

Ово дело је заштићено лиценцом Креативне заједнице Ауторство – некомерцијално – без прерада<sup>1</sup>.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.



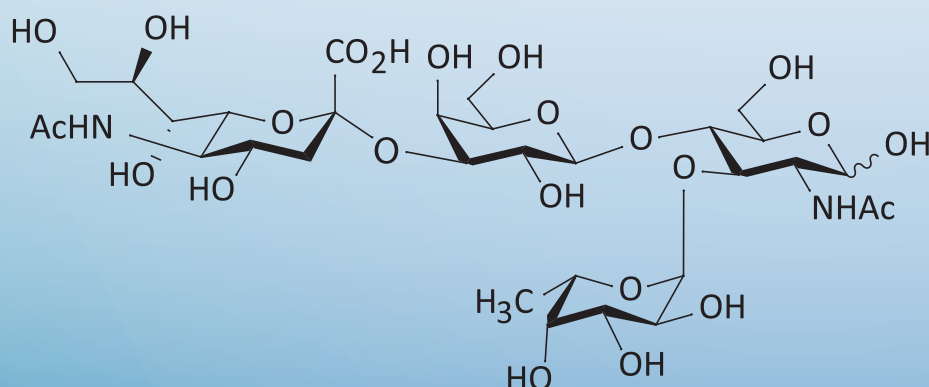
---

<sup>1</sup> Опис лиценци Креативне заједнице доступан је на адреси [creativecommons.org.rs/?page\\_id=74](https://creativecommons.org.rs/?page_id=74).

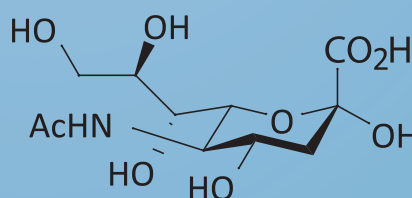


Mirjana Popsavin  
Velimir Popsavin

# MONOSAHARIDI I BIOAKTIVNI DERIVATI



sialil Lewis<sup>X</sup> (sLe<sup>X</sup>)



sijalna kiselina (N-acetil- $\alpha$ -neuraminska kiselina)



*Izdavač*

Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad

[www.pmf.uns.ac.rs](http://www.pmf.uns.ac.rs)

Za izdavača

Dekan PMF- u Novom Sadu

dr Milica Pavkov Hrvojević

*Recenzenti*

dr Marija Sakač, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

dr Gordana Četković, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

*Tehnička obrada slika i dizajn korica*

Nada Popsavin

Odlukom Nastavno-naučnog veća Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, broj 0602-88/6 od 2. februara 2018. godine „Monosaharidi i bioaktivni derivati“ je prihvaćen kao univerzitetski udžbenik za predmet Monosaharidi i bioaktivni derivati za studente treće i četvrte godine Osnovnih akademskih studija biohemije.

CIP - Каталогизација у публикацији

Библиотека Матице српске, Нови Сад

547.455(075.8)

**ПОПСАВИН, Мирјана**

Monosaharidi i bioaktivni derivati [Elektronski izvor] / Mirjana Popsavin, Velimir Popsavin. - Novi Sad : Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, 2018

Način dostupa

(URL): [https://www.pmf.uns.ac.rs/studije/epublikacije/hemija/popsavinm\\_popsavinv\\_monosaharidi\\_i\\_bioaktivni\\_derivati.pdf](https://www.pmf.uns.ac.rs/studije/epublikacije/hemija/popsavinm_popsavinv_monosaharidi_i_bioaktivni_derivati.pdf). - Nasl. sa pristupne stranice. - Opis izvora dana: 13.04.2018. - Bibliografija.

ISBN 978-86-7031-455-9

1. Попсавин, Велимир [аутор]

а) Органска хемија – Моносахариди

COBISS.SR-ID [322784519](https://www.pmf.uns.ac.rs/studije/epublikacije/hemija/popsavinm_popsavinv_monosaharidi_i_bioaktivni_derivati.pdf)



POSVETA

*Našoj deci i našim studentima*

## **Predgovor**

Odavno je poznato da ugljeni hidrati, uz proteine, predstavljaju najvažnije komponente žive ćelije. Većina dodirnih tačaka sintetičke, medicinske i biološke hemije nalaze se na raskrsnici nauke o ugljenim hidratima.

Poslednjih decenija razvoj bioorganske hemije je u punom zamahu. Bez sumnje, hemija ugljenih hidrata odigrala je veliku ulogu u ovom istorijskom napretku, a i u budućnosti će imati ključnu ulogu u većini oblasti biomedicinskih istraživanja o dejstvu lekova na molekularnom nivou.

Hemija ugljenih hidrata je bez sumnje značajna oblast organske hemije zbog biološkog značaja ovih jedinjenja i zbog njihove primene u nekoliko važnih industrijskih grana, kao što su farmaceutske proizvodi, hrana i biotehnologija.

Uloga ovih molekula u ćelijskoj komunikaciji je izuzetno značajna. Važni biomolekuli kao što su DNK i RNK, ili kofaktori ATP i NAD sadrže šećere u svojim strukturama. Takođe, značajan broj raznovrsnih prirodnih i sintetičkih glikozida se koriste kao antibiotici, antivirusni i antineoplastični agensi. Postoji i značajan broj hromoforičnih glikozida koji se koriste u molekularnoj biologiji kao supstrati za detekciju enzimske aktivnosti genskih markera.

Hemija ugljenih hidrata često je percipirana kao složena tema, ona je u stvari jednostavna i konzistentna i može se savladati sa nekoliko ključnih koncepata.

Veliku zahvalnost dugujemo recenzentima, dr Mariji Sakač (redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu) i dr Gordani Četković (redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu) na korisnim sugestijama i uloženom vremenu za pregledanje rukopisa ovog udžbenika.

Nadamo se da će ovaj udžbenik dodatno zainteresovati naše studente za izučavanje najrasprostranjenijih biomolekula u prirodi i da će ih motivisati da nastave da istražuju i proširuju znanje u oblasti monosaharida i njihovih biološki aktivnih derivata.

Ova knjiga je nastala od predavanja koja su slušali studenti osnovnih studija hemije i biohemije, na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, PMF-a u Novom Sadu.

Mart, 2018.

Autori

**SADRŽAJ**

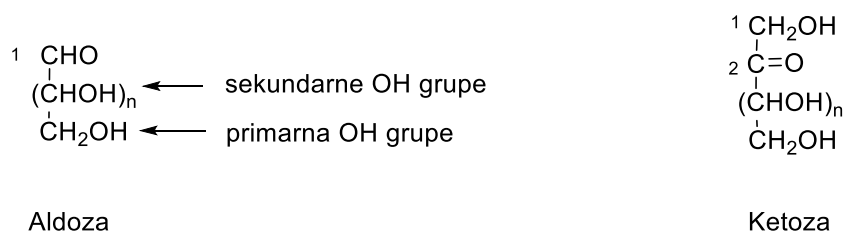
Poglavlje 1. UVOD .....	1
1.1. Načini prikazivanja strukture monosaharida .....	2
1.1.1. Aciklične forme monosaharida .....	2
1.1.2. Konformacije i ciklične forme monosaharida.....	3
1.1.3. Određivanje anomerne konfiguracije.....	12
1.1.4. Određivanje apsolutne konfiguracije kod heksofuranoza.....	13
1.1.5. Primeri načina prikazivanja acikličnih formi monosaharida .....	15
Poglavlje 2. NOMENKLATURA MONOSAHARIDA I DERIVATA .....	16
2.1. Više aldoze.....	17
2.2. Ketoze ili uloze .....	18
2.3. Amino-šećeri.....	20
2.4. Račvasti šećeri .....	22
2.5. Glikozidi .....	23
2.6. C-glikozil-jedinjenja .....	23
2.7. Zamena kiseonika iz prstena drugim elementom.....	24
2.8. Alditoli .....	26
2.9. Aldoketoze (ketoaldoze, alduloze).....	26
2.10. Acetali, ketali i njihovi analozi .....	27
2.11. Ciklični acetali i ketali .....	28
2.12. Aldonske kiseline.....	29
Poglavlje 3. HEMIJSKA GLIKOBIOLOGIJA .....	30
3.1. Glikokod .....	31

Poglavlje 4. GLIKOPROTEINI.....	32
4.1. Rad sa ugljenim hidratima .....	39
Poglavlje 5. LEKTINI.....	44
5.1. Šećeri kod inflamatornih procesa.....	45
5.2. C-Glikozil-amino kiseline.....	50
Poglavlje 6. PROTEOGLIKANI .....	52
Poglavlje 7. MODIFIKOVANI UGLJENI HIDRATI I ŠEĆERNI ANALOZI.....	58
7.1. Modifikacije.....	58
7.2. Klasifikacija ugljenih hidrata sa modifikacijom anomerne funkcije .....	59
Poglavlje 8. GLIKOZIDI .....	62
8.1. C-Glikozidi .....	62
8.2. C-Nukleozidi.....	63
8.3. Sinteze C-nukleozida sa pirazolskim heterocikličnim bazama.....	64
8.4. Sinteze 4-supstituisanog pirazola.....	64
8.5. Sinteza C-nukleozidnog antibiotika šoudomicina .....	67
Poglavlje 9. HOMONUKLEOZIDI I ZNAČAJ SINTEZE OLIGONUKLEOTIDA .....	73
9.1. Sinteza i proučavanje termičke stabilnosti oligonukleotida koji sadrži $\beta$ -C-nukleozidni analog Fapy dG .....	73
Poglavlje 10. ANTIVIRUSNI AGENSI.....	85
10.1. Ribavirin .....	85
10.1.1. Mehanizam delovanja ribavirina.....	85
10.1.2. Dizajn proleka i metabolitička inaktivacija ribavirina.....	87
10.1.3. Sinteza ribavirina .....	89
Poglavlje 11. ŠEĆERI KAO CILJNI MOLEKULI LEKOVA. AZA ŠEĆERI .....	91

11.1. Mehanizam delovanja enzima za procesuiranje složenih ugljenih hidrata .....	91
11.2. Inhibitori glikozidaza i glikoziltransferaza .....	93
11.2. Dobijanje aza šećera aminacijom niza ili anomernog centra.....	99
11.3. Biosinteza aza šećera .....	103
Poglavlje 12. HEMOENZIMSKA SINTEZA ŠEĆERNIH MIMETIKA .....	104
12.1. Formiranje C-C veze aldolnom kondenzacijom katalizovanom aldolazama ....	104
LITERATURA .....	108

## Poglavlje 1. UVOD

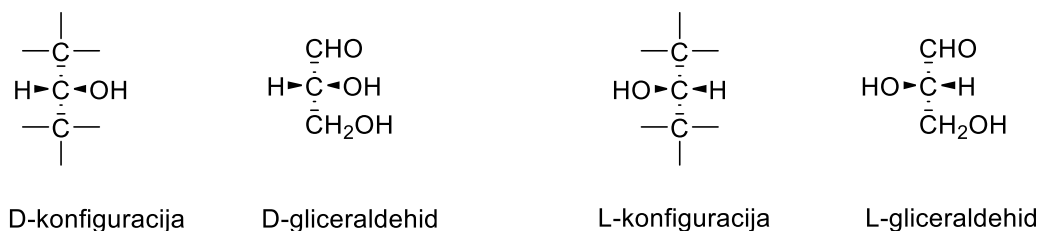
Monosaharidi su polihidroksilni aldehidi i ketoni koji u svojim ugljeničnim skeletima sadrže od četiri do devet ugljenikovih atoma (najčešće 5 i 6). U zavisnosti od broja ugljenikovih atoma, monosaharidi se nazivaju tetroze (4 C-atoma), pentoze (5 C-atoma), heksoze (6 C-atoma), heptoze (7 C-atoma) itd, dok se u zavisnosti od prirode karbonilne grupe oni zovu aldoze (kada je karbonilna grupa u sklopu aldehydne funkcije) i ketoze (kada je karbonilna grupa u sklopu keto funkcije). Stoga možemo imati aldo-heksoze ili keto-heksoze.



**Slika 1.1.** Tipovi karbonilnih i alkoholnih grupa u acikličnim formama monosaharida

Najjednostavnijim monosaharidima odgovara opšta formula  $C_nH_{2n}O_n$ , odnosno  $C_n(H_2O)_n$  („hidratne forme ugljenika“), pa su saglasno tome dobili naziv ugljeni hidrati. Međutim, neki derivati monosaharida mogu imati veći ili manji broj kiseonikovih, odnosno vodonikovih atoma nego što je predstavljeno opštom formulom (npr. aldonske kiseline, nezasićeni monosaharidi). Takođe mogu sadržavati i neke druge elemente koji nisu prisutni u opštoj formuli (Cl, N, S itd). Karbonilni ugljenik se numerički najmanjim brojem u skeletu (npr. brojem 1 kod aldoza, odnosno brojem 2 kod ketoza, pošto keto grupa ne može biti u terminalnom položaju).

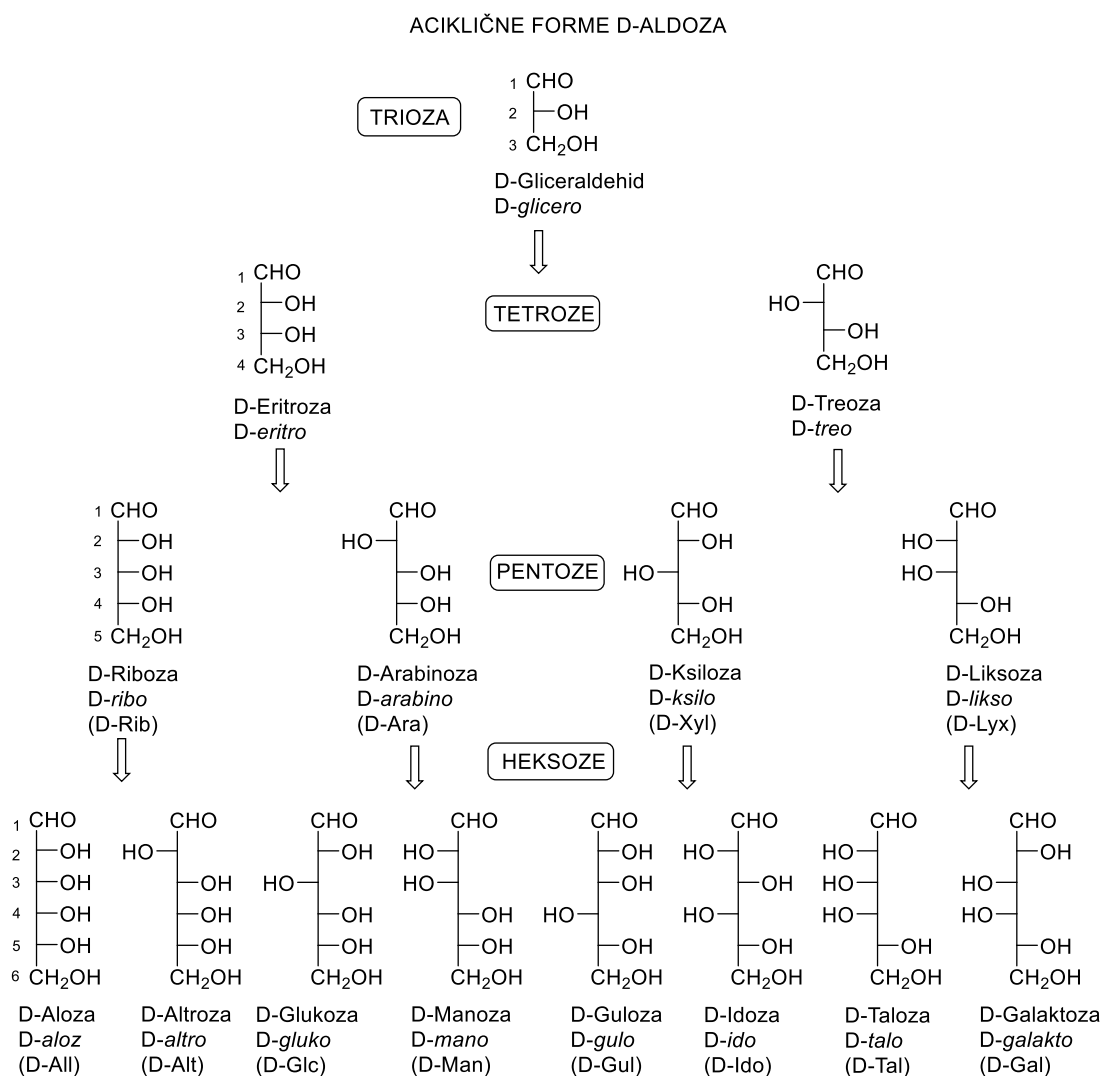
Monosaharidi su hiralni molekuli i mogu imati 2 ili više stereocentara koji su najčešće hidroksimetilenski ugljenici. Zbog praktičnih razloga termin asimetričan ugljenik zamenjen je sa terminom stereocentar. Konfiguracija hiralnog centra koji nosi najveći redni broj (najudaljeniji od karbonilne grupe anomernog centra) određuje kojoj seriji pripada neki monosaharid (D- ili L-serija). Ako je konfiguracija ovog ugljenika ista kao kod D-glicerinaldehida taj monosaharid pripada D-seriji; u suprotnom kada je konfiguracija identična sa istom od L-glicerinaldehida, monosaharid pripada L-seriji (Slika 1.2).



Slika 1.2. Stereohemija označena sa D i L deskriptorima

## 1.1. Načini prikazivanja strukture monosaharida

### 1.1.1. Aciklične forme monosaharida



Slika 1.3. Fišerove formule, trivijalni nazivi, konfiguracioni prefiksi (napisani *italic*) i usvojeni skraćeni simboli (dati u zagradi) osnovnih D-aldoza. L-Forme predstavljaju lik u ogledalu prikazanih Fišerovih projekcionih formula

Čuveni hemičar Emil Fišer (E. Fischer) prvi je primenio 1891. godine dvodimenzionalni prikaz 3D oblika hiralnih molekula monosaharida. Konvencija ovakvog prikazivanja je da horizontalne linije predstavljaju veze koje izlaze iz ravni papira a vertikalne linije su veze koje su iza ravni papira.

Sa povećanjem broja asimetričnih ugljenikovih atoma (stereocentara), povećava se i broj stereoisomera. Tako na primer, kod trioza, koje sadrže jedan stereocentar, postoji jedan par enantiomera (ukupno dva stereoisomera D- i L-apsolutne konfiguracije); tetroze sadrže dva stereocentra pa stoga postoji dva para enantiomera (ukupno četiri stereoisomera); pentoze sadrže tri stereocentra pa stoga postoji četiri para enantiomera (ukupno osam stereoisomera); kod heksoza koje sadrže četiri stereocentra postoji osam parova enantiomera (ukupno šesnaest stereoisomera). Ukupni broj stereoisomera se može izračunati pomoću izraza:  $2^n$  (gde  $n$  predstavlja broj stereocentara u molekulu).

### ***1.1.2. Konformacije i ciklične forme monosaharida***

Postojanje cikličnih formi monosaharida je prihvaćeno veoma rano pošto se veliki broj reakcija nije mogao objasniti sa acikličnim formama. Tako, acetilovanjem aldoheksoza dobijaju se dva izomerna penta-*O*-acetyl derivata [1,2], dok bi aciklična forma trebala da daje samo jedan penta-*O*-acetyl derivat. Reakcija metanolnog rastvora hlorovodonika sa aldozama daje dva izomerna OMe derivata, što znači da u reakciji ne nastaje dimetilacetal na aldehidnoj grupi aciklične forme aldoze [3]. Dalje, reaktivnost aldehidne grupe aldoza je mala, pa čak ne reaguju ni sa Schiffovim reagensom osim pri specijalnim reakcionim uslovima [4]. Na kraju, Tanre (Tanret) je uspeo da izoluje dve forme D-glukoze koji podležu interkonverziji u vodenom rastvoru [5]. Neobično slabu reaktivnost karbonilne grupe aldoza objasnio je Tolens (Tollens) [6] koji je postulirao ciklične strukture, i predložio je, bez dokaza, postojanje tetrahidrofuranskog prstena u strukturama aldoza. Čuveni engleski hemičar Norman Hejvort (N. Haworth) je kasnije korigovao ove tetrahidrofuranske formule u tetrahidropiranske i uveo je novi način prikazivanja cikličnih struktura monosaharida [7].

Alkoholi veoma lako reaguju sa aldehidima i formiraju hemiacetale (Šema 1.1). Hejvort je dokazao da aciklične formule glukoze (i drugih aldoheksoza i aldopentoza) mogu

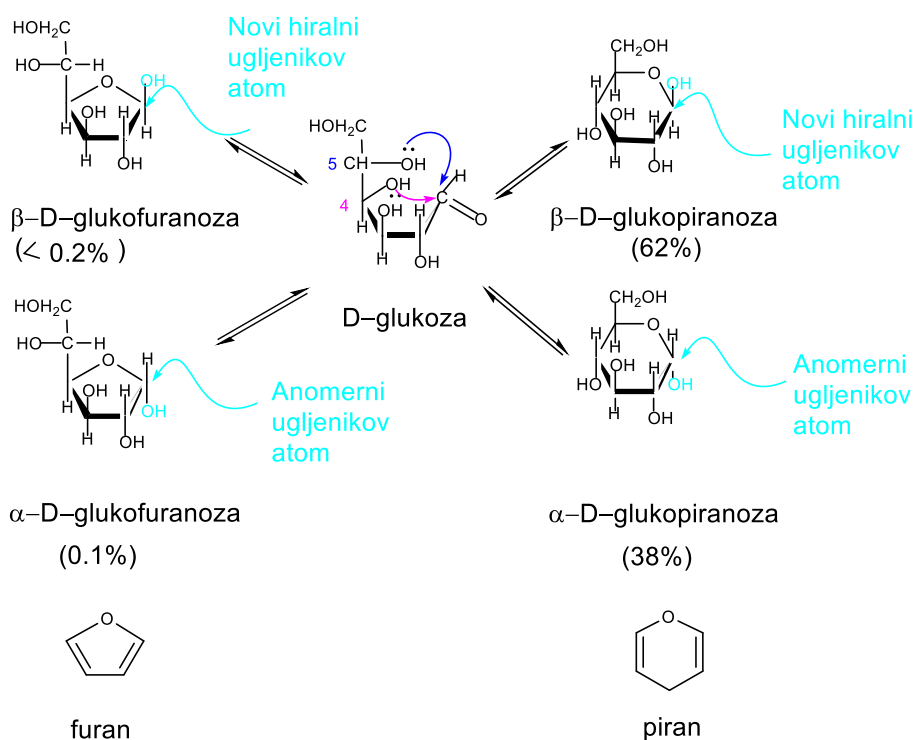
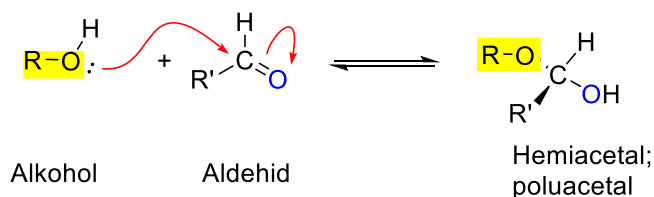


podleći sličnoj intramolekularnoj reakciji uz formiranje cikličnih hemiacetala (poluacetala). Ako se ova reakcija aldehidne grupe ostvaruje sa hidroksilnom grupom na petom ugljenikovom atomu, nastaje šestočlani prsten sa kiseonikom kao heteroatomom koji je sličan piranu i stoga naziva piranoza.

Isto tako i hidroksilna grupa sa četvrtog ugljenikovog atoma može reagovati sa aldehidnom grupom aciklične forme uz građenje petočlanog heterocikla (zove se furanoza zbog sličnosti sa aromatičnim furanom).

Na sličan način, ketoni mogu reagovati sa alkoholima uz građenje hemiketala. Analogna intramolekularna reakcija ketoze, kao npr. fruktoze, omogućava formiranje cikličnog hemiketala (Šema 1.2). Ove ciklične furanozne i piranozne forme su dominantne strukture monosaharida u vodenim rastvorima. U vodenim rastvorima monosaharida postoji ravnoteža između aldehidne ili ketonske aciklične forme i piranoznih i furanoznih cikličnih formi. Aciklična forma je mnogo manje zastupljena (ima je manje od 1%) u odnosu na piranozne ili furanozne strukture, ali je značajna jer se ova interkonverzija cikličnih struktura ostvaruje preko aciklične forme, nakon otvaranja prstena.

## Nukleofilna adicija OH na karbonilnu grupu

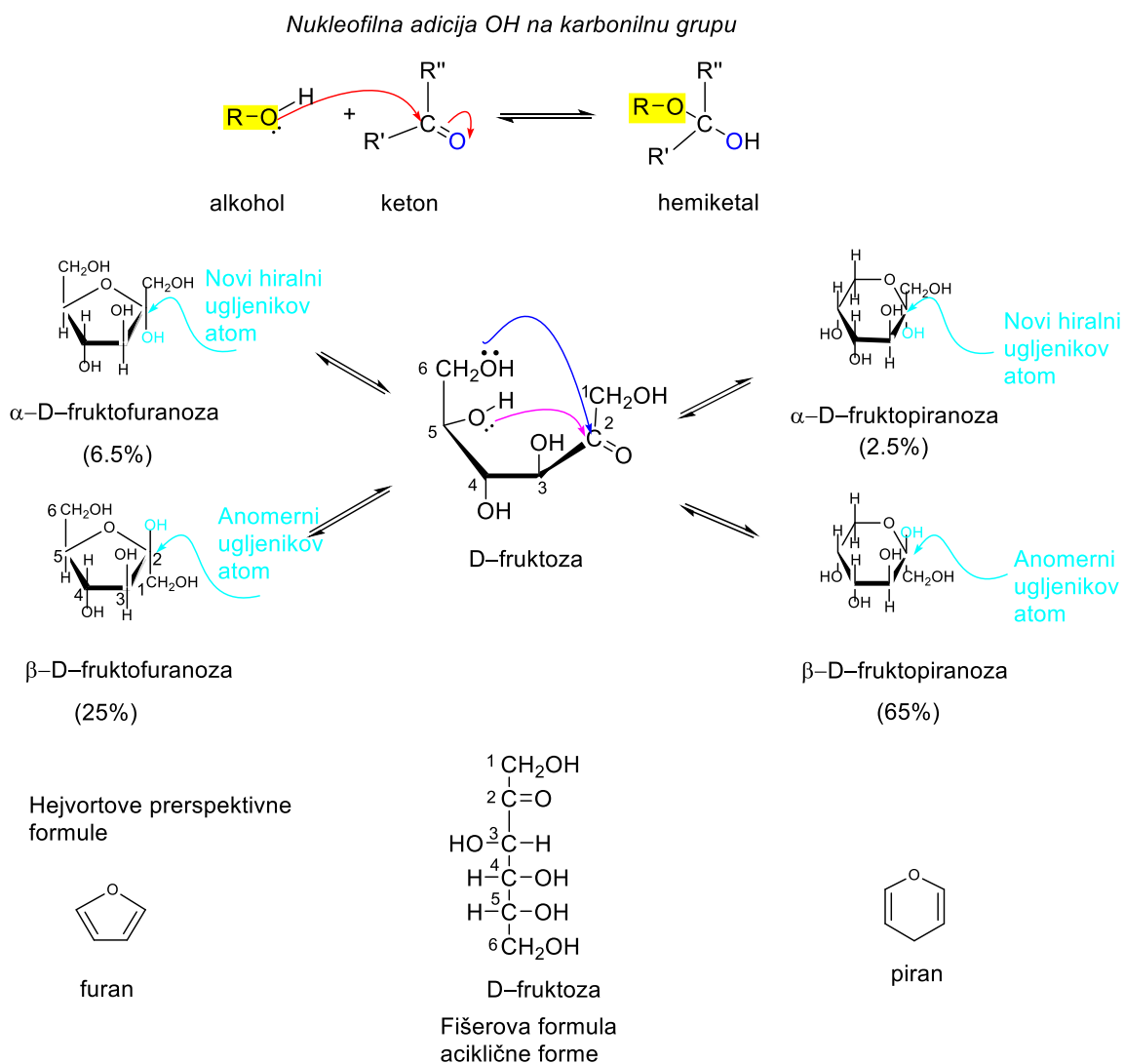


**Šema 1.1.** Aciklična forma D-glukoze podleže intramolekularnoj reakciji uz formiranje cikličnih hemiacetala. Ciklizacijom u šestočlani ili petočlani oblik nastaje još jedan stereocentar i po dva izomera u svakoj cikličnoj strukturi. Procenti ispod formula u zagradama označavaju procentualni udeo svake ciklične forme na 31 °C [9].

Kada se formira hemiacetal ili hemiketal, ugljenikov atom iz karbonilne funkcije postaje novi stereocentar. Izomeri monosaharida koji se razlikuju po konfiguraciji na tom ugljenikovom atomu nazivaju se  **$\alpha$ -** i  **$\beta$ -anomeri**.

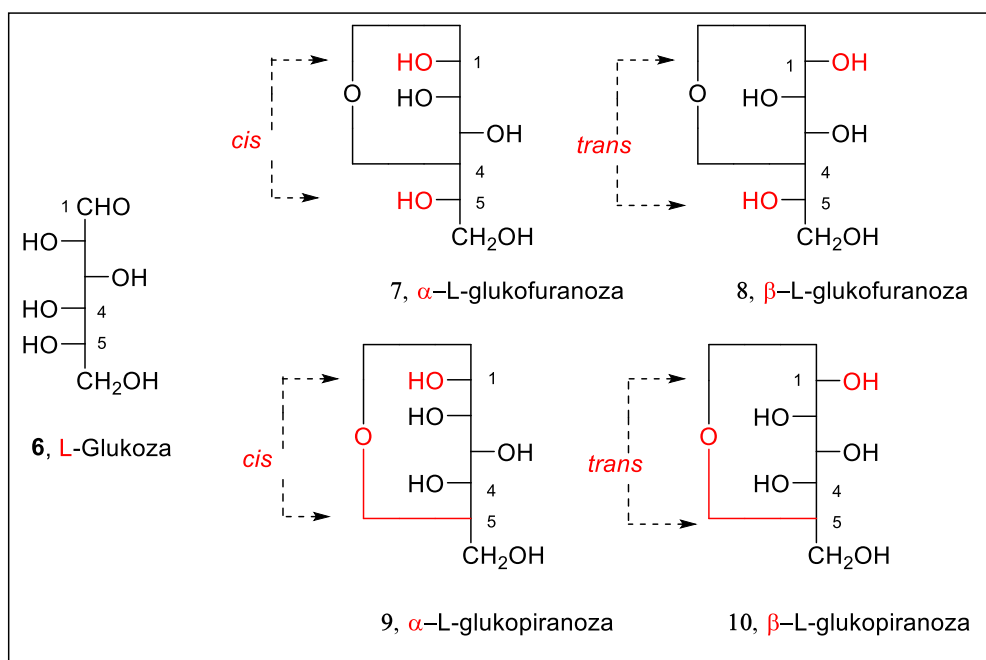
U rastvorima aldoheksosa i aldopentoza dominantan udeo imaju piranozni oblici zbog veće stabilnosti šestočlanog prstena. Zavisno od uslova glukoza može kristalirati iz rastvora u obliku  $\alpha$ - ili  $\beta$ -anomera. Međutim sveže pripremljeni vodeni rastvori bilo koje anomerne forme imaju karakterističnu optičku rotaciju koja se vremenom menja dok ne

dostigne konstantnu vrednost (posle 48 časova). Ova promena optičke rotacije zove se **mutarotacija** (lat. *mutare*, menjati) i ukazuju na molekulske promene koje se ostvaruju u rastvorima. Kada se postigne konačna vrednost optičke rotacije znači da je postignuta ravnotežna smesa  $\alpha$ - i  $\beta$ -oblika piranoznih i furanoznih struktura koje su navedene na Šemama 1.1. i 1.2. Pojava mutarotacije se uočava i kod ostalih heksoza i pentoza, kao i kod redukujućih disaharida i viših oligosaharida (sa slobodnom poluacetalnom OH grupom).



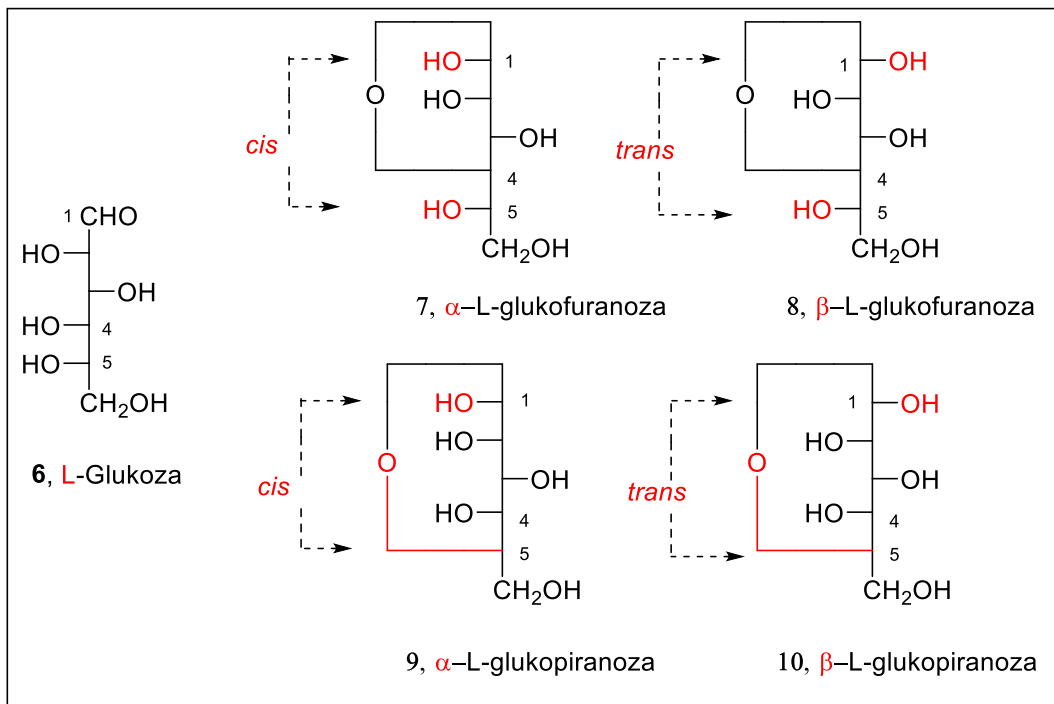
**Šema 1.2.** Aciklična forma D-fruktoze podleže intramolekulskoj reakciji uz formiranje cikličnih hemiketala u rastvoru. Mutarotacijom se ostvaruje izomerizacija na anomernom centru preko aciklične forme. Procenti ispod formula u zagradama označavaju procentualni udeo svake ciklične forme na 31 °C [9].

Anomeri **D-serije** monosaharida, kod kojih je poluacetalna hidroksilna grupa orijentisana ispod ravni prstena, nazivaju se  **$\alpha$ -anomeri**, a oni kod kojih je ova hidroksilna grupa orijentisana iznad ravni prstena su  **$\beta$ -anomeri**. Konfiguracija anomernog centra, u Fišerovoj projekcionoj formuli određuje se na osnovu orijentacije anomerne hidroksilne grupe (ili nekog drugog supstituenta) u odnosu na kiseoničnu grupu na najudaljenijem stereocentru (C-4 kod pentoza, C-5 kod heksoza). Ako su ove dve grupe sa iste strane u odnosu na vertikalnu liniju koji predstavlja ugljenični skelet (*cis*), anomer je  **$\alpha$**  (**2 i 4** kod D-serije a **7 i 9** kod L-serije). Međutim ako su oni sa suprotne strane (*trans*), anomer je  **$\beta$**  (**3 i 5** kod D-serije a **8 i 10** kod L-serije; Slika 1.4a. i Slika 1.4b).

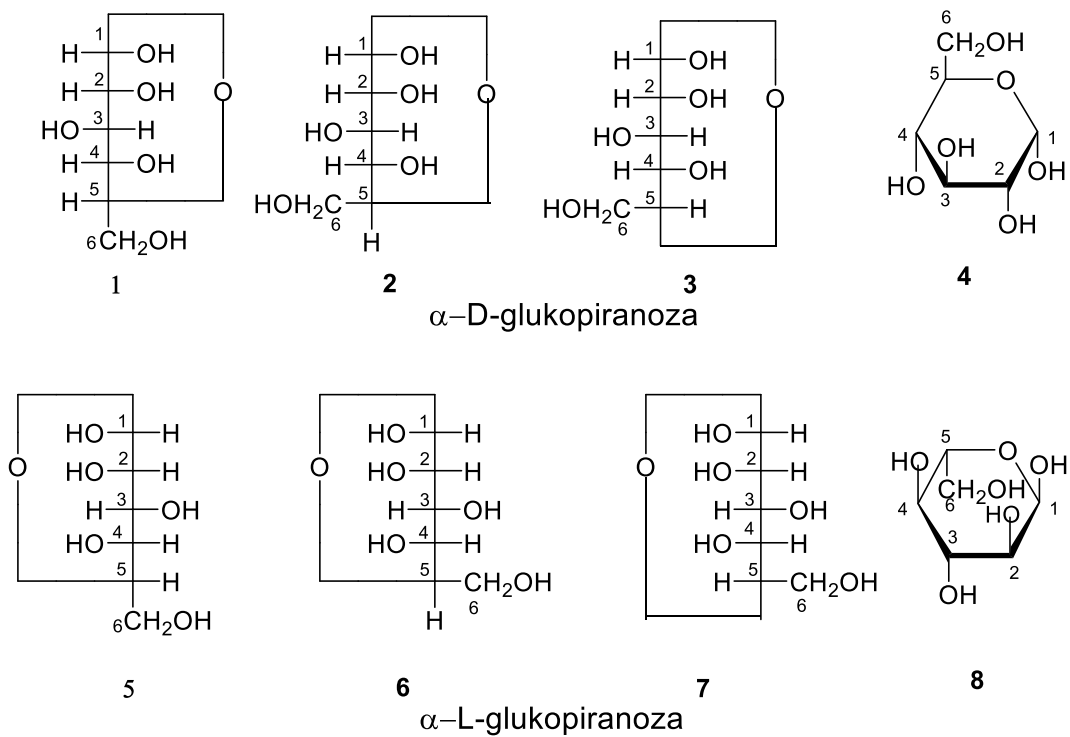


**Slika 1.4a.** Ciklične forme D-glukoze prikazane Fišerovim projekcionim formulama i određivanje anomernih konfiguracija.

Na Shemi 1.1. i 1.2. ciklične forme D-glukoze i D-fruktoze prikazane su takozvanim Hejvortovim perspektivnim formulama koje su takođe u primeni uprkos ozbiljnim nedostacima (u ovim formulama uglovi ugljeničnih valenci od  $109^\circ$  su ignorisane pošto su uglovi C-C veza u šećernom prstenu  $120^\circ$ , a uglovi C-H i C-OH su  $90^\circ$ ). Međutim, Hejvort, kao i Fišer pre njega, nisu želeli da prikažu pravi oblik molekula, već da opišu konfiguracioni odnos pojedinih asimetričnih ugljenika [8]. Konverzija Fišerovih u Hejvortove formule je data na Slici 1.5. na primeru molekula  $\alpha$ -D- i  $\alpha$ -L-glukopiranoze.



Slika 1.4b. Ciklične forme L-glukoze prikazane Fišerovim projekcionim formulama i određivanje anomernih konfiguracija.



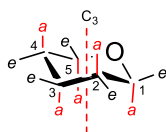
Slika 1.5. Postupak prevođenja Fišerovih (1,5) u Hejvortove (4,8) formule na primeru  $\alpha$ -D- i  $\alpha$ -L-glukopiranoze

Hejvortova perspektivna formula može se dobiti iz Fišerove projekcione formule na sledeći način: Vodonik sa C-5 promeni mesto sa C-5 hidroksimetilnom grupom u strukturama **1** i **5** pri čemu se dobijaju strukture **2** i **6** (**1**→**2**; **5**→**6**). Zatim sledi promena mesta vodonika sa C-5 i C-5 kiseonika, pri čemu se dobijaju strukture **3** i **7** (**2**→**3**; **6**→**7**). Na taj način kiseonična veza se sada nalazi normalno iza glavnog niza (tj. ispod ravni hartije) a horizontalne veze i dalje označavaju grupe koje se nalaze iznad ravni hartije. Obrtanjem formula **3** i **7** tako da tetrahidropiranski prsten bude u ravni upravnoj na ravan hartije, a etarski kiseonik pozadi desno (tj. obrtanjem nadesno iz vertikalnog u horizontalni položaj), dobijaju se perspektivne formule (**4** i **8**; **3**→**4**; **7**→**8**). Prema tome, sve grupe koje su u Fišerovim formulama **3** i **7** sa desne strane, u Hejvortovim perspektivnim formulama (**4**, **8**) su orijentisane ispod ravni prstena, a one koje su bile sa leve strane, biće iznad ravni prstena [10].

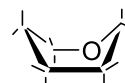
Mada su Hejvortove perspektivne formule veoma pogodne za prikazivanje cikličnih formi one imaju nedostatak što prikazuju monosaharide kao planarne molekule što ne odgovara stvarnosti. Naime zbog C-C-C tetraedarskog ugla od  $\sim 109^\circ$  i C-O-C ugla u piranoznom prstenu od  $112-114^\circ$ , analogno cikloheksanu, šestočlani piranozni prsteni mogu postojati u konformaciji stolice ili kreveta (kade, lađe). Oblik lađe je manje stabilan, pa je glavni konformer piranoza najčešće stoličasti oblik. Iako usled inverzije stolice mogu postojati dve stoličaste konformacije, aldoze uglavnom egzistiraju u jednoj, dominantnoj. Supstituenti u ovim strukturama mogu imati ekvatorijalan (radijalan položaj u odnosu na glavnu,  $C_3$  obrtnu osu molekula, odnosno zaklapaju sa njom tetraedarski ugao) ili aksijalan položaj (paralelan položaj u odnosu na obrtnu  $C_3$  osu).

Favorizovana (dominantna) stoličasta konformacija biće ona u kojoj je veći broj velikih supstituenata u ekvatorijalnom položaju. Za tipičnu piranozu, kao što je  $\beta$ -D-glukopiranoza, postoje dve moguće stoličaste konformacije (Šema 1.3). Od svih aldoheksosa,  $\beta$ -D-glukoza je jedina koja može zauzeti konformaciju sa svim velikim supstituentima u ekvatorijalnom položaju. Zbog ove prednosti u stabilnosti, nije iznenađujuće da  $\beta$ -D-glukoza je najrasprostranjeniji strukturni fragment u prirodi i dominantna heksoza u metabolizmu ugljenih hidrata.

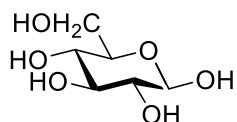
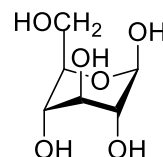
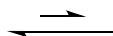
molekulska obrtna osa

stoličasta  
konformacija

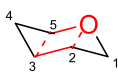
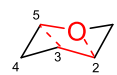
$a$  = aksijalna veza  
 $e$  = ekvatorijalna veza

konformacija  
kade

(a)

 ${}^4C_1$  konformacija  
 $\beta$ -D-glukopiranoze ${}^1C_4$  konformacija  
 $\beta$ -D-glukopiranoze

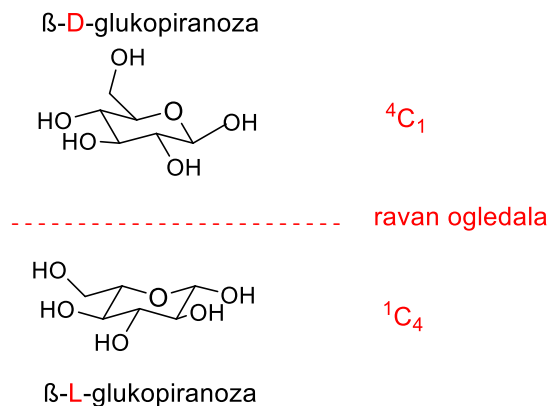
(b)

 ${}^4C_1$  konformacija  
piranoze ${}^1C_4$  konformacija  
piranoze

(c)

**Šema 1.3.** (a) Stoličasta i krevetasta konformacija piranoza. (b) dve moguće stoličaste konformacije  $\beta$ -D-glukoze koje nastaju inverzijom stolice uz promenu položaja supstituenta iz ekvatorijalnog u aksijalni. Manje stabilna konformacija je ona sa aksijalnim voluminoznim supstinentima. (c) Crvenom bojom je prikazana glavna (referentna ravan) za opis konformacija piranoza.

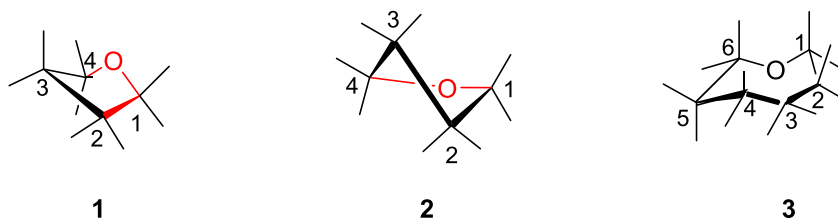
Stoličasta konformacija piranoza se po konvenciji simbolično obeležava sa C a da bi se opisao konformer mora se odrediti referentna ravan gde se nalaze četiri atoma iz prstena sa obaveznim kiseonikovim atomom. Atom iz prstena koji se nalazi iznad referentne ravni (numerisanje se vrši u smeru kazaljke na satu) piše se kao superskript, zatim sledi simbol za stoličastu konformaciju, dok se atom iz prstena koji nalazi ispod referentne ravni piše kao subskript. Slično cikloheksanu i kod piranoznih struktura je moguća interkonverzija stoličastih konformera preko različitih intermedijernih konformacija. U kojoj će stoličastoj konformaciji pretežno egzistirati neka aldoheksopiranoza uglavnom zavisi od toga u kojoj konformaciji je hidroksimetil grupa (kod heksoza C-6), kao najveći supstinent), orijentisana ekvatorijalno. Tako  $\beta$ -D-glukopiranoza skoro isključivo egzistira u  ${}^4C_1$  konformaciji sa najvećim supstinentom (hidroksimetil grupom) u ekvatorijalnom položaju, dok je  $\beta$ -L-glukopiranoza je pretežno u  ${}^1C_4$  konformaciji (Slika 1.6).



**Slika 1.6.** U kojoj od stoličastih konformacija će se aldeheksopiranoza predominantno nalaziti zavisi od orijentacije najvećeg ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ) supstituenta [11].

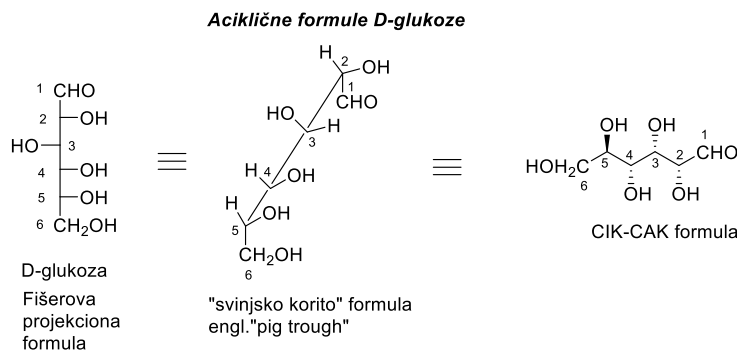
Sledeći prsten u kojemu se mogu naći neke heksoze i pentoze je furanozni prsten. Ovaj prsten je malo nabran i egzistira uglavnom u dva oblika, dominantniji oblik je konformacija koverta (E; *engl.* envelope), a manje zastupljeni oblik je uvijena konformacija (T; *engl.* twist) (Slika 1.7). Za oblik koverta, konformacija se definiše na osnovu atoma koji je iznad ili ispod ravni ostalih atoma prstena (prikazano crvenom bojom). Tako, za **1** (Slika 1.7) konformacija je  ${}^3E$  pošto je C-3 iznad ravni ostalih atoma (C-1, C-2, C-4 i O). Glavna ravan za uvijenu formu **2** (Slika 1.7) je određena prisustvom C-1, C-4 i O i stoga se konformacija simbolično označava sa  ${}^3T_2$ .

Pod normalnim uslovima, septanozni prsteni uopšte ne postoje osim u slučajevima viših monosaharida (sadrže sedam ili više C-atoma) gde su C-4 i C-5 hidroksilne grupe derivatizovane ili zamenjene. Konformacija septanoze je između stoličaste i uvijene stoličaste forme kako je prikazano na slici 1.7 (formula **3**).

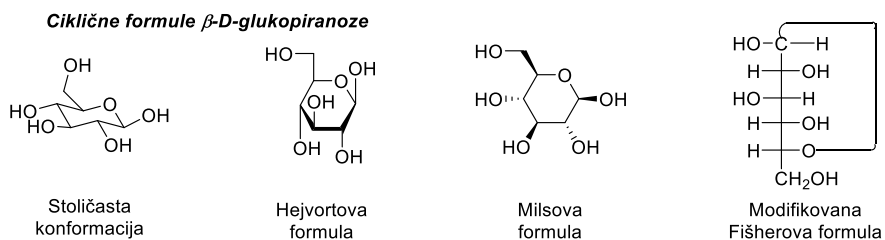


**Slika 1.7.** Konformacije furanoznih i septanoznih prstena [11]





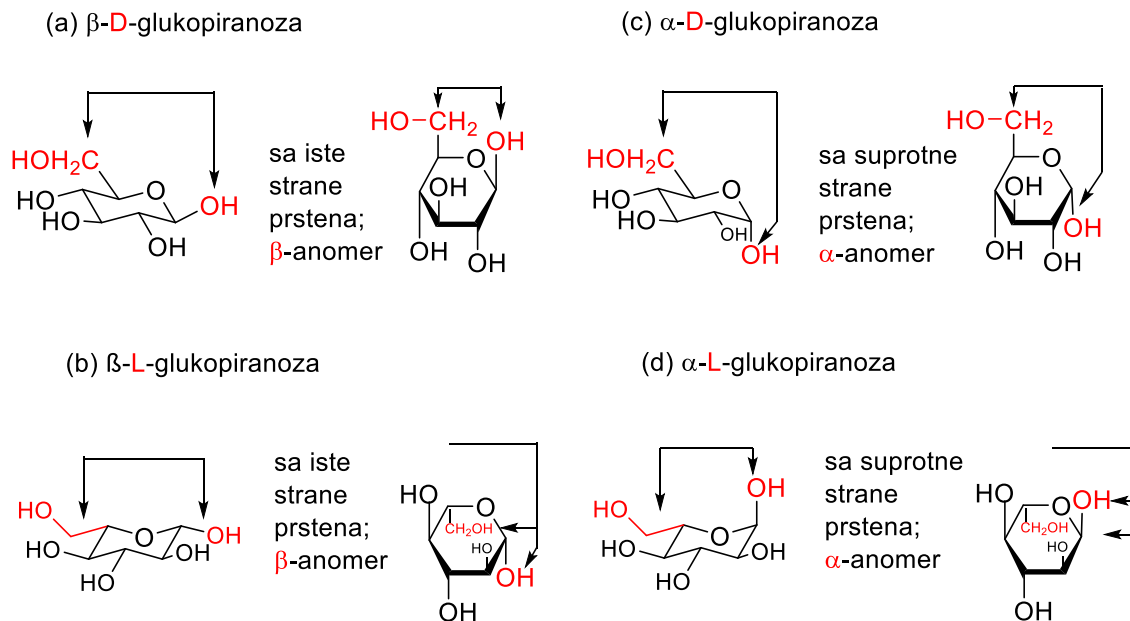
Aciklične formule D-glukoze mogu se predstaviti Fišerovom projekcionom formulom. Svaki C-atom je u ravni papira sa dva supstituenta sa leve i desne strane, koji su usmereni prema posmatraču. Susedni ugljenici (iznad i ispod posmatranog ugljenika u nizu) nalaze se iza ravni papira. Ovo je najnestabilnija moguća konformacija u kojoj su supstituenti na susednim C-atomima eklipsni. Rotacijom oko C-C veza dobija se CIK-CAK prikaz aciklične forme gde su supstituenti orijentisani prema posmatraču (puna linija), ili su usmereni iza ravni papira (prikaz a, isprekidana linija). Najlakši način prevođenja Fišerove formule u CIK-CAK formulu je da se prvo nacrtaju ugljenični skelet (u CIK-CAK obliku), a zatim se supstituent na ugljeniku orijentisanom prema gore, prikazuje punom linijom ako je u Fišerovoj formuli sa desne strane. Međutim ugljenik koji je u datom ugljeničnom nizu orijentisan prema dole, a ugljenične veze skeleta su orijentisane prema gore u CIK-CAK formuli, tada se supstituent koji je u Fišerovoj formuli sa desne strane u CIK-CAK formuli prikazuje isprekidano.



**Slika 1.8.** Različiti načini prikazivanja cikličnih oblika monosaharida [12, 13].

### 1.1.3. Određivanje anomerne konfiguracije

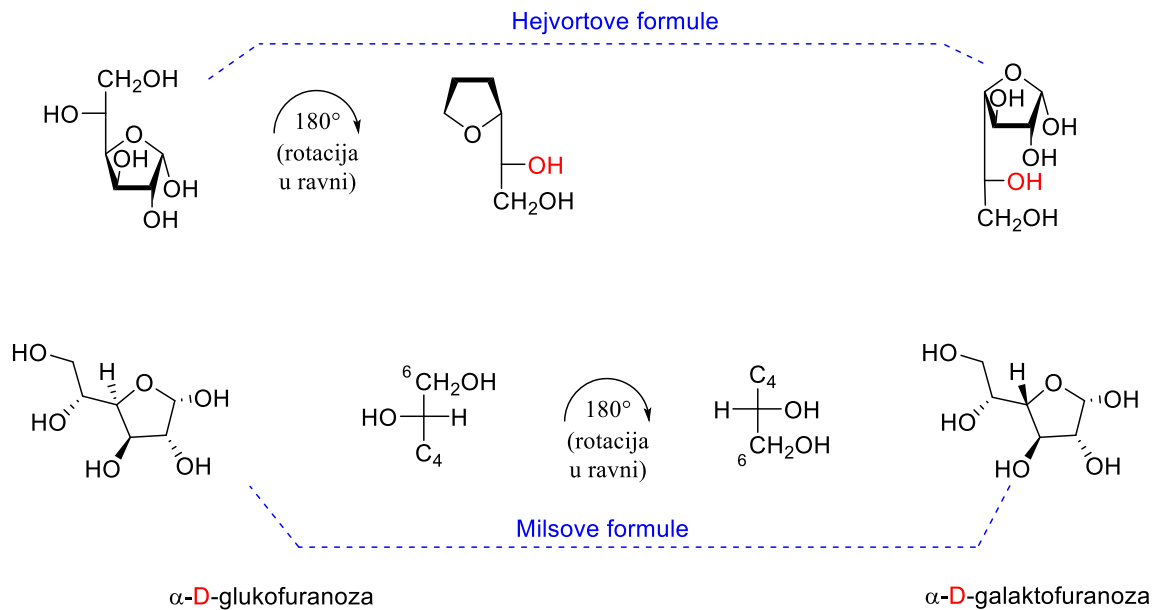
Određivanje anomerne konfiguracije koja predstavlja orijentaciju i relaciju supstituenta na C-1 (kod aldoza) ili na C-2 (kod ketoza) sa apsolutnom konfiguracijom monosaharida možemo prikazati primenom Hejvortovih ili konformacionih formula (Slika 1.9). Kod heksopiranoza apsolutna konfiguracija (D, L) se određuje na sledeći način: ako su C-6 supstituenti orijentisani prema gore, radi se o D-konfiguraciji, dok dole orijentisani C-6 odgovara L-konfiguraciji. β-Anomerna konfiguracija podrazumeva *cis* odnos C-1 i C-6 supstituenata u obe serije, dok *trans* odnos pomenutih grupa odgovara α-anomeru.



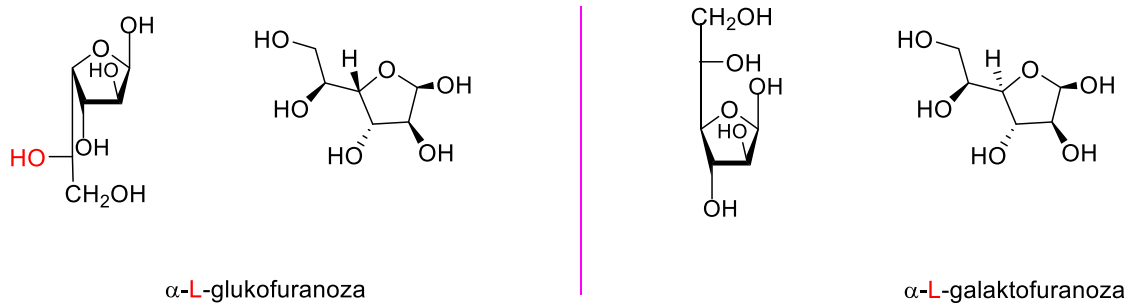
Slika 1.9. Grafički prikaz određivanja anomerne konfiguracije [12]

#### 1.1.4. Određivanje apsolutne konfiguracije kod heksofuranoza

Prilikom korišćenja Hejvortovih formula heksofuranoza (D-glukofuranoza, D-altrofuranoza, D-alofuranoza, D-manofuranoza) poslednji hiralni centar se rotacijom dovodi u poziciju kao što smo to radili kod Fišerovih formula, pa na identičan način, kao što je ranije opisano, određujemo konfiguraciju. Kod galaktofuranoze (takođe i kod D-gulofuranoze, D-idofuranoze, D-talofuranoze) dvouglenični bočni niz je orijentisan kao što smo navikli kod Fišerovih formula (prema dole) te direktno određujemo konfiguraciju na osnovu orijentacije supstituenta na poslednjem hiralnom centru. U L-monosaharidnoj seriji situacija je obrnuta. Naime, kod L-glukofuranoze, L-altrofuranoze, L-alofuranoze i L-manofuranoze dvouglenični bočni niz (C-5 i C-6) je dole orijentisan te direktno određujemo konfiguraciju. Kod korišćenja Milsovih formula bočni niz je najbolje prvo napisati u projekcionoj formi pa onda kod obe dole navedene heksofuranoze moramo izvršiti odgovarajuću rotaciju (Slika 1.10). Anomerna konfiguracija se zatim određuje na način kako je opisano na strani 6.



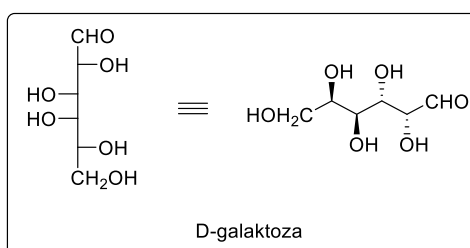
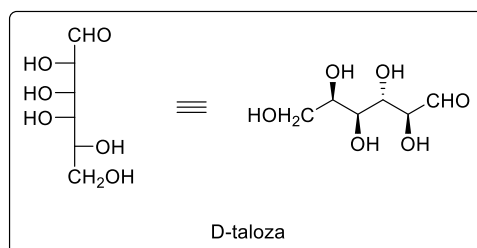
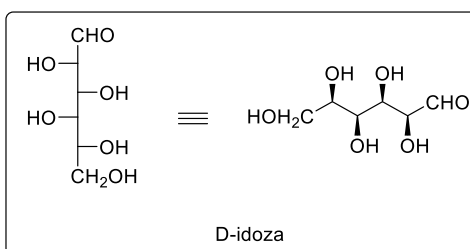
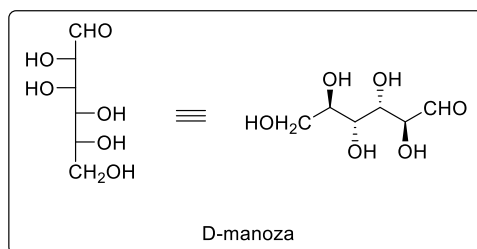
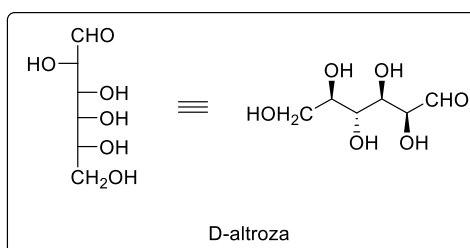
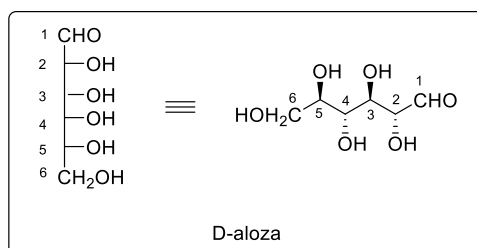
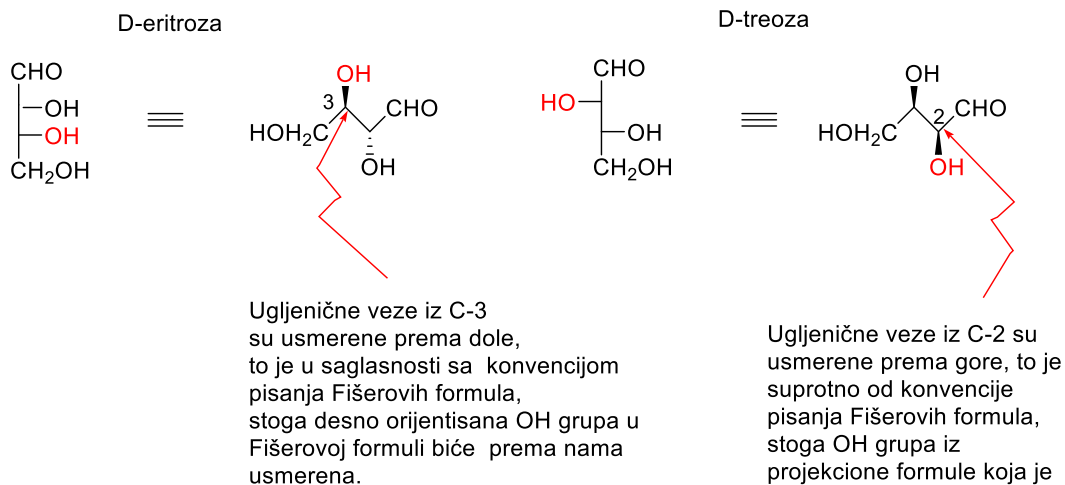
Primeri iz L-serije gore navedenih heksofuranosa



**Slika 1.10.** Određivanje apsolutne konfiguracije kod heksofuranosa.

### 1.1.5. Primeri načina prikazivanja acikličnih formi monosaharida

CIK-CAK formulule nekih monosaharida



**Slika 1.11.** CIK-CAK (engl. *zig-zag*) prikaz acikličnih formi monosaharida prikazuje konformaciju gde su supstituenti raspoređeni u prostoru dok Fišerove formule prikazuju supstituente u najnestabilnijoj, eklipsnoj orijentaciji. Važno je znati koristiti oba tipa acikličnih formi.

## **Poglavlje 2. NOMENKLATURA MONOSAHARIDA I DERIVATA**

Za sveobuhvatan opis nomenklature ugljenih hidrata videti referencu [14]. Nomenklatura primenjena u ovom udžbeniku se bazira na IUPAK pravilima, koja su značajno skraćena i ograničena samo na monosaharide i odabrane derivate.

### **Trivijalni nazivi**

Trivijalni nazivi acikličnih aldoza sa tri, četiri, pet i šest ugljenikovih atoma dati su na Slici 1.3.

Trioze: gliceraldehid

Tetroze: eritroza, treoza

Pentoze: riboza, arabinoza, ksiloza, liksoza

Heksoze: aloza, altroza, glukoza, manoza, guloza, idoza, galaktoza, taloza

### **Osnovni i sistematski nazivi**

*Osnovni naziv* ukazuje na *dužinu ugljeničnog niza* monosaharida. Tako aciklične aldoze sa tri, četiri, pet, šest, sedam, osam, devet, itd., ugljenikovih atoma u nizu su *trioze*, *tetroze*, *pentoze*, *heksoze*, *heptoze*, *oktoze*, *nonoze*,

*Osnovni naziv* acikličnih ketoza koji imaju četiri, pet, šest, sedam, osam, devet, itd., ugljenikovih atoma u nizu su *tetruloze*, *pentuloze*, *heksuloze*, *heptuloze*, *oktuloze*, *nonuloze*. *Sistematski naziv* se formira od osnovnog naziva i konfiguracionog prefiksa koji se piše malim slovima u kurzivu i odvajaju crticom. Svakom prefiksu prethodi konfiguracioni simbol D- i L-. Konfiguracioni prefiks se dobija od trivijalnog imena monosaharida izostavljajući završetak naziva -za. Primer: D-galakto-heptoza. Za osnovne aldoze, čije su strukturne formule date na Slici 1.3., se uobičajeno koriste trivijalni nazivi. Primer: D-galaktoza a ne D-galakto-heksoza.

### **IZBOR OSNOVNE STRUKTURE MONOSAHARIDA KOD NOMENKLATURE**

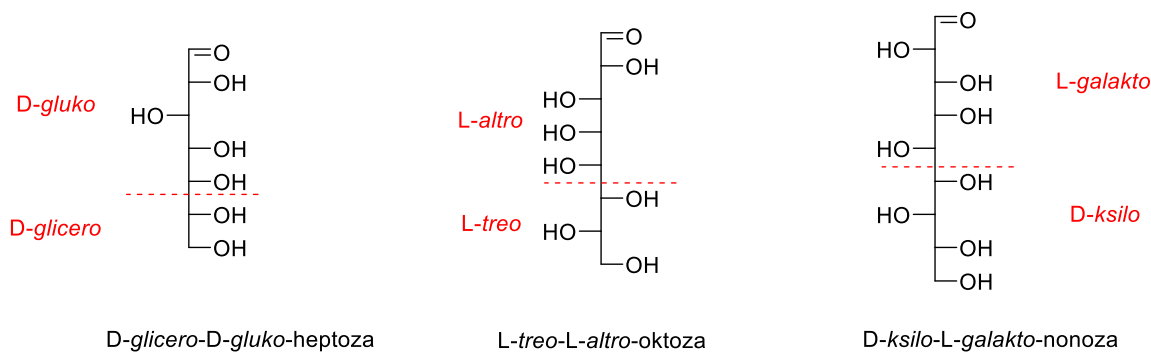
U slučaju imenovanja složenijih monosaharida osnovna struktura se bira na osnovu sledećeg redosleda prvenstva:

- 1) Osnova sa najvećim brojem ugljenikovih atoma u nizu ima prioritet (npr. heptoza pre nego heksoza).
- 2) Osnova čije je prvo slovo trivijalnog imena prvo po redosledu abecede. Ako postoji i tada dva moguća osnovna imena gleda se sledeće slovo (npr. aloza pre nego altroza, galaktoza pre nego glukoza, glukoza pre nego guloza). Ovo važi i za konfiguracione prefikse, tako da će pre biti *alo-* nego *altro-* i *gluko-* pre nego *gulo-*.
- 3) Konfiguracioni simbol D- pre nego L-.
- 4) Anomerni simbol  $\alpha$ - pre nego  $\beta$ -.
- 5) Broj (lokant) koji označava položaj supstituenta mora biti manji ako ima više mogućnosti.
- 6) Ime gde su supstituenti poređani po abecednom redosledu, bira se najmanja brojučana vrednost prvog supstituenta.

## 2.1. Više aldoze

Za više aldoze se koriste isključivo sistematski nazivi.

Kao što je ranije rečeno aldotetroze se zbog prisustva 2 stereocentra javljaju u obliku 4 stereoizomera, aldopentoze koje imaju 3 stereocentra javljaju se u obliku 8 stereoizomera, a aldoheksoze zbog prisustva 4 stereocentra imaju 16 stereoizomera. Nastavljanjem sekvence stižemo do aldoheptoza koji imaju 32 stereoizomera i aldooktoza sa čak 64 stereoizomera. Srećom nema novih trivijalnih naziva već se viši šećeri opisuju sistematski upotrebom konfiguracionih prefiksa (pišu se italic slovima) koji potiču od imena nižih članova monosaharida na način kako je prikazano na Slici 2.1.

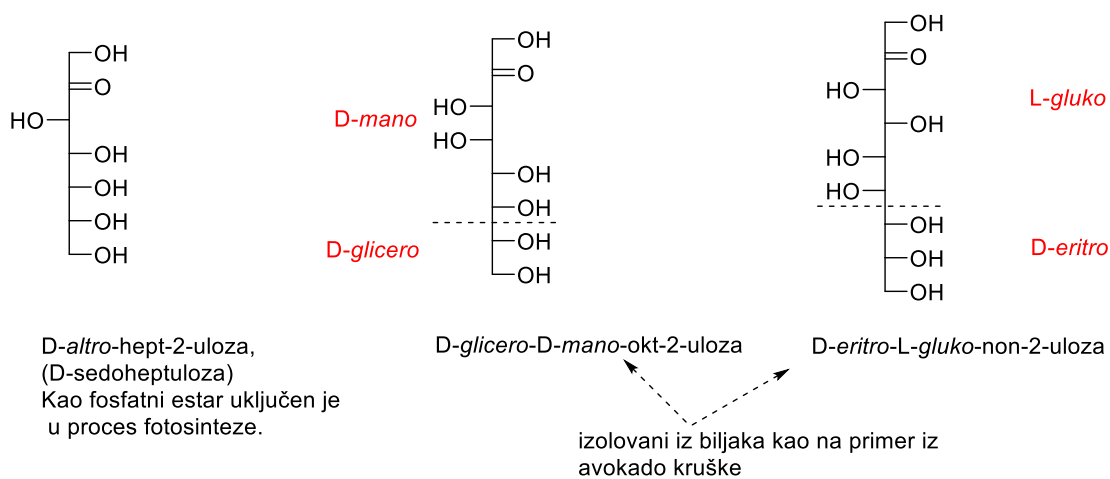


Slika 2.1. Odabrani primeri viših aldoza

Kao što se iz primera vidi konfiguracioni prefiksi se biraju na osnovu stereohemije stereogenih centara u molekulu dok se nestereogeni centri zanemaruju. Ugljeni nizi više aldoze se misaono podeli tako da aldehidna grupa bude u nizu sa još četiri stereocentra a ostatak je drugi deo molekule. Odrede se konfiguracioni prefiksi za oba dela monosaharida pa se navodi prvo konfiguracioni prefiks sa većim lokantom (brojem) a zatim deo koji sadrži aldehidnu grupu. Na kraju naziva sledi, kako je napred rečeno, osnovni naziv koji ukazuje na dužinu ugljeničnog niza monosaharida.

## 2.2. Ketoze ili uloze

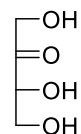
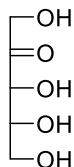
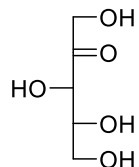
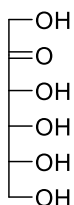
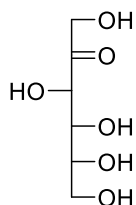
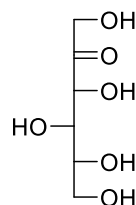
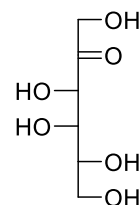
**Ketoze ili uloze** mogu sadržavati karbonilnu grupu u bilo kojoj neterminalnoj poziciji. U prirodi se uglavnom nalaze 2-keto derivati pa se u tim slučajevima često ne navodi pozicija karbonilne grupe, ako nema dvosmislenosti u sistematskom nazivu. Ovo se često primenjuje naročito u biohemijskom kontekstu (umesto *D-altro-hept-2-uloza* može da stoji *D-altro-heptuloza*). Sistematski naziv uloza se sastavlja od osnovnog naziva i konfiguracionog prefiksa. U osnovnom nazivu koristi se odgovarajuće osnovno ime aldoze zamenjujući sufiks "oza" sa "uloza" kojemu prethodi lokant koji označava brojanu oznaku karbonilne grupe. Niz se numeriše tako da je karbonilna grupa obeležena najmanjim brojem. Ako je karbonilna grupa u sredini niza sa neparnim brojem ugljenikovih atoma izbor se pravi na osnovu pravila o izboru osnovnog monosaharida, kao što je napred dato. Primeri su prikazani na Slikama 2.3. i 2.4.



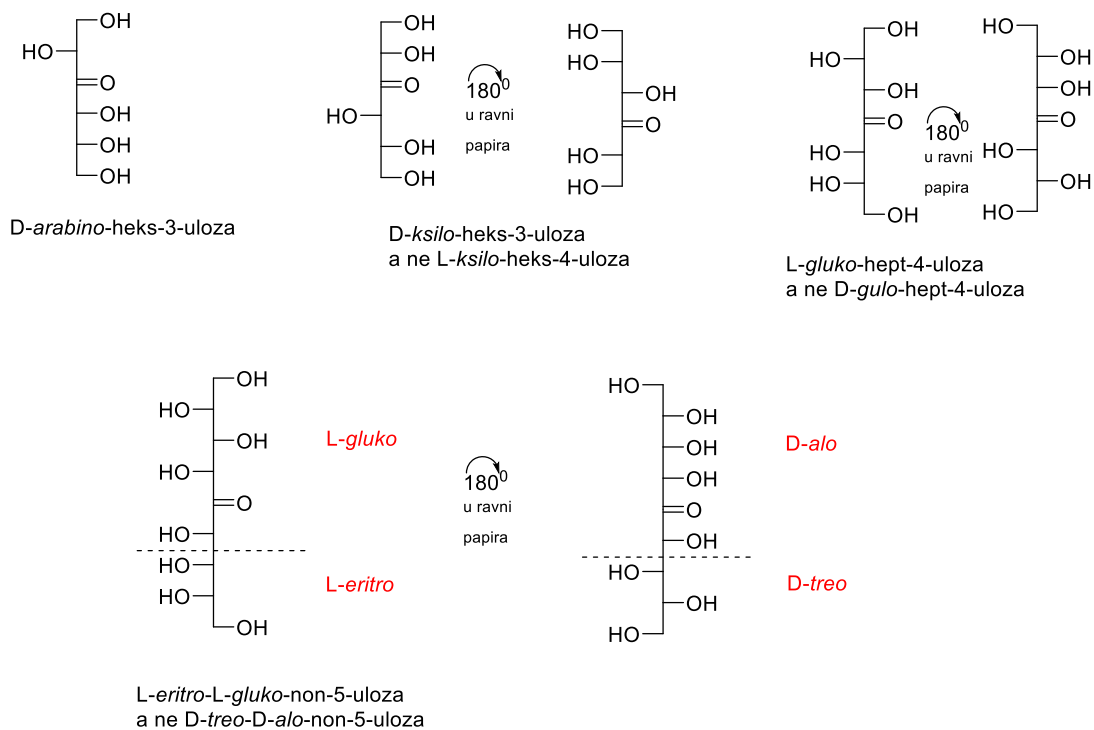
**Slika 2.3.** Poznate prirodne više 2-ketoze.



1,3-dihidroksiaceton

D-glicero-tetruloza  
(D-eritruuloza, samo u biohemijskom kontekstu dozvoljeno)D-eritro-pent-2-uloza  
(D-ribouloza, samo u biohemijskom kontekstu dozvoljeno)D-treo-pent-2-uloza  
(D-ksilouloza, samo u biohemijskom kontekstu dozvoljeno)D-ribo-heks-2-uloza  
(D-psikoza)D-arabino-heks-2-uloza  
(D-fruktoza)D-ksilo-heks-2-uloza  
(D-sorboza)D-likso-heks-2-uloza  
(D-tagatoza)**Slika 2.2.** Strukture sa sistematskim i trivijalnim nazivom za 2-ketoze koje sadrže 3-6 ugljenikovih atoma.





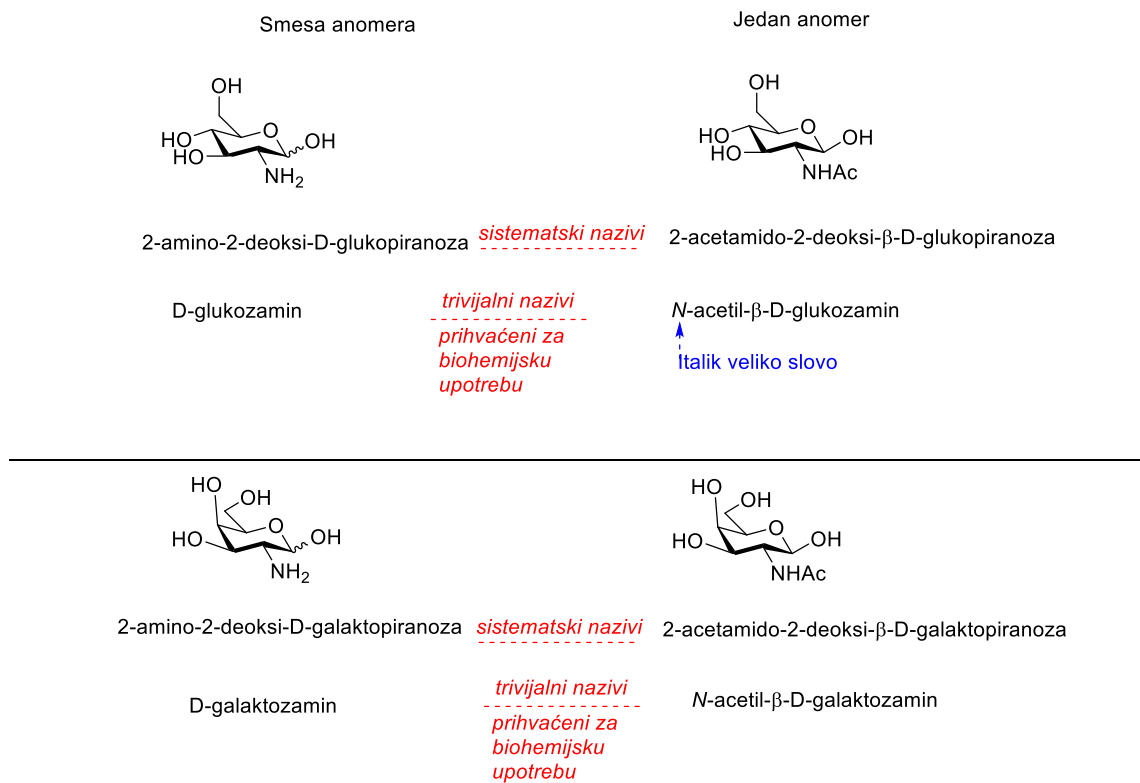
**Slika 2.4.** Primena pravila kod davanja sistematskih naziva

### 2.3. Amino-šećeri

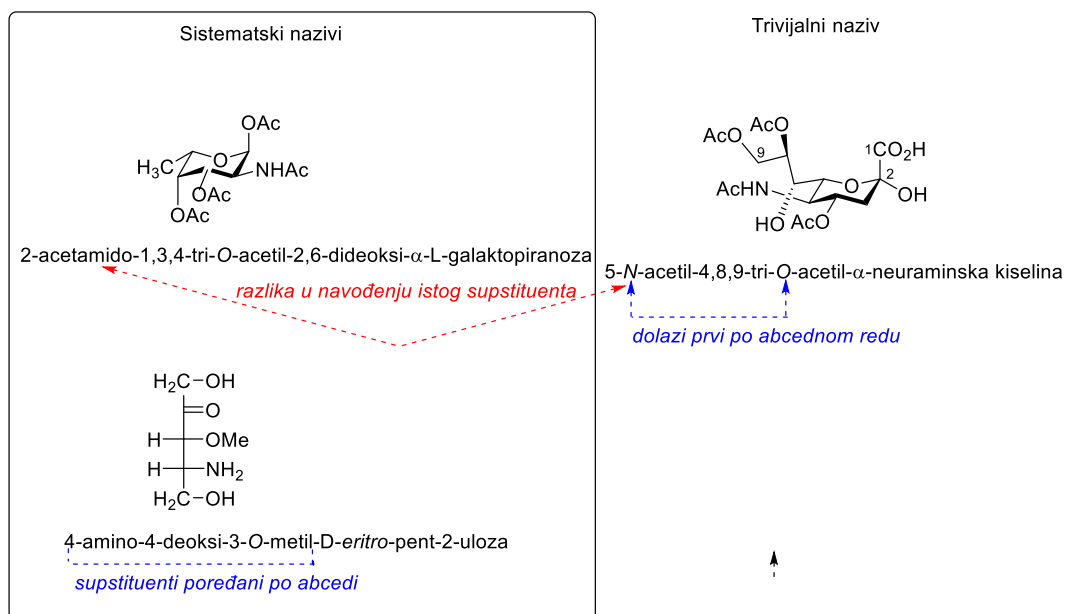
Supstitucija alkoholne hidroksilne grupe monosaharida ili monosaharidnog derivata, amino grupom, tretira se kao supstitucija odgovarajućeg vodonikovog atoma odgovarajućeg deoksi-monosaharida amino grupom. Što se tiče konfiguracionog prefiksa, amino ili supstituisana amino grupa se smatra da zamenjuje OH grupe (Slika 2.5).

Kada kompletno ime derivata uključuje druge prefikse, deoksi se rangira po abecednom redu sa drugim supstuentima; u citiranju abecedni red ima prednost nad numeričkim redom, npr. 4-amino-4-deoksi-3-*O*-metil-*D-eritro*-pent-2-uloza. Kada je amino grupa pozicionirana na C-2, prednost se daje trivijalnim nazivima koji se grade tako što se odgovarajućem konfiguracionom prefiksu doda nastavak "(o)zamin" a konfiguracioni prefiks se ne odvaja crticom od pomenutog nastavka i ne piše se u kurzivu. Ako za amino šećer koristimo trivijalno ime supstitucija se naglašava sa prefiksom koji sledi nakon velikog slova *N* koje je u kurzivu. Kod ove šećerne nomenklature (Slika 2.6), supstitucija na heteroatomu se navodi prvo brojem koji označava C atom koji je supstituisan, zatim ide crtica, a zatim *italic* heteroatom sa svojim simbolom i na kraju supstuent (*5-N-*

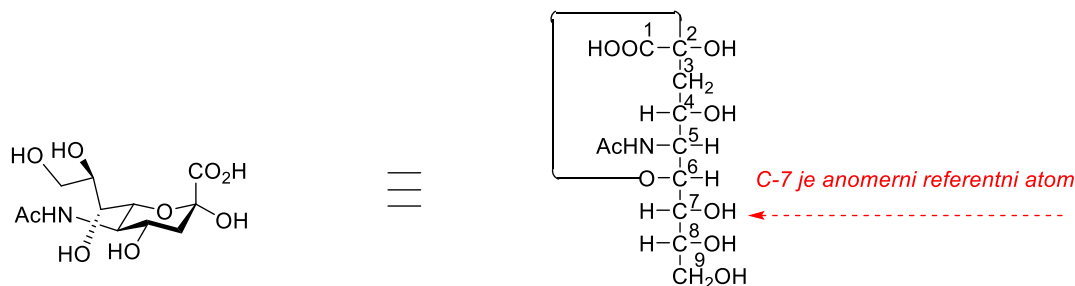
acetil). Supstituenti na istom heteroatomu se grupišu (2,3,4-tri-*O*-metil) i istog tipa se ređaju po abecedi heteroatoma (5-*N*-acetil-4,8,9-tri-*O*-acetil).



Slika 2.5.



Slika 2.6.



sijalna kiselina (N-acetil- $\alpha$ -neuraminska kiselina;  $\alpha$ -Neu5Ac)  $\leftarrow$  --- *trivijalni nazivi i usvojeni skraćeni simbol*

5-Acetamido-3,5-dideoksi-D-glicero- $\alpha$ -D-galakto-non-2-ulopiranozonska kiselina  $\leftarrow$  *-.sistematski naziv.*

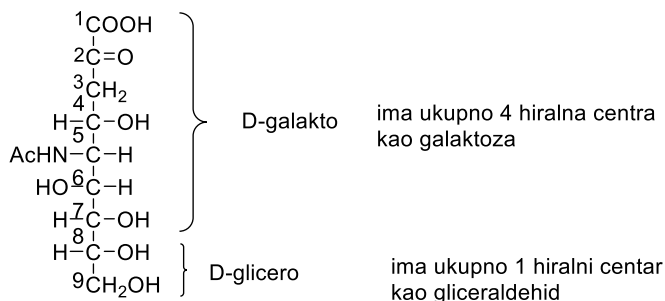
U ketozi koja ima više od 4 hiralna centra mogu se dodati na koren naziva 2 ili više konfiguraciona prefiksa. Koren naziva je non i potiče od nonoze (ukupno ima 9 C-atoma)

Prefiks započinje grupom hiralnih centara koji su najudaljeniji od C-1 i mogu imati manje od 4 atoma. Ako u sekvenci atoma hiralni centri su razdvojeni nehiralnim centrom taj nehiralni centar se ignoriše.

2-ulo potiče od uloze

Sufiks onska kiselina se stavlja umesto oze jer se radi o aldonskoj kiselini

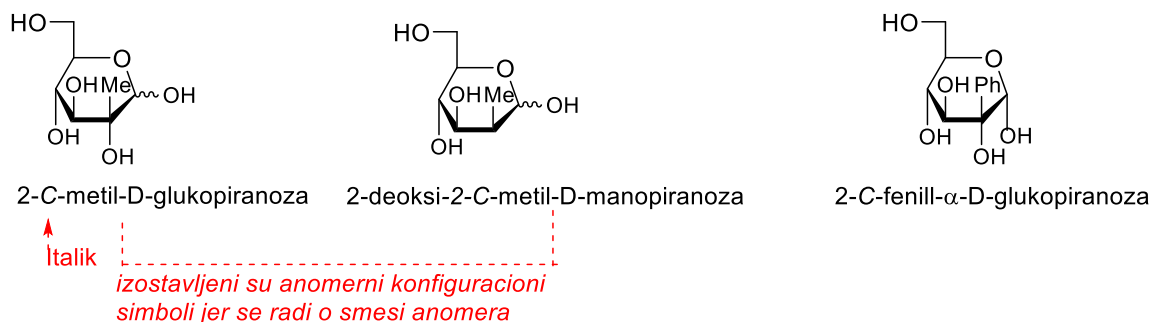
Aciklična forma, Fisher-ova projekciona formula za N-acetil- $\alpha$ -neuraminsku kiselinu



Slika 2.7.

## 2.4. Račvasti šećeri

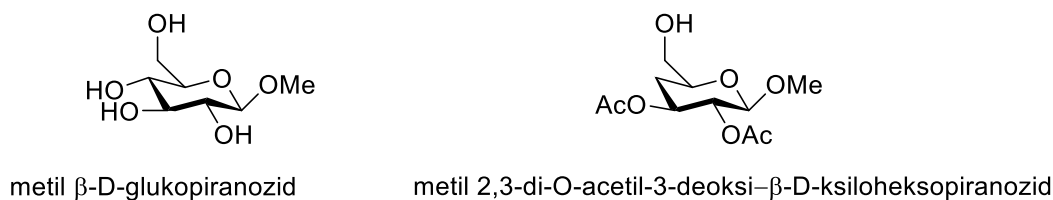
Ova jedinjenja se nazivaju kao C-supstituisani monosaharidi. Kada supstituent koji formira račvanje skeleta u nekom račvastom monosaharidnom derivatu zamenjuje vodonikov atom zaostala OH grupa na mestu račvanja će određivati konfiguraciju jedinjenja. Kod derivata gde supstituen koji formira račvanje se nalazi na deoksi ugljeniku (bez kiseonične funkcije) tada taj supstituent se koristi za određivanje konfiguracije. Primeri su dati na Slici 2.8.:



Slika 2.8.

## 2.5. Glikozidi

Mešoviti acetali, koji nastaju zamenom vodonika anomerne hidroksilne grupe sa grupom R, koja potiče iz alkohola ili fenola, zovu se glikozidi. Kod naziva ciklične forme monosaharida poslednje slovo "a" se zamenjuje sa nastavkom "id" i ispred konfiguracionog prefiksa ili ispred naziva supstituenata poređanih po abecedi stavlja se naziv grupe R koji je odvojen interventnim prostorom (*engl.* space) od ostalog dela naziva (Slika 2.9). Supstituen R se naziva aglikon, a ove derivate smatramo mešovitim acetalima jer karbonilna grupa formalno reaguje intramolekulski i intermolekulski sa dve hidroksilne grupe.

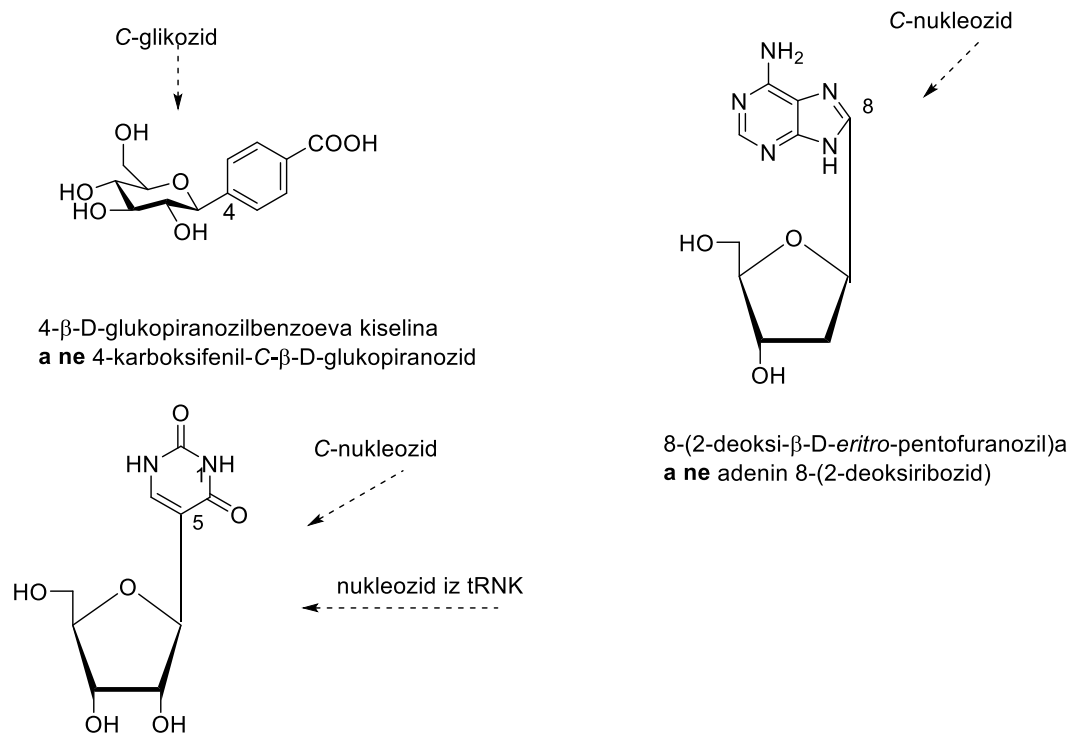


Slika 2.9.

## 2.6. C-glikozil-jedinjenja

Jedinjenja koja formalno mogu nastati eliminacijom vode iz glikozidne OH grupe i vodonik sa ugljenika koji će davati C-C vezu dobijaju naziv tako što dobijaju "glikozil" prefiks a zatim sledi naziv supstituenta na anomernom centru. Treba paziti da se ne koristi C-glikozidi terminologija u nazivu mada se u suštini radi o C-glikozidima. Oni koji su sastavljali nomenklaturu šećera smatraju da je potpuno pogrešno ih ubrajati u C-glikozide zbog stabilnosti C<sub>1</sub>-C veze (teško se hidrolizuje) međutim u najnovijim

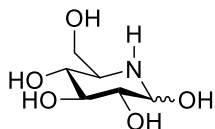
radovima naučnika koji se bave sintezom ovih jedinjenja i dalje se ova jedinjenja ubrajaju u C-glikozide (Primeri su dati na Slici 2.10.).



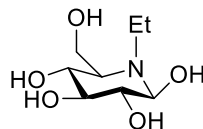
Slika 2.10.

### 2.7. Zamena kiseonika iz prstena drugim elementom

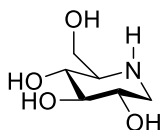
Zamena kiseonika iz prstena sa atomima N, P i S: Nazivi prate pravila kao kod amino šećera (Slika 2.11). Kod "karba-" šećera prilikom zamene kiseonika iz prstena sa ugljenikom obeležavanje tog ugljenika je sa brojem susednog ne-anomernog ugljenika uz dodatak sufiksa "a" (Slika 2.12).



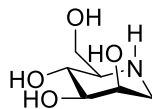
5-amino-5-deoksi-D-glukopiranoza;  
trivijalni naziv nojirimicin



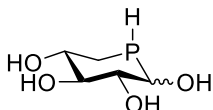
5-deoksi-5-etilamino- $\beta$ -D-glukopiranoza



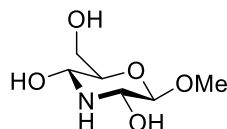
1-amino-1,5-anhidro-1-deoksi-D-glucitol ili  
1,5-dideoksi-1,5-imino-D-glucitol;  
trivijalni naziv deoksinojirimicin



1-amino-1,5-anhidro-1-deoksi-D-manitol ili  
1,5-dideoksi-1,5-imino-D-manitol;  
trivijalni naziv deksimannojirimicin



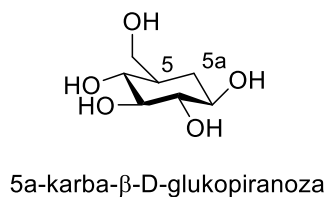
5-deoksi-5-fosfanil-D-ksilopiranoza



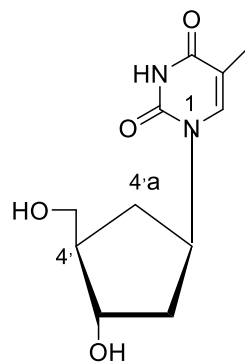
metil 3-aza-3-deoksi- $\beta$ -D-ribo-heksopiranozid

Napomena: Korišćenje termina "aza šećer", "fosfa šećer" trebalo bi da bude samo za strukture gde je ugljenik a ne kiseonik zamenjen sa heteroatomom. Poslednja struktura na ovoj shemi je pravi aza šećer. Naziv "imino šećer" može se koristiti za klasu cikličnih šećera kod kojih je kiseonik iz prstena zamenjen azotom.

**Slika 2.11.**



5a-karba- $\beta$ -D-glukopiranoza

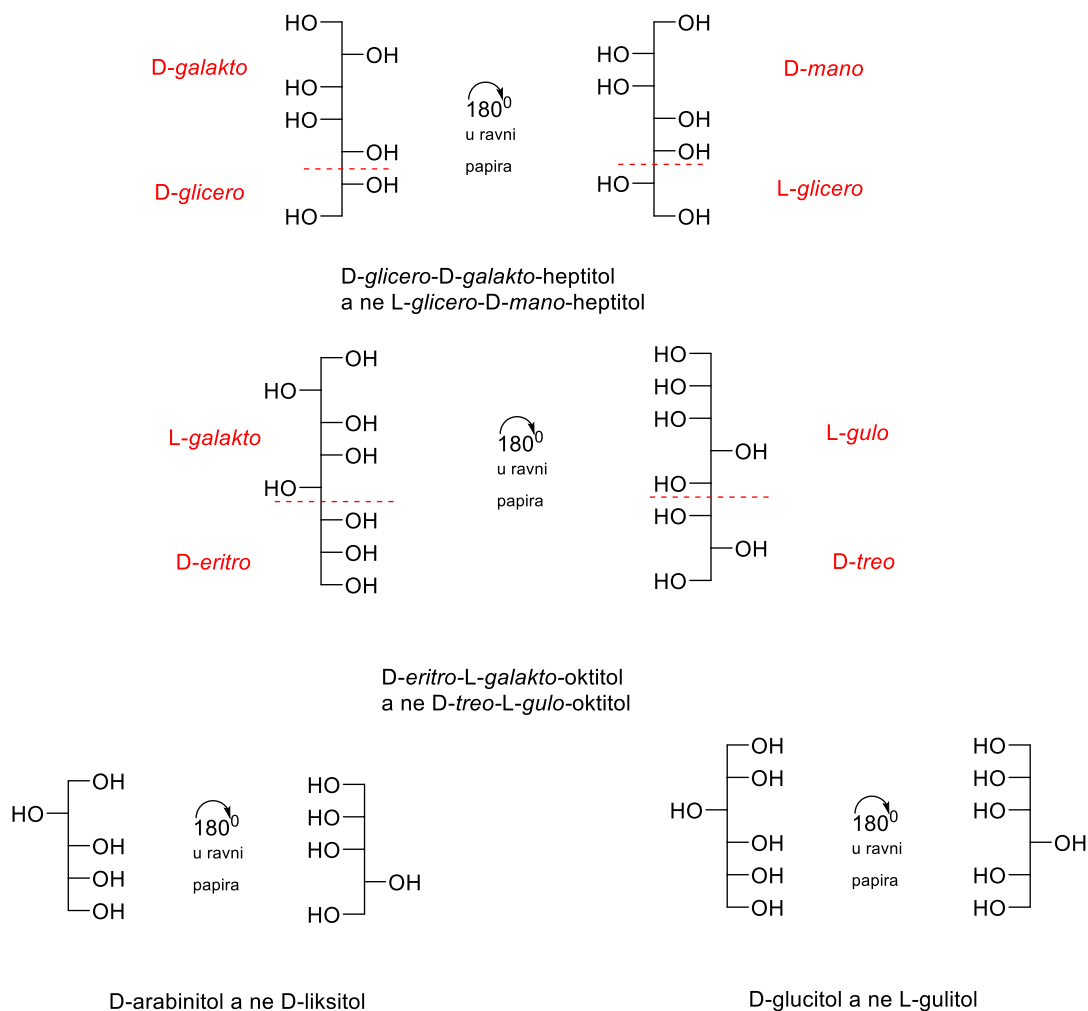


1-(2-deoksi-4a-karba- $\beta$ -D-eritro-pentofuranosil)timin  
ili 4'a-karbatimidin

**Slika 2.12.**

## 2.8. Alditoli

Pri davanju naziva ovim jedinjenjima sufiks "oza" kod odgovarajuće aldoze menja se u "itol". Ako isti alditol može da nastane iz dve različite aldoze, ili aldoze i ketoze koriste se već pomenuta pravila. Neki primeri su dati na Slici 2.13.

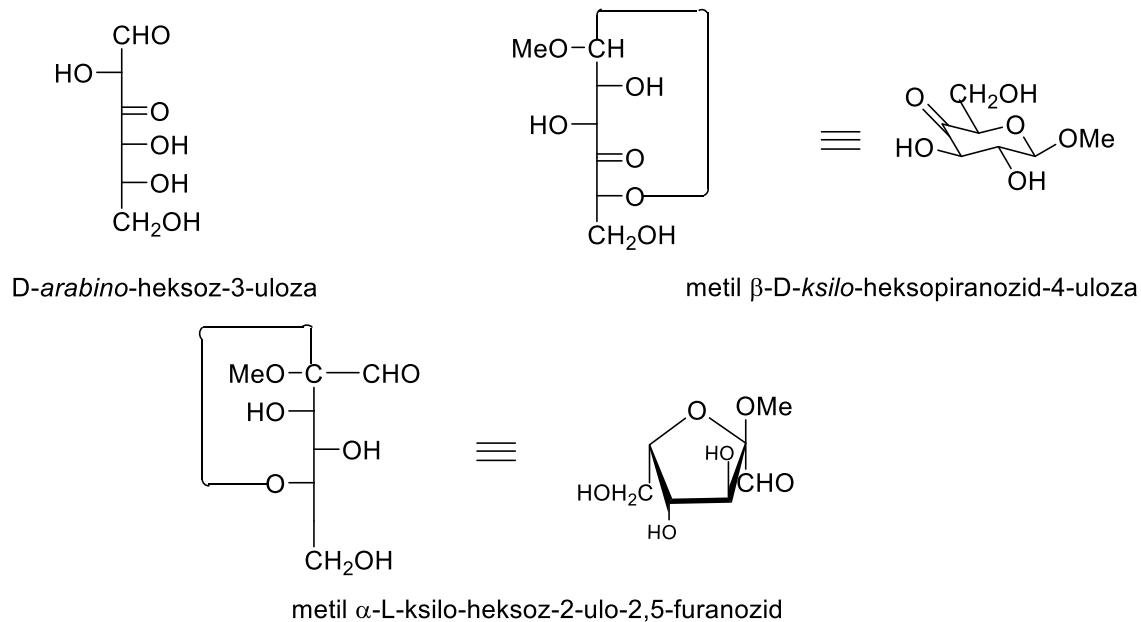


Slika 2.13

## 2.9. Aldoketoze (ketoaldoze, alduloze)

U nazivu za aldoketoze umesto završetka "e" za odgovarajuću aldozu ubacuje se "uloza". Potencijalna aldehidna grupa se numeriše brojem 1 i taj broj se ne ubacuje u naziv. Broj koji obeležava položaj ketonske karbonilne grupe se daje pre sufiksa "uloza" razdvojeno od njega crticom osim ako je u položaju 2 kada se može izostaviti (mada je bolje navesti zbog jasnoće). Kod cikličnih formi, broj ugljenikovih atoma za poziciju zatvaranja

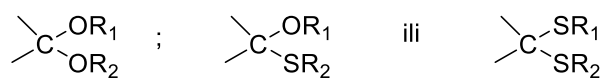
prstena mora se navesti i tada se potencijalna karbonilna grupa prvo navodi. Navođenje veličine prstena (na primer pirano) zavisi od toga koja karbonilna grupa učestvuje u stvaranju prstena (Slika 2.14).



Slika 2.14.

### 2.10. Acetali, ketali i njihovi analozi

Jedinjenja koja se dobijaju transformacijom aldehidne ili keto funkcije šećera ili njegovog derivata sa alkoholima ili tiolima pri čemu uopšteni prikaz nastale grupe je prikazan na Slici 2.15.



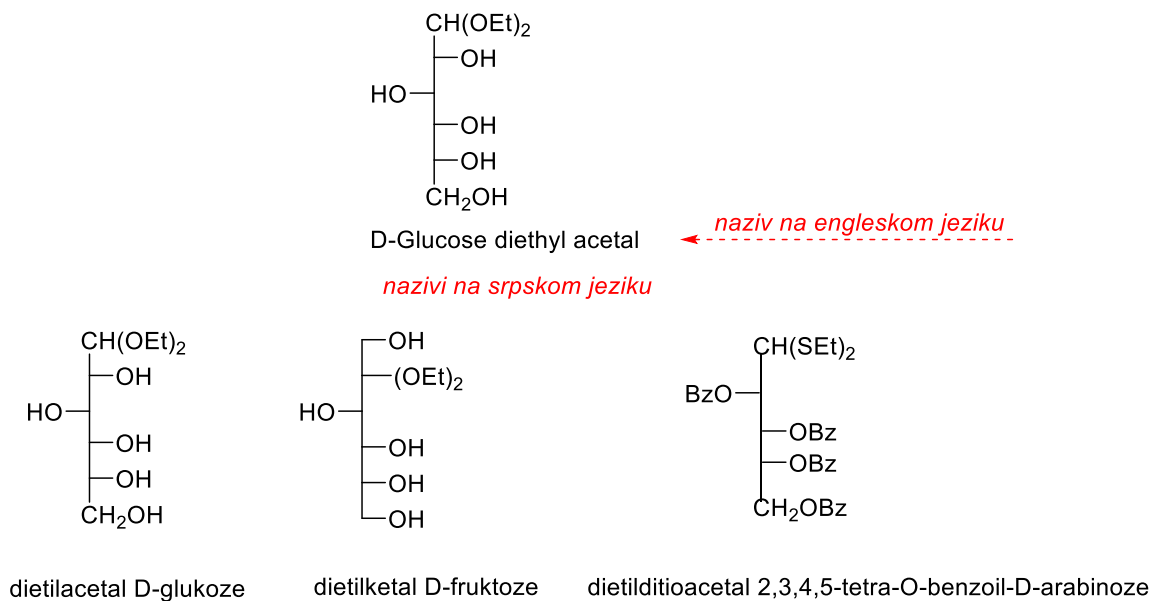
R= alkil ili aril

Slika 2.15.

Ova jedinjenja se nazivaju kombinacijom imena sistematskog naziva aldoze uz dodatak reči "acetal", "monotioacetal" ili "dithioacetal" (ili odgovarajući termin "ketal" za derivate ketona) kojima prethode nazivi grupa R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub>. Kod monotioacetala način vezivanja različitih R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub> grupa se mora naznačiti korišćenjem prefiksa O i S. Na srpskom jeziku nazivi ovih jedinjenja se dosta razlikuju. Naime sistematskom nazivu monosaharida ili



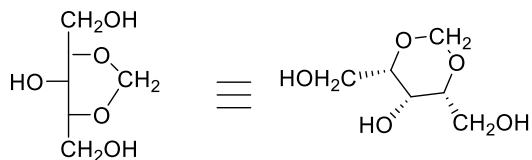
njegovog derivata prethodi, kao jedna reč, ime alkilgrupe uz dodatak "acetal", "monotioacetal" ili "ditioacetal". Primeri su dati na Slici 2.16.



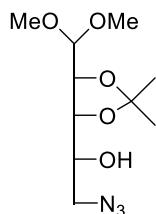
Slika 2.16.

### 2.11. Ciklični acetali i ketali

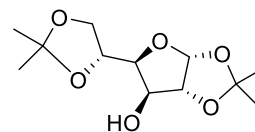
Ciklični acetali i ketali nastali u reakciji monosaharida ili njihovih derivata sa aldehidima i ketonima se nazivaju kao imena dvovalentnih supstituenata "O-alkil(id)en" kojima prethode odgovarajući numerički lokanti. Ako u molekuli postoje više cikličnih acetalnih ili ketalnih grupa odgovarajući lokantni parovi se razdvajaju tipografski (;). Primeri su dati na Slici 2.17.



2,4-metilenksilitol



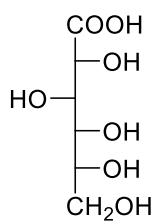
Dimetilacetal 5-azido-5-deoksi-2,3-O-izopropiliden-D-riboze

1,2:5,6-di-O-izopropiliden- $\alpha$ -D-glukofuranoza

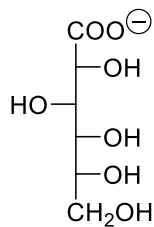
Slika 2.17.

## 2.12. Aldonske kiseline

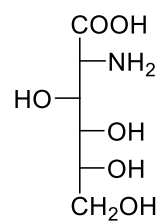
Naziv ovih jedinjenja se formira zamenom nastavka "oza" sistematskog ili trivijalnog imena aldoze sa nastavkom "onska kiselina". Soli ovih kiselina se nazivaju promenom završetka "onska kiselina" sa "onat" (Slika 2.18).



D-glukonska kiselina



D-glukonat



2-amino-2-deoksi-D-glukonska kiselina

Slika 2.18.

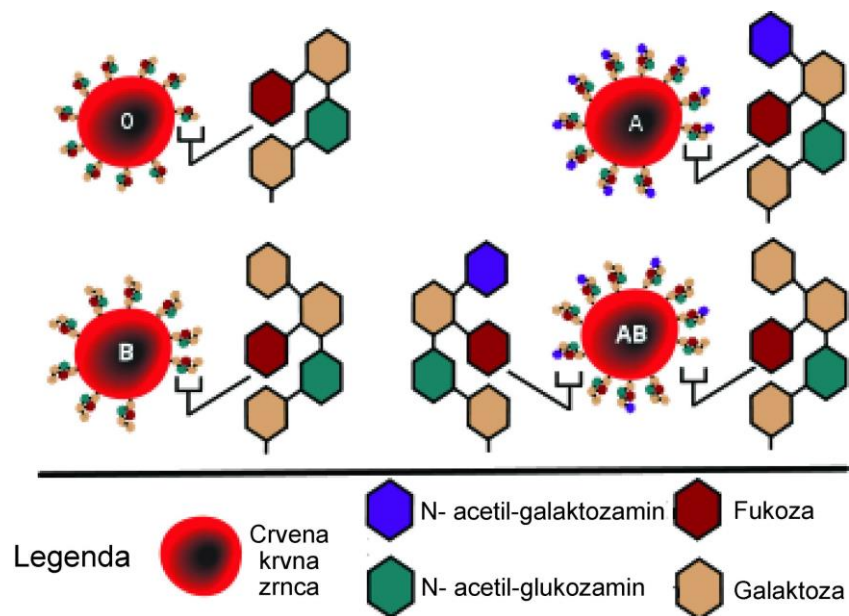
### Poglavlje 3. HEMIJSKA GLIKOBIOLOGIJA

#### Značaj ugljenih hidrata u biologiji

Ugljeni hidrati su kao najzastupljenija klasa biomolekula rasprostranjeni svuda u prirodi. Mada je od davno poznato da su šećeri strukturno veoma značajne komponente biomolekula i da imaju veliku ulogu u ishrani, razvoj istraživanja u poslednjih 20 godina otkriva njihovu ulogu u preciznim i prefinjenim biološkim procesima. Postoje mnogobrojni primeri učešća šećera u biološkim komunikacijama između ćelija i unutar ćelije.

Tako, neke šećerne strukture koje su rasprostranjene na površini ćelije ukazuju na rast tumora u organizmu i u vezi su sa rasprostranjenošću kancernih ćelija u organizmu (indikatori maligniteta).

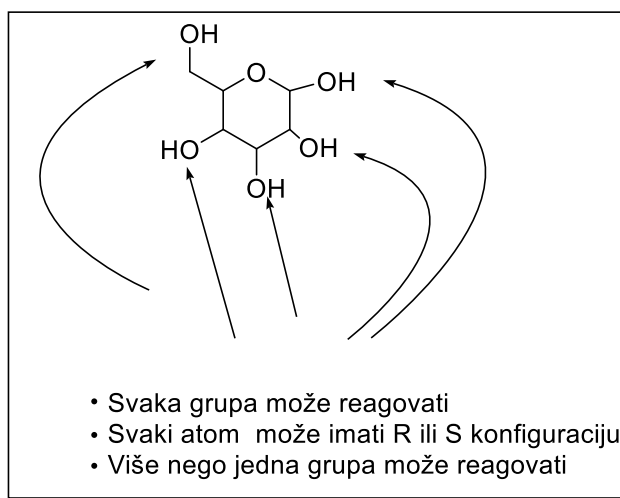
Korektne šećerne strukture na površini ćelije su neophodne za oplodnju jajne ćelije sa spermom i za razvoj embriona. Krvna grupa kod čoveka se određuje na osnovu različitih šećernih završetaka glikana (oligosaharida koji su strukturni delovi antigena na površini eritrocita). Ako je šećer galaktoza krvna grupa će biti B, dok ako je šećerni završetak galaktoza koja je u C-2 položaju N-acetilovana krvna grupa će biti A (oligosaharidni završetak je GalNAc; Slika 3.1). Ovi primeri pokazuju koliko su šećeri važni za život.



**Slika 3.1.** Krvnu grupu određuju oligosaharidni strukturni elementi na površini crvenih krvnih zrnaca

### 3.1. Glikokod

Šećerne strukture su bez konkurencije u broju informacija koje mogu prenositi i izraziti. Priroda veze između dva šećerna ostatka je veoma varijabilna. Na primer, dva piranozna molekula mogu se vezati na pet različitih načina, i to sa vezama 1-1, 1-2, 1-3, 1-4 i 1-6 (Slika 3.2.). Ako ovome dodamo druge promenljive kao što su stereochemija anomernog centra, veličina prstena (piranozna ili furanozna forma), kao i modifikacija hidroksilnih grupa (acilacija, fosforilacija, metilacija i dobijanje sulfatnih estara). Iz ovog se vidi da je šećerni "jezik" veoma obiman i dat mu je naziv **glikokod**. Ovaj naziv veoma dobro predstavlja visok nivo kompleksnosti informacija koje šećerne strukture mogu da pruže. Dok DNK (sadrži 4 osnovne jedinice) i amino kiseline (sadrži set od 20 jedinica) mogu formirati biološki jezik za transfer informacija od 4096 i  $6.4 \times 10^7$  "informacija" respektivno. Međutim, ugljeni hidrati mogu ostvariti više od  $10^{12}$  varijacija u svojim informacijama [15].



**Slika 3.2.** Veliki broj funkcionalnih grupa kod ugljenih hidrata omogućava im da se međusobno povezuju na veoma različite načine. Na taj način šećeri imaju veliki potencijal za strukturnu raznolikost.

#### Poglavlje 4. GLIKOPROTEINI

Veliki broj proteina koji su nađeni kod sisara, biljaka ili mikroorganizama sadrže kovalentno vezane oligosaharide, kao deo svoje strukture. Ovaj šećerni udeo može da varira od 0.5 do 85%. To su takozvani **glikoproteini**, kod kojih se kovalentna veza ostvaruje između oligosaharidnog niza i amidnog azotovog atoma L-asparagina (*N*-glikozidno vezani glikoproteini, **1**; Slika 4.1). Osim toga, kovalentna veza se formira i između oligosaharidnog niza i kiseonikovog atoma iz amino kiselina L-serina ili L-treonina (*O*-glikozidno vezani glikoproteini, **2**; Slika 4.1) [15]. Ove dve grupe se hemijski lako mogu razlikovati pošto u poslednjem slučaju vezani oligosaharid može biti lako uklonjen od proteinskog niza tretiranjem sa veoma slabom bazom (0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> na 20 °C). Oligosaharidi vezani amidnom vezom su stabilni pri ovim uslovima. Ova laka β-eliminacijakoj koja se ostvaruje kod O-vezanih glikoproteina omogućava da šećer postane dobra odlazeća grupa nakon kompleksiranja sa metalnim katjonom.

Svi ovi kompleksni makromolekuli igraju važnu ulogu u biološkoj funkciji živih organizama. Šećerna komponenta glikoproteina je vitalna jer utiče na fizičko-hemijske osobine proteina. Uloga ovih konjugovanih proteina je veoma raznovrsna: strukturna (kod kolagena), hormonska (tiroglobulin), enzimska (protrombin, enzim koji hidrolizuje saharozu i maltozu u intestinalnom traktu), zaštitna (mucin u sluzokoži želudačnog zida, engl. *gastric mucins*; imunoglobulini i supstance krvnih grupa eritrocita od kojih potiču glavne imunološke reakcije krvi, takozvani izoaglutinogeni), transportna (58 od 60 plazma proteina uključujući α<sub>1</sub>-kiselni glikoprotein i ceruloplazmin) kao i rezerve hrane (proteini mleka i svi proteini belanca jaja izuzev lisozima, od kojih je najpoznatiji primer jajčani albumin). Pošto su šećerne komponente membrana, koji su strukturni elementi glikolipida i glikoproteina, zbog svoje hidrofilnosti po pravilu locirane na spoljnoj strani membrane, stoga su odgovorni za orijentaciju ovih makromolekula. Znači šećerni delovi membranskih glikoproteina pomažu da se očuva asimetrični karakter biološke membrane. Šećeri na površini ćelije takođe mogu biti važni za *intercelularno prepoznavanje*. Interakcije različitih ćelija radi formiranja tkiva i detekcija strane ćelije od strane imunološkog sistema su procesi koji zavise od prepoznavanja jedne ćelijske površine od strane druge. Značaj normalne proteinske glikozilacije je danas već jasan pošto je nađeno

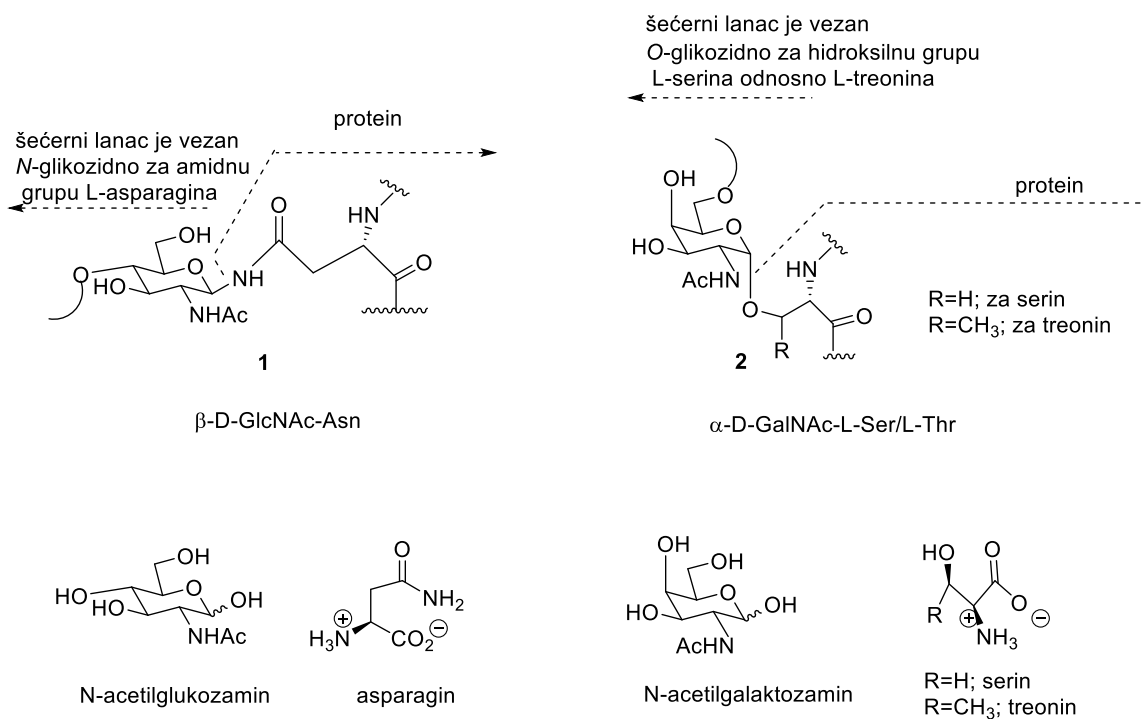
najmanje 18 različitih genetskih poremećaja glikozilacije kod ljudi, koji prozrokuju ozbiljne poremećaje u fizičkom ili mentalnom razvoju. Dosta ovih poremećaja su fatalne.

Broj oligosaharida vezanih za proteinski niz jako varira. Tako na primer, postoji samo jedno mesto za glikozilovanje u jajčanom albuminu a oko 200 mesta kod mucina ovaca.

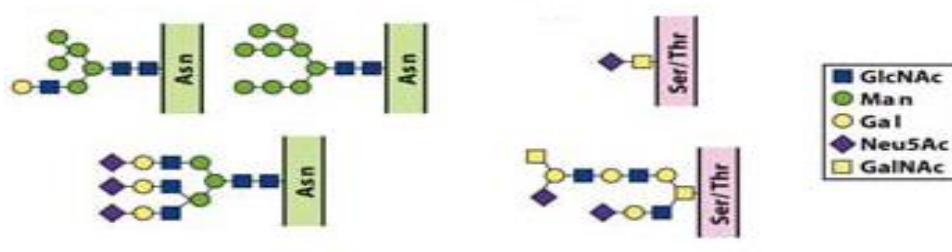
Takođe, različiti tipovi oligosaharida mogu biti vezani za jedan isti proteinski niz.

Izvori *N*-glikozidnih tipova glikoproteina:  
životinje, biljke i mikroorganizmi

Izvori *O*-glikozidnih tipova glikoproteina:  
životinje



Primeri:

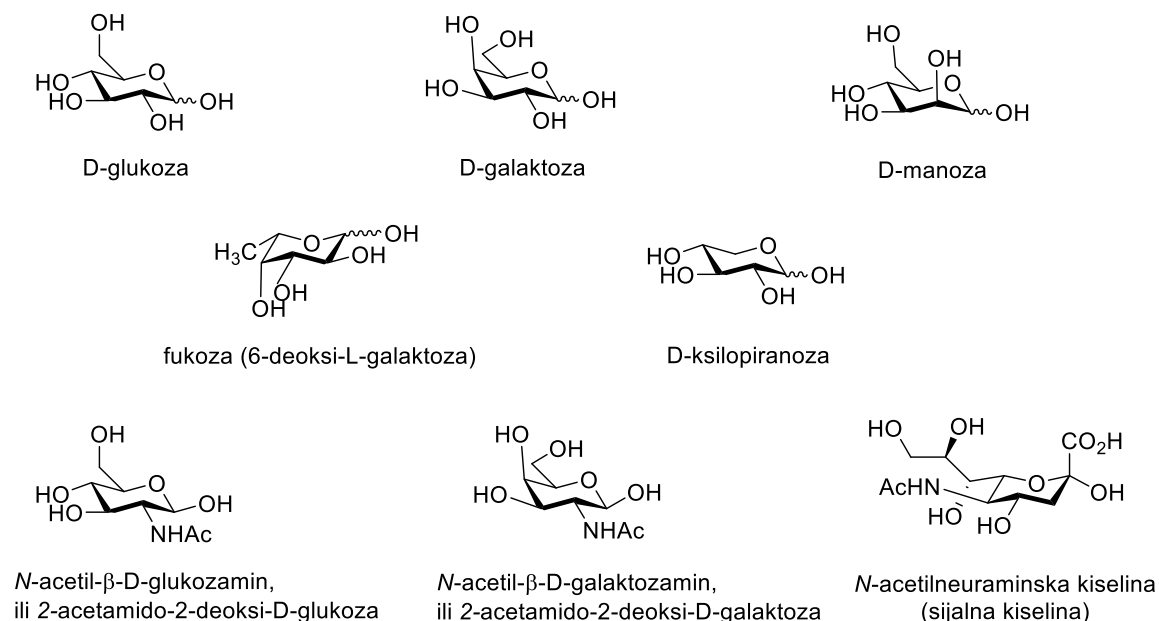


**Slika 4.1.** Kod glikoproteina oligosaharidna komponenta je vezana *N*-glikozidnom vezom za amidnu grupu L-asparagina (1), ili *O*-glikozidno za hidroksilnu grupu L-serina odnosno L-treonina (2). Šećer direktno vezan za asparaginski ostatak je *N*-acetilglukozamin, dok *N*-acetilgalaktozamin je šećer koji se najčešće vezuje za serinski i treoninski fragment [16].

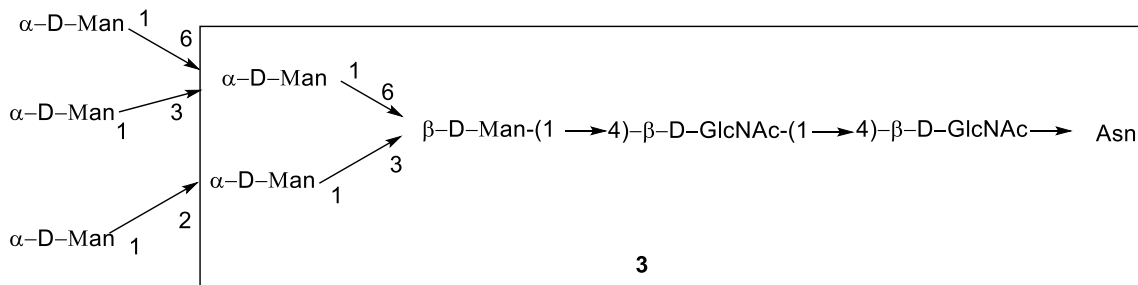
Oligosaharidne strukture koje su među prvima okarakterisane su bile antigeni krvnih grupa. Prvi membranski glikoprotein koji je korektno okarakterisan je glikoforin A koji se nalazi u membrane eritrocita. On sadrži 16 oligosaharidnih nizova od kojih su 15 *O*-vezani za serinske i treoninske ostatke, a jedan je *N*-vezan za asparaginski ostatak [16].

Najuobičajeni konstituentni monosaharidi (Slika 4.2) koji se javljaju kod glikoproteina su: D-glukoza, D-galaktoza, D-manoza, D-ksiloza i L-fukoza, koji se često javljaju zajedno sa amino šećerima 2-acetamido-2-deoksi-D-glukozom i 2-acetamido-2-deoksi-D-galaktozom kao i *N*-acetilneuraminskom kiselinom (sijalna kiselina).

Neka generalizacija se može napraviti o *N*-glikozidno vezanim glikoproteinima koji uglavnom imaju pentasaharidno jezgro prikazano uokvireno na Slici 4.3., koji se zatim kod  $\alpha$ -D-manoznih jedinica račvaju u različite nizove dajući širok spektar oligosaharida. Jedan primer je oktasaharid sa visokim sadržajem manoze (manozni tip oligosaharida) koji se nalazi u jajčanom albuminu (**3**, Slika 4.3).

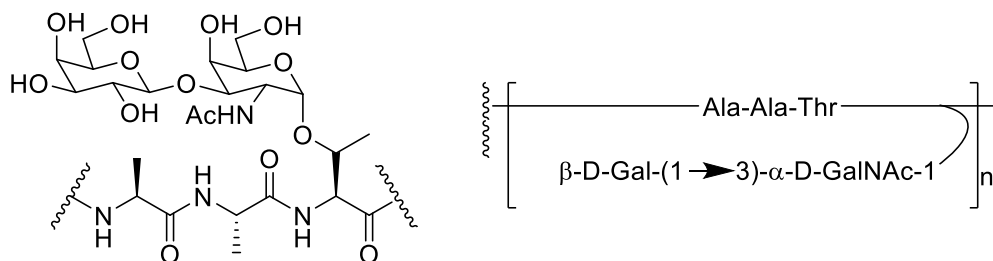


Slika 4.2



**Slika 4.3.** Oktasaharid koji se nalazi u jajčanom albuminu (sa uokvirenim pentasaharidnim jezgrom) koji je karakteristični konstituent glikoproteina kod kojih se uspostavlja *N*-glikozidna veza između oligosaharida i proteinskog dela. Asn je ostatak asparagina.

Uloga šećernih komponenti na površini proteina može biti raznovrsna i posledica je njihovih osobina. Tako na primer, oni povećavaju rastvorljivost, čine protein manje više antigeničnim i štite proteinski skelet od peptidaza koje katalizuju degradaciju proteina. U krvi morske ribe koja živi u velikim dubinama, otkriven je glikoprotein sa ponavljajućom strukturom prikazanom na Slici 4.4, koji omogućava ovim ribama da opstaju na temperaturi od  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$  usled antifriznog efekta. Smatra se da šećerni fragment ovog glikoproteina, svojim OH-grupama inhibira formiranje kristala leda.



**Slika 4.4.** Dva načina prikaza antifriznog glikoproteina koji se nalazi kod ribe koja opstaje na niskim temperaturama ( $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Struktura disaharidne jedinice koja se ponavlja sadrži  $\beta$ -galaktozil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -*N*-acetilgalaktozamin koji se glikozidnom vezom povezuje za treoninski ostatak [15].

Račvanje šećera u glikoproteinu je manifestacija **koda** koji je ranije objašnjen. *N*-Vezani i *O*-vezani glikoproteini sadrže različite šećerne strukture u svom oligosaharidnom segmentu, a račvanje na tom delu se često ostvaruje kod kompleksnih i razgranatih biološki aktivnih oligosaharida, kao na primer u strukturi **4** (Slika 4.5). Ova mesta račvanja su izvor informacija za *lektine* (vidi kasnije). Tako na primer, u nekim glikoproteinima krvi (Struktura **4**) prisustvo sijalne kiseline na kraju račvanja je neophodno. Međutim, kada ovaj protein "ostari", usled degradacije se gubi sijalna kiselina sa račvastog završetka i ostaje D-galaktozni ostatak. Ovaj ostatak se prepoznaje



od strane proteina na površini jetre koji se zove asijaloglikoproteinski receptor (*asijalo* = bez sijalne kiseline). Ostvaruje se veza između ovog receptora i "starog" krvnog glikoproteina i vrši se absorpcija i degradacija krvnih ćelije sa ovim šećernim zapisom u jetri. U ovom slučaju informacija ili **kod** koji se ostvaruje od strane šećera je "novo" (sa sijalnom kiselinom) ili "staro" (bez sijalne kiseline). Veliki doprinos nauci je bilo otkriće da se sijalna kiselina (*N*-acetilneuraminska kiselina, NeuAc), kao monosaharidna jedinica odvaja od oligosaharidnog niza pomoću "receptorskog razgrađujućeg enzima" virusa influence. Glikoproteini se javljaju u prirodi u velikom broju oblika, sa istim peptidnim skeletom, ali sa različitim šećernim fragmentima i različitim regionima glikozilovanja.

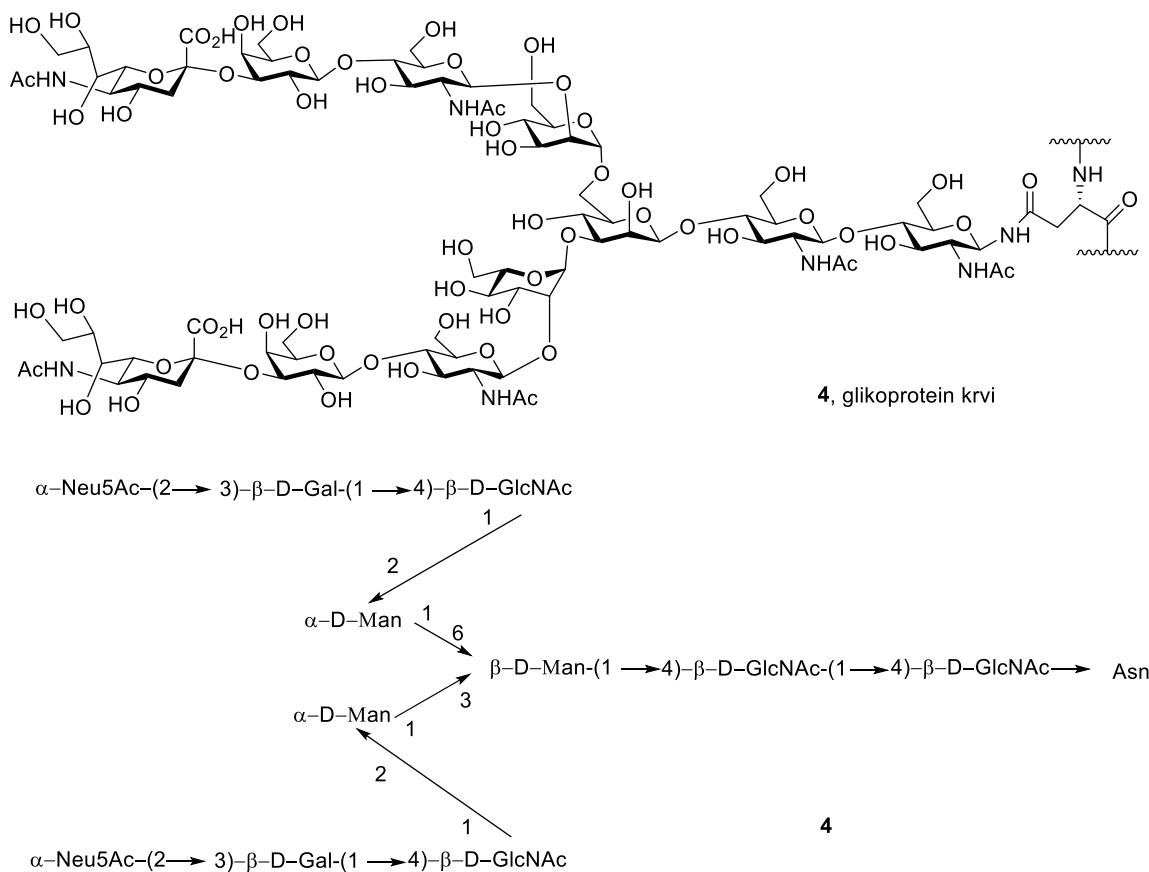
Ove različite forme se nazivaju **glikoforme**. Svaka **glikoforma** ima različite osobine i stoga spektar ovih glikoformi u prirodi omogućava fino podešavanje proteinskih osobina. Vreme cirkulacije plazma glikoproteina u velikoj meri zavisi od strukture njihovih oligosaharida. Na Slici 4.6. je prikazana jedna glikoforma (5) glikoproteina ceruloplazmina (čija je uloga transport bakra) kada je u terminalnom položaju sijalna kiselina vezana za galaktozne jedinice 2→6 ili 2→3 glikozidnom vezom. Kada neuraminidaza ukloni sijalnu kiselinu, ovaj plazma glikoprotein postaje asijaloceruloplazmin i specifično se vezuje za glikoproteinski receptor na jetri i tako biva eliminisan iz krvotoka (Slika 4.7).

*O*-Glikopeptidi su značajni kao antigeni i receptori, pa su stoga od velikog interesa sintetičkih hemičara. Hemijska sinteza igra značajnu ulogu u razumevanju odnosa struktura/funkcija kod prirodnih šećera od biološkog značaja. Oligosaharidne sekvence vezane za proteine i lipide su značajni ćelijski signalni molekuli, a biološke informacije su sačuvane baš u oligosaharidnim delovima molekula. Primeri *O*-vezanih glikoproteina su antigeni koji su karakteristični za krvne grupe M i N, a koje se nalaze u strukturi glikoforina<sup>1</sup> (nalazi se u membrani eritrocita). Imaju karakterističnu amino-kiselinsku sekvencu, Ser-Ser-Thr-Thr-Gly. za M i Leu-Ser-Thr-Thr-Glu. za N. Ovi amino-kiselinski

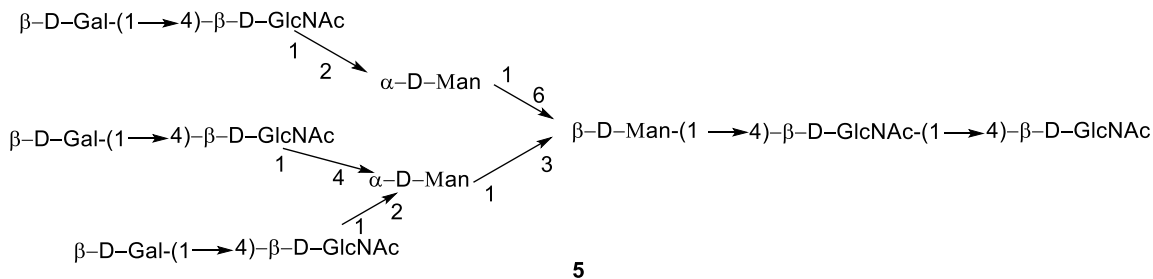
---

<sup>1</sup> Glikoforin je glikoprotein membrane crvenih krvnih zrnaca. Zbog visokog sadržaja sijalne kiseline ćelije eritrocita su hidrofilne. To im omogućava pokretljivost bez adhezije na druge ćelije ili na zidove krvnih sudova. Glikoforin se proteže kroz membranu eritrocita tako što je oligosaharidni deo ovog glikoproteina lociran sa spoljne strane membrane dok je proteinski deo orijentisan prema citoplazmi.

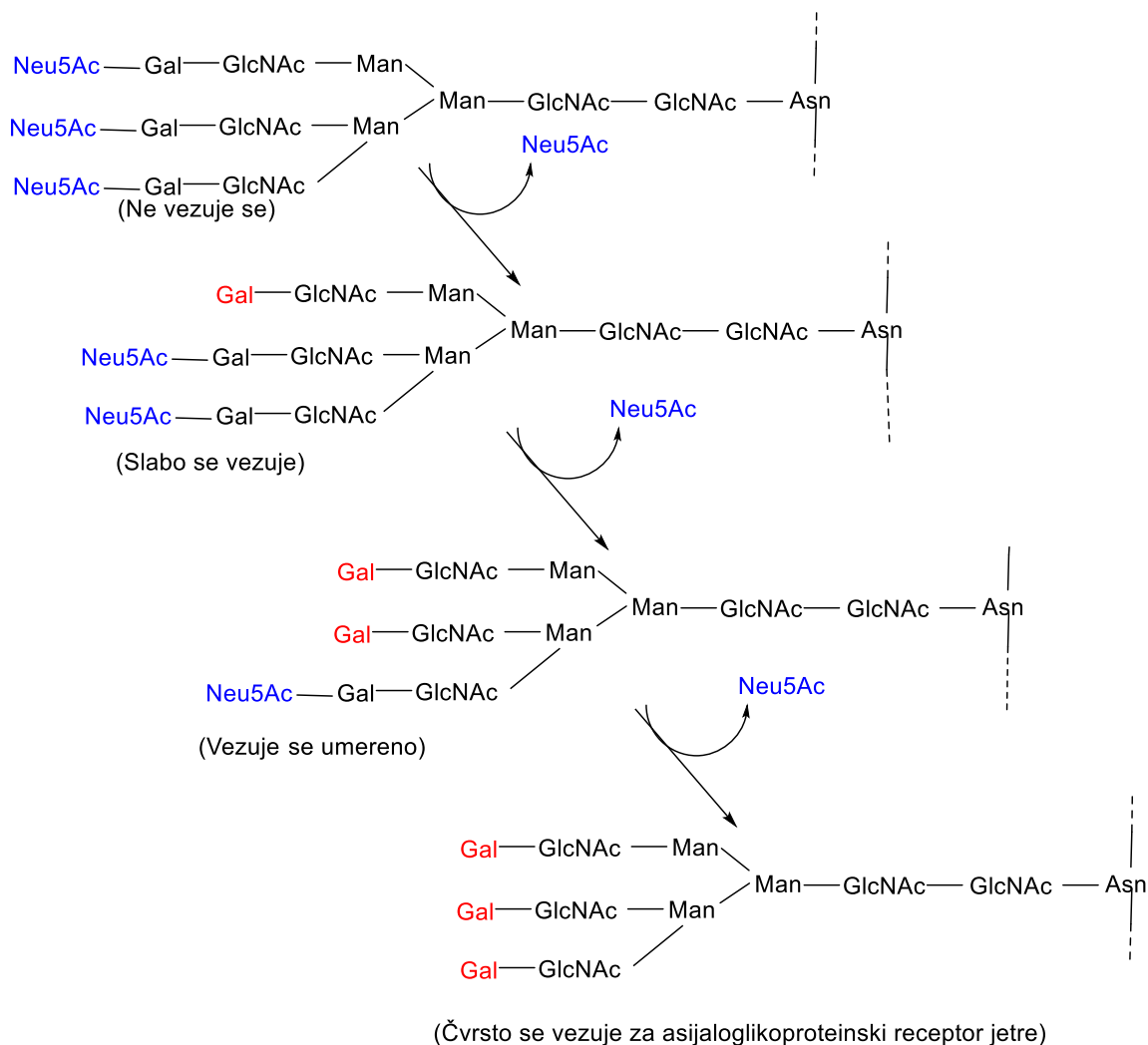
završeci vezuju isti oligosaharid. Oba dela, peptidni i oligosaharidni su neophodni za prepoznavanje antitela, međutim specifičnost im daje amino-kiselinska sekvenca [17]. Mucin je visoko molekularni glikoprotein koji se formira na površini epitela gastrointestinalnog i respiratornog trakta ostvarujući selektivnu i zaštitnu barijeru. Takođe je nađen i na površini kancernih ćelija. Sposobnost ćelije da metastazira zavisi od izlučenog mucina. Kancer debelog creva proizvodi veliku količinu mucina i stoga ima veće invazivne osobine odnosno lakše se povezuje za osnovne proteine membrane nego ćelije koje luče manje mucina. Ovaj *O*-glikozilovani protein je jedan od prvih kandidata za imunološku terapiju kancera i stoga su ostvarena opsežna istraživanja radi karakterizacije oligosaharidnog segmenta i radi razumevanja ekspresije njegovog proteinskog dela od strane familije MUC gena (ima ih ukupno 18) [18].



**Slika 4.5.** Primer oligosaharida koji je prisutan u *N*-vezanom glikoproteinu **4**, koji je prikazan strukturnom formulom i simboličkim zapisom sekvence. Iako u strukturnoj formuli nije data prava konformacija ovog oligosaharida ipak se može dobiti ideja o razgranatosti i "nalik na ruku" prirodni šećernog dela glikoproteina.

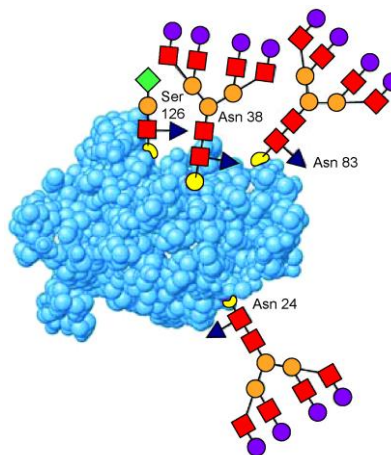


**Slika 4.6.** Primer glikoforme glikoproteina asijaloceruloplasmina (kada je za većinu terminalnih galaktoznih jedinica vezana sijalna kiselina 2→6 ili 2→3 vezom dobija se glikoforma ceruloplasmina, transportera za bakar).



**Slika 4.7.** Oligosaharidni deo glikoproteina ceruloplazmina (zadužen je za transport bakra) podleže strukturalnoj promeni tokom cirkulacije u krvnoj plazmi. Enzimi na zidovima krvnog suda vremenom uklanjaju sijalnu kiselinu otkrivajući galaktozne ostatke. U jetri asijaloglikoproteinski receptor vezuje ovako modifikovani glikoprotein. Najveći afinitet vezivanja glikoproteina za receptor ima struktura sa sva tri slobodna galaktozna ostatka. Kompleks receptora i glikoproteina se endocitozom uvlači u ćeliju, a zatim se glikoprotein degradira u celularnim lizozomima.

Eritropoetin (EPO) je glikoproteinski hormon koji kontrolira produkciju crvenih krvnih zrnaca (eritrocita). Dominantno mesto produkcije ovog citokina, koji predstavlja signalni molekul za prekursore eritrocita u koštanoj srži, jesu bubrezi i jednim delom jetra. Ovaj protein takođe ima neuroprotektivnu aktivnost i antiapoptotsku funkciju u nekoliko tipova tkiva [19]. Aktivni EPO ima 40% ugljenih hidrata. Glikozilacija stabilizuje protein u krvi. Ne glikozilovani protein ima samo 10% biološke aktivnosti glikozilovanog proteina jer se neglikozilovani protein uklanja iz krvotoka (filtracija bubrega). Tehnikom rekombinacije gena proizveden je sintetički EPO koji se aplicira putem injekcija. U medicini EPO se koristi u svrhu lečenja težih slučajeva anemije, međutim ovaj bioaktivni glikoprotein se često koristi i kao doping sredstvo kod sportista. Sportisti koji se bave sportovima izdržljivosti najčešće koriste EPO kako bi povećali broj eritrocita, koji služe kao prenosioci kiseonika. Ovo često može biti prilično opasno. Naime, time što omogućava veću izdržljivost, organizam dođe u stanje dehidriranosti, viskoznost krvi se povećava, što doprinosi stvaranju ugrušaka u krvnim sudovima, srčanih i moždanih udara [20].



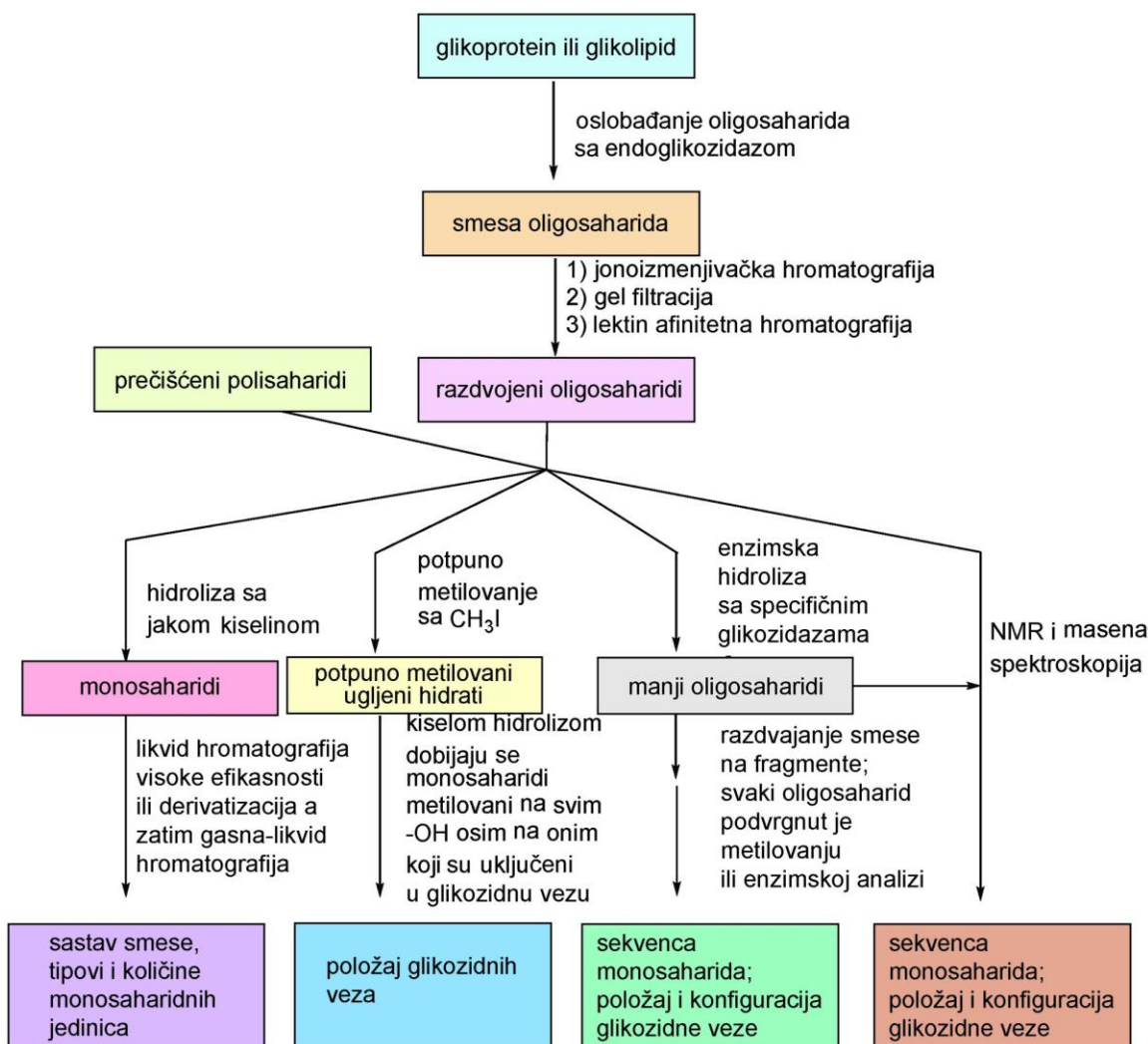
**Slika 4.8.** EPO je glikoproteinski hormon koji regulira produkciju crvenih krvnih zrnaca kao odgovor na smanjenje koncentracije kiseonika u tkivu.

#### 4.1. Rad sa ugljenim hidratima

Veoma je izazovan poduhvat određivanje položaja glikozilacije aminokiselinske sekvence kao i konstitucije oligosaharidnog dela glikoproteina, ali je vredno truda

saznanje kako se vrši glikozilacija pri normalnim uslovima i način na koji se ona menja kod razvoja genetske bolesti ili kancera.

Ugljeni hidrat koji je pročišćen u prvom koraku, često je potrebno analizirati svim navedenim metodama kako bi se u potpunosti okarakterisao (Slika 4.9).

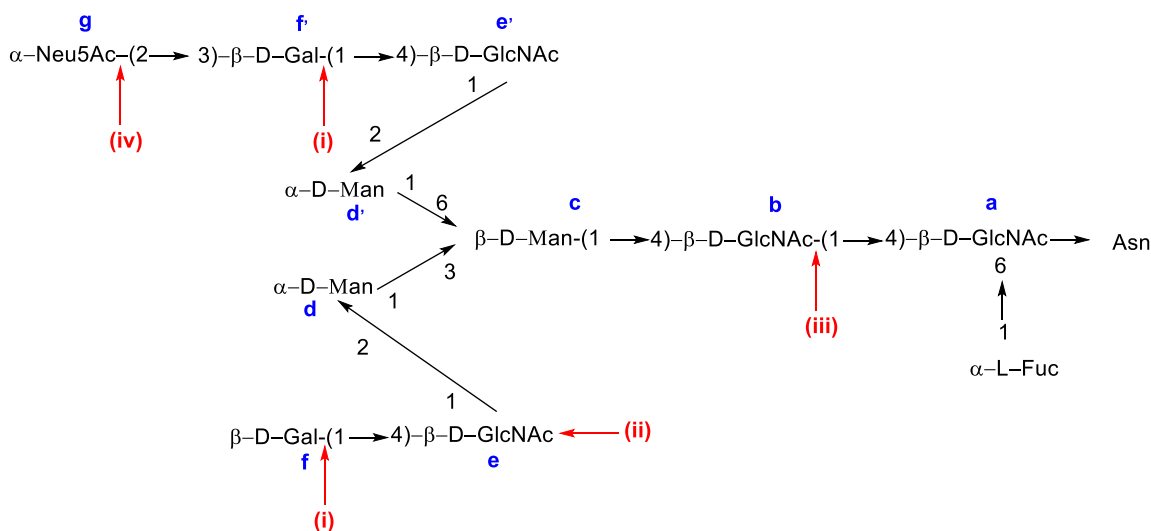


Slika 4.9. Metode analize ugljenih hidrata [16].

#### 4.1.1. Enzimске procedure određivanja ugljenohidratnog sastava glikoproteina

Da bi se okarakterisala oligosaharidna komponenta glikoproteina, oligosaharidi se prvo moraju odvojiti od proteinskog dela pomoću prečišćenih enzima - glikozidaza, koji specifično odcepljuju *O*- ili *N*-vezane oligosaharide. Treba razlikovati dve vrste enzima. Oni enzimi sa hidrolitičkom aktivnošću samo na ne-redukujućem, terminalnom delu glikanskog lanca, koji oslobađaju monosaharide i nazivaju se *exo*-glikozidaze. U

suprotnom, *endo*-glikozidaze hidrolizuju veze unutrašnjih parova monosaharida u glikanskom lancu pri čemu oslobađaju oligosaharide. Visoka specifičnost prema šećernim delovima i anomernim konfiguracijama glikozidnih veza karakteristična je za većinu *exo*- i *endo*-glikozidaza. Sekvencionalna degradacija glikanskog lanca je prikazana na Slici 4.10. Glikopeptid je otporan na dejstvo  $\alpha$ -D-manozidaze,  $\beta$ -D-manozidaze i  $\beta$ -N-acetilglukozaminidaze, ali će osloboditi D-galaktozu (ostatak **f**) ako se tretira  $\beta$ -D-galaktozidazom iz *Streptococcus pneumoniae* (Slika 4.10. **i**), što potvrđuje terminalni položaj  $\beta$ -D-galaktoznog ostatka, povezanog (1→4) vezom za drugi šećerni ostatak. Zaostali glikopeptid će sada osloboditi N-acetilglukozamin (ostatak **e**) nakon tretmana sa  $\beta$ -N-acetilglukozaminidazom (Slika 4.10. **ii**), potvrđujući strukturu pretposlednjeg šećera iz ne-redukujućeg kraja lanca. U ovom slučaju tip glikozidne veze se ne može utvrditi zbog široke specifičnosti datog enzima. Vezu između dve  $\beta$ -N-acetilglukozaminske jedinice u susedstvu asparaginskog ostatka (Slika 4.10. **iii**) uspešno će raskinuti enzim *endo*- $\beta$ -N-acetilglukozaminidaza D. Dodatna specifičnost ovog enzima je potreba za postojanjem 1,3-povezanog  $\alpha$ -D-manoznog ostatka (**d**) kao ne-redukujućeg (terminalnog) ostatka glikopeptida.



**Slika 4.10.** Sekvencionalna degradacija glikopeptida sa *exo*- i *endo*-glikozidazama, koristeći **(i)** *exo*- $\beta$ -D-galaktozidazu, **(ii)** *exo*- $\beta$ -N-acetilglukozaminidazu, **(iii)** *endo*- $\beta$ -N-acetilglukozaminidaza D i **(iv)** neuraminidaza iz influenza virusa [12].

Zaostali heptasaharid (ostatak **b**, **c**, **d**, **d'**, **e'**, **f** i **g**) ne sadrži L-fukozu koji ostaje povezan sa N-acetilglukozaminskim ostatkom na delu šećer-peptidnog fragmenta. Enzimska

hidroliza drugog lanca može se postići na sledeći način: Hidrolizom sa influenza-viralnom neuraminidazom potvrđuje se prisustvo terminalnog položaja sijalne kiseline povezane (2→3) vezom za sledeći šećer (**g**). Njemu susedan šećer je identifikovan kao β-D-galaktozni ostatak, povezan (1→4) vezom, zbog njegove hidrolize sa *Streptococcus pneumoniae* β-D-galaktozidazom (**f**).

#### **4.1.2. Hemijski i fizički postupci za određivanje ugljenohidratnog sastava glikoproteina**

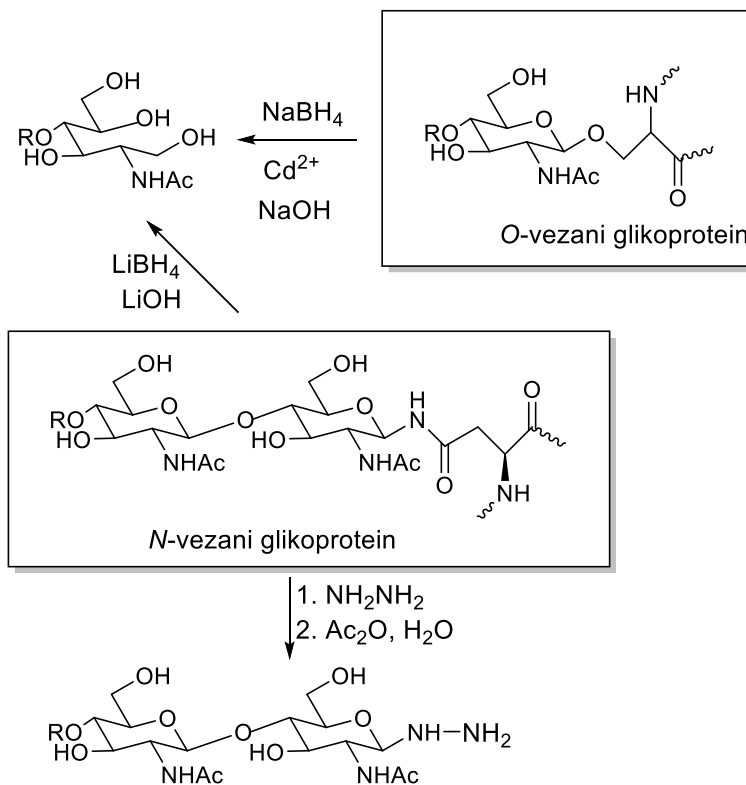
Alternativno enzimskom postupku, *N,O*-vezani glikani (šećerni lanci) mogu biti odvojeni od glikoproteina dejstvom sa alkalnim NaBH<sub>4</sub> ili sa hidrazinom. U prvom slučaju favorizovano je raskidanje O-Ser/Thr veze pri čemu se dobijaju alditoli. Tom prilikom dolazi do istovremenog delimičnog oslobađanja asparaginski *N*-vezanih glikopeptida. Hemoselektivnost može, međutim, biti značajno povećana prema *O*-vezanim oligosaharidima dodatkom kadmijunovih soli [21]. Razrađena je blaga metoda za oceppljenje oligosaharida kod *N*-vezanih glikoproteina, koja uključuje tretman sa LiBH<sub>4</sub>, LiOH i Li-citratom u vodenom *tert*-butanolu na 45 °C, uz naknadnu hidrolizu u prisustvu CH<sub>3</sub>COOH. Dobijeni oligosaharid je izolovan gel filtracijom i jonoizmenjivačkom hromatografijom u prinosu od 60-80% [22]. Jedna atraktivna hemijska metoda za raskidanje GlcNAc-Asn veze koristi anhidrovani hidrazin [23]. U ovom slučaju se sve peptidne veze raskidaju i amino kiseline se prevode u odgovarajuće hidrazide, a acetamido šećeri se deacetiluju. Rezultujući oligosaharidi mogu se koristiti za analizu ili da se prvo podvrgnu re-acetilovanju amino funkcija (Slika 4.11).

Metilovanjem se može odrediti pozicija glikozidne veze i veličina prstena kod oligosaharida. Ova klasična metoda potpunog metilovanja se sastoji od tretiranja celog polisaharida sa metil-jodidom u jako baznoj sredini da bi se sve slobodne hidroksilne grupe prevele u metil-etarske funkcije koje su stabilne prema hidrolizi. Sledeći korak je kiselna hidroliza metilovanog polisaharida. Nastali monosaharidni derivati će sadržavati slobodne OH grupe koje su bile uključene u formiranju glikozidne veze.

Da bi se odredila sekvenca monosaharidnih ostataka uključujući sve prisutne grane račvanja, koriste se ranije pomenute egzoglikozidaze poznate specifičnosti. Poznata

specifičnost tih egzoglikozidaza često omogućava razjašnjenje mesta i stereochemije vezivanja između monosaharida.

Dobijena smeša šećera se može razdvojiti gel filtracijom (jedna vrsta hromatografije prema veličini čestica, engl. *Size-exclusion chromatography*), jonoizmenjivačkom hromatografijom ili afinitetnom hromatografijom (koriste se prečišćeni lektini vezani kovalentnom vezom za nerastvorni nosač). Analiza oligosaharida se, u velikoj meri, oslanja na masenu spektrometriju (određuju se mase molekulskog jona i pojedinih fragmenata) i NMR spektroskopiju. NMR analiza, naročito za oligosaharide manjih dimenzija, može dati više informacija o sekvenci, mestu vezivanja i anomernoj konfiguraciji. Drugo važno sredstvo u definisanju šećera je hemijska sinteza, što se pokazalo kao moćan pristup u sagledavanju bioloških funkcija oligosaharida.



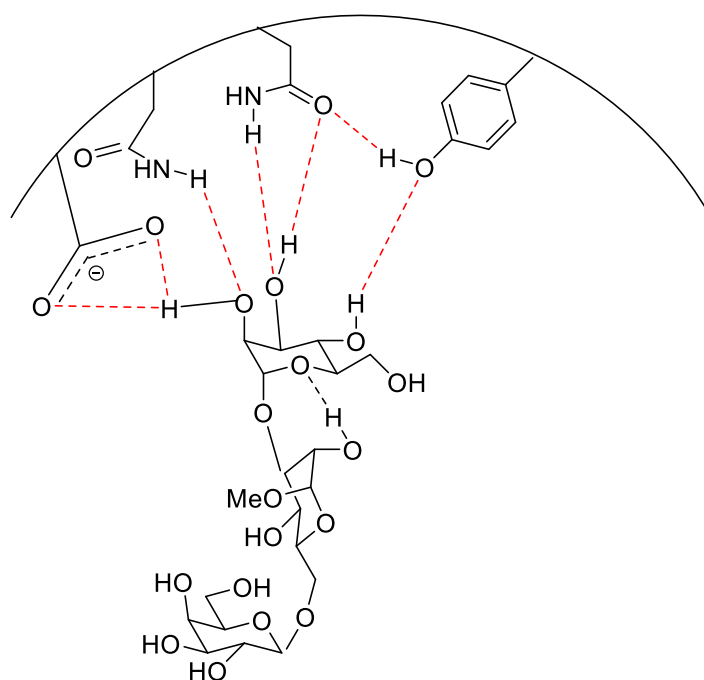
**Slika 4.11.** Moguća hemijska degradacija *N*-, *O*-vezanih glikoproteina [28]



## Poglavlje 5. LEKTINI

Lektini su proteini koji se mogu reverzibilno vezati za specifične segmente ugljenih hidrata vodoničnim vezama i hidrofobnim interakcijama. Lektini su prvi put izolovani iz biljaka, gde su uglavnom prisutni u semenju. Lektini su kasnije pronađeni u svim živim organizmima i javljaju se u vidu različitih molekulskih struktura. Imaju višestruku ulogu u različitim organizmima, **ali uvek deluju specifično u prepoznavanju mono- i oligosaharida**. Lektine je otkrio Stillmark 1888 godine. On je otkrio da ekstrakt ricinusovog semena (*Ricinus communis*) može "slepiti" (vezati nekovalentno) eritrocite. Kasnije (1940-tih godina) je utvrđeno da se slepljivanje može vršiti selektivno samo na bazi aktivnosti krvne grupe. Specifičnost lektina prema različitim ćelijskim tipovima se bazira na razlikama u glikozilaciji na njihovim površinama. Reč lektin potiče od latinske reči *lektus* = odabrati, što ukazuje na visoko specifičnu sposobnost vezivanja glikozilovanih struktura. Ovaj izraz je vremenom redefinisano i opisuje šećerno-vezane proteine koji nisu ni enzimi ni antitela (mada postoji sličnost u načinu vezivanja između njih). Lektini nasuprot njihovog površinskog načina vezivanja pokazuju veliku specifičnost u prepoznavanju visoko razgranatih kompleksnih šećera. Vezivanje koje se ostvaruje u **regionu šećernog prepoznavanja** (*engl. carbohydrate recognition domain; CRD*) je uglavnom posledica vodonične veze između proteinske karbonilne grupe i OH grupa šećernih liganada (Slika 5.1). Van der Waals-ove interakcije između hidrofobnih delova proteina lektina i šećernih hidrofobnih ostataka takođe povećavaju afinitet vezivanja. Pošto se vezivanje vrši samo na površini lektinske strukture, veza između jednog šećera i CRD je veoma slaba. Međutim, veoma se povećava afinitet i specifičnost datog lektina ako je više šećera pogodnog tipa i pravilne orijentacije u blizini lektinske strukture. To je takozvani **multivalentni efekat**. Specifičnost lektina može biti usmerena prema većem broju monosaharida. U slučaju concanavalina A (lectin iz *Canavalia ensiformis*) lektin prepoznaje glukozu, manozu i 2-acetamido-2-deoksi-D-glukozu. Optimalni zahtevi za vezivanje su hidroksilne grupe na C-3, C-4 i C-6  $\alpha$ -piranoza sa D-gluko ili D-mano konfiguracijom. U početku se mislilo da se lektin vezuje za neredukujući (terminalni) monosaharid, ali sada je već razjašnjeno da ovaj lektin prepoznaje i vezuje unutrašnji deo oligosaharidne strukture [12].

Lektini nisu samo značajni kod vezivanja eritrocita već usled toga što su ćelije na površini prekrivene glikoproteinima stoga igraju značajnu ulogu kod adhezionih procesa između ćelija. Tako na primer kod interakcije jajna ćelija-sperma kao i kod virusnih, odnosno bakterijskih ćelija interakcija (mikroorganizmi često koriste lektine da bi se vezali za ćeliju domaćina), lektini imaju odlučujuću ulogu za početnu fazu oplodnje i za inflamatorni odgovor respektivno. Funkcija lektina varira zavisno od organizma, ali svi oni deluju specifičnim prepoznavanjem mono- i oligosaharida. Već pomenuti asijaloglikoproteinski receptor u jetri je primer lektinske strukture. Lektini se mogu izolovati u čistom obliku afinitetnom hromatografijom. **Znači lektini su proteini ili glikoproteini neimunogenog porekla sa jednim ili više vezivnih mesta sa kojima se reverzibilno vezuju za specifične šećerne segmente vodoničnom vezom i van der Waals-ovim interakcijama.**



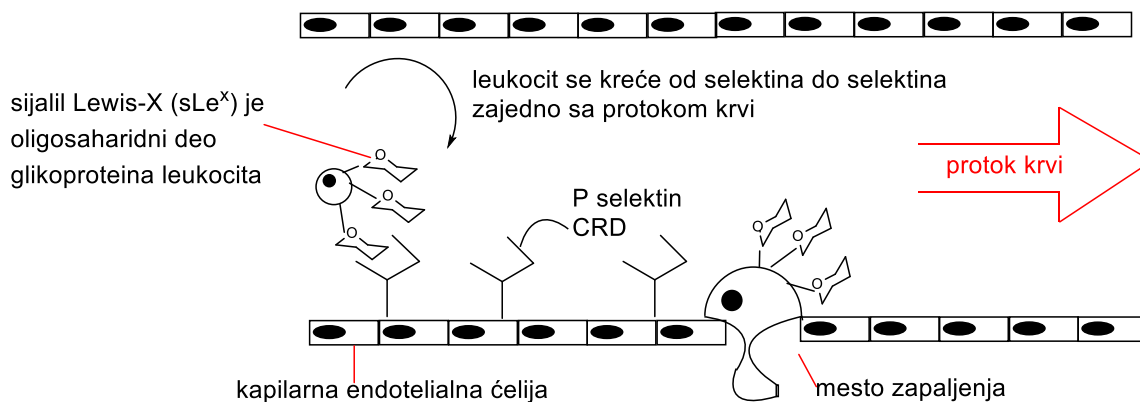
**Slika 5.1.** Uglavnom postoji samo jedan način da se razgranata šećerna struktura efikasno uklapa u CRD (region šećernog prepoznavanja). Ovo omogućava lektinsku specifičnosti. Veza koja se ostvaruje u CRD delu lektina je usled vodoničnih veza između proteinskih karbonilnih grupa i OH-grupa šećernih liganada.

### 5.1. Šećeri kod inflamatornih procesa

Oštećenja nastala na krvnim sudovima izazivaju oslobađanje signalnih supstanci koje izazivaju inflamatorni proces (odgovor). Inflamatorni odgovor koji nastupa nakon

povreda ili infekcija vodi ka brzom formiranju adhezivnih glikoproteina koji se pripremaju da pomognu normalnu popravku oštećenja. Lektini koji se nazivaju **selektini** brzo nastaju sa unutrašnje strane krvnih sudova i nazivaju se **E-selektini** (od reči endothelia) kao i na pločicama (**P-selektin** od reči **platelets**) koji vezuju za sebe šećere na specifičan način. Ovo vezivanje omogućava prijanjanje leukocita za zid krvnog suda. Tokom protoka krvi leukociti se kreću prema oštećenom mestu usporavajući se procesom vezivanja za lektin (selektin **E** i selektin **P**) sa svojim odgovarajućim **L-selektinskim** površinskim adhezivnim lektinom (Slika 5.2). Mehanizam ovog adhezionog procesa uključuje specifično vezivanje E-selektina za sijalil-Lewis<sup>x</sup> koji se nalazi na površini leukocita, a po strukturi je tetrasaharid koji je prikazan na Slici 5.5. Dokazano je da je sijalna kiselina bitna komponenta za ovo vezivanje pošto sijalidazom tretirani leukociti nisu u stanju da ostvare ovo vezivanje. Sintezom velikog broja mimetika dokazano je da L-fukoza nije neophodna strukturna komponenta za biološku aktivnost sijalil Lewis<sup>x</sup>.

Dok je kod zdravog organizma ovaj proces veoma dobro kontrolisan, dotle u nekim slučajevima preveliki broj leukocita prilazi u oštećenom tkivu izazivajući sepsu, artritis, astmu i srčana oboljenja. Za te slučajeve dizajniran je lek koji blokira vezivanje sijalil-Lewis<sup>x</sup> za selektin na oštećenoj membrani. Struktura **6** (Slika 5.5) je 800 puta potentniji inhibitor za **P-selektin** od sijalil-Lewis<sup>x</sup>. Dodatna informacija je da je sijalil-Lewis<sup>x</sup> takođe nađen na ćelijama karcinoma pluća i debelog creva što može implicirati na metastazu humanog kancera. Iz ovih podataka sledi da bi sijalil-Lewis<sup>x</sup> mogao poslužiti kao antiinflamatorni i antitumorski lek, jer bi on blokirao E-selektin i na taj način sprečio vezivanje leukocita odnosno kancerne ćelije za njega [24].



Slika 5.2.

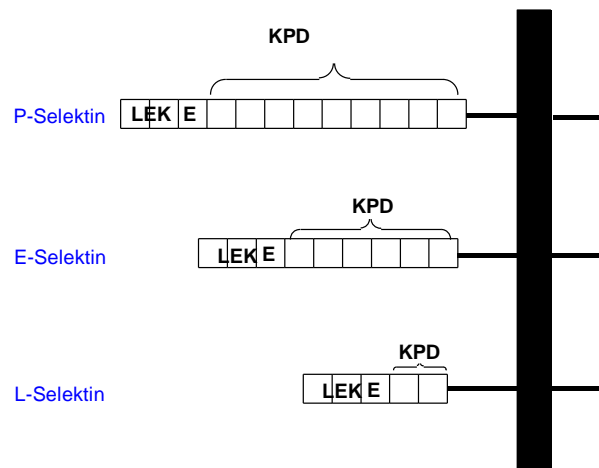
Leukociti se kotrljajući kreću kroz vaskularni sistem. Ovo kretanje je potpomognuto reverzibilnom adhezionom interakcijom leukocita i vaskularne površine. Interakcija uključuje adhezione proteine selektine koji su nađeni kako na leukocitima tako i na vaskularnom zidu (eng. *endothelial cells*). P- i E-selektini se nalaze na vaskularnom endotelijumu i vezuju se za šećerne ligande na leukocitima. Selektini se formiraju na površini ćelija nakon njihovog izlaganja inflamatornim signalnim molekulima kao što su histamin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bakterijski endotoksini itd. Za P-selektine je dokazano da su uskladišteni u intracelularnim granulama i transportuju se do ćelijske membrane u periodu od sekunde do minute nakon izlaganja ćelije agensu ("okidaču").

U Tabeli 5.1. je dato svega nekoliko od velikog broja poznatih lektina, njihova specifičnost i njihova funkcija.

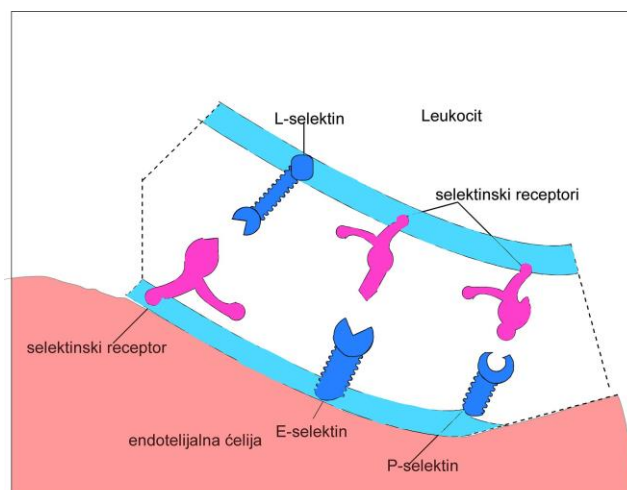
**Tabela 5.1.** Specifičnost i funkcija odabranih lektina životinjskog porekla [25]

Lektinska familija	Specifičnost prema ugljenom hidratu	Funkcija
Calneksin	Glukoza	Ligand-selektivni molekularni pratilac u endoplazmatičnom retikulumu
Lektini C-tipa	Promenljiva	Endocitoza specifičnog ćelijskog tipa
ERGIC-53	Manoza	Intracelularno uvlačenje glikoproteina i vezikula
Galektin	Galaktoza/laktoza	Regulacija rasta ćelije i ćelija-matriks interakcija
Pentraksin	Promenljiva	Anti-infalamatorna aktivnost
Selektin	Promenljiva	Ćelijska pokretljivost

## Adhezioni proteini familije selektina



**Slika 5.3.** Selektini imaju karakteristične delove strukture sadržavajući *N*-terminalni ekstracelularni lektin (**LEK**), jedan epidermalni faktor rasta (**E**), seriju od 2–9 kratkog ponavljajućeg dela (**KPD**), jedan transmembranski segment i kratak citoplazmatični deo [25]

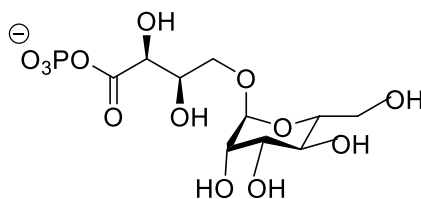
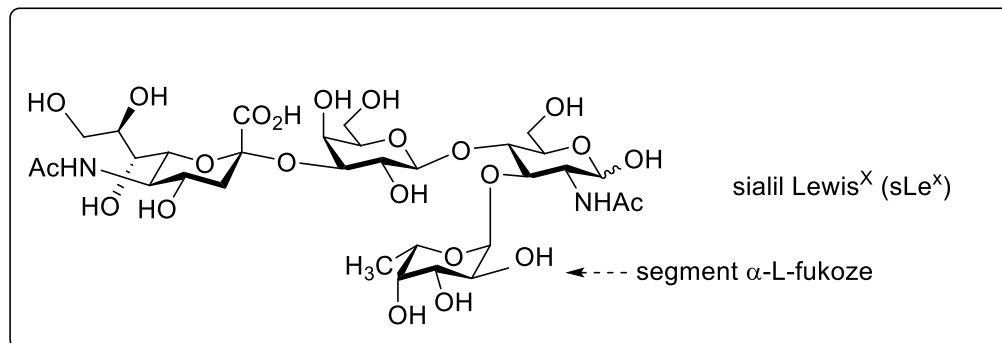


**Slika 5.4.** Interakcije selektina i njihovih receptora [25]

Lektin jacalin (*engl*) koji je izolovan iz semena tropskog voća *Jackfruit* (*Artocarpus integrifolia*, Slika 5.6) pokazuje selektivnost za  $\alpha$ -*O*-glikozide a specifično za galaktozni (Gal) ili *N*-acetil-galaktozaminski segment (GalNAc). Veoma je specifičan za Thomsen-Friedenrich-ov antigen, koji je T-antigenski disaharid, koji je povezan sa tumorom i generalno je specifičan za *O*-vezane glikoproteine (*O*-glikani). Nedavno je utvrđeno da jakalin sprečava HIV-1 infekciju *in vitro*. Ispitivanja ponašanja lektina daju mogućnosti

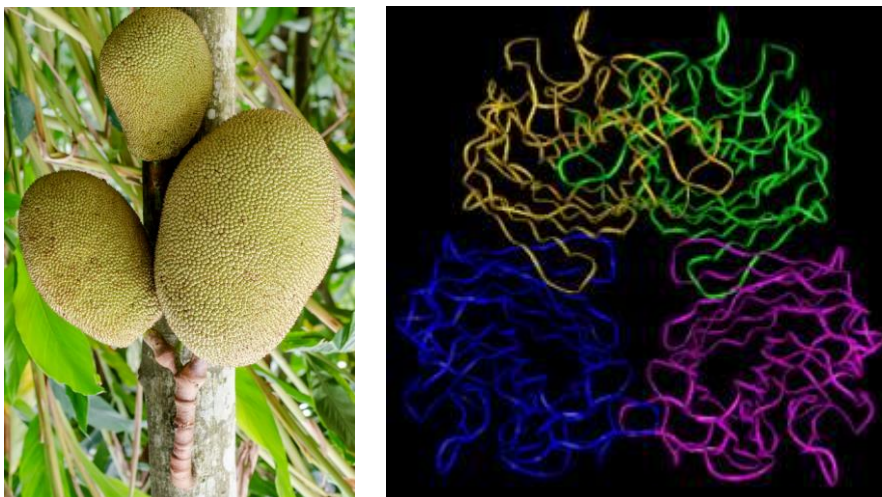
da se razjasne procesi i pojmovi molekulskih mehanizama za ćelijsku diferencijaciju, malignitet, imunološki odgovor, organizaciju i strukturu membrane [26].

Jakalin sadrži 4 podjedinice koje su povezane nekovalentnim interakcijama. Dve podjedinice su veličine 10 kDa a ostale dve 16 kDa. Zbog osobine ovog lektina da se vezuje za čovečija antitela IgA, sirovi jakalin se prečišćava afinitetnom hromatografijom na imobilizovanom IgA ili podjedinicom IgA1.



6

**Slika 5.4.** Sijalil Lewis<sup>X</sup> ima značajnu ulogu pri inflamatornim procesima, bolesti imunološkog sistema i metastazi kancera. Sijalil Lewis<sup>X</sup> je jezgro koje se prepoznaje pomoću ćelijske adhezione supstance E-selektina, koji se brzo nakon ozleda formira na površini ćelija krvnih sudova. Ovo prepoznavanje je odgovorno za antiinflamatorni odgovor, a takođe i za formiranje metastaze jer sijalil Lewis<sup>X</sup> tada postaje determinanta neutrofila (tip leuokocita) i tumorskih ćelija u metastazi.

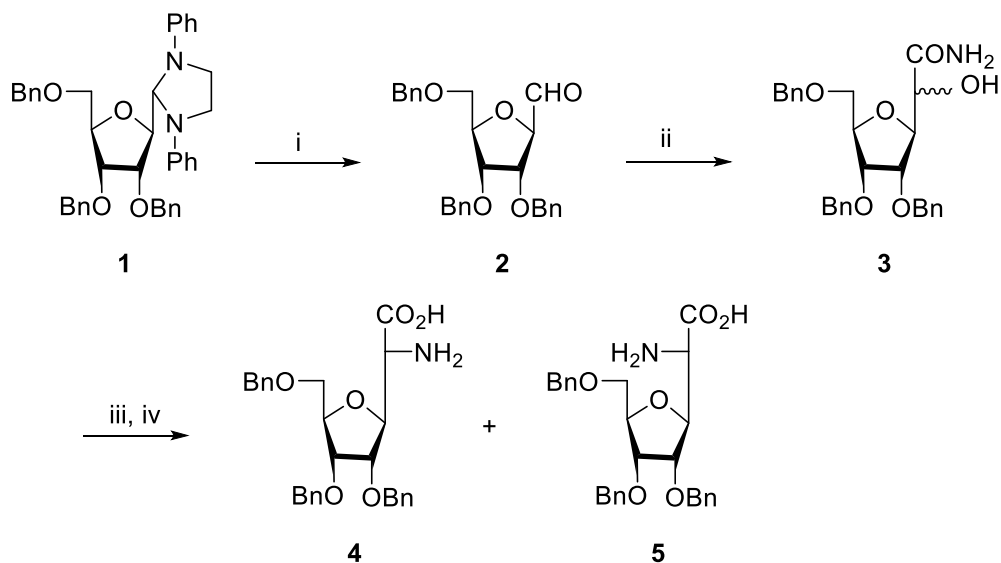


**Slika 5.5.** Plod tropske biljke *Artocarpus integrifolia* iz kojeg je izolovan lektin jakalin (slika levo). Šematski prikaz njegove strukture nalazi se na slici desno.

## 5.2. C-Glikozil-amino kiseline

C-Glikozil-amino kiseline su jedinjenja kod kojih je za anomerni ugljenikov atom šećera C-C vezom vezana neka amino kiselina. Ranije je rečeno da su prirodni glikopeptidi podeljeni na *O*-glikopeptide (kod kojih šećerni deo formira *O*-glikozilnu vezu sa L-treoninom ili L-serinom) i *N*-glikopeptide (kod kojih postoji *N*-glikozilna veza sa asparaginom). Postoji veliki interes medicinskih hemičara za dobijanje neprirodnih C-glikozil-amino kiselina, kao potencijalnih gradivnih elemenata u sintezi modifikovanih glikopeptida koji bi mogli poslužiti za dobijanje terapijski korisnih mimetika. Pokazujući veću otpornost prema hidrolitičkim enzimima neki modifikovani glikopeptidi imaju čak superiornije osobine od prirodnih derivata. U cilju sinteze veštačkih glikopeptida Dondoni je opisao metode sinteze šećernih derivata kod kojih je anomerni ugljenikov atom povezuje šećere i amino kiseline, kao npr. glicin, alanin, serin, asparagin, tirozin i triptofan [9]. Stereoselektivne transformacije D-riboze u 2-( $\beta$ -D-ribofuranozil)-L i D-glicin ostvarene su polazeći od 2-(2,3,5-tri-O-benzil- $\beta$ -D-ribofuranozil)-1,3-difenilimidazolidina (**1**) koji je nakon kisele hidrolize aldehidne zaštite podvrgnut *in situ* tretmanu sa smesom natrijum-cijanid/kalijum-karbonat. Dobijeni cijanohidriini dejstvom vodonik-peroksida podležu sukcesivnoj transformaciji nitrilne grupe u  $\alpha$ -hidroksiamidnu (**3**). Nastali epimeri su razdvojeni kao *O*-mezil derivati koji su odvojeno podvrgnuti

transformaciji u azide, koji su naknadno redukovani i deprotektovani katalitičkim hidrogenovanjem dajući epimerne glikozil amino kiseline **4** i **5** [27].



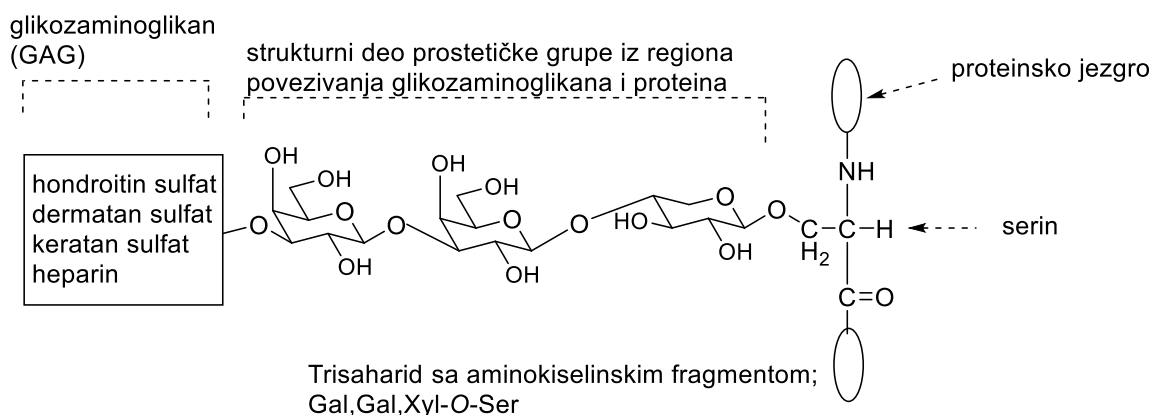
**Šema 5.1.** i) TsOH, ii) NaCN, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, iii) a) MsCl, Py, b) LiN<sub>3</sub>, DMF, iv) aq. HCl, b) H<sub>2</sub>, Pd/C, EtOH, NH<sub>4</sub>OAc, H<sub>2</sub>O.



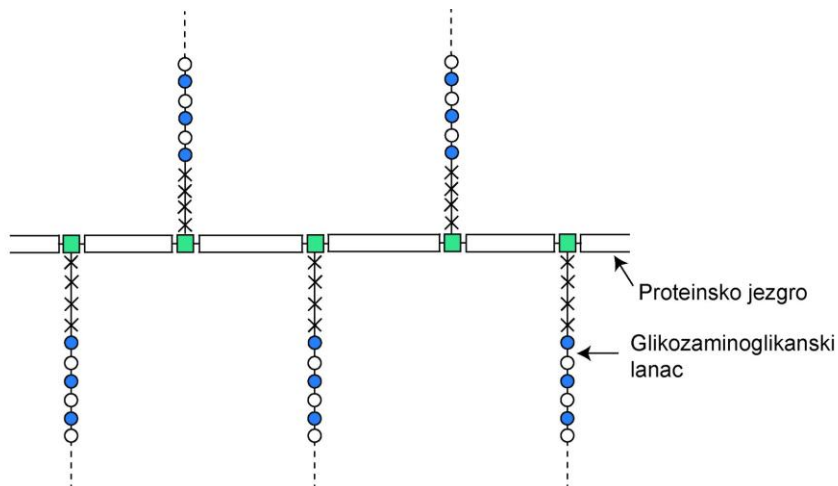
## Poglavlje 6. PROTEOGLIKANI

Proteoglikani su grupa glikoproteina (podklasa glikoproteina) koji sadrže veliki udeo polisaharida, tako da se nekad smatralo da je protein samo kontaminirajuća komponenta polisaharida. Ovi proteini sadrže kovalentnom vezom vezane glikozaminoglikane (polisaharidni deo). Glikozaminoglikani (GAG) su najrasprostranjeniji heteropolisaharidi u organizmu (stari naziv: mukopolisaharidi). Ovi dugi, nerazgranati biopolimeri sadrže ponavljajuću disaharidnu jedinicu, koja je najčešće 2-amino-2-deoksi šećer (GalNAc ili GlcNAc) povezan sa uronskom kiselinom (glukuronat ili iduronat). GAG je negativno naelektrisan polisaharid, jer sadrži anjonske grupe kao što su karboksilatna ili sulfatna. Ovi polisaharidi se nalaze kod životinja i čoveka na površini ćelija, ili u matriksu između ćelija. Visoka viskoznost i niska kompresibilnosti čini ih idealnim za podmazivanje u zglobovima. U isto vreme, njihova krutost obezbeđuje strukturni integritet ćelije i omogućava lakši prolaz između ćelija, što je važno za migracione procese. Ovi polisaharidi su takođe nađeni kod bakterija ali ne i kod biljaka [16].

Postoje pet tipova glikozaminoglikana: *hondroitin sulfat*, *dermatan sulfat*, *keratan sulfat*, *heparin* i *hijaluronska kiselina*. Prve četiri grupe se obično vezuju za protein *O*-glikozidnom vezom preko trisaharidne jedinice Gal-Gal-Xyl-*O*-Ser (Slika 6.1). Proteinsko jezgro proteoglikana je bogato serinskim i treoninskim ostacima što omogućava vezivanje većeg broja GAG-a za njega (struktura podseća na četku).



**Slika 6.1.** Polisaharidni nizovi su vezani pomoću jedne trisaharidne sekvence (galaktoza-galaktoza-ksiloza) za hidroksilnu grupu serina u proteinu. Serin, prema tome, služi kao mesto na kojemu se polisaharidna prostetička grupa grana od proteina [24].



Opšti prikaz proteoglikana. □ , regioni proteinskog lanca koji nisu uključeni u glikopeptidne veze; ■ , amino kiselinski delovi uključeni u glikopeptidne veze; × , monosaharidne jedinice iz vezivnog regiona koji nisu tipični za glikozaminoglikanski lanac; ● , i ○ , monosaharidne jedinice iz ponavljajuće disaharidne sekvence glikozaminoglikanskog lanca.

**Slika 6.2.** Glikozaminoglikani su delovi proteoglikana i uključeni su u različite ekstracelularne (ponekad u intracelularne) funkcije[12].

*Hondroitin sulfat* je verovatno najrasprostranjeniji glikozaminoglikan u čovečijem organizmu. Javlja se u velikom broju tkiva međutim u najvećoj koncentraciji u hrskavici.

Javlja se u polimernoj formi disaharidne ponavljajuće jedinice prikazane na Slici 6.3. pod brojem **1**, gde je kod *Hondroitin 4-sulfata* O-4, a kod *Hondroitin 6-sulfata* je O-6 u obliku sulfatovane amino šećerne komponente. U oba jedinjenja disaharidna jedinica koja se ponavlja, sastavljena je od  $\beta$ -D-glukuronske kiseline koja je povezana 1,3-glikozidnom vezom sa drugim delom, a to je *N*-acetilgalaktozamin sulfat. U formi bez sulfatnih grupa javlja se u placenti gde mu se vremenom smanjuje koncentracija. Osim toga, *Hondroitin sulfati* su dosta heterogeni s obzirom na dužinu polisaharidnog lanca i stepena sulfatacije. Neke disaharidne jedinice nisu uopšte sulfatovane druge sadrže sulfat u položajevima 4 i 6 u heksozaminu ili u položaju 2 i 3 glukuronske kiseline.

*Dermatan sulfat* se nalazi u koži, tetivama i srčanim zaliscima. Razlikuje se od hondroitin-4- ili 6-sulfata po tome što mu je karakteristična uronska kiselina L-iduronska kiselina (Slika 6.3). Poseduje međutim, i promenljive količine D-glukuronske kiseline. Glikozidne veze u dermatan sulfatu imaju isti položaj i konfiguraciju kao i u hondroitin sulfatu. Sulfatna grupa može se javljati na O-2 položaju uronske kiseline. Dermatan sulfat

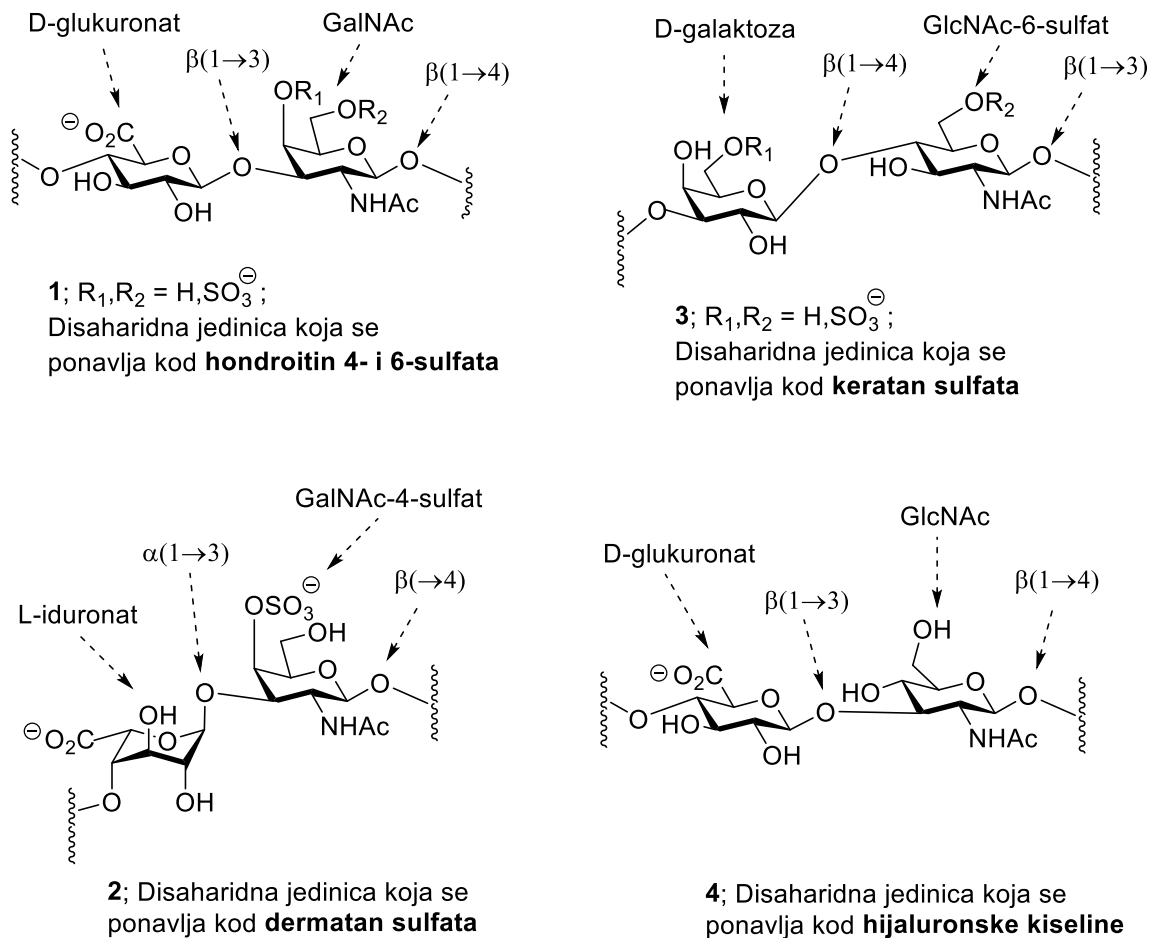
je poznat i pod nazivom  $\beta$ -heparin, jer pokazuje slabo antikoagulaciono dejstvo, no za razliku od heparina, veoma slabo odstranjuje lipide. Disaharidne ponavljajuće jedinice mogu biti povezane 1→4 ili alternativno 1→3 glikozidnom vezom.

*Keratan sulfat* je nađen u korneji (rožnjača oka), embrionalnoj jetri i tkivu pluća, a u minimalno modifikovanoj formi u skeletnom tkivu (kao što su hrskavica i kosti). Heterogenost strukture mnogo je veća nego u slučaju hondroitina. Polisaharid keratan uglavnom je sastavljen iz disaharidnih jedinica, koje se ponavljaju, a sastoje se iz *N*-acetilglukozamina i galaktoze (Slika 6.3). U molekulu nema uronskih kiselina. Kao i kod prethodnih polimera veze između monosaharida su 1→3 i 1→4, ali stepen polimerizacije je za 10% manji. Ukupan sadržaj sulfata varira, no karakteristično je da je sulfat estarski vezan za ugljenik u položaju C-6, kako *N*-acetilglukozamina, tako i galaktoze. Opisane su bar dve vrste keratan sulfata: *keratan sulfat I* (nalazi se u korneji) i *keratan sulfat II* (nalazi se u skeletnom tkivu). Osim gore pomenutih monosaharida u disaharidnim jedinicama, koje se u keratinima ponavljaju nađene su još i manozna, fukoza, sijalna kiselina i *N*-acetilglukozamin. Ovaj poslednji heksozamin nađen je samo u keratan sulfatu II. U kornealnom *keratan sulfatu I* vezan je *N*-acetilglukozamin glikozidnom vezom tipičnom za glikoproteine, sa asparaginom u proteinskom delu. U skeletnom *keratan sulfatu II* bar je jedan deo veza sa proteinom vezan preko hidroksilnih grupa serina ili treonina.

*Hijaluronska kiselina* je takođe glikozaminglikan sa najvećom molekulskom masom, nekad čak do 10000 ponavljajućih jedinica. Jedinice disaharida koje se u njoj ponavljaju, sastoje se od glukuronske kiseline vezane za *N*-acetilglukozamin (Slika 6.3). Slična je, prema tome, po sastavu hondroitinu, a bitna je razlika u tome da hondroitin ima galaktozamin, dok hijaluronska kiselina ima glukozamin. *Hijaluronska kiselina* je jedinstvena među glikozaminglikanima pošto ne sadrži sulfatne grupe i nije kovalentno vezana za proteinsku strukturu. Međutim ona je komponenta ekstracelularnog matriksa ne-kovalentno kompleksirana sa proteoglikanom. Ima veliku sposobnost vezivanja vode što je čini dobrim amortizerom. *Hijaluronska kiselina* je veoma rasprostranjena supstanca kod sisara i nalazi se u koži, zidovima arterija, pupčanoj vrpici, oku, zglobovima, kao i u sluzi sličnoj supstanci za povezivanje ćelija i kao sredstvo za zadržavanje vode u

intesticijskim prostorima. Matriks u zglobovima je bogat proteoglikanima koji imaju polianjonsku strukturu i između njih je visok sadržaj vode. Ako se ovaj matriks stisne i otpusti zbog jonskih odbijajućih interakcija elastično se vraća u prvobitno stanje. *Hijaluronska kiselina* je sastavni deo kapsule nekih vrsta pneumokoka, streptokoka i nekih drugih organizama.

*Hijaluronidaza* je enzim, koji se nalazi u nekim tkivima, posebno u tkivu testisa i slezine, a imaju ga neke vrste pneumokoka i hemolitičkih streptokoka. Jedan enzim sličan *hijaluronidazi* iz testisa, otkriven je takođe u jetri, plućima i bubrezima pacova, a i u bubrezima, urinu, plazmi i sinovijalnoj tečnosti kod čoveka. *Hijaluronidaza* razgrađuje tkivnu *hijaluronsku kiselinu*, te tako smanjuje njen viskozitet i omogućuje da razne materije više prodru u tkivne prostore. *Hijaluronidaza* se zato ponekad naziva "faktor prodiranja" (ili širenja tj. "spreading factor"). Invazivnost nekih patogenih mikroorganizama povećana je zbog toga što luče hijaluronidazu. Enzim u sekretu testisa može razgraditi viskozne supstance koje okružuju jajnu ćeliju i tako omogućiti oplodnju. *Hijaluronidaza* se klinički koristi kao dodatak rastvorima koji se daju klizmom da bi se povećala apsorpcija datih supstanci.

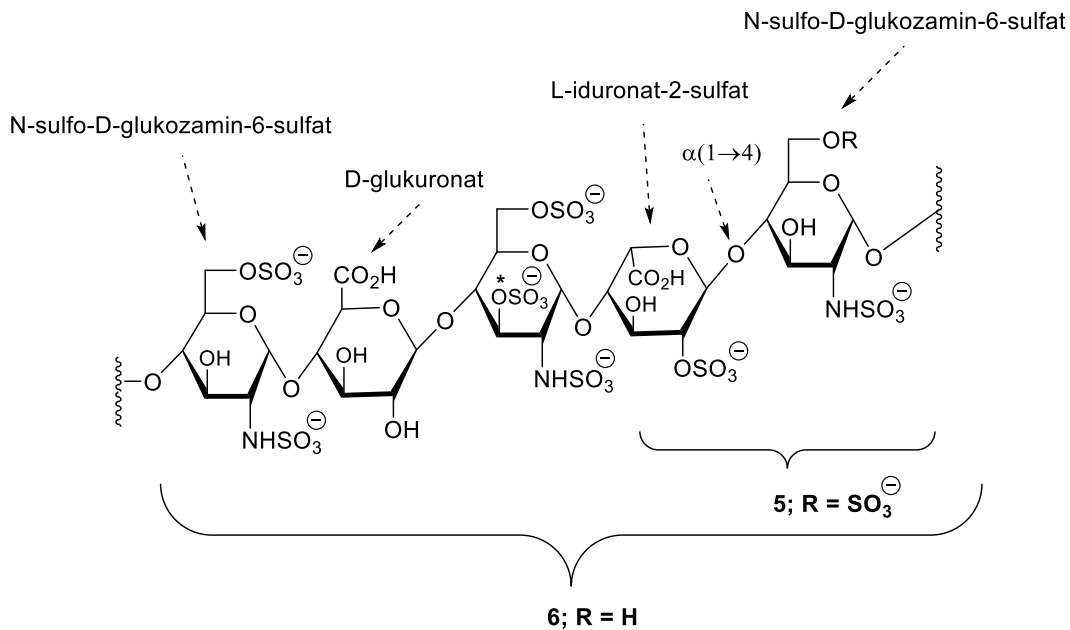


**Slika 6.3.** Ponavljajuće disaharidne jedinice glikozaminoglikana [24].

*Heparin* nije homogeno jedinjenje, nego grupa polimera unutar veoma heterogene familije polisaharida u okviru glikoproteina. Struktura heparina ukazuje na to da je ovaj molekul sastavljen od naizmeničnih jedinica uronske kiseline i  $\alpha$ -D-glukozamina, spojenih glikozidnim vezama 1 $\rightarrow$ 4. Monosaharidne jedinice uronske kiseline mogu biti ili  $\alpha$ -L-iduronska kiselina ili  $\beta$ -L-iduronska kiselina. Međutim, postoje i disaharidne jedinice u kojima je  $\alpha$ -L-iduronska kiselina zamenjena  $\beta$ -D-glukuronskom kiselinom. Amino grupe glukozamina uglavnom su u obliku sulfata mada je manji broj amino grupa acetilovano (Slika 6.4). Prosečan sadržaj sulfatnih grupa je 2-3 po disaharidnoj jedinici, mada drugi analog koji se zove *heparan sulfat* sadrži svega jednu sulfatnu grupu po disaharidnoj jedinici. *Heparin* koji se nalazi u granulama mastocita krvi oslobađa se posle povreda u cilju inhibicije zgrušavanja krvi. *Heparin* je veoma efikasan antikoagulant zbog svoje osobine vezivanja za antitrombin protease, jer se na taj način inhibiraju

proteolitički enzime koji su uključeni u procese zgrušavanje krvi. Zbog ovih osobina ova supstanca se koristi posle operacija i u tretmanu arterijske i venske tromboze.

*Heparina* ima u većoj količini u srcu i jetri, ali za kliničku upotrebu se izoluje iz pluća i mastocita. U normalnim fiziološkim uslovima *heparin* se nalazi samo intracelularno u mastocitima i bazofilnim leukocitima, dok *heparan sulfat* se nalazi na površini ćelija (u membranama).



**5** je disaharidni fragment heparina sa  $\alpha$ -L-iduronskom i  $\alpha$ -D-glukozaminskom komponentom dok **6** je pentasaharidni fragment heparina koji zadržava antikoagulantna svojstva. 3-O-Sulfatna grupa obeležena sa zvezdicom je bitna za visok afinitet vezivanja heparina za antitrombin III.

**Slika 6.4.** Prirodna antikoagulantna supstanca. Efikasno se vezuje za antitrombin III (protein koji je uključen u process koagulacije) i tako inhibira process zgrušavanja krvi [24].

## Poglavlje 7. MODIFIKOVANI UGLJENI HIDRATI I ŠEĆERNI ANALOZI

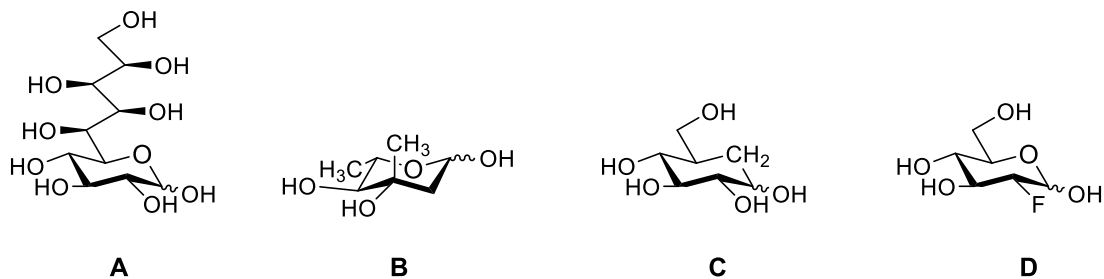
Pojam "modifikovani ugljeni hidrati" uopšteno definiše molekule u kojima je struktura prirodnih šećera modifikovana po veličini i/ili u funkcionalnim grupama. "Šećerni analozi" su podklasa modifikovanih ugljenih hidrata koji po veličini odgovaraju prirodnim šećerima, ali imaju modifikacije u okviru funkcionalnih grupa.

### 7.1. Modifikacije

Strukturalna modifikacija ugljenih hidrata se može ostvarivati u ugljeničnom skeletu i/ili u funkcionalnim grupama. Modifikacije u okviru ugljeničnog skeleta su uglavnom produžavanje skeleta pri čemu se dobijaju takozvani "viši ugljenični šećeri" (**A**; Slika 7.1) ili račvanjem, pri čemu se dobijaju takozvani "račvasti šećeri" (**B**; Slika 7.1). Modifikacije u okviru funkcionalnih grupa se mogu podeliti na dve grupe: modifikacije kiseonika u prstenu (**C**, Slika 7.1) što predstavlja promene anomernog centra i modifikacije koje uključuju ne-anomerne funkcionalne grupe (**D**, hidroksilna grupa, amino grupa, karboksilna i sulfatna grupa; Slika 7.1). Razlog za modifikaciju "ne-anomerne" funkcionalne grupe je izbegavanje mogućnosti za kovalentno vezivanje (eliminisanje "sidra"), kao npr. formiranje glikozidne veze od strane hidroksilne grupe ili promena zahteva za privlačne interakcije šećera za njegove receptore. U poslednjem slučaju je jasno da treba da se promeni OH grupu za neku drugu funkcionalnu grupu mada ostvarivanje tog cilja najčešće nije jednostavan zadatak.

Veliki interes se u poslednje vreme posvećuje modifikacijama anomerne funkcije, pošto te modifikacije daju strukture koje bi uticale na procese glikozilacije, koji su između ostalog veoma bitni kod formiranja glikokonjugata ćelijskog zida.

Druga klasa modifikovanih ugljenih hidrata za kojima interes značajno raste u poslednje vreme su oligosaharidni mimetici. Kod ovih analoga se jedna ili više monosaharidnih jedinica zamenjuje sa nešećernim fragmentima. U ovim slučajevima cilj je dobiti jednostavniju strukturu koja bi zadržavala biološke osobine prirodnog oligosaharida koji je od biomedicinskog značaja [28].

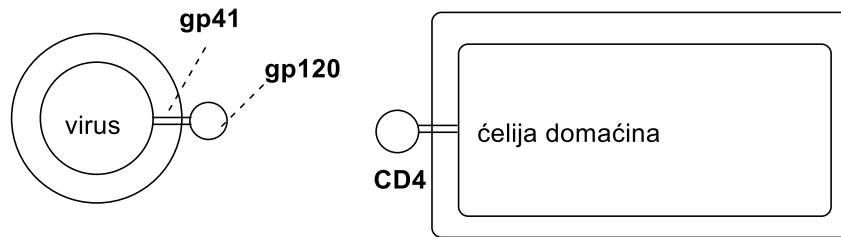


**Slika 7.1.** Modifikovani ugljeni hidrati. **A**, viši ugljeni šećer; **B**, račvasti šećer, **C**, ugljeni hidrat sa modifikovanim O-atomom u prstenu; **D**, ugljeni hidrat modifikovani na drugim funkcionalnim grupama [28]

## 7.2. Klasifikacija ugljenih hidrata sa modifikacijom anomerne funkcije

Modifikacijom anomerne funkcije omogućava se dobijanje stabilnih analoga glikozida i glikokonjugata koji mogu inhibirati enzime koji su uključeni u raskidanje glikozidne veze (glikoziltransferaze i glikozidaze). Stoga oni predstavljaju specifične inhibitore viralnih interakcija, tumora u metastazi i bolestima poremećaja metabolizma kao npr. diabetes (lat. *Diabetes mellitus*). Ustanovljeno je da su glikoproteini tumorskih ćelija veoma glikozilovani i da je šećerni deo mnogo razgranatiji uz veći sadržaj sijalne kiseline. Takođe je dokazano da tumorske ćelije imaju enormne količine glikozidaza (enzimi koji hidrolizuju glikozidne veze). Ova činjenica ukazuje na to da inhibitori formiranja odgovarajućih glikoproteina mogu poslužiti kao antineoplastični agensi, odnosno mogu inhibirati rast tumorskih ćelija i metastazu. Viralne infekcije su takođe posredovane šećernim delom glikoproteina. Naročito ciklus opstanka HIV virusa zahteva interakciju viralnog gp120 glikoproteina i specifičnog receptora na površini T ćelije domaćina (transmembranski protein CD4, Slika 7.2). Od posebnog je interesa inhibicija enzima glikozidaze, koji katalizuje integraciju šećernog dela koji je vezan za virusni protein. Ako se ovaj proces inhibira mnogo šećera će biti vezano za završetak proteina što uslovljava da protein zauzima nepovoljnu konformaciju. Pošto to najviše utiče na gp120 glikoprotein on se ne može ukloniti da bi se oslobodio gp41 protein koji je takođe veoma bitan za proces adsorpcije i prodor virusa u ćeliju domaćina. Stoga inhibitori glikozidaza sprečavaju replikacioni ciklus virusa, odnosno blokiraju prodor virusa u ćeliju domaćina. Neprirodni šećeri treba da budu prepoznatljivi od strane enzima, i treba da onemoguće reakciju koja se katalizuje datim enzimom. Idealan slučaj je kada neprirodan molekul ima veći afinitet za aktivni centar enzima nego prirodni supstrat.

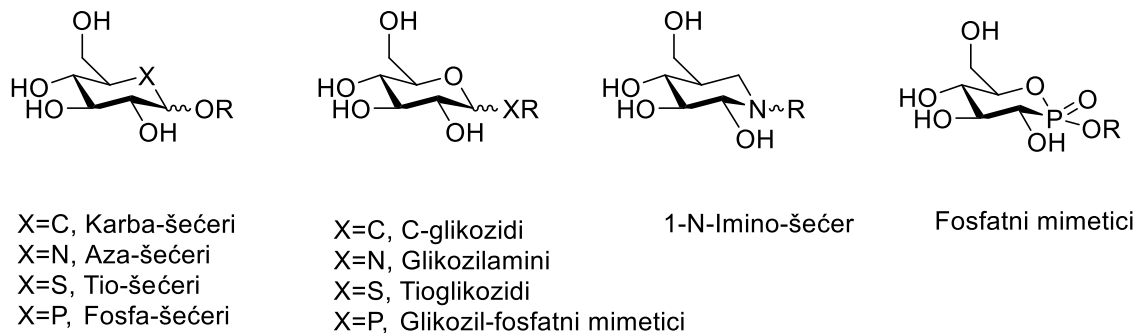




**Slika 7.2.** Šematski prikaz bitnih elemenata za adsorpciju HIV virusa

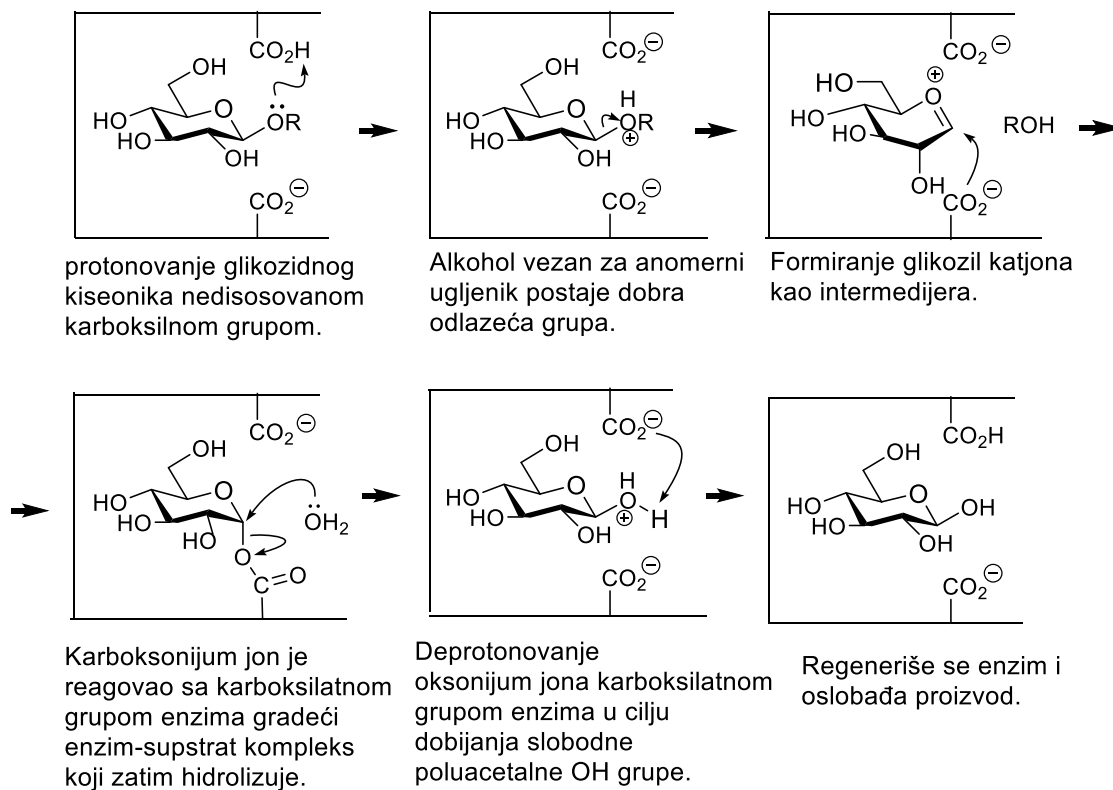
Mehanizam enzimskog delovanja glikozidaza je dobro poznat. Aktivno mesto enzima ima dva kisela ostatka (Šema 7.1), jedan koji vrši protonovanje glikozidnog kiseonika što omogućava odlazak ROH. Aktivaciona energija ovog raskidanja se snižava stabilizacijom intermedijerno nagrađenog oksonijum jona pomoću privlačnih interakcija sa anjonskim ostatkom iste ili različite aminokiseline. Oksonijum jon zatim reaguje sa kiseonikom karboksilatne grupe gradeći enzim-supstrat kompleks koji se na kraju hidrolizuje.

Modifikacija anomernog centra šećera ostvaruje se na tri različita načina kao što je prikazano na Slika 7.3. U svim slučajevima acetalna funkcija je modifikovana, a samim tim reaktivnost strukture je promenjena. Kiseonik iz prstena se najčešće menja sa ugljenikom, azotom, sumporom ili fosforom. Anomerni ugljenik se supstituiše sa azotom i fosforom. Supstitucija glikozidnog kiseonika sa ugljenikom daje stabilne ne-metabolizirajuće strukture takozvane "C-glikozide". Kada se kiseonik iz prstena zameni sa ugljenikom takođe se dobijaju stabilna jedinjenja koja se zovu "karba-šećeri" ili "pseudo-šećeri". Supstitucijom kiseonika iz prstena sa azotom dobijaju se "aza-šećeri" dok zamena glikozidnog kiseonika sa azotom daje glikozilamino derivate koji su sa biološkog aspekta manje interesantna jedinjenja zbog svoje nestabilnosti. Supstitucija kiseonika iz prstena sa dvovalentnim sumporom vodi ka formiranju "tio-šećera", dok glikozidi kod kojih je sumpor zamenio glikozidni kiseonik se nazivaju "tio-glikozidi". Ova poslednja klasa modifikovanih ugljenih hidrata se često koriste u procedurama glikozilacije ali su kao analozi manje interesantni. Kada se fosfor pozicionira na mesto kiseonika iz prstena dobijaju se "fosfa-šećeri", dok fosfatni mimetici nastaju zamenom anomernog kiseonika sa fosforom.



**Slika 7.3.** Različiti tipovi modifikacija na anomernom centru šećera [28].

Glikozidaze imaju dve karboksilatne grupe u katalitičkom centru, od kojih je jedna disosovana, dok je druga protonovana.



**Šema 7.1.** Mehanizam delovanja glikozidaza [28].

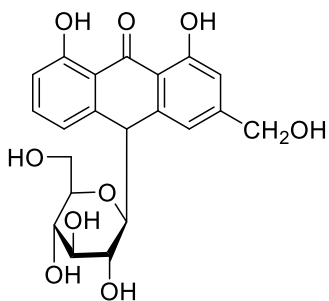
## Poglavlje 8. GLIKOZIDI

U prirodi, u živim organizmima, veoma je rasprostranjena, po hemijskoj strukturi heterogena klasa organskih jedinjenja kojoj je dat opšti naziv glikozidi. Po definiciji, molekuli svih glikozida se sastoje iz šećernog dela (glikonskog dela) i ne šećernog dela (aglikonskog ili geninskog dela) koji vrlo često ima složenu strukturu. Veza između šećernog ostatka i gena se najčešće u prirodi ostvaruje preko kiseonikovog atoma (*O*-glikozidi), ali se može ostvariti i preko atoma azota (*N*-glikozidi), sumpora (*S*-glikozidi), kao i preko atoma ugljenika (*C*-glikozidi).

### 8.1. C-Glikozidi

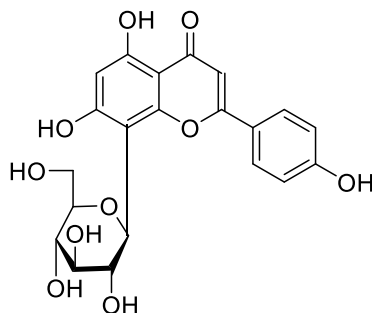
Serijski šećernih derivata kod kojih su monosaharidna jedinica i aglikonska struktura povezani C<sub>1</sub>-C vezom izolovani su i iz prirodnih izvora. Često je za anomerni centar vezana aromatična struktura. Ova jedinjenja se nazivaju "C-glikozidima", uprkos njihovoj neglikozidnoj prirodi, odnosno odsustvu acetalne funkcije. Za razliku od *O*- i *N*-glikozida ova jedinjenja pokazuju veliku stabilnost prema kiselom hidrolizi. Barbaloin (Slika 8.1), C-glikozidni derivat sa antracenskim aglikonom, izolovan je iz soka aloje, dok žuti pigment novozelandskih šuma, viteksin (Slika 8.1), sadrži aglikon flavonske strukture. Oba ova C-glikozida kiselom hidrolizom ne daju glukozu, ali oksidativnom degradacijom daju D-arabinozu. Mikroorganizmi su bogat izvor C-glikozidnih struktura koja često pokazuju značajnu biološku aktivnost. Tu pripada vineomicin B<sub>2</sub> koji spada u antitumorske antibiotike (Slika 8.1, [24]).

Izolovan iz soka aloje



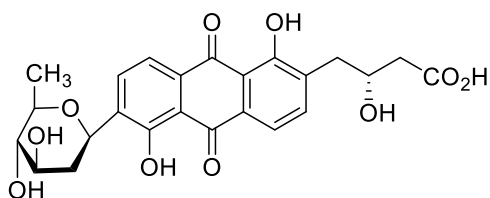
Aloin A, (10S)-barbaloin

Žuti pigment novozelandskih šuma



viteksin

Ne mogu se hidrolizovati ali oksidacijom daju arabinozu.



vineomicin B<sub>2</sub>

Antitumorski antibiotik izolovan iz *Streptomyces matensis vineus*.

Slika 8.1.

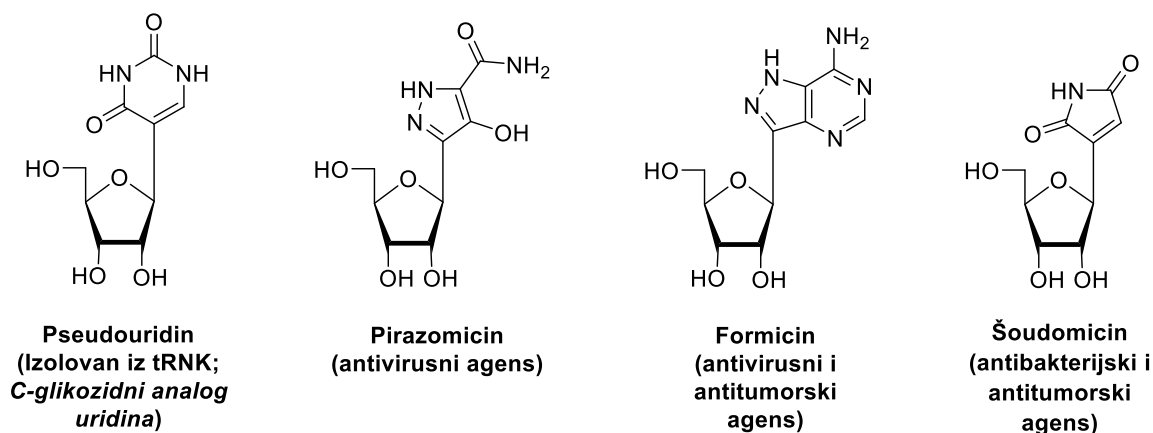
## 8.2. C-Nukleozidi

Poslednjih nekoliko godina postignuti su značajni rezultati u oblasti sinteze različitih biološki aktivnih molekula, pri čemu dizajn i sinteza određenih C-nukleozida predstavlja posebno aktuelnu problematiku. C-Nukleozidi su posebna klasa nukleozida koji, umesto C-N, sadrže C-C vezu između šećernog i heterocikličnog segmenta. Sintaza izosternih analoga nukleozida sa hemijski izmenjenim bazama i/ili strukturno modifikovanim šećernim komponentama predstavlja veoma aktuelnu problematiku zbog činjenice da pojedini predstavnici pokazuju interesantnu biološku aktivnost.

Hemijska i enzimaska stabilnost (prema dejstvu intracelularnih hidrolitičkih enzima) C–C glikozidne veze u C-nukleozidima predstavlja dodatnu atraktivnu osobinu ovih nukleozidnih analoga.

Pseudouridin (Slika 8.2) pripada C-nukleozidima, a izolovan je 1959. godine iz hidrolizata ribonukleinskih kiselina i predstavlja C-glikozidni analog uridina [29]. Posle toga izolovan je veliki broj prirodnih C-nukleozida uglavnom iz fermentacionih rastvora. Ova jedinjenja pokazuju različite biološke osobine: antitumorske, antiviralne,

antibakterijske dok neki od njih ispoljavaju više od jedne od navedenih aktivnosti (Slika 8.2).



Slika 8.2. Prirodni *C*-nukleozidi i njihova biološka aktivnost [30, 31]

### 8.3. Sinteze *C*-nukleozida sa pirazolskim heterocikličnim bazama

Prisustvo pirazolskog prstena u formicinu i pirazofurinu (drugi naziv je pirazomicinu) podstaklo je razvoj metoda za sintezu brojnih novih *C*-ribofuranozil pirazola, kao i odgovarajućih izosternih analoga sa izmenjenim šećernim komponentama.

Različito supstituisani derivati 2,5-anhidro-*D*-aldoza predstavljaju pogodan polazni materijal za sintezu *C*-nukleozida hemijskim transformacijama reaktivnog *C*-1 supstituenta u odgovarajući heterociklični sistem.

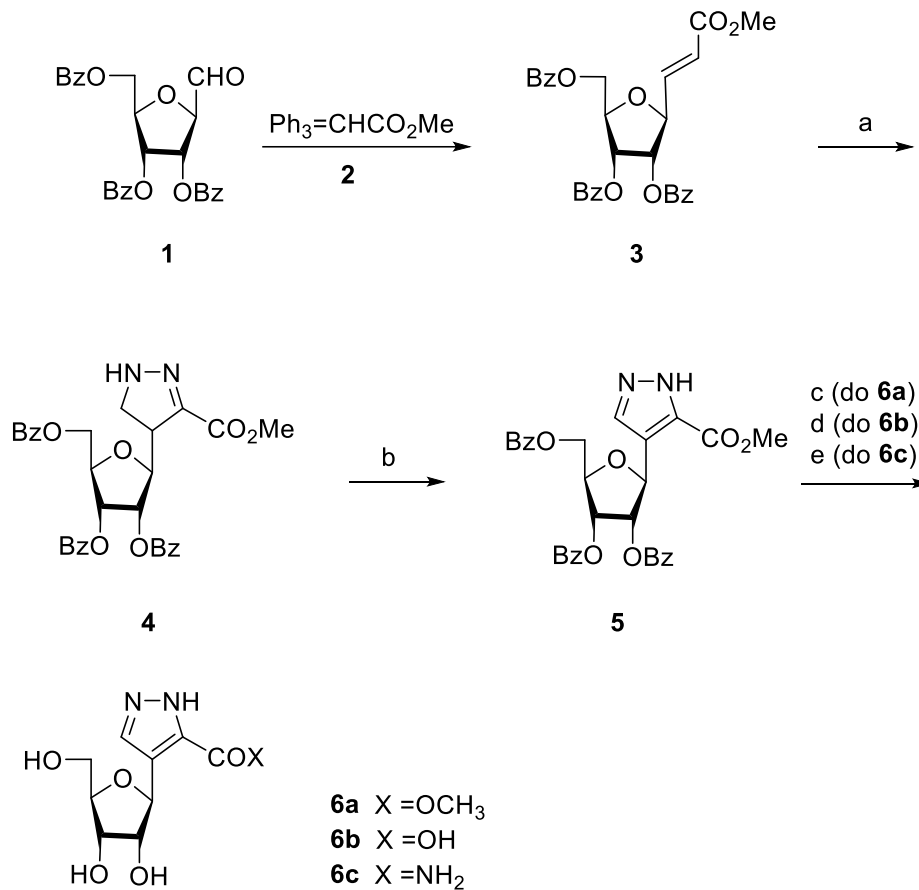
### 8.4. Sinteze 4-supstituisanog pirazola

Jedan od uobičajenih postupaka za sintezu 4-supstituisanih pirazola je 1,3-dipolarna adicija diazoalkana na pogodno aktivirane  $\beta$ -*D*-ribofuranozil olefine.

Albrecht, Repke i Moffatt su ostvarili sinteze nekoliko različitih 4-( $\beta$ -*D*-ribofuranozil)-pirazola primenom pomenute metode [32]. Metil-*E*-4,7-anhidro-5,6,8-tri-*O*-benzoil-2,3-dideoksi-*D*-*alo*-okt-2-enoat (**3**) se pokazao kao pogodan dipolarofil za pomenutu reakciju cikloadicije (Šema 8.1).

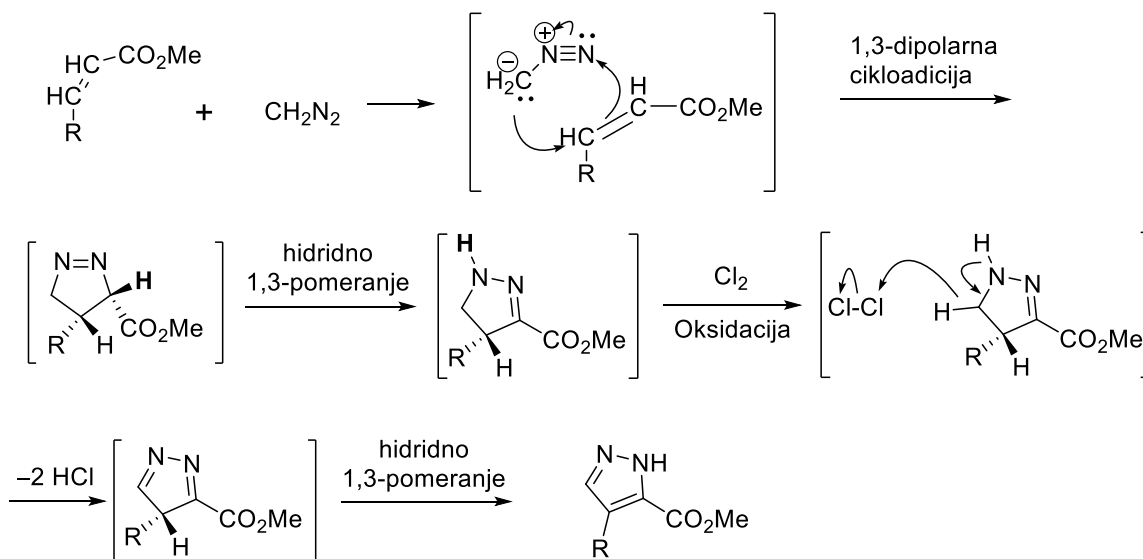
Polazno jedinjenje **3** je dobijeno kondenzacijom sveže pripremljene 2,5-anhidro-3,4,6-tri-*O*-benzoil-*D*-*alo*ze (**1**) sa karbometoksimetilentrifenilfosforanom (**2**) u metilen-hloridu (prinos 91%, isključivo *E*-izomer).

Nezasićeni ester **3** podleže 1,3-dipolarnoj cikloadiciji sa viškom diazometana na 0°C, pri čemu se dobija 2-pirazolin **4** u kvantitativnom prinosu kao smesa tautomera, što je ustanovljeno NMR analizom. Mogućnost dehidrogenacije **4** u pirazol **5** ispitivana je pri različitim reakcionim uslovima. Kao daleko najefikasnija metoda, pokazala se reakcija razblaženog rastvora 2-pirazolina sa 2-10 molarnim viškom sveže pripremljenog rastvora hlora u ugljentetrahloridu. Pod tim uslovima, pirazolin **4** preveden je u kristalni 5-karbometoksi-4-(2,3,5-tri-*O*-benzoil- $\beta$ -D-ribofuranozil)pirazol (**5**) u ukupnom prinosu od 86%, računato na nezasićeni ester **3**. Reakcija metanolize tri-*O*-benzoil derivata **5** u prisustvu katalitičkih količina natrijum-metoksida dala je kristalni 3(5)-karbometoksi-4-( $\beta$ -D-ribofuranozil)pirazol (**6a**) u prinosu od 87%. Hidroliza metil estra **6a**, ili tribenzoata **5**, sa vodenim natrijum-hidroksidom daje slobodnu pirazol karboksilnu kiselinu **6b**. Obzirom da značajan broj nukleozida sa karboksamidnim funkcijama u heterocikličnom prstenu pokazuje biološku aktivnost, od interesa je bila i sinteza amida **6c**. Ovo jedinjenje je dobijeno u prinosu od 70% reakcijom potpuno zaštićenog metil estra **5** sa zasićenim rastvorom amonijaka u metanolu na sobnoj temperaturi, u toku pet dana. Ispitivanje toka reakcije nakon kraćih vremenskih perioda ukazalo je da je konverzija metil estra u amid najsporiji korak, pa je triol **6a** detektovan kao glavni reakcioni proizvod nakon dvodnevnog tretmana. Amid **6c** se takođe može dobiti tretiranjem metil estra **6a** tečnim amonijakom na 100 °C u autoklavu.



**Šema 8.1.** Reagensi: a) CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>; b) Cl<sub>2</sub>, CCl<sub>4</sub>; c) NaOMe, MeOH (do **6a**); d) aq. NaOH (do **6b**); e) NH<sub>3</sub>, MeOH (do **6c**) [32]

Mehanizam i tok adicije diazoalkana na aktivirane olefine je intenzivno proučavan, a opšte je prihvaćena činjenica da je proces elektronski kontrolisan, usmeravajući tok reakcije ka formiranju pirazolina sa azotom u β-položaju u odnosu na aktivirajuću elektron-akceptorsku grupu (Šema 8.2).



Šema 8.2.

Kako se sa Šeme 8.2. može videti, adicija diazometana na nezasićeni estar predstavlja sinhroni proces u kojem je C-atom iz reagensa nukleofil, dok je terminalni N-atom elektrofil [33, 34].

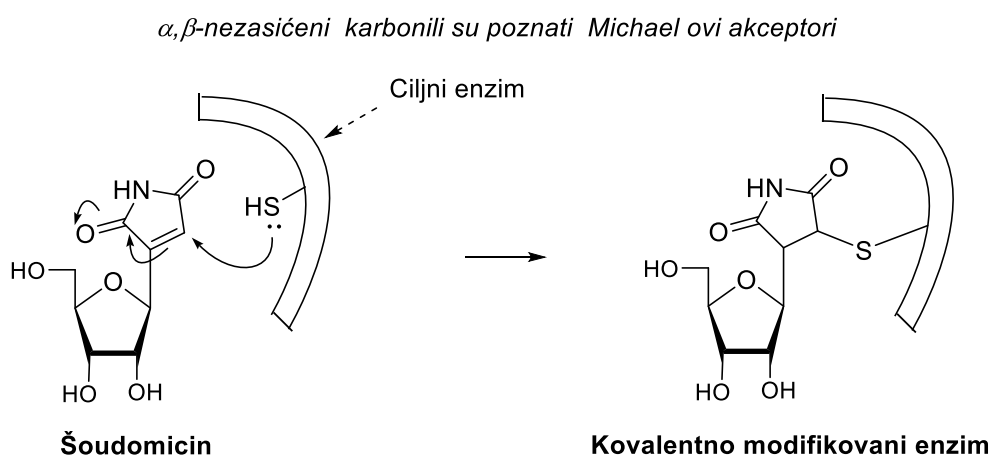
### 8.5. Sinteza C-nukleozidnog antibiotika šoudomicina

Nishimura et al. su prvi put izolovali šoudomicin iz *Streptomyces showdoensis* 1964. god. [35]. Tri godine kasnije je dokazano na osnovu spektroskopskih analiza i hemijskih transformacija da je ovo jedinjenje po strukturi 3-( $\beta$ -D-ribofuranozil)maleinimid.

Šoudomicin je potentni nukleozidni antibiotik koji pokazuje strukturnu sličnost sa uridinom i pseudouridinom. Ovaj molekul je jako elektrofilni prirodni proizvod što je posledica prisustva  $\alpha,\beta$ -nezasićene karbonilne strukture (Michael-ov akceptor). Stoga se za ovo jedinjenje kaže da je sulfhidrilni reagens jer lako reaguje sa SH grupom (Šema 8.3). Sulfhidrilni reagensi mogu biti enzimski inhibitori, enzimski reaktivatori ili obeleživači (markeri). Dokazano je da dejstvo ovog antibiotika na *Staphylococcus aureus* je verovatno usled inhibicije važnih enzima kao na primer MurA1 i MurA2 koji su neophodni za biosintezu ćelijskog zida. Šoudomicin je korisno hemijsko sredstvo za određivanje enzima koji je povezan sa patogeneozom kod bakterija. Radi određivanja biološkog ciljnog molekula za šoudomicin on se prvo mora derivatizovati sa 5-heksinskom kiselinom u 5'-položaju D-riboze. Sledi testiranje dobijenog derivata



šoudomicina da li pokazuje istu antibakterijsku aktivnost kao šoudomicin. To se ostvaruje određivanjem njegove minimalne inhibitorne koncentracije (MIC\*) koja se upoređuje sa MIC vrednošću šoudomicina. Pošto oba molekula (šoudomicin i njegov derivat) pokazuju istu MIC vrednost (500  $\mu\text{M}$ ) zaključeno je da mali alkinski dodatak ne menja aktivnost prirodnog antibiotika. Zatim se vrši *in situ* markiranje proteina sa derivatom šoudomicina. MS\*\* analizom je dokazano da SH grupa cisteinskog ostatka proteina iz vezivnog centra enzima napada maleinimidni fragment i kovalentno se vezuje za njega (Slika 8.3). Nakon toga se lizira bakterijska ćelija i separacija membranske od citozolne frakcije centrifugiranjem. Brzom hemijom\*\*\* se modifikacije alkinski fragment 1,3-diploarnom Huisgen-ovom cikloadicijom (Šema 8.4. i Šema 8.5) u cilju uvođenja triazolne flouore. Ovo je potrebno radi vizualizacije i identifikacije ciljnog enzima nakon gel elektroforeze [36].

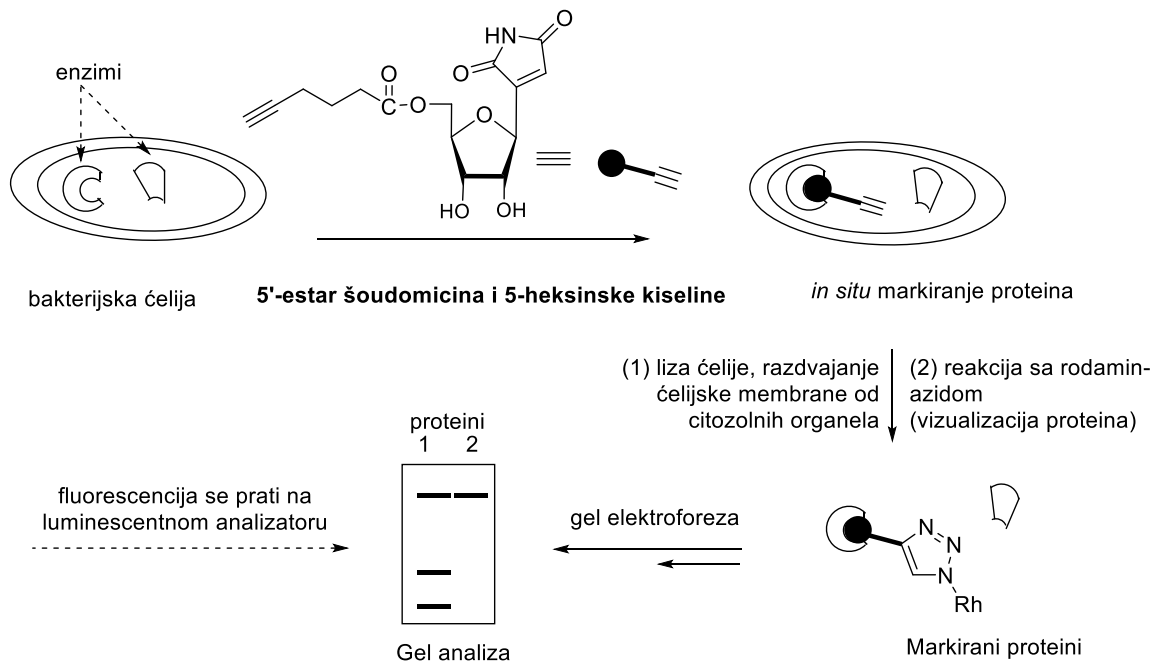


**Šema 8.3.** Šematski prikaz elektrofilnih osobina šoudomicina prema SH grupi nekog enzima [36]

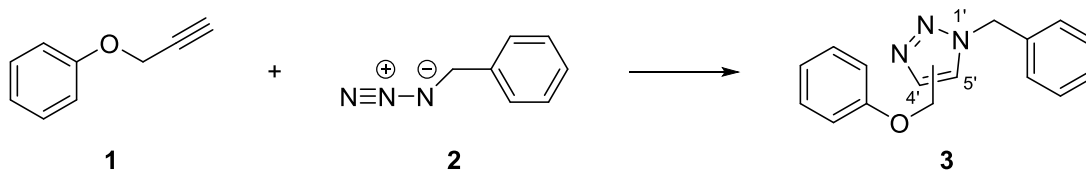
\* MIC (*engl.* Minimal inhibitory concentration) određuje se variranjem koncentracije šoudomicina i njegovog derivata, u nezavisnim probama, u kulturi medijuma i njihovim inkubiranjem u prisustvu *S. aureus*.

\*\* MS - Masena spektrometrija

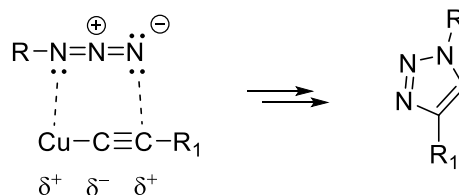
\*\*\* *Engl.* "Click chemistry" način da se generišu supstance brzo i pouzdano nakon spajanja malih jedinica.



**Slika 8.3.** Određivanje enzima koji je povezan sa patogenezom kod bakterije. Proteini označeni brojem 1 su izolovani iz bakterije a komercijalni protein označeni brojem 2 je takođe podvrgnut reakciji sa derivatom šoudomicina i rodamin-azidom i predstavlja standard [36].



**Šema 8.4.** Substituisani 1,2,3-triazoli mogu se dobiti primenom azid-alkin Huisgen-ovom cikloadicijom u kojoj azid **2** i alkin **1** podležu 1,3-dipoloarnoj cikloadiciji dajući triazol **3** kao smesu 1,4- i 1,5-addukta (98 °C u toku 18 h).

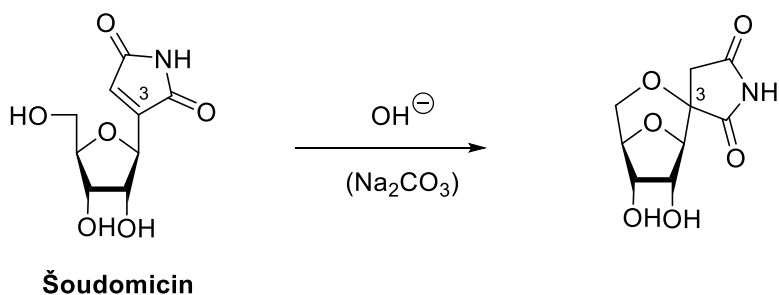


**Šema 8.5.** 1,3-Dipoloarna cikloadicija terminalnog alkina prema azidu kada se katalizuje sa Cu(I) solima ostvaruje se preko Cu-acetilidnog kompleksa nakon čega sledi adicija na azidnu grupu. Ovaj katalizator omogućuje da se reakcija izvodi pri blagim uslovima.

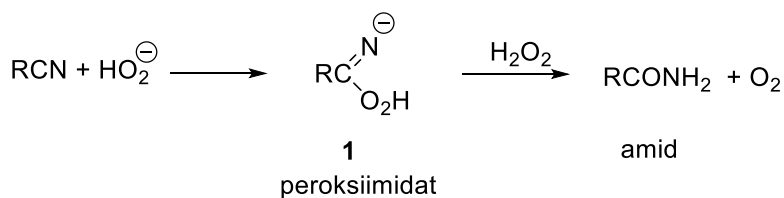
Moffatt i saradnici su 1972. god. objavili jednu elegantnu sintezu šoudomicina (Šema 8.8) nukleozidnog antibiotika, koji ispoljava antibakterijsku i antitumorsku aktivnost. Šećerni segment je tokom sinteze bio zaštićen benziletarskim zaštitnim grupama, jer je

ovaj nukleozid stabilan u kiselim uslovima dok izuzetno nestabilan pri baznim uslovima. Razlog ove nestabilnosti leži u favorizovanoj adiciji 5'-hidroksilne grupe na maleinimidnu dvostruku vezu (Michael-ova adicija; Šema 8.6). Za homologaciju niza je u početku istraživanja korišćena cijanhidrinska reakcija koja nije dala dobre rezultate, jer nastali cijanhidrin se povratno delimično transformisao u polazni aldehid **1**. Međutim kada je odmah nakon cijanhidrinske reakcije u reakcionu smešu dodat vodonik-peroksid reakcija je postala ireverzibilna uz formiranje  $\alpha$ -hidroksi amida **2** (Šema 8.8) [37].

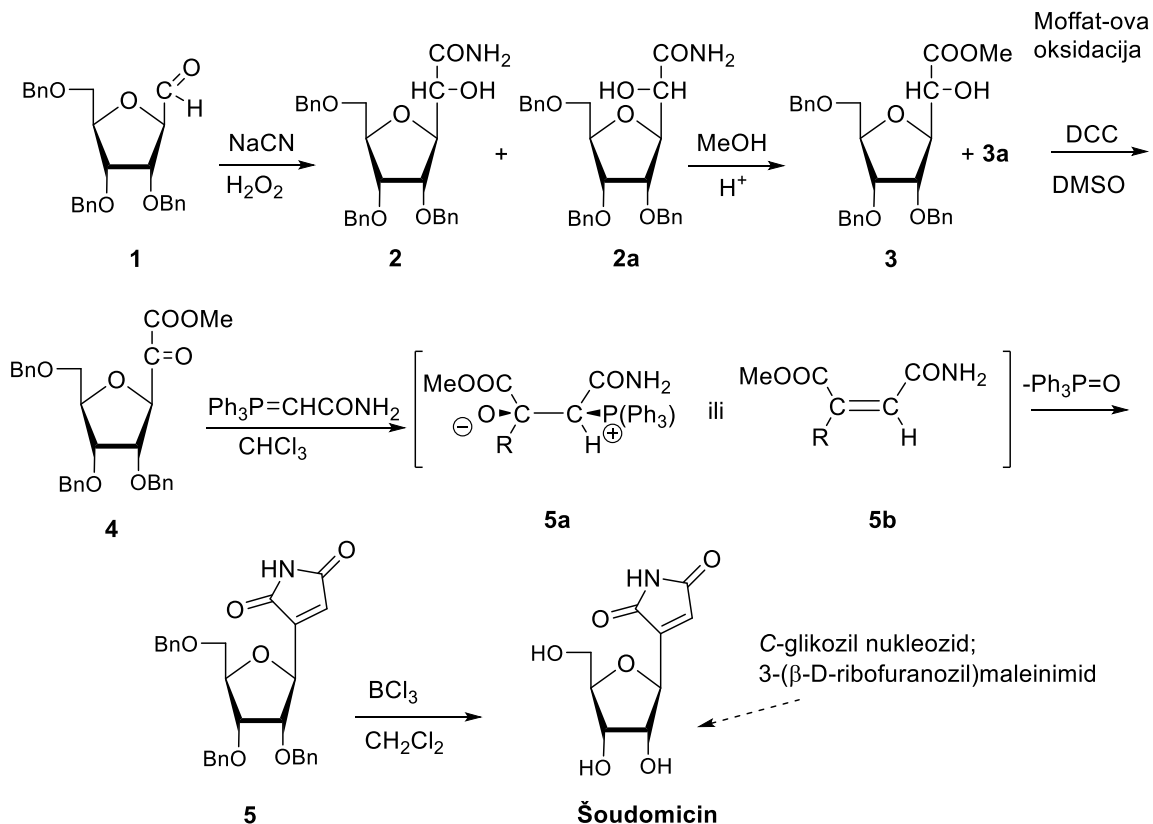
Reakcija  $\text{HO}_2^-$  (hidroperoksidni anjon) sa nitrilima prvo daje peroksiimidat (**1**, Šema 8.7) koji se sa vodonik-peroksidom veoma brzo prevodi u amid, uz oslobađanje molekulskog kiseonika. Stehiometrija ove reakcije nije u potpunosti razjašnjena [38].



**Šema 8.6.** Razlog bazne nestabilnosti šuodomicina je intramolekulska Michael-ova adicija 5'-hidroksilne grupe na maleinimidnu dvostruku vezu



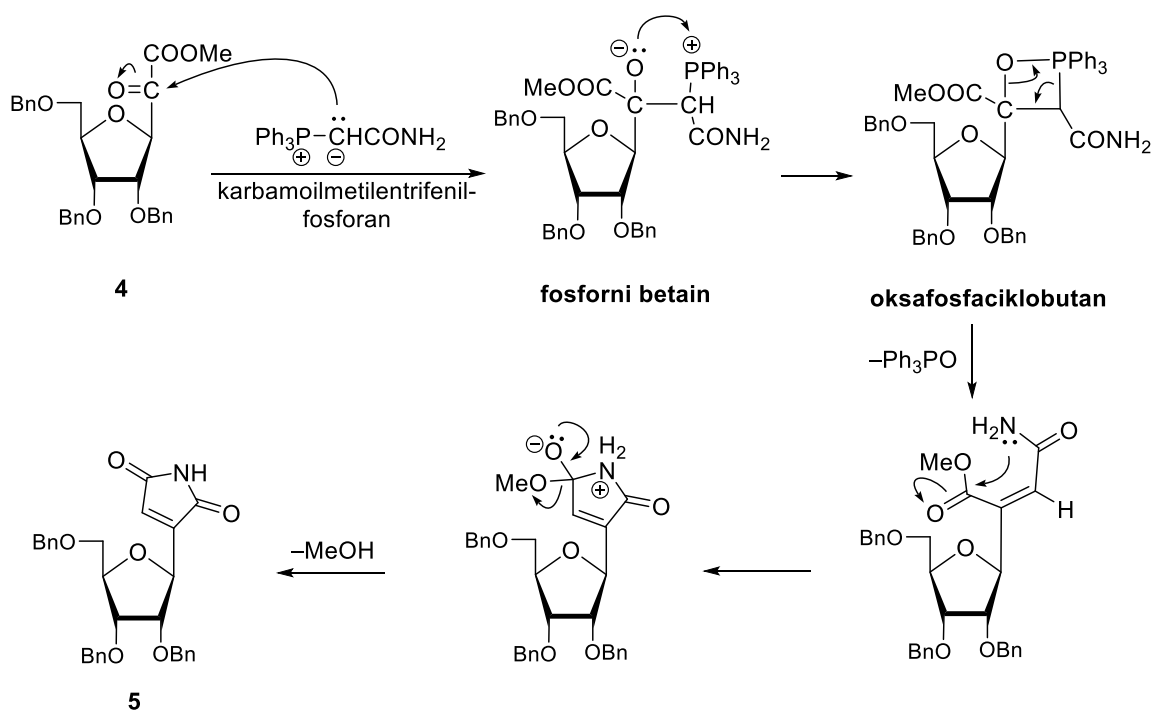
**Šema 8.7.**



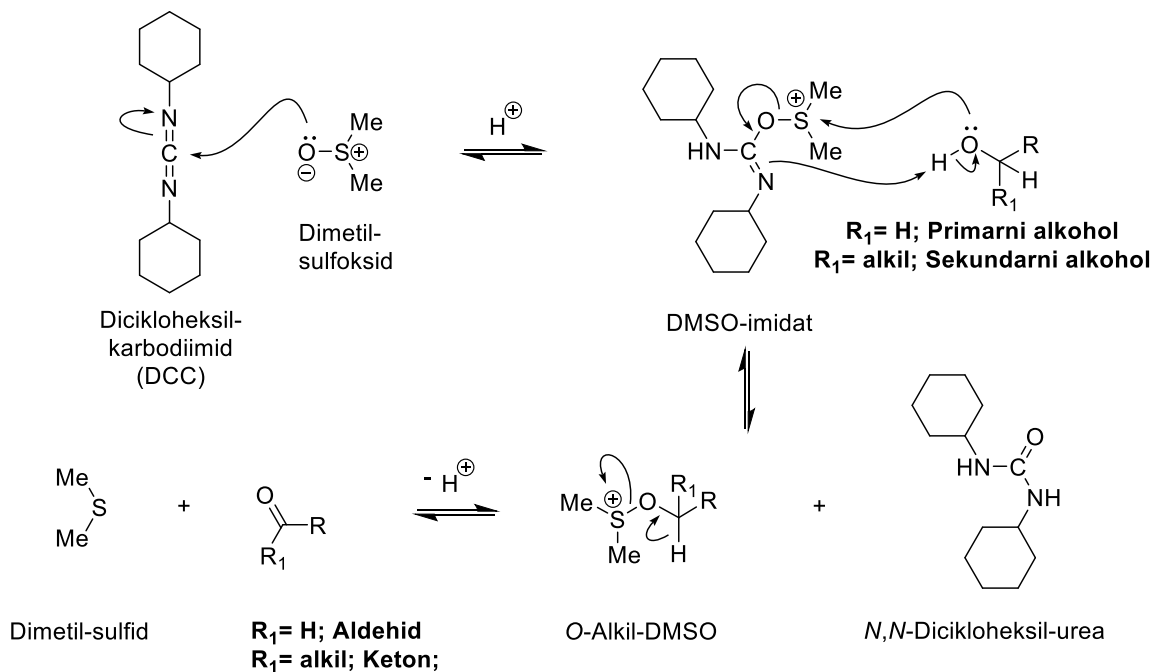
Šema 8.8.

Reakcijom 2,5-anhidro-3,4,6-tri-*O*-benzil-D-aloze (**1**, Šema 8.8.) sa natrijum-cijanidom i vodonik-peroksidom, dobijaju se hidroksiamidi (**2**: 3,6-anhidro-4,5,7-tri-*O*-benzil-D-*glicero*-D-*alo*-heptonoamid i **2a**: 3,6-anhidro-4,5,7-tri-*O*-benzil-D-*glicero*-D-*altro*-heptonoamid), koji nakon metanolize daju odgovarajuće heptonate (**3**: metil-3,6-anhidro-4,5,7-tri-*O*-benzil-D-*glicero*-D-*alo*-heptonat i **3a**: metil-3,6-anhidro-4,5,7-tri-*O*-benzil-D-*glicero*-D-*altro*-heptonat). Jedinjenje **3** lako podleže Moffat-ovoj oksidaciji do keto-estra **4** (metil-3,6-anhidro-4,5,7-tri-*O*-benzil-D-*alo*-heptulozonat), koji zatim, nakon kondenzacije sa karbamoilmetilentrifenil-fosforanom, daje odgovarajući tribenzil-derivat šoudomicina **5**. Spontana ciklizacija u maleinimidni prsten je moguća na nivou betainskog prekursora **5a**, ili alternativno iz *cis*-orijentisanog olefinskog intermedijera **5b** (derivata maleinamidnog estera). Ciklizacija uključuje nukleofilni napad azota na karbonilnu grupu iz estarske funkcije. Nakon toga se eliminiše metanol, pri čemu nastaje imidna funkcionalna grupa (Šema 8.9.). Uklanjanje benziletarskih zaštitnih grupa izvedeno je dejstvom bortrihlorida na  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pri čemu je dobijen šoudomicin.

Mehanizam Moffat-ove oksidacije sekundarnih ili primarnih alkohola je prikazan na Šemi 8.10.



Šema 8.9. Nakon Wittigove reakcije sledi spontana ciklizacija



Šema 8.10. Mehanizam Moffat-ove oksidacije primarnih i sekundarnih alkohola

## Poglavlje 9. HOMONUKLEOZIDI I ZNAČAJ SINTEZE OLIGONUKLEOTIDA

Homonukleozidi su analozi prirodnih nukleozida koji sadrže metilensku grupu između heterocikličnog prstena i C<sub>1'</sub>, ili između C<sub>4'</sub> i C<sub>5'</sub> ugljenikovih atoma.

Uvođenje ugljeničnog mosta između nukleobaze i šećernog fragmenta dovodi do povećane stabilnosti ovih jedinjenja prema hidrolizi ili enzimskom cepanju kao i do povećane konformacione fleksibilnosti i rotacione slobode u odnosu na prirodne nukleozide. Štaviše, nukleozidni mimetici, koji poseduju veću fleksibilnost, izgleda da ostvaruju bolju interakciju sa receptorima. Nedavno je dokazano da je vezivno mesto velikog broja enzima fleksibilnije nego što se ranije verovalo, a direktna posledica toga je da fleksibilniji inhibitori mogu pokazati pogodnije karakteristike.

Oligonukleotidi koji su sastavljeni od modifikovanih nukleozida sa metilenskom grupom (CH<sub>2</sub>) između šećernog dela i nukleobaze omogućavaju snižavanje elektrostatičkih repulzivnih interakcija (odbijanja), dok zadržavaju sposobnost građenja Watson-Crickovih parova baza sa neprirodnim DNK i RNK nizovima što je posledica boljeg usklađivanja komplementarnih nukleobaza. Kreiranje ovakvih analoga je opravdano zbog njihovog biološkog potencijala i eventualne biomedicinske upotrebe.

Sposobnost egzogeno sintetizovanih oligonukleotida da modulišu funkcije specifičnih gena *in vitro* i *in vivo*, stimulisao je intenzivna istraživanja u pravcu njihove upotrebe u terapijske i dijagnostičke svrhe.

### 9.1. Sinteza i proučavanje termičke stabilnosti oligonukleotida koji sadrži β-C-nukleozidni analog FapydG

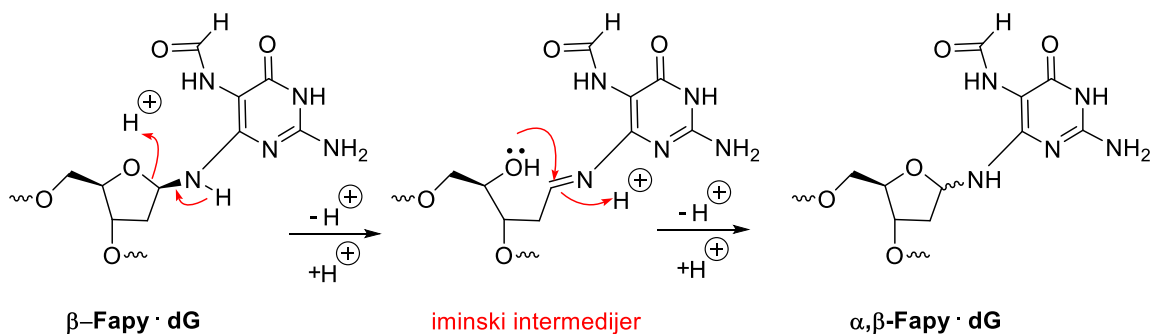
Proces starenja, kao i pojava nekih bolesti (npr. kancera), uzrokovani su oštećenjem (lezijom) DNK. Ove promene strukture DNK najčešće se ostvaruju alkilovanjem, oksidacijom ili redukcijom heterocikličnih baza nukleinskih kiselina.

Deoksiguanosin se najlakše oksiduje od svih nukleozida koji sačinjavaju DNK. Proces počinje adicijom hidroksilnog radikala na purinsku bazu pri čemu nastaje 8-OH derivat iz kojeg oksidacijom nastaje 8-oksipurin, dok redukcioni uslovi kao i UV zračenje pogoduju građenju FapydG (Formamidopirimidin-deoksiguanozin, Šema 9.1). Iako FapydG i Oxo dG nastaju iz zajedničkog prekursora u ćelijama humane leukemije odnos

FapydG prema Oxo:dG je 3:1. Do ovih tkzv. formamidopirimidinskih lezija (FapydA, FapydG) dolazi kada se DNK izloži oksidativnom stresu. Za razliku od većine lezija FapydA i FapydG se lako epimerizuju u rastvoru (Šema 9.2). Raspodela konfiguracionih izomera u DNK je nepoznata ali se zna da  $\beta$ -anomer svake monomerne forme dominira na sobnoj temperaturi. Stoga su sintetički analozi koji se teško hidrolizuju ili epimerizuju korisni za određivanje konfiguracije Fapy lezija u DNK, kao i za pronalaženje potencijalnih enzimskih inhibitora. Naime konfiguraciono stabilni analozi formamidopirimidina su posebno važni radi određivanja koji je anomer odgovoran za DNK-protein interakcije.

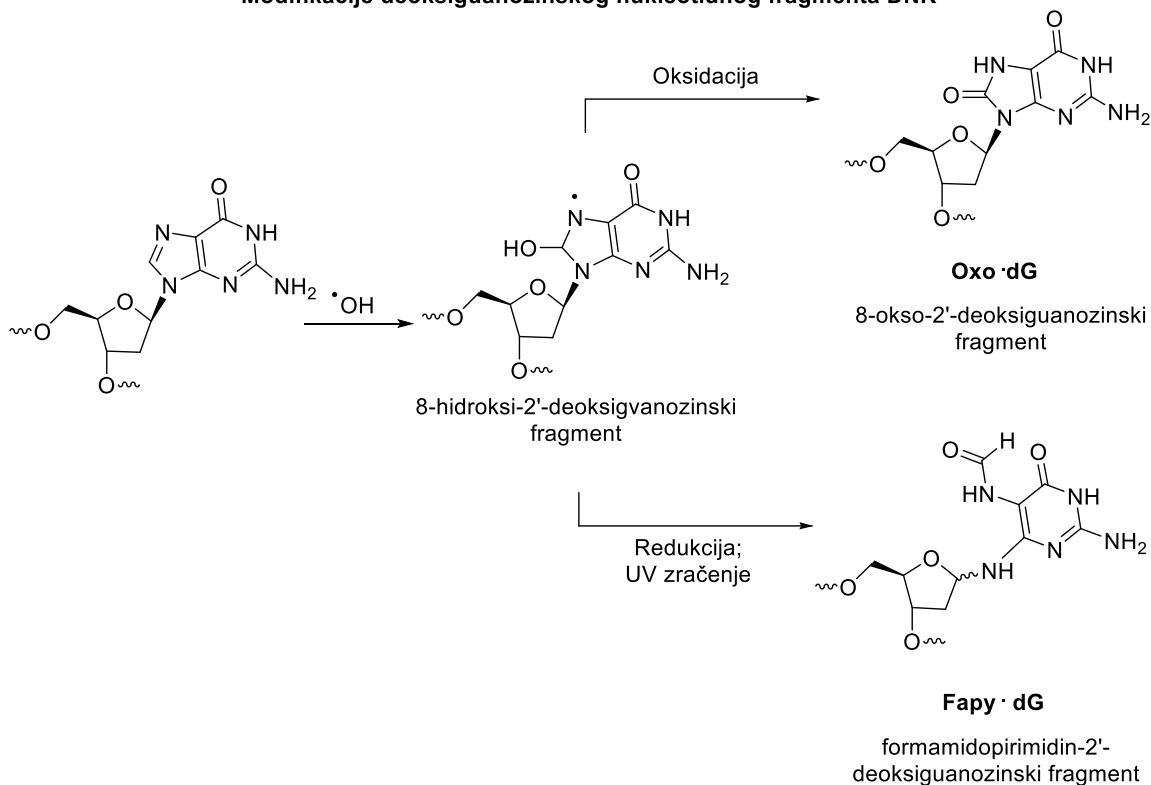
Biološki značaj formamidopirimidinskih lezija je velik pošto postoji enzim koji popravlja odnosno uklanja oštećene baze (BER, engl. **B**ase **E**xcision **R**epair enzimi) i koji je nađen u različitim jedinkama uključujući i ljude. Stoga se čine veliki napori za određivanje uticaja ovih lezija na polimeraze i na enzim koji popravlja oštećenja.

I pored očiglednog značaja formamidopirimidinskih lezija, o njima se mnogo manje zna nego o 8-oksopurinima. Razlog za to je uglavnom odsustvo efikasnih metoda sinteze oligonukleotida koji sadrže formamidopirimidine, što je trajalo do početka trećeg milenijuma. Inkorporacija lezija i njihovih analoga na određena mesta u oligonukleotide, omogućuje procenu njihovog uticaja na funkciju i strukturu DNK. Pored toga, analozi koji su stabilni prema hidrolizi, predstavljaju korisne model-sisteme za proveru interakcije DNK sa enzimom koji vrši popravke. Dosadašnja ispitivanja su potvrdila da je  $\beta$ -C-nukleozidni analog FapydA veoma blizak po karakteristikama strukturi FapydA. To znači da glikozidni azot nije uključen u specifičnoj interakciji sa polimerazom, niti sa enzimom koji vrši popravke. Delaney *et al.* su opisali sintezu i karakterizaciju oligonukleotida koji sadrže  $\beta$ -C-nukleozidni analog FapydG ( $\beta$ -1,  $\beta$ -C-FapydG, Slika 9.1).



Šema 9.2. Postulirani mehanizam epimerizacije formamidopirimidin-2'-deoksiguanozinskog fragmenta

#### Modifikacije deoksiguanozinskog nukleotidnog fragmenta DNK

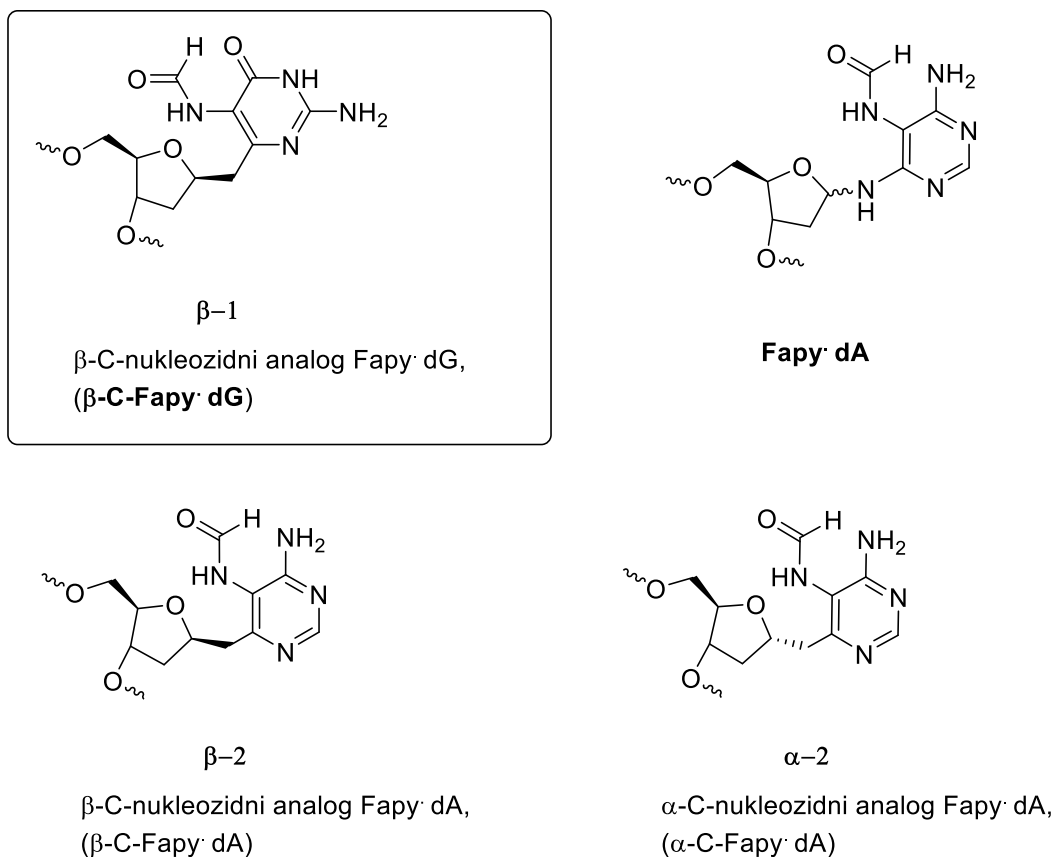


Šema 9.1. Formamidopirimidini i 8-oksopurini nastaju iz zajedničkog intermedijera [39]

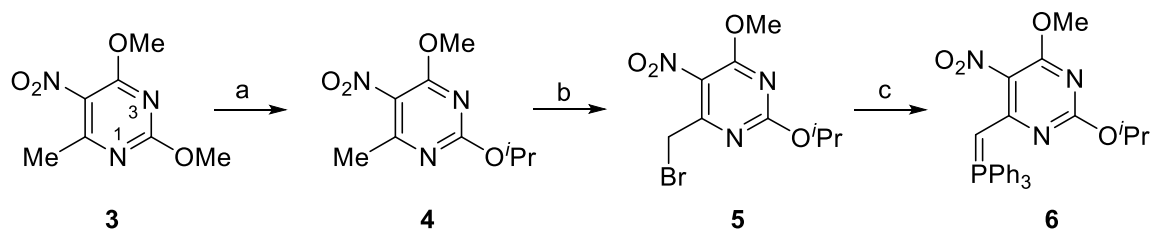
Prvo je sintetizovan 2,4-dialkoksi-6-metilen-5-nitropirimidinski ilid **6**, koji je zatim kuplovan sa odgovarajućim derivatom 2-deoksiriboze Wittig-ovom reakcijom (Šema 9.5. i Šema 9.6). Ilid **6** (Šema 9.3) je dobijen iz 2,4-dimetoksipirimidinskog derivata **3** u tri sintetičke faze. Regioselektivnom transterifikacijom metiletarske funkcije u prisustvu srebro(I)-oksida sa 2-propanolom dobija se 2-izopropil etarski derivat **4**. Ova voluminozna izopropil-alkoksi grupa je uvedena u položaj C<sub>2</sub> u cilju selektivnog uklanjanja C<sub>4</sub> etarske zaštite u kasnijim fazama sinteze. Monobromid **5** je dobijen u



skromnom prinosu pošto je reakciju bromovanja bilo nemoguće kontrolisano zaustaviti na monobrom-derivatu. Pored željenog proizvoda, izolovano je neizregovano polazno jedinjenje i odgovarajući dibrom-derivat. Fosforan **6** je dobijen tretiranjem monobromida **5** sa trifenilfosfinom, a dobijena fosfonijumova so je naknadnim dejstvom NaOH prevedena u ilid **6**. Mehanizam transformacije **5** u **6** je prikazan na Šemi 9.4.



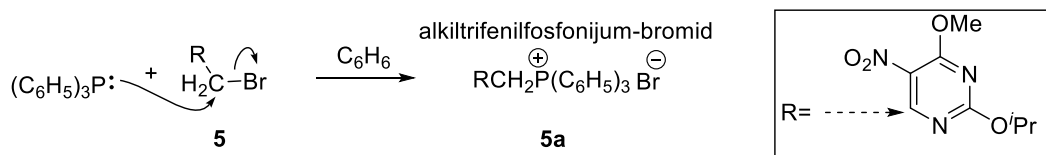
**Slika 9.1.** Neepimerizujući, kao i nehidrolizujući analozi su potencijalni enzimski inhibitori i model sistemi za ispitivanje konfiguracije Fapy lezija u DNK [39]



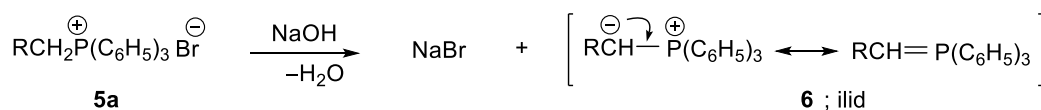
**Šema 9.3.** Reagensi i uslovi: (a) <sup>i</sup>PrOH, Ag<sub>2</sub>O, ↑↓, 24 h, 43%; (b) Br<sub>2</sub>, NaOAc, AcOH, ↑↓, 1 h, 48%; (c) *i*, PPh<sub>3</sub>, benzen, ST, 4.5 h, *ii*, CHCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, NaOH, ST, 1.5 h, 38% [39].

Nakon reakcije ilida **6** i disilil-etarskog derivata 2-deoksiriboze **7** dobijena je smeša diastereoizomernih homo-C-nukleozida **8** koju nije bilo moguće razdvojiti (Šema 9.5). Transformacija **7** u **8** uključuje dve reakcije: Wittig-ovu olefinaciju i Michael-ovu ciklizaciju (Šema 9.6). Hemiacetal **7** reaguje (u formi hidroksialdehida **7a**) sa ilidom **6**, pri čemu nastaje **8a**. Ovaj aciklični olefin zatim, dejstvom metoksidnog anjona, podleže ciklizaciji (Michael-ovom reakcijom), nakon deprotonacije OH-grupe i nukleofilne adicije nastalog alkoksidnog anjona na dvostruku vezu prethodno dobijenog olefina **8a**, dajući anomernu smesu **8** (Šema 9.6).

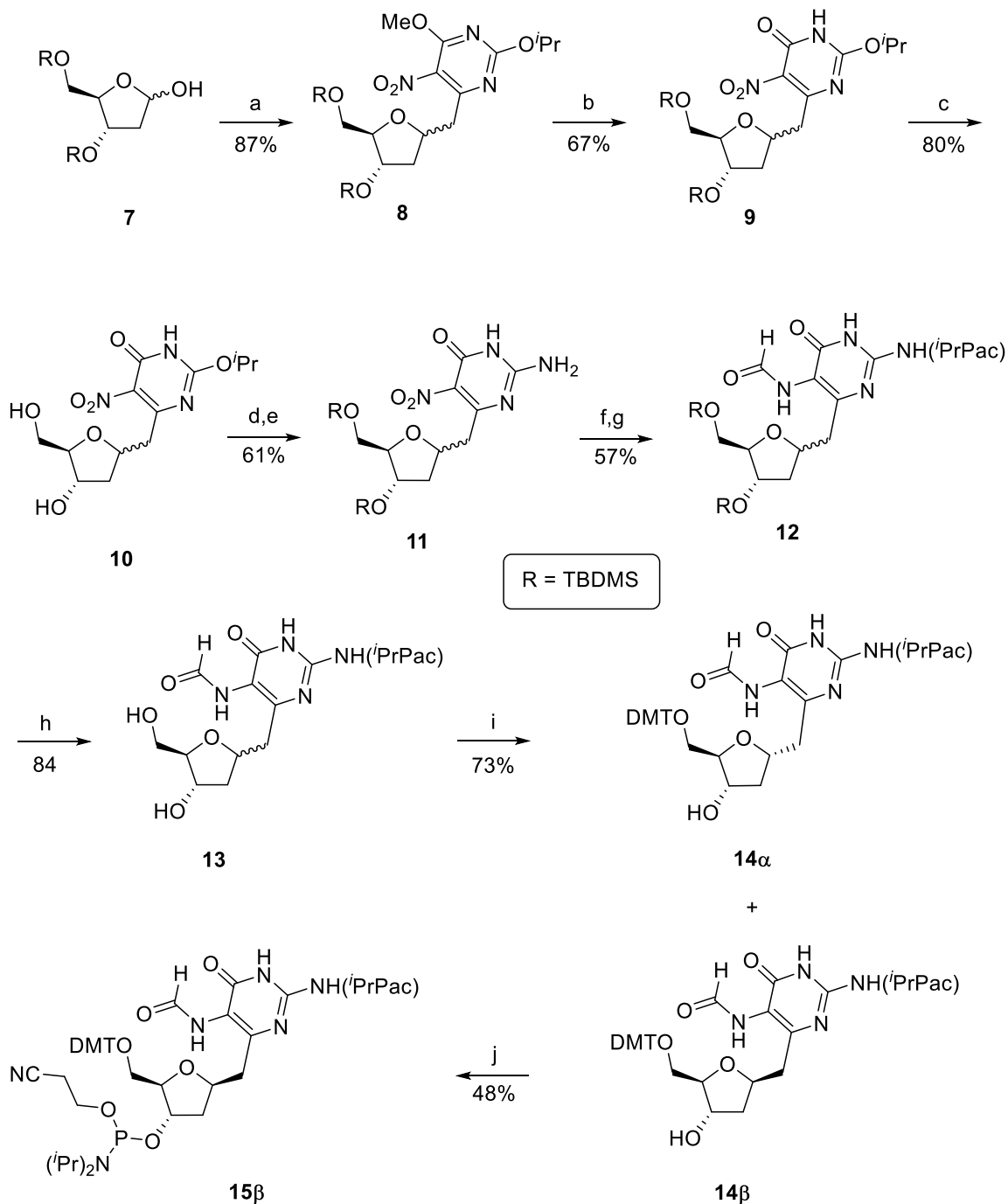
PRVA FAZA Wittig-ove reakcije: gradjenje alkiltrifenilfosfonijumove soli **5a** nukleofilnom supstitucijom broma trifenilfosfinom.



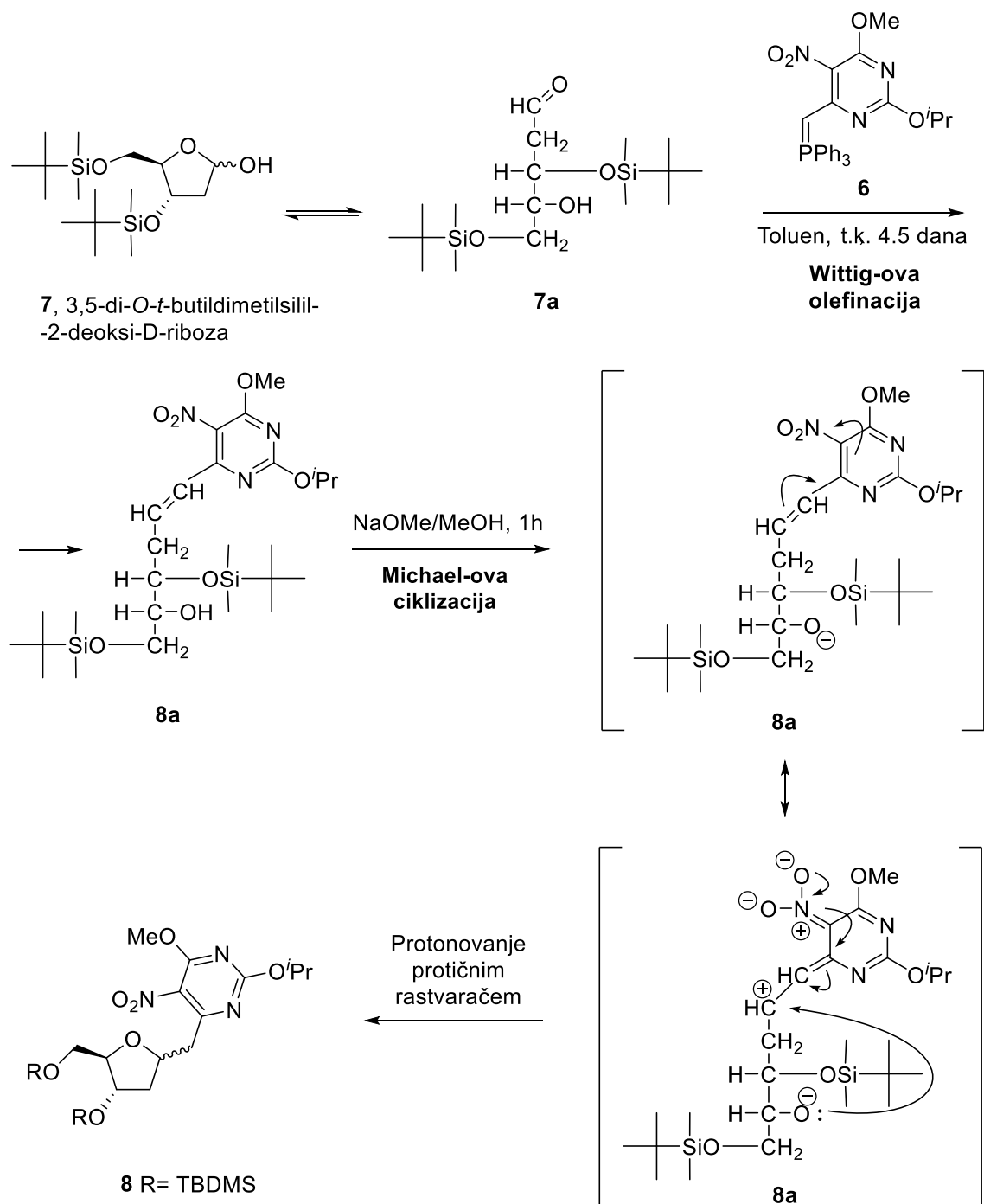
DRUGA FAZA Wittig-ove reakcije: baza deprotonuje  $\alpha$ -C atom do fosfora (koji je elektrofilan zbog pozitivno naelektrisanog fosfora) gradeći ilid **6**. U ovom slučaju se radi o stabilizovanom ilidu pa je NaOH dovoljno jaka baza za deprotonovanje. Da je R vodonik ili jednostavna alkil grupa, kiselost vodonika na  $\alpha$ -C atomu fosfonijumove soli bila bi veoma mala, pa bi se za gradjenje ilida morala koristiti znatno jača baza (npr. butil-litijum ili fenil-litijum).



Šema 9.4.



**Šema 9.5.** Reagensi i uslovi: (a) *i*, **6**, toluen, *ii*, NaOMe, MeOH (b) TBDMSCl, NaI, CH<sub>3</sub>CN; (c) NH<sub>4</sub>F, MeOH; (d) NH<sub>3</sub>, MeOH, 90°C (e) TBDMSCl, imidazol, DMF; (f) 2-(4-izopropilfeniloksi)sirčetna kiselina, Hünigs-ova baza; (g) *i*, H<sub>2</sub>, Pd/C, *ii*, mešoviti anhidrid mravlje i sirčetne kiseline, piridin; THF (h) Et<sub>3</sub>N·HF, THF (i) DMTCl, cat. DMAP, piridin; (j) 2-cianoetiltetraizopropilfosfordiamidit, diizopropilamin, tetrazol, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [39].



Šema 9.6.

Selektivno uklanjanje kiseonične zaštite u položaju C<sub>4</sub> sa trimetilsilil-jodidom (TMSI) na 0 °C, praćeno je bilo u velikoj meri i desilovanjem kiseoničnih funkcija šećernog segmenta nukleozida **8**. Međutim, uspešno demetilovanje je izvedeno sa voluminoznijim *tert*-butildimetilsilil-jodidom (TBDMSI) koji se generiše *in situ* iz TBDMSCl pomoću

natrijum-jodida u acetonitrilu. Iako je ovom reakcijom onemogućena razgradnja silil-etarskih funkcija u ostatku deoksiriboze i eliminisano dealkilovanje C<sub>2</sub>-O-izopropil grupe, reakcija je veoma spora pa je iz reakcione smese izolovano 67% željenog proizvoda **9** i 27% neizreagovanog polaznog jedinjenja. Supstitucija izopropoksidne grupe sa amonijakom ili hidrazinom iziskivala je rigorozne uslove koji su doveli do formiranja smese proizvoda sa parcijalno deblokiranim šećernim ostatkom. Stoga je uvedena još jedna sintetička faza kojom su uklonjene silil etarske zaštite dejstvom NH<sub>4</sub>F u ključalom metanolu\*. Amonoliza diola **10** sa NH<sub>3</sub> u metanolu, na temperaturi ključanja reakcione smese u toku 43 h, daje željeni C<sub>2</sub>-amino derivat, koji je re-sililovan sa TBDMSCl u DMF-u, uz imidazol kao katalizator, dajući anomernu smesu **11**. Imidazol u reakciji sililovanja deluje kao nukleofilni katalizator i formira intermedijer gde silil postaje elektrofilniji atom (Šema 9.7). Da bi se smanjila polarnost pirimidinskog derivata, što omogućava lakše hromatografsko prečišćavanje, uvedena je izopropilfeniloksiacetilna zaštita amino grupe. Reakcijom amina **11** sa 2-(4-izopropilfeniloksi)siroćetnom kiselinom u prisustvu Hünigs-ove baze (*N*-etil-diizopropilamin, Slika 9.3), u metilenuhloridu na sobnoj temperaturi u toku 6 h dobijen je amid u prinosu od 72%. Radi uvođenja formamidne funkcije u položaj C<sub>5</sub> nitro grupa je podvrgnuta katalitičkom hidrogenovanju u prisustvu Pd/C, u smesi MeOH i THF-a, u toku 1 h. Dobijeni sirovi amin je reakcijom sa mešovitim anhidridom mravlje i siroćetne kiseline u prisustvu piridina i THF preveden u **12**. Ponovno uklanjanje sililetarskih zaštita izvedeno je reakcijom jedinjenja **12** sa fluoridnim jonom iz trietilamonijum-fluorida u tetrahidrofuranu na sobnoj temperaturi u toku 24h.

Dobijeni diol **13** podvrgnut je regioselektivnoj zaštiti primarne hidroksilne grupe, reakcijom sa dimetoksitritil-hloridom (DMTCl) u prisustvu DMAP (4-dimetilaminopiridin) u piridinu. Jonizacijom dimetoksitritil-hlorida formira se rezonancom stabilizovani katjon koji je dovoljno voluminozan na metilnom ugljenikovom atomu, stoga S<sub>N</sub>1 reakcija se isključivo odvija na sterno pristupačnijoj

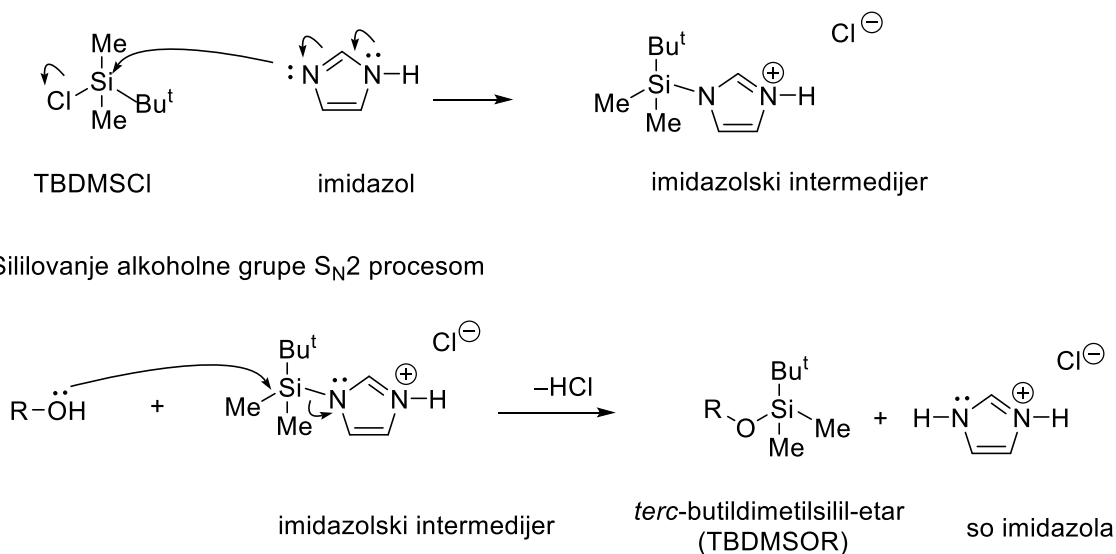
---

\* Silil etri mogu se ukloniti kiselinama pri čemu se mogu ukloniti i druge prema kiselinama osetljive funkcionalne grupe. Selektivno oni se uklanjaju sa tetrabutilamonijum-fluoridom (TBAF) koji se rastvara u organskim rastvaračima.

primarnoj hidroksilnoj grupi (Šema 9.8). DMAP kao baza vezuje izdvojeni HCl, što dodatno ubrzava reakciju.

Dobijena smesa anomera **14** je uspešno razdvojena preparativnom tankoslojnom hromatografijom, a zatim je **14 $\beta$**  preveden u fosforamidit **15 $\beta$**  reakcijom sa 2-cianoetiltetraizopropilfosforamiditom odnosno 2-cianoetil-*N,N,N',N'*-tetraizopropilfosforodiamidit) uz tetrazol i diizopropilamin kao katalizator u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Opšte-prihvaćeni mehanizam za fosfitalaciju hidroksilne grupe sa fosforamiditom prikazan je na Shemi 9.9. Nakon protonacije fosforamidita sa slabom kiselinom 1H-tetrazolom sledi nukleofilni napad tetrazolidnog jona pri čemu nastaje tetrazolilfosforamidit. Nukleofilnim napadom OH grupe sa C<sub>3'</sub> iz **14 $\beta$**  na tetrazolilfosforamidit uvodi se fosfor u dati nukleozid. Fosfitalacija **14 $\alpha$**  nije bila ostvariva ni nakon niza varijacija eksperimentalnih uslova. Molekulsko modelovanje datog anomera je ukazivalo na sternu zaštićenost 3'-hidroksilne grupe sa pirimidinskim prstenom. Stereohemija i strukturna asignacija epimera **14** je izvedena <sup>1</sup>H NMR spektrima. Kod **14 $\alpha$**  se uočava značajno povećanje H-1' signala (pozitivan NOE) prilikom ozračivanja H-3'. Očekivani NOE efekat između H-1' i H-4' je izostao kod **14 $\beta$**  epimera. Međutim ROSEY analiza je potvrdila blizinu ovih vodonika a samim tim i stereohemiju ovog diastereoizomera (Slika 9.4).

Imidazol u reakciji sililovanja deluje kao nukleofilni katalizator i formira intermedijer gde silil postaje elektrofilni atom

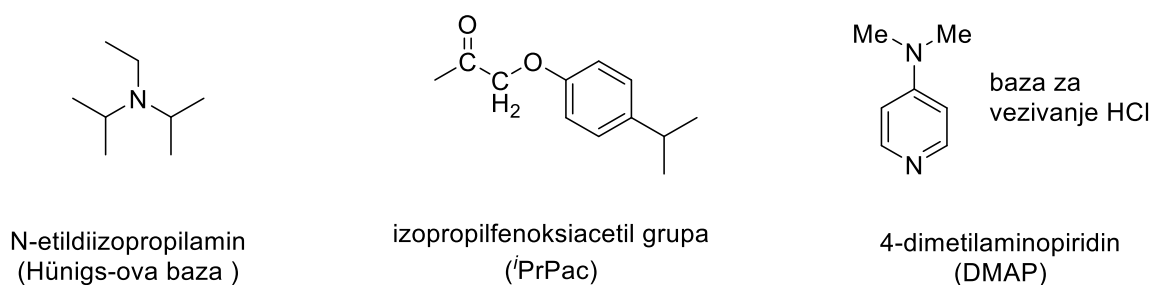


Šema 9.7.

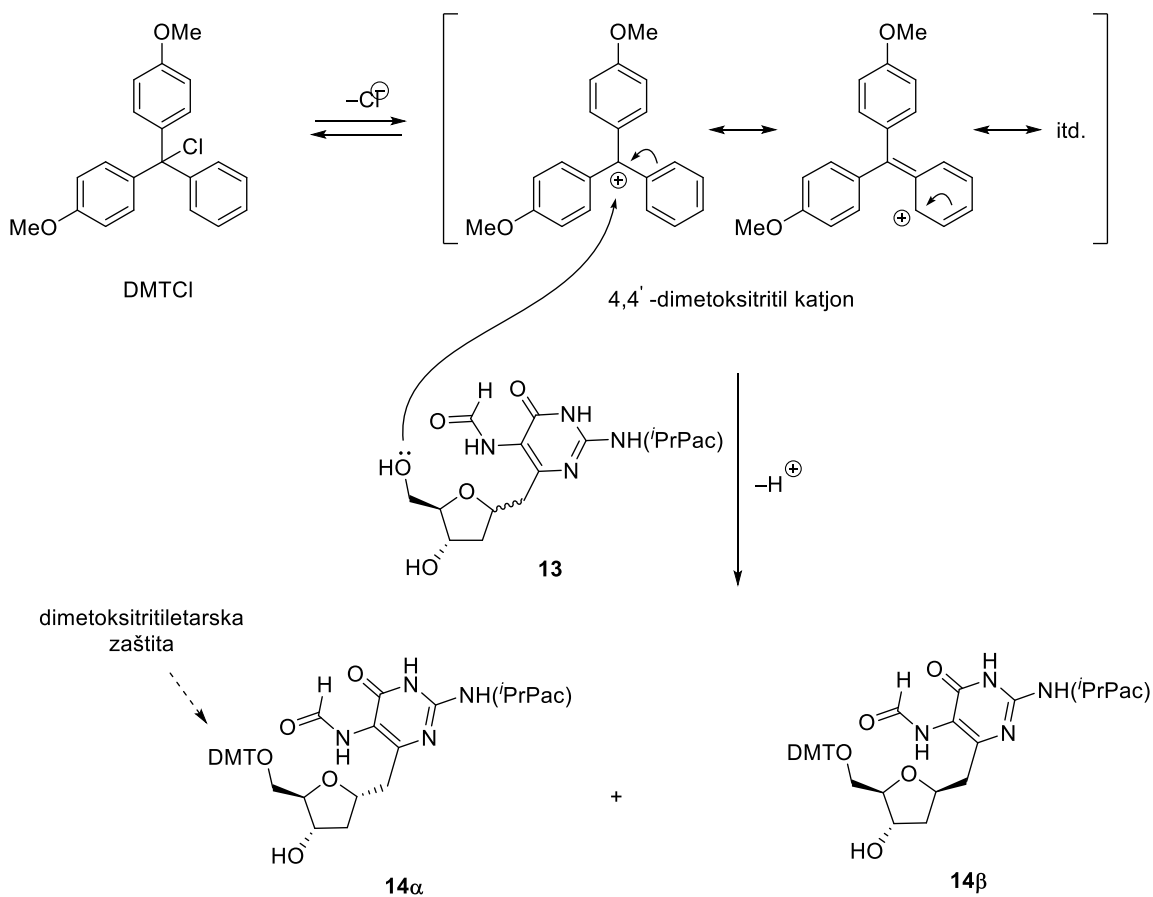
Relativni odnos brzine kisele hidrolize silil-etara pokazuje da im stabilnost raste po sledećem redosledu



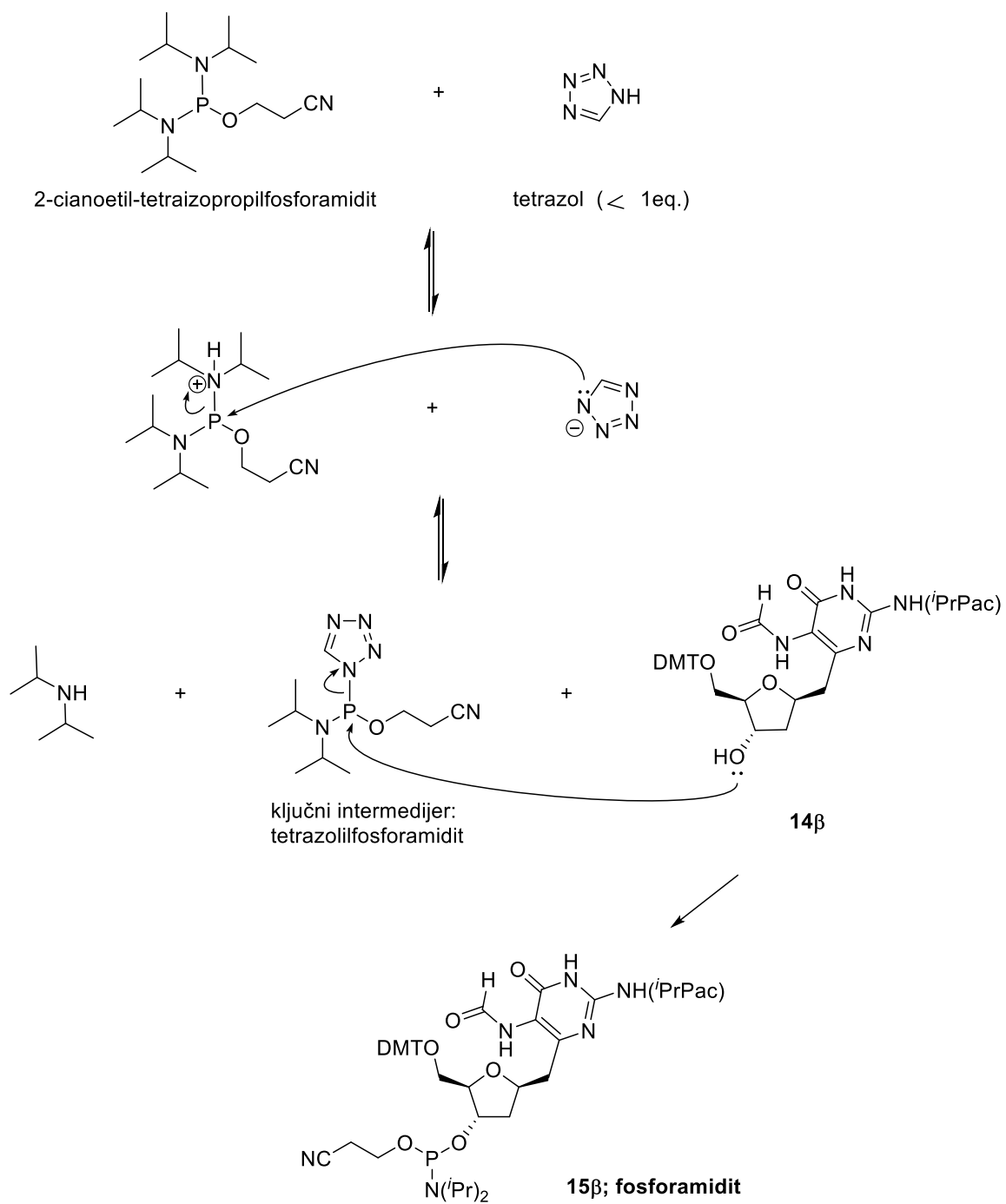
Slika 9.2.



Slika 9.3.

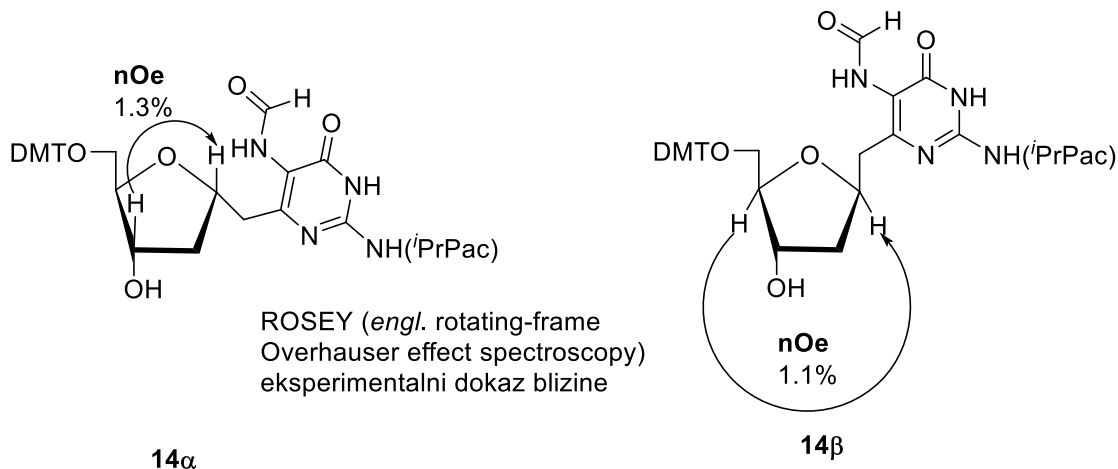


Šema 9.8. Uvođenje dimetoksitritiletarske zaštite na primarnu OH grupu



Šema 9.9. Mehanizam fosfitilacije hidroksilne grupe





**Slika 9.4.** Dokazivanje stereochemije na anomernom centru NMR metodom [39].

Dobijeni **15 $\beta$**  je korišćen u sintezi novih oligonukleotida sastavljenih čak i od 36 nukleotida koji su prečišćavani na denaturisanom PAGE-u a okarakterisani su ESI-MS metodom. Sintaza ovih oligonukleotida je ostvarena u DNA/RNA sintitajzeru uz korišćenje komercijalnih fosforamiditnih standarda drugih nativnih nukleozida kao gradivnih elemenata. Kao aktivator je primenjen tetrazol uz 15 minutno vreme kuplovanja. Istovremeno oslobađanje od čvrste faze i deprotekcija cianoetil zaštitne grupe ostvareno je dejstvom 0.05 M  $K_2CO_3$  u MeOH u toku 3–5 h. Za proučavanje UV-topljenja primenjen je molarni odnos od 1:1 sintetizovanog oligonukleotida sa komplementarnim oligonukleotidom. Hibridizacija komplementarnog oligonukleotida ostvarena je zagrevanjem na 90 °C u toku 5 minuta, uz naknadno spontano hlađenje rastvora do sobne temperature u toku noći. Absorbanca uzorka je praćena na 260 nm dok je temperatura povećavana brzinom od 0.5 °C/min u temperaturnom intervalu od 25–85 °C. Termodinamički parametri su dobijeni van't Hoff-ovom analizom podataka. Dupleks koji sadrži C-nukleozidni analog ( $\beta$ -C-Fapy·dG) topi se na nižoj temperaturi nego Fapy·dG dupleks što je posledica ugradnje metilenske grupe ( $CH_2$ ) između azota i glikozilnog fragmenta. Molekulsko modelovanje i termodinamička izračunavanja stabilnosti su ukazivala da je C-nukleozidni analog pogodan za selektivno sparivanje baza sa nativnim nukleotidom. Sveukupno molekulsko modelovanje ukazuje da  $\beta$ -C-Fapy·dG predstavlja dobar mimetik za Fapy·dG.

## **Poglavlje 10. ANTIVIRUSNI AGENSI**

Zbog epidemija izazvanih patogenim virusima kao što su: HIV (Human Immunodeficiency Virus), hepatitis C virus (HCV) i koronavirus koji izaziva ozbiljan respiratorni sindrom (SARS), medicinski hemičari su bili motivisani za istraživanja u pravcu pronalaska antivirusnih hemoterapeutika širokog spektra.

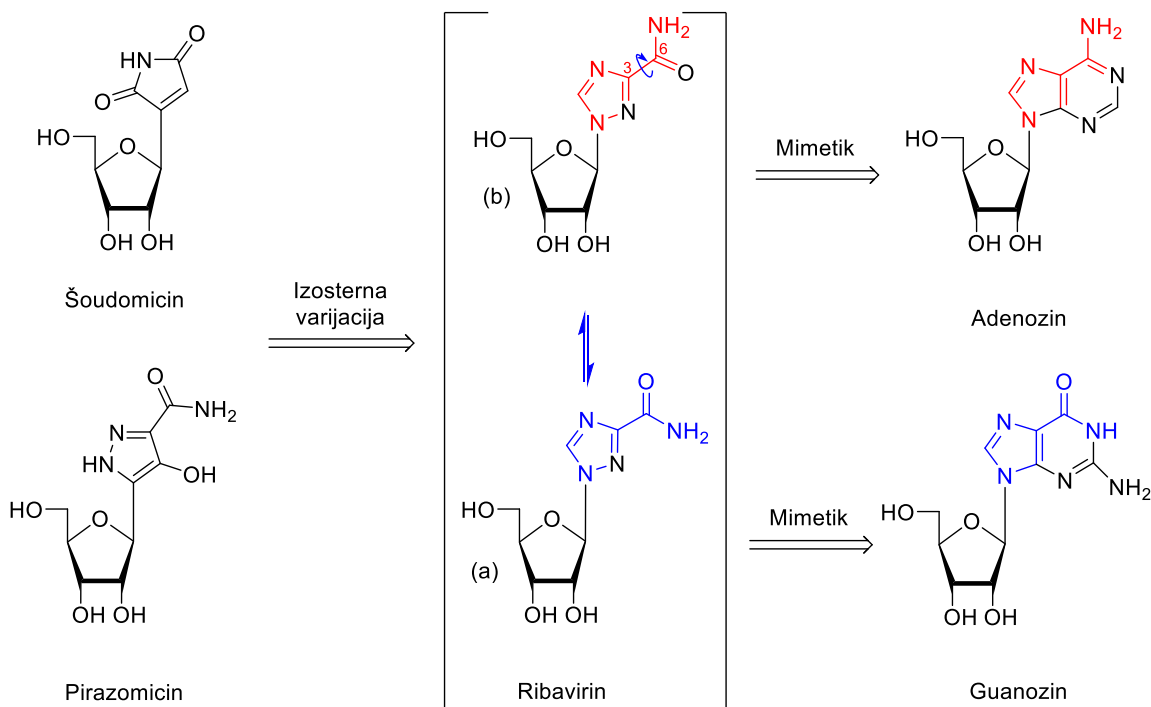
### **10.1. Ribavirin**

Dva nukleozidna antibiotika šoudomicin i pirazomicin su 1960-tih izolovani iz bakterijskih kultura. Ovi nukleozidi, sa petočlanom heterocikličnom bazom, pokazivali su širok spektar antivirusnog delovanja u ćelijskim kulturama (Slika 8.2). Nova strukturna karakteristika ovih prirodnih nukleozida motivisala je medicinske hemičare za sintezu i testiranje velikog broja ribonukleozida sa imidazolnim i triazolnim aglikonom. Među njima ribavirin (originalno nazvan virazol) se pokazao kao antivirusni agens širokog spektra delovanja, koji je odobren za tretman hepatitisa C.

Ribavirin je antivirusni lek, koji može da inhibira rast velikog broja DNK i RNK virusa različitim mehanizmom delovanja. On pripada u nukleozidne antimetabolite, lekove koji deluju na nivou duplikacije genetskog materijala. Iako ne deluje na sve viruse, ribavirin je neobičan stoga što kao mali molekul ima veoma širok spektar delovanja, uključujući njegovo dejstvo prema influenci, flavivirusima i prema virusnim hemoragijskim groznicama [40].

#### ***10.1.1. Mehanizam delovanja ribavirina***

Rendgenostrukturna analiza ukazuju da petočlani triazolni ribonukleozid imitira konformaciju nekoliko purinskih ribonukleozida. Konformacija ribavirina (a) odgovara O-6 i N-1 atomima guanozina, dok rotacijom oko C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> veze za 180°, ribavirin je u prostornoj orijentaciji (b) koja imitira adenzin.



**Šema 10.1.** Dizajn i sinteza ribavirina su ostvareni na osnovu dva prirodna nukleozida koji pokazuju značajnu antivirusnu aktivnost širokog spektra. Ovaj sintetički nukleozid je sposoban da rotacijom oko C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> veze formira rotacione izomere koji mogu biti mimetici i za adenozin i za guanozin [41].

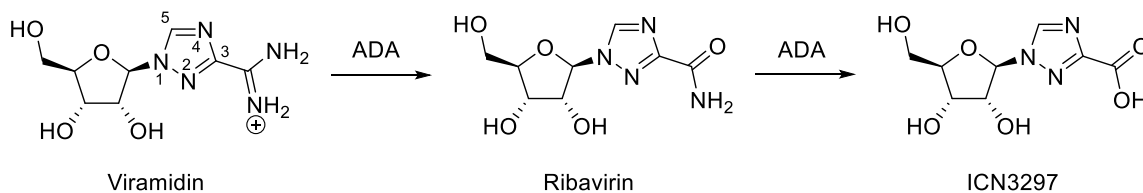
Znači zbog prisustva karboksamidne grupe i mogućnosti njene rotacije ribavirin može da podseća na adenozin ili guanozin i stoga nakon inkorporiranja ovog molekula u viralnu RNK može se sparivati sa citidinom ili uridinom indukujući mutaciju u RNK-zavisnoj replikaciji kod RNK virusa (Šema 10.1). Ribavirin je pro-lek koji se metabolizuje *in vivo* u aktivne fosfatne forme: 5'-monofosfat (RMP), 5'-difosfat i 5'-trifosfat. Ribavirin-5'-monofosfat (RMP) inhibira celularni inozin-monofosfat dehidrogenazu (IMPDH), pri čemu snižava intracelularnu količinu GTP-a (guanozin-trifosfat) neophodnog za virusnu replikaciju. Ovaj mehanizam može koristiti za objašnjenje opšte citotoksičnosti i anti-DNK replikacionog efekta (toksičnosti) kao i samog efekta na viralnu DNK replikaciju. U prilog ovim saznanjima je i činjenica da 2'-deoksi analog ribavirina (DNK nukleozidni analog) nije aktivan kao antivirusni agens, što potvrđuje činjenicu da ribavirin zahteva RNK-zavisni enzim za svoju antiviralnu aktivnost. Ribavirin se pomoću celularne kinaze transformiše u 5'-trifosfatni nukleotid (RTP) i u tom obliku se uglavnom *in vivo* akumulira, predstavljajući tako efektivan inhibitor za viralnu RNK-guanilil transferazu i (guanin-<sup>7</sup>N-)metil transferazu. Na taj način se remeti viralni transkript i izaziva

neadekvatna translacija. Inhibicija ovih enzima je od značaja kod DNK virusa kao npr. kod *vaccinia* virusa koji je kompletan DNK virus. Kao nukleotidni analog, RTP se može inkorporirati u viralni genom izazivajući uništenje virusa mutacijom. U ćelijskim kulturama proučavana je replikacija poliovirusa pri korišćenju mutirane poliovirus RNK-zavisne RNK polimeraze koja se pokazala rezistentom prema ribavirinu. Ova studija je potvrdila ideju da mutacija izazvana ugradnjom ribavirina kao mutagena je odgovorna za antiviralnu aktivnost ribavirina (u slučaju poliovirusa). U skladu sa antiviralnom aktivnošću širokog spektra, ribavirin je takođe niskomolekularni imunomodulator sposoban da izazove antiviralnu aktivnost imunološkim odgovorom 'Tip 1' kod domaćina. Tom prilikom se pojačava imunološki odgovor regulisan T ćelijama koji doprinosi eliminaciji intracelularnog viralnog patogena. Činjenica da rezistentnost na ribavirin nije uočena u kliničkoj praksi govori u prilog tome da on ispoljava svoj efekat preko nespecifičnog pleotropnog mehanizma (višestrukog mehanizma). Nasuprot njegovim efektivnim antivirusnim osobinama u ćelijskim kulturama i infekcijama kod životinja, faktor koji može limitirati njegov klinički potencijal je dozno-zavisna hemolitička anemija kada se primenjuje velika doza leka. U tretmanu infekcija izazvanih hepatitis C virusom (HCV-infekcija) koristi se kombinovana terapija sa ribavirinom i interferonom- $\alpha$ , što postaje 'zlatan' standard za anti-HCV hemoterapiju. Primarna nepovoljna dejstva ovog leka su hemolitička anemija što se može pogoršati u vidu srčanih obolenja. Tokom ovog efekta dolazi do akumulacije RTP u crvenim krvnim zncima (engl. RBCs).

### ***10.1.2. Dizajn proleka i metabolitička inaktivacija ribavirina***

U cilju specifičnijeg transporta ribavirina u jetru i smanjenju akumulacije njegovog metabolita u crvenim krvnim zncima, što bi poboljšalo terapijski indeks, ispitan je veliki broj derivata ribavirina. Nakon intenzivnih proučavanja odnosa struktura-aktivnost (*engl.* structure-activity relationship) jedno od obećavajućih jedinjenja je postao 3-karboksamidinski derivat ribavirina nazvan viramidinom (Šema 10.2). Ovaj analog ribavirina pokazuje *in vitro* antiviralnu i imunomodulatorsku aktivnost sličnu ribavirinu. Biohemijske i farmakokinetičke studije su pokazale da viramidin deluje kao prolek ribavirina i ima veoma različite farmakokinetičke osobine u odnosu na njega. Verovatno zbog pozitivno naelektrisane 3-karboksamidinske grupe, viramidin ne prolazi efikasno u

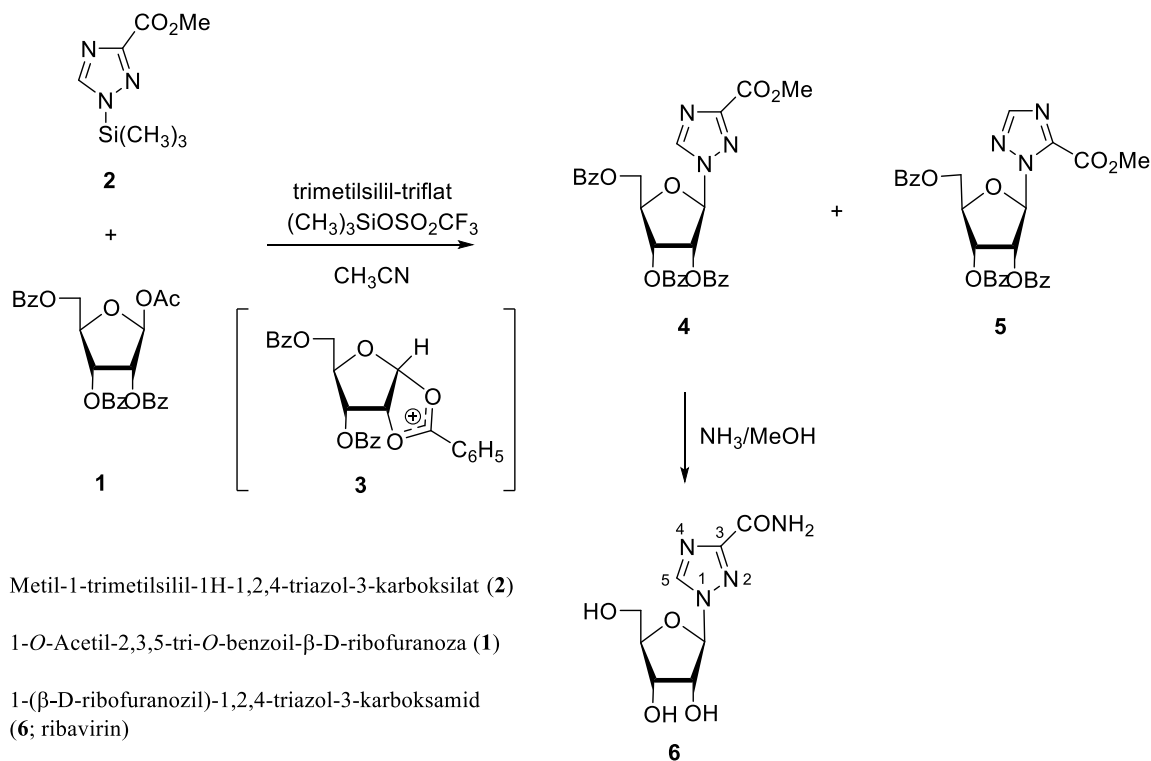
crvena krvna zrnca. Biološke studije na životinjama ukazuju da viramidin lakše dopire do jetre od ribavirina gde se vrši njegova konverzija u ribavirin. Ispitivanja su vršena na pacovima koji su primili oralnu dozu (30 mg/kg) [ $^{14}\text{C}$ ]ribavirina i [ $^{14}\text{C}$ ]viramidina a nakon 2 h su bili žrtvovani. Radioaktivni sadržaj svih glavnih organa/tkiva je kvantitativno određivan kompjuterizovanim denzitometrom. Iz tako dobijenih autoradiografa celog tela pacova ustanovljeno je da je jetra imala veći sadržaj leka kod viramidinski tretiranog pacova nego kod ribavirinom tretirane eksperimentalne životinje. Dalja istraživanja koja su izvedena na majmunima su pokazala da viramidin ostvaruje tri puta više leka u jetri a samo polovinu količine leka u crvenim krvnim zrnima u odnosu na ribavirin. Zbog ovakve usmerenosti prema jetri a i smanjenog hemolitičkog potencijala viramidin predstavlja pogodniju alternativu za ribavirin. Momentalno ovo jedinjenje je u II fazi kliničkih ispitivanja za primenu kod hronične HCV infekcije. U cilju uticaja na dizajn proleka Wu *et al.* su istraživali deaminaciju i aktivaciju viramidina u ribavirin kao i transformaciju ribavirina u inaktivni metabolit ICN3297 pod katalitičkim dejstvom ADA enzima (Šema 10.2). ADA (adenozin deaminaza) predstavlja ključni enzim u metabolizmu purina i katalizuje hidrolitičku deaminaciju adenozina u inozin i amonijak. On se nalazi u svim tkivima sisara i neophodan je za imunološku kompetenciju. Zbog strukturne sličnosti viramidina i adenozina pretpostavljeno je da ovaj enzim katalizuje konverziju viramidina u ribavirin. UV spektroskopskom metodom je dokazano da u *in vitro* uslovima ADA stvarno katalizuje ovu reakciju. Upoređujući deaminaciju adenozina, deaminacija viramidina ima neobično visok optimalni pH od 10. Ovakav optimalni pH ukazuje na činjenicu da viramidin prvo podleže deprotonaciji 3-karboksamidinske grupe a zatim deaminaciji. Takođe je u biološkim ispitivanjima dokazano da se ribavirin u *in vivo* uslovima prevodi u karboksilatni derivat, ICN3297, koji ne pokazuje antivirusnu aktivnost (Šema 10.2).



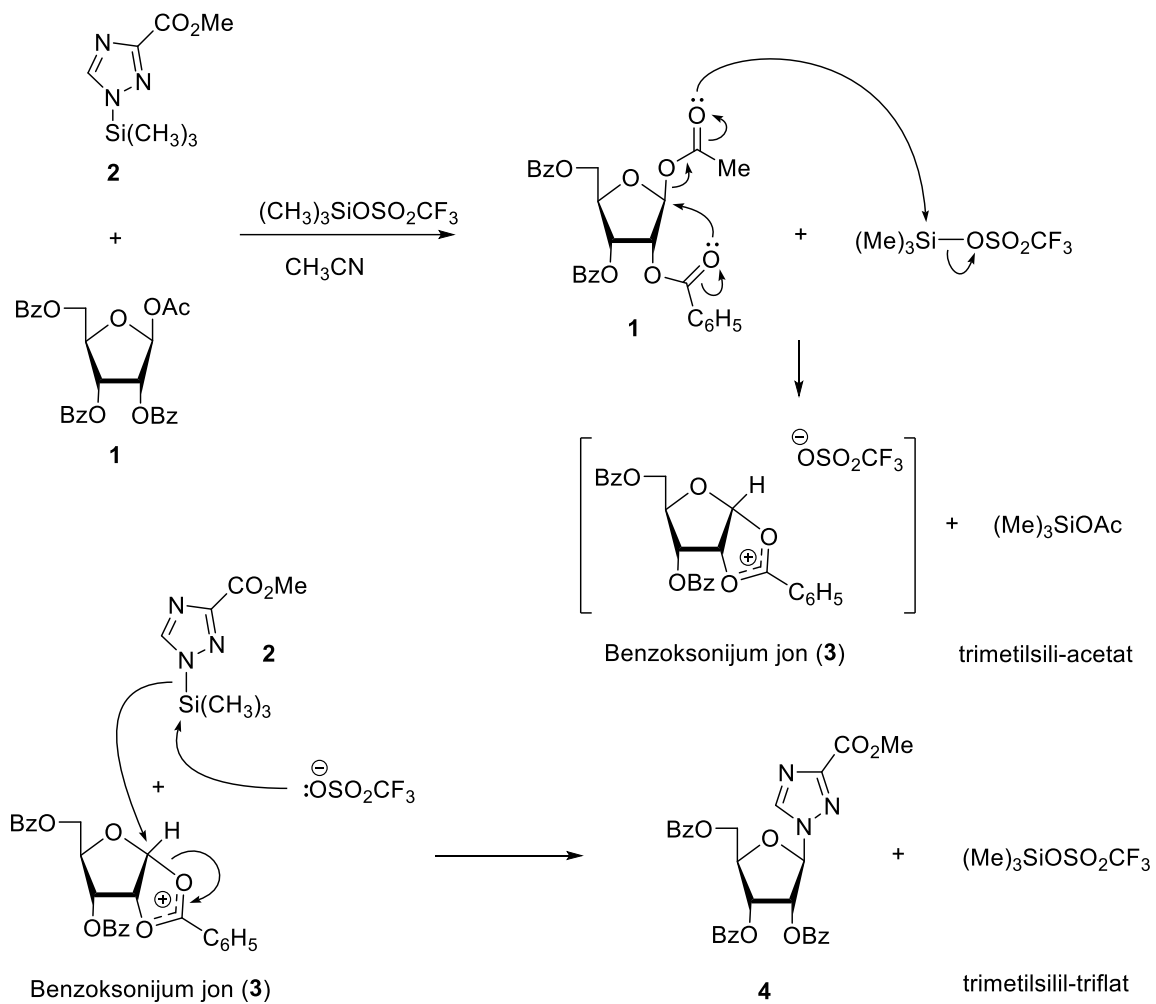
**Šema 10.2.** ADA katalizuje dve uzastopne reakcije deaminacije prevodeći viramidin u ribavirin i ribavirin u inaktivni metabolit, ICN3297 [41].

### 10.1.3. Sinteza ribavirina

Vorbrüggen-ovom reakcijom kuplovanja između 1-*O*-acetil-2,3,5-tri-*O*-benzoil- $\beta$ -D-ribofuranoze (**1**) i sililovanog metil-1,2,4-triazol-3-karboksilata (**2**) u acetonitrilu dobija se 47% željenog proizvoda (**4**) kao i 19.6% izomerna (**5**). Ovu reakciju katalizuje jaka Lewis-ova kiselina, trimetilsililtriflat  $[(\text{CH}_3)_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3]$ , koji je visoko selektivan i efikasan Friedel-Crafts-ov katalizator za formiranje nukleozida. Naime ovaj katalizator prevodi jedinjenje (**1**) u reaktivni elektrofilni šećerni katjon (**3**), koji je sterno zaštićen sa  $\alpha$ -strane te se veza sa heterocikličnom bazom preferencijalno ostvaruje sa željene  $\beta$ -strane. Tretman jedinjenja **4** sa zasićenim rastvorom amonijaka u metanolu rezultovao je nastankom 1-( $\beta$ -D-ribofuranozil)-1,2,4-triazol-3-karboksamida (**6**; tj. ribavirina, Šema 10.3) [43, 45]. Mehanizam dobijanja nukleozida Vorbrüggen-ovom reakcijom prikazan je na Šemi 10.4.



Šema 10.3

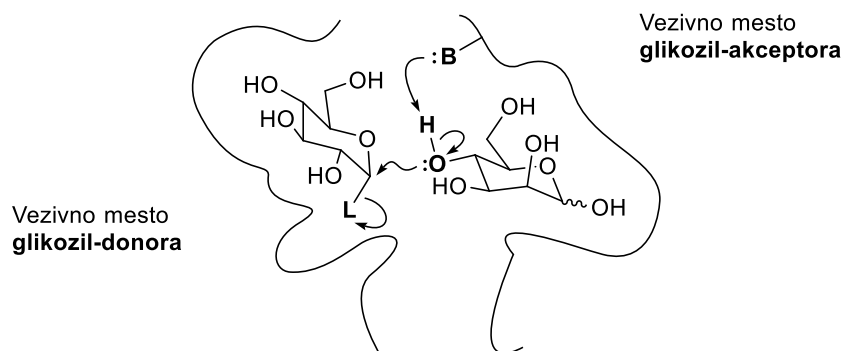


**Šema 10.4.** Mogući mehanizam Vorbrüggen-ove reakcije kojom se formira neposredni sintetički prekursor ribavirina (4).

## Poglavlje 11. ŠEĆERI KAO CILJNI MOLEKULI LEKOVA. AZA ŠEĆERI

### 11.1. Mehanizam delovanja enzima za procesuiranje složenih ugljenih hidrata

Postoje dva tipa enzima za procesuiranje šećera (oligosaharida). Glikoziltransferaze koji katalizuju formiranje glikozidne veze i glikozidaze (skraćenica za glikozilhidrolaze), koji katalizuju raskidanje glikozidne veze. Može se reći da aktivno mesto enzima sadrži dva dela: *katalitičko mesto*, koje povećava brzinu reakcije, i *vezivno mesto* ili deo koji nosi reaktante i određuje selektivnost reakcije. Formiranje glikozidne veze, u regionima enzima koji kontrolišu reakciju, zavisi od sledećih bitnih faktora (Šema 11.1):



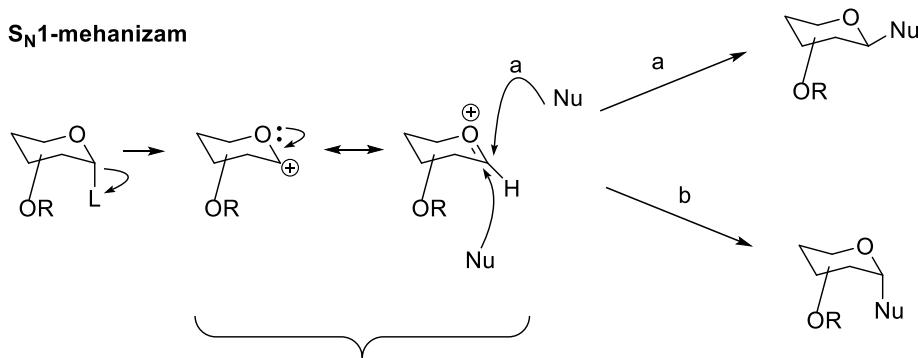
Šema 11.1

- 1) *Reaktivnost*: Tokom formiranja glikozidne veze (kako u laboratorijskim tako i u biološkim sistemima) dolazi do gubitka dobre odlazeće grupe (**L**) sa anomernog centra odgovarajućeg glikozil-donora. Ovo raskidanje veze omogućava nastajanje glikozil-katjona i potpomognuto je učestvom slobodnog elektronskog para sa kiseonika iz prstena. Prelazno stanje koje vodi formiranju ovog reaktivnog intermedijera je stabilizovano funkcionalnim grupama iz katalitičkog centra enzima. Ovo je najsporija faza reakcije i snižavanjem energije ovog prelaznog stanja ubrzava se reakcija. Oblik enzima u vezivnom mestu omogućuje da se reaktivni molekul održava spremnim za napad na elektrofilni deo glikozil-donora. Nukleofil je hidroksilna grupa drugog šećera koji se naziva glikozil-akceptor.
- 2) *Regioselektivnost*: Pošto se reaktanti veoma dobro uklapaju u vezivno mesto enzima samo u jednoj mogućoj orijentaciji, oblik enzima određuje koja grupa će reagovati.

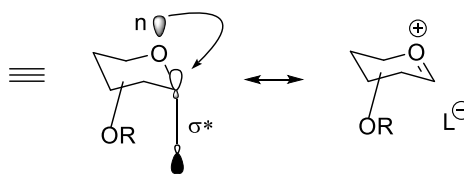


Oba reaktanta, glikozil-akceptor i glikozil-donor su čvrsto vezani za vezivno mesto enzima. Njihova međusobna orijentacija omogućuje reakciju samo jedne akceptorske OH-grupe. Ostale hidroksilne grupe glikozil akceptora su zaštićene od strane enzima koji ih opkoljava i stoga nisu u stanju da reaguju. Dalje, reaktivni anomerni centar glikozil-donora je dovoljno blizu samo jednoj OH-grupi akceptora sa kojim će reagovati.

- 3) *Stereoselektivnost*: Enzim takođe vezuje reaktivni glikozil-donor na jedan određeni način tako da može da primi napad samo sa jedne strane: samo sa gornje ili samo sa donje strane. Rezultat je formiranje veze samo jedne određene stereoheмиjske konfiguracije. Pošto u ovakvim reakcijama mogu biti uključeni različiti enzimi sa različitim oblikom aktivnog centra, stoga neki dozvoljavaju formiranje  $\alpha$ - dok drugi samo  $\beta$ -konfiguraciju anomernog centra. Niže je prikazan  $S_N1$  mehanizam da bi se ilustrovala diskusija reaktivnosti, mada kao kod hemijske glikozilacije i enzimaska glikozilacija može teći po  $S_N1$  ili po  $S_N2$  mehanizmu (Šema 11.2).

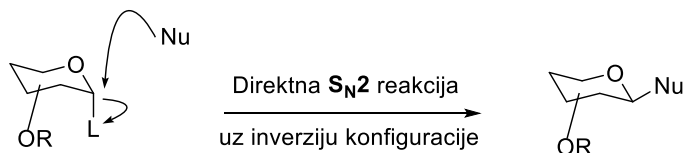
**S<sub>N</sub>1-mehanizam**

Anomerni karbonijum jon se često naziva glikozil-katjon. Pošto kiseonik sadrži dva slobodna para elektrona koja omogućavaju odlazak dobre odlazeće grupe i stabilizaciju intermedijernog karbonijum jona rezonancom. Formalno ova interakcija se može opisati kao  $n \rightarrow \sigma^*$  donacija kiseoničnog elektronskog para.



$n \rightarrow \sigma^*$  donacija kiseoničnog elektronskog para.

Nakon gubitka anomerne odlazeće grupe, koja je najsporija faza S<sub>N</sub>1 reakcije, karbonijum jon biva napadnut od strane nukleofila sa gornje ili donje strane.

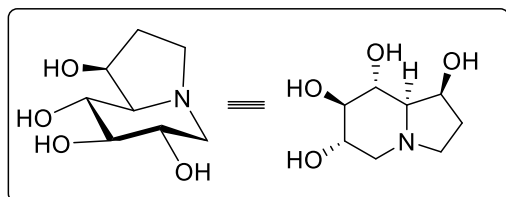
**S<sub>N</sub>2-mehanizam**

Kod hipotetičkog primera S<sub>N</sub>2 supstitucija  $\alpha$ -anomerne odlazeće grupe vodi ekskluzivno do  $\beta$ -anomernog proizvoda.

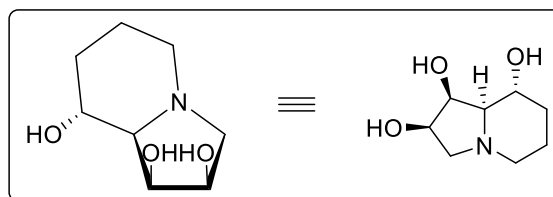
**Šema 11.2****11.2. Inhibitori glikozidaza i glikoziltransferaza**

Uočeno je da glikoproteini tumorskih ćelija sadrže više monosaharidnih jedinica u oligosaharidnim ostacima, a da su šećerni delovi račvastiji i sadrže više sijalne kiseline od zdravih ćelija. Takođe je dokazano da tumorska ćelija ima veoma visok sadržaj glikozidaza (enzima koji hidrolizuje glikozidnu vezu). Ova otkrića ukazuju da inhibitori biosinteze odgovarajućih glikoproteina predstavljaju potencijalne antitumorske agense. Najnovija saznanja indiciraju da šećerni analozi kao što su kastanospermin i svansonin

(*engl.* castanospermine and swainsonine, Slika 11.1) kao efikasni inhibitori glikozidaza inhibiraju rast i metastazu tumorskih ćelija [28].



(+)-kastanospermin  
(inhibitor glikozidaza indolizidinske strukture).  
Ovaj alkaloid biljnog porekla pokazuje  
antitumorsku, antivirusnu i anti-AIDS aktivnost.



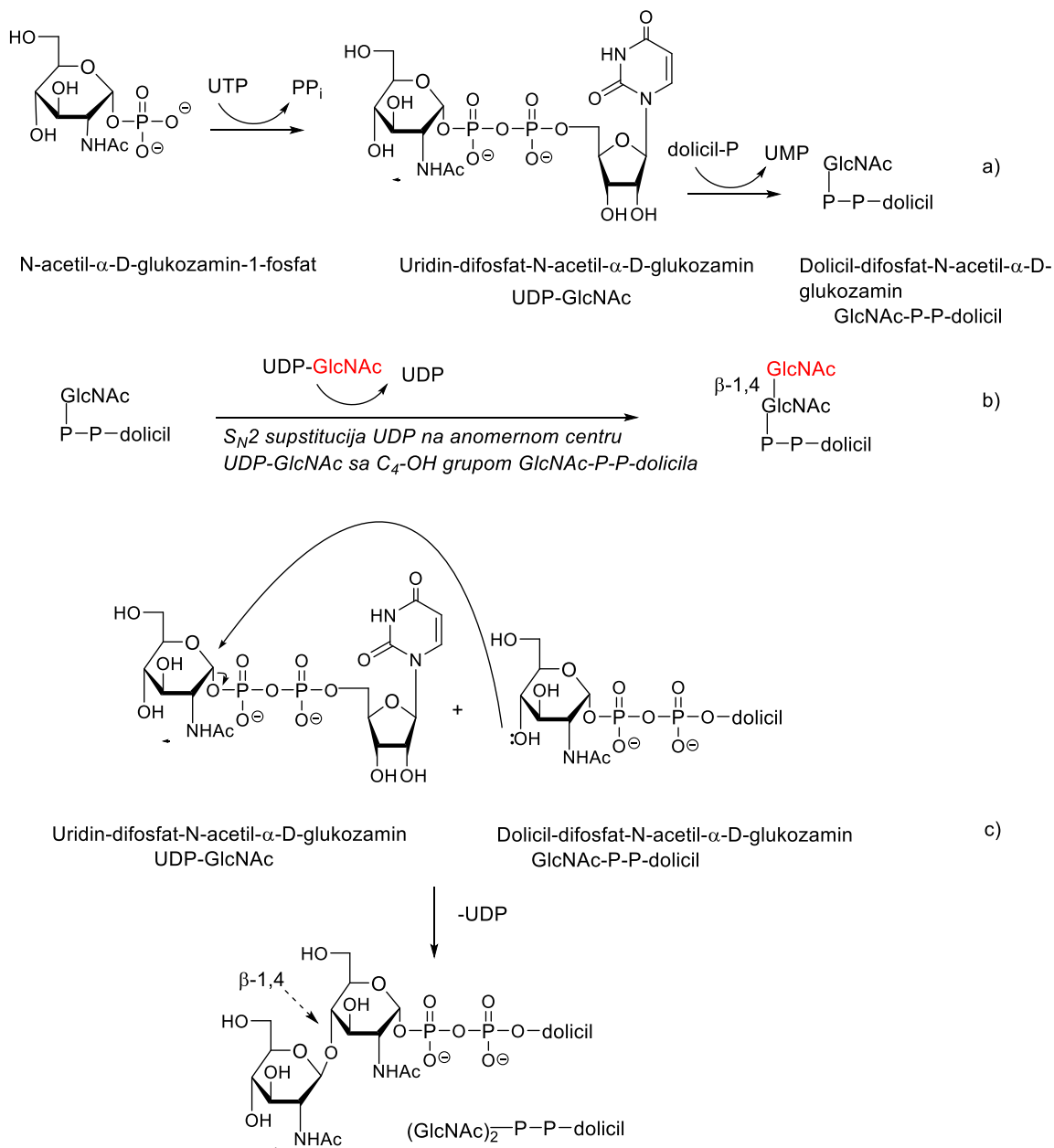
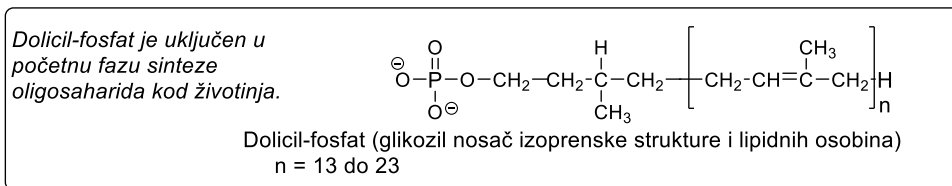
svansonin  
(prirodni inhibitor manozidaza).  
Pokazuje imunostimulatornu aktivnost.

**Slika 11.1.**

Dokazano je da je viralna infekcija posredovana glikoproteinima, naročito u slučaju HIV infekcije gde je neophodna interakcija između viralnog glikoproteina gp120 i specifičnog receptora na površini T ćelije koji se simbolično označava CD4. I u ovom slučaju različiti šećerni analozi među njima kastanospermin i svansonin su efikasni inhibitori viralnog ciklusa replikacije.

Možemo se zapitati koji su kod virusa i tumora zajednički procesi na koje utiču inhibitori glikozidaza. Odgovor je danas već jasan: kod tumora i virusa su jednake početne faze biosinteze *N*-vezanih glikoproteina, koji su uključeni u fenomen prepoznavanja odgovornih za patologiju.

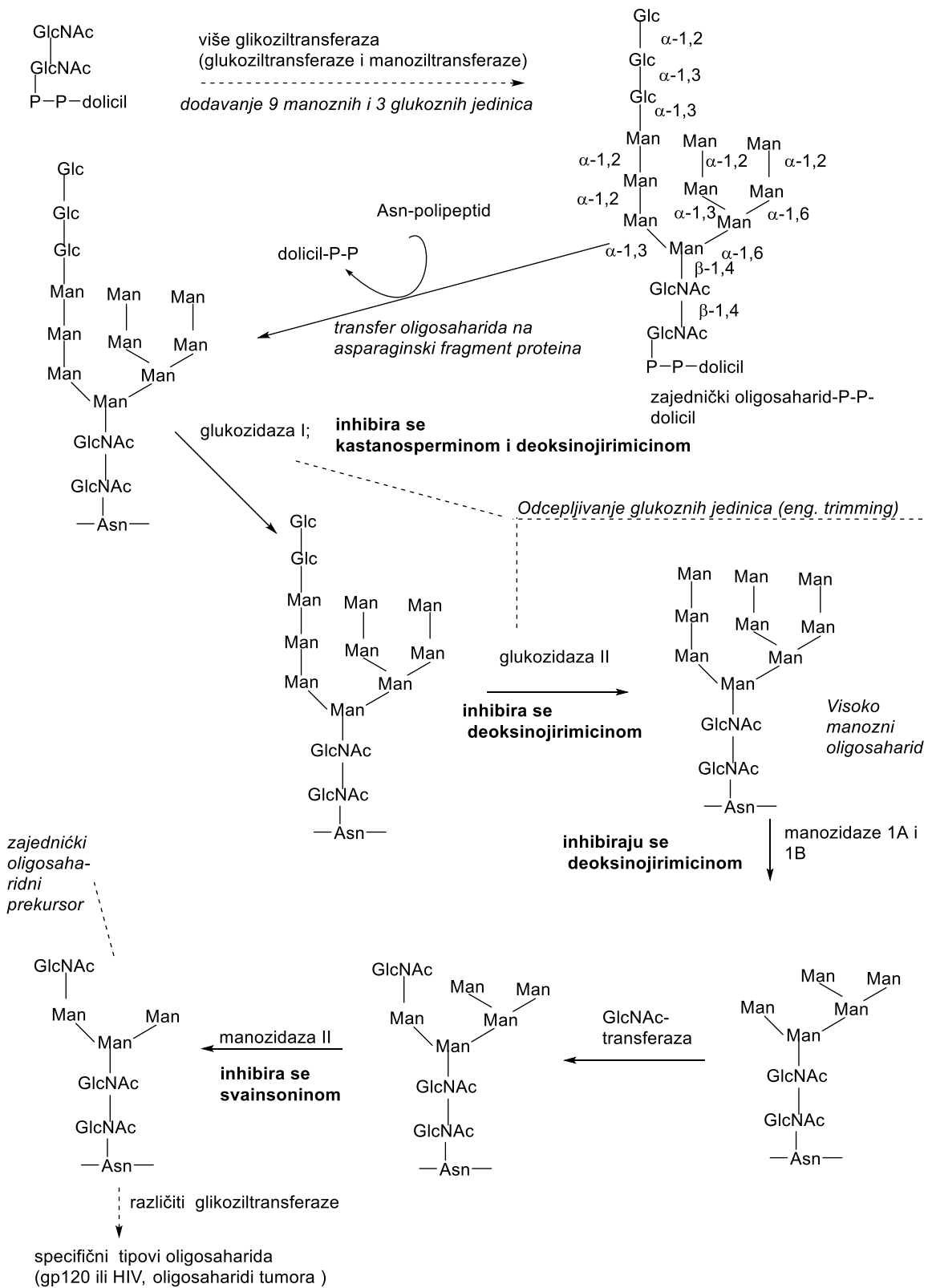
Ovaj biosintetski put započinje formiranjem aktiviranih šećera (Šema 11.3). Uridin difosfat-*N*-acetil- $\alpha$ -D-glukozamin (UDP-GlcNAc) se sintetizuje iz *N*-acetilglukozamin-1-fosfata (GlcNAc) i UTP u reakciji pri kojoj se hidrolizom oslobađa PPi.



Šema 11.3. a) vezivanje prve monosaharidne jedinice za hidrofolbni nosač, b) vezivanje druge monosaharidne jedinice za isti nosač, c) proces b prikazan strukurnim formulama.

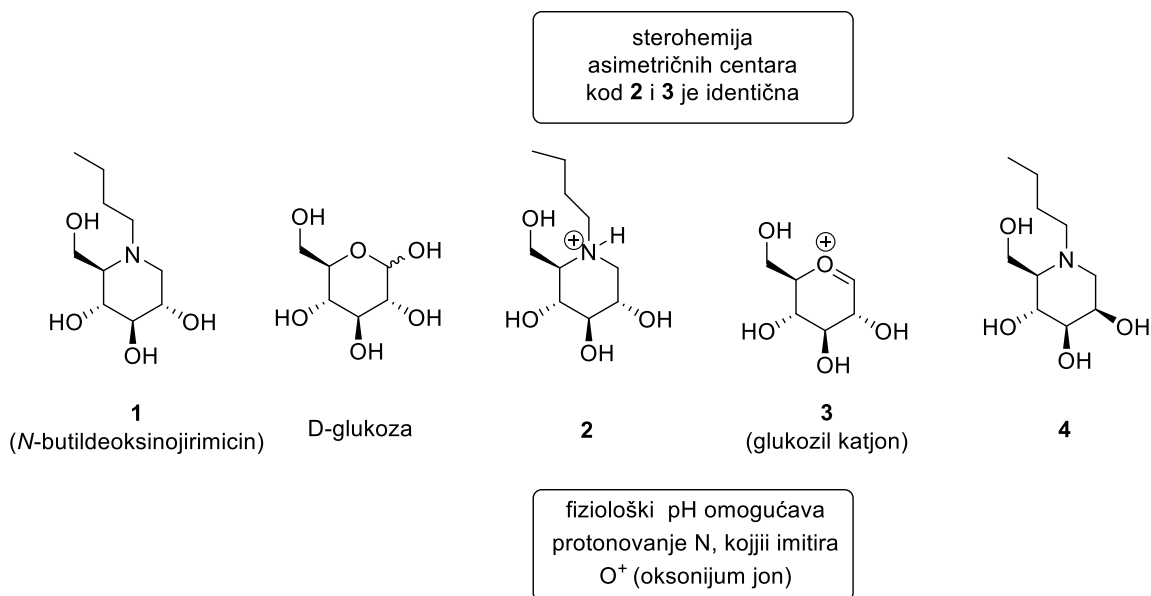
Nastali UDP-GlcNAc reaguje sa dolicil-fosfatom dajući GlcNAc-P-P-dolicil. Izgradnja oligosaharidnog jezgra i njegov transfer na rastući polipeptidni niz se vrši pomoću

lipidnog nosača (dolicil-fosfata, Šema 11.4), izoprenske strukture koji u terminalnom položaju ima fosfatnu grupu kojom se vezuju za aktiviran šećer. Sledeća GlcNAc jedinica se vezuje za prethodnu pomoću GlcNAc-transferaze, a zatim različite manozil-transferaze i glukozil-transferaze katalizuju sekvencionalnu dogradnju disaharidnog fragmenta sa devet manoznih i tri glukozne jedinice dajući aktivirano oligosaharidno jezgro (oligosaharid-P-P-dolicil). Ovaj zajednički oligosaharidni blok se transferuje sa aktiviranog hidrofobnog nosača na proteinski asparaginski ostatak. Zatim se otcepljuje jedan molekul glukoze dejstvom  $\alpha$ -glukozidaza (glukozidaza I i II) dajući "visokomanozni" oligosaharid. Dalje smanjivanje manoznih jedinica i ugradnja GlcNAc ostvaruje se delovanjem manozidaze 1A, manozidaze 1B, manozidaze II i GlcNAc transferaze dajući zajednički oligosaharidni prekursor. Iz ovog oligosaharidnog prekursora dejstvom različitih glikoziltransferaza nastaju specifični oligosaharidi koji su strukturni delovi kompleksnih glikoproteina tumorskih i virusnih ćelija. Kao što se sa Sheme 11.4. vidi iste glikozidaze i glikoziltransferaze deluju u biosintezi različitih glikoproteina koji su prisutni u tumorskim i u HIV virusnim ćelijama. Sada je jasno zašto inhibitori glikozidaza, kao što su kastanospermin i svainsonin, mogu inhibirati tako različite procese. Ono što nije potpuno jasno je kako se u prisustvu ovih sintetičkih inhibitora ostvaruje formiranje kompleksnih oligosaharida u normalnoj ćeliji. Izgleda da se ovde stvara baj-pas put koji omogućava formiranje nekih glikoproteina pomoću endomanozidaza iz Goldžijevog aparata. Kao što je već prethodno rečeno veoma je bitno da razgranati šećeri na površini ćelije imaju korektnu strukturu i oblik da bi se ostvarilo vezivanje sa lektinom. Inhibicijom nekih enzima bitnih za sintezu ovih razgranatih šećera (na primer glikoproteina) onemogućava se nastajanje korektnih šećernih struktura i stoga izostaje i efikasno vezivanje sa lektinom. Polihidroksilovani piperidini i pirolidini su jedinjenja koja često veoma uspešno mogu selektivno inhibirati glikozidaze, enzime koji učestvuju u izgradnji oligosaharida. Glikozidaze su enzimi koji modifikuju glikokonjugate hidrolizom glikozidne veze, pri čemu učestvuju u procesima koji su veoma bitni za rast, regulaciju i razvoj ćelije. Na taj način aza šećeri koji inhibiraju ove procese mogu potencijalno poslužiti kao antivirousni, antiadhezivni, antitumorski, antibakterijski, antihiperглиkemijski ili imunostimulatorni agensi.



Šema 11.4. Biosinteza N-vezanog glikoproteina [28]

Ovim pristupom mi tretiramo bolest na bazi poremećaja vezivanja lektin za šećer. Efikasan tretman AIDS-a može se ostvariti sa NB-DNJ (**1**; *N*-butildeoksinojirimicin, Slika 11.2) koji je veoma sličan D-glukozi i stoga je sposoban da redukuje infekciju leukocita HIV virusom, izazivčem AIDS-a. Mehanizam delovanja NB-DNJ takođe podrazumeva inhibiranje glukozidaze koja učestvuje u sintezi oligosaharida vezanih za glikoprotein (gp120) koji je nađen na površini HIV-a. Pošto je gp120 važan za vezivanje HIV virusa za bela krvna zrnca inhibicijom glukozidaza izostaje za infekciju neophodno vezivanje. Pošto pri fiziološkim uslovima NB-DNJ se javlja u obliku katjona **2** i veoma je sličan glukozilnom katjonskom intermedijeru **3**, koji nastaje tokom dejstva glukozidaza, sposoban je da ga imitira u procesu vezivanja sa glukozidazom. Ustvari, NB-DNJ je tako čvrsto vezan za aktivno mesto enzima da ga blokira i onemogućava njegovu funkciju. Međutim kada se stereochemija bilo koje hidroksilne grupe promeni u strukturi NB-DNJ, glukozidaza se neće više inhibirati. Tako na primer, jedinjenje **4** uopšte ne inhibira glukozidazu.



**Slika 11.2.** *N*-Butildeoksinojirimicin je modifikovani monosaharid koji inhibira glikozidaze - enzime koji katalizuje odcepljivanje šećernih molekula koji su vezani za viralni protein. Ako se ovaj proces inhibira ostace previše monosaharidnih jedinica na proteinu, pa stoga ovaj makromolekul zauzima nepovoljnu konformaciju. Smatra se da na ovaj način gp120 protein se ne može ukloniti da se oslobodi gp41 protein. Ovaj molekul takođe efikasno inhibira glukozilceramid sintazu, važan enzim za sintezu velikog broja glikosfingolipida [15].

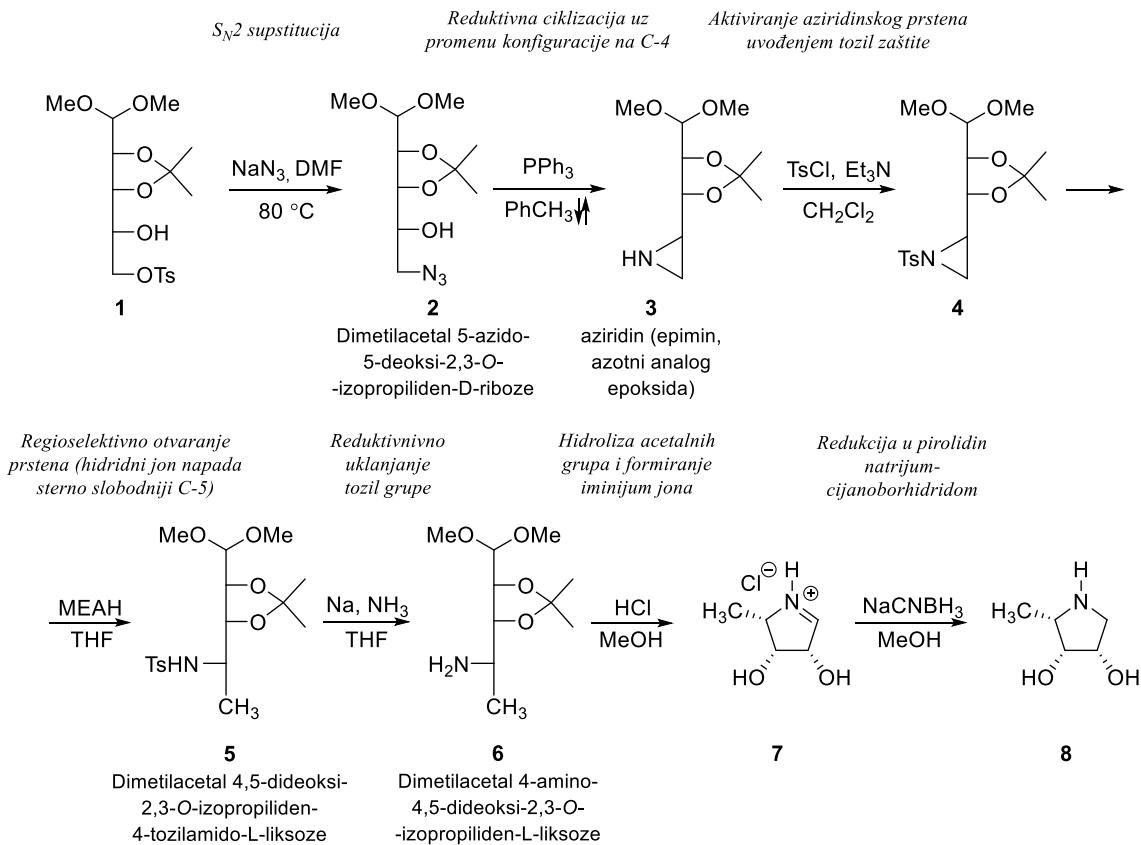
## 11.2. Dobijanje aza šećera aminacijom niza ili anomernog centra

Uloga piperidinskih i pirolidinskih alkaloida kao selektivnih inhibitora enzima koji učestvuju u procesuiranju oligosaharida (glikozidaza) je napred opisana (strana 95). Takođe je rečeno (strana 99) da su pirolidinske i piperidinske strukture dobri inhibitori glikozidaza zbog mogućnosti ovih aza šećera da nakon protonovanja azota pri fiziološkim pH uslovima imitiraju pozitivno naelektrisani piranozni prsten intermedijera visoke energije (glikozil katjona).

U cilju sinteze aza šećera azot se uvodi zamenom dobre odlazeće grupe sa azidnim jonom na odgovarajuće mesto ugljeničnog šećernog niza, ili pak transformacijom aldehidne funkcije u nitrilnu. Reduktivna transformacija azida ili nitrila vodi formiranju amino derivata koji zatim podležu ciklizaciji uz nastajanje aza šećera pirolidinske i piperidinske strukture (Šema 11.5. i Šema 11.6).

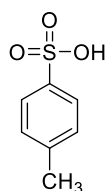
Dimetilacetal 5-azido-5-deoksi-2,3-*O*-izopropiliden-D-riboze (**2**) je dobijen nukleofilnom supstitucijom primarne toziloksi grupe u sulfonatu **1** (Šema 11.5) [42]. Redukcijom azidne grupe sa trifenilfosfinom u ključalom toluenu dobija se amino grupa koja podleže ciklizaciji uz inverziju konfiguracije na C-4 dajući aziridin **3**, koji se aktivira prevođenjem u odgovarajući *N*-tozil derivat **4**. Regioselektivnim otvaranjem aziridinskog prstena sa bis(2-metoksietoksi)aluminijum-hidridom nastaje sulfonamidni derivat **5** (dimetilacetal 4,5-dideoksi-2,3-*O*-izopropiliden-4-tozilamido-L-liksoze). Sulfonamid **5** je podvrgnut reduktivnom uklanjanju *N*-tozil-grupe sa natrijumom u amonijaku, pri čemu nastaje 4-amino derivat **6** (dimetilacetal 4-amino-4,5-dideoksi-2,3-*O*-izopropiliden-L-liksoze). Uklanjanjem acetalne grupe sa 1 M HCl vodi ka formiranju imina **7**, koji je naknadnom sukcesivnom redukcijom sa natrijum-cijanoborhidridom dao aza šećer **8**. Ovaj pirolidinski aza šećer je veoma snažan inhibitor  $\alpha$ -fukozidaze. Pretpostavljeni mehanizam redukcije azidne grupe sa trifenilfosfinom prikazan je na Šemi 11.6. On uključuje inicijalni nukleofilni napad fosfina na azidnu grupu pri čemu nastaje intermedijer fosfatriazadien **3**, koji verovatno predstavlja smesu *Z* i *E* cviterjona (**4Z** i **4E**). Degradacijom izomera **4Z** nastaje iminofosforan **5** i elementarni azot (N<sub>2</sub>). Nakon hidrolize intermedijera **5** nastaje amin **6** i trifenilfosfin-oksid **7** (Šema 11.6).



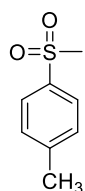


### Napomene:

MEAH:  
 (MeOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>AlH  
 bis(2-metoksietoksi)aluminijum-hidrid



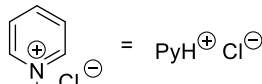
*p*-toluolsulfonska kiselina



*p*-toluolsulfonylna grupa ili tozil grupa

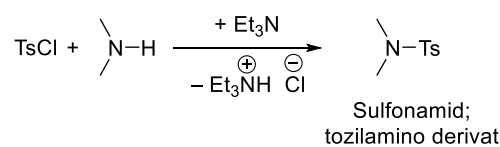
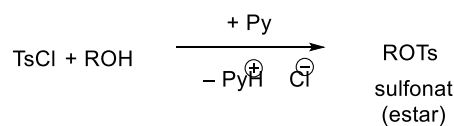


Piridin



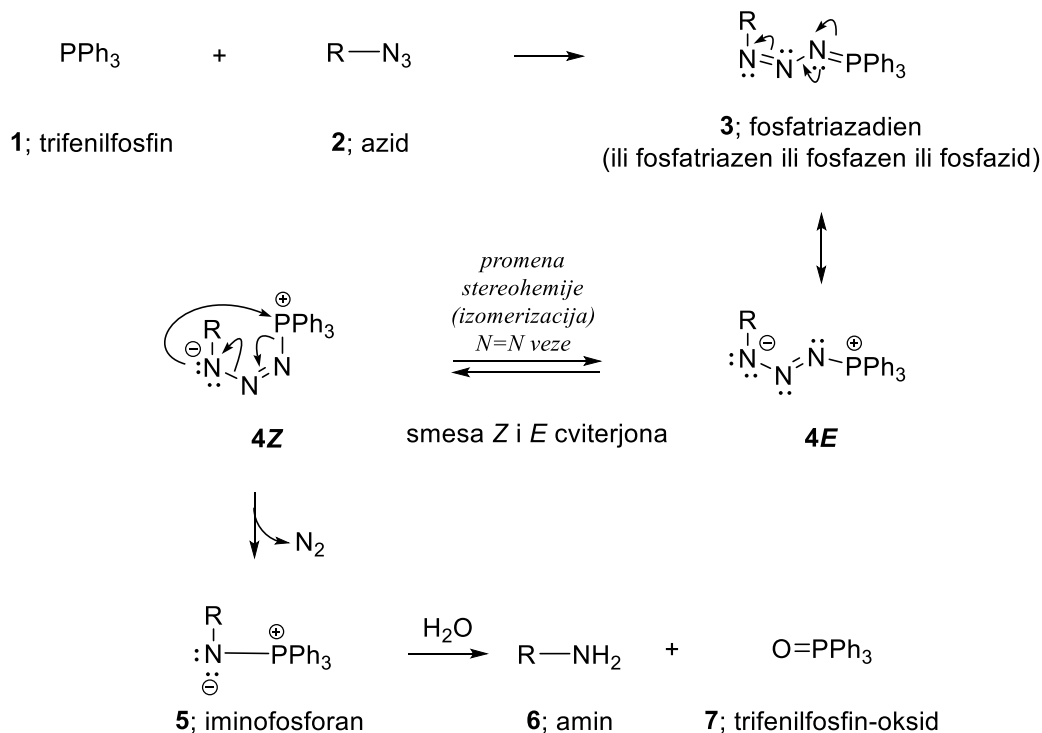
Hidrohlorid piridina

Tozil grupa se uvodi reakcijom TsCl (tozil-hlorida) sa alkoholnom ili amino grupom u prisustvu neke baze.



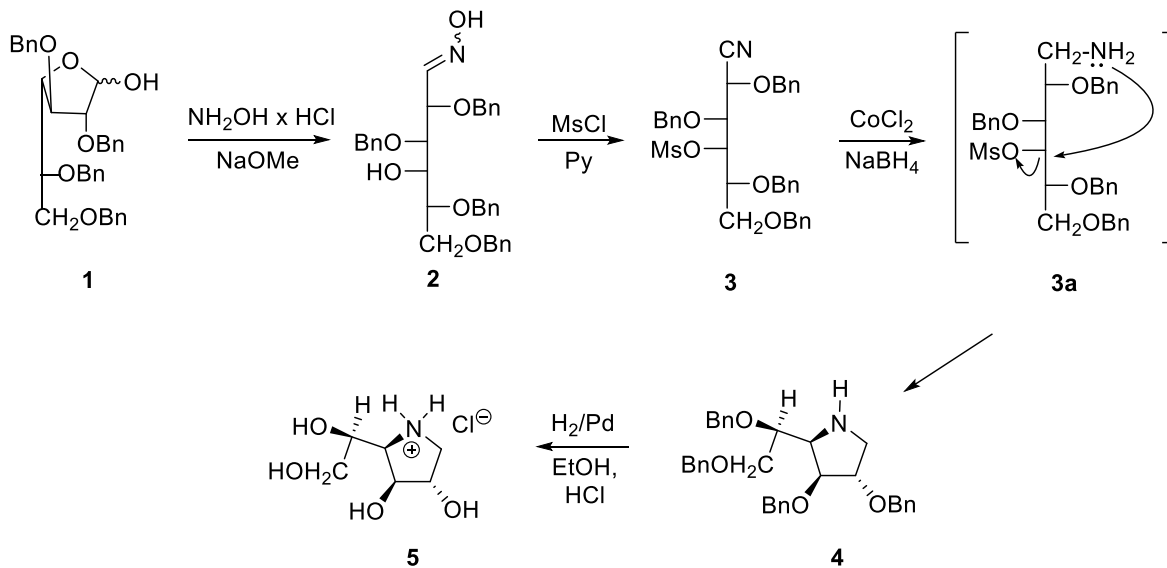
Poslednja reakcija se radi najčešće u apsolutnom CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Šema 11.5.

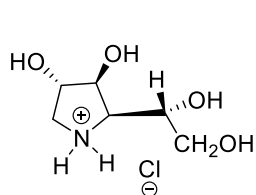


Šema 11.6.

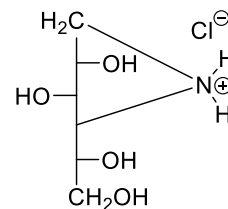
U cilju uspostavljanja odnosa struktura-aktivnost kod pirolidinskih derivata kao potencijalnih inhibitora glikozidaza, Buchanan i saradnici su primenili drugu strategiju sinteze aza šećera: redukciju nitrilne u amino funkciju (Šema 11.7) [43]. Sinteza hidrohlorida 1,4-dideoksi-1,4-imino-D-glucitola (**5**) ostvarena je iz 2,3,5,6-tetra-O-benzil-D-galaktofuranoze (**1**) u četiri sintetičke faze. Reakcija jedinjenja **1** sa hidroksilamin-hidrohloridom u prisustvu natrijum-metoksida, izvedena je na sobnoj temperaturi u toku 24 časa. Pri tome je dobijena smesa *E*- i *Z*-oksima **2**, koji su bez prečišćavanja podvrgnuti daljoj dehidraciji oksimino-grupe. Reakcija oksima **2** sa metansulfonil-hloridom u apsolutnom piridinu dobijen je meziloksinitril **3**. Tretiranjem jedinjenja **3** sa kobalt(II)hloridom i natrijum-borhidridom, redukovana je nitrilna u amino funkciju, uz sukcesivno zatvaranja pirolidinskog prstena  $S_N2$  procesom. Katalitička redukcija dobijenog benziletarskog derivata pirolidina **4**, u prisustvu Pd/C, pri normalnom pritisku vodonika, u etanolu, koji sadrži HCl, dala je hidrohlorid pirolidina **5**.



**Napomene:**

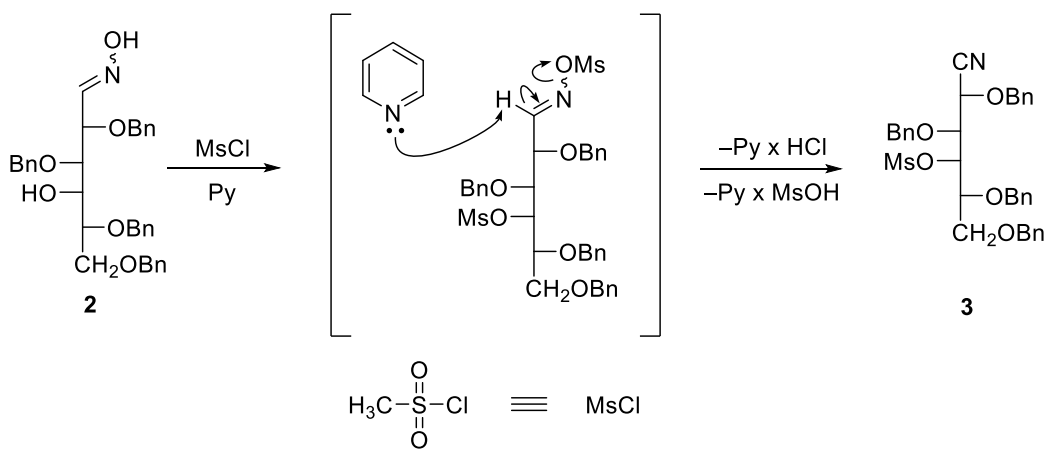


Prikaz strukture 5 iz originalnog rada.



Fisher-ova projekciona formula jedinjenja 5

**Transformacija oksima u nitril i esterifikacija C<sub>4</sub>-OH grupe**

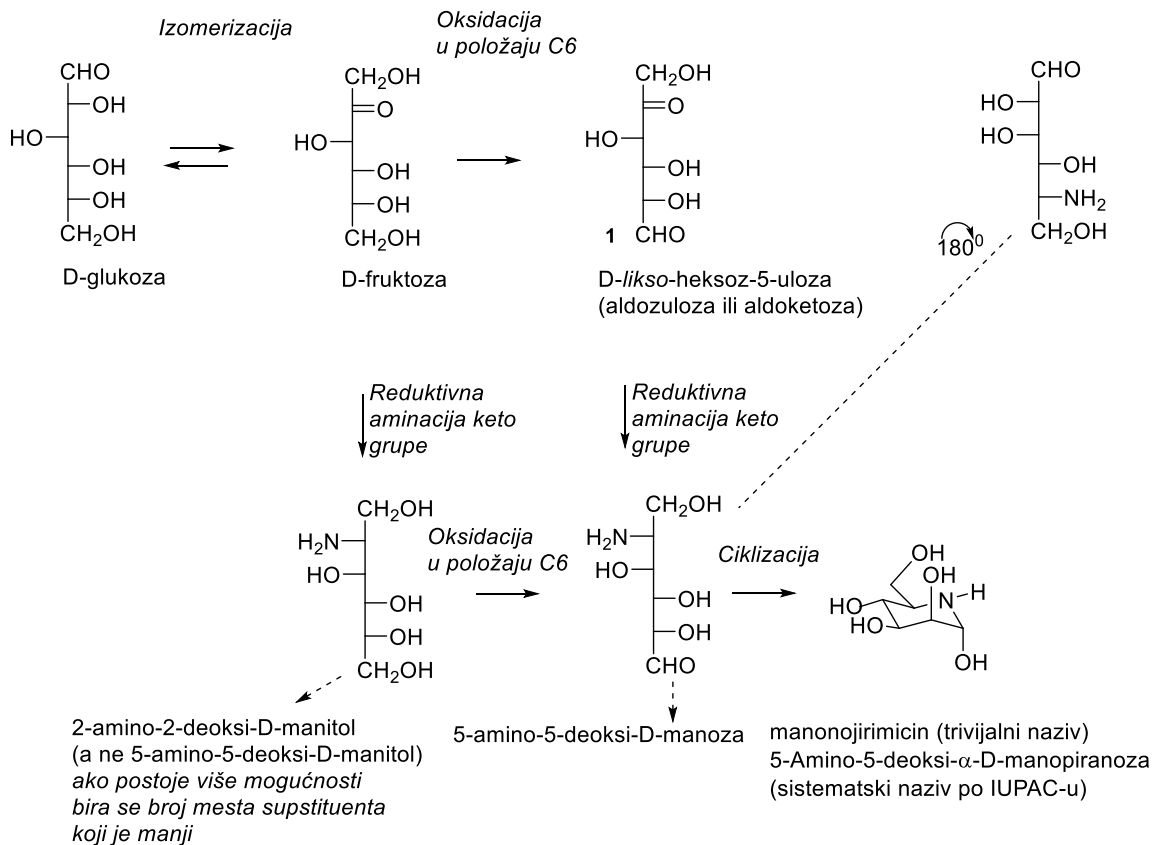


Metansulfonil-hlorid ili mezil-hlorid

Šema 11.7.

### 11.3. Biosinteza aza šećera

Biosinteza aza šećera se ostvaruje iz prirodno raspoloživih šećera oksidacijom i reduktivnom aminacijom, uz naknadnu sukcesivnu ciklizaciju. Dokazano je da je prva faza biosinteze kod *Streptomyces subrutilius* izomerizacija glukoze u fruktozu, a zatim sledi oksidacija položaja C-6 i njegova reduktivna aminacija. Dobijeni primarni amin ciklizacijom se prevodi u manonojirimicin što je prikazano na Šema 11.8. [28].



Šema 11.8.

## Poglavlje 12. HEMOENZIMSKA SINTEZA ŠEĆERNIH MIMETIKA

Enzimi su veoma korisni katalizatori brojnih organskih reakcija, pa se često primenjuju u laboratorijskim uslovima.

Jedna od glavnih prednosti enzimskih katalizatora je njihova sposobnost da katalizuju reakcije uz visoku stereoselektivnost. Osim toga, primenu enzima u organskoj sintezi opravdava njihova sposobnost da reakcije katalizuju pri blagim reakcionim uslovima i na regioselektivan način. Zbog toga su potrebe za zaštitama funkcionalnih grupa svedene na minimum. Pošto se većina enzimski katalizovanih reakcija odigrava u vodenim rastvorima pri pH oko 7 njihove reakcije su kompatibilne. To omogućava da se nekoliko enzima koristi kao "one-pot"\* sintetička sekvenca. Zbog njihove biodegradabilnosti njihova upotreba ih čini veoma opravdanim. Visoka regio- i stereoselektivnost kao i katalitička efikasnost čini enzime korisnim za sinteze visoko funkcionalizovanih molekula kao što su ugljeni hidrati. Pristupačnost ugljenih hidrata i njihovih mimetika putem sinteze omogućava uvid i razumevanje njihove biološke uloge pa i do ostvarenja racionalnog dizajna nove generacije terapijskih agenasa. Sintaza takvih visoko funkcionalizovanih kompleksnih molekula hemijskim metodama često iziskuje mnogo selektivnih zaštita i deprotekcija koje se mogu izbeći upotrebom enzima. Sintaza monosaharida i njihovih derivata aldolnom reakcijom koja je katalizovana aldolazama je veoma efikasna. Kuplovanje monosaharida radi formiranja oligosaharida preko specifične glikozidne veze mogu katalizovati glikozidaze ili glikoziltransferaze.

### 12.1. Formiranje C-C veze aldolnom kondenzacijom katalizovanom aldolazama

Enzimi koji katalizuju reverzibilno formiranje heksoza iz trougljeničnih prekursora aldolnom kondenzacijom naziva se aldolaze (originalno su se nazivali zimoheksaze). Aldolaze pripadaju velikoj grupi enzima pod nazivom liaze, koji su prisutni u svim organizmima. Uglavnom učestvuju u metabolizmu ugljenih hidrata, amino kiselina i oksikiselina. Mada je njihova funkcija *in vivo* uglavnom degradacija metabolita, zbog

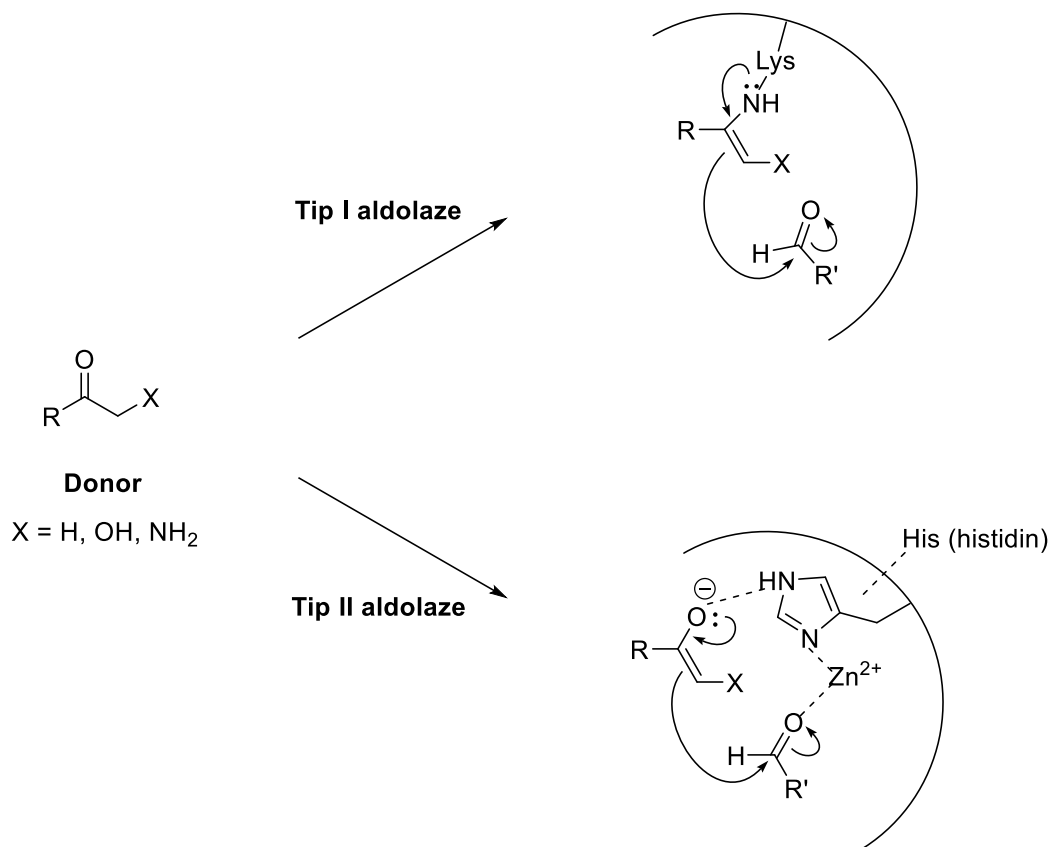
---

\* "one-pot": □ postupak za izvođenje višefazne sintetičke sekvence u jednom reakcionom sudu.

reverzibilnosti procesa i pažljivim podešavanjem reakcionih uslova, formiranje C-C veze može postati dominantno. Tako na primer. upotreba viška jednog reaktanta pomera ravnotežu u pravcu sinteze. Preko 30 aldolaza je do sada identifikovano i izolovano i većina od njih katalizuje stereospecifičnu adiciju keton-donora na aldehidni akceptor. Po mehanizmu delovanja prepoznatljive su dve klase aldolaza (Šema 12.1). Aldolaza tipa I formira u aktivnom centru intermedijernu Šifovu bazu sa donorskim supstratom koji se zatim stereospecifično adira na akceptor. Aldolaza tipa II koristi  $Zn^{2+}$  jon kofaktor, koji deluje kao Lewis-ova kiselina u aktivnom centru. Aldolaza tipa I se pre svega nalaze u organizmima životinja i viših biljaka dok su aldolaze tipa II uglavnom rasprostranjene kod bakterija i gljiva. Oba tipa enzima su uglavnom specifični za donorski supstrat ali pokazuju manju specifičnost i za akceptorski supstrat. Stereoselektivnost aldolne reakcije je generalno kontrolisana od strane enzima i ne zavisi od strukture ili stereochemije supstrata što čini stereochemiju proizvoda predvidljivom. Postoji i izuzetak od napred rečenog u slučajevima kada se koriste termodinamički kontrolisani reakcioni uslovi. Aldolaze koje su do sada primenjene u sintezi podeljene su u četiri glavne grupe na osnovu strukture donorskog supstrata i proizvoda.

- a) Prva grupa koristi dihidroksiacetone-fosfat (DHAP) kao donorski supstrat, pri čemu se nakon reakcije sa aldehidom, formira ketoza 1-fosfat.
- b) Druga grupa aldolaza koristi piruvat ili fosfoenolpiruvat kao donor uz formiranje 3-deoksi-2-keto kiseline kao proizvoda.
- c) Treća grupa aldolaza kao donor koristi acetaldehid dajući 2-deoksi aldehide kao proizvode.
- d) Poslednja grupa aldolaza koristi glicin kao donor dajući  $\alpha$ -supstituisane kiseline.

Aldolaze se mogu izolovati iz različitih organizama u dovoljnim količinama, što pogoduje za njihovu laboratorijsku primenu [44].



Šema 12.1.

Ako sinteza aza-šećera počinje iz optički čistih hiralnih amino-sintona moguće je ostvariti stereoselektivnu sintezu. Prilikom sinteze deoksinojirimicina (**4**) i deoksimanojirimicina (**5**), koji su potentni inhibitori glikozidaza, kreće se od enantiomerne smese prekursora (Šema 12.2). Hemoenzimsku sintezu ovih aza-šećera su ostvarili Wong i saradnici primenom RAMA-katalizovane aldolne reakcije između dihidroxiacetonfosfata (DHAP) i racemskog 3-azido-2-hidroksiopropanala (**1**), u prisustvu fruktoza-1,6-difosfat aldolaze (**FDP** aldolaza) [44]. Dobijene diastereoizomerne 6-azidoketoze **2** i **3** su podvrgnute razgradnji primarne fosfatne estarske grupe sa fosfatazom. Katalitičkom hidrogenacijom deblokiranih azido-uloza u prisustvu Pd(0) kao katalizatora, prvo se redukuje azidna grupa do amino funkcije, a nastali primarni amin nukleofilnom adicijom na karbonilnu funkciju, uz naknadnu dehidrataciju, daje imino-intermedijer, koji "one pot" redukcijom konačno daje deoksinojirimicin (**4**) i deoksimanojirimicin (**5**) u odnosu 1:4.





**LITERATURA**

1. Ervig, E.; Koenigs, W. *Ber.* **1889**, 22, 1464.
2. Ervig, E.; Koenigs, W. *Ber.* **1889**, 22, 2207.
3. Fischer, E. *Ber.* **1895**, 28, 1445.
4. Villiers, A.; Favolle, M. *Bull. Soc. Chim. France* **1894**, 11, 692.
5. Tanret, C. *Compt. Rend.* **1895**, 120, 1060.
6. Tollens, B. *Ber.* **1883**, 16, 921.
7. Heaworth, W.N. *The Constitution of the Sugars*, Arnold, London, 1929.
8. Miljković, M. *Carbohydrates, Synthesis, Mechanisms, and Stereoelectronic Effects*, Springer Science+Business Media, LLC 2009.
9. Marco, B. A. *Synthesis and Characterization of Glycosides*, Second Edition, Springer International Publishing, 2016.
10. Mihailović, M. Lj. *Osnovi teorijske organske hemije i stereochemije*, Građevinska knjiga, Beograd, 1972.
11. Stoddart, J. F. *Stereochemistry of Carbohydrates*, Willey Interscience, New York, 1971.
12. Kennedy, J. F. *Carbohydrate Chemistry*, Clarendon Press, Oxford, 1988.
13. Radulović, N. S.; Blagojević, P.D. *Nomenklatura organskih jedinjenja*, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, 2015.
14. International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Bio-chemistry and Molecular Biology, Joint Commission on Biochemical Nomenclature, McNaught, A. D. *Nomenclature of Carbohydrates*, *Pure & Appl. Chem.* **1996**, 68 (10), 1919.
15. Davis, B. G.; Fairbanks, A. J. *Carbohydrate Chemistry*, Oxford University Press, 2003.
16. Nelson, D.L.; Cox, M. N. *Lehninger, Principles of Biochemistry*, Fifth Edition, W.H.Freeman and Company, 2008.

17. Furthmayr, H. *Nature* **1078**, 271, 519.
18. Hounsell, E. F.; Davies, M. J.; Renouf, D. V. *Glycoconj. J.* **1996**, 13, 1.
19. Elliott, S.; Sinclair, A. M. *Biologics* **2012**, 6, 163.
20. Momaya, A.; Fawal, M.; Estes, R. *Sports Med.* **2015**, 45 (4), 517.
21. Likhosherstov, L. M.; Novikova, O.S.; Derevitskaya, V. A.; Kochetkov, N. K. *Carbohydr. Res.* **1990**, 199, 67.
22. Likhosherstov, L. M.; Novikova, O.S. Piskarev, V. E.; Trusikhina, E. E.; Derevitskaya, V. A.; Kochetkov, N. K. *Carbohydr. Res.* **1988**, 178, 155.
23. Takasaki, S.; Mizuochi, T.; Kobata, A. *Methods Enzymol.* **1982**, 83, 263.
24. Collins, P.; Ferrier, R. *Monosaccharides. Their Chemistry and Their Roles in Natural Products*, John Wiley & Sons, England, 1995.
25. Garrett, R. H.; Grisham, C. M. *Biochemistry*, Fourth Edition, Brooks/Cole, Cengage Learning, 2010.
26. Tachibana, K.; Nakamura, S.; Wang, H.; Iwasaki, H.; Tachibana, K.; Maebara, K.; Cheng, L.; Hirabayashi, J.; Narimatsu, H. *Glycobiology*, **2006**, 16, 46.
27. Robins, M. J.; Parker J. M. R. *Can. J. Chem.* **1983**, 61, 312.
28. Boons, G. J. *Carbohydrate Chemistry*, Blackie Academic&Professional, an imprint of Thomson Science, London SE1 8HN, UK, 1998.
29. (a) Cohn, W. E. *J. Biol. Chem.* **1960**, 235, 1488. (b) Cohn, W. E. *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, 32, 569.
30. (a) Matsuura, S.; Shiratori, O.; Katagiri, K. *J. Antibiot.* **1964**, 17, 234. (b) Nishimura, H.; Shimaoka, N.; Tanaka, Y.; Komatsu, Y.; Kato, H.; Mayama, M. *J. Antibiot.* **1964**, 17, 148. (c) Nakagawa, Y.; Kano, H.; Tsukuda, Y.; Koyama, H. *Tetrahedron Lett.* **1967**, 42, 4105.

31. Bzowska, A. In *Modified Nucleosides: Biochemistry, Biotechnology and Medicine*; Herdewijn, P., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2008; str. 473-510.
32. Albrecht, H. P.; Repke, D. B.; Moffatt, J. G. *J. Org. Chem.*, **1974**, *39*, 2176.
33. Huisgen, R., *Angew. Chem.*, Int. Ed. Engl. **1963**, *2*, 565, 633.
34. Jarboe, C. H., u *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Weissberger, A., Ed., Interscience, New York, N. Y., 1967, Vol. 22, str. 177.
35. Nishimura, H.; Mayama, M.; Komatsu, Y.; Kato, H.; Shimaoka, N.; Tanaka, Y. *J. Antibiot.* **1964**, *17*, 148.
36. Böttcher, T.; Sieber, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6964.
37. Trummlitz, G.; Moffatt, G. J. *J. Org. Chem.*, **1973**, *38*, 1841.
38. Gillitt, N. D.; Domingos, J.; Bunton, C. A. *J. Phys. Org. Chem.*, **2003**, *16*, 603.
39. Delaney, M. O.; Greenberg, M. M. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 1460.
40. (a) Witkowski, J.T.; Robins, R. K.; Sidwell, R. W.; Simon, L. N. *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 1150. (b) Franchetti, P.; Grifantini, M. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 599.
41. Wu, J. Z.; Lin, Ch. Ch.; Hong, Z. *J. Antimicrob. Chemoter.* **2003**, *52*, 543.
42. Wong, C. H.; Provencher, L.; Porco, J. A.; Jung, S. H.; Wang, Y. F. Chen, L.; Wang, R.; Steensma, D. H. *J. Org. Chem.* 1995, *60*, 1492.
43. Buchanan, J. G.; Lumbard, K. W.; Sturgeon, R. J.; Thompson, D. K.; Wightman, R. H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1990**, *0*, 699.
44. Gijzen, H. J. M.; Qiao, L.; Fitz, W.; Wong, C. H. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 443.
45. Popsavin, M. Nепубликовани rezultati.

