

# Priprava ferocenskih amida manoziliranog desmuramil-dipeptida s potencijalnim adjuvantskim učinkom

---

**Bajan, Ivona**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:548880>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-18**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Ivona Bajan

**Priprava ferocenskih amida manoziliranog  
desmuramil-dipeptida s potencijalnim  
adjuvantskim učinkom**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2022.



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



Diplomski rad izrađen je u okviru projekta  
*Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i  
biološka evaluacija*

(IP-2020-02-9162, voditeljica: prof. dr. sc. Lidija Barišić,  
Prehrambeno-bioteknološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu).



## Zahvale

Želim se zahvaliti svim dragim ljudima koji su bili dio ove priče. Ponajviše želim zahvaliti svom ocu i majci bez kojih ovo sve ne bi bilo ni moguće i koji su mi kroz sve moje godine studija bili neizmjerena podrška i rame za plakanje kad je bilo teško. Hvala i mojim sestrama za svaku riječ podrške i ohrabrenja.

Najveća hvala i mentorici izv. prof. dr. sc. Vesni Petrović Peroković na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju, kao i na svakom savjetu. Također veliko hvala i mojoj neposrednoj mentorici mag. chem. Miji Bušljeti, kako za savjet tako i za smijeh.

Hvala i svim mojim kolegama, prijateljima, koji su ovo studentsko iskustvo upotpunili i uveselili. Također, hvala Krešo jer si odslušao svako “žugeljanje“ i kao što si rekao, na kraju sve i bi dobro.

Na kraju, želim se zahvaliti i svim kolegama iz Plivinog odjela istraživanja i razvoja. Uz vas sve sam narasla kao kemičar i dobila priliku uistinu proširiti svoje iskustvo i znanje. Naročito se želim zahvaliti svojoj prvoj mentorici dr. sc. Marini Marinković, za kavu, znanje, smijeh, savjet i priču.



# Sadržaj

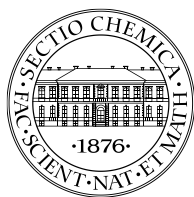
<b>SAŽETAK .....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIII</b>
<b>§ 1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Ferocen i ferocenski derivati.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. <i>Struktura i reakcije ferocena.....</i>	<i>2</i>
2.1.2. <i>Primjena ferocenskih derivata u medicini.....</i>	<i>5</i>
<b>2.2. Adjuvantska aktivnost (des)muramil-dipeptida .....</b>	<b>8</b>
2.2.1. <i>Adjuvanti i muramil-dipeptidi.....</i>	<i>8</i>
2.2.2. <i>Mehanizam djelovanja muramil-dipeptida.....</i>	<i>9</i>
2.2.3. <i>Desmuramil-dipeptid i lipofilni derivati desmuramil-dipeptida.....</i>	<i>11</i>
2.2.4. <i>Manozilirani desmuramil-dipeptid .....</i>	<i>11</i>
<b>2.3. Zaštitne skupine .....</b>	<b>11</b>
2.3.1. <i>Zaštita hidroksilne skupine monosaharida.....</i>	<i>12</i>
2.3.2. <i>Zaštita amino-skupine u peptidnoj kemiji.....</i>	<i>14</i>
2.3.3. <i>Zaštita karboksilne skupine peptida.....</i>	<i>15</i>
<b>2.4. Priprava amida – kondenzacijske reakcije .....</b>	<b>16</b>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. Materijali i metode.....</b>	<b>21</b>
3.1.1. <i>Kemikalije i otapala.....</i>	<i>21</i>
3.1.2. <i>Metode.....</i>	<i>21</i>
<b>3.2. Priprava peptidnog prekursora.....</b>	<b>22</b>
3.2.1. <i>Priprava spoja 1 .....</i>	<i>22</i>
<b>3.3. Priprava ferocenskih amina.....</b>	<b>23</b>
3.3.1. <i>Priprava spoja 2 .....</i>	<i>23</i>
3.3.2. <i>Priprava spoja 3 .....</i>	<i>24</i>
3.3.3. <i>Priprava spoja 4 .....</i>	<i>25</i>
<b>3.4. Priprava ferocenskih amida desmuramil-dipeptida .....</b>	<b>25</b>
3.4.1. <i>Općeniti postupak kondenzacije ferocenskih amina s peptidnim prekursorom.....</i>	<i>25</i>
3.4.2. <i>Priprava spoja 5 .....</i>	<i>26</i>
3.4.3. <i>Priprava spoja 6 .....</i>	<i>27</i>
3.4.1. <i>Priprava spoja 7 .....</i>	<i>27</i>



3.4.2. Općeniti postupak uklanjanje Boc zaštitne skupine s peptidnog fragmenta.....	28
3.4.3. Priprava spoja 8.....	28
3.4.4. Priprava spoja 9.....	29
3.4.5. Priprava spoja 10.....	30
<b>3.5. Priprava zaštićene manozne podjedinice .....</b>	<b>30</b>
3.5.1. Priprava spoja 11.....	30
3.5.2. Priprava spoja 12.....	31
<b>3.6. Općeniti postupak kondenzacije ferocenskih amida desmuramil dipeptida s manoznom podjedinicom.....</b>	<b>32</b>
3.6.1. Priprava spoja 13.....	32
3.6.2. Priprava spoja 14.....	33
3.6.3. Priprava spoja 15.....	34
<b>3.7. Općeniti postupak uklanjanja acetilne zaštitne skupine – Zemlénov postupak.....</b>	<b>35</b>
3.7.1. Priprava spoja 16.....	36
3.7.2. Priprava spoja 17.....	36
3.7.1. Priprava spoja 18.....	37
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1. Uvod .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1. Uklanjanje benzilne zaštite s Boc-L-Ala-D-isoGln(OBn).....</b>	<b>42</b>
<b>4.2. Priprava ferocenskih amina 2-4 .....</b>	<b>42</b>
4.2.1. Priprava ferocenskog amina 2 redukcijom iz odgovarajućeg nitrila.....	42
4.2.2. Priprava soli ferocenskih amina 3 i 4 uklanjanjem Boc skupine sa zaštićenih ferocenskih amina.....	43
<b>4.3. Priprava manozne podjedinice .....</b>	<b>44</b>
<b>4.4. Kondenzacijske reakcije priprave ferocenskih amidnih derivata desmuramil-dipeptida..</b>	<b>45</b>
<b>4.5. Reakcija kondenzacije manozne podjedinice s ferocenskim amidnim derivatom desmuramil-dipeptida .....</b>	<b>46</b>
<b>4.6. Uklanjanje acetilnih zaštitnih skupina Zemlénovim postupkom .....</b>	<b>47</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>48</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA .....</b>	<b>49</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>51</b>
<b>§ 8. DODATAK .....</b>	<b>XV</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XXXI</b>







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

Diplomski rad

## SAŽETAK

### PRIPRAVA FEROCENSKIH AMIDA MANOZILIRANOG DESMURAMIL-DIPEPTIDA S POTENCIJALNIM ADJUVANTSKIM UČINKOM

Ivona Bajan

U sklopu ovog rada sintetizirana su tri ferocenska amidna derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida s varirajućom duljinom ugljikovodičnog lanca između ferocena i ostatka molekule. Ferocenski amini s tri i četiri metilenske skupine pripremljeni su iz odgovarajućih zaštićenih amina uklanjanjem Boc zaštite dok je ferocenski amin s dvije metilenske skupine pripremljen redukcijom iz ferocenacetonitrila. Kao peptidna podjedinica korišten je Boc-L-Ala-D-isoGln koji je priređen uklanjanjem benzilne zaštitne skupine s odgovarajućeg komercijalno dostupnog dipeptida Boc-L-Ala-D-isoGln(OBn). Manozna podjedinica pripremljena je iz 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoze reakcijom s *tert*-butil-bromoacetatom te uklanjanjem *tert*-butilne zaštitne skupine u kiselim uvjetima. Ferocenski amini najprije su amidnom vezom povezani s desmuramil-dipeptidom preko karboksilne skupine bočnog ogranka *iso*Gln reakcijom kondenzacije uz EDC $\times$ HCl kao kondenzacijski reagens, HOBt kao aditiv te TEA kao bazu. Nakon uklanjanja peptidne Boc zaštite, ferocenski amidni derivati desmuramil-dipeptida povezani su s manoznom podjedinicom u istim uvjetima amidacije. Konačni korak u sintezi ciljnih produkata bilo je uklanjanje acetilnih zaštitnih skupina s manozne podjedinice, što je provedeno Zemlénovim postupkom te su uspješno pripremljeni produkti u svrhu ispitivanja adjuvantnog učinka.

(52 + xxxi stranica, 45 slika, 3 tablice, 36 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: adjuvanti, amidacija, desmuramil-dipeptid, ferocen, manokonjugati

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Neposredni voditelj: Mia Bušljeta, mag. chem.

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
  2. izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović
  3. doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
- Zamjena: doc. dr. sc. Željka Car

Datum diplomskog ispita: 16. rujna 2022.





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

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### SYNTHESIS OF FERROCENE AMIDES OF MANNOSYLATED DESMURAMYL DIPEPTIDE WITH POTENTIAL ADJUVANT ACTIVITY

Ivona Bajan

In this thesis, three ferrocene amide derivatives of mannosylated desmuramyl dipeptide with varying length of the alkyl chain connecting the ferrocene subunit with the rest of the molecule have been synthesized. Ferrocene amines with three and four methylene groups were prepared from the corresponding protected amines by removal of the Boc protective group. Ferrocene amine with two methylene groups has been prepared by reduction of ferroceneacetonitrile. Boc-L-Ala-D-*iso*Gln was used as the peptide subunit and prepared by removing the benzyl protective group from the corresponding commercially available Boc-L-Ala-D-*iso*Gln(OBn). 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranose was used for the preparation of the mannose subunit by its reaction with *tert*-butyl bromoacetate and subsequent removal of the *tert*-butyl protective group in acidic condition. Ferrocene amines were connected through an amide bond to desmuramyl dipeptide via the carboxyl group located on the *iso*Gln side chain. For this purpose reaction with EDC $\times$ HCl as a condensation reagent, HOBt as an additive and TEA as a base was used. After the removal of the peptide Boc protective group, ferrocene amide derivatives of desmuramyl dipeptide were linked to the mannose subunit in the same amidation reaction conditions. The final step in the synthesis of the target products was the removal of the acetyl protective groups from the mannose subunit, which was achieved by Zemplén's procedure. Thus, the final products were successfully obtained and will be used for the investigation of their adjuvant activity.

(52 + xxxi pages, 45 figures, 3 tables, 36 references, original in croatian)

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

Keywords: adjuvants, amidation, desmuramyl dipeptide, ferrocene, mannoconjugates

Mentor: Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor

Assistant mentor: Mia Bušljeta, mag. chem.

Reviewers:

1. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
2. Dr. Ivica Đilović, Associate Professor
3. Dr. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor

Substitute: Dr. Željka Car, Assistant Professor

Date of exam: 16th of September 2022









## § 1. UVOD

Cijepljenje je jedna od najefikasnijih metoda zaštite i prevencije zaraznih bolestima, a kako bi se pojačala imunostimulatorna aktivnost cjepiva često se koriste adjuvanti. Adjuvanti su tvari koje pojačavaju ili smanjuju imunogenost cjepiva. Muramil-dipeptid (MDP), *N*-acetilmuramil-L-alanin-D-izoglutamin (MurNAc-L-Ala-D-*iso*Gln), poznati je adjuvant čija šira primjena zbog niza nuspojava nije zaživjela. Strukturni je fragment peptidoglikana koji grade stanične stijenke Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija i ujedno njihov najmanji dio koji još pokazuje adjuvantsku aktivnost. Istraživanja su pokazala da za adjuvantsku aktivnost muramil-dipeptida nije nužna prisutnost *N*-acetilmuraminske kiseline (MurNAc) u strukturi te se uklanjanjem MurNAc dobiva desmuramil-dipeptid (DMP), L-alanin-D-izoglutamin (L-Ala-D-*iso*Gln). Ovo otkriće otvorilo je mogućnost za dodatne modifikacije strukture DMP-a u svrhu povećanja njegove adjuvantske aktivnosti. Vezanje lipofilnih podjedinica na molekulu DMP-a jedan je od načina njegove strukturne modifikacije čiji je cilj poboljšati pasivni prijenos preko nepolarne stanične membrane.

U ovom radu opisana je sinteza ferocenskih amidnih derivata desmuramil-dipeptida, dodatno modificiranih uvođenjem manozne podjedinice na *N*-kraj dipeptida. Razlog odabira i uvođenja manozne podjedinice u strukturu molekule desmuramil-dipeptida leži u činjenici da manoza dolazi u interakciju s receptorima za manozu (engl. *mannose binding protein*, MBP), koji se nalaze na površini stanica imunskog sustava čime se može povoljno utjecati na specifično prepoznavanje.

Ferocen je organometalni spoj koji se sastoji od atoma željeza i dva ciklopentadienilna prstena. Za strukturnu modifikaciju desmuramil-dipeptida odabran je zbog svoje lipofilnosti te biološke aktivnosti, zbog koje se mnogi ferocenski derivati već nalaze na listi potencijalnih lijekova.

U sklopu ovog diplomskog rada konvergentnim pristupom sintezi bit će pripravljena tri ferocenska amidna derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida (slika 1). Konvergentni pristup sintezi podrazumijeva prvotnu pripravu strukturnih fragmenata, u našem slučaju to su: Boc-zaštićeni desmuramil-dipeptid, manozna podjedinica s razmaknicom od dva atoma ugljika (C2 razmaknica) te ferocenski amini. Strukturni se fragmenti u ciljne molekule povezuju odgovarajućim redoslijedom reakcijama amidacije.

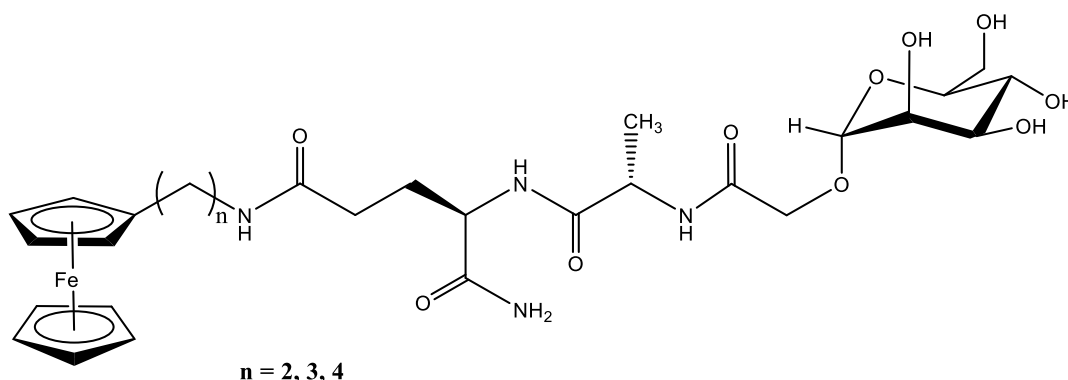
Boc zaštićeni desmuramil-dipeptid bit će pripremljen iz komercijalno dostupnog zaštićenog DMP-a, Boc-L-Ala-D-*iso*Gln(OBn), s benzilnom zaštitom na bočnom ogranku izoglutaminske kiseline te Boc zaštitom na *N*-kraju L-alanina, uklanjanjem benzilne zaštite katalitičkom hidrogenolizom u Parrovom uređaju.

Manozni fragment priredit će se iz 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoze, vezanjem anomerne hidroksilne skupine molekule manoze na *tert*-butil-bromoacetat u uvjetima Williamsonove sinteze etera nakon čega slijedi uklanjanje *tert*-butilne zaštitne skupine u kiselim uvjetima (trifluoroctena kiselina, TFA).

Ferocenski amini 3-(ferocen-1-il)propanamin i 4-(ferocen-1-il)butanamin priredit će se u obliku soli iz prethodno pripremljenih Boc-zaštićenih amina, uklanjanjem Boc zaštitne skupine uvođenjem plinovitog klorovodika. 2-(ferocen-1-il)etanamin bit će priređen redukcijom ferocenacetonitrila uz litijev tetrahidroaluminat (LiAlH<sub>4</sub>, LAH).

Pripremljeni ferocenski amini prvo će se kondenzirati s peptidnim prekursorom uz EDC×HCl kao kondenzacijski reagens te HOBt kao aditiv za sprječavanje racemizacije, obzirom da peptidni prekursor ima stereogene centre u blizini reakcijskog mjesta. U sljedećem koraku uklonit će se zaštitna skupina s *N*-kraja dipeptida, kako bi amino-skupina ferocenskog amidnog derivata desmuramil-dipeptida mogla reagirati s karboksilnom skupinom manozne podjedinice. Za nastajanje ove amidne veze ponovo će se kao reagens koristiti EDC×HCl te HOBt kao aditiv.

Konačni ferocenski amidi manoziliranog desmuramil-dipeptida, ciljne molekule ovog diplomskog rada, pripremit će se uklanjanjem sve četiri acetilne zaštitne skupine s manozne podjedinice Zemplénovim postupkom, tj. dodatkom otopine natrijeva metoksida u metanolu (NaOMe/MeOH).



Slika 1: Strukturna formula molekula ciljnih produkata – ferocenskih amida manoziliranog desmuramil-dipeptid

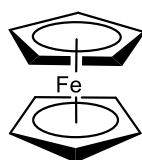


## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Ferocen i ferocenski derivati

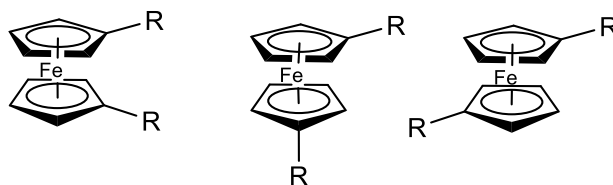
#### 2.1.1. Struktura i reakcije ferocena

Ferocen je organometalni spoj molekulske formule  $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ , koji se sastoji od iona  $\text{Fe}(\text{II})$  i dva ciklopentadienilna prstena (slika 2). Prvi je puta sintetiziran 1951. godine od strane Kealy, Paulson i Millera<sup>1,2</sup> te je naredne 1952. godine i strukturno okarakteriziran.<sup>3</sup> Puni naziv ferocena po anorganskoj nomenklaturi je bis( $\eta^5$ -ciklopentadienil)željezo(II) pri čemu prefiks  $\eta$  ukazuje na to da željezo nije povezano s ciklopentadienilnim prstenom preko jednog, već preko svih pet ugljikovih atoma prstena ili, preciznije, preko svih deset  $\pi$  elektrona iz aromatskog ciklopentadienilnog aniona. Tako se u strukturi molekule ferocena željezo zapravo nalazi između dva ciklopentadienilna prstena što se u literaturi često naziva i „sendvič“ strukturom. Ferocen pokazuje iznimnu stabilnost, kako na zraku tako i u vodenim otopinama, što omogućava njegovu široku primjenu u elektrokemiji, kemiji materijala, pripravi polimernih vrsta, medicini, bioorganometalnoj kemiji, katalizi. Koristi se i kao aditiv gorivu<sup>4</sup>, a u posljednjih dvadesetak godina ferocenski se motiv javlja i u strukturi molekula biološki aktivnih spojeva.<sup>3-8</sup>



Slika 2: Strukturna formula molekule ferocena

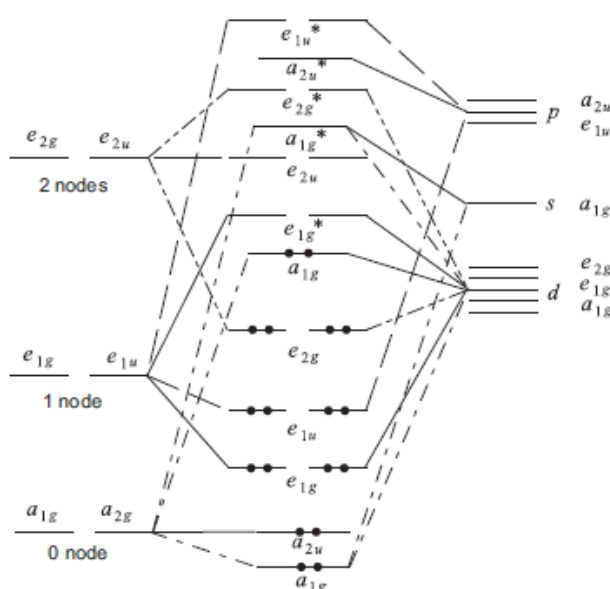
Iako se dva ciklopentadienilna prstena pri niskim temperaturama nalaze u zvjezdastoj konformaciji, u kojoj se ugljik-ugljik veze jednog prstena ne nalaze iznad ugljik-ugljik veza drugog prstena, zbog male rotacijske barijere pri višim temperaturama dolazi do slobodne rotacije dvaju prstenova. Navedeno je potvrđeno reakcijama disupstitucije, gdje se može uočiti dobivanje samo jednog produkta. Naime, da je rotacija na bilo koji način onemogućena, odnosno da je sustav zakočen, bilo bi moguće izolirati više od jednog produkta čije su strukturne formule prikazane na slici 3.<sup>4</sup>



Slika 3: Strukturne formule hipotetskih molekula produkata disupstitucije na ferocenskom prstenu u slučaju zakočenosti strukture<sup>4</sup>

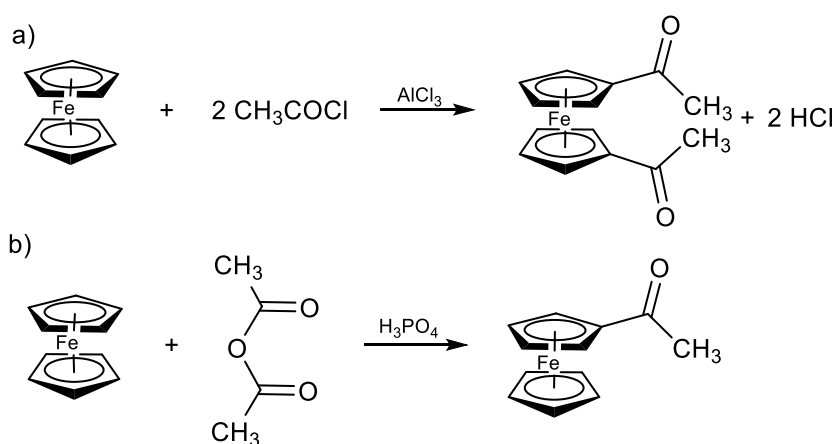
Od fizikalnih svojstava ferocena može se spomenuti da je vrelište ferocena pri atmosferskom tlaku pri 173 °C te da sublimira.

U usporedbi s ostalim metalocenima kao što su kobaltocen i nikelocen, feroceni se puno teže oksidiraju, što je posljedica nepopunjenosti protuveznih  $e_{1g}$  orbitala ferocena. Na slici 4 prikazan je kvalitativni molekularno-orbitalni dijagram ferocena, gdje se mogu uočiti prazne protuvezne orbitale željeza. Pri tome, ukupno 12 elektrona potječe od ciklopentadielnih prstena, a preostalih 6 od iona željeza  $Fe^{2+}$ . Oksidacija ferocena do ferocenila moguća je pri +0,4 V i reverzibilna je. S druge strane, u slučaju kobaltocena ukupan broj elektrona je 19 s jednim elektronom u protuveznoj  $e_{1g}$  orbitali, što ga čini sklonijim oksidaciji, dok je kod nikelocena ukupan broj elektrona 20 te se dva elektrona nalaze u protuveznoj  $e_{1g}$  orbitali. Ovo svojstvo čini i nikelocen također puno sklonijim oksidaciji u usporedbi s ferocenima.<sup>4</sup>



Slika 4: Kvalitativni molekularno-orbitalni dijagram ferocena<sup>4</sup>

Budući da ferocen u svojoj strukturi sadrži dva aromatska prstena, većina organskih reakcija kojima ferocen podliježe su reakcije elektrofilne aromatske supstitucije karakteristične za kemiju aromatskih organskih spojeva. Tako je jedan od mogućih sintetskih puteva za pripremu derivata ferocena reakcija Fiedel-Craftsovog aciliranja (slika 5), koja se odvija u prisutnosti acil-halogenida kao acilnog donora te Lewisove kiseline kao katalizatora, poput primjerice aluminijskoga klorida ili željezova(III) klorida. Ovisno o uvjetima aciliranja, moguće je dobiti i disupstituirane i monosupstituirane acil-ferocene. Zanimljivo je da se za dobivanje monosupstituiranih ferocena kao izvor acila u pravilu koristi odgovarajući anhidrid u prisutnosti katalitičke količine fosforne kiseline (slika 5).<sup>4</sup>



Slika 5: Shematski prikaz reakcija Friedel-Craftsovog aciliranja ferocena uz: a) acetil-halogenid i aluminijski klorid kao katalizator; b) anhidrid octene kiseline u prisutnosti katalitičke količine fosforne kiseline<sup>4</sup>

Osim već navedenih reakcija aciliranja, ostale karakteristične reakcije za kemiju ferocena te drugi sintetski put pripreme ferocenskih derivata su reakcije metalacije. Navedene reakcije omogućuju sintezu reaktivnih metal-ferocena, koji dalje služe kao reaktivni međuprodukti u sintezi ostalih ferocenskih derivata. Tako je primjerice litijski derivat ferocena moguće pripremiti reakcijom ferocena s butil-litijem. Pri tome dolazi do generiranja iznimno reaktivnog derivata, koji reagira i s vlagom iz zraka. Litij-ferocen upravo se zbog svoje visoke reaktivnosti često koristi za pripremu mnogih drugih ferocenskih derivata, odnosno njegovim korištenjem je na aromatski prsten moguće uvesti razne supstituente, kao što su  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{B}(\text{OR})_2$  i  $-\text{NH}_2$ .

Od ostalih derivata ferocena treba izdvojiti i boratne estere. Oni zbog svoje visoke reaktivnosti također omogućuju sintezu drugih specifičnih produkata. Tako se primjerice diferocen može dobiti reakcijom boratnog estera sa srebrovim(I) oksidom (slika 6).<sup>4</sup>

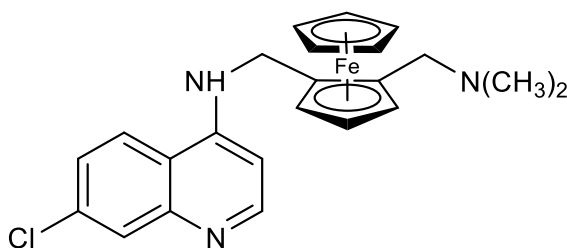


Slika 6: Shematski prikaz priprave diferocena

### 2.1.2. Primjena ferocenskih derivata u medicini

Zapažen je izniman potencijal raznih ferocenskih derivata kao biološki aktivnih spojeva te se mnogi od njih nalaze i na listi potencijalnih lijekova. Ferocenski derivati imaju zapažena antitumorska, antibakterijska, antifungalna i antiparazitska svojstva. Prvi i do sada jedini ferocenski derivat odobren kao lijek sam je ferocen, koji se 70-ih godina prošlog stoljeća u SSSR-u koristio kao lijek za anemiju. U ovom poglavlju detaljnije će se razmatrati dva dosada najdetaljnije istraživana derivata ferocena s potencijalnim korištenjem u području medicine – ferokina i ferocifena.<sup>3</sup>

Jedan od derivata ferocena koji je pokazao velik potencijal na području medicine je svakako ferokin, koji se trenutno u kombinaciji s antiparazitikom artefenomelom nalazi u Iib fazi kliničkih ispitivanja kao lijek za malariju. Ključan problem kod postojećih lijekova za malariju predstavljaju sojevi rezistentni na već postojeće lijekove za malariju, poput sojeva rezistentnih na klorokin ili artemisin. Ferokin (slika 7) nastao je kao posljedica istraživanja strukturnih analoga klorokina koji sadrže željezo te je ujedno prvi pripremljeni i biološki najaktivniji derivat klorokina i ferocena. Pokazao je iznimnu *in vivo* efikasnost prema klorokin-rezistentnim sojevima, kao i prema klorokin-osjetljivim sojevima *Plasmodium falciparum*, ujedno i najopasnijim sojevima malarije.<sup>3,9</sup>



Slika 7: Strukturna formula molekule ferokina



Biološko djelovanje ferokina u stanici može se opisati preko dva različita mehanizma. Prvi mehanizam isti je mehanizmu djelovanja klorokina te u njemu, zbog bazičnosti 4-aminokinolinskog sustava klorokina i ferokina, dolazi do njihovog nakupljanja u vakuoli parazita. U vakuoli parazita općenito dolazi do razgradnje slobodnog hema u toksični hemozoin – poznat i kao malarijski pigment. Slobodni hem može dovesti do stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta i inhibirati mnoge druge procese te je stoga prilično toksičan i potrebna je njegova stanična razgradnja.<sup>10</sup> Akumulirani klorokin odnosno ferokin sprječavaju upravo taj proces biomineralizacije hema u toksični hemozoin čime dolazi do nakupljanja slobodnog hema i posljedično smrti parazitske stanice.<sup>3,11</sup>

Drugi mehanizam djelovanja ferokina posljedica je prisutnosti ferocenskog dijela molekule te se odnosi na generiranje slobodnih radikala u oksidativnim uvjetima putem reakcije slične Fentonovoj. U navedenoj reakciji dolazi do oslobađanja hidroksilnog radikala i hidroksilnog iona prilikom oksidacije Fe(II) u Fe(III) u prisutnosti vodikovog peroksida (slika 8)<sup>3,9</sup> pri čemu slobodni hidroksilni radikali inhibiraju nastajanje merozoita. Merozoiti su invazivne forme parazita malarije koje se oslobađaju iz jetre i napadaju nove crvene krvne stanice te su samim time i odgovorne za reinfekciju.<sup>11</sup> Takvo nastajanje hidroksilnih radikala u crvenim krvnim stanicama zaraženim *P. Falciparum* zapaženo je samo kod stanica tretiranih ferokinom, ali nije zapaženo kod stanica tretiranih klorokinom ili rutenokinom.<sup>3,9</sup> Reakcija oksidacija ferocena (Fc) u ferocenil (Fc<sup>+</sup>) reverzibilna je u *in vivo* uvjetima, dok oksidacija rutenocena (Rc) nije reverzibilna zbog dimerizacije i disproporcionacije (Rc<sup>+</sup>).<sup>3,13</sup>



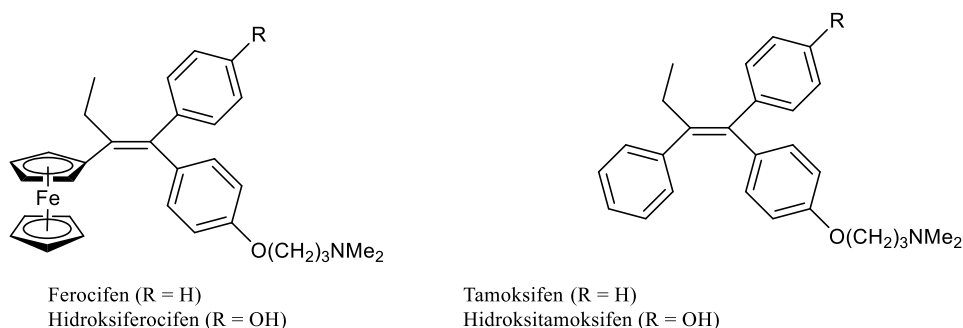
Slika 8: Jednadžba kemijske reakcije oksidacije ferokina<sup>3</sup>

Nadalje, bitno je razjasniti zašto i rutenocen i ferocen djeluju na klorokin-rezistentne sojeve malarije. Razlog tomu je što ferokin, kao i rutenokin, ne dolazi u interakciju sa staničnim transporterom odgovornim za klorokin-rezistenciju (pfCRT) kao ni s drugim eksporterima klorokina te se, za razliku od klorokina kojeg isti transporteri izbace iz stanice, uspijevaju akumulirati u vakuoli stanice parazita, što je osnovni preduvjet uspješnog djelovanja na stanice parazita malarije.<sup>3,9</sup>

Također, bolji učinak ferokina u odnosu na klorokin posljedica je i različitog protoniranja molekula u fiziološkim uvjetima. Pri fiziološkom pH ferokin je većinom u

neutralnoj ili jednostruko protoniranoj formi, dok je klorokin u dvostruko protoniranoj formi. Upravo neutralnija, a samim time i nepolarnija forma, omogućuje ferokinu efikasniji transport preko nepolarne lipofilne membrane vakuole.<sup>3</sup>

Drugi derivat ferocena, čija se potencijalna uporaba u medicinske svrhe uvelike istražuje, jest ferocifen (Fc-TAM, slika 9). Ferocifen je strukturni analog tamoksifena (TAM, slika 9), koji se koristi kao citostatik za hormonski-ovisan rak dojke. Oksidacijom Fc-TAM-a u stanici dolazi do nastanka hidroksitamoksifena (OH-TAM, slika 9), kompetitivnog inhibitora  $\alpha$ -pozitivnog estrogen receptora. Vežanjem OH-TAM na navedeni receptor spriječena je transkripcija DNA potaknuta vežanjem estradiola na receptor u tumorskom tkivu pri čemu dolazi do stanične smrti.<sup>3,14</sup>

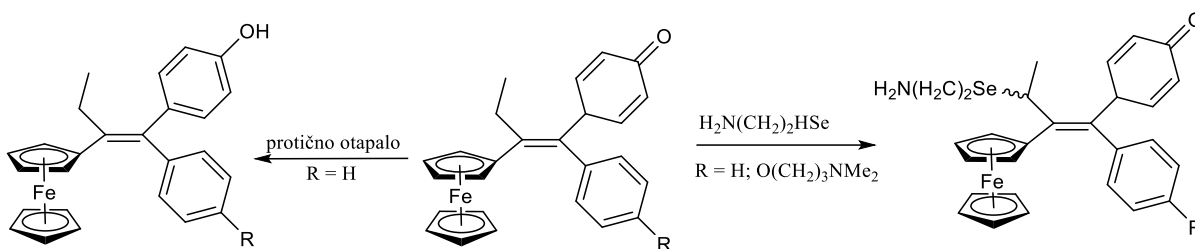


Slika 9: Strukturne formule molekula ferocifena (hidroksiferocifena) i tamoksifena (hidroksitamoksifena)

Kao što je vidljivo na slici 9, kod ferocifena jedna je fenilna skupina TAM-a zamijenjena ferocenom, dok je hidroksiferocifen strukturni analog OH-TAM-a. Navedena strukturna modifikacija TAM-a uzrokuje bolje pristajanje molekule u aktivno mjesto receptora i veći stupanj inhibicije. Nadalje, ferocifen i hidroksiferocifen djeluju i na hormonski-neovisne stanice raka dojke. Važno je napomenuti da je jedna trećina slučajeva raka dojke hormonski neovisna te ih nije moguće liječiti selektivnim modulatorima estrogenskih receptora, poput TAM-a, što dodatno povećava potrebu za istraživanje upravo ovakvih spojeva.<sup>3,14</sup>

Reakcijama prikazanim na slici 10 objašnjena je još jedna prednost ferocifena, a to je njegova selektivnost prema malignim stanicama u odnosu na zdrave. Kao što vidimo na slici 10, kvinonski se međuprodukti u slučaju oba derivata vežu na derivat selenija korišten kao model za vežanje u aktivno mjesto enzima koje sadrži selenij poput tioredoksin reduktaze. Navedeni enzimi sa selenijem u aktivnom mjestu su u malignim stanicama preekspimirani.

Također, u protičnom mediju, koji odgovara okruženju tipičnom za malignu stanicu, samo je derivat u kojem je  $R = H$  preveden u inaktivnu formu.<sup>3</sup>



Slika 10: Shematski prikaz reakcija kvinonskog oblika derivata ferocifena u protičnom otapalu (lijevo) te vezanje derivata ferocifena i spoja koji sadrži selenij kao modelni prikaz vezanjan u aktivno mjesto enzima koji sadrži selenij (desno)<sup>3</sup>

Zanimljivo je naglasiti da rutenocifen (Rc-TAM-OH) ne djeluje na hormonski-neovisne stanice raka dojke, baš kao ni TAM. Pretpostavlja se da je ta razlika posljedica različitog redukcijskog potencijala ferocena i rutenocifena, odnosno posljedica različitih stabilnosti njihovih kvinonskih međuprodukata, koji su u slučaju ferocifena stabilni satima u fiziološkim uvjetima, te nastanka reaktivnih kisikovih radikala zabilježenih u stanicama tretiranim Fc-TAM-OH-om.<sup>3,15</sup>

Kao što je vidljivo iz navedena dva primjera, ferocenska skupina igra ključnu ulogu u biološkoj aktivnosti ovih spojeva. Ovoj činjenici posebno ide u prilog različita biološka aktivnost navedenih derivata ferocena i derivata rutenocena, strukturno analognih spojeva.

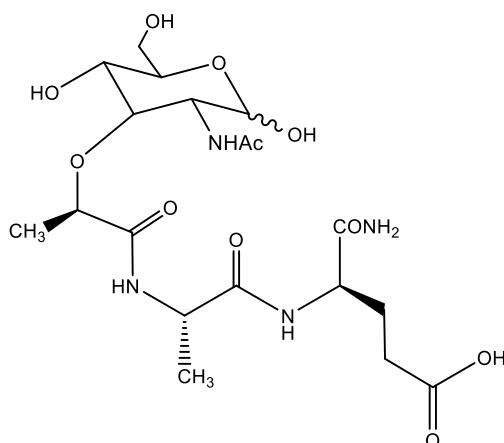
## 2.2. Adjuvantska aktivnost (des)muramil-dipeptida

### 2.2.1. Adjuvanti i muramil-dipeptidi

Cijepljenje je jedna od najefikasnijih metoda sprječavanja širenja zaraznih bolesti. Tradicionalna cjepiva koriste umrtvljeni ili inaktivirani patogen kako bi potaknula reakciju imunskog sustava te su, u usporedbi s pojediničnim cjepivima, više imunogena. Zbog manje imunogenosti pojediničnih cjepiva postoji potreba za dodavanjem adjuvanata njihovim formulacijama. Adjuvanti su tvari koje pojačavaju ili smanjuju imunogenost cjepiva ili lijeka.<sup>17,18</sup> Imunostimulantni adjuvanti mogu djelovati na način da ili produljuju izlaganje stanica koje prezentiraju antigen (engl. *antigen presenting cells*, APC) samom antigenu koji se nalazi u cjepivu, ili dolaze u izravni kontakt s APC-evima, olakšavajući antigenu da dođe u

kontakt s APC-ovima.<sup>18</sup> Još je 1920-ih godina otkriveno da aluminijeve soli imaju adjuvantski učinak te su i danas u najširoj upotrebi. Nakon aluminijevih soli, sljedeće veliko otkriće bio je Freundov potpuni adjuvant, koji je otkriven 1930-ih godina i sadrži uljnu suspenziju termički umrtvljenih mikobakterijskih stanica u vodi. Za razliku od njega, Freundov nepotpuni adjuvant je uljna suspenzija u vodi bez umrtvljenih stanica mikobakterija.<sup>16-18</sup>

Muramil-dipeptid (MurNAc-L-Ala-D-isoGln, MDP, slika 11) najmanji je dio peptidoglikana, koji grade stijenke Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, kao i Freundovog potpunog adjuvanta koji ima imunostimulatornu adjuvantsku aktivnost. Pokazalo se da se adjuvantska aktivnost muramil-dipeptida može povećati dodatkom lipofilnih supstituenata, koji poboljšavaju, između ostalog, prolazak muramil-dipeptida preko stanične membrane.<sup>16-19</sup> Neki od do sada pripremljenih lipofilnih derivata muramil-dipeptida koji se koriste u medicini su mifamurtid, koji se koristi za liječenje osteokarcinoma u kombinaciji s kemoterapijom, i murabutid, koji pojačava rezistenciju na mikrobne infekcije.<sup>17,20</sup>



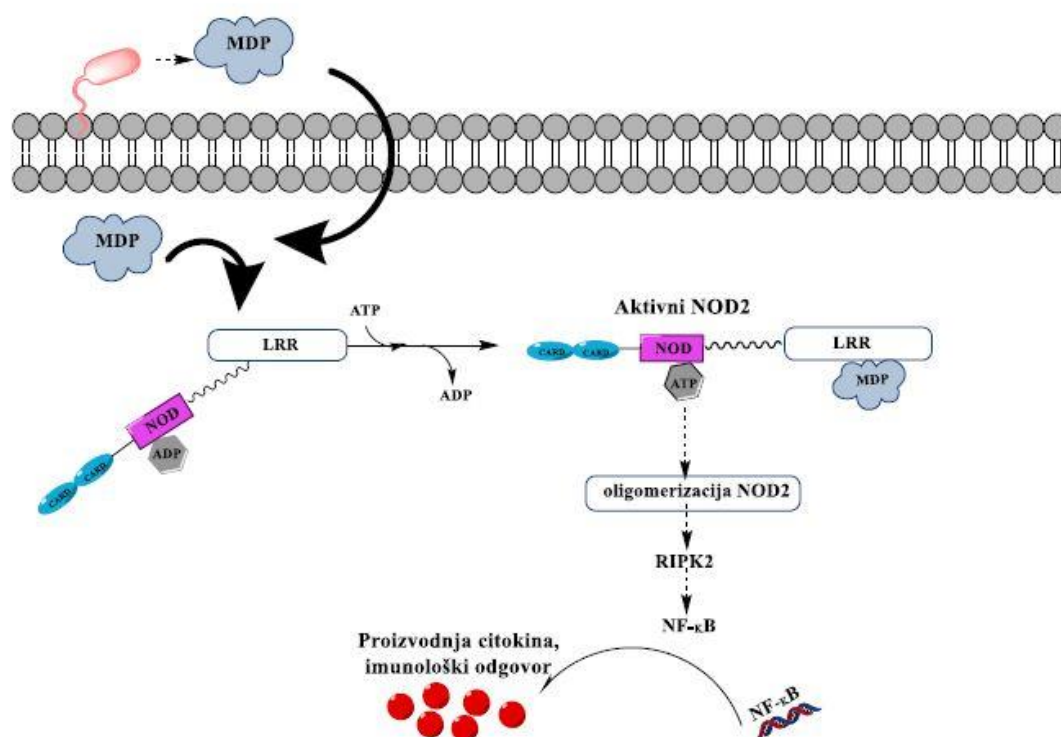
Slika 11: Strukturna formula molekule muramil-dipeptida (MDP)

### 2.2.2. Mehanizam djelovanja muramil-dipeptida

Peptidoglikani, pa tako i muramil-dipeptid, djeluju kao antagonisti receptora za patogene (eng. *Pathogen recognition receptors*, PRR) te aktiviraju urođeni imunostimulacijski sustav.<sup>17-19</sup> PRR-ovi se dijele na Toll receptore (eng. *Toll-like receptors*, TLR), RIG-I receptore (eng. *Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors*, RIG-I-like receptors, RLR), NOD receptore (eng. *Nucleotide-binding oligomerisation domain-containing-like receptors*, NLR) i C-tip lektinske receptore (eng. *C-type lectin receptors*, CLR).<sup>18,19</sup> Muramil-dipeptid aktivira NOD2 receptore, koji su vrsta NOD receptora. NOD2 receptori se nalaze u stanicama odgovornim za imunostimulacijski odgovor organizma poput makrofaga, dendritičkih stanica, mononuklearnih stanica periferne krvi te

epitelnih stanica crijeva.<sup>21</sup> Određene mutacije (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) NOD2 gena povezane su s bolestima poput Chronove bolesti, Blauova sindroma i sarkoidoze.<sup>21</sup> NOD2 je ATP-aza, koju karakteriziraju tri strukturalna motiva: *N*-terminalna efektorska domena, koja sadrži domenu za regrutiranje kaspaze (engl. *caspase activation and recruitment domain*, CARD), nukleotid-vezna domena s veznim mjestom za ATP/ADP (engl. *nucleotide-binding and oligomerization domain*, NOD) te domena bogata leucinom (engl. *leucine rich repeat domain*, LRR).<sup>17,21</sup> Pretpostavlja se da je domena bogata leucinom odgovorna za vezanje i prepoznavanje muramil-dipeptida te je na njoj konkavnoj površini pronađen hidrofobni džep koji bi svojim dimenzijama mogao odgovarati veličini molekule muramil-dipeptidu.<sup>17,22</sup>

Vežanje muramil-dipeptida na NOD2 receptore uzrokuje transkripciju NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor Kappa B*) te aktivaciju određenih MAP-kinaznih modula (engl. *mitogen activated protein*).<sup>21</sup> NF- $\kappa$ B put zadužen je za regulaciju proinflamatornih odgovora urođenog i adaptivnog imuniteta te njegovom aktivacijom dolazi do proizvodnje raznih citokina i kemokina. Također, odgovoran je za regulaciju inflamatornih T-stanica kao i proizvodnju inflamiasoma. Nereguliran NF- $\kappa$ B često je uzrok kroničnih upala.<sup>23</sup>



Slika 12: Shematski prikaz djelovanja NOD2 receptora<sup>24,25</sup>

### 2.2.3. Desmuramil-dipeptid i lipofilni derivati desmuramil-dipeptida

Istraživanja su pokazala kako je za adjuvantsku aktivnost muramil-dipeptida nužan samo peptidni dio molekule, dok *N*-acetilmuraminski dio nema utjecaja na sveukupnu imunostimulatornu aktivnost. Derivati muramil-dipeptida koji ne sadrže *N*-acetilmuraminski dio, već samo peptidni fragment L-Ala-D-*iso*Gln, nazivaju se desmuramil-dipeptidima. Uklanjanjem *N*-acetilmuraminskog dijela otvorila se mogućnost pripreme velikog broja derivata vezanjem supstituenta na mjesto *N*-acetilmuraminske kiseline, a posebno perspektivno za imunostimulatornu aktivnost takvih derivata pokazalo se uvođenje raznih lipofilnih supstituenata.<sup>19</sup> U dosadašnjim istraživanjima provedenim na Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a kao najbolji supstituent u svrhu poboljšanja imunostimulatorne aktivnosti desmuramil-dipeptida pokazao se adamantan<sup>26</sup>.

### 2.2.4. Manozilirani desmuramil-dipeptid

Lektini su proteini koji se nalaze na površini stanica te specifično prepoznaju i vežu monosaharidne i oligosaharidne strukture, ali nemaju katalitičku aktivnost. Jedna od nekoliko šećernih struktura koje lektini prepoznaju je D-manoza kao i oligosaharidi koji ju sadrže u svojoj strukturi. Lektin koji veže manozu (engl. *mannose-binding lectin/protein*, MBL/MBP) pripada skupini C-tipa lektina, odnosno lektinima kojima je za vezanje šećera potreban ion kalcija. MBP preko svog C-kraja veže manozu, a preko *N*-kraja veže se na makrofag te započinje fagocitozu, odnosno proces stanične razgradnje većih čestica. Osim na makrofazima, MBP-ovi se nalaze i na dendritičkim stanicama koje su zaslužne za prezentiranje antigena T-stanicama imunskog sustava, kao i na površini endotelnih stanica. Samim time možemo zaključiti da vezanje manoze utječe na procese endocitoze, fagocitoze te sinteze citokina.<sup>27</sup>

Dosadašnja istraživanja potvrdila su da manoziliranje derivata desmuramil-dipeptida pozitivno utječe na njihovu imunostimulatornu adjuvantsku aktivnost, što je upravo posljedica interakcije manozne podjedinice derivata s MBP-ovima.<sup>18,19,27,28</sup>

## 2.3. Zaštitne skupine

U organskoj sintezi često je potrebno jednu ili više funkcijskih skupina zaštititi i spriječiti kemijsku reakciju koju želimo provesti na nekom drugom reaktivnom centru, prvenstveno kako ne bi nastali neželjeni nusprodukti. U tu svrhu koriste se razne zaštitne skupine. Da bi zaštitna skupina bila prikladna za korištenje, mora zadovoljavati određene kriterije. Za početak,

uvođenje zaštitne skupine na odabranu funkcijsku skupinu mora biti moguće provesti u visokom iskorištenju ili idealno kvantitativno. Uvođenje zaštitne skupine bi također trebalo biti moguće provesti u što blažim uvjetima kako se ne bi narušila funkcionalnost drugih molekulskih fragmenata. Nužno je i da se zaštitna skupina može lako i u visokom iskorištenju selektivno ukloniti uporabom netoksičnih reaktanata u uvjetima koji ne narušavaju preostalu strukturu supstrata niti funkcijsku skupinu s koje je zaštitna skupina uklonjena. Također, poželjno je i da se dobiveni zaštićeni supstrat lako i efikasno odvaja od mogućih nusprodukata ili zaostalih reaktanata. Uvođenje zaštitne skupine ne bi smjelo generirati nove stereogene centre jer to otežava čišćenja produkta. Treba naglasiti da idealna univerzalna zaštitna skupina u pravilu ne postoji te njezin odabir uvelike ovisi o specifičnosti supstrata kojeg želimo zaštititi, kao i uvjetima daljnje sinteze.<sup>29</sup>

Posebnu važnost imaju zaštitne skupine u kemiji peptida i ugljikohidrata, obzirom na veliki broj funkcijskih skupina koje molekule tih spojeva sadrže kao i na veliku mogućnost sporednih reakcija, pogotovo prilikom reakcija kondenzacije.<sup>29</sup> U navedenom kontekstu zaštitne skupine pojavljuju se i u ovom radu.

### 2.3.1. Zaštita hidroksilne skupine monosaharida

Hidroksilna skupina prisutna je u mnogim biološkim i sintetskim spojevima poput nukleotida, ugljikohidrata, steroida te polietera kao i na bočnim lancima nekih aminokiselina. Osjetljiva je na mnoge kemijske transformacije poput oksidacija, aciliranja, dehidratiranja i halogeniranja.<sup>29</sup> U kontekstu ovog rada, nužna je bila zaštita hidroksilnih skupina molekule manoze, pa će se u ovom odlomku detaljnije razmotriti kemija zaštitnih skupina ugljikohidrata.

Monosaharidi, polisaharidi i glikokonjugati iznimno su važne molekule u raznim biološkim procesima uključujući i imunosni odgovor na virusne i bakterijske infekcije.<sup>30,31</sup> Saharidi su polihidroksi-spojevi, zbog čega je odabir zaštitnih skupina iznimno bitan kako bi se postigla kemoselektivnost i regioselektivnost reakcija u kojima sudjeluju.<sup>31</sup> Kod kemije saharida važno nam je razdvojiti dva pojma, a to su permanentne i privremene zaštitne skupine. Permanentne zaštitne skupine su one koje zadržavamo u ciljnoj molekuli do kraja sinteze i najčešće ciljamo na njihovo uklanjanje u jednom sintetskom koraku. Kod privremenih zaštitnih skupina uvodimo skupinu kroz jedan ili nekoliko koraka te ju želimo selektivno uvesti i ukloniti. Generalno se koriste dva tipa permanentnih zaštitnih skupina: benzilna eterska zaštitna skupina ili skupina ekvivalentna benzilnoj te esterske zaštitne skupine. Benzilna zaštitna

skupina uklanja se katalitičkom hidrogenolizom. S druge strane, esterske zaštitne skupine uklanjaju se u bazičnim uvjetima, primjerice acetatna (Ac) i benzoatna (Bz) skupina mogu se ukloniti u uvjetima Zemplénove transesterifikacije (NaOMe/MeOH). Tako se prve zaštitne skupine koriste u slučajevima kada je supstrat osjetljiv na bazične uvjete, dok se esterske zaštitne skupine koriste u slučajevima kada supstrat posjeduje nezasićene veze koje su osjetljive na reakcije redukcije.<sup>32</sup> Hidroksilne skupine saharida međusobno se razlikuju po reaktivnosti te je ta činjenica često ključna za efikasno selektivno uklanjanje i uvođenje određenih zaštitnih skupina. Najreaktivnija je primarna, odnosno anomerna hidroksilna skupina zbog steričkih faktora, kao i hemiacetalne funkcionalnosti. Navedena funkcijska skupina je i najkiselija, što omogućava njenu kemoselektivnu transformaciju u bazičnim uvjetima.<sup>31</sup>

U tablici 1 prikazane su neke najčešće korištene zaštitne skupine u kemiji ugljikohidrata, kao i najčešći uvjeti njihovog uvođenja i uklanjanja.

Tablica 1: Pregled najčešće korištenih zaštitnih skupina za zaštitu hidroksilnih skupina ugljikohidrata te uvjeta za njihovo uvođenje i uklanjanje.<sup>29</sup>

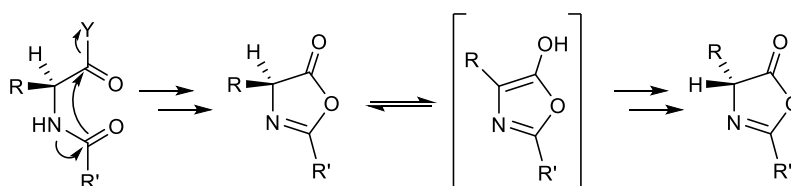
	Zaštitna skupina	Uvjeti uvođenja	Uvjeti uklanjanja
<b>ESTERSKE ZAŠTITNE SKUPINE</b>	Acetatna skupina -OAc	Anhidrid octene kiseline/acetil-klorid uz Lewisovu kiselinu, piridin ili NaOAc	NaOMe/MeOH (Zemplénova transesterifikacija) NH <sub>3</sub> /MeOH NaOH
	Benzoatna skupina -OBn	Benzoil-klorid uz piridin	NaOMe/MeOH
	Kloracetatna skupina	Kloroacetil-klorid uz piridin	Tiourea Hidrazin
<b>ESTERSKE ZAŠTITNE SKUPINE</b>	Benzilna skupina -OBn	BnX (X = Cl; Br)/baza	H <sub>2</sub> /Pd-C
	Alilna skupina -OAl	Alil bromid uz NaOH	Izomerizacija katalizirana Pd, Ir, Rh i hidroliza
	Tritilna skupina -OTr	Tritil-klorid uz piridin	Mineralne kiseline



### 2.3.2. Zaštita amino-skupine u peptidnoj kemiji

Aminokiseline su monomeri koji grade peptide i proteine te su kao takve od iznimne važnosti za živi svijet. Kako im ime govori, sve sadrže karboksilnu skupinu i amino-skupinu. Prilikom reakcija polimerizacije, odnosno kondenzacije aminokiselina i peptidnih fragmenta nužno je zaštititi prvenstveno  $\alpha$ -amino-skupinu, kako bi se spriječilo nastajanje nusprodukata u takvim reakcijama. Osim zaštite  $\alpha$ -amino-skupine, potrebno je zaštititi i amino-skupinu bočnog ogranka, ukoliko je ona prisutna. Zaštita amino-skupina ključna je i u kemiji drugih spojeva od velike važnosti za živi svijet, poput raznih neurotransmitera i nukleinskih kiselina, ali i u mnogim farmakološkim spojevima.<sup>33</sup>

Obzirom da se zaštita amino-skupine u ovom radu spominje prvenstveno u kontekstu zaštite aminokiselina i peptida u kondenzacijskim reakcijama, navedene su najčešće korištene zaštitne skupine u peptidnoj kemiji, a to su karbamatne (uretanske) zaštitne skupine. Jedna od prednosti korištenja karbamatne zaštite u slučaju peptida jest i mogućnost utjecaja karbamatne zaštitne skupine na smanjenje racemizacije peptida u bazičnim uvjetima, u kojima se provode kondenzacijske reakcije. Racemizacija se kod *N*-acil-zaštićenih peptida događa preko oksazolonskog međuprodukta, mehanizmom prikazanim na slici 13.<sup>29</sup>

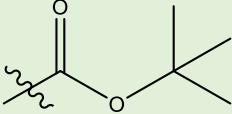
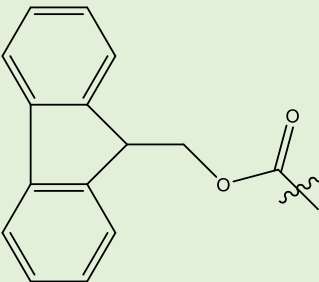
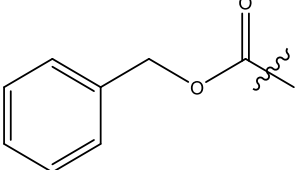
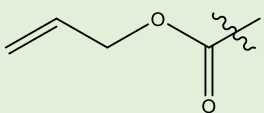


Slika 13: Shematski prikaz mehanizma racemizacije *N*-acil-zaštićenog polipeptida preko oksazolonskog međuprodukta<sup>28</sup>

Od iznimne je važnosti zaštitnu skupinu uklanjati u blagim uvjetima kako ne bi došlo do raspada polipeptidnog lanca ili prijevremenog uklanjanja drugih zaštitnih skupina. Također, poželjno je da se dodatkom zaštitne skupine na  $\alpha$ -amino-skupinu povećava i topljivost spoja u najčešće korištenim otapalima.<sup>33</sup>

Način uvođenja i uklanjanja nekih najčešće korištenih karbamatnih zaštitnih skupina za zaštitu amino-skupine navedeni su u tablici 2.

Tablica 2: Pregled najčešće korištenih karbamatnih zaštitnih skupina za zaštitu amino-skupine te uvjeta za njihovo uvođenje i uklanjanje<sup>29,33</sup>

Zaštitna skupina	Strukturna formula	Uvjeti uvođenja	Uvjeti uklanjanja
<b>Tert-butiloksikarbonil</b> (Boc)		Boc <sub>2</sub> O/baza	1. 25-50 % TFA-DCM 2. 4 M HCl-dioksan 3. 2 M MeSO <sub>3</sub> H-dioksan
<b>9-Fluorenilmetoksi-karbonil</b> (Fmoc)		Fmoc-Cl, Fmoc-OSu, Fmoc-N <sub>3</sub>	1. 20 % piperidin u DMF-u; 2. 1-5 % DBU-DMF 3. morfolin-DMF (1:1) 4. NH <sub>3</sub>
<b>Benziloksikarbonil</b> (Cbz/Z)		PhCH <sub>2</sub> OCOC/NaHCO <sub>3</sub> , NaOH ili MgO	1. H <sub>2</sub> /Pd-C 2. Kiseline: HBr/AcOH; TFA; HF 3. BBr <sub>3</sub>
<b>Aliloksikarbonil</b> (Alloc)		1. Alloc-Cl, py 2. Alloc <sub>2</sub> O, dioksan-H <sub>2</sub> O 3. Alloc-OSu, TEA, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1. Pd(Ph) <sub>3</sub> cat. 2. H <sub>3</sub> N·BH <sub>3</sub> , Me <sub>2</sub> NH·BH <sub>3</sub> ili Ph <sub>3</sub> SiH u organskom otapalu

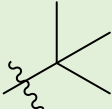
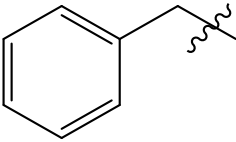
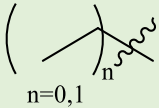
### 2.3.3. Zaštita karboksilne skupine peptida

Zaštita α-karboksilne skupine kod sinteze peptida na čvrstoj podlozi nije nužna jer je peptid uglavnom preko nje vezan na podlogu. Ovo ne vrijedi za sintezu na čvrstoj podlozi gdje je ta podloga smola jer je tada polipeptid na podlogu vezan preko okosnice. U slučaju sinteze u otopini, zaštita α-karboksilne skupine je nužna. U sva tri slučaja pak potrebno je uzeti u obzir

zaštitu karboksilne skupine bočnog ogranka, ukoliko u strukturi peptida imamo aspartat ili glutamat.<sup>33</sup>

Kao zaštitne skupine za  $\alpha$ -karboksilne skupine peptida, kao i za karboksilne skupine bočnih ogranaka, uglavnom se koriste esterske zaštitne skupine te su uvjeti njihova uklanjanja i uvođenja navedeni u tablici 3.

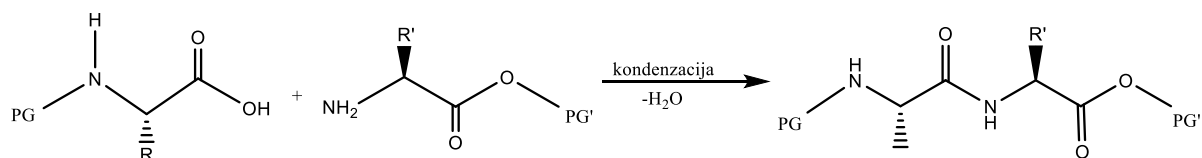
Tablica 3. Pregled najčešće korištenih esterskih zaštitnih skupina za zaštitu karboksilnih skupina peptida te uvjeta za njihovo uvođenje i uklanjanje.<sup>29</sup>

Zaštitna skupina	Strukturna formula	Uvjeti uvođenja	Uvjeti uklanjanja
<b>tert-butilna skupina</b> ( <i>t</i> -Bu)		1. CH <sub>2</sub> =CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , konc H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Et <sub>2</sub> O 2. <i>t</i> -BuOH, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> , Et <sub>2</sub> O	1. AcOH 2. TFA 3. TsOH
<b>Benzilna skupina</b> (Bn)		BnOCOCl, Et <sub>3</sub> N, 0 °C, DMAP, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> /Pd-C
<b>Metilna/etilna skupina</b> (Me, Et)		1. MeOH/SOCl <sub>2</sub> 2. MeOH/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	LiOH

## 2.4. Priprava amida – kondenzacijske reakcije

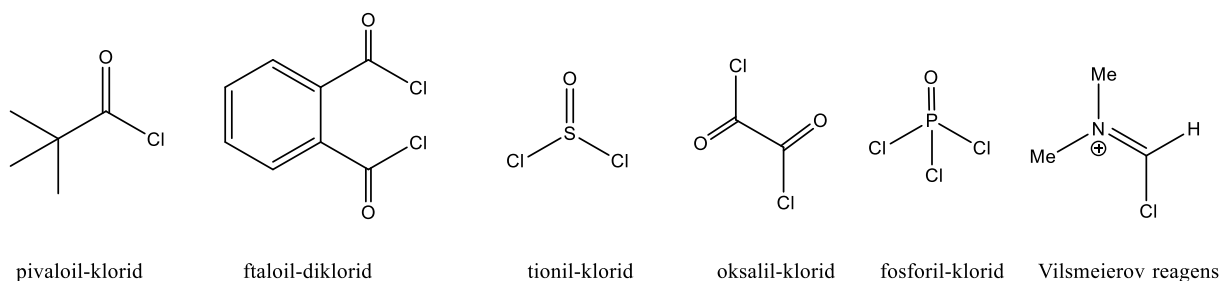
Peptidna veza jest vrsta amidne veze kojom su povezane aminokiseline u peptidima i proteinima. Također, amidnu i peptidnu vezu često se nađe u strukturi molekula mnogih farmakološki važnih spojeva. Najčešće se sinteza amidne veze provodi kondenzacijom karboksilne kiseline i amina. Međutim, ova reakcija nije spontana pri sobnoj temperaturi te je reakcijsku smjesu potrebno zagrijavati najčešće do 200 °C kako bi došlo do eliminacije vode te kondenzacije. U protivnom dolazi do nastanka soli kiselo-baznom reakcijom kisele karboksilne skupine i bazične amino-skupine. Pri ovakvim uvjetima najčešće dolazi do popratnih nepoželjnih reakcija i raspada spojeva pa su razvijene druge metode amidacije koje se oslanjaju

na aktivaciju karboksilne skupine prije reakcije s aminom. Aktivacija karboksilne skupine provodi se pretvorbom hidroksilne skupine karboksilne kiseline u bolju izlaznu skupinu, odnosno njenom supstitucijom nekom elektron-odvlačećom skupinom.<sup>34,35</sup>



Slika 14: Shematski prikaz reakcije kondenzacije karboksilne skupine i amino-skupine uz izlazak molekule vode (PG = zaštitna skupina, engl. *protecting group*)

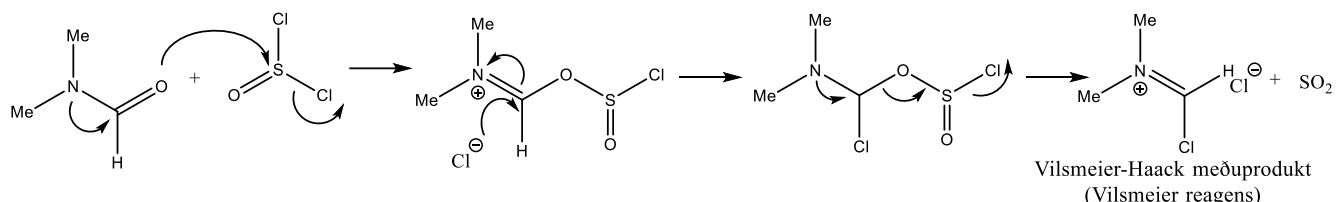
Za pripremu aktiviranog oblika karboksilne kiseline koriste se kondenzirajući reagensi, kojima se karboksilna kiselina prevodi u acil-halogenid, miješani ili simetrični anhidrid, azid ili u aktivni ester, ovisno o korištenom reagensu.<sup>34-36</sup> Aktivacija karboksilne kiseline prevođenjem u acil-klorid jedna je od najkorištenijih i najstarijih metoda aktivacije. Neki od najčešće korištenih reagensa su pivaloil-klorid, ftaloil-diklorid, tionil-klorid, oksalil-klorid, fosforil-klorid i Vilsmeirov reagens (slika 15).<sup>35,36</sup>



Slika 15: Strukturne formule molekula reagensa za pripremu acil-halogenida<sup>34,35</sup>

Od navedenih reagensa, na većoj skali najkorišteniji su svakako tionil-klorid i oksalil-klorid koji u reakcijama s karboksilnom kiselinom generiraju klorovodičnu kiselinu, što može ograničavati njihovu upotrebu u slučaju kiselo labilnih spojeva.<sup>36</sup> Također, potrebno je prije reakcije s aminom neutralizirati klorovodičnu kiselinu nastalu u reakciji, u svrhu čega se najčešće dodaju tercijarni amini, primjerice trietilamin. U ovakvim uvjetima može doći do nastanka oksazolonskog prstena i racemizacije (slika 13). Da bi se to spriječilo jedno od mogućih rješenja je korištenje dvofaznog sustava kako bi se kontakt supstrata s bazom koja je otopljena u vodenom sloju sveo na najmanju moguću mjeru.<sup>35</sup>

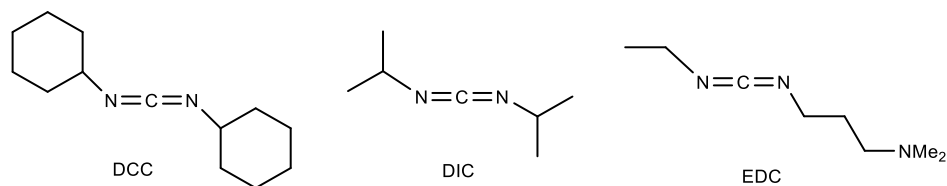
Kod pripreve acil-halogenida u prisutnosti oksalil-klorida i tionil-klorida često se dodaje i katalitička količina DMF-a pri čemu nastaje Vilsmeier-Haackov međuprodukt ili već navedeni Vilsmeierov reagens, koji je komercijalno dostupan. Mehanizam reakcije tionil-klorida i DMF-a dan je na slici 16.<sup>36</sup>



Slika 16: Shematski prikaz mehanizma reakcije tionil-klorida i DMF-a<sup>36</sup>

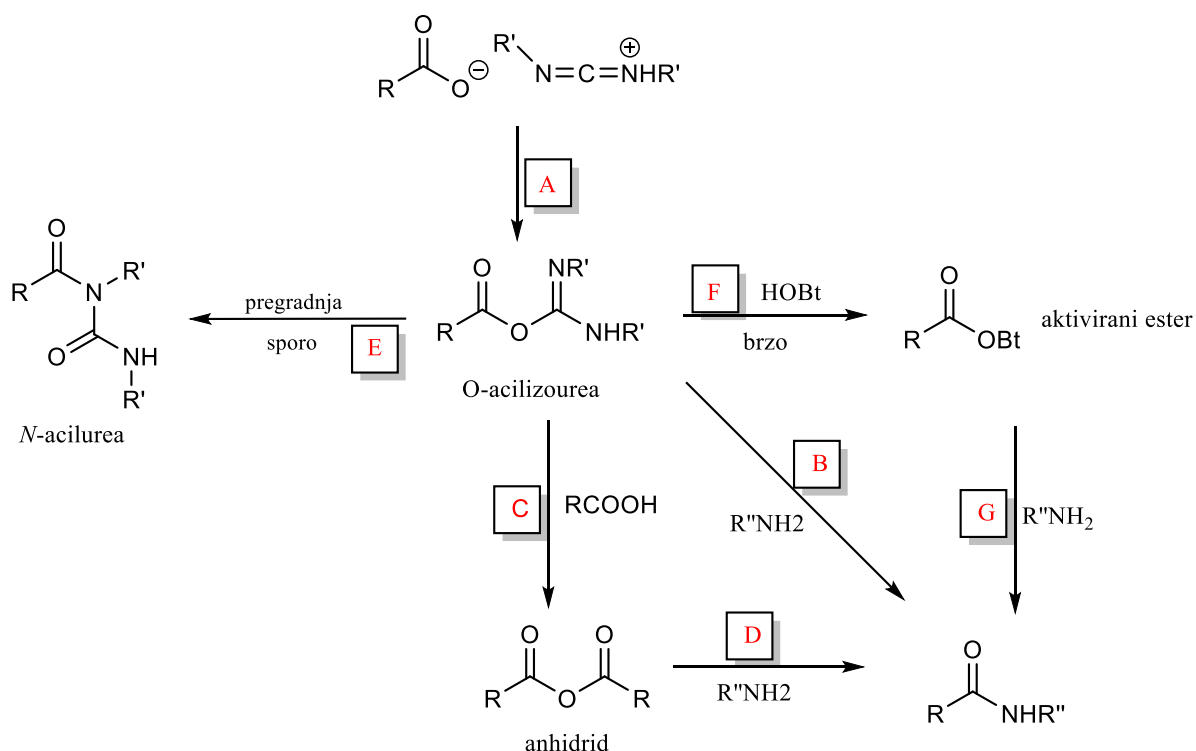
Metoda aktivacije karboksilne kiseline preko miješanog anhidrida provodi se uz dodatak reagensa poput anhidrida octene kiseline, pivaloil-klorida, odgovarajućih klorformijata i kinolinskih reagensa poput EEDQ (2-etoksi-1-etoksikarbonil-1,2-dihidrokinolin). Jedna od mogućih komplikacija pri ovome postupku je disproporcioniranje miješanog anhidrida te nastanak dvaju različitih simetričnih anhidrida, što se može izbjeći pripravom miješanog anhidrida netom prije reakcije s aminom. Do navedenog problema dolazi ukoliko se kao reagensi koriste oni koji daju aktivirane anhidride karboksilnih kiselina (pivaloil-klorid i anhidrid octene kiseline). U slučaju reagensa koji daju anhidride ugljične kiseline, problem se javlja kod moguće sporedne reakcije tercijarne dušikove baze s drugim karbonilnim ugljikom.<sup>35,36</sup> Optimalni uvjeti za ovakve kondenzacijske reakcije su aktivacija na niskoj temperaturi (-5 do -15 °C) uz *N*-metilmorfolin kao bazu u bezvodnom otapalu, koje nije ni kloroform ni diklormetan.<sup>35</sup>

Relevantna metoda aktivacije karboksilnih kiselina u kontekstu ovog rada jest aktivacija uz karbodiimidne aktivacijske reagense. Prvi karbodiimidni reagens *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC, slika 17) sintetiziran 1955. godine. Ostali često korišteni karbodiimidni reagensi su 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)karbodiimid-hidroklorid (EDC·HCl, slika 17) i *N,N'*-diizopropilkarbodiimid (DIC, slika 17).<sup>34-36</sup>



Slika 17: Strukturne formule molekula često korištenih karbodiimidnih reagensa

Aktivacija karboksilne kiseline karbodiimidnim reagensom prikazana je na slici 18. Reakcijom karbodiimidnog reagensa i karboksilne kiseline nastaje *O*-acilizourea (put **A**), čijom daljnom reakcijom s aminom nastaje ciljani amid (put **B**) i kao nusprodukt odgovarajuće uree. U slučaju DCC-a to je dicikloheksil-urea, koja je relativno netopljiva u otapalima koja se koriste za reakcije kondenzacije pa se najčešće uklanja filtriranjem.<sup>34</sup> U slučaju DIC-a nastala diizopropilurea je umjereno topljiva u kloroformu i uglavnom se uklanja ekstrakcijom vodom. Naposljetku, urea koja nastaje iz EDC-a je topljiva u vodi i u potpunosti se uklanja ekstrakcijom u vodeni sloj, što čini EDC najkorištenijim karbodiimidnim reagensom na većoj skali.<sup>35</sup> Jedan od mogućih nusprodukata je i anhidrid karboksilne kiseline (put **C**), koji dalje ponovo može reagirati s aminom (put **D**). Problem kod korištenja samo karbodiimidnih reagensa je i mogućnost pregradnje (put **E**) i nastanka *N*-aciluree, koja je stabilna i ne reagira s aminom. U svrhu sprječavanja te nepoželjne reakcije, koriste se aditivi. Najčešće korišteni aditivi su svakako 1-hidroksi-1*H*-benzotriazol (HOBt) i 1-hidroksi-7-azabenzotriazol (HOAt), koji uvelike povećavaju iskorištenje reakcija kondenzacije i smanjuju racemizaciju. HOBt i HOAt sprječavaju reakciju pregradnje i nastanka *N*-aciluree i u reakciji s *O*-acilizouream daju aktivirani ester (put **F**) iz kojeg u reakciji s aminom nastaje ciljani amid (put **G**).<sup>34-36</sup>



Slika 18: Shematski prikaz reakcije karbodiimidnog reagensa s karboksilnom kiselinom te mogućih sporednih reakcija i reakcije *O*-acilizouree s aditivom HOBt<sup>36</sup>



## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

#### 3.1.1. Kemikalije i otapala

Boc-zaštićeni ferocenski amini ( $\text{Fc}-(\text{CH}_2)_n\text{NHBoc}$ ) i ferocenacetonitril ( $\text{Fc}-\text{CH}_2\text{CN}$ ) korišteni u sintezi, prethodno su pripremljeni u laboratoriju literaturno opisanim postupcima. Ostale kemikalije korištene u sintezi komercijalno su dostupne i analitičke su čistoće: manoza (*Sigma-Aldrich*), jod ( $\text{I}_2$ , *Kemika*), morfolin (*Sigma-Aldrich*), *tert*-butil-bromacetat (*Sigma-Aldrich*), kalijev karbonat ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ , *Sigma-Aldrich*), sumporna kiselina ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , *Fluka*), litijev tetrahidroaluminat (LAH, *Sigma-Aldrich*), natrijev klorid ( $\text{NaCl}$ , *Kemika*), benzilni ester *N*-(*t*-butiloksikarobnil)-*L*-alanil-*D*-izoglutamina (Boc-*L*-Ala-*D*-Gln(OBn), *Bachem*), trifluoroctena kiselina (TFA, *Merck*), natrijev sulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , *Kemika*), hidroksibenzotriazol (HOBt, *Sigma-Aldrich*), *N*-etil-*N'*-(3-etildiaminopropil)karbodiimid-hidroklorid ( $\text{EDC} \times \text{HCl}$ , *Sigma-Aldrich*), 1,4-dioksan (*Kemika*), klorovodična kiselina ( $\text{HCl}$ , *Carlo Erba*), natrijev hidrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ , *Gram mol*), trietilamin (TEA, *Sigma-Aldrich*), natrijev metoksid ( $\text{NaOMe}$ , *Sigma-Aldrich*), platinov(IV) oksid ( $\text{PtO}_2$ ), paladij na ugljiku (Pd/C)

Otapala korištena u sintezi po potrebi su sušena prema uobičajenim literaturnim postupcima. Korištena su komercijalno dostupna otapala: diklormetan (DCM, *Carlo Erba*), acetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ , *Kemika*), dimetilformamid (DMF, *Fisher Chemical*), dietil-eter ( $\text{Et}_2\text{O}$ , *J. T. Baker*), metanol ( $\text{MeOH}$ , *Fluka*), 1,4-dioksan (*Kemika*), etil-acetat ( $\text{EtOAc}$ , *Carlo Erba*), etanol ( $\text{EtOH}$ , *Kemika*), kloroform ( $\text{CHCl}_3$ , *Carlo Erba*).

#### 3.1.2. Metode

Tijek reakcija, kao i sastav frakcija prilikom kromatografskog pročišćavanja na stupcu te kontrola čistoće sintetiziranih produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na staklenim pločicama silikagela (60 F254, 0,25 mm, *Fluka*). Silikagel 60 (0,063-0,200 mm, *Sigma-Aldrich*) korišten je za pročišćavanje sintetskih produkata prilikom kromatografije na stupcu. Detekcija mrlja na pločicama silikagela provedena je ultraljubičastim zračenjem ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ), prskanjem pločica ninhidrinom uz zagrijavanje te prskanjem pločica 10 %-tnom otopinom sumporne kiseline uz zagrijavanje. Hidrogenolize (debenziliranja) provedena su u Parrovom uređaju.

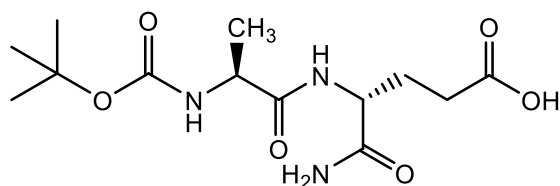


U svrhu identifikacije i kontrole čistoće produkata korištena je spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i spektrometrija masa (MS).  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  DEPT-Q NMR spektri snimljeni su pomoću instrumenta Avance III HD (*Bruker*) pri frekvenciji oscilacije od 400 MHz za  $^1\text{H}$  spektre i 100 MHz za  $^{13}\text{C}$  spektre u deuteriranim otapalima ( $\text{CDCl}_3$  ili  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; navedeno u tekstu). Kemijski pomaci ( $\delta$ ) izraženi su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS, 0 ppm) kao unutarnji standard, dok su spektri  $^{13}\text{C}$  kalibrirani prema srednjem signalu otapala. Multipliciteti signala navedeni su u tekstu kao: s-singlet, d-dublet, dd-dublet dubleta, t-triplet, q-kvartet i m-multiplet. Spektri masa produkata snimljeni su pomoću uređaja Agilent 6410 uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS). Tališta spojeva određena su pomoću mjerenja uređajem *Büchi Melting Point B-540*.

### 3.2. Priprava peptidnog prekursora

#### 3.2.1. Priprava spoja **1** – (4R)-4-[(2S)-2-(tert-butiloksikarbonil-amino)propanamido]-4-karbamoilbutanske kiseline **1**

Komercijalno dostupan dipeptid Boc-L-Ala-D-*iso*Gln(OBn) (0,5 g, 1,23 mmol) otopi se u 96 %-tnom EtOH (25 mL) te se u otopinu doda paladij na ugljiku (250 mg). Otopina se miješa 24 h u struji vodika na sobnoj temperaturi u Parrovom uređaju ( $p = 2,34$  bar). Tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu otapala  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 3 : 1$  uz prskanjem 10 %-tnom sumpornom kiselinom i zagrijavanje. Po završetku, reakcijska smjesa se profiltrira i obilno ispere etanolom, a dobiveni filtrat upari. Dobiveni produkt **1** (377 mg, 97 %, slika 19) je pahuljasta bijela krutina. Struktura spoja **1** potvrđena je spektroskopijom NMR.



Slika 19: Strukturna formula molekule spoja **1**

$R_f = 0,28$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 2 : 1$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ / ppm: 4,36 (dd, 1H,  $J = 4,2$  Hz,  $J = 9,2$  Hz, CH, *iso*Gln); 4,02 (q, 1H,  $J = 7,1$  Hz, CH, Ala); 2,38 (t, 2H,  $J = 7,6$  Hz,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 2,26 – 2,17 (m, 1H, *iso*Gln); 1,94 – 1,85 (m, 1H, *iso*Gln); 1,43 (s, 9H,  $3 \times \text{CH}_3$ , Boc); 1,30 (d, 3H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_3$ , Ala).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ / ppm: 175,02-174,98 ( $3 \times \text{C}=\text{O}$ ); 156,6 ( $\text{C}=\text{O}$ , Boc); 79,5 (C, Boc); 52,1 (CH, *iso*Gln); 50,6 (CH, Ala); 29,7 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 27,3 ( $\text{CH}_3$ , Boc); 26,7 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 16,1 ( $\text{CH}_3$ , Ala).

### 3.3. Priprava ferocenskih amina

#### 3.3.1. Priprava spoja **2** – 2-(ferocen-1-il)etanamina

##### Metoda I:

Ferocenacetonitril (50 mg) otopljen je u EtOH (5 mL) te je u otopinu dodan PtO<sub>2</sub> (2,5 mg). Reakcijska smjesa je miješana 24 h u struji vodika na sobnoj temperaturi u Parrovom uređaju ( $p = 3,45$  bar). Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala DCM : MeOH = 5 : 1. Nakon 24 h reakcijska smjesa je profiltrirana te je filtrat ekstrahiran vodenom otopinom HCl-a ( $c = 1$  mol dm<sup>-3</sup>). Vodeni sloj je neutraliziran vodenom otopinom NaOH ( $c = 1$  mol dm<sup>-3</sup>) do pH 12 te ekstrahiran eterom i sušen na bezvodnom Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu uz gradijentno eluiranje od sustava otapala DCM : MeOH = 10 : 1 do DCM : MeOH = 5 : 1. Dobiven je produkt **2** (slika 20) u obliku narančaste krutine (7 mg, 14 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

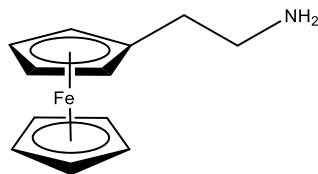
##### Metoda II:

Ferocenacetonitril (50 mg) je otopljen u EtOH (5 mL) te je u otopinu dodan paladij na ugljiku (2,5 mg). Otopina je miješana 24 h u struji vodika na sobnoj temperaturi u Parrovom uređaju ( $p = 3,45$  bar). Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala DCM : MeOH = 5 : 1 te nakon 24 h nije uočeno nastajanje produkta.

##### Metoda III:

LAH (167 mg, 4,444 mmol) je suspendiran u suhom eteru (10 mL). Siva suspenzija LAH-a u eteru miješana je na sobnoj temperaturi 30 min. Potom je dokapavanjem dodana otopina FcCH<sub>2</sub>CN (200 mg, 0,222 mmol) otopljenog u suhom eteru (6 mL). Reakcijska smjesa zagrijana je do temperature refleksa te miješana 3 h. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 5 : 1 uz detekciju ninhidrinom i zagrijavanjem.

Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je prvo ohlađena na ledu te je u nju dokapavana hladna voda uz neprestano hlađenje. Reakcijska smjesa je oddekantirana, talog još par puta ispran eterom te ponovo oddekantirana otopina iznad taloga. Dobivena je bistra narančasta otopina. Nakon uparavanja otapala na rotacijskom uparivaču sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu uz gradijentno eluiranje od sustava otapala DCM : MeOH = 10 : 1 do DCM : MeOH = 5 : 1. Dobiven je uljasti smeđi produkt (130 mg, 64 %). Struktura spoja potvrđena je spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 20: Strukturna formula molekule spoja 2

$R_f = 0,35$  (DCM : MeOH = 5 : 1)

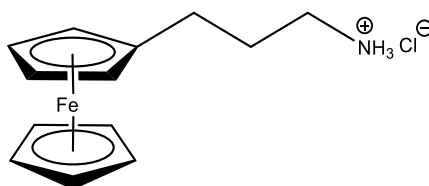
$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 4,10 – 4,07 (m, 9H,  $9 \times \text{CH}$ , Fc); 2,82 (t, 2H,  $J = 6,3$  Hz,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ); 2,49 (t, 2H,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 1,75 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 86,26 (C, Fc); 68,70, 68,54, 67,58 (CH, Fc); 43,53 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ); 33,90 ( $\text{CH}_2\text{Fc}$ ).

ESI-MS:  $m/z$  230,20  $[\text{M}+\text{H}]^+$

### 3.3.2. Priprava spoja 3 – 3-(ferocen-1-il)propan-1-ilamonijeva klorida

Fc-( $\text{CH}_2$ )<sub>3</sub>-NHBoc (200 mg, 0,583 mmol) otopi se u suhom DCM-u (8 mL). U otopinu se uvodi plinoviti klorovodik pri čemu dolazi do promjene boje otopine iz narančaste u zelenu. Reakcija se prati TLC-om u sustavu otapala DCM : MeOH = 5 : 1. Nakon 4 h uvođenja klorovodika na sobnoj temperaturi, reakcijska smjesa se upari te se upareni ostatak pročisti kromatografijom na stupcu uz gradijentno eluiranje od sustava otapala DCM : MeOH = 20 : 1 do DCM : MeOH = 5 : 1. Dobiven produkt je svijetlo-žuto gusto ulje (95 mg, 58 %), čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR te spektrometrijom masa.



Slika 21: Strukturna formula molekule spoja 3

$R_f = 0,30$  (DCM : MeOH = 5 : 1)

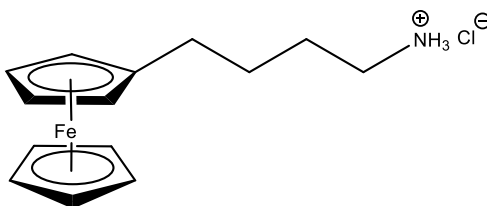
$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 4,11 – 4,08 (m, 9H,  $9 \times \text{CH}$ , Fc); 2,93 – 2,90 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ ); 2,46 (t, 2H,  $J = 7,6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 1,91 – 1,82 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ , poveznica ferocen-dipeptid).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 88,47 (C, Fc); 69,66, 69,12, 68,58 (CH, Fc); 40,66 ( $\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ ); 30,33 ( $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 27,59 ( $\text{CH}_2$ , poveznica ferocen-dipeptid)

ESI-MS:  $m/z$  244,150  $[\text{M}+\text{H}]^+$

### 3.3.3. Priprava spoja **4** – 4-(ferocen-1-il)butan-1-ilamonijeva klorida

Fc-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NHBoc (302 mg, 0,845 mmol) se otopi u 10 mL suhog DCM-a te se potom u reakcijsku smjesu uvodi plinoviti HCl-a. HCl se generira literaturno opisanim postupkom reakcijom natrijeva klorida i sumporne kiseline. Nakon 4 h uvođenja HCl-a, otapalo se upari na rotacijskom uparivaču. Dobiveni upareni ostatak se potom pročisti kromatografijom na stupcu uz gradijentno eluiranje u sustavu otapala DCM : MeOH = 10 : 1 do DCM : MeOH = 5 : 1. Dobiveni produkt je gusto žuto ulje (183 mg, 74 %). Struktura spoja **4** potvrđena je spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 22: Strukturna formula molekule spoja **4**

R<sub>f</sub> = 0,42 (DCM : MeOH = 5 : 1)

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ / ppm: 4,09 – 4,04 (m, 9H, 9 × CH, Fc); 2,91 (t, 2H, J = 7,5 Hz, CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 2,43 (t, 2H, J = 7,3 Hz, CH<sub>2</sub>Fc); 1,71 – 1,54 (m, 4H, 2 × CH<sub>2</sub>, poveznica ferocen-dipeptid)

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ / ppm: 89,74 (C, Fc); 69,75, 69,39, 68,51 (CH, Fc); 40,76 (CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 30,53 (CH<sub>2</sub>Fc); 29,17, 28,43 (2 × CH<sub>2</sub>, poveznica ferocen-dipeptid)

ESI-MS: m/z 258,150 [M+H]<sup>+</sup>

## 3.4. Priprava ferocenskih amida desmuramil-dipeptida

### 3.4.1. Općeniti postupak kondenzacije ferocenskih amina s peptidnim prekursorom

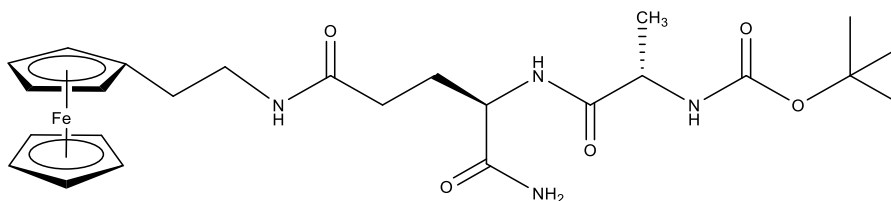
Boc-L-Ala-D-isoGln (1,2 ekv.) suspendira se u smjesi suhog 1,4-dioksana i DCM-a (1 : 1). Suspenzija se ohladi na 0-5 °C te se u nju potom dodaju HOBt (1,2 ekv.) i EDC×HCl (1,2 ekv.). Suspenzija se miješa na 0-5 °C, 5-10 min.

U drugoj tikvici pripremi se suspenzija spojeva **2**, **3** ili **4** (1,0 ekv.) u smjesi suhog 1,4-dioksana i DCM-a (1 : 1) u koju se potom doda TEA (2,0 ekv.). Tako pripremljena suspenzija prebaci se preko lijevka u suspenziju s aktiviranim dipeptidom. Reakcijska smjesa se miješa 30 min na 0-5 °C, nakon čega se miješa na sobnoj temperaturi preko noći.

Tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu otapala DCM : MeOH = 5 : 1 uz prskanje sumpornom kiselinom i zagrijavanje. Po završetku reakcije reakcijska smjesa se obradi na način da se prvo razrijedi s EtOAc-om te se zatim u reakcijsku smjesu doda otopina 0,5 M vodene otopine HCl-a. Organski sloj se odvoji i zatim ispere sa zasićenom vodenom otopinom NaHCO<sub>3</sub>. Dobiveni organski sloj se suši na bezvodnom Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari na rotacijskom uparivaču. Upareni ostatak se pročisti kromatografijom na stupcu uz gradijentno eluiranje u sustavu otapala od CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 20 : 1 do CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 5 : 1.

3.4.2. Priprava spoja **5** – N-[2-(ferocen-1-il)etan-1-il]-(4R)-4-[(2S)-2-(tert-butiloksikarbonilamino)propanamido]-4-karbamoilbutanamida

Iz spoja **1** (34,8 mg, 0,110 mmol) i spoja **2** (21 mg, 0,0917 mmol) postupkom opisanim u prethodnom poglavlju pripremljen je spoj **5** (slika 23, 42,8 mg, 88 %), čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 23: Strukturna formula molekule spoja **5**

$R_f = 0,53$  (DCM : MeOH = 5 : 1)

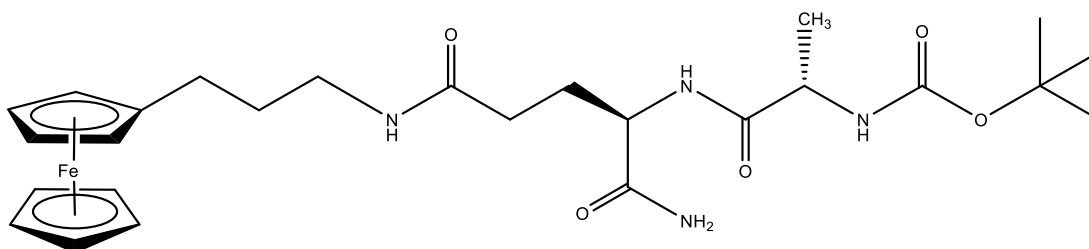
**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  / ppm:** 7,82 (s, 1H, NH); 7,10 (s, 1H, NH); 6,22 (s, 1H, NH); 5,71 (s, 1H, NH); 5,27 (d, 1H,  $J = 5,5$  Hz, NH); 4,44 – 4,39 (m, 1H, CH, *iso*Gln); 4,12 – 4,01 (m, 10H: 9H, 9  $\times$  CH, Fc; 1H, CH, Ala); 3,38 (q, 2H,  $J = 6,5$  Hz, CH<sub>2</sub>NH); 2,55 (t, 2H,  $J = 7,1$  Hz, CH<sub>2</sub>Fc); 2,41 – 2,26 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 2,18 – 2,12 (m, 1H, CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 2,07 – 2,04 (m, 1H, CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 1,43 (s, 9H, 3  $\times$  CH<sub>3</sub>, Boc); 1,36 (d, 3H,  $J = 7,1$  Hz, CH<sub>3</sub>, Ala)

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  / ppm:** 173,56, 172,94 (C=O); 85,50 (C, Fc); 68,84, 68,43, 67,80 (CH, Fc); 52,54 (CH, *iso*Gln); 51,12 (CH, Ala); 40,96 (CH<sub>2</sub>NH); 32,74 (CH<sub>2</sub>Fc); 29,72 (CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 28,50 (CH<sub>3</sub>, Boc); 27,95 (CH<sub>2</sub>, *iso*Gln); 18,01 (CH<sub>3</sub>, Ala)

**ESI-MS:**  $m/z$  529,256 [M+H]<sup>+</sup>

3.4.3. Priprava spoja **6** – N-[3-(ferocen-1-il)propan-1-il]-(4R)-4-[(2S)-2-(tert-butiloksikarbonilamino)propanamido]-4-karbamoilbutanamida

Kondenzacijom spoja **1** (88 mg, 0,315 mmol) i spoja **3** (113 mg, 0,356 mmol) prethodno opisanim općenitim postupkom kondenzacije pripremljen je spoj **6** (slika 24) u obliku narančastog ulja (145 mg, 78 %). Struktura spoja potvrđena je spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 24: Strukturna formula molekule spoja **6**

$R_f = 0,63$  (DCM : MeOH = 5 : 1)

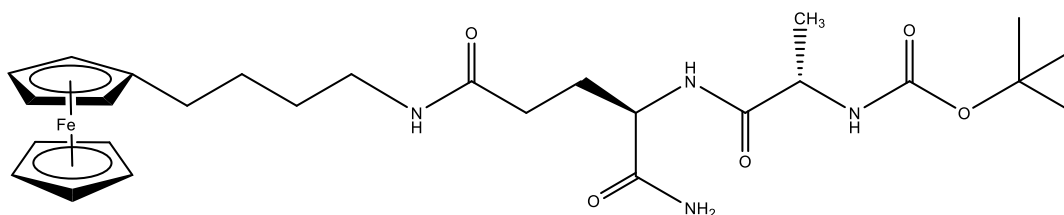
$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 4,35 – 4,32 (m, 1H, CH, *iso*Gln); 4,11 – 4,03 (m, 9H, 9  $\times$  CH, Fc); 3,51 (q, 1H,  $J = 7,0$  Hz, CH, Ala); 3,20 (t, 2H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 2,39 (t, 2H,  $J = 7,9$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 2,28 (t, 2H,  $J = 6,7$  Hz,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 2,23 – 2,21 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 1,98 – 1,89 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 1,77 – 1,69 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ , poveznica ferocen-dipeptid); 1,47 (s, 9H, 3  $\times$   $\text{CH}_3$ , Boc); 1,31 (d, 3H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_3$ , Ala)

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 176,46, 174,90 (C=O); 158,17 (C=O, Boc); 89,68 (C, Fc); 80,91 (C, Boc); 69,56, 69,18, 68,29 (CH, Fc); 53,77 (CH, *iso*Gln); 52,31 (CH, Ala); 40,47 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 33,36 ( $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 31,89 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 29,06 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 28,83 ( $\text{CH}_3$ , Boc); 28,04 ( $\text{CH}_2$ , poveznica ferocen-dipeptid); 17,77 ( $\text{CH}_3$ , Ala)

ESI-MS:  $m/z$  543,30 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$

3.4.1. Priprava spoja **7** – N-[4-(ferocen-1-il)butan-1-il]-(4R)-4-[(2S)-2-(tert-butiloksikarbonilamino)propanamido]-4-karbamoilbutanamida

Kondenzacijom spoja **1** (90 mg, 0,284 mmol) i spoja **4** (90 mg, 0,307 mmol) općenitim postupkom kondenzacije ferocenskih amina s peptidnim prekursorom pripremljen je spoj **7** (slika 25) u obliku narančastog ulja (112 mg, 71 %). Struktura spoja potvrđena je spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 25: Strukturna formula molekule spoja 7

$R_f = 0,63$  (DCM : MeOH = 5 : 1)

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 7,81 (s, 1H, NH); 7,18 (s, 1H, NH); 6,35 (s, 1H, NH); 5,78 (s, 1H, NH); 5,34 (d, 1H,  $J = 5,6$  Hz, NH); 4,42 – 4,03 (m, 1H, CH, *iso*Gln); 4,08 – 4,03 (m, 10H: 9H, 9  $\times$  CH, Fc; 1H, CH, Ala); 3,16 – 3,08 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 2,29 – 2,15 (4H: 2H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln; 2H,  $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 2,08 – 2,00 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 1,97 – 1,90 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 1,42 – 1,39 (m, 4H, 2  $\times$   $\text{CH}_2$ , poveznica ferocen-dipeptid); 1,31 (s, 9H, 3  $\times$   $\text{CH}_3$ , Boc); 1,24 (d, 3H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_3$ , Ala)

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 174,01, 173,52, 173,02 (C=O); 156,07 (C=O, Boc); 88,97 (C, Fc); 80,54 (C, Boc); 68,73, 68,32, 67,36 (CH, Fc); 52,47 (CH, *iso*Gln); 51,20 (CH, Ala); 39,82 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 32,72 ( $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 29,88, 29,45, 29,68, 28,73, 28,00 (4  $\times$   $\text{CH}_2$ : 2  $\times$   $\text{CH}_2$ , *iso*Gln; 2  $\times$   $\text{CH}_2$ , poveznica ferocen-dipeptid); 28,50 ( $\text{CH}_3$ , Boc); 17,96 ( $\text{CH}_3$ , Ala)

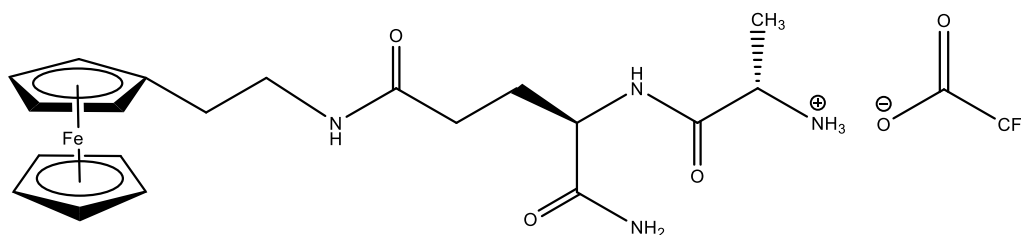
ESI-MS:  $m/z$  557,30  $[\text{M}+\text{H}]^+$

#### 3.4.2. Općeniti postupak uklanjanje Boc zaštitne skupine s peptidnog fragmenta

Spojevi **5**, **6** ili **7** se otope suhom DCM-u. U priređenu otopinu se zatim doda 15 ekvivalenata TFA. Reakcija se miješa na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu otapala DCM : MeOH = 5 : 1. Nakon 3 h miješanja na sobnoj temperaturi, reakcijska smjesa se upari na rotacijskom uparivaču te ispere eterom. Dobiveni zeleni upareni ostatak se pročisti kromatografijom na stupcu u sustavu otapala DCM : MeOH = 5 : 1.

#### 3.4.3. Priprava spoja **8** – (1S)-1-{N-[(1R)-3-[4-(ferocen-1-il)etan-1-ilaminokarbonil]-1-karbamoilpropan-1-il]aminokarbonil}etan-1-ilamonijeva trifluoracetata

Iz spoja **5** (170 mg, 0,322 mmol) pripremljen je spoj **8** (slika 26) u obliku žutog praha uz kvantitativno iskorištenje (170 mg, 100 %) te mu je struktura potvrđena spektrometrijom masa i spektroskopijom NMR.

Slika 26: Strukturna formula molekule spoja **8**

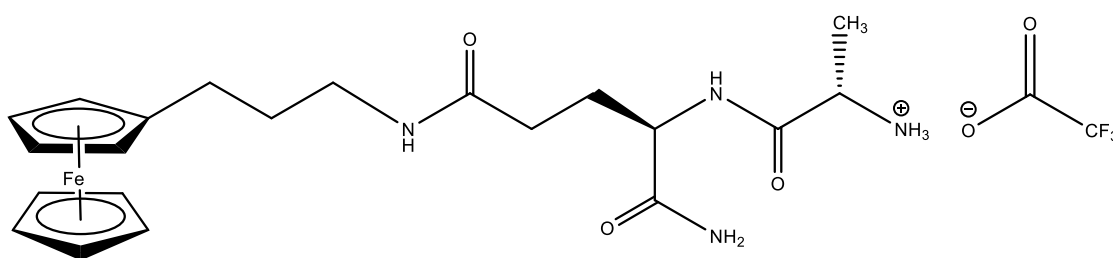
$R_f = 0,17$  (DCM : MeOH = 5 : 1)

$^1\text{H NMR (CD}_3\text{OD)}$   $\delta$  / ppm: 4,33 (dd, 1H,  $J = 4,9$  Hz,  $J = 9,0$  Hz, CH, *isoGln*); 4,11 – 4,05 (m, 9H,  $9 \times$  CH, Fc); 3,59 (q, 1H,  $J = 6,8$  Hz, CH, Ala); 3,34 – 3,33 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH); 2,52 (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz, CH<sub>2</sub>Fc); 2,27 (t, 2H,  $J = 7,6$  Hz, CH<sub>2</sub>, *isoGln*); 2,13 – 2,10 (m, 1H, CH<sub>2</sub>, *isoGln*); 1,97 – 1,88 (m, 1H, CH<sub>2</sub>, *isoGln*); 1,34 (d, 3H,  $J = 7,0$  Hz, CH<sub>3</sub>, Ala)

$^{13}\text{C NMR (CD}_3\text{OD)}$   $\delta$  / ppm: 177,79, 176,64, 174,73 (C=O); 86,93 (C, Fc); 69,61, 69,31, 68,53 (CH, Fc); 58,41, 54,00 (CH, *isoGln*); 51,43 (CH, Ala); 41,86 (CH<sub>2</sub>NH); 33,24 (CH<sub>2</sub>Fc); 30,53 (CH<sub>2</sub>, *isoGln*); 29,31 (CH<sub>2</sub>, *isoGln*); 20,97,(); 18,46 (CH<sub>3</sub>, Ala)

#### 3.4.4. Priprava spoja **9** – (1S)-1-{N-[(1R)-3-[4-(ferocen-1-il)propan-1-ilaminokarbonil]-1-karbamoilpropan-1-il]aminokarbonil]etan-1-ilamonijeva trifluoracetata

Iz spoja **6** (135 mg, 0,249) pripravljen je spoj **9** (slika 27) u obliku narančaste krutine u kvantitativnom iskorištenju (135 mg). Struktura spoja potvrđena je spektrometrijom masa i spektroskopijom NMR.

Slika 27: Strukturna formula molekule spoja **9**

$R_f = 0,12$  (DCM : MeOH = 5 : 1)

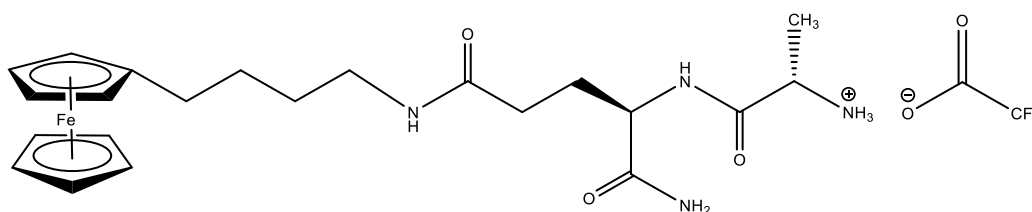
$^1\text{H NMR (CD}_3\text{OD)}$   $\delta$ /ppm: 4,36 – 4,33 (dd, 1H,  $J = 4,9$  Hz,  $J = 9,0$  Hz, CH, *isoGln*); 4,08 – 4,03 (m, 9H,  $9 \times$  CH, Fc); 3,63 (q, 1H,  $J = 7,0$  Hz, CH, Ala); 3,20 – 3,16 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH); 2,37 (t, 2H,  $J = 7,6$  Hz, CH<sub>2</sub>Fc); 2,29 (t, 2H,  $J = 7,6$  Hz, CH<sub>2</sub>, *isoGln*); 2,18 – 2,09 (m, 1H, CH<sub>2</sub>, *isoGln*); 1,98 – 1,89 (m, 1H, CH<sub>2</sub>, *isoGln*); 1,74 – 1,67 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, poveznica ferocen-dipeptid); 1,36 (d, 3H,  $J = 7,0$  Hz, CH<sub>3</sub>, Ala)



$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 176,36, 176,24, 174,83 (C=O); 89,64 (C, Fc); 69,54, 69,15, 68,28 (CH, Fc); 54,03 (CH, *iso*Gln); 51,23 (CH, Ala); 40,48 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 33,26 ( $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 31,91 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 29,39 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 28,05 ( $\text{CH}_2$ , poveznica ferocen-dipeptid); 20,26 ( $\text{CH}_3$ , Ala)

3.4.5. Priprava spoja **10** – (1S)-1-{N-[(1R)-3-[4-(ferocen-1-il)butan-1-ilaminokarbonil]-1-karbamoilpropan-1-il]aminokarbonil}etan-1-ilamonijeva trifluoracetata

Iz spoja **7** (170 mg, 0,306 mmol) pripravljen je spoj **10** (slika 28) u obliku narančastog ulja u kvantitativnom iskorištenju (170 mg). Struktura spoja potvrđena je spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 28: Strukturna formula molekule spoja **10**

$R_f = 0,05$  (DCM : MeOH = 5 : 1)

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta / \text{ppm}$ : 4,34 (dd, 1H,  $J_1 = 5,2$  Hz,  $J_2 = 8,8$  Hz, CH, *iso*Gln); 4,08 – 4,02 (m, 9H,  $9 \times$  CH, Fc); 3,71 (q, 1H,  $J = 6,8$  Hz, CH, Ala); 3,17 (t, 2H,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 2,36 (t, 2H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 2,28 (t, 2H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 2,17 – 2,08 (m, 1H, CH, *iso*Gln); 1,98 – 1,94 (m, 1H, CH, *iso*Gln); 1,52 – 1,51 (m, 4H,  $2 \times$   $\text{CH}_2$ , poveznica ferocen-dipeptid); 1,39 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{CH}_3$ , Ala)

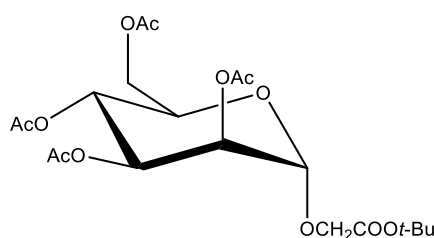
$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta / \text{ppm}$ : 176,25, 174,88, 174,75 (C=O); 90,14 (C, Fc); 69,51, 69,19, 68,19 (CH, Fc); 54,05 (CH, *iso*Gln); 51,00 (CH, Ala); 40,40 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 33,21 ( $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 30,84, 30,37, 29,68, 29,37 ( $4 \times$   $\text{CH}_2$ :  $2 \times$   $\text{CH}_2$ , *iso*Gln;  $2 \times$   $\text{CH}_2$ , poveznica ferocen-dipeptid); 19,58 ( $\text{CH}_3$ , Ala)

### 3.5. Priprava zaštićene manozne podjedinice

3.5.1. Priprava spoja **11** – tert-butil-2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetat

U 100 mL okruglu jednogrlu tikvicu odvagan je uzorak prethodno pripravljenje 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoze (1,4989 g, 4,30 mmol). U istu tikvicu odpipetiran je tert-butil bromoacetat (0,954 mL, 6,46 mmol) i odvagan prethodno žareni  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2,98 g, 21,53 mmol).

Dodano je 25 mL DMF-a te je reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala DCM : CH<sub>3</sub>CN = 3 : 1. Nakon 2 h miješanja, reakcijska smjesa je profiltrirana i razrijeđena s 150 ml Et<sub>2</sub>O. Organski sloj ispran je s 3 × 75 mL destilirane vode te potom sušen na bezvodnom Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i, naposljetku, uparen na rotacijskom uparivaču. Dobiveni upareni ostatak je pročišćen kromatografski u sustavu otapala DCM : CH<sub>3</sub>CN = 3 : 1. Dobiveni produkt je gusto ulje (1,0331 g, 52 %). Produkt je strukturno okarakteriziran spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 29: Strukturna formula molekule spoja **11**

$R_f = 0,80$  (DCM : CH<sub>3</sub>CN = 3 : 1)

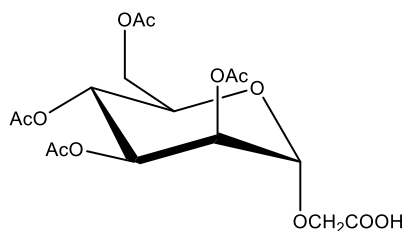
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  / ppm: 5,41-5,28 (m, 3H, H-2, H-3, H-4); 4,96 (d, 1H,  $J_{1,2} = 1,0$  Hz; H-1); 4,30 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 4,8$  Hz,  $J_{6a,6b} = 12,2$  Hz, H-6b); 4,20 - 4,02 (m, 4H, H-5, H-6a, OCH<sub>2</sub>); 2,26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,48 (s, 9H; CH<sub>3</sub>; *t*-Bu).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  / ppm: 170,62; 169,78; 169,75; 169,69; 168,17 (5 C=O); 97,70 (C1); 82,30 (C; *t*-Bu); 69,32; 69,03; 68,87; 65,92 (C2, C3, C4, C5); 64,89; 62,29 (C6, OCH<sub>2</sub>); 28,03 (CH<sub>3</sub>; *t*-Bu); 20,84; 20,73; 20,68; 20,64 (4 CH<sub>3</sub>).

ESI-MS:  $m/z$  485,20 [M+Na]<sup>+</sup>

### 3.5.2. Priprava spoja **12** – 2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octena kiselina

Prethodno pripravljeni uzorak spoja **11** (1,0331 g, 2,23 mmol) otopljen je u 4 mL suhog DCM-a. U otopinu se doda TFA (2 mL, 26,14 mmol). Reakcijska smjesa miješa se na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>CN = 3 : 1. Nakon 3 h miješanja na sobnoj temperaturi, reakcijska smjesa je uparena do suha na rotacijskom uparivaču. Dobiveni upareni ostatak je kromatografski pročišćen u sustavu otapala CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>CN = 3 : 1. Produkt je dobiven u obliku žutog gustog ulja (0,9296 g) u kvantitativnom iskorištenju. Strukturno je okarakteriziran spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Slika 30: Strukturna formula molekule spoja **12**

$R_f = 0,06$  (DCM : CH<sub>3</sub>CN = 3 : 1)

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 5,35-5,25 (m, 3H, H-2, H-3, H-4); 4,95 (d, 1H,  $J_{1,2} = 0,9$  Hz; H-1); 4,58 (s, <1H, OH); 4,32-4,16 (m, 4H, H-5, H-6a, OCH<sub>2</sub>); 4,11 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 1,7$  Hz,  $J_{6a,6b} = 11,5$  Hz, H-6b); 2,14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 172,45; 172,57; 171,50 (5 C=O); 99,17 (C1); 70,69; 70,49; 70,42; 67,16 (C2, C3, C4, C5); 63,50 (C6, OCH<sub>2</sub>); 20,68; 20,65; 20,60 (4 CH<sub>3</sub>).

ESI-MS:  $m/z$  429,20 [M+Na]<sup>+</sup>

### 3.6. Općeniti postupak kondenzacije ferocenskih amida desmuramil dipeptida s manoznom podjedinicom

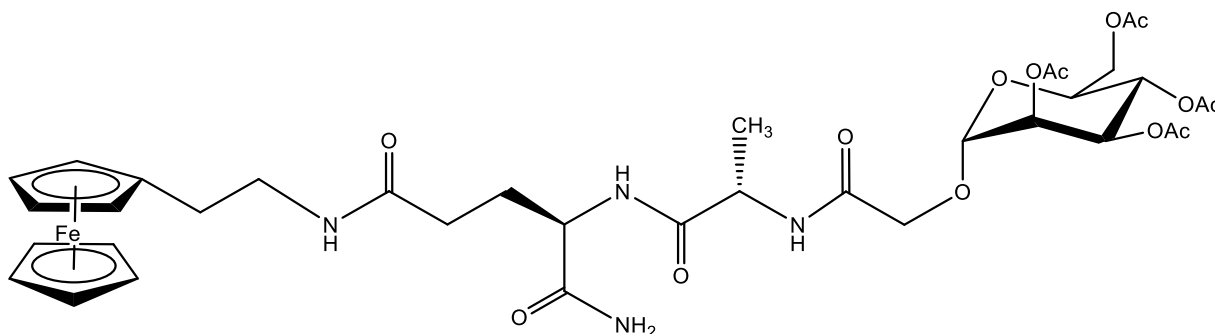
Spoj **12** se suspendira u smjesi otapala - suhi 1,4-dioksan i suhi DCM (1 : 1). Suspenzija se ohladi na 0-5 °C te se u nju potom dodaju HOBt (1,2 ekv.) i EDC×HCl (1,2 ekv.). Nakon 5-10 min miješanja na 0-5 °C, aktiviranom šećeru se doda prethodno pripravljena suspenzija spoja **8**, **9** ili **10** s TEA (2-3 ekv.) u smjesi otapala 1,4-dioksan i DCM. Reakcijska smjesa se miješa 30 min na 0-5 °C, nakon čega se zagrije na sobnu temperaturu i miješa 24 - 48 h. Tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu otapala DCM : MeOH = 5 : 1.

Po završetku reakcije, u reakcijsku smjesu se dodaje EtOAc i 0,5 M vodena otopina HCl-a. Organski sloj se odvoji te se potom ispere zasićenom vodenom otopinom NaHCO<sub>3</sub>. Organski sloj se suši na bezvodnom Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i zatim upari na rotacijskom uparivaču. Dobiveni upareni ostatak pročisti se kromatografijom na stupcu uz gradijentno eluiranje u sustavu otapala od DCM : MeOH = 20 : 1 do DCM : MeOH = 5 : 1.

#### 3.6.1. Priprava spoja **13** – N-[2-(ferocen-1-il)etan-1-il]-(4R)-4-[(2S)-2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)etanamido]propanamido}-4-karbamoilbutanamida

U otopinu spoja **12** (28 mg, 0,053 mmol), HOBt-a (9,7 mg, 0,064 mmol) i EDC×HCl-a (12,2 mg, 0,064 mmol) u smjesi suhog dioksana i diklormetana (5 mL) dodan je spoj **8** (61 mg, 0,13

mmol) suspendiran u smjesi diklormetana i dioksana (2 mL) i TEA (16  $\mu$ L, 0,12 mmol). Nakon završetka reakcije, njene obrade i kromatografskog čišćenja dobiven je spoj **13** (slika 31) u obliku žuto narančaste krutine (23 mg, 55 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR te spektrometrijom masa.



Slika 31: Strukturna formula molekule spoja **13**

$R_f = 0,63$  (DCM : MeOH = 5 : 1)

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 5,41 – 5,37 (m, 2H, H-2, H-3); 5,27 (t, 1H,  $J = 9,6$  Hz, H-4); 4,93 (s, 1H, H-1); 4,37 (q, 1H,  $J = 7,1$  Hz, CH, Ala); 4,32 – 4,07 (15H: 9H,  $9 \times$  CH, Fc; 2H,  $\text{CH}_2$ , acetilna poveznica; 2H,  $\text{CH}_2$ , H-6a6b; 1H, CH, *iso*Gln; 1H, H-5); 3,34 – 3,32 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 2,52 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 2,27 (t, 2H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 2,20 – 2,14 (m, 4H: 3H,  $\text{CH}_3$ , Ac; 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 2,06 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ , Ac); 2,03 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ , Ac); 1,97 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ , Ac); 1,94 – 1,89 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 1,43 (d, 3H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_3$ , Ala)

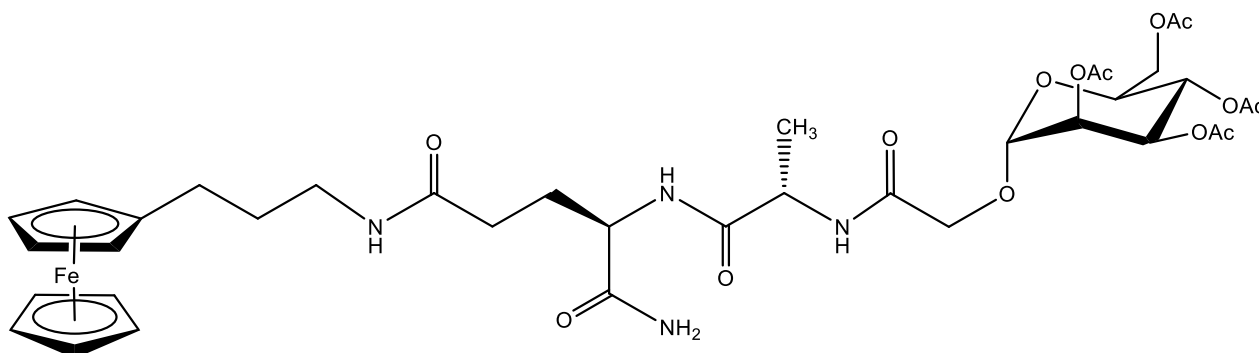
$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 177,40, 176,10, 175,80, 173,45, 172,60, 172,48 (C=O); 100,26 (C1); 87,94 (C, Fc); 71,68, 71,48, 71,37, 70,59, 70,30, 69,51, 68,17 (CH, Fc; C2 – C5); 68,52 (C6); 64,46 (acetilna poveznica); 55,19 (CH, *iso*Gln); 51,78 (CH, Ala); 42,85 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 34,28 ( $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 31,50 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 29,65 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 21,69, 21,67 ( $\text{CH}_3$ , Ac); 18,74 ( $\text{CH}_3$ , Ala)

**ESI-MS:**  $m/z$  817,25  $[\text{M}+\text{H}]^+$

3.6.2. Priprava spoja **14** – N-[3-(ferocen-1-il)propan-1-il]-(4R)-4-[(2S)-2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)etanamido]propanamido}-4-karbamoilbutanamida

U otopinu spoja **12** (140 mg, 0,265 mmol), HOBT-a (43 mg, 0,278 mmol) i EDC $\times$ HCl-a (53 mg, 0,064 mmol) u smjesi suhog dioksana i diklormetana (11 mL) dodan je spoj **9** (130 mg, 0,232 mmol) suspendiran u smjesi diklormetana i dioksana (11 mL) te TEA (81  $\mu$ L, 0,580 mmol). Nakon završetka reakcije, njene obrade i kromatografskog čišćenja dobiven je spoj **14**

(slika 32) u obliku gustog žutog ulja (134 mg, 69 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 32: Strukturna formula molekule spoja **14**

$R_f = 0,70$  (DCM : MeOH = 5 : 1)

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 5,40 – 5,37 (m, 2H, H-2, H-3); 5,27 (t, 1H,  $J = 9,6$  Hz, H-4); 4,90 (s, 1H, H-1); 4,40 – 4,12 (7H: 2H,  $\text{CH}_2$ , acetilna poveznica; 2H,  $\text{CH}_2$ , H-6a6b; 1H, CH, Ala; 1H, H5; 1H, CH, *iso*Gln); 4,09 – 4,03 (m, 9H,  $9 \times \text{CH}$ , Fc); 3,20 – 3,18 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 2,37 (t, 2H,  $J = 7,7$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 2,29 (t, 2H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 2,22 – 2,14 (m, 4H: 3H,  $\text{CH}_3$ , Ac; 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 2,06 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ , Ac); 2,03 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ , Ac); 1,97 – 1,90 (m, 4H: 3H,  $\text{CH}_3$ , Ac; 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 1,75 – 1,68 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ , poveznica ferocen-dipeptid); 1,43 (d, 3H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_3$ , Ala)

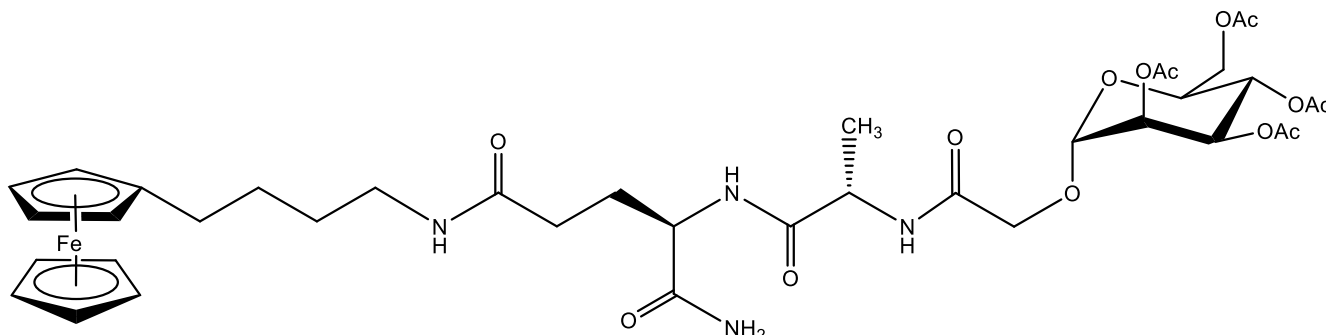
$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 176,45, 175,14, 174,95, 172,49, 171,64, 171,54 (C=O); 99,29 (C1); 89,68 (C, Fc); 70,71, 70,52, 70,40, 69,56, 69,18, 69,29, 67,21 (CH, Fc; C2 – C5); 67,55 (C6); 63,49 (acetilna poveznica); 54,22 (CH, *iso*Gln); 50,85 (CH, Ala); 40,50 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 33,33 ( $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 32,10 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 28,94 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 28,04 ( $\text{CH}_2$ , poveznica ferocen-dipeptid); 32,11, 29,94, 20,73, 20,71 ( $\text{CH}_3$ , Ac); 17,79 ( $\text{CH}_3$ , Ala)

**ESI-MS:**  $m/z$  831,30  $[\text{M}+\text{H}]^+$

3.6.3. Priprava spoja **15** – N-[4-(ferocen-1-il)butan-1-il]-(4R)-4-[(2S)-2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)etanamido]propanamido}-4-karbamoilbutanamida

U otopinu spoja **12** (57 mg, 0,108 mmol), HOBT-a (15 mg, 0,098 mmol) i EDC $\times$ HCl-a (23 mg, 0,120 mmol) u smjesi suhog dioksana i diklormetana (3 mL) dodan je spoj **10** (45 mg, 0,078 mmol) suspendiran u smjesi diklormetana i dioksana (3 mL) te TEA (40  $\mu\text{L}$ , 0,287 mmol).

Nakon završetka reakcije, njene obrade i kromatografskog čišćenja dobiven je spoj **15** (slika 33) u obliku gustog žutog ulja (36 mg, 54 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 33: Strukturna formula molekule spoja **15**

$R_f = 0,66$  (DCM : MeOH = 5 : 1)

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 5,41 – 5,37 (m, 2H, H-2, H-3); 5,27 (t, 1H,  $J = 9,6$  Hz, H-4); 4,93 (s, 1H, H-1); 4,35 (q, 1H,  $J = 7,2$  Hz, CH, Ala); 4,31 – 4,25 (m, 2H: 1H, CH, *iso*Gln; 1H, H-6b); 4,24 – 4,07 (14H: 9H,  $9 \times$  CH, Fc; 2H,  $\text{CH}_2$ , acetilna poveznica; 1H,  $\text{CH}_2$ , H-6a; 1H, H-5); 3,17 (t, 2H,  $J = 5,8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 2,36 (t, 2H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 2,27 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 2,20 – 2,14 (m, 4H: 3H,  $\text{CH}_3$ , Ac; 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 2,06 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ , Ac); 2,03 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ , Ac); 1,97 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ , Ac); 1,99 – 1,88 (m, 4H: 3H,  $\text{CH}_3$ , Ac; 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 1,53 – 1,51 (m, 4H,  $2 \times$   $\text{CH}_2$ , poveznica ferocen-dipeptid); 1,41 (d, 3H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_3$ , Ala)

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ /ppm: 176,45, 175,15, 174,92, 172,48, 171,61, 171,53 (C=O); 99,32 (C1); 90,22 (C, Fc); 70,73, 70,53, 70,43, 69,54, 69,22, 68,21 67,23 (CH, Fc; C2 – C5); 67,56 (C6); 63,51 (acetilna poveznica); 54,25 (CH, *iso*Gln); 50,85 (CH, Ala); 40,46 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 33,34 ( $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 30,39, 30,35, 29,70, 28,77 ( $4 \times$   $\text{CH}_2$ :  $2 \times$   $\text{CH}_2$ , *iso*Gln;  $2 \times$   $\text{CH}_2$ , poveznica ferocen-dipeptid); 20,74, 20,18 ( $\text{CH}_3$ , Ac); 17,78 ( $\text{CH}_3$ , Ala)

ESI-MS:  $m/z$  845,29 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$

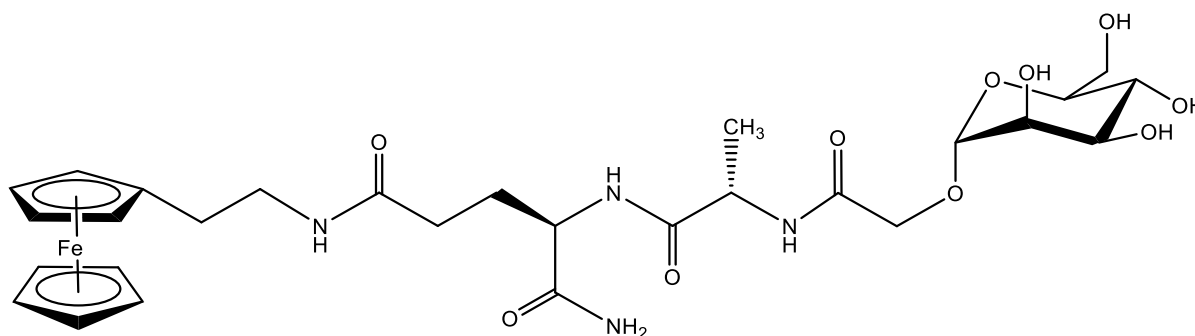
### 3.7. Općeniti postupak uklanjanja acetilne zaštitne skupine – Zemplénov postupak

Acetilirani ferocenski amid manoziliranog desmuramil dipeptida otopi se u 28-30 V suhog MeOH te se u otopinu doda 0,25 ekv. NaOMe ( $w = 25\%$ ). Reakcijska smjesa se miješa na sobnoj temperaturi 15 – 45 min u atmosferi argona. Tijek reakcije prati se TLC-om u sustavu otapala  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 5 : 1$  uz prskanje 10%-tnom sumpornom kiselinom uz zagrijavanje.

Po završetku reakcije, reakcijska smjesa se profiltrira preko silikagela na Sinter lijevku te se silikagel obilno ispere metanolom. Dobiveni filtrat upari se do suha na rotacijskom uparivaču i ispere DCM-om te ponovo upari na rotacijskom uparivaču.

3.7.1. Priprava spoja **16** – N-[2-(ferocen-1-il)etan-1-il]-(4R)-4-[(2S)-2-(*a*-D-manopiranoziloksi)etanamido]propanamido}-4-karbamoilbutanamida

Iz spoja **13** (60 mg, 0,074 mmol) postupkom uklanjanja acetilne skupine opisanim u prethodnom poglavlju pripravljen je spoj **16** (slika 34) u obliku žutog ulja (40 mg, 84 %).



Slika 34: Strukturna formula molekule spoja **16**

$R_f = 0,42$  ( $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 5 : 1$ )

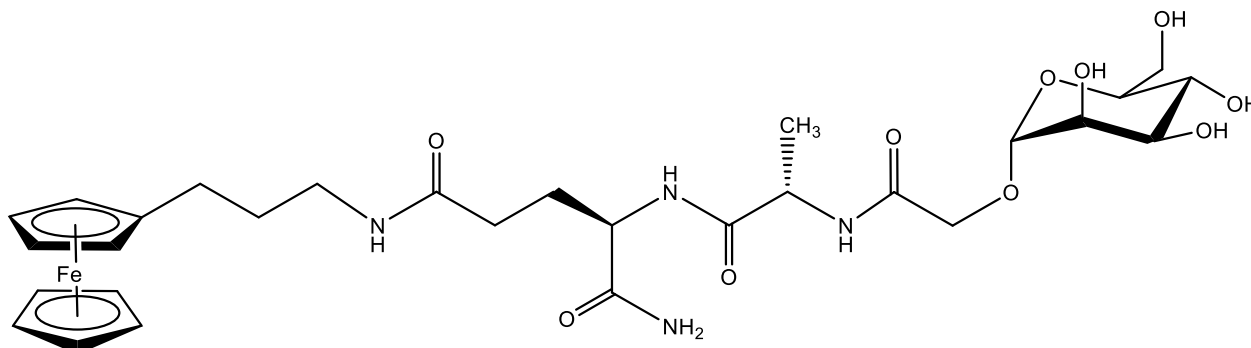
$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 4,86 (s, 1H, H-1); 4,40 (q, 1H,  $J = 7,0$  Hz, CH, Ala); 4,31 (dd, 1H,  $J = 4,0$  Hz,  $J = 8,8$  Hz, CH, *iso*Gln); 4,22 (d, 1H,  $J_{\text{gem}} = 15,2$  Hz,  $\text{CH}_2$ , acetilna poveznica); 4,13 – 4,07 (m, 10H: 9H,  $9 \times \text{CH}$ , Fc; 1H,  $\text{CH}_2$ , acetilna poveznica); 3,95 (s, 1H, H-2); 3,84 (d, 1H,  $J_{1,2} = 11,4$  Hz, H-2); 3,79 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 9,1$  Hz,  $J_{2,3} = 3,4$  Hz, H-3); 3,69 (dd, 1H,  $J_{6a,6b} = 11,6$  Hz,  $J_{5,6b} = 5,8$  Hz, H-6a); 3,61 (t, 1H,  $J = 9,4$  Hz, H-4); 3,56 – 3,55 (m, 1H, H-5); 3,34 – 3,31 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 2,51 (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 2,26 (t, 2H,  $J = 7,7$  Hz,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 2,20 – 2,11 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 1,95 – 1,89 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 1,41 (d, 3H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_3$ , Ala)

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 176,39, 174,99, 174,78, 172,01 (C=O); 101,83 (C1); 87,01 (C, Fc); 75,47, 72,49, 71,79, 69,66, 69,36, 68,66, 68,57 (CH, Fc; C2 – C5); 66,95 (C6); 62,97 ( $\text{CH}_2$ , acetilna poveznica); 54,16 (CH, *iso*Gln); 50,56 (CH, Ala); 41,88 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 33,31 ( $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 30,56 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 28,88 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 18,11 ( $\text{CH}_3$ , Ala)

**ESI-MS:**  $m/z$  649,30 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$

3.7.2. Priprava spoja **17** – N-[3-(ferocen-1-il)propan-1-il]-(4R)-4-[(2S)-2-(*a*-D-manopiranoziloksi)etanamido]propanamido}-4-karbamoilbutanamida

Iz spoja **14** (105 mg, 0,128 mmol) prethodno opisanim Zemlenovim postupkom uklanjanja acetilne zaštitne skupine pripravljen je spoj **17** (slika 35) u obliku žutog gustog ulja (66 mg, 79 %).



Slika 35: Strukturna formula molekule spoja **17**

$R_f = 0,39$  ( $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 5 : 1$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 4,83 (d, 1H,  $J_{1,2} = 1,6$  Hz, H-1); 4,40 (q, 1H,  $J = 7,1$  Hz, CH, Ala); 4,22 (dd, 1H,  $J = 4,5$  Hz,  $J = 9,3$  Hz, CH, *iso*Gln); 4,19 (d, 1H,  $J_{\text{gem}} = 15,2$  Hz,  $\text{CH}_2$ , acetilna poveznica); 4,11 – 4,03 (10H:  $9 \times \text{CH}$ , Fc; 1H,  $\text{CH}_2$ , acetilna poveznica); 3,95 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 3,4$  Hz,  $J_{1,2} = 1,7$  Hz, H-2); 3,84 (dd, 1H,  $J_{6a,6b} = 11,8$  Hz,  $J_{5,6a} = 2,2$  Hz, H-6b); 3,78 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 9,1$  Hz,  $J_{2,3} = 3,4$  Hz, H-3); 3,69 (dd, 1H,  $J_{6a,6b} = 12,6$  Hz,  $J_{5,6b} = 6,3$  Hz, H-6a); 3,61 (t, 1H,  $J = 9,4$  Hz, H-4); 3,57 – 3,52 (m, 1H, H-5); 3,20 – 3,16 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 2,37 (t, 2H,  $J = 7,7$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 2,28 (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 2,21 – 2,15 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 1,98 – 1,87 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 1,74 – 1,67 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ , poveznica ferocen-dipeptid); 1,41 (d, 3H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_3$ , Ala)

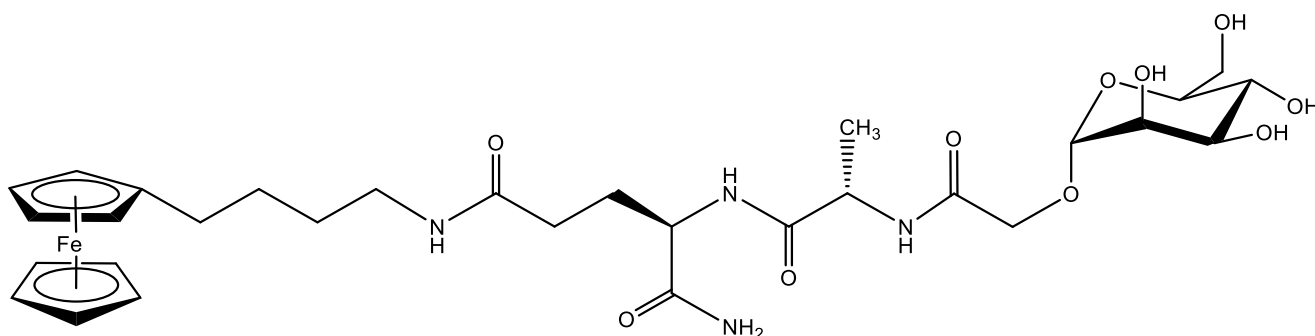
$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 176,40, 174,99, 174,89, 172,02 (C=O); 101,84 (C1); 89,67 (C, Fc); 75,47, 72,49, 71,89, 69,55, 69,17, 68,67, 69,28 (C2-C5; CH, Fc); 66,95 (C6); 62,70 ( $\text{CH}_2$ , acetilna poveznica); 54,16 (CH, *iso*Gln); 50,57 (CH, Ala); 40,49 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 33,31 ( $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 31,91 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 28,93 ( $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 28,06 ( $\text{CH}_2$ , poveznica ferocen-dipeptid); 18,11 ( $\text{CH}_3$ , Ala)

**ESI-MS:**  $m/z$  663,30  $[\text{M}+\text{H}]^+$

3.7.1. Priprava spoja **18** – N-[3-(ferocen-1-il)butan-1-il]-(4R)-4-[(2S)-2-(*a*-D-manopiranoziloksi)etanamido]propanamido}-4-karbamoilbutanamida

Iz spoja **15** (88 mg, 0,104 mmol) Zemlenovim postupkom uklanjanja acetilne zaštitne skupine pripravljen je spoj **18** (slika 36) u obliku žutog ulja (68 mg, 97 %).



Slika 36: Strukturna formula molekule spoja **18**

$R_f = 0,54$  ( $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 5 : 1$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 4,89 – 4,83 (m, 1H, H-1); 4,30 (q, 1H,  $J = 7,1$  Hz, CH, Ala); 4,21 (dd, 1H,  $J = 4,5$  Hz,  $J = 9,3$  Hz, CH, *iso*Gln); 4,12 (d, 1H,  $J_{\text{gem}} = 15,2$  Hz,  $\text{CH}_2$ , acetilna poveznica); 4,01 – 3,92 (10H:  $9 \times \text{CH}$ , Fc; 1H,  $\text{CH}_2$ , acetilna poveznica); 3,86 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 3,4$  Hz,  $J_{1,2} = 1,7$  Hz, H-2); 3,75 (dd, 1H,  $J_{6a,6b} = 11,8$  Hz,  $J_{5,6a} = 2,1$  Hz, H-6b); 3,69 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 9,2$  Hz,  $J_{2,3} = 2,6$  Hz, H-3); 3,60 (dd, 1H,  $J_{6a,6b} = 11,8$  Hz,  $J_{5,6b} = 5,9$  Hz, H-6a); 3,52 (t, 1H,  $J = 10,0$  Hz, H-4); 3,47 – 3,43 (m, 1H, H-5); 3,07 (t, 2H,  $J = 6,2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 2,26 (t, 2H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 2,17 (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 2,10 – 2,03 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 1,87 – 1,80 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , *iso*Gln); 1,43 – 1,41 (t, 4H,  $J = 3,4$  Hz,  $2 \times \text{CH}_2$ , poveznica ferocen-dipeptid); 1,30 (d, 3H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_3$ , Ala)

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 176,38, 174,97, 174,82, 171,99 (C=O); 101,80 (C1); 60,14 (C, Fc); 75,41, 72,46, 71,75, 69,50, 69,18, 68,62, 68,17 (C2-C5; CH, Fc); 66,93 (C6); 62,93 ( $\text{CH}_2$ , acetilna poveznica); 54,16 (CH, *iso*Gln); 50,54 (CH, Ala); 40,42 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 33,30 ( $\text{CH}_2\text{Fc}$ ); 30,35, 30,31, 29,66, 28,92 ( $4 \times \text{CH}_2$ :  $2 \times \text{CH}_2$ , *iso*Gln;  $2 \times \text{CH}_2$ , poveznica ferocen-dipeptid); 18,11 ( $\text{CH}_3$ , Ala)

ESI-MS:  $m/z$  677,30  $[\text{M}+\text{H}]^+$

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Uvod

Metodama opisanim u sklopu ovog diplomskog rada pripravljena su tri ferocenska amidna derivata desmuramil-dipeptida s varirajućom duljinom alkilnog lanca između ferocena i ostatka molekule ( $n = 2, 3, 4$ ). Na tako pripravljene ferocenske amidne derivate desmuramil-dipeptida dodatno je uvedena manozna podjedinice na *N*-kraj dipeptidnog dijela molekule. Desmuramil-dipeptid je strukturno modificiran kako bi se poboljšala njegova biološka aktivnost i smanjio udio neželjenih nuspojava koje su posljedica adjuvantskog djelovanja samog desmuramil-dipeptida. Vežanjem manozne podjedinice povećava se imunostimulatorna aktivnost derivata zbog interakcije manozne s MBP receptorima prisutnima na površini stanica imunskog sustava, što je potvrđeno u ranije provedenim istraživanjima na Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.<sup>17-19</sup> Uvođenjem lipofilnog fragmenta u strukturu molekule desmuramil-dipeptida poboljšava se pasivni prijenos ciljnih molekula preko stanične membrane zbog povećane lipofilnosti ciljne molekule. Potvrdu navedenog također nalazimo u ranijim istraživanjima u kojima je kao lipofilna podjedinica korišten adamantan. U ovome radu po prvi je puta opisano uvođenje ferocena kao lipofilne podjedinice u strukturu molekule desmuramil-dipeptida koji je, osim zbog lipofilnosti, odabran i zbog njegovih otprije poznatih dobrih bioloških učinaka.

Za sintezu ciljnih molekula odabran je konvergentni pristup (slika 37) što uključuje pripremu molekulskih fragmenata – ferocenskog amina, zaštićene manozne podjedinice te zaštićenog desmuramil-dipeptida, koji se zatim povezuju odgovarajućim redoslijedom amidnim vezama u ciljne molekule.

Početni dipeptid **1** pripremljen je uklanjanjem benzilne zaštitne skupine s komercijalno dostupnog dipeptida Boc-L-Ala-D-*iso*Gln(OBn) reakcijom katalitičke hidrogenolize u Parrovom uređaju uz paladij na ugljiku kao katalizator.

Amin **2**, 2-(ferocen-1-il)etanamin pripremljen je u jednom reakcijskom koraku i to redukcijom ferocenacetonitrila uz pomoć litijevog aluminijevog hidrida.

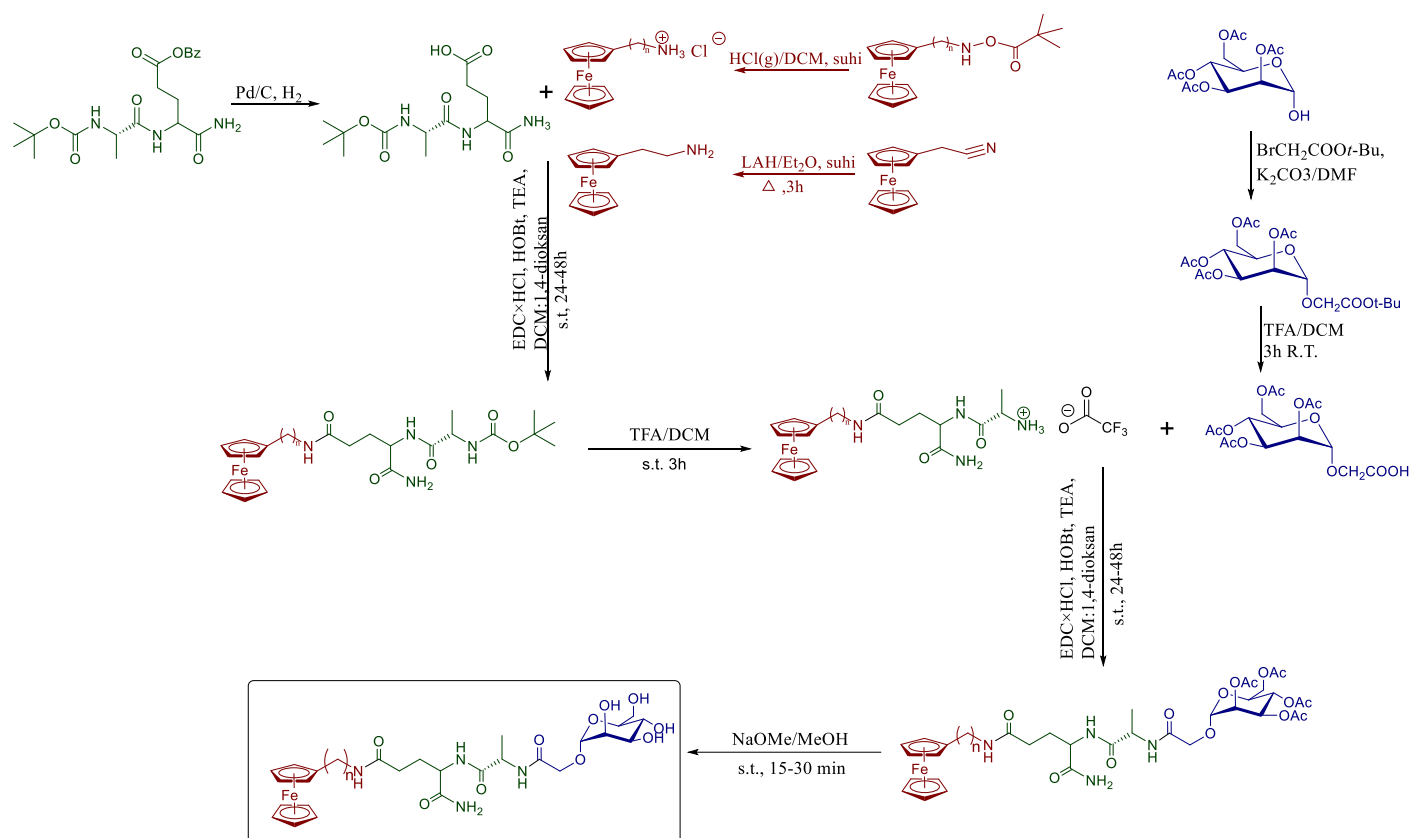
Amini **3**, 3-(ferocen-1-il)propanamin, i **4**, 4-(ferocen-1-il)butanamin, pripravljene su iz odgovarajućih prethodno pripremljenih Boc zaštićenih amina uklanjanjem zaštitne skupine koje je provedeno uvođenjem plinovitog klorovodika u otopinu spoja u diklormetanu.

Reakcijom kondenzacije dipeptida **1**, Boc-L-Ala-D-*iso*Gln, i ferocenskih amina **2-4** pripremljeni su ferocenski amidni derivati Boc-zaštićenog desmuramil-dipeptida **5-7**. Korištena je metoda amidacije uz odgovarajući karbodiimidni kondenzacijski reagens za aktivaciju karboksilne skupine, konkretno EDC×HCl, i HOBt kao aditiv. Na ovaj su način amidnom vezom povezani dipeptidni i ferocenski fragment konačnih ciljnih molekula.

Zaštićenim ferocenskim amidnim derivatima desmuramil-dipeptida, spojevima **5-7**, u idućom su koraku u kiselim uvjetima dodatkom trifluoroctena kiseline (TFA) uklonjene Boc zaštitne skupine s *N*-kraja alanina desmuramil-dipeptidnog fragmenta. Dobiveni spojevi **8-10** izolirani su u obliku trifluoracetatnih soli. Time je na *N*-kraju spojeva **8-10** dobivena slobodna amino-skupina potrebna za reakciju amidacije s prethodno pripremljenom manoznom podjedinicom **12** u čijoj je strukturi prisutna slobodna karboksilna skupina. Benzilima zaštićena manozna podjedinica u obliku karboksilne kiseline, spoj **12**, pripravljena je iz odgovarajućeg *tert*-butilnog estera **11** uklanjanjem *tert*-butilne zaštitne skupine dodatkom trifluoroctene kiseline. Spoj **11** pripremljena je literaturno opisanom postupkom iz 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoze reakcijom s *tert*-butil-bromacetatom u lužnatom mediju što su uvjeti Williamsonove sinteze etera.

Spojevi **13-15** pripremljeni su reakcijom amidacije zaštićene manozne podjedinice **12** i ferocenskih amida desmuramil-dipeptida, spojeva **8-10**, u sličnim uvjetima kao i prethodna reakcija amidacije, dodatkom DC×HCl kao reagensa za aktivaciju karboksilne skupine na manoznoj podjedinici uz HOBt kao aditiv.

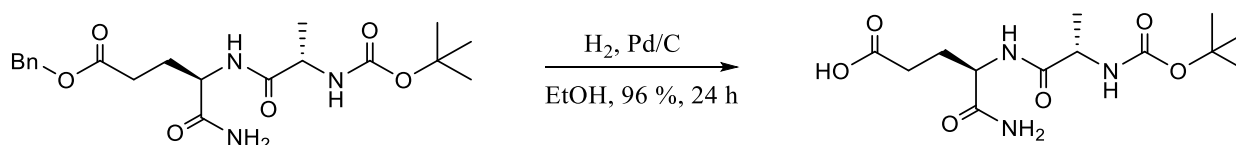
Konačni produkti - ferocenski amidni derivati manoziliranog desmuramil-dipeptida s varirajućim duljinama ugljikovog lanca između ferocena i ostatka molekule, spojevi **16-18**, pripremljeni su uklanjanjem sve četiri acetilne zaštitne skupine s manozne podjedinice spojeva **13-15** u jednom koraku Zemlénovim postupkom, dodatkom natrijeva metoksida u metanolu u otopinu spoja u suhom metanolu.



Slika 37: Shema sintetskog puta priprave ciljnih molekula diplomskog rada **16-18**, ferocenskih amida manoziliranog desmursamil-dipeptida

#### 4.1. Uklanjanje benzilne zaštite s Boc-L-Ala-D-isoGln-(OBn)

Derivat desmuramil-dipeptida sa slobodnom karboksilnom skupinom na bočnom lancu izoglutamina, Boc-L-Ala-D-isoGln **1**, pripremljen je iz komercijalno dostupnog zaštićenog Boc-L-Ala-D-isoGln-(OBn) uklanjanjem esterske benzilne zaštitne skupine postupkom katalitičke hidrogenolize u Parrovom uređaju uz paladij na ugljenu kao katalizator. Reakcija je u navedenim uvjetima bila kvantitativna te nije bilo potrebe za dodatnim kromatografskim pročišćavanjem finalnog produkta koji je iz reakcijske smjese izoliran u iznimno visokom iskorištenju od 97 %. Kvantitativno uklanjanje, ali i uvođenje zaštitnih skupina, iznimno je važno u organskoj sintezi, što je u ovome slučaju još dodatno izraženo s obzirom na visoku cijenu polaznog zaštićenog desmuramil-dipeptida Boc-L-Ala-D-isoGln-(OBn).



Slika 38: Shematski prikaz uklanjanja benzilne zaštite s komercijalno dostupnog Boc-L-Ala-D-isoGln(OBn) – priprava spoja **1**

Na ovaj je način dobivena slobodna karboksilna skupina na bočnom ogranku izoglutaminske komponente desmuramil-dipeptida dipeptida potrebna za reakciju amidacije s amino-skupinom ferocenskih amina.

#### 4.2. Priprava ferocenskih amina 2-4

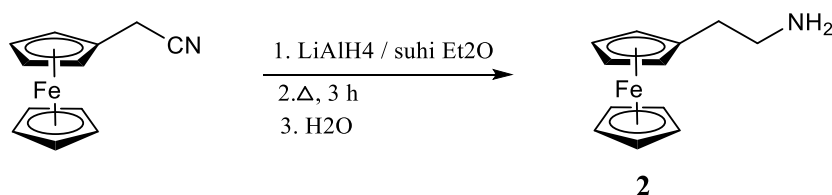
Prije kondenzacije ferocenskog amina s dipeptidnim fragmentom bilo je potrebno pripremiti ferocenske amine spojeve **2-4**. Tako je amin **2**, 2-(1-ferocen-1il)etanamin, pripremljen reakcijom redukcije iz ferocenacetonitrila, dok su amini **3**, 3-(ferocen-1-il)propanamin, i **4**, 4-(ferocen-1-il)butanamin, priređeni iz odgovarajućeg Boc zaštićenog ferocenskog amina.

##### 4.2.1. Priprava ferocenskog amina **2** redukcijom iz odgovarajućeg nitrila

Priprava primarnih amina iz nitrila provodi se u reduktivnim uvjetima. U sklopu rada isprobane su reakcija redukcije polaznog ferocenacetonitrila u uvjetima katalitičkog hidrogeniranja i redukcija uz dodatka litijeva aluminijeva hidrida (LAH).

Katalitičko hidrogeniranje ferocenacetonitrila provedeno je u Parrovom uređaju pri čemu su kao katalizatori korišteni platinin(IV) oksid, PtO<sub>2</sub>, i paladij na ugljenu. U slučaju prve metode hidrogeniranja uz PtO<sub>2</sub> kao katalizator, u reakcijskoj smjesi je nastao ciljani produkt **2**, ali isti nije izoliran u zadovoljavajućem iskorištenju (14 %). Drugom metodom u kojoj je korišten paladij na ugljenu kao katalizator u opisanim uvjetima nije uočeno nastajanje ciljanog produkta.

Zadovoljavajućom metodom pokazala se redukcija uz LAH kao reducens (slika 39). Navedena reakcija provedena je uz zadovoljavajuće iskorištenje od 64 % nakon kromatografskog pročišćavanja te je produkt strukturno okarakteriziran spektroskopskim metodama. Važno je istaknuti da korištenje LAH-a zahtijeva dodatan oprez prilikom rukovanja ovim reagensom. Naime, za LAH je karakteristično da iznimno burno reagira s vodom uz oslobađanje vodika. S druge strane, dodavanje vode nakon završetka reakcije u fazi obrade reakcijske smjese je nužno kako bi se uklonio neizreagirani LAH. Takvo dodavanje vode provodi se postepeno uz konstantno hlađenje reakcijske smjese. Iz istog razloga, reakcija mora biti provedena u suhom otapalu, što je u ovom slučaju bio suhi eter. Također važno je reakcijsku smjesu dekantirati da bi se uklonile razne aluminijeve i litijeve soli nastale prilikom dodatka vode i raspadom LAH-a, koje su netopljive u eteru.



Slika 39: Shematski prikaz priprave spoja **2**

#### 4.2.2. Priprava soli ferocenskih amina **3** i **4** uklanjanjem zaštitne Boc skupine sa zaštićenih ferocenskih amina

Karbamatna (uretanska) Boc zaštitna skupina služi za zaštićivanje amino-skupine i u pravilu se uklanja u kiselim reakcijskim uvjetima. U ovome radu Boc zaštitna skupina uklanjana je u dva sintetska koraka – sa zaštićenih ferocenskih amina da bi se dobili amini **3** i **4** i s *N*-kraja ferocenskih dipeptida **5-7** čime su dobiveni spojevi **8-10** (poglavlje 4.4., slika 43). U oba slučaja dobiveni produkti izolirani su u obliku odgovarajućih amonijevih soli.

Reakcija uklanjanja Boc zaštitne skupine sa zaštićenih ferocenskih amina s tri i četiri metilenske skupine u svrhu priprave spojeva **3** i **4** provedena je uvođenjem plinovitog

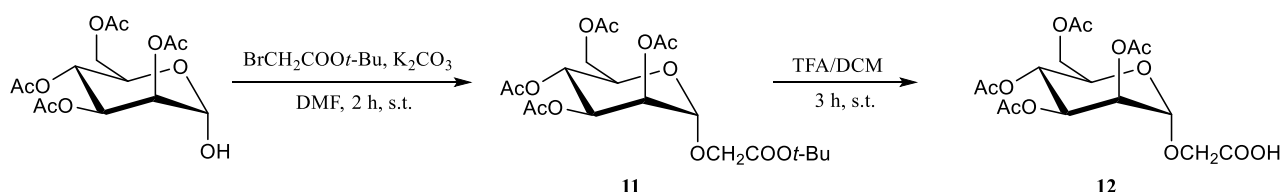
klorovodika u otopinu zaštićenih amina u suhom DCM-u. Plinoviti klorovodik dobiven je reakcijom natrijevog klorida s koncentriranom sumpornom kiselinom. Reakcija nije bila kvantitativna što je uočeno tankoslojnom kromatografijom gdje je na kromatografskim pločicama zaostajala mrlja polaznog zaštićenog ferocenskog amina. Ova činjenica nikako nije idealna obzirom da bi reakcije uklanjanja zaštitnih skupina trebale ići u što većem, po mogućnosti kvantitativnom iskorištenju. Postupak pripreve spojeva **3** i **4** proveden je više puta, a iskorištenja reakcije nakon kromatografskog pročišćavanja na stupcu varirala su od 58-74 %.



Slika 40: Shematski prikaz reakcije uklanjanja Boc zaštitne skupine – priprava spojeva **3** i **4**

### 4.3. Priprava manozne podjedinice

Manokonjugat **12** pripremljen je u dva sintetska koraka iz prethodno pripremljene 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoze. Najprije je provedena Williamsonova sinteza etera koja je uključivala reakciju slobodnu anomerne hidroksilne skupine i *tert*-butil-bromacetatom u baznim uvjetima, u našem slučaju to je bio kalijev karbonat, kojom je dobiven ester **11**. Prinos reakcije pripreve spoja **11** nakon kromatografskog pročišćavanja bio je relativno nizak (52 %), međutim kako se radi se o iznimno jeftinim početnim spojevima za navedenu reakciju, manje iskorištenje ne predstavlja problem na skali pri kojoj je reakcija provedena. Sljedeća reakcija hidrolize *tert*-butilnog estera **11** išla je kvantitativno dajući nakon kromatografskog pročišćavanja produkt **12**. Spojevi **11** i **12** strukturno su okarakterizirani spektroskopijom NMR.

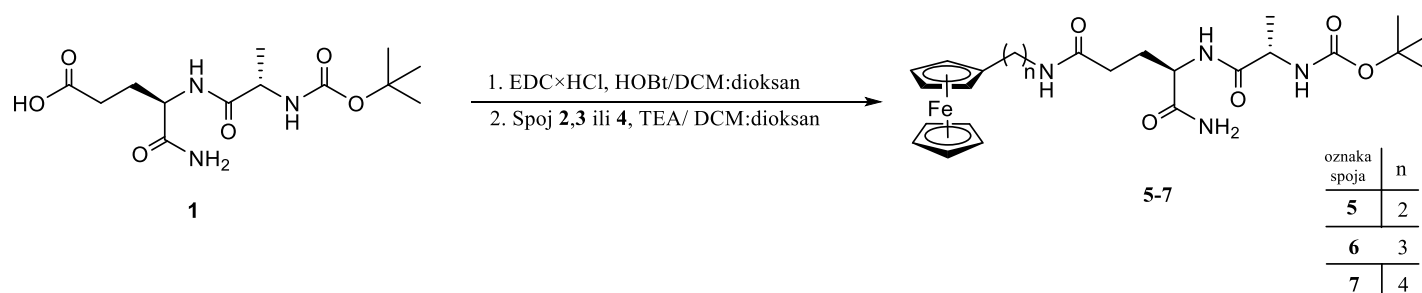


Slika 41: Shematski prikaz pripreve spoja **12** iz spoja **11**

#### 4.4. Kondenzacijske reakcije priprave ferocenskih amidnih derivata desmuramil-dipeptida

Ferocenski amidi desmuramil-dipeptida **6-8** pripravljeni su reakcijom amidacije iz prethodno pripravljenog zaštićenog dipeptidnog derivata **1** i ferocenskih amina **2-5** uz EDC×HCl kao kondenzacijski reagens. Ferocenski amini **3** i **4** korišteni su u obliku hidrokloridnih soli, dok je amin **2**, pripremljen redukcijom iz odgovarajućeg nitrila, korišten u deprotoniranom obliku. Također, obzirom da dipeptid **1** koji sudjeluje u ovom reakcijskom stupnju sadrži kiralne ugljikove atome neposredno pored karbonilnih skupina, bilo je potrebno koristiti HOBt kao aditiv. Kao baza u reakcijama kondenzacije amina **2-4** s dipeptidom korišten je trietilamin (TEA) koji u reakciji s HCl-om tvori sol te omogućuje aktivaciju EDC-om. Osim vezanja HCl-a, budući da su ferocenski amini **3** i **4** izolirani su u obliku hidrokloridnih soli, TEA je služio i deprotoniranju ferocenskih amina.

Prilikom početne reakcije aktivacije karboksilne kiseline bočnog ogranka dipeptida, moguć je nastanak *N*-acilizouree kao nusprodukta. Kako bi se u što je većoj mjeri moguće izbjegla ova reakcija, aktivacija karboksilne kiseline i reakcija kondenzacije provedena je na samom početku pri nižim temperaturama.



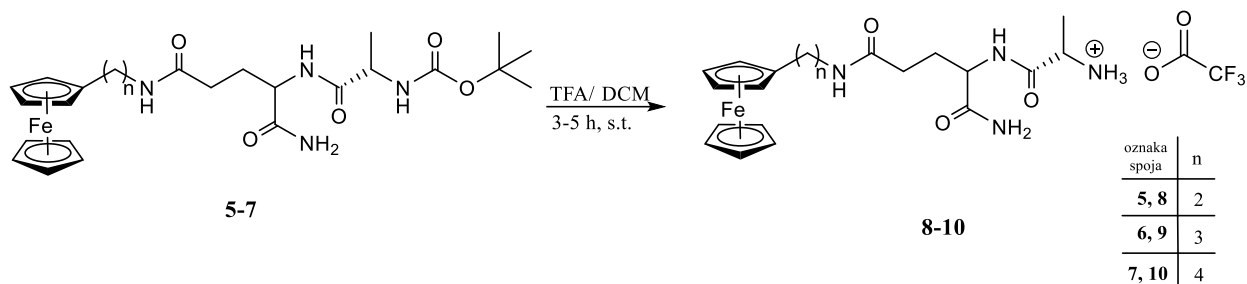
Slika 42: Shematski prikaz reakcije priprave spojeva **5-7** iz peptidnog prekursora **1** te ferocenskih amina **2-4**

Zanimljivo je uočiti da kod kondenzacije amina **2** s dipeptidom, uzmemo li u obzir da ferocenski amin **2** s dvije metilenske skupine nije izoliran u obliku hidrokloridne soli, dodatak znatne količine TEA nije uzrokovao racemizaciju konačnog produkta **5**. Ovaj je konjugat izoliran u najvećem iskorištenju (88 %) pri čemu se može zaključiti da povećana količina baze zapravo pogoduje reakciji kondenzacije.

Prije reakcije kondenzacije ferocenskih amida desmuramil-dipeptida **5-8** i manozne podjedinice **12**, bilo je potrebno ukloniti Boc zaštitnu skupinu s *N*-kraja alanina spojeva **5-8**. Boc zaštitnu skupinu bilo je potrebno ukloniti kako bi se dobila slobodna amino-skupina koja bi dalje mogla reagirati s karboksilnom skupinom zaštićene manozne podsjedinice, spoja **12**. U



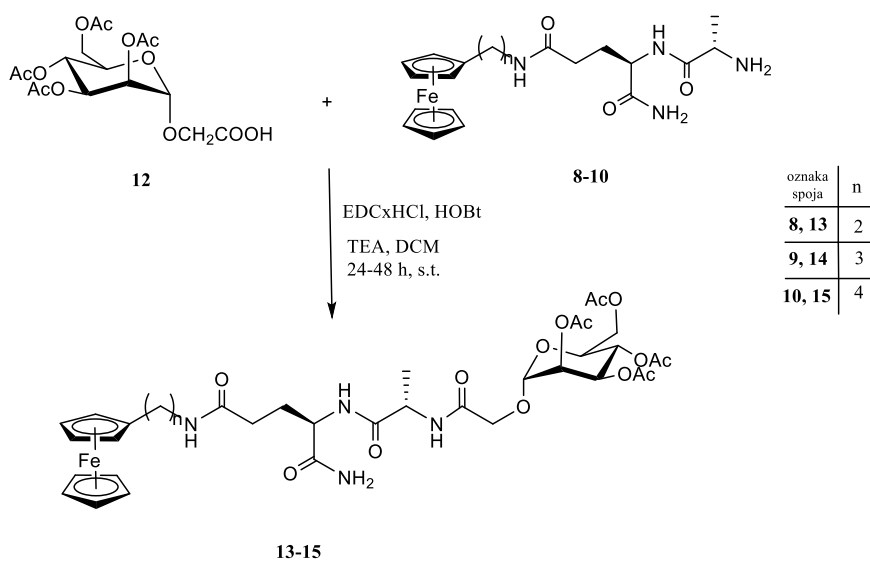
ovome slučaju reakcije uklanjanja zaštitne Boc skupine sa spojeva **5-8** provodile su se dodatkom TFA u suhom DCM-u. Produkti ovih reakcija, spojevi **8-10**, izolirani su u obliku trifluoracetatnih soli u kvantitativnom prinosu.



Slika 43: Shematski prikaz reakcije pripreme spojeva **8-10** uklanjanjem Boc zaštitne skupine sa spojeva **5-7**

#### 4.5. Reakcija kondenzacije manozne podjedinice s ferocenskim amidnim derivatom desmuramil dipeptida

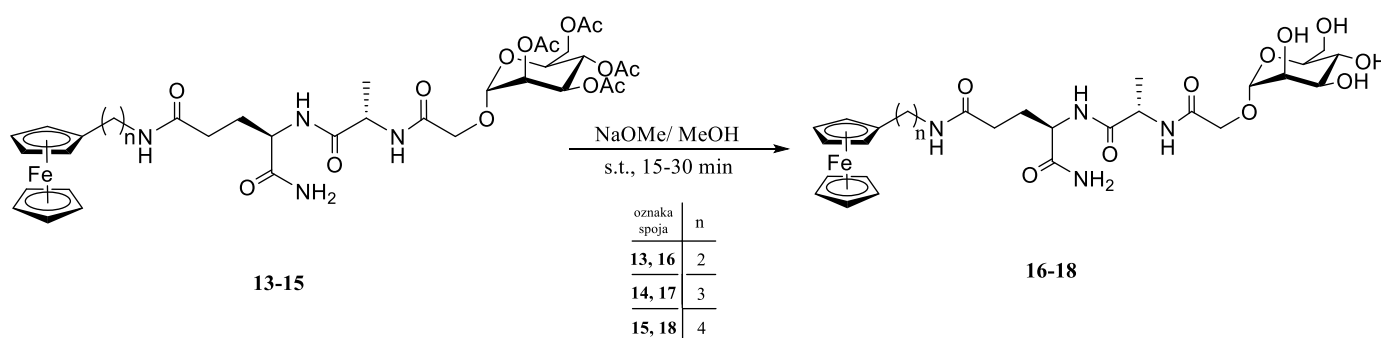
Reakcije kondenzacije zaštićene manozne podjedinice **12** s ferocenskim amidnim derivatima desmuramil-dipeptida **8-10** provodene su uz EDCxHCl kao kondenzacijski reagens za aktivaciju šećerne kiseline te HOBt kao aditiv, dakle u istim uvjetima kao i prethodne reakcije amidacije kojima su dobiveni spojevi **5-7**. Kao baza korišten je TEA. Količine reagensa i uvjeti provođenja reakcija međusobno su se razlikovali. Produkti **13-15** izolirani su u nešto nižem iskorištenju nego što je to slučaj kod prethodne kondenzacijske reakcije desmuramil-dipeptida **1** s ferocenskim aminima **2-4** kojom su dobiveni spojevi **5-7**.



Slika 44: Shematski prikaz reakcije pripreme spojeva **13-15** kondenzacijom manozne podjedinice **12** i spoja **8-10**

#### 4.6. Uklanjanje acetilnih zaštitnih skupina Zemplénovim postupkom

Nakon uspješne pripreve ferocenskih amidnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida **13-15**, bilo je potrebno pronaći odgovarajuću metodu za uklanjanje acetilnih zaštitnih skupina s manozne podjedinice. Kao prikladna opcija pokazao se Zemplénov postupak jer je omogućio uklanjanje sve četiri zaštitne skupine u jednom koraku bez ugrožavanja ostalih funkcijskih skupina ciljnih molekula. Zemplénov postupak podrazumijeva dodatak metanolne otopine natrijeva metoksida u otopine spojeva **13-15** u suhom metanolu te su njime uspješno otklonjene sve četiri acetilne zaštitne skupine. Reakcije su provedene uz visoka iskorištenja od 80-100 % te je produkt iz reakcijske smjese izoliran bez potrebe za dodatnim kromatografskim pročišćavanjem. Međutim, s obzirom da je konačna svrha pripreve ciljnih molekule **16-18** biološko testiranje, spojevi su ipak kromatografski pročišćeni. U sva tri slučaja reakcija je provedena na sobnoj temperaturi i bila je iznimno brza (15-30 min). Treba naglasiti da navedena reakcija zadovoljava sve glavne kriterije idealne reakcije uklanjanja zaštitnih skupina: brza je, provodi se u blagim reakcijskim uvjetima uz vrlo visok do kvantitativan prinos i jednostavnu obradu reakcijske smjese i izolaciju produkta. Na ovaj način su pripravljene ciljne molekule dostatne čistoće za ispitivanja željene biološke aktivnosti.



Slika 45: Shema reakcije uklanjanja acetilnih zaštitnih skupina spoja **13-15** – pripreva spojeva **16-18**

## § 5. ZAKLJUČAK

1. Ferocenski aaminski prekursori 3-(ferocen-1-il)propanamin **3** te 4-(ferocen-1-il)butanamin **4** pripremljeni su reakcijom uklanjanja Boc zaštitne skupine u kiselim reakcijskim uvjetima (plinoviti klorovodik) s prethodno pripremljenih zaštićenih amina u zadovoljavajućem iskorištenju (58 % za spoj **3**, 74 % za spoj **4**). Ferocenski aaminski prekursor 2-(ferocen-1-il)etanamin **2** pripremljen je redukcijom uz dodatak litijeva tetrahidroaluminata ( $\text{LiAlH}_4$ ) iz ferocenacetitrila (64 %).
2. Uspješno je provedeno uklanjanje benzilne esterske zaštitne skupine s Boc-L-Ala-D-*iso*Gln(OBn) u uvjetima katalitičke hidrogenolize te je pripremljen peptidni prekursor **1**, Boc-L-Ala-D-*iso*Gln, u visokom iskorištenju (97 %).
3. Provedene su uspješno reakcije kondenzacije prethodno pripremljenih ferocenskih amina **2-4** s peptidnim prekursorom **1** uz EDC·HCl kao kondenzacijski reagens, HOBt kao aditiv te TEA kao bazu te su dobiveni spojevi **5-7** (88 % za spoj **5**, 78 % za spoj **6**, 71 % za spoj **7**).
4. Reakcija uklanjanja Boc zaštite s peptidnog kraja ferocenskih amidnih derivata desmuramil-dipeptida **5-7** provedena je u kiselim reakcijskim uvjetima (trifluoroctena kiselina) pri čemu su nastali produkti **8-10** u obliku odgovarajućih soli te su izolirani uz kvantitativno iskorištenje. (spoj **8**, **9** i **10**)
5. Reakcijom 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoze s *tert*-butil-bromoacetatom pripremljen je manozni prekursor *tert*-butil-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetat **11** (52 %), kojem je u reakciji s trifluoroctenom kiselinom uspješno uklonjena *tert*-butilna esterska skupina te je kvantitativno priređen spoj **12**, 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octena kiselina.
6. Reakcijom ferocenskih amidnih derivata desmuramil-dipeptida **8-10** s manoznom podjedinicom **12** pripremljeni su acetatima zaštićeni manokonjugati **13-15** u prihvatljivom iskorištenju (55 % za spoj **13**, 69 % za spoj **14**, 54 % za spoj **15**).
7. Ciljne molekule ovog rada, ferocenski amidni derivati manoziliranog desmuramil-dipeptida **16-18**, priređeni su uklanjanjem acetilnih zaštitnih skupina s manozne podjediniče spojeva **13-15** Zemlénovim postupkom (dodatak natrijeva metoksida u otopinu spoja u suhom metanolu), u visokom iskorištenju (84 % za spoj **16**, 79 % za spoj **17**, 97 % za spoj **18**)

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Ala	alanin
Bn	benzil
Boc	<i>t</i> -butiloksikarbonil
CARD	domena za regrutaciju kaspaze (engl. <i>caspase activation and recruitment domain</i> )
CLR	C-tip receptora za lektin (engl. <i>C-type lectin receptors</i> )
DCM	diklormetan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMP	desmuramil-dipeptid
EDC·HCl	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilkarbodiimid-hidroklorid
EtOAc	etil-acetat
EtOH	etanol
Fc	ferocen
HOBt	1-hidroksi-1 <i>H</i> -benzotriazol
<i>iso</i> Gln	izoglutamin
LAH	iitijev tetrahidroaluminat
LRR	domena bogata leucinom (engl. <i>leucine repeat rich domain</i> )
MDP	muramil-dipeptid
MeOH	metanol
NaOMe	natrijev metoksid
NLR	engl. <i>nucleotide-binding oligomerisation domain-containing-like receptors</i>
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
NOD	domena za vezanje nukleotida i oligomerizaciju (engl. <i>nucleotide-binding and oligomerisation domain</i> )
PRR	receptor za patogene (engl. <i>pathogen recognition receptor</i> )
Rc	rutenocen
RIG-I	engl. <i>Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors</i>

---

SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
s.t.	sobna temperatura
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctenakiselina
TLC	tankoslojna kromatografija (engl. <i>thin-layer chromatography</i> )
TLR	Toll receptori (engl. <i>Toll-like receptors</i> )
TMS	tetrametilsilan

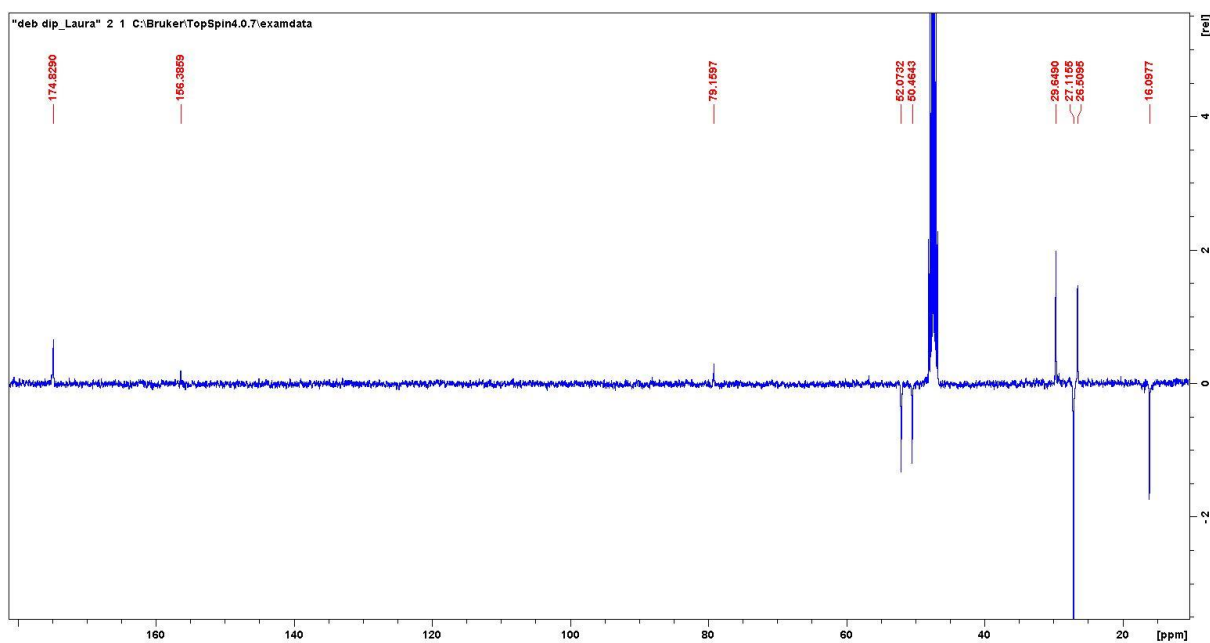
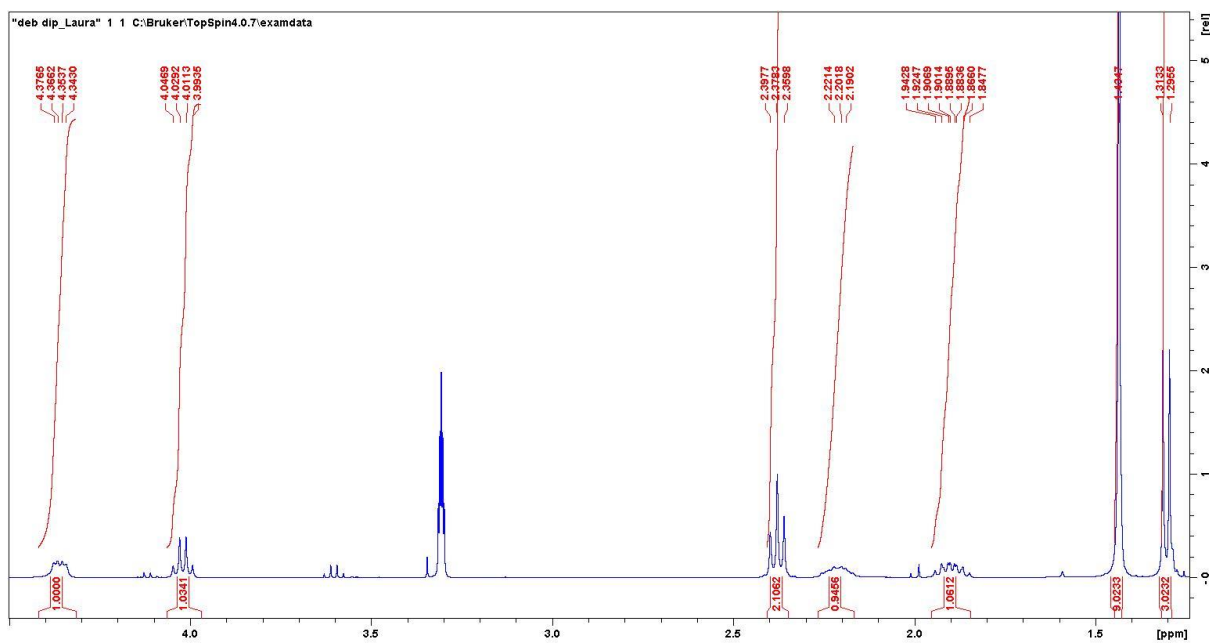
## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. Kealy, T. J. & Pauson, P. L. A new type of organo-iron compound. *Nature* **168** (1951) 1039–1040
2. K. Heinze, H. Lang, *Organometallics* **32** (2013) 5623-5625.
3. M. Patra, G. Gasser, *Nat. Rev. Chem.* **1** (2017), 0066.
4. J. E. House, *Inorganic Chemistry*, Elsevier, Oxford, 2013., str. 732-745.
5. S. Peter and B. A. Aderibigbe, *Molecules* **24** (2019).
6. M. Kovačević, M. Č. Semenčić, K. Radošević, K. Molčanov, S. Roca, L. Šimunović, I. Kodrin and L. Barišić, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021) 13532.
7. V. Rapić, M. Kovačević, *Kem. Ind.* **61** (2012) 71-120.
8. N. C. S. Costa, J. P. Piccoli, N. A. Santos-Filho, L. C. Clementino, A. M. Fusco-Almeida, S. R. de Annunzio, C. R. Fontana, J. B. M. Verga, S. F. Eto, J. M. Pizauro-Junior, M. A. S. Graminha and E. M. Cilli, *PLoS ONE* **15** (3) (2020) DOI:10.1371/journal.pone.0228740.
9. F. Dubar et al., *ACS Chem. Biol.* **6** (2011) 275-287.
10. A. Ferreira, J. Balla, V. Jeney, G. Balla, M. P. Soares, *J. Mol. Med.* **86** (2008) 1097-1111.
11. T. N. C Wells, R. H. Van Huijsduijnen, *Lancet Infect. Dis.* **15** (2015) 1365-1366.
12. F. Dubar, C. Slomianny, J. Khalife, D. Dive, H. Kalamou, Y. Guerardel, P. Grellier, C. Biot, *Angew. Chem., Int. Ed.* **52** (2013) 7690-7693.
13. J. C. Swarts, A. Nafady, J. H. Roudebush, S. Trupia, W. E. Geiger, *Inorg. Chem.* **48** (2009) 2156-2165.
14. U. Schatzschneider, N. Metzler-Nolte, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng* **45** (2006) 1504-1507.
15. E. Hillard, A. Vessières, L. Thouin, G. Jaouen, C. Amatore, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **45** (2005) 285-90.
16. J. S. Apostolico, V. A. S. Lunardelli, F. C. Coirada, S. B. Boscardin, D. S. Rosa, *J. Immunol. Res.* **2016** (2016).
17. R. Ribić, M. Paurević, S. Tomić, *Croat. Chem. Acta* **92** (2019) 153-161.
18. V. Petrović-Peroković, Ž. Car, J. Draženović, R. Stojković, L. Milković, M. Antica, Đ. Škalamera, S. Tomić, R. Ribić, *Molecules* **26** (2021) 6352.

19. R. Ribić, R. Stojković, L. Milković, M. Antica, M. Cigler, S. Tomić, *Beilstein J. Org. Chem.* **15** (2019) 1805-1814.
20. S. V. Guryanova, R. M. Khaitov, *Front. Immunol.* **12** (2021).
21. C. Ogawa, Y. J. Liu, K. S. Kobayashi, *Curr. Bioact. Compd.* **7** (2011) 180-197.
22. S. Maekawa, U. Ohto, T. Shibata, K. Miyake, T. Shimizu, *Nat. Commun.* **7** (2016) 11813.
23. T. Liu, L. Zhang, D. Joo, S. C. Sun, *Signal Transduction Targeted Ther.* **2** (2017) 17023.
24. M. Bušljeta, *Priprava alifatskih triazolnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2022., str. 7.
25. A. Maršavelski, M. Paurević, R. Ribić, *Org. Biomol. Chem.* **19** (2021) 7001-7012.
26. V. Petrović-Peroković, Ž. Car, M. Bušljeta, D. Mihelec, M. Paurević, S. Ivanković, R. Stojković, R. Ribić, *Int. J. Mol. Sci.* **23** (2022) 8628.
27. R. Ribić, S. Tomić, *Kem. Ind.* **62** (2013) 19-31.
28. R. Ribić, M. Kovačević, V. Petrović-Peroković, I. Gruić-Sovulj, V. Rapić, S. Tomić, *Croat. Chem. Acta* **83** (2010) 421-431.
29. T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 5th Edition, John Wiley & Sons, 2014.
30. J. Guo, X. S. Ye, *Molecules* **15** (2010) 7235-7265.
31. S. Vidal (ur.), *Protecting Groups: Strategies and Applications in Carbohydrate Chemistry*, Wiley-VCH, 2018., str. 1-27.
32. J. Barchi (ur.), *Comprehensive Glycoscience*, 2nd Edition, Elsevier, 2021., str. 203-259.
33. A. Isidro-Llobet, M. Alvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **109** (2009) 2455-2504.
34. E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **38** (2009) 606-631.
35. A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **111** (2011) 6557-6602.
36. J. R. Dunetz, J. Magano, G. A. Weisenburger, *Org. Process Res. Dev.* **20** (2016) 140-177.

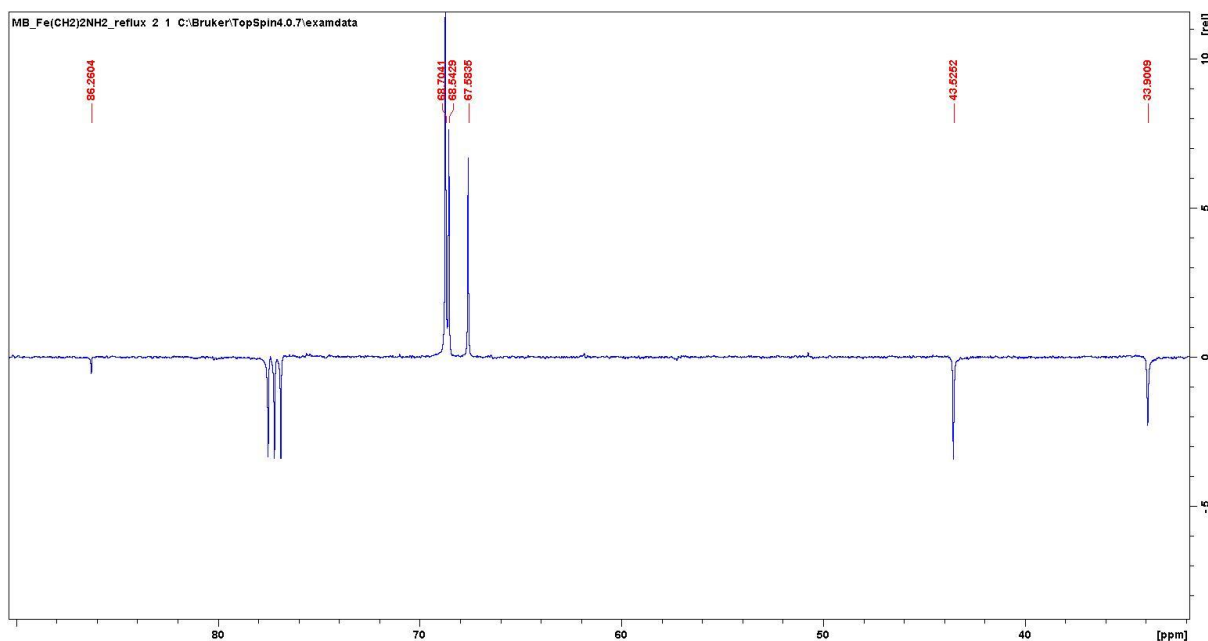
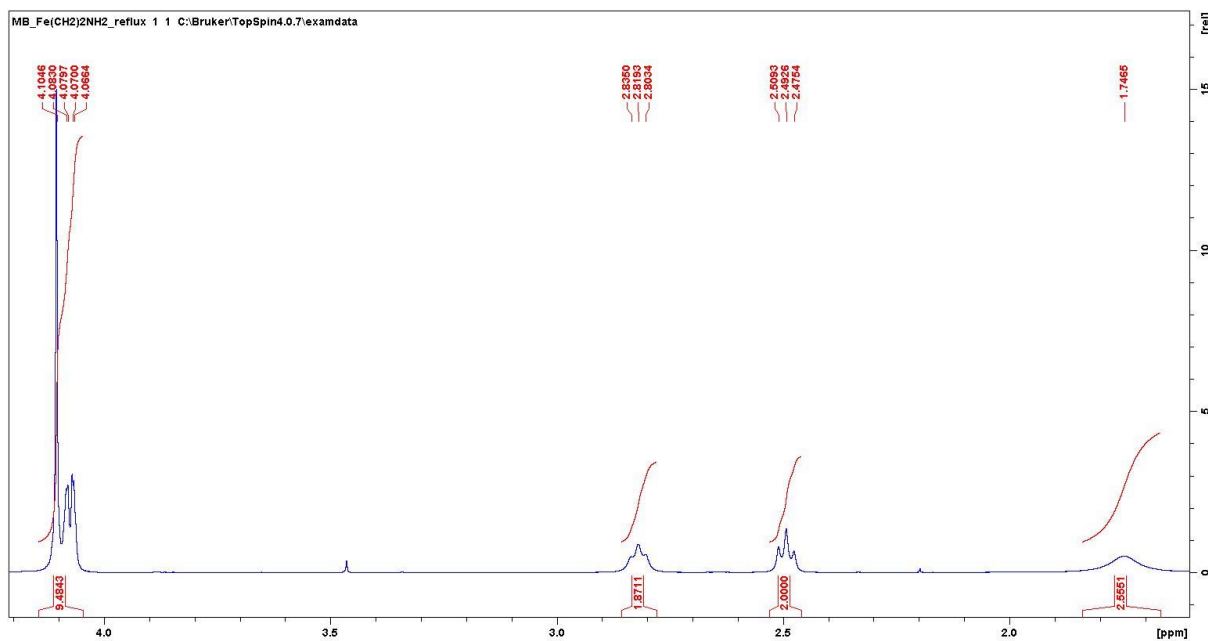
## § 8. DODATAK

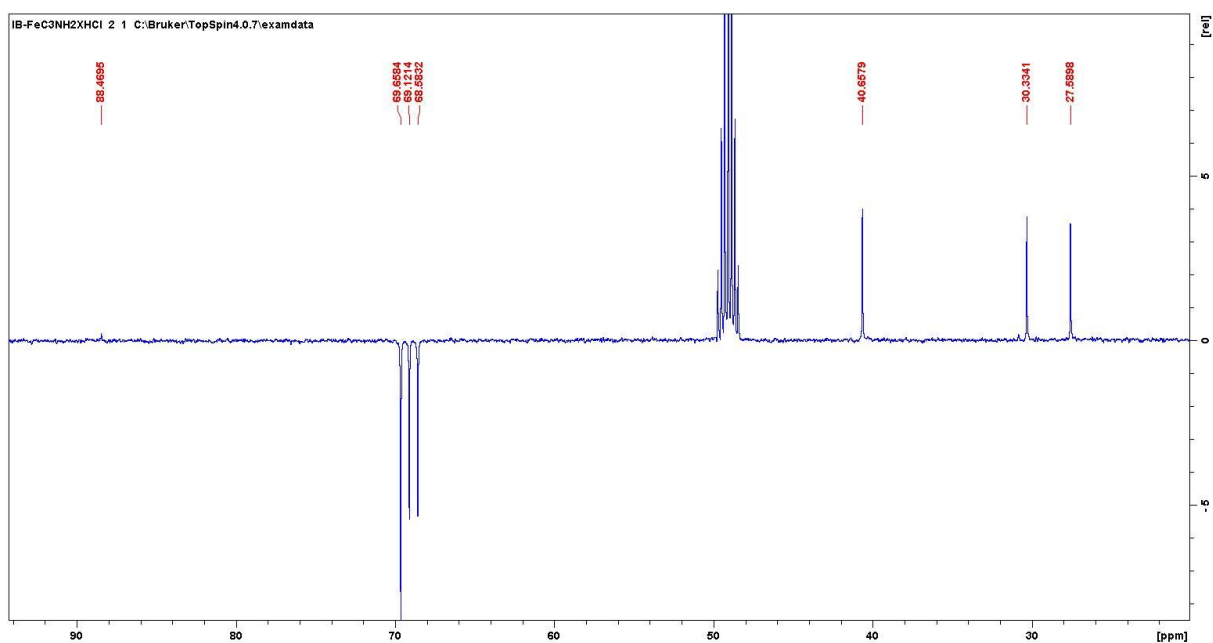
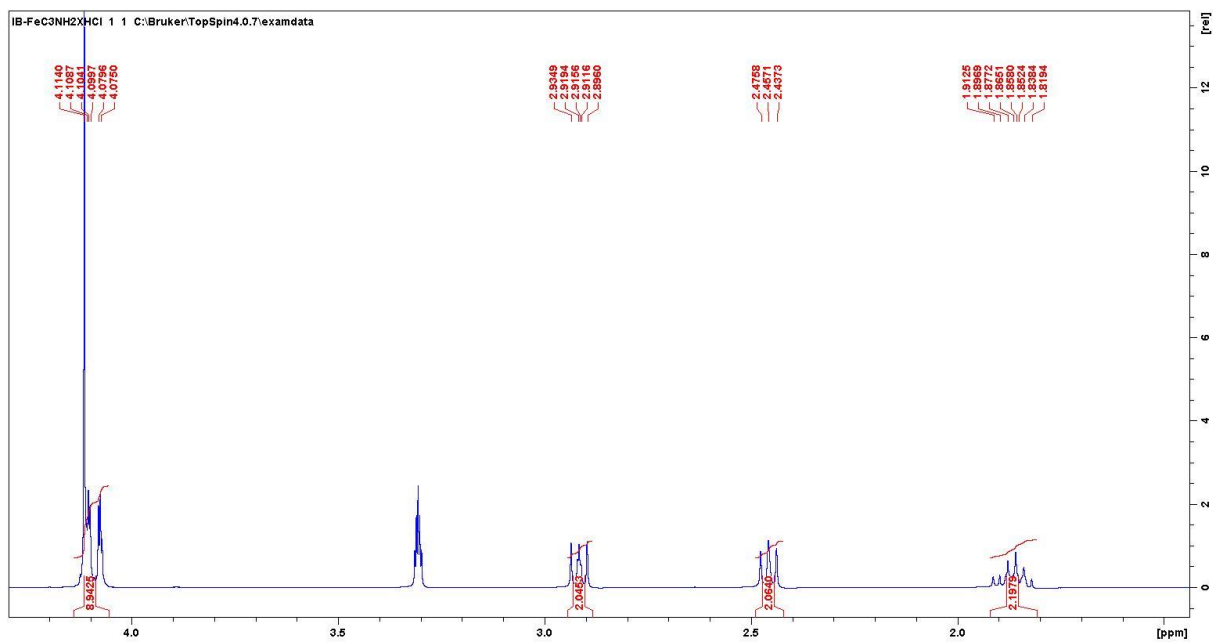
Dodatak:  $^1\text{H}$  NMR i DEPTQ spoja 1



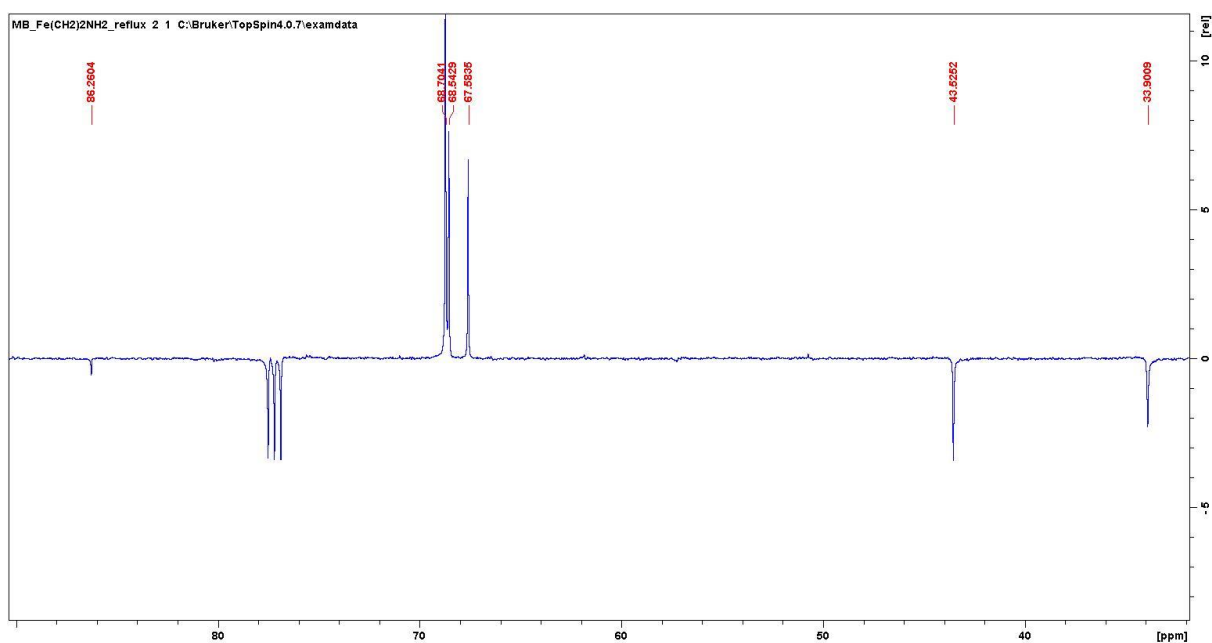
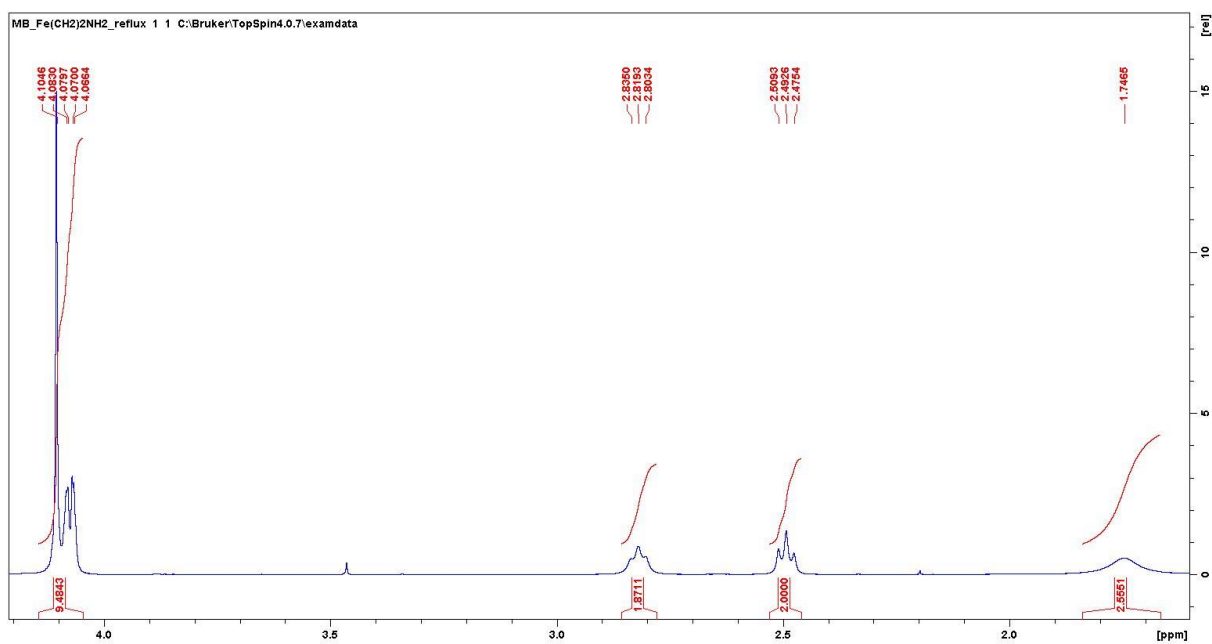


Dodatak: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 2

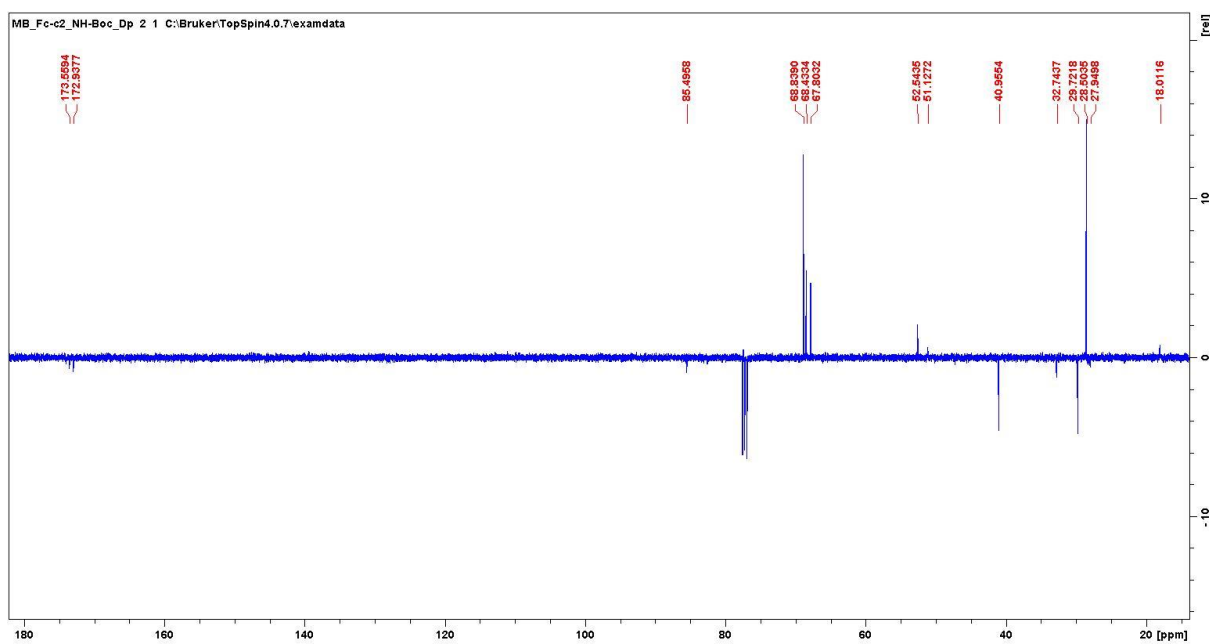
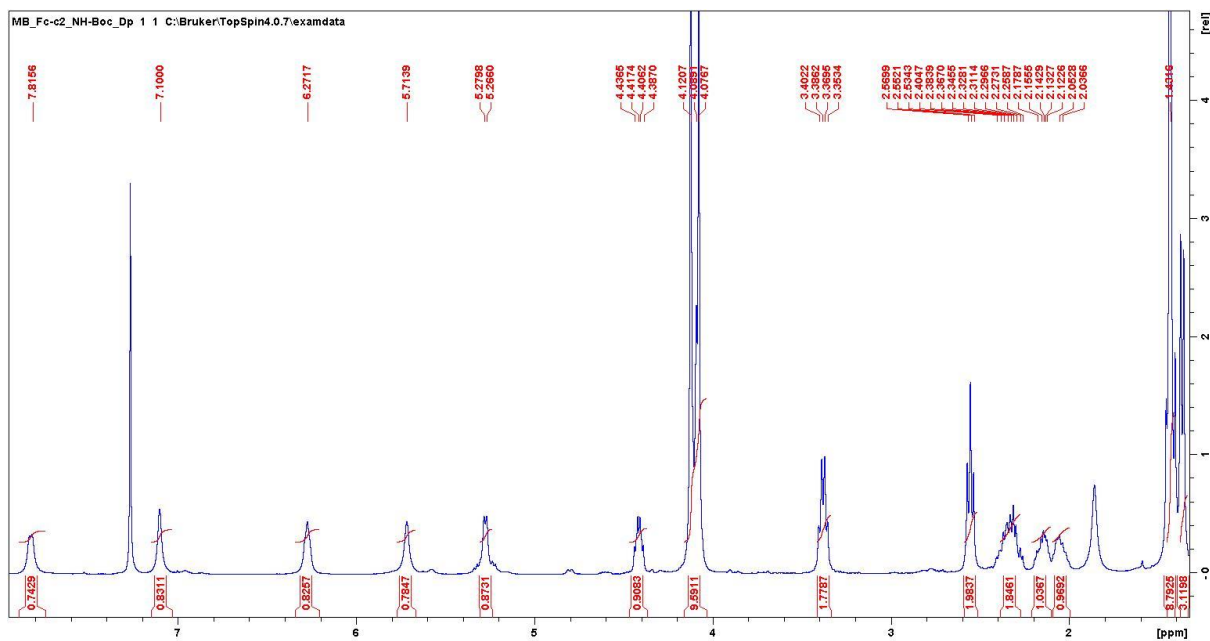


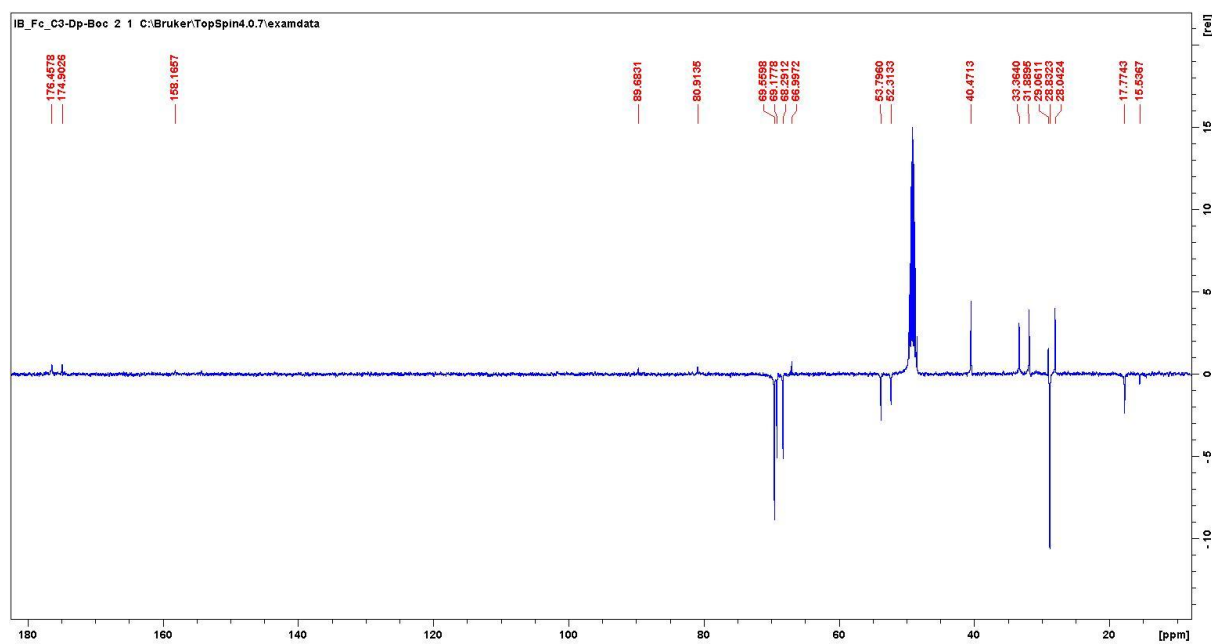
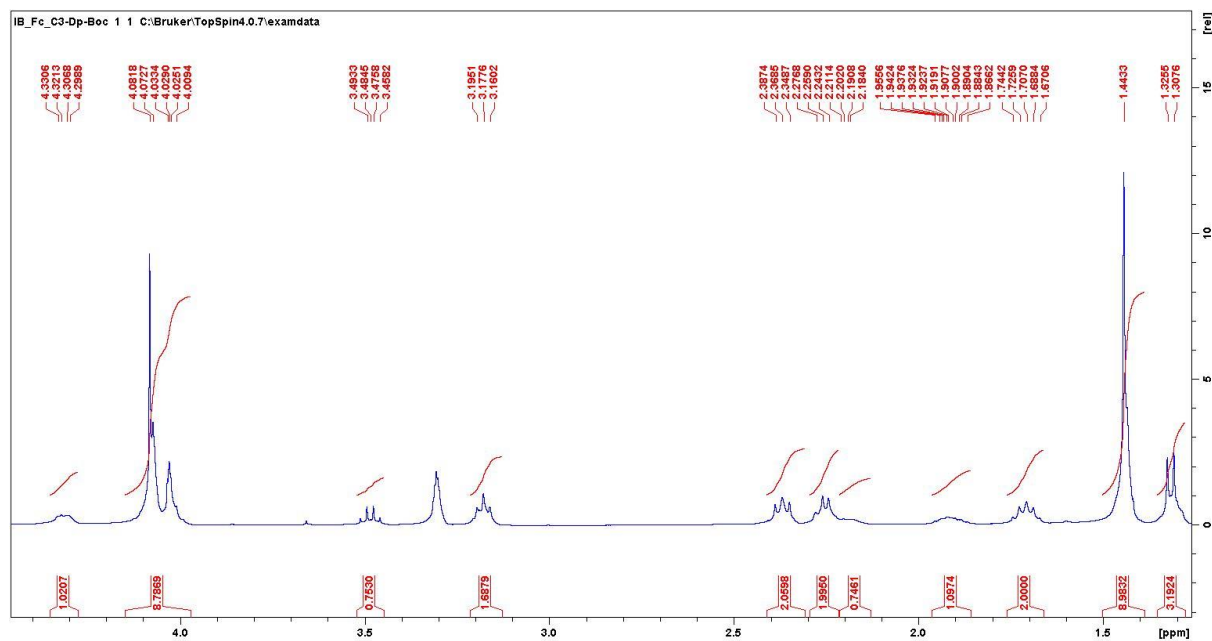
Dodatak:  $^1\text{H}$  NMR i DEPTQ spoja 3

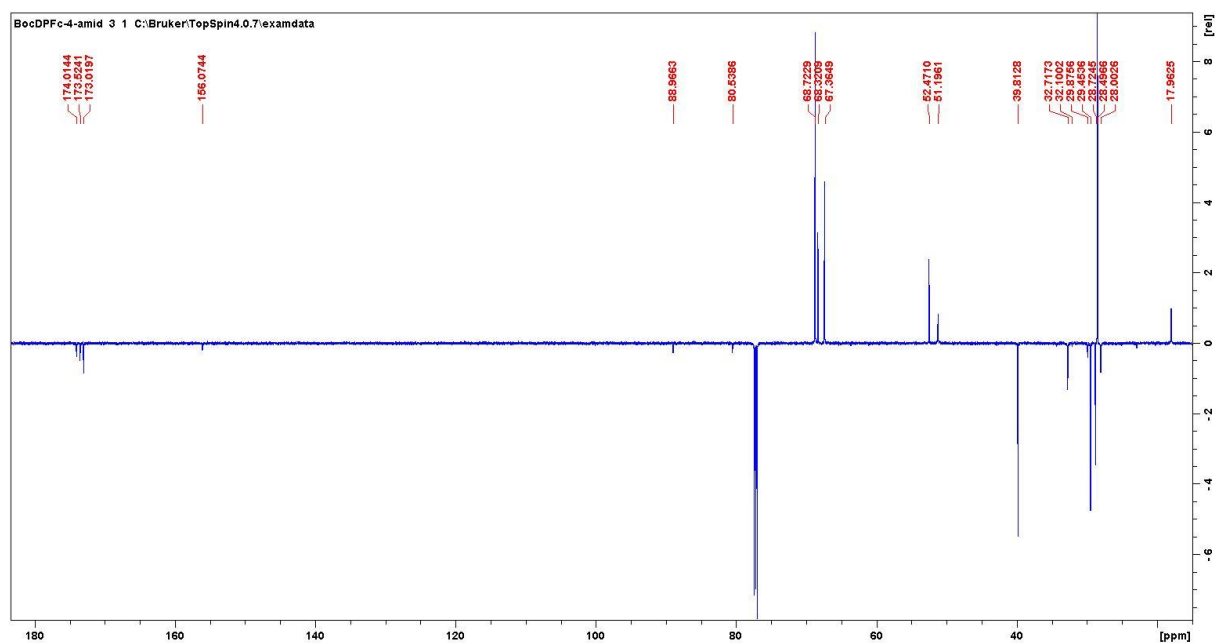
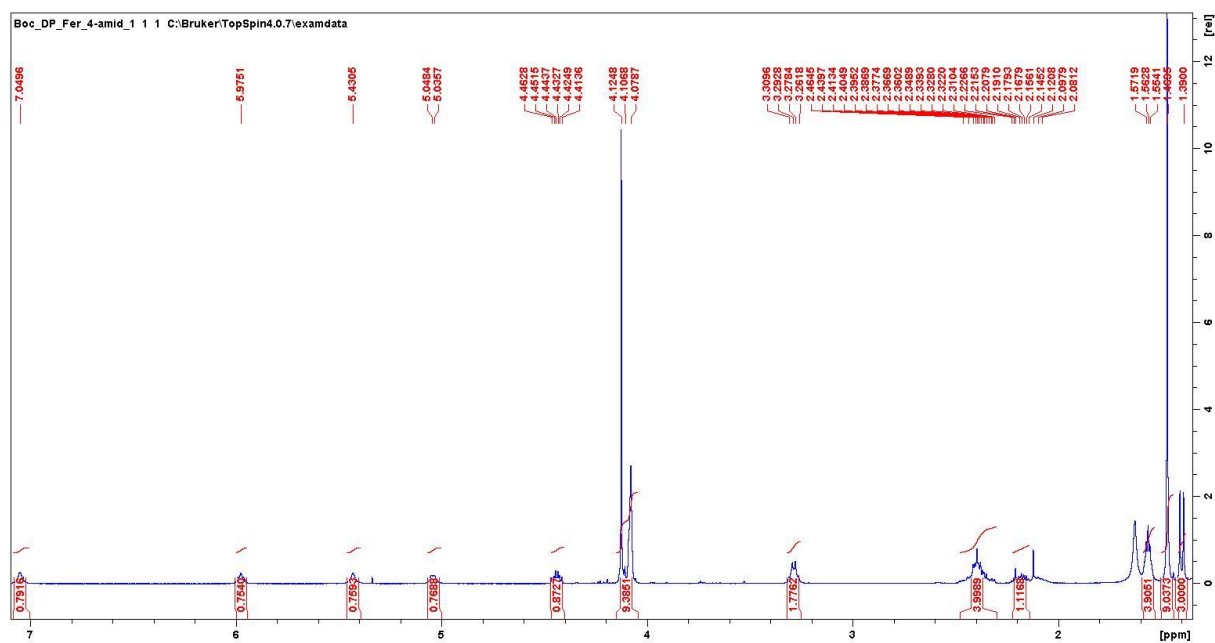
Dodatak: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 4



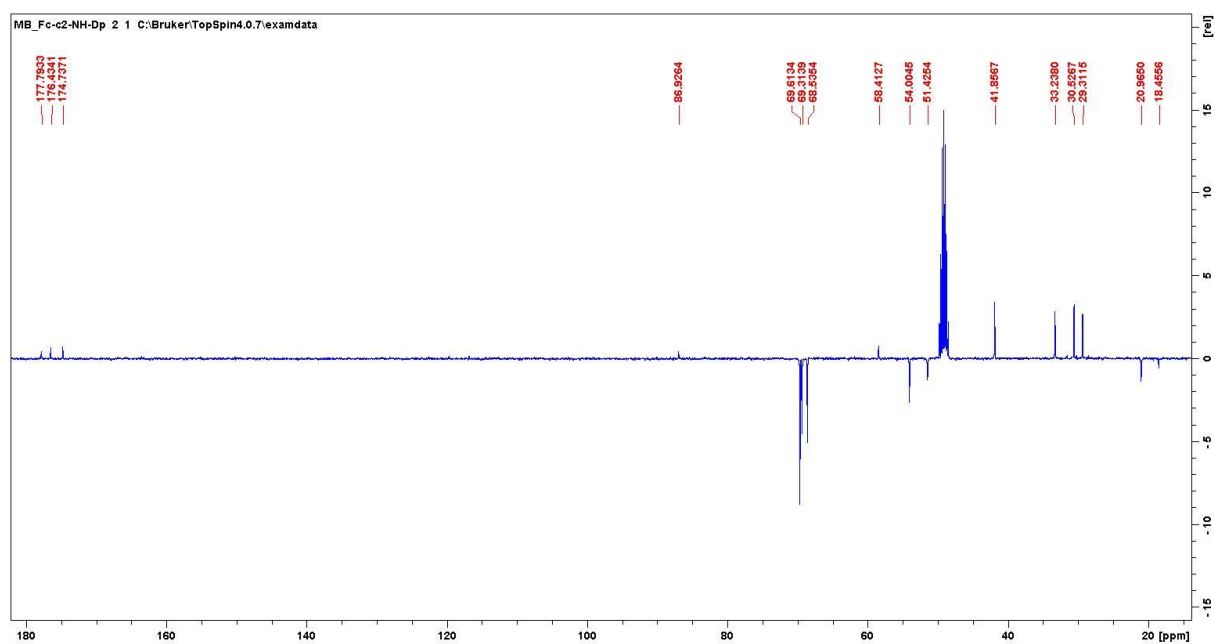
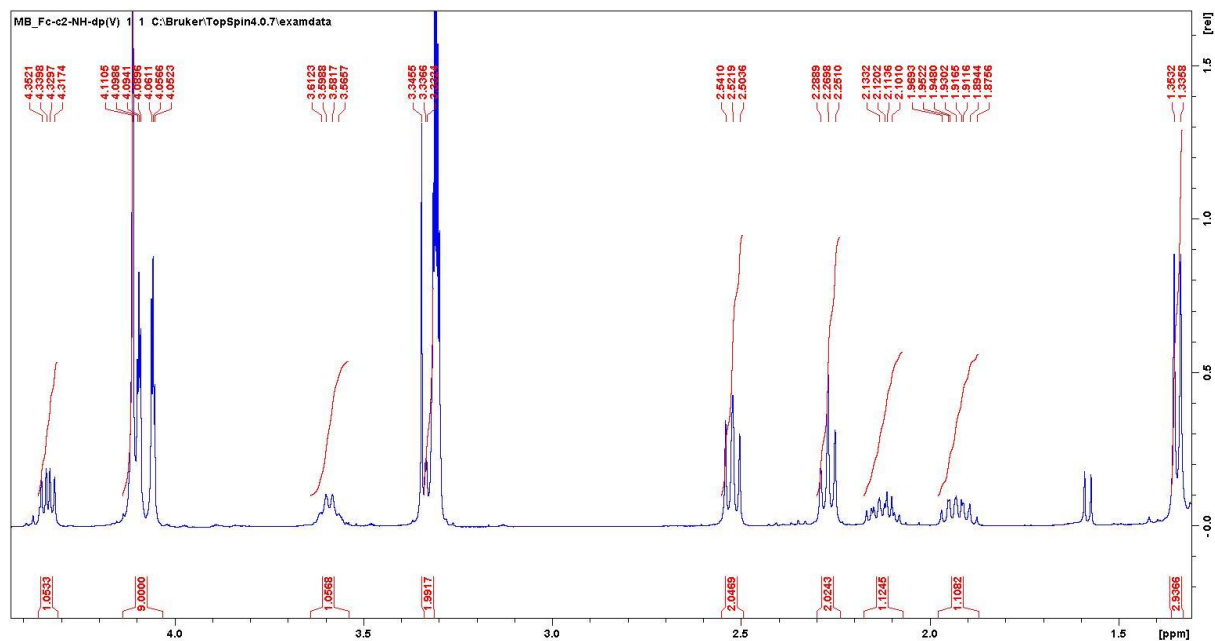
Dodatak: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 5



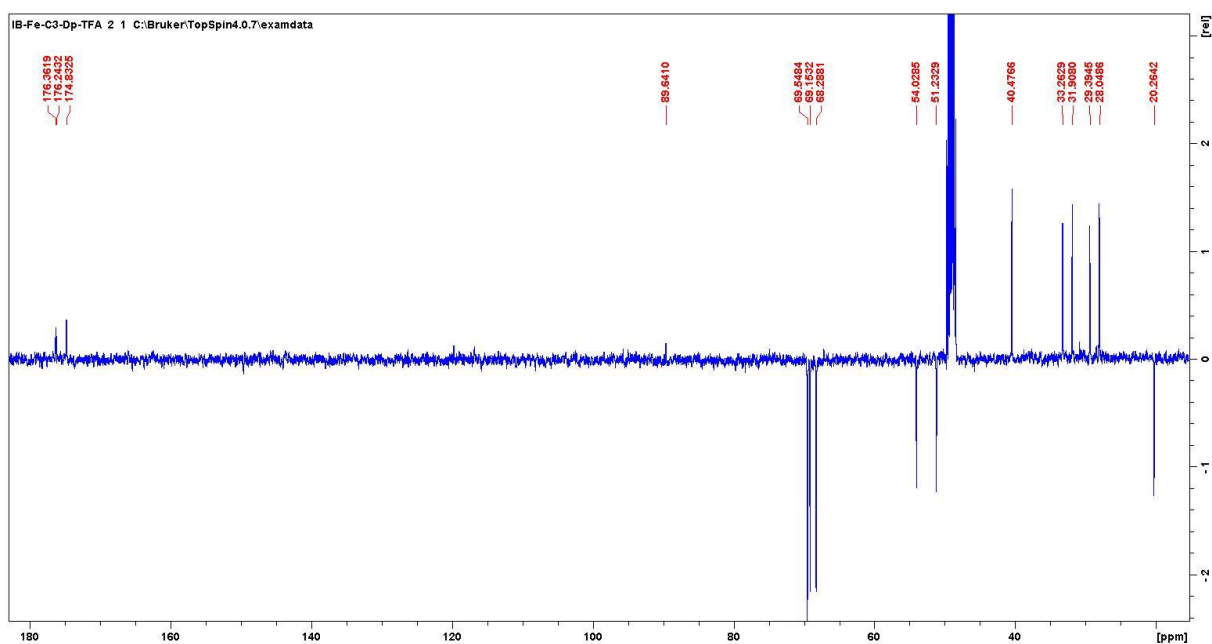
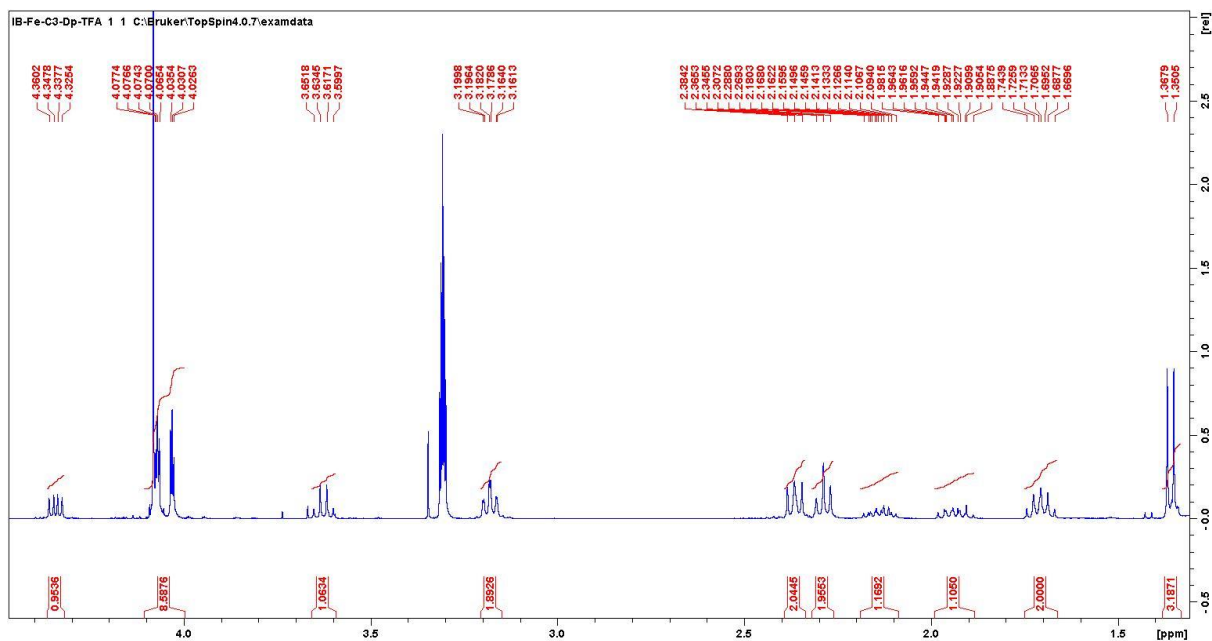
Dodatak:  $^1\text{H}$  NMR i DEPTQ spoja 6

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

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

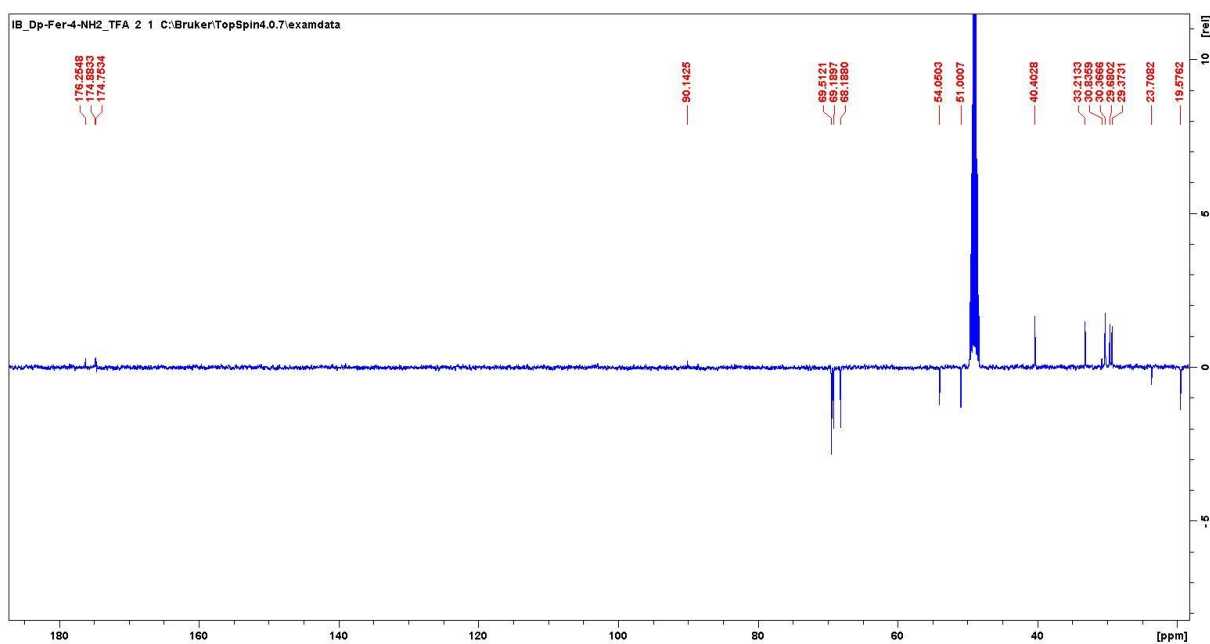
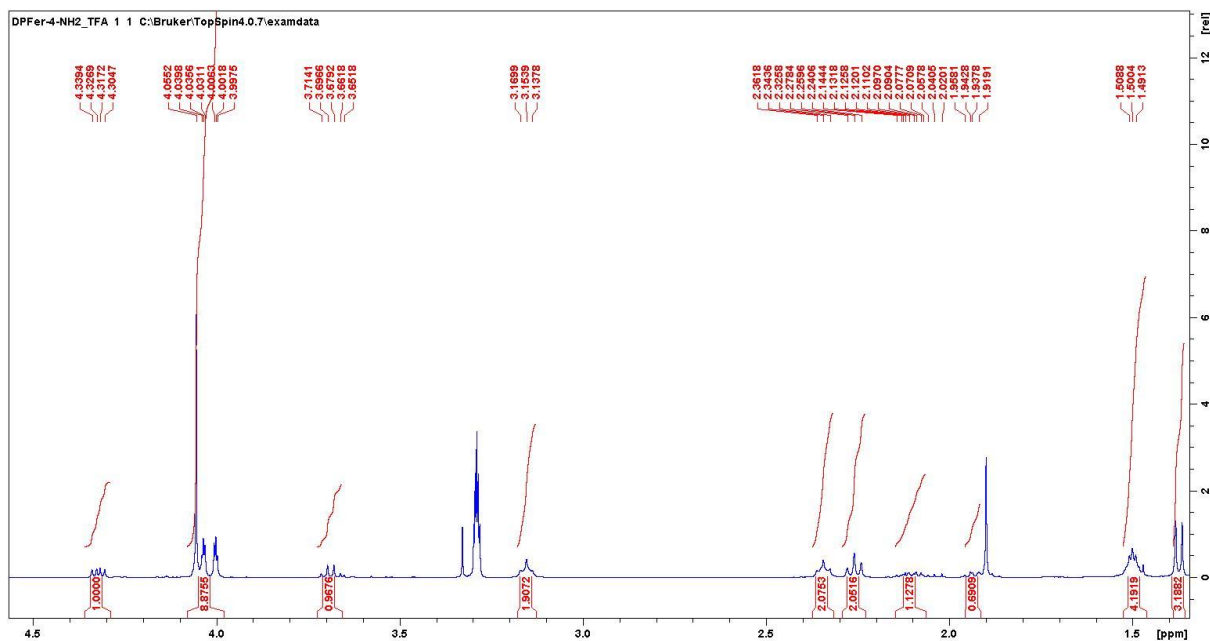


Dodatak: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 9

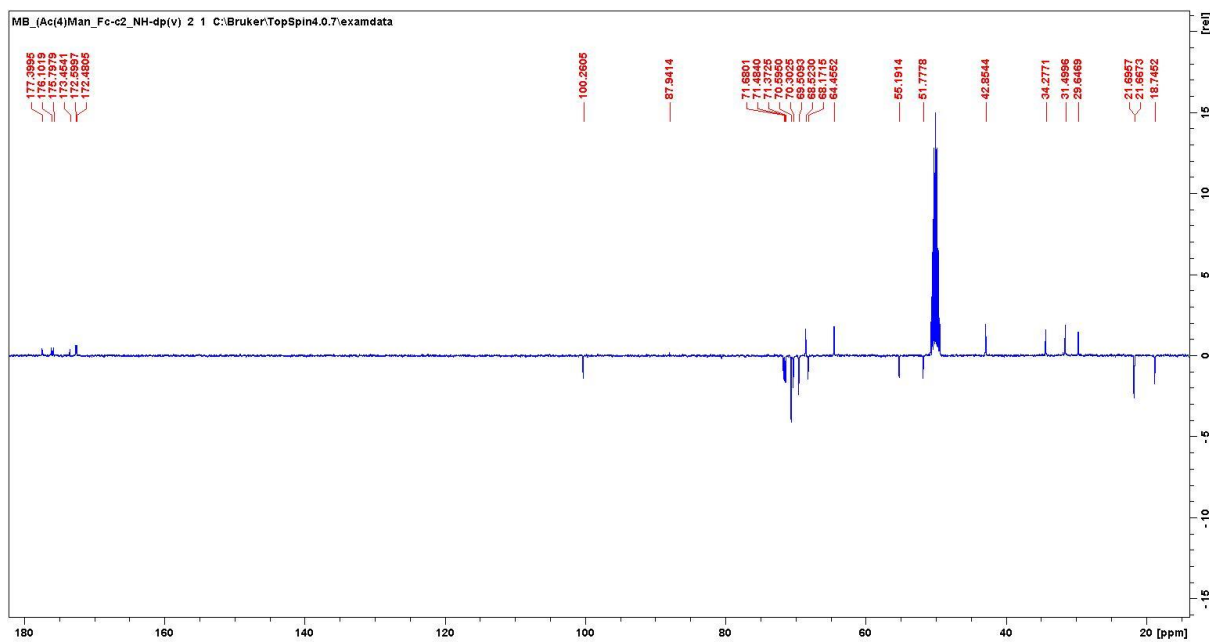
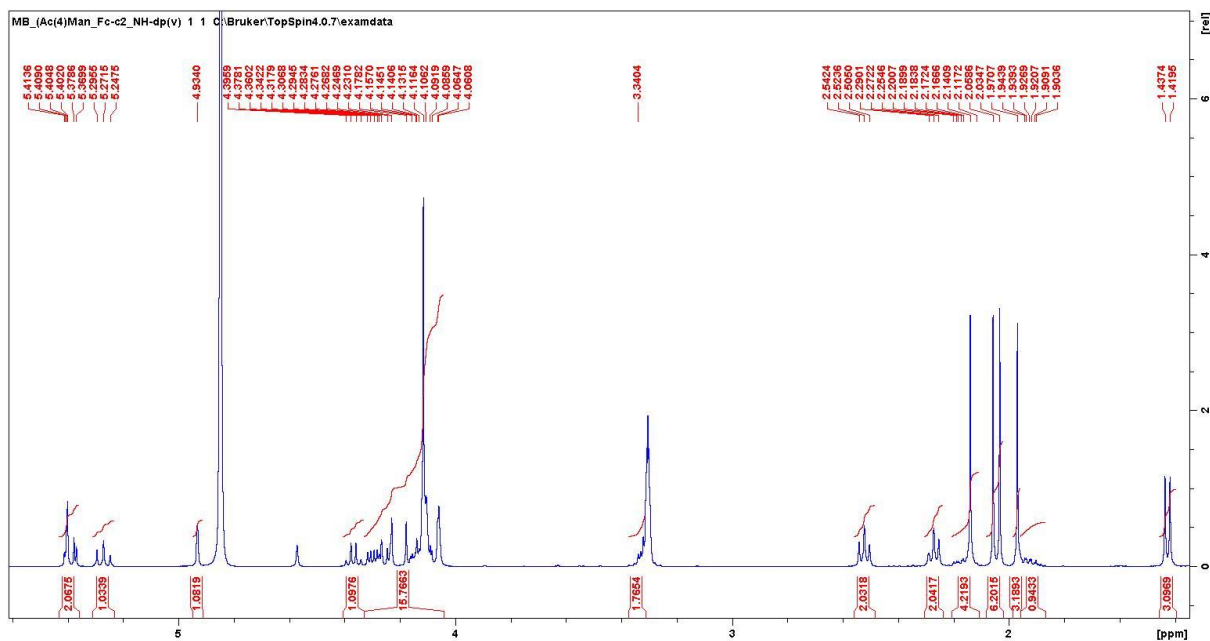




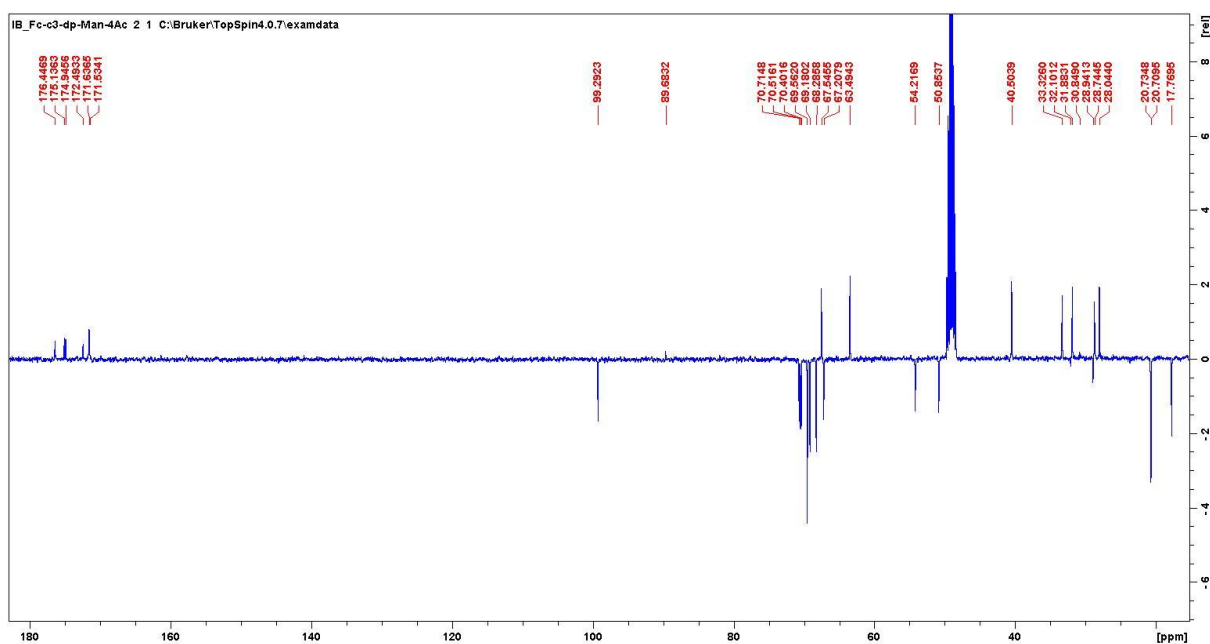
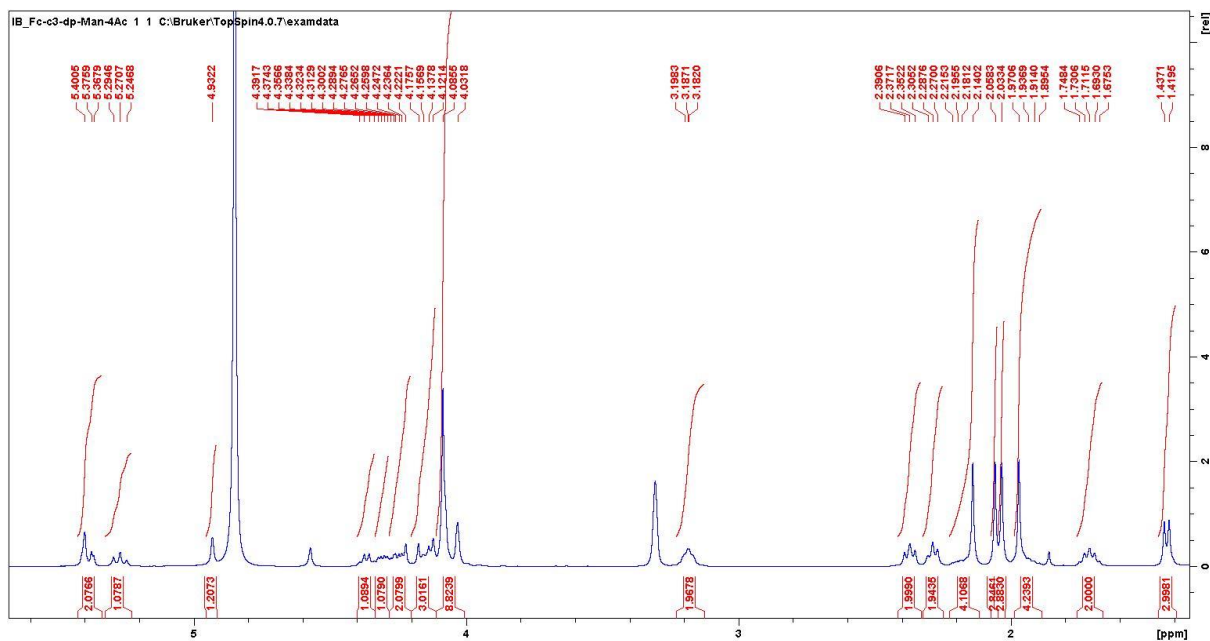
Dodatak: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 10



Dodatak: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 13

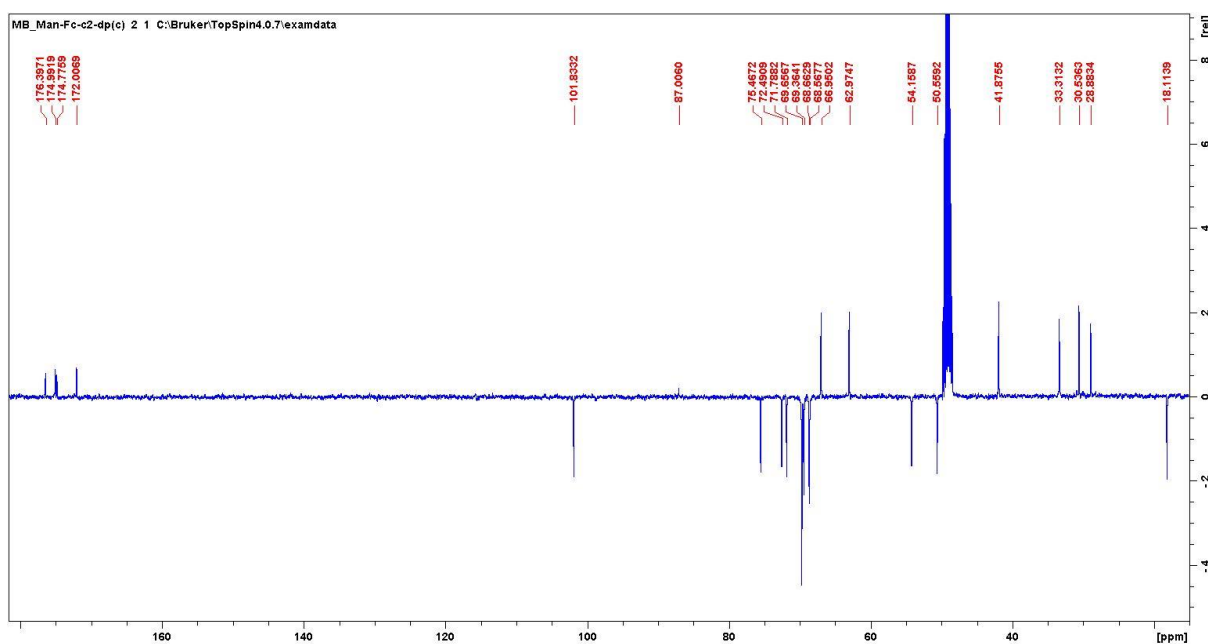
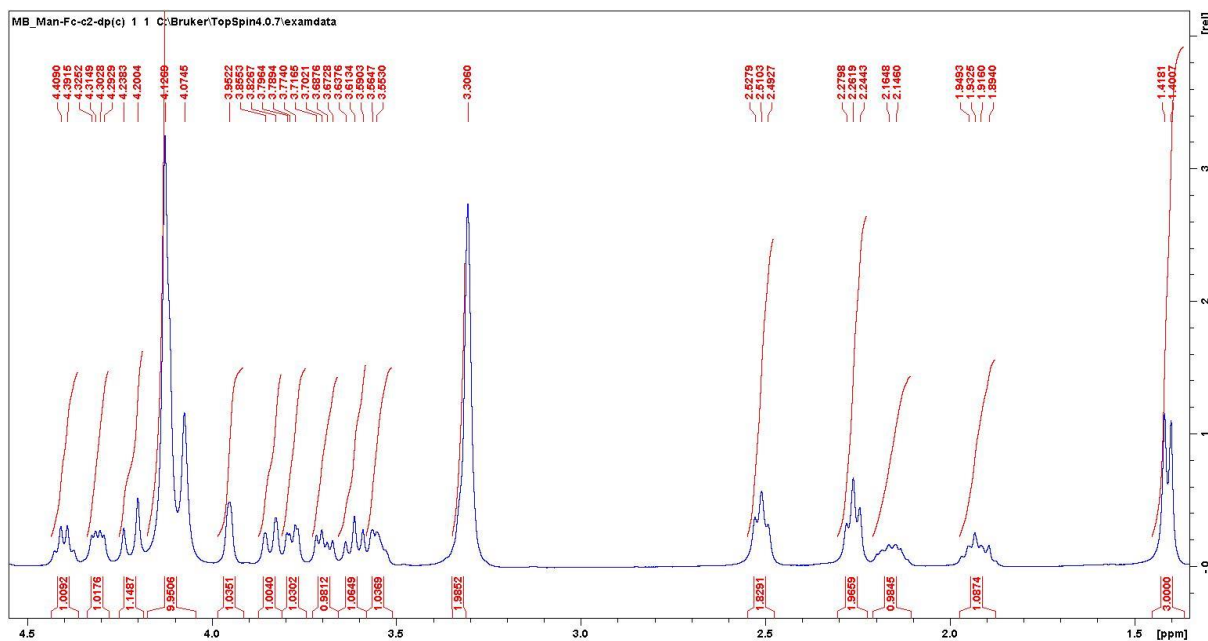


Dodatak: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 14

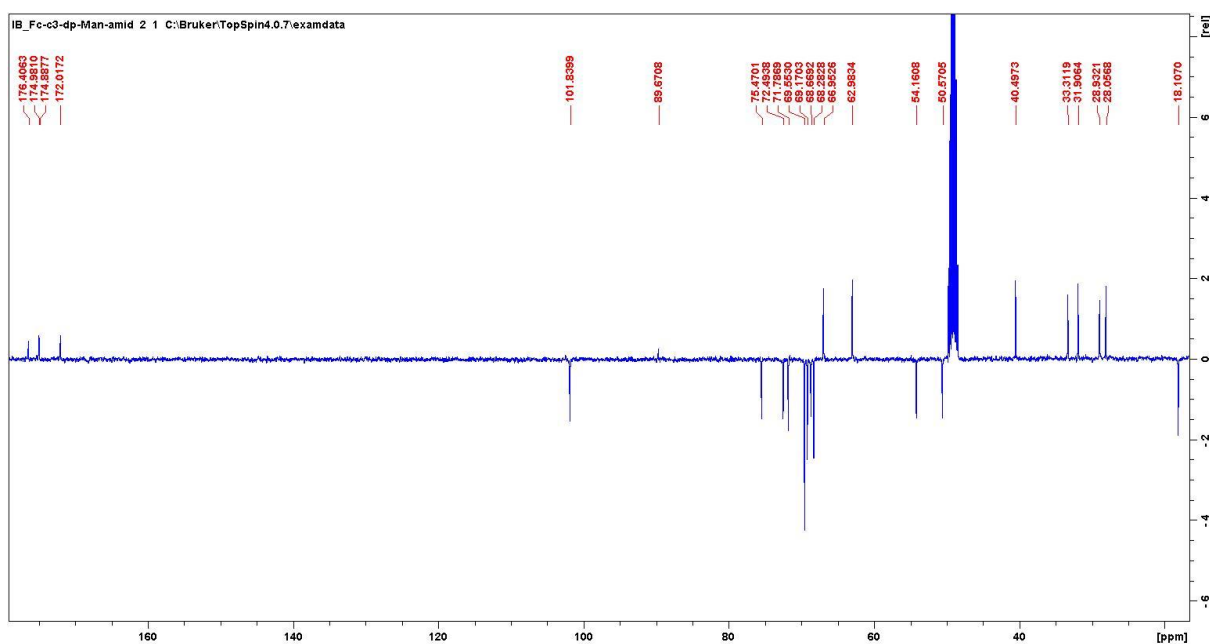
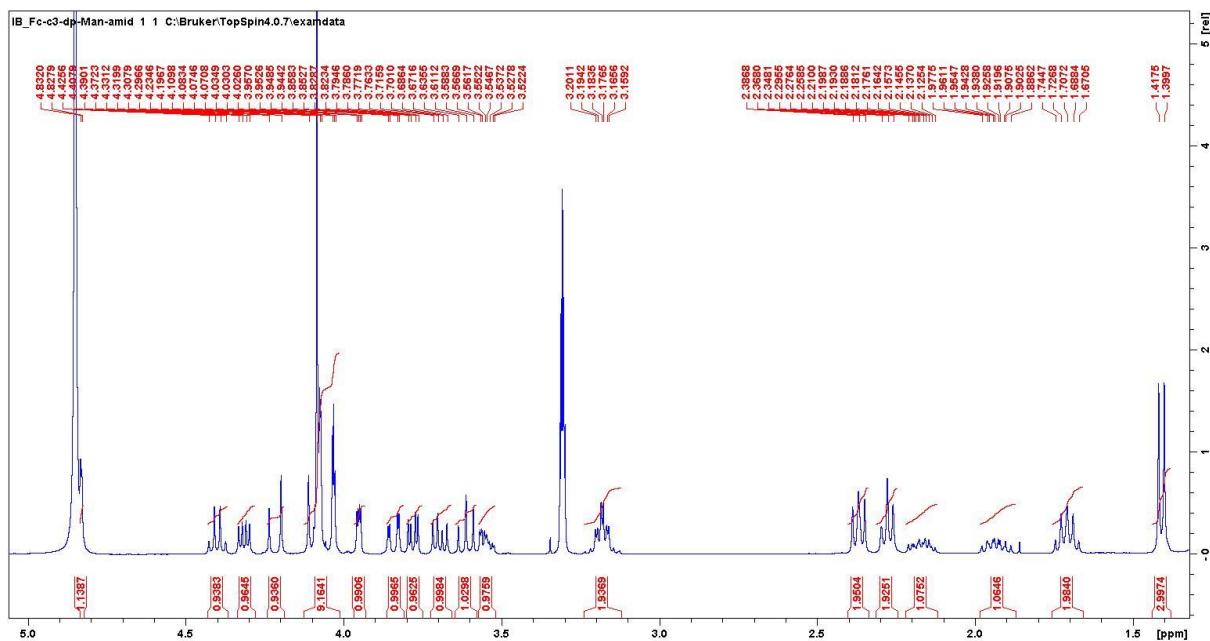




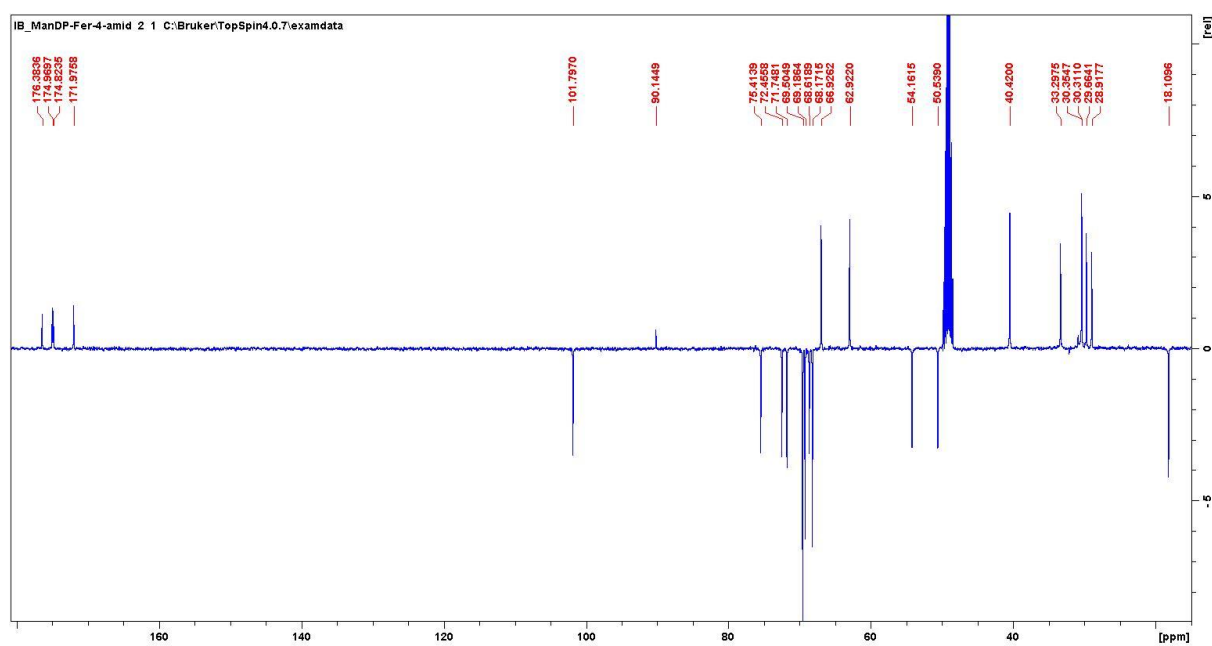
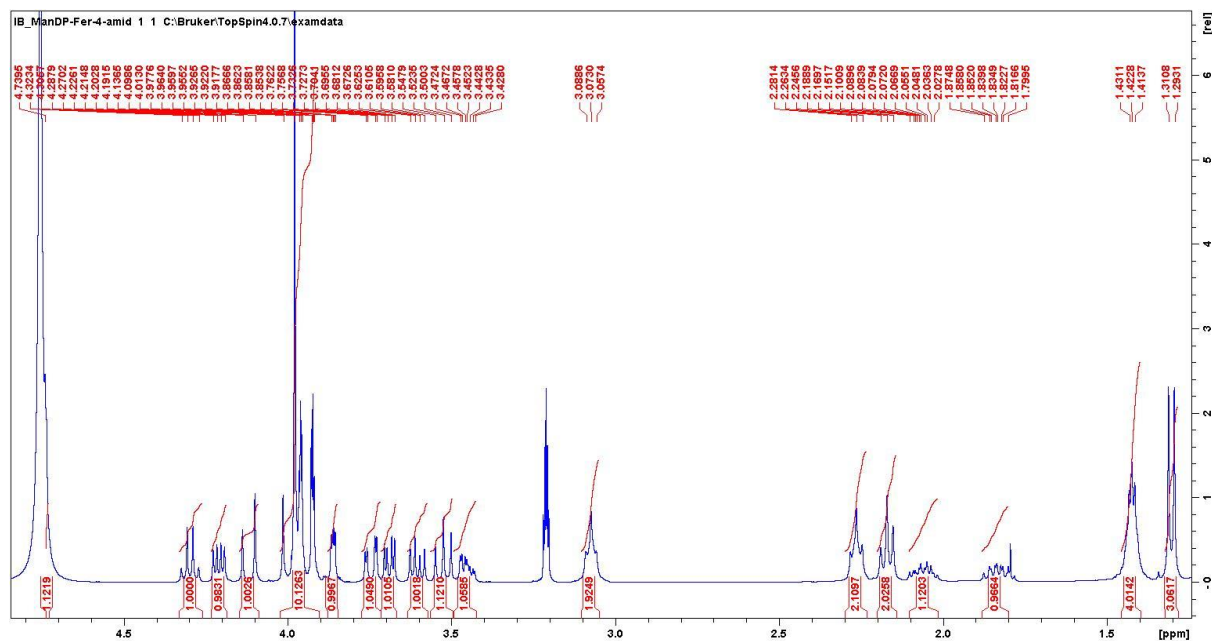
Dodatak: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 16



Dodatak: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 17



Dodatak: <sup>1</sup>H NMR i DEPTQ spoja 18



## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Ivona Bajan

Datum rođenja: 26. lipnja 1996.

Mjesto rođenja: Knin

### Obrazovanje

2003.-2011. Osnovna škola Domovinske zahvalnosti, Knin

2011.-2015. Srednja škola Lovre Montija, Knin

2015.-2020. Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2020.-2022. Diplomski sveučilišni studij Kemija; smjer: istraživački, grane: organska kemija i biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2020.-2021. Stručna praksa Pliva, TEVA Api-Kemija, Istraživanje i razvoj, Zagreb

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2015. Otvoreni dan Kemije