

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

**Anamarija Butumović i Marija Štivojević**

**SINTEZA I KONFORMACIJSKA ANALIZA**  
**ADAMANTIL-TETRAPEPTIDNOG**  
**ANALOGA MURAMILDIPEPTIDA**

**Zagreb, 2012.**

*Ovaj rad izrađen je pod mentorstvom prof. dr. sc. Srđanke Tomić-Pisarović i neposrednim vodstvom dr. sc. Rosane Ribić i dr. sc. Ivana Kodrina na Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2011./2012.*

## Zahvala

*Zahvaljujemo se dr. sc. Rosani Ribić na vođenju kroz sintetski, a dr. sc. Ivanu Kodrinu kroz računalni dio rada te na smjernicama, strpljenju i prijedlozima oko pisanja ovog rada.*

*Hvala prof. dr. sc. Srđanki Tomić-Pisarović na kritičkom čitanju i savjetima.*

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

## Popis kratica

AdGly	adamantilglicin
AIM	engl. <i>atoms-in-molecules</i> , teorija atoma u molekulama
Ala	alanin
AMBER	engl. <i>assisted model building with energy refinement</i>
B3LYP	engl. <i>Becke, three-parameter, Lee-Yang-Parr</i> , tip hibridnog funkcionala
Boc	<i>tert</i> -butiloksikarbonil
DFT	engl. <i>density functional theory</i> , teorija funkcionala gustoće
EDC × HCl	1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid
Fmoc	fluoren-9-ilmetoksikarbonil
HOBt	1-hidroksi-benzotriazol
<i>iso</i> Gln	izoglutamin
MD	molekulska dinamika
MDP	muramildipeptid
MM	molekulska mehanika
OPLS	engl. <i>optimized potentials for liquid simulations</i>
PGM	peptidoglikan monomer
QM	kvantna mehanika
Ser	serin

## Sadržaj

<b>Zahvala</b> .....	<b>iii</b>
<b>Popis kratica</b> .....	<b>iv</b>
<b>Sadržaj</b> .....	<b>v</b>
<b>SAŽETAK</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>1 Uvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Literaturni pregled</b> .....	<b>3</b>
2.1 <i>Imunomodulatori</i> .....	3
2.1.1 Muramildipeptid .....	3
2.1.2 Peptidoglikan monomer .....	4
2.1.3 Adamantanski analozi muramildipeptida .....	5
2.2 <i>Kemijska sinteza peptida</i> .....	7
2.2.1 Zaštitne skupine.....	8
2.2.1.1 Zaštita $\alpha$ -amino skupine.....	8
2.2.1.2 Zaštita $\alpha$ -karboksilne skupine .....	8
2.2.1.3 Kondenzacija aminokiselina .....	9
2.2.1.4 Karbodiimidi .....	10
2.3 <i>Pretraživanje konformacijskog prostora peptida</i> .....	12
2.3.1 Računalna kemija .....	12
2.3.2 AIM teorija .....	12
2.3.3 Kriteriji za opis vodikove veze .....	14
2.3.4 Metode pretraživanja konformacijskog prostora .....	14
2.3.5 Konformacijska analiza peptida .....	15
2.3.6 Utjecaj vodikovih veza na strukturiranje peptida .....	17
<b>3 Eksperimentalni dio</b> .....	<b>20</b>
3.1 <i>Materijali i metode</i> .....	20
3.2 <i>Računalni dio</i> .....	26
<b>4 Rezultati i rasprava</b> .....	<b>27</b>
4.1 <i>Sinteza adamantil-tetrapeptida</i> .....	27
4.1.1 Priprava <i>tert</i> -butiloksikarbonil(adamant-1-il)glicina .....	27
4.1.2 Priprava adamantil-tripeptida .....	28
4.1.3 Priprava adamantil-tetrapeptida.....	29
4.2 <i>Konformacijska analiza</i> .....	30
4.2.1 Cilj istraživanja.....	30
4.2.2 Modelni spojevi .....	30
4.2.3 Metoda za pretraživanje konformacijskog prostora.....	31
4.2.3.1 Molekulska mehanika .....	31
4.2.3.2 Usporedba rezultata dobivenih različitim metodama.....	36
4.2.4 Karakterizacija najstabilnijih konformera i obrazaca vodikovih veza .....	37
4.2.4.1 Dipeptid <b>A</b> , L-Ala-D- <i>iso</i> Gln .....	37
4.2.4.2 Tripeptid <b>B</b> , L-AdGly-L-Ala-D- <i>iso</i> Gln .....	41
4.2.4.3 Tetrapeptid <b>C</b> , L-Ser-L-AdGly-L-Ala-D- <i>iso</i> Gln .....	45
4.2.4.4 Obrasci vodikovih veza u modelnim spojevima .....	46
<b>5 Zaključak</b> .....	<b>49</b>
<b>6 Literatura</b> .....	<b>50</b>
<b>7 Životopis</b> .....	<b>xiii</b>

## SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Kemijski odsjek

### SINTEZA I KONFORMACIJSKA ANALIZA ADAMANTIL-TETRAPEPTIDNOG ANALOGA MURAMILDIPEPTIDA

ANAMARIJA BUTUMOVIĆ i MARIJA ŠTIVOJEVIĆ

Zavod za organsku kemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb, Hrvatska

Muramildipeptid (MDP), *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin (L-Ala-D-*iso*Gln), najmanja je strukturna jedinica peptidoglikana koja pokazuje imunostimulatornu (adjuvantsku) aktivnost. U potrazi za novim, učinkovitijim imunostimulatorima izvedenim iz MDP-a veliki su potencijal pokazali adamantil-desmuramildipeptidi koji na L-Ala-D-*iso*Gln imaju vezanu lipofilnu adamantansku podjedinicu. Izomeri adamantil-tripeptida, AdGly-L-Ala-D-*iso*Gln, apirogeni su i netoksični spojevi koji pokazuju imunostimulatorno djelovanje u pokusima *in vivo*.

U ovom radu opisana je sinteza i konformacijska analiza novog adamantil-tetrapeptida, L-seril-D,L-(adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutamina. Prvo je pripremljen racemični Boc-(adamant-1-il)glicin (BocAdGly) koji je zatim kondenziran s benzilnim esterom L-Ala-D-*iso*Gln. Dobiveni adamantil-tripeptid nakon *N*-deprotekcije konjugiran je s *N*-Fmoc-*O*-benzil-L-serinom. Konačni produkt, L-Ser-D,L-AdGly-L-Ala-D-*iso*Gln tetrapeptid, dobiven je učinkovitim uklanjanjem triju zaštitnih skupina (*N*-Fmoc te benzilnog estera i etera) u samo jednom koraku. U sintezi peptida korištena je karbodiimidna metoda stvaranja peptidne veze uz 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC × HCl) kao kondenzacijski reagens i 1-hidroksi-benzotriazol (HOBt) kao pomoćni reagens.

Za promjenu biološke (adjuvantske) aktivnosti molekula mogu biti odgovorne promjene u primarnoj strukturi peptida, kao i konformacijske promjene koje utječu na njihovo strukturiranje. Slabe interakcije u peptidima imaju važnu ulogu kod nastajanja sekundarnih struktura poput  $\alpha$ -zavojnica,  $\beta$ -nabranih ploča i okreta. Konformacijskom analizom određene su energijski najpovoljnije strukture desmuramildipeptida, (adamant-1-il)tripeptida i L-Ser-L-AdGly-L-Ala-D-*iso*Gln tetrapeptida. Korištena je kombinacija sustavnog pretraživanja konformacijskog prostora molekulskom mehanikom (OPLS\_2005 i AMBER\* poljima sila), a samo najstabilnije strukture reoptimizirane su kvantnom mehanikom (B3LYP/6-31G\* računskim modelom). Metodom populacijske analize (AIM) okarakterizirane su vodikove veze u najstabilnijim konformerima te je komentiran utjecaj broja aminokiselina na obrasce vodikovih veza uočene u dipeptidu, adamantil-tripeptidu i tetrapeptidu.

Ključne riječi: muramildipeptid, (adamant-1-il)glicin, L-serin, sinteza peptida, vodikove veze, konformacijska analiza, populacijska analiza

## ABSTRACT

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Chemistry

# SYNTHESIS AND CONFORMATIONAL ANALYSIS OF ADAMANTYLTETRAPEPTIDE – MURAMYLDIPEPTIDE ANALOGUE

ANAMARIJA BUTUMOVIĆ and MARIJA ŠTIVOJEVIĆ

Division of Organic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science,  
University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia

Muramyldipeptide (MDP), *N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-*iso*glutamine, is the smallest structural unit of peptidoglycans displaying immunostimulating (adjuvant) activity. In search of new, more potent MDP-derived immunostimulators, adamantyl desmuramylpeptides with lipophilic adamantane subunit attached to the L-Ala-D-*iso*Gln have been shown a great potential. Isomers of adamantyl tripeptides, AdGly-L-Ala-D-*iso*Gln, are apyrogenic and non-toxic compounds with immunostimulating activity, proven in *in vivo* experiments.

In this work the synthesis and conformational analysis of new adamantyl tetrapeptide, L-seryl-D,L-(adamant-1-yl)glycyl-L-alanyl-D-*iso*glutamine, are described. The racemic Boc-(adamant-1-yl)glycine was prepared, in the first step followed by the condensation with benzyl ester of L-Ala-D-*iso*Gln. The obtained adamantyl tripeptide following the *N*-deprotection, was conjugated with *N*-Fmoc-*O*-benzyl-L-serine. The final product, L-Ser-D,L-AdGly-L-Ala-D-*iso*Gln, was obtained the efficient removing of three protective groups (*N*-Fmoc, benzyl ester and benzyl ether) in a single step. In the peptide synthesis carbodiimide method was used for the peptide bond formation with 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC × HCl) used as a coupling reagent and 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) as the coreagent.

Changes of biological activity of molecules, in this case immunostimulating, can be consequence of primary structure modifications as well as their conformational changes. The weak interactions in proteins affect the protein secondary structure formation, such as  $\alpha$ -helices,  $\beta$ -sheets and loops. The most stable conformers of desmuramyldipeptide, (adamant-1-yl)tripeptide and L-Ser-L-AdGly-L-Ala-D-*iso*Gln tetrapeptide were determined. Systematic conformational space search was performed using combination of molecular-mechanical (OPLS\_2005 and AMBER\* force fields), and for the most stable conformers, quantum-mechanical calculations (B3LYP/6-31G\*). Hydrogen bonds were characterized using the AIM population analysis method. The effect of the number of amino acids on the hydrogen bond patterns of the dipeptide, adamantyl tripeptide and tetrapeptide was studied.

Keywords: muramyldipeptide, (adamant-1-yl)glycine, L-serine, peptide synthesis, hydrogen bonds, conformational analysis, population analysis

## 1 Uvod

Imunostimulatori, poznati i kao adjuvanti, dodaju se cjepivima kako bi se ubrzala, produžila ili pojačala specifična imunoreakcija na određeni antigen. Muramilpeptidi su fragmenti peptidoglikana, prirodnih polimera koji izgrađuju stanične stijenke bakterija te imaju veliki imunostimulatorni potencijal. Muramildipeptid (MDP), *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin, najmanja je strukturna jedinica peptidoglikana koja pokazuje imunostimulatornu aktivnost. Sintetizirani su brojni derivati i analozi MDP-a kako bi se poboljšala njegova imunomodulacijska aktivnost i umanjile nuspojave kao što je pirogenost, artritogenost i toksičnost. SAR (engl. *structure-activity relationship*) studije pokazale su da *N*-acetil-D-glukozamin u strukturi MDP-a nije ključan za njegov imunostimulatorni učinak. Stoga je u sintezi novih adjuvanata izvedenih iz MDP-a često korišten pristup u kojem se šećerni dio modificira ili potpuno zamijeni acilnom skupinom. Literaturno je poznato nekoliko adamantil-desmuramildipeptida koji imaju vezanu lipofilnu adamantansku podjedinicu na L-Ala-D-*iso*Gln desmuramildipeptid. Izomeri adamantil-tripeptida, AdGly-L-Ala-D-*iso*Gln, airogeni su i netoksični spojevi koji pokazuju imunostimulatorno djelovanje u pokusima *in vivo*, u mišjem modelu.

Cilj ovog rada bila je sinteza i konformacijska analiza novog adamantil-tetrapeptida, L-seril-D,L-(adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutamina. Svrha uvođenja dodatne aminokiseline, L-serina, na N-kraj adjuvantski aktivnog (adamant-1-il)tripeptida je ispitivanje utjecaja L-Ser na imunostimulatornu aktivnost polaznog adamantil-tripeptida, a koje se će se provesti u nastavku istraživanja. Isto tako u daljnjem istraživanju planira se preko serina vezati monosaharide na adamantil-tripeptid. Naime, poznato je da bi takva modifikacija mogla dodatno pojačati adjuvantsko djelovanje. Stoga će Ser poslužiti kao poveznica između navedenih podjedinica.

Polazni spoj u sintezi tetrapeptida bio je benzilni ester desmuramildipeptida koji je konjugiran s Boc-(adamant-1-il)glicinom. Opisana sinteza (adamant-1-il)tripeptida razlikuje se od literaturno poznate metode. U sljedećem koraku benzilni ester adamantil-tripeptida konjugiran je s *N*-Fmoc-*O*-benzil-L-serinom, a konačni produkt dobiven je učinkovitim uklanjanjem triju zaštitinih skupina (*N*-Fmoc te benzilnog estera i etera) u samo jednom koraku. U sintezi peptida korištena je karbodiimidna metoda stvaranja peptidne veze uz 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC × HCl) kao kondenzacijski reagens i 1-hidroksibenzotriazol (HOBt) kao pomoćni reagens.



Za promjenu biološke, u ovom slučaju imunostimulatorne aktivnosti molekula, mogu biti odgovorne promjene u primarnoj strukturi peptida, kao i konformacijske promjene koje utječu na njihovo strukturiranje. U peptidima postoje slabe interakcije koje imaju važnu ulogu kod nastajanja sekundarnih struktura poput  $\alpha$ -zavojnica,  $\beta$ -nabranih ploča i okreta. Osim eksperimentalnih metoda (difrakcija rendgenskih zraka, NMR spektroskopija) kojima se može dobiti uvid u strukturu peptida, danas se vrlo često koriste računalne metode. Međutim, sustavno pretraživanje složenog konformacijskog prostora ovakvih molekula s velikim brojem stupnjeva slobode je vrlo zahtjevno. Najčešće korištene metode su molekulska dinamika, te Monte Carlo i stohastičke metode kojima se se može dobiti uvid u raspodjelu konformera. Međutim, ponekad je samo na temelju molekulske mehanike vrlo teško kvalitetno objasniti unutarmolekulske interakcije, prvenstveno vodikove veze, odgovorne za strukturiranje peptida. Stoga je u literaturi, osim usporedbe rezultata molekulske dinamike s NMR rezultatima, korišten i pristup kojim su najstabilniji konformeri dobiveni jednostavnijim metodama, reoptimizirani kvantno mehaničkim računom (DFT metodom). Na taj su način lakše objašnjena svojstva koja ovise o raspodjeli elektrona unutar molekule.

U računalnom dijelu rada napravljena je konformacijska analiza sljedećih modelnih spojeva – desmuramildipeptida, (adamant-1-il)tripeptida i L-Ser-L-AdGly-L-Ala-D-isoGln tetrapeptida koji se razlikuju po broju vezanih aminokiselina. Prvi dio uključuje traženje metode kojom bi se što iscrpnije opisao konformacijski prostor odabranih modelnih spojeva. Drugi dio uključuje generiranje skupa konformera molekulske mehanike metodama, od kojih su oni energijski najpovoljniji reoptimizirani B3LYP/6-31G\* računskim modelom. Strukturiranje peptida povezano je s obrascima vodikovih veza nastalih u najstabilnijim konformerima. AIM metoda populacijske analize korištena je za opis vodikovih veza, a temelji se na topološkoj analizi elektronske gustoće. Tako su okarakterizirane vodikove veze te je proučen utjecaj broja aminokiselina na obrasce njihovog nastajanja u dipeptidu, adamantil-tripeptidu i tetrapeptidu.

## 2 Literaturni pregled

### 2.1 Imunomodulatori

Imunomodulatori su tvari koje reguliraju imunološki odgovor. Dijele se na imunosupresive, te imunostimulatore koji su poznati i pod imenom adjuvanti (lat. *adiuvare* – pomagati). Adjuvanti se dodaju cjepivima kako bi se ubrzala, produžila ili pojačala specifična imunoreakcija na određen antigen jer utječu na produkciju citokina. Time omogućuju bolju obranu organizma protiv patogenih organizama te se zbog toga dodaju cjepivima koja nisu dovoljno imunogenična.<sup>1,2,3</sup>

Adjuvanti također mogu usmjeravati imunoreakciju prema pojedinom tipu; Th1 ili Th2. Th1 tip imunoreakcije karakterizira stanični odgovor i tom tipu imunoreakcije svojstveno je uništavanje stanica na čijoj površini se nalaze peptidi patogena prezentirani preko MHC molekula (engl. *major histocompatibility complex*) tipa I, a djelovanjem T stanica. Kod Th2 odgovora aktiviraju se B stanice koje luče antitijela karakteristična za humoralnu imunost.<sup>4,5</sup>

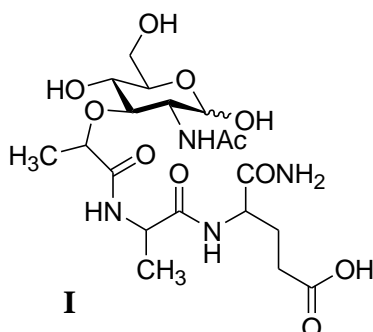
Postoji mnogo različitih tvari koje pokazuju adjuvantsku aktivnost. Mogu se klasificirati na temelju nekoliko kriterija. Tako ih razvrstavamo na čestične i nečestične, te anorganske i organske adjuvantske tvari. U ovom radu opisani su peptidni adjuvanti, derivati muramildipeptida (MDP).<sup>2</sup>

#### 2.1.1 Muramildipeptid

Muramilpeptidi su fragmenti peptidoglikana koji izgrađuju stanične stijenke Gram negativnih i Gram pozitivnih bakterija. Peptidoglikani su građeni od alternirajućih molekula *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i *N*-acetilmuraminske kiseline (MurNAc) međusobno povezanih  $\beta$ -glikozidnom vezom, a umreženih preko kratkih peptida vezanih na MurNAc.<sup>1</sup> Muramildipeptid (MDP), *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin I, prikazan na Slici 1, najmanja je strukturna jedinica peptidoglikana koja pokazuje adjuvantsku aktivnost.

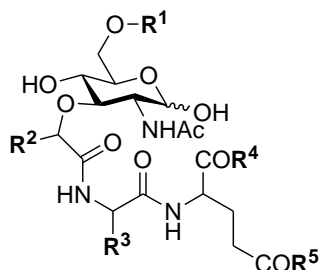
Mehanizam imunostimulacijskog djelovanja MDP-a i njegovih derivata nije razjašnjen, međutim poznato je da su relativno male promjene u primarnoj peptidoglikanskoj strukturi važne za proces prepoznavanja koji zatim vodi do imunoreakcije. Izmjene u primarnoj strukturi uzrokuju i promjene u konformaciji koje

također mogu biti odgovorne za promjenu veznih sposobnosti, odnosno biološke aktivnosti molekule.<sup>1</sup>



Slika 1 Muramildipeptid (MDP).

Kako bi se poboljšala imunomodulacijska aktivnost MDP-a **I** i umanjile njegove nuspojave kao što je pirogenost, artritogenost i toksičnost, sintetizirani su brojni derivati i analozi MDP-a. Posebno se ističu romurtid (MDP-Lys(L18)) **II**, *N*<sup>ε</sup>-steraoil-MurNAc-L-Ala-D-isoGln-L-Lys,<sup>6,7</sup> imunostimulator kojeg je odobrila američka Uprava za hranu i lijekove (FDA, engl. *Food and Drug Administration*), te muramiltripeptid fosfatidiletanolamin (MTP-PE) **III** koji kad je ugrađen u liposome, poznat pod imenom mifamurtid (L-MTP-PE)<sup>8,9</sup> te ga je odobrila Europska agencija za lijekove (EMA, engl. *European Medicines Agency*) za liječenje nemetastaziranog osteosarkoma (Slika 2).



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>
MDP-Lys(L18) <b>II</b>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	NHCH(COOH)CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> CH <sub>3</sub>
MTP-PE <b>III</b>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	NHCHCONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OPO <sub>2</sub> (OH)CH <sub>2</sub> CHO <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> CH <sub>3</sub>

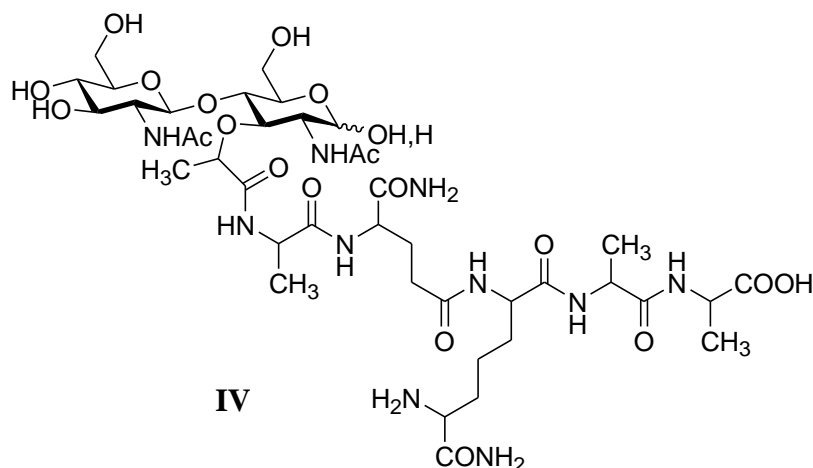
Slika 2 Odobreni muramildipeptidni adjuvanti.

### 2.1.2 Peptidoglikan monomer

Peptidoglikan monomer **IV** (PGM) je disaharid-pentapeptid (Slika 3) sljedećeg sastava: β-D-GlcNAc-(1→4)-D-MurNAc-L-Ala-D-isoGln-*meso*DAP(εNH<sub>2</sub>)-D-Ala-D-Ala i predstavlja osnovnu ponavljajuću jedinicu stanične stjenke bakterije *Brevibacterium*

*divaricatum*. Može se izolirati lizozimskom hidrolizom neumreženih peptidoglikanskih lanaca iz bakterija tretiranih penicilinom.<sup>10</sup>

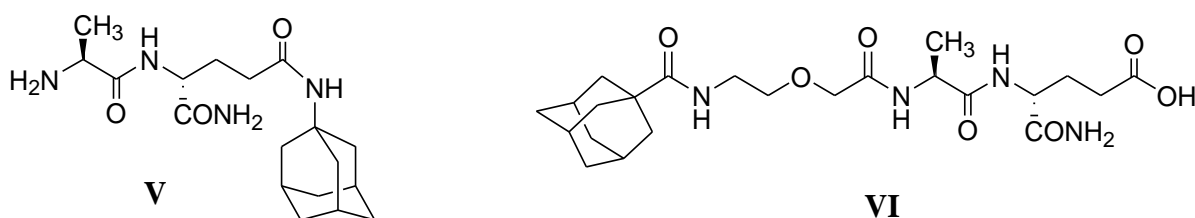
Struktura PGM-a potvrđena je kemijskim i spektroskopskim metodama. Hidroksilna skupina na C1 atomu *N*-acetilmuraminskog prstena može biti u  $\alpha$  ili  $\beta$  položaju te u anhidro obliku.  $\alpha$ -Anomer (63 %),  $\beta$ -anomer (32 %) te anhidro oblik (5 %) PGM-a mogu se razdvojiti HPLC-om na koloni reverzne faze i detektirati kao zasebni pikovi.<sup>11</sup> Testovima *in vivo* i *in vitro* pokazano je da PGM pokazuje antitumorsku i antimetastatsku aktivnost,<sup>12,13,14</sup> te adjuvantsku aktivnost.<sup>15,16,17,18,19</sup>



Slika 3 Peptidoglikan monomer (PGM).

### 2.1.3 Adamantanski analozi muramildipeptida

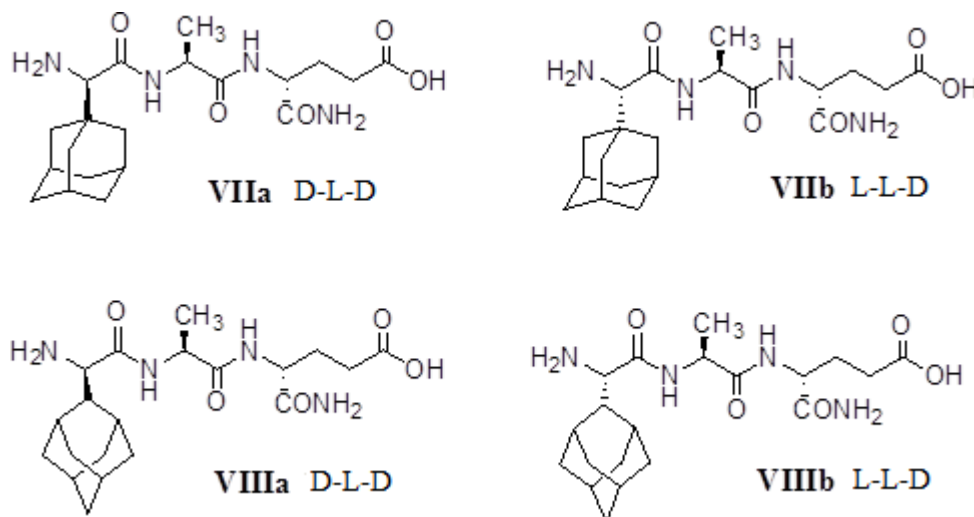
Studije odnosa strukture i aktivnosti (SAR, engl. *structure-activity relationship*) pokazale su da *N*-acetil-D-glukozamin u strukturi MDP-a nije ključan za njegov imunostimulatorni učinak.<sup>20</sup> Stoga je u sintezi novih adjuvanata izvedenih iz MDP-a često korišten pristup u kojem se šećerni dio modificira ili potpuno zamijeni acilnom skupinom.<sup>21,22</sup>



Slika 4 Adjuvantski aktivni adamantil-desmuramildipeptidi.

Literaturno je poznato nekoliko adjuvantski aktivnih adamantil-desmuramildipeptida, odnosno adamantanskih analoga muramildipeptida koji na L-Ala-D-*iso*Gln iz muramildipeptida imaju vezanu lipofilnu adamantansku podjedinicu. Na Slici 4 prikazani su adamantilamid-dipeptid<sup>23</sup> **V** i (adamant-1-il)karboksiamido-dipeptid **VI**.

Vežanjem adamantana u obliku racemičnog adamantilglicina na amino kraj dipeptida iz MDP (umjesto *N*-acetilglukozamina) dobiveni su apirogeni i netoksični dijastereomeri adamantil-tripeptida (Slika 5).<sup>24</sup>



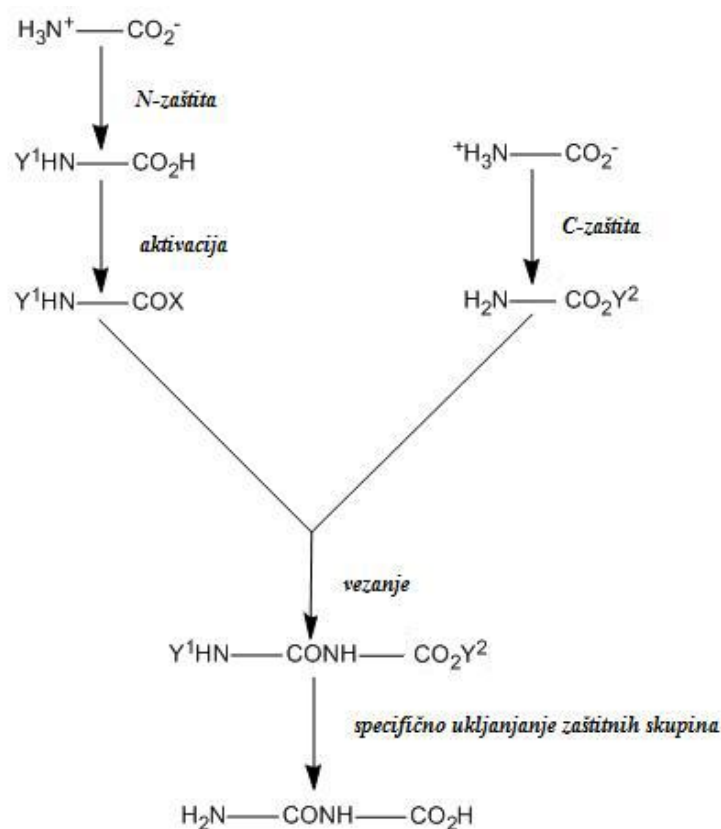
Slika 5 Dijastereoizomeri (adamant-1-il)tripeptida **VII** i (adamant-2-il)tripeptida **VIII**.

Adamantil-tripeptidi, D,L-adamantglicil-L-alanil-D-izoglutamini **VII** i **VIII**, priređeni su kondenzacijom racemičnog (adamant-1-il)glicina, odnosno (adamant-2-il)glicina s L-Ala-D-*iso*Gln dipeptidom. U oba slučaja, čisti dijastereomeri **VIIa** i **VIIb**, odnosno **VIIIa** i **VIIIb**, uspješno su odvojeni iz dobivene smjese izomera. Apsolutna konfiguracija dijastereomera potvrđena je enzimskom oksidacijom njihovih hidrolizata, djelovanjem L-aminokiselinskom oksidazom.<sup>25,26,27</sup> Adamantil-tripeptidima ispitana je imunomodulacijska aktivnost na imunološki odgovor na ovalbumin kao antigen u miševima, a u usporedbi s PGM-om.<sup>27</sup> Uočena je razlika u djelovanju s obzirom na D-L-D i L-L-D slijed, ali svi izomeri adamantil-tripeptida slabiji su adjuvanti od peptidoglikan monomera **IV**. Međutim, dokazano je da je vežanjem manoze na adamantil-tripeptide moguće pojačati adjuvantsko djelovanje polaznih tripeptida. Manozilirani derivat tripeptida **VIIa** pokazao je tako u mišjem modelu podjednaku adjuvantsku aktivnost kao i PGM **IV**.<sup>28</sup>

## 2.2 Kemijska sinteza peptida

Kemičari se sintezom peptida i proteina bave nešto više od jednog stoljeća. Uz kemijske sinteze upotrebljavaju se metode molekularne biologije i genetičkog inženjerstva. Dvije su osnovne metode kemijske sinteze peptida: sinteza peptida u otopini te na čvrstom nosaču koju je 1963. godine uveo Merrifield. Za pripremu velikih peptida praktičnija je sinteza na čvrstom nosaču, obzirom da je u tom slučaju sinteza u otopini spora i laboratorijski zahtjevnija, te može biti popraćena problemom racemizacije i slabom topljivošću međuprodukata.

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, amino-skupinu jedne i karboksilnu skupinu druge aminokiseline potrebno je zaštititi prije njihove kondenzacije. Shema 1 prikazuje korake u kemijskoj sintezi peptida.



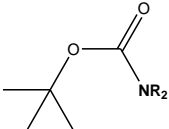
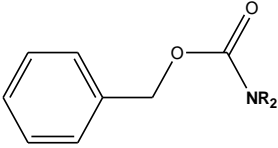
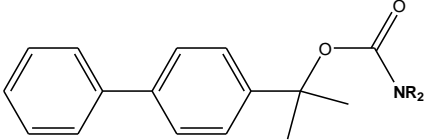
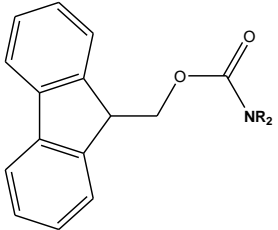
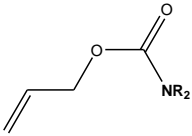
Shema 1 Koraci u kemijskoj sintezi peptida.

## 2.2.1 Zaštitne skupine

### 2.2.1.1 Zaštita $\alpha$ -amino skupine

Zaštitom  $\alpha$ -amino-skupine aminokiseline želi se izbjeći racemizacija te postići smanjenje nukleofilnosti dušikovog atoma i to najčešće prevođenjem u karbamate. Osim karbamatne zaštite, provode se i zaštite prevođenjem u imide, amide, *N*-alkilne derivate, *N*-silylne derivate, iminske, enaminske derivate te još neke rjeđe korištene metode.<sup>29,30</sup>

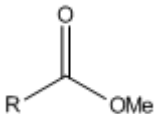
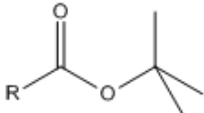
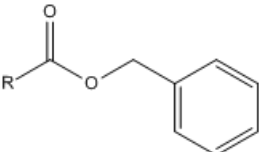
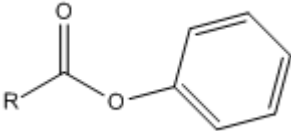
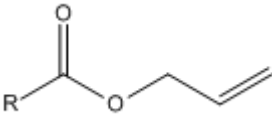
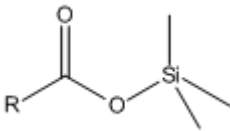
Tablica 1 Najčešće karbamatne zaštitne skupine.<sup>29,30</sup>

Ime zaštitne skupine (kratica)	Struktura	Uklanjanje zaštite
<i>tert</i> -butiloksikarbonil ( <i>t</i> -Boc)		blago kiseli uvjeti (pr. 25%-tna TFA/DCM)
Benziloksikarbonil (Z, Cbz)		katalitička hidrogenoliza (10 % Pd/C); kiseli uvjeti (pr. HBr/CH <sub>3</sub> COOH)
1-(Bifenil-4-il)-izopropiloksikarbonil (Bpoc)		blago kiseli uvjeti (pr. 25%-tna TFA/DCM)
Fluoren-9-ilmetoksikarbonil (Fmoc)		blago lužnati uvjeti (pr. piperidin ili morfolin)
Aliloksikarbonil (Alloc)		paladijevi katalizatori (pr. Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> )

### 2.2.1.2 Zaštita $\alpha$ -karboksilne skupine

Zaštita karboksilne skupine najčešće se provodi pripremom stabilnih estera koji ne hidroliziraju u uvjetima stvaranja peptidne veze. Takvi su primjerice metilni esteri i njihovi derivati, alkoksialkilni esteri, esteri koji se cijepaju  $\beta$ -eliminacijom te silylni esteri. Najčešće korišteni su fenilni, benzilni i *tert*-butilni esteri. Karboksilna skupina se zaštićuje se iz nekoliko razloga. Najčešće se želi spriječiti nukleofilna adicija na karbonilnoj skupini ili zaštititi kiseli proton kako ne bi sudjelovao u bazno-kataliziranoj reakciji.

Tablica 2 Najčešće esterske zaštitne skupine.<sup>30</sup>

Ime zaštitne skupine (kratica)	Struktura	Uklanjanje zaštite
Metilni ester (Me)		hidroksidi alkalijskih metala u smjesama voda/alkohol (pr. LiOH, <i>t</i> -BuOH)
<i>tert</i> -butilni ester ( <i>t</i> -Bu)		blago-kiselni uvjeti (pr. HOAc, <i>i</i> PrOH, H <sub>2</sub> O (4:4:1))
Benzilni ester (Bn)		katalitička hidrogenoliza (H <sub>2</sub> /Pd-C); kiselni uvjeti (pr. CF <sub>3</sub> COOH/HOAc)
Fenilni ester		lužnati uvjeti (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , pH = 10,5)
Alilni ester		paladijevi katalizatori (pr. Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> )
Sililni ester		blago-kiselni ili bazični uvjeti (pr. AcOH, THF, H <sub>2</sub> O (8:8:1))

### 2.2.1.3 Kondenzacija aminokiselina

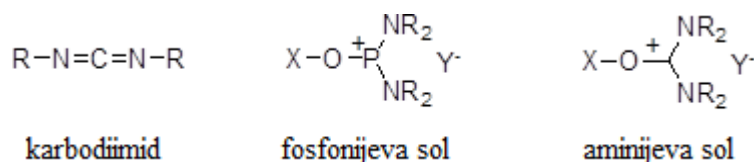
Tvorba peptidne veze između dviju molekula aminokiselina uključuje dva koraka: aktivaciju karboksilne skupine i zatim nukleofilni napad amino-skupine druge aminokiseline na aktiviranu karboksilnu skupinu. Aktivacija karboksilne skupine ključni je korak u sintezi peptida. Svrha aktivacije je povećanje elektrofilnosti ugljika karboksilne skupine i prevođenje hidroksilne skupine u bolju izlaznu skupinu. Nužno je da taj korak bude dovoljno brz i da se prilikom aktivacije očuva optička čistoća polaznog spoja, odnosno da ne dođe do racemizacije.

Generalno postoje dvije metode kondenzacije; a) metoda kod koje se karboksilna skupina aktivira *in situ* i b) metoda koja uključuje pripremu i izolaciju aktiviranih spojeva



(aktivnih estera) u prethodnom koraku, primjerice *N*-hidroksisukcinimidnog, pentaklorfenolnog ili pentafluorfenolnog estera.<sup>31,32</sup>

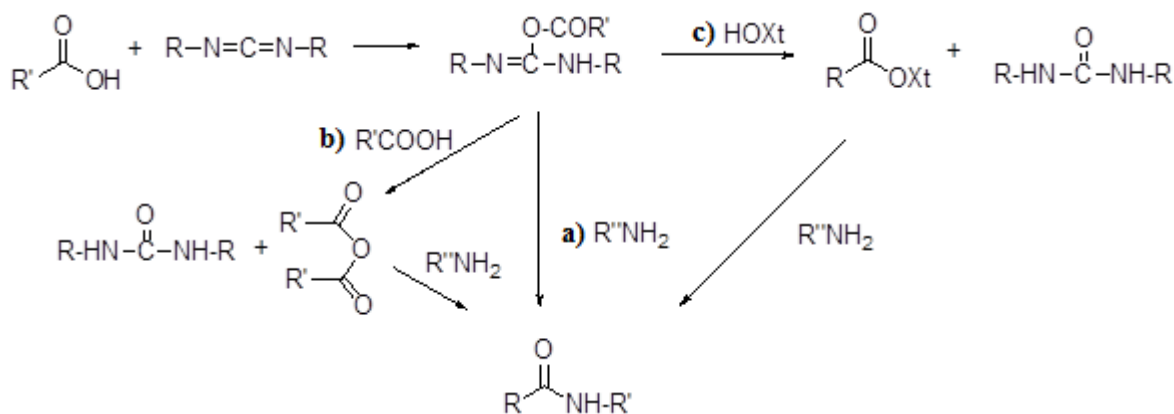
Najčešće korišteni reagensi u kondenzacijskim reakcijama su karbodiimidne ili fosfonijeve, odnosno aminijeve soli (Slika 6).<sup>33</sup>



Slika 6 Reagensi za kondenzaciju aminokiselina.

#### 2.2.1.4 Karbodiimidi

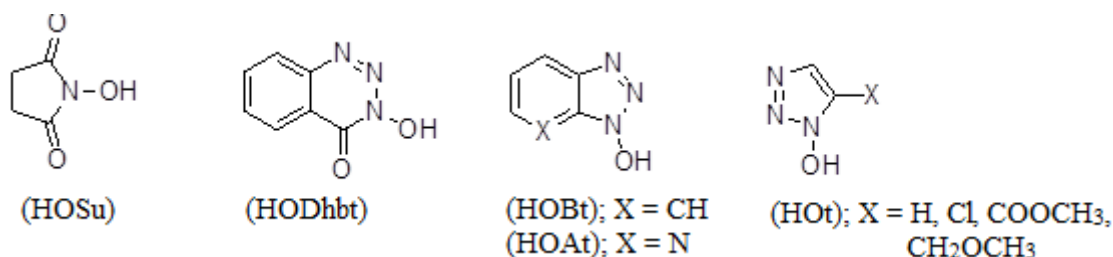
Reakcijom karboksilne kiseline i karbodiimida nastaje labilni derivat *O*-aciluree koji zatim reagira s amino komponentom i daje amid (Shema 2a). Ako se koriste dva ekvivalenta kiseline, *O*-acilni derivat uree reagira s karboksilnom kiselinom i daje odgovarajući simetrični anhidrid (Shema 2b). Ukoliko je u otopini prisutan hidroksilamin (Slika 7) nastaje aktivirani ester (Shema 2c). Sve tri navedene aktivne vrste su izvrsni acilirajući agensi.



Shema 2 Tvorba amidne veze korištenjem karbodiimida.<sup>33</sup>

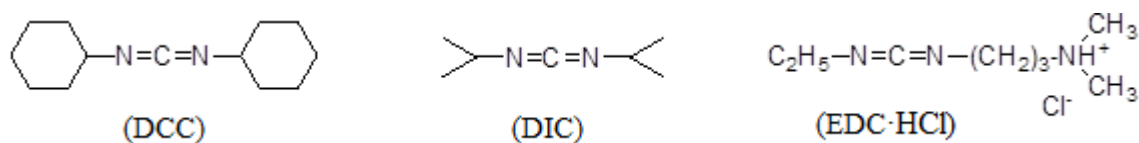
Na Slici 7 prikazani su najčešće korišteni pomoćni reagensi u kondenzacijskim reakcijama koji se koriste kako bi se izbjegla racemizacija *N*-zaštićene aminokiseline. Riječ je o hidroksilaminskim derivatima (HOXt): *N*-hidroksisukcinimidu (HOSu), 1-okso-2-hidroksilhidrobenzotriazin (HODhbt), 1-hidroksibenzotriazolu (HOBt), 7-aza-1-hidroksibenzotriazolu (HOAt) te o derivatima 1-hidroksi-1,2,3-triazola (HOT). Može se uočiti da sve strukture u svojim prstenovima imaju jedan ili više dušikovih atoma. Razlog

tome je povećanje elektron-akceptorskog karaktera čime se smanjuje elektronska gustoća na ugljikovom atomu karboksilne skupine i olakšava nukleofilni napad amino-skupine.



Slika 7 Najčešće korišteni hidroksilaminski pomoćni reagensi.<sup>33</sup>

Najčešće korišteni karbodiimidni reagensi (Slika 8) su *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC), *N,N'*-diizopropilkarbodiimid (DIC) i 1-etil-3-(3'-dimetilamino-propil)karbodiimid hidroklorid (EDC × HCl). EDC × HCl posebno se koristi kod sinteze peptida u otopini zbog toga što je derivat uree koji nastaje kao koprodukt reakcije topljiv u vodi pa se lako uklanja iz reakcijske smjese.



Slika 8 Najčešće korišteni karbodiimidni reagensi.<sup>33</sup>

## 2.3 Pretraživanje konformacijskog prostora peptida

### 2.3.1 Računalna kemija

Računalna kemija danas ima sve veću primjenu u tumačenju kemijskih problema. Računalna istraživanja se mogu koristiti u razumijevanju eksperimentalnih podataka, u učinkovitoj sintezi spojeva i predviđanju svojstava dosad 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 (dizajn lijekova, katalizatori), itd. Danas se dimenzija problema koji se mogu teorijski proučavati pomiče prema sve većim i složenijim sustavima.

Metode modeliranja molekulskih sustava mogu se podijeliti na klasične metode, gdje je energija dana analitički (molekulska mehanika), i kvantno-mehaničke metode, kod kojih se energija dobiva rješavanjem Schrödingerove jednačbe. Molekulska mehanika je matematička procedura za računanje energije molekulskih sustava pri čemu jednačbe i parametre koji definiraju energijsku plohu molekule kolektivno nazivamo poljem sila. *Ab initio*, kvantno-mehaničke metode za rješavanje Schrödingerove jednačbe ne uključuju nikakve empirijske parametre, već se temelje na temeljnim teorijskim principima kvantne mehanike. Drugi pristup u rješavanju Schrödingerove jednačbe, teorija funkcionala gustoće (DFT, engl. Density Functional Theory) metode, ne temelji se na valnoj funkciji, nego na elektronskoj gustoći.<sup>34,35,36</sup>

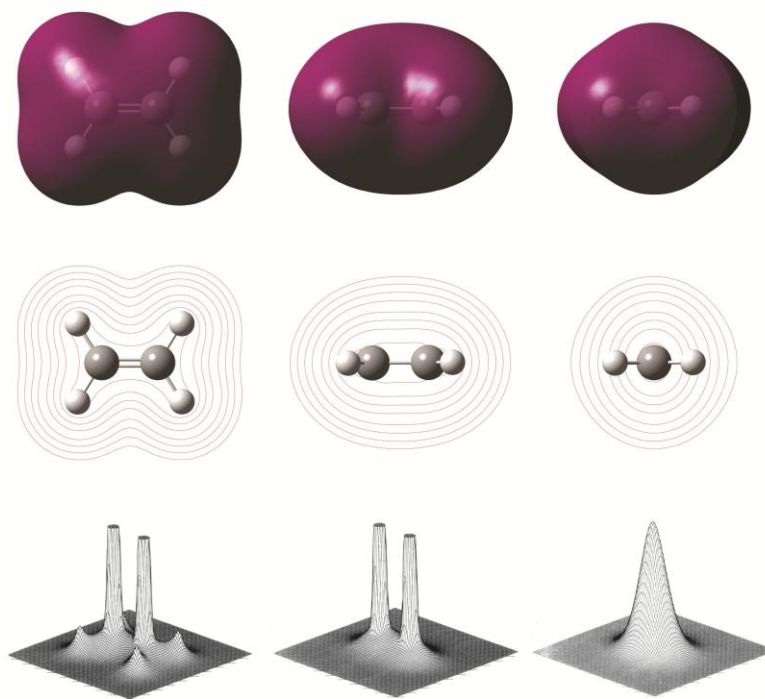
### 2.3.2 AIM teorija

AIM teorija (engl. Atoms In Molecules) teorija daje odgovore na neka osnovna pitanja o shvaćanju atoma i njegovim svojstvima u molekulama, te odgovore na pitanja o teoriji veze. Ova teorija je dobra za interpretaciju elektronske gustoće dobivene teorijskim računom (kvantno-mehaničkim metodama) ili eksperimentalno (difrakcijom rendgenskih zraka), dakle sve zaključke izvodi iz analize elektronske gustoće. Elektronska gustoća se izravno analizira gradijentom (vektorskog polja) koji se za neku skalarnu funkciju  $f(x)$  po vektorskoj varijabli  $x = (x_1, x_2, \dots, x_n)$  označava kao  $\nabla f$  gdje  $\nabla$  predstavlja diferencijalni operator, a izražava se kao:

$$\nabla f = \left( \frac{\partial f}{\partial x_1}, \frac{\partial f}{\partial x_2}, \dots, \frac{\partial f}{\partial x_n} \right)$$

Staza gradijenta se zove trajektorija i predstavlja krivulju na koju je vektor gradijenta tangencijalan u svakoj točki. Trajektorije su okomite na linije konstantne

elektronske gustoće. Kritične točke elektronske gustoće su točke u kojima svaka trajektorija započinje ili završava. Za njih je karakteristično da u njima gradijent nestaje, tj. jednak je nuli.



**Slika 9** Prikaz elektronske gustoće etena pomoću 3D ljuske (gore), konturnim dijagramom za odabranu geometrijsku ravninu (sredina) i reljefnim prikazom (dolje).<sup>34</sup>

Osim trajektorija koje završavaju u jezgrama, takozvanim *nuklearnim atraktorima*, postoje i trajektorije koje se sijeku u nekoj točki koja nije nuklearni atraktor, nego se nalazi u prostoru između njih. U toj je točki gradijent također jednak nuli. Tako se može definirati međuatomska ploha koja predstavlja granicu između atoma, a sastoji se od trajektorija koje počinju u beskonačnosti, a završavaju u kritičnoj točki između jezgara. Takva točka se zove *kritična točka veze* te u toj točki elektronska gustoća postiže maksimum u dvodimenzionalnom prostoru, odnosno minimum u smjeru okomitom na tangencijalnu ravninu.

Kritične točke se klasificiraju prema drugoj derivaciji funkcije u promatranoj točki. U trodimenzionalnom prostoru promatra se matrica drugih derivacija, odnosno Hessian. Njenom dijagonalizacijom dobiju se tri vlastite vrijednosti koje opisuju svaku kritičnu točku i na temelju kojih se mogu okarakterizirati kemijski najzanimljivija područja u

molekuli – atom i kemijska veza. Osim elektronske gustoće, definira se i Laplacian elektronske gustoće

$$\nabla^2 \rho = \left( \frac{\partial^2 \rho}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \rho}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \rho}{\partial z^2} \right)$$

Govori gdje je polje lokalno koncentrirano. Ukoliko je Laplacian manji od nule, funkcija je lokalno koncentrirana, ako je vrijednost Laplaciana veća od nule, funkcija nije lokalno koncentrirana.<sup>34,37,38</sup>

### 2.3.3 Kriteriji za opis vodikove veze

Raspodjela elektrona može se iskoristiti kao koristan izvor informacija za karakterizaciju vodikovih veza. Koch i Popelier predložili su nekoliko kriterija koji se mogu odrediti AIM metodom za opis vodikovih veza, uz one danas općenito prihvaćene.<sup>39</sup> Kriteriji su navedeni u Tablici 3. Prvi kriterij je postojanje kritične točke veze jer je to topološki dokaz vodikove veze. Daljnji kriterij govori da vrijednost elektronske gustoće u kritičnoj točki mora biti u rasponu [0,002; 0,04] a.u., zatim vrijednost funkcije L (koja predstavlja negativnu vrijednost Laplaciana), za vodikovu vezu mora biti negativna i u rasponu [-0,15; -0,02] a.u. Navedena tri kriterija najčešće se koriste za opis vodikovih veza.

**Tablica 3.** Kriteriji za određivanje i karakteriziranje vodikove veze.<sup>34</sup>

<b>KRITERIJI</b>
1. Dosljedna topologija za svaku vodikovu vezu (kritična točka veze, staza veze, međuatomska ploha).
2. Vrijednost $\rho$ u kritičnoj točki veze u rasponu od 0,002 do 0,04 a.u.
3. Vrijednost $L(r)$ 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. Energijско destabiliziranje atoma vodika.
7. Smanjenje dipolarne polarizacije atoma vodika.
8. Smanjenje volumena atoma vodika.

### 2.3.4 Metode pretraživanja konformacijskog prostora

Pretraživanje konformacijskog prostora zasniva se na pronalaženju globalnog i lokalnih minimuma na plohi konformacijske potencijalne energije. Pronalaženje „smislenog“ minimuma za biomakromolekulske sustave ovisi o odabiru „dobre“ polazne geometrije. Male molekule je moguće sustavno pretraživati rotacijom oko veza u molekuli za definirane diskretne inkremente. Međutim, problem nastane kod velikih sustava za koje

bi takvo pretraživanje zahtijevalo puno vremena. Problem je moguće prevladati ograničavanjem sistematskog pretraživanja (npr. definiranjem manjih fragmenata). Iz tog razloga, za veće sustave postoje metode koje se mogu koristiti za perturbaciju geometrije iz jednog lokalnog minimuma do drugog. Neke metode koje se učestalo primjenjuju u svrhu pretraživanja konformacijskog prostora su stohastičke i Monte Carlo metode, te molekulska dinamika. Monte Carlo metode započinju od unaprijed zadane geometrije koja je obično lokalni minimum te se nove konfiguracije generiraju slučajno tako da se sustavu pridaju slučajne izmjene u geometriji, tj. korištenjem statističkog faktora generira se nova geometrija koja se ili prihvaća ili odbacuje na temelju određenih kriterija. Kod malih i fleksibilnih molekula, torzijski kutovi čine dobar skup koordinata za slučajnu perturbaciju geometrije. Kod cikličkih i „ograničenih“ struktura, perturbacija izabranog torzijskog kuta dovodi do struktura visoke energije, tomu je razlog nova napetija struktura ili to što dolazi do sudaranja atoma. Ove se metode primarno koriste kod pretraživanja konformacijskog prostora fleksibilnih sustava, ali ne za „ograničene“ molekule kao što su proteini i DNA. Prednost im je u tome što generiraju konformacije razdvojene velikim energetske barijerama.

Molekulska dinamika koristi Newtonove zakone gibanja, kvantnu mehaniku ili miješani model za opisivanje vremenski ovisnog ponašanja sustava. Kod ove metode se generiraju trajektorije koje određuju položaje atoma u vremenu. Energija molekule je podijeljena između potencijalne i kinetičke energije time su molekule sposobne prijeći barijeru koja razdvaja minimume ukoliko je visina barijere manja od ukupne energije umanjene za potencijalnu energiju. Ove metode često se koriste za pretraživanje konformacijskog prostora kada je početna geometrija izvedena iz eksperimentalne informacije, kao što su NMR strukture. Glavni nedostatak MD je nemogućnost svladavanja barijera većih od internih energija te dobivanje velikog broja istih struktura. Kako je to jedna od prednosti Monte Carlo metoda, razvile su se kombinacije MC/MD metoda.<sup>35,36</sup>

### 2.3.5 Konformacijska analiza peptida

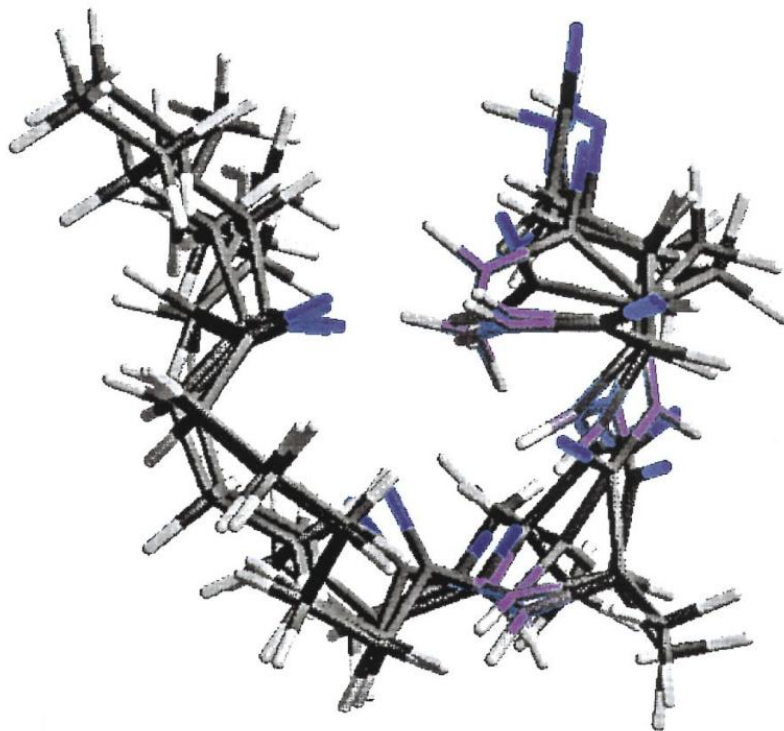
Konformacijska analiza peptida ima svoju primjenu u proučavanju strukturnih sličnosti (različitosti) pojedinih konformera, objašnjavanju topljivosti, lipofilnosti molekula, određivanju i klasifikaciji vodikovih veza te okreta prisutnih u peptidima, i često se koriste za potvrđivanje eksperimentalnih podataka dobivenih spektroskopskim metodama (npr. NMR).

Konformacijski stereoizomeri acikličkih molekula primarno se razlikuju u torzijskim kutovima. Uzimajući u obzir najmanje ograničene interne stupnjeve slobode (npr. torzije), problem pretraživanja se s formalno  $3N - 6$  dimenzija može tretirati kao prostor s najviše  $N$  dimenzija.<sup>40</sup> Korištenjem torzijskih internih koordinata olakšava se selektivno ispitivanje područja manje energije konformacijskog prostora gdje se mogu pronaći stabilni koformeri. S obzirom da se broj minimuma povećava s brojem veza oko kojih je moguća rotacija, potrebno je ograničiti domenu pretraživanja. Slučajne metode pretraživanja dobra su alternativa kod rješavanja ovog problema (npr. Monte Carlo algoritmi).<sup>41</sup>

Konformacijska analiza serije *N*-(oksoacil)-*L*-alinil-*D*-isoglutamina s  $n = 0-6$  metilenskih skupina između terminalne metilne i 7-okso skupine dala je uvid u njihova interesantna fizičko-kemijska svojstva. Navedeni spojevi imaju svoju praktičnu važnost kao analozi *N*-acetilmuramildipeptida (MDP), a time i potencijalno zanimljiva biološka svojstva. Monte Carlo pristup je korišten za pretraživanje konformacijskog prostora molekula u ovoj seriji. Utvrđen je anomalan porast topljivosti u vodi i pad lipofilnosti kada se broj metilenskih skupina povećava do 6, što se može pripisati konformacijskoj promjeni koja prevladava u skupini konformera prema Boltzmannovoj raspodjeli. Konformeri članova serije s  $n = 3, 4$  i  $5$  se razlikuju od konformacije koja prevladava u slučaju  $n = 6$ . Umjesto krutog i globularnog oblika prisutnog kod analoga s  $n = 3$  do  $n = 5$ , promjena je uočljiva u slučaju  $n = 6$  (Slika 10) u kojem prošireni ugljikovodični lanac postaje dostupan za intermolekulske interakcije sa okolnim otapalom.<sup>41</sup>

Osim proučavanja konformacijskog prostora isključivo temeljnog 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 (DFT metodama). Analiza je provedena na skupu tripeptida koji u svojoj strukturi imaju ugrađenu 2,6-diaminopimeličnu kiselinu te su također zanimljivi zbog svoje biološke aktivnosti. Računalno provedena konformacijska analiza pokazala je dobro slaganje s eksperimentalno dobivenim podacima (difrakcija rendgenskih zraka, <sup>1</sup>H-NMR i IR) koji su dosljedni u zaključcima o formiranju intermolekulske vodikove veze. Time se računalno modeliranje (kombinacija MM i DFT metoda) pokazalo kao dobra metoda u shvaćanju strukture ovakvih spojeva i objašnjavanju njihovih intermolekulskih interakcija.<sup>42,43</sup>





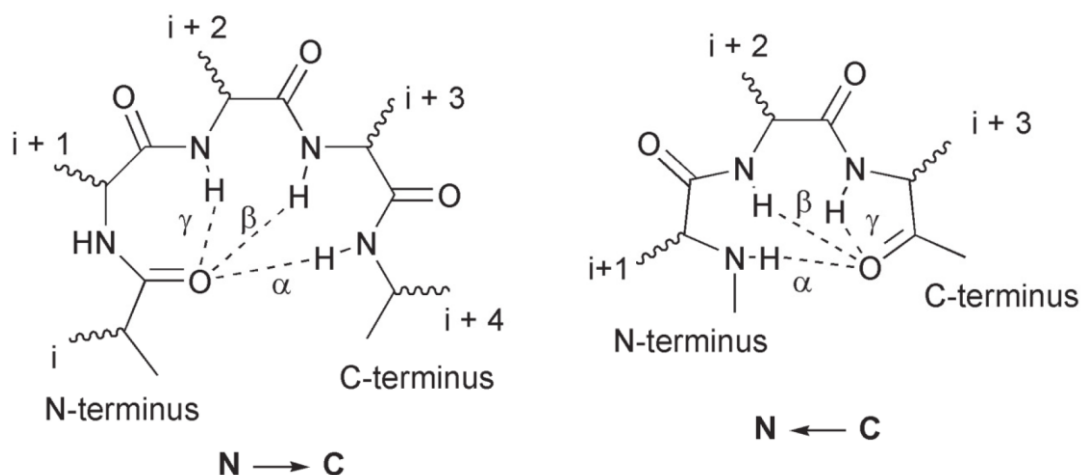
**Slika 10.** Konformacijski stereoisomeri N-(oksoacil)-L-alinil-D-isoglutamina s  $n = 3$ . Konformeri su položeni tako da je dipeptidni dio molekule na desnoj strani slike.<sup>42</sup>

### 2.3.6 Utjecaj vodikovih veza na strukturiranje peptida

Kako bi se shvatila i proučila struktura neke biološki aktivne molekule, kao što je to MDP, proučava se mogućnost stvaranja vodikovih veza unutar same strukture pošto vodikove veze stabiliziraju strukturu. Peptidi mogu stvarati sekundarne strukture poput  $\alpha$ -zavojnica ili  $\beta$ -ploča.

Konformacijskom i strukturnom analizom (kristalna struktura, NMR) proučava se tip strukturnih fragmenata u peptidima te se oni klasificiraju prema vrsti okreta, a razlikuju se prema obrascu vodikovih veza. Slika 11 prikazuje tip strukturnih fragmenata u peptidima. Postoje dvije vrste okreta. Ukoliko je karbonilna skupina bliža *N*-kraju peptida od amidnog protona, tada se smjer definira kao  $N \rightarrow C$ . Prema veličini prstena koji uključuje vodikovu vezu, razlikuju se  $\gamma$ -okret (7-člani prsten) i  $\beta$ -okret (10-člani prsten), dok je  $\alpha$ -okret (13-člani prsten) prisutan u  $\alpha$ -zavojnicama. Osim klasičnog, postoji i reverzni okret koji ima obrnuti smjer,  $C \rightarrow N$  te sadrži reverzne prstenove koji uključuju vodikovu vezu. Prstenovi se klasificiraju također prema broju članova koji uključuju vodikovu vezu pa tako postoji rvs- $\gamma$ -okret (5-člani prsten), rvs- $\beta$ -okret (8-člani prsten) i rvs- $\alpha$ -okret (11-člani prsten). Reverzni okreti su svakako energetske manje povoljni i rjeđe se opažaju u proteinskim strukturama.<sup>34</sup>





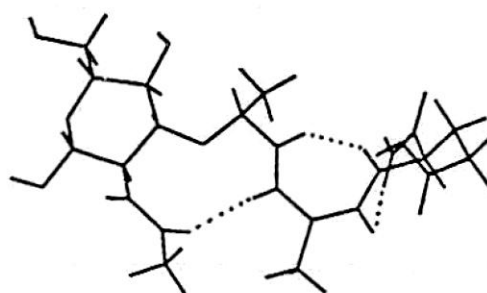
Slika 11. Vrste okreta u peptidima.<sup>34</sup>

Na primjeru MDP-a i njegovih analoga pokazano je slaganje podataka dobivenih računalnim metodama, odnosno konformacijskom strukturnom analizom s podacima dobivenim spektroskopski. Potvrđeno je prisutstvo 2  $\beta$ -okreta, jednog nastalog formiranjem vodikove veze između karbonylne skupine Nac i NH skupine L-Ala MDP-a i njegovih analoga, te drugog stabilnijeg, nastalog formiranjem vodikove veze između karbonylne skupine D-Lac i NH<sub>2</sub> skupine D-*iso*Gln što nije pokazalo slaganje s podacima dobivenim spektroskopski.<sup>44</sup>

Na Slici 12 prikazane su strukture najniže energije koje sadrže 3 vodikove veze. Jednu između karbonylne skupine Nac i NH skupine L-Ala, drugu između karbonylne skupine D-Lac i NH skupine D-*iso*Gln i treću između karbonylne skupine L-Ala i NH<sub>2</sub> skupine D-*iso*Gln.<sup>44</sup>

Uočene su razlike između  $\alpha$ - i  $\beta$ -anomera u preklapanju signala što je češće u  $\alpha$ -anomeru. Razlike između anomera objašnjene su na temelju temperaturne ovisnosti kemijskih pomaka amidnih protona. U  $\beta$ -anomeru temperaturni koeficijent je manji nego u  $\alpha$ -anomeru što je dokaz postojanja jače vodikove veze. Na taj način moguće je formiranje 5-članog prstena u  $\beta$ -anomeru, odnosno rvs- $\gamma$ -okreta.

Za konformer MDP-a s najnižom energijom potvrđeno je stvaranje drugog  $\beta$ -okreta koji molekuli daje S-oblik, međutim, uočeno je da je komponenta biološki neaktivna čime se potvrđuje važnost funkcionalne i konformacijske sličnosti peptidnih dijelova muramil-peptida.<sup>44</sup>



**Slika 12.** Konformacije MDP-a s najnižom energijom. Superpozicija 18 konformacija iz klustera s najmanjom energijom (gore). Konformer s najmanjom energijom i prikazanim vodikovim vezama (dolje).<sup>44</sup>

### 3 Eksperimentalni dio

#### 3.1 Materijali i metode

Svi reagensi i kemikalije korišteni u sintezi bili su analitičke čistoće. Otapala korištena u radu pročišćena su prema standardnim literaturnim postupcima.<sup>45</sup> Tijek reakcija, sastav frakcija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva ispitivani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela 60 F<sub>254</sub> (Merck). Detekcija je provedena ultraljubičastim zračenjem, reverzibilnom adicijom joda, prskanjem 10 %-tnom sumpornom kiselinom uz zagrijavanje, te ninhidrinom uz zagrijavanje. Za kromatografiju na stupcu korišten je silikagel veličine zrna 0,063-0,200 mm (Fluka).

Identifikacija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva provedena je TLC-om, određivanjem temperature tališta, te pomoću infracrvene spektroskopije (IR), nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i tekućinske kromatografije visoke razlučivosti sa spektrometrijom masa (HPLC-MS).

<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri snimljeni su na spektrometru Bruker AV600 (600 MHz za <sup>1</sup>H, 150 MHz za <sup>13</sup>C). Kemijski pomaci ( $\delta$ ) izraženi su prema tetrametilsilanu (TMS, [(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si]) kao unutarnjem standardu.

Za spektrometriju masa korišten je MS 6410 Triple Quadrupole LC/MS Agilent Technologies instrument, uz elektroraspršenje kao način ionizacije.

Temperature tališta određene su uređajem Büchi Melting Point B-540 u otvorenim kapilarama.

Infracrveni spektar snimljen je na FT-IR spektrometru PerkinElmer Spectrum Two. Uzorak je pripremljen tehnikom KBr pastile.

#### **Bis(etil-acetoacetato)kobalt (II) (I)**

Kobalt(II) acetat tetrahidrat (5,0 g; 0,02 mol) otopi se u 15 mL vode i doda etil-acetoacetatu (5,1 mL; 0,04 mol) u 10 mL metanola. Zatim se uz miješanje dokapa trietilamin (5,56 mL; 0,04 mol) otopljen u 10 mL metanola. Nastala krutina odfiltrira se i ispere s otprilike 50 mL ohlađenog metanola.

Dobivena je ružičasta krutina (1,53 g; 24 %)  $t_f$  217 °C (lit. je 220 °C).<sup>46</sup> IR (KBr,  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 1621 s (C=O)<sub>ester</sub>, 1524 s (C=O).

**Etil-2-(adamant-1-il)acetoacetat (2)**

U 5 mL suhog kloroforma dodaju se bezvodni kobaltov(II) klorid (0,065 g; 0,5 mmol) i trifenilfosfin (0,262 g; 1,0 mmol). Zatim se doda *bis*(etil-acetoacetato)kobalt (II) (1,526 g; 4,2 mmol), 1-bromadamantan (2,012 g; 9,4 mmol) i lantanijev(III) bromid heksahidrat (0,215 g; 0,5 mmol). Smjesa se zagrijava 48h na 140 °C u zatvorenom, prethodno vakuumiranom staklenom reaktoru. Po završetku reakcije smjesa se ohladi i razrijedi diklormetanom te ekstrahira klorovodičnom kiselinom ( $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Organski sloj suši se na bezvodnom natrijevom sulfatu i nakon filtriranja, otapalo se upari pri sniženom tlaku. Produkt **2** kromatografski se pročisti na stupcu silikagela uz dietil-eter : petroleter = 1 : 1 kao eluens.

Dobiveno je 0,79 g uljastog produkta **2** (71 %).  $R_f = 0,68$  (dietil-eter : petroleter = 1 : 1);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 4,16 (q, 2H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ; Et); 3,18 (s, 1H,  $\text{CH-}\alpha$ ); 2,23 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ;  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 1,96 (br s, 3H, Ad); 1,82-1,61 (m, 12H, Ad); 1,26 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_3$ ; Et).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 208,75 (CO;  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 168,61 (CO;  $\text{COOEt}$ ); 70,00 ( $\text{CH-}\alpha$ ); 60,68 ( $\text{CH}_2$ ; Et); 40,13; 36,70 ( $\text{CH}_2$ ; Ad); 31,98 (C; Ad); 28,68; 28,65 (CH; Ad,  $\text{CH}_3$ ;  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 14,19 ( $\text{CH}_3$ ; Et).

**Etil-N-acetil(adamant-1-il)aminoacetat (3)**

Spoj **2** (1,52 g; 5,8 mmol) otopi se u 8,5 mL dimetoksietana. Otopina se ohladi na -20 °C (smjesa acetona i leda) te se doda 6,7 mL metansulfonske kiseline. Nakon 10 min postupno (cca. u tri dijela) dodaje se natrijev azid (1,11 g; 17,0 mmol). Reakcijska smjesa miješa se 15 min na -20 °C, a zatim preko noći pri sobnoj temperaturi. Smjesi se dodaje vodena otopina amonijaka ( $w = 33$  %) dok se ne postigne pH = 8-9. Zatim se smjesa razrijedi diklormetanom i ekstrahira vodom. Organski sloj suši se na bezvodnom natrijevom sulfatu, profiltrira i otapalo upari pri sniženom tlaku. Ostatak se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela. Neizreagirani spoj **1** eluira se s kolone eluensom dietil-eter : petroleter = 1 : 1, a nakon toga produkt **3** s metanolom.

Dobiveno je 1,24 g produkta **3** (77 %) u obliku bijele krutine,  $t_f$  113-115 °C (lit. je 111-113 °C).<sup>47</sup>  $R_f = 0,22$  (dietil-eter : petroleter = 1 : 1);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 6,04 (d, 1H,  $J = 9,6$  Hz, NH); 4,34 (d, 1H,  $J = 9,6$  Hz,  $\text{CH-}\alpha$ ); 4,19 (q, 2H,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{CH}_2$ ; Et); 2,04 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ;  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 2,00 (br s, 3H, Ad); 1,72-1,53 (m, 12H, Ad); 1,30 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_3$ , Et).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 171,28 (CO;  $\text{COOEt}$ ); 169,82 (CO;

CH<sub>3</sub>CO); 60,92 (CH<sub>2</sub>; Et); 60,64 (CH- $\alpha$ ); 38,67; 36,64 (CH<sub>2</sub>; Ad); 28,67 (C; Ad); 28,21 (CH; Ad); 23,35 (CH<sub>3</sub>; CH<sub>3</sub>CO); 14,24 (CH<sub>3</sub>; Et).

#### (Adamant-1-il)glicin hidroklorid (4)

Amidoesteru **3** (580 mg; 2,1 mmol) doda se 16 mL klorovodične kiseline ( $c = 7 \text{ mol dm}^{-3}$ ) te se reakcijska smjesa refluksira 12 h. Po završetku reakcije smjesa se ohladi i nastala krutina odfiltrira te ispere dietil-eterom.

Dobiveno je 305 mg produkta **4** (75 %) u obliku bijele krutine,  $t_f$  (raspada) 239-242 °C (lit. (raspada) je 238-241 °C).<sup>47</sup>  $R_f = 0,58$  (CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O = 5 : 1); <sup>1</sup>H NMR (MeOH-d<sub>4</sub>)  $\delta$  / ppm: 3,31 (s, 1H, CH- $\alpha$ ); 2,06 (br s, 3H, Ad); 1,72-1,50 (m, 12H, Ad). <sup>13</sup>C NMR (MeOH-d<sub>4</sub>)  $\delta$  / ppm: 170,91 (CO); 63,50 (CH- $\alpha$ ); 40,45 (C; Ad); 37,53; 36,40 (CH<sub>2</sub>; Ad); 29,68 (CH; Ad).

#### *N*-(*tert*-butiloksikarbonil)-D,L-(adamant-1-il)glicin (5)

Hidroklorid L,D-(adamant-1-il)glicina **4** (405 mg; 1,65 mmol) suspendira se u 12 mL smjese dioksan : H<sub>2</sub>O = 2 : 1. Doda se di-*tert*-butildikarbonat (540 mg; 2,48 mmol) i 7,25 mL natrijeve lužine ( $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Smjesa se miješa 24 h pri sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije smjesa se zakiseli zasićenom vodenom otopinom kalijevog hidrogensulfata do pH = 3 i ekstrahira dva puta s 20 mL etil-acetata. Spojeni organski slojevi isperu se s 30 mL vode i suše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Nakon filtriranja sredstva za sušenje, otapalo se upari pri sniženom tlaku.

Dobiveno je 449 mg produkta **5** (88 %) u obliku bijele krutine,  $t_f$  188-190 °C.  $R_f = 0,66$  (CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O = 5 : 1); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  / ppm: 7,27 (s, 1H, NH); 4,01 (s, 1H, CH- $\alpha$ ); 2,01 (br s, 3H, Ad); 1,73-1,55 (m, 12 H, Ad); 1,45 (s, 9H, Boc). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  / ppm: 175,45 (COOH); 152,20 (CO; Boc), 62,40 (CH; Gly); 42,20; 40,24; 38,55; 36,64; 36,42; 36,35 (C i CH<sub>2</sub>; Ad); 28,36; 28,32; 28,26; 27,94 (CH; Ad, CH<sub>3</sub>; Boc). ESI-MS: izračunato za C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub> 309,40; dobiveno [M+Na]<sup>+</sup> na  $m/z$  332,3.

#### Općenit postupak uklanjanja *tert*-butiloksikarbonilne skupine

Spoj **6** ili **8** (1 mmol) otopi se u 10 mL suhog etil-acetata te se u otopinu 2 h uvodi suhi plinoviti klorovodik. Uparavanjem otapala dobiva se produkt reakcije. Produkti **7** (340 mg) i **9** (530 mg) dobiveni su kvantitativno u obliku bijele krute pjene. U daljnjim reakcijama korišteni su bez dodatnog pročišćavanja.

**Hidroklorid benzilnog estera L-alanil-D-izoglutamina (7)**

$R_f = 0,43$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 2 : 1$ );  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{MeOH-d}_4$ )  $\delta$  / ppm: 7,39-7,29 (m, 5H,  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ; Bn); 5,13 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ; Bn); 4,41 (dd, 1H,  $J = 6,5$  Hz,  $J = 5,0$  Hz, CH- $\alpha$ ; *iso*Gln); 4,01 (q, 1H,  $J = 7,4$  Hz, CH- $\alpha$ ; Ala); 2,49 (pt, 1H,  $J = 7,7$  Hz,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{CH}_2$ - $\gamma$ ; *iso*Gln); 2,45-2,40 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ - $\gamma'$ ; *iso*Gln); 2,23-2,15 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ - $\beta$ ; *iso*Gln); 2,02-1,95 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ - $\beta'$ ; *iso*Gln); 1,50 (d, 3H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ; Ala).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{MeOH-d}_4$ )  $\delta$  / ppm: 175,80; 174,03; 171,23 (CO); 137,52 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ; Bn); 129,60; 129,28; 129,26 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ; Bn); 67,54 ( $\text{CH}_2$ ; Bn); 53,86 (CH- $\alpha$ ; *iso*Gln), 50,44 (CH- $\alpha$ ; Ala), 31,44 ( $\text{CH}_2$ - $\gamma$ ; *iso*Gln); 28,34 ( $\text{CH}_2$ - $\beta$ ; *iso*Gln), 17,73 ( $\text{CH}_3$ ; Ala). ESI-MS: izračunato za  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_4^+$  308,35; dobiveno  $\text{M}^+$  na  $m/z$  308,3.

**Hidroklorid benzilnog estera D,L-(adamant-1-il)-L-alanil-D-izoglutamina (9)**

Karakterizacija je provedena na smjesi diastereizomera. Ukoliko se vrijednosti pojedinih izomera u NMR spektru razlikuju, pokraj vrijednosti za jedan izomer u uglatoj zagradi navedena je i vrijednost za drugi izomer.

$R_f = 0,48$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 2 : 1$ );  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{MeOH-d}_4$ )  $\delta$  / ppm: 7,36-7,32 (m,  $5\text{CH}_{\text{arom}}$ ; Bn); 5,13 (s,  $\text{CH}_2$ ; Bn); [5,12 (s,  $\text{CH}_2$ ; Bn)]; 4,42-4,29 (m, CH- $\alpha$ ; *iso*Gln); 4,13 (q,  $J = 7,2$  Hz, CH- $\alpha$ ; Ala); [4,12 (q,  $J = 7,1$  Hz, CH- $\alpha$ ; Ala)]; 3,67 (s, CH- $\alpha$ ; AdGly); [3,66 (s, CH- $\alpha$ ; AdGly)]; 2,51-2,38 (m,  $\text{CH}_2$ - $\gamma$ ; *iso*Gln); 2,33-2,12 (m,  $\text{CH}_2$ - $\beta$ ; *iso*Gln); 2,07 (br s;  $3\text{CH}$ ; Ad); 1,99-1,51 (m,  $6\text{CH}_2$ ; Ad); 1,42-1,37 (m,  $\text{CH}_3$ ; Ala); [1,38 (d,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_3$ ; Ala)].  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{MeOH-d}_4$ )  $\delta$  / ppm: 176,18; 176,15; 174,63; 174,02; 168,65; 168,56 (CO), 137,55 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ; Bn), 129,58; 129,53; 129,27; 129,25 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ; Bn); 67,50; 67,47 ( $\text{CH}_2$ ; Bn); 63,49; 63,29, (CH- $\alpha$ ; AdGly); 53,79, 53,60 (CH- $\alpha$ ; *iso*Gln); 51,42; 50,95 (CH- $\alpha$ ; Ala); 39,34; 39,13; 37,56; 37,39; 36,16; 35,89; 31,51; 31,25; 28,08; 27,97 ( $\text{CH}_2$ ; Ad,  $\text{CH}_2$ - $\gamma$ ; *iso*Gln, C; Ad,  $\text{CH}_2$ - $\beta$ ; *iso*Gln); 29,56; (CH; Ad); 17,79; 17,57 ( $\text{CH}_3$ ; Ala). ESI-MS: izračunato za  $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_5^+$  499,62; dobiveno  $\text{M}^+$  na  $m/z$  499,4.

**Benzilni ester N-(tert-butiloksikarbonil)-D,L-(adamant-1-il)-L-alanil-D-izoglutamina (8)**

Otopini *N*-Boc-(adamant-1-il)glicina **5** (215 mg; 0,70 mmol) u 5 mL suhog diklormetana pri 0 °C doda se 1-etil-3-(3'-dimetilamino-propil)karbodiimid hidroklorid (161 mg; 0,84 mmol) i 1-hidroksibenzotriazol (95 mg; 0,70 mmol). Reakcijska smjesa miješa se 30 min pri istoj temperaturi, a zatim se doda otopini spoja **7** (240 mg; 0,70 mmol) u 5 mL dioksana kojoj je dodan trietilamin (125  $\mu\text{L}$ ; 1,40 mmol). Smjesa se miješa 1 h pri 0 °C i dodatno 48 h pri sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije smjesa se razrijedi

s 10 mL diklormetana, ekstrahira s 10 mL klorovodične kiseline ( $c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i ispere zasićenom vodenom otopinom natrijevog hidrogen karbonata. Organski sloj suši se na bezvodnom natrijevom sulfatu, profiltrira i otapalo upari. Produkt **8** dobiven je nakon pročišćavanja kromatografijom na stupcu silikagela uz AcOEt kao eluens.

Karakterizacija je provedena na smjesi dijastereizomera. Ukoliko se vrijednosti pojedinih izomera u NMR spektru razlikuju, pokraj vrijednosti za jedan izomer u uglatoj zagradi navedena je i vrijednost za drugi izomer.

Bijela kruta pjena (323 mg, 77%);  $R_f = 0,29$  (AcOEt);  $^1\text{H NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$  / ppm: 7,36-7,29 (m,  $5\text{CH}_{\text{arom}}$ ; Bn); 5,11 (s,  $\text{CH}_2$ ; Bn); 4,38-4,19 (m,  $\text{CH-}\alpha$ ; *iso*Gln,  $\text{CH-}\alpha$ ; Ala); [4,36 (dd,  $J = 4,5 \text{ Hz}$ ,  $J = 7,5 \text{ Hz}$ ,  $\text{CH-}\alpha$ ; *iso*Gln)]; [4,23 (q,  $J = 7,2 \text{ Hz}$ ,  $\text{CH-}\alpha$ ; Ala)]; 3,75 (br s,  $\text{CH-}\alpha$ ; AdGly); [3,72 (br s,  $\text{CH-}\alpha$ ; AdGly)]; 2,50-2,39 (m,  $\text{CH}_2$ - $\gamma$ ; *iso*Gln); 2,33-2,20 (m,  $\text{CH}_2$ - $\beta$ ; *iso*Gln); 1,96 (br s; 3CH; Ad); 1,72-1,48 (m,  $6\text{CH}_2$ ; Ad); 1,44 (s,  $3\text{CH}_3$ ; Boc); 1,43 (d,  $J = 7,0 \text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ ; Ala); [1,35 (d,  $J = 7,1 \text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ ; Ala)].  $^{13}\text{C NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$  / ppm: 176,25; 176,23; 175,21; 174,13; 174,10; 173,08 (CO), 157,97; 157,95 (CO; Boc); 137,59 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ; Bn), 129,57; 129,38; 129,30; 129,27; 129,23 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ; Bn); 80,71 (CO; Boc); 67,45; 67,44 ( $\text{CH}_2$ ; Bn); 65,29; 64,48, ( $\text{CH-}\alpha$ ; AdGly); 53,74, 53,59 ( $\text{CH-}\alpha$ ; *iso*Gln); 51,27; 50,78 ( $\text{CH-}\alpha$ ; Ala); 39,90; 39,77; 38,17; 37,91; 37,88; 37,34; 31,57; 31,53; 28,00; ( $\text{CH}_2$ ; Ad,  $\text{CH}_2$ - $\gamma$ ; *iso*Gln, C; Ad,  $\text{CH}_2$ - $\beta$ ; *iso*Gln); 29,86; 28,80; (CH; Ad,  $\text{CH}_3$ ; Boc); 17,66; 17,42 ( $\text{CH}_3$ ; Ala). ESI-MS: izračunato za  $\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_7$  598,73; dobiveno  $[\text{M}+\text{H}]^+$  na  $m/z$  599,4.

### **Benzilni ester *N*-(fluoren-9-ilmetskikarbonil)-*O*-benzil-*L*-seril-*D,L*-(adamant-1-il)-*L*-alanil-*D*-izoglutamina (11)**

Otopini *N*-Fmoc-*O*-benzil-*L*-serina **10** (58 mg; 0,14 mmol) u 4 mL suhog diklormetana pri 0 °C doda se 1-etil-3-(3'-dimetilamino-propil)karbodiimid hidroklorid (32 mg; 0,17 mmol) i 1-hidroksibenzotriazol (19 mg; 0,14 mmol). Reakcijska smjesa miješa se 30 min pri istoj temperaturi i zatim se doda otopini spoja **9** (75 mg; 0,14 mmol) u 4 mL dioksana. U reakcijsku smjesu na kraju se doda *N*-etilmorfolin (35  $\mu\text{L}$ ; 0,18 mmol). Smjesa se miješa 1 h pri 0 °C i dodatno 48 h pri sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije otapalo se upari, a produkt pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 2 : 1 kao eluens. Zaštićeni tetrapeptid **11** (120 mg, 96 %) dobiven je u obliku bijele krute pjene.



Karakterizacija je provedena na smjesi dijastereizomera. Ukoliko se vrijednosti pojedinih izomera u NMR spektru razlikuju, pokraj vrijednosti za jedan izomer u uglatoj zagradi navedena je i vrijednost za drugi izomer.

$R_f = 0,84$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 2 : 1$ );  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{MeOH-d}_4$ )  $\delta / \text{ppm}$ : 7,79 (d,  $J = 7,5$  Hz, H-4 i H-5; Fmoc); 7,75-7,62; 7,41-7,25 (m,  $4\text{CH}_{\text{arom}}$ ; Fmoc,  $5\text{CH}_{\text{arom}}$ ; Bn); 7,37 (d,  $J = 7,2$  Hz, H-1 i H-8; Fmoc); 5,09 (s,  $\text{CH}_2$ ; Bn); [5,08 (s,  $\text{CH}_2$ ; Bn)]; 4,46-3,96 (m,  $\text{CH-}\alpha$ ; Ser,  $\text{CH-}\alpha$ ; *iso*Gln,  $\text{CH-}\alpha$ ; Ala); 3,81 (d,  $J = 5,6$  Hz,  $\text{CH}_2$ ; Fmoc); 3,74 (s,  $\text{CH-}\alpha$ ; AdGly); [3,73 (s,  $\text{CH-}\alpha$ ; AdGly)]; 3,72-3,59 (m, CH; Fmoc,  $\text{CH}_2$ ; Ser); 2,59-2,48 (m,  $\text{CH}_2$ - $\gamma$ ; *iso*Gln); 2,48-2,32 (m,  $\text{CH}_2$ - $\beta$ ; *iso*Gln); 2,29-2,13 (m,  $\text{CH}_2$ - $\beta'$ ; *iso*Gln); 1,92 (br s; 3CH; Ad); 1,67-1,46 (m,  $6\text{CH}_2$ ; Ad); 1,36 (d,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ; Ala); [1,34 (d,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ; Ala)].  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{MeOH-d}_4$ )  $\delta / \text{ppm}$ : 176,34; 176,26; 175,11; 175,03; 174,27; 174,23; 173,08; 173,05; 172,30; 172,15 (CO); 145,33; 145,25; 145,22; 145,18 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ; Fmoc); 142,63; 142,62 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ; Bn), 129,55; 129,24; 129,22; 129,18; 128,86; 128,84; 128,29; 128,23; 126,30; 126,24; 126,22; 126,20; 120,99 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ; Bn,  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ; Fmoc); 68,37 ( $\text{CH}_2$ ; Bn); 67,45; 67,40; 67,25 ( $\text{CH}_2$ ; Fmoc,  $\text{CH}_2$ ; Ser); 63,84; 63,79, ( $\text{CH-}\alpha$ ; AdGly); 58,03; 57,92 ( $\text{CH-}\alpha$ ; Ser); 53,80, 53,64 ( $\text{CH-}\alpha$ ; *iso*Gln); 51,15; 50,75 ( $\text{CH-}\alpha$ ; Ala); 48,41 (CH; Fmoc); 39,92; 39,87; 39,79; 38,06; 37,86; 37,81; 37,15; 37,12; 31,27; 31,21; 28,09; 28,04 ( $\text{CH}_2$ ; Ad, C; Ad,  $\text{CH}_2$ - $\gamma$ ; *iso*Gln,  $\text{CH}_2$ - $\beta$ ; *iso*Gln); 29,84; 29,81 (CH; Ad); 17,45; 17,36 ( $\text{CH}_3$ ; Ala).

### L-seril-D,L-(adamant-1-il)-L-alanil-D-izoglutamin (12)

Zaštićeni tetrapeptid **11** (91 mg; 0,10 mmol) otopi se u 10 mL metanola i doda se 50 mg 10 %-tnog paladija na ugljenu. Reakcijska smjesa miješa se 24 h u atmosferi vodika (g) pri sobnoj temperaturi i tlaku od 4 bara. Katalizator se odfiltrira preko naboranog filter papira, otapalo upari, a produkt pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 2 : 1 kao eluens. Dobiveno je 33 mg (65 %) produkta **12** u obliku krute pjene.

Karakterizacija je provedena na smjesi dijastereizomera. Ukoliko se vrijednosti pojedinih izomera u NMR spektru razlikuju, pokraj vrijednosti za jedan izomer u uglatoj zagradi navedena je i vrijednost za drugi izomer.

$R_f = 0,27$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 2 : 1$ );  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{MeOH-d}_4$ )  $\delta / \text{ppm}$ : 4,39-4,08 (m,  $\text{CH-}\alpha$ ; *iso*Gln,  $\text{CH-}\alpha$ ; Ala); [4,36 (dd,  $J = 4,2$  Hz,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH-}\alpha$ ; *iso*Gln)]; [4,25 (q,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH-}\alpha$ ; Ala)]; 4,01 (s,  $\text{CH-}\alpha$ ; AdGly); [3,96 (s,  $\text{CH-}\alpha$ ; AdGly)]; 3,79-3,55 (m,  $\text{CH-}\alpha$ ; Ser,  $\text{CH}_2$ ; Ser); 2,47-2,37 (m,  $\text{CH}_2$ - $\gamma$ ; *iso*Gln); 2,29-2,13 (m,  $\text{CH}_2$ - $\beta$ ; *iso*Gln); 1,99 (br s; 3CH; Ad); 1,71-1,53 (m,  $6\text{CH}_2$ ; Ad); 1,39 (d,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_3$ ; Ala); [1,37 (d,  $J = 7,1$  Hz,



CH<sub>3</sub>; Ala)]. <sup>13</sup>C NMR (MeOH-d<sub>4</sub>) δ / ppm: 176,32; 175,57; 175,54; 175,09; 175,06; 174,94; 172,47; 172,33 (CO); 65,23; 65,15 (CH<sub>2</sub>; Ser); 64,26; 63,76, (CH-α; AdGly); 57,17; 57,03 (CH-α; Ser); 53,77, 53,67 (CH-α; isoGln); 51,18; 50,66 (CH-α; Ala); 41,31; 39,93; 39,87; 38,07; 37,90; 37,84; 37,07; 36,74 (CH<sub>2</sub>; Ad, C; Ad); 31,27; 31,22 (CH<sub>2</sub>-γ; isoGln); 29,90; 29,87; 29,84 (CH; Ad); 28,22; 28,11 (CH<sub>2</sub>-β; isoGln); 17,49; 17,37 (CH<sub>3</sub>; Ala). ESI-MS: izračunato za C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 495,57; dobiveno [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> na m/z 513,5.

### 3.2 Računalni dio

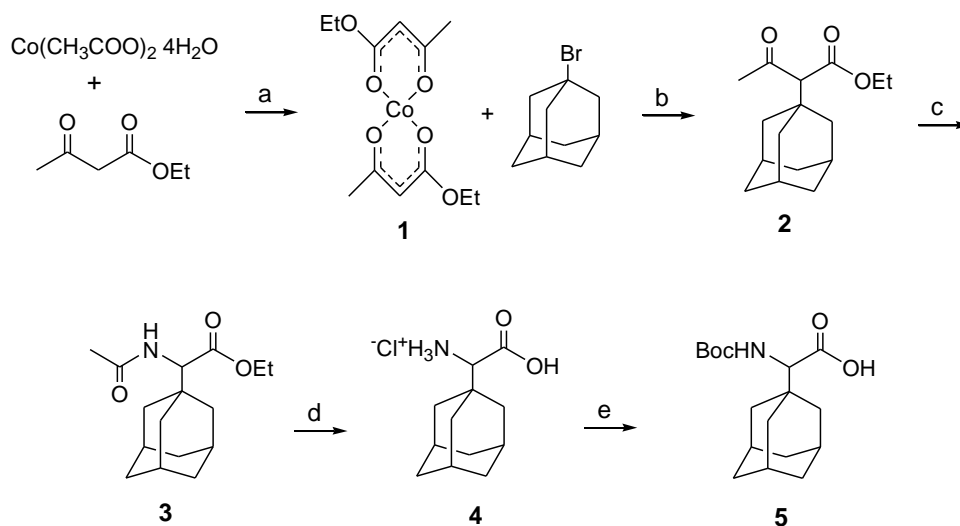
Početne geometrije modelnih spojeva konstruirane su pomoću programa Maestro.<sup>48</sup> Nakon toga su optimizirane i podvrgnute konformacijskoj analizi u vakuumu u programu MacroModel,<sup>49,50</sup> pri čemu su korištena ugrađena polja sila OPLS\_2005 i AMBER\* i algoritmi konformacijskog pretraživanja.<sup>51,52,53,54,55,56</sup> Detaljniji pregled korištenih metoda opisan je u poglavlju 4.2.3. Samo najstabilniji konformeri reoptimizirani su u programu Gaussian09<sup>57</sup> računskim modelom B3LYP/6-31G\* u vakuumu.<sup>58,59</sup> Frekvencijskom analizom na istoj razini teorije najstabilnije strukture potvrđene su kao minimumi na plohi potencijalne energije. Za topološku analizu elektronske gustoće AIM metodom korišten je program AIM2000<sup>60,61</sup> Molekule su prikazane pomoću programa GaussView<sup>62</sup> i Chem3D (CambridgeSoft, Cambridge, MA). Svi zahtjevniji računi napravljeni su na računalnom klasteru ISABELLA Sveučilišnog računalnog centra u Zagrebu.

## 4 Rezultati i rasprava

### 4.1 Sinteza adamantil-tetrapeptida

#### 4.1.1 Priprava *tert*-butiloksikarbonil(adamant-1-il)glicina

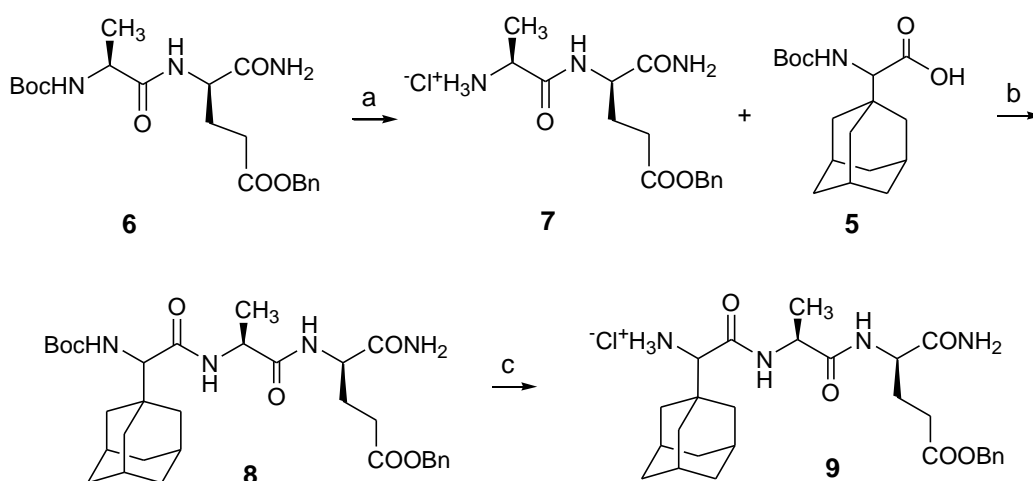
*Tert*-butiloksikarbonil(adamant-1-il)glicin **5** pripravljen je u pet sintetskih koraka s dobrim ukupnim iskorištenjem (Shema 3.). Prvi korak u sintezi (adamant-1-il)glicina bila je priprava kobaltovog (II) kompleksnog spoja **1**, *bis*(etil-acetoacetat)kobalta (II).<sup>46</sup> U sljedećoj reakciji etil-acetoacetat alkiliran je 1-bromadamantanom. S obzirom da je direktno  $\alpha$ -alkiliranje navedenog  $\beta$ -ketoestera velikim adamantil-bromidom otežano zbog steričkih smetnji, alkiliranje  $\beta$ -dikarbonilnog spoja je potpomognuto prethodnom pripravom koordinacijskog spoja etil-acetoacetata i kobalta (II). Alkiranjem etil-acetoacetata sintetiziran je etil-2-(adamant-1-il)acetoacetat **2** u vrlo dobrom iskorištenju.<sup>47</sup> Schmidtovom pregradnjom adamantil-ketoestera **2** dobiven je acetamid **3**. U tom stupnju karbonilna skupina reagirala je s azidnom kiselinom pri čemu je došlo do ugradnje dušikovog atoma. Spoj **3** je zatim kiselom hidrolizom preveden u racemičnu adamantil-aminokiselinu **4**. Amino-skupina (adamant-1-il)glicina **4** (AdGly) zaštićena je *tert*-butiloksikarbonil (Boc) skupinom te je pripravljen Boc-AdGly **5**.



Shema 3 Priprava *tert*-butiloksikarbonil(adamant-1-il)glicina **5**; (a)  $\text{Et}_3\text{N}$ , MeOH,  $\eta = 24\%$ ; (b)  $\text{CoCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ ,  $\text{LaBr}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , suhi  $\text{HCCl}_3$ ,  $\eta = 71\%$ ; (c)  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ,  $\eta = 77\%$ ; (d)  $\text{HCl}$  (aq), ( $c = 7 \text{ mol dm}^{-3}$ ),  $\eta = 75\%$ ; (e)  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{NaOH}$  (aq) ( $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ ),  $\eta = 88\%$ .

#### 4.1.2 Priprava adamantil-tripeptida

Polazni spoj u sintezi adamantil-tripeptida, D,L-(adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutamin, bio je kupovni dipeptid **6** (Shema 4). Boc-deprotekcija terminalne amino-skupine provedena je uvođenjem suhog plinovitog klorovodika u otopinu spoja **6** u suhom etil-acetatu pri čemu je dobiven hidroklorid benzilnog estera desmuramidipeptida **7**.<sup>63</sup> Dipeptid **7** kondenziran je karbodiimidnom metodom s Boc-AdGly **5** čija sinteza je opisana u prethodnom poglavlju. Korišten je EDC × HCl/HOBt protokol uz trietilamin. 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC × HCl) djeluje kao kondenzacijski reagens, 1-hidroksibenzotriazol (HOBt) kao koreagens i trietilamin kao baza. Baza deprotonira amino-skupinu dipeptida i tako generira nukleofil za stvaranje peptidne veze.

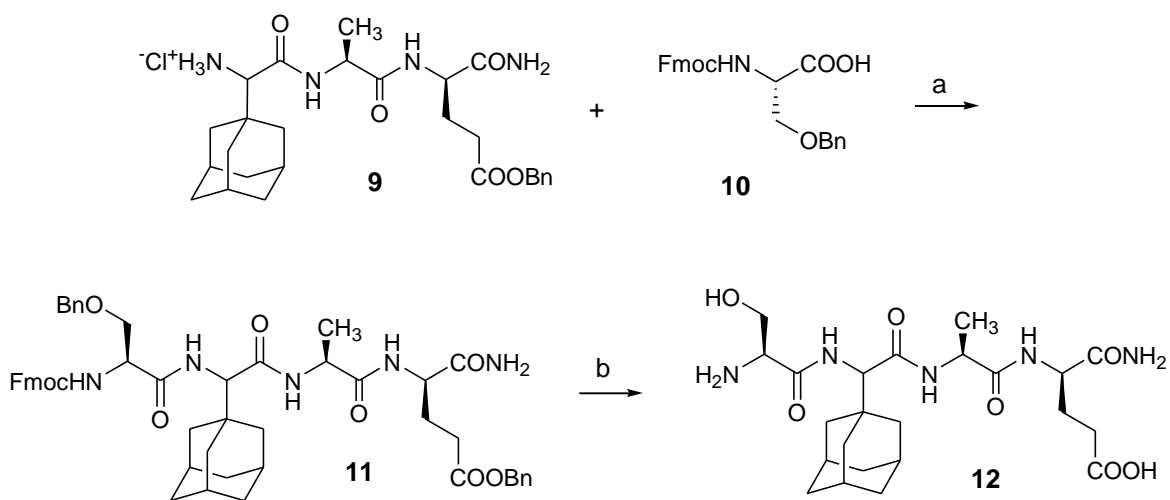


**Shema 4** Priprava hidroklorida benzilnog estera D,L-(adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutamina **9**; (a) HCl (g) u EtOAc,  $\eta \geq 99\%$ ; (b) EDC-HCl, HOBt-H<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, dioksan:DCM=1:1,  $\eta = 77\%$ ; (c) HCl (g) u EtOAc,  $\eta \geq 99\%$ .

U literaturno poznatoj pripravi (adamant-1-il)tripeptida **9** kao prekursor upotrebljen je *tert*-butilni ester dipeptida, a ovdje je korišten benzilni ester navedenog dipeptida. Stoga je u ovom radu opisana sinteza i karakterizacija novog, do sada neidentificiranog peptida **8**, te nova metoda pripreme tripeptida **9**.<sup>25</sup> Zaštićenom tripeptidu **8** uklonjena je *N*-Boc skupina te je dobiven produkt **9** s benzilnom zaštitom na C-kraju i slobodnom amino-skupinom koja će poslužiti za vezanje *N*-[(fluoren-9-il)metoksikarbonil]-*O*-benzil-L-serina.

### 4.1.3 Priprava adamantil-tetrapeptida

Kondenzacijom adamantil-tripeptida **9** i kupovnog *N*-Fmoc-*O*-benzil-L-Ser **10** uz EDC × HCl / HOBT reagens i *N*-etilmorfolin kao bazu, priređen je zaštićeni adamantil-tetrapeptid **11** (Shema 5.). U ovoj reakciji priprave peptidne veze kao baza upotrebljen je *N*-etilmorfolin umjesto trietilamina. Naime, *N*-etilmorfolin je slabija baza od trietilamina i njegovim korištenjem željelo se spriječiti eventualno uklanjanje *N*-Fmoc-skupine sa serina, a što bi uzrokovalo nastajanje neželjenih nusprodukata.



**Shema 5** Priprava L-seril-D,L-(adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutamina **12**; (a) EDC·HCl, HOBT·H<sub>2</sub>O, *N*-etilmorfolin, dioksan:DCM=1:1,  $\eta = 96\%$ ; (b) H<sub>2</sub> (g), 10% Pd/C, MeOH,  $\eta = 65\%$ .

Konačni produkt sinteze i ciljna molekula ovog rada, L-seril-D,L-(adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutamin **12**, dobiven je potpunom deprotekcijom adamantil-tetrapeptida **11**. Trostruka zaštita (*N*-Fmoc, te benzilni ester i eter) uklonjena je u samo jednom koraku, katalitičkim hidrogeniranjem uz 10% Pd/C u metanolu. Dobiven je deprotektirani adamantil-tetrapeptid **12** u dobrom iskorištenju. Benzilna eterska i esterska zaštita uobičajeno se uklanjaju katalitičkim hidrogeniranjem, dok se za Fmoc-deprotekciju obično koriste blago lužnati reakcijski uvjeti (najčešće su upotrebljavani sekundarni amini). U ovom slučaju je *N*-Fmoc zaštita uklonjena katalitičkim hidrogeniranjem u neutralnim uvjetima. Reakcija je vođena 24 h pod visokim tlakom vodika (4 atm) i uz dovoljnu količinu katalizatora. U navedenim reakcijskim uvjetima uklonjene su obje benzilne zaštite (na hidroksilnoj skupini serina i karboksilnoj skupini izoglutamina), ali je također uklonjena i Fmoc skupina s amino-skupine serina, odnosno došlo je do potpune deprotekcije peptida **11**. Opisana *N*-Fmoc deprotekcija u neutralnim uvjetima u skladu je s literaturnim podacima.<sup>64</sup>

## 4.2 Konformacijska analiza

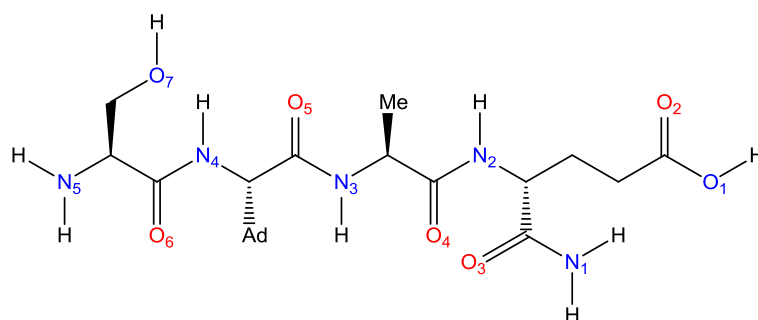
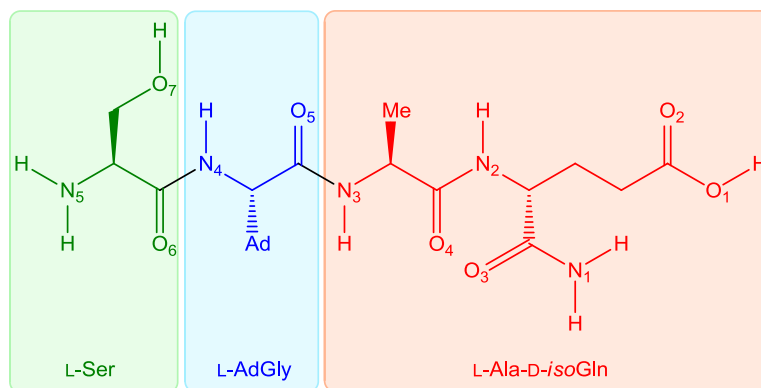
### 4.2.1 Cilj istraživanja

Cilj istraživanja bio je proučiti konformacijski prostor odabranih modelnih peptida. Proučavanje je podijeljeno u nekoliko koraka ne bi li se pronašla optimalna metoda za proučavanje konformacijskog prostora. Najprije su odabrani modelni spojevi na kojima su provedene simulacije. Odabrani spojevi su i sintetizirani te za njih postoje odgovarajući eksperimentalni podaci također prikazani u ovom radu. Najjednostavnija jedinica odgovorna za aktivnost ovih peptida je dipeptid, L-Ala-D-*iso*Gln. Provedena je najprije sinteza, a zatim računaska analiza potencijalnih spojeva s adjuvantskom aktivnosti. Cilj je bio provesti preliminarna ispitivanja kojima bi zaključili kako dodavanje jedne po jedne aminokiseline na aktivnu dipeptidnu jedinicu utječe na obrasce vodikovih veza, odnosno na strukturiranje modelnih peptida.

Nakon što su odabrani modelni spojevi, naredno proučavanje je podijeljeno u dvije cjeline. Prije konačnih izračuna, 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 je uključivala generiranje početnih struktura koje su dalje proučavane isključivo metodama kvantne mehanike (DFT razinom teorije). Na taj način dobiven je bolji uvid u intermolekulske interakcije modelnih peptida, nego što bi bio samo na temelju molekulske mehanike. Kako bi se što bolje okarakterizirale vodikove veze u najstabilnijim konformerima, napravljena je populacijska analiza. AIM metodom proučena je elektronska gustoća najstabilnijih konformera i na temelju topološke analize okarakterizirane su intramolekulske vodikove veze.

### 4.2.2 Modelni spojevi

Konačni spoj sintetiziran u ovom radu je adamantil-tetrapeptid, odnosno L-seril-D,L-(adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutamin (Slika 13), koji se sastoji od tri dijela: najmanje aktivne jedinice koja pokazuje adjuvantsku aktivnost (dipeptida L-Ala-D-*iso*Gln), te dvije konsektivno vezane aminokiseline na dipeptid (L-AdGly i L-Ser).



**Slika 13** Strukturne formule L-seril-D,L-(adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutamina. Različitim bojama prikazani su osnovni sastavni dijelovi molekule, aminokiseline i dipeptid (gore). Korištena numeracija atoma koji su potencijalni akceptori (crveno), odnosno donori i/ili akceptori (plavo) vodika.

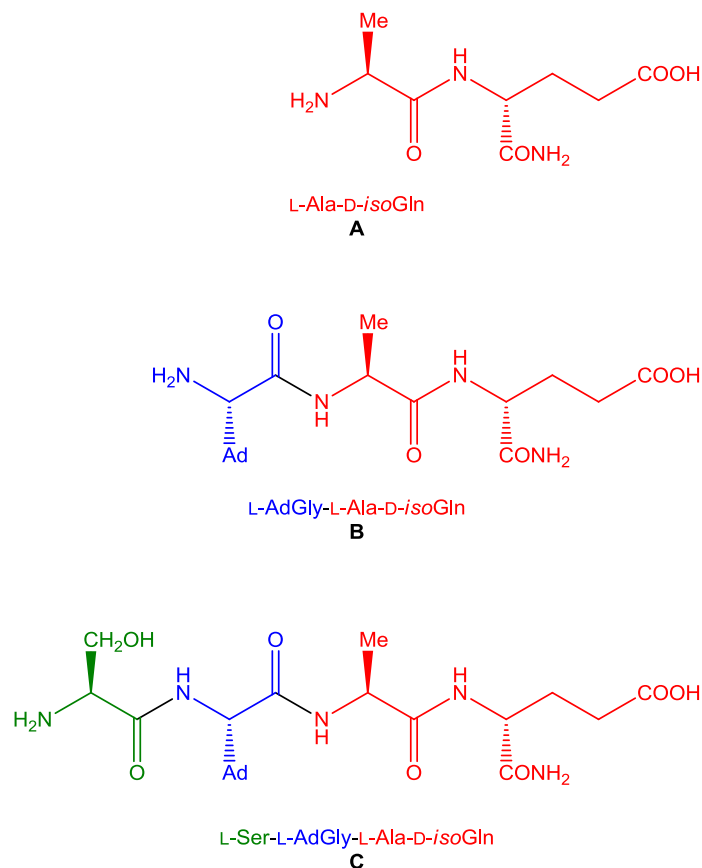
Na temelju strukture proučavane molekule adamantil-tetrapeptida, odabrani su modelni spojevi: dipeptid **A** (L-Ala-D-isoGln), tripeptid **B** (L-AdGly-L-Ala-D-isoGln) i tetrapeptid **C** (L-Ser-L-AdGly-L-Ala-D-isoGln) prikazani na Slici 14. Karbonilne skupine mogu biti potencijalni akceptori vodika, dok amino i hidroksilne skupine mogu istovremeno biti donori i akceptori vodika. S povećanjem broja aminokiselina uključenih u strukturu spojeva, povećava se i broj mogućih vodikovih veza, a time i složenost obrazaca koji nastaju.

### 4.2.3 Metoda za pretraživanje konformacijskog prostora

#### 4.2.3.1 Molekulska mehanika

Traženje optimalne metode za pretraživanje konformacijskog prostora molekulskom mehanikom napravljeno je na tripeptidu **B**, koji je odabran kao srednje složena struktura, kada se uspoređi s jednostavnijim dipeptidom **A** i složenijim tetrapeptidom **C**. Cilj je bio pronaći metodu koja će u što kraćem vremenu što bolje pretražiti konformacijski prostor te generirati prikladan skup konformera. Problem pretraživanja konformacijskog prostora krije se u odabiru polja sila koje će dovoljno dobro opisati modelne peptide s obzirom na skup obuhvaćenih parametara, odnosno u

pronalaženju odgovarajućih postavki u komercijalno dostupnim algoritmima kojima se provodi pretraživanje. Pregled nekih metoda do sada korištenih u analizi sličnih peptida opisan je u literaturnom dijelu, a u ovom radu korištena su dva polja sila uz isti algoritam za pretraživanje konformacijskog prostora.



Slika 14 Strukturne formule modelnih spojeva.

Prvo polje sila bilo je OPLS\_2005 (engl. *Optimized Potentials for Liquid Simulations*), poboljšana verzija OPLSAA polja sila s novim parametrima za proteine. Drugo polje sila bilo je AMBER\* (engl. *Assisted Model Building with Energy Refinement*) s poboljšanim parametrima za vodikove veze i peptide. Za pretraživanje konformacijskog prostora korišten je ugrađeni algoritam koji kombinira Monte Carlo metodu (engl. *Monte Carlo Multiple Minimum*, MCMM) sa slučajnim promjenama torzijskih kutova i metodu konformacijskog pretraživanja koja istražuje vlastite vektore pridružene malim frekvencijama koji slijede 'mekane' stupnjeve slobode, poput torzija (engl. *Low-Mode Conformational Search*, LMCS).<sup>40,65,66</sup> Pritom su mijenjani različiti parametri pretraživanja poput broja kojima se definira rotacija oko veza (100, 300 i 500) što je utjecalo i na broj maksimalnih koraka u pretraživanju konformera. Također je mijenjan i parametar kojim se

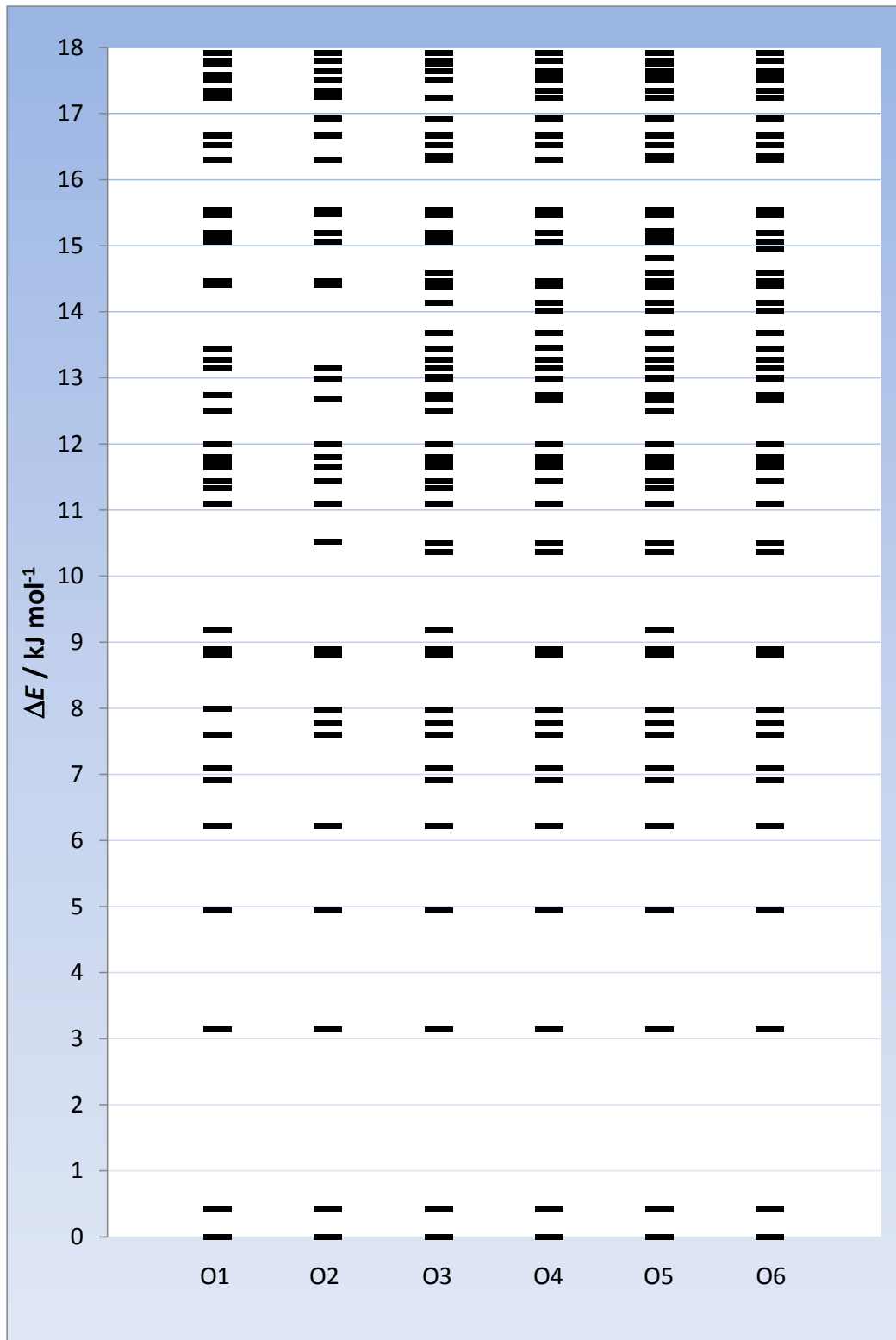
definiraju torzije povezane uz amidne i esterske veze, prema kojem rotacija može biti ograničena (opcija 'intermediate') ili dopuštena (opcija 'extended').

**Tablica 4** Popis oznaka metoda (O od OPLS\_2005, A od AMBER\* polja sila), odabrani parametri i broj dobivenih konformera spoja **B**.

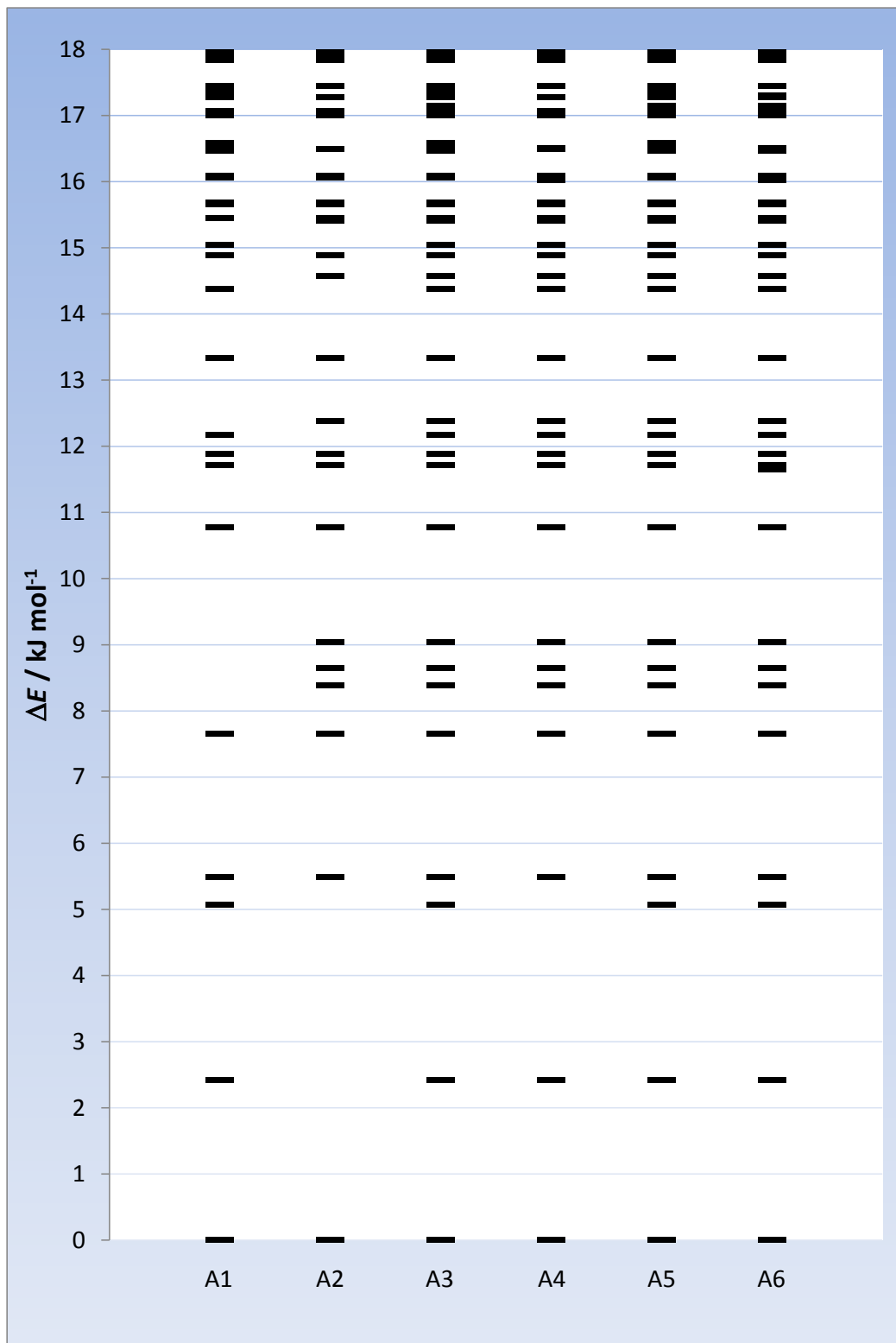
<i>oznaka</i>	<i>broj dobivenih konformera</i>	<i>ukupan broj koraka</i>	<i>broj koraka za rotaciju oko veze</i>	<i>ograničene torzije</i>
<b>O1/A1</b>	392/418	1400	100	DA
<b>O2/A2</b>	486/523	1800	100	NE
<b>O3/A3</b>	780/866	4200	300	DA
<b>O4/A4</b>	961/1035	5400	300	NE
<b>O5/A5</b>	979/1114	7000	500	DA
<b>O6/A6</b>	1210/1344	9000	500	NE

Analize su napravljene na modelnom spoju **B**. Slike 15 i 16 prikazuju Boltzmannovu raspodjelu najstabilnijih konformera (do energijskog praga od 18 kJ mol<sup>-1</sup>) dobivene odabranim metodama, a oznake metoda detaljnije su opisane u Tablici 4. Iz tablice se može vidjeti kako su metode s najvećim brojem koraka generirale najveći broj konformera – obično su to one metode s većim brojem definiranih koraka za rotaciju oko veza (500), odnosno bez ograničenih torzija za rotaciju oko amidne veze ('extended'). Naravno, udio ukupno nađenih različitih konformera s obzirom na najveći definirani broj koraka smanjuje se s porastom broja koraka, što znači da dolazi do konvergiranja i metoda sve rjeđe pronalazi nove konformere. Međutim, nama su zanimljive energijski najstabilnije strukture koje će biti odabrane za daljnju reoptimizaciju. Pokazalo se kako složenije metode (OPLS\_2005, O3-O6) daju veći broj konformera više energije, ali do praga od 9 kJ mol<sup>-1</sup> nema bitnih razlika u raspodjeli konformera. Slično opažanje vrijedi i za metode s AMBER\* (A5-A6) poljem sila. Općenito, ako se usporede rezultati dobiveni različitim poljima sila, pokazalo se da je raspodjela najstabilnijih konformera unutar svakog polja relativno slična, a razlike nastaju pri višim energijama. U daljnjem istraživanju za generiranje najstabilnijih konformera molekulskom mehanikom korištene su metode koje imaju veći broj koraka za rotaciju oko veze, s ili bez ograničenja rotacija oko amidnih i esterskih veza, najčešće O6/A6.





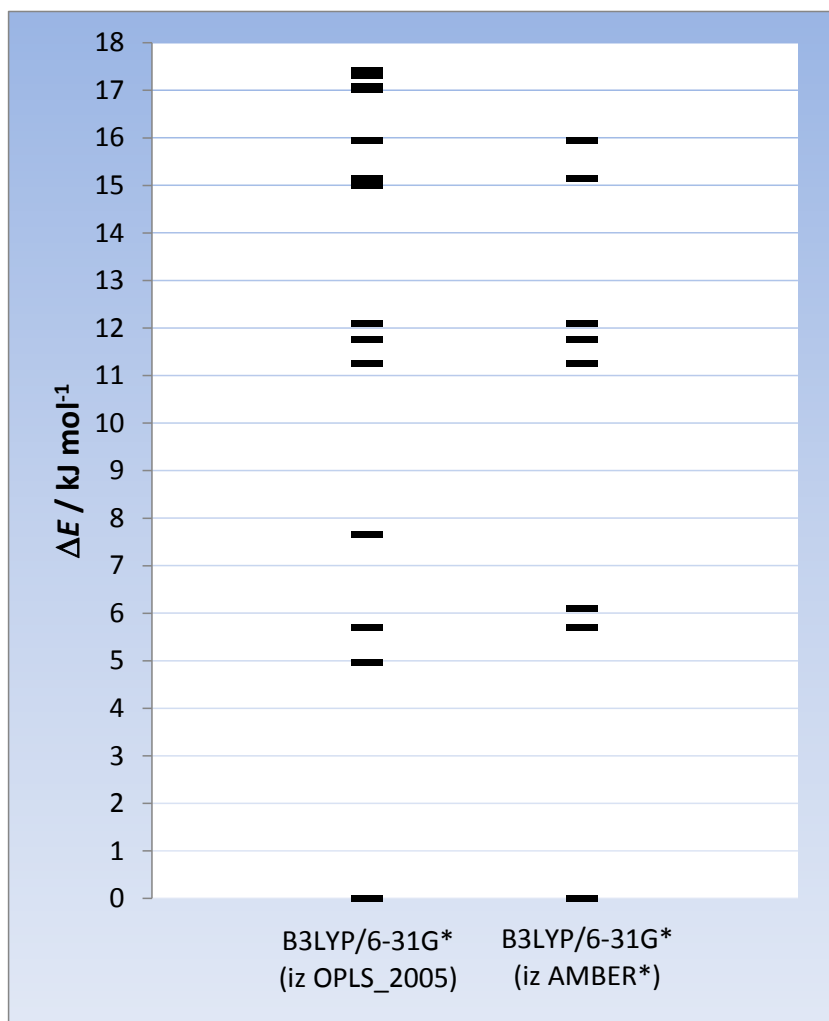
Slika 15 Boltzmannova raspodjela konformera spoja **B** dobivenih s OPLS\_2005 poljem sila (objašnjenje metoda u tablici).



Slika 16 Boltzmannova raspodjela konformera spoja **B** dobivenih s AMBER\* poljem sila (objašnjenje metoda u tablici).

#### 4.2.3.2 Usporedba rezultata dobivenih različitim metodama

Boltzmannova raspodjela konformera dobivenih molekulkom mehanikom ne mora biti jednaka raspodjeli dobivenoj kvantno-mehaničkim metodama, s obzirom na različit pristup u opisu energije sustava. Idealno bi bilo, da je skup najstabilnijih konformera određen molekulkom mehanikom sličan skupu najstabilnijih konformera dobivenom, u našem slučaju, DFT metodom.



Slika 17 Boltzmannova raspodjela konformera spoja **B** dobivenih reoptimizacijom s B3LYP/6-31G\* iz najstabilnijih geometrija određenih molekulkom mehanikom.

Kako bismo lakše usporedili dobivene konformere spoja **B** dobivene različitim poljima sila, OPLS\_2005 i AMBER\*, skup najstabilnijih konformera reoptimiziran je B3LYP/6-31G\* računskim modelom, već korištenim u literaturi za proučavanje intermolekulskih vodikovih veza u peptidima.<sup>42,43</sup> Rezultati su prikazani na Slici 17. Nijedna molekulkom-mehanička metoda nije generirala jednaki skup najstabilnijih konformera. Međutim, obje su metode pronašle najstabilniji konformer nakon reoptimizacije DFT-om. Zanimljivo je kako je to ujedno i najstabilniji konformer određen

molekulske mehaničke metode, OPLS\_2005 i AMBER\*. Ovakvo slaganje postignuto je samo kod modelnog tripeptida **B**. U modelnim spojevima **A** i **C** reoptimizacijom su kao najstabilnije strukture dobiveni neki molekulske mehaničke manje povoljni konformeri. Prema Slici 17 uočljivo je da OPLS\_2005 metoda nije obuhvatila četvrti, a AMBER\* drugi i peti konformer po relativnoj stabilnosti kada se u obzir uzme skup svih konformera.

Kao optimalni izbor za što potpuniji opis konformacijskog prostora za sve modelne spojeve u ovom radu bit će korištene obje molekulske mehaničke metode (OPLS\_2005 i AMBER\*) s obzirom da nijedna nije dala istu raspodjelu najstabilnijih konformera nakon reoptimizacije s B3LYP/6-31G\* računskim modelom. Međutim, sumarno se ove dvije metode nadopunjuju i daju iscrpniji skup konformera, a time je i mogućnost izostavljanja energijski najpovoljnijih konformera smanjena.

#### 4.2.4 Karakterizacija najstabilnijih konformera i obrazaca vodikovih veza

Nakon što je određena optimalna metoda za pretraživanje konformacijskog prostora, napravljena je Boltzmannova raspodjela dipeptida **A**, tripeptida **B** i tetrapeptida **C**, te su opisani obrasci vodikovih veza uočeni u spojevima.

##### 4.2.4.1 Dipeptid **A**, *L-Ala-D-isoGln*

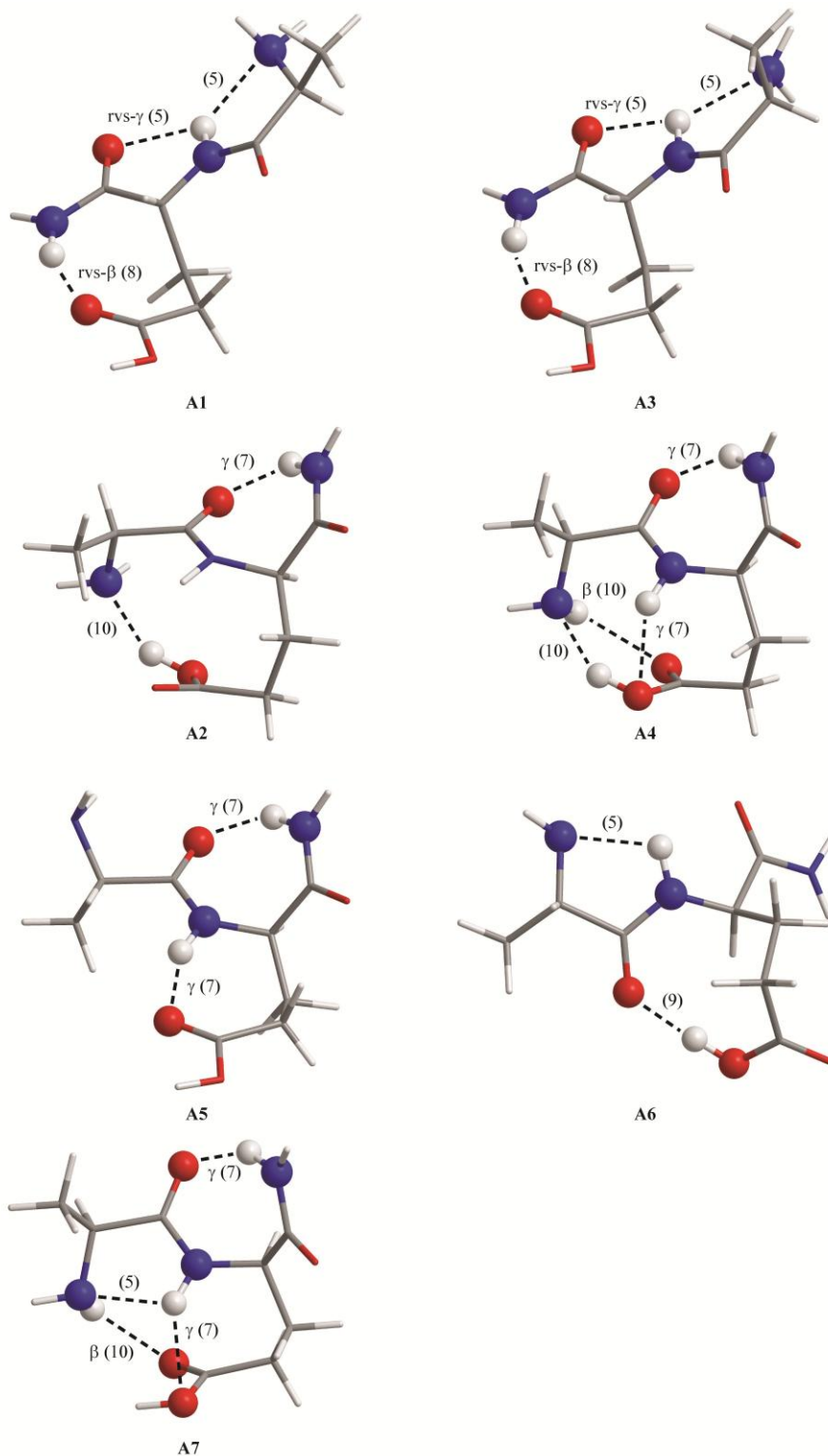
Najstabilniji konformeri prikazani su na Slici 18, a odabrani izračunati podaci u Tablicama 5 i 6. U raspodjeli konformera spoja **A** ne prevladava jedan konformer kao što je to uočeno kod ostalih peptida. Međutim, prikazani konformeri zastupljeni više od 5% prema Boltzmannu mogu se grupirati u dvije osnovne skupine prema uočenom obrascu vodikovih veza. Prva skupina obuhvaća konformere **A1** (20%) i **A3** (13%), a druga konformere **A2** (13%), **A4** (9%) i **A7** (5%). Prvi skup karakterističan je po tri tipa vodikovih veza. Rvs- $\beta$  okret (8-člani prsten) uključuje N(1)–H $\cdots$ O(2) vodikovu vezu između amino skupine bočnog ogranka *isoGln* te karbonilnog kisika na C-kraju *isoGln*. Druga dva tipa imaju isti donor vodika koji sudjeluje u stvaranju dva 5-člana prstena, rvs- $\gamma$  okreta s N(2)–H $\cdots$ O(3) i drugog s N(2)–H $\cdots$ N(3) vodikovom vezom. Sve tri veze potvrđene su AIM analizom i vrijednosti topoloških parametara odgovaraju rasponu vrijednosti predloženom od Kocha i Popeliera. Relativno mali kut (oko 105°) u 5-članim prstenovima odgovara i manjoj udaljenosti donora i akceptora (oko 2,65 Å), dok je ista udaljenost u 7-članom prstenu 3,00 Å, a kut 158°.

**Tablica 5** Dipolni momenti, relativne energije i Boltzmannova raspodjela pri 298 K najstabilnijih konformera dipeptida **A** (zastupljeni > 1%).

dipeptid	$\mu / D$	$\Delta E / \text{kJ mol}^{-1}$	Pop, %
<b>A1</b>	1,14	0,00	19,9
<b>A2</b>	4,20	0,99	13,4
<b>A3</b>	1,51	1,12	12,7
<b>A4</b>	3,88	1,90	9,3
<b>A5</b>	2,21	3,05	5,8
<b>A6</b>	5,51	3,13	5,6
<b>A7</b>	3,31	3,29	5,3
<b>A8</b>	3,91	3,45	4,9
<b>A9</b>	0,95	3,85	4,2
<b>A10</b>	5,43	3,86	4,2
<b>A11</b>	3,45	5,12	2,5
<b>A12</b>	1,55	5,31	2,3
<b>A13</b>	4,23	5,61	2,1
<b>A14</b>	3,57	5,63	2,1
<b>A15</b>	2,62	5,77	1,9
<b>A16</b>	3,26	6,50	1,4
<b>A17</b>	4,05	7,05	1,2
<b>A18</b>	3,01	7,07	1,1

Druga skupina konformera (**A2**, **A4** i **A7**) ima orijentaciju skupina u kojoj je moguća neka interakcija između N i C kraja dipeptida, ovisno o orijentaciji terminalne karboksilne skupine. U jednom slučaju nastane  $\beta$  okret (10-člani prsten) s  $N(3)-H\cdots O(2)$  vodikovom vezom (**A4** i **A7**), odnosno sličan 10-člani prsten ako je donor vodika hidroksilna skupina kao u **A2** i **A4**,  $O(1)-H\cdots N(3)$ . Prvoj vezi odgovaraju i nešto manji kutovi s većom udaljenosti donora od akceptora, dok druga veza ima kut od  $150^\circ$  i kraću udaljenost između O i N atoma (2.78 Å u **A2**, 2.82 Å u **A4**). Formalno gledano, vrijednost elektronske gustoće u kritičnoj točki veze između vodika i dušika malo je veća je od predloženih literaturnih vrijednosti kod konformera **A2** (0.04 a.u.) što odgovara relativno kratkoj udaljenosti i indicira jaču interakciju. Slično je opaženo i kod konformera **A6** u kojem kao donor vodika sudjeluje kisik,  $O(1)-H\cdots O(4)$ . U strukturama druge skupine uvijek se pojavljuje  $\gamma$ -okret (7-člani prsten) između amino skupine bočnog ogranka *iso*Gln i karbonilnog kisika Ala  $N(1)-H\cdots O(4)$ . Dodatna interakcija postoji u konformerima **A4** i **A7** u kojoj N atom peptidne veze tvori  $\gamma$ -okret (7-člani prsten),  $N(2)-H\cdots O(1)$ , odnosno

dotatni 5-člani prsten N(2)–H···N(3). Sve vodikove veze potvrđene su AIM analizom. Konformer **A5** vrlo je sličan već opisanim, ali u njemu nije moguća interakcija N kraja zbog drugačijeg torzijskog kuta kojim je definirana rotacija oko veze između karbonilnog i asimetričnog Ala ugljika.



Slika 18 Najstabilniji konformeri dipeptida A (zastupljenost > 5%).

**Tablica 6** Geometrijski i AIM topološki parametri vodikovih veza za najstabilnije konformere (zastupljenost > 5%) dipeptida **A**.

spoj	interakcija	prsten	$d(X-H\cdots Y) / \text{\AA}$	$d(X-H) / \text{\AA}$	$d(H\cdots Y) / \text{\AA}$	$\alpha(X-H-Y) / ^\circ$	H $\cdots$ Y				
							$\rho$	$\nabla^2\rho$	$H(r)$	$\varepsilon$	$-G(r)/V(r)$
<b>A1</b>	N(2)-H $\cdots$ O(3)	rvs- $\gamma$ (5)	2,65	1,02	2,19	105,4	0,0200	0,0848	0,0021	1,4200	0,0003
<b>A1</b>	N(1)-H $\cdots$ O(2)	rvs- $\beta$ (8)	3,00	1,02	2,03	158,0	0,0218	0,0701	-0,0003	0,0086	0,0003
<b>A1</b>	N(2)-H $\cdots$ N(3)	(5)	2,67	1,02	2,20	106,4	0,0212	0,0772	0,0015	0,4261	0,0003
<b>A2</b>	N(1)-H $\cdots$ O(4)	$\gamma$ (7)	2,96	1,02	2,07	145,3	0,0218	0,0671	-0,0006	0,0194	0,0003
<b>A2</b>	O(1)-H $\cdots$ N(3)	(10)	2,78	1,01	1,86	150,4	0,0405	0,0976	-0,0034	0,0197	0,0009
<b>A3</b>	N(2)-H $\cdots$ O(3)	rvs- $\gamma$ (5)	2,65	1,02	2,17	106,4	0,0206	0,0847	0,0019	0,9689	0,0003
<b>A3</b>	N(1)-H $\cdots$ O(2)	rvs- $\beta$ (8)	2,99	1,02	2,03	158,1	0,0221	0,0708	-0,0003	0,0082	0,0003
<b>A3</b>	N(2)-H $\cdots$ N(3)	(5)	2,68	1,02	2,23	104,8	0,0201	0,0746	0,0016	0,4906	0,0003
<b>A4</b>	N(3)-H $\cdots$ O(2)	$\beta$ (10)	3,01	1,02	2,34	122,7	0,0134	0,0472	0,0007	0,3366	0,0001
<b>A4</b>	O(1)-H $\cdots$ N(3)	(10)	2,82	1,00	1,91	149,2	0,0359	0,0888	-0,0027	0,0061	0,0007
<b>A4</b>	N(2)-H $\cdots$ O(1)	$\gamma$ (7)	2,90	1,01	2,17	127,5	0,0186	0,0661	0,0004	0,2402	0,0003
<b>A4</b>	N(1)-H $\cdots$ O(4)	$\gamma$ (7)	2,91	1,02	2,01	146,7	0,0247	0,0758	-0,0008	0,0139	0,0004
<b>A5</b>	N(1)-H $\cdots$ O(4)	$\gamma$ (7)	2,85	1,02	1,93	147,3	0,0289	0,0893	-0,0011	0,0138	0,0006
<b>A5</b>	N(2)-H $\cdots$ O(2)	$\gamma$ (7)	2,84	1,02	1,88	157,0	0,0321	0,1011	-0,0010	0,0177	0,0007
<b>A6</b>	N(2)-H $\cdots$ N(3)	(5)	2,65	1,02	2,14	109,1	0,0237	0,0824	0,0011	0,3131	0,0004
<b>A6</b>	O(1)-H $\cdots$ O(4)	(9)	2,72	0,99	1,73	174,3	0,0422	0,1343	-0,0011	0,0076	0,0012
<b>A7</b>	N(3)-H $\cdots$ O(2)	$\beta$ (10)	3,18	1,02	2,36	136,5	0,0116	0,0406	0,0007	0,1077	0,0001
<b>A7</b>	N(1)-H $\cdots$ O(4)	$\gamma$ (7)	2,91	1,02	2,01	146,0	0,0245	0,0753	-0,0008	0,0093	0,0004
<b>A7</b>	N(2)-H $\cdots$ N(3)	(5)	2,71	1,01	2,26	105,4	0,0188	0,0712	0,0017	0,5997	0,0002
<b>A7</b>	N(2)-H $\cdots$ O(1)	$\gamma$ (7)	3,08	1,01	2,32	130,6	0,0131	0,0492	0,0009	0,3869	0,0001

#### 4.2.4.2 Tripeptid B, L-AdGly-L-Ala-D-isoGln

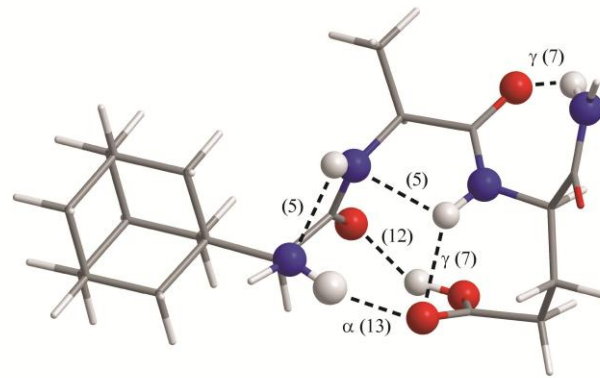
Najstabilnije konformere prikazuje Slika 19, a računom dobiveni podaci sadržani su u Tablicama 7 i 8. Za razliku od dipeptida **A**, u tripeptidu postoji dodatna aminokiselina s jednim potencijalnim donatorom, odnosno akceptorom vodika više. Prostorno velika adamantilna skupina mogla bi utjecati na strukturiranje peptida i obrasce vodikovih veza, a uvedena je ne bi li se proučio utjecaj na lipofilnost i adjuvantsku aktivnost sintetiziranog spoja.

**Tablica 7** Dipolni momenti, relativne energije i Boltzmannova raspodjela pri 298 K najstabilnijih konformera tripeptida **B** (zastupljeni > 1%).

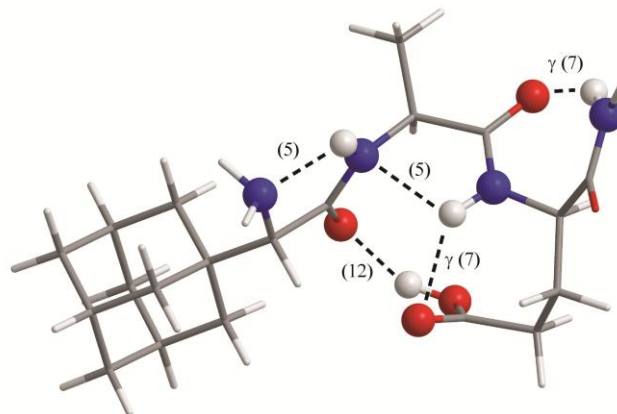
tripeptid	$\mu / D$	$\Delta E / \text{kJ mol}^{-1}$	Pop, %
<b>B1</b>	3,58	0,00	72,2
<b>B2</b>	4,45	4,96	9,8
<b>B3</b>	9,36	5,70	7,2
<b>B4</b>	5,90	6,10	6,1
<b>B5</b>	6,41	7,65	3,3

U Boltzmannovoj raspodjeli tripeptida **B** prevladava skupina od dva konformera sumarno zastupljenih više od 80% s vrlo sličnim obrascem vodikovih veza (**B1** 72% i **B2** 10%). Dipeptidni završetak strukturiran je na sličan način kao i druga skupina konformera spoja **A**. Dva  $\gamma$ -okreta (7-člana prstena) nastaju vodikovim vezama amino skupine bočnog ogranka *isoGln* i karbonilnog kisika Ala N(1)–H $\cdots$ O(4), odnosno između N atoma peptidne veze s karboksilnom skupinom N(2)–H $\cdots$ O(1).. U oba konformera (**B1** i **B2**) nastanu još tri vodikove veze: 12-člani prsten s O(1)–H $\cdots$ O(5), 5-člani prsten s N(2)–H $\cdots$ N(3) i 5-člani prsten s N(3)–H $\cdots$ N(4) vodikovom vezom. Kao što je kod dipeptida ostvarena vodikova veza između N i C kraja peptida, slično je opaženo i ovdje, ali samo kod najstabilnijeg konformera **B1**. Sada kao donor vodika sudjeluje amino skupina L-AdGly i tvori  $\alpha$ -okret (13-član prsten) s N(4)–H $\cdots$ O(2) vodikovom vezom. Najveća razlika u strukturi dva najstabilnija konformera (**B1** i **B2**) je torzijski kut koji definira rotaciju oko veze između karbonilnog i asimetričnog ugljika L-AdGly što utječe i na različito usmjerenje adamantilne skupine u prostoru. Sve opisane vodikove veze imaju vrijednosti topoloških parametara u skladu s predloženim Koch-Popelierovim literaturnim vrijednostima. Najkraće udaljenosti (od 2,6 Å do 2,7 Å) između donora i akceptora vodika uočene su kod 5-članih prstenova iako su kutovi relativno mali (od 105° do 113°).

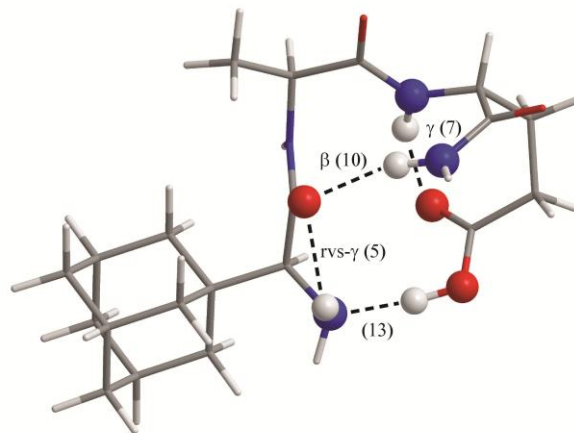




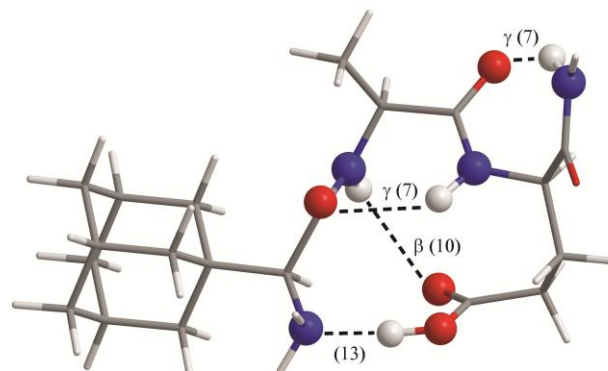
B1



B2



B3



B4

Slika 19 Najstabilniji konformeri tripeptida B (zastupljenost &gt; 5%).

**Tablica 8** Geometrijski i AIM topološki parametri vodikovih veza za najstabilnije konformere (zastupljenost > 5%) tripeptida **B**.

spoj	interakcija	prsten	$d(X-H\cdots Y) / \text{Å}$	$d(X-H) / \text{Å}$	$d(H\cdots Y) / \text{Å}$	$\alpha(X-H-Y) / ^\circ$	AIM		H $\cdots$ Y		$-G(r)/V(r)$
							$\rho$	$\nabla^2\rho$	$H(r)$	$\varepsilon$	
<b>B1</b>	N(1)-H $\cdots$ O(4)	$\gamma$ (7)	2,91	1,02	2,01	145,1	0,0242	0,0753	-0,0007	0,0078	0,0004
<b>B1</b>	N(2)-H $\cdots$ N(3)	(5)	2,78	1,01	2,32	105,9	0,0165	0,0663	0,0021	1,2953	0,0002
<b>B1</b>	N(3)-H $\cdots$ N(4)	(5)	2,65	1,02	2,16	107,8	0,0234	0,0814	0,0010	0,3053	0,0004
<b>B1</b>	N(2)-H $\cdots$ O(2)	$\gamma$ (7)	3,03	1,01	2,26	131,8	0,0144	0,0548	0,0011	0,5674	0,0001
<b>B1</b>	N(4)-H $\cdots$ O(2)	$\alpha$ (13)	3,15	1,02	2,36	133,2	0,0104	0,0412	0,0010	0,1571	0,0001
<b>B1</b>	O(1)-H $\cdots$ O(5)	(12)	2,72	0,99	1,80	152,7	0,0349	0,1129	-0,0008	0,0547	0,0009
<b>B2</b>	N(1)-H $\cdots$ O(4)	$\gamma$ (7)	2,92	1,02	2,03	144,9	0,0234	0,0727	-0,0007	0,0107	0,0004
<b>B2</b>	N(2)-H $\cdots$ N(3)	(5)	2,78	1,01	2,33	105,5	0,0164	0,0657	0,0021	1,2682	0,0002
<b>B2</b>	N(3)-H $\cdots$ N(4)	(5)	2,60	1,02	2,02	113,5	0,0302	0,0975	0,0000	0,1818	0,0006
<b>B2</b>	O(1)-H $\cdots$ O(5)	(12)	2,74	0,99	1,80	155,9	0,0346	0,1118	-0,0007	0,0476	0,0008
<b>B2</b>	N(2)-H $\cdots$ O(2)	$\gamma$ (7)	3,06	1,01	2,30	130,7	0,0136	0,0527	0,0014	0,9517	0,0001
<b>B3</b>	O(1)-H $\cdots$ N(4)	(13)	2,72	1,02	1,73	162,4	0,0532	0,1202	-0,0059	0,0140	0,0015
<b>B3</b>	N(2)-H $\cdots$ O(2)	$\gamma$ (7)	2,85	1,01	1,92	150,7	0,0287	0,0950	-0,0006	0,0206	0,0006
<b>B3</b>	N(4)-H $\cdots$ O(5)	rvs- $\gamma$ (5)	2,68	1,02	2,20	107,0	0,0195	0,0842	0,0020	1,6162	0,0003
<b>B3</b>	N(1)-H $\cdots$ O(5)	$\beta$ (10)	3,17	1,01	2,18	165,5	0,0152	0,0500	0,0001	0,0449	0,0002
<b>B4</b>	N(1)-H $\cdots$ O(4)	$\gamma$ (7)	2,95	1,02	2,07	144,1	0,0218	0,0678	-0,0006	0,0169	0,0003
<b>B4</b>	N(2)-H $\cdots$ O(5)	$\gamma$ (7)	3,24	1,01	2,40	139,3	0,0107	0,0392	0,0008	0,1977	0,0001
<b>B4</b>	N(3)-H $\cdots$ O(2)	$\beta$ (10)	3,14	1,01	2,58	114,4	0,0079	0,0306	0,0010	0,7239	0,0000
<b>B4</b>	O(1)-H $\cdots$ N(4)	(13)	2,70	1,02	1,70	167,0	0,0563	0,1261	-0,0068	0,0054	0,0017

**Tablica 9** Geometrijski i AIM topološki parametri vodikovih veza za najstabilnije konformere (zastupljenost > 5%) tetrapeptida **C**.

spoj	interakcija	prsten	$d(X-H\cdots Y) / \text{Å}$	$d(X-H) / \text{Å}$	$d(H\cdots Y) / \text{Å}$	$\alpha(X-H-Y) / ^\circ$	H $\cdots$ Y				
							$\rho$	$\nabla^2\rho$	$H(r)$	$\varepsilon$	$-G(r)/V(r)$
<b>C1</b>	N(4)-H $\cdots$ O(2)	$\alpha$ (13)	3,19	1,02	2,88	97,9	0,0060	0,0216	0,0005	0,2528	0,0000
<b>C1</b>	N(5)-H $\cdots$ O(2)	(16)	3,68	1,02	2,99	126,0	0,0026	0,0126	0,0008	0,6078	0,0000
<b>C1</b>	O(1)-H $\cdots$ O(5)	(12)	2,73	0,99	1,80	154,3	0,0343	0,1120	-0,0007	0,0499	0,0008
<b>C1</b>	N(3)-H $\cdots$ O(6)	$\gamma$ (7)	2,77	1,03	1,81	153,8	0,0375	0,1186	-0,0014	0,0210	0,0010
<b>C1</b>	N(2)-H $\cdots$ O(7)	(12)	3,08	1,02	2,35	128,2	0,0124	0,0429	0,0005	0,1078	0,0001
<b>C1</b>	O(7)-H $\cdots$ O(3)	(15)	2,78	0,98	1,85	174,8	0,0326	0,1007	-0,0013	0,0149	0,0007
<b>C1</b>	N(1)-H $\cdots$ O(4)	$\gamma$ (7)	2,98	1,02	2,13	138,9	0,0192	0,0605	-0,0003	0,0243	0,0002

Međutim, najveće vrijednosti elektronske gustoće i Laplaciana elektronske gustoće odgovaraju vodikovim vezama O(1)–H···O(5) s udaljenostima kisika oko 2,7 Å, ali većim kutom (od 153° do 156°). Obrasci vodikovih veza manje stabilnih konformera **B3** i **B4** prikazani su na Slici 19. U ovom slučaju vrijednosti elektronske gustoće i Laplaciana elektronske gustoće opet su najveće za O(1)–H···N(4) vodikove veze (13-člani prsten) i formalno su izvan predloženih literaturnih vrijednosti pri čemu je udaljenost između donora i akceptora vodika oko 2,7 Å, a udaljenost između akceptora (dušik) i vodika najmanja (oko 1,7 Å) od svih vrijednosti u modelnim spojevima.

#### 4.2.4.3 *Tetrapeptid C, L-Ser-L-AdGly-L-Ala-D-isoGln*

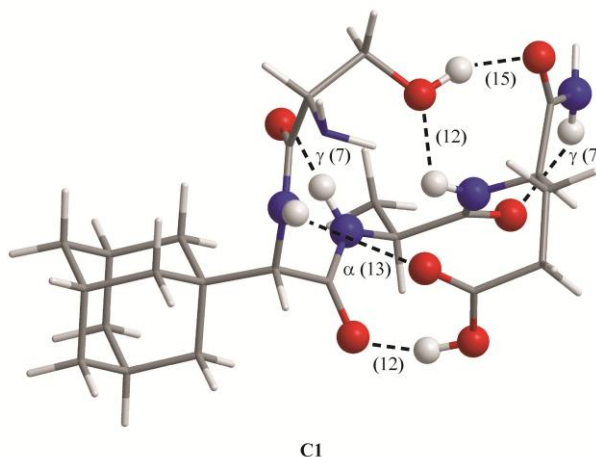
Posljednji proučavani modelni spoj je tetrapeptid **C**, koji se strukturno od tripeptida **B** razlikuje u dodanoj aminokiselini, L-Ser, na N-kraju. Na ovaj su način u strukturu uvedeni dodatni akceptor vodika, te dva potencijalna donora, amino i hidroksilna skupina. Slika 13 prikazuje numeriranje atoma, a rezultati konformacijske analize prikazani su grafički i tablično (Slika 20 i Tablica 10). Rezultati AIM analize s geometrijskim parametrima nalaze se u Tablici 9.

**Tablica 10** Dipolni momenti, relativne energije i Boltzmannova raspodjela pri 298 K najstabilnijih konformera tetrapeptida **C** (zastupljeni > 1%).

tetrapeptid	$\mu / D$	$\Delta E / kJ mol^{-1}$	Pop, %
<b>C1</b>	2,94	0,00	97,7
<b>C2</b>	3,55	9,97	1,7

U Boltzmannovoj raspodjeli konformera tetrapeptida **C** prevladava jedna struktura zastupljena više od 95% (**C1**) s obrascem od 6 vodikovih veza. U strukturi postoji već opisani  $\gamma$ -okret (7-člani prsten) između amino skupine bočnog ogranka *isoGln* i karbonilnog kisika Ala N(1)–H···O(4). Isto tako nastane 12-člani prsten s O(1)–H···O(5) vodikovom vezom uočen kod tripeptida. Sve tri NH skupine peptidnih veza sudjeluju u stvaranju vodikovih veza. Tako su formirani 12-člani prsten s N(2)–H···O(7), još jedan  $\gamma$ -okret (7-člani prsten) s N(3)–H···O(6) i  $\alpha$ -okret (13-člani prsten) s N(4)–H···O(2) vodikovom vezom. Hidroksilna skupina L-Ser sudjeluje u stvaranju 15-članog prstena s O(7)–H···O(3) vodikovom vezom. Sve opisane vodikove veze potvrđene su AIM teorijom. Međutim, AIM teorija pokazala je postojanje dodatne kritične točke za N(5)–H···O(2) vodikovu vezu u 16-članom prstenu iako je vrijednost Laplaciana

elektronske gustoće manja od literaturnih vrijednosti. S obzirom na veliku udaljenost između donora i akceptora vodika (oko 3,7 Å), ova interakcija nije klasificirana kao vodikova veza. Najkraće udaljenosti vodikovih veza (oko 2,8 Å) opažene su za najveće kutove (veće od 150°), što se slaže i s velikom elektronskom gustoćom u pripadajućoj kritičnoj točki, to su N(3)–H···O(6), O(1)–H···O(5) i O(7)–H···O(3) vodikova veza.



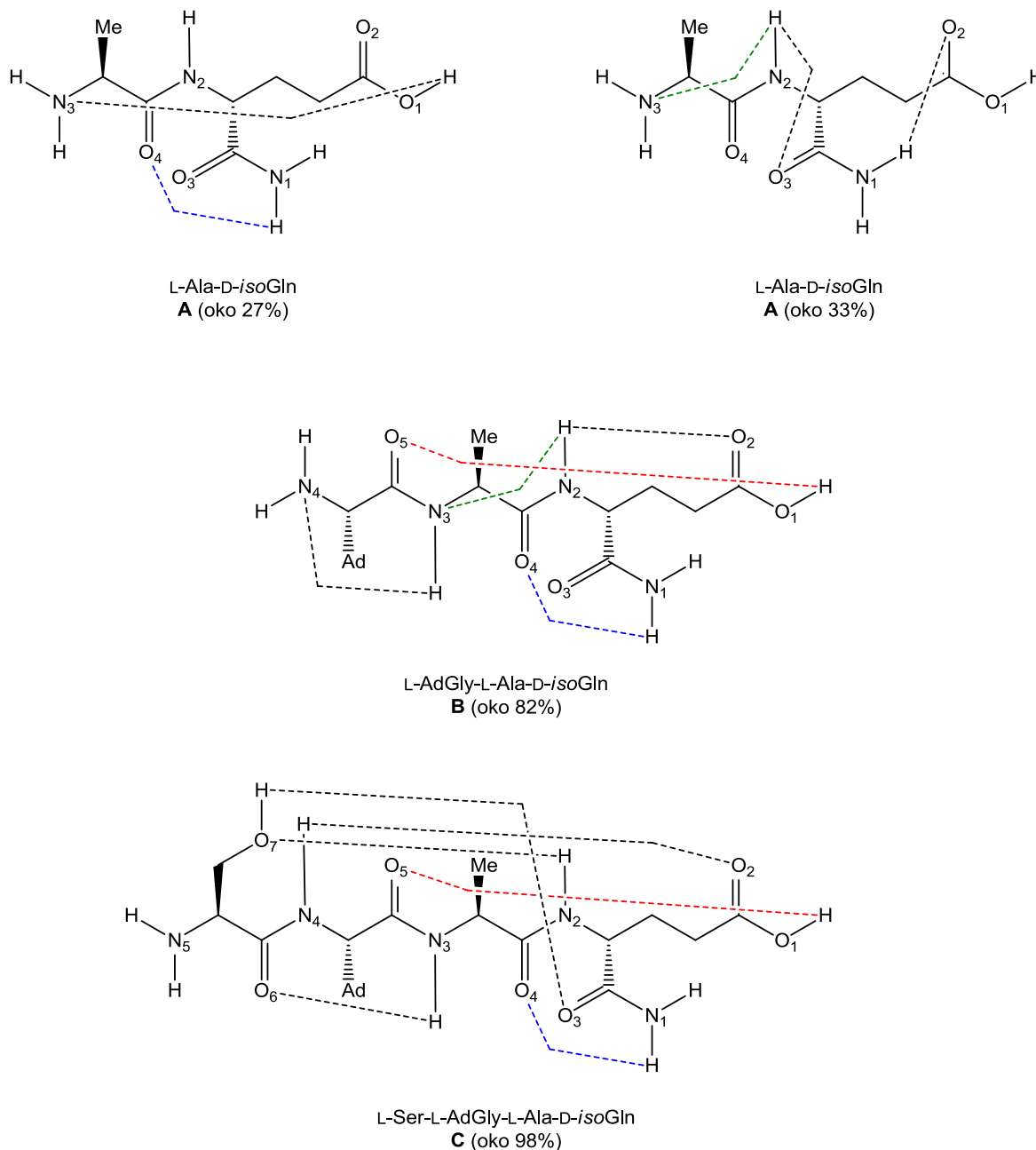
Slika 20 Najstabilniji konformeri tetrapeptida C (zastupljenost > 5%).

#### 4.2.4.4 Obrasci vodikovih veza u modelnim spojevima

Usporedbom obrazaca vodikovih veza najstabilnijih skupina konformera modelnih spojeva **A**, **B** i **C** može se vidjeti utjecaj strukturnih promjena na njihovo nastajanje. Rezultati su prikazani na Slici 21. U dipeptidu **A** opažene su dvije skupine konformera, a prikazane su samo vodikove veze koje se pojavljuju u cijeloj skupini. Jedna skupina ima karakteristični  $\gamma$ -okret (7-člani prsten, N(1)–H···O(4), plavo obojen). Jedino se ovaj motiv pojavljuje u sva tri peptida. U ovoj skupini postoji i interakcija C i N-kraja dipeptida, pri čemu karboksilna kiselina stvara 10-člani prsten s O(1)–H···N(3) vodikovom vezom. U peptidima **B** i **C** ista skupina također sudjeluje u stvaranju vodikovih veza. Druga skupina najstabilnijih konformera dipeptida **A** stvara karakterističnu N(2)–H···N(3) vodikovu vezu u 5-članom prstenu (zeleno obojen).

Vezanje treće aminokiseline, L-AdGly, sa sterički zahtjevnom adamantilnom skupinom uz  $\gamma$ -okret (7-člani prsten, N(1)–H···O(4), plavo obojen) ima istovremeno i 5-člani prsten (N(2)–H···N(3), zeleno obojen). Uvođenje terminalne amino skupine dovelo je do nastajanja dodatnog 5-članog prstena na isti način preko N(n)–H···N(n+1) vodikove veze. Karboksilna skupina sada više ne formira vezu s terminalnom amino skupinom, već 12-člani prsten (O(1)–H···O(5), crveno obojen) s karboksilnim kisikom novonastale peptidne veze.

Na kraju, vezanje četvrte aminokiseline, L-Ser, ne narušava već formirani  $\gamma$ -okret (7-člani prsten, N(1)–H $\cdots$ O(4), plavo obojen) i 12-člani prsten (O(1)–H $\cdots$ O(5), crveno obojen).



**Slika 21** Obrasci najčešće opaženih vodikovih veza opaženi u najstabilnijim konformerima peptida **A**, **B** i **C**.

Također je opažen sljedeći trend. Uvođenje treće aminokiseline utjecalo je na povećanje 10-članog prstena za dva atoma, umjesto O(1)–H $\cdots$ N(3) nastala je O(1)–H $\cdots$ O(5) vodikova veza u kojoj više ne sudjeluje dušik, nego karbonilni kisik peptidne veze. Na sličan način uvođenje četvrte aminokiseline utjecalo je na povećanje 5-članog prstena za dva atoma, umjesto N(3)–H $\cdots$ N(4) nastala je N(3)–H $\cdots$ O(6) vodikova

veza. Slično je i 5-člani prsten (N(2)–H···N(3), zeleno obojen) povećan na 12 atoma preko N(2)–H···O(7) vodikove veze.

Povećanjem složenosti strukture dolazi do nastajanja sve složenije mreže vodikovih veza koje dovode do stabilizacije peptida pri čemu jedan konformer postaje bitno stabilniji od drugih kao u slučaju tetrapeptida.  $\gamma$ -okret (7-člani prsten, N–H···O) ostaje očuvan u sva tri modelna peptida. Drugi motiv koji ostaje sačuvan je 12-člani prsten s O–H···O vodikovom vezom.

Ovako dobivena preliminarna istraživanja provedena su na nezwitterionskim oblicima peptida u vakuumu. Moguća poboljšanja u boljem opisu konformacijskog prostora i struktura najstabilnijih konformera mogla bi se postići korištenjem funkcionala koji bolje opisuju disperzne interakcije (prvenstveno vodikove veze) ili modeliranjem peptida u otapalu.

## 5 Zaključak

Prikazana je uspješna sinteza novog adamantil-tetrapeptida, L-seril-D,L-(adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutamina, potencijalno novog imunostimulatora. Polazni spoj u sintezi bio je benzilni ester Boc-L-Ala-D-*iso*Gln koji je nakon *N*-deprotekcije kondenziran s *N*-Boc-(adamant-1-il)glicinom (BocAdGly). BocAdGly prethodno je priređen u četiri sintetska koraka, polazeći od *bis*(etil-acetoacetato)kobalta (II) i 1-bromadamantana. Potpuno zaštićen adamantil-tetrapeptid dobiven je kondenzacijom benzilnog estera (adamant-1-il)tripeptida i *N*-Fmoc-*O*-benzil-L-serina. Posljednji korak bilo je katalitičko hidrogeniranje kojim su istovremeno uklonjene tri zaštitne skupine, *N*-Fmoc te benzilna esterska i eterska zaštita. Konačni produkt, L-seril-D,L-(adamant-1-il)glicil-L-alanil-D-izoglutamin, dobiven je u dobrom iskorištenju. Za stvaranje peptidnih veza korištena je karbodiimidna EDC × HCl/HOBt metoda.

Sintetizirani peptidi odabrani su kao modelni spojevi za konformacijsku analizu. Za pretraživanje konformacijskog prostora korištena je kombinacija molekulske (OPLS\_2005 i AMBER\* polja sila), te kvantne mehanike (B3LYP/6-31G\*) na skupu najstabilnijih konformera. Vodikove veze okarakterizirane su AIM metodom u skladu s Koch-Popelierovim kriterijama za njihov opis. Proučeni su obrasci vodikovih veza u dvije skupine konformera L-Ala-D-*iso*Gln, jednoj skupini konformera L-AdGly-L-Ala-D-*iso*Gln te najstabilnijem konformeru L-Ser-L-AdGly-L-Ala-D-*iso*Gln. Pokazalo se kako porast složenosti strukture uvođenjem dodatnih aminokiselina utječe na broj nastalih vodikovih veza. Strukturni motiv koji se pojavljuje u sva tri peptida je  $\gamma$ -okret (7-člani prsten) kojim je uglavljena struktura dipeptida N-H $\cdots$ O vodikovom vezom između amino skupine bočnog ogranka L-*iso*Gln i karbonilnog kisika Ala. Vodikova veza O-H $\cdots$ O između karboksilne skupine L-*iso*Gln i karbonilnog kisika L-AdGly druge peptidne veze u obliku 12-članog prstena karakteristična je za tripeptid i tetrapeptid. Uz navedene javlja se složena mreža ostalih vodikovih veza koje dovode do strukturiranja peptida i njegove stabilizacije.



## 6 Literatura

- <sup>1</sup> L. Szilagyi, P. Pristovček, *Mini-reviews Med. Chem.* **7** (2007) 861-870.
- <sup>2</sup> J. C. Cox, A. R. Coulter, *Vaccine* **15** (1997) 248-256.
- <sup>3</sup> K. N. Masihi, *Int. J. Antimicrob. Agents* **14** (2000) 181-191.
- <sup>4</sup> R. A. Goldsby, T. J. Kindt, B. A. Osborne, J. Kuby, *Immunology* 5. izd., W. H. Freeman and Company, New York, 2002.
- <sup>5</sup> K. D. Elgert, *Immunology: understanding the immune system*, Wiley-Liss, New York, 1996.
- <sup>6</sup> I. Azuma, *Trends Pharmacol. Sci.* **13** (1992) 425-428.
- <sup>7</sup> I. Azuma, *Int. J. Immunopharmacol.* **14** (1992) 487-496.
- <sup>8</sup> J. E. Frampton, *Paediatr. Drugs* **12** (2010) 141-153.
- <sup>9</sup> P. M. Anderson, M. Tomaras, K. McConnell, *Drugs Today (Barc.)* **46** (2010) 327-337.
- <sup>10</sup> D. Keglević, B. Ladešić, O. Hadžija, J. Tomašić, Z. Valinger, M. Pokorny, R. Nauminski, *Eur. J. Biochem.* **42** (1974) 389-400.
- <sup>11</sup> M. Krstanović, R. Frkanec, B. Vranešić, Đ. Ljevaković, V. Šporec, J. Tomašić, *J. Chromatogr.* **773** (2002) 167-174.
- <sup>12</sup> I. Hršak, J. Tomašić, M. Osmak, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **19** (1983) 681-686.
- <sup>13</sup> G. Sava, T. Giralidi, J. Tomašić, I. Hršak, *Cancer Immunol. Immunother.* **15** (1983) 84-86.
- <sup>14</sup> G. Sava, J. Tomašić, I. Hršak, *Cancer Immunol. Immunother.* **18** (1984) 49-53.
- <sup>15</sup> I. Hršak, J. Tomašić, K. Pavelić, Z. Valinger, *Z. Immun. Forsc.* **155** (1978) 312-318.
- <sup>16</sup> I. Hršak, J. Tomašić, *Period. Biol.* **88** (1986) 22-23.
- <sup>17</sup> J. Tomašić, I. Hršak, *Peptidoglycan monomer originating from Brevibacterium divaricatum – its metabolites and biological activities in the host*, u: E. Shrinner, M. H. Richmond, G. Seibert, G. Schwartz (ur.), *Surface structures of microorganisms and their interactions with mammalian host*, VCH, Weinheim, 1988, 113-112.
- <sup>18</sup> J. Tomašić, I. Hanzl-Dujmović, B. Špoljar, B. Vranešić, M. Šantak, A. Jovičić, *Vaccine* **18** (2000) 1236-1243.
- <sup>19</sup> B. Halassy, M. Krstanović, R. Frkanec, J. Tomašić, *Vaccine* **21** (2003) 971-976.
- <sup>20</sup> P. Lefrancier, E. Lederer, *Pure & Appl. Chem.* **59** (1987) 449-454.
- <sup>21</sup> S. Gobec, U. Urleb, *Molecules* **7** (2002) 394-404.
- <sup>22</sup> S. Gobec, M. Sollner-Dolenc, U. Urleb, B. Wraber, S. Simčič, M. Filipič, *Il Farmaco* **59** (2004) 345-352.
- <sup>23</sup> M. Flegel, J. Seifert, H. Farghali, K. Masek, M. Krojidlo, *Synthesis and pharmacological properties of adamantylamide analogs of muramyl-dipeptide* u: D. Therodopoulos (ur.), *Peptides*, Walter de Gruyter and Co. (1986) 561-564.
- <sup>24</sup> B. Vranešić, J. Tomašić, S. Smerdel, D. Kantoci, F. Benedetti, *Helv. Chim. Acta* **76** (1993) 1752-1758.
- <sup>25</sup> R. Ribić, L. Habjanec, B. Vranešić, R. Frkanec, S. Tomić, *Chem. Biodiv.*, doi: 10.1002/cbdv.201100232
- <sup>26</sup> T. Barman, *Enzyme handbook*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1969, 176.
- <sup>27</sup> J. Tomašić, I. Hanzl-Dujmović, B. Špoljar, B. Vranešić, M. Šantak, A. Jovičić, *Vaccine* **18** (2000) 1236-1243.
- <sup>28</sup> R. Ribić, L. Habjanec, R. Frkanec, B. Vranešić, S. Tomić, *Chem. Biodiv.* doi: 10.1002/cbdv.201200008

- <sup>29</sup> P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, 3rd ed.; Georg Thieme Verlag, New York, 2005.
- <sup>30</sup> V. Petrović-Peroković, *Predavanja iz Odabranih poglavlja u organskoj kemiji*, 2011.
- <sup>31</sup> M. Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 1984.
- <sup>32</sup> T. I. Al-Warhi, H. M. A. Al-Hazimi, A. El-Faham, *J. Saudi Cem. Soc.* (2011), doi:10.1016/j.jscs.2010.12006
- <sup>33</sup> R. Ribic, *Sinteze i biološke aktivnosti manoziliranih derivata 1-aminoadamantana, adamantil-tripeptida i peptidoglikan monomera*. Disertacija, (2011.) Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- <sup>34</sup> I. Kodrin, *Konformacijska analiza ferocenskih peptida*. Disertacija, (2011.) Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet
- <sup>35</sup> C. J. Cramer, *Essentials of Computational Chemistry*, 2<sup>th</sup> edition, John Wiley & Sons, Ltd, USA 2004.
- <sup>36</sup> F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry*, 2<sup>th</sup> edition, John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- <sup>37</sup> R.F.W. Bader, *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*, Oxford University Press, 1995.
- <sup>38</sup> P.L.A. Popelier, *Atoms in Molecules An Introduction*, Prentice Hall. 2000.
- <sup>39</sup> U. Koch, P. L. A. Popelier, *J. Phys. Chem.* **99** (1995) 9747-9754.
- <sup>40</sup> G. Chang, W. Guida, W. C. Still, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 4379-4386.
- <sup>41</sup> T. Solmajer, O. Planinšek, S. Srčić, *International Journal of Pharmaceutics* **199** (2000) 59-64.
- <sup>42</sup> R. Galezzi, M. Garavelli, A. Grandi, M. Monari, G. Porzi, S. Sandri, *Tetrahedron: Asymmetry* **14** (2003) 2639-2649.
- <sup>43</sup> R. Galezzi, D. Balducci, S. Crupi, F. Piccinelli, G. Porzi, S. Sandri, *Tetrahedron: Asymmetry* **16** (2005) 1103-1112.
- <sup>44</sup> Y. Boulanger, Y. Tu, V. Ratovelomanana, E. Purisima, S. Hanessian, *Tetrahedron*, **48** (1992) 8855-8868.
- <sup>45</sup> Vogel's, *Textbook of Practical Organic Chemistry*, Fourth ed., Longman, 1978.
- <sup>46</sup> P. G. Harris, R. P. Houghton, P. L. Taylor, *Polyhedron* **16** (1997) 2651-2658.
- <sup>47</sup> J. Clariana, S. García-Granda, V. Gotor, A. Gutiérrez-Fernández, A. Luna, M. Moreno-Manãs, A. Vallribera, *Tetrahedron: Asymmetry* **11** (2000) 4549-4557.
- <sup>48</sup> Maestro, version 9.1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011
- <sup>49</sup> MacroModel, version 9.8, Schrodinger, LLC, New York, NY, 2010.
- <sup>50</sup> F. Mohamadi, N. G. J. Richards, W. C. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Caufield, G. Chang, T. Henrickson, W. C. Still, *J. Comput. Chem.* **11** (1990) 440-467.
- <sup>51</sup> W. L. Jorgensen, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 1657-1666.
- <sup>52</sup> W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 11225-11236.
- <sup>53</sup> G. A. Kaminski, R. A. Friesner, J. Tirado-Rives, W. J. Jorgensen, *J. Phys. Chem.* **105** (2001) 6474-6487.
- <sup>54</sup> W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 5179-5197.
- <sup>55</sup> D. M. Ferguson, P. A. Kollman, *J. Comput. Chem.* **12** (1991) 620-626.
- <sup>56</sup> D. Q. McDonald, W. C. Still, *Tetrahedron Lett.* **33** (1992) 7743-7746.
- <sup>57</sup> Gaussian 09, Revision A.02, 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, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. 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, J. E. 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, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- <sup>58</sup> A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 5648-5652.
- <sup>59</sup> C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev.* **37** (1998) 785-789.
- <sup>60</sup> F. Biegler-König, J. Schönbohm, D. J. Bayles, *J. Comp. Chem.* **22** (2001) 545-559.
- <sup>61</sup> F. Biegler-König, J. Schönbohm, *J. Comp. Chem.* **23** (2002) 1489-1494.
- <sup>62</sup> R. D. Dennington II, T. A. Keith, J. M. Millam, GaussView 5.0, Wallingford, CT, 2009.
- <sup>63</sup> F. S. Gibson, S. C. Bergmeier, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **59** (1994) 3216-3218.
- <sup>64</sup> T. Maegawa, Y. Fujiwara, T. Ikawa, H. Hisashi, Y. Monguchi, H. Sajiki, *Amino Acids* **36** (2009) 493-499.
- <sup>65</sup> I. Kolossváry, W. C. Guida, *J. Comput. Chem.* **20** (1999) 1671-1684.
- <sup>66</sup> I. Kolossváry, W. C. Guida, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 5011-5019.

## 7 Životopis

### Osobni podaci:

Ime i prezime: Anamarija Butumović  
Datum i mjesto rođenja: 13. srpnja 1988., Beograd  
e-mail: [abutumovic@chem.pmf.hr](mailto:abutumovic@chem.pmf.hr)

### Obrazovanje:

2010. – diplomski Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Sveučilište u Zagrebu  
diplomski studij kemije 4,65 (17 položenih ispita)  
2007. – 2010. Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Sveučilište u Zagrebu  
preddiplomski studij kemije, prosjek ocjena 4,25 (36  
položenih ispita)  
završni rad: Biokemijski temelji metaboličkih bolesti,  
mentor: doc. dr. sc. Boris Mildner  
2003. – 2007. Opća gimnazija Nova Gradiška  
1995. – 2003. Osnovna škola Matija Antun Relković, Davor

**Jezici:** engleski, njemački, talijanski

**Stipendije:** Stipendija Općine Davor

**Sudjelovanje:** demonstrature u praktikumskoj nastavi organske kemije,  
ak. god. 2010./2011. i 2011./2012.  
Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Zagreb, 2011. i 2012.  
IX. Skup mladih kemijskih inženjera, Zagreb 2012.  
postersko izlaganje: Sinteza manoziliranih i  
galaktoziliranih adamantiltetrapeptida

**Osobni podaci:**

Ime i prezime: Marija Štivojević  
Datum i mjesto rođenja: 02. srpnja 1988., Pakrac  
e-mail: [mstivojevic@chem.pmf.hr](mailto:mstivojevic@chem.pmf.hr)

**Obrazovanje:**

2010. – diplomski                      Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Sveučilište u Zagrebu  
diplomski studij kemije 4,53 (17 položenih ispita)  
2007. – 2010.                      Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Sveučilište u Zagrebu  
preddiplomski studij kemije, prosjek ocjena 4,50 (36  
položenih ispita)  
završni rad: Utjecaj strukture na reaktivnost organskih  
kiselina i baza  
mentor: prof. dr. sc. Srđanka Tomić-Pisarović  
2003. – 2007.                      Opća gimnazija Novska  
1995. – 2003.                      Osnovna škola Novska

**Jezici:**                                      engleski, njemački

**Stipendije:**                                Stipendija Sisačko-moslavačke županije

**Sudjelovanje:**                            demonstrature u praktikumskoj nastavi organske kemije,  
ak. god. 2011./2012.  
Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Zagreb, 2011. i 2012.  
IX. Skup mladih kemijskih inženjera, Zagreb 2012.  
postersko izlaganje: Sinteza manoziliranih i  
galaktoziliranih adamantiltetrapeptida