Sinteza cikličkih peptida s ugrađenom muraminskom kiselinom na čvrstom nosaču

Vlahoviček-Kahlina, Kristina

Doctoral thesis / Disertacija

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:561167

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Kristina Vlahoviček-Kahlina

SOLID PHASE SYNTHESIS OF CYCLIC PEPTIDES CONTAINING MURAMIC ACID

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015.

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kristina Vlahoviček-Kahlina

SINTEZA CIKLIČKIH PEPTIDA S UGRAĐENOM MURAMINSKOM KISELINOM NA ČVRSTOM NOSAČU

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr.sc. Andreja Jakas

Zagreb, 2015.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Kristina Vlahoviček-Kahlina

SOLID PHASE SYNTHESIS OF CYCLIC PEPTIDES CONTAINING MURAMIC ACID

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Andreja Jakas, PhD

Zagreb, 2015.

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Andreji Jakas na odabiru teme, stručnom vodstvu, korisnim savjetima i raspravama te uloženom trudu i vremenu tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Veliko hvala tehničarki Milici Perc na susretljivosti i dragocjenoj pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela.

Zahvaljujem se svim članovima Laboratorija za kemiju ugljikohidrata, peptida i glikopeptida, dr. sc. Lidiji Varga-Defterdarović, dr. sc. Ivanki Jerić, dr. sc. Matiji Gredičaku, dipl. ing. Josipi Sud, dipl. ing. Lidiji Brkljačić i Višnji Čičić na pružanoj nesebičnoj pomoći, savjetima i podršci.

Hvala dr. sc. Ivanu Kosalcu za provedena antimikrobna ispitivanja te na uspješnoj suradnji i susretljivosti.

Hvala dr. sc. Ivi Piantanidi, dr. sc. Marijani Radić Stojković, dr. sc. Ivi Crnolatcu i dr. sc. Mariji Matković na pomoći za DNA ispitivanja te korisnim savjetima i intrepretaciji rezultata.

Hvala dr. sc. Marijeti Kralj za provedena antiproliferativna ispitivanja.

Hvala mr. sc. Željku Mariniću i ostalim članovima Centra za NMR na snimljenim NMR spektrima.

Od srca zahvaljujem svojim prijateljima Josipi, Matiji, Lidiji, Lari, Andreji, Danijelu, Kruni, Tihomiru na svim lijepim trenucima, iskrenom prijateljstvu, podršci i pomoći.

Na kraju, od srca zahvaljujem svojoj obitelji, posebno Marijanu na ljubavi, podršci i razumjevanju.

Kristina Vlahoviček-Kahlina

Sadržaj

SAŽETAK XIII
ABSTRACT XV

§ 1. UVOD 1
1.1. UVOD 1
1.2. CILJ RADA 2

§ 2. LITERATURNI PREGLED 4
2.1. CIKLIČKI PEPTIDI 4
2.1.1. Peptidni lijekovi 4
2.1.2. Dizajn potencijalnih peptidnih lijekova 4
2.1.3. Ciklički peptidi s antimikrobnom aktivnošću 7
2.1.3. Ciklički peptidi s antitumorskom aktivnošću 10
2.1.5. Sintetski lektini 11
2.1.6. Interakcija peptida s DNA 14
2.2. LSKL PEPTIDNA SEKVENCA 16
2.3. ŠEĆERNE AMINOKISELINE 18
2.3.1. Sinteza SAA i njihova ugradnja u peptidnu strukturu 19
2.3.2. Prirodne šećerne aminokiseline 25
2.4. SINTEZA PEPTIDA NA ČVRSTOM NOSAČU 28
2.4.1. Osnove sinteze peptida na čvrstom nosaču 28
2.4.2. Polimerni nosači 30
2.4.3. Načini zaštite reaktivnih skupina 31
2.4.3.1. Privremene zaštitne skupine 32
2.4.3.2. Trajne zaštitne skupine 32
2.4.4. Kondenzacijski reagensi 33
2.4.5. Sporedne reakcije 35

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO 37
3.1. MATERIJALI I METODE 37
3.2. SINTEZA ZAŠTIĆENE MURAMINSKE KISELINE 40

3.2.1. Benzil-2-acetamido-2-deoksi-α-D-glukopiranozid (2) 40
3.2.2. Benzil-2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-α-D-glukopiranozid (3) 41
3.2.3. Benzil-2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-*O*-[(*R*)-1-(karboksietil)]-α-D-glukopiranozid (4) 42
3.2.4. Benzil-2-amino-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-*O*-[(*R*)-1-(karboksietil)]-α-D-glukopiranozid (5) 43
3.2.5. Benzil-2-amino-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-*N*-9-fluerenilmetoksikarbonil-3-*O*-[(*R*)-1-(karboksietil)]-α-D-glukopiranozid (6) 44
3.2.6. (*S*)-2-klorpropionska kiselina (7) 45
3.3. SINTEZA GLIKOPEPTIDA 46
3.3.1. Automatska sinteza zaštićenih linearnih glikopeptida na čvrstom nosaču 46
3.3.2. Opći postupak priprave linearnih glikopeptida 51
3.3.3. Karakterizacija linearnih glikopeptida 53
3.3.3.1. Linearni glikopeptid H-Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-N^{ε}-Lys-Asn-OH (16) 53
3.3.3.2. Linearni glikopeptid H-Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ε}-Lys-Mur-Asn-OH (19) 54
3.3.3.3. Linearni glikopeptid H-N^{ε}-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-Asn-OH (22) 55
3.3.3.4. Linearni glikopeptid H-N^{ε}-Lys-Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn-OH (25) 56
3.3.3.5. Linearni glikopeptid H-Mur-N^{ε}-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn-OH (28) 57
3.3.3.6. Linearni glikopeptid H-Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ε}-Lys-Asn-OH (31) 58
3.3.4. Opći postupak priprave cikličkih glikopeptida 59
3.3.5. Karakterizacija cikličkih glikopeptida 61
3.3.5.1. Ciklički glikopeptid ciklo[Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ε}-Lys-Mur(OBn)-Asn] (36) 61
3.3.5.2. Ciklički glikopeptid ciklo[Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-N^{ε}-Lys-Asn] (34) 62
3.3.5.3. Ciklički glikopeptid ciklo[Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ε}-Lys-Mur-Asn] (37) 63
3.3.5.4. Ciklički glikopeptid ciklo[N^{ε}-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-Asn] (40) 64
3.3.5.5. Ciklički glikopeptid ciklo[N^{ε}-Lys-Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn] (43) 65
3.3.5.6. Ciklički glikopeptid ciklo[Mur-N^{ε}-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn] (46) 66
3.3.5.7. Ciklički glikopeptid ciklo[Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ε}-Lys-Asn] (49) 67
3.3.6. Sinteza obilježenog cikličkog glikopeptida za određivanje interakcije s DNA 68
3.3.6.1. Ciklički glikopeptid ciklo[Leu-Ser-Lys(Cy3.5)-Leu-Cy3.5-N$^{\varepsilon}$-Lys-Mur-Asn] (50) 68
3.4. ODREĐIVANJE ANTITUMORSKE AKTIVNOSTI 69
3.5. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI 70
3.6. ISPITIVANJA INTERAKCIJA CIKLIČKIH GLIKOPEPTIDA S DNA 71

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 72
4.1. UVOD 72
4.2. SINTEZA ZAŠTIĆENE MURAMINSKE KISELINE 73
4.3. SINTEZA GLIKOPEPTIDA 74

4.3.1. Automatska sinteza zaštićenih linearnih glikopeptida na čvrstom nosaču 76
4.3.2. Sinteza linearnih glikopeptida 78
4.3.4. Sinteza cikličkih glikopeptida 88
4.4. ODREĐIVANJE ANTITUMORSKE AKTIVNOSTI 97
4.5. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI 100
4.6. ISPITIVANJA INTERAKCIJA CIKLIČKIH GLIKOPEPTIDA S DNA 103
4.6.1. Promjena temperature mekšanja DNA 103
4.6.2. Ispitivanje interakcija fluorimetrijskom spektroskopijom 105
4.6.4. Ispitivanje interakcija CD spektroskopijom 107

§ 5. ZAKLJUČAK 108
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ 111
§ 7. LITERATURNI IZVORI 114
§ 8. ŽIVOTOPIS XVI

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

SINTEZA CIKLIČKIH PEPTIDA S UGRAĐENOM MURAMINSKOM KISELINOM NA ČVRSTOM NOSAČU

Kristina Vlahoviček-Kahlina
Laboratorij za sintezu ugljikohidrata, peptida i glikopeptida
Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb, Hrvatska

U okviru ove disertacije sintetizirana je knjižnica cikličkih peptida i njihovih linearnih analoga s muraminskom kiselinom (Mur) na različitim položajima u odnosu na biološki aktivnu sekvencu Leu-Ser-Lys-Leu (LSKL). Uzimajući u obzir da je muraminska kiselina dipeptidni izoster priprava ortogonalno Fmoc-zaštićene Mur, kao građevne jedinice za sintezu analoga prirodnih produkata na čvrstom nosaču, od posebne je praktične važnosti. Sinteza lineranih glikopeptida provedena je na čvrstom nosaču korištenjem Fmoc-strategije uz reagense *O*-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonijev heksaflorofosfat (HBTU)/1-hidroksibenzotriazol (HOBt) za standardne aminokiseline, te *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonijev heksafluorofosfat (HATU)/HOBt za ugradnju Mur, na instrumentu za automatsku sintezu peptida. Ciklički peptidi pripravljeni su tzv. glava-rep ciklizacijom linearnih peptida ručnom sintezom na čvrstom nosaču uz reagense HATU ili benzotriaz-1-il-oksitripirolidinfosfonijev heksafluorofosfat (PyBOP). Uklanjanjem peptida s čvrstog nosača dobiveni su glikopeptidi s benzilnom zaštitom na hidroksilnoj skupini C-1 položaja Mur, a nakon katalitičke hidrogenolize dobiveno je 6 linearnih heptapeptida, koji sadrže Asn (važan za vezanje na čvrsti nosač), sekvencu LSKL, te muraminsku kiselinu na različitim položajima (1, 2, 5, 6) koje izmjenjuje s Lys. Deprotekcijom je dobiveno i 6 cikličkih nezaštićenih heptapeptida u kojima je ciklizacija ostvarena preko karboksilne skupine Asn i amino skupine Mur, Lys (bočnog lanca) ili Leu. Provedena su biološka ispitivanja antiproliferativne aktivnosti sintetiziranih spojeva na humanim staničnim linijama karcinoma, antimikrobna aktivnost te interakcija s DNA.

(120 stranica, 42 slike, 21 shema, 9 tablica, 147 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: ciklički peptidi / muraminska kiselina / sinteza peptida na čvrstom nosaču

Mentor: Dr. sc. Andreja Jakas, zn. sur.
Ocjenitelji: Dr. sc. Ines Primožič, izv. prof.
Dr. sc. Andreja Jakas, zn. sur.
Dr. sc. Srđanka Tomić-Pisarović, red. prof.

Rad prihvaćen: 27. svibnja 2015.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

SOLID PHASE SYNTHESIS OF CYCLIC PEPTIDES CONTAINING MURAMIC ACID

Kristina Vlahoviček-Kahlina
Ruđer Bošković Institute, Bijenička 54, Zagreb

In frame of this dissertation the peptide libraries of cyclic peptide and their linear analogs containing muramic acid (Mur) in different positions, according to biologically active sequence Leu-Ser-Lys-Leu (LSKL), were synthesized. Taking into consideration that muramic acid is a dipeptide isoster, preparation of orthogonally Fmoc-protected Mur as a building block for solid phase synthesis of natural products is of particular practical importance. Synthesis of linear glycopetpide was obtained using Fmoc-strategy solid phase peptide synthesis with *O*-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylamonium hexafluorophosphat (HBTU)/1-benzotriazole (HOBt) reagents for standard amino acids and *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylamonium hexafluorophosphate (HATU)/HOBt for incorporation of Mur, on peptide synthesizer. Cyclic peptides were prepared according to the so called head-to tail cyclisation of linear peptides using manual synthesis on solid phase with HATU or benzotriaz-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) reagents. Cleavage of the peptide from solid phase gave glycopetides with benzyl protected hydroxyl group at C-1 position of Mur, which was followed by catalytic hydrogenolysis to give 6 linear heptapeptides which contain Asn (important for anchoring to resin), sequence LSKL, muramic acid on different positions (1, 2, 5, 6) which alternates with Lys. Deprotection gave 6 cyclic unprotected heptapeptides wherein the cyclization was accomplished via a carboxyl group of Asn and an amino group of Mur, Lys (side chain) or Leu. The effects on proliferation of different human tumor cell lines, antimicrobial activity and interaction with DNA of prepared compounds were investigated.

(120 pages, 42 figures, 21 schemes, 9 tables, 147 references, original in Croatian)

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

Keywords: cyclic glycopeptides / muramic acid / solid phase peptide synthesis

Supervisor: Dr. Andreja Jakas, Research Associate
Reviewers: Dr. Ines Primožič, Associate Professor
Dr. Andreja Jakas, Research Associate
Dr. Srđanka Tomić-Pisarović, Professor

Thesis accepted: May 27th, 2015

§ 1. UVOD

1.1. UVOD

Proteini i peptidi su aktivni sudionici bioloških procesa, a poremećaji u njihovoj funkciji mogu dovesti do niza kroničnih ili infektivnih oboljenja. S druge strane oni se mogu koristiti kao terapeutici, ali uz vrlo ograničenu primjenu zbog svojih brojnih nepovoljnih svojstava. Stoga je modificiranje peptidne strukture u svrhu optimizacije njihovih svojstava veliki izazov. Ciklizacija peptida povećava njihovu biološku aktivnost, enzimatsku stabilnost i rigidnost konformacije, te stoga ciklički peptidi imaju značajnu ulogu u dizajnu potencijalnih terapeutika. Uvođenje ugljikohidratne jedinice utječe na konformaciju peptida, te aktivnost i selektivnost peptida prema receptoru. Naime, ugljikohidrati smješteni na površini stanice posreduju u mnogim biološkim procesima koji uključuju stanično prepoznavanje, a glikopeptidi imaju mogućnost istovremenog stvaranja peptid-ugljikohidrat i ugljikohidrat-ugljikohidrat interakcija unutar jedne molekule. Šećerne aminokiseline su ugljikohidrati čiji piranozni ili furanozni prsten sadrži najmanje jednu amino te jednu karboksilnu skupinu pa se stoga kao aminokiselinska građevna jedinica mogu ugraditi u peptidni kostur.

Od pronalaska prvog antibiotika penicilina do danas stalna je borba između dramatičnog porasta rezistencije na postojeće i razvoja novih antimikrobnih lijekova. Oni bi trebali izbjeći sve moguće mehanizme rezistencije bakterija, kojih je zbog često neracionalne antimikrobne terapije sve više. Koncept razvoja antibakterijskih lijekova vrlo je jednostavan: naći lijek koji zaustavlja rast bakterija ili ih uništava, a u isto vrijeme ne šteti inficiranoj osobi. Međutim, nije jednostavno zadovoljiti ove kriterije. U nastojanju da se riješe prijetnje mikrobiološke otpornosti na antibiotike, znanstvenici koriste nekoliko strategija, a jedna od njih bazira se na razvoju peptidnih antibiotika.

Antimikrobni peptidi (AMP) su zanimljivi kao nova generacija antibiotika. Obuhvaćaju širok izbor strukturnih motiva. Amfipatičnost igra ključnu ulogu u aktivnosti antimikrobskih peptida, a njihov mehanizam djelovanja određen je različitim fizikalno-kemijskim svojstvima: dužinom sekvence, nabojem, hidrofobnosti, strukturom (uključujući sekundarne strukture, dinamiku i orijentaciju), oligomerizacijom, koncentracijom peptida i

kompozicijom membrane. Provode se mnoga istraživanja s ciljem razumijevanja načina na koji djeluju. Iako nije do kraja razjašnjen mehanizam kojim uništavaju bakterije, pokazalo se da interakcija peptida s lipidnom membranom vodi povećanju propusnosti membrane, a time i uništenju bakterije. Važnu skupinu čine kationski antimikrobni peptidi koji su snažni inhibitori rasta širokog spektra mikroorganizama, ali imaju citotoksični učinak.

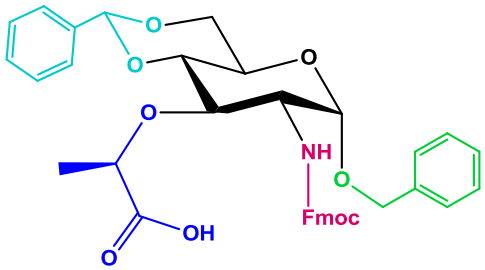
Fizikalna i kemijska svojstava nukleinskih kiselina te njihove interakcije s drugim kemijskim spojevima predmet su znanstvenih istraživanja današnjice. Glavni razlozi intenzivnog istraživanja spomenutog područja usmjereni su na razjašnjenje osnove djelovanja prirodnih i sintetskih lijekova koji se vežu na DNA. Peptidi koji stupaju u interakciju s dvostrukom uzvojnicom molekule DNA u određenom i specifičnom području, mogu biti korisni u liječenju različitih bakterijskih, viralnih, a danas naročito raširenih tumorskih bolesti.

Metode sinteze peptida mogu se podijeliti u dvije kategorije: sinteza u otopini i sinteza na čvrstoj fazi. Klasična metoda sinteze peptida u otopini uključuje pripremu potpuno zaštićenih peptidnih segmenata te njihovu kondenzaciju, dok sinteza peptida na čvrstom nosaču koristi netopljivi polimerni nosač za sekvencijonalnu adiciju zaštićenih aminokiselina.

1.2. CILJ RADA

U okviru ove doktorske disertacije sintetizirana je knjižnica cikličkih peptida i njihovih linearnih analoga sa SAA (engl. *sugar amino acid*) na različitim položajima u odnosu na biološki aktivnu sekvencu Leu-Ser-Lys-Leu (LSKL) s ciljem pronalaska biološki aktivnih spojeva.

U prvom dijelu disertacije opisana je sinteza ortogonalno zaštićene muraminske kiseline (Slika 1) za sintezu peptida na čvrstom nosaču Fmoc-strategijom. Muraminska kiselina (Mur) je jedna od komponenata bakterijskog staničnog zida. Svrstavamo je u prirodne šećerne aminokiseline te se može upotrijebiti kao dipeptidni izoster u sintezi peptida.



Slika 1. Zaštićena muraminska kiselina

U drugom dijelu disertacije, posvećene sintezi peptida na čvrstom nosaču (engl. *solid phase peptide synthesis*, SPPS), opisana je sinteza cikličkih glikopeptida i njihovih linearnih analoga (Slika 2). Prikladno zaštićena muraminska kiselina ugrađena je na različite položaje u odnosu na LSKL sekvencu. Sinteza na čvrstom nosaču uključivala je dvije faze: 1. sinteza zaštićenih linearnih peptida na instrumentu za automatsku sintezu peptida i 2. ciklizacija peptida na čvrstom nosaču ručno u reakcijskoj posudi.

H-Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-*N*$^{\varepsilon}$-Lys-Asn-OH	**Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-*N*$^{\varepsilon}$-Lys-Asn**
H-Leu-Ser-Lys-Leu-*N*$^{\varepsilon}$-Lys-Mur-Asn-OH	**Leu-Ser-Lys-Leu-*N*$^{\varepsilon}$-Lys-Mur-Asn**
H-*N*$^{\varepsilon}$-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-Asn-OH	**N$^{\varepsilon}$-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-Asn**
H-*N*$^{\varepsilon}$-Lys-Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn-OH	**N$^{\varepsilon}$-Lys-Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn**
H-Mur-*N*$^{\varepsilon}$-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn-OH	**Mur-*N*$^{\varepsilon}$-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn**
H-Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-*N*$^{\varepsilon}$-Lys-Asn-OH	**Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-*N*$^{\varepsilon}$-Lys-Asn**

Slika 2. Linearni i ciklički glikopeptidi

U trećem dijelu doktorske disertacije provedena su biološka ispitivanja:

- antiproliferativne aktivnosti na humanim staničnim linijama karcinoma: HCT 116 (debelo crijevo) i H 460 (pluća).
- antimikrobne aktivnosti na testnim sojevima vrsta: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 te *Microsporum gypseum* FBF 10570.
- interakcija cikličkih glikopeptida s ctDNA.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. CIKLIČKI PEPTIDI

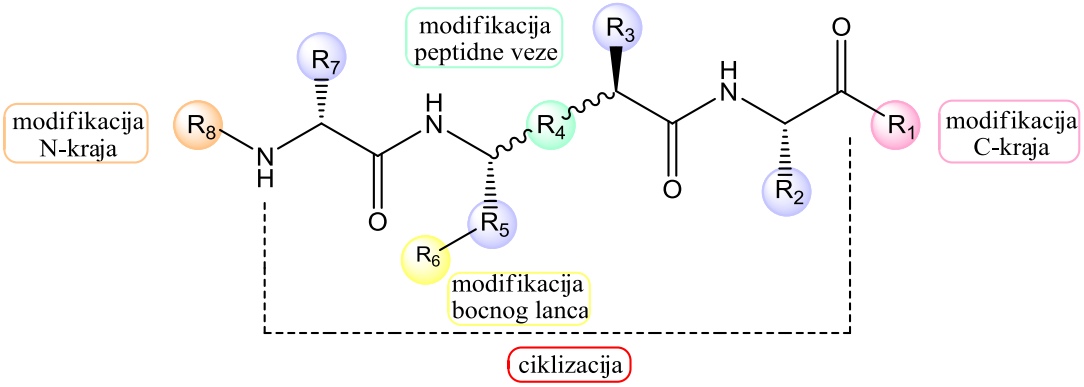
2.1.1. Peptidni lijekovi

Peptidi i proteini su spojevi od velike važnosti i čitav niz bioloških procesa ovisi o njihovom pravilnom funkcioniranju. Dok se neki peptidi i proteini koji se nalaze u ljudskom organizmu uspješno mogu upotrijebiti kao lijekovi bez ikakve modifikacije, drugi su kao lijekovi neupotrebljivi. Razlog tome leži u čitavom spektru nepovoljnih farmaceutskih i biofarmaceutskih osobina peptida. Najvažniji limit za primjenu nativnih peptida kao lijekova je njihova brza razgradnja. Odnosno, vrlo često peptidi ne stignu do svojih konačnih odredišta zbog djelovanja proteolitičkih enzima. Osim toga, peptidi su vrlo fleksibilne molekule što omogućuje interakciju s različitim receptorima, zbog čega se javljaju nepoželjne nuspojave. Polarni karakter peptida otežava njihov prolazak kroz staničnu membranu i krvno-moždanu granicu. Svi ovi čimbenici utječu na prijenos peptida i u konačnosti na njihovu dostupnost u organizmu. Stoga se ulažu ogromni napori u istraživanja koja bi trebala pronaći rješenje za navedene nedostatke peptida. Zahtjevi za modificiranim peptidima s unaprijeđenim farmakodinamičkim i farmakokinetičkim svojstvima (povećana djelotvornost, selektivnost, metabolička stabilnost, bolja bioraspoloživost, smanjena toksičnost) doveli su do razvoja peptidomimetika.[1-4]

2.1.2. Dizajn potencijalnih peptidnih lijekova

Poznavanje strukturnih karakteristika koje utječu na topljivost peptida, njegovu konformaciju, stabilnost i prijenos preko bioloških membrana prvi su korak u dizajnu peptidnih lijekova.[1-5] Klinička primjena biološki aktivnih peptida omogućena je njihovim modifikacijama: uvođenje neprirodnih aminokiselina, promjena kiralnosti uvođenjem D-

aminokiselina, supstitucija funkcijskih skupina u bočnim lancima, uvođenje skupina na amino ili karboksilni kraj te ciklizacija peptida (Slika 3).[5]

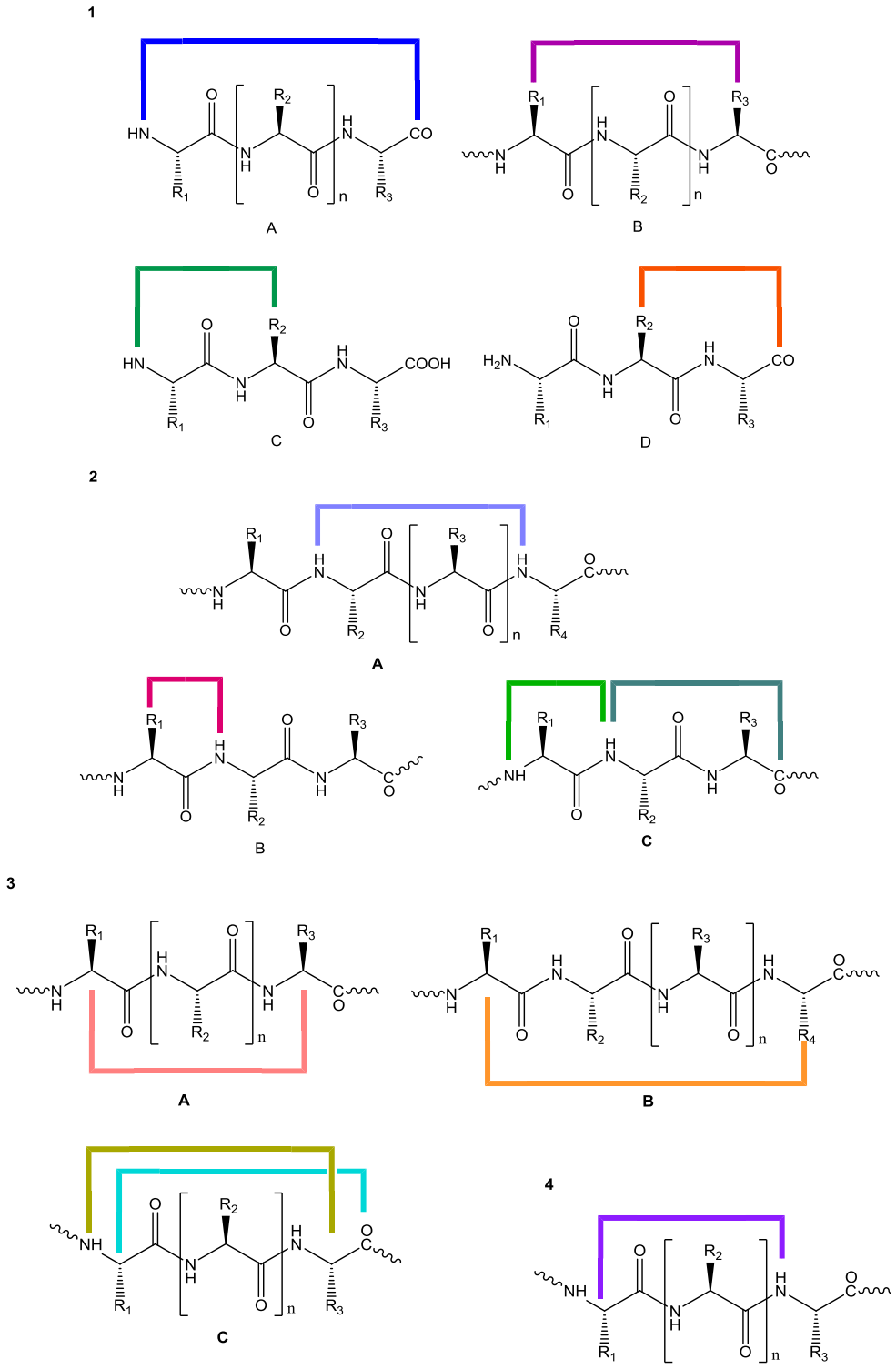


Slika 3. Modifikacije peptida

Za prijenos peptidnog lijeka u organizmu potrebna je topljivost u vodi, što je u izravnoj vezi s njegovom polarnošću. Supstitucija funkcijskih skupina u bočnim lancima, zamjena osnovne neprirodnom aminokiselinom ili ugradnja D-aminokiseline utječe na lipofilnost peptida. Mala stabilnost peptida koja je rezultat djelovanja peptidaza može se poboljšati zaštitom terminalnih amino i karboksilnih skupina, modifikacijom određenih peptidnih veza ili uvođenjem D-aminokiselina. Uvođenjem strukturnih elemenata koji mogu ograničiti fleksibilnost peptida doprinosi se povećanoj aktivnosti i selektivnosti za određeni receptor.[1-4]

Ciklizacija se povoljno odražava na metaboličku stabilnost, smanjuje stupanj slobode i makrociklička molekula poprima konformacijski rigidnu strukturu kojom se minimizira vezanje na neželjene receptore istovremeno povećavajući afinitet za ciljani receptor.[1]

Ciklički peptidi mogu se podijeliti u četri klase ovisno o načinu ciklizacije: 1. ciklizacije koje ne uključuju okosnicu peptida (Slika 4.1), 2. ciklizacije koje uključuju amidni dušik iz okosnice peptida (Slika 4.2), 3. ciklizacije koje uključuju α-ugljik iz okosnice peptida (Slika 4.3) te 4. ciklizacije između amidnog dušika i α-ugljika iz okosnice (Slika 4.4). Najčešći oblik ciklizacije je glava-rep (engl. *head-to-tail*) u kojem dolazi do nastajanja laktama između krajnje karboksilne i amino skupine (Slika 4.1.A).[6,7]



Slika 4. Klase cikličkih peptida: 1) A) glava-rep, B) bočni lanac-bočni lanac, C) bočni lanac-glava, D) bočni lanac-rep; 2) A) *N*-okosnica-*N*-okosnica, B) *N*-okosnica-bočni lanac, C) *N*-okosnica-rep; 3) A) C-C-okosnica, B) C-okosnica-bočni lanac, C) C-okosnica-rep; 4) C-*N*-okosnica.

Počeci sinteze cikličkih peptida temelje se na potrebi strukturnog dokazivanja prirodnih spojeva.[8] Premda je to još uvijek glavni razlog njihove priprave, velika se nada polaže u cikličke analoge kao prikladne poveznice na putu od biološki aktivnih peptida do peptidomimetika i potom do aktivnih farmakofora.[9]

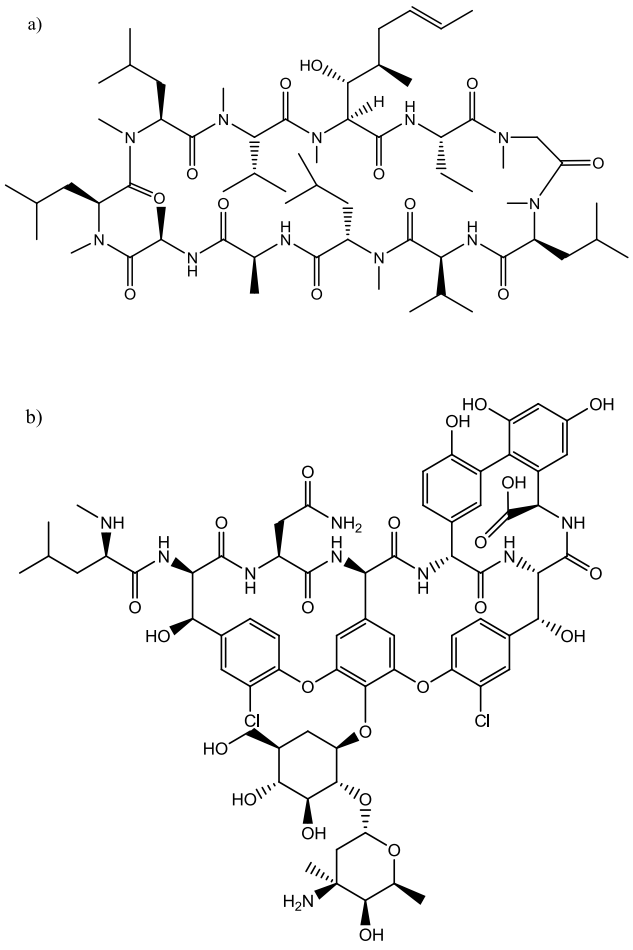
Ciklički peptidi kao mimetici β-plohe dizajniraju se tako da nadomjeste nedostatke prirodnih peptida istovremeno oponašajući njihove sekundarne strukture, pa tako ostvaruju poboljšanu biološku aktivnost. Zanimljivi su upravo radi niza pozitivnih svojstava kao što je antimikrobna i antitumorska aktivnost.

2.1.3. Ciklički peptidi s antimikrobnom aktivnošću

Antimikrobni peptidi (AMP) kao nova generacija antibiotika obuhvaćaju širok izbor strukturnih motiva. Amfipatičnost igra ključnu ulogu u aktivnosti antimikrobnih peptida, a njihov mehanizam djelovanja određen je različitim fizikalno-kemijskim svojstvima: dužinom sekvence, nabojem, hidrofobnosti, strukturom (uključujući sekundarne strukture, dinamiku i orijentaciju), oligomerizacijom, koncentracijom peptida i kompozicijom membrane.[10-11] Provode se mnoga istraživanja s ciljem razumijevanja načina na koji djeluju. Iako nije do kraja razjašnjen mehanizam kojim uništavaju bakterije, pokazalo se da interakcija peptida s lipidnom membranom vodi povećanju propusnosti membrane. Neki antimikrobni peptidi ostvaruju neku vrstu interakcija sa staničnom membranom bakterija i time ometaju izgradnju unutarnje ili vanjske bakterijske membrane što uzrokuje smrt stanice. Dok drugi peptidi mogu proći kroz staničnu membranu i djeluju na neki cilj unutar stanice. Interakcija ovih peptida s biološkim membranama ne ovisi samo o građi peptida nego i o lipidima koje sadržava sama stanična membrana. Nije vjerojatno da tako široka skupina relativno strukturno različitih peptida ima jedan mehanizam djelovanja.[10-14]

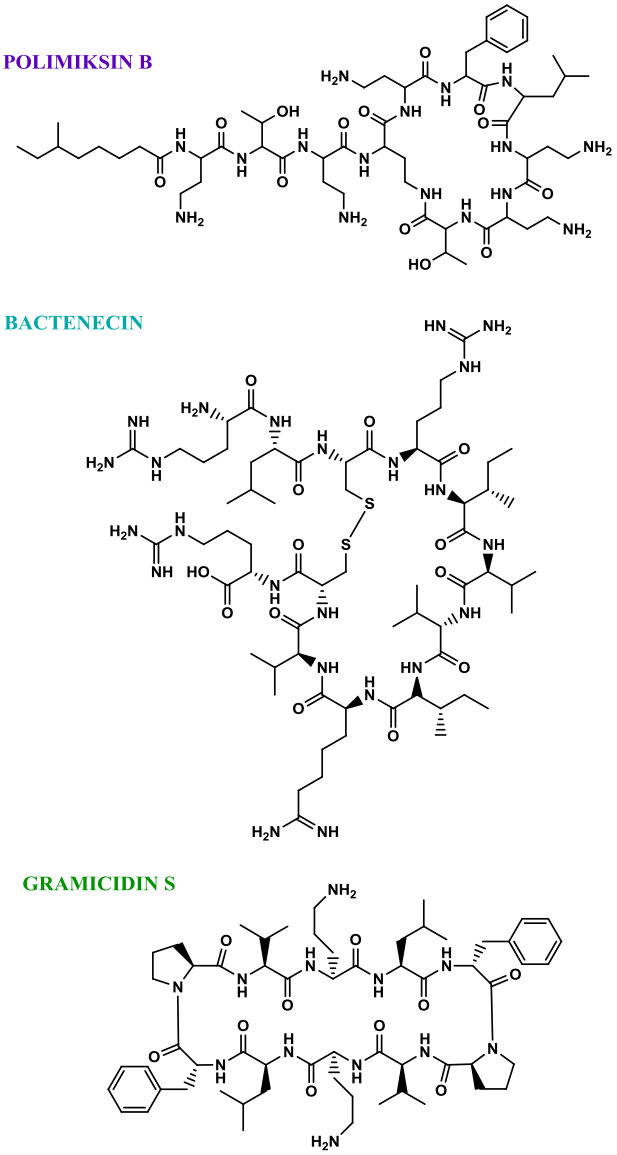
Značajnu skupinu antibiotika čine ciklički peptidi. Ciklosporin A (Slika 5a) je ciklički peptid izoliran iz metabolita gljivice *Tolypocladium inflatum*. Otkriveno je da navedena molekula ima svojstva snažnog imunosupresanta. Najvažnija upotreba navedenog lijeka je kod transplatacije organa gdje sprečava reakciju imunološkog sustava te smanjuje mogućnost odbacivanja presađenih organa. Mehanizam djelovanja navedenog peptida temelji se na supresiji signala koji su nužni za aktiviranje T-stanica.[15]

Vankomicin (Slika 5b) je ciklički glikopeptid izoliran iz mikroorganizma *Amycolatopsis orientalis* koji pokazuje antibiotička svojstva na Gram-pozitivne bakterije, i smatra se zadnjom opcijom u liječenju kada se ostali antibiotici pokažu nedjelotvorni. Sama molekula djeluju na način da sprječava sintezu poliglikanske stanične stijenke Gram-pozitivnih bakterija čime spriječava i njihov rast. Za razliku od pencilina i cefalosporina koji također utječu na izgradnju stanične stijenke, vankomicin djeluje na drugi fragment stanične stijenke pa tako uništava i bakterije koje su se pokazale rezistentne na prije navedne antibiotike. Molekula se veže na prekursor stanične stijenke i time uzrokuje raspad stanice (lizu). Također, molekula je u stanju proći kroz staničnu stijenku bakterijske stanice i utječe na sintezu bakterijske RNA.[15]



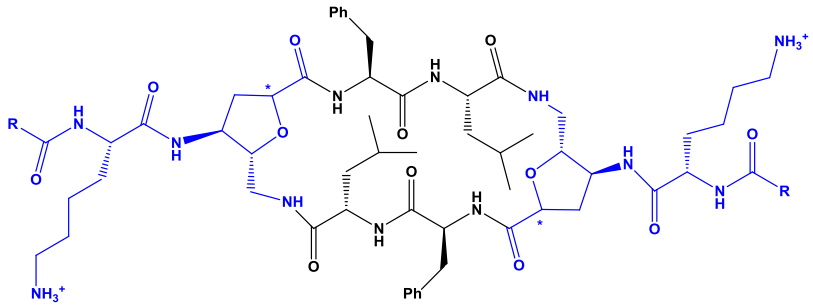
Slika 5. Antibakterijski lijekovi: a) ciklosporin, b) vankomicin

Važnu skupinu čine kationski antimikrobni peptidi (CAP) koji su snažni inhibitori rasta širokog spektra mikroorganizama, ali imaju citotoksični učinak. Ovi peptidi sadrže višak lizina i arginina, i mogu biti α-spiralni i β-zavijeni peptidi s ili bez disulfidnih mostova. Mjesto djelovanja mnogih od ovih peptida je citoplazmatska membrana, gdje se peptidi slažu formirajući pore ili kanale. Selektivnost ovih peptida za bakterijske stanice temelji se na razlici u sastavu bakterijskih i eukariotskih membrana. Prednost im je da su baktericidni, razvoj rezistencije je ekstremno nizak i aktivni su protiv rezistentnih bakterija na druge antibiotike. Skupinu cikličkih kationskih peptida čini niz antobiotika od kojih su polimiksin B, bactenecin i gramicidin S prikazani na slici 6.[16]



Slika 6. Antimikrobni cikilčki peptidi

Pored spomenutih priređene su i nove serije cikličkih kationskih antimikrobnih peptida (Slika 7) s ugrađenom šećernom kiselinom i njihove verzije vezane na zlatne nanočestice (nosač). Peptidi povezani s nanočestičnim nosačima pokazuju povećanu učinkovitost djelovanja na mikroorganizme i manju citotoksičnost u usporedbi s običnim peptidima.[17]



Slika 7. Ciklički peptid s ugrađenom SAA

2.1.4. Ciklički peptidi s antitumorskom aktivnošću

Antimikrobni peptidi pokazuju veliki potencijal kao lijekovi za razne tipove tumora radi svog citotoksičnog učinak prema raznim humanim tumorskim stanicama poput tumora dojke, mjehura, pluća i jajnika.[18] Nadalje, antimikrobni peptidi imaju drugačiji mehanizam djelovanja od trenutno dostupnih antitumorskih lijekova, a također pokazuju manju citotoksičnosti prema eukariotskim stanicama.[18]

Antimikrobni peptidi mogu djelovati na tumorske stanice na način da ometaju izgradnju stanične membrane svojim ugrađivanjem ili stvaranjem transmembranskih pora. Zahvaljujući mehanizmu djelovanja tumorske stanice teško mogu postati rezistentne na navedene peptide. Naime, potencijalna rezistencija bi zahtijevala velike promjene u građi stanične membrane tumorske stanice koje se teško mogu dogoditi u relativno kratkom vremenu. Također, postoje brojni dokazi da alternativni mehanizam djelovanja nekih vrsta navedenih peptida uključuje prodiranje u stanice kroz membranu te djelovanje na unutarstanične organele poput mitohondrija ili na nukleinske kiseline te dovodi do stanične smrti.[18-22]

Dobar primjer navedenog su klinička ispitivanja upotrebe cikličkog peptida kahalalid F kao lijeka za više vrsta tumora te upotreba novih antitumorskih peptidnih imunoterapija, poput cijepiva na bazi peptida.[18]

Peptidi se mogu podijeliti u dvije glavne skupine na temelju svog antitumorskog djelovanja. Prva skupina uključuje peptide koji su veoma učinkoviti prema bakterijskim i tumorskim stanicama, ali ne i prema ostalim stanicama sisavaca. U drugu skupinu spadaju peptidi koji su toksični prema bakterijama, stanicama raka i ostalim stanicama sisavaca. Elektrostatsko privlačenje pozitivno nabijenih peptida i negativno nabijene stanične membrane bakterijskih i tumorskih stanica ima ključnu ulogu u djelovanju navedenih peptida te omogućuje ignoriranje mehanizama rezistencije koji postoje u navedenim stanicama. Međutim, nije u potpunosti jasno zašto neki CAP ubijaju stanice tumora dok drugi ne pokazuju sličnu aktivnost. Također, djelovanje CAP na unutar stanične organele pokazuje sve veću važnost u efikasnosti njihovog antitumorskog djelovanja.[20] Peptidomimetički pristup u kombinaciji s novim sintetskim metodama omogućuje rješavanje barem dijela navedenih problema.

2.1.5. Sintetski lektini

Proteini koji stupaju u nekovalentnu interakciju s ugljikohidratima rasprostranjeni su u prirodi. To su primjerice specifični enzimi za ugljikohidrate i antitijela nastala kao odgovor imunog sustava na ugljikohidratne antigene. Lektini spadaju u proteine specifične za ugljikohidrate koji se vežu na mono- i oligosaharide reverzibilno s visokom selektivnošću, ali nemaju katalitičku aktivnost poput enzima i ne izazivaju imuni odgovor kao antitjela. Aktivni dio lektina koji veže šećer naziva se CRD domena (engl. *carbohydrate-recognition domain*). Poznato je da su nekovalentne interakcije ugljikohidrata i lektina, iako slabe, visoko specifične, a nastaju stvaranjem vodikovih veza i hidrofobnih interakcija.[23-26]

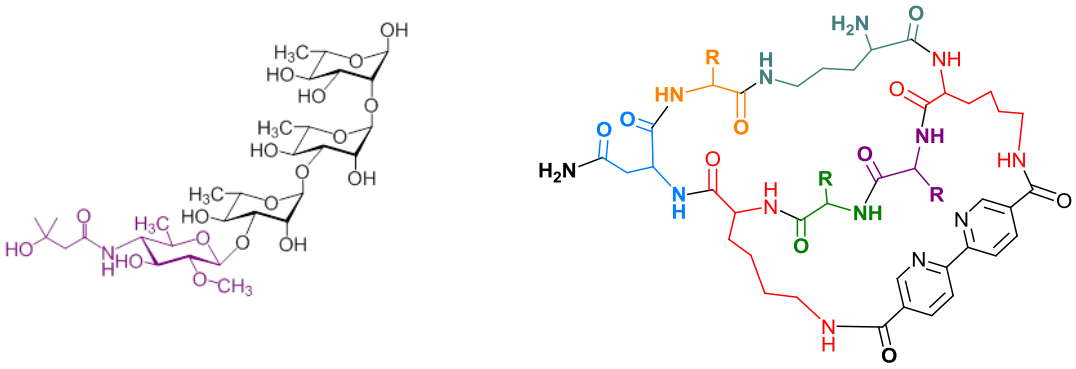
Lektini postoje u nizu organizama, od virusa i bakterija do biljaka i životinja. Prvi čisti izolirani lektin, konkanavalin A, izolirao je Sumner 1919. te je također pokazao i njegovu selektivnost za manozu.[27,28] Prema svom afinitetu za monosaharidni ligand, lektini se mogu klasificirati u pet skupina: lektine specifične za manozu, galaktozu/*N*-acetilgalaktozamin, *N*-acetilglukozamin, fruktozu, *N*-acetilneuraminsku kiselinu.[27] U današnje vrijeme istraživanja interakcije lektin-ugljikohidrat usmjerena su na njihovu ulogu u međustaničnom prepoznavanju preko proučavanja ugljikohidrata u otopini i na površini stanica.[28,29]

S obzirom na velik broj različitih lektina na raspolaganju, lektinski mikročipovi mogu nam pružiti informacije o glikomu korištenjem metode „velike propusnosti“ (high-

throughput) što je osobito korisno u određivanju glikana koji nastaju kod zaraznih bolesti. Međutim, još se moraju riješiti mnogi tehnički problemi, kao što su standardizacija potrebna za kliničku uporabu, razvoj pročišćenih rekombinantnih lektina i bolje definiranje specifičnosti mnogih lektina.[30,31] Razvoj učinkovitih i selektivnih sintetičkih lektina veliki je izazov, a posebno ako se temelje ugljikohidrat-ugljikohidrat prepoznavanju, jer je selektivnije i specifičnije od ugljikohidrat-peptid prepoznavanja. Pronađena interakcija ugljikohidrat-ugljikohidrat između dvije iste ugljikohidratne komponente (dvije sialične kiseline Le^x-Le^x (Lewis X)[32]) predstavlja osnovu za dizajn lektina s ugrađenom ugljikohidratnom jedinicom kao potencijalnom CRD domenom.

Ciklički peptidi su posebno važni u dizajnu umjetnih lektina jer svojim specifičnim lipofilnim veznim mjestima odgovarajućeg oblika i veličine omogućuju vezanje točno određenog ugljikohidratnog supstrata, te specifičnu detekciju određenog šećera.[33]

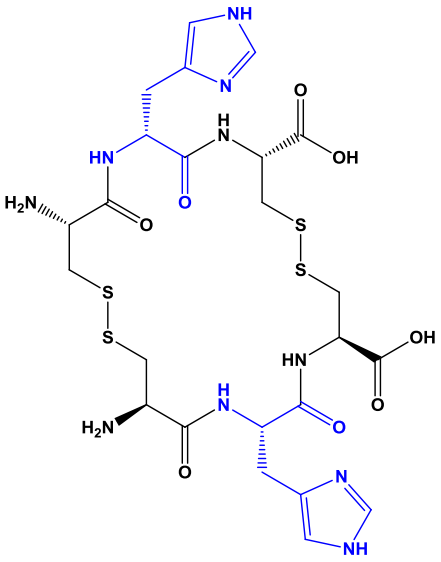
Tako je otkriveno da protein BclA (engl. *Bacillus collagen-like protein of anthracis*) jedna od sastavnih komponenata *B. anthracis* egzospore sadrži tetrasaharid prikazan na slici 8a. S obzirom da antroza, krajnji šećer tog tetrasaharida, nije pronađena u sporama drugih bakterija, izvrsna je meta za razvijanje specifičnih detektora za *B. anthracis*. Polimiksin peptidni antibiotik koji stupa u interakciju sa šećerom na staničnoj membrani bakterija korišten je kao okosnica za sintezu bicikličkih peptida (Slika 8b), potencijalnih umjetnih lektina.[34]



a) b)

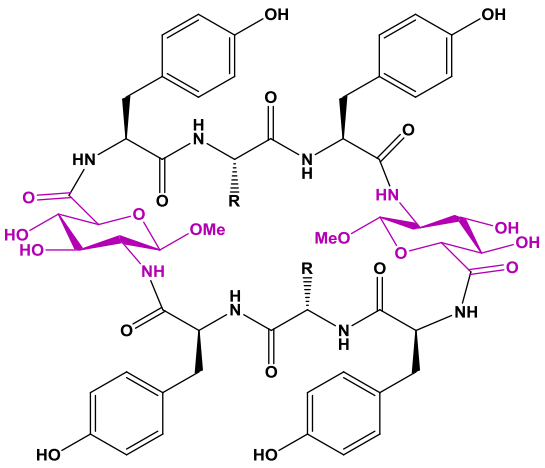
Slika 8. a) Tetrasaharidni dio Bcla glikosaharida; b) Opća struktura bicikličkog peptida

Jedan noviji primjer sintetskog lektina je HisHis ciklički peptid (Slika 9) koji je pokazao visoku selektivnost i afinitet za dva različita ugljikohidrata, *N*-acetilneuraminsku kiselinu i β-D-galaktozu.[35,36]



Slika 9. Sintetski lektin HisHis

Ciklički peptid koji sadrži δ-šećernu aminokiselinu (Slika 10) sintetiziran je i evaluiran kao umjetni receptor. Korištena je SAA kao polarni strukturni element u kombinaciji s nepolarnim aromatskim aminokiselinama. Spojevi su pokazali slabu, ali značajnu interakciju s purinskim nukleotidima (dAMP, dGMP).[37]



Slika 10. Ciklički glikopeptid sa δ-SAA

2.1.6. Interakcija peptida s DNA

Fizikalna i kemijska svojstva nukleinskih kiselina te njihove interakcije s organskim molekulama predmet su intenzivnih znanstvenih istraživanja medicinskih kemičara u posljednjih nekoliko desetljeća od otkrića dvostruke uzvojnice DNA, Watsona i Cricka, kada su otkrivene temeljne strukturne i funkcijske značajke ove biološke makromolekule, između ostalog replikacija i transkripcija. Supstancije koji stupaju u interakciju s dvostrukom uzvojnicom molekule DNA u određenom i specifičnom području, imaju potencijal inhibicije aktivnosti individualnih gena, te stoga mogu biti korisne u liječenju različitih bakterijskih, viralnih, a danas naročito raširenih tumorskih bolesti. Svrha znanstvenih istraživanja tako je sinteza selektivnijih i aktivnijih supstancija koje će pokazati interakciju sa specifičnim sekvencama DNA molekule ili prepoznati stanice koje sadrže specifične DNA molekule. Ukoliko takve supstancije imaju i svojstvo prikladno za laku detekciju, poput fluorescencije ili promjene intenziteta emisije nakon interakcije s polinukleotidnom, područje korištenja takvih spojeva se uvelike proširuje:[38-40]

Postoje tri glavna načina interakcije supstancije s DNA molekulom:[38,41]

1. Kontrola transkripcijskih faktora i polimeraza pri čemu supstancija dolazi u interakciju s proteinom koji se veže na DNA
2. Vezanje RNA na dvostruku uzvojnicu DNA pri čemu se dobije struktura trostruke uzvojnice ili stvaranje hibridne RNA koja s jednostrukom uzvojnicom DNA stvara DNA-RNA hibrid pri čemu dolazi do onemogućavanja transkripcijske aktivnosti
3. Vezanje malih aromatskih planarnih molekula na dvostruku uzvojnicu DNA slijedećim načinima:

- interkaliranjem izmenu parova baza
- vezanjem u mali ili veliki utor DNA
- kombinacija interkaliranja s vezanjem u mali utor DNA
- kao alkilirajući agensi

Interkalativni način vezanja ima ključnu ulogu u djelovanju mnogih klinički korištenih antitumorskih lijekova (amsakrin, elipticin, daunomicin, adriamicin) te nekih antibiotika (aktinomicin D, nogalamicin).[42] U interakciji s DNA važnu ulogu imaju peptidne skvence bogate lizinom, te interakcije DNA s raznim šećerima.[43-44]

Najčešće primjenjivane eksperimentalne metode za ispitivanje nekovalentnih kompleksa malih molekula s DNA mogu se podijeliti u nekoliko osnovnih grupa.

a) Eksperimenti koji prate promjene strukture i stabilnosti polinukleotida uzrokovane vezanjem ispitivanog spoja:

- promjena viskoziteta otopine DNA
- promjena sedimentacijskog koeficijenta ili elektroforetske pokretljivosti cirkularne DNA
- pomaci u niže magnetsko polje signala fosfatnog dijela polinukleotida u ^{31}P NMR spektru polinukleotida
- promjena temperature „mekšanja" dvostruke uzvojnice po vezanju ispitivanog spoja

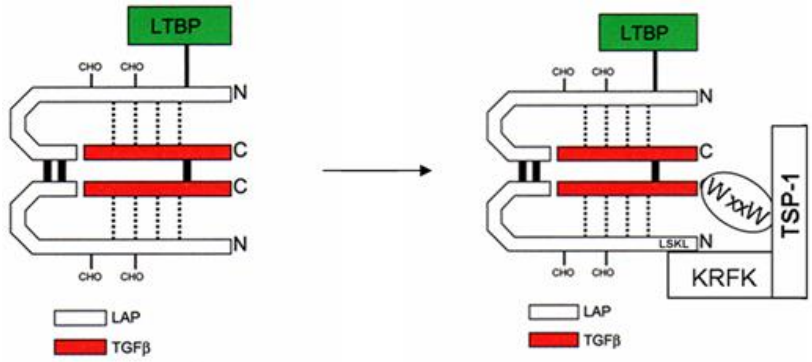
b) Metode temeljene na promjeni spektroskopskih svojstava ispitivanog spoja (UV/VIS, fluorescencijska i ^{1}H NMR spektroskopija).

c) Metode koje upućuju na pravilnost orijentacije molekula ispitivanog spoja te dinamiku i homogenost načina vezanja na polinukleotid – CD i LD spektroskopija, polarizacija fluorescencije, anizotropija fluorescencije.

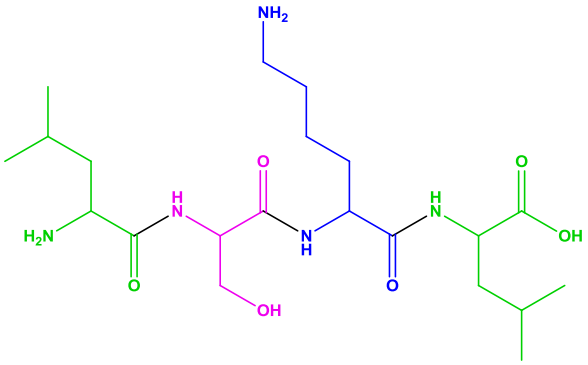
2.2. LSKL PEPTIDNA SEKVENCA

Transformacijski čimbenici rasta β (TGF-β, engl. *transforming growth factor*) koji se pojavljuju u tri izooblika, su multifunkcionalni citokini s različitim utjecajem na stanični rast, prepoznavanje i funkciju. Prijenos signala potaknut čimbenikom rasta TGF-β započinje njegovim vezanjem na stanični receptor II i nastavlja se stvaranjem zajedničkog kompleksa sa staničnim receptorom I. Ovako nastali kompleks liganda TGF-β i raceptora I i II potiče fosforilaciju SMAD proteina. Fosforilirani SMAD protein je u prikladnom obliku za vezanje s ostalim jedinicama potrebnim za nastajanje transkripcijskog kompleksa i provođenje transkripcije gena.[45,46] Mutacije koje nastaju tijekom ovog prijenosa signala često su uzrok nastanka raznih oblika humanih tumora, te poremećaja u razvoju. TGF-β tako može djelovati kao supresor tumora debelog crijeva, dok u uznapredovalom stadiju, potiče metastaziranje stanica.[47,48]

TGF-β se sintetizira kao prohormon koji se u procesu izlučivanja cijepa na aminoterminalni propeptid i C-terminalni fragment čimbenika rasta (TFG-β). Za razliku od drugih hormona, TGF-β i nakon izlučivanja ostaje nekovalentno vezan sa svojim propeptidom i kao takav je neprepoznatljiv za receptore. Budući da je odgovoran za neaktivnost čimbenika rasta propeptid je dobio naziv LAP (engl. *latency-associated protein*). Potrebna je aktivacija kako bi TGF-β prepoznali receptori na površini stanice i potaknuli biološki odgovor. Upravo ti mehanizmi koji kontroliraju pretvorbu latentnog prekursora u aktivni oblik su ključni regulatori aktivnosti TGF-β1. Trombospodin-1 smatra se glavnim fiziološkim regulatorom aktivacije latentne TGF-β1 faze. Da bi se ova aktivacija ostvarila neophodno je nastajanje trombospodin-LAP kompleksa. Taj kompleks uključuje Lys-Arg-Phe-Lys (KRFK) aktivacijsku sekvencu trombospodina-1 i Leu-Ser-Lys-Leu (LSKL) sekvencu koja se nalazi u blizini amino kraja LAP-a (Slika 11a).[45,49,50] Važnost LSKL sekvence LAP-a u aktivaciji TGF-β potakla je istraživanja tog peptidnog fragmenta. Naime, dokazano je da LSKL peptid (Slika 11b) sprečava progresiju oštećenja jetre i fibroze inhibicijom TGF-β.[51,52]



a)



LSKL (Leu-Ser-Lys-Leu)

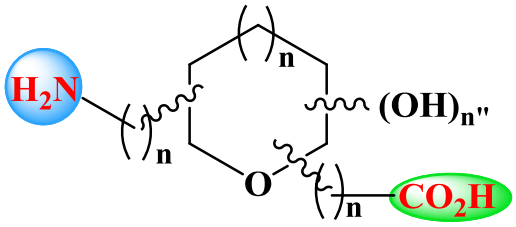
b)

Slika 11. a) Trombospodin-LAP kompleks; b) LSKL sekvenca

2.3. ŠEĆERNE AMINOKISELINE

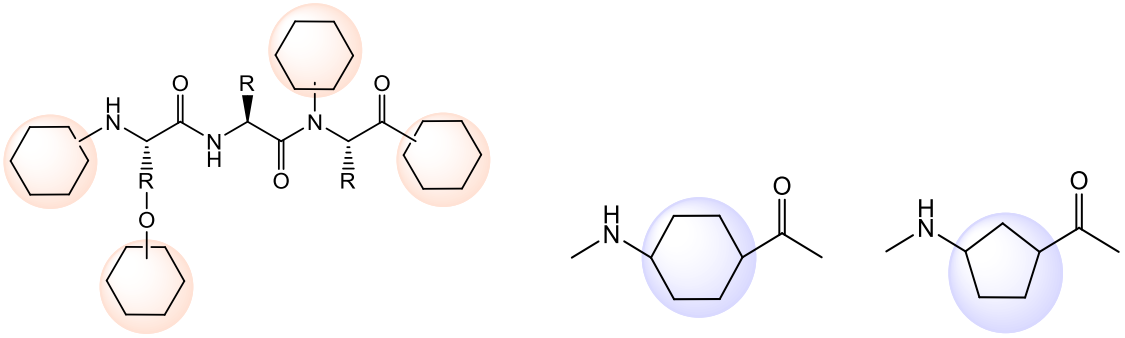
Ugljikohidrati su uz peptide i proteine esencijalni biopolimeri života. Uključeni su u kompleksne biološke procese kao što su kataliza i selektivno molekulsko prepoznavanje. Da bi se ostvarili ti procesi presudna je odgovarajuća sekundarna struktura. Interakcija je uočena samo ako su reaktivne skupine smještene u ispravnoj međusobnoj prostornoj orjentaciji. Prema tome, potreban je razvoj malih građevnih blokova jednostavnih za funkcionaliziranje kako bi se dizajnirale molekule s korisnim biološkim funkcijama, a jedan od primjera su šećerne aminokiseline.[53]

Šećerne aminokiseline (engl. *sugar amino acid*, SAA) su ugljikohidrati čiji piranozni ili furanozni prsten sadrži najmanje jednu amino odnosno karboksilnu skupinu.[54-61] Opća struktura SAA prikazana je na slici 12.



Slika 12. Opća struktura SAA (n=0,1; n"=0-3)

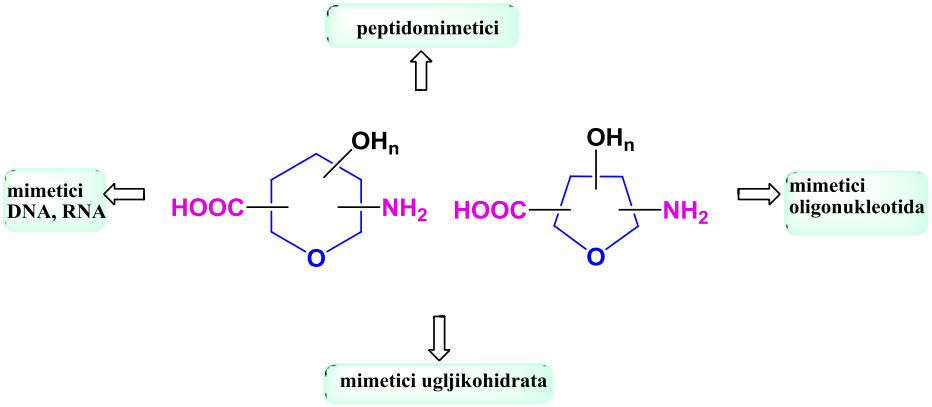
U peptidnu strukturu šećerna komponenta može biti integrirana kao *supstituent* ili kao *strukturni element* (Slika 13).



a) b)

Slika 13. Šećerna komponenta kao a) peptidni supstituent i b) strukturni element

Šećerne aminokiseline mogu biti strukturni elementi mimetika peptida, oligonukleotida, ugljikohidrata, DNA i RNA (Slika 14).



Slika 14. Šećerna aminokiselina kao mimetic

Upravo u dizajnu peptidomimetika SAA daju nekoliko potencijalnih prednosti. Njihovo umetanje u peptidnu strukturu utječu na konformaciju peptida, a time i na receptorsku aktivnost i/ili selektivnost. Također, zbog rigidnije konformacije doprinose metaboličkoj stabilnost. Deprotekcijom i zaštitom hidroksilnih skupina omogućen je utjecaj na hidrofilnost/lipofilnost molekule.

2.3.1. Sinteza šećernih aminokiselina i njihova ugradnja u peptidnu strukturu

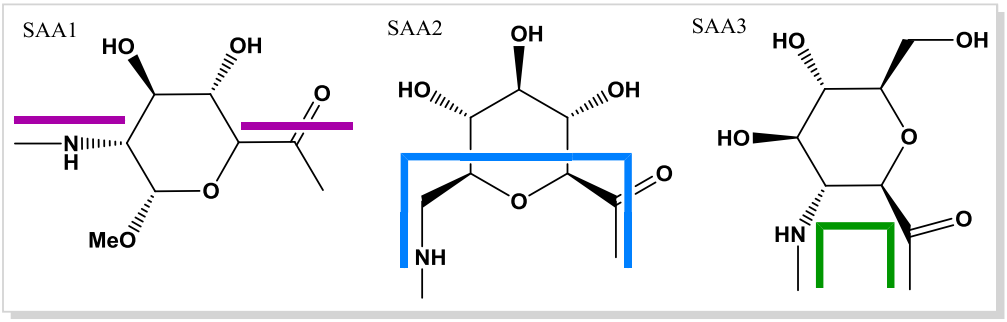
Šećerne aminokiseline su vrlo raznovrsni konformacijski građevni blokovi jer stereokemijski razmještaj supstituenata na prstenu, veličina prstena kao i prisutnost drugih funkcijskih skupina pruža mnoštvo mogućih kombinacija.

Razvoj novih SAA kao građevnih blokova mora zadovoljiti niz zahtjeva:[53]

- Njihova sinteza mora biti brza, jednostavna, visokog iskorištenja te jeftina
- Njihova sekundarna struktura mora doprinjeti pozitivnim svojstvima
- Treba se lako uvesti kiralna različitost
- Trebaju poboljšati enzimsku stabilnost
- Trebaju biti kompatibilne s modernim tehnikama sinteze na čvrstoj fazi

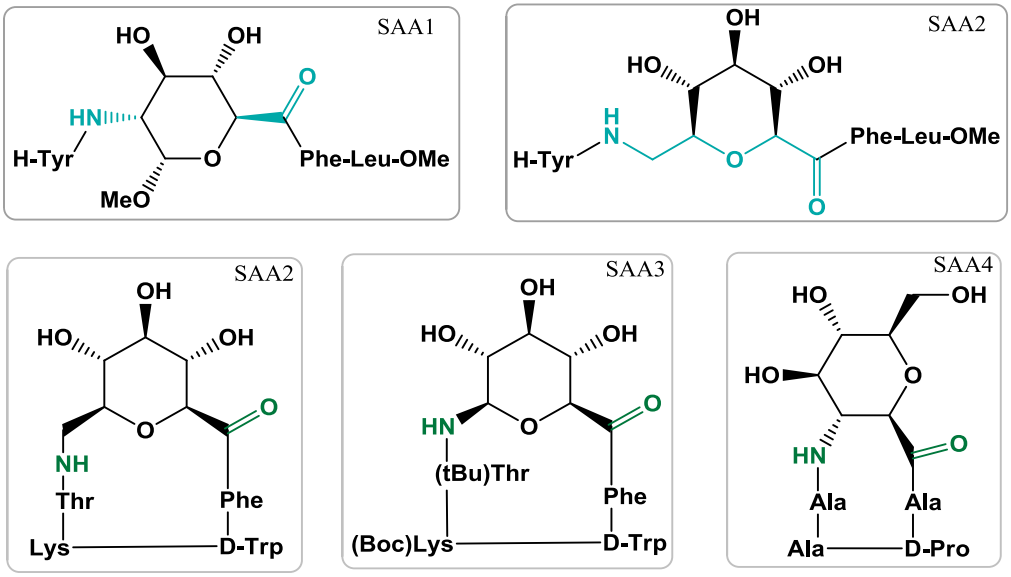
Sinteza šećernih aminokiselina lako se postiže u nekoliko koraka počevši iz komercijalno dostupnih monosaharida (glukoza, glukozamin, galaktoza…). Amino skupina uvodi se kao azid, cijanid ili nitrometanska skupina nakon čega slijedi redukcija. Karboksilna skupina uvodi se direktno kao CO_2 ili kao cijanid, Wittig-ovom reakcijom, oksidacijom ili selektivnom oksidacijom primarnih alkohola.[54]

Ovisno o položaju funkcijskih skupina na prstenu moguće je na specifičan i predvidljiv način dizajnirati ugljikohidratne molekule koje će utjecati na konformaciju i svojstva peptidomimetika u koji su ugrađene. Očekuje se da SAA1 neće mijenjati strukturu, SAA2 bi mogla utjecati na β-okret, SAA3 na konformaciju γ-okreta (Slika 15).[53,54,62]



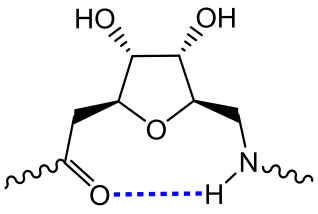
Slika 15. Utjecaj SAA na sekundarnu strukturu peptida

Sintetizirane su različite SAA koje pokazuju sposobnost ograničavanja linearne okosnice peptida ili različite okrete (engl. *turn*) strukture. SAA1 i SAA2 su ugrađene u dva linearna analoga Leu-enkefalina, zamijenivši prirodni dipeptid Gly-Gly. NMR studije pružaju dokaze o učinku ugljikohidratnog dijela na konformaciju peptida. SAA2 i SAA3 su smještene u analoge cikličkog heptapeptida somatostatina, a SAA4 je ugrađena u modelni peptid. Konformacije cikličkih peptida su analizirane te je dokazano da SAA2 i SAA3 induciraju β-okret strukture, a SAA4 γ-okret (Slika 16).[61]



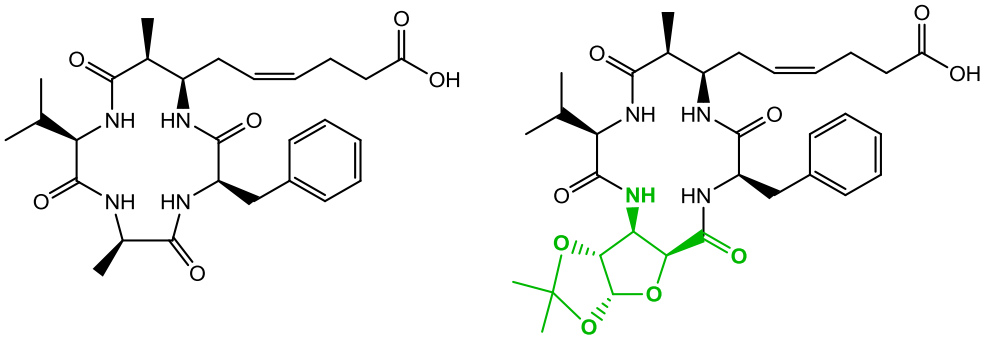
Slika 16. SAA1α i SAA2 ugrađene u analog enkefalina; SAA2, SAA3 i SAA4 ugrađene u cikličke peptide

Trodimenzionalne strukture cikličkih hibridnih molekula koje sadrže furanoid ε-SAA (Slika 17) i nekoliko aminokiselina razjašnjene su proučavajući preferiranu konformaciju takve ε-SAA te njezinog konformacijskog utjecaja na okosnicu cikličkog peptida. Istraživanja su pokazala da furanoid ε-SAA stvara vodikovu vezu i time stabilizira β-okret.[63]



Slika 17. Furanoid ε-SAA

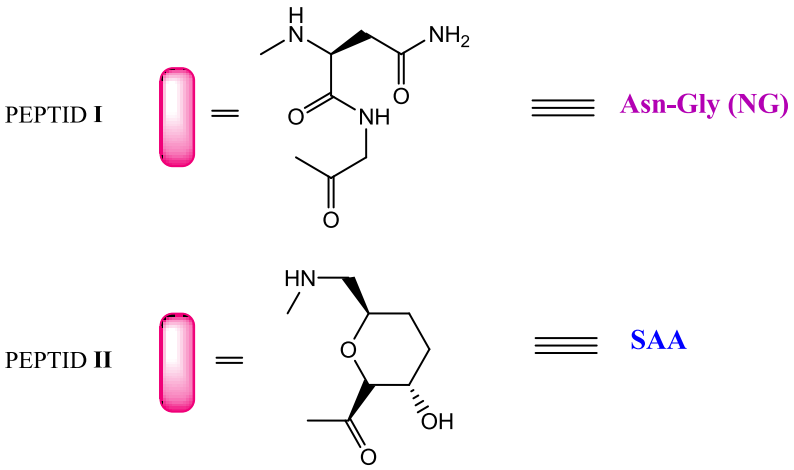
Azumamid E (Slika 18a) je pokazao inhibiciju histon deacetilaze (HDAC) pri najnižoj koncentraciji u odnosu na svoje srodnike. D-alanin je zamijenjen β-SAA (Slika 18b), te su preliminarni biološki podaci pokazali da je šećerni derivat azumamida E-SAA superiorniji u odnosu na sam spoj.[64]



a) b)

Slika 18. Struktur:a a) azumamid E i b) analoga azumimid E-SAA

SAA-na uspješno je sintetizirana i ugrađena u peptidni lanac koristeći Fmoc kemiju. Novi peptid II ima istu sekvencu aminokiselina kao i peptid I osim aminokiselina (Asn-Gly) uključenih u okret koje su zamijenjene sa SAA. Pokazalo se da SAA može oponašati β-okret. Prema spoznajama, peptid II (Ac-KKYTVSI-*SAA*-KKITVSI) predstavlja prvu necikličku β-uzvojnicu koja sadrži SAA (Slika 19).[65]

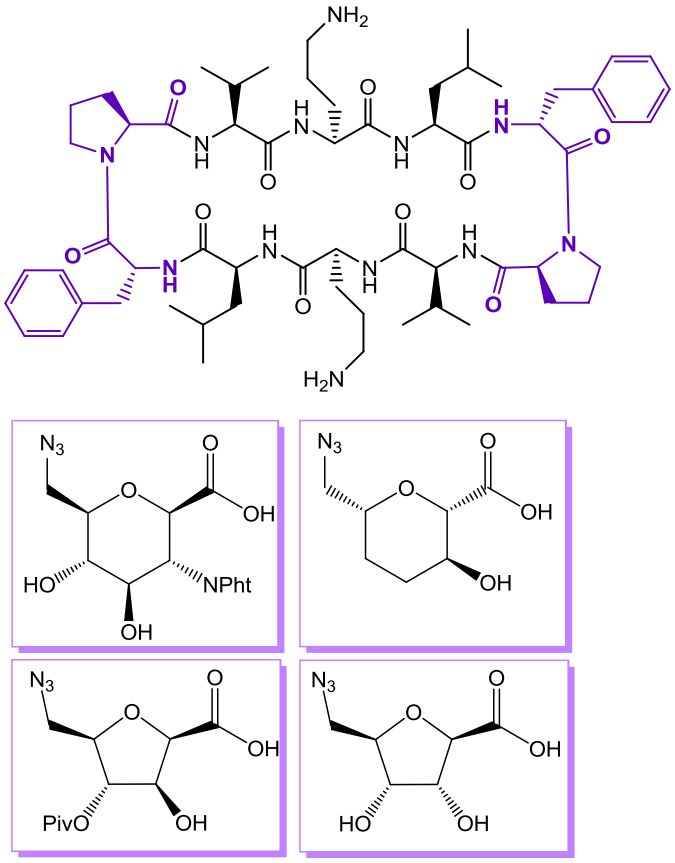


Slika 19. β-okret peptida I i modificiranog peptida II

Gramicidin S (GS) je amfifilični simetrični ciklički dekapeptid strukture ciklo[Pro-Val-Orn-Leu-D-Phe]$_2$ koji djeluje kao antibiotik djelovanjem na lipidni dvosloj bakterijske stanice. Nakon akumuliranja u lipidnom dvosloju, GS inducira raspad (lizu) bakterijske stanice. Mogučnost ugradnje u lipidnu membranu bakteijskih stanica GS duguje amfifiličnoj građi gdje se s jedne strane cikličkog peptida nalaze dva bazična Orn bočna lanca, a s druge

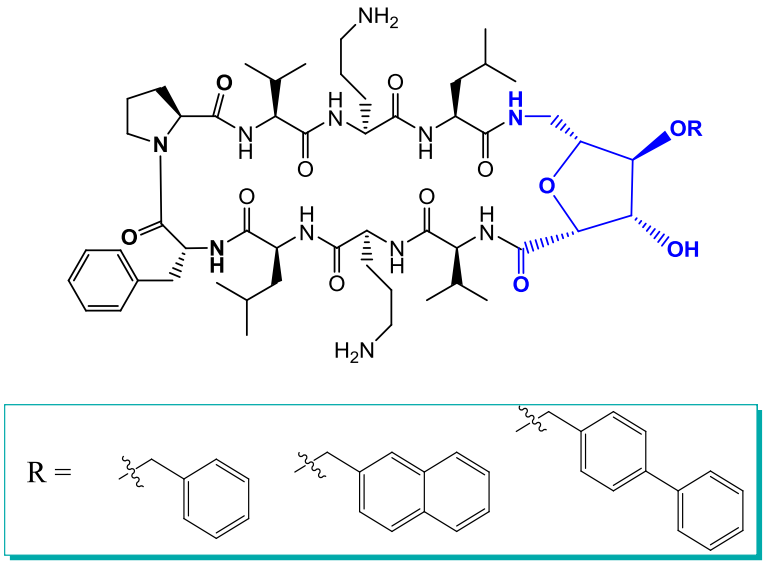
alifatski Leu i Val bočni lanci. Amfifilnost GS-a je povećana i zauzimanjem povoljne konformacije antiparalelne ploče.

Opisana je učinkovita sinteza gramicidin S koristeći Fmoc sintezu peptida na čvrstom nosaču. Strategija se pokazala svestrana za ugradnju šećernih aminokiselina (Slika 20).[66]



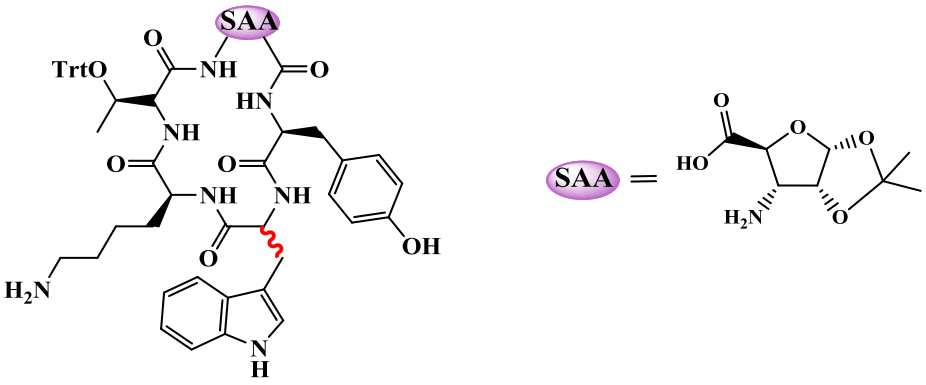
Slika 20. Struktura gramicidin S i šećernih aminokiselina ugrađenih u okret regiju

Sintetizirani su analozi gramicidin S (GS) koji sadrže arilnu šećernu aminokiselinu kao zamjenu za D-Phe-Pro, aminokiseline koje tvore okret (Slika 21). Ciklički amfifilni peptidi zauzimaju konformaciju ploče s okretom induciranim SAA-om. Takvi okreti uzrokuju blage distorzije u konformaciji antiparalelne ploče u usporedbi s GS. Zaključeno je da prisutnost aromatskih skupina na položaju okreta GS-a pozitivno utječe na biološku aktivnost. Dobiveni rezultati mogli bi poslužiti u budućim istraživanjima i dobivanju efikasnih i nehemolitičkih analoga GS-a kao učinkovitih lijekova za bakterijske infekcije.[67]



Slika 21. Struktura SAA-modificiranog gramicidin S

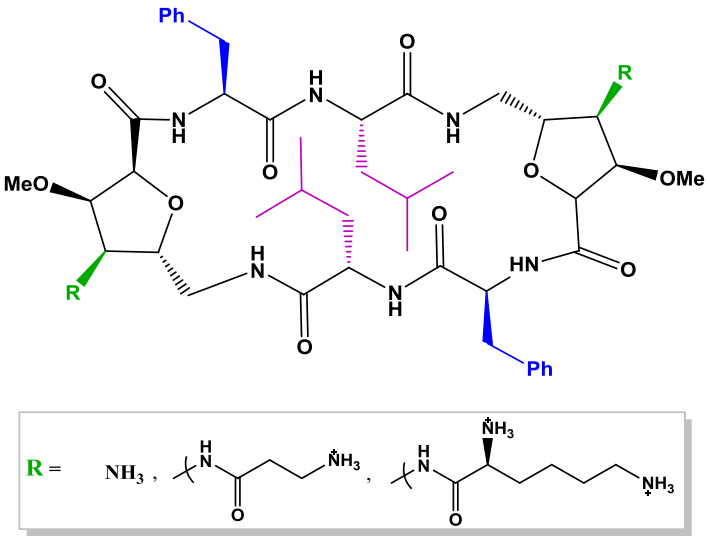
Jedan od glavnih problemu u liječenju osoba oboljelih od karcinoma je otpornost tumorskih stanica na kemoterapiju. Somatostatinski analozi koji sadrže nove SAA pokazuju potenticijal u zaustavljanju dijeljena i uništavanju iznimno otpornih karcinomskih stanica jetre (Slika 22).[68]



Slika 22. Struktura analoga somatostatina

Linearni i ciklički kationski antimikrobni peptidi predstavljaju dio imunonosnog sustava kod mnogih kralježnjaka uključujući i čovjeka. Dizajnirani i sintetizirani su C2-

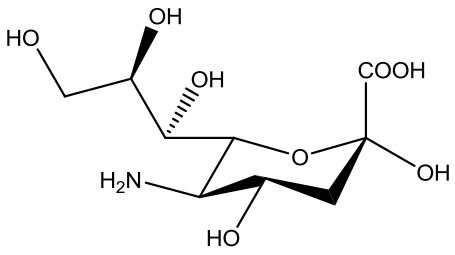
simetrični makrociklički kationski peptidi sa SAA koja sadrži kationsku skupinu (Slika 23). Obzirom na svoja svojstva ovi spojevi su dobri kosturi za dizajn antibiotika.[69]



Slika 23. Struktura cikličkih kationskih peptida koji sadrže SAA

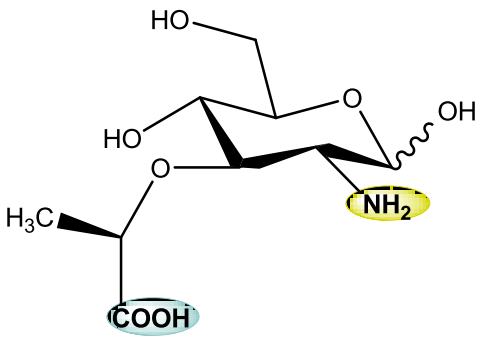
2.3.2. Prirodne šećerne aminokiseline

Neke šećerne aminokiseline mogu se naći u prirodi uglavnom kao građevni elementi. Najistaknutiji primjer je neuraminska kiselina (Slika 24) odnosno njeni *N*- i *O*-acil derivati poznati kao sialična kiselina koja se nalazi na perifernim dijelovima glikoproteina. Glikozaminuronske kiseline su češće u obliku njihovih derivata. Glavni supstituenti na dušiku su *N*-acetil i *N*-glikozilne skupine.[54]



Slika 24. Neuraminska kiselina

Među prirodnim šećernim aminokiselinama posebno mjesto zauzima muraminska kiselina (Slika 25) prisutna u staničnim stjenkama gotovo svih bakterija.[54] S obzirom na položaj funkcijskih skupina, karboksilnu i amino, muraminsku kiselinu ubrajamo u δ-SAA, kao dipeptidni izoster.

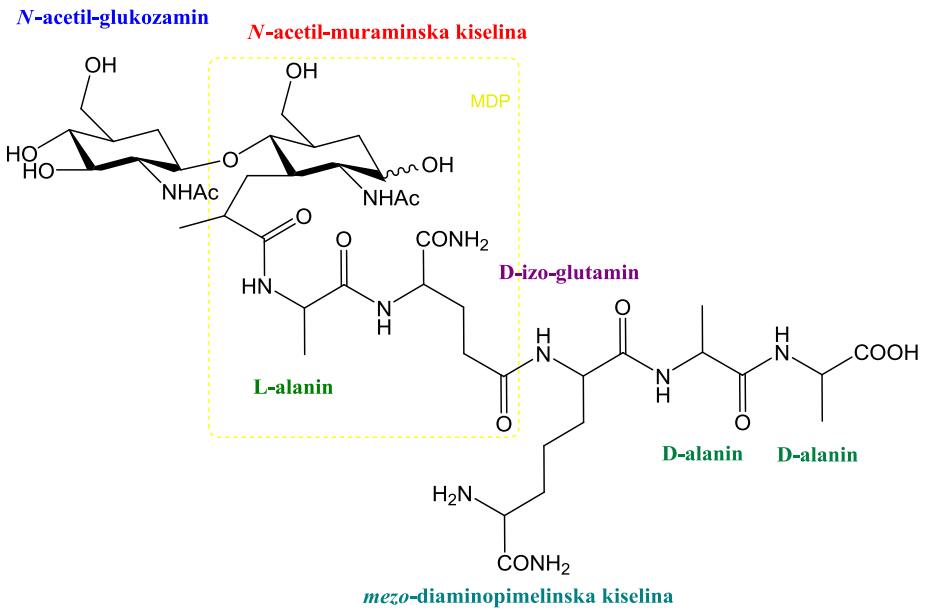


Slika 25. Muraminska kiselina (Mur)

Muraminska kiselina

Peptidoglikan (PGN), sastavni dio stanične stijenke gotovo svih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, sastavljen je od mreže glikanskih lanaca i oligopeptida. Glikanski su lanci izgrađeni iz alternirajućih podjedinica *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i *N*-acetilmuraminske kiseline (MurNAc) kopulirane s prirodnim aminokiselinama (Slika 26).[70-72] Peptidoglikanski fragmenti pokazuju različita biološka djelovanja, među kojima je i jaka imunostimulacijska aktivnost, ali i čitav niz neželjenih nuspojava kao što su pirogenost i alergijske reakcije. Istraživanja su pokazala da manji fragmenti imaju manje štetnih nuspojava, ali i dalje zadržavaju biološku aktivnost. Tijekom rasta bakterije, kao i tijekom antibakterijskog tretmana, dolazi do enzimske hidrolize PGN na muramilpeptide koji sadrže najmanje po jednu MurNAc i prirodnu aminokiselinu. Muramilpeptidi utječu na imunosustav djelujući kao imunoadjuvansi što znači da stimuliraju stanični odgovor na infekciju.[73-77] Otkriveno je da *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin (Mur-NAc-L-Ala-D-iGln, muramildipeptid (MDP)) minimalna strukturna jedinica odgovorna za imunoadjuvantsku

aktivnost.[78-83] Muraminska kiselina može poslužiti kao biomarker[84] za detekciju bakterijskih fragmenata u okolišu.



Slika 26. Kemijska struktura peptidoglikanskog monomer (PGM-a)

2.4. SINTEZA PEPTIDA NA ČVRSTOM NOSAČU

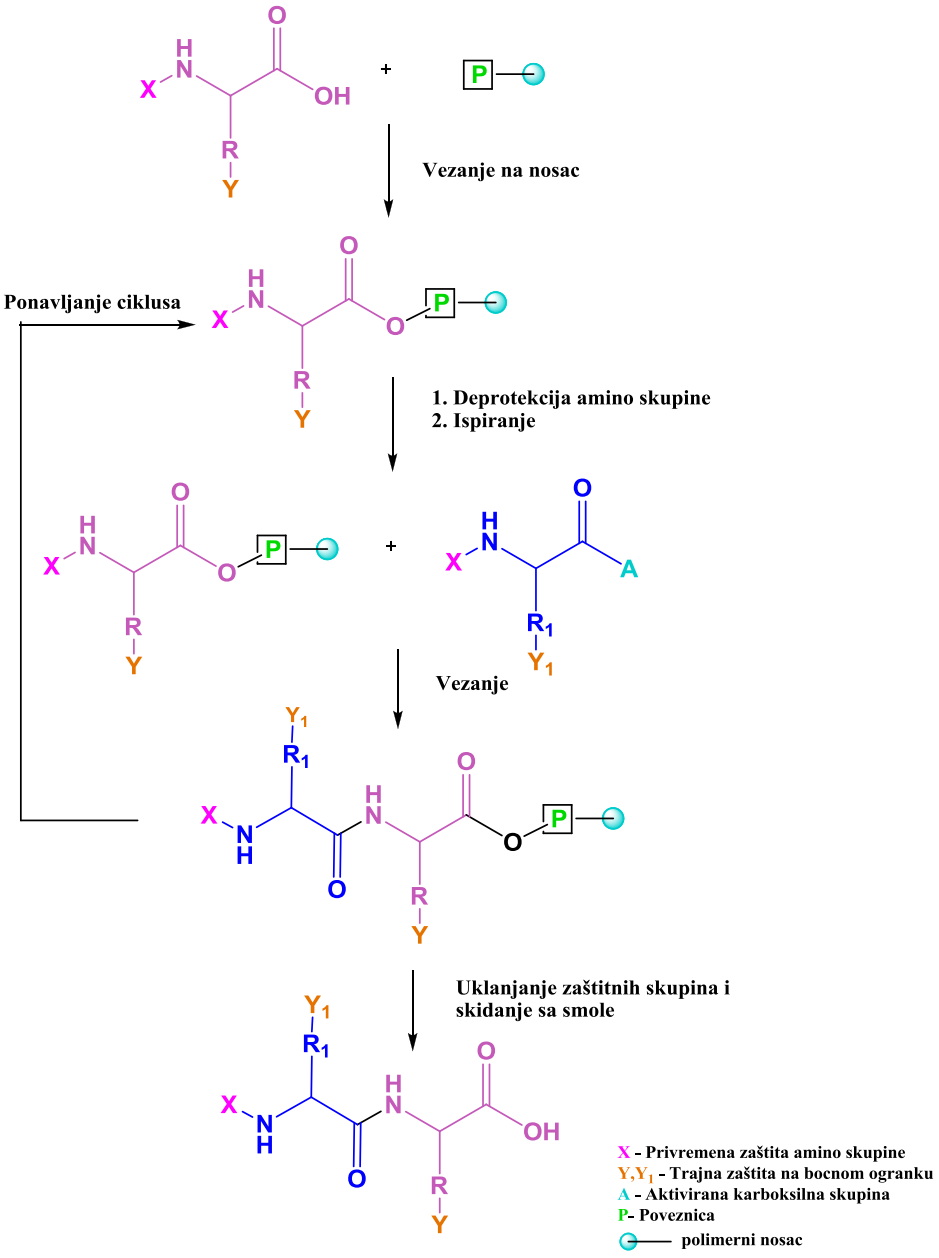
Peptidi imaju značajnu ulogu u biološkim i fiziološkim procesima. Da bi razjasnili biološke funkcije proteina, važno je omogućiti njihovu jednostavnu sintezu. Danas poznajemo tehnologije koje nam omogućuju gotovo rutinske metode sinteze malih peptida i proteina, te je postignut značajan napredak prema sintezi većih proteina putem kemoselektivnog vezanja. Iako su ti novi pristupi impresivni, te su uspješno korišteni za sintezu mnogih proteina, kemijska sinteza proteina još uvijek nije rutina i tu postoje mnogi izazovi s kojima se treba suočiti.

Metode za sintezu peptida mogu se podijeliti u dvije kategorije: sinteza u otopini i sinteza na čvrstom nosaču. Klasična metoda za sintezu peptida u otopini uključuje pripremu potpuno zaštićenih peptidnih segmenata i njihovu kondenzaciju u organskom otapalu. Sinteza peptida na čvrstom nosaču (engl. *solid phase peptide synthesis*; SPPS) koristi ne topljivi polimerni nosač za sekvencijsku adiciju bočno zaštićenih aminokiselina. Dobiveni peptid se skida u kiselim uvjetima. SPPS ima mnogo prednosti u odnosu na klasičnu sintezu u otopini kao što je automatizirana elongacijska reakcija, neovisnost o problemima topljivosti te minimizirano nastajanje nusprodukata. S druge strane, u klasičnoj sintezi u otopini produkti mogu biti čišćeni i praćeni u svakom stupnju reakcije, što može voditi do jednostavne izolacije konačnog produkta. Stoga je sinteza u otopini važna u proizvodnji na velikoj skali te za specijalizirane laboratorijske primjene, dok se SPPS metoda većinom koristi u istraživačke svrhe.[85-90]

2.4.1. Osnove sinteze peptida na čvrstom nosaču

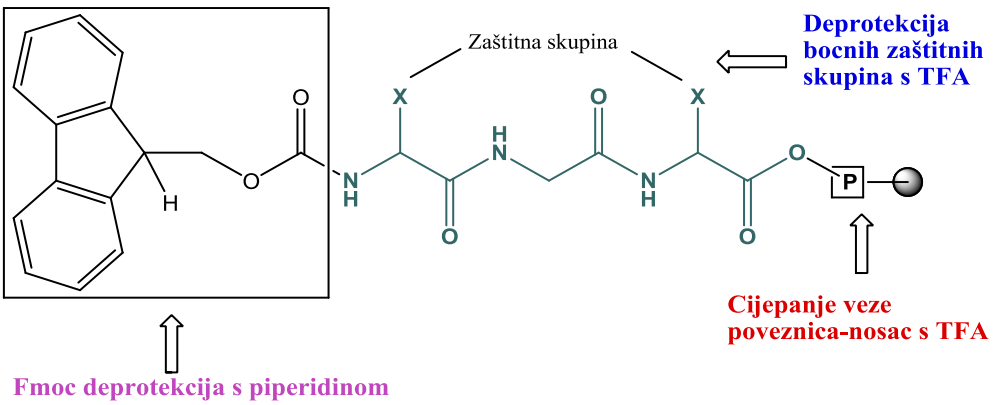
Sintezu peptida na čvrstom nosaču prvi puta je opisao R. B. Merrifield 1963. godine.[91] Ova metoda koristi netopljivi polimerni materijal kao čvrsti nosač na kojem su vezane funkcijske poveznice. Tijekom cijelog postupka sinteze, peptidni lanac je kovalentnom vezom vezan na čvrsti nosač i time omogućava, nakon svakog stupnja, ispiranje suviška reagensa, nevezanih nusprodukata te uklonjenih zaštitnih skupina. Sinteza na čvrstom nosaču započinje vezanjem *N*-zaštićene aminokiseline na netopljivi čvrsti nosač preko poveznice. *N*-zaštitna skupina se uklanja te se dobiveni adukt dobro ispere s otapalom. Sljedeća aminokiselina veže se na adukt ili kao prethodno aktivirana ili se aktivira in situ u prisutnosti aktivatora. Nastali

oligopeptid-poveznica-nosač se ispere otapalom kako bi se uklonio neizreagirani ostatak. Ponavljanje ciklusa deprotekcije i vezanja odgovara broju aminokiselina peptida. Kada se dobije željeni slijed aminokiselina, dobiveni peptid se skida s čvrstog nosača (Slika 27).[85,86,91-94]



Slika 27. Tijek sinteze peptida na čvrstom nosaču

Postoje dvije strategije koje se koriste za sintezu peptida na čvrstom nosaču. Prva strategija koristi *tert*-butiloksikarbonilnu (Boc) skupinu za *N*-zaštitu. Boc zaštitna skupina se uklanja trifluoroctenom kiselinom (TFA), a slobodni amino kraj se neutralizira upotrebom tercijarnog amina. Skidanje peptida s nosača provodi se jakom kiselinom, te se obično upotrebljava vodikov fluorid (HF). Druga strategija koristi 9-fluorenilmetiloksikarbonilnu (Fmoc) skupinu za *N*-zaštitu. Strategija Fmoc zaštitne skupine bazirana je na ortogonalnom principu kada dvije zaštitne skupine pripadaju nezavisnim kemijskim klasama i uklanjaju se različitim mehanizmima. Fmoc zaštitna skupina obično se uklanja piperidinom u *N*,*N*-dimetilformamidu (DMF) ili *N*-metilpirolidinu (NMP). Zaštitne skupine koje su kompatibilne s *N*-Fmoc zaštitom uklanjaju se u isto vrijeme kada se peptid skida s nosača uz pomoć TFA. Glavna prednost ove metode je upotreba blažih uvjeta (Slika 28).[85,86]



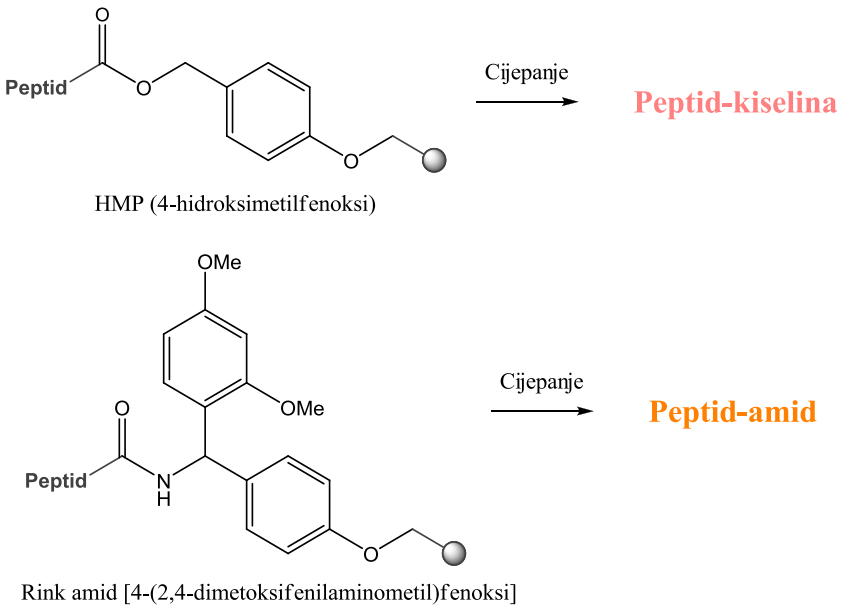
Slika 28. Osnovne karakteristike Fmoc strategije

2.4.2. Polimerni nosači

Kemijski sastav i fizička svojstva polimerne matrice (smole) su ključni za uspjeh sinteze na čvrstom nosaču. Polimerni nosači moraju imati izraženu sposobnost bubrenja u otapalima koja se koriste tijekom reakcija, te za ispiranje. Čvrsti nosač je obično polistirenski polimer umrežen s 1 % 1,3-divinilbenzenom. Suha polistirenska zrnca imaju prosječan promjer 50 μm, ali bubenjem u otapalima (DCM, DMF) povećavaju volumen za 2,5–6,2 puta. Prema tome sinteza na čvrstom nosaču se zapravo odvija u dobro nabubrenom gelu koji sadrži

mobilne i reagensu dostupne lance. Polimerne smole su razvijene na temelju koncepta da netopljiva smola i peptid imaju kompatibilnu polarnost.[85,86]

Neovisno o strukturi i prirodi izabrane polimerne smole ona mora sadržavati funkcijsku skupinu na koju se prva aminokiselina može vezati. Skoro sve sinteze peptida na čvrstom nosaču odvijaju se u smjeru od C- prema *N*-kraju i zbog toga takve sinteze počinju vezanjem C-kraja na nosač. To se postiže upotrebom poveznice koja je bifunkcijska. Na jednom kraju se nalazi funkcijska skupina koja omogućuje vezanje poveznice na smolu, a na drugom kraju funkcijska skupina za lako vezanje i skidanje s aminokiseline. Posebna poveznica omogućuje dobivanje peptida, nakon skidanja sa smole, sa slobodnom karboksilnom skupinom (peptid-kiselina) ili amidnom skupinom (peptid-amid) (Slika 29). Različite poveznice se koriste za Boc i Fmoc sintezu peptida na čvrstom nosaču.[85,86,95-97]



Slika 29. Poveznice na čvrstom nosaču za Fmoc sintezu peptida

2.4.3. Načini zaštite reaktivnih skupina

Važan korak u sintezi peptida na čvrstom nosaču je izbor i optimizacija zaštitnih skupina za svaki pojedini slučaj sinteze. Naime, čak i kada je neka aminokiselina već uspješno vezana, postoji mogućnost da u narednim koracima sinteze dođe do deformacije ili

pregradnje aminokiseline. Aminokiseline u peptidu su posebno osjetljive tijekom koraka deprotekcije i skidanja peptida s čvrstog nosača jer se koriste najžešći uvjeti. Zaštitne skupine koje se koriste u sintezi peptida na čvrstom nosaču dijele se na „privremene“ i „trajne“ zaštitne skupine. Prema vrsti privremenih zaštitnih skupina razlikuju se dva osnovna načina sinteze peptida na čvrstom nosaču, Boc- i Fmoc- strategija, ovisno o tome je li amino skupina zaštićena Boc ili Fmoc zaštitnom skupinom. Privremene zaštitne skupine se uklanjaju odmah po kondenzaciji, dok se trajne zaštitne skupine koriste za sprečavanje granjanja ili nastajanje drugih nusprodukata na bočnim lancima. Ovakva podjela zaštitnih skupina ukazuje na to da barem dvije vrste zaštitnih skupina moraju biti zastupljene s obzirom da trajne zaštitne skupine moraju biti otporne na uzastopna uklanjanja privremenih zaštitnih skupina s amino kraja. Pojam ortogonalnosti znači da dvije ili više zaštitnih skupina pripadaju nezavisnim klasama i uklanjaju se različitim mehanizmina. Korištenje ortogonalne zaštite zahtjeva blaže uvjete jer je selektivno uklanjanje zaštitnih skupina regulirano alterntivnim mehanizmom cijepanja, a ne brzinom reakcije.[85,95]

2.4.3.1. Privremene zaštitne skupine

9-Fluorenilmetiloksikarbonilna (Fmoc) zaštitna skupina je privremena zaštita za *N*-amino skupinu, te se lako uklanja slabom bazom jer elektron-odvlačeći prstenasti sustav slobodni vodik na β-ugljiku čini vrlo kiselim. Cijepanje kiselog protona na poziciji 9 prstenastog sustava prati β-eliminacija dajući vrlo reaktivan dibenzofulven kao intermedijer. Dibenzofulven se veže dodatkom suviška agensa za skidanje amina, stvarajući stabilan adukt. Fmoc zaštitna skupina se lako skida s primarnim (etanolamin, cikloheksenilamin) te ponekim sekundarnim (piperazin, piperidin) aminima. Skidanje Fmoc zaštitne skupine s tercijarnim aminima (Et_3N, DIEA) je vrlo sporo. Za uklanjanje Fmoc skupine koristi se polarni medij (DMF ili NMP) jer je brže uklanjanje nego u nepolarnom mediju (DCM), obično 20–55 %-tni piperidin u DMF-u ili NMP-u. Nakon uklanjanja Fmoc zaštite amina, peptid-nosač može u daljnju sintezu bez neutralizacije.[85,86,98-100]

2.4.3.2. Trajne zaštitne skupine

Zaštita bočnih lanaca aminokiselina mora biti specifična kako bi se potencijalne reakcije bočnih reaktivnih skupina svele na minimum. Zaštitne skupine za bočne lance koje su

najprikladnije za Fmoc-kemiju su prikazane u Tablici 1. Trajne zaštitne skupine koje su kompatibilne s *N*-Fmoc zaštitnom skupinom su eterski, esterski i uretanski derivati *tert*-butanola. Te se skupine uklanjaju s TFA u stupnju skidanja peptida s čvrstog nosača. Uz TFA potrebno je dodati „hvatač“ (engl. *scavenger*) koji će ukloniti reaktivne karbokatione.[85,101-104]

Tablica 1. Trajne zaštitne skupine (Fmoc-kemija) za bočne lance aminokiselina

Aminokiselina	Zaštitna skupina
Arg	Pbf
Asp	*tert*-Bu
Glu	*tert*-Bu
Asn	Trt
Gln	Trt
Ser	*tert*-Bu
Tyr	*tert*-Bu
Thr	*tert*-Bu
Trp	Boc
Lys	Boc
His	Boc; Trt
Cys	Trt

2.4.4. Kondenzacijski reagensi

Kondenzacijski reagensi u sintezi peptida na čvrstom nosaču koriste se u suvišku kako bi se osigurao završetak reakcije. Valja biti oprezan kod izbora aktivacijske skupine i kondenzacijskih reagenasa kako bi se postiglo dobro iskorištenje tijekom vezanja, a izbjegle neželjene reakcije.

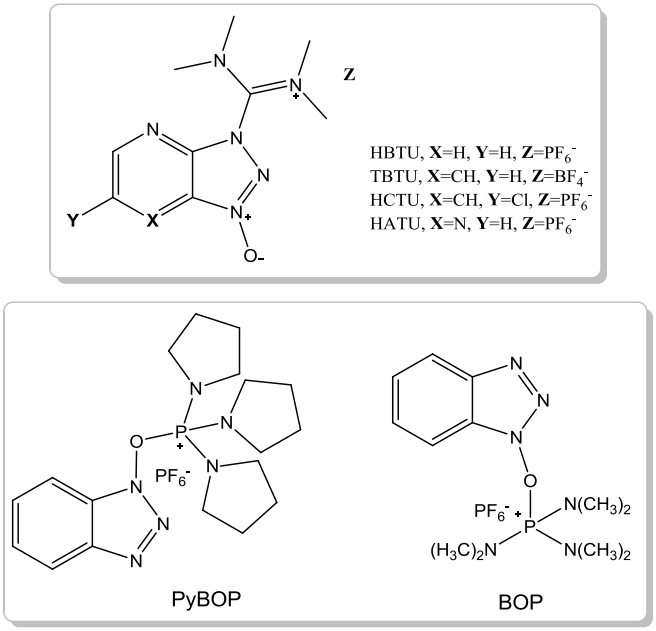
Klasičan primjer *in situ* kondenzacijskog reagensa su *N*,*N*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC) i *N*,*N*-diizopropilkarbodiimid (DIPCDI). DIPCDI je prikladniji za upotrebu jer je nusprodukt urea, koja nastaje u reakciji topljivija u DCM od uree koja nastaje u reakciji s DCC. Iskorištenje reakcije znatno se poboljšava korištenjem 1-hidroksibenzotriazola (HOBt)

kao aditiva u reakciji kondenzacije jer HOBt ubrzava kondenzaciju, sprečava racemizaciju i inhibira dehidratiranje karboksamidnog bočnog lanca Asn i Gln u odgovarajuće nitrile.[85]

U novije vrijeme koriste se protokoli koji upotrebljavaju fosfonijeve i amonijeve soli benzotriazolnih derivata. Neki od značajnih su benzotriaz-1-oksi-tris(dimetilamino)fosfonij heksaflorofosfat (BOP), (*O*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonijev heksafluorofosfat (HBTU), 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonij tetrafluorborat (TBTU), (*O*-(7-azabenzotriazol-1-il))-1,1,3,3-tetrametilamonijev heksafluorofosfat (HATU), benzotriaz-1-il-oksitripirolidinfosfonijev heksafluorofosfat (PyBOP) (Slika 30). Svi oni trebaju tercijarni amin poput NMM i DIEA da bi postigli optimalnu učinkovitost.[104-117]

Već je dugi niz godina poznata kondenzacijska metoda koja koristi aktivne estere kao što su pentafluorfenoli (OPfp), HOBt, 6-klor-1-H-benzotriazol (6-ClOBt) i 3-hidroksi-2,3-dihidro-4-oksibenzotriazolni (ODhbt) ester.[85]

U reakcijama kondenzacije mogu se koristiti fluoridi Fmoc kiselina koji u uvjetima sinteze peptida na čvrstom nosaču uz prisutnost DIEA reagiraju vrlo brzo i uz mali stupanj racemizacije.[85]

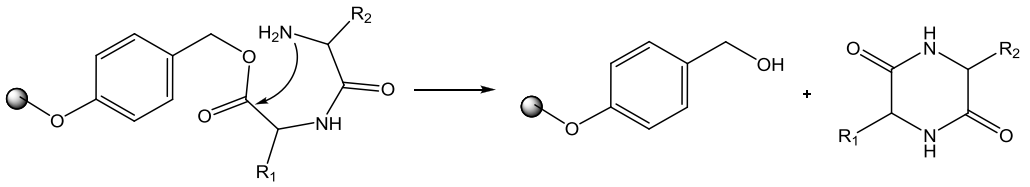


Slika 30. Kondenzacijski reagensi (Amonijeve i Fosfonijeve soli)

2.4.5. Sporedne reakcije

Diketopiperazin

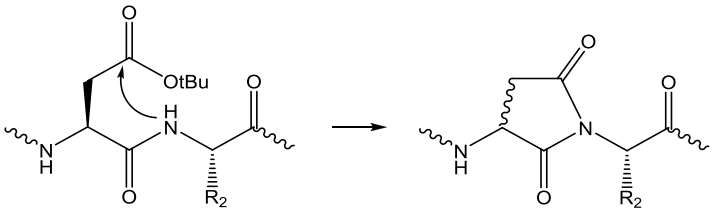
Slobodna N^{α}-amino skupina dipeptida je podložna bazom kataliziranom intramolekulskom napadu C-kraja karbonila. Prema tome, bazom katalizirana deprotekcija Fmoc zaštitne skupine može dovesti do nastanka diketopiperazina dok hidroksimetilna izlazna skupina ostaje na nosaču (Slika 31). Za osjetljive Fmoc sekvence preporučena je deprotekcija s piperidin-DMF (1 : 1) u trajanju 5 min ili 0,1 mol dm^{-3} otopina tetrabutilamonij fluorida (uz dodatak MeOH) u DMF za minimiziranje ciklizacije. Alternativno, druga i treća aminokiselina se mogu unaprijed povezati kao N^{α}-zaštićeni dipeptid, čime je izbjegnuta deprotekcija na drugoj aminokiselini koja može dovesti do nastanka diketopiperazina.[118-120]



Slika 31. Diketopiperazin

Aspartimid

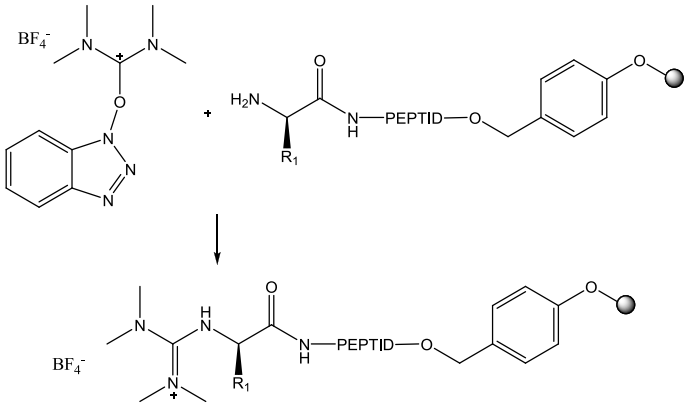
U reakciji dolazi do eliminacije i nastanka aspartimida koji se može raspasti u vodi na željeni alfa-peptid i nusprodukt kod kojeg lanac raste iz beta-karbonilne skupine. Nastanak aspartimida (Slika 32) ovisi o sekvenci s kojom se radi. Sekvence najpodložnije ciklizaciji u bazičnim uvjetima su: Asp(OBzl)-Gly, -Ser, -Thr, -Asn, i –Gln, a također su osjetljive i na jako kisele uvjete. Ova sporedna reakcija se može minimalizirati upotrebom 0,1 mol dm^{-3} HOBt u piperidinu ili piperazinu. Međutim, potpuno sprećavanje ove reakcije je moguće jedino ako Asp-X amidnu vezu maskiramo zaštitnom skupinom na temelju amida (npr. 2-hidroksi-4-metoksibenzil, Hmb).[121-125]



Slika 32. Aspartimid

Gvanilacija

Ova reakcija se događa tijekom reakcije kondenzacije s uronium/aminium reagensom. Sprečava se aktiviranjem aminokiseline prije kondenzacije (Slika 33).



Slika 33. Gvanilacija

3-(1-Piperidinil)alanin

Prilikom sinteze peptida s Cys na C-kraju, dolazi do nastanka 3-(1-piperidinil) alanina. Bazom katalizirana eliminacija sulfhidrilne (Acm) zaštitne skupine daje dehidroalanin, a zatim dodatak piperidina daje modificirani peptid na C-kraju. Ova reakcija se minimizira korištenjem tritilne zaštite C-kraja Cys.

Transfer Pmc s Arg na Trp tijekom deprotekcije s TFA

Reakcija transfera Pmc zaštitne skupine sa Arg na Trp se događa kada se koristi nezaštićeni Trp. Količina nastanka nus-produkta ovisi o udaljenosti između bočnih lanaca Trp i Arg.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE

Sve upotrebljene kemikalije u sintezi su bile analitičke čistoće, dok su otapala korištena u radu pročišćena prema standardnim propisima. Polazni spojevi su komercijalno dostupne supstance.

Automatska sinteza peptida provedena je na instrumentu za sintezu na čvrstom nosaču firme Protein Tehnologies Inc. (Tucson, Arizona, SAD).

Karakterizacija sintetiziranih spojeva provedena je pomoću nuklearne magnetske rezonance (NMR), masene spektrometrije (HRMS, MS-ESI), te određivanjem temperature tališta i optičko skretanje.

NMR spektri snimljeni su na Bruker 600 spektrometru, pri frekvencijama 600,13 MHz (^{1}H) i 150,91 MHz (^{13}C). NMR spektri spojeva snimljeni su u otapalu DMSO-d_6 (δ_H= 2,50 ppm, δ_C= 39,51 ppm) pri sobnoj temperaturi. Kemijski pomaci (δ) izraženi su prema tetrametilsilanu (TMS) u ppm vrijednostima. Konstante sprege (J) izražene su u hercima (Hz). Spektri su asignirani na temelju jednodimenzionalnih ^{1}H i APT (engl. *Attached Proton Test*) i dvodimenzionalnih COSY (engl. *Correlation Spectroscopy*), HETCOR (engl. *Heteronuclear Chemical Shift Correlation*), HMBC (engl. *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) i HMQC (engl. *Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation*) eksperimenata. U uglatim zagradama [ ] navedeni su ppm pomaci koji mogu biti pripisani C atomu jedne od skupina navedene u zagradi ( ).

Identifikacijski maseni spektri (MS-ESI) spojeva snimljeni su na uređaju Agilent 6410 Triple Quad tvrtke Agilent Tehnologies uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI, engl. *Electron Spray Ionisation*). HPLC-MS analiza rađena je na Zorbax RF koloni XDB-C18 (3,5 μm, 4,6·75 mm).

Spektri masa visoke rezolucije snimljeni su na instrumentu MALDI-TOF/TOF 4800 Plus analyzer (matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja – analizator masa s vremenom leta).

Točka tališta (t.t.) određena je na Tottoli (Buchu) aparatu i nije korigirana.

Optička skretanja određena su na Optical Activity LTD automatskom AA-10 polarimetru pri temperaturi 20 – 25 °C.

Tijek reakcija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva ispitani su tankoslojnom kromatografijom (TLC). Tankoslojna kromatografija provedena je na pločicama silikagela Kieselgel 60 GF_{254} (Merk). Spojevi su detektirani prskanjem s 10 %-tnom sumpornom kiselinom ili ninhidrinom uz zagrijavanje, te korištenjem UV-svjetlosti.

Ugljikohidratni produkti su pročišćeni brzom (flash) kromatografijom na koloni silikagela Kieselgel 60 F_{254} (0,040 – 0,063 mm) (Merk) te je određen retencijski faktor (R_f). Rabljene su sljedeće smjese otapala za tankoslojnu kromatografiju i kromatografiju na stupcu:

A EtOAc : EtOH : HOAc : H_2O = 70 : 10 : 2 : 2;

B EtOAc : HOAc : H_2O = 70 : 2 : 2;

C EtOAc : HOAc : H_2O = 70 : 1 : 1;

D DCM : MeOH = 9 : 1;

E EtOAc : EtOH : HOAc : H_2O = 70 : 20 : 2 : 2.

Glikopeptidni produkti su pročišćeni tekućinskom kromatografijom visoke rezolucije (RP HPLC) na instrumentu Varian 940 LC opremljen Photodiodoe Array detektorom, na preparativnoj koloni Phenomenex Luna C_{18} (5 μm, 21,2·250 nm). Valne duljine detekcije su bile 215 nm i 280 nm, a protok je iznosio 10 mL/min. Određena su retencijska vremena (t_R) priređenih glikopeptida. Rabljene su sljedeće smjese otapala za RP HPLC kromatografiju:

F Gradijent: 0 → 10 min, 25 % MeOH/ 0,1 TFA; 10 → 20 min, 25 % MeOH/ 0,1 TFA → 50 % MeOH/ 0,1 % TFA; 20 → 25 min, 50 % MeOH/ 0,1 % TFA; 25 → 30 min, 50 % MeOH/ 0,1 % TFA → 25 % MeOH/ 0,1 TFA.

G Gradijent: 0 → 10 min, 30 % MeOH/ 0,1 TFA; 10 → 20 min, 30 % MeOH/ 0,1 TFA → 52,5 % MeOH/ 0,1 % TFA; 20 → 25 min, 52,5 % MeOH/ 0,1 % TFA; 25 → 30 min, 52,5 % MeOH/ 0,1 % TFA → 30 % MeOH/ 0,1 TFA.

Provjera čistoće produkata provedena je na analitičkoj koloni Phenomenex Luna C_{18} (5 μm, 4,6·250 nm). Valne duljine detekcije su bile 215 nm i 280 nm, a protok otapala iznosio je 0,5 mL/min. Rabljena je smjesa otapala F i G.

Ispitivanje optičke čistoće provedeno je kvantitativnom analizom hidrolizata: 1 mg spoja hidroliziran je 1 ml 6 mol dm^{-3} klorovodične kiseline na 110 °C kroz 24 sata u hermetički zatvorenoj ampuli. Nakon obrade suhi su hidrolizati otopljeni u metanolu,

naneseni na aktivirane kiralne pločice te ispitani tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala:

H MeCN : MeOH : H_2O = 4 : 1 : 1;

I MeOH : H_2O : MeCN = 5 : 5 : 3.

Provjera uspješnosti sinteze na čvrstom nosaču rađena je ninhidrinskim testiom prema Kaiseru: na nekoliko zrnaca smole dobro isprane DCM-om dodaje se 1 – 3 kapi otopina a, b, i c, te se zagrijava na 100 °C 5 min. Otopine: a) ninhidrin (0,5 g) u EtOH (10 mL), b) fenol (80 g) u EtOH (20 mL), c) 0,001 M KCN (6,5 mg/100 mL H_2O; 0,4 mL) u piridinu (20 mL).

UV/ VIS spektri snimljeni su na Varian Cary 100 Bio spektrofotometru u kvarcnim kivetama, a uzorci otopljeni u kakodilatnom puferu.

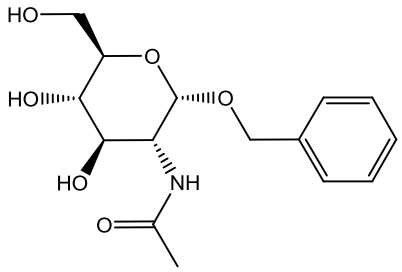
CD (cirkularni dikroizam) spektri snimljeni su na Jasco J-815 spektrometru.

Fluorescencijski spektri snimljeni su na Varian Cary Eclipse spektrofotometru.

3.2. SINTEZA ZAŠTIĆENE MURAMINSKE KISELINE

3.2.1. Benzil-2-acetamido-2-deoksi-α-D-glukopiranozid (2)[126]

N-acetil-α-D-glukozamina (**1**, 10 g, 0,045 mol) i *p*-toluensulfonska kiselina monohidrat (500 mg) suspendiraju se u benzilnom alkoholu (72 mL) i toluenu (120 mL). Reakcijska smjesa se refluksira u aparaturi po Dean-Stark-u 4 sata na temperaturi od 130 °C. Zatim se ohladi na sobnu temperaturu te se doda zasićena otopina natijeva bikarbonata do postizanja pH ~ 6. Toluen se upari pri sniženom tlaku, a ohlađena reakcijska smjesa se polako doda uz miješanje u smjesu dietil-eter : heksan (2 : 1, 260 mL). Reakcijska smjesa se snažno miješana 3 h, ostavi preko noći u hladnjaku, a zatim odfiltrira. Nastali smeđi talog se ispere eterom, te prekristalizira iz 2-propanola i ispere hladnim 2-propanolom. Dobiveno je 10,1 g (72 %) spoja **2** kao bijele krutine.



$C_{15}H_{21}NO_6$

M_r = 311,33

t.t. = 186 – 187 °C (lit. 185 – 186 °C)

R_f (A) = 0,42

$[\alpha]_D$ = +170 ° c1, voda

(lit. $[\alpha]_D$ = +168 ° c1, voda)[127]

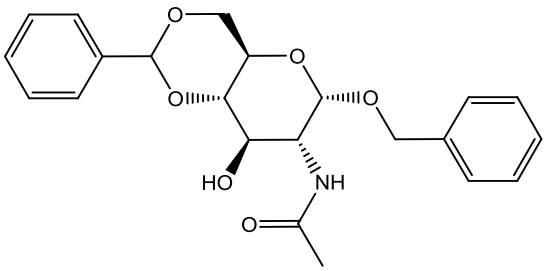
MS-ESI: *m/z* 312 $[M+H]^+$

^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 7,81 (d, 1H, *J*=8.2 Hz, NH); 7,35-7,28 (m, 5H, Ph); 5,01 (d, 1H, *J*=5.8 Hz, OH-4); 4,73 (d, 1H, *J*=5.8 Hz, OH-3); 4,70 (d, 1H, *J*=3.2 Hz, H-1), 4,66 (d, 1H, *J*=12.3 Hz, CH_2b-Ph); 4,54 (t, 1H, *J*=5.8 Hz, OH-6); 4,41 (d, 1H, *J*=12.3 Hz, CH_2a-Ph); 3,68 (m, 1H, H-2); 3,65 (m, 1H, H-6b); 3,53 (m, 1H, H-3); 3,50 (m, 1H, H-6a); 3,45 (m, 1H, H-5); 3,16 (m, 1H, H-4); 1,83 (s, 3H, CH_3-CON acetil).

^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 169,38 (CO acetil); 137,91 (Ph (*C*)); 128,13-127,37 (Ph(*CH*)); 95,87 (C-1); 73,10 (C-5); 70,89 (C-4); 70,55 (C-3); 67,65 (CH_2-Ph); 60,82 (C-6); 53,71 (C-2); 22,52 (CH_3-CON acetil).

3.2.2. Benzil-2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-α-D-glukopiranozid (3)[128]

Suspenzija benzil 2-acetamido-2-deoksi-α-D-glukopiranozida (**2**, 6 g, 0,019 mol), benzaldehida (100 mL) i dobro smrvljenog bezvodnog $ZnCl_2$ (6 g) mućka se na sobnoj temperaturi preko noći. Bijela se suspenzija izlije u ledenu vodu-benzin (80 mL - 60 mL) te miješa 15 minuta. Nastali se bijeli talog odsiše te ispere vodom i heksanom. Produkt se suši na zraku i u vakuumu. Sirovi se produkt prekristalizira iz smjese 2-propanola (100 mL) i dioksana (40 mL). Nastala bijela krutina se odsiše i ispere hladnim 2-propanolom. Dobiveno je 6,1 g (80 %) spoja **3**.



$C_{22}H_{25}NO_6$

M_r = 399,44

t.t. = 240 – 242 °C (lit. 263 – 264 °C)

R_f (B) = 0,72

$[\alpha]_D$ = +110 ° c1, piridin

(lit. $[\alpha]_D$ = +108 ° c1, piridin)[129]

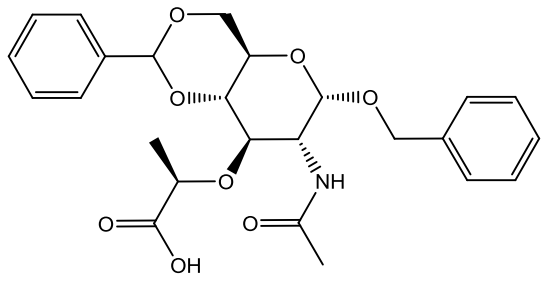
MS-ESI: *m/z* 400 $[M+H]^+$

^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 7,97 (d, 1H, *J*=8,3 Hz, NH); 7,46-7,30 (m, 10H, Ph); 5,62 (s, 1H, *CH*-Ph); 5,16 (d, 1H, *J*=5,8 Hz, OH-3); 4.80 (d, 1H, *J*=3,6, H-1); 4,69 (d, 1H, *J*=12,3 Hz, CH_2b-Ph); 4,48 (d, 1H, *J*=12,3 Hz, CH_2a-Ph); 4,14 (m, 1H, H-6b); 3,84 (m, 1H, H-2); 3,74-7,71 (m, 2H, H-3, H-6a); 3,69 (m, 1H, H-5); 3,51 (t, 1H, *J*=8,8 Hz, H-4); 1,84 (s, 3H, CH_3-CON acetil).

^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 169,40 (CO acetil); 137,67 (Ph (*C*)); 129,21-126,35 (Ph(*CH*)); 100,84 (*CH*-Ph); 96,93 (C-1); 82,08 (C-4); 68,57 (CH_2-Ph); 67,98 (C-6); 67,23 (C-3); 62,82 (C-5), 54,17 (C-2); 22,49 (CH_3-CON acetil).

3.2.3. Benzil-2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-*O*-[(*R*)-1-(karboksietil)]-α-D-glukopiranozid (4)[130]

U dvogrlu tikvicu s povratnim hladilom i $CaCl_2$ cijevčicom otopi se benzil 2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-α-D-glukopiranozid (**3**, 4 g, 0,010 mol) u apsolutnom dioksanu (170 mL) uz zagrijavanje i miješanje na 80 – 90 °C. Temperatura otopine spusti se na 70 °C te se u malim obrocima doda NaH (3,1 g 80 %, 0,130 mol). Reakcijska smjesa se miješa 1h na 95 °C, a zatim ohladi na 65 °C te dokapa otopina (*S*)-2-klorpropionske kiseline (**7**, 3,2 g, 0,030 mol) u apsolutnom dioksanu (10 mL). Nakon miješanja kroz 1h kod 65 °C doda se ponovo NaH (1,9 g, 0,080 mol), te se nastavi miješanje kod 70 °C kroz 24 sata. Reakcijska smjesa se ohladi (ledena kupelj) pa se oprezno dokapa ledena voda da se razori suvišak NaH. Nakon odvajanja slojeva u lijevku za odjeljivanje, gornji svjetložuti sloj se profiltrira, a dioksan zatim upari u vakuumu do približno 30 mL. Nastala gusta masa se razrijedi s vodom (50 mL) te ekstrahira diklormetanom (2·20 mL). Organski sloj se ispere s 20 mL vode. Vodeni sloj se ohladi na 0 °C, zakiseli na pH 3 (2 mol dm^{-3} HCl) i nakon 15 min miješanja uz hlađenje, produkt se odsiše, ispere s malo ledene vode i suši. Spoj je čišćen na koloni silikagela u sustavu otapala: DCM : MeOH = 9 : 1. Dobiveno je 3,7 g (78 %) spoja **4** kao bijele krutine.



$C_{25}H_{29}NO_8$

M_r = 471,50

t.t. = 238 – 240 °C (lit. 237 – 239 °C)

R_f (D) = 0,52

$[\alpha]_D$ = +133 ° c1, MeOH

(lit. $[\alpha]_D$ = +117 ° c 0,5, MeOH)[129]

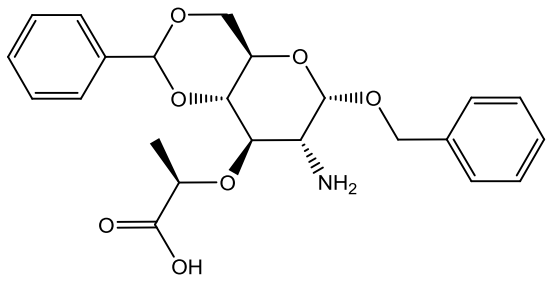
MS-ESI: *m/z* 472 $[M+H]^+$

^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 7,97 (d, 1H, *J*=5,2 Hz, NH); 7,42-7,30 (m, 10H, Ph); 5,70 (s, 1H, *CH*-Ph); 5,04 (d, 1H, J=3.2 Hz, H-1); 4,69 (d, 1H, *J*=12,3 Hz, CH_2b-Ph); 4,48 (d, 1H, *J*=12,3 Hz, CH_2a-Ph); 4,28 (q,1H, *J*=6,9 Hz, *CH*-CH_3 laktil); 4,14 (m, 1H, H-6b); 3,80 (m, 1H, H-2); 3,77 (m, 1H, H-6a); 3,73 (m, 1H, H-3); 3,72 (m, 1H, H-2); 3,70 (m, 1H, H-5); 1,85 (s, 3H, CH_3-CON acetil); 1,27 (d, 3H, J=6,9 Hz, CH-CH_3 laktil).

^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 175,20 (COOH); 169,33 (CO acetil); 137,57 (Ph(*C*)); 128,74-125,79 (Ph(*CH*)); 100,22 (*CH*-Ph); 96,77 (C-1); 81,50 (C-4); 75,05 (C-3); 75,03 (*CH*-CH_3 laktil); 68,93 (*CH_2*-Ph); 67,82 (C-6); 62,84 (C-5); 53,47 (C-2); 22,56 (*CH_3*-CON); 18,63 (CH-*CH_3* laktil).

3.2.4. Benzil-2-amino-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-*O*-[(*R*)-1-(karboksietil)]-α-D-glukopiranozid (5)[126]

Benzil 2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-3-*O*-[(*R*)-1-karboksietil]-2-deoksi-α-D-glukopiranozid (**4**, 2 g, 4 mol) se otopi u 5 mol dm^{-3} otopini KOH u etanolu (28 mL). Reakcijska smjesa se miješa i refluksira (120 °C) u inertnim uvjetima, pod dušikom preko noći (24 sata). U reakcijsku smjesu doda se zasićena otopina NH_4Cl, te ekstrahira diklormetanon (3·50 ml). Spoj je čišćen na koloni silikagela u sustavu otapala: EtOAc : EtOH : HOAc : H_2O = 70 : 20 : 2 : 2 i DCM : MeOH = 9 : 1. Dobiveno je 1,4 g (81 %) spoja **5**.



$C_{23}H_{27}NO_7$
M_r = 429,46
t.t. = 175 – 176 °C
R_f (E) = 0,52
$[\alpha]_D$ = +128 ° c1, MeOH

MS-ESI: *m/z* 430 $[M+H]^+$

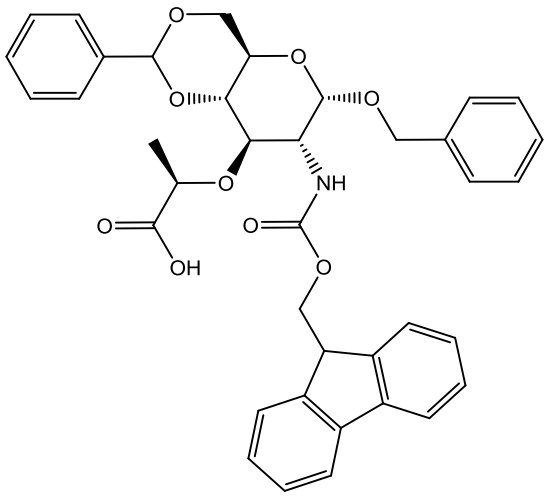
HRMS: *m/z* 430,1849 (izračunato: 430,1860)

^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 7,97 (d, 1H, *J*=5,2 Hz, NH_2); 7,43-7,30 (m, 10H, Ph); 5,68 (s, 1H, *CH*-Ph); 5,08 (d, 1H, *J*=3,7 Hz, H-1); 4,69 (d, 1H, *J*=11,8 Hz, *CH_2*a-Ph); 4,57 (d, 1H, *J*=11,8 Hz, *CH_2*b-Ph); 4,11 (m, 1H, H-6a); 3,91 (q, 1H, *J*=7,0 Hz, *CH*-CH_3 laktil); 3,72 (m, 1H, H-6b); 3,66 (m, 1H, H-4); 3,63 (m, 1H, H-5); 3,61 (m, 1H, H-3); 3,11 (m, 1H, H-2); 1,22 (d, 3H, *J*=6,9 Hz, CH-*CH_3* laktil).

^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 175,68 (COOH); 137,31 (Ph(*C*)); 128,77-125,78 (Ph(*CH*)); 100,17 (*CH*-Ph); 96,83 (C-1); 80,91 (C-4); 78,59 (*CH*-CH_3 laktil); 76,80 (C-3); 69,39 (*CH_2*-Ph); 67,59 (C-6); 62,89 (C-5); 53,44 (C-2); 19,30 (CH-*CH_3* laktil).

3.2.5. Benzil-2-amino-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-*N*-9-fluorenilmetoksikarbonil-3-*O*-[(*R*)-1-(karboksietil)]-α-D-glukopiranozid (6)

Benzil 2-amino-4,6-*O*-benziliden-3-*O*-[(*R*)-1-karboksietil]-2-deoksi-α-D-glukopiranozid (**5**, 1 g, 2,33 mmol) otopi se u DMF-u (20 mL) uz dodatak natrijeva bikarbonata (392 mg, 2 ekv.) otopljenog u vodi (20 mL). Reakcijska smjesa se ohladi na 0 °C te postupno doda 9-fluorenilmetil-*N*-sukcinimidil-karbonat (Fmoc-OSu, 865 mg, 1,1 ekv.) kao otopina u DMF-u (također ohlađena) (20 mL). Reakcija se miješa u ledu 2h. Nastali talog dodatkom vode (100 mL) se profiltrira i ispere vodom. Produkt se suši na $CaCl_2$ i vakuum pumpi. Spoj je čišćen na koloni silikagela u sustavu otapala DCM : MeOH = 9 : 1. Dobiveno je 1,35 g (90 %) spoja **6**.



$C_{38}H_{37}NO_9$

M_r = 651,70

t.t. = 179 – 180 °C

R_f (C) = 0,48

$[\alpha]_D$ = +71 ° c1, DMF

MS-ESI: *m/z* 652 $[M+H]^+$; 674 $[M+Na]^+$

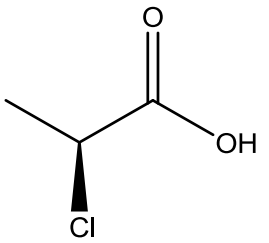
HRMS: *m/z* 674,2372 (izračunato 674,2360)

^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 7,95 (NH); 7,91-7,89 (m, 2H, Fmoc); 7,75-7,71 (m, 2H, Fmoc); 7,43-7,28 (m, 12H, Ph); 7,22-7,20 (m, 2H, Fmoc); 5,69 (s, 1H, *CH*-Ph); 5,21 (d, 1H, *J*=3,1 Hz, H-1); 4,69 (d, 1H, *J*=12,4 Hz, *CH*$_2$b-Ph); 4,48 (d, 1H, *J*=12,4 Hz, *CH*$_2$a-Ph); 4,23 (m, *CH*$_2$b-CH-Fmoc); 4,22 (m, *CH*-Fmoc); 4,15 (m, 1H, H-6a); 4,11 (m, *CH*$_2$a-CH-Fmoc); 4,10 (q, 1H, *J*=7,0 Hz, *CH*-CH_3 laktil); 3,79 (m, 1H, H-6b); 3,85 (m, 1H, H-3); 3,77 (m, 1H, H-4); 3,71 (m, 1H, H-5); 3,44 (m, 1H, H-2); 1,26 (d, 3H, *J*=7,4 Hz, CH-*CH*$_3$ laktil).

^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 177,21 (COOH); 156,44 (CO Fmoc); 143,83 (Fmoc (*C*));140,61 (Fmoc (*C*)); 137,70 (Ph (*C*)); 128,88-125,32 (Ph (*CH*)); 120,08-119,98 (Fmoc (*CH*)); 100,21 (*CH*-Ph); 96,66 (C-1); 82,56 (C-4); 77,51 (*CH*-CH_3 laktil); 72,83 (C-3); 68,78 (*CH*$_2$-Ph); 67,91 (C-6); 65,76 (*CH*$_2$-CH Fmoc); 63,09 (C-5), 55,77 (C-2); 46,59 (CH_2-*CH* Fmoc); 19,30 (CH-*CH*$_3$ laktil).

3.2.6. (*S*)-2-klorpropionska kiselina (7)[131]

L-alanin (6 g, 0,067 mol) otopi se u 8 mol dm^{-3} HCl (84 mL). Otopina se ohladi na 0 °C postupno se dodaje $NaNO_2$ (7,6 g u 24 mL H_2O) uz snažno miješanje da temperatura ne prijeđe 5 °C (2 h). Reakcijska smjesa se miješa 4h na +2 °C, a zatim preko noći na sobnoj temperaturi u inertnim uvjetima (pod dušikom). Uz snažno miješanje doda se natrijev bikarbonat (6,6 g) oprezno u malim porcijama. Reakcijska smjesa se ekstrahirana s eterom (2·50 mL, 1·30 mL), a spojeni eterski ekstrakti se isperu zasićenom otopinom kalcijeva klorida (20 mL) koja se reekstrahira dietil-eterom (1·30 mL). Spojeni eterski ekstrakti se suše 2 h na $CaCl_2$. Nakon uparavanja etera, preostalo ulje se destilira u vakuumu vodene sisaljke. Dobiveno je 5,3 g (73 %) spoja **7**.



t.v. = 89 °C (2,66 kPa)

$[\alpha]_D$ = −16,3 ° (lit. −13,9 °)

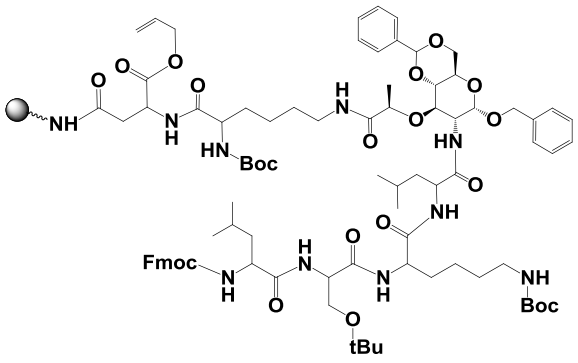
^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ/ppm: 1,74 (d,3H,CH_3); 4,45 (q,1H,CH); 10,5 (s, 1H, OH).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ/ppm: 21,33 (C-3); 52,08 (C-2); 176,04 (C-1).

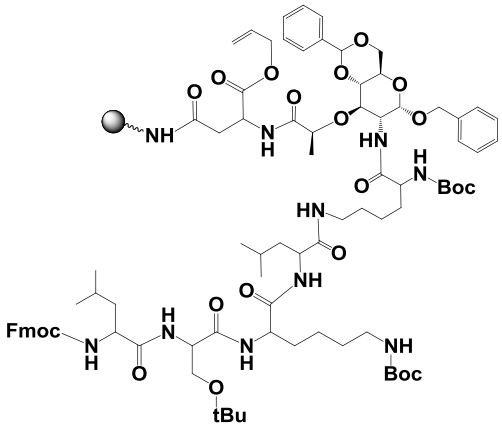
MS-ESI *m/z* 153,1 $[M+2Na]^{2+}$ (100 %); 155,0 $[M+2+2Na]^{2+}$ (32 %).

3.3. SINTEZA GLIKOPEPTIDA

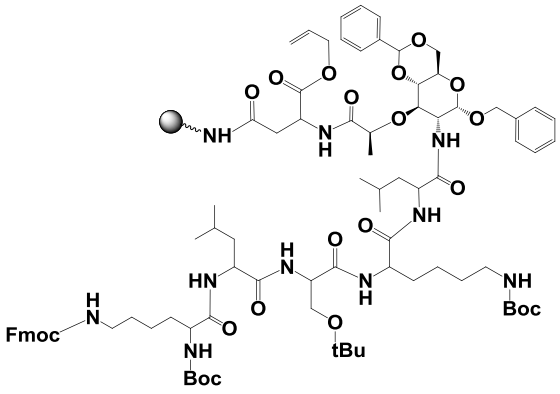
3.3.1. Automatska sinteza zaštićenih linearnih glikopeptida na čvrstom nosaču



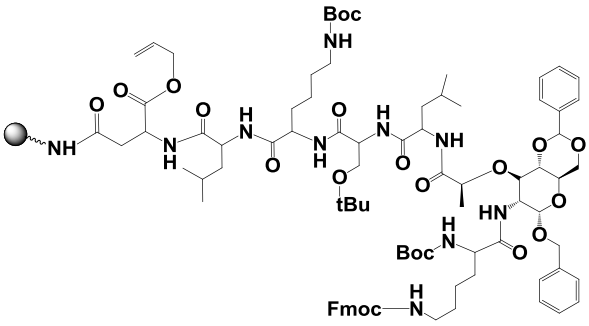
8



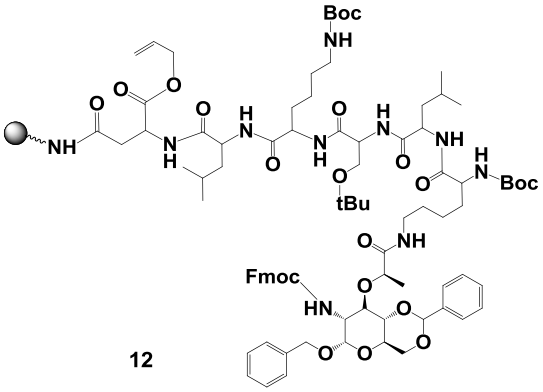
9



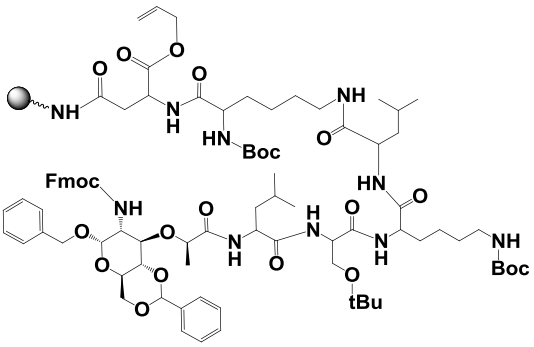
10



11



12



13

Po jedna Fmoc *N*-terminalno zaštićena aminokiselina (0,252 mmol) i reagensi *O*-benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametilamonijev heksafluorofosfat (HBTU, 0,252 mmol) ili *O*-(7-azabenzotriazol-1-il))-1,1,3,3-tetrametilamonijev heksafluorofosfat (HATU, 0,252 mmol) i 1-hidroksibenzotriazol (HOBt, 0,252 mmol) odvažu se u bočice i svaka aminokiselina postavi se na odgovarajući položaj na instrumentu. Za sintezu je korištena smola Rink amid MBHA resin (0,56 mmol/g; 150 mg, 0,084 mmol), a reakcija je provedena u *N*,*N*-dimetilformamidu (DMF). Svaki stupanj automatske sinteze peptida na čvrstom nosaču regulira se odgovarajućem programom navedenim u Tablicama 2 – 7. Deprotekcija Fmoc zaštitne skupine se provodi 20 %-tnim otopinom piperidina u DMF-u, aktivacija s 0,4 mol dm^{-3} otopinom *N*-metilmorfolina (NMM) u DMF-u, a smola se ispere DMF-om.

Program 1: Bubrenje smole (2·10 min), deprotekcija smole (3·6 min), ispiranje (6·5 mL), aktivacija *N*-terminalno zaštićena aminokiseline (1 min), reakcija vezanja (1 h), ispiranje (3·5 mL).
Program 2: Ispiranje smole (3·5 mL), deprotekcija na smoli vezane aminokiseline ili peptida (3·6 min), ispiranje (6·5 mL), aktivacija *N*-terminalno zaštićene aminokiseline (1 min), reakcija vezanja (1 min), ispiranje smole (3·5 mL).

Tablica 2. Sinteza zaštićenog linearnog peptida **8**

Program	Uzorak br.	Aminokiselina i reagensi	Odvaga (mg)	Molekulska masa (g/mol)
1	1	Fmoc-Asp-Oall HOBt HBTU	99,6 34,1 95,6	395,4 135,1 379,2
2	2	Boc-Lys(Fmoc)-OH HOBt HBTU	118,1 34,1 95,6	468,5 135,1 379,2
2	3	Fmoc-Mur(*O*-Pg)-OH HOBt HATU	164,2 34,1 95,8	651,7 135,1 380,2
2	4	Fmoc-Leu-OH HOBt HATU	89,1 34,1 95,6	353,4 135,1 380,2
2	5	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	118,1 34,1 95,6	468,5 135,1 379,2
2	6	Fmoc-Ser(tBu)-OH HOBt HBTU	96,6 34,1 95,6	383,5 135,1 379,2
2	7	Fmoc-Leu-OH HOBt HBTU	89,1 34,1 95,6	353,4 135,1 379,2

Tablica 3. Sinteza zaštićenog linearnog peptida **9**

Program	Uzorak br.	Aminokiselina i reagensi	Odvaga (mg)	Molekulska masa (g/mol)
1	1	Fmoc-Asp-Oall HOBt HBTU	99,6 34,1 95,6	395,4 135,1 379,2
2	2	Fmoc-Mur(*O*-Pg)-OH HOBt HATU	164,2 34,1 95,8	651,7 135,1 380,2
2	7	Boc-Lys(Fmoc)-OH HOBt HATU	118,1 34,1 95,8	468,5 135,1 380,2
2	3	Fmoc-Leu-OH HOBt HBTU	89,1 34,1 95,6	353,4 135,1 379,2
2	4	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	118,1 34,1 95,6	468,5 135,1 379,2
2	5	Fmoc-Ser(tBu)-OH HOBt HBTU	96,6 34,1 95,6	383,5 135,1 379,2
2	6	Fmoc-Leu-OH HOBt HBTU	89,1 34,1 95,6	353,4 135,1 379,2

Tablica 4. Sinteza zaštićenog linearnog peptida **10**

Program	Uzorak br.	Aminokiselina i reagensi	Odvaga (mg)	Molekulska masa (g/mol)
1	1	Fmoc-Asp-Oall HOBt HBTU	99,6 34,1 95,6	395,4 135,1 379,2
2	2	Fmoc-Mur(*O*-Pg)-OH HOBt HATU	164,2 34,1 95,8	651,7 135,1 380,2
2	3	Fmoc-Leu-OH HOBt HATU	89,1 34,1 95,6	353,4 135,1 380,2
2	4	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	118,1 34,1 95,6	468,5 135,1 379,2
2	5	Fmoc-Ser(tBu)-OH HOBt HBTU	96,6 34,1 95,6	383,5 135,1 379,2
2	6	Fmoc-Leu-OH HOBt HBTU	89,1 34,1 95,6	353,4 135,1 379,2
2	7	Boc-Lys(Fmoc)-OH HOBt HBTU	118,1 34,1 95,6	468,5 135,1 379,2

Tablica 5. Sinteza zaštićenog linearnog peptida **11**

Program	Uzorak br.	Aminokiselina i reagensi	Odvaga (mg)	Molekulska masa (g/mol)
1	1	Fmoc-Asp-Oall HOBt HBTU	99,6 34,1 95,6	395,4 135,1 379,2
2	2	Fmoc-Leu-OH HOBt HBTU	89,1 34,1 95,6	353,4 135,1 380,2
2	3	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	118,1 34,1 95,6	468,5 135,1 379,2
2	4	Fmoc-Ser(tBu)-OH HOBt HBTU	96,6 34,1 95,6	383,5 135,1 379,2
2	5	Fmoc-Leu-OH HOBt HBTU	89,1 34,1 95,6	353,4 135,1 379,2
2	6	Fmoc-Mur(*O*-Pg)-OH HOBt HATU	164,2 34,1 95,8	651,7 135,1 380,2
2	7	Boc-Lys(Fmoc)-OH HOBt HATU	118,1 34,1 95,8	468,5 135,1 380,2

Tablica 6. Sinteza zaštićenog linearnog peptida **12**

Program	Uzorak br.	Aminokiselina i reagensi	Odvaga (mg)	Molekulska masa (g/mol)
1	1	Fmoc-Asp-Oall HOBt HBTU	99,6 34,1 95,6	395,4 135,1 379,2
2	2	Fmoc-Leu-OH HOBt HBTU	89,1 34,1 95,6	353,4 135,1 379,2
2	3	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	118,1 34,1 95,6	468,5 135,1 379,2
2	4	Fmoc-Ser(tBu)-OH HOBt HBTU	96,6 34,1 95,6	383,5 135,1 379,2
2	5	Fmoc-Leu-OH HOBt HBTU	89,1 34,1 95,6	353,4 135,1 379,2
2	6	Boc-Lys(Fmoc)-OH HOBt HBTU	118,1 34,1 95,6	468,5 135,1 379,2
2	7	Fmoc-Mur(*O*-Pg)-OH HOBt HATU	164,2 34,1 95,8	651,7 135,1 380,2

Tablica 7. Sinteza zaštićenog linearnog peptida **13**

Program	Uzorak br.	Aminokiselina i reagensi	Odvaga (mg)	Molekulska masa (g/mol)
1	1	Fmoc-Asp-Oall HOBt HBTU	99,6 34,1 95,6	395,4 135,1 379,2
2	2	Boc-Lys(Fmoc)-OH HOBt HBTU	118,1 34,1 95,6	468,5 135,1 379,2
2	3	Fmoc-Leu-OH HOBt HBTU	89,1 34,1 95,6	353,4 135,1 379,2
2	4	Fmoc-Lys(Boc)-OH HOBt HBTU	118,1 34,1 95,6	468,5 135,1 379,2
2	5	Fmoc-Ser(tBu)-OH HOBt HBTU	96,6 34,1 95,6	383,5 135,1 379,2
2	6	Fmoc-Leu-OH HOBt HBTU	89,1 34,1 95,6	353,4 135,1 379,2
2	7	Fmoc-Mur(*O*-Pg)-OH HOBt HATU	164,2 34,1 95,8	651,7 135,1 380,2

3.3.2. Opći postupak priprave linearnih glikopeptida

A. Selektivno uklanjanje alilne zaštitne skupine

Na smolu (Rink amid MBHA resin) s vezanim peptidom doda se aps. DCM (2 mL). Adukt dimetilamin borana ($Me_2NH{\cdot}BH_3$; 29,7 mg, 0,504 mmol; 6 ekv. u odnosu na broj zaštitnih skupina) otopi se u DCM-u i doda smoli. Reakcija se miješa 5 min pod dušikom, zatim se u reakcijsku smjesu doda tetrakis(trifenilfosfin) paladij ($Pd(PPh_3)_4$; 9,7 mg; 0,008 mmol; 10 mol % bazirano na supstituciji smole za svaku zaštitnu skupinu) te nastavi miješati još 10 min pod dušikom, zaštićeno od svijetla. Smola se zatim ispere aps. DCM-om (5·3 mL). Cijeli postupak se ponovi još 2 puta.

Po završetku reakcije smola se ispere sljedećim otopinama: 1) DCM (5·3 mL); 2) 0,2 % trifluoroctena kiselina (TFA/DCM v/v, 3·5 mL); 3) DCM (5·3 mL); 4) 5 % diizopropiletilamin (DIEA/DCM v/v, 3·5 mL); 5) DCM (5·3 mL). Dobiveni peptid se bez izolacije koristi u daljnoj reakciji.

B. Uklanjanje Fmoc zaštitne skupine

Smola s peptidom se po završetku deprotekcije alilne zaštitne skupine, ispere s DMF-om (3·3 mL). Piperidin (20 %-tni, 5 mL) se doda u reakcijsku posudu sa smolom i miješa 15 minuta pod dušikom. Nakon toga, smola se ispere s DMF-om (3·3 mL). Ponovo se doda piperidin (20 %-tni, 5 mL) u reakcijsku posudu, te se miješa 10 min pod dušikom. Smola se ispere s DMF-om (3·2 mL) i DCM-om (5·2 mL). Ninhidrinski test po Kaiseru pokazao je plavu boju (prisutna slobodna amino skupina). Navedenim postupkom dobiveni su zaštićeni linearni glikopeptidi (**14**, **17**, **20**, **23**, **26**, **29**) vezani na smoli koji se bez izolacije koriste u daljnoj reakciji.

C. Skidanje linearnog glikopeptida s čvrstog nosača

Uklanjanje sintetiziranog linearnog glikopeptida sa smole i deprotekcija bočnih lanaca aminokiselina provodi se smjesom otapala (1,5 mL; TFA : TIS : H_2O = 95 : 2,5 : 2,5 v/v/v) na sobnoj temperaturi kroz 3 sata. Reakcijska smjesa se ispusti u hladni diizopropil-eter, ostavi

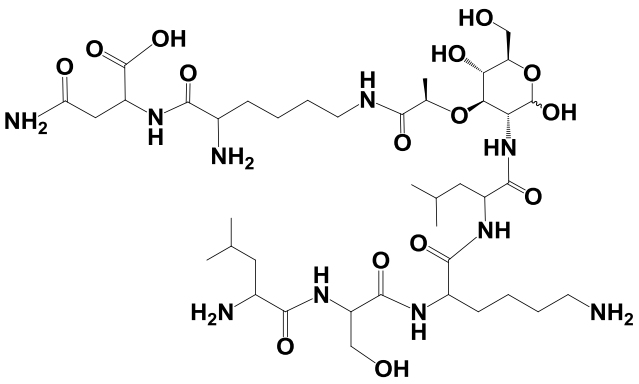
taložiti preko noći u hladnjaku, te se centrifugira. Navedenim postupkom dobiveni su linearni glikopeptidi (**15**, **18**, **21**, **24**, **27**, **30**) pročišćeni na RP HPLC preparativnoj koloni u sistemu otapala F.

D. Hidrogenoliza linearnog glikopeptida

Čisti produkt zaštićenog linearnog glikopeptida otopi se u smjesi otapala EtOH : HOAc : H_2O = 6 : 1,5 : 1,5 (9 mL) uz dodatak paladija kao katalizatora (10 % Pd/C, 170 mg). Smjesa se podvrgne hidrogenolizi na sobnoj temperaturi 18 sati. Potom se profiltrira katalizator preko Celita i upari otapalo. Navedenim postupkom dobiveni su potpuno nezaštićeni linearni glikopeptidi (**16**, **19**, **22**, **25**, **28**, **31**). Čistoća spojeva provjerena je na RP HPLC analitičkoj koloni u sistemu otapala F. Nezaštićeni linearni glikopeptidi su liofilizirani.

3.3.3. Karakterizacija linearnih glikopeptida

3.3.3.1. Linearni glikopeptid H-Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-N^{ε}-Lys-Asn-OH (16)



Iskorištenje: 70 %

$C_{40}H_{74}N_{10}O_{15}$

M_r = 935,07

t.t. = 131 – 133 °C

t_R (F) = 5,99

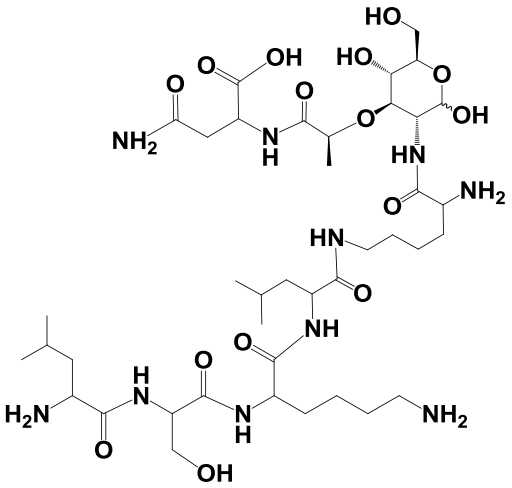
MS-ESI: *m/z* 935,8 $[M+H]^+$

HRMS: *m/z* 935,5377 $[M+H]^+$ (izračunato: 935,5408)

^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: 8,78-6,81 (NH); 5,02 (s, 1H, H-1α); 4,71 (d, 1H, H-1β); 4,54-3,70 (m, 7H, *CH*-CH_3, Leu^{1,4}-α, Lys^{3,6}-α, Ser-α, Asn-α); 3,68-3,09 (m, 7H, H-3, H-4, H-5, H-6a,b, Ser-β); 2,75-2,55 (m, 5H, H-2α, Lys^{3,6}-ε); 2,53-2,39 (m, 3H, Asn-β, H-2β); 1,91-1,69 (m, 4H, Lys^{3,6}-δ); 1,69-1,54 (m, 3H, Leu^{1,4}-γ, Lys^{3,6}-β); 1,54-1,41 (m, 2H, Leu^{1,4}-β); 1,31 (m, 3H, CH-*CH_3*); 1,30-1,19 (m, 4H, Lys^{3,6}-γ); 0,90-0,81 (m, 12H, Leu^{1,4}-δ,δ').

^{13}C NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: [173,26; 172,45; 170,94; 169,65] (CO); 94,10 (C-1β); 90,35 (C-1α); 76,82 (C-3); 75,35 (*CH*-CH_3); 72,32 (C-5); 70,16 (C-4); 61,70 (Ser-β); 60,72 (C-6); [55,19; 54,11; 52,50; 51,36; 51,04; 49,13] (Ser-α, C-2, Lys^{3,6}-α, Leu^{1,4}-α, Asn-α); [41,11; 40,04] (Leu^{1,4}-β); [38,50; 38,34] (Lys^{3,6}-ε); 36,68 (Asn-β); [30,46; 30,42] (Lys^{3,6}-δ); [28,63; 26,52] (Lys^{3,6}-β); [24,01; 23,64] (Leu^{1,4}-γ); [23,17; 22,80] (Leu^{1,4}-δ); [22,14; 21,68] (Lys^{3,6}-γ); [21,87; 21,30] (Leu^{1,4}-δ'); 19,24 (CH-*CH_3*).

3.3.3.2. Linearni glikopeptid H-Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ε}-Lys-Mur-Asn-OH (19)



Iskorištenje: 67 %

$C_{40}H_{74}N_{10}O_{15}$

M_r = 935,07

t.t. = 127 – 129 °C

t_R (F) = 7,11

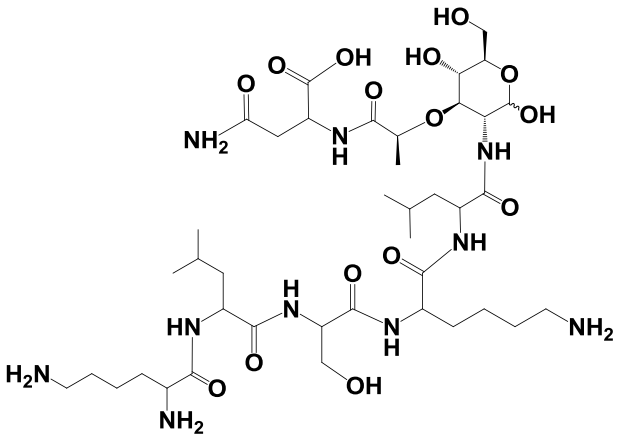
MS-ESI: *m/z* 935,7 $[M+H]^+$

HRMS: *m/z* 935,5396 $[M+H]^+$ (izračunato: 935,5408)

^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: 8,7-6,94 (NH); 5,10 (s, 1H, H-1α); 4,71 (d, 1H, H-1β); 4,64-3,75 (m, 7H, *CH*-CH_3, Leu^{1,4}-α, Lys^{3,5}-α, Ser-α, Asn-α); 3,84-3,14 (m, 7H, H-3, H-4, H-5, H-6a,b, Ser-β); 2,87-2,60 (m, 5H, H-2, Lys^{3,5}-ε); 2,52-2,48 (m, 2H, Asn-β); 1,89-1,67 (m, 4H, Lys^{3,5}-δ); 1,65-1,53 (m, 5H, Leu^{1,4}-γ, Lys^{3,5}-β); 1,50-1,42 (m, 4H, Leu^{1,4}-β); 1,35-1,30 (m, 3H, CH-*CH$_3$*); 1,30-1,22 (m, 4H, Lys^{3,5}-γ); 0,89-0,80 (m, 12H, Leu^{1,4}-δ,δ').

^{13}C NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: [173,59; 172,55; 171,88; 171,65; 171,05; 169,70; 169,07; 168,81] (CO); 94,28 (C-1β); 90,08 (C-1α); [80,29; 76,64; 76,40] (C-3,C-4,C-5); 74,94 (*CH*-CH_3); [72,30; 70,38; 69,30] (C-3,C-4,C-5); 61,71 (Ser-β); 60,69 (C-6); [57,05; 55,01; 54,25; 52,75; 52,53; 51,18; 50,80; 48,74] (Ser-α, C-2α,β, Lys^{3,5}-α, Leu^{1,4}-α, Asn-α); [40,93; 40,20] (Leu^{1,4}-β); [38,54; 38,30] (Lys^{3,5}-ε); 36,68 (Asn-β); [30,79; 30,42] (Lys^{3,5}-δ); [28,40; 26,46] (Lys^{3,5}-β); [24,18; 23,49] (Leu^{1,4}-γ); [22,91; 22,62] (Leu^{1,4}-δ); [22,10; 21,61] (Lys^{3,5}-γ); [21,96; 21,53] (Leu^{1,4}-δ'); 19,42 (CH-*CH$_3$*).

3.3.3.3. Linearni glikopeptid H-N^{ε}-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-Asn-OH (22)



Iskorištenje: 68 %

$C_{40}H_{74}N_{10}O_{15}$

M_r = 935,07

t.t. = 128 – 130 °C

t_R (F) = 7,16

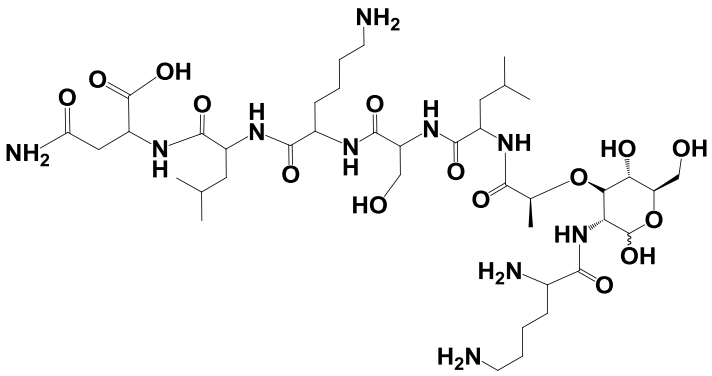
MS-ESI: *m/z* 935,7 $[M+H]^+$

HRMS: *m/z* 935,5444 $[M+H]^+$ (izračunato: 935,5408)

^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: 8,59-7,40 (NH); 5,01 (s, 1H, H-1α); 4,45 (d, 1H, H-1β); 4,55-3,74 (m, 7H, *CH*-CH_3, Leu^{2,5}-α, Lys^{1,4}-α, Ser-α, Asn-α); 3,78-3,17 (m, 7H, H-3, H-4, H-5, H-6a,b, Ser-β); 2,76-2,67 (m, 5H, H-2, Lys^{1,4}-ε); 2,67-2,55 (m, 2H, Asn-β); 1,92-1,65 (m, 4H, Lys^{1,4}-δ); 1,65-1,55 (m, 5H, Leu^{2,5}-γ, Lys-β); 1,51-1,42 (m, 4H, Leu^{2,5}-β); 1,33-1,30 (m, 3H, CH-*CH$_3$*); 1,30-1,22 (m, 4H, Lys^{1,4}-γ); 0,89-0,80 (m, 12H, Leu^{2,5}-δ,δ').

^{13}C NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: [173,16; 172,33; 171,70; 170,84; 169,84; 168,87] (CO); 95,32 (C-1β); 90,32 (C-1α); [80,13; 76,59] (C-3,C-4,C-5); 74,71 (*CH*-CH_3); [72,24; 70,11; 69,20] (C-3, C-4, C-5); 61,68 (Ser-β); 60,79 (C-6); [56,00; 54,99; 53,92; 52,44; 52,01; 51,23; 51,04; 49,11] (Ser-α, C-2α,β, Lys^{1,4}-α, Leu^{2,5}-α, Asn-α); [40,95; 40,64] (Leu^{2,5}-β); [38,56; 38,38] (Lys^{1,4}-ε); 36,57 (Asn-β); [30,86; 30,70] (Lys^{1,4}-δ); [26,49; 26,39] (Lys^{1,4}-β); [24,06; 24,02] (Leu^{2,5}-γ); [23,13; 23,08] (Leu^{2,5}-δ); [22,01; 21,04] (Lys^{1,4}-γ); [21,45; 21,27] (Leu^{2,5}-δ'); 19,25 (CH-*CH$_3$*).

3.3.2.4. Linearni glikopeptid H-N^{ε}-Lys-Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn-OH (25)



Iskorištenje: 71 %

$C_{40}H_{74}N_{10}O_{15}$

M_r = 935,07

t.t. = 127 – 129 °C

t_R (F) = 7,41

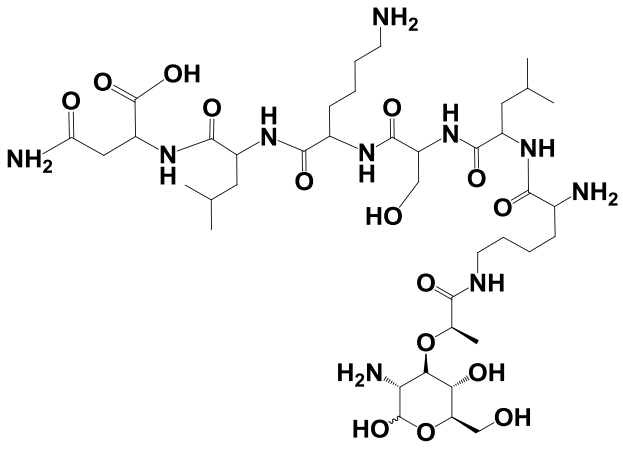
MS-ESI: *m/z* 935,5 $[M+H]^+$

HRMS: *m/z* 935,5436 $[M+H]^+$ (izračunato: 935,5408)

^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: 8,75-7,41 (NH); 5,15 (s,1H, H-1α); 4,54 (d, 1H, H-1β); 4,53-3,77 (m, 7H, *CH*-CH_3, Leu^{3,6}-α, Lys^{1,5}-α, Ser-α, Asn-α); 3,97-3,17 (m, 7H, H-3, H-4, H-5, H-6a,b, Ser-β); 2,75-2,55 (m, 5H, H-2, Lys^{1,5}-ε); 2,55-2,35 (m, 2H, Asn-β); 1,91-1,70 (m, 4H, Lys^{1,5}-δ); 1,61-1,53 (m, 5H, Leu^{3,6}-γ, Lys^{1,5}-β); 1,50-1,44 (m, 4H, Leu^{3,6}-β); 1,34-1,30 (m, 3H, CH-*CH_3*); 1,29-1,20 (m, 4H, Lys^{1,5}-γ); 0,89-0,81 (m, 12H, Leu^{3,6}-δ,δ').

^{13}C NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: [174,02; 172,59; 171,88; 171,65; 171,24; 171,00; 169,87; 168,57] (CO); 94,83 (C-1β); 89,95 (C-1α); 75,79 (C-3); 74,69 (*CH*-CH_3); [72,32; 70,49; 67,10] (C-3, C-4, C-5); 61,63 (Ser-β); 60,59 (C-6); [55,01; 54,41; 52,41; 52,25; 50,69; 50,63; 48,65] (Ser-α, C-2, Lys^{1,5}-α, Leu^{3,6}-α, Asn-α); [41,07; 40,77] (Leu^{3,6}-β); [38,56; 38,33] (Lys^{1,5}-ε); 36,50 (Asn-β); [31,10; 30,01] (Lys^{1,5}-δ); [26,52; 26,33] (Lys^{1,5}-β); [24,24; 24,02] (Leu^{3,6}-γ); [23,13; 23,03] (Leu^{3,6}-δ); [21,97; 21,07] (Lys^{1,5}-γ); [21,47; 21,29] (Leu^{3,6}-δ'); 19,74 (CH-*CH_3*).

3.3.3.5. Linearni glikopeptid H-Mur-N^{ε}-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn-OH (28)



Iskorištenje: 78 %

$C_{40}H_{74}N_{10}O_{15}$

M_r = 935,07

t.t. = 129 – 131 °C

t_R (F) = 8,29

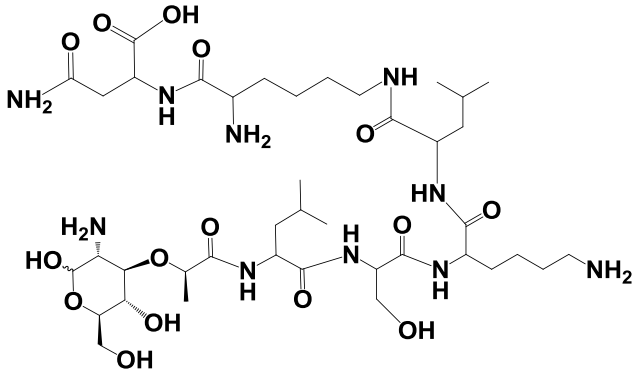
MS-ESI: *m/z* 935,7 $[M+H]^+$

HRMS: *m/z* 935,5454 $[M+H]^+$ (izračunato: 935,5408)

^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: 8,55-7,45 (NH); 5,20 (s,1H, H-1α); 4,73 (d, 1H, H-1β); 4,56-3,75 (m, 7H, *CH*-CH_3, Leu^{3,6}-α, Lys^{2,5}-α, Ser-α, Asn-α); 3,78-3,11 (m, 7H, H-3, H-4, H-5, H-6a,b, Ser-β); 2,97-2,65 (m, 5H, H-2, Lys^{2,5}-ε); 2,55-2,44 (m, 2H, Asn-β); 1,91-1,62 (m, 4H, Lys^{2,5}-δ); 1,62-1,52 (m, 5H, Leu^{3,6}-γ, Lys^{2,5}-β); 1,50-1,42 (m, 4H, Leu^{3,6}-β); 1,34-1,30 (m, 3H, CH-*CH*$_3$); 1,30-1,23 (m, 4H, Lys^{2,5}-γ); 0,90-0,82 (m, 12H, Leu^{3,6}-δ,δ').

^{13}C NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: [174,84; 174,56; 171,67; 171,55; 171,34; 170,97; 169,81; 168,51] (CO); 93,15 (C-1β); 88,85 (C-1α); [79,81; 77,71; 76,49] (C-3,C-4,C-5); 75,78 (*CH*-CH_3); [72,22; 70,76; 70,58] (C-3,C-4,C-5); 61,65 (Ser-β); 60,20 (C-6); [55,96; 54,94; 53,31; 52,40; 51,99; 51,05; 50,80; 48,87] (Ser-α, C-2α,β, Lys^{2,5}-α, Leu^{3,6}-α, Asn-α); [40,76; 40,10] (Leu^{3,6}-β); [38,55; 38,47] (Lys^{2,5}-ε); 36,73 (Asn-β); [31,23; 30,88] (Lys^{2,5}-δ); [28,37; 26,59] (Lys^{2,5}-β); [24,03; 23,99] (Leu^{3,6}-γ); [23,12; 23,03] (Leu^{3,6}-δ); [21,95; 21,58] (Lys^{2,5}-γ); [21,44; 21,47] (Leu^{3,6}-δ'); 20,09 (CH-*CH*$_3$).

3.3.3.6. Linearni glikopeptid H-Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ε}-Lys-Asn-OH (31)



Iskorištenje: 80 %

$C_{40}H_{74}N_{10}O_{15}$

M_r = 935,07

t.t. = 128 – 130 °C

t_R (F) = 12,87

MS-ESI: *m/z* 935,6 $[M+H]^+$

HRMS: *m/z* 935,5398 $[M+H]^+$ (935,5408)

^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: 8,62-6,89 (NH); 5,20 (s,1H, H-1α); 4,72 (d, 1H, H-1β); 4,57-3,70 (m, 7H, *CH*-CH_3, Leu^{2,5}-α, Lys^{4,6}-α, Ser-α, Asn-α); 3,80-3,20 (m, 7H, H-3, H-4, H-5, H-6a,b, Ser-β); 2,97-2,61 (m, 5H, H-2, Lys^{4,6}-ε); 2,56-2,53 (m, 2H, Asn-β); 1,91-1,74 (m, 4H, Lys^{4,6}-δ); 1,74-1,66 (m, 5H, Leu^{2,5}-γ, Lys^{4,6}-β); 1,57-1,38 (m, 4H, Leu^{2,5}-β); 1,33-1,31 (m, 3H, CH-*CH$_3$*); 1,30-1,24 (m, 4H, Lys^{4,6}-γ); 0,90-0,82 (m, 12H, Leu^{2,5}-δ,δ').

^{13}C NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: [175,03; 174,73; 172,49; 172,13; 171,87; 171,68; 171,06; 170,30; 168,44] (CO); 93,10 (C-1β); 88,79 (C-1α); [79,54; 77,54; 76,52] (C-3,C-4,C-5); 75,16 (*CH*-CH_3); [72,22; 70,82; 70,61] (C-3,C-4,C-5); 61,57 (Ser-β); 60,18 (C-6); [56,00; 55,04; 53,40; 52,75; 51,93; 51,23; 51,11; 49,13] (Ser-α, C-2α,β, Lys^{4,6}-α, Leu^{2,5}-α, Asn-α); [40,84; 40,64] (Leu^{2,5}-β); [38,55; 38,32] (Lys^{4,6}-ε); 36,56 (Asn-β); [30,86; 30,79] (Lys^{4,6}-δ); [28,53; 26,48] (Lys^{4,6}-β); [24,24; 24,20] (Leu^{2,5}-γ); [23,12; 23,09] (Leu^{2,5}-δ); [22,90; 21,22] (Lys^{4,6}-γ); [21,28; 21,56] (Leu^{2,5}-δ'); 20,06 (CH-*CH$_3$*).

3.3.4. Opći postupak priprave cikličkih glikopeptida

A. Selektivno uklanjanje alilne zaštitne skupine

Na smolu (Rink amid MBHA resin) s vezanim peptidom doda se aps. DCM (2 mL). Adukt dimetilamin borana ($Me_2NH{\cdot}BH_3$; 29,7 mg, 0,504 mmol; 6 ekv. u odnosu na broj zaštitnih skupina) otopi se u DCM i doda smoli. Reakcija se miješa 5 min pod dušikom, zatim se u reakcijsku smjesu doda tetrakis(trifenilfosfin) paladij ($Pd(PPh_3)_4$; 9,7 mg; 0,008 mmol; 10 mol % bazirano na supstituciji smole za svaku zaštitnu skupinu) te nastavi miješati još 10 min pod dušikom, zaštićeno od svijetla. Smola se zatim ispere aps. DCM (5·3 mL). Cijeli postupak se ponovi još 2 puta.

Po završetku reakcije smola se ispere sljedećim otopinama: 1) DCM (5·3 mL); 2) 0,2 % trifluoroctena kiselina (TFA/DCM v/v, 3·5 mL); 3) DCM (5·3 mL); 4) 5 % diizopropiletilamin (DIEA/DCM v/v, 3·5 mL); 5) DCM (5·3 mL). Dobiveni peptid se bez izolacije koristi u daljnoj reakciji.

B. Uklanjanje Fmoc zaštitne skupine

Smola s peptidom se po završetku deprotekcije alilne zaštitne skupine, ispere s DMF-om (3·3 mL). Piperidin (20 %-tni, 5 mL) se doda u reakcijsku posudu sa smolom i miješa 15 minuta pod dušikom. Nakon toga, smola se ispere s DMF-om (3·3 mL). Ponovo se doda piperidin (20 %-tni, 5 mL) u reakcijsku posudu, te se miješa 10 min pod dušikom. Smola se ispere s DMF-om (3·2 mL) i DCM-om (5·2 mL). Ninhidrinski test po Kaiseru pokazao je plavu boju (prisutna slobodna amino skupina). Navedenim postupkom dobiveni su linearni glikopeptidi (**14**, **17**, **20**, **23**, **26**, **29**) sa zaštićenima bočnim lancima aminokiselina vezani na smoli koji se bez izolacije koriste u daljnoj reakciji.

C. Ciklizacija

Linearni glikopeptid vezan na smoli, ispere se DMF-om (5·3 mL). Doda se DMF (2 mL) na smolu. Benzotriaz-1-il-oksi-tripirolidinofosfonijev heksafluorofosfat (PyBOP; 87,36 mg; 0,168 mmol; 2 ekvivalenta) ili *O*-(7-azabenzotriazol-1-il))-1,1,3,3-tetrametilamonijev

heksafluorofosfat (HATU; 63,84 mg; 0,168 mmol; 2 ekv.) i HOBt (22,68 mg; 0,168 mmol; 2 ekv.), otope se u DMF-u (4 mL) i dodaju na smolu. U reakciju se doda DIEA (29,34 μL) u porcijama od 2 ekv. da se postigne pH ~ 8 (obično potrebno: 6 ekv. = 88,02 μL). Reakcija se miješa na sobnoj temperaturi 4 sata (HATU) ili preko noći (PyBOP). Smola se ispere s DMF-om (3·3 mL) i DCM-om (5·2 mL). Provjera ninhidrinskim testom po Kaiseru dala je žutu boju. Navedenim postupkom dobiveni su ciklički glikopeptidi (**32**, **35**, **38**, **41**, **44**, **47**) sa zaštićenima bočnim lancima aminokiselina vezani na smoli.

D. Skidanje cikličkog glikopeptida s čvrstog nosača

Uklanjanje sintetiziranog cikličkog glikopeptida sa smole i deprotekcija bočnih lanaca aminokiselina provodi se smjesom otapala (1,5 mL; TFA : TIS : H_2O = 95 : 2,5 : 2,5 v/v/v) na sobnoj temperaturi kroz 3 sata. Reakcijska smjesa se doda u hladni diizopropil-eter, ostavi taložiti preko noći u hladnjaku, te se centrifugira. Navedenim postupkom dobiveni su ciklički glikopeptidi (**33**, **36**, **39**, **42**, **45**, **48**) korišteni bez izolacije u daljnoj reakciji.

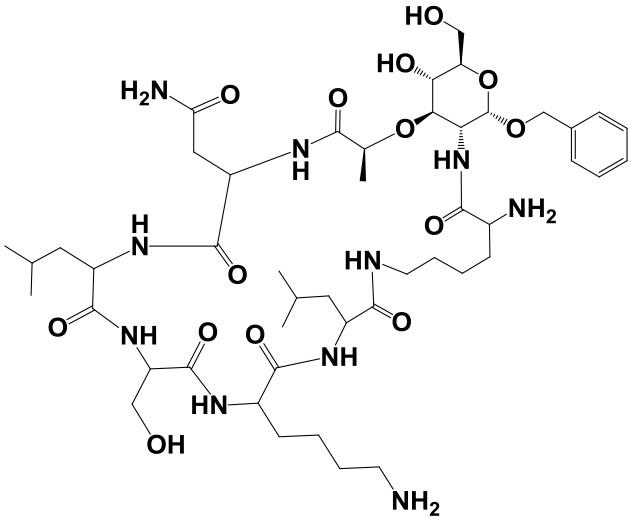
Za ispitivanje i karakteritaciju izoliran je glikopeptid **36** te pročišćen na RP HPLC preparativnoj koloni u sistemu G.

E. Hidrogenoliza cikličkog glikopeptida

Sirovi produkt 1-*O* zaštićenog cikličkog glikopeptida otopi se u smjesi otapala MeOH : HOAc : H_2O = 6 : 2 : 1,5 (9 mL) uz dodatak paladija kao katalizatora (10 % Pd/C, 160 mg). Smjesa se podvrgne hidrogenolizi na sobnoj temperaturi 18 sati. Potom se profiltrira katalizator preko Celita i upari otapalo. Ostatak se pročisti visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom obrnutih faza RP HPLC (sistem G). Navedenim postupkom dobiveni su potpuno nezaštićeni ciklički glikopeptidi (**34**, **37**, **40**, **43**, **46**, **49**).

3.3.5. Karakterizacija cikličkih glikopeptida

3.3.5.1. Ciklički glikopeptid ciklo[Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ε}-Lys-Mur(OBn)-Asn] (36)



Iskorištenje: 50 % (HATU)

$C_{47}H_{78}N_{10}O_{14}$

M_r = 1007,18

t_R (G) = 23,5

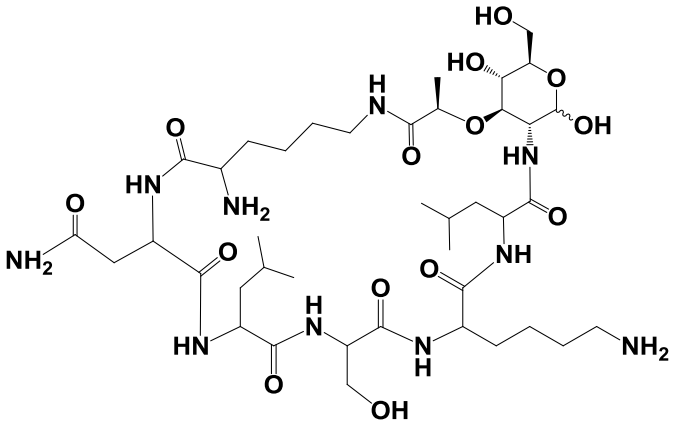
MS-ESI: *m/z* 1008 $[M+H]^+$

HRMS: *m/z* 1007,5736 $[M+H]^+$ (izračunato: 1007,5771)

^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: 8,71-6,95 (NH); 7,41-7,31 (Ph (*CH*)); 5,72 (NH_2); 5,22 (NH_2); 4,70 (s, 1H, H-1α); 4,66-3,75 (m, 7H, *CH*-CH_3, Leu^{1,4}-α, Lys^{3,5}-α, Ser-α, Asn-α); 3,92-3,14 (m, 7H, H-3, H-4, H-5, H-6a,b, Ser-β); 2,91-2,61 (m, 5H, H-2, Lys^{3,5}-ε); 2,59-2,47 (m, 2H, Asn-β); 1,75-1,62 (m, 4H, Lys^{3,5}-δ); 1,61-1,50 (m, 5H, Leu^{1,4}-γ, Lys-β); 1,45-1,38 (m, 4H, Leu^{1,4}-β); 1,33-1,31 (m, 3H, CH-*CH$_3$*); 1,24-1,20 (m, 4H, Lys^{3,5}-γ); 0,89-0,78 (m, 12H, Leu^{1,4}-δ,δ').

^{13}C NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: [174,23; 172,22; 172,17; 171,38; 171,34; 171,11; 170,52; 169,15] (CO); 173,45 (Ph (*C*)); [128,28; 127,81; 127,62] (Ph (*CH*)); 96,21 (C-1α); 78,72 (C-3); 76,12 (*CH*-CH_3); 72,92 (C-5); 68,39 (C-4); 68,37 (*CH$_2$*-Ph); 61,86 (Ser-β); 60,47 (C-6); [54,72; 53,74; 53,59; 53,02; 51,41; 51,26; 51,16] (Ser-α, C-2, Lys^{3,5}-α, Leu^{1,4}-α, Asn-α); [40,02; 39,93] (Leu^{1,4}-β); [38,76; 38,60] (Lys^{3,5}-ε); 34,66 (Asn-β); [30,95; 29,60] (Lys^{3,5}-δ); [28,50; 26,51] (Lys^{3,5}-β); [24,42; 24,08] (Leu^{1,4}-γ); [23,18; 22,99] (Leu^{1,4}-δ); [22,87; 22,56] (Lys^{3,5}-γ); 20,85 (Leu^{1,4}-δ'); 18,23 (CH-*CH$_3$*).

3.3.5.2. Ciklički glikopeptid ciklo[Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-N^{ε}-Lys-Asn] (34)



Iskorištenje: 36 % (HATU);
27 % (PyBOP)

$C_{40}H_{72}N_{10}O_{14}$

M_r = 917,06

t.t. = 156 – 157 °C

t_R (G) = 10,05

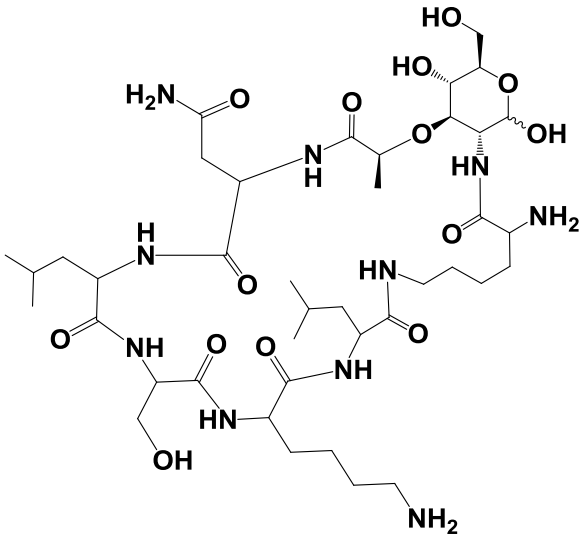
MS-ESI: *m/z* 917,6 $[M+H]^+$

HRMS: *m/z* 917,5307 $[M+H]^+$ (izračunato: 917,5302)

^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: 8,80-6,48 (NH); 5,25-5,06 (NH_2); 5,04 (s,1H, H-1α); 4,64 (d, 1H, H-1β); 4,64-3,75 (m, 7H, *CH*-CH_3, Leu^{1,4}-α, Lys^{3,6}-α, Ser-α, Asn-α); 3,75-3,05 (m, 7H, H-3, H-4, H-5, H-6a,b, Ser-β); 2,98-2,50 (m, 5H, H-2, Lys^{3,6}-ε); 2,60-2,38 (m, 2H, Asn-β); 1,75-1,55 (m, 4H, Lys^{3,6}-δ); 1,54-1,35 (m, 9H, Leu^{1,4}-γ, Lys^{3,6}-β, Leu^{1,4}-β), 1,35-1,25 (m, 3H, CH-*CH_3*); 1,25-1,20 (m, 4H, Lys^{3,6}-γ); 0,93-0,80 (m, 12H, Leu^{1,4}-δ,δ').

^{13}C NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: [173,73; 171,97; 171,48; 170,39; 168,34] (CO); 90,23 (C-1α); 76,24 (C-3); 74,90 (*CH*-CH_3); 72,30 (C-5); 70,20 (C-4); 61,66 (Ser-β); 60,80 (C-6); [54,19; 51,93; 50,82; 49,72] (Ser-α; Lys^{3,6}-α; Leu^{1,4}-α; Asn-α); [40,29; 40,05] (Leu^{1,4}-β); [38,67; 38,31] (Lys^{3,6}-ε); 36,86 (Asn-β); [31,80; 30,88] (Lys^{3,6}-δ); [28,59; 26,48] (Lys^{3,6}-β); [24,04; 23,20] (Leu^{1,4}-γ); [22,16; 22,55] (Lys^{3,6}-γ); [21,40; 21,15] (Leu^{1,4}-δ,δ'); 19,56 (CH-*CH_3*).

3.3.5.3. Ciklički glikopeptid ciklo[Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ε}-Lys-Mur-Asn] (37)



Iskorištenje: 44 % (HATU);
40 % (PyBOP)

$C_{40}H_{72}N_{10}O_{14}$

M_r = 917,06

t.t. = 160 – 162 °C

t_R (G) = 9,43

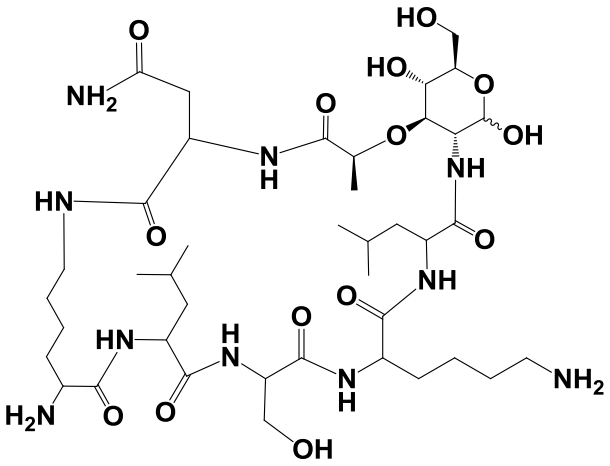
MS-ESI: *m/z* 917,6 $[M+H]^+$

HRMS: *m/z* 917,5338 $[M+H]^+$ (izračunato: 917,5302)

^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: 8,70-6,94 (NH); 5,72 (NH_2); 5,20 (NH_2); 4,87 (s, 1H, H-1α); 4,50 (d, 1H, H-1β); 4,49-3,78 (m, 7H, *CH*-CH_3, Leu^{1,4}-α, Lys^{3,5}-α, Ser-α, Asn-α); 3,94-3,15 (m, 7H, H-3, H-4, H-5, H-6a,b, Ser-β); 2,92-2,59 (m, 5H, H-2, Lys^{3,5}-ε); 2,59-2,41 (m, 2H, Asn-β); 1,75-1,64 (m, 4H, Lys^{3,5}-δ); 1,64-1,45 (m, 5H, Leu^{1,4}-γ, Lys^{3,5}-β); 1,45-1,35 (m, 4H, Leu^{1,4}-β); 1,33-1,31 (m, 3H, CH-*CH$_3$*); 1,30-1,21 (m, 4H, Lys^{3,5}-γ); 0,94-0,76 (m, 12H, Leu^{1,4}-δ,δ').

^{13}C NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: [174,28; 172,18; 171,88; 171,40; 171,33; 171,12; 170,57; 169,00] (CO); 94,72 (C-1β); 90,70 (C-1α); [78,56; 76,60] (C-3,C-4,C-5); 75,95 (*CH*-CH_3); [71,98; 68,66] (C-3,C-4,C-5); 61,81 (Ser-β); 60,77 (C-6); [56,77; 54,67; 53,97; 53,69; 52,94; 51,42; 51,23; 51,17] (Ser-α, C-2α,β, Lys^{3,5}-α, Leu^{1,4}-α, Asn-α); [40,02; 39,90] (Leu^{1,4}-β); [38,70; 38,59] (Lys^{3,5}-ε); 34,79 (Asn-β); [31,02; 29,64] (Lys^{3,5}-δ); [28,48; 26,51] (Lys^{3,5}-β); [24,41; 24,07] (Leu^{1,4}-γ); [23,23; 23,00] (Leu^{1,4}-δ); [22,76; 22,55] (Lys^{3,5}-γ); 20,89 (Leu^{1,4}-δ'); 18,83 (CH-*CH$_3$*).

3.3.5.4. Ciklički glikopeptid ciklo[N^{ε}-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-Asn] (40)



Iskorištenje: 47 % (HATU);
44 % (PyBOP)

$C_{40}H_{72}N_{10}O_{14}$

M_r = 917,06

t.t. = 166 – 168 °C

t_R (G) = 7,89

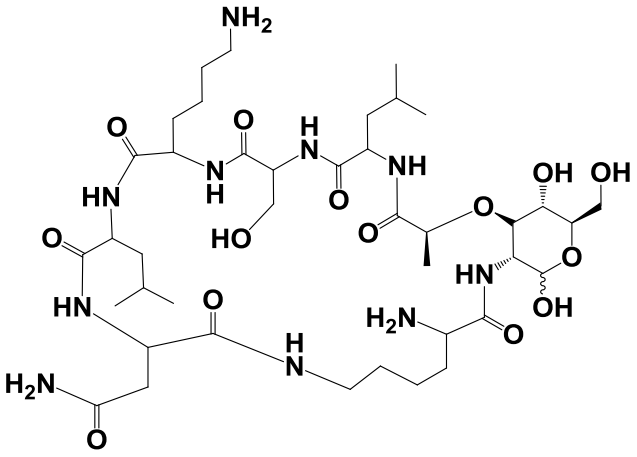
MS-ESI: *m/z* 917,6 $[M+H]^+$

HRMS: *m/z* 917,5320 $[M+H]^+$ (izračunato: 917,5302)

^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: 8,66-6,89 (NH); 5,33 (s, 1H, H-1α); 4,50 (d, 1H, H-1β); 4,61-3,75 (m, 7H, *CH*-CH_3, Leu^{2,5}-α, Lys^{1,4}-α, Ser-α, Asn-α); 3,82-3,15 (m, 7H, H-3, H-4, H-5, H-6a,b, Ser-β); 3,06-2,57 (m, 5H, H-2, Lys^{1,4}-ε); 2,57-2,46 (m, 2H, Asn-β); 1,79-1,61(m, 4H, Lys^{1,4}-δ); 1,64-1,40 (m, 5H, Leu^{2,5}-γ, Lys^{1,4}-β); 1,45-1,35 (m, 4H, Leu^{2,5}-β); 1,31 (m, 3H, CH-*CH$_3$*); 1,26-1,14 (m, 4H, Lys^{1,4}-γ); 0,87-0,77 (m, 12H, Leu^{2,5}-δ,δ').

^{13}C NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: [174,60; 172,35; 171,55; 171,20; 170,65; 170,52; 170,09; 168,64] (CO); 95,39 (C-1β); 89,09 (C-1α); [79,18; 76,56; 76,1] (C-3,C-4,C-5); 75,30 (*CH*-CH_3); [74,81; 72,15; 71,29; 70,33] (C-3,C-4,C-5); 61,76 (Ser-β); 60,56 (C-6); [54,67; 54,54; 52,70; 52,05; 51,83; 51,40; 50,19] (Ser-α, C-2, Lys^{1,4}-α, Leu^{2,5}-α, Asn-α); 41,31; 40,50 (Leu^{2,5}-β); 38,72; 38,23 (Lys^{1,4}-ε); 37,21 (Asn-β); 30,42; 29,42 (Lys^{1,4}-δ); [27,93; 26,77] (Lys^{1,4}-β); [24,02; 23,08] (Leu^{2,5}-γ); [22,26; 20,67] (Lys^{1,4}-γ); [21,66; 21,23] (Leu^{2,5}-δ); 20,09 (CH-*CH$_3$*).

3.3.5.5. Ciklički glikopeptid ciklo[N^{ε}-Lys-Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn] (43)



Iskorištenje: 50 % (HATU);
46 % (PyBOP)

$C_{40}H_{72}N_{10}O_{14}$

M_r = 917,06

t.t. = 162 – 163 °C

t_R (G) = 9,45

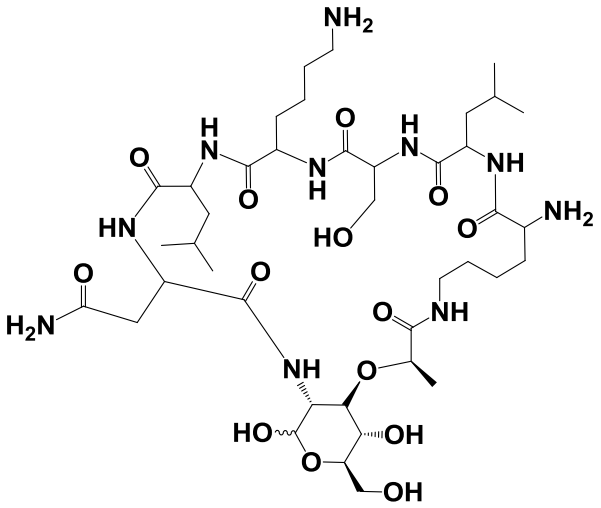
MS-ESI: *m/z* 917,6 $[M+H]^+$

HRMS: *m/z* 917,5327 $[M+H]^+$ (izračunato: 917,5302)

^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: 8,75-6,94 (NH); 5,27 (NH_2); 5,13 (NH_2); 4,86 (s, 1H, H-1α); 4,43 (d, 1H, H-1β); 4,42-3,76 (m, 7H, *CH*-CH_3, Leu^{3,6}-α, Lys^{1,5}-α, Ser-α, Asn-α); 3,86-3,09 (m, 7H, H-3, H-4, H-5, H-6a,b, Ser-β); 2,98-2,65 (m, 5H, H-2, Lys^{1,5}-ε); 2,52-2,48 (m, 2H, Asn-β); 1,67-1,56 (m, 4H, Lys^{1,5}-δ); 1,56-1,47 (m, 5H, Leu^{3,6}-γ, Lys^{1,5}-β); 1,44-1,38 (m, 4H, Leu^{3,6}-β); 1,32-1,33 (m, 3H, CH-*CH_3*); 1,28-1,18 (m, 4H, Lys^{1,5}-γ); 0,81-0,72 (m, 12H, Leu^{3,6}-δ,δ').

^{13}C NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: [174,16; 172,52; 172,28; 171,67; 171,24; 171,05; 170,03; 168,80] (CO); 94,82 (C-1β); 90,55 (C-1α); [76,78; 76,38] (C-3, C-4, C-5); 74,90 (*CH*-CH_3); [71,99; 68,98] (C-3,C-4,C-5); 61,16 (Ser-β); 60,83 (C-6); [54,63; 54,48; 53,80; 52,66; 52,48; 52,81; 49,96] (Ser-α, C-2, Lys^{1,5}-α, Leu^{3,6}-α, Asn-α); [40,02; 39,90] (Leu^{3,6}-β); [38,72; 38,65] (Lys^{1,5}-ε); 36,33 (Asn-β); [30,66; 30,29] (Lys^{1,5}-δ); [28,24; 26,40] (Lys^{1,5}-β); [24,28; 24,15] (Leu^{3,6}-γ); [22,90; 22,73] (Leu^{3,6}-δ); [22,21; 21,96] (Lys^{1,5}-γ); [21,85, 21,57] (Leu^{3,6}-δ'); 18,76 (CH-*CH_3*).

3.3.5.6. Ciklički glikopeptid ciklo[Mur-N^{ε}-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn] (46)



Iskorištenje: 35 % (HATU);
29 % (PyBOP)

$C_{40}H_{72}N_{10}O_{14}$

M_r = 917,06

t.t. = 167 – 169 °C

t_R (G) = 8,04

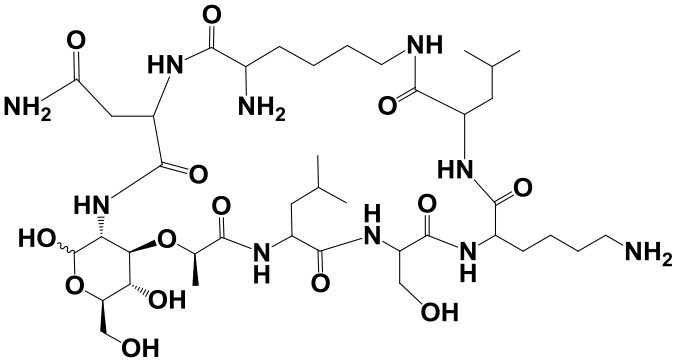
MS-ESI: *m/z* 917,6$[M+H]^+$

HRMS: *m/z* 917,5302 $[M+H]^+$ (izračunato: 917,5302)

^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: 8,75-6,93 (NH); 4,89 (s, 1H, H-1α); 4,61 (d, 1H, H-1β); 4,58-3,73 (m, 7H, *CH*-CH_3, Leu^{3,6}-α, Lys^{2,5}-α, Ser-α, Asn-α); 3,90-3,04 (m, 7H, H-3, H-4, H-5, H-6a,b, Ser-β); 2,77-2,63 (m, 5H, H-2, Lys^{2,5}-ε); 2,63-2,43 (m, 2H, Asn-β); 1,74-1,65 (m, 4H, Lys^{2,5}-δ); 1,65-1,46 (m, 5H, Leu^{3,6}-γ, Lys^{2,5}-β); 1,42-1,33 (m, 4H, Leu^{3,6}-β); 1,33-1,30 (m, 3H, CH-*CH_3*); 1,29-1,21 (m, 4H, Lys^{2,5}-γ); 0,91-0,81 (m, 12H, Leu^{3,6}-δ,δ').

^{13}C NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: [173,29; 172,27; 172,16; 171,57; 171,31; 171,18; 170,95; 169,35] (CO); 94,82 (C-1β); 91,10 (C-1α); [82,12; 79,22; 77,33] (C-3,C-4,C-5); 77,01 (*CH*-CH_3); [72,71; 70,65; 70,13] (C-3,C-4,C-5); 62,82 (Ser-β); 61,17 (C-6); [54,31; 54,25; 53,82; 52,51; 51,72; 51,28; 50,83; 50,41] (Ser-α, C-2α,β, Lys^{2,5}-α, Leu^{3,6}-α, Asn-α); [40,51; 40,43] (Leu^{3,6}-β); [39,09; 38,72] (Lys^{2,5}-ε); 37,59 (Asn-β); [31,26; 30,34] (Lys^{2,5}-δ); [29,46; 27,00] (Lys^{2,5}-β); [24,67; 24,44] (Leu^{3,6}-γ); [23,57; 23,42] (Leu^{3,6}-δ); [23,09; 21,58] (Lys^{2,5}-γ); [21,99; 21,44] (Leu^{3,6}-δ'); 19,40 (CH-*CH_3*).

3.3.5.7. Ciklički glikopeptid ciklo[Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ε}-Lys-Asn] (49)



Iskorištenje: 38 % (HATU);
30 % (PyBOP)

$C_{40}H_{72}N_{10}O_{14}$

M_r = 917,06

t.t. = 161 – 163 °C

t_R (G) = 8,97

MS-ESI: *m/z* 917,6 $[M+H]^+$

HRMS: *m/z* 917,5308 $[M+H]^+$ (izračunato: 917,5302)

^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: 8,65-6,75 (NH); 5,00 (s,1H, H-1α); 4,62 (d, 1H, H-1β); 4,61-3,74 (m, 7H, *CH*-CH_3, Leu^{2,5}-α, Lys^{4,6}-α, Ser-α, Asn-α); 3,94-3,06 (m, 7H, H-3, H-4, H-5, H-6a,b, Ser-β); 2,98-2,64 (m, 5H, H-2, Lys^{4,6}-ε); 2,64-2,35 (m, 2H, Asn-β); 1,80-1,62 (m, 4H, Lys^{4,6}-δ); 1,62-1,49 (m, 5H, Leu^{2,5}-γ, Lys^{4,6}-β); 1,52-1,32 (m, 4H, Leu^{2,5}-β); 1,10 (m, 3H, CH-*CH_3*); 1,32-1,16 (m, 4H, Lys^{4,6}-γ); 0,87-0,82 (m, 12H, Leu^{2,5}-δ,δ').

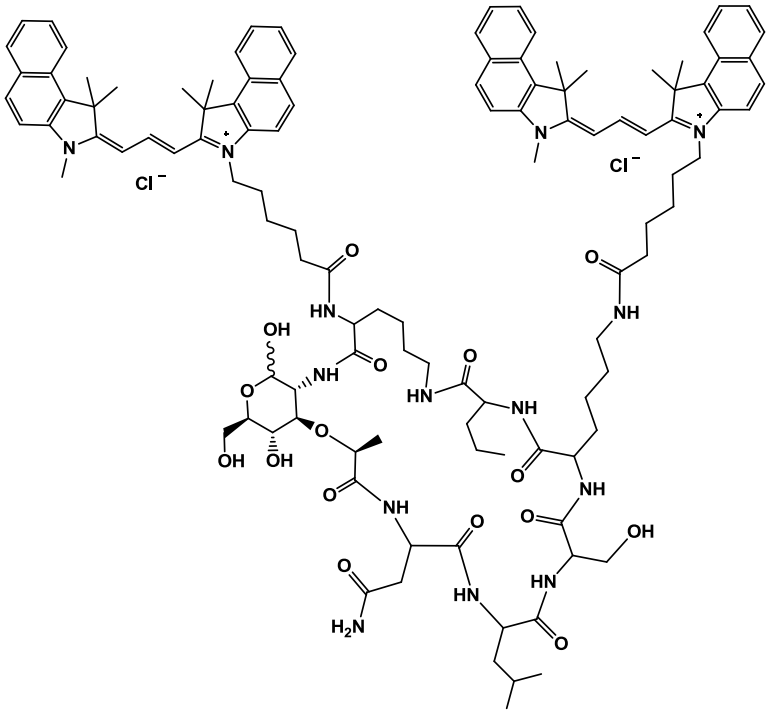
^{13}C NMR(DMSO-d_6) δ/ppm: [174,11; 171,69; 171,37; 170,96; 170,84; 170,32; 168,35; 168,13] (CO); 94,69 (C-1β); 90,08 (C-1α); [78,21; 77,24; 76,42] (C-3,C-4,C-5); 73,95 (*CH*-CH_3); [72,12; 69,84; 69,28] (C-3,C-4,C-5); 61,71 (Ser-β); 60,76 (C-6); [57,37; 54,29; 54,11; 53,50; 52,17; 51,35; 50,66; 50,22] (Ser-α, C-2α,β, Lys^{4,6}-α, Leu^{2,5}-α, Asn-α); [40,00; 39,90 (Leu^{2,5}-β); [38,59; 38,23] (Lys^{4,6}-ε); 37,05 (Asn-β); [30,59; 29,82] (Lys^{4,6}-δ); [28,22; 26,50] (Lys^{4,6}-β); [24,38; 24,17] (Leu^{2,5}-γ); [22,95; 22,83] (Leu^{2,5}-δ); [22,45; 21,13] (Lys^{4,6}-γ); [21,78; 21,04] (Leu^{2,5}-δ'); 19,16 (CH-*CH_3*).

3.3.6. Sinteza obilježenog cikličkog glikopeptida za određivanje interakcije s DNA

Ciklički glikopeptid **37** (0,5 mg; 0,0005 mmol) otopi se u 450 μL fosfatnog pufera pH 8,1. NHS ester Cy3.5 (1,13 mg; 0,0016 mmol) otopi se u 50 μL DMF-a te se doda u otopinu cikličkog glikopeptida. Reakcija se provodi 4 sata na sobnoj temperaturi uz miješanje. Sirovi produkt se pročisti kromatografijom na preparativnoj ploči u sistemu otapala EtOAc : EtOH : HOAc : H_2O = 7 : 1 : 1 : 1 : 1.

3.3.6.1. Ciklički obilježeni glikopeptid

ciklo[Leu-Ser-Lys(Cy3.5)-Leu-Cy3.5-*N*$^{\varepsilon}$-Lys-Mur-Asn] (50)



$C_{114}H_{148}Cl_2N_{14}O_{16}$

M_r = 2065,06

R_f = 0,42 (EtOAc : EtOH : HOAc : H_2O = 7 : 1 : 1 : 1 : 1)

MS-ESI: *m/z* 997,7 $[M/2]^{2+}$ ($C_{114}H_{148}N_{14}O_{16}^{2+}$)

3.4. ODREĐIVANJE ANTITUTUMORSKE AKTIVNOSTI

Antiproliferativna aktivnost ispitana je na humanim staničnim linijama karcinoma:

- HCT 116 (debelo crijevo)
- H 460 (pluća).

Svaka od testnih točaka je ponovljena četiri puta u 3 individualna eksperimenta. Rezultati su iskazani u obliku GI_{50} vrijednosti, tj. koncentracije testnog reagensa u kojoj je postignuta 50 % inhibicija. Prema tome, „prava" vrijednost bilo kojeg parametra koji pokazuje reakciju stanica na testni spoj je uzimana u obzir samo ako barem jedna od uzetih koncentracija testnog uzorka bude iznad ili ispod zadanih referentnih vrijednosti. Svaki navedeni rezultat je srednja vrijednost od barem dva odvojena eksperimenta. GI_{50} vrijednosti za svaki spoj su izračunate iz krivulje koja pokazuje reakciju živih stanica na koncentraciju testnog spoja (eng. *dose–response curve*) koristeći metodu linearne regresije stavljanjem testih koncentracija iz PG vrijednosti iznad i ispod referentne vrijednosti (npr. 50 za GI_{50}).

Ispitan je utjecaj priređenih linearnih (**16**, **19**, **22**, **25**, **28**, **31**) i cikličkih (**34**, **37**, **40**, **43**, **46**, **49**) glikopeptida (Tablica 8).

Tablica 8. GI_{50} vrijednosti za nezaštićene linearne i cikličke glikopeptide

GI_{50}* (μM)					
LINEARNI GLIKOPEPTIDI	Stanične linije		CIKLIČKI GLIKOPEPTIDI	Stanične linije	
	HCT 116	H 460		HCT 116	H 460
16	> 100	> 100	**34**	> 100	> 100
19	> 100	> 100	**37**	> 100	> 100
22	> 100	> 100	**40**	> 100	> 100
25	> 100	> 100	**43**	> 100	> 100
28	> 100	> 100	**46**	> 100	> 100
31	> 100	> 100	**49**	> 100	> 100

* koncentracije testnog reagensa u kojoj je postignuta 50 %-tna inhibicija

3.5. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

Primijenjene su dvije metode u uvjetima *in vitro* za dokaz antimikrobnog učinka:

- metoda difuzije (određivanje zone inhibicije rasta) prema Europskoj farmakopeji
- metoda mikrodilucije (određivanje minimalne inhibitorne koncentracije, MIK) prema smjernicama EUCAST protokola

Antimikrobni učinak ispitan je na testnim sojevima vrsta:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538,
- *Escherichia coli* ATCC 10536,
- *Candida albicans* ATCC 10231,
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404,
- *Microsporum gypseum* FBF 10570.

Metodom difuzije dobiveni su rezultati u koncentraciji stock otopine 1,6 mg/mL, volumena 50 μL.

Metodom mikrodilucije dobiveni su rezultati sa stock otopinom 1,6 mg/mL FO uz serijalna razrijeđenja od 800 μg/mL do 0,78 μg/mL.

Ispitan je utjecaj priređenih nezaštićenih linearnih (**16**, **19**, **22**, **25**, **28**, **31**) i cikličkih (**34**, **37**, **40**, **43**, **46**, **49**) glikopeptida, te zaštićenog cikličkog glikopeptida **36**.

3.6. ISPITIVANJE INTERAKCIJA CIKLIČKIH GLIKOPEPTIDA S DNA

Supstrat:

Za dvolančanu DNA koristi se kupovna DNA timusa teleta (engl. *calf thymus* DNA) (Aldrich). ctDNA otopi se u Na-kakodilatnom puferu (I = 0,05 mol dm^{-3}, pH 7,01) te se dodatno obradi ultrazvukom i filtrira kroz filter 0,45 mm. Koncentracija ctDNA odredi se spektroskopski kao koncentracija fosfata (ctDNA na 260 nm, ε = 6600).

Promjena temperature mekšanja ctDNA:

Eksperiment se provodi u Na-kakodilatnom puferu (I = 0,05 mol dm^{-3}) pri pH 7,01. Temperaturne krivulje mekšanja DNA te njezinih kompleksa s ispitivanim spojevima određene su praćenjem promjene absorbancije ctDNA na 260 nm u ovisnosti o temperaturi (25 – 98 °C). Temperature mekšanja određene su kao točke infleksije temperaturnih krivulja na osnovu prve derivacije ili metodom tangente. Vrijednosti promjene temperature mekšanja ΔT_m razlika su između vrijednosti temperature mekšanja kompleksa ctDNA/spoj i temperature mekšanja čiste ctDNA. Dobivene vrijednosti ΔT_m rezultat su najmanje dva neovisna pokusa.

Fluorescencijska mjerenja:

Eksperiment se provodi u Na-kakodilatnom puferu (I = 0,05 mol dm^{-3}) pri pH 7,01. Kod fluorescencijske titracije prati se promjena intenziteta fluorescencije ispitanog spoja na valnim duljinama λ_{em} = 450 – 600 nm te koriste se valne duljine pobude kod kojih ctDNA nema UV/Vis spektar $\lambda_{eks.}$ > 320 nm. Fluorescencijska titracija izvodi se uz dodatak otopine ctDNA u puferiranu vodenu otopinu spoja. Koristi se relativno kratko vrijeme (1 min) potrebno da se uspostavi ravnotežno stanje po dodatku ctDNA u otopinu ispitivanog spoja.

CD mjerenja:

Eksperiment se provodi u Na-kakodilatnom puferu (I = 0,05 mol dm^{-3}) pri pH 7,01 te spoj se dodaje u otopinu polinukleotida. Mjeri se u rasponu od 240 – 700 nm pri standardnoj osjetljivosti instrumenta i brzini snimanja od 200 nm min^{-1}.

Spektri su obrađeni u programu Origin.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UVOD

Unatoč velikom napretku tehnologije i novim spoznajama u području medicine i kemije, rak ostaje jedan od vodećih uzroka smrtnosti. Također, veliki problem u području medicinske kemije predstavlja rastuća otpornost bakterija na standardne antibiotike. Postalo je bitno pronaći nove antimikrobne i antitumorske supstance s novim načinima djelovanja, a razvoj peptidnih antitumorskih i antibakterijskih spojeva iskorak je u tom smjeru. Sinteza, strukturne preinake i testiranje se ponavlja dok se ne dobije spoj zadovoljavajuće jačine djelovanja, selektivnosti i stabilnosti.

U okviru ove doktorske disertacije u svrhu razvoja novih biološki aktivnih peptida sintetizirana je knjižnica cikličkih glikopeptida i njihovih linearnih analoga s ugrađenom muraminskom kiselinom na različitim položajima u odnosu na biološki aktivnu LSKL sekvencu. Proučavan je doprinos ciklizacije peptida na biološku aktivnost.

Sinteza linearnih i cikličkih glikopeptida rađena je na čvrstom nosaču. U tu svrhu prvo je bilo potrebno pripraviti ortogonalno zaštićenu muraminsku kiselinu prikladnu za Fmoc strategiju sinteze. Sinteza glikopeptida je podijeljena na dva dijela. Prvi dio je sinteza zaštićenih lineranih glikopeptida uz standardne reagense i Fmoc zaštićene aminokiseline, na instrumentu za automatsku sintezu peptida na čvrstom nosaču. Ciklički peptidi pripravljeni su u drugom dijelu sinteze, tzv. glava-rep ciklizacijom zaštićenih linearnih peptida ručnom sintezom na čvrstom nosaču u reakcijskoj posudi.

U nastavku je detaljno opisana sinteza prikladno zaštićene muraminske kiseline, te sinteza cikličkih i linearnih glikopeptida. Prikazani su rezultati bioloških utjecaja novih spojeva na tumorskim stanicama, na bakterijama i gljivicama, te interakcija s DNA.

4.2. SINTEZA ZAŠTIĆENE MURAMINSKE KISELINE

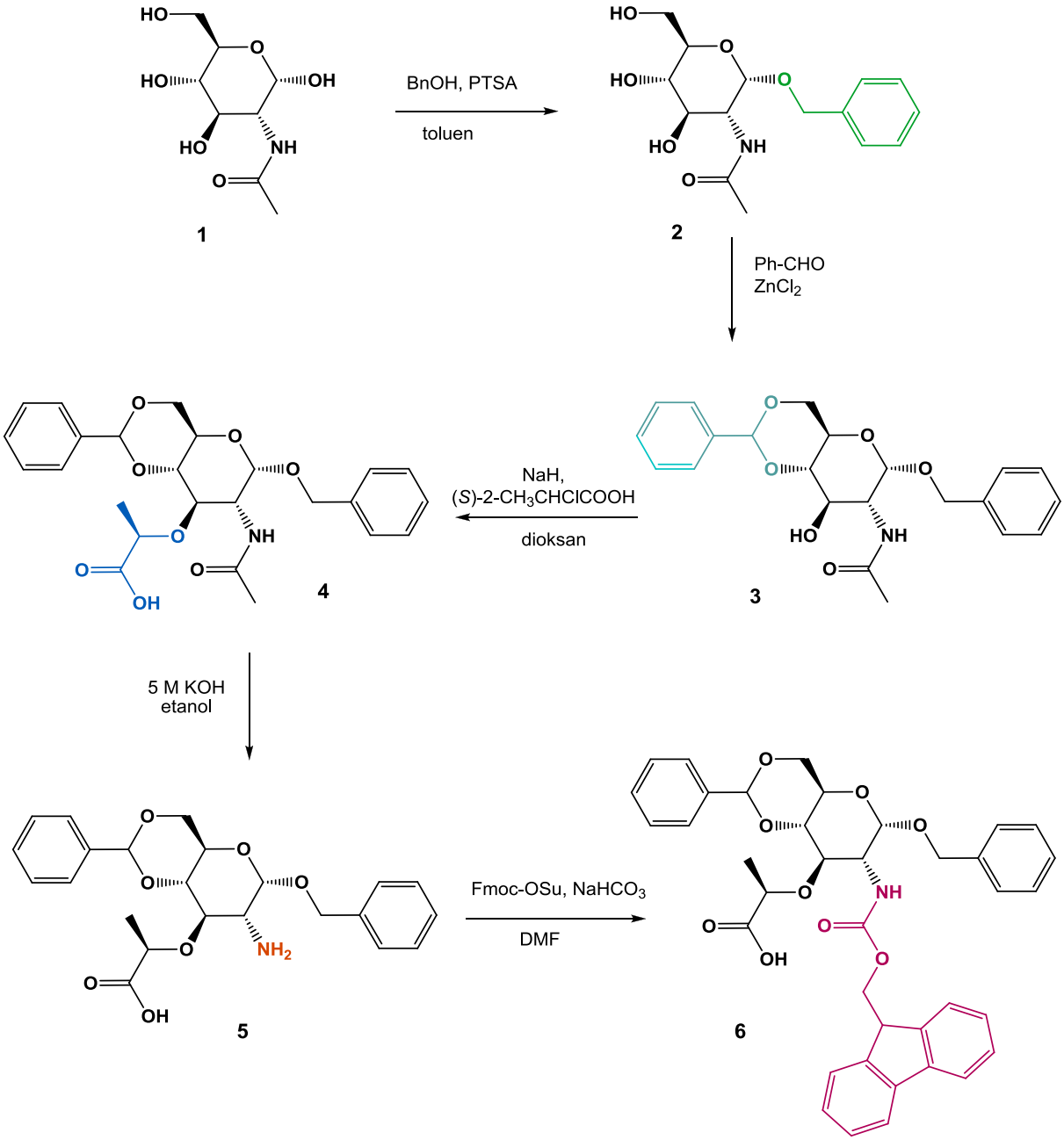
Muraminska kiselina pronađena je u mnogim peptidnim prirodnim produktima koji sadrže oligo(poli)saharide. Uzimajući u obzir da se Fmoc metoda rutinski koristi u sintezi peptida na čvrstom nosaču, priprava Fmoc ortogonalno zaštićene muraminske kiseline, kao građevne jedinice za sintezu prirodnih produkata od posebne je praktične važnosti.

Sinteza potpuno zaštićene *N*-fluoreniloksikarbonilmuraminske kiseline (*N*-Fmoc-Mur(*O*-Pg)-OH, **6**) prikazana je na shemi 1.

Prva tri koraka u sintezi *N*-acetilmuraminske kiseline su literaturno poznati.[132-136] Sinteza započinje benziliranjem komercijalno dostupnog *N*-acetil-D-glukozamina (**1**) u smjesi benzil-alkohola i toluena u prisutnosti *p*-toluensulfonske kiseline kao katalizatora.[126] Ovom reakcijom provedena je selektivna zaštita anomerne hidroksilne skupine. Termodinamičkom kontrolom reakcije, odnosno visokom temperaturom (130 °C) izoliran je čisti α-anomer **2** (72 %). Njegovom miješanjem s benzaldehidom u prisutnosti cinkova klorida uvedena je selektivna zaštita na C-4 i C-6 hidroksilne skupine pri čemu je dobiven *O*-1,4,6-zaštićeni derivat **3** (80 %).[128] Ključni korak u sintezi muraminske kiseline je ugradnja propionskog dijela na hidroksilnu skupinu na C-3 položaju. Alkiliranjem slobodne *O*-3 hidroksilne skupine s optički čistom (*S*)-2-klorpropionskom kiselinom u dioksanu u prisutnosti natrijeva hidrida dobiven je ključni prekursor **4** (78 %).[130] (*S*)-2-klorpropionska kiselina (**7**) priređena je iz L-alanina uz natrijev nitrit u klorovodičnoj kiselini.[131] Nakon sintetizirane *O*-zaštićene muraminske kiseline, potrebno ju je deacetilirati kako bi se uvela Fmoc zaštitna skupina nužna za sintezu na čvrstom nosaču. Saponifikacija amino skupine provedena je KOH-om (5 mol dm^{-3}) u etanolu pri čemu je dobiven spoj **5** (81 %).[126] Amino skupina je selektivno zaštićena Fmoc zaštitnom skupinom korištenjem 9-fluorenilmetil-*N*-sukcinimidil-karbonat uz natrijev bikarbonat kao bazu pri niskoj temperaturi (0 °C). Zaštićeni spoj **6** dobiven je u 90 %-tnom iskorištenju.

Važna poboljšanja u odnosu na prijašnje sintetske postupke za glukopiranozide **2** i **3** uključuju pojednostavljenje sinteze te učinkovitu izolaciju i čišćenje produkta. Uvođenje benzilne zaštitne skupine na anomerni položaj rezultira α/β smjesom. Međutim, kontrolom temperature moguće je pomaknuti ravnotežu prema željenom produktu.[136] Uvođenje benzilidenske zaštitne skupine na *O*-4 i *O*-6 položaj provedeno je uz neke izmjene Gross/Jeanloz strategije.[128] Sinteza muraminske kiseline opisane u literaturi temelji se na

kondezaciji D-glukozamin derivata s 2-halogen-propionskom kiselinom.[130,137] U većini sinteza kao polazni materijal korišteni su metil- ili benzil- 2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-α-D-glukopiranozid. Alkiliranje slobodne 3-*O* skupine šećera s racemičnom 2-halogen-propionskom kiselinom dovodi do nastajanja smjese (*R*) i (*S*) epimera etera (derivati muraminske i izomuraminske kiseline). Takva sinteza zahtijevala je dodatno razdvajanje kako bi se dobio čisti dijastereomer.[138] Utvrđeno je da kondenzacija generiranog alkoksida sa (*S*)-2-klorpropionskom kiselinom dovodi do Waldenove inverzije.[139] Prema tome, kondenzacija spoja **3** s optički čistom (*S*)-2-klorpropionskom kiselinom (**7**) dovela je do (*R*)-konfiguracije laktilnog bočnog lanca te nastanka produkta **4**, derivata muraminske kiseline.[130,137,140] Ovim postupkom izbjegnuto je kromatografsko odjeljivanje.[138] Stereoselektivnost reakcije utvrđena je ^{1}H NMR-om. Benzilidenski proton na 5,68 ppm odgovara derivatu muraminske kiseline, s obzirom na literaturno poznate pomake za derivat muraminske kiseline na 5,66 ppm i izomuraminske kiseline na 5,55 ppm.[130] Reakcijski uvjeti za dobivanje spoja **5** omogućuju racemizaciju. Dokaz da nismo izgubili optičku čistoću u spoju **5** s (*R*)-konfiguracijom laktilne skupine je benzilidenski proton na 5,69 ppm. Uvođenje Fmoc zaštitne skupine s Fmoc-OSu rezultiralo je boljim iskorištenjem nego s Fmoc-Cl. Konačni produkt **6** istaloži se s vodom i pročisti brzom kromatografijom na stupcu silikagela. Ovako sintetizirana Fmoc zaštićena muraminska kiselina može se koristiti u sintezi peptida na čvrstom nosaču, pri čemu se benzilidenska skupina uklanja u kiselim uvjetima skidanja peptida sa smole, dok se benzilna zaštita uklanja katalitičkom hidrogenolizom.

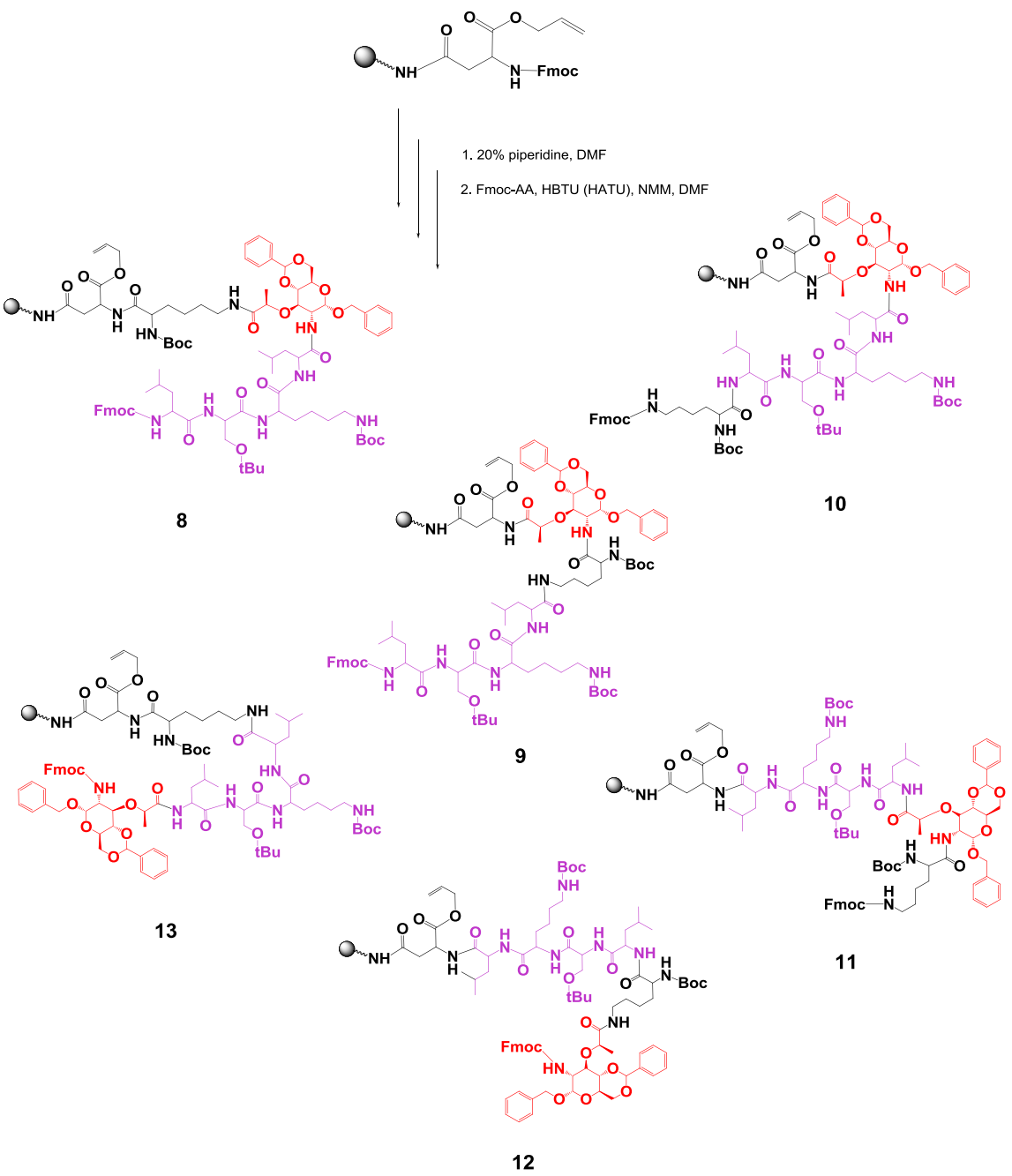


Shema 1. Sinteza zaštićene muraminske kiseline

4.3. SINTEZA GLIKOPEPTIDA

4.3.1. Automatska sinteza zaštićenih linearnih glikopeptida na čvrstom nosaču

Potpuno zaštićeni linearni glikopeptidi (**8 – 13,** Shema 2) dobiveni su automatskom sintezom na način opisan u poglavlju 3.3.1.



Shema 2. Glikopeptidi dobiveni automatskom sintezom

Sve upotrebljene aminokiseline bile su na *N*-kraju zaštićene 9-fluorenilmetoksikarbonilnom (Fmoc) zaštitnom skupinom. Za automatsku sintezu na čvrstom nosaču priređeno je otapalo za sintezu (DMF), otopine za aktivaciju (0,4 mol dm^{-3} NMM/DMF) i deprotekciju Fmoc-zaštite (20 % piperidin/DMF). U reakcijsku posudu stavljeno je 150 mg (0,084 mmol) Rink amid smole, a zaštićene aminokiseline su odvagane (3 ekv.) i zajedno s odvaganim aktivacijskim reagensima HBTU (3 ekv.), HATU (3 ekv.) i HOBt (3 ekv.) stavljene u plastične bočice na instrumentu za automatsku sintezu peptida. Standardni uvjeti vezanja aminokiselina zahtjevaju suvišak aminokiselina i reagensa koji se koriste kroz sintezu kako bi se osigurao završetak reakcije. Sinteza na instrumentu započela je bubrenjem te aktivacijom smole uklanjanjem Fmoc zaštitne skupine s amino skupine 20 %-tnim piperidinom.

Prva zaštićena aminokiselina, asparaginska kiselina (Fmoc-Asp-OAll) vezana je preko svog bočnog lanaca na čvrsti nosač, dok je C-kraj zaštićen alilnom zaštitnom skupinom. Postupak je proveden na sljedeći način: aktivacija karboksilnog kraja aminokiseline provedena je dodatkom 0,4 mol dm^{-3} otopine NMM u DMF-u (1 min); prva aminokiselina zajedno s reagensima HBTU i HOBt prebačena je u reakcijsku posudu sa smolom i tu je započela reakcija vezanja na smolu koja je trajala 1 sat, a po završetku vezanja smola je dobro isprana kako bi se uklonili nusprodukti.

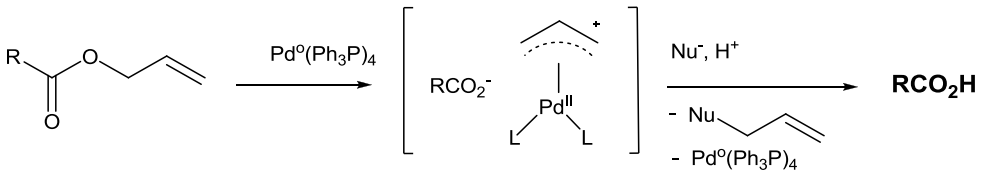
Za vezanje druge i tako redom sljedećih aminokiselina bilo je potrebno deprotektirati amino-kraj prethodno vezane aminokiseline. Na taj način vezane su sljedeće aminokiseline: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Boc-Lys(Fmoc)-OH te Fmoc-Mur(*O*-Pg)-OH. Zbog efikasnijeg vezanja, muraminska kiselina i aminokiselina nakon nje vezane su s HATU kondenzacijskim reagensom. Dodatak aditiva kao što je HOBt povećava učinkovitost reakcije vezanja, te sprečava racemizaciju. Postupak deprotekcije te vezanja se ponavlja dok se ne sintetizira željeni peptid. Funkcijske skupine u bočnom lancu pojedinih aminokiselina su specifično zaštićene kako bi se potencijalne reakcije bočnih lanaca svele na minimum.

Važno je uočiti da sinteza peptida na čvrstom nosaču započinje od C-terminalnog dijela, tako da je konačni glikopeptid obrnutog aminokiselinskog slijeda nego što je tijek sinteze. Nadalje, vezanjem preko bočnog lanca asparaginske kiseline na Rink amid smolu, koja daje aminikiselinu u obliku amida, konačno je dobiven asparagin kao *N*-terminalna aminokiselina.

Zaštićeni linearni glikopeptidi (**8 – 13**) na smoli korišteni su bez izolacije u daljnoj sintezi nezaštićenih linearnih i cikličkih glikopeptida.

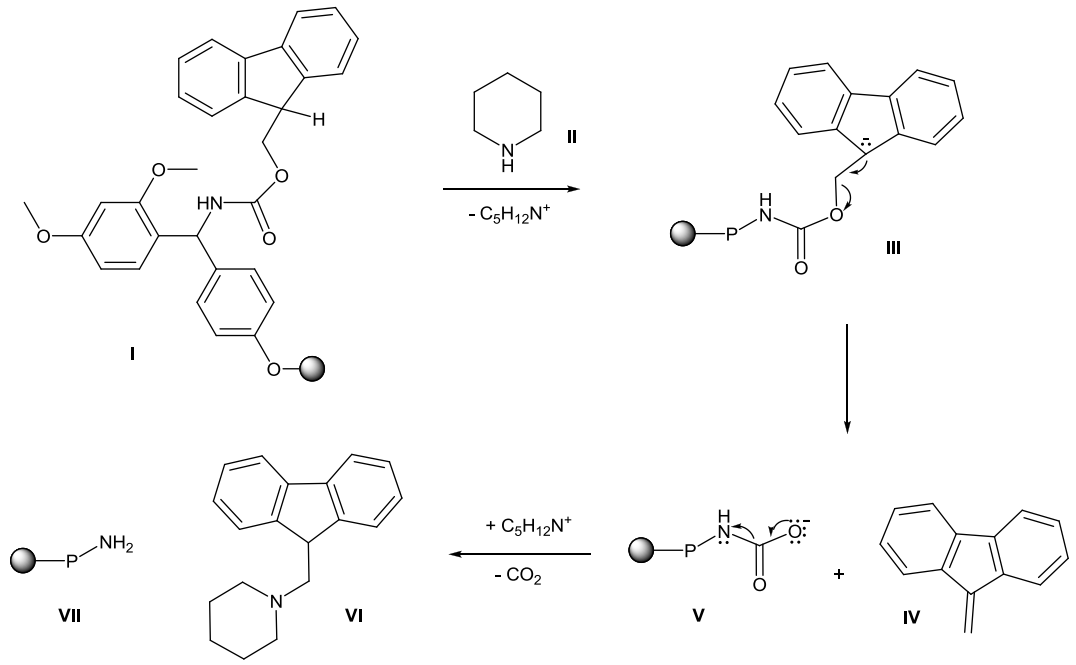
4.3.2. Sinteza linearnih glikopeptida

Prvi korak u sintezi nezaštićenih linearnih glikopeptida je selektivno uklanjanje alilne zaštitne skupine. C-terminalna alilna zaštitna skupina uklonjena je s aduktom dimetilamin borana u DCM-u uz $Pd(Ph_3P)_4$ kao katalizator (Shema 3).[140] Alil je privremena i ortogonalna zaštitna skupina otporna na uvjete potrebne za uklanjanje Fmoc zaštitne skupine, a moguće ju je ukloniti prije konačnog skidanja sa smole. Reakcija se provodi zaštićena od svjetlosti radi fotoosjetljivosti paladijeva kompleksa. Cijeli postupak je ponovljen tri puta kako bi se alilna zaštitna skupina u potpunosti skinula. Dobiveni spojevi korišteni su bez izolacije u daljnoj sintezi.



Shema 3. Mehanizam deprotekcije alilne zaštitne skupine

Drugi korak je uklanjanje Fmoc zaštitne skupine s 20 %-tnim piperidinom u DMF-u. Mehanizam uklanjanja Fmoc zaštitne skupine počinje tako da piperidin **II**, nukleofilna baza, deprotonira spoj **I** dajući spoj **III** koji se raspada na **IV** i **V**. Karbamidna kiselina **V** gubi ugljikov dioksid te se dobiva slobodni amin **VII**. Vezanjem piperidina **II** na metilfluorenil **IV** dobiva se **VI** (Shema 4).[141]

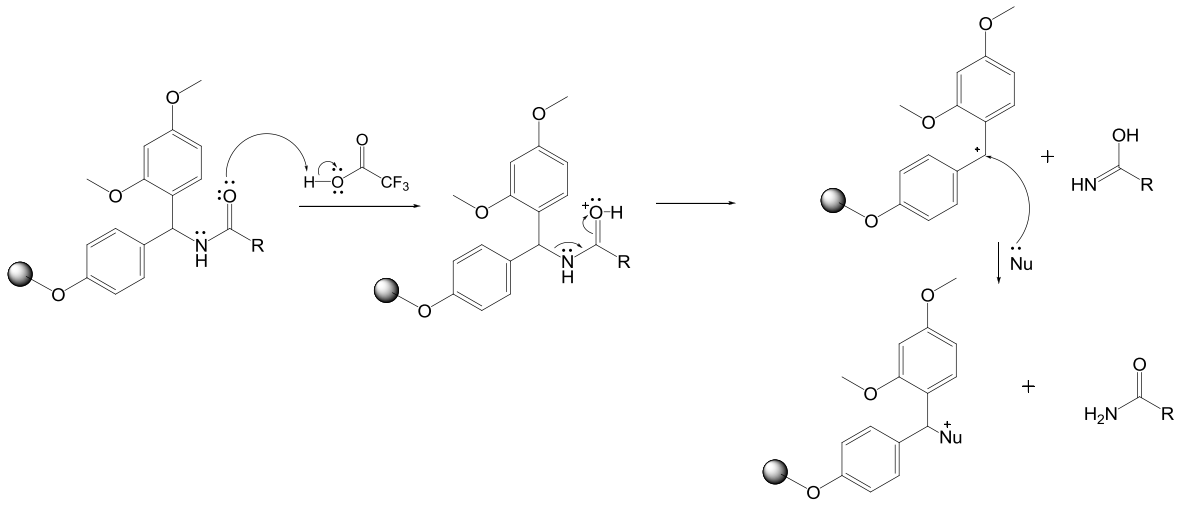


Shema 4. Mehanizam deprotekcije Fmoc zaštitne skupine sa smole[141]

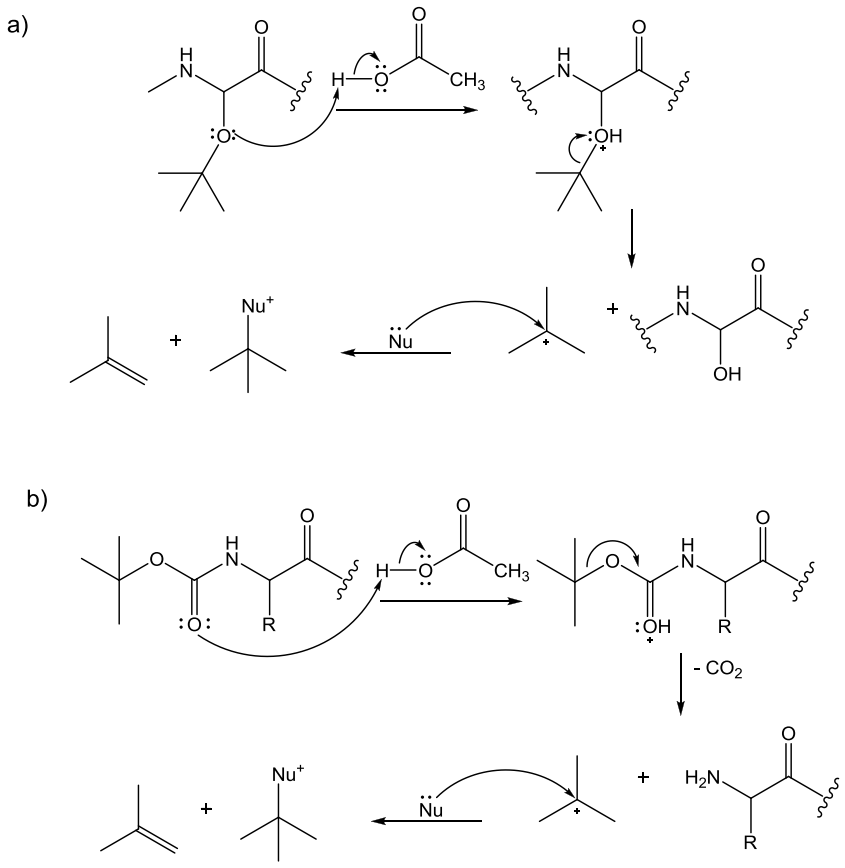
Uspješnost uklanjanja Fmoc zaštitne skupine provjerena je ninhidrinskim testom po Kaiseru. Otopina je pokazala plavu boju što ukazuje na slobodnu amino skupinu, tj. da je Fmoc zaštitna skupina uklonjena.

Rezultat tih dviju deprotekcija (alil, Fmoc) su spojevi **14**, **17**, **20**, **23**, **26**, **29**.

Treći korak je skidanje peptida sa smole. Mehanizami deprotekcije peptida s Rink amid smole, te *tert*-Bu i Boc skupine prikazani su na shemi 5, 6a i 6b.[141] Deprotekcija se postiže s trifluoroctenom kiselinom. Linker na Rink amid smoli daje aminokiselinu u obliku amida. Triizopropilsilan je dodan kao „hvatač“, tj. nukleofil za oslobođene karbokatione.



Shema 5. Predloženi mehanizam deprotekcije peptida s Rink amid smole[141]



Shema 6. Predloženi mehanizami a) *tert*-Bu i b) Boc deprotekcije djelovanjem TFA[141]

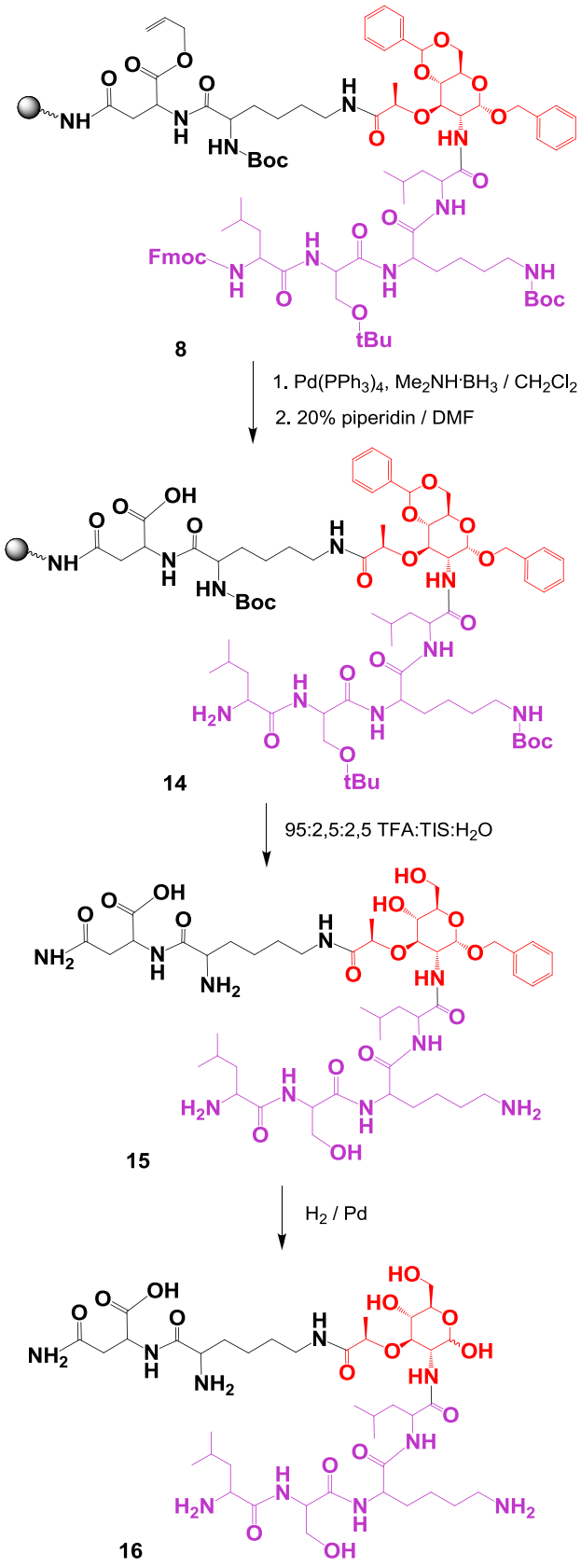
Priređeni spojevi su uklonjeni sa smole smjesom otapala (TFA : TIS : H_2O = 95 : 2,5 : 2,5, v/v/v) uz istovremeno uklanjanje zaštitnih skupina s bočnog lanca (Boc, *tert*-Bu) te benzilidenske zaštitne skupine s muraminske kiseline na sobnoj temperaturi 3 sata i taloženjem u diizopropil-eteru. Dobiveni su spojevi **15**, **18**, **21**, **24**, **27**, **30**.

Zadnji korak je uklanjanje benzilne zaštitne skupine hidrogenolizom uz katalizator Pd/C (10 %). Dobiveni su potpuno nezaštićeni linearni glikopeptidi **16**, **19**, **22**, **25**, **28**, **31**.

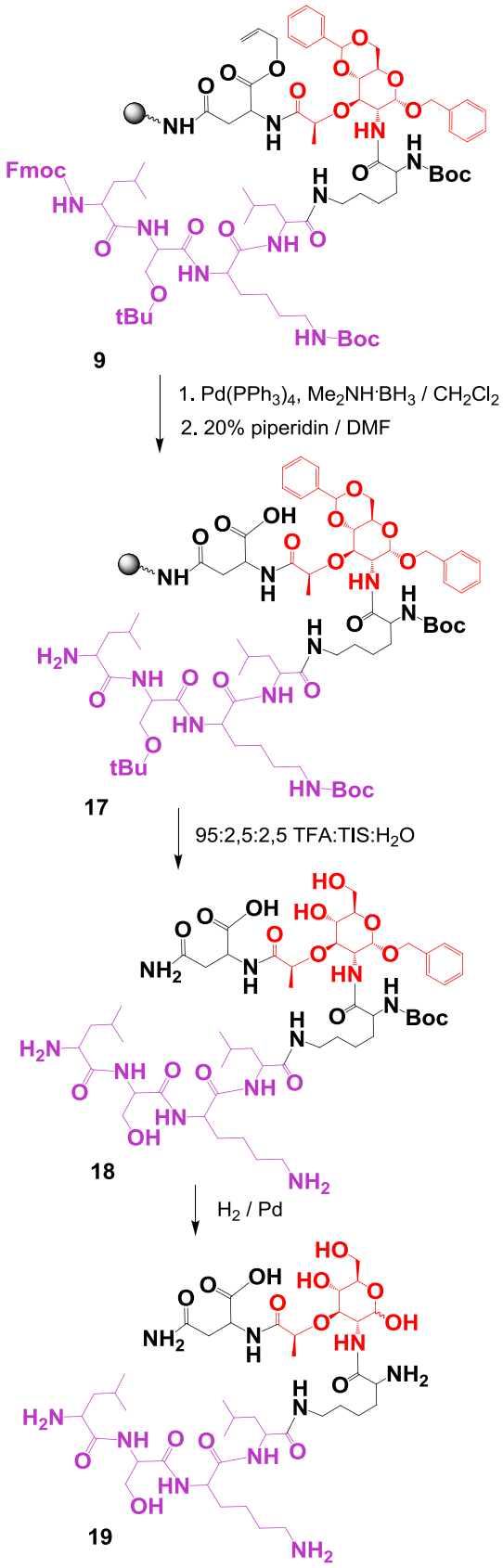
Dobiveni nezaštićeni linearni glikopeptidi čišćeni su na RP HPLC preparativnoj koloni u sistemu otapala F, te karakterizirani.

Najbolje iskorištenje reakcije postignuto je pri sintezi linearnih peptida **28** i **31** (~ 79 %) u kojima je muraminska kiselina vezana zadnja na čvrstom nosaču, a najlošije kod peptida **19** i **22** (~ 67 %) gdje je vezana kao druga aminokiselina. Iz toga možemo zaključiti da je vezanje muraminske kiseline u okosnicu peptida lošije u odnosu na standardne aminokiseline, a posebno vezanje na njenu slobodnu amino skupinu.

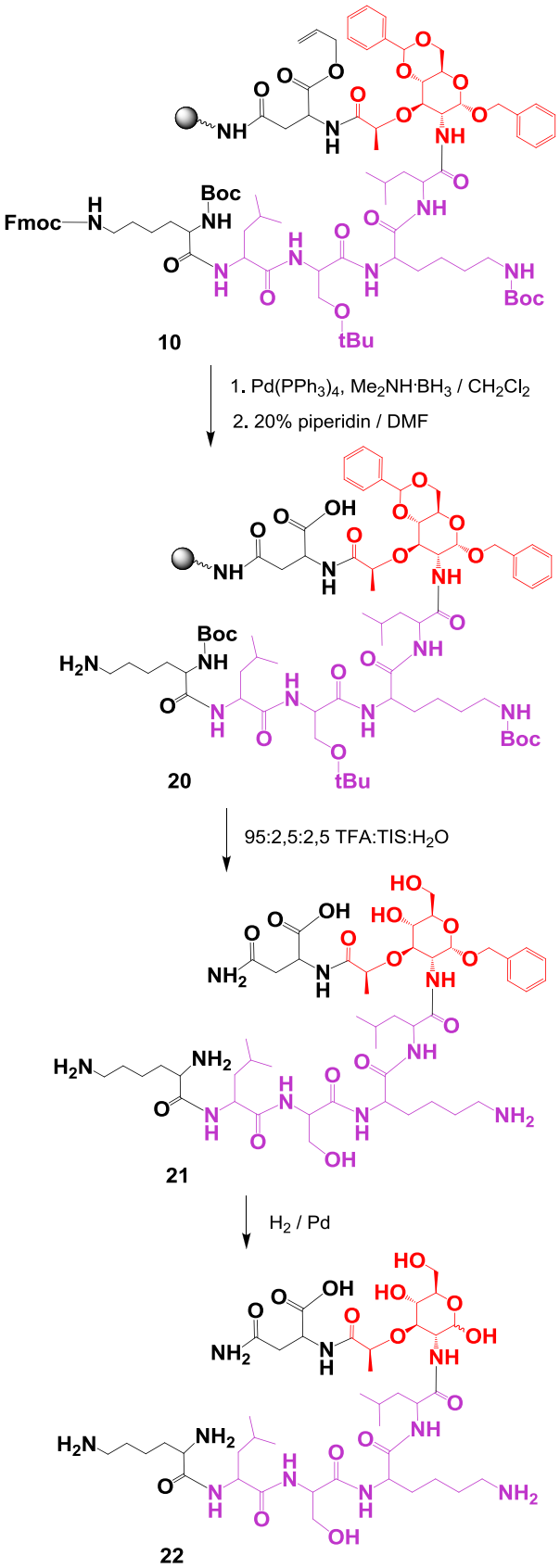
NMR analizom priređenih spojeva utvrđeno je da su izolirani spojevi smjesa α- i β-anomera muraminske kiseline. Spojevi **28** i **31** gdje je muraminska kiselina *N*-krajnja aminokiselina peptidne sekvence, primjećena je drugačija anomerna raspodjela u odnosu na druge spojeve gdje je muraminska kiselina ugrađena unutar peptida. Kod spojeva **16**, **19**, **22**, **25** amino skupina muraminske kiseline uključena je u peptidnu vezu i cijela je struktura rigidnija te je preferirano nastajanje (ostaje) α-anomera. Muraminska kiselina kod spojeva **28** i **31** ima slobodnu amino skupinu koja nije toliko sterički ometana te je omogućena enolizacija i otvaranje prstena što dovodi do raspodjele ~ 1 : 1 α- : β- anomera.



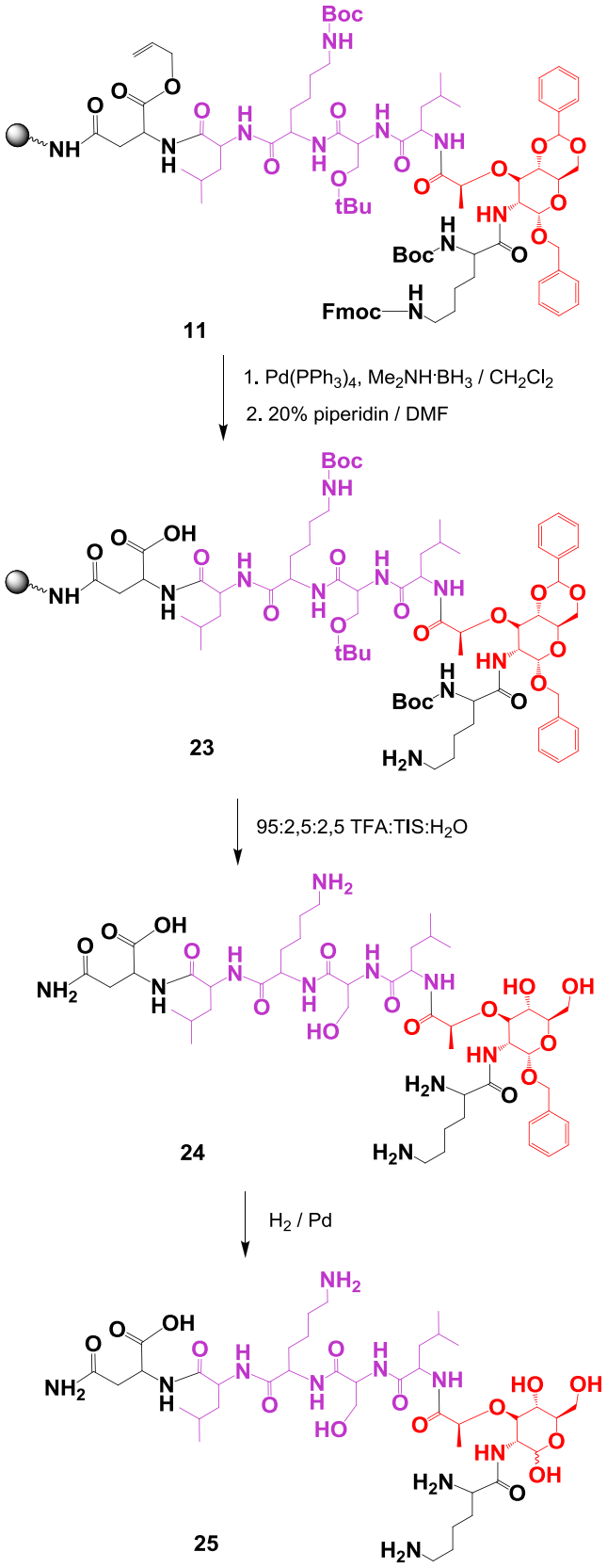
Shema 7. Sinteza nezaštićenog linearnog glikopeptida H-Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-N^{ε}-Lys-Asn-OH (**16**)



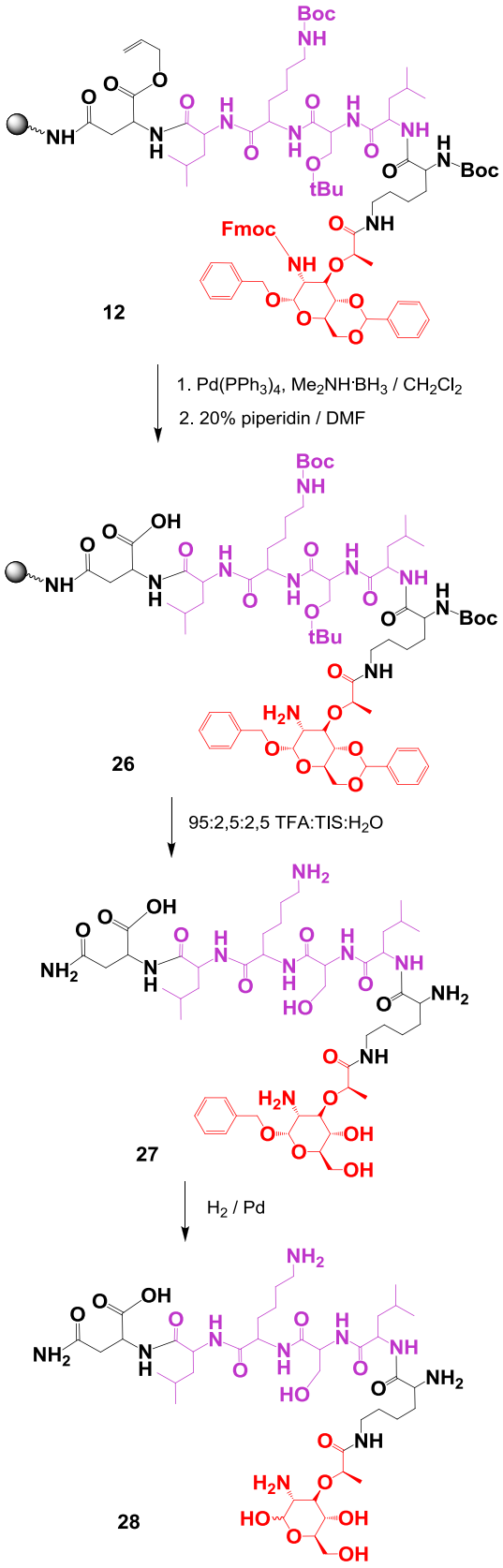
Shema 8. Sinteza nezaštićenog linearnog glikopeptida H-Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ε}-Lys-Mur-Asn-OH (**19**)



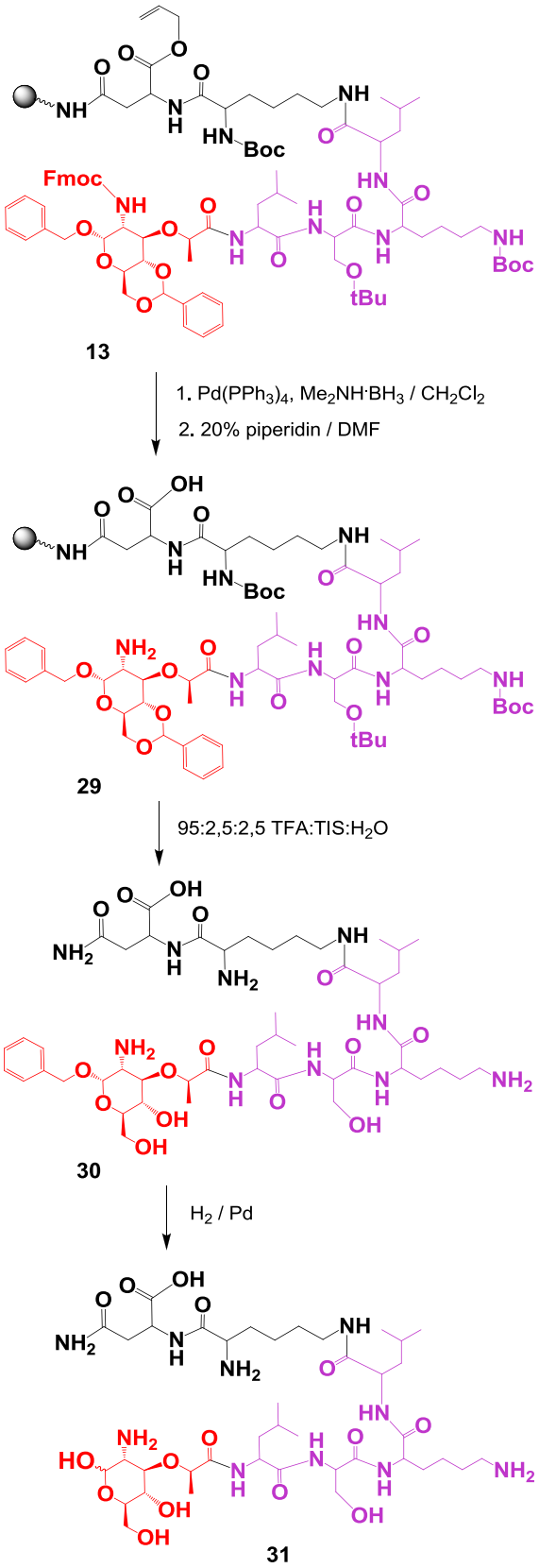
Shema 9. Sinteza nezaštićenog linearnog glikopeptida H-N^{ε}-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-Asn-OH (**22**)



Shema 10. Sinteza nezaštićenog linearnog glikopeptida H-N^{ε}-Lys-Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn-OH (**25**)



Shema 11. Sinteza nezaštićenog linearnog glikopeptida H-Mur-N^{ε}-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn-OH (**28**)



Shema 12. Sinteza nezaštićenog linearnog glikopeptida H-Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ε}-Lys-Asn-OH (**31**)

4.3.3. Sinteza cikličkih glikopeptida

Ciklizacija linearnih peptida na čvrstom nosaču napravljena je ručno u reakcijskoj posudi. Primjenjena je tzv. glava-rep ciklizacija u kojoj dolazi do nastajanja laktama između krajnje karboksilne i amino skupine. Da bi se provela takva ciklizacija, potrebno je ukloniti zaštitne skupine s C- i *N*-kraja linearnog glikopeptida dobivenog automatskon sintezom na čvrstom nosaču.

Prvo je provedeno selektivno uklanjanje C-terminalne alilne zaštitne skupine s asparaginske kiseline dimetilamin boranovim aduktom te Pd-tetrakisom kao katalizatorom u DCM-u. Potom je uklonjena *N*-terminalna Fmoc zaštitna skupina 20 % piperidinom u DMF-u. Dobiveni su spojevi **14**, **17**, **21**, **23**, **27**, **29** sa slobodnim C- i *N*-krajem. Time je omogućena ciklizacija glikopeptida.

Kao kondenzacijski reagensi korišteni su PyBOP ili HATU uz HOBt u bazičnim uvjetima, reguliranim s DIEA (pH ~ 8). Vezanje s PyBOP-om je provedeno preko noći, a s HATU samo 4 sata. Budući da se uz HATU postižu bolja iskorištenja u kraćem vremenu, možemo HATU smatrati prikladnijim reagensom za ove ciklizacije.

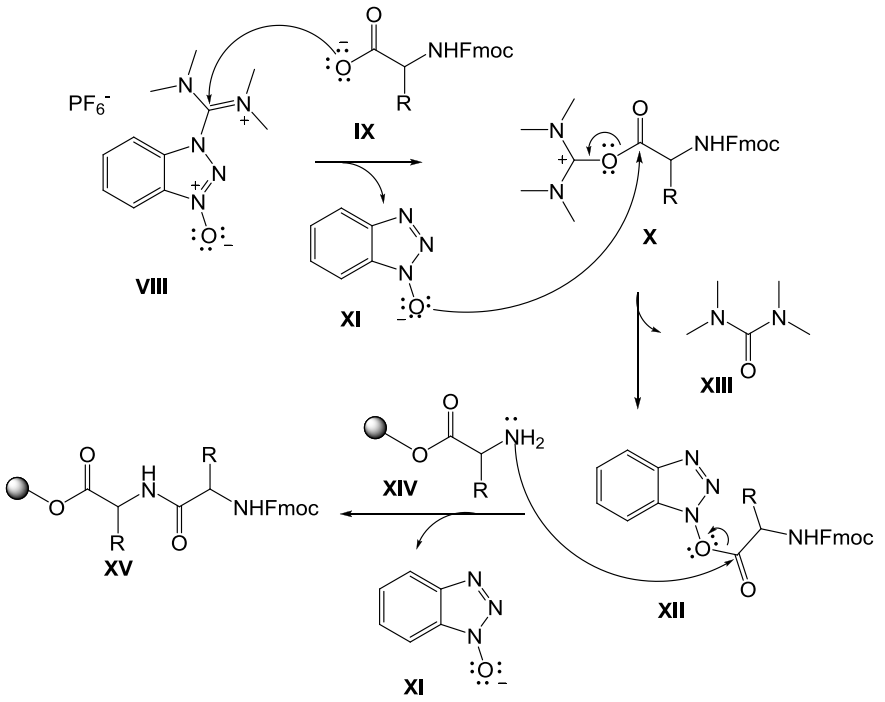
Mehanizam reakcije s HATU započinje napadom karboksilnog aniona **IX** na HATU **VIII** pri čemu se dobije spoj **X**. Vezanjem HOBt-a (**XI**) nastaje aktivni ester **XII** i nusprodukt **XIII**. Slobodna amino skupina spoja **XIV** napada spoj **XII** i nastaje spoj **XV**. (Shema 13).[141,142]

Mehanizam ciklizacije uz PyBOP i HOBt započinje nukleofilnom supstitucijom na PyBOP **XVI** napadom kisikova atoma karboksilne skupine spoja **IX** pri čemu se dobije spoj **XVII**. Deprotonirani HOBt **XI** se veže na spoj **XVII** dajući aktivni ester **XVIII** i nusprodukt **XIX**. Aktivni ester **XVIII** sporo reagira sa slobodnom amino skupinom **XIV** i daje spoj **XX** (Shema 14).[141,143]

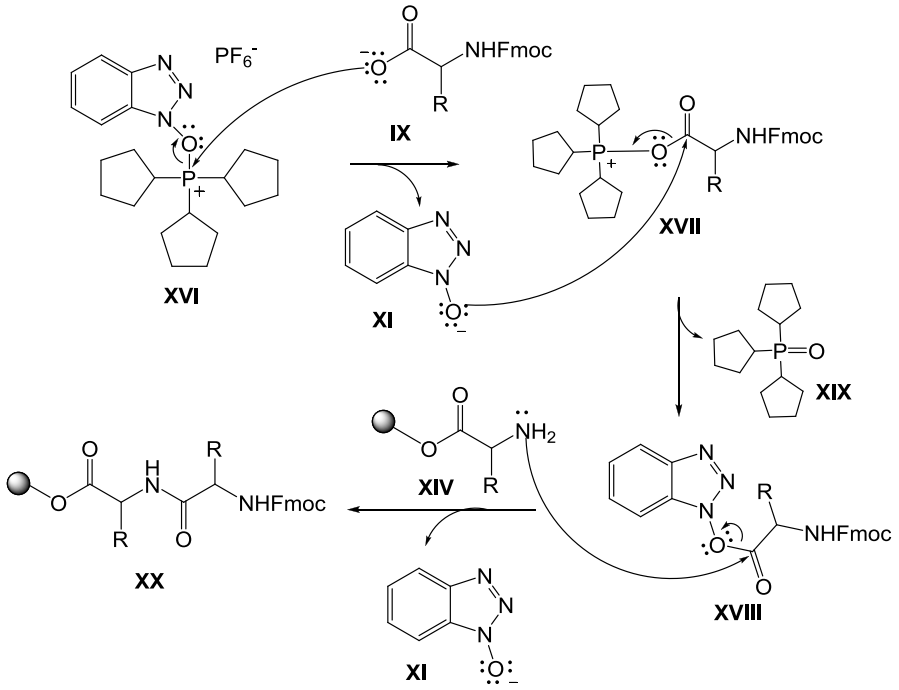
U sintezi je korištena Boc-Lys(Fmoc)-OH aminokiselina koja je preko bočnog lanca ugrađena u peptidni kostur čime je povećana fleksibilnost i olakšana ciklizacija peptida.

Rezultat ciklizacije su ciklički glikopeptidi **32**, **35**, **38**, **41**, **44**, **47** još uvijek vezani na čvrsti nosač.

Uspješnost ciklizacije provjerena je ninhidrinskim testom po Kaiseru. Test je dao žutu boju što znači da nema slobodne amino skupine te da je reakcija ciklizacije uspješno provedena.



Shema 13. Predloženi mehanizam vezanja s HATU



Shema 14. Predloženi mehanizam vezanja s PyBOP

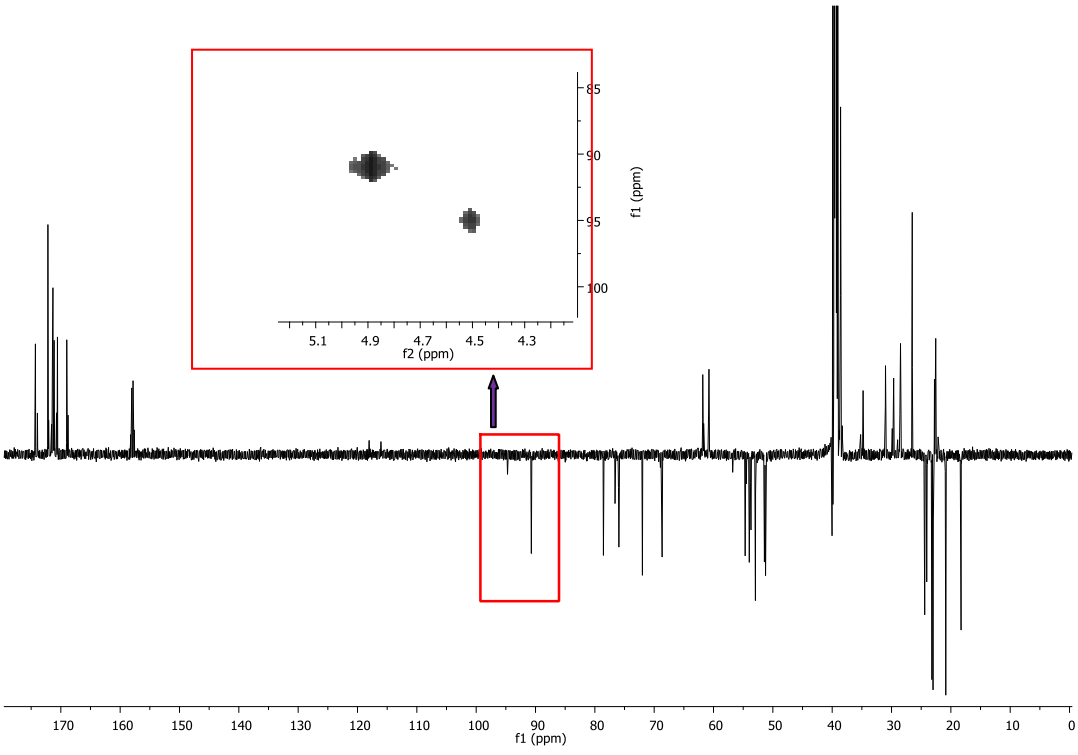
Deprotekcija bočnih zaštitnih skupina aminokiselina te istovremeno uklanjanje cikličkog glikopeptida s čvrstog nosača provedeno je u 95 % trifluoroctenoj kiselini (TFA)/voda u prisutstvu triizopropilsilana (TIS) na sobnoj temperaturi kroz 3 sata. Konačni produkti izolirani su taloženjem u diizopropil-eteru. Dobiveni su ciklički glikopeptidi **33**, **36**, **39**, **42**, **45**, **48** s benzilnom zaštitom na anomernom ugljiku muraminske kiseline.

Zadnji korak je uklanjanje benzilne zaštitne skupine hidrogenolizom uz katalizator Pd/C (10 %). Dobiveni su potpuno nezaštićeni ciklički glikopeptidi **34**, **37**, **40**, **43**, **46**, **49**.

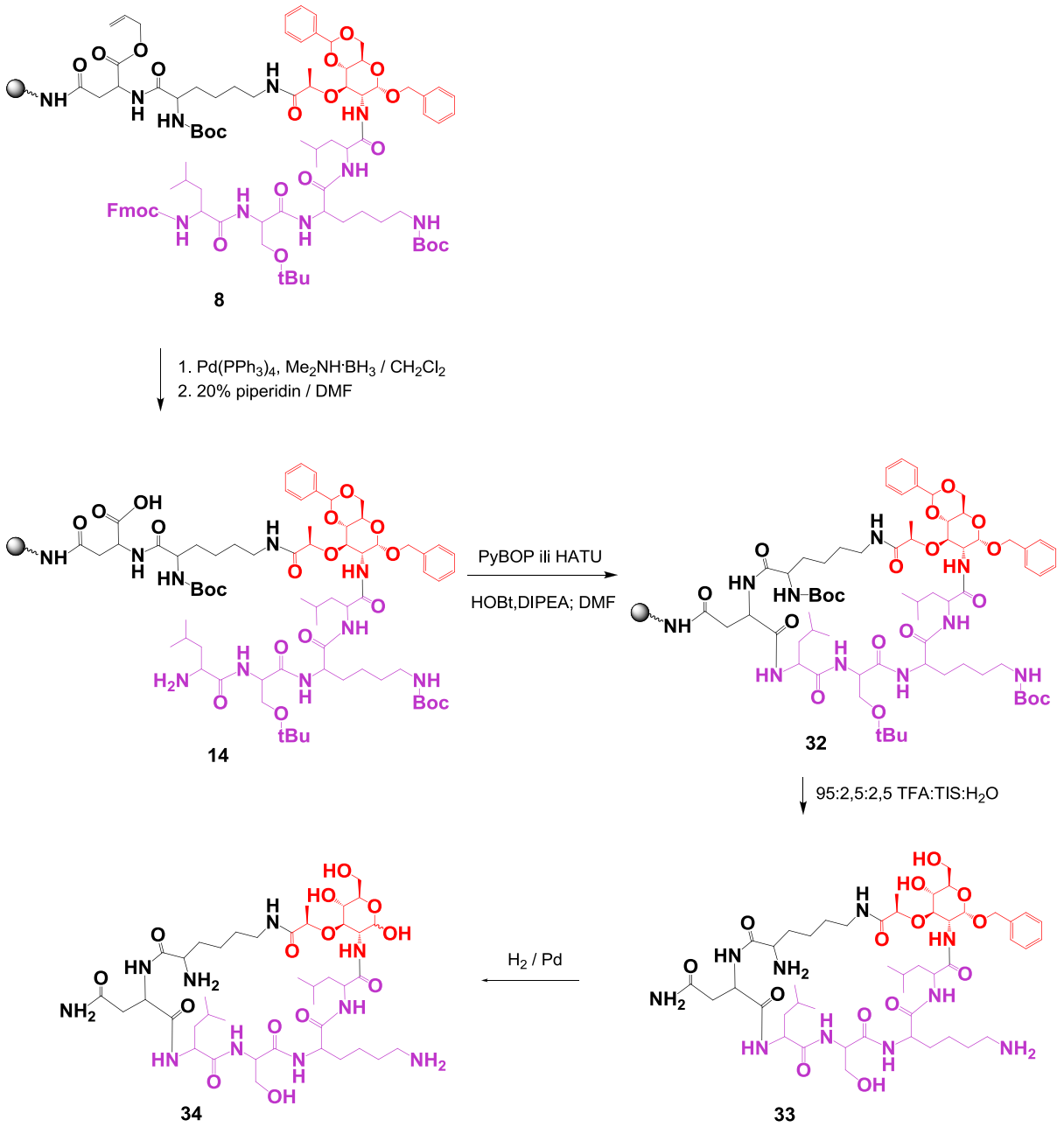
Dobiveni nezaštićeni ciklički glikopeptidi čišćeni su na RP HPLC preparativnoj koloni u sistemu otapala G, te karakterizirani.

Najlošije iskorištenje reakcije ciklizacije postignuto je za glikopeptide **46** i **49** (~ 37 %) gdje je u ciklizaciju upravo uključena muraminska kiselina, dok je najbolje iskorištenje kod spojeva **40** i **43** (~ 49 %) gdje se ciklizacija odvija preko bočnog lanca lizina.

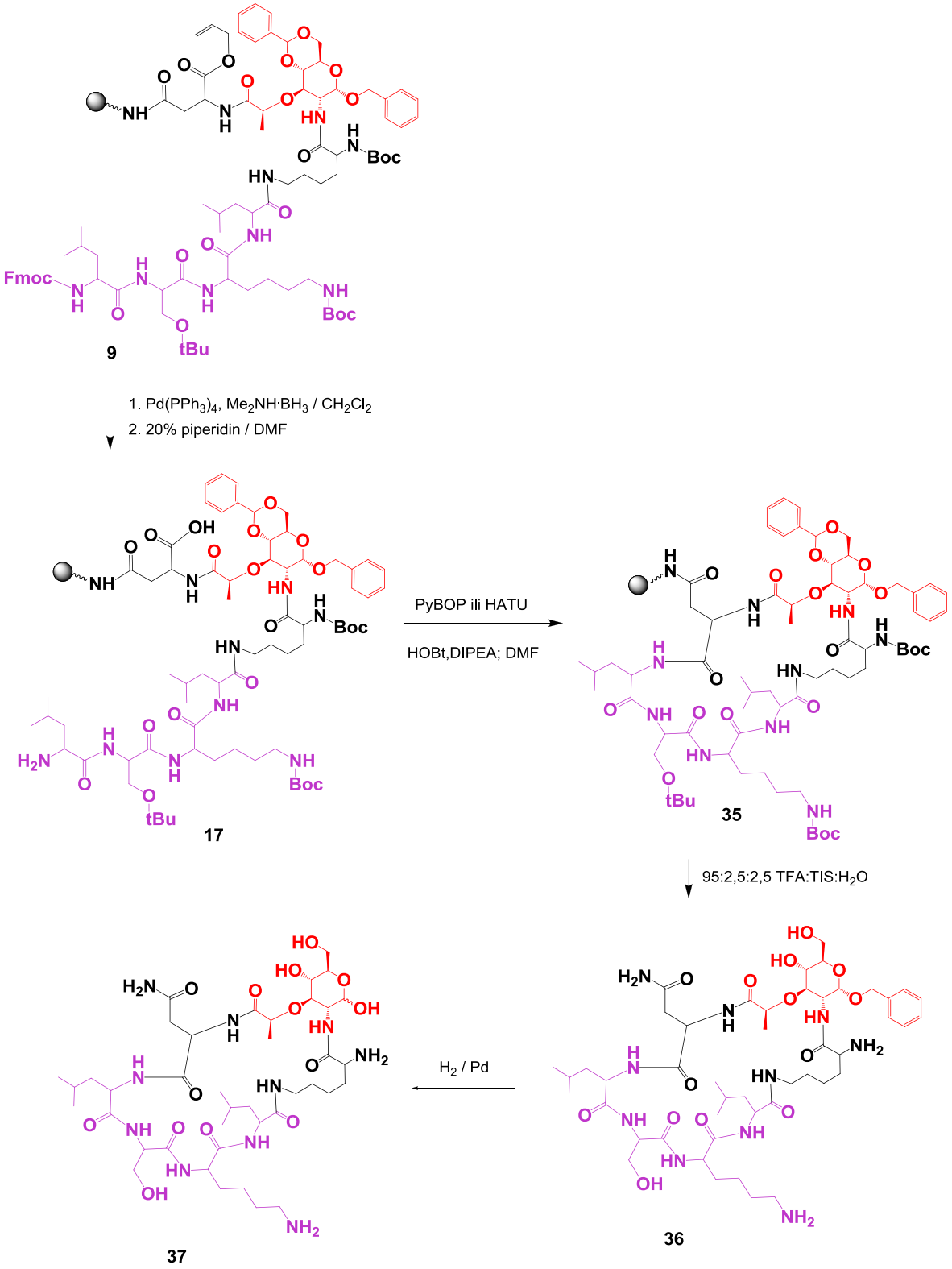
NMR analizom priređenih spojeva određeni su pomaci anomernih protona (Slika 34). ^{1}H NMR utvrđeno je da su izolirani spojevi smjesa α- i β-anomera muraminske kiseline (~ 1,2 : 1).



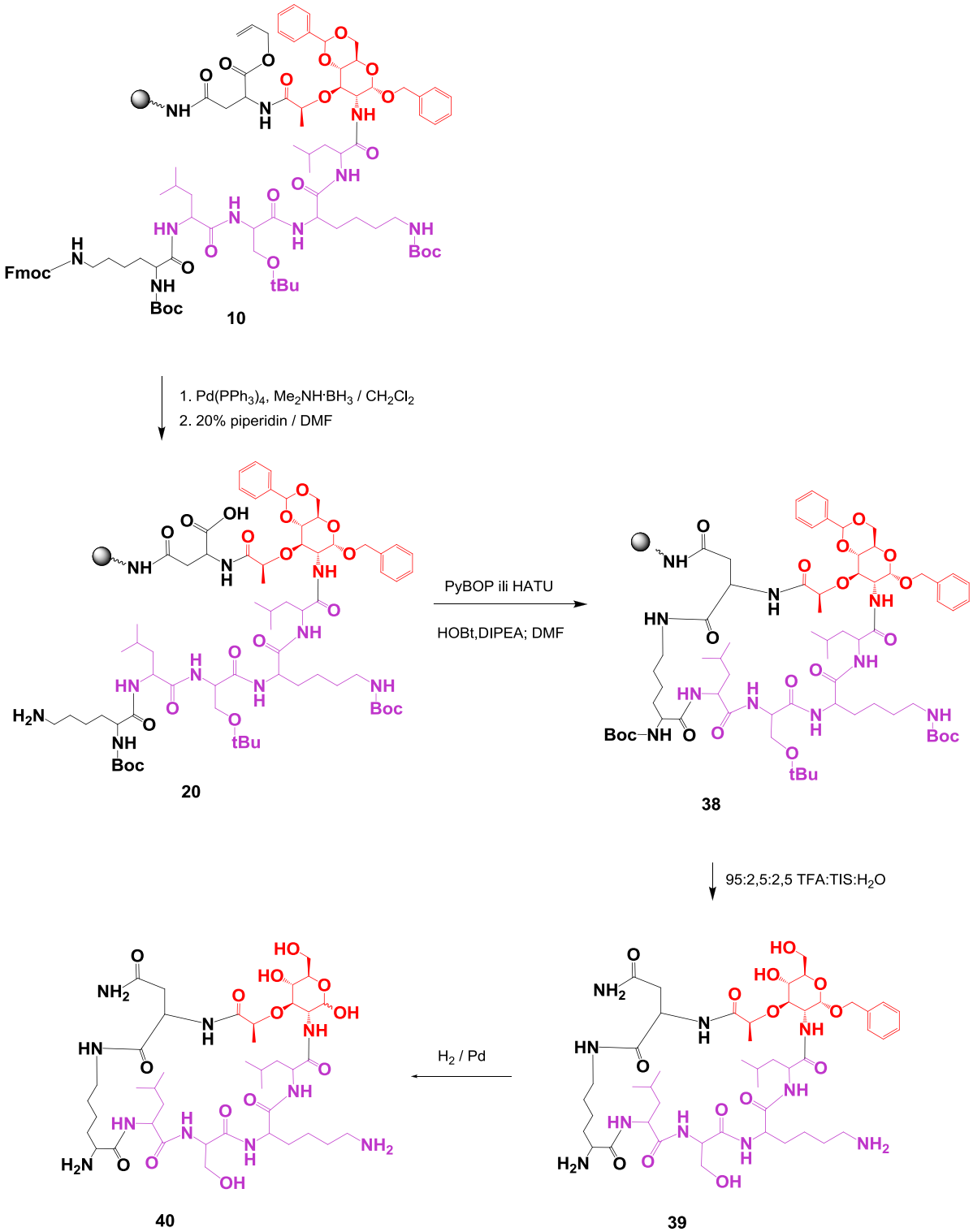
Slika 34. Prikaz anomernog područja cikličkog peptida **37** (^{13}C i HSQC spektar)



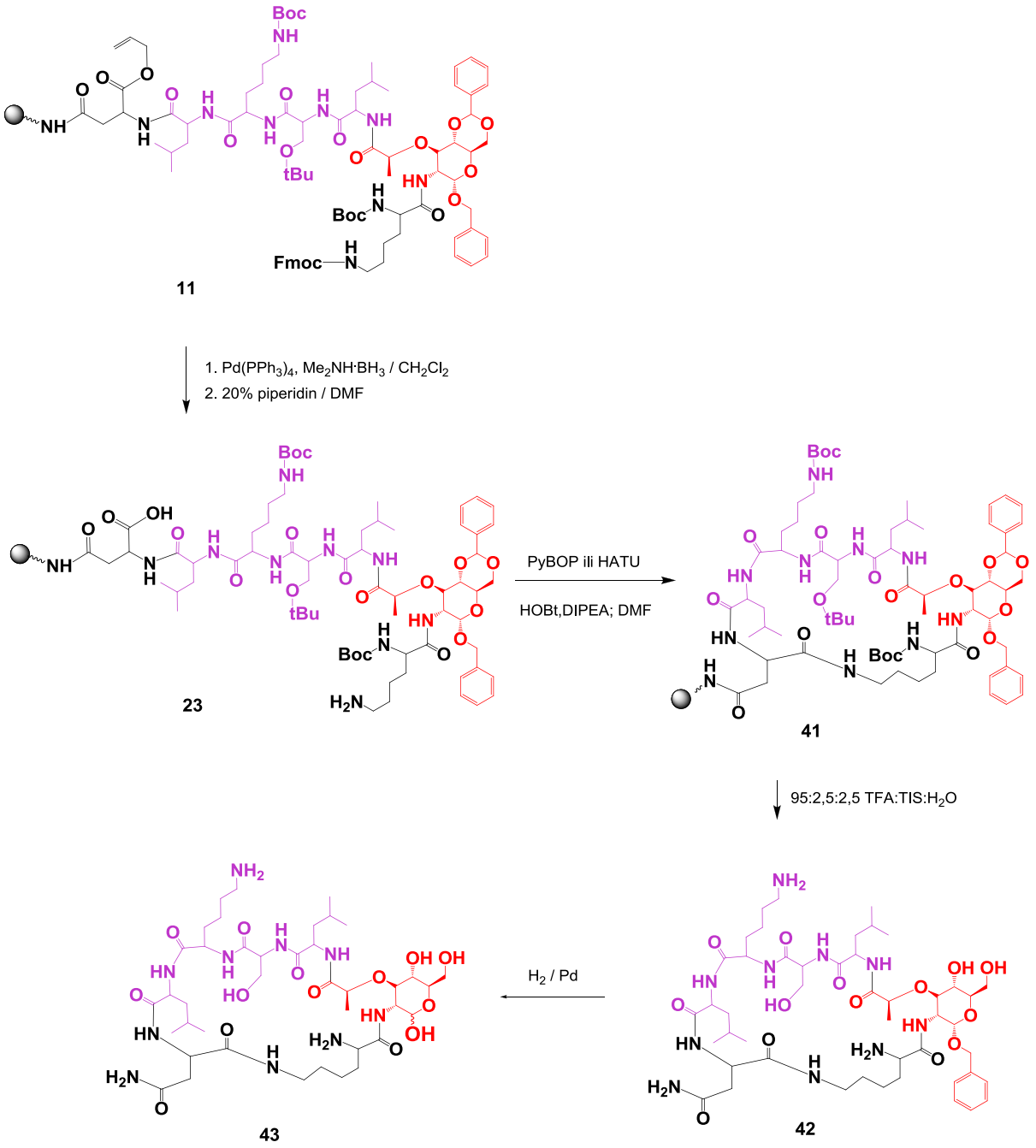
Shema 15. Sinteza nezaštićenog cikličkog glikopeptida ciklo[Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-N^{ε}-Lys-Asn] (**34**)



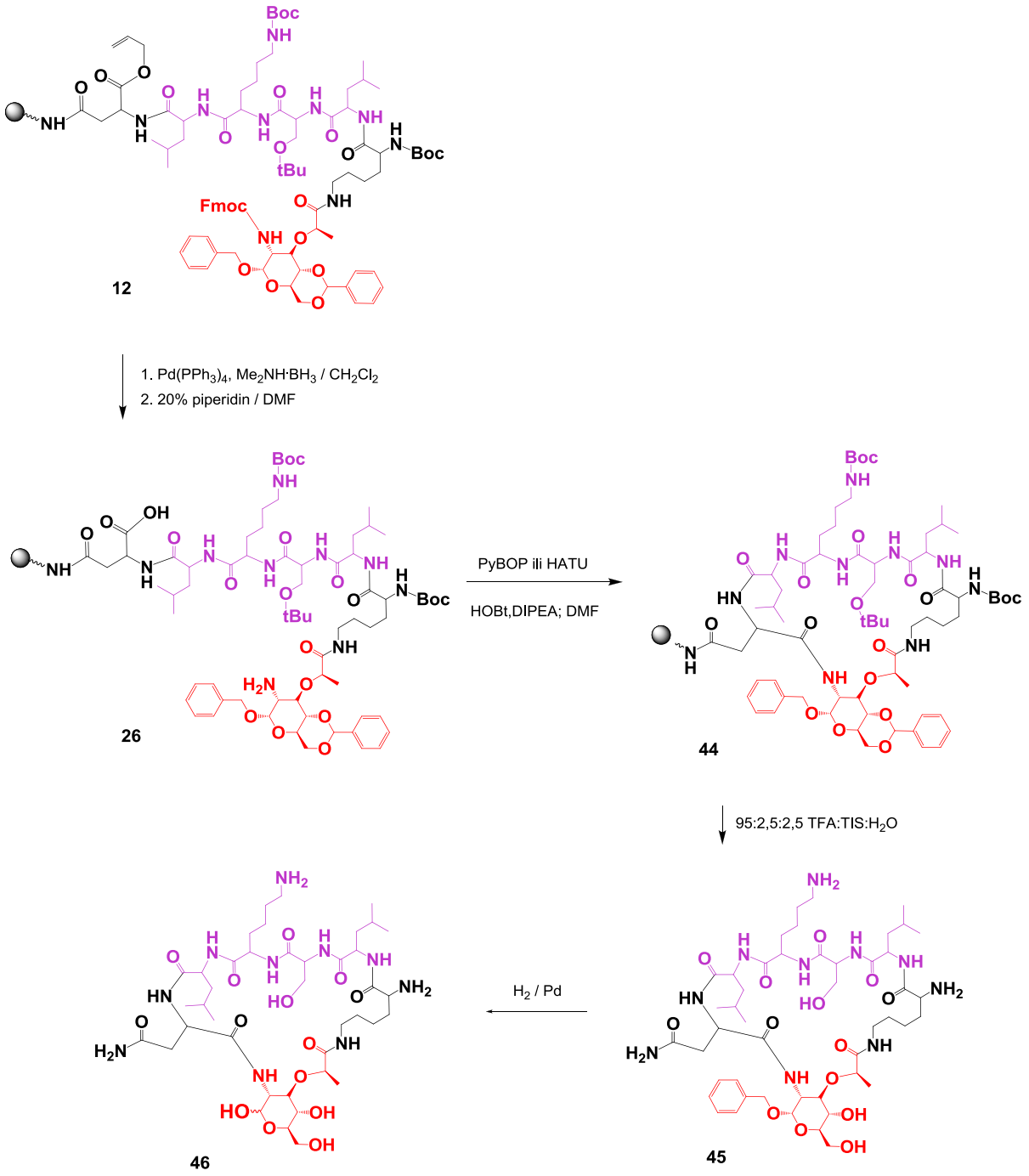
Shema 16. Sinteza nezaštićenog cikličkog glikopeptida ciklo[Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ε}-Lys-Mur-Asn] (**37**)



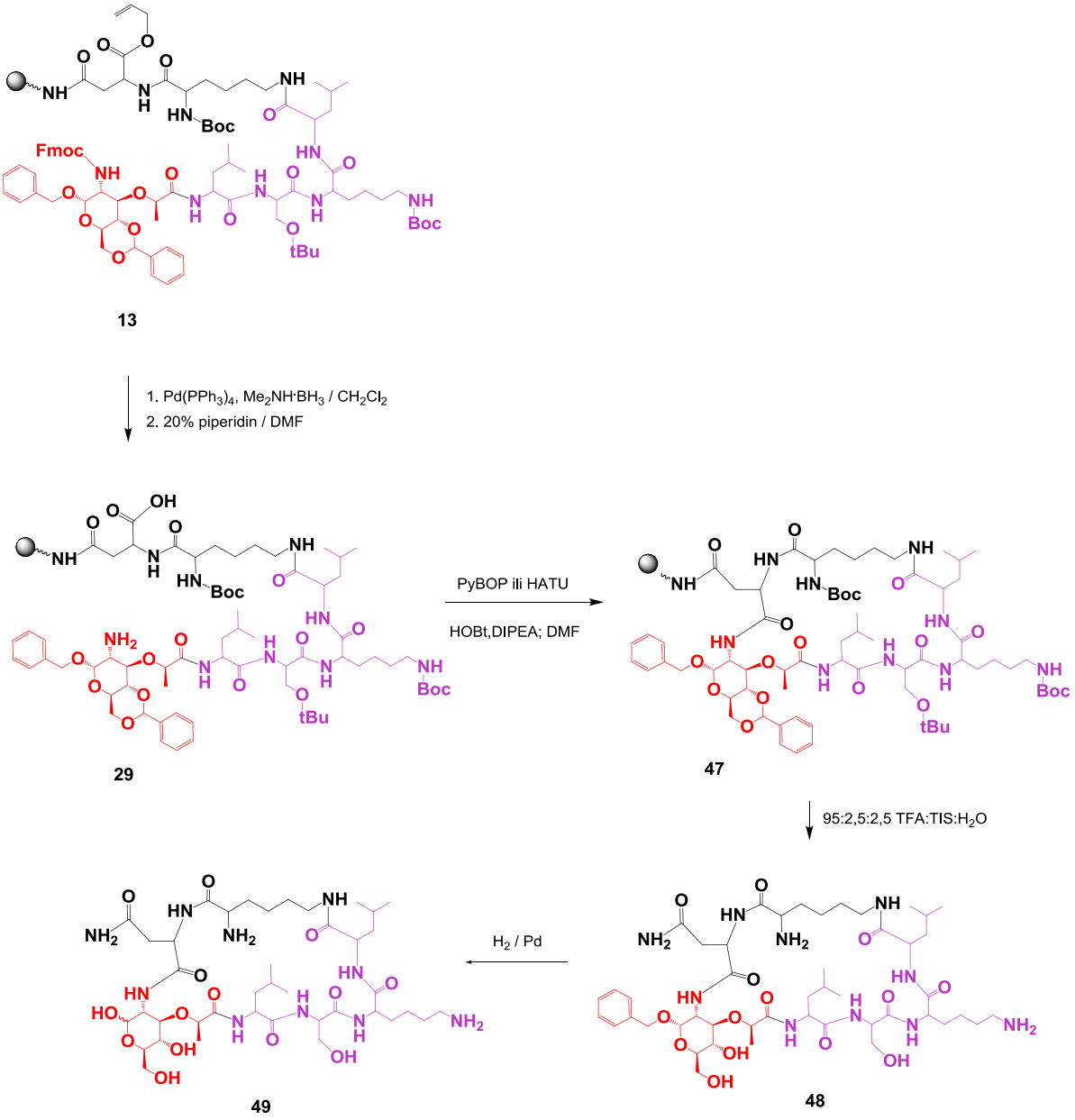
Shema 17. Sinteza nezaštićenog cikličkog glikopeptida ciklo[N^{ε}-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-Asn] (**40**)



Shema 18. Sinteza nezaštićenog cikličkog glikopeptida ciklo[N^{ε}-Lys-Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn] (**43**)



Shema 19. Sinteza nezaštićenog cikličkog glikopeptida ciklo[Mur-N^{ε}-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn] (**46**)



Shema 20. Sinteza nezaštićenog cikličkog glikopeptida ciklo[Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ε}-Lys-Asn] (**49**)

4.4. ODREĐIVANJE ANTITUMORSKE AKTIVNOSTI

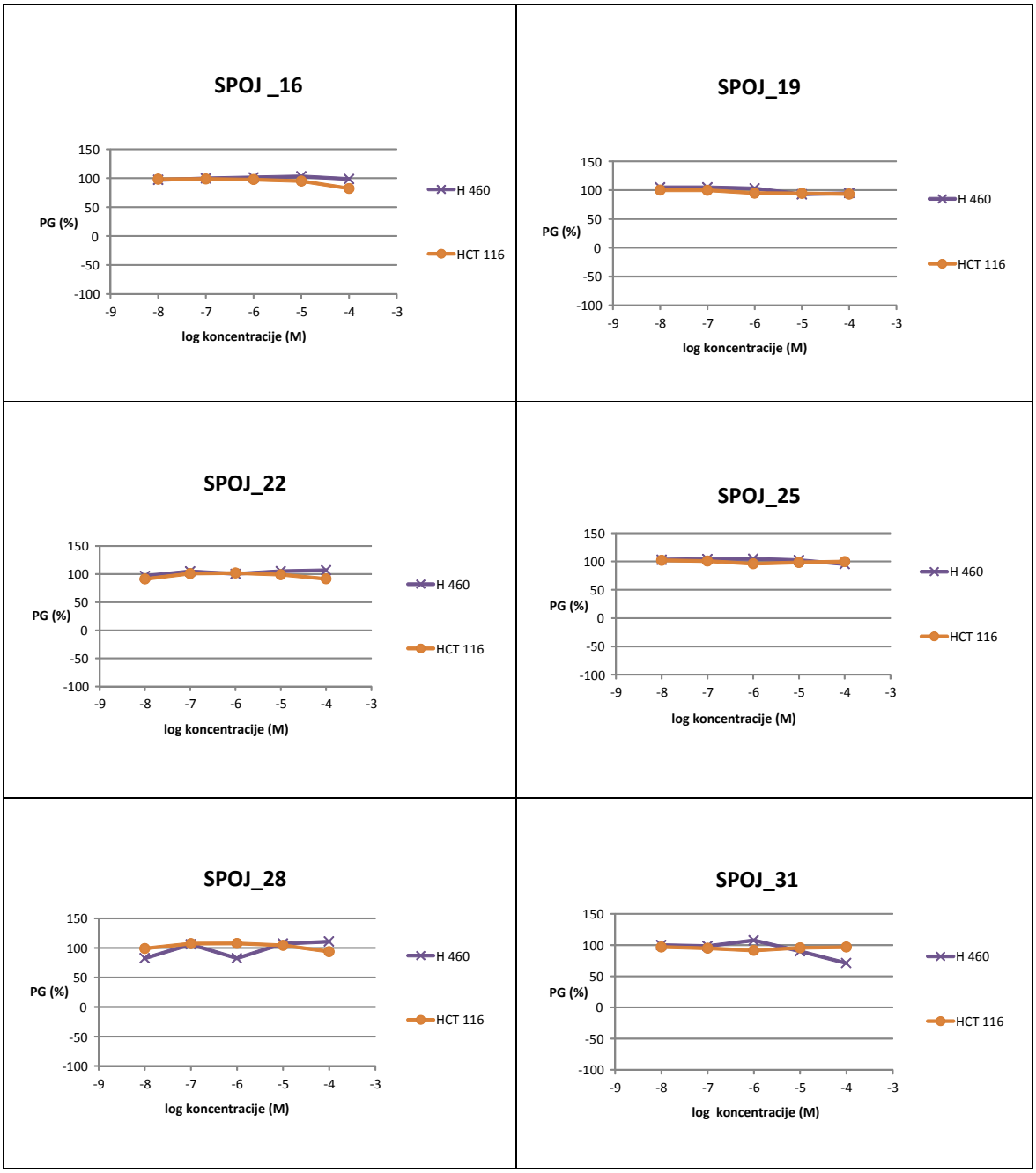
Dizajn peptida kao potencijalnih antitumorskih lijekova:

Ciklizacijom peptida i umetanjem muraminske kiseline, čime bi se trebala ograničiti konfomacijska sloboda i smanjiiti stupanj podložnosti enzimskoj razgradnji, nastojali smo povećati biološku aktivnost proučavanih peptida. Konformacijski rigidnija struktura povećava selektivnost, te minimizira vezanje na neželjene receptore. Razmještaj funkcijskih skupina na ugljikohidratnom prstenu također definira konformaciju, a polarne hidroksilne skupine doprinose boljoj topljivost u vodi. Nadalje, uvođenje ugljikohidratne komponente može smanjiti lipofilnost peptida, ali i istovremeno povećati prijenos preko bioloških membrana. Kako je molekula ugljikohidrata determinanta koja utječe na interstanično prepoznavanje, očekuje se da će muramiska kiselina pospješiti usmjeravanje peptida do odredišta. Muraminska kiselina izabrana je radi svoje strukturne sličnosti s δ-SAA *N*-acetilneurarminskom kiselinom (sialičnom kiselinom), terminalnim šećerom na oligosaharidu glikoproteina povezanim s malignim promjenama stanica. U sekvenci LSKL prisutan je Lys čiji bočni lanac zbog kationskog karaktera može dovesti do interakcije s uglavnom negativno nabijenom fosfolipidnom membranom. Ugradnja biološki aktivne sekvence Leu-Ser-Lys-Leu (LSKL) zanimljiva je s obzirom na literaturno poznato sudjelovanje u aktivaciji TGF-β, čijim poremećajem u signalnom putu, može doći do nastanka tumora. Nadalje u našem su laboratoriju sintetizirani spojevi koji su sadržavali LSKL peptidnu sekvencu i pokazali su antiproliferativnu aktivnost na nekoliko humanih linija karcinoma (rezultati nisu objavljeni).

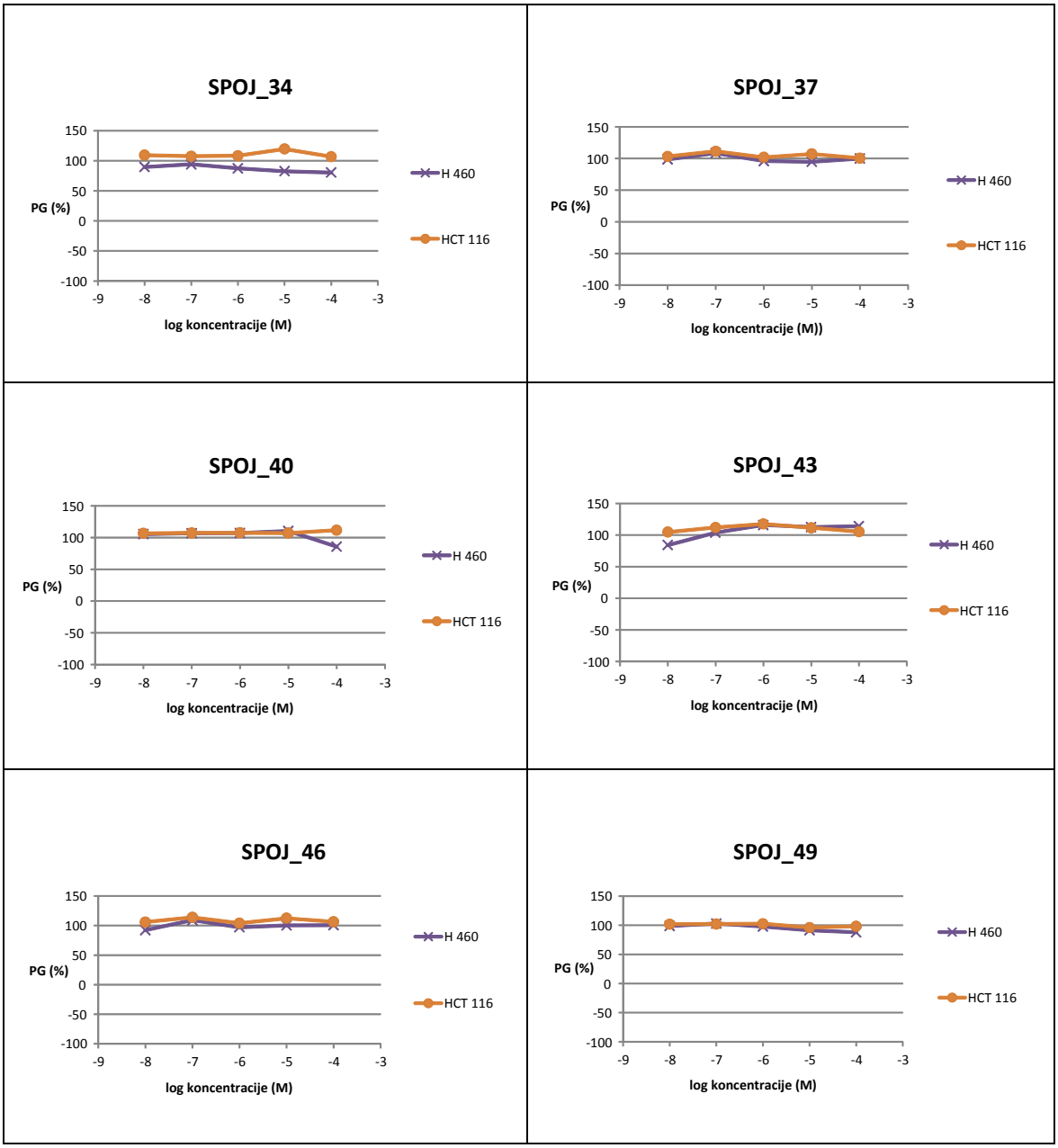
Ispitan je utjecaj priređenih linearnih (**16**, **19**, **22**, **25**, **28**, **31**) i cikličkih (**34**, **37**, **40**, **43**, **46**, **49**) glikopeptida na proliferaciju dviju humanih staničnih linija karcinoma, debelog crijeva (HCT 116) i pluća (H 460) MTT metodom. MTT je kolorimetriska proliferacijska metoda, koja ukazuje na aktivnost mitohondija žive stanice. Metoda se bazira na cijepanju veze tetrazolijeve soli (MTT-a) staničnim dehidrogenazama pri čemu iz žutog MTT-a nastaju ljubičasti kristali formazana. Stanice su izložene djelovanju sintetiziranih spojeva u rasponu koncentracija od 10^{-4} do 10^{-8} mol dm^{-3}. GI_{50} predstavlja učinkovitost testnog reagensa kao inhibitora, a navodi se kao koncentracija u kojoj je postignuta 50 % inhibicija rasta testih stanica.

Sintetizirani potpuno nezaštićeni linearni (**16**, **19**, **22**, **25**, **28**, **31**) i ciklički (**34**, **37**, **40**, **43**, **46**, **49**) glikopeptidi (Slika 34 i Slika 35) nisu pokazali antitutumorsku aktivnost s obzirom

na korištene stanične linije, koncentraciju i strukturu primjenjenog spoja. Za sve spojeve dobiveno je GI_{50} >100.



Slika 35. Linearni glikopeptidi – antitumorska aktivnost



Slika 36. Ciklički glikopeptidi – antitumorska aktivnost

Potrebne su daljnje preinake postojećeg glikopeptidnog kostura kako bi se dobila molekula željenih karakteristika. Slobodne hidroksilne skupine šećernog dijela molekule kao i amino skupine peptida predstavljaju pogodna mjesta za te preinake.

4.5. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

Dizajn peptida kao potencijalnih antimikrobnih lijekova:

Dizajn peptida s ugrađenom šećernom građevnom jedinicom koja doprinosi rigidnosti strukture i eventulano stabilizira peptid u odnosu na enzimsku razgradnju, te utječe na selektivno međustanično prepoznavanje može u svakom slučaju, kao što je to već ranije navedeno (pogl. 4.4.), povećati biološku aktivnost peptida. Muraminsku kiselinu kao sastavni dio stanične stijenke bakterija, odredili smo kao determinatu koja će s muraminskom kiselinom ugrađenom u peptid sudjelovati u ugljikohidrat-ugljikohidrat interakciji. Ova interakcija trebala bi pridonijeti djelotvornosti priređenih spojeva.

Ispitan je antimikrobni utjecaj nezaštićenih linearnih (**16**, **19**, **22**, **25**, **28**, **31**) i nezaštićenih cikličkih (**34**, **37**, **40**, **43**, **46**, **49**) glikopeptida, cikličkog peptida s benzilnom zaštitom na *O*-1 Mur (**36**), te LSKL sekvence kao standarda, na sojevima vrsta: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 te *Microsporum gypseum* FBF 10570. Primijenjene su dvije metode u uvjetima *in vitro*: metoda difuzije (određivanje zone inhibicije rasta) te metoda mikrodilucije (određivanje minimalne inhibitorne koncentracije, MIK).

Difuzijskom metodom određuje se zona inhibicije. Antibiotik iz diska difundira u podlogu, te ako je djelotvoran sprečava bakterijski rast, tako da bakterija poraste tek na određenoj udaljenosti od diska na kojoj je koncentracija difundiranog antibiotika premala i stoga nedjelotvorna. Ovaj izostanak rasta se naziva zona inhibicije. Dilucijskom metodom određuje se minimalna inhibitorna koncentracija (MIK), a to je najniža koncentracija antibiotika koja sprečava rast bakterija. Koncentracija antibiotika, koja se nalazi u prvoj podlozi (u nizu), u kojoj nema porasta bakterija dobiva se minimalna inhibitorna koncentracija koja se izražava u μg/mL.

Tablica 9. Prikaz rezultata mjerenja antimikrobnog učinka spojeva metodom mikrodilucije

	MIK* (μg/mL, N=3**)				
GLIKOPEPTIDI	***Staphylococcus aureus* ATCC 6538**	***Escherichia coli* ATCC 10536**	***Candida albicans* ATCC 10231**	***Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404**	***Microsporum gypseum* FBF 10570**
LSKL*	>800	>800	>800	>800	>800
16	>800	>800	>800	>800	>800
19	**533,33±231**	>800	>800	>800	>800
22	>800	>800	>800	>800	>800
25	>800	>800	>800	>800	>800
28	>800	>800	>800	>800	>800
31	>800	>800	>800	>800	>800
34	>800	>800	>800	>800	>800
37	>800	>800	>800	>800	>800
40	>800	>800	>800	>800	>800
43	>800	>800	>800	>800	>800
46	>800	>800	>800	>800	>800
49	>800	>800	>800	>800	>800
36	>800	**100±0**	>800	>800	>800

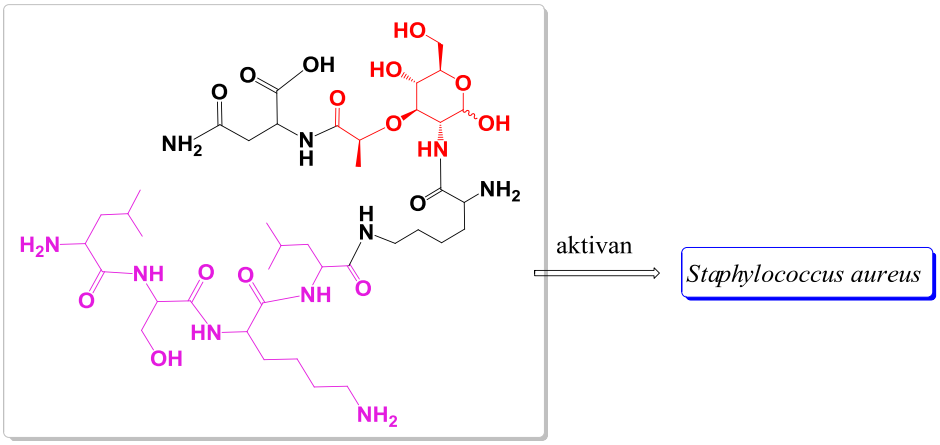
* MIK = minimalna inhibitorna koncentracija
** N = broj ponavljnja eksperimenta
*** LSKL = Leu-Ser-Lys-Leu

Metodom difuzije dobiveni su negativni rezultati za sve testirane spojeve.

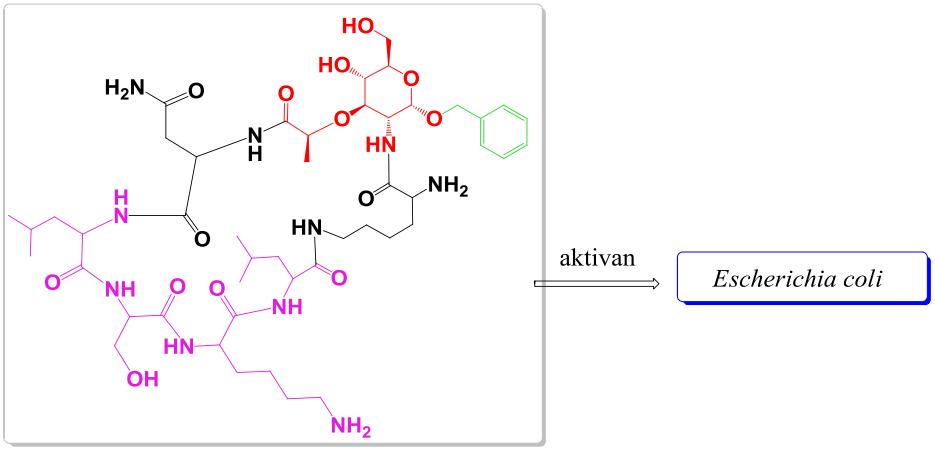
Rezultati mjerenja antimikrobne aktivnosti metodom mikrodilucije prikazani su u tablici 13. Glikopeptid **19** (Slika 36a) pokazao se aktivnim na *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitivna bakterija) pri koncentraciji 533,33±231 μg/mL. Ciklički glikopeptid s benzilnom zaštitom na muraminskoj kiselini **36** (Slika 36b) pokazao je antimikrobnu aktivnost na *Escherichia coli* (Gram-negativna bakterija) pri koncentraciji od 100 μg/mL.

Dobiveni rezultati antimikrobne aktivnosti imaju veliku važnost budući da se radi o dva spoja koji se strukturno razlikuju i pokazali su aktivnost jedan na Gram-pozitivne, a drugi na Gram-negativne bakterije. Finim preinakama na ovim spojevima nastojat će se poboljšati antimikrobna svojstva ovih glikopeptida.

Linearni glikopeptid **19**



Ciklički glikopeptid **36**



Slika 37. Spojevi antimikrobne aktivnosti

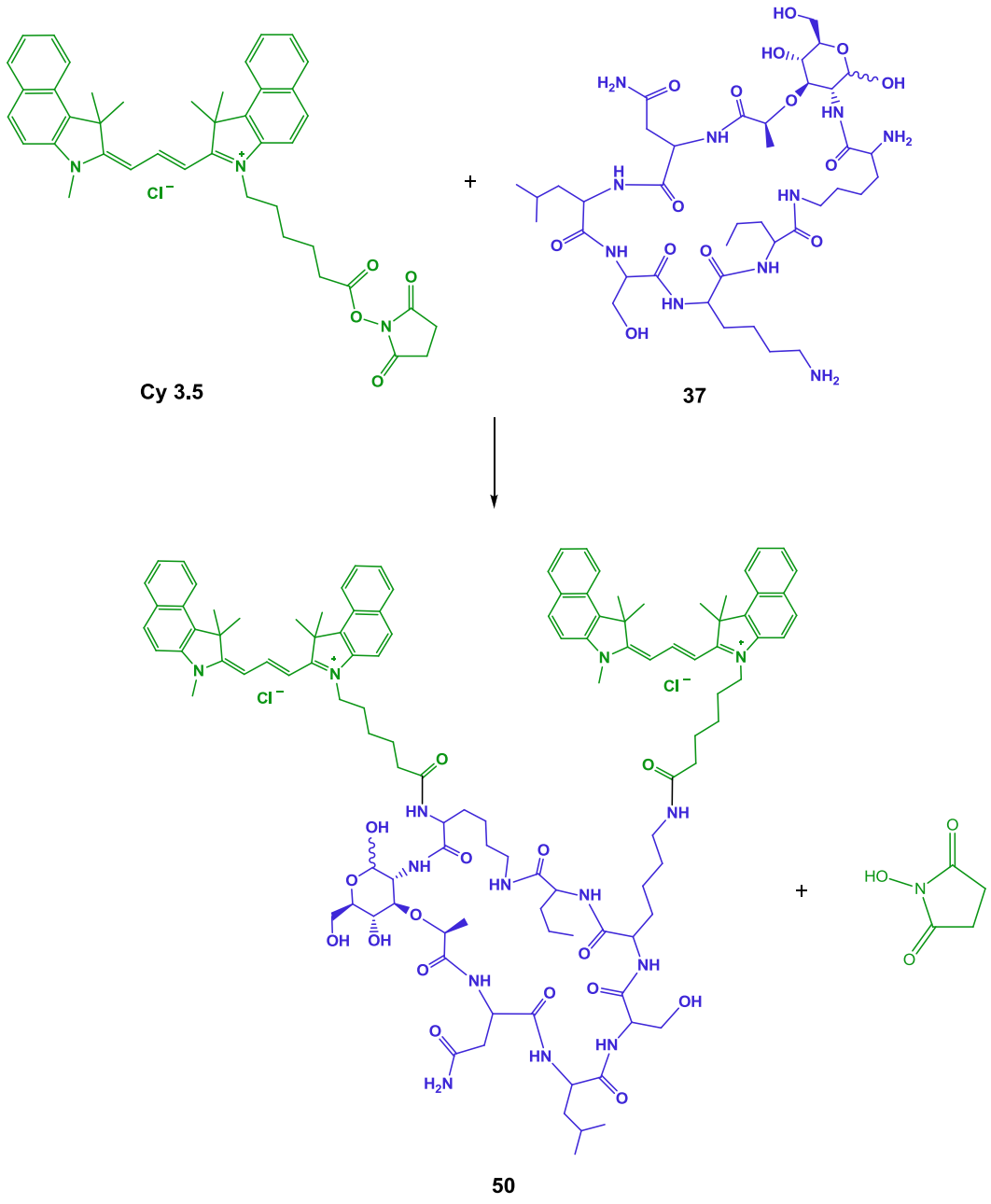
4.6. ISPITIVANJA INTERAKCIJA CIKLIČKIH GLIKOPEPTIDA S DNA

4.6.1. Promjena temperature mekšanja DNA

Dvostruke uzvojnice dvolančanih polinukleotida termički su nestabilne. Grijanjem njihovih vodenih otopina dolazi do pucanja vodikovih veza između baza. Svaki od dvolančanih polinukleotida karakterizira temperatura „mekšanja" (T_m), to jest temperatura pri kojoj je približno pola dvolančane uzvojnice prešlo u dvije jednolančane. Općenito se može zaključiti da interkalativni način vezanja stabilizira dvostruku uzvojnicu te daje pozitivne T_m vrijednosti, dok spojevi koji se vežu u utore DNA mogu uzrokovati pozitivne, ali i negativne (destabilizacija dvostruke uzvojnice) T_m vrijednosti. Poznat je niz cikličkih proteina koji svoju biološku aktivnost baziraju na interakcijama s DNA.[144]

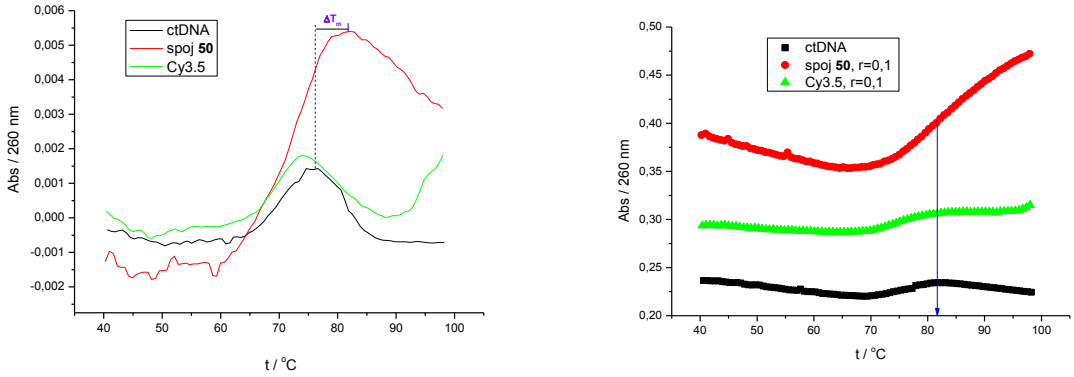
Kao model za dvolančanu DNA korištena je DNA timusa teleta (engl. *calf thymus* DNA), karakterizirana sekundarnom strukturom β-heliksa i omjerom AT : GC parova = 58 : 42. Kako bi se odredio utjecaj nezaštićenih cikličkih glikopeptida (**34**, **37**, **40**, **43**, **46**, **49**) na stabilnost dvolančane uzvojnice ctDNA, provedeni su eksperimenti određivanja temperature mekšanja ΔT_m/°C. Temperatura mekšanja polinukleotida rađena je kod koncentracijskog omjera spoja i polinukleotida r = 0,3. Kod nijednog ispitanog spoja nije došlo do promjene temperature mekšanja, odnosno stabilizacije polinukeotida.

Na odabrani spoj **37** kovalentno je vezana cijaninska boja Cy3.5 po proceduri[145] opisanoj u poglavlju 3.3.6. pri čemu je dobiven spoj **50** (Shema 21).



Shema 21. Shema sinteze spoja **50**

Ispitana je interakcija spoja **50** s ctDNA praćenjem temperature mekšanja pri koncentracijskom omjeru spoja i polinukleotida r = 0,1. Također, je ispitana interakcija same boje Cy3.5 s ctDNA pri istim uvjetima. Rezultati ukazuju da spoj **50** uzrokuje stabilizaciju dvostruke uzvojnice ctDNA pri čemu ΔT_m iznosi 7 °C (Slika 38), dok za samu boju nije dobivena promjena temperature mekšanja ctDNA te zaključujemo da je ne stabilizira.



a) b)

Slika 38. a) Temperaturne denaturacijske krivulje (derivacija)

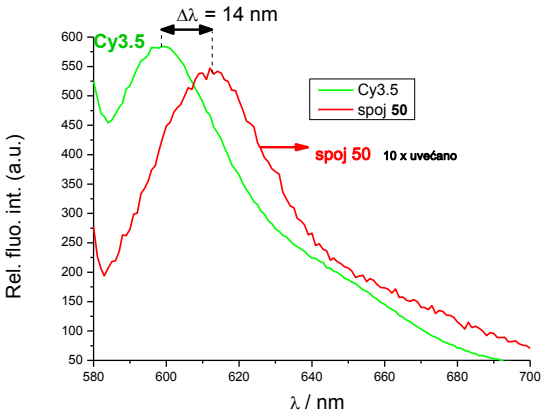
b) Krivulja mekšanja ctDNA i kompleksa sa spojem **50** i bojom Cy3.5 (Na-kakodilatni pufer, pH 7,01; I = 0,05 mol dm^{-3}; r = 0, 1)

4.6.2. Ispitivanje interakcije fluorimetrijskom spektroskopijom

Vezivanje organskih molekula na polinukleotide najčešće uzrokuje značajne promjene u njihovim spektroskopskim svojstvima. Fluorimetrijska spektroskopska ispitivanja moguće je provesti kod bitno manjih koncentracija pa su takvi uvjeti slični onima u biološkim sustavima.

Spektrofotometrijska karakterizacija pomoću UV/Vis i fluorescentne spektrofotometrije je potvrdila stabilnost spoja **50** u biološki relevantnom mediju, te linearni spektrofotometrijski odgovor u širokom rasponu koncentracija (10^{-8} – 10^{-5} mol dm^{-3}).

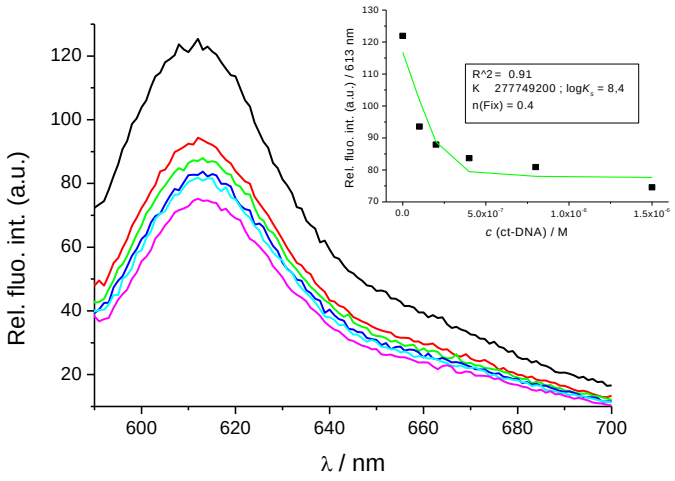
Usporedbom fluorimetrijskih spektara nevezane boje Cy3.5 i spoja **50** uočena je razlika u intenzitetu i značajnom batokromnom pomaku maksimuma emisije spoja **50** (Slika 39). S obzirom na alifatsku poveznicu između boje i peptida, kovalentno vezanje ne bi trebalo utjecati na svojstva boje, iz čega slijedi kako je boja u nekovalentnoj interakciji s cikličkim peptidom, najvjerojatnije zbog intarakcija unutar cikličke strukture.



Slika 39. Usporedba kupovne boje (zeleno) i spoja **50** (crveno, originalni spektar uvećan 10 puta). Oba uzorka c = 10^{-7} mol dm^{-3}; Na-kakodilatni pufer, pH 7,01, I = 0,05 mol dm^{-3}.

Iz dobivenih krivulja fluorimetrijskih titracija spoja **50** s ctDNA može se zaključiti da spoj pokazuje interakciju s ctDNA. Titracijom spoja **50** s ctDNA fluorescencija je značajno smanjena, no bez pomaka valne duljine maksimuma emisije (Slika 40).

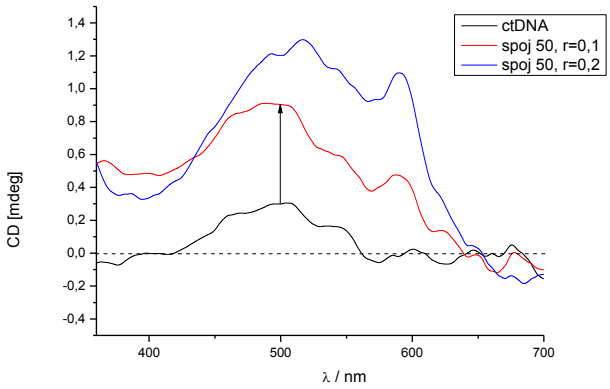
Obradom titracijskih podataka po Scatchard-ovoj jednadžbi[146,147] procijenjena je konstanta stabilnosti vezanja logKs = 8,4 za gustoću vezanja n[vezani spoj **50**]/[DNA] = 0,4. Dobiveni rezultat ukazuje kako je moguće kovalentnim vezanjem boje Cy3.5 prevesti DNA-neaktivni spoj **37** u spoj **50** izrazite DNA aktivnosti.



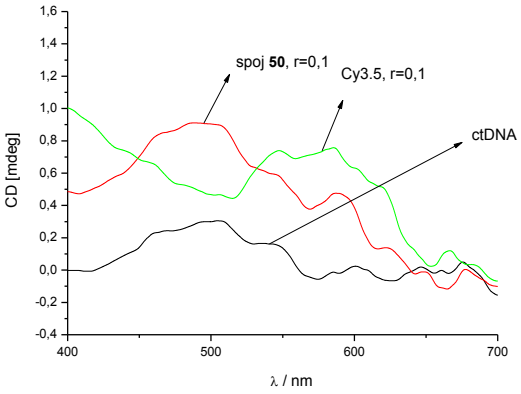
Slika 40. Titracija spoja **50** s ctDNA (Na-kakodilatni pufer, pH 7,01, I = 0,05 mol dm^{-3}; c(spoj 50) = 10^{-7} mol dm^{-3}; c(ctDNA) = 10^{-7}, $2 \cdot 10^{-7}$, $4 \cdot 10^{-7}$, $8 \cdot 10^{-7}$, $1{,}5 \cdot 10^{-6}$ mol dm^{-3})

4.6.3. Ispitivanje interakcije CD spektroskopijom

Praćena je promjena u CD spektru ctDNA dodatkom spoja **50** pri različitim koncentracijskim omjerima ($r_{[\mathbf{50}]/[DNA]}$ = 0,1; 0,2). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da spoj **50** pokazuje promjenu CD spektra ctDNA što ukazuje na njihovu interakciju (Slika 41). Usporedbom spektara spoja **50** i boje Cy3.5 vidljiva je razlika u načinu vezanja na ctDNA (Slika 42).



Slika 41. CD spektar ctDNA sa spojem **50** kod različitih koncentracijskih omjera $r_{[\mathbf{50}]/[DNA]}$ (Na-kakodilatni pufer, pH 7,01, I = 0,05 mol dm^{-3})



Slika 42. Usporedba CD spektara spoja **50** i boje Cy3.5 u odnosu na ctDNA (Na-kakodilatni pufer, pH 7,01, I = 0,05 mol dm^{-3}, $r_{[\mathbf{50}]/[DNA]}$ =0,1)

§ 5. ZAKLJUČAK

Opisana je kemijska sinteza Fmoc zaštićene muraminske kiseline iz komercijalno dostupnog *N*-acetilglukozamina. Prvo je provedena selektivna zaštita OH skupine na C-1 položaju benzilom, a OH skupine na poziciji C-4 i C-6 benzilidenskom zaštitom. Ključni korak u sintezi muraminske kiseline je uvođenje propionskog dijela na položaj C-3 sa (*S*)-2-klorpropionskom kiselinom uz inverziju konfiguracije pri čemu nastaje derivat muraminske kiseline **4** {benzil-2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-*O*-[(*R*)-1-(karboksietil)]-α-D-glukopiranozid}. Sljedeći stupanj je deacetilacija amino skupine, te uvođenje Fmoc zaštite što rezultira Fmoc zaštićenom muraminskom kiselinom **6** {2-amino-4,6-*O*-benziliden-3-*O*-[(*R*)-1-karboksietil]-2-deoksi-*N*-9-fluorenilmetoksikarbonil-α-D-glukopiranozid}.Ovako ortogonalno zaštićena muraminska kiselina predstavlja važnu građevnu jedinicu kao dipeptidni izoster u sintezi peptida na čvrstom nosaču Fmoc-strategijom.

Zaštićeni linerani glikopeptidi sintetizirani su na instrumentu za automatsku sintezu peptida na čvrstom nosaču koristeći kondenzacijske reagense HBTU/HOBt za vezanje standardnih aminokiselina, a HATU/HOBt za učinkovitije vezanje muraminske kiseline **6**. Prva aminokiselina vezana na čvrsti nosač, asparaginska kiselina, vezana je preko svog bočnog lanaca. Za vezanje drugih aminokiselina ponavljan je postupak deprotekcije Fmoc zaštite te kondenzacije do željene dužine peptidnog lanca. Po završetku reakcije uklonjena je alilna zaštitna skupina s C-kraja, te Fmoc zaštitna skupina s *N*-kraja. Skidanjem peptida s čvrstog nosača dobiveni su glikopeptidi s benzilnom zaštitom na *O*-1 položaju Mur, a nakon katalitičke hidrogenolize dobiveno je 6 linearnih nezaštićenih heptapeptida: H-Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-N^{ε}-Lys-Asn-OH (**16**), H-Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ε}-Lys-Mur-Asn-OH (**19**), H-N^{ε}-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-Asn-OH (**22**), H-N^{ε}-Lys-Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn-OH (**25**), H-Mur-N^{ε}-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn-OH (**28**), H-Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ε}-Lys-Asn-OH (**31**). Bolja iskorištenja reakcija postignuta su pri sintezi linearnih peptida **28** i **31** (~ 79 %) u kojima je muraminska kiselina vezana zadnja na čvrstom nosaču, a lošija kod peptida **19** i **22** (~ 67 %) gdje je vezana kao druga aminokiselina. Iz toga možemo zaključiti da je vezanje muraminske kiseline u okosnicu peptida relativno dobro, ali je daljnja nadogradnja peptidnog lanca slabija jer je amino skupina sterički ometana.

Ciklički peptidi pripravljeni su tzv. glava-rep ciklizacijom zaštićenih linearnih peptida ručnom sintezom na čvrstom nosaču u reakcijskoj posudi. Ciklizacija je omogućena preko C-kraja asparaginske kiseline nakon selektivnog uklanjanja alilne zaštite, te Fmoc zaštite s amino skupine Mur, Lys (bočnog lanca) ili Leu. Kao kondenzacijski reagensi korišteni su PyBOP ili HATU uz HOBt. Pokazalo se da se bolja iskorištenja (5 – 8 %) postižu uz HATU u odnosu na PyBOP, koji se uvriježeno smatra kondenzacijskim reagensom za ciklizacije. Uzevši u obzir vrijeme kondenzacije za HATU 2 – 4 h, a za PyBOP najmanje 12 h možemo HATU smatrati prikladnijim reagensom za ove ciklizacije. Deprotekcija i skidanje sa smole priređenih spojeva provedena je na isti način kao i kod linearnih peptida, te je dobiveno 6 cikličkih nezaštićenih heptapeptida: ciklo[Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-N^{ϵ}-Lys-Asn] (**34**), ciklo[Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ϵ}-Lys-Mur-Asn] (**37**), ciklo[N^{ϵ}-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Mur-Asn] (**40**), ciklo[N^{ϵ}-Lys-Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn] (**43**), ciklo[Mur-N^{ϵ}-Lys-Leu-Ser-Lys-Leu-Asn] (**46**), ciklo[Mur-Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ϵ}-Lys-Asn] (**49**). Lošije iskorištenje reakcije ciklizacije postignuto je za glikopeptide **46** i **49** (~ 37 %) gdje je u ciklizaciju upravo uključena muraminska kiselina, dok je najbolje iskorištenje kod spojeva **40** i **43** (~ 49 %) gdje se ciklizacija odvija preko bočnog lanca lizina vjerojatno radi njegove fleksibilnosti. Možemo zaključiti da rigidna struktura muraminske kiseline otežava interakciju amino skupine s asparaginskom kiselinom i stvaranje peptidne veze.

Novosintetizirani derivati testirani su na dvije tumorske stanične linije *in vitro,* te pet sojeva mikroorganizama. Nezaštićeni linearni i ciklički heptapetidi nisu pokazali antitumorsku aktivnost. Linearni glikopeptid **19** pokazao se aktivnim na *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitivna bakterija) pri koncentraciji 533,33±231 μg/mL. Ciklički glikopeptid s benzilnom zaštitom na muraminskoj kiselini ciklo[Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ϵ}-Lys-Mur(Bn)-Asn] (**36**) pokazao je antimikrobnu aktivnost na *Escherichia coli* (Gram-negativna bakterija) pri koncentraciji od 100 μg/mL. Dobiveni rezultati antimikrobne aktivnosti imaju veliku važnost budući da se radi o dva spoja koji se strukturno razlikuju i pokazali su aktivnost jedan na Gram-pozitivne, a drugi na Gram-negativne bakterije. Slobodne hidroksilne skupine šećernog dijela molekule kao i amino skupine peptida predstavljaju pogodna mjesta za daljnje preinake glikopeptidne okosnice, koje će odvesti do poboljšanja antimikrobnih svojstava.

Ispitana je interakcija priređenih spojeva s DNA metodama temperaturnog mekšanja, fluorescencijskom titracijom, te snimanjem CD spektara. Nije dobivena interakcija između peptidnih derivata i DNA. Uvođenjem boje Cy3.5 na slobodne amino skupine cikličkog

peptida ciklo[Leu-Ser-Lys-Leu-N^{ε}-Lys-Mur-Asn] (**37**) dobiven je spoj ciklo[Leu-Ser-Lys(Cy3.5)-Leu-Cy3.5-N^{ε}-Lys-Mur-Asn] (**50**) koji pokazuje značajnu interakciju s DNA. Ovi rezultati određuju smjernice za istraživanje i sintezu slične klase spojeva koji bi radi prikazane interakcije s DNA mogli imati i antitumorsku aktivnost.

Dobiveni rezultati su orginalni znanstveni doprinos u području istraživanja dizajna i sinteze novih glikopeptida s ugrađenom šećernom aminokiselinom u peptidnu okosnicu, kao učinkovitih lijekova s antimikrobnim djelovanjem. Dobiveni spojevi predstavljaju važnu osnovu za daljnji dizajn učinkovitih antimikrobnih i antitumorskih lijekova.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

AA	aminokiselina
Ala	alanin
Ac	acetil
AcOH	octena kiselina
All	alil
Alloc	aliloksikarbonil
AMP	antimikrobni peptidi (engl. *antimicrobal peptide*)
APT	engl. *attached proton test*
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	asparaginska kiselina
Bn	benzil
BnOH	benzilni alkohol
Boc	*tert*-butiloksikarbonil
BOP	benzotriaz-1-oksi-tris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat
CAP	kationski antimikrobni peptid (engl. *cationic antimicrobal peptide*)
COSY	engl. *correlation spetroscopy*
Cy3.5	2-((1E,3E)-3-(3-butil-1,1-dimetil-1*H*-benzo[e]indol-2(3*H*)-iliden)prop-1-enil)-3-(6-(2,5-dioksopirolidin-1-iloksi)-6-oksoheksil)-1,1-dimetil-1*H*-benzo[e]indolijev klorid
Cys	cistein
ctDNA	DNA izolirana iz timusa teleta (engl. *calf thymus* DNA)
d	dublet
DCC	*N*,*N*-dicikloheksilkarbodiimid
DCM	diklormetan
DIC	diizopropilkarbodiimid
DIEA	*N*,*N*-diizopropiletilamin
DIPCDI	*N*,*N*-diizopropilkarbodiimid
DMF	*N*,*N*-dimetilformamid

DMSO-d_6	deuterirani dimetilsulfoksid
ekv.	ekvivalent
Et	etil
ESI	elektrosprej ionizacija (engl. *electron spray ionisation*)
Et_3N	trietilamin
EtOAc	etil-acetat
EtOH	etanol
Fmoc	9-fluorenilmetoksikarbonil
Fmoc-OSu	9-fluorenilmetil-*N*-sukcinimidil-karbonat
Gln	glutamin
Glu	glutaminska kiselina
HATU	(*O*-(7-azabenzotriazol-1-il))-1,1,3,3-tetrametilamonijev heksafluorofosfat
HBTU	(*O*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonijev heksafluorofosfat
His	histidin
HMBC	engl. *heteronuclear multiple bond correlation*
HMQC	engl. *heteronuclear multiple-quantum correlation*
HOBt	1-hidroksibenzotriazol
LAP	engl. *latency-associated protein*
LSKL	leucil-seril-lizil-leucin
Lys	lizin
m	multiplet
MBHA	4-metilbenzilhidrilamin
$Me_2NH \cdot BH_3$	adukt dimetilamin borana
MeOH	metanol
Met	metionin
MS	spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
Mur	muraminska kiselina
NANA	*N*-acetilneuraminska kiselina
NMM	*N*-metilmorfolin
NMP	*N*-metilpirolidin
NMR	nuklearna magnetska rezonancija (engl. *nuclear magnetic resonance*)

OAll	alilni ester
OBn	benzilni ester
PAM	4-hidroksimetil-fenilacetamidometil
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonil
Pg	zaštitna skupina (engl. *protecting group*)
PyBOP	benzotriaz-1-il-oksitripirolidinfosfonijev heksafluorofosfat
PTSA	*p*-toluensulfonska kiselina
Rink amid	4-(2,4-dimetoksifenilaminometil)fenoksi
RP HPLC	tekućinska kromatografija visokog učinka obrnutih faza (engl. *reversed-phase high performance chromatography*)
s	singlet
SAA	šećerna aminokiselina (engl. *sugar amino acid*)
Ser	serin
SPPS	sinteza peptida na čvrstom nosaču (engl. *solid phase peptide synthesis*)
t	triplet
TBTU	2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonijev tetrafluorborat
t-Bu	*tert*-butil
TFA	trifloroctena kiselina
TGF	transformacijski čimbenik rasta (engl. *transforming growth factor*)
Thr	treonin
TIS	triizopropilsilan
TLC	tankoslojna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
Trp	triptofan
Trt	tritil
t.t.	točka tališta
Tyr	tirozin
Val	valin

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. S. H. Joo, *Biomol. Ther.* **20** (2012) 19-26.
2. P. Vlieghe, V. Lisowski, J. Martinez i M. Khrestchatisky, *Drug Discovery Today* **15** (2010) 40-56.
3. D. J. Craik, D. P. Fairlie, S. Liras i D. Price, *Chem. Biol. Drug Des.*, **81** (2013) 136–147.
4. I. Jerić, *Kem. Ind.* **53** (2004) 495-504.
5. D. Goodwin, P. Simerska i I. Toth, *Curr. Med. Chem.*, **19** (2012) 4451-4461.
6. D. A. Horton, G. T. Bourne i M. L. Smythe, *Molec. Divers*. **5** (2000) 289-304.
7. P. Gomes, N. Vale i R. Moreira, *Molecules* **12** (2007) 2484-2506.
8. J. S. Davies, *J. Pept. Sci.* **9** (2003) 471-501.
9. M. Goodman, C.Zapf i Y. Rew, *Biopolimers* **60** (2001) 229-245
10. S. Kalenić, B. Bedenić, u S. Kalenić (ur), *Antibakterijski lijekovi***,** Medicinska mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb, 2013. str. 97-116.
11. A. A. Bahar i D. Ren, *Pharmaceuticals* **6** (2013) 1543-1575.
12. M.-D. Seo, H.-S. Won, J.-H. Kim, T. Mishig-Ochir i B.-J. Lee, *Molecules* **17** (2012) 12276-12286.
13. R. M. Epand i H. J. Vogel, *Biochim. Biophys. Acta* **1462** (1999) 11-28.
14. H. Sato i J. B. Feix, *Biochim. Biophys. Acta* **1758** (2006) 1245–1256.
15. R. M. J. Liskamp, D. T. S. Rijkers, S. E. Bakker, u F. Diederich, P. J. Stang, R. R. Tykwinski (ur.), *Modern Supramolecular Chemistry: Strategies for Macrocycle Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, Chichester, 2008. str. 1-27.
16. A. T. Bockus, C. M. McEwen i R. S. Lokey, *Curr. Top. Med. Chem.* **13** (2013) 821-836.
17. S. Pal, K. Mitra, S. Azmi, J. K. Ghosh i T. K. Chakraborty, *Org. Biomol. Chem.* **9** (2011) 4806–4810.
18. L. Feliu, G. Oliveras, A. D. Cirac, E. Besalú, C. Rosés, R. Colomer, E. Bardají, M. Planas i T. Puig, *Peptides* **31** (2010) 2017–2026.
19. D. W. Hoskin i A. Ramamoorthy, *Biochim. Biophys. Acta* **1778** (2008) 357–375.

20. F. Schweizer, *Eur. J. Pharmacol.* **625** (2009) 190–194.
21. S. C. Brauns, P. Milne, R. Naudé i M. van de Venter, *Anticancer Res.* **24** (2004) 1713-1720.
22. F. Schweizer, *An. Acad. Bras. Cienc.* **81** (2009) 503-520.
23. R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **96** (1996) 683-720.
24. A. M. Wu, E. Lisowska, M. Duk i Z. Yang, *Glycoconj. J.* **26** (2009) 899-913.
25. L. Dehuyser, E. Schaeffer, O. Chaloin, C. G. Muellre, R. Baati i A. Wagner, *Bioconjugate Chem.* **23** (2012) 1731-1739.
26. M. Ambrosi, N. R. Cameron i B. G. Davis, *Org. Biomol. Chem*. **3** (2005) 1593-1608.
27. R. Ribić i S. Tomić, *Kem. Ind*. **62** (2013) 19-31.
28. Z. Peri, „Doctoral Thesis“, KTH Chemical Science and Engineering, Stockholm, 2006, str. 3-5.
29. A. P. Davis, *Org. Biomol. Chem*. **7** (2009) 3629-3638.
30. G. W. Hart i R. J. Copeland, *Cell*, **143** (2010) 672-676.
31. M. Eriksson, S. Serna, M. Maglinao, M. K. Schlegel, P. H. Seeberger, N. C. Reichardt i B. Lepenies, *ChemBioChem* **15** (2014) 844 – 851
32. S. Hakamori, *Pure & Appl. Chem*. **63** (1991) 473-482.
33. M. C. Rodriguez i P. Cudic, *Chim.Oggi.* **29** (2011) 36-39.
34. A. Jakas, P. Cudic, N. Bionda, J. Sućˊ, K. Vlahoviček-Kahlina, M. Cudic, u G. Kokotos, V. Constantinou-Kokotou, J. Matsoukas (ur.), *Peptides 2012., Proc.32nd Eur.Peptide Symp.*, Athens, Greece, 2012, str. 314-315.
35. M. Raushenberg, E. C. Fritz, C. Schulz, T. Kaufmann i B. J. Ravoo, *Beilstein J. Org. Chem*. **10** (2014) 1354-1364.
36. M. Raushenberg, S. Bomkle, U. Karst i B. J. Ravoo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **49** (2010) 7340-7345.
37. J. F. Biling i U. J. Nilsson, *Tetrahedron* **61** (2005) 863-874.
38. I. Piantanida, *Kem. Ind*. **52** (2003) 545–552.
39. H. W. Zimmermann, *Angew. Chem.* **25** (1986) 115-196.
40. L. S. Lerman, *J. Mol . Biol.* **3** (1961) 18-30.
41. X. Qu, J. O. Trent, I. Fokt, W. Priebe i J. B. Chaires, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97** (2002) 12032-12037.

42. A. G. Krishna, D. Balasubramanian i K. N. Ganesh, *Biochem. Biopgys. Res. Commun*. **15** (1994) 204-210.
43. F. Azorin, J. Vives, J. L. Campos, A. Jordan, J. Loversa, L. Puigjaner i J. A. Subirana, *J. Mol. Biol.* **185** (1985) 371-387.
44. J. Massagué, *Annu. Rev. Biochem.* **67** (1998) 753–791.
45. R. J. Akhurst i A. Hata, *Nat. Rev. Drug Discovery* **11** (2012) 790-811.
46. A. Rojas, S. Meherem, Y.-H. Kim, M. K. Washington, J. E. Willis, S. D. Markowitz, W. M. Grady, *Int. J. Cancer* **123** (2008) 14–21.
47. C. F. Chang, R. Westbrook, J. Ma i D. Cao, *Front. Biosci.* **12** (2007) 4393-4401.
48. N. Khalil, *Microbes and infections* **1** (1999) 1255-1263.
49. S. M. F. Riberio, M. Poczatek, S. Schultz-Cherry, M. Villain i J. E. Murphy-Ullrich, *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 13586-13593.
50. H. Kondou, S. Mushiake, Y. Etani, Y. Myoshi, T. Michigami, K. Ozono, *J. Hepatol* **39** (2003) 742-743.
51. X. Xie, F. Li, H. Liu, Y. Deng, Z. Li i J. Fan, *Arc. Pharm. Res.* **33** (2010) 275-284.
52. H. Kessler, S. A. W. Gruner, V. Truffault, G. Voll, E. Locordi i M. Stockle, *Amino Acids. Chem. Eur. J*. **8** (2002) 4366-4376.
53. S. A. W. Gruner, E. Locardi, E. Lohof i H. Kessler, *Chem. Rev.* **102** (2002) 491-514.
54. F. Schweizer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **41** (2002) 230–253.
55. T. K. Chakraborty, S. Ghosh i S. Jayaprakash, *Curr. Med. Chem.* **9** (2002) 421–435.
56. T. K. Chakraborty, S. Jayaprakash i S. Ghosh, *Comb. Chem. High T. Scr.* **5** (2002) 373–387.
57. J. Gervay-Hague i T. M. Jr. Weathers, *J. Carbohydr. Chem.* **21** (2002) 867–910.
58. T. K. Chakraborty, P. Srinivasu, S. Tapadari i B. K. Mohan, *J. Chem. Sci.* **116** (2004) 187–207.
59. K. J. Jensen i J. Brask, *Biopolymers* **80** (2005) 747–761.
60. M. D. P. Risseeuw, M. Overhand, G. W. J. Fleet i M. I. Simone, *Tetrahedron-Asymmetr.* **18** (2007) 2001-2010.
61. E. Graf von Roedern, E. Lohof, G. Hessler, M. Hoffmann i H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **118** *(*1996) 10156-10167.

62. R. M. van Well, L. Marinelli, C. Altona, K. Erkelens, G. Siegal, M. van Raaij, A. L. Llamas-Saiz, H. Kessler, E. Novellino, A. Lavecchia, J. H. van Boom i M. Overhand, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003), 10822-10829.
63. S. Chandrasekhar, C. L. Rao, M. Seenaiah, P. Naresh, B. Jagadeesh, D. Manjeera, A. Sarkar i M. P. Bahadra, *J. Org. Chem*. **74** (2009) 401-404.
64. B. Aguilera, G. Siegal, H. S. Overkleeft, N. J. Meeuwenoord, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, H. E. Schoemaker, G. A. van der Marel, J. H. van Boom i M. Overhand, *Eur. J. Org. Chem*. (2001) 1541-1547.
65. G. M. Grotenbreg, M. Kronemeijer, M. S. M. Timmer, F. El Oualid, R. M. van Well, M. Verdoes, E. Spalburg, P. A. V. van Hooft, A. J. de Neeling, D. Noort, J. H. van Boom, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft i M. Overhand, *J. Org. Chem.* **69** (2004) 7851-7859.
66. G. M. Grotenbreg, A. E. M. Buizert, A. L. Llamas-Saiz, E. Spalburg, P. A. V. van Hooft, A. J. de Neeling, D. Noort, M. J. van Raaij, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft i M. Overhand, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 7559-7565.
67. S. A. W. Gruner, G. Keri, R. Schwab, A. Venetianer i H. Kessler**,** *Org. Lett*. **3** (2001) 3723-3725.
68. T. K. Chakraborty, D. Koley, R. Ravi, V. Krishnakumari, R. Nagaraj i A. C. Kunwar, *J. Org. Chem*. **73** (2008) 8731-8744.
69. L. Szilagy i P. Pristovšek, *Med. Chem.* **7** (2007) 861-870.
70. B. A Dmitriev, F. V Toukach, O. Holst, E. T. Rietschel i S. Ehlers, *J. Bacteriol*. **186** (2004) 7141-7148.
71. W. Vollmer i J. V. Holtje, *J. Bacteriol*. **186** (2004) 5978-5987.
72. L. Chedid, M. Parant, F. Parant, P. Lefrancier, J. Choay i E. Lederer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** (1977) 2089-2093.
73. M. Parant, F. Parant i L. Chedid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** (1978) 3395-3399.
74. N. P. Cummings, M. J. Pabst i R. B. J. Johnston, *J. Exp. Med.* **152** (1980) 1659-1669.
75. J. C. Cox i A. R. Coulter, *Vaccine* **15** (1997) 248-256.
76. K. Dzierzbicka i A. M. Kolodziejczyk, *Pol. J. Chem*. **77** (2003) 373-395.
77. H. Takada, M. Tsujimoto, K. Kato, S. Kotani, S. Kusumoto i M. Inage, *Infect. Immun.* **25** (1979) 48-53.
78. M. J. Pabst i R. B. J. Johnston, *J. Exp. Med.* **151** (1980) 101-114.

79. M. R. J. Salton, *Microbial Cell Walls*, Wiley, New York, 1960, str. 39-42.
80. F. Ellouz, A. Adam, R. Ciobvaru i E. Lederer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59** (1974) 1317-1325.
81. L. Habjanec, B. Halassy i J. Tomašić, *Int. Immunopharmacol.* **10** (2010) 751-759.
82. F. Coulombe, S. Fiola, S. Akira, Y. Cormier i J. Gosselin, *PLoS 1* **4** (2012) e36734.
83. S. Traub, S. von Aulock, T. Hartung i C. Hermann, *Jour. Of. Endotox. Res*. **12** (2006) 69-85.
84. M. Cudic i G. B. Fields, *Molecular Biomethods Handbook*, Vol. 20, Humana Press, New York, 2008, str. 513-544.
85. V. Made, S. Els-Heindl i A. G. Beck-Sickinger, *Beilstein J. Org. Chem*. **10** (2014) 1197-1212.
86. G. Barany, N. Kneib-Cordonier i D. G. Mullen, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **30** (1987) 705-739.
87. S. Sakakibara, *Pept. Sci*. **51** (1999) 279-296.
88. L. Anderson, L. Blomberg, M. Flegel, L. Lepsa, B. Nilsson i M. Verlander, *Pept. Sci*. **55** (2000) 227-250.
89. F. Albericio, *Curr. Opinion. Chem Biol*. **8** (2004) 211-221.
90. R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc*. **85** (1963) 2149-2154.
91. R. B. Merrlfield, *Science* **150** (1965) 178-185.
92. B. Merrifield, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **24** (1985) 799-810.
93. C. A. G. N. Montalbetti i V. Falque, *Tetrahedron* **61** (2005) 10827-10852.
94. V. K. Sarin, S. B. H. Kent i R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 5463–5470.
95. J. Alsina i F. Albericio, *Biopolymers (Pept. Sci)* **71** (2003) 454–477.
96. G. B. Fields i R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res*. **35** (1990) 161-214.
97. L. A. Carpino i G. Y. Han, *J. Org. Chem*. **37** (1972) 3404–3409.
98. L. A. Carpino, *Acc. Chem. Res.* **20** (1987) 401–407.
99. L. A. Carpino i G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc*. **92** (1970) 5748-5749.
100. A. Isidro-Liobet, M. Álvarez i F. Albericio, *Chem. Rev.* **109** (2009) 2455-2504.
101. C. Carreno, M. E. Mendez, Y. D. Kim, S. A. Kates, D. Andreu i F. Albericio, *J. Pept. Pes*. **56** (2000) 63-69.
102. F. Albericio, *Biopolimers* **55** (2000) 123-139.

103. A. El-Faham i F. Albericio, *Chem. Rev.* **111** (2011) 6557-6602.
104. S.-Y. Han i Y.-A. Kim, *Tetrahedron* **60** (2004) 2447-2467.
105. B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin i C. Selve, *Tetrahedron Lett.* **16** (1975) 1219-1222.
106. S. Mojsov, A. R. Mitchell i R. B. Merrifield, *J. Org. Chem*. **45** (1980) 555-560.
107. R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth i D. Gillessen, *Tetrahedron Lett*. **30** (1989) 1927-1929.
108. J. Coste, D. Le-Nguyen i B. Castro, *Tetrahedron Lett*. **31** (1990) 205-207.
109. L. A. Carpino i A. El-Faham, *J. Org. Chem*. **59** (1994) 695-697.
110. V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou i C. Zioudrou, *Synthesis* 572-574.
111. C. G. Fields, D. H. Lloyd, R. L. Macdonald, K. M. Otteson i R. L. Noble, *Pept. Res*. **4** (1991) 91-101.
112. L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor i F. Albericio, *J. Chem. Soc. Chem. Commun* (1994) 201-203.
113. O. Marder i F. Albericio, *Chim. Oggi* **21** (2003) 35-40.
114. J. Hachmann i M. Lebel, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **84** (2006) 340-347.
115. I. Abdelmoty, F. Albericio, L. A. Carpino, B. M. Foxman i S. A. Kates, *Lett. Pept. Sci*. **1** (1994) 95-101.
116. F. Albericio, *Curr. Opinion. Chem. Biol*. **8** (2004) 211-221.
117. B. F. Gisin i R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc*. **94** (1972) 3102-3106.
118. E. Pedroso, A. Grandas, X. de las Heras, R. Eritja i E. Giralt, *Tetrahedron Lett*. **27** (1986) 743-746.
119. M. Ueki i M. Amemiya, *Tetrahedron Lett.* **28** (1987) 6617-6620
120. Y. Yang, W.V. Sweeneg, K. Schneider, S. Thornqvist, B. T. Chait i J. P. Tam, *Tetrahedron Lett*. **52** (1994) 9689-9695.
121. J. L. Lauer, C. G. Fields, G. B. Fields, *Lett. Pept. Sci*. **1** (1995) 197-205.
122. M. Quibell, D. Owen, L.C. Packman i T. Johnson, *J. Chem. Soc. Comm*. (1994) 2343-2346.
123. J. P. Tam, M. W. Riemen i R. B. Merrifield, *Pept. Res.* **1** (1988) 6-18.
124. M. Bodanszky i J. Z. Kwei, *Int. J. Pept Protein Res.* **12** (1978) 69-74.
125. R. Enugala, M. Manuel i B. Marques, *ARKIVOC* (2012) 90-100.
126. M. L. Shulman i A. Ya Khorlin, *Carbohydr. Res.* **27** (1973) 141-147.
127. P. H. Gross i R.W. Jeanloz, *J. Org. Chem*. **32** (1967) 2759-2763.

128. P. H. Gross i M. Rimpler, *Liebigs Ann. Chem.* (1986) 37-45.
129. Y**.** Matsushima i J. T. Park, *J. Org. Chem*, **27** (1962) 3581-3583.
130. B. Koppenhoefer, V. Schurig, u G. N. Reddy i J. D. White (ur.), *Organic Synthesis*, Organic Syntheses, Inc., Coll. Vol. 8, 1993, str.119.
131. R. Lambert i F. Zilliken, *Chem. Ber.* **93** (1960) 2915-2923.
132. R. Gigg i P. M. Carroll, *Nature*, (London) **191** (1961) 495-496.
133. H. M. Flowers i R. W. Jeanloz, *J. Org. Chem.* **28** (1963) 1564-1467.
134. T. Osawa i R. W. Jeanloz, *J. Org. Chem.* **30** (1965) 448-450.
135. A. Babič i S. Pečar, *Tetrahedron-Asymmetr*. **19** (2008) 2265-2271.
136. D. Craig, J. P. Tierney i C. Williamson, *Tetrahedron Lett.* **38** (1997) 4153-4156.
137. V. Ragoussis, L. Leondiadis, E. Livaniou i J. P. Evangelatos, *Carbohydr. Res.* **297** (1997) 289-295.
138. P. Sinaÿ, M. D. A. Halford, M. S. Choudhary, P. H. Gross i R. W. Jeanloz, *J. Biol. Chem.* **247** (1972) 391-397.
139. E. D. Hugges, C. K. Ingold, R. J. L. Martin i D. F. Meigh, *Nature*, **166** (1950) 679 – 680.
140. P. Gomez-Martinez, M. Dessolin, F. Guibe i F. Albericio, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1** (1999) 2871-2874.
141. D. A. T. Pires, M. P. Bemquerer i C. J. do Nascimento, *Int. J. Pept. Res. Ther*. (2013) DOI 10.1007/s10989-013-9366-8
142. E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev*. **38** (2009) 606-631.
143. C.A.G.N. Montalbetti i V. Falque, *Tetrahedron* **61** (2005) 10827-10852.
144. J. Matić, L.-M. Tumir, M. Radić Stojković i M. Piantanida, *Current protein & peptide science* (2015).
145. http://www.lumiprobe.com/p/cy35-nhs-ester (preuzeto 14. svibnja 2015. god.)
146. J. D. McGhee i P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol*. **103** (1976) 679-684.
147. G. Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci*. **51** (1949) 660-672.

§ 8. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Kristina Vlahoviček-Kahlina
Datum i mjesto rođenja: 28.09.1986, Zagreb, Hrvatska
e-mail: Kristina.Vlahovicek-Kahlina@irb.hr

RADNO MJESTO:

2011. – danas: znanstveni novak/asistent, Institut Ruđer Bošković, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Laboratorij za kemiju ugljikohidrata, peptida i glikopeptida, Zagreb, Hrvatska.

OBRAZOVANJE:

2008. – 2011.: magistra kemije; Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultat, Kemijski odsjek, Zavod za organsku kemiju i analitičku kemiju.

Diplomski rad: „Optimiranje metode ICP-AES za određivanje vanadija u vodenim matricama“ pod vodstvom dr.sc. Sandre Rončević.

2005. – 2008.: prvostupnica kemije; Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultat, Kemijski odsjek.

2001. – 2005.: X. Gimnazija, Zagreb

1993. – 2001.: Osnovna škola Veliko Trgovišće

ČLANSTVA U DRUŠTVIMA:

- Hrvatsko kemijsko društvo 2012.-danas;
- European Peptide Society (EPS) 2012.-danas

ZNANSTVENA USAVRŠAVANJA:

2014. XV. International Chromatography School, Zagreb

IZVORNI ZNANSTVENI I PREGLEDNI RADOVI U CC ČASOPISIMA :

1. Kristina Vlahoviček-Kahlina, Andreja Jakas, Synthesis of orthogonally protected muramic acid building blocks for solid phase peptide synthesis, *Croat. Chem. Acta.* (2015) (prihvaćeno za tisak)

SUDJELOVANJE NA KONGRESIMA:

1. *2015.:* poster - XXIV. Skup hrvatskih kemičara i kemijskih inženjera, Zagreb, Hrvatska; (Kristina Vlahoviček-Kahlina, Andreja Jakas, „Sinteza cikličkih peptida s ugrađenom muraminskom kiselinom na čvrstom nosaču")
2. *2014.*: usmeno priopćenje – „Macrocycles" ; Skup u organizaciji The Royal Society of Chemistry and Croatian Chemical Society; Fidelta and Pliva, Zagreb, Hrvatska; (Kristina Vlahoviček-Kahlina, Andreja Jakas „Solid phase synthesis of cyclic peptides containing sugar amino acid")
3. *2014.:* usmeno priopćenje - X. Skup mladih kemijskih inženjera, Zagreb, Hrvatska; (Kristina Vlahoviček-Kahlina, Andreja Jakas „Sinteza biološki aktivnih cikličkih peptida")
4. *2013.:* poster - XXIII. Skup hrvatskih kemičara i kemijskih inženjera, Osijek, Hrvatska; (Kristina Vlahoviček-Kahlina, Andreja Jakas, Predrag Cudic, Nina Bionda, Mare Cudic, Milica Perc „Umjetni receptori za detekciju antroze")
5. *2012.:* poster - 32EPS Kongres, Atena, Grčka; (Andreja Jakas, Predrag Cudic, Nina Bionda, Josipa Suć, Kristina Vlahoviček-Kahlina, Mare Cudic „Peptide Based Artificial Receptors for Carbohydrate Anthros Detection").

SUDJELOVANJE U NASTAVI:

2012. – 2013.: asistentica u nastavi – „Praktikum iz organske kemije", Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

POPULARIZACIJA ZNANOSTI:

2013. Otvoreni dani Instituta Ruđer Bošković – voditelj punkta „Slatka kemija“

2013. Noć istraživača, Zagreb

PROJEKTI

2011. – 2013.: suradnica na projektu – „Kemijske modifikacije prirodnih spojeva” (MZOŠ-HR 098-0982933-2936), (Voditelj: Defterdarović-Varga, L.).

2011. – 2013: suradnica na projektu – „Artificial Receptors for *Bacillus Anthracis* Sepecific Anthrose Detection” (NATO SfP 983154), (Voditelji: Jakas, A., Cudic, P.).