



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Mirko Duvnjak

Sinteza i makrociklizacija oligopeptida

Zagreb, 2022.

Ovaj je rad izrađen pod mentorstvom doc. dr. sc. Nikole Cindre (potpora HrZZ projekta IP-2019-04-9560) te je predan na Natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022.

Popis korištenih kratica

Boc	<i>tert</i> -butiloksikarbonilna skupina
Cbz (Z)	benziloksikarbonilna skupina
DCM	diklormetan
DEPBT	dietil-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3(4H)-il-fosfat
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
ESI	elektroaspršenje (<i>eng.</i> electrospray ionization)
EtOAc	etil-acetat
HRMS	masena spektrometrija visokog razlučenja
MeOH	metanol
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
PyBOP	(benzotriazol-1-iloksi)tripirolidinofosfonijev heksafluorofosfat
TBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminijev tetrafluoroborat
TEA	triethylamin
TEACl	tetraetilamonijev klorid
TFA	trifluoroctena kiselina

Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	LITERATURNI PREGLED	2
2.1.	Struktura, svojstva i uloga ciklopeptida	2
2.2.	Sintetske strategije priprave ciklopeptida	5
3.	MATERIJALI I METODE	13
3.1.	Sinteza metilnog estera <i>N</i> -benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-fenilalanina (P1)	13
3.2.	Sinteza <i>N</i> -benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-fenilalanina (P2)	14
3.3.	Sinteza metil-glicil-glicinata hidroklorida (P3)	15
3.4.	Sinteza metilnog estera <i>N</i> -benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicina (P4)	16
3.5.	Sinteza <i>N</i> -benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicina (P5)	17
3.6.	Sinteza L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicina (1)	18
3.7.	Sinteza metilnog estera <i>N</i> -benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicil-L-fenilalanina (P6)	19
3.8.	Sinteza <i>N</i> -benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicil-L-fenilalanina (P7)	20
3.9.	Sinteza L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicil-L-fenilalanina (2)	21
3.10.	Sinteza metilnog estera L-fenilalanil-L-fenilalanina (P8)	22
3.11.	Sinteza metilnog estera <i>N</i> -benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicil-L-fenilalanil-L-fenilalanina (P9)	23
3.12.	Sinteza <i>N</i> -benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicil-L-fenilalanil-L-fenilalanina (P10)	24
3.13.	Sinteza L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicil-L-fenilalanil-L-fenilalanina (3)	25
3.14.	Sinteza ciklo-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicina (C2)	26
3.15.	Sinteza ciklo-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicina (C3)	27
4.	REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1.	Uvod	28
4.2.	Sinteza linearnih prekursora	29
4.2.1.	Sinteza tetrapeptida 1	29
4.2.2.	Sinteza pentapeptida 2	31
4.2.3.	Sinteza heksapeptida 3	32
4.3.	Makrociklizacije linearnih peptida	35
5.	ZAKLJUČAK	38
6.	ZAHVALE	39
7.	LITERATURNI IZVORI	40
8.	SAŽETAK	42
9.	SUMMARY	42
10.	DODATAK	43
11.	ŽIVOTOPIS	65

1. UVOD

Ciklopeptidi pripadaju skupini prirodnih organskih spojeva u kojima je polipeptidni lanac dio prstenaste strukture. Od prvog izoliranog ciklopeptida gramicidina S 1944. godine pa do danas otkrivene su i sintetizirane tisuće novih ciklopeptida različitih veličina, a posljednjih im je godina broj eksponencijalno narastao zbog poželjnih bioloških i terapijskih svojstava.

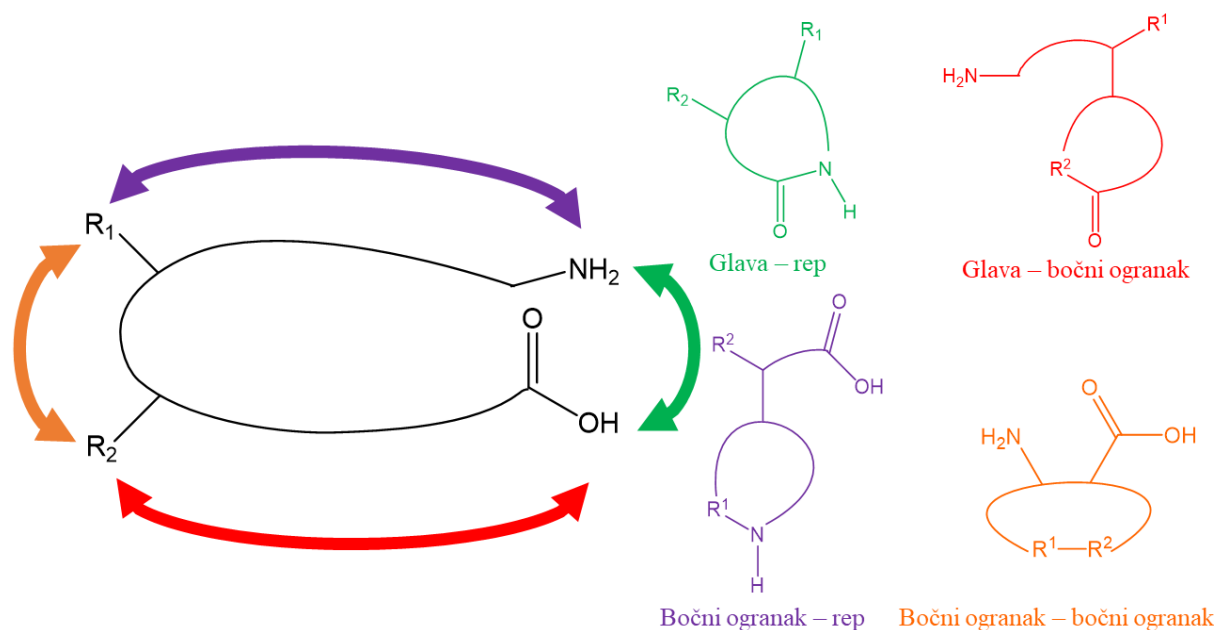
Zbog velike mogućnosti primjene peptida, pogotovo u primjerice medicini i farmaceutskoj industriji, razvijen je čitav niz sintetskih metoda, što sinteze u otopini (eng. *Liquid-phase peptide synthesis*) tako i sinteze na krutom nosaču (eng. *Solid-phase peptide synthesis*), a neki su postupci i automatizirani. Međutim, sinteza se ciklopeptida uglavnom svodi na makrociklizaciju linearnih prekursora, a upravo se taj korak pokazao izrazito zahtjevnim za provesti klasičnim sintetskim postupcima. Budući da početni spoj ima dva reaktivna kraja, ne čudi da su neželjene reakcije oligomerizacije i polimerizacije čest problem kod provođenja makrociklizacija, stoga se reakcije većinom provode pri velikom razrjeđenju (submilimolarna koncentracija) što zahtijeva velik volumen otapala, najčešće DMF-a.

Brojni ciklopeptidi u prirodi vrlo su snažni ionofori te imaju ulogu u prepoznavanju i transportu kationa i aniona. Znajući to razvijena je metoda makrociklizacije peptida potpomognute metalnim kationima (poput alkalijskih metala). Međutim, tek se nedavno primijetilo da i anioni mogu usmjeravati ciklizaciju¹ te je cilj ovoga rada bio razvijenu metodologiju kloridom potpomognute makrociklizacije primijeniti na novim supstratima. U tu svrhu pripravljena tri oligopeptida: tetrapeptid L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicin (**1**), pentapeptid L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicil-L-fenilalanin (**2**) i heksapeptid L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicil-L-fenilalanil-L-fenilalanina (**3**). Kao gradivne jedinice željenih ciljnih spojeva izabrane su aminokiseline L-fenilalanin i glicin zbog njihovih fizikalnih svojstava i relativno jednostavnih struktura bez funkcionalnosti u bočnim ograncima. Fenilalanin je u vodi slabo topljiva aminokiselina i sadrži UV kromofor u bočnom ogranku, a glicin je dobro topljiva aminokiselina.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Struktura, svojstva i uloga ciklopeptida

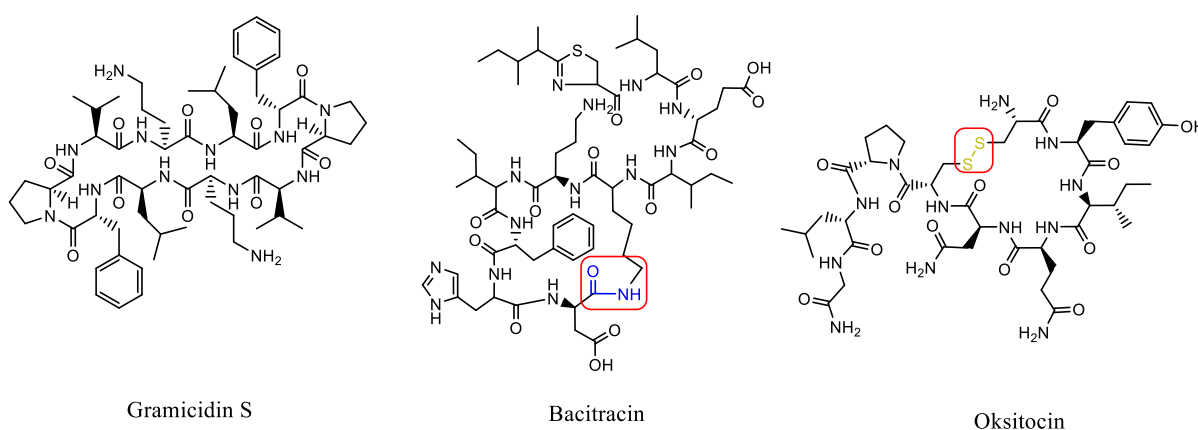
Ciklopeptidi su polipeptidni lanci čije su veze organizirane u cikličku strukturu, a postoji nekoliko načina na koji takva struktura može nastati. Neki su od glavnih načina primjerice nastajanje nove amidne veze između C- i N-kraja polipeptidnog lanca (*glava-rep*, eng. *head-to-tail*), između N-kraja polipeptidnog lanca i bočnog ogranka neke aminokiseline (bočni ogranak-*rep*, eng. *side chain-to-tail*), između C-kraja i bočnog ogranka (*glava-bočni ogranak*, eng. *head-to-side chain*) ili povezivanjem dvaju bočnih ogranka (eng. *side chain-to-side chain*) (Slika 1.). Najčešći tipovi veza koje nastaju ciklizacijom su amidna (laktamska), esterska (laktonska), tioesterska, eterska, disulfidna i sl.^{2,3}



Slika 1. Glavni načini ostvarivanja makrocikličke strukture kod peptida
(Prilagođeno prema: *Contemporary strategies for peptide macrocyclization*, str. 510)²

Prvi je izolirani ciklopeptid gramicidin S, otkrili su ga 1944. godine ruski mikrobiolog G. F. Gause i njegova supruga M. Brazhnikova, a nedugo nakon njegova otkrića počeo se koristiti za liječenje ozljeda vojnika tijekom Drugog svjetskog rata. Gramicidin S je ciklodekapeptid, građen od dva identična pentapeptidna lanca povezanih načinom *glava-rep*. Kristalna struktura gramicidina S riješena je 1957. godine. Ovi se ciklopeptidi, u čijoj su strukturi sve amidne veze klasične peptidne veze, još nazivaju i homodetskim ciklopeptidima. Ciklički izopeptidi sadrže barem jednu izopeptidnu vezu; između primjerice bočnog ogranka

lizina i C-kraja polipeptidnog lanca kao u bacitracinu, još jednom antibiotiku otkrivenom 1945. Ciklički depsipeptidi umjesto barem jedne amidne veze sadrže laktonsku (estersku) vezu, često ostvarenu preko bočnih ogranaka serina ili treonina. Još je jedan vrlo čest način nastajanja cikličke strukture kod peptida povezivanjem bočnih ogranaka cisteina pri čemu nastaje disulfidna veza, a najpoznatiji je primjer ovakvog tipa ciklopeptida oksitocin (Slika 2.).⁴⁻⁶

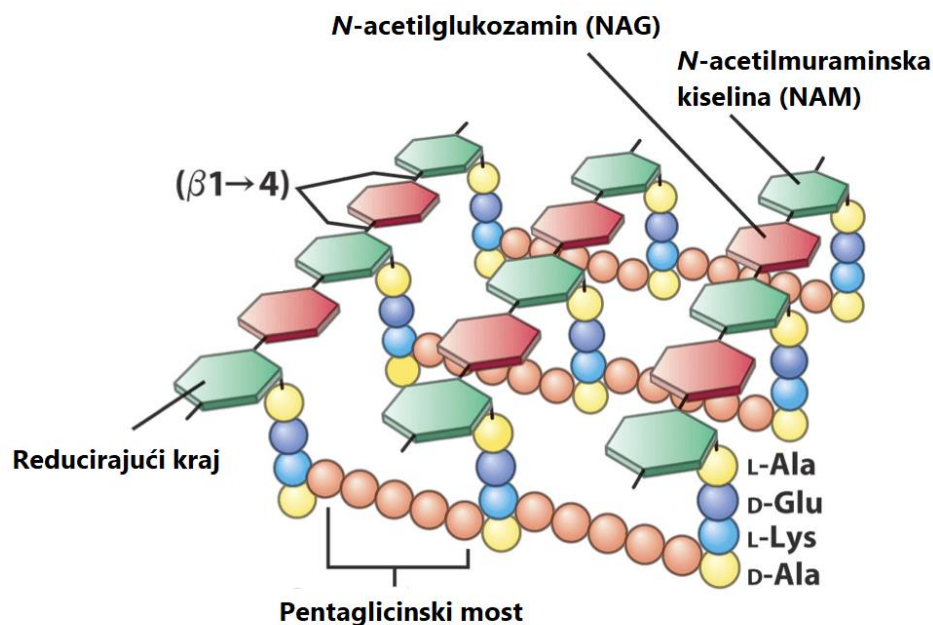


Slika 2. Strukture gramicidina S (homodetskog ciklopeptida), bacitracina (cikličkog izopeptida) i oksitocina

Zbog vrlo velike biorazlikosti, kompatibilnosti s biološkim sustavima i sličnosti s proteinima peptidi su se pokazali kao obećavajući kandidati u dizajnu lijekova i terapeutika te svoju primjenu nalaze u primjerice cjepivima, kao antibiotici, molekularni markeri u medicinskoj dijagnostici i sl.⁷⁻¹² Međutim, linearni peptidi podložni su razgradnji proteolitičkim enzimima *in vivo* što smanjuje njihovu bioraspoloživost, a time i mogućnost primjene u farmaceutskoj industriji. Iz tog je razloga jedan od mnogih načina modifikacije strukture peptida upravo ciklizacija jer su se ciklopeptidi pokazali otpornijima prema proteolizi, a njihova manje konformacijski slobodna, ali i dalje fleksibilna struktura čini ih otpornijim na metaboličku razgradnju i selektivnijim u usporedbi s analognim linearnim peptidima.¹³⁻¹⁵

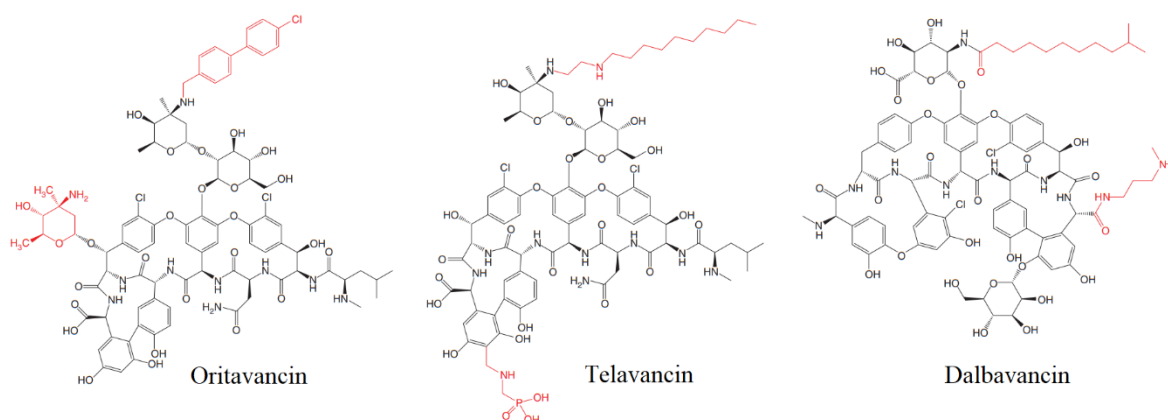
Opisana svojstva ciklopeptida, kao i njihova rigidna struktura te selektivnost u receptorskim i protein-proteinskim interakcijama, čini ih poželjnim metama u farmaceutskoj industriji. Brojni sintetski kao i prirodni ciklopeptidi biološki su aktivni; primjerice vankomicin je glikopeptidni antibiotik koji se koristi za liječenje brojnih bakterijskih infekcija poput kožnih, meningitisa, infekcije kostiju i zglobova i sl. Vankomicin inhibira sintezu stanične stijenke bakterija ostvarivanjem vodikovih veza s D-Ala-D-Ala motivom peptidoglikana. Stanična stijenka bakterija građena je od dugih polimernih mreža *N*-acetilmuraminske kiseline

(NAM) i *N*-acetilglukozamina (NAG). Šećerne komponente povezane su ($\beta 1 \rightarrow 4$) glikozidnim vezama, a na NAM je kovalentno vezan oligopeptid (s tri do pet aminokiselina) preko kojeg se ostvaruje mrežasta struktura između pojedinih NAM/NAG alternirajućih lanaca (Slika 3).⁴³⁻⁴⁵



Slika 3. Struktura peptidoglikana koji grade staničnu stijenku bakterija (Preuzeto i prilagođeno prema: *Lehninger Principles of Biochemistry*, str. 252)⁴³

Nastajanjem kompleksa vankomicina i jednog NAM/NAG lanca zbog steričke smetnje sprječava se tzv. *cross-linking* i transpeptidacija peptidoglikana te time i nastajanje stanične stijenke. Uz vankomicin koriste se i slični ciklički lipoglikopeptidi telavancin, dalbavancin i oritavancin (Slika 4.) koji djeluju na sličan način, a lipofilna ih ruka vjerojatno usidrava u staničnu membranu.^{45,46}

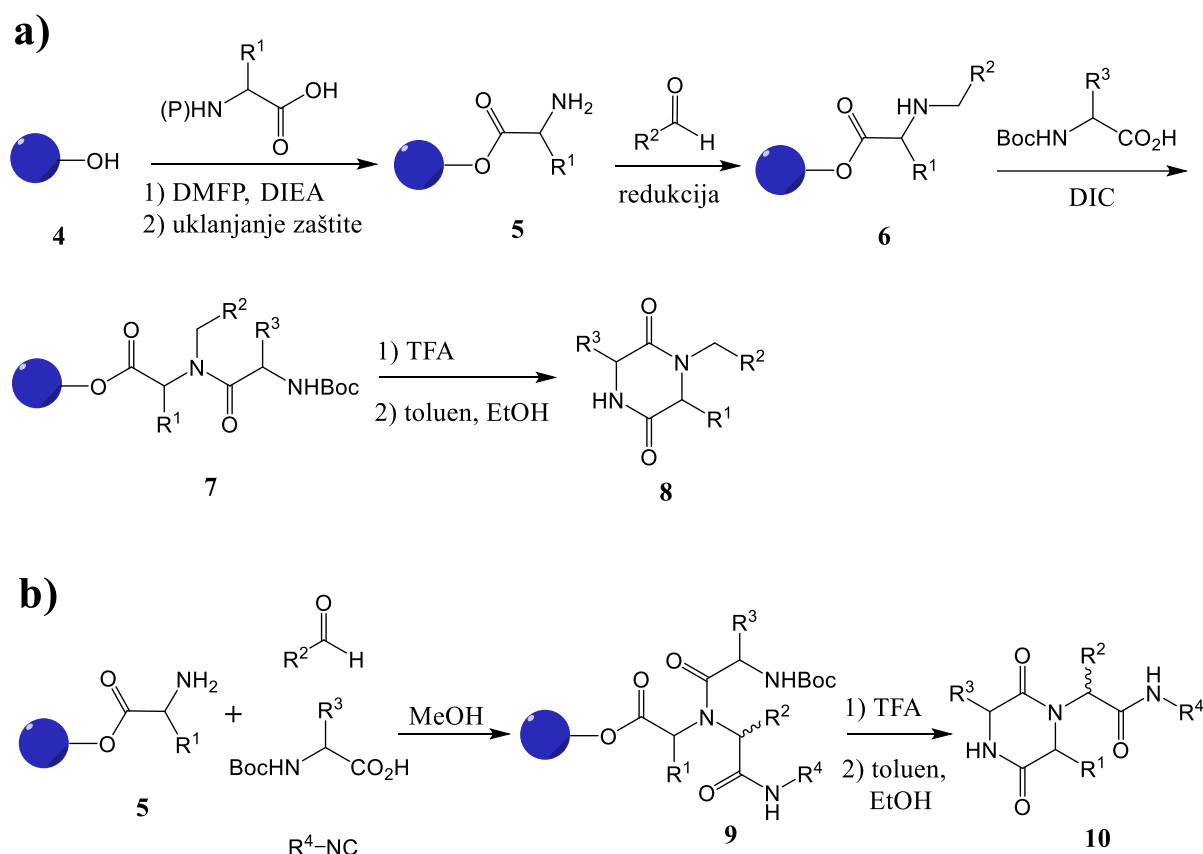


Slika 4. Strukture nekih ciklopeptidnih antibiotika

2.2. Sintetske strategije priprave ciklopeptida

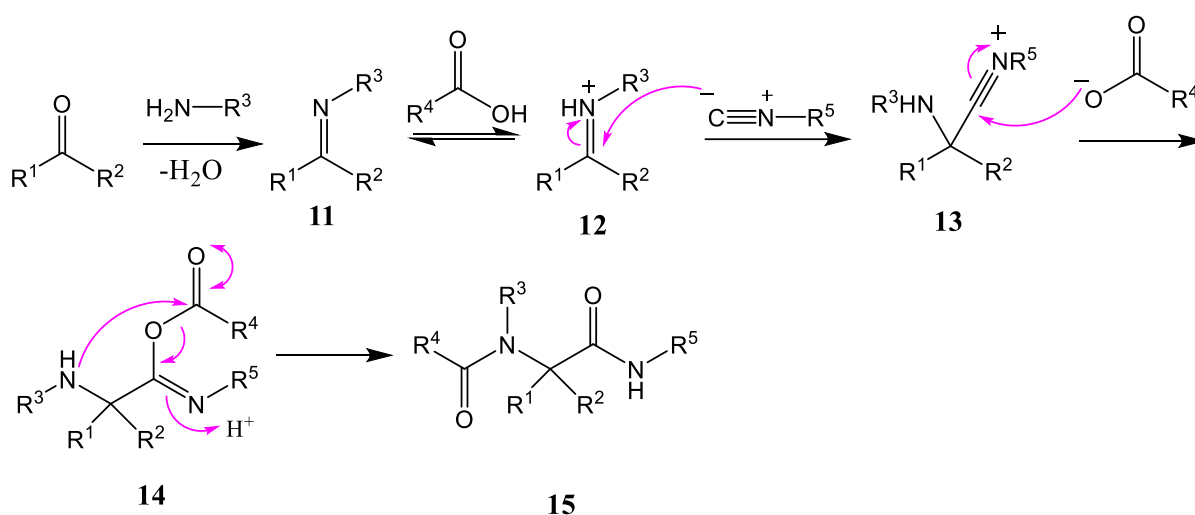
Zbog opisanih svojstava ciklopeptida i njihove mogućnosti primjene u industriji ne čudi da su razvijene brojne metode njihove sinteze, a pokazalo se da ih je vrlo teško pripremiti uobičajenim sintetskim metodama. Zadnji je korak u sintezi ciklopeptida laktamizacija za koju se mora postići entropijski nepovoljna konformacija peptida koja će reakciju usmjeriti prema nastajanju željenog produkta umjesto neželjenih intermolekulskih reakcija oligo- ili polimerizacije. Iz ovog se razloga otopinske makrociklizacije najčešće provode pri velikom razrjeđenju.

2,5-diketopiperazini najjednostavniji su predstavnici ove skupine, a nastaju *glava-rep* ciklizacijom dipeptida te su često neželjeni nusprodukti u otopinskoj sintezi peptida ili sintezi na krutom nosaču. Međutim, privukli su veliku pažnju zbog česte pojave ovakvih heterocikličkih spojeva u prirodi. K. Szardenings i suradnici razvili su dvije metode dobivanja supstituiranih 2,5-diketopiperazina koje su prikazane na Shemi 1.^{16,17}



Metoda **a**) temelji se na vezanju *N*-zaštićene aminokiseline na kruti nosač **4** pri čemu nakon uklanjanja zaštite nastaje **5**. Reduktivnom aminacijom s odgovarajućim aldehidom može se dobiti sekundarni amin **6** čijom se acilacijom dobiva zaštićeni dipeptid **7** koji je u ovom stupnju i dalje vezan na kruti nosač. Uklanjanjem Boc zaštitne skupine pomoću TFA i tretiranjem nosača u kiselim ili bazičnim uvjetima u smjesi toluena i etanola dobije se diketopiperazin **8**.

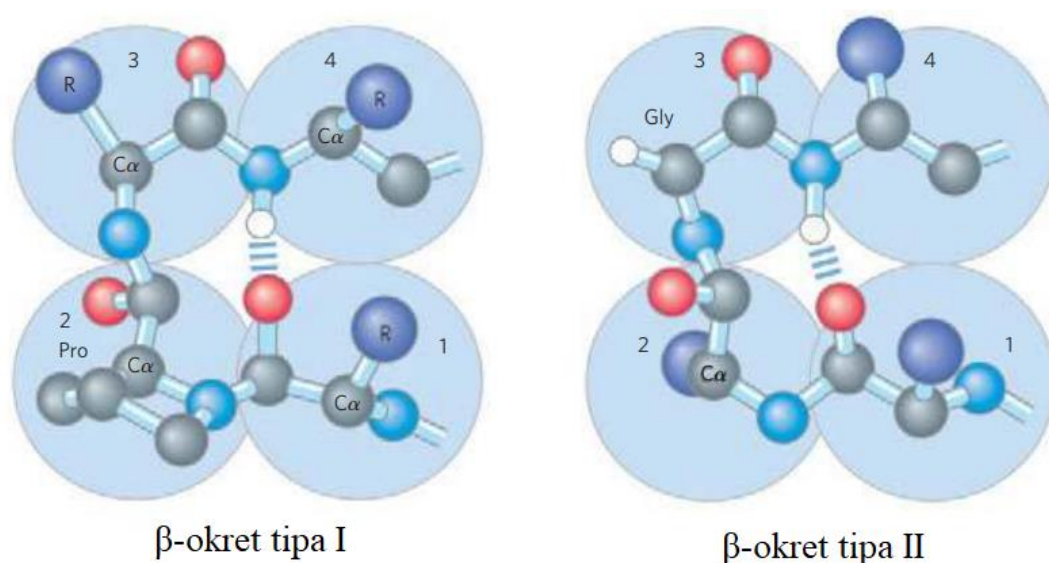
Isti adukt **5** može se koristiti i u metodi **b**) koja u prvom koraku koristi višekomponentnu Ugijevu reakciju. Prednost je ove metode što se izbjegne potencijalno problematičan korak acilacije sekundarnog amina kao u metodi **a**). Nakon Ugijeve kondenzacije dobivenom se spoju **9** uklanjaju zaštitne skupine i u smjesi toluena i etanola dimer disocira s krutog nosača i dobiva se diketopiperazin **10** u uglavnom boljim iskorištenjima nego u prvoj metodi.



Shema 2. Predloženi mehanizam Ugijeve reakcije¹⁸

Jedan je od mogućih mehanizama Ugijeve reakcije prikazan na Shemi 2. U prvom koraku karbonilni spoj i primarni amin daju Schiffovu bazu **11** koja izmjenom protona s karboksilnom kiselinom daje iminijev kation **12** koji je podložan nukleofilnoj adiciji. Adicijom izocijanida nastaje nitrilijev kation **13** koji još jednom nukleofilnom adicijom karboksilata daje imidat **14**. Zadnji je korak, ujedno i jedini ireverzibilni korak Ugijeve reakcije, Mummova pregradnja pri čemu dolazi do pomaka R^4 acilne grupe s kisikovog na dušikov atom pri čemu nastaje konačni produkt **15**. Ova je reakcija vrlo zanimljiva jer pripada tzv. *one-pot* reakcijama u kojoj se čak četiri komponente zajedno pomiješaju pri čemu nastaje željeni produkt uz izlazak samo molekule vode.¹⁸

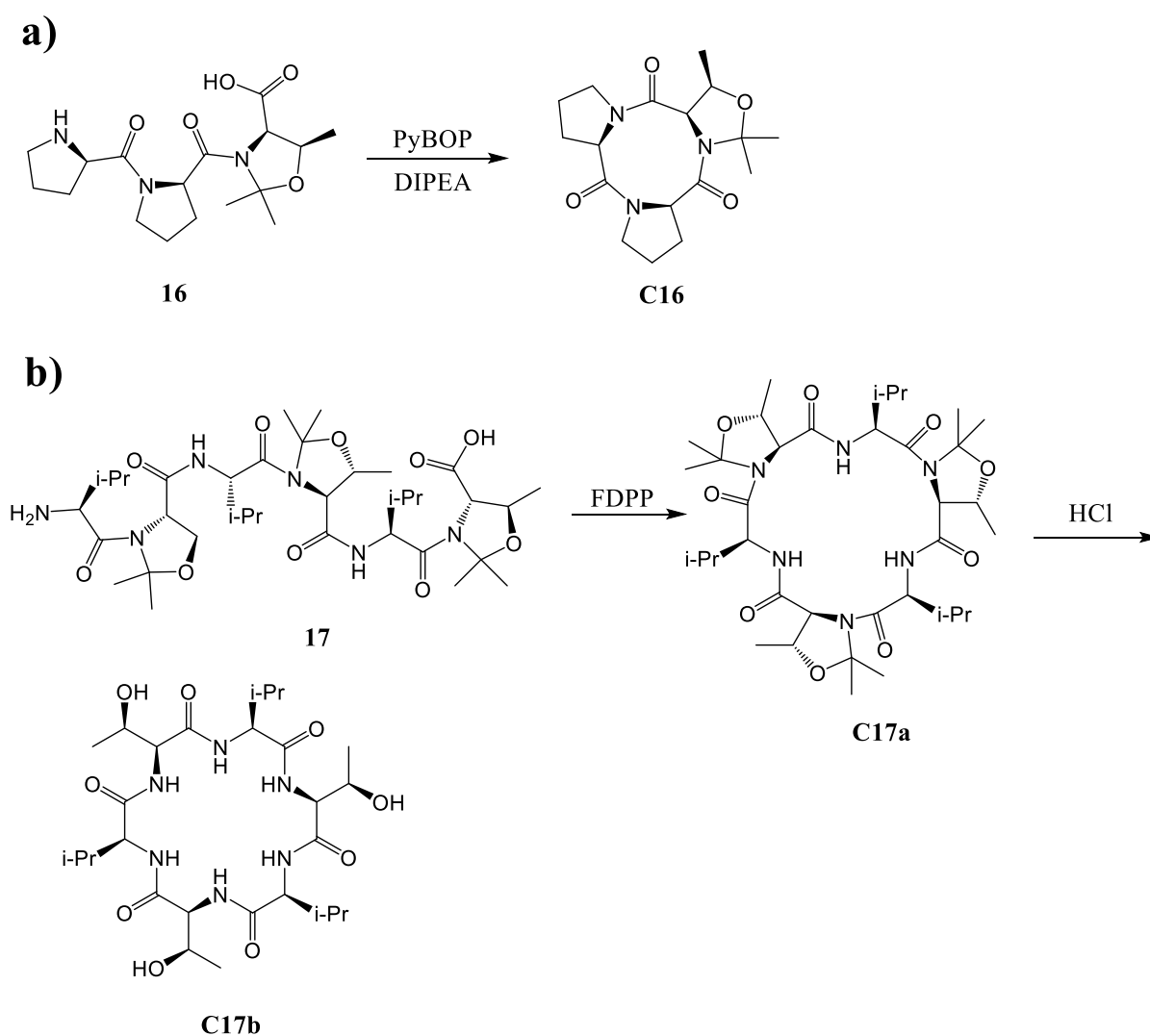
Glavni je faktor u mogućnosti ciklizacije linearnih peptida veličina prstena koji nastaje. Iako možda nije intuitivno, peptidi sa sedam ili više aminokiselina uglavnom se lako cikliziraju za razliku od nižih oligopeptida. Cikličke tripeptide koji sadrže L-aminokiseline gotovo je nemoguće sintetizirati jer uglavnom nastaju ciklodimeri (ciklički heksapeptidi) kao glavni produkti zbog nepovoljne konformacije *trans* peptidne veze. Ovaj se problem uspio zaobići uvođenjem konformacijskih elemenata koji omogućuju nastajanje *cis* amidne veze duž peptidne okosnice. U prirodi je analogan motiv ovome tzv. β -okret (Slika 5.), a vrlo često se u strukturi ovog motiva nalaze prolin, aminokiselina koja lakše može ostvariti *cis* konfiguraciju peptidne veze, i glicin, konformacijski vrlo fleksibilna aminokiselina.^{5,19}



Slika 5. Slikoviti prikaz β -okreta, čestog motiva sekundarne strukture u proteinima (Preuzeto i prilagođeno iz: *Lehninger Principles of Biochemistry*, str. 124)¹⁹

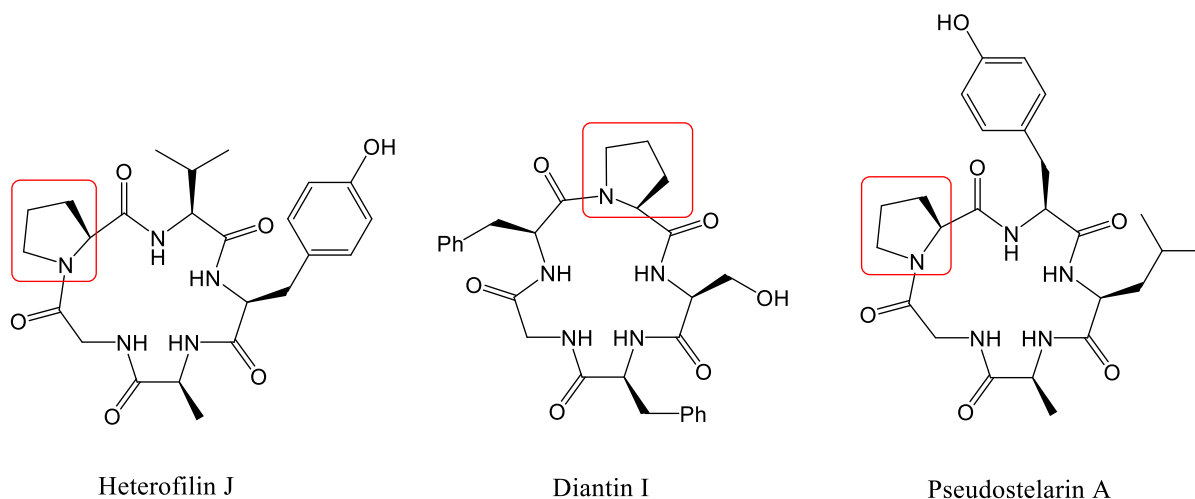
Upravo iz opisanog razloga peptide koji sadrže L-prolin ili pseudo-proline moguće je lako ciklizirati. Pseudo-prolini heterociklički su derivati serina i treonina, a mogu se u kiselim uvjetima hidrolizirati dajući odgovarajuće aminokiseline, stoga se ova strategija može koristiti i za sintezu ciklopeptida koji u svojoj strukturi nemaju motive koji uzrokuju konformacijske promjene. Na Shemi 3. prikazane su dvije ciklizacije u kojima je primijenjena ova metodologija. Shema 3a prikazuje ciklizaciju pseudo-prolinskog tripeptida **16** koja se događa vrlo brzo uz dodatak *coupling* reagensa PyBOP-a, a sama je reakcija vrlo elegantna te ne nastaju oligomerni nusprodukti zbog rigidne konformacije linearnog reaktanta. Ova se strategija može primijeniti i za više oligopeptide: Shema 3b prikazuje dobivanje cikloheksapeptida **C17b** koji je građen od naizmjenično povezanih aminokiselina L-valina i

L-treonina. Budući da bi odgovarajućem linearnom prekursoru H-(Val-Thr)₃-OH nedostajali konformacijski elementi koji daju *cis* amidnu vezu, pokazano je da se ciklizacija može provesti koristeći pseudo-prolinski derivat L-treonina u linearnom reaktantu **17**, a nakon ciklizacije kiselom hidrolizom spoja **C17a** na kraju se dobije željeni ciklopeptid **C17b**. Ciklotetrapeptidi također su građeni od napetih srednje velikih prstenova (12 atoma s četiri *trans* peptidne veze) te ih je teško dobiti iz istih razloga kao i ciklotripeptide. Uz aminokiselinu prolin i pseudo-prolinske derivate *cis* amidna veza može se uvesti u strukturu korištenjem *N*-metiliranih ili D-aminokiselina.^{20,21}



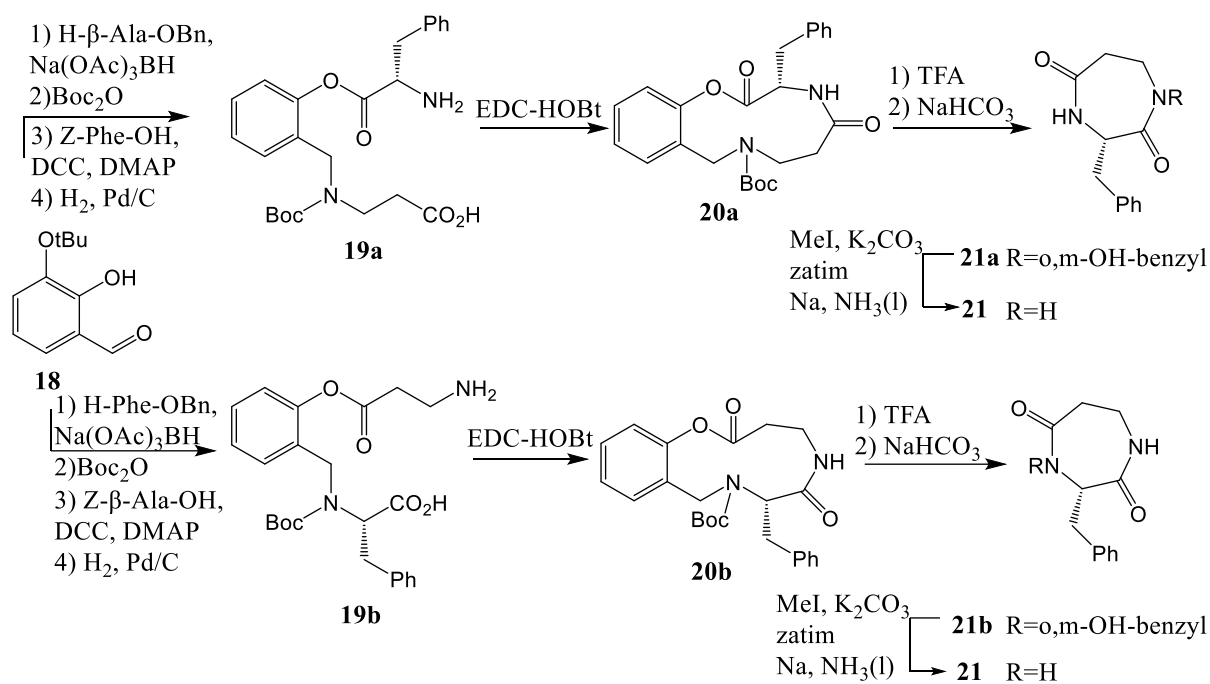
Shema 3. Makrociklizacije pseudo-prolinskih derivata: **a)** H-Pro-Pro-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH¹⁹ i **b)** H-(Val-Thr)₃-OH²¹

Homodetični ciklopentapeptidi koji sadrže samo L-aminokiseline rijetko se pronalaze u prirodi, a zbog steričkih napetosti u srednje velikom prstenu teško se pripravlja. Na Slici 6. prikazane su strukture triju ciklopentapeptida izoliranih iz kineskog karanfila (lat. *Dianthus chinensis* L.) koji pripadaju klinčićevkama (lat. Caryophyllaceae), porodici čije su biljke bogat izvor raznih cikličkih peptida koji pokazuju fiziološki aktivna svojstva. Može se primijetiti da sva tri peptida sadrže L-prolin te je njihova totalna sinteza uspješno provedena iz linearnih prekursora.²⁴

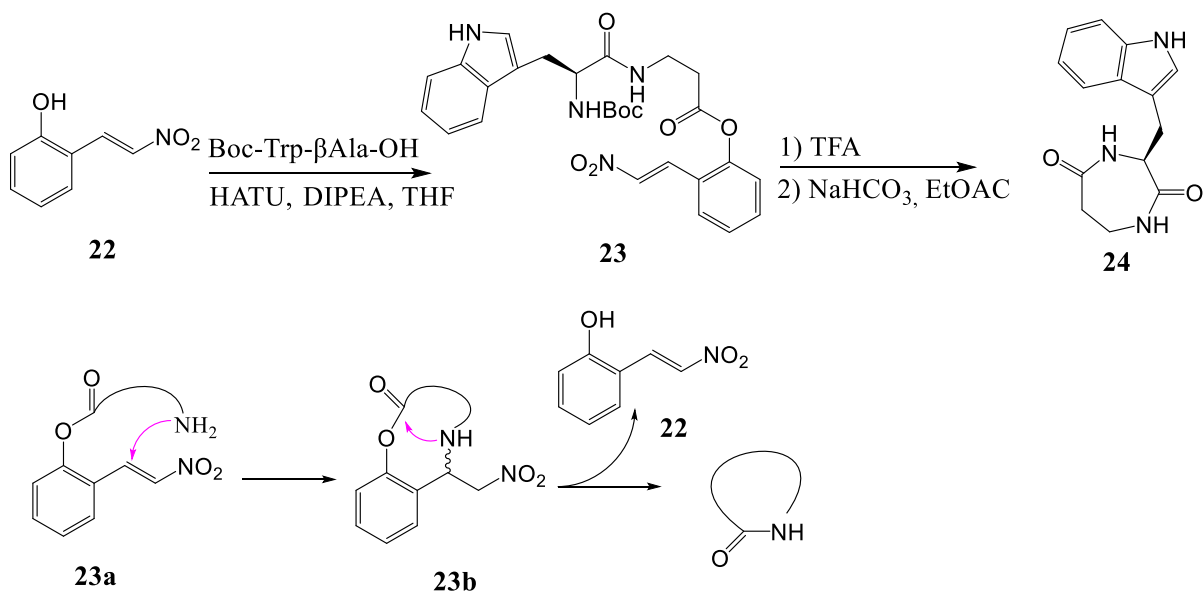


Slika 6. Strukture triju ciklopentapeptida izoliranih iz kineskog karanfila (lat. *Dianthus chinensis* L.)

J. H. van Maarseveen i suradnici razvili su dvije impresivne metode za sintezu sterički napetih ciklopeptida poput diketopiperazina sa sedmeročlanim prstenom građenih od α - i β -aminokiseline. Obje metode koriste „pomoćne“ molekule kao fleksibilno sidro koje dovodi u prostornu blizinu glavu i rep što omogućava korak ciklizacije. Jedna metoda koristi sterički ometen derivat salicilaldehida **18** koji u prvom koraku reduktivnom aminacijom s odgovarajućom aminokiselinom, zaštitom nastalog sekundarnog amina te zatim esterifikacijom s drugom aminokiselinom i uklanjanja Cbz zaštite i benzilnog estera katalitičkim hidrogeniranjem daje spoj **19a** odnosno **19b**. Terminalna karboksilna i amino-skupina dodatkom *coupling* reagensa daju makrocikličke spojeve **20a** odnosno **20b**. Reakcijom s TFA dolazi do skidanja Boc zaštite na aminu te u idućem koraku do migracije acilne skupine s kisikovog na dušikov atom (laktamizacija) dajući **21a** odnosno **21b**. U zadnjem se koraku metilira hidroksilna skupina na benzilnom supstituentu i uklanja redukcijom pomoću natrija u tekućem amonijaku (Shema 4).²²



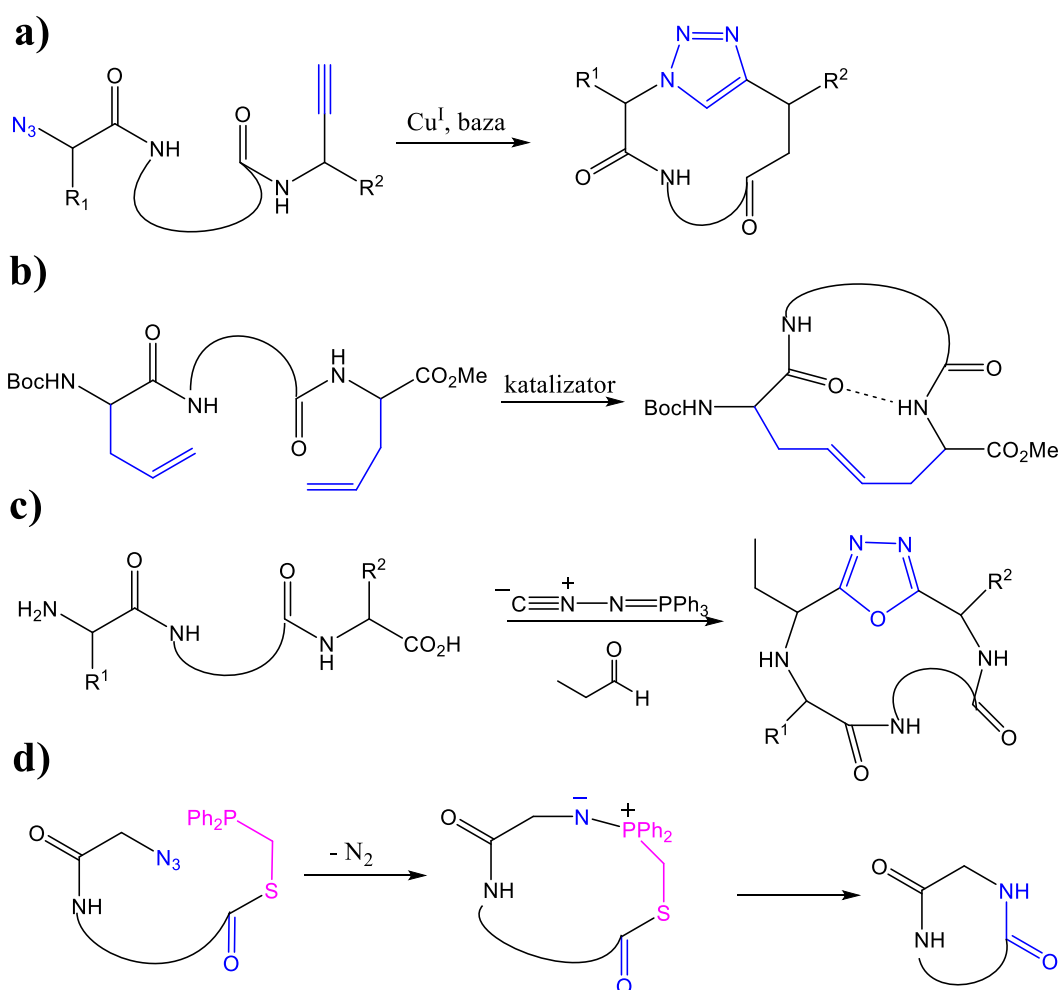
Shema 4. Sinteza diketopiperazina **21** pomoću derivata salicilaldehida **18** metodom koju su razvili van Maarseveen i suradnici²²



Shema 5. Sinteza diketopiperazina **24** pomoću derivata β -nitrostirena **22** metodom koju su razvili van Maarseveen i suradnici²³

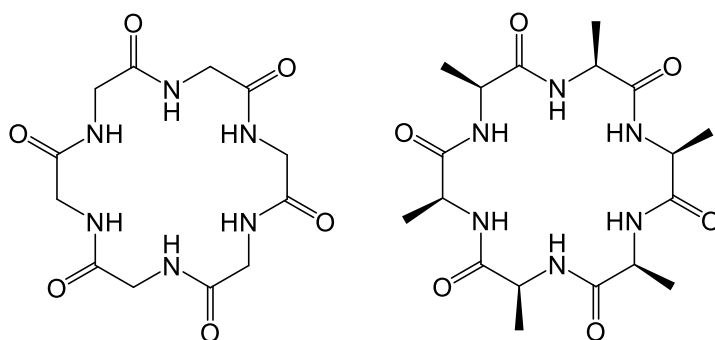
Druga metoda koristi derivate β -nitrostirena **22** koji se mogu acilirati dajući ester odgovarajućeg peptida **23**. Uklanjanjem karbamatne zaštite s N-kraja nastali amin **23a** može kaskadom konjugirane adicije (aza-Michaelova reakcija) (preko **23b**) i O \rightarrow N prijenosom acilne skupine daje konačni ciklički produkt **24** (Shema 5).²³ U literaturi su opisane još brojne vrlo inovativne metode ciklizacije peptida (od kojih su neke prikazane na Shemi 6.), ali važno je za napomenuti da su većini tih metoda polazni supstrati neprirodni peptidi kojima su na neki način modificirani ili peptidna okosnica ili bočni ogranci, zbog čega je bilo potrebno razviti novu metodologiju za *head-to-tail* makrociklizaciju prirodnih peptida.

U svrhu ovog rada posebno se ističu metalom potpomognute makrociklizacije. Poznato je da su neki prirodni ciklopeptidi vrlo dobri ionofori te da tvore stabilne komplekse s metalnim kationima *in vivo*. Tako primjerice valinomycin, ciklički dodekadepsi-peptid, djeluje kao selektivni receptor za kalijeve katione i sudjeluje u procesu prijenosa kalija niz koncentracijski gradijent preko stanične membrane koja je inače nepropusna za nabijene vrste.

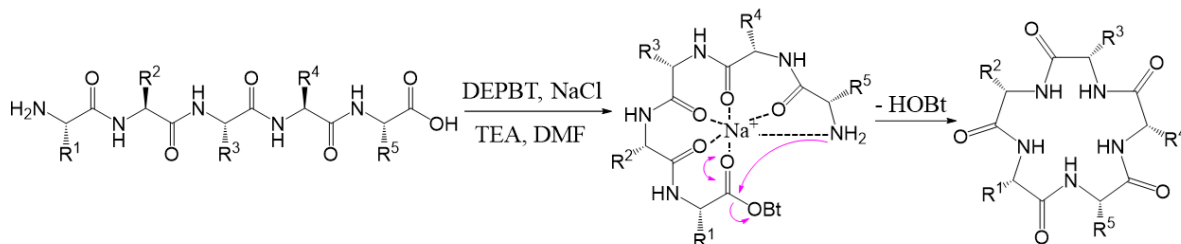


Shema 6. Neke metode makrociklizacije peptida: **a)** azid-alkin cikloadicija, **b)** zatvaranje prstena olefinskom metatezom, **c)** stvaranje oksadiazola, **d)** Staudingerova ligacija²⁵⁻³⁰

Razmatranje ciklopeptida kao ionskih receptora počelo je izradom teorijskih modela kompleksa cikloheksaglicila i cikloheksaalanila (Slika 7.) pri čemu se pokazalo da kisikovi atomi karbonilne skupine mogu koordinirati katione, a NH skupine peptidne okosnice koordiniraju anione.^{31,32} Iz ovog razloga, kao i uz činjenicu da postoje prirodni ciklopeptidi koji su snažni ionofori, ne čudi da je razvijena strategija ionom potpomognute *glava-rep* makrociklizacije čija je ideja da interakcijom s metalnim ionima u otopini linearni peptid postiže povoljnu konformaciju za zatvaranje prstena (Shema 7.).³³⁻³⁷



Slika 7. Strukture cikloheksaglicila (lijevo) i cikloheksaalanila (desno)



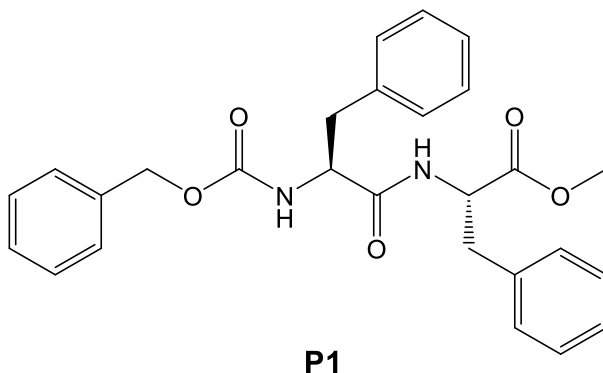
Shema 7. Pretpostavljeni mehanizam natrijem potpomognute makrociklizacije pentapeptida

Međutim, pokazalo se da anioni također imaju ulogu u reakcijama ciklizacije pri čemu se u nekim slučajevima prilikom dodatka natrijevih soli s nekoordinirajućim anionima (poput tetrafenilborata ili perklorata) uopće nije mogao izolirati ciklički produkt, a prilikom dodatka reagensa s nekoordinirajućim kationom poput tetraetilamonijeva klorida iskorištenja su ciklizacija bila znatno veća nego u slučaju dodatka natrijeva ili litijeva klorida. Ovaj bi rezultat upućivao da kloridni anion usmjerava reakciju ciklizacije te da ima značajniji templatni učinak nego kationi alkalijskih metala kao što se dosad smatralo što su i potvrdili kalorimetrijski eksperimenti i simulacije molekulske dinamike, metode koje se često koriste za proučavanje ovakvog tipa interakcija. Opisana strategija kloridom potpomognute makrociklizacije korištena je u sklopu ovoga rada.^{1,38}

3. MATERIJALI I METODE

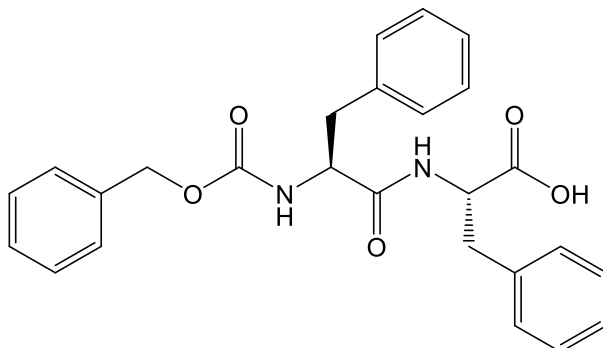
Sve kemikalije za sintezu bile su p.a. čistoće, nabavljene su od proizvođača Sigma i Carbolution te su korištene bez dodatnog pročišćavanja. TLC analize provedene su na pločicama silikagela 60 na staklenom nosaču s fluorescentnim indikatorom (Merck). U okviru ovoga rada pripremljeni spojevi identificirani su ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom te masenom spektrometrijom. Odgovarajući ^1H i ^{13}C NMR spektri prikupljeni su na instrumentu Bruker Ascend 400 MHz/54 mm opremljenim 5 mm inverznom probom BBI sa Z-gradijentnom zavojnicom (model PA BBI 1H/D-BB Z). Otopine su pripravljene u deuteriranim otapalima DMSO- d_6 i CDCl_3 s TMS-om kao unutarnjim standardom. ^1H NMR spektri kalibrirani su prema signalu TMS-a (0 ppm), a ^{13}C NMR spektri prema signalu otapala (CDCl_3 : 77,23 ppm, DMSO- d_6 : 39,52 ppm). Odgovarajući maseni spektri visoke rezolucije prikupljeni su na instrumentu Fisher Thermo Scientific Q Exactive Orbitrap s ESI tehnikom ionizacije.

3.1. Sinteza metilnog estera *N*-benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-fenilalanina (P1)



U okrugloj tikvici od 500 mL otopljeni su *N*-benziloksikarbonil-L-fenilalanin (6,94 g, 23,2 mmol) i metil-L-fenilalaninat hidroklorid (5,00 g, 23,2 mmol) u DMF-u (150 mL). Dobivena je otopina ohlađena na 0 °C, dodan je TEA (6,40 mL, 45,9 mmol) i u malim obrocima TBTU (8,11 g, 25,3 mmol). Reakcijska je smjesa miješana pri sobnoj temperaturi na magnetskoj miješalici 24 h. Nakon 24 h reakcijska je smjesa ohlađena na 0 °C i dokapavana je voda (300 mL) do taloženja produkta. Nastali je talog ofiltriran pri sniženome tlaku, ispran otopinom DMF:H₂O (1:2), zatim vodom i osušen na zraku. Dobiveno je 10,08 g (94 %) spoja **P1** u obliku bijelog praha i produkt je korišten u idućem koraku bez dodatnog pročišćavanja. ^1H i ^{13}C NMR spektri odgovaraju literaturno navedenim.³⁹

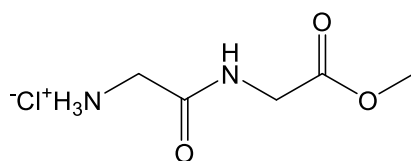
3.2. Sinteza *N*-benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-fenilalanina (**P2**)



P2

U okruglu tikvicu od 500 mL dodani su spoj **P1** (6,37g, 13,8 mmol) i metanol (175 mL), a zatim LiOH · H₂O (0,639 g, 15,2 mmol) i voda (50 mL). Reakcijska je smjesa miješana pri sobnoj temperaturi 48 h. Metanol je uparen na rotacijskom uparivaču, smjesa ohlađena na 0 °C, dokapana je klorovodična kiselina (18,0 mL, $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$) do pH ≈ 2 i nastala suspenzija snažno je miješana 10 min. U smjesu je dodan EtOAc (100 mL), sadržaj tikvice prebačen u lijevak za odjeljivanje i slojevi su odvojeni. Vodeni sloj ekstrahiran je još dva puta etil-acetatom (2×50 mL), organski su ekstrakti spojeni, isprani zasićenom otopinom NaCl (2×50 mL), osušeni na Na₂SO₄, profiltrirani preko vate i upareni do suhog. Dobiveno je 6,13 g (99 %) skoro čistog produkta **P2** u obliku bijelog praha koji je korišten u sljedećem koraku bez dodatnog pročišćavanja. ¹H i ¹³C NMR spektri odgovaraju literaturno navedenim.⁴⁰

3.3. Sinteza metil-glicil-glicinata hidroklorida (P3)



P3

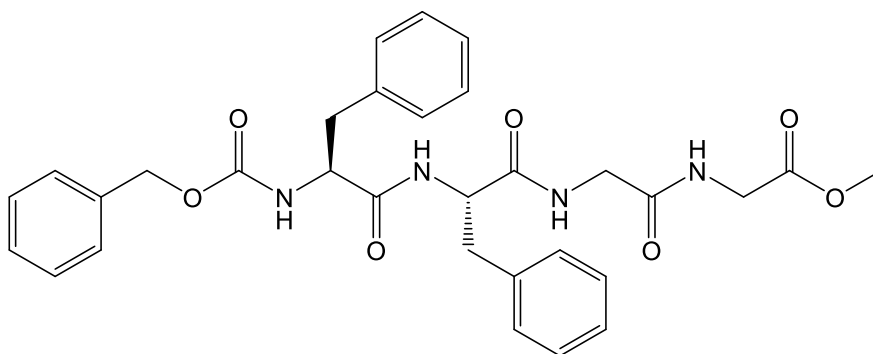
Glicil-glicin (5,00 g, 37,9 mmol) suspendiran je u suhom metanolu (150 mL) u okrugloj tikvici od 250 mL. Dobivena je smjesa ohlađena na 0 °C i uz stijenku tikvice dokapan je tionil-klorid (5,00 mL, 68,9 mmol). Na tikvicu je stavljena klor-kalcijeva cjevčica i nastala otopina miješana pri sobnoj temperaturi 24 h na magnetskoj miješalici. Reakcijska je smjesa uparena do suhog i naparena benzenom (50 mL). Sirovi je produkt prekrizaliziran iz izopropanola (150 mL). Dobiveno je 5,88 g (85 %) čistog spoja **P3** u obliku bijelog praha.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 9,01 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H), 8,30 (s, 3H), 3,95 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H), 3,65 (s, 3H), 3,60 (s, 2H)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 169,9, 166,6, 51,9, 40,5, 39,9

HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ – izračunato (C₅H₁₁N₂O₃⁺) – 147,0725, pronađeno 147,0767.

3.4. Sinteza metilnog estera *N*-benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicina (**P4**)



P4

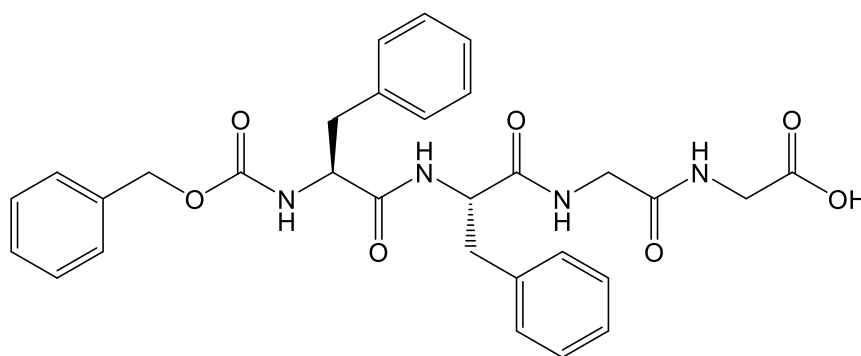
U okrugloj tikvici od 500 mL otopljeni su spojevi **P2** (2,42 g, 13,2 mmol) i **P3** (5,91 g, 13,2 mmol) u DMF-u (150 mL). Otopina je ohlađena na 0 °C, dodan je TEA (3,70 mL, 26,5 mmol) i u malim obrocima TBTU (4,67 g, 14,6 mmol). Reakcijska je smjesa miješana 24 h na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi. Smjesa je zatim ohlađena na 0 °C, dokapana voda (150 mL) i dodan EtOAc (150 mL). Sadržaj tikvice miješan je 10 minutai talog odfiltriran pri sniženome tlaku. Dobiveno je 2,42 g čistog spoja. Matičnica prebačena u lijevak za odjeljivanje i organski sloj odvojen je od vodenog. Organski sloj ispran je zasićenom otopinom NaCl (50 mL), osušen na Na₂SO₄, profiltriran preko vate i uparen do suhog. Dodan je izopropanol (50 mL), zatim Et₂O (100 mL) i nastali talog odfiltriran. Dobiveno je 3,14 g skoro čistog spoja. Ukupno je izolirano 5,56 g (73 %) spoja **P4** u obliku bijelog praha.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 8,32 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 8,23–8,18 (m, 2H), 7,47 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,35–7,03 (m, 15H), 4,96–4,78 (m, 2H), 4,59–4,54 (m, 1H), 4,28–4,22 (m, 1H), 3,88 (d, *J* = 5,9 Hz, 2H), 3,83–3,70 (m, 2H), 3,62 (s, 3H), 3,07 (dd, *J*₁ = 13,9 Hz, *J*₂ = 4,8 Hz, 1H), 2,94–2,83 (m, 2H), 2,66 (dd, *J*₁ = 13,8 Hz, *J*₂ = 10,8 Hz, 1H)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 171,6, 171,2, 170,2, 169,2, 155,7, 138,0, 137,6, 137,0, 129,3, 129,2, 128,3, 128,1, 128,0, 127,7, 127,4, 126,3, 126,2, 65,2, 56,0, 54,0, 51,7, 41,8, 40,5, 37,5, 37,4

HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ – izračunato (C₃₁H₃₅N₄O₇⁺) – 575,2461, pronađeno 575,2512.

3.5. Sinteza *N*-benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicina (P5)



P5

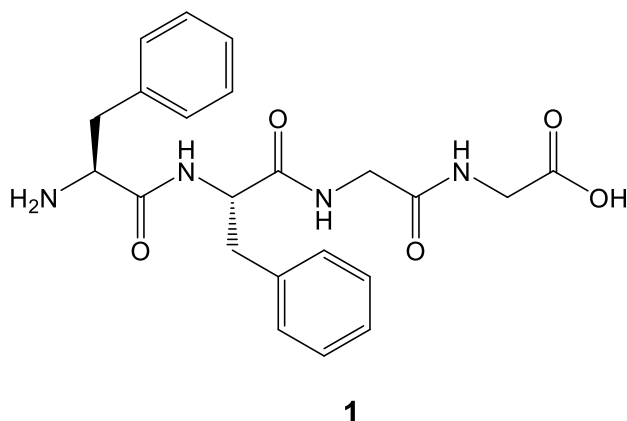
Spoj **P4** (6,68 g, 11,6 mmol) suspendiran je u metanolu (200 mL) u okrugloj tikvici od 500 mL. Dodani su LiOH · H₂O (0,540 g, 12,8 mmol) i zatim voda (60 mL) te je reakcijska smjesa miješana pri sobnoj temperaturi 48 h na magnetskoj miješalici. Metanol je uparen na rotacijskom uparivaču, smjesa ohlađena na 0 °C, zakiseljena dokapavanjem klorovodične kiseline (15 mL, $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$) do pH ≈ 2 . Nastali je talog odfiltriran, ispran vodom i osušen na zraku. Dobiveno je 4,97 g (76 %) čistog spoja **P5** u obliku bijelog praha.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ /ppm: 8,30 (t, $J = 5,7 \text{ Hz}$, 1H), 8,18 (d, $J = 7,9 \text{ Hz}$, 1H), 8,08 (t, $J = 5,8 \text{ Hz}$, 1H), 7,47 (d, $J = 8,8 \text{ Hz}$, 1H), 7,35–7,02 (m, 15H), 4,96–4,78 (m, 2H), 4,59–4,54 (m, 1H), 4,27–4,22 (m, 1H), 3,82–3,73 (m, 4H), 3,07 (dd, $J_1 = 13,9 \text{ Hz}$, $J_2 = 4,7 \text{ Hz}$, 1H), 2,95–2,83 (m, 2H), 2,66 (dd, $J_1 = 13,7 \text{ Hz}$, $J_2 = 10,7 \text{ Hz}$, 1H)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ /ppm: 171,5, 171,2, 171,1, 169,0, 155,7, 138,0, 137,6, 137,0, 129,3, 129,2, 128,3, 128,1, 128,0, 127,7, 127,4, 126,3, 126,2, 65,2, 56,1, 54,0, 41,8, 40,7, 37,5, 37,4

HRMS (ESI) m/z [M + H]⁺ – izračunato (C₃₀H₃₃N₄O₇⁺) – 561,2305, pronađeno 561,2354.

3.6. Sinteza L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicina (1)



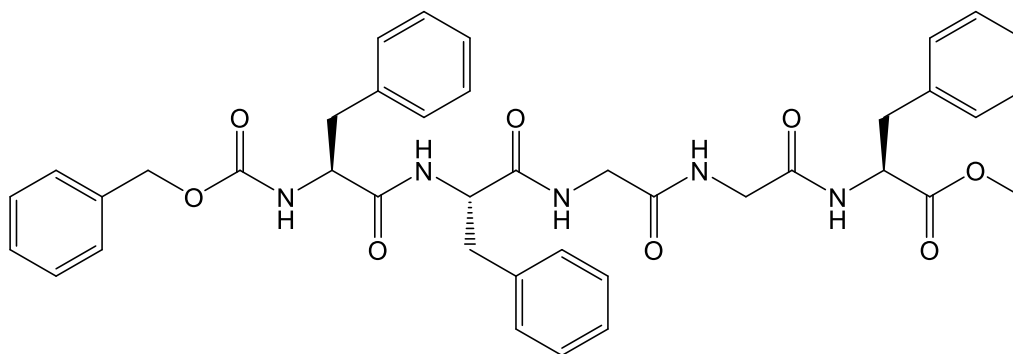
Spoj **P5** (1,96 g, 3,50 mmol) i amonijev formijat (2,20 g, 35,0 mmol) otopljeni su u metanolu (250 mL) u okrugloj tikvici od 500 mL. Dodan je Pd/C, na tikvicu spojeno povratno hladilo i smjesa je zagrijavana uz refluks 3 h. Reakcijska je smjesa ohlađena na sobnu temperaturu, katalizator uklonjen filtracijom preko stupca celita pri sniženome tlaku i otopina uparena do suhog. Sirovoj je krutini dodana voda (50 mL), sadržaj tikvice sonificiran na ultrazvučnoj kupelji, talog profiltriran i ispran s malo vode. Dobiveno je 1,11 g (75 %) čistog spoja **1** u obliku bijelog praha.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,42–8,38 (m, 2H), 7,88 (t, *J* = 5,4 Hz, 1H), 7,31–7,02 (m, 10H), 4,55–4,56 (m, 1H), 3,81–3,62 (m, 4H), 3,54 (dd, *J*₁ = 13,6 Hz, *J*₂ = 4,8 Hz, 1H), 3,06 (dd, *J*₁ = 13,8 Hz, *J*₂ = 4,8 Hz, 1H), 2,92–2,83 (m, 2H), 2,58 (dd, *J*₁ = 13,6 Hz, *J*₂ = 8,5 Hz, 1H)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 172,3, 171,3, 171,0, 168,6, 137,7, 137,5, 129,4, 129,3, 128,2, 128,1, 126,4, 126,3, 55,4, 53,7, 42,0, 41,5, 39,4, 37,5

HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ – izračunato (C₂₂H₂₇N₄O₅⁺) – 427,1937, pronađeno 427,1983.

3.7. Sinteza metilnog estera *N*-benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicil-L-fenilalanina (**P6**)



P6

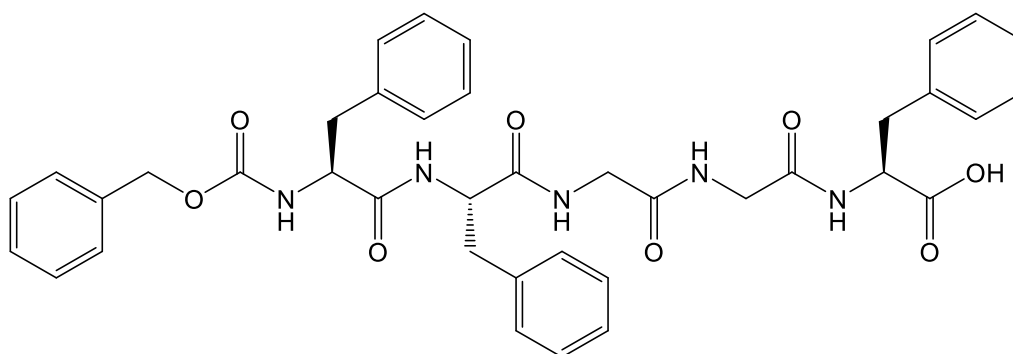
U okrugloj tikvici od 250 mL spoj **P5** (2,25 g, 4,01 mmol) i metil-L-fenilalaninat hidroklorid (0,87 g, 4,01 mmol) otopljeni su u DMF-u (75 mL). Otopina je ohlađena na 0 °C, dodan TEA (1,12 mL, 8,03 mmol) i TBTU (1,42 g, 4,41 mmol) te je reakcijska smjesa miješana je pri sobnoj temperaturi 24 h. Reakcijska je smjesa zatim ohlađena na 0 °C, dokapana voda (75 mL), nastali talog profiltriran, ispran otopinom DMF:H₂O (1:1), zatim vodom i osušen na zraku. Dobiveno je 2,53 g (87 %) čistog spoja **P6** u obliku bijelog praha.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 8,33 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,27 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 8,16 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 8,00 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,46 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,34–7,01 (m, 20H), 4,96–4,78 (m, 2H), 4,60–4,54 (m, 1H), 4,50–4,45 (m, 1H), 4,27–4,21 (m, 1H), 3,79–3,65 (m, 4H), 3,57 (s, 3H), 3,09–2,63 (m, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 171,8, 171,4, 171,3, 168,8, 168,7, 155,7, 138,1, 137,6, 137,03, 136,98, 129,3, 129,2, 129,1, 128,3, 128,04, 128,01, 127,7, 127,4, 126,6, 126,3, 126,2, 65,2, 56,1, 53,9, 53,6, 51,9, 42,0, 41,5, 37,6, 37,4, 36,8

HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ – izračunato (C₄₀H₄₄N₅O₈⁺) – 722,3145, pronađeno 722,3195.

3.8. Sinteza *N*-benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicil-L-fenilalanina (**P7**)



P7

U okruglu tikvicu od 500 mL dodani su spoj **P6** (3,40 g, 4,71 mmol) i metanol (200 mL). Zatim je dodan LiOH · H₂O (0,237 g, 5,65 mmol) i voda (50 mL) te je reakcijska smjesa miješana pri sobnoj temperaturi 24 h. Sadržaj tikvice zagrijan je do vrenja da se sav sadržaj otopi i smjesa je miješana još 24 h. Metanol je uparen na rotacijskom uparivaču, smjesa ohlađena na 0 °C i dokapana klorovodična kiselina (10 mL, $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$) do pH ≈ 2 . Nastali je talog profiltriran, ispran vodom i osušen na zraku. Dobiveno je 2,86 g (86 %) spoja **P7** u obliku bijelog praha te je korišten u iduće koraku bez dodatnog pročišćavanja.

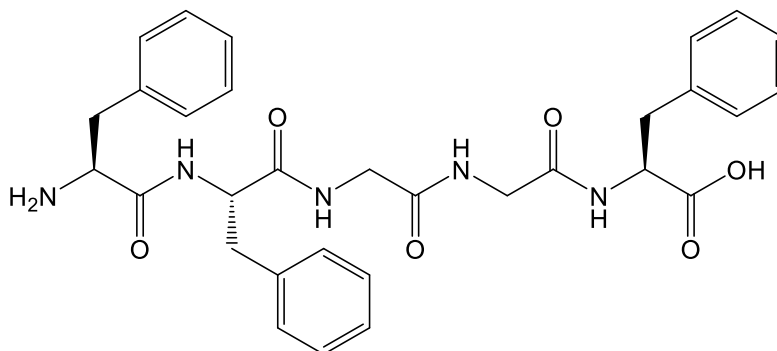
Napomena: Sadržaj tikvice zagrijan je do vrenja jer reakcija nije išla do završetka nakon prvih 24 h pri sobnoj temperaturi.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ /ppm: 8,28 (t, $J = 5,6 \text{ Hz}$, 1H), 8,21 (d, $J = 8,0 \text{ Hz}$, 1H), 8,09 (d, $J = 7,9 \text{ Hz}$, 1H), 8,00 (t, $J = 5,5 \text{ Hz}$, 1H), 7,48 (d, $J = 8,7 \text{ Hz}$, 1H), 7,34–7,15 (m, 20H), 4,96–4,75 (m, 2H), 4,60–4,55 (m, 1H), 4,42–4,37 (m, 1H), 4,26–4,21 (m, 1H), 3,75–3,73 (m, 2H), 3,67 (dd, $J_1 = 16,7 \text{ Hz}$, $J_2 = 5,7 \text{ Hz}$, 2H), 3,09–3,03 (m, 2H), 2,94–2,82 (m, 3H), 2,67 (dd, $J_1 = 13,4 \text{ Hz}$, $J_2 = 11,1 \text{ Hz}$, 1H)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ /ppm: 172,8, 171,4, 171,3, 168,8, 168,4, 155,7, 138,1, 137,73, 137,65, 137,0, 129,3, 129,2, 128,3, 128,1, 128,0, 127,7, 127,4, 126,33, 126,26, 126,2, 65,2, 56,1, 53,9, 53,8, 42,1, 41,7, 37,6, 37,4, 37,0

HRMS (ESI) m/z [M + H]⁺ – izračunato (C₃₉H₄₂N₅O₈⁺) – 708,2989, pronađeno 708,3043.

3.9. Sinteza L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicil-L-fenilalanina (2)



2

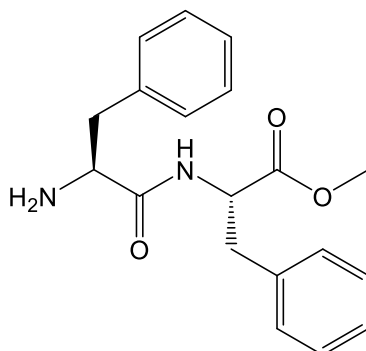
Spoj **P7** (2,80 g, 3,96 mmol) i amonijev formijat otopljeni su u metanolu (250 mL) u okrugloj tikvici od 500 mL. Dodan je Pd/C, na tikvicu spojeno povratno hladilo i smjesa zagrijavana uz refluks 3 h. Sadržaj tikvice ohlađen je na sobnu temperaturu i profiltriran preko stupca celita. Metanol je uparen na rotacijskom uparivaču, sirovom produktu dodana je voda (100 mL), sadržaj sonificiran na ultrazvučnoj kupelji i talog profiltriran. Dobiveno je 935 mg (41 %) sirovog spoja **2**. Analitički čist spoj dobiven je prekrizacijom iz metanola (30 mL) te je dobiveno 508 mg (22 %) čistog spoja **2** u obliku bijelog praha.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,42 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 8,37 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H), 8,04 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,97 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,28–7,14 (m, 15H), 4,58–4,57 (m, 1H), 4,37–4,32 (m, 1H), 3,79–3,62 (m, 4H), 3,54 (dd, *J*₁ = 8,4 Hz, *J*₂ = 4,9 Hz, 1H), 3,09–3,03 (m, 2H), 2,91–2,83 (m, 3H), 2,58 (dd, *J*₁ = 13,7 Hz, *J*₂ = 8,5 Hz, 1H)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 173,1, 172,3, 171,2, 168,8, 168,3, 138,0, 137,6, 129,4, 129,3, 129,2, 128,2, 128,1, 126,5, 126,3, 126,2, 55,5, 54,2, 53,6, 42,1, 41,8, 39,4, 37,6, 37,1

HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ – izračunato (C₃₁H₃₅N₅O₆⁺) – 574,2621, pronađeno 574,2670.

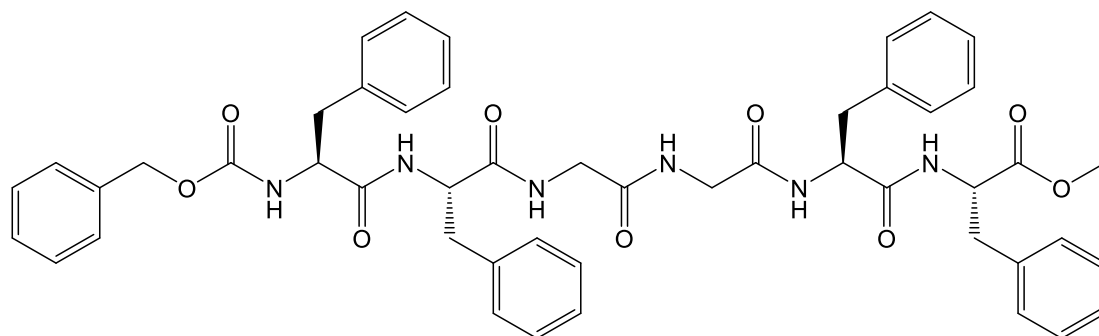
3.10. Sinteza metilnog estera L-fenilalanil-L-fenilalanina (P8)



P8

U okrugloj tikvici od 500 mL otopljen je spoj **P1** (2,80 g, 6,08 mmol) u metanolu (250 mL). Dodan je Pd/C i u tikvicu uvedena prvo atmosfera argona, zatim atmosfera vodika. Reakcijska je smjesa miješana pod atmosferom vodika 48 h. Sadržaj tikvice je zagrijan, profiltriran preko stupca celita i metanol je uparen na rotacijskom uparivaču. Dobiveno je 1,98 g (> 99 %) spoja **P8** u obliku blijedožute krutine. Sirovi je produkt korišten u sljedećem koraku bez dodatnog pročišćavanja. ¹H spektar odgovara literaturno navedenom.⁴¹

3.11. Sinteza metilnog estera *N*-benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicil-L-fenilalanil-L-fenilalanina (**P9**)



P9

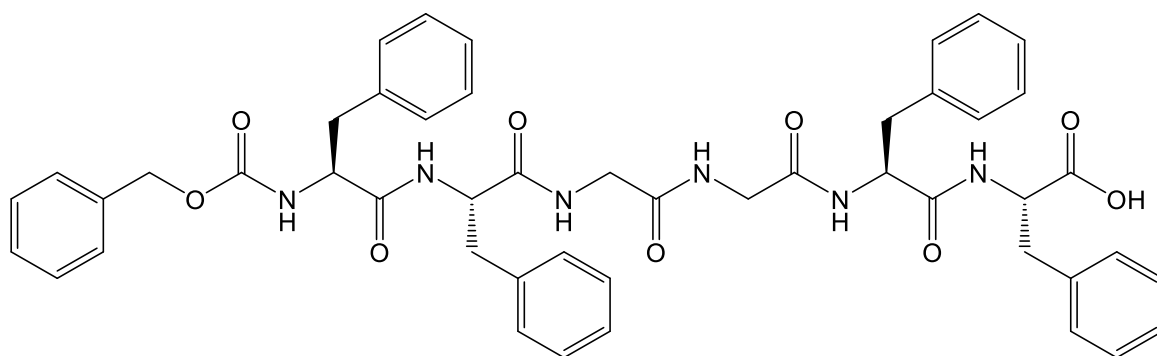
U okrugloj tikvici od 500 mL spojevi **P5** (2,35 g, 4,19 mmol) i **P8** (1,37 g, 4,19 mmol) otopljeni su u DMF-u (75 mL). Otopina je ohlađena na 0 °C, dodan je TEA (1,17 mL, 8,38 mmol) i TBTU (1,48 g, 4,61 mmol). Reakcijska je smjesa miješana pri sobnoj temperaturi 20 h, zatim ohlađena u ledenoj kupelji, dokapana je voda (200 mL) i sadržaj tikvice prebačen u lijevak za odjeljivanje. Vodeni je sloj ekstrahiran diklormetanom (3×100 mL), organski su ekstrakti spojeni, isprani redom klorovodičnom kiselinom (100 mL, $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$), zasićenom otopinom NaCl (100 mL), zasićenom otopinom NaHCO₃ (100 mL) i zasićenom otopinom NaCl (100 mL). Organski je ekstrakt osušen na Na₂SO₄, profiltriran preko vate, i uparen na pola volumena. Nastali je talog ofiltriran, ispran diklormetanom i osušen na zraku. Dobiveno je 1,03 g čistog spoja **P9** u obliku bijelog praha. Ostatak matičnice uparen je do suhog. Sirovi produkt iz matičnice otopljen je u smjesi MeOH/DCM, dodan je SiO₂ i otapalo upareno na rotacijskom uparivaču. Dobiveni je uzorak nanesen suh na kolonu („dry loading“) i produkt je eluiran prvo 2,5 %-tnom otopinom MeOH u DCM, zatim 5 %-tnom otopinom MeOH u DCM. Dobiveno je 2,40 g skoro čistog spoja **P9**. Izolirano je ukupno 3,43 g (94 %) spoja **P9**, spojene su šarže iz filtracije i kromatografije i korištene u idućem koraku bez dodatnog pročišćavanja.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 8,50 (d, $J = 7,5 \text{ Hz}$, 1H), 8,25 (t, $J = 5,2 \text{ Hz}$, 1H), 8,14 (d, $J = 7,9 \text{ Hz}$, 1H), 8,05 (d, $J = 8,4 \text{ Hz}$, 1H), 7,93 (t, $J = 5,0 \text{ Hz}$, 1H), 7,45 (d, $J = 8,7 \text{ Hz}$, 1H), 7,34–7,01 (m, 25H), 4,99–4,77 (m, 2H), 4,57–4,45 (m, 3H), 4,26 – 4,21 (m, 1H), 3,75–3,70 (m, 3H), 3,56 (s, 3H), 3,08 – 2,63 (m, 8H)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 171,7, 171,4, 171,2, 171,1, 168,8, 168,2, 155,7, 138,0, 137,6, 137,0, 129,3, 129,2, 129,1, 128,3, 128,0, 127,6, 127,4, 126,6, 126,3, 126,2, 65,2, 56,1, 53,8, 53,7, 53,5, 51,8, 42,0, 41,7, 37,6, 37,4, 36,6

HRMS (ESI) m/z [M + H]⁺ – izračunato (C₄₉H₅₃N₆O₉⁺) – 722,3145, pronađeno 722,3195.

3.12. Sinteza *N*-benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicil-L-fenilalanil-L-fenilalanina (**P10**)



P10

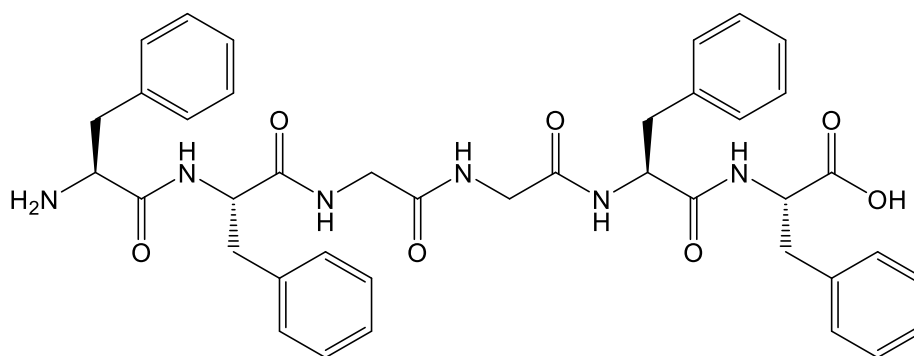
U okrugloj tikvici od 250 mL spoj **P9** (2,23 g, 2,57 mmol) suspendiran je u metanolu (150 mL). Sadržaj je tikvice zagrijan do nastanka bistre otopine, zatim je dodan LiOH · H₂O (130 mg, 3,08 mmol) i voda (40 mL) te je reakcijska smjesa miješana pri sobnoj temperaturi 48 h. Dodano je još LiOH · H₂O (108 mg, 2,57 mmol), sadržaj tikvice zagrijan do nastanka bistre otopine i miješan još 48 h. Metanol je uparen na rotacijskom uparivaču, smjesa ohlađena na 0 °C i dokapana klorovodična kiselina (10 mL, *c* = 1 mol dm⁻³) do pH ≈ 2. Zatim je dodan EtOAc (300 mL), sadržaj tikvice prebačen u lijevak za odjeljivanje i odvojen je organski sloj od vodenog. Organski je sloj ispran zasićenom otopinom NaCl (100 mL) i uparen do suhog. Sirovi je produkt otopljen u EtOAc, dodan SiO₂ i smjesa uparena do suhog te nanosena na stupac silikagela. Produkt je eluiran s kolone prvo 5 %-tnom otopinom MeOH u DCM, zatim 10 %-tnom otopinom MeOH u DCM. Dobiveno je 885 mg (40 %) skoro čistog spoja **P10** u obliku bijelog praha te je korišten u idućem koraku bez dodatnog pročišćavanja.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 12,74 (brs, 1H), 8,34 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 8,25 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 8,17 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 8,04 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,92 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 7,46 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,34–7,03 (m, 25H), 4,96–4,77 (m, 2H), 4,60–4,52 (m, 2H), 4,46–4,40 (m, 1H), 4,27–4,21 (m, 1H), 3,75–3,70 (m, 3H), 3,59 (dd, *J*₁ = 16,7 Hz, *J*₂ = 5,5 Hz, 1H), 3,09–2,63 (m, 8H)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 172,7, 171,4, 171,2, 171,0, 168,8, 168,2, 155,7, 138,0, 137,7, 137,6, 137,4, 137,0, 129,3, 129,22, 129,16, 129,1, 128,3, 128,2, 128,0, 127,6, 127,4, 126,4, 126,2, 65,2, 56,1, 53,9, 53,6, 42,0, 41,7, 37,6, 37,4, 36,7

HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ – izračunato (C₄₈H₅₁N₆O₉⁺) – 855,3673, pronađeno 855,3727.

3.13. Sinteza L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicil-L-fenilalanil-L-fenilalanina (**3**)



3

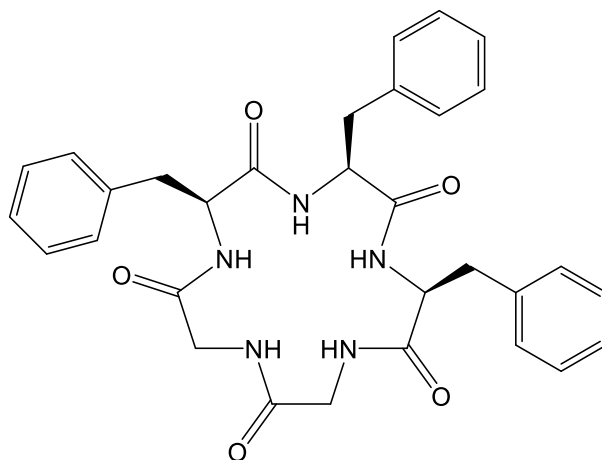
Spoj **P10** (727 mg, 0,850 mmol) i amonijev formijat (536 mg, 8,50 mmol) dodani su u okruglu tikvicu od 250 mL i otopljeni u metanolu (150 mL). Otopini je dodan Pd/C, na tikvicu spojeno povratno hladilo i smjesa zagrijavana uz refluks 2,5 h. Smjesa je vruća profiltrirana preko stupca celita da se ukloni katalizator i otapalo upareno na rotacijskom uparivaču. Sirovoj smjesi dodana je voda (50 mL), sadržaj sonificiran na ultrazvučnoj kupelji i talog ofiltriran. Sirovi produkt trituriran je u metanolu (50 mL). Dobiveno je 493 mg (80 %) skoro čistog spoja **3** u obliku bijelog praha koji je korišten u idućem koraku bez dodatnog pročišćavanja.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 9,26 (brs, 1H), 8,42 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 8,27 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,99 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,94 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 7,29–7,14 (m, 20H), 4,53–4,47 (m, 1H), 4,43–4,37 (m, 1H), 4,29 (m, 1H), 3,79 (dd, *J*₁ = 16,5 Hz, *J*₂ = 6,3 Hz, 1H), 3,69–3,58 (m, 4H), 3,15 (dd, *J*₁ = 13,5 Hz, *J*₂ = 5,2 Hz, 1H), 3,07–2,90 (m, 5H), 2,75–2,63 (m, 2H)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 173,5, 171,3, 171,2, 170,5, 168,9, 168,6, 138,1, 138,0, 137,9, 136,9, 129,42, 129,39, 129,3, 129,1, 128,3, 128,1, 128,0, 126,5, 126,3, 126,25, 126,15, 55,1, 54,7, 54,6, 54,3, 42,2, 41,9, 37,3, 37,0

HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ – izračunato (C₄₀H₄₅N₆O₇⁺) – 721,3305, pronađeno 721,3358.

3.14. Sinteza ciklo-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicina (C2)



C2

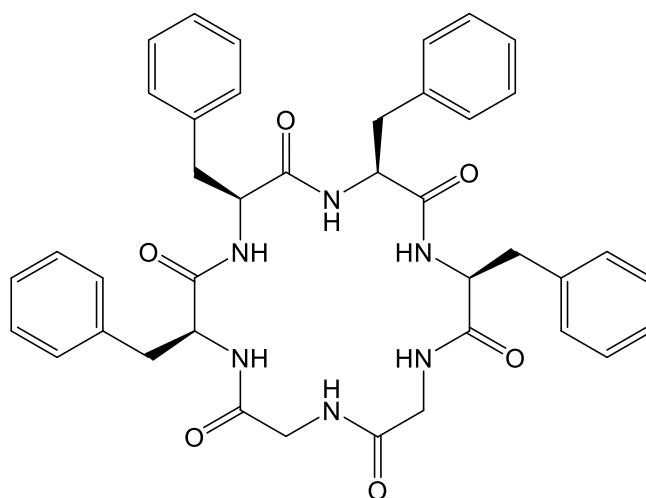
U okruglu tikvicu od 500 mL dodani su spoj **2** (284 mg, 0,495 mmol) i DEPBT (163 mg, 0,545 mmol) te DMF (300 mL). Zatim su dodani TEACl (1,23 g, 7,43 mmol) i TEA (140 μ L, 1,00 mmol) te je dobivena otopina miješana pri sobnoj temperaturi 4 dana. DMF je uparen na rotacijskom uparivaču, u tikvicu dodani EtOAc (100 mL) i voda (100 mL) i smjesa miješana 10 min. Talog je profiltriran pri sniženome tlaku i ispran vodom, matičnica prebačena u lijevak za odjeljivanje da bi se organska faza odvojila od vodene. Organski je ekstrakt osušen na Na_2SO_4 i uparen do suhog. Izolirano je 187 mg sirovog produkta. Sirovoj smjesi iz matičnice dodana je smjesa DCM:MeOH 1:1 i SiO_2 , miješano na magnetskoj miješalici 10 min i upareno do suhog. Dobiveni je kruti uzorak suh nanesen na stupac silikagela („dry loading“) i eluiran prvo 5 %-tnom otopinom MeOH u DCM, zatim 10 %-tnom otopinom MeOH u DCM. Dobiveno je ukupno 96 mg (35 %) čistog spoja **C2** u obliku bijelog praha.

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ /ppm: 8,65 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H), 8,46 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 8,11 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,99 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 7,67 (m, 1H), 7,29–7,17 (m, 11H), 7,12–7,06 (m, 4H), 4,36–4,24 (m, 2H), 4,19 (m, 1H), 3,90 (dd, $J_1 = 15,6$ Hz, $J_2 = 6,6$ Hz, 1H), 3,72 (dd, $J_1 = 14,8$ Hz, $J_2 = 6,7$ Hz, 1H), 3,72 (dd, $J_1 = 14,8$ Hz, $J_2 = 6,7$ Hz, 1H), 3,60 (dd, $J_1 = 14,8$ Hz, $J_2 = 4,6$ Hz, 1H), 3,40 (dd, $J_1 = 15,6$ Hz, $J_2 = 5,2$ Hz, 1H), 3,08 (dd, $J_1 = 13,6$ Hz, $J_2 = 6,9$ Hz, 1H), 2,98–2,88 (m, 3H), 2,82–2,72 (m, 2H)

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ /ppm: 171,1, 170,5, 169,3, 169,0, 137,8, 137,4, 137,3, 129,15, 129,10, 128,8, 128,24, 128,18, 126,4, 126,3, 56,4, 56,1, 54,9, 43,2, 42,7, 37,5, 36,7, 36,5

HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ – izračunato ($\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_5\text{Na}^+$) – 578,2374, pronađeno 578,2386.

3.15. Sinteza ciklo-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicina (C3)



C3

U okruglu tikvicu od 500 mL dodani su spoj **3** (300 mg, 0,416 mmol) i DEPBT (137 mg, 0,458 mmol) te DMF (300 mL). Zatim su dodani TEACl (1,03 g, 6,24 mmol) i TEA (120 μ L, 0,861 mmol) te je dobivena otopina miješana pri sobnoj temperaturi 3 dana. DMF je uparen na rotacijskom uparivaču, u tikvicu dodani EtOAc (100 mL) i voda (100 mL). Dobivena je smjesa miješana 15 min. Sadržaj tikvice prebačen je u lijevak za odjeljivanje i slojevi su odvojeni. Vodeni sloj ekstrahiran je s EtOAc (50 mL) i organski su ekstrakti spojeni, isprani zasićenom otopinom NaCl (3×50 mL), osušeni na Na₂SO₄, profiltrirani preko vate i upareni do suhog. Sirovi je produkt trituiran u MeOH te je dobiveno 112 mg čistog **C3**. Ostatku matičnice nakon trituracije dodan je anionski izmjenjivač, koji je prethodno aktiviran pomoću NaOH te ispran vodom i MeOH, i smjesa je profiltrirana, uparena do suhog i nanescena na kolonu silikagela. Produkt je eluiran 5%-tnom, zatim 10 %-tnom otopinom MeOH u DCM te je izolirano još 58 mg čistog spoja. Dobiveno je ukupno 170 mg (58 %) čistog spoja **C3** u obliku bijelog praha.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ /ppm: 8,35–8,32 (m, 1H), 8,27 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 8,20–8,18 (m, 1H), 8,03–7,95 (m, 3H), 7,30–7,06 (m, 20H), 4,37–4,30 (m, 3H), 4,22–4,17 (m, 1H), 3,94 (dd, $J_1 = 16,6$ Hz, $J_2 = 7,0$ Hz, 1H), 3,69 (dd, $J_1 = 15,5$ Hz, $J_2 = 7,2$ Hz, 1H), 3,60 (dd, $J_1 = 15,5$ Hz, $J_2 = 4,0$ Hz, 1H), 3,42 (dd, $J_1 = 16,5$ Hz, $J_2 = 3,8$ Hz, 1H), 3,12–2,58 (m, 8H)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ /ppm: 171,3, 171,2, 170,9, 170,7, 169,3, 168,8, 137,9, 137,5, 137,1, 129,3, 129,1, 129,0, 128,7, 128,3, 128,2, 128,1, 126,5, 126,3, 55,3, 54,9, 54,8, 42,64, 42,59, 37,3, 36,5, 35,8

HRMS (ESI) m/z [M + Na]⁺ – izračunato (C₄₀H₄₂N₆O₆Na⁺) – 725,3058, pronađeno 725,3073.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

Cilj je ovoga rada bio pripremiti tri ravnolančasta oligopeptida; jedan tetrapeptid, pentapeptid i heksapeptid te provesti njihovu otopinsku ciklizaciju i spektroskopski okarakterizirati pripadne ciklopeptide. Ravnolančasti su prekursori dobiveni klasičnim metodama otopinske sinteze peptida, a reakcije ciklizacija provedene su u razrijeđenim otopinama koristeći tetraetilamonijev klorid kao kompleksirajući reagens.

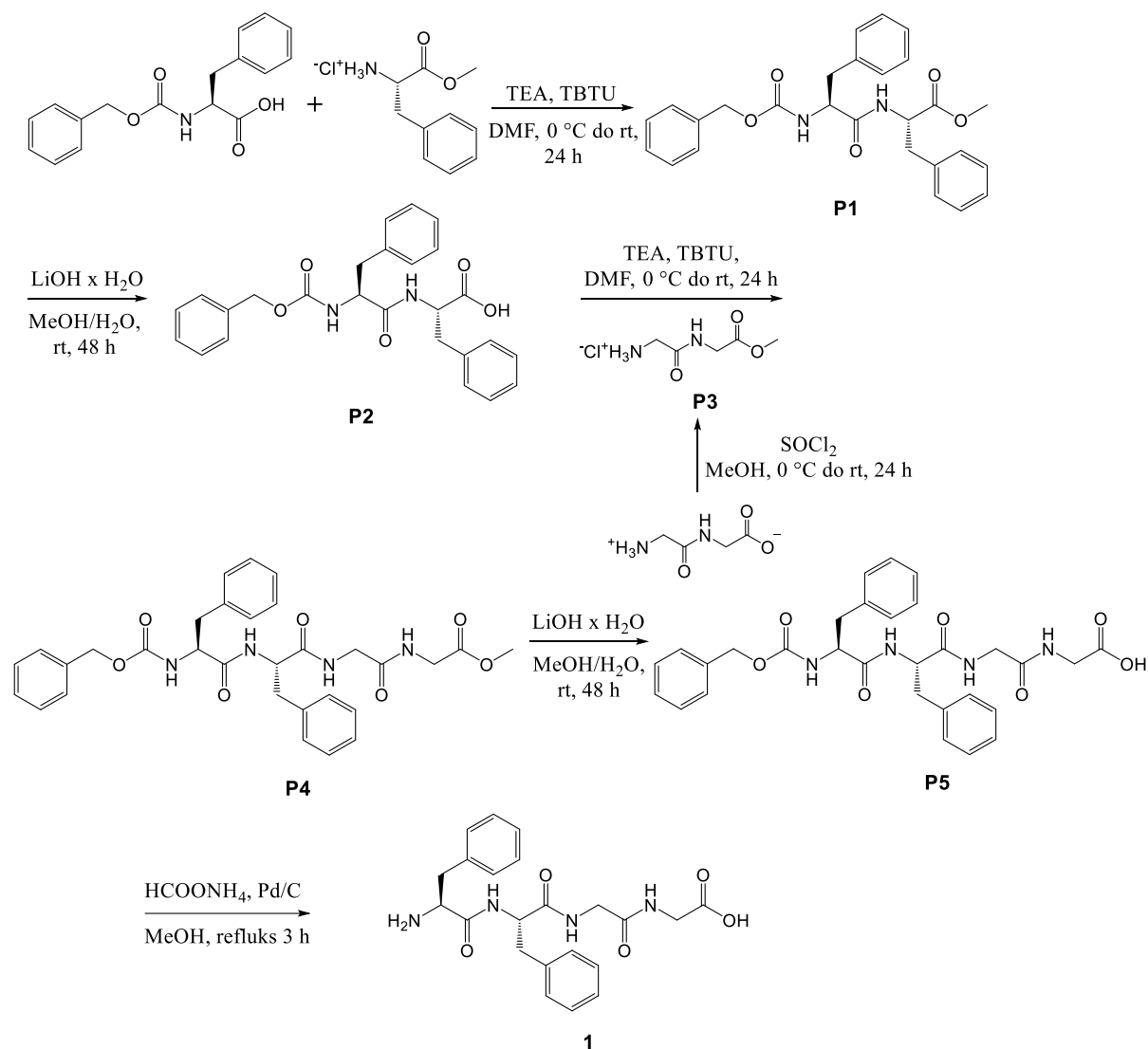
Aminokiseline L-fenilalanin i glicin izabrane su kao gradivne jedinice ciljnih molekula, što zbog manjka funkcionalnosti u njihovim bočnim ograncima (što smanjuje broj koraka i olakšava samu sintezu linearnih prekursora), tako i zbog njihovih fizikalnih svojstva poput polarnosti i topljivosti. Sama sinteza linearnih peptida **1**, **2** i **3** pokazala se netrivialnom o čemu će kasnije biti riječ. Generalna je sintetska strategija bila izgraditi željeni peptid od N-kraja prema C-kraju. Dvije su zaštitne skupine korištene tijekom sinteze: benziloksikarbonilna ili Z zaštita za amino skupinu i metilni ester kao zaštita za karboksilnu skupinu. Za nastajanje peptidne veze korišteni su TBTU i DEPBT kao *coupling* reagensi.

Reakcijom N-zaštićene aminokiseline i C-zaštićene aminokiseline uz *coupling* reagens dobiven je dipeptid kojemu je u idućem koraku uklonjena metilna zaštita hidrolizom u bazičnom mediju. Takvom N-zaštićenom dipeptidu može se dodati novi fragment u idućem koraku i postupak se ponavlja dok se ne dobije peptid željene veličine, a na samom se kraju transfer-hidrogeniranjem ukloni benziloksikarbonilna zaštita s N-kraja oligopeptida. Pročišćavanje dobivenih spojeva bilo je izazovno zbog njihove slabe topljivosti u tipično korištenim organskim otapalima kao i u vodi.

4.2. Sinteza linearnih prekursora

4.2.1. Sinteza tetrapeptida 1

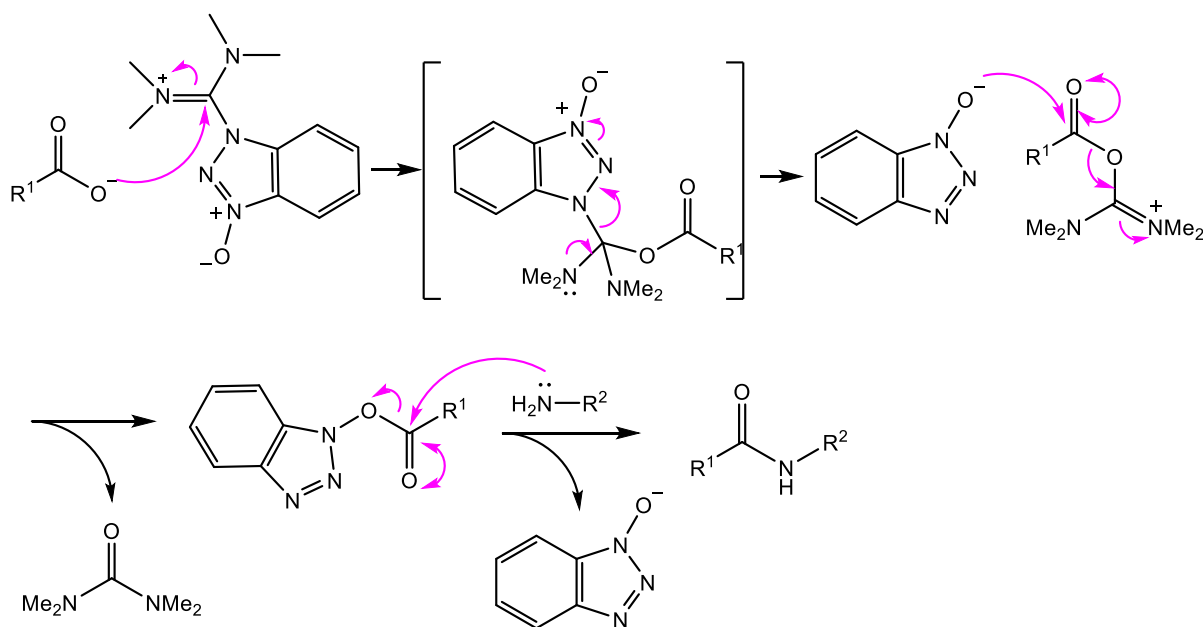
Spoj **1** pripravljen je nizom reakcija (Shema 8.) počevši od *N*-benziloksikarbonil-L-fenilalanina i metil-L-fenilalaninata hidroklorida koji u prvom koraku uz TBTU i TEA kao bazu daju zaštićeni dipeptid **P1**. Baznom hidrolizom pomoću litijevog hidroksida monohidrata **P1** se prevodi u kiselinu **P2**. Esterifikacijom glicil-glicina pomoću tionil-klorida u metanolu kao otapalu dobiven je C-zaštićeni dipeptid **P3**, drugi fragment konačnog spoja, koji u reakciji s **P2** uz TBTU i TEA daje zaštićeni tetrapeptid **P4**.



Shema 8. Sinteza tetrapeptida 1

Pokazalo se da je važno pročitati dobivene peptide u fazi kada još na sebi imaju vezane zaštitne skupine jer to uvelike olakšava sam postupak pročišćavanja. Prekristalizacija se pokazala kao loša metoda za pročišćavanje većine dobivenih spojeva jer su dodatkom otapala uglavnom nastajali gelovi. Pažljivim dokapavanjem vode u reakcijsku smjesu nakon provedenih *coupling* reakcija uz hlađenje u ledenoj kupelji uglavnom su taložili najčišći produkti za razliku od ekstrakcije prilikom koje je bilo neizbježno da se nusprodukte koji su prešli u organsku fazu ukloni kolonskom kromatografijom.

Produkti provedenih *coupling* reakcija slabo su topljivi u vodi zbog velikih nepolarnih bočnih ogranaka fenilalanina kao i zbog vezanih zaštitnih skupina. Ako produkt ne bi taložio, spoj bi se raslojio dodatkom organskog otapala pri čemu se etil-acetat pokazao kao bolja opcija od diklormetana jer bi manje nusprodukata prelazilo u organsku fazu. Osim nusprodukata, u organsku fazu prilikom ekstrakcije prelazi i reakcijsko otapalo (DMF) te se u tom slučaju kolonska kromatografija pokazala kao najbolja metoda za pročišćavanje. Nusprodukti reakcija s TBTU-om su tetrametilurea, spoj dobro topljiv u vodi, i *N*-oksid benzotriazola (Shema 9.) koji se može ukloniti kolonskom kromatografijom.



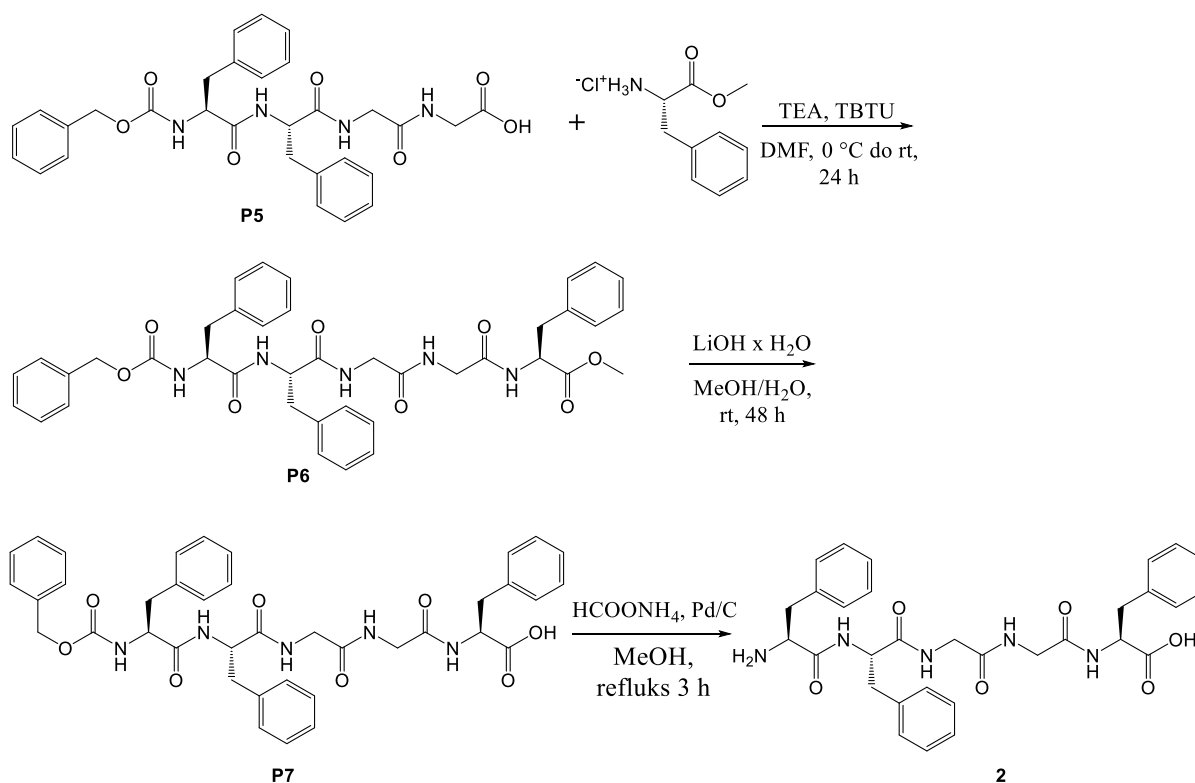
Shema 9. Predloženi mehanizam reakcije nastajanja amidne veze uz TBTU kao *coupling* reagens

Hidrolizom metilnog estera u idućem koraku dobiven je spoj **P5**, a uklanjanjem Z zaštite transfer-hidrogeniranjem dobiven je tetrapeptid **1**. Hidroliza metilnog estera provedena je u smjesi metanola i vode te je reakcijska smjesa na početku reakcije u svim hidrolizama bila suspenzija, a pri završetku reakcije bila je bistra otopina. Produkt je hidrolize topljiva litijeva sol, a uklanjanjem metanola i zakiseljavanjem reakcijske smjese produkt taloži u obliku netopljive karboksilne kiseline i lako se izolira filtracijom. U slučaju spoja **P2** produkt se hidrolize nakon zakiseljavanja mogao otopiti u etil-acetatu, ali kod većih se peptida filtracija pokazala boljom opcijom zbog njihove slabe topljivosti.

Benziloksikarbonilna zaštita lako se uklanja hidrogeniranjem (u slučaju transfer hidrogeniranja kao izvor vodika koristio se amonijev formijat) pri čemu kao nusprodukti nastaju toluen, koji se uparavanjem izdvaja iz reakcijske smjese, i CO₂. Sirovi produkt reakcije sadrži i neizreagirani amonijev formijat koji se lako odvojio dodatkom vode i filtracijom.

4.2.2. *Sinteza pentapeptida 2*

Spoj **P5**, čije je dobivanje opisano u prethodnom poglavlju, dalje je korišten u sintezi spoja **2** (Shema 10.). U reakciji spoja **P5** i metil-fenilalaninata hidroklorida uz TBTU i TEA dobiven je zaštićeni pentapeptid **P6**. Analogno već opisanim postupcima, baznom hidrolizom metilnog estera dobiven je spoj **P7** i uklanjanjem benziloksikarbonilne zaštite dobiven je pentapeptid **2**. Uklanjanje C-zaštite s dobivenog zaštićenog pentapeptida **P6** pokazalo se nešto težim nego u slučaju tetrapeptida zbog manje topljivosti spoja u sustavu MeOH/H₂O što je riješeno zagrijavanjem reakcijske smjese pri čemu se reaktant otopio. U ovome slučaju transfer-hidrogeniranje spoja **P7** pokazalo se lošom metodom za uklanjanje Z zaštite te je konačni produkt bilo potrebno dodatno pročišćavati za razliku od analognog postupka kod sinteze tetrapeptida **1**. Dodatno je reakcija išla u neobično malom prinosu jer se produkt vjerojatno otopio u vodi prilikom obrade, tj. uklanjanja suviška amonijeva formijata.

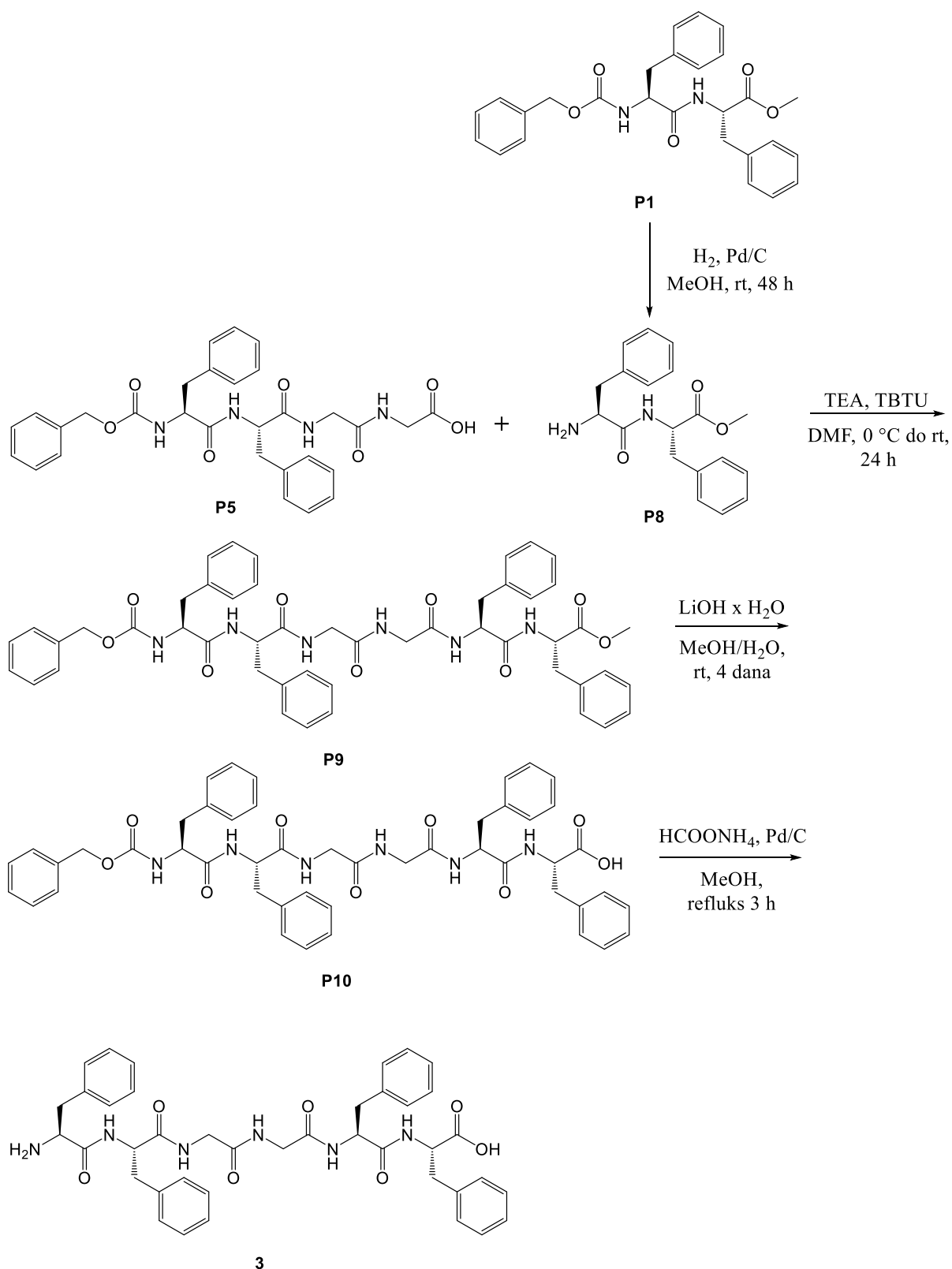


Shema 10. Sinteza pentapeptida 2

4.2.3. Sinteza heksapeptida 3

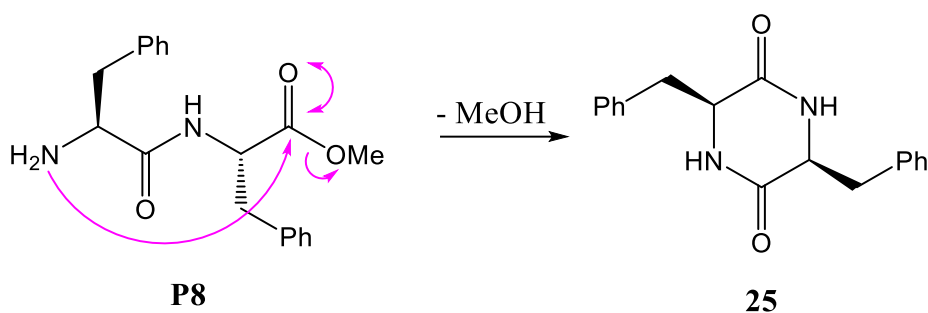
Spoj **3** dobiven je nizom reakcija (Shema 11.) počevši od već pripravljenog N-zaštićenog tetrapeptida **P5**. Drugi fragment za *coupling* reakciju dobiven je katalitičkim hidrogeniranjem dipeptida **P1** pri čemu je dobiven **P8**. Reakcijom **P5** i **P8** uz TBTU i TEA dobiven je zaštićeni heksapeptid **P9**. Baznom hidrolizom metilnog estera dobiven je **P10** i u zadnjem koraku transfer hidrogeniranjem dobiven je heksapeptid **3**.

Isti problem kao kod hidrolize zaštićenog pentapeptida **P6**, opisane u prethodnom poglavlju, pojavio se i kod hidrolize spoja **P9**. U prvom je pokušaju zagrijavanjem reakcijske smjese do vrenja i dodatkom velikog suviška litijeva hidroksida nastao niz neželjenih produkata koji su se odvojili kolonskom kromatografijom što je znatno smanjilo iskorištenje reakcije. Ista se kromatografija pokazala vrlo zahtjevnom jer se željeni produkt „razvukao“ po koloni zbog slobodne karboksilne skupine.

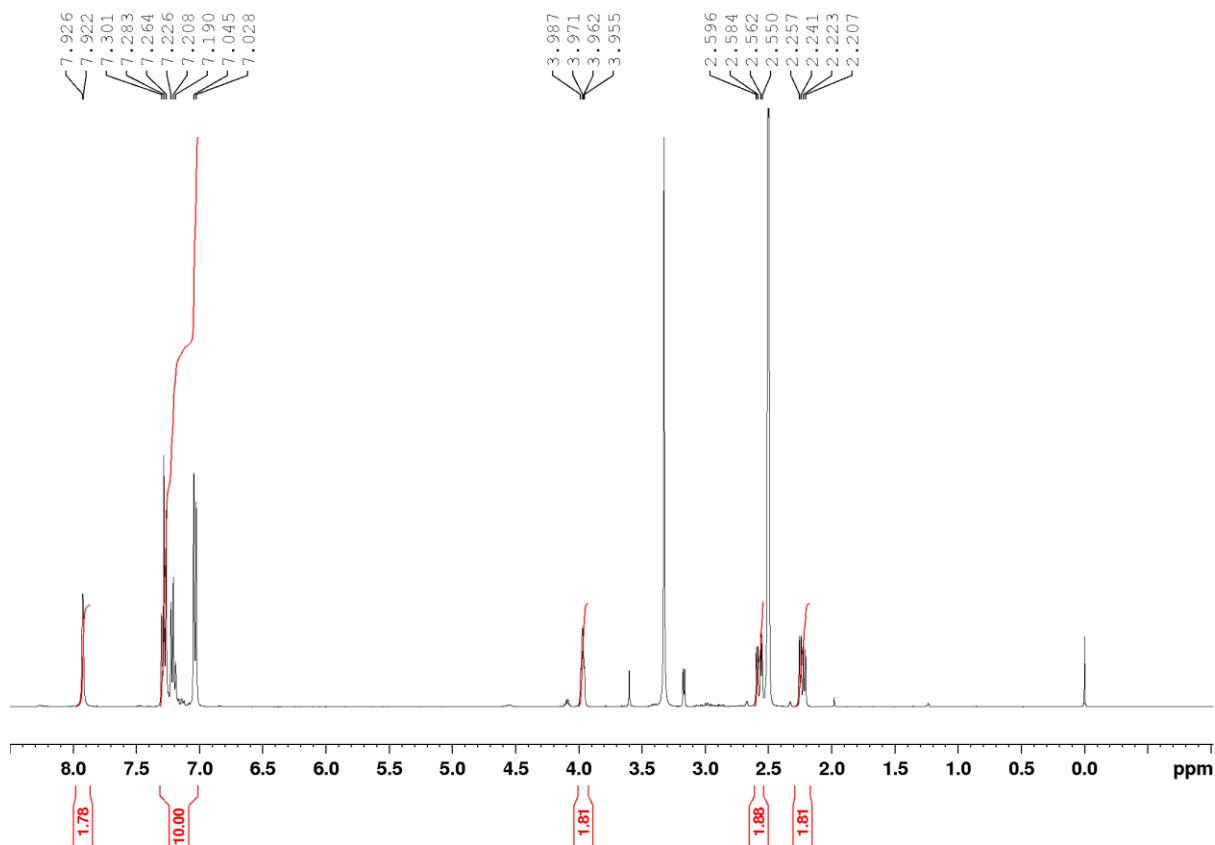


Shema 11. Sinteza heksapeptida **3**

Dodatan zanimljiv problem pojavio se kod dobivanja spoja **P8**; primijećeno je da stajanjem spontano prelazi u diketopiperazin bez prisutnosti otapala u krutom stanju. Predloženi mehanizam te reakcije prikazan je na Shemi 12. Uklanjanjem Z zaštite dobiveni spoj ima slobodnu reaktivnu amino-skupinu koja nukleofilnom supstitucijom (aminoliza estera) na C-kraju dipeptida daje diketopiperazin **25**. Iz ovog je razloga bilo potrebno dobiveni dipeptid **P8** odmah koristiti u idućem koraku reakcije. Druga je mogućnost spoj izolirati u obliku hidrokloridne soli jer se protonacijom slobodne amino-skupine gubi njena nukleofilnost. ^1H NMR spektar diketopiperazina **25** (Slika 8.) odgovara literaturno navedenom.⁴²



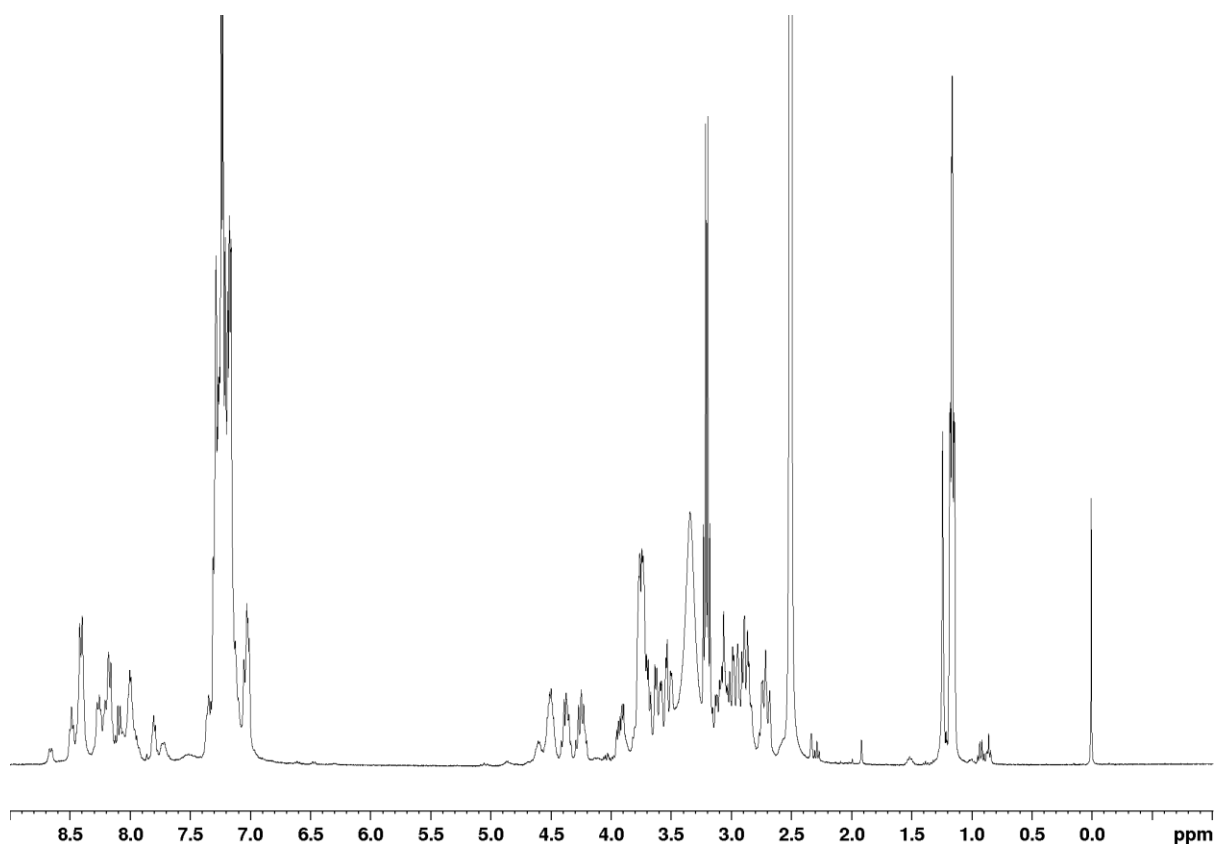
Shema 12. Predloženi mehanizam nastajanja diketopiperazina **25** iz dipeptida **P8**



4.3. Makrociklizacije linearnih peptida

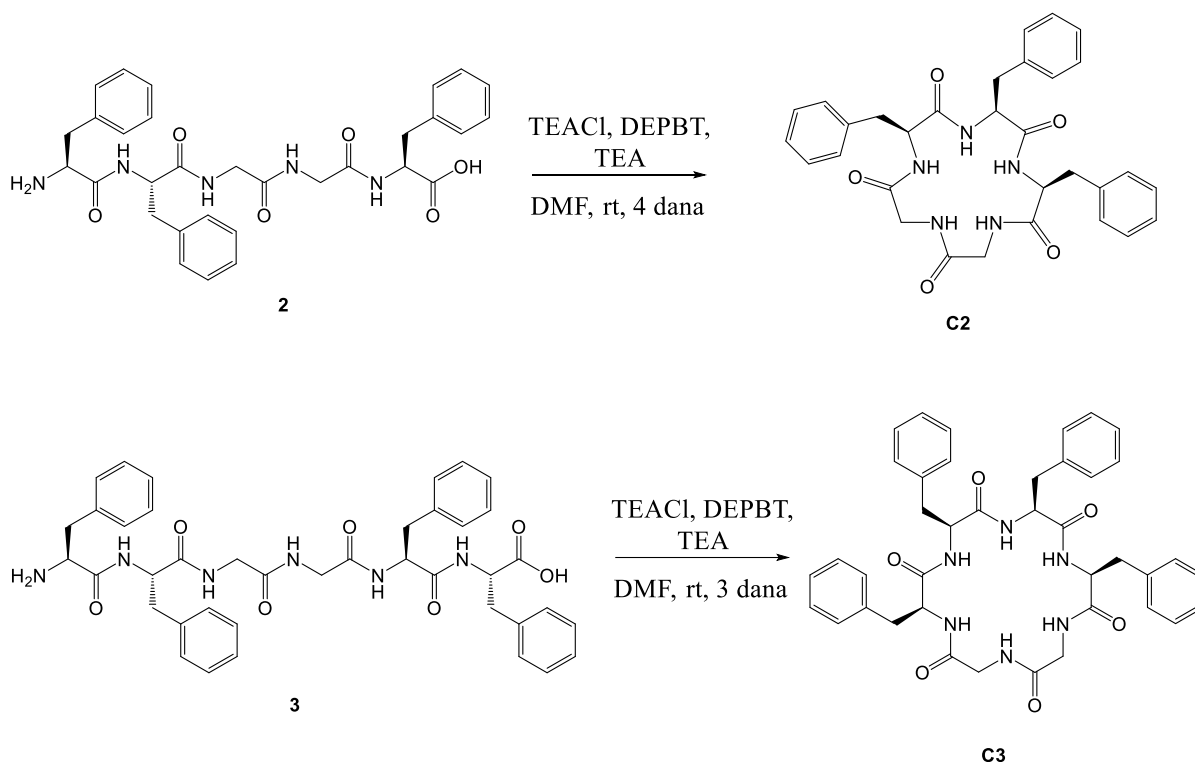
Nakon uspješne sinteze linearnih prekursora **1**, **2** i **3** u idućem se dijelu pokušalo otopinski ciklizirati dobivene oligopeptide. Budući da je poznato da peptidi tvore komplekse i s anionima, ciklizacije su se provodile uz dodatak TEACl kao kompleksirajućeg reagensa pri čemu N- i C-kraj dolaze u prostornu blizinu i mogu stvoriti novu peptidnu vezu u prisustvu *coupling* reagensa. Da bi se izbjegle neželjene oligomerizacije, reakcije su provođene u razrijeđenim otopinama i korišten je veliki suvišak kloridne soli da bi koncentracija kompleksa u otopini bila čim veća.

Pokušaj otopinske ciklizacije tetrapeptida **1** bio je neuspješan, a ^1H NMR spektar (Slika 9.) smjese izolirane iz reakcijske smjese upućuje na nastajanje oligomera zbog velikog broja signala u području spektra gdje se nalaze protoni peptidnih veza (7,5 – 9 ppm). Dobiveni se rezultat može objasniti činjenicom da tetrapeptidi imaju manje ravnotežne konstante kompleksacije u usporedbi s penta- i heksapeptidima zbog čega bi oligomerizacija bila preferirana reakcija umjesto ciklizacije.³⁷



Slika 9. ^1H NMR spektar smjese izolirane iz pokušaja ciklizacije tetrapeptida **1**

Za razliku od tetrapeptida, pentapeptid **2** i heksapeptid **3** uspješno su ciklizirani i dobiveni su ciklopeptidi spektroskopski okarakterizirani. Otapanjem spoja **2** i TEACl u DMF-u i dodatkom TEA i DEPBT dobiven je spoj **C2**, a analognim postupkom iz spoja **3** dobiven je **C3** (Shema 13.).

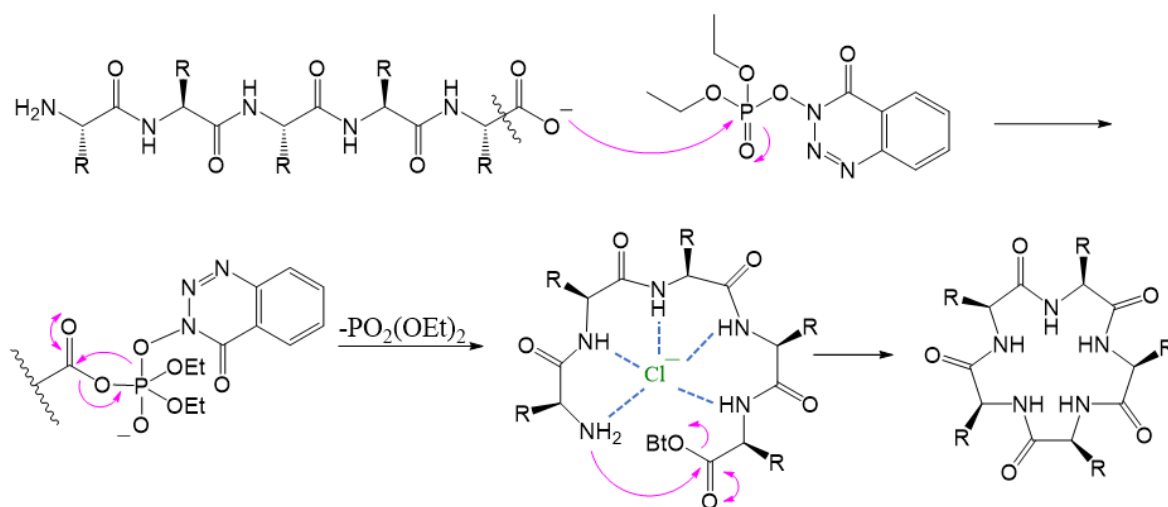


Shema 13. Makrociklizacije pentapeptida **2** i heksapeptida **3**

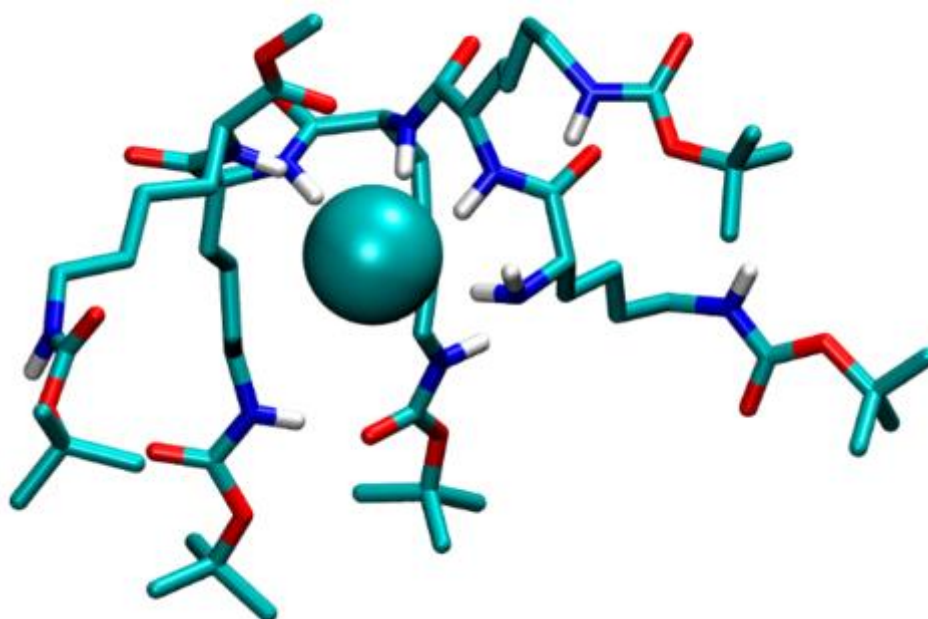
Izolacija ciklopentapeptida pokazala se vrlo jednostavnom; reakcijsko se otapalo uparilo pri sniženome tlaku, dodatkom dvofaznog sustava EtOAc/H₂O uklonjeni su svi nusprodukti i suvišak reaktanata, željeni čisti produkt odvojen je filtracijom, a ostatak produkta u sirovoj smjesi iz organske faze nakon ekstrakcije pročišćen je kolonskom kromatografijom. Cikloheksapeptid je prilikom izolacije prešao u organsku fazu, stoga je bilo potrebno provesti dodatni korak trituracije. Ispostavilo se da je dio produkta ostao otopljen vjerojatno u obliku kompleksa s TEACl, stoga je smjesi dodan anionski izmjenjivač da se tetraetilamonijev kation prevede u slobodnu bazu koja ne tvori kompleks s ciklopeptidom. Tako dobivena smjesa nanescena je na kolonu silika gela i ostatak je produkta eluiran s kolone.

Pretpostavljeni mehanizam kloridom potpomognute makrociklizacije prikazan je na Shemi 14. Uvelike se smatralo da dodatkom halogenida alkalijskih metala do makrociklizacije

dolazi isključivo zbog nastajanja kompleksa s kationom, ali pokazano je da anioni, ne samo da tvore kompleksne spojeve s peptidima i time usmjeravaju reakciju prema ciklizaciji, nego da to rade bolje od metalnih kationa. Dodatkom DEPBT i TEA nastaje aktivirani ester, a linearni se peptid „omata“ oko kloridnog aniona. MD simulacijama na nekim oligopeptidima pokazano je da u stvaranju kompleksa sudjeluju sve NH skupine peptidne okosnice kao i terminalna amino-skupina (Slika 10.) što dovodi peptid u prikladnu konformaciju u kojoj su N- i C-kraj dovoljno blizu za završni korak laktamizacije.³⁷



Shema 14. Predloženi mehanizam kloridom potpomognute makrociklizacije



Slika 10. Struktura kompleksa pentapeptida H₂N-Lys(Boc)₅-OMe i Cl⁻ dobivena MD simulacijom u DMF-u (Preuzeto iz: *Chloride-assisted peptide macrocyclization*, str. 2133)³⁷

5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog rada uspješno su pripravljena tri oligopeptida: tetrapeptid **1**, pentapeptid **2** i heksapeptid **3**. Linearni su prekursori dobiveni klasičnim metodama otopinske sinteze peptida. Provedene su i kloridom potpomognute otopinske makrociklizacije spojeva **2** i **3** te su pripadni ciklopeptidi **C2** i **C3** spektroskopski okarakterizirani.

Sama priprava linearnih peptida pokazala se najzahtjevnijim dijelom jer su dobiveni viši oligopeptidi (građeni od četiri i više aminokiselina) slabo topljivi u većini tipično korištenih otapala, stvaraju gelove te su higroskopni zbog čega je proces pročišćavanja tih spojeva bio izrazito izazovan.

Ciklizacija spoja **1** ovom metodom nije bila moguća čemu je vjerojatno razlog slab templatni učinak klorida kao kompleksirajućeg reagensa kod tetrapeptida što čini oligomerizaciju preferiranom reakcijom. Ova se metoda ciklizacije pokazala dobrom za pentapeptide i heksapeptide jer su dovoljno veliki da se prilikom nastajanja kompleksa s kloridnim anionom postigne ciklička konformacija koja je povoljna za završni korak *glava-rep* laktamizacije. Same su se obrade reakcijskih smjesa pokazale jednostavnima, ali reakcije izrazito dugo traju i prinos im je relativno nizak.

U daljnjem će se istraživanju pokušati provesti mehanokemijske ciklizacije dobivenih linearnih peptida, a dobiveni spojevi **C2** i **C3** koristit će se kao standardi za praćenje tijeka reakcije.

6. ZAHVALE

Na samome početku jedno neizmjereno hvala mentoru Nikoli na pruženoj prilici izrade rada za Rektorovu nagradu; na Vašem strpljenju, korisnim savjetima, ugodnoj atmosferi i pomoći pri rješavanju mnogih problema s kojima smo se susreli.

Veliko hvala svim djelatnicima Zavoda za organsku kemiju, posebice Marini i Andreji koje su uvijek pronašle način za podići raspoloženje u labosu.

Bruni i Blanki, koji su uz mene već duuuugi niz godina, hvala vam što me konstantno gurate naprijed. Na ugodnom društvu hvala Filipu, Tei, Magdaleni i Petri zbog kojih su zadnje četiri godine nezaboravne. Ekipi s Discorda: Ivanu, 2 x Luki, Aci i Marinu što ste tu za sve moje rantove, što me nasmijavate do suza i što mi držite ego pod kontrolom.

I ljudima bez kojih ništa ne bi bilo moguće, roditeljima Moniki i Željku, bratu Luki i ostatku obitelji koji me beskrajno podržava, najviše hvala na svemu što činite za mene, što vjerujete u mene. Bez vas ovo ne bi imalo smisla!

7. LITERATURNI IZVORI

1. N. Vidović, G. Horvat, D. Riva, T. Rinkovec, N. Cindro, V. Tomišić, G. Speranza, *Org. Lett.* **22** (2020) 2129–2134.
2. C. J. White, A. K. Yudin, *Nat. Chem.* **3** (2011) 509–524.
3. S. H. Joo, *Biomol. Ther.* **20** (2012), 19–26.
4. G. F. Gause, M. G. Brazhnikova, *Nature* **154** (1944) 703.
5. J. S. Davies, *J. Pept. Sci.* **9** (2003) 471–501.
6. G. M. J. Schmidt, D. C. Hodgkin, B. Oughton, *Biochem. J.* **65** (1957) 744–750.
7. D. J. Craik, D. P. Fairlie, S. Liras, D. Price, *Chem. Biol. Drug. Des.* **81** (2013) 136–147.
8. A. A. Kaspar, R. M. Reichert, *Drug. Discov.* **18** (2013) 807–817.
9. A. A. Zempra, A. S. Galanis, O. Werbitzky, F. Albericio, *Med. Chem.* **1** (2009) 361–377.
10. P. M. Moyle, I. Toth, *Chem. Med. Chem.* **8** (2013) 360–376.
11. S. J. Moore, C. L. Leung, H. K. Norton, J. R. Cochran, *PLoS One* **8** (2013) 1–11.
12. J. E. Lin, M. Valentino, G. Marszalowicz, M. S. Magee, Peng Li, A. E. Snook, B. A. Stoecker, C. Chang, S. A. Waldman, *Toxins* **2** (2010) 2028–2054.
13. D. Goodwin, P. Simerska, I. Toth, *Curr. Med. Chem.* **19** (2012) 4451–4461.
14. D. J. Craik, *Science* **311** (2006) 1563–1564.
15. H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **21** (1982) 512–523.
16. J. N. Lambert, J. P. Mitchell, K. D. Roberts, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **0** (2001) 471–484.
17. M. del Fresno, J. Alsina, M. Royo, G. Barany, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **39** (1998) 2639–2642.
18. R. O. Rocha, M. O. Rodrigues, B. A. D. Neto, *ACS Omega* **5** (2020) 972–979.
19. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 2013, str. 124.
20. T. Rückle, P. de Lavallaz, M. Keller, P. Dumy, M. Mutter, *Tetrahedron* **55** (1999) 11281–11288.
21. D. Skropeta, K. A. Jolliffe, P. Turner, *J. Org. Chem.* **69** (2004) 8804–8809.
22. H. Bierägel, H. E. Schoemaker, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Org. Biomol. Chem.* **1** (2003) 1830–1832.
23. J. P. A. Rutters, Y. Verdonk, R. de Vries, S. Ingemann, H. Hiemstra, V. Levacher, J. H. van Maarseveen, *Chem. Commun.* **48** (2012) 8084–8086.

24. S. Zhang, Z. Amso, L. M. De Leon Rodriguez, H. Kaur, M. A. Brimble, *J. Nat. Prod.* **79** (2016) 1769–1774.
25. C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **67** (2002) 3057–3064.
26. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **41** (2002) 2596–2599.
27. E. C. Gleeson, W. R. Jackson, A. J. Robinson, *Chem. Commun.* **53** (2017) 9769–9772.
28. U. Kazmaier, C. Hebach, A. Watzke, S. Maier, H. Mues, V. Huch, *Org. Biomol. Chem.* **3** (2004) 136–145.
29. J. R. Frost, C. C. G. Scully, A. K. Yudin, *Nat. Chem.* **8** (2016) 1105–1111.
30. R. Kleineweischede, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **47** (2008) 5984–5988.
31. K. S. Kim, C. Cui, S. J. Cho, *J. Phys. Chem. B* **102** (1998) 461–463.
32. S. B. Suh, C. Cui, H. S. Son, J. S. U, Y. Won, K. S. Kim, *J. Phys. Chem. B* **106** (2002) 2061–2064.
33. Y.-H. Ye, X.-M. Gao, M. Liu, Y.-C. Tang, G.-L. Tian, *Lett. Pept. Sci.* **10** (2003) 571–579.
34. L. Zhang, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.* **38** (1997) 4375–4378.
35. M. Liu, Y.-C. Tang, K.-Q. Fan, X. Jiang, L.-H. Lai, Y.-H. Ye, *J. Pept. Sci.* **65** (2005) 55–64.
36. A. Kotynia, J. S. Pap, J. Brasun, *Inorg. Chim. Acta* **472** (2018) 3–11.
37. K. Krzywoszynska, H. Kozłowski, *Dalton Trans.* **43** (2014) 16207–16212.
38. G. Horvat, S. Tarana, N. Vidović, N. Cindro, G. Speranza, V. Tomišić, *J. Mol. Liq.* **340** (2021) 116848
39. R. R. Hill, D. Birch, G. E. Jeffs, M. North, *Org. Biomol. Chem.* **1** (2003) 965–972.
40. A. R. Katritzky, K. Suzuki, S. K. Singh, *Synth.* **16** (2004) 2645–2652.
41. S. Bayryamov, D. Danalev, N. Vassilev, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **186** (2011) 338–344.
42. S. Selvakumar, D. Sivasankaran, V. K. Singh, *Org. Biomol. Chem.* **7** (2009) 3156–3162.
43. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 2021, str. 252.
44. D. Kahne, C. Leimkuhler, W. Lu, C. Walsh, *Chem. Rev.* **105** (2005) 425–448.
45. D. Zeng, D. Debabov, T. L. Hartsell, R. J. Cano, S. Adams, J. A. Schuyler, R. McMillan, J. L. Pace, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6** (2016) a026989.
46. A. Falanga, E. Nigro, M. G. De Biasi, A. Daniele, G. Morelli, S. Galdiero, O. Scudiero, *Molecules* **22** (2017) 1217.

8. SAŽETAK

Autor: Mirko Duvnjak

Mentor: doc. dr. sc. Nikola Cindro

Naslov rada: Sinteza i makrociklizacija oligopeptida

U okviru ovoga rada klasičnim metodama otopinske sinteze peptida pripravljena su tri oligopeptida: tetrapeptid L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicin (**1**), pentapeptid L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicil-L-fenilalanin (**2**) i heksapeptid L-fenilalanil-L-fenilalanil-glicil-glicil-L-fenilalanil-L-fenilalanin (**3**) te su dobiveni spojevi korišteni u reakcijama kloridom potpomognute makrociklizacije. **1** nije bilo moguće ciklizirati opisanim načinom, a iz spojeva **2** i **3** dobiveni su pripadni ciklopeptidi **C2** i **C3** koji su okarakterizirani NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom. Dobiveni će se ciklopeptidi koristiti u daljnjim istraživanjima kao standardi za praćenje mehanokemijskih reakcija makrociklizacije.

Ključne riječi: oligopeptidi, makrociklizacija, ciklopeptidi

9. SUMMARY

Author: Mirko Duvnjak

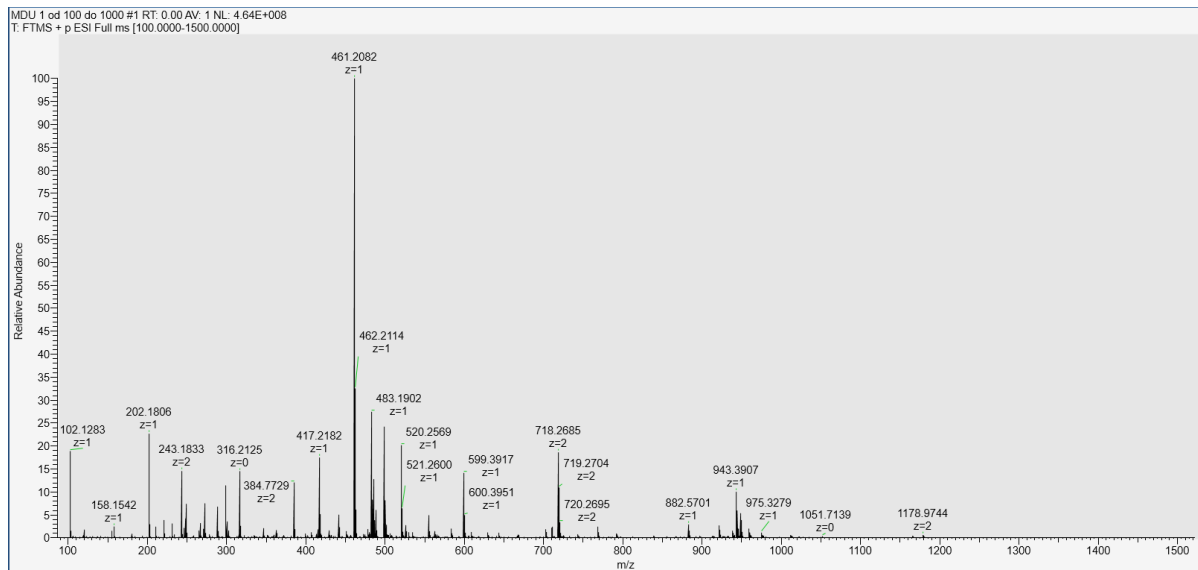
Mentor: Asst. Prof. Nikola Cindro

Title: Synthesis and macrocyclisation of oligopeptides

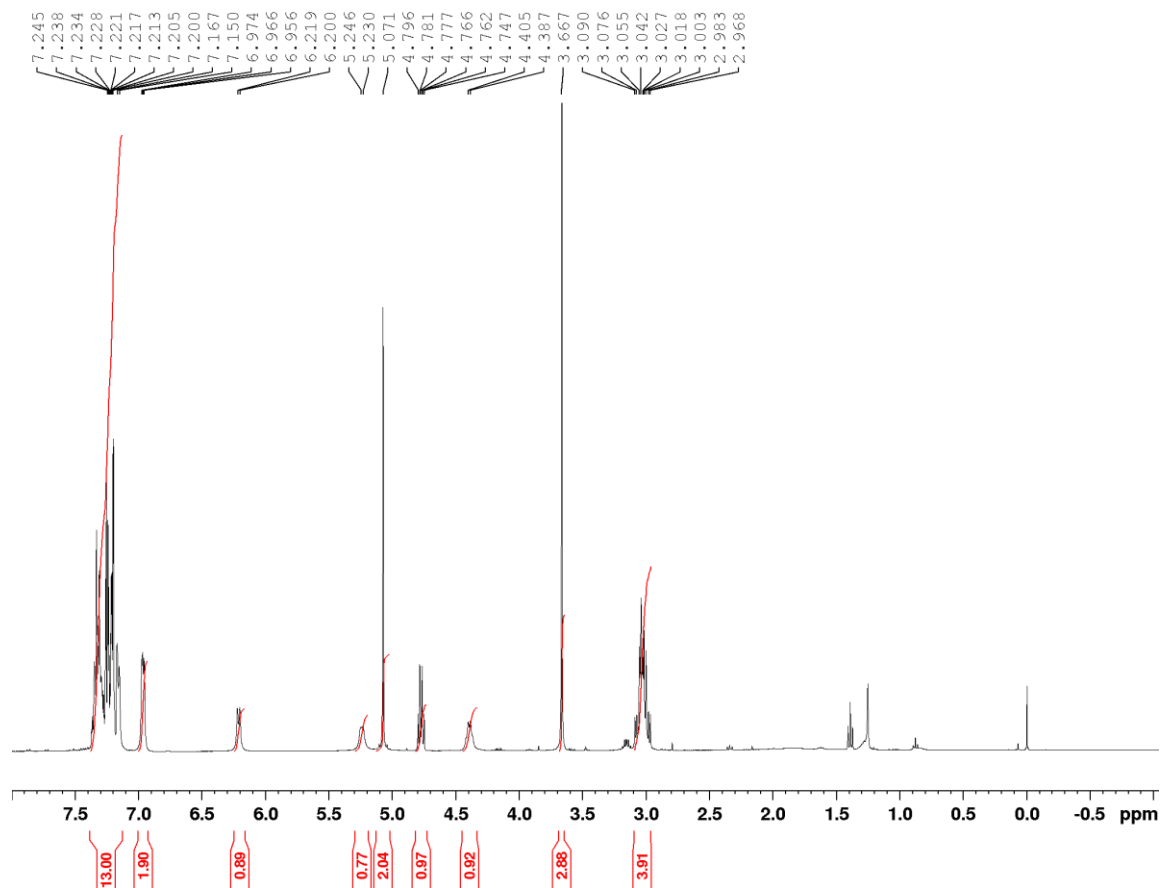
In the scope of this work three oligopeptides were prepared by classic methods of liquid phase peptide synthesis: tetrapeptide L-phenylalanyl-L-phenylalanylglycylglycine (**1**), pentapeptide L-phenylalanyl-L-phenylalanylglycylglycyl-L-phenylalanine (**2**) and hexapeptide L-phenylalanyl-L-phenylalanylglycylglycyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanine (**3**). The prepared compounds were used for chloride-assisted peptide macrocyclisations. Compound **1** could not be cyclised by this method, however cyclopeptides **C2** and **C3** were obtained from **2** and **3** respectively and have been characterised by NMR spectroscopy and mass spectrometry. Obtained compounds will be used in further work as standards for monitoring mechanochemical macrocyclisations of oligopeptides.

Key words: oligopeptides, macrocyclisation, cyclopeptides

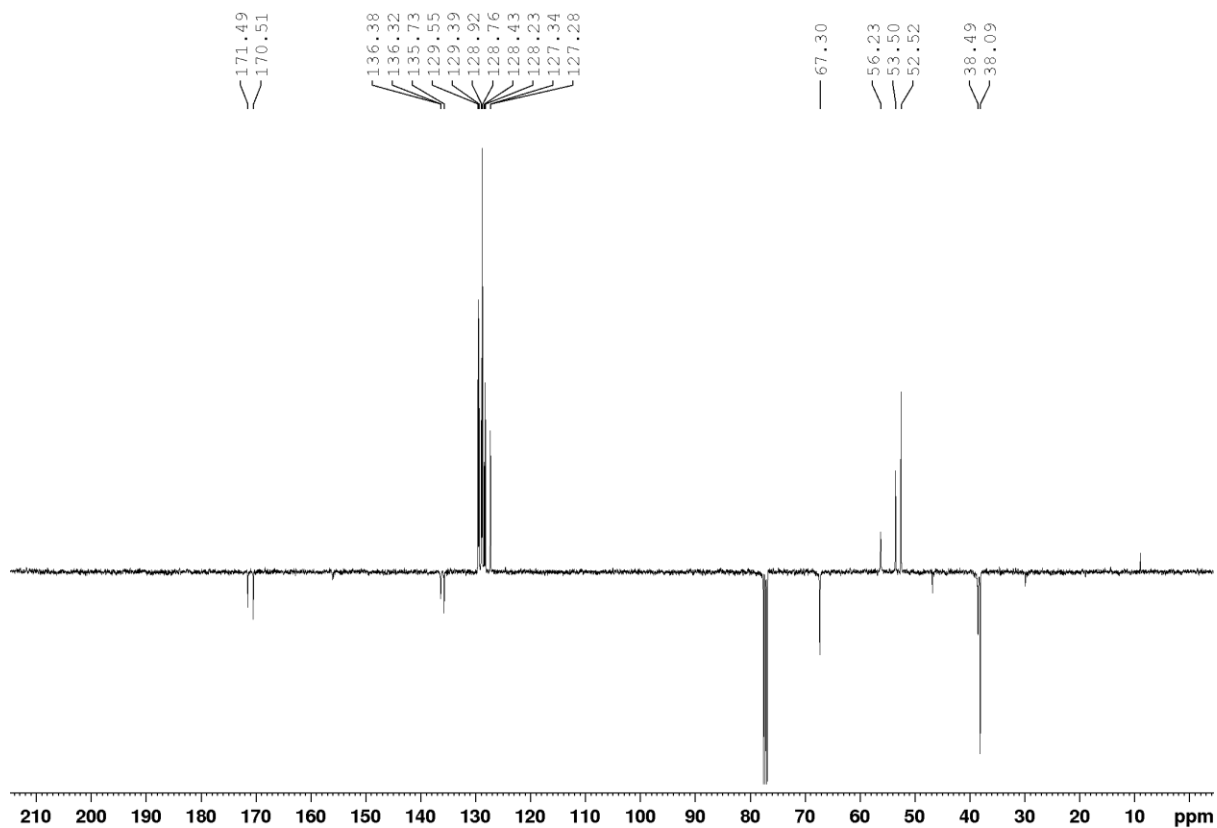
10. DODATAK



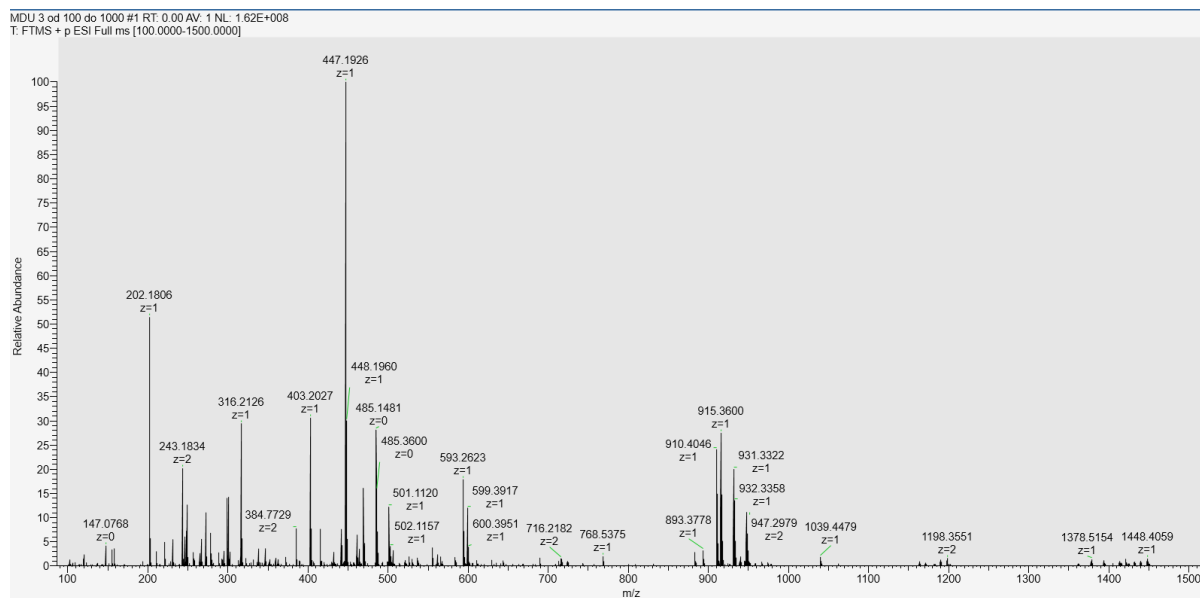
Slika D1. Spektar masa spoja P1.



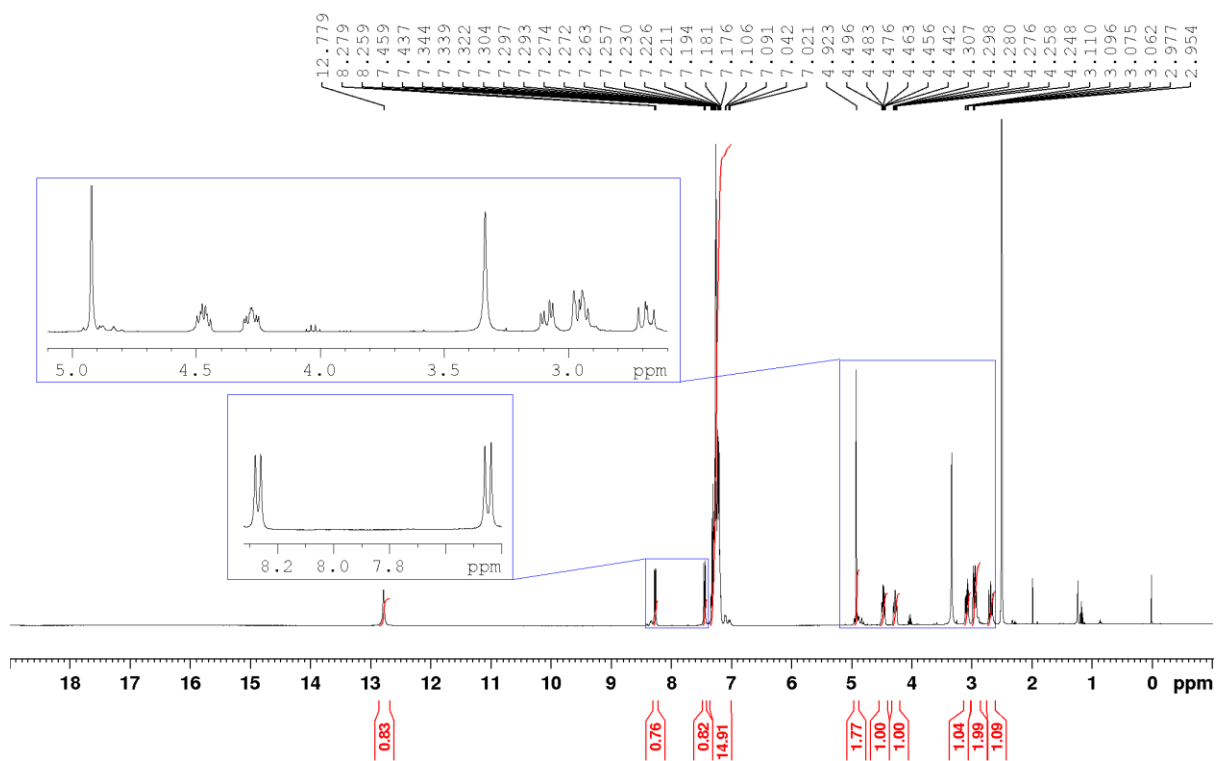
Slika D2. ^1H NMR spektar spoja P1 u CDCl_3 .



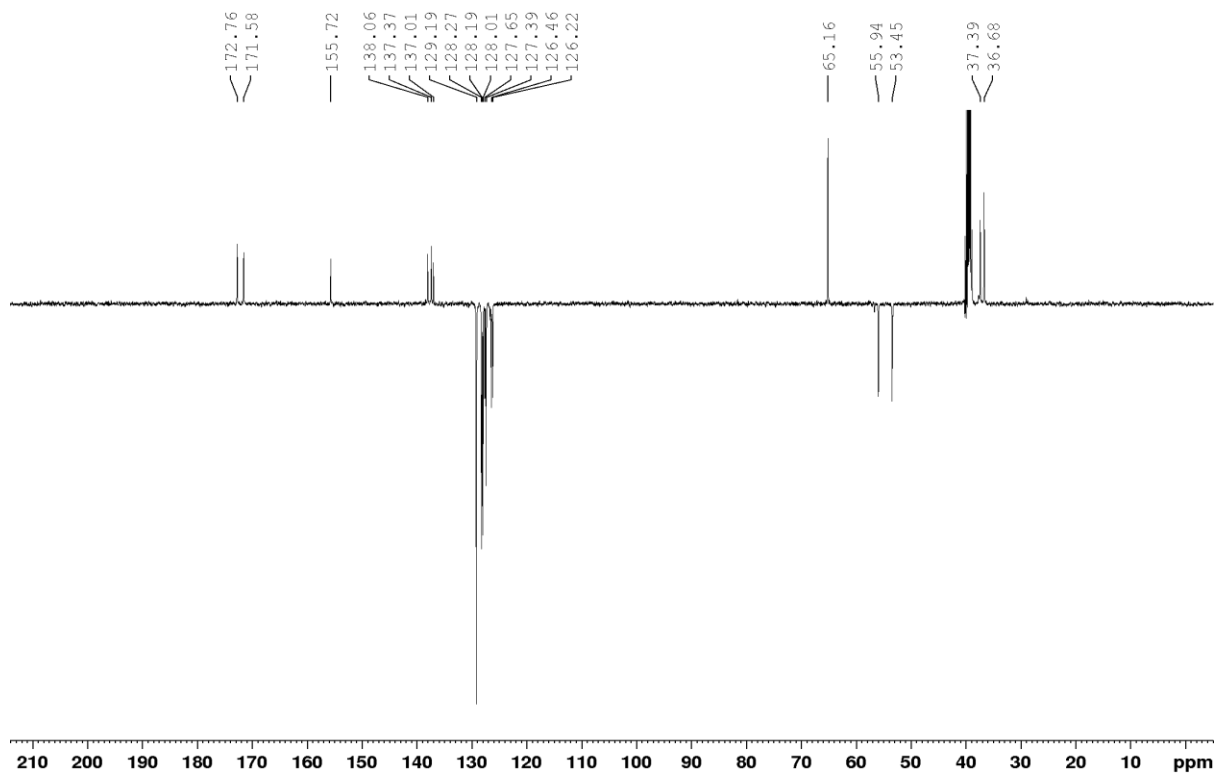
Slika D3. ^{13}C NMR spektar spoja **P1** u CDCl_3 .



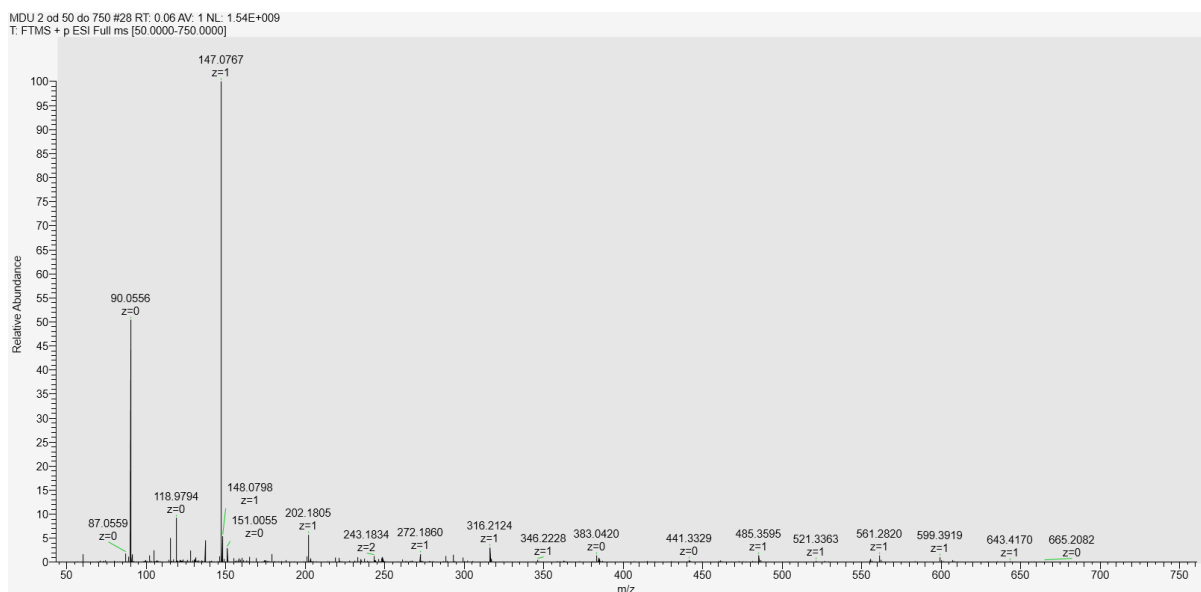
Slika D4. Spektar masa spoja **P2**.



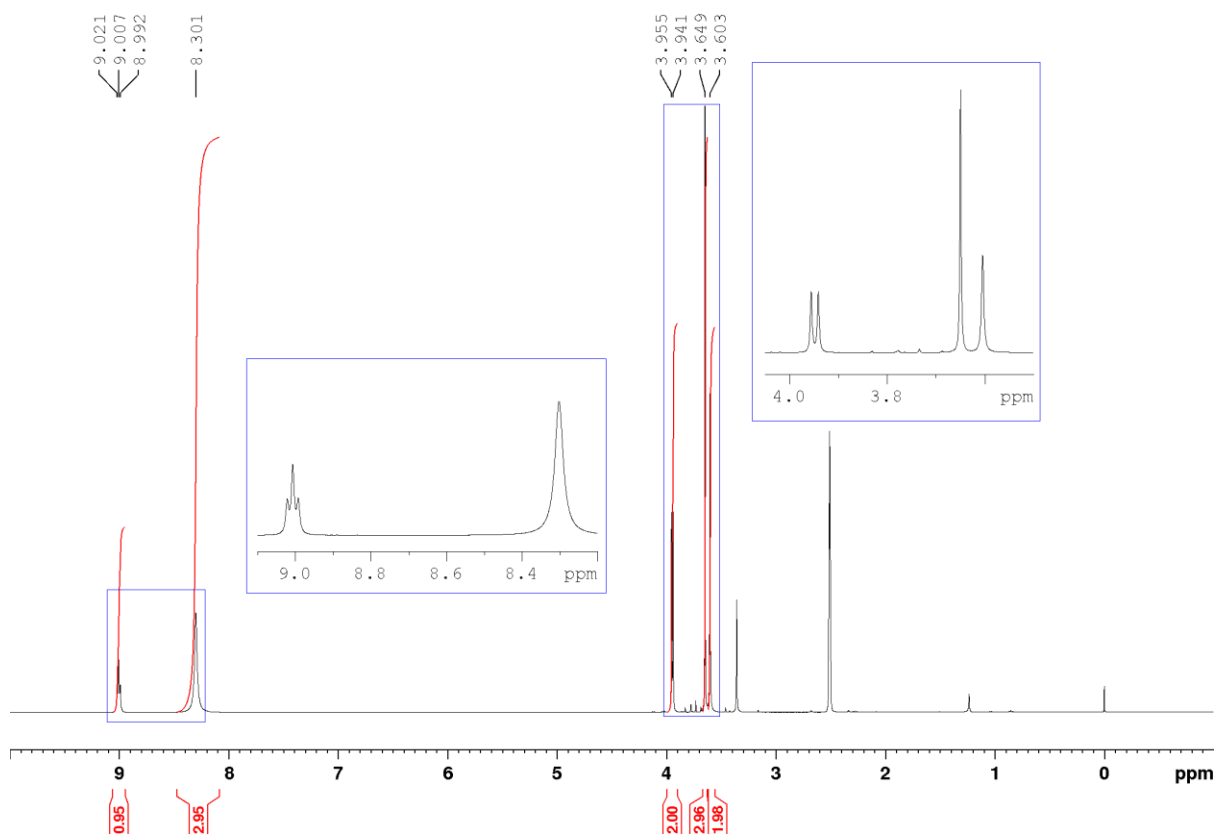
Slika D5. ^1H NMR spektar spoja **P2** u DMSO-d_6 .



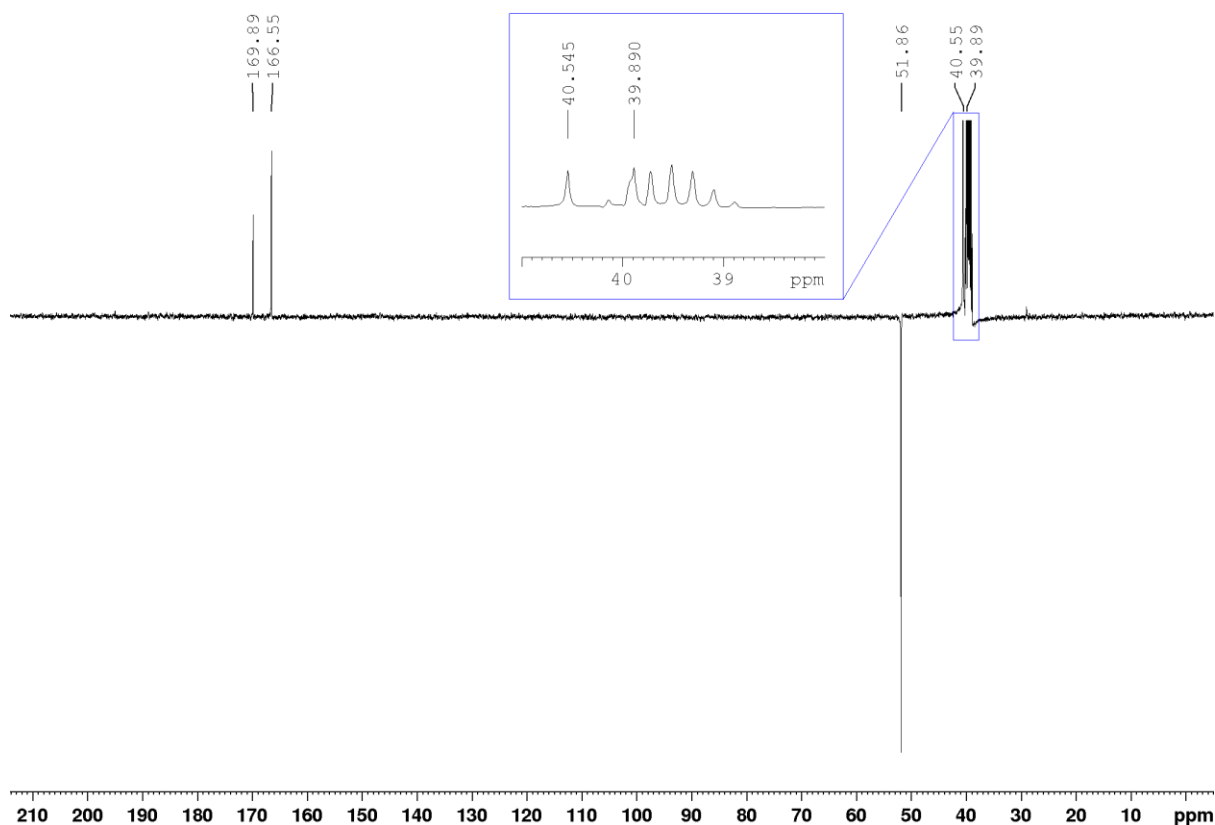
Slika D6. ^{13}C NMR spektar spoja **P2** u DMSO-d_6 .



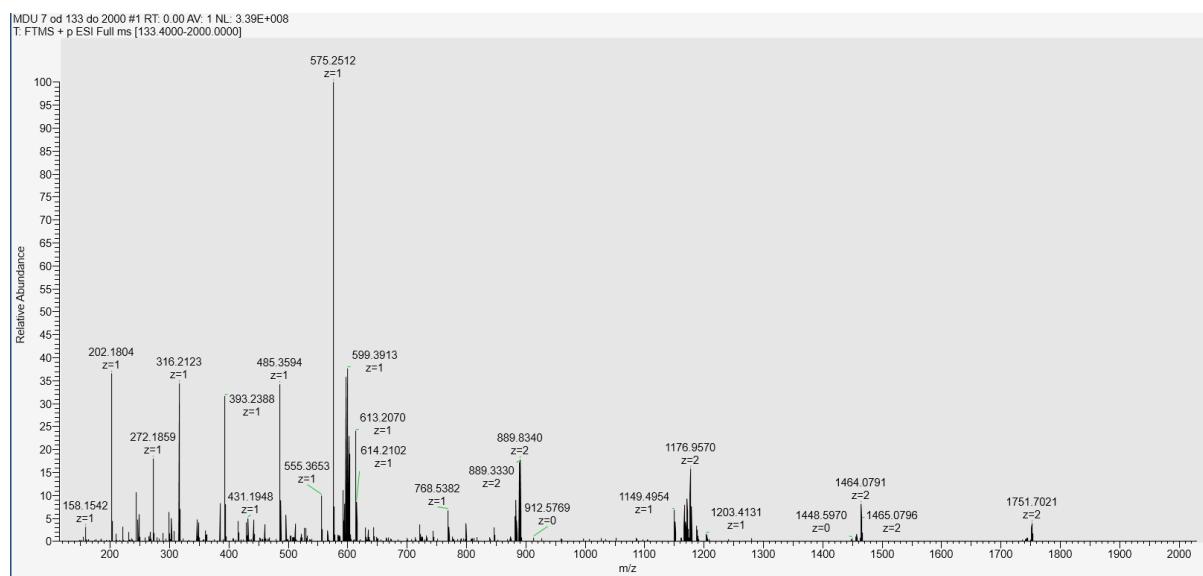
Slika D7. Spektar masa spoja P3.



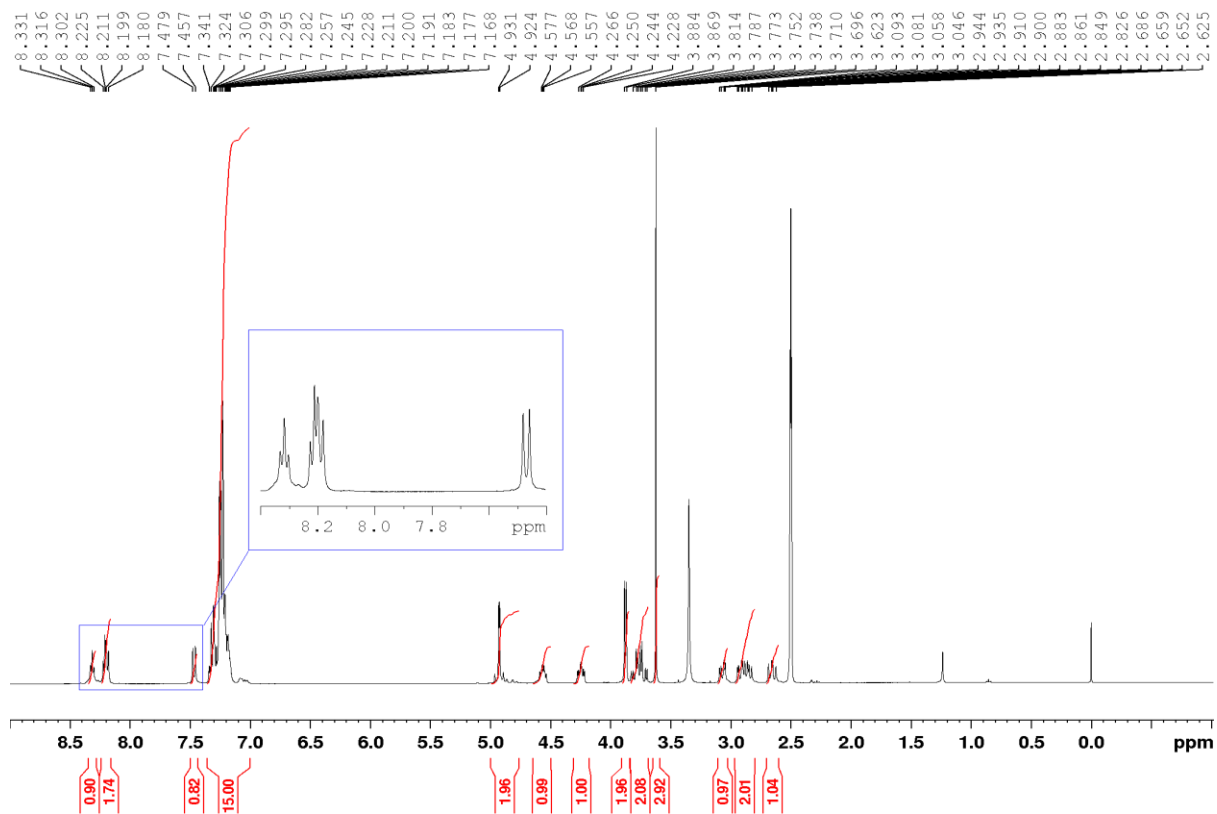
Slika D8. ^1H NMR spektar spoja P3 u DMSO- d_6 .



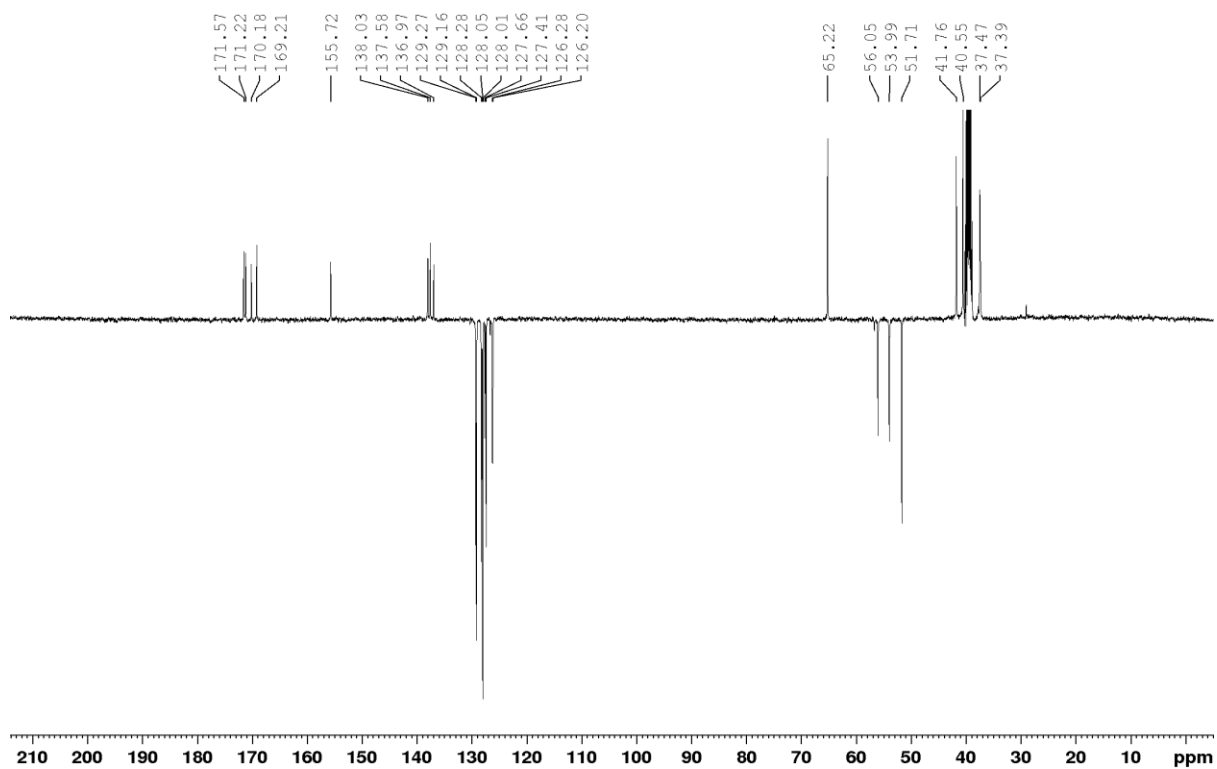
Slika D9. ^{13}C NMR spektar spoja **P3** u DMSO-d_6



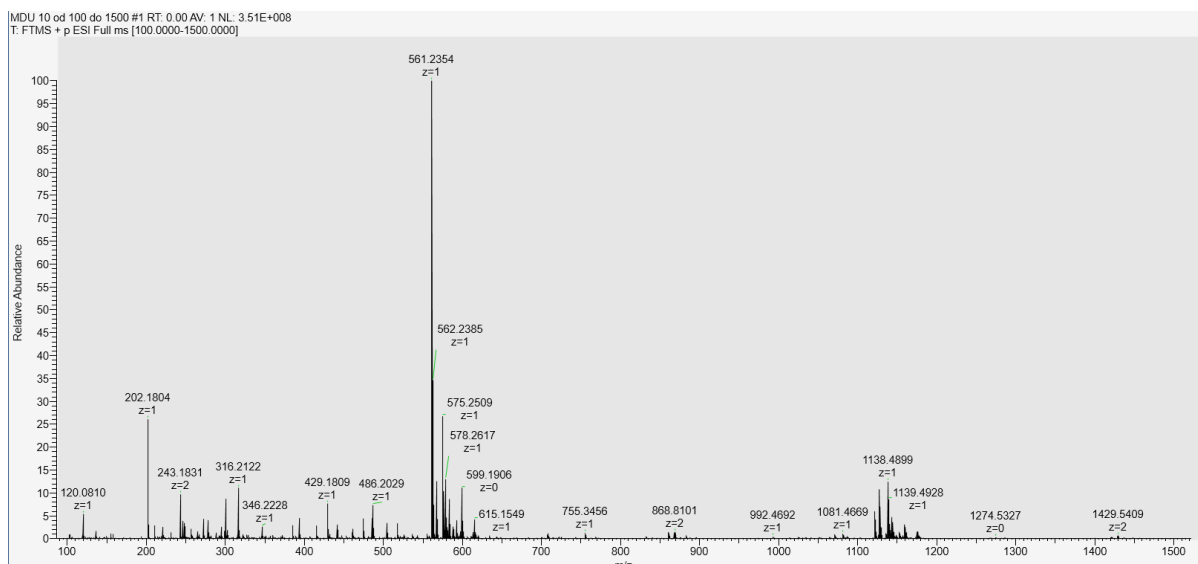
Slika D10. Spektar masa spoja **P4**.



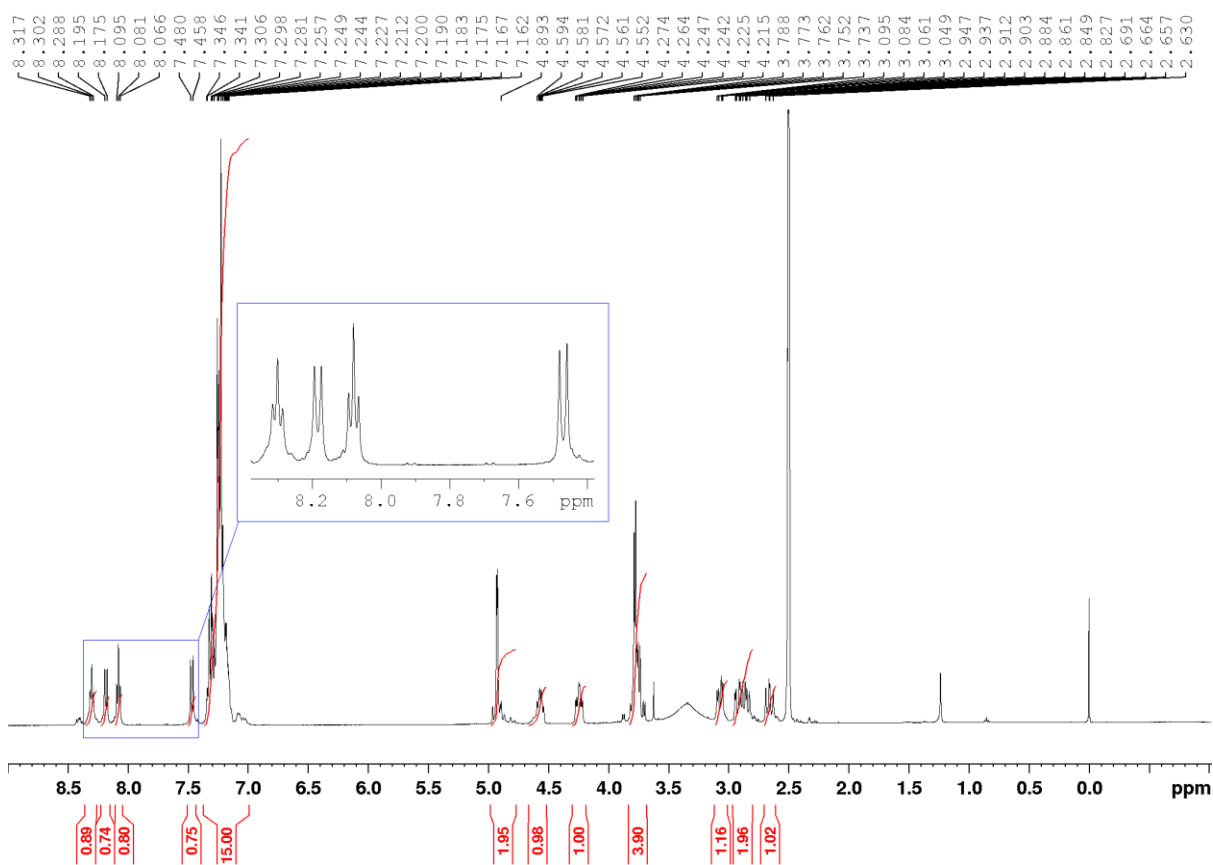
Slika D11. ^1H NMR spektar spoja **P4** u DMSO-d_6 .



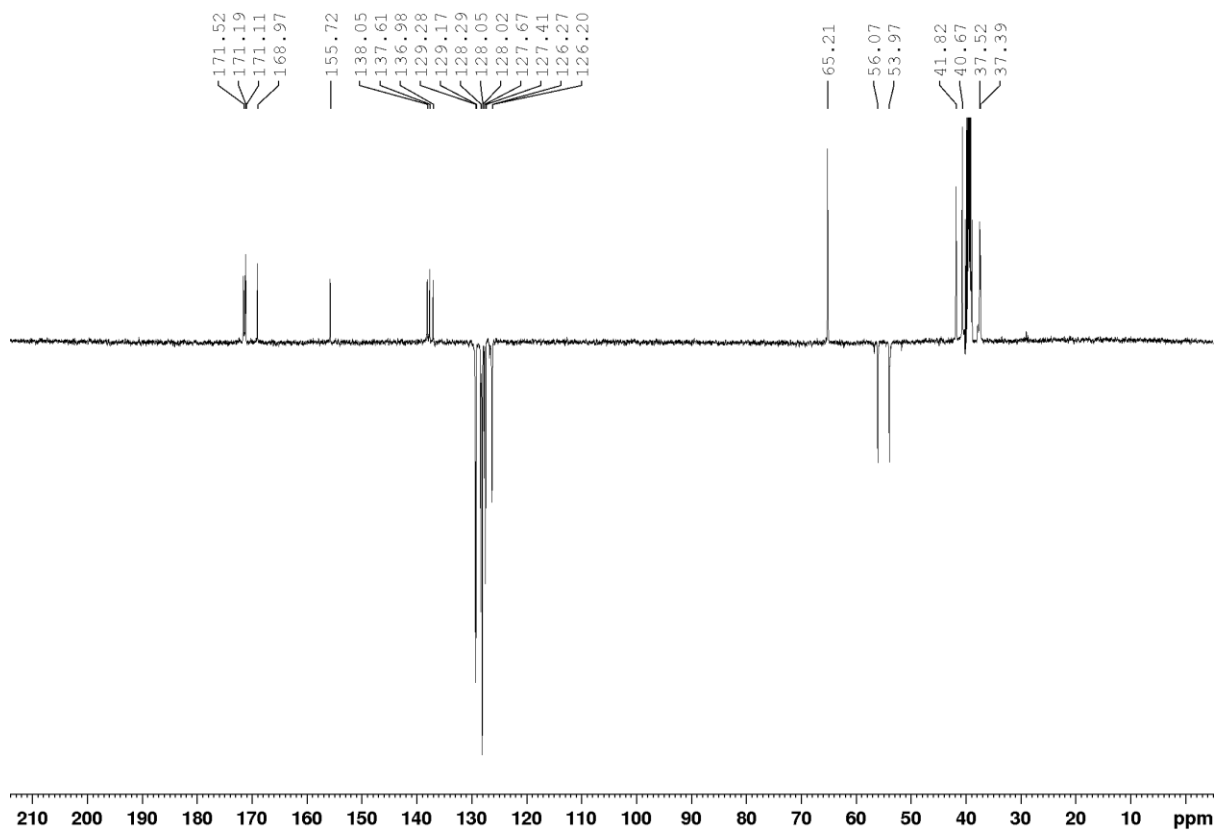
Slika D12. ^{13}C NMR spektar spoja **P4** u DMSO-d_6 .



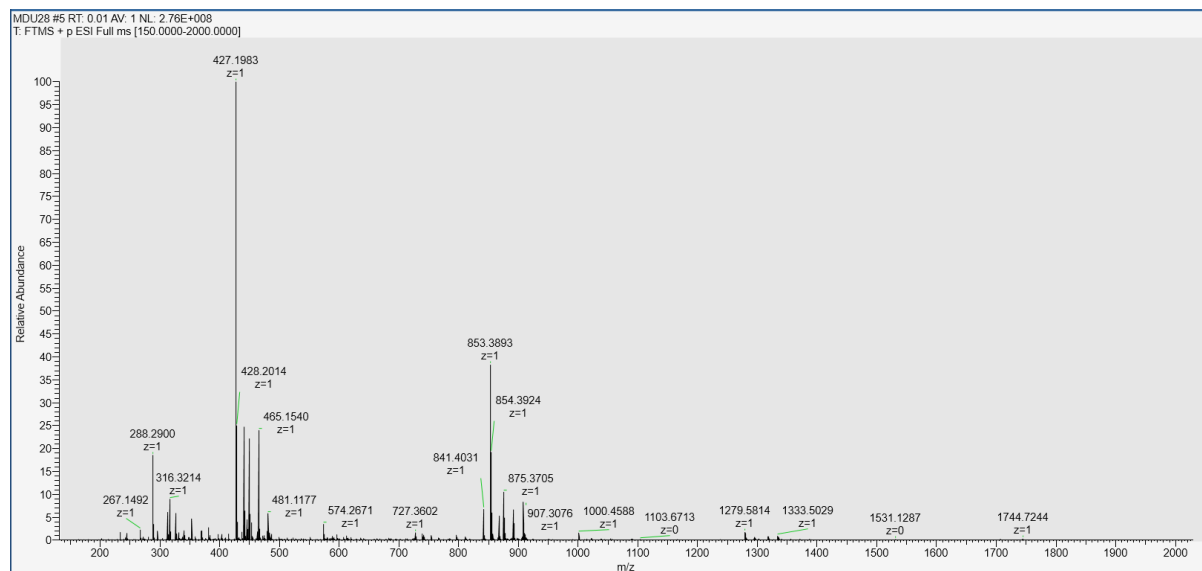
Slika D13. Spektar masa spoja **P5**.



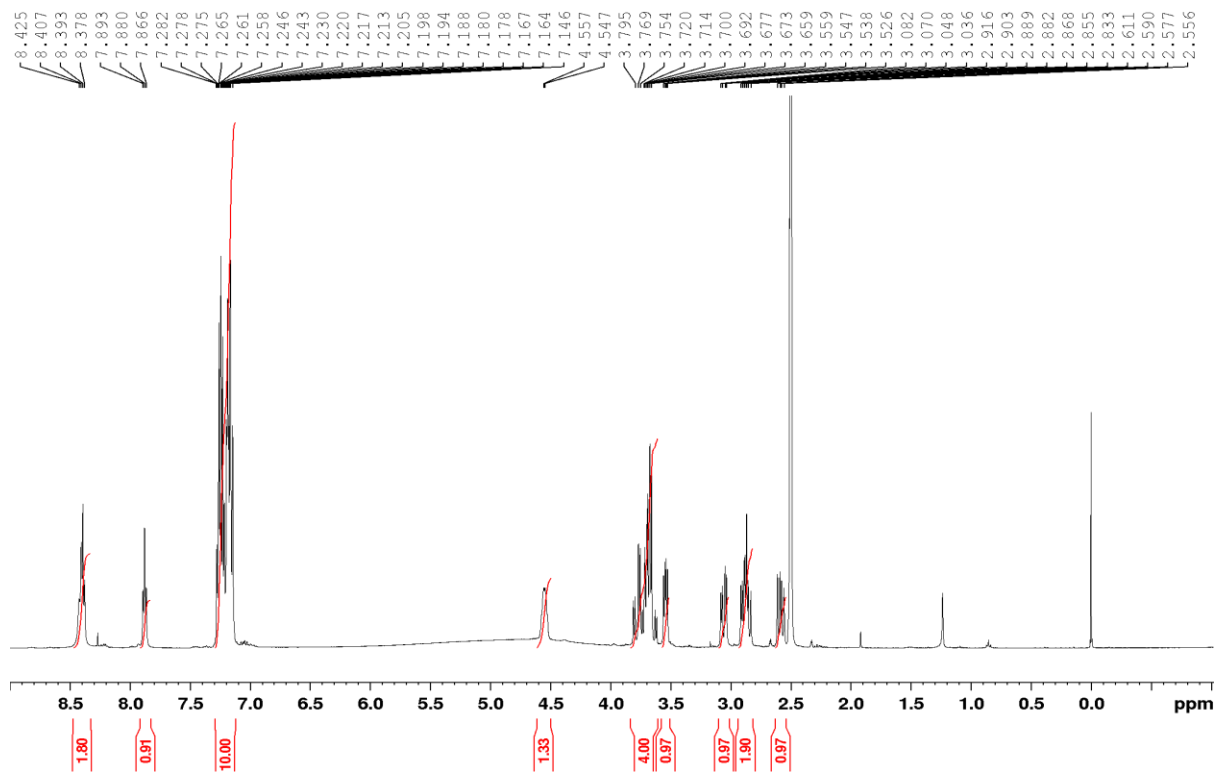
Slika D14. ^1H NMR spektar spoja **P5** u DMSO-d_6 .



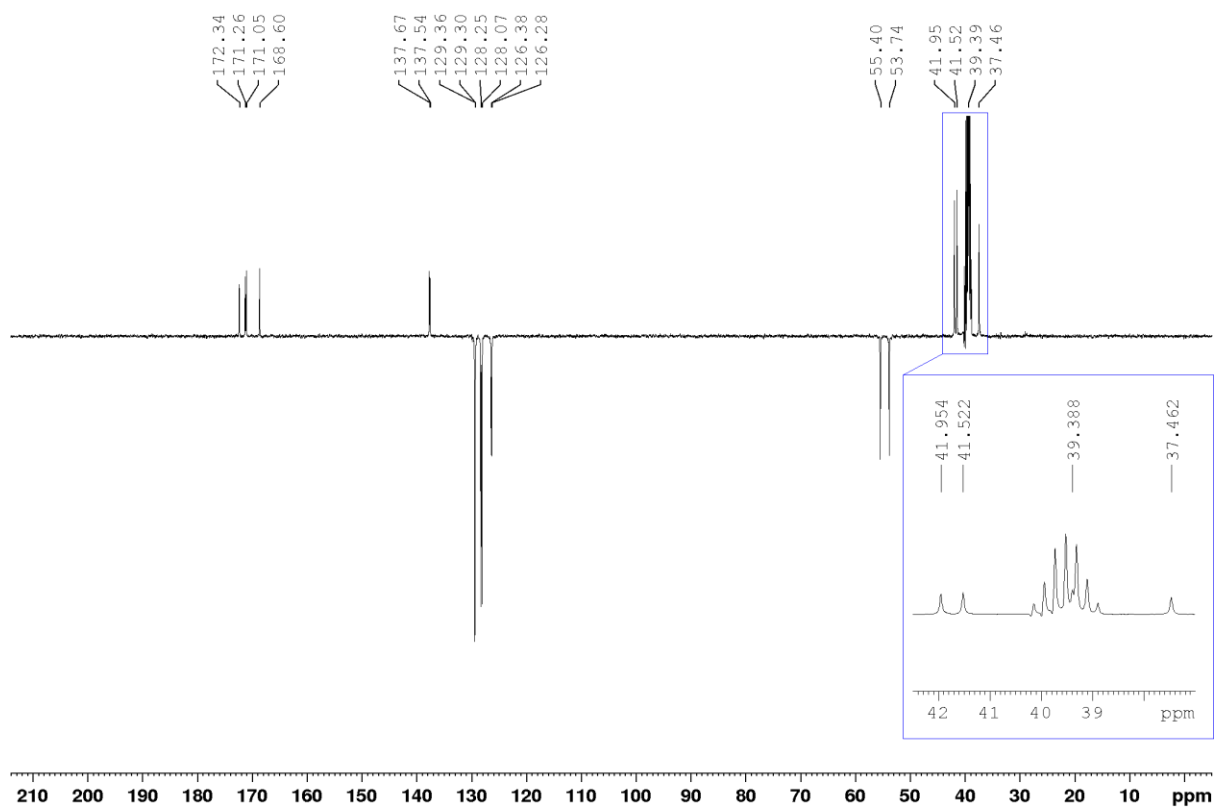
Slika D15. ^{13}C NMR spektar spoja P5 u DMSO- d_6 .



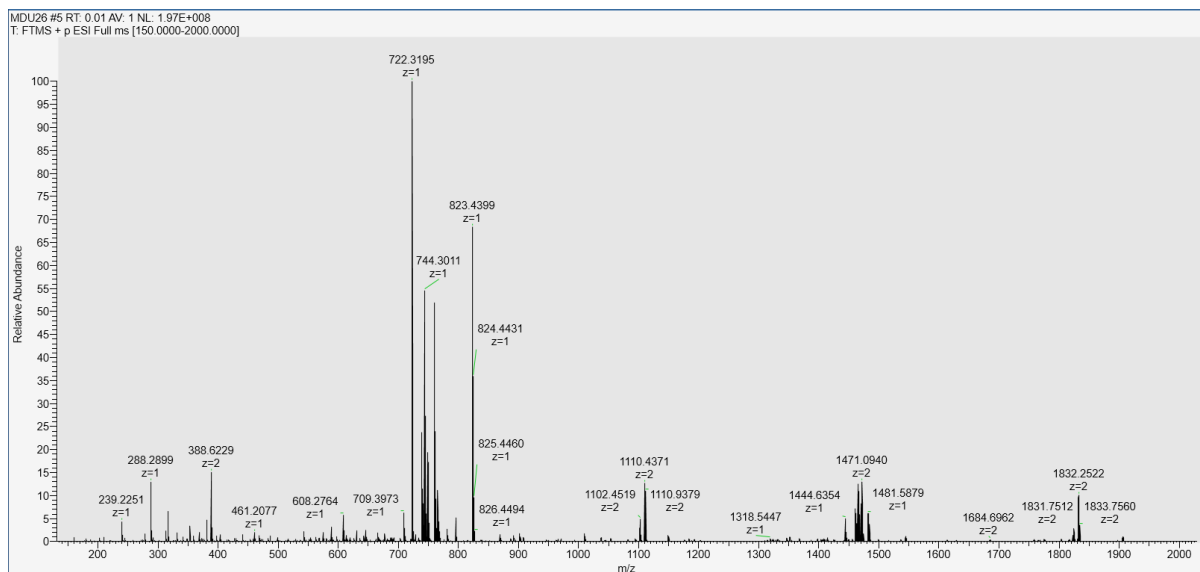
Slika D16. Spektar masa spoja 1.



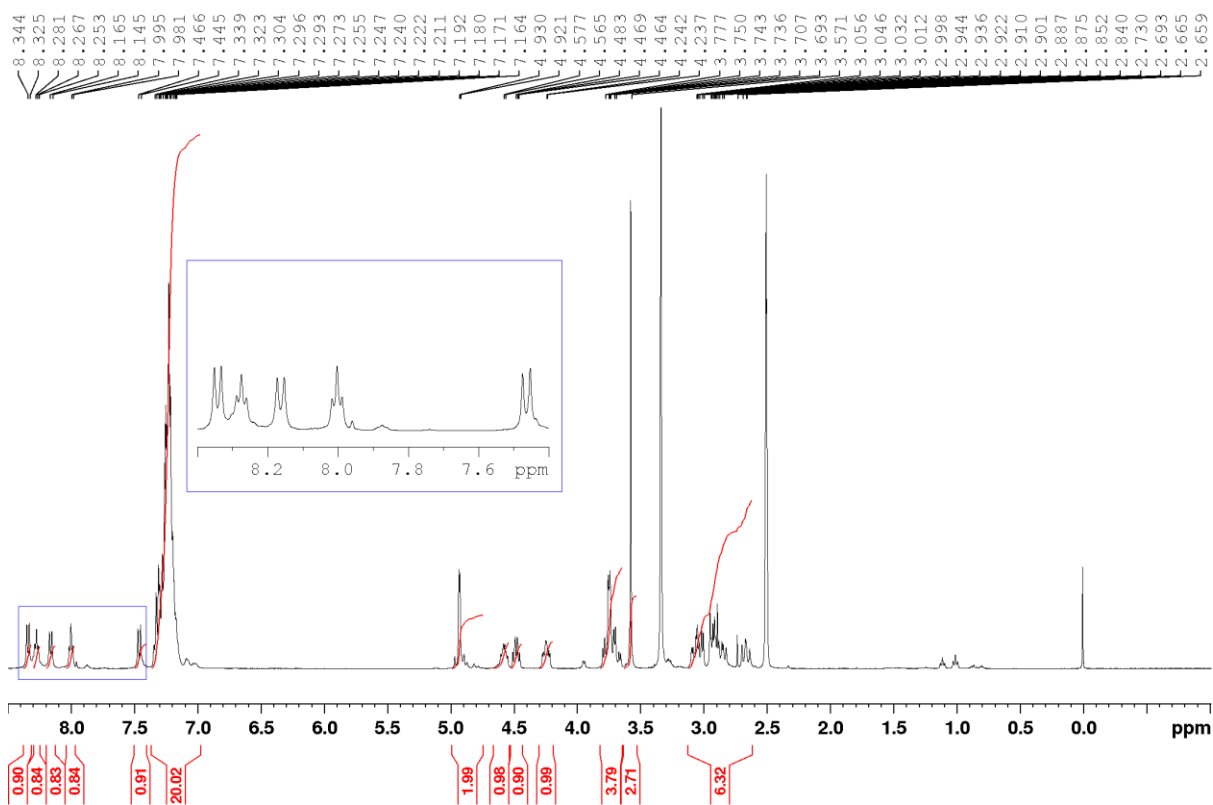
Slika D17. ^1H NMR spektar spoja **1** u DMSO-d_6 .



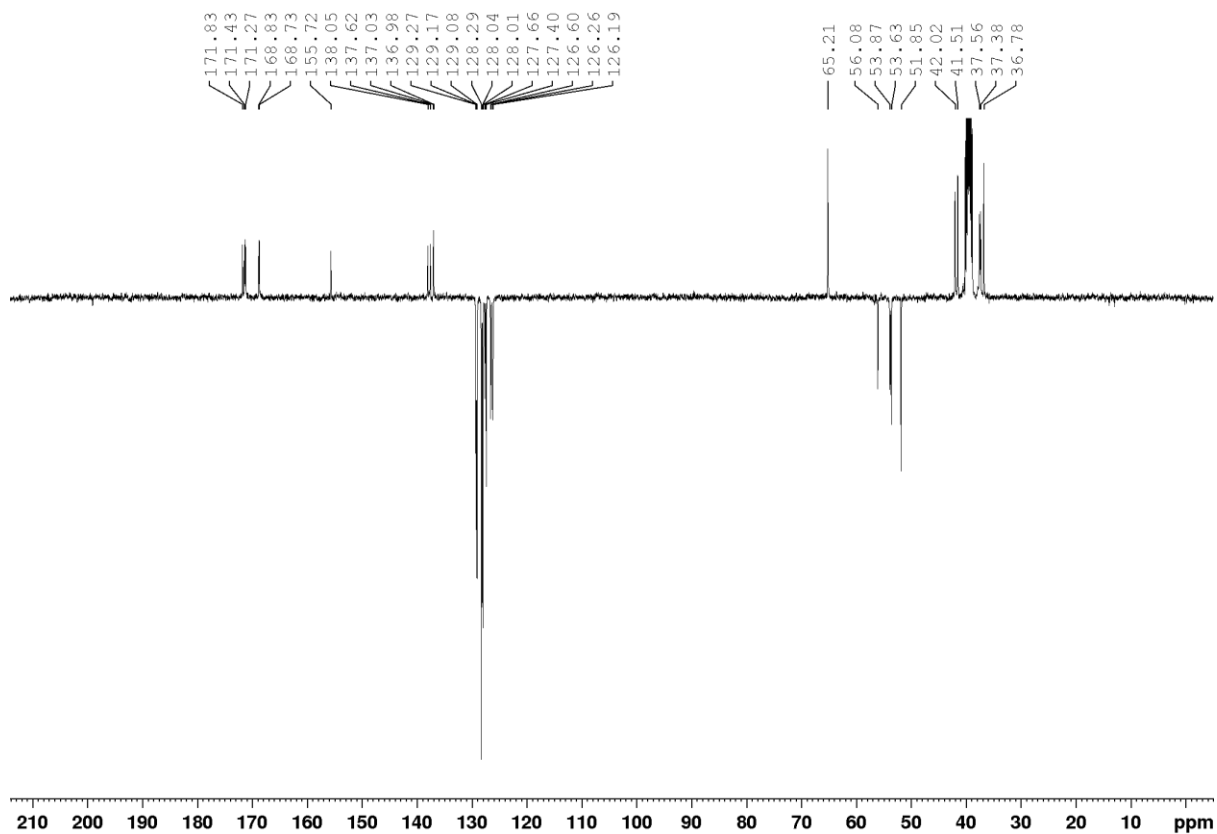
Slika D18. ^{13}C NMR spektar spoja **1** u DMSO-d_6 .



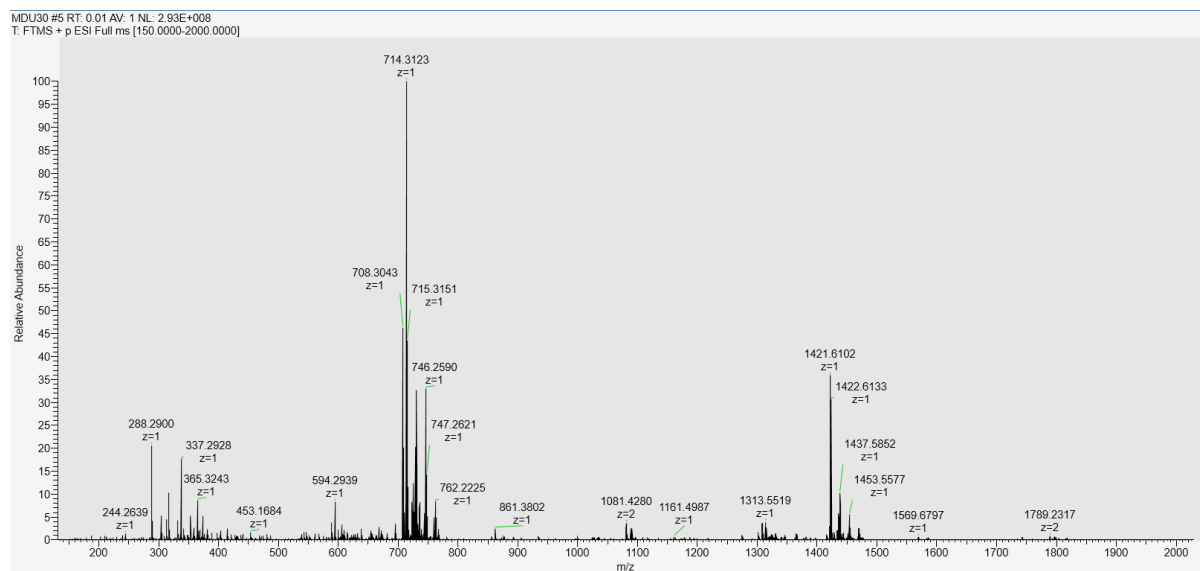
Slika D19. Spektar masa spoja P6.



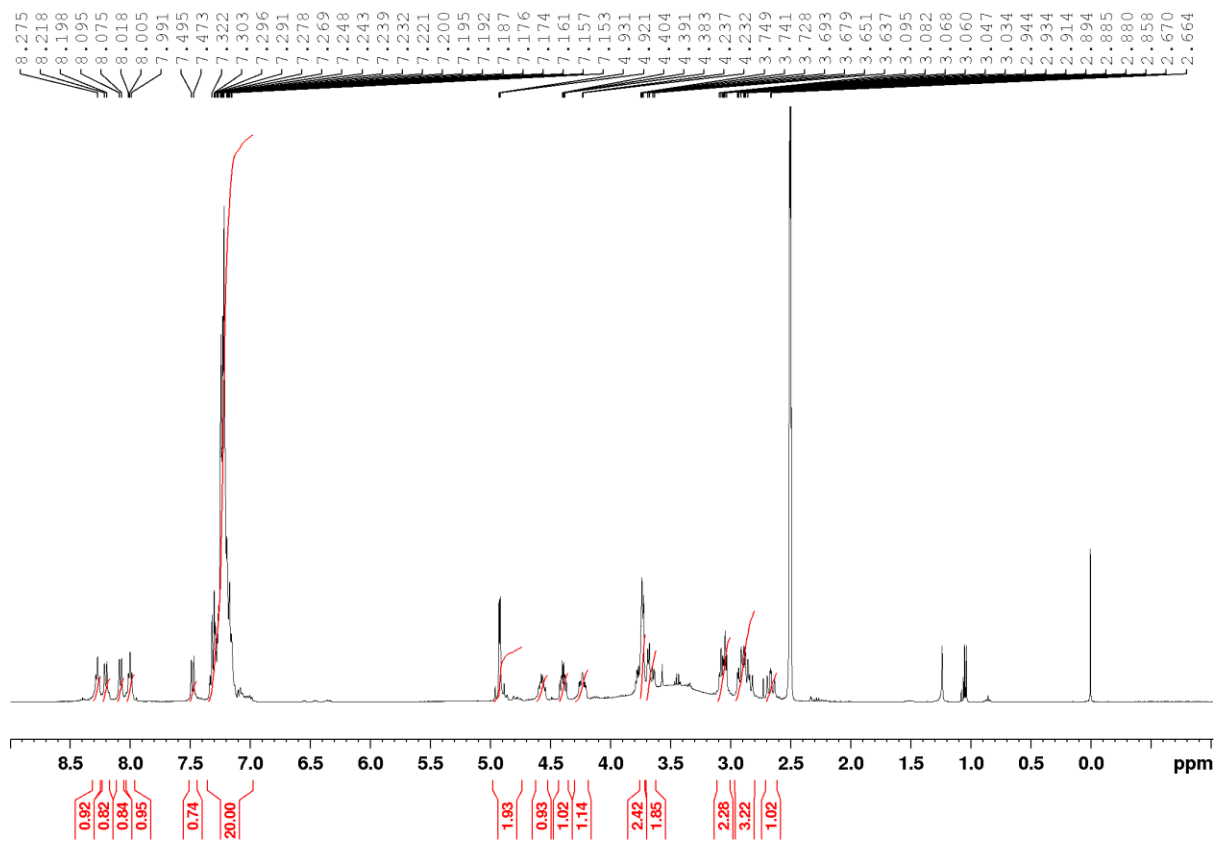
Slika D20. ^1H NMR spektar spoja P6 u DMSO- d_6 .



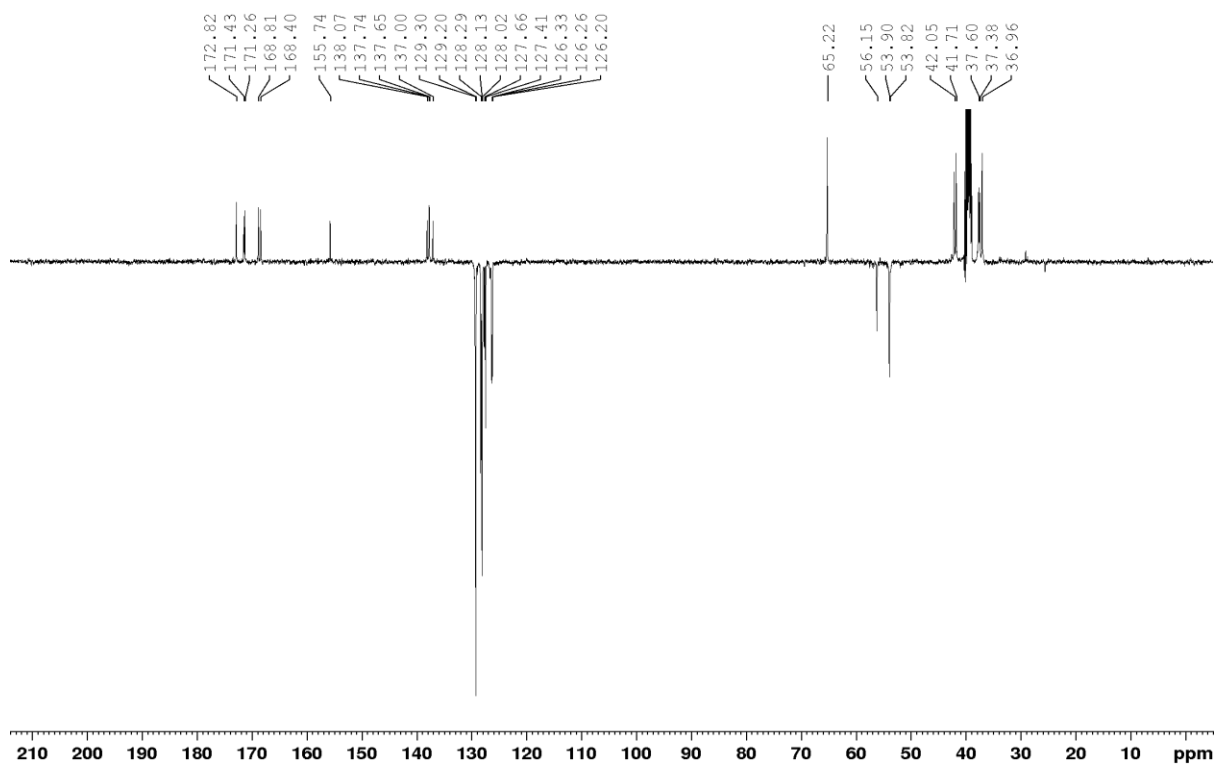
Slika D21. ^{13}C NMR spektar spoja P6 u DMSO- d_6 .



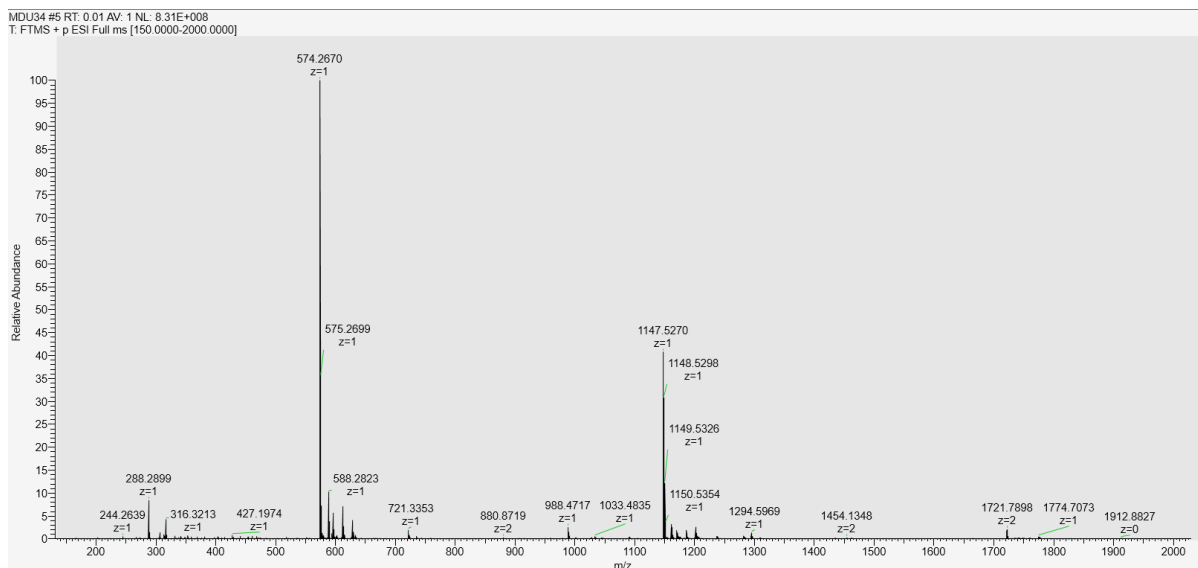
Slika D22. Spektar masa spoja P7.



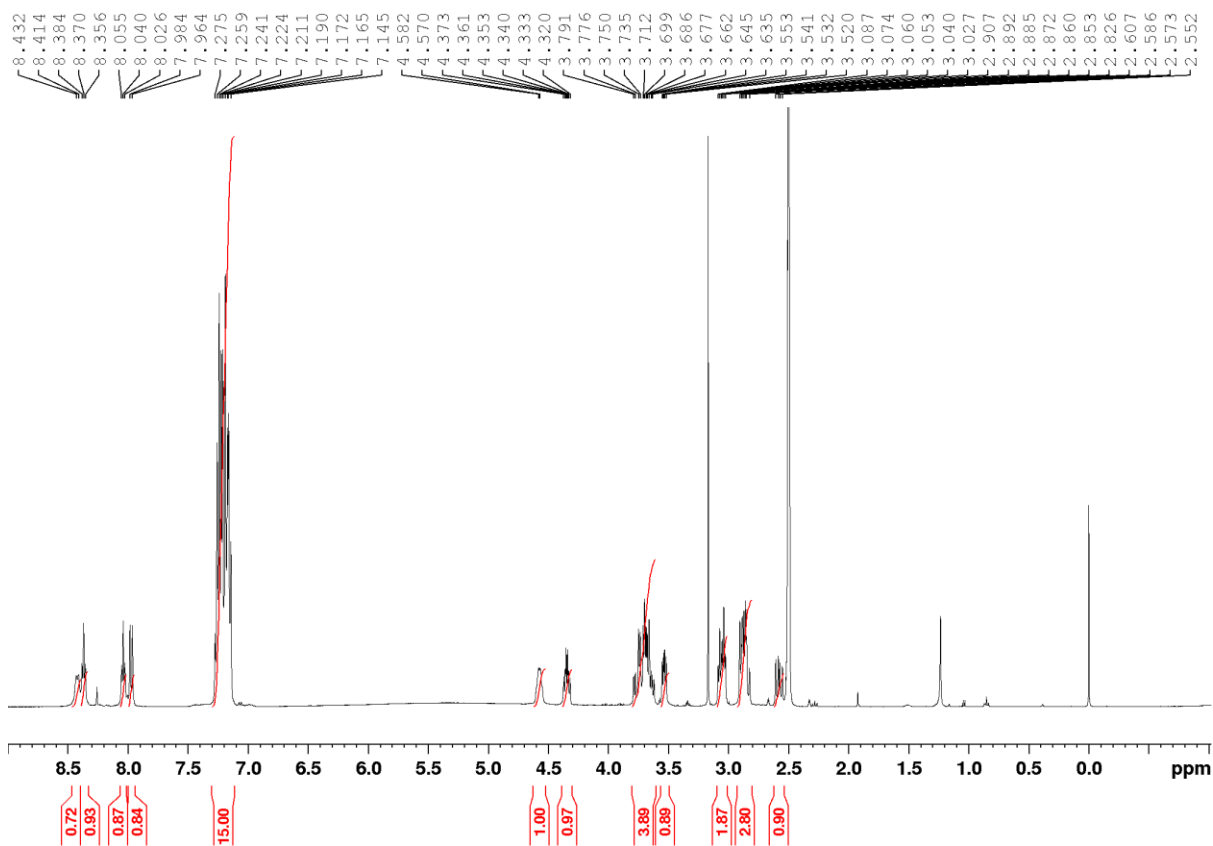
Slika D23. ^1H NMR spektar spoja P7 u DMSO- d_6 .



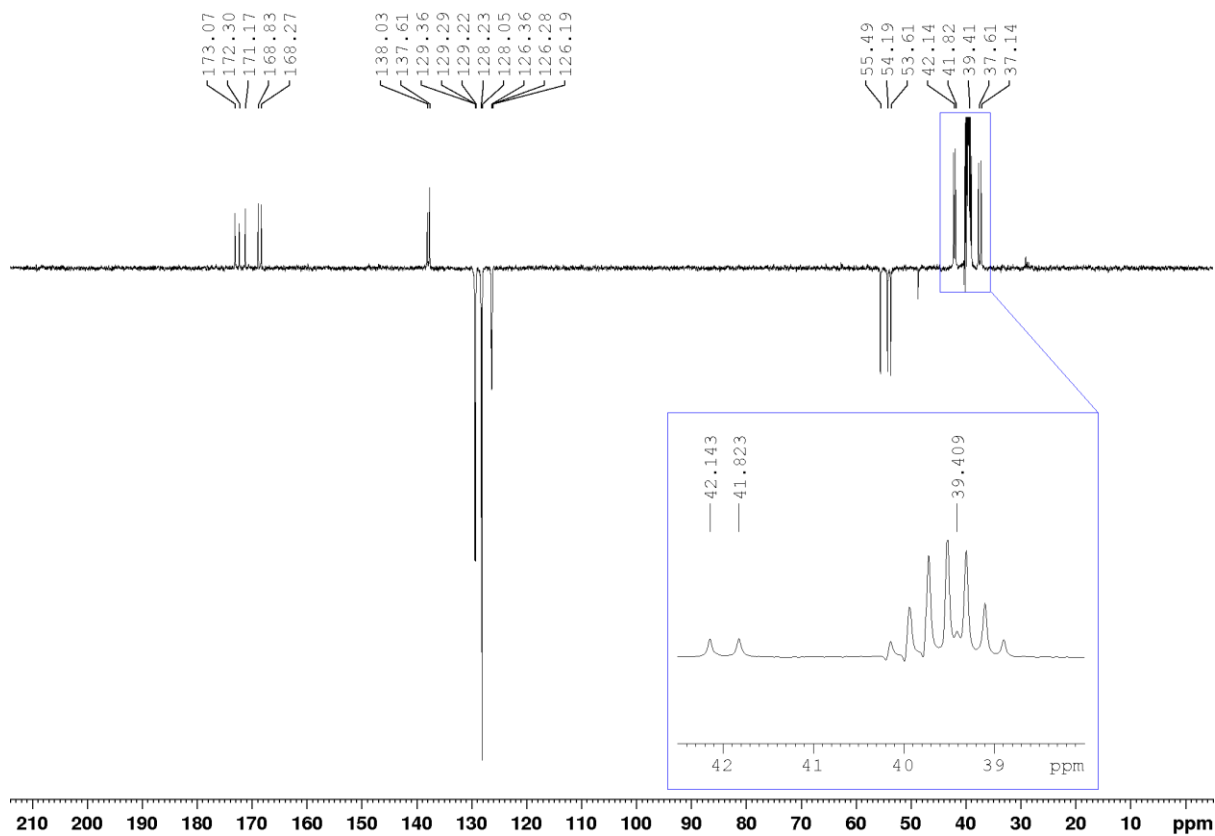
Slika D24. ^{13}C NMR spektar spoja P7 u DMSO- d_6 .



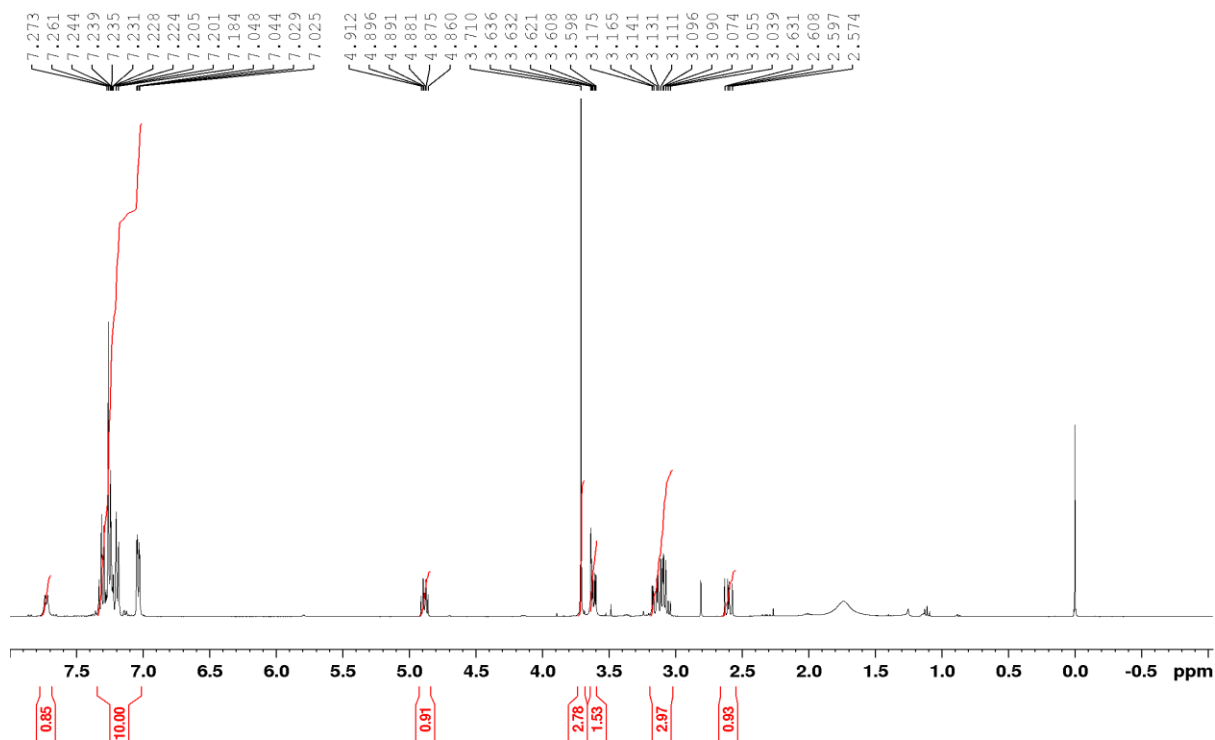
Slika D25. Spektar masa spoja 2.



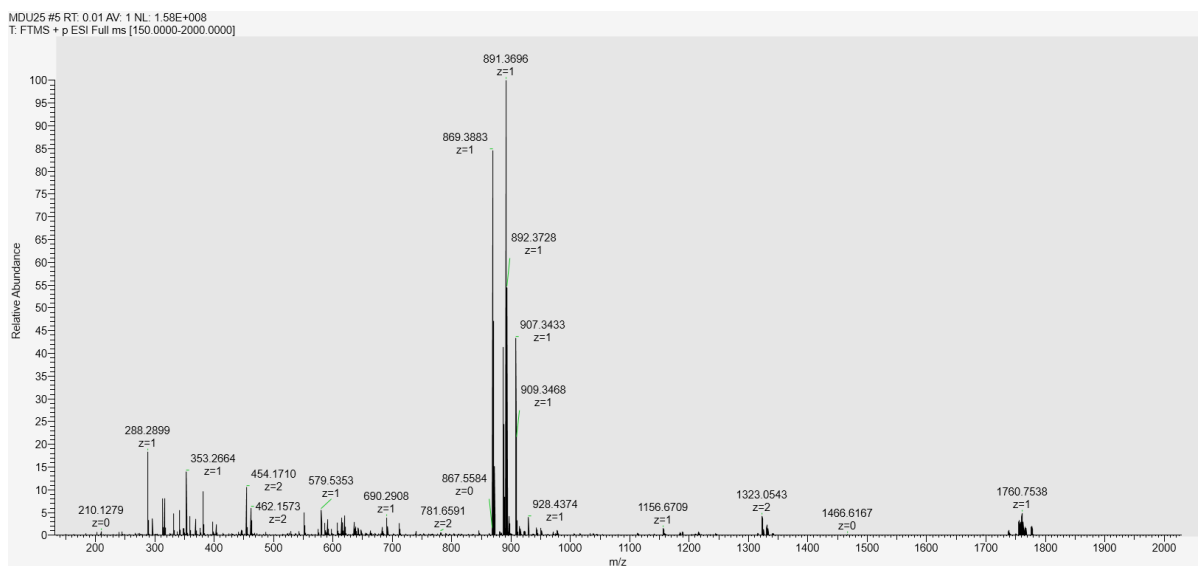
Slika D26. ^1H NMR spektar spoja 2 u DMSO-d_6 .



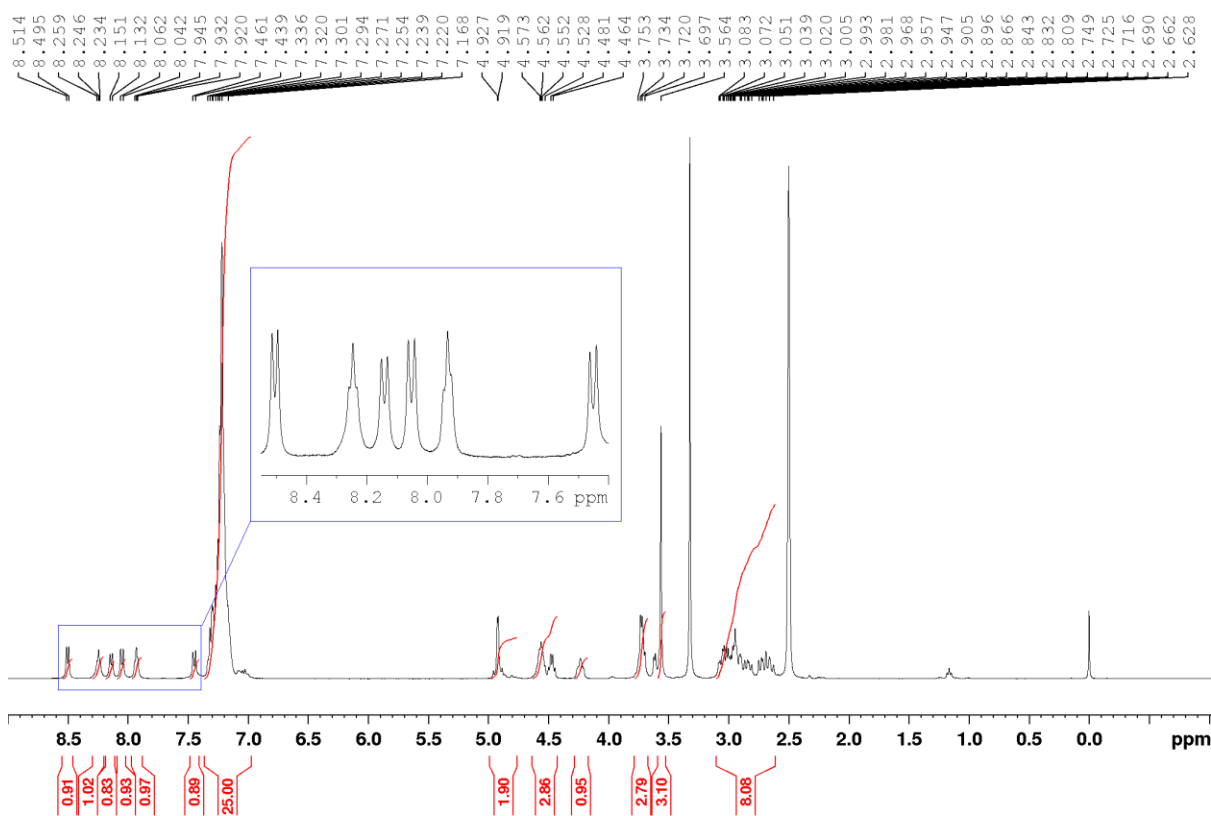
Slika D27. ^{13}C NMR spektar spoja **2** u DMSO-d_6 .



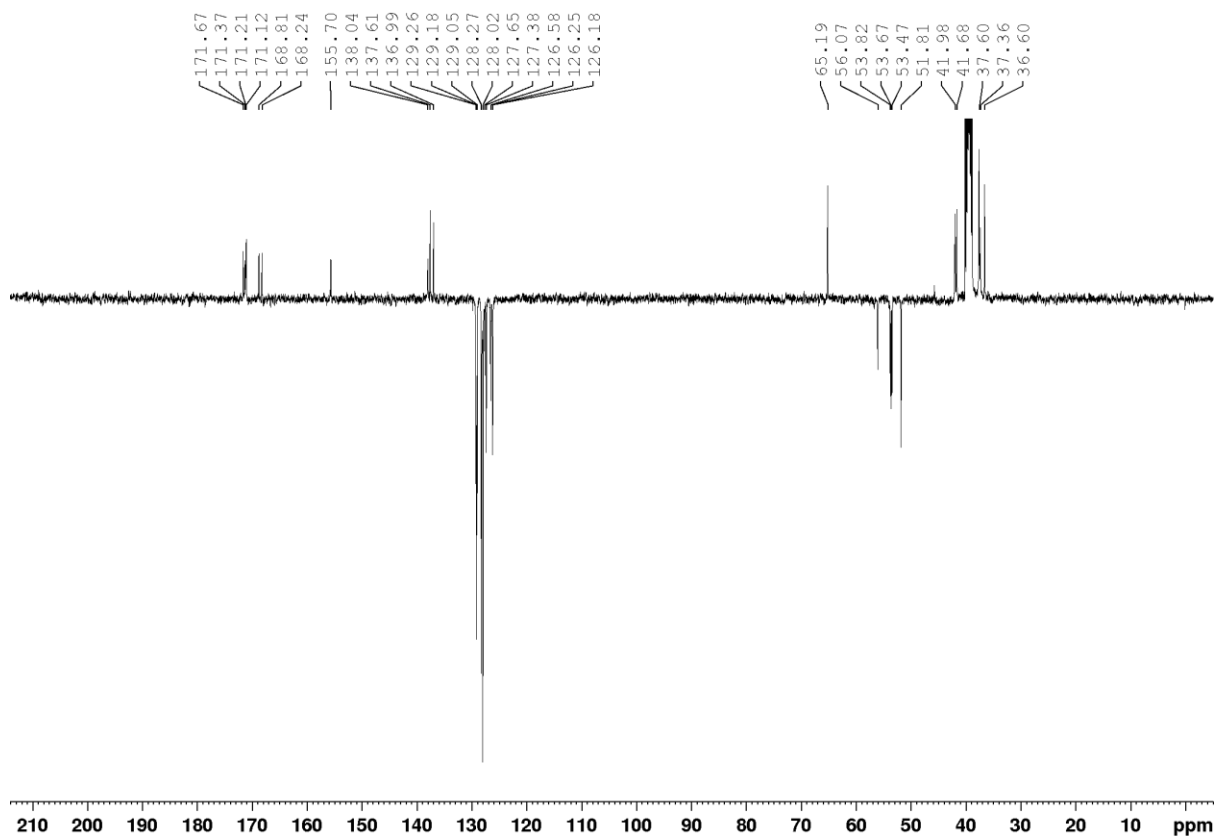
Slika D28. ^1H NMR spektar spoja **P8** u CDCl_3 .



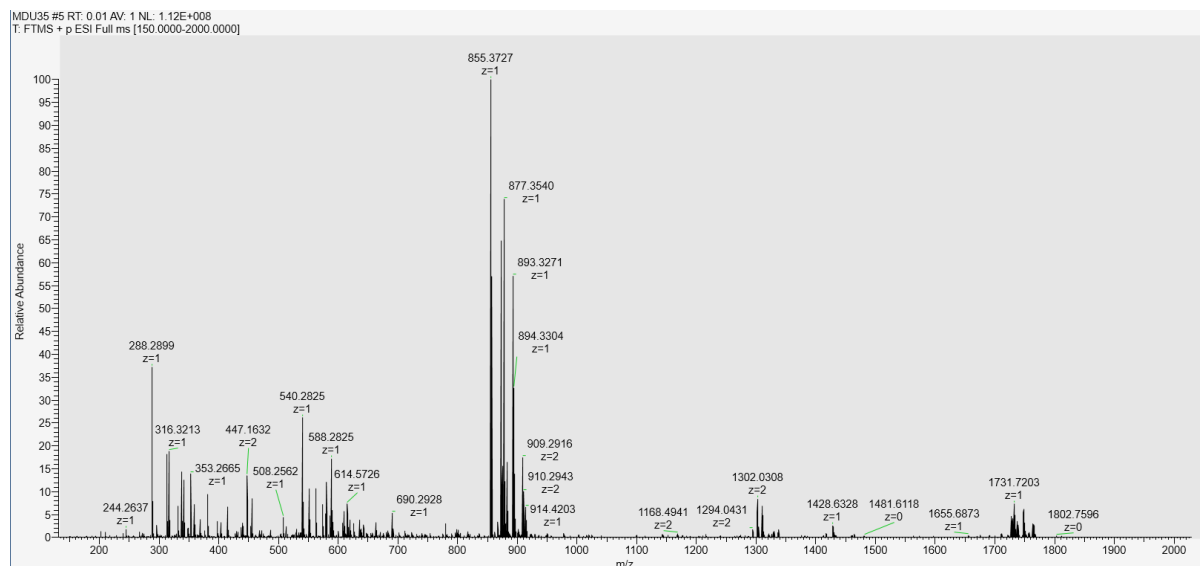
Slika D29. Spektar masa spoja **P9**.



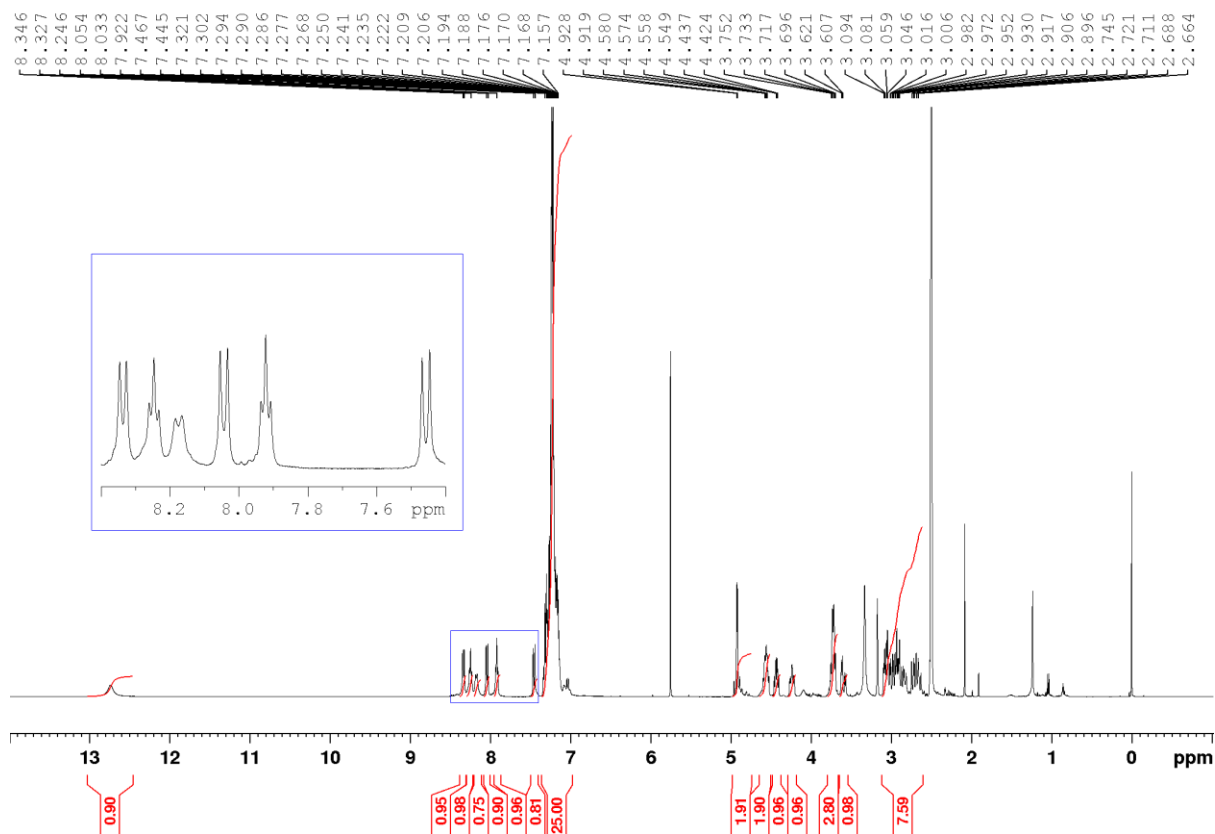
Slika D30. ^1H NMR spektar spoja **P9** u DMSO-d_6 .



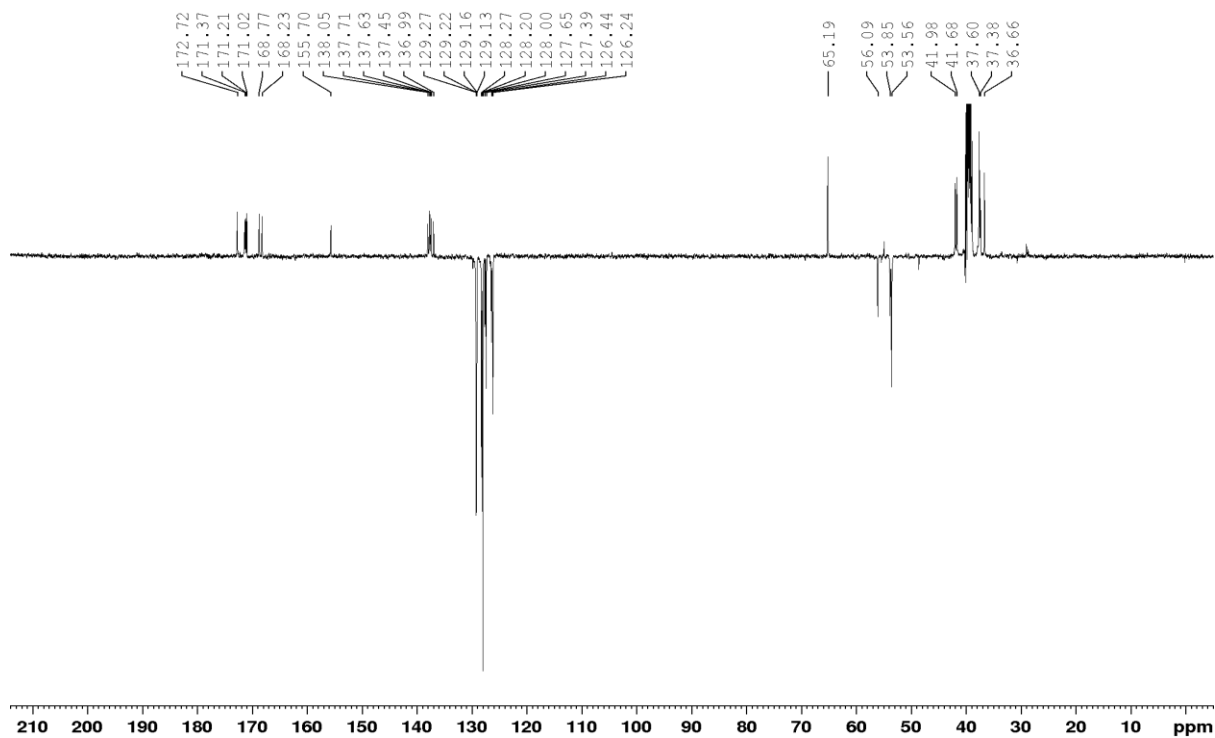
Slika D31. ^{13}C NMR spektar spoja **P9** u DMSO-d_6 .



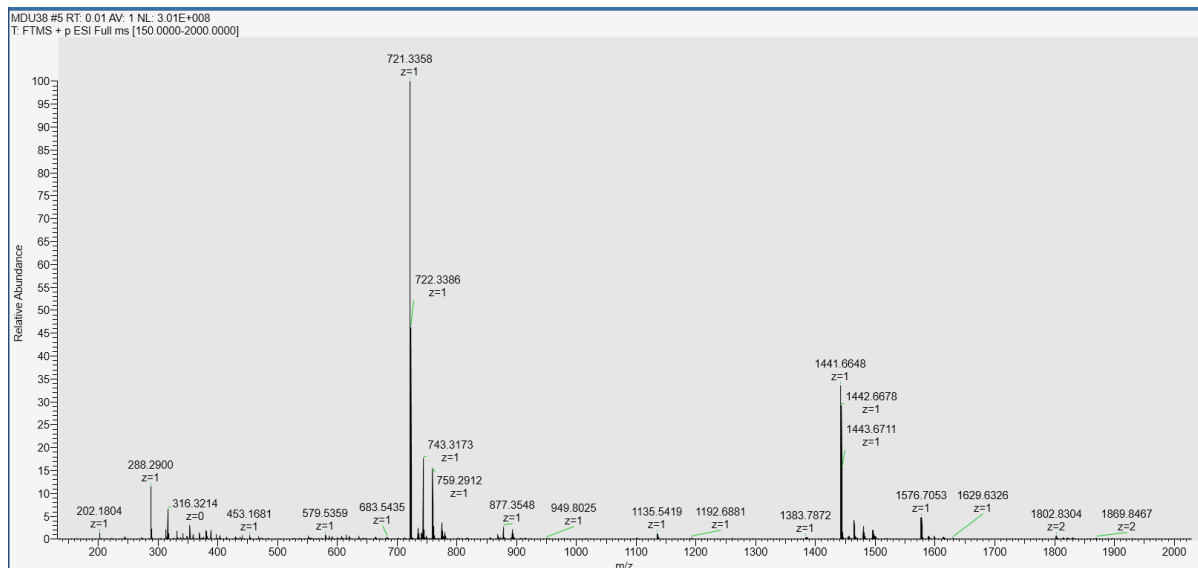
Slika D32. Spektar masa spoja **P10**.



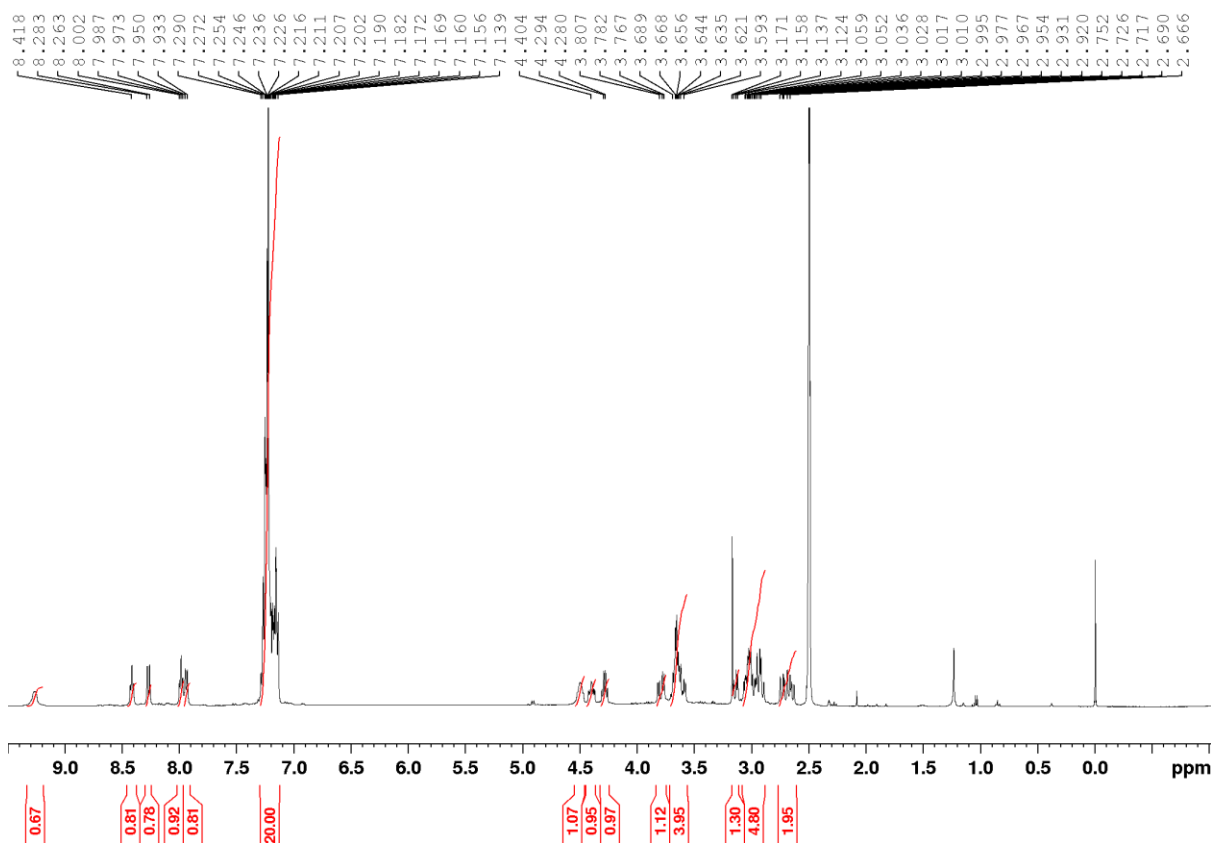
Slika D33. ^1H NMR spektar spoja **P10** u DMSO-d_6 .



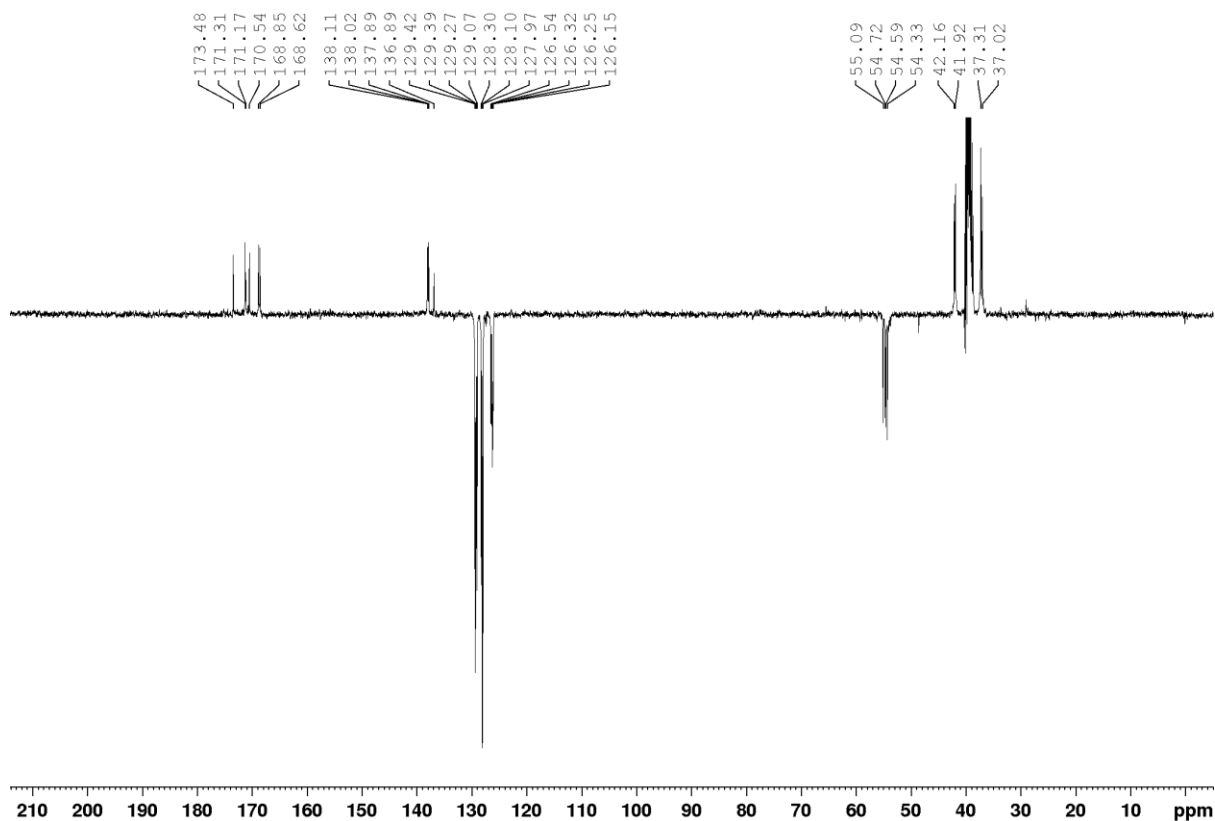
Slika D34. ^{13}C NMR spektar spoja **P10** u DMSO-d_6 .



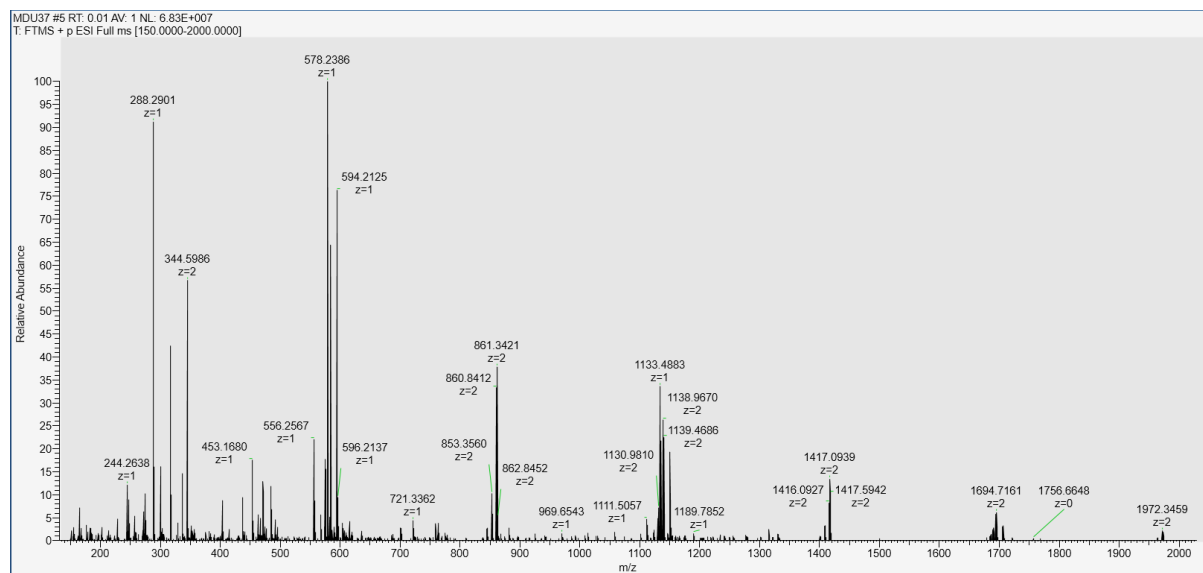
Slika D35. Spektar masa spoja 3.



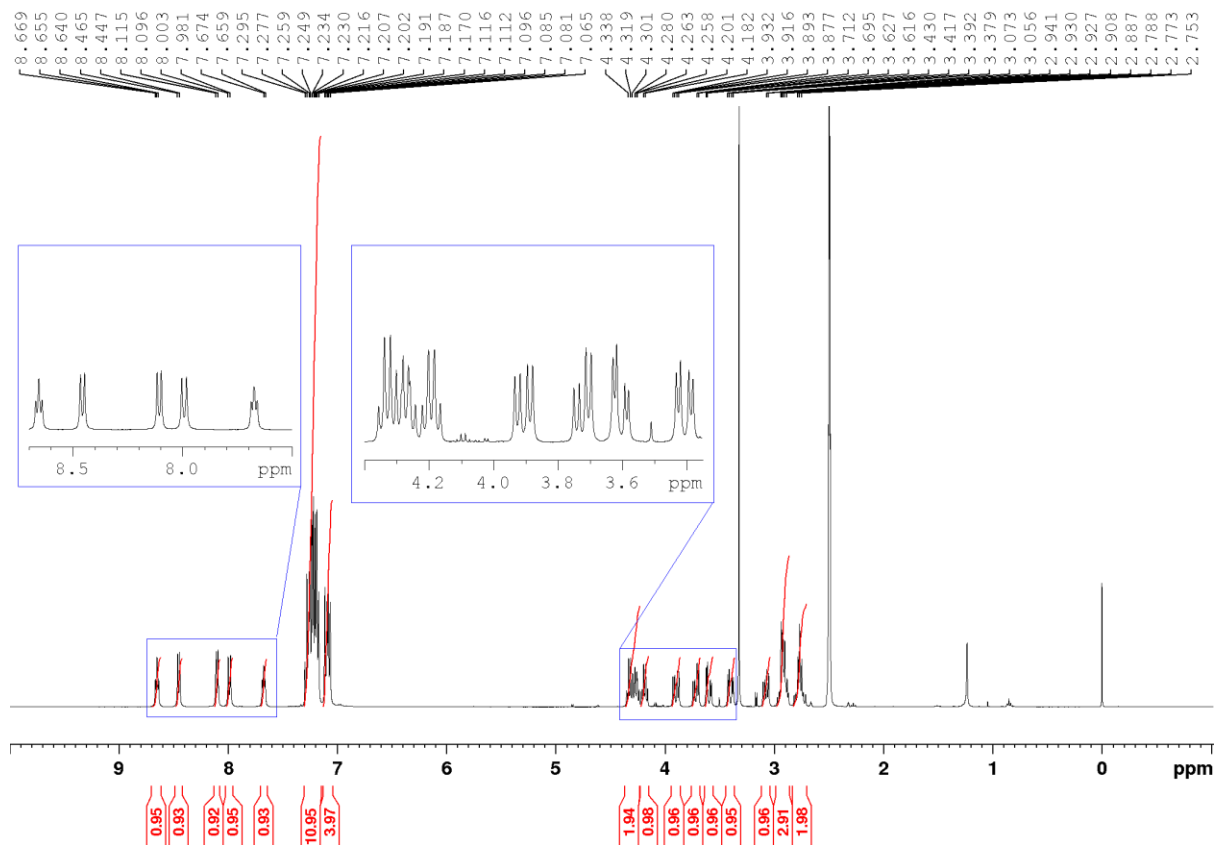
Slika D36. ¹H NMR spektar spoja 3 u DMSO-d₆.



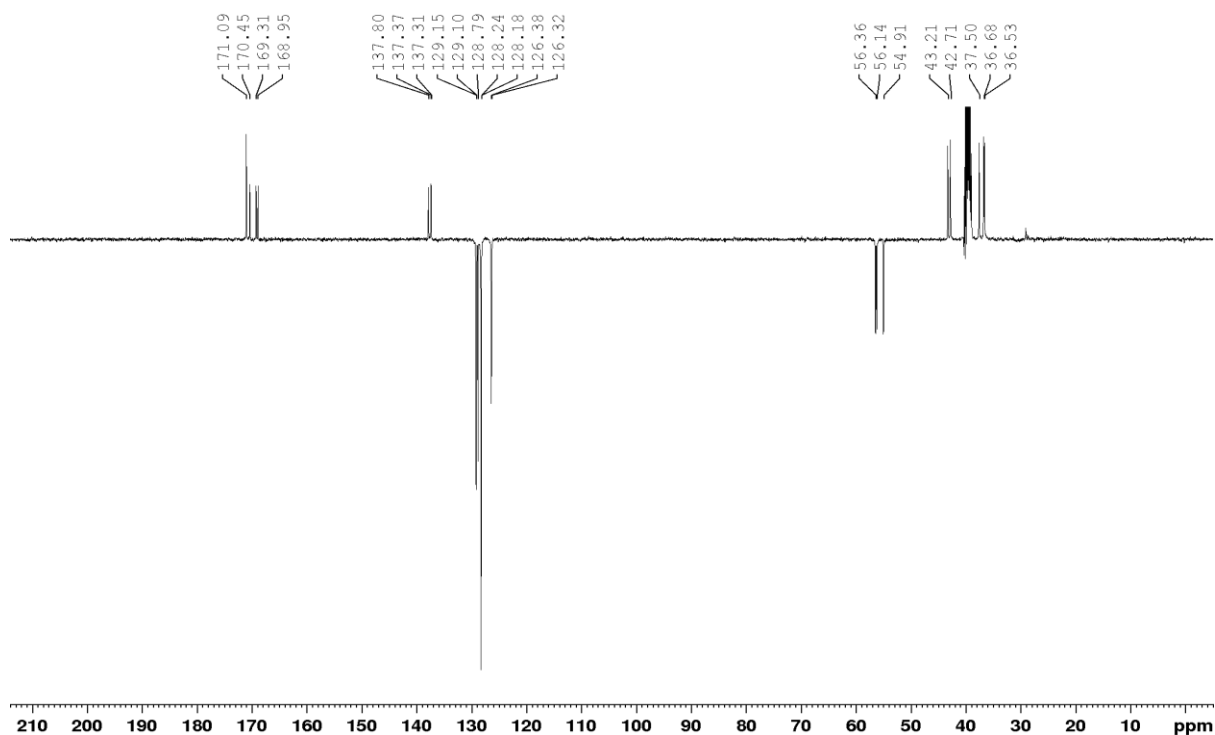
Slika D37. ^{13}C NMR spektar spoja **3** u DMSO- d_6 .



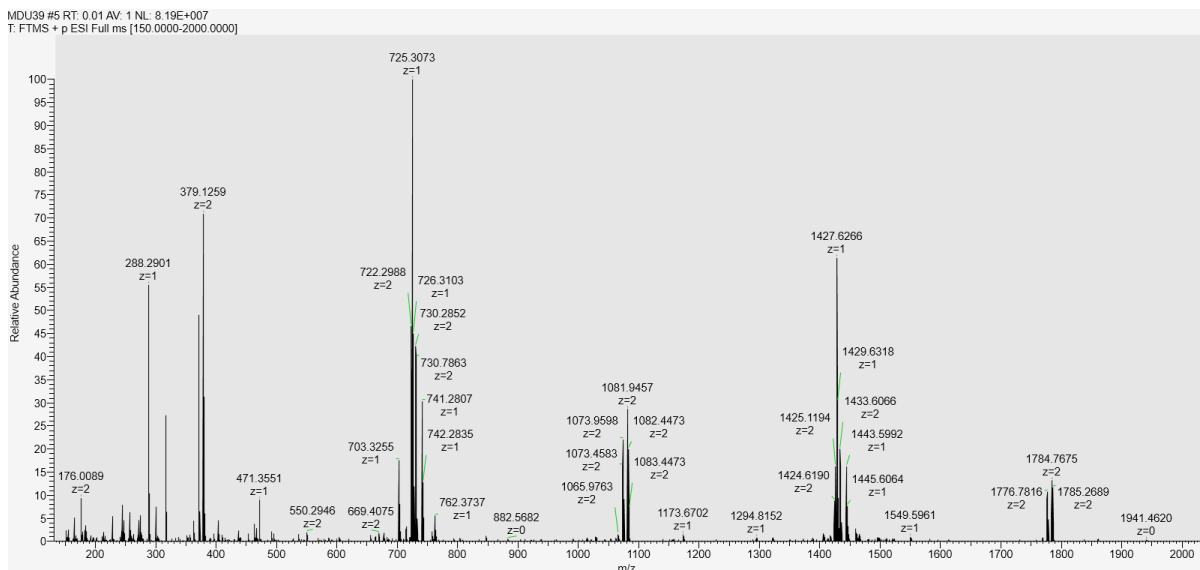
Slika D38. Spektar masa spoja **C2**.



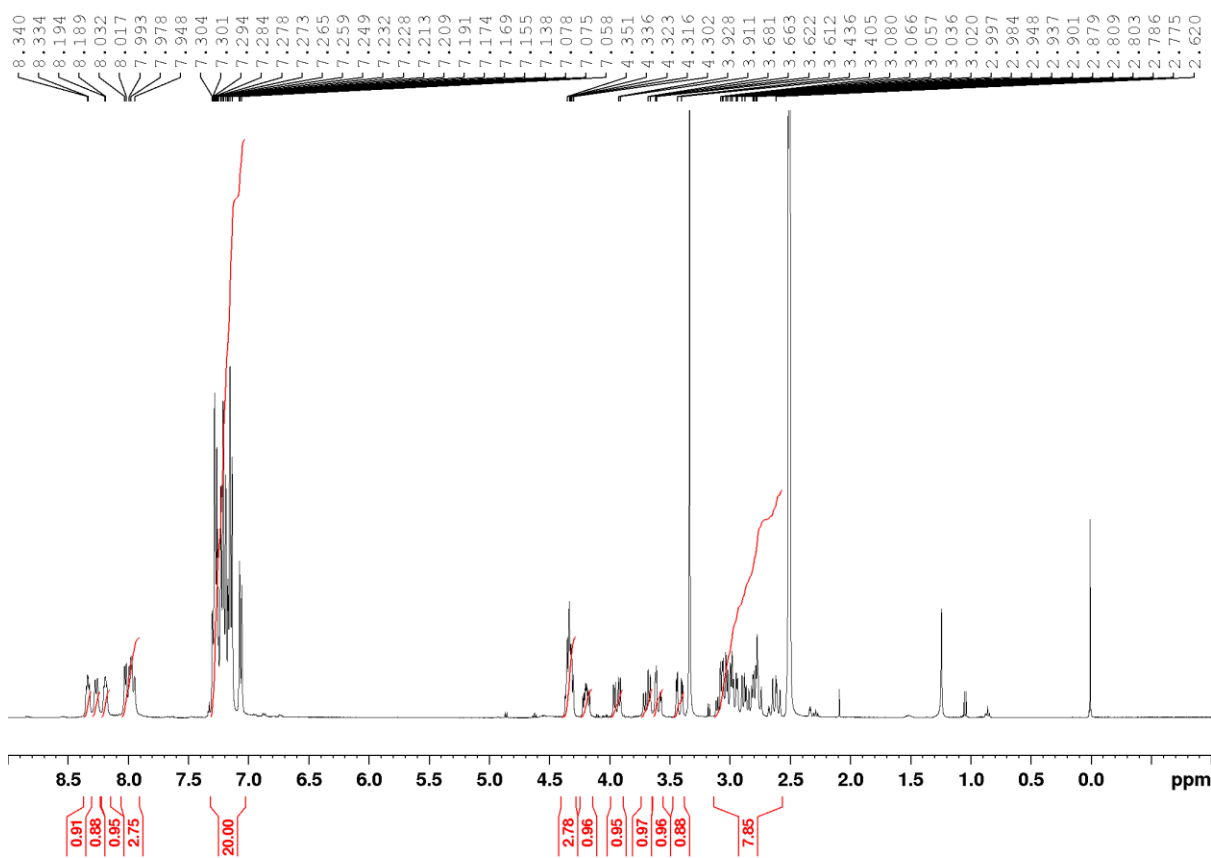
Slika D39. ^1H NMR spektar spoja C2 u DMSO-d_6 .



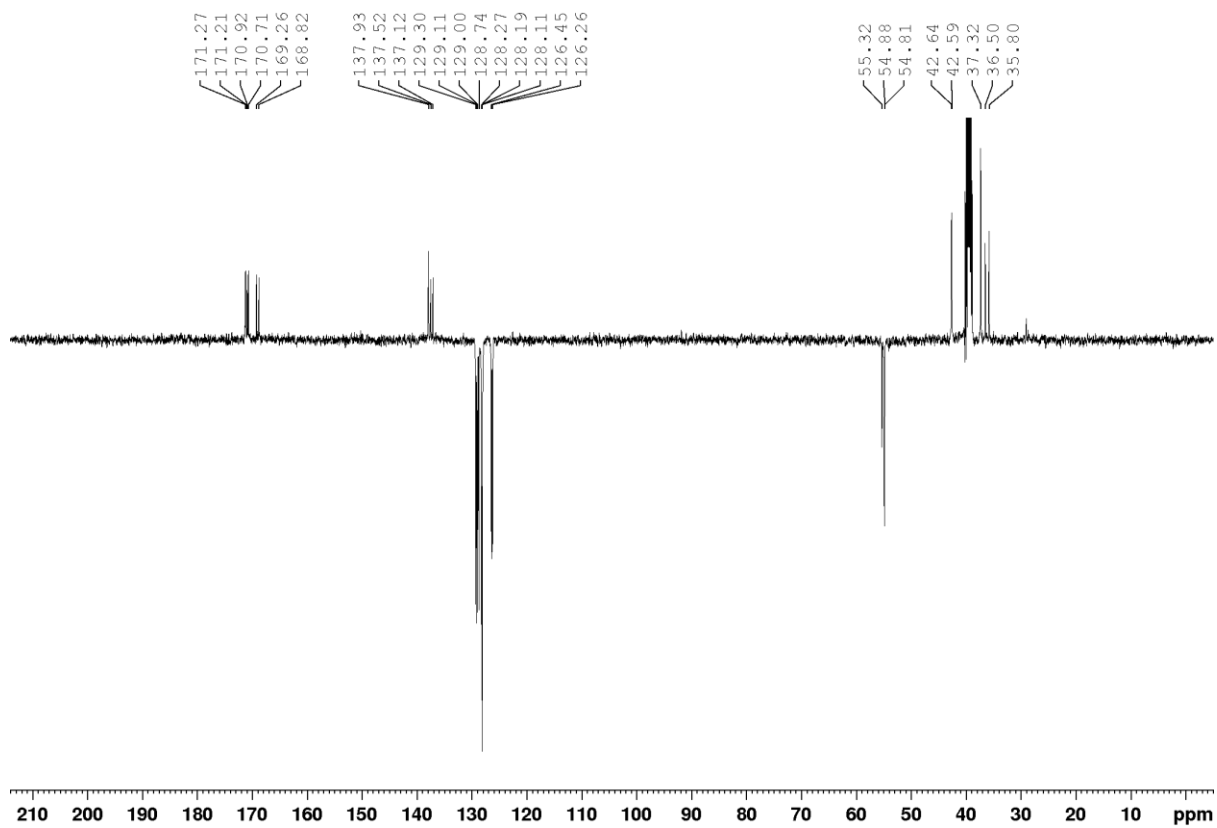
Slika D40. ^{13}C NMR spektar spoja C2 u DMSO-d_6 .



Slika D41. Spektar masa spoja C3.



Slika D42. ^1H NMR spektar spoja C3 u DMSO- d_6 .



Slika D43. ^{13}C NMR spektar spoja C3 u DMSO- d_6 .

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Mirko Duvnjak
Datum rođenja: 7. kolovoza 1999.
Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2006. – 2014. Osnovna škola Tituša Brezovačkog, Zagreb
2014. – 2018. Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb
2018. – 2021. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2021. – danas Diplomski studij kemije, istraživački smjer, grana Anorganska i organska kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2019. i 2021. Otvoreni dan Kemije

Sudjelovanja u znanstvenim i istraživačkim projektima

2021. – danas Projekt Hrvatske zaklade za znanost
Koordinacijske reakcije makrocikličkih liganada u otopini
Šifra projekta: IP-2019-04-9560 (voditelj: prof. dr. sc. Vladislav Tomišić)