

Priprava ferocenskih estera manoziliranog desmuramil-dipeptida

Grgurić, Dora

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:217:170966>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Dora Grgurić

Priprava ferocenskih estera manoziliranog desmuramil-dipeptida

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 Kemijskog odsjeka
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Vesne Petrović Peroković

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost
Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija
(IP-2020-02-9162, voditeljica: prof. dr. sc. Lidija Barišić,
Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu).

Zahvale

Želim se zahvaliti svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Vesni Petrović Peroković – hvala Vam na ukazanoj prilici da radim s Vama, da učim od Vas, da se bavim organskom, svojom najdražom granom. Ali, još više, hvala na dobrom društvu, ugodnoj atmosferi u labosu zbog koje sam uvijek rado dolazila i zbog koje je raditi ovaj rad bio baš gušt...

Veliko hvala doc. dr. sc. Željki Car – hvala Vam na svakom odgovorenom pitanju kad god bi Vam „uletila“, na svakom savjetu zbog kojeg sam naučila još više i pametnije i također, na ugodnoj atmosferi u labosu...

Hvala tetama tehničarkama Andreji i Marini, te svim djelatnicima Zavoda za organsku kemiju koji su mi uvijek pomogli kad mi je trebalo...

Hvala Plivinom odjelu Istraživanja i razvoja na pruženoj prilici da radim ono što volim i dodatno proširim svoje znanje o sintezi. Posebno hvala Morisu Mihoviloviću – hvala ti na svakom (vrlo detaljno) odgovorenom pitanju, svakom savjetu, pohvali i kritici...hvala ti što vidiš potencijal u meni i mojih idejama, a najviše ti hvala na prijateljstvu...

Hvala mojoj profesorici kemije, Marijani Žderić – da nije Vas, ja ne bi bila sad tu gdje jesam. Hvala što ste me uveli u svijet kemije i pokazali mi koliko mogu i znam. Zbog Vas svaki dan radim ono što volim...

Hvala Miji, Tei, Lei, Vekiju i Dokiju – Vi ste jedna od najboljih stvari koje mi je donijela kemija, bez vas studiranje ne bi bilo ovako lako (koliko ide) i sigurno ne bi bilo ovako zabavno...

Hvala Romanu – hvala ti što si me uvijek podržavao da ostvarim sve što želim i više od toga, hvala što si znao da ćemo se snać, hvala ti što smo „uvijek tim“, čak i kad moraš staviti slušalice jer ja idem rano spavati...

I za kraj... najveće hvala mojoj obitelji – hvala što se moja najveća podrška, što ste moj oslonac i uvijek tu za mene. Hvala mami – hvala ti na svakom savjetu, razgovoru, zbog tebe se osjećam da mogu više. Hvala tati – hvala ti na što si tu za mene i u podne i u ponoć, što god trebalo i hvala ti za svaki put što si prošetao Ronija da ja mogu učiti. Hvala baki – hvala ti što si mi objasnila da sam „i ja skupa“ i hvala što si sve naše tajne čuvala među nama. Hvala Petri – hvala ti sekić za sve, ti si vidjela apsolutno sve moje pobjede i poraze tokom studija, a i oduvijek, hvala za sve te silne sate provedene u knjižnici. Hvala ti što si moja sestra i najbolja prijateljica, s tobom je sve lakše, ljepše i zabavnije.

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Adjuvanti	3
2.1.1. Muramil-dipeptid	3
2.1.2. Desmuramil-dipeptid	6
2.1.3. Manozilirani derivati desmuramil-dipeptida	7
2.1.4. Lipofilni derivati desmuramil-dipeptida	9
2.2. Feroceni.....	10
2.2.1. Otkriće i struktura ferocena	10
2.2.2. Svojstva ferocena	13
2.2.3. Primjena ferocena i njegovih derivata.....	13
2.2.4. Derivati ferocena i aminokiselina/peptida.....	15
2.3. Esteri	17
2.3.1. Struktura i važnost estera.....	17
2.3.2. Načini priprave estera	18
2.3.2.1. Fischerova esterifikacija	18
2.3.2.2. Reakcija alkohola i kiselinskih halogenida	19
2.3.2.3. Steglichova esterifikacija.....	20
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1. Materijali i metode.....	23
3.1.1. Kemikalije	23
3.1.2. Metode.....	23
3.2. Priprava manoznog prekursora 2.....	24
3.2.1. Priprava tert-butil-2-(2,3,4,6-tetra-O-benzil- α -D-manopiranoziloksi)etanoata 1	24
3.2.2. Priprava 2-(2,3,4,6-tetra-O-benzil- α -D-manopiranoziloksi)octene kiseline 2	25
3.3. Priprava peptidnog prekursora Boc-L-Ala-D-isoGln 3.....	26
3.4. Priprava ferocenskih estera desmuramil-dipeptida 7-9	27
3.4.1. Općeniti postupak priprave ferocenskih estera Boc-zaštićenog desmuramil-dipeptida 4-6.....	27
3.4.2. Općeniti postupak uklanjanja Boc-zaštite sa spojeva 4-6 i priprava spojeva 7-9	30
3.5. Priprava zaštićenih manoziliranih ferocenskih estera desmuramil-dipeptida 10-12.....	33

3.5.1. Općeniti postupak priprave spojeva 10-12	33
3.6. Priprava ciljnih molekula 13-15 debenziliranjem spojeva 10-12.....	37
3.6.1. Općeniti postupak uklanjanja benzilnih zaštitnih skupina sa spojeva 10-12.....	37
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	41
4.1. Uvod	41
4.2. Uklanjanje benzilne zaštitne skupine s Boc-L-Ala-D-isoGln(OBn).....	42
4.3. Priprava ferocenskih estera desmuramil-dipeptida 7-9	43
4.3.1. Priprava zaštićenih ferocenskih estera desmuramil-dipeptida u uvjetima Steglichove esterifikacije	442
4.3.2. Uklanjanje Boc-zaštite sa zaštićenih ferocenskih estera desmuramil-dipeptida 4-6	44
4.4. Priprava manozne podjedinice s C2 razmaknicom 2	44
4.5. Priprava ferocenskih estera manoziliranog desmuramil-dipeptida 13-15.....	46
§ 5. ZAKLJUČAK	48
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	50
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	51
§ 8. DODATAK.....	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXVIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Priprava ferocenskih estera manoziliranog desmuramil-dipeptida

Dora Grgurić

U sklopu diplomskog rada opisana je priprava triju ferocenskih estera manoziliranog desmuramil-dipeptida, L-Ala-D-*iso*Gln. Konvergentnim pristupom sintezi najprije su zasebno pripravljena tri fragmenta: manozna podjedinica s razmaknicom od dva atoma ugljika (C2 razmaknica), dipeptid te ferocenski alkoholi, koji su zatim povezani u jednu cjelinu. Benzilima zaštićena manozna podjedinica s C2 razmaknicom pripremljena je u dva sintetska koraka iz 2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranoze. Kao polazni dipeptid korišten je komercijalno dostupni zaštićeni desmuramil-dipeptid, Boc-L-Ala-D-*iso*Gln(OBn), kojem je najprije uklonjena benzilna esterska skupina s bočnog ogranka *iso*Gln. Ferocenski alkoholi, pripremljeni na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, sadrže alkilnu poveznicu s različitim brojem metilenskih skupina ($n = 2, 4$ i 5). Navedeni alkoholi u uvjetima Steglichove esterifikacije vezani su esterskom vezom na karboksilnu skupinu bočnog ogranka izoglutamina. Pripremljenim ferocenskim esterima desmuramil-dipeptida uklonjena je Boc-zaštitna skupina s amino-skupine alanina te su amidnom vezom vezani na karboksilnu skupinu benzilima zaštićene manozne podjedinice. U posljednjem sintetskom koraku uklonjene su zaštitne skupine s manoze, čime su dobivene ciljne molekule pogodne za ispitivanje *in vitro* adjuvatnog učinka.

(52 + XXVII stranica, 47 slika, 22 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, desmuramil-dipeptid, esterifikacija, ferocen, manokonjugati

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

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
2. prof. dr. sc. Željka Soldin
3. prof. dr. sc. Sanda Rončević

Zamjena: doc. dr. sc. Željka Car

Datum diplomskog ispita: 14. rujna 2022.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Synthesis of ferrocene esters of mannosylated desmuramyl dipeptide

Dora Grgurić

In this diploma thesis, preparation of three ferrocene esters of mannosylated desmuramyl-dipeptide, L-alanyl-D-isoglutamine, is described. Using a convergent approach, fragments, a mannose subunit with a C2 spacer, a dipeptide and ferrocene alcohols were prepared separately, which were subsequently combined into one unit. Commercially available Boc-L-Ala-D-isoGln-OBn was used as starting dipeptide. Ferrocene alcohols, that were prepared at the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, contain an alkyl linker with a different number of methylene groups ($n = 2, 4$ and 5). The alcohols are bound by an ester bond under the conditions of Steglich esterification to the carboxyl group of isoglutamine side chain, which was previously deprotected. The prepared ferrocene esters of desmuramyl-dipeptide were additionally mannosylated by binding of the α -amino group of alanine, which was previously deprotected, to the carboxyl group of the mannose subunit. The benzyl-protected mannose subunit with a C2 spacer was prepared in two synthetic steps from 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- α -D-mannopyranose. In the last step, protective groups were removed from mannose, which resulted in target molecules suitable for testing the *in vitro* adjuvant effect.

(52 + XXVII pages, 47 figures, 22 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, desmuramyl dipeptide, esterification, ferrocene, mannoconjugates

Mentor: Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor

Reviewers:

1. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
2. Dr. Željka Soldin, Professor
3. Dr. Sanda Rončević, Professor

Substitute: Dr. Željka Car, Assistant Professor

Date of exam: 14 September 2022

§ 1. UVOD

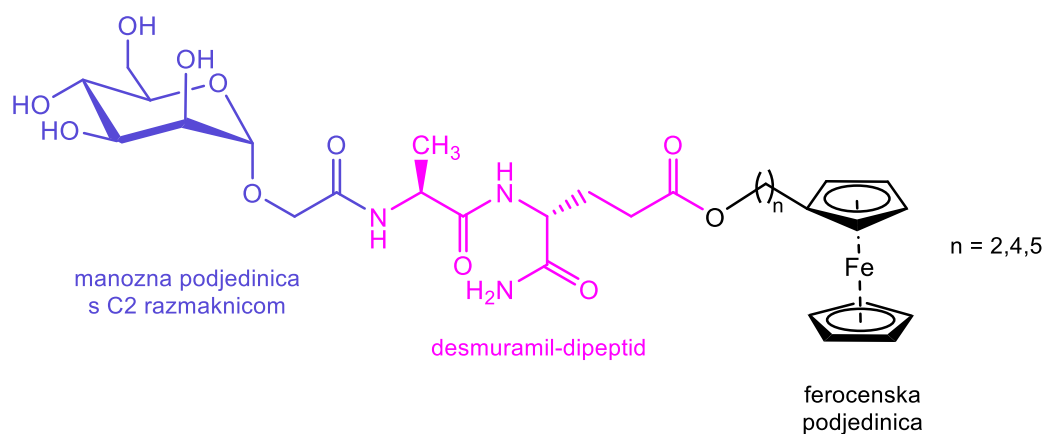
Adjuvanti ili imunostimulatori pomoćne su tvari koje se dodaju cjepivima u svrhu poboljšanja imunološkog odgovora organizma. Postoji nekoliko skupina tvari koje imaju ulogu adjuvanata od kojih jednu čine adjuvanti bakterijskog podrijetla poput derivata muramil-dipeptida.^{1,2}

Muramil-dipeptid, *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin (MurNAc-L-Ala-D-*iso*Gln, MDP) najmanja je strukturna jedinica peptidoglikana koja pokazuje adjuvantnu aktivnost. Unatoč dobrome adjuvantnom učinku, zbog nuspojava koje izaziva nikad nije korišten u tu svrhu. Istraživanja odnosa strukture i aktivnosti (engl. *structure-activity relationship*, SAR) pokazala su da je za adjuvantnu aktivnost MDP-a nužna prisutnost L-alanil-D-izoglutamina (L-Ala-D-*iso*Gln), poznatog kao desmuramil-peptid (DMP).³ U posljednjih nekoliko godina na Zavodu za organsku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu pripremljeni su brojni derivati DMP-a u cilju poboljšanja njegove adjuvantne aktivnosti. Dosad su se najboljima pokazali lipofilni triazolni adamantilni derivati DMP-a, čiji je učinak dodatno pojačan uvođenjem manozne podjedinice.^{4,5} Poznato je da manozna zbog interakcija s manoznim receptorima koji se nalaze na površini stanica može pojačati imunski odgovor organizma. S druge strane, lipofilna podjedinica uvodi se radi bolje ugradnje DMP-a u staničnu membranu i posljedično lakšeg ulaska u stanicu pasivnim transportom.

U sklopu ovog diplomskog rada, po prvi će se puta u strukturu DMP-a kao lipofilni motiv uvesti ferocenska podjedinica, konkretno ferocenski alkoholi koji sadrže alkilnu poveznicu s različitim brojem metilenskih skupina ($n = 2, 4$ i 5). Uvođenjem metilenskih skupina dodatno se pojačava lipofilnost ciljnih molekula i otvara mogućnost ispitivanja odnosa duljine alkilne poveznice i adjuvatnog učinka novopripremljenih spojeva.

Cilj ovog rada jest priprava triju ferocenskih estera manoziliranog desmuramil-dipeptida s esterskom vezom na bočnom ogranku izoglutamina (slika 1). Za pripravu ciljnih molekula koristit će se konvergentni pristup sintezi, odnosno pripremit će se zasebne podjedinice koje će se zatim spojiti logičnim redosljedom. Radi se o manoznoj podjedinici s razmaknicom od dva atoma ugljika (C2 razmaknica), desmuramil-dipeptidu te ferocenskim alkoholima s alkilnom poveznicom. Kao polazni dipeptid koristit će se komercijalno dostupni DMP s odgovarajućim zaštitnim skupinama na amino-skupini alanina i karboksilnoj skupini bočnog ogranka izoglutamina. Nakon uklanjanja zaštitne skupine s bočnog ogranka

izoglutamina provest će se reakcija esterifikacije s lipofilnim ferocenskim alkoholima, prethodno pripremljenim na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Dobivenim ferocenskim esterima DMP-a zatim će se ukloniti zaštita na amino-skupini alanina kako bi se slobodna amino-skupina mogla povezati amidnom vezom s karboksilnom skupinom manozne podjedinice na C2 razmaknici. Navedena benzilima zaštićena manozna podjedinica s C2 razmaknicom pripremit će se u dva sintetska koraka iz 2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranoze. U posljednjem koraku, nakon reakcije amidacije, uklonit će se benzilne zaštitne skupine s manoze. Ovako pripravljenim ferocenskim esterima manoziliranog desmuramil-dipeptida ispitat će se *in vitro* adjuvatni učinak.



Slika 1. Strukturna formula ciljnih molekula diplomskog rada

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Adjuvanti

Zarazne bolesti nastaju kao posljedica ulaska patogenih mikroorganizama u organizam domaćina. Postoji nekoliko načina prevencije zaraznih bolesti, od kojih se najučinkovitijim smatra cijepljenje. Cijepljenje je postupak unošenja cjepiva u organizam domaćina radi stvaranja specifične imunosti. Opća podjela cjepiva je na ona koja sadrže oslabljeni ili inaktivirani oblik određenog patogena i ona koja sadrže umrtvljeni patogen ili njegovu komponentu poput antigena. Cjepiva koja sadrže pročišćene antigene rezultiraju slabijim imunološkim odgovorom te obično zahtijevaju dodatak pomoćne tvari za povećanje istog.¹ Takve pomoćne tvari nazivaju se adjuvanti ili imunostimulatori.

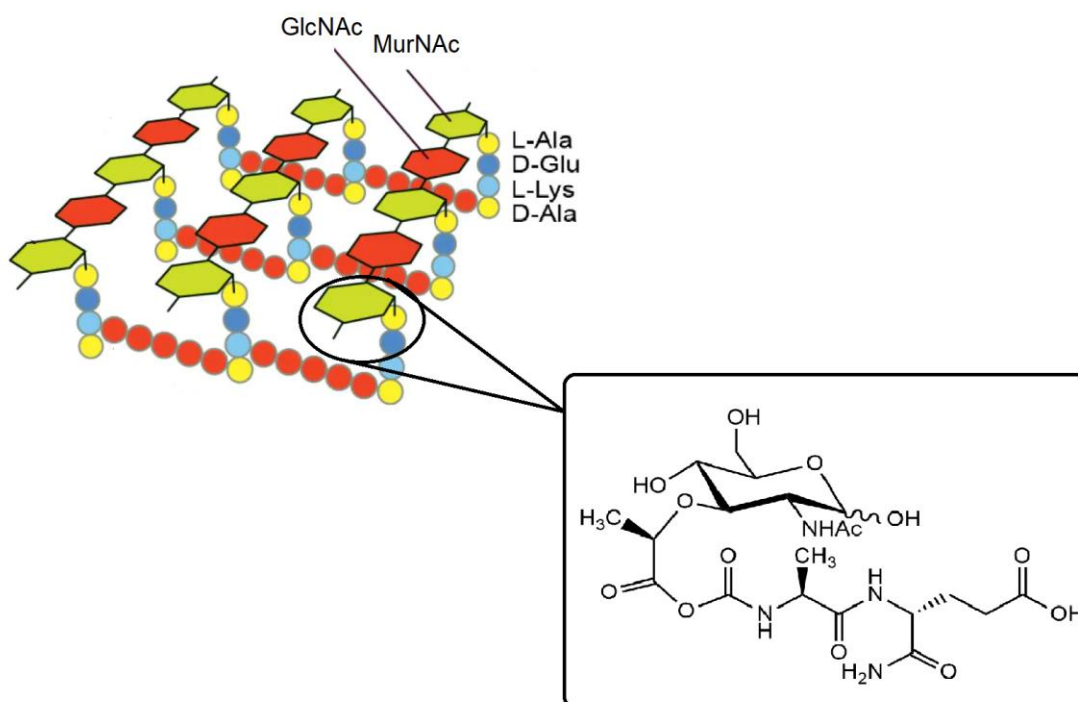
Adjuvanti mogu utjecati na imunosni odgovor organizma na nekoliko načina: povećavaju imunogenost slabih antigena, povećavaju brzinu i trajanje imunološkog odgovora, moduliraju humoralni imunosni odgovor i/ili stanični imunosni odgovor, pojačavaju imunološki odgovor kod imunološki nezrelih pacijenata poput dojenčadi te smanjuju potrebnu dozu antigena.²

Mnoštvo kemijskih spojeva proučavani su kao potencijalni adjuvatni. Jedni od najčešće korištenih spojeva su anorganske soli na bazi aluminijske poput aluminijskog fosfata i aluminijskog hidroksida. Njih nalazimo u cijepovima protiv hepatitisa A, antraksa i u DTP cjepivu (kombinirano cjepivo protiv difterije, tetanusa i hripavca). Osim aluminijskih soli, ulogu adjuvanta ima submikronska emulzija ulja u vodi koju nalazimo u cijepovima protiv gripe. Kao dodatci cjepivima protiv gripe i hepatitisa A mogu se naći i razni virosomi – sferne vezikule koje sadrže proteine virusne membrane. Posljednja skupina su adjuvanti bakterijskog porijekla poput derivata muramil-dipeptida koji ujedno spadaju i u skupinu peptidnih adjuvanata.²

2.1.1. Muramil-dipeptid

Muramil-dipeptid, *N*-acetilmuramil-*L*-alanil-*D*-izoglutamin (MurNAc-*L*-Ala-*D*-isoGln, MDP), najmanja je strukturna jedinica peptidoglikana koja pokazuje adjuvantnu aktivnost. Peptidoglikani su prirodni polimeri koji grade stanične stijenke Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Strukturno se radi o alternirajućim monomerima *N*-acetilglukozamina

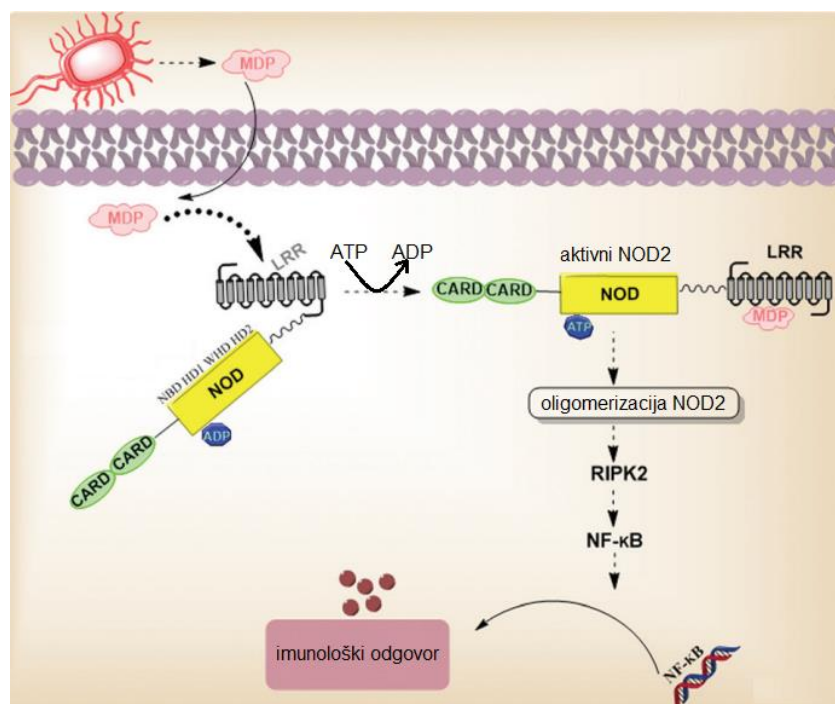
(GlcNAc) i *N*-acetilmuraminske kiseline (MurNAc) međusobno povezanim β -glikozidnom vezom umreženih preko kratkih peptida vezanih na *N*-acetilmuraminsku kiselinu (slika 2).³



Slika 2. Muramil-dipeptid (MDP) kao sastavni dio strukture peptidoglikana

Peptidoglikani se vežu na receptorske proteine za prepoznavanje patogena i na taj način potiču imunološki odgovor. Postoji nekoliko skupina receptorskih proteina (engl. *Pattern Recognition Receptors*, PRR) – Toll receptori, RIG-I receptori, NOD receptori i C-tip lektinskih receptora. NOD2 receptor specifično prepoznaje *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutaminski fragment peptidoglikana, odnosno muramil-dipeptid. Sam NOD2 sastoji se od dvije *N*-terminalne domene za regrutiranje kaspaze (engl. *Caspase Reruitment Domains*, CARDs), oligomerizacijske domene koja veže nukleotide (engl. *Nucleotide Oligomerization Domain*, NOD) te regije bogate leucinom (engl. *Leucine-rich Repeat*, LRR). Upravo je LRR regija odgovorna za MDP-NOD2 interakciju, točnije aminokiselinski ostaci Arg857, Trp911 i Ser913. U interakciji s NOD2 sudjeluju i šećerni i peptidni dio molekule MDP-a pri čemu je aromatski bočni ogranak Trp911 ključan je za vezanje šećerne komponente MDP-a. Interakcijom MDP-NOD2 putem LRR regije dolazi do složenih konformacijskih promjena receptora. Posljedica

navedenih promjena je samooligomerizacija te CARD-CARD interakcija s enzimom RIP2 (engl. *Receptore-Interaction Protein 2*, RIP2) kinazom koja aktivira NF- κ B (engl. *Nuclear Factor Kappa B*) proteinski kompleks. U konačnici dolazi do nastanka antigen specifičnih T-stanica, odnosno do imunskog odgovora (slika 3).^{5,6}

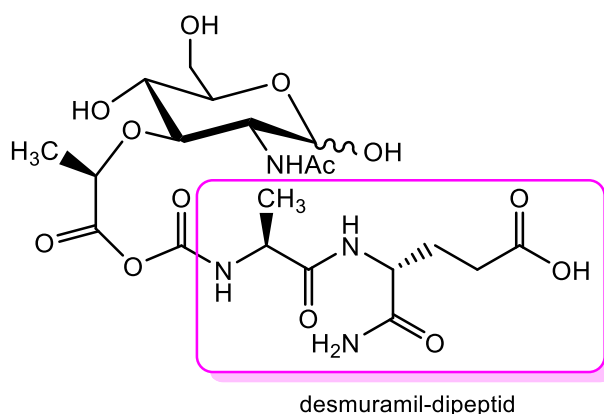


Slika 3. Shematski prikaz interakcije muramil-dipeptida s NOD2 receptorom i aktiviranje imunskog odgovora⁶

Iako muramil-dipeptid pokazuje adjuvantnu aktivnost, ne koristi se kao adjuvant zbog nuspojava koje izaziva kao posljedica vlastite pirogenosti, artritogenosti i toksičnosti. No, navedene spoznaje bile su poticaj za sintezu brojnih derivata MDP-a u cilju poboljšanja adjuvantne aktivnosti i smanjenja nuspojava. Rađene su razne strukturne modifikacije molekule MDP-a te se došlo do dva glavna zaključaka o odnosu strukture i aktivnosti: i) *N*-acetilglukozamin nije ključan za adjuvantnu aktivnost te se može zamijeniti drugim ugljikohidratnim konfiguracijskim izomerom, poput manoze, i ii) *L*-alanin moguće je zamijeniti nekom drugom *L*-aminokiselinom ili glicinom bez gubitka adjuvatne aktivnosti. No, zamjenom *L*-alanina *D*-alaninom dolazi do inaktivacije spoja. Isto vrijedi i kod *D*-glutamina – potrebno je zadržati *D*-konfiguraciju aminokiseline. Osim navedenog, imunostimulirajuća aktivnost MDP-a ne gubi se u slučaju da nema slobodne anomerne hidroksilne skupina na šećernom dijelu.³

2.1.2. Desmuramil-dipeptid

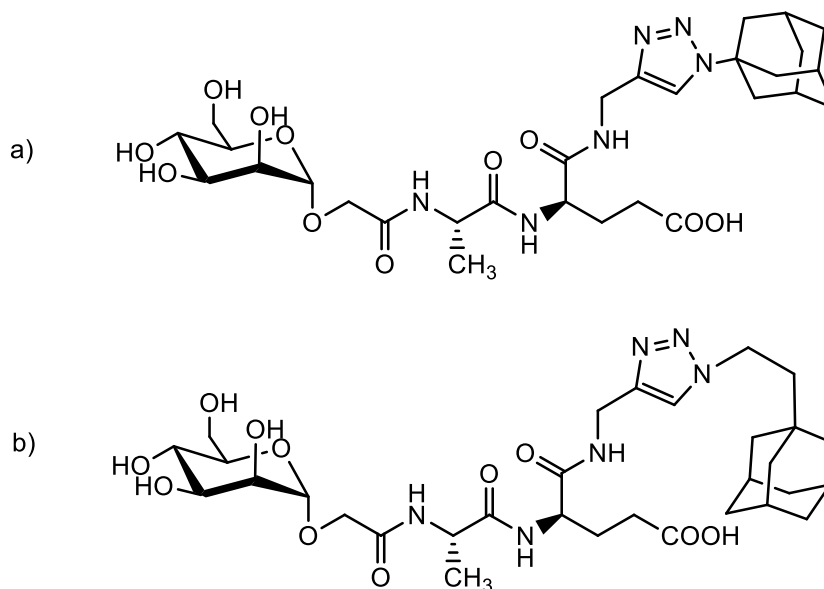
Kao što je ranije navedeno, *N*-acetilmuramilni dio molekule MDP-a nije ključan za njegovu adjuvantnu aktivnost. Ključnim se pokazao dipeptidni fragment L-alanil-D-izoglutamin (L-Ala-D-*iso*Gln) poznatiji kao desmuramil-dipeptid (DMP) (slika 4). Ova spoznaja otvorila je vrata dizajnu i sintezi derivata desmuramil-dipeptida u cilju poboljšanja njegove imunostimulirajuće aktivnosti.



Slika 4. Strukturna formula molekule muramil-dipeptida (MDP) s označenim desmuramil-peptidnim fragmentom (DMP)

Tijekom dosadašnjih istraživanja pripremljeni su analozi DMP-a kojima je strukturno modificiran i N- i C-kraj molekule. Imunomodulacijske aktivnosti pripremljenih spojeva procijenjene su *in vivo*, u mišjem modelu, na temelju sekundarnog humoralnog odgovora na ovalbumin kao testni antigen. Rezultati navedenih istraživanja pokazali su da uvođenje lipofilne podjedinice na C-kraj DMP-a doprinosi imunostimulirajućoj aktivnosti. Također, manozilacija N-kraja DMP-a prethodno modificiranog lipofilnom podjedinicom dodatno pojačava taj učinak. Ispitivanjem odnosa strukture i aktivnosti (engl. *structure-activity relationship*, SAR) pokazano je da glikokonjugati koji sadrže glikolnu poveznicu između manoze i DMP-a pokazuju jaču adjuvantnu aktivnosti od analoga s kiralnom hidroksiizobutirilnom poveznicom. Od svih dosad pripremljenih glikokonjugata DMP-a, najboljim su se pokazali triazolni adamantilni manokonjugati DMP-a (slika 5), pri čemu je umetanje fleksibilne etilne poveznice između triazolnog i adamantilnog dijela molekule dodatno doprinijelo porastu imunskog odgovora (spoj b). Navedeni spojevi sadrže slobodnu karboksilnu skupinu na bočnom lancu D-izoglutamina koja daje najveći doprinos vezanju na NOD2 receptor. Također valja napomenuti

kako su opisani konjugati stabilni, apirogeni i topljivi u vodi, što ih, posebno spoj b), čini potencijalno primjenjivim kao dodatak cijepivima.^{4,5}



Slika 5. Strukturne formule molekula lipofilnih triazolnih adamantilnih derivata manoziliranog DMP-a s jakim adjuvatnom aktivnosti

2.1.3. Manozilirani derivati desmuramil-dipeptida

Kao što je ranije spomenuto, manoziliranje N-kraja DMP-a pozitivno utječe na njegovu adjuvatnu aktivnost. Pretpostavka je da se to ostvaruje putem specifičnih receptora za manozu.

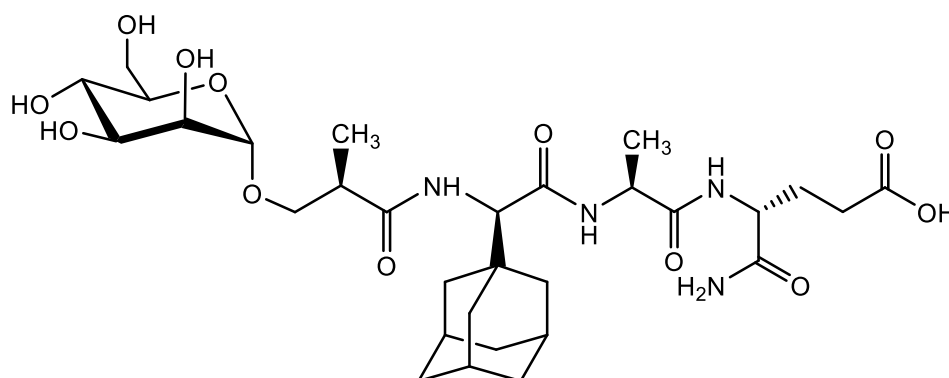
Proteini koji specifično i reverzibilno vežu šećere, a da pri tom ne pokazuju katalitičku aktivnost nazivaju se lektini. Postoje četiri osnovne skupine lektina s obzirom na aminokiselinski slijed domene za prepoznavanje ugljikohidrata (engl. *carbohydrate-recognition domain*, CRD): C, S, P, i I tip. CRD je aktivni dio molekule lektina koji veže specifični šećer. Šećeri koje lektini prepoznaju i vežu su monosaharidi: D-manoza, D-glukoza, D-galaktoza, L-fukoza, D-ksiloza i njihovi derivati: *N*-acetil-D-glukozamin, *N*-acetil-D-galaktozamin, *N*-acetilneuraminska kiselina. Također, vežu i oligosaharide koji u svojoj strukturi sadrže navedene monosaharide te njihove derivate.³

Manozni receptor (engl. *mannose receptor*, MR) i lektin koji veže manozu (engl. *mannose-binding lectin*, MBL) spadaju u lektine tipa C. MBL nalazimo u ljudskom serumu, dok je MR transmembranski protein imunokompetentnih stanica. Manozni receptor služi za

prepoznavanje patogena, „hvata“ i prezentira antigen T-stanicama te ima ulogu posrednika u endocitozi i fagocitozi. MBL veže velik broj patogenih organizama te također sudjeluje u procesu fagocitoze, aglutinacije i regulacije upalnih procesa.^{3,7}

Pretpostavka je da uvođenjem manozne podjedinice u strukturu DMP-a dolazi do prepoznavanja od strane navedenih lektina čime se stimulira imunološki odgovor. Iz tog razloga pripravljena je cijela serija derivata DMP-a s manoznom podjedinicom te je ispitan njihov adjuvatni učinak.

Kod prve pripravljene serije manoziliranih derivata DMP-a radilo se o derivatima adamantil-tripeptida (AdTP) s kiralnom hidroksiizobutirilnom poveznicom između N-kraja tripetida i manoze. Pripravljene derivati razlikovali su se stereokemijom na navedenoj poveznici i (adamant-1-il)glicinskom fragmentu. Najboljim se pokazao derivat ManAdTP s *R*-konfiguracijom na hidroksiizobutirilnoj poveznici i *D*-konfiguracijom na (adamant-1-il)glicinskom fragmentu (slika 6).³



Slika 6. Strukturna formula molekule manoziliranog adamantilglicinskog derivata DMP-a s jakom adjuvatnom aktivnosti (ManAdTP)

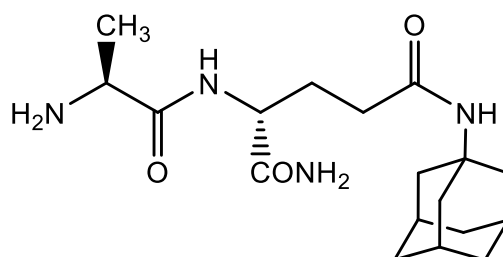
Na temelju ovih rezultata pripravljena je nova serija derivata DMP-a i adamantil-tripeptida povezanih glikolnom poveznicom. Svi derivati s glikolnom poveznicom pokazali su bolji adjuvatni učinak od analoga s hidroksiizobutirilnom poveznicom, što je potaknulo sintezu novih derivata DMP-a s glikolnom poveznicom.⁸ Bolji od derivata adamantil-tripeptida pokazali su se oni spojevi kod kojih je adamantilna podjedinica vezana preko triazolne poveznice na α -položaju izoglutamina. Najboljima su se pokazali već spomenuti konjugati prikazani na slici 5, pri čemu je derivat s etilnom razmaknicom između triazolnog prstena i

adamantana najaktivniji do sada priređeni derivat ManDMP na Zavodu za organsku kemiju. Pripravljen je i analog konjugata a) bez manozne podjedinice te mu je ispitan adjuvantni učinak. Manozilirani konjugat a) pokazao je bolji adjuvantni učinak od svog analoga bez manozne podjedinice, što dodatno potvrđuje ulogu manoze u imunostimulacijskom učinku derivata DMP-a.⁵

2.1.4. Lipofilni derivati desmuramil-dipeptida

Poznato je da tvari mogu ući u stanicu pasivnim ili aktivnim transportom kroz staničnu membranu. Za prolazak pasivnim transportom, tvari moraju biti lipofilne kako bi nesmetano mogle difundirati kroz fosfolipidni dvosloj stanične membrane. Jedna od tvari koja na taj način ulazi u stanicu je i desmuramil-dipeptid. Iz tog se razloga u strukturu DMP-a uvode lipofilne podjedinice koje omogućavaju lakšu ugradnju u staničnu membranu te posljedično i bolju imunostimulacijsku aktivnost.

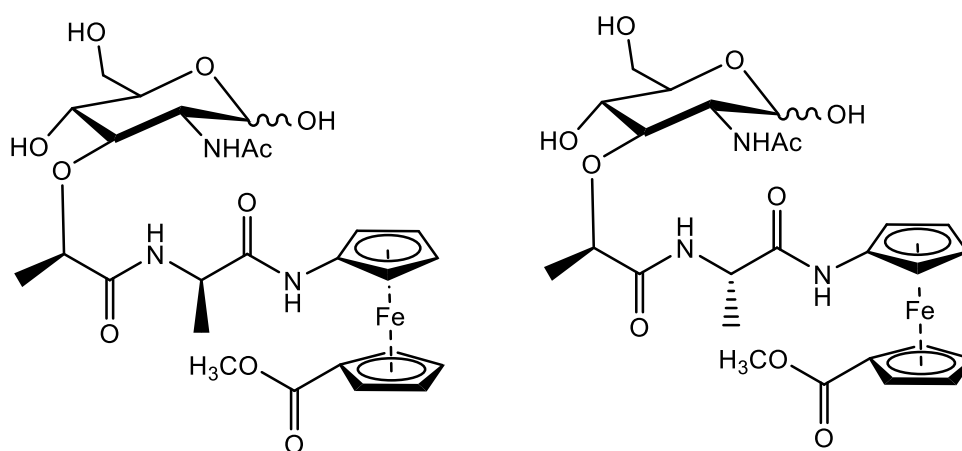
U dosadašnjim istraživanjima pripravljeni su brojni derivati DMP-a koji su sadržavali lipofilnu podjedinicu i na N- i na C-kraju dipeptida te je ispitan njihov adjuvantni učinak. Najviše pripravljenih i ispitanih derivata u strukturi su sadržavali adamantanski strukturni motiv. Svojstva adamantana poput hidrofobnosti, dobro definirane 3D strukture i lipofilnosti bila su povod za sintezu derivata DMP-a s adamantanskom podjedinicom. Vežanjem adamantana na γ -poziciju D-izoglutamina dobiven je adamantilamid-dipeptid (slika 7). Navedeni konjugat pokazao se vrlo učinkovitim adjuvatom u eksperimentima *in vivo*.³



Slika 7. Strukturna formula molekule adamantilamid-dipeptida

Rezultati najnovijih istraživanja pokazali su da je α -pozicija D-izoglutamina optimalna za uvođenje lipofilnih podjedinica jer na taj način karboksilna skupina bočnog ogranka D-izoglutamina, ključna za vezanje na NOD2 receptor, ostaje slobodna.⁵

Uvođenje lipofilnih ferocenskih podjedinica u strukturu DMP-a dosad nije istraženo. L. Barišić i njeni suradnici opisali su pripremu derivata MDP-a s ferocenskom podjedinicom polazeći od *O*-zaštićene MurNAc, L- ili D-Ala i 10-aminoferocen-1-karboksilne kiseline.⁹ Pripravljani analozi MDP-a s potencijalnim imunomodulatornim djelovanjem prikazani su na slici 8. Navedeni spojevi okarakterizirani su infracrvenom spektroskopijom (IR), spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i spektroskopijom cirkularnog dikroizma (CD) te spektrometrijom masa (MS),⁹ no dosad nema podataka da je spojevima ispitan imunomodulacijski učinak.

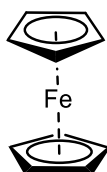


Slika 8. Strukturne formule molekula pripremljenih ferocenskih analoga MDP-a

2.2. Ferocen

2.2.1. Otkriće i struktura ferocena

Ferocen, sustavnog imena bis(η^5 -ciklopentadienil)željezo(II), organometalni je spoj iz skupine metalocena. Poznat je po takozvanoj „sendvič“ strukturi – metalno središte nalazi se između dva ciklopentadienilna prstena (slika 9).

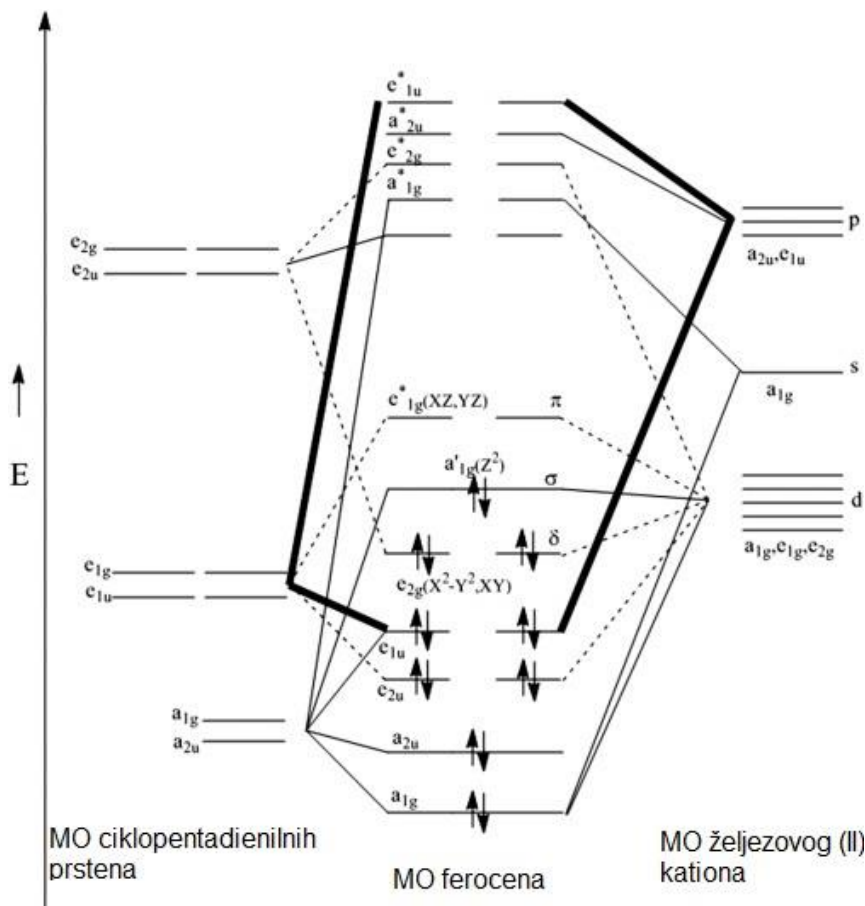


Slika 9. Strukturna formula molekule ferocena

Prva zabilježena sinteza ferocena pripisuje se nepoznatom znanstveniku koji je krajem 1940-tih godina propuštao vrući ciklopentadien kroz željeznu cijev prilikom čega je nastala žuta tvar u unutrašnjosti cijevi koja je istu začepila. Slijedeća sinteza iz 1950. godine pripisuje se S. Milleru, J. Tebbothu i J. Tremaineu. Oni su pokušali sintetizirati amine u prilagođenom Haber-Boschovom postupku iz elementarnog dušika i ugljikovodika. Umjesto reakcije ciklopentadiena s dušikom na 300 °C došlo je do reakcije ciklopentadiena s nepoznatim izvorom željeza pri čemu je nastao ferocen. Godinu dana kasnije, P. L. Pauson i T. J. Kealy pokušali su pripremiti fulvalen oksidativnom dimerizacijom ciklopentadiena. Umjesto željenog produkta, reakcijom ciklopentadienilmagnezijeva bromida sa željezovim(III) kloridom u dietil-eteru dobili su stabilni svjetlonarančasti prah ferocena. Upravo se ova sinteza navodi kao otkriće ferocena.¹⁰

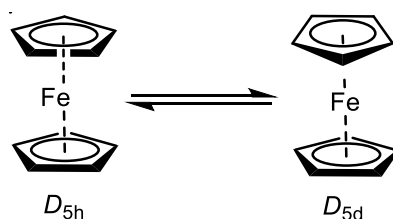
Otkriće ferocena otvorilo je mnoštvo pitanja vezanih uz njegovu strukturu. Pauson i Kealy pretpostavili su da je svaka od dvije ciklopentadienilne skupine preko zasićenog atoma ugljika kovalentnom vezom vezana na atom željeza.¹⁰ No, takva struktura nije bila u skladu s neočekivanom stabilnosti ferocena. Točna struktura otkrivena je 1952. godine od strane tri neovisne skupine znanstvenika. Woodward i Wilkinson primjetili su da ferocen reagira u reakcijama tipičnim za aromatske spojeve poput benzena, te su na temelju toga donijeli zaključak da nezasićenost svih ugljikovih atoma ciklopentadienilnih prstena sugerira da su prsteni simetrično vezani na dvovalentno željezo, a ne preko jednog od ugljikovih atoma iz prstena.¹¹ E. Fischer strukturu ferocena nazvao je „dvostruki stožac“, dok su P. F. Eiland i R. Pepinsky do svojih zaključaka došli primjenom rendgenske kristalografije i kasnije spektroskopije NMR.^{12,13}

Velika stabilnost ferocena posljedica je organometalne veze između željezova(II) kationa i dvaju ciklopentadienilnih prstena. Priroda ove veze može se pojasniti molekularno-orbitalnim dijagramom (slika 10). Ferocen je 18-elektronski sustav: 6 d-elektrona potječe od željezova(II) kationa, a 12 elektrona od liganada (6 od svakog ciklopentadienilnog prstena). Kao takav ima popunjenu a_1' orbitalu, kao i sve ostale orbitale niže energije što rezultira nastankom relativno najjače veze u usporedbi sa sličnim spojevima s različitim brojem elektrona. Kod sustava s većim brojem elektrona dolazi do popunjavanja protuveznih orbitala što smanjuje jakost veze i samim time duljina veze se povećava.¹⁴



Slika 10. Molekularno-orbitalni dijagram molekule ferocena

Zanimljivost vezana uz strukturu molekule ferocena jest mogućnost slobodne rotacije ciklopentadienilnih prstena oko osi koja ih povezuje i istovremeno prolazi metalnim središtem. Energija potrebna za navedenu rotaciju iznosi svega 4 kJ mol^{-1} te prilikom rotacije dolazi do promjene simetrije molekule iz D_{5h} u D_{5d} i obrnuto (slika 11). Ovakva rotacija može se usporediti s rotacijom dvije metilne skupine oko C–C veze u molekuli etana, gdje dolazi do promjene konformacije iz zvjezdaste u zasjenjenu i obrnuto.^{14,15}

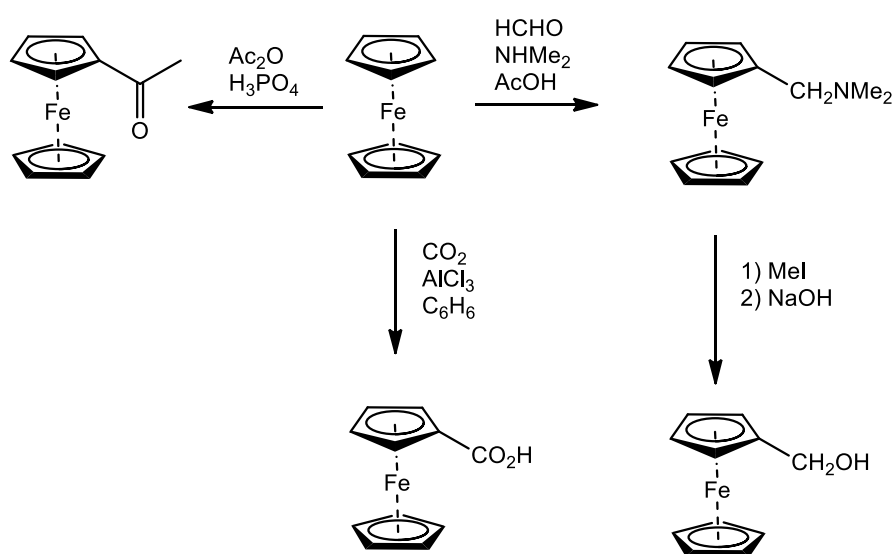


Slika 11. Promjena simetrije molekule ferocena kao posljedica rotacije ciklopentadienilnih prstena

2.2.2. Svojstva ferocena

Veliki interes koji se nakon otkrića ferocena javio kako za sam ferocen tako i općenito za organometalne spojeve posljedica je upravo njegovih neobičnih svojstava - stabilnosti do 400 °C, reaktivnosti prema elektrofilima te blagom i reverzibilnom oksidacijom s redukcijskim potencijalom od 0,4 V u odnosu na zasićenu kalomelovu elektrodu. Također, topljiv je u većini organskih otapala, dok je vrlo slabo topljiv u vodi.¹⁵

Zbog prisutnosti ciklopentadienilnih prstena ferocen podliježe tipičnim reakcijama aromatskih spojeva, odnosno elektrofilnoj aromatskoj supstituciji. Friedel-Craftsovo aciliranje ferocena pomoću anhidrida octene kiseline u prisutnosti fosforne kiseline kao katalizatora često se provodi kao studentska vježba. U uvjetima Mannichove reakcije, ferocen daje *N,N*-dimetilaminometilferocen. Njega možemo reakcijom s metil-jodidom prevesti u odgovarajuću sol, te dodatkom baze dobiti ferocenilmetanol. Ferocenkarboksilnu kiselinu dobivamo reakcijom ferocena s ugljikovim monoksidom uz Lewisovu kiselinu kao katalizator. Navedene tipične reakcije ferocena prikazane su na slici 12.



Slika 12. Shematski prikaz odabranih reakcija ferocena

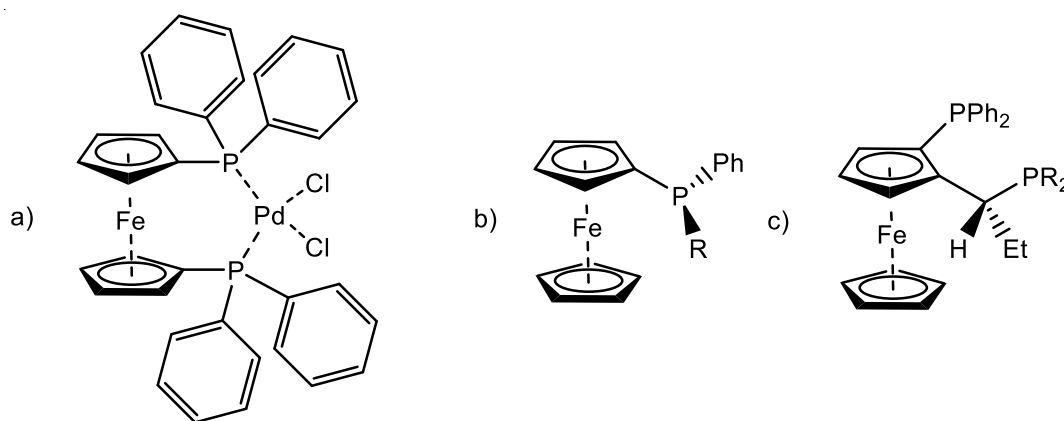
2.2.3. Primjena ferocena i njegovih derivata

Ferocen i njegovi derivati imaju primjenu u raznim granama industije. Organski derivati ferocena često se koriste kao katalizatori, u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama, kao aditivi

gorivu i ostalo. Posljednjih godina sve se više razvija bioorganometalna kemija kao zasebno područje koje spaja organometalnu kemiju s biologijom i medicinom. Razvijaju se nove aktivne tvari koje u svojoj strukturi sadrže ferocensku podjedinicu.

U industriji goriva, ferocen i njegovi derivati koriste se kao antidetonatori koji se dodaju gorivu za benzinske motore. Ferocen i derivati pokazali su se sigurnijima i manje štetnima za okoliš od prethodno korištenog tetraetilolova. Ferocen se koristi i kao aditiv ugljenu – dodatkom ferocena u komoru za izgaranje ili impregnacijom ugljena ferocenom dolazi do smanjenja količine nastalog dima i sumporovog trioksida koji nastaje kao nusprodukt izgaranja ugljena.^{16,17}

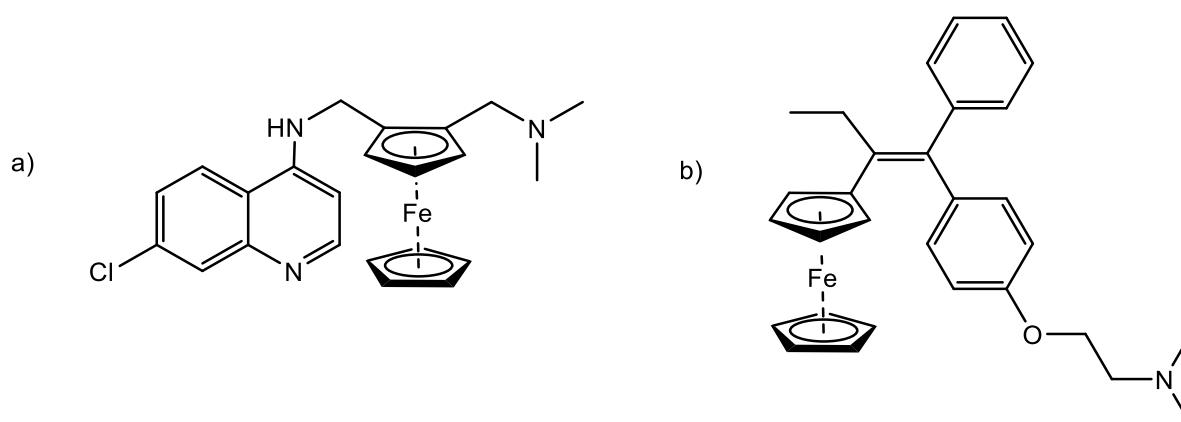
Derivat ferocena 1,1'-bis(difenilfosfin)ferocen (dppf) koristi se kao ligand u homogenoj katalizi. Vrlo lako stvara metalne komplekse – njegov kompleks s paladijem, (dppf)PdCl₂ čest je katalizator u reakcijama sprežavanja (engl. *coupling reactions*) kataliziranim paladijem (slika 13a). Upravo se on primjenjuje za katalizu reakcija u farmaceutskoj i agrokemijskoj industriji. Za razliku od dppf-a, derivati ferocena s jednim fosfinom mogu biti kiralni ukoliko su supstituenti vezani na atom fosfora različiti. Takvi spojevi koriste se kao asimetrični katalizatori u enantioselektivnoj sintezi (slika 13b). Ako su dva supstituenta na ciklopentadienilnom prstenu različita, onda prsten ima kiralnu ravninu (slika 13c).¹⁵



Slika 13. Strukturne formule molekula: a) kompleksa (dppf)PdCl₂; b) kiralnog derivata ferocena s kiralnim središtem na atomu fosfora; c) kiralnog derivata ferocena s kiralnom ravninom i kiralnim središtem na ugljikovom atomu supstituenta

Stabilnost ferocena u vodenom, aerobnom mediju te dostupnost velikog broja derivata bili su povod za ispitivanje biološke primjene ferocena i njegovih derivata, te za njihovu

konjugaciju s biomolekulama. Sam ferocen pokazao se kao antianemično i citotoksično sredstvo. Pripravljani su konjugati ferocena s dobro poznatim lijekovima, poput antibiotika penicilina i cefalosporina. Također, ferocenska podjedinica uspješno je uvedena u strukture već poznatih lijekova poput klorokina – lijeka protiv malarije (ferokin), te lijeka protiv raka – tamoksifena (ferocifen) (slika 14).¹⁸ Ferokin je pokazao pozitivan antimalarijski učinak protiv klorokin-rezistentnih *Plasmodium falciparum* vrsta, dok je ferocifen pokazao visoko selektivnu antitumorsku aktivnost prema hormonski-ovisnom i hormonski-neovisnom raku dojke, za razliku od tamoksifena koji djeluje samo na hormonski-ovisan rak dojke.¹⁹



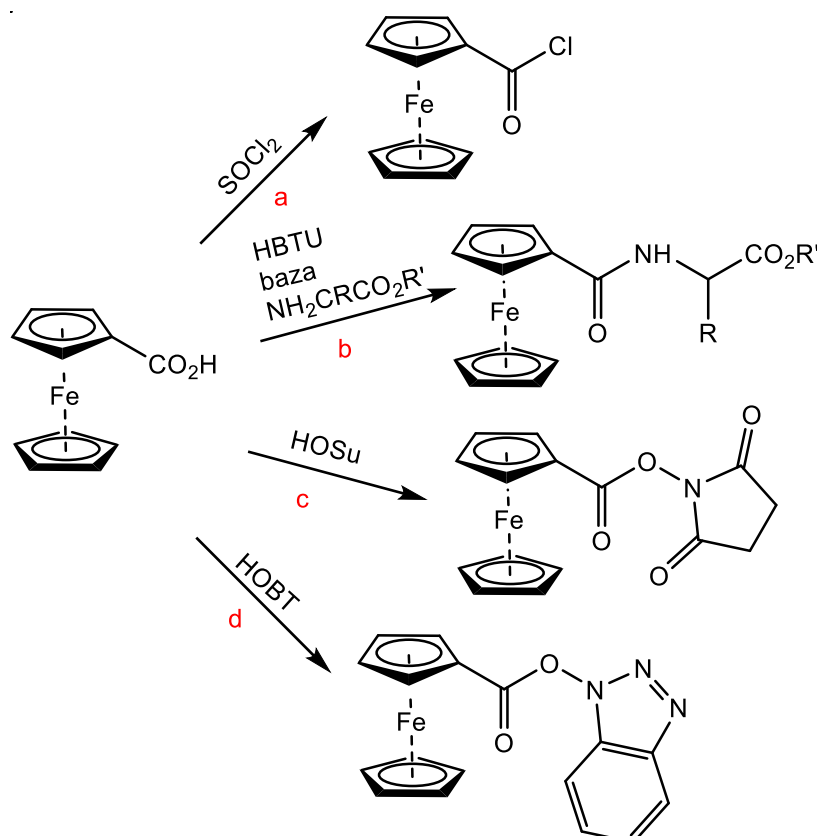
Slika 14. Strukturne formule molekula dobivenih uvođenjem ferocenske podjedinice u strukture poznatih lijekova: a) ferokin – strukturna varijacija klorokina; b) ferocifen – strukturna varijacija tamoksifena

2.2.4. Derivati ferocena i aminokiselina/peptida

Najčešći način povezivanja ferocena s aminokiselinama ili peptidima je formiranjem amidne veze pri čemu se amino-skupina terminalne aminokiseline povezuje s ferocenkarboksilnom kiselinom. Schlögel je 1957. godine prvi pripremio takve spojeve, radilo se o derivatima ferocena i aminokiselina ili dipeptida: Fc-CO-Gly-OMe, Fc-CO-Gly-OH i Fc-CO-Gly-Leu-OEt.¹⁸

Kako bi došlo do formiranja amidne veze na sobnoj temperaturi i pri blagim uvjetima, karboksilnu skupinu potrebno je aktivirati. To podrazumijeva prevođenje hidroksilne skupine karboksilne kiseline u bolju izlazeću skupinu. Postoji nekoliko načina aktivacije, od kojih se često koriste: prevođenje karboksilne kiseline u kiselinski klorid (slika 14a), aktivacija *in situ*

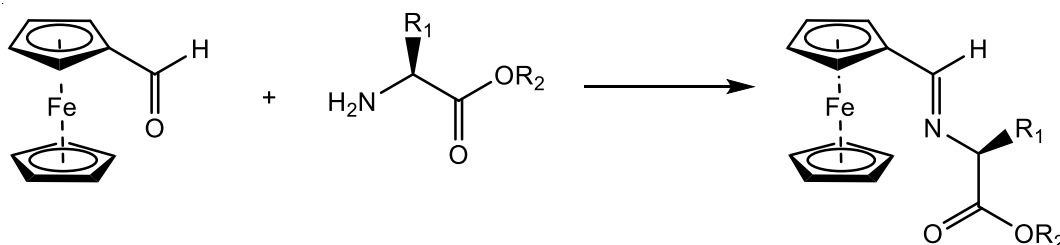
pomoću *O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)-*N,N,N,N'*-tetrametiluronijevog haksaf fluorofosfata (HBTU) (slika 14b) i prevođenje karboksilne kiseline u sukcinimidni ili benzotriazolni ester, uz upotrebu karbodiimida poput *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimida (EDC) ili *N,N*-dicikloheksilkarbodiimida (DCC) u kombinaciji s *N*-hidroksisukcinimidom (HOSu) ili 1-hidroksibenzotriazolom (HOBT) (slika 15c, d).¹⁸



Slika 15. Shematski prikaz odabranih metoda aktivacije karboksilne kiseline: a) prevođenje u kiselinski klorid; b) aktivacija *in situ* pomoću HBTU; c) prevođenje u sukcinimidni ester; d) prevođenje u benzotriazolni ester

Za praktičnu primjenu od navedenih metoda najboljom se pokazala aktivacija karboksilne kiseline *in situ* pomoću HBTU. Postoji nekoliko razloga, prvi od kojih je da se cijela reakcija karboksilne kiseline i amina, zajedno s aktivacijom može provesti u jednoj tikvici (engl. *one pot*). Osim toga, vrijeme takvih reakcije relativno je kratko (cca. < 45 min) i nije nužno koristiti suhe uvjete. Nusprodukti nastali reakcijom mogu se relativno dobro ukloniti obradom reakcijske smjese nakon završetka reakcije, bez potrebe za dodatnim čišćenjem.¹⁸

Osim amidnom, ferocen se može povezati s aminokiselinom ili peptidom iminskom vezom. Radi se o reakciji između ferocenkarbaldhida i slobodne amino-skupine aminokiseline ili peptida (slika 16).¹⁸



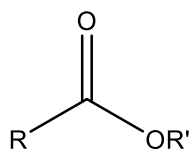
Slika 16. Shematski prikaz povezivanja ferocena s aminokiselinama iminskom vezom

Eisenthal i suradnici pripravili su derivate ferocena i peptida povezanih esterskom vezom. Veza je formirana reakcijom ferocenkarboksilne kiseline i hidroksilne skupine derivata peptida na čijem se C-kraju nalazio fenilalaninol.¹⁵ O načinima priprave estera više će riječi biti u nastavku.

2.3. Esteri

2.3.1. Struktura i važnost estera

Esteri su derivati karboksilnih kiselina čija je općenita formula RCOOR' (slika 17). Reakcija karboksilnih kiselina i alkohola uz izdvajanje vode samo je jedan od brojnih načina njihove priprave. Obično se radi o hlapljivim tekućinama ili lako taljivim krutinama. Esteri malih molekulskih masa poznati su po slatkastom mirisu pa tako butil-butirat ima miris ananasa, etil-formijat ruma i slično. No, u prirodi su značajniji esteri većih molekulskih masa – gliceridi, koji su sastavne komponente masti i ulja. Masti i ulja, odnosno trigliceridi koji ih grade, esteri su alkohola glicerola i triju molekula masnih kiselina.



Slika 17. Općenita formula molekule estera

Osim u trigliceridima, esterske su veze prisutne u brojnim metabolitima u organizmu, poput mnogih primarnih metabolita lipida, ali i u sekundarnim metabolitima poput makrocikličkih laktona koji pripadaju ciklopepsi-peptidima i poliketidima.²⁰

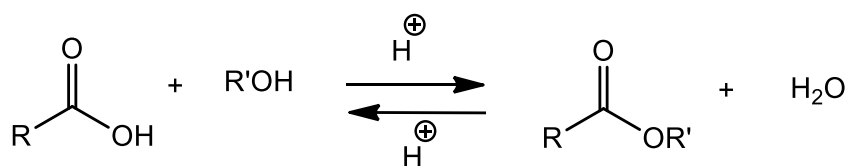
Esteri imaju široku primjenu u industriji – estersku vezu nalazimo kod poliesterskih polimera, poput poli(etilen-tereftalata) (PET), koriste se kao otapala te u industriji sintetičkih okusa i mirisa i drugo.

2.3.2. Načini priprave estera

Općeniti naziv za vrstu reakcije u kojoj iz reaktanata nastaje ester kao glavni produkt je esterifikacija. Najčešće se radi o karboksilnim kiselinama i alkoholima kao reaktantima, te o esterima i vodi kao produktima. U tom slučaju voda koja reakcijom nastaje može hidrolizirati dobiveni ester, odnosno radi se o povratnoj reakciji. Danas su poznati brojni postupci esterifikacije, a neki od najpoznatijih su: Fischerova esterifikacija, reakcija alkohola i kiselinskih halogenida, Steglichova esterifikacija i drugi.

2.3.2.1. Fischerova esterifikacija

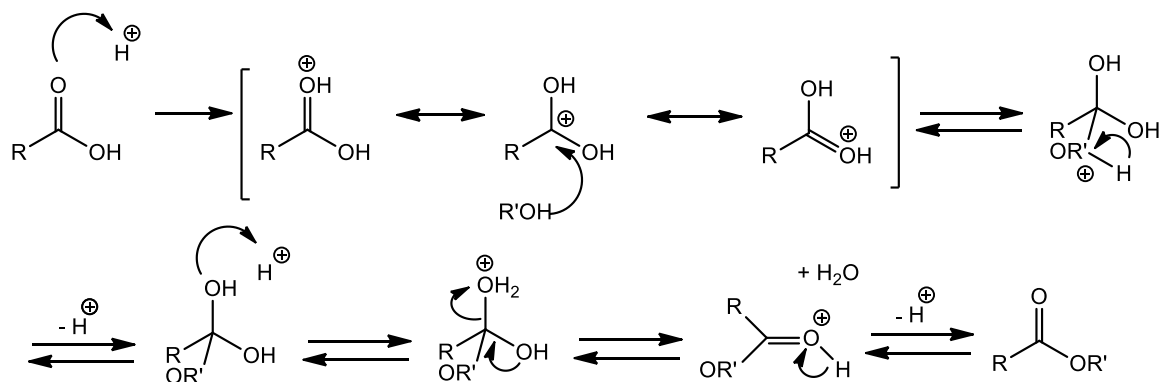
Fischerova esterifikacija je metoda nastanka esterske veze reakcijom između karboksilne skupine molekule karboksilne kiseline i hidroksilne skupine molekule alkohola uz dodatak jake kiseline kao katalizatora (slika 18). Najčešće ulogu katalizatora imaju sumporna kiselina, *p*-toluensulfonska kiselina ili Lewisove kiseline poput skandijevog triflata. Reakciju su prvi puta opisali Emil Fischer i Arthur Speier 1895. godine.²¹



Slika 18. Shematski prikaz Fischerove esterifikacije

Mehanizam reakcije prikazan je na slici 19. Prvi korak je protoniranje karboksilne skupine čime raste elektrofilnost atoma ugljika karbonilne skupine. Slijedi nukleofilni napad hidroksilne skupine molekule alkohola na karbonilnu skupinu kiseline. Izmjenom protona

dolazi do eliminacije molekule vode, obnavljanja dvostruke ugljik-kisik veze te nastanka molekule estera.

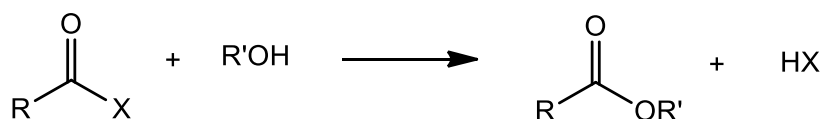


Slika 19. Shematski prikaz mehanizma Fischerove esterifikacije

Navedena reakcija je povratna, riječ je o hidrolizi estera, no prema Le Chatelierovom principu ravnoteža reakcije može se pomaknuti prema produktima. To se može postići korištenjem značajnog suviška reaktanata (primjerice provođenjem reakcije u alkoholu kao otapalu) ili uklanjanjem produkata (primjerice vode dodatkom dehidratacijskog sredstva ili korištenjem Dean-Starkove aparature).

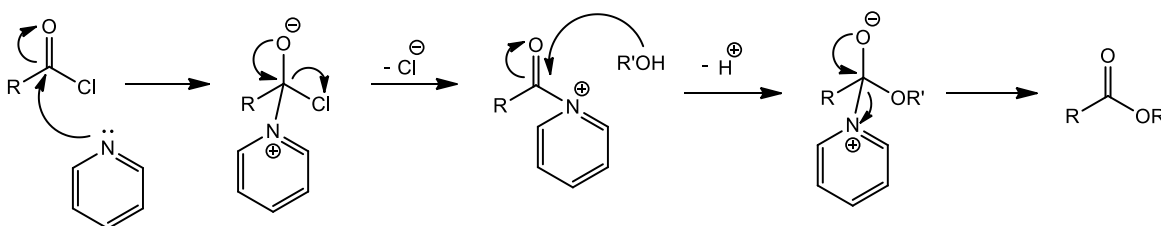
2.3.2.2. Reakcija alkohola i kiselinskih halogenida

Kiselinski halogenidi zbog svoje su elektrofilnosti pogodni za reakciju s alkoholima pri čemu nastaju esteri. Reakciju je u pravilu potrebno provoditi u suhim uvjetima jer kiselinski halogenidi lako hidroliziraju. Osim hidrolize, sklone su i racemizaciji u bazičnim uvjetima. Kiselinski halogenidi koji su najmanje podložni hidrolizi i racemizaciji su kiselinski fluoridi. Oni se mogu generirati *in situ* reakcijom karboksilne kiseline i fluorirajućeg sredstva poput dietilaminosumporova trifluorida (DAST).²⁰ Općeniti prikaz pripreve estera reakcijom alkohola i kiselinskih halogenida prikazana je na slici 20.



Slika 20. Shematski prikaz nastanka estera reakcijom alkohola i kiselinskih halogenida

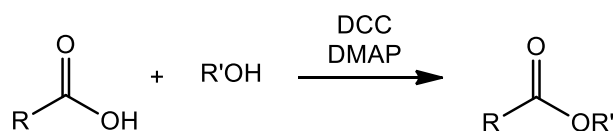
Mehanizam ove reakcije primjer je mehanizma nukleofilne supstitucije praćen izlaskom dobre izlazne skupine – odgovarajućeg halogenida, uobičajeno klorida (slika 21). U reakcijsku smjesu često se dodaje slaba baza poput piridina koji ima ulogu katalizatora. Piridin je bolji nukleofil od alkohola i prvi napada kiselinski klorid čime nastaje vrlo elektrofilan međuprodukt. Slijedi nukleofilni napad alkohola na karboksilnu skupinu spomenutog međuprodukta, zatim izlazak piridina pri čemu nastaje odgovarajući ester kao konačni produkt reakcije.



Slika 21. Shematski prikaz mehanizma nastanka estera reakcijom alkohola i kiselinskog klorida

2.3.2.3. Steglichova esterifikacija

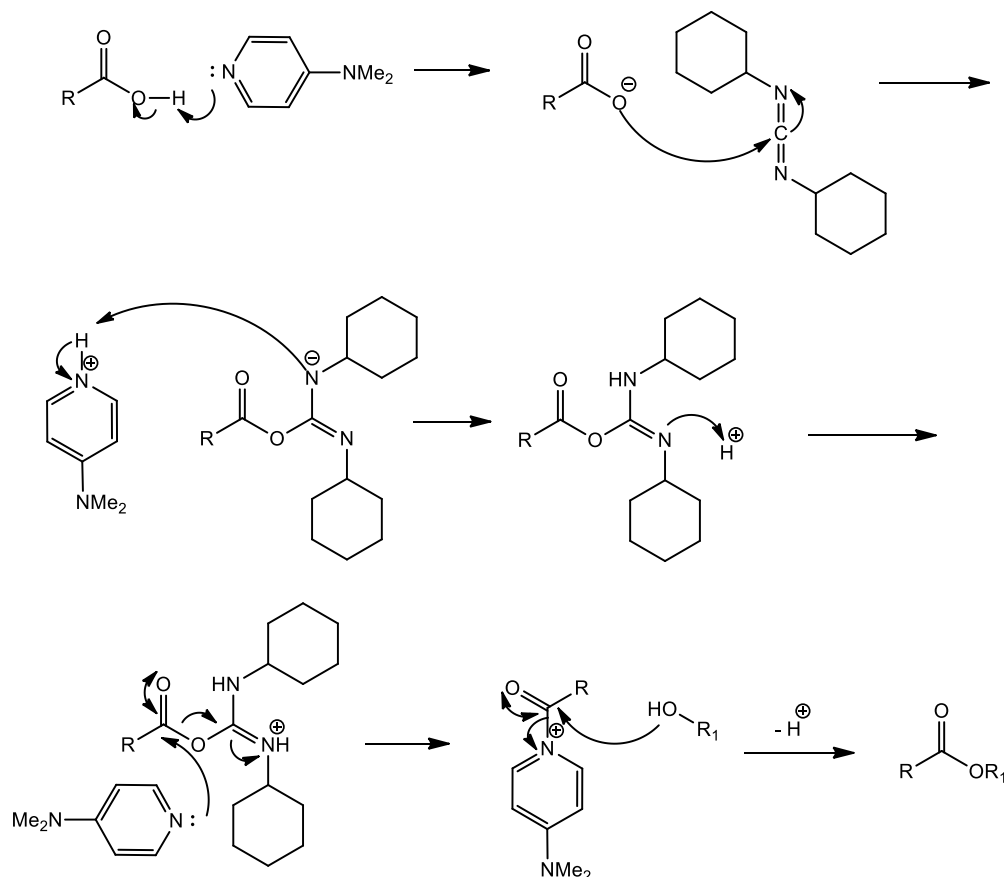
Steglichova esterifikacija je metoda nastanka esterske veze gdje *N,N*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC) ima ulogu kondenzacijskog reagensa, a *N,N*-dimetiaminopiridin (DMAP) nukleofilnog katalizatora (slika 22). Reakciju je prvi puta opisao Wolfgang Steglich 1978. godine.²²



Slika 22. Shematski prikaz Steglichove esterifikacije

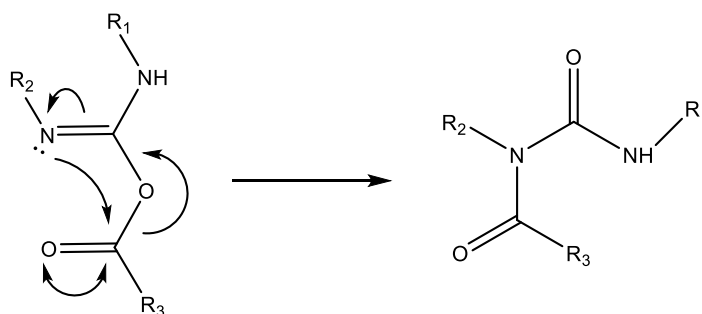
Mehanizam reakcije prikazan je na slici 23. U prvom koraku dolazi do deprotoniranja karboksilne kiseline pomoću DMAP-a. Nastali karboksilatni ion nukleofilno napada

elektrofilni ugljikov atom karbodiimida pri čemu nastaje *O*-acilizourea. To je takozvani aktivirani oblik karboksilne kiseline gdje je hidroksilna skupina zamijenjena boljom izlazećom skupinom. Slijedi prijenos acilne skupine pomoću DMAP-a i nukleofilni napad hidroksilne skupine alkohola pri čemu nastaje esterska veza.



Slika 23. Shematski prikaz mehanizma Steglichove esterifikacije

Reakciju je moguće provesti i bez prisutnosti DMAP-a, samo značajno sporije. Sukladno tome nastaje više nusprodukata poput *N*-aciluree koja nastaje 1,3-pregradnjom *O*-acilizouree (slika 24).²⁰ Korištenjem amina umjesto alkohola kao nukleofila u reakciji nastaje amidna veza bez dodatka DMAP-a. Razlog tome je taj što je amino-skupina bolji nukleofil od hidroksilne skupine te je nukleofilni napad amino-skupine na *O*-acilizoureu dovoljno brz i bez dodatka katalizatora.

Slika 24. Shematski prikaz nastanka *N*-aciluree 1,3-pregradnjom *O*-acilizouree

Kao nusprodukt reakcije s DCC-om nastaje dicikloheksilurea (DCU) koja je slabo topljiva u većini organskih otapala, pa se taloži tijekom reakcije. Obično se uklanja filtriranjem iz reakcijske smjese, no tragovi mogu zaostati što dodatno komplicira naknadnu obradu. Zbog toga se često kao alternativa DCC-u koristi *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimid-hidroklorid (EDC·HCl). EDC·HCl i iz njega nastala urea kao nusprodukt topljivi su u vodi stoga se lako uklanjaju ispiranjem reakcijske smjese vodom, odnosno ekstrakcijom. Kao alternativa DCC-u koristi se i *N,N'*-diizopropilkarbodiimid (DIC), osobito prilikom sinteze peptida na čvrstoj fazi.²⁰

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

3.1.1. Kemikalije

Ferocenski alkoholi pripremljeni su na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Spoj 2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranoza prethodno je pripremljen u laboratoriju literaturno opisanim postupcima, a svi ostali reagensi i otapala komercijalno su dostupni i analitičke su čistoće: benzilni ester *N*-Boc-L-alanil-D-izoglutamina (*Bachem*) hidroksibenzotriazol (HOBT, *Sigma-Aldrich*), kalijev karbonat (KCl, *Kemika*), klorovodična kiselina (HCl, *Carlo Erba*), natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO₃, *Gram mol*), natrijev klorid (NaCl, *Kemika*), natrijev sulfat (Na₂SO₄, *Gram mol*), *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC·HCl, *Sigma-Aldrich*), *N,N*-dimetiaminopiridin (DMAP, *Sigma-Aldrich*), sumporna kiselina (H₂SO₄, *Fluka*), *tert*-butilbromacetat (*Sigma-Aldrich*), trietilamin (TEA, *Sigma-Aldrich*), trifluoroctena kiselina (TFA, *Merck*).

Korištena otapala komercijalno su dostupna te su po potrebi sušena prema uobičajenim literaturnim postupcima: acetonitril (CH₃CN, *Kemika*), benzen (C₆H₆, *Kemika*), dietil-eter (Et₂O, *J. T. Baker*), diklormetan (DCM, *Carlo Erba*), 1,4-dioksan (*Kemika*), etanol (EtOH, *Kemika*), etil-acetat (EtOAc, *Carlo Erba*), kloroform (CHCl₃, *Carlo Erba*), metanol (MeOH, *Fluka*), *N,N*-dimetilformamid (DMF, *Fisher Chemical*).

3.1.2. Metode

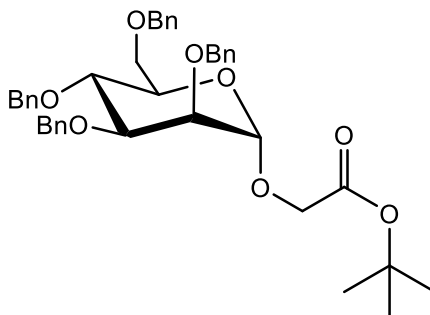
Tijek reakcija, sastav frakcija kod kromatografskog pročišćavanja na stupcu i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (60 F₂₅₄, 0,25 mm, *Fluka*). Detekcija spojeva na TLC pločicama provedena je ultraljubičastim zračenjem ($\lambda = 254$ nm), prskanjem vodenom otopinom sumporne kiseline ($w = 10$ %) uz zagrijavanje te prskanjem otopinom ninhidrina uz zagrijavanje. Za kromatografska pročišćavanja na stupcu korišten je silikagel 60 veličine zrna 0,063-0,200 mm (*Sigma-Aldrich*). Hidrogenolize (debenziliranja) su provedene u Parrovu uređaju.

Identifikacija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva provedena je pomoću spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i spektrometrije masa (MS). Spektri NMR (^1H i ^{13}C DEPTQ) snimljeni su pomoću instrumenta Avance III HD (*Bruker*) pri 400 MHz (^1H) i 100 MHz (^{13}C) u deuteriranim otapalima (navedeno u tekstu). Kemijski pomaci (δ) u spektrima ^1H NMR izraženi su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS, 0 ppm) kao unutarnji standard, dok su spektri ^{13}C NMR kalibrirani prema srednjem signalu otapala. Multipliciteti signala navedeni su kao: s-singlet, d-dublet, dd-dublet dubleta, t-triplet, q-kvartet i m-multiplet. Spektri masa pripremljenih spojeva snimljeni su pomoću uređaja Agilent 6410 uz elektroraspršenje kao način ionizacije (ESI-MS). Interval tališta čvrstih spojeva određen je pomoću uređaja *Büchi Melting Point* B-540.

3.2. Priprava manoznog prekursora 2

3.2.1. Priprava tert-butil-2-(2,3,4,6-tetra-O-benzil- α -D-manopiranoziloksi)etanoata 1

Prethodno priređeni uzorak 2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranoze (1,506 g, 2,78 mmol) otopi se u suhom dimetilformamidu (5 mL). Otopini se doda svježe izaren kalijev karbonat (2,054 g, 21 mmol) i tert-butil-bromacetat (617 μL , 4,17 mmol). Reakcijska smjesa miješa se 24 sata pod atmosferom dušika pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala benzen : EtOAc = 5 : 1 uz detekciju sumpornom kiselinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se profiltrira preko vate uz ispiranje dietil-eterom (20 mL). Filtrat se prebaci u lijevak za odjeljivanje i ispere destiliranom vodom (3×30 mL). Organski sloj prebaci se u tikvicu i suši na bezvodnom natrijevom sulfatu. Sredstvo za sušenje se profiltrira, a otapalo se upari na rotacijskom uparivaču. Suhi sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz benzen : EtOAc = 5 : 1 kao eluens. Dobiven je spoj **1** (slika 25) u obliku žutog ulja (844 mg, 46 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 25. Strukturna formula molekule spoja 1

$R_f = 0,73$ (benzen : EtOAc = 5 : 1)

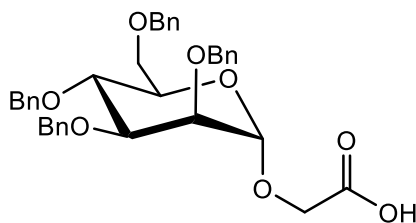
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ / ppm: 7,40-7,14 (m, 20H, CH, Ar), 5,08 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,7$ Hz, H-1), 4,88 (d, 1H, $J_{gem} = 10,8$ Hz, CH₂, Bn), 4,74 (s, 2H, CH₂, Bn), 4,65 (d, 1H, $J_{gem} = 12,1$ Hz, CH₂, Bn), 4,59 (s, 2H, CH₂, Bn), 4,53 (d, 1H, $J_{gem} = 12,1$ Hz, CH₂, Bn), 4,49 (d, 1H, $J_{gem} = 10,8$ Hz, CH₂, Bn), 4,02-3,93 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 4,11 (d, 1H, $J_{gem} = 16,6$ Hz, CH₂, acetilna poveznica), 3,99 (d, 1H, $J_{gem} = 16,5$ Hz, CH₂, acetilna poveznica), 3,80-3,69 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 1,46 (s, 9 H, *t*-Bu).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ / ppm: 169,03 (C=O), 138,50, 138,46, 138,29, 138,26 (4 × C, Bn), 128,28-127,47 (CH, Bn), 97,33 (C1), 79,91, 74,69, 74,46, 72,22 (C2-C5), 75,06, 73,34, 72,62, 71,96 (4 × CH₂, Bn), 69,16 (C6), 63,45 (CH₂, acetilna poveznica), 28,08 (*t*-Bu).

ESI-MS: m/z 677,4 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺.

3.2.2. Priprava 2-(2,3,4,6-tetra-O-benzil- α -D-manopiranoziloksi)octene kiseline 2

Spoj 1 (1,227 g, 1,87 mmol) otopi se u suhom diklormetanu (10 mL). Otopini se doda TFA (2,153 mL, 27,87 mmol) te se reakcijska smjesa ostavi miješati 5 sati na sobnoj temperaturi uz klor-kalcijevu cjevčicu. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala CHCl_3 : $\text{CH}_3\text{CN} = 3 : 1$ uz detekciju sumpornom kiselinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijskoj smjesi doda se diklormetan (2×20 mL) te se upari na rotacijskom uparivaču. Zatim se doda dietil-eter (2×20 mL) te se ponovo upari na rotacijskom uparivaču. Suhi sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz CHCl_3 : $\text{CH}_3\text{CN} = 3 : 1$ kao eluens. Dobiven je spoj 2 (slika 26) u obliku bijele pahuljaste krutine (970 mg, 87 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 26. Strukturna formula molekule spoja 2

$R_f = 0,62$ ($\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{CN} = 3 : 1$)

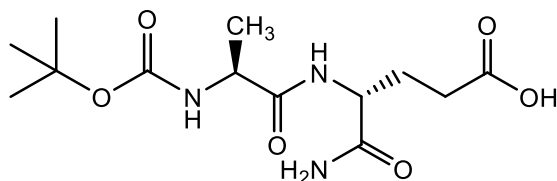
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ/ppm : 7,38-7,13 (m, 20H, CH, Bn), 5,02 (s, 1H, H-1); 4,85 (d, 1H, $J_{gem} = 10,8$ Hz, CH_2 , Bn); 4,75 (d, 1H, $J_{gem} = 12,4$ Hz, CH_2 , Bn); 4,72 (d, 1H, $J_{gem} = 12,4$ Hz, CH_2 , Bn); 4,63 (d, 1H, $J_{gem} = 12,2$ Hz, CH_2 , Bn); 4,59 (s, 2H, CH_2 , Bn); 4,53 (d, 1H, $J_{gem} = 12,2$ Hz, CH_2 , Bn); 4,49 (d, 1H, $J_{gem} = 10,9$ Hz, CH_2 , Bn); 4,23 (d, 1H, $J_{gem} = 17,0$ Hz, CH_2 , acetilna poveznica); 4,16 (d, 1H, $J_{gem} = 17,0$ Hz, CH_2 , acetilna poveznica); 3,99–3,90 (m, 3H: H-2; H-3; H-4); 3,80–3,68 (m, 3H: H-5; H6a; H-6b).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ/ppm : 173,9 (C=O); 138,4, 138,3, 138,1, 138,1 ($4 \times \text{C}$, Bn); 128,4–127,6 (CH, Bn); 97,9 (C1); 79,6, 74,6, 74,3, 72,4 (C2-C5); 75,1, 73,4, 72,5, 72,1 ($4 \times \text{CH}_2$, Bn); 69,1 (C6); 63,2 (CH_2 , acetilna poveznica).

ESI-MS: m/z 621,2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

3.3. Priprava peptidnog prekursora (4R)-4-[(2S)-2-(tert-butiloksikarbonilamino)propanamido-4-karbamoilbutanske kiseline 3 (Boc-L-Ala-D-isoGln)

Komercijalno dostupan zaštićeni desmuramil-dipeptid, Boc-L-Ala-D-isoGln(OBn) (829 mg, 2,03 mmol) otopi se u 96 % etanolu (30 mL). Otopini se doda 10 %-tni paladij na ugljiku (417 mg). Reakcijska smjesa se miješa 24 sata pod tlakom vodika od 34 PSI. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 2 : 1$ uz detekciju ninhidrinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se profiltira uz ispiranje taloga 96 % etanolom, a filtrat se upari na rotacijskom uparivaču. Suhi sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 2 : 1$ kao eluens. Dobiven je spoj 3 (slika 27) u obliku bezbojnog ulja (591 mg, 92 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 27. Strukturna formula molekule spoja 3

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

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ / **ppm**: 4,36 (dd, 1H, $J = 4,2$ Hz, $J = 9,2$ Hz, CH, *isoGln*); 4,02 (q, 1H, $J = 7,1$ Hz, CH, Ala); 2,38 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH_2 , *isoGln*); 2,26-2,17 (m, 1H, *isoGln*); 1,94-85 (m, 1H, *isoGln*); 1,43 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$, Boc); 1,30 (d, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH_3 , Ala).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD) δ / **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, *isoGln*); 50,6 (CH, Ala); 29,7 (CH_2 , *isoGln*); 27,3 (CH_3 , Boc); 26,7 (CH_2 , *isoGln*); 16,1 (CH_3 , Ala).

ESI-MS: m/z 340,1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

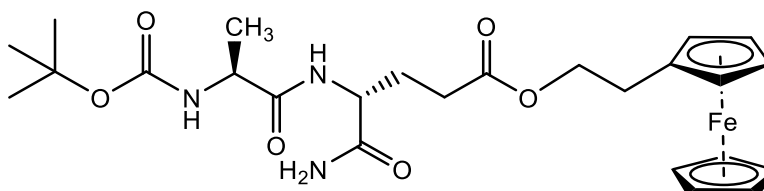
3.4. Priprava ferocenskih estera desmuramil-dipeptida 7-9

3.4.1. Općeniti postupak priprave ferocenskih estera Boc-zaštićenog desmuramil-dipeptida 4-6

Spoj 3 (200 mg, 0,64 mmol) otopi se u smjesi suhog diklormetana i suhog dioksana (5 mL + 5 mL). Otopini se doda EDC·HCl (133 mg, 0,69 mmol) i ostavi miješati na ledenoj kupelji. Nakon 15 minuta u reakcijsku smjesu doda se DMAP (77 mg, 0,64 mmol), a nakon par minuta i ferocenski alkohol (1 ekv.). Reakcijska smjesa ostavi se miješati 24 sata na sobnoj temperaturi uz klor-kalcijevu cjevčicu. Nakon 24 sata u reakcijsku smjesu ponovno se doda EDC·HCl (67 mg, 35 mmol) i ostavi miješati još 24 sata. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 12 : 1$ uz detekciju ninhidrinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, u reakcijsku smjesu doda se diklormetan (12 mL) te se smjesa ekstrahira otopinom klorovodične kiseline (2×20 mL, $c = 0,5$ mol dm^{-3}). Spojeni organski ekstrakti isperu se prvo zasićenom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata (20 mL), zatim vodom (20 mL) te se suše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Sredstvo za sušenje se profiltrira, a otapalo upari na rotacijskom uparivaču. Sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 12 : 1$ kao eluens.

3.4.1.1. [2-(ferocen-1-il)etan-1-il]-(4*R*)-4-[(2*S*)-2-(*tert*-butiloksikarbonilamino)propanamido-4-karbamoilbutanoat **4**

Iz spoja **3** i 2-(ferocen-1-il)etanola (146 mg, 0,64 mmol) dobiven je spoj **4** (slika 28) u obliku narančastog ulja (227 mg, 67 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Slika 28. Strukturna formula molekule spoja **4**

$R_f = 0,56$ ($\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 12 : 1$)

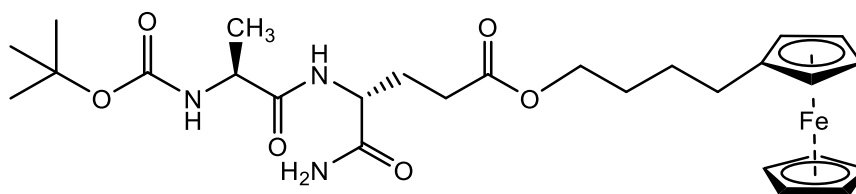
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ / ppm: 7,18 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, NH); 6,77 (s, 1H, NH); 5,62 (s, 1H, NH); 5,13 (d, 1H, $J = 6,7$ Hz, NH); 4,50-4,45 (m, 1H, CH, *isoGln*); 4,22-4,19 (m, 2H, CH_2O); 4,18-4,08 (m, 10H: 1H, CH, Ala; 9H, CH, Fc); 2,66 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz, CH_2Fc); 2,58-2,50 (m, 1H, CH_2 , *isoGln*); 2,58-2,50 (m, 1H, CH_2 , *isoGln*); 2,25-2,16 (m, 1H, CH_2 , *isoGln*); 2,04-1,95 (m, 1H, CH_2 , *isoGln*); 1,42 (s, 9H, CH_3 , Boc); 1,35 (d, 3H, $J = 7,1$ Hz, CH_3 , Ala).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ / ppm: 173,6, 173,4, 173,2 ($3 \times \text{C}=\text{O}$); 156,0 ($\text{C}=\text{O}$, Boc); 84,1 (C, Fc); 80,4 (C, Boc); 68,6; 68,4; 67,6 (CH, Fc); 65,3 (CH_2O); 52,3 (CH, *isoGln*); 50,7 (CH, Ala); 30,6 (CH_2 , *isoGln*); 28,9 (CH_2 , *isoGln*); 28,3 (CH_3 , Boc); 26,8 (CH_2Fc); 17,8 (CH_3 , Ala).

ESI-MS: m/z 529,1 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

3.4.1.2. [4-(ferocen-1-il)butan-1-il]-(4*R*)-4-[(2*S*)-2-(*tert*-butiloksikarbonilamino)propanamido-4-karbamoilbutanoat **5**

Iz spoja **3** i 4-(ferocen-1-il)butan-1-ola (164 mg, 0,64mmol) dobiven je spoj **5** (slika 29) u obliku narančastog ulja (176 mg, 50 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 29. Strukturna formula molekule spoja 5

$R_f = 0,4$ ($\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 12 : 1$)

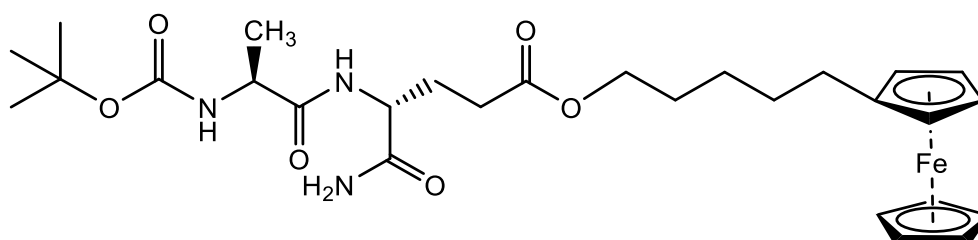
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ / ppm : 7,20 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz, NH); 6,79 (s, 1H, NH); 5,56 (s, 1H, NH); 5,10 (d, 1H, $J = 6,7$ Hz, NH); 4,49-4,44 (m, 1H, CH, *iso*Gln); 4,09-4,04 (m, 12H: 2H, CH_2O ; 1H, CH, Ala; 9H, CH, Fc); 2,57-2,49 (m, 1H, CH_2 , CH_2Fc); 2,45-2,39 (m, 1H, CH_2 , CH_2Fc); 2,35 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH_2 , *iso*Gln); 2,24-2,16 (m, 1H, CH_2 , *iso*Gln); 2,03-1,95 (m, 1H, CH_2 , *iso*Gln); 1,66-1,61 (m, 2H, CH_2); 1,58-1,52 (m, 2H, CH_2); 1,42 (s, 9H, CH_3 , Boc); 1,34 (d, 3H, $J = 7,1$ Hz, CH_3 , Ala).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ / ppm : 173,8, 173,4, 173,3 ($3 \times \text{C}=\text{O}$); 155,9 ($\text{C}=\text{O}$, Boc); 88,6 (C, Fc); 80,4 (C, Boc); 68,5; 68,1; 67,2 (CH, Fc); 64,8 (CH_2O); 52,3 (CH, *iso*Gln); 50,7 (CH, Ala); 30,5, 29,2, 28,6, 27,4 ($4 \times \text{CH}_2$: $2 \times \text{CH}_2$, *iso*Gln, $2 \times \text{CH}_2$, poveznica ferocen-dipeptid); 28,3 (CH_3 , Boc); 26,9 (CH_2Fc); 17,8 (CH_3 , Ala).

ESI-MS: m/z 558,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.4.1.3. [5-(ferocen-1-il)pentan-1-il]-(4*R*)-4-[(2*S*)-2-(*tert*-butiloksikarbonil-amino)propanamido-4-karbamoilbutanoat 5

Iz spoja 3 i 5-(ferocen-1-il)pentan-1-ola (172 mg, 0,64 mmol) dobiven je spoj 6 (slika 30) u obliku narančastog ulja (209 mg, 58 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 30. Strukturna formula molekule spoja 6

$R_f = 0,36$ ($\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 12 : 1$)

¹H NMR (CDCl₃) δ/ ppm: 7,22 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz, NH); 6,77 (s, 1H, NH); 5,59 (s, 1H, NH); 5,12 (d, 1H, *J* = 6,7 Hz, NH); 4,49-4,44 (m, 1H, CH, *iso*Gln); 4,12-4,04 (m, 12H: 2H, CH₂O; 1H, CH, Ala; 9H, CH, Fc); 2,58-2,50 (m, 1H, CH₂, CH₂Fc); 2,45-2,38 (m, 1H, CH₂, CH₂Fc); 2,33 (t, 2H, *J* = 7,7 Hz, CH₂, *iso*Gln); 2,23-2,17 (m, 1H, CH₂, *iso*Gln); 2,05-1,96 (m, 1H, CH₂, *iso*Gln); 1,67-1,60 (m, 2H, CH₂, poveznica ferocen-dipeptid); 1,55-1,48 (m, 2H, CH₂, poveznica ferocen-dipeptid); 1,43 (s, 9H, CH₃, Boc); 1,40-1,32 (m, 2H, CH₂, poveznica ferocen-dipeptid); 1,35 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz, CH₃, Ala).

¹³C NMR (CDCl₃) δ/ ppm: 173,9, 173,3, 173,2 (3 × C=O); 155,9 (C=O, Boc); 89,0 (C, Fc); 80,4 (C, Boc); 68,5; 68,1; 67,1 (CH, Fc); 65,0 (CH₂O); 52,4 (CH, *iso*Gln); 50,7 (CH, Ala); 30,8, 30,6, 29,5, 28,4, 26,9, 25,8 (6 × CH₂: 2 × CH₂, *iso*Gln, 4 × CH₂, poveznica ferocen-dipeptid); 28,3 (CH₃, Boc); 17,7 (CH₃, Ala).

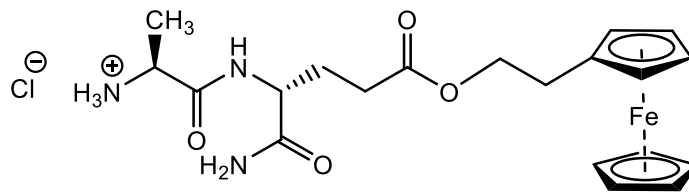
ESI-MS: *m/z* 572,5 [M+H]⁺.

3.4.2. Općeniti postupak uklanjanja Boc-zaštite sa spojeva 4-6 i priprava spojeva 7-9

Spojevi **4**, **5** ili **6** otope se u suhom diklormetanu. Sastavi se aparatura za generiranje suhog klorovodika (reakcijom natrijevog klorida i koncentrirane sumporne kiseline). Suhi klorovodik propuhuje se kroz otopinu 2 sata uz miješanje pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala CH₃CN : H₂O = 5 : 1 uz detekciju ninhidrinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se upari na rotacijskom uparivaču. Suhi sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz CH₃CN : H₂O = 5 : 1 kao eluens.

3.4.2.1. (1*S*)-1-*N*-{(1*R*)-3-[2-(ferocen-1-il)etan-1-iloksikarbonil]-1-karbamoilpropan-1-il}aminokarbonil}etilamonijev klorid **7**

Spoj **4** (85 mg, 0,15 mmol) otopi se u suhom diklormetanu (5 mL). Nakon završetka reakcije i kromatografskog čišćenja dobiven je spoj **7** (slika 31) u obliku narančastog ulja (33 mg, 47 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 31. Strukturna formula molekule spoja 7

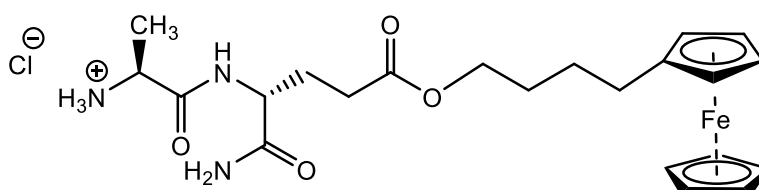
$R_f = 0,47$ ($\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 5 : 1$)

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ / ppm : 4,40 (dd, 1H, $J = 5,1 \text{ Hz}$, $J = 9,1 \text{ Hz}$, CH, *isoGln*); 4,22 (t, 2H, $J = 6,9 \text{ Hz}$, CH_2O); 4,13-4,07 (m, 9H, CH, Fc); 3,81 (q, 1H, $J = 7,0 \text{ Hz}$, CH, Ala); 2,66 (t, 2H, $J = 6,9 \text{ Hz}$, CH_2 , CH_2Fc); 2,43 (t, 2H, $J = 7,6 \text{ Hz}$, *isoGln*); 2,22-2,13 (m, 1H, CH_2 , *isoGln*); 1,99-1,93 (m, 1H, CH_2 , *isoGln*); 1,41 (d, 3H, $J = 6,9 \text{ Hz}$, CH_3 , Ala).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD) δ / ppm : 179,6, 176,1, 174,3 ($3 \times \text{C}=\text{O}$); 69,6, 69,5, 68,6 (CH, Fc); 66,4 (CH_2O); 53,7 (CH, *isoGln*); 50,8 (CH, Ala); 31,5 (CH_2 , *isoGln*); 29,9 (CH_2 , *isoGln*); 28,4 (CH_2Fc); 19,4 (CH_3 , Ala).

3.4.2.2. (1*S*)-1- $\{N$ - $\{(1R)$ -3-[4-(ferocen-1-il)butan-1-iloksikarbonil]-1-karbamoilpropan-1-il}aminokarbonil}etilamonijev klorid **8**

Spoj **5** (77 mg, 0,13 mmol) otopi se u suhom diklormetanu (5 mL). Nakon završetka reakcije i kromatografskog čišćenja dobiven je spoj **8** (slika 32) u obliku narančastog ulja (47 mg, 74 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 32. Strukturna formula molekule spoja 8

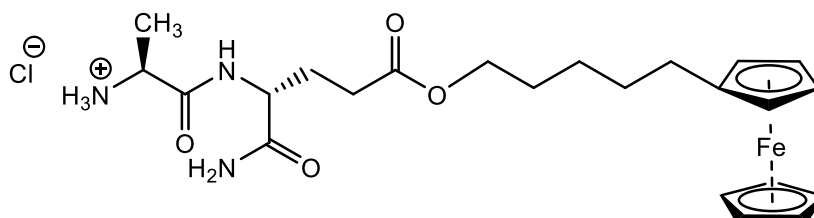
$R_f = 0,54$ ($\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 5 : 1$)

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ / ppm : 4,39 (dd, 1H, $J = 5,0 \text{ Hz}$, $J = 9,1 \text{ Hz}$, CH, *isoGln*); 4,11-4,03 (m, 11H: 2H, CH_2O ; 9H, CH, Fc); 3,67 (q, 1H, $J = 6,8 \text{ Hz}$, CH, Ala); 2,42 (t, 2H, $J = 7,6 \text{ Hz}$, CH_2 , CH_2Fc); 2,38 (t, 2H, $J = 7,5 \text{ Hz}$, *isoGln*); 2,21-2,12 (m, 1H, CH_2 , CH_2 , *isoGln*); 1,96-1,53 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$, poveznica ferocen-dipeptid); 1,36 (d, 3H, $J = 7,0 \text{ Hz}$, CH_3 , Ala).

^{13}C NMR (CD_3OD) $\delta/$ ppm: 175,9, 174,3, 171,7 ($3 \times \text{C}=\text{O}$); 69,5, 69,2, 68,2 (CH, Fc); 65,8 (CH_2O); 53,7 (CH, *iso*Gln); 50,4 (CH, Ala); 31,4, 30,2, 29,6, 28,7, 28,5 ($5 \times \text{CH}_2$: $2 \times \text{CH}_2$, *iso*Gln, $3 \times \text{CH}_2$, poveznica ferocen-dipeptid); 18,0 (CH_3 , Ala).

3.4.2.3. (1*S*)-1- $\{N-\{(1*R*)-3-[5-(ferocen-1-il)pentan-1-iloksikarbonil]-1-karbamoilpropan-1-il\}$ aminokarbonil}etilamonijev klorid **9**

Spoj **6** (100 mg, 0,16 mmol) otopi se u suhom diklormetanu (5 mL). Nakon završetka reakcije i kromatografskog čišćenja dobiven je spoj **9** (slika 33) u obliku narančastog ulja (52 mg, 63 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 33. Strukturna formula molekule spoja **9**

$R_f = 0,64$ ($\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 5 : 1$)

^1H NMR (CD_3OD) $\delta/$ ppm: 4,40 (dd, 1H, $J = 5,1$ Hz, $J = 9,1$ Hz, CH, *iso*Gln); 4,10-4,02 (m, 11H: 2H, CH_2O ; 9H, CH, Fc); 3,90-3,89 (m, 1H, $J = 6,8$ Hz, CH, Ala); 2,42 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH_2 , CH_2Fc); 2,35 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, *iso*Gln); 2,21-2,12 (m, 1H, CH_2 , CH_2 , *iso*Gln); 1,99-1,90 (m, 1H, *iso*Gln); 1,68-1,61 (m, 2H, CH_2 , poveznica ferocen-dipeptid); 1,57-1,50 (m, 2H, CH_2 , poveznica ferocen-dipeptid); 1,47 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3 , Ala), 1,42-1,34 (m, 2H, CH_2 , poveznica ferocen-dipeptid).

^{13}C NMR (CD_3OD) $\delta/$ ppm: 175,9, 174,4, 172,6 ($3 \times \text{C}=\text{O}$); 90,2 (C, Fc); 69,5, 69,1, 68,1 (CH, Fc); 65,9 (CH_2O); 53,8 (CH, *iso*Gln); 50,6 (CH, Ala); 31,9, 31,4, 30,5, 29,6, 28,4, 26,9 ($6 \times \text{CH}_2$: $2 \times \text{CH}_2$, *iso*Gln, $4 \times \text{CH}_2$, poveznica ferocen-dipeptid); 18,5 (CH_3 , Ala).

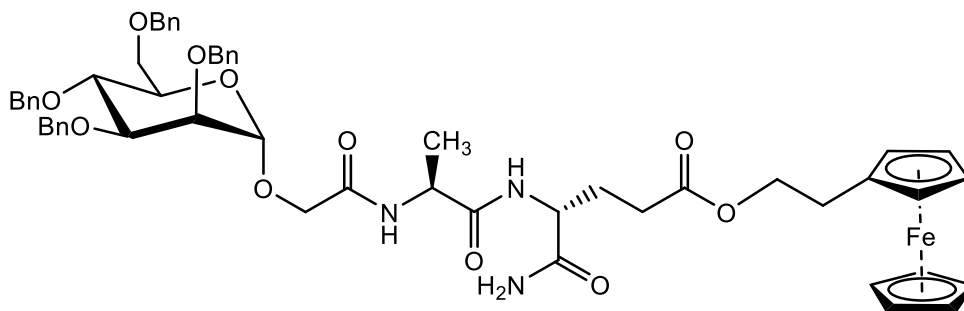
3.5. Priprava zaštićenih manoziliranih ferocenskih estera desmuramil-dipeptida 10-12

3.5.1. Općeniti postupak pripreve spojeva 10-12

Spoj **2** (1,3 ekv.) otopi se u suhom diklormetanu. Otopina se miješa 10 minuta na ledenoj kupelji, zatim se u otopinu doda HOBT (1,3 ekv.) i EDC·HCl (1,6 ekv.). Tako priređena otopina miješa se još 20 minuta na ledenoj kupelji. Nakon 20 minuta, dodaju se spojevi **7**, **8** ili **9** (1 ekv.) otopljeni u suhom diklormetanu i TEA (2 ekv.). Reakcijska smjesa miješa se 30 minuta na ledenoj kupelji, a zatim 24 sata na sobnoj temperaturi pod atmosferom argona. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala CHCl₃ : MeOH = 12 : 1 uz detekciju ninhidrinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se upari na rotacijskom uparivaču. Upareni ostatak otopi se u diklormetanu (20 mL) te ekstrahira vodom (2 × 15 mL) uz isoljivanje organskog sloja natrijevim kloridom. Spojeni organski ekstrakti suše se na bezvodnom natrijevom sulfatu. Sredstvo za sušenje se profiltrira, a otapalo upari na rotacijskom uparivaču. Suhi sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz CHCl₃ : MeOH = 12 : 1 kao eluens.

3.5.1.1. [2-(ferocen-1-il)etan-1-il]-(4R)-4-[(2S)-2-[(2,3,4,6-tetra-O-benzil- α -D-manopiranozil-oksi)etanamido]propanamido]-4-karbamoilbutanoat **10**

U otopinu spoja **2** (61 mg, 0,13 mmol), HOBT-a (23 mg, 0,17 mmol) i EDC·HCl-a (40 mg, 0,21 mmol) u suhom diklormetanu (2 mL) dodan je spoj **7** (61 mg, 0,13 mmol) otopljen u suhom diklormetanu (2 mL) i TEA (37 μ L, 0,27 mmol). Nakon završetka reakcije, njene obrade i kromatografskog čišćenja dobiven je spoj **10** (slika 34) u obliku narančastog ulja (57 mg, 43 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 34. Strukturna formula molekule spoja **10**

$R_f = 0,63$ ($\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 12 : 1$)

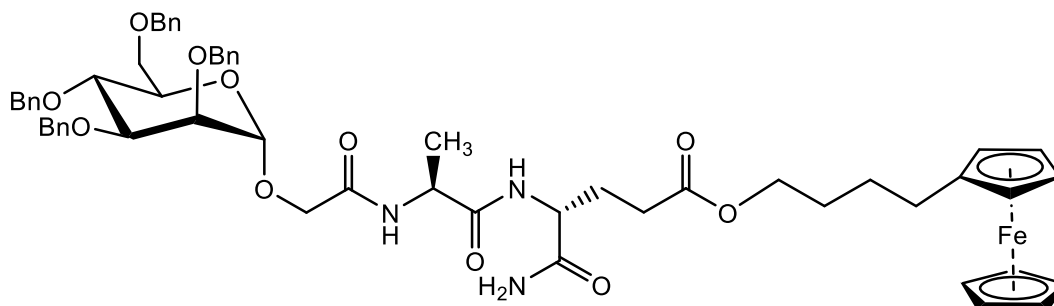
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ/ppm : 7,36 – 7,15 (m, 20H, $20 \times \text{CH}$, Bn); 7,10 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, NH); 6,78 (d, 1H, $J = 6,7$ Hz, NH); 6,52 (s, 1H, NH); 6,78 (d, 1H, $J = 3,4$ Hz, NH); 5,36 (s, 1H, NH); 4,88 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz, H-1); 4,83-4,47 (m, 8H, $4 \times \text{CH}_2$, Bn); 4,43 – 4,38 (m, 1H, CH, *iso*Gln); 4,34 – 4,27 (m, 1H, CH, Ala); 4,20 – 4,00 (13H: 9H, Fc; 2H, CH_2 , CH_2O ; 1H, H-4, 1H, CH_2 , acetilna poveznica); 3,95 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, CH_2 , acetilna poveznica); 3,87 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz, $J = 3,2$ Hz, H-3); 3,77 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-2); 3,78 – 3,67 (3H: H-5, H-6a, H-6b); 2,64 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_2Fc); 2,58 – 2,50 (m, 1H, CH_2 , *iso*Gln); 2,41 – 2,36 (m, 1H, CH_2 , *iso*Gln); 2,20 – 2,11 (m, 1H, CH_2 , *iso*Gln); 2,04 – 1,96 (m, 1H, CH_2 , *iso*Gln); 1,33 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, CH_3 , Ala).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ / ppm : 173,83, 172,80, 172,06, 169,28 (C=O); 138,28, 138,16, 138,11, 138,00 ($4 \times \text{C}$, Bn); 128,41, 128,34, 127,96, 127,81, 127,57 (CH, Bn); 98,46 (C1); 84,05 (C, Fc); 79,18, 74,66, 73,40, 72,67, 68,59, 68,40, 68,36, 67,62 (CH, Fc; C2 – C5); 74,87, 72,78, 72,57 (CH_2 , Bn); 68,90 (C6); 66,29 (CH_2O); 65,42 (CH_2 , acetilna poveznica); 52,54 (CH, *iso*Gln); 49,06 (CH, Ala); 30,67 (CH_2Fc); 28,86 (CH_2 , *iso*Gln); 26,52 (CH_2 , *iso*Gln); 17,70 (CH_3 , Ala).

ESI-MS: m/z 1010,45 $[\text{M}+\text{H}]^+$

3.5.1.2. [4-(ferocen-1-il)butan-1-il]-(4*R*)-4-{(2*S*)-2-[(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-mano-piranoziloksi)etanamido]propanamido}-4-karbamoilbutanoat **11**

U otopinu spoja **2** (80 mg, 0,13 mmol), HOBT-a (18 mg, 0,13 mmol) i EDC·HCl-a (32 mg, 0,16 mmol) u suhom diklormetanu (2 mL) dodan je spoj **8** (51 mg, 0,10 mmol) otopljen u suhom diklormetanu (2 mL) i TEA (29 μL , 0,21 mmol). Nakon završetka reakcije, njene obrade i kromatografskog čišćenja dobiven je spoj **11** (slika 35) u obliku narančastog ulja (43 mg, 39 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Slika 35. Strukturna formula molekule spoja **11**

$R_f = 0,64$ ($\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 12 : 1$)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ/ppm : 7,45 – 7,15 (m, 20H, $20 \times \text{CH}$, Bn); 6,82 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz, NH); 6,53 (s, 1H, NH); 5,44 (s, 1H, NH); 4,88 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-1); 4,83 – 4,47 (m, 8H, $4 \times \text{CH}_2$, Bn); 4,43 – 4,31 (m, 2H: 1H, CH, *iso*Gln; 1H, CH, Ala); 4,14 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, CH_2 , acetilna poveznica); 4,08 – 4,04 (12H: $9 \times \text{CH}$, Fc; 2H, CH_2O ; 1H, H-4); 3,98 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, CH_2 , acetilna poveznica); 3,87 (dd, 1H, $J = 8,6$ Hz, $J = 3,0$ Hz, H-3); 3,78 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-2); 3,74 – 3,66 (m, 3H: H-5, H-6a, H-6b); 2,56 – 2,48 (m, 1H, CH_2Fc); 2,43 – 2,37 (m, 2H, CH_2Fc); 2,34 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, CH_2 , *iso*Gln); 2,19 – 2,10 (m, 1H, CH_2 , *iso*Gln); 2,04 – 1,95 (m, 1H, CH_2 , *iso*Gln); 1,66 – 1,56 (m, 2H, CH_2 , poveznica ferocen - dipeptid); 1,55 – 1,49 (m, 2H, CH_2 , poveznica ferocen - dipeptid); 1,38 – 1,33 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3 , Ala).

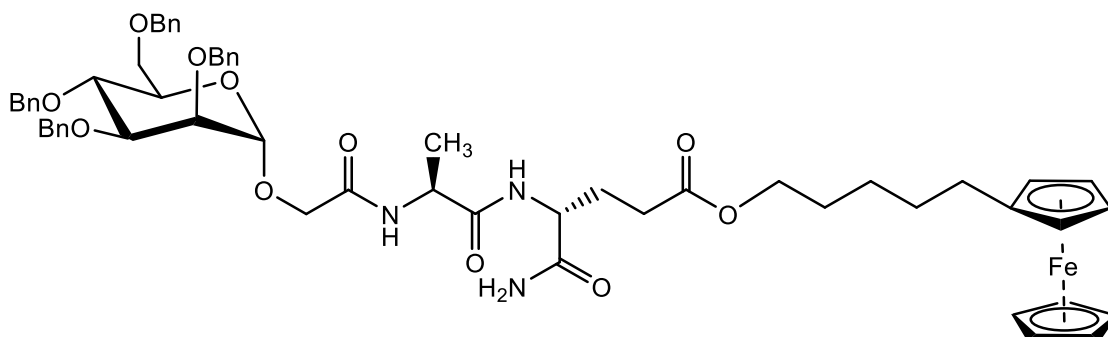
$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD) δ / ppm : 174,00, 172,88, 172,09, 169,26 (C=O); 138,28, 138,16, 138,10, 138,00 ($4 \times \text{C}$, Bn); 128,41, 128,33, 127,95, 127,83, 127,89, 127,56 (CH, Bn); 98,43 (C1); 88,57 (C, Fc); 79,21, 74,80, 74,63, 72,64, 68,06, 68,47, 68,40, 68,36, 67,15 (CH, Fc; C2 – C5); 74,86, 72,77, 72,55 (CH_2 , Bn); 68,89 (C6); 66,25 (CH_2O); 64,89 (CH_2 , acetilna poveznica); 52,51 (CH, *iso*Gln); 48,98 (CH, Ala); 30,57 (CH_2Fc); 29,16, 28,33, 27,42, 26,57 ($4 \times \text{CH}_2$: $2 \times \text{CH}_2$, *iso*Gln, $2 \times \text{CH}_2$, poveznica ferocen-dipeptid); 17,70 (CH_3 , Ala).

ESI-MS: m/z 1038,50 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

3.5.1.3. [5-(ferocen-1-il)pentan-1-il]-(4*R*)-4-[(2*S*)-2-[(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-mano-piranoziloksi)etanamido]propanamido]-4-karbamoilbutanoat **12**

U otopinu spoja **2** (80 mg, 0,13 mmol), HOBt-a (18 mg, 0,13 mmol) i EDC·HCl-a (32 mg, 0,17 mmol) u suhom diklormetanu (2 mL) dodan je spoj **9** (52 mg, 0,10 mmol) otopljen u suhom diklormetanu (2 mL) i TEA (29 μL , 0,21 mmol). Nakon završetka reakcije, njene obrade i

kromatografskog čišćenja dobiven je spoj **12** (slika 36) u obliku narančastog ulja (62 mg, 55 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 36. Strukturna formula molekule spoja **12**

$R_f = 0,60$ ($\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 12 : 1$)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ/ppm : 7,38 – 7,15 (m, 20H, $20 \times \text{CH}$, Bn); 6,82 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz, NH); 6,54 (s, 1H, NH); 5,45 (s, 1H, NH); 4,88 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz, H-1); 4,83 – 4,47 (m, 8H, $4 \times \text{CH}_2$, Bn); 4,43 – 4,31 (m, 2H: 1H, CH, *iso*Gln; 1H, CH, Ala); 4,14 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, CH_2 , acetilna poveznica); 4,16 – 3,93 (12H: $9 \times \text{CH}$, Fc; 2H, CH_2O ; 1H, H-4); 3,95 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz, CH_2 , acetilna poveznica); 3,87 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz, $J = 3,2$ Hz, H-3); 3,78 (t, 1H, $J = 2,8$ Hz, H-2); 3,75 – 3,66 (m, 3H: H-5, H-6a, H-6b); 2,55 – 2,35 (m, 2H, CH_2Fc); 2,31 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, CH_2 , *iso*Gln); 2,19 – 2,12 (m, 1H, CH_2 , *iso*Gln); 2,02 – 1,96 (m, 1H, CH_2 , *iso*Gln); 1,65 – 1,58 (m, 2H, CH_2 , poveznica ferocen - dipeptid); 1,54 – 1,46 (m, 2H, CH_2 , poveznica ferocen - dipeptid); 1,38 – 1,33 (m, 5H: 3H, CH_3 , Ala; 2H, CH_2 , poveznica ferocen-dipeptid).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ/ppm : 174,01, 172,89, 172,08, 169,26 (C=O); 138,27, 138,16, 138,10, 138,00 ($4 \times \text{C}$, Bn); 128,41, 128,33, 127,95, 127,83, 127,89, 127,56 (CH, Bn); 128,42 – 127,56 (CH, Bn); 98,44 (C1); 79,21, 74,80, 74,63, 72,64, 68,06, 68,47, 68,40, 68,52, 68,09 (CH, Fc; C2 – C5); 74,85, 72,76, 72,55 (CH_2 , Bn); 68,89 (C6); 66,26 (CH_2O); 65,05 (CH_2 , acetilna poveznica); 52,53 (CH, *iso*Gln); 48,99 (CH, Ala); 30,59 (CH_2Fc); 29,44, 28,40, 26,57, 25,77 ($5 \times \text{CH}_2$: $2 \times \text{CH}_2$, *iso*Gln, $3 \times \text{CH}_2$, poveznica ferocen-dipeptid); 17,87 (CH_3 , Ala).

ESI-MS: m/z 1052,45 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

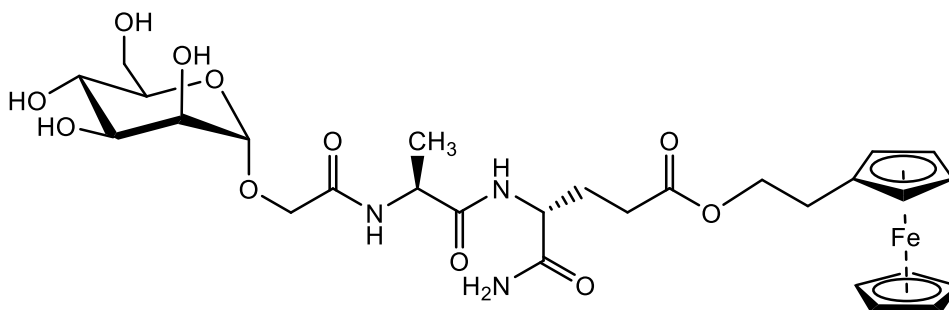
3.6. Priprava ciljnih molekula 13-15 debenziliranjem spojeva 10-12

3.6.1. Općeniti postupak uklanjanja benzilnih zaštitnih skupina sa spojeva 10-12

Spojevi **10**, **11** ili **12** otope se u 96 % etanolu te se otopini doda 10 %-tni paladij na ugljiku (0,5 ekv.). Reakcijska smjesa se miješa 12 sati pod tlakom vodika od 37 PSI. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 5 : 1$ uz detekciju sumpornom kiselinom i zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se profiltira uz ispiranje taloga 96 % etanolom, a filtrat se upari na rotacijskom uparivaču. Suhi sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 5 : 1$ kao eluens.

3.6.1.1. [2-(ferocen-1-il)etan-1-il]-(4R)-4-[(2S)-2-[(α -D-manopiranoziloksi)etanamido]propanamido]-4-karbamoilbutanoat **13**

Spoj **10** (57 mg, 0,06 mmol) otopi se u 96 % etanolu te se otopini doda 10 %-tni paladij na ugljiku (24 mg). Nakon završetka reakcije, njene obrade i kromatografskog čišćenja dobiven je spoj **13** (slika 37) u obliku narančastog ulja (22 mg, 56 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 37. Strukturna formula molekule spoja **13**

$R_f = 0,53$ ($\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 5 : 1$)

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ/ppm : 4,83 (s, 1H, H-1); 4,43 – 4,35 (m, 2H: 1H, CH, Ala; 1H, CH, *iso*Gln); 4,23 – 4,19 (m, 3H: 2H, CH_2O ; 1H, CH_2 , acetilna poveznica); 4,12 – 4,07 (m, 10H: 9H, 9H, Fc; 1H, CH_2 , acetilna poveznica); 3,95 (1H, $J_{2,3} = 3,3$ Hz, $J_{1,2} = 1,7$ Hz, H-2); 3,84 ($J_{6a,6b} = 11,8$ Hz, $J_{5,6a} = 2,2$ Hz, H-6b); 3,78 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9,2$ Hz, $J_{2,3} = 3,4$ Hz, H-3); 3,70 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 11,8$ Hz, $J_{5,6b} = 5,9$ Hz, H-6a); 3,62 (app t, 1H, $J = 9,6$ Hz, H-4); 3,56 – 3,52 (m, 1H,

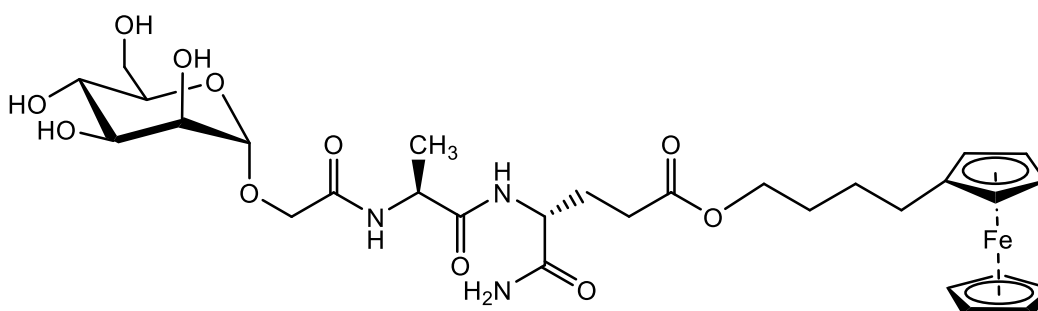
H-5); 2,66 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, CH₂Fc); 2,43 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, CH₂, *iso*Gln); 2,25 – 2,17 (m, 1H, CH₂, *iso*Gln); 1,96 – 1,87 (m, 1H, CH₂, *iso*Gln); 1,39 (d, 3H, $J = 7,1$ Hz, CH₃, Ala).

¹³C NMR (CD₃OD) δ /ppm: 176,27, 175,01, 174,53, 171,89 (C=O); 101,83 (C1); 85,75 (C, Fc); 75,43, 72,48, 71,77, 69,64, 69,52, 68,62 (CH, Fc; C2 – C5); 66,49 (C6); 66,49 (CH₂O); 62,95 (CH₂, acetilna poveznica); 53,78 (CH, *iso*Gln); 50,43 (CH, Ala); 31,58 (CH₂Fc); 29,96 (CH₂, *iso*Gln); 28,04 (CH₂, *iso*Gln); 18,26 (CH₃, Ala).

ESI-MS: m/z 649,21 [M+H]⁺

3.6.1.2. [4-(ferocen-1-il)butan-1-il]-(4*R*)-4-[(2*S*)-2-[(α -D-manopiranoziloksi)etanamido]propanamido]-4-karbamoilbutanoat **14**

Spoj **11** (43 mg, 0,04 mmol) otopi se u 96 % etanolu (8 mL) te se otopini doda 10 %-tni paladij na ugljiku (22 mg). Nakon završetka reakcije, njene obrade i kromatografskog čišćenja dobiven je spoj **14** (slika 38) u obliku narančastog ulja (25 mg, 92 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 38. Strukturna formula molekule spoja **14**

$R_f = 0,54$ (CH₃CN : H₂O = 5 : 1)

¹H NMR (CD₃OD) δ /ppm: 4,86 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz, H-1); 4,46 – 4,37 (m, 2H: 1H, CH, Ala; 1H, CH, *iso*Gln); 4,23 (d, 1H, $J = 15,2$ Hz, CH₂, acetilna poveznica); 4,14 – 4,06 (m, 12H: 9H, 9 × CH, Fc; 2H, CH₂O; 1H, CH₂, acetilna poveznica); 3,99 (1H, $J_{2,3} = 3,2$ Hz, $J_{1,2} = 1,6$ Hz, H-2); 3,87 ($J_{6a,6b} = 11,8$ Hz, $J_{5,6a} = 2,2$ Hz, H-6b); 3,82 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9,2$ Hz, $J_{2,3} = 3,2$ Hz, H-3); 3,73 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 11,8$ Hz, $J_{5,6b} = 5,8$ Hz, H-6a); 3,63 (app t, 1H, $J = 9,5$ Hz, H-4); 3,59 – 3,55 (m, 1H, H-5); 2,47 – 2,39 (m, 4H: 2H, CH₂Fc; 2H, CH₂, *iso*Gln); 2,29 – 2,20 (m, 1H, CH₂,

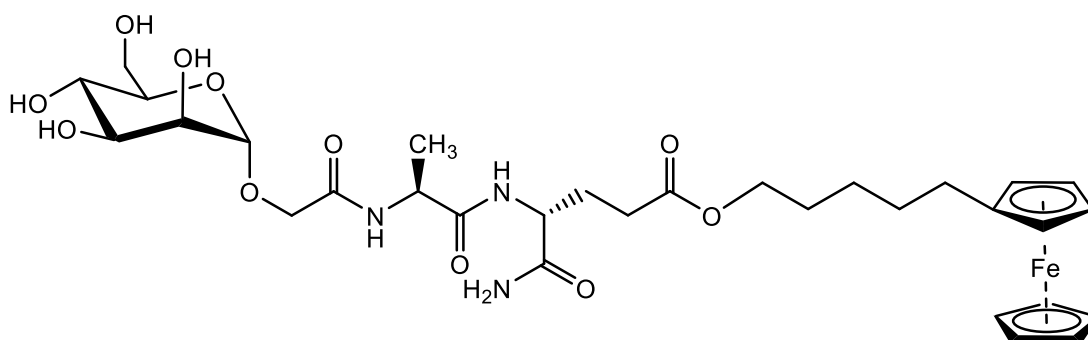
*iso*Gln); 2,00 – 1,94 (m, 1H, CH₂, *iso*Gln); 1,72 – 1,56 (m, 4H, 2 × CH₂, poveznica ferocen-dipeptid); 1,42 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz, CH₃, Ala).

¹³C NMR (CD₃OD) δ/ppm: 176,29, 175,05, 174,74, 171,92 (C=O); 101,82 (C1); 75,40, 72,46, 71,75, 69,74, 69,36, 68,60, 68,40 (CH, Fc; C2 – C5); 66,92 (C6); 65,85 (CH₂O); 62,90 (CH₂, acetilna poveznica); 53,82 (CH, *iso*Gln); 50,44 (CH, Ala); 31,56 (CH₂Fc); 30,27, 29,61, 28,66, 28,05 (4 × CH₂: 2 × CH₂, *iso*Gln, 2 × CH₂, poveznica ferocen-dipeptid); 18,24 (CH₃, Ala).

ESI-MS: *m/z* 677,24 [M+H]⁺

3.6.1.3. [5-(ferocen-1-il)pentan-1-il]-(4*R*)-4-{(2*S*)-2-[(α-D-manopiranoziloksi)etanamido]propanamido}-4-karbamoilbutanoat **15**

Spoj **12** (62 mg, 0,06 mmol) otopi se u 96 % etanolu (8 mL) te se otopini doda 10 %-tni paladij na ugljiku (31 mg). Nakon završetka reakcije, njene obrade i kromatografskog čišćenja dobiven je spoj **15** (slika 39) u obliku narančastog ulja (18 mg, 43 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 39. Strukturna formula molekule spoja **15**

R_f = 0,50 (CH₃CN : H₂O = 5 : 1)

¹H NMR (CD₃OD) δ/ppm: 4,82 (d, 1H, *J* = 1,7 Hz, H-1); 4,43 – 4,34 (m, 2H: 1H, CH, Ala; 1H, CH, *iso*Gln); 4,20 (d, 1H, *J* = 15,2 Hz, CH₂, acetilna poveznica); 4,09 – 4,04 (m, 10H: 9H, 9 × CH, Fc; 1H, CH₂, acetilna poveznica); 3,95 (1H, *J*_{2,3} = 3,4 Hz, *J*_{1,2} = 1,8 Hz, H-2); 3,83 (*J*_{6a,6b} = 11,8 Hz, *J*_{5,6a} = 2,3 Hz, H-6b); 3,78 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 9,2 Hz, *J*_{2,3} = 3,4 Hz, H-3); 3,69 (dd, 1H, *J*_{6a,6b} = 11,8 Hz, *J*_{5,6b} = 6,0 Hz, H-6a); 3,61 (app t, 1H, *J* = 9,5 Hz, H-4); 3,56 – 3,52 (m, 1H, H-5); 2,42 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz, CH₂Fc); 2,34 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz, CH₂, *iso*Gln); 2,25 – 2,16 (m, 1H, CH₂, *iso*Gln); 1,96 – 1,86 (m, 1H, CH₂, *iso*Gln); 1,68 – 1,61 (m, 2H, CH₂, poveznica

ferocen-dipeptid); 1,57 – 1,49 (m, 2H, CH₂, poveznica ferocen-dipeptid); 1,42 – 1,36 (m, 5H: 3H, CH₃, Ala, 2H, CH₂, poveznica ferocen - dipeptid).

¹³C NMR (CD₃OD) δ/ppm: 176,30, 175,03, 174,70, 171,91 (C=O); 101,86 (C1); 75,45, 72,49, 71,79, 68,65 (CH, Fc; C2 – C5); 66,93 (C6); 65,92 (CH₂O); 62,96 (CH₂, acetilna poveznica); 53,83 (CH, *iso*Gln); 50,45 (CH, Ala); 31,93 (CH₂Fc); 31,57, 30,56, 29,66, 28,07, 26,95 (5 × CH₂: 2 × CH₂, *iso*Gln; 3 × CH₂, poveznica ferocen-dipeptid); 18,24 (CH₃, Ala).

ESI-MS: *m/z* 691,26 [M+H]⁺

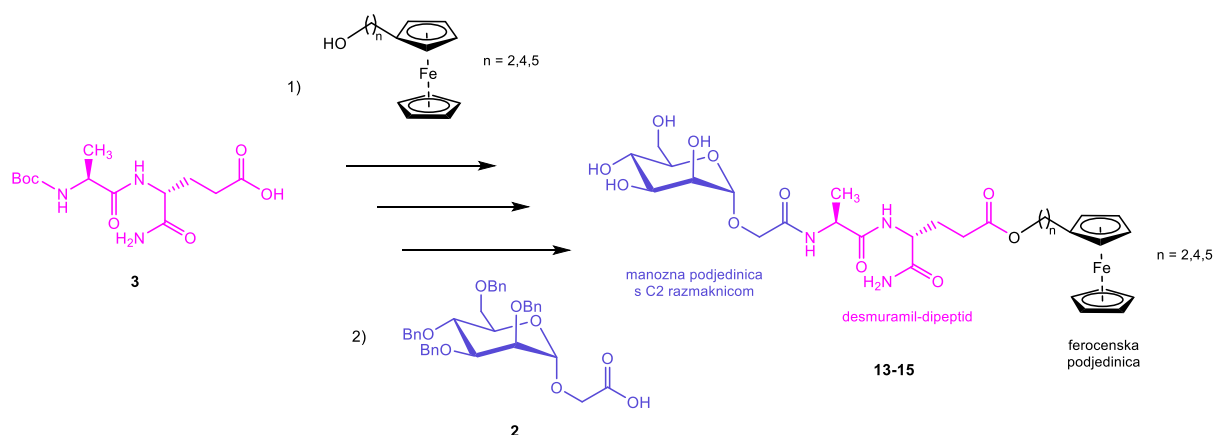
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

U sklopu diplomskog rada uspješno su priređena tri ferocenska estera manoziliranog desmuramil-dipeptida (DMP), spojevi **13-15**. Sam desmuramil-dipeptid, odnosno L-alanil-D-izoglutamin (L-Ala-D-*iso*Gln) sastavni je dio muramil-dipeptida (MurNAc-L-Ala-D-*iso*Gln, MDP) te je ključan za njegovu adjuvantnu aktivnost. Strukturne modifikacije molekule DMP-a posljednjih su godina predmet istraživanja na Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazali su da uvođenjem lipofilne podjedinice u strukturu DMP-a dolazi do poboljšanja njegove imunostimulacijske aktivnosti.³ Lipofilne podjedinice omogućavaju bolju ugradnju u fosfolipidni dvosloj stanične membrane i posljedično lakši pasivni transport u stanicu. U okviru ovog rada po prvi je puta kao lipofilna podjedinica korišten ferocenski strukturni motiv. Konkretno, korišteni su ferocenski alkoholi koji su reakcijom esterifikacije vezani na karboksilnu skupinu bočnog ogranka izoglutamina. Ferocenski alkoholi, pripremljeni na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, sadrže alkilnu poveznicu s različitim brojem metilenskih skupina ($n = 2, 4$ i 5). Alkilne poveznice uvedene su u strukturu molekula alkohola u cilju povećanja lipofilnosti te kako bi se ispitaio njihov utjecaj na imunostimulacijsku aktivnost ciljnih molekula ovog rada. Osim uvođenja lipofilne ferocenske podjedinice, u strukturu molekule DMP-a uvedena je i manoznom podjedinica povezana preko dva atoma ugljika (C2 razmaknica) na N-kraj dipeptida. Poznato je da manozni receptori koji se nalaze na površini stanica imunosnog sustava specifično prepoznaju i vežu manozu te na taj način pojačavaju adjuvantni učinak.

Za pripravu ciljnih molekula korišten je konvergentni pristup sintezi, točnije sintetizirani su zasebni fragmenti koji su naknadno spojeni u jednu cjelinu. Radi se o manoznoj podjedinici s C2 razmaknicom, dipeptidu te ferocenskim alkoholima s alkilnom poveznicom. Kao polazni dipeptid korišten je komercijalno dostupan Boc-L-Ala-D-*iso*Gln(OBn) s odgovarajućim zaštitnim skupinama na amino-skupini alanina i karboksilnoj skupini bočnog ogranka izoglutamina. Katalitičkom hidrogenolizom uklonjena je esterska benzilna zaštitna skupina s bočnog ogranka izoglutamina te je pripremljen spoj **3**, Boc-L-Ala-D-*iso*Gln. Slobodna

karboksilna skupina bočnog ogranka izoglutamina spoja **3** reagira u uvjetima Steglichove esterifikacije s prethodno pripravljenim ferocenskim alkoholima dajući ferocenske estere Boc-zaštićenog desmuramil-dipeptida, spojeve **4**, **5** i **6**. Uklanjanjem Boc-zaštitne skupine s N-kraja spojeva **4**, **5** i **6** propuhivanjem suhog klorovodika kroz otopinu, nastaju odgovarajuće soli ferocenskih estera desmuramil-dipeptida, spojevi **7**, **8** i **9**. Manozna podjedinica s C2 razmaknicom pripravljena je u dva sintetska koraka. Prvi korak je Williamsonova sinteza etera između prethodno pripravljene 2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranoze i *tert*-butilbromacetata, uz kalijev karbonat kao bazu, pri čemu nastaje ester **1**. Slijedi hidroliza nastalog *tert*-butilnog estera **1** uz dodatak trifluoroctene kiseline čime nastaje spoj **2**. Kondenzacija manozne podjedinice **2** s ferocenskim derivatima desmuramil-dipeptida **7**, **8** i **9** provedena je uz kondenzacijski reagens EDC·HCl i dodatak HOBT-a. Formiranjem amidne veze dobiveni su spojevi **10**, **11** i **12**. Posljednji korak uključivao je skidanje benzilnih zaštitnih skupina s manozne podjedinice katalitičkom hidrogenolozom čime su dobivene ciljne molekule **13**, **14** i **15** (slika 40).

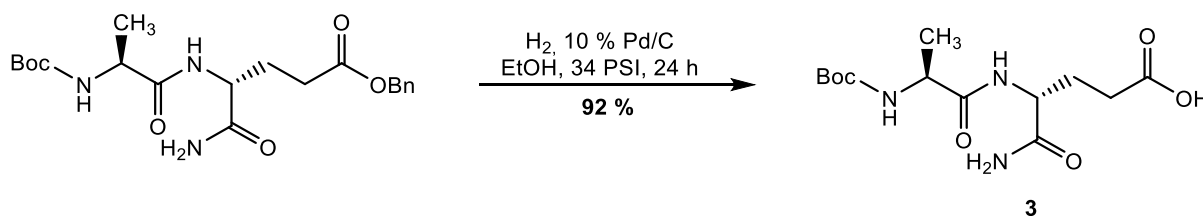


Slika 40. Sažeti prikaz sinteza provedenih u sklopu diplomskog rada

4.2. Uklanjanje benzilne zaštitne skupine s Boc-L-Ala-D-*iso*Gln(OBn)

Dipeptidni prekursor pripravljen je katalitičkom hidrogenolizom komercijalno dostupnog Boc-L-Ala-D-*iso*Gln(OBn) (slika 41). Prilikom reakcije koja se provodi u Paarovom uređaju dolazi do uklanjanja benzilne esterske zaštitne skupine s bočnog ogranka *iso*Gln. Dobiven je spoj **3**, Boc-L-Ala-D-*iso*Gln, čija će slobodna karboksilna skupina reagirati reakcijom esterifikacije s

ferocenskim alkoholima u idućem koraku. Struktura spoja **3** potvrđena je spektroskopijom NMR.



Slika 41. Shematski prikaz skidanja benzilne zaštitne skupine s Boc-L-Ala-D-isoGln(OBn)

Navedeni reakcijski uvjeti u smislu tlaka pri kojem se reakcija provodi i trajanja reakcije dobro su izbalansirani što osigurava gotovo kvantitativan prinos reakcije (92 %). Visok prinos reakcija uvijek je poželjan osobito kada se radi o reakcijama uvođenja ili uklanjanja zaštitnih skupina te dodatno, u konkretnom slučaju, kada cijena polaznog supstrata nije zanemariva.

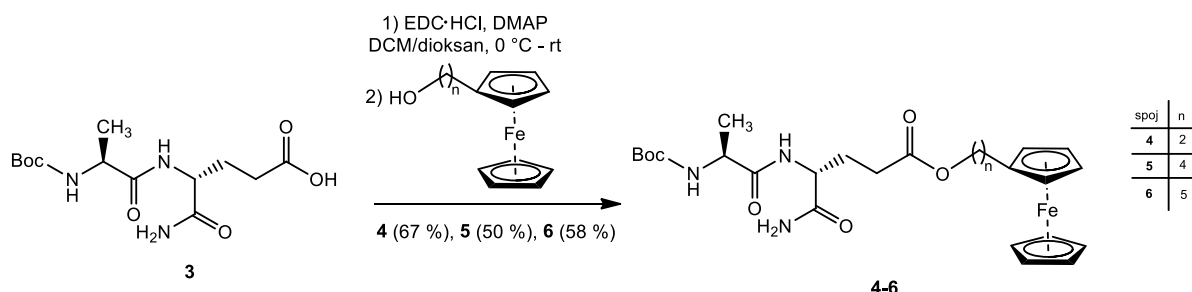
4.3. Priprava ferocenskih estera desmuramil-dipeptida 7-9

4.3.1. Priprava zaštićenih ferocenskih estera desmuramil-dipeptida u uvjetima Steglichove esterifikacije

U slijedećem stupnju sinteze dolazi do formiranja esterske veze između peptidnog prekursora **3** i prethodno pripremljenih ferocenskih alkohola u uvjetima Steglichove esterifikacije (slika 42). Spoj **3** ima slobodnu karboksilnu skupinu bočnog ogranka *iso*Gln, dok je amino-skupina Ala zaštićena Boc-zaštitom kako ne bi došlo do samokondenzacije dipeptida. Poznato je da su amini bolji nukleofili od alkohola, stoga bi slobodna amino-skupina alanina bila pogodnija za nukleofilni napad od hidroksilne skupine ferocenskih alkohola. Uvedena Boc-zaštita na N-kraju dipeptida onemogućuje takav neželjeni ishod reakcije.

Prvi korak reakcije esterifikacije je aktivacija karboksilne skupine pomoću EDC·HCl koja se provodi pri sniženoj temperaturi kako bi se smanjilo nastajanje nusprodukata poput *N*-aciluree. Slijedi dodatak nukleofila – ferocenskih alkohola i DMAP-a kao katalizatora. Reakcija se odvija i bez dodatka DMAP-a, no značajno sporije pri čemu mogu nastati neželjeni nusprodukti (poglavlje 2.3.2.3.). Nakon 24 sata dodano je još EDC·HCl, te je reakcija prekinuta nakon ukupno 48 sati kada se praćenjem tijekom reakcije tankoslojnom kromatografijom više

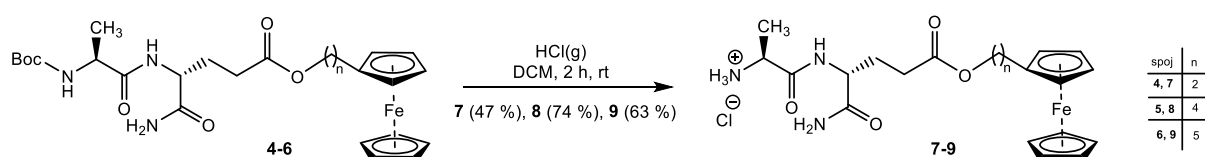
nije uočio napredak. Izolirani su spojevi **4** (67 %), **5** (50 %) i **6** (58 %) čije su strukture potvrđene spektroskopijom NMR.



Slika 42. Shematski prikaz pripreve zaštićenih ferocenskih estera desmuramil-dipeptida **4-6** u uvjetima Steglichove esterifikacije

4.3.2. Uklanjanje Boc-zaštite sa zaštićenih ferocenskih estera desmuramil-dipeptida **4-6**

Kako bi amino-skupina pripremljenih ferocenskih estera desmuramil-dipeptida **4-6** mogla reagirati s karboksilnom skupinom manozne podjedinice na C2 razmaknici, potrebno je ukloniti Boc-zaštitnu skupnu s N-kraja dipeptida. Za uklanjanje Boc-zaštite u pravilu se koriste kiseli uvjeti stoga je odabrana metoda propuhivanja suhog klorovodika kroz otopine spojeva **4-6** u suhom diklormetanu (slika 43). Nakon završetka reakcije i kromatografskog čišćenja izolirani su spojevi **7** (47 %), **8** (74 %) i **9** (63 %) u obliku kloridnih soli čije su strukture potvrđene spektroskopijom NMR.

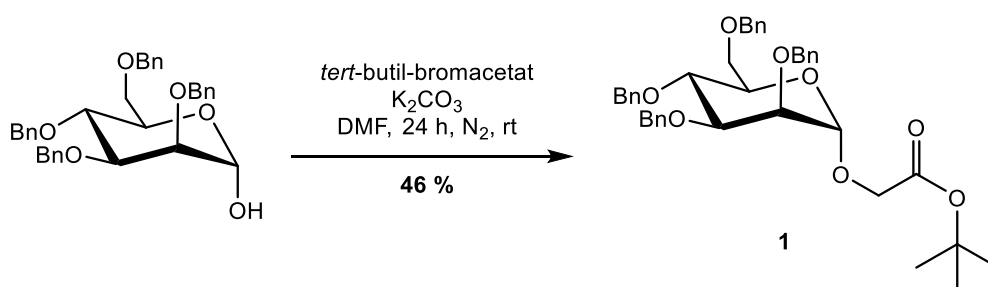


Slika 43. Shematski prikaz uklanjanja Boc-zaštite sa zaštićenih ferocenskih estera desmuramil-dipeptida **4-6** i pripreva odgovarajućih soli **7-9**

4.4. Priprema manozne podjedinice s C2 razmaknicom 2

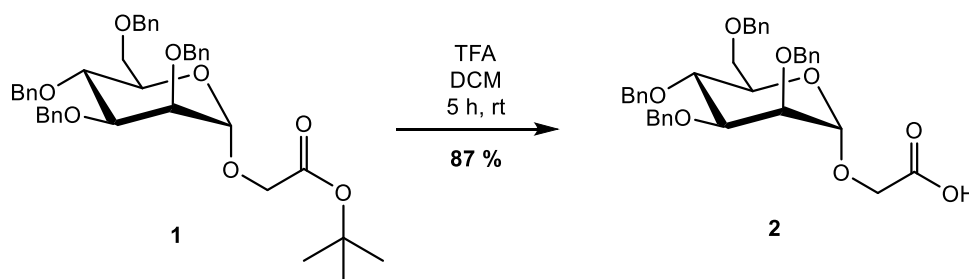
Manozna podjedinica pripravljena je u dva sintetska koraka uvođenjem C2 razmaknice na prethodno pripravljenu 2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranozu. Prilikom odabira

odgovarajuće metode trebalo je voditi računa o benzilnim zaštitama na polaznom spoju. Kao prvi korak odabrana je Williamsonova sinteza etera između polaznog spoja i *tert*-butil-bromacetata, uz kalijev karbonat kao bazu (slika 44). Iako se ovdje radi o jakoj bazi, benzilna zaštita uklanja se katalitičkom hidrogenolizom stoga je baza neće ugroziti. Nakon završetka reakcije i kromatografskog čišćenja izoliran je spoj **1** (46 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR.



Slika 44. Shematski prikaz pripreve spoja **1** Williamsonovom sintezom iz polazne 2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-manopiranoze i *tert*-butil-bromacetata

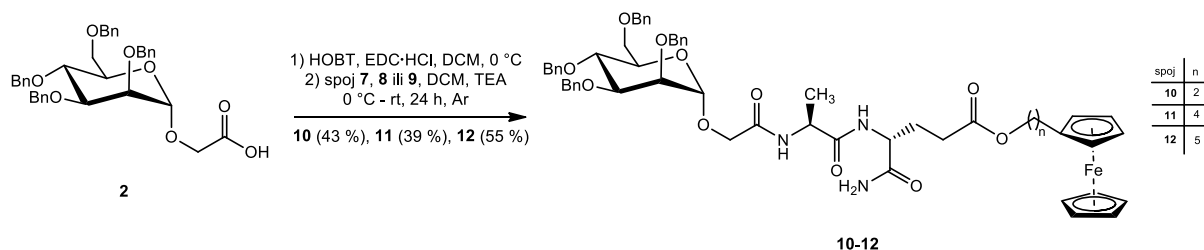
U sljedećem koraku potrebno je ukloniti *tert*-butilnu estersku skupinu kako bi se karboksilna kiselina oslobodila za nadolazeću reakciju amidacije. Reakcija je provedena u kiselim uvjetima, dodatkom trifluoroctene kiseline u otopinu spoja **1** u suhom DCM-u (slika 45). Zbog relativno niskog vrelišta trifluoroctene kiseline lako ju je ukloniti uparavanjem na rotacijskom uparivaču nakon završetka reakcije. Kromatografskim čišćenjem na koloni silikagela izoliran je spoj **2** (87 %) čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR.



Slika 45. Shematski prikaz reakcije uklanjanja *tert*-butilne esterske skupine sa spoja **1** pri čemu nastaje spoj **2**

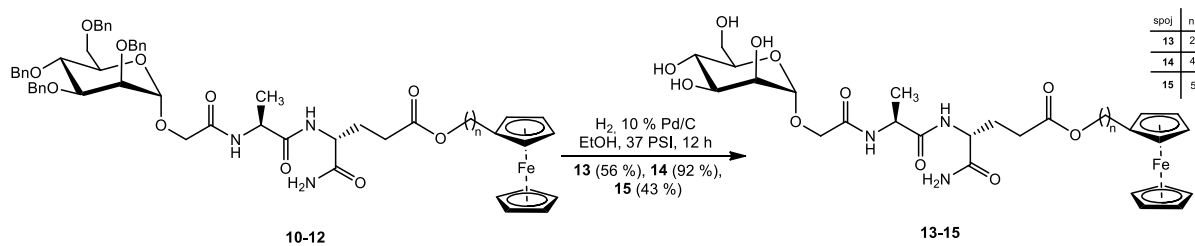
4.5. Priprava ferocenskih estera manoziliranog desmuramil-dipeptida 13-15

Slijedeći korak u sintezi ciljnih molekula je reakcija amidacije između manoznog prekursora **2** i slobodne amino-skupine spojeva **7**, **8** ili **9** (slika 46). Prije nukleofilnog napada amino-skupine, karboksilnu kiselinu potrebno je aktivirati (poglavlje 2.2.4.). Za aktivaciju odabran je karbodiimidni reagens EDC·HCl uz dodatak HOBT-a kako bi se smanjio nastanak *N*-aciluree kao nusprodukta. Iz istog je razloga aktivacija karboksilne kiseline provedena na sniženoj temperaturi. Nakon aktivacije slijedi dodatak nukleofila – kloridnih soli ferocenskih estera desmuramil-dipeptida i baze trietilamina. S obzirom da se ferocenski esteri desmuramil-dipeptida dodaju u reakcijsku smjesu u obliku kloridnih soli, trietilamin služi za njihovu neutralizaciju. Kromatografskim čišćenjem na koloni silikagela izolirani su spojevi **10** (43 %), **11** (39 %) i **12** (55 %), čije su strukture potvrđene spektroskopijom NMR.



Slika 46. Shematski prikaz priprave spojeva **10-12** reakcijom amidacije između manoznog prekursora **2** i kloridnih soli ferocenskih estera desmuramil-dipeptida **7-9**

Ciljne molekule **13-15** dobivene su uklanjanjem benzilnih zaštitnih skupina s hidroksilnih skupina manoze. S obzirom da manozni receptori koji se nalaze na površini stanica imunskog sustava specifično prepoznaju i vežu manozu, potrebno je ukloniti zaštitne skupine s manoze kako bi bila prepoznata od strane navedenih receptora. Benzilne zaštitne skupine odabrane su kako bi se tijekom posljednjeg koraka u sintezi, njihovog uklanjanja, postigli što blaži uvjeti i kako bi se spriječio raspad pripremljenih spojeva. Za uklanjanje zaštitnih skupina odabrana je ista metoda kao i u poglavlju 4.2. – katalitička hidrogenoliza (slika 47). Nakon obrade i kromatografskog čišćenja izolirane su ciljne molekule **13** (56 %), **14** (92 %) i **15** (43 %), čije su strukture potvrđene spektroskopijom NMR.



Slika 47. Shematski prikaz pripreve ciljnih molekula **13-15** katalitičkom hidrogenolizom spojeva **10-12**

§ 5. ZAKLJUČAK

1. Kondenzacijom prethodno pripremljenih ferocenskih alkohola s Boc-zaštićenim dipeptidom **3**, Boc-L-Ala-D-*iso*Gln, kojem je uklonjena esterska benzilna zaštitna skupina s bočnog ogranka *iso*Gln, uspješno su pripremljeni Boc-zaštićeni ferocenski esteri desmuramil-dipeptida **4-6**. Pritom su korišteni uvjeti Steglichove esterifikacije, odnosno EDC·HCl kao kondenzacijski reagens i DMAP kao katalizator. Produkti su izolirani uz iskorištenja od 50 – 67 % (67 % **4**, 50 % **5**, 58 % **6**).
2. Boc-zaštitne skupine sa spojeva **4-6** uklonjene su u kiselim uvjetima (propuhivanje suhog klorovodika kroz otopinu spojeva u suhom diklormetanu). Uspješno su pripremljeni ferocenski esteri desmuramil-dipeptida **7-9** u obliku kloridnih soli. Iskorištenja reakcija iznose od 47 – 74 % (47 % **7**, 74 % **8**, 63 % **9**).
3. Kondenzacijom ferocenskih estera desmuramil-dipeptida **7-9** s prethodno pripremljenom manoznom podjedinicom s C2 razmaknicom, spojem **2**, uspješno su pripremljeni ferocenski esteri zaštićenog manoziliranog desmuramil-dipeptida **10-12**. Pritom je korišten EDC·HCl kao kondenzacijski reagens, a HOBT kao aditiv. Produkti su izolirani uz iskorištenja od 39 – 55 % (43 % **10**, 39 % **11**, 55 % **12**).
4. Posljednji korak bio je uklanjanje benzilnih zaštitnih skupina s hidroksilnih skupina manoze spojeva **10-12**. Odabrana je metoda katalitičke hidrogenolize uz Pd/C kao katalizator. Uspješno su pripremljene ciljne molekule – ferocenski esteri manoziliranog desmuramil-dipeptida **13-15** uz iskorištenja od 43 – 92 % (56 % **13**, 92 % **14**, 43 % **15**).
5. Strukture svih pripremljenih spojeva potvrđene su spektroskopijom NMR te spektrometrijom masa.
6. Konačni cilj pripreme ferocenskih estera manoziliranog desmuramil-dipeptida **13-15** jest ispitivanje adjuvatnog učinka. Istražit će se utjecaj lipofilnih ferocenskih podjedinica na imunološki odgovor. Također, ispitat će se utjecaj različitih duljina alikilne poveznice

između ferocenskog dijela i ostatka molekule na adjuvatni učinak dobivenih spojeva **13-15**.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

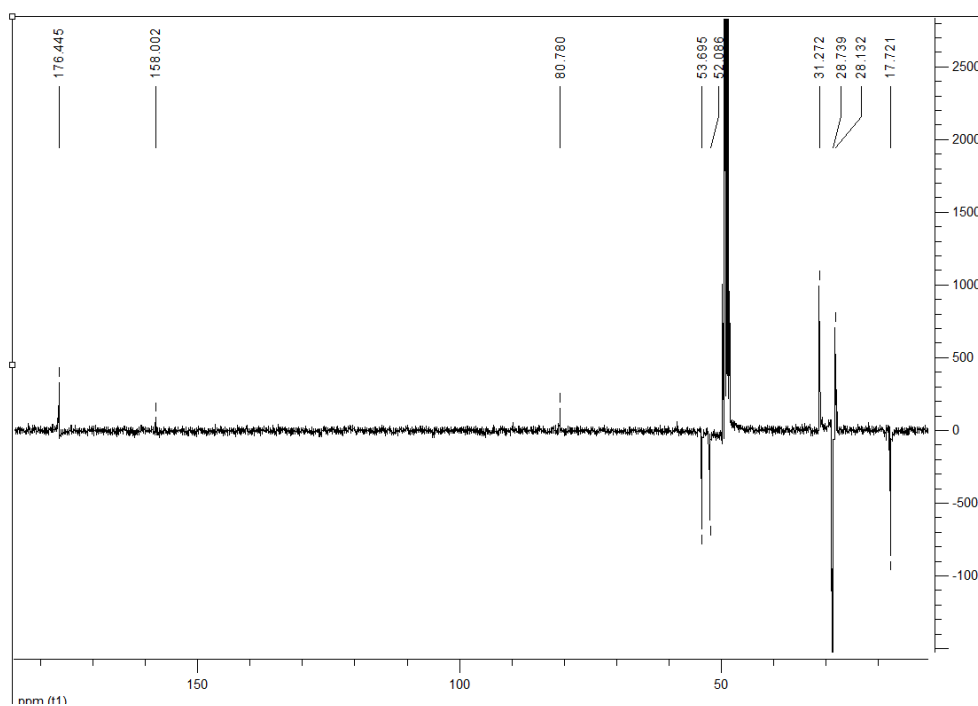
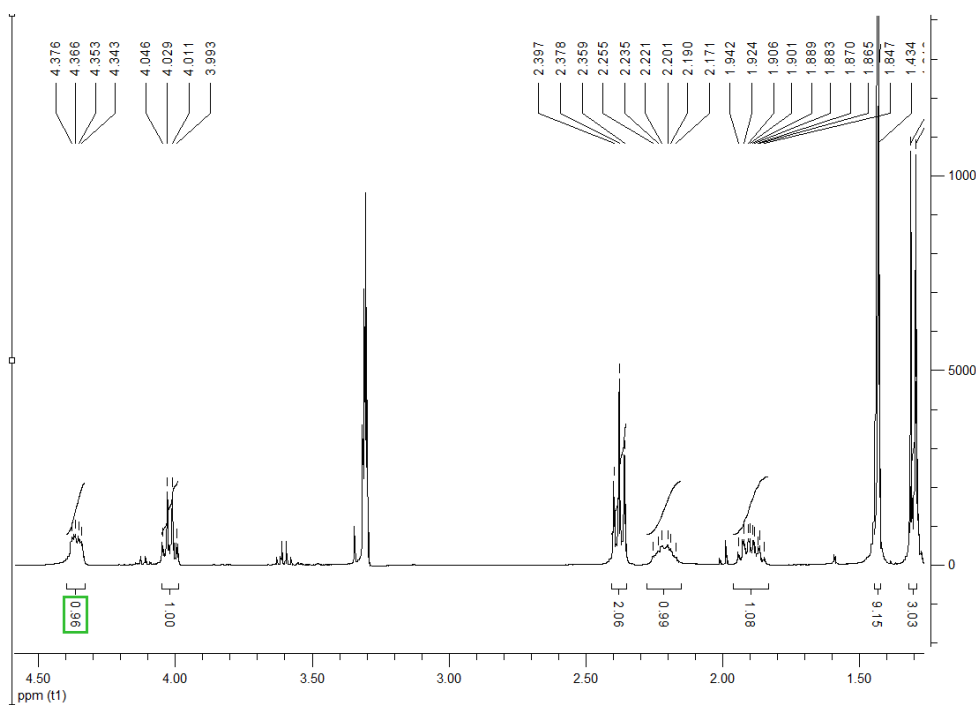
Bn	benzil
Boc	<i>t</i> -butiloksikarbonil
CARDs	engl. <i>Caspase Reruitment Domains</i>
CHCl ₃	kloroform
CH ₃ CN	acetonitril
EDC·HCl	<i>N</i> -(3- dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilkarbodiimid-hidroklorid
EtOAc	etil-acetat
DCC	<i>N,N</i> -dicikloheksilkarbodiimid
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropilkarbodiimid
DMAP	<i>N,N</i> -dimetiaminopiridin
DMP	desmuramil-dipeptid
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
HBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> - tetrametiluronijev heksafluorofosfat
HOBT	1-hidroksi-1 <i>H</i> -benzotriazol
LRR	engl. <i>Leucine-rich Repeat</i>
MDP	muramil-dipeptid
MeOH	metanol
NF-κB	engl. <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
NOD	engl. <i>Nucleotide Oligomerization Domain</i>
PRR	engl. <i>Pattern Recognition Receptors</i>
RIP2	engl. <i>Receptore-Interaction Protein 2</i>
TEA	trietilamin
TFA	trifluoroctena kiselina

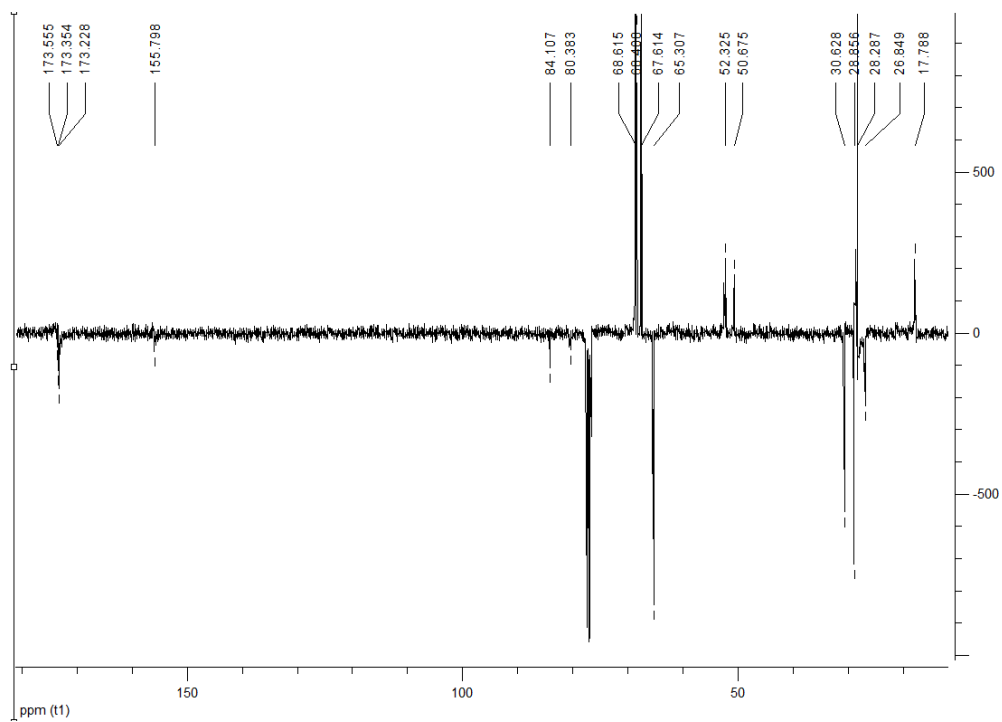
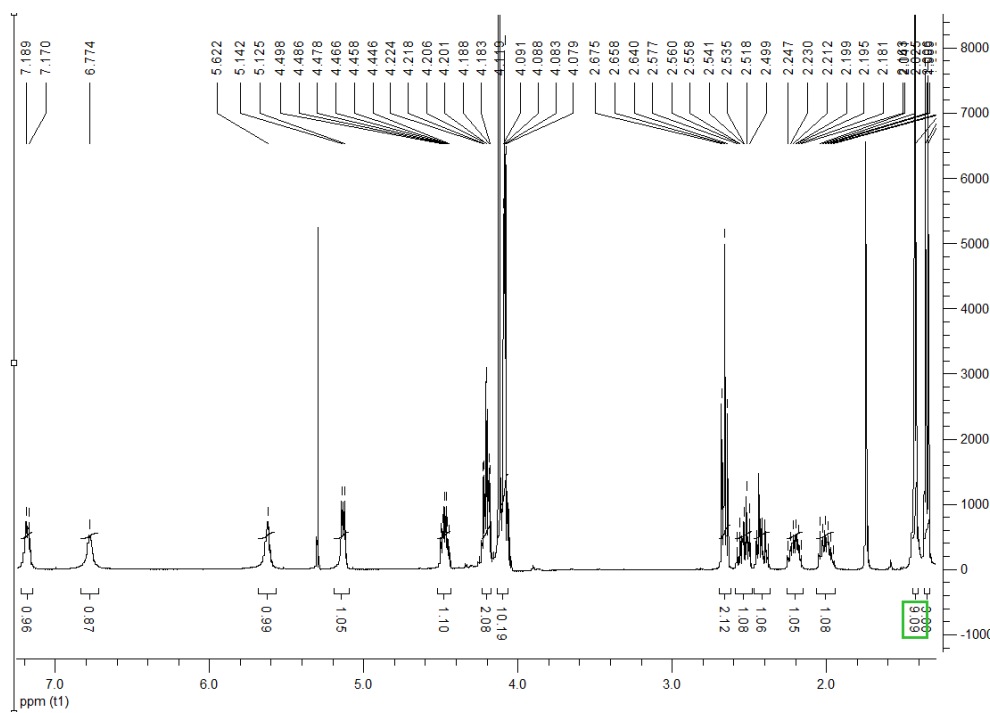
§ 7. LITERATURNI IZVORI

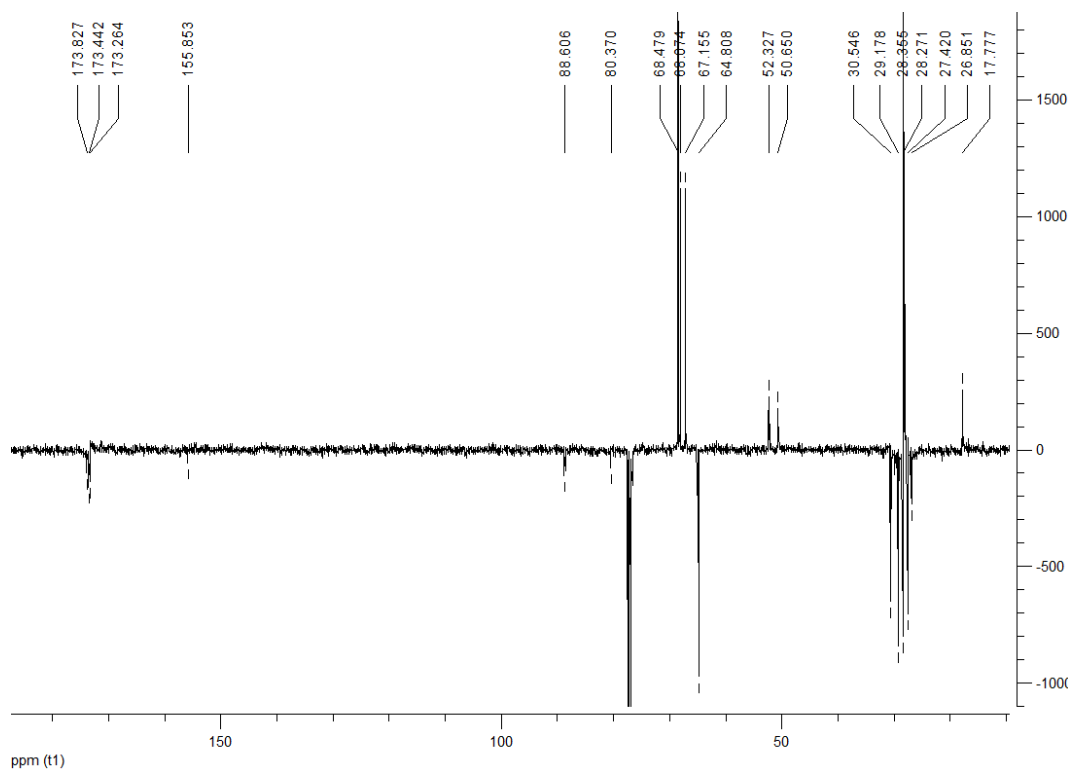
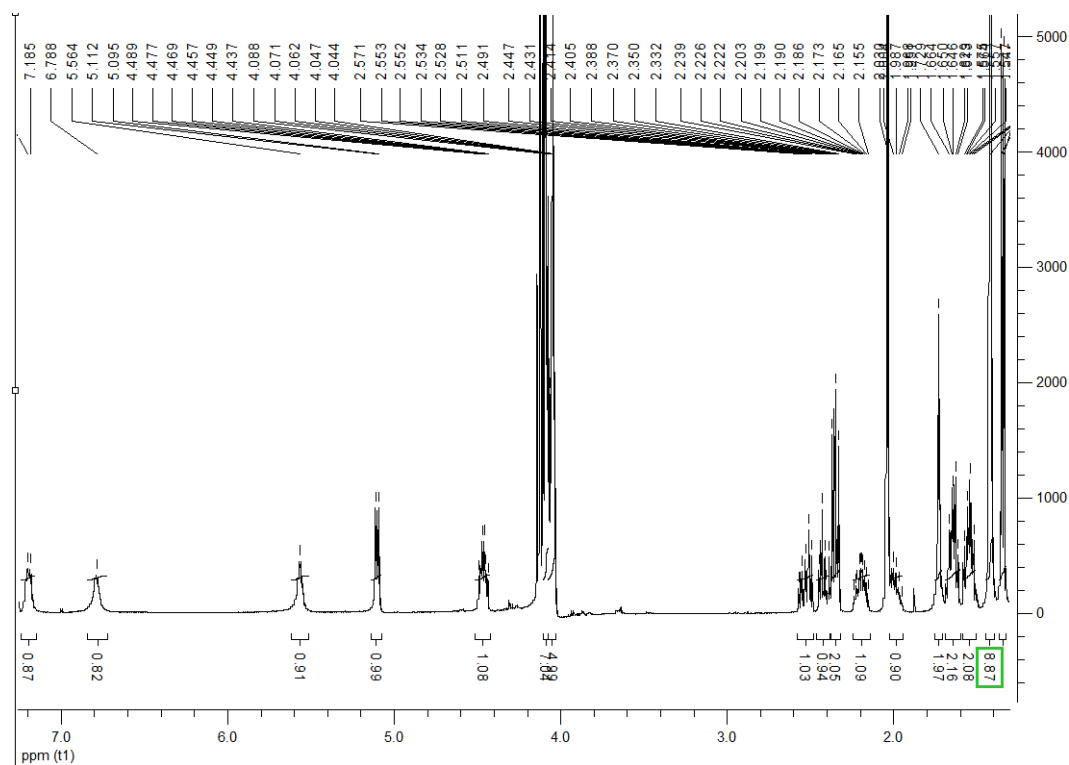
1. P. Marrack, A. McKee, M. Munks, *Nat. Rev. Immunol.* **9** (2009) 287–293.
2. <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/vaccines-and-therapeutics/adjuvants-introduction> (datum pristupa 25.7.2022.)
3. R. Ribić, S. Tomić, *Kem. Ind.* **62** (2013) 1931.
4. V. Petrović Peroković, Ž. Car, M. Bušljeta, D. Mihelec, M. Paurević, S. Ivanković, R. Stojković, R. Ribić, *Int. J. Mol. Sci.* **23** (2022) 8628–8648.
5. V. Petrović Peroković, Ž. Car, J. Draženović, R. Stojković, L. Milković, M. Antica, Đ. Škalamera, S. Tomić, R. Ribić, *Molecules* **26** (2021) 6352
6. A. Maršavelski, M. Paurević, R. Ribić, *Org. Biomol. Chem.* **19** (2021) 7001–7012.
7. M. Paurević, Sinteza, Strukturna karakterizacija i biološko djelovanje manoliziranih derivata desmuramil-dipeptida, Doktorski rad, Prirodoslovo-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2021.
8. R. Ribić, R. Stojković, L. Milković, M. Antica, M. Cigler, S. Tomić, *Beilstein J. Org. Chem.* **15** (2019) 1805–1814.
9. L. Barišić, M. Roščić, M. Kovačević, M. Čakić Semenčić, Š. Horvat, V. Rapić, *Carbohydr. Res.* **346** (2011) 678–684.
10. H. Werner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **51** (2012) 6052–6058.
11. G. Wilkinson, M. Rosenblum, M. C. Whiting, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **74** (1952) 2125–2126.
12. E. O. Fischer, W. Pfab, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **7** (1952) 377–339.
13. P. Laszlo, R. Hoffmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **39** (2000) 123–124.
14. P. Atkins, T. Overton, J. Rourke, M. Weller, F. Armstrong, M. Hagerman, *Shriver & Atkins' Inorganic Chemistry*, 5th Edition, Oxford University Press, Oxford, 2010, str. 560–564.
15. D. Astruc, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017** (2017) 6–29.
16. <https://web.archive.org/web/20060505193757/http://www.osd.org.tr/14.pdf> (datum pristupa: 20.7.2022.)
17. R. V. Kerley, *Coal Combustion Process and Composition*, U. S. Patent 3927992, 1971.
18. D. R. van Staveren, N. Metzler-Nolte, *Chem. Rev.* **104** (2004) 5931–5985.

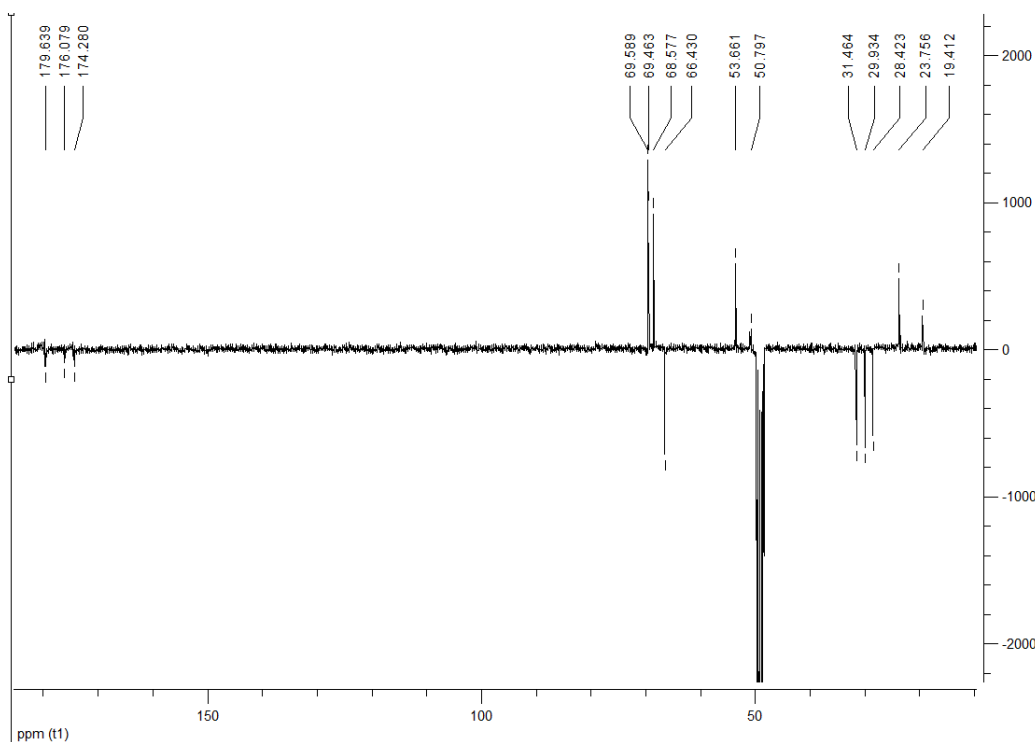
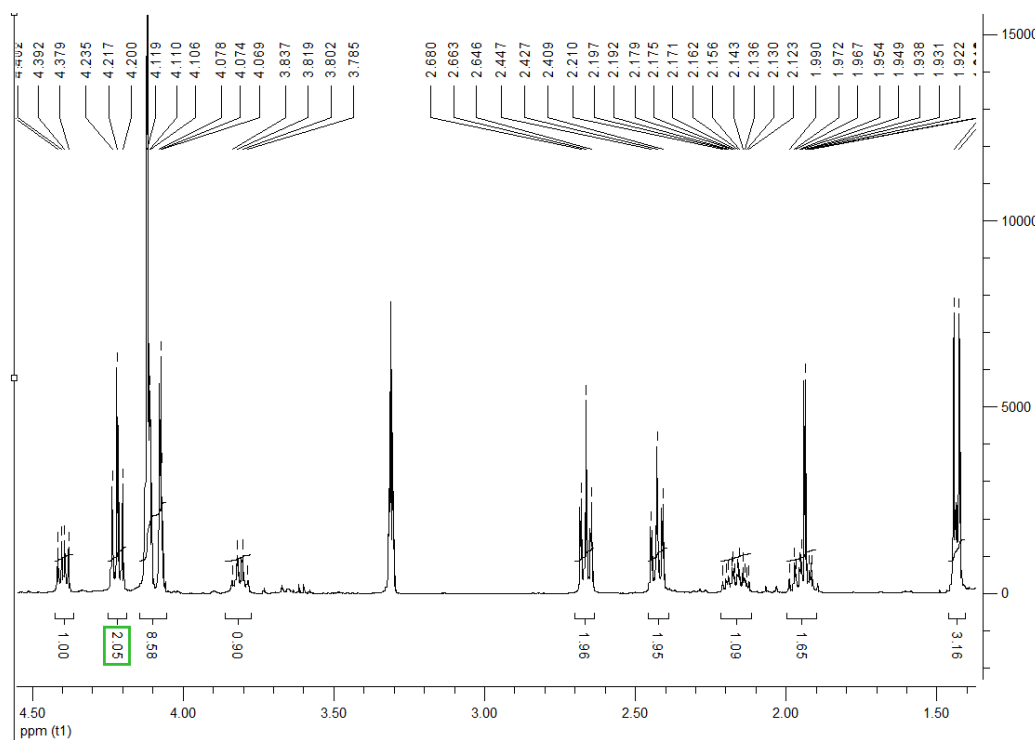
19. M. Toma, V. Vrček, *Kem. Ind.* **69** (2020) 21–29.
20. M. Tsakos, E. S. Schaffert, L. L. Clement, N. L. Villadsen, T. B. Poulsen, *Nat. Prod. Rep.* **32** (2015) 605–632.
21. E. Fischer, A. Speier, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **28** (1895) 3252–3258.
22. B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **17** (1978) 522–524.

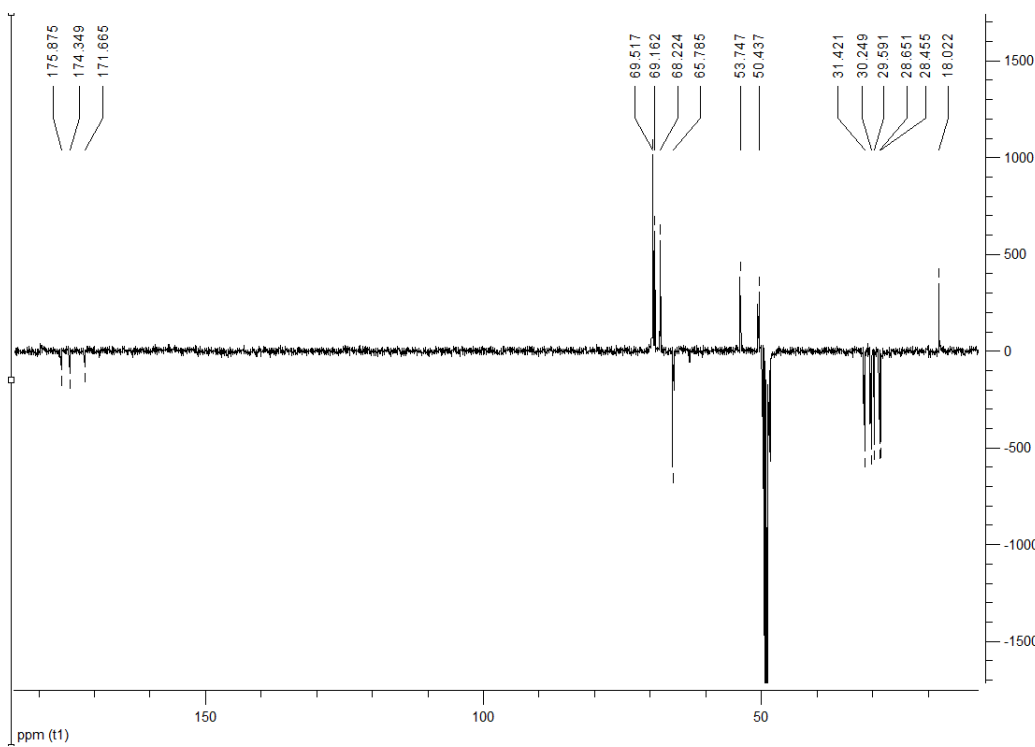
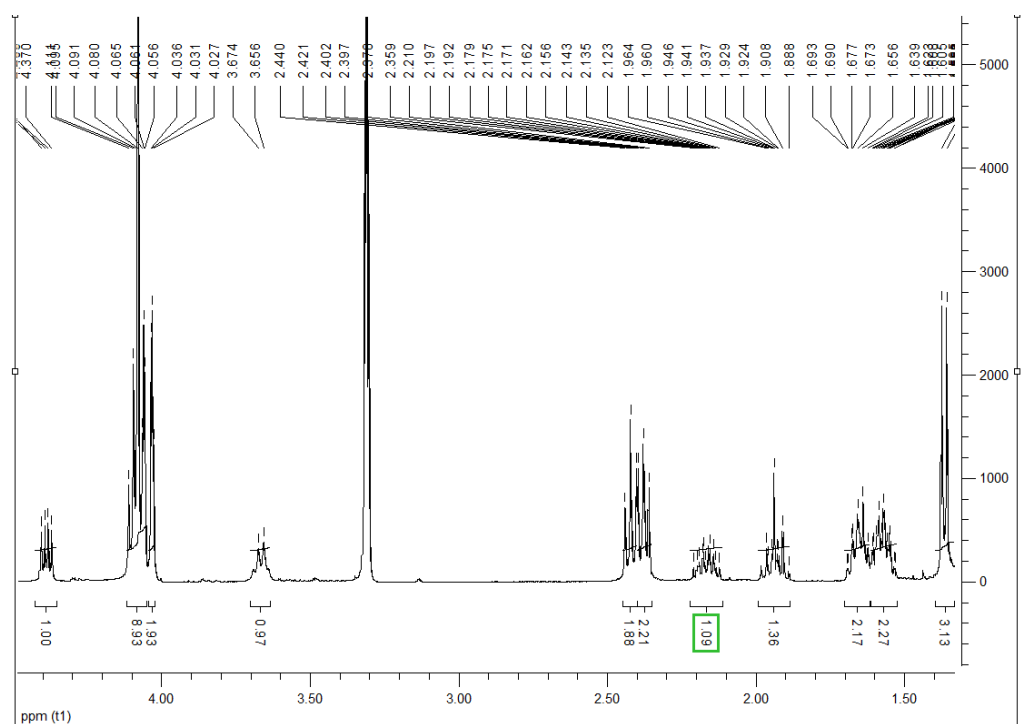
§ 8. DODATAK

Dodatak 1: ^1H NMR i DEPTQ spoja 3

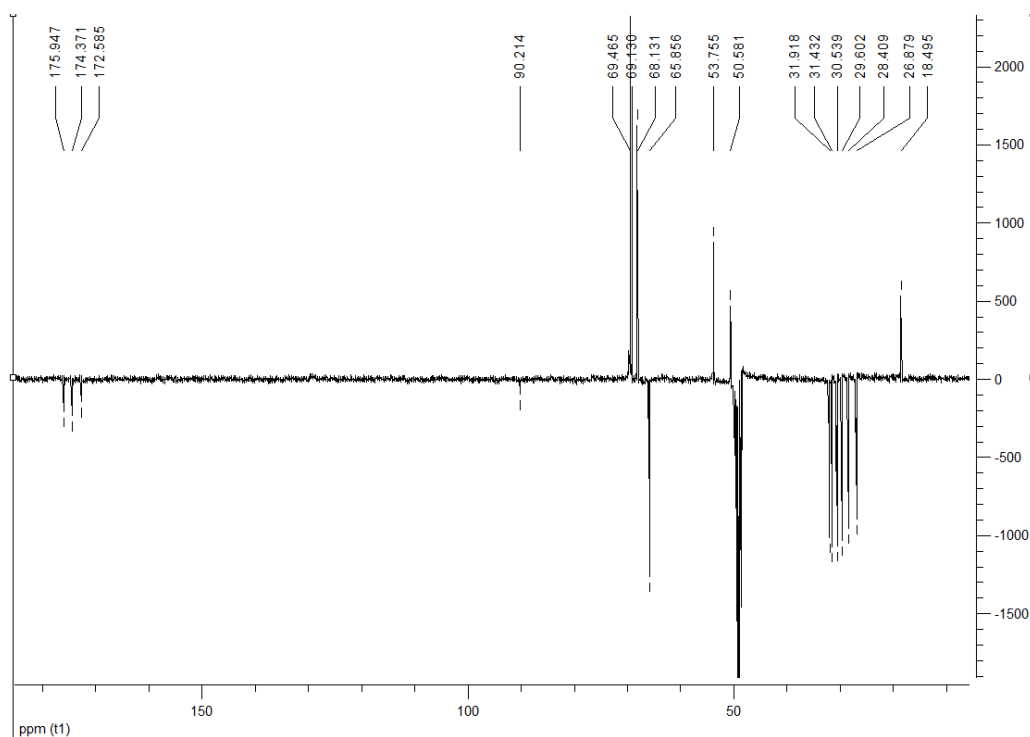
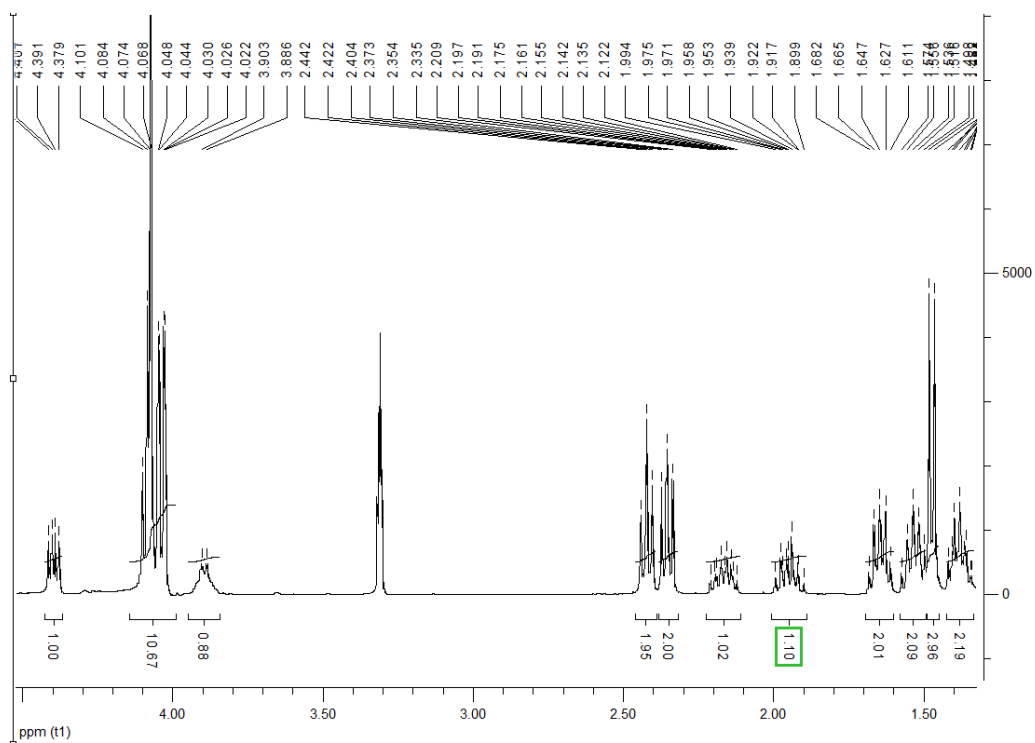
Dodatak 2: ¹H NMR i DEPTQ spoja 4

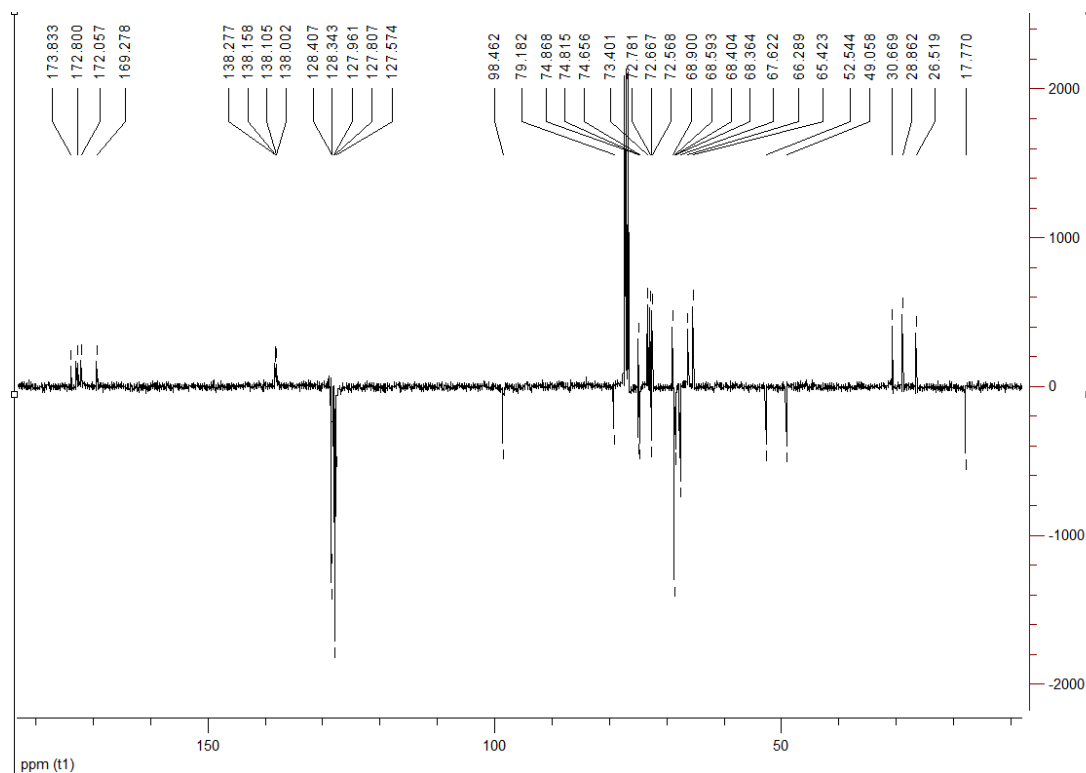
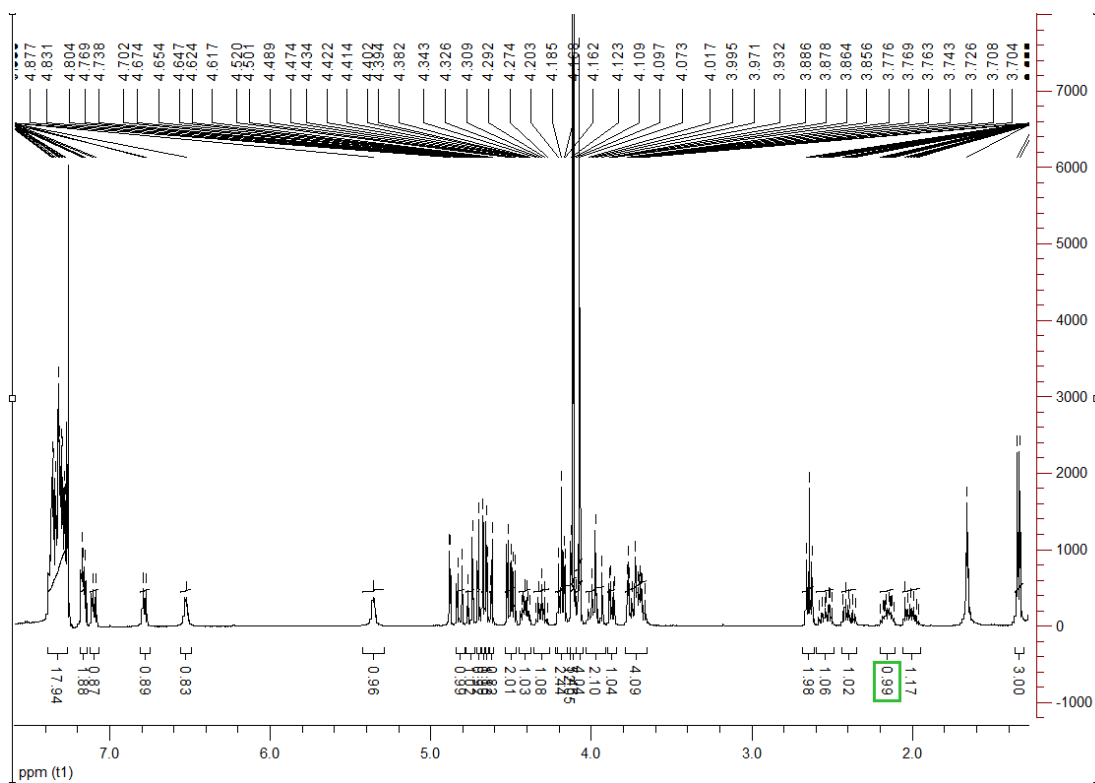
Dodatak 3: ^1H NMR i DEPTQ spoja 5

Dodatak 5: ^1H NMR i DEPTQ spoja 7

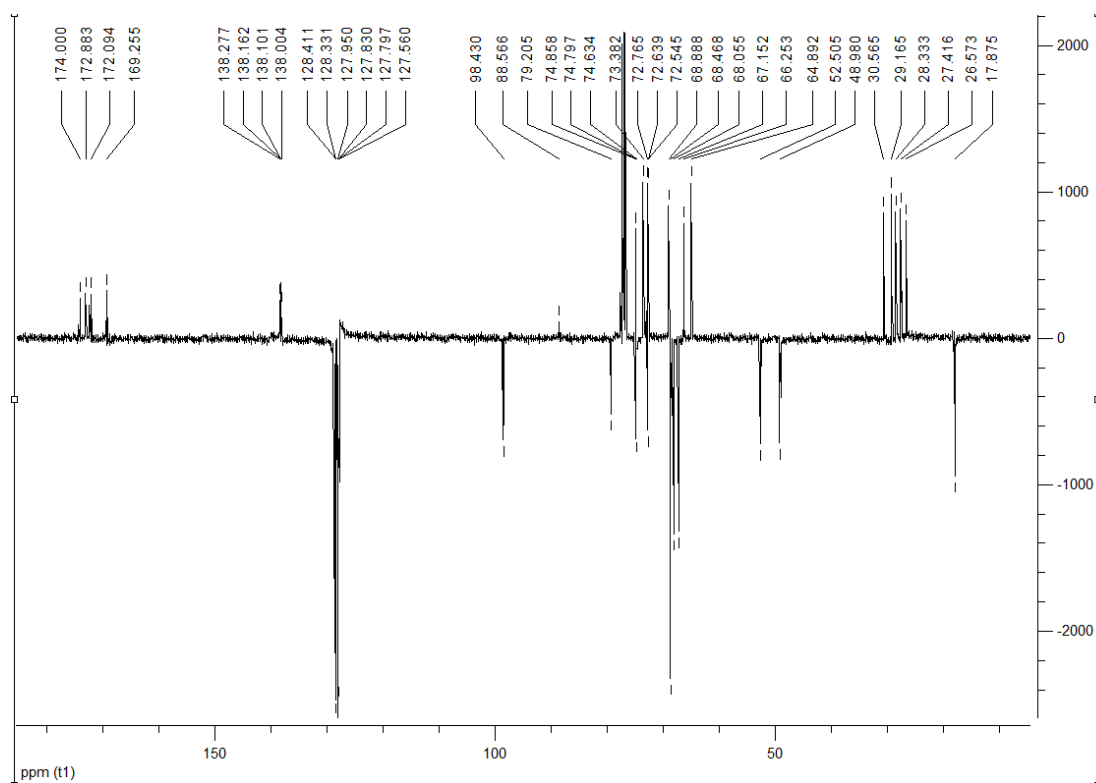
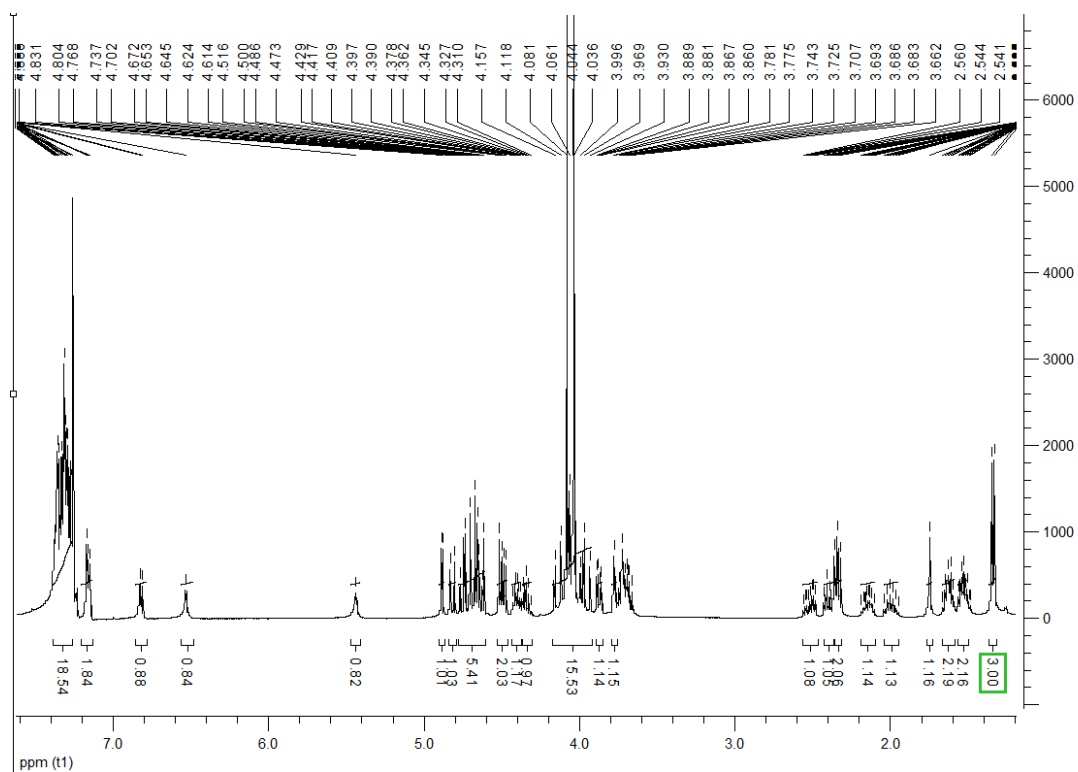
Dodatak 6: ^1H NMR i DEPTQ spoja 8

Dodatak 7: ¹H NMR i DEPTQ spoja 9

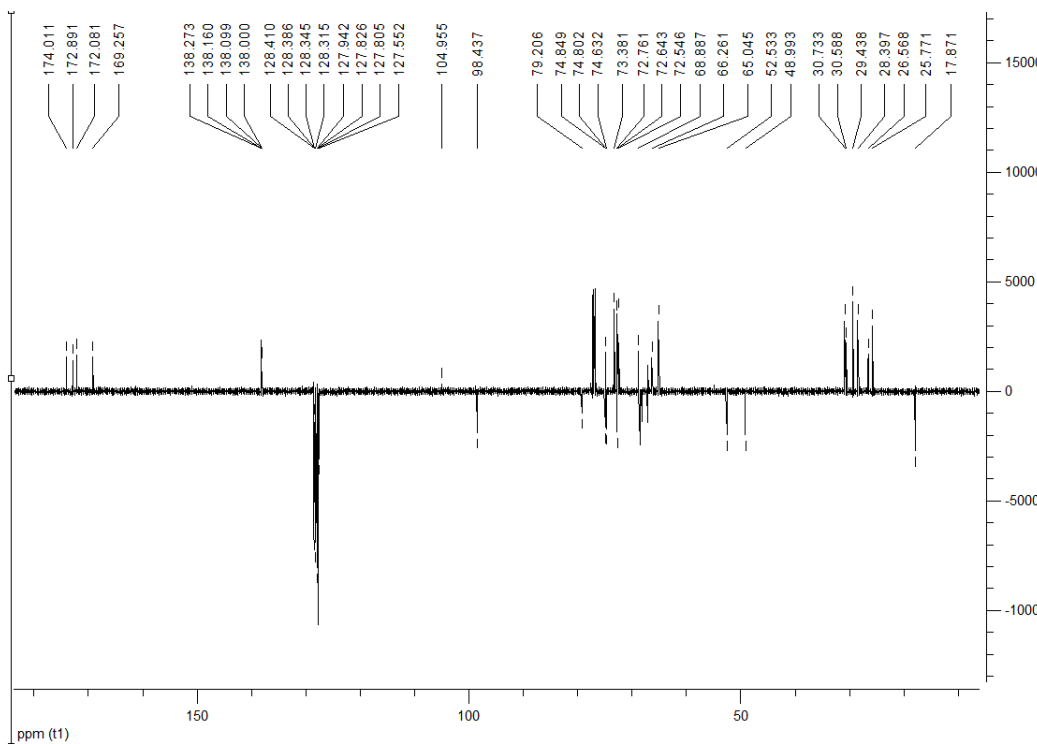
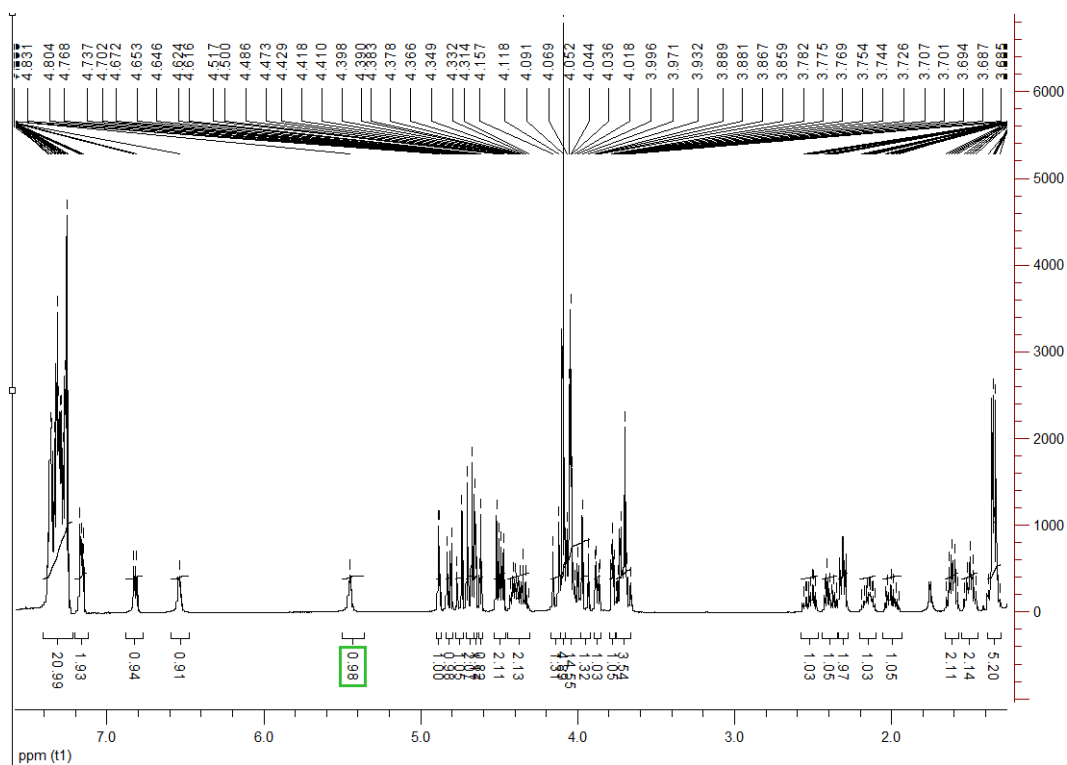


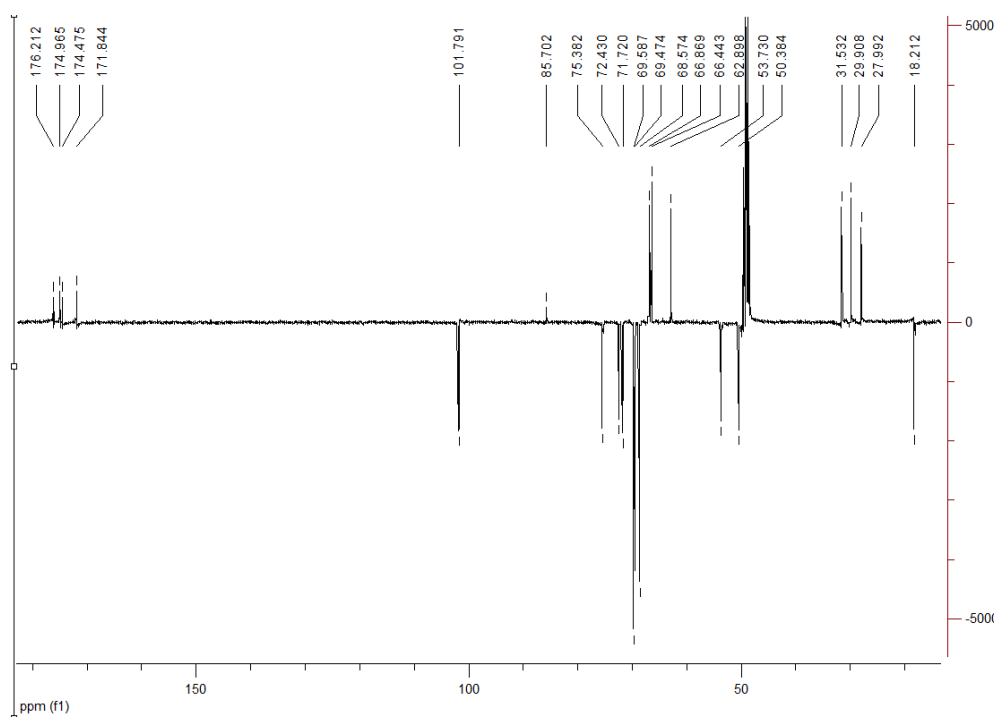
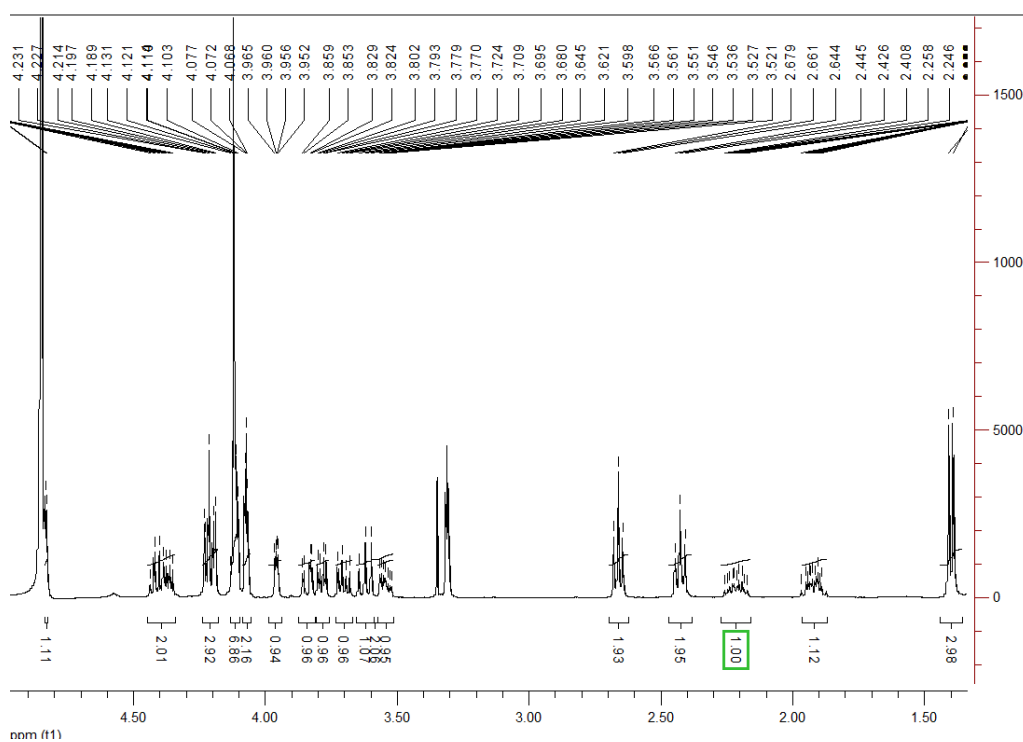
Dodatak 8: ^1H NMR i DEPTQ spoja 10

Dodatak 9: ¹H NMR i DEPTQ spoja 11

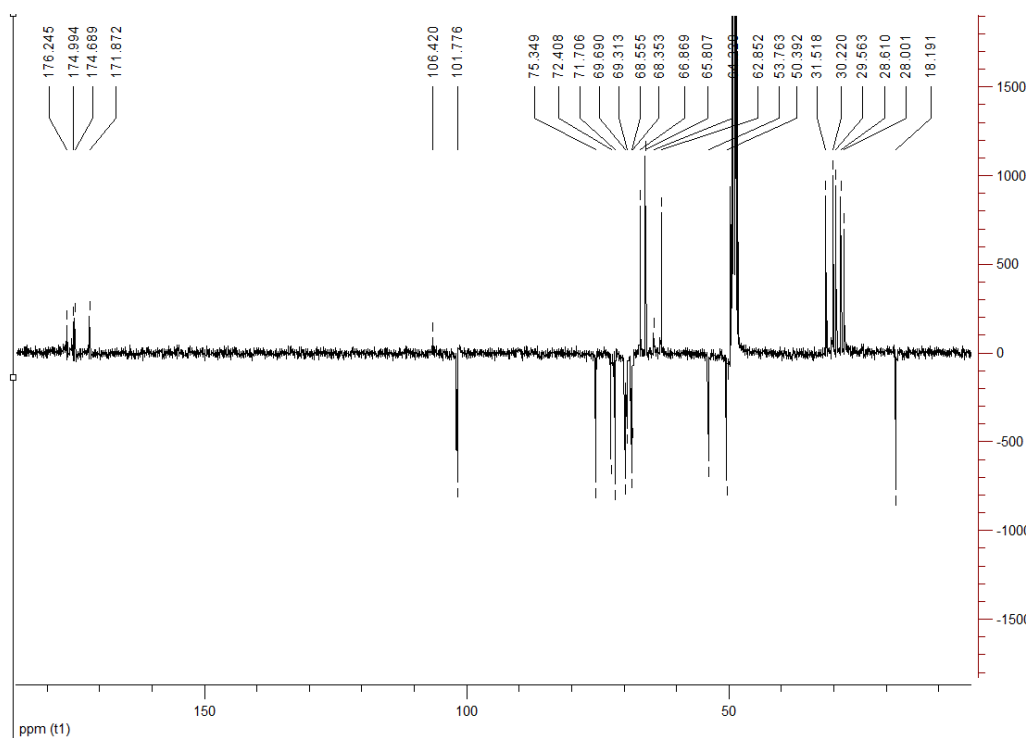
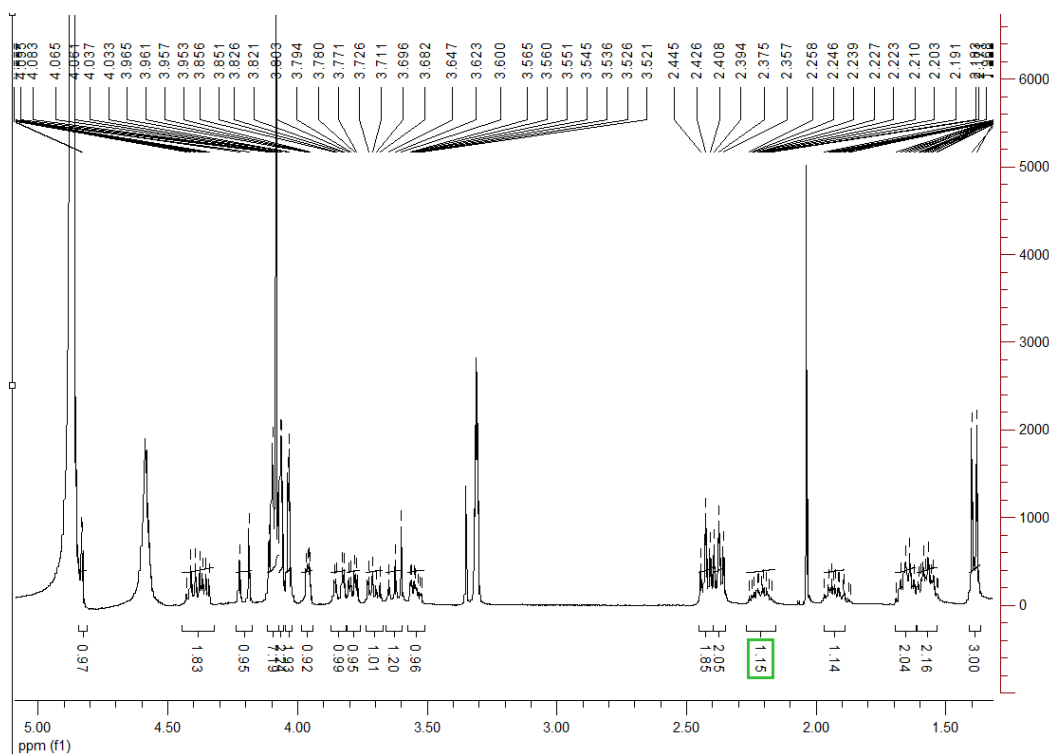


Dodatak 10: ¹H NMR i DEPTQ spoja 12

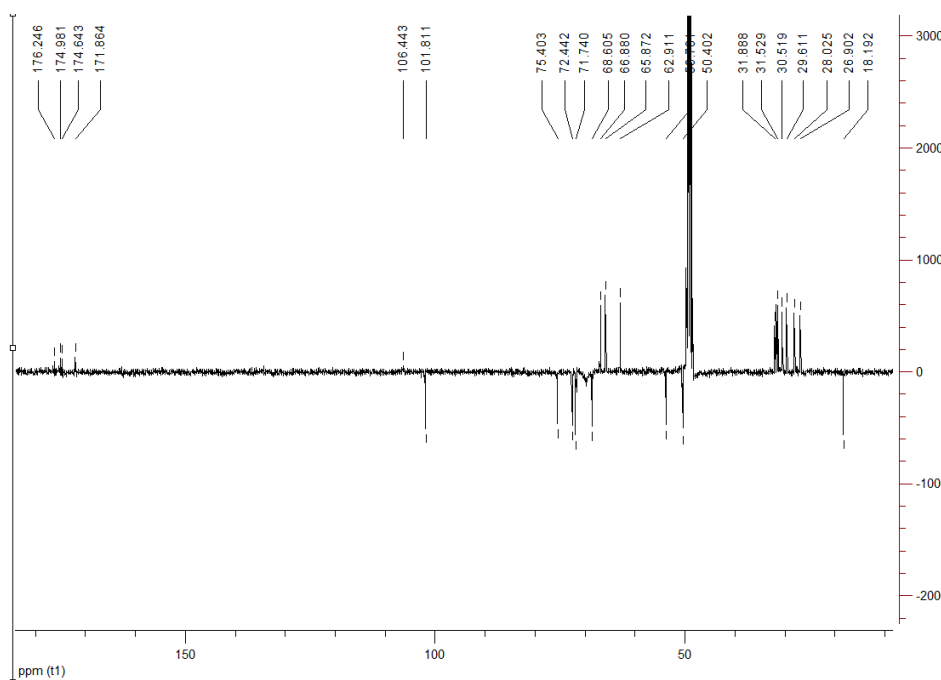
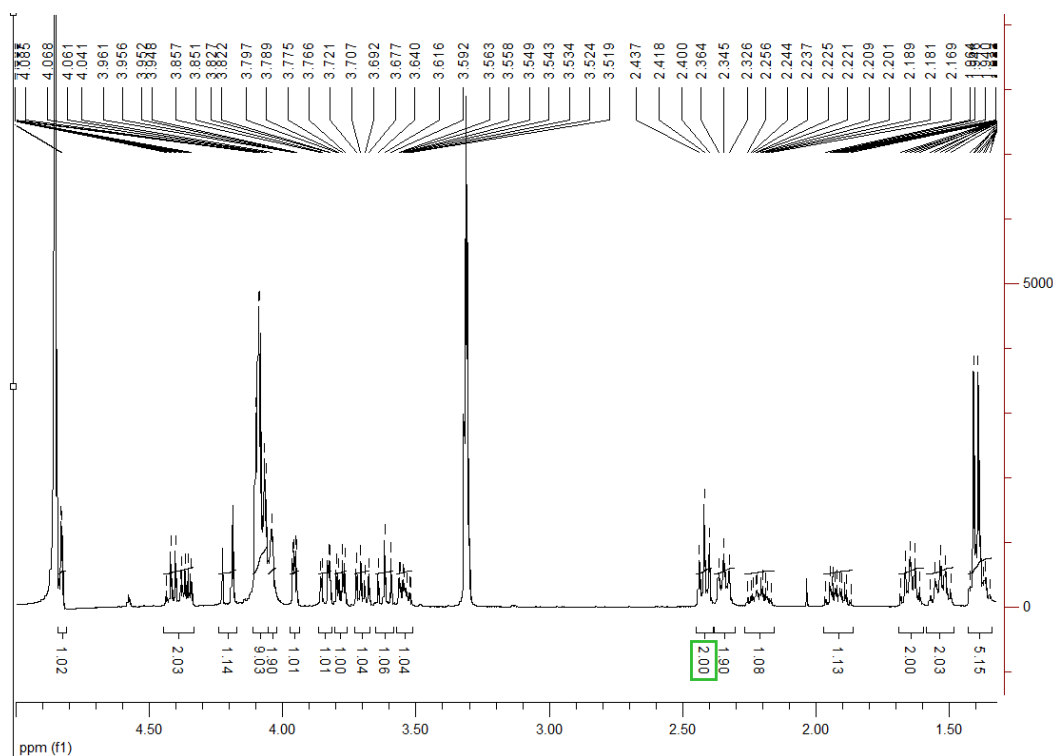


Dodatak 11: ^1H NMR i DEPTQ spoja 13

Dodatak 12: ¹H NMR i DEPTQ spoja 14



Dodatak 13: ¹H NMR i DEPTQ spoja 15



§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Dora Grgurić

Datum rođenja: 11. studeni 1998.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2005. – 2013. Osnovna škola Matije Gupca, Zagreb

2013. – 2017. XV. gimnazija, Zagreb

2017. – 2020. Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

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

Nagrade i priznanja

2016. – 2017. Državno natjecanje iz kemije, 2016. (13. mjesto), 2017. (6. mjesto)

2013. – 2014. Državno natjecanje iz kemije, 2013. (6. mjesto), 2014. (6. mjesto)

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2018. Otvoreni dani Kemijskog odsjeka

2017. Kemijsko-inženjerske radionice HDKI-ja, Križevci