

# Priprava novih potencijalnih NOD2 agonista s lipofilnim tripeptidnim motivom

---

Čižmešija, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:217:272712>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-29**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Karla Čižmešija

# **PRIPRAVA NOVIH POTENCIJALNIH NOD2 AGONISTA S LIPOFILNIM TRIPEPTIDNIM MOTIVOM**

## **Diplomski rad**

predložen Kemijском odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2024. godina.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Željke Car

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija (FER-AN-BIOMOL, HRZZ-IP-2020-02-9162, voditeljica Lidija Barišić, Prehrambeno-biotehnološki Fakultet, Zagreb)



## Zahvale

*Najprije se želim zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Željki Car na uloženom trudu, pažnji i strpljenju. Hvala Vam na svom prenesenom znanju koje planiram nositi sa sobom dalje kroz život te što ste mi pokazali što znači biti odlična znanstvenica.*

*Hvala prof. dr. sc. Žigi Jakopinu te njegovoj grupi s Farmaceutskog fakulteta, Sveučilišta u Ljubljani, Slovenija, na suradnji prilikom in vitro eksperimenata tj. ispitivanja NOD2 agonističkog učinka pripremljenih spojeva.*

*Hvala izv. prof. dr. sc. Vesni Petrović Peroković i asistentici Danijeli Beneš koje su mi uvijek pravile društvo. Za Vas mi nikada nije teško pripaziti TLC pločice.*

*Hvala tetama tehničarkama Andreji i Marini na svojoj pomoći u laboratoriju te svim zanimljivim razgovorima. Nadam se da će se Vaš smijeh još dugo čuti na Zavodu za organsku kemiju.*

*Hvala mom SGC-u, odnosno Nini, Sari, Kristini, Stipi, Igoru, Petru i Adrianu, što su mi uljepšali studentske dane. S vama je sve bilo lakše, a naših druženja ću se uvijek rado sjećati.*

*Hvala mojoj Mariji koja je uvijek bila tu za mene čak i na drugom kraju Europe. Najbolja prijateljica za cijeli život.*

*Hvala mom dečku Filipu koji mi je bio ogromna potpora te koji je sve teške i lijepo trenutke proživio sa mnom. Volim te najviše.*

*Hvala mojoj obitelji, a najveće hvala mojim roditeljima. Hvala Vam na svim zezanjima zbog ispita koje ste znali da ću položiti. Hvala Vam na razumijevanju i odricanjima. Hvala Vam na svojoj podršci i ljubavi. Volim Vas.*



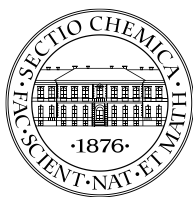
# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Adjuvanti i adjuvantska aktivnost.....</b>	<b>3</b>
2.1.1. <i>Cjepiva i imunoreakcija .....</i>	<i>3</i>
2.1.2. <i>Adjuvantska aktivnost muramil-dipeptida i njegovih derivata .....</i>	<i>5</i>
2.1.3. <i>Mehanizam imunostimulirajućeg djelovanja MDP derivata .....</i>	<i>7</i>
2.1.4. <i>Adjuvantska aktivnost desmuramil-peptida.....</i>	<i>9</i>
<b>2.2. Sinteza peptida .....</b>	<b>13</b>
2.2.1. <i>Peptidi i peptidna veza .....</i>	<i>13</i>
2.2.2. <i>Zaštitne skupine u sintezi peptida.....</i>	<i>17</i>
2.2.3. <i>Kondenzirajući reagensi u sintezi peptida.....</i>	<i>20</i>
<b>2.3. Feroceni i derivati ferocena .....</b>	<b>23</b>
2.3.1. <i>Otkriće ferocena i svojstva ferocena .....</i>	<i>23</i>
2.3.2. <i>Uobičajene reakcije pripreme derivata ferocena .....</i>	<i>24</i>
2.3.3. <i>Prikaz odabranih derivata ferocena.....</i>	<i>25</i>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Materijali i metode.....</b>	<b>30</b>
3.1.1. <i>Kemikalije i otapala .....</i>	<i>30</i>
3.1.2. <i>Metode .....</i>	<i>30</i>
<b>3.2. Priprava tripeptida .....</b>	<b>31</b>
3.2.1. <i>Sinteza (R)-dietil-2-aminopentandioat hidroklorida (1).....</i>	<i>31</i>
3.2.2. <i>Sinteza dietil-N-(tert-butoksikarbonil)-L-valil-D-glutamata (2).....</i>	<i>32</i>
3.2.2.a <i>Priprava spoja 2 iz hidroksisukcinimidnog estera Boc-L-valina .....</i>	<i>32</i>
3.2.2.b <i>Priprava spoja 2 EDC/HOBt metodom uz DIPEA-u i DMAP .....</i>	<i>33</i>
3.2.2.c <i>Priprava spoja 2 EDC/HOBt metodom uz TEA kao bazu .....</i>	<i>34</i>
3.2.3. <i>Uklanjanje Boc-zaštitne skupine sa spoja 2 .....</i>	<i>35</i>
3.2.4. <i>Sinteza Boc-zaštićenog tripeptida (4) EDC/HOBt metodom .....</i>	<i>36</i>
3.2.5. <i>Uklanjanje Boc-zaštitne skupine sa spoja 4 .....</i>	<i>37</i>
<b>3.3. Kondenzacija derivata ferocena i pripremljenog tripeptida 5.....</b>	<b>38</b>
3.3.1. <i>Sinteza tripeptidnog derivata ferocenkarboksilne kiseline (6).....</i>	<i>38</i>



3.3.2. Sinteza tripeptidnog derivata 1'-(tert-butoksikarbonilamino)ferocen-1-karboksilne kiseline (8)	40
3.3.2.a Priprava 1'-(tert-butoksikarbonilamino)ferocen-1-karboksilne kiseline (7)	40
3.3.2.b Priprava tripeptidnog derivata 1'-(tert-butoksikarbonilamino)ferocen-1-karboksilne kiseline	
3.3.3. Sinteza peptidnog derivata ferocenoctene kiseline (9)	42
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	<b>44</b>
<b>4.1. Uvod</b>	<b>44</b>
<b>4.2. Sinteza tripeptida</b>	<b>47</b>
4.2.1. Priprava 1,5-dietil-D-glutamat hidroklorida 1	47
4.2.2. Priprava Boc-zaštićenog dipeptida 2	48
4.2.3. Uklanjanje Boc-zaštitne skupine sa spoja 2	52
4.2.4. Priprava Boc-zaštićenog tripeptida 4	52
4.2.5. Uklanjanje Boc-zaštitne skupine sa spoja 4	53
<b>4.3. Priprava ciljnih molekula kondenzacijom derivata ferocena i pripremljenog tripeptida</b>	<b>53</b>
4.3.1. Priprava 1'-(tert-butoksikarbonilamino)ferocen-1-karboksilne kiseline 7	53
4.3.2. Priprava ciljnih tripeptidnih derivata 6, 8 i 9	54
<b>4.4. Ispitivanje NOD2 agonističkog učinka spojeva</b>	<b>55</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK</b>	<b>57</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI)</b>	<b>58</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI</b>	<b>60</b>
<b>§ 8. DODATAK</b>	<b>XV</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS</b>	<b>XXIV</b>





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

Diplomski rad

## SAŽETAK

### PRIPRAVA NOVIH POTENCIJALNIH NOD2 AGONISTA S LIPOFILNIM TRIPEPTIDNIM MOTIVOM

Karla Čižmešija

U sklopu ovog diplomskog rada razvijen je sintetski put pripreme tripeptidnih derivata ferocena, potencijalnih NOD2 agonista. Ciljni spojevi **6**, **8** i **9** sintetizirani su kondenzacijom prethodno pripremljenog tripeptidnog motiva **5** s kiselinskim derivatima ferocena (ferocenkarboksilnom kiselinom, spojem **7** i ferocenoctenom kiselinom). Amidna veza ostvarena je pomoću pouzdane EDC/HOBt metode. Spoj **7** dobiven je reakcijom saponifikacije iz odgovarajućeg esterskog prekursora. Sinteza spoja **5** provedena je u nekoliko koraka. Polazna D-glutaminska kiselina najprije je esterificirana u dietilni ester **1** te kondenzirana s L-valinom čime je dobiven Boc-zaštićeni dipeptid **2**. Ispitana su tri načina kondenzacije pri čemu se N-hidroksisukcinimidna metoda pokazala najučinkovitijom. Uklanjanjem Boc-zaštitne skupine uz trifluoroctenu kiselinu uspješno je pripremljen TFA-dipeptid **3**. Spoj **3** je kondenziran s Boc-zaštićenim glicinom EDC/HOBt metodom uz trietilamin te uspješno proveden u Boc-zaštićeni tripeptid **4**. Uklanjanjem Boc-zaštitne skupine uz TFA pripremljen je tripeptid **5**. Provedena je strukturna karakterizacija svih sintetiziranih spojeva (<sup>1</sup>H, DEPTQ NMR i spektrometrija masa ESI-MS). Ciljne molekule **6**, **8** i **9** pokazuju značajnu agonističku aktivnost na HEK-Blue NOD2 stanicama.

(86 stranica, 36 slika, 2 tablice, 52 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: adjuvant, desmuramil-peptid, ferocen, NOD2 agonist, tripeptid

Mentor: doc. dr. sc. Željka Car

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Željka Car
  2. prof. dr. sc. Mirta Rubčić
  3. doc. dr. sc. Ivan Nemet
- Zamjena: prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Datum diplomskog ispita: 22. listopada 2024.





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

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### PREPARATION OF NOVEL POTENTIAL NOD2 AGONISTS WITH LIPOPHILIC TRIPEPTIDE MOTIVE

Karla Čižmešija

In this Thesis, the synthetic route for the preparation of tripeptide derivatives of ferrocene, potential NOD2 agonists, was optimized. The target compounds **6**, **8** and **9** were synthesized by condensation of the previously prepared tripeptide motif **5** and the corresponding ferrocene acid derivatives (ferrocenecarboxylic acid, compound **7** and ferrocenacetic acid). The amide bond was formed using the reliable EDC/HOBt method. Compound **7** was prepared by saponification from corresponding ester precursor. Synthesis of compound **5** was conducted in several steps. Starting D-glutamic acid was converted into diethyl ester **1** first and coupled with L-valine resulting in Boc-protected dipeptide **2**. Three condensation methods were investigated with *N*-hydroxysuccinimide method being the most efficient one. Boc-protecting group was removed with trifluoroacetic acid and TFA dipeptide **3** was successfully prepared. Compound **3** was converted into Boc-protected tripeptide **4** by condensation with Boc-protected glycine using the EDC/HOBt method and triethylamine. Removal of Boc protection yielded tripeptide **5**. Structural characterization of all compounds was performed by <sup>1</sup>H and DEPTQ NMR spectroscopy as well as mass spectrometry (ESI-MS). Target molecules **6**, **8** and **9** show high NOD2 agonistic activity on HEK-Blue NOD2 cells.

(86 pages, 36 figures, 2 tables, 52 references, original in Croatian)

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

Keywords: adjuvant, desmuramyl peptide, ferrocene, NOD2 agonist, tripeptide

Mentor: Dr. Željka Car, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Željka Car, Assistant Professor

2. Dr. Mirta Rubčić, Professor

3. Dr. Ivan Nemet, Assistant Professor

Substitute: Dr. Vesna Petrović Peroković, Professor

Date of exam: October 22<sup>nd</sup>, 2024.





## § 1. UVOD

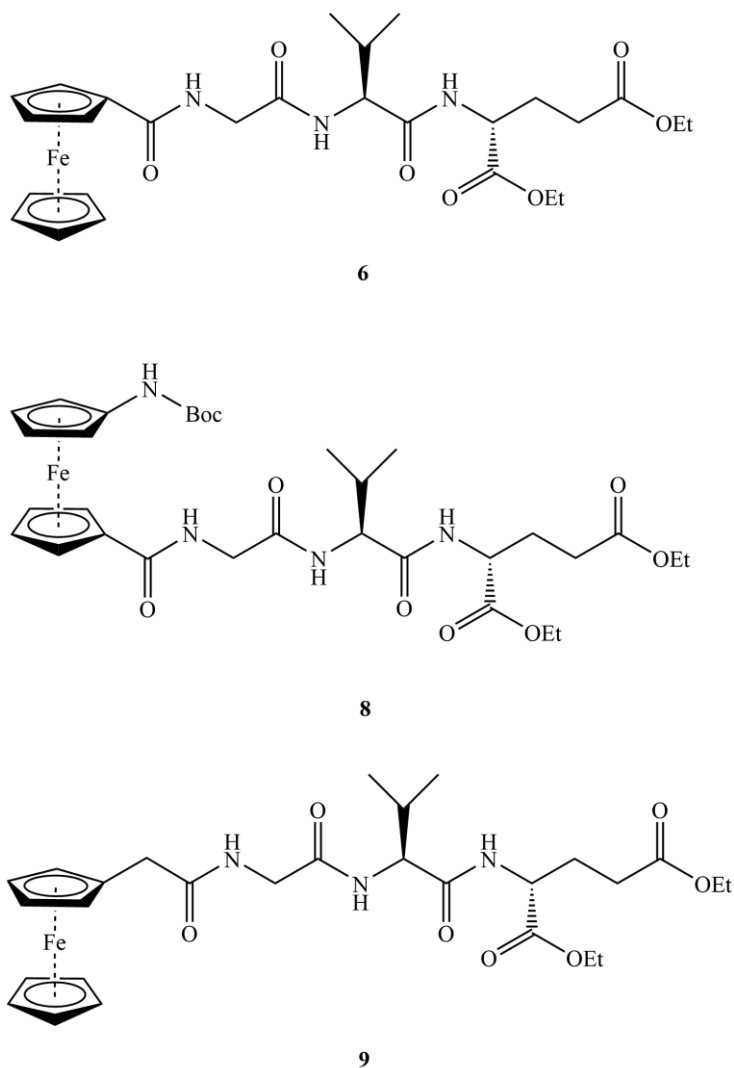
Cjepivo je biološki preparat koji se koristi za sigurno poticanje imunološkog odgovora. Osigurava zaštitu protiv infekcije ili bolesti pri naknadnom izlaganju patogenu. Da bi bilo učinkovito cjepivo mora sadržavati antigene koji su izvedeni iz patogena ili proizvedeni sintetički na način da predstavljaju komponente uzročnika bolesti.<sup>1</sup> Cjepiva ponekad uzrokuju slab odgovor imunološkog sustava te se cjepivima koja nisu dovoljno imunogenična dodaju adjuvanti. Adjuvanti ili imunostimulatori su tvari koje ubrzavaju, produljuju ili pojačavaju specifičnu imunoreakciju na određeni antigen te tako omogućuju bolju obranu organizma protiv patogena.<sup>2,3</sup> Prvi pisani trag o adjuvantima datira iz 1926. godine kada su Alexander Glenny i suradnici ustanovili da miješanjem aluminijevih soli s antigenima, a zatim ubrizgavanjem pripremljene smjese u zamorce dolazi do stvaranja više protutijela, nego kada se u zamorce ubrizga samo smjesa antigena.<sup>4</sup>

Adjuvantsku aktivnost pokazuje mnoštvo različitih spojeva, a značajnima su se pokazali i peptidni adjuvanti poput derivata muramil-dipeptida i desmuramil-peptida. Muramil-dipeptid, *N*-acetil-muramil-L-alanil-D-izoglutamin, najmanja je strukturna jedinica peptidoglikana koja pokazuje adjuvantsku aktivnost. Kako bi se poboljšala imunostimulacijska aktivnost muramil-dipeptida te umanjile nuspojave koje izaziva (pirogenost, artritogenost i toksičnost), zbog kojih se ne može upotrebljavati u kliničke svrhe, sintetizirani su brojni derivati i analozi muramil-dipeptida.<sup>3,5</sup> U nedavnom su istraživanju tripeptidni derivati sastavljeni od D-glutaminske kiseline, L-valina i glicina s lipofilnim aromatskim i cikloalkilnim supstituentima vezanim na N-kraj glicina pokazali izniman NOD2 agonistički učinak.

Cilj ovog diplomskog rada je optimizacija sinteze tripeptidnih derivata ferocena (slika 1) te karakterizacija pripremljenih ciljnih molekula. U konačnici, cilj je odrediti agonistički NOD2 te imunostimulirajući učinak pripremljenih molekula u okviru šire studije odnosa strukture i aktivnosti (SAR, engl. *structure-activity relationship study*). Želja je ispitati utjecaj ferocenskog i tripeptidnog dijela spojeva na biološku aktivnost. Ciljne molekule pripremit će se kondenzacijom pripremljenog tripeptidnog motiva i odgovarajućeg derivata ferocena. Tripeptidni motiv pripremit će se iz komercijalno dostupne D-glutaminske kiseline čije će se  $\alpha$ - i  $\gamma$ -karboksilne skupine najprije esterificirati. Zatim će uslijediti kondenzacija s L-valinom



čime nastaje odgovarajući dipeptid, a nakon toga i s glicinom što će dati željeni tripeptid. Amidne veze ostvarit će se uobičajenim kondenzacijskim postupcima u peptidnoj kemiji. Provest će se detaljna strukturna karakterizacija svih pripremljenih prekursora i konačnog spoja ( $^1\text{H}$  NMR, DEPTQ NMR i spektrometrija masa ESI-MS).



Slika 1. Strukturne formule ciljnih molekula **6**, **8** i **9**

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Adjuvanti i adjuvantska aktivnost

#### 2.1.1. Cjepiva i imunoreakcija

Imunološki sustav izgrađuju organi i stanice čija je uloga obrana organizma od patogena.<sup>6</sup> Da bi se uspješno borio protiv infekcija, imunološki sustav mora identificirati uzročnike bolesti, tj. patogene. Patogeni na svojoj površini sadrže molekule koje se nazivaju antigeni te na temelju antigena stanice imunološkog sustava prepoznaju različite patogene i razlikuju patogene od vlastitih stanica i tkiva.<sup>7,8</sup> Invazivni patogen najprije treba prodrijeti kroz fizičku barijeru, poput kože ili sluznice epitela, a treba se oduprijeti i napadu već postojećih antimikrobnih proteina kao što su lizozim i fosfolipaza A. Ukoliko patogen uspješno preživi i prijeđe epitelnu barijeru, počinje se replicirati što prepoznaju stanice urođenog (nespecifičnog) imunološkog sustava i uništavaju patogen. U mnogim slučajevima aktivacija urođenog imunološkog sustava dovoljna je za suzbijanje infekcije, no ako je potrebno aktiviraju se stanice stečenog (specifičnog) imunološkog sustava.<sup>7</sup> Odgovor stečenog imunološkog sustava je sporiji od urođenog imunološkog sustava, ali stečeni imunološki sustav može specifično prepoznati i reagirati na određeni antigen.<sup>7,8</sup> Kod stečene imunosti najvažnije su stanice T- i B-limfociti. Dio T-limfocita ubija patogene i zaražene stanice, a ostatak pomaže u kontroli odgovora stečenog imunološkog sustava. Glavna uloga B-limfocita je stvaranje antitijela za specifične antigene. Antitijela, odnosno imunoglobulini, su proteini koji se vežu za patogene te na taj način signaliziraju imunološkim stanicama da ga unište.<sup>8</sup>

Cijepljenje je zasigurno jedno od najvažnijih zdravstvenih dostignuća u povijesti čovječanstva. U nešto više od dva stoljeća cjepiva su omogućila potpuno iskorjenjivanje malih boginja, nestanak poliomijelitisa (dječje paralize) u većem dijelu svijeta i snažan pad smrtnosti i morbiditeta mnogih zaraznih bolesti u mnoštvo zemalja.<sup>9</sup> Cjepivo je biološki preparat koji se koristi za sigurno poticanje imunološkog odgovora te osigurava zaštitu protiv infekcije ili bolesti pri naknadnom izlaganju patogenu. Da bi se to postiglo cjepivo mora sadržavati antigene koji su izvedeni iz patogena ili proizvedeni sintetički na način da predstavljaju komponente uzročnika bolesti. Cjepiva se dijele na živa i neživa cjepiva. Živa

cjepiva se sastoje od živih, ali oslabljenih (atenuiranih) uzročnika bolesti, dok se neživa cjepiva sastoje od mrtvih mikroorganizama ili njihovih dijelova (pročišćeni proteini iz mikroorganizama, rekombinantni proteini, polisaharidi i sl.).<sup>1</sup>

Cjepiva ponekad uzrokuju slab odgovor imunološkog sustava, ponajviše zbog nemogućnosti antigena da induciraju sazrijevanje dendritičkih stanica, odnosno primarnih antigen-prezentirajućih stanica (APC, engl. *antigen-presenting cell*) koje reagiraju na antigen i time aktiviraju imunološki odgovor. Zbog toga se cjepivima koja nisu dovoljno imunogenična dodaju adjuvanti. Adjuvanti ili imunostimulatori su tvari koje ubrzavaju, produljuju ili pojačavaju specifičnu imunoreakciju na određeni antigen te tako omogućuju bolju obranu organizma protiv patogena.<sup>2,3</sup> Adjuvanti imaju i druge prednosti kao što je smanjenje količine antigena po dozi cjepiva i smanjenje broja cijepljenja, a u određenim slučajevima povećavaju stabilnost antigenske komponente produžujući njezin poluživot i sl.<sup>9</sup> Prvi pisani trag o adjuvantima datira iz 1926. godine kada su Alexander Glenny i suradnici ustanovili da miješanjem aluminijskih soli s antigenima, a zatim ubrizgavanjem pripremljene smjese u zamorce dolazi do stvaranja više protutijela, nego kada se u zamorce ubrizga samo smjesa antigena.<sup>4</sup> Adjuvanti mogu varirati od malih sintetskih molekula do složenih prirodnih ekstrakata i čestičnih materijala. Klasificiraju se u nekoliko kategorija, a to su: mineralni spojevi, tvari bakterijskog podrijetla, uljne emulzije, imunostimulirajući kompleksi (ISCOM) i liposomi.<sup>10,11</sup>

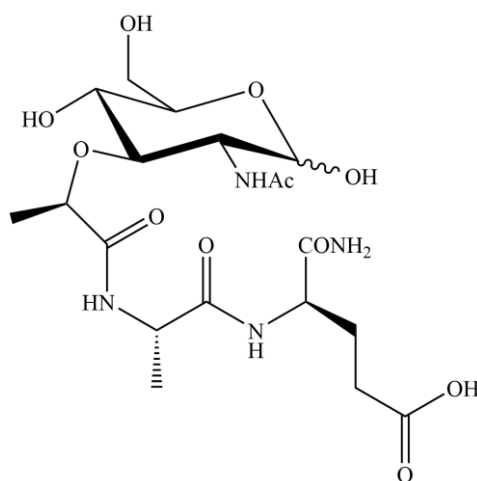
Adjuvant koji se već vrlo dugo koristi u ljudskim cjepivima je aluminijska sol (kalijev aluminijski sulfat, aluminijski hidroksid, aluminijski fosfat i sl.). Proteini iz patogena se adsorbiraju na aluminijsku sol čime nastaje suspenzija koja se zatim ubrizgava intramuskularno. Unatoč svojoj dugotrajnoj i raširenoj uporabi u ljudskim cjepivima, još uvijek nije jasno kako točno ovaj adjuvant djeluje. Trenutačno postoji vrlo malo licenciranih adjuvanata za kliničku upotrebu.<sup>12</sup> Agencija za hranu i lijekove (FDA, engl. *Food and Drug Administration*) Sjedinjenih Američkih Država, osim aluminijskih soli, odobrila je uljne emulzije MF59 i AS03, zatim AS04, tj. 3-*O*-deacilirani monofosforil-lipid A (MPL, engl. *monophosphoryl lipid A*) koji se koristi u cjepivu protiv humanog papiloma virusa u kombinaciji s aluminijskim hidroksidom te CpG ODN i AS01 (MPL i saponin QS-21 formuliran u liposomima).<sup>2,12</sup> Pandemija COVID-19 ponovno je pokrenula potrebu za ulaganjem u strateški dizajn cjepiva što je dovelo do licenciranja lipidnih nanočestica (LNP, engl. *lipid nanoparticles*). Lipidne nanočestice su sustavi za isporuku koji mogu djelovati kao

adjuvantni.<sup>13</sup> Također, najnovije licencirano COVID-19 cjepivo sadrži novi adjuvant pod nazivom Matrix-M izveden iz saponina koji se nalaze u kori stabla *Quillaja saponaria*. Pri odabiru adjuvanta za cjepivo treba uzeti u obzir mnoge aspekte, među kojima je sigurnost nedvojbeno na prvom mjestu. Dobar adjuvant mora biti siguran za organizam, dobro podnošljiv i jednostavan za proizvodnju. Mora imati dobra farmaceutska svojstva (pH, osmolalnost, razina endotoksina, itd.) i prihvatljiv rok trajanja te mora biti ekonomski isplativ.<sup>9</sup>

### 2.1.2. Adjuvantska aktivnost muramil-dipeptida i njegovih derivata

Adjuvantsku aktivnost pokazuje mnoštvo različitih spojeva, a značajnima su se pokazali i peptidni adjuvanti poput derivata muramil-dipeptida (MDP, engl. *muramyl dipeptide*) i desmuramil-peptida (DMP, engl. *desmuramyl peptide*).

Muramil-dipeptid, *N*-acetil-muramil-L-alanil-D-izoglutamin, najmanja je strukturna jedinica peptidoglikana koja pokazuje adjuvantsku aktivnost (slika 2). Peptidoglikani grade stanične stijenke Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija te su nužni za očuvanje cjelovitosti i oblika stanice. Također, važni su jer čine skelet za učvršćivanje drugih komponenata kao što su lipoproteini. Peptidoglikani su prirodni polimeri građeni od molekula *N*-acetylglukozamina (GlcNAc) i *N*-acilmuraminske kiseline (MurNAc) koje su povezane  $\beta(1\rightarrow4)$  glikozidnim vezama, a umrežene preko kratkih peptida vezanih na MurNAc.<sup>3,5</sup> Navedeni kratki peptidni lanac sastoji se od četiri do pet aminokiselina, od kojih su prve dvije L-Ala i D-Glu, a na trećem mjestu nalazi se L-Lys ili *meso*-diaminopimelinska kiselina (DAMP).<sup>5</sup>



Slika 2. Strukturna formula muramil-dipeptida (*N*-acilmuramil-L-alanil-D-izoglutamina)

Kako bi se poboljšala imunostimulacijska aktivnost MDP-a te umanjile nuspojave koje izaziva (pirogenost, artritogenost i toksičnost), zbog kojih se ne može upotrebljavati u kliničke svrhe, sintetizirani su njegovi brojni derivati i analozi.<sup>3</sup>

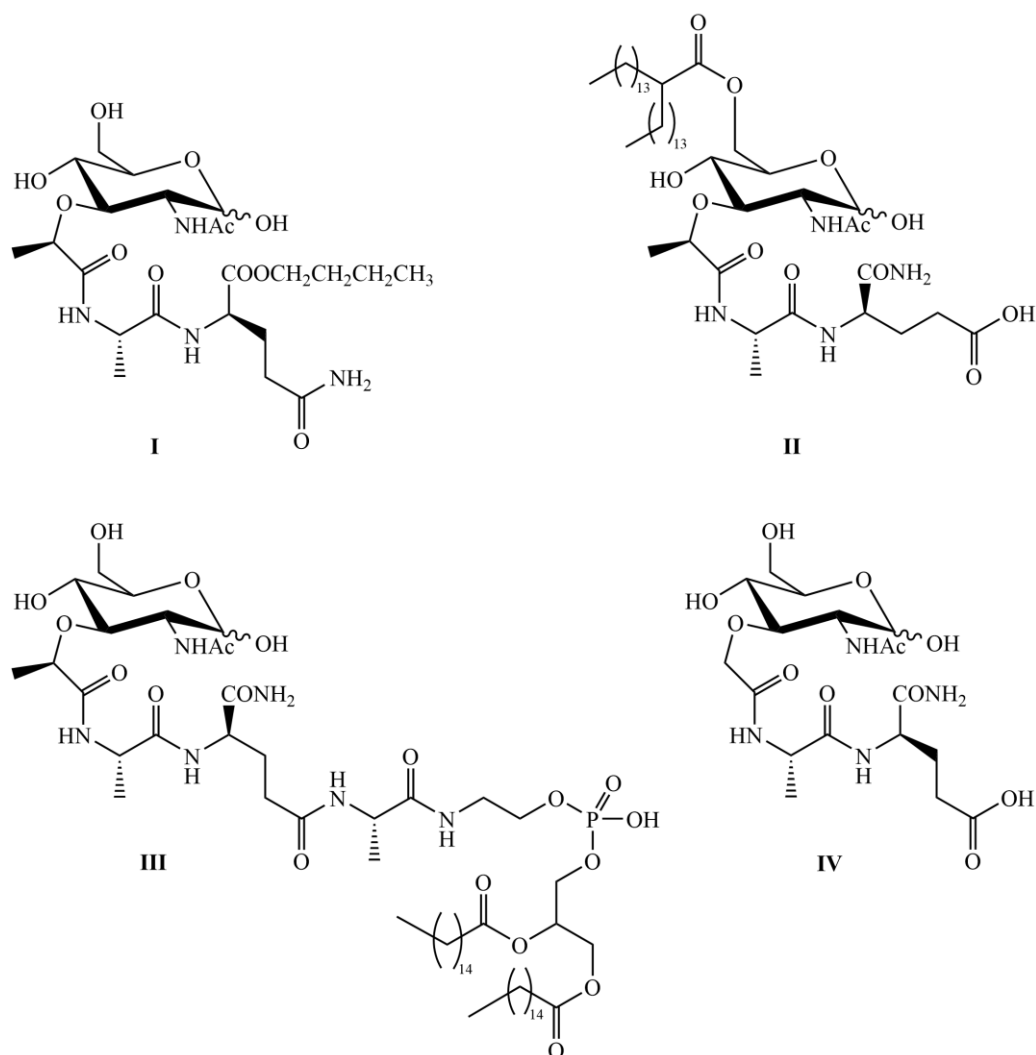
Jedan od derivata je murabutid (**I**, slika 3) koji ne izaziva nuspojave i primjenjiv je kod ljudi.<sup>3</sup> Makrofagi stimulirani murabutidom pokazali su povećanu ekspresiju gena koji kodiraju različite proteine kao što su imunološki medijatori i njihovi receptori, transkripcijski faktori i kinaze, transporter i proteini uključeni u metaboličku aktivnost stanica. Također, murabutid poboljšava otpornost domaćina na mikrobnе infekcije, nespecifičnu otpornost na tumore te inducira stvaranje citokina i kemokina koji su uključeni u jačanje imunološkog odgovora i hematopoeze.<sup>14</sup>

Kada se B3O-MDP, odnosno 6-*O*-(2-tetradecilheksadekanoil)-*N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin (**II**, slika 3) doda kao adjuvant u cjepivo protiv gripe koje sadrži hemaglutinin i neuraminidazu virusa influence dolazi do 16 puta jačeg stvaranja antitijela u odnosu na isto cjepivo bez B3O-MDP. Ugrađivanje navedenog adjuvanta u čestice kolesterola te priprava virosoma, točnije liposoma, produžuje proizvodnju antitijela do 6 mjeseci.<sup>14</sup>

Mifamurtid (**III**, slika 3) je registriran u 27 zemalja Europske unije kao pomoćno sredstvo koje se koristi u kombinaciji s tradicionalnom kemoterapijom za liječenje osteosarkoma.<sup>2</sup> Osteosarkom je tumor kostiju koji se najčešće javlja kod djece i mladih te ima smrtni ishod u 30% slučajeva. Primjena mifamurtida prilikom liječenja eliminira nastanak metastaza u plućima i pojačava odgovor na kemoterapiju. Mifamurtid je uključen i kao adjuvant u cjepivo protiv hepatitisa B što je rezultiralo povećanjem imunogenosti 4 do 5 puta.<sup>14</sup>

Muramil-peptid norMDP (*N*-acetyl-nor-muramil-L-alanil-D-izoglutamin, **IV**, slika 3) trenutno je u prvoj fazi kliničkih ispitivanja kao adjuvant u cjepivu HER-2 protiv raka želuca, dojke i jajnika.<sup>14,15</sup>

Uviđamo da derivati MDP-a nisu ograničeni samo na profilaktična cjepiva, nego mogu i pojačati antitumorsku aktivnost imunoloških stanica te tako pokazuju potencijal u imunoterapiji i liječenju raka.<sup>16</sup>



Slika 3. Strukturne formule derivata MDP-a: murabutid (I), B3O-MDP (II), mifamurtid (III) i norMDP (IV)

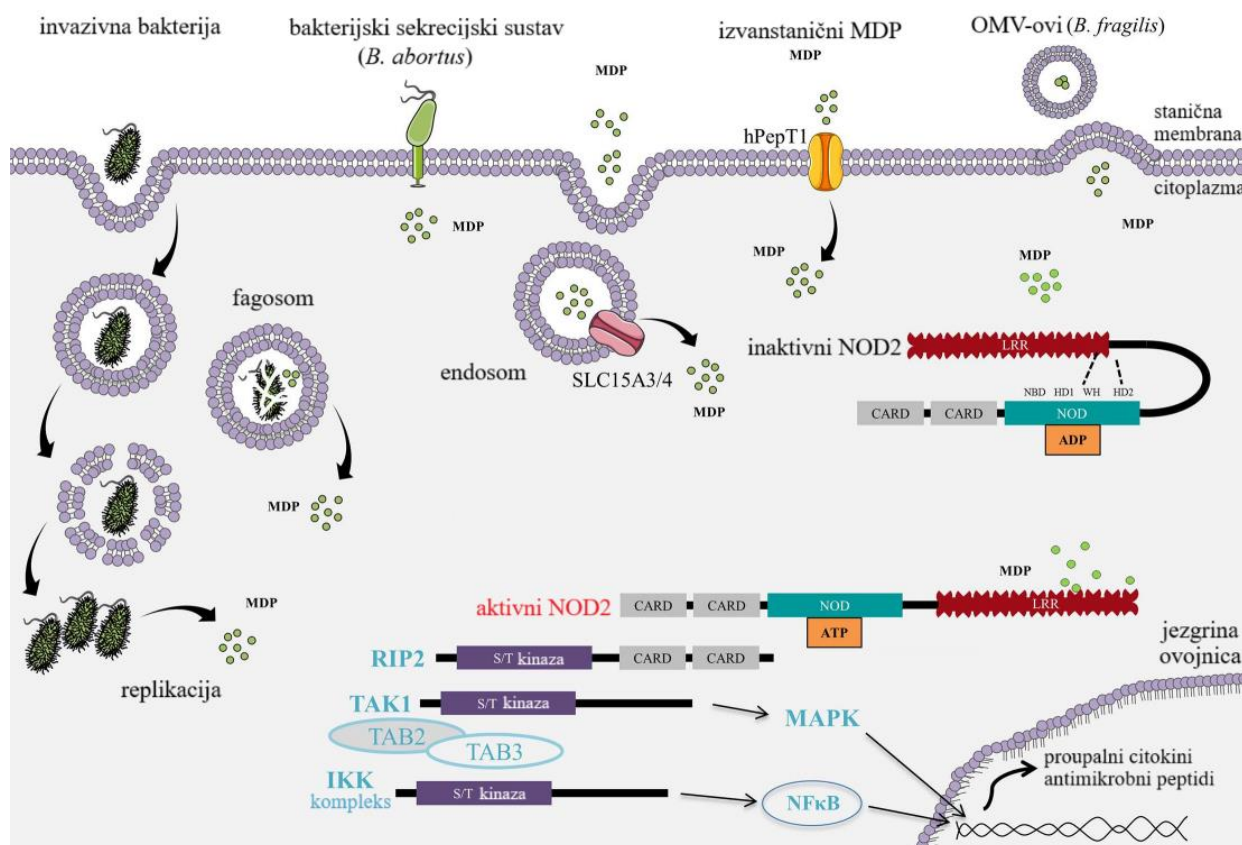
### 2.1.3. Mehanizam imunostimulirajućeg djelovanja MDP derivata

Kod kralježnjaka se obrana od patogena postiže koordiniranim odgovorom urođenog i stečenog imunološkog sustava. Urođeni imunološki sustav je zaslužan za prvu liniju obrane kroz djelovanje receptora za prepoznavanje patogena (PRR, engl. *pathogen recognition receptors*).<sup>17</sup> PRR se klasificiraju na: receptore nalik Toll-u (TLR, engl. *Toll-like receptors*), receptore nalik RIG-I (RLR, engl. *RIG-I-like receptors*), receptore nalik NOD-u (NLR, engl. *NOD-like receptors*) i C-tip lektinskih receptora (CLR, engl. *C-type lectin receptors*).<sup>2,18</sup>

MDP i njegove derivate prepoznaje NOD2 receptor (engl. *nucleotide-binding oligomerization-domain-containing protein 2*). NOD2 receptor se sastoji od tri proteinske

domene (slika 4): 1) N-terminalne efektorske domene koja sadrži dvije aktivacijske domene za kaspazu (CARDs, engl. *caspase activation and recruitment domains*), 2) nukleotid-vezujuće oligomerizacijske domene (NOD, engl. *nucleotide-binding oligomerization domain*) koja ima mjesto za vezanje ATP-a i potrebna je za procese oligomerizacije i 3) domene bogate leucinskim ponavljajućim slijedovima (LRR, engl. *leucine-rich repeat*) koja sudjeluje u prepoznavanju liganada.<sup>2,18</sup> Još uvijek nisu poznati detalji vezanja MDP-a na NOD2 receptor, no Maekawa i suradnici su odredili kristalnu strukturu ADP-a vezanog na NOD2 te su potvrdili da se LRR domena NOD2 sastoji od deset LRR-ova i da se predloženo mjesto vezanja MDP-a nalazi na konkavnoj površini LRR domene.<sup>2,19</sup>

Mehanizmi kojima MDP ulazi u stanicu nisu u potpunosti razjašnjeni, no predloženo je nekoliko različitih mogućih načina ulaska (slika 4). MDP može ući u stanicu fagocitozom cijelih bakterija, endocitozom, pomoću vanjske membranske vezikule (OMV, engl. *outer membrane vesicle*) ili pomoću transmembranskih kanala kao što je hPepT1. Kako bi došlo do aktivacije NOD2 receptora on se mora nalaziti u blizini mjesta isporuke MDP-a, odnosno blizu plazma membrane ili endosoma gdje se onda pomoću dva peptidna prijenosnika, SLC15A3 i SLC15A4, MDP može transportirati prema citosolnom odjeljku i NOD2 receptoru.<sup>21</sup> NOD domena NOD2 receptora dijeli se na četiri manje domene: nukleotid-vezujuću domenu (NBD, engl. *nucleotide-binding domain*), krilate zavojnice (WH, engl. *winged helix*) i dvije helikalne domene, HD1 i HD2 (engl. *helix domain*).<sup>20,21</sup> Interakciju između NBD i WH, koja je važna za stabilizaciju inaktivnog oblika NOD2, održava adenzin-difosfat vezan na NOD domenu. Kada se MDP ili derivat MDP-a veže na LRR domenu HD2 posreduje u konformacijskim promjenama NBD-a, WH-a i HD1 kako bi se omogućila izmjena ADP-a s ATP-om, samooligomerizacija i nizvodna signalizacija.<sup>21</sup> Aktivirani NOD2 se veže za RIP2 kinazu (engl. *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2*) CARD-CARD interakcijama. Kinaza RIP2 djeluje kao transkripcijski aktivator NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) proteinskog kompleksa.<sup>15,20</sup> Ne dolazi samo do aktivacije NF- $\kappa$ B kompleksa preko IKK kompleksa (I $\kappa$ B kinaze), nego se aktiviraju i druge kaskade koje uključuju MAP kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase*). NF- $\kappa$ B i MAP kinaze aktiviraju proizvodnju proupalnih citokina i kemokina te sudjeluju u regulaciji imunološkog odgovora na infekciju.<sup>15</sup>



Slika 4. Mehanizmi kojima MDP ulazi u stanicu i aktivira NOD2 protein. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>21</sup>

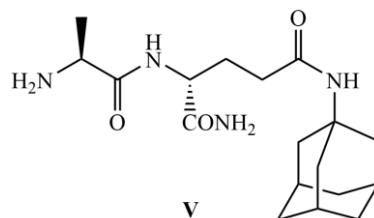
#### 2.1.4. Adjuvantska aktivnost desmuramil-peptida

Studije odnosa strukture i aktivnosti (SAR, engl. *structure-activity relationship*) su pokazale da *N*-acetil-D-glukozamin (GlcNAc) u strukturi MDP-a nije ključan za njegov imunostimulativni učinak. Imunološki aktivni MDP analozi bez *N*-acetilmuraminske kiseline se nazivaju desmuramil-peptidi (DMP).<sup>3,18</sup> Također, dokazano je da molekule DMP-a u stanicu ulaze pasivnom apsorpcijom što izravno ovisi o njihovoj lipofilnosti. Zbog toga se u strukturu DMP-a uvode lipofilne podjedinice čime se omogućuje bolja ugradnja u lipofilni dvosloj membrane, a time i bolja adjuvantska aktivnost.<sup>22,23</sup>

Jedan od načina povećanja lipofilnosti DMP-a jest uvođenje ugljikovodičnog lanca ili adamantilne podjedinice.<sup>22</sup> Različiti adamantil-DMP derivati dobiveni su vezanjem lipofilne adamantanske podjedinice na *L*-Ala-*D*-*iso*Gln dio iz MDP-a. Primjerice, adamantilamid-dipeptid (V, AdDP, slika 5) dobiven je vezanjem 1-aminoadamantana, poznatog antivirusnog sredstva, na karboksilnu skupinu izoglutamina.<sup>3,22</sup> AdDP se pokazao vrlo učinkovitim adjuvantom u eksperimentima *in vivo* u miševima i kunićima. Ugrađivanjem adamantilamid-

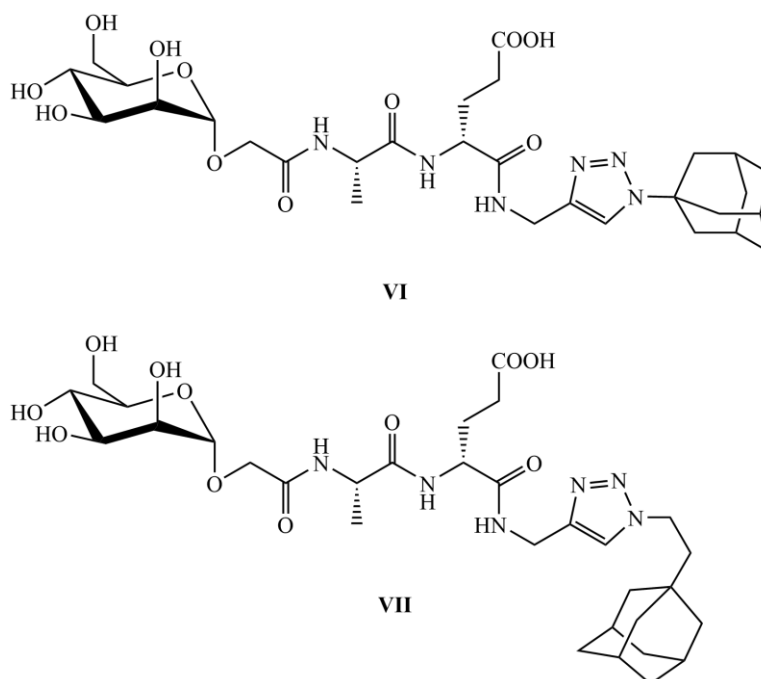


dipeptida u liposome dolazi do stimulacije nespecifičnog imunološkog sustava u mišjem modelu.<sup>3</sup>



Slika 5. Strukturna formula adamantilamid-dipeptida (AdDP)

Pokazalo se da uvođenje lipofilne adamantanske strukture preko triazolnog prstena u strukturu DMP-a može pozitivno utjecati na njegovu adjuvantsku aktivnost. Također, vezanje manoze na DMP može pridonijeti prepoznavanju DMP-a od strane manoznih receptora eksprimiranih na imunološkim stanicama čime takvi spojevi lakše dolaze do unutarstaničnih receptora kao što je NOD2 receptor.<sup>18,24</sup> Zbog navedenih razloga, sintetizirani su DMP derivati koji sadrže manoznu podjedinicu te adamantansku strukturu vezanu preko triazolnog prstena (spojevi **VI** i **VII**, slika 6). Spoj **VI** je stabilan, apirogen i topiv u vodi što ga čini potencijalno primjenjivim kao adjuvantom za cjepiva. Nema jasnih dokaza o tome koje PRR-ove ovaj spoj aktivira, no ne može se isključiti njegova mogućnost utjecaja na imunološki odgovor.<sup>24</sup> Spoj **VII** pokazao je adjuvantsku aktivnost koja je usporediva s adjuvantskom aktivnosti MDP-a te se do sada pokazao najboljim adjuvantom u ovoj seriji spojeva. Adjuvantska aktivnost ovog spoja određena je *in vivo* u mišjem modelu.<sup>18</sup>



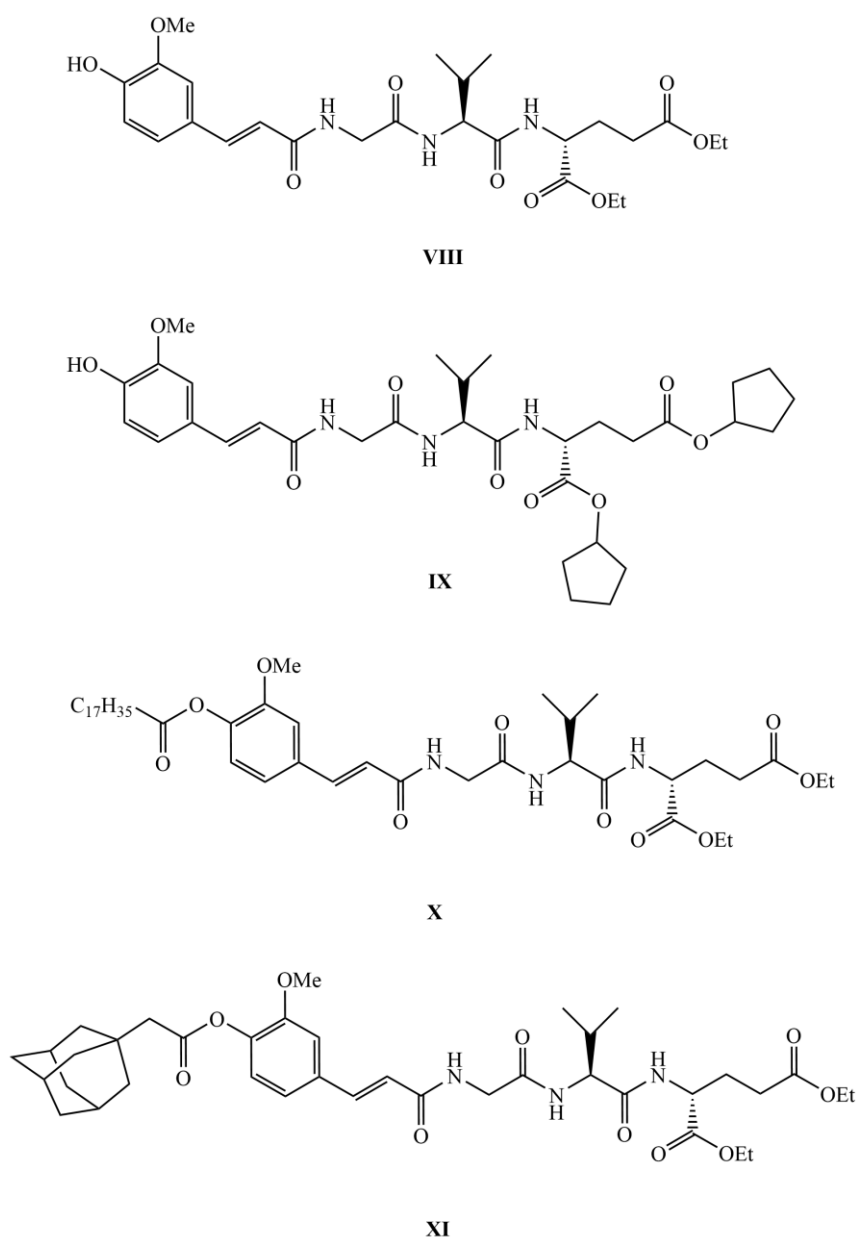
Slika 6. Strukturne formule DMP derivata **VI** i **VII** s manoznom te lipofilnom adamantanskom strukturom vezanom preko triazolnog prstena

U nedavnim istraživanjima tripeptidni derivati sastavljeni od glicina, L-valina i D-glutaminske kiseline s lipofilnim aromatskim i cikloalkilnim supstituentima vezanim na N-kraj glicina pokazali su izniman NOD2 agonistički učinak. Jakopin i suradnici su 2018. godine sintetizirali acilni tripeptid (**VIII**, slika 7) u kojem je ugljikohidratni dio zamijenjen s *trans*-feruloilnim dijelom. Navedeni spoj se pokazao dvostruko jačim NOD2 agonistom od MDP-a. Njegova imunostimulirajuća svojstva utvrđena su *in vitro* eksperimentima koji su otkrili da spoj **VIII** povećava proupalno oslobađanje citokina iz ljudskih PMBC stanica (engl. *peripheral blood mononuclear cells*) samostalno te sinergistički s lipopolisaharidom.<sup>25</sup>

Zatim su, 2021. godine, sintetizirani spojevi **IX** i **X** (slika 7). Spoj **IX** je snažan nanomolarni *in vitro* NOD2 agonist, a lipofilniji spoj **X** pokazuje značajnu adjuvantsku aktivnost *in vivo*. Oba spoja imaju imunostimulirajući učinak na PMBC stanice, a **X** povećava citotoksično djelovanje PMBC stanica protiv malignih stanica. Lipofilni acilni dio od 18 ugljikovih atoma spoja **X** identificiran je kao ključni strukturni element za *in vivo* adjuvantsku aktivnost u kombinaciji s liposomskim sustavom za isporuku. Spoj **X** ugrađen u liposom pokazao je obećavajuću adjuvantsku aktivnost u mišjem modelu pri čemu je nadmašio adjuvantsku aktivnost muramil-dipeptida.<sup>17</sup>

Daljnijim istraživanjem 2022. godine sintetiziran je lipofilni spoj **XI** s adamantanom (slika 7). Identificiran je kao prvi desmuramil-peptid s NOD2 stimulirajućom aktivnošću u jednoznamenkastom nanomolarnom rasponu te kao najjači NOD2 agonist u svojoj strukturnoj klasi do danas. Navedeni spoj djeluje sinergistički s lipopolisaharidom i interferonom- $\gamma$  na induciranju proizvodnje citokina u PMBC stanicama čovjeka i pojačava nespecifičnu citotoksičnu aktivnost citokina protiv stanica raka K562.<sup>16</sup>

Navedene prednosti te dobra adjuvantska aktivnost sintetiziranih spojeva potaknuli su interes za daljnju sintezu sličnih lipofilnih tripeptidnih NOD2 agonista.

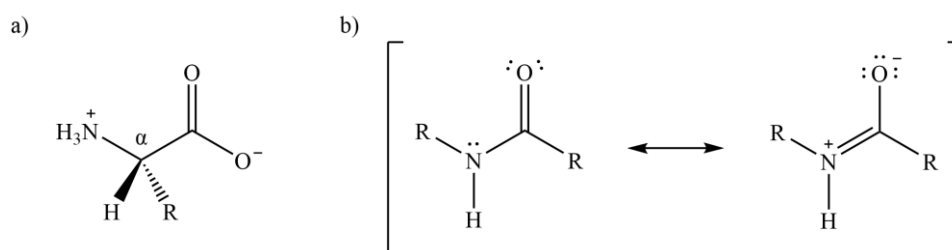


Slika 7. Strukturne formule lipofilnih tripeptidnih NOD2 agonista

## 2.2. Sinteza peptida

### 2.2.1. Peptidi i peptidna veza

Peptidi odnosno proteini su biopolimeri aminokiselina, točnije  $\alpha$ -aminokiselina, koje se tako nazivaju budući da je amino skupina vezana na  $\alpha$ -ugljikov atom karboksilne skupine. Također, na  $\alpha$ -ugljikovom atomu vezan je i odgovarajući bočni ogranak pojedine aminokiseline (slika 8a). Fizikalna i kemijska svojstva peptida određena su njegovim sastavnim aminokiselinama. Peptidi sadržavaju najmanje dvije aminokiseline u lancu koje su međusobno povezane peptidnom, tj. amidnom vezom. Peptidna veza ima djelomičan karakter dvostruke veze što ju čini izrazito stabilnom (slika 8b). Stabilnost veze je posljedica rezonancijske stabilizacije neveznih elektrona na dušikovom atomu. Također, C-N veza ima i ograničenu rotaciju zbog svog djelomičnog karaktera dvostruke veze.<sup>26,27</sup>



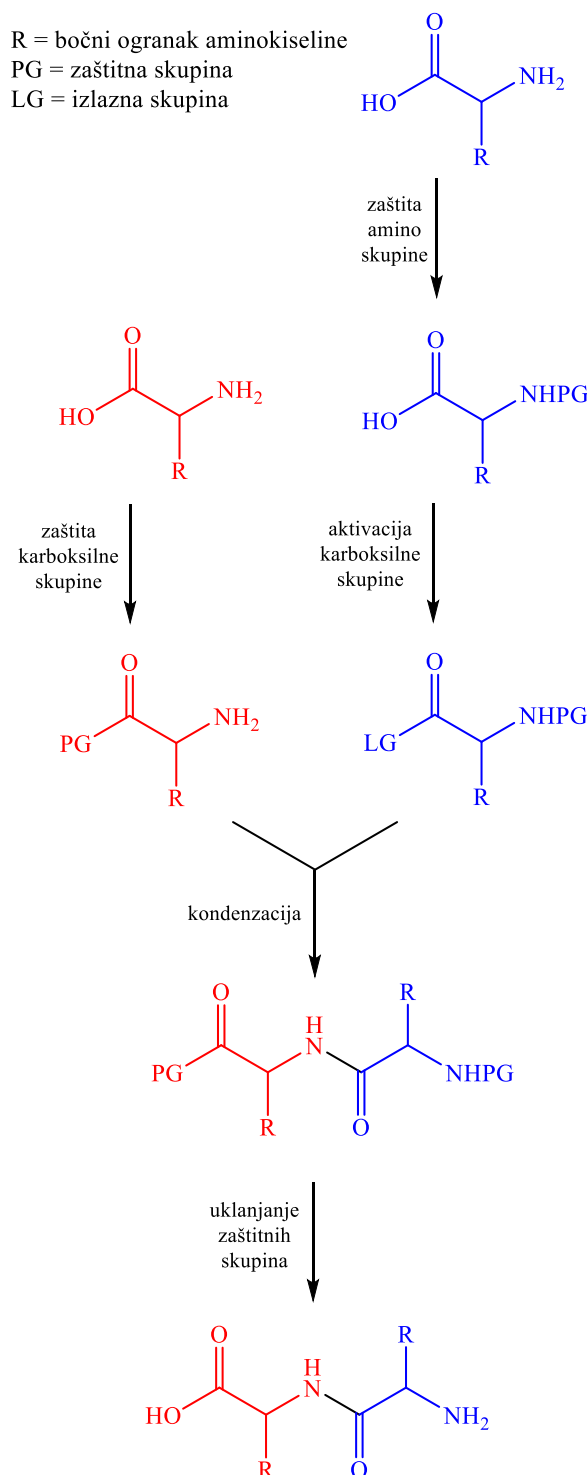
Slika 8. a) Općenita strukturna formula prirodne aminokiseline. b) Djelomičan karakter dvostruke veze u peptidnoj vezi posljedica je delokalizacije elektronskog para s dušikovog atoma prema atomu kisika karbonilne skupine.

Proteini i peptidi su izrazito važni za život te se pojavljuju u svim živim organizmima. Uključeni su u veliki broj fizioloških i bioloških procesa poput prijenosa raznih tvari kroz membrane, međustaničnu komunikaciju i zaštitu organizama u obliku antitijela. Kako bi se razumjeli principi i mehanizmi koji određuju funkcionalne i strukturne karakteristike bioaktivnih proteina provode se brojni istraživački projekti. Takva istraživanja zahtijevaju dostupnost proteina u većoj količini i odgovarajućoj čistoći. Proteini i peptidi mogu se dobiti kemijskom sintezom, izolacijom iz prirodnih izvora, rekombinantnim tehnikama ili kombinacijom navedenih postupaka.<sup>28</sup> Primjerice, peptidni hormon inzulin, koji je nužan za život dijabetičarima, može se izolirati iz svinjske gušterače. No, inzulin je moguće dobiti i rekombinantnim tehnikama. Potrebno je izdvojiti dio DNA koji sadrži kod za određeni protein, umetnuti ga u bakteriju i potaknuti bakteriju da proizvodi željeni protein. Za

proizvodnju humanog inzulina, koji ne izaziva opasne reakcije kod ljudi koji su alergični na proizvode od svinjskog mesa, razvijeni su genetski modificirani sojevi *Escherichie coli*.<sup>26</sup>

Peptidna veza nastaje reakcijom karboksilne skupine jedne aminokiseline s amino skupinom druge aminokiseline uz oslobađanje molekule vode. No, sinteza peptida nije jednostavna. Svaka aminokiselina ima odgovarajuću amino skupinu i karboksilnu skupinu. Ukoliko samo pomiješamo dvije aminokiseline te dodamo reagens za aktivaciju nećemo dobiti čisti željeni dipeptid već smjesu četiri različitih dipeptida. Također, određene aminokiseline imaju bočne ogranke koji mogu ometati stvaranje peptida. Na primjer, glutaminska kiselina ima dodatnu karboksilnu skupinu, a lizin ima dodatnu amino skupinu. Zato peptidna sinteza uvijek uključuje i odgovarajuće kondenzirajuće reagense te zaštitne skupine koje „blokiraju“ tvorbu nepotrebnih veza i nastajanje neželjenih, sporednih produkata.<sup>26,29</sup>

Sinteza peptida se može provesti u tekućoj ili na čvrstoj fazi. Sinteza peptida u otopini najprije zahtijeva zaštitu onih skupina u strukturi aminokiselina koje ne sudjeluju u formiranju amidne veze, odnosno zaštitu amino skupine jedne aminokiseline te karboksilne skupine druge. Zatim slijedi aktivacija karboksilne skupine jedne aminokiseline pomoću kondenzacijskog reagensa te kondenzacija s drugom zaštićenom aminokiselinom, čime dolazi do formiranja peptidne veze. Nakon toga, selektivnim se uklanjanjem zaštitnih skupina dobiva željeni dipeptid.<sup>26,30</sup> Svaki korak sinteze peptida u otopini zahtijeva izolaciju, pročišćavanje i karakterizaciju produkta što čini ovu metodu zahtjevnom i dugotrajnom. Zbog toga ova metoda nije pogodna za sintezu duljih peptida, no prednost metode je što omogućuje dobivanje produkata visoke čistoće.<sup>26,29</sup> Na slici 9 prikazana je shema sinteze dipeptida u otopini.



Slika 9. Shematski prikaz sinteze peptida u otopini

1962. godine Robert Bruce Merrifield proveo je prvu sintezu peptida na čvrstoj fazi. Glavne prednosti sinteze peptida na ovaj način su:

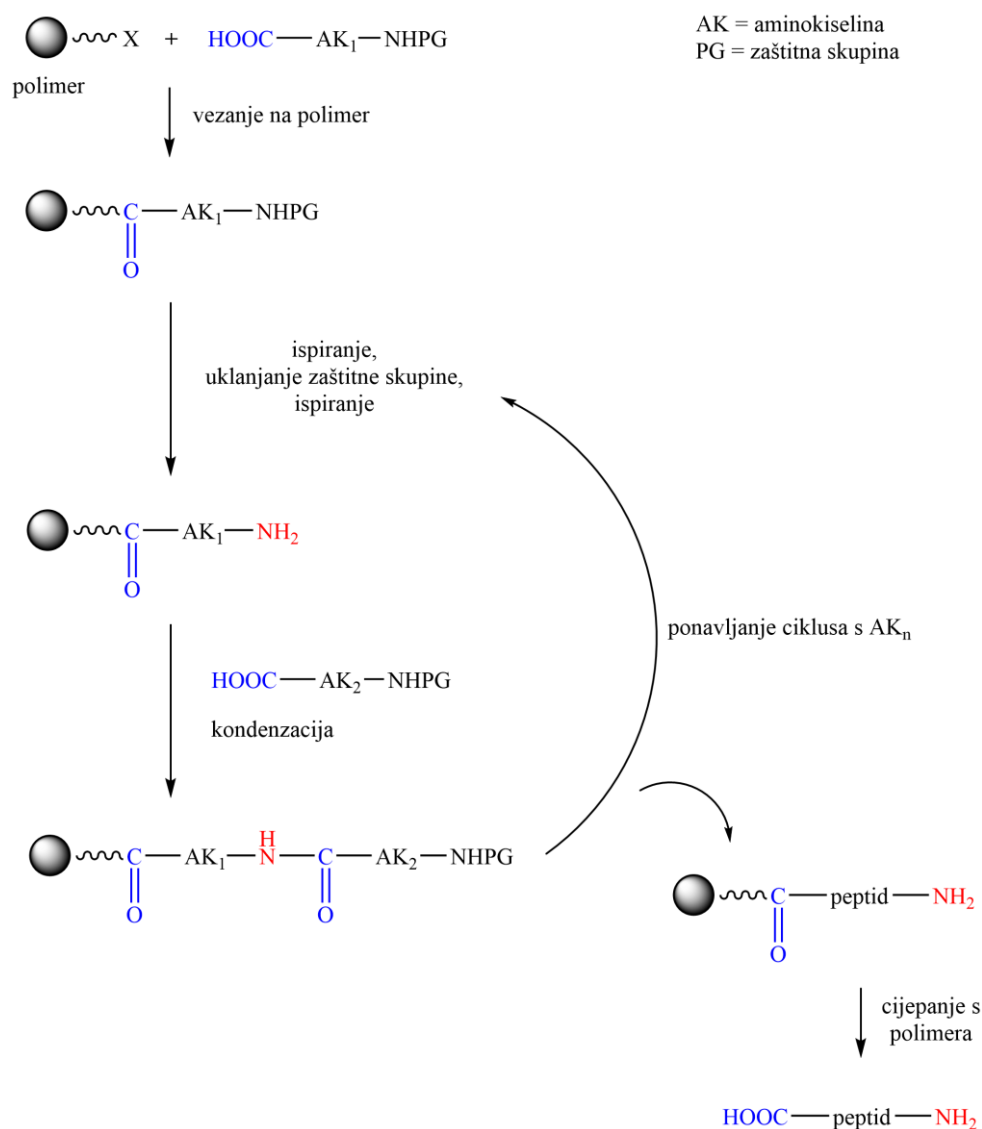
1) jednostavnost i brzina (sve reakcije se provode u jednoj reakcijskoj posudi);

2) učinkovitost (izbjegavaju se gubitci koji se obično javljaju prilikom izolacije i pročišćavanja međuprodukata, a upotreba viška reagensa rezultira većim prinosima finalnih peptida).<sup>31</sup>

Sinteza peptida na čvrstoj fazi pogodna je i za automatizaciju. Merrifield je napravio stroj koji omogućuje dodatak nekoliko aminokiselina na peptid automatiziranim postupkom. Koristeći navedeni stroj uspješno je sintetizirao ribonukleazu koja se sastoji od 124 aminokiseline u samo 6 tjedana, postigavši ukupni prinos od 17%.<sup>26</sup>

Željeni peptid se postupkom sinteze peptida na čvrstom nosaču pripravlja počevši od C-kraja prema N-kraju. Najprije se prva aminokiselina (AK<sub>1</sub>, slika 10) s karboksilnom skupinom veže na čvrsti nosač, tj. polimer. Za pričvršćivanje na polimer amino skupina AK<sub>1</sub> mora biti zaštićena kako ne bi došlo do neželjene reakcije. Nakon vezanja na polimer slijedi ispiranje čime se uklanjaju sporedni produkti te višak reagensa. Potrebno je ukloniti i zaštitnu skupinu vezanu na amino skupinu AK<sub>1</sub>. Zatim dolazi do reakcije s drugom, zaštićenom aminokiselinom (AK<sub>2</sub>) čime nastaje željena peptidna veza, nakon čega se ponavlja postupak ispiranja te uklanjanja zaštitne skupine. Navedeni postupak se ponavlja s preostalim aminokiselinama (AK<sub>n</sub>) sve dok ne nastane konačni peptid. Naposljetku, jednim korakom cijepa se veza između peptida i polimera.<sup>26,28,31</sup>

Danas se koristi i sinteza peptida na čvrstom nosaču potpomognuta mikrovalnim zračenjem. Ovakav način sinteze je osobito koristan za sintezu duljih peptida uz visoke prinose te nizak stupanj racemizacije, a dodatna prednost je mogućnost kontrole temperature i tlaka prilikom sinteze.<sup>32</sup> Često se koristi i kombinacija sinteze u otopini te sinteze na krutom nosaču na način da se veći peptidi sintetiziraju na krutom nosaču, a manji fragmenti u otopini nakon čega dolazi do njihove kondenzacije.<sup>26</sup> Navedenim hibridnim pristupom su Trimeris i Roche sintetizirali peptidni lijek enfuvirtid koji se sastoji od 36 aminokiselina. Najprije su tri manja zaštićena peptidna fragmenta pripravljena sintezom peptida na čvrstoj fazi, a zatim nakon odvajanja od čvrste podloge, pročišćavanja i karakterizacije kondenzirani u otopini.<sup>33</sup>



Slika 10. Shematski prikaz postupka sinteze peptida na čvrstom nosaču. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>31</sup>

### 2.2.2. Zaštitne skupine u sintezi peptida

Zaštita reaktivnih funkcijskih skupina koje su prisutne u aminokiselinama, poput  $\alpha$ -amino skupine, skupina u bočnom ogranku pojedinih aminokiselina (amini, karboksilne kiseline, alkoholi i tioli) te karboksilne skupine, važna je za sintezu peptida. Zaštita je nužna za sprječavanje spontane polimerizacije aminokiselina te za smanjenje broja nastalih sporednih produkata.<sup>34</sup> Zaštitna skupina mora biti stabilna u širokom rasponu reakcijskih uvjeta i mora se lako te sigurno ukloniti kada više nije potrebna. Pri odabiru zaštitne skupine mora se voditi računa o tome da zaštitna skupina ne smije reagirati s drugim reaktivnim skupinama koje

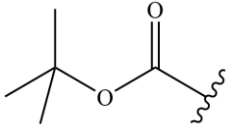
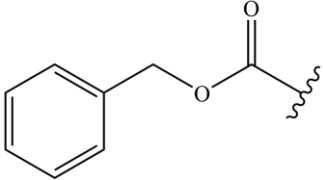
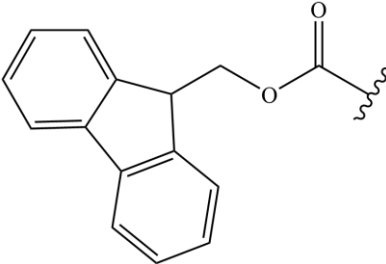


moraju ostati slobodne za ostvarivanje željene kemijske veze. Ne postoji savršena zaštitna skupina koja je primjenjiva na sve molekule.<sup>35</sup>

Emil Fischer je prvi prepoznao potrebu privremenog maskiranja funkcijske skupine kako bi se omogućila regioselektivnost prilikom stvaranja veze u sintezi ugljikohidrata. Međutim, prva "moderna" zaštitna skupina bila je benziloksikarbonilna zaštitna skupina (Cbz ili Z) koju su 1932. godine razvili Bergmann i Zervas. Još jedno dostignuće u području zaštitnih skupina predstavili su Barany i suradnici s konceptom ortogonalnosti, odnosno činjenicom da zaštitne skupine pripadaju različitim klasama te se tako uklanjaju različitim mehanizmima što omogućuje uklanjanje određene zaštitne skupine u prisutnosti drugih.<sup>35</sup> 1957. godine Albertson i McKay predstavili su *tert*-butiloksikarbonilnu zaštitnu skupinu (Boc) koja je bila ortogonalna mnogim drugim zaštitnim skupinama koje su bile dostupne za sintezu peptida u to vrijeme.<sup>28</sup>

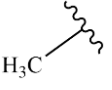
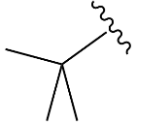
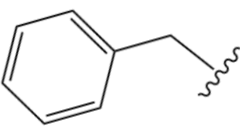
Za  $\alpha$ -amino skupinu najčešće se koriste karbamatne, odnosno uretanske zaštite, već spomenute Boc i Cbz te 9-fluorenilmetiloksikarbonilna (Fmoc) zaštitna skupina. Strukturne formule zaštitnih skupina te načini njihova uvođenja i uklanjanja prikazani su u tablici 1. Budući da se sinteza peptida provodi od C-kraja prema N-kraju,  $\alpha$ -amino zaštitne skupine su privremene, tj. uklanjaju se nekoliko puta tijekom sinteze. Stoga se, uklanjanje  $\alpha$ -amino zaštitne skupine mora provoditi u blagim uvjetima koji ne utječu na preostale zaštitne skupine koje su uglavnom trajne te se obično uklanjaju u posljednjem koraku sinteze. Zaštita  $\alpha$ -amino skupine je potrebna budući da  $\alpha$ -amino skupina ima nukleofilna i bazična svojstva.<sup>35</sup>

Tablica 1. Prikaz najčešće korištenih zaštitnih skupina za  $\alpha$ -amino skupinu aminokiselina

ZAŠTITNA SKUPINA	NAČINI UVOĐENJA	NAČINI UKLANJANJA
 <i>tert</i> -butiloksikarbonil (Boc)	1) Boc <sub>2</sub> O, TEA, dioksan/H <sub>2</sub> O 2) Boc-ON, TEA, dioksan/H <sub>2</sub> O 3) Boc <sub>2</sub> O, TEA, THF/H <sub>2</sub> O	1) TFA, DCM 2) HCl, dioksan 3) MeSO <sub>3</sub> H, dioksan
 benziloksikarbonil (Cbz ili Z)	1) CbzCl, NaOH/H <sub>2</sub> O 2) CbzOSu, NaOH, dioksan/H <sub>2</sub> O	1) H <sub>2</sub> , Pd/C 2) HBr, AcOH 3) BBr <sub>3</sub>
 9-fluorenilmetoksikarbonil (Fmoc)	1) FmocCl, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , dioksan/H <sub>2</sub> O 2) FmocOSu, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , dioksan/H <sub>2</sub> O	1) piperidin, DMF 2) morfolin, DMF 3) DEA, DMA

Karbonilni ugljikov atom karboksilne skupine je elektrofilan i podložan nukleofilnom napadu, a vodikov atom kiselo-baznoj reakciji zbog čega je potrebna zaštita karboksilne skupine. Za zaštitu  $\alpha$ -karboksilne skupine najčešće se koristi esterska zaštita, odnosno potrebno je pripremiti stabilne estere koji neće hidrolizirati u uvjetima stvaranja peptidne veze. To su često metilni (Me), *tert*-butilni (*t*-Bu) i benzilni (Bn) esteri (tablica 2).<sup>35</sup>

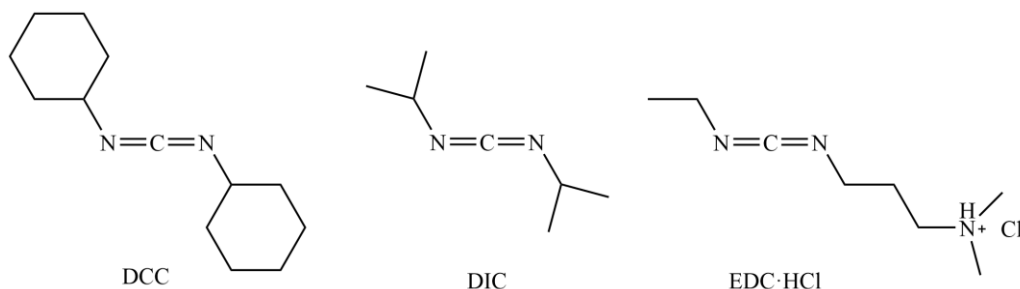
Tablica 2. Prikaz najčešće korištenih zaštitnih skupina esterskog tipa (RCOOR') za  $\alpha$ -karboksilnu skupinu aminokiselina

R'	NAČINI UVOĐENJA	NAČINI UKLANJANJA
 metil (Me)	1) MeOH, $H_2SO_4$ 2) $Me_3SiCl$ , MeOH	1) LiOH 2) NaOH
 tert-butil (t-Bu)	1) izobuten, $H_2SO_4$ 2) <i>t</i> -BuOH, $H_2SO_4$	1) TFA, DCM 2) HCl, dioksan
 benzil (Bn)	1) $BnOCOCl$ , piridin, DMAP 2) $BnOH$ , piridin	1) $H_2$ , Pd/C 2) HF

### 2.2.3. Kondenzirajući reagensi u sintezi peptida

Ključan korak u sintezi peptida je stvaranje peptidne veze. Međutim, dobivanje peptidne odnosno amidne veze reakcijom karboksilne kiseline s aminom nije moguće budući da dolazi do kiselinsko-bazne reakcije u kojoj nastaje amonijeva sol, prije nego što dođe do nukleofilne supstitucije i nastanka amidne veze. Kako bi se riješio navedeni problem, dodaje se dodatni kondenzirajući reagens koji će aktivirati karboksilnu skupinu prevodeći je u bolju izlaznu skupinu. Na taj se način karboksilne kiseline prevode u anhidride, estere, kiselinske halogenide ili neke druge reaktivnije derivate koji će zatim reagirati s aminom. Koriste se jeftini, netoksični reagensi koji se na jednostavan način mogu ukloniti iz reakcijske smjese. Dodatno, odabirom kondenzirajućeg reagensa kontrolira se brzina nastanka peptidne veze te stupanj racemizacije.<sup>28</sup>

Najčešće korišteni kondenzirajući reagensi za aktivaciju  $\alpha$ -karboksilne skupine su karbodiimidi (slika 11) poput *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimida (DCC), *N,N'*-diizopropilkarbodiimida (DIC) i *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorida (EDC·HCl).<sup>26,28</sup>

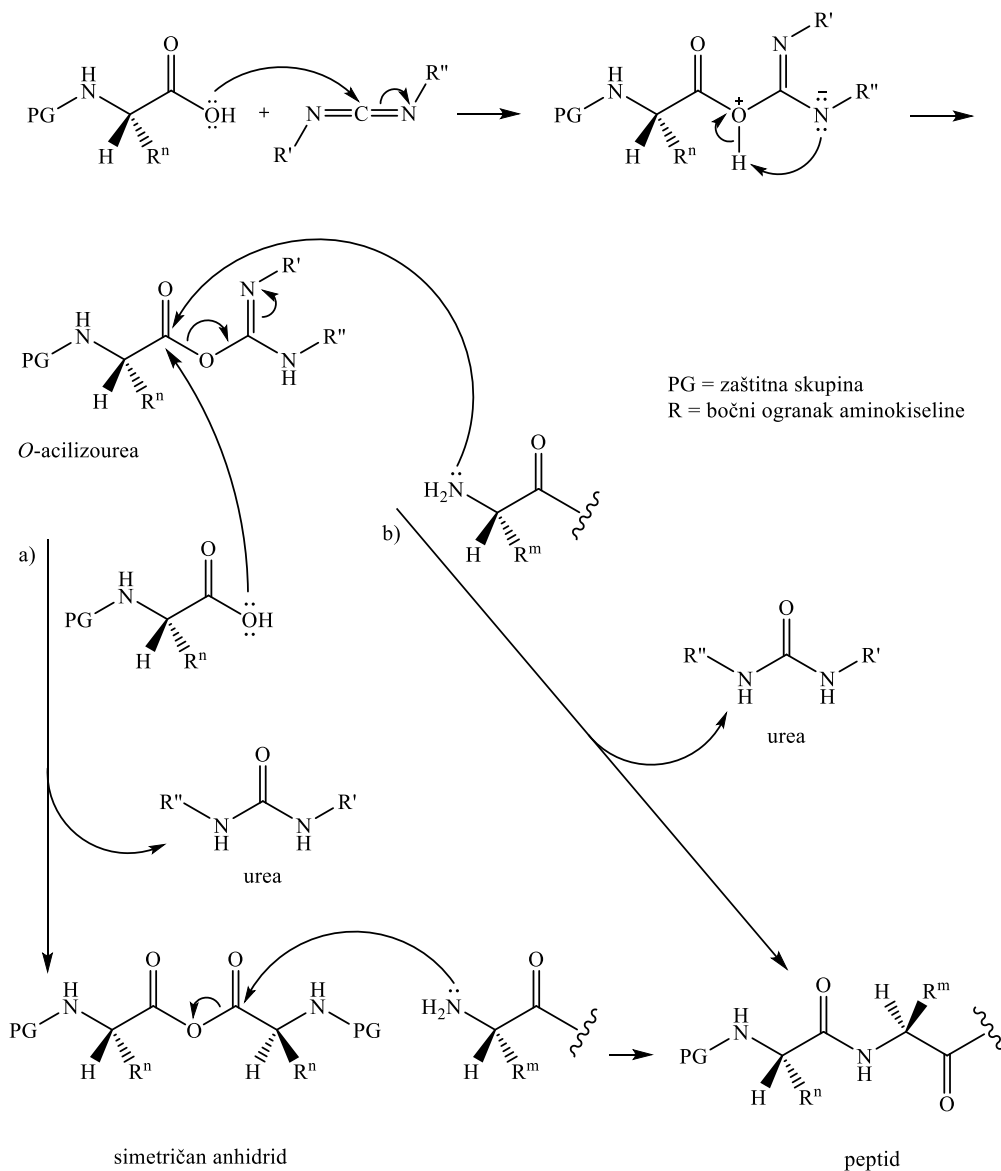


Slika 11. Strukturne formule najčešće korištenih kondenzirajućih reagensa za aktivaciju  $\alpha$ -karboksilne skupine u sintezi peptidne veze

Sheehan i Hess su 1955. godine prvi puta upotrijebili DCC za sintezu peptida te je on vrlo brzo postao najpopularnijim reagensom za sintezu peptida u otopini i na čvrstoj fazi. No, nedostatak DCC-a je što dolazi do nastanka neželjenog, sporednog produkta *N,N'*-dicikloheksiluree koja se teško uklanja iz reakcijske smjese jer je netopljiva u većini otapala te onečišćuje glavni produkt.<sup>28,29</sup> Zato su Sheehan i Hess 1961. godine potaknuli korištenje DIC-a i EDC·HCl-a. Korištenjem ovih reagenasa nastaju analogni sporedni produkti, ali se oni lako uklanjaju iz reakcijske smjese i topljivi su u većini otapala. Primjerice, EDC·HCl je koristan za sintezu peptida u otopini jer su EDC·HCl te njegova urea dobro topljivi u vodenom mediju, stoga se jednostavno mogu ukloniti tijekom obrade reakcijske smjese postupkom ekstrakcije.<sup>28</sup>

Na slici 12 prikazana su dva moguća načina nastanka peptidne veze uz aktivaciju  $\alpha$ -karboksilne skupine pomoću karbodiimida. Najprije dolazi do nukleofilnog napada kisikova atoma karboksilne skupine aminokiseline na karbodiimidni C-atom čime nastaje međuprodukt koji se prijenosom protona prevodi u *O*-acilizoureu. Nastalu *O*-acilizoureu, tj. njen karbonilni C-atom tada može nukleofilno napasti kisikov atom karboksilne skupine početne aminokiseline čime nastaje simetrični anhidrid te odgovarajuća urea kao sporedni produkt (put a). Zatim, nukleofilnim napadom dušikova atoma druge aminokiseline ili peptida na simetričan anhidrid dolazi do nastanka željenog peptida, odnosno peptidne veze. U drugom

slučaju (put b), odmah dolazi do nukleofilnog napada dušikova atoma amino skupine aminokiseline ili peptida čime nastaje željena peptidna veza te urea kao sporedni produkt.<sup>28,29</sup>



Slika 12. Shematski prikaz puteva pripreve peptidne veze uz dodatak karbodiimida

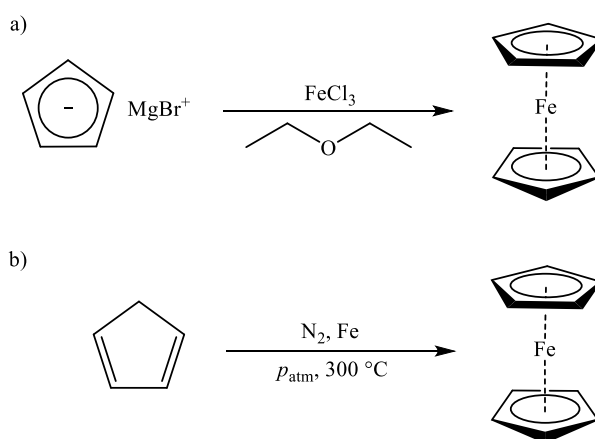
Kao što je već navedeno, prevođenjem karboksilne skupine u bolju izlaznu skupinu potiče se stvaranje peptidne veze. Problem je što izravnim napadom aminokiseline na *O*-acilizoureu dolazi do neželjene racemizacije. Zato se često pripremaju aktivirani esteri koji ubrzavaju aminolizu i potiskuju racemizaciju. Najčešće korišteni reagensi za pripremu aktiviranih estera su *N*-hidroksibenzotriazol (HOBt), *N*-hidroksisukcinimid (HOSu) te različiti fenoli s elektron-odvlačećim skupinama poput pentafluorfenola, pentaklorfenola i *p*-

nitrofenola.<sup>28</sup> Na primjer, dodatkom HOBt-a nastaje novi ester kao međuprodukt, nakon čega dolazi do nukleofilnog napada aminokiseline na esterski derivat HOBt-a čime vrlo brzo nastaje peptidna veza bez racemizacije kiralnih središta.<sup>27</sup> U poglavlju Rezultati i rasprava na slici 35 prikazan je mehanizam nastanka peptidne veze uz EDC·HCl i HOBt, a na slici 36 mehanizam nastanka peptidne veze uz *N*-hidroksisukcinimidni ester na primjerima zaštićenih aminokiselina koje su korištene u ovome radu.

## 2.3. Ferocen i derivati ferocena

### 2.3.1. Otkriće ferocena i svojstva ferocena

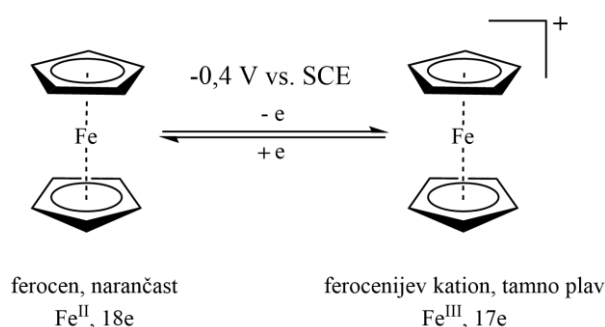
Ferocen, sustavnog imena bis( $\eta^5$ -ciklopentadienil)željezo(II), otkriven je 1951. godine kada su Peter L. Pauson i Thomas J. Kealy pokušali pripremiti fulvalen oksidativnom dimerizacijom ciklopentadiena (slika 13a). Reakcijom ciklopentadienilmagnezijeva bromida s željezovim(III) kloridom kao oksidacijskim sredstvom u dietil-eteru nisu dobili očekivani fulvalen već stabilnu, praškastu svijetlo narančastu krutinu.<sup>36,37</sup> Iako se 1951. godina uzima kao godina otkrića ferocena, ferocen je pripremljen i 1950. godine od strane Samuela A. Millera, Johna A. Tebbotha i Johna F. Tremainea. Provodili su sintezu amina prilagođenim Haber-Boschovim procesom, no reakcijom ciklopentadiena i dušika pri atmosferskom tlaku i 300 °C uz prisutnost željeza nisu dobili željeni produkt, nego ferocen (slika 13b).<sup>37</sup>



Slika 13. a) Reakcija sinteze ferocena 1951. godine (Peter L. Pauson i Thomas J. Kealy);  
b) reakcija sinteze ferocena 1950. godine (Samuel A. Miller, John A. Tebboth i John F. Tremaine)

Ubrzo nakon otkrića, strukturu ferocena razjasnili su neovisno Wilkinson te Fischer, a zbog sličnosti njegove reaktivnosti s benzenom Woodward mu je nadjenao ime ferocen. Razvojem organometalne kemije ustanovljeno je da ferocen pripada većoj skupini metalnih kompleksa arena koju danas nazivamo metaloceni.<sup>38-40</sup>

Ferocen se odlikuje takozvanom „sendvič-strukturom“ budući da je metalni kation,  $\text{Fe}^{2+}$  ion, smješten između dva arena. Radi se o 18-elektronskom sustavu, pri čemu 6 elektrona potječe od  $\text{Fe}^{2+}$  kationa, a preostalih 12 elektrona od dva ciklopentadienilna aniona. Ferocen pokazuje izrazitu stabilnost te je tako stabilan do temperature od  $400\text{ }^\circ\text{C}$  s temperaturom tališta od  $172,5\text{ }^\circ\text{C}$ . Stabilan je na zraku i topljiv u uobičajenim organskim otapalima. Karakterizira ga "superaromatičnost" i blaga, reverzibilna oksidacija s redukcijskim potencijalom od oko  $0,4\text{ V}$  (slika 14) u usporedbi sa standardnom kalomelovom elektrodom (SCE, engl. *saturated calomel electrode*).<sup>40-42</sup>

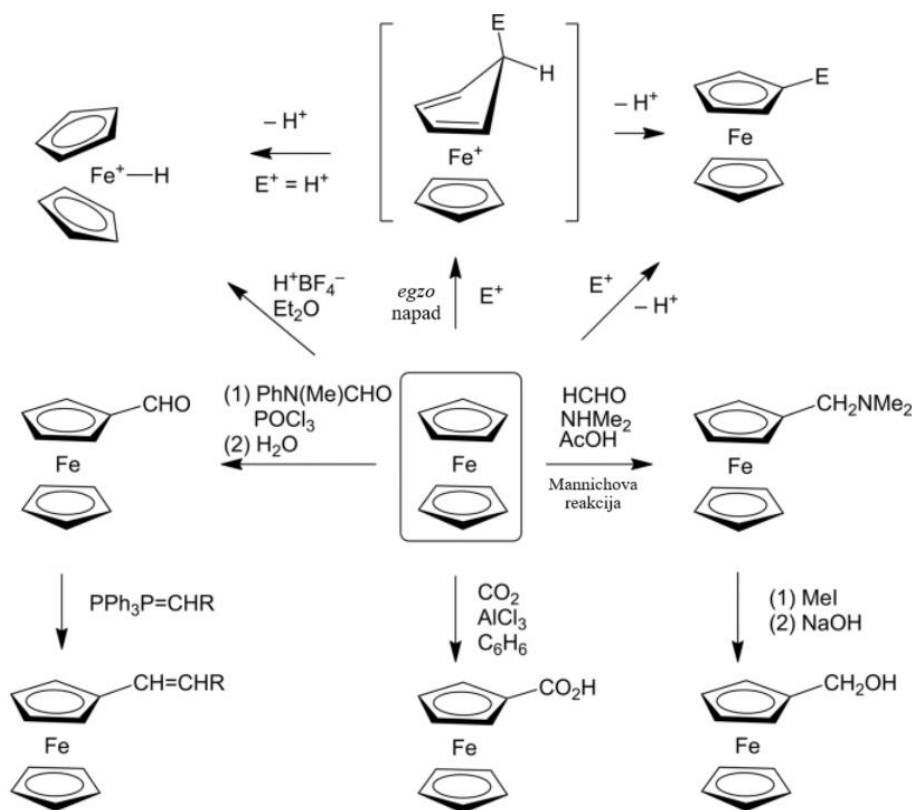


Slika 14. Oksidacijsko-redukcijski potencijal ferocena s obzirom na standardnu kalomelovu elektrodu (SCE) pri standardnim uvjetima. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>42</sup>

### 2.3.2. Uobičajene reakcije pripreve derivata ferocena

Kod pripreve derivata ferocena često se koriste reakcije elektrofilne aromatske supstitucije s različitim elektrofilima (slika 15). Primjerice, jaka kiselina poput  $\text{HBF}_4$  u dietil-eteru može protonirati željezo što rezultira nastankom željezo(IV) hidridnog kompleksa. Ipak, najčešće se koriste reakcije Friedel-Craftsovog alkiliranja ili aciliranja. Aciliranje se uobičajeno provodi pomoću anhidrida karboksilne kiseline ili kiselinskog klorida uz jaku Lewisovu kiselinu kao katalizator, npr.  $\text{AlCl}_3$ . Reakcija ferocena s acetil-kloridom koristi se za isticanje različite reaktivnosti dvaju ferocenskih prstenova. Dodatkom otopine reagensa kapalicom u otopinu

ferocena dolazi do acetiliranja samo jednog prstena zato što će vezanje prve acetilne skupine deaktivirati nesupstituirani prsten i na taj način usporiti njegovu acilaciju.<sup>42</sup>



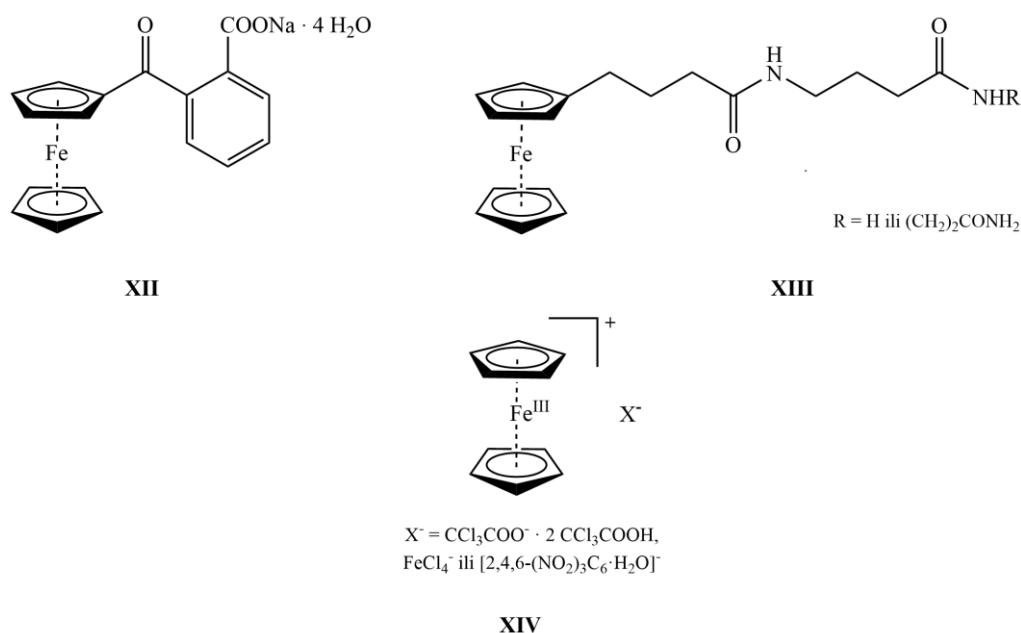
Slika 15. Prikaz reprezentativnih reakcija ferocena s različitim elektrofilima. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>42</sup>

### 2.3.3. Prikaz odabranih derivata ferocena

Metaloceni pokazuju širok raspon biološke aktivnosti, a među metalocenima ferocen je privukao posebnu pozornost jer je neutralna, kemijski stabilna i netoksična molekula koja se može lako derivatizirati i funkcionalizirati. Mnogi spojevi ferocena pokazuju citotoksičnu, antitumorsku, antimalaričnu ili antifungalnu aktivnost te se koriste u liječenju gljivičnih i bakterijskih infekcija, malarije, virusa humane imunodeficiencije (HIV) i raka.<sup>38,43</sup> Također, ferocen se koristi i u poljima kao što su nanomedicina, biološki senzori (npr. za detekciju glukoze u krvi), kataliza, baterije, znanost o materijalima i sl.<sup>38,41</sup>



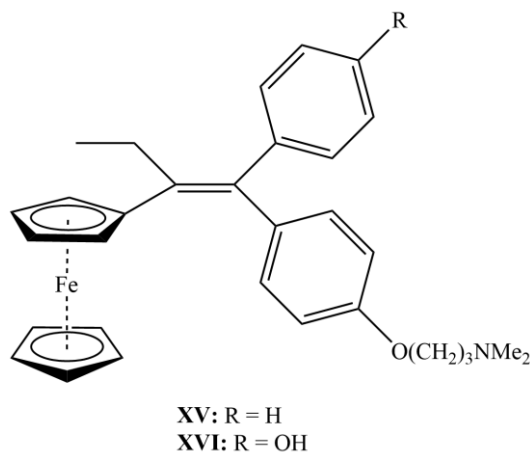
1970.-tih godina feroceron **XII** (slika 16) je korišten za liječenje anemije u bivšem Sovjetskom Savezu. Feroceron je bio prvi i možda jedini lijek na bazi ferocena koji je bio odobren za medicinsku uporabu, međutim više nije dostupan na tržištu.<sup>45</sup> 1976. godine Brynes i suradnici su otkrili slabo antitumorsko djelovanje derivata ferocena s amidnim skupinama **XIII** protiv limfocitne leukemije P-388, a Köpf-Maier, Köpf i Neuse su 1984. godine došli do otkrića ferocenijskih soli **XIV** koje su bile učinkovite protiv Ehrlichovih ascitesnih tumora. Nakon više od desetljeća ustanovljeno je da iz ferocenijskih soli dolazi do stvaranja OH-radikala koji uzrokuju oštećenje DNA i dovode do smrti stanice. Navedena istraživanja omogućila su otkriće dva najpoznatija derivata ferocena u medicinskoj kemiji, ferocifena i ferokina (slike 17 i 18).<sup>44</sup>



Slika 16. Strukturne formule derivata ferocena s antitumorskim svojstvima

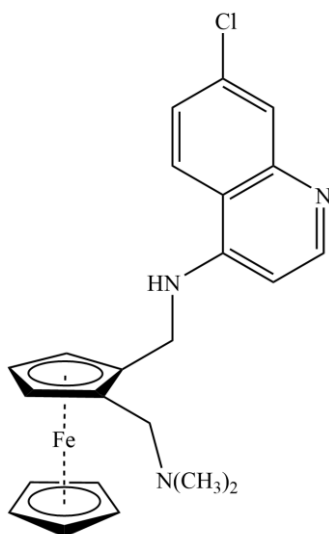
1996. godine započela su istraživanja o ferocenijskim analogima tamoksifena (TAM) kao sredstvima za liječenje raka. Tamoksifen je lijek za pacijente s hormonski ovisnim rakom dojke. Ferocenijski analozi tamoksifena (slika 17), ferocifen **XV** (Fc-TAM) i hidroksiferocifen **XVI** (Fc-OH-TAM), vrlo su aktivni protiv  $\text{ER}\alpha^+$  (hormonski ovisnih) i  $\text{ER}\alpha^-$  (hormonski neovisnih) stanica raka dojke, za razliku od hidroksitamoksifena koji je aktivan samo protiv  $\text{ER}\alpha^+$  stanica. Navedena činjenica je izrazito značajna budući da trećina svih rakova dojke pripada  $\text{ER}\alpha^-$  tipu, odnosno ne mogu se liječiti hormonskom terapijom sa SERM-ovima (engl. *selective estrogen receptor modulators*), kakav je i tamoksifen.<sup>45</sup> Zamjena fenilne skupine

tamoksifena s ferocenilom te produljenje alifatskog lanca uzrokuje porast lipofilnosti i time povećanje antiproliferativnog učinka spoja.<sup>40</sup>



Slika 17. Strukturne formule ferocifena **XV** i hidroksiferocifena **XVI**

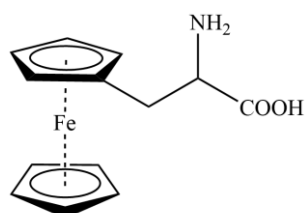
Približno 249 milijuna slučajeva malarije zabilježeno je u 85 zemalja 2022. godine, sa 608 000 zabilježenih smrtnih slučajeva diljem svijeta.<sup>46</sup> Najveći izazov kod razvoja lijekova protiv malarije je otpor koji razvijaju mnogi paraziti što čini nekoliko lijekova, poput klorokina i artemisinina, neučinkovitim protiv određenih sojeva. Iako se pacijenti obično tretiraju s dva različita lijeka za povećanje vjerojatnosti uspješnog liječenja, potreba za novim lijekovima protiv malarije je neupitna.<sup>45</sup> 1994. godine otkriven je ferocenilni derivat klorokina, ferokin **XVII** (slika 18), kod kojeg je ferocenilna skupina ugrađena u alkilni lanac koji povezuje dvije amino skupine klorokina.<sup>44</sup> Utvrđeno je da je ferokin aktivan protiv klorokin-osjetljivih i klorokin-otpornih sojeva *Plasmodium falciparum* (najopasnije vrste malarije) *in vivo* te se još uvijek smatra najaktivnijim među više od stotinu srodnih metalolijekova. Ferokin djeluje tako da izaziva razgradnju membrane probavne vakuole parazita pomoću OH· radikala.<sup>44,45</sup> Zbog svoje hidrofobnosti koja je posljedica ferocenilne skupine, ferokin može prodrijeti kroz lipofilnu membranu probavne vakuole parazita brže od klorokina.<sup>44</sup> 2019. godine je ferokin prošao fazu IIb kliničkih ispitivanja.<sup>42,44,45</sup> Za njega je otkriveno i da inhibira infekciju virusom hepatitisa C.<sup>42</sup>



XVII

Slika 18. Strukturna formula ferokina **XVII**

S obzirom na stabilnost ferocena u biološkom okolišu i mogućnost pripreve derivata pogodnih za vezivanje na peptide, tj. aminokiseline ne začuđuje podatak da se više od polovice do sada opisanih bioorganometalnih konjugata toga tipa odnosi na ferocenske konjugate s aminokiselinama.<sup>40</sup> 1957. godine Schlögl je malonesterskom kondenzacijom sintetizirao prvu ferocensku aminokiselinu, ferocenilalanin **XVIII** (slika 19).<sup>39,40</sup> Navedena sinteza je moguća zahvaljujući aromatskoj reaktivnosti ferocena i lakoj transformaciji njegovih supstitucijskih produkata.<sup>40</sup>

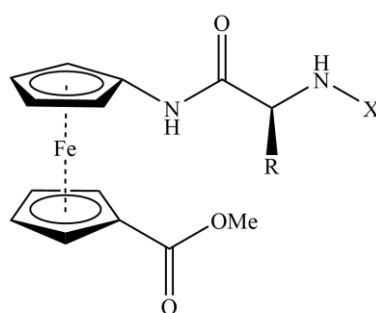


XVIII

Slika 19. Strukturna formula ferocenilalanina, prve sintetizirane aminokiseline koja sadrži ferocen

Konjugati ferocena i aminokiselina opsežno su proučavani u području peptidomimetika. Unatoč njihovoj biološkoj važnosti i svojstvima sličnim lijekovima, medicinska uporaba peptida ponekad je ograničena njihovom slabom proteolitičkom stabilnošću, slabom apsorpcijom i malom selektivnosti. U posljednja četiri desetljeća pojam peptidomimetika, odnosno umijeća preobrazbe peptida u lijekove, pojavio se kao moćno oružje u medicinskoj kemiji. Peptidomimetik je spoj čija su sekundarna strukturna svojstva analogna prirodnom peptidu zbog čega može oponašati njegovu biološku funkciju.<sup>47</sup> Najjednostavnije modifikacije peptida uključuju supstituciju funkcijskih skupina u bočnim lancima aminokiselina, zamjenu osnovne aminokiseline nekom neprirodnom aminokiselinom ili promjenu kiralnosti na jednom centru ugradnjom D-aminokiseline. Time se utječe na hidrofилnost/lipofilnost peptida, a ugradnja D-aminokiseline može povećati i stabilnost peptida.<sup>48</sup>

2023. godine sintetiziran je niz ferocenskih peptidomimetika te je testirana njihova antimikrobna aktivnost protiv odabranih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, bakterija mliječne kiseline i kvasaca, kao i njihova antioksidativna aktivnost. Spojevi **XIX**, **XX** i **XXI** (slika 20) pokazali su antimikrobnu aktivnost protiv *P. aeruginosa*, *B. subtilis* i *S. aureus* sojeva bakterija. Pokazalo se da kiralnost (D-aminokiseline) i polaritet zaštitne skupine (acetil) utječu na biološku aktivnost budući da su navedeni ferocenski dipeptidi pokazali bolje antimikrobno djelovanje u usporedbi s ostalim ispitanim dipeptidima. Također, spojevi su pokazali izuzetno veliku stabilnost, odnosno dobru otpornost na proteolizu u prisutnosti kimotripsina.<sup>49</sup>



- XIX:** R = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, X = COCH<sub>3</sub>  
**XX:** R = CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, X = COCH<sub>3</sub>  
**XXI:** R = CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, X = COCH<sub>3</sub>

Slika 20. Strukturne formule ferocenskih peptidomimetika s antimikrobnom aktivnošću

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

#### 3.1.1. Kemikalije i otapala

Ferocenkarkoksilna kiselina, 1'-(*tert*-butoksikarbonilamino)-1-metoksikarbonilferocen i ferocenoctena kiselina pripravljeni su i donirani od strane Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Ostali korišteni reagensi komercijalno su dostupni i analitičke su čistoće: D-glutaminska kiselina (*Bachem*), tionil-klorid ( $\text{SOCl}_2$ , *Sigma-Aldrich*), Boc-L-valin (Boc-Val-OH, *Sigma-Aldrich*), HOBt (*Fluka*), natrijev hidroksid (NaOH, *Kemika*), *N,N*-diizopropiletilamin (DIPEA, *Sigma-Aldrich*), EDC·HCl (*Sigma-Aldrich*), trietilamin (TEA, *Sigma-Aldrich*), 4-dimetilaminopiridin (DMAP, *Sigma-Aldrich*), klorovodična kiselina (HCl, *Merck*), natrijev hidrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ , *Gram-mol*), natrijev sulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , *Gram-mol*), natrijev klorid (NaCl, *Kemika*), hidroksisukcinimidni ester Boc-L-valina (Boc-Val-OSu, *Sigma-Aldrich*), trifluorocetna kiselina (TFA, *Merck*), Boc-L-glicin (Boc-Gly-OH, *Sigma-Aldrich*).

Sva korištena otapala su komercijalno dostupna i prema potrebi sušena prema uobičajenim literaturnim postupcima: diklormetan (DCM, *Carlo Erba*), metanol (MeOH, *Gram-mol*), tetrahidrofuran (THF, *Sigma-Aldrich*), kloroform ( $\text{CHCl}_3$ , *Macron Fine Chemicals*), etil-acetat (EtOAc, *Fisher Chemical*), 1,4-dioksan (*Kemika*), etanol (EtOH, *J. T. Baker*).

#### 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 F<sub>254</sub>, 0,25 mm, *Fluka*). Detekcija spojeva na TLC pločicama provedena je ultraljubičastim zračenjem ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) te prskanjem otopinom ninhidrina uz zagrijavanje. Za kromatografska pročišćavanja na stupcu korišten je silikagel 60 veličine zrna 0,063-0,200 nm (*Sigma-Aldrich*).

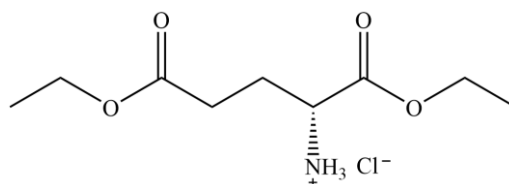
Identifikacija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva provedeni su pomoću spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i spektrometrije masa (MS). Spektri  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  DEPTQ NMR snimljeni su pomoću instrumenta Avance III HD (*Bruker*) pri 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) i pri 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) u deuteriranim otapalima (otapala su navedena u daljnjem tekstu eksperimentalnog dijela). Kemijski pomaci ( $\delta$ ) u  $^1\text{H}$  NMR spektrima izraženi su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS, 0 ppm) kao unutarnji standard, dok su  $^{13}\text{C}$  NMR spektri kalibrirani prema srednjem signalu otapala. Multipliciteti signala navedeni su kao: s-singlet, d-dublet, t-triplet, q-kvartet i m-multiplet. Maseni spektri (LC-MS/MS analize) pripremljenih spojeva snimljeni su pomoću uređaja *Agilent Technologies 1200 series HPLC* sustav uz elektroraspršenje kao način ionizacije. Interval tališta čvrstih tvari određen je pomoću uređaja *Büchi Melting Point B-540*. Optička skretanja su izmjerena na uređaju *Schmidt + Haensch Polartronic NH8* pri sobnoj temperaturi.

## 3.2. Priprava tripeptida

### 3.2.1. Sinteza (R)-dietil-2-aminopentandioat hidroklorida (**1**)

D-glutaminska kiselina (1 g, 6,8 mmol) stavljena je u okruglu tikvicu, dodan je magnetič i 10 mL (172 mmol) suhog etanola. Tikvica je uronjena u ledenu kupelj te je na vrh tikvice stavljena klor-kalcijeva cjevčica. Zatim je u ohlađenu smjesu dodan tionil-klorid (1,488 mL, 20,4 mmol) u četiri navrata, tj. po 372  $\mu\text{L}$  svakih 5 minuta uz miješanje. Smjesa je miješana uz magnetsku miješalicu na ledenoj kupelji još 45 minuta. Tikvica je izvađena iz ledene kupelji, ostavljena da se ugrije na sobnu temperaturu, a zatim je na tikvicu stavljeno povratno hladilo s klor-kalcijevom cjevčicom. Tikvica je uronjena u uljnu kupelj te zagrijavana na 85 °C uz miješanje i refluks 24 h. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala V ( $\text{CHCl}_3$ ) : V (MeOH) = 1 : 1 uz UV detekciju te detekciju ninhidrinom uz zagrijavanje. Nakon 24 h smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu, a zatim je dodano još tionil-klorida (496  $\mu\text{L}$ , 6,8 mmol) te je tikvica ponovno postavljena na zagrijavanje uz povratno hladilo s klor-kalcijevom cjevčicom na 85 °C uz miješanje i refluks još dodatnih 24 h. Smjesa je uparena na rotacijskom uparivaču uz koodestilaciju suhim EtOH (10 mL) čime je dobiveno gusto, žuto ulje. Hlađenjem na ledu dobiveno je 1,636 g spoja **1** (kvantitativan prinos, slika 21) u obliku blijedo žute krutine. Struktura spoja je potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom

masa. Spoj je u sirovom obliku korišten dalje u sintezi, a jedan manji dio je pročišćen za potrebe određivanja temperature tališta.



Slika 21. Strukturna formula spoja **1**

$R_f = 0,58$ ;  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 1 : 1$

$T_m = 111,5 - 113,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $T_m^{\text{lit.}} = 112 - 114 \text{ }^\circ\text{C}$ .<sup>50</sup>

$[\alpha]_D = -11,15^\circ$  ( $c = 0,565$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

**$^1\text{H}$  i DEPTQ NMR:** Dodatak D1

**$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 4,35-4,30 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -etil); 4,20-4,14 (m, 3H,  $\text{CH}_2$ -etil,  $\text{CH}\alpha$ -Glu); 2,68-2,54 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -Glu); 2,31-2,17 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -Glu); 1,35 (t, 3H,  $J = 7,1 \text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ -etil); 1,28 (t, 3H,  $J = 7,1 \text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ -etil).

**$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 172,22, 168,72 ( $2 \times \text{C}=\text{O}$ ); 62,42, 60,60 ( $2 \times \text{CH}_2$ -etil); 51,92 ( $\text{CH}\alpha$ -Glu); 29,15, 25,21 ( $2 \times \text{CH}_2$ -Glu); 13,18, 13,04 ( $2 \times \text{CH}_3$ -etil).

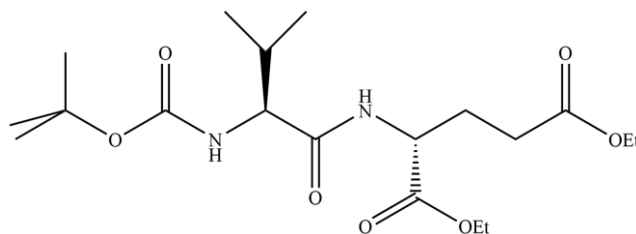
**ESI-MS:**  $m/z$  204,2 [ $\text{M}-\text{Cl}$ ]<sup>+</sup>

### 3.2.2. Sinteza dietil-N-(tert-butoksikarbonil)-L-valil-D-glutamata (**2**)

#### 3.2.2.a Priprava spoja **2** iz hidroksisukcinimidnog estera Boc-L-valina

U tikvicu sa spojem **1** (114,3 mg, 0,477 mmol) dodan je magneti c i 4 mL suhog diklormetana. Tikvica je uronjena u ledenu kupelj i u nju je dodan N-hidroksisukcinimidni ester Boc-L-valina (100 mg, 0,318 mmol), a zatim se uz miješanje u struji argona dodaje TEA (88,7  $\mu\text{L}$ , 0,636 mmol) u tri navrata, tj. po 29,6  $\mu\text{L}$  svakih 10 minuta. Dobivena smjesa je dalje miješana u atmosferi argona do otapanja leda, a zatim na sobnoj temperaturi 24 h. Nakon 24 h dodano je još trietilamina (22,2  $\mu\text{L}$ , 0,159 mmol) i 1 mL suhog DCM-a te je smjesa dalje miješana u atmosferi argona na sobnoj temperaturi dodatna 24 h. Dobivena je blijedo narančasta otopina. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 10 : 1$  uz UV detekciju te detekciju ninhidrinom uz zagrijavanje. Reakcijska smjesa je uparena do suha na rotacijskom uparivaču i pročišćena kromatografijom na stupcu silikagela uz sustav otapala  $V$

(CHCl<sub>3</sub>) : V (MeOH) = 10 : 1. Dobiven je (2*R*)-dietil-2-[(2*S*)-2-(*tert*-butoksikarbonilamino)-3-metilbutanoilamido]pentan-1,5-dioat **2** (101,8 mg, 80%, slika 22) u obliku blijedo žute krutine. Struktura spoja je potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 22. Strukturna formula spoja **2**

$R_f = 0,72$ ; V (CHCl<sub>3</sub>) : V (MeOH) = 10 : 1

$T_m = 56 - 58$  °C

$[\alpha]_D^{20} = -11,2^\circ$  ( $c = 0,33$ , CHCl<sub>3</sub>)

**<sup>1</sup>H i DEPTQ NMR:** Dodatak D2

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 6,73 (d, 1H,  $J = 7,6$  Hz, NH); 5,00 (brs, 1H, NH); 4,63-4,57 (m, 1H, CH $\alpha$ -Glu); 4,21 (q, 2H,  $J = 7,1$  Hz, CH<sub>2</sub>-etil); 4,15 (q, 2H,  $J = 7,1$  Hz, CH<sub>2</sub>-etil); 4,01 (brs, 1H, CH $\alpha$ -Val); 2,47-2,32 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Glu); 2,27-2,18 (m, 2H, 1 $\times$ CH<sub>2</sub>-Glu, CH-Val); 2,06-1,97 (m, 1H, 1 $\times$ CH<sub>2</sub>-Glu); 1,47 (s, 9H, 3 $\times$ CH<sub>3</sub>-Boc); 1,30 (t, 3H,  $J = 7,1$  Hz, CH<sub>3</sub>-etil); 1,27 (t, 3H,  $J = 7,1$  Hz, CH<sub>3</sub>-etil); 0,99 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz, CH<sub>3</sub>-Val); 0,92 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz, CH<sub>3</sub>-Val).

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 172,77, 171,62, 171,56 (3 $\times$ C=O); 155,82 (C=O, Boc); 80,03 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc); 61,69, 60,73 (2 $\times$ CH<sub>2</sub>-etil); 59,84 (CH $\alpha$ -Val); 51,68 (CH $\alpha$ -Glu); 30,62 (CH-Val); 30,23 (CH<sub>2</sub>-Glu); 28,28 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc); 27,21 (CH<sub>2</sub>-Glu); 19,35, 17,35 (2 $\times$ CH<sub>3</sub>-Val); 14,16, 14,12 (2 $\times$ CH<sub>3</sub>-etil).

**ESI-MS:**  $m/z$  403,0 [M+H]<sup>+</sup>

### 3.2.2.b Priprava spoja **2** EDC/HOBt metodom uz DIPEA-u i DMAP

U tikvicu sa spojem **1** (166,6 mg, 0,7 mmol) dodan je magnetiće, Boc-Val-OH (167,8 mg, 0,77 mmol) te 4 mL suhog diklormetana. Tikvica je uronjena u ledenu kupelj te je na vrh tikvice stavljena klor-kalcijeva cjevčica. U ohlađenu je smjesu dodana DIPEA (299  $\mu$ L, 1,75 mmol) te je smjesa miješana na ledu 15 min. Zatim su dodani EDC $\cdot$ HCl (147,6 mg, 0,77 mmol), HOBt (104 mg, 0,77 mmol) i DMAP (8,6 mg, 0,07 mmol). Smjesa je ostavljena na



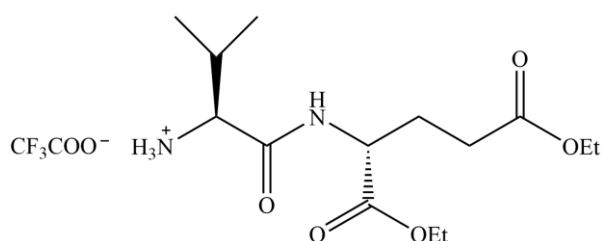
magnetskoj miješalici i ledenoj kupelji uz klor-kalcijevu cjevčicu sve dok se led ne otopi, a zatim je miješanje nastavljeno na sobnoj temperaturi 24 h čime je dobivena narančasta otopina. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 3 : 1$  uz UV detekciju te detekciju ninhidrinom uz zagrijavanje. Nakon 24 h reakcijska je smjesa prebačena u lijevak za odjeljivanje u kojem se nalazilo 4 mL DCM-a te je ekstrahirana s  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl (30 mL), zasićenom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata (30 mL) te destiliranom vodom (30 mL). Organski sloj je sušen na bezvodnom  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , uparen do suha na rotacijskom uparivaču i pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz sustav otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 10 : 1$ . Dobiven je spoj **2** (132,8 mg, 47%, slika 22) u obliku blijedo žute krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa. Spektralni podaci u skladu su sa podacima produkta dobivenog metodom a.

### 3.2.2.c Priprava spoja **2** EDC/HOBt metodom uz TEA kao bazu

U tikvicu sa spojem **1** (100,8 mg, 0,42 mmol) dodan je magnetič, Boc-Val-OH (100,4 mg, 0,462 mmol) te 4 mL suhog diklormetana. Tikvica je uronjena u ledenu kupelj te je na vrh tikvice stavljena klor-kalcijeva cjevčica i smjesa je miješana dok se ne ohladi. U ohlađenu smjesu dodan je TEA (146,4  $\mu\text{L}$ , 1,05 mmol) te je smjesa dalje miješana na ledu 15 min. Zatim su dodani EDC·HCl (88,6 mg, 0,462 mmol) i HOBt (62,4 mg, 0,462 mmol). Smjesa je ostavljena na magnetskoj miješalici i ledenoj kupelji uz klor-kalcijevu cjevčicu sve dok se led ne otopi, a zatim na sobnoj temperaturi 48 h čime je dobivena blijedo narančasta otopina. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 10 : 1$  uz UV detekciju te detekciju ninhidrinom uz zagrijavanje. Dobivena reakcijska smjesa je prebačena u lijevak za odjeljivanje u kojem se nalazi 5 mL DCM-a te je ekstrahirana s  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl (30 mL), zasićenom otopinom  $\text{NaHCO}_3$  (30 mL) te zasićenom otopinom NaCl (30 mL). Organski sloj je sušen na bezvodnom  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , uparen do suha na rotacijskom uparivaču i pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz sustav otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 10 : 1$ . Dobiven je spoj **2** (104,8 mg, 62%, slika 22) u obliku blijedo žute krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa. Spektralni podaci u skladu su sa podacima produkta dobivenog metodom a.

## 3.2.3. Uklanjanje Boc-zaštitne skupine sa spoja 2

U tikvicu koja sadrži spoj **2** (101,2 mg, 0,25 mmol) stavljen je magnetič i tikvica je uronjena u ledenu kupelj. U zasebnoj bočici su pomiješane trifluoroctena kiselina (166,7  $\mu$ L) i suhi DCM (833,5  $\mu$ L), tj. u omjeru  $V$  (TFA) :  $V$  (suhi DCM) = 1 : 5, te je dobivena otopina ohlađena na ledu. Ohlađena otopina je brzo prebačena u reakcijsku tikvicu sa spojem **2**, a na vrh tikvice je stavljena klor-kalcijeva cjevčica. Dobivena reakcijska smjesa je miješana dok se led u kupelji ne otopi, odnosno približno sat vremena, a zatim još tri i pol sata na sobnoj temperaturi. Dobivena je bezbojna otopina. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala  $V$  ( $\text{CHCl}_3$ ) :  $V$  (MeOH) = 10 : 1 uz UV detekciju te detekciju ninhidrinom uz zagrijavanje. Reakcijska smjesa je uparena do suha na rotacijskom uparivaču i pročišćena kromatografijom na kratkom stupcu silikagela u sustavu otapala  $V$  ( $\text{CHCl}_3$ ) :  $V$  (MeOH) = 10 : 1. Dobiven je (1*S*)-[*N*-(1*R*)-1,3-dietoksikarbonilpropilkarbamoi]-2-metilpropilamonijev trifluoroacetat (**3**, 79,2 mg, 76%, slika 23) u obliku gustog bezbojnog ulja čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Slika 23. Strukturna formula spoja **3**

$R_f = 0,34$ ;  $V$  ( $\text{CHCl}_3$ ) :  $V$  (MeOH) = 10 : 1

$[\alpha]_D = + 36,6^\circ$  ( $c = 0,41$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )

$^1\text{H}$  i DEPTQ NMR: Dodatak D3

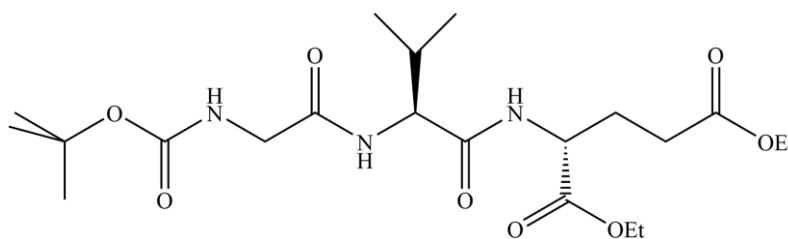
$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ /ppm: 4,48 (dd, 1H,  $J_1 = 9,2$  Hz,  $J_2 = 5,3$  Hz,  $\text{CH}\alpha$ -Glu); 4,22 (q, 2H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ -etil); 4,15 (q, 2H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ -etil); 3,78 (d, 1H,  $J = 5,5$  Hz,  $\text{CH}\alpha$ -Val); 2,46 (appt, 2H,  $J_1 = 7,9$  Hz,  $J_2 = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_2$ -Glu); 2,28-2,19 (m, 2H,  $1 \times \text{CH}_2$ -Glu,  $\text{CH}$ -Val); 2,06-1,96 (m, 1H,  $1 \times \text{CH}_2$ -Glu); 1,32-1,24 (m, 6H,  $2 \times \text{CH}_3$ -etil); 1,10 (d, 3H,  $J = 6,9$  Hz,  $\text{CH}_3$ -Val); 1,07 (d, 3H,  $J = 6,9$  Hz,  $\text{CH}_3$ -Val).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 172,59, 171,45, 168,46 ( $3\times\text{C}=\text{O}$ ); 162,01, 161,67, 161,32, 160,98 ( $\text{CF}_3\text{COO}^-$ ); 61,34, 60,38 ( $2\times\text{CH}_2\text{-etil}$ ); 58,30 ( $\text{CH}\alpha\text{-Val}$ ); 51,87 ( $\text{CH}\alpha\text{-Glu}$ ); 30,15 ( $\text{CH-Val}$ ); 29,84 ( $\text{CH}_2\text{-Glu}$ ); 26,08 ( $\text{CH}_2\text{-Glu}$ ); 17,50, 16,42 ( $2\times\text{CH}_3\text{-Val}$ ); 13,12, 13,05 ( $2\times\text{CH}_3\text{-etil}$ ).

**ESI-MS:**  $m/z$  303,2 [ $\text{M-CF}_3\text{COO}^-$ ] $^+$ ;  $m/z$  113,1 [ $\text{CF}_3\text{COO}^-$ ]

#### 3.2.4. Sinteza Boc-zaštićenog tripeptida (4) EDC/HOBt metodom

U tikvicu sa spojem **3** (79,2 mg, 0,19 mmol) dodan je magnetić, Boc-Gly-OH (36,6 mg, 0,209 mmol) te 4 mL suhog diklormetana. Tikvica je uronjena u ledenu kupelj te je na vrh tikvice stavljena klor-kalcijeva cjevčica i smjesa je miješana dok se ne ohladi. Nakon što se smjesa ohladila dodan je TEA (66,3  $\mu\text{L}$ , 0,475 mmol) te je smjesa dalje miješana na ledu 15 min. Zatim su dodani EDC·HCl (40,1 mg, 0,209 mmol) i HOBt (28,2 mg, 0,209 mmol). Smjesa je ostavljena na magnetskoj miješalici i ledenoj kupelji uz klor-kalcijevu cjevčicu sve dok se led ne otopi, a zatim se miješanje nastavlja na sobnoj temperaturi 24 h čime je dobivena bezbojna otopina. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 10 : 1$  uz UV detekciju te detekciju ninhidrinom uz zagrijavanje. Dobivena reakcijska smjesa je prebačena u lijevak za odjeljivanje u kojem se nalazi 10 mL DCM-a te je ekstrahirana s 1 mol  $\text{dm}^{-3}$  HCl (30 mL), zasićenom otopinom  $\text{NaHCO}_3$  (30 mL) te zasićenom otopinom NaCl (30 mL). Organski sloj je sušen na bezvodnom  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , uparen do suha na rotacijskom uparivaču i pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz sustav otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 10 : 1$ . Dobiven je (2*R*)-dietil-{(2*S*)-[(*tert*-butoksikarbonilaminoetanoilamido)-3-metilbutanoilamido]}pentan-1,5-dioat **4** (73 mg, 84%, slika 24) u obliku bijele krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 24. Strukturna formula spoja **4**

$R_f = 0,58$ ;  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 10 : 1$

$\mathcal{D}_t = 76,5 - 79 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\mathcal{D}_t^{\text{lit.}} = 75 - 78 \text{ }^\circ\text{C}$ .<sup>25</sup>

$[\alpha]_D = -15,2^\circ$  ( $c = 0,645$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

**$^1\text{H}$  i DEPTQ NMR:** Dodatak D4

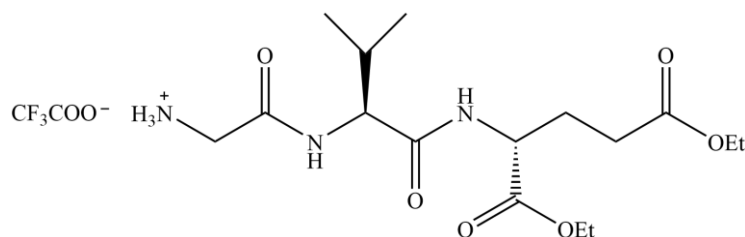
**$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 7,06 (d, 1H,  $J = 7,3$  Hz, NH); 6,66 (d, 1H,  $J = 8,7$  Hz, NH-Val); 5,29 (brs, 1H, NH); 4,56-4,51 (m, 1H,  $\text{CH}\alpha$ -Glu); 4,39 (dd, 1H,  $J_1 = 8,7$  Hz,  $J_2 = 5,4$  Hz,  $\text{CH}\alpha$ -Val); 4,23-4,13 (m, 4H,  $2\times\text{CH}_2$ -etil); 3,90 (dd, 1H,  $J_1 = 16,9$  Hz,  $J_2 = 6,1$  Hz, CH-Gly); 3,84-3,79 (m, 1H, CH-Gly); 2,49-2,36 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -Glu); 2,33-2,16 (m, 2H,  $1\times\text{CH}_2$ -Glu, CH-Val); 2,10-2,01 (m, 1H,  $1\times\text{CH}_2$ -Glu); 1,48 (s, 9H,  $3\times\text{CH}_3$ -Boc); 1,31-1,26 (m, 6H,  $2\times\text{CH}_3$ -etil); 0,99 (d, 3H,  $J = 6,9$  Hz,  $\text{CH}_3$ -Val); 0,95 (d, 3H,  $J = 6,9$  Hz,  $\text{CH}_3$ -Val).

**$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 173,22, 171,48, 171,01, 169,74 ( $4\times\text{C}=\text{O}$ ); 158,59 ( $\text{C}=\text{O}$ , Boc); 80,62 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ -Boc); 61,60, 60,86 ( $2\times\text{CH}_2$ -etil); 58,09 ( $\text{CH}\alpha$ -Val); 52,09 ( $\text{CH}\alpha$ -Glu); 44,71 ( $\text{CH}_2$ -Gly); 30,43 ( $\text{CH}_2$ -Glu); 28,27 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ -Boc, CH-Val); 26,60 ( $\text{CH}_2$ -Glu); 19,34 ( $\text{CH}_3$ -Val); 17,27 ( $\text{CH}_3$ -Val); 14,13 ( $2\times\text{CH}_3$ -etil).

**ESI-MS:**  $m/z$  460,4  $[\text{M}+\text{H}]^+$

### 3.2.5. Uklanjanje Boc-zaštitne skupine sa spoja 4

U tikvicu koja sadrži spoj **4** (81 mg, 0,176 mmol) stavljen je magnetič i tikvica je uronjena u ledenu kupelj. U zasebnoj bočici su pomiješane trifluoroctena kiselina (117,5  $\mu\text{L}$ ) i suhi DCM (587,5  $\mu\text{L}$ ), tj. u omjeru  $V(\text{TFA}) : V(\text{suhi DCM}) = 1 : 5$ , te je dobivena otopina ohlađena na ledu. Ohlađena otopina je brzo prebačena u reakcijsku tikvicu sa spojem **4**, a na vrh tikvice je stavljena klor-kalcijeva cjevčica. Dobivena reakcijska smjesa je miješana dok se led u kupelji ne otopi, odnosno približno sat vremena, a zatim još tri i pol sata na sobnoj temperaturi. Dobivena je bezbojna otopina. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 10 : 1$  uz UV detekciju te detekciju ninhidrinom uz zagrijavanje. Reakcijska smjesa je uparena do suha na rotacijskom uparivaču i pročišćena kromatografijom na kratkom stupcu silikagela uz sustav otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$ . Dobiven je *N*-[(2*S*)-1-(*N*-(1*R*)-1,3-dietoksikarbonilpropilkarbamoil)-3-metil butilkarbamoil]metilamonijev trifluoroacetat **5** (76,6 mg, 92%, slika 25) u obliku gustog bezbojnog ulja. Struktura spoja je potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Slika 25. Strukturna formula spoja **5**

$R_f = 0,18$ ;  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 5 : 1$

$[\alpha]_D = -1,7^\circ$  ( $c = 0,60$ , MeOH)

$^1\text{H}$  i DEPTQ NMR: Dodatak D5

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 4,42 (dd, 1H,  $J_1 = 9,3$  Hz,  $J_2 = 5,2$  Hz,  $\text{CH}\alpha\text{-Glu}$ ); 4,34 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz,  $\text{CH}\alpha\text{-Val}$ ); 4,21-4,12 (m, 4H,  $2\times\text{CH}_2\text{-etil}$ ); 3,78 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Gly}$ ); 2,44 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-Glu}$ ); 2,24-2,10 (m, 2H,  $1\times\text{CH}_2\text{-Glu}$ ,  $\text{CH-Val}$ ); 2,03-1,94 (m, 1H,  $1\times\text{CH}_2\text{-Glu}$ ); 1,30-1,25 (m, 6H,  $2\times\text{CH}_3\text{-etil}$ ); 1,02-0,98 (m, 6H,  $2\times\text{CH}_3\text{-Val}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 172,93, 172,14, 171,51, 166,33 ( $4\times\text{C=O}$ ); 61,09, 60,38 ( $2\times\text{CH}_2\text{-etil}$ ); 58,77 ( $\text{CH}\alpha\text{-Val}$ ); 51,78 ( $\text{CH}\alpha\text{-Glu}$ ); 40,20 ( $\text{CH}_2\text{-Gly}$ ); 30,71 ( $\text{CH-Val}$ ); 29,88 ( $\text{CH}_2\text{-Glu}$ ); 25,94 ( $\text{CH}_2\text{-Glu}$ ); 18,33 ( $\text{CH}_3\text{-Val}$ ); 16,83 ( $\text{CH}_3\text{-Val}$ ); 13,09, 13,05 ( $2\times\text{CH}_3\text{-etil}$ ).

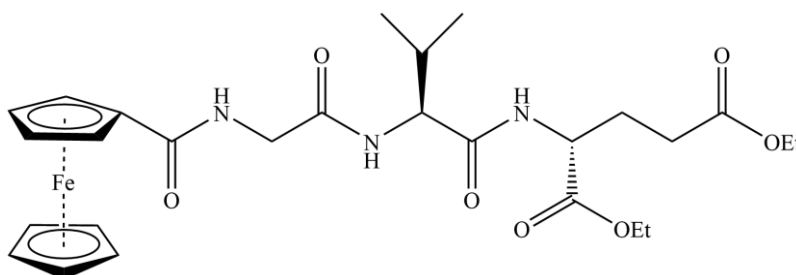
ESI-MS:  $m/z$  360,2 [ $\text{M-CF}_3\text{COO}^-$ ] $^+$ ;  $m/z$  113,1 [ $\text{CF}_3\text{COO}^-$ ]

### 3.3. Kondenzacija derivata ferocena i pripremljenog tripeptida **5**

#### 3.3.1. Sinteza tripeptidnog derivata ferocenkarboksilne kiseline (**6**)

U tikvicu sa spojem **5** (50,7 mg, 0,107 mmol) dodan je magneti , 4 mL suhog diklormetana i 0,5 mL suhog THF te je smjesa miješana dok se tripeptid ne otopi. Zatim je u tikvicu dodana ferocenkarboksilna kiselina (27,1 mg, 0,118 mmol), na vrh tikvice stavljena je klor-kalcijeva cjevčica, tikvica je uronjena u ledenu kupelj i smjesa je miješana dok se ne ohladi. U ohlađenu smjesu dodan je TEA (37,3  $\mu\text{L}$ , 0,268 mmol) te je smjesa dalje miješana na ledu 15 min. Zatim su dodani EDC $\cdot\text{HCl}$  (22,6 mg, 0,118 mmol) i HOBt (15,9 mg, 0,118 mmol)  ime je dobivena Źuta otopina. Smjesa je ostavljena na magnetskoj miješalici i ledenoj kupelji uz klor-kalcijevu cjevčicu sve dok se led ne otopi, a zatim na sobnoj temperaturi 48 h čime je dobivena narančasta otopina. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 10 : 1$  uz UV detekciju te detekciju ninhidrinom uz zagrijavanje. Dobivena

reakcijska smjesa je prebačena u lijevak za odjeljivanje u kojem se nalazi 10 mL DCM-a te je ekstrahirana s 1 mol dm<sup>-3</sup> HCl (30 mL), zasićenom otopinom NaHCO<sub>3</sub> (30 mL) te zasićenom otopinom NaCl (30 mL). Organski sloj je sušen na bezvodnom Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, uparen do suha na rotacijskom uparivaču i pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz sustav otapala V (EtOAc) : V (DCM) = 5 : 1. Dobiven je (2*R*)-dietil-{(2*S*)-[(ferocenoilamido)etanoilamido]-3-metilbutanoilamido}pentan-1,5-dioat **6** (35,2 mg, 58%, slika 26) u obliku narančaste krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Slika 26. Strukturna formula spoja **6**

$R_f = 0,55$ ; V (CHCl<sub>3</sub>) : V (MeOH) = 10 : 1

$T_m = 141,5 - 144$  °C

$[\alpha]_D^{20} = -19,4^\circ$  ( $c = 0,475$ , CHCl<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H i DEPTQ NMR: Dodatak D6

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 7,25 (d, 1H,  $J = 7,5$  Hz, NH); 7,11 (d, 1H,  $J = 8,7$  Hz, NH-Val); 6,88 (t, 1H,  $J = 5,2$  Hz, NH); 4,77 (s, 2H, 2×CH-Fc); 4,60-4,54 (m, 1H, CH $\alpha$ -Glu); 4,46 (dd, 1H,  $J_1 = 8,9$  Hz,  $J_2 = 5,9$  Hz, CH $\alpha$ -Val); 4,38 (s, 2H, 2×CH-Fc); 4,24 (s, 5H, 5×CH-Fc); 4,20-4,11 (m, 6H, 2×CH<sub>2</sub>-etil, CH<sub>2</sub>-Gly); 2,49-2,35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Glu); 2,30-2,18 (m, 2H, 1×CH<sub>2</sub>-Glu, CH-Val); 2,10-2,00 (m, 1H, 1×CH<sub>2</sub>-Glu); 1,29-1,24 (m, 6H, 2×CH<sub>3</sub>-etil); 1,00 (d, 3H,  $J = 6,9$  Hz, CH<sub>3</sub>-Val); 0,98 (d, 3H,  $J = 6,9$  Hz, CH<sub>3</sub>-Val).

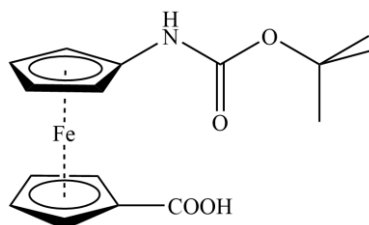
<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 172,93, 171,62, 171,52, 171,12, 169,85 (5×C=O); 75,03 (C-Fc); 70,74, 69,87, 68,43, 68,40 (CH-Fc); 61,61, 60,78 (2×CH<sub>2</sub>-etil); 58,53 (CH $\alpha$ -Val); 51,97 (CH $\alpha$ -Glu); 43,73 (CH<sub>2</sub>-Gly); 30,78 (CH-Val); 30,44 (CH<sub>2</sub>-Glu); 26,84 (CH<sub>2</sub>-Glu); 19,39 (CH<sub>3</sub>-Val); 17,75 (CH<sub>3</sub>-Val); 14,16, 14,13 (2×CH<sub>3</sub>-etil).

ESI-MS:  $m/z$  594,4 [M+Na]<sup>+</sup>

### 3.3.2. Sinteza tripeptidnog derivata 1'-(tert-butoksikarbonilamino)ferocen-1-karboksilne kiseline (8)

#### 3.3.2.a Priprava 1'-(tert-butoksikarbonilamino)ferocen-1-karboksilne kiseline (7)

U tikvicu s 1'-(tert-butoksikarbonilamino)-1-metoksikarbonilferocenom (100 mg, 0,279 mmol) stavljen je magnetič, dodan je dioksan (2,38 mL, 27,9 mmol) i 1 mol dm<sup>-3</sup> NaOH (2,79 mL, 2,79 mmol) te je smjesa miješana na magnetskoj miješalici 48 h pri sobnoj temperaturi. Dobivena je tamno narančasta otopina. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala V (DCM) : V (EtOAc) = 5 : 1 uz UV detekciju te detekciju ninhidrinom uz zagrijavanje. Nakon 48 h reakcijska smjesa se zakiseli s 1 mol dm<sup>-3</sup> otopinom HCl do pH = 3. Dobivena otopina je prebačena u lijevak za odjeljivanje te je ekstrahirana dva puta s diklormetanom (10 mL). Organski sloj je sušen na bezvodnom Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, uparen do suha na rotacijskom uparivaču i pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela gradijentnom eluacijom u sustavima otapala V (DCM) : V (EtOAc) = 5 : 1; V (DCM) : V (EtOAc) = 2,5 : 1 i metanol. Dobiven je spoj **7** (42,1 mg, 44%, slika 27) u obliku narančaste krutine. Struktura spoja je potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 27. Strukturna formula spoja **7**

$R_f = 0,06$ ; V (DCM) : V (EtOAc) = 5 : 1

**<sup>1</sup>H i DEPTQ NMR:** Dodatak D7

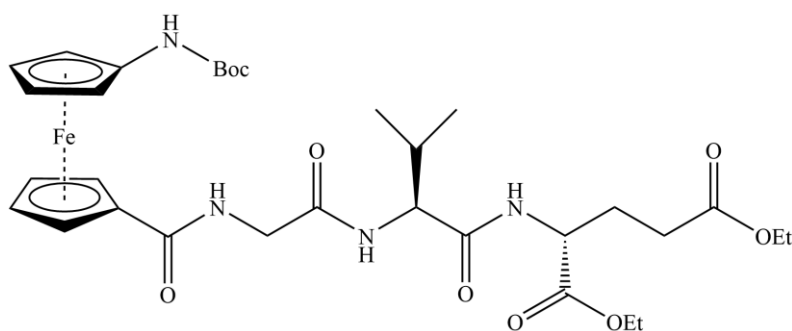
**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 8,55 (brs, 1H, NH); 4,96 (s, 2H, 2×CH-Fc); 4,58 (s, 2H, 2×CH-Fc); 4,42 (s, 2H, 2×CH-Fc); 3,97 (s, 2H, 2×CH-Fc); 1,67 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>-Boc).

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 175,66 (C=O, kiselina), 155,51 (C=O, Boc); 98,59 (C-N, Fc); 82,11 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc); 73,07 (C-C=O, Fc); 71,49, 71,28, 65,26, 60,48 (CH-Fc); 28,43 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc).

**ESI-MS:**  $m/z$  344,5 [M]<sup>-</sup>

### 3.3.2.b Priprava tripeptidnog derivata 1'-(tert-butoksikarbonilamino)ferocen-1-karboksilne kiseline (**8**)

U tikvicu sa spojem **5** (50 mg, 0,106 mmol) dodan je magnetić, 4 mL suhog diklormetana i 0,5 mL suhog THF te je smjesa miješana dok se tripeptid ne otopi. Zatim je u tikvicu dodan spoj **7** (40,1 mg, 0,116 mmol), na vrh tikvice stavljena je klor-kalcijeva cjevčica. Tikvica je uronjena u ledenu kupelj i smjesa je miješana dok se ne ohladi. U ohlađenu smjesu dodan je TEA (36,8  $\mu$ L, 0,264 mmol) te je smjesa dalje miješana na ledu 15 min. Zatim su dodani EDC·HCl (22,3 mg, 0,116 mmol) i HOBt (15,7 mg, 0,116 mmol) čime je dobivena žuta otopina. Smjesa je ostavljena na magnetskoj miješalici i ledenoj kupelji uz klor-kalcijevu cjevčicu sve dok se led ne otopi, a zatim na sobnoj temperaturi 48 h čime je dobivena smeđa otopina. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 10 : 1$  uz UV detekciju te detekciju ninhidrinom uz zagrijavanje. Dobivena je reakcijska smjesa prebačena u lijevak za odjeljivanje u kojem se nalazi 10 mL DCM-a te je ekstrahirana s 1 mol  $\text{dm}^{-3}$  HCl (30 mL), zasićenom otopinom  $\text{NaHCO}_3$  (30 mL) te zasićenom otopinom NaCl (30 mL). Organski sloj je sušen na bezvodnom  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , uparen do suha na rotacijskom uparivaču i pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz sustav otapala  $V(\text{EtOAc}) : V(\text{DCM}) = 5 : 1$ . Dobiven je spoj (2*R*)-dietil-{(2*S*)-[(1'-*tert*-butoksikarbonilaminoferocenoilamido)etanoilamido]-3-metilbutanoilamido}pentan-1,5-dioat **8** (45,1 mg, 62%, slika 28) u obliku narančaste krutine čija je struktura potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 28. Strukturna formula spoja **8**

$R_f = 0,60$ ;  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 10 : 1$

$T_m = 49,5 - 52$  °C

$[\alpha]_D = -63,3^\circ$  ( $c = 0,332$ ,  $\text{CHCl}_3$ )



**<sup>1</sup>H i DEPTQ NMR:** Dodatak D8

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 7,20 (brs, 1H, NH); 6,98 (brs, 3H, 3×NH); 4,69-4,61 (m, 3H, 2×CH-Fc, CH $\alpha$ -Glu); 4,49-4,43 (m, 3H, 2×CH-Fc, CH $\alpha$ -Val); 4,39 (s, 2H, 2×CH-Fc); 4,22-4,09 (m, 6H, 2×CH<sub>2</sub>-etil, CH<sub>2</sub>-Gly); 4,02 (s, 2H, 2×CH-Fc); 2,48-2,36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Glu); 2,28-2,20 (m, 2H, 1×CH<sub>2</sub>-Glu, CH-Val); 2,13-2,04 (m, 1H, 1×CH<sub>2</sub>-Glu); 1,53 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>-Boc); 1,30-1,24 (m, 6H, 2×CH<sub>3</sub>-etil); 1,01 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz, CH<sub>3</sub>-Val); 0,98 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz, CH<sub>3</sub>-Val).

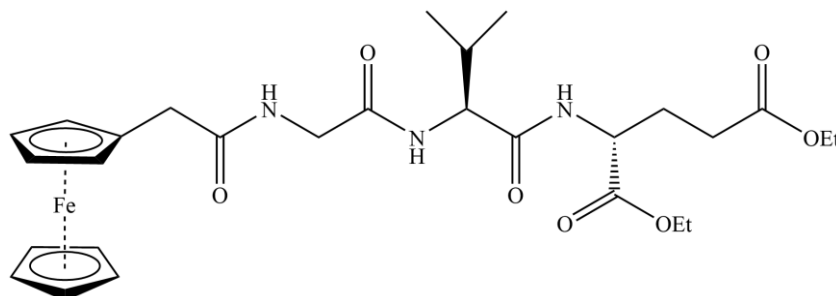
**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 172,90, 171,76, 171,13, 170,22 (C=O); 97,59 (C-N, Fc); 71,22, 69,78, 69,34, 65,53, 65,40, 62,15 (CH-Fc); 61,67, 60,76 (2×CH<sub>2</sub>-etil); 60,41 (C-C=O, Fc); 58,45 (CH $\alpha$ -Val); 51,96 (CH $\alpha$ -Glu); 43,98 (CH<sub>2</sub>-Gly); 30,64 (CH-Val); 30,43 (CH<sub>2</sub>-Glu); 28,38 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc); 26,90 (CH<sub>2</sub>-Glu); 19,40 (CH<sub>3</sub>-Val); 17,68 (CH<sub>3</sub>-Val); 14,16, 14,14 (2×CH<sub>3</sub>-etil).

**ESI-MS:**  $m/z$  687,5 [M+H]<sup>+</sup>

### 3.3.3. Sinteza peptidnog derivata ferocenoctene kiseline (9)

U tikvicu sa spojem **5** (26,5 mg, 0,056 mmol) dodan je magneti c, 4 mL suhog diklormetana i 0,5 mL suhog THF te je smjesa miješana dok se tripeptid ne otopi. Zatim je u tikvicu dodana ferocenoctena kiselina (15 mg, 0,062 mmol), tikvica je uronjena u ledenu kupelj i smjesa je miješana dok se ne ohladi uz struju argona. U ohlađenu smjesu dodan je TEA (19,4  $\mu$ L, 0,140 mmol) te je smjesa dalje miješana na ledu 15 min. Zatim su dodani EDC·HCl (11,8 mg, 0,062 mmol) i HOBt (8,3 mg, 0,062 mmol)  ime je dobivena žuta otopina. Dobivena smjesa je miješana u atmosferi argona do otapanja leda, a zatim na sobnoj temperaturi 24 h. U smjesu je dodano još 0,75 ekvivalenta TEA (5,8  $\mu$ L, 0,042 mmol), 0,5 ekvivalenta EDC·HCl (5,4 mg, 0,028 mmol) i HOBt (3,8 mg, 0,028 mmol) istim redoslijedom i na isti način kako je prethodno opisano. Reakcijska smjesa je nakon toga miješana dodatna 24 h čime je dobivena tamnosmeđa otopina. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala  $V$  (CHCl<sub>3</sub>) :  $V$  (MeOH) = 10 : 1 uz UV detekciju te detekciju ninhidrinom uz zagrijavanje. Dobivena reakcijska smjesa je prebačena u lijevak za odjeljivanje u kojem se nalazi 10 mL DCM-a te je ekstrahirana s 0,33 mol dm<sup>-3</sup> HCl (15 mL), zasićenom otopinom NaHCO<sub>3</sub> (15 mL) te zasićenom otopinom NaCl (15 mL). Organski sloj je sušen na bezvodnom Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, uparen do suha na rotacijskom uparivaču i pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz sustav otapala  $V$  (CHCl<sub>3</sub>) :  $V$  (MeOH) = 10 : 1. Dobiven je (2*R*)-dietil-{(2*S*)-

[(feroceniletanoilamido)etanoilamido]-3-metilbutanoilamido}pentan-1,5-dioat **9** (17 mg, 52%, slika 29) u obliku gustog žutog ulja. Struktura spoja je potvrđena spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.



Slika 29. Strukturna formula spoja **9**

$R_f = 0,70$ ;  $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{MeOH}) = 10 : 1$

$[\alpha]_D = -10,1^\circ$  ( $c = 0,44$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

**$^1\text{H}$  i DEPTQ NMR:** Dodatak D9

**$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 6,98 (d, 1H,  $J = 7,4$  Hz, NH); 6,61 (d, 1H,  $J = 8,7$  Hz, NH-Val); 6,43 (t, 1H,  $J = 5,1$  Hz, NH); 4,56-4,51 (m, 1H,  $\text{CH}\alpha$ -Glu); 4,34 (dd, 1H,  $J_1 = 8,7$  Hz,  $J_2 = 5,4$  Hz,  $\text{CH}\alpha$ -Val); 4,24-4,11 (m, 13H,  $7 \times \text{CH-Fc}$ ,  $2 \times \text{CH}_2$ -etil,  $\text{CH}_2$ -Gly); 3,91 (d, 2H,  $J = 5,4$  Hz,  $2 \times \text{CH-Fc}$ ); 3,41 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,48-2,33 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -Glu); 2,30-2,16 (m, 2H,  $1 \times \text{CH}_2$ -Glu, CH-Val); 2,08-1,99 (m, 1H,  $1 \times \text{CH}_2$ -Glu); 1,32-1,26 (m, 6H,  $2 \times \text{CH}_3$ -etil); 0,95 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{CH}_3$ -Val); 0,91 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{CH}_3$ -Val).

**$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 173,09, 171,98, 171,56, 170,83, 169,11 ( $5 \times \text{C=O}$ ); 80,40 (C-Fc); 69,14, 68,94, 68,69 (CH-Fc); 61,65, 60,82 ( $2 \times \text{CH}_2$ -etil); 58,25 ( $\text{CH}\alpha$ -Val); 52,02 ( $\text{CH}\alpha$ -Glu); 43,63 ( $\text{CH}_2$ -Gly); 37,62 ( $\text{CH}_2$ ); 30,44 (CH-Val); 30,41 ( $\text{CH}_2$ -Glu); 26,73 ( $\text{CH}_2$ -Glu); 19,32 ( $\text{CH}_3$ -Val); 17,42 ( $\text{CH}_3$ -Val); 14,15 ( $2 \times \text{CH}_3$ -etil).

**ESI-MS:**  $m/z$  586,3 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

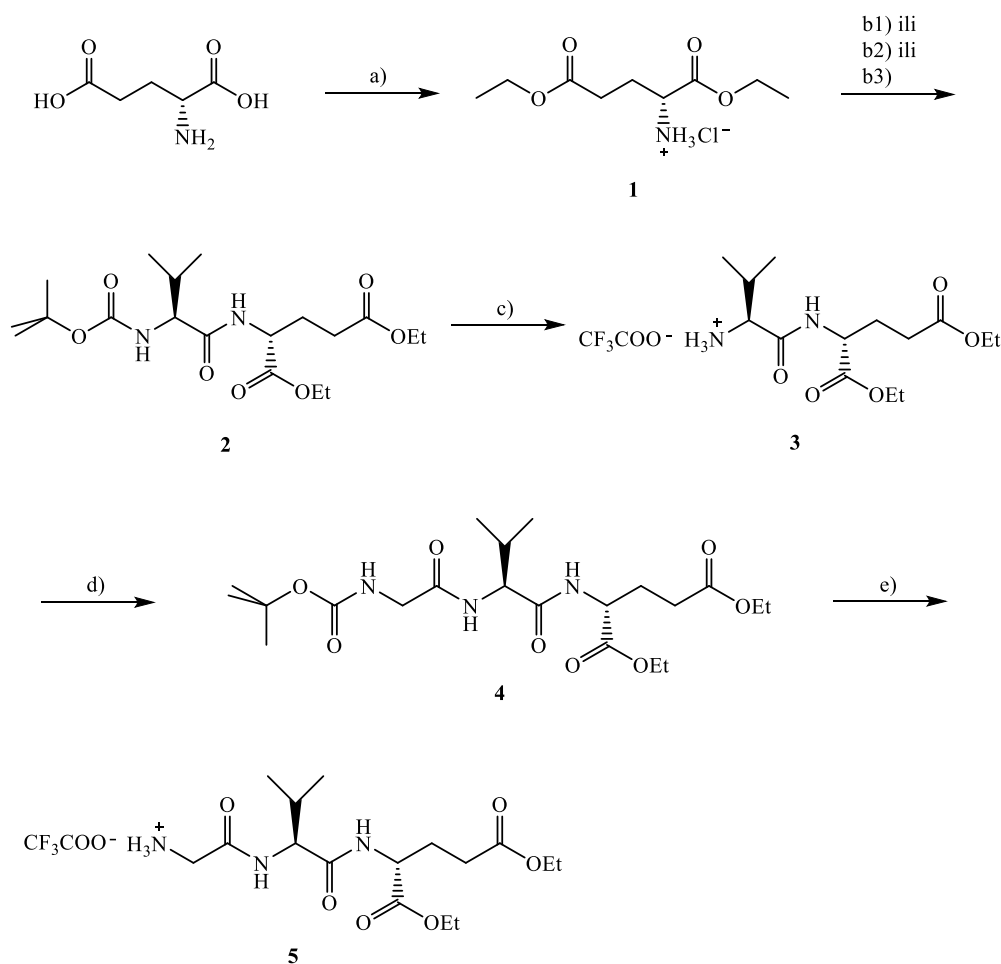
### 4.1. Uvod

Cjepivo se koristi za sigurno poticanje imunološkog odgovora te osigurava zaštitu protiv infekcije ili bolesti pri naknadnom izlaganju patogenu.<sup>1</sup> Cjepiva se proizvode na temelju dobro okarakteriziranih antigena, no često je imunološki odgovor cjepiva slab te se stoga cjepivima dodaju adjuvanti ili imunostimulatori. Adjuvanti su tvari koje ubrzavaju, produljuju ili pojačavaju specifičnu imunoreakciju na određeni antigen te tako omogućuju bolju obranu organizma protiv patogena.<sup>2,3</sup> Adjuvanti imaju i druge prednosti kao što je smanjenje količine antigena po dozi cjepiva i smanjenje broja cijepljenja, a u određenim slučajevima povećavaju stabilnost antigenske komponente produžujući njezin poluzivot i sl.<sup>9</sup> Imunostimulacijsku aktivnost pokazuje mnoštvo različitih spojeva, a među njima su i derivati desmuramil-peptida.<sup>3</sup>

U nedavnom su istraživanju tripeptidni derivati sastavljeni od D-glutaminske kiseline, L-valina i glicina s lipofilnim aromatskim i cikloalkilnim supstituentima vezanim na N-kraj glicina pokazali izniman NOD2 agonistički učinak.<sup>16</sup> Inspirirani time, u sklopu ovog diplomskog rada pripremljena su tri različita tripeptidna derivata ferocena **6**, **8** i **9**. Za potrebe njihove sinteze najprije je pripremljen odgovarajući prekursor trifluoroacetatne soli tripeptida **5** (TFA-tripeptid **5**, slika 30) koji je zatim kondenziran s tri ferocenske jedinice u konačne tripeptidne derivate **6**, **8** i **9** (slika 31). Svrha pripreme navedenih spojeva jest određivanje njihovog NOD2 agonističkog učinka u okviru šire studije odnosa strukture i aktivnosti (SAR).

Kao polazni spoj za sintezu TFA-tripeptida **5** poslužila je komercijalno dostupna D-glutaminska kiselina (slika 30). Esterifikacijom D-glutaminske kiseline uz tionil-klorid i suhi etanol pripremljen je dietilni ester D-glutaminske kiseline **1**. Dobiveni ester poslužio je za kondenzaciju s Boc-zaštićenim L-valinom u svrhu pripreme Boc-zaštićenog dipeptida **2** na tri načina: b1) EDC/HOBt metodom uz DIPEA-u i DMAP te Boc-zaštićeni L-valin, b2) EDC/HOBt metodom uz TEA te Boc-zaštićeni L-valin i b3) uz *N*-hidroksisukcinimidni ester Boc-zaštićenog L-valina i TEA kao bazu. Pripremljenom Boc-zaštićenom dipeptidu potrebno je s N-kraja ukloniti Boc-zaštitnu skupinu uz trifluoroctenu kiselinu pri čemu nastaje TFA-dipeptid **3**. Kondenzacijskom EDC/HOBt metodom uz TEA iz spoja **3** i Boc-zaštićenog

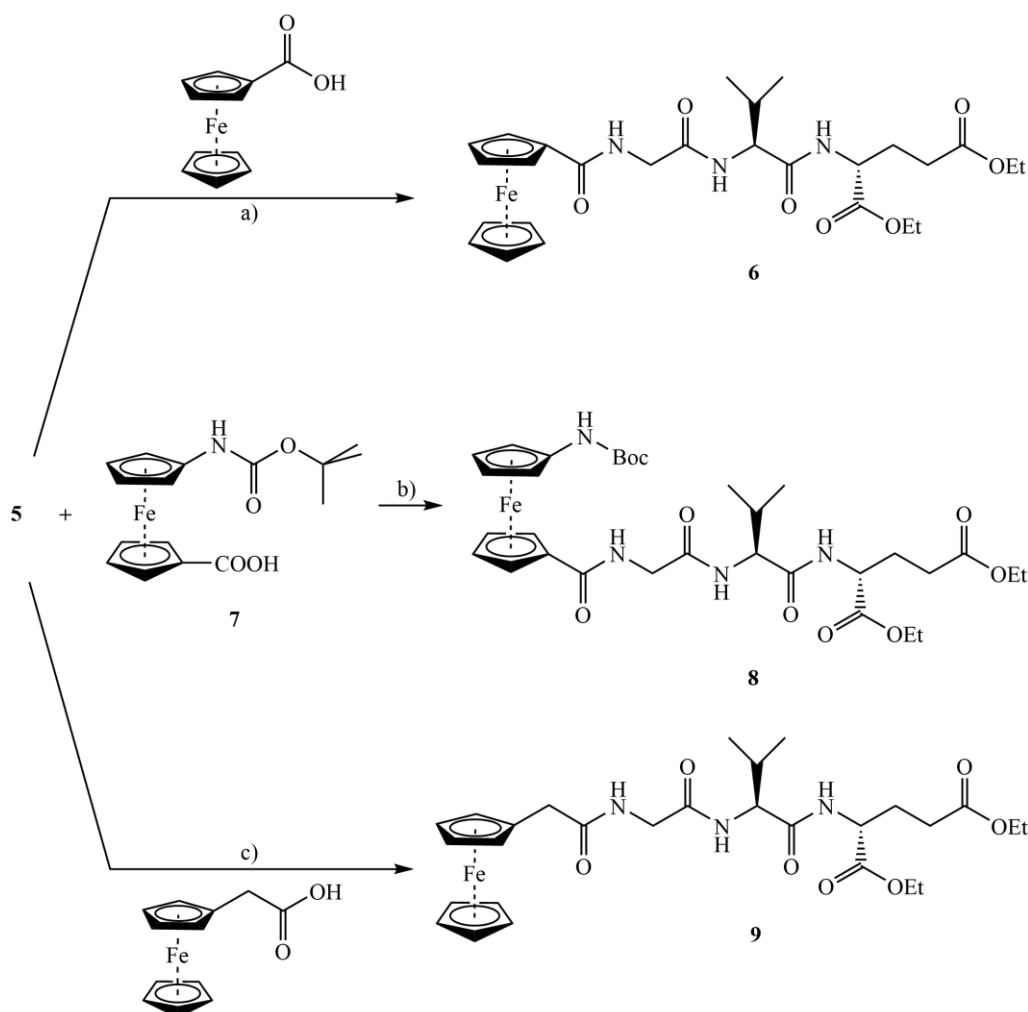
glicina dobiven je Boc-zaštićeni tripeptid **4**. Kako bi se omogućilo vezanje ferocenskih kiselina na N-kraj glicina, Boc-zaštićenom tripeptidu uklonjena je Boc-zaštitna skupina uz trifluoroctenu kiselinu čime je dobiven željeni TFA-tripeptid **5**.



Slika 30. Shematski prikaz sinteze TFA-tripeptida **5**: **a**) 1.  $\text{SOCl}_2$ , suhi EtOH,  $0^\circ\text{C}$ , 1h; 2.  $85^\circ\text{C}$ , 48h, kvantitativan prinos; **b1**) 1. Boc-Val-OH, suhi DCM, DIPEA, DMAP, EDC·HCl, HOBt,  $0^\circ\text{C}$ , 1h; 2. st, 24h, 47%; **b2**) 1. Boc-Val-OH, suhi DCM, TEA, EDC·HCl, HOBt,  $0^\circ\text{C}$ , 1h; 2. st, 48h, 62%; **b3**) 1. Boc-Val-OSu, suhi DCM, TEA, Ar,  $0^\circ\text{C}$ , 1h; 2. st, 48h, 80%; **c**) 1. TFA, suhi DCM,  $0^\circ\text{C}$ , 1h; 2. st, 3,5h, 76%; **d**) 1. Boc-Gly-OH, suhi DCM, TEA, EDC·HCl, HOBt,  $0^\circ\text{C}$ , 1h; 2. st, 24h, 84%; **e**) 1. TFA, suhi DCM,  $0^\circ\text{C}$ , 1h; 2. st, 3,5h, 92%.

Nakon priprave TFA-tripeptida **5** slijedi kondenzacija s odgovarajućim derivatima ferocena kako bi se dobile željene ciljne molekule, tj. spojevi **6**, **8** i **9** (slika 31). Spoj **6** pripravljen je EDC/HOBt metodom uz TEA kao bazu iz TFA-tripeptida **5** i ferocenkarkoboksilne kiseline. Za pripravu spoja **8** najprije je bilo potrebno pripremiti prekursor **7**. Prekursor **7** moguće je dobiti saponifikacijom 1'-(*tert*-butoksikarbonilamino)-1-

metoksikarbonilferocena uz dioksan i 1 mol dm<sup>-3</sup> NaOH pri sobnoj temperaturi kroz 48 h. Zatim je, kondenzacijom TFA-tripeptida **5** i prekursora **7** EDC/HOBt metodom uz TEA dobiven spoj **8**. Spoj **9** je pripravljen EDC/HOBt metodom uz TEA kao bazu iz TFA-tripeptida **5** i ferocenoctene kiseline. Produktima svih koraka snimljeni su NMR i ESI-MS spektri čime su potvrđene njihove strukture.



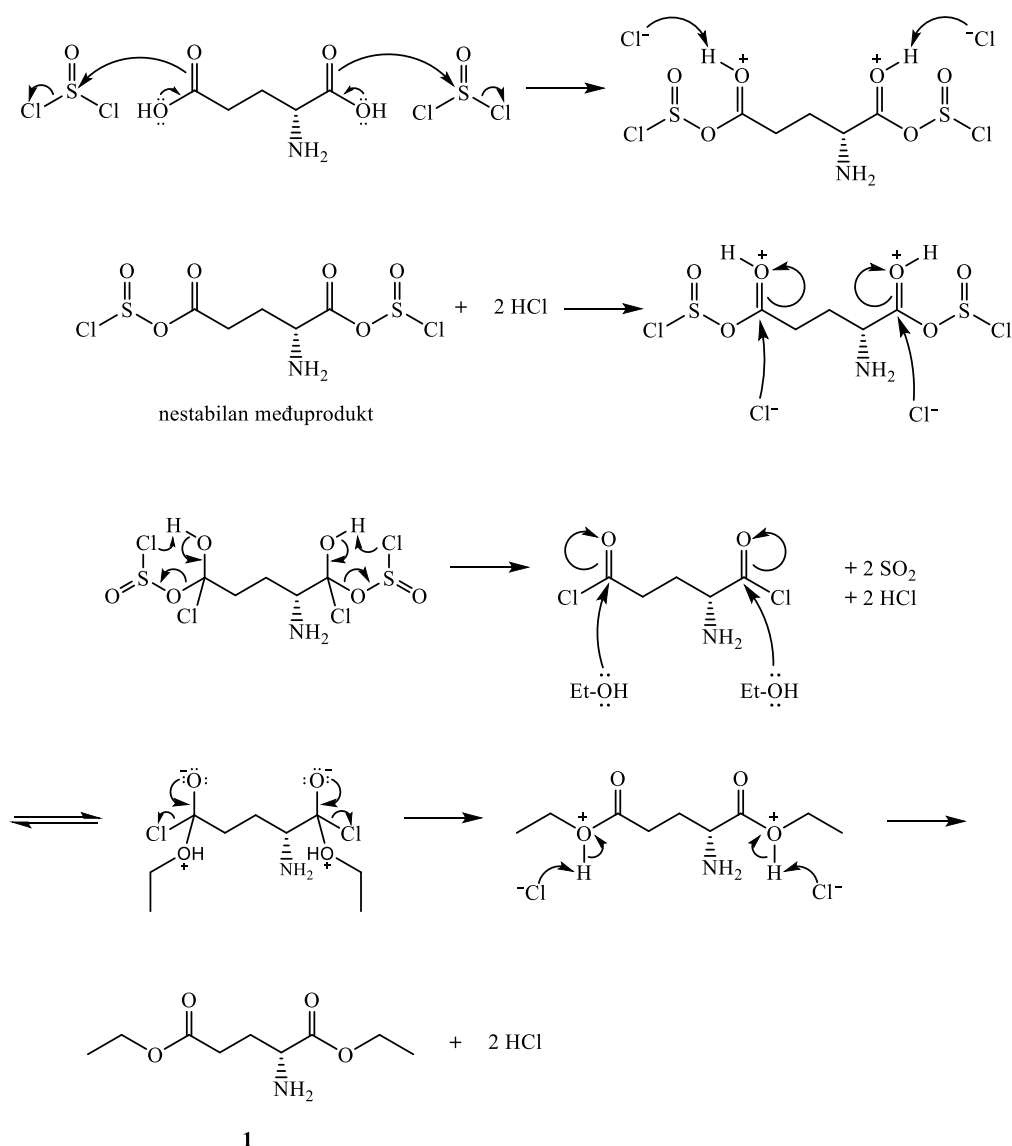
Slika 31. Shematski prikaz kondenzacije TFA-tripeptida **5** s derivatima ferocena u svrhu pripreme ciljnih molekula **6**, **8** i **9**: **a)** 1. ferocenkarkobosilna kiselina, suhi DCM, suhi THF, TEA, EDC·HCl, HOBt, 0 °C, 1.5h; 2. st, 48h; 58%; **b)** 1. suhi DCM, suhi THF, TEA, EDC·HCl, HOBt, 0 °C, 1.5h; 2. st, 48h; 62%; **c)** ferocenoctena kiselina, suhi DCM, suhi THF, TEA, EDC·HCl, HOBt, Ar, 0 °C, 1.5h; 2. st, 48h, 52%.

## 4.2. Sinteza tripeptida

### 4.2.1. Priprava 1,5-dietil-D-glutamat hidroklorida **1**

Reakcijom polazne, komercijalno dostupne D-glutaminske kiseline s tionil-kloridom uz suhi etanol pri povišenoj temperaturi nastaje spoj **1** u kvantitativnom iskorištenju. Reakcija je optimizirana s obzirom na broj ekvivalenata reagensa tionil-klorida. Prvotno je u reakcijsku smjesu dodano tri ekvivalenta tionil-klorida, no tankoslojnom kromatografijom je nakon 24h utvrđeno da u reakcijskoj smjesi zaostaje još polaznog, neizreagirano spoja. Iz tog razloga dodan je još jedan ekvivalent tionil-klorida (ukupno četiri) te je nakon 48h izoliran produkt kvantitativno.

Mehanizam navedene reakcije prikazan je na slici 32. Najprije dolazi do nukleofilnog napada karbonilnog kisikovog atoma D-glutaminske kiseline na elektrofilan sumporov atom tionil-klorida što dovodi do nastanka nestabilnog, no izrazito elektrofilnog međuprodukta. Ponovnim protoniranjem od strane nastale klorovodične kiseline nastaje jaki elektrofil koji može reagirati čak i sa slabim nukleofilima poput kloridnog aniona. Nastali tetraedarski međuprodukt se brzo raspada čime nastaje odgovarajući kiselinski klorid te sumporov dioksid i klorovodik. Navedeni korak je reverzibilan budući da nastaju plinoviti SO<sub>2</sub> i HCl koji napuštaju reakcijsku smjesu. Također, to je povoljno jer na taj način nastali plinoviti sporedni produkti neće onečistiti konačni spoj. Kiselinski klorid tada reagira s etanolom adicijsko-eliminacijskim mehanizmom čime nastaje produkt **1**. Kisikov atom hidroksilne skupine etanola djeluje kao nukleofil i napada elektrofilan karbonilni ugljikov atom kiselinskog klorida čime nastaje tetraedarski međuprodukt, a zatim izlaskom klorida i deprotoniranjem nastaje željeni dietilni ester.<sup>26,27</sup> Dobiveni spoj **1** je u sirovom obliku korišten dalje u sintezi.



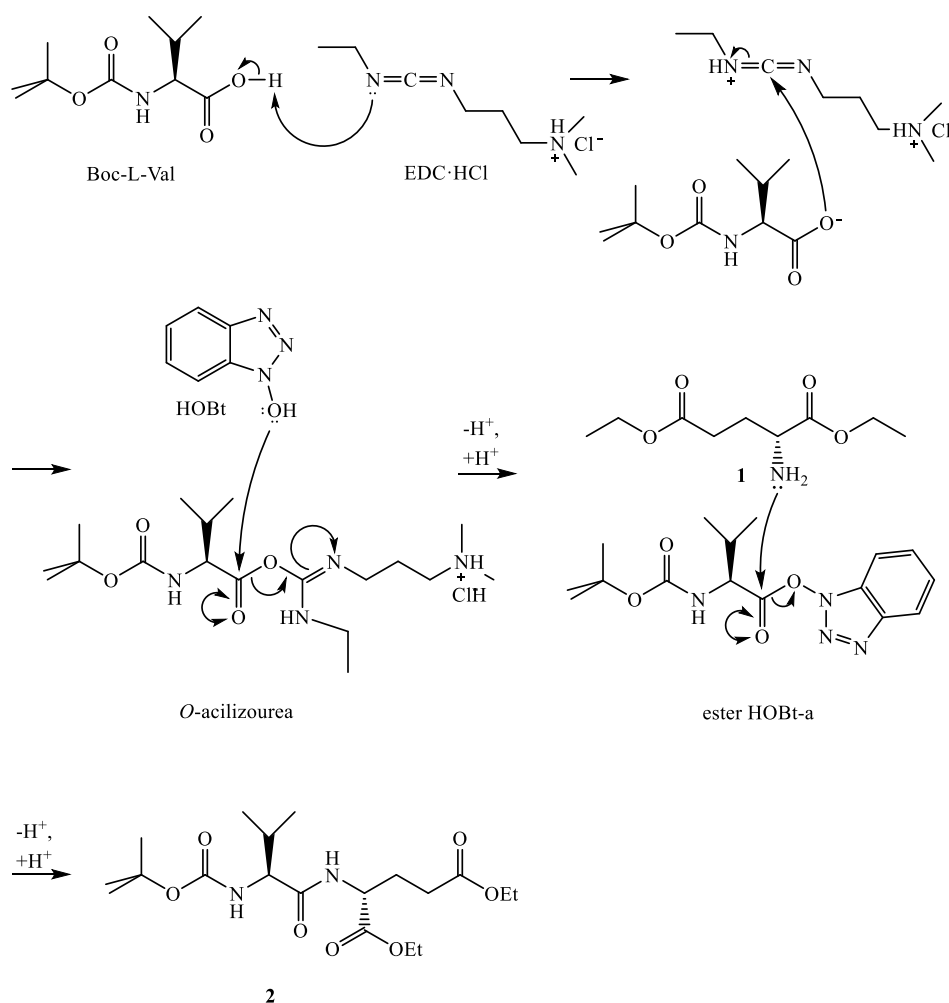
Slika 32. Shematski prikaz mehanizma nastajanja 1,5-dietil-D-glutamat hidroklorida **1** uz tionil-klorid i suhi etanol

#### 4.2.2. Priprava Boc-zaštićenog dipeptida **2**

Priprava Boc-zaštićenog dipeptida **2** provedena je na tri različita načina kako bi se ustanovilo koja metoda je optimalna u smislu čistoće produkata, reakcijskog vremena i iskorištenja.

Jedna od tri provedene metode uključuje kondenzaciju 1,5-dietil-D-glutamat hidroklorida **1** s Boc-zaštićenim L-valinom EDC/HOBt pristupom uz DIPEA-u i DMAP. Dodatak baze nužan je kako bi dobili amino skupinu, odnosno dušikov atom koji može djelovati kao nukleofil. Iako je ovom reakcijom dobiven željeni produkt, iskorištenje iznosi svega 47%. Ekvimolarni dodatak DMAP-a i katalitičke količine HOBt reagensa u literaturi<sup>51</sup>

se pokazao dobrim odabirom osobito kada su u pitanju slabo nukleofilni amini derivati, no ovdje ta kombinacija reagensa nije bila zadovoljavajuća. Na slici 33 prikazan je općeniti mehanizam kondenzacije dietilnog estera **1** s Boc-zaštićenim L-valinom EDC/HOBt metodom. Najprije dolazi do deprotoniranja Boc-L-Val od strane EDC·HCl-a, a zatim do nukleofilnog napada negativno nabijenog kisika Boc-L-Val na elektrofilan ugljikov atom EDC·HCl-a čime nastaje odgovarajuća *O*-acilizourea. Zatim dolazi do nukleofilnog napada kisikova atoma hidroksilne skupine HOBt-a na elektrofilan karbonilni ugljikov atom *O*-acilizouree i nastanka odgovarajućeg estera HOBt-a uz izlazak uree kao sporednog produkta. Hidroklorid **1** se najprije deprotonira bazom, a zatim dušikov atom amino skupine djeluje kao nukleofil i napada elektrofilan karbonilni ugljikov atom estera HOBt-a te dolazi do nastanka željenog Boc-zaštićenog dipeptida **2**, a HOBt reagens se regenerira.



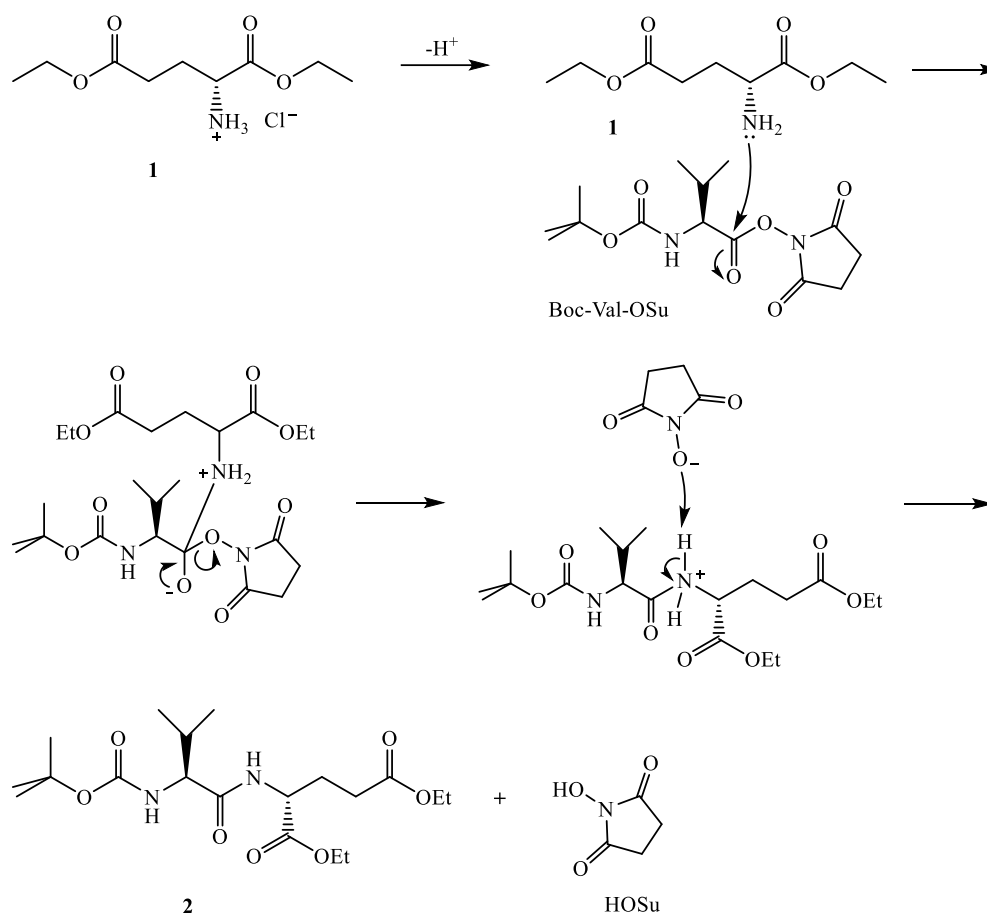
Slika 33. Shematski prikaz općenitog mehanizma nastajanja Boc-zaštićenog dipeptida **2** EDC/HOBt metodom uz Boc-L-Val



Izravan nukleofilni napad spoja **1** na *O*-acilizoureu mogao bi voditi nepovoljnoj reakciji epimerizacije aktivnog estera. Iz tog se razloga dodaje HOBt koji vodi do nastanka esterskog derivata HOBt-a koji neće epimerizirati, primarno zato što HOBt jako ubrzava željenu reakciju.<sup>27</sup>

Druga metoda pripreme spoja **2** uključivala je kondenzaciju 1,5-dietil-D-glutamat hidroklorida **1** s Boc-zaštićenim L-valinom EDC/HOBt metodom bez dodatka DMAP-a uz trietilamin kao bazu. Reakcija je provedena istim postupkom kao i prethodna, pri čemu je došlo do porasta iskorištenja reakcije (62%). Vrijeme reakcije je u ovom slučaju bilo 48 h. Nakon prvotnih 24 h tankoslojnom kromatografijom utvrđeno je da u reakcijskoj smjesi zaostaje polazni, neizreagirani spoj te je reakcija produljena još dodatna 24 h. Mehanizam reakcije se odvija na isti način kao i u prvom slučaju, odnosno kao što je prikazano na slici 33. Kao što je ranije napomenuto, u literaturi je poznato da dodatak DMAP reagensa može biti povoljan u nekim slučajevima pripreme amidne veze, no produljenje reakcije uz navedeni reagens može također uzrokovati epimerizaciju kiralnih ugljikovih atoma na peptidnom produktu.<sup>52</sup> Naime, osim što mu je bazičnost usporediva s bazama poput TEA i DIPEA, dodaje ga se ekvimolarno. Iz navedenih razloga poželjno je vrijeme reakcije skratiti kako bi se spriječila neželjena epimerizacija što je i učinjeno u prvoj metodi pripreme spoja **2**.

Treća metoda pripreme spoja **2** pokazala se najučinkovitijom i uključuje kondenzaciju hidroklorida **1** s Boc-Val-OSu, tj. *N*-hidroksisukcinimidnim esterom Boc-zaštićenog L-valina uz trietilamin kao bazu (slika 34).

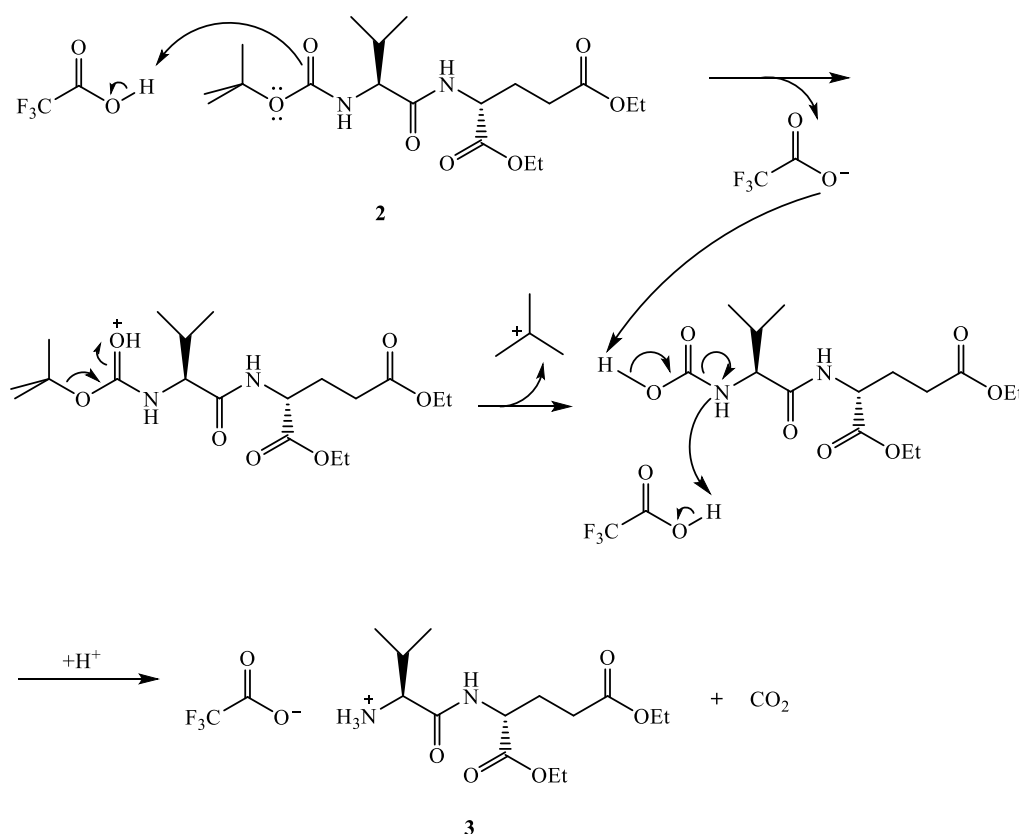


Slika 34. Shematski prikaz mehanizma nastajanja Boc-zaštićenog dipeptida **2** s Boc-Val-OSu

Najprije dolazi do deprotoniranja hidroklorida **1** pomoću baze TEA, a zatim do nukleofilnog napada dušikova atoma amino skupine na elektrofilan karbonylni ugljikov atom Boc-Val-OSu čime nastaje međuprodukt. Obnavljanjem dvostruke veze karbonylne skupine *N*-hidroksisukcinimidni anion izlazi kao izlazna skupina van te u idućem koraku anion deprotonira dušikov atom čime nastaje željeni Boc-zaštićeni dipeptid **2** i *N*-hidroksisukcinimid (HOSu) kao sporedni produkt. Aktivacija karboksilne skupine u *N*-hidroksisukcinimidni ester, slično kao i aktivacija EDC/HOBt reagensima, ubrzava reakciju i na taj način umanjuje mogućnost epimerizacije te povećava prinos reakcije. Kako bi se osigurala inertna atmosfera za reakciju i spriječila nepovoljne sporedne reakcije, primjerice oksidacija, korišten je argon. Nakon prvotnih 24 h tankoslojnom kromatografijom utvrđeno je da u reakcijskoj smjesi zaostaje polazni, neizreagirani spoj te je zato reakcija puštena još 24 h. Navedena metoda sinteze spoja **2** pokazala se najboljom od sve tri provedene metode budući da je iskorištenje reakcije bilo 80%.

## 4.2.3. Uklanjanje Boc-zaštitne skupine sa spoja 2

Uklanjanje Boc-zaštitne skupine na amino kraju spoja **2** nužno je kako bi se provela sljedeća reakcija kondenzacije, odnosno sinteza tripeptida. Uklanjanje zaštite provodi se uz kiselinu TFA (slika 35) pri čemu nastaje TFA-dipeptid **3** uz iskorištenje od 76%.



Slika 35. Shematski prikaz općenitog mehanizma uklanjanja Boc-zaštitne skupine sa spoja **2** uz TFA

Reakcijom Boc-zaštićenog dipeptida **2** s TFA dolazi do protoniranja karbamatne zaštitne skupine, a zatim i do nastanka nestabilne karbaminske kiseline i terciarnog karbokationa. Karbaminska kiselina se dekarboksilira čime nastaje TFA-dipeptid **3** kao produkt te plinoviti  $\text{CO}_2$ .

4.2.4. Priprava Boc-zaštićenog tripeptida **4**

Boc-zaštićeni tripeptid **4** pripremljen je kondenzacijom dipeptida **3** s Boc-zaštićenim glicinom EDC/HOBt metodom uz trietilamin kao bazu. Reakcija je provedena istim postupkom kao i

sinteza spoja **2** ovom metodom, no prekinuta je nakon 24 h budući da je tankoslojnom kromatografijom utvrđeno da nastaje željeni produkt, a zaostaje vrlo malo polaznog spoja. Iskorištenje reakcije je iznosilo 84%. Mehanizam reakcije kondenzacije TFA-dipeptida **3** i Boc-zaštićenog glicina odvija se na analogan način i sličnim mehanizmom već opisanim na slici 33.

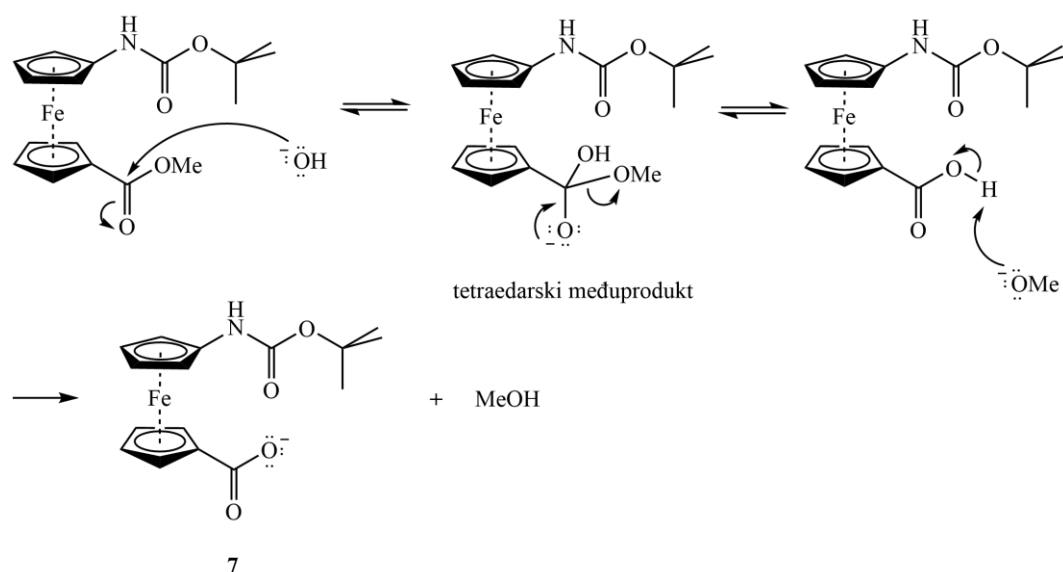
#### 4.2.5. Uklanjanje Boc-zaštitne skupine sa spoja **4**

Uklanjanje Boc-zaštitne skupine na amino kraju spoja **4** nužno je kako bi se provele reakcije kondenzacije s derivatima ferocena u svrhu pripreme ciljnih molekula **6**, **8** i **9**. Uklanjanje zaštitne skupine provodi se uobičajenim postupkom u peptidnoj kemiji, uz trifluoroctenu kiselinu pri čemu nastaje TFA-tripeptid **5** uz iskorištenje od 92%. Mehanizam uklanjanja Boc-zaštitne skupine odvija se jednako kao što je prethodno opisano, tj. kao što je prikazano na slici 35.

### 4.3. Priprava ciljnih molekula kondenzacijom derivata ferocena i pripremljenog tripeptida

#### 4.3.1. Priprava 1'-(*tert*-butoksikarbonilamino)ferocen-1-karboksilne kiseline **7**

Kako bi dobili željeni derivat ferocena **7** za pripravu spoja **8**, potrebno je bilo provesti saponifikaciju, tj. baznu hidrolizu 1'-(*tert*-butoksikarbonilamino)-1-metoksikarbonil ferocena (slika 36). Saponifikacija se provodi kako bi se dobila karboksilna kiselina koja je potrebna u idućem koraku sinteze za ostvarivanje amidne veze između TFA-tripeptida **5** i spoja **7**. Bazna hidroliza estera uobičajeno se provodi uz vodenu otopinu natrijeva hidroksida. Kao otapalo je korišten dioksan budući da se miješa s vodom jer je polazni spoj, 1'-(*tert*-butoksikarbonilamino)-1-metoksikarbonilferocen, u njemu dobro topljiv. Nakon 48 h dobiven je spoj **7** u iskorištenju od 44%.



Slika 36. Shematski prikaz mehanizma saponifikacije 1'-(*tert*-butoksisarbonilamino)-1-metoksikarbonil ferocena

Bazna hidroliza estera odvija se adicijsko-eliminacijskim mehanizmom. Hidroksidni ion baze nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom estera pri čemu nastaje tetraedarski međuprodukt. Iz tetraedarskog međuprodukta izlaskom alkoksida nastaje najprije karboksilna kiselina, a zatim brzim prijenosom protona karboksilatni ion i alkohol. Navedeni brzi prijenos protona čini saponifikaciju gotovo ireverzibilnom reakcijom.<sup>26</sup>

#### 4.3.2. Priprava ciljnih tripeptidnih derivata **6**, **8** i **9**

Spojevi **6**, **8** i **9** pripravljeni su EDC/HOBt metodom uz trietilamin kao bazu iz TFA-tripeptida **5** i ferocenskih prekursora, ferocenkarboksilne kiseline, spoja **7** i ferocenoctene kiseline. Kao i kod reakcija sinteze dipeptida, dolazi do nastanka amidne veze između karboksilne skupine karboksilnih kiselina i amino skupine tripeptida **5**. Tetrahidrofuran se dodaje kao otapalo kako bi se osiguralo potpuno otapanje TFA soli tripeptida u reakcijskoj smjesi, a trietilamin je nužan kako bi dobili amino skupinu, odnosno dušikov atom koji može djelovati kao nukleofil. Sve reakcije sinteze ciljnih molekula provodile su se 48 h kako bi se osigurala što bolja iskorištenja reakcija koja su u ovoj metodi bila usporediva te su iznosila redom, za spoj **6** 58%, za spoj **8** 62% i spoj **9** 52%. Mehanizmi reakcija kondenzacije analogni su mehanizmu prikazanom na slici 33 u sintezi dipeptida.

#### 4.4. Ispitivanje NOD2 agonističkog učinka spojeva

Kao što je spomenuto u literaturnom dijelu, u nedavnim istraživanjima tripeptidni derivati sastavljeni od glicina, L-valina i D-glutaminske kiseline s lipofilnim aromatskim supstituentima vezanim na N-kraj glicina (slika 7, spojevi **VIII**, **IX**, **X** i **XI**) pokazali su izniman NOD2 agonistički učinak.<sup>16,25</sup> Navedeni učinak utvrđen je u *in vitro* staničnim eksperimentima u kojima do izražaja dolazi sposobnost vezivanja liganda za NOD2 protein te prolaz potencijalnog liganda kroz lipidni dvosloj stanične membrane. Spojevi su ispitani komercijalno dostupnom metodom koja uključuje HEK-Blue NOD2 reporterske stanice. Rezultati se izražavaju kao EC<sub>50</sub> vrijednosti pri čemu se često kao referentni spoj dodaje muramil-dipeptid (MDP). MDP kao najmanja strukturna jedinica peptidoglikana pokazuje NOD2 agonistički učinak te adjuvantsku aktivnost.

Proteini NOD1 i NOD2 stanični su receptori koji specifično prepoznaju određene motive peptidoglikana, važne strukturne jedinice bakterijske stanične stijenke. NOD1 tako prepoznaje D- $\gamma$ -glutamil-*meso*-DAP dipeptidni dio PGM-a Gram negativnih i nekih Gram-positivnih bakterija, a NOD2 prepoznaje strukturu MPD-a koja se obično nalazi u većini bakterijskih sojeva. U HEK-Blue NOD2 stanicama pojačana je ekspresija ljudskog NOD2 proteina i u pravilu te stanice ne reagiraju na agonistički učinak NOD1 liganada. U spomenutom testu aktivirani NOD2 veže se za RIP2 kinazu koja potom djeluje kao transkripcijski aktivator NF- $\kappa$ B. Niz kaskadnih reakcija koje slijede posljedično stimuliraju lučenje SEAP enzima (izlučena alkalna fosfataza embrija, engl. *secreted embryonic alkaline phosphatase*) čija se aktivnost određuje mjerenjem optičke gustoće (OD, engl. *optical density*) spektrofotometrijski pri 630 nm. Iz dobivenih podataka za svaki se potencijalni agonist računaju EC<sub>50</sub> vrijednosti. Općenito, navedene vrijednosti predstavljaju koncentraciju spoja potrebnu za postizanje 50%-tnog biološkog učinka, u ovom slučaju NOD2 agonističkog. Nakon što se odredi agonistički učinak spojeva, najpotentnijim se spojevima određuje njihov *in vitro* imunostimulirajući učinak, dodatnim testovima, induciranjem proizvodnje citokina u PMBC stanicama čovjeka.

Spojevi pripremljeni u ovome radu pokazali su u gore opisanom testu EC<sub>50</sub> vrijednosti u rasponu od 44,1 – 563,3 nM pri čemu je kao referentni NOD2 agonist korišten MDP (EC<sub>50</sub> = 80,5 nM). Testiranje serije spojeva u koju su bili uključeni i ovdje pripremljeni spojevi provedeno je kroz projektну suradnju u grupi prof. dr. sc. Ž. Jakopina s Farmaceutskog

fakulteta, Sveučilišta u Ljubljani, Slovenija. U tijeku je testiranje imunostimulirajućeg učinka najaktivnijih tripeptidnih derivata na PMBC stanicama.

## § 5. ZAKLJUČAK

1. Kao polazni spoj za sintezu tripeptidne podjedinice korištena je komercijalno dostupna D-glutaminska kiselina koja je u reakciji s tionil-kloridom i suhim etanolom uspješno dala najprije odgovarajući kiselinski klorid, a zatim 1,5-dietil-D-glutamat hidroklorid **1**.
2. Boc-zaštićeni dipeptid **2** uspješno je i s vrlo dobrim prinosom pripremljen iz dietilnog estera D-glutaminske kiseline **1** pri čemu se najboljom od tri ispitane metode pokazala metoda kondenzacije uz *N*-hidroksisukcinimidni ester Boc-zaštićenog L-valina i trietilamin kao bazu. Uklanjanjem Boc-zaštitne skupine uz trifluoroctenu kiselinu uspješno je sintetiziran TFA-dipeptid **3**.
3. Boc-zaštićeni tripeptid **4** pripremljen je EDC/HOBt metodom iz TFA-dipeptida **3** i Boc-zaštićenog glicina uz trietilamin. Uklanjanjem Boc-zaštitne skupine uz trifluoroctenu kiselinu dobiven je TFA-tripeptid **5** u visokom iskorištenju.
4. Saponifikacijom, odnosno baznom hidrolizom 1'-(*tert*-butoksikarbonilamino)-1-metoksikarbonilferocena uspješno je pripremljen željeni derivat ferocena **7** koji je potreban za pripremu ciljne molekule **8**.
5. Ciljne molekule **6**, **8** i **9**, potencijalni novi NOD2 agonisti, uspješno su pripremljene kondenzacijom TFA-tripeptida **5** i ferocenskih prekursora EDC/HOBt metodom uz trietilamin kao bazu te iskorištenja od 58, 62 i 52%.
6. Svi produkti su okarakterizirani spektroskopijom NMR te spektrometrijom masa ESI-MS. Također, određenim produktima određeno je talište, a svim kiralnim spojevima optičko zakretanje.
7. Tripeptidni derivati s ferocenskim motivom pokazali su u *in vitro* testu na HEK-Blue NOD2 stanicama vrlo dobar agonistički NOD2 učinak.



## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

AcOH	octena kiselina
ADP	adenozin-difosfat (engl. <i>adenosine diphosphate</i> )
Ala	alanin
ATP	adenozin-trifosfat (engl. <i>adenosine triphosphate</i> )
BBr <sub>3</sub>	borov tribromid
Bn	benzil
BnOCOCl	benzil-kloroformijat
BnOH	benzilni alkohol
Boc <sub>2</sub> O	di- <i>tert</i> -butildikarbonat
Boc-ON	2-( <i>tert</i> -butoksikarboniloksiimino)-2-fenilacetonitril
CbzOSu	<i>N</i> -(benziloksikarboniloksi)sukciniimid
DEA	dietanolamin
DMA	dimetilacetamid
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamid
ESI-MS	spektrometrija masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (engl. <i>electrospray ionization-mass spectrometry</i> )
Et	etil
FmocCl	9-fluorenilmetilkloroformijat
FmocOSu	<i>N</i> -(9-fluorenilmetiloksikarboniloksi)sukcinimid
Glu	glutaminska kiselina
Gly	glicin
HBr	bromovodik
HF	fluorovodik
HOBt	<i>N</i> -hidroksibenzotriazol
hPepT1	ljudski peptidni transporter (engl. <i>human peptide transporter</i> )
ISCOM	imunostimulirajući kompleksi (engl. <i>immune stimulating complexes</i> )
<i>iso</i> Gln	izoglutamin
LiOH	litijev hidroksid
LRR	ponavljajući slijedovi bogati leucinom (engl. <i>leucine-rich repeat</i> )

---

Lys	lizin
Me	metil
Me <sub>3</sub> SiCl	trimetilsilil-klorid
NMR	nuklearna magnetska rezonancija (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> )
NOD	nukleotid-vezujuća oligomerizacijska domena (engl. <i>nucleotide-binding oligomerization domain</i> )
PMBC	stanice mononuklearne stanice periferne krvi (engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
SO <sub>2</sub>	sumporov dioksid
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butil
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -butanol
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctena kiselina
THF	tetrahidrofuran
TMS	tetrametilsilan
UV	ultraljubičasto (engl. <i>ultraviolet</i> )
Val	valin
Z	benziloksikarbonil

## § 7. LITERATURNI IZVORI

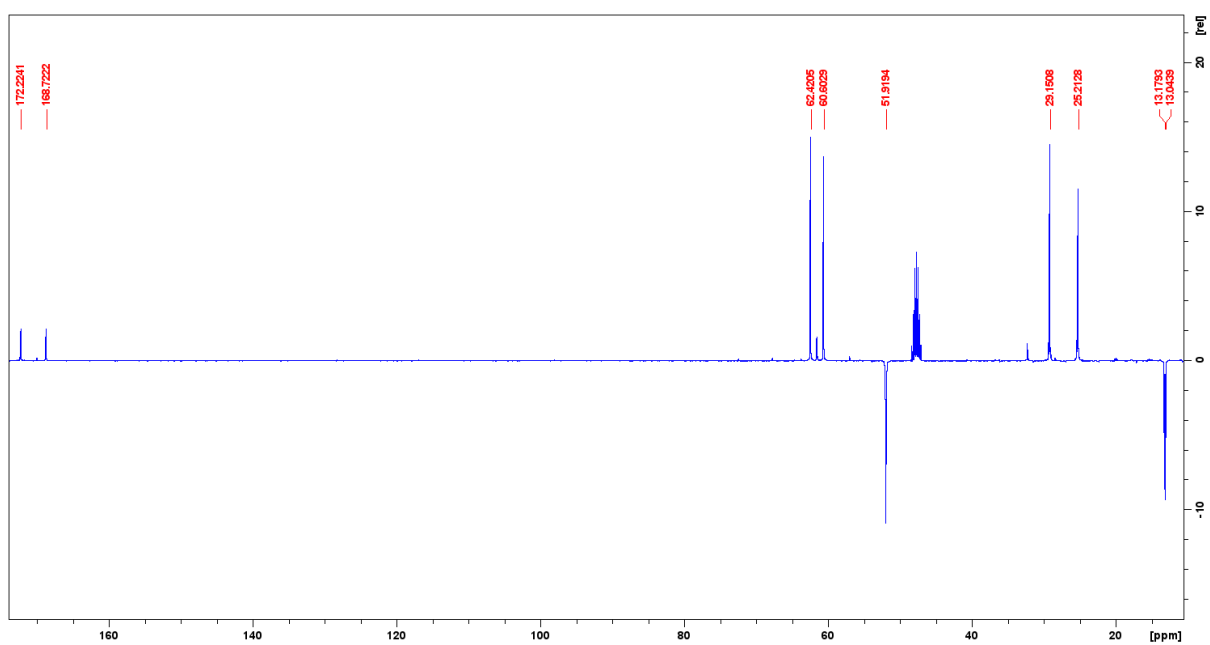
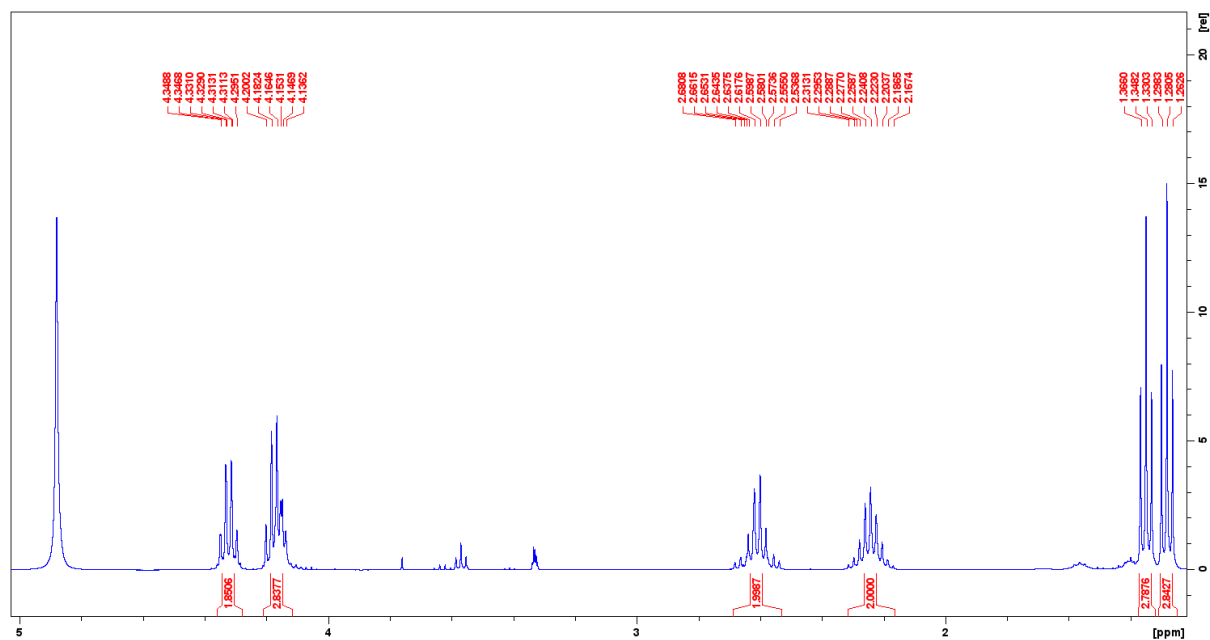
1. A. J. Pollard, E. M. Bijker, *Nat. Rev. Immunol.* **21** (2021) 83-100.
2. R. Ribić, M. Paurević, S. Tomić, *Croat. Chem. Acta* **92** (2019) 153–161.
3. R. Ribić, S. Tomić, *Kem. Ind.* **62** (2013) 19-31.
4. A. T. Glenn, C. G. Pope, H. Waddington, U. Wallace, *J. Pathol. Bacteriol.* **29** (1926) 31-40.
5. C. Ogawa, Y.-J. Liu, K. S. Kobayashi, *Curr. Bioact. Compd.* **7** (2011) 180-197.
6. P. J. Delves, I. M. Roitt, *N. Engl. J. Med.* **343** (2000) 37-49.
7. S. Kellie, Z. Al-Mansour, u M. Skwarczynski, I. Toth (ur.), *Micro- and Nanotechnology in Vaccine Development*, William Andrew; Elsevier, Oxford, United Kingdom, 2017, str. 63-81.
8. A. E. Thompson, *JAMA* **313** (16) (2015) 1686.
9. A. Facciola, G. Visalli, A. Laganà, A. Di Pietro, *Vaccines* **10** (2022) 1-26.
10. T. Zhao, Y. Cai, Y. Jiang, X. He, Y. Wei, Y. Yu, X. Tian, *Signal Transduct. Target. Ther.* **8** (2023) 283-306.
11. A. Harini, A. Kumar, G. P. Kumar, S. Neeta, *J. Vaccin.* **4** (2013) 167-171.
12. A. S. McKee, M. K. L. MacLeod, J. W. Kappler, P. Marrack, *BMC Biol.* **8** (2010) 1-10.
13. S. Hemmati, Z. Saeidikia, H. Seradj, A. Mohagheghzadeh, *Pharmaceuticals* **17** (2024) 1-28.
14. S. V. Guryanova, R. M. Khaitov, *Front. Immunol.* **12** (2021) 1-17.
15. E. Iwicka, J. Hajtuch, K. Dzierzbicka, I. Inkielewicz-Stepniak, *Front. Oncol.* **22** (2022) 1-14.
16. S. Guzelj, Š. Bizjak, Ž. Jakopin, *ACS Med. Chem. Lett.* **13** (2022) 1270-1277.
17. S. Guzelj, S. Nabergoj, M. Gobec, S. Pajk, V. Klančič, B. Slütter, R. Frkanec, A. Štimac, P. Šket, J. Plavec, I. Mlinarič-Raščan, Ž. Jakopin, *J. Med. Chem.* **64** (2021) 7809-7838.
18. V. Petrović Peroković, Ž. Car, M. Bušljeta, D. Mihelec, M. Paurević, S. Ivanković, R. Stojković, R. Ribić, *Int. J. Mol. Sci.* **23** (2022), 8628.
19. S. Maekawa, U. Ohto, T. Shibata, K. Miyake, T. Shimizu, *Nat. Commun.* **7** (2016) 11813.
20. T. Sidiq, S. Yoshihama, I. Downs, K. S. Kobayashi, *Front. Immunol.* **7** (2016) 367.
21. Z. Al Nabhani, G. Dietrich, J.-P. Hugot, F. Barreau, *PLoS Pathog.* **13** (2017) 1-19.

22. M. Bušljeta, *Priprava alifatskih triazolnih derivata manoziliranog desmuramil-dipeptida*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2022.
23. R. Ribić, R. Stojković, L. Milković, M. Antica, M. Cigler, S. Tomić, *Beilstein J. Org. Chem.* **15** (2019) 1805–1814.
24. V. Petrović Peroković, Ž. Car, J. Draženović, R. Stojković, L. Milković, M. Antica, Đ. Škalamera, S. Tomić, R. Ribić, *Molecules* **26** (2021) 6352.
25. M. Gobec, T. Tomašič, A. Štimac, R. Frkanec, J. Trontelj, M. Anderluh, I. Mlinarič-Raščan, Ž. Jakopin, *J. Med. Chem.* **61** (2018) 2707-2724.
26. L. G. Wade, J. W. Simek, *Organic Chemistry*, Pearson Education Limited, United Kingdom, 2023, str. 1131-1132, 1283-1314, 1090-1091.
27. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, New York, 2012, str. 553-560, 747-748, 214-215.
28. D. M. M. Jaradat, *Amino Acids* **50** (2018) 39-68.
29. M. Bodanszky, *Peptide Chemistry: A Practical Textbook*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1988., str. 54-88.
30. Y. Tsuda, Y. Okada, u A. B. Hughes (ur.), *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Building Blocks, Catalysis and Coupling Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 2011, str. 201-251.
31. J. M. Palomo, *RSC Adv.* **4** (2014) 32 658–32 672.
32. S. Chandrudu, P. Simerska, I. Toth, *Molecules* **18** (2013) 4373-4388.
33. C. Petrou, Y. Sarigiannis, u S. Koutsopoulos (ur.), *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*, Woodhead Publishing, United Kingdom, 2018, str. 1-21.
34. M. Conda-Sheridan, M. Krishnaiah, u W. M. Hussein, M. Skwarczynski, I. Toth (ur.), *Peptide Synthesis; Methods and Protocols*, Humana Press, New York, 2020, str. 111-128.
35. A. Isidro-Llobet, M. Álvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **109** (2009) 2455-2504.
36. P. L. Pauson, *J. Organomet. Chem.* **637–639** (2001) 3-6.
37. H. Werner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **51** (2012) 6052-6058.
38. C. Ornelas, *New J. Chem.* **35** (2011) 1973-1985.
39. D. R. van Staveren, N. Metzler-Nolte, *Chem. Rev.* **104** (2004) 5931-5985.
40. V. Rapić, M. Čakić Semenčić, *Kem. Ind.* **60** (2011) 61-79.

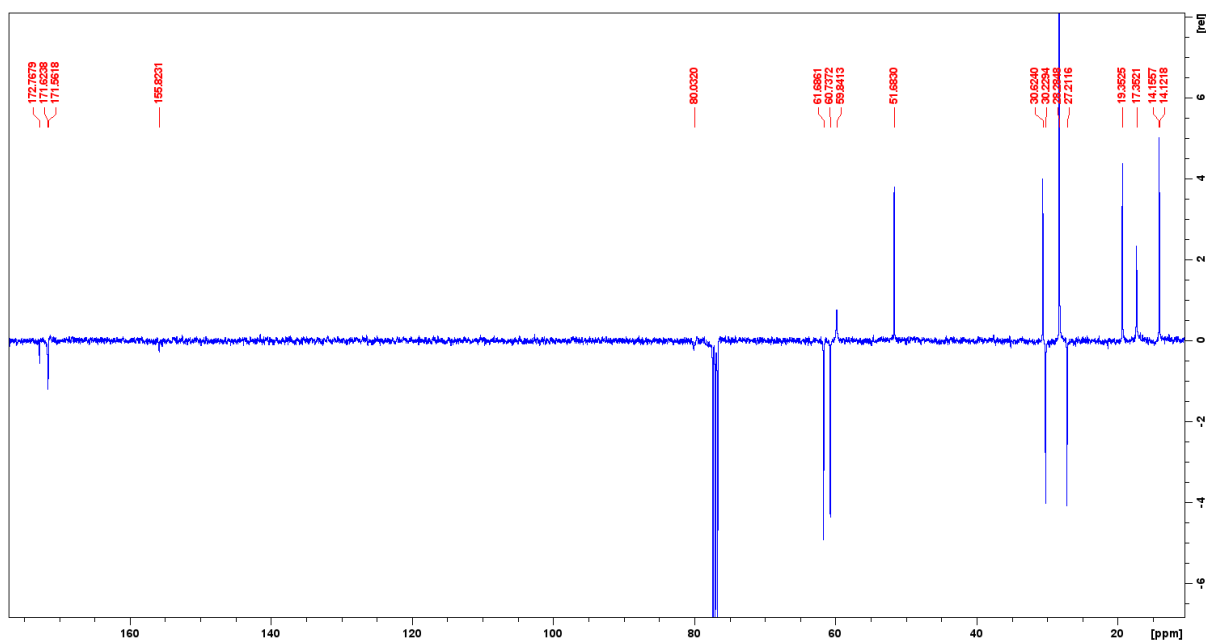
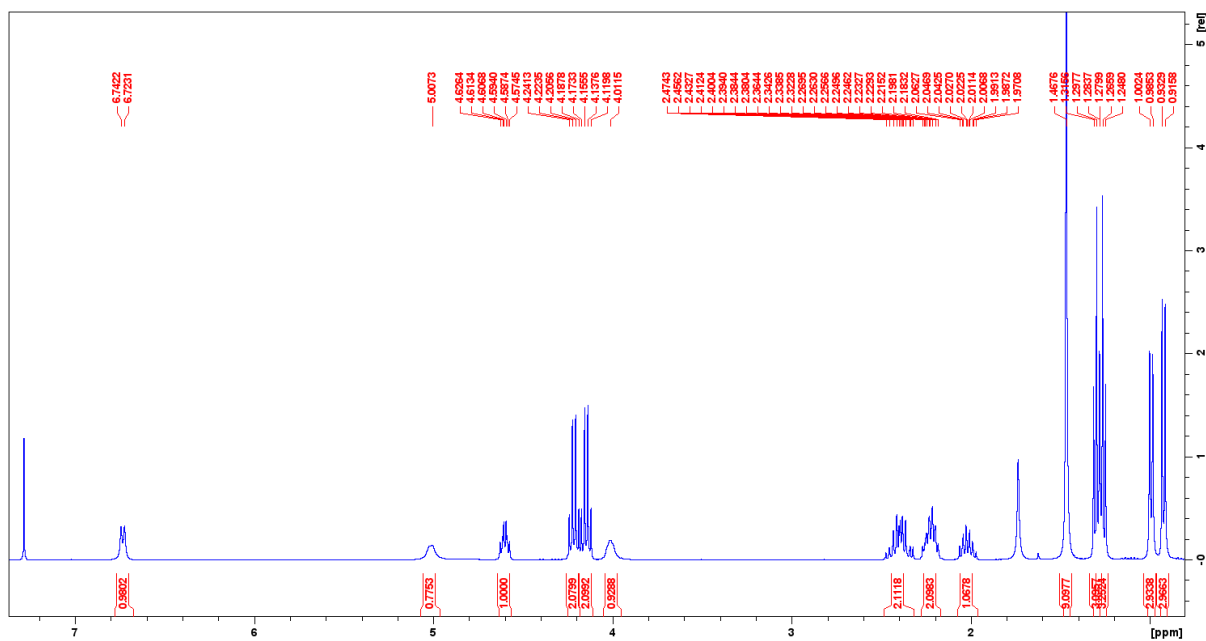
41. M. Čakić Semenčić, L. Barišić, *Croat. Chem. Acta* **90** (2017) 537-569.
42. D. Astruc, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017** (2017) 6-29.
43. M. F. R. Fouda, M. M. Abd-Elzaher, R. A. Abdelsamaia, A. A. Labib, *Appl. Organometal. Chem.* **21** (2007) 613-625.
44. C. Ornelas, D. Astruc, *Pharmaceutics* **15** (2023) 2044-2083.
45. M. Patra, G. Gasser, *Nat. Rev. Chem.* **1** (2017) 0066.
46. P. Venkatesan, *Lancet Microbe* **5** (2024) e214
47. M. Kovačević, M. Čakić Semenčić, K. Radošević, K. Molčanov, S. Roca, L. Šimunović, I. Kodrin, L. Barišić, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021) 13532.
48. I. Jerić, *Kem. Ind.* **53** (2004) 495-504.
49. M. Kovačević, M. Čakić Semenčić, I. Kodrin, S. Roca, J. Perica, J. Mrvčić, D. Stanzer, K. Molčanov, V. Milašinović, L. Brkljačić, L. Barišić, *Inorganics* **11** (2023) 29.
50. [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB8950330.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8950330.htm), (datum pristupa 25. kolovoz 2024.)
51. A. K. Ghosh, D. Shahabi, *Tetrahedron Lett.* **63** (2021) 152719.
52. J. -P. Gamet, R. Jacquier, J. Verducci, *Tetrahedron* **40** (1984) 1995-2001.

## § 8. DODATAK

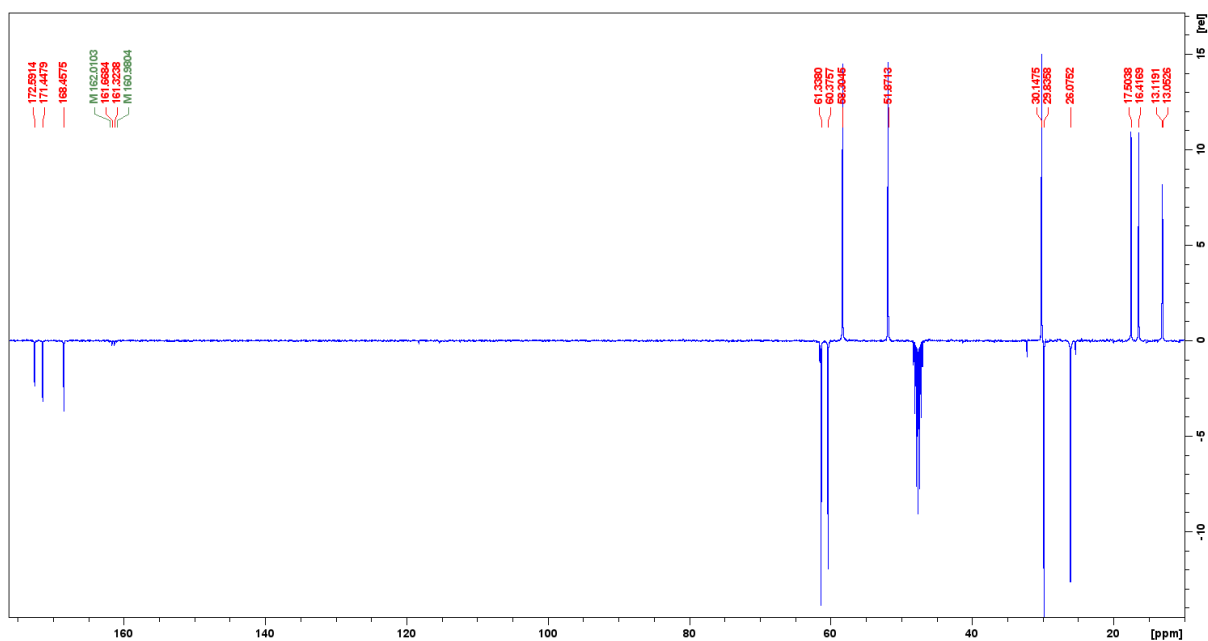
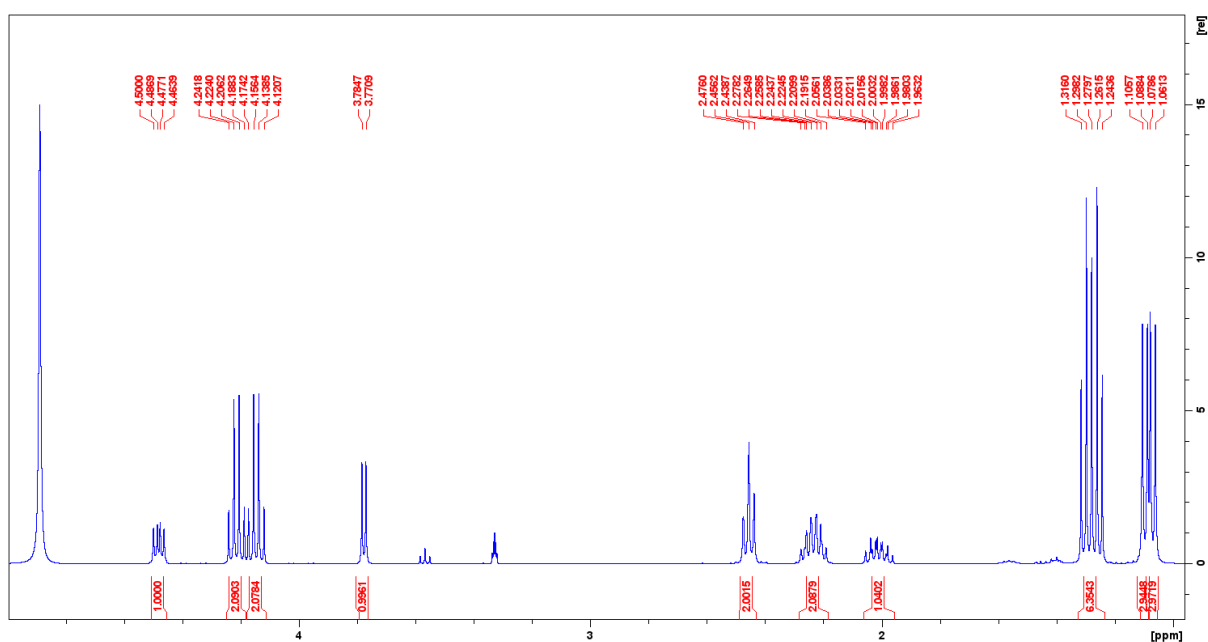
Dodatak D1:  $^1\text{H}$  i DEPTQ NMR spektri spoja 1



Dodatak D2: <sup>1</sup>H i DEPTQ NMR spektri spoja 2

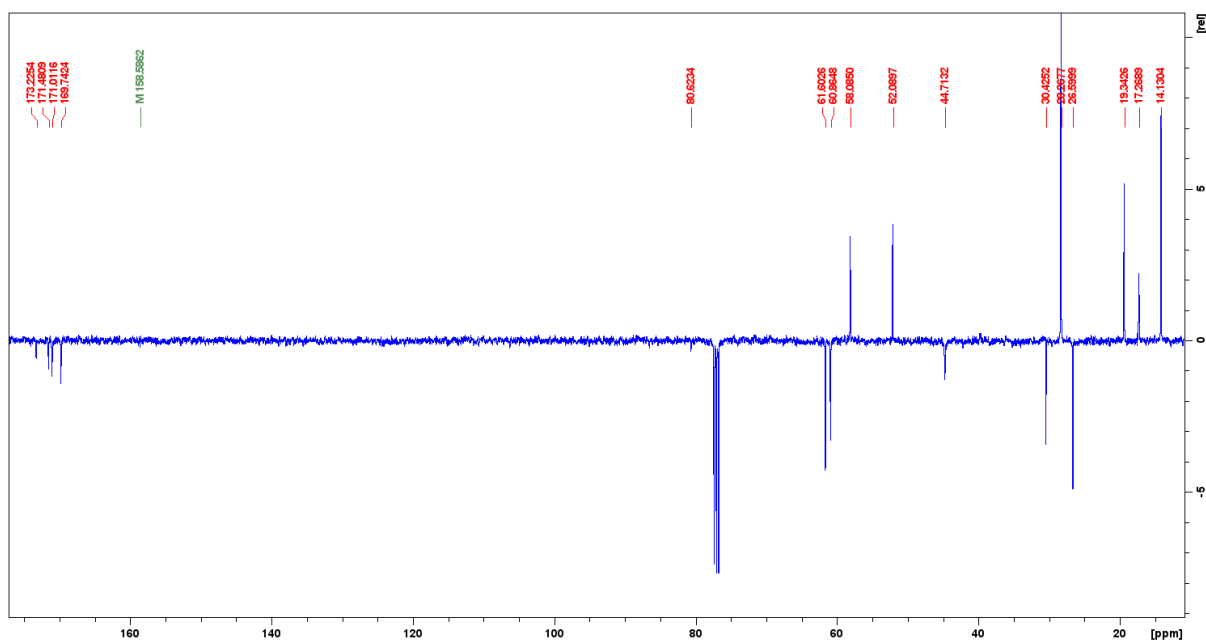
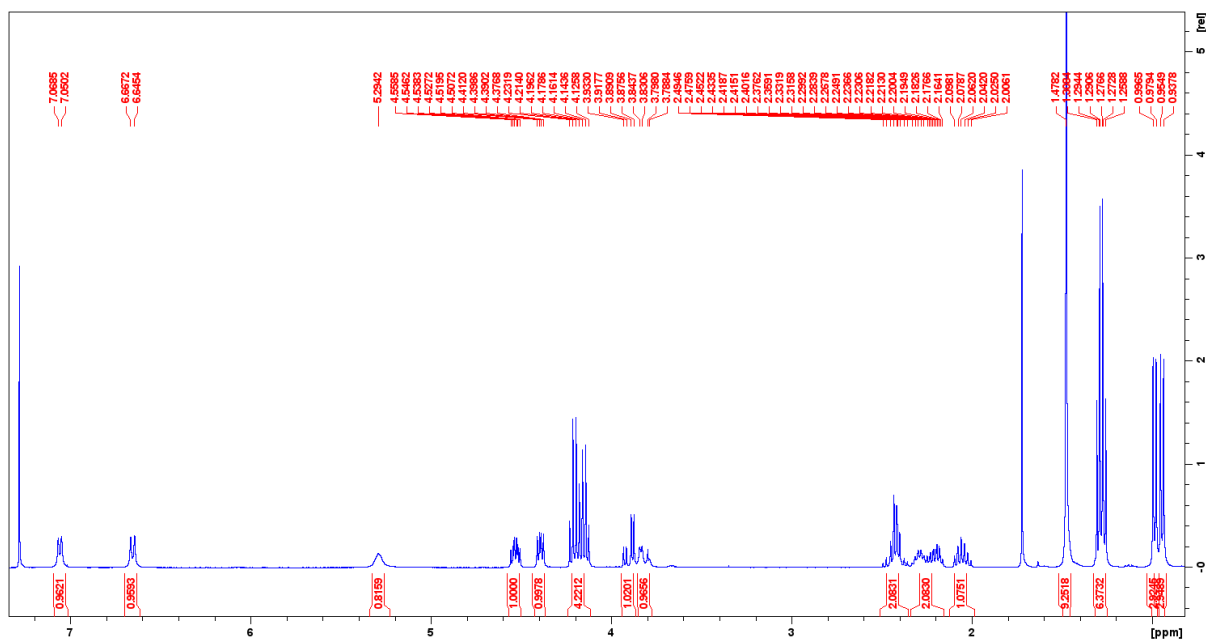


Dodatak D3: <sup>1</sup>H i DEPTQ NMR spektri spoja 3

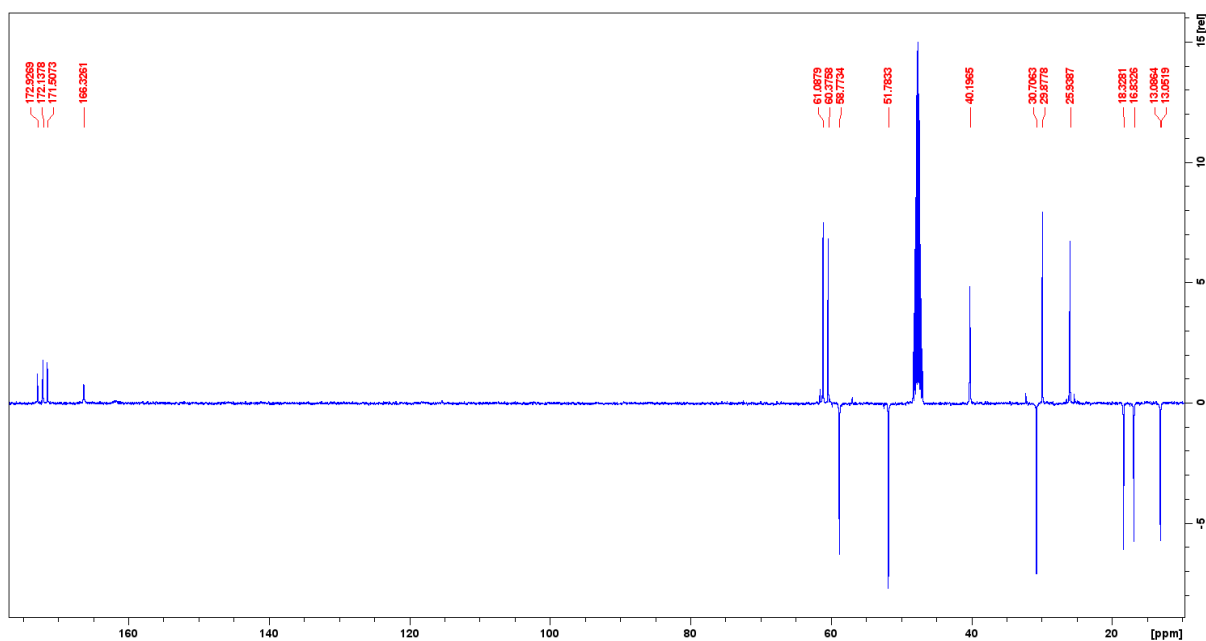
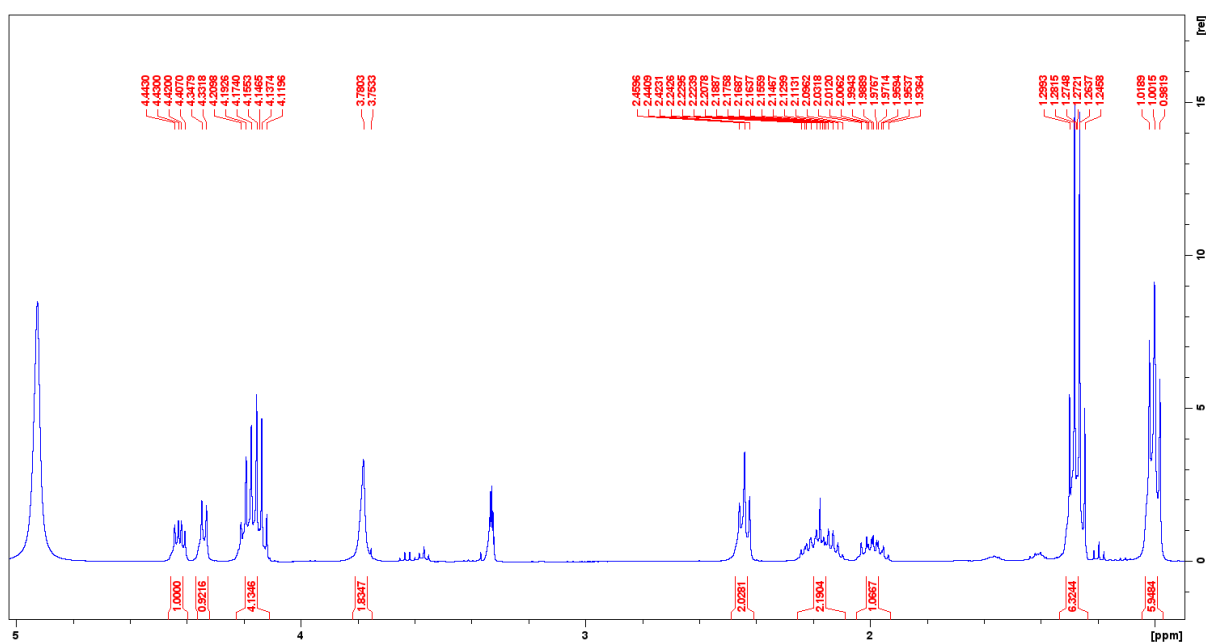




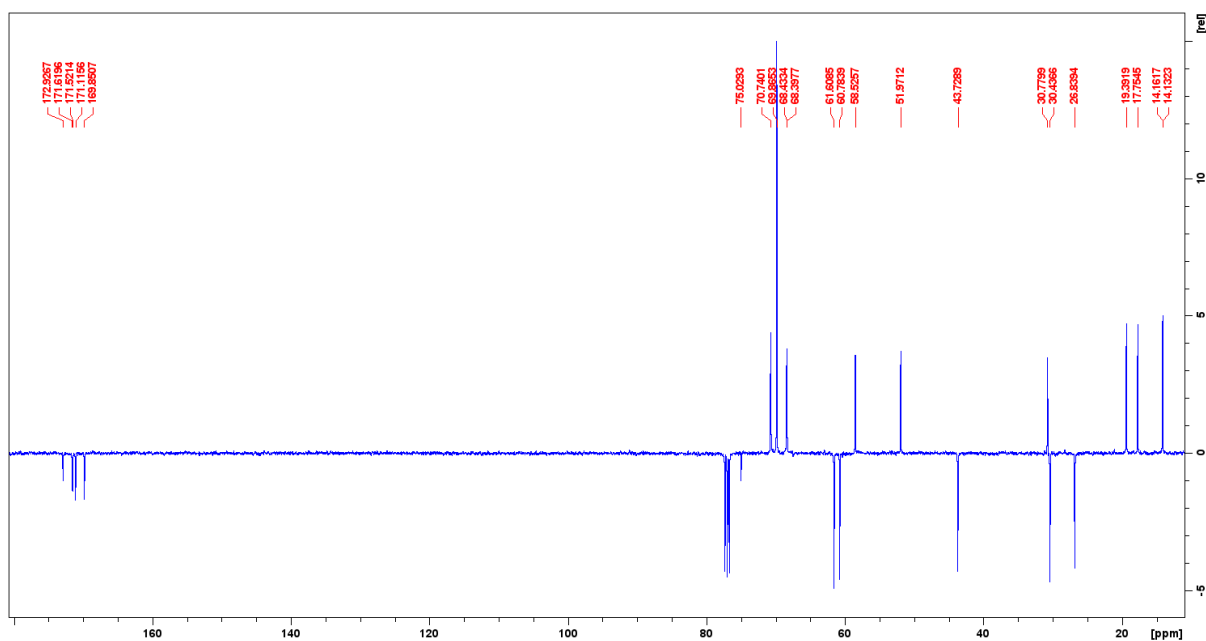
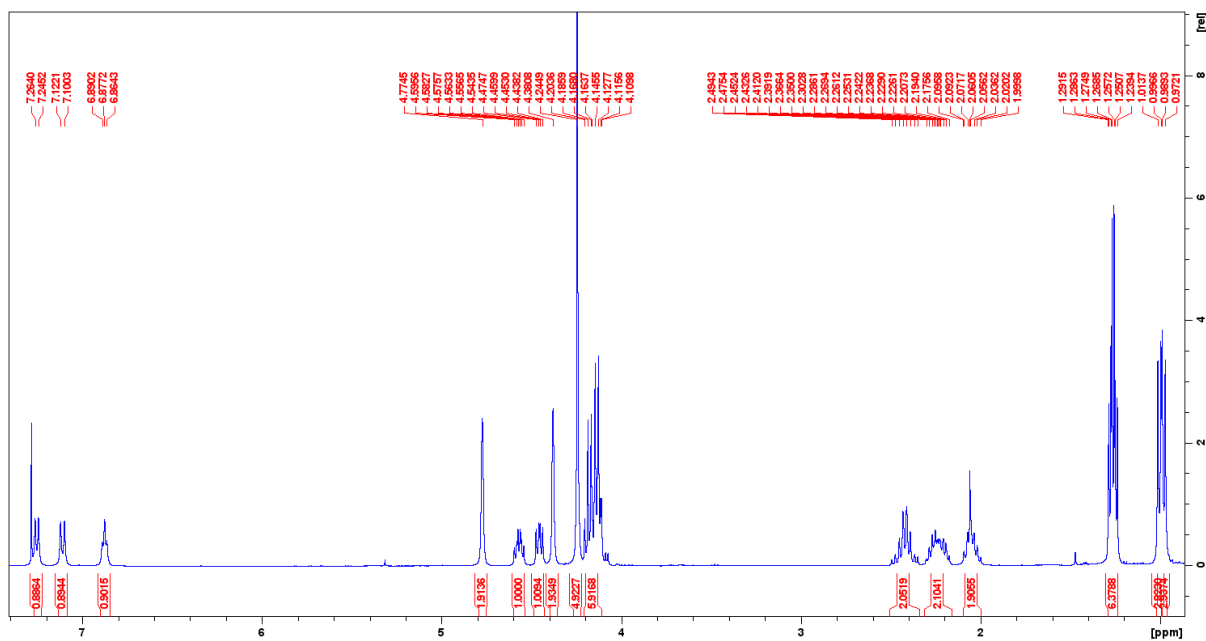
Dodatak D4: <sup>1</sup>H i DEPTQ NMR spektri spoja 4

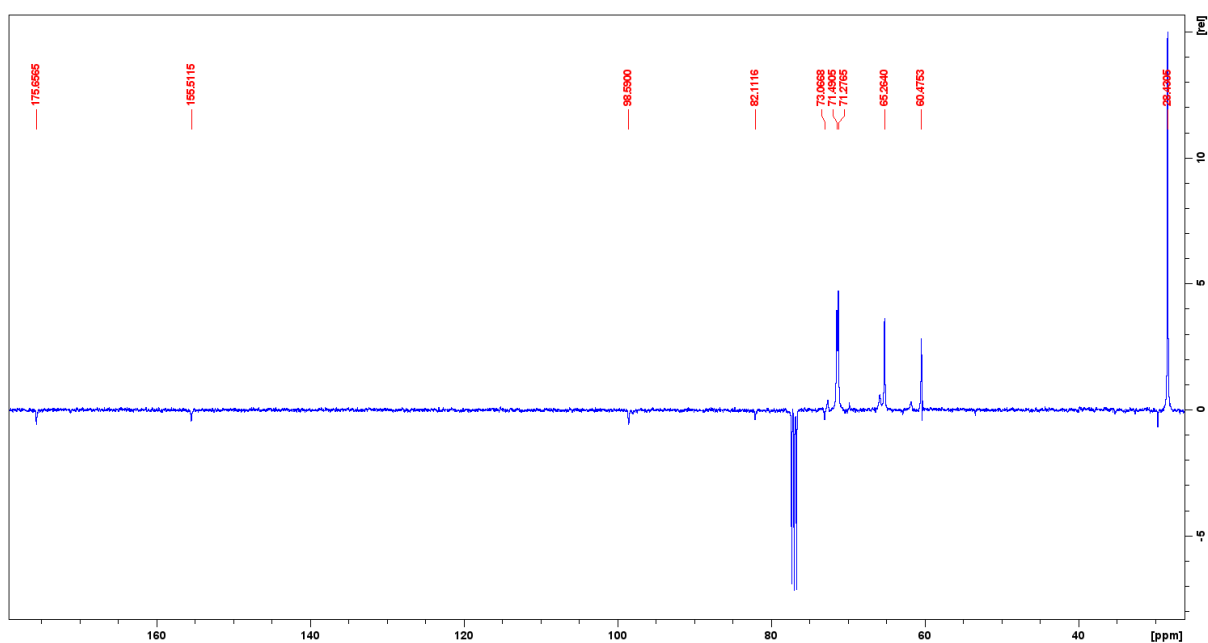
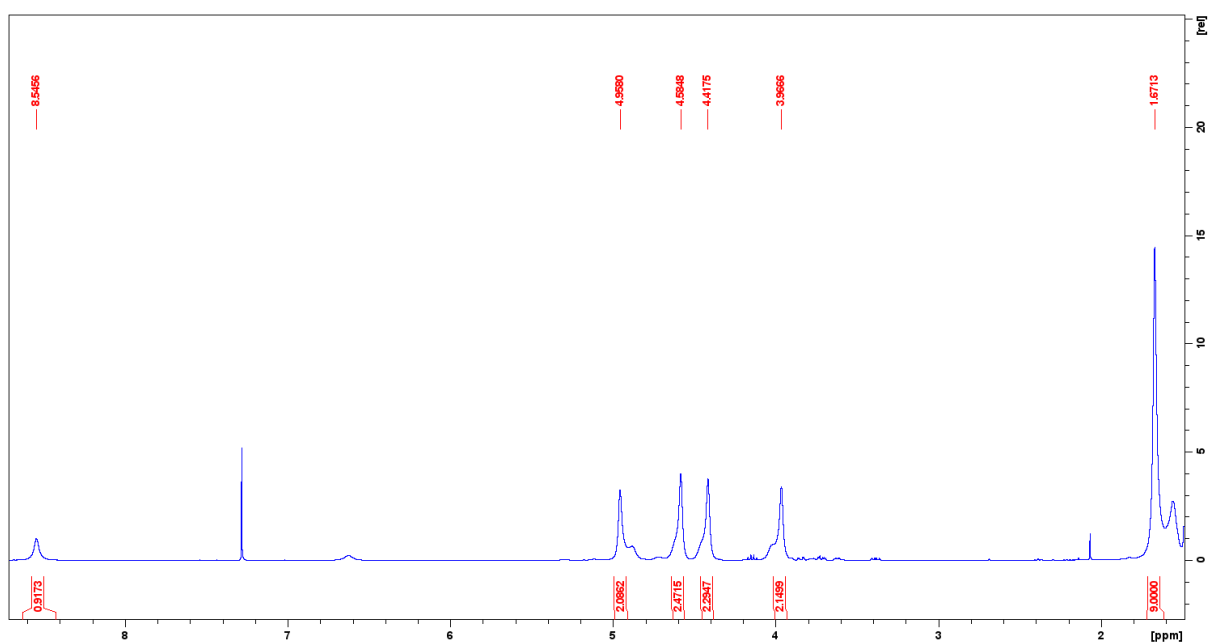


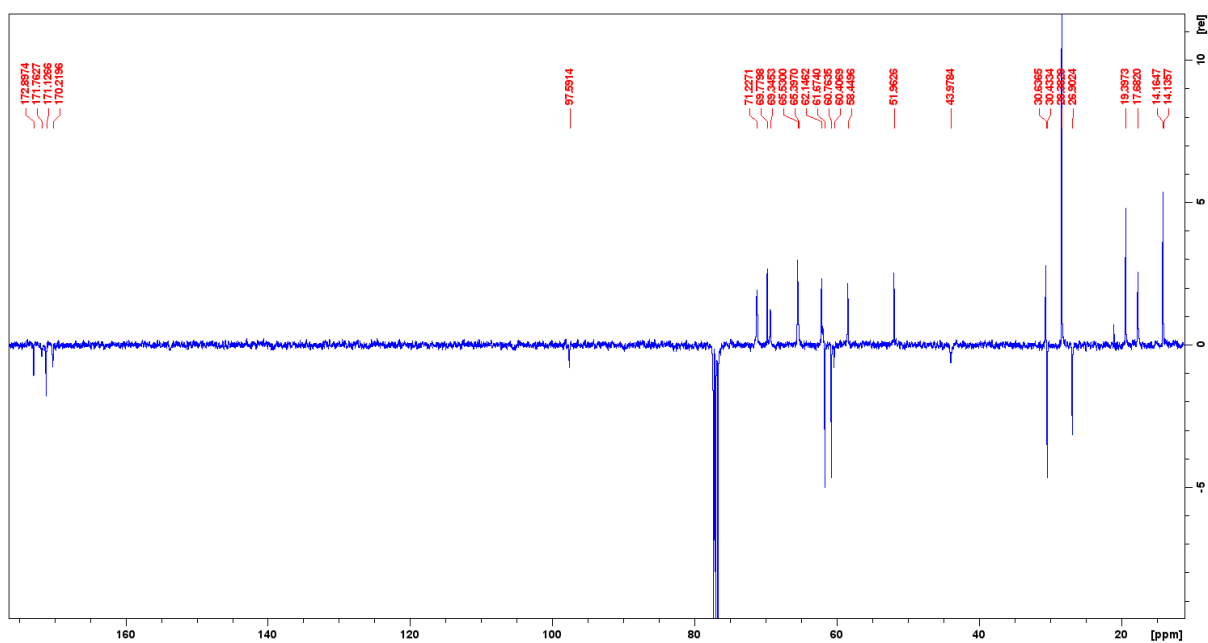
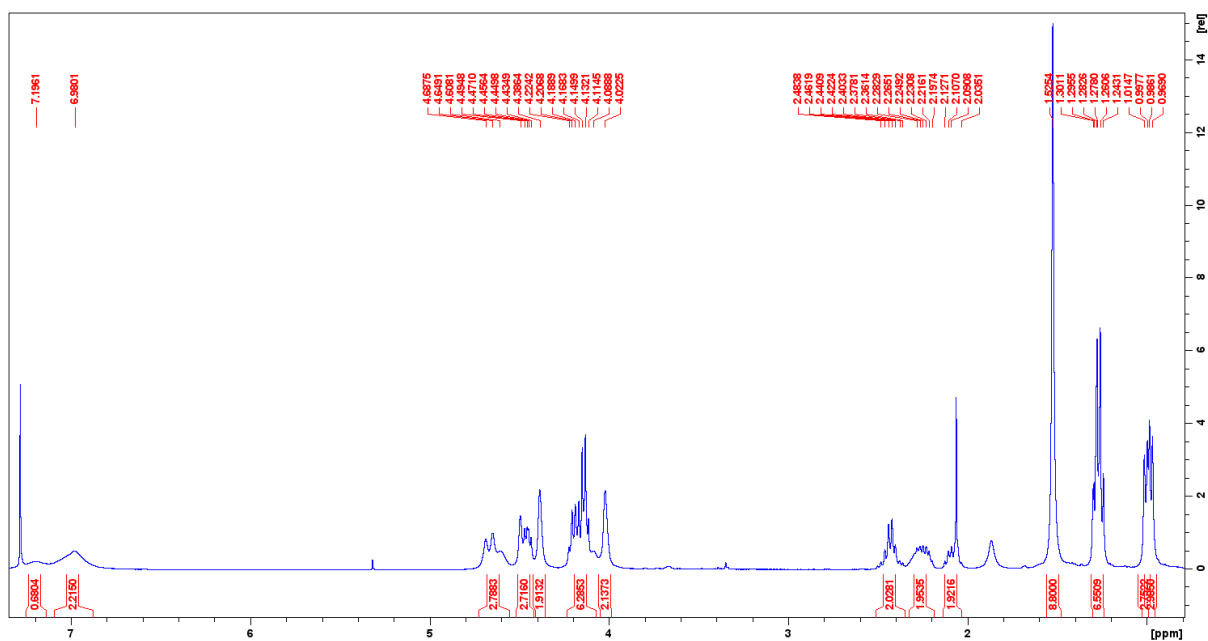
Dodatak D5: <sup>1</sup>H i DEPTQ NMR spektri spoja 5

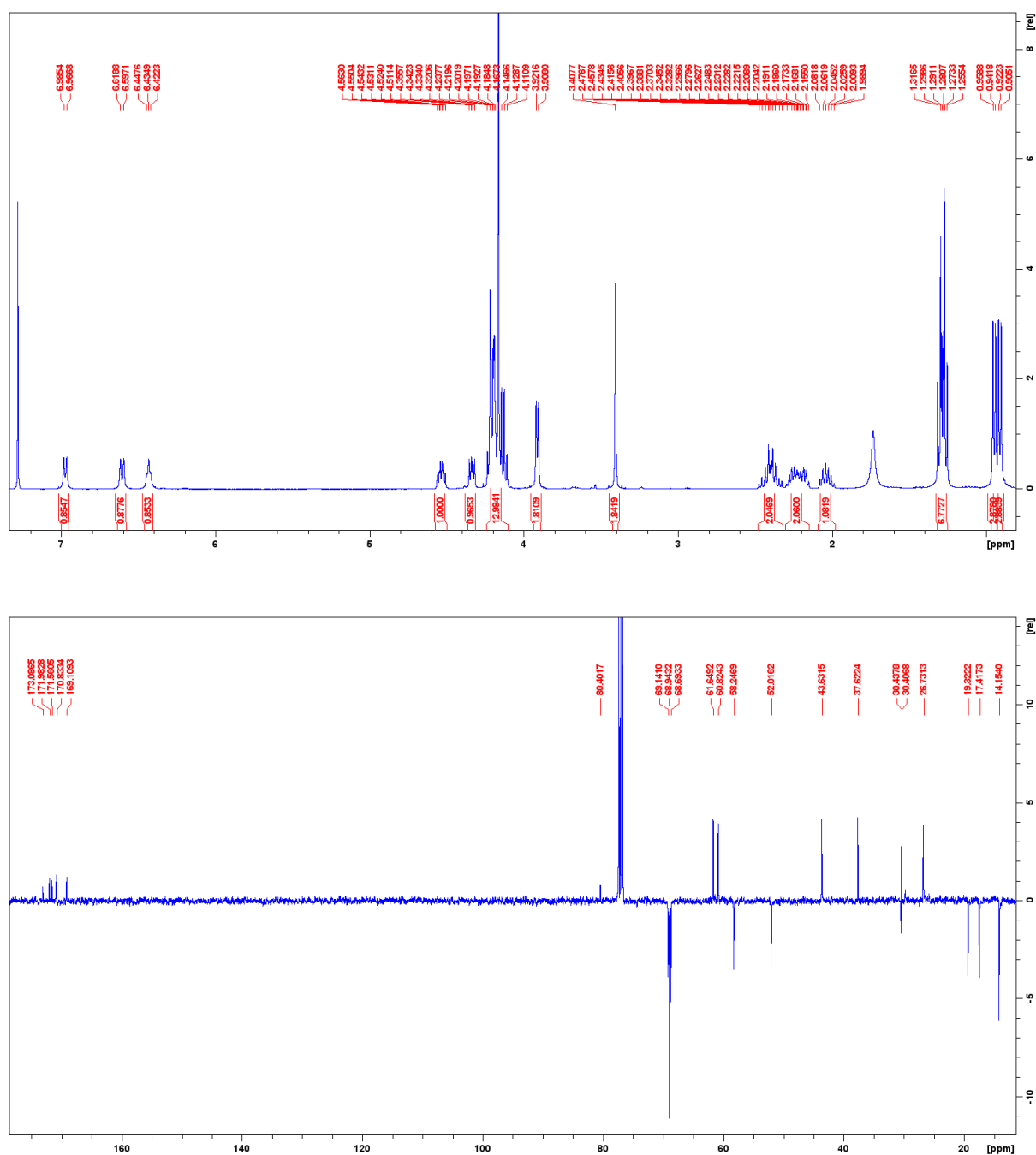


Dodatak D6: <sup>1</sup>H i DEPTQ NMR spektri spoja 6



Dodatak D7:  $^1\text{H}$  i DEPTQ NMR spektri spoja 7

Dodatak D8:  $^1\text{H}$  i DEPTQ NMR spektri spoja 8

Dodatak D9:  $^1\text{H}$  i DEPTQ NMR spektri spoja 9

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Karla Čižmešija

Datum rođenja: 17. rujna 1999.

Mjesto rođenja: Zagreb

### Obrazovanje

2006.–2014. I. Osnovna škola Dugave, Zagreb

2014.–2018. I. gimnazija, Zagreb

2018.–2022. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2018., 2023., 2024. Otvoreni dan kemije (Dan i noć na PMF-u)

### Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Ž. Car, K. Čižmešija, V. Petrović Peroković, R. Ribić, M. Kovačević, Š. Janež, Ž. Jakopin, L. Barišić, *Investigation of the structure–activity relationship of a series of novel NOD2 agonists with ferrocene motive*, EFMC-ISCB, 2nd EFMC International Symposium on Chemical Biology, Basel, Švicarska, 29.-31. siječnja 2025., postersko priopćenje.