,0; 25,9; 24,9; 24,7 (27, 28, 29, 30); 20,6 (26).

DS2, manjinski dijastereoizomer, (*R*)-**17**. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ / ppm 10,88 (s, 0,35H, NH(17)); 8,71 (d, $J = 9,3$ Hz, 0,35H, 24); 7,66 (d, $J = 3,0$ Hz, 0,35H, 21); 7,23 – 7,16 (m, 0,35H, 23); 5,63 – 5,57 (m, 0,35H, 13); 5,21 (d, $J = 9,4$ Hz, 0,35H, 4); 4,62 (dd, $J = 7,9$ Hz; $J = 2,3$ Hz, 0,35H, 3); 4,40 – 4,33 (m, 0,35H, 2); 4,20 (dd, $J = 9,4$ Hz; $J = 1,8$ Hz, 0,35H, 1); 3,85 (s, 1,05H, $\text{OCH}_3(26)$); 2,28 (s, 1,05H, 31); 1,58 (s, 0,35H, $\text{CH}_3(30)$); 1,48 (s, 0,70H, $\text{CH}_3(30)$); 1,46 (s, 0,70H, $\text{CH}_3(29)$); 1,40 (s, 0,35H, $\text{CH}_3(29)$); 1,33 (s, 1,05H, $\text{CH}_3(28)$); 1,30 (s, 1,05H, $\text{CH}_3(27)$). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ / ppm 169,8 (16); 166,5 (15); 155,2 (20); 137,3 (22); 127,7 (19); 123,7 (24); 123,2 (23); 109,7 (11); 109,2 (8); 108,7 (21); 96,3 (4); 72,6 (2); 71,4 (1); 70,9 (3); 70,8 (6); 67,1 (13); 55,9 (26); 26,1; 25,8; 25,0; 24,1 (27, 28, 29, 30); 20,9 (31).

3.4.1.3. Sinteza i karakterizacija 1-((3aR,4S,6R,6aR)-6-metoksi-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)-2-((4-metoksi-2-nitrofenil)amino)-2-oksoetil acetata (**18**)



$C_{19}H_{24}N_2O_4$

$M_r = 440,41$

crveno ulje; ($m = 1,22$ g, 94 %)

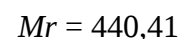
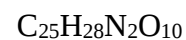
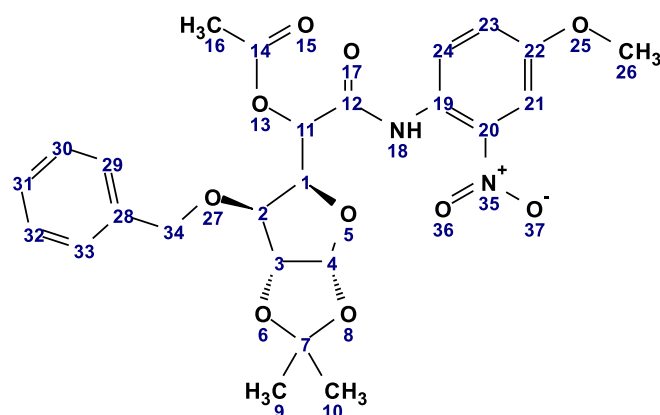
$R_f = 0,55$ (PE:EtOAc = 1:1)

Smjesa dijastereoizomera 80:20 d.r. Navedeni su kemijski pomaci za oba dijastereoizomera.

DS1, glavni dijastereoizomer, (S)-**18**. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm 10,88 (s, $J = 10,8$ Hz, 0,80H, NH(13)); 8,85 – 8,60 (m, 0,80H, 16); 7,76 – 7,50 (m, 0,80H, 19); 7,30 – 7,17 (m, 0,80H, 18); 5,51 (d, $J = 4,6$ Hz, 0,80H, 6); 5,11 – 4,96 (m, 0,80H, 4); 4,89 (d, $J = 5,9$ Hz, 0,80H, 1); 4,83 – 4,66 (m, 0,80H, 3); 4,65 – 4,55 (m, 0,80H, 2); 3,86 (s, $J = 22,0$ Hz, 2,40H, OCH_3 (21)); 3,30 (s, 2,40H, OCH_3 (31)); 2,30 (s, $J = 9,9$ Hz, 2,40H, 11); 1,48; 1,32 (s, 4,80H, CH_3 (26, 25)). ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm 169,3 (9); 166,1 (7); 155,5 (17); 137,2 (15); 127,5 (14); 123,6 (19); 123,4 (18); 112,8 (23); 111,2 (16); 108,8 (4); 86,7 (3); 85,6 (2); 81,1 (1); 74,2 (6); 56,0 (31); 55,9 (21); 26,6; 25,1 (26, 25); 20,9 (11).

DS2, manjinski dijastereoizomer, (R)-**18**. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm 10,88 (s, 0,20H, NH(13)); 8,85 – 8,60 (m, 0,20H, 16); 7,76 – 7,50 (m, 0,20H, 19); 7,30 – 7,17 (m, 0,20H, 18); 5,42 (d, $J = 6,0$ Hz, 0,20H, 6); 5,11 – 4,96 (m, 0,20H, 4); 4,89 (d, $J = 5,9$ Hz, 0,20H, 1); 4,83 – 4,66 (m, 0,20H, 3); 4,65 – 4,55 (m, 0,20H, 2); 3,86 (s, $J = 22,0$ Hz, 0,60H, OCH_3 (21)); 3,30 (s, 0,60H, OCH_3 (31)); 2,30 (s, $J = 9,9$ Hz, 0,60H, 11); 1,48; 1,32 (s, 1,20H, CH_3 (26, 25)). ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm 169,6 (9); 166,4 (7); 155,5 (17); 137,1 (15); 127,4 (14); 123,5 (19); 123,5 (18); 112,9 (23); 110,0 (16); 108,9 (4); 86,4 (3); 85,3 (2); 81,0 (1); 74,5 (6); 55,8 (31); 55,4 (21); 26,6; 25,2 (26, 26); 20,8 (11).

3.4.1.4. Sinteza i karakterizacija 1-((3aR,5S,6S,6aR)-6-(benziloksi)-2,2-dimetiltetrahidrofuro [2,3-d][1,3]dioksol-5-il)-2-((4-metoksi-2-nitrofenil)amino)-2-oksoetil acetata (**19**)



crveno ulje; ($m = 682,2$ mg; 94 %)

$R_f = 0,62$ (PE:EtOAc=1:1)

Smjesa dijastereoizomera 55:45 d.r. Navedeni su kemijski pomaci za oba dijastereoizomera.

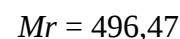
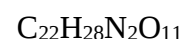
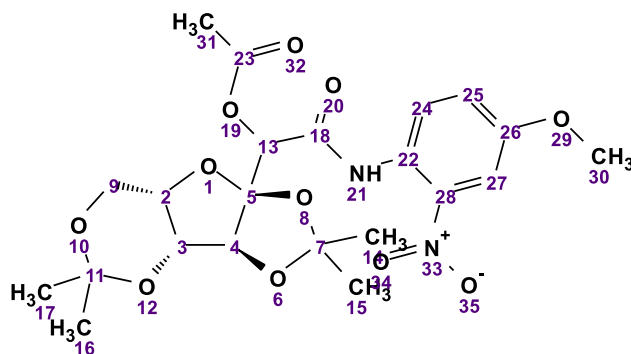
DS1, glavni dijastereoizomer (S)-**19**. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ / ppm 10,63 (s, 0,55H, 18); 8,64 (d, $J = 9,3$ Hz, 0,55H, 24); 7,77 – 7,53 (m, 0,55H, 21); 7,40 – 7,25 (m, 2,75H, (23, 29, 30, 32, 33)); 7,23 – 7,14 (m, 0,55H, 31); 6,24 – 5,93 (m, 0,55H, 11); 5,41 (d, $J = 8,7$ Hz, 0,55H, 4); 4,76 – 4,62 (m, 1,10H, 34); 4,60 – 4,52 (m, 0,55H, 1); 4,51 – 4,27 (m, 0,55H, 2); 4,23 – 4,07 (m, 0,55H, 3); 3,85 (s, 1,65H, $\text{OCH}_3(26)$); 2,18 – 2,03 (m, 1,65H, 16); 1,47; 1,33 (s, 3,30H, $\text{CH}_3(10, 9)$).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ / ppm 169,3 (14); 166,8 (12); 155,1 (22); 137,3 (20); 136,7 (28); 128,6 (30); 128,3 (32); 128,2 (29); 128,0 (33); 127,9 (31); 127,6 (19); 124,0 (24); 123,0 (23); 112,4 (7); 108,6 (21); 105,6 (4); 82,7 (2); 81,7 (3); 78,4 (1); 72,1 (34); 70,9 (11); 55,9 (26); 26,8; 26,3 (9, 10); 20,5 (16).

DS2, manjinski dijastereoizomer, (R)-**19**. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ / ppm 10,76 (s, 0,45H, 18); 8,58 (d, $J = 9,3$ Hz, 0,45H, 24); 7,77 – 7,53 (m, 0,45H, 21); 7,40 – 7,25 (m, 2,25H, (23, 29, 30, 32, 33)); 7,23 – 7,14 (m, 0,45H, 31); 6,24 – 5,93 (m, 0,45H, 11); 5,76 (d, $J = 5,5$ Hz, 0,45H, 4); 4,76 – 4,62 (m, 0,9H, 34); 4,60 – 4,52 (m, 0,45H, 1); 4,51 – 4,27 (m, 0,45H, 2); 4,23 – 4,07 (m, 0,45H, 3); 3,85 (s, 1,35H, $\text{OCH}_3(26)$); 2,18 – 2,03 (m, 1,35H, 16); 1,47; 1,33 (s, $J = 10,2$ Hz, 2,70H, $\text{CH}_3(10, 9)$).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ / ppm 169,6 (14); 166,7 (12); 155,2 (22); 137,3 (20); 136,9 (28); 128,6 (30); 128,3 (32); 128,2 (29); 128,0 (33); 127,9 (31); 127,9 (19); 123,8 (24); 123,1 (23); 112,4 (7); 108,7 (21); 105,1 (4); 82,6 (2); 81,0 (3); 79,1 (1); 72,5 (34); 71,0 (11); 55,9 (26); 27,0; 26,4 (9, 10); 20,8 (16).

3.4.1.5. *Sinteza i karakterizacija 2-((4-metoksi-2-nitrofenil)amino)-2-okso-1-((3a*S*,3b*R*,7a*S*,8a*R*)-2,2,5,5-tetrametiltetrahidro-8a*H*-[1,3]dioksolo[4',5':4,5]furo[3,2-*d*][1,3]dioksin-8a-il)etil acetata (20)*



crveno ulje; ($m = 1,53$ g; 91 %)

$R_f = 0,58$ (PE:EtOAc = 1:1)

Smjesa dva diastereoizomera 82:18 d.r. Navedeni su kemijski pomaci za oba diastereoizomera.

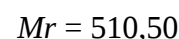
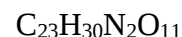
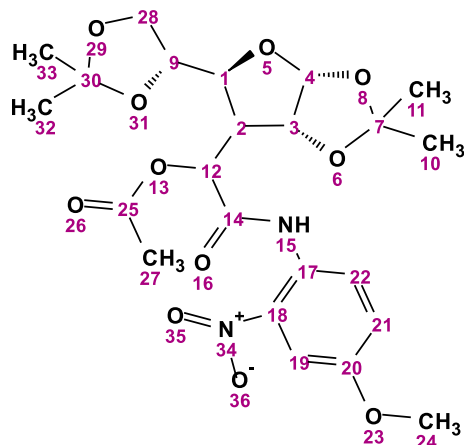
DS1, većinski diastereoizomer, (*S*)-**20**. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ / ppm 10,98 (s, 0,82H, NH); 8,75 (dd, $J = 22,1$ Hz, $J = 9,4$ Hz, 0,82H, Ar(27)); 7,75 – 7,59 (m, 0,82H, Ar(24)); 7,22 – 7,16 (m, 0,82H, Ar(25)); 5,54 (d, $J = 61,6$ Hz, 0,82H, 13); 4,51 (s, 0,82H, 2); 4,39 – 4,33 (m, 0,82H, 4); 4,32 – 4,23 (m, 1,64H, 9, 9'); 4,10 – 4,05 (m, 0,82H, 3); 3,84 (br s, 2,46H, OCH_3 (30)); 2,26 (s, 2,46H, 31); 1,49; 1,47; 1,43; 1,33 (s, 9,84H, 17, 16, 15, 14)).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ / ppm 169,2 (18); 164,4 (23); 154,9 (26); 137,3 (28); 128,2 (22); 124,0 (24); 122,9 (7); 113,7 (25); 112,6 (11); 108,6 (5); 97,6 (27); 85,5 (2); 74,2 (4); 73,9 (3); 72,7 (13); 59,9 (9); 55,9 (30); 28,8; 27,5; 26,3; 20,7 (17, 16, 15, 14); 18,7 (31).

DS2, manjinski diastereoizomer. (*R*)-**20**. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ / ppm 10,91 (s, 0,18H, NH); 8,67 (d, $J = 9,3$ Hz, 0,18H, Ar(27)); 7,75 – 7,59 (m, 0,18H, Ar(24)); 7,22 – 7,16 (m, 0,18H, Ar(25)); 5,70 (d, $J = 49,8$ Hz, 0,18H, 13); 4,51 (s, 0,18H, 2); 4,39 – 4,33 (m, 0,18H, 4); 4,32 – 4,23 (m, 0,36H, 9, 9'); 4,10 – 4,05 (m, 0,18H, 3); 3,84 (br s, 0,54H, OCH_3 (30)); 2,31 (s, 0,54H, 31); 1,49; 1,47; 1,43; 1,33 (s, 2,16H, CH_3 (17, 16, 15, 14)).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ / ppm 169,3 (18); 164,8 (23); 155,0 (26); 137,3 (28); 128,1 (22); 123,5 (24); 123,0 (7); 113,2 (25); 112,6 (11); 108,7 (5); 97,5 (27); 85,2 (2); 73,3 (4); 73,2 (3); 72,6 (13); 59,8 (9); 55,9 (30); 27,8; 27,7; 26,4; 21,0 (17, 16, 15, 14); 18,8 (31).

3.4.1.6. *Sinteza i karakterizacija 1-((3aR,5R,6aR)-5-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioksolan-4-il)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[2,3-d][1,3]dioksol-6-il)-2-((4-metoksi-2-nitrofenil)amino)-2-oksoetil acetata (21)*



crveno ulje; ($m = 1,12 \text{ g}$; 93 %)

$R_f = 0,52$ (PE:EtOAc = 1:1)

Smjesa dijastereoizomera 90:10 d.r. Navedeni su kemijski pomaci za oba dijastereoizomera.

DS1, većinski dijastereoizomer (*S*)-**21**. **¹H NMR** (600 MHz, CDCl₃): δ / ppm 10,80 (s, 0,90H, 21); 8,69 (d, $J = 9,3 \text{ Hz}$, 0,90H, 25); 7,68 (d, $J = 3,0 \text{ Hz}$, 0,90H, 28); 7,23 (dd, $J = 9,3 \text{ Hz}$, $J = 3,1 \text{ Hz}$, 0,90H, 27); 5,82 (d, $J = 4,9 \text{ Hz}$, 0,90H, 18); 5,78 (d, $J = 3,8 \text{ Hz}$, 0,90H, 4); 4,79 (t, $J = 4,2 \text{ Hz}$, 0,90H, 9); 4,41 (dd, $J = 9,9 \text{ Hz}$; $J = 6,0 \text{ Hz}$, 0,90H, 3); 4,16 – 4,05 (m, 2,70H, 13, 13', 1); 3,86 (s, 2,70H, 30); 2,62 (dt, $J = 9,7 \text{ Hz}$; $J = 4,8 \text{ Hz}$, 0,90H, 2); 2,31 (s, 2,70H, 33); 1,39; 1,36; 1,24; 1,21 (s, 10,80H, CH₃(14, 15, 16, 17)).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ /ppm 169,2 (20); 167,95 (31); 155,2 (26); 127,9 (24); 123,3 (23, 28, 27); 112,4 (7); 109,7 (11); 108,7 (25); 104,5 (4); 81,5 (1); 78,3 (3); 76,9 (9); 69,7 (18); 66,8 (13); 55,9 (30); 48,5 (2); 26,4; 26,3; 26,1; 25,1 (14, 15, 16, 17); 20,9 (33).

DS1, manjinski dijastereoizomer, (*R*)-**21**. **¹H NMR** (600 MHz, CDCl₃): δ / ppm 10,80 (s, 0,10H, 21); 8,69 (d, $J = 9,3 \text{ Hz}$, 0,10H, 25); 7,68 (d, $J = 3,0 \text{ Hz}$, 0,10H, 28); 7,23 (dd, $J = 9,3 \text{ Hz}$; $J = 3,1 \text{ Hz}$, 0,10H, 27); 5,87 (d, $J = 3,7 \text{ Hz}$, 0,10H, 18); 5,70 (d, $J = 5,8 \text{ Hz}$, 0,10H, 4); 4,79 (t, $J = 4,2 \text{ Hz}$, 0,10H, 9); 4,41 (dd, $J = 9,9 \text{ Hz}$; $J = 6,0 \text{ Hz}$, 0,10H, 3); 4,16 – 4,05 (m, 0,30H, 13, 13', 1); 3,91 (s, 0,30H, 30); 2,62 (dt, $J = 9,7 \text{ Hz}$; $J = 4,8 \text{ Hz}$, 0,30H, 2); 2,24 (s, 0,30H, 33); 1,39; 1,36; 1,24; 1,21 (s, 1,20H, CH₃(14, 15, 16, 17)).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ /ppm 169,6 (20); 168,1 (31); 155,3 (26); 127,5 (24); 123,1 (23, 28, 27); 112,8 (7); 109,8 (11); 108,8 (25); 105,1 (4); 80,6 (1); 77,5 (3); 76,6 (9); 71,1 (18); 67,6 (13); 56,4 (30); 49,0 (2); 26,7; 26,6; 25,0; 24,8 (14, 15, 16, 17); 20,8 (33).

3.4.2. Sinteza metilnog estera α -hidroksi C-glikozilne kiseline

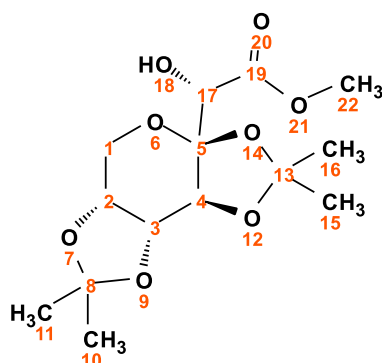
(a) Hidroliza Passerinijevog produkta – priprava α -hidroksi C-glikozilne kiseline

Passerinijev produkt (1,0 ekv) je otopljen u metanolu ($c = 0,1$ M), a zatim je dodan NaOH (5 ekv). Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije otapalo je upareno. Ostatak zaostao uparavanjem je očišćen tekućinskom kromatografijom pri čemu je kao eluens korišten slijedeći sustav otapala, najprije PE:EtOAc = 1:1, a potom EtOAc:EtOH:AcOH:H₂O = 70:10:2:2. Izoliran je produkt u obliku žutog ulja.

(b) Metiliranje α -hidroksi C-glikozilne kiseline

Produkt prethodnog reakcijskog koraka (1,0 ekv) je otopljen u MeCN ($c = 0,1$ M), a zatim je dodan kalijev karbonat (K₂CO₃; 1,5 ekv) i polagano je dokapan metil jodid (CH₃I; 3,0 ekv). Miješanje je nastavljeno 4–24 sata uz refluks pri temperaturi uljne kupelji od 78 °C. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je uparena te je provedena ekstrakcija sustavom EtOAc/zasićena vodena otopina NaHCO₃. Organski sloj je osušen iznad bezvodnog Na₂SO₄, profiltriran, a otapalo je upareno. Sirovi produkt očišćen je tekućinskom kromatografijom pri čemu je kao eluens korišten sustav otapala PE:EtOAc = 1:1. Izoliran je produkt u obliku žuto-smeđeg ulja.

3.4.2.1. Sinteza i karakterizacija metil (S)-2-hidroksi-2-((3aS,5aR,8aR,8bS)-2,2,7,7-tetrametil tetrahydro-3aH-bis([1,3]dioksolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-3a-il)acetata (22)


 $C_{14}H_{22}O_8$
 $Mr = 318,32$

žuto-smeđe ulje; ($m = 832,1$ mg; 85 %)

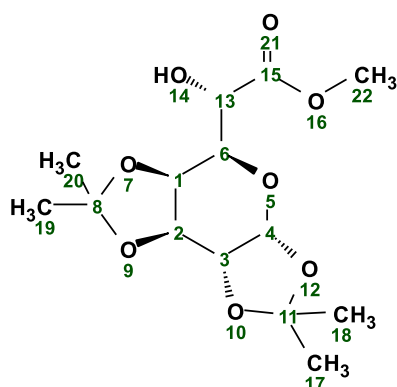
 $R_f = 0,58$ (PE:EtOAc = 1:1)

 $R_f = 0,88$ (EtOAc:EtOH:AcOH:H₂O = 70:10:2:2)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ / ppm 4,63 (dd, $J = 7,9$ Hz; $J = 2,8$ Hz, 1H, 17); 4,53 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, 3); 4,27 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, 2); 4,25 – 4,20 (m, 1H, 4); 3,88 (dd, $J = 13,0$, 1,9 Hz, 1H, 1); 3,80 (s, 3H, 22); 3,77 (d, $J = 13,1$ Hz, 1H, 1'); 1,54; 1,51; 1,42; 1,35 (s, 12H, (16, 15, 11, 10)).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ / ppm 172,3 (19); 109,6 (13); 109,4 (18); 102,9 (5); 72,3 (4); 70,8 (3); 70,4 (17); 70,1 (2); 61,8 (1); 52,6 (22); 26,5; 25,8; 25,4; 24,2 (16, 15, 11, 10).

3.4.2.2. Sinteza i karakterizacija metil (S)-2-hidroksi-2-((3aR,5R,5aS,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidroksi-5H-bis([1,3]dioksolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-il)acetata (23)


 $C_{14}H_{22}O_8$
 $Mr = 318,32$

žuto-smeđe ulje; ($m = 1,01$ g; 62 %)

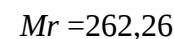
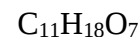
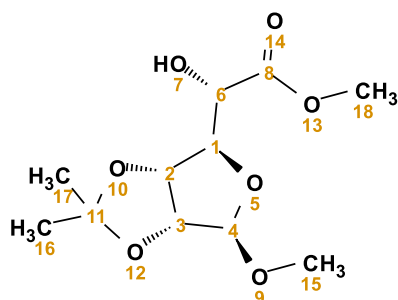
 $R_f = 0,55$ (PE:EtOAc = 1:1)

 $R_f = 0,83$ (EtOAc:EtOH:AcOH:H₂O = 70:10:2:2)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ / ppm 5,55 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H, 4); 4,62 (dd, $J = 8,0$ Hz; $J = 2,5$ Hz, 1H, 2); 4,44 – 4,38 (m, 2H, 1, 13); 4,32 (dd, $J = 5,0$ Hz; $J = 2,5$ Hz, 1H, 3); 3,95 (dd, $J = 7,3$ Hz; $J = 1,7$ Hz, 1H, 6); 3,81 (s, 3H, 22); 3,26 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, 14); 1,51; 1,48; 1,35; 1,32 (s, 12H, 20, 19, 18, 17).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ / ppm 173,3 (15); 109,8 (11); 108,9 (8); 96,4 (4); 71,1 (1); 71,0 (13); 70,7 (3); 70,5 (2); 67,8 (6); 52,6 (22); 26,0; 25,9; 24,9; 24,3 (20, 19, 18, 17).

3.4.2.3. *Sinteza i karakterizacija metil (S)-2-hidroksi-2-((3aR,4R,6R,6aR)-6-metoksi-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)acetata (24)*



žuto-smeđe ulje; ($m = 732,8$ mg; 77 %)

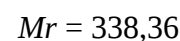
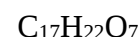
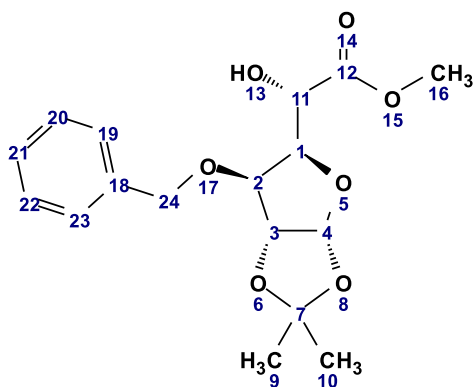
$R_f = 0,54$ (PE:EtOAc = 1:1)

$R_f = 0,85$ (EtOAc:EtOH:AcOH:H₂O = 70:10:2:2)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ / ppm 4,99 (s, 1H, 4); 4,89 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H, 3); 4,59 (t, $J = 4,9$ Hz, 2H, 2, 7); 4,32 (t, $J = 3,4$ Hz, 1H, 1); 3,91 (d, $J = 3,4$ Hz, 1H, 10); 3,82 (s, 3H, 18); 3,43 (s, 3H, 15); 1,47; 1,30 (s, 6H, (16, 17)).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ / ppm 171,2 (8); 112,4 (11); 110,4 (4); 89,0 (3); 85,5 (1); 80,6 (2); 72,3 (6); 55,8 (15); 52,6 (18); 26,3; 24,7 (16, 17).

3.4.2.4. *Sinteza i karakterizacija metil (S)-2-((3aR,5R,6S,6aR)-6-(benziloksi)-2,2-dimetil tetrahidrofuro[2,3-d][1,3]dioksol-5-il)-2-hidroksiacetata (25)*



žuto-smeđe ulje; ($m = 357,1$ mg; 42 %)

$R_f = 0,56$ (PE:EtOAc = 1:1)

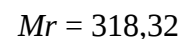
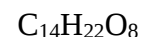
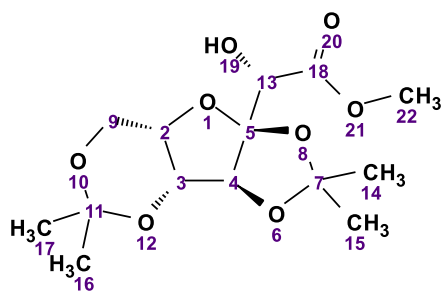
$R_f = 0,87$ (EtOAc:EtOH:AcOH:H₂O = 70:10:2:2)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ / ppm 7,44 – 7,29 (m, 5H, 21, 22, 23, 19, 21); 6,03 (d, $J = 3,9$ Hz, 1H, 4); 4,71 – 4,61 (m, 2H, 24); 4,59 – 4,50 (m, 2H, 11, 1); 4,40 (dd, $J = 6,0$ Hz; $J = 3,8$ Hz, 1H, 2); 4,18 – 4,12 (m, 1H, 3); 3,76 (s, 3H, 16); 3,37 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, 13); 1,49; 1,33 (s, 6H, (9, 10)).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): δ / ppm 173,1 (12); 136,6 (18); 128,6 (20, 22); 128,3 (19,23); 128,1 (21); 112,2 (7); 105,4 (4); 83,2 (2); 82,2 (3); 79,7 (1); 72,6 (24); 69,9 (11); 52,6 (16); 26,9; 26,4 (9, 10).

Dijastereoizomeri produkta su razdvojeni tekućinskom kromatografijom na stupcu silikagela pri čemu je kao eluens korišten sustav otapala $\text{EtOAc}:\text{EtOH}:\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O} = 70:10:2:2$. Navedeni su kemijski pomaci jednog od dijastereoizomera produkta, d.r. 55:45.

3.4.2.5. *Sinteza i karakterizacija metil (S)-2-hidroksi-2-((3aS,3bR,7aS,8aS)-2,2,5,5-tetrametil tetrahidro-8aH-[1,3]dioksolo[4',5':4,5]furo[3,2-d][1,3]dioksin-8a-il)acetata (26)*



žuto-smeđe ulje; ($m = 1,61$ g; 78 %)

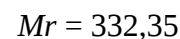
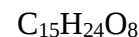
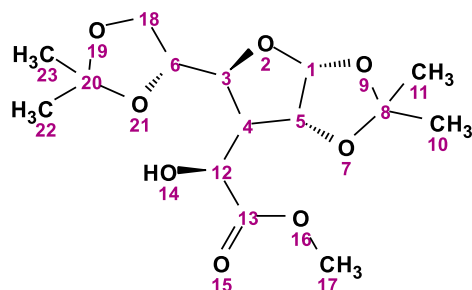
$R_f = 0,45$ (PE:EtOAc = 1:1)

$R_f = 0,80$ (EtOAc:EtOH:AcOH:H₂O = 70:10:2:2)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ / ppm 4,72 (s, 1H, 13); 4,45 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, 2); 4,37 – 4,29 (m, 1H, 4); 4,20 – 4,13 (m, 1H, 3); 4,07 (d, $J = 1,8$ Hz, 2H, 9, 9'); 3,83 (s, 3H, 22); 3,49 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, 19); 1,49 (s, 3H, 15); 1,44 (s, 3H, 14); 1,39 (s, 3H, 17); 1,35 (s, 3H, 27).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): δ / ppm 172,2 (18); 114,1 (7); 113,2 (11); 97,7 (5); 84,8 (13); 73,3 (4); 72,7 (3); 72,0 (2); 60,3 (9); 52,7 (22); 28,8; 27,6; 26,4; 18,7 (17, 16, 15, 14).

3.4.2.6. Sinteza i karakterizacija metil (2S)-2-((3aR,5R,6aR)-5-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioksolan-4-il)-2,2-dimetiltetrahidro furo[2,3-d][1,3]dioksol-6-il)-2-hidroksiacetat (27)



žuto-smeđe ulje; ($m = 445,9$ mg; 84 %)

$R_f = 0,57$ (PE:EtOAc = 1:1)

$R_f = 0,86$ (EtOAc:EtOH:AcOH:H₂O = 70:10:2:2)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ / ppm 5,75 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H, 1); 4,84 – 4,77 (m, 1H, 5); 4,57 (dd, $J = 6,6$ Hz; $J = 2,5$ Hz, 1H, 3); 4,19 (dd, $J = 9,8$ Hz; $J = 7,0$ Hz, 1H, 12); 4,17 – 4,12 (m, 1H, 18); 4,04 – 3,99 (m, 2H, (18', 6)); 3,79 (s, 3H, 17); 2,46 – 2,36 (m, 1H, 4); 1,48; 1,43; 1,34; 1,29 (s, 12H, (11, 10, 22, 23)).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ / ppm 173,0 (13); 112,4 (8); 110,1 (20); 104,7 (1); 81,5 (5); 79,5 (12); 77,3 (6); 68,2 (3); 67,8 (18); 52,4 (4); 52,1 (17); 26,6; 26,3; 26,2; 25,1 (11, 10, 22, 23)).

3.4.3. *Sinteza metilnog estera α -azido C-glikozilne kiseline*

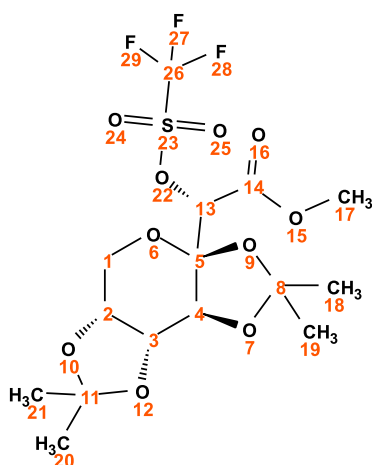
(a) Sinteza triflatnog derivata

Metilni ester α -hidroksi C-glikozilne kiseline (1,0 ekv) je otopljen u suhom DCM ($c = 0,04$ M). Ohlađenoj otopini (-20 °C) je dodan piridin (10,0 ekv), a potom i anhidrid trifluorometansulfonske kiseline (3,0 ekv). Miješanje je nastavljeno tijekom 3–5 sata u atmosferi argona. Reakcijska smjesa je ekstrahirana vodom, 10 % vodenom otopinom KHSO_4 , zasićenom vodenom otopinom NaHCO_3 i zasićenom vodenom otopinom NaCl . Organski sloj je osušen iznad bezvodnog Na_2SO_4 , profiltriran, a otapalo je upareno. Sirovi produkt korišten je u slijedećem reakcijskom koraku bez daljnjeg čišćenja.

(b) Sinteza azido derivata

Produkt prethodnog reakcijskog koraka (1,0 ekv) je otopljen u DMF ($c = 0,15$ M). Ohlađenoj otopini (-20 °C) je dodan natrijev azid (NaN_3 ; 3,5 ekv). Miješanje je nastavljeno 0,25–12 sati na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije DMF je uparen, a potom je provedena ekstrakcija sustavom EtOAc/zasićena vodena otopina NaHCO_3 . Organski sloj je osušen iznad bezvodnog Na_2SO_4 , nakon čega je profiltriran, a otapalo je upareno. Sirovi produkt je očišćen kolonskom kromatografijom pri čemu je kao eluens korišten sustav otapala $\text{PE}:\text{EtOAc} = 1:1$. Izoliran je produkt u obliku žutog ulja.

3.4.3.1. *Sinteza i karakterizacija metil (S)-2-((3aR,5aR,8aR,8bS)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-3aH-bis([1,3]dioksolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-3a-il)-2-(((trifluorometil)sulfonyl)oksi)acetata (28)*

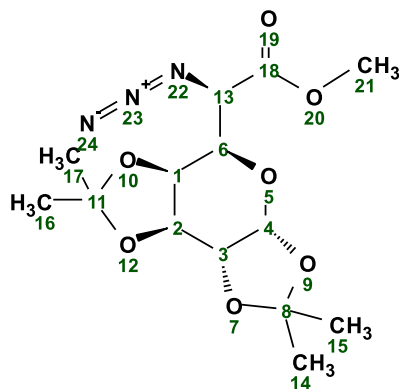

 $C_{15}H_{21}F_3O_{10}S$
 $Mr = 450,38$

 žuto ulje; ($m = 1,17$ g; 92 %)

 $R_f = 0,74$ (PE:EtOAc = 1:1)

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm 5,15 (s, 1H, 13); 4,64 (dd, $J = 7,8$ Hz; $J = 2,8$ Hz, 1H, 3); 4,42 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, 2); 4,24 (dd, $J = 7,8$ Hz; $J = 1,6$ Hz, 1H, 4); 3,90 – 3,86 (m, 1H, 1); 3,85 (s, 3H, 19); 3,79 (dd, $J = 22,0$ Hz; $J = 18,8$ Hz, 1H, 1); 1,56; 1,49; 1,43; 1,35 (s, 12H, (17, 18, 20, 21)).

3.4.3.2. *Sinteza i karakterizacija metil (R)-2-azido-2-((3aR,5R,5aS,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametil tetrahidro-5H-bis([1,3]dioksolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-il)acetata (29)*


 $C_{14}H_{22}N_3O_7$
 $Mr = 343,34$

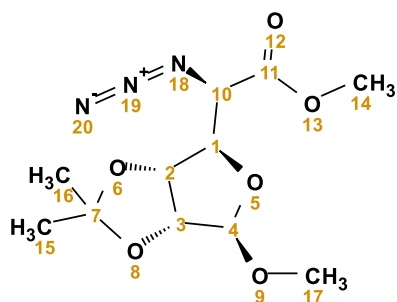
 žuto ulje; ($m = 1,07$ g; 86 %)

 $R_f = 0,84$ (PE:EtOAc = 1:1)

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm 5,57 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H, 4); 4,62 (dd, $J = 7,9$ Hz; $J = 2,5$ Hz, 1H, 2); 4,35 (dd, $J = 5,0$ Hz; $J = 2,5$ Hz, 1H, 3); 4,28 (dd, $J = 7,9$ Hz; $J = 1,8$ Hz, 1H, 1); 4,11 (dd, $J = 8,4$ Hz; $J = 1,7$ Hz, 1H, 6); 4,06 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, 13); 3,82 (s, 3H, 21); 1,55; 1,47; 1,33; 1,32 (s, 12H, (17, 16, 15, 14)).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm 168,5 (18); 110,0 (11); 109,1 (8); 96,4 (4); 71,03 (1); 71,02 (2); 70,4 (3); 68,0 (6); 62,0 (13); 52,8 (21); 25,9; 25,9; 24,9; 24, 4 (17, 16, 15, 14).

3.4.3.3. *Sinteza i karakterizacija metil (R)-2-azido-2-((3aR,4R,6R,6aR)-6-metoksi-2,2-dimetil tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)acetaat (30)*


 $C_{11}H_{17}N_3O_6$
 $Mr = 287,27$

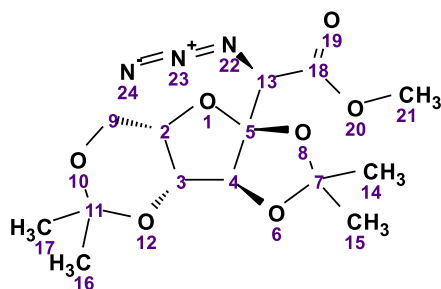
žuto ulje; ($m = 558,5$ mg; 83 %)

$R_f = 0,74$ (PE:EtOAc = 1:1)

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm 5,02 (s, 1H, 4); 4,76 (dd, $J = 6,0$ Hz; $J = 1,4$ Hz, 1H, 3); 4,60 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H, 2); 4,43 (dd, $J = 8,6$ Hz; $J = 1,5$ Hz, 1H, 1); 3,94 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, 10); 3,83 (s, 3H, 14); 3,40 (s, 3H, 17); 1,48; 1,31 (s, 6H, (16, 15)).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm 168,5 (11); 113,0 (7); 110,1 (4); 85,8 (1); 85,1 (2); 81,3 (3); 64,2 (10); 55,8 (17); 52,9 (14); 26,5; 25,0 (16, 15).

3.4.3.4. *Sinteza i karakterizacija metil (R)-2-azido-2-((3aS,3bR,7aS,8aS)-2,2,5,5-tetrametil tetrahidro-8aH-[1,3]dioksolo [4',5':4,5]furo[3,2-d][1,3]dioksin-8a-il)acetata (31)*


 $C_{14}H_{22}N_3O_7$
 $Mr = 343,34$

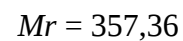
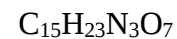
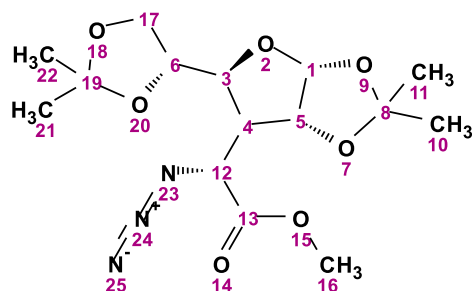
žuto ulje; ($m = 625,3$ mg; 89 %)

$R_f = 0,72$ (PE:EtOAc = 1:1)

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm 4,77 (s, 1H, 13); 4,34 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 2); 4,31 (s, 1H, 4); 4,19 – 4,16 (m, 1H, 3); 4,09 – 4,05 (m, 2H, 9); 3,83 (s, 3H, 21); 1,49; 1,43; 1,39; 1,32 (s, 12H, (17, 16, 15, 14)).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm 167,2 (18); 113,9 (7); 113,5 (11); 97,6 (5); 85,8 (13); 73,4 (4); 73,1 (3); 65,6 (2); 60,2 (9); 52,8 (21); 28,7; 27,7; 26,5; 18,8 (17, 16, 15, 14).

3.4.3.5. Sinteza i karakterizacija metil (2R)-2-azido-2-((3aR,5R,6aR)-5-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioksolan-4-il)-2,2-dimetil tetrahidrofuro[2,3-d][1,3]dioksol-6-il)acetata (32)



žuto ulje; ($m = 450,4$ mg; 85 %)

$R_f = 0,72$ (PE:EtOAc = 1:1)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ / ppm 5,76 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H, 1); 4,78 (t, $J = 4,0$ Hz, 1H, 5); 4,20 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, 3); 4,07 (dd, $J = 8,4$ Hz; $J = 5,7$ Hz, 1H, 17); 4,00 – 3,87 (m, 3H, 12, 16, 17'); 3,80 (s, 3H, 16); 2,55 – 2,41 (m, 1H, 4); 1,53; 1,38; 1,33; 1,29 (s, 12H, (22, 21, 11, 10)).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ / ppm 169,2 (13); 112,7 (8); 109,8 (19); 104,4 (1); 81,2 (5); 79,3 (12); 76,9 (6); 67,5 (17); 60,0 (3); 52,6 (15); 49,3 (4); 26,6; 26,4; 26,3; 25,3 (22, 21, 10, 11).

3.4.4. Sinteza Fmoc-zaštićenih C-glikozilnih α -aminokiselina

(a) Redukcija

Produkt prethodnog reakcijskog koraka (1,0 ekv) je otopljen u smjesi otapala DCM:MeOH = 1:5 ($c = 0,03$ M), a zatim je dodan natrijev borhidrid (NaBH_4 ; 1,5 ekv) i $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,01 ekv). Miješanje je nastavljeno 4–12 sati na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je profiltrirana uz vakuum preko sinter lijevaka, a matičnica je uparena. Ostatak zaostao uparavanjem je otopljen u DCM i ekstrahiran zasićenom vodenom otopinom NaHCO_3 . Organski sloj je osušen iznad bezvodnog Na_2SO_4 , profiltriran, a otapalo je upareno. Sirovi produkt korišten je u narednom sintetskom koraku bez daljnjeg čišćenja.

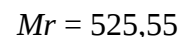
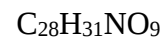
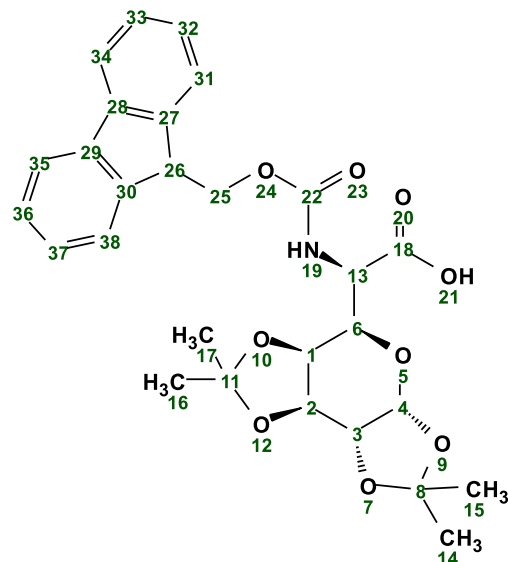
(b) Hidroliza estera C-glikozilne α -aminokiseline

Produkt prethodnog reakcijskog koraka je otopljen u MeCN, a zatim je dodan MeOH i 4 M NaOH (Tesserova baza, MeCN:MeOH:4M NaOH = 14:5:1, $c = 0,05$ M). Miješanje je nastavljeno na sobnoj temperaturi, 2,0 – 2,5 sata. Po završetku reakcije otapalo je upareno.

(c) Uvođenje Fmoc zaštitne skupine na amino skupinu C-glikozilne α -aminokiseline

Produkt prethodnog reakcijskog koraka (1,0 ekv) je otopljen u vodi. pH vrijednost reakcijske smjese prilagođena je na 9,5 dodatkom 1 M otopine klorovodične kiseline (1 M HCl). Zatim je postepeno dodan *N*-(9-fluorenilmetoksikarboniloksi)sukcinimid (Fmoc-OSu; 1,1 ekv) otopljen u MeCN, što je rezultiralo замуćenjem reakcijske smjese. Miješanje je nastavljeno tijekom 1–3 sata uz održavanje pH vrijednosti reakcijske smjese u rasponu od 8,5 do 9. Po završetku reakcije, dodana je 10 %-tna otopina limunske kiseline (pH $\sim$ 2). Zatim je provedena ekstrakcija s EtOAc. Organski sloj je ispran s H_2O i zasićenom vodenom otopinom NaCl te je sušen iznad bezvodnog Na_2SO_4 nakon čega je uparen. Sirovi produkt je očišćen kolonskom kromatografijom pri čemu je kao eluens korišten sljedeći sustav otapala, prvo DCM:MeOH = 95:5, a zatim DCM:MeOH = 10:1. Izoliran je produkt u obliku bijele krutine.

3.4.4.1. *Sinteza i karakterizacija (R)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoksi)karbonil)amino)-2-((3aR,5R,5aS,8aS,8bR)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-5H-bis([1,3]dioksolo)[4,5-b:4',5'-d]piran-5-il)octene kiseline (33); Fmoc-G_{Gal}-OH*



bijela krutina; ($m = 622,4$ mg; 71 %)

$t.t. = 94,2 - 95,4$ °C

$[\alpha]_D^{25} = +24,0$ (c 1; MeOH)

$R_f = 0,42$ (DCM:MeOH = 10:1)

Sirovi produkt je pročišćen taloženjem, koristeći pritom sustave otapala MeOH/(C₂H₅)₂O i DCM/heksan te tekućinskom kromatografijom na koloni silikagela, pri čemu je kao eluens korišten najprije DCM:MeOH = 95:5, a zatim DCM:MeOH = 10:1.

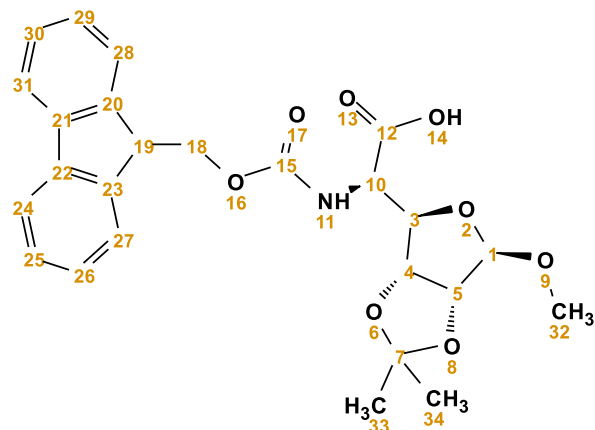
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ / ppm 7,76 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H, 34, 35); 7,67 – 7,54 (m, 2H, 33, 36); 7,44 – 7,37 (m, 2H, 31, 38); 7,31 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, 32, 37); 5,79 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H, 19); 5,61 – 5,54 (m, 1H, 4); 4,64 (dd, $J = 7,9$ Hz; $J = 2,4$ Hz, 1H, 2); 4,57 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H, 13); 4,48 – 4,44 (m, 1H, 1); 4,44 – 4,37 (m, 2H, 25); 4,36 – 4,34 (m, 1H, 6); 4,34 – 4,30 (m, 1H, 3); 4,23 (t, $J = 6,9$ Hz, 1H, 26); 1,58 – 1,51; 1,47 – 1,41; 1,35 – 1,31 (m, 12H, (17, 16, 15, 14)).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ / ppm 171,8 (18); 156,5 (22); 143,9 (27); 143,6 (30); 141,4 (28); 141,3 (29); 127,7 (32); 127,7 (37); 127,08 (36); 127,07 (33); 125,2 (34); 125,1 (35); 119,98 (31); 119,95 (32); 109,92 (8); 109,7 (11); 96,3 (4); 71,1 (2); 70,9 (1); 70,7 (3); 67,3 (25); 66,5 (6); 54,5 (13); 47,2 (26); 26,0; 25,5; 25,0; 24,0 (17, 16, 15, 14).

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ izračunato za C₂₈H₃₂NO₉ 526,2072; eksperimentalno određeno 526,2067.

3.4.4.2. *Sinteza i karakterizacija (R)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoksi)karbonil)amino)-2-((3aR, 4R,6R,6aR)-6-metoksi-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)octene kiseline (34);*

Fmoc-G_{Rib}-OH



C₂₅H₂₇NO₈

Mr = 469,49

bijela krutina; (*m* = 1,19 g; 67 %)

t.t. = 97,8 – 99,1 °C

$[\alpha]_D^{25} = +30,0$ (*c* 1; MeOH)

R_f = 0,42 (DCM:MeOH = 10:1)

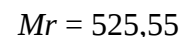
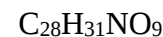
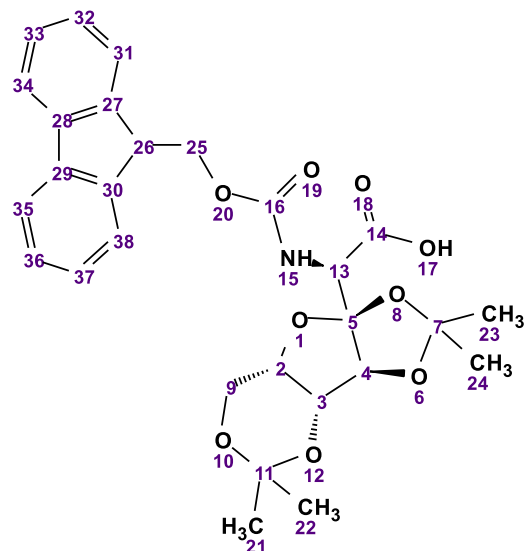
Sirovi produkt je pročišćen taloženjem, koristeći pritom sustave otapala MeOH/(C₂H₅)₂O i DCM/heksan te tekućinskom kromatografijom na koloni silikagela, pri čemu je kao eluens korišten najprije DCM:MeOH = 95:5, a zatim DCM:MeOH = 10:1.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ / ppm 7,77 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H, 27, 28); 7,60 (dd, *J* = 15,0; *J* = 7,4 Hz, 2H, 24, 31); 7,40 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, 26, 29); 7,31 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, 25, 30); 6,57 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H, 11); 5,01 (s, 1H, 1); 4,96 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H, 5); 4,70 (d, *J* = 5,9 Hz, 1H, 4); 4,61 – 4,53 (m, 2H, 18, 18'); 4,46 (dd, *J* = 10,5 Hz; *J* = 7,1 Hz, 1H, 3); 4,37 – 4,32 (m, 1H, 10); 4,26 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H, 19); 3,44 (s, 3H, 32); 1,49; 1,32 (s, 6H, (33, 34)).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ / ppm 174,1 (15); 156,7 (12); 143,9 (20); 143,6 (23); 141,4 (21); 141,3 (22); 127,8 (25); 127,7 (30); 127,1 (26); 127,0 (29); 125,2 (27); 125,1 (28); 120,0 (24, 31); 112,8 (7); 110,6 (1); 87,2 (5); 85,8 (3); 81,8 (4); 67,2 (18); 56,0 (32); 55,9 (10); 47,1 (19); 26,4; 25,0 (33, 34).

HRMS (ESI-TOF): *m/z* [M+H]⁺ izračunato za C₂₅H₂₈NO₈ 470,1810; eksperimentalno određeno 470,1807.

3.4.4.3. *Sinteza i karakterizacija (R)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoksi)carbonil)amino)-2-((3aS,3bR,7aS,8aS)-2,2,5,5-tetrametiltetrahidro-8aH-[1,3]dioksolo[4',5':4,5]furo[3,2-d][1,3]dioksin-8a-il)octene kiseline (35); Fmoc-G_{Sor}-OH*



bijela krutina; ($m = 650,1$ mg; 84 %)

$t.t. = 98,2 - 99,5$ °C

$[\alpha]_D^{25} = +18,4$ (c 0,76; MeOH)

$R_f = 0,58$ (DCM:MeOH = 10:1)

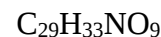
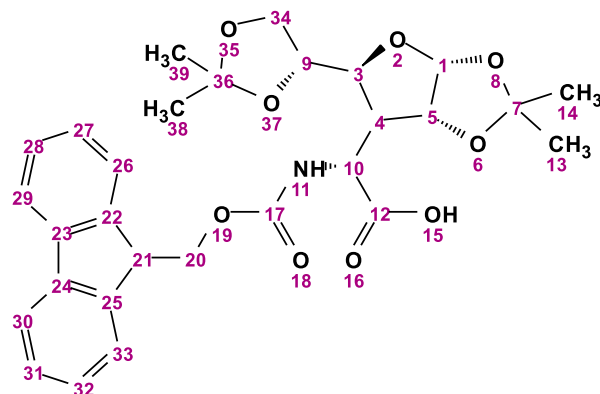
Sirovi produkt je pročišćen taloženjem, koristeći pritom sustave otapala MeOH/(C₂H₅)₂O i DCM/heksan te tekućinskom kromatografijom na koloni silikagela, pri čemu je kao eluens korišten najprije DCM:MeOH = 95:5, a zatim DCM:MeOH = 10:1.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ / ppm 7,77 – 7,71 (m, 2H, 34, 35); 7,64 – 7,53 (m, 2H, 31, 38); 7,38 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, 33, 36); 7,32 – 7,27 (m, 2H, 32, 37); 6,06 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, 15); 4,69 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, 13); 4,54 (s, 1H, 2); 4,48 – 4,36 (m, 2H, 25); 4,26 (s, 1H, 3); 4,21 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 26); 4,15 – 4,05 (m, 2H, 9); 4,05 – 4,01 (m, 1H, 4); 1,52; 1,45; 1,42; 1,32 (s, 12H, (24, 23, 22, 21)).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ / ppm 171,6 (14); 156,4 (16); 143,9 (27); 143,7 (30); 141,3 (28); 141,3 (29); 127,67 (37); 127,66 (32); 127,10 (36); 127,06 (33); 125,24 (34); 125,21 (35); 119,90 (32); 119,88 (31); 112,8 (7); 112,6 (11); 97,9 (5); 86,8 (2); 73,4 (3); 72,6 (4); 67,2 (25); 59,7 (9); 59,0 (13); 47,2 (26); 28,6; 26,9; 25,9; 18,6 (24, 23, 22, 21).

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ izračunato za C₂₈H₃₂NO₉ 526,2072; eksperimentalno određeno 526,2067.

3.4.4.4. *Sinteza i karakterizacija (2R)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoksi)karbonil)amino)-2-(((3aR,5R,6aR)-5-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioksolan-4-il)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[2,3-d][1,3]dioxol-6-il)octene kiseline (36); Fmoc-G_{All}-OH*



$$Mr = 539,58$$

bijela krutina; ($m = 488,7$ mg; 72 %)

$$t.t. = 92,6 - 93,9\text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$[\alpha]_D^{25} = +33,8\text{ (c } 0,74; \text{ MeOH)}$$

$$R_f = 0,38\text{ (DCM:MeOH = 10:1)}$$

Sirovi produkt je pročišćen taloženjem, koristeći pritom sustave otapala MeOH/(C₂H₅)₂O i DCM/heksan te tekućinskom kromatografijom na koloni silikagela, pri čemu je kao eluens korišten najprije DCM:MeOH = 95:5, a zatim DCM:MeOH = 10:1.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ / ppm 7,75 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H, 29, 30); 7,62 – 7,54 (m, 2H, 26, 33); 7,39 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, 28, 31); 7,34 – 7,27 (m, 2H, 27, 32); 6,42 (d, $J = 9,7$ Hz, 1H, 11); 5,80 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H, 1); 5,05 (dd, $J = 9,6$ Hz; $J = 4,2$ Hz, 1H, 10); 4,84 (t, $J = 4,2$ Hz, 1H, 5); 4,48 – 4,33 (m, 2H, 34); 4,23 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H, 9); 4,12 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H, 20); 4,04 (dd, $J = 9,9$ Hz; $J = 6,0$ Hz, 1H, 3); 3,95 (q, $J = 7,8$ Hz, 1H, 21); 2,68 – 2,54 (m, 1H, 4); 1,59; 1,38 – 1,30 (m, 12H, (39, 38, 14, 13)).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ / ppm 175,1 (12); 156,4 (23); 144,0 (28); 143,6 (31); 141,4 (29); 141,3 (30); 127,7 (33); 127,7 (38); 127,03 (34); 127,02 (37); 125,1 (35); 125,0 (36); 120,0 (32, 39); 112,9 (7); 110,2 (14); 105,0 (1); 82,1 (5); 78,1 (3); 77,1 (9); 67,2 (26); 67,1 (16); 51,4 (10); 47,1 (27); 46,4 (4); 26,5; 26,2; 26,1; 24,9 (39, 38, 14, 13).

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ izračunato za C₂₉H₃₄NO₉ 540,2228; eksperimentalno određeno 550,2241.

3.5. Sinteza C-glikopeptida na čvrstom nosaču

Opći postupak sinteze C-glikopeptida:

(a) Vezanje prve aminokiseline (funkcionalizacija smole)

U svrhu sinteze C-glikopeptida, korištena je 2-klortritil-kloridna smola (2-CTC), koja je prethodno funkcionalizirana Fmoc-Val-OH, sukladno standardnim literaturnim postupcima.^{137,138} U početnom koraku je provedeno bubrenje 2-CTC smole (100 mg; 0,169 mmol; kapacitet smole: 1,69 mmol/g) u DCM (2 mL) tijekom 1 sat, u inertnoj atmosferi dušika u peptidnom reaktoru. Nakon toga je dodana otopina Fmoc-Val-OH (81,45 mg; 0,68 mmol; 4,0 ekv) i *N,N'*-diizopropiletilamin (DIPEA; 167,2 μ L; 2,70 mmol; 16,0 ekv) u DCM (1 mL). Reakcijska smijesa miješana je 1 sat laboratorijskim miješačem za sintezu peptida (engl. „Laboratory peptide shaker LP360PRO“). Po završetku reakcije smola je isprana s DMF-om (8×1 mL) i DCM (5×2 mL) te je sušena pod vakuumom.

Kapacitet smole (eng. „loading capacity“) nakon vezanja prve aminokiseline (Fmoc-Val-OH) je određen prema metodologiji opisanoj u literaturi,^{137–139} a iznosi 0,60 mmol/g.

(b) Sinteza heksapeptida

Sinteza heksapeptida provedena je na čvrstom nosaču. Korištena je 2-CTC smola (100 mg; 0,06 mmol; kapacitet 0,6 mmol/g). Reakcije su provedene u inertnoj atmosferi dušika u peptidnom reaktoru. Fmoc-zaštićena aminokiselina (4,0 ekv) i regensi *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronijum tetrafluoroborat (HATU; 4,4 ekv) i *N*-metil morfolin (NMM; 8,0 ekv) su dodani u peptidi reaktor. Kao otapalo je korišten DMF (1 mL). Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine je provedena s 20 %-tnom otopinom piperidina u DMF-u. Nakon svake reakcije kondenzacije i deprotekcije Fmoc-zaštitne skupine, smola je isprana s DMF-om (8×1 mL) i CH_2Cl_2 (5×2 mL). Naposljetku, deprotekcija sintetiziranog peptida s čvrstog nosača provedena je korištenjem 20 %-tne otopine trifluoroetanola (TFE) u CH_2Cl_2 te 1 %-tne otopine trifluorooctene kiseline (TFA) u CH_2Cl_2 . Pročišćavanje sintetiziranog peptida provedeno je taloženjem i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvosti obrnute faze (RP-HPLC) na instrumentu Varian 940 LC.

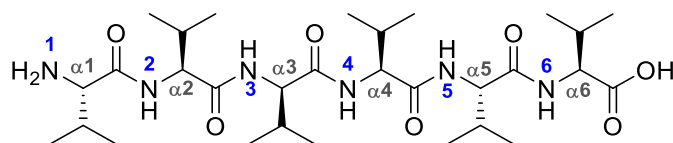
Slijed sinteze peptida prikazan je u Tablicama 1–16 (neparni broj):

Postupak 1. *Vežanje prve aminokiseline: bubrenje smole (2 mL DCM, 1 h); reakcija kondenzacije (Fmoc-Val-OH, DIPEA, 1 – 2 h); ispiranje: $8 \times 1\text{ mL DMF}$, $5 \times 2\text{ mL DCM}$.*

Postupak 2. *Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine: 20 %-tna otopina piperidina u DMF-u ($2 \times (1\text{ mL}, 30\text{ min})$); ispiranje: ($8 \times 1\text{ mL}$) DMF, ($5 \times 2\text{ mL}$) DCM.*

Postupak 3. *Reakcija kondenzacije: Fmoc-zaštićena aminokiselina, HATU, NMM, DMF (1-3) h; ispiranje: ($8 \times 1\text{ mL}$) DMF, ($5 \times 2\text{ mL}$) DCM.*

Postupak 4. *Deprotekcija peptida s čvrstog nosača: 20 %-tna otopina TFE u DCM-u i/ili 1 %-tna otopina TFA u DCM-u. Cijepanje modelnog heksapeptida sa smole: 90%-tna TFA u DCM-u.*

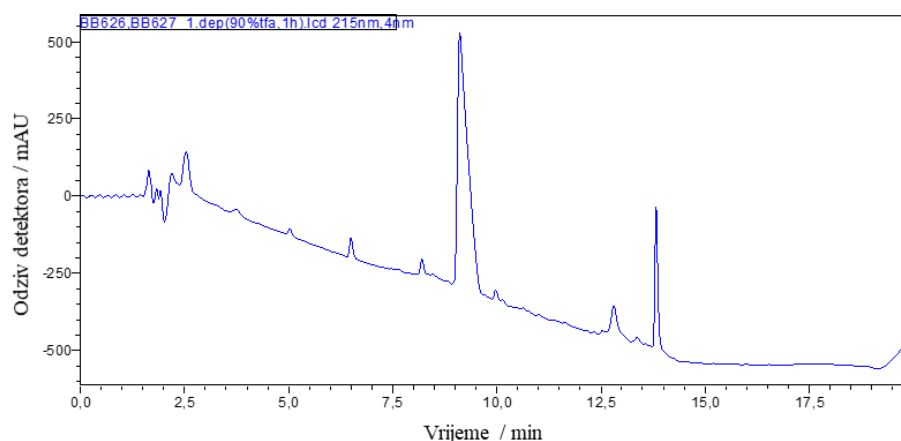
3.5.1. Sinteza i karakterizacija H_2N -Val-Val-D-Val-Val-Val-Val-OH (37)

$C_{30}H_{56}N_6O_7$; $Mr = 612,8130$; bijela krutina ($m = 35$ mg; $\eta = 95$ %); $t_R = 9,046$ min

Tablica 1. Sinteza heksapeptida 37.

Postupak	Sintetski korak	Aminokiselina, reagensi	Količina	Vrijeme
1	Reakcija kondenzacije	Fmoc-L-Val-OH DIPEA	81,45 mg 167,2 μ L	2 h
2	Uklanjanje Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-L-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Uklanjanje Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-L-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Uklanjanje Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-D-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Uklanjanje Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-L-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Uklanjanje Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-L-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Uklanjanje Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
4	Deprotekcija peptida s čvrstog nosača	90 % TFA/DCM	2×1 mL	2×1 h

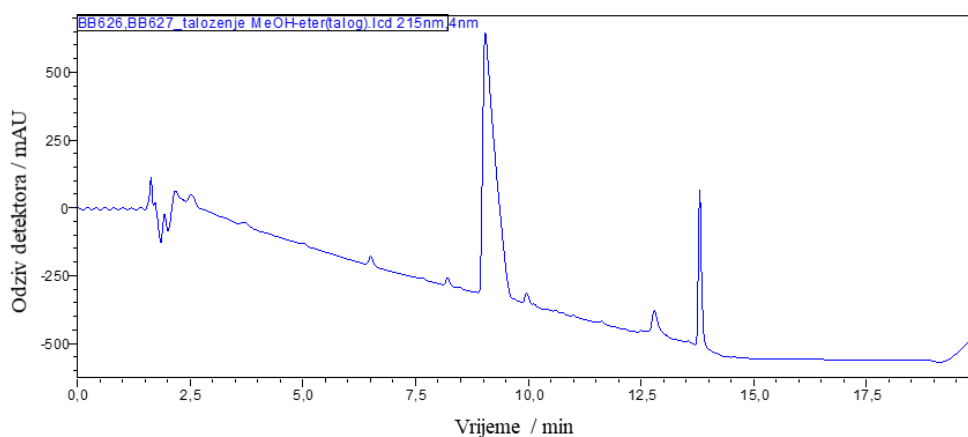
Deprotekcijom peptida s čvrstog nosača dobiveno je 50 mg sirovog produkta ($m_{\text{teorijska}} = 37 \text{ mg}$).



Slika 35. Kromatogram reakcijske smjese spoja **37** nakon deprotekcije peptida s čvrstog nosača, dobiven LC-UV-MS analizom (Metoda A) uz PDA detekciju na 215 nm.

Analizom kromatograma reakcijske smjese nakon deprotekcije peptida s čvrstog nosača procijenjeno je da udio produkta **37** iznosi približno 90 % (Slika 35; $t_R = 9,107 \text{ min}$).

Pročišćavanja spoja **37** provedeno je precipitacijom, koristeći pritom sustav otapala MeOH/(C₂H₅)₂O.



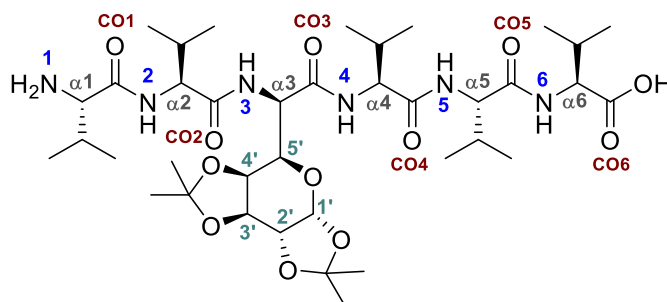
Slika 36. Kromatogram pročišćenog C-glikopeptida **37** dobiven LC-UV-MS analizom (Metoda A) uz PDA detekciju na 215 nm.

Na temelju kromatograma prikazanog na Slici 36, utvrđeno je da je izoliran produkt **37** visoke čistoće (98 %, $t_R = 9,046 \text{ min}$). Pritom, masa izoliranog heksapeptida **37** iznosi 35 mg, a ukupno iskorištenje sinteze je 95 %.

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ izračunato za C₃₀H₅₇N₆O₇ 613,4283; eksperimentalno određeno 613,4288.

Tablica 2. Asignacija ^1H NMR i ^{13}C NMR kemijskih pomaka spoja **37**.

AA		^1H	^{13}C
Val ¹	NH ₂		
	α	3,73 (d, $J = 5.5$ Hz)	57,12 ^a
	β	2,10-1,87 (m, 1H)	31,1; 30,9; 30,4; 30,3; 30,0; 29,7 ^b
	γ'	0,93-0,74 (m, 6H)	19,3; 19,2; 19,1; 19,0; 18,3; 18,2; 18,1; 17,9; 17,80; 17,76; 17,6 ^c
	CO		167,7
Val ²	NH	8,32 (d, $J = 8,9$ Hz)	
	α	4,47 (dd, $J = 8,8$ Hz; $J = 6,3$ Hz)	57,4 ^d
	β	2,10-1,87 (m, 1H)	31,1; 30,9; 30,4; 30,3; 30,0; 29,7 ^b
	γ'	0,93-0,74 (m, 6H)	19,3; 19,2; 19,1; 19,0; 18,3; 18,2; 18,1; 17,9; 17,80; 17,76; 17,6 ^c
	CO		170,3
D-Val ³	NH	8,10 (d, $J = 8,9$ Hz)	
	α	4,36 (dd, $J = 8,8$ Hz; $J = 6,1$ Hz)	57,5 ^d
	β	2,10-1,87 (m, 1H)	31,1; 30,9; 30,4; 30,3; 30,0; 29,7 ^b
	γ'	0,93-0,74 (m, 6H)	19,3; 19,2; 19,1; 19,0; 18,3; 18,2; 18,1; 17,9; 17,80; 17,76; 17,6 ^c
	CO		170,6
Val ⁴	NH	7,95-7,90 (m, 1H)	
	α	4,28-4,20 (m, 1H)	57,6 ^d
	β	2,10-1,87 (m, 1H)	31,1; 30,9; 30,4; 30,3; 30,0; 29,7 ^b
	γ'	0,93-0,74 (m, 6H)	19,3; 19,2; 19,1; 19,0; 18,3; 18,2; 18,1; 17,9; 17,80; 17,76; 17,6 ^c
	CO		170,8
Val ⁵	NH	7,95-7,90 (m, 1H)	
	α	4,28-4,20 (m, 1H)	57,6 ^d
	β	2,10-1,87 (m, 1H)	31,1; 30,9; 30,4; 30,3; 30,0; 29,7 ^b
	γ'	0,93-0,74 (m, 6H)	19,3; 19,2; 19,1; 19,0; 18,3; 18,2; 18,1; 17,9; 17,80; 17,76; 17,6 ^c
	CO		171,1
Val ⁶	NH	7,85 (d, $J = 8,4$ Hz)	
	α	4,12 (dd, $J = 8,3$ Hz; $J = 5,8$ Hz)	57,08 ^a
	β	2,10-1,87 (m, 1H)	31,1; 30,9; 30,4; 30,3; 30,0; 29,7 ^b
	γ'	0,93-0,74 (m, 6H)	19,3; 19,2; 19,1; 19,0; 18,3; 18,2; 18,1; 17,9; 17,80; 17,76; 17,6 ^c
	CO		172,7

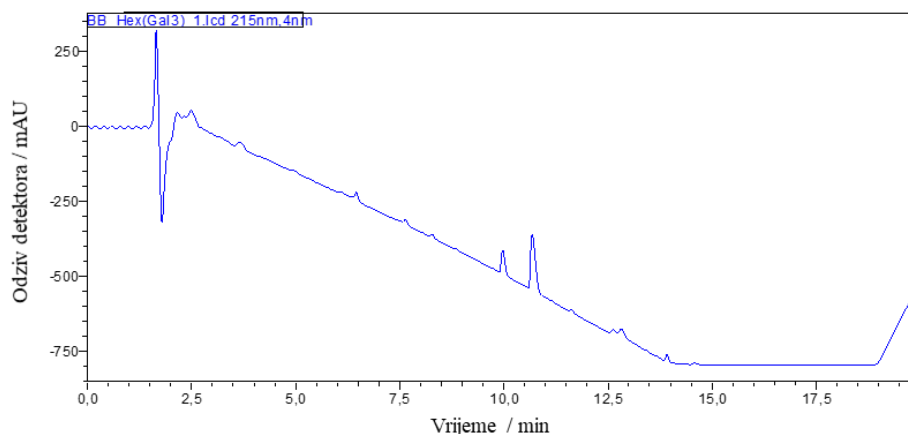
3.5.2. Sinteza i karakterizacija H_2N -Val-Val- G_{Gal} -Val-Val-Val-OH (**38**)

$C_{38}H_{66}N_6O_{12}$; $M_r = 798,9760$; bijela krutina ($m = 30$ mg; $\eta = 68$ %); $t_R = 10,177$ min

Tablica 3. Sinteza C-glikopeptida **38**.

Postupak	Sintetski korak	Aminokiselina, reagensi	Količina	Vrijeme
1	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH DIPEA	81,45 mg 167,2 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc- G_{Gal} -OH HATU NMM	126,13 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
4	Deprotekcija peptida s čvrstog nosača	1 % TFA/DCM	3×1 mL	3×1 h

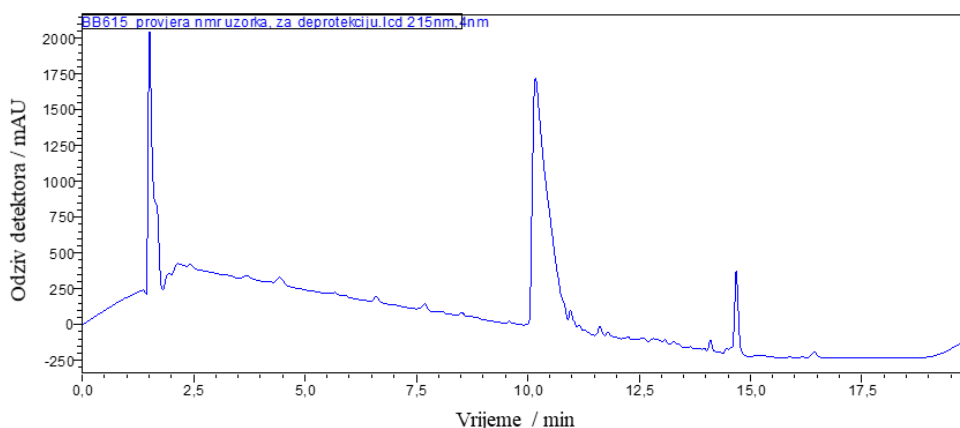
Deprotekcijom peptida s čvrstog nosača dobiveno je 58 mg sirovog produkta ($m_{\text{teorijska}} = 48 \text{ mg}$).



Slika 37. Kromatogram reakcijske smjese spoja **38** nakon deprotekcije peptida s čvrstog nosača, dobiven LC-UV-MS analizom (Metoda A) uz PDA detekciju na 215 nm.

Analizom kromatograma reakcijske smjese nakon deprotekcije peptida s čvrstog nosača procijenjeno je da udio produkta **38** iznosi približno 76 % (Slika 37; $t_R = 10,684 \text{ min}$).

Pročišćavanja spoja **38** provedeno je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti obrnutih faza (RP-HPLC), korištenjem Metode B.



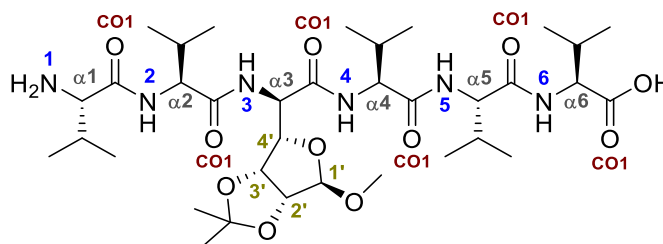
Slika 38. Kromatogram pročišćenog C-glikopeptida **38** dobiven LC-UV-MS analizom (Metoda A) uz PDA detekciju na 215 nm.

Na temelju kromatograma prikazanog na Slici 38, utvrđeno je da je izoliran produkt **38** visoke čistoće (98 %, $t_R = 10,177 \text{ min}$). Pritom, masa izoliranog C-glikopeptida **38** iznosi 30 mg, a ukupno iskorištenje sinteze je 68 %.

HRMS (ESI-TOF): m/z $[M+H]^+$ izračunato za $C_{38}H_{67}N_6O_{12}$ 799,4812; eksperimentalno određeno 799,4814.

Tablica 4. Asignacija 1H NMR i ^{13}C NMR kemijskih pomaka spoja **38**.

AA		1H	^{13}C
Val ¹	NH ₃ ⁺	8,03 (br s, 3H)	
	α	3,76 (br s, 1H)	57,0
	β	2,07-1,90 (m, 1H)	29,9
	$\gamma\gamma'$	0,90-0,78 (m, 6H)	19,3; 19,1; 19,0; 18,3; 18,2; 17,8; 17,5 ^d
	CO		167,6
Val ²	NH	8,27 (d, $J = 4,2$ Hz, 1H)	
	α	4,45 (dd, $J = 9,1$ Hz; $J = 6,0$ Hz, 1H)	57,28; 57,34; 57,7 ^e
	β	2,07-1,90 (m, 1H)	30,8
	$\gamma\gamma'$	0,90-0,78 (m, 6H)	19,3; 19,1; 19,0; 18,3; 18,2; 17,8; 17,5 ^d
	CO		170,2
G _{Gal} ³	NH	8,26 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H)	
	α	4,60-4,53 (m, 1H) ^a	53,7
	1'	5,37 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H)	95,5
	2'	4,28 (dd, $J = 4,9$ Hz; $J = 2,2$ Hz, 1H)	70,0 (ili 3')
	3'	4,60-4,53 (m, 1H) ^a	70,1 (ili 2')
	4'	4,15-4,09 (m, 1H) ^b	70,4
	5'	3,93 (d, $J = 8,4$, 1H)	67,7
	C		107,9; 108,4
	CH ₃	1,46; 1,38; 1,25; 1,22 (s, 12H)	25,9; 24,9; 23,9
	CO		168,2
Val ⁴	NH	7,61 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H)	
	α	4,26-4,21 (m, 2H) ^c	57,28; 57,34; 57,7 ^e
	β	2,07-1,90 (m, 1H)	30,8
	$\gamma\gamma'$	0,90-0,78 (m, 6H)	19,3; 19,1; 19,0; 18,3; 18,2; 17,8; 17,5 ^d
	CO		170,2
Val ⁵	NH	7,94 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H)	
	α	4,26-4,21 (m, 2H) ^c	57,28; 57,34; 57,7 ^e
	β	2,07-1,90 (m, 1H)	30,4
	$\gamma\gamma'$	0,90-0,78 (m, 6H)	19,3; 19,1; 19,0; 18,3; 18,2; 17,8; 17,5
	CO		171,0
Val ⁶	NH	7,87 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H)	
	α	4,15-4,09 (m, 1H) ^b	57,0
	β	2,07-1,90 (m, 1H)	29,9
	$\gamma\gamma'$	0,90-0,78 (m, 6H)	19,3; 19,1; 19,0; 18,3; 18,2; 17,8; 17,5 ^d
	CO		172,7
^a nije jednoznačno, moguća zamjena ^b nije jednoznačno, moguća zamjena ^c nije jednoznačno, moguća zamjena ^d istovrsni atomi (C $\gamma\gamma'$) ^d istovrsni atomi (C α)			

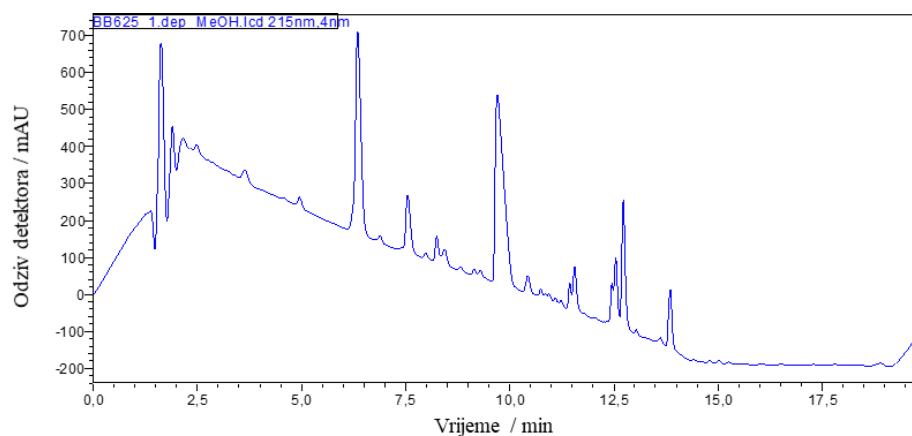
3.5.3. Sinteza i karakterizacija H_2N -Val-Val- G_{Rib} -Val-Val-Val-OH (39)

$C_{35}H_{62}N_6O_{11}$; $M_r = 742,9120$; bijela krutina (19 mg, $\eta = 47\%$); $t_R = 9,432$ min

Tablica 5. Sinteza C-glikopeptida 39.

Postupak	Sintetski korak	Aminokiselina, reagensi	Količina	Vrijeme
1	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH DIPEA	81,45 mg 167,2 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc- G_{Rib} -OH HATU NMM	112,68 mg 100,4 mg 52,8 μ L	2 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
4	Deprotekcija peptida s čvrstog nosača	1 %TFA/DCM	3×1 mL	3×30 min

Deprotekcijom peptida s čvrstog nosača dobiveno je 71 mg sirovog produkta **41** ($m_{\text{teorijska}} = 45 \text{ mg}$).

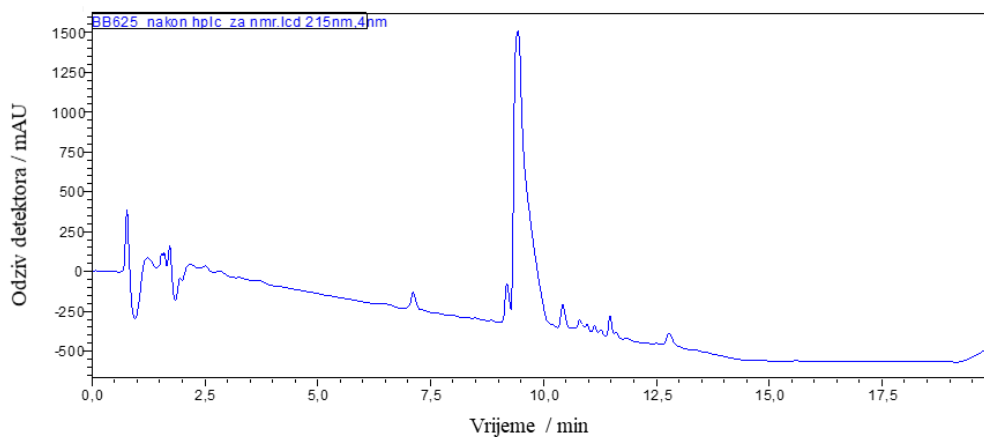


Slika 39. Kromatogram reakcijske smjese spoja **41** nakon deprotekcije peptida s čvrstog nosača, dobiven LC-UV-MS analizom (Metoda A) uz PDA detekciju na 215 nm.

Analizom kromatograma reakcijske smjese nakon deprotekcije peptida s čvrstog nosača procijenjeno je da udio produkta **41** iznosi približno 52 % (Slika 39; $t_R = 9,702 \text{ min}$).

U svrhu pročišćavanja spoja **41** korištena je:

- Precipitacija ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$, CH_2Cl_2 /heksan i $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$)
- RP-HPLC (Metoda C)



Slika 40. Kromatogram pročišćenog C-glikopeptida **41** dobiven LC-UV-MS analizom (Metoda A) uz PDA detekciju na 215 nm.

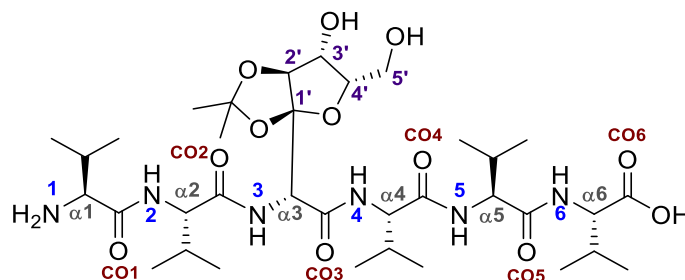
Na temelju kromatograma prikazanog na Slici 40, utvrđeno je da je izoliran produkt **41** visoke čistoće (94 %, $t_R = 9,432 \text{ min}$). Pritom, masa izoliranog C-glikopeptida **41** iznosi 19 mg, a ukupno iskorištenje sinteze je 47 %.

HRMS (ESI-TOF): m/z $[M+H]^+$ izračunato za $C_{35}H_{63}N_6O_{11}$ 743,4550; eksperimentalno određeno 743,4553.

Tablica 6. Asignacija 1H NMR i ^{13}C NMR kemijskih pomaka spoja **39**.

AA		1H	^{13}C
Val ¹	NH ₃ ⁺		
	α	3,68-3,62 (m, 1H)	57,7
	β	2,20-1,74 (m, 1H)	(31,4; 31,0; 30,1; 29,8) ^c
	$\gamma\gamma'$	0,90-0,68 (m, 6H)	(19,3; 19,1; 19,0; 18,6; 18,3; 17,9; 17,73; 17,66; 17,4)
	CO		168,6
Val ²	NH	8,26 (d, $J = 7,8$ Hz)	
	α	4,59-4,47 (m, 1H)	57,2 ^a
	β	2,20-1,74 (m, 1H)	(31,4; 31,0; 30,1; 29,8) ^c
	$\gamma\gamma'$	0,90-0,68 (m, 6H)	(19,3; 19,1; 19,0; 18,6; 18,3; 17,9; 17,73; 17,66; 17,4)
	CO		171,0 ^b
G _{Rib} ³	NH	8,37 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H)	
	α	4,68 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H)	58,2
	1'		111,3
	2'	4,72 (s, 1H)	86,0
	3'	4,00 (br s, 1H)	73,3
	4'	4,07 (br s, 1H)	82,0
	5'	3,62-3,54; 3,44-3,36 (m, 2H)	58,3
	C		112,4
	CH ₃	1,36; 1,23	27,5, 26,3
	CO		167,6
Val ⁴	NH	7,44 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H)	
	α	4,41-4,29 (m, 1H)	56,8
	β	2,20-1,74 (m, 1H)	(31,4; 31,0; 30,1; 29,8) ^c
	$\gamma\gamma'$	0,90-0,68 (m, 6H)	(19,3; 19,1; 19,0; 18,6; 18,3; 17,9; 17,73; 17,66; 17,4) ^d
	CO		170,3
Val ⁵	NH	8,04 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	
	α	4,23-4,13 (m, 1H)	57,8
	β	2,20-1,74 (m, 1H)	(31,4; 31,0; 30,1; 29,8) ^c
	$\gamma\gamma'$	0,90-0,68 (m, 6H)	(19,3; 19,1; 19,0; 18,6; 18,3; 17,9; 17,73; 17,66; 17,4) ^d
	CO		170,9 ^b
Val ⁶	NH	7,83 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H)	
	α	4,12-4,08 (m, 1H)	57,1 ^a
	β	2,20-1,74 (m, 1H)	(31,4; 31,0; 30,1; 29,8) ^c
	$\gamma\gamma'$	0,90-0,68 (m, 6H)	(19,3; 19,1; 19,0; 18,6; 18,3; 17,9; 17,73; 17,66; 17,4) ^d
	CO		172,8

^{a-b} nije jednoznačno, moguća zamjena

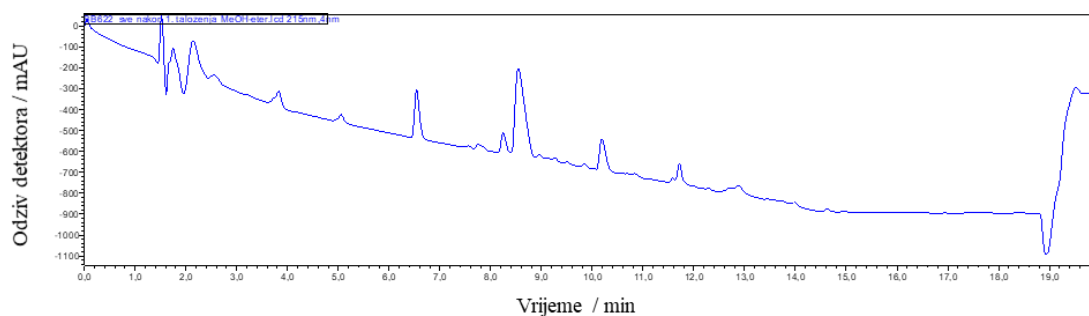
3.5.4. Sinteza i karakterizacija H_2N -Val-Val- G_{Sor} -Val-Val-Val-OH (**40**)

$C_{35}H_{62}N_6O_{12}$; $M_r = 758,9110$; bijela krutina (39 mg, $\eta = 85\%$); $t_R = 8,110$ min

Tablica 7. Sinteza C-glikopeptida **40**.

Postupak	Sintetski korak	Aminokiselina, reagensi	Količina	Vrijeme
1	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH DIPEA	81,45 mg 167,2 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc- G_{Sor} -OH HATU NMM	126,13 mg 100,4 mg 52,8 μ L	2 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	2 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
4	Deprotekcija peptida s čvrstog nosača	1 % TFA/DCM	3×1 mL	3×1 h

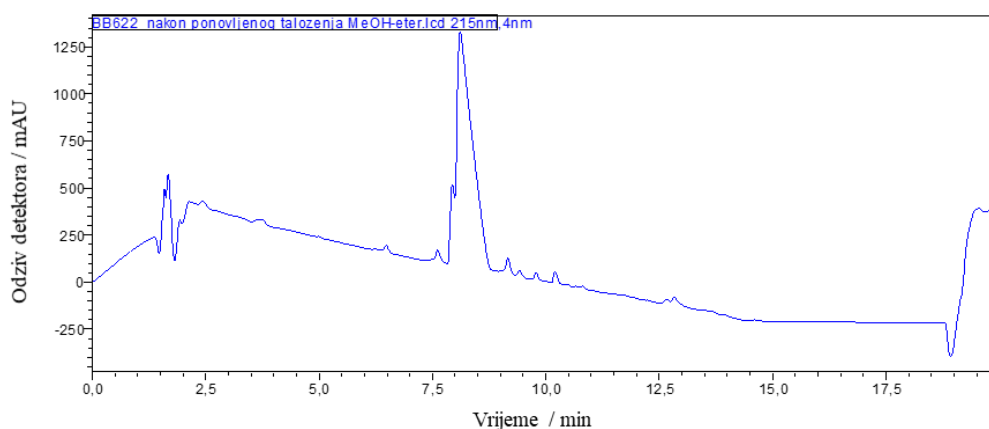
Deprotekcijom peptida s čvrstog nosača dobiveno je 68 mg sirovog produkta **40** ($m_{\text{teorijska}} = 46 \text{ mg}$).



Slika 41. Kromatogram reakcijske smjese spoja **40** nakon deprotekcije peptida s čvrstog nosača, dobiven LC-UV-MS analizom (Metoda A) uz PDA detekciju na 215 nm.

Analizom kromatograma reakcijske smjese nakon deprotekcije peptida s čvrstog nosača procijenjeno je da udio produkta **40** iznosi približno 58 % (Slika 41; $t_R = 8,542 \text{ min}$).

Pročišćavanja spoja **40** provedeno je precipitacijom, koristeći pritom sustav otapala MeOH/(C₂H₅)₂O.



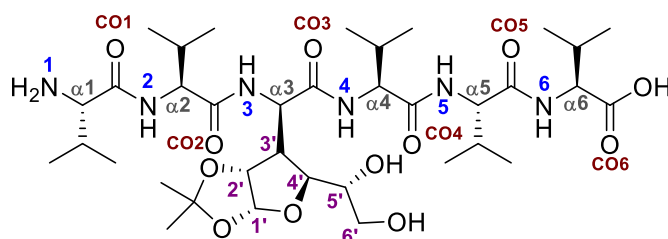
Slika 42. Kromatogram pročišćenog C-glikopeptida **40**, dobiven LC-UV-MS analizom (Metoda A) uz PDA detekciju na 215 nm.

Na temelju kromatograma prikazanog na Slici 42, utvrđeno je da je izoliran produkt **40** visoke čistoće (97 %, $t_R = 8,110 \text{ min}$). Pritom, masa izoliranog C-glikopeptida **40** iznosi 39 mg, a ukupno iskorištenje sinteze je 85 %.

HRMS (ESI-TOF): m/z $[M+H]^+$ izračunato C₃₅H₆₃N₆O₁₂ $[M+H]^+$ 759,4499; eksperimentalno određeno 759,4503.

Tablica 8. Asignacija ^1H NMR i ^{13}C NMR kemijskih pomaka spoja **40**.

AA		^1H	^{13}C
Val ¹	NH ₃ ⁺		
	α	3,68-3,62 (m, 1H)	57,7
	β	2,20-1,74 (m, 1H)	31,4; 31,0; 30,1; 29,8 ^a
	$\gamma\gamma'$	0,90-0,68 (m, 6H)	19,3; 19,1; 19,0; 18,6; 18,3; 17,9; 17,73; 17,66; 17,4 ^b
	CO		168,6
Val ²	NH	8,26 (d, $J = 7,8$ Hz)	
	α	4,59-4,47 (m, 1H)	57,2 ^c
	β	2,20-1,74 (m, 1H)	31,4; 31,0; 30,1; 29,8 ^a
	$\gamma\gamma'$	0,90-0,68 (m, 6H)	19,3; 19,1; 19,0; 18,6; 18,3; 17,9; 17,73; 17,66; 17,4 ^b
	CO		171,0 ^d
G _{Sor} ³	NH	8,37 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H)	
	α	4,68 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H)	58,2
	1'		111,3
	2'	4,72 (s, 1H)	86,0
	3'	4,00 (br s, 1H)	73,3
	4'	4,07 (br s, 1H)	82,0
	5'	3,62-3,54; 3,44-3,36 (m, 2H)	58,3
	C		112,4
	CH ₃	1,36, 1,23	27,5, 26,3
	CO		167,6
Val ⁴	NH	7,44 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H)	
	α	4,41-4,29 (m, 1H)	56,8
	β	2,20-1,74 (m, 1H)	31,4; 31,0; 30,1; 29,8 ^a
	$\gamma\gamma'$	0,90-0,68 (m, 6H)	19,3; 19,1; 19,0; 18,6; 18,3; 17,9; 17,73; 17,66; 17,4 ^b
	CO		170,3
Val ⁵	NH	8,04 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	
	α	4,23-4,13 (m, 1H)	57,8
	β	2,20-1,74 (m, 1H)	31,4; 31,0; 30,1; 29,8 ^a
	$\gamma\gamma'$	0,90-0,68 (m, 6H)	19,3; 19,1; 19,0; 18,6; 18,3; 17,9; 17,73; 17,66; 17,4 ^b
	CO		170,9 ^d
Val ⁶	NH	7,83 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H)	
	α	4,12-4,08 (m, 1H)	57,1 ^c
	β	2,20-1,74 (m, 1H)	31,4; 31,0; 30,1; 29,8 ^a
	$\gamma\gamma'$	0,90-0,68 (m, 6H)	19,3; 19,1; 19,0; 18,6; 18,3; 17,9; 17,73; 17,66; 17,4 ^b
	CO		172,8
^a istovrsni atomi (C β)			
^b istovrsni atomi (C $\gamma\gamma'$)			
^c nije jednoznačno, moguća zamjena			
^d nije jednoznačno, moguća zamjena			

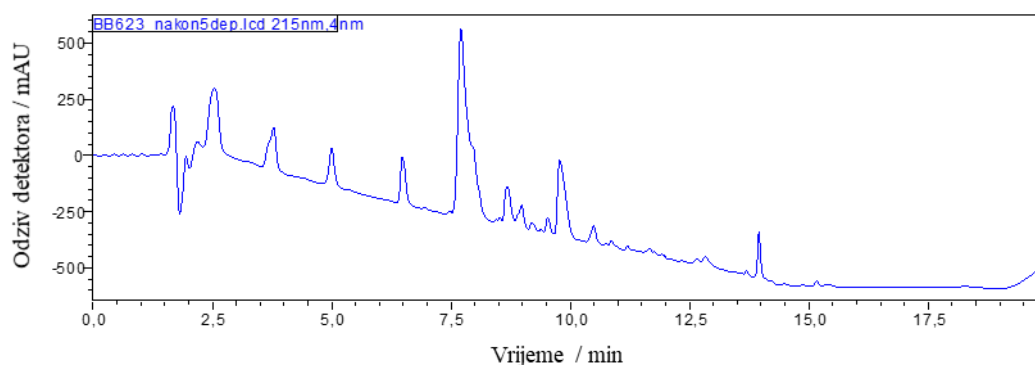
3.5.5. Sinteza i karakterizacija H_2N -Val-Val- G_{All} -Val-Val-Val-OH (**41**)

$C_{36}H_{64}N_6O_{12}$; $M_r = 772,9380$; bijela krutina (33 mg, $\eta = 71\%$); $t_R = 7,690$ min

Tablica 9. Sinteza C-glikopeptida **41**.

Postupak	Sintetski korak	Aminokiselina, reagensi	Količina	Vrijeme
1	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH DIPEA	81,45 mg 167,2 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2 $\times$ 1 mL	2 $\times$ 30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2 $\times$ 1 mL	2 $\times$ 30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2 $\times$ 1 mL	2 $\times$ 30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc- G_{All} -OH HATU NMM	129,5 mg 100,4 mg 52,8 μ L	2 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2 $\times$ 1 mL	2 $\times$ 30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	2 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2 $\times$ 1 mL	2 $\times$ 30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2 $\times$ 1 mL	2 $\times$ 30 min
4	Deprotekcija peptida s čvrstog nosača	1 % TFA/DCM	3 $\times$ 1 mL	3 $\times$ 1 h

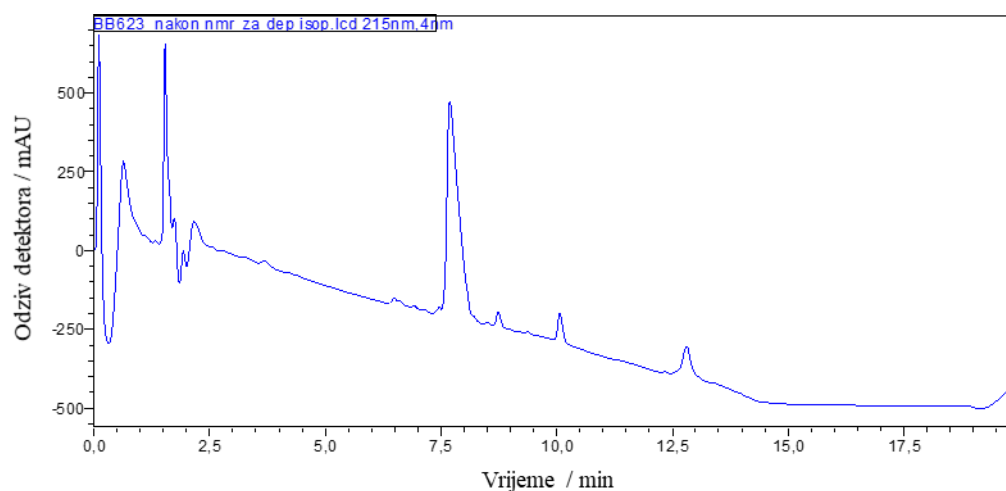
Deprotekcijom peptida s čvrstog nosača dobiveno je 84 mg sirovog produkta **41** ($m_{\text{teorijska}} = 46$ mg).



Slika 43. Kromatogram reakcijske smjese spoja **41** nakon deprotekcije peptida s čvrstog nosača, dobiven LC-UV-MS analizom (Metoda A) uz PDA detekciju na 215 nm.

Analizom kromatograma reakcijske smjese nakon deprotekcije peptida s čvrstog nosača procijenjeno je da udio produkta **41** iznosi približno 52 % (Slika 43; $t_R = 7,711$ min).

Pročišćavanja spoja **41** provedeno je tekućinskom kromatografijom na koloni C-18 silikagela. Nakon toga provedeno je dodatno pročišćavanje primjenom RP-HPLC (Metoda C).



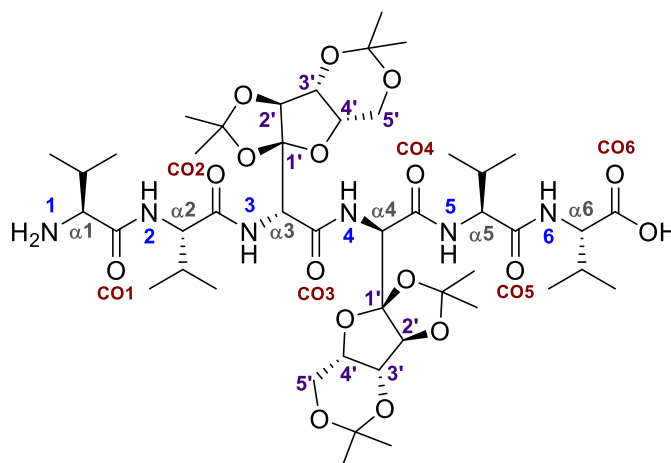
Slika 44. Kromatogram pročišćenog C-glikopeptida **41** dobiven LC-UV-MS analizom (Metoda A) uz PDA detekciju na 215 nm.

Na temelju kromatograma prikazanog na Slici 44, utvrđeno je da je izoliran produkt **41** visoke čistoće (95 %, $t_R = 7,690$ min). Pritom, masa izoliranog C-glikopeptida **41** iznosi 33 mg, a ukupno iskorištenje sinteze je 71 %.

HRMS (ESI-TOF): m/z $[M+H]^+$ izračunato za $C_{36}H_{65}N_6O_{12}$ $[M+H]^+$ 773,4582; eksperimentalno određeno 773,4585.

Tablica 10. Asignacija ^1H NMR i ^{13}C NMR kemijskih pomaka spoja **41**.

AA		^1H	^{13}C
Val ¹	NH ₃ ⁺	8,06 (br s, 3H)	
	α	3,75 (br, 1H)	57,1 ^a
	β	2,09-1,91 (m, 1H)	30,0
	$\gamma\gamma'$	0,92-0,85 (m, 6H)	19,2; 19,15; 19,1; 19,0; 18,4; 18,2; 17,9; 17,7; 17,6 ^b
	CO		167,8
Val ²	NH	8,35 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H)	
	α	4,43 (dd, $J = 8,6$ Hz ; $J = 5,6$ Hz, 1H)	57,7 ^c
	β	2,09-1,91 (m, 1H)	31,1
	$\gamma\gamma'$	0,92-0,85 (m, 6H)	19,2; 19,15; 19,1; 19,0; 18,4; 18,2; 17,9; 17,7; 17,6 ^b
	CO		169,7
G _{All} ³	NH	7,86 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H) ^d	
	α	4,74 (dd, $J = 8,5$ Hz; $J = 6,9$ Hz, 1H)	51,0
	1'	5,70 (d, $J = 3,4$ Hz, 1H)	103,9
	2'	5,58-5,56 (m, 1H)	81,5
	3'	2,66-2,58 (m, 1H)	45,2
	4'	3,99 (dd, $J = 9,9$ Hz; $J = 3,6$ Hz, 1H)	79,3
	5'	3,52-3,47 (m, 1H)	72,1
	6'	3,30 (dd, $J = 10,9$ Hz; $J = 3,6$ Hz, 1H) 3,40 (<i>under water</i>)	62,4
	C		111,4
	CH ₃	1,47; 1,22 (s, 6H)	26,8; 26,2
	CO		170,0
Val ⁴	NH	7,78 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H)	
	α	4,29-4,19 (m, 1H) ^e	57,7 ^c
	β	2,09-1,91 (m, 1H)	30,3
	$\gamma\gamma'$	0,78 (dd, $J = 21,6$ Hz; $J = 6,7$ Hz, 6H)	19,2; 19,15; 19,1; 19,0; 18,4; 18,2; 17,9; 17,7; 17,6 ^b
	CO		170,7
Val ⁵	NH	7,97 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H)	
	α	4,29-4,19 (m, 1H) ^e	57,7 ^c
	β	2,09-1,91 (m, 1H)	30,4
	$\gamma\gamma'$	8,85 – 8,82 (m, 6H)	19,2; 19,15; 19,1; 19,0; 18,4; 18,2; 17,9; 17,7; 17,6 ^b
	CO		171,1
Val ⁶	NH	7,86 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H) ^d	
	α	4,18 (dd, $J = 8,5$ Hz; $J = 5,8$ Hz, 1H)	57,1 ^a
	β	2,09-1,91 (m, 1H)	29,7
	$\gamma\gamma'$	0,92-0,85 (m, 6H)	19,2; 19,15; 19,1; 19,0; 18,4; 18,2; 17,9; 17,7; 17,6 ^b
	CO		172,7
^a nije jednoznačno, moguća zamjena			
^b istovrsni atomi (C $\gamma\gamma'$)			
^{c-e} nije jednoznačno, moguća zamjena			

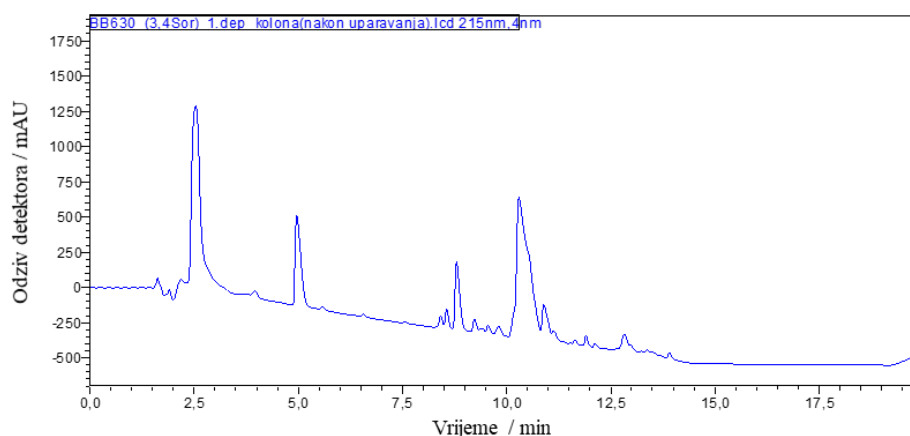
3.5.6. Sinteza i karakterizacija H_2N -Val-Val- G_{Sor} - G_{Sor} -Val-Val-OH (42)

$C_{46}H_{76}N_6O_{17}$; $Mr = 985,1390$; bijela krutina (15 mg, $\eta = 25\%$); $t_R = 10,489$ min

Tablica 11. Sinteza C-glikopeptida 42.

Postupak	Sintetski korak	Aminokiselina, reagensi	Količina	Vrijeme
1	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH DIPEA	81,45 mg 167,2 μ L	2 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	2 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc- G_{Sor} -OH HATU NMM	126,13 mg 100,4 mg 52,8 μ L	3 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc- G_{Sor} -OH HATU NMM	126,13 mg 100,4 mg 52,8 μ L	3 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	2 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	3 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
4	Deprotekcija peptida s čvrstog nosača	20 % TFE/DCM	3×2 mL	1×30 min 2×45 min

Deprotekcijom peptida s čvrstog nosača dobiveno je 52 mg sirovog produkta **42** ($m_{\text{teorijska}} = 59 \text{ mg}$).

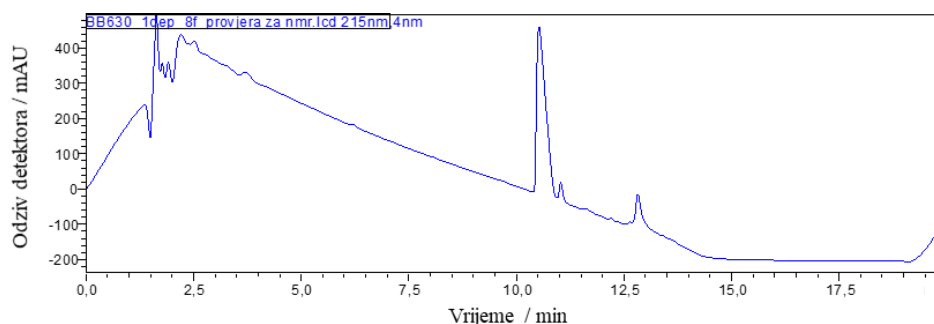


Slika 45. Kromatogram reakcijske smjese spoja **42** nakon deprotekcije peptida s čvrstog nosača, dobiven LC-UV-MS analizom (Metoda A) uz PDA detekciju na 215 nm.

Analizom kromatograma reakcijske smjese nakon deprotekcije peptida s čvrstog nosača procijenjeno je da udio produkta **42** iznosi približno 58 % (Slika 45; $t_R = 10,434 \text{ min}$).

U svrhu pročišćavanja i karakterizacije spoja **42** korištena je:

- Precipitacija ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$)
- RP-HPLC (Metoda D)



Slika 46. Kromatogram pročišćenog C-glikopeptida **42** dobiven LC-UV-MS analizom (Metoda A) uz PDA detekciju na 215 nm.

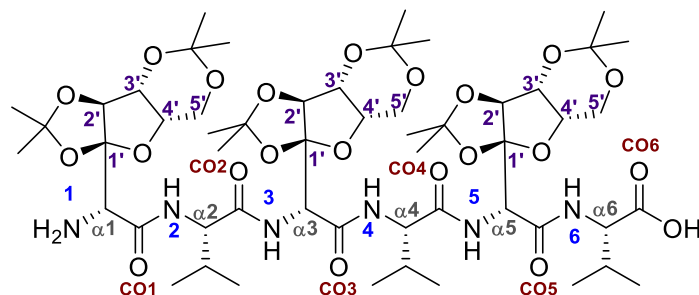
Na temelju kromatograma prikazanog na Slici 46, utvrđeno je da je izoliran produkt **42** visoke čistoće (96 %, $t_R = 10,489 \text{ min}$). Pritom, masa izoliranog C-glikopeptida **42** iznosi 15 mg, a ukupno iskorištenje sinteze je 25 %.

HRMS (ESI-TOF): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{46}\text{H}_{77}\text{N}_6\text{O}_{17}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 985,5340; eksperimentalno određeno 985,5340.

Tablica 12. Asignacija ^1H NMR i ^{13}C NMR kemijskih pomaka spoja **42**.

AA		^1H	^{13}C
Val ¹	NH		
	α	3,20 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H)	59,5
	β	2,04-1,96 (m, 1H)	(30,6; 30,4; 29,6; 31,5) ^h
	$\gamma\gamma'$	0,90 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H); 0,88 – 0,80 (m, 3H)	(19,3; 19,2; 19,1; 18,7; 18,3; 17,9; 17,6; 17,1) ⁱ
	CO		172,7 ^a
Val ²	NH	8,14 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H)	
	α	4,59 – 4,50 (m, 1H)	56,5
	β	2,20-2,12 (m, 1H)	(30,6; 30,4; 29,6; 31,5) ^h
	$\gamma\gamma'$	0,88 – 0,80 (m, 6H)	(19,3; 19,2; 19,1; 18,7; 18,3; 17,9; 17,6; 17,1) ⁱ
	CO		171,8
G _{Sor} ³	NH	8,24 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H)	
	α	4,90 – 4,84 (m, 1H)	57,4
	1'		97,1 ^b
	2'	4,90 – 4,84 (m, 1H)	85,3 ^c
	3'	4,27 (dd, $J = 7,2$ Hz; $J = 2,0$ Hz, 1H)	73,0 ^d
	4'	4,05 – 3,96 (m, 1H)	72,2 ^e
	5'	4,05 – 3,96 (m, 1H); 3,75 (d, $J = 13,1$ Hz, 1H)	59,2; 59,1
	C		(112,7; 112,6; 112,2; 111,8) ^f
	CH ₃	1,44 (s, 3H); 1,39-1,33 (m, 12H); 1,29 (s, 3H); 1,22 (s, 3H); 1,13 (s, 3H)	(28,8; 28,3; 27,2; 26,4; 26,1) ^g
G _{Sor} ⁴	CO		167,4
	NH	7,53 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H)	
	α	4,59 – 4,50 (m, 1H)	58,9
	1'		96,7 ^b
	2'	4,59 – 4,50 (m, 1H)	84,7 ^c
	3'	4,27 (dd, $J = 7,2$ Hz; $J = 2,0$ Hz, 1H)	72,5 ^d
	4'	4,05 – 3,96 (m, 1H)	71,9 ^e
	5'	4,05 – 3,96 (m, 1H); 3,75 (d, $J = 13,1$ Hz, 1H)	59,2, 59,1
	C		(112,7; 112,6; 112,2; 111,8) ^f
G _{Sor} ⁵	CH ₃	1,44 (s, 3H); 1,39-1,33 (m, 12H); 1,29 (s, 3H); 1,22 (s, 3H); 1,13 (s, 3H)	(28,8; 28,3; 27,2; 26,4; 26,1) ^g
	CO		166,4
	NH	7,15 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H)	
	α	4,59 – 4,50 (m, 1H)	57,0
	β	1,95-1,89 (m, 1H)	31,5
	$\gamma\gamma'$	0,77 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H); 0,88 – 0,80 (m, 3H)	(19,3; 19,2; 19,1; 18,7; 18,3; 17,9; 17,6; 17,1) ⁱ
	CO		170,4
	NH	8,04 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H)	
	α	3,91 (dd, $J = 7,3$ Hz; $J = 6,0$ Hz, 1H)	58,1
Val ⁶	β	2,04-1,96 (m, 1H)	(30,6; 30,4; 29,6; 31,5) ^h
	$\gamma\gamma'$	0,88 – 0,80 (m, 6H)	(19,3; 19,2; 19,1; 18,7; 18,3; 17,9; 17,6; 17,1) ⁱ
	CO		172,8 ^a

^{a-h} nije jednoznačno, moguća zamjena
ⁱ istovrsni atomi (C $\gamma\gamma'$)

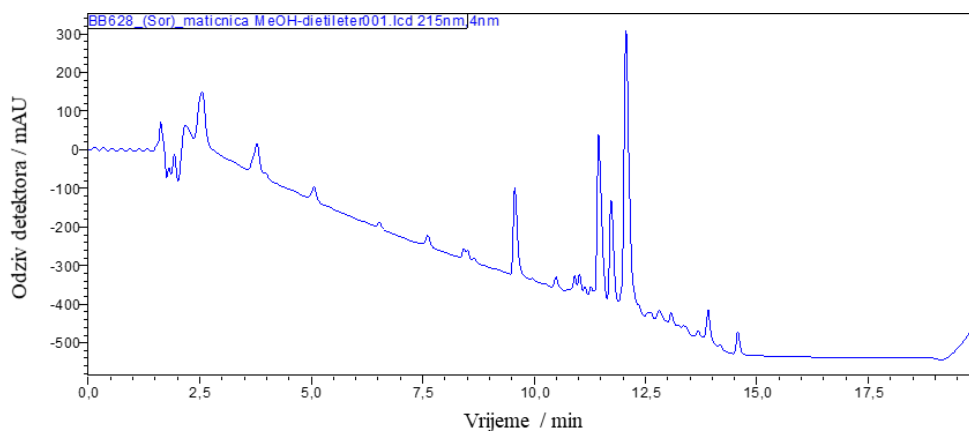
3.5.7. Sinteza i karakterizacija $H_2N-G_{Sor}-Val-G_{Sor}-Val-G_{Sor}-Val-OH$ (43)

$C_{54}H_{86}N_6O_{22}$; $M_r = 1171,3020$; bijela krutina (22 mg, $\eta = 31\%$); $t_R = 12,046$ min

Tablica 13. Sinteza C-glikopeptida 43.

Postupak	Sintetski korak	Aminokiselina, reagensi	Količina	Vrijeme
1	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH DIPEA	81,45 mg 167,2 μ L	1,5 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc- G_{Sor} -OH HATU NMM	126,13 mg 100,4 mg 52,8 μ L	2 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	1,5 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc- G_{Sor} -OH HATU NMM	126,13 mg 100,4 mg 52,8 μ L	2 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	2 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc- G_{Sor} -OH HATU NMM	126,13 mg 100,4 mg 52,8 μ L	3 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
4	Deprotekcija peptida s čvrstog nosača	20 % TFE/DCM	3×2 mL	2×30 min, 1×1 h

Deprotekcijom peptida s čvrstog nosača dobiveno je 73 mg sirovog produkta **43** ($m_{\text{teorijska}} = 70$ mg).

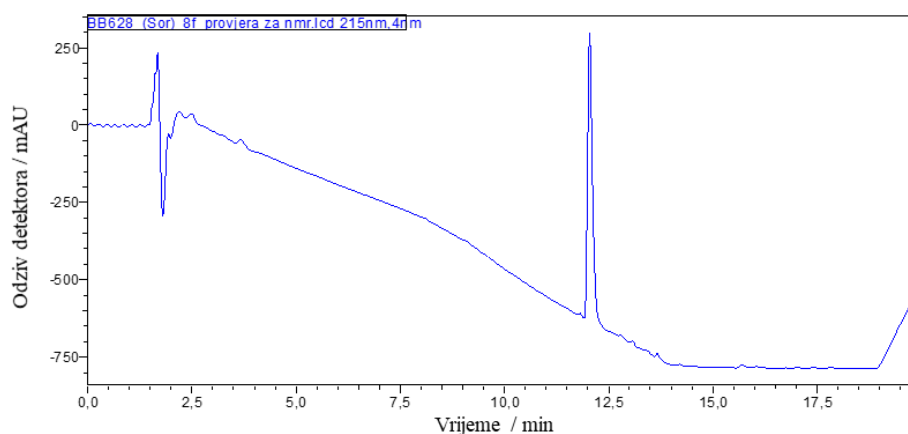


Slika 47. Kromatogram reakcijske smjese spoja **43** nakon deprotekcije peptida s čvrstog nosača, dobiven LC-MS analizom (Metoda A) uz PDA detekciju na 215 nm.

Analizom kromatograma reakcijske smjese nakon deprotekcije peptida s čvrstog nosača procijenjeno je da udio produkta **43** iznosi približno 48 % (Slika 47; $t_R = 12,129$ min).

U svrhu pročišćavanja spoja **43** korištena je:

- Precipitacija ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$)
- RP-HPLC (Metoda D)



Slika 48. Kromatogram pročišćenog C-glikopeptida **43** dobiven LC-MS analizom (Metoda A) uz PDA detekciju na 215 nm.

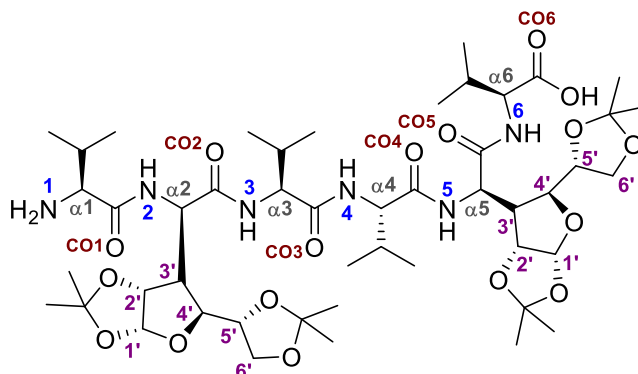
Na temelju kromatograma prikazanog na Slici 48, utvrđeno je da je izoliran produkt **43** visoke čistoće (99 %, $t_R = 12,046$ min). Pritom, masa izoliranog C-glikopeptida **43** iznosi 22 mg, a ukupno iskorištenje sinteze je 31 %.

HRMS (ESI-TOF): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{54}\text{H}_{87}\text{N}_6\text{O}_{22}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1171.5868; eksperimentalno određeno 1171.5872.

Tablica 14. Asignacija ^1H NMR i ^{13}C NMR kemijskih pomaka spoja **43**.

AA		^1H	^{13}C
G _{Sor} ¹	NH		
	α	3,62 (s, 1H)	59,5
	1'		114,2
	2'	4,89-4,78 (m, 1H)	(85,3; 85,0; 84,8) ^c
	3'	4,28 (s, 3H)	(72,8; 72,6) ^e
	4'	4,04-3,96 (m, 1H)	(72,0; 71,5) ^f
	5'	4,04-3,96 (m, 3H); 3,83 (d, $J = 13,3$ Hz, 1H); 3,68 (dd, $J = 12,8$ Hz; $J = 7,0$ Hz, 2H) ^a	(59,6; 59,3) ^g
	C		(112,1; 111,3; 96,9; 96,8) ^h
	CH ₃	1,40-1,12 (m, 12H)	(28,9; 28,5; 27,5; 27,4; 26,3; 26,2) ⁱ
	CO		169,8
Val ²	NH	7,92 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H)	
	α	4,54 (dd, $J = 8,2$ Hz; $J = 3,3$ Hz, 1H)	56,1
	β	2,18-2,11 (m, 1H)	(31,7; 30,7) ^d
	$\gamma\gamma'$	0,84 (br t, 6H)	(19,2; 19,0; 18,8; 17,8; 16,9; 16,7) ^j
	CO		170,6
G _{Sor} ³	NH	8,53 (br s, 1H)	
	α	4,89-4,78 (m, 1H)	58,0
	1'		113,0 ^b
	2'	4,74-4,66 (m, 1H)	(85,3; 85,0; 84,8) ^c
	3'	4,28 (s, 3H)	(72,8; 72,6) ^e
	4'	4,04-3,96 (m, 1H)	(72,0; 71,5) ^f
	5'	4,04-3,96 (m, 3H); 3,83 (d, $J = 13,3$ Hz, 1H); 3,68 (dd, $J = 12,8$ Hz; $J = 7,0$ Hz, 2H) ^a	(59,6; 59,3) ^g
	C		(112,1; 111,3; 96,9; 96,8) ^h
	CH ₃	1,40-1,12 (m, 12H)	(28,9; 28,5; 27,5; 27,4; 26,3; 26,2) ⁱ
	CO		(167,5; 170,8) ^k
Val ⁴	NH	7,30 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H)	
	α	4,60 (dd, $J = 8,1$ Hz; $J = 3,5$ Hz, 1H)	56,3
	β	2,11-2,05 (m, 1H)	(31,7; 30,7) ^d
	$\gamma\gamma'$	0,77 (dd, $J = 7,6$ Hz; $J = 19,1$ Hz, 6H)	(19,2; 19,0; 18,8; 17,8; 16,9; 16,7) ^j
	CO		n.d.
G _{Sor} ⁵	NH	8,39 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H)	
	α	4,89-4,78 (m, 1H)	58,0
	1'		112,8 ^b
	2'	4,74-4,66 (m, 1H)	(85,3; 85,0; 84,8) ^c
	3'	4,28 (s, 3H)	(72,8; 72,6) ^e
	4'	4,04-3,96 (m, 1H)	(72,0; 71,5) ^f
	5'	4,04-3,96 (m, 3H); 3,83 (d, $J = 13,3$ Hz, 1H); 3,68 (dd, $J = 12,8$ Hz; $J = 7,0$ Hz, 2H) ^a	(59,6; 59,3) ^g
	C		(112,1; 111,3; 96,9; 96,8) ^h
	CH ₃	1,40-1,12 (m, 12H)	(28,9; 28,5; 27,5; 27,4; 26,3; 26,2) ⁱ
	CO		(167,5; 170,8) ^k
Val ⁶	NH	7,38 (br s, 1H)	
	α	4,10 (br s, 1H)	57,6
	β	2,04-1,92 (m, 1H)	(31,7; 30,7) ^d
	$\gamma\gamma'$	0,82-0,79 (m, 6H)	(19,2; 19,0; 18,8; 17,8; 16,9; 16,7) ^j
	CO		n.d.

^{a-k} nije jednoznačno, moguća zamjena; ^{n.d.} nije određeno

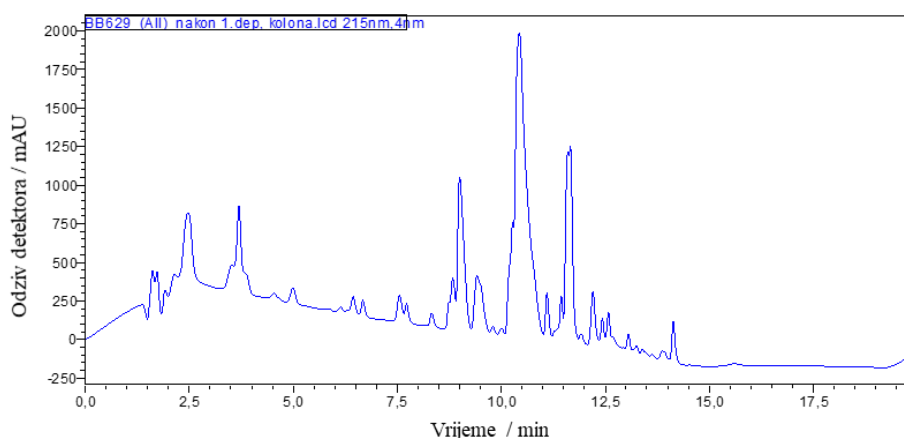
3.5.8. Sinteza i karakterizacija H_2N -Val- G_{Al} -Val-Val- G_{Al} -Val-OH (**44**)

$C_{48}H_{80}N_6O_{17}$; $M_r = 1013,1930$; bijela krutina (22 mg, $\eta = 33\%$); $t_R = 10,823$ min

Tablica 15. Sinteza C-glikopeptida **44**.

Postupak	Sintetski korak	Aminokiselina, reagensi	Količina	Vrijeme
1	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH DIPEA	81,45 mg 167,2 μ L	1,5 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc- G_{Al} -OH HATU NMM	129,5 mg 100,4 mg 52,8 μ L	2 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	2 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	2 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc- G_{Al} -OH HATU NMM	129,5 mg 100,4 mg 52,8 μ L	2 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
3	Reakcija kondenzacije	Fmoc-Val-OH HATU NMM	81,45 mg 100,4 mg 52,8 μ L	3 h
2	Deprotekcija Fmoc-zaštitne skupine	20 % piperidin/DMF	2×1 mL	2×30 min
4	Deprotekcija peptida s čvrstog nosača	20 % TFE/DCM	3×2 mL	2×30 min, 1×1 h

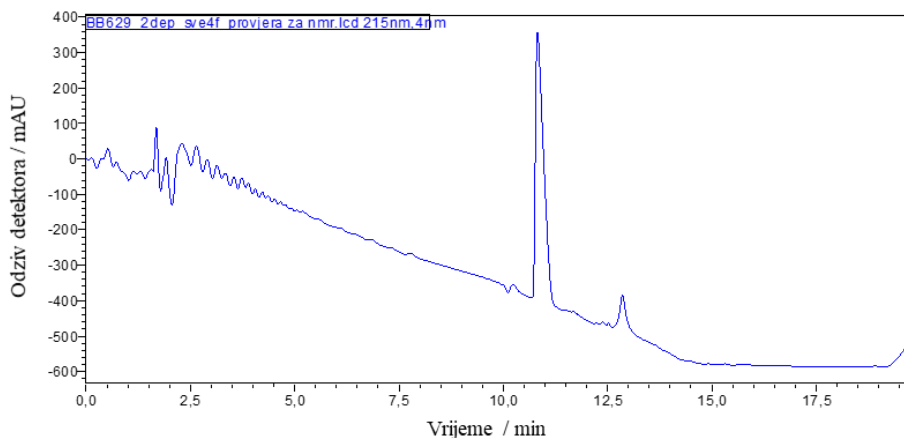
Deprotekcijom peptida s čvrstog nosača dobiveno je 67 mg sirovog produkta **44** ($m_{\text{teorijska}} = 61 \text{ mg}$).



Slika 49. Kromatogram reakcijske smjese spoja **44** nakon deprotekcije peptida s čvrstog nosača, dobiven LC-MS analizom (Metoda A) uz PDA detekciju na 215 nm.

Analizom kromatograma reakcijske smjese nakon deprotekcije peptida s čvrstog nosača procijenjeno je da udio produkta **44** iznosi približno 50 % (Slika 49; $t_R = 10,434 \text{ min}$).

Pročišćavanja spoja **44** provedeno je primjenom RP-HPLC (Metoda D).



Slika 50. Kromatogram pročišćenog C-glikopeptida **44** dobiven LC-MS analizom (Metoda A) uz PDA detekciju na 215 nm.

Na temelju kromatograma prikazanog na Slici 50, utvrđeno je da je izoliran produkt **44** visoke čistoće (95 %, $t_R = 10,823 \text{ min}$). Pritom, masa izoliranog C-glikopeptida **44** iznosi 22 mg, a ukupno iskorištenje sinteze je 33 %.

HRMS (ESI-TOF): m/z $[M+H]^+$ izračunato za $C_{48}H_{81}N_6O_{17}$ $[M+H]^+$ 1013,5653; eksperimentalno određeno 1013,5658.

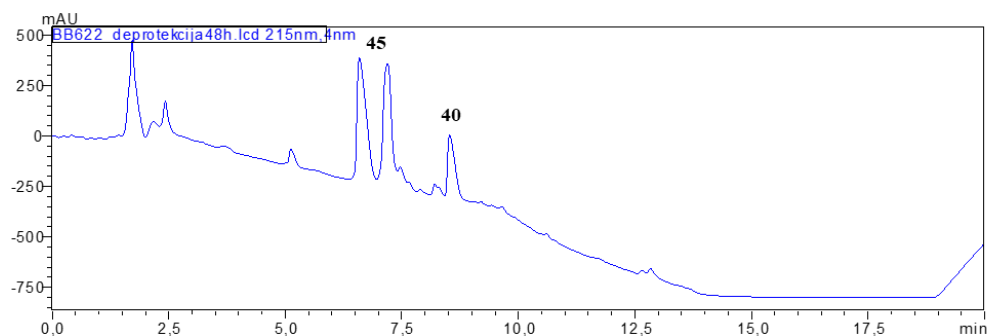
Tablica 16. Asignacija ^1H NMR i ^{13}C NMR kemijskih pomaka spoja **44**.

AA		^1H	^{13}C
Val ¹	NH ₂		
	α	3,43 (s, 1H)	58,5
	β	2,14-1,93 (m, 1H)	(30,6; 30,5; 30,14; 30,09) ^a
	$\gamma\gamma'$	0,97-0,79 (m, 6H)	(19,3; 19,1; 19,0; 18,8; 18,6; 18,3; 17,9; 16,8) ^b
	CO		171,3
G _{All} ²	NH	8,87 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H)	
	α	4,76 (t, $J=7,5$ Hz, 1H)	50,2
	1'	5,76 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H)	104,1 ^c
	2'	4,65-4,56 (m, 1H)	81,0
	3'	2,24-2,14 (m, 1H)	46,2
	4'	4,15-4,07 (m, 1H)	77,2 ^d
	5'	4,05-4,00 (m, 1H)	75,6 ^e
	6'	3,89 – 3,83 (m, 1H); 3,74-3,66 (m, 1H)	63,6 ^f
	C		(111,4; 108,4; 108,3) ^g
	CH ₃	1,47, 1,53 (s, 6H); 1,29-1,17 (m, 18H)	26,8; 26,0; 25,1; 25,0
	CO		170,3 ^h
Val ³	NH	8,16 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H)	
	α	4,26 – 4,16 (m, 1H)	58,0 ⁱ
	β	2,14-1,93 (m, 1H)	(30,6; 30,5; 30,14; 30,09) ^a
	$\gamma\gamma'$	0,97-0,79 (m, 6H)	(19,3; 19,1; 19,0; 18,8; 18,6; 18,3; 17,9; 16,8) ^b
	CO		170,3 ili 170,2
Val ⁴	NH	7,73 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H)	
	α	4,26 – 4,16 (m, 1H)	57,8 ⁱ
	β	2,14-1,93 (m, 1H)	(30,6; 30,5; 30,14; 30,09) ^a
	$\gamma\gamma'$	0,97-0,79 (m, 6H)	(19,3; 19,1; 19,0; 18,8; 18,6; 18,3; 17,9; 16,8) ^b
	CO		170,2 ^h
G _{All} ⁵	NH	8,27 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H)	
	α	4,65-4,56 (m, 1H)	50,6
	1'	5,76 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H)	104,0 ^c
	2'	4,65-4,56 (m, 1H)	81,0
	3'	2,24-2,14 (m, 1H)	46,2
	4'	4,15-4,07 (m, 1H)	77,01 ^d
	5'	4,05-4,00 (m, 1H)	75,5 ^e
	6'	3,89 – 3,83 (m, 1H); 3,74-3,66 (m, 1H)	63,3 ^f
	C		(111,4; 108,4; 108,3) ^g
	CH ₃	1,47; 1,53 (s, 6H); 1,29-1,17 (m, 18H)	26,8; 26,0; 25,1; 25,0
	CO		169,8
Val ⁶	NH	7,93 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H)	
	α	3,98 (br t, 1H)	58,2
	β	2,14-1,93 (m, 1H)	(30,6; 30,5; 30,14; 30,09) ^a
	$\gamma\gamma'$	0,97-0,79 (m, 6H)	(19,3; 19,1; 19,0; 18,8; 18,6; 18,3; 17,9; 16,8) ^b
	CO		172,6
^{a-i} nije jednoznačno, moguća zamjena			

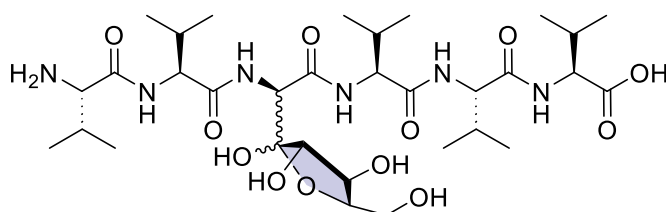
3.6. Deprotekcija C-glikopeptida

3.6.1. Deprotekcija C-glikopeptida **40** (**45**)

C-glikopeptidu **40** (17,9 mg; 758,91 g/mol; 0,0236 mmol) je dodana otopina TFA:DCM = 9:1 (1 mL). Miješanje je nastavljeno tijekom 24 sata na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije, reakcijskoj smjesi je dodan hladan diizopropil-eter pri čemu dolazi do taloženja. Centrifugiranjem je izoliran produkt **45**, u obliku bijele krutine (**45**; 12,1 mg; η = 71 %). Tijek reakcije, kontrola čistoće spojeva i preliminarna identifikacija produkata praćena je LC-MS (Metoda A, Slika 51).



Slika 51. LC-MS kromatogram deprotektiranog C-glikopeptida **45** (Metoda A).



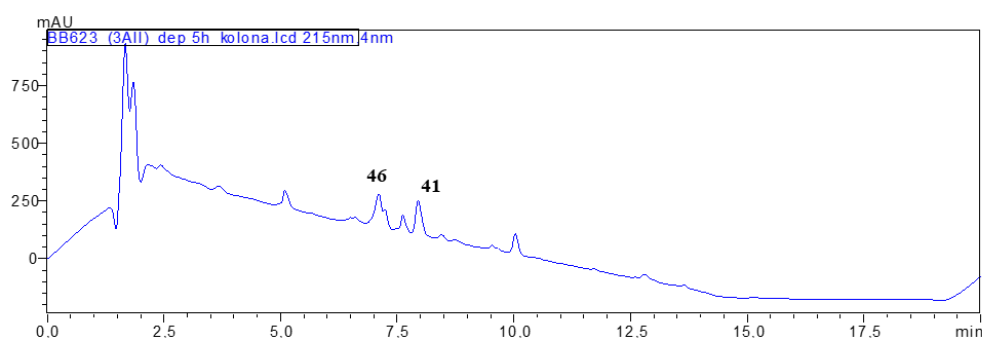
$C_{32}H_{58}N_6O_{12}$; M_r = 718,8460; bijela krutina (12,1 mg; η = 71 %); HRMS (ESI-TOF): m/z $[M+H]^+$ izračunato za $C_{32}H_{59}N_6O_{12}$ $[M+H]^+$ 719,4113; eksperimentalno određeno 719,4108.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆; smjesa tautomera): δ / ppm 10,20; 8,47; 8,45; 8,37; 8,36; 8,32; 8,30; 8,21; 8,20; 8,16; 8,14; 8,06; 8,01; 7,99; 7,93; 7,90; 7,88; 7,86; 7,37; 7,35; 7,31; 7,29; 6,47; 4,97; 4,72; 4,64; 4,63; 4,58; 4,56; 4,52; 4,51; 4,40; 4,33; 4,32; 4,31; 4,29; 4,28; 4,24; 4,23; 4,14; 4,13; 4,00; 3,73; 3,60; 3,53; 3,44; 3,42; 3,41; 3,39; 3,37; 3,36; 3,27; 3,17; 3,16; 2,55; 2,50; 2,38; 2,05; 2,04; 2,03; 2,02; 2,01; 1,96; 1,95; 1,94; 1,38; 1,37; 1,15; 1,14; 1,04; 1,03; 0,94; 0,93; 0,92; 0,90; 0,89; 0,87; 0,84; 0,83; 0,82; 0,80; 0,77; 0,73; 0,72.

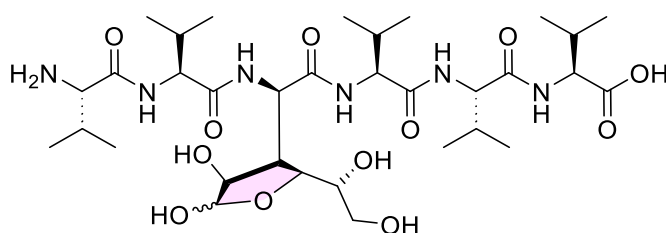
¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆; smjesa tautomera): δ / ppm 172,7; 171,5; 171,3; 171,0; 170,1; 169,9; 167,9; 158,0; 100,6; 98,4; 86,3; 76,6; 73,9; 71,4; 69,5; 62,6; 57,8; 57,6; 57,1; 55,3; 40,2; 40,1; 39,9; 39,9; 39,8; 39,7; 39,5; 39,4; 39,2; 39,1; 30,5; 30,0; 29,7; 24,5; 19,0; 18,3; 18,1; 17,9; 17,6.

3.6.2. Deprotekcija C-glikopeptida 41 (46)

C-glikopeptidu **41** (9,5 mg; 772,94 g/mol; 0,01229 mmol) je dodana otopina TFA:DCM = 9:1 (400 μ L). Miješanje je nastavljeno tijekom 24 sata na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije, reakcijskoj smjesi je dodan hladan diizopropil-eter pri čemu dolazi do taloženja. Centrifugiranjem je izoliran produkt **46**, u obliku bijele krutine (**46**; 9,0 mg; η = kvantitativno). Tijek reakcije, kontrola čistoće spojeva i preliminarna identifikacija produkata praćena je LC-MS (Metoda A, Slika 52).



Slika 52. LC-MS kromatogram deprotektiranog C-glikopeptida **46** (Metoda A).



$C_{33}H_{60}N_6O_{12}$; $Mr = 732,8730$; bijela krutina (9,0 mg, η = kvantitativno); HRMS (ESI-TOF): m/z $[M+H]^+$ izračunato za $C_{33}H_{61}N_6O_{12}$ $[M+H]^+$ 733,4268; eksperimentalno određeno 733,4241.

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 ; smjesa tautomera): δ / ppm 9,07; 8,89; 8,88; 8,60; 8,59; 8,37; 8,35; 8,33; 8,10; 8,03; 8,02; 7,95; 7,93; 7,64; 7,62; 6,82; 6,26; 6,26; 5,63; 5,47; 5,34; 5,28; 5,23; 5,22; 5,20; 5,13; 5,00; 4,93; 4,92; 4,80; 4,79; 4,76; 4,74; 4,68; 4,58; 4,49; 4,41; 4,36; 4,34; 4,32; 4,31; 4,25; 4,23; 4,22; 4,21; 4,19; 4,15; 4,14; 4,13; 4,12; 4,11; 4,10; 4,01; 3,89; 3,84; 3,80; 3,79; 3,78; 3,76; 3,75; 3,74; 3,72; 3,71; 3,64; 3,50; 3,49; 3,45; 3,34; 3,24; 3,19; 3,16; 3,02; 3,01; 3,00; 2,89; 2,73; 2,61; 2,55; 2,50; 2,50; 2,50; 2,38; 2,06; 2,05; 2,04; 1,98; 1,97; 1,96; 1,94; 1,93; 1,85; 1,66; 1,64; 1,63; 1,62; 1,56; 1,55; 1,26; 1,25; 1,23; 0,93; 0,91; 0,91; 0,90; 0,89; 0,88; 0,87; 0,86; 0,85; 0,85; 0,84; 0,83; 0,81; 0,78; 0,77; 0,75; 0,71; 0,70.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

Motivacija za istraživanje u okviru ove doktorske disertacije proizlazi iz činjenice da, unatoč značajnom napretku u razvoju sintetskih metodologija, većina dosad opisanih pristupa prvenstveno je usmjerena na pripremu C-glikozilnih aminokiselina u kojima je ugljikohidratna jedinica vezana na bočni lanac,^{34–37,140} kao i na N- ili C-terminalni kraj peptida, gdje se glikozilne jedinice najčešće povezuju amidnom vezom ili putem prethodno uvedenih reaktivnih skupina.^{108,128,141} Nadalje, pregledom literature zabilježen je i znatan broj primjera C-glikozilnih β -aminokiselina.^{34–37,39} Nasuprot tome, primjeri C-glikozilnih α -aminokiselina, u kojima je ugljikohidratna jedinica izravno vezana na α -ugljikov atom α -aminokiseline, znatno su rjeđe istraživani.^{42–45}

Dosadašnja istraživanja usmjerena na razvoj metodologija za sintezu C-glikozilnih α -aminokiselina obuhvaćaju različite sintetske pristupe, uključujući alkilaciju ekvivalenata α -aminokiselina, Streckerovu reakciju, hidrogenaciju dehidroaminokiselina, višekomponentne reakcije sa šećernim derivatima, kao i *de novo* pristupe sintezi navedenih spojeva.^{25,34,39,40,142} Pored toga, razvijene su i alternativne strategije, poput unakrsne metateze/ciklizacije olefina,¹⁴³ stereoselektivne adicije 2-litij-furana i 2-litij-tiazola na šećerne nitrone⁶⁹ te Ni-katalizirana reduktivna hidroglikozilacija alkina.¹⁴⁰ Unatoč tome, šira primjena navedenih metodologija u značajnoj je mjeri ograničena složenošću višestupanjskih sintetskih postupaka, koji u pravilu zahtijevaju izrazito nepovoljne i teško kontrolirane reakcijske uvjete. Pored toga, rezultati provedenih sintetskih koraka često nisu konzistentni, čime se dovodi u pitanje njihova reproducibilnost. Nadalje, dostupnost odgovarajućih supstrata često je ograničena. Kao jedno od ključnih ograničenja ističe se činjenica da većina dosad opisanih pristupa rezultira lošom stereoselektivnošću i/ili niskim prinosima, uz istodobnu nemogućnost učinkovite separacije dobivenih produkata. U konačnici, prethodno navedena ograničenja ukazuju na ozbiljan izazov u razvoju sintetski učinkovitih i strukturno jasno definiranih spojeva.

Polazeći od prethodno navedenih saznanja, razvijeni su noviji pristupi sintezi, uglavnom jednostupanjski, koje se odvijaju pri relativno blagim reakcijskim uvjetima, a najčešće uključuju fotokemijske reakcije (Slika 1).^{43,45} Među njima se ističu primjeri fotokataliziranog generiranja glikozilnih radikala ugljikohidratnih redoks-aktivnih estera te njihova adicija na α -imino estere⁴⁵ kao i foto-inducirana Cu-katalizirana asimetrična C(sp³)-H alkilacija derivata glicina.⁴³ Međutim, važno je istaknuti da takvi pristupi sintezi još uvijek zahtijevaju daljnju metodološku razradu i sustavnu evaluaciju njihove šire primjenjivosti. Posebno ostaju izazovni aspekti reproducibilnosti i provedbe reakcija na većoj skali, što značajno ograničava njihovu praktičnu primjenu, naročito u kontekstu sinteze oligomera s ugrađenim C-glikozilnim jedinicama kao gradivnim blokovima, što dosad nije sustavnije istraženo.

Neophodno je istaknuti da kontinuirani napredak u području sinteze i karakterizacije peptida, zajedno s rastućom dostupnošću i pristupačnošću biblioteka peptida, značajno doprinosi širenju područja primjene C-glikozilnih aminokiselina. One su prepoznate kao važne gradivne jedinice u medicinskoj kemiji, razvoju katalizatora i funkcionalnih materijala. Međutim, njihova šira i učinkovitija primjena još uvijek je ograničena nedostatnim razumijevanjem njihova utjecaja na konformaciju peptida, osobito u pogledu nekovalentnih interakcija koje su odgovorne za stabilizaciju točno određenih sekundarnih struktura. Za širu i učinkovitiju primjenu C-glikozilnih α -aminokiselina zasigurno nije dostatno razviti samo učinkovit pristup sintezi pojedinačnih gradivnih jedinica. Ključno je razviti i optimizirati sintetske protokole koji omogućuju njihovu daljnju transformaciju i preciznu ugradnju u peptidne sekvence. Osim toga, utjecaj strukture ugrađenih C-glikozilnih aminokiselina na konformaciju i funkcionalna svojstva peptida dosad nije bio predmet sustavnog istraživanja. Dosadašnja istraživanja uglavnom su bila usmjerena na modifikaciju peptida s ciljem poboljšanja njihove stabilnosti ili afiniteta prema specifičnim biomolekulama.^{46,47}

Uzimajući u obzir prethodno navedeno, istraživački interes unutar ove doktorske disertacije usmjeren je na proširenje kemijskog prostora C-glikozilnih α -aminokiselina s jasno definiranim trodimenzionalnim strukturama. Poseban je naglasak stavljen na ispitivanje potencijala razmatranih gradivnih jedinica da moduliraju konformaciju peptida na jasno definiran i predvidljiv način. Istraživanje se temelji na pretpostavci da prisutnost sterički zahtjevnih ugljikohidratnih jedinica, vezanih izravno na α -ugljikov atom α -aminokiseline, u kombinaciji

sa strukturnom raznolikošću te promjenom broja i raspodjele C-glikozilnih α -aminokiselina unutar peptidne sekvence, može značajno utjecati na lokalnu konformaciju peptida, kao i na formiranje i stabilizaciju struktura višeg reda.

Značajno je istaknuti da je pregledom relevantne literature opisan tek jedan primjer metodologije sinteze C-glikopeptida, pri čemu razvijena strategija omogućuje ugradnju C-glikozilne α -aminokiseline isključivo na N-terminalni kraj peptida.⁴³ Slijedom toga, razvoj novih sintetskih pristupa koji omogućuju učinkovitu i kontroliranu ugradnju C-glikozilnih jedinica predstavlja značajan istraživački izazov i preduvjet za bolje razumijevanje njihovih strukturnih i funkcionalnih učinaka.

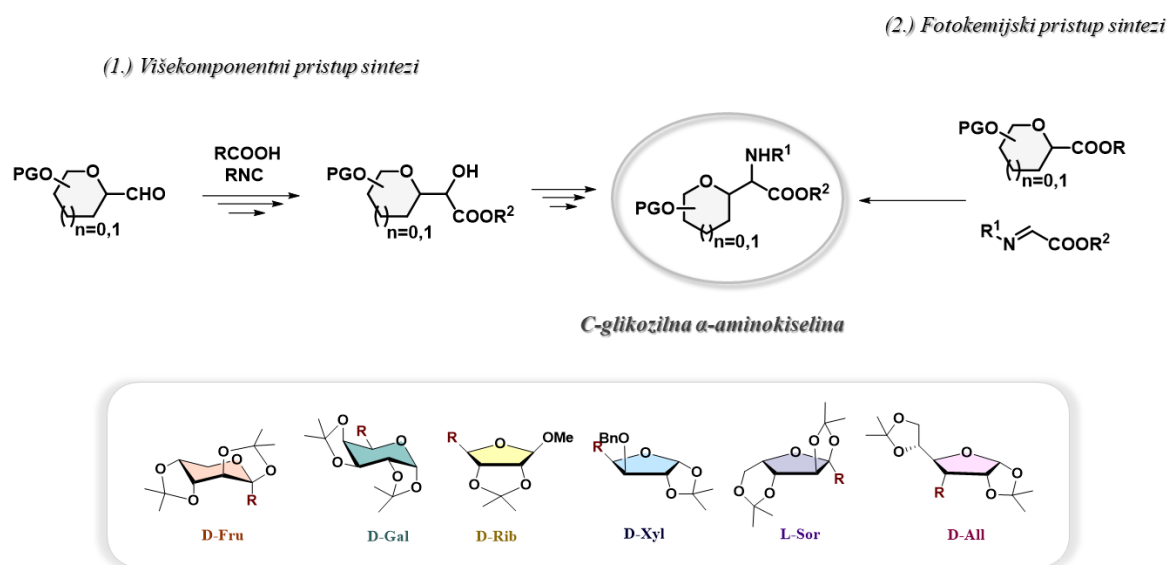
U tom kontekstu, u okviru ove disertacije razvijen je novi sintetski pristup koji po prvi put omogućava kontroliranu, selektivnu ugradnju strukturno različitih C-glikozilnih α -aminokiselina na unaprijed definirane položaje unutar peptidne sekvence. Time je ostvaren značajan metodološki iskorak koji otvara mogućnost sustavnog istraživanja utjecaja C-glikozilnih aminokiselina na konformaciju i svojstva peptida, čime se ostvaruje relevantan doprinos razvoju kemije glikopeptida.

Eksperimentalni dio istraživanja obuhvatio je kemijsku transformaciju ugljikohidrata u odgovarajuće C-glikozilne α -aminokiseline, nakon čega je uslijedilo njihovo ugrađivanje u odabrane peptidne sekvence. U konačnici je provedena detaljna strukturna karakterizacija i konformacijska analiza sintetiziranih C-glikopeptida, čime je omogućen sustavan uvid u njihov funkcionalni doprinos te utjecaj na konformacijska svojstva peptida.

4.2. Metodologije sinteze C-glikozilnih α -aminokiselina

Istražena su dva metodološka pristupa sintezi C-glikozilnih α -aminokiselina:

1. Višekomponentni pristup sintezi C-glikozilnih α -aminokiselina
2. Fotokemijski pristup sintezi C-glikozilnih α -aminokiselina



Slika 53. Shematski prikaz metodologija sinteze C-glikozilnih α -aminokiselina. C-glikozilni donori ($R=CHO$ za multikomponentni pristup, $R=COOR$ za fotokemijski pristup sintezi).

4.2.1. Višekomponentni pristup sintezi

Na temelju ranijih istraživanja unutar naše istraživačke grupe doskočilo se problemu stereoselektivnosti. Naime, razvijena je metodologija koja se zasniva na višekomponentnim reakcijama, a omogućuje ugradnju C-glikozilne jedinice s dijastereoselektivnošću do 94:6 d.r. Slijedom ovog istraživanja potvrđeno je da na dijastereoselektivnost razmatrane Passerinijeve reakcije, uglavnom utječe izbor karbonilne komponenta, odnosno izopropilidenima zaštićen ugljikohidratni aldehid, dok ostale komponente reakcije imaju tek neznatan utjecaj.^{76,135}

Na temelju tog saznanja, koje je ujedno poslužilo kao motivacija, daljnje je istraživanje bilo usmjereno na optimiziranje metodologije pripreme C-glikozilnih α -aminokiselina iz Passerinijevih produkata, za koje se pretpostavljalo da predstavljaju prikladne prekursore za sintezu željenih C-glikozilnih α -aminokiselina.

Nadovezujući se na prethodna otkrića, nedavno je razvijena strategija pripreme dipeptidnih struktura primjenom dijastereoselektivne Passerinijeve reakcije.⁸¹ U navedenom pristupu, kao izocijanidne komponente, korišteni su različiti kiralni aminokiselinski izocijanidi. Naknadnim post-kondenzacijskim modifikacijama omogućena je priprava C-glikozilnih α -aminokiselina, čime su formirane hibridne dipeptidne struktra koje u svojoj strukturi sadrže C-glikozilne α -aminokiseline i proteinogene aminokiseline. Glavno ograničenje metodologije odnosilo se na činjenicu da su produkti dobiveni u obliku smjese dijastereomera, koje nije bilo moguće učinkovito razdvojiti tekućinskom kromatografijom na koloni silikagela. Odvajanje je bilo dugotrajno i nepotpuno te je rezultiralo značajnim gubicima produkata, zbog čega su sve daljnje reakcije provedene sa smjesama dijastereomera.⁸¹ Ovi rezultati jasno ukazuju na potrebu za daljnjom optimizacijom metodologije.

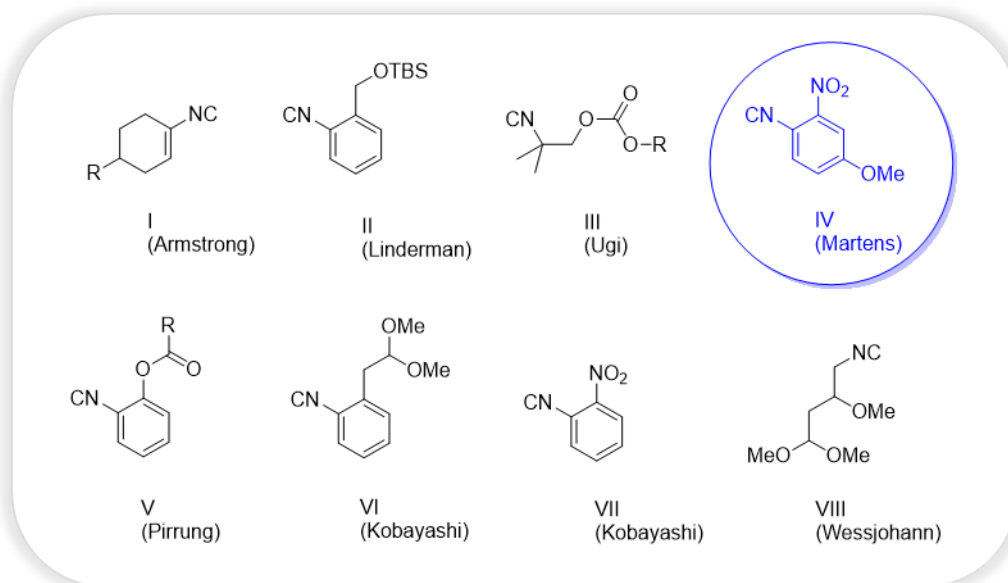
Slijedom navedenih spoznaja, u ovom je radu metodologija dodatno unaprijeđena. Provedena je optimizacija reakcijskih uvjeta s ciljem sinteze dijastereomerno čistih C-glikozilnih α -aminokiselina, koje će predstavljati monomere u sintezi C-glikopeptida. Pristup je temeljen na višekomponentnoj sintezi u kojoj je, kao izocijanidna komponenta odabran konvertibilni izocijanid. Na taj je način izbjegnuta mogućnost racemizacije, uočena u ranijim primjerima s aminokiselinskim izocijanidima, dok je krajnji produkt sinteze ciljane

dijastereomerno čista C-glikozilna α -aminokiselina, umjesto hibridne dipeptidne strukture dobivene u obliku smjese dijastereomera (Slika 53, lijevo).

U nastavku je prikazana priprava polaznih spojeva koji sudjeluju u Passerinijevoj reakciji, s naglaskom na sintezu konvertibilnih izocijanida kao ključnih reaktanata. Riječ je o izocijanidima koji se, nakon provedene Passerinijeve reakcije, mogu daljnjim transformacijama prevesti u drugu funkcijsku skupinu, čime se proširuje njihova sintetska primjenjivost. Dodatno, iako se ugljikohidratni aldehidi često koriste u višekomponentnim reakcijama (VKR), njihova je primjena gotovo zanemarena u VKR temeljenim na izocijanidima (IVKR). Polazeći od navedenog, pretpostavljeno je da se α -aciloksiamidi, kao produkti Passerinijeve reakcije, mogu daljnjim standardnim transformacijama prevesti u odgovarajuće C-glikozilne α -aminokiseline, pri čemu se reakcije mogu učinkovito provesti i na većoj skali, bez narušavanja prinosa.

4.2.1.1. Priprava konvertibilnih izocijanida

Prvotni je korak bio priprava izocijanidne komponente Passerinijeve reakcije. U nastavku su prikazani najčešće korišteni konvertibilni izocijanidi (Slika 54). Ključna svojstva prikladnog konvertibilnog izocijanida uključuju dostatnu nukleofilnost te sposobnost da amidni fragment, koji nastaje njegovim uključivanjem u reakciju, djeluje kao dobra izlazna skupina.^{144,145}



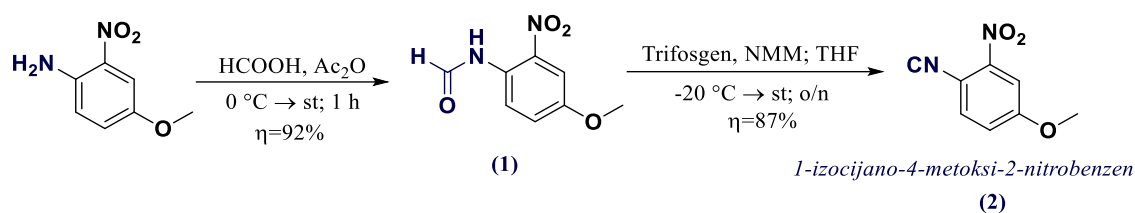
Slika 54. Najčešće korišteni konvertibilni izocijanidi.¹⁴⁵

Naime, u ranijim istraživanjima^{144,146,147} provedene su Passerinijeve reakcije s nekoliko različitih konvertibilnih izocijanida:

- 1-izocijano-4-metoksi-2-nitrobenzen
- 2-bromo-6-izocijanopiridin
- 2-izocijanopiridin

Izolirani su Passerinijevi produkti u prinosu od 50 % do 90 %. Optimizacija reakcijskih uvjeta s ciljem dobivanja C-glikozilne α -hidroksi kiseline hidrolizom Passerinijevog produkta, provedena je na modelnoj reakciji koja je uključivala benzojevu kiselinu, cikloheksankarbaldehid i 1-izocijano-4-metoksi-2-nitrobenzen. Kao najpovoljnije baze za dobivanje odgovarajućih α -hidroksi kiselina pokazale su se 1 M NaOH u MeOH, kao i NaOCH₃ u MeOH te KOtBu u THF, pri sobnoj temperaturi i trajanju reakcije od 24 sata.¹⁴⁶

Kao najprikladniji izocijanid pokazao se 1-izocijano-4-metoksi-2-nitrobenzen (2) (*Martensonov izocijanid*), koji je u okviru ove doktorske disertacije odabran i korišten za daljnje sintetske transformacije. Sinteza izocijanida (2) odvija se u dva reakcijska koraka, pri čemu je željeni produkt izoliran u visokom prinosu od 87 % (Slika 55). Za razliku od sinteze aminokiselinskih izocijanida, u ovom slučaju reakciju nije bilo potrebno provoditi pri vrlo niskim temperaturama, budući da ne postoji rizik od racemizacije tijekom priprave izocijanidne komponente.

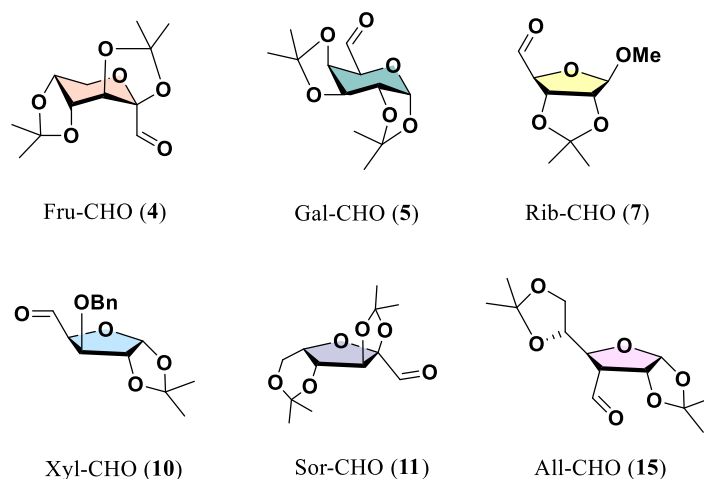


Slika 55. Shematski prikaz priprave konvertibilnog izocijanida, 1-izocijano-4-metoksi-2-nitrobenzena (2).

4.2.1.2. Priprava izopropilidenima zaštićenih aldehida iz odgovarajućih ugljikohidrata

Izopropilidenima zaštićeni aldehidi, dobiveni uglavnom oksidacijom odgovarajućih ugljikohidrata, korišteni su kao aldehidne komponente u Passerinijevoj reakciji. Formiranje novog stereogenog centra svojstveno je mnogim VKR, a poznato je da ugljikohidratni aldehidi mogu značajno utjecati na diastereoselektivnost takvih procesa zbog prostorne blizine novog kiralnog centra koji nastaje reakcijom.

Za potrebe ovog istraživanja pripravljeno je šest različitih glikozilnih donora: aldehid dobiven iz 2,3:4,5-di-O-izopropiliden- β -D-fruktopiranoze (Fru-CHO, **4**), iz 1,2:3,4-di-O-izopropiliden- α -D-galaktopiranoze (Gal-CHO, **5**), iz metil-2,3-O-izopropilidene- β -D-ribofuranozida (Rib-CHO, **7**), iz 3-O-benzil-1,2-O-izopropiliden- α -D-ksilofuranoze (Xyl-CHO, **10**), iz 2,3:4,6-di-O-izopropiliden- α -L-sorbofuranoze (Sor-CHO, **11**) te, naposljetku, iz 1,2:5,6-di-O-izopropiliden- α -D-alofuranoze (All-CHO, **15**) (Slika 56).



Slika 56. Glikozilni donori VKR. Ugljikohidratni aldehidi za Passerinijevu reakciju.

Osim „klasičnih“ C-glikozilnih veza na anomernom položaju, ovako odabrani glikozilni donori, omogućuju i formiranje „neklasičnih“ C-glikozilnih veza na položajima 3' i 5' (aldehidi **5**, **7**, **10** i **15**), čime se dodatno proširuje spektar dostupnih C-glikozilnih α -aminokiselina.

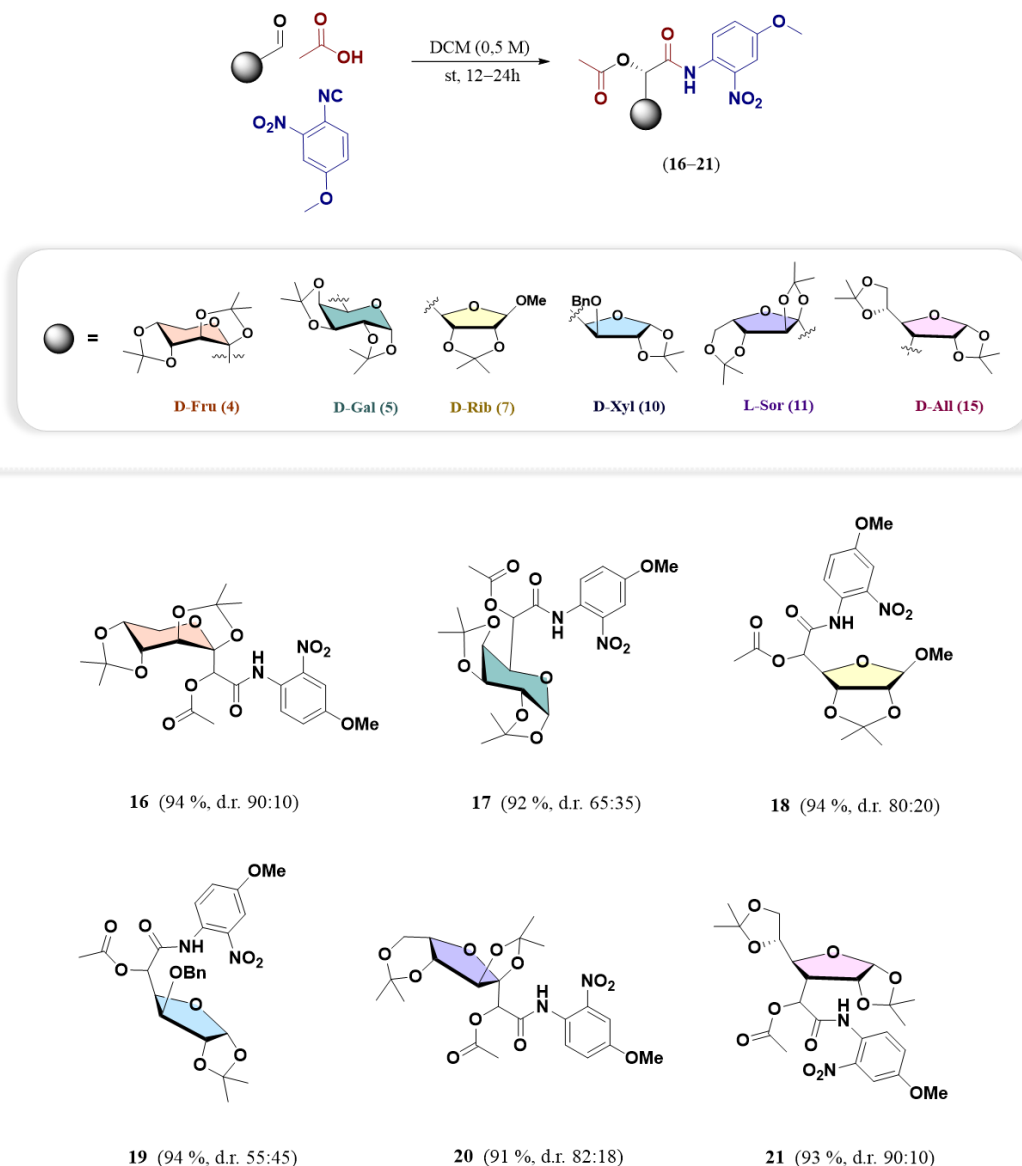
Svi su produkti sintetizirani prema ranije objavljenim metodologijama, uz manje modifikacije reakcijskih uvjeta, koje su detaljno opisane u eksperimentalnom dijelu disertacije, a njihova je karakterizacija u potpunosti je u skladu s literaturno navedenim podacima.^{132–135}

4.2.1.3. Priprava α -aciloksi amida dobivenih Passerinijevom reakcijom

Nadovezujući se na prethodno opisane sinteze izocijanidnih i aldehidnih komponenti, provedena je diastereoselektivna Passerinijeva reakcija, s ciljem uvođenja C-glikozilne jedinice. U razmatranoj VKR kao karbonilna komponenta korišteni su izopropilidenima zaštićeni aldehidi (**4**, **5**, **7**, **10**, **11**, **15**) dobiveni iz odgovarajućih ugljikohidrata, pri čemu je kao izocijanidna komponenta odabran tzv. konvertibilni izocijanid (**2**), dok se kao kiselinska komponenta najboljim izborom pokazala octena kiselina. Na taj su način Passerinijevom reakcijom dobiveni α -aciloksiamidi u kojima je ugljikohidratna jedinica izravno vezana na novi kiralni centar koji se formira reakcijom. Reakcije su provedene u diklormetanu pri sobnoj temperaturi, pri čemu su α -aciloksiamidi izolirani u vrlo visokim prinosima ($> 90\%$) u obliku smjesa dva diastereoizomera. Međutim, zapažena diastereoselektivnost pokazala se varijabilnom, što se može pripisati strukturnoj raznolikosti korištenih ugljikohidratnih aldehida (Slika 56, Tablica 17).

Dijastereomerni omjeri određeni su asignacijom ^1H NMR spektara reakcijskih smjesa. Primjerice, u slučaju produkata **16** i **21** opažena je najviša diastereoselektivnost (90:10 d.r.). Slični su rezultati dobiveni i za produkte **18** (80:20 d.r.) i **20** (82:18 d.r.). Nasuprot tome, produkt **17** pokazao je nešto nižu diastereoselektivnost (65:35 d.r.), dok je u slučaju Passerinijevog produkta **19**, u čijoj je strukturi kao ugljikohidratna komponenta sadržan ksilozni derivat, reakcija rezultirala smjesom dva diastereoizomera u gotovo jednakim omjerima (55:45 d.r.). Iz tog je razloga provedena njihova zasebna konverzija u amine, odnosno ciljane C-glikozilne α -aminokiseline. U ranijim istraživanjima, rentgenskom kristaligrafijom potvrđena je (*S*)-konfiguracija na novom kiralnom centru većinskog diastereomera Passerinijevog produkta.⁷⁵

Tablica 17. Priprava α -aciloksi amida **16–21** Passerinijevom reakcijom. Prinosi su navedeni u zagradama. d.r. omjeri određeni su asignacijom pripadajućih ^1H NMR spektara.



Hidrolizom α -aciloksiamida u narednom koraku sintetizirane su odgovarajuće α -hidroksi C-glikozilne kiseline, dok su naknadnim post-kondenzacijskim modifikacijama pripremljene ciljane C-glikozilne α -aminokiseline. Izolacija i pročišćavanje produkata provedeni su primjenom različitih kromatografskih metoda, dok je njihova identifikacija i strukturna karakterizacija ostvarena korištenjem različitih spektroskopskih i spektrometrijskih tehnika. Pojedini sintetski koraci detaljno su razmotreni u nastavku.

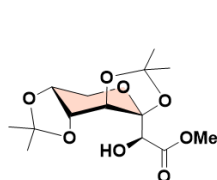
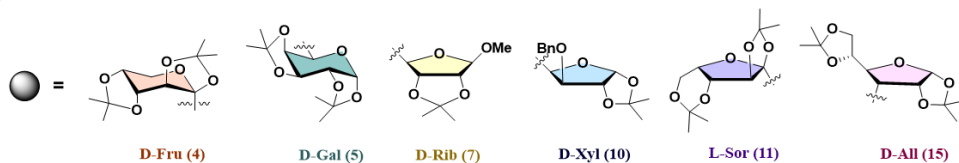
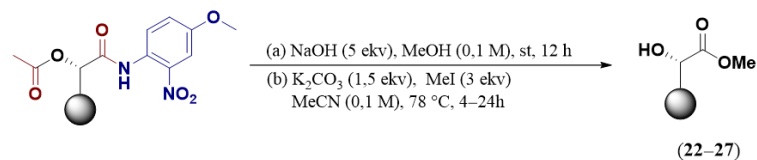
4.2.1.4. Priprava metilnih estera α -hidroksi C-glikozilnih kiselina

Nakon provedene Passerinijeve reakcije, uslijedila je hidroliza α -aciloksi karboksiamida u bazičnim uvjetima (NaOH u metanolu) s ciljem očuvanja izopropilidenskih zaštitnih skupina na ugljikohidratnom dijelu molekule. Na taj su način dobivene odgovarajuće α -hidroksi C-glikozilne kiseline, koje su potom prevedene u odgovarajuće α -hidroksi metilne estere **22** - **27** u prisutnosti metil-jodida (MeI) i kalijevog karbonata (K_2CO_3) u acetonitrilu, uz prinose koji su se kretali u rasponu od 42 % do 85 % , nakon dva provedena reakcijska koraka (Tablica 18).

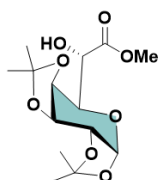
Jedno od ključnih saznanja u okviru ovog istraživanja odnosi se na uspješno razdvajanje dijastereomera produkata, α -hidroksi metilnih estera, kromatografijom na koloni silikagela, što je predstavljalo metodološku prekretnicu u razvoju sinteze. Pritom je kao mobilna faza korišten sustava otapala PE:EA = 1:1. Mogućnost učinkovitog razdvajanja dijastereomera pokazala se presudnom za nastavak sinteze, budući da je omogućila izolaciju većinskog dijastereomera s jasno definiranom stereokemijom. Time je ostvaren značajan metodološki iskorak u odnosu na ranije pristupe, u kojima razdvajanje dijastereomera nije bilo izvedivo ili je bilo dugotrajno i neučinkovito. Važno je napomenuti da se navedeni prinosi odnose isključivo na većinski dijastereomer, odnosno dijastereomerno čist produkt, što predstavlja temeljni napredak i preduvjet za daljnje sintetske transformacije usmjerene na pripravu dijastereomerno čistih C-glikozilnih α -aminokiselina.

Iznimku predstavlja ksilozni derivat spoja **25**, u slučaju kojeg je kao produkt dobivena smjesa dva dijastereomera u približno jednakim omjerima. Iako su dva dijastereomera spoja Xyl-**25** naposljetku razdvojena kolonskom kromatografijom, postupak se pokazao dugotrajnim i nepotpunim. U konačnici je za svaki dijastereomer zasebno provedena konverzija do odgovarajuće C-glikozilne α -aminokiseline, no ksilozni derivat je, zbog ograničene učinkovitosti reakcije, ipak izostavljen iz daljnjih razmatranja.

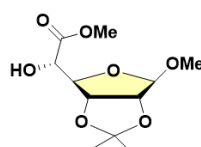
Tablica 18. Priprava metilnih estera α -hidroksi C-glikozilnih kiselina 22–27. Prinosi su navedeni u zagradama.



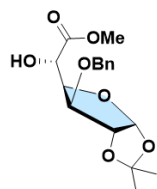
22 (85 %)



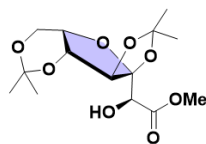
23 (62 %)



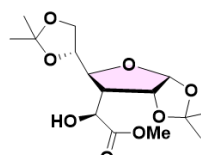
24 (77 %)



25 (42 %)



26 (78 %)

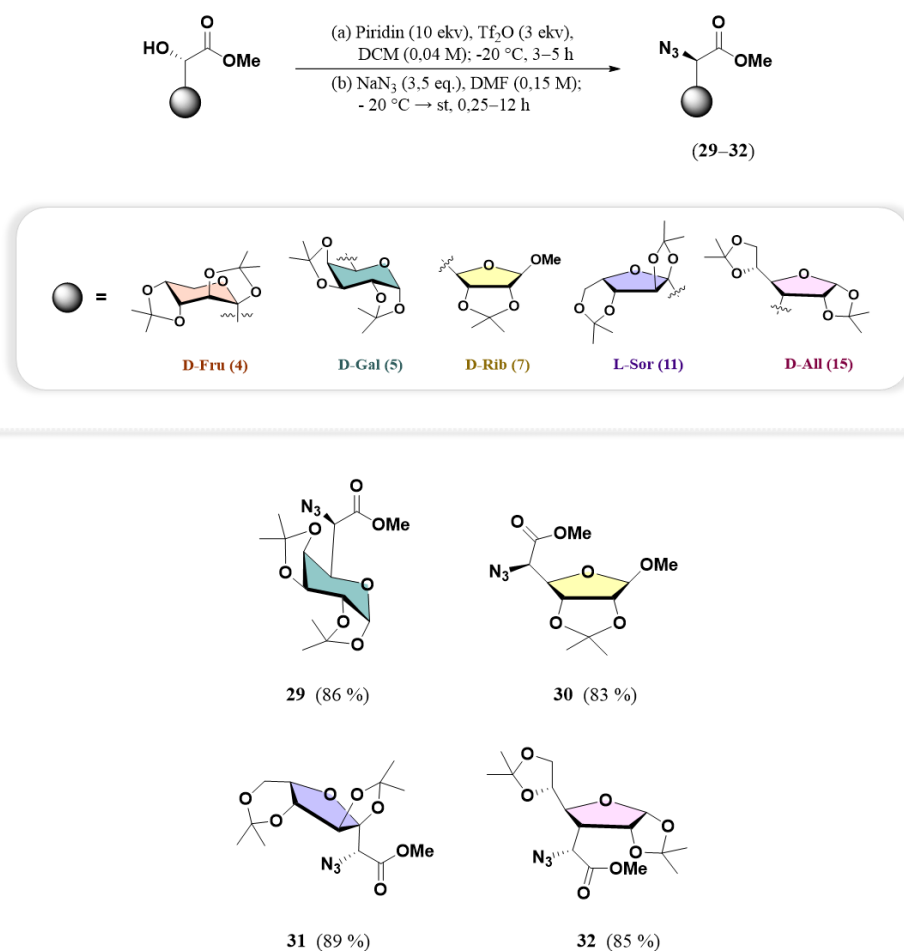


27 (84 %)

4.2.1.5. Priprava metilnih estera α -azido C-glikozilnih kiselina

U nastavku su provedene post-kondenzacijske modifikacije s ciljem pripreme odgovarajućih C-glikozilnih α -aminokiselina. Ključni korak sinteze uključivao je aktivaciju slobodne α -hidroksilne skupine u reakciji s anhidridom trifluorometansulfonske kiseline (Tf_2O), što je rezultiralo nastajanjem odgovarajućeg triflatnog derivata. Potom je uslijedila reakcija nukleofilne supstitucije, koja se odvijala $\text{S}_{\text{N}}2$ mehanizmom i rezultirala inverzijom konfiguracije na novom kiralnom centru formiranom Passerinijevom reakcijom, čime je potvrđena kontrola stereokemijskog ishoda reakcije. Na taj je način dobiven odgovarajući azidoester **3**, (*R*)-konfiguracije, u prinosima koji su se kretali u rasponu od 83 % do 89 % nakon dva uzastopna reakcijska koraka (Tablica 19).

Tablica 19. Priprava metilnih estera α -azido C-glikozilnih kiselina **29–32**. Prinosi su navedeni u zagradama.

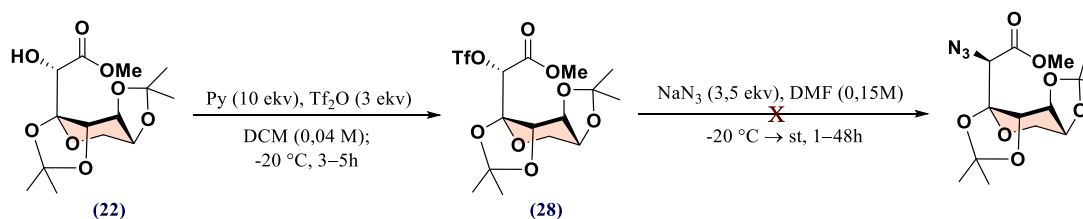


Međutim, tijekom provedene sinteze uočena je nemogućnost pripreve C-glikozilne α -aminokiseline koja sadrži fruktozni derivat kao C-glikozilnu jedinicu, i to u koraku nukleofilne supstitucije koja rezultira nastajanjem odgovarajućeg azidoestera. Unatoč brojnim pokušajima, konverzija nije ostvarena, već je u reakcijskoj smjesi zaostajao polazni spoj (triflatni derivat **28**).

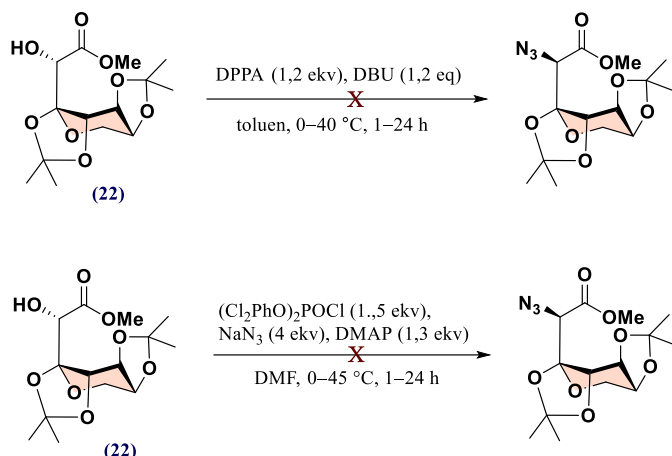
S ciljem rješavanja uočenog problema, provedena je sustavna optimizacija reakcijskih uvjeta. Reakcije su provedene pri različitim temperaturama (0–110 °C), korištenjem različitih otapala (CH_3CN , DMF, DMSO), a vrijeme reakcije produljeno je do 48 sati. Ipak, niti jedan od ispitivanih uvjeta nije rezultirao nastajanjem željenog produkta (Slika 57a).

Na temelju pregleda relevantne literature, provedeni su i alternativni pristupi sintezi, uključujući Mitsunobu reakciju s hidrazoičnom kiselinom kao izvorom azida, zatim procedura Thompsona i suradnika koja uključuje DPPA/DBU u toluenu (bez primjene toksične hidrazoične kiseline), kao i noviji „one-pot“ pristup koji omogućuje izravnu konverziju alkohola u azid putem fosfatne aktivacije. Nadalje, ispitana je i mogućnost zamjene triflatne skupine tosilnom ili mesilnom, međutim konverzija ni u tim slučajevima nije ostvarena (Slika 57b).^{148,149}

(a)



(b)



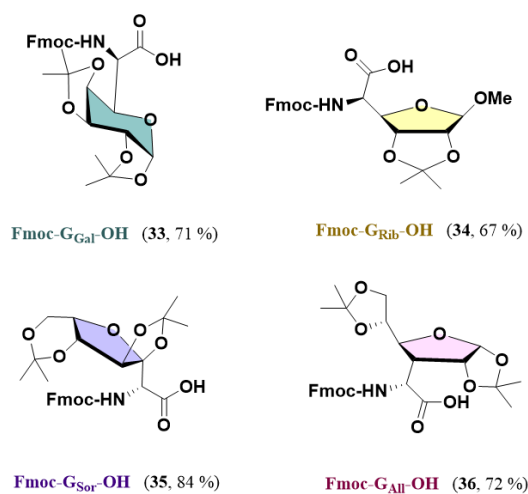
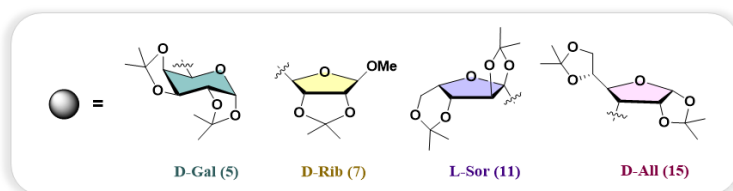
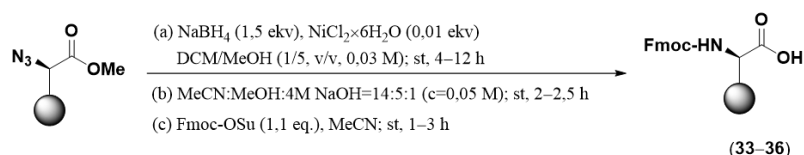
Slika 57. Shematski prikaz provedenih metodologija sinteze azido estera, koje nisu rezultirale očekivanim produktom.

Opažena loša reaktivnost najvjerojatnije proizlazi iz steričkih ograničenja, odnosno činjenice da se reakcija odvija na anomernom ugljiku (C1) fruktoznog derivata. Pretpostavlja se da sterička ograničenja u blizini reakcijskog centra onemogućuje učinkovitu nukleofilnu supstituciju, što dovodi do zaostajanja polaznog spoja i izostanka željene konverzije. Premda dosadašnji sintetski pristupi nisu rezultirali željenim ishodom, daljnja su istraživanja usmjerena su na razvoj prikladnije strategije kojom bi se prevladala navedena ograničenja i omogućila učinkovita priprava fruktoznih C-glikozilnih α -aminokiselina.

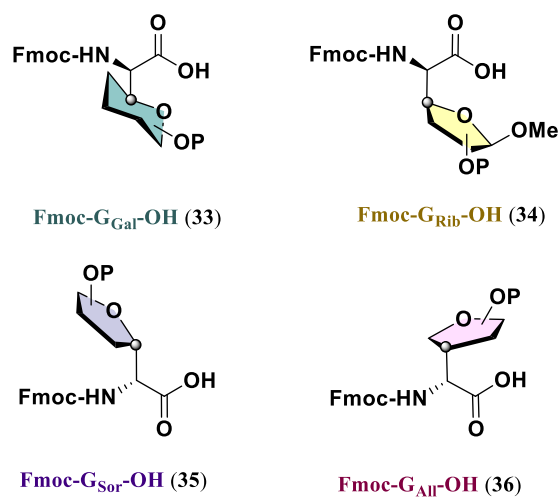
4.2.1.6. Priprava Fmoc-zaštićenih C-glikozilnih α -aminokiselina

Naposljetku, redukcijom azida do amina natrijevim borohidridom (NaBH_4) u prisutnosti katalitičke količine $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ u DCM/MeOH (1:5, v/v), nakon čega je uslijedilo uklanjanje metilne esterske skupine te uvođenje Fmoc-zaštite na amino skupinu, dobivene su ciljane Fmoc-zaštićene C-glikozilne α -aminokiseline. Na taj su način izolirane četiri diasternomerno čiste Fmoc-zaštićene C-glikozilne α -aminokiseline (**33** – **36**), u prinosima od 67 % do 84 % nakon tri uzastopna reakcijska koraka i pročišćavanja kolonskom kromatografijom (Tablica 20).

Tablica 20. Priprava Fmoc-zaštićenih C-glikozilnih α -aminokiselina **33–36**. Prinosi su navedeni u zagradama.



Dobivene strukture mogu se razmatrati kao glicinski derivati koji sadrže četiri različite ugljikohidratne jedinice izravno vezane na C α -atom: aldohexzoza u piranoznom obliku na položaju C5' (**33**), furanozni oblik na položaju C3' (**36**), aldopentoza na položaju C4' (**34**) te ketoheksoza u furanoznom obliku na anomernom ugljiku C1' (**35**) (Slika 58).

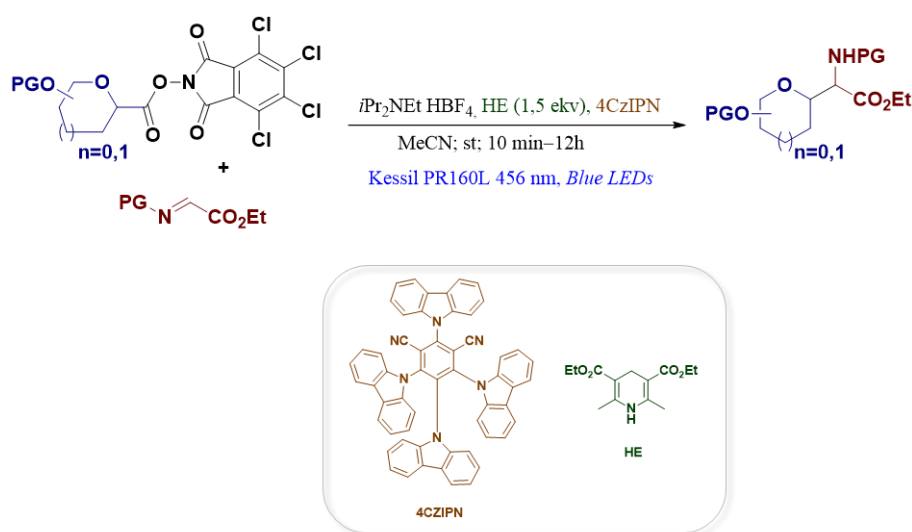


Slika 58. Sintetizirane Fmoc- zaštićene C-glikozilne α -aminokiseline.

Dodatno je ispitana robusnost razvijene sintetske metodologije, pri čemu je potvrđeno da se reakcije mogu reproducibilno provesti i na većoj skali (do 5 mmol) bez gubitka učinkovitosti.

4.2.2. Fotokemijski pristup sintezi C-glikozilnih α -aminokiselina

Uz ranije opisani pristup postmodifikacije α -aciloksiamida (Slika 53, lijevo), u ovom je radu razmotrena i fotokatalitička strategija pripreve C-glikozilnih α -aminokiselina (Slika 53, desno). U tom kontekstu evaluirana je metodologija temeljena na fotoredoks kataliziranoj reakciji, u kojoj α -imino ester djeluje kao elektrofilna komponenta u kemoselektivnoj adiciji s *in situ* generiranim nukleofilnim glikozilnim radikalom, dobivenim iz odgovarajućeg ugljikohidratnog redoks-aktivnog estera (Slika 59).⁴⁵

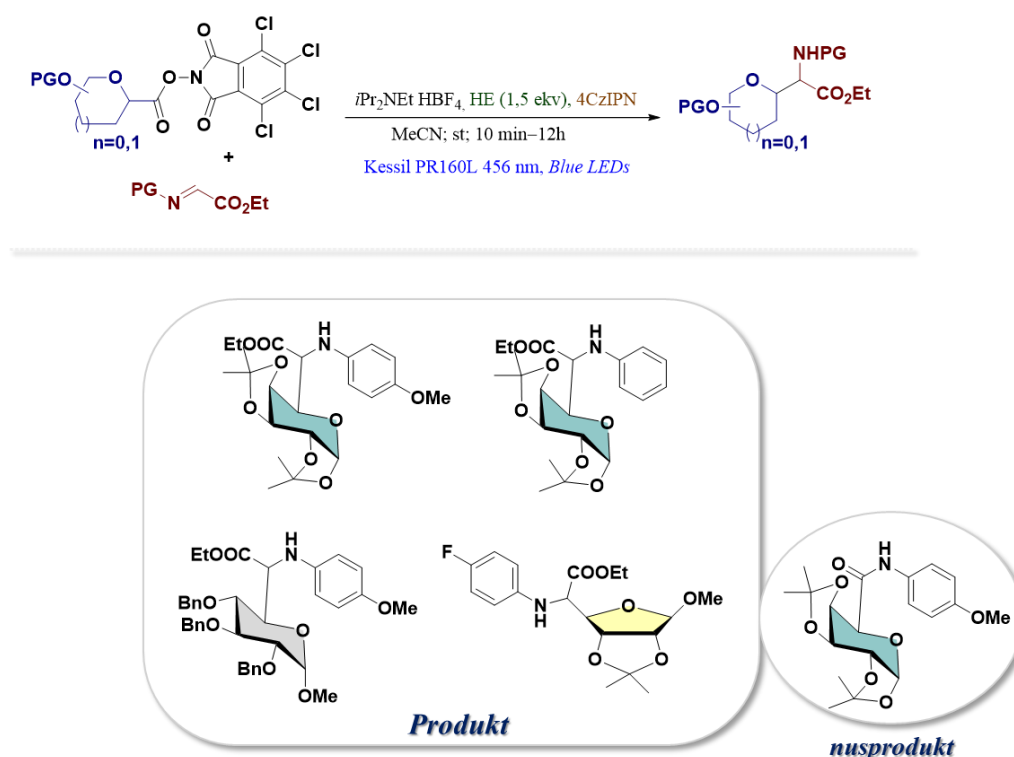


Slika 59. Shematski prikaz fotokatalizirane adicije *in-situ* generiranog glikozilnog radikala na α -imino ester.

Reakcija je provedena u prisutnosti katalizatora 4CzIPN, kao i u njegovoj odsutnosti, pri čemu je Hantzschov ester preuzeo katalitičku ulogu. Reakcijska smjesa izložena je vidljivom zračenju, pritom su korištene Kessil lampe (456 nm). Reakcija je provedena na sobnoj temperaturi. Vrijeme trajanja reakcije ovisilo je o prirodi supstrata, a kretalo se u rasponu od približno 10 minuta do 12 sati, a zaustavljana je u trenutku kada je ugljikohidratni redoks-aktivni ester u potpunosti utrošen.

Prvotono su pripremljeni polazni spojevi, odnosno redoks-aktivni esteri odgovarajućih ugljikohidrata, kao i α -imino esteri i glicinski derivati, čija je sinteza uspješno provedena. Za razliku od ranije razmatrane višestupanjske metodologije, fotokemijski pristup odvija se u jednom reakcijskom stupnju i rezultira istim produktom, odnosno C-glikozilnom α -aminokiselinom.

Unatoč prividnoj jednostavnosti provedbe, tijekom sinteze uočeni su brojni izazovi. Izolacija i pročišćavanje produkata iz kompleksnih reakcijskih smjesa pokazali su se izrazito zahtjevnima, dok je uklanjanje zaštitnih skupina bilo otežano ili u većini slučajeva onemogućeno. Iznimku su predstavljale *N*-metoksifenilna (PMP) i metoksikinolinska zaštitna skupina, koje je moguće ukloniti oksidacijom pomoću CAN-a. Uz željene produkte, uočeno je nastajanje i različitih nusprodukata, među kojima su amidi ili *homocoupling* produkti, dok su se čistoća produkata i prinosi pokazali varijabilnima i neujednačenima. Dodatno, sinteza nije bila izvediva na većoj skali, što dodatno ograničava njezinu praktičnu primjenjivost (Slika 60).



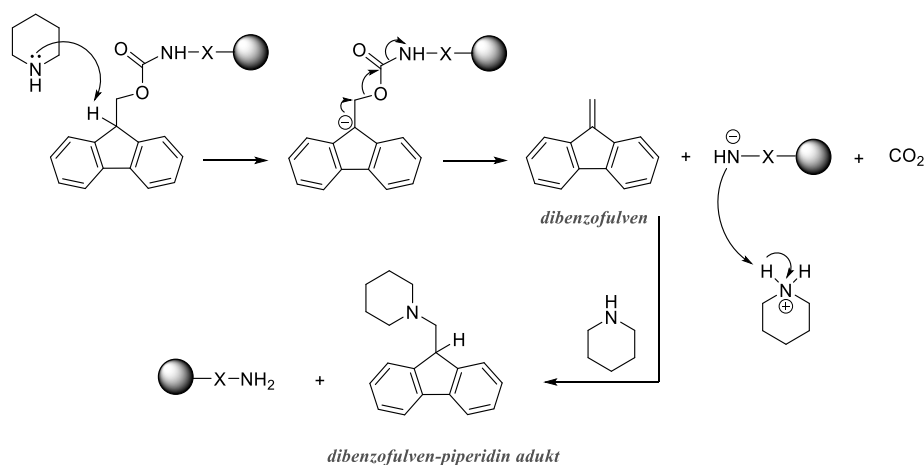
Slika 60. Fotokemijski pristup sintezi C-glikozilnih α -aminokiselina.

Slijedom provedenih istraživanja, prethodna metodologija, temeljena na VKR pokazala se učinkovitijom u prevladavanju ključnih izazova sinteze, uključujući stereospecifično generiranje novog kiralnog centra, postizanje visoke stereoselektivnosti i reproducibilnosti, mogućnost provedbe reakcija na većoj skali te dobivanje diastereomerno čistih ciljanih C-glikozilnih α -aminokiselina. Dobiveni rezultati jasno potvrđuju njezinu prednost u odnosu na ranije opisane pristupe sintezi te potvrđuju njezin potencijal za daljnju primjenu u razvoju metodologije pripreme C-glikopeptida.

4.3. Sinteza peptida na čvrstom nosaču

U svrhu pripreve C-glikopeptida ispitane su dvije strategije sinteze, i to sinteza u otopini te sinteza na čvrstom nosaču temeljene na Fmoc-strategiji zaštite. Usporedba dvaju pristupa pokazala je veću učinkovitost sinteze na čvrstom nosaču (SPPS), zbog čega je prednost dana ovoj metodi.

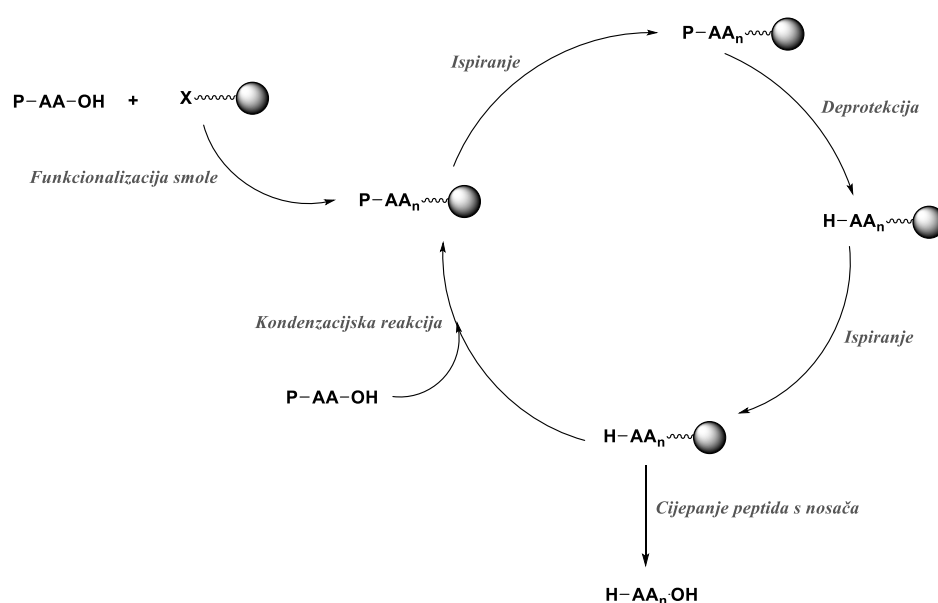
Opći postupak sinteze peptida na čvrstom nosaču temelji se na sekvencijalnom vezanju aminokiselinskih ostataka te započinje vezanjem prve aminokiseline, odnosno N-zaštićene C-terminalne aminokiseline, na netopljivi polimerni nosač (smolu) putem/preko odgovarajuće poveznice. Tijekom cijelog procesa sinteze rastući peptidni lanac ostaje kovalentno vezan na nosač, što omogućuje učinkovito uklanjanje nusprodukata i suviška dodanih reagensa ispiranjem u svakom koraku reakcijskog ciklusa. Kako bi se spriječila neželjena polimerizacija aminokiselina, α -amino skupina te reaktivne skupine na bočnim lancima zaštićene su tzv. „privremenim zaštitnim skupinama“. U okviru ovoga istraživanja, za zaštitu α -amino skupine odabrana je Fmoc-zaštitna skupina. Nakon vezanja prve aminokiseline na nosač, smola se ispiri radi uklanjanja nusprodukata i suviška dodanih reagensa. U sljedećem koraku provodi se uklanjanje N α -zaštitne skupine u blago bazičnim uvjetima, korištenjem 20 %-tne otopine piperidina u *N,N*-dimetilformamidu (DMF). Mehanizam deprotekcije temelji se na β -eliminaciji u prvom koraku, pri čemu nastaje reaktivni međuprodukt dibenzofulven, koji u prisutnosti piperidina podliježe Michaelovoj adiciji, što rezultira formiranjem stabilnog dibenzofulven-piperidinskog adukta (Slika 61).¹⁵⁰



Slika 61. Mehanizam uklanjanja Fmoc-skupine uz nastajanje dibenzofulven-piperidinskog adukta.¹⁵⁰

Po završetku deprotekcije, smola se ispiri kako bi se uklonili eventualni nusprodukti i zaostali reagensi. Slijedom toga, provodi se kondenzacijska reakcija u kojoj se sljedeća aminokiselina najprije aktivira i potom veže na rastući peptidni lanac. Time se smola s vezanim peptidom priprema za novi reakcijski ciklus. Reakcijski ciklusi deprotekcije i kondenzacije ponavljaju se sve dok se ne dobije željena peptidna sekvenca. U završnoj fazi sinteze uklanjaju se sve, ili prema potrebi samo pojedine zaštitne skupine, nakon čega se smola ispiri te se u konačnici sintetizirani peptid cijepa s čvrstog nosača (Slika 62).^{151,152}

Tako definiran standardizirani postupak, koji obuhvaća sekvencijalno vezanje aminokiselina, ponavljane cikluse deprotekcije i kondenzacije te završno cijepanje peptida s nosača, predstavlja temeljni princip SPPS, koji je u okviru ovoga istraživanja dodatno prilagođen za ugradnju prethodno sintetiziranih C-glikozilnih α -aminokiselina.

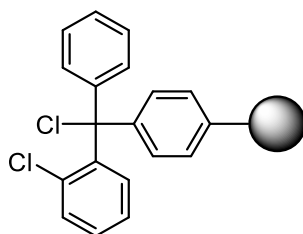


Slika 62. Opći postupak sinteze peptida na čvrstom nosaču.

Slijedom prethodno dobivenih rezultata, sljedeći faza istraživanja bila je usmjerena na optimiziranje protokola za sintezu peptida na čvrstom nosaču uz primjenu prethodno sintetiziranih C-glikozilnih α -aminokiselina **4**. Kako bi se procijenio utjecaj njihove ugradnje u na konformacijska svojstva peptida, bilo je potrebno odabrati modelni peptid sa sklonošću usvajanja jasno definirane sekundarne strukture te razmatrati rezultirajuće konformacijske promjene uslijed ugrađivanja C-glikozilnih α -aminokiselina. Statističke analize proteina

poznate strukture pokazale su da β -razgranate, kao i aromatske aminokiseline najčešće pridonose formiranju β -nabrane ploče.¹⁵³ Stoga je valin odabran kao gradivna jedinica za pripremu modelnog heksapeptida. Budući da se C-glikozilnim α -aminokiselinama **4**, ugrađenim na položaj tri unutar peptidne sekvence razmatranih heksapeptida, pripisuje *R*-konfiguracija, na isti je položaj modelnog peptida uveden je D-valin umjesto L-valina. Na taj je način omogućena izravna usporedba konformacija sintetiziranih C-glikopeptida, koji na trećem položaju sadrže različite C-glikozilne α -aminokiseline, s konformacijom modelnog valinskog heksapeptida.

S ciljem sinteze C-glikopeptida, kao čvrsti nosač odabrana je 2-klorotritil-kloridna smola (2-CTC), koja se pokazala najboljim odabirom zahvaljujući svojim karakterističnim svojstvima (Slika 63).



Slika 63. 2-Klorotritil-kloridna smola (2-CTC).

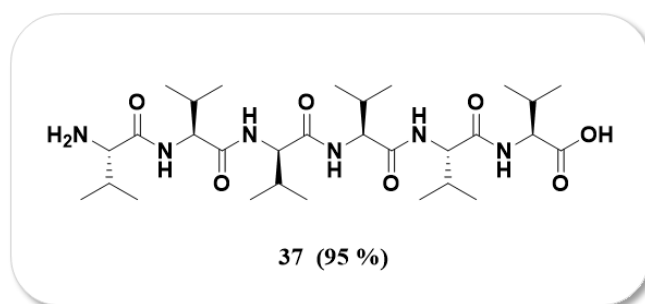
Navedena smola izrazito je osjetljiva na djelovanje kiselina te omogućuje cijepanje pri blago kiselim uvjetima (npr. 1 % TFA u DCM-u ili 20 % TFE u DCM-u, kao 30 % HFIP u DCM ili smjesa AcOH/TFE/DCM (2:2:6)), što omogućuje očuvanje osjetljivih zaštitnih skupina, uključujući izopropilidenske zaštitne skupine na ugljikohidratnim jedinicama. Dodatna prednost primjene ove smole jest znatno smanjen rizik od neželjenih sporednih reakcija, kao što su racemizacije ili nastajanja diketopiperazina, čime se osigurava visoka kemijska čistoća i jasno definirana stereokemija sintetiziranih peptida. Sve navedene značajke čine 2-klorotritil-kloridnu smolu povoljnim čvrstim nosačem za sintezu zaštićenih peptidnih fragmenata. Na taj je način, nakon cijepanja sintetiziranog peptida sa smole, bilo je moguće dobiti potpuno zaštićene peptide u obliku peptidnih kiselina, što je predstavljalo ključni preduvjet za njihovu detaljnu strukturnu karakterizaciju te daljnju konformacijsku analizu. Dodatno, primjenom 95 % TFA tijekom cijepanja peptida po završetku sinteze moguće je dobiti i potpuno deprotektirane peptide, čime se potvrđuje fleksibilnost i prilagodljivost razvijene metodologije u sintezi peptida.

Slijedom prethodno navedenih spoznaja, ispitana je stabilnost C-glikozilne α -aminokiselina **4b** u blago kiselim uvjetima, odnosno primjenom 1 % TFA u DCM, kao i 20 % TFE u DCM tijekom 24 sata. Utvrđeno je očuvanje izopropilidenske zaštite i nakon jednog dana izlaganja ranije navedenim reakcijskim uvjetima, što potvrđuje stabilnost zaštitinih skupina tijekom provedbe planirane SPPS.

Tijekom sinteze peptida korištena je standardna SPPS metodologija temeljena na Fmoc-strategiji zaštite. U kondenzacijskim reakcijama su korištene odgovarajuće acilirajuće aminokiseline dodane u molarnom suvišku (4 ekvivalenta), dok se HATU pokazao najboljim izborom kondenzacijskog reagensa. Za sintezu peptidnih kiselina s karboksilnom skupinom na C-kraju, 2-CTC smola prethodno je funkcionalizirana aminokiselinom Fmoc-Val-OH sukladno standardnim literaturnim postupcima. Kapacitet smole (engl. „*loading capacity*“) nakon vezanja prve aminokiseline je određen prema metodologiji opisanoj u literaturi,^{137–139} te je iznosio 0,60 mmol/g. Po završetku sinteze, nakon cijepanja peptida sa smole, provedeno je pričišćavanje precipitacijom i/ili RP HPLC metodom. Sintetizirani peptidi strukturno su okarakterizirani NMR spektroskopijom. Konformacijska svojstva osim temeljem NMR rezultata, dodatno su istražena i primjenom CD spektroskopije kao i računalnim metodama.

4.3.1. Priprava modelnog heksapeptida 37

Prvotno je sintetiziran modelni heksapeptid (Slika 64). Po završetku SPPS, cijepanjem sa smole dobiven je valinski heksapeptid **37**, koji je pročišćen precipitacijom, korištenjem smjese otapala MeOH/Et₂O. Izoliran je produkt u visokom prinosu (95 %) visoke čistoće (98 %). Sintetizirani modelni peptid poslužio je kao referentna sekvenca u analizi i usporedbi konformacijskih značajki C-glikopeptida s ugrađenim C-glikozilnim α -aminokiselinama.

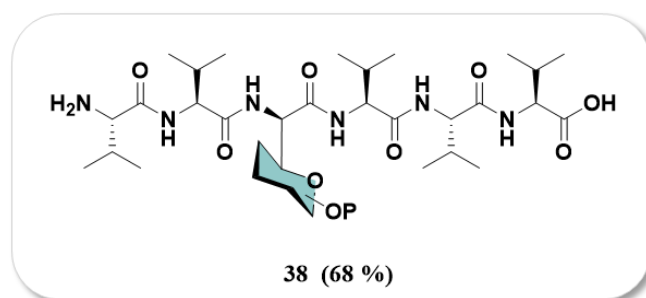


Slika 64. Struktura sintetiziranog modelnog heksapeptida 37.

4.3.2. Priprava C-glikopeptida 38 – 44

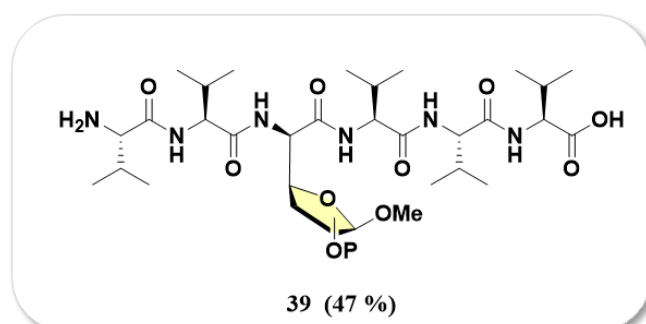
Sterička ograničenja voluminoznih ugljikohidratnih skupina smještenih u neposrednoj blizini peptidne okosnice mogu potencijalno utjecati na učinkovitost kondenzacijskih reakcija tijekom SPPS, osobito kada su takve gradivne jedinice pozicionirane u središtu peptidnog lanca. Unatoč tome, svi provedeni kondenzacijski koraci, uključujući i one s C-glikozilnim α -aminokiselinama, pokazali su se uspješnima i rezultirali očekivanim produktima.

Uslijedila je sinteza C-glikopeptida **38** primjenom SPPS, pri čemu je C-glikozilna α -aminokiselina **33** ugrađena na treću poziciju unutar peptidne sekvence. Nakon pročišćavanja primjenom RP-HPLC metode, peptid **38** je izoliran u vrlo dobrom iskorištenju od 68 % (Slika 65).



Slika 65. Sintetiziran C-glikopeptid 38.

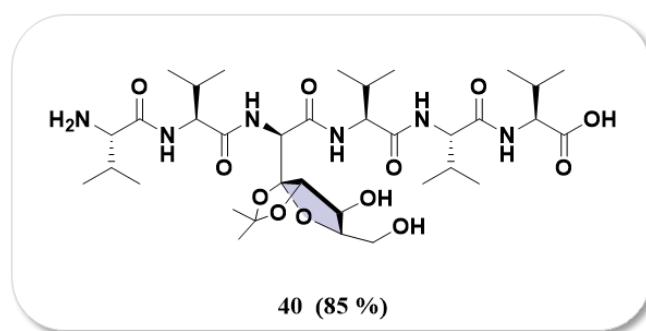
Nadalje, C-glikopeptid **39** u čijoj je strukturi sadržana aminokiselina **34**, izoliran je u prinosu od 49 % nakon pročišćavanja precipitacijom, a naknando i primjenom RP-HPLC metode (Slika 66).



Slika 66. Struktura sintetiziran C-glikopeptida 39.

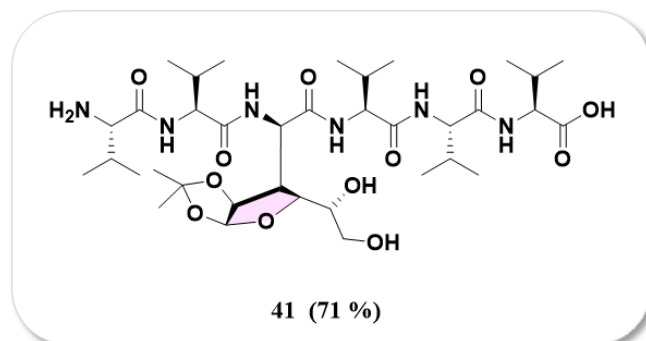
U ovom smo dijelu istraživanja uočena su dva ključna izazova. Prvi se odnosio na cijepanje peptida s čvrstog nosača, pri čemu po završetku sinteze nije dobivena očekivana količina sirovog produkta, što je zahtijevalo ponavljanje postupka i do nekoliko puta. Drugi i ujedno najznačajniji izazov, bila je slaba topljivost amfifilnih C-glikopeptida, koja se pokazala ozbiljnom preprekom prilikom pročišćavanja RP-HPLC metodom, budući da je produkt zaostajao na koloni, što je rezultiralo znatnim gubicima. Srećom, navedeni je problem uočen u ranoj fazi istraživanja pa je pristup pročišćavanju C-glikopeptida bio pažljivo optimiziran.

Zanimljivo je opažanje da se u pojedinim slučajevima navedeno ograničenje pokazalo prednošću. Utvrđeno je da je veća topljivost kraćih peptidnih fragmenata, prisutnih u sirovim produktima, omogućila učinkovitu izolaciju ciljanog C-glikopeptida jednostavnom precipitacijom. Naime, po završetku SPPS, cijepanjem peptida sa smole, uz ciljani produkt u reakcijskoj su smjesi često prisutni i kraći peptidni fragment, analozi heksapeptida. U primjeru koji je detaljnije razmotren u nastavku, navedeno opažanje pokazalo se ključnim za uspješnu izolaciju C-glikopeptida **40** jednostavnom precipitacijom. C-glikopeptida **40** koji u svojoj strukturi sadrži aminokiselinu **35** sa sorboznim derivatom kao C-glikozilnom jedinicom izoliran je u visokom prinosu od 85 % (Slika 67).



Slika 67. Struktura sintetiziran C-glikopeptida **40**.

Potom je provedena sinteza C-glikopeptida **41** s ugrađenom aminokiselinom **36**. Nakon pročišćavanja precipitacijom, a naknadno i RP-HPLC metodom, C-glikopeptid **41** je izoliran u prinosu od 71 % (Slika 68).

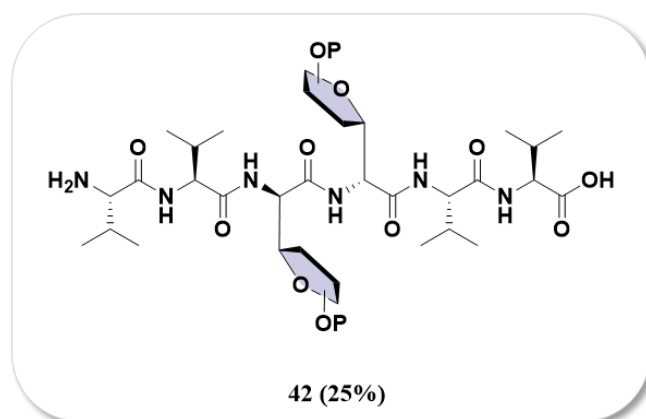


Slika 68. Struktura sintetiziran C-glikopeptida **41**.

Nedugo zatim, uočeno je još jedno ograničenje, koje je, srećom, uspješno prevladano. Analizom pročišćenih C-glikopeptida **40** i **41** HPLC–MS metodom potvrđena je djelomična deprotekcija sorbofuranoznog, odnosno alofuranoznog prstena. Zaključeno je da ponavljane deprotekcije s 1 % TFA u DCM-u dovode do uklanjanja osjetljivijih izopropilidenskih zaštitnih skupina na ugljikohidratnom dijelu molekule, odnosno onih koje su prostorno dostupnije i slabije sterički ometane. Radi pouzdanije procjene stabilnosti izopropilidenskih zaštitnih skupina, provedeno je dodatno ispitivanje na Fmoc-zaštićenoj C-glikozilnoj α -aminokiselini **35**, pri čemu je uočeno da do djelomične deprotekcije dolazi već nakon približno 10 minuta (oko 50 % spoja **35** bilo je djelomično deprotektirano), dok je nakon 30 minuta taj udio porastao na približno 70 %. Nakon 60 minuta više od 90 % spoja **35** je djelomično deprotektirano. Suprotno tome, u 20 % TFE u DCM-u izopropilidenske zaštitne skupine ostale su očuvane i nakon 60 minuta izlaganja navedenim reakcijskim uvjetima. Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da se ubuduće cijepanje peptida s čvrstog nosača po završetku SPPS-a provodi isključivo primjenom 20 % TFE u DCM-u.

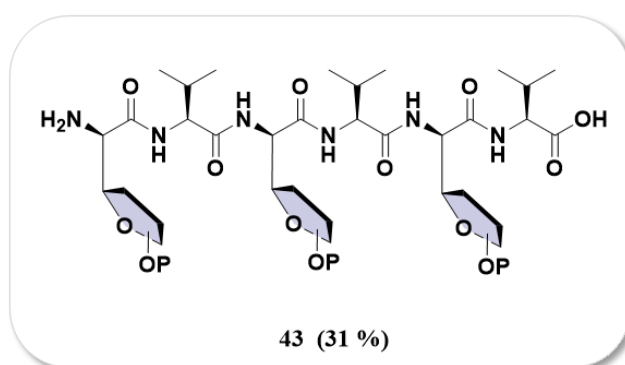
Razvijenom metodologijom uspješno su prevladani temeljni izazovi sinteze C-glikopeptida, a izvedeni zaključci omogućili su oblikovanje strategije kojom su daljnja istraživanja usmjerena prema strukturno složenijim sustavima. Na temelju dobivenih rezultata, koji su potvrdili učinkovitost metodologije na glikopeptidima s jednom ugrađenom C-glikozilnom α -aminokiselinom, pristup je proširen i primijenjen na sintezu multivalentnih peptida povećane strukturne složenosti.

Prvotno je sintetiziran glikopeptid **42**, koji u svojoj strukturi sadrži dvije uzastopno ugrađene C-glikozilne α -aminokiseline **35**. S obzirom na izražene steričke smetnje očekivane za navedene sustave, pretpostavljeno je da će sinteze pripadajućeg peptida predstavljati značajan sintetski izazov te da će zahtijevati dodatnu optimizaciju reakcijskih uvjeta u svrhu učinkovitog formiranja amidne veze. Srećom, unatoč mogućim ograničenjima karakterističnim za navedene peptide, sinteza je rezultirala uspješnim ishodom, a nakon pročišćavanja precipitacijom i naknadno RP-HPLC metodom, glikopeptid **42** izoliran je u nešto nižem, ali prihvatljivom prinosu od 25 % (Slika 69).



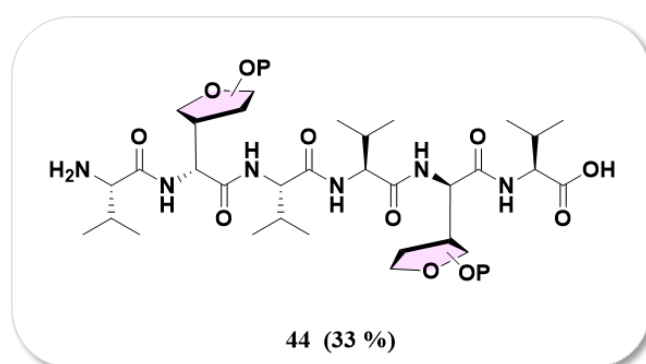
Slika 69. Struktura sintetiziran C-glikopeptida **42**.

Nakon uspješne sinteze glikopeptida **42**, daljnja su istraživanja usmjerena na pripremu strukturno složenijih i sintetski zahtjevnijih predstavnika iste skupine spojeva. U skladu s time sintetiziran je C-glikopeptid **43** s alternirajućim razmještajem triju ugrađenih C-glikozilnih α -aminokiselina **35**. Sinteza je uspješno provedena, a nakon pročišćavanja RP-HPLC metodom glikopeptid **43** izoliran je u prinosu od 31 % (Slika 70).



Slika 70. Struktura sintetiziran C-glikopeptida **43**.

Slijedom navedenog, naposljetku je sintetiziran C-glikopeptid **44**, u čijoj su strukturi dvije C-glikozilne α -aminokiseline ugrađene na položaje 2 i 5, s ciljem ispitivanja utjecaja njihove međusobne udaljenosti na konformacijska svojstva peptida (tzv. „*long-range effect*“). U literaturi se ovaj pojam odnosi na pojavu prema kojoj interakcije između prostorno udaljenih supstituenata unutar peptidne sekvence mogu značajno pridonijeti formiranju i stabilizaciji točno određenih sekundarnih struktura. Po završetku sinteze, cijepanjem peptida s čvrstog nosača, sirovi produkt pročišćen je RP-HPLC metodom, pri čemu je izoliran ciljani pridukt, C-glikopeptid **44** u prinosu od 33 % (Slika 71).



Slika 71. Struktura sintetiziran C-glikopeptida **44**.

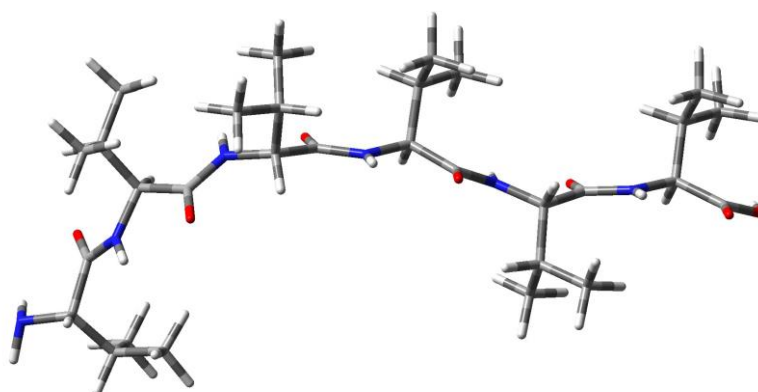
Važno je istaknuti da su sve kondenzacijske reakcije tijekom SPPS multivalentnih C-glikopeptida **42-44** provedene uspješno te su rezultirale željenim produktima, bez značajnijih poteškoća. Po završetku sinteze, cijepanjem sa smole dobiveni su potpuno zaštićeni glikopeptidi. Korištenjem 20 % TFE u DCM-u očuvane su izopropilidenske zaštitne skupine na ugljikohidratnom dijelu molekule. Međutim, slabija topljivost sintetiziranih glikopeptida rezultirala je nešto nižim prinosima nakon pročišćavanja RP-HPLC metodom.

4.4. Konformacijska analiza

Modelni valinski heksapeptid **37** i C-glikopeptidi **38** – **44** strukturno su okarakterizirani i podvrgnuti iscrpnoj konformacijskoj analizi temeljenoj na eksperimentalnim i teorijskim metodama. Detaljna konformacijska analiza modelnog peptida **37** te C-glikopeptida **38** – **44** provedena je primjermom NMR spektroskopije i računalne metode optimizacije geometrije, koja je uključivala NOE ograničenja udaljenosti između odabranih parova protona (engl. „*distance restraints*“), određena asignacijom 2D ^1H – ^1H NOESY spektra (0 – 3 Å (s), 3 – 5 Å (m), > 5 Å (w)). Najstabilnije konformacije su reoptimizirane na DFT razini teorije (M06-2X-D3/6-31+G(d,p)) u DMSO, primjenom implicitnog modela solvatacije SMD.

Prvotno je provedena konformacijska analiza modelnog heksapeptida **5** u otapalu DMSO- d_6 primjenom NMR spektroskopije (Slika 72). Dobiveni spektri pokazali su jasno razlučene signale amidnih NH protona, dok su odgovarajuće križne-korelacije (engl. „*cross-correlation*“) u dvodimenzionalnim NMR spektrima omogućile potpunu asignaciju peptidne okosnice.

Kako bi se preciznije sagledale konformacijske značajke te intramolekulske interakcije, prvenstveno intramolekulske vodikove veze prisutne u razmatranim peptidima, analizirani su i NOE kontakti između amidnih skupina. Prisutnost jakih kratkodosežnih (engl. „*strong short-range*“) NOE korelacija $\text{NH}_i \leftrightarrow \alpha\text{H}_{i-1}$, u kombinaciji sa slabim NOE kontaktima $\text{NH}_i \leftrightarrow \alpha\text{H}_i$ i $\text{NH}_i \leftrightarrow \text{NH}_{i+1}$, ukazuje da modelni peptid **37** zauzima izduženu konformaciju (engl. „*extended conformation*“).



Slika 72. Optimizirana geometrija peptida (37) na SMD-M06-2X-D3/6-31+G(d,p) razini teorije u DMSO. Vodikove veze prikazane su isprekidanim linijama, a udaljenosti su izražene u Å.

Obrazac opaženih NOE signala dodatno je potvrdio zaključke izvedene iz analize kemijskih pomaka. Takav raspored signala karakterističan je za izduženu konformaciju peptida, u kojoj izostaju stabilizirajuće intramolekulske interakcije tipične za uređene sekundarne strukture. Ovo saznanje ujedno predstavlja referentnu točku za usporedbu s C-glikopeptidima, kod kojih se očekuje da će ugradnja C-glikozilnih α -aminokiselina utjecati na konformacijsku stabilnost te potaknuti formiranje lokalnih sekundarnih strukturnih motiva. Na taj je način potvrđeno da prostorna organizacija peptida **37** odgovara izduženoj konformaciji, čime on predstavlja pouzdan modelni sustav i polazište za daljnje usporedbe s pripadajućim C-glikopeptidima (Slika 72).

Slijedom prethodno utvrđenih saznanja na modelnom peptidu **37**, provedena je konformacijska analiza C-glikopeptida **38–41** u otapalu DMSO- d_6 , s ciljem usporedbe njihovih konformacijskih preferencija s onima modelnog peptida **37**. Usporedba kemijskih pomaka amidnih protona (NH) i α -protona (α H) modelnog peptida **37** i C-glikopeptida **38–41** prikazana je u Tablici 21. Asignacijom NMR spektara C-glikopeptida utvrđeno je da zamjena jednog valinskog ostatka s C-glikozilnom α -aminokiselinom, odnosno ugrađivanjem strukturno različitih C-glikozilnih α -aminokiselina na treću poziciju peptidnog slijeda uzrokuje perturbacije u kemijskim pomacima protona peptidne okosnice susjednih aminokiselina, koje se očituju na različite načine i u različitom opsegu. Dodatno, uspoređena je skalarna sprega između NH i α H protona ($^3J_{\text{NH}, \alpha\text{H}}$), budući da navedena konstanta u NMR spektroskopiji odražava prostorni odnos između protona, te omogućuje procjenu torzijskog (dihedralnog) kuta

ϕ između amidnog protona (NH) i α -protona (α H) iste aminokiseline, u skladu s Karplusovom jednadžbom:

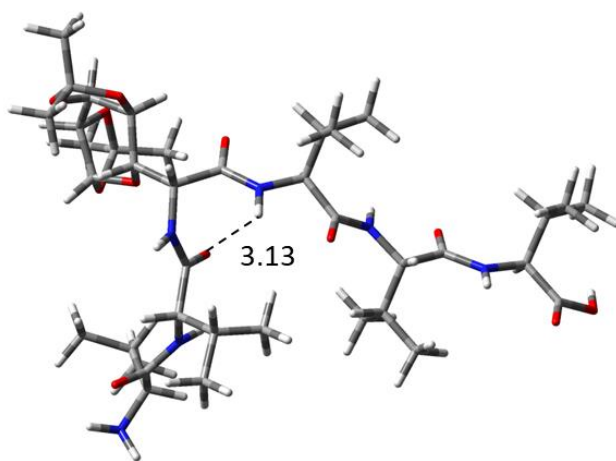
$$J(\phi) = A \cos^2\phi + B \cos\phi + C$$

Slijedom toga, vrijednosti $^3J_{\text{NH}, \alpha\text{H}} < 5$ Hz odgovaraju rasponu $-80^\circ < \phi < -40^\circ$, dok se $^3J_{\text{NH}, \alpha\text{H}} > 8$ Hz pripisuje rasponu $-150^\circ < \phi < -60^\circ$. Navedena su dva raspona u korelaciji s dvjema regijama Ramachandranovog dijagrama, koje su karakteristične za α -uzvojnica i β -ploču.¹⁵⁴

Tablica 21. Usporedba kemijskih pomaka amidnih protona (NH) i α -protona (α H) svake pojedine aminokiseline u modelnom heksapeptidu **37** i C-glikopeptidima **38** – **41**. Pomaci signala prema manjim vrijednostima kemijskog pomaka, odnosno prema višem magnetskom polju (engl. „*upfield shifts*“) veći od 0,05 ppm označeni su crvenom bojom, dok su pomaci signala prema većim vrijednostima kemijskog pomaka, odnosno nižem polju (engl. „*downfield shifts*“) označeni plavom bojom. Vrijednosti skalarne sprege $^3J_{\text{NH}, \alpha\text{H}}$, gdje su određene, navedene su u zagradama.

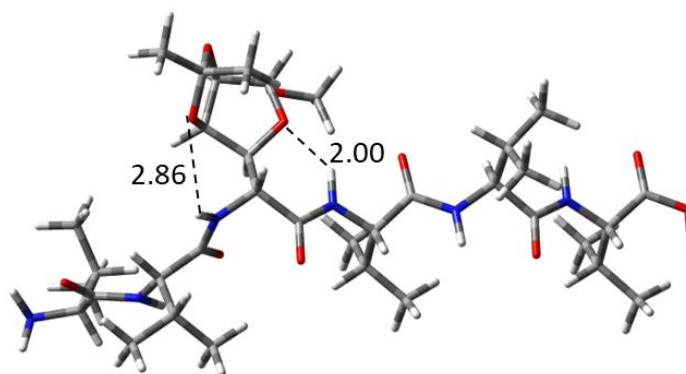
AA	Proton	37	38	39	40	41
1	NH		8.03	8.07		8.06
	α H	3.73	3.76	3.73	3.65	3.75
2	NH	8.32 (8.9)	8.27 (4.2)	8.37 (9.1)	8.26 (7.8)	8.35 (8.7)
	α H	4.47	4.45	4.38	4.53	4.43
3	NH	8.10 (8.9)	8.26 (3.8)	8.19 (8.4)	8.37 (8.2)	7.86 (8.5)
	α H	4.36	4.57	4.53	4.68	4.74
4	NH	7.92	7.61 (8.7)	8.15 (9.0)	7.44 (8.8)	7.78 (8.6)
	α H	4.24	4.23	4.31	4.36	4.24
5	NH	7.92	7.94 (8.9)	7.97 (8.9)	8.04 (8.5)	7.97 (8.9)
	α H	4.24	4.23	4.23	4.18	4.24
6	NH	7.85 (8.4)	7.87 (8.4)	7.88 (8.4)	7.83 (7.9)	7.86 (8.5)
	α H	4.12	4.12	4.12	4.10	4.18

Usporedbom kemijskih pomaka i NOE kontakata, utvrđene su značajne razlike za C-glikopeptid **38** u odnosu na modelni peptid **37**. U slučaju C-glikopeptida **38**, ugradnja C-glikozilne aminokiseline **33** (Fmoc-G_{Gal}-OH) uzrokovala je pomak signala prema manjim vrijednostima kemijskog pomaka, odnosno prema višem magnetskom polju (engl. „*upfield shift*“) amidnog protona Val⁴ NH. Nadalje, prisutnost slabog NOE kontakta između Val⁴ NH ↔ H5' te jakog NOE kontakta G_{Gal} NH ↔ H5' ukazuje na relativnu orijentaciju piranoznog prstena. Ključno je opažanje da izraženi NOE kontakati G_{Gal} NH ↔ H α i G_{Gal} NH ↔ Val⁴ NH, zajedno s malim vrijednostima skalarnih sprega G_{Gal} ³J_{NH, α H} (3,8 Hz) i Val² ³J_{NH, α H} (4,2 Hz), ukazuje na konformaciju nalik okretu (engl. „*turn-like conformation*“) u području oko aminokiseline G_{Gal}. Optimizirana struktura potvrdila je formiranje γ -okreta (engl. „ *γ -turn*“), stabiliziranog intramolekulskom vodikovom vezom između karbonilnog kisika amidne skupine Val² CO i amidnog protona skupine Val⁴ NH (Slika 73). Dok je prisutnost D-Val³ u modelnom heksapeptidu **37** inducirala tek blago savijanje peptidne okosnice, pri čemu su bočni lanci sekvence Val²–D–Val³–Val⁴ usmjereni u istom smjeru, ugradnja G_{Gal} ostatka u C-glikopeptid **38** dovela je do uvijanja peptidne okosnice te orijentacije bočnih lancaca Val² i Val⁴ u suprotnom smjeru u odnosu na galaktopiranozni bočni lanac (Slika 73).



Slika 73. Optimizirana geometrija peptida (**38**) na SMD-M06-2X-D3/6-31+G(d,p) razini teorije u DMSO. Vodikove veze prikazane su isprekidanim linijama, a udaljenosti su izražene u Å.

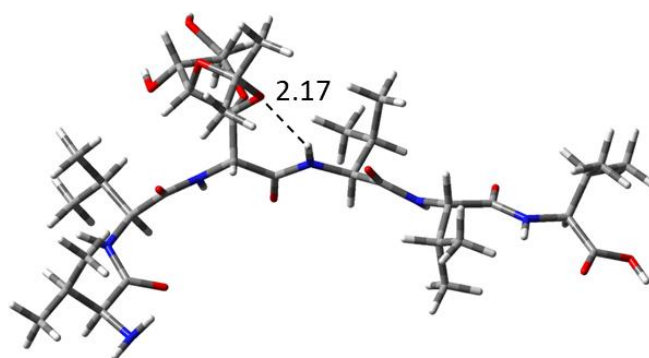
Analizom C-glikopeptida **39** utvrđeno je da ugrađivanje aminokiseline **34** (Fmoc-G_{Rib}-OH) rezultira pomakom signala prema većim vrijednostima kemijskog pomaka, odnosno nižem magnetskom polju NH i α H protona aminokiselinskog ostatka Val⁴. Orijentacija furanoznog prstena određena je na temelju NOE kontakata Val⁴ NH $\leftrightarrow$ H4' i Val⁴ NH $\leftrightarrow$ H2'. Svi ostali uočeni NOE signali, kao i vrijednosti skalarnih sprega $^3J_{\text{NH},\alpha\text{H}}$ ukazuju da peptid pretežno zauzima izduženu konformaciju okosnice. Optimizirana struktura C-glikopeptida **39** potvrdila je odsutnost konformacije nalik okretu stabilizirane vodikovom vezom, ali je ukazala na novo strukturno obilježje koje nije prisutno u peptidu **38**. Naime, amidni protoni NH G_{Rib} i Val⁴ usmjereni su prema ribofuranoznom bočnom lancu te sudjeluju u dvjema intramolekulskim vodikovim vezama s atomima kisika iz cikličkog acetala i ribofuranoze. Pritom su bočni lanci Val² i Val⁴, kao i u prethodnom primjeru, orijentirani u suprotnom smjeru u odnosu na ugljikohidratni bočni lanac, premda se izvor stabilizacije u ovom slučaju razlikuje se od onoga opaženog u C-glikopeptidu **38** (Slika 74).



Slika 74. Optimizirana geometrija peptida (**39**) na SMD-M06-2X-D3/6-31+G(d,p) razini teorije u DMSO. Vodikove veze prikazane su isprekidanim linijama, a udaljenosti su izražene u Å.

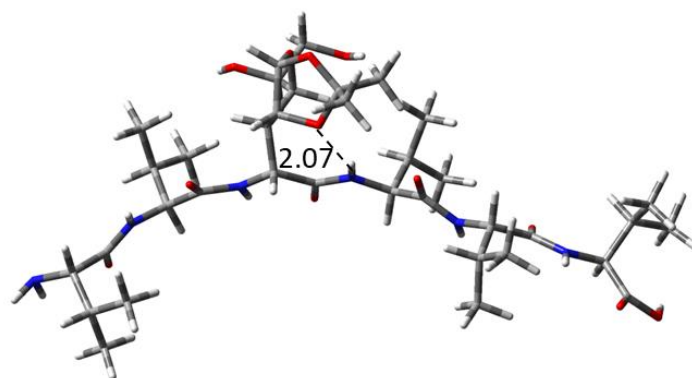
Usporedba peptida **40** i **41** dodatno je potvrdila utjecaj strukturne raznolikosti C-glikozilnih jedinica na lokalnu konformaciju peptidne okosnice te na međumolekulske interakcije. Konformacijska analiza C-glikopeptida **40** ukazala je na pomak signala prema višem magnetskom polju Val⁴ NH i Val¹ α H protona, dok su signali Val⁴ α H i Val² α H protona pomaknuti prema nižem magnetskom polju. Izostanak NOE korelacija između protona peptidne okosnice i sorbozne C-glikozilne jedinice vjerojatno je posljedica odsutnosti β -protona u C-glikozilnoj α -aminokiselini koja sadrži sorbozni derivat kao ugljikohidratnu jedinicu. Optimizirana struktura C-glikopeptida **40** ukazuje na prisutnost intramolekulske vodikove veze

između amidnog protona Val⁴ NH i atoma kisika sorbofuranoznog prstena te na konformaciju u kojoj su bočni lanci ostataka Val²-D-G_{Sor}¹³-Val⁴ usmjereni u istom smjeru. Takva orijentacija bočnih lanaca dovodi protone Val² βH i γH, kao i Val⁴ γH, u prostornu blizinu s protonima sorbofuranoze H2'/H3' i H4', što je također potvrđeno asignacijom 2D ¹H-¹H NOESY spektra (Slika 75).



Slika 75. Optimizirana geometrija peptida (**40**) na SMD-M06-2X-D3/6-31+G(d,p) razini teorije u DMSO. Vodikove veze prikazane su isprekidanim linijama, a udaljenosti su izražene u Å.

Analogno prethodnim opažanjima, NOE signali i vrijednosti skalarnih sprega ³J_{NH,αH} za C-glikopeptid **41** u skladu su s izduženom konformacijom i prisutnošću vodikove veze između amidnog protona Val⁴ NH i atoma kisika alofuranoznog prstena (Slika 76).



Slika 76. Optimizirana geometrija peptida (**41**) na SMD-M06-2X-D3/6-31+G(d,p) razini teorije u DMSO. Vodikove veze prikazane su isprekidanim linijama, a udaljenosti su izražene u Å.

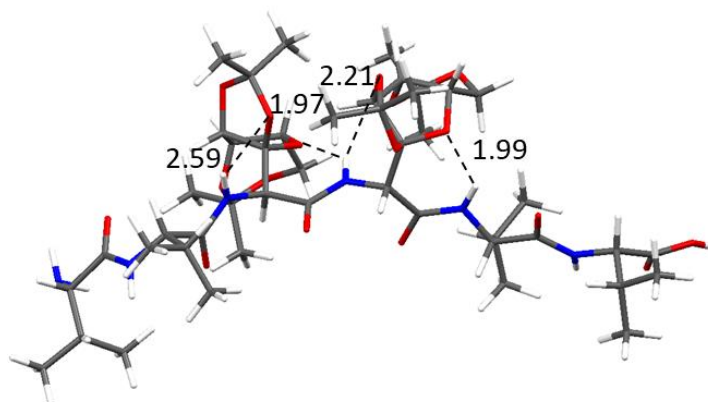
Konformacijska analiza zatim je proširena na strukturno složenije, multivalentne C-glikopeptide, s ciljem utvrđivanja utjecaja broja, prostorne raspodjele i strukturne raznolikosti ugrađenih C-glikozilnih α -aminokiselina unutar peptidnog slijeda na lokalne strukturne motive, sekundarnu strukturu i ukupnu konformaciju peptida. U nastavku su stoga analizirani višestruko supstituirani C-glikopeptidi **42–44**, a kemijski pomaci amidnih (NH) i α -protona (α H) prikazani su u Tablici 22.

Tablica 22. Usporedba kemijskih pomaka amidnih protona (NH) i α -protona (α H) svake pojedine aminokiseline u C-glikopeptidima **40**, **42–44**. NH i α H protoni koji odgovaraju C-glikozilnoj aminokiselini su istaknuti ljubičastom (G_{Sor}) ili rozom (G_{All}) bojom. Vrijednosti skalarnih sprega $^3J_{\text{NH},\alpha\text{H}}$, gdje su određene, navedene su u zagradama.

AA	Proton	40	42	43	44
1	NH				
	α H	3.65	3.20	3.62	3.43
2	NH	8.26 (7.8)	8.14 (8.6)	7.92 (8.7)	8.87 (4.9)
	α H	4.53	4.55	4.54	4.76
3	NH	8.37 (8.2)	8.24 (7.3)	8.53	8.16 (4.5)
	α H	4.68	4.88	4.82	4.20
4	NH	7.44 (8.8)	7.53 (6.9)	7.30 (8.4)	7.73 (7.5)
	α H	4.36	4.55	4.60	4.20
5	NH	8.04 (8.5)	7.15 (9.2)	8.39 (8.4)	8.27 (6.8)
	α H	4.18	4.55	4.84	4.60
6	NH	7.83 (7.9)	8.04 (7.7)	7.38	7.93 (7.1)
	α H	4.10	3.91	4.10	3.98

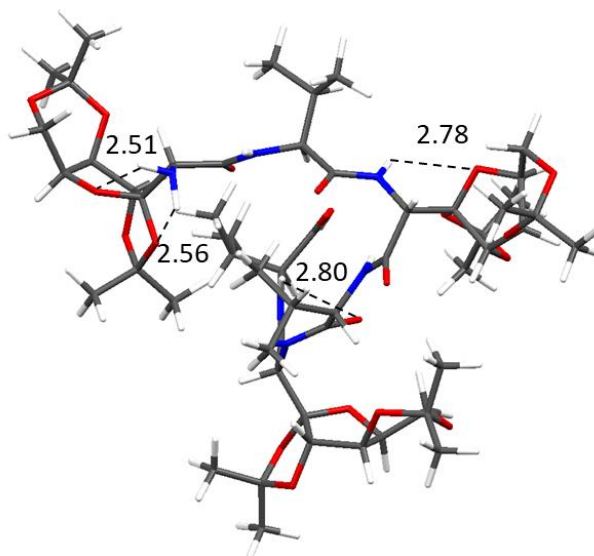
Od osobitog je značaja usporedba C-glikopeptida **40**, **42** i **43** koji u svojoj strukturi sadrže jednu, dvije odnosno tri C-glikozilne α -aminokiseline **35** (Fmoc- G_{Sor} -OH). Assignacija 2D NOESY spektra peptida **42** pokazala je slabljenje kontakata $\text{NH}_i \leftrightarrow \alpha\text{H}_{i-1}$ te pojavu novih NOE korelacija $\text{NH}_i \leftrightarrow \beta\text{H}_{i-1}$, što je karakteristično za konformaciju okreta. Na temelju optimizirane strukture peptida **42** zaključeno je da su tri uzastopna amidna protona (D- G_{Sor} -D- G_{Sor} -Val) usmjerena prema sorbofuranoznim bočnim lancima. Pritom navedeni amidni protoni sudjeluju u višestrukim intramolekulskim vodikovim vezama s atomima kisika cikličkog acetala i/ili

sorbofuranoznog prstena. Takva mreža vodikovih veza stabilizira konformaciju nalik kišobranu (engl. „*umbrella-like conformation*“), u kojoj ugljikohidratni bočni lanci zauzimaju „gornju“, a valinski bočni lanci „donju“ stranu u odnosu na peptidnu okosnicu (Slika 77).¹⁵⁵ Navedeni rezultati ukazuju da ugradnja C-glikozilnih α -aminokiselina doprinosi konformacijskoj stabilnosti C-glikopeptida **42** te značajno utječe ukupnu konformaciju peptida.



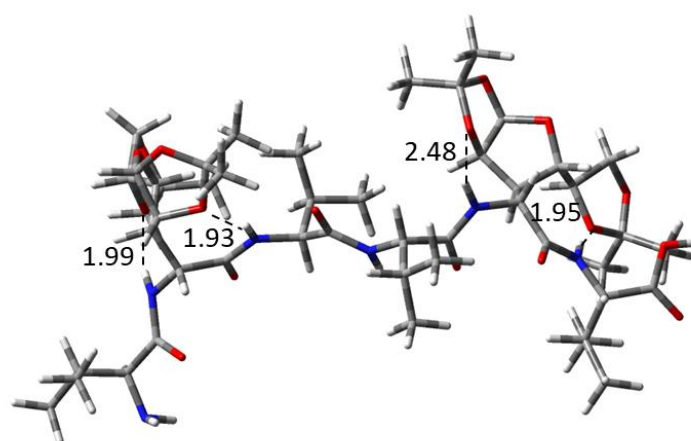
Slika 77. Optimizirana geometrija peptida (**42**) na SMD-M06-2X-D3/6-31+G(d,p) razini teorije u DMSO. Vodikove veze prikazane su isprekidanim linijama, a udaljenosti su izražene u Å.

Analiza 2D ^1H - ^1H NOESY spektra C-glikopeptida **43** ukazuje na prisutnost jakih NOE kontakata $\text{NH}_i \leftrightarrow \beta\text{H}_{i-1}$ i $\text{NH}_i \leftrightarrow \gamma\text{H}_{i-1}$, kao i korelacije $\text{NH}_3 \leftrightarrow \text{NH}_4$ i $\text{NH}_5 \leftrightarrow \text{NH}_6$, koji su karakteristični za konformaciju okreta. Optimizirana struktura C-glikopeptida **43**, temeljena na eksperimentalno određenim NOE signalima, ukazuje na izrazito savijenu konformaciju, nalik uzvojnici (engl. „*highly folded, pre-helical conformation*“) stabiliziranu s dvije vrste vodikovih veza. Amino skupina ostatka Val^1 te amidne skupine Val^3 i Val^4 zajedno sudjeluju u formiranju četiri intramolekulske vodikove veze s atomima kisika sorboznog prstena G_{Sor}^1 i G_{Sor}^3 , dok se na C-terminalnom dijelu formira γ -okret stabiliziran vodikovom vezom između Val^4 CO i Val^6 NH (Slika 78).



Slika 78. Optimizirana geometrija peptida (**43**) na SMD-M06-2X-D3/6-31+G(d,p) razini teorije u DMSO. Vodikove veze prikazane su isprekidanim linijama, a udaljenosti su izražene u Å.

Naposljetku, u slučaju C-glikopeptida **44**, koji sadrži dvije C-glikozilne α -aminokiseline **36** (Fmoc-G_{All}-OH), prisutnost slabih NOE kontakata $\text{NH}_2 \leftrightarrow \beta\text{H}_1$ i $\text{NH}_2 \leftrightarrow \gamma\text{H}_1$, zajedno s izraženom interakcijom $\text{NH}_6 \leftrightarrow \beta\text{H}_5$, ukazuje na savijanje peptidne okosnice na N- i C-terminalnom dijelu, u blizini ugrađenih G_{All} aminokiselina. Optimizirana struktura C-glikopeptida **44** prikazuje konformacija stabiliziranu dvijema vodikovim vezama po svakom aložnom bočnom lancu, pri čemu su u interakciju uključena po dva amidna protona (NH) i atomi kisika cikličkog acetala i/ili alofuranoznog prstena (Slika 79).



Slika 79. Optimizirana geometrija peptida (**44**) na SMD-M06-2X-D3/6-31+G(d,p) razini teorije u DMSO. Vodikove veze prikazane su isprekidanim linijama, a udaljenosti su izražene u Å.

Važno je istaknuti da je intenzitet NOE signala proporcionalan $1/r^6$, pri čemu se r odnosi na udaljenost između dva spina. Efekt je ograničen na udaljenosti protona do približno 5 Å. Prostorna blizina protona koji su međusobno udaljeni u primarnom slijedu peptida, a do koje dolazi nabiranjem peptidnog lanca, eksperimentalno je određena 2D ^1H – ^1H NOESY spektroskopijom. Uobičajeno se razlikuju jaki, srednji i slabi NOE kontakti, koji odražavaju relativni intenzitet križnih-pikova u pripadajućem NOESY spektru. Pritom, jaki NOE kontakti tipično ukazuju na prostornu blizinu protona od približno 0–3 Å, srednji na udaljenosti od 3–5 Å, dok slabi kontakti odgovaraju udaljenostima većim od 5 Å. Navedene se vrijednosti koriste kao orijentacijska udaljenosna ograničenja u računalnim modelima optimizacije geometrije i konformacijske analize, pri čemu omogućuju usporedbu i validaciju eksperimentalno određenih NOE s računalno predviđenim konformacijama.

Najstabilnije konformacije sintetiziranih peptida utvrđene su računalnim modeliranjem primjenom teorije funkcionala gustoće (DFT), a dobiveni teorijski nalazi pokazali su dobru sukladnost s eksperimentalnim NMR rezultatima, čime je potvrđena pouzdanost predloženih konformacijskih modela (Tablica 23).

Tablica 23. NOE ograničenja udaljenosti između odabranih parova protona za modelni heksapeptid **5** i C-glikopeptide **6 – 12**.

Peptid	Proton 1	Proton 2	Kontakt ^a	NOE ograničenja udaljenosti (Å)	Kontakt – određeno ^b
37	NH2	α H1 NH3	s w	0-3 3-5	2,2 4,2
	NH3	α H2 NH4	s w	0-3 3-5	2,2 4,3
	NH4	α H3 NH5	s w	0-3 3-5	2,4 4,3
	NH5	α H4 NH6	s w	0-3 3-5	2,3 4,3
	NH6	α H5	s	0-3	2,3
38	NH2	α H1	s	0-3	2,3
	NH3	α H2 NH4	s m	0-3 3-5	2,3 3,1
		H6'	s	0-3	2,9
	NH4	α H3 NH5	s w	0-3 3-5	2,9 4,1
		H6'	w	3-5	4,8
	NH5	α H4	s	0-3	2,2
39	NH2	α H1 NH3	s w	0-3 3-5	2,4 4,3
	NH3	α H2	s	0-3	2,4
	NH4	α H3 NH5	s w	0-3 3-5	3,0 4,3
		4'	s	0-3	2,5
		2'	m	3-5	5,0
	NH5	α H4 NH6	s w	0-3 3-5	2,3 4,3
40	NH2	α H1	m	3-5	3,1
	NH3	α H2 NH4	s m	0-3 3-5	2,2 4,3
		α H3	s	0-3	2,5
	NH5	α H4 NH6	s w	0-3 3-5	2,4 4,2
		α H5	m	3-5	3,1
	α H2	α H1 α H3	w m	3-5 3-5	4,3 4,2
41	NH2	α H1	s	0-3	2,2

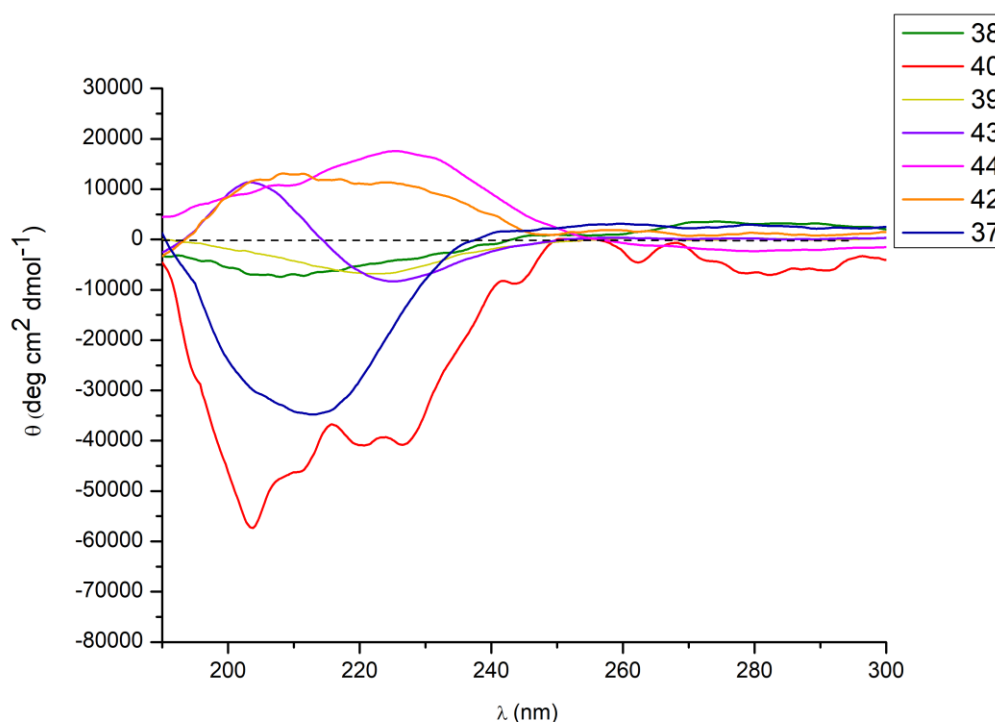
	NH3	α H2 NH4 4'	s m m	0-3 3-5 3-5	2,3 4,3 4,1
	NH4	α H3 NH5	s w	0-3 3-5	2,5 4,3
	NH5	α H4 NH6	s m	0-3 3-5	2,4 4,3
	NH6	α H5	m	3-5	3,1
	α H3	4' 5'	m m	3-5 3-5	3,5 4,1
42	NH2	α H1	m	3-5	3,1
	NH3	α H2 NH4	s w	0-3 3-5	2,3 4,1
	NH4	α H3 NH5	m m	3-5 3-5	3,1 4,1
	NH5	α H4	m	3-5	3,1
	NH6	α H5	m	3-5	3,1
43	NH1	2'	m	3-5	4,6
	NH2	β	w	3-5	3,9
	NH3	α H2	s	0-3	2,4
		β	s	0-3	2,6
		γ	s	0-3	2,7
		NH4	s	0-3	2,8
	NH4	α H2	m	3-5	3,4
		α H3	m	3-5	3,7
		NH6	w	3-5	3,7
	NH5	α H4	m	3-5	3,3
		β	m	3-5	3,7
		γ	m	3-5	3,4
		NH6	s	0-3	2,9
NH6	α H5	m	3-5	3,2	
	α H4	w	3-5	4,8	
44	NH2	α H1	w	3-5	3,1
		β	w	3-5	3,1
		3'	s	0-3	2,5
	NH3	α H2	s	0-3	2,6
		NH4	w	3-5	4,2
	NH4	α H3	s	0-3	2,2
		NH5	m	3-5	4,1
	NH5	α H4	s	0-3	2,2
		3'	w	3-5	3,7
		NH6	m	3-5	4,7
NH6	α H5	m	3-5	3,1	
	3'	s	0-3	2,3	
^a s-jak, m-srednji, w-slab NOE kontakt (određeno asignacijom NOESY spektra)					
^b rezultati dobiveni optimizacijom geometrije					

Nakon provedene detaljne konformacijske analize, utvrđena je jasna povezanost između strukture C-glikopeptida i njihovih optimiziranih konformacija, na temelju koje su izvedeni zaključci o utjecaju strukturno različitih C-glikozilnih α -aminokiselina, kao i njihova broja i razmještaja unutar peptidnog slijeda, na konformacijske promjene razmatranih peptida. Zamjenom D-Val³ u modelnom peptidu **37** aminokiselinom G_{Gal}³ u heksapeptidu **38** zabilježena je značajna konformacijska promjena, koja je rezultirala formiranjem γ -okreta između valinskih ostataka Val² i Val⁴. Suprotno tome, ugradnjom G_{Rib}³ u C-glikopeptid **39** nije zabilježen isti učinak. Naprotiv, stabilizirana je relativno izdužena konformacija, posredovana vodikovim vezama između amidnih protona i kisikovih atoma ribofuranoznog prstena. Sličan obrazac uočen je i kod C-glikopeptida **40** i **41**, koji sadrže djelomično deprotektirane sorbofuranozne i alofuranozne bočne lance. U navedenim primjerima C-glikopeptida pojedinačna vodikova veza između amidnih protona i ugljikohidratnog prstena rezultirala je tek neznatnim međudjelovanjem, što je pridonijelo formiranju još izduženije konformacije, vrlo slične onoj zabilježenoj za valinski heksapeptid **37**.

U multivalentnim C-glikopeptidima **42–44**, koji sadrže potpuno zaštićene G_{Sor} i G_{All} ostatke, stabilizacija specifičnih konformacija ostvarena je višestrukim vodikovim vezama između peptidne okosnice i ugljikohidratnih bočnih lanaca. U C-glikopeptidu **42** dva su uzastopna G_{Sor} ostatka prostorno blizu i usidrena mrežom vodikovih veza koje uključuju tri amidna protona, dok je alternirajući redoslijed aminokiselina u C-glikopeptidu **43** rezultirao savijenom konformacijom nalik zavojnici. U C-glikopeptidu **44**, u kojem su dva G_{All} ostatka smještene na udaljenijim položajima unutar peptidnog slijeda, zabilježeno je savijanje peptidne okosnice u području gdje su ugrađene G_{All} aminokiseline.

Kako bi se dodatno potvrdile i usporedile konformacijske značajke utvrđene NMR analizom i molekularnim modeliranjem, primijenjena je spektroskopska metoda cirkularnog dikroizma (engl. „*circular dichroism*“, CD). CD spektroskopija predstavlja pouzdanu metodu za određivanje trodimenzionalne strukture proteina te za praćenje konformacijskih promjena u peptidima. CD spektri modelnog heksapeptida **37** i C-glikopeptida **38** – **44** snimljeni u 2,2,2-trifluoroetanolu (TFE) prikazani su na Slici 80.

Korištenje TFE-a kao otapala bilo je nužno zbog slabe topljivosti istraživanih C-glikopeptida u vodi, dok DMSO, zbog snažne apsorpcije u UV području ispod približno 265 nm, nije prikladan za mjerenja u dalekom-UV području (190–250 nm), koje je ključno za istraživanje sekundarne strukture peptida.



Slika 80. CD spektar modelnog peptida **37** i C-glikopeptida **38-44**.

Modelni peptid **37** pokazao je minimum negativne molarne eliptičnosti pri približno 214 nm s točkom prolaska kroz nulu (engl. „*zero-crossing point*“) pri oko 239 nm (Slika 29). C-glikopeptidi **38** – **41** pokazali su manje izražene CD spektre, s točkom prijalaz kroz nulu između 240 nm i 255 nm, nakon čega vrijednosti molarne eliptičnosti ostaje gotovo nepromijenjena. Pritom, CD spektar C-glikopeptida **6** pokazuje minimum pri približno 210 nm, dok je u spektru

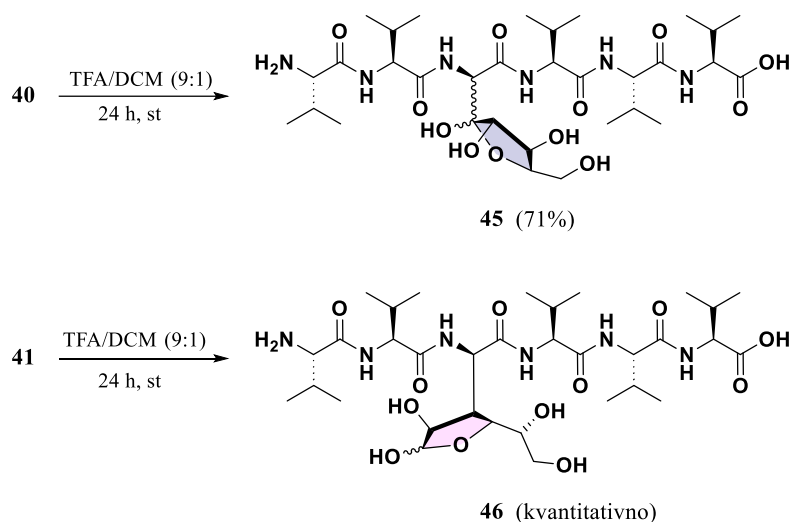
C-glikopeptida **7** zabilježen minimum pri 225 nm. U slučaju C-glikopeptida **40** CD spektar pokazuje nekoliko minimuma i maksimuma u području između 200 nm i 230 nm.

Među multivalentnim C-glikopeptidima posebno se ističe peptid **43**, čiji spektar pokazuje minimum pri 225 nm i maksimum pri 203 nm. C-glikopeptidi **42** i **44** pokazuju slične oblike CD krivulja, s izraženim širokim pozitivnim pojasom, kao što je vidljivo za peptid **42**, s maksimumom pri 208 nm te peptid **44**, s maksimumom pri 225 nm i prijelazom kroz nulu pri 250 nm (Slika 29).

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je CD spektroskopija pouzdana i učinkovita metoda za praćenje konformacijskih promjena C-glikopeptida, dok se konačna i strukturno najpouzdanija identifikacija i dalje prvenstveno temelji na rezultatima NMR spektroskopije.

4.5. Deprotekcija C-glikopeptida

U završnoj fazi istraživanja, provedena je potpuna deprotekcija sintetiziranih C-glikopeptida **40** i **41**. Tretiranje smjesom TFA/DCM (9:1, v/v) tijekom 24 sata pri sobnoj temperaturi rezultiralo je uklanjanjem zaštitnih skupina na ugljikohidratnim bočnim lancima pri čemu su dobiveni ciljani, potpuno deprotektirani C-glikopeptidi **45** i **46** (Slika 81). Uklanjanje izopropilidenskih zaštitnih skupina u multivalentnim C-glikopeptidima **42** i **43** odvijalo se postupno i znatno sporije, što otvara mogućnost kontroliranog zaustavljanja reakcije u određenom trenutku pažljivim odabirom reakcijskih uvjeta i kontroliranjem temperature.



Slika 81. Shematski prikaz potpune deprotekcije C-glikopeptida **40** i **41**.

§ 5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije razvijena je nova sintetska metodologija za pripravu C-glikozilnih α -aminokiselina i pripadajućih C-glikopeptida, koja omogućuje selektivnu i kontroliranu ugradnju strukturno različitih C-glikozilnih gradivnih blokova u peptidne sekvence, uključujući njihovu ugradnju na bilo koji položaj unutar peptida, čime je prevladano prethodno ograničenje ugradnje isključivo na N- ili C-terminalni položaj. Ovim je istraživanjem ostvaren značajan metodološki iskorak koji omogućuje sustavni pristup istraživanju utjecaja C-glikozilnih α -aminokiselina na lokalne strukturne motive, sekundarnu strukturu i ukupnu konformaciju peptida.

Polazeći od odgovarajućih ugljikohidratnih derivata, provedena je priprava aldehidnih prekursora za C-glikozilaciju, pri čemu su korištene zaštitne skupine izopropilidenskog tipa radi očuvanja stereokemijske čistoće i kontrole reaktivnosti. Izolirani aldehidi **4**, **5**, **7**, **10**, **11**, **15** dobiveni su u vrlo dobrim do izvrsnim prinosima, u rasponu od 63 % do 94 %.

Dijastereoselektivna Passerinijeva reakcija provedena je s ciljem uvođenja C-glikozilne jedinice. Passerinijevom reakcijom dobiveni su α -aciloksiamidi **16–21** u kojima je ugljikohidratna jedinica izravno vezana na novonastali kiralni centar. Dijastereoselektivnost se pokazala varijabilnom (55:45 – 90:10), što se može pripisati strukturnoj raznolikosti korištenih ugljikohidratnih aldehida. Reakcija je rezultirala visokom selektivnošću i pokazala dobru kompatibilnost s različitim funkcijskim skupinama, a produkti su izolirani u izvrsnim prinosima (91 % – 94 %), kao smjese dva dijastereomera.

Hidrolizom α -aciloksiamida sintetizirane su odgovarajuće α -hidroksi C-glikozilne kiseline, koje su u sljedećem koraku prevedene u odgovarajuće α -hidroksi metilne estere **22–27** uz prinose od 42 % do 85 %, nakon dva uzastopna reakcijska koraka. Jedan od ključnih metodoloških doprinosa ovog istraživanja odnosi se na uspješno razdvajanje dijastereomera produkata kromatografijom na koloni silikagela, čime je omogućena izolacija većinskog dijastereomera s jasno definiranom stereokemijom. Ovaj je pristup predstavljao značajnu

prekretnicu u odnosu na ranije metode, u kojima razdvajanje diastereomera nije bilo učinkovito.

Slijedom toga, provedene su post-kondenzacijske modifikacije s ciljem pripreve željenih C-glikozilnih α -aminokiselina. Ključni korak sinteze uključivao je aktivaciju slobodne α -hidroksilne skupine, čime su dobiveni odgovarajući triflatni derivati koji su naknadno podvrgnuti reakciji nukleofilne supstitucije, što je rezultiralo inverzijom konfiguracije na novom kiralnom centru. Time je potvrđena učinkovita kontrola stereokemijskog ishoda reakcije. Na taj su način sintetizirani metilni esteri α -azido C-glikozilnih kiselina **29–32** (*R*)-konfiguracije, u visokim prinosima (83 % do 89 %), nakon dva uzastopna reakcijska koraka.

Redukcijom azidne u amino skupinu, nakon čega je uslijedila deprotekcija metilne esterske skupine te naknadno uvođenje Fmoc-zaštite, dobivene su ciljane Fmoc-zaštićene C-glikozilne α -aminokiseline **33–36**. Izolirane su četiri diastereomerno čiste C-glikozilne α -aminokiseline u prinosima od 67 % do 84 %, nakon tri uzastopna reakcijska koraka i pročišćavanja kolonskom kromatografijom. Time je ostvaren jedan od ključnih ciljeva ovog istraživanja.

Nadovezujući se na prethodna otkrića, razvijena je metodologija pripreme oligomera s različitim brojem i razmještajem C-glikozilnih α -aminokiselina unutar peptidne sekvence primjenom metode sinteze peptida na čvrstom nosaču. Kao prvi primjer sintetiziran je modelni heksapeptid **37**, u izvrsnom prinosu od 95 %. Optimizacijom reakcijskih uvjeta omogućena je učinkovita i kontrolirana ugradnja strukturno različitih C-glikozilnih α -aminokiselina na unaprijed definirane položaje unutar peptidne sekvence, čime je uspješno sintetiziran niz C-glikopeptida **38–44**, u dobrim do visokim prinosima, u rasponu od 25 % do 85 %, uz visoku analitičku čistoću (> 95 %).

Naposljetku, provedena je detaljna strukturna karakterizacija i konformacijska analiza sintetiziranih C-glikopeptida s ciljem utvrđivanja utjecaja strukturno različitih C-glikozilnih α -aminokiselina, njihova broja i razmještaja unutar peptidnog slijeda na konformacijska svojstva peptida. Konformacijskom analizom utvrđeno je da vodikove veze između amidnih skupina peptidne okosnice i ugljikohidratnih bočnih lanaca predstavljaju glavni čimbenik

stabilizacije specifičnih konformacija. Također je pokazano da povećanje broja C-glikozilnih α -aminokiselina u peptidnoj sekvenci dovodi do smanjenja konformacijske fleksibilnosti te formiranja lokalnih okreta ili savijenih konformacija nalik uzvojnici. Dobivena opažanja potvrđena su računalnim modeliranjem, koje je pokazalo dobro slaganje s eksperimentalnim podacima.

Provedeno istraživanje potvrdilo je glavnu hipotezu prema kojoj prisutnost sterički zahtjevne ugljikohidratne jedinice, kovalentno vezane izravno na α -ugljikov atom α -aminokiseline, značajno utječe na konformacijska svojstva peptida. Nadalje, pokazano je da strukturna raznolikost ugrađenih C-glikozilnih α -aminokiselina, njihov broj i raspodjela unutar peptidne sekvence moduliraju konformaciju peptida na jasno definiran način te doprinose stabilizaciji specifičnih strukturnih motiva u sintetiziranim C-glikopeptidima.

Zaključno, provedeno istraživanje predstavlja značajan doprinos jer omogućuje sveobuhvatnu analizu utjecaja broja i raspodjele strukturno različitih C-glikozilnih α -aminokiselina unutar peptidnog slijeda na konformacijska svojstva pripadajućih oligomera. Dobiveni rezultati postavljaju temelje za daljnji razvoj stabilnih i konformacijski definiranih C-glikopeptida s potencijalnom primjenom u medicinskoj kemiji, katalizi, biotehnologiji i razvoju funkcionalnih materijala.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ (prema potrebi)

°C	Celzijev stupanj
Å	angstrem
δ	kemijski pomak
θ	temperatura
$\tilde{\nu}$	valni broj
Ac	acetil
acetone-d ₆	deuterirani aceton
Ala	alanin
Ar	argon
Boc	tert-butiloksikarbonil
BOP	(benzotriazol-1-iloksi)-tris-(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat
<i>c</i>	množinska koncentracija
Cbz	benzil klorformat
CDCl ₃	deuterirani kloroform
COSY	<i>CO</i> related <i>S</i> pectroscop <i>Y</i>
d.r.	dijastereomerni omjer (<i>diastereomeric ratio</i>)
Da	dalton
DBU	1,8-diazabiciklo(5.4.0)undek-7-en
DCM	diklormetan
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DMAP	4-dimetilaminopiridin

DMF	dimetilformamid
DMP	Dess-Martin perjodinan
DMSO-d ₆	deuterirani dimetil-sulfoksid
DPPA	difenilfosforil azid
e.e.	enantiomerni višak
e.r.	enantiomerni omjer (<i>enantiomeric ratio</i>)
EDG	elektron-donirajuća skupina (<i>electron donating group</i>)
ekv / eq.	ekvivalent
ESI	elektrosprej ionizacija (<i>electrospray ionization</i>)
ESI ⁺	elektrosprej ionizacija u pozitivnom modu
ESI ⁻	elektrosprej ionizacija u negativnom modu
Et ₂ O	dietil-eter
EtOAc	etil-acetat
EWG	elektron-odvlačeća skupina (<i>electron withdrawing group</i>)
G	Gibbsova slobodna energija
g	gram
Gly	glicin
h	sat
HATU	1-(bis(dimetilamino)metilen)-1H-1,2,3-triazol(4,5-b)piridin-3-oksidi heksafluorofosfat
HBTU	N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronijev heksafluorofosfat
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation</i>
HOBt	hidroksibenzotriazol
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (<i>high performance liquid chromatography</i>)

HR-MS	masena spektrometrija visoke rezolucije (<i>high resolution mass spectrometry</i>)
Hz	herc
IMCRs	višekomponentne reakcije s izocijanidnom komponentom (<i>isocyanide-based multicomponent reaction</i>)
IR	infracrvena spektroskopija
<i>J</i>	konstanta sprege
K	kelvin
L	ligand
LC	tekućinska kromatografija (<i>liquid chromatography</i>)
Leu	leucin
Lys	lizin
<i>m</i>	meta-položaj
MALDI	matriksom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MCR	<i>multicomponent reactions</i>
MeCN	acetonitril
MeO–	metoksi skupina
MeOH	metanol
mg	miligram
min	minuta
mmol	milimol
<i>Mr</i>	molekulska masa
MS	spektrometrija masa (<i>mass spectrometry</i>)
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -butil-litij
NaOH	natrijev hidroksid

nm	nanometar
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	nuklearna magnetska rezonancija (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
Nu	nukleofil
<i>o</i>	orto-položaj
<i>p</i>	para-položaj
PE	petroleter
PG	zaštitna skupina (<i>protective group</i>)
Ph	fenil
Phe	fenilalanin
pKa	logaritamska vrijednost konstante disocijacije kiseline
ppm	milijunti dio (<i>parts per million</i>)
Pro	prolin
PyBOP	(benzotriazol-1-iloksi)tripirolidinofosfonijev heksafluorofosfat
Q-TOF	<i>quadrupole time-of-flight</i>
rac	racemično
Rf	retencijski faktor
RP-HPLC	tekućinska kromatografija obrnutih faza (<i>reversed-phase high performance liquid chromatography</i>)
rt / st	sobna temperatura
t	vrijeme
t.t.	temperatura taljenja
t _{1/2}	vrijeme poluraspada
TEA	trietilamin

TFA	trifluoroctena kiselina
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoslojna kromatografija (<i>thin layer chromatography</i>)
TMS	tetrametilsilan
TOF	<i>time of flight</i>
UV	ultraljubičasto zračenje (<i>ultraviolet</i>)
Val	valin
VKR	višekomponentna reakcija
Xaa	aminokiselina (općeniti simbol)
XRD	rendgenska strukturna analiza (<i>X-ray diffraction</i>)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. E. Lenci, A. Trabocchi, *Chem. Soc. Rev.* **49** (2020) 3262–3277.
2. M. Pelay-Gimeno, A. Glas, O. Koch, T. N. Grossmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **54** (2015) 8896–8927.
3. J. Vagner, H. Qu, V. J. Hruby, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12** (2008) 292–296.
4. L. Lombardi, V. Del Genio, F. Albericio, D. R. Williams, *Chem. Rev.* **125** (2025) 7099–7166.
5. J. Suć, L.-M. Tumir, L. Glavaš-Obrovac, M. Jukić, I. Piantanida, I. Jerić, *Org. Biomol. Chem.* **14** (2016) 4865–4874.
6. C. Shi, I. Correia, N. Tonali, S. Onger, O. Lequin, *Org. Biomol. Chem.* **20** (2022) 8430–8437.
7. M. Rzeigui, M. Traikia, L. Jouffret, A. Kriznik, J. Khiari, O. Roy, C. Taillefumier, *J. Org. Chem.* **85** (2020) 2190–2201.
8. R. Fanelli, D. Berta, T. Földes, E. Rosta, R. A. Atkinson, H.-J. Hofmann, K. Shankland, A. J. A. Cobb, *J. Am. Chem. Soc.* **142** (2020) 1382–1393.
9. J. M. Lee, H. M. Hammarén, M. M. Savitski, S. H. Baek, *Nat. Commun.* **14** (2023) 201.
10. M. M. Müller, *Biochemistry* **57** (2018) 177–185.
11. R. D. Süßmuth, A. Mainz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **56** (2017) 3770–3821.
12. J. Han, H. Konno, T. Sato, V. A. Soloshonok, K. Izawa, *Eur. J. Med. Chem.* **220** (2021) 113448.
13. M. A. T. Blaskovich, *J. Med. Chem.* **59** (2016) 10807–10836.
14. S. B. Gunnoo, A. Madder, *Org. Biomol. Chem.* **14** (2016) 8002–8013.
15. I. Kwon, S. I. Lim, *Macromol. Chem. Phys.* **214** (2013) 1295–1301.
16. A. J. Metrano, A. J. Chinn, C. R. Shugrue, E. A. Stone, B. Kim, S. J. Miller, *Chem. Rev.* **120** (2020) 11479–11615.
17. E. A. C. Davie, S. M. Mennen, Y. Xu, S. J. Miller, *Chem. Rev.* **107** (2007) 5759–5812.
18. Z. C. Girvin, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **142** (2020) 17211–17223.
19. A. J. Romo, T. Shiraishi, H. Ikeuchi, G.-M. Lin, Y. Geng, Y.-H. Lee, P. H. Liem, T. Ma, Y. Ogasawara, K. Shin-ya, M. Nishiyama, T. Kuzuyama, H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **141** (2019) 14152–14159.
20. S. I. Elshahawi, K. A. Shaaban, M. K. Kharel, J. S. Thorson, *Chem. Soc. Rev.* **44** (2015) 7591–7697.
21. Z. Yuan, C. Zhu, Y. Zhang, Y. Rao, *Eur. J. Org. Chem.* **2022** (2022).
22. P. Hultin, *Curr. Top. Med. Chem.* **5** (2005) 1299–1331.
23. A. Chen, S. Zhao, Y. Han, Z. Zhou, B. Yang, L. G. Xie, M. A. Walczak, F. Zhu, *Chem. Sci.* **14** (2023) 7569–7580.
24. H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz, *Chem. Rev.* **100** (2000) 4495–4538.
25. Y. Yang, B. Yu, *Chem. Rev.* **117** (2017) 12281–12356.
26. X. Wu, S. Li, L. Chen, S. Ma, B. Ma, L. Song, D. Qian, *J. Am. Chem. Soc.* **146** (2024) 22413–22423.
27. J. Wu, R. Purushothaman, F. Kallert, S. L. Homölle, L. Ackermann, *ACS Catal.* **14** (2024) 11532–11544.
28. R. Talukdar, D. Chong, A. J. Fairbanks, *Org. Lett.* **26** (2024) 10536–10541.

29. T. Gulzar, Y.-H. Liu, Y.-N. Xia, W. Liu, P. Liu, D. Zhu, P. Xu, B. Yu, *Org. Lett.* **26** (2024) 1718–1722.
30. Y. Ding, B. Yao, *Org. Lett.* **26** (2024) 7128–7133.
31. Y. Xia, Y. Wang, Z. Zhang, T. Gulzar, Y. Lin, J. Wang, D. Zhu, B. Yu, *Org. Lett.* **25** (2023) 6741–6745.
32. R.-Q. Jiao, Y.-N. Ding, M. Li, W.-Y. Shi, X. Chen, Z. Zhang, W.-X. Wei, X.-S. Li, X.-P. Gong, Y.-Y. Luan, X.-Y. Liu, Y.-M. Liang, *Org. Lett.* **25** (2023) 6099–6104.
33. Y.-H. Liu, Y.-N. Xia, T. Gulzar, B. Wei, H. Li, D. Zhu, Z. Hu, P. Xu, B. Yu, *Nat. Commun.* **12** (2021) 4924.
34. S. Koch, D. Schollmeyer, H. Löwe, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **19** (2013) 7020–7041.
35. E. G. Nolen, L. Li, K. V. Waynant, *J. Org. Chem.* **78** (2013) 6798–6801.
36. N. R. M. Reintjens, T. S. Koemans, N. Zilverschoon, R. Castelli, R. A. Cordfunke, J. W. Drijfhout, N. J. Meeuwenoord, H. S. Overkleeft, D. V. Filippov, G. A. van der Marel, J. D. C. Codée, *European J. Org. Chem.* **2020** (2020) 5126–5139.
37. K. Jayakanthan, Y. D. Vankar, *Org. Lett.* **7** (2005) 5441–5444.
38. W. Shang, S. Su, R. Shi, Z. Mou, G. Yu, X. Zhang, D. Niu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **60** (2021) 385–390.
39. A. Dondoni, A. Massi, S. Sabbatini, *Chem. Eur. J.* **11** (2005) 7110 – 7125.
40. A. Dondoni, A. Massi, *Acc. Chem. Res.* **39** (2006) 451–463.
41. N. R. M. Reintjens, T. S. Koemans, N. Zilverschoon, R. Castelli, R. A. Cordfunke, J. W. Drijfhout, N. J. Meeuwenoord, H. S. Overkleeft, D. V. Filippov, G. A. van der Marel, J. D. C. Codée, *Eur. J. Org. Chem.* **2020** (2020) 5126–5139.
42. M.-C. Frantz, S. Dropsit-Montovert, F. Pic, A. Prévot-Guéguiniat, C. Aracil, Y. Ding, M. Lima, F. Alvarez, S. Ramos, L. Mao, L. Lu, J. Xu, X. Marat, M. Dalako-Csiba, *Org. Lett.* **21** (2019) 2684–2687.
43. R. Qi, C. Wang, Z. Ma, H. Wang, Q. Chen, L. Liu, D. Pan, X. Ren, R. Wang, Z. Xu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **61** (2022).
44. Y.-N. Ding, N. Li, Y.-C. Huang, Y. An, Y.-M. Liang, *Org. Lett.* **24** (2022) 4519–4523.
45. P. Ji, Y. Zhang, Y. Wei, H. Huang, W. Hu, P. A. Mariano, W. Wang, *Org. Lett.* **21** (2019) 3086–3092.
46. S. Boden, F. Reise, J. Kania, T. K. Lindhorst, L. Hartmann, *Macromol. Biosci.* **19** (2019).
47. K. S. Bücher, P. B. Konietzny, N. L. Snyder, L. Hartmann, *Chem. Eur. J.* **25** (2019) 3301–3309.
48. F. Germain, Y. Chapleur, B. Castro, *Tetrahedron* **38** (1982) 3593–3596.
49. S. Hanessian, T. Ogawa, Y. Guindon, *Carbohydr. Res.* **38** (1974) 647–683.
50. A. Dondoni, A. Marra, *Chem. Rev.* **100** (2000) 4395–4421.
51. M. J. Robins, J. M. R. Parker, *Can. J. Chem.* **61** (1983) 1911–1920.
52. G. Liu, D. A. Cogan, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 9913–9914.
53. S. J. Zuend, M. P. Coughlin, M. P. Lalonde, E. N. Jacobsen, *Nature* **461** (2009) 968–970.
54. M. S. Sigman, P. Vachal, E. N. Jacobsen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **39** (2000) 1279–1281.
55. K. Maruoka (ur.), *Asymmetric Phase Transfer Catalysis*, Wiley-VCH: Weinheim, 2008, str. 35–48.
56. T. Ooi, Y. Uematsu, K. Maruoka, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 2548–2549.
57. S. Sipos, I. Jablonkai, O. Egyed, M. Czugler, *Carbohydr. Res.* **346** (2011) 2862–2871.
58. S. P. Vincent, A. Schleyer, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **65** (2000) 4440–4443.
59. D. M. Stout, L. A. Black, W. L. Matier, *J. Org. Chem.* **48** (1983) 5369–5373.

60. T. K. Chakraborty, K. Azhar Hussain, G. Venkat Reddy, *Tetrahedron* **51** (1995) 9179–9190.
61. M. Musawwer Khan, R. Yousuf, S. Khan, *RSC Adv.* **5** (2015) 57883–57905.
62. A. de F. S. Barreto, C. K. Z. Andrade, *Beilstein J. Org. Chem.* **15** (2019) 906–930.
63. S. Brauch, S. S. van Berkel, B. Westermann, *Chem. Soc. Rev.* **42** (2013) 4948–4962.
64. A. Dondoni, A. Massi, *Synthesis of heterocycle-linked C-glycosyl α -amino acids and C-glycopeptides*, Vol. 1009 ACS Symposium Series, American Chemical Society, 2009, str. 13–30.
65. A. Dondoni, G. Mariotti, A. Marra, *Tetrahedron Lett.* **41** (2000) 4677–4679.
66. A. Dondoni, P. P. Giovannini, A. Massi, *Org. Lett.* **6** (2004) 2929–2932.
67. A. Dondoni, A. Massi, S. Sabbatini, V. Bertolasi, *Tetrahedron Lett.* **45** (2004) 2381–2384.
68. A. Dondoni, A. Massi, E. Minghini, S. Sabbatini, V. Bertolasi, *J. Org. Chem.* **68** (2003) 6172–6183.
69. A. Dondoni, F. Junquera, F. L. Merchán, P. Merino, M.-C. Scherrmann, T. Tejero, *J. Org. Chem.* **62** (1997) 5484–5496.
70. A. Dömling, I. Ugi, *Angew. Chem.* **39** (2000) 3168–3210.
71. L. Reguera, D. G. Rivera, *Chem. Rev.* **119** (2019) 9836–9860.
72. A. Strecker, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **75** (1850) 27–45.
73. R. Ramozzi, K. Morokuma, *J. Org. Chem.* **80** (2015) 5652–5657.
74. J. Suć, D. Barić, I. Jerić, *RSC Adv.* **6** (2016) 99664–99675.
75. K. Vlahoviček-Kahlina, M. Vazdar, A. Jakas, V. Smrečki, I. Jerić, *J. Org. Chem.* **83** (2018) 13146–13156.
76. K. Vlahoviček-Kahlina, J. S. Sajko, I. Jerić, *Int. J. Mol. Sci.* **20** (2019) 6236.
77. A. Brust, C. A. Wang, N. L. Daly, J. Kennerly, M. Sadeghi, M. J. Christie, R. J. Lewis, M. Mobli, P. F. Alewood, *Angew. Chem. Int. Ed.* **52** (2013) 12020–12023.
78. M.-L. Han, X.-P. Hu, J.-D. Huang, L.-G. Chen, Z. Zheng, *Tetrahedron Asymmetry* **22** (2011) 222–225.
79. A. Ros, A. Magriz, H. Dietrich, R. Fernández, E. Alvarez, J. M. Lassaletta, *Org. Lett.* **8** (2006) 127–130.
80. S. A. W. Gruner, E. Locardi, E. Lohof, H. Kessler, *Chem. Rev.* **102** (2002) 491–514.
81. I. Colić, B. Bogović, I. Jerić, *New J. Chem.* **48** (2024) 12584–12590.
82. S. Pelliccia, A. I. Alfano, U. Galli, E. Novellino, M. Giustiniano, G. C. Tron, *Symmetry* **11** (2019) 798.
83. K. Vlahoviček-Kahlina, Z. Štefanić, K. Vazdar, I. Jerić, *Chempluschem* **85** (2020) 838–844.
84. X. Peng, K. Xu, Q. Zhang, L. Liu, J. Tan, *Trends. Chem.* **4** (2022) 643–657.
85. G. A. Adamson, A. L. J. Beckwith, C. L. L. Chai, *Aust. J. Chem.* **57** (2004) 629–633.
86. R. Hamzavi, C. Meyer, N. Metzler-Nolte, *Org. Biomol. Chem.* **4** (2006) 3648–3651.
87. M. Ousmer, V. Boucard, N. Lubin-Germain, J. Uziel, J. Augé, *Eur. J. Org. Chem.* **2006** (2006) 1216–1221.
88. F. Zhu, M. J. Rourke, T. Yang, J. Rodriguez, M. A. Walczak, *J. Am. Chem. Soc.* **138** (2016) 12049–12052.
89. N. A. Romero, D. A. Nicewicz, *Chem. Rev.* **116** (2016) 10075–10166.
90. C. K. Prier, D. A. Rankic, D. W. C. MacMillan, *Chem. Rev.* **113** (2013) 5322–5363.
91. D. A. Nicewicz, D. W. C. MacMillan, *Science* (1979) **322** (2008) 77–80.
92. J.-R. Chen, X.-Q. Hu, L.-Q. Lu, W.-J. Xiao, *Chem. Soc. Rev.* **45** (2016) 2044–2056.

93. Q. Wang, Y. Fu, W. Zhu, S. An, Q. Zhou, S.-F. Zhu, G. He, P. Liu, G. Chen, *CCS Chemistry* **3** (2021) 1729–1736.
94. F. Cong, X.-Y. Lv, C. S. Day, R. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **142** (2020) 20594–20599.
95. Y. Wei, B. Ben-zvi, T. Diao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **60** (2021) 9433–9438.
96. A. Dumoulin, J. K. Matsui, Á. Gutiérrez-Bonet, G. A. Molander, *Angew. Chem. Int. Ed.* **57** (2018) 6614–6618.
97. R. Mao, S. Xi, S. Shah, M. J. Roy, A. John, J. P. Lingford, G. Gäde, N. E. Scott, E. D. Goddard-Borger, *J. Am. Chem. Soc.* **143** (2021) 12699–12707.
98. G. Gäde, R. Kellner, K. L. Rinehart, M. L. Proefke, *Biochem Biophys. Res. Commun.* **189** (1992) 1303–1309.
99. D. Takeda, M. Yoritake, H. Yasutomi, S. Chiba, T. Moriyama, A. Yokoo, K. Usui, G. Hirai, *Org. Lett.* **23** (2021) 1940–1944.
100. E. M. Miller, M. A. Walczak, *Org. Lett.* **23** (2021) 4289–4293.
101. S. P. Parida, T. Das, M. A. Ahemad, T. Pati, S. Mohapatra, S. Nayak, *Carbohydr. Res.* **530** (2023) 108856.
102. N. Kiya, Y. Hidaka, K. Usui, G. Hirai, *Org. Lett.* **21** (2019) 1588–1592.
103. N. Miquel, G. Doisneau, J.-M. Beau, *Angew. Chem.* **39** (2000) 4111–4114.
104. S. O. Badir, A. Dumoulin, J. K. Matsui, G. A. Molander, *Angew. Chem. Int. Ed.* **57** (2018) 6610–6613.
105. Y. Ma, S. Liu, Y. Xi, H. Li, K. Yang, Z. Cheng, W. Wang, Y. Zhang, *Chem. Commun.* **55** (2019) 14657–14660.
106. M. Zhu, S. Messaoudi, *ACS Catal.* **11** (2021) 6334–6342.
107. I. C. S. Wan, M. D. Witte, A. J. Minnaard, *Org. Lett.* **21** (2019) 7669–7673.
108. A. Chen, S. Zhao, Y. Han, Z. Zhou, B. Yang, L. G. Xie, M. A. Walczak, F. Zhu, *Chem. Sci.* **14** (2023) 7569–7580.
109. X. Chen, K. M. Engle, D. Wang, J. Yu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **48** (2009) 5094–5115.
110. R. Giri, B.-F. Shi, K. M. Engle, N. Maugel, J.-Q. Yu, *Chem. Soc. Rev.* **38** (2009) 3242–3272.
111. H. Yi, G. Zhang, H. Wang, Z. Huang, J. Wang, A. K. Singh, A. Lei, *Chem. Rev.* **117** (2017) 9016–9085.
112. G. Meng, N. Y. S. Lam, E. L. Lucas, T. G. Saint-Denis, P. Verma, N. Chekshin, J.-Q. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **142** (2020) 10571–10591.
113. N. Y. S. Lam, K. Wu, J. Yu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **60** (2021) 15767–15790.
114. A. F. M. Noisier, M. A. Brimble, *Chem. Rev.* **114** (2014) 8775–8806.
115. W. Wang, M. M. Lorion, J. Shah, A. R. Kapdi, L. Ackermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **57** (2018) 14700–14717.
116. J. Wu, A. Kopp, L. Ackermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **61** (2022).
117. G. Chen, Z. Zhuang, G. Li, T. G. Saint-Denis, Y. Hsiao, C. L. Joe, J. Yu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **56** (2017) 1506–1509.
118. J. He, M. Wasa, K. S. L. Chan, Q. Shao, J.-Q. Yu, *Chem. Rev.* **117** (2017) 8754–8786.
119. T. G. Saint-Denis, R.-Y. Zhu, G. Chen, Q.-F. Wu, J.-Q. Yu, *Science* **359** (2018) eaao4798.
120. C. Li, C. Wang, B. Villa-Marcos, J. Xiao, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 14450–14451.
121. R. Zhu, M. E. Farmer, Y. Chen, J. Yu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **55** (2016) 10578–10599.
122. L. Ackermann, *Acc. Chem. Res.* **53** (2020) 84–104.
123. P. Gandeepan, L. Ackermann, *Chem.* **4** (2018) 199–222.
124. P. Gandeepan, T. Müller, D. Zell, G. Cera, S. Warratz, L. Ackermann, *Chem. Rev.* **119** (2019) 2192–2452.

125. C. Sambigiagio, D. Schönbauer, R. Blicke, T. Dao-Huy, G. Pototschnig, P. Schaaf, T. Wiesinger, M. F. Zia, J. Wencel-Delord, T. Besset, B. U. W. Maes, M. Schnürch, *Chem. Soc. Rev.* **47** (2018) 6603–6743.
126. J. Ghouilem, C. Tran, N. Grimblat, P. Retailleau, M. Alami, V. Gandon, S. Messaoudi, *ACS Catal.* **11** (2021) 1818–1826.
127. Y. Liu, Y. Wang, W. Dai, W. Huang, Y. Li, H. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **59** (2020) 3491–3494.
128. J. Wu, N. Kaplaneris, S. Ni, F. Kaltenhäuser, L. Ackermann, *Chem. Sci.* **11** (2020) 6521–6526.
129. J. Wu, N. Kaplaneris, S. Ni, F. Kaltenhäuser, L. Ackermann, *Chem. Sci.* **11** (2020) 6521–6526.
130. I. Vogel, A. R. Tatchell, B. S. Furnis, A. J. Hannaford, P. W. G. Smith, *Vogel's Textbook of practical Organic Chemistry*, Longman, London 1989.
131. Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **120** (2008) 215–241.
132. R. F. Brady, *Carbohydr. Res.* **15** (1970) 35–40.
133. R. C. Sawant, Y.-J. Liao, Y.-J. Lin, S. S. Badsara, S.-Y. Luo, *RSC Adv.* **5** (2015) 19027–19033.
134. P. Sairam, R. Puranik, B. Sreenivasa Rao, P. Veerabhadra Swamy, S. Chandra, *Carbohydr. Res.* **338** (2003) 303–306.
135. A. Jakas, A. Višnjevac, I. Jerić, *J. Org. Chem.* **85** (2020) 3766–3787.
136. A. Dömling, *Chem. Rev.* **106** (2006) 17–89.
137. L. M. Gatzemeier, F. Meyer, U. Diederichsen, T. F. Outeiro, *Chemistry* **29** (2023) e202300649.
138. S. Eissler, M. Kley, D. Bächle, G. Loidl, T. Meier, D. Samson, *J. Pept. Sci.* **23** (2017) 757–762.
139. J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimre, T. J. Lambros, R. C. Makofske, C. Chang, *Int. J. Pept. Protein. Res.* **13** (1979) 35–42.
140. Y. H. Liu, Y. N. Xia, T. Gulzar, B. Wei, H. Li, D. Zhu, Z. Hu, P. Xu, B. Yu, *Nat. Commun.* **12** (2021).
141. M. Wang, C. Wang, X. Xie, D. Pan, L. Liu, Q. Chen, Z. Li, Q. Zhang, Z. Xu, *Chem. Commun.* **59** (2023) 3305–3308.
142. H. Liao, J. Ma, H. Yao, X.-W. Liu, *Org. Biomol. Chem.* **16** (2018) 1791–1806.
143. E. G. Nolen, A. J. Kurish, J. M. Potter, L. A. Donahue, M. D. Orlando, *Org. Lett.* **7** (2005) 3383–3386.
144. G. van der Heijden, J. A. W. (Sjaak) Jong, E. Ruijter, R. V. A. Orru, *Org. Lett.* **18** (2016) 984–987.
145. S. Santra, T. Andreana, J.-P. Bourgault, P. R. Andreana, *Convertible Isocyanides: Application in Small Molecule Synthesis, Carbohydrate Synthesis, and Drug Discovery, in Domino and Intramolecular Rearrangement Reactions as Advanced Synthetic Methods in Glycoscience*, Wiley, 2016, str. 121–194.
146. J. Suć Sajko, V. Ljoljić Bilić, I. Kosalec, I. Jerić, *ACS Comb. Sci.* **21** (2019) 28–34.
147. R. B. Lacerda, C. K. F. de Lima, L. L. da Silva, N. C. Romeiro, A. L. P. Miranda, E. J. Barreiro, C. A. M. Fraga, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 74–84.
148. C. Yu, B. Liu, L. Hu, *Org. Lett.* **2** (2000) 1959–1961.
149. A. S. Thompson, G. R. Humphrey, A. M. DeMarco, D. J. Mathre, E. J. J. Grabowski, *J. Org. Chem.* **58** (1993) 5886–5888.
150. Z. Li, Q. Geng, Z. Lv, B. P. Pritchett, K. Baba, Y. Numajiri, B. M. Stoltz, G. Liang, *Org. Chem. Front.* **2** (2015) 236–240.

151. E. Szczepańska, B. Grobelna, J. Ryl, A. Kulpa, T. Ossowski, P. Niedziałkowski, *Molecules* **25** (2020) 3983.
152. M. Cudic, G. B. Fields, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, Molecular Biomethods Handbook. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, 2008, str. 515–546.
153. G. Barany, N. Kneib-Cordonier, D. G. Mullen, *Int. J. Pept. Protein Res.* **30** (1987) 705–739.
154. P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Biochemistry* **13** (1974) 211–222.
155. L. M. Gatzemeier, F. Meyer, U. Diederichsen, T. F. Outeiro, *Chem. Eur. J.* **29** (2023) e202300649.
156. A. C. Wang, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 2483–2494.
157. C. Besançon, A. Guillot, S. Blaise, M. Dauchez, N. Belloy, J. Prévotau-Jonquet, S. Baud, *Methods* **173** (2020) 94–104.

§ 8. DODATAK

Svi sirovi eksperimentalni podaci (NMR spektri) prikupljeni u okviru ovog istraživanja javno su dostupni u repozitoriju FULIR na poveznici <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:241:241599>.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime	Barbara Bogović
Datum rođenja	03. rujna 1990.
Mjesto rođenja	Zagreb

Obrazovanje

2021. – danas	Poslijediplomski (doktorski) studij kemije, Kemijski odsjek, PMF, Sveučilište u Zagrebu.
2015. – 2018.	Diplomski studij kemije, PMF, Sveučilište u Zagrebu. Diplomski rad: „Aktivacijski parametri i kinetički izotopni efekt dimerizacije <i>para</i> -brom nitrozobenzena u kriogenim uvjetima“ (mentor: prof. dr. sc. Hrvoj Vančik)
2009. – 2015.	Preddiplomski studij kemije, PMF, Sveučilište u Zagrebu. Završni rad: „Sintetske reakcije stvaranja veze ugljik–ugljik“ (mentor: prof. dr. sc. Hrvoj Vančik)
2005. – 2009.	Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb
2001. – 2005.	Osnovna škola Nikole Hribara, Velika Gorica
1997. – 2001.	Osnovna škola Nikole Hribara, Područna škola Donja Lomnica

Radna mjesta

2021. – danas	Asistent – doktorand, Institut Ruđer Bošković, Zagreb. Zavod za organsku kemiju i biokemiju; Laboratorij za biomimetičku kemiju / Laboratorij za sintetske metodologije u organskoj kemiji. Projekt: HRZZ DOK-2021-02-5260 i IP-2022-10-9617 (voditelj projekta: dr. sc. Ivanka Jerić)
---------------	--

2020. – 2021. Stručni suradnik; Institut Ruđer Bošković, Zagreb. Zavod za organsku kemiju i biokemiju; Laboratorij za biomimetičku kemiju. Projekt „Razvoj inovativnih formulacija kliničke prehrane“ (IRI 2 OP-KK.01.1.1.07).
2019. – 2020. Stručni suradnik; Institut Ruđer Bošković, Zagreb. Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Laboratorij za biomimetičku kemiju.

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2014. – 2016. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka
2014. – 2018. Znanstvene čarolije

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Bogović, Barbara; Jerić, Ivanka; Smrečki, Vilko. Fmoc Solid-Phase Synthesis and Structural Characterization of C-Glycopeptides // 29th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers Book of Abstracts (29HSKIKI). Zagreb: HKD; HDKI, 2025. str. 102-102
2. Jerić, Ivanka; Bogović, Barbara. C-glycosyl α -amino acids derived from D-galactose, D-ribose, D-xylose, and L-sorbose // 22nd European Symposium on Organic Chemistry - Book of Abstracts / van der Eycken, Erik; van der Eycken, Johan (ur.). Ghent: Ghent University, 2023. str. 301-301
3. Colić, Ivana; Bogović, Barbara; Jerić, Ivanka. Synthesis of C-glycosyl α -amino acids and their oligomers // Book of Abstracts. Granada: International Legume Society, 2023. str. 35-35
4. Bogović, Barbara; Jerić, Ivanka. C-glycosyl α -amino acids in peptide synthesis // Book of Abstracts, Peptide Chemistry Day / frkanec, ruža; namjesnik, danijel (ur.). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, 2023. str. 16-16
5. Bogović, Barbara; Jerić, Ivanka. Synthesis of unnatural C-glycosyl α -amino acids derived from D-galactose, D-ribose, D-xylose, and L-sorbose // 7th Faculty of Science PhD Student Symposium - Book of Abstracts / Pavlek, Katarina (ur.). Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2023. str. 107-107

6. Colić, Ivana ; Bogović, Barbara ; Jerić, Ivanka. Synthesis of C-glycosyl α -amino acids and their oligomers // 22nd Tetrahedron Symposium Lisbon, Portugal, 01.01.2022-01.01.2022
7. Varga, Katarina; Bogović, Barbara ; Bibulić, Petar ; Vančik, Hrvoj. The role of topochemical effects on energetics of solid-state reactions // Solid-state science and research : book of abstracts. Zagreb: Institut Ruđer Bošković, 2017. str. 99-99

Publikacije

1. B. Bogović, I. Colić, I. Nikšić-Franjić, V. Smrečki, I. Jerić, „C-Glycosyl α -Amino Acids as Structural Encoders of Peptide Conformation“ *Angew. Chem. Int. Ed.* (2025) DOI: 10.1002/anie.202522704.
2. I. Colić, B. Bogović, I. Jerić, *New J. Chem.* **48** (2024) 12584–12590.
3. K. Varga, N. Lešić, B. Bogović, M. Pisačić, B. Panić, I. Biljan, I. Novak, H. Vančik, *ChemistrySelect* **4** (2019) 4709–4717.