

Sinteza, strukturna karakterizacija i biološko djelovanje manoziliranih desmuramil-peptida

Paurević, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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:217:952893>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-08**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Marija Paurević

**SINTEZA, STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA I
BIOLOŠKO DJELOVANJE MANOZILIRANIH
DESMURAMIL-PEPTIDA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Doc. dr. sc. Rosana Ribić

Zagreb, 2021.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Marija Paurević

**SYNTHESIS, STRUCTURAL CHARACTERIZATION
AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF MANNOSYLATED
DESMURAMYL PEPTIDES**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Dr. Rosana Ribić, Assistant professor

Zagreb, 2021.

Ova disertacija izrađena je na Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku pod vodstvom doc. dr. sc. Rosane Ribić u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija kemije pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Za moju obitelj...

Zahvale

Na početku, najljepše i iskreno hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Rosani Ribić. Hvala joj na velikom znanju kojeg mi je uvijek rado prenosila, konstruktivnim diskusijama, predanom radu i svom uloženom vremenu, strpljenju, snažnoj podršci i prijateljskim savjetima.

Zahvaljujem se prof. Srđanki Tomić koja mi je pružila priliku raditi u njezinom timu, koja me je usmjerila Rosani, bila podrška tijekom izrade ovog rada i tijekom poslijediplomskog studija.

Srdačno se zahvaljujem doc. Ivanu Kodrinu na izvedbi i pomoći oko provedbe konformacijske analize spojeva. Hvala mu na smjernicama, strpljenju, nesebičnoj podjeli znanja i prijateljskim savjetima.

Veliko hvala i doc. dr. sc. Aleksandri Maršavelski na provedbi i pomoći oko molekuskog pristajanja i molekulsko-dinamičkih simulacija kompleksa prikazanih u ovom radu. Također, zahvaljujem joj se i na svom uloženom trudu, prijenosu znanja, strpljenju, na kritičkom čitanju rada i savjetima.

Hvala izv. prof. Ivani Biljan na 2D NMR analizama peptida te dr. sc. Ranku Stojkoviću na imunizaciji miševa i dr. sc. Lidiji Milković i prof. dr. sc. Mariastefaniji Antici na mjerenjima antitijela.

Hvala i izv. prof. Vesni Petrović-Peroković i dr. sc. Željki Car na pomoći kad i gdje god je to bilo potrebno.

Srdačno hvala mojim kolegama s Odjela za kemiju, najviše cimerici Martini koja mi je velika podrška i oslonac, Tomi, Andrei, Milenku i Oliveri. Hvala i doc. dr. sc. Elviri Kovač-Andrić izv. prof. Berislavu Markoviću na slobodi koju su mi omogućili u mom istraživačkom radu te izv. prof. Dajani Gašo-Sokač na brojnim istraživačkim i životnim savjetima.

Hvala dugogodišnjim prijateljima koji su me razveseljavali, vjerovali u mene i bodrili te to čine i danas. Posebno hvala mojoj prijateljici i kumi Anamariji na snažnoj podršci.

Najljepše hvala mojim roditeljima, sestri, bratu, baki, Držislavu i nećacima na ljubavi, velikoj podršci, razumijevanju i pomoći.

Najveće hvala suprugu Luki, Riti i Petru na silnoj podršci, ljubavi i svemu što iz nje proizlazi!

I na kraju, najviše od svega, hvala Ti!

Sadržaj

SAŽETAK.....	XVI
ABSTRACT	XVIII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. CILJ I OPSEG RADA.....	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. IMUNOMODULATORI.....	4
2.1.1. <i>Muramil-dipeptid (MDP)</i>	5
2.1.1.1. <i>NOD2 PROTEIN</i>	6
2.1.1.2. <i>MEHANIZAM AKTIVACIJE NOD2 PROTEINA MDPom</i>	9
2.1.1.3. <i>BIOLOŠKI AKTIVNI DERIVATI MDPa</i>	10
2.1.2. <i>Desmuramil-dipeptid i njegovi lipofilni derivati</i>	11
2.1.3. <i>Manozni derivati desmuramil-dipeptida</i>	16
2.1.4. <i>Liposomi i sustavi za dostavu adjuvanata</i>	18
2.1.5. <i>Manozni receptori</i>	19
2.2. KEMIJSKA SINTEZA AMINOKISELINA I PEPTIDA	20
2.2.1. <i>Metode kemijske sinteze aminokiselina</i>	20
2.2.2. <i>Zaštitne skupine u sintezi peptida</i>	22
2.2.3. <i>Reakcije kondenzacije aminokiselina – metode i strategije priprave amidne veze</i>	24
2.3. METODE MODELIRANJA MOLEKULSKIH SUSTAVA	28
2.3.1. <i>Kvantno-mehaničke metode</i>	28
2.3.2. <i>Metode molekulske mehanike</i>	30
2.3.2.1. <i>METODE PRETRAŽIVANJA KONFORMACIJSKOG PROSTORA</i>	32
2.3.3. <i>Molekulsko-dinamičke (MD) simulacije</i>	33
2.3.4. <i>MD simulacije interakcija NOD2 i MDP derivata</i>	36
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	38
3.1. SINTETSKI DIO	38
3.1.1. <i>Materijali i metode</i>	38
3.1.2. <i>Priprava i karakterizacija spojeva</i>	39
3.1.2.1. <i>PRIPRAVA PEPTIDA KOJIMA JE PROVEDENA KONFORMACIJSKA ANALIZA</i>	39
3.1.2.1.1. <i>Benzilni ester L-alanil-D-izoglutamin-trifluoracetata (1)</i>	39
3.1.2.1.2. <i>L-Alanil-D-izoglutamin (2)</i>	40

3.1.2.1.3. Benzilni ester tert-butiloksikarbonil-(S)-(adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutamina (3).....	40
3.1.2.1.4. Benzilni ester (S)-(adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutamin trifluoracetata (4).....	41
3.1.2.1.5. (S)-(Adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutamin (5)	41
3.1.2.1.6. Benzilni ester N-[(fluoren-9-il)metoksikarbonil]-(O-benzil)-L-seril-(S)-(adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutamina (6)	42
3.1.2.1.7. L-Seril-(S)-(adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutamin (7)	42
3.1.2.2. PRIPRAVA 2-AMINOADAMANTAN-2-KARBOKSILNE KISELINE	43
3.1.2.2.1. Sinteza 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline metodom Streckerove sinteze aminokiselina	43
3.1.2.2.1.1. 2-Aminoadamantan-2-karbonitril (8)	43
3.1.2.2.1.2. N-(2-Cijanoadamant-2-il)benzamid (9).....	43
3.1.2.2.1.3. 2-Benzamidoadamantan-2-karboksilna kiselina (10)	44
3.1.2.2.1.4. Hidroklorid 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline (11)	44
3.1.2.2.2. Sinteza 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline u autoklavu putem spirohidantoina kao međuprodukta.....	45
3.1.2.2.2.1. Spiro(adamantan-2,4'-imidazolin)-2,5'-dion (12).....	45
3.1.2.2.2.2. 2-Aminoadamantan-2-karboksilna kiselina (13)	45
3.1.2.2.3. Zaštita amino skupine 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline.....	46
3.1.2.2.3.1. N-(tert-butiloksikarbonil)-2-aminoadamantan-2-karboksilna kiselina (14).....	46
3.1.2.3. SINTEZA MANOZILIRANOG PREKURSORA.....	46
3.1.2.3.1. 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- α -D-manopiranoza (15).....	46
3.1.2.3.2. 2,3,4,6-Tetra-O-acetil- α -D-manopiranoza (16).....	47
3.1.2.3.3. Sinteza O-manozida	48
3.1.2.3.3.1. Tert-butil-2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranoziloksi)acetat (17).....	48
3.1.2.3.3.2. 2-(2,3,4,6-Tetra-O-acetil- α -D-manopiranoziloksi)octena kiselina (18)	49
3.1.2.4. SINTEZA DIMANOZILIRANOG LIZINA	50
3.1.2.4.1. Di-p-toluensulfonat benzilnog estera L-lizina (19).....	50
3.1.2.4.2. Benzilni ester (2S)-2,6-di[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranoziloksi)-acetilamino] heksanske kiseline (20).....	50
3.1.2.4.3. (2S)-2,6-Di[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranoziloksi)-acetilamino] heksanska kiselina (21)	51
3.1.2.5. PRIPRAVA SPOJEVA KOJIMA JE ISPITANA IMUNOMODULACIJSKA AKTIVNOST	52
3.1.2.5.1. Sinteza adamantanskog desmuramil-peptida i njegovih manoznih derivata	52
3.1.2.5.1.1. Benzilni ester 4-{2-[(2-tert-butoksikarbonilaminoadamantan-2-karbonil)amino]-propionilamino}-4-karbamoilbutanske kiseline (22).....	52
3.1.2.5.1.2. Benzilni ester 4-{2-[(2-aminoadamantan-2-karbonil)amino]propionilamino}-4-karbamoilbutanske kiseline (23).....	53

3.1.2.5.1.3. 4-{2-[(2-aminoadamantan-2-karbonil)amino]propionilamino}-4-karbamoilbutanska kiselina (24)	54
3.1.2.5.1.4. Benzilni ester 4-{2-[(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranoziloksi)etanoil]-aminoadamantan-2-karbonil)amino]propionilamino}-4-karbamoilbutanske kiseline (25)	54
3.1.2.5.1.5. 4-{2-[(2-(α -D-manopiranoziloksi)etanoil)-aminoadamantan-2-karbonil)amino]-propionilamino}-4-karbamoilbutanska kiselina (26)	55
3.1.2.5.1.6. Benzilni ester 4-{2-[(2-(2S)-2,6-di{2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranoziloksi)acetilamino}heksanoil)-aminoadamantan-2-karbonil)amino]propionilamino}-4-karbamoilbutanske kiseline (27).....	56
3.1.2.5.1.7. 4-{2-[(2-(2S)-2,6-di{2-(α -D-manopiranoziloksi)acetilamino}heksanoil)-aminoadamantan-2-karbonil)amino]propionilamino}-4-karbamoilbutanska kiselina (28).....	57
3.2. RAČUNALNI DIO	58
3.2.1. Konformacijska analiza peptida	58
3.2.2. Priprema sustava za MD simulacije	58
3.2.3. Docking	60
3.2.4. Simulacije molekulske dinamike	60
3.2.5. MM/GBSA pristup računanju relativnih slobodnih energija s obzirom na pojedine aminokiseline	62
3.3. ISPITIVANJE IMUNOMODULACIJSKE AKTIVNOSTI.....	63
3.3.1. Eksperimenti in vivo	63
3.3.2. Enzimski imunotest.....	64
3.3.2.1. ENZIMSKI IMUNOTEST ZA KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE UKUPNIH IMUNOGLOBULINA G SPECIFIČNIH ZA OVA (ANTI-OVA IgGa, ANTI-OVA IgG1 I ANTI-OVA IgG2a) U MIŠJEM SERUMU.....	64
3.3.2.2. STATISTIČKA ANALIZA	64
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	65
4.1. SINTEZA I KONFORMACIJSKA ANALIZA ADAMANTILGLICIL-DESMURAMILPEPTIDA.....	65
4.1.1. Priprava desmuramil-dipeptida s ugrađenim (S)-adamantil-glicinom	65
4.1.2. Konformacijska analiza računalnim modeliranjem	66
4.1.2.1. CILJ ISTRAŽIVANJA I MODELNI SPOJEVI.....	66
4.1.2.2. KARAKTERIZACIJA NAJSTABILNIJIH KONFORMERA I OBRAZACA VODIKOVIH VEZA.....	68
4.1.2.2.1. Dipeptid L-Ala-D-izoGln 2	69
4.1.2.2.2. Tripeptid (S)-AdGly-L-Ala-D-izoGln 5	70
4.1.2.2.3. Tetrapeptid L-Ser-(S)-AdGly-L-Ala-D-izoGln 7	72
4.1.3. NMR konformacijska analiza u otopini.....	74
4.2. SINTEZA I IMUNOSTIMULACIJSKA SVOJSTVA MANOZILIRANIH DERIVATA DESMURAMIL-PEPTIDA	78

4.2.1. Sinteza manoziliranih derivata desmuramil-peptida	78
4.2.1.1. SINTEZA 2-AMINOADAMANTAN-2-KARBOKSILNE KISELINE	79
4.2.1.2. SINTEZA DESMURAMIL-TRYPEPTIDA S UGRAĐENOM 2-AMINOADAMANTAN-2-KARBOKSILNOM KISELINOM 24.....	81
4.2.1.3. PRIPRAVA ACETILIRANE α -D-MANOPIRANOZE.....	81
4.2.1.4. PRIPRAVA O-MANOZIDA.....	83
4.2.1.5. PRIPRAVA DI-p-TOLUENSULFONAT BENZILNOG ESTERA L-LIZINA	84
4.2.1.6. KONDENZACIJA 2-(2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL- α -D-MANOPIRANOZILOKSI)OCTENE KISELINE I BENZILNOG ESTERA DI-p-TOLUENSULFONAT L-LIZINA.....	84
4.2.1.7. SINTEZA MANOZILIRANOG DERIVATA DESMURAMIL-PEPTIDA 26	85
4.2.1.8. SINTEZA DIMANOZILIRANOG DERIVATA DESMURAMIL-PEPTIDA 29	86
4.2.2. Ispitivanje imunostimulacijskog djelovanja u mišjem modelu	87
4.2.3. Molekulsko-dinamičke simulacije kompleksa manoziliranih desmuramil-peptida i NOD2 receptora	92
4.2.3.1. MOLEKULSKO-DINAMIČKE SIMULACIJE S ManAdDMP-OM	92
4.2.4. Struktura NOD2 receptora i MD simulacije kompleksa NOD2 i ManAdDMP	94
4.2.4.1. DŽEP 1 (SWISS-MODEL STRUKTURA)	95
4.2.4.2. DŽEP 2 (SWISS-MODEL STRUKTURA)	98
4.2.5. Molekulsko-dinamičke simulacije s manoziliranim desmuramil-peptidima 26 i 28	104
4.3.7.1. MD simulacije kompleksa NOD2 i liganada 26 i 28 u džepu 1	104
4.3.7.2. MD simulacije kompleksa NOD2 i liganada 26 i 28 u džepu 2a	112
4.3.7.3. MD simulacije kompleksa NOD2 i liganada 26 i 28 u džepu 2b	114
§ 5. ZAKLJUČAK	119
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ (PREMA POTREBI)	122
§ 7. LITERATURNI IZVORI	126
§ 8. DODATAK	XX
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXXVII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

SINTEZA, STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKO DJELOVANJE MANOZILIRANIH DESMURAMIL-PEPTIDA

Marija Paurević

Odjel za kemiju, Cara Hadrijana 8/A, 31 000 Osijek, Hrvatska

U disertaciji je opisana sinteza novih desmuramil-peptida s ugrađenim adamantanskim aminokiselinama te manoznih derivata peptida s ciljem istraživanja njihovih imunomodulacijskih svojstava i strukturnih karakteristika. Sinteza peptida i glikopeptida je optimirana. Imunomodulacijska aktivnost desmuramil-peptida s ugrađenom 2-aminoadamantan-2-karboksilnom kiselinom i manoznih derivata ispitana je *in vivo* u mišjem modelu. Učinci sintetiziranih spojeva određeni su temeljem izmjerene ukupne količine specifičnih anti-OVA IgG antitijela i potklasa IgG antitijela te uspoređeni s aktivnošću literaturno opisanog ManAdDMP adjuvanta. Manozilirani derivati pokazali su pojačanu imunostimulacijsku aktivnost, dok se dimanozilirani derivat pokazao najaktivnijim adjuvantom ove serije spojeva. U disertaciji je opisana i sustavna konformacijska analiza odabranih desmuramil-peptida u vodi i DMSO primjenom računalnih metoda i spektroskopije NMR. Provedene su i molekulsko-dinamičke simulacije kompleksa manoziliranih desmuramil-peptida i intaktnog NOD2 receptora te su identificirane ključne aminokiseline za vezanje ove klase spojeva na receptor.

(132 + xxxvii stranica, 50 slika, 19 shema, 6 tablica, 163 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: 2-aminoadamantan-2-karboksilna kiselina / desmuramil-dipeptid / imunomodulacijska aktivnost / manozna / molekulsko-dinamičke simulacije / NOD2 receptor

Mentor: doc. dr. sc. Rosana Ribić

Rad prihvaćen: [dan sjednice Vijeća KO PMF]

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
2. prof. dr. sc. Snežana Miljanić
3. prof. dr. sc. Lidija Barišić



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

SYNTHESIS, STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF MANNOSYLATED DESMURAMYL PEPTIDES

Marija Paurević

Department of Chemistry, Cara Hadriana 8/A, 31 000 Osijek, Croatia

In the thesis the synthesis of new desmuramyl peptides with incorporated adamantane amino acids and their mannose peptide derivatives is described. Compounds are prepared in order to investigate their immunomodulatory properties and structural characteristics. Peptide and glycopeptide synthesis were optimized and obtained products were structurally characterized. The immunomodulatory activity of desmuramyl peptides with incorporated 2-aminoadamantane-2-carboxylic acid and mannose derivatives was examined *in vivo* using a mouse model. The effects of the compounds were determined based on the total amount of specific anti-OVA IgG antibodies and subclasses of IgG antibodies and compared with the activity of the known ManAdDMP adjuvant. Mannosylated derivatives showed enhanced immunostimulatory activity, while the dimanosylated derivative proved to be the most active adjuvant. In the thesis a systematic conformational analysis of selected desmuramyl peptides in water and DMSO was performed using computational modeling and NMR spectroscopy. Molecular dynamics simulations of mannosylated desmuramyl peptide complexes with intact NOD2 receptor were also performed, and key amino acid residues involved in binding have been identified.

(132 + xxxvii pages, 50 figures, 19 schemes, 6 tables, 163 references, original in Croatian)

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

Keywords: 2-aminoadamantane-2-carboxylic acid / desmuramyl dipeptide / immunomodulatory activity / mannose / molecular dynamics simulations / NOD2 receptor

Supervisor: Dr. Rosana Ribić, Assistant Professor

Thesis accepted: [dan sjednice Vijeća KO PMF]

Reviewers:

Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor

Dr. Snežana Miljanić, Professor

Dr. Lidija Barišić, Professor

§ 1. UVOD

Cijepljenje se smatra najučinkovitijom i najisplativijom mjerom u sprečavanju širenja zaraznih bolesti i karcinoma, što je osobito vidljivo trenutno u vrijeme pandemije COVID-19 bolesti. Osnova cjepiva je dobro karakterizirani antigen. Međutim, imunološki odgovor organizma često je slab, ponajviše zbog nemogućnosti antigena da inducira sazrijevanje dendritičkih stanica, primarnih stanica koje prezentiraju antigen i time utječu na aktivaciju imunološkog odgovora. Adjuvanti su tvari koje se dodaju cjepivima kako bi se ubrzala, produžila ili pojačala specifična imunoreakcija na određeni antigen. Dodavanjem adjuvanata cjepivima koja nisu dovoljno imunogenična omogućuje se bolja obrana organizma od patogena.¹ Mogu utjecati i na smanjenje doze cjepiva, a time i na uštedi antigena, kao i na redukciju broja potrebnih cijepljenja.² Velik je broj različitih adjuvantski aktivnih tvari. U disertaciji će biti opisana jedna vrsta peptidnih adjuvanata, derivati muramil-dipeptida (MDP).³

Muropeptidi su fragmenti peptidoglikana, prirodnih polimera koji izgrađuju stanične stijenke bakterija te imaju veliki imunostimulacijski potencijal. Muramil-dipeptid, *N*-acetilmuramil-*L*-alanil-*D*-izoglutamin, najmanja je strukturna jedinica peptidoglikana koja pokazuje imunostimulacijsku aktivnost. Nedavno je potvrđeno da se MurNAc-*L*-Ala-*D*-izoGln direktno veže na NOD2 receptor i time stimulira produkciju NF- κ B.⁴ NF- κ B je transkripcijski aktivator, kompleks proteina koji kontrolira transkripciju DNA te ima važnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora na infekciju tako da utječe na proizvodnju citokina i kemokina. Poznato je da i relativno male promjene u primarnoj strukturi MDPa mogu utjecati na molekularno prepoznavanje od strane NOD2, a time i na modulaciju imunološkog odgovora.⁵

Sintetizirani su brojni derivati i analozi MDPa kako bi se poboljšala njegova imunomodulacijska aktivnost i umanjile nuspojave kao što su pirogenost, artritogenost i toksičnost.⁶ Analozi muramil-dipeptida bez hidrofilne *N*-acetilmuramilne skupine nazivaju se desmuramil-peptidi. Literaturno je poznato nekoliko derivata desmuramil-dipeptida koji imaju vezanu lipofilnu adamantansku podjedinicu na *L*-Ala-*D*-izoGln desmuramil-dipeptid (DMP). Općenito, adamantanske strukture imaju mnoga terapijska svojstva (antivirusno, antibakterijsko, antitumorsko svojstvo itd.) te zbog svoje lipofilnosti omogućuju lakši unos i dostavu potencijalnih lijekova u stanice. Izomeri adamantil-tripeptida (AdTP), (Ad-1-il)- i (Ad-2-il)-Gly-*L*-Ala-*D*-izoGln, apirogeni su i netoksični spojevi koji pokazuju imunostimulacijsko

djelovanje u pokusima *in vivo*, u mišjem modelu.⁷ Također, manoziliranje spomenutih adamantanskih derivata desmuramil-dipeptida rezultira pojačanom imunomodulacijskom aktivnošću.⁸ Najaktivniji manozilirani derivat AdTP je ManAdDMP s glikolnom poveznicom između šećernog i peptidnog dijela, za kojeg je pokazano da imunološki odgovor usmjerava prema Th2 tipu.⁹

1.1. CILJ I OPSEG RADA

Cilj disertacije je priprava i ispitivanje imunomodulacijskog učinka manoziliranih desmuramil-peptida u svrhu proučavanja utjecaja manoze na biološko djelovanje desmuramil-dipeptida kojemu je osim manoze, uvedena i adamantanska struktura. U radu će biti prikazana i priprava kompleksa odabranih manoziliranih desmuramil-peptida i NOD2 receptora računalnim metodama (molekulska pristajanje, engl. *molecular docking*, i metode simulacije molekulske dinamike), te konformacijska analiza peptida u vodi i DMSOu kao otapalima.

Prvi dio istraživanja uključuje sintezu desmuramil-dipeptida te adamantanskih tri- i tetrapeptida u kojima je lipofilna adamantanska skupina na desmuramil-dipeptidu uvedena u obliku (*S*)-(adamant-1-il)glicina. Opisana je sustavna konformacijska analiza desmuramil-dipeptida te tri- i tetrapeptida s ugrađenim (*S*)-(adamant-1-il)glicinom. Proučeni su obrasci vodikovih veza upotrebom računalne metode i spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije.

Drugi dio istraživačkog rada uključuje sintezu manozida s glikolnom poveznicom koja će se koristiti za vezanje manoze na desmuramil-peptide, odnosno za pripravu nove serije monomanoziliranih i dimanoziliranih derivata desmuramil-peptida s ugrađenom akiralnom adamantanskom aminokiselinom. U dimanoziliranom spoju, dvije molekule manoze bit će vezane preko dvije amino skupine lizina na adamantil-tripeptid. U sintezi amidne veze koristit će se optimizirana karbodiimidna metoda stvaranja peptidne veze uz 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid kao kondenzacijski reagens i 1-hidroksi-benzotriazol kao pomoćni reagens. Imunomodulacijsko djelovanje novih spojeva ispitano je *in vivo* u mišjem modelu te je uspoređeno s aktivnošću literaturno opisanog ManAdDMP adjuvanta⁹.

Literaturno je poznato da MDP vezanjem i aktivacijom NOD2 receptora stimulira imunološki odgovor. U riješenoj kristalnoj strukturi NOD2 (PDB: 5IRN) nedostaje sedam fleksibilnih petlji koje mogu doprinijeti vezanju liganda u vezno mjesto NOD2. Stoga je

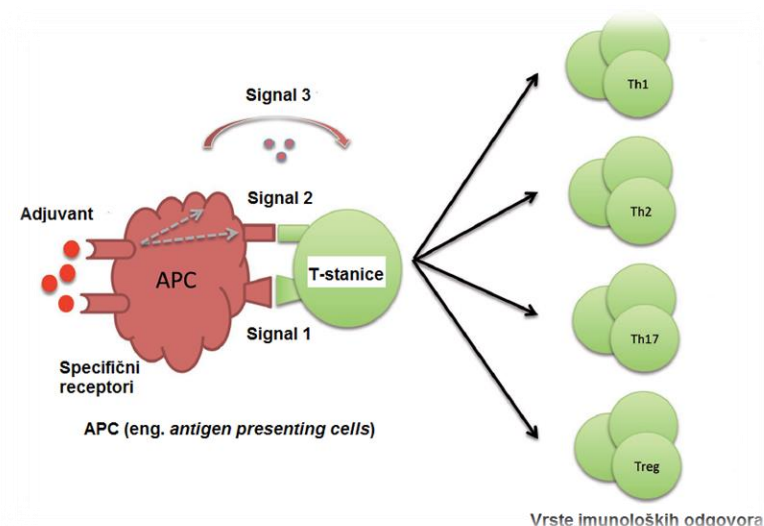
modelirana intaktna struktura NOD2 receptora sa sedam petlji koje su nedostajale u kristalnoj strukturi, kao i kompleksi NOD2 receptora i optimiziranih spojeva. Opisana su potencijalna vezna mjesta i prikazane specifične interakcije između liganda i receptora. Ovim dijelom istraživanja dobiven je uvid u interakcije ostvarene između NOD2 receptora i manoziliranih desmuramil-peptida koje će doprinijeti razumijevanju međuodnosa strukturnih i bioloških svojstava ove klase spojeva, kao i dizajnu aktivnijih MDP-mimetika.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. IMUNOMODULATORI

Imunomodulatori su tvari koje reguliraju imununološki odgovor te se dodaju cjepivima koja nisu dovoljno imunogenična kako bi ubrzali, pojačali ili produžili specifičnu imunoreakciju na određen antigen.³ Osnovna klasifikacija imunomodulatora uključuje podjelu na imunosupresive te imunostimulatore, koji su poznati i pod imenom adjuvanti (lat. *adiuvare* – pomagati), dok se prema strukturnim karakteristikama adjuvanti mogu grupirati u nekoliko skupina. Možemo ih podijeliti na mineralne spojeve, među kojima su u ljudskim cjepivima najzastupljenije aluminijske soli, tvari bakterijskog podrijetla, samostalno sastavljene peptide, različite polimerne čestice, uljne emulzije, imunostimulirajuće komplekse, saponine te liposome i virosome.¹⁰ Najčešći i najdulje korišteni adjuvanti su oni na bazi aluminijske soli koji se dodaju u obliku aluminijskog hidroksida, aluminijskog fosfata ili stipsa.

Brojni su načini djelovanja adjuvanata u organizmu, a jedan od značajnijih je i usmjerenje imunoreakcije prema pojedinom tipu imunološkog odgovora; Th1, Th2, Th17 ili Treg vrsti odgovora. Sam mehanizam se odvija preko APC stanica (engl. *antigen presenting cells*), stanica koje prezentiraju antigen T-stanicama imunološkog sustava, među kojima su najznačajnije dendritičke stanice. Dendritičke stanice imaju važnu ulogu u premošćivanju urođenog i stečenog imunološkog odgovora. One nespecifičnim ulaskom u stanicu i svojevrsnom obradom antigena, prezentiraju specifični dio antigena T stanici što rezultira njezinom aktivacijom. Koji tip imunološkog odgovora će se aktivirati, ovisi i o angažmanu specifičnih receptora za prepoznavanje patogena (engl. *pathogen recognition receptors*, PRR) na APC stanicama (Slika 1).^{2,11} Četiri su vrste receptora za prepoznavanje patogena koji se danas intenzivno istražuju: Toll-like receptori (TLR), RIG-I-like receptori (RLRs), NOD-like receptori (NLRs) i lektini tipa C (CLRs).¹²

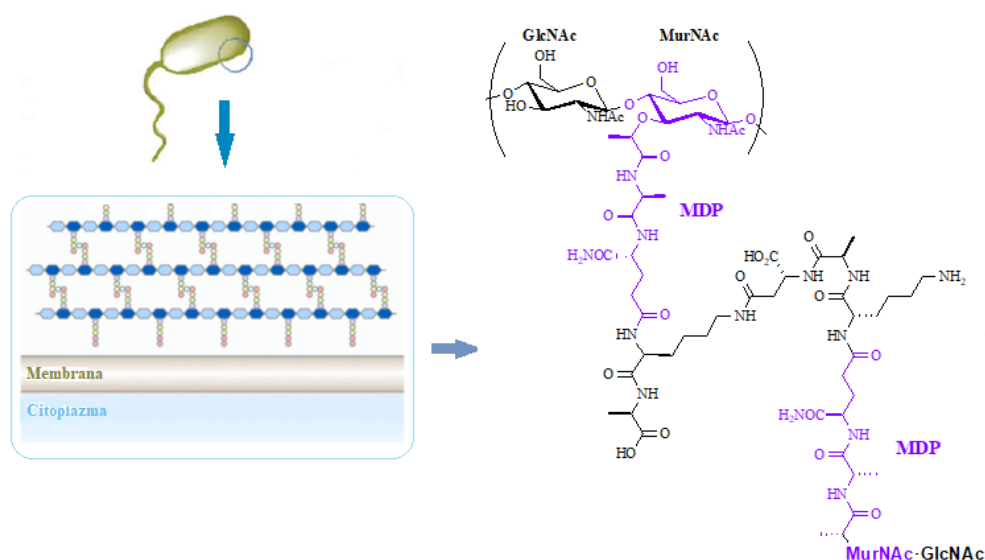


Slika 1. Uloga adjuvanata u usmjeravanju imunoreakcije prema pojedinom tipu imunološkog odgovora.¹¹

Među brojnim vrstama tvari koje pokazuju adjuvantsko djelovanje, velika pozornost je posvećena proučavanju peptidnih adjuvanata. U jednu vrstu peptidnih adjuvanata izvedenih iz bakterija, ubrajamo i derivate muramil-dipeptida (MDP), koji su predmet istraživanja ovog rada.

2.1.1. Muramil-dipeptid (MDP)

Muramil-dipeptid, *N*-acetilmuramil-*L*-alanil-*D*-izoglutamin, najmanja je strukturna jedinica peptidoglikana koja ima ulogu aktivatora urođenog imunološkog odgovora. Peptidoglikani (PGN) su prirodni polimeri koji izgrađuju staničnu stijenku Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Građeni su od alternirajućih molekula *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i *N*-acetilmuraminske kiseline (MurNAc) međusobno povezanih β -glikozidnom vezom, a umreženih preko kratkih peptida vezanih na MurNAc (Slika 2).



Slika 2. Shematski prikaz strukture MDPa kao sastavnog dijela stanične stijenke Gram-pozitivnih bakterija.

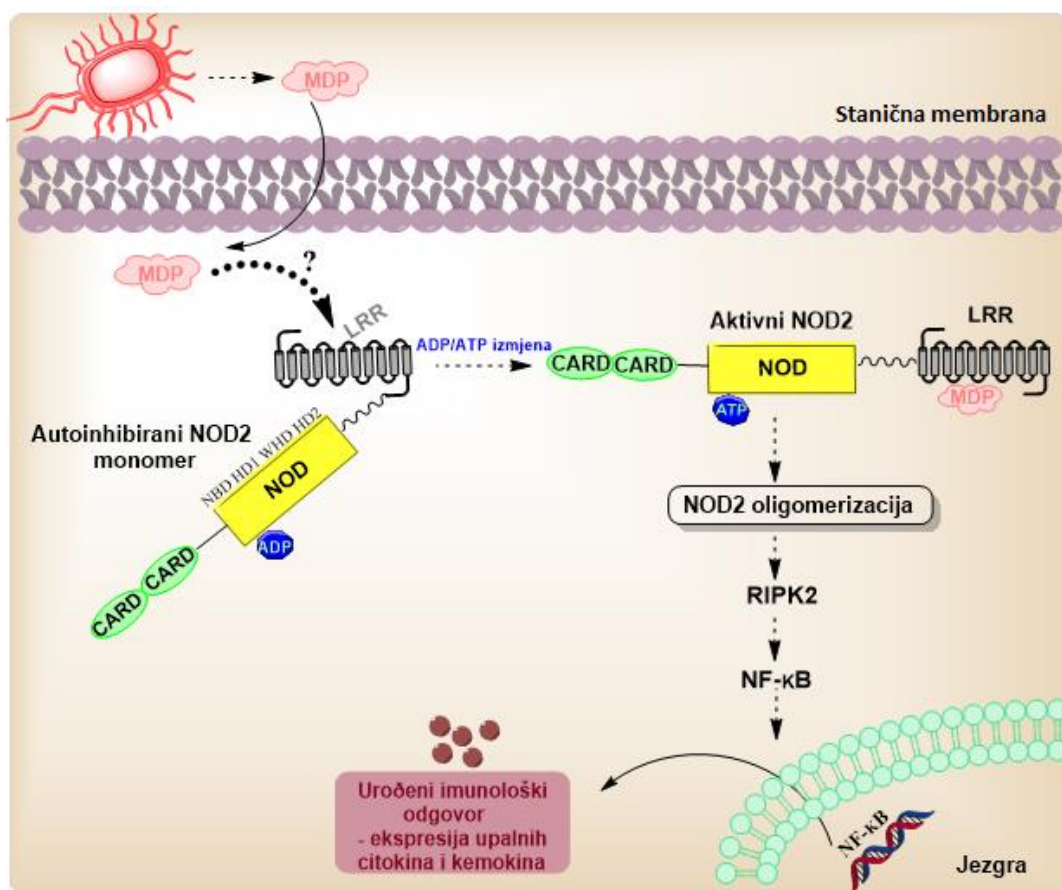
MDP aktivira urođeni imunološki sustav, tj. „pokreće“ imunološki odgovor aktivacijom NOD2 receptora (engl. *Nucleotide binding oligomerization domain-containing protein 2*, NOD2).

2.1.1.1. NOD2 PROTEIN

NOD2 (engl. *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*) protein, koji se također poznat i pod nazivima CARD15 (engl. *Caspase recruitment domain-containing protein 15*) i IBD1 (engl. *Inflammatory bowel disease protein 1*) unutarstanični je protein koji je u ljudskom organizmu kodiran NOD2 genom, smještenom na kromosomu 16. Ubraja se u NLR skupinu proteina (engl. *Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing protein gene family*, NLR), a zajedno s Toll-like receptorima pripada skupini evolucijski očuvanih receptorskih proteina PRR (engl. *Pattern recognition receptors*) koji domaćinu omogućavaju prepoznavanje patogenima pridruženih molekularnih slijedova, PAMPa (engl. *Pathogen Associated Molecular Patterns*).¹³ Uslijed aktivacije specifičnim ligandima, NLR oligomeriziraju u velike multiproteinske komplekse i aktiviraju urođeni imunološki odgovor (induciraju upalni proces, autofagocitozu ili staničnu smrt).¹⁴

Ljudski NOD2 je velik protein (1040 aminokiselina, 110 kD). Sastoji se od dvije N-terminalne, tandemske domene regrutacije kaspaze odnosno CARD (engl. *Caspase recruitment domain*, CARD), koje funkcioniraju kao efektorske domene i aktiviraju se MDPom, središnje

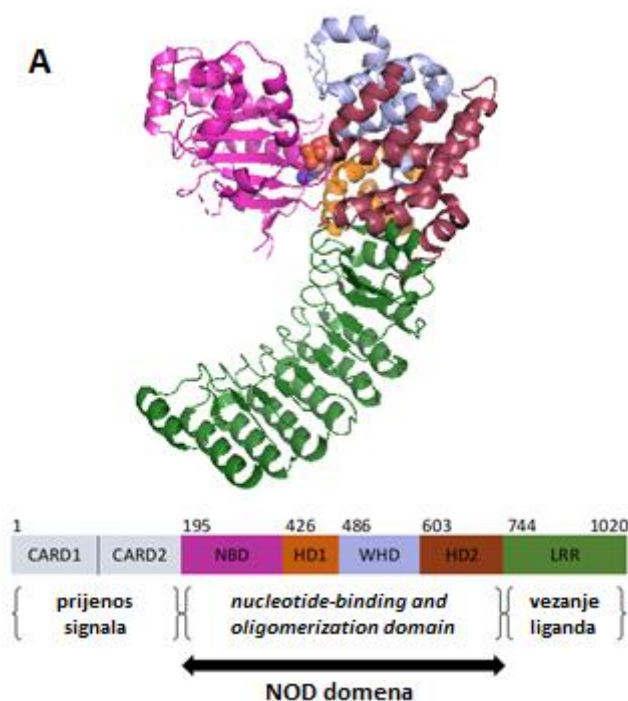
NOD domene koja sadrži 4 poddomene (NBD – engl. *Nucleotide-binding domain*; HD1 – engl. *Helical domain 1*; WHD – engl. *Winged helical domain*; HD2 – engl. *Helical domain 2*) i ima ulogu u vezanju i hidrolizi ATPa, te C-terminalne LRR domene (engl. *Leucine-rich domain*) za koju se vjeruje da sudjeluje u interakciji s ligandom. NOD2 se aktivira interakcijom s MDP pri čemu dolazi do samo-oligomerizacije proteina (iz inaktivne, „presavijene“ forme prelazi u rasklopljeno, aktivno stanje kroz niz konformacijskih promjena) i aktivira se nizvodna signalizacija u kojoj dolazi do regrutiranja RIPK2 (engl. *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2*) kroz CARD–CARD interakcije proteina. Konformacijske promjene kojim protein postiže aktivno stanje, uzrokovane su i izmjenom ADPa za ATP (ADP ima važnu ulogu u zadržavanju proteina u zatvorenoj formi), što stabilizira rasklopljenu strukturu.¹⁵ Aktivacija NOD2 rezultira stimulacijom proupalnih transkripcijskih čimbenika, uključujući i nuklearni faktor- κ B (NF- κ B), što rezultira povećanom ekspresijom citokina (Slika 3).¹⁶

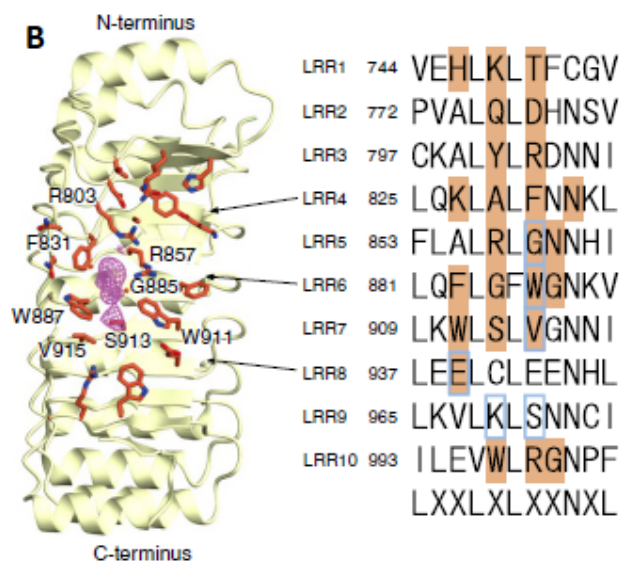


Slika 3. Strukturna građa NOD2 proteina, shematski prikaz aktivacije i signalne kaskade.

NOD2 je privukao značajnu pozornost znanstvenika zbog svoje povezanosti s upalnim bolestima. Velik broj pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama identificiran je na NOD2 genu, te je za njih potvrđeno da su povezani s Chronovom bolešću (engl. *Chron's disease*, CD), Blau-ovim sindromom (BS) i početnim stadijem sarkoidoze. Neke od mutacija koje uzrokuju CD povezane su s nemogućnošću aktiviranja NOD2, ali točna uloga NOD2 mutacija u patogenezi CD još nije utvrđena. S druge strane, za mutacije povezane s BS i sarkoidozom je dokazano da dovode do povećane bazalne aktivnosti NF- κ B.^{17,18}

Shimzu i suradnici nedavno su objavili kristalnu strukturu NOD2 iz kunića (*rabbit* NOD2 model, PDB kod: 5IRN) i pokazali da je vezanje ADPa presudno za održavanje konformacije NOD2 u „zatvorenom“, inaktivnom obliku (Slika 4a). Pretpostavili su i odgovarajuće vezno mjesto za MDP na temelju pronađene neraspoređene elektronske gustoće u hidrofobnom džepu na konkavnoj površini LRR domene, koja svojim dimenzijama odgovara veličini glikana ili peptida.¹⁹ Aminokiseline koje izgrađuju džep (Arg803, Phe831, Arg857, Trp887, Trp911, Val915 i Cys941) evolucijski su očuvane među različitim vrstama, a Trp887 i Val915 prethodno su spomenute u kontekstu vezanja liganda (Slika 4b).²⁰ Autori su proveli i ključne mutacije (njih ukupno 14) koje uzrokuju BS i ranu sarkoidozu te su dobili bolji uvid u interakcije između domena i oligomerizaciju proteina.





Slika 4. a) Struktura „zatvorene“ forme NOD2 s vezanim ADP (u sfernom prikazu) iz kunića koja uključuje NOD i LRR domene (PDB unos: 5IRN); b) LRR domena proteina i istaknute aminokiseline (prikazane modelom štapića u koraljnoj i plavoj boji) koje su evolucijski očuvane i sudjeluju u interakciji s neraspoređenom elektronskom gustoćom u hidrofobnom džepu.¹⁹

2.1.1.2. MEHANIZAM AKTIVACIJE NOD2 PROTEINA MDPom

MDP se izravno i s visokim, nanomolarnim afinitetom veže na NOD2.⁴ NOD2 je protein promjenjive stabilnosti, a kako je iz literature poznato da vezanje liganda može utjecati na stabilnost receptora²¹, za NOD2 je pokazano da osim što veže MDP, MDP ima i ulogu u njegovoj stabilizaciji.²² Molekularna osnova prepoznavanja MDPa od strane NOD2 dugo nije bila razjašnjena, a mehanizam aktivacije NOD2 još uvijek nije u potpunosti opisan. Pretpostavljalo se da se vezanje MDPa odvija u LRR domeni jer je ovaj motiv evolucijski očuvan u brojnim proteinima povezanim s urođenim imunitetom (i kod biljaka i kod sisavaca). LRR domena veže širok raspon molekularnih obrazaca povezanih s patogenima (PAMPs), a tu se ubrajaju i komponente bakterija, virusa i gljivica.²³

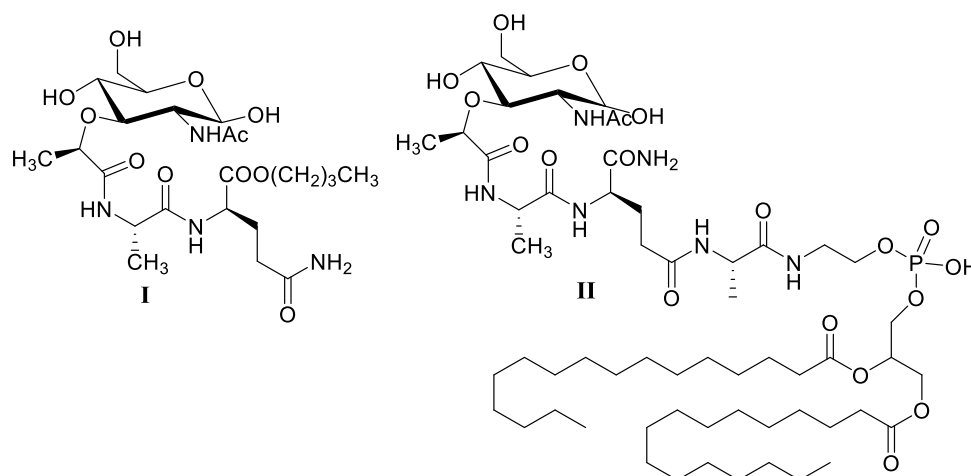
Lauro i suradnici su kombinacijom klasičnih biokemijskih metoda i metode površinske plazmonske rezonancije (SPR), prvi iznijeli konkretnije dokaze prema kojima MDP ostvaruje interakcije s LRR domenom proteina. Prvi su objavili i uspješnu ekspresiju i pročišćavanje LRR domene ljudskog NOD2 iz *E. coli*. Definirali su i ključne aminokiseline odgovorne za prepoznavanje MDPa.²⁴ Usporedbom aminokiselina istaknutih u ovom istraživanju, rezultata dobivenih rješavanjem kristalne strukture (*rabbit* NOD2 model)¹⁹ i analizom modela dobivenih MD simulacijama (*zebrafish* model)²⁵, aminokiseline Arg857, Trp911, Phe831 i Ser913 iz kristalne strukture se navode kao ključne za ostvarivanje interakcije s MDPom. Nedavno

objavljena dodatna biokemijska istraživanja i računalni modeli također sugeriraju LRR domenu kao potencijalno područje vezanja MDPa.^{26–30} Ipak, dosad nije riješena struktura NOD2 u kompleksu s MDPom te su time ovo mjesto prepoznavanja i molekularni detalji ove interakcije i dalje nerazjašnjeni.

Uz vezanje MDPa, na aktivaciju NOD2 utječe i izmjena molekule ADPa, vezane za središte NOD domene, molekulom ATPa. ADP, specifične interakcije unutar NOD domene i prostorno premošćivanje HD2 i NBD pomoću LRR domene, kritični su koraci za održavanje NOD2 u inhibiranom, zatvorenom obliku.¹⁹ Prijašnji hipotetski modeli NOD2 signalne aktivacije, pretpostavljali su da izmjena ADPa ATPom omogućuje samo-oligomerizaciju NOD2 i vezanje MDPa^{31,32}, dok su nedavna istraživanja podržala model u kojem prvo dolazi do vezanja liganda, a zatim slijedi ADP/ATP izmjena koja potiče dodatne povoljne strukturne promjene u NOD domeni¹⁹. Potrebno je provesti dodatne studije kako bi se razjasnilo kako vezanje liganda dovodi do oligomerizacije NOD2. Rezultirajuća, „opuštena“ NOD2 konformacija, ima izložene CARD domene spremne za regrutaciju i vezanje na RIP2 (engl. *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase2*), što kao posljedicu ima aktivaciju NF-κB signalnog puta (Slika 3).^{33,34}

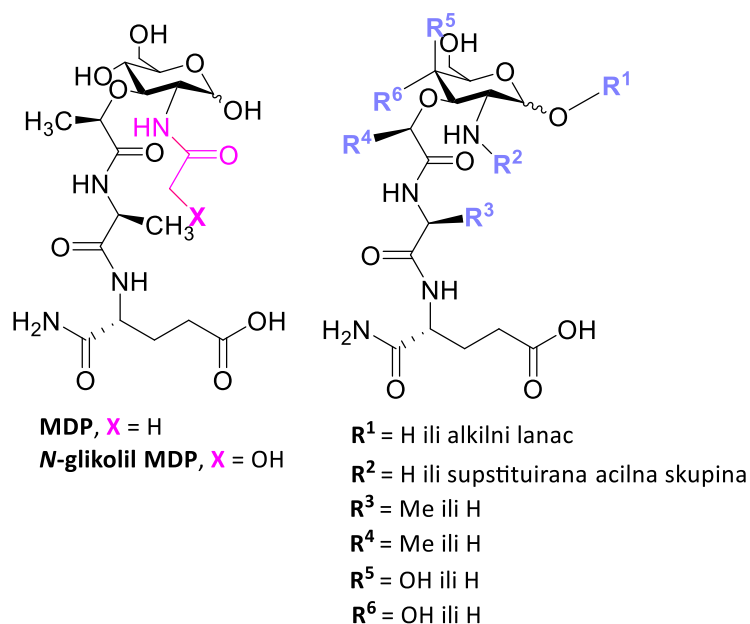
2.1.1.3. BIOLOŠKI AKTIVNI DERIVATI MDPa

Sintetizirani su brojni derivati i analozi MDPa, a neki od njih imaju i kliničku primjenu te su prikazani na Slici 5. Murabutid **I** ne izaziva nuspojave, ima protuupalni i antitumorski učinak te je poznato i da inhibira replikaciju HIV-1 virusa.³⁵ Mifamurtid **II** je lipofilni derivat MDPa kojeg je Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) odobrila za liječenje nemetastaziranog osteosarkoma.³⁶



Slika 5. Strukturne formule molekula Murabutida **I** i Mifamurtida **II** – klinički primjenjivih derivata MDPa.

Brojna istraživanja usmjerena su na strukturne izmjene peptidnog dijela MDPa i njihov utjecaj na adjuvantsku aktivnost, dok je manje pozornosti posvećeno proučavanju strukturne uloge šećernog dijela. Mikobakterije (lat. *Mycobacterium*) pripadaju vrsti bakterija koje u strukturi svojih peptidoglikana imaju glikolne derivate muraminske kiseline, koji im omogućuju dodatnu stabilizaciju stanične stijenke.³⁷ Inspirirani mikobakterijskom strukturom peptidoglikana, Chen i suradnici pripravili su seriju *N*-glikolnih derivata MDPa, koji su se pokazali boljim NOD2 ligandima. Strukturu molekule modificirali su na nekoliko pozicija, a najboljim NOD2 aktivatorima pokazali su se spojevi s metoksi-skupinom na C-1 atomu šećera i *N*-glikolnom skupinom na C-2 atomu (Slika 6). Istraživanje je također pokazalo da NOD2 receptor može prepoznati širok raspon supstituenata na C-2 položaju.³⁸



Slika 6. Strukturne formule NOD2 liganada: a) MDP i *N*-glikolil-MDP, b) različiti *N*-supstituirani MDP analozi s predloženim mjestima za modifikaciju strukture.

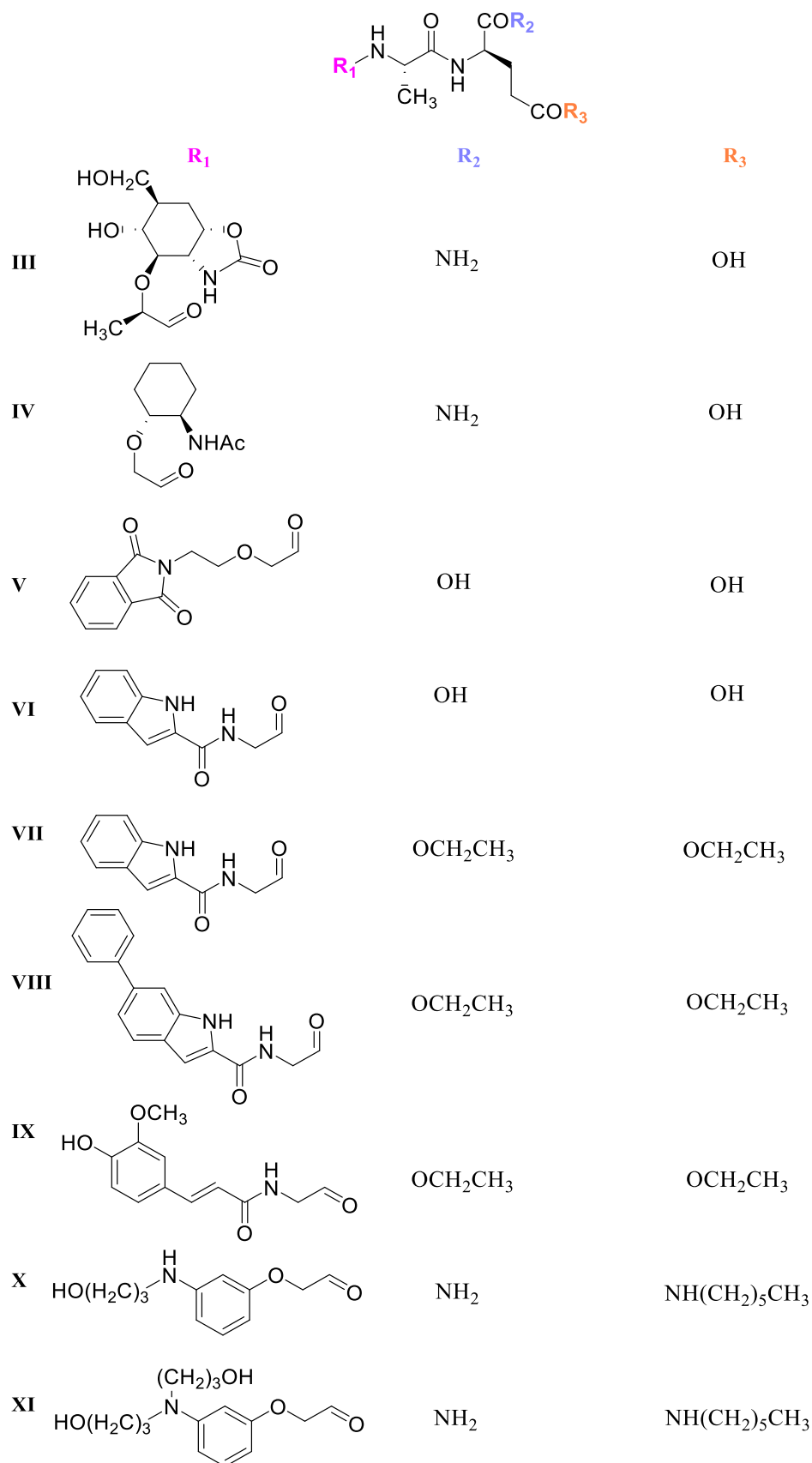
2.1.2. Desmuramil-dipeptid i njegovi lipofilni derivati

Istraživanja koja se bave analizom odnosa strukture i aktivnosti (engl. *Structure-Activity Relationship*, SAR) pokazala su da je dipeptidni dio MDPa, L-Ala-D-izoGln, ključan za njegov imunostimulacijski učinak. Sintetizirani su brojni derivati MDPa koji uključuju modifikaciju

ili potpunu zamjenu šećernog dijela molekule. Analози MDPa bez šećernog dijela nazivaju se desmuramil-dipeptidi (DMP).³⁹ Lipofilnost desmuramil-dipeptida izravno utječe na njihov unos u stanicu, koji se odvija putem pasivnog transporta kroz staničnu membranu. U cilju poboljšanja farmakoloških svojstava, DMP derivati opisani u literaturi uglavnom sadrže lipofini supstituent na N-kraju dipeptidne jezgre, a najaktivnijim su se pokazali spojevi s inkorporiranom cikličkom strukturom.⁴⁰

Prvi derivati MDPa, koji su pokazali adjuvantsku aktivnost su karbociklički MDP analози **III** i **IV** (Slika 7), od kojih se analog **IV** istaknuo i kao apirogen i netoksičan spoj.^{41,42} Zamjenom *N*-acetilmuraminske skupine ftalimidnom, pripremljen je LK423 derivat **V**, koji pokazuje imunostimulacijsku aktivnost u vidu značajnog povećanja produkcije interleukina-10 (IL-10) u slezeni miševa tretiranih ciklofosfamidom.⁴³ LK423 pokazuje i protuupalni učinak, spominje se u kontekstu terapeutika za upalne bolesti crijeva, te kao spoj koji *in vitro* pouspješuje produkciju TNF (engl. *tumour necrosis factor*).⁴⁴⁻⁴⁶ Indolni strukturni motiv također se pokazao dobrim surogatom za MurNAc dio MDPa. Pripremljeni su brojni derivati s indolnim prstenom koji pokazuju imunostimulacijsku aktivnost.⁴⁷ Najznačajniji su strukturno prikazani na Slici 7, od kojih se najaktivnijim pokazao spoj treće generacije ove serije spojeva, derivat **VIII**, s uvedenom fenilnom skupinom na položaju 6 indolnog prstena i esterskom modifikacijom kiselinskog dijela molekule u svrhu olakšanog unosa spojeva u stanice. Njegova NOD2 aktivnost ispitana je na komercijalno dostupnoj HEK-Blue NOD2 staničnoj liniji i usporediva je s aktivnošću MDPa.⁵ Tripeptid **IX** dosad je najaktivniji antagonist koji spada u četvrtu generaciju DMP derivata koju je razvila ista skupina znanstvenika sa suradnicima. Cinamoil-glicin uveden je na N-kraj dipeptida, a L-Ala je dodatno lipofilno modificiran. **IX** je pokazao sposobnost poticanja oslobađanja protuupalnih citokina iz PBMC (mononuklearne stanice periferne krvi), kao i povećanje OVA-specifičnog titra IgG protutijela u mišjem modelu. Ovi rezultati upućuju na to da spoj **IX** može inducirati i urođeni i stečeni imunološki odgovor.²⁶ Nedavno su pripremljeni i amfipatski derivati desmuramil-dipeptida, kod kojih je muraminska kiselina zamijenjena hidrofilnim aromatskim aminima, a koji su glikolnim linkerom vezani na L-Ala-D-izoGln s uvedenim lipofilnim lancem na C-kraju dipeptida (Slika 5, spojevi **X** i **XI**).⁴⁸ Pokazano je da ova vrsta spojeva modulira imunološki odgovor na način da pojačava ekspresiju glikoproteina ICAM-1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) u THP-1 stanicama i nije toksična za stanice. ICAM-1 ima važnu ulogu u brojnim upalnim i imunološkim procesima. Nadalje, u usporedbi s murabutidom, ovi spojevi pokazuju snažniji učinak poticanja

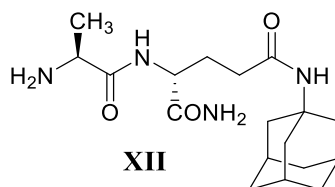
oslobađanja protuupalnih citokina TNF- α (engl. *tumour necrosis factor-alpha*, TNF- α), koji su važni posrednici imunoloških i protuupalnih reakcija.⁴⁹ Iz ovog se može zaključiti da je odnos lipofilnosti i hidrofilitnosti molekule važan faktor manifestiranja biološke aktivnosti desmuramil-dipeptida.



Slika 7. Strukturne formule desmuramil-dipeptidnih derivata.

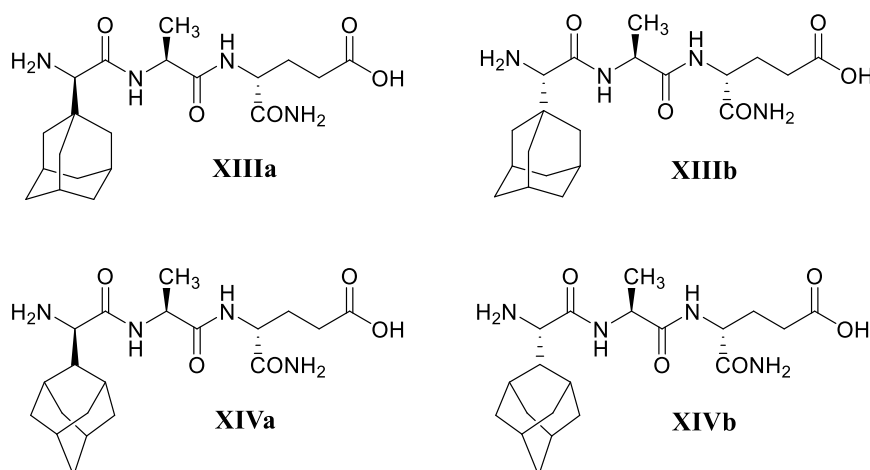
Adamantanski strukturni motiv također se pokazao kao izvrstan farmakofor. Dobro definirana 3D konformacija, hidrofobnost i lipofilnost daju spojevima s inkorporiranom adamantanskom strukturom povoljna svojstva za njihov transport kroz biološke membrane. Također, značajnija reaktivnost u usporedbi s drugim ugljikovodicima te jednostavna funkcionalizacija u smislu selektivnosti, zbog prisutnosti samo dva različita reaktivna mjesta (šest sekundarnih i četiri tercijarna ugljikova atoma), omogućuju široku biološku primjenu ove vrste spojeva.^{50,51}

Istražen je veliki broj mono-funkcionaliziranih spojeva adamantana s širokim područjem primjene. Do danas je poznato nekoliko adamantanskih derivata koji su odobreni kao lijekovi, među njima su najzastupljeniji antivirusni lijekovi.^{52,53} Prvi adamantanski spoj s primjenom u medicini bio je amantadin (1-aminoadamantan), koji je pokazao snažnu aktivnost protiv gripe tipa A i time označio početak otkrića lijekova na bazi adamantana.^{51,54,55} U svrhu povećanja lipofilnosti, sintetizirani su i brojni spojevi adamantana i već poznatih biološki aktivnih tvari, među koje ubrajamo i adamantanske derivate DMPa. Na Slici 8. prikazan je adamantilamid-dipeptid (AdDP) **XII**, dobiven vezanjem spomenutog virostatika 1-aminoadamantana na karboksilnu skupinu D-izoglutamina. AdDP **XII** pokazao se netoksičnim i vrlo učinkovitim adjuvantom u eksperimentima *in vivo* u miševima i kunićima. Imunoreakciju usmjerava prema Th2 tipu odgovora, a ugrađen u liposome djeluje i kao dobar stimulator nespecifične imunosti u mišjem modelu.^{56,57}



Slika 8. Strukturna formula adamantilamid-dipeptida, AdDP.

Adamantan je u obliku racemičnog adamantil-glicina vezan i na amino-kraj desmuramid-dipeptida (umjesto *N*-acetilglukozamina). Pripremljeni su apirogeni i netoksični diastereoizomeri adamant-1-il-tripeptida **XIII**⁷, (Slika 7) i adamantil-2-tripeptida **XIV**⁵⁸, (Slika 9) koji su pokazali imunostimulacijsku aktivnost *in vivo*, u mišjem modelu. Testirani adamantil-tripeptidi nisu pokazali tendenciju modulacije specifičnu za ovalbumin (OVA) kao antigen, ali je uočena izražena razlika u IgG1 odgovoru, slično kao i kod AdDP derivata.



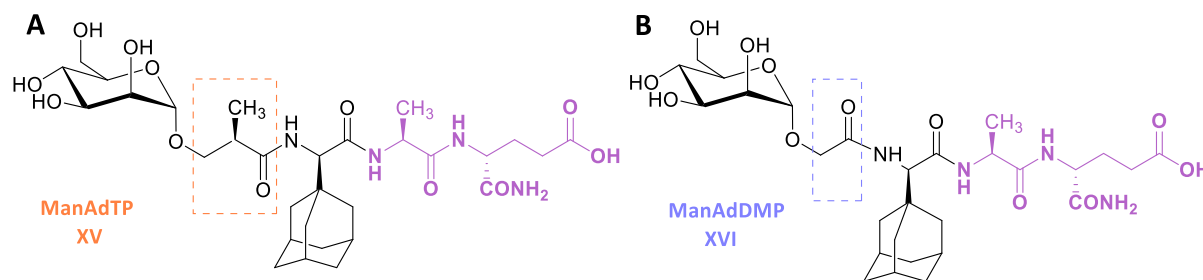
Slika 9. Strukturne formule adamantil-tripeptida, AdTp.

2.1.3. Manozni derivati desmuramil-dipeptida

Hasegawa i suradnici pripravili su seriju ugljikohidratnih derivata i analoga MDPa te im ispitali adjuvantsku aktivnost. U usporedbi s MDPom, većina je derivata pokazala slabiju adjuvantsku aktivnost, dok su derivati s uvedenom glukozom i manozom na položaju C-3 i *N*-acetilnom skupinom na C-2 u aksijalnom položaju, pokazali adjuvantsko djelovanje koje je usporedivo s djelovanjem od MDPa.^{59,60}

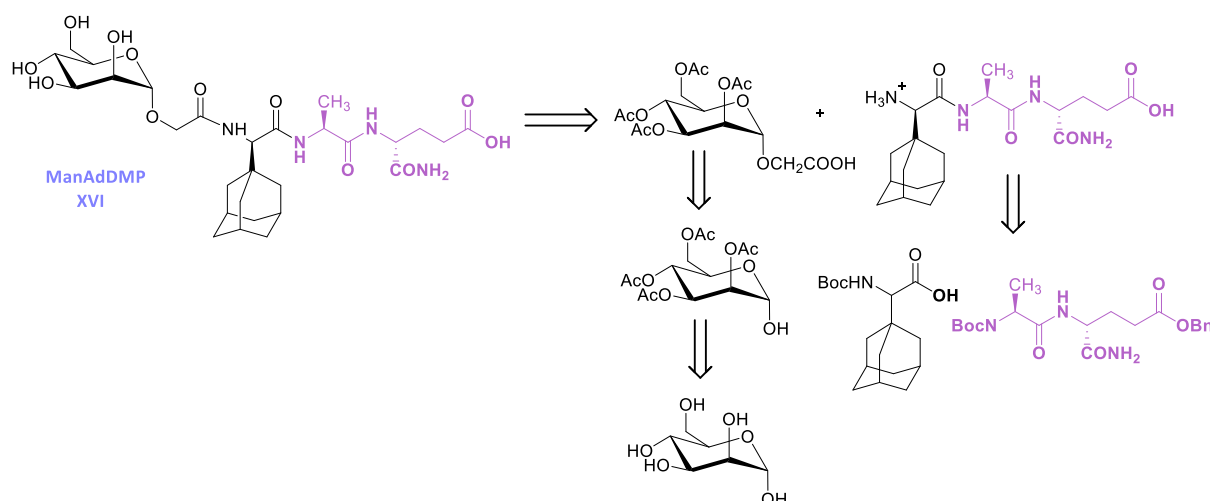
Prilikom dizajna molekula, kao jedna od strukturnih komponenti odabrana je manaza jer je pokazano da može pridonijeti prepoznavanju adjuvanta (derivata DMPa u našem slučaju) pomoću specifičnih receptora za manozu, eksprimiranih na određenim stanicama imunološkog sustava, poput primjerice makrofaga i dendritičkih stanica).

Manaza je preko kiralne poveznice na anomernom C-atomu uvedena i na već opisane adamantil-tripeptide te je pripremljenim spojevima ispitana biološka aktivnost *in vivo*.⁶¹ Pokazalo se da uvođenje manoze značajno potiče imunološki odgovor, a najaktivnijim derivatom pokazao se spoj **XV**, ManAdTp (Slika 10a) s *D*-konfiguracijom na (adamant-1-il)-glicinu i (*R*)-konfiguracijom na hidroksi-izobutirilnoj poveznici. Glikopeptid **XV** pokazao je jednako dobar imunostimulacijski učinak na proizvodnju ukupnih antitijela IgG kao i PGM koji je učinkovit adjuvant. PGM, peptidoglikan monomer, je disaharid-pentapeptid i predstavlja osnovnu ponavljajuću jedincu stanične stijenke bakterije *Brevibacterium divaricatum*. Apirogen je i netoksičan spoj koji u testovima *in vivo* i *in vitro*, osim adjuvantske, pokazuje brojne druge biološke aktivnosti.⁶²⁻⁶⁴



Slika 10. Strukturne formule biološki aktivnih manoziliranih adamantil-tripeptida s istaknutim različitim linkerima između šećernog i peptidnog dijela: a) ManAdTp i b) ManAdDMP.

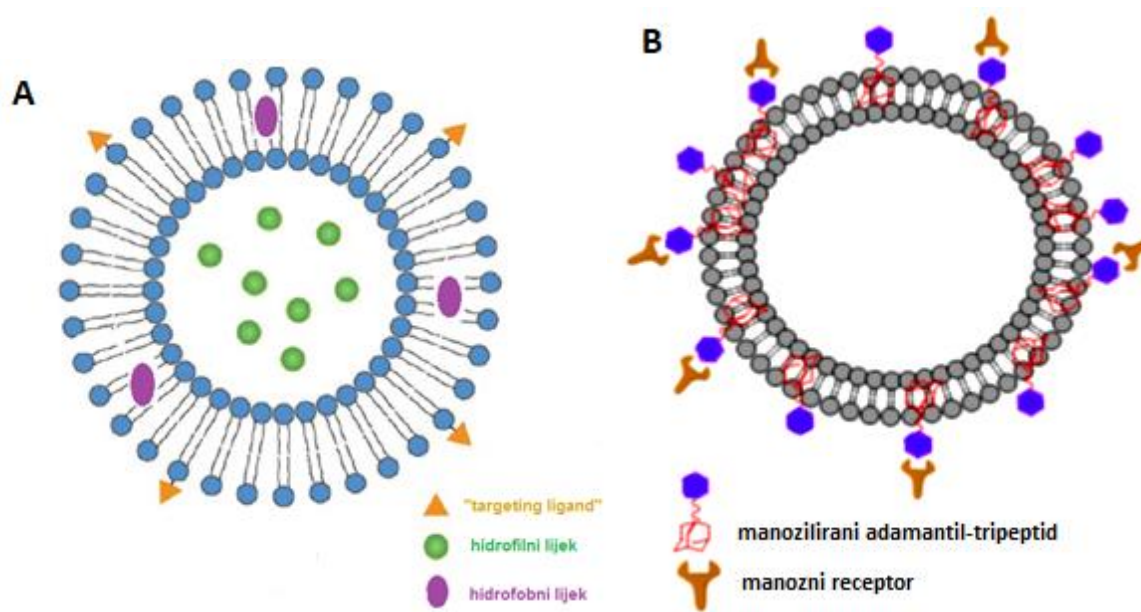
Na temelju ovih rezultata, pripravljena je nova serija glikopeptida ove vrste, u kojima je na manozu, osim hidroksi-izobutirilne, uvedena i već opisana glikolna poveznica, obzirom da su se analozi MDPa s glikolnom skupinom pokazali boljim NOD2 ligandima. Adamantanski strukturni motiv uveden je na dva načina, u obliku prethodno pripremljenog racemičnog (adamant-1-il)-glicina na N-kraj, i pomoću 1-aminoadamantan-hidroklorida na C-kraj L-Ala-D-izoGln. Pripremljeni su i manozni konjugati DMPa bez adamantana kao lipofine strukturne komponente, te je ispitana adjuvantska aktivnost svih spojeva *in vivo* u mišjem modelu, uz ovalbumin kao antigen. Svi manozilirani peptidi s glikolnom poveznicom pokazali su bolju imunostimulacijsku aktivnost u usporedbi s analogima kod kojih je uveden hidroksi-izobutirilni linker. Također, aktivnijim su se pokazali spojevi s adamantanom na N-kraju dipeptida. Spoj **XVI**, ManAdDMP (Slika 10b) pokazao se najboljim potencijalnim adjuvantom u ovoj seriji manoziliranih desmuramil-dipeptida. Na Shemi 1 prikazan je pojednostavljeni retrosintetski pristup sinteze ManAdDMPa.⁹



Shema 1. Pojednostavljena retrosintetska shema pripreve ManAdDMPa.

2.1.4. Liposomi i sustavi za dostavu adjuvanata

Jedan od razloga odabira manoze kao strukturne komponente ove vrste spojeva je i činjenica da se manozni glikokonjugati mogu koristiti za pripremu manoziliranih liposoma kao potencijalnih nosača za dostavu antigena. Liposomi su modelni membranski sustavi koji u svoj lipidni dvosloj mogu inkorporirati različite aktivne tvari (Slika 11a).⁶⁵ Manozilirani liposomi, osim što su se pokazali zanimljivim nosačima za ciljanu dostavu lijekova, netoksični su, slabo imunogenični te je za njih karakteristično da pojačavaju aktivaciju dendritičkih stanica i proliferaciju T-stanica.⁶⁶ Različiti spojevi koji sadrže elemente peptidoglikanske strukture, također su ugrađeni u liposome. Najistraženiji su sintetski derivati MDPa, među kojima i 1-adamantilamid-L-Ala-D-izoGln⁶⁷, a nešto kasnije i manozni derivat adamantil-2-tripeptida te je određenim fizikalno-kemijskim metodama pokazano da se lipofilni adamantan ugrađuje u lipidni dvosloj, dok hidrofilna manozna ostaje na površini liposoma, što je potvrđeno u pokusima s konkavalinom A (ConA), lektinom koji specifično veže α -D-manozu (Slika 11b). Ovaj pristup bi mogao biti i koristan model za ispitivanje specifičnih interakcija proteina s membranskim receptorima.⁶⁸



Slika 11. a) Shematski prikaz građe liposoma. b) Shematski prikaz interakcije lektina s manoziliranim adamantil-tripeptidom, koji je s adamantanskom podjedinicom usidren u lipidni dvosloj.

Nedavno su Ribić i suradnici opisali alternativnu metodologiju za ispitivanje imunomodulacijskih svojstava derivata PGNa. Modelni spojevi kojima je ispitana adjuvantska

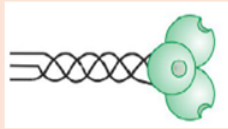
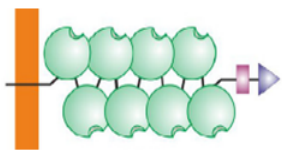
aktivnost su već opisani dijastereoizomeri adamantil-tripeptida **XIIIa** i **XIIIb** te njihovi manozni analozi Man-D-AdTp **XV** i Man-L-AdTp. Stimulacija imunološkog odgovora pripremljenih spojeva proučavana je *in vitro*, pomoću stanica iBMDMs (engl. *immortalized mouse bone-marrow derived macrophages*) stimuliranih lipopolisaharidom (LPS), koji se obično koristi za indukciju upale i proizvodnju proupalnih citokina (uključujući kemokine), a aktivira urođeni imunološki odgovor. Praćena je produkcija Il-6 citokina i RANTES kemokina; Il-6 izlučuju makrofagi i T stanice kako bi se potaknuo imunološki odgovor u borbi protiv infekcije, a RANTES je upalni kemokin koji u procesu kemotaksije privlači T stanice, eozinofile i bazofile, te ima važnu ulogu u regrutiranju leukocita na upalna mjesta. Najaktivnijim spojem pokazao se α -D-manozni derivat AdTp s L-konfiguracijom na adamantanskoj amino kiselini, Man-L-AdTp. Važno je istaknuti da su u okviru ovog rada pripremljeni i liposomi u koje su uspješno inkorporirani analizirani spojevi, te je pokazano da je imunostimulacijska aktivnost ovih spojeva dodatno unaprijeđena njihovom ugradnjom u lipidni dvosloj.⁶⁹

2.1.5. Manozni receptori

Lektini (lat. *legere* – izabrati) su proteini koji specifično i reverzibilno vežu šećerne strukture (monosaharide i oligosaharide), a da pri tom ne pokazuju katalitičku aktivnost. Od brojnih prirodnih monosaharida, lektini prepoznaju samo njih nekoliko; D-manozu, D-glukozu, D-galaktozu, *N*-acetil-D-glukozamin, *N*-acetil-D-galaktozamin, L-fukozu, *N*-acetilneuraminsku kiselinu i D-ksilozu te oligosaharide koji sadrže navedene monosaharide.^{70,71} Sudjeluju u različitim biološkim procesima, od kojih se posebno ističe njihova važna uloga u procesima međustaničnog prepoznavanja (imunološki odgovor, stanična adhezija). Podijeljeni su u pet osnovnih skupina s obzirom na šećer prema kojem pokazuju najveći afinitet, i četiri skupine s obzirom na aminokiselinski slijed CDR-domene (engl. *carbohydrate-recognition domain*, CRD) koja je aktivni dio lektina i veže specifični šećer.⁷²

Najveću i najraznolikiju skupinu lektina čine lektini tipa C, u koje ubrajamo i manozni receptor (MR) i MBL lektin (engl. *mannose-binding lectin*), a zajedničko im je da im je za vezanje šećernog dijela neophodan ion Ca^{2+} . Oba lektina imaju određenu ulogu obrane domaćina od patogenih organizama: MBP je oligomerni protein kojeg nalazimo u ljudskom serumu, dok je MR transmembranski protein imunokompetentnih stanica (endotelne, Kupffer, dendritičke stanice te makrofagi). Neke od uloga MRa i MBLa prikazane su u Tablici 1.⁷³

Tablica 1. Uloge izdvojenih lektina C-skupine.^{74,75}

	VRSTA C-LEKTINA	SELEKTIVNI LIGAND	SELEKTIVNI PATOGENI ORGANIZAM	ULOGA
	MBL	Manoza Glukoza L-fukoza ManNAc GluNAc	<i>Escherichia coli</i> HIV, <i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i> Brojni drugi virusi, bakterije i gljivice	Vežanje velikog broja patogenih organizama, fagocitoza, aglutinacija, regulacija upale
	Manozni receptor	Manoza Fukoza N-acetilglukozamin	<i>M. tuberculosis</i> <i>Candida albicans</i> , HIV <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Leishmania donovani</i> <i>Pneumocystis carinii</i> Brojni drugi mikroorganizmi	Receptori za prepoznavanje patogena, „hvataju“ i prezentiraju antigen T-stanicama imunološkog sustava, posreduju u endocitozi i fagocitozi

Lektini posjeduju nizak afinitet vezanja monosaharida, uobičajenije je da vežu velike i razgranate ugljikohidrate. U pravilu, da bi se povećao afinitet vezanja i specifičnost interakcije, razvijaju se razgranate i polivalentne šećerne podjedinice koje onda mogu ostvariti interakciju s nekoliko komplementarnih veznih mjesta na lektinskim receptorima. Ovaj efekt je u literaturi poznat kao „glycoside cluster effect“⁷⁶, a osmišljavanje novih glikokonjugata ove vrste znanstvenicima olakšava proučavanje različitih polivalentnih učinaka poveznih sprepoznavanjem ugljikohidrata u biološkim sustavima.

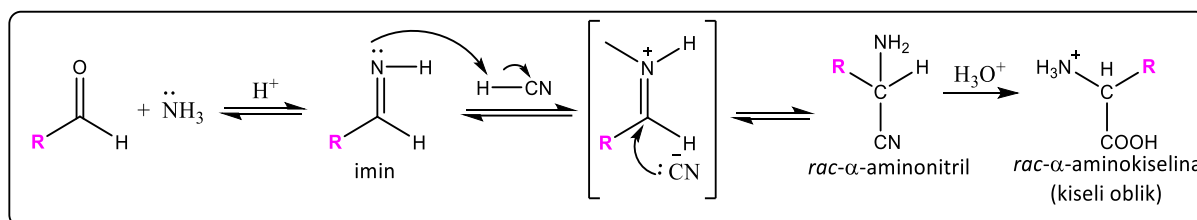
2.2. KEMIJSKA SINTEZA AMINOKISELINA I PEPTIDA

Aminokiseline i peptidi su biološki važne gradivne jedinice i međuprodukti metabolizma, koje zajedno s enzimima imaju i sve značajniju ulogu kao katalizatori.⁷⁷ Peptidi u prirodi i svakodnevnom životu ispunjavaju i brojne uloge kao hormoni, neurotransmiteri, toksini, zaslađivači, katalizatori, ali i kao važna terapijska sredstva u liječenju brojnih bolesti. Široka paleta različitih funkcija proizlazi iz velike strukturne i funkcionalne raznolikosti peptida, koji se mogu pripremiti povezivanjem različitih prirodnih i neprirodnih aminokiselina. U ovom dijelu pregleda literature prikazat će se najučestalije metode kemijske sinteze aminokiselina i peptida, obzirom da su peptidi ciljne molekule ovog rada.

2.2.1. Metode kemijske sinteze aminokiselina

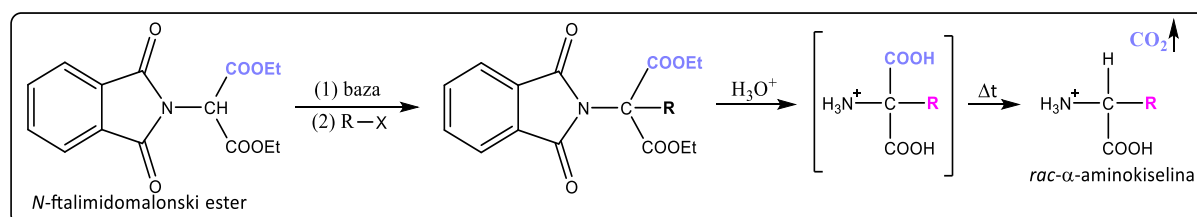
Razvijene su brojne metode priprave prirodnih α -aminokiselina. Jedan od najstarijih načina sinteze aminokiselina jest Streckerova reakcija. Ovom trokomponentnom reakcijom između

odabranog karbonilnog spoja, amina i izvora cijanida nastaju racemični *rac*- α -aminonitrili, svestrani međuprodukti u organskoj sintezi koji se hidrolizom jednostavno prevode u *rac*- α -aminokiseline (Shema 2).⁷⁸



Shema 2. Streckerova sinteza aminokiselina.

Jedna od često korištenih metoda sinteze aminokiselina jest kombinacija Gabrielove sinteze amina i malonesterske sinteze karboksilnih kiselina. Sintaza započinje iz *N*-ftalimidomalonskog estera koji se u prvom koraku alkilira. Slijedi hidroliza esterskih skupina, zajedno s ftalimidnom skupinom i potom dekarboksilacija koja rezultira konačnim spojem, racemičnom smjesom α -aminokiselina.⁷⁹



Shema 3. Gabrielova malonesterska sinteza aminokiselina.

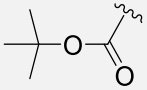
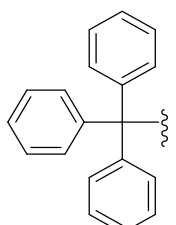
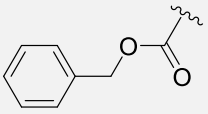
U najvažnije metode pripreve aminokiselina ubrajaju se i reduktivna aminacija i aminacija α -halogenkiselina. Reduktivna aminacija je reakcija u kojoj se aldehidi ili ketoni prevode u amine. U prvom koraku nastaje imin (uz izlazak vode), a potom se dvostruka C=N veza reducira, primjerice katalitičkim hidriranjem. Kod pripreve aminokiselina ovom metodom, u prvom koraku se kao reaktant koristi α -ketokiselina. Metoda je biomimetička i nalikuje biosintezi aminokiselina. Karboksilne kiseline se mogu halogenirati na α -ugljikovom atomu, tj. vodik se može zamijeniti halogenom, obično je to brom. Na taj način dobijemo α -halogenkiseline koje u drugom koraku podliježu aminaciji s amonijakom (dolazi do nukleofilne supstitucije halogenida amino-skupinom na zasićenom atomu ugljika). Iskorištenja ove reakcije su niža pa se rjeđe primjenjuje. Noviji načini kemijske pripreve aminokiselina uključuju različite enzimске i mehanokemijske metode.^{80,81}

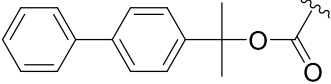
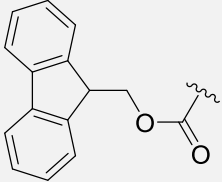
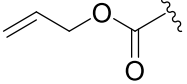
2.2.2. Zaštitne skupine u sintezi peptida

Aminokiseline u peptidima, odnosno proteinima, međusobno su povezane amidnom vezom (peptidna veza) koja nastaje reakcijom amino-skupine jedne aminokiseline s karboksilnom skupinom druge. Kemijska sinteza peptida predstavlja veliki izazov s obzirom da je za određeni peptidni slijed od n aminokiselina potrebno konsektivno formirati $n - 1$ peptidnih veza. Kako bi se izbjeglo nasumično formiranje veza i polimerizacija nakon što je aminokiselina jednom aktivirana, potrebno je prije kondenzacije zaštititi amino-skupinu jedne i karboksilnu skupinu druge aminokiseline za koje ne želimo da reagiraju.

α -Amino zaštitna skupina trebala bi osigurati topljivost u učestalo korištenim organskim otapalima, spriječiti ili minimizirati moguću racemizaciju tijekom povezivanja, dok bi njezino uklanjanje trebalo biti učinkovito uz nastajanje nusprodukata koji se mogu jednostavno izdvojiti. Poželjno je i da su tako zaštićene aminokiseline stabilne, idealno krutine.⁸² Amino-skupina aminokiselina najčešće se zaštićuje prevođenjem u karbamate, a nešto rjeđe se prevodi i u imide, amide, N -alkilne derivate, N -sililne derivate, iminske te enaminske derivate. U Tablici 2. prikazane su najčešće korištene zaštitne skupine za α -amino-skupinu, uvjeti u kojima se uklanjaju i stabilnost u odnosu na druge eventualno prisutne skupine.

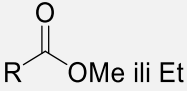
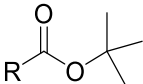
Tablica 2. Najčešće korištene zaštitne skupine za α -amino-skupinu.⁸²

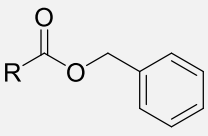
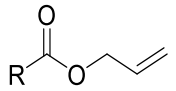
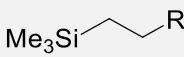
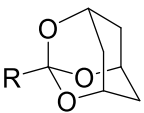
Ime zaštitne skupine, kratica i struktura	Uvjeti uklanjanja zaštite	Ortogonalne zaštitne skupine
<p><i>tert</i>-Butiloksikarbonil (<i>t</i>-Boc)</p> 	<p>kiseli uvjeti (pr. 25-50 % TFA-DCM, 4M HCl u dioksanu)</p>	<p>Fmoc, Z, Alloc, Trt</p>
<p><i>Tritil</i> (<i>TR</i>)</p> 	<p>blago kiseli uvjeti (pr. 1 % TFA-DCM)</p>	<p>Fmoc, Alloc</p>
<p><i>Benziloksikarbonil</i> (<i>Z</i>, <i>Cbz</i>)</p> 	<p>katalitička hidrogenoliza (10 % Pd/C); kiseli uvjeti (pr. bezvodna HBr/CH₃COOH);</p>	<p>Boc, Fmoc, Trt, Alloc</p>

	redukcija tekućim metalima (pr. Na, Li)	
<p><i>2-(Bifen-4-il)-izopropiloksikarbonil (Bpoc)</i></p> 	blago kiseli uvjeti (pr. 0,2-0,5 % TFA)	Fmoc, Alloc
<p><i>Fluoren-9-ilmetskikarbonil (Fmoc)</i></p> 	blago lužnati uvjeti (pr. piperidin ili morfolin u DMF)	Boc, Z, Trt, Alloc
<p><i>Aliloksikarbonil (Alloc)</i></p> 	paladijevi katalizatori (pr. Pd(PPh ₃) ₄)	Boc, Fmoc, Trt

Zaštita karboksilne skupine najčešće se provodi pripravom stabilnih estera koji ne podliježu hidrolizi u uvjetima stvaranja peptidne veze. Takvi su primjerice metilni esteri i njihovi derivati, alkoksialkilni esteri, esteri koji se cijepaju β -eliminacijom te sililni esteri. Najčešće korišteni su fenilni, benzilni i *tert*-butilni esteri (Tablica 3). Karboksilnu skupinu je potrebno zaštititi jer je podložna enolizaciji i reakciji s nukleofilom i bazom.^{82,83}

Tablica 3. Najčešće korištene zaštitne skupine za α -karboksilnu skupinu.^{82,83}

Ime zaštitne skupine, kratica i struktura	Uvjeti uklanjanja zaštite	Stabilna u odnosu na uklanjanje
<p><i>Metilni (Me) i etilni (Et) ester</i></p> 	Hidroksidi alkalijskih metala u smjesama voda/alkohol (pr. LiOH, <i>t</i> -BuOH)	Boc, Z
<p><i>tert-Butilni ester (t-Bu)</i></p> 	kiseli uvjeti (pr. 90 % TFA-DCM ili 4 M HCl u dioksanu)	Fmoc, Z, Trt, Alloc

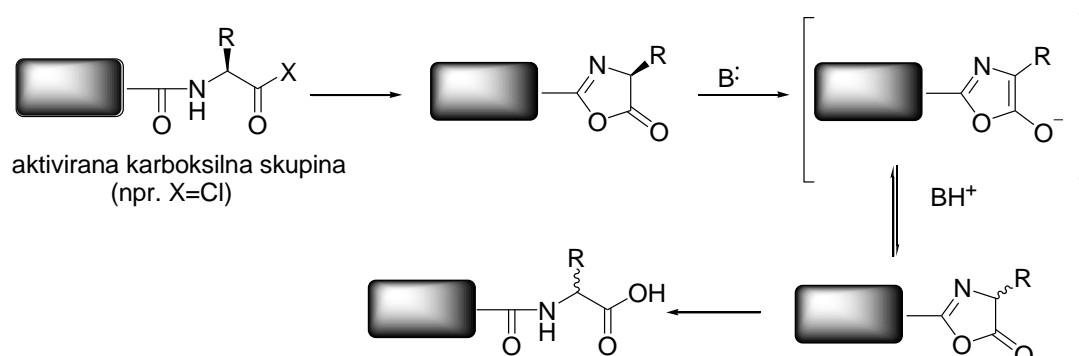
<p><i>Benzilni ester (Bn)</i></p> 	<p>katalitička hidrogenoliza (H₂/Pd-C); kiseli uvjeti (pr. CF₃COOH/HOAc); NaOH u vodenim organskim otapalima</p>	<p>Boc, Fmoc, Trt, Alloc</p>
<p><i>Alilni ester (Bpoc)</i></p> 	<p>paladijevi katalizatori (pr. Pd(PPh₃)₄)</p>	<p>Boc, Fmoc, Trt</p>
<p><i>2-trimetilsililni ester (TMSE)</i></p> 	<p>TBAF (tetra-n-butilamonijev klorid)</p>	<p>Z</p>
<p>O, O, O-, O, S, S- i S, S, S-ortoesteri (<i>aciklički i ciklički</i>); pr:</p> 	<p>blago kiseli uvjeti nakon čega slijedi saponifikacija nastalog estera</p>	<p>-</p>

2.2.3. Reakcije kondenzacije aminokiselina – metode i strategije pripreve amidne veze

Tvorba peptidne veze između dvije aminokiseline uključuje dva koraka: aktivaciju karboksilne skupine jedne aminokiseline i nukleofilni napad amino-skupine druge aminokiseline na aktiviranu karboksilnu skupinu.⁸⁴ Aktivacija karboksilne skupine ključni je korak u sintezi peptida. Svrha aktivacije jest povećanje elektrofilnosti atoma ugljika karboksilne skupine i prevođenje hidroksilne skupine u bolju izlaznu skupinu čime se, zbog inače nepovoljnih termodinamičkih uvjeta, ravnoteža reakcije pomiče u korist sinteze amidne veze. Nužno je i da taj korak bude dovoljno brz i da se prilikom aktivacije očuva optička čistoća polaznog spoja, odnosno da ne dođe do racemizacije.

Općenito, postoje različiti načini povezivanja reaktivnih derivata karboksilnih kiselina s aminom. Princip metoda svodi se na to da se reaktivna acilirajuća komponenta pripremi zasebno i izdvoji ili odmah kondenzira s aminom, ili se karboksilna skupina aktivira *in situ* u prisutnosti amina u smjesi. Poteškoće koje se često mogu pojaviti prilikom reakcija stvaranja amidne veze uključuju niske prinose, racemizaciju i teško pročišćavanje produkata. Kako bi se ovi problemi nadišli, razvijeni su brojni reagensi i metode nastajanja amidne veze u blagim uvjetima koje daju visok prinos, ali i potencijalno pomažu u sprečavanju racemizacije susjednih stereogenih

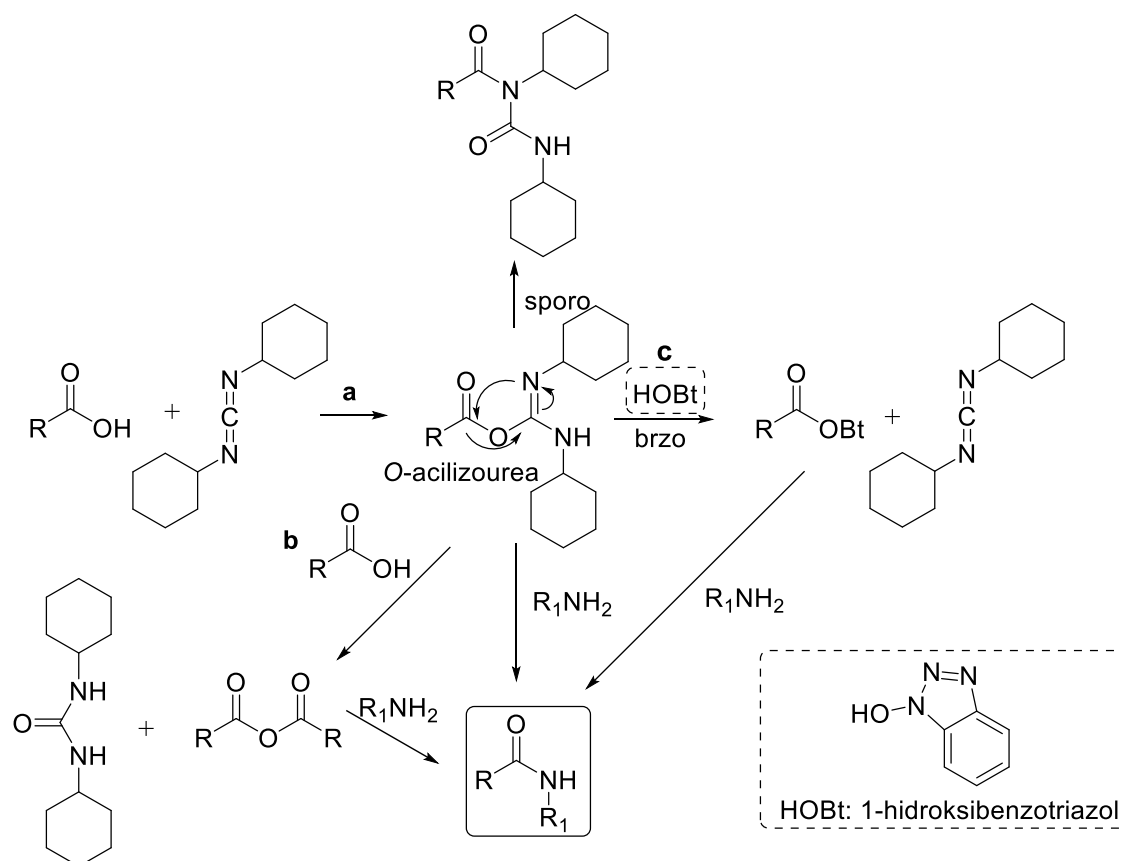
centara. Kemičari koji se bave sintezom peptida općenito izbjegavaju aktivaciju C-terminalnog kraja, obzirom da taj princip često dovodi do racemizacije kroz stvaranje oksazolona kao međuprodukta (dolazi do gubitka optičke aktivnosti stereokemijski čistog reaktanta, Shema 4).⁸⁵



Shema 4. Kiralna nestabilnost oksazolona kao međuprodukta u reakcijama sinteze peptida metodom koja uključuje aktivaciju C-terminalnog kraja „rastućeg“ peptida.

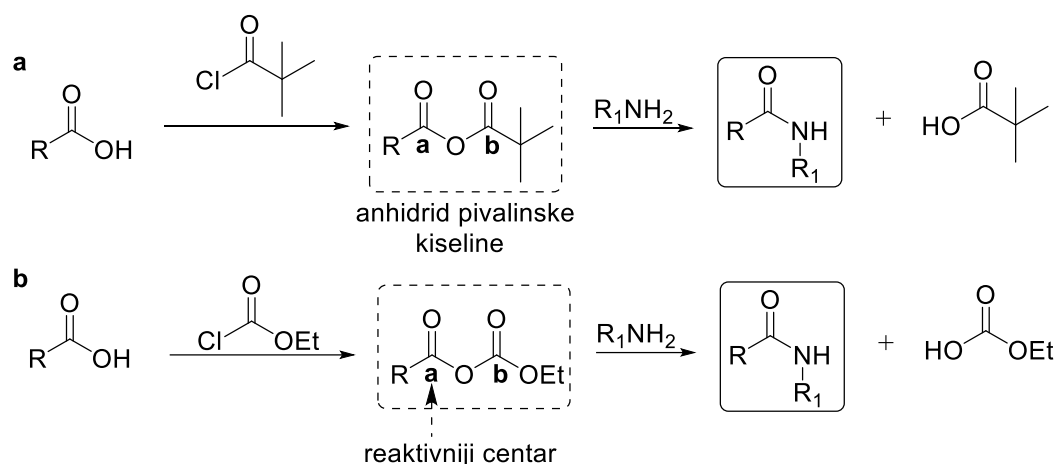
Najčešće korišteni reagensi u kondenzacijskim reakcijama su karbodiimidi, fosfonijeve, imidazolijeve, odnosno amonijeve soli, različiti (uglavnom aromatski) alkoholi kod pripreme aktivnih estera aminokiselina te brojni drugi.⁸⁶

Reakcijom karboksilne kiseline i karbodiimida nastaje nestabilni derivat *O*-aciluree koji zatim reagira s amino-komponentom i daje amid (Shema 5a). Ukoliko se koriste dva ekvivalenta kiseline, *O*-acilni derivat uree reagira s karboksilnom kiselinom i daje odgovarajući simetrični anhidrid (Shema 5b). Ako je u otopini prisutan hidroksilamin (primjerice 1-hidroksibenzotriazol, HOBt), nastaje aktivirani ester (Shema 5c). Prikazane aktivne tvari su jako dobri i često korišteni acilirajući agensi. Prilikom sinteze peptida u otopini, najčešće se koriste *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC) i 1-etil-3-(3'-dimetilamino-propil)karbodiimid hidroklorid (EDC·HCl) zbog toga što je derivat uree koji nastaje kao koprodukt reakcije, topljiv u vodi i lako se uklanja iz reakcijske smjese filtracijom ili ispiranjem. HOBt i druge vrste hidroksilaminskih derivata koriste se kako bi se izbjegla racemizacija *N*-zaštićene aminokiseline. U svojoj strukturi sadrže jedan ili više dušikovih atoma koji imaju ulogu povećavanja elektron-akceptorskog karaktera acilirajuće komponente.⁸⁷



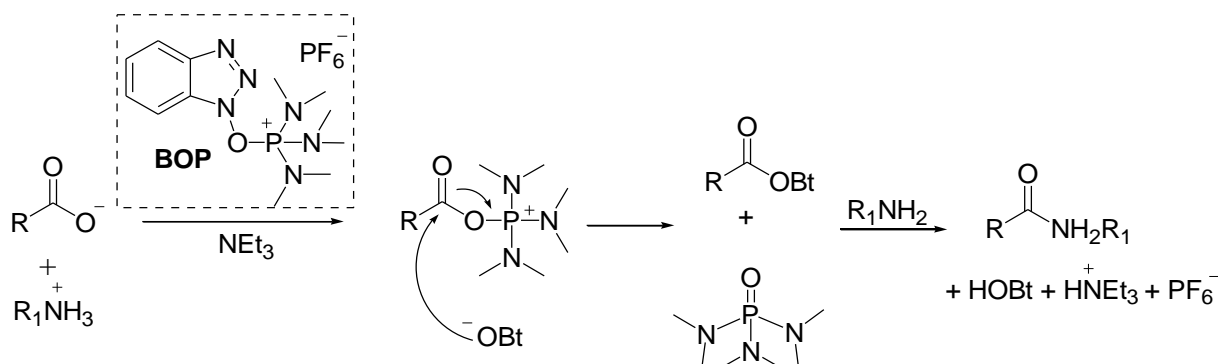
Shema 5. Tvorba amidne veze korištenjem karbodiimidne aktivacije karboksilne skupine.

Od metoda priprave amidne veze koje uključuju dva koraka i miješani anhidrid kao reaktivnu acilirajuću komponentu, često se spominju one u kojima se kao reaktanti koriste pivaloilni acil-halogenid⁸⁸ i etil-klorformijat⁸⁹. U ovim se primjerima problem regioselektivnosti, koji se javlja prilikom nukleofilnog napada amino-komponente, prevladava steričkom zaklonjenošću *t*Bu skupine (Shema 6a), odnosno boljom rezonantnom stabilizacijom jednog karboksilnog mjesta u odnosu na drugo (Shema 6b).



Shema 6. Primjer kondenzacijskih reakcija koje uključuju dva koraka.

Reagensi koji se najčešće koriste za brze kondenzacijske reakcije su fosfonijeve i aminijeve soli. Pretpostavljena metoda kondenzacije u jednom koraku, uz (benzotriazol-1-iloksi)-tris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat (BOP), prikazana je na Shemi 7.⁸⁷ Aminijeve soli su svojevrsni analozi fosfonijevim solima s pozitivnim ugljikovim atomom (primjerice *N*-[(dimetilamino)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridin-1-ilmetilen]-*N*-metilmetanaminijev heksafluorofosfat – HATU i *N*-[(1*H*-benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metilen]-*N*-metilmetanaminijev heksafluorofosfat – HBTU su često korištene aminijeve soli).⁸⁶



Shema 7. Primjer kondenzacijske reakcije u jednom koraku uz BOP kao aktivirajući reagens.

2.3. METODE MODELIRANJA MOLEKULSKIH SUSTAVA

Računalna kemija ili molekulsko modeliranje je grana kemije koja se zasniva na modelima teorijske kemije i fizike te ima sve veću primjenu u tumačenju kemijskih problema, budući da je razvoj računala omogućio proučavanje sve većih i složenijih sustava. Računalna istraživanja koriste se za bolje razumijevanje eksperimentalnih podataka, predviđanju svojstava nepoznatih molekula, u istraživanju reakcijskih mehanizama, pri traženju odnosa između kemijske strukture i svojstava, u dizajniranju molekula koje su u specifičnoj interakciji s drugim molekulama ili sustavima (dizajn lijekova, katalizatora), itd. U tu svrhu koriste se metode modeliranja različitog stupnja složenosti: empirijske (tj. metode molekulske mehanike, MM i molekulske dinamike, MD), semiempirijske, kvantno-mehaničke (QM) i kombinirane kvantno-mehaničke i molekulski-mehaničke (QM/MM) metode. *Ab initio* metode se u potpunosti temelje na kvantno-mehaničkoj teoriji i izuzetno su točne, ali primjenjive smo na male molekule. Empirijske i semiempirijske metode, u svrhu pojednostavljenja teorijske pozadine, imaju ugrađene neke eksperimentalne rezultate (parametre) i obično su manje precizne, ali zbog širih mogućnosti, pomoću njih se prilično točno mogu opisati i znatno veći sustavi.

2.3.1. Kvantno-mehaničke metode

Osnovni koncept kvantne mehanike temelji se na činjenici da se energija i sva svojstva izvedena iz energije mogu izračunati rješavanjem Schrödingerove jednadžbe. Sustav je u prostoru i vremenu u potpunosti opisan valnom funkcijom $\Psi(\mathbf{r}, t)$, gdje je \mathbf{r} matrica prostornih koordinata $(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3, \dots, \mathbf{r}_{3n})$, sastavljena od po tri koordinate (npr. x , y i z) za svaku od n čestica, a t je vrijeme. Prostorni integral umnoška valne funkcije s njenim kompleksnim konjugatom ($|\Psi^2|$) ima jedinicu gustoće vjerojatnosti. Vjerojatnost da će se sustav naći u određenom dijelu faznog prostora jednak je integralu od $|\Psi^2|$ preko tog dijela prostora. Valna funkcija se često zove i funkcijom stanja jer jednom kad se odredi, moguće je djelovanjem određenog operatora (npr. hamiltonijana, \mathbf{H}) na nju, odrediti sva mjerljiva svojstva sustava.⁹⁰ Schrödingerova jednadžba se može egzaktno riješiti samo za sustave s jednim elektronom (atom vodika, kation helija i molekulski kation H_2^+). Metode elektronske strukture razlikuju se po aproksimacijama koje se koriste u rješavanju Schrödingerove jednadžbe. Semiempirijske kvantno-mehaničke metode (npr. Austin Model 1, AM1 i Parametrizacijska metoda 3, PM3) koriste parametre izvedene iz eksperimentalnih podataka, dok *ab initio* metode (npr. Hatree-Fock metoda, HF)

ne koriste eksperimentalne parametre u izračunima te se oslanjaju na zakone kvantne mehanike i koriste osnovne fizikalne konstante (npr. Planckova konstanta, mase i naboj elektrona i jezgri itd.). Prednost semiempirijskih računa je u brzini izračuna, posebno u usporedbi s *ab initio* računima. Nedostaci su nepredvidljivost samih rezultata te velika odstupanja u svojstvima koja se računaju. Semiempirijske metode su parametrizirane te ako je proučavana molekula strukturno slična molekulama u bazi podataka iz koje su korišteni parametri za tu metodu, rezultati mogu biti prilično točni, ali ako se proučavani sustav znatno razlikuje od sustava u parametrizacijskom skupu, rezultati mogu biti krivi ili čak potpuno promašeni. Ipak, uz detaljnu parametrizaciju, semiempirijske metode se mogu koristiti kao inicijalni račun koji onda značajno ubrza proces geometrijske optimizacije na višim razinama teorije.

Često se kao posebna kategorija računalnih metoda koje se temelje na kvantnoj mehanici, izdvaja teorija funkcionala gustoće (engl. *Density Functional Theory*, DFT) koja se temelji na drugačijim teorijskim postavkama. DFT metoda polazi od pretpostavke da je energija osnovnog stanja sustava određena elektronskom gustoćom, koja je funkcija tri prostorne koordinate. Za razliku od Hartree-Fock metode, DFT metode uključuju efekt elektronske korelacije, tj. činjenicu da elektroni u molekulskom sustavu „reagiraju“ na kretanje drugih elektrona te se orijentiraju tako da su privlačne i odbojne sile u molekuli u ravnoteži. Za konačni izračun energije iz elektronske gustoće koristi se DFT funkcional.⁹¹ Neki funkcionali su razvijeni parametrizacijom funkcija uz usporedbu s eksperimentalnim rezultatima, a drugi iz fundamentalnih postavki kvantne mehanike te se time DFT metode mogu svrstati i u *ab initio*, ali i u semiempirijske metode. DFT funkcionali se međusobno razlikuju prema opisu funkcionala izmjene, funkcionala korelacije i udjela HF funkcionala kao dopune člana izmjene (kod hibridnih funkcionala). Jedan od češće korištenih funkcionala je B3LYP (engl. *Becke Three Parameter Hybrid Functionals*), koji predstavlja kombinaciju Becketovog funkcionala (označeno slovom B) i Lee, Yang i Parr-ov korelacijski funkcional (označeno slovima LYP).

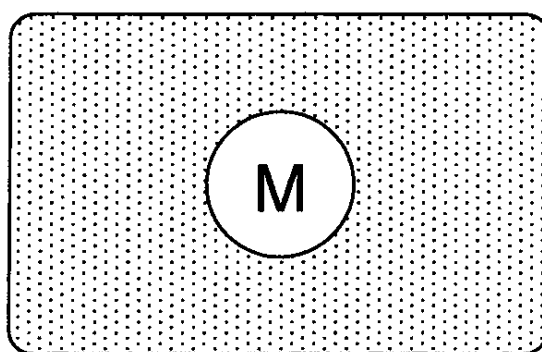
92

Kvantno-mehanički računi se mogu izvoditi za sustav u plinskoj fazi (u vakuumu) ili u otapalu. Utjecaj otapala se može proučavati pomoću: a) modela koji eksplicitno promatra pojedine molekule oko otopljene tvari, b) modela koji otapalo tretira kao kontinuum i c) kombinacije ta dva modela. Zbog jednostavnosti računa, otapalo se često promatra kao jednoliko polarizabilna sredina koja je karakterizirana dielektričnom konstantom otapala (engl.

Polarisable Continuum Model, PCM), tj. zanemaruju se eksplicitne molekule otapala. Slobodna energija solvatacije molekula u otapalu se promatra kao suma tri doprinosa:

$$\Delta G_{\text{solv}} = \Delta G_{\text{cav}} + \Delta G_{\text{disp}} + \Delta G_{\text{el}}$$

Otopljena molekula smješta se u šupljinu u otapalu koja nastaje preklapanjem van der Waalsovih radijusa atoma (Slika 12). Za to je potrebna energija, budući da se gube interakcije između molekula otapala, dok međumolekularne (disperzne, van der Waalsove) interakcije između otapala i otopljene tvari stabiliziraju sustav, nejednoliki raspored naboja otopljene molekule polarizira medij što sve skupa rezultira elektrostatskom stabilizacijom. Iako su računi u otapalu zahtjevniji, sve češće se koriste kako bi se dobio što realniji sustav.^{91,93}



Slika 12. Model kontinuuma: otopljena tvar smještena je u odgovarajuću šupljinu u otapalu.⁹⁴

2.3.2. Metode molekulske mehanike

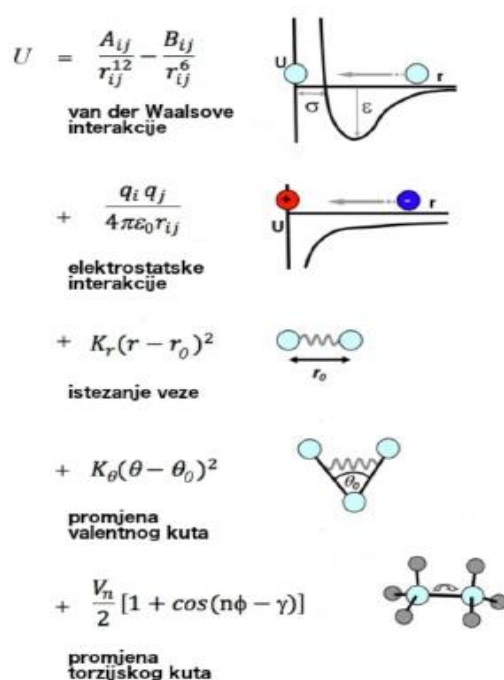
Empirijske metode računalne kemije zanemaruju elektronsku strukturu atoma te je ukupna potencijalna energija sustava izražena kao funkcija položaja jezgara. Ove metode pojednostavljeno promatraju molekule kao kuglice koje su povezane oprugama, čija se strukturalna svojstva ispituju pomoću zakona klasične mehanike te njima pripadaju metode molekulske mehanike (engl. *molecular mechanics*, MM) i molekulske dinamike (engl. *molecular dynamics*, MD). MM metode se koriste kada se želi odrediti optimalna geometrija neke biomakromolekule, a MD kada želimo ispitati dinamiku približno realnih sustava na dužoj vremenskoj skali.

Empirijske metode se nazivaju još i metodama polja sila. Polje sila je termin za funkciju potencijalne energije sustava koje podrazumijeva skup parametra za opis različitih tipova atoma te funkciju koja omogućava računanje potencijalne energije molekule na temelju njezine geometrije. Polje sila za sve atome (engl. *all-atom force field*) predstavljaju svaki atom kao zasebnu česticu kojoj su dodijeljeni naboj, masa i van der Waalsov radijus. Oblik funkcije i

parametri koji ulaze u izraze za potencijalnu energiju sustava dobiveni su eksperimentalno (npr. spektroskopskim metodama), i/ili iz kvantno-mehaničkih računa na manjima sustavima. Osnovni oblik funkcije potencijalne energije sastoji se od „veznog“ i „neveznog“ člana. Vezni član opisuje interakcije između atoma povezanih kovalentnom vezom (energija istezanja veze, promjene valentnog kuta i torzijska energija), dok nevezni ili nekovalentni član opisuje elektrostatske i van der Waalsove interakcije među atomima:

$$U_{\text{ukupna}} = U_{\text{vezna}} + U_{\text{nevezna}}$$
$$U_{\text{ukupna}} = [U_{\text{veza}} + U_{\text{kut}} + U_{\text{torzija}}] + [U_{\text{v.d.W}} + U_{\text{elektrostatska}}]$$

U poljima sila, energija istezanja veze (U_{veza}) i promjene kuta (U_{kut}) atoma povezanih kovalentnom vezom ima oblik harmoničkog potencijala koji je definiran Hookovim zakonom i opisuje promjenu energije sustava uslijed odstupanja duljine veze (Slika 13) i valentnog kuta od referentnih vrijednosti. U nekim slučajevima, kada se želi dobiti realističniji opis veze uslijed velikog istezanja, koristi se računski zahtjevniji anaharmonički (Morseov) potencijal. Oblik funkcije ostalih veznih članova dosta ovisi o polju sila koje se koristi u sustavu. Član U_{torzija} se odnosi na periodičku funkciju koja opisuje promjenu potencijalne energije sustava nastalu uslijed promjene torzijskog kuta između četiri kovalentno povezana atoma od njegove referentne vrijednosti. Nevezni doprinos potencijalnoj energiji sustava je računalno najzahtjevniji jer obuhvaća interakcije jednog atoma sa svim ostalim u sustavu, uz uvjet da ih dijele najmanje tri kovalentne veze. Van der Waalsove interakcije su kratkog dometa i opisane su pomoću Lennard-Jonesovog potencijala, dok je elektrostatski doprinos neveznom članu polja sila dan Coulombovim potencijalom. Kako naboj na atomu nije eksperimentalno mjerljiv, parcijalni naboji se dobivaju usuglašavanjem (engl. *fitting*) s nabojima dobivenim iz kvantno-mehaničkih računa.^{91,95}



Slika 13. Opis pojedinih članova od kojih se sastoji polje sila.⁹⁵

Danas postoji niz suvremenih polja sila razvijenih za različite vrste molekula, a njihova se specifičnost temelji na funkciji kojom se opisuje energija sustava te o skupu atoma za koje je provedena parametrizacija. Neka od općenitih polja sila koja posjeduju parametre za velik broj tipova atoma su CHARMM (engl. *Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics*), AMBER (engl. *Assisted Model Building with Energy Refinement*) i OPLS (engl. *Optimized Potentials for Liquid Simulations*) polje sila. Specijalizirana polja sila su optimizirana za određenu skupinu spojeva i tu se često navode GLYCAM06 polja sila koja su namijenjena za simulaciju ugljikohidrata te Lipid14 polje sila koje je dizajnirano za lipide.

U računalnom dijelu ovog rada, korišteno je AMBER polje sila ff12SB u sklopu AMBER programskog paketa, obzirom da obuhvaća skup parametara koji dobro opisuju strukturalna svojstva proteina, a polje sila GAFF (engl. *General Amber force field*, GAFF) je korišteno za male organske molekule, koje je također dostupno u okviru paketa AMBER za simulacije molekulske dinamike.⁹⁶

2.3.2.1. METODE PRETRAŽIVANJA KONFORMACIJSKOG PROSTORA

Osim relativno lagane i brze optimizacije željene molekulske geometrije, računalni kemičari često žele pretražiti konformacijski prostor, primjerice nekog peptida, tj. žele pronaći sve minimume na plohi konformacijske potencijalne energije. Ovaj princip računalnog istraživanja

ima svoju primjenu u proučavanju strukturnih sličnosti ili različitosti pojedinih konformera, objašnjavanju topljivosti, lipofilnosti i hidrofilitnosti molekula, određivanju i klasifikaciji vodikovih veza, okreta prisutnih u peptidima te se često koristi za interpretaciju eksperimentalnih podataka dobivenih spektroskopskim metodama.

Male molekule je moguće sustavno pretražiti rotacijom oko veza u molekuli za definirane diskretne inkremente, što je kod većih sustava predstavlja problem jer je vremenski zahtjevno. Za veće sustave se ograničava sistemsko pretraživanje te se koriste metode koje perturbiraju geometriju iz jednog lokalnog minimuma u drugi, kao što su stohastičke i Monte Carlo metode, te molekulsko-dinamičke simulacije. Monte Carlo metode započinju od unaprijed zadane geometrije, koja je obično lokalni minimum, te se nove konfiguracije generiraju slučajnim perturbacijama. Kod malih i fleksibilnih, odnosno acikličkih molekula, torzijski kutovi su dobar skup varijabli za slučajnu perturbaciju geometrije. Konformacijski stereoizomeri acikličkih molekula primarno se razlikuju u torzijskim kutovima. Njihovim korištenjem konformacijski prostor se s $3N - 6$ dimenzija smanjuje na približno N dimenzija.⁹⁷ Korištenjem torzijskih internih koordinata olakšava se selektivno ispitivanje područja manje energije konformacijskog prostora gdje se mogu pronaći stabilni konformeri. S obzirom da se broj minimuma povećava s brojem veza oko kojih je moguća rotacija, potrebno je ograničiti domenu pretraživanja. Slučajne metode pretraživanja (npr. Monte Carlo algoritmi) dobar su pristup kod rješavanja ovog problema.⁹⁸ Pronalaženje „smislenog“ minimuma za biomakromolekulske sustave ovisi o odabiru dobre polazne geometrije.

Osim proučavanja konformacijskog prostora isključivo temeljenog na molekulsko-mehaničkim metodama, u literaturi postoji još jedan pristup kojim se može dobiti potpuniji uvid u strukturne karakteristike spojeva. Nakon generiranja konformera molekulsko-mehaničkim metodama, oni najstabilniji kasnije su reoptimizirani na višoj razini teorije (u našem slučaju DFT metodom). Ovaj princip detaljnije računalne konformacijske analize u kojem se koristi kombinacija MM i DFT metoda, pokazao se dobrim i u proučavanju strukturiranja peptida.⁹⁴

2.3.3. Molekulsko-dinamičke (MD) simulacije

Prilikom proučavanja velikih sustava, npr. strukturnih, dinamičkih i termodinamičkih svojstava bioloških molekula i njihovih kompleksa, pronalazak strukture najniže energije (globalnog minimuma) nije od velikog značenja. Razlog tomu je da se u realnim sustavima i u laboratoriju obično susrećemo s ravnotežnom smjesom velikog broja različitih struktura (konformacija), te

eksperimentalno određene veličine (npr. kristalna struktura nekog proteina) odgovaraju statističkom prosjeku pri određenoj temperaturi T . Ta „prosječna struktura“ obuhvaća velik broj stereoizomera, tautomera i konformacijskih izomera koji se strukturno prilično razlikuju od idealiziranog modela sustava.

Kako bi se teorija i eksperiment što bolje uskladili, potrebno je što potpunije okarakterizirati plohu potencijalne energije, tj. pronaći što više reprezentativnih struktura kako bi se generirao ansambl struktura pri nekoj temperaturi, odnosno reprezentativni uzorak koji predstavlja željenu distribuciju svojstava. Strategije generiranja takvih uzoraka se nazivaju uzorkovanje (engl. *sampling*), a dva najpoznatija pristupa uzorkovanja su *Monte Carlo* simulacije i simulacije molekulske dinamike. *Monte Carlo* metode se temelje na slučajnim perturbacijama molekule, dok molekulske-dinamičke simulacije generiraju sekvencu točaka koje pripadaju istom ansamblu u faznom prostoru, ali u funkciji vremena i time daju uvid u dinamičke procese u promatranom sustavu, poput značajnih konformacijskih promjena, smatanje proteina (engl. *foldng*) itd.

Molekulska dinamika (MD) je računalna metoda kojom se simulira vremenski ovisno gibanje atoma, kako bi se opisalo ponašanje molekula u realnom sustavu. Vremenskim uprosječavanjem veličina sakupljenih tijekom dovoljno dugih simulacija, mogu se odrediti termodinamička, odnosno makroskopska svojstva simuliranog sustava.

MD simulacijama se rješavaju jednadžbe gibanja (za sustav od N atoma koji međusobno djeluju jedan na drugog na način koji je određen molekulske-mehaničkim poljem sila), od kojih je najjednostavnija Newtonova jednadžba:

$$m_i \frac{\partial^2 \mathbf{q}_i}{\partial t^2} = m_i \mathbf{a}_i = \mathbf{F}_i \quad (2.1)$$

gdje je \mathbf{F}_i sila koja djeluje na pojedini atom i jednaka je umnošku njegove mase, m_i , i druge derivacije njegovog položaja u vremenu, odnosno negativnoj derivaciji potencijalne energije definirane poljem sila, a s obzirom na interne koordinate, \mathbf{q}_i :

$$\mathbf{F}_i = - \frac{\partial U(\mathbf{q}_1, \mathbf{q}_2, \dots, \mathbf{q}_N)}{\partial \mathbf{q}_i} . \quad (2.2)$$

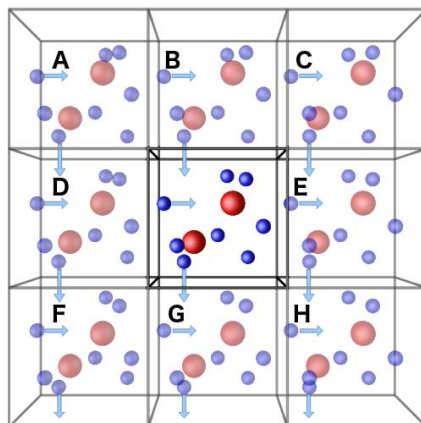
Kombiniranjem jednadžbi 2.1 i 2.2, dobije se diferencijalna jednadžba čije rješenje predstavlja vremensku evoluciju koordinata i brzina čestica u $3N-6$ dimenzionalnom faznom prostoru koji je definiran položajima N čestica, a naziva se trajektorija. Općenito, trajektorije opisuju promjenu strukture i energije sustava s vremenom te sam postupak dobivanja trajektorije,

pogotovo za kompleksnije sustave, je zahtjevan i često ne postoje egzaktna analitička rješenja, već je potrebno numerički riješiti diferencijalne jednačbe za konačne (male) promjene vremena. Najčešće se primjenjuje Verletov algoritam (engl. *velocity-Verlet*) koji računa položaje čestica iz jednačbe dobivene razvojem funkcije položaja u Taylorov red. Glavna pretpostavka je da su sila, a time i ubrzanje a , konstantni u integracijskom koraku, a računi se rastavljaju na niz veoma kratkih vremenskih integrala, obično od 1 fs, što je za red veličine kraće od perioda vibracije C-H veze, koja predstavlja najfrekventniju vibraciju unutar molekule. Poželjno bi bilo da je vremenski korak u simulacijama što duži jer bi to omogućilo bolju pretragu faznog prostora, ali odbojne sile i veliko ubrzanje bi u tom slučaju prouzrokovalo nestabilne MD trajektorije, a time i krive rezultate.^{95,99}

Međutim, vremenski interval se može produžiti za dva do tri puta korištenjem tzv. *SHAKE* algoritma⁹⁶, kojim se „zamrzavaju“ određeni stupnjevi slobode gibanja atoma na ravnotežnu vrijednost (najčešće vibracije veze atoma vodika s nekim težim atomom). Time se mogu proučavati fenomeni koji se odvijaju na mikrosekundnoj ili dužoj vremenskoj skali (kao što je npr. smatanje proteina), koji inače predstavljaju ograničenja za standardne MD simulacije.

Početne strukture, obično dobivene difrakcijom rendgenskih zraka na kristalima ili NMR spektroskopijom, preuzimaju se iz proteinske baze podataka (engl. *Protein Data Bank*, PDB). Prvo se modeliraju dijelovi strukture koji nedostaju, dodaju se vodici, odgovarajući ligand (supstrat ili inhibitor) te se sustav otapa. Simulacija biomakromolekula se provodi u vodi kao otapalu, a kao što je već opisano, otapalo se može opisati implicitno, eksplicitno (simulacijom pojedinačnih molekula vode), ili kombinacijom oba pristupa. U istraživanju je korišten eksplicitni model vode, TIP3P model⁹³. U ovom modelu molekula vode ima tri središta elektrostatskih interakcija, parcijalno negativni naboj pripisan je atomu kisika i neutraliziran je dvama parcijalno pozitivnim nabojima od strane atoma vodika. Van der Waalsove interakcije imaju središte samo na atomu kisika, a kovalentne veze se ne računaju, tj. molekula je kruta. Sustav se promatra zajedno s molekulama otapala i ionima koji se prema potrebi dodaju za neutralizaciju sustava (npr. Na^+ i Cl^-) te se smješta u tzv. kutiju (engl. *box*) koja je najčešće u obliku krnjeg oktaedra. Samo postavljanje biomakromolekula u kutiju otapala ne predstavlja dovoljno dobar model s obzirom na to da će se velik broj molekula otapala naći na granici između kutije i okolnog vakuuma, odnosno na rubovima kutije. Kako bi se izbjegli rubni efekti, nužno je koristiti periodične rubne uvjete (engl. *periodic boundary conditions*) pomoću kojih se kutija sa sustavom preslikava u sve tri dimenzije prostora. Time, ukoliko tijekom simulacija

molekula prijeđe izvan granica osnovne kutije, zamijenit će je njezina periodička slika (tzv. „imaginarna“ čestica), Slika 14. Korištenjem ovih uvjeta omogućeno je očuvanje mase, broja čestica i ukupne energije unutar simulacijske kutije.



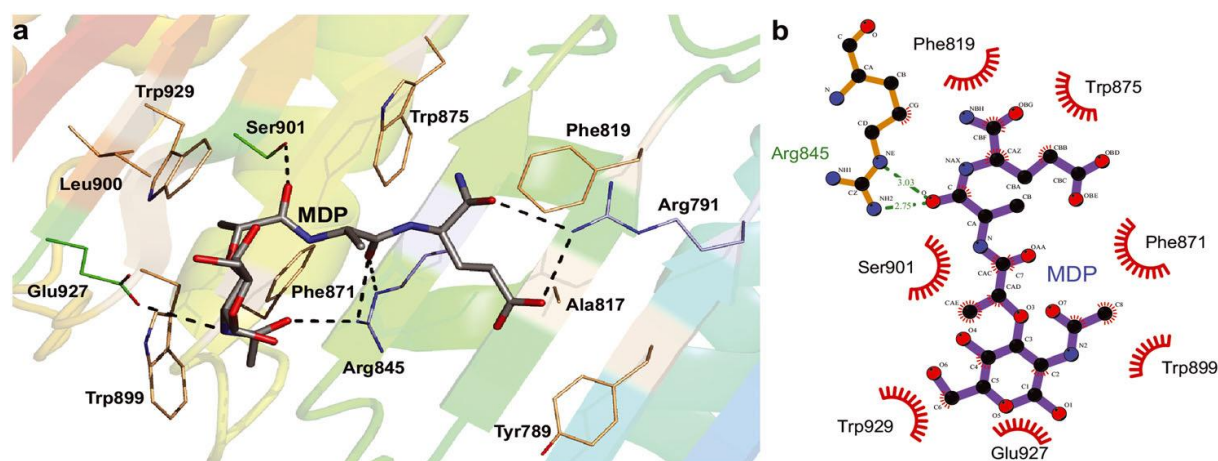
Slika 14. Primjer primjene periodičnih rubnih uvjeta. Sustav je u svakom smjeru okružen svojim slikama. Ako tijekom simulacije čestica (atom ili molekula) izađe iz osnovne simulacijske kutije, njezina virtualna slika će je zamijeniti (naznačeno strelicom).⁹⁵

Tako pripremljeni sustav se zatim minimizira u nekoliko uzastopnih koraka kako bi se otklonili neželjeni kontakti dobiveni dodavanjem vodika, molekula otapala i odgovarajućeg spoja u aktivno ili vezno mjesto proteina. U sljedećem se koraku sustav zagrijava u kratkom periodu (od oko 30 ps do 0 K do željene temperature) u uvjetima odabranog termostata, pri čemu se početne brzine nasumično dodjeljuju atomima kroz Maxwell-Boltzmannovu raspodjelu. Slijedi korak u kojem se provode MD simulacije na željenoj temperaturi do koje se sustav zagrijavao, kako bi se uravnotežio u uvjetima stalnog volumena, tlaka i temperature, nakon čega se započinje s MD simulacijama u kojima se generiraju ansambli koji će se kasnije analizirati za proučavanje željenih svojstava kreiranog sustava. Termostati koji se koriste za održavanje uvjeta sličnih eksperimentalnim su Berendsenov¹⁰⁰, Langevinov¹⁰¹ i Nosé-Hooverov¹⁰².

2.3.4. MD simulacije interakcija NOD2 i MDP derivata

Docking studije i MD simulacije *zebrafish* NOD2-LRR (zNOD2-LRR) 3D modelnih sustava, također su istaknule konkavnu površinu LRR domene koja je bogata aromatskim aminokiselinama, kao vezno mjesto MDPa na NOD2. Modeli opisani u disertaciji ističu Arg845 (odgovara Arg857 aminokiselini iz *rabbit* modela, odnosno kristalne strukture) kao aminokiselinu koja ostvaruje jaku interakciju s MDPom, te aminokiseline Phe819 (Phe831 u

rabbit modelu), Trp875 (Trp887 u *rabbit* NOD2), Trp899 (Trp911 u *rabbit* NOD2), Phe871 i Trp929 koje izgrađuju tzv. hidrofobni džep i odgovorne su za „održavanje“ odgovarajuće orijentacije liganda (Slika 15).¹⁰³



Slika 15. Intermolekulske interakcije MDP-a i zNOD2-LRR: a) Interakcija MDPa s aminokiselinama zNOD2-LRR. Hidrofobne aminokiseline su obojene nježno žuto, polarni ogranci aminokiselina zelenom bojom, a vodikove veze su sivo obojene. b) 2D prikaz interakcija MDPa i LRR domene.¹⁰³

Gobec i suradnici su proveli *docking* i MD simulacije MDPa i DMP derivata s uvedenom *trans*-feruličnom kiselinom kao mimetikom MurNac dijela MDPa i pretpostavljenim veznim mjestom u *rabbit* NOD2 kristalnoj strukturi (PDB kod: 5IRN, rNOD2). Njihovi rezultati su pokazali da Arg857 ostvaruje dvije vodikove veze, jednu sa šećernim dijelom MDPa i jednu s dipeptidom. Kompleks rNOD2-LRR i spoja s *trans*-feruličnom kiselinom (derivat spoja IX s uklonjenim esterskim zaštitama), pokazuju dobru komplementarnost što se tiče ostvarenih interakcija i samog smještaja liganda u predloženo vezno mjesto.²⁶

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. SINTETSKI DIO

3.1.1. Materijali i metode

Svi reagensi i kemikalije korišteni u sintezi bili su analitičke čistoće. Boc-L-Ala-D-isoGln-OBn naručen je od tvrtke *Bachem* (Švicarska), a (*S*)-Boc-adamant-1-ilglicin od *Chem-Impex International Inc.* (SAD). Otapala korištena u radu pročišćena su prema standardnim literaturnim postupcima.¹⁰⁴ Jedan način sinteze 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline proveden je u autoklavu od nehrđajućeg čelika i teflonske jezgre (Parr Instrument Company, Germany) volumena 45 i 80 mL. Tijek reakcija, sastav frakcija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva ispitivani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela 60 F₂₅₄ (Merck). Detekcija je provedena ultraljubičastim zračenjem, reverzibilnom adicijom joda, prskanjem 10 %-tnom sumornom kiselinom uz zagrijavanje, te ninhidrinom uz zagrijavanje. Za kromatografiju na stupcu je korišten silikagel veličine zrna 0,063-0,200 mm (Fluka).

¹H i ¹³C NMR spektri snimljeni su na spektrometru Bruker AV-600 na 600 MHz, 300 MHz i 75,5 MHz (300 MHz i 600 MHz za ¹H, 150 MHz za ¹³C). ¹H i 2D COSY, NOESY, ¹H-¹³C HSQC i ¹H-¹³C HMBC NMR spektri^a snimljeni su odabranim peptidima na Bruker Avance III HD 400 NMR spektrometru. Svi NMR eksperimenti izvedeni su na 298 K i prema TMSu kao unutarnjem standardu.

Za HPLC analizu korišten je Shimadzu HPLC s detektorom s nizom fotodioda (SPD-M20A) i autosamplerom (SIL-20ACTH). Testirani spojevi imali su čistoću preko 95 % na 214 nm. Analize su provedene na Shim-pack GIST C-18 koloni; 250 mm × 4,6 mm; 5 μm; s brzinom protoka od 1,0 mL/min na sobnoj temperaturi. Korišten je gradijentni sustav otapala koji se sastojao od smjese acetonitrila i vode, HPLC kvalitete.

Za snimanje MS spektara korišten je instrument Agilent 6410 MS, a HRMS spektri su snimljeni pomoću spektrometra masa visokog razlučivanja Agilent 6550 Series Accurate-Mass-

^a 2D COSY, NOSEY, ¹H-¹³C HSQC i ¹H-¹³C HMBC NMR spektre radila je izv. prof. dr. sc. Ivana Biljan na Zavodu za organsku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu

Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) vezanog na Agilent 1290 Infinity II sustav za tekućinsku kromatografiju. Analize su provedene na Zorbax Eclipse Plus C-18 koloni; $2,1 \times 50$ mm; $1,8 \mu\text{m}$; s brzinom protoka $0,4 \text{ mL/min}$ na temperaturi od $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Korišten je gradijentni sustav otapala koji se sastojao od smjese mravlje kiseline u vodi i smjese mravlje kiseline u metanolu. Parametri snimanja su sljedeći: temperatura protočnog plina $350 \text{ }^\circ\text{C}$; protok protočnog plina 11 L/min ; tlak raspršivača 35 psi ; potencijal kapilare 3500 V ; potencijal mlaznice 1000 V ; temperatura plina za desolvaciju $200 \text{ }^\circ\text{C}$ i protok plina za desolvaciju 14 L/min . Kao protočni plin i plin za desolvaciju korišten je dušik.

Optička skretanja mjerena su pri sobnoj temperaturi na instrumentu Schmidt + Haensch Polartronic.

3.1.2. Priprava i karakterizacija spojeva

3.1.2.1. PRIPRAVA PEPTIDA KOJIMA JE PROVEDENA KONFORMACIJSKA ANALIZA

3.1.2.1.1. Benzilni ester L-alanil-D-izoglutamin-trifluoracetata (1)

Benzilni ester Boc-L-alanil-D-izoglutamina (400 mg ; $0,98 \text{ mmol}$) suspendira se u bezvodnom diklormetanu (2 mL) i doda TFA (1 mL). Reakcijska smjesa miješa se na sobnoj temperaturi 1 h (dok se TLCom ne detektira izostanak Boc-L-Ala-D-izoGln-OBn) te se upari na rotacijskom uparivaču pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = $2 : 1$ kao eluens.

Dobiven je produkt, L-Ala-D-izoGlnOBn **1**, u obliku soli trifluoroctene kiseline kao viskozno ulje, kvantitativnog iskorištenja (414 mg ; $0,98 \text{ mmol}$).

$R_f = 0,49$ ($\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} = 2:1$).

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz) δ $7,36\text{-}7,30$ (m, 5H ; H_{arom}); $5,13$ (s, 2H , CH_2 ; Bn); $4,41$ (dd, $J = 5,1, 9,0 \text{ Hz}$, 1H , $\text{CH-}\alpha$; izoGln); $3,87$ (q, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 1H , $\text{CH-}\alpha$; Ala); $2,48$ (pt, $J = 7,5, 7,7 \text{ Hz}$, 2H , $\text{CH}_2\text{-}\gamma$; izoGln); $2,24\text{-}2,13$ (m, 1H , $\text{CH-}\beta$; izoGln); $2,03\text{-}1,91$ (m, 1H , $\text{CH-}\beta$; izoGln), $1,44$ (d, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 3H , CH_3 ; Ala).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , $75,5 \text{ MHz}$) δ $193,85$; $192,40$ (C=O); $129,61$; $129,30$ (CH_{arom}); $67,56$ (CH_2 , Bn); $53,72$; $50,56$ ($\text{CH-}\alpha$; Ala, izoGln); $31,42$ ($\text{CH}_2\text{-}\gamma$); $28,43$ ($\text{CH}_2\text{-}\beta$); $18,32$ (CH_3 ; Ala).

MS (ESI) izračunato za $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_4$ $308,2$; dobiveno $[\text{M}]^+$ na m/z : $308,1$.

3.1.2.1.2. L-Alanil-D-izoglutamin (2)

L-Ala-D-izoGln-OBn **1** (81 mg; 0,19 mmol) u obliku soli trifluoroctene kiseline otopi se u 1,4-dioksanu (1 mL), neutralizira s *N*-etilmorfolinom te pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 2 : 1 kao eluens. Pročišćeni produkt otopi se u metanolu (8 mL) i doda se 10 % Pd/C (30 mg). Reakcijska smjesa miješa se 24 h u atmosferi H₂ (g) pri sobnoj temperaturi i tlaku od 30 psi. Smjesa se profiltrira preko naboranog filter-papira i otapalo upari. Produkt se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 1 : 1 kao eluens.

Dobiven je produkt, L-Ala-D-izoGln **2** (16 mg, 0,07 mmol, 39 %), u obliku bezbojne krutine. $R_f = 0,15$ (CHCl₃ : CH₃OH = 1:1).

MS (ESI) izračunato za C₈H₁₅N₃O₄ 217,2; dobiveno [M-H]⁻ na *m/z*: 216,0.

3.1.2.1.3. Benzilni ester *tert*-butiloksikarbonil-(*S*)-(adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutamina (3)

(*S*)-BocAdGly (113 mg; 0,37 mmol) se otopi u bezvodnom diklormetanu (5 mL) i ohladi na 0 °C. Otopini se dodaju EDC·HCl (85 mg; 0,44 mmol) i HOBt·H₂O (49 mg; 0,37 mmol) te se smjesa miješa 0.5 h na 0 °C. Zatim se smjesa doda otopini L-Ala-D-izoGlnOBn **1** u obliku soli trifluoroctene kiseline (154 mg; 0,37 mmol) u bezvodnom 1,4-dioksanu (5 mL) u kojoj je dodan trietilamin (65 µL; 0,74 mmol). Reakcijska smjesa miješa se 1 h na 0 °C, a zatim 48 h na sobnoj temperaturi. Smjesa se razrijedi s etil-acetatom (20 mL) i ispere s vodom (10 mL). Organski sloj se suši na bezvodnom MgSO₄, profiltrira i otapalo upari. Sirovi produkt se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 9 : 1 kao eluens.

Dobiven je produkt, Boc-(*S*)-AdGly-L-Ala-D-izoGlnOBn **3** (180 mg, 0,30 mmol, 82 %), u obliku viskoznog ulja.

$R_f = 0,76$ (CHCl₃ : CH₃OH = 9 : 1).

¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ 7,35-7,29 (m, 5H; H_{arom}); 6,36 (d, *J* = 8,6 Hz, 0,5 ili < 1H; NH); 5,11 (m, 2H, CH₂; Bn); 4,35 (dd, *J* = 4,5; 9,8 Hz, 1H, CH- α ; izoGln); 4,21 (q, *J* = 7,1 Hz, 1H, CH- α ; Ala); 3,66 (s, 1H, CH- α ; AdGly); 2,52-2,41 (m, 2H, CH₂- γ ; izoGln); 2,31-2,25 (m, 1H, CH- β ; izoGln); 2,01-1,89 (m, 1H CH- β ; izoGln); 1,95 (br s, 3H, CH; Ad); 1,71-1,59 (m, 12H, CH₂; Ad); 1,34 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃; Ala).

¹³C NMR (CD₃OD, 75,5 MHz) δ 176,27; 175,27; 174,12; 173,10 (C=O); 137,62 (C_{arom}); 129,58; 129,29; 129,23 (CH_{arom}); 80,68 (C; Boc); 67,43 (CH₂; Bn); 64,47 (CH- α ; AdGly);

53,60; 51,31 (CH- α ; Ala, izoGln); 39,76; 37,91 (CH₂; Ad); 37,35 (C; Ad); 31,57 (CH₂- γ); 27,98 (CH₂- β); 29,87 (CH₃; Boc); 28,80 (CH; Ad); 17,38 (CH₃; Ala).

MS (ESI) izračunato za C₃₂H₄₆N₄O₇ 598,7; dobiveno [M+H]⁺ na m/z 599,4.

3.1.2.1.4. Benzilni ester (*S*)-(adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutamin trifluoracetata (**4**)

Boc-(*S*)-AdGly-L-Ala-D-izoGlnOBn **3** (260 mg; 0,43 mmol) suspendira se u bezvodnom diklormetanu (1 mL) i dodaje se TFA (0,5 mL). Reakcijska smjesa miješa se na sobnoj temperaturi 1 h (dok se TLCom ne detektira izostanak Boc-(*S*)-AdGly-L-Ala-D-izoGlnOBn) te se upari na rotacijskom uparivaču pod sniženim tlakom. Sirovi produkt se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 2 : 1 kao eluens.

Dobiven je produkt, (*S*)-AdGly-L-Ala-D-izoGlnOBn **4**, u obliku soli trifluoroctene kiseline kao viskozno ulje, kvantitativnog iskorištenja (266 mg; 0,43 mmol).

R_f = 0,62 (CHCl₃ : CH₃OH = 2 : 1).

¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ 7,36-7,30 (m, 5H; H_{arom}); 5,12 (s, 2H, CH₂; Bn); 4,38 (dd, J = 4,7, 9,4 Hz, 1H, CH- α ; izoGln); 4,29 (q, J = 7,1 Hz, 1H, CH- α ; Ala); 3,35 (s, 1H, CH- α ; AdGly); 2,47 (pt, J = 7,4, 7,7 Hz, 2H, CH₂- γ ; izoGln); 2,32-2,21 (m, 1H, CH- β ; izoGln); 1,99-1,94 (m, 4H, 3CH; Ad i CH- β ; izoGln); 1,86-1,75 (m, 12H; Ad); 1,36 (d, J = 7,1 Hz, 3H, CH₃; Ala).

¹³C NMR (CD₃OD, 75,5 MHz) δ 176,20; 175,00; 174,17; 172,70 (C=O); 137,59 (C_{arom}); 129,58; 129,27; 129,25 (CH_{arom}); 67,48 (CH₂; Bn); 64,58 (CH- α ; AdGly); 53,61; 51,19 (CH- α ; Ala, izoGln); 39,43; 37,79 (CH₂; Ad); 36,77 (C; Ad); 31,52 (CH₂- γ); 28,13 (CH₂- β); 29,80 (CH; Ad); 17,54 (CH₃; Ala).

MS (ESI) izračunato za C₂₇H₃₉N₄O₅ 499,3; dobiveno [M]⁺ na m/z 499,4.

3.1.2.1.5. (*S*)-(Adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutamin (**5**)

Sol (*S*)-AdGly-L-Ala-D-izoGlnOBn **4** (50 mg; 0,08 mmol) otopi se u 1,4-dioksanu (1 mL), neutralizira s *N*-etilmorfolinom te pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz CHCl₃ : CH₃OH = 2 : 1 kao eluens. Pročišćeni produkt otopi se u metanolu (5 mL) i dodaje se 10 % Pd/C (25 mg). Reakcijska smjesa miješa se 24 h u atmosferi H₂ (g) pri sobnoj temperaturi i tlaku od 30 psi. Smjesa se profiltrira preko naboranog filter-papira i otapalo upari. Produkt se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform: metanol = 2 : 1 kao eluens.

Dobiven je produkt, (*S*)-AdGly-L-Ala-D-izoGln **5** (14 mg, 0,03 mmol, 38 %), u obliku bezbojne krutine.

R_f = 0,21 (CHCl₃ : CH₃OH 2:1).

MS (ESI) izračunato za $C_{20}H_{32}N_4O_5$ 408,5; dobiveno $[M+H]^+$ na m/z 409,3.

3.1.2.1.6. Benzilni ester *N*-[(fluoren-9-il)metoksikarbonil]-(*O*-benzil)-*L*-seril-(*S*)-(adamant-1-il)glicil-*L*-alanil-*D*-izoglutamina (6)

Fmoc-*L*-Ser(OBn)-OH (70 mg, 0,17 mmol) otopi se u bezvodnom diklormetanu (5 mL) i ohladi na 0 °C. Otopini se dodaju EDC·HCl (39 mg; 0,34 mmol) i HOBT·H₂O (23 mg, 0,17 mmol) te se smjesa miješa 0,5 h na 0 °C. Zatim se smjesa doda otopini (*S*)-AdGly-*L*-Ala-*D*-izoGlnOBn **5** (104 mg; 0,17 mmol) u bezvodnom 1,4-dioksanu (5 mL) u kojoj je dodan trietilamin (43 µL; 0,34 mmol). Reakcijska smjesa miješa se 1 h na 0 °C, a zatim 48 h na sobnoj temperaturi. Smjesa se razrijedi s etil-acetatom (20 mL) i ispere s vodom (10 mL). Organski sloj suši se na bezvodnom MgSO₄, profiltrira i otapalo upari. Sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 15 : 1 kao eluens.

Dobiven je produkt, Fmoc-*L*-Ser(OBn)-(*S*)-AdGly-*L*-Ala-*D*-izoGlnOBn **6** (52 mg; 0,06 mmol, 33 %), u obliku viskoznog ulja.

$R_f = 0,31$ (CHCl₃ : CH₃OH = 15 : 1).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz); δ 8,33 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H; NH); 7,93-7,19 (m, 18H, H_{arom}; Fmoc, 2Bn); 5,08 (m, 2H, CH₂; Bn); 4,51 (m, 2H, CH₂; Bn); 4,46-4,08 (m, 9H, CH; Fmoc, CH- α ; Ala, izoGln, Ser, AdGly, CH₂; Fmoc, Bn); 3,64 (m, 2H, CH₂; Ser); 2,39-2,31 (m, 1H, CH- β ; izoGln); 1,83-1,71 (m, 4H, 3CH; Ad and CH- β ; izoGln); 1,57-1,50 (m, 12H, Ad); 1,18 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H, CH₃; Ala).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75,5 MHz) δ 172,73; 172,04; 171,93; 169,21; 169,16 (C=O); 155,92 (CO; Fmoc); 143,71; 143,62; 140,59; 138,08; 136,05 (C_{arom}; Fmoc, 2Bn); 128,31; 128,04; 127,87; 127,78; 127,55; 127,38; 127,31; 127,28; 127,18; 126,99; 125,14; 120,02 (CH_{arom}; Fmoc, 2Bn); 71,98; 69,69; 65,78; 65,39 (CH₂; Ser, Fmoc, 2Bn); 60,12; 54,69; 51,26; 48,80; 46,51 (CH; Fmoc, CH- α ; AdGly, Ser, Ala, izoGln); 37,87; 36,26 (CH₂; Ad); 36,05 (C; Ad); 29,88 (CH₂- γ ; izoGln); 27,60 (CH; Ad); 27,01 (CH₂- β ; izoGln); 17,37 (CH₃; Ala).

MS (ESI) izračunato za $C_{52}H_{59}N_5O_9$ 898,1; dobiveno $[M+H]^+$ na m/z 899,4.

3.1.2.1.7. *L*-Seril-(*S*)-(adamant-1-il)glicil-*L*-alanil-*D*-izoglutamin (7)

Fmoc-*L*-Ser(OBn)-(*S*)-AdGly-*L*-Ala-*D*-izoGlnOBn **6** (51 mg; 0,06 mmol) otopi se u metanolu (10 mL) i doda se 10 % Pd/C (25 mg). Reakcijska smjesa miješa se 24 h u atmosferi H₂ (g) pri sobnoj temperaturi i tlaku od 35 psi. Smjesa se profiltrira preko naboranog filter-papira i otapalo

upari. Produkt se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 1 : 1 kao eluens.

Dobiven je tetrapeptid, L-seril-(S)-AdGly-L-Ala-D-izoGln **7** (8 mg; 0,02 mmol, 29 %), u obliku bezbojne krutine.

$R_f = 0,15$ (CHCl₃ : CH₃OH = 1 : 1).

MS (ESI) izračunato za C₂₃H₃₇N₅O₇ 495,6; dobiveno [M-H]⁻ na m/z 494,0.

3.1.2.2. PRIPRAVA 2-AMINOADAMANTAN-2-KARBOKSILNE KISELINE

3.1.2.2.1. Sinteza 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline metodom Streckerove sinteze aminokiselina

3.1.2.2.1.1. 2-Aminoadamantan-2-karbonitril (**8**)

Adamantan-2-on (2 g; 0,01 mol), NaCN (0,66 g; 0,01 mol), NH₃ (2,64 mL) i NH₄Cl (1,43 g; 0,027 mol) otope se u smjesi vode (13,3 mL) i etil-acetata (24 mL). Tako pripremljena otopina (pH > 10) miješa se 8 h na 55 °C, nakon čega se reakcijska smjesa ohladi na sobnu temperaturu i ekstrahira s dietil-eterom (2 × 20 mL Et₂O), otapalo se upari dok ne ostane oko 7 mL smjese (do pojave precipitata), krutina se izolira filtriranjem, ispere s vodom (2 × 3 mL H₂O) i osuši na zraku.

Dobiven je 2-aminoadamantan-2-karbonitril **8** (1,7 g; 9,87 mmol; 96 %), u obliku bijele krutine.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ / ppm: 2,27 (d, 2H, $J = 12,4$ Hz); 2,19-1,89 (m, 6H); 1,74 (s, 4H); 1,58 (d, 2H, $J = 13,1$ Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ / ppm: 125,09 (CN); 46,99 (C_{Ad}); 37,51; 34,96; 30,29 (CH₂; Ad); 36,57; 26,79; 26,45 (CH; Ad).

MS (ESI) izračunato za C₁₁H₁₆N₂ 176,13; dobiveno [M+H]⁺ na m/z 177,2.

3.1.2.2.1.2. N-(2-Cijanoadamant-2-il)benzamid (**9**)

2-Aminoadamantan-2-karbonitril **8** (1,74 g; 9,88 mmol) otopi se u tetrahidrofuranu (17,4 mL) te se u otopinu doda otopina K₂CO₃ (2,075 g; 0,015 mol) u vodi (27,9 mL). Tako pripremljenoj otopini doda se benzoil-klorid (1,68 mL; 0,015 mol) i smjesa se miješa pomoću magnetske mješalice na sobnoj temperaturi. Nakon 10 min se počinje stvarati precipitat. Nakon 1,5 h

filtriranjem se izolira bijela krutina, trituirana s etil-acetatom (9 mL) i tetrahidrofuranom (10,5 mL) te osuši u vakuumiranom eksikatoru.

Dobiven je *N*-(2-cijanoadamant-2-il)benzamid **9** (1,77 g; 6,31 mmol; 64 %), u obliku bijele krutine.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ / ppm: 7,82-7,80 (m, 2H, CH_{arom}); 7,56 (tt, 1H, $J_1=7,5$ Hz, $J_2=2,3$ Hz; CH_{arom}); 7,50-7,45 (m, 2H, CH_{arom}); 6,24 (s, 1H, CONH); 2,71 (s, 2H; CH₂); 2,36 (d, 2H, $J=13,0$ Hz); 2,01-1,90 (m, 6H); 1,83-1,64 (m, 4H).

¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ / ppm: 166,51 (CONH); 133,83 (C_{arom}); 132,13; 128,78; 127,07 (CH_{arom}); 120,09 (CN); 57,16 (C_{Ad}); 37,71; 34,07; 31,34 (CH₂; Ad); 33,76; 26,37; 26,09 (CH; Ad).

MS (ESI) izračunato za C₁₈H₂₀N₂O 280,16; dobiveno [M-H]⁻ na m/z 279,1.

3.1.2.2.1.3. 2-Benzamidoadamantan-2-karboksilna kiselina (10)

N-(2-cijanoadamant-2-il)benzamid **9** (1,77 g; 6,31 mmol) suspendira se u otopini koncentrirane HCl (29,8 mL) i tetrahidrofurana (3,82 mL) te miješa na sobnoj temperaturi 18 sati. Otopina se polako prelije u hladnu vodu (43 mL) i ostavi stajati 1 h. Produkt se izolira filtriranjem i osuši u vakuumiranom eksikatoru preko noći.

Dobivena je 2-benzamidoadamantan-2-karboksilna kiselina **10** (1,45 g; 4,84 mmol; 77 %), u obliku bijele krutine.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ / ppm: 12,14 (s, 1H, COOH); 8,13 (s, 1H, NH); 7,81-7,78 (m, 2H, CH_{arom}); 7,53 (tt, 1H, $J_1=7,2$ Hz, $J_2=1,4$ Hz; CH_{arom}); 7,47-7,43 (m, 2H, CH_{arom}); 2,62 (s, 2H); 2,11 (d, 4H, $J=12,7$ Hz); 1,81 (br s, 2H); 1,70 (m, 4H), 1,57 (d, 2H, $J=12,8$ Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ / ppm: 174,26 (COOH); 166,93 (CONH); 135,49 (C_{arom}); 131,58; 128,56; 128,18 (CH_{arom}); 63,51 (C_{Ad}); 38,00; 33,93; 33,27 (CH₂; Ad); 31,94; 26,97; 26,82 (CH; Ad).

MS (ESI) izračunato za C₁₈H₂₁NO₃ 299,15; dobiveno [M-H]⁻ na m/z 298,1.

3.1.2.2.1.4. Hidroklorid 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline (11)

2-benzamidoadamantan-2-karboksilna kiselina **10** (1,45 g; 4,84 mmol) otopi se u smjesi koncentrirane HCl (2,42 mL), vode (7,25 mL) i koncentrirane octene kiseline (16,9 mL). Smjesa se zagrijava uz refluks 3 dana nakon čega se na rotacijskom uparivaču upari smjesa kiselina, a dobivena se krutina trituirana s vrućim dietil-eterom (2 × 8 mL) i vrućim acetonitrilom

(2 × 6 mL). Dobivena krutina zatim se otopi u minimalnom volumenu metanola (~ 5 mL) te se doda dietil-eter (~ 25 mL) i ostavi kristalizirati na oko 0 °C preko noći. Krutina se izolira filtriranjem.

Dobiven je hidroklorid 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline **11** (0,752 mg; 3,25 mmol; 68 %), u obliku bijele krutine.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ / ppm: 8,62 (s, COOH); 2,23-2,17 (m, 4H); 1,91 (d, 2H, *J* = 12,5 Hz); 1,79-1,76 (m, 4H), 1,67-1,63 (m, 4H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ / ppm: 171,43 (COOH); 63,87 (C_{Ad}); 37,52; 34,35; 31,16 (CH₂; Ad); 32,16; 26,23 (CH; Ad).

3.1.2.2.2. Sinteza 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline u autoklavu putem spirohidantoina kao međuprodukta

3.1.2.2.2.1. Spiro(adamantan-2,4'-imidazolin)-2,5'-dion (**12**)

U smjesu etanola (6,7 mL) i amonijaka (25 % aq, 2,9 mL) doda se adamantan-2-on (0,5 g; 3,35 mmol), NaCN (0,5 g; 0,01 mol) i karbamat (amonijev karbonat s oznakom "carbamate"; 2,1 g; 0,01 mmol). Smjesa se grije u autoklavu od nehrđajućeg čelika s teflonskom oblogom na 120 °C kroz 1 h. Autoklav se spontano ohladi do sobne temperature. Produkt se odfiltrira i ispere hladnom vodom, acetonom i na kraju s dietil-eterom. Dobivena krutina prekrizalizira se iz tetrahidrofurana.

Dobiven je spiro(adamantan-2,4'-imidazolin)-2,5'-dion **12** (300 mg; 1,36 mmol; 47 %) u obliku bijele krutine.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ / ppm: 10,49 (s, 1H, NH); 8,39 (s, 1H, NH); 2,55 (s, 2H); 2,02 (d, 2H, *J* = 13,2 Hz); 1,78 (br s, 4H); 1,69 (s, 2H); 1,57 (d, 4H, *J* = 13,1 Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ / ppm: 177,73; 156,32 (CONH); 66,03 (C_{Ad}); 35,10; 26,75; 26,11 (CH₂; Ad); 37,81; 33,33; 31,98 (CH; Ad).

3.1.2.2.2.2. 2-Aminoadamantan-2-karboksilna kiselina (**13**)

Spiro(adamantan-2,4'-imidazolin)-2,5'-dion **12** (150 mg; 0,77 mmol) suspendira se u 3,6 mL natrijeve lužine (*c* = 0,5 mol dm⁻³) i zagrijava na 195 °C u autoklavu kroz 3h. Autoklav se spontano ohladi do sobne temperature. Reakcijska smjesa prebaci se u čašu i polako dodaje koncentrirana HCl do pH 7-7,5. Nastali talog se odfiltrira, ispere hladnom vodom i acetonom.

Dobivena je 2-aminoadamantan-2-karboksilna kiselina **13** (100 mg; 0,51 mmol; 67 %) u obliku bijele krutine. NMR i MS podaci podudarni su s podacima dobivenima za spoj **11**.

3.1.2.2.3. Zaštita amino skupine 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline

3.1.2.2.3.1. *N*-(*tert*-butiloksikarbonil)-2-aminoadamantan-2-karboksilna kiselina (**14**)

Hidroklorid 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline **11** (100 mg; 0,43 mmol) suspendira se u smjesi dioksan : voda = 2 : 1 (3,4 mL). Doda se di-*tert*-butildikarbonat (187,7 mg; 0,86 mmol) i natrijeve lužine (1,8 mL, $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$). Smjesa se miješa 24 h pri sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije smjesa se zakiseli zasićenom vodenom otopinom kalijevog hidrogensulfata do pH = 3 i ekstrahira s etil-acetatom (2 × 5 mL). Spojeni organski slojevi isperu se s vodom (7,6 mL) i suše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Nakon filtriranja sredstva za sušenje, otapalo se upari pri sniženom tlaku.

Dobivena je *N*-(*tert*-butiloksikarbonil)-2-aminoadamantan-2-karboksilna kiselina **14** (111,8 mg; 0,38 mmol; 88 %) u obliku bijele krutine.

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ / ppm: 3,68 (s, 1H, NH); 2,48 (s, 2H); 2,12 (t, 4H, $J = 10,8 \text{ Hz}$); 1,79 (br m, 6H, Ad); 1,64 (d, 2H, $J = 11,7 \text{ Hz}$, Ad), 1,44 (s, 9H, Boc).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ / ppm: 175,13 (COOH); 66,74 (C_{Ad}); 37,61; 33,78; 32,40 (CH_2); 27,35; 27,05; 26,84; 26,17 (CH; Ad, CH_3 ; Boc).

MS (ESI) izračunato za $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ 295,18; dobiveno $[\text{M}-\text{H}]^-$ na m/z 293,9.

3.1.2.3. SINTEZA MANOZILIRANOG PREKURSORA

3.1.2.3.1. 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- α -D-manopiranoza (**15**)

U okruglu tikvicu doda se α -D-(+)-manoza (1,007 g; 2,58 mmol), acetanhidrid (7 mL) te jod (0,061 g). Na tikvicu se stavi klor-kalcijeva cjevčica i reakcijska se smjesa miješa pomoću magnetske mješalice na sobnoj temperature 1,5 h. Reakcijska smjesa je smeđe boje i mogu se uočiti pare joda. Nakon završetka reakcije, smjesa se razrijedi s diklormetanom (50 mL) i prebaci u lijevak za odjeljivanje u kojem se nalazi otopina natrijeva tiosulfata ($c = 2,5 \text{ mol dm}^{-3}$, 50 mL) i usitnjeni led. Nakon ekstrakcije organski sloj se obezboji. Slojevi se odvoje, a organski sloj se ekstrahira još dva puta zasićenom otopinom natrijevog karbonata (50 mL). Odvoje se slojevi te se organski sloj ispere zasićenom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata (50 mL). Nakon što se slojevi ponovo odvoje organski sloj se suši na bezvodnom magnezijevu sulfatu. Otopina se profiltrira i otapalo se upari. Dobiveni je produkt u obliku žute uljaste

tekućine (3,027 g). Dobiveni produkt otopi se u dietil-eteru na koji se dodaje heksan dok otopina ne postane mliječno bijela i zamuti se. Otopina se ostavi u frižideru dva dana dok se faze ne odvoje. Otapalo se ukloni kapalicom, a produkt zaostane na dnu tikvice u obliku žute uljaste tekućine.

Dobiven je produkt, 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- α -D-manopiranoza **15** (1,107 g; 33 %), u obliku viskoznog ulja.

$R_f = 0,75$ (CHCl_3 : $\text{CH}_3\text{CN} = 3 : 1$).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ / ppm: 6,09 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-1 α); 5,35 (m, 2H, H-3, H-4); 5,26 (m, 1H, H-2); 4,29 (dd, 1H, $J = 4,8$ Hz, $J = 12,4$ Hz, H-6a); 4,06-4,14 (m, H-5, H-6b); 2,18 (s, 3H, CH_3), 2,17 (s, 3H, CH_3), 2,10 (s, 3H, CH_3), 2,06 (s, 3H, CH_3), 2,01 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ / ppm: 170,64; 169,99; 169,74; 169,55; 168,09 (5 C=O; Ac); 90,61 (C1); 70,62; 68,76; 68,35; 65,55 (C2-C5); 62,11 (C6); 20,85; 20,76; 20,71; 20,66; 20,63 (5 CH_3 ; Ac).

3.1.2.3.2. 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoza (**16**)

Tetraacetilirana manoza, spoj **16**, pripravljena je na sljedeća tri načina.

Postupak A:

Spoj 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- α -D-manopiranoza **15** (1,374 g; 3,52 mmol) otopi se u apsolutnom metanolu (35 mL). U otopinu se doda cinkov acetat dihidrat (86,3 mg; 0,393 mmol). Na tikvicu se stavi klor-kalcijeva cjevčica i reakcijska smjesa se miješa 18 h na sobnoj temperaturi. Metanol se upari, a dobiveni produkt otopi u etil-acetatu (20 mL) te prebaci u lijevak za odjeljivanje. U lijevak se doda voda (30 mL) i dobro izmućka. Slojevi se odvoje, vodeni sloj se ekstrahira još dva puta s etil-acetatom (20 mL). Organski ekstrakti se spoje i suše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Smjesa se profiltrira, a otapalo upari. Sirovi produkt se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : acetonitril = 3 : 1 kao eluens.

Dobiven je produkt, 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoza **16** (0,442 g; 36 %) u obliku žute uljaste tekućine.

$R_f = 0,59$ (CHCl_3 : $\text{CH}_3\text{CN} = 3 : 1$). $[\alpha]_D^{25} = +18,9$ (c 1,1; CHCl_3).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ / ppm: 5,42 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3,2$ Hz, $J_{3,4} = 10,0$ Hz, H-3); 5,34-5,24 (m, 3H, H1, H-4, OH); 4,29-4,12 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b); 3,71 (d, 1H, $J_{2,3} = 3,9$ Hz, H2); 2,17 (s, 3H, CH_3), 2,11 (s, 3H, CH_3), 2,06 (s, 3H, CH_3), 2,01 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ / ppm: 170,86; 170,21; 170,05; 169,80 (4 C=O; Ac); 92,13 (C1); 70,00; 68,73; 68,44; 66,14 (C2-C5); 62,54 (C6); 20,88; 20,74; 20,68; 20,67 (4 CH_3 ; Ac).

MS (ESI) izračunato za C₁₄H₂₀O₁₀ 348,1; dobiveno [M+Na]⁺ na *m/z* 371,1.

Postupak B:

Spoj 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- α -D-manopiranoza **15** (1,046 g; 2,7 mmol) otopi se u smjesi tetrahidrofuran : metanol = 1 : 1 (po 2 mL svakog otapala). Smjesi se doda amonijev acetat (0,418 g; 5,42 mmol). Na tikvicu se stavi klor-kalcijeva cjevčica te se smjesa miješa 24 h na sobnoj temperaturi. Dobiveni produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : acetonitril = 3 : 1 kao eluens.

Dobiven je produkt, 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoza **16** (0,754 g; 81 %), u obliku žute uljaste tekućine.

Postupak C:

Spoj 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- α -D-manopiranoza **15** (1 g; 2,6 mmol) otopi se u diklormetanu (1 mL). U otopinu se doda morfolin (0,895 mL; 0,01 mol). Reakcijska smjesa se miješa 1 h na sobnoj temperaturi. TLCom se prati tijek reakcije te se nakon završetka reakcije smjesa razrijedi s etil-acetatom i ispere u lijevku za odjeljivanje ispere redom s vodenom otopinom HCl (*c* = 2 mol dm⁻³), 5 %-tnom otopinom NaHCO₃, vodom, zasićenom otopinom NaCl. Organski sloj suši se na bezvodnom natrijevom sulfatu. Smjesa se profiltrira i otapalo se upari. Dobiveni produkt se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : acetonitril = 3 : 1 kao eluens.

Dobiven je produkt, 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoza **16** (0,391 g; 43 %), u obliku bezbojne uljaste tekućine.

NMR i MS podaci produkata dobivenih postupcima B i C podudarni su s podacima dobivenima za spoj 16 dobiven postupkom A.

3.1.2.3.3. Sinteza *O*-manozida

3.1.2.3.3.1. *Tert*-butil-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoziloksi)acetat (17)

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoza **16** (0,372 g; 1,068 mmol) otopi se u suhom *N,N*-dimetil-formamidu (5 mL). U otopinu se doda *tert*-butil-bromacetat (0,236 mL) i K₂CO₃ (0,738 g). Reakcijska smjesa miješa se na magnetskog mješalici 2 h na sobnoj temperaturi u zatvorenoj tikvici. Nakon završetka reakcije smjesa se profiltrira preko Hirschvog lijevka, a tikvica se ispere s dietil-eterom (20 mL). Dobivena otopina prebaci se u lijevak za odjeljivanje i ispere tri puta s vodom (3 × 5 mL). Organski sloj se prebaci u tikvicu i osuši na bezvodnom natrijevom

sulfatu. Nakon toga se otopina profiltrira, a otapalo upari. Dobiven sirovi produkt **17** pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : acetonitril = 3 : 1 kao eluens.

Dobiven je produkt, *tert*-butil-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoziloksi)acetat **17** (0,398 g; 81 %) u obliku žute uljaste tekućine.

$$[\alpha]_D^{25} = +48,5 \text{ (} c \text{ 1,2; CHCl}_3\text{)}.$$

$$R_f = 0,64 \text{ (CHCl}_3 \text{ : CH}_3\text{CN} = 3 : 1\text{)}.$$

$^1\text{H NMR}$ (CDCl₃) δ / ppm: 5,41-5,28 (m, 3H, H-2, H-3, H-4); 4,96 (d, 1H, $J_{1,2} = 1,0$ Hz; H-1); 4,30 (dd, 1H, $J_{5,6} = 4,8$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,2$ Hz, H-6b); 4,20 - 4,02 (m, 4H, H-5, H-6a, OCH₂); 2,26 (s, 3H, CH₃); 2,11 (s, 3H, CH₃); 2,04 (s, 3H, CH₃); 1,99 (s, 3H, CH₃); 1,48 (s, 9H; CH₃; *t*-Bu). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃) δ / ppm: 170,62; 169,78; 169,75; 169,69; 168,17 (5 C=O); 97,70 (C1); 82,30 (C; *t*-Bu); 69,32; 69,03; 68,87; 65,92 (C2, C3, C4, C5); 64,89; 62,29 (C6, OCH₂); 28,03 (CH₃; *t*-Bu); 20,84; 20,73; 20,68; 20,64 (4 CH₃).

MS (ESI) izračunato za C₂₀H₃₀O₁₂ 462,2; dobiveno [M+Na]⁺ na m/z 485,2.

3.1.2.3.3.2. 2-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoziloksi)octena kiselina (**18**)

Spoj *tert*-butil-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoziloksi)acetat **17** (1,11 g; 2,4 mmol) otopi se u suhom diklormetanu (5 mL) te se doda trifluoroctena kiselina (2 mL). Na tikvicu se stavi klor-kalcijeva cjevčica. Reakcijska smjesa miješa se na magnetskoj mješalici 3 h. Nakon završetka reakcije, smjesa se razrijedi s diklormetanom (30 mL) i prebaci u lijevak za odjeljivanje. Reakcijska smjesa se ispere s vodom (20 mL). Nakon što se slojevi odjele donji organski sloj se ispusti u tikvicu, a vodeni sloj se dodatno ekstrahira s diklormetanom (20 mL). Organski slojevi spoje se u tikvicu i osuše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Nakon toga se otopina profiltrira, a otapalo upari na rotacijskom uparivaču. Dobiveni sirovi spoj **18** pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 15 : 1 kao eluens.

Dobiven je produkt, 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoziloksi)octena kiselina **18** (0,856 g; 72 %) u obliku žute uljaste tekućine.

$$[\alpha]_D^{25} = +29,0 \text{ (} c \text{ 1,0; MeOH)}.$$

$$R_f = 0,62 \text{ (CHCl}_3 \text{ : CH}_3\text{OH} = 15 : 1\text{)}.$$

$^1\text{H NMR}$ (CD₃OD) δ / ppm: 5,35-5,25 (m, 3H, H-2, H-3, H-4); 4,95 (d, 1H, $J_{1,2} = 0,9$ Hz; H-1); 4,58 (s, <1H, OH); 4,32-4,16 (m, 4H, H-5, H-6a, OCH₂); 4,11 (dd, 1H, $J_{5,6} = 1,7$ Hz, $J_{6a,6b} = 11,5$ Hz, H-6b); 2,14 (s, 3H, CH₃); 2,06 (s, 3H, CH₃); 2,04 (s, 3H, CH₃); 1,96 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ / ppm: 172,45; 172,57; 171,50 (5 C=O); 99,17 (C1); 70,69; 70,49; 70,42; 67,16 (C2, C3, C4, C5); 63,50 (C6, OCH_2); 20,68; 20,65; 20,60 (4 CH_3).

MS (ESI) izračunato za $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$ 406,1; dobiveno $[\text{M}+\text{Na}]^+$ na m/z 429,2.

3.1.2.4. SINTEZA DIMANOZILIRANOG LIZINA

3.1.2.4.1. Di-*p*-toluensulfonat benzilnog estera L-lizina (19)

U okruglu tikvicu stavi se L-lizin-monohidroklorid (0,5203 g; 2,737 mmol), *p*-toluensulfonska kiselina-monohidrat (1,176 g, 6,022 mmol), benzilni alkohol (1,15 mL) i toluen (11 mL). Na tikvicu se stavi Dean-Starkov nastavak za uklanjanje vode i povratno hladilo. Reakcijska smjesa miješa se na magnetskoj mješalici i zagrijava na uljnoj kupelj (135 °C) 24 h. Nakon što se reakcijska smjesa ohladi u nju se doda suhi etil-acetat (5 mL) i tikvica se ostavi u hladnjaku do kristalizacije produkta. Dobiveni kristali se odfiltriraju preko Hirshofovog lijevka i prekrizaliziraju iz etanola (10 mL). Na otopinu se doda suhi etil-acetat (7 mL) te se stavi u hladnjaku do kristalizacije produkta. Dobiveni kristali bijele boje odfiltriraju se preko Büchnerovog lijevka i isperu s par kapalica etil-acetata te stave na sušenje.

Dobiven je produkt, di-*p*-toluensulfonat benzilnog estera L-lizina **19** (0,858 g; 52 %) u obliku bijele krutine. $t_f = 158\text{-}159$ °C (lit. $159\text{-}160$ °C¹⁰⁵)

$[\alpha]_D^{25} = -1,9$ (c 1,1; MeOH).

$R_f = 0,828$ ($\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} = 1 : 1$).

^1H NMR (CD_3OD) δ / ppm: 7,71 (s, 2H; H_{arom} ; Ts); 7,69 (s, 2H; H_{arom} ; Ts); 7,89 (s, 7,43-7,34 (m, 5H, H_{arom} ; Bn); 7,24 (s, 2H; H_{arom} ; Ts); 7,22 (s, 2H; H_{arom} ; Ts); 5,32-5,22 (m, 2H; CH_2 ; Bn); 4,09 (t, 1H, $J = 6,4$ Hz; CH- α); 2,85 (pt, 1H, $J = 6,5$ Hz; CH_2); 2,36 (s, 6H, 2 CH_3); 2,01-1,33 (m, 6H, 3 CH_2).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ / ppm: 170,32 (C=O); 143,43; 141,87; 136,49 (3 C_{arom}); 129,92; 129,88; 129,78; 126,97 (CH_{arom}); 69,20 (C6, OCH_2); 53,76 (CH- α); 40,29; 31,01; 27,93; 23,00 (4 CH_2); 21,36 (2 CH_3).

MS (ESI) izračunato za $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ 236,2; dobiveno $[\text{M}+\text{H}]^+$ na m/z 237,2.

3.1.2.4.2. Benzilni ester (2*S*)-2,6-di[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoziloksi)-acetilamino] heksanske kiseline (20)

U okrugloj tikvici otopi se spoj **18** (0,22 g, 0,55 mmol) u suhom diklormetanu (4 mL). U tu otopinu doda se 0,129 g EDC·HCl i 0,075 g HOBt·H₂O i tikvica se začepi. Reakcijska smjesa

miješa se na ledenoj kupelji 15 min. Nakon toga se u reakcijsku smjesu doda suhi *N,N*-dimetilformamid (4 mL), spoj **19** (0,1736 g, 0,28 mmol) i trietilamin (0,202 mL). Nakon 48 h reakcijska smjesa se razrijedi s etil-acetatom (20 mL) i prebaci u lijevak za odjeljivanje. Dobivena smjesa ispere se dva puta s vodom (20 mL). Organski sloj se osuši na bezvodnom natrijevom sulfatu, profiltrira i upari na rotacijskom uparivaču. Spoj **20** pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela, kao eluens koristi se CHCl₃ : CH₃OH = 5 : 1.

Dobiven je produkt, benzilni ester (2*S*)-2,6-di[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -*D*-manopiranoziloksi)-acetilamino] heksanske kiseline **20** (0,233 g; 82 %) u obliku žute viskozne tekućine.

$[\alpha]_D^{25} = +31,8$ (*c* 0,8; MeOH). $R_f = 0,83$ (CHCl₃ : CH₃OH = 5 : 1).

¹H NMR (CD₃OD) δ / ppm: 7,90 (s, <1H, NH); 7,38-7,31 (m, 5 H; 5 H_{arom}); 5,41- 5,14 (m, 6 H, H-2, H-3, H-2', H-3', CH₂; OBn); 4,93 (d, *J* = 1,1 Hz, 1H; H-1); 4,90 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H; H-1'); 4,51 (dd, 1H, *J* = 5,1 Hz, *J* = 8,8 Hz, CH; Lys); 4,28- 4,03 (m, 12H; H-4, H-4', H-5, H-5', H-6a, H-6a', H-6b, H-6b', 2 OCH₂); 3,26-3,19 (m, 2H; ϵ -CH₂; Lys); 2,13 (s, 6H, 2CH₃; Ac); 2,06 (s, 3H, CH₃; Ac); 2,05 (s, 3H, CH₃; Ac); 2,03 (s, 3H, CH₃; Ac); 2,01 (s, 3H, CH₃; Ac); 1,97 (s, 6H, 2 CH₃; Ac); 1,94- 1,74 (m, 2H, CH₂; Lys); 1,61-1,23 (m, 4H; CH₂; Lys).

¹³C NMR (CD₃OD) δ / ppm: 173,19, 172,42; 172,38; 171,76; 171,68; 171,58; 171,56; 171,52; 171,40; 171,06 (11 C=O); 137,30 (C_{arom}); 129,68; 129,43; 129,35 (CH_{arom}); 99,25; 99,13 (C1); 70,71; 70,44; 70,43; 70,40; 70,37; 67,15 (C2, C3, C4, C5); 68,08; 67,57; 67,48; 63,46 (C6, OCH₂; linker; OCH₂; Bn); 53,61(CH; Lys); 39,79; 31,90; 29,92; 24,24 (CH₂; Lys); 20,68 (CH₃; Ac).

MS (ESI) izračunato za C₄₅H₆₀N₂O₂₄ 1012,4; dobiveno [M+Na]⁺ na *m/z* 1036,5.

HRMS izračunato za C₄₅H₆₀N₄O₂₄ 1012,35; dobiveno [M+H]⁺ 1013,36.

3.1.2.4.3. (2*S*)-2,6-Di[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -*D*-manopiranoziloksi)-acetilamino] heksanska kiselina (**21**)

Spoj **20** (0,106 g; 0,1046 mmol) otopi se u metanolu (10 mL) i prebaci u bocu za hidrogenolizu. U tu otopinu doda se 10 % Pd/C (0,0489 g). Reakcijska smjesa se miješa 1,5 h pri tlaku vodika od 30 psi nakon čega se otopina profiltrira preko finog naboranog filter papira. Spoj **21** pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela, kao eluens koristi se kloroform : metanol = 5 : 1.

Dobiven je produkt, (2*S*)-2,6-di[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoziloksi)-acetilamino] heksanska kiselina **21** (0,0793 g; 83 %) u obliku žute viskozne tekućine.

$[\alpha]_D^{25} = +51,0$ (*c* 1,0; MeOH).

$R_f = 0,6$ (CHCl₃: CH₃OH = 5 : 1).

¹H NMR (CD₃OD) δ / ppm: 5,41- 5,24 (m, 4 H, H-2, H-3, H-2', H-3'); 4,95 (s, 1H, H-1); 4,91 (d, *J* = 0,8 Hz, H-1'); 4,34 (dd, 1H, *J* = 4,6 Hz, *J* = 8,1 Hz, CH; Lys); 4,28- 4,03 (m, 12H; H-4, H-4', H-5, H-5', H-6a, H-6a', H-6b, H-6b', 2 OCH₂); 3,26-3,21 (m, 2H; ϵ -CH₂; Lys); 2,15 (s, 6H, 2CH₃; Ac); 2,14 (s, 3H, CH₃; Ac); 2,06 (s, 6H, 2CH₃; Ac); 2,04 (s, 6H, 2CH₃; Ac); 1,97 (s, 6H, 2CH₃; Ac); 1,96-1,76 (m, 2H, CH₂; Lys); 1,62-1,54 (m, 2H, CH₂; Lys); 1,44-1,38 (m, 2H, CH₂; Lys).

¹³C NMR (CD₃OD) δ / ppm: 170,49; 170,46; 169,78; 169,71; 169,63; 169,62; 169,60; 169,14; 168,83 (11 C=O); 97,28; 97,25 (C1); 68,78; 68,52; 68,47; 68,42; 68,41 (C2, C3, C4); 65,69; 65,66 (OCH₂; linker); 65,20; 65,15 (C5); 61,51; 61,48 (C6); 53,00(CH; Lys); 38,02; 30,84; 28,17; 22,27 (4 CH₂; Lys); 18,79; 18,78; 18,77; 18,75; 18,74 (CH₃; Ac).

MS (ESI) izračunato za C₃₈H₅₄N₂O₂₄ 922,3; dobiveno [M+Na]⁺ na *m/z* 945,4.

3.1.2.5. PRIPRAVA SPOJEVA KOJIMA JE ISPITANA IMUNOMODULACIJSKA AKTIVNOST

3.1.2.5.1. Sinteza adamantanskog desmuramil-peptida i njegovih manoznih derivata

3.1.2.5.1.1. Benzilni ester 4-{2-[(2-*tert*-butoksikarbonilaminoadamantan-2-karbonil)amino]-propionilamino}-4-karbamoilbutanske kiseline (**22**)

N-(*tert*-butiloksikarbonil)-2-aminoadamantan-2-karboksilna kiselina **14** (195 mg; 0,66 mmol) otopi se u bezvodnom diklormetanu (3 mL) i ohladi na 0 °C. Otopini se dodaju EDC·HCl (151 mg; 0,73 mmol) i HOBt·H₂O (90 mg, 0,66 mmol) te se smjesa miješa 0,5 h na 0 °C. Zatim se smjesa doda otopini L-Ala-D-izoGlnOBn **1** (278 mg; 0,66 mmol) u bezvodnom 1,4-dioksanu (3 mL) u kojoj je dodan trietilamin (165 μ L; 1,32 mmol). Reakcijska smjesa miješa se 1 h na 0 °C, a zatim 48 h na sobnoj temperaturi. Smjesa se razrijedi s etil-acetatom (20 mL) i ispere s vodom (15 mL). Organski sloj suši se na bezvodnom MgSO₄, profiltrira i otapalo upari. Sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 9 : 1 kao eluens.

Dobiven je tripeptid **22** (212 mg, 55 %) u obliku krute pjene.

$R_f = 0,43$ (CHCl₃: CH₃OH = 9 : 1).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ / ppm: 7,39-7,33 (m, 5H, CH_{arom}); 5,14 (d, 2H, $J = 4,6$ Hz CH₂; Bn); 4,49-4,44 (m, 1H, $J =$ CH- α ; izoGln); 4,30-4,24 (m, 1H, CH- α ; Ala); 2,61-2,45 (m, 3H, CH₂- γ ; izoGln, CH- β ; izoGln,); 2,33-2,24 (m, 1H, CH- β ; izoGln, Ad); 2,06-1,66 (m, 14H, Ad); 1,43 (s, 9H, CH₃; Boc); 1,38 (d, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH₃; Ala).

¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ / ppm: 173,98; 173,48; 173,31; 172,77 (CO); 155,26 (CO; Boc); 135,75 (C_{arom}); 128,58; 128,27 (CH_{arom}); 80,37 (C; Boc); 66,55 (CH₂; Bn); 62,66 (C_{Ad}); 52,42 (CH- α ; izoGln); 49,88 (CH- α ; Ala); 37,44; 34,03; 33,84; 32,62; 32,52; 30,79; 26,58 (CH₂; Ad, CH₂- γ ; izoGln, CH₂- β ; izoGln); 32,44; 32,04; 28,35; 26,64; 26,45 (CH; Ad, CH₃; Boc); 16,97 (CH₃; Ala).

HRMS izračunato za C₃₁H₄₄N₄O₇ 584,32; dobiveno [M+Na]⁺ 607,3129.

3.1.2.5.1.2. Benzilni ester 4-{2-[(2-aminoadamantan-2-karbonil)amino]propionilamino}-4-karbamoilbutanske kiseline (23)

Zaštićeni peptid **22** (617 mg; 1,056 mmol) suspendira se u bezvodnom diklormetanu (2 mL) i doda trifluoroctena kiselina (1 mL). Reakcijska smjesa miješa se na sobnoj temperaturi 1 h (dok se TLC_{com} ne detektira izostanak spoja **22** te se upari na rotacijskom uparivaču pod sniženim tlakom. Sirovi produkt može se koristiti dalje u sintezi bez pročišćavanja. Za potrebe strukturne karakterizacije uzorak je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 5 : 1 kao eluens.

Dobiven je produkt **23**, u obliku soli trifluoroctene kiseline i kao viskozno ulje, uz gotovo kvantitativno iskorištenje (620 mg; 98 %).

$R_f = 0,40$ (CHCl₃ : CH₃OH = 5 : 1).

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ / ppm: 7,38-7,32 (m, 5H, CH_{arom}); 5,14 (s, 2H, CH₂; Bn); 4,38 (dd 1H, $J = 4,7$ Hz, $J = 9,7$ Hz, CH- α ; izoGln); 4,35 (k, 1H, $J = 7,1$ Hz, 1H, CH- α ; Ala); 2,49 (t, 2H, $J = 7$, Hz, CH₂- γ ; izoGln); 2,30-2,17 (m, 5H, CH₂- β ; izoGln, Ad); 2,00-1,66 (m, 11H, Ad), 1,39 (d, 3H, $J = 7,4$ Hz, CH₃; Ala).

¹³C NMR (CDCl₃) δ / ppm: 176,69; 174,93; 174,24; 172,79 (CO); 136,14 (C_{arom}); 128,15; 127,85 (CH_{arom}); 66,05 (CH₂; Bn); 61,03 (C_{Ad}); 52,25 (CH- α ; izoGln); 49,64 (CH- α ; Ala); 37,35; 34,64; 31,55; 30,09 (CH₂; Ad, CH₂- γ ; izoGln, CH₂- β ; izoGln); 33,76; 33,58; 26,88; 26,67 (CH; Ad); 16,02 (CH₃; Ala).

HRMS izračunato za C₂₆H₃₆N₄O₅ 485,2758; dobiveno 485,2768.

3.1.2.5.1.3. 4-{2-[(2-aminoadamantan-2-karbonil)amino]propionilamino}-4-karbamoilbutanska kiselina (24)

Spoj **23** (40 mg; 0,067 mmol) u obliku soli trifluoroctene kiseline otopi se u metanolu (5 mL) i doda se 10 % Pd/C (10 mg). Reakcijska smjesa miješa se 24 h u atmosferi H₂ (g) pri sobnoj temperaturi i tlaku od 35 psi. Smjesa se profiltrira preko naboranog filter-papira i otapalo upari. Produkt se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform: metanol = 1 : 1 kao eluens.

Dobiven je produkt, **24** (25,6 mg, 0,07 mmol, 98 %), u obliku bezbojne krutine.

$R_f = 0,65$ (CHCl₃ : CH₃OH = 1:1).

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ / ppm: 4,48 (k, 1H, $J = 7,4$ Hz, CH- α ; Ala); 4,50 (dd, 1H, $J = 4,3$ Hz, $J = 9,1$ Hz CH- α ; izoGln); 2,39 (brs, 2H, CH₂- γ ; izoGln); 2,26-2,22 (m, 2H, CH₂- β ; izoGln); 2,05-1,68 (m, 14H, Ad), 1,37 (d, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH₃; Ala).

¹³C NMR (CDCl₃) δ / ppm: 181,66; 176,52; 174,56; 170,85 (CO); 64,06 (C_{Ad}); 54,00 (CH- α ; izoGln); 49,97 (CH- α ; Ala); 36,34; 34,02; 33,71; 33,47; 30,88; 30,70; 27,07 (CH₂; Ad, CH₂- γ ; izoGln, CH₂- β ; izoGln); 31,58; 30,82; 25,68; 25,50 (CH; Ad); 16,33 (CH₃; Ala).

HRMS izračunato za C₁₉H₃₀N₄O₅ 394,22; dobiveno [M+H]⁺ 395,23.

3.1.2.5.1.4. Benzilni ester 4-{2-[(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranoziloksi)etanoil]-aminoadamantan-2-karbonil)amino]propionilamino}-4-karbamoilbutanske kiseline (25)

Manozid **18** (200 mg; 0,492 mmol) otopi se u bezvodnom diklormetanu (5 mL) i ohladi na 0 °C. Otopini se dodaju EDC·HCl (105 mg; 0,492 mmol) i HOBt·H₂O (67 mg, 0,492 mmol) te se smjesa miješa 0,5 h na 0 °C. Zatim se smjesi doda otopina peptida **23** (294 mg; 0,492 mmol) u bezvodnom 1,4-dioksanu (5 mL) u kojoj je dodan trietilamin (123 μ L; 1,968 mmol). Reakcijska smjesa miješa se 1 h na 0 °C, a zatim 48 h na sobnoj temperaturi. Smjesa se razrijedi s AcOEt (20 mL) i ispere s vodom (15 mL). Organski sloj suši se na bezvodnom Na₂SO₄, profiltrira i otapalo upari. Sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 15 : 1 kao eluens.

Dobiven je zaštićeni manozilirani peptid **26** (245 mg, 57 %) u obliku krute pjene.

$R_f = 0,50$ (CHCl₃: CH₃OH = 15 : 1).

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ / ppm: 8,2 (d, <1H, $J = 7,3$ Hz, NH); 7,51 (s, <1H, NH); 7,37-7-7,30 (m, 5H, CH_{arom}); 5,39-5,28 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 5,13 (s, 2H, CH₂; Bn); 4,94 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H, H-1), 4,43-4,35 (m, 2H, CH- α ; izoGln, CH- α ; Ala); 4,30 – 4,06 (m, 5H, H-5, H-6, OCH₂); 2,71 (s, 1H, Ad); 2,56 (s, 1H, Ad); 2,49 (t, 2H, CH₂- γ ; izoGln, $J = 7,5$ Hz); 2,27-

2,19 (m, 1H, CH-β; izoGln); 2,16 (s, 3H, CH₃ Ac); 2,13-2,08 (m, 2H, Ad); 2,08 (s, 3H, CH₃ Ac); 2,05 (s, 3H, CH₃ Ac); 2,014-2,01 (m, 1H, CH-β; izoGln); 1,99 (s, 3H, CH₃ Ac); 1,90-1,74 (m, 8h, Ad); 1,40 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H, CH₃ Ala).

¹³C NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ / ppm: 175,09; 173,64; 173,24; 172,84; 171,01; 170,16; 170,11; 170,05; 169,18 (CO); 136,21 (C_{arom}); 128,16; 127,78 (CH_{arom}); 97,47 (C1); 69,18; 69,13; 68,88; 65,53 (C2, C3, C4, C5); 66,13; 65,96; 63,01; 61,96 (C6, CH₂; Bn, OCH₂, C_{Ad}); 52,46 (CH-α; izoGln); 49,29 (CH-α; Ala); 39,02 (CH₃; Boc); 37,27; 33,60; 33,52; 32,60; 30,19; 26,64 (CH₂; Ad, CH₂-γ; izoGln, CH₂-β; izoGln); 32,52; 31,43; 26,78; 26,50 (CH; Ad); 19,27; 19,21; 19,16 (CH₃; Ac); 16,06 (CH₃; Ala).

MS (ESI) izračunato za C₄₂H₅₆N₄O₁₆ 872,37; dobiveno na m/z 871,3.

3.1.2.5.1.5. 4-{2-[(2-(α -D-manopiranoziloksi)etanoil]-aminoadamantan-2-karbonil)amino]-propionilamino}-4-karbamoilbutanska kiselina (26)

Manozilirani peptid **25** (245 mg; 0,280 mmol) otopi se u metanolu (10 mL) i doda se 10 % Pd/C (60 mg). Reakcijska smjesa se miješa 2 h u atmosferi H₂ (g) pri sobnoj temperaturi i tlaku od 40 psi. Ishod reakcije provjeri se pomoću TLC u sustavu otapala kloroform : metanol = 15 : 1. Reakcijska mjesa se profiltrira preko naboranog filter-papira i otapalo upari. Sirovi produkt koristi se u sljedećem koraku Zemplénove deacetilacije bez pročišćavanja. Manozilirani peptid sa slobodnom karboksilnom skupinom (157 mg; 0,18 mmol) otopi se u apsolutnom metanolu (2 mL) te se doda otopina natrijevog metoksida u metanolu ($w = 25$ %, 10 μ L). Reakcija smjesa miješa se na pri sobnoj temperaturi 1 h. Nakon završetka reakcije reakcijska smjesa se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela, kao eluens se koristi kloroform : metanol = 1 : 1.

Dobiven je produkt **26** (68 mg, 48 %), u obliku bezbojne krutine.

$R_f = 0,36$ (CHCl₃ : CH₃OH = 1:1).

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ / ppm: 4,83 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H, H-1), 4,32 (q, 1H, $J = 7,3$ Hz, CH-α; Ala); 4,21 (dd, 1H, $J = 4,8$ Hz, $J = 9,6$ Hz, CH-α; izoGln); 4,16 (m, 1H,); 4,04 (m, 1H); 3,98 (dd, 1H, $J = 1,8$ Hz, $J = 3,7$ Hz); 3,81 (dd, 1H, $J = 2,1$ Hz, $J = 12,6$ Hz); 3,78 (dd, 1H, $J = 3,5$ Hz, $J = 9,4$ Hz); 3,68 (dd, 1H, $J = 6,8$ Hz, $J = 12,4$ Hz); 3,63-3,58 (m, 1H); 3,56-3,63 (m, 1H); 2,54 (s, 1H, Ad); 2,44 (s, 1H, Ad); 2,49 (pt, 2H, CH₂-γ; izoGln, $J = 6,8$ Hz); 2,09-2,04 (m, 1H, CH-β; izoGln); 2,02-1,58 (m, 15H; 14H Ad, 1H, CH-β; izoGln); 1,32 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, CH₃ Ala).

^{13}C NMR (D_2O , 400 MHz) δ / ppm: 180,11; 176,35; 175,30; 174,77; 170,70 (CO); 99,80 (C1); 73,25; 70,47; 69,73; 66,52 (C2, C3, C4, C5); 65,66; 63,59; 60,82 (C6, OCH_2 , C_{Ad}); 53,18 (CH- α ; izoGln); 49,91 (CH- α ; Ala); 36,68; 33,39; 33,21; 32,69; 32,27; 32,24; 27,22 (CH_2 ; Ad, CH_2 - γ ; izoGln, CH_2 - β ; izoGln); 32,48; 31,18; 26,28; 25,92 (CH; Ad); 16,22 (CH_3 ; Ala).

MS (ESI) izračunato za $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{12}$ 614,28; dobiveno $[\text{M}-\text{H}]^-$ na m/z 613.

HRMS izračunato za $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{12}$ 614,27; dobiveno $[\text{M}+\text{H}]^+$ 615,2974.

3.1.2.5.1.6. Benzilni ester 4-{2-[(*2S*)-2,6-di{2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -*D*-manopiranoziloksi)acetilamino}heksanoil]-aminoadamantan-2-karbonil)amino]propionil-amino}-4-karbamoilbutanske kiseline (27)

Dimanozilirani lizin **21** (31,4 mg; 0,034 mmol) otopi se u bezvodnom diklormetanu (2 mL) i ohladi na 0 °C. Otopini se dodaju EDC·HCl (10 mg; 0,052 mmol) i HOBt·H₂O (5 mg, 0,037 mmol) te se smjesa miješa 0,5 h na 0 °C. Zatim se smjesa doda otopini peptida **23** (25 mg; 0,037 mmol) u smjesi bezvodnog 1,4-dioksana (2 mL) i suhog *N,N*-dimetilformamida (0,5 mL). Potom se doda trietilamin (10 μL ; 0,080 mmol). Reakcijska smjesa miješa se 1 h na 0 °C, a zatim 48 h na sobnoj temperaturi. Smjesa se razrijedi s etil-acetatom (10 mL) i ispere s vodom (5 mL). Organski sloj suši se na bezvodnom Na_2SO_4 , profiltrira i otapalo upari. Sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 15 : 1 kao eluens.

Dobiven je zaštićen dimanozilirani peptid **27** (40 mg, 85 %) u obliku bijele krutine.

R_f = 0,33 (CHCl_3 : CH_3OH = 15 : 1).

^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ / ppm: 8,1 (d, <1H, J = 8,0 Hz, NH); 7,39-7-7,30 (m, 5H, CH_{arom}); 5,45–5,25 (m, 2H, H-3, H-3'), 5,14 (m, 2H, CH_2 ; Bn); 4,93 (d, J = 1,6 Hz, 1H, H-1), 4,44-4,07 (m, 6H, CH- α ; izoGln, CH- α ; Ala, CH- α ; Lys, H4, H4', H5); 3,67 (dd, 1H, J = 5,0 Hz; J = 11,3 Hz, H-5'); 3,60 (dd, 1H, J = 4,7 Hz, J = 11,4 Hz, H-6a); 3,53 (m, 1H, H-6a'); 3,30 (m, 2H; ϵ - CH_2 ; Lys); 3,01 (s, 1H, OCH); 2,88 (s, 1H, OCH); 2,54-2,45 (2H, CH_2 - γ ; izoGln); 2,32-2,18 (m, 2H, CH_2 - β ; izoGln); 2,18-1,95 (24H, CH_3 Ac); 1,88-1,69 (m, 14H, Ad); 1,66-1,53 (m, 2H, CH_2 Lys); 1,45-1,31 (m, 5H, CH_2 Lys, CH_3 Ala).

^{13}C NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ / ppm: 174,92; 173,72; 172,74; 170,98; 170,35; 170,08; 169,89; 169,64 (CO); 136,14 (C_{arom}); 128,15; 127,81 (CH_{arom}); 97,73 (C1); 72,46; 69,27; 69,94; 65,71 (C2, C3, C4, C5); 66,18; 66,05; 65,99; 63,02; 62,02 (C6, CH_2 ; Bn, OCH_2 , C_{Ad}); 52,40; 52,28 (CH- α ; izoGln, CH- α ; Lys); 49,92 (CH- α ; Ala); 38,40; 37,30; 37,22; 33,66; 35,54; 30,14;

30,02; 29,35; 28,67; 27,38; 26,81 (CH₂; Ad, CH₂-γ; izoGln, CH₂-β; izoGln, CH₂; Lys); 35,55; 33,35; 32,20; 26,81 (CH; Ad); 19,24 (CH₃; Ac); 16,03 (CH₃; Ala).

HRMS izračunato za C₆₄H₈₈N₆O₂₈ 1388,56; dobiveno [M+Na]⁺ 1411,55.

3.1.2.5.1.7. 4-{2-[(2S)-2,6-di{2-(α-D-manopiranoziloksi)acetilamino}heksanoil]-amino-adamantan-2-karbonil}amino]propionilamino-4-karbamoilbutanska kiselina (28)

Dimanozilirani peptid **27** (40 mg; 0,029 mmol) otopi se u metanolu (5 mL) i doda se 10 % Pd/C (10 mg). Reakcijska smjesa miješa se 2 h u atmosferi H₂ (g) pri sobnoj temperaturi i tlaku od 30 psi. Ishod reakcije provjeri se pomoću TLC u sustavu otapala CHCl₃ : CH₃OH = 9 : 1. Reakcijska mjesa profiltrira se preko naboranog filter-papira i otapalo upari. Sirovi produkt koristi se u sljedećem koraku Zemplénove deacetilacije bez pročišćavanja. Dobiven dimanozilirani peptid sa slobodnom karboksilnom skupinom otopi se u apsolutnom metanolu (1 mL) te se doda otopina natrijevog metoksida u metanolu (*w* = 25 %, 5 μL). Reakcija smjesa miješa se na pri sobnoj temperaturi 1 h. Nakon završetka reakcije reakcijska smjesa se propusti kroz stupac silikagela u smjesi otapala kloroform : metanol = 9 : 1.

Dobiven je produkt **28** (18 mg, 64 %), u obliku bezbojne krutine.

R_f = 0,14 (CH₃CN: H₂O = 5:1).

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ / ppm: 4,84 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H, H-1), 4,81 (s, 1H, H-1'), 4,33-4,26 (m, 2H, CH-α; Ala, CH-α; izoGln); 4,21-3,96 (m, 6H,); 3,80 (m, 3H); 3,68 (dd, 1H, *J* = 6,0 Hz, *J* = 12,6 Hz); 3,59 (pt, 2H, *J* = 9,4 Hz); 3,53 (m, 1H); 3,23-3,19 (m, 2H) ; 3,54-3,42 (m, 2H, CH₂, Lys); 2,26-2,16 (m, 2H, CH₂-γ; izoGln); 2,1-2,0 (m, 1H, CH-β; izoGln), 2,0-1,90 (m, 1H, CH-β; izoGln); 1,88-1,62 (m, 14H, Ad), 1,47 (k, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂ Lys); 1,33-1,23 (2H, CH₂, Lys); 1,30 (3H, *J* = 7,4 Hz, CH₃ Ala).

¹³C NMR (D₂O, 400 MHz) δ / ppm: 180,93; 176,41; 176,38; 175,20; 175,10; 174,68; 174,53; 173,19; 173,10; 171,46; 171,39; 171,38 (CO); 100,00; 99,96 (C1); 73,20; 70,33; 69,68; 69,65 (C2, C3, C4, C5); 65,79; 65,67; 65,51; 65,47; 60,83 (C6, OCH₂, C_{Ad}); 53,65; 53,38; 49,82 (CH-α; izoGln, CH-α; Ala; CH-α; Lys); 38,72; 36,64; 33,46; 33,40; 33,34; 33,20; 32,14; 30,67; 28,06; 27,56 (CH₂; Ad, CH₂-γ; izoGln, CH₂-β; izoGln, CH₂; Lys); 32,38; 31,59; 26,21; 25,97 (CH; Ad); 16,48 (CH₃; Ala).

HRMS izračunato za C₄₁H₆₆N₆O₂₀ 962,43; dobiveno [M+H]⁺ 963,44

3.2. RAČUNALNI DIO

3.2.1. Konformacijska analiza peptida

Početne geometrije proučavanih peptida (Slika 17 u Rezultatima i raspravi) konstruirane su pomoću programa Maestro.¹⁰⁶ Molekule su vizualizirane pomoću programa Maestro, Chem3D (CambridgeSoft, Cambridge, MA)¹⁰⁷ i GausView 5¹⁰⁸. Konstruirane molekule su optimizirane i podvrgnute konformacijskoj analizi u vodi i DMSOu u programu MacroModel v10.3^{109,110}, pri čemu su korištena ugrađena polja sila OPLS_2005 i AMBER, najčešće OPLS_2005 i razni algoritmi konformacijskog pretraživanja.^{111,112} Početne strukture koje su dobivene pomoću programa Macromodel (približno između 200 i 400 za svaki spoj) su u sljedećem koraku korištene kao početne strukture za reoptimizaciju u programu Gaussian09¹¹³, računskim modelom B3LYP/6-31+G(d,p) u vodi i DMSOu.^{114–116} Utjecaj otapala je opisan pomoću programa IEFPCM^{117,118}. Frekvencijskom analizom na istoj razini teorije najstabilnije strukture su potvrđene kao minimumi na plohi potencijalne energije. Za topološku analizu elektronske gustoće QTAIM metodom korišten je program AIM2000¹¹⁹. Svi zahtjevniji računi napravljeni su na računalnom klasteru ISABELLA Sveučilišnog računalnog centra u Zagrebu.^b

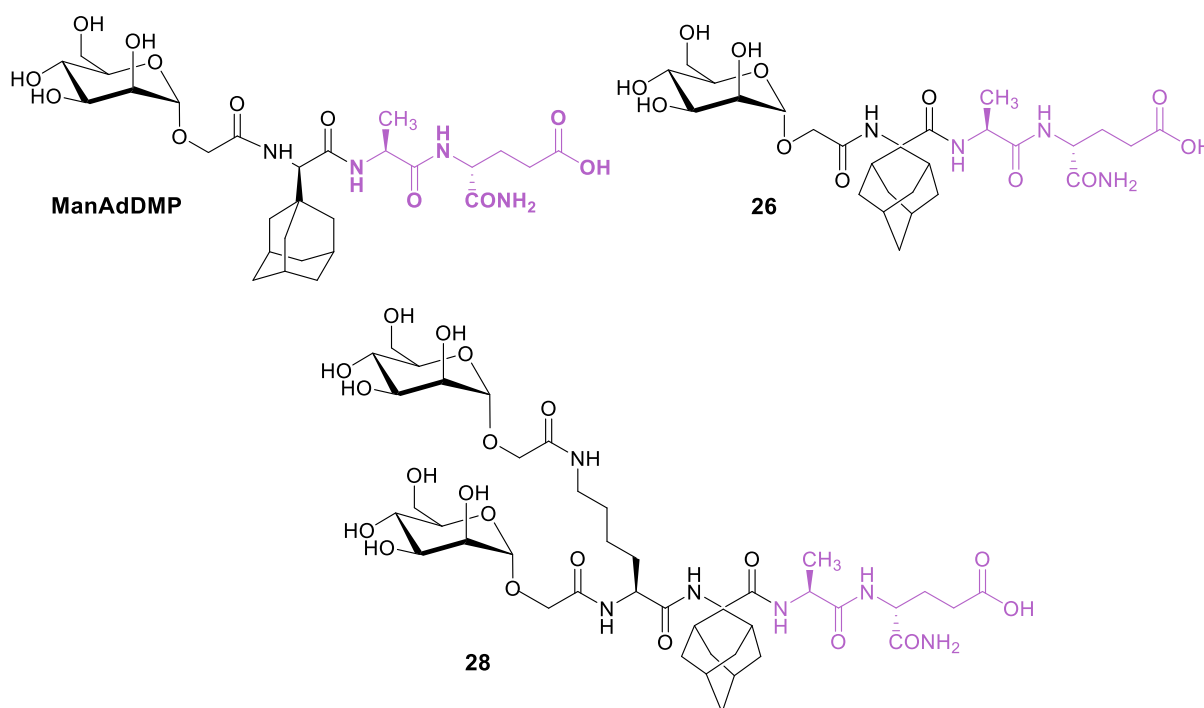
3.2.2. Priprema sustava za MD simulacije

Eksperimentalno riješenoj strukturi (rentgenskom difrakcijom) NOD2 proteina iz kunića u ADP-veznom stanju (PDB kod: 5IRN) nedostaje sedam petlji (S218-E224, E242-P253, P264-N269, S506-P517, A568-T576, R613-K635, P703-M713). Kako bi se pripremila adekvatna struktura proteina za MD simulacije s odabranim sintetiziranim spojevima kao ligandima (Slika 16), modelirali smo izvornu strukturu proteina I-TASSER¹²⁰ i SWISS-MODEL¹²¹ serverima.^c I-TASSER (engl. *Iterative Threading ASSEmbly Refinement*) izgrađuje proteinske strukture na temelju poravnanja s više navoja pomoću LOMETSa (engl. *Local MEta-Threading-Server*) i iterativnih simulacija rasklapanja strukturnih fragmenata na temelju Monte Carlo simulacija izmjene replika. U slučaju kada postoje neujednačene regije, proteinske petlje ili u slučaju kada

^b Optimizaciju spojeva i konformacijsku analizu peptida radio je doc. dr. sc. Ivan Kodrin na Zavodu za organsku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu

^c Pripremu sustava za MD simulacije, optimizaciju spojeva i MD simulacije radila je doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski na Zavodu za biokemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu

LOMETS ne može prepoznati odgovarajući predložak, strukture se grade *ab initio* modeliranjem. SwissModel pristup za izgradnju proteinske strukture uključuje nekoliko koraka. Za identifikaciju strukturnih predložaka, SWISS-MODEL koristi BLAST i HHblits za pretragu struktura pohranjenih u SWISS-MODEL knjižnici predložaka SMTL (engl. *SwissModel Template Library*), a koje su izvedene iz PDB. Kvaliteta odabranih predložaka zatim se procjenjuje pomoću GMQE modela (engl. *Global Model Quality Estimate*) i QSQE (engl. *Quaternary Structure Quality Estimate*). Nakon toga slijedi generiranje 3D modela proteina prijenosom očuvanih koordinata atoma koje su definirane poravnanjem ciljanog predloška. Koordinate aminokiselinskih ogranaka koje su umetnute (npr. aminokiseline u petlji) generiraju se modeliranjem petlje pomoću OpenStructure računalnog okvira i ProMod3 mehanizma za modeliranje. Kvaliteta dobivenog modela se procjenjuje pomoću QMEAN bodovne funkcije. U oba slučaja smo koristili trodimenzionalnu strukturu proteina NOD2 iz kunića kao ciljanu strukturu (UniProtKB kod: G1T469) dok je PDB kod: 5IRN naveden kao strukturni obrazac.



Slika 16. Strukturne formule modeliranih liganada NOD2 proteina.

3.2.3. Docking

Prvo je provedeno slijepo pristajanje (engl. *blind docking*) s odabranim spojevima (Slika 16). Korišten je SwissDock¹²² sa zadanim parametrima, bez navođenja ciljnih džepova te dobivena dva vezna džepa, od kojih se jedan sastoji od dva potencijalna vezna mjesta. Prvi džep se nalazi unutar šupljine koja je i mjesto vezanja ATP/ADP u NOD domeni proteina, dok su u LRR domeni pronađena dva podmjesta vezanja unutar veznog džepa (Slika 27). Dodatno je korišten GHECOM¹²³, program za pronalaženje džepova na površini proteina pomoću matematičke morfologije, koji je odredio dva glavna džepa (Slika 28) koja pozicijom odgovaraju džepovima dobivenim slijepim pristajanjem. Koordinate središta masa u dva glavna džepa su 50,341; 105,069; 118,231 i 53,180; 81,957; 112,266. Nadalje, korišten je program AutoDock Vina 1.1.2¹²⁴ za ponovni docking liganada na prethodno pripravljena dva modela NOD2 receptora. Korišteni su zadani parametri i postavljene dimenzije kutije na 20, 20, 20 Å. Koordinate središta kutije receptora izračunate su pomoću GHECOM 1.0 programa. Dobiveni rezultati su analizirani u programu Chimera¹²⁵ i uspoređeni s rezultatima dobivenim slijepim pristajanjem.

3.2.4. Simulacije molekulske dinamike

Za opis modela NOD2 proteina korišteno je AMBER ff14SB polje sila. Gaussian16 je korišten za dobivanje parametara liganada, optimizaciju njihovih struktura te za izračunavanje ESP-a. Program *antechamber* iz programskog paketa AmberTools¹⁸⁹⁶ je korišten za dobivanje prep i parmchk2 ulaznih datoteka kojima se provjeravaju parametri polja sila koji eventualno nedostaju u opisu pojedinih kompleksa (način provedbe parametrizacije). Dobiveni kompleksi su smješteni u kutiju oblika krnjeg oktaedra ispunjenu TIP3P⁹³ molekulama vode. Postavljen je puffer od najmanje 10 Å između proteina i periodične stijenke kutije. Sustavi su neutralizirani dodavanjem natrijevih iona (Na⁺), koji su smješteni u blizinu negativno nabijenih iona na površini proteina. Dobiveni sustavi su simulirani korištenjem periodičnih rubnih uvjeta (PBC).

Minimizacija, uravnoteženje i MD simulacije izvedene su pomoću modula PMEMD. Optimizacije geometrije proteina provedena je u četiri kruga s različitim ograničenjima. U prvom krugu minimizacije (5000 koraka), molekulama vode i ligandu je dozvoljeno pomicanje, dok je protein ograničen korištenjem harmonijskog potencijala s konstantom sile od 50 kcal (mol Å²)⁻¹. U drugom (5000 koraka) i trećem krugu (5000 koraka) primijenjena je konstanta sile od 50 kcal (mol Å²)⁻¹ i 25 kcal (mol Å²)⁻¹ da bi se ograničila samo proteinska okosnica, dok

je ostatku sustava bilo dozvoljeno pomicanje. U četvrtom ciklusu (10000 koraka) su optimizirati svi atomi sustava. Postupak minimizacije energije sastojao se od 2000 koraka algoritma metode najstrmijeg spusta (engl. *steepest descent*), nakon kojeg je korišten algoritam metode konjugiranog gradijenta za preostale korake optimizacije u sva četiri ciklusa.

Nakon optimizacije geometrije kompleksa, sustav je uravnotežen zagrijavanjem od 0 do 300 K tijekom 5 ns, uz uvjete konstantnog tlaka i temperature (*NPT* ansambl), nakon čega su sustavi podvrgnuti produktivnim, neograničenim MD simulacijama pri konstantnoj temperaturi (300 K) i tlaku (1 atm). Temperatura je održavana konstantnom korištenjem Langevinove dinamike s frekvencijom sudara od 1 ps^{-1} . Vibracije veza u kojima sudjeluju atomi vodika su ograničeni primjenom SHAKE¹²⁶ algoritma te je korišten vremenski korak od 2 fs. Svakih 1000 koraka je uzorkovano u izlaznu datoteku (NTPR) i datoteku trajektorije (NTWX). *Particle-mesh* Ewaldova metoda je primijenjena za izračun elektrostatičkih interakcija velikog dometa. Nevezne interakcije su skraćene na 10,0 Å. Svaka simulacija je trajala 100 ns (Nstlim = 50 000 000 koraka, dt = 2 fs), a svaka putanja je sadržavala 50 000 okvira (NTWX = 1000).

Ukupno je pripremljeno 12 različitih polaznih kompleksa (Tablica 4). Odabrani ligandi su dockirani u džep 1 i u dva podmjesta vezanja unutar džepa 2 (2a i 2b) modela dobivenog SWISS-MODELom. Korištene su strukture dobivene SWISS-MODELom obzirom da je petlja 2 (Slika 29 u Rezultatima i raspravi) u zatvorenoj konformaciji u ovom modelu, te u džepu 2 tvori dva podmjesta. Također, petlje 1 i 5 (Slika 29 u Rezultatima i raspravi) se u strukturama dobivenim I-TASSERom nalaze u zatvorenoj konformaciji koja tvori džep 1 te su pripremljeni dodatni kompleksi s ligandima dockiranim u džep 1 modela dobivenog I-TASSER serverom (Tablica 4).

Tablica 4. Pripremljeni kompleksi između struktura odabranih liganada i NOD2 dobivenih SWISS-MODELom i I-TASSERom.

	Modeli of NOD2	Ligand	Vrijeme simulacije
1	SWISS-MODEL struktura džep 1	ManAdDMP	100 ns
2	SWISS-MODEL struktura džep 2a	ManAdDMP	100 ns
3	SWISS-MODEL struktura džep 2b	ManAdDMP	100 ns
4	I-TASSER struktura džep 1	ManAdDMP	100 ns
5	SWISS-MODEL struktura džep 1	26	100 ns
6	SWISS-MODEL struktura džep 2a	26	100 ns
7	SWISS-MODEL struktura džep 2b	26	100 ns
8	I-TASSER struktura džep 1	26	100 ns
9	SWISS-MODEL struktura džep 1	28	100 ns
10	SWISS-MODEL struktura džep 2a	28	100 ns
11	SWISS-MODEL struktura džep 2b	28	100 ns
12	I-TASSER struktura džep 1	28	100 ns

Vizualizacija kompleksa u radu napravljena je pomoću programa PyMOL.¹²⁷

3.2.5. MM/GBSA pristup računanju relativnih slobodnih energija s obzirom na pojedine aminokiseline

Korišten je MM/GBSA (engl. *Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area*) pristup za računanje entalpijskih doprinosa (ΔH) slobodnoj Gibbsovoj energiji vezanja liganada u pojedinim džepovima NOD2, na temelju slijedeće jednadžbe:

$$\Delta G_{\text{vezanja}} = \langle G_{\text{kompleks}} \rangle - \langle G_{\text{BEN1}} \rangle - \langle G_{\text{kofaktor}} \rangle. \quad (3.1)$$

Simbol $\langle \rangle$ označava prosječnu vrijednost od preko 5000 struktura prikupljenih u posljednjih 100 ns svake putanje. Slobodna energija sustava, $G_{\text{complex/BEN1/cofactor}}$, aproksimirana je s tri člana:

$$G_{\text{kompleks/BEN1/kofaktor}} = E_{\text{MM}} + G_{\text{solv}} - T\Delta S, \quad (3.2)$$

energijom sustava u plinskoj fazi, slobodnom energijom otapanja (solvatacije) i entropijskim doprinosom. E_{MM} , molekulska-mehanička energija u plinskoj fazi, računa se kao suma doprinosa E_{internal} , E_{VDW} i E_{elec} doprinosa (tj. kao suma svih vezanih i nevezanih interakcija). G_{solv} ,

slobodna energija solvatacije, je suma polarnog (G_{polar}) i nepolarnog (G_{nonpolar}) doprinosa. Polarni (elektrostatski) doprinos energije solvatacije se računa rješavanjem poopćene Bornove jednadžbe, dok se nepolarni doprinos određuje računanjem površine dostupne otapalu (engl. *Solvent Accessible Surface Area*, SASA) kao:

$$G_{\text{nonpolar}} = g\text{SASA} + b, \quad (3.3)$$

Korištenjem zadanih empirijskih parametara, MM/GBSA izračuni su izvedeni na ukupno četiri simulacije (u kompleksima s ManAdDMP kao ligandom).

3.3. ISPITIVANJE IMUNOMODULACIJSKE AKTIVNOSTI

3.3.1. *Eksperimenti in vivo*

Testiranja na životinjama obavljena su u skladu s Hrvatskim zakonom o dobrobiti životinja (NN 19/1999). Korištene su zdrave ženke CBA soja miševa (Institut „Ruđer Bošković“), stare 8-12 tjedana, koje nisu bile trudne za vrijeme eksperimenta, a u kavezima je bila skupina od pet miševa. Dno kaveza bilo je prekriveno piljevinom (Scobis Uno[®], Muchedola srl, Italija) te je korištena standardna hrana za laboratorijske miševe (4RF 21 GLP[®], Muchedola srl, Italija), a pristup hrani i vodio bio je proizvoljan. Uvjeti u kavezu bili su normalni: izmjene svijetlog i mračnog ritma su 12/12 h, temperatura i vlaga održavane su na 22 °C i 55 %. Svi eksperimenti na životinjama izvedeni su prema ILAR Vodiču za njegu i korištenje laboratorijskih životinja, EU Direktive 2010/63/EU i Hrvatskog zakona o zaštiti životinja (NN 102/17).^d

Imunizacijski protokol sastojao se od primo imunizacije i dva docjepljivanja u razmaku od 21 dan, s ovalbuminom (OVA) kao testnim antigenom, a vađenje krvi obavljalo se sedam dana nakon pojedinog docjepljivanja. Pokusne životinje (skupine od pet životinja) imunizirale su se OVA uz dodatak spojeva čiju aktivnost smo željeli testirati. Prikupljeni serumi dekomplementirani su na 56 °C tijekom 30 min i pohranjeni na -20 °C do ispitivanja. Eksperimentalne skupine od pet miševa cijepljene su subkutano (s.c.) u bazu repa sa 100 µL testne otopine po mišu. U 100 µL fiziološke otopine aplicirano je ukupno 10 µg OVA i 200 µg testiranog spoja.

^d Imunizaciju miševa radio je dr.sc. Ranko Stojković, a mjerenje antitijela dr. sc. Lidija Milković i prof.dr.sc. Mariastefania Antica.

3.3.2. Enzimski imunotest

Enzimskim imunotestom (ELISA, engl. *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) određena je količina antitijela i to ukupnih anti-OVA antitijela (kao pokazatelja intenziteta ukupne imunoreakcije) te antitijela podklase IgG1 i IgG2a (kao pokazatelja smjera imunoreakcije).

3.3.2.1. ENZIMSKI IMUNOTEST ZA KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE UKUPNIH IMUNOGLOBULINA G SPECIFIČNIH ZA OVA (ANTI-OVA IgGa, ANTI-OVA IgG1 I ANTI-OVA IgG2a) U MIŠJEM SERUMU

ELISA je provedena na mikrotitarskim pločicama ravnog dna (Costar, SAD) koje se sastoje od 96 bazenčića, pomoću mišjih anti-OVA IgG, IgG1 i IgG2a setova za ispitivanje antitijela (Chondrex, SAD), prema uputama proizvođača.

Nakon svakog pojedinog koraka, pločica je isprana tri puta s razrijeđenim puferom za ispiranje na peraču mikrotitracijskih pločica. Prvo se pločica obložila sa 100 μL otopine OVA po bazenčiću i ostavila inkubirati na 4 °C preko noći. Zatim je slijedilo blokiranje inkubacijskim puferom (100 μL pufera za blokiranje po bazenčiću) jedan sat na sobnoj temperaturi. Nakon toga su nanešeni standardi i mišji serumi u kojima se određivala količina anti-OVA IgG antitijela te je uslijedila inkubacija dva sata na sobnoj temperaturi. Pločica se isprala te se potom dodalo 100 μL priređene otopine sekundarnog antitijela (antitijelo konjugirano s peroksidazama) za detekciju. Tako pripremljena pločica potom se inkubirala jedan sat na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, dodana je otopina TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) i pločica je inkubirana 25 minuta na sobnoj temperaturi. Enzimska reakcija zaustavljena je dodatkom 50 μL H_2SO_4 ($c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$) u svaki bazenčić. Apsorbancija je mjerena spektrofotometrom Thermo Scientific Multiscan spectrum na 490 nm .

Relativne količine anti-OVA IgGa i podtipova anti-ova IgG1 i anti-OVA IgG2a antitijela određene su regresijskom analizom, na temelju standardnih krivulja za anti-OVA IgGa, anti-ova IgG1 i anti-OVA IgG2a antitijela.

3.3.2.2. STATISTIČKA ANALIZA

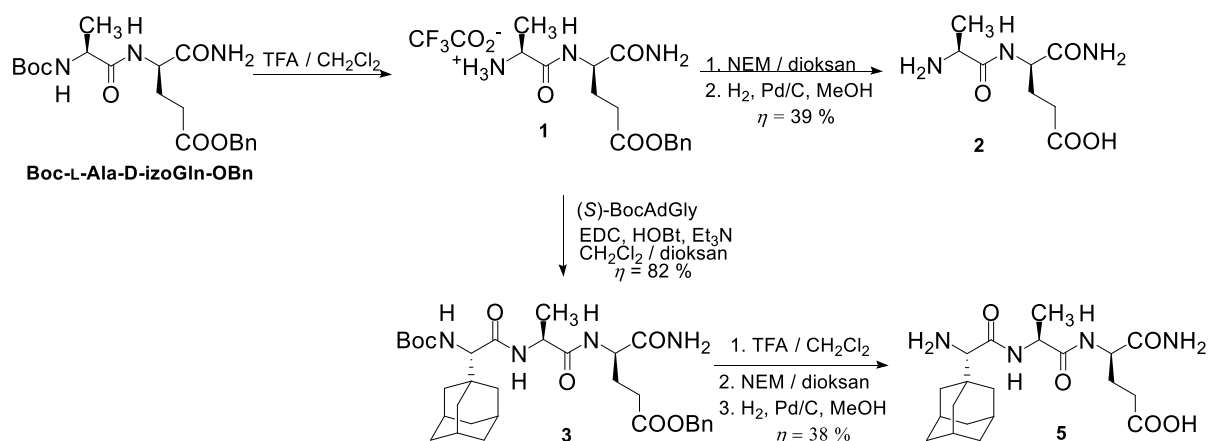
Statističke analize provedene su pomoću softvera GraphPad Prism. Značajne razlike između eksperimentalnih skupina određene su Kruskal-Wallis ANOVA testom, nakon čega je uslijedio Dunnov test. Vrijednosti manje od 0,05 ($p < 0,05$) smatrane su značajnima.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. SINTEZA I KONFORMACIJSKA ANALIZA ADAMANTILGLICIL-DESMURAMILPEPTIDA

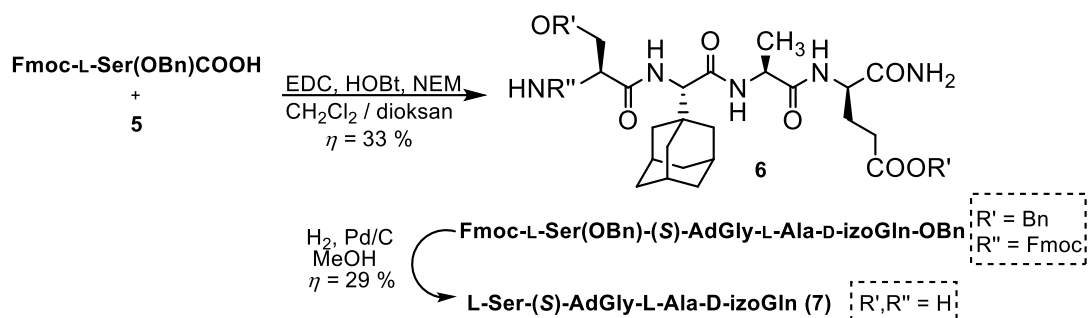
4.1.1. Priprava desmuramil-dipeptida s ugrađenim (S)-adamantil-glicinom

Odabrani derivati desmuramil-dipeptida, spojevi **2**, **5** i **7**, pripremljeni su kako bi se provela NMR konformacijska analiza u otopini, a kao polazni spoj u sintezi korišten je benzilni ester Boc-L-alanil-D-izoglutamina. Najjednostavniji modelni spoj, dipeptid L-Ala-D-izoGln **2** prirodni spoj koji nam je poslužio za usporedbu strukturnih motiva nakon ugradnje neprirodne aminokiseline AdGly, dobiven je uklanjanjem N- i C- zaštitnih skupina s polaznog zaštićenog desmuramil-peptida (Shema 8). Sinteza i imunomodulacijska aktivnost tripeptida literaturno je već opisana,⁷ međutim, ovdje je opisana učinkovitija metoda njegove pripreve.¹²⁸ Zaštićeni tripeptid sintetiziran je kondenzacijom Boc-(S)-(adamant-1-il)glicina i L-Ala-D-izoGln-OBn, korištenjem optimizirane metode sinteze amidne veze (EDC·HCl/HOBt karbodiimidni reagensi u smjesi otapala diklormetan/1,4-dioksan 1:1). Uklanjanjem N-Boc zaštitne skupine uz TFA/NEM kao reagense i benzilne zaštite s karboksilne skupine hidrogenolizom uz paladij (10 %) na ugljenu, pripremljen je tripeptid (S)-AdGly-L-Ala-D-izoGln **5** (Shema 8). Tripeptid **5** pripremljen je u ukupnom prinosu od 34 %, dok je prethodno opisan postupak sinteze rezultirao ukupnim prinosom od 17 %⁷.



Shema 8. Priprava di- i tridesmuramil-peptida s ugrađenim (S)-(adamant-1-il)glicinom.

Prilikom pripreve tetrapeptida **6**, također je korištena EDC·HCl/HOBt metoda kondenzacije. *N*-Fmoc-L-serin s benzilnom zaštitnom skupinom na bočnom lancu (Fmoc-L-Ser(OBn)-COOH) kondenziran je s prethodno pripremljenim (*S*)-AdGly-L-Ala-D-izoGln-OBn **5** (Shema 9). Preostale zaštitne skupine (*N*-Fmoc i *O*-benzilna zaštitna skupina na serinu te benzilna na C-kraju) tetrapeptida su katalitičkom hidrogenolizom uklonjene u jednom koraku, te je kao produkt dobiven L-Ser-(*S*)-AdGly-L-Ala-D-izoGln **7**.



Shema 9. Priprava tetrapeptida **7** s ugrađenim (*S*)-(adamant-1-il)glicinom i L-serinom.

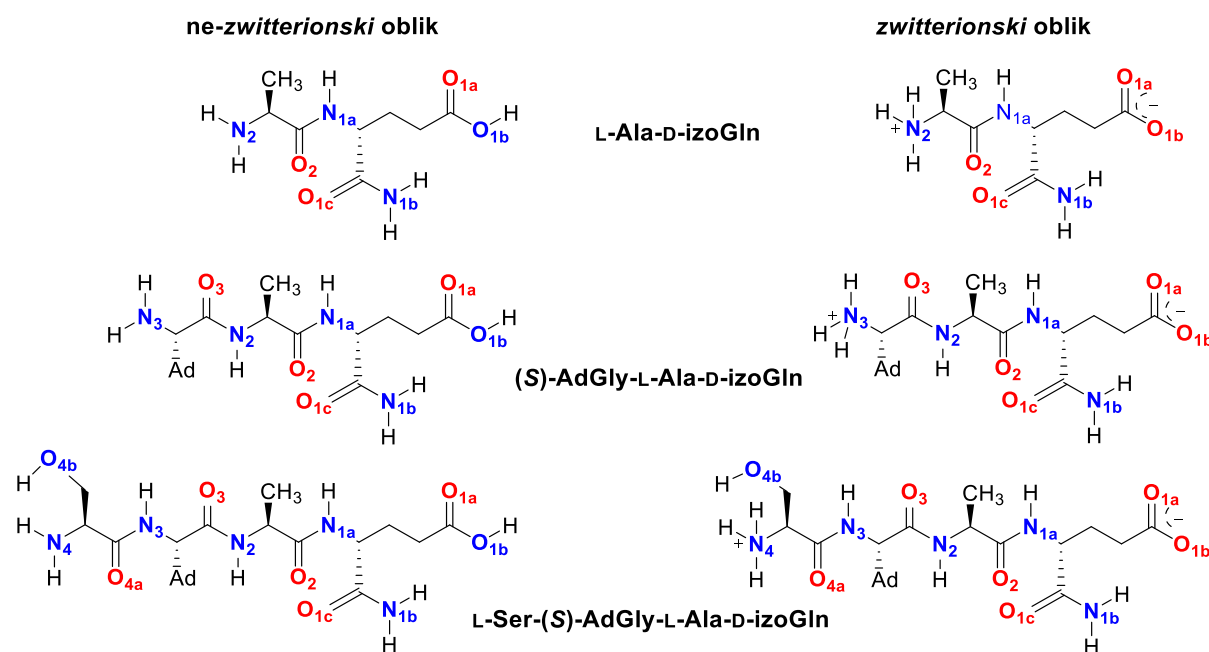
4.1.2. Konformacijska analiza računalnim modeliranjem

4.1.2.1. CILJ ISTRAŽIVANJA I MODELNI SPOJEVI

Detaljna konformacijska analiza prethodno pripremljenih peptida **2**, **5** i **7** u *zwitterionskom* i *nezwitterionskom* obliku, provedena je kako bi se detaljnije opisao utjecaj dodavanja aminokiselina na aktivnu dipeptidnu jedinicu. Serin je uveden kako bi se povećala složenost strukture (hidroksilna skupina na bočnom ogranku kao dodatni donor/akceptor vodika u vodikovoj vezi). Također, serin se često primjenjuje i za povezivanje peptidnog i šećernog dijela u biološki aktivnim glikokonjugatima, kao što su sintetski adjuvanti i imunološki aktivni spojevi.^{129,130} Općenito, cilj konformacijske analize računalnim modeliranjem je provesti preliminarna ispitivanja na temelju kojih bi se dobio detaljniji uvid kako dodavanje jedne aminokiseline utječe na obrasce vodikovih veza, odnosno na strukturiranje desmuramilpeptida te usporediti i opisati uočene razlike u strukturiranju koje su potencijalno od biološkog značenja. Spojevi su modelirani u vodi kao prirodnom otapalu i u DMSOu, otapalu koje se učestalo primjenjuje u NMR analizi spojeva.

Najjednostavnija jedinica odgovorna za aktivnost ovih peptida je sam dipeptid, L-Ala-D-izoGln, na kojeg su konsektivno vezane dvije aminokiseline, najprije (*S*)-AdGly kao aminokiselina s hidrofobnim bočnim ogrankom, a zatim već spomenuti L-Ser (Slika 17).

Karbonilne skupine mogu biti potencijalni akceptori vodika, dok amino i hidroksilne skupine mogu istovremeno biti donori i akceptori vodika. Dodavanjem aminokiselina povećava se ukupan broj potencijalnih akceptora i donora vodika te se mreža vodikovih veza u tetrapeptidu može značajno razlikovati od onih koje su prisutne u nižim homolozima. Isto tako, neke vodikove veze mogu biti dovoljno čvrste pa time i očuvane uvođenjem dodatnih aminokiselina.



Slika 17. Strukture *zwitterionskog* (desno) i *ne-zwitterionskog* (lijevo) oblika modelnih spojeva desmuramil-dipeptida **2**, tripeptida **5** i tetrapeptida **7**. Plavo su označeni potencijalni donori vodika, a crveno potencijalni akceptori vodika. Neki od obojenih atoma mogu istovremeno biti donori i akceptori H-veza te su označeni dodatnim slovom (primjerice N1a i N1b za svaku donorsku skupinu NH u isoGln). Atomi su numerirani od C-kraju prema N-kraju.

Nakon što su odabrani modelni spojevi, bilo je potrebno ispitati postojeće metode molekulske mehanike, te odabrati onaj računski model koji će u optimalnom vremenu generirati najprikladniji skup konformera za daljnju optimizaciju. Konformacijska analiza uključivala je generiranje početnih struktura koje su dalje proučavane isključivo DFT metodama. Na taj je način dobiven bolji uvid u intermolekularne interakcije modelnih peptida, nego što bi bio samo na temelju molekulske mehanike. QTAIM metodom proučena je elektronska gustoća najstabilnijih konformera i na temelju topološke analize okarakterizirane su intramolekulske vodikove veze u vodi i DMSOu.

4.1.2.2. KARAKTERIZACIJA NAJSTABILNIJIH KONFORMERA I OBRAZACA VODIKOVIH VEZA

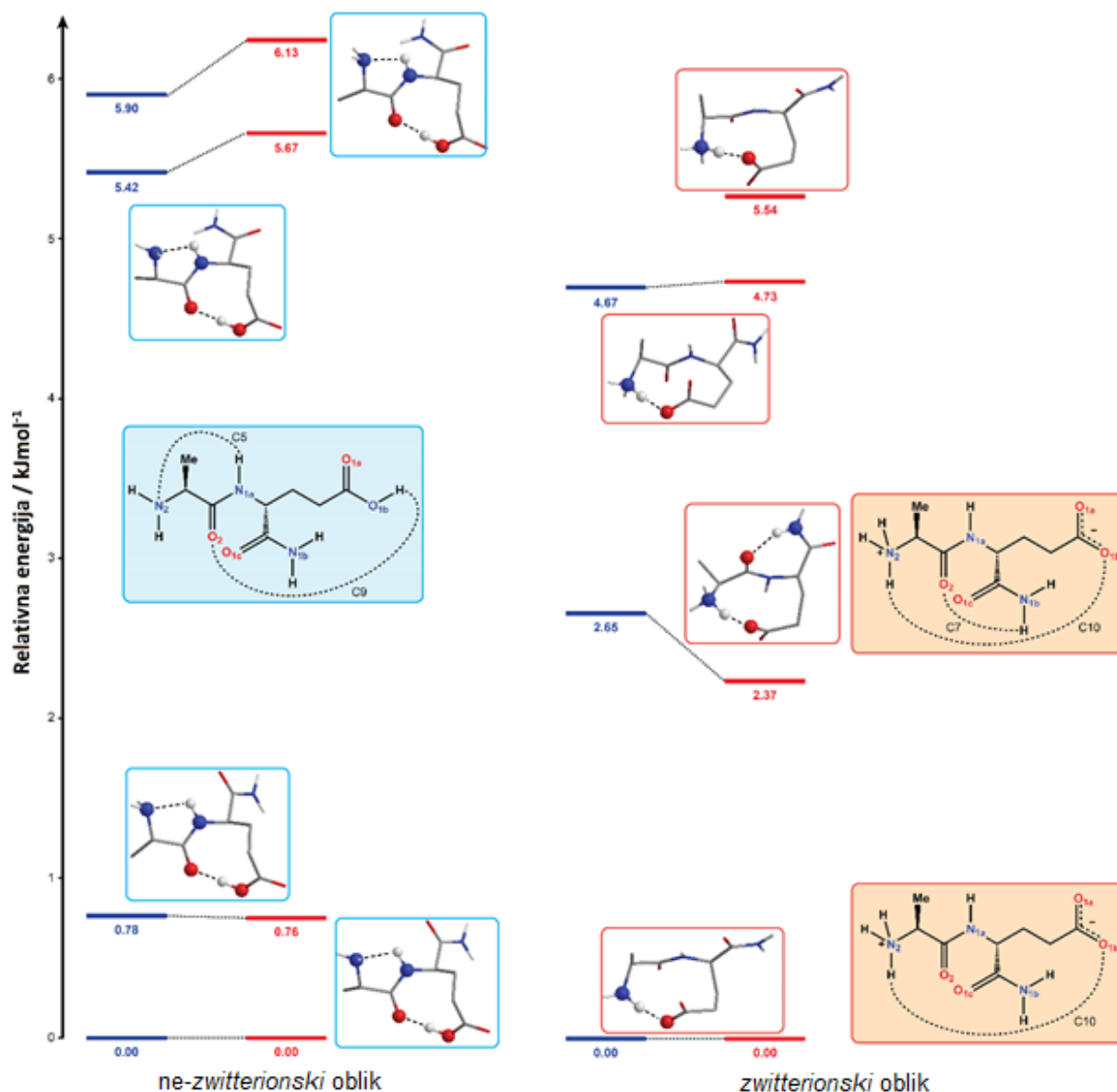
Slike 3-5 prikazuju reprezentativne geometrije najstabilnijih konformera dipeptida **2**, tripeptida **5** i tetrapeptida **7** u *zwitterionskom* i *ne-zwitterionskom* obliku. Na temelju uočenih obrazaca vodikovih veza, različiti konformacijski minimumi mogu se grupirati u osnovne skupine, tzv. *conformational families*. Obrasci vodikovih veza prikazani su za svaki konformer zasebno, osim u slučaju kada su dobivene geometrije s istim brojem i vrstom vodikovih veza. Primjerice, svi *ne-zwitterionski* konformeri dipeptida L-Ala-D-izoGln **2** pripadaju istoj osnovnoj skupini koja se sastoji od jednog 5-članog (C5) i jednog 9-članog (C9) prstena. Sve vodikove veze, prikazane točkastim krivuljama na Slikama 3-5, potvrđene su QTAIM analizom i vrijednosti topoloških parametara odgovaraju rasponu vrijednosti predloženom od Kocha i Popeliera. Konkretnije, izračunate vrijednosti uspoređene su s vrijednostima topoloških parametara u kritičnim točkama veze između akceptora vodika i donora vodika, kao što su elektronska gustoća $\rho(r)$, laplasijan elektronske gustoće $\nabla^2\rho(r)$ i energijska gustoća $H(r)$, koji su u skladu s Kochovim i Popelierovim kriterijima za karakterizaciju H-veza (Tablica 5). Prva tri kriterija najčešće se koriste za opis vodikovih veza.^{131,132} Pojednosti o geometrijskim parametrima za svaku vodikovu vezu i odgovarajuće vrijednosti topoloških parametara prikazane su u Tablicama D1-D6 u Dodatku.

Tablica 5. Kriteriji za određivanje i karakterizaciju vodikove veze.¹³¹

KRITERIJI
1. Dosljedna topologija za svaku vodikovu vezu (kritična točka veze, staza veze, međuatomska ploha).
2. Vrijednost ρ u kritičnoj točki veze u rasponu od 0,002 do 0,04 a.u.
3. Vrijednost $\nabla^2\rho$ u kritičnoj točki veze u rasponu od -0,15 do -0,02 a.u.
4. Preklapanje atoma vodika s akceptorom vodika.
5. Gubitak naboja na atomu vodika.
6. Energijsko destabiliziranje atoma vodika.
7. Smanjenje dipolarne polarizacije atoma vodika.
8. Smanjenje volumena atoma vodika.

4.1.2.2.1. Dipeptid L-Ala-D-izoGln 2

Obrasci vodikovih veza koji su uočeni u dipeptidu **2** jedinstveni su i razlikuju se u usporedbi s tripeptidom **5** i tetrapeptidom **7**. Osnovne skupine konformera dipeptida sastoje se samo od jedne ili najviše dvije vodikove veze. Ne-zwitterionski konformeri se uglavnom razlikuju po torzijskom kutu koji opisuje rotaciju oko N-terminalne amino i amidne skupine izoGln. U svim najstabilnijim konformerima prisutna su dva tipa vodikovih veza (C5 i C9 prsten). Najstabilniji konformeri tripeptida **5** prikazani su na Slici 19, a odgovarajući topološki parametri u Tablicama D1 i D2 u Dodatku. U *zwitterionskim* oblicima dipeptida opažen je novi strukturni obrazac, 10-člani prsten (C10) koji vodikovom vezom povezuje N- i C- terminalni kraj peptida (Slika 18). Isto strukturno obilježje je prisutno i kod viših analoga, što potvrđuje povoljnu interakciju između dva kraja proučavanih peptida. Treba naglasiti da su svi izračuni provedeni na način da je otapalo zadano implicitno, te se takav PCM pristup odnosi samo na elektrostatske interakcije s otapalom. Eksplicitni model bi bio bolji izbor prilikom opisa interakcija otopljene tvari i otapala, ali i računalno zahtjevniji. Međutim, i ovaj pristup može pokazati određene trendove vezane uz obrasce vodikovih veza, posebno kada su vodikove veze dovoljno jake da se očuvaju u sustavu, neovisno o povećanju broja potencijalnih donora, odnosno akceptora vodikovih veza.



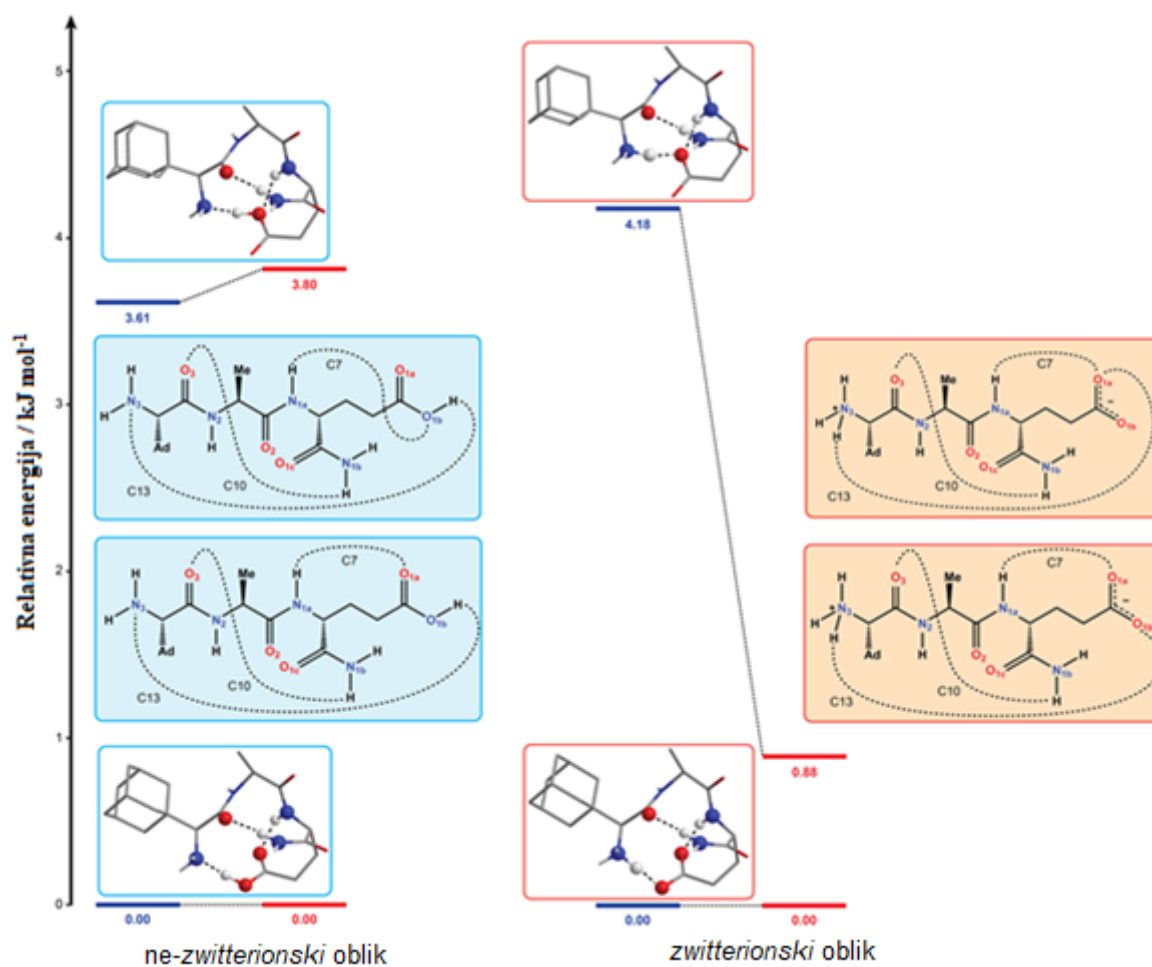
Slika 18. Dijagram relativnih energija najstabilnijih konformera dipeptida L-Ala-D-izoGln **2** u ne-zwitterionskom (lijevo) i zwitterionskom obliku (desno). Plave linije odgovaraju relativnim energijama najstabilnijih konformera optimiziranih u vodi, a crvene u DMSOu kao otapalu. Isprekidane linije predstavljaju H-veze potvrđene QTAIM analizom. Sažetak obrazaca vodikovih veza (n-člani prstenovi označeni kao Cn) za dipeptid **2** modeliran u vodi i DMSOu, prikazan je plavo obojenim (za ne-zwitterionski oblik), i crveno obojenim pravokutnicima (zwitterionski oblik). Napolarni atomi vodika izostavljeni su zbog jasnoće prikaza.

4.1.2.2.2. Tripeptid (S)-AdGly-L-Ala-D-izoGln **5**

Najstabilniji konformeri tripeptida **5** prikazani su na Slici 19, a odgovarajući topološki parametri u Tablicama D3 i D4 u Dodatku. Za razliku od dipeptida **2**, u tripeptidu je uvedena dodatna aminokiselina s jednim potencijalnim donatorom, odnosno akceptorom vodika više. Prostorno velika adamantilna skupina mogla bi utjecati na strukturiranje peptida i obrasce

vodikovih veza, a uvedena je kako bi se proučio utjecaj na lipofilnost i imunomodulacijsku aktivnost sintetiziranog spoja.

U pravilu, mreža vodikovih veza između susjednih skupina u tripeptidu **5** i tetrapeptidu **7** očekivano je složenija u usporedbi s dipeptidom. Osnovne skupine konformera tripeptida uglavnom sadrže tri vodikove veze. U tripeptidu nastaje specifična interakcija između amidne skupine izoGln i karbonilne skupine AdGly ($N_{1b}H \cdots O_3$) u obliku 10-članog prstena (C10). Ista vrsta vodikove veze postoji i u najstabilnijim konformerima tetrapeptida **7**. Prema rezultatima konformacijske analize, može se zaključiti da je ova vodikova veza ključna interakcija prisutna kod viših analoga dipeptida i da je dovoljno jaka jer ostaje očuvana prilikom uvođenja dodatnih akceptora/donora vodika u obliku novih aminokiselina. Osim C10 prstena, nastaje i jedan 13-člani prsten ($C_{13}, O_{1b}H \cdots N_3$ ili $N_3H \cdots O_{1b}$) između terminalnih skupina peptidnog lanca i jedan sedmeročlani prsten (C7, $N_{1a}H \cdots O_1$) između NH amida i karboksilne skupine izoGln. Ovaj 13-člani prsten djelomično je očuvan i u tetrapeptidu **7**.



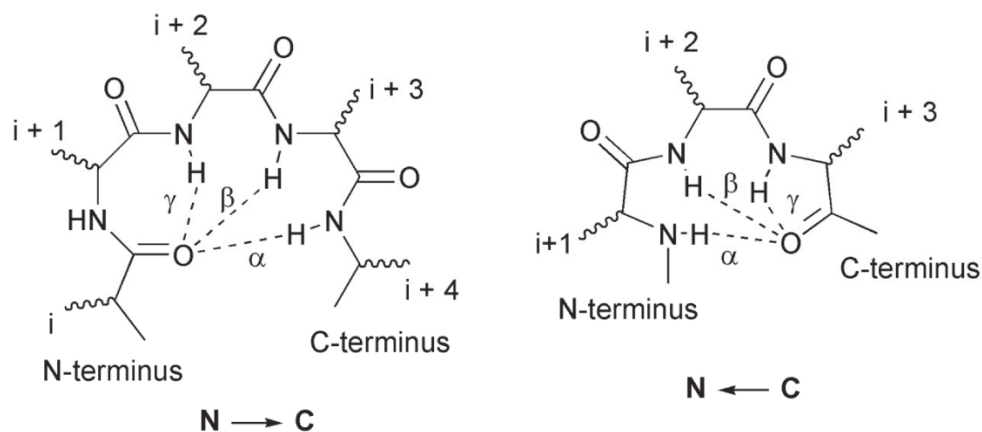
Slika 19. Dijagram relativnih energija najstabilnijih konformera tripeptida (S)-AdGly-L-Ala-D-izoGln **5** u ne-*zwitterionskom* (lijevo) i *zwitterionskom* obliku (desno). Plave linije odgovaraju relativnim energijama najstabilnijih konformera optimiziranih u vodi, a crvene u DMSOu kao otapalu. Isprekidane linije predstavljaju H-veze potvrđene QTAIM analizom. Sažetak obrazaca vodikovih veza (n-člani prstenovi označeni kao C_n) za tripeptid **5** modeliran u vodi i DMSOu, prikazan je plavo obojenim (za ne-*zwitterionski* oblik), i crveno obojenim pravokutnicima (*zwitterionski* oblik). Napolarni atomi vodika izostavljeni su zbog jasnoće prikaza.

4.1.2.2.3. Tetrapeptid L-Ser-(S)-AdGly-L-Ala-D-izoGln **7**

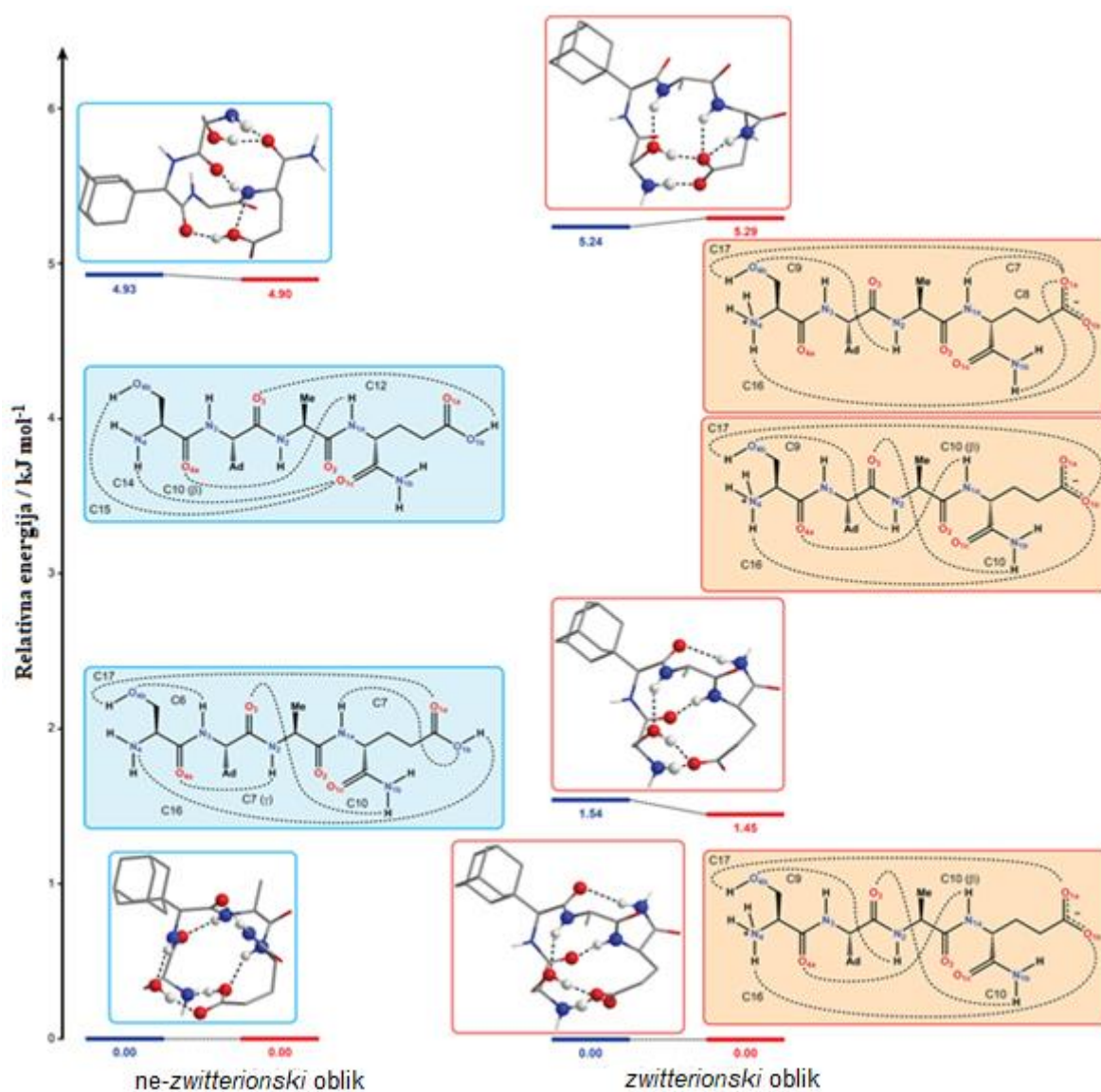
Sljedeći proučavani modelni spoj je tetrapeptid **7**, koji se strukturno od tripeptida **5** razlikuje u dodanoj aminokiselini, L-Ser, na N-kraju. Na ovaj način su u strukturu uvedeni dodatni akseptori vodika, te dva potencijalna donora, amino i hidroksilna skupina. Slika 21 prikazuje najstabilnije konformere u *zwitterionskom* i ne-*zwitterionskom* obliku, dok su rezultati QTAIM analize s geometrijskim parametrima prikazani u Tablicama D5 i D6 u Dodatku.

Produljenje peptidnog lanca s četvrtom aminokiselinom, L-Ser, uzrokuje nastanak dodatnih vodikovih veza. U *zwitterionskim* konformerima oba su peptidna kraja povezana 16-članim (C16) prstenom. Istodobno, bočni ogranak Ser tvori vodikovu vezu s tetrapeptidnim krajem u obliku 17-članog prstena.

Osnovne skupine konformera tetrapeptida **7** sadrže i neke vrste strukturnih okreta koji se opažaju i u prirodnim peptidima. Načelno, postoje dvije vrste okreta. Ukoliko je karbonilna skupina (akceptor vodika) bliža N-kraju peptida, tada se smjer definira kao N→C. Prema veličini prstena koji uključuje vodikovu vezu, razlikuju se γ -okret (7-člani prsten) i β -okret (10-člani prsten), dok je α -okret (13-člani prsten) prisutan u α -zavojnica. Ukoliko je karbonilna skupina bliža C-kraju peptida, definira se obrnuti smjer C→N, te sadrži reverzne prstenove koji uključuju vodikovu vezu. Prstenovi se klasificiraju također prema broju članova u prstenu koji uključuju vodikovu vezu pa tako postoji rvs- γ -okret (5-člani prsten), rvs- β -okret (8-člani prsten) i rvs- α -okret (11-člani prsten). Reverzni okreti su energijski manje povoljni i rjeđe se opažaju u proteinskim strukturama.¹³³ Slika 20 prikazuje tip strukturnih fragmenata u peptidima. U slučaju tetrapeptida **7**, između susjednih aminokiselina nastaje 7-člani (C7, N₂H⋯O_{4a}) i 10-člani (C10, N_{1a}H⋯O_{4a}) prsten, odnosno γ - i β -okret.



Slika 20. Shematski prikaz vrsta okreta u peptidima.⁹¹



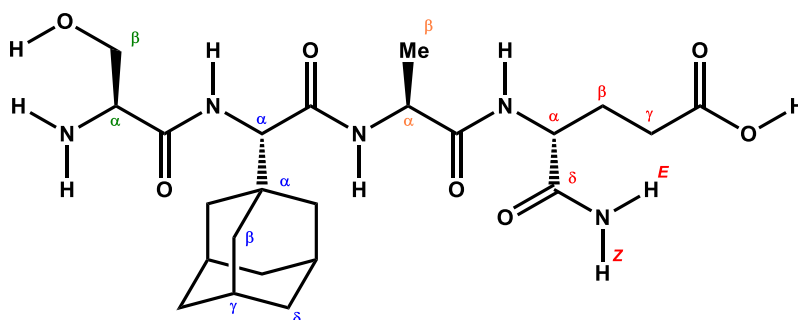
Slika 21. Dijagram relativnih energija najstabilnijih konformera tetrapeptida L-Ser-(S)-AdGly-L-Ala-D-izoGln **7** u ne-zwitterionskom (lijevo) i zwitterionskom obliku (desno). Plave linije

odgovaraju relativnim energijama najstabilnijih konformera optimiziranih u vodi, a crvene u DMSOu kao otapalu. Isprekidane linije predstavljaju H-veze potvrđene QTAIM analizom. Sažetak obrazaca vodikovih veza (n-člani prstenovi označeni kao C_n) za tetrapeptid **7** modeliran u vodi i DMSOu, prikazan je plavo obojenim (za ne-*zwitterionski* oblik), i crveno obojenim pravokutnicima (*zwitterionski* oblik). Nepolarni atomi vodika izostavljeni su zbog jasnoće prikaza.

Varijacije u energijskoj distribuciji konformera uzrokovane različitim otapalima (voda i DMSO koji su modelirani kao polarizabilni kontinuum), uglavnom se uočavaju u ansamblima najstabilnijih konformera najjednostavnijeg spoja, dipeptida **2**. U tripeptidu **5** i tetrapeptidu **7** različita otapala uzrokuju tek neznatne promjene u energijama proučavanih konformera.

4.1.3. NMR konformacijska analiza u otopini

¹H i ¹³C rezonancije proučavanih desmuramildi-, tri- i tetrapeptida **2**, **5** i **7** asignirane su na temelju analize ¹H, COSY, ¹H-¹³C HSQC i ¹H-¹³C HMBC spektara. Svi ¹H i ¹³C kemijski pomaci u D₂O i DMSO-*d*₆ prikazani su u Tablici 6, dok je shematski prikaz načina obilježavanja prikazan na Slici 22.



Slika 22. Shematski prikaz načina obilježavanja pojedinih atoma koji su relevantni u asignaciji NMR spektara.

Tablica 6. ^1H i ^{13}C kemijski pomaci izraženi u ppm.

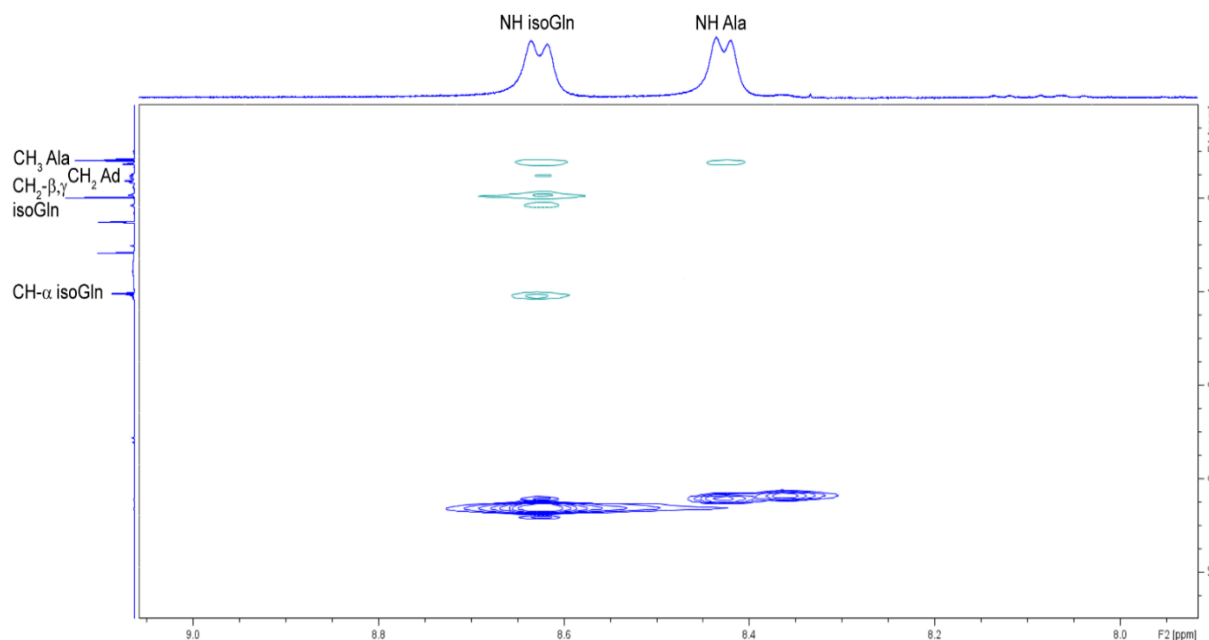
	DIPEPTID				TRIPEPTID				TETRAPEPTID			
	D ₂ O		DMSO		D ₂ O		DMSO		D ₂ O		DMSO	
	δ_{1H}	δ_{13C}	δ_{1H}	δ_{13C}	δ_{1H}	δ_{13C}	δ_{1H}	δ_{13C}	δ_{1H}	δ_{13C}	δ_{1H}	δ_{13C}
D-izoGln												
NH			8.47				8.63				9.09	
CH- α	4.20	53.5	4.09	52.8	4.19	53.5	4.09	52.9	4.19	53.4	3.96	53.9
CH ₂ - β	2.00	27.7	1.80	29.1	2.05	27.6	1.92	27.2	2.05	27.6	1.81	28.6
	1.88		1.74		1.86		1.75		1.86		1.75	
CH ₂ - γ	2.21	33.5	2.04	33.5	2.18	33.5	2.15	31.9	2.19	33.6	1.98	34.9
COOH		181.4		176.1		181.2		175.8		181.2		177.0
C- δ		176.6		174.0		175.9		173.7		176.7		174.5
NH ₂ -E			7.53		7.56		7.21		7.93		7.35	
NH ₂ -Z			6.98		7.06		7.12		6.47		7.00	
L-Ala												
NH							8.43				8.35	
CH- α	3.78	49.4	3.08	57.7	4.32	50.0	4.12	49.3	4.26	49.9	4.09	49.5
CH ₃ - β	1.35	18.1	1.11	19.7	1.35	16.1	1.26	17.7	1.32	16.3	1.20	17.7
CO		176.5		174.7		174.4		171.9		174.9		172.1
(S)-AdGly												
NH											8.19	
CH- α					3.46	62.0	3.01	63.1	3.97	62.2	4.08	59.9
CO						167.8		171.2		171.2		170.0
(Ad)C- α												
(Ad)CH ₂ - β					1.66	35.7	1.62	36.9	1.63	35.9	1.60	36.9
					1.55		1.55		1.53		1.55	
(Ad)CH- γ					1.96	27.6	1.93	28.1	1.91	27.9	1.89	28.2
(Ad)CH ₂ - δ					1.56	37.5	1.63	38.5	1.54	38.2	1.55	38.5
							1.50					
L-Ser												
CH- α									3.57	55.7	3.27	57.2
CH ₂ - β									3.66	63.4	3.51	64.5
OH												
CO										174.6		173.2

2D NOSEY spektri desmuramildi-, tri- i tetrapeptida također su snimljeni, kako bi se dodatno potvrdila asignacija i dobio bolji uvid u prostorni odnos između pojedinih protona. U 1D i 2D ^1H spektrima tripeptida i tetrapeptida u D₂O, vide se samo amidni protoni bočnog ogranka izoGln. Odsutnost signala drugih amidnih protona može se pripisati brzom izmjeni s atomima deuterija iz D₂O, koji su „nevidljivi“ u protonskom frekvencijskom području. S druge strane, svi su amidni protoni dobro vidljivi u spektrima snimljenim u DMSOu. Dipeptid **2**, tripeptid **5**

i tetrapeptid **7** su pokazali jedan skup amidnih protona što sugerira da je na NMR vremenskoj skali prisutan isključivo jedan konformer.

U 2D NOESY spektru dipeptida **2** snimljenom u D₂O, uz nekoliko intrarezidualnih NOE kontakata, opaženi su i križni signali između CH- α , CH₂- β i CH₂- γ izoGln i prostorno bliskih CH₃- β protona Ala. U DMSO su opažene samo intrarezidualne NOE korelacije.

U NOESY spektru tripeptida u D₂O opaženi su NOE kontakti između CH₂- γ protona izoGln i CH₂ protona adamantanske skupine. U spektru su također prisutne sekvencijalne NOE korelacije kroz više veza, točnije između CH- α protona iz AdGly i CH₂- γ protona iz izoGln s CH₃- β protonima Ala. U DMSO se mogu uočiti i NOE kontakti NH protona izoGln s CH₂ protonima adamantana, te sekvencijalni NOE signali s CH₃- β protonima Ala (Slika 23). Također, u spektru se opažaju i križni NOE signali između NH₂-*E* i NH₂-*Z* protona izoGln i CH₃- β protona Ala.



Slika 23. Dio 2D NOESY spektra tripeptida (*S*)-AdGly-L-Ala-D-izoGln **5**, snimljenog u DMSOu. Spektar prikazuje NOE signale (zeleno obojeni).

NOESY spektar tetrapeptida **7** snimljen u D₂O sastoji se od NOE kontakata ostvarenih između CH- α i CH₂- β protona Ser s CH₂- β protonima izoGln te CH₂ protonima adamantana. Također, u spektru se uočavaju i NOE kontakti između CH protona adamantana i CH₂- β protona izoGln. U NOESY spektru tetrapeptida u DMSO uglavnom se uočavaju intrarezidualni NOE signali. Izuzetak predstavljaju korelacije između CH- α Ala i CH₂ protona adamantana te NH protona izoGln.

Detaljnou konformacijskom analizom derivata desmurmil-dipeptida opaženo je da povećanjem složenosti strukture dolazi do nastajanja sve složenije mreže vodikovih veza, koja dovodi do stabilizacije peptida. Neovisno o uvođenju novih donora/akceptora vodika u vodikovoj vezi, određene preferentne strukturne značajke su prisutne i u *zwitterionskim* i *ne-zwitterionskim* oblicima peptida. U oba oblika di-, tri- i tetrapeptida prisutne su interakcije između terminalnih amio kiseline. Najznačajnije strukturno obilježje koje je uočeno u modelu tripeptida **5** i tetrapeptida **7** je desetoročlani prsten (C₁₀, N_{1b}H···O₃), između amidne skupine bočnog ogranka izoGln i karbonilne skupine AdGly. Na temelju proučene literature o sličnim spojevima, ovaj desetoročlani prsten bi se mogao smatrati i mimetikom ključne konformacijske značajke muropeptida (MDPa i njegovih derivata) kod kojih je todeseteročlani prsten nastalo između NH amidnog dijela Ala i *N*-acetilkarbonilne skupine MurNAc.

Fermandjian je na temelju ¹H NMR istraživanja, prvi predložio trodimenzijsku strukturu MDPa, koja prema tim podacima dolazi u obliku slova S i stabilizirana je dvama uzastopnim β-okretima.^{134,135} Kasnija NMR istraživanja i MD simulacije su uglavnom potvrdile samo jedan β-okret (β-okret koji nastaje između NAc karbonilne skupine i NH skupine L-Ala).¹³⁶

Prisutnost desetoročlanog prstena kao dominantnog strukturnog obilježja, potvrđena je i u analogima MDPa kojima nedostaje šećerni (MurNAc) dio.¹³⁷ Prstovšek i suradnici su u svojim istraživanjima, koja su imala naglasak na računalnom modelu molekulskog pristajanja derivata MDPa na T4 model lizozima, također potvrdili prisutnost desetoročlanog prstena u derivatima MDPa, te su ujedino pokazali da se može postići učinkovito vezanje alifatskog dijela desmuralnog analoga.¹³⁸ Ovi rezultati dodatno pokazuju da MurNAc dio nije odgovoran za specifično vezanje ove vrste spojeva, te da bi jedna od važnijih strukturnih značajki bila stabilizacija N-terminalne aminokiseline kroz nastanak desetoročlanog prstena.

Deseteročlani prsten (prvi β-okret) prisutan je i u imunološki aktivnim derivatima koji na C-kraju imaju estersku skupinu, kao što je murabutid.¹³⁴ Ovo istraživanje, kao i rezultati računalnog modeliranja PGMa^{139,140} i GMDPa (glukozaminil-MDP)¹⁴¹, sugeriraju i određeni trend koji pokazuje da je N-terminalni peptidni dio krući, kompaktnije strukture i bolje konformacijski definiran, dok C-terminalni dio pokazuje veću konformacijsku slobodu.

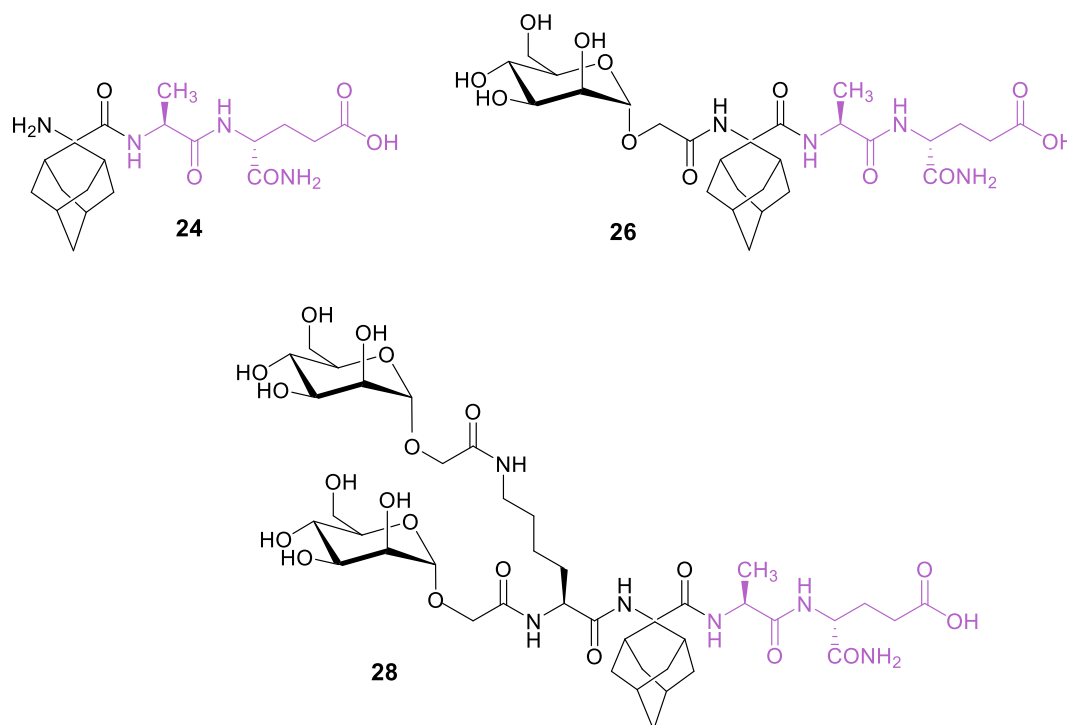
Sintetizirani peptidi odabrani su kao modelni spojevi za konformacijsku analizu. Uvedena hidrofobna adamantilna skupina, u obliku neprirodne aminokiseline (*S*)-AdGly, uzrokuje određenu krutost peptidne okosnice na N-kraju, što kao posljedicu ima stvaranje lokalnih strukturnih obrazaca svojstvenih ovoj vrsti spojeva. Prikazani rezultati izdvajaju desetoročlani

prsten (C10, N₁₆H \cdots O₃), koji nastaje između amidne skupine bočnog ogranka izoGln i karbonilne skupine AdGly, kao ključnu interakciju koja ujedino potiče i savijanje modelnih peptida te ostaje očuvana i prilikom uvođenja dodatnih peptidnih veza. Da je savijanje modeliranih peptida povoljno, potvrđuju i opisani NOE kontakti CH₂ protona adamantana s CH₂ i NH protonima izoGln. Također, NOE korelacije između Ser i bočnog ogranka izoGln ukazuju na trend interakcije C- i N-kraja peptida.

4.2. SINTEZA I IMUNOSTIMULACIJSKA SVOJSTVA MANOZILIRANIH DERIVATA DESMURAMIL-PEPTIDA

4.2.1. *Sinteza manoziliranih derivata desmuramil-peptida*

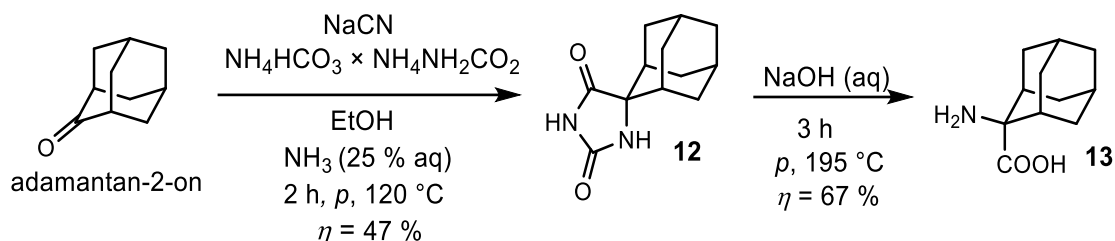
U okviru ove disertacije razvijena je i metoda pripreme novog adamantil-tripeptida **24**, kondenzacijom akiralne adamantanske kiseline i desmuramil-dipeptida te novih manoziliranih desmuramil-dipeptida **26** i **28** (Slika 24), kojima je ujedino ispitana imunomodulacijska aktivnost *in vivo*, u mišjem modelu te modelirano pristajanje i provedene MD simulacije u kompleksu s NOD2 receptorom. Glikolil-manozid će se koristiti kao šećerna komponenta u pripravi nove serije monomanoziliranog (**26**) i dimanoziliranog (**28**) konjugata adamantil-tripeptida s akiralnom adamantanskom aminokiselinom. U dimanoziliranom spoju **28**, dvije molekule manoze vezat će se preko dvije amino-skupine lizina na adamantil-tripeptid. 2-Aminoadamantan-2-karboksilna kiselina također je sintetizirana u okviru ovog rada.



Slika 24. Novi derivati DMPa s akiralnom adamantanskom kiselinom pripremljeni u sklopu ove disertacije.

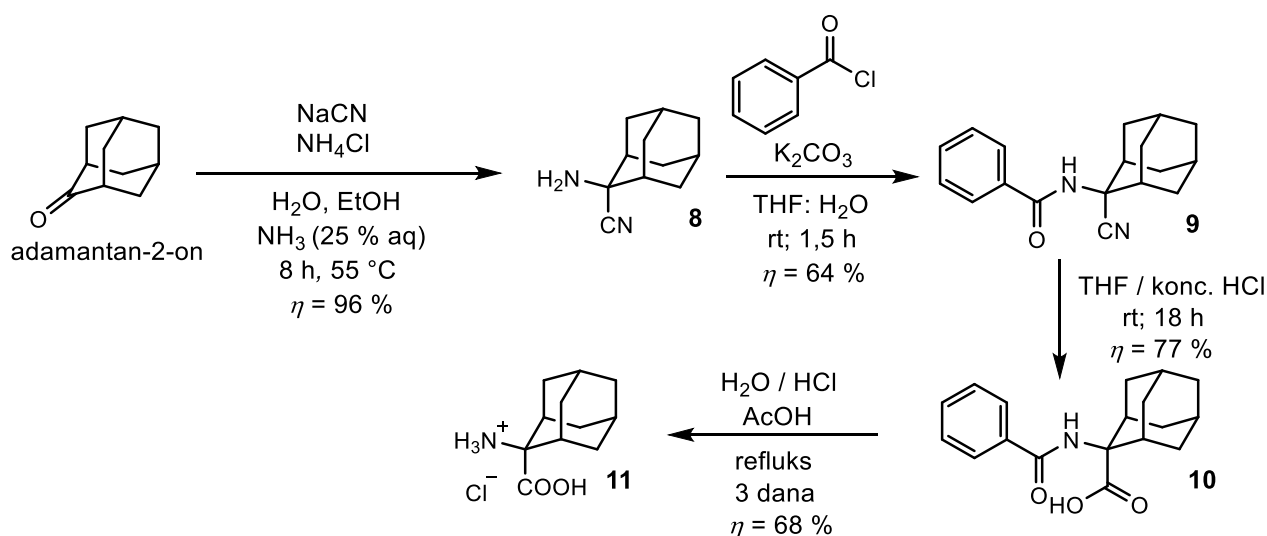
4.2.1.1. SINTEZA 2-AMINOADAMANTAN-2-KARBOKSILNE KISELINE

U dizajnu spojeva pripremljenih u ovoj disertaciji 2-aminoadamantan-2-karboksilna kiselina (**11** i **13**) odabrana je kao akiralna alternativa kiralnom (adamant-1-il)glicinu, te je u okviru ovog rada sintetizirana na dva načina. Prvi način sinteze prikazan je na Shemi 10, a odvija se u dva koraka preko spirohidantoina **12** kao međuprodukta i prethodno je opisan u literaturi.¹⁴² Za razliku od literaturno opisanog postupka, u sklopu ovog rada sinteze su provedene u autoklavu od nehrđajućeg čelika s teflonskom jezgrom, bez mogućnosti miješanja smjese. Sintaza hidantoina odvija se putem Bucherer-Bergove metode¹⁴³ i uključuje više-komponentnu reakciju adamantan-2-ona, natrijevog cijanida i amonijevog karbonata. Spirohidantoin **12** se u sljedećem koraku hidrolizira u autoklavu na 195 °C kako bi se dobila 2-aminoadamantan-2-karboksilna kiselina **13** u dobrom iskorištenju. Međutim, aminokiselina **13** pripravljena na ovaj način sadrži dosta anorganskih nečistoća koje je teško izdvojiti iz smjese i dobiti čisti produkt. Osim toga, produkt je u tom obliku netopljiv u standardnim otapalima korištenim u daljnjim koracima sinteze i time teško primjenjiv, a bez obzira na „žestoke“ uvjete hidrolize, i dalje zaostaje dosta nehidroliziranog spirohidantoina.



Shema 10. Priprava 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline **13** u autoklavu preko spirohidantoina **12** kao međuprodukta.

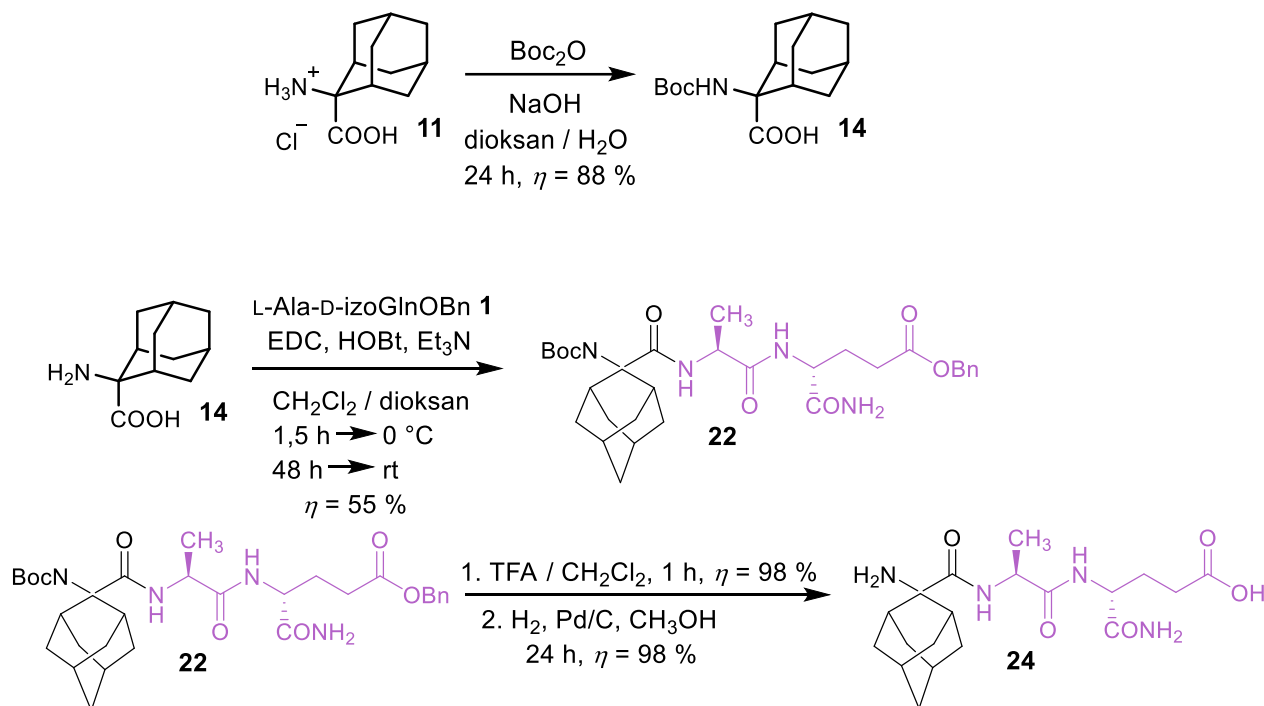
Kao alternativa prethodno opisanoj sintezi, 2-aminoadamantan-2-karboksilna kiselina pripravljena je i pomoću Streckerove reakcije (Shema 11).¹⁴⁴ U prvom koraku sintetiziran je aminonitril **8**, koji teško hidrolizira do karboksilne kiseline, zbog čega je primijenjena literaturno opisana intramolekulska aktivacija hidrolize¹⁴⁵ preko spiro nestabilnog međuprodukta uz pomoć benzoil-klorida i kasnije snažnih kiselih uvjeta. Pripravljena 2-aminoadamantan-2-karboksilna kiselina u obliku hidroklorida **11**, ne sadrži spomenute anorganske nečistoće i dobivena je u dobrom ukupnom iskorištenju (33 %). Ukupno iskorištenje reakcije priprave 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline preko spirohidantoina kao međuprodukta je 32 %.



Shema 11. Sinteza 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline metodom Streckerove sinteze aminokiselina.

4.2.1.2. SINTEZA DESMURAMIL-TRIPEPTIDA S UGRAĐENOM 2-AMINOADAMANTAN-2-KARBOKSILNOM KISELINOM **24**

Polazni spojevi u sintezi tripeptida **24**, 4-{2-[(2-aminoadamantan-2-karbonil)amino]propionilamino}-4-karbamoilbutanska kiselina, su 2-aminoadamantan-2-karboksilna kiselina **14** s uvedenom *tert*-butiloksikarbonilnom (Boc) zaštitom i prethodno sintetizirani dipeptid **1** (Shema 12). *Tert*-butiloksikarbonil-2-aminoadamantan-2-karboksilna kiselina pripravljena je Boc zaštićivanjem amino-skupine **11** pomoću di-*tert*-butilnog dikarbonata uz natrijevu lužinu. Tripeptid **22** dobiven je kondenzacijom dipeptida **1** i adamantanske aminokiseline **14**, korištenjem EDC·HCl kao kondenzacijskog reagensa i HOBt kao koreagensa i trietilamina kao baze. Baza deprotonira amino-skupinu dipeptida i tako generira nukleofil za stvaranje peptidne veze.^{87,128} Uklanjanjem *N*-Boc zaštitne skupine uz TFA/NEM kao reagensa i benzilne zaštite s terminalne karboksilne skupine hidrogenolizom uz paladij (10 %) na ugljenu, pripremljen je tripeptid **24** s iskorištenjem 53 % (Shema 12).



Shema 12. Sintaza tripeptida **24** s uvedenom 2-aminoadamantan-2-karboksilnom kiselinom.

4.2.1.3. PRIPRAVA ACETILIRANE α -D-MANOPIRANOZE

Polazni spoj u sintezi manozilirane karboksilne kiseline **18** je 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- α -D-manopiranoza **15**. Kako bi se provela regioselektivna transformacija skupine na anomernom centru, prvo su uvedene zaštite na slobodne hidroksilne skupine. Hidroksilne skupine α -D-(+)-

manoze zaštićene su prevođenjem u acetatne estere. Postupak acetiliranja proveden je korištenjem acetanhidrida uz jod kao katalizator (Shema 13). Reakcija je egzotermna i odvija se 1,5 h. TLC pokazuje prisutnost isključivo nastalog pentaacetata. Jod djeluje na način da tvori kompleks s atomom kisika jedne od karbonilnih skupina acetanhidrida, dodatno polarizirajući C=O vezu, čime je olakšan nukleofilni napad hidroksilnih skupina α -D-(+)-manoze. Prilikom obrade reakcijske smjese, jod se uklanja ekstrakcijom s otopinom natrijevog tiosulfata pentahidrata, a suvišak acetanhidrida i nastala octena kiselina ispiranjem zasićenom otopinom natrijevog karbonata te dodatno nadslojavanjem sirovog produkta s dietil-eterom (tako pripremljena smjesa ostavi se stajati u hladnjaku dok ne izostane miris octene kiseline). Iskorištenje reakcije je oko 50 %.

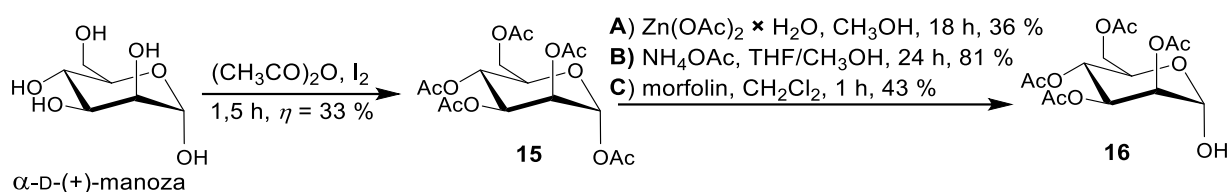
Dobivenoj 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- α -D-manopiranozi **15** selektivno je uklonjena anomerna acetatna zaštita na tri načina: a) pomoću cinkovog acetata dihidrata u apsolutnom metanolu (Shema 13, drugi korak A); b) pomoću amonijevog acetata u smjesi tetrahidrofuran / metanol (Shema 13, drugi korak B) i c) pomoću morfolina u diklormetanu (Shema 13, drugi korak C).

Uklanjanje anomernog acetata pomoću cinkovog acetata dihidrata u apsolutnom metanolu dalo je čisti produkt **16** u relativno niskom iskorištenju (oko 36 %). Tijek reakcije kontroliran je TLCom u sustavu otapala $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{CN} = 3 : 1$. Uočeno je da daljnim napredovanjem reakcije (provođenjem reakcije duže od 18 h) dolazi do postepenog uklanjanja i preostalih acetata što dovodi do nastanka triacetiliranih produkata. Također, dužim provođenjem reakcije povećava se i udio β -anomera. Iako se reakcija može dobro kontrolirati TLCom i neizreagirana petnaacetilirana manozu **15** odvojiti kromatografijom, odlučili smo anomernu deacetilaciju provesti i na dva alternativna načina.

Sljedeći način bila je deacetilacija uz amonijev acetat u smjesi otapala tetrahidrofuran : apsolutni metanol = 1: 1 koji nam se ujedino pokazao i najboljim jer je iskorištenje reakcije znatno bolje (oko 80 %), a uvjeti reakcije dovoljno „blagi“ tako da nije došlo do deacetilacije preostalih skupina. Reakcija deacetilacije u navedenoj smjesi otapala razvijena je u sklopu ovog rada. Literaturno je poznata deacetilacija uz amonijev acetat u suhom DMFu (koju smo također proveli), ali zbog prevelike polarnosti otapala, a time i teškog uklanjanja iz reakcijske smjese, odlučili smo se promijeniti otapalo i pronašli dobar sustav.¹⁴⁶

Deacetilacija uz morfolin provedena je nekoliko puta. Ova se reakcija, prema TLCu, znatno brže odvija i potrebna je učestala provjera tijekom reakcije jer se pokazalo da dosta brzo dolazi do uklanjanja preostalih acetata i nastanka triacetiliranog produkta. Iskorištenje reakcije je 45

%. Ovaj postupak deacetilacije također je literaturno opisan.¹⁴⁷

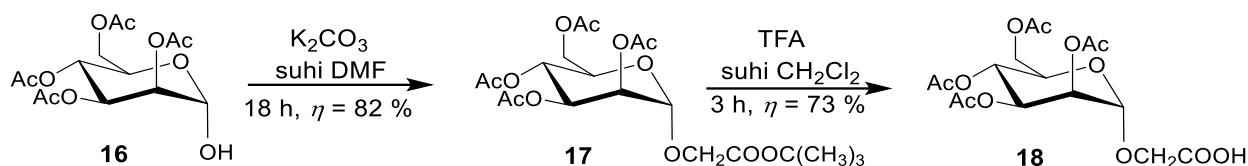


Shema 13. Priprava 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoze **16**.

4.2.1.4. PRIPRAVA *O*-MANOZIDA

Obzirom da jedna od ciljnih molekula u svojoj strukturi sadrži dvije molekule α -D-manoze, bilo je potrebno odabrati odgovarajuću podstrukturu koja će omogućiti vezanje dvije manozne podjedinice. Kako se manaza uvodi na peptidni fragment, kao idealna podstruktura se nametnula aminokiselina koja u bočnom ogranku ima amino-skupinu, odnosno molekula L-lizina. Lizin omogućuje vezanje dviju molekula manoze, međutim, da bi manozne podjedinice mogli vezati preko amino-skupine lizina, potrebno je prethodno na manozu uvesti poveznicu funkcionaliziranu karboksilnom skupinom. Odabrana je najjednostavnija akiralna poveznica od svega dva ugljikova atoma, koja u konačnici predstavlja glikolnu poveznicu između šećernog i aminokiselinskog dijela ciljnih molekula **26** i **28**. Osim toga, novija istraživanja pokazuju da su *N*-glikolni derivati MDPa (glikolna komponenta uvedena na C2 položaj šećera) bolji aktivatori NOD2 receptora od MDPa,^{22,38} i bolji adjuvant⁹.

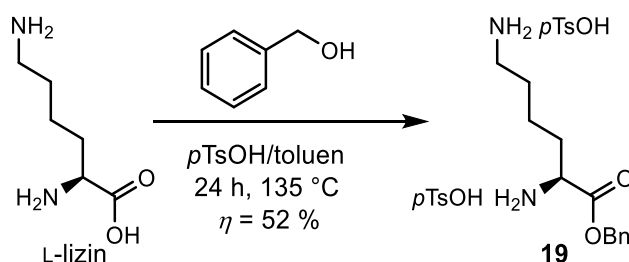
Reakcijom 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoze **16** i *tert*-butil-bromacetata uz kalijev karbonat 18 h u suhom DMFu, uspješno je provedena *O*-glikozidacija (Shema 14). Reakcija glikozidacije pri navedenim uvjetima preferentno je rezultirala nastankom α -anomera *O*-manozida, uz vrlo zanemariv udio β -anomera. Veća zastupljenost α -manozida može se objasniti većom termodinamičkom stabilnošću koja je posljedica snažnijeg anomernog efekta. Sirova reakcijska smjesa pročišćena je kromatografijom na stupcu silikagela uz $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{CN} = 3 : 1$ kao eluens te je izoliran produkt **18** u 81 %-tnom iskorištenju. U sljedećem koraku, uklonjena je *tert*-butilna zaštita pomoću trifluoroctene kiseline u suhom diklormetanu (Shema 14) uz 72 %-tno iskorištenje.



Shema 14. Reakcija *O*-glikozidacije uz *tert*-butil-bromacetat.

4.2.1.5. PRIPRAVA DI-*p*-TOLUENSULFONAT BENZILNOG ESTERA L-LIZINA

Benzilni ester L-lizina **19** pripremljen je reakcijom Fisherove esterifikacije uz *p*-toluensulfonsku kiselinu i toluen kao otapalo (Shema 15). *p*-Toluensulfonska kiselina se u ovoj reakciji dodaje u stehiometrijskoj količini i ima dvojaku ulogu: protonira α - i ϵ -amino-skupine i time onemogućava nastanak amidne veze te ima ulogu katalizatora u reakciji Fisherove esterifikacije. Voda se iz reakcijske smjese uklanja pomoću Dean-Starkovog nastavka, kako bi se ravnoteža reakcije dodatno pomaknula u korist nastanka produkta. Produkt **19** iskristalizira iz žutog uljnog sloja dodatkom suhog etil-acetata i stajanjem u hladnjaku (oko 3 dana) te se dodatno prekrizalizira iz suhog etil-acetata uz lagano zagrijavanje. Prinos reakcije je 52 %.



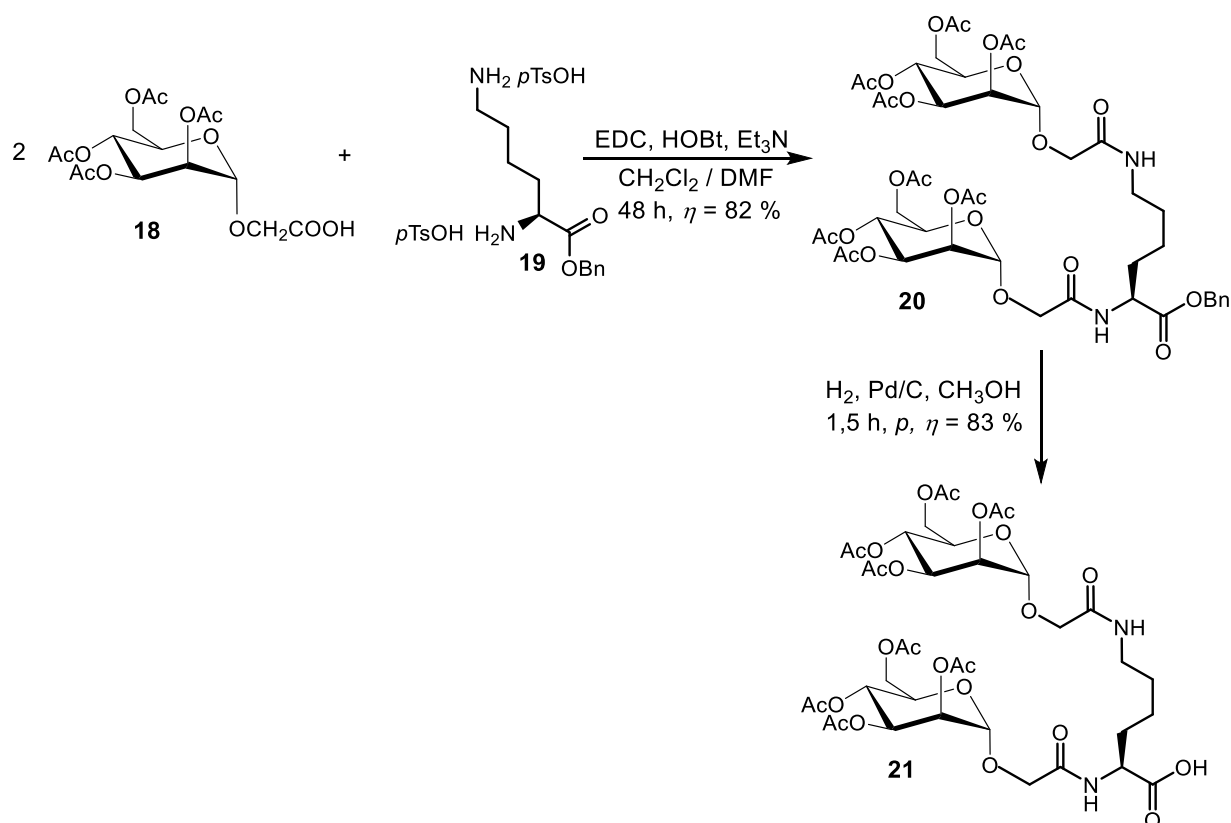
Shema 15. Esterifikacija L-lizina.

4.2.1.6. KONDENZACIJA 2-(2,3,4,6-TETRA-*O*-ACETIL- α -D-MANOPIRANOZILOKSI)OCTENE KISELINE I BENZILNOG ESTERA DI-*p*-TOLUENSULFONAT L-LIZINA

Za kondenzaciju 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranoziloksi)octene kiseline **18** i benzilnog estera di-*p*-toluensulfonat L-lizina **19** potrebno je dodati dva ekvivalenta spoja **18** na ekvivalent spoja **19** (Shema 16). Kondenzacija je provedena optimiziranom karbodiimidnom metodom sinteze amidne veze (EDC·HCl/HOBt karbodiimidni reagensi u smjesi otapala diklormetan/1,4-dioksan 1:1) u prisutnosti trietilamina kao baze. Dodatkom katalitičke količine baze postiže se deprotoniranje amino skupina lizina i omogućuje nukleofilan napad amino skupine na aktiviranu karboksilnu skupinu manozilirane karboksilne kiseline **18**. Kondenzaciju

se pokušalo provesti i na način da se karboksilna komponenta aktivira pripravom miješanog anhidrida uz izobutil-klorformijat i trietilamin kao bazu u smjesi suhog diklormetana i *N,N*-dimetilformamida.⁸⁷ Usporedbom konačnih iskorištenja i čistoće produkta, boljom se pokazala standardna karbodiimidna metoda.

Ovako pripravljenom dimanoziliranom lizinu **20** u obliku benzilnog estera, u sljedećem se koraku katalitičkom hidrogenolizom u metanolu uz 10 %-tni Pd/C, uklonila benzilna zaštita da bi se kao produkt dobio spoj **21**. Ukupno iskorištenje reakcije u odnosu na polazni lizin iznosi oko 35 %.

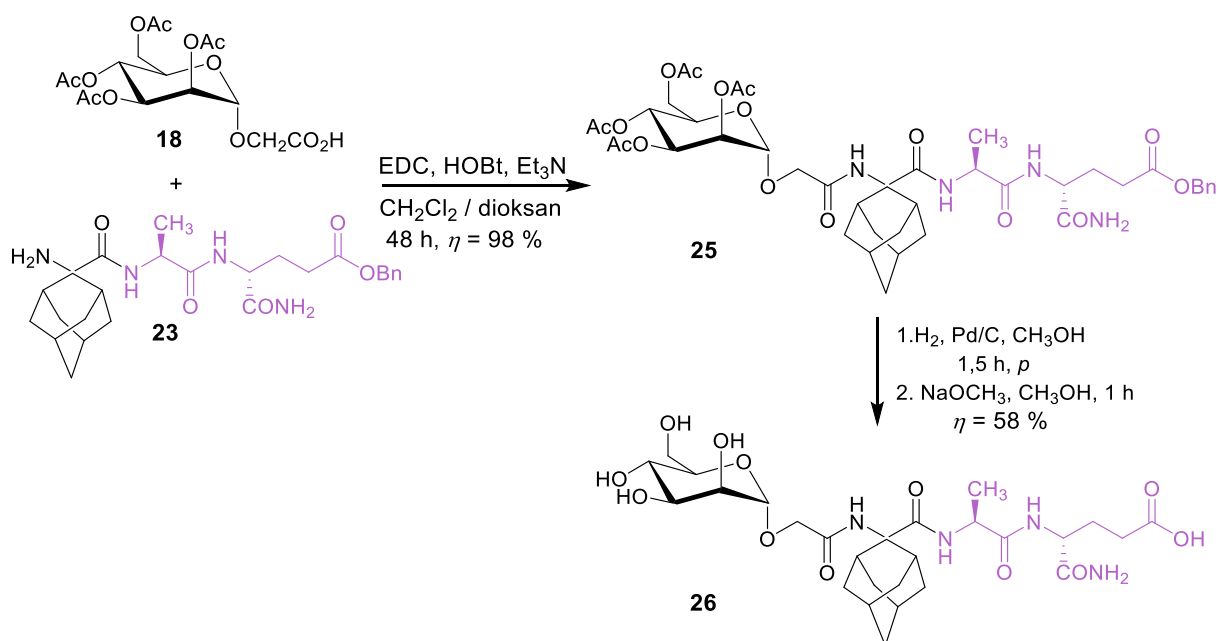


Shema 16. Sinteza dimanoziliranog L-lizina **21**.

4.2.1.7. SINTEZA MANOZILIRANOG DERIVATA DESMURAMIL-PEPTIDA **26**

Polazni spojevi u sintezi manoziliranog desmuramil-dipeptida **26** su 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-manopiranoziloksi)octena kiselina **18** i prethodno sintetizirani tripeptid **23** (Shema 17). Korištena je već opisana EDC/HOBT karbodiimidna metoda uz trietilamin kao bazu. Uklanjanjem benzilne zaštitne skupine s terminalne karboksilne skupine spoja **25** katalitičkom hidrogenolizom uz paladij (10 %) na ugljenu u metanolu u prvom koraku, te acetatnih zaštita djelovanjem katalitičke količine 25 %-tne otopine natrijevog metoksida u metanolu u drugom

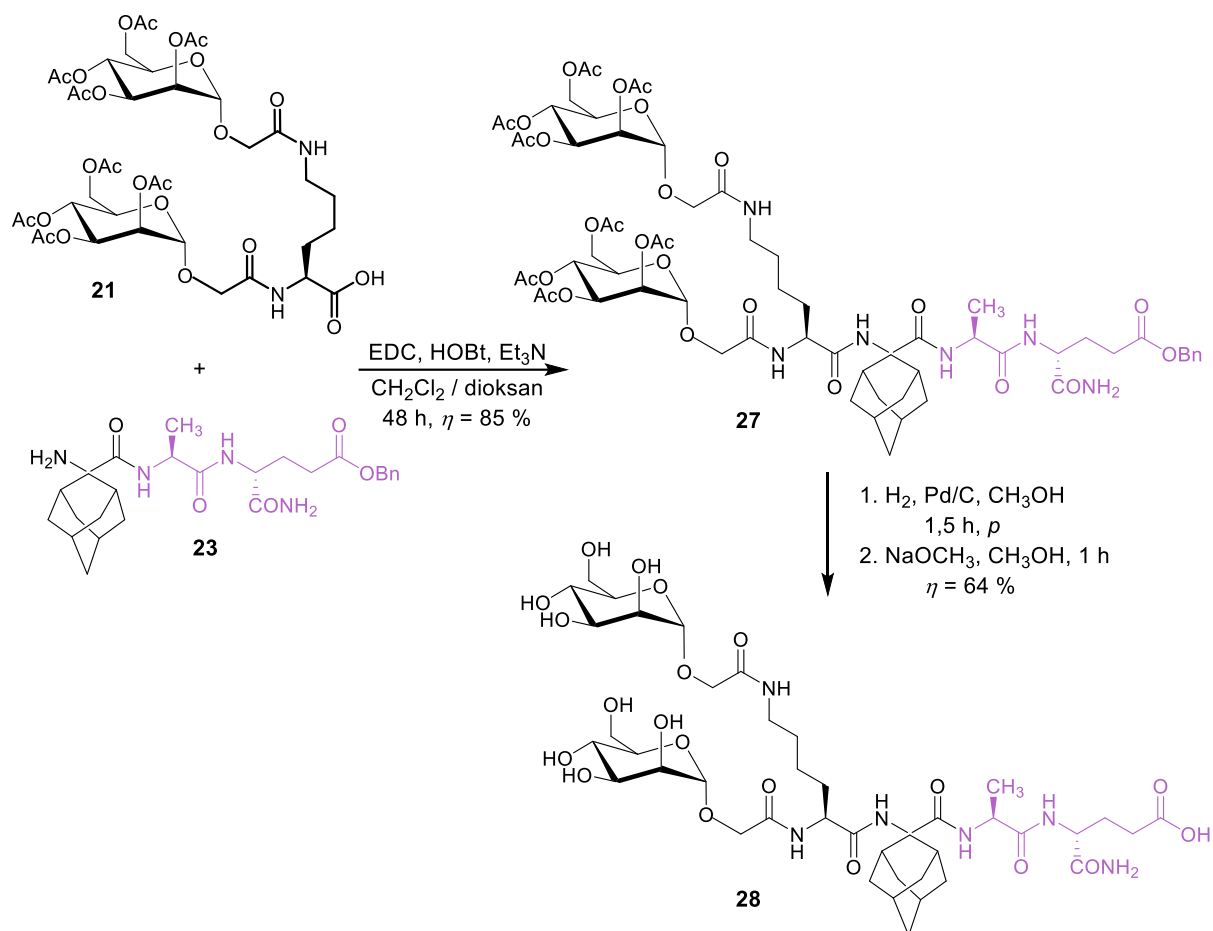
koraku, pripravljen je manozilirani desmuramil-peptid **26** u dobrom iskorištenju (ukupno iskorištenje koraka prikazanih na Shemi 17 je 28 %). (Shema 17).



Shema 17. Sinteza manoziliranog derivata desmuramil-peptida **26**.

4.2.1.8. SINTEZA DIMANOZILIRANOG DERIVATA DESMURAMIL-PEPTIDA **28**

Zaštićeni dimanozilirani derivat desmuramil-peptida **27** pripravljen je kondenzacijom dimanoziliranog L-lizina **21** i prethodno sintetiziranog tripeptida **23** (Shema 18). I kod ove sinteze je korištena već opisana optimizirana EDC/HOBt karbodiimidna metoda uz trietilamin kao bazu. Također, uklanjanjem benzilne zaštitne skupine s terminalne karboksilne skupine spoja **27** katalitičkom hidrogenolizom uz paladij (10 %) na ugljenu u metanolu u prvom koraku, te acetatnih zaštita djelovanjem katalitičke količine 25 %-tne otopine natrijevog metoksida u metanolu u drugom koraku, pripravljen je manozilirani desmuramil-peptid **28** u dobrom iskorištenju (ukupno iskorištenje koraka prikazanih na Shemi 18 je 54 %).



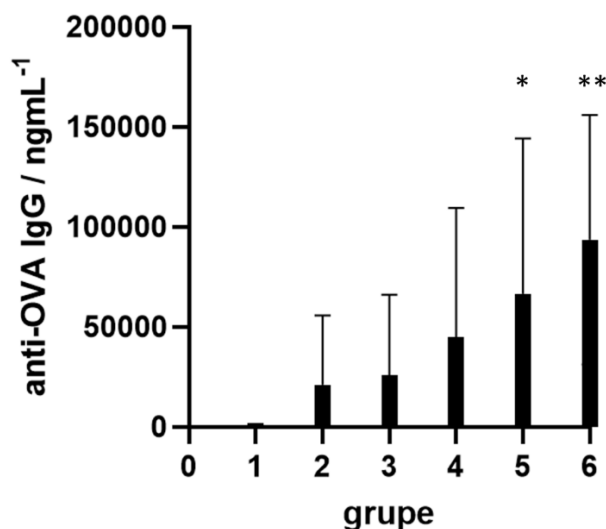
Shema 18. Sinteza dimanoziliranog derivata desmuramil-dipeptida **28**.

4.2.2. Ispitivanje imunostimulacijskog djelovanja u mišjem modelu

Adjuvanti su tvari koje se dodaju cjepivima kako bi se pojačala imunoreakcija na specifični antigen. Značajni su i zbog svoje mogućnosti usmjeravanja imunološkog odgovora organizma prema pojedinom tipu imunoreakcije; Th1 ili Th2. Th1 karakterizira stanični odgovor i djelovanje T stanica, dok kod Th2 odgovora B stanice luče antitijela. Smjer imunoreakcije moguće je pratiti mjerenjem količine pojedine vrste antitijela, odnosno njihovog omjera. U našem istraživanju korišten je ovalbumin (OVA), proteinski antigen koji se zbog svoje relativno slabe imunogeničnosti koristi za ispitivanje potencijalnih pojačivača imunoreakcije, a kao eksperimentalne životinje korišteni su miševi CBA soja. Anti-OVA IgG, anti-OVA IgG1 i anti-OVA IgG2a određeni su u serumu miševa ELISA metodom nakon drugog docjepljivanja. Adjuvantska aktivnost novosintetiziranih spojeva procijenjena je u usporedbi s ManAdDMPom. Testirane su slijedeće skupine uz kontrolu (kao 0-ta skupina) ovim

redosljedom: 1. negativna kontrola (sterilna voda); 2. OVA; 3. ManAdDMP + OVA; 4. **24** + OVA; 5. **26** + OVA i 6. **28** + OVA.

Ukupna količina IgG antitijela prikazana je na Slici 25, a količine proizvedenih podklasa IgG1 i IgG2a antitijela na Slici 26.

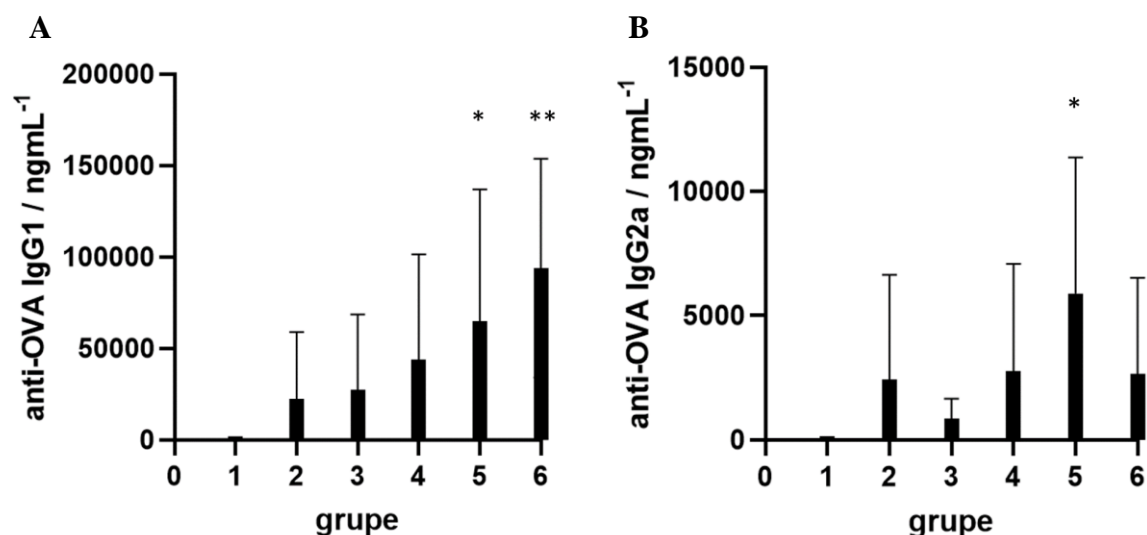


Slika 25. Učinak novosintetiziranih derivata desmuramil-dipeptida s uvedenom 2-aminoadamantan-2-karboksilnom kiselinom **24**, i njegovih manoznih derivata **26** i **28**, na proizvodnju ukupnih anti-OVA IgG u CBA miševima imuniziranim s OVA antigenom. Eksperimentalne skupine: 1. negativna kontrola (sterilna voda); 2. OVA; 3. ManAdDMP + OVA; 4. **24** + OVA; 5. **26** + OVA i 6. **28** + OVA. Zvezdicama je označena statistički značajna razlika (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) u odnosu na kontrolnu skupinu.

Na Slici 25. vidljivo je da svi testirani spojevi stimuliraju veću proizvodnju anti-OVA IgG antitijela u CBA miševima u odnosu na pokusnu skupinu 2, koja je imunizirana samo s ovalbuminom. Pritom je potrebno istaknuti da je i u prethodnim studijama provedenim na CBA miševima izražena jača produkcija anti-OVA IgG u odnosu na ukupnu količinu antitijela određenu u BALB/c miševima.^{8,9} Iz navedenog je razloga stimulacija imunološkog odgovora u skupini 3, koja je imunizirana referentnim spojem ManAdDMP, manje izražena. Međutim, jasno je vidljiv porast ukupne količine antitijela u skupinama 4, 5 i 6 koje su bile imunizirane novosintetiziranim peptidom **24**, njegovim monomanozilirnim derivatom **26** i dimanoziliranim derivatom **28**. Temeljem uočenog trenda porasta (gotovo linearni porast) može se zaključiti da vezanjem manoze na desmuramil-peptid **24** dolazi do pojačanja specifične imunoreakcije. Pritom manozni derivati desmuramil-dipeptida, spojevi **26** i **28**, značajno više induciraju proizvodnju ukupnih IgG antitijela u usporedbi s ManAdDMPom. Vidljivo je da količina izmjernih specifičnih antitijela statistički značajnija u skupini 5 koja je primila **26** ($p < 0,05$) i u skupini 6 koja je bila imunizirana spojem **28** ($p < 0,01$), u odnosu na kontrolnu skupinu. Obzirom

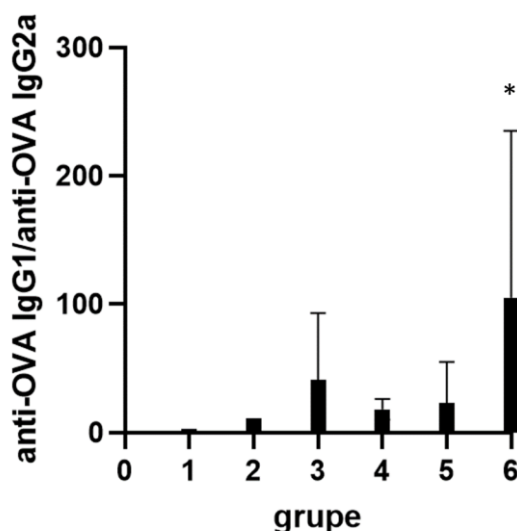
da spoj **28** koji ima vezane dvije manozne podjedinice preko glikolne poveznice, najviše doprinosi povećanju količine produciranih antitijela, može se zaključiti da vezanje manoznih podjedinica na polazni tripeptid **24** značajno utječe na pojačavanje njegove imunostimulacijske aktivnosti (gotovo dvostruko veća količina antitijela proizvedena je u serumu miševa koji su imunizirani sa spojem **28**, u usporedbi s produciranom količinom antitijela u skupini 4). Uspoređujući adjuvantsku aktivnost spoja ManAdDMP i tripeptida **24**, koji u svojoj strukturi nema manoznu podjedinicu, može se zaključiti da akiralna adamantanska aminokiselina, također pozitivno utječe na povećanje imunostimulacijske aktivnosti ove serije spojeva. Dakle, na temelju prikazanih rezultata pokusa može se zaključiti da strukturni motivi uvedeni u ciljnim molekulama, doprinose stimulaciji imunološkog odgovora na OVA antigen. Potvrđeno je da je za stimulaciju proizvodnje veće količine ukupnih IgG antitijela poželjnije vezanje 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline na desmuramil-peptidnu osnovicu, te da manoziliranje doprinosi imunostimulaciji.

Sličan trend kao i kod ukupne količine antitijela dobiven je i nakon određivanja količine anti-OVA IgG1 antitijela (Slika 26.A). Količina izmjerenih anti-OVA IgG1 antitijela statistički je značajnija u skupini 5 koja je primila **26** ($p < 0,05$) i u skupini 6 koja je bila imunizirana spojem **28** ($p < 0,01$), u odnosu na kontrolnu skupinu.



Slika 26. Učinak nosintetiziranog derivata desmuramil-dipeptida s uvedenom 2-aminoadamantan-2-karboksilnom kiselinom **24**, i njegovih manoziliranih konjugata **26** i **28**, na proizvodnju podtipova anti-OVA IgG1 a) i anti-OVA IgG2a b) u CBA miševima imuniziranim s OVA antigenom. Eksperimentalne skupine: 1. negativna kontrola (sterilna voda); 2. OVA; 3. ManAdDMP + OVA; 4. **24** + OVA; 5. **26** + OVA i 6. **28** + OVA. Zvezdicama je označena statistički značajna razlika (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) u odnosu na kontrolnu skupinu.

Proizvodnja IgG2a antitijela (Slika 26.B) najznačajnija je u skupini koja je bila imunizirana monomanoziliranim peptidom **26**. Količina izmjerenih anti-OVA IgG2a antitijela u navednoj skupini 5 statistički je značajnija ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Najmanja količina anti-OVA IgG2a antitijela izmjerena je u skupini koja je bila imunizirana referentnim spojem ManAdDMPom. Desmuramil-peptid **24** i dimanoziliran desmuramil-peptid **28** podjednako su stimulirali produkciju IgG2a podtipa antitijela.



Slika 27. Omjer antitijela anti-OVA IgG1 i anti-OVA IgG2a (IgG1 / IgG2a) nakon drugog docjepljivanja za ManAdDMP, **24**, **26** i **28**. Zvezdicama je označena statistički značajna razlika (* $p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu.

Omjer IgG1 / IgG2a antitijela, temeljem kojeg se može odrediti usmjerenje imunoreakcije, prikazan je na Slici 27. Općenito vrijedi da što je omjer antitijela IgG1 / IgG2a manji, količina Ig2a antitijela je veća, odnosno imunološka reakcija više je usmjerena prema Th1 tipu imunološkog odgovora (stanični tip imunološkog odgovora). Najveći omjer IgG1 / IgG2a antitijela prisutan u 6. pokusnoj skupini koja je imunizirana sa spojem **28**. Iz izračunatog omjera IgG1 / IgG2a antijela, vidljivo je da dimanozilirani desmuramil-peptid **28** statistički značajno usmjerava prema humoralnom Th2 tipu odgovora. Usmjerenje prema Th2 tipu odgovora pokazuje i MDP (prirodni ligand NOD2 receptora) i ManAdDMP koji je korišten kao referentni spoj u opisanom istraživanju.⁹ Zanimljivo je uočiti (Slika 26) da je u skupini 5, monomanozilirani desmuramil-peptid **26** stimulirao statistički značajnu količinu oba podtipa IgG antitijela (IgG1 i IgG2a). Navedeni rezultat ukazuje na balansiranu staničnu i humoralnu imunoreakciju.

ManAdDMP je manozilirani derivat desmuramil-dipeptida, koji se pokazao najboljim adjuvantom ove vrste analoga DMPa, u *in vivo* pokusima na miševima BALB/c soja, također uz OVA kao antigen. U opisanom pokusu pokazano je da su spojevi u kojima je hidroksi-izobutirilna poveznica zamijenjena glikolnom, bolji stimulatori imunološkog odgovora te da imunoreakciju usmjeravaju prema Th2 tipu.⁹ Također, temeljem provedene studije odnosa strukture i aktivnosti utvrđen je određeni trend, koji pokazuje da je optimalno mjesto za „ugradnju“ adamantanske aminokiseline N-dipeptidni kraj. Iz navedenog razloga su i dizajnirani desmuramil-peptidi s ugrađenom adamantanskom aminokiselinom. Upravo se provedenim istraživanjem pokazalo da su dizajnirani spojevi potentniji adjuvanti.

Na temelju navedenih rezultata može se zaključiti da su sva tri testirana spoja pokazala veću imunostimulacijsku aktivnost u usporedbi s ManAdDMPom. Najveća proizvodnja ukupnih IgG antitijela pokazana je u serumu miševa koji su imunizirani sa spojem **28**. Razlog tomu može biti: 1. uvođenje dodatne manozne podjedinice koja može ostvariti dodatne interakcije, najčešće u obliku vodikovih veza, s NOD2 receptorom; 2. uvođenje lipofilne akiralne 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline koja može utjecati na značajniju promjenu konformacije liganda i 3. mogućnost vezanja na specifične manozne receptore. U opisanom istraživanju je prvi put istražena imunomodulacijska aktivnost desmuramil-peptida koji u svojoj strukturi ima dvije manozne komponente (spoj **28**) te su stoga potrebne nove studije kojima će se detaljnije istražiti mehanizam djelovanja. Naime, za manozne receptore svojstveno je povećanje afiniteta vezanja liganda ukoliko spoj ima više šećernih podjedinica (vezanje je jače kod razgranatih ili polivalentnih šećernih struktura).^{148,149}

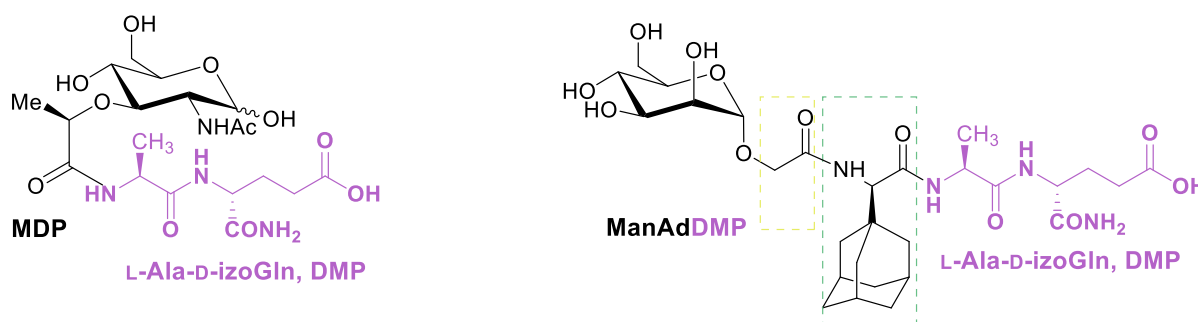
Osim manoziliranih liposoma, poznati su i brojni drugi biološki aktivni sustavi s uvedenom manoznom sredinom kao ključnom komponentom za specifičnu dostavu terapeutika. Manozilirani nanomaterijali imaju velik potencijal u liječenju karcinoma i različitih infekcija što je posljedica njihovog izravnog terapijskog učinka na ciljne stanice te mogućnosti modulacije mikrokruženja tumora i stimulacije imunološkog odgovora kroz prezentaciju antigena.¹⁵⁰ Manozni receptor i DC-SIGN (engl. *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) transmembranski protein pretežno su eksprimirani na različitim stanicama raka, dendritičkim stanicama, makrofagima i epitelnim stanicama te se trenutno ubrajaju u najprivlačnije ciljne receptore (*targeti*) za manozilirane nanomaterijale.^{150,151} Ova vrsta formulacija najčešće se primjenjuje u kemoterapiji, fotodinamskoj terapiji liječenja različitih tumora, imunoterapiji i genskom principu liječenja

brojnih bolesti. Problem niskog afiniteta vezanja ciljnog receptora ili stanica na monomanozilirane konjugate i ovdje je prisutan.^{152,153} Međutim, razvijena je jednostavna metoda polimerizacije, polimerizacija reverzibilnog prijenosa lanca fragmentacije RAFT¹⁵⁴ (engl. *reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization*), u kojoj se molarna masa i sama morfologija implementiranog glikopolimera na površini nanočestica može kontrolirati i time znatno utjecati na jačinu vezanja.¹⁵⁵

4.2.3. Molekulsko-dinamičke simulacije kompleksa manoziliranih desmuramil-peptida i NOD2 receptora

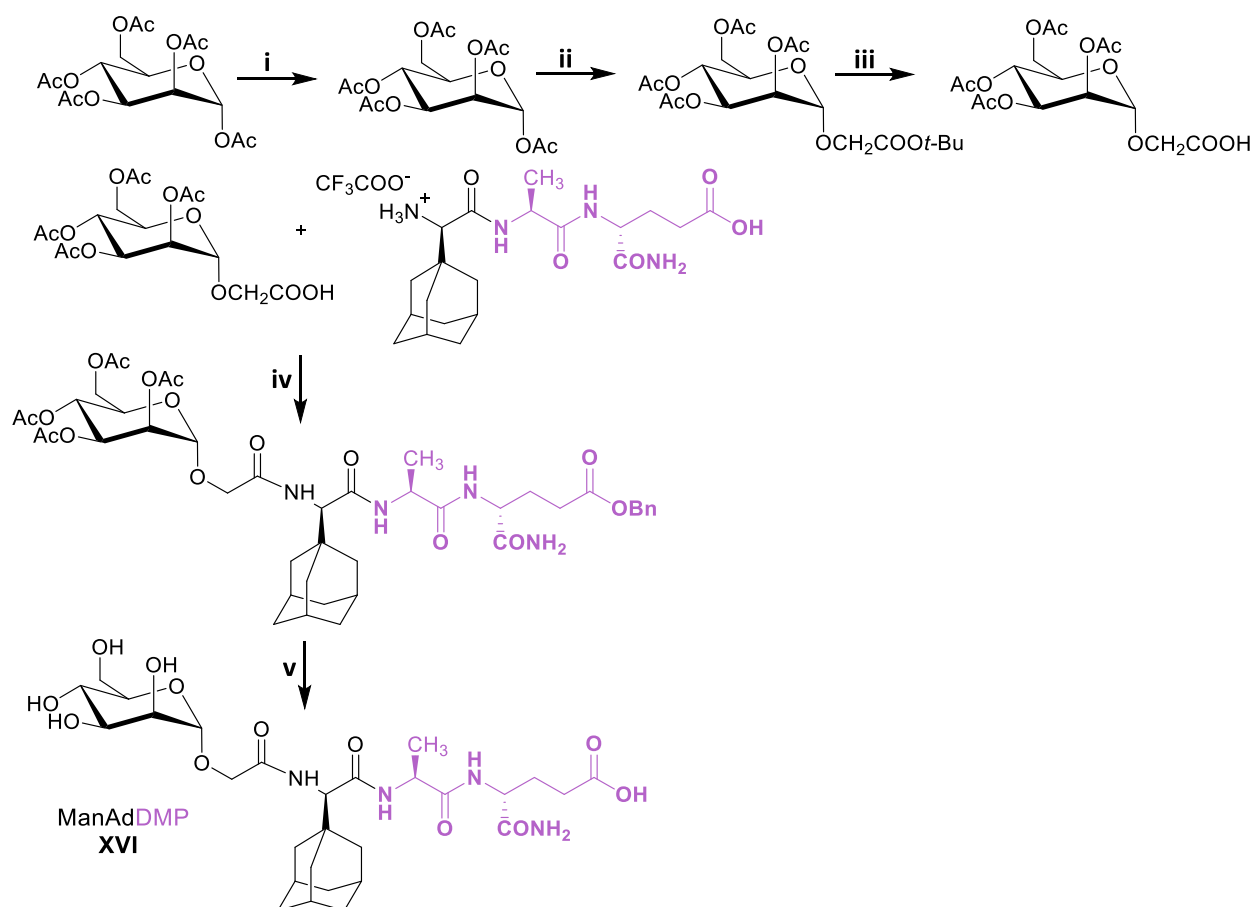
4.2.3.1. MOLEKULSKO-DINAMIČKE SIMULACIJE S ManAdDMP-OM

ManAdDMP (Man-OCH₂-D-(1-Ad)Gly-L-Ala-D-izoGln) je derivat desmuramil-dipeptida s uvedenom adamantanskom strukturom u obliku kiralne aminokiseline D-(1-Ad)Gly i manozom preko akiralne glikolne poveznice (Slika 28). Opisana je njegoa sinteza i imunostimulacijsko djelovanje te je trenutno najaktivniji manozni analog ove vrste derivata DMPa.⁹ Njegova adjuvantska aktivnost ispitana je *in vivo* u mišjem modelu, na temelju njegovog imunostimulacijskog efekta na sekundarni humoralni imunološki odgovor na ovalbumin (OVA) kao antigen, odnosno mjerenjem ukupne količine ili omjera anti-OVA IgG i podtipova anti-OVA IgG1 i anti-OVA IgG2a, kao pokazatelja usmjeravanja imunološke reakcije prema Th1 i Th2 vrsti imunološkog odgovora. ManAdDMP, kao i MDP, usmjerava imunoreakciju prema Th2 tipu odgovora. Također, SAR studija ovog istraživanja je potvrdila da su derivati s glikolnom poveznicom između manoze i AdDMPa i slobodnom karboksilnom skupinom na bočnom ogranku izoGln aktivniji.



Slika 28. Usporedba strukture MDPa i ManAdDMPa (Man-OCH₂-D-(1-Ad)Gly-L-Ala-D-izoGln). Žuto obojeno je istaknuta struktura glikolne poveznice, a zeleno struktura kiralne adamantanske aminokiseline.

Shema 19 prikazuje pojednostavljenu metodu pripreve ManAdDMP: a) sinteza manoziliranog prekursora s glikolnom poveznicom i b) sinteza ManAdDMP kondenzacijom manozne jedinice i D-(1-Ad)Gly-L-Ala-D-izoGln optimiziranom karbodiimidnom metodom pripreve amidne veze (EDC·HCl/HOBt karbodiimidni reagensi u smjesi otapala diklormetan/1,4-dioksan 1:1). Za potrebe ove disertacije, ponovljena je sinteza ManAdDMPa prema Shemi 19 te nam je ovaj spoj poslužio kao referentni spoj prilikom proučavanja biološke aktivnosti u *in vivo* modelu, te kod proučavanja interakcija s NOD2 receptorom.

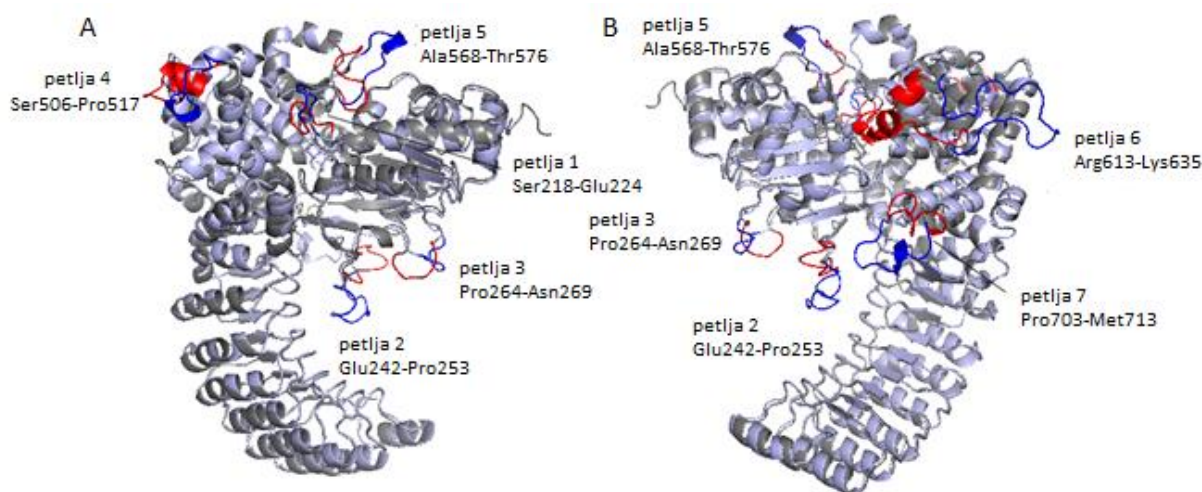


Shema 19. Shema pripreve manoznog prekursora s glikolnom poveznicom: i) Zn(OAc)₂·H₂O, apsolutni MeOH, rt, 20 h, 60 %; ii) BrCH₂COOC(CH₃)₃, K₂CO₃, suhi DMF, rt, 2 h, 81 %; iii) TFA, suhi DCM, rt, 1,5 h, 72 %; iv) EDC·HCl, HOBt·H₂O, Et₃N, DCM/DMF 1:1, 0 °C, rt, 72 h, 67 %; v) NaOMe/MeOH, rt, 1 h, 59 %.

4.2.4. Struktura NOD2 receptora i MD simulacije kompleksa NOD2 i ManAdDMP

Obzirom da dosad nije riješena kristalna struktura kompleksa NOD2 proteina i MDPa kao njegovog agonista, te sam mehanizam aktivacije nije u potpunosti razjašnjen, u sklopu disertacije proučeno je vezanje manoznih mimetika MDPa na NOD2, u prvom redu ManAdDMPa.

Prvo smo modelirali intaktnu strukturu NOD2 receptora jer eksperimentalno riješenoj strukturi nedostaje sedam petlji (PDB unos: 5IRN). Petlje su izrazito fleksibilni dio proteina, koje potencijalno mogu biti važne prilikom definiranja veznog mjesta liganda, kao što je u našem slučaju. Dobili smo dva intaktna modela NOD2, koja se razlikuju samo u područjima petlji (Slika 29). Dobiveni modeli odgovaraju inaktivnoj konformaciji NOD2 u kompleksu s ADP-om, čija je kristalna struktura jedina dosad objavljena (PDB unos: 5IRN).

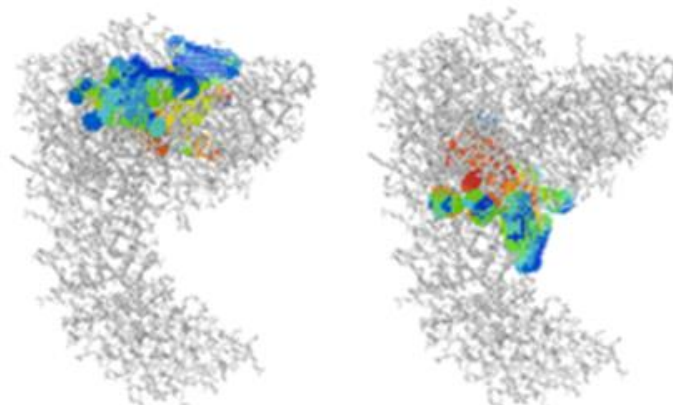


Slika 29. Struktura dobivena a) SWISS-MODEL serverom prikazana je svjetloplavom bojom, a njezine petlje plavom bojom, dok je struktura dobivena b) I-TASSER serverom prikazana sivom bojom, a njezine petlje crvenom bojom.

Modelirane petlje (Ser218-Glu224, Glu242-Pro253, Pro264-Asn269, Ser506-Pro517, Ala568-Thr576, Arg613-Lys635, Pro703-Met713) sa Slike 29, impliciraju da je petlja 2 važna za definiranje predloženog veznog mjesta liganda unutar LRR domene, dok su petlje 1 i 5 važne za karakterizaciju veznog mjesta unutar NOD domene.

Nakon što smo pomoću I-TASSER i SWISS-MODEL servera dobili intaktne strukture NOD2 s modeliranim petljama, proveli smo slijepo molekularno pristajanje (engl. *blind molecular docking*) i analizu veznih džepova na proteinu pomoću GHECOM servera. Slijepo

pristajanje je otkrilo dva glavna vezna džepa, jedan unutar NBD domene i drugi unutar LRR domene koji je podijeljen na dva moguća pod-džepa (Slika 30).



Slika 30. Dva glavna vezna džepa dobivena pomoću GHECOM servera.

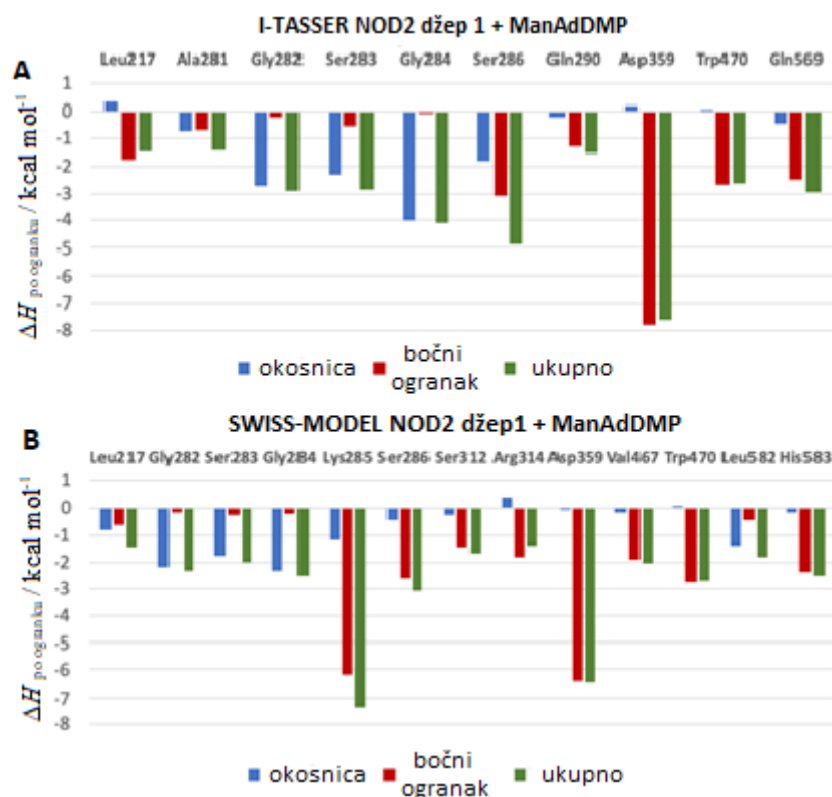
Zatim smo proveli molekulske pristajanje ManAdDMPa u džepu 1 i pod-džepovima 2a i 2b u modelu dobivenom SWISS-MODEL serverom jer se petlja 2 u džepu 2 ove strukture nalazi u zatvorenoj konformaciji (Slika 29) i zapravo tvori spomenuta dva pod-džepa. Osim toga, petlje 1 i 5 (Slika 29) koje izgrađuju džep 1, također se nalaze u zatvorenoj konformaciji u strukturi dobivenoj I-TASSER serverom pa smo se odlučili pripremiti dodatni kompleks ManAdDMPa u džepu 1 pomoću ovog servera (Tablica 4).

Provedene MD simulacije su rezultirale stabilnim kompleksima (Slika D1 u Dodatku). Za bolje razumijevanje obrazaca interakcija ostvarenih između ManAdDMP i aminokiselina iz proučavanih veznih mjesta, provedena je dekompozicija entalpijskog doprinosa Gibbsove energije vezanja po pojedinim aminokiselinskim ostatcima. Navedene su energije aminokiselinskih ostataka koji doprinose s najmanje $-1,36 \text{ kcal mol}^{-1}$, što odgovara promjeni konstante disocijacije za jedan red veličine.

4.2.4.1. DŽEP 1 (SWISS-MODEL STRUKTURA)

Obrasci interakcija ostvarenih između ManAdDMP i aminokiselina iz džepa 1 u oba modela (Slika 31), pokazuju da je u džepu 1 strukture dobivene SWISS-MODEL serverom ligand ostvario više interakcija (13 aminokiselina ostvaruje interakciju) u usporedbi s džepom 1 strukture dobivene I-TASSER serverom (10 aminokiselina ostvaruje interakciju). U oba kompleksa, Asp359 najviše doprinosi entalpiji vezanja, dok Lys285 doprinosi još više, ali je interakcija ostvarena samo u džepu 1 strukture NOD2 dobivene SWISS-MODEL serverom.

Osim Lys285 i Asp259, u ovom modelu redom doprinose i Ser286, Trp470, His583, Gly282 i Gly284 (Slika 31B).

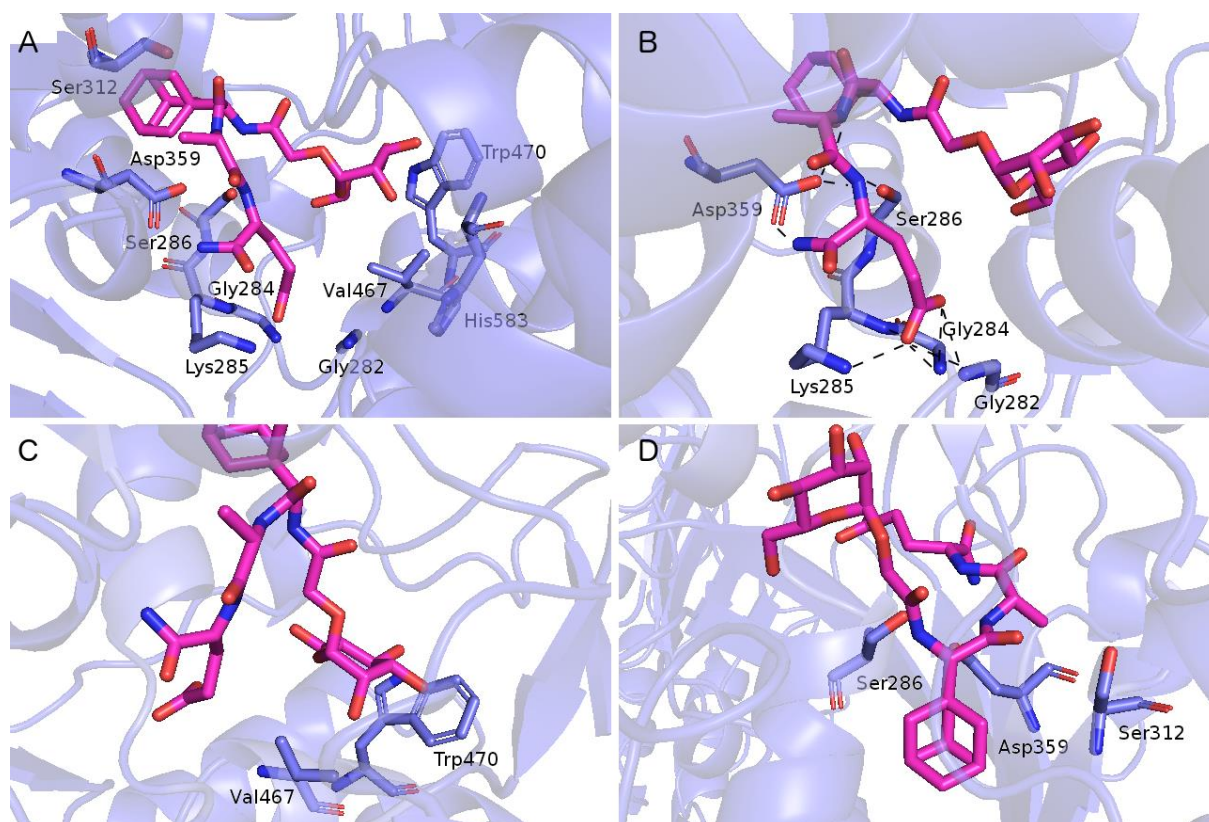


Slika 31. Dekompozicija entalpijskog doprinosa Gibbsove energije vezanja po pojedinim aminokiselinskim ostacima: a) I-TASSER struktura džepa 1 + ManAdDMP i b) SWISS-MODEL struktura džepa 1 + ManAdDMP. Prikazane su samo one aminokiseline koje doprinose entalpiji vezanja najmanje s $-1,36 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Prije komentiranja interakcija koje su ostvarene u pojedinim kompleksima, potrebno je istaknuti da su sve relevantne aminokiseline numerirane prema numeraciji koja je prikazana u *Nature Communications*¹⁹ i pohranjene u proteinskoj bazi podataka (PDB, <https://www.rcsb.org>) pod kodom 5IRN. Međutim, ova numeracija se razlikuje od numeracije aminokiselina u primarnoj sekvenci NOD2 iz kunića koja je pohranjena u UNIPROT bazi podataka (UniProtKB – G1T469, <https://www.uniprot.org/uniprot/G1T469>). Svi radovi objavljeni prije riješene kristalne strukture NOD2 iz kunića primjenjuju numeraciju prema UNIPROT bazi podataka. Kako bi se dobila UNIPROT numeracija za NOD2 iz kunića, od PDB načina numeracije i numeracije prikazane u disertaciji, potrebno je oduzeti 7.

Lys285, koji najviše doprinosi entalpiji vezanja, svojim NH dijelom amidne okosnice ostvaruje vodikove veze s karboksilatnom izoGln (prosječan kut Lys285-NH...COO-izoGln iznosi $162,3^\circ$ i prosječna duljina veze je $2,8 \text{ \AA}$) (Slika 32.A). Također, bočni ogranak Lys285

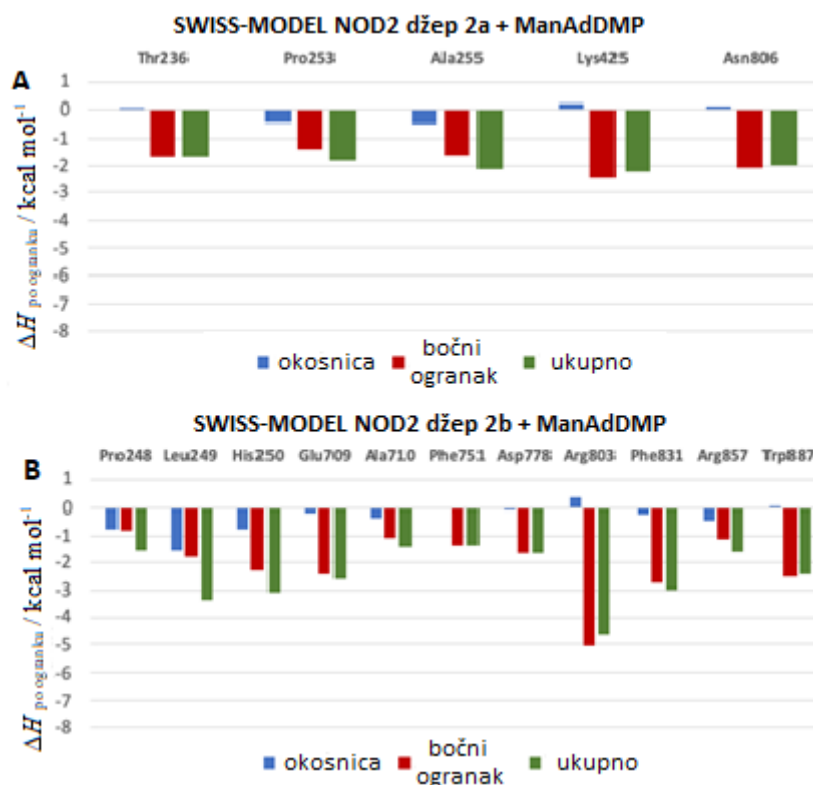
ostvaruje vodikove veze s karboksilatom izoGln i s karbonilnim kisikom bočnog ogranka izoGln (prosječan kut $\text{Lys285-N}\epsilon\text{H}_3\cdots\text{O-izoGln}$ iznosi $155,7^\circ$ i prosječna duljina veze je $2,8 \text{ \AA}$). Bočni ogranak Asp359 tvori prolaznu vodikovu vezu (povremeno se ostvaruje) s amidnom skupinom bočnog lanca izoGln i amidom okosnice Ala. Bočni ogranak Ser286 tvori vodikovu vezu s amidom okosnice AdGly (prosječan kut $\text{Ser286-O}\gamma\cdots\text{NH-AdGly}$ iznosi $152,4^\circ$ a prosječna duljina veze je $2,8 \text{ \AA}$). Trp470 ostvaruje $\text{C-H}\cdots\pi$ *stacking* hidrofobne interakcije s manozom koja ujedino ostvaruje interakciju i s bočnim ogranakom Val467. Bočni ogranak His583 povremeno ostvaruje vodikovu vezu s karboksilatom izoGln (prosječan kut $\text{His583-N}\epsilon\text{H}_3\cdots\text{COO-izoGln}$ iznosi $158,9^\circ$ i prosječna duljina veze je $2,8 \text{ \AA}$). Amidne skupine okosnica Gly282, Gly284 i Ser286 također tvore vodikove veze s karboksilatom izoGln. Adamantan ostvaruje interakciju s metilenskim skupinama Asp359, Ser286 i Ser312.



Slika 32. Obrasci interakcija ostvarenih između ManAdDMP (magenta obojen) i aminokiselina džepa 1 strukture NOD2 dobivene SWISS-MODEL serverom. a) Obrasci interakcija ostvarenih s aminokiselinama koje najviše doprinose entalpiji vezanja ManAdDMPa. b) Obrasci interakcija ostvarenih između aminokiselina džepa 1 i L-Ala-D-izoGln dijela ManAdDMPa. c) Obrasci interakcija ostvarenih između aminokiselina džepa 1 i manoze ManAdDMPa. d) Obrasci interakcija ostvarenih između aminokiselina džepa 1 i L-Ala-D-adamantanske skupine ManAdDMPa.

4.2.4.2. DŽEP 2 (SWISS-MODEL STRUKTURA)

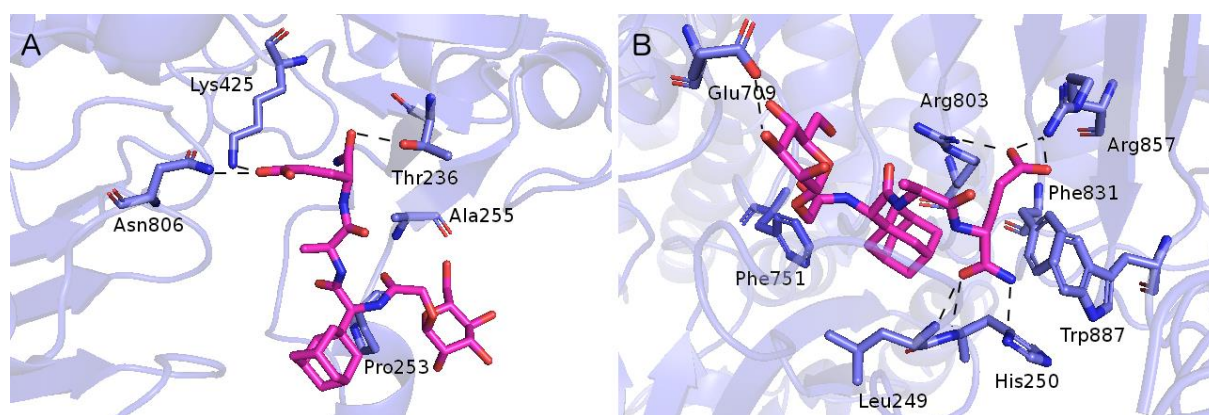
Prema dekompoziciji entalpijskog doprinosa Gibbsove energije vezanja po pojedinim aminokiselinama, džep 2a je najmanje povoljan za smještaj ManAdDMPa (Slika 33.A). Dijelovi manoze i adamantana ManAdDMPa pretežno su izloženi otapalu i samo nekoliko aminokiselina ostvaruje interakcije s ligandom (Slika 33.A). Bočni ogranak Thr236 ostvaruje interakciju s kisikom bočnog ogranka izoGln (prosječni kut Thr236-O γ H \cdots O-izoGln iznosi 158,3° i prosječna duljina veze je 2,7 Å). Pro253 ostvaruje interakciju s adamantanom, a bočni ogranak Ala255 usmjerava svoju metilnu skupinu prema peptidnoj vezi L-Ala-D-izoGln. Bočni ogranaci Lys425 (kut Lys425-N ϵ H $_3\cdots$ COO-izoGln iznosi 157,6° i prosječna duljina veze 2,8 Å) i Asn806 (kut Asn806-N δ H $_2\cdots$ COO-izoGln iznosi 160,3° i prosječna duljina veze je 2,8 Å) tvore vodikovu vezu s karboksilatnom grupom izoGln.



Slika 33. Dekompozicija entalpijskog doprinosa slobodne energije vezanja po pojedinim aminokiselinama: a) SWISS-MODEL struktura džepa 2a + ManAdDMP i b) SWISS-MODEL struktura džepa 2b + ManAdDMP. Prikazane su samo one aminokiseline koje doprinose entalpiji vezanja najmanje $-1,36 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Prema dekompoziciji entalpijskog doprinosa Gibbsove energije vezanja po pojedinim aminokiselinama, 11 aminokiselina značajno doprinose vezanju ManAdDMPa u džep 2b NOD2 strukture dobivene SWISS-MODEL serverom (Slika 33.B). Bočni ogranak Arg803 (kut

Arg803-N η_1 H $_2$...COO-izoGln iznosi 162,6° i prosječna duljina veze je 2,8 Å) te bočni ogranak Arg857 (kut Arg857-N η_2 H $_2$...COO-izoGln iznosi 155,5° i prosječna duljina veze je 2,8 Å) ostvaruju vodikovu vezu s karboksilatnom izoGln. NH skupina okosnice Leu249 ostvaruje vodikovu vezu s kisikom amidne skupine bočnog ogranka izoGln (prosječni kut Leu249-NH...O-izoGln iznosi 163,7° i prosječna duljina veze je 2,9 Å), dok bočni ogranak Leu249 ostvaruje interakcije s adamantanom (Slika 34.B). Bočni ogranak His250 tvori vodikovu vezu s amidnom skupinom bočnog ogranka izoGln (prosječan kut His250-N δ ...NH $_2$ -izoGln iznosi 164,0° i prosječna duljina veze je 2,9 Å), a okosnica His250 tvori vodikovu vezu s amidnom skupinom bočnog ogranka izoGln (prosječan kut His250-NH...O-izoGln iznosi 151,8° i prosječna duljina je 2,9 Å). Bočni ogranaci Phe831 i Trp887 tvore kavez kojim se ostvaruje amino- π interakcija s amidnom skupinom izoGln i anion- π interakcija s karboksilatnom izoGln. Bočni ogranak Glu709 ostvaruje vodikove veze s hidroksilnim skupinama manoze, C3-OH (Glu709-COO...OH-C3-manoza – prosječan kut iznosi 163,6° i prosječna duljina veze je 2,6 Å) i C4-OH (Glu709-COO...OH-C4-manoza – prosječan kut iznosi 163,2° i prosječna duljina veze je 2,6 Å). Phe751 tvori hidrofobne interakcije s adamantanom.



Slika 34. Obrasci interakcija ostvarenih između ManAdDMP (magenta obojen) i aminokiselina džepova 2a (A) i 2b (B) strukture NOD2 dobivene SWISS-MODEL serverom.

Analiza kompleksa liganda i svih potencijalnih veznih mjesta ističe džepove 1 i 2b strukture dobivene SWISS-MODEL serverom, kao najvjerojatnija vezna mjesta ManAdDMPa. U džepu 2b, ManAdDMP je petljama 2 (Glu242-Pro253) i 7 (Pro703-Met713), koje ujedino i zatvaraju ovo vezno mjesto, odvojen od otapala. Pro248, Leu249 i His250 koji pripadaju petlji 2, zajedno s Glu709 i Ala710 iz petlje 7 značajno doprinose entalpiji vezanja (Slika 33.B). Konkretnije, 2b džep je smješten na udubljenom dijelu površine LRR domene NOD2, koje se u literaturi spominje kao najvjerojatnije mjesto vezanja MDPa.²⁴ Kristalna struktura NOD2 kunića u

inaktivnom stanju (s vezanim ADPom) otkrila je hidrofobni džep na udubljenom dijelu površine LRR domene, koji je strukturno pogodan za smještanje glikanske i peptidne strukture MDPa, te je od strane autora predložen kao potencijelno mjesto vezanja. U kristalnoj stukturi se može vidjeti da Arg803, Phe831, Arg857, Trp887, Trp911, Val915 i Cys941 izgrađuju unutarnji zid džepa, dok Gly885 i Ser913 formiraju pod. Od spomenutih aminokiselina, supstitucije alaninom su pokazale da su Phe831, Arg857, Trp887, Trp911, Gly885 i Ser913 presudni za vezanje MDPa.¹⁹ U skladu s našim simulacijama, izoGln MDPa je pozicioniran između Phe831 i Trp887, dok karboksilatni dio ManAdDMPa stvara vodikove veze s Arg857. Također, analiza naših MD simulacija pokazuje da Trp911 tvori kation- π interakcije s Arg857 koje održavaju Arg857 u ispravnoj orijentaciji za ostvarivanje interakcije s karboksilatnim dijelom ManAdDMPa. Naša analiza nije utvrdila značajniju ulogu Gly885 i Ser913 u vezanju ManAdDMPa.

Površinska plazmonska rezonancija (engl. *Surface plasmon resonance*, SPR) i molekulsko pristajanje ljudske LRR domene i MDPa, istaknuli su Arg877 (Arg857 u NOD2 kunića), Trp931 (Trp111 u NOD2 kunića) i Ser933 (Ser913 u NOD2 kunića) kao najvažnije aminokiseline odgovorne za prepoznavanje fragmenata PGNa.²⁴ Maharana i suradnici su na temelju svog računalnog 3D modela, otkrili da je vezno mjesto unutar LRR domene *zebrafish* NOD2 proteina, bogato aromatskim aminokiselinama.²⁵ Molekulskim pristajanjem i MD simulacijama su pokazali da se MDP veže između 4. i 8. β -lanca LRR domene. Arg845 *zebrafish* NOD2, koji odgovara Arg857 *rabbit* NOD2, je ključan za ostvarivanje jake interakcije s MDPom i u ovom modelu. Hidrofobne aminokiseline koje izgrađuju džep su Phe819 (Phe831 u NOD2 kunića), Phe871, Trp875 (Trp887 u NOD2 kunića), Trp929 i Trp899 (Trp911 u NOD2 kunića) te su iste ujedino istaknute kao ključne za održavanje liganda u ispravnoj orijentaciji.¹⁰³

Također, naši rezultati ističu i dvije jake vodikove veze ostvarene između karboksilne skupine izoGln ManAdDMPa i dva arginina, Arg857 i Arg803, koji su i u prijašnjim radovima istaknuti kao važne aminokiseline za vezanje liganda. Osim toga, aromatske aminokiseline Phe831 i Trp887 hidrofobnog džepa tvore amino- π interakcije s amidom izoGln i anion- π interakcije s karboksilatom izoGln. Na temelju ovih rezultata, može se zaključiti da izoGln, posebno slobodna karboksilna skupina, značajno doprinosi vezanju liganda. Ovi rezultati su u skladu s opisanim biološkim aktivnostima sličnih manoziliranih DMPa, kod kojih je primjećeno

da su derivati sa slobodnom γ -COOH skupinom učinkovitiji adjuvanti od analognih γ -amidnih derivata.⁹

Gobec i suradnici su proučavali vezanje derivata DMPa s trans-ferulinskom kiselinom kao MurNAc mimetikom, u LRR domenu *rabbit* NOD2 receptora, molekulskim pristajanjem pomoću GOLD softvera. Pokazali su da Arg857 ostvaruje značajne vodikove veze s dipeptidnim i šećernim dijelom MDPa²⁶, što su Lauro i suradnici pokazali na ljudskom modelu NOD2 (Arg877, koji odgovara Arg857 u *rabbit* NOD2), ostvaruje kritične interakcije s 2'-*N*-acilnom skupinom šećera i s dipeptidnim dijelom MDPa).²⁴ Također, pokazano je da uklanjanje acilne skupine s C-2 položaja MurNAc komponente MDPa destabilizira NOD2 i rezultira prekidanjem NF- κ B signalnog puta, dok zamijena acilne skupine glikolnom dodatno aktivira NF- κ B signalni put.^{38,156}

U našem istraživanju, manoza ostvaruje dvije vodikove veze, između C3-OH i C4-OH i bočnog ogranka Glu709 koji je dio modelirane petlje 7 koja se nalazi u HD2 poddomeni NOD2. Ovim interakcijama je zapravo ostvarena komunikacija između NOD i LRR domene receptora, koja je dodatno potpomognuta interakcijom adamantana s bočnim ogrankom Leu249 (smještenom u petlji 2 NBD poddomene) i Phe751 LRR domene (Slika 33.B). Bočni ogranak Leu249 doprinosi entalpiji vezanja NOD2 u istoj mjeri kao i njegova okosnica, koja ostvaruje vodikovu vezu s bočnim ogrankom izoGln. Ovi rezultati upućuju na to da je adamantanska struktura liganda važna za vezanje na NOD2, što je u skladu s literaturnim podacima u kojima adamantan kao lipofilna komponenta derivata DMPa, značajno doprinosi pojačavanju adjuvantske aktivnosti.^{6,9}

Zanimljivo je naglasiti da amidna skupina izoGln dodatno tvori vodikovu vezu s okosnicom His250. Leu249 i His250 su smješteni unutar NBD domene i izgrađuju petlju 2.

Zaključno, u ovom džepu je uočeno nekoliko interakcija između ManAdDMPa kao liganda i NOD2 receptora. Iako dipeptid, posebno izoGln, značajno sudjeluje u vezanju liganda u džep 2b, manoza također doprinosi vezanju. Bočni ogranak Arg803 najviše doprinosi entalpiji vezanja na način da ostvaruje jake vodikove veze s izoGln. Peptidni dio liganda ostvaruje interakcije s aminokiselinama LRR domene te dodatno s aminokiselinama NBD poddomene iz NOD domene proteina, a manoza tvori interakcije s aminokiselinama iz HD2 poddomene. Bitno je istaknuti da ManAdDMP ostvaruje interakcije s aminokiselinama petlje 2 (E242-P253), koje se nalaze u NBD domeni, i aminokiselinama petlje 7 (P703-M713) koje su smještene unutar HD2 poddomene što ukazuje na važnost petlji 2 i 7 u prepoznavanju liganda od strane NOD2.

Poznato je da interakcije nekoliko proteinskih domena, uključujući i NOD poddomene, posreduju u konformacijskim promjenama koje su neophodne za aktivaciju NOD2, a uzrokovane su vezanjem liganda.¹⁵⁷

Na temelju rezultata dobivenih slijepim pristajanjem i činjenice da je mjesto vezanja ADP/ATPa, džep 1 smo također proučili kao potencijalno mjesto vezanja ManAdDMPa.¹⁵⁸ Iako glavnina novijih radova opisuje LRR domenu kao mjesto vezanja MDPa, džep 1 koji se nalazi unutar NOD domene je također razmotren, ponajviše zato što vezanje MDPa na NOD2 još nije potpuno objašnjeno, niti eksperimentalno potvrđeno. NOD2 je relativno nestabilan protein, posebno njegovi mutanti koji su povezani s Chronovom bolešću.¹⁵⁹ Osim toga, prethodna istraživanja su pokazala da prepoznavanje specifičnog liganda pomoću LRR domene nije uobičajena karakteristika svih NOD-receptora (NLR skupina proteina). Kristalna struktura LRR domene ljudskog NLRP1 receptora, kojemu je MDP također ligand, nije „smjestila“ MDP unutar proučavane LRR domene. U slučaju ovog receptora, vezno mjesto MDPa je NBD domena.¹⁶⁰ Njihovi zaključci su u skladu s drugim istraživanjima, koja također navode NBD domenu kao adekvatnu za vezanje MDPa.^{31,157}

Obrasci interakcija ostvarenih između ManAdDMPa i džepa 1 *rabbit* NOD2, dobiveni su analizom oba modela (SWISS-MODEL i I-TASSER), te su u oba slučaja ostvarene složene interakcije između ManAdDMPa i NOD poddomene. Asp359 najviše doprinosi entalpiji vezanja na način da tvori prolazne interakcije, u obliku vodikovih veza, s amidnom skupinom izoGln te s amidnom skupinom okosnice L-Ala i D-izoGln. U SWISS-MODEL strukturi, Lys285 još više doprinosi entalpiji vezanja zbog ostvarenih jakih vodikovih veza s izoGln. Osim Lys285, karboksilat izoGln ostvaruje vodikove veze s Gly282, Gly284, Ser286, a povremeno i s His583 iz WHD poddomene. Susjedni Ser286 ostvaruje vodikovu vezu s amidnom skupinom okosnice AdGly te s metilenskim skupinama Asp359 i Ser286.

Maharana i suradnici su kombinacijom *in silico* metoda, metoda modeliranja, molekuskog pristajanja i molekulske dinamike, opisali mehanizam vezanja ATPa unutar NOD domene *zebrafish* (lat. *Danio rerio*) NOD2. U ovom modelu, evolucijski očuvani His579 (koji odgovara His583 u *rabbit* NOD2) i Asp357 (Asp359 u *rabbit* modelu NOD2) ostvaruju jake elektrostatske interakcije s adeninskim dijelom molekule ATPa. Osim ovih, kao ključne aminokiseline u vezanju ATP-a se ističu i Trp468 (Trp470 u *rabbit* modelu NOD2), koji ostvaruje interakciju s adeninskim dijelom i ima važnu ulogu u održavanju snažne hidrofobne veze s ATPom. Zatim Lys283 (Lys285 *rabbit* modela NOD2), Pro464 (Pro466 *rabbit* modela

NOD2) i His579 (His583 *rabbit* modela NOD2).²⁵ Važnost ovih aminokiselina dodatno je potvrđena istraživanjem mutageneze NOD domene ljudskog NOD2 proteina. Također su izdvojeni Lys305 (Lys285 *rabbit* modela NOD2), Asp379 (Asp359 *rabbit* modela NOD2) te Pro486 (Pro466 *rabbit* modela NOD2) kao aminokiseline koje su neophodne za aktivaciju NOD2.³² Još jedno istraživanje mutageneze NOD2 je pokazalo da mutacija Lys305Arg u ljudskom NOD2, onemogućava aktivaciju NOD2 te navodi Lys305 (Lys285 u *rabbit* modelu NOD2) kao aminokiselinu koja je neophodna za aktivaciju NOD2.¹⁶¹

U kristalnoj strukturi *rabbit* modela NOD2 u ADP-veznom obliku¹⁹, aminokiseline Walker A motiva (Gly284, Lys285 i Ser286) i njegova okolina, tvore pet vodikovih veza s β -fosfatom i dvije s α -fosfatom. Ser286 i Trp470 su važni za vezanje i fosfatnog dijela i adenzina. Mutagenezom je pokazano da je mutacija Trp490Leu izrazito destabilizirajuća.¹⁵ U našem modelu, Trp470, koji je pozicioniran u HD1 poddomeni, je također važna aminokiselina koja značajno doprinosi entalpiji vezanja putem CH- π interakcija između manoze ManAdDMPa i Trp470. Analiza interakcija šećer-aromatski spoj u proteinima, pokazala je da Trp, od svih aromatskih aminokiselina, u najvećoj mjeri doprinosi CH- π interakciji.¹⁶²

Na temelju ovih rezultata može se istaknuti da Lys285 pokazuje najveći doprinos entalpiji vezanja na način da ostvaruje snažnu vodikovu vezu s izoGln dijelom ManAdDMP. Lys285 je i literaturno naveden kao aminokiselina koja ima važnu ulogu u aktivaciji NOD2. Drugi najveći doprinos entalpiji vezanja daje Asp359, koji je također literaturno istaknut kao važna aminokiselina odgovorna za aktivaciju NOD2. Asp359 tvori vodikove veze s amidnom skupinom izoGln i amidnim skupinama okosnice L-Ala i D-izoGln, dok u kompleksu NOD2-ADP/ATP ostvaruje interakciju s adeninom. Obje aminokiseline (Lys285 i Asp359) su smještene unutar NBD poddomene.

Petlje, koje smo *ab initio* modelirali, slabije doprinose vezanju liganda u ovom veznom mjestu, džepu 1. Samo Gln569 ostvaruje izravnu interakciju s ManAdDMP, i to u modelu dobivenom I-TASSER serverom. U SWISS-MODEL strukturi NOD2 nema izravnih interakcija između aminokiselina petlje i liganda. Međutim, SWISS-MODEL struktura kompleksa zapravo pokazuje bogatiji obrazac interakcija i bez interakcija s modeliranim petljama, što upućuje na to da konformacija petlje može imati neizravan, ali bitan utjecaj na postizanje optimalne arhitekture aminokiselina koje čine mjesto vezanja, a time i na pravilan smještaj liganda. Općenito, ligandi koji imaju određenu mogućnost vezanja u NOD domenu

NOD2, mogu potencijalno utjecati i na hidrolizu ATPa, a time i na regulaciju NOD2 signalnog puta.

4.2.5. Molekulsko-dinamičke simulacije s manoziliranim desmuramil-peptidima 26 i 28

Osim proučavanja interakcija kompleksa NOD2 s ManAdDMP, u okviru ovog rada opisane su i interakcije NOD2 receptora s novosintetiziranim manoziliranim derivatima desmuramil-tripeptida kojima je kao adamantanska podjedinica uvedena akiralna 2-aminoadamantan-2-karboksilna kiselina. Prije provođenja MD simulacija, provedeno je slijepo pristajanje i analiza veznih džepova na proteinu pomoću GHECOM servera. I u slučaju novopripremljenih liganada, slijepo pristajanje je otkrilo dva glavna džepa, jedan unutar NBD domene i drugi unutar LRR domene koji je podijeljen na dva pod-džepa (Slika 30).

Zatim je provedeno molekulsko pristajanje spojeva **26** i **28** u džepu 1 i pod-džepovima 2a i 2b u modelu dobivenom SWISS-MODEL serverom jer se petlja 2 u džepu 2 ove strukture nalazi u zatvorenoj konformaciji (Slika 29) i zapravo tvori spomenuta dva pod-džepa. Osim toga, petlje 1 i 5 (Slika 29) koje izgrađuju džep 1, također se nalaze u zatvorenoj konformaciji u strukturi dobivenoj I-TASSER serverom te smo se, kao i u slučaju ManAdDMPa, odlučili pripremiti dodatne komplekse u džepu 1 pomoću ovog servera (Tablica 4).

Provedene MD simulacije su rezultirale stabilnim kompleksima. Za bolje razumijevanje obrazaca interakcija ostvarenih između liganada i aminokiselina iz proučavanih veznih mjesta, u ovim kompleksima nije provedena dekompozicija entalpijskog doprinosa Gibbsove energije vezanja po pojedinim aminokiselinskim ostatcima, već su prikazane vodikove veze i općenito sve interakcije koje se pojavljuju u kompleksu čiji je vremenski doprinos tijekom trajanja simulacije od 100 ns 10 % i veći (dakle traju barem 10 ns). Time su ova istraživanja preliminarna i planirani su dodatni računalni eksperimenti i detaljnija analiza kako bi se potvrdili ovdje prikazani rezultati.

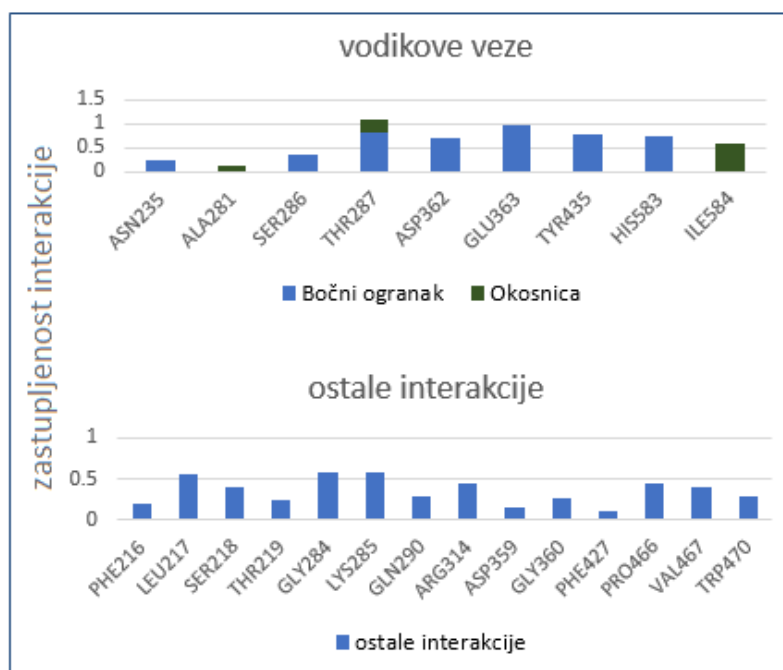
4.3.7.1. MD simulacije kompleksa NOD2 i liganada 26 i 28 u džepu 1

Kao i u slučaju numeriranja aminokiselina u kompleksima NOD2 s ManAdDMP, sve relevantne aminokiseline u kompleksima s ligandima **26** i **28**, numerirane su prema načinu koji je prikazan u *Nature Communications*¹⁹ i pohranjene u proteinskoj bazi podataka (PDB,

<https://www.rcsb.org>) pod kodom 5IRN. Kako bi se dobila UNIPROT numeracija za NOD2 iz kunića, od PDB načina numeracije i numeracije prikazane u disertaciji, potrebno je oduzeti 7.

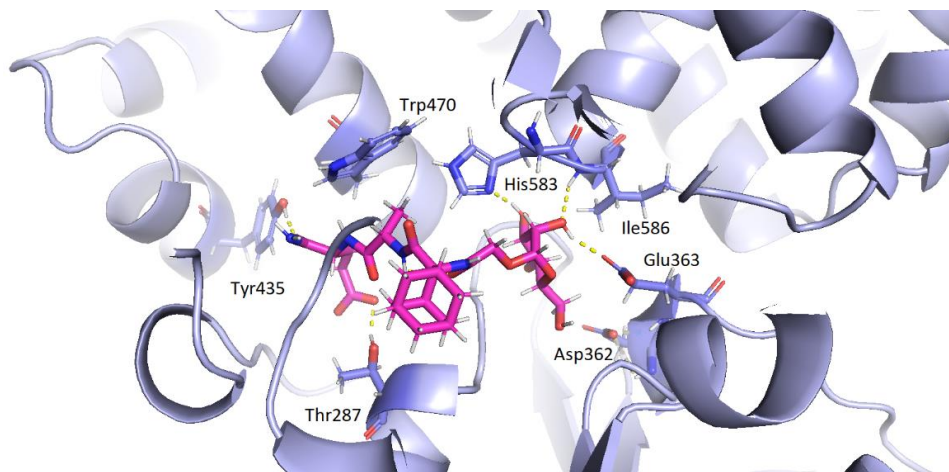
Obrasci interakcija ostvarenih između liganda **26** i aminokiselina iz džepa 1 u oba modela (Slike 36 i 38), pokazuju podjednak broj ostvarenih vodikovih veza i ostalih interakcija. U strukturi dobivenoj SWISS-MODEL serverom, Thr287 i Glu363 najviše doprinose vezanju liganda preko ostvarenih vodikovih veza, nakon čega slijede Tyr435, His583, Asp362 i Ile584. U strukturi dobivenoj I-TASSER serverom, ligand ostvaruje najjače vodikove veze s Tyr435 i Asp359, nakon čega slijede Thr287, Thr233, Arg314 i Glu580.

U kompleksu NOD2 i **26** dobivenom SWISS-MODEL serverom, Thr287 najviše doprinosi vezanju liganda na način da ostvaruje vodikovu vezu s karboksilnom skupinom izoGln (Slike 35 i 36). Bočni ogranci Glu363, Asp362 i His583 te okosnice Ile586 i Ala281 ostvaruju vodikove veze s manozom. Bočni ogranak Tyr435 tvori vodikovu vezu s amidnom skupinom bočnog ogranka izoGln. Ser286 i Asn235 također tvore vodikove veze s izoGln. Adamantan ostvaruje interakcije s Gln290, Thr219 te okosnicom Ser218, Phe216 i Leu217. Manoza još ostvaruje interakcije s Asp359, Gly360, Arg314, okosnicom Gly284, Val467 i Lys285. IzoGln još tvori interakcije s Pro466 i Phe427. U ovom kompleksu, Trp470 ostvaruje interakcije s dipeptidnim dijelom molekule, konkretnije s bočnim ogrankom Ala i amidnom skupinom bočnog ogranka izoGln.



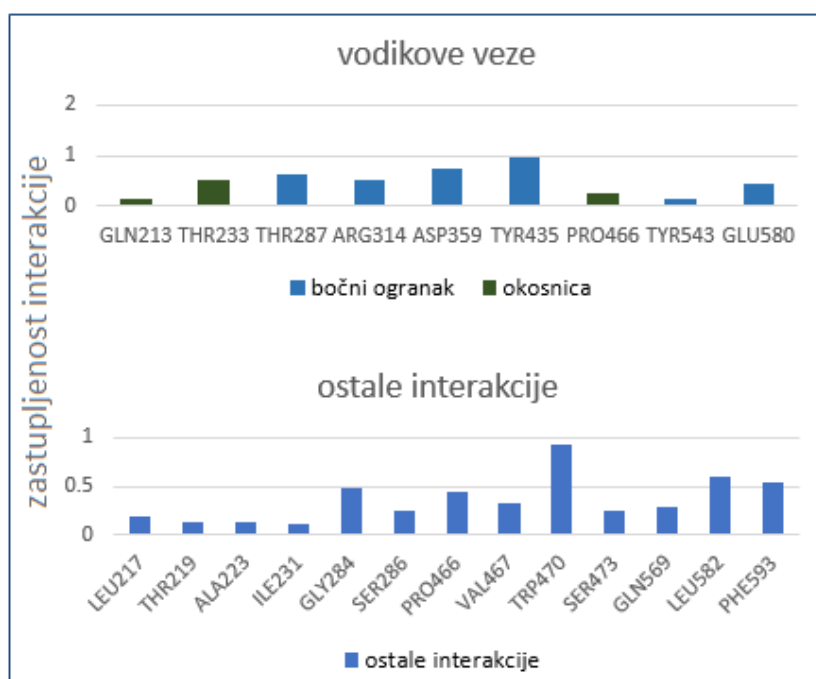
Slika 35. Vodikove veze i općenito sve interakcije koje se ostvaruju između liganda **26** i aminokiselina džepa 1 strukture NOD2 dobivene SWISS-MODEL serverom, a koje se

pojavljuju u barem 10 % ili više vremena tijekom simulacije od 100 ns. One aminokiseline koje sudjeluju u interakcijama i s bočnim ogrankom i s peptidnom okosnicom mogu imati zastupljenost preko 1.

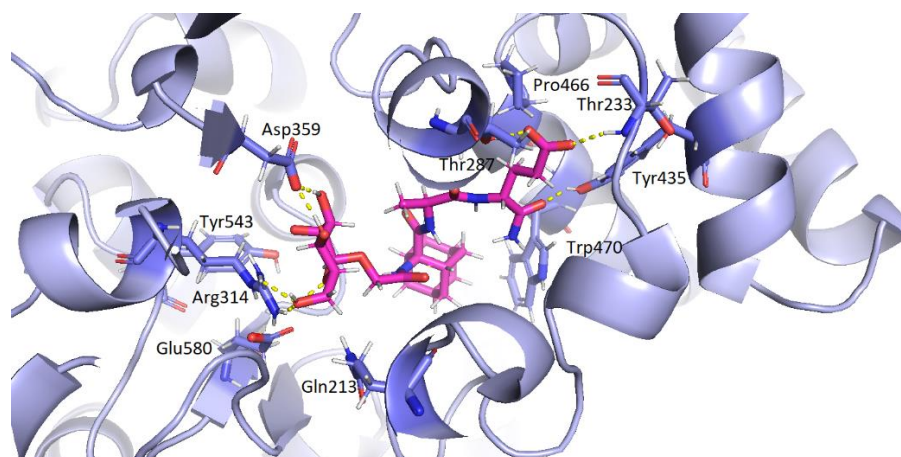


Slika 36. Obrasci interakcija ostvarenih između liganda **26** (magenta obojen) i aminokiselina džepa 1 strukture NOD2 dobivene SWISS-MODEL serverom.

U I-TASSER modelu kompleksa NOD2 i liganda **26**, najveći doprinos vezanju liganda imaju Tyr435 koji tvori vodikovu vezu s bočnim ogrankom izoGln, i Asp359 koji ostvaruje vodikovu vezu s manozom (Slike 37 i 38). Manozu još tvore vodikove veze s Glu580, Gln213, Arg314 i Tyr543 te ostvaruje interakcije sa Ser286, Leu217 i metilenskom skupinom Gln569. Ala tvori interakcije s Val467. Adamantan ostvaruje CH- π interakcije s Trp470, te interakcije s Leu582, Ala223, Thr219 i Val467. Amidna okosnica 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline ostvaruje interakciju s Thr212. Karboksilat izoGln tvori vodikove veze s Thr233 i Thr287. IzoGln još tvori vodikovu vezu s Pro466 te ostvaruje interakcije s Ile231, Ser473 i Gly284.



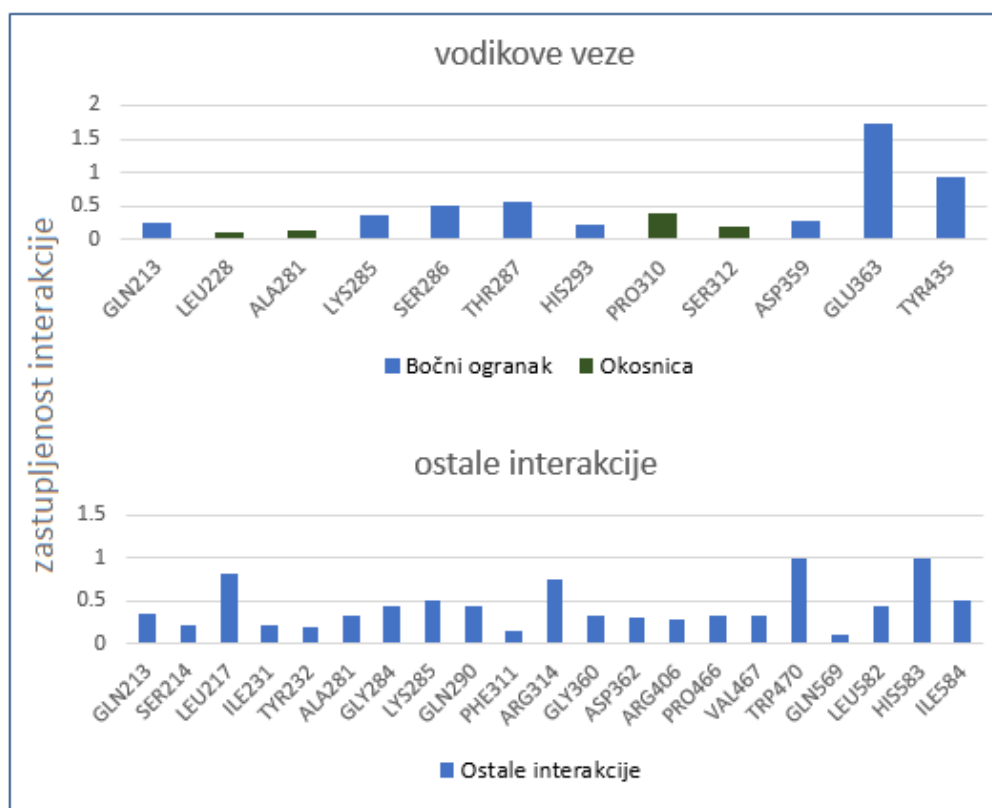
Slika 37. Vodikove veze i općenito sve interakcije koje se ostvaruju između liganda **26** i aminokiselina džepa 1 strukture NOD2 dobivene I-TASSER serverom, a koje se pojavljuju u barem 10 % ili više vremena tijekom simulacije od 100 ns. One aminokiseline koje sudjeluju u interakcijama i s bočnim ogranakom i s peptidnom okosnicom mogu imati zastupljenost preko 1.



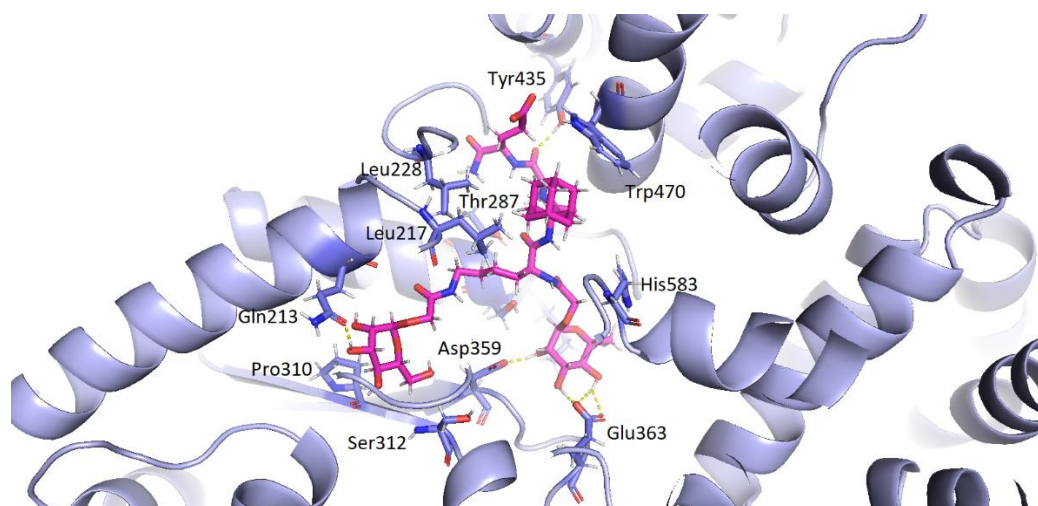
Slika 38. Obrasci interakcija ostvarenih između liganda **26** (magenta obojen) i aminokiselina džepa 1 strukture NOD2 dobivene I-TASSER serverom.

U kompleksu NOD2 i **28** dobivenom SWISS-MODEL serverom, Glu363 i Tyr435 najviše doprinose vezanju liganda na način da ostvaruju vodikove veze s manozom koja je bliža adamantanskoj aminokiselini (vodikova veza s Glu363) i okosnicom L-Ala (vodikova veza s Tyr435) (Slike 39 i 40). L-Ala još ostvaruje interakcije s Gly284 i Pro466. Manoza bliža

adamantanskoj aminokiselini još ostvaruje vodikove veze s Lys285, Asp359, Ala281 i Ser286 te ostale interakcije s Gly360, Asp362, Ile584, Arg314 i Arg406. L-Lys tvori vodikovu vezu s Thr287 te ostvaruje dodatne interakcije s Gln290 i Leu217. Adamantan ostvaruje CH- π interakcije s Trp470 (unutar 3Å udaljenosti), te interakcije s Leu582 i Val467. Manozna udaljenija od tripeptida tvori vodikove veze s Ser312, His293, Pro310 i Gln213 te dodatne interakcije s okosnicom Phe311, Ser241 i Gln569. IzoGln tvori vodikovu vezu s Leu228 i dodatno interakcije s Gln290 i Tyr232. Karboksilat izoGln ostvaruje interakcije s Trp470 i Ile231.

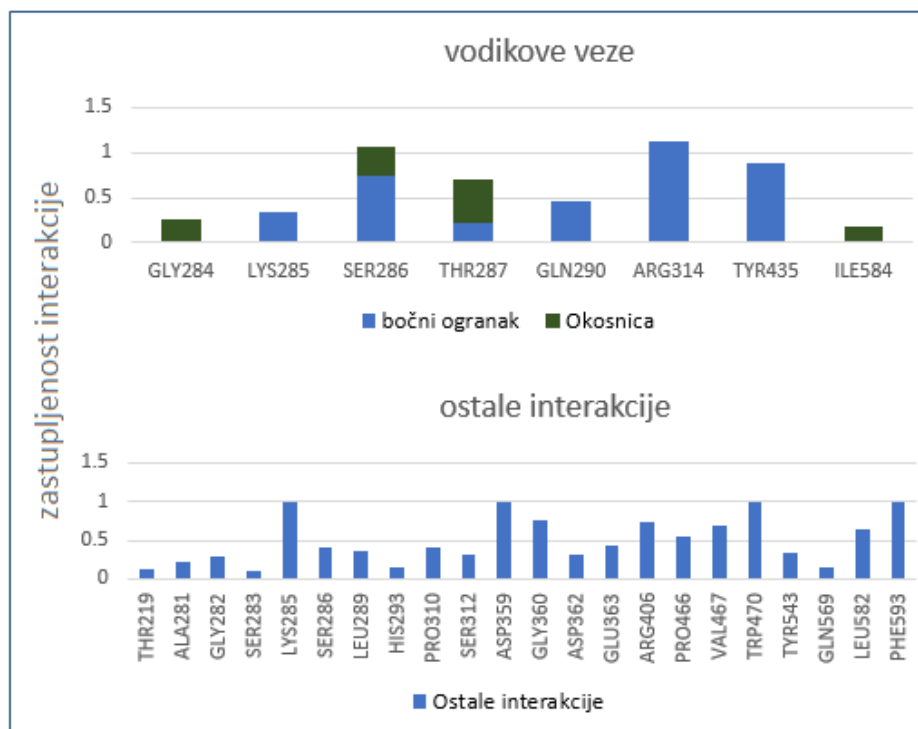


Slika 39. Vodikove veze i općenito sve interakcije koje se ostvaruju između liganda **28** i aminokiselina džepa 1 strukture NOD2 dobivene SWISS-MODEL serverom, a koje se pojavljuju u barem 10 % ili više vremena tijekom simulacije od 100 ns. One aminokiseline koje sudjeluju u interakcijama i s bočnim ogranakom i s peptidnom okosnicom mogu imati zastupljenost preko 1.

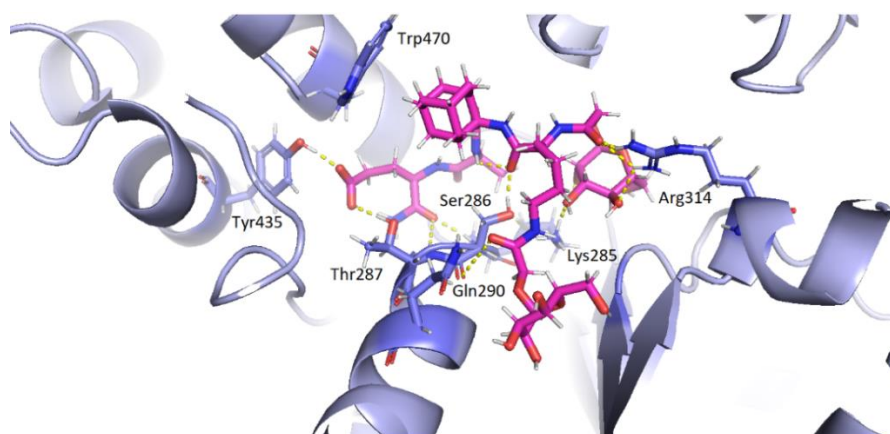


Slika 40. Obrasci interakcija ostvarenih između liganda **28** (magenta obojen) i aminokiselina džepa 1 strukture NOD2 dobivene SWISS-MODEL serverom.

U I-TASSER modelu kompleksa NOD2 i liganda **28**, najveći doprinos vezanju liganda imaju Arg314 koji tvori vodikovu vezu s glikolnom poveznicom manoze koja je bliže adamantanskoj aminokiselini, Ser286 koji ostvaruje vodikovu vezu s L-Lys i karbonilnom skupinom bočnog ogranka izoGln i Tyr435 koji tvori vodikovu vezu s karboksilatom izoGln (Slike 41 i 42). Karboksilat izoGln tvori i vodikovu vezu s Thr287. IzoGln još tvori vodikovu vezu s Gly284 te ostvaruje interakcije s Pro466. Adamantan ostvaruje CH- π interakcije s Trp470, te interakcije s Thr219 i Val467. L-Ala ostvaruje interakcije i sa Ser283, Gly282 i Ser286. Manoja bliža adamantanskoj aminokiselini tvori vodikove veze s Ile584 i Lys285 te dodatne interakcije s Gly360, Glu363, Ser312, Asp359, Asp362 i Arg406. Manoja udaljenija od adamantanske aminokiseline ostvaruje vodikovu vezu s Gln290 i dodatne interakcije s Gln569, Asp359, His293, Pro310 i Leu289. L-Lys ostvaruje i interakcije s Leu582.



Slika 41. Vodikove veze i općenito sve interakcije koje se ostvaruju između liganda **28** i aminokiselina džepa 1 strukture NOD2 dobivene I-TASSER serverom, a koje se pojavljuju u barem 10 % ili više vremena tijekom simulacije od 100 ns. One aminokiseline koje sudjeluju u interakcijama i s bočnim ogranakom i s peptidnom okosnicom mogu imati zastupljenost preko 1.



Slika 42. Obrasci interakcija ostvarenih između liganda **28** (magenta obojen) i aminokiselina džepa 1 strukture NOD2 dobivene I-TASSER serverom.

Na temelju prikazanih rezultata, džep 1, odnosno šupljina koja je ujedino i vezno mjesto ADP/ATP-a, može dobro smjestiti spojeve **26** i **28**, obzirom da su svi kompleksi dobiveni pomoću SWISS-MODEL i I-TASSER servera pokazali velik broj interakcija između proteina i liganda. Očekivano, ligand **28**, koji ima dodatnu molekulu manoze vezanu pomoću L-Lys i

dodatne glikolne poveznice, ostvaruje veći broj interakcija u oba prikazana kompleksa u odnosu na spoj **26**.

Kompleksi liganda **26** i NOD2 u džepu 1 u oba modela ostvaruju podjednak broj interakcija, ali se razlikuju obrasci vodikovih veza i ostalih interakcija. U kompleksu NOD2 i **26** dobivenom SWISS-MODEL serverom, Thr287 najviše doprinosi vezanju liganda na način da ostvaruje vodikovu vezu s karboksilnom skupinom izoGln (Slike 35 i 36), dok u modelu dobivenom I-TASSER serverom, najveći doprinos vezanju liganda imaju Tyr435 koji tvori vodikovu vezu s bočnim ogrankom izoGln, i Asp359 koji ostvaruje vodikovu vezu s manozom (Slike 37 i 38).

Ukoliko se uspoređuju prethodno opisani modeli kompleksa ManAdDMPa s NOD2 i ovdje opisani modeli spoja **26** s NOD2, svima su zajedničke značajne interakcije ligandada s Trp470 i Gly284 NOD2. Modelima dobivenim SWISS-MODEL serverom, dodatno su zajedničke značajne interakcije s His583, Ser286, Gly284, Arg314 i Val467, dok je modelima dobivenim I-TASSER serverom zajednička interakcija s Asp359. Značajnije usporedbe vezanja pojedinih liganda moći će se prikazati kada se i u ovim kompleksima provede dekompozicija entalpijskog doprinosa slobodne energije vezanja po pojedinim aminokiselinskim ostacima.

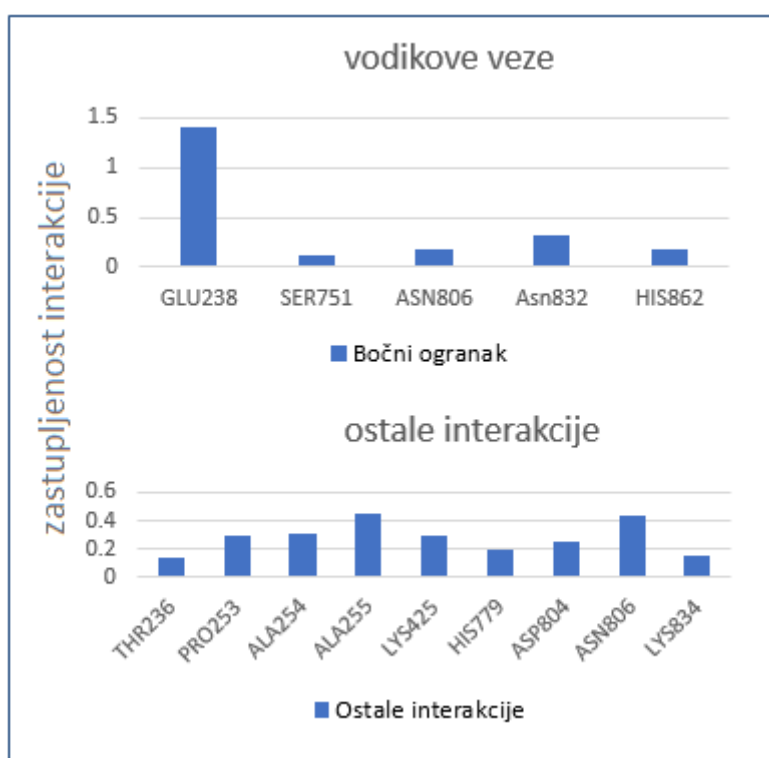
U modelu kompleksa liganda **28** i NOD2 dobivenog SWISS-MODEL serverom, ostvareno je nešto više interakcija (tri interakcije više) u usporedbi s modelom dobivenim I-TASSER serverom. Također se razlikuju obrasci interakcija, ali zajedničko im je da u oba modela, Trp470 ostvaruje jaku interakciju s adamantanskom skupinom te u oba slučaja Ser286, Tyr435 i Thr287 ostvaruju značajne vodikove veze s ligandom.

Usporedbom s literaturno opisanim modelima kompleksa NOD2 i ADP/ATPa te modelom u kojem je ManAdDMP vezan na NOD2, i u ovim kompleksima se ostvaruju interakcije s Trp470, Pro466, Asp359, Ser286, Gly284, Lys285 (osim u slučaju kompleksa **26** i NOD2 dobivenog I-TASSER serverom), a kod modela dobivenih SWISS-MODEL serverom, ostvaruju se i interakcije s evolucijski očuvanim His583. Izdvojene aminokiseline su literaturno opisane kao važne u kontekstu ostvarivanja jakih interakcija s ATPom unutar NOD domene NOD2 i općenito za aktivaciju NOD2.^{19,25}

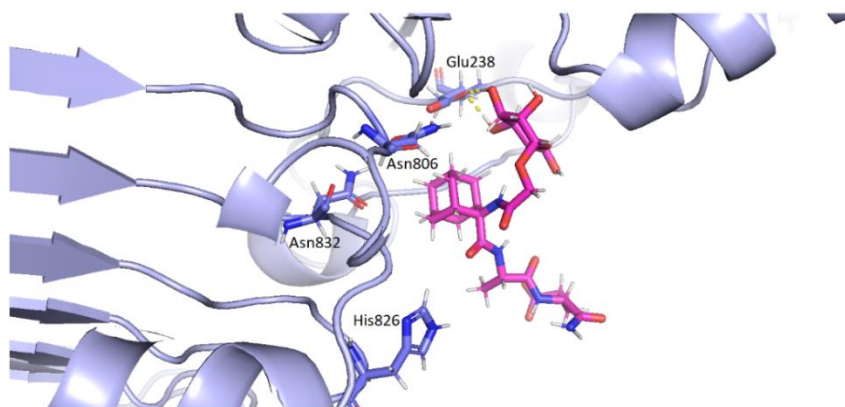
U svakom od modela postoji određena, a prema jakosti interakcija manje značajna, interakcija s uvedenim petljama. U kompleksima NOD2 sa spojem **26** to su interakcije s Thr219 i Ser218 u strukturi dobivenoj SWISS-MODEL serverom, te interakcije s Gln569, Thr219 i Ala223 u I-TASSER strukturi. U modelima NOD2 i liganda **28**, ostvarene su interakcije s Gln569 (SWISS-MODEL struktura) i Gln569 i Thr219 (I-TASSER struktura).

4.3.7.2. MD simulacije kompleksa NOD2 i liganada 26 i 28 u džepu 2a

U kompleksu 2a džepa NOD2 i **26** dobivenom SWISS-MODEL serverom, Glu238 najviše doprinosi vezanju liganda na način da ostvaruje vodikove veze s manozom (Slike 43 i 44). Manoza također ostvaruje znatno slabiju vodikovu vezu s Asn806 te dodatne interakcije s Thr236, Lys834, Ala255, His779 i Lys425. Adamantan ostvaruje interakcije s Asn832, Ala254 i Pro253. Peptidni dio molekule ostvaruje slabu vodikovu vezu s His862.

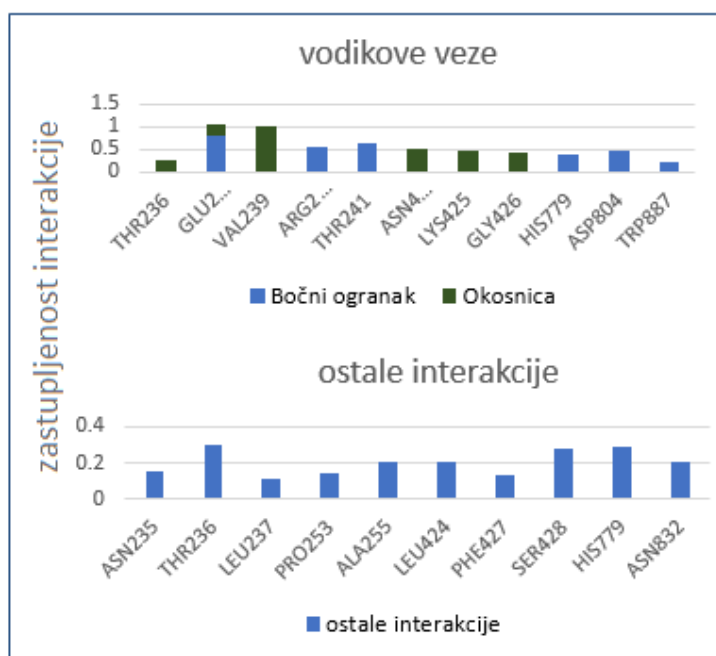


Slika 43. Vodikove veze i općenito sve interakcije koje se ostvaruju između liganda **26** i aminokiselina džepa 2a strukture NOD2 dobivene SWISS-MODEL serverom, a koje se pojavljuju u barem 10 % ili više vremena tijekom simulacije od 100 ns. One aminokiseline koje sudjeluju u interakcijama i s bočnim ogrankom i s peptidnom okosnicom mogu imati zastupljenost preko 1.



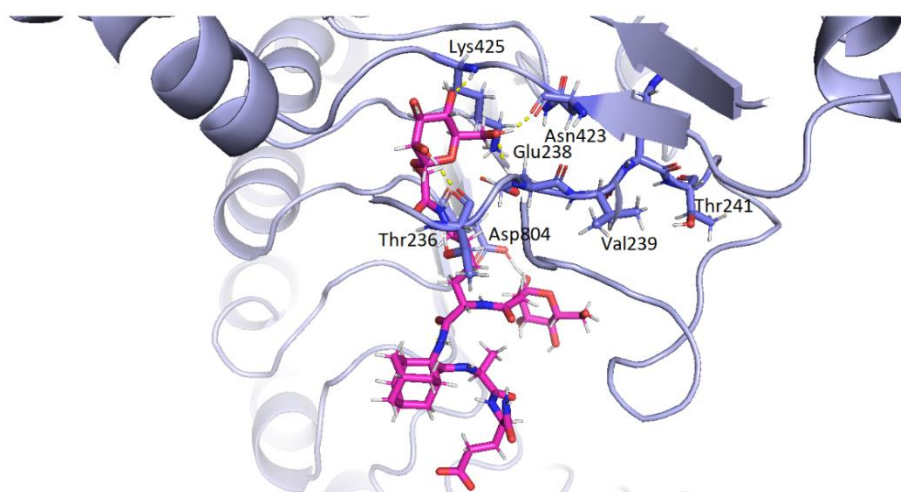
Slika 44. Obrasci interakcija ostvarenih između liganda **26** (magenta obojen) i aminokiselina džepa 2a strukture NOD2 dobivene SWISS-MODEL serverom.

U kompleksu 2a džepa NOD2 i **28** dobivenom SWISS-MODEL serverom, Glu238 i Val239 najviše doprinose vezanju liganda na način da ostvaruju vodikove veze s manozom udaljenijom od 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline koja ostvaruje dodatne vodikove veze s Asn423, Lys425, Thr241 i Gly426 te interakcije s Leu237, Asn235, Leu424, Ser428 i Phe427 (Slike 45 i 46). Manoza koja je strukturno bliža adamantanskoj aminokiselini tvori vodikove veze s Asp804, Trp887 i His779 te dodatne interakcije s Asn832 i Pro253. L-Lys ostvaruje interakcije s His779 i Ala255. Ligand još tvori prolazne vodikove veze s Arg240 i Thr241.



Slika 45. Vodikove veze i općenito sve interakcije koje se ostvaruju između liganda **28** i aminokiselina džepa 2a strukture NOD2 dobivene SWISS-MODEL serverom, a koje se pojavljuju u barem 10 % ili više vremena tijekom simulacije od 100 ns. One aminokiseline koje

sudjeluju u interakcijama i s bočnim ogrankom i s peptidnom okosnicom mogu imati zastupljenost preko 1.



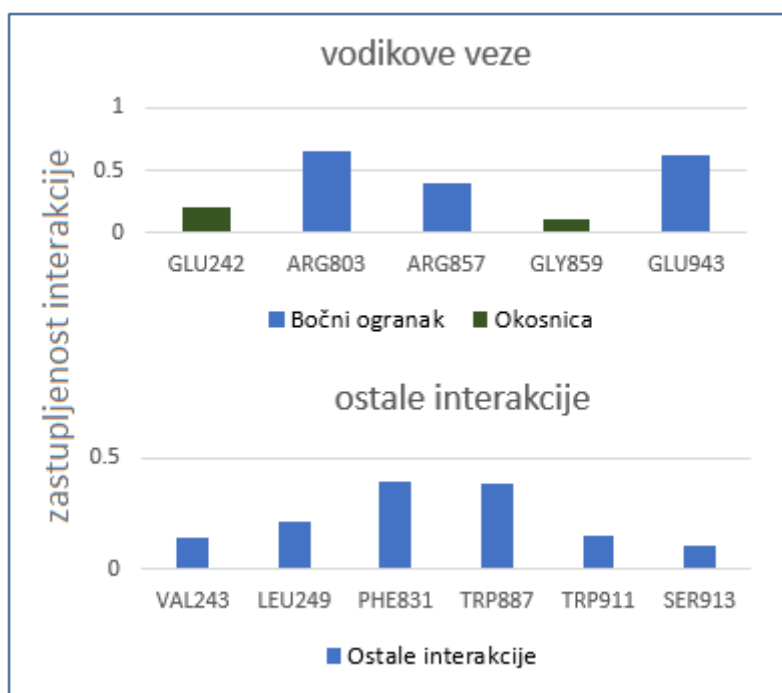
Slika 46. Obrasci interakcija ostvarenih između liganda **28** (magenta obojen) i aminokiselina džepa 2a strukture NOD2 dobivene SWISS-MODEL serverom.

Usporedbom prikazanih kompleksa, ligand **28** očekivano ostvaruje veći broj interakcija s proteinom. Aminokiseline koje karakteriziraju ovaj džep i s kojima oba liganda ostvaruju interakcije su Glu238, Asp804, His779, Thr236, Asn832, Lys425, Ala255 i Pro253. MD simulacije kompleksa ManAdDMPa i NOD2 pokazale su da je ovaj džep najmanje povoljan za smještanje liganda. I u slučaju ova dva kompleksa, veliki dijelovi molekule su izloženi otapalu. Kod liganda **26** dipeptidni dio molekule je izložen otapalu (Slika 44), dok su kod spoja **28** dipeptidni dio i dijelovi 2-aminoadamantan-2-karboksilne kiseline pretežno izloženi otapalu (Slika 46), na temelju čega bi se moglo pretpostaviti da je džep 2a najmanje povoljan za smještanje ove vrste derivata DMP-a. Oba liganda ostvaruju interakciju s Pro253 koji pripada modeliranoj petlji 2.

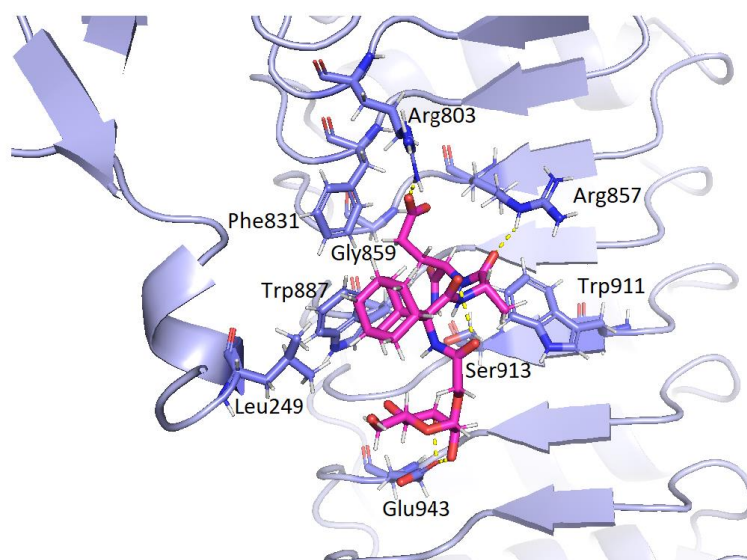
4.3.7.3. MD simulacije kompleksa NOD2 i liganada 26 i 28 u džepu 2b

U kompleksu spoja **26** i džepa 2b proteina NOD2 vezanju liganda najviše doprinose Arg803, Glu943 i Arg857 na način da ostvaruju vodikove veze s karboksilnom skupinom izoGln (Arg803), karbonilnom skupinom okosnice L-Ala (Arg857) i manozom (Glu943). Manoza još tvori vodikovu vezu s Glu242. Trp911 ostvaruje interakcije s L-Ala. 2-Aminoadamantan-2-karboksilna kiselina i L-Ala ostvaruju interakciju s Leu249, adamantan dodatno ostvaruje

interakciju s Trp887. IzoGln još ostvaruje interakcije s Phe831, Ser913 te tvori vodikovu vezu s Gly859. Interakcije su prikazane na Slikama 47 i 48.

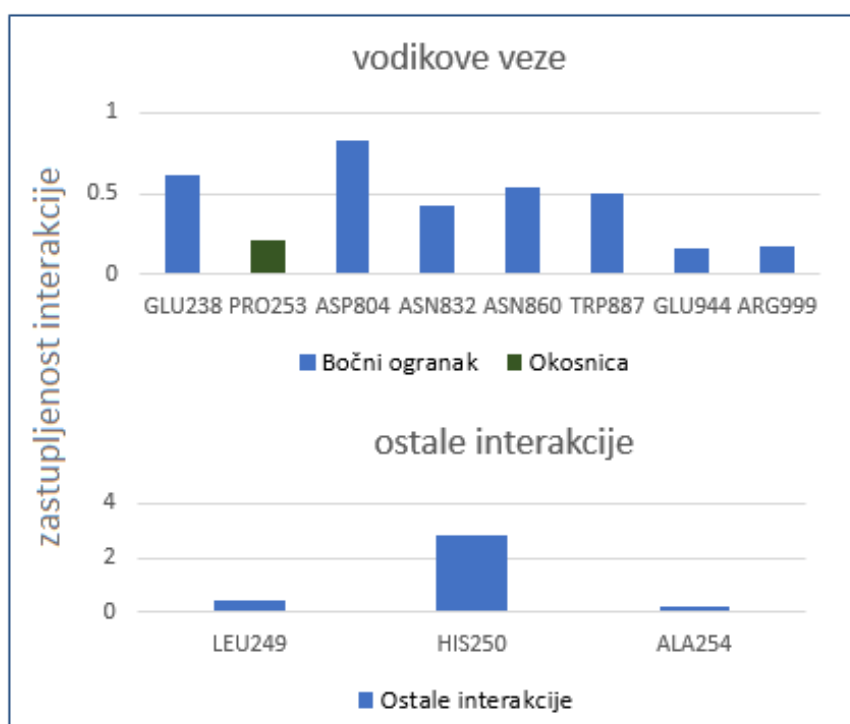


Slika 47. Vodikove veze i općenito sve interakcije koje se ostvaruju između liganda **26** i aminokiselina džepa 2b strukture NOD2 dobivene SWISS-MODEL serverom, a koje se pojavljuju u barem 10 % ili više vremena tijekom simulacije od 100 ns. One aminokiseline koje sudjeluju u interakcijama i s bočnim ogranakom i s peptidnom okosnicom mogu imati zastupljenost preko 1.

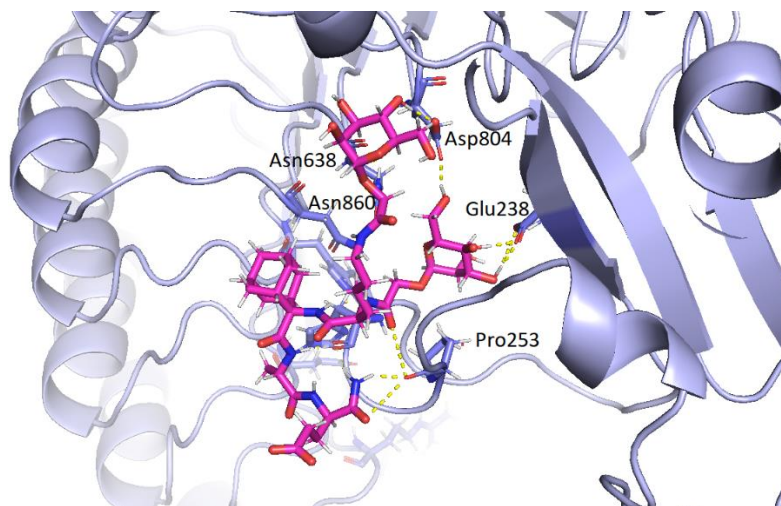


Slika 48. Obrasci interakcija ostvarenih između liganda **26** (magenta obojen) i aminokiselina džepa 2b strukture NOD2 dobivene SWISS-MODEL serverom.

U kompleksu spoja **28** i džepa 2b proteina NOD2, nekoliko je aminokiselina koje ostvaruju značajne interakcije s ligandom. U prvom redu su to Asp804 i Glu238 koji ostvaruju vodikove veze s manoznim komponentama spoja, te Asn860 koji ostvaruje vodikovu vezu s glikolnom poveznicom manoze koja je bliža adamantanskoj aminokiselini i Trp887 koji tvori vodikovu vezu s dipeptidnim dijelom molekule (Slike 49 i 50). Dodatnu jaku interakciju s L-Ala ostvaruje His250. Manozna strukturno bliža adamantanskoj aminokiselini još tvori vodikovu vezu s Asn832, dok njezina glikolna poveznica ostvaruje dodatnu interakciju s Leu249. Pro253 tvori vodikovu vezu s amidnom skupinom bočnog ogranka izoGln. Dipeptidni dio molekule dodatno ostvaruje interakciju s Glu944, a L-Lys s Ala254.



Slika 49. Vodikove veze i općenito sve interakcije koje se ostvaruju između liganda **28** i aminokiselina džepa 2b strukture NOD2 dobivene SWISS-MODEL serverom, a koje se pojavljuju u barem 10 % ili više vremena tijekom simulacije od 100 ns. One aminokiseline koje sudjeluju u interakcijama i s bočnim ogrankom i s peptidnom okosnicom mogu imati zastupljenost preko 1.



Slika 50. Obrasci interakcija ostvarenih između liganda **28** (magenta obojen) i aminokiselina džepa 2b strukture NOD2 dobivene SWISS-MODEL serverom.

U kompleksu liganda **26** i džepa 2b receptora NOD2, koji ujedino odgovara literaturno opisanom mjestu vezanja MDPa, uočene su interakcije s aminokiselinama koje imaju ključnu ulogu u aktivaciji NOD2 signalnog puta. U prvom redu su to vodikove veze ostvarene između karboksilne skupine izoGln i Arg803 te karbonilne skupine okosnice L-Ala i Arg857. Osim toga, jedna od ključnih aromatskih aminokiselina hidrofobnog džepa, Phe831, tvori anion- π interakciju s karboksilatom izoGln, a Trp887 ostvaruje CH- π interakcije s adamantanskom skupinom liganda. Trp911 ostvaruje CH- π interakcije s metilnom skupinom L-Ala, a Ser913 interakciju s bočnim ogrankom izoGln. I na temelju ovih rezultata, opet se može zaključiti da izoGln, posebno slobodna karboksilna skupina, značajno doprinosi vezanju liganda. U ovom kompleksu su prisutne i interakcije s modeliranom petljom 2, konkretnije s aminokiselinama Glu242, Val243 i Leu249.

Spoj **28** u džepu 2b, od interakcija s ključnim aminokiselinama, ostvaruje samo vodikovu vezu s Trp887. Bitno je naglasiti da u ovom kompleksu, za razliku od prethodnog, karboksilat izoGln je dio molekule liganda koji je najizloženiji otapalu, odnosno ne ostvaruje interakcije s proteinom, te da se obrasci interakcija u kompleksu znatno razlikuju od prethodnog modela. I u ovom kompleksu su prisutne interakcije s modeliranom petljom 2, točnije s aminokiselinama Leu249, His250 i Pro253. Interakcija s His250 je ujedino i najznačajnija interakcija koju ligand ostvaruje s proteinom. Leu249 i His250 su smješteni unutar NBD domene i izgrađuju petlju 2, a u disertaciji su izdvojene i kao aminokiseline koje ostvaruju značajnu interakciju s ManAdDMP kao ligandom, također u džepu 2b proteina.

Podrobnijom analizom rezultata koji se tiču odnosa strukture i reaktivnosti novodizajniranih manoznih derivata, sumarno se može zaključiti da je uvođenje manoze i akiralne adamantanske aminokiseline na N-kraju DMPa povoljno. Manozne komponente, u većini modela prikazanih u disertaciji, ostvaruju jednu ili više značajnih vodikovih veza te u nekim slučajevima dodatno i CH- π interakcije s NOD2 receptorom, dok lipofilna adamantanska aminokiselina doprinosi vezanju tvorbom brojnih hidrofobnih interakcija i u nekim modelima dodatno vodikovim vezama sa svojom amidnom okosnicom. Osim toga, naši rezultati upućuju i na važnost izoGln kao bitne aminokiseline za vezanje liganda, posebno slobodne karboksilne skupine koja u većini modela ostvaruje značajne vodikove veze. Ovi zaključci su u skladu s opisanim biološkim aktivnostima sličnih manoziliranih DMPa,⁹ ali i MDP derivata s uvedenim izmjenama na izoGln, gdje se pokazalo da su aktivniji derivati sa slobodnom γ -COOH i modificiranim bočnim ogrankom.¹⁶³

Važno je još jednom naglasiti da su rezultati MD simulacija kompleksa NOD2 i spojeva **26** i **28** preliminarni te će se dodatno upotpuniti izračunom dekompozicije entalpijskog doprinosa slobodne energije vezanja po pojedinim aminokiselinama, kako bi se kvantificirale interakcije. Temeljem prikazanih struktura, može se samo zaključiti da su izdvojene aminokiseline NOD2 receptora značajne za interakcije s novosintetiziranim ligandima.

§ 5. ZAKLJUČAK

1. Pripravljene su desmuramil-dipeptid **2**, tripeptid **5** i tetrapeptid **7** s ugrađenim (*S*)-adamantil-glicinom kondenzacijom Boc-(*S*)-(adamant-1-il)glicina i L-Ala-D-izoGln-OBn, odnosno (Fmoc-L-Ser(OBn)-COOH) i prethodno pripremljenog (*S*)-AdGly-L-Ala-D-izoGln-OBn, pomoću optimizirane metode sinteze amidne veze uz karbodiimidne reagense. Peptidima L-alanil-D-izoglutaminu (**2**), (*S*)-(adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutaminu (**5**) i L-seril-(*S*)-(adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutaminu (**7**) provedena je sustavna konformacijska analiza primjenom računalnih metoda i spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije u vodi i DMSOu kao odabranim otapalima. Za pretraživanje konformacijskog prostora peptida u *zwitterionskom* i *ne-zwitterionskom* obliku korištena je kombinacija molekulske (OPLS_2005 i AMBER polje sila) i kvantne mehanike (B3LYP/6-31+G(d,p)) na skupu najstabilnijih konformera. Vodikove veze okarakterizirane su QTAIM metodom u skladu s Koch-Popelievim kriterijama za njihov opis. Pokazalo se kako porast složenosti strukture uvođenjem dodatnih aminokiselina utječe na broj nastalih vodikovih veza. Uvedena hidrofobna adamantilna skupina, u obliku neprirodne aminokiseline (*S*)-AdGly, uzrokuje određenu krutost peptidne okosnice na N-kraju, što kao posljedicu ima stvaranje lokalnih strukturnih obrazaca svojstvenih ovoj vrsti spojeva. Najznačajnije strukturno obilježje koje je uočeno u modelu tripeptida **5** i tetrapeptida **7** je deseteročlani prsten (C₁₀, N_{1b}H...O₃) između amidne skupine bočnog ogranka izoGln i karbonilne skupine AdGly. Povoljno savijanje modeliranih peptida potvrđuju i opisani NOE kontakti CH₂ protona adamantana s CH₂ i NH protonima izoGln. Također, NOE korelacije između Ser i bočnog ogranka izoGln ukazuju na trend interakcije C- i N-kraja peptida.
2. U disertaciji je opisana sinteza novog adamantanskog derivata desmuramil-dipeptida **24** s vezanom akiralnom 2-aminoadamantan-2-karboksilnom kiselinom te monomanoziliranog derivata **26** i dimanoziliranog derivata **28**. Ciljni spojevi dobiveni su u dobrom iskorištenju te su strukturno okarakterizirani. Ključni koraci bili su sinteza peptidne veze i vezanje α -manoznih podjedinica. Sintaza amidnih veza provedena je optimiziranom EDC/HOBt metodom. α -Manozne podjedinice su uvedene u obliku

manozida s glikolilnom poveznicom **18** koji je prethodno pripremljen u četiri sintetska koraka, a najvažniji sintetski stupanj bila je reakcija anomerne deacetilacije. Monomanozilirani derivat **24** dobiven je kondenzacijom manozida **18** s adamantil-tripeptidom **23**. Dimanozilirani derivat desmuramil-dipeptida **28** pripremljen je kondenzacijom tripeptida **23** i dimanoziliranog L-lizina **21** koji je dobiven vezanjem manozida **18** na L-lizin.

3. Adjuvantska aktivnost spojeva **24**, **26** i **28** određena je u CBA miševima na temelju izmjerene količine IgG antitijela specifičnih za ovalbumin koji je korišten kao antigen. Sva tri ispitana spoja pokazala su veću imunostimulacijsku aktivnost u usporedbi s literaturno poznatim ManAdDMP adjuvantom. Najveća proizvodnja ukupnih IgG antitijela pokazana je u serumu miševa koji su imunizirani s dimanoziliranim derivatom **28**. Temeljem omjera IgG1 / IgG2a antitijela pokazano je da dimanozilirani desmuramil-peptid **28** usmjerava imunoreakciju prema humoralnom Th2 tipu odgovora. Rezultatima *in vivo* pokusa dokazano je da uvođenje 2-aminoadamantan-2-karboksilne aminokiseline pozitivno utječe na stimulaciju imunološkog odgovora te da se manoziliranjem desmuramil-dipeptida značajno pojačava adjuvantska aktivnost ove klase spojeva.
4. Provedene su i molekulske-dinamičke simulacije kompleksa NOD2 receptora i manoziliranih desmuramil-peptida (novosintetiziranih manoznih derivata **26** i **28** te ManAdDMPa). Modelirana je intaktna struktura NOD2 proteina sa sedam petlji, koje su izostavljene u eksperimentalno riješenoj strukturi te je prvi put istraženo vezanje manoznih mimetika MDPa na NOD2. Identificirana su dva potencijalna vezna mjesta, jedno je smješteno unutar NBD domene, a drugo na konkavnom dijelu površine LRR domene NOD2. U kompleksima s ManAdDMPom kao ligandom, džepovi 1 i 2b su potencijalna mjesta vezanja spoja. Modelirane petlje 2 i 7 značajno utječu na vezanje ManAdDMPa unutar džepa 2b, a time i na samo prepoznavanje liganda od strane NOD2. Posebno se ističu dvije jake vodikove veze ostvarene između slobodne γ -COOH skupine izoGln i receptora. Provedene su i preliminarne MD simulacije spojeva **26** i **28** i NOD2 te su, kao i u slučaju kompleksa s ManAdDMPom, uočena dva potencijalna vezna mjesta. U kompleksu liganda **26** i džepa 2b receptora NOD2, koji ujedno odgovara literaturno opisanom mjestu vezanja MDPa, također su uočene interakcije s aminokiselinama koje imaju ključnu ulogu u aktivaciji NOD2 signalnog puta. U prvom

redu su to vodikove veze ostvarene između karboksilne skupine izoGln i Arg803 te karbonilne skupine okosnice L-Ala i Arg857.

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

Ad = adamantan

ADP = adenzin-difosfat

AdDP = adamantil-dipeptid

AdTP = adamantil-tripeptid

Ala = alanin

AMBER = programski paket (engl. *Assisted model building with energy refinement*)

APC = stanice koje prezentiraju antigen (engl. *antigen presenting cells*)

Arg = arginin

Asp = asparaginska kiselina

ATP = adenzin-trifosfat

BLAST = engl. *Basic local alignment search tool*

Boc = *tert*-butiloksikarbonil

BS = Blauov sindrom

B3LYP = vrsta DFT funkcionala, engl. *Becke Three Parameter Hybrid Functionals*

CARD = domena proteina (engl. *Caspase recruitment domain*)

CD = Chronova bolest (engl. *Chron's disease*)

CLRs = lektini tipa C

CRD = domena za prepoznavanje ugljikohidrata (engl. *Carbohydrate recognition domain*)

d = dublet

DCC = *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid

DCM = diklormetan

dd = dublet dubleta

DFT = teorija funkcionala gustoće, engl. *Density Functional Theory*

DMF = *N,N'*-dimetilformamid

DMSO = dimetil-sulfoksid

EDC = 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid

ELISA = enzimski imunotest (engl. *Enzyme linked immunosorbent assay*)

EMA = Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*)

Fmoc = 9-fluorenilmetoksikarbonil

GAFF = vrsta polja sila (engl. *General Amber force field*)

GHECOM = program za pronalaženje šupljina na proteinu (engl. *Grid-based HECOMi finder*)

GlcNAc = *N*-acetilglukozamin

Gly = glicin

HHblits = softverski program

HD1 = domena proteina; eng. *Helical domain 1*

HD2 = domena proteina; eng. *Helical domain 2*

HF = vrsta *ab initio* računalne metode, engl. *Hartree-Fock*

His = histidin

HOBt = *N*-hidroksibenzotriazol

HPLC = kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*)

I-TASSER = vrsta *on-line* servera kojim se mogu dobiti određene proteinske strukture, engl. *Iterative Threading ASSEmbly Refinement*

iBMDMs = engl. *immortalized mouse bone-marrow derived macrophages*

IgG = imunoglobulin G

izoGln = izoglutamin

J = konstanta sprege (NMR)

Leu = leucin

LRR = domena proteina (engl. *Leucine-rich domain*)

Lys = lizin

m = multiplet

m/z = omjer mase i naboja (MS)

Man = manozna

MBL = lektin koji veže manozu (engl. *Mannose-binding lectin*)

MD = molekulsko-dinamičke (simulacije)

MDP = muramil-dipeptid

MM = molekulska mehanika (engl. *molecular mechanics*)

MM/GBSA = engl. *Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area*

MR = manozni receptor

MS = masena spektrometrija

- MurNAc = *N*-acetilmuraminska kiselina
- NBD = domena proteina (engl. *Nucleotide-binding domain*)
- NEM = *N*-etilmorfolin
- NLR = vrsta proteina (engl. *Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing protein gene family*)
- NMR = nuklearna magnetska rezonancija
- NOD2 = protein, engl. *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*
- NOSEY = spektroskopija nuklearnog Overhauserovog efekta (engl. *Nuclear Overhauser effect spectroscopy*)
- ODP = *o*-fenilendiamina
- OPLS = vrsta polja sila (engl. *Optimized Potentials for Liquid Simulations*)
- OVA = ovalbumin
- PAMP = molekularni obrasci vezani za patogene (engl. *Pathogen associated molecular patterns*)
- PCM = implicitni model uvođenja otapala u promatrani računalni sustav, engl. *Polarisable continuum model*
- PDB = proteinska baza podataka (engl. *Protein data bank*)
- PGM = peptidoglikan monomer
- PGN = peptidoglikan
- Phe = fenilalanin
- PRR = receptori za prepoznavanje patogena (engl. *Pathogen recognition receptors*)
- q = kvartet
- RIP2 = protein, engl. *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase2*
- ROSEY = vrsta 2D NMR spektroskopije, engl. *Rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy*
- s = singlet
- SAR = odnos strukture i aktivnosti (engl. *Structure-activity relationship*)
- Ser = serin
- SPR = površinska plazmonska rezonancija (engl. *Surface plasmon resonance*)
- SWISS-MODEL = vrsta servera za modeliranje proteina
- t = triplet
- TFA = trifluoroctena kiselina

THF = tetrahidrofurán

Thr = treonin

TLC = tankoslojna kromatografija (engl. *Thin layer chromatography*)

TLR = Toll-like receptori (engl. *Toll-like receptors*)

TNF α = faktor tumorske nekroze α (engl. *Tumor necrosis factor α*)

Trp = triptofan

Tyr = tirozin

Val = valin

WHD = domena proteina (engl. *Winged helical domain*)

QM = kvantna mehanika (engl. *quantum mechanics*)

QTAIM = engl. *Quantum theory of atoms in molecules*

δ = kemijski pomak

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. R. Bastola, G. Noh, T. Keum, S. Bashyal, J.-E. Seo, J. Choi, Y. Oh, Y. Cho, S. Lee, *Arch. Pharm. Res.* **40** (2017) 1238–1248.
2. F. Azmi, A. A. H. Ahmad Fuaad, M. Skwarczynski, I. Toth, *Hum. Vaccines Immunother.* **10** (2014) 778–796.
3. J. C. Cox, A. R. Coulter, *Vaccine* **15** (1997) 248–256.
4. C. L. Grimes, L. D. Z. Ariyananda, J. E. Melnyk, E. K. O’Shea, *J. Am. Chem. Soc.* **134** (2012) 13535–13537.
5. M. Gobec, I. Mlinarič-Raščan, M. S. Dolenc, Ž. Jakopin, *Eur. J. Med. Chem.* **116** (2016) 1–12.
6. C. Ogawa, Y.-J. Liu, K. S. Kobayashi, *Curr. Bioact. Compd.* **7** (2011) 180–197.
7. R. Ribić, L. Habjanec, B. Vranešić, R. Frkanec, S. Tomić, *Chem. Biodivers.* **9** (2012) 777–788.
8. R. Ribić, L. Habjanec, B. Vranešić, R. Frkanec, S. Tomić, *Croat. Chem. Acta* **84** (2011) 233–244.
9. R. Ribić, R. Stojković, L. Milković, M. Antica, M. Cigler, S. Tomić, *Beilstein J. Org. Chem.* **15** (2019) 1805–1814.
10. J. de S. Apostólico, V. A. S. Lunardelli, F. C. Coirada, S. B. Boscardin, D. S. Rosa, *J. Immunol. Res.* **2016** (2016) e1459394.
11. Gerdts V, *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* (2015) 456–463.
12. L. M. Kingeter, X. Lin, *Cell. Mol. Immunol.* **9** (2012) 105–112.
13. W. Strober, T. Watanabe, *Mucosal Immunol.* **4** (2011) 484–495.
14. J. von Moltke, J. S. Ayres, E. M. Kofoed, J. Chavarría-Smith, R. E. Vance, *Annu. Rev. Immunol.* **31** (2013) 73–106.
15. D. Thirumal Kumar, S. Udhaya Kumar, A. S. Nishaat Laeeque, S. Apurva Abhay, R. Bithia, R. Magesh, M. Kumar, H. Zayed, C. George Priya Doss, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **120** (2020) 379–408.
16. C. R. Homer, A. Kabi, N. Marina-García, A. Sreekumar, A. I. Nesvizhskii, K. P. Nickerson, A. M. Chinnaiyan, G. Nuñez, C. McDonald, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 25565–25576.
17. Q. Yao, *Semin. Arthritis Rheum.* **43** (2013) 125–130.
18. M. Salem, J. B. Seidelin, G. Rogler, O. H. Nielsen, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **70** (2013) 3391–3404.
19. S. Maekawa, U. Ohto, T. Shibata, K. Miyake, T. Shimizu, *Nat. Commun.* **7** (2016) 11813–11823.
20. T. Tanabe, M. Chamaillard, Y. Ogura, L. Zhu, S. Qiu, J. Masumoto, P. Ghosh, A. Moran, M. M. Predergast, G. Tromp, C. J. Williams, N. Inohara, G. Núñez, *EMBO J.* **23** (2004) 1587–1597.
21. P. Pissios, I. Tzamelis, P. J. Kushner, D. D. Moore, *Mol. Cell* **6** (2000) 245–253.
22. J. E. Melnyk, V. Mohanan, A. K. Schaefer, C.-W. Hou, C. L. Grimes, *J. Am. Chem. Soc.* **137** (2015) 6987–6990.
23. E. A. D’Ambrosio, W. R. Drake, S. Mashayekh, O. I. Ukaegbu, A. R. Brown, C. L. Grimes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **29** (2019) 1153–1161.

24. M. L. Lauro, E. A. D'Ambrosio, B. J. Bahnson, C. L. Grimes, *ACS Infect. Dis.* **3** (2017) 264–270.
25. J. Maharana, B. R. Sahoo, A. Bej, I. Jena, A. Parida, J. R. Sahoo, B. Dehury, M. C. Patra, S. R. Martha, S. Balabantray, S. K. Pradhan, B. K. Behera, *PLOS ONE* **10** (2015) e0121415.
26. M. Gobec, T. Tomašič, A. Štimac, R. Frkanec, J. Trontelj, M. Anderluh, I. Mlinarič-Raščan, Ž. Jakopin, *J. Med. Chem.* **61** (2018) 2707–2724.
27. F.-A. Khan, N. Nasim, Y. Wang, A. Alhazmi, M. Sanam, Z. Ul-Haq, D. Yalamati, M. Ulanova, Z.-H. Jiang, *Eur. J. Med. Chem.* **209** (2021) 112863–112913.
28. B. Brahma, M. C. Patra, P. Mishra, B. C. De, S. Kumar, J. Maharana, A. Vats, S. Ahlawat, T. K. Datta, S. De, *J. Mol. Graph. Model.* **65** (2016) 15–26.
29. J. K. Mann, J. Shen, S. Park, *J. Cell. Biochem.* **118** (2017) 1227–1238.
30. E. A. D'Ambrosio, K. L. Bersch, M. L. Lauro, C. L. Grimes, *J. Am. Chem. Soc.* **142** (2020) 10926–10930.
31. J. Mo, J. P. Boyle, C. B. Howard, T. P. Monie, B. K. Davis, J. A. Duncan, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 23057–23067.
32. B. Zurek, M. Proell, R. N. Wagner, R. Schwarzenbacher, T. A. Kufer, *Innate Immun.* **18** (2012) 100–111.
33. J. G. Magalhaes, J. Lee, K. Geddes, S. Rubino, D. J. Philpott, S. E. Girardin, *Eur. J. Immunol.* **41** (2011) 1445–1455.
34. Q. Gong, Z. Long, F. L. Zhong, D. E. T. Teo, Y. Jin, Z. Yin, Z. Z. Boo, Y. Zhang, J. Zhang, R. Yang, S. Bhushan, B. Reversade, Z. Li, B. Wu, *Nat. Commun.* **9** (2018) 4993.
35. L. Chedid, M. Parant, F. Audibert, G. Riveau, F. Parant, E. Lederer, J. Choay, P. Lefrancier, *Infect. Immun.* **35** (1982) 417–24.
36. K. Ando, K. Mori, N. Corradini, F. Redini, D. Heymann, *Expert Opin. Pharmacother.* **12** (2011) 285–292.
37. S. Mahapatra, D. C. Crick, M. R. McNeil, P. J. Brennan, *J. Bacteriol.* **190** (2008) 655–661.
38. K.-T. Chen, D.-Y. Huang, C.-H. Chiu, W.-W. Lin, P.-H. Liang, W.-C. Cheng, *Chem. – Eur. J.* **21** (2015) 11984–11988.
39. P. Lefrancier, E. Lederer, *Pure Appl. Chem.* **59** (1987) 449–454.
40. R. Ribic, M. Paurevic, S. Tomic, *Croat. Chem. Acta* **92** (2019) 1–10.
41. M. Moriguchi, K. Urabe, N. Norisada, C. Ochi, A. Stalc, U. Urleb, S. Muraoka, *Arzneimittelforschung* **49** (1999) 184–192.
42. P. Smrdel, M. Černe, M. Bogataj, U. Urleb, A. Mrhar, *J. Microencapsul.* **27** (2010) 572–582.
43. C. Ochi, N. Norisada, M. Moriguchi, A. Stalc, U. Urleb, S. Muraoka, *Arzneimittelforschung* **49** (1999) 72–79.
44. S. Simčič, B. Wraber, M. Sollner, U. Urleb, S. Gobec, *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* **440** (2000) 64–66.
45. G. S. U. U, A. G, B. D, *Pharm.* **56** (2001) 295–297.
46. U. Urleb, S. Gobec, *Acta Pharm.* **50** (2000) 173–184.
47. K. Keček Plešec, D. Urbančič, M. Gobec, A. Pekošak, T. Tomašič, M. Anderluh, I. Mlinarič-Raščan, Ž. Jakopin, *Bioorg. Med. Chem.* **24** (2016) 5221–5234.
48. F.-A. Khan, M. Ulanova, B. Bai, D. Yalamati, Z.-H. Jiang, *Eur. J. Med. Chem.* **141** (2017) 26–36.

49. K. Suzuki, K. Torii, S. Hida, H. Hayashi, Y. Hiyama, Y. Oomoto, T. Takii, T. Chiba, K. Onozaki, *Immunopharmacology* **28** (1994) 31–38.
50. M. Grillaud, A. Bianco, *J. Pept. Sci.* **21** (2015) 330–345.
51. L. Wanka, K. Iqbal, P. R. Schreiner, *Chem. Rev.* **113** (2013) 3516–3604.
52. G. L. and G. Artavia, *Curr. Med. Chem.* **17** (2010) 2967–2978.
53. K. Aigami, Y. Inamoto, N. Takaishi, K. Hattori, A. Takatsuki, G. Tamura, *J. Med. Chem.* **18** (1975) 713–721.
54. W. L. Davies, R. R. Grunert, R. F. Haff, J. W. McGahen, E. M. Neumayer, M. Paulshock, J. C. Watts, T. R. Wood, E. C. Hermann, C. E. Hoffmann, *Science* **144** (1964) 862–863.
55. R. Dolin, R. C. Reichman, H. P. Madore, R. Maynard, P. N. Linton, J. Webber-Jones, *N. Engl. J. Med.* **307** (1982) 580–584.
56. K. N. Masihi, W. Lange, S. Schwenke, G. Gast, P. Huchshorn, A. Palache, K. Mašek, *Vaccine* **8** (1990) 159–163.
57. P. D. Becker, R. S. Corral, C. A. Guzmán, S. Grinstein, *Vaccine* **19** (2001) 4603–4609.
58. B. Vranešić, J. Tomašić, S. Smerdel, D. Kantoci, F. Benedetti, *Helv. Chim. Acta* **76** (1993) 1752–1758.
59. A. Hasegawa, Y. Kaneda, Y. Goh, K. Nishibori, M. Kiso, I. Azuma, *Carbohydr. Res.* **94** (1981) 143–163.
60. R. Ribić, Sinteze i biološke aktivnosti manoziliranih derivata 1-aminoadamantana, adamantil-tripeptida i peptidoglikan monomera, doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2011.
61. R. Ribić, L. Habjanec, R. Frkanec, B. Vranešić, S. Tomić, *Chem. Biodivers.* **9** (2012) 1373–1381.
62. J. Tomašić, I. Hanzl-Dujmović, B. Špoljar, B. Vranešić, M. Šantak, A. Jovičić, *Vaccine* **18** (2000) 1236–1243.
63. G. Sava, J. Tomašić, I. Hršak, *Cancer Immunol. Immunother.* **18** (1984) 49–53.
64. G. Sava, T. Giraldo, J. Tomašić, I. Hršak, *Cancer Immunol. Immunother.* **15** (1983) 84–86.
65. T. M. Allen, P. R. Cullis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65** (2013) 36–48.
66. K. L. White, T. Rades, R. H. Furneaux, P. C. Tyler, S. Hook, *J. Pharm. Pharmacol.* **58** (2006) 729–737.
67. J. Turánek, D. Záluská, A. Vacek, P. Borkovcová, J. Thurnvaldová, L. Bláha, K. Mašek, *Int. Immunopharmacol.* **1** (2001) 167–175.
68. A. Štimac, M. Šekutor, K. Mlinarić-Majerski, L. Frkanec, R. Frkanec, *Molecules* **22** (2017) 297–310.
69. M. Manček-Keber, R. Ribić, F. Chain, D. Sinnaeve, J. C. Martins, R. Jerala, S. Tomić, K. Fehér, *Molecules* **25** (2020) 3707–3716.
70. R. Ribić, S. Tomić, *Kem. U Ind. Časopis Kemičara Kem. Inženjera Hrvat.* **62** (2013) 19–31.
71. A. Santos, M. Silva, T. Napoleão, P. Paiva, M. Correia, L. C. Coelho, *Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications*, 2014.
72. D. A. Wesener, A. Dugan, L. L. Kiessling, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **44** (2017) 168–178.
73. A. M. Kerrigan, G. D. Brown, *Immunobiology* **214** (2009) 562–575.
74. K. Drickamer, M. E. Taylor, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **34** (2015) 26–34.

75. J. M. Irache, H. H. Salman, C. Gamazo, S. Espuelas, *Expert Opin. Drug Deliv.* **5** (2008) 703–724.
76. J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **102** (2002) 555–578.
77. R. T. Raines, H. Wennemers, *Acc. Chem. Res.* **50** (2017) 2419–2419.
78. J. Gorzynski Smith, *Organic Chemistry*, 3rd Edition, McGraw Hill, New York, 2011.
79. L. G. Wade, *Organic chemistry*, 8th Edition, Pearson, Boston, 2013.
80. C. Bolm, J. G. Hernández, *ChemSusChem* **11** (2018) 1410–1420.
81. N. Kawahara, K. Yasukawa, Y. Asano, *Green Chem.* **19** (2017) 418–424.
82. A. Isidro-Llobet, M. Alvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **109** (2009) 2455–2504.
83. V. Petrović-Peroković, Predavanja iz Odabranih poglavlja organske kemije, 2011.
84. V. R. Pattabiraman, J. W. Bode, *Nature* **480** (2011) 471–479.
85. G. Danger, R. Plasson, R. Pascal, *Chem. Soc. Rev.* **41** (2012) 5416–5429.
86. T. I. Al-Warhi, H. M. A. Al-Hazimi, A. El-Faham, *J. Saudi Chem. Soc.* **16** (2012) 97–116.
87. C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **61** (2005) 10827–10852.
88. S. J. Wittenberger, M. A. McLaughlin, *Tetrahedron Lett.* **40** (1999) 7175–7178.
89. W. Chu, Z. Tu, E. McElveen, J. Xu, M. Taylor, R. R. Luedtke, R. H. Mach, *Bioorg. Med. Chem.* **13** (2005) 77–87.
90. A. S. Christensen, T. Kubař, Q. Cui, M. Elstner, *Chem. Rev.* **116** (2016) 5301–5337.
91. C. J. Cramer, *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*, 2nd Edition / Wiley, John Wiley & Sons, West Sussex, England, 2004.
92. B. Miehllich, A. Savin, H. Stoll, H. Preuss, *Chem. Phys. Lett.* **157** (1989) 200–206.
93. W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, *J. Chem. Phys.* **79** (1983) 926–935.
94. M. Štivojević, Sinteza i konformacijska analiza manoziliranog adamantil-tetrapeptida, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2012.
95. A. Maršavelski, Predavanja iz Modeliranja biomakromolekula, 2020.
96. D. A. Case, V. Babin, J. T. Berryman, R. M. Bertz, D. S. Cerruti, T. E. Cheatham, T. A. Darden, R. E. Duke, H. Ghlke, A. W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, A. Kolossváry, T. S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K. M. Merz, P. Paesani, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C. L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, R. M. Wolf, X. Wu, P. A. Kollman, *AMBER 14*, University of California, San Francisco, 2014.
97. G. Chang, W. Guida, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 4379–4386.
98. T. Solmajer, O. Planinšek, S. Srčić, *Int. J. Pharm.* **199** (2000) 59–64.
99. A. Tomić, Primjena računalnih pristupa različitih stupnjeva složenosti u svrhu razumijevanja strukture, dinamike i aktivnosti ljudske dipeptidil-peptidaze III, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
100. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, J. R. Haak, *J. Chem. Phys.* **81** (1984) 3684–3690.
101. G. S. Grest, K. Kremer, *Phys. Rev. A* **33** (1986) 3628–3631.
102. W. G. Hoover, *Phys. Rev. A* **31** (1985) 1695–1697.
103. J. Maharana, M. C. Patra, B. C. De, B. R. Sahoo, B. K. Behera, S. De, S. K. Pradhan, *J. Mol. Recognit.* **27** (2014) 260–275.
104. Vogel's, *Textbook of Practical Organic Chemistry*, Longman, 1978.
105. G. Jokhadze, M. Machaidze, H. Panosyan, C. C. Chu, R. Katsarava, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **18** (2007) 411–438.
106. *Maestro*, version 9.7, Schrodinger, New York, 2014.

107. *ChemBio3D Ultra*, v. 13, PerkinElmer, Inc., 2012.
108. T. Dennington, T. Keith, J. Millam, *GaussView 5.0*, Semichem Inc., Shwnee Mission, KS, 2009.
109. *MacroModel*, version 10.3, Schrodinger, New York, 2014.
110. F. Mohamadi, N. G. J. Richards, W. C. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Caufield, G. Chang, T. Hendrickson, W. C. Still, *J. Comput. Chem.* **11** (1990) 440–467.
111. D. Q. McDonald, W. C. Still, *Tetrahedron Lett.* **33** (1992) 7743–7746.
112. J. L. Banks, H. S. Beard, Y. Cao, A. E. Cho, W. Damm, R. Farid, A. K. Felts, T. A. Halgren, D. T. Mainz, J. R. Maple, R. Murphy, D. M. Philipp, M. P. Repasky, L. Y. Zhang, B. J. Berne, R. A. Friesner, E. Gallicchio, R. M. Levy, *J. Comput. Chem.* **26** (2005) 1752–1780.
113. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, E. J. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, *Gaussian 09, Revision A.02*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
114. C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **37** (1988) 785–789.
115. S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, H. Krieg, *J. Chem. Phys.* **132** (2010) 154104–154119.
116. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 5648–5652.
117. E. Cancès, B. Mennucci, *J. Math. Chem.* **23** (1998) 309–326.
118. E. Cancès, B. Mennucci, J. Tomasi, *J. Chem. Phys.* **107** (1997) 3032–3041.
119. F. Biegler-König, J. Schönbohm, *J. Comput. Chem.* **23** (2002) 1489–1494.
120. J. Yang, Y. Zhang, *Curr. Protoc. Bioinforma.* **52** (2015) 5.8.1–5.8.15.
121. T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, M. C. Peitsch, *Nucleic Acids Res.* **31** (2003) 3381–3385.
122. A. Grosdidier, V. Zoete, O. Michielin, *Nucleic Acids Res.* **39** (2011) 270–277.
123. T. Kawabata, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **78** (2010) 1195–1211.
124. O. Trott, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **31** (2010) 455–461.
125. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* **25** (2004) 1605–1612.
126. J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti, H. J. C. Berendsen, *J. Comput. Phys.* **23** (1977) 327–341.
127. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0*, Schrodinger, LLC.
128. R. Ribić, I. Kodrin, I. Biljan, M. Paurević, S. Tomić, *Struct. Chem.* **30** (2019) 743–754.
129. S. Tsuboi, M. Fukuda, *BioEssays* **23** (2001) 46–53.
130. T. Freire, E. Osinaga, *Inmunologia* **22** (2003) 27–38.
131. U. Koch, P. L. A. Popelier, *J. Phys. Chem.* **99** (1995) 9747–9754.
132. P. L. A. Popelier, *J. Phys. Chem. A* **102** (1998) 1873–1878.

133. I. Kodrin, Konformacijska analiza ferocenskih peptida, disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2011.
134. S. Femandjian, B. Perly, M. Level, P. Lefrancier, *Carbohydr. Res.* **162** (1987) 23–32.
135. P. Sizun, B. Perly, M. Level, P. Lefrancier, S. Femandjian, *Tetrahedron* **44** (1988) 991–997.
136. Y. Boulanger, Y. Tu, V. Ratovelomanana, E. Purisima, S. Hanessian, *Tetrahedron* **48** (1992) 8855–8868.
137. P. Pristovšek, J. Kidrič, J. Mavri, D. Hadži, *Biopolymers* **33** (1993) 1149–1157.
138. P. Pristovšek, J. Kidrič, D. Hadži, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **37** (1997) 971–976.
139. H. Matter, L. Szilágyi, P. Forgó, Ž. Marinić, B. Klaić, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 2212–2223.
140. K. Fehér, P. Pristovšek, L. Szilágyi, Đ. Ljevaković, J. Tomašić, *Bioorg. Med. Chem.* **11** (2003) 3133–3140.
141. E. A. Meshcheryakova, K. S. Mineev, P. E. Volynski, T. M. Andronova, V. T. Ivanov, *J. Pept. Sci.* **21** (2015) 717–722.
142. H. T. Nagasawa, J. A. Elberling, F. N. Shirota, *J. Med. Chem.* **16** (1973) 823–826.
143. Elinor. Ware, *Chem. Rev.* **46** (1950) 403–470.
144. I. R. Baxendale, S. Cheung, M. O. Kitching, S. V. Ley, J. W. Shearman, *Bioorg. Med. Chem.* **21** (2013) 4378–4387.
145. M. Paventi, F. L. Chubb, J. T. Edward, *Can. J. Chem.* **1525** (2011) 2114–2117.
146. C. Srinivas, H. Blake, W. Qian, *Lett. Org. Chem.* **3** (2005) 35–38.
147. C. Ionlscu, V. Barragan-Montero, J.-L. Montero, *Rev. Chim. -Buchar. - Orig. Ed.-* **63** (2012) 412–415.
148. R. T. Lee, Y. C. Lee, *Glycoconj. J.* **17** (2000) 543–551.
149. R. Roy, M. Touaibia, *Compr. Glycosci.* (2007) 821–870.
150. J. Hu, P. Wei, P. H. Seeberger, J. Yin, *Chem. – Asian J.* **13** (2018) 3448–3459.
151. E. D. Vedove, G. Costabile, O. M. Merkel, *Adv. Healthc. Mater.* **7** (2018) 1701398–1701416.
152. N. C. Reichardt, M. Martín-Lomas, S. Penadés, *Chem. Soc. Rev.* **42** (2013) 4358–4376.
153. S. Avvakumova, P. Fezzardi, L. Pandolfi, M. Colombo, F. Sansone, A. Casnati, D. Proserpi, *Chem. Commun.* **50** (2014) 11029–11032.
154. S. N. R. Kutcherlapati, R. Koyilapu, U. M. R. Boddu, D. Datta, R. S. Perali, M. J. Swamy, T. Jana, *Macromolecules* **50** (2017) 7309–7320.
155. R. De Coen, N. Vanparijs, M. D. P. Risseuw, L. Lybaert, B. Louage, S. De Koker, V. Kumar, J. Grooten, L. Taylor, N. Ayres, S. Van Calenbergh, L. Nuhn, B. G. De Geest, *Biomacromolecules* **17** (2016) 2479–2488.
156. J. B. Raymond, S. Mahapatra, D. C. Crick, M. S. Pavelka, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 326–333.
157. J. L. Tenthorey, E. M. Kofoed, M. D. Daugherty, H. S. Malik, R. E. Vance, *Mol. Cell* **54** (2014) 17–29.
158. Ž. Jakopin, *J. Med. Chem.* **57** (2014) 6897–6918.
159. C.-W. Hou, V. Mohanan, N. E. Zachara, C. L. Grimes, *Glycobiology* (2015) 13–18.
160. T. F. Reubold, G. Hahne, S. Wohlgemuth, S. Eschenburg, *FEBS Lett.* **588** (2014) 3327–3332.
161. Y. Ogura, N. Inohara, A. Benito, F. F. Chen, S. Yamaoka, G. Núñez, *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 4812–4818.

162. K. L. Hudson, G. J. Bartlett, R. C. Diehl, J. Agirre, T. Gallagher, L. L. Kiessling, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **137** (2015) 15152–15160.
163. W.-C. Cheng, T.-Y. You, Z.-Z. Teo, A. A. Sayyad, J. Maharana, C.-W. Guo, P.-H. Liang, C.-S. Lin, F.-C. Meng, *Chem. – Asian J.* **15** (2020) 3836–3844.

§ 8. DODATAK

Sadržaj

1. QTAIM analiza xxi
2. MD simulacije xxix
3. NMR spektri ciljnih spojeva.....xxxii

Tablica D1. Relativne energije, geometrijski parametri i vrijednosti odabranih QTAIM parametara (u a.u. za BCP_{H...Y}) za dipeptid (u vodi).

konformer	$\Delta E / \text{kJ mol}^{-1}$	oznaka	interakcija	$d(\text{X-H}\cdots\text{Y})/\text{\AA}$	$d(\text{X-H})/\text{\AA}$	$d(\text{H}\cdots\text{Y})/\text{\AA}$	$\alpha(\text{X-H-Y})/^\circ$	ρ	$\nabla^2\rho$	ε
dipeptid-ZW-1	0.00	C10	N ₂ -H \cdots O _{1b}	2.57480	1.10953	1.48880	164.398	0.08023	0.14859	0.03936
dipeptid-ZW-2	2.65	C10	N ₂ -H \cdots O _{1a}	2.56603	1.11423	1.47605	164.148	0.08323	0.14476	0.03820
		C7	N _{1b} -H \cdots O ₂	2.81371	1.01802	1.88616	149.918	0.03052	0.09061	0.03834
dipeptid-ZW-3	4.67	C10	N ₂ -H \cdots O _{1a}	2.60380	1.08699	1.54326	163.483	0.06710	0.16094	0.04798
dipeptid-NONZW-1	0.00	C9	N ₂ -H \cdots O _{1b}	2.59505	1.00882	1.58689	177.338	0.05799	0.15713	0.02381
		C5	N _{1a} -H \cdots N ₂	2.67114	1.01956	2.16073	108.894	0.02237	0.07815	0.28560
dipeptid-NONZW-2	0.78	C9	N ₂ -H \cdots O _{1b}	2.59280	1.00928	1.58429	177.142	0.05839	0.15768	0.02330
		C5	N _{1a} -H \cdots N ₂	2.65566	1.01933	2.12357	110.328	0.02400	0.08186	0.24172
dipeptid-NONZW-3	5.42	C9	N ₂ -H \cdots O _{1b}	2.62522	1.00338	1.62294	176.580	0.05261	0.14857	0.03205
		C5	N _{1a} -H \cdots N ₂	2.66500	1.02013	2.10901	112.026	0.02468	0.08108	0.20718
dipeptid-NONZW-4	5.90	C9	N ₂ -H \cdots O _{1b}	2.62300	1.00368	1.62050	176.473	0.05295	0.14926	0.03118
		C5	N _{1a} -H \cdots N ₂	2.64582	1.02022	2.09244	111.738	0.02555	0.08417	0.20180

Tablica D2. Relativne energije, geometrijski parametri i vrijednosti odabranih QTAIM parametara (u a.u. za BCP_{H...Y}) za dipeptid (u DMSO).

konformer	$\Delta E / \text{kJ mol}^{-1}$	oznaka	interakcija	$d(\text{X-H}\cdots\text{Y})/\text{\AA}$	$d(\text{X-H})/\text{\AA}$	$d(\text{H}\cdots\text{Y})/\text{\AA}$	$\alpha(\text{X-H-Y})/^\circ$	ρ	$\nabla^2\rho$	ε
dipeptid-ZW-1	0.00	C10	N ₂ -H \cdots O _{1b}	2.57282	1.10670	1.49298	163.325	0.07835	0.15353	0.03954
dipeptid-ZW-2	2.37	C10	N ₂ -H \cdots O _{1a}	2.56231	1.11680	1.46937	164.274	0.08476	0.14244	0.03773
		C7	N _{1b} -H \cdots O ₂	2.81368	1.01802	1.88613	149.917	0.03052	0.09062	0.03827
dipeptid-ZW-3	4.73	C10	N ₂ -H \cdots O _{1b}	2.59955	1.08890	1.53718	163.454	0.06829	0.16095	0.04743
dipeptid-ZW-4	5.54	C10	N ₂ -H \cdots O _{1a}	2.60785	1.09616	1.54138	162.537	0.07163	0.14971	0.03756
dipeptid-NONZW-1	0.00	C9	O _{1b} -H \cdots O ₂	2.59607	1.00859	1.58811	177.409	0.05780	0.15692	0.02374
		C5	N _{1a} -H \cdots N ₂	2.67120	1.01959	2.16100	108.878	0.02237	0.07815	0.28591
dipeptid-NONZW-2	0.76	C9	O _{1b} -H \cdots O ₂	2.59346	1.00904	1.58515	177.206	0.05825	0.15759	0.02328
		C5	N _{1a} -H \cdots N ₂	2.65566	1.01933	2.12385	110.308	0.02399	0.08185	0.24202
dipeptid-NONZW-3	5.67	C9	O _{1b} -H \cdots O ₂	2.62642	1.00313	1.62438	176.618	0.05241	0.14827	0.03200
		C5	N _{1a} -H \cdots N ₂	2.66502	1.02011	2.10903	112.026	0.02469	0.08110	0.20696
dipeptid-NONZW-4	6.13	C9	O _{1b} -H \cdots O ₂	2.62432	1.00336	1.62208	176.546	0.05272	0.14895	0.03116
		C5	N _{1a} -H \cdots N ₂	2.64588	1.02021	2.09268	111.726	0.02555	0.08418	0.20193

Tablica D3. Relativne energije, geometrijski parametri i vrijednosti odabranih QTAIM parametara (u a.u. za BCP_{H...Y}) za tripeptid (u vodi).

konformer	$\Delta E / \text{kJ mol}^{-1}$	oznaka	interakcija	$d(\text{X-H}\cdots\text{Y})/\text{\AA}$	$d(\text{X-H})/\text{\AA}$	$d(\text{H}\cdots\text{Y})/\text{\AA}$	$\alpha(\text{X-H-Y})/^\circ$	ρ	$\nabla^2\rho$	ε
tripeptid-ZW-1	0.00	C13	N ₃ -H \cdots O _{1b}	2.59368	1.10920	1.49138	171.556	0.08067	0.14295	0.03282
		C10	N _{1b} -H \cdots O ₃	3.02247	1.01613	2.01635	170.138	0.02050	0.06229	0.06042
		C7	N _{1a} -H \cdots O _{1a}	2.78541	1.02254	1.83567	152.943	0.03397	0.10141	0.04168
tripeptid-ZW-2	4.18	C13	N ₃ -H \cdots O _{1a}	2.58006	1.10991	1.48729	166.684	0.08295	0.14153	0.03516
		C10	N _{1b} -H \cdots O ₃	3.04308	1.01615	2.03413	171.646	0.01953	0.05993	0.05391
		C7	N _{1a} -H \cdots O _{1a}	2.84725	1.01948	1.94166	146.399	0.02758	0.07943	0.05008
tripeptid-NONZW-1	0.00	C13	O _{1b} -H \cdots N ₃	2.61101	1.05481	1.56692	169.430	0.07730	0.08487	0.01334
		C10	N _{1b} -H \cdots O ₃	2.99971	1.01736	1.99211	170.243	0.02164	0.06560	0.05757
		C7	N _{1a} -H \cdots O _{1a}	2.87756	1.01529	1.96593	147.981	0.02497	0.07766	0.04090
tripeptid-NONZW-2	3.61	C13	O _{1b} -H \cdots N ₃	2.61685	1.05035	1.57851	168.811	0.07534	0.08903	0.01112
		C10	N _{1b} -H \cdots O ₃	3.01229	1.01745	2.00173	171.812	0.02102	0.06433	0.05363
		C7	N _{1a} -H \cdots O _{1b}	2.93151	1.01303	2.08729	139.396	0.02025	0.06173	0.06709

Tablica D4. Relativne energije, geometrijski parametri i vrijednosti odabranih QTAIM parametara (u a.u. za BCP_{H...Y}) za tripeptid (u DMSO).

konformer	$\Delta E / \text{kJ mol}^{-1}$	oznaka	interakcija	$d(\text{X-H}\cdots\text{Y})/\text{\AA}$	$d(\text{X-H})/\text{\AA}$	$d(\text{H}\cdots\text{Y})/\text{\AA}$	$\alpha(\text{X-H-Y})/^\circ$	ρ	$\nabla^2\rho$	ε
tripeptid-ZW-1	0.00	C13	N ₃ -H \cdots O _{1b}	2.59048	1.11111	1.48623	171.582	0.08179	0.14159	0.03253
		C10	N _{1b} -H \cdots O ₃	3.02481	1.01606	2.01875	170.143	0.02039	0.06196	0.06040
		C7	N _{1a} -H \cdots O _{1a}	2.78548	1.02250	1.83546	153.002	0.03398	0.10147	0.04163
tripeptid-ZW-2	0.88	C13	N ₃ -H \cdots O _{1b}	2.57706	1.11158	2.48246	166.745	0.08403	0.14012	0.03496
		C10	N _{1b} -H \cdots O ₃	3.04545	1.01606	2.03656	171.662	0.01943	0.05961	0.05382
		C7	N _{1a} -H \cdots O _{1b}	2.84736	1.01944	1.94132	146.469	0.02760	0.07948	0.05007
tripeptid-NONZW-1	0.00	C13	O _{1b} -H \cdots N ₃	2.61194	1.05422	1.56855	169.372	0.07697	0.08549	0.01342
		C10	N _{1b} -H \cdots O ₃	3.00094	1.01729	1.99399	170.251	0.02158	0.06541	0.05755
		C7	N _{1a} -H \cdots O _{1a}	2.87688	1.01528	1.96459	148.081	0.02504	0.07787	0.04061
tripeptid-NONZW-2	3.80	C13	O _{1b} -H \cdots N ₃	2.61791	1.04964	1.58042	168.749	0.07497	0.08969	0.01122
		C10	N _{1b} -H \cdots O ₃	3.01417	1.01737	2.00363	171.843	0.02092	0.06405	0.05343
		C7	N _{1a} -H \cdots O _{1b}	2.93148	1.01302	2.08582	139.569	0.02031	0.06184	0.06622

Tablica D5. Relativne energije, geometrijski parametri i vrijednosti odabranih QTAIM parametara (u a.u. za BCP_{H...Y}) za tetrapeptid (u vodi).

konformer	$\Delta E / \text{kJ mol}^{-1}$	oznaka	interakcija	$d(\text{X-H}\cdots\text{Y})/\text{\AA}$	$d(\text{X-H})/\text{\AA}$	$d(\text{H}\cdots\text{Y})/\text{\AA}$	$\alpha(\text{X-H-Y})^\circ$	ρ	$\nabla^2\rho$	ε
tetrapeptid-ZW-1	0.00	C17	O _{4b} -H \cdots O _{1a}	2.61298	1.00104	1.61898	171.355	0.05387	0.15033	0.02561
		C16	N ₄ -H \cdots O _{1b}	2.57746	1.11724	1.47317	168.426	0.08347	0.14101	0.01780
		C10 (β)	N _{1a} -H \cdots O _{4a}	2.99286	1.01236	2.05013	153.952	0.01983	0.06114	0.05147
		C10	N _{1b} -H \cdots O ₃	3.32234	1.01380	2.31554	171.921	0.01083	0.03493	0.05528
		C9	N ₂ -H \cdots O _{4b}	3.03738	1.01913	2.09301	153.155	0.01976	0.05553	0.08593
tetrapeptid-ZW-2	1.54	C17	O _{4b} -H \cdots O _{1b}	2.69023	0.98849	1.74909	157.771	0.03921	0.11921	0.04520
		C16	N ₄ -H \cdots O _{1b}	2.58510	1.10797	1.48950	168.690	0.08184	0.14614	0.03630
		C10 (β)	N _{1a} -H \cdots O _{4a}	2.98590	1.01291	2.02960	156.491	0.02064	0.06327	0.06078
		C10	N _{1b} -H \cdots O ₃	3.26705	1.01424	2.25903	172.357	0.01222	0.03828	0.05084
		C9	N ₂ -H \cdots O _{4b}	3.06195	1.01639	2.16970	145.502	0.01721	0.05050	0.07605
tetrapeptid-ZW-3	5.24	C17	O _{4b} -H \cdots O _{1a}	2.62088	0.99843	1.64181	165.683	0.05137	0.14655	0.03363
		C16	N ₄ -H \cdots O _{1b}	2.59679	1.09645	1.51651	167.076	0.07372	0.15520	0.01708
		C8	N _{1b} -H \cdots O _{1a}	2.94742	1.02038	1.99275	154.648	0.02485	0.06763	0.03170
		C9	N ₂ -H \cdots O _{4b}	3.00976	1.01876	2.05519	155.059	0.02142	0.05943	0.05797
		C7	N _{1a} -H \cdots O _{1a}	2.87127	1.01268	2.10553	130.781	0.02063	0.06479	0.17484
tetrapeptid-NONZW-1	0.00	C17	O _{4b} -H \cdots O _{1a}	2.71557	0.98485	1.74821	166.486	0.03884	0.11676	0.01543
		C10	N _{1b} -H \cdots O ₃	2.93896	1.01759	1.93781	167.272	0.02423	0.07529	0.05774
		C7 (γ)	N ₂ -H \cdots O _{4a}	2.94118	1.01826	2.03536	146.865	0.02254	0.06471	0.03918

§ 8. DODATAK

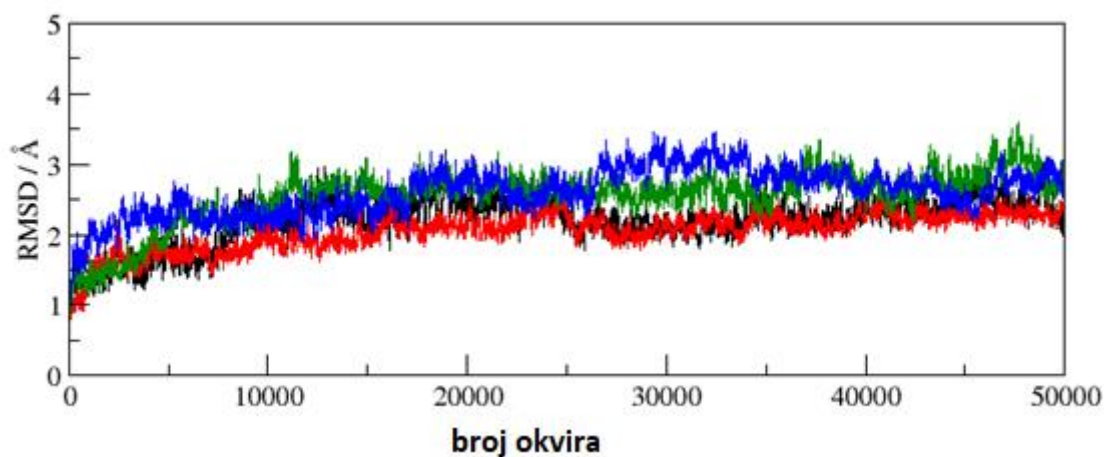
		xxvi								
		C7	N _{1a} -H···O _{1b}	2.89250	1.01471	1.99946	145.376	0.02334	0.07153	0.07038
		C16	O _{1b} -H···N ₄	2.59111	1.06548	1.53079	172.654	0.08492	0.06850	0.00229
		C6	N ₃ -H···O _{4b}	2.75334	1.02034	1.89080	140.206	0.03210	0.09437	0.04494
tetrapeptid-NONZW-2	4.93	C15	O _{4b} -H···O _{1c}	2.76991	0.98255	1.79174	173.268	0.03423	0.10595	0.02944
		C14	N ₄ -H···O _{1c}	3.14118	1.01931	2.19897	152.952	0.01498	0.04775	0.06220
		C12	O _{1b} -H···O ₃	2.70753	0.99030	1.76914	156.783	0.03561	0.10934	0.03044
		C10 (β)	N _{1a} -H···O _{4a}	3.01678	1.01689	2.03070	162.699	0.02042	0.06156	0.06484

Tablica D6. Relativne energije, geometrijski parametri i vrijednosti odabranih QTAIM parametara (u a.u. za BCP_{H...Y}) za tetrapeptid (u DMSO).

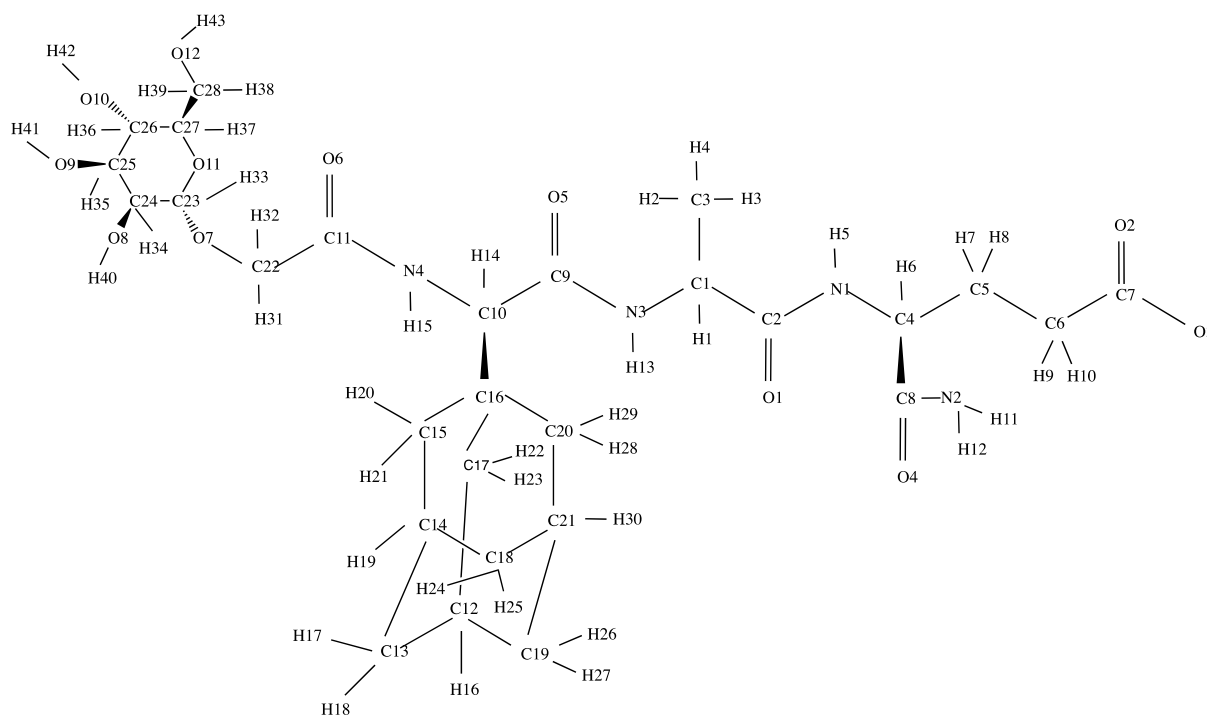
konformer	$\Delta E / \text{kJ mol}^{-1}$	oznaka	interakcija	$d(\text{X-H}\cdots\text{Y})/\text{\AA}$	$d(\text{X-H})/\text{\AA}$	$d(\text{H}\cdots\text{Y})/\text{\AA}$	$\alpha(\text{X-H-Y})^\circ$	ρ	$\nabla^2\rho$	ε
tetrapeptid-ZW-1	0.00	C17	O _{4b} -H \cdots O _{1a}	2.61177	1.00124	1.61749	171.401	0.05406	0.15072	0.02541
		C16	N ₄ -H \cdots O _{1b}	2.57342	1.11994	1.46643	168.427	0.08502	0.13842	0.01762
		C10 (β)	N _{1a} -H \cdots O _{4a}	2.99543	1.01228	2.05263	153.983	0.01972	0.06082	0.05133
		C10	N _{1b} -H \cdots O ₃	3.32539	1.01377	2.31840	172.051	0.01076	0.03476	0.05517
		C9	N ₂ -H \cdots O _{4b}	3.03720	1.01912	2.09208	153.290	0.01980	0.05560	0.08569
tetrapeptid-ZW-2	1.45	C17	O _{4b} -H \cdots O _{1b}	2.69108	0.98842	1.75043	157.672	0.03906	0.11883	0.04527
		C16	N ₄ -H \cdots O _{1b}	2.58205	1.10974	1.48455	168.749	0.08301	0.14464	0.03631
		C10 (β)	N _{1a} -H \cdots O _{4a}	2.98749	1.01284	2.03060	156.630	0.02059	0.06312	0.06083
		C10	N _{1b} -H \cdots O ₃	3.27697	1.01415	2.26886	172.478	0.01197	0.03765	0.05017
		C9	N ₂ -H \cdots O _{4b}	3.06235	1.01646	2.16653	145.989	0.01731	0.05063	0.07599
tetrapeptid-ZW-3	5.29	C17	O _{4b} -H \cdots O _{1a}	2.61926	0.99860	1.63984	165.743	0.05163	0.14708	0.03344
		C16	N ₄ -H \cdots O _{1b}	2.59455	1.09726	1.51349	167.062	0.05163	0.14708	0.03344
		C8	N _{1b} -H \cdots O _{1a}	2.94757	1.02031	1.99344	154.577	0.02482	0.06759	0.03150
		C9	N ₂ -H \cdots O _{4b}	3.00975	1.01875	2.05359	155.370	0.02148	0.05958	0.05804
		C7	N _{1a} -H \cdots O _{1a}	2.87271	1.01256	2.10857	130.640	0.02052	0.06452	0.17605
tetrapeptid-NONZW-1	0.00	C17	O _{4b} -H \cdots O _{1a}	2.71615	0.98481	1.74881	166.499	0.03878	0.11658	0.01539
		C10	N _{1b} -H \cdots O ₃	2.93988	1.01757	1.93835	167.427	0.02419	0.07518	0.05782
		C7 (γ)	N ₂ -H \cdots O _{4a}	2.94051	1.01826	2.03495	146.827	0.02257	0.06478	0.03935
		C7	N _{1a} -H \cdots O _{1b}	2.89236	1.01463	1.99969	145.334	0.02333	0.07153	0.07081

§ 8. DODATAK

		xxviii							
	C16	O _{1b} -H···N ₄	2.59217	1.06470	1.53257	172.700	0.08454	0.06955	0.00229
	C6	N ₃ -H···O _{4b}	2.75314	1.02035	1.89070	140.192	0.03210	0.09441	0.04523
tetrapeptid-NONZW-2	C15	O _{4b} -H···O _{1c}	2.77035	0.98255	1.79230	173.173	0.03419	0.10578	0.02942
4.90	C14	N ₄ -H···O _{1c}	3.13993	1.01930	2.19654	153.160	0.01504	0.04793	0.06256
	C12	O _{1b} -H···O ₃	2.70842	0.99023	1.77070	156.651	0.03547	0.10893	0.03026
	C10 (β)	N _{1a} -H···O _{4a}	3.01716	1.01684	2.03137	162.632	0.02038	0.06149	0.06497



Slika D1. RMSD profili (korijen iz srednjeg kvadrata odstupanja, engl. *root mean square deviation*) okosnica atoma kompleksa između ManAdDMP i SWISS-MODEL strukturnog džepa 1 (crno), SWISS-MODEL strukturnog džepa 2a (crveno), SWISS-MODEL strukturnog džepa 2b (zeleno), I-TASSER strukturnog džepa 1 (plavo), s obzirom na odgovarajuće uravnotežene strukture.

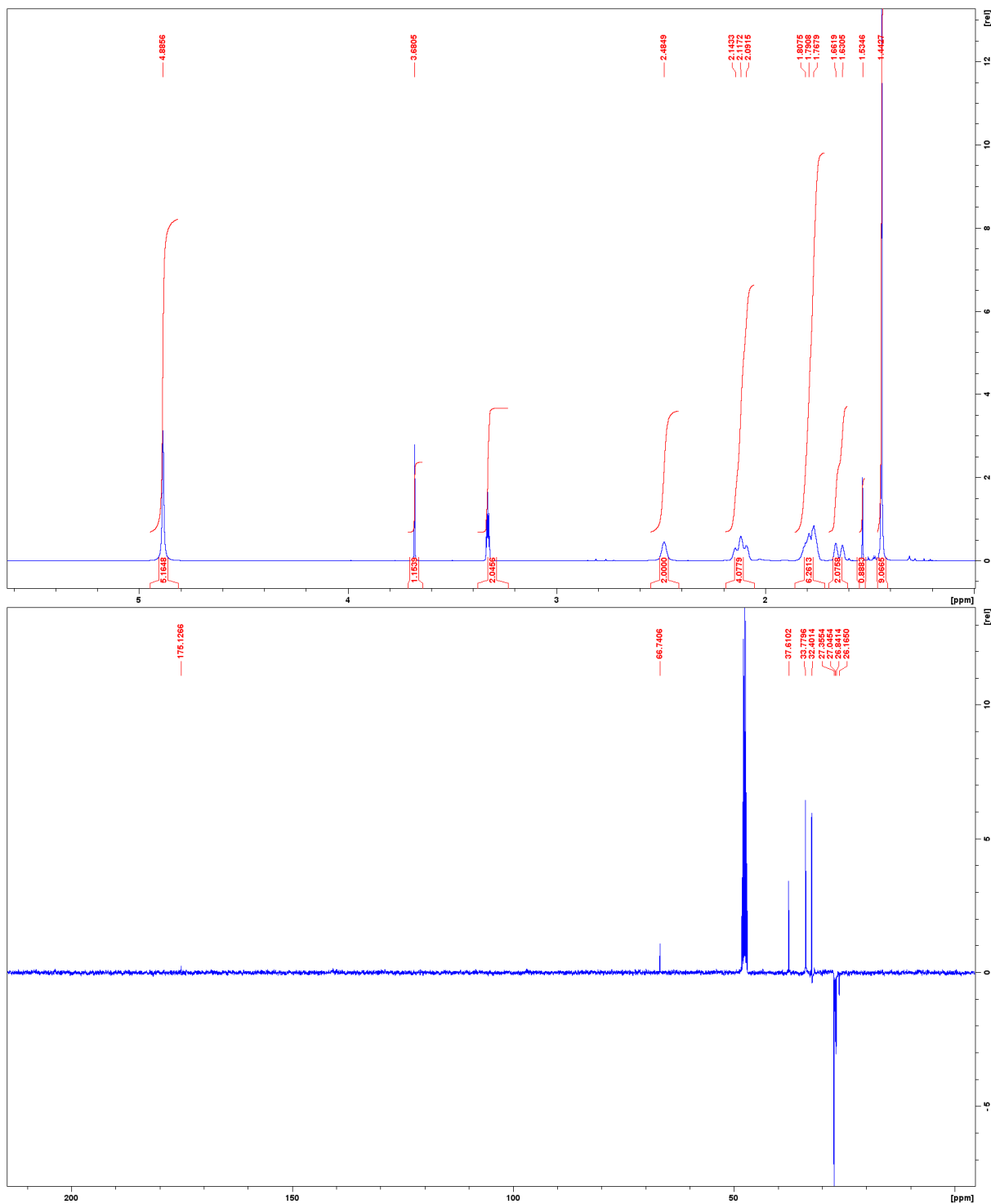
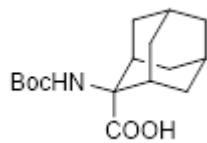


Slika D2. Nazivi atoma za ManAdDMP (Man-OCH₂-D-(1-Ad)Gly-L-Ala-D-izoGln).

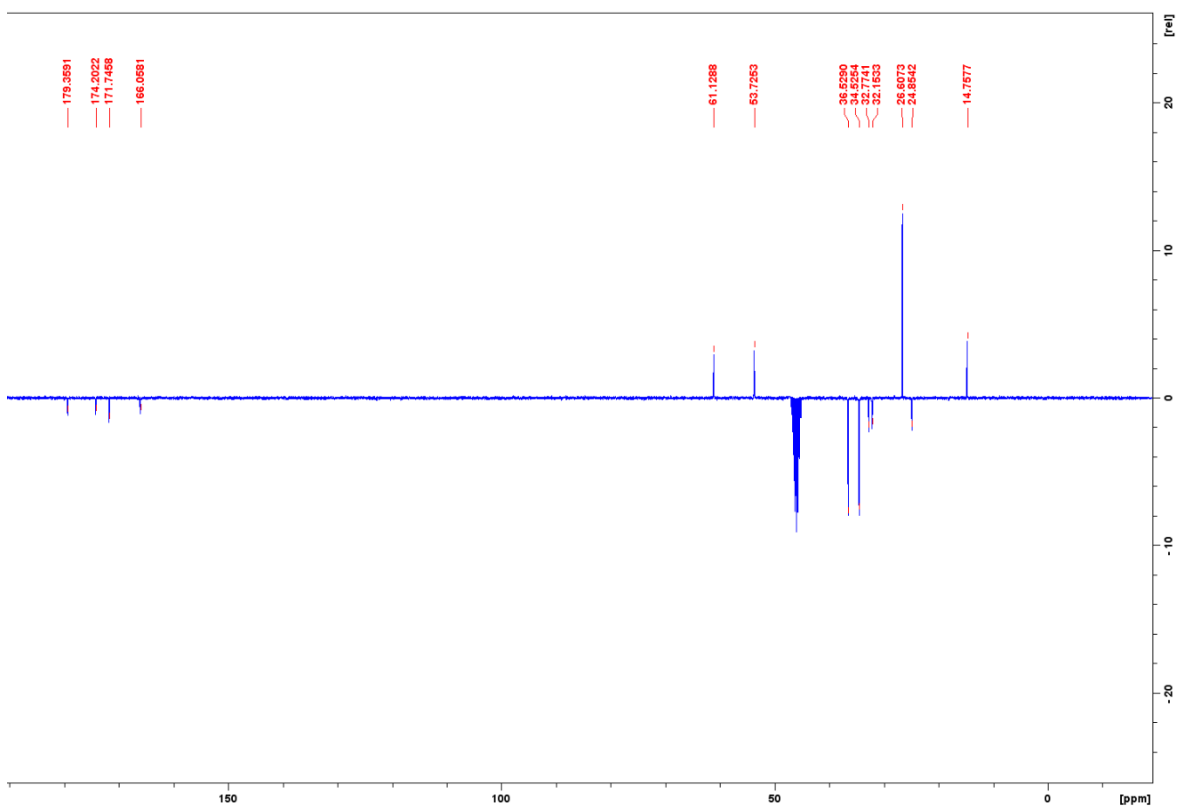
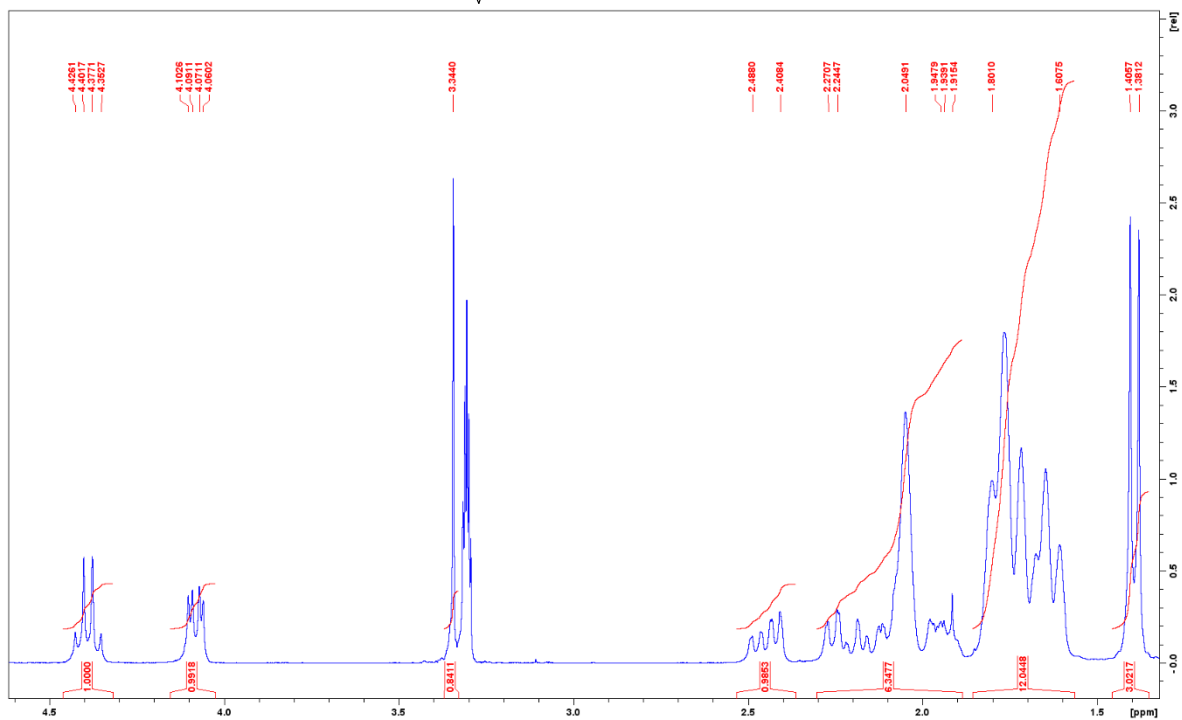
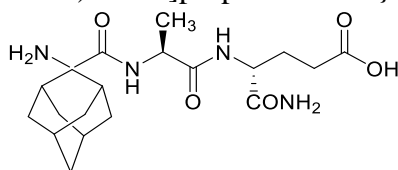
Tablica D7. Oznake atoma, vrste atoma i naboji za ManAdDMP (Man-OCH₂-D-(1-Ad)Gly-L-Ala-D-izoGln).

Ime atoma	Tip atoma	Naboji
O2	o	-0.766906
C7	c	0.813786
O3	o	-0.766906
C6	c3	-0.094142
H9	hc	0.021275
H10	hc	0.021275
C5	c3	0.063207
H7	hc	-0.008559
H8	hc	-0.008559
C4	c3	-0.037933
H6	h1	0.083452
C8	c	0.598285
N2	n	-0.704160
H11	hn	0.341131
H12	hn	0.341131
O4	o	-0.608272
N1	n	-0.241959
H5	hn	0.183747
C2	c	0.418101
O1	o	-0.550592
C1	c3	0.005489
C3	c3	-0.404308
H2	hc	0.128413
H3	hc	0.128413
H4	hc	0.128413
H1	h1	0.090281
N3	n	-0.236322
H13	hn	0.239939
C9	c	0.299319
O5	o	-0.420972
C10	c3	0.013540
H14	h1	0.143907
C16	c3	0.051085
C15	c3	0.025823
C14	c3	0.070438
C13	c3	-0.052381
C12	c3	0.070438
C17	c3	0.025823
H22	hc	-0.019048
H23	hc	-0.019048
H16	hc	-0.019276
C19	c3	-0.052381

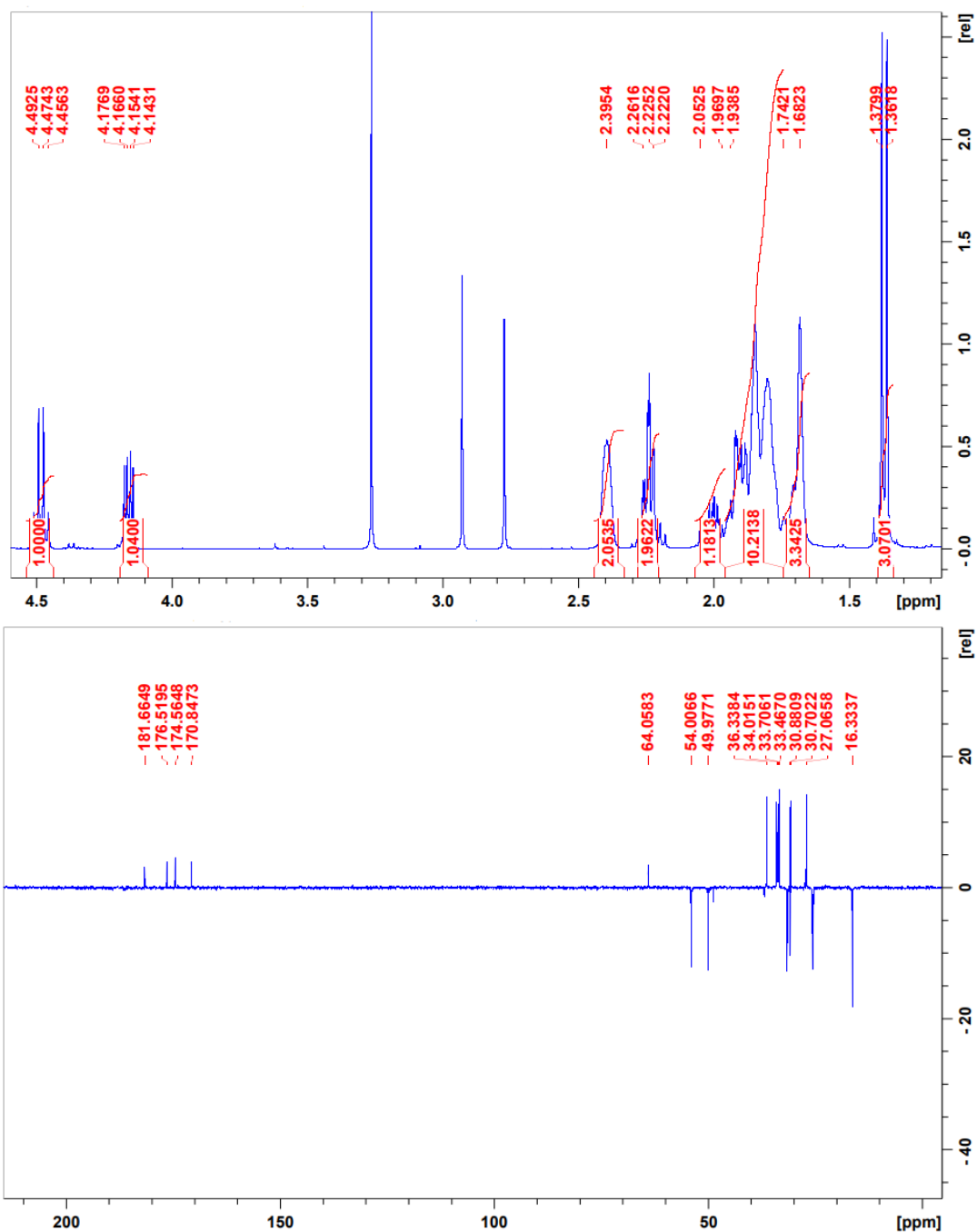
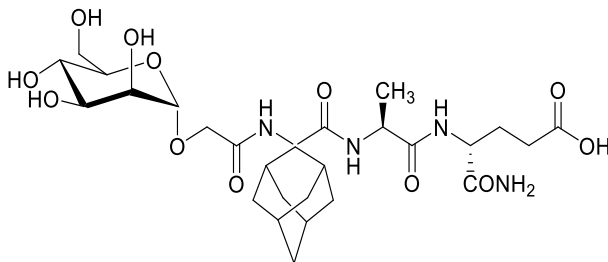
H26	hc	-0.004067
H27	hc	-0.004067
C21	c3	0.070438
C18	c3	-0.052381
H24	hc	-0.004067
H25	hc	-0.004067
C20	c3	0.025823
H28	hc	-0.019048
H29	hc	-0.019048
H30	hc	-0.019276
H17	hc	-0.004067
H18	hc	-0.004067
H19	hc	-0.019276
H20	hc	-0.019048
H21	hc	-0.019048
N4	n	-0.435455
H15	hn	0.243673
C11	c	0.437424
O6	o	-0.507193
C22	c3	0.363963
H31	h1	-0.001110
H32	h1	-0.001110
O7	os	-0.401157
C23	c3	-0.074814
O11	os	-0.281104
H33	h2	0.234910
C24	c3	0.237503
O8	oh	-0.677957
H40	ho	0.434164
H34	h1	0.096747
C25	c3	0.114957
O9	oh	-0.672593
H41	ho	0.413255
H35	h1	0.054589
C26	c3	0.394263
O10	oh	-0.700177
H42	ho	0.400311
H36	h1	0.062258
C27	c3	0.010100
H37	h1	0.060508
C28	c3	0.092733
H38	h1	0.064844
H39	h1	0.064844
O12	oh	-0.620371
H43	ho	0.392275

N-(*tert*-butilokarbonil)-2-aminoadamantan-2-karboksilna kiselina

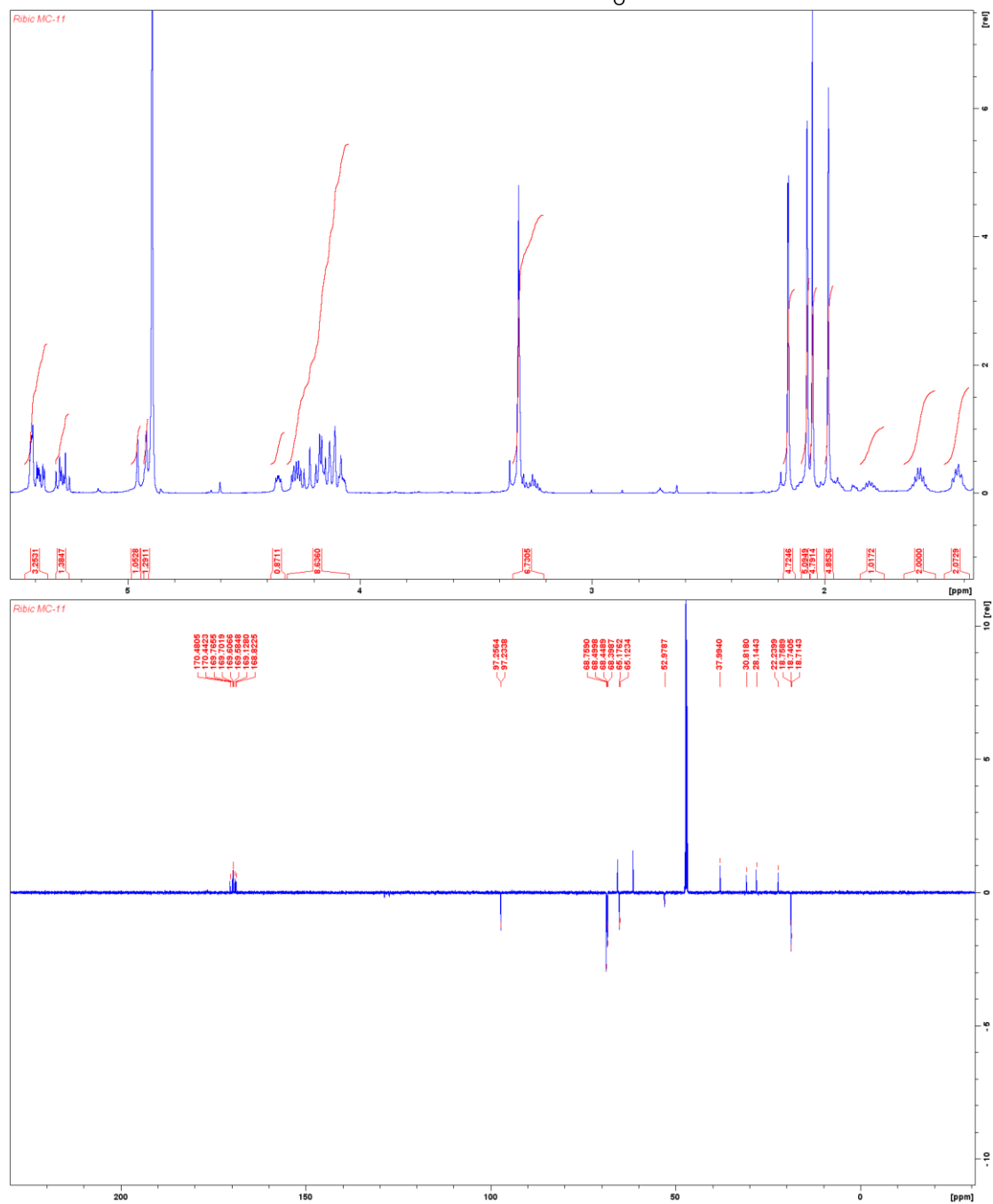
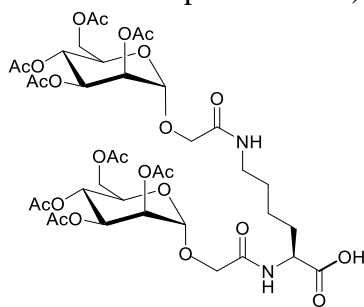
4-{2-[(2-aminoadamantan-2-karbonil)amino]propionilamino}-4-karbamoilbutanska kiselina



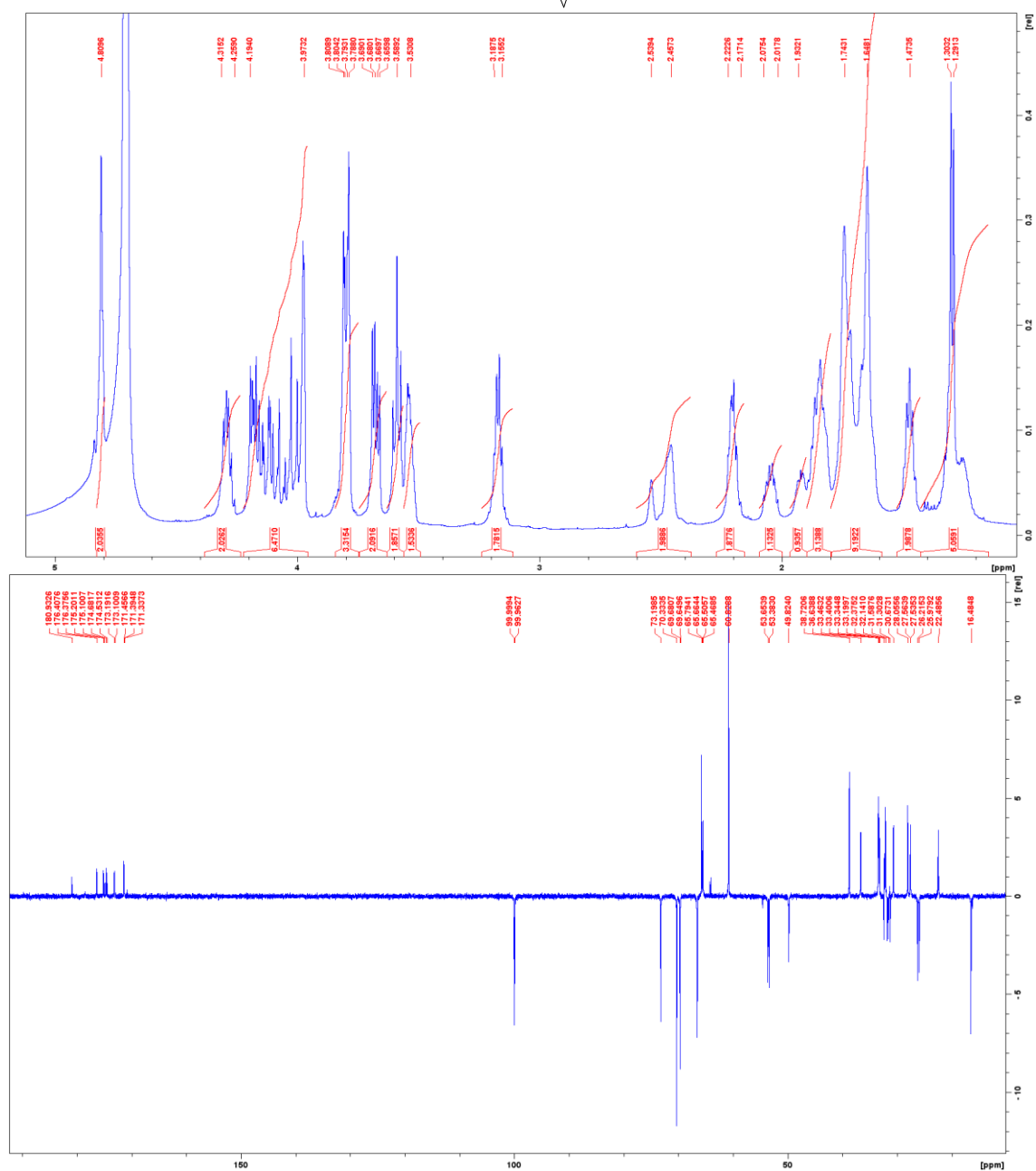
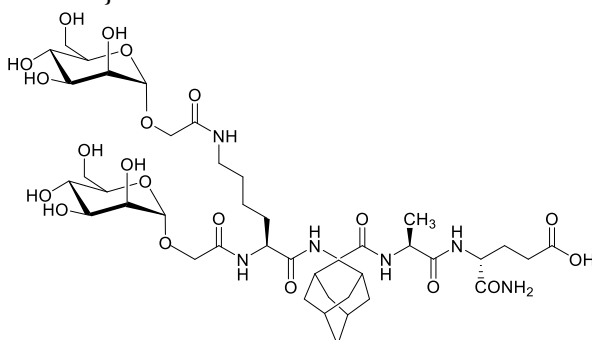
4-{2-[[2-(α -D-manopiranoziloksi)etanoil]-aminoadamantan-2-karbonil]amino]-propionilamino}-4-karbamoilbutanska kiselina



(2*S*)-2,6-Di[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-manopiranoziloksi)-acetilamino] heksanska kiselina



4-{2-[[[(2S)-2,6-di{2-(α -D-manopiranoziloksi)acetilamino}heksanoil]-amino-adamantan-2-karbonilamino]propionilamino]-4-karbamoilbutanska kiselina



§ 9. ŽIVOTOPIS

Marija Paurević je rođena 02. 07. 1988. godine u Pakracu. Opću gimnaziju „Srednja škola Novska“ upisuje 2003. godine u Novskoj te maturira 2007. godine. Iste godine upisuje Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Kemijski odsjek, preddiplomski studij kemije. Na diplomskom studiju odabire smjerove Organska kemija i Biokemija te diplomira 2012. godine na Zavodu za organsku kemiju s diplomskim radom naslova „Sinteza i konformacijska analiza manoziliranog adamantiltetrapeptida“. Dobitnica je Medalje Kemijskog odsjeka za izvrstan uspjeh u studiranju, Rektorove nagrade za studentski rad „Sinteza i konformacijska analiza adamantiltetrapeptidnih analoga muramildipeptida“ u akademskoj godini 2011. / 2012., zajedno s kolegicom Anamarijom Butumović, te stipendije Sisačko-moslavačke županije za studente. Od 2013. godine zaposlena je na Odjelu za kemiju (Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera) u Osijeku na radnom mjestu asistent na Zavodu za analitičku, organsku i primijenjenu kemiju. Sudjeluje u izvođenju nastave seminara Organska kemija 1 i 2, Biokemije 2, Metoda organske sinteze te Praktikumama organske kemije 1 i 2. Sudjelovala je na tri znanstvena projekta, brojnim znanstvenim radionicama i radionicama popularizacije znanosti. Udana je i majka dvoje djece, Rite i Petra.

Koautorica je na šest znanstvenih radova koje citira baza *Web of Science* (popis radova je priložen u Životopisu), petnaest priopćenja na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima, jednog obrazovnog materijala te neposredna voditeljica tri diplomska rada. Kao dobitnica stipendije za sudjelovanje, pohađala je Europsku školu medicinske kemije (Urbino, Italija, 2018.). Članica je Hrvatskog kemijskog društva.

Popis objavljenih radova u časopisima (baza WoS):

1. A. Maršavelski, M. Paurević, R. Ribić (2021) Mannosylated adamantane-containing desmuramyl peptide recognition by NOD2 receptor: a molecular dynamics study. *Organic & Biomolecular Chemistry*, DOI: 10.1039/D1OB00679G.
2. M. Paurević, A. Dandić, M. Šrajcer Gajdošik, B. Vidović, F. Perdih, T. Balić (2020) Efficient synthesis of new 17-, 18-, 19- and 20-membered N₂O₂-donor macrocycles by

- NaBH₄ reduction and metal picrate extraction studies. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 97, 87-98 doi:10.1007/s10847-020-00987-y.
3. R. Ribić, M. Paurević, S. Tomić (2019) Advances in Desmuramyl Peptide Research. *Croatica chemica acta*, 92 (2), 153-161 doi:10.5562/cca3556.
 4. R. Ribić, I. Kodrin, I. Biljan, M. Paurević, S. Tomić-Pisarović (2019) Ten-membered rings as key interaction motifs in folding of desmuramyl di-, tri-, and tetrapeptides. *Structural chemistry*, 30, 743-754 doi:10.1007/s11224-018-1234-x.
 5. D. Gašo-Sokač, M. Štivojević (2016) Diels-Alder “click” reactions. *Current organic chemistry*, 20 (21), 2211-2221 doi:10.2174/1385272820666160215235852.
 6. T. Balić, B. Matasović, B. Marković, A. Šter, M. Štivojević, D. Matković-Čalogović (2016) Synthesis, structural characterization and extraction studies of 17-, 18-, 19- and 20- membered N₂O₂-donor macrocyclic Schiff bases. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 3 (85), 217-226 doi:10.1007/s10847-016-0621-4.

Priopćenja na znanstvenim skupovima:

1. A. Dandić, M. Paurević, M. Šrajer Gajdošik, T. Balić, Synthesis and characterization of novel naphthodiazacrown macrocyclic Schiff bases, *European Winter School on Physical Organic Chemistry*, Bressanone, Italy, 2020.
2. M. Paurević, A. Dandić, M. Šrajer Gajdošik, B. Vidović, T. Balić, Efficient synthesis of new of 17-, 18-, 19- and 20-membered N₂O₂-donor macrocycles by NaBH₄ reduction, *18th Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry*, Ljubljana, Slovenija, 2019.
3. R. Ribić, M. Paurević, S. Tomić, Design and Synthesis of Immunostimulating Mannosylated Muropeptide Analogs Containing 2-Aminoadamantane-2- carboxylic Acid, *2nd Molecules Medicinal Chemistry Symposium: Facing Novel Challenges in Drug Discovery*, Barcelona, Španjolska, 2019.
4. R. Ribić, N. Tir, D. Škalamera, M. Paurević, S. Tomić, Synthesis of mannoconjugates of glycolyl desmuramyl peptides and evaluation of their immunostimulatory activity, *19th Tetrahedron Symposium*, Riva del Garda, Italija, 2018.
5. M. Andabak, I. Živković, M. Paurević, M. Šrajer Gajdošik, The role of metallothioneins in detoxification and oxidative stress, *ISC GREEN 2018 1st International Students' GREEN Conference*, Osijek, 2018.

6. M. Paurević, R. Ribić, I. Kodrin, S. Tomić, Synthesis, structural characterization and biological activities of desmuramyl peptide derivatives, *European School of Medicinal Chemistry - XXXVIII Advanced Course of Medicinal Chemistry and Seminar for PhD students*, Urbino, Italija, 2018.
7. I. Živković, M. Paurević, M. Šrajer Gajdošik, R. Ribić, S. Tomić, Razvoj sintetske metode za pripremu α -O-manozida octene kiseline, *International Conference 17th Ružička Days "Today Science - Tomorrow Industry"*, Osijek, Hrvatska, 2018.
8. E. Gotal, M. Šrajer Gajdošik, M. Paurević, A. Amić, Pregled biološke aktivnosti spojeva s oksadiazolskom jezgrom, *17th Ružička Days*, Vukovar, Hrvatska, 2018.
9. M. Paurević, R. Ribić, S. Tomić, Desmuramyl peptide derivatives – synthesis and adjuvant activity, *1st YOUNG SCIENTIST DAY – PhD Conference*, Osijek, Hrvatska, 2018.
10. R. Ribić, M. Paurević, N. Tir, S. Tomić, Synthesis of multiantennary mannose derived DESMURAMYL PEPTIDES, 10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Dubrovnik, Hrvatska, 2018.
11. M. Paurević, R. Ribić, I. Kodrin, I. Biljan, S. Tomić, Sinteza i konformacijska analiza desmuramil di-, tri- i tetrapeptida, 25. HRVATSKI SKUP KEMIČARA I KEMIJSKIH INŽENJERA, Poreč, Hrvatska, 2017.
12. D. Gašo-Sokač, M. Komar, M. Štivojević, V. Bušić, M. Habuda-Stanić, Bioreduction of aromatic aldehydes and ketones, 24. *Croatian meeting of Chemists and Chemical engineers*, Zagreb, Hrvatska, 2015.
13. D. Gašo-Sokač, V. Bušić, M. Štivojević, M. Habuda-Stanić, M. Nujić, Biokatalytic reduction of prochiral ketones, *International Scientific and Professional Conference 15th Ružička days "Today science - Tomorrow industry"*, Osijek, Hrvatska, 2014.
14. E. Kovač-Andrić, M. Paurević, M. Šrajer Gajdošik, Potential effects of sulphate particles and ozone on calcareous sinter at Plitvica lakes, *7th International Scientific and Professional Conference WATER FOR ALL*, Osijek, Hrvatska, 2017.
15. A. Butumović, M. Štivojević, R. Ribić, S. Tomić, SINTEZA MANOZILIRANIH I GALAKTOZILIRANIH ADAMANTILTETRAPEPTIDA, IX. *Susret mladih kemijskih inženjera*, Zagreb, Hrvatska, 2012.