

# Priprava ferocenskog muropeptida

---

**Martinić-Cezar, Tea**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:420125>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-10**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Tea Martinić-Cezar**

7403/PT

**PRIPRAVA FEROCENSKOG MUROPEPTIDA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Organska kemija

**Mentor:** Doc.dr.sc. Monika Kovačević

**Zagreb, 2019.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za kemiju i biokemiju**

**Laboratorij za organsku kemiju**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**

**Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

### PRIPRAVA FEROCENSKOG MUROPEPTIDA

*Tea Martinić-Cezar, 0058210546*

**Sažetak:** Muramildipeptid je produkt koji nastaje enzimskom razgradnjom peptidoglikana, sastavnog dijela stanične stijenke Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Kemijski gledano, oni su konjugati muraminske i prirodnih aminokiselina, koji imaju ulogu imunoadjuvanata. Posjeduju veliki potencijal te se koriste u terapijske svrhe kao imunostimulativni spojevi. U ovom radu opisani su sinteza i konformacijska svojstva ferocenskog muropeptida **5** koji nastaje kopulacijom C-terminusa muraminske kiseline **4** i N-terminusa ferocenske aminokiseline **3**. Na temelju rezultata NMR- i IR-spektroskopije predloženi su najstabilniji konformeri.

**Ključne riječi:** adjuvantska aktivnost, ferocen, muramiska kiselina, peptidoglikan, peptidomimetici

**Rad sadrži:** 28 stranica, 10 slika, 4 tablice, 3 sheme, 50 literaturnih navoda, 1 prilog

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Doc.dr.sc. Monika Kovačević

**Datum obrane:** 09. srpnja 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food technology**  
**Department of Chemistry and Biochemistry**  
**Laboratory of Organic Chemistry**  
**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Food Technology**

### SYNTHESIS OF FERROCENE MUROPEPTIDE

*Tea Martinić-Cezar, 0058210546*

**Abstract:** Muropeptides are degradation fragments of Gram(+) and Gram(-) peptidoglycan (PGN), produced by enzymatic degradation of bacterial cell wall. From chemical point of view, muropeptides are conjugates of muramic and natural amino acids with adjuvant properties. They have great potential acting as therapeutic agents with immunostimulating activity. This study has explored the synthesis and structural characteristics of ferrocene muropeptide **5** derived by coupling of C-terminus of muramic acid **4** and N-terminus of ferrocene amino acid **3**. Based on NMR- and IR-spectroscopy the preferable conformations were proposed.

**Keywords:** adjuvant activity, ferrocene, muramic acid, peptidoglycan, peptidomimetics

**Thesis contains:** 28 page, 10 figures, 4 table, 3 sheme, 50 references, 1 supplement

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Ph. D. Monika Kovačević, Assistant Professor

**Defence date:** July 9<sup>th</sup> 2019

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. STRUKTURA I SVOJSTVA MURAMILDIPEPTIDA</b> .....	<b>2</b>
2.1.1. Analizi i derivati MDP i njihova biološka aktivnost .....	4
2.1.2. Konjugati MDP i njihova biološka aktivnost .....	5
2.1.3. Klinička ispitivanja derivata i analoga MDP .....	7
<b>2.2 STRUKTURA I SVOJSTVA FEROCENA</b> .....	<b>9</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>12</b>
<b>3.2. METODE</b> .....	<b>12</b>
3.2.1. Sinteza Mur-Fn-COOMe .....	13
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>15</b>
<b>4.1. UVOD</b> .....	<b>15</b>
<b>4.2. PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA ANALIZA FEROCENSKOG MUROPEPTIDA Mur-Fn-COOMe 5</b> .....	<b>15</b>
4.2.1. Sinteza ferocenskog muropeptida .....	16
4.2.2. IR-spektroskopska analiza.....	17
4.2.3. NMR- spektroskopska analiza.....	18
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>21</b>
<b>6. POPIS LITERATURE</b> .....	<b>22</b>
<b>PRILOZI</b> .....	<b>1</b>
<b>POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA</b> .....	<b>1</b>

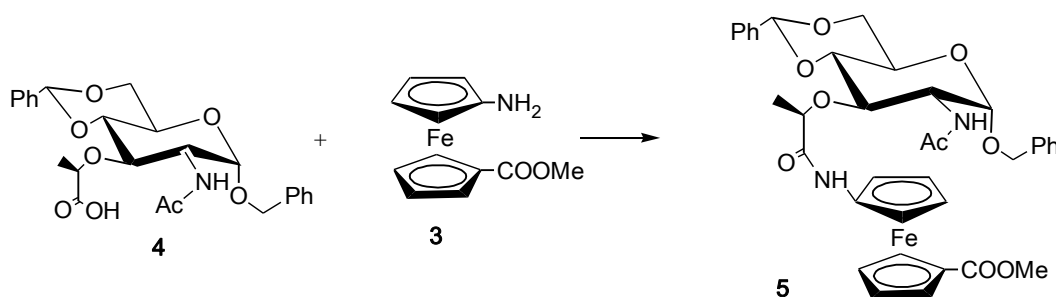
# 1. UVOD

Bioorganometalna kemija je znanstvena disciplina na granici biokemije i organometalne kemije koja proučava konjugate organometalnih spojeva i biomolekula, pri čemu su osobito važni spojevi metalocenâ s biomolekulama. Ti kompleksi su značajni kako s teorijskog stanovišta (mimetici proteina i ugljikohidrata) tako i zbog moguće primjene u biokemiji, biologiji, biomedicini, itd. [1].

Muramildipeptid [(MDP, MurNAc-L-Ala-D-Gln, MurNAc=*N*-acetil-muraminska kiselina)], je produkt koji nastaje enzimskom hidrolizom peptidoglikana, sastavnog dijela stanične stijenke Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, a predstavlja najmanju imunološki aktivnu komponentu u peptidoglikanu stanične stijenke.

Poznato je da postoji velik broj biološki aktivnih, ali nažalost klinički neupotrebljivih peptida, pa se takve molekule modificiraju na način da se unaprijedi njihova farmakološka primjena. Tako se i MDP podvrgava raznolikim strukturnim modifikacijama, bilo da se vrši zamjena šećernog ili dipeptidnog fragmenta.

U sklopu ovog završnog rada sintetizirat će se ferocenski muropeptid **5** služeći se postupcima opisanim u literaturi [2]. Kopulacijom *C*-terminusa muraminske i *N*-terminusa ferocenske aminokiseline pripremit će se bioorganometalni muropeptid **5** (slika 1), čija će se strukturna svojstva ispitati NMR- i IR- spektroskopijom, te će se predložiti njegove preferentne konformacije u otopini.



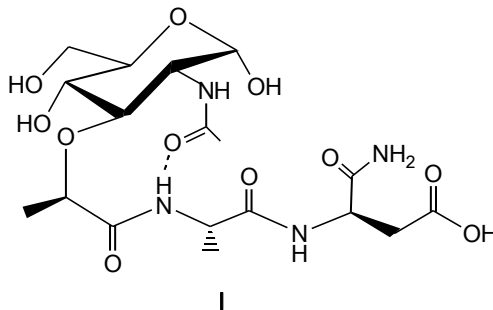
**Slika 1.** Sinteza ferocenskog muropeptida **5** konjugacijom *O*-zaštićene MurNAc (**4**) i Fca-OMe (**3**)

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. STRUKTURA I SVOJSTVA MURAMILDIPEPTIDA

Muramildipeptidi su sastavni djelovi peptidoglikana staničnih stijenki Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Peptidoglikani su prirodni polimeri sastavljeni od alternirajućih molekula *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i *N*-acetilmuraminske kiseline (MurNAc) međusobno povezanih b-1,4-glikozidnom vezom, pri čemu je MurNAc kopulirana s prirodnim aminokiselinama [3]. Enzimskom hidrolizom peptidoglikana nastaju muramilpeptidi koji sadrže najmanje po jednu MurNAc i prirodnu aminokiselinu [4-7].

Muramildipeptid (*N*-acetil-muramil-L-alanil-D-izoglutamin) (slika 2) je jedinica peptidoglikana koja ukazuje adjuvansku aktivnost (*adjuvare*, lat. pripomoći). Adjuvanti utječu na produkciju citokina čija je uloga u organizmu da pojačavaju, ubrzavaju ili produžuju specifičnu imunoreakciju na određeni antigen. Time se omogućava bolja obrana organizma od patogenih organizama zbog čega se često dodaju u cjepiva koja nisu dovoljno imunogenična [8].

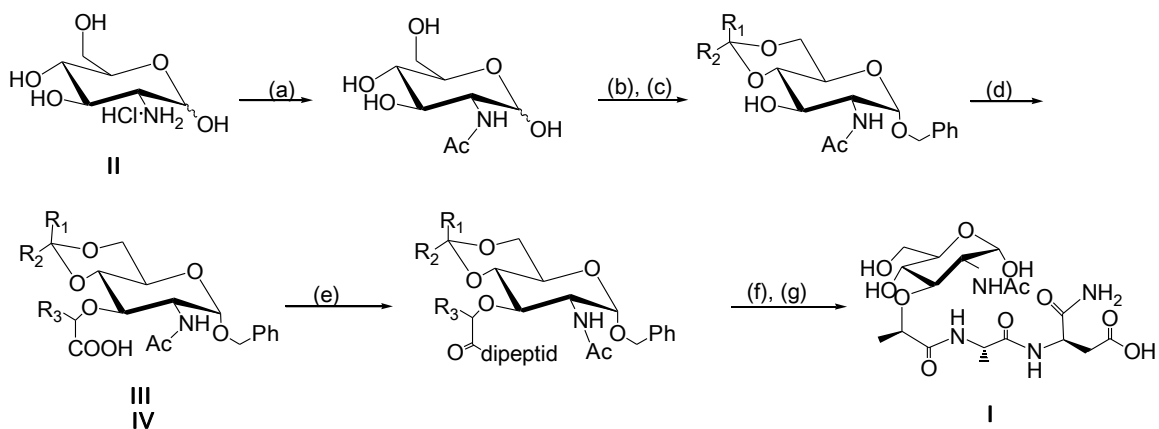


**Slika 2.** Struktura *N*-acetil-muramil-L-alanil-D-izoglutamina

1974. godine otkriveno je da je MDP minimalna strukturna jedinica koja je odgovorna na imunoadjuvantsku aktivnost Freundovog adjuvansa. Od tada se provode brojna istraživanja u cilju sinteze, izolacije i utvrđivanja aktivnosti muramildipeptida, ali i ostalih muramilpeptida [9]. S ciljem što bolje karakterizacije imunostimulacijskog efekta i adjuvantske aktivnosti sintetiziran je velik broj različitih derivata muramilpeptida koji su podvrgnuti istraživanju odnosa strukture i biološke aktivnosti [SAR, (engl. *Structural-*

*Activity Relationship* ]. Utvrđeno je da kemijska struktura i stereokemija imaju veliki utjecaj na biološku aktivnost modificiranih derivata i analoga MDP [10,11,12]. Konformacijskom analizom MDP primjenom, <sup>1</sup>H NMR-spektroskopije i molekulskog modeliranja, potvrđena je tvorba 10-članog β-okreta (CO<sub>MurNAc</sub> ··· NH<sub>Ala</sub> IHB). Alternativni β-okret koji bi bio rezultat CO<sub>Lac</sub> ··· NH<sub>Gln</sub> IHB nije potvrđen [13,14].

Sinteza većih produkata enzimske hidrolize peptidoglikana je složen postupak, dok je muramildipeptid moguće pripremiti jednostavnom kemijskom sintezom primjenom Jeanloz/Flowersova postupka [15]. Iz D- glukoaminhidroklorida **II** koji se nakon protekcije reaktivnih NH<sub>2</sub>- i OH-skupina i reakcije s D, L-α-klorpropionskom kiselinom prevodi u dijastereomernu smjesu muraminske **III** i izomuraminske kiseline **IV** (Shema 1). O-zaštićena muraminska kiselina **III** kopulacijom s prirodnim dipeptidom L-Ala-D-iGln uz deprotekciju OH-skupina pretvara se u MurNAc-L-Ala-D-iGln (MDP, **I**) (Shema 1). (S)-Izomer muraminske kiseline **IV** na isti način daje izoMurNAc-L-Ala-D-iGln (*izo*MDP) čija je adjuvantska aktivnost značajno smanjena u odnosu na MDP [12].



(a) anhidrid octene kiseline, NaH; (b) fenilmetanol, H<sup>+</sup>; (c) PhCHO, H<sup>+</sup> ili 2,2-dimetoksiopropan, H<sup>+</sup>; (d) NaH, D,L-α-klorpropionska kiselina (kloroctena kiselina, klorbutanska ili mlijecna kiselina); (e) ester dipeptida i EEDQ ili DCC, HOBt ili Woodwardov reagens K ili izobutil klorkarbonat; (f) octena kiselina (aq.); (g) H<sub>2</sub> / Pd, H<sup>+</sup>;

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub> ili R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; R<sub>3</sub> = H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; dipeptid = L-Ala-D-isoGln

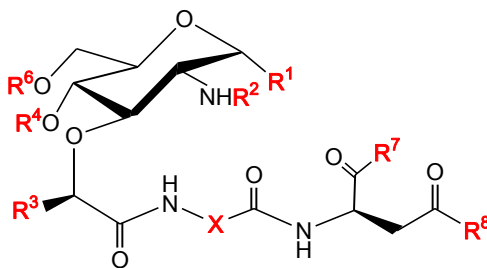
**Shema 1.** Sinteza muramildipeptida **I** (MDP)



Kao sastavni dio stanične stijenke, MDP može poslužiti kao biomarker za detekciju bakterijskih fragmenata u okolišu [16]. Obzirom da u ljudskom organizmu ne postoje enzimi koji bi hidrolizirali muramildipeptid do muraminske kiseline, prisustvo MurNAc u tkivima i tjelesnim tekućinama može upućivati na postojanje određenih poremećaja ili oboljenja [17]. Otkrićem faktora S, faktora odgovornog za spavanje, po prvi puta su u ljudskom tkivu (mozak, jetra i bubrezi) detektirane molekule muramildipeptida [18, 19]. Povećane koncentracije muraminske kiseline zabilježene su kod pacijenata s urinarnim infekcijama, te u cerebrospiralnoj tekućini pacijenata oboljelih od pneumokoknog meningitisa [20, 21].

### 2.1.1. Analizi i derivati MDP i njihova biološka aktivnost

Mnogi derivati i analozi MDP bili su predmet istraživanja kako bi se poboljšala njihova aktivnost i selektivnost, a smanjile nuspojave kao što su upalne reakcije, povišena temperatura i indukcija autoimmune reakcije. Dokazano je da i male promjene u primarnoj strukturi utječu na konformaciju, a samim time i na biološka svojstva i aktivnost derivata i analoga MDP (slika 3). Adjuvantska aktivnost očuvana je kod većine derivata muramildipeptida. Antikancerogena aktivnost uočena je kod derivata MDP kod kojih je  $R^4$  skupina zamjenjena glukozaminom i acilom i kod derivata MDP kod kojih je  $R^6$  skupina zamjenjena *O*-acilom (tj. mikolinskom kiselinom, masnim kiselinama, kinolinskom grupom). Antibakterijsku aktivnost pokazuju derivati kojim je  $R^1$  skupina je zamjenjena  $\alpha$ -*O*-acilom,  $\beta$ -*O*-acilom i glukozaminom. Također, antibakterijsku aktivnost imaju i derivati čija je  $R^6$  skupina zamjenjena *O*-acilom,  $NH_2$  ili *N*-acilom. Pirogena aktivnost zamjećena je kod derivata čija je  $R^1$  skupina zamjenjena  $\alpha$ - ili  $\beta$ -*O*-alkilom (Me, Bn) i kod derivata koji na mjestu X imaju L-aminokiselinu (Ala, Ser, Val, Thr) [15].



**Slika 3.** Supstitucija određenih skupina u MDP-u

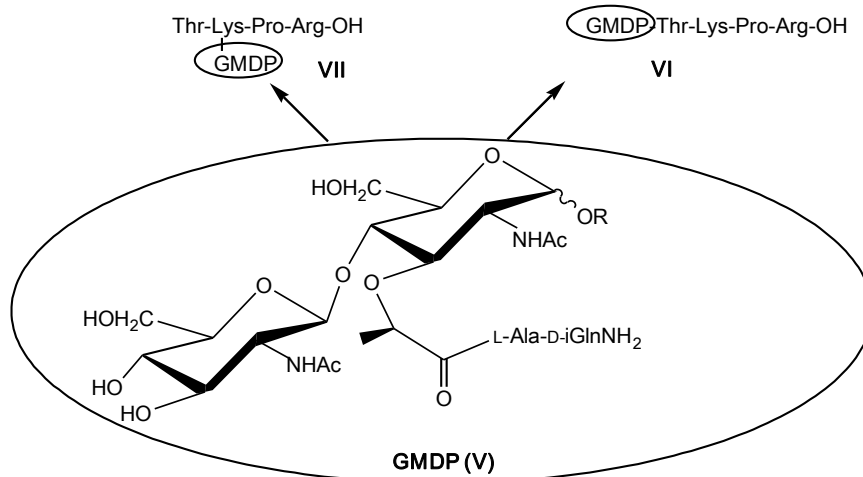
Sakupljanjem i analiziranjem rezultata SAR-studija (engl. *Structural Activity Relationship*) uočeno je da je konfiguracija aminokiselinskih kiralnih centara (*S*-konfiguracija prve aminokiseline i *R*-konfiguracija C-terminalne aminokiseline) ključna za imunomodulacijsku aktivnost sintetiziranih peptida, dok *N*-acetil-D-glukozaminski ostatak vezan na dipeptidnu podjedinicu nema esencijalnu ulogu [22 - 24].

Budući da je dokazano kako šećerni dio molekule muramildipeptida nije odgovoran za imunostimulacijsku aktivnost [24], sinteza derivata MDP odvijala se u smjeru tvorbe novih imunoaktivnih derivata - demuramilpeptida. Demuramilpeptidi mogu imati zamjenjen glukozaminski fragment s raznim acilnim i karbocikličnim skupinama kao i andamatilnim derivatima.

### **2.1.2. Konjugati MDP i njihova biološka aktivnost**

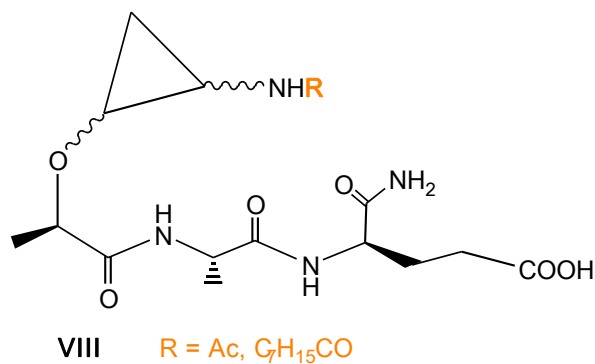
Konjugiranjem MDP s biološki aktivnim spojevima ne samo da se zadržavaju prirodna biološka svojstva, već se poboljšavaju i njihova farmakološka svojstva i jača samoobrana infekcijom napadnutog organizma.

Tuftsina, fiziološki tetrapeptid (H-Thr-Lys-Pro-Arg-OH), odlikuje se imunoadjuvantskim svojstvima: stimulira fagocitozu makrofaga i granulocita, te ostvaruje antibakterijsku i antitumorsku aktivnost [25]. Vezivanjem derivata tuftsina s *N*-acetil-glukozaminil-muramil-dipeptidom (GMDP, **V**) preko  $\alpha$ -amino-skupine terminalnog Thr-ostatka pripremljen je konjugat **VI**, dok je konjugat **VII** dobiven vezivanjem GMDP s  $\epsilon$ -amino-skupinom lizinskog ostatka tuftsina (slika 4) [26]. Imunološki testovi konjugata GMDP i tuftsina indiciraju visokodjelotvornu adjuvantsku aktivnost: stimuliraju stvaranja antitijela u testovima na ovalbumin kao i u reakcijama odgođene osjetljivosti (DTH, engl. *Delayed Type Hypersensitivity*) te potiču fagocitozu [11].



**Slika 4.** Konjugati GMDP-tuftsina

U cilju postizanja poboljšane biološke aktivnosti i smanjenja negativnih nuspojava MDP, pripremljeni su i analozi **VIII** u kojima je šećerna podjedinica zamijenjena derivatom ciklopropana (slika 5). Ispitivanje njihove biološke aktivnosti nije dalo očekivane rezultate [27].



**Slika 5.** Struktura MDP-a i njegovog ciklopropanskog analoga **VIII**

### 2.1.3. Klinička ispitivanja derivata i analoga MDP

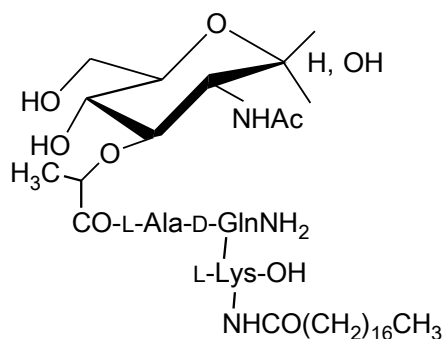
Klinička ispitivanja derivata i analoga MDP prikazanih u tablici 1. dala su obećavajuće rezultate:

**Tablica 1.** Derivati i analozi MDP odobreni od Europske agencije za lijekove\* i Američke uprave za hranu i lijekove\*\*

#### MDP-Lys(L-18), Muroctasin, Romurtide\*\*

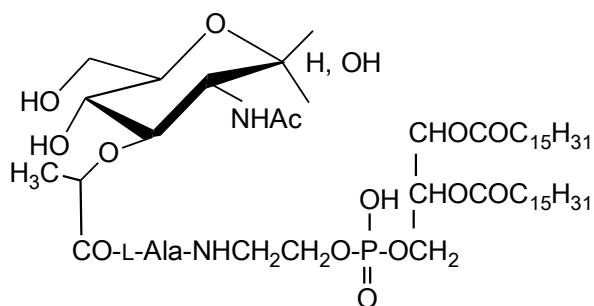
$N^2$ -[*N*-(acetil-muramil)-L-alanil-D-izoglutaminil]

- $N^6$ -stearoil-L-lizin - lipofilni derivat uveden u liječenje leukopenije izazvane zračenjem [28, 29].



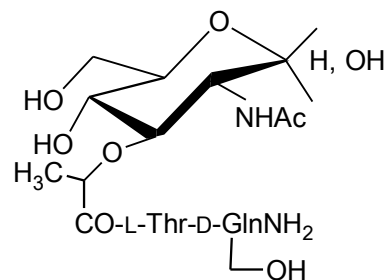
#### MTP-PE, Mifamurtid\*

Muramil-tripeptid-fosfatidiletanolamin, lipofilni analog koji stimulira monocite/makrofage da uništavaju različite tumorske stanice *in vitro* i *in vivo*. Klinički je testiran na pacijentima s recidivom osteosarkoma i melanoma, a u kombinaciji s drugim antikancerogenim agensima povećava izgleda za dugoročno izlječenje kod pacijenata s tim bolestima [30, 31].



### Syntex adjuvant formulation (SAF)\*\*

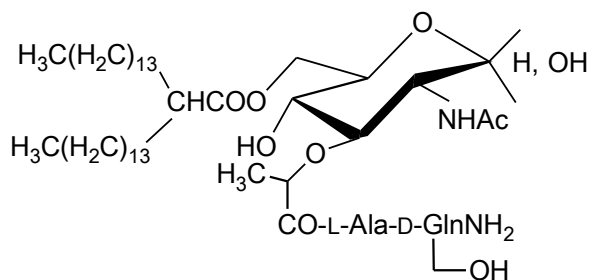
Emulzija s MDP[Thr] koristi se kao veterinarsko cjepivo u SAD [32]. Pokazao se izvrsnim adjuvantom u kontaktima s virusom gripe i malarije. Zbog toga što se koristi kao emulzija ulja u vodi, najefikasniji je s amfifilnim antigenima zbog duljeg zadržavanja antigena u ulju i mogućnosti produljenja imuno-odgovora.



**XI**

### B30-MDP

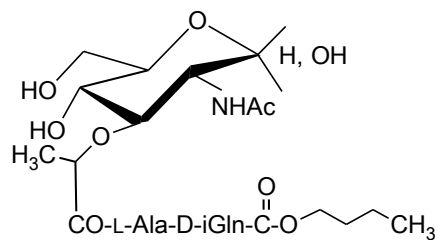
Ispituje se mogućnost njegova utjecaja na unapređenje imunogenosti cjepiva. Također, ispituju se dodatne modifikacije s kolesterolom, dimiristoilfosfatidilkolinom (DMPC), distearoilfosfatidilkolinom (DSCP), dipalmitoilfosfatidilkolinom (DPPC) ili dipalmitoilfosfatidilglicerolom (DPPG) u cilju poboljšanja farmakodinamskih svojstava [33].



**XII**

### Murabutid\*\*

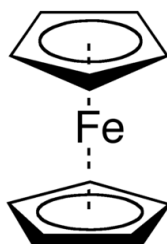
Sintetski analog koji je pokazao izvrsnu učinkovitost i primjenljivost kod ljudi (suzbija replikaciju HIV) [34].



**XIII**

## 2.2 STRUKTURA I SVOJSTVA FEROCENA

Ferocen (fero- + c[iklopentadi]en[il]), diciklopentadienil-željezo,  $(C_5H_5)_2Fe$ , čine dva ciklopentadienilna prstena, između kojih je smješten atom željeza, zbog čega spoj ima aromatska svojstva. Najpoznatiji je predstavnik metalocenâ, spojeva s tzv. strukturom sendviča, u kojima je metalni atom uklopljen između organskih prstenastih struktura (slika 6).



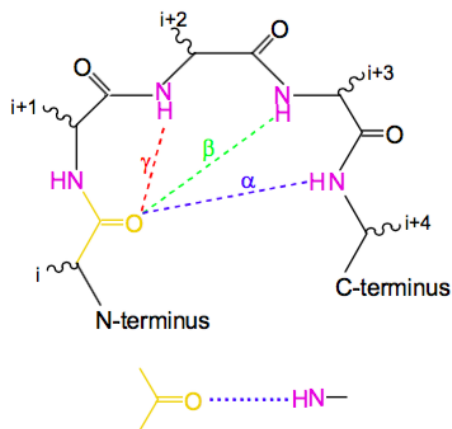
**Slika 6.** Struktura diciklopentadienil-željeza

Nakon otkrića ferocena (1951. godine) i njegove potpune karakterizacije nastupilo je razdoblje intenzivnog razvoja organometalne kemije. Granice organometalne kemije pomaknute su u svim smjerovima, kako u teorijskom smislu tako i u samoj primjeni. Pojedini tipovi organometalnih spojeva izrazito su nestabilni i osjetljivi na djelovanje zraka ili vode pa se koriste samo u bezvodnim uvjetima i atmosferi inertnog plina. Ipak mnogi od njih mogu se održati u biološkim uvjetima, što je važan preduvjet za primjenu tih molekula u farmakologiji. Osim primjene u farmakologiji, ti se spojevi rabe u katalizi (npr. Ziegler-Nattina polimerizacija), asimetričnoj sintezi, olefinskoj metatezi, itd [35, 36].

Ferocen može tvoriti brojne biokonjugate sa aminokiselinama, peptidima, proteinima, DNA, RNA, PNA, ugljikohidratima, hormonima itd. Razlog tomu je stabilnosti ferocenske podjedinice u vodenom mediju te povoljna elektrokemijska svojstva [37]. Ferocen se smatra začetnikom  $\beta$ -okreta [38].  $\beta$ -Okret je opći strukturni element u građi proteina koji je posljedica intramolekulskih vodikovih veza tipa  $N-H \cdots O=C$  između antiparalelnih peptidnih lanaca. Bitno svojstvo  $\beta$ -okreta je da je CO-skupina ostatka i vezana vodikovom vezom na NH-skupinu ostatka ( $i+2$ ) te zatvara 10-člani prsten (Slika 7). Ako je CO-skupina vezana na NH-skupinu ostatka ( $i+1$ ) nastaje  $\gamma$ -okret koji zatvara

7-člani prsten, a vezanjem na NH-skupinu ostatka ( $i+3$ ) nastaje  $\alpha$ -uzvojnica koja zatvara 13-člani prsten.

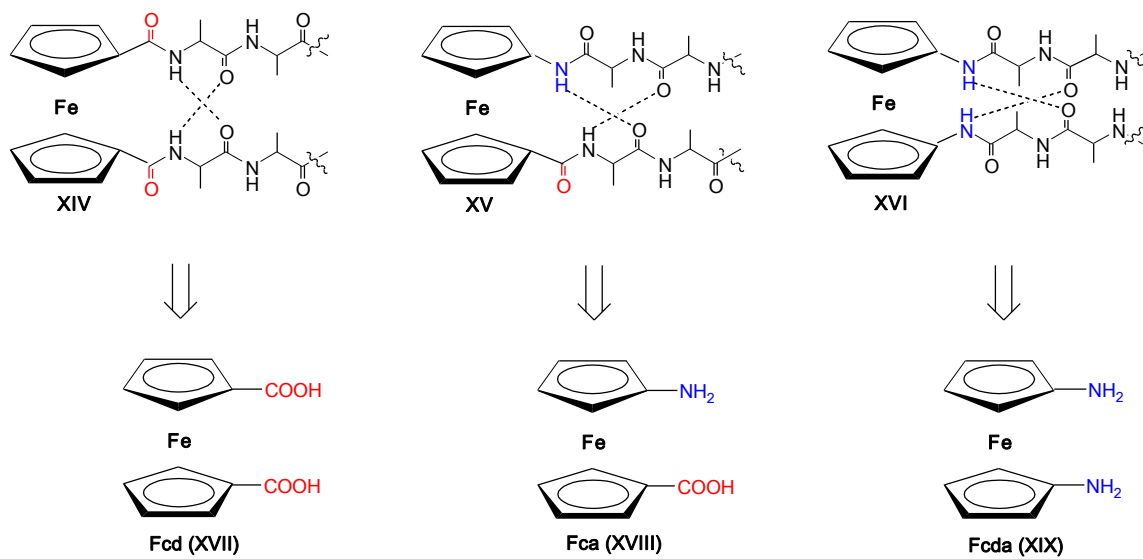
Od prirodnih peptida začetnici okreta su neke aminokiseline (npr. prolin), dok su kod peptidnih mimetika začetnici okreta male pogodno funkcionalne molekule kao što su dibenzofuran, bipiridin, norbornan i za nas najzanimljiviji ferocen te mnogi drugi.



**Slika 7.**  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -okret

Heteroanularno disupstituirani feroceni su osnova molekulskih predložaka za dizajn okreta i struktura sličnim  $\beta$ -plohamama. Njihovi su slobodno rotirajući ciklopentadienilni (Cp) prstenovi udaljeni oko 3.3 Å, što je idealno za uspostavljanje intramolekulskih vodikovih veza u konjugatima s prirodnim aminokiselinama [39-41]. Ovisno o strukturi ferocenskog prekursora, 1,1'-disupstituirani ferocenski peptidi dijele se u tri glavne skupine: (i)  $\text{Fn}[\text{CO}(\text{AA})_m\text{OMe}]_2$  (**XIV**) izvedeni iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (**Fcd**, **XVII**), (ii)  $\text{Y}(\text{AA})_n\text{Fca}(\text{AA})_m\text{OMe}$  (**XV**) izvedeni iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (**Fca**, **XVIII**) te (iii)  $\text{Fn}[\text{NH}(\text{AA})_m\text{Y}]_2$  (**XVI**) izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (**Fcda**, **XIX**) [Fn = ferocenilen, AA = prirodna aminokiselina, Y = Ac (acetil), Boc (tert-butoksikarbonil),  $m = 1, 2, \dots$ ;  $n = 1, 2, \dots$ ] [42].

Simetrično supstituirane peptide **XIV** i **XVI** odlikuje paralelno usmjerenje podandnih peptidnih lanaca, dok su u ferocenskim peptidima **XV** peptidni lanci orijentirani antiparalelno (slika 8) [43].



**Slika 8.** Ferocenski peptidi **XIV-XVI** izvedeni iz Fcd (**XVII**), Fca (**XVIII**) i Fcda (**XIX**) (IHB su označene isprekidanim crtama)



## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

Sve kemikalije korištene u sintezi bile su analitičke čistoće, dok su otapala korištena u radu pročišćena prema standardnim postupcima [44].

### 3.2. METODE

Tijek reakcija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva ispitivani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel) s fluorescentnim indikatorom (254 nm). Produkti su pročišćeni tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu ("Merck", Kieselgel 60 HF<sub>254</sub>) uporabom smjesâ diklormetan/etil-acetat = 5:1 kao eluensâ. Karakterizacija sintetiziranih spojeva provedena je pomoću infracrvene spektroskopije (IR), nuklearne magnetske rezonance (NMR), elementarne analize i tekućinske kromatografije visoke razlučivosti sa spektrometrijom masa (HPLC-MS).

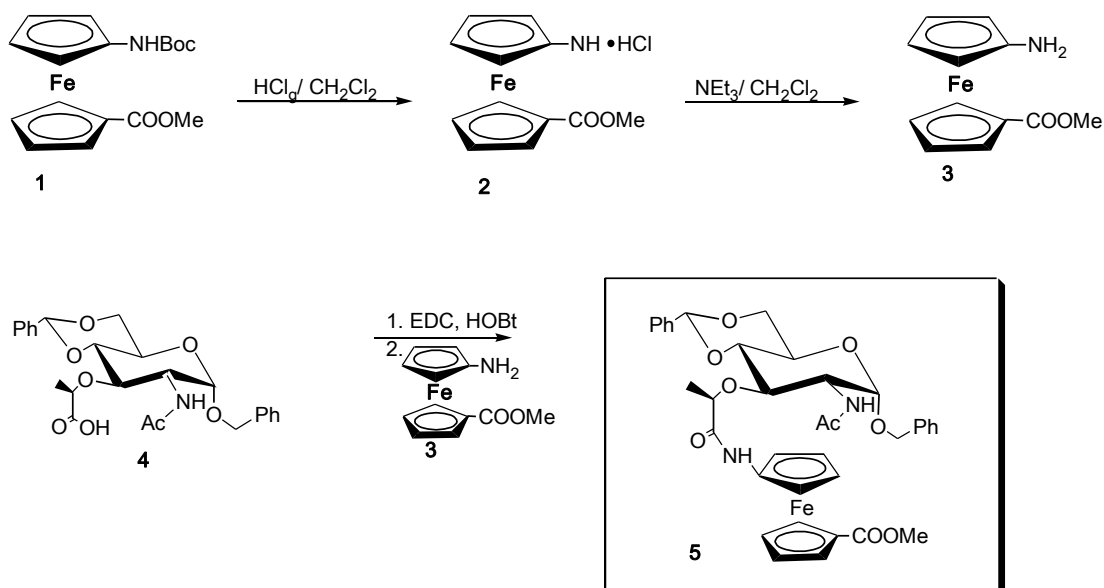
IR-spektri uzoraka snimljeni su na spektrofotometru Bomem MB 100 u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

<sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR-spektri određeni su u CDCl<sub>3</sub>, Bruker Advance DRX 400 uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard. Kemijski pomaci ( $\delta$ ) izraženi su u ppm.

Maseni spektri izmjereni su na Agilent Technologies 6410 Triple Quadrupole Mass Spectrometer (MS ionizacija).

Sinteza Boc-Fca (**1**) i *O*-zaštićene MurNAc (**4**) opisana je u literaturi [45, 46], a spektroskopski podaci odgovaraju literaturnima.

### 3.2.1. Sinteza Mur-Fn-COOMe



Shema 2. Sinteza ferocenskog muropeptida 5 (Mur-Fn-COOMe)

### Priprava hidroklorida ferocenske aminokiseline (2)

U otopinu *N*-Boc zaštićene ferocenske aminokiseline [Boc-Fn-COOMe, **1** (0.5 mmol)] u suhom etil-acetatu ohlađenu na 0°C uvodi se suhi plinoviti HCl pola sata. Nakon 30' miješanja pri sobnoj temperaturi, otapalo se upari, a u tikvici zaostaje žuti talog HCl·HN-Fn-COOMe **2**.

### Sinteza Mur-Fn-COOMe (5)

Muraminska kiselina **4** se otopi u suhom CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Njeno dispergiranje pospješuje se u ultrazvučnoj kupelji. Doda se EDC (1,5 mmol) i HOBT (1,5 mmol) uz miješanje. Reakcija se provodi pola sata pri sobnoj temperaturi.

HCl·HN-Fn-COOMe **2** (0.25 mmol) suspendira se u suhom CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, otopi uz dodatak Et<sub>3</sub>N (pH 8) i doda aktiviranoj kiselini. Nakon što se tankoslojnom kromatografijom u sustavu (diklormetan:etilacetat = 5:1) utvrdi da je sav slobodan amin izreagirao, dodaje se sljedeći obrok ferocenskog amina **3** (0.25 mmol). Reakcija se provodi 48h na sobnoj temperaturi uz miješanje.

## Pročišćavanje sintetiziranog Mur-Fn-COOMe 5

Otopina se prebaci u lijevak za ekstrakciju i doda se 5%-tna otopina NaHCO<sub>3</sub>. Ekstrakcija se ponovi 3 puta uz dodatak diklormetana. Zatim se provodi ekstrakcija s 10%-tnom otopinom limunske kiseline i nakon toga s zasićenom otopinom NaCl. Dobiveni organski sloj se osuši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari na vakuum uparivaču do suha. Sirovi produkti razdvoje se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz smjesu otapala: diklormetana i etil-acetata (5:1) kao eluensa.

Reakcijom je dobiveno 34,7 mg muropeptida **5** (0,16 mmol, 31 %) u obliku narančastih, praškastih kristala.  $R_f = 0,63$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : EtOAc = 5 : 1).

**IR** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3430 sr (NH<sub>slobodni</sub>), 3374 sr (NH<sub>asocirani</sub>), 1733 j (CO<sub>ester</sub>), 1706 j (CO<sub>amid</sub>), 1679 j (CO<sub>acetil</sub>), 1538 j (amid II).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,75 (s, 1H, NH<sub>amid</sub>); 7,45-7,32 (m, 10H, CH<sub>Ph</sub>); 6,42 (d, 1H,  $J_{\text{NH}, \text{H-2}} = 9,21$  Hz, NH<sub>acetil</sub>); 5,57 (s, 1H, CH<sub>benziliden</sub>); 4,91 (d, 1H,  $J_{\text{H-1}, \text{H-2}} = 3,73$  Hz, H-1); 4,72-4,71 (m, 4H, Fn<sub>H-2</sub>, Fn<sub>H-5</sub>, Fn<sub>H-2'</sub>, Fn<sub>H-5'</sub>); 4,69-4,47 (m, 2H, OCH<sub>2a</sub>-Ph, OCH<sub>2b</sub>-Ph); 4,35 (s, 2H, Fn<sub>H-3'</sub>, Fn<sub>H-4'</sub>); 4,33-4,32 (m, 1H, H-2); 4,23 (dd, 1H,  $J_{\text{H-6a}, \text{H-5}} = 4,6$  Hz,  $J_{\text{H-6a}, \text{H-6b}} = 10,09$  Hz, H-6a); 4,11 (q, 1H,  $J_{\text{CH-laktil}, \text{CH3-laktil}} = 6,79$  Hz, CH<sub>laktil</sub>); 3,98 (pt, 2H, Fn<sub>H-3</sub>, Fn<sub>H-4</sub>); 3,88-3,86 (m, 1H, H-5); 3,79-3,74 (m, 2H, H-6b, H-3); 3,72 (s, 3H, CH<sub>3-ester</sub>); 3,67 (t, 1H, H-4); 1,93 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>); 1,44 (d, 3H,  $J_{\text{CH3-laktil}, \text{CH-laktil}} = 6,58$  Hz, CH<sub>3-laktil</sub>).

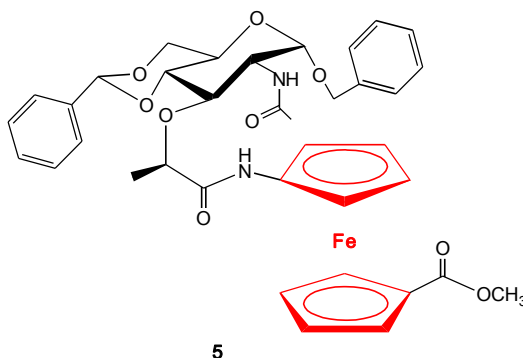
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/\text{ppm}$** : 171,57 (CO<sub>ester</sub>); 171,54 (CO<sub>amid</sub>); 171,01 (CO<sub>acetil</sub>); 136,92; 136,60 (C<sub>Ph</sub>); 129,10–125,87 (CH<sub>Ph</sub>); 101,46 (CH<sub>benziliden</sub>); 97,36 (C1); 95,73 (C<sub>Fn</sub>); 82,08 (C4); 79,10 (CH<sub>laktil</sub>); 78,76 (C3); 72,26 (Fn<sub>C-3'</sub>); 72,21 (Fn<sub>C-4'</sub>); 71,69 (C'<sub>Fn</sub>); 71,09 (Fn<sub>C-2'</sub>); 71,03 (Fn<sub>C-5'</sub>); 70,02 (CH<sub>2</sub>Ph); 68,82 (C6); 65,97 (Fn<sub>C-3</sub>, C4); 62,96 (C5); 62,30 (Fn<sub>C-5</sub>); 62,01 (Fn<sub>C-2</sub>); 52,68 (C2); 51,61 (CH<sub>3-ester</sub>); 23,47 (COCH<sub>3</sub>); 19,92 (CH<sub>3-laktil</sub>).

**MS(FD):**  $m/z$  (%) = 712,6 (100) [M]<sup>+</sup>. Elementarna analiza za C<sub>37</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>Fe: C 62,37; H 5,66; N 3,93. Pronađeno: C 62,30; H 5,78; N 3,71.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. UVOD

U *Teorijskom dijelu* Završnog rada dan je pregled prethodno opisanih analoga i derivata muramildipeptida (MurNAc-L-Ala-D-izoGln, MDP) (*v.* 2.1.1. i 2.1.2.). Kako se pokazalo da kemijske modifikacije glukopiranoznog prstena i/ili prirodne peptidne sekvence iz MDP značajno utječu na njegova biološka svojstva, a imajući na umu da do sada nisu poznati ferocenom modificirani muropeptidi, odlučili smo pripremiti ferocenski analoga MDP **5** prikazanog na slici 9. Za očekivati je da će umetanje ferocena, dokazanog začetnika okretâ, utjecati na konformacijski prostor rezultirajućeg biokonjugata.



**Slika 9.** Ferocenski konjugat s muraminskom kiselinom **5**

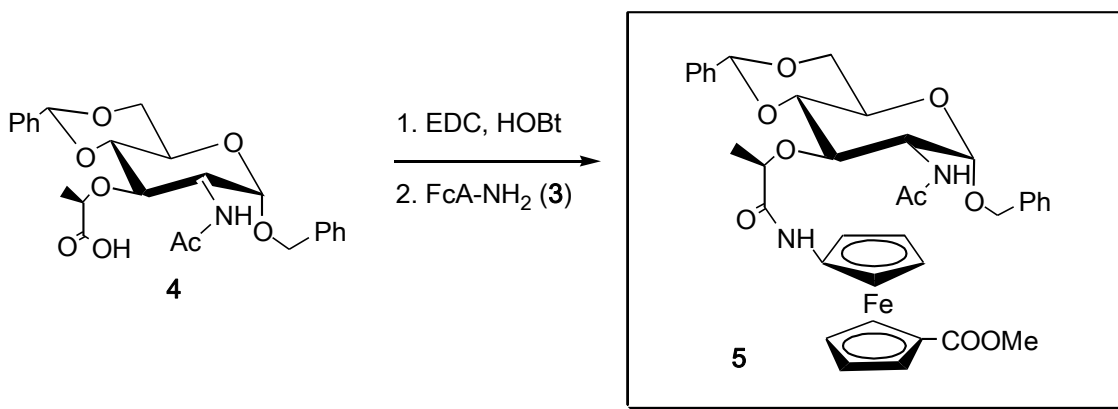
### 4.2. PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA ANALIZA FEROCENSKOG MUROPEPTIDA Mur-Fn-COOMe **5**

U cilju pripreme i strukturne karakterizacije ferocenom modificiranog muropeptida **5** (slika 9), kopulirali smo *O*-zaštićenu *N*-Ac-Mur-OH **4** i ferocenski amin **3** (shema 2) [2]. Za očekivati je da će ciklopentadienilni supstituent (COOMe) imati utjecaja ne samo na sekundarnu sustruktururu, nego i na biološka svojstva izvedenih muropeptida modifikacijom njihovog 3D oblika, lipofilnosti i metaboličke stabilnosti.

Kondenzacija ferocenskog amina NH<sub>2</sub>-Fn-OMe **3** s *O*-zaštićenom *N*-Ac-Mur-OH **4** provedena je korištenjem uobičajenog postupka EDC / HOBt (shema 2).

### 4.2.1. Sinteza ferocenskog muropeptida

Boc-zaštićeni ferocenski amin BocNH-Fn-COOMe **1** pripravljen je prema postupcima utvrđenima u našem Laboratoriju [45]. Primjenom standardne metode EDC / HOBt, aktiviran je C-terminus iz muraminske kiseline **4** te joj je dodan netom deprotektirani ferocenski amin H<sub>2</sub>N-Fn-COOMe **3** (deprotekcija je provedena djelovanjem plinovitog HCl u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> uz naknadnu obradu hidroklorida s NEt<sub>3</sub>). Naime, pokazalo se (i) da su ferocenski amini nestabilni, odnosno podložni intermolekulskoj polimerizaciji što se na TLC-pločici detektira kao više žuto obojenih mrlja te (ii) da se vrijeme potrebno za kondenzaciju ferocenskih amina s različitim aminokiselinama produljuje razmjerno veličini aminokiseline s kojom stupa u reakciju (primjerice, kondenzacija ferocenske aminokiseline s Ala završena je nakon nekoliko minuta, dok s Phe traje nekoliko sati) [47]. Napredovanje reakcije pratili smo tankoslojnom preparativnom kromatografijom (TLC).



**Shema 3.** Sinteza ferocenskog muropeptida **5** (Mur-Fn-COOMe)

Da bismo što kvalitetnije proveli konformacijsku analizu, osim spektroskopske analize pripravljenog muropeptida **5**, u narednim poglavljima prikazat ćemo i rezultate spektroskopskih mjerenja ugljikohidratnog prekursora- muraminske kiseline **4**.

#### 4.2.2. IR-spektroskopska analiza

IR-spektroskopija je metoda koja daje pouzdan uvid u konformacijski prostor peptida u otopini [48]. Istezne frekvencije NH-skupina u području nižem od  $3400\text{ cm}^{-1}$  ukazuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama, dok se signali iznad  $3400\text{ cm}^{-1}$  pripisuju slobodnim NH-skupinama. Apsorpcijske vrpce karbonilnih esterskih skupina nađene ispod  $1730\text{ cm}^{-1}$  indiciraju njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.

Karakter vodikove veze (inter- ili intramolekulski) određuje se mjerenjem koncentracijski-ovisnih IR-spektara. Postupnim razrjeđivanjem otopine ispitivanog uzorka cijepaju se intermolekulske vodikove veze uslijed čega znatno opada intenzitet njihovih signala u području nižem od  $3400\text{ cm}^{-1}$ . Ukoliko su, pak, u molekuli prisutne intramolekulske vodikove veze njihov intenzitet razrjeđivanjem slabi proporcionalno slabljenju signala slobodne NH-skupine.

U IR-spektrima ispitivanog muropeptida **5** te njihovog ugljikohidratnog prekursora **4** javljaju se vrpce slobodnih i asociраних NH-skupina (tablica 2). U ugljikohidratnom prekursoru *N*-Ac-Mur-OMe **4** prevladava vrpca asociране NH-skupine. U karbonilnom dijelu spektra, esterske karbonilne skupine spoja **4** apsorbiraju pri valnim duljinama  $\sim 1730\text{ cm}^{-1}$  čime je indicirano njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama u otopini. Signali amidnih skupina  $\nu(\text{NH})$  pri  $3376\text{ cm}^{-1}$  u diklormetanskoj otopini peptida **5** ( $c = 5 \times 10^{-2}\text{ M}$ ) (Tablica 2) ukazuju na sudjelovanje u vodikovim vezama.

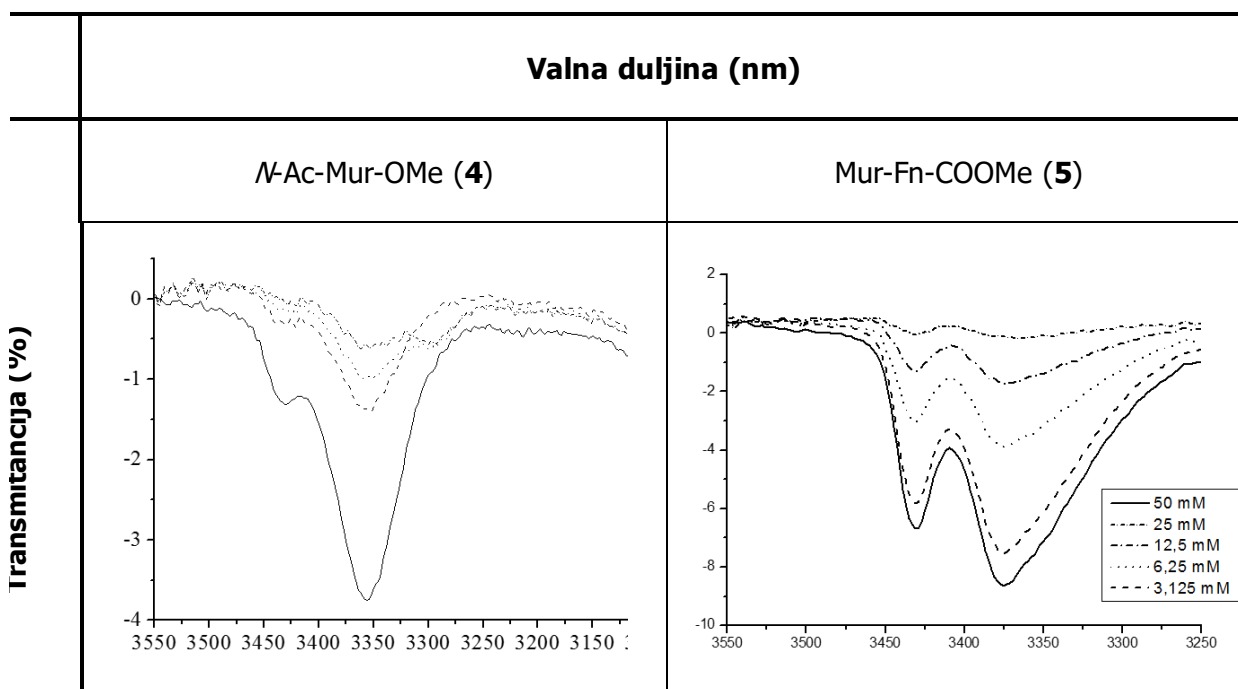
**Tablica 2.** Istezne vibracije NH- i CO-skupina prekursora **4** te muropeptida **5**

Spoj	Formula		$\nu_{\text{NH}}$ (slob.)	$\nu_{\text{NH}}$ (asoc.)	$\nu_{\text{CO}}$ (ester)	$\nu_{\text{CO}}$ (amidI)	$\nu_{\text{CO}}$ (amidII)
<b>4</b>	<i>N</i> -Ac-Mur-OMe	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3431sl	3356sr	1732j	1674j	1538j
<b>5</b>	Mur-Fn-COOMe	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3430sr	3376sr	1733j	1706j 1679j	1538j

[a]IR-spekttri snimljeni su u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,  $c = 5 \times 10^{-2}\text{ M}$

Karakter (inter- ili intramolekulski) asociраниh NH-skupina registriranih između 3356 i 3430  $\text{cm}^{-1}$  u IR spektrima prekursora **4** kao i biokonjugata **5** ispitan je razrjeđivanjem od  $c = 5 \times 10^{-2}$  M do  $3 \times 10^{-3}$  M (tablica 3)., pri čemu se očekuje slabljenje signala intermolekulski asociраниh NH-skupina. Kako se omjer intenziteta slobodnih i asociраниh vrpca razrjeđivanjem ne mijenja, može se pretpostaviti sudjelovanje amidnih skupina u *intramolekulskim interakcijama*.

**Tablica 3.** Koncentracijski-ovisan IR-spektar<sup>[a]</sup> prekursora **4** te biokonjugata **5**



<sup>[a]</sup>IR-spektari snimljeni su u  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , [(—)  $c = 5 \times 10^{-2}$  M, (----)  $c = 2,5 \times 10^{-2}$  M, (....)  $c = 1,25 \times 10^{-2}$  M, (-.-.)  $c = 6,13 \times 10^{-3}$  M, (· · ·)  $c = 3 \times 10^{-3}$  M].

#### 4.2.3. NMR- spektroskopska analiza

NMR-spektroskopska analiza omogućava jasniji uvid u obrasce vodikovih veza, prethodno indiciranih IR-spektroskopijom. Naime, tom je tehnikom moguće razlikovati pojedine NH-skupine u molekuli te na temelju njihovih kemijskih pomaka zaključiti sudjeluju li u vodikovim vezama (kemijski pomaci iznad 7 ppm pripisuju se asociраниm NH-skupinama). Dakako, pri tome treba imati na umu da registrirani protonski kemijski

pomak predstavlja prosjek svih doprinosećih konformacija zahvaljujući brzom ravnoteži između slobodnih i vezanih stanja [49, 50].

Karakteristika  $\text{NH}_{\text{MurNAc}}$ -protona iz biokonjugata **5** jest da se u  $^1\text{H-NMR}$  spektrima detektiraju kao dubleti zbog sprege s protonom na C-2 poziciji glukopiranoze, dok je  $\text{NH}_{\text{amid}}$ -proton detektiran kao singlet. Asignacija svih protona konjugata **5** izvršena je pomoću dvodimenzijskih spektara (COSY, HMBC i HSQC) (tablica 4).

Prema naprijed rečenom, vidljivo je da je proton iz peptidne veze muropeptida **5** uključen u vodikovu vezu ( $\delta = 7,74$  ppm), dok proton iz acetamidne skupine vezane na šećernu jezgru ne sudjeluje u vodikovim vezama ( $\delta = 6,38$  ppm) (Tablica 4), dok u slučaju prekursora *N*-Ac-Mur-OMe **4** acetamidni proton sudjeluje u vodikovim vezama ( $\delta = 7,49$  ppm).

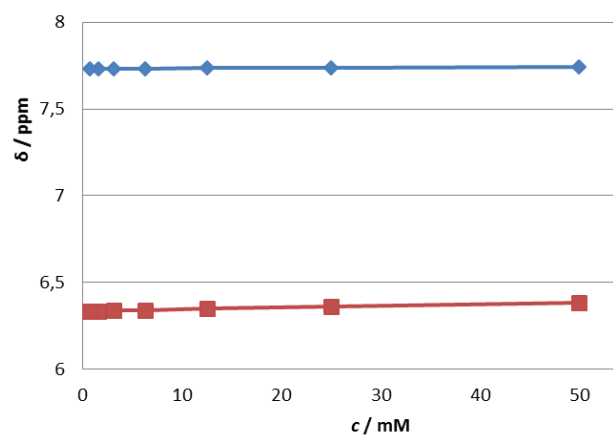
**Tablica 4.** Kemijski pomaci ( $\delta$ )<sup>[a]</sup> amidnih protona spoja **4** i biokonjugata **5**

<b>Spoj</b>	<b>Formula</b>	<b>Otapalo</b>	$\delta \text{NH}_{\text{MurNAc}}$ <b>(ppm)</b>	$\delta \text{NH}_{\text{amid}}$ <b>(ppm)</b>
<b>4</b>	<i>N</i> -Ac-Mur-OMe	$\text{CDCl}_3$	7,49	
<b>5</b>	Mur-Fn-COOMe	$\text{CDCl}_3$	6,38	7,74

<sup>[a]</sup>NMR-spektri snimljeni su u  $\text{CDCl}_3$  pri  $c = 5 \times 10^{-2}$  M i 298 K.

Intramolekulski karakter vodikovih veza, sugeriran rezultatima koncentracijski-ovisne IR-spektroskopije dodatno je potvrđen koncentracijski-ovisnom NMR-spektroskopijom. Naime, razrjeđivanje otopine biokonjugata **5** nije utjecalo na kemijske pomake njihovih NH-protona za koje je indicirano sudjelovanje u HB, što je vidljivo iz slike 10.





c (mM)	$\delta_{\text{NH}}$ (amid)	$\delta_{\text{NH}}$ (acetamid)
50,00	7,743	6,386
25,00	7,737	6,360
12,50	7,734	6,348
6,25	7,733	6,337
3,13	7,732	6,336
1,56	7,731	6,336
0,70	7,731	6,336

**Slika 10.** Koncentracijska ovisnost kemijskih pomaka IHB-asociranih NH-skupina u biokonjugatu **5**

## 5. ZAKLJUČCI

- Sintezom u jednom koraku pripravljen je ferocenski muropeptid **Mur-Fn-COOMe** u 30%-tnom iskorištenju.
- Struktura spoja potvrđena je IR- i NMR-spektroskopijom. NMR pomaci amidnog protona upućuju na njegovo sudjelovanje u vodikovoj vezi.
- Konformacijskom analizom pripravljenog muropeptida u otopini, a na temelju IR-spektara i koncentracijski ovisnih NMR-spektara indicirano je sudjelovanje amidnog protona iz peptidne veze u intramolekulskoj vodikovoj vezi.
- Acetamidni proton iz muropeptida ne sudjeluje u vodikovoj vezi.
- U nastavku istraživanja pripravljeni muropeptid elongirat će se izoglutaminom, s ciljem dobivanja pravog analoga muramildipeptida. Pripravljenom analogu ispitat će se imunostimulacijska aktivnost u suradnji s prof. Ž. Jakopin sa Sveučilišta u Ljubljani.

## 6. POPIS LITERATURE

- [1] Metzler-Nolte N. (2001) *Angewante Chemie. Int. Ed.* **40**, 1040-1044.
- [2] Förster C., Kovačević M., Barišić L., Rapić V., Heinze K. (2012) Ferrocenyl-Labeled Sugar Amino Acids: Conformation and Properties. *Organometallics* **31**, **9**: 3683-3694.
- [3] Schumann P. (2011) Peptidoglycan Structure. *Taxonomy of Prokaryotes*: 101–129.
- [4] Chedid L., Parant M., Parant F., Lefrancier P., Choay J., Lederer E. (1977) Enhancement of nonspecific immunity to *Klebsiella pneumoniae* infection by a synthetic immunoadjuvant (N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine) and several analogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 2089-2093.
- [5] Parant M., Parant F., Chedid L. (1978) Enhancement of the neonate's nonspecific immunity to *Klebsiella* infection by muramyl dipeptide, a synthetic immunoadjuvant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 3395-3399.
- [6] Cummings N. P., Pabst M. J., Johnston R. B. (1980) Activation of macrophages for enhanced release of superoxide anion and greater killing of *Candida albicans* by injection of muramyl dipeptide. *Journal of Experimental Medicine* **152**: 1659-1669.
- [7] Cox J. C., Coulter A. R. (1997) Adjuvants - a classification and review of their modes of action. *Vaccine* **15**: 248-256.
- [8] Ribić R., Tomić S. (2013) Priprava i imunomodulacijska svojstva modificiranih peptoglikanskih fragmenata. *Kemija u industriji* **62**: 19–31.
- [9] Traub S., von Aulock S., Hartung T., Hermann C. (2006) MDP and other muropeptides - Direct and synergistic effects on the immune system. *Journal of Endotoxin Research* **12**: 69-85.

- [10] Szilagy L., Pristovšek P., (2007) Structural Aspects of Peptides with Immunomodulating Activity. *Medicinal Chemistry* **7**: 861-870.
- [11] Dzierzbicka K., Kolodziejczyk A. M. (2003) Muramyl Peptides-Synthesis and Biological Activity. *Polish Journal of Chemistry* **77**: 373-395.
- [12] Ogawa C., Liu Y-J., Kobayashi K. S. (2011) Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy. *Current Bioactive Compounds*. **7**: 180-197.
- [13] Femandjian S., Perly B., Level M., Lefrancier P. (1987) A comparative <sup>1</sup>H-n.m.r. study of MurNAc-L-Ala-D-iGln (MDP) and its analogue murabutide: evidence for a structure involving two successive beta-turns in MDP. *Carbohydrate Research* **162**: 23-32.
- [14] Boulanger Y., Tu Y., Ratovelomanana V., Purisima E., Hanessian S. (1992) Conformation of MurNAc-L-Ala-D-iGln (MDP) and of a constrained analog using <sup>1</sup>H NMR data and molecular modeling. *Tetrahedron* **48**: 8855-9110.
- [15] Flowers H. M., Jeanloz R. W. (1963) The Synthesis of 2-Acetamido-3-O-(D-1-carboxyethyl)-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucose (N-Acetylmuramic Acid) and of Benzyl Glycoside Derivatives of 2-Amino-3-O-(D-1-carboxyethyl)-2-deoxy-D-glucose (Muramic Acid). *The Journal of Organic Chemistry* **28**: 2983-2986.
- [16] Traub S., von Aulock S., Hartung T., Hermann C. (2006) MDP and other muropeptides - Direct and synergistic effects on the immune system. *Journal of Endotoxin Research* **12**: 69-85.
- [17] Pabst M. J., Beranova-Giorgianni S., Krueger J. M. (1999) Effects of muramyl peptides on macrophages, monokines, and sleep. *Neuroimmunomodulation* **6**: 261-283.

- [18] Pappenheimer J. R., Koski G., Fencel V., Kamovsky M. L., Krueger J. (1975) Extraction of sleep-promoting factor S from cerebrospinal fluid and from brains of sleep-deprived animals. *Journal of Neurophysiology* **38**: 1299-1311.
- [19] Krueger J. M., Kamovsky M. L., Martin S. A., Pappenheimer J. R., Walter J., Biemann K. (1984) Peptidoglycans as promoters of slow-wave sleep. II. Somnogenic and pyrogenic activities of some naturally occurring muramyl peptides; correlations with mass spectrometric structure determination. *Journal of Biological Chemistry* **259**: 12659-12662.
- [20] Sen Z., Kamovsky M. L. (1984) Qualitative detection of muramic acid in normal mammalian tissues. *Infection and Immunity* **43**: 937-941.
- [21] Bal K., Larsson L., (2000) New and simple procedure for the determination of muramic acid in chemically complex environments by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications* **738** 57-65.
- [22] Adam A., Lederer E. (1984) Muramyl peptides: immunomodulators, sleep factors, and vitamins. *Medicinal Research Reviews* **4**: 111-120.
- [23] Adam A., Lederer E. (1988) Muramylpeptides as immunomodulators. *Immunology* **1**: 205-214.
- [24] Lefrancier P., Lederer E. (1987) Muramyl-peptides. *Pure and Applied Chemistry* **59**: 449-454.
- [25] Phillips J. H., Babcock G. F., Nishioka K. (1981) Tuftsin: a naturally occurring immunopotentiating factor. I. In vitro enhancement of murine natural cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunology* **126**: 915-921.
- [26] Titov V. M., Meshcheryakova E. A., Balashova T. A., Andronova T. M., Ivanov V. T., (1995) Synthesis and immunological evaluation of the conjugates composed from a muramyl peptide GMDP and tuftsin. *International journal of peptide and protein research* **45**: 348-355.

- [27] Csuk R., Gothe G., (2004) Synthesis of cyclopropanoid analogues of N-acylmuramyl dipeptide as potential immunostimulants. *Tetrahedron* **60**: 2201-2211.
- [28] Sosnowska D., Dzierzbicka K., Mysliwski A., Kolodziejczyk A. M. (1992) Muroctasin, a muramyl dipeptide derivative. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej* **46**: 521-530.
- [29] Azuma I., Otani T., (1994) Potentiation of host defense mechanism against infection by a cytokine inducer, an acyl-MDP derivative, MDP-Lys(L18) (romurtide) in mice and humans. *Medicinal Research Reviews* **14**: 401-414.
- [30] Frampton J. E., (2010) Mifamurtide: A review of its use in the treatment of osteosarcoma. *Pediatric Drugs* **12**: 141-153.
- [31] Anderson P. M., Tomaras M., McConnel K., (2010) Mifamurtide in osteosarcoma--a practical review. *Drugs Today* **46**: 327-337.
- [32] Lederc C., Vogel F. R. (1986) Synthetic immunomodulators and synthetic vaccines. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **2**: 353-406.
- [33] Ando S., Tsuge H., Mayumi T. (1996) Effect of cholesterol or phospholipid incorporation on the chemical stability of the muramyl dipeptide derivative B30-MDP in mixed vesicles *Colloid and Polymer Science* **274**: 678-684.
- [34] Bahr G. M. (2003) Non-specific immunotherapy of HIV-1 infection: potential use of the synthetic immunodulator murabutide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**: 5-8.
- [35] Cotton F. A., Wilkinson G., Murillo C. A., Bochmann M., (1999) *Advanced inorganic chemistry*, 6.izd., A Wiley-Interscience publication, New York.
- [36] Rapić V., Čakić Semenić M. (2011) Organometalna i bioorganometalna kemija, *Kemija u Industriji* **60**: 61-79.
- [37] Van Staveren D. R., Metzler-Nolte N. (2004) Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene. *Chemical Reviews* **104**: 5931.

- [38] Van Staveren D. R., Weyhermüller T., Metzler-Nolte N. (2003) Organometallic  $\beta$ -turn mimetics. A structural and spectroscopic study of inter-strand hydrogen bonding in ferrocene and cobaltocenium conjugates of amino acids and dipeptides. *Dalton Transactions* **2**: 210.
- [39] Moriuchi T., Hirao T. (2010) Design of Ferrocene-Dipeptide Bioorganometallic Conjugates To Induce Chirality-Organized Structures. *Accounts of Chemical Research*. **43**: 1040-1051.
- [40] Moriuchi T., Hirao T. (2012) Dipeptide-induced chirality organization. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **74**: 23-40.
- [41] Barišić L., Dropučić M., Rapić V., Pritzkow H., Kirin S. I., Metzler-Nolte N. (2004) The first oligopeptide derivative of 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid shows helical chirality with antiparallel strands. *Chemical Communications* **17**: 2004-2005.
- [42] Barišić L., Čakić M., Mahmoud K. A., Liu Y., Kraatz H-B., Pritzkow H., Kirin S. I., Metzler-Nolte N., Rapić V. (2006) Helically chiral ferrocene peptides containing 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid subunit as turn inducers. *Chemistry: A European Journal* **12**: 4965-4980.
- [43] de Hatten X., Weyhermüller T., Metzler-Nolte N. J. (2004) Ferrocenoyl peptides with sulfur-containing side chains: synthesis, solid state and solution structures. *Journal of Organometallic Chemistry* **689**: 4856- 4867.
- [44] Perrin D. D., Armarego W. L. F. (1988) Purification of laboratory chemicals, Pergamon Press.
- [45] Barišić L., Rapić V., Kovač V. (2002) Ferrocene Compounds. XXIX.\* Efficient Syntheses of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid Derivatives. *Croatica Chemica Acta* **75**: 199-210.
- [46] Babič A., Pečar S. (2008) Total synthesis of uridine diphosphate-*N*-acetylmuramoyl-L-alanine. *Tetrahedron* **19**, 2265-2271

- [47] Rosenblum M., Woodward R. B., (1958) The Structure and Chemistry of Ferrocene. III. Evidence Pertaining to the Ring Rotational Barrier. *Journal of the American Chemical Society* **80**: 5443-5449.
- [48] Kong J., Yu S., (2007) Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **39**: 549-559.
- [49] Rai R., Raghothama S., Balaram P., (2006) Design of a Peptide Hairpin Containing a Central Three-Residue Loop. *Journal of the American Chemical Society* **128**: 2675–2681.
- [50] Lee H.-J., Park H.-M., Lee K.-B., (2007) The beta-turn scaffold of tripeptide containing an azaphenylalanine residue. *Biophysical Chemistry* **125**: 117-126.



Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Tea Martinčić Cezar

ime i prezime studenta

# PRILOZI

## POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AA = aminokiselina

Ac = acetil

Ala = alanin

Boc = tert-butoksikarbonil

d = dublet

dd = dublet dubleta

EDC = N'-(3-dimetilaminopropil)-N-etilkarbodiimid-hidroklorid

Et = etil

EtOAc = etil-acetat

Fc = feroceni

Fca = 1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina

Fcd = ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina

Fcda = ferocen-1,1'-diamin

Fn = 1,1'-feroceni

HOBt = 1-hidroksibenzotriazol-hidrat

HB = vodikova veza (eng. Hydrogen Bond)

IHB = intramolekulska vodikova veza (engl. Intramolecular Hydrogen Bond)

IR = infracrvena spektroskopija [asoc. (asocirana); slob. (slobodna)]

m = multiplet

Me = metil

MDP = muramil-dipeptid

MS = maseni spektar

pt = pseudotriplet

q = kvartet

SAR = odnos strukture i biološke aktivnosti (engl. Structural-Activity Relationship)

t = triplet

s = singlet