

Sinteza i fotofizika oligopeptida s argininom i modificiranim tirozinom ili BODIPY karboksilnom kiselinom

Karakaš, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:648444>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-04**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



zir.nsk.hr



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Antonija Karakaš

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I
TEHNOLOGIJEPOVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE
ISPITE

Kandidatkinja Antonija Karakaš

Predala je izrađen diplomski rad dana: 26. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Irena Škorić, Sveučilište u Zagrebu
Fakultetkemijskog inženjerstva i tehnologije
Doc. dr. sc. Dragana Vuk, Sveučilište u Zagrebu
Fakultetkemijskog inženjerstva i tehnologije
Prof. dr. sc. Danijela Ašperger, Sveučilište u
ZagrebuFakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Prof. dr. sc. Helena Otmačić Ćurković, Sveučilište u
ZagrebuFakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
(zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu
diplomskograda pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 29. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Antonija Karakaš

*Sinteza i fotofizika oligopeptida s argininom i modificiranim tirozinom
ili BODIPY karboksilnom kiselinom*

DIPLOMSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Irena Škorić

Komentor: dr. sc. Nikola Basarić, zn. savj.

Neposredni voditelj: dr. sc. Mladena Glavaš

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Irena Škorić

doc. dr. sc. Dragana Vuk

prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Zagreb, rujan 2023.

Zahvale

Zahvaljujem se dr. sc. Mladeni Glavaš što je sa mnom vrijedno i marljivo provela sve eksperimente. Hvala za svu pomoć, preneseno znanje i ugodne trenutke koje smo provele u Laboratoriju za sintetsku organsku kemiju na Institutu Ruđer Bošković.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ireni Škorić na svim savjetima i na pomoći oko popunjavanja dokumentacije.

Zahvaljujem se mojoj obitelji i prijateljima što su me bodrili tijekom cijelog mog studiranja. Zahvaljujem mojoj seki Nikolini što me uvijek ohrabivala i gurala naprijed.

Posebnu zahvalu dugujem čovjeku koji sa mnom zadnjih 8 godina prolazi sve lijepe i manje lijepe trenutke. Veliko hvala mom dečku Saši što me uvijek podržavao u svemu i bezuvjetno vjerovao u mene.

Sažetak

U ovome radu provedena je sinteza dipeptida i tripeptida u otopini uz Boc-zaštitne skupine. Ciljne molekule su Boc-Arg(2Z)-Arg(2Z)-Tyr[*m*-CH₂N(CH₃)₂]-OBn (**1**) i BODIPY-Arg(2Z)-Arg(2Z)-OBn (**2**). Tripeptid **1** u svojoj strukturi sadrži fotokemijski reaktivni tirozin koji u fotokemijskoj reakciji generira kinon-metid, dok dipeptid **2** sadrži BODIPY fluorofor. Oba peptida sadrže diargininski fragment za koji se očekuje nekovalentno vezanje na polinukleotide. Nadalje, fotokemijskim pobuđivanjem spoja **1**, nekovalentno vezanog za polinukleotide, očekuje se da će se generirati kinon-metidi koji će alkilirati polinukleotide, dok je fluorofor u spoju **2** uveden kako bi se nekovalentno vezanje vizualiziralo i kako bi se priredili fluorescentni indikatori za polinukleotide. Uspješno su sintetizirani spojevi Boc-Tyr-OH (**4**, $\eta = 88\%$), Boc-Tyr-OBn (**5**, $\eta = 65\%$), Boc-Tyr[*m*-CH₂N(CH₃)₂]-OBn (**6**, $\eta = 69\%$), Boc-Arg(2Z)-OH (**9**, $\eta = 49\%$), Boc-Arg(2Z)-OMe (**11**, $\eta = 25\%$), Boc-Arg(2Z)-Arg(2Z)-OMe (**14**, $\eta = 66\%$), Boc-Arg(2Z)-ONHS (**16**, $\eta = 68\%$), Boc-Arg(2Z)-Arg(2Z)-OH (**15**, $\eta = 27\%$), Boc-Arg(2Z)-OBn (**18**, $\eta = 98\%$), Boc-Arg(2Z)-Arg(2Z)-OBn (**20**, $\eta = 58\%$), BODIPY-Arg(2Z)-Arg(2Z)-OBn (**2**, $\eta = 32\%$), dok je Boc-Arg(2Z)-Arg(2Z)-Tyr[*m*-CH₂N(CH₃)₂]-OBn (**1**, $\eta = 9\%$) dobiven u smjesi s drugim spojevima. Svi sintetizirani spojevi okarakterizirani su ¹H i ¹³C NMR spektroskopijom. Spoj **2** dodatno je okarakteriziran masenom spektrometrijom visoke rezolucije, FTIR-ATR-om i temperaturom tališta. U svrhu ispitivanja fotofizičkih svojstva, provedena su UV-Vis i fluorescencijska mjerenja. Za spoj **2** u acetonitrilnoj otopini određena je vrijednost molarnog apsorpcijskog koeficijenta ($\epsilon = 90500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pri 499 nm), kvantni prinos fluorescencije ($\Phi_F = 0,52$) i vrijeme života singletnog pobuđenog stanja ($\tau = 1,21 \text{ ns}$).

Ključne riječi: arginin, BODIPY, nekovalentno vezanje na polinukleotide, kinon-metidi, oligopeptidi

Abstract

This thesis features the synthesis of a dipeptide and a tripeptide in solution using the Boc-protecting group chemistry. The target molecules were Boc-Arg(2Z)-Arg(2Z)-Tyr[*m*-CH₂N(CH₃)₂]-OBn (**1**) and BODIPY-Arg(2Z)-Arg(2Z)-OBn (**2**). Tripeptide **1** contains a photochemically reactive modified tyrosine, which can generate quinone methide in the photochemical reaction, while dipeptide **2** contains a BODIPY fluorophore. Both peptides contain a diarginine fragment for which non-covalent bonding to polynucleotides is anticipated. Furthermore, upon the photochemical excitation of the compound **1** non-covalently bound to a polynucleotide, the generation of quinone methides is anticipated, leading to the alkylation of polynucleotides, whereas the fluorophore in compound **2** was introduced for the visualization of the non-covalent binding to develop fluorescent indicators for polynucleotides. We successfully synthesized Boc-Tyr-OH (**4**, $\eta = 88\%$), Boc-Tyr-OBn (**5**, $\eta = 65\%$), Boc-Tyr[*m*-CH₂N(CH₃)₂]-OBn (**6**, $\eta = 69\%$), Boc-Arg(2Z)-OH (**9**, $\eta = 49\%$), Boc-Arg(2Z)-OMe (**11**, $\eta = 25\%$), Boc-Arg(2Z)-Arg(2Z)-OMe (**14**, $\eta = 66\%$), Boc-Arg(2Z)-ONHS (**16**, $\eta = 68\%$), Boc-Arg(2Z)-Arg(2Z)-OH (**15**, $\eta = 27\%$), Boc-Arg(2Z)-OBn (**18**, $\eta = 98\%$), Boc-Arg(2Z)-Arg(2Z)-OBn (**20**, $\eta = 58\%$), BODIPY-Arg(2Z)-Arg(2Z)-OBn (**2**, $\eta = 32\%$), while Boc-Arg(2Z)-Arg(2Z)-Tyr[*m*-CH₂N(CH₃)₂]-OBn (**1**, $\eta = 9\%$) was obtained in a mixture with other compounds. All synthesized compounds were characterized by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. Additionally, compound **2** was characterized by high-resolution mass spectrometry, FTIR-ATR and melting point determination. To investigate photophysical properties, we conducted UV-Vis and fluorescence measurements. For compound **2** in acetonitrile solution, we determined the molar absorption coefficient ($\epsilon = 90500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 499 nm), fluorescence quantum yield ($\Phi_F = 0,52$) and lifetime of the singlet excited state ($\tau = 1,21 \text{ ns}$).

Keywords: arginine, BODIPY, non-covalent binding to polynucleotide, quinone methides, oligopeptides

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Cilj rada	3
2. TEORIJSKI DIO	5
2.1. Arginin, svojstva aminokiseline, arginin u lijekovima	6
2.2. Tripeptidi i tetrapeptidi s diargininom	9
2.2.1. Sinteza	9
2.2.2. Primjena arginina i diarginina u biomedicini	12
2.3. Nekovalentno vezanje molekula na polinukleotide	14
2.4. BODIPY, struktura, svojstva, spektralna i fotofizička svojstva	17
2.5. Kinon-metidi, svojstva, reaktivnost i priprava iz modificiranog tirozina	19
3. DISKUSIJA REZULTATA	22
3.1. Peptidna sinteza	23
3.1.1. Kondenzacijski reagensi	24
3.2. Sinteza Arg-Arg tripeptida	26
3.2.1. Priprava modificiranog tirozina	26
3.2.2. Priprava bisarginina	28
3.2.3. Pokušaji priprave Arg-Arg-Tyr[<i>m</i> -CH ₂ N(CH ₃) ₂]	37
3.2.4. Priprava BODIPY-Arg-Arg	39
3.3. Fotofizička svojstva BODIPY-Arg-Arg	43
4. EKSPERIMENTALNI DIO	45
4.1. Opće napomene	46
4.1.1. Temperatura taljenja	46
4.1.2. Masena spektrometrija	47
4.1.3. FTIR-ATR	47
4.2. Sinteze spojeva	48
4.3. UV-Vis i fluorescencijska spektroskopija	59
5. ZAKLJUČAK	61
6. LITERATURA	63
7. PRILOZI	76
7.1. Spektri NMR	77
7.2. UV-Vis i fluorescencijska spektroskopija	101
7.3. Spektri masa	104

7.4. FTIR-ATR spektr

107

8. ŽIVOTOPIS

108

1. UVOD

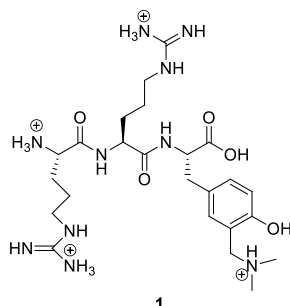
Peptidi su oligomeri ili polimeri aminokiselina, koje se međusobno povezuju peptidnom vezom¹. Danas je na tržištu više od 80 peptidnih lijekova, koji se koriste za liječenje niza bolesti kao što su: dijabetes, karcinom, osteoporoza, multipla skleroza, HIV². Najraniji peptidni terapeutik koji je pronašao svoju primjenu za liječenje šećerne bolesti bio je inzulin. Selektivnost i niska toksičnost, izdvajaju se kao glavne prednosti peptida, dok su nedostaci: niska oralna bioraspoloživost, slaba stabilnost u plazmi i kratko vrijeme zadržavanja^{3, 4} zbog podložnosti proteolizi, slaba apsorpcija, većinski hidrofilan karakter što otežava prolazak kroz biološku membranu te mogućnost različitih konformacija što smanjuje specifičnost za određenu biološku metu^{5, 6}.

Peptidomimetici oponašaju prirodne peptide, zadržavaju njihovo farmakološko djelovanje i sposobnost interakcije s biološkom metom⁷, a zaobilaze nedostatke⁸, imaju bolju metaboličku stabilnost i bioraspoloživost⁵. Peptidi su konformacijski fleksibilni, a razvojem sintetskih strategija moguće je kontrolirati njihove konformacije⁵, kako bi se održala sposobnost interakcije s biološkom metom, primjerice ciklizacijom ili uvođenjem neprirodnih aminokiselina^{7, 9}. Neprirodne aminokiseline koriste se i u svrhu sprječavanja enzimske razgradnje¹⁰⁻¹². Osim navedenih strukturnih modifikacija, one koje se još provode kako bi peptidi ostvarili terapijsko djelovanje su: amino-alkiliranje, supstitucija bočnog lanca, te zamjene atoma ili skupina unutar peptidne okosnice⁸. Strukturnim modifikacijama povećava se hidrolitička stabilnost peptida, što je ključno za primjenu u medicinskoj kemiji¹³. Također, peptidna okosnica koristi se za sintezu novih interkalatora i poli-intekalatora^{14, 15} ili molekula koje se vežu u utore DNA ili RNA¹⁶. Međutim, u peptidnu se okosnicu mogu ugraditi i fluorofori koji se koriste za praćenje staničnih organela, primjerice lizosoma ili za proučavanje interakcija s biomolekulama pri čemu se mijenja fluorescencija, vrijeme života te maksimumi apsorpcije ili ekscitacije¹⁷.

Oligopeptidi su peptidi koji u svojoj strukturi imaju od 2 – 20 aminokiselina, obavljaju razne biološke zadaće u isporuci lijekova, a mogu biti specifične mete ili penetrirati u stanicu¹⁸. Tek je malenom broju oligopeptida ispitano nekovalentno vezanje na DNA¹⁹, a mogućnost selektivnog prepoznavanja dušičnih baza u DNA pomoću oligopeptida omogućuje gensku transkripciju, koju reguliraju transkripcijski faktori, a njihov poremećaj dovodi do raznih bolesti²⁰. Molekulsko prepoznavanje nukleinskih kiselina važno je za gensku transkripciju i replikaciju, sintezu proteina te za staničnu diobu²¹.

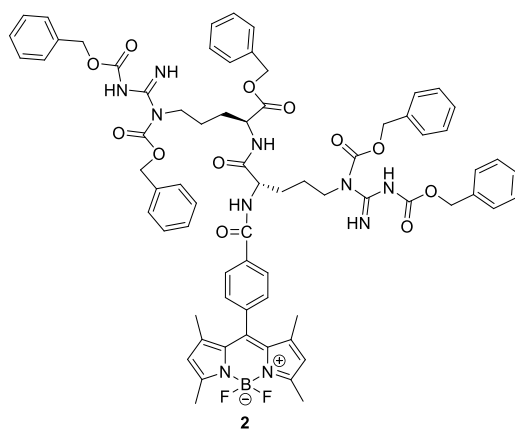
1.1. Cilj rada

Zadatak ovoga rada bila je priprava tripeptida **1** koji u svojoj strukturi sadrži arginine i fotokemijski reaktivan modificirani tirozin (Slika 1). U strukturu tirozina uvedena je *N,N*-dimetilaminometilenska skupina u *ortho*-položaju prema fenolnoj hidroksilnoj skupini. Za tako modificirani tirozin poznato je da podliježe fotokemijskoj reakciji deaminiranja pri čemu se generira kinon-metid²². Budući da kinon-metidi reagiraju s različitim biološkim metama uključujući i DNA²³, karakterizira ih antiproliferativno djelovanje²⁴. Modificirani tirozin moguće je ugraditi u oligopeptide koji potom postaju fotokemijski reaktivni²⁵. Hipoteza istraživanja je da će se fotokemijski reaktivni oligopeptid **1** nekovalentno vezati na polinukleotide. Pobuđivanjem elektromagnetskim zračenjem takvog kompleksa generirat će se kinon-metid, koji će alkilirati polinukleotide, te na taj način potencijalno voditi do biološkog učinka²⁶. Naime, poznato je da je križno spajanje molekula DNA i njihovo alkiliranje znatno učinkovitije ukoliko se prekursor kinon-metida nekovalentno veže na DNA^{27, 28}.



Slika 1. Ciljna molekula tripeptida **1**

Osim tripeptida s modificiranim tirozinom, ideja je bila sintetizirati i spoj koji će u svojoj strukturi sadržavati dipeptid arginil-arginin te BOPIDY fluorofor (Slika 2). Hipoteza istraživanja je da će se ova molekula zbog peptidnog dijela nekovalentno vezati za polinukleotide, a vizualizacija vezanja bit će omogućena pomoću BODIPY fluorofora.

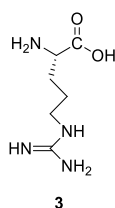


Slika 2. Ciljna molekula dipeptida **2** s BODIPY fluoroforom

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Arginin, svojstva aminokiseline, arginin u lijekovima

Arginin (Slika 3) je α -aminokiselina koja u svojoj strukturi sadržava gvanidinsku skupinu koja je jaka baza i jak nukleofil²⁹. Gvanidinska skupina je planarna, može tvoriti vodikove veze³⁰ koje doprinose termodinamičkoj stabilnosti proteina³¹. pK_a vrijednost određuje jakost kiselina ili baza. Osim za arginin, pK_a vrijednost može se promatrati za gvanidinsku skupinu arginina. pK_a gvanidinske skupine, izmjerene u vodi, iznosi 13,5, dok kada je dio aminokiseline arginina, pK_a je niži i u vodi iznosi 12,5^{32, 33}.

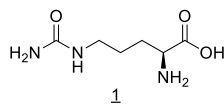


Slika 3. Struktura L-arginina

L-arginin obavlja važne funkcije u biokemiji organizma. Iako se radi o polu-esencijalnoj aminokiselini, ona je esencijalna pod određenim okolnostima tijekom rasta, trudnoće te nakon ozljeda. Sintetizira se u jetri tijekom ciklusa uree³⁴. L-arginin je supstrat za dušikovu oksidnu sintetazu (*engl. nitric oxide synthase* - NOS)³⁵, enzim koji povećava proizvodnju dušikovog (II) oksida i na taj način poboljšava zdravlje krvnih žila. Provedena su brojna istraživanja koja govore o utjecaju L-arginina na srčane bolesti, hiperkolesterolemiju, hipertenziju, dijabetes te okulzivnu bolest perifernih arterija³⁶. L-arginin sudjeluje u metaboličkim putevima ornitina, prolina, poliamina te neurotransmitera agmatina³⁵. Metiliranje i demetiliranje arginina odvija se uz određene enzime, a metiliranje arginina na ostatku 3 histona H4 (H4-R3) i arginina 17 na histonu H3 (H3-R17) dokazano potiče ekspresiju gena^{37, 38}. Arginin s koaktivatorom metiltransferazom-1 (CARM1) i histonom H3-R17 ima važnu ulogu kod upalnih bolesti jer zajedno reguliraju upalne gene u monocitima^{39, 40}.

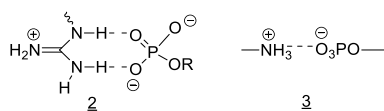
Američka agencija za hranu i lijekove (*engl. The United States Food and Drug Administration* - FDA) uvrstila je arginin u ispitivanje hormona rasta te se koristi prilikom dijagnosticiranja deficita ovog hormona u ljudskom organizmu³⁵. Nerijetko se ova aminokiselina prodaje kao dijetni dodatak prehrani, a dnevna preporučena doza je 4,4 g po danu³⁵, dok Svjetska zdravstvena organizacija (*engl. World Health Organization* - WHO) preporučuje dnevni unos arginina od 115 mg/kg tjelesne težine⁴¹. Sportaši, među kojima i bodybuilderi upotrebljavaju arginin i citrulin 1 (Slika 4) kao suplemente koji im osiguravaju

vazodilataciju povećanjem proizvodnje dušikovog (II) oksida⁴². Metabolički putevi arginina i citrulina međusobno su povezani s efektom pumpanja mišića (*engl. muscle pump*) prilikom čega dolazi do povećanja transporta kisika u aktiviranim mišićima, a preporučuju se za aerobne i anaerobne sportske discipline. U aerobnim disciplinama preporučuje se 1,5 – 2,0 g arginina dnevno, dok je preporučena doza za anaerobne discipline 10 – 12 g⁴³.



Slika 4. Struktura L-citrulina

Oligopeptidi su u biološkom mediju često u zwitterionskom obliku i teško prolaze kroz nepolarne stanične membrane⁴⁴. Ipak, određeni oligopeptidi kao što su stanični penetrirajući peptidi mogu savladati tu barijeru, primjerice endocitozom¹⁸. Pojmovi proteinska transdukcijska domena (*engl. protein transduction domain – PTD*) i stanični penetrirajući peptidi (*engl. cell penetrating peptides - CPP*), odnose se na male kationske peptide (< 20 aminokiselina), koji mogu prijeći plazmatsku membranu sisavaca⁴⁵. Važnost peptida u dostavi lijekova leži upravo u njihovoj mogućnosti prenošenja velikih bioloških aktivnih molekula, kao što su proteini i oligonukleotidi. Jedni od najčešće korištenih PTD-ova su i poliarginini⁴⁶. Potvrđeno je da kratki oligomeri arginina lako prelaze biološke barijere, u čemu im pomažu inverzne micelle, koje olakšavaju njihov prijelaz kroz membranu. Takav nespontani prijelaz, ovisi o energiji i receptorima koji prenose peptide za dostavu lijekova⁴⁷. PTD-ovi su otkriveni istraživanjem ulaska HIV virusa tipa 1 u stanicu⁴⁵. TAT protein HIV-a je kodirani protein, aktivira transkripciju u jezgri HIV-a, a u svojoj strukturi sadrži arginine⁴⁷. Iz toga razloga sintetizirani su strukturni analozi TAT49-57 proteina. Oligomeri arginina koji sadrže šest ili više L- ili D-arginina pokazali su se puno učinkovitijima od oligomera sastavljenih od lizina, ornitina i histidina, dok manje od šest nije učinkovito⁴⁸. Vodeću funkciju u ostvarivanju prijelaza kroz staničnu membranu ima gvanidinska skupina jer je njen pK_a 12,48, (u strukturi arginina) viši od pK_a amino-skupine lizina, ($pK_a = 10,79$)⁴⁷. Također, arginin je učinkovitiji od lizina prilikom kondenzacije DNA i transporta kroz staničnu membranu jer gvanidinska skupina tvori bidentatne vodikove veze s anionskim skupinama u DNA i na staničnoj membrani, dok lizin tvori samo nespecifične elektrostatske interakcije (Slika 5)⁴⁹.

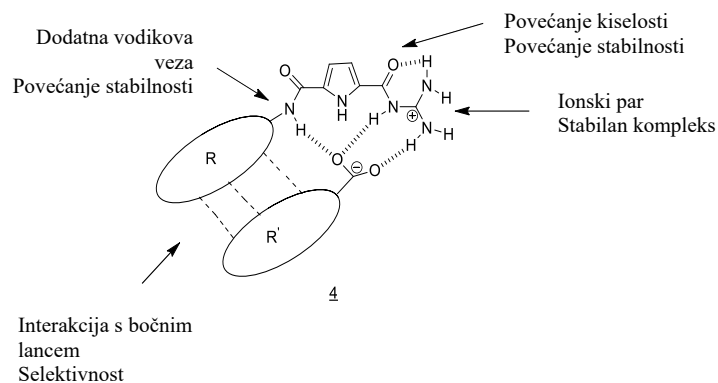


Slika 5. Specifične interakcije s DNA/staničnom membranom i 2 (gvanidnskom skupinom arginina) ili 3 (amino-skupinom lizina)⁴⁹

CPP-ovi koji su bogati argininima koriste se kao vektori za dostavu gena. Ipak, da bi transfekcija bila učinkovita, provodi se optimizacija te se uvodi hidrofobni dio, odnosno lipofilni supstituent na peptidu. Dobiveni peptid s amfifilnim karakterom¹⁹, s lakoćom prelazi staničnu membranu i veže se na DNA specifičnim interakcijama⁴⁹. Kako bi se CPP-ovi koji su bogati argininima mogli koristiti za dostavu gena potrebno je minimalno šest⁵⁰ ili više pozitivnih naboja za efektivno djelovanje^{51, 52}. Polikationi kao što su CPP ili poliamidoamin dendrimeri (PAMAM) kondenziraju DNA u molekularne komplekse lipoplekse i poliplekse. Lipopleksi i polipleksi su kationski agregati koji su u interakciji s negativno nabijenom staničnom membranom⁵³. Lipidni dijelovi lipopleksa oslobađaju DNA u citoplazmu destabilizirajući endosomalnu membranu¹⁹.

Pozitivan naboj arginina glavni je razlog zašto se arginin koristi kao gradivni blok u CPP-ovima. Pojam argininska „magija“ opisuje sposobnost pozitivno nabijenih peptida koji su bogati argininima da jednostavno penetriraju kroz stanične membrane, a povezana je s gvanidinskim kationom (Gdm^+) čija pK_a vrijednost u vodi iznosi 13,6 što ga čini potpuno protoniranim u biološkim medijima⁵⁴. Kako bi arginin u vodenom mediju prošao kroz lipidni dvosloj potrebna je energija od oko 70 kJ/mol⁵⁵. Gdm^+ ostvaruje vodikovu vezu u snažnoj međumolekularnoj interakciji s vodom⁵⁶, te ima sposobnost stvaranja ionskih parova u vodi unatoč elektrostatskom odbijanju⁵⁷. Gvanidinijeve soli koriste se kao denaturatori proteina⁵⁸.

Gvanidinske skupine pojavljuju se u aktivnim mjestima enzima⁵⁹, stoga su razvijeni umjetni receptori koji sadrže gvanidinski kostur, a vežu se na oksoanione, primjerice karboksilate preko vodikovih veza ili ionskih interakcija^{60, 61}. Strukturni analog gvanidinskog motiva je gvanidinokarbonil-pirolski motiv 4 (*engl. guanidiniocarbonyl pyrrole* - GCP) (Slika 6). Peptidi i molekule koje sadrže GCP imaju primjenu u biokemiji jer pokazuju izvrsna genska transfekcijska svojstva te u supramolekularnoj kemiji zbog sposobnosti nastajanje samoorganizirajućih struktura i zbog mogućnosti nekovalentnog vezanja na DNA/RNA⁶².



Slika 6. GCP kation i vezanje na karboksilat vodikovim vezama i ionskim interakcijama⁶²

2.2. Tripeptidi i tetrapeptidi s diargininom

Diarginin vrlo je zastupljen fragment koji se pojavljuje u oligopeptidima^{49, 63, 64}. Naredna poglavlja sadržavaju opisanu sintezu diarginina i primjenu diarginina i arginina.

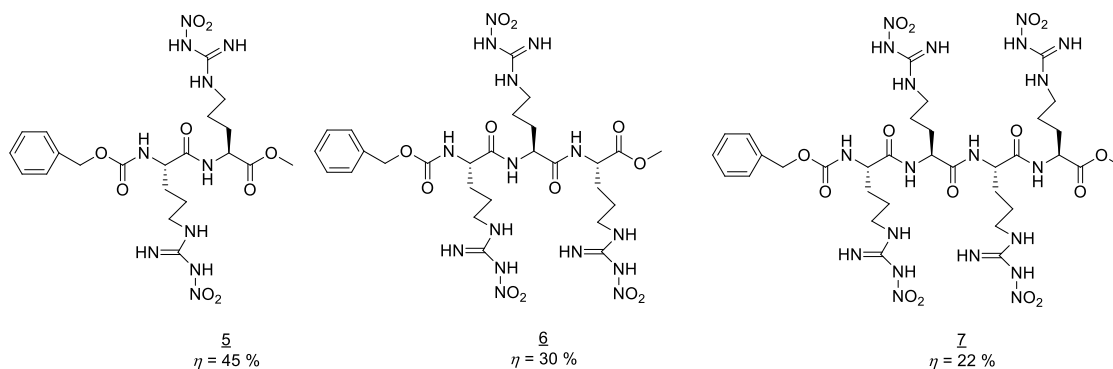
2.2.1. Sinteza

Za sintezu Arg-Arg fragmenta i njegovu ugradnju u peptide koriste se dvije metode: sinteza peptida u otopini i sinteza peptida na krutom nosaču (*engl. solid-phase synthesis*)⁶⁵.

Sinteza Arg-Arg u vodenoj otopini, može se provesti uz katalizator tripsin, što su opisali znanstvenici Aso, K. i suradnici⁶⁶. Reakcijska smjesa sadržavala je različite koncentracije L-arginin-etil-estera (Arg-OEt) i tripsina u karbonatnom puferu, a najveće iskorištenje $\eta = 40\%$, ostvareno je pri pH = 10. Pretpostavljeno je da prilikom hidrolize Arg-OEt nastaje acil-enzimski međuprodukt, stoga će aminolizom intermedijera tijekom nukleofilnog napada doći do oligomerizacije⁶⁶.

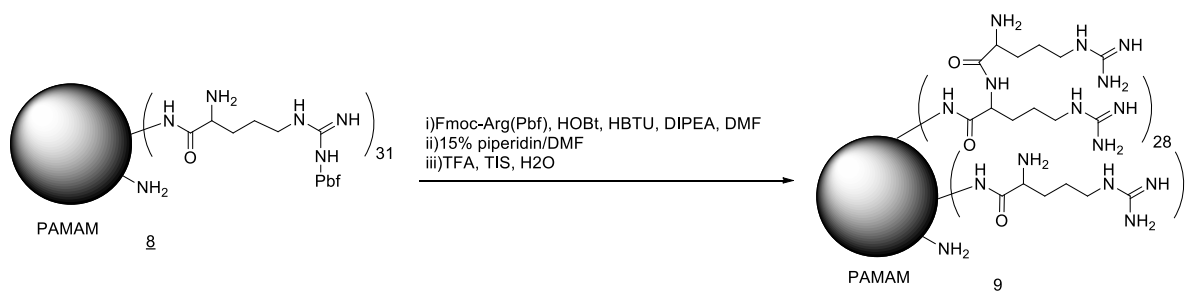
Znanstvenik Ito, H. je sa suradnicima proveo sintezu oligopeptida u otopini, a dobiveni produkti su: di-, tri- i tetra-arginini⁶³. Prekursor u ovim reakcijama bio je karbobenzoksi-nitro-L-arginin, a reakcija je provedena uz anhidrid i dicikloheksil-karbodiimid (DCC). Anhidrid koji je korišten u ovome radu pripremljen je iz karbobenzoksi-nitro-L-arginina i etil-kloroformata uz tributilamin u suhom tetrahidrofranu (THF). Dobiveni su produkti 5 ($\eta = 45\%$), 6 ($\eta = 30\%$) i 7 ($\eta = 22\%$) (Slika 7)⁶³. Danas je upotreba DCC kao kondenzacijskog reagensa u peptidnoj sintezi, znatno smanjena zbog generiranja *N,N*-dialkiluree, koja zaostaje

u reakcijskoj smjesi. Iako se dio uree može ukloniti filtracijom, njena topljivost u vodi, acetonu i heksanu dodatno otežava pročišćavanje. Naročiti problemi nastaju ako se DCC koristi kod Boc-kemije jer se Boc-zaštitna skupina uklanja uz trifluoroctenu kiselinu (TFA) u diklormetanu (DCM) u kojima je urea topljiva⁶⁷.



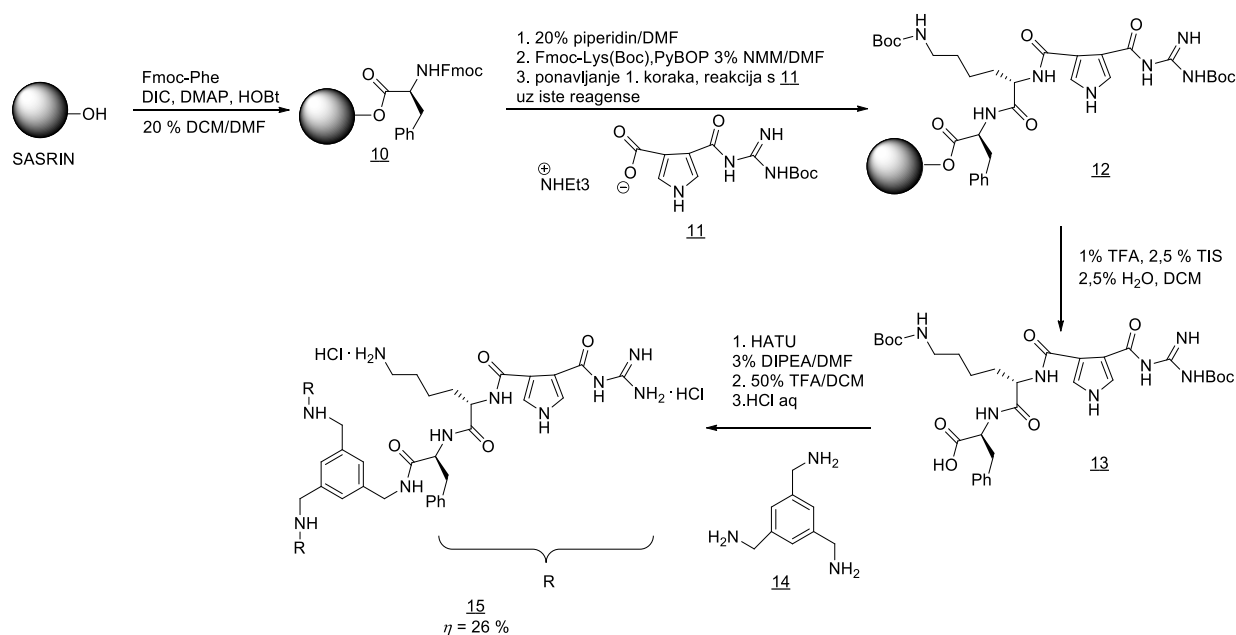
Slika 7. Strukture spojeva 5, 6 i 7

Kako bi se proučio odnos strukture i aktivnosti u sustavu za dostavu gena, znanstvenik Kim, T. i suradnici sintetizirali su konjugate mono- i diarginina poli-amidoaminskog (PAMAM) dendrimera s etilendiaminskom jezgrom⁶⁴. Dendrimeri imaju posebno dizajniranu strukturu, a moguće je kontrolirati njihovu veličinu, oblik, duljinu ili gustoću grananja, stoga se primjenjuju u biomedicini⁶⁸. S ciljem sinteze spoja 9 (Shema 1), provedena je reakcija u tri sintetska koraka. U prvom koraku spoj 8, reagira s *N* α -9-fluorenilmetoksikarbonil-*N* ω -(2,2,4,6,7-pentametildihydrobenzofuran-5-sulfonil)-L-argininom (Fmoc-Arg(Pbf)), hidroksibenzotriazolom (HOBt), heksafluorofosfat-benzotriazol-tetrametil-uronijem (HBTU), *N,N*-diizopropiletilaminom (DIPEA) u dimetilformamidu (DMF). U drugom koraku uklonjena je Fmoc zaštitna skupina upotrebom piperidina, dok je u trećem koraku uklonjena Pbf skupina upotrebom trifluoroctene kiseline (TFA), triizopropilsilana (TIS) i vode. Struktura je potvrđena ¹H NMR spektroskopijom. Utvrđeno je da se citotoksičnost smanjuje s povećanjem argininskih konjugata⁶⁴.



Shema 1. Sinteza spoja 9⁶⁴

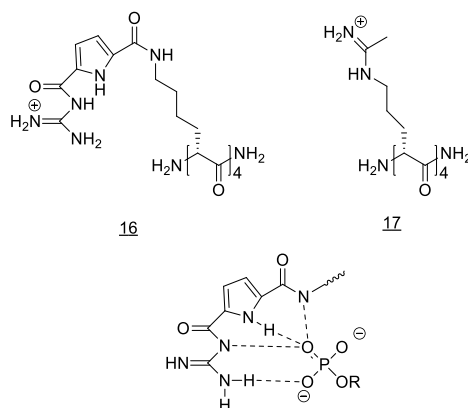
Schmuck, C. i suradnici su u sintezi peptidnog liganda s visokim afinitetom vezanja na DNA 15 koristili peptidnu sintezu na krutom nosaču i sintezu u otopini⁵³. Prvo je provedena peptidna sinteza na krutom nosaču uz Fmoc-zaštitnu skupinu na SASRIN smoli (*engl. Super Acid Sensitive ResIN*), koja omogućuje pročišćavanje produkta bez uklanjanja zaštitnih skupina (Shema 2). Aminokiselina Fmoc-Phe 10 vezana je za smolu uz dodatak *N,N*-diizopropilkarbodiimida (DIC), hidroksibenzotriazola (HOBt), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) u DCM-u i DMF-u. U sljedećem stupnju provedena je peptidna kondenzacija između spoja 10 i *N*-Boc-guanidinokarbonil-pirola 11, uz benzotriazol-1-iloksitripirolidinofosfonijev heksafluorofosfat (PyBOP) kao kondenzacijski reagens te je dobiven spoj 12. Za izolaciju produkta, smoli su dodani reagensi TFA/DCM, triizopropilsilan (TIS) i voda. Nakon sinteze spoja 13, uslijedila je peptidna sinteza u otopini između spoja 13 i 14 uz 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3,-triazolo[4,5-*b*]piridinij-3-oksidi heksafluorofosfat (HATU) kao kondenzacijski reagens. Spoj 15, izoliran u iskorištenju od $\eta = 26\%$, ima tendenciju vezanja na nukleinske kiseline, primjerice plazmidnu DNA, stoga ima potencijalno terapijsko djelovanje kao nevirusni transfekcijski vektor u genskoj terapiji⁵³.



Shema 2. Sinteza peptidnog liganda 15⁵³

Peptidnu sintezu na krutom nosaču koristeći Fmoc-zaštitnu skupinu, proveo je znanstvenik Li, M. sa suradnicima, te je sintetizirao dva oligopeptida 16 i 17 s argininima (Slika 8) s ciljem proučavanja transfekcije⁴⁹. Oligopeptid 16 sadrži gvanidinokarbonilpirolski motiv umjesto gvanidinske skupine kako bi se ostvarilo bolje vezanje na DNA i staničnu membranu,

ostvarujući veći broj vodikovih veza nego s gvanidinskom skupinom. Niska citotoksičnost čini ga učinkovitim kandidatom za dostavu gena⁴⁹.

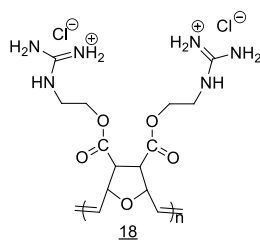


Slika 8. Struktura oligopeptida 16 i 17 (gore); specifične interakcije spoja 16 s fosfatnom skupinom na DNA ili staničnoj membrani (dolje)⁴⁹

2.2.2. Primjena arginina i diarginina u biomedicini

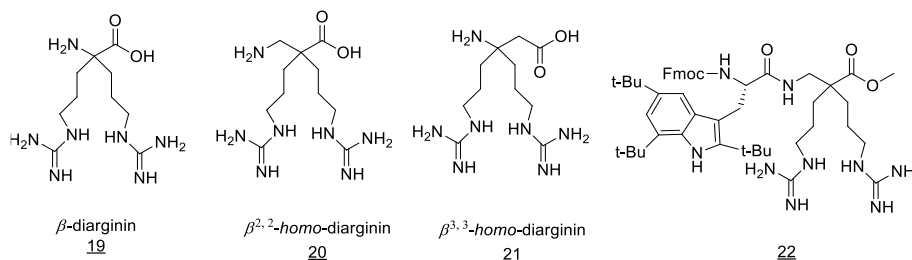
Arginin je neophodan prekursor u biosintezi proteina i važnih bioloških molekula ornitina, prolina, poliamina, kreatina i agmatina⁴¹. Poboljšava funkciju endotelnih stanica, koje kontroliraju vaskularni tonus te inhibiraju agregaciju trombocita⁶⁹. Iz toga se razloga upotrebljava za regulaciju krvnog tlaka, za liječenje erektilne disfunkcije, te za liječenje i suzbijanje preeksklamije, rizičnog stanja u trudnoći praćenog visokim krvnim tlakom i proteinima u urinu⁷⁰⁻⁷². Diarginin se zbog biološke aktivnosti nalazi u farmaceuticima pa tako ukrajinska farmaceutska kompanija Zdorovya proizvodi lijek Kardioarginin koji sadrži arginil-asparginat i diarginil-sukcinat, a koriste se za liječenje bolesti kardiovaskularnog sustava⁴¹.

Prirodni spojevi stoljećima su inspiracija za nove spojeve, čijim se dizajniranjem dobivaju bolja svojstva. Spojevi koji imitiraju prirodne spojeve nazivaju se biomimeticima, a oni koji oponašaju strukturu peptida peptidomimeticima. Biomimetik 18 (Slika 9) u strukturi sadrži ROMP (*engl. Ring-Opening Metathesis Polymerization*) polimer supstituiran s lancima koji su mimetici arginina. Spoj 18 oponaša smrt T-stanica sisavaca⁷³, koje sudjeluju u imunološkom odgovoru⁷⁴.



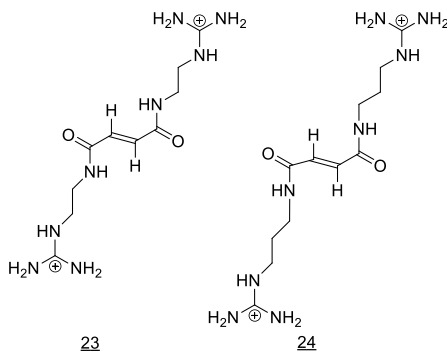
Slika 9. Struktura biomimetika 18⁷³

Znanstvenici Boulet, H. i suradnici istraživali su antimikrobne peptide (*engl. antimicrobial peptides* -AMP) kao potencijalne terapeutike⁷⁵. U usporedbi s klasičnim antibioticima AMP imaju širi spektar djelovanja. Upotrebljeni su β -diarginini 19, 20, 21 (Slika 10), za dizajn malih dipeptida aktivnih protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. *In vivo* ispitivanja na miševima oboljelima od sepse pokazala su da su sintetizirani AMP-ovi efektivni u liječenju sepse, naročito 22⁷⁵.



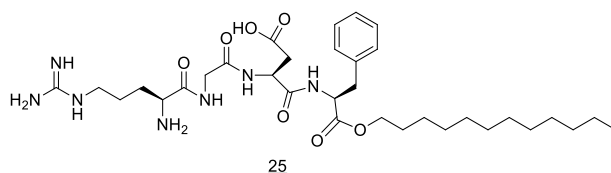
Slika 10. Disupstirani analozi arginina⁷⁵

Arginin (Arg¹³ i Arg¹⁴) se nalazi u strukturi peptida apamina, koji sadrži 18 aminokiselina⁷⁶. Bitna uloga apamina je blokiranje Ca²⁺ i K⁺ kanala, stoga su sintetizirani derivati diguanidina (Slika 11) kako bi se ispitala njihova farmakološka svojstva. Međutim, iako je pretpostavljeno da je Arg-Arg važan fragment, diguanidinski derivati 23 i 24 pokazali su slabu aktivnost⁷⁶.



Slika 11. Struktura spojeva 23 i 24⁷⁶

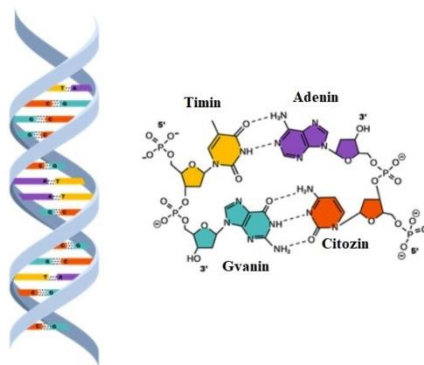
Arginin s ostalim aminokiselinama čini medicinski korisne peptide. Du, H. je sa svojim suradnicima dizajnirao tetrapeptid arginil-glicil-aspartatil-fenilalanin (RGDF) koji ima funkciju izravnog praćenja liposomalnog doksorubicina na tumorske stanice⁷⁷. Ovaj tetrapeptid inhibira adheziju i angiogenezu tumorskih stanica. Depsid 25 sintetiziran je s alkoholnim lancima različitih duljina (C8, C12 i C16), kako bi se postigla amfifilnost (Slika 12)⁷⁷.



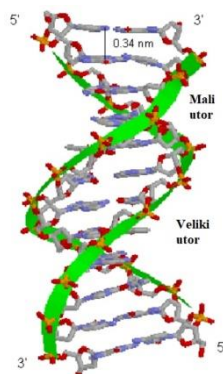
Slika 12. Struktura depsida 25⁷⁷

2.3. Nekovalentno vezanje molekula na polinukleotide

Biološki procesi, poput sinteze proteina, genske transkripcije i replikacije te staničnog dijeljenja, temelje se na nekovalentnom vezanju molekula na DNA ili RNA⁷⁸. Mehanizam djelovanja pojedinih lijekova (malih molekula) također se povezuje s nekovalentnim vezanjem na polinukleotide^{79, 80}. James D. Watson i Francis C. Crick su opisali molekulsku strukturu DNA, izgrađenu od dva polinukleotidna lanca koja su međusobno povezana vodikovim vezama, a nukleotidi su povezani fosfodieterskom vezom. Lanci su antiparalelni, jedan je usmjeren 3' → 5' slijeva udesno, a drugi 3' → 5' zdesna ulijevo (Slika 13). Dva komplementarna lanca DNA savijaju se u dvostruku zavojnicu oko iste osi, zavojnica je promjera 20 Å, a jedan zavoj sadržava 10 parova baza i ima duljinu od 34 Å. Dušične baze koje pronalazimo u DNA su purinske: adenin i gvanin ili pirimidinske baze: citozin i timin⁸¹. Adenin i timin međusobno se povezuju s dvije vodikove veze, dok se gvanin i citozin povezuju s tri vodikove veze⁸². Dvostruka zavojnica DNA pojavljuje se u nekoliko konformacija, na primjer A, B, Z, a svakoj razlikujemo veliki i mali utor¹⁶ (Slika 14)⁸³.



Slika 13. Vodikove veze u molekuli DNA⁸²



Slika 14. Veliki i mali utor u dvostrukoj zavojnici DNA⁸³

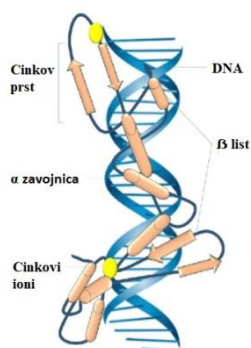
Veliki i mali utor DNA međusobno se razlikuju u elektrostatskom potencijalu, mogućnostima hidratacije i stvaranja vodikovih veza te steričkim karakteristikama, što utječe na mogućnost vezanja različitih molekula. U veliki se utor često vežu velike molekule poput proteina ili oligonukleotida, dok se u mali utor vežu molekule s izduženom strukturom, zbog njegovog izduženog oblika^{79, 84}. Molekule se na DNA vežu na tri načina: nespecifičnim elektrostatskim interakcijama s fosfatnom skupinom, vezanjem u utor (*engl. groove binding*) ili interkaliranjem⁷⁹. Nekovalentne veze koje sudjeluju u vezanju su: hidrofobne, π - π interakcije, van der Waalove^{85, 86}, vodikove veze⁸⁷ i elektrostatske. Molekule koje se vežu u mali utor DNA, često ne izazivaju znatne konformacijske promjene DNA, ali obično pokazuju visoku specifičnost. Interkalatori su molekule planarne aromatske, često heterocikličke strukture koje se umeću između parova baza. U većini slučajeva to su pozitivno nabijene molekule, a nerijetko pokazuju nisku specifičnost^{79, 88}. Većina tipičnih interkalatora ima 3 ili 4 planarne aromatske kondenzirane jezgre. Interkalatori pokazuju veliki afinitet prema G-C području, a za njih je važan princip „isključenja susjeda“ što znači da se sljedeća molekula ne može vezati između susjednih parova baza^{88, 89}. Vezanjem na DNA interkalatori uzrokuju strukturne promjene kao što su izvijanje i produljenje zavojnice, što narušava funkciju raznih proteina

uključenih u DNA i RNA sintezu⁹⁰. Ovisno o broju cikličkih podjedinica razlikujemo: mono-, bis- i tris-funkcionalne interkalatore. Interkalatori s pozitivnim nabojem, točnije kationski interkalatori bolje se vežu na negativno nabijenu DNA^{88,91}.

Interkalatori ne prelaze lako stanične membrane, stoga peptidni fragmenti služe kao posrednici za ulazak u stanicu, s poznatim mehanizmom djelovanja¹⁶. Primjer peptidnog interkalatora koji u svojoj strukturi sadrži arginine je D-oktaarginin-rodij. Interkalator se nekovalentno veže na DNA, a fotoaktivacijom selektivno cijepa lance DNA na mjestu oštećenja gdje baze nisu sparene. Oligoarginini povećavaju afinitet nespecifičnog vezanja peptida za DNA⁹².

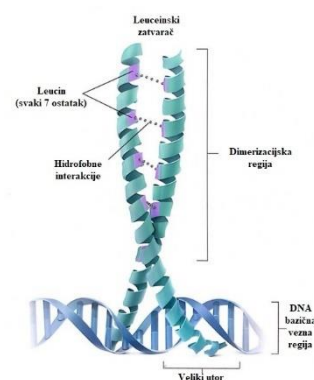
Nekovalentno vezanje peptida i proteina na DNA ili RNA važan je proces kojim se onemogućava DNA transkripcija i replikacija⁹³. Ovaj proces omogućuje brojne primjene u medicini, biologiji i biokemiji. Među brojnim primjerima za vezanje DNA i peptida te peptida i proteina ističu se, cinkov prst⁹⁴, leucinski zatvarač²⁵ i slani mostovi. U proteinima se javljaju elektrostatske interakcije, koje se nazivaju slani mostovi (*engl. salt bridges*). Ove specifične interakcije osiguravaju stabilnost, fleksibilnost, te savijanje proteina. Prisutne su u argininu, a njegova gvanidinska skupina ima funkciju povezivanja⁹⁵.

Pojam cinkov prst (*engl. zinc finger*) odnosi se na proteinski strukturni motiv, odnosno supersekundarnu strukturu koje se povezuju s cinkovim ionima⁹⁶. Kao rezultat povezivanja nastaju strukture koje oblikom podsjećaju na prst. Ovakva trodimenzionalna struktura građena je od dva β lista i α zavojnice i mali je dio velike strukturne domene DNA-protein (Slika 15)⁹⁷. Na ovakav način povezuju se aminokiseline cistein i histidin. Glavna uloga cinkovog prsta je DNA vezanje s transkripcijskim faktorima, kako bi se stabilizirala proteinska domena⁹⁸.



Slika 15. Cinkov prst⁹⁷

Leucinski zatvarač (*engl. leucin zipper* ili *leucin scissors*) je proteinska domena koja nastaje dimerizacijom dviju monomernih desnozakrećućih α zavojnica⁹⁹. Dimerizacija se odvija na C-terminalnom kraju, na kojem se nalaze hidrofobne aminokiseline kao što je leucin. Leucin se pojavljuje na svakom sedmom ostatku. Dolazi do interakcije između hidrofobne aminokiseline i monomera te nastaje leucinski zatvarač. N-terminalni kraj sadrži bazične aminokiseline koji imaju pozitivan naboj te dolazi do interakcije s DNA koja je negativno nabijena jer sadrži fosfate (Slika 16)¹⁰⁰. Ova trodimenzionalna struktura usko je povezana s transkripcijskim faktorima koji omogućuju normalno odvijanje transkripcije, a njihovom disfunkcijom dolazi do mutacija. Ona prepoznaje kratke ponavljajuće sekvence¹⁰¹, veže se u veliki utor DNA te tvori više vodikovih veza i van der Waalovih interakcija s nukleotidnim bazama¹⁰².

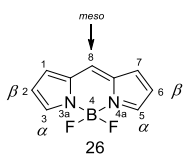


Slika 16. Leucinski zatvarač¹⁰⁰

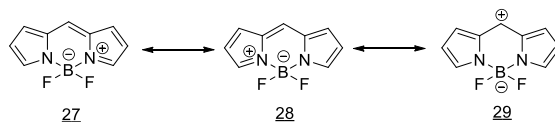
Posebna se pažnja posvećuje proteinima koji selektivno prepoznaju DNA, kao i vezanju DNA i oligopeptida potaknuto svjetlom¹⁰³. Vezanje peptidnih jedinica funkcionalizira se fluoroforima koji pružaju jednostavne metode za označavanje i vizualizaciju DNA^{104, 105}.

2.4. BODIPY, struktura, svojstva, spektralna i fotofizička svojstva

Derivati 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena, poznatiji pod trgovačkim imenom BODIPY 26 (Slika 17), sintetizirali su 1968. godine Treibs i Kreuzer¹⁰⁶. Ovi spojevi plijene pažnju zbog svojih izuzetnih spektroskopskih i fotofizičkih svojstava¹⁰⁶, a to je ujedno i razlog njihove široke primjene. Položaj 8 se često u literaturi naziva *meso-*, a na tom položaju su česti supstituenti, iako funkcionalizaciju nije lako provesti, dok položaji 3, 5 označavaju α položaj, a položaji 2, 6 nazivaju se β položajem. BODIPY ima više rezonantnih struktura^{106, 107}, a u ovome radu prikazane su tri 27, 28 i 29 (Slika 18).



Slika 17. Struktura BODIPY-a, numerirani položaji prema IUPAC-u¹⁰⁶



Slika 18. Rezonantne strukture BODIPY-ja^{106, 107}

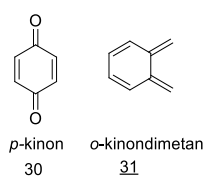
BODIPY se ističu svojim dobrim spektralnim i fotofizikalnim svojstvima. Imaju visok molarni apsorpcijski koeficijent ϵ (od $43000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ do $180000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)¹⁰⁸, visoki kvantni prinos fluorescencije Φ_F , uske emisijske vrpce s visokim intenzitetom pikova, uglavnom ne stvaraju agregate u otopini, a neki derivati topljivi su u vodi što omogućuje primjenu u biološkim sustavima¹⁰⁹. Valne duljine emisije i ekscitacije su u vidljivom području $\geq 500 \text{ nm}$. Prijelaz iz osnovnog u prvo pobuđeno stanje $S_0 \rightarrow S_1$ odgovara prijelazu od 450 nm do 530 nm . Prijelaz od 350 nm do 450 nm odgovara pobuđivanju $S_0 \rightarrow S_2$, a apsorpcijske vrpce u ovom području su široke i niskog intenziteta. Stokesovi pomaci su mali, najčešće reda veličine nekoliko stotina cm^{-1} , vrijeme života pobuđenog stanja, τ je u nanosekundama, a molekula BODIPY-ja je nepolarna^{106, 107, 110}.

BODIPY spojevi imaju raznoliku primjenu. Budući da su često dobri fluorofori, koriste se u funkcionalnim materijalima, primjerice fotonskim organskim materijalima (*engl. photonic organic based materials*)^{111, 112}. Koriste se kao fluorescentni indikatori za metalne katione, anione, reaktivne kisikove vrste, promjene u viskoznosti¹¹¹, biomolekule, te reaktivne dušikove vrste¹⁰⁶. Pronašli su primjenu kao pH indikatori¹⁰⁶ i organski fotokatalizatori zbog sposobnosti prijenosa elektrona i energije¹¹³. Senzori koji svoje djelovanje temelje na nekovalentnom vezanju, a u svojoj strukturi sadržavaju BODIPY i porfirin, koriste se u svrhu prepoznavanja aminokiselina i njihovih derivata¹¹⁴. BODIPY se upotrebljavaju u fluorescentnom oslikavanju u biologiji (*engl. fluorescence bioimaging technique*). Tako se na primjer koristeći BODIPY fluorofore, može pratiti put molekule u organizmu npr. lijeka¹¹⁴.

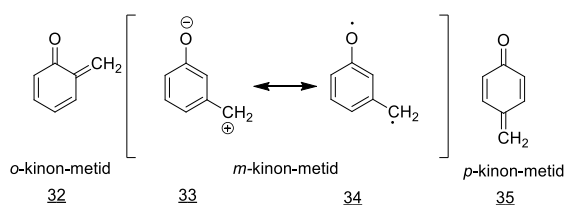
2.5. Kinon-metidi, svojstva, reaktivnost i priprava iz modificiranog tirozina

Kinon-metidi (*engl. quinone methides* - QM) važni su intermedijeri u kemiji i biokemiji fenola, a odlikuje ih široka biološka aktivnost²³. Na primjer, djelovanje nekih antitumorskih antibiotika kao što su antraciklini i mitomicin, temelji se na unutarstaničnom metaboličkom nastajanju QM koji alkiliraju DNA^{115, 116}. Derivati QM javljaju se i kao intermedijeri u biotransformaciji lignina¹¹⁷, a nalaze se i u mehanizmu transformacije vitamina E i K^{118, 119}.

Struktura kinon-metida slična je kinonima 30 ili kinondimetanima 31 (Slika 19). QM građeni su od cikloheksadienskog skeleta koji je supstituiran s karbonilnom i metilenskom skupinom, koje su međusobno konjugirane. Najčešće su *ortho* 32 ili *para* 35 supstituirani, iako je moguća i *meta* supstitucija 33 i 34, koja se u literaturi predočava kao rezonancijski hibrid zwitteriona i biradikala (Slika 20)²³.



Slika 19. Struktura *p*-kinona i *o*-kinondimetana



Slika 20. Struktura kinon-metida

Zbog njihovog zwitterionskog karaktera, QM su vrlo reaktivni, jako polarizirani te reagiraju s nukleofilima²² ili elektrofilima¹²⁰. S nukleofilima reagiraju na metilenskom položaju, te se u tome slučaju odvija Michaelova adicija. Najčešći nukleofili su voda ili u biološkim sustavu tioli i amino-skupine peptida i nukleozida²³.

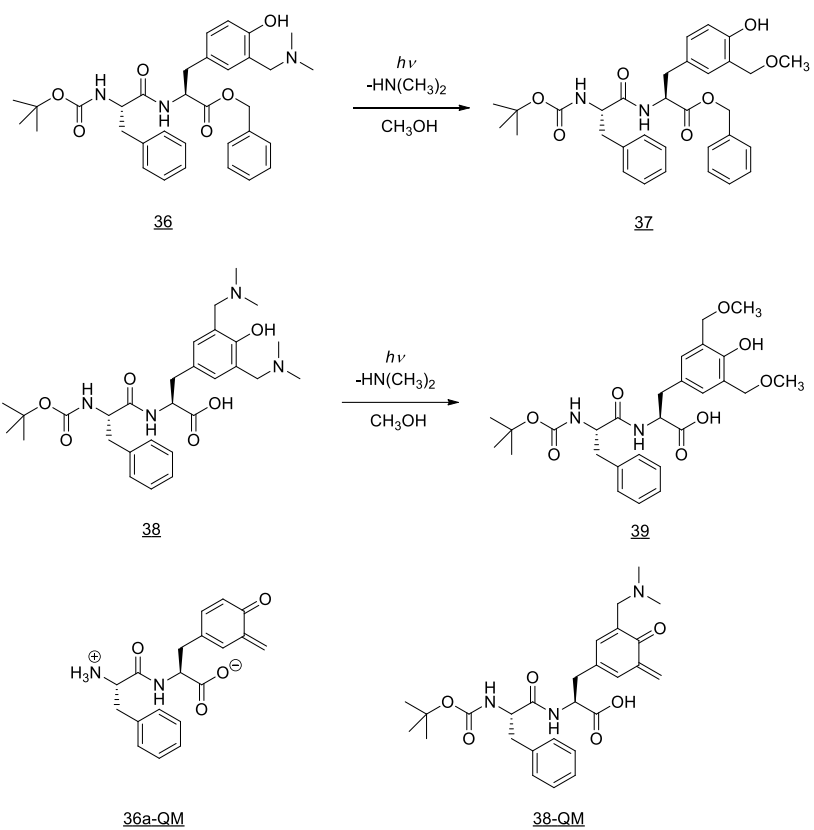
Glavno obilježje QM je njihovo kratko vrijeme života, koje traje od nekoliko minuta do < 1 ns, te se iz toga razloga ne mogu pohraniti, već se moraju pripravljati *in-situ*. Sintaza se bazira

na termičkim reakcijama kao što su: oksidacija fenola¹²¹, dehidracija iz hidroksibenzilnog alkohola¹²², eliminacija nitrila iz 1,2-benzoksazina¹²³ te desilacija izazvana fluorom¹²⁴.

Također, QM moguće je pripremiti i fotokemijskim reakcijama²⁵. Najčešće metode pripreme su dehidracija iz hidroksimetilnog supstituiranog fenola¹²⁵ i deaminiranje aminometila¹²⁶ ili amonijmetilfenola¹²⁷. QM u fotokemijskim reakcijama mogu se okarakterizirati laserskom pulsnom fotolizom. Prekursori QM u svojoj strukturi moraju sadržavati kromoforne skupine koje apsorbiraju iznad 350 nm, kako ne bi došlo do interferencije s uobičajenim intracelularnim kromoforima aminokiselina i nukleozida u DNA i RNA²³.

Potvrđeno je da kinon-metidi reagiraju s aminokiselinama i proteinima, naročito cisteinskim SH skupinama¹²⁸. Njihova primjena u biološkim sustavima temelji se i na reaktivnosti sa serinom koji uzrokuje enzimatsku inhibiciju¹²⁹. Osim što su važni prekursori u organskoj sintezi¹³⁰, QM pronašli su primjenu u medicini kao prolijekovi²⁴. Ciklopropilindolni derivati generiraju QM te se odvija selektivno alkiliranje DNA na gvaninskom položaju N(7) što pogoduje antikancerogenom djelovanju¹³¹. QM imaju raznoliko biološko djelovanje, kao DNA alkilatori aminokiselina, peptida i nukleotida. Križno povezivanje lanaca DNA s QM temelj je njihove primjene kao terapeutika²⁶.

Peptidi 36 i 38 koji u svojoj strukturi imaju modificiranu aminokiselinu tirozin uvođenjem *N,N*-dimetilaminometilenske skupine u *ortho*-položaju prema fenolnoj hidroksilnoj skupini, mogu se u fotokemijskim reakcijama prevesti u 36a-QM i 38-QM. Zračenjem nastalog modificiranog tirozina u metanolu odvijaju se reakcije fotodeaminiranja i fotometanolize te nastaju produkti 37 i 39, a QM se javljaju kao intermedijeri (Shema 3)²².

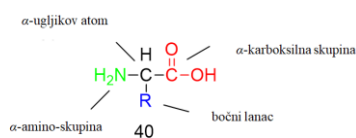


Shema 3. Reakcije fotodeaminiranja i fotometanolize iz dipeptida te strukture nastalih QM²²

3. DISKUSIJA REZULTATA

3.1. Peptidna sinteza

Peptidi su (bio)polimeri aminokiselina. Kod α -aminokiselina koje su najzastupljenije, na α -ugljikov atom vezane su amino-skupina, karboksilna skupina te bočni lanac R (Slika 21). Iznimka je najjednostavnija aminokiselina glicin koja nema bočni lanac. Osim glicina, sve ostale α -aminokiseline su kiralne. Kiralni centar je asimetrični α -ugljikov atom, njegova je konfiguracija u prirodnim aminokiselinama *S*, osim kod cisteina gdje je *R*, zbog prioriteta sumpora nad kisikom (u Cahn, Ingold Prelogovim pravilima). Bočni lanac može biti nepolaran (npr. alanin), bazičan (npr. arginin) ili sadržavati hidroksilnu skupinu (npr. serin), sumpor (npr. cistein), nebazični dušik (npr. asparagin), aromatski (npr. triptofan) te karboksilnu skupinu (npr. asparaginska kiselina). Aminokiseline međusobno se povezuju peptidnim vezama, a sinteza peptida u laboratoriju se provodi u otopini ili na krutom nosaču^{1, 65}. U ovome radu provedena je sinteza peptida u otopini.



Slika 21. Opća struktura α -aminokiselina

U sintezi peptida upotreba zaštitnih skupina je nužna, kako bi se selektivno pripravila jedna peptidna veza. Tako samo jedna amino-skupina (*N*-kraj) i jedna karboksilna skupina (*C*-kraj) trebaju biti slobodne, dok sve druge trebaju biti zaštićene. Na *N*-kraju najčešće zaštitne skupine su: *tert*-butiloksikarbonilna (Boc), 9-fluorenilmetoksikarbonilna (Fmoc) i benziloksikarbonilna skupina (Z)⁶⁵. Na *C*-kraju se karboksilna kiselina prevodi u estere, i to vrlo često metilni ili benzilni koji se lako uklanjaju u blagim baznim uvjetima (LiOH)¹³², odnosno hidrogeniranjem¹.

Boc-zaštitna skupina uvodi se u prisutnosti baze, a lako se uklanja u kiselim uvjetima najčešće uz trifluoroctenu kiselinu (TFA). U toj reakciji uklanjanja zaštitne skupine, dolazi do protoniranja karbamata koji se cijepa na stabilni *tert*-butilni kation i nestabilnu karbaminsku kiselinu, koja dekarboksilacijom daje slobodnu aminokiselinu¹. Fmoc zaštitna skupina se uklanja u baznim uvjetima, uglavnom sa sekundarnim aminima, kao što je piperidin, a stabilna je u kiselim uvjetima¹³³. Tijekom katalitičkog hidrogeniranja, postupkom kojim se uklanjaju Z zaštitne skupine, Fmoc zaštitna skupina nije u potpunosti stabilna. Z zaštitna

skupina uvodi se u bazičnim uvjetima, a glavne prednosti su joj jednostavna priprava Z zaštićenih aminokiselina, stabilnost u lužnatom ili slabo kiselom mediju (stabilne su u uvjetima u kojima se Boc-zaštitna skupina uklanja) te različiti uvjeti uklanjanja; katalitičkim hidrogeniranjem ili jakim kiselinama (u HBr uz octenu kiselinu)^{1, 133}.

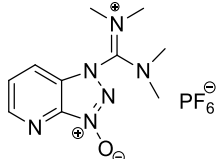
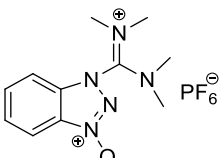
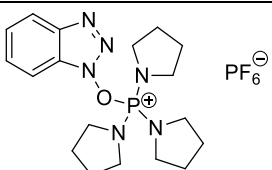
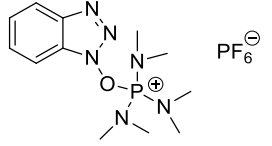
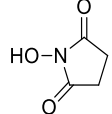
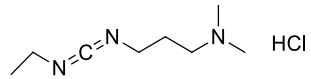
U ovome radu korištena je strategija sinteze peptida u otopini uz Boc-zaštitnu skupinu. Naime, za uklanjanje Fmoc zaštitne skupine potrebni su bazični uvjeti koji nisu kompatibilni s modificiranim tirozinom niti s BODIPY fluoroforom. U bazičnim uvjetima iz modificiranog tirozina dolazi do deaminiranja i nastanka kinon-metida¹²⁷, dok je također poznato da BODIPY spojevi podliježu određenim reakcijama u bazičnim uvjetima¹⁰⁷.

3.1.1. Kondenzacijski reagensi

Nastajanje peptidne veze iz karboksilne kiseline i amina zahtijeva vrlo žestoke reakcijske uvjete. Zbog toga se priprava peptida odvija u dva stupnja uz upotrebu peptidnih kondenzacijskih reagensa. U prvom stupnju dolazi do aktivacije karboksilne skupine upotrebom kondenzacijskih reagensa, dok u drugom stupnju dolazi do nukleofilnog napada amino-skupine jedne aminokiseline na aktiviranu karboksilnu skupinu druge aminokiseline. S ciljem pronalaska optimalnog kondenzacijskog reagensa za svaku pojedinu reakciju, sintetiziran je velik broj reagensa¹³⁴, a oni koji su korišteni u ovom radu prikazani su u Tablici 1.

Većina kondenzacijskih reagensa su po svojoj strukturi fosfonijeve (PyBOP, BOP) ili amonijeve/uronijeve soli (HATU, HBTU). Fosfonijeve soli reaktivnije su nego uronijeve soli¹³⁵. HBTU i HATU brzo reagiraju s karboksilnom kiselinom uz prisutnost tercijarnog amina. HBTU je zbog svoje strukture, izrazito stabilan reagens, a nedostatak mu je nastanak nusprodukta tetrametiluree koja je citotoksična. U mehanizmu BOP-a se kao nusprodukt oslobađa heksametilfosforotriamid (HMPA) koji je kancerogen. PyBOP je reaktivniji i ekološki prihvatljiviji nego BOP. Korištenjem PyBOP-a smanjen je broj nusprodukata, oslobađa se tripropilidinofosforov oksid koji nije toksičan, a može se ukloniti kolonskom kromatografijom na silikagelu¹³⁶.

Tablica 1. Korišteni kondenzacijski reagensi u ovome radu

STRUKTURA REAGENSA	KONDENZACIJSKI REAGENS
	<p>HATU 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1<i>H</i>-1, 2, 3,-triazolo[4, 5-<i>b</i>]piridiniij-3-oksid heksafluorofosfat</p>
	<p>HBTU Heksafluorofosfat-benzotriazol-tetrametil-uronij</p>
	<p>PyBOP Benzotriazol-1-iloksitripirolidinofosfonijev heksafluorofosfat</p>
	<p>BOP Benzotriazol-1-iloksitris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat</p>
	<p>NHS <i>N</i>-hidroksisukcinimid</p>
	<p>EDC × HCl 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodimid hidroklorid</p>

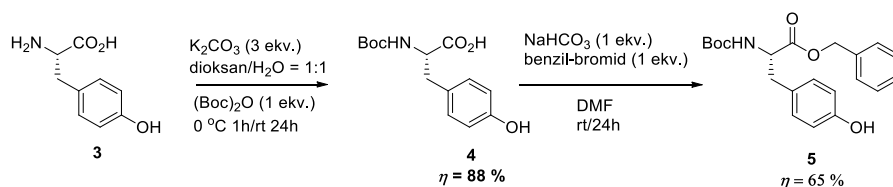
3.2. Sinteza Arg-Arg tripeptida

U ovom radu opisana je strategija sinteze peptida u otopini koristeći Boc-zaštitnu skupinu, a pristupilo se pripravi spojeva linearnom sintezom na *N* i *C* kraju. Prilikom pokušaja sinteze s *N*-kraja, pripravljena su dva sintona Arg-Arg i modificirani tirozin. U tom pristupu, *C*-terminalni kraj arginina isprva je zaštićen zaštitnom metoksi-skupinom, a nakon toga provedena je sinteza bez uvođenja zaštitne skupine na *C*-kraju, koristeći sukcinimidnu aktivaciju¹³⁷. Prilikom pristupa sintezi s *C*-kraja, pokušali smo pripremiti dipeptidni fragment Boc-Arg-Tyr[*m*-CH₂N(CH₃)₂]-OBn što nije bilo uspješno pa smo odustali od sintetskog pristupa s *C*-kraja.

3.2.1. Priprava modificiranog tirozina

U prvom stupnju, provedeno je Boc-zaštićivanje amino-skupine tirozina (Shema 4). Početni spoj **4** sintetiziran je u dobrom iskorištenju, ($\eta = 88\%$) iz tirozina **3** i di-*tert*-butil-dikarbonata uz kalijev karbonat, kao bazu. Mehanizam reakcije uključuje napad α -amino-skupine tirozina na karbonilni ugljik di-*tert*-butil-dikarbonata.

Spoj **4** okarakteriziran je spektroskopijom ¹H NMR. U spektru ¹H NMR vidljivo je šest signala, od čega u aromatskom području dva dubleta intenziteta 2H s pripadajućim konstantama sprege $J = 8,3$ Hz. U alifatskom području vidljiv je multiplet intenziteta 1H, te dva dublet-dubleta intenziteta 1H, s pripadajućim tipičnim geminalnim konstantama sprege $J = 14,0$ Hz. Pokazatelj da je reakcija uspješno provedena je singlet na 1,39 ppm, intenziteta 9H koji se pripisuje metilima Boc-zaštitne skupine.



Shema 4. Uvođenje zaštitnih skupina na Tyr; sinteza spojeva **4** i **5**

Sljedeći korak sinteze bio je zaštićivanje α -karboksilne skupine Boc-Tyr **4**. Provedena je S_N2 reakcija s benzil-bromidom. Natrijev hidrogenkarbonat se koristi kao baza, a potreban je kako bi se kiselina prevela u karboksilat i na taj način postala nukleofil. Karboksilatni kisikov

atom, nukleofilno napada ugljik benzil-bromida (ugljkov atom na kojemu je vezan brom), te brom izlazi iz molekule kao dobra odlazeća skupina. Spoj **5** sintetiziran je u umjereno dobrom iskorištenju, ($\eta = 65\%$), a okarakteriziran je spektroskopijom ^1H i ^{13}C NMR.

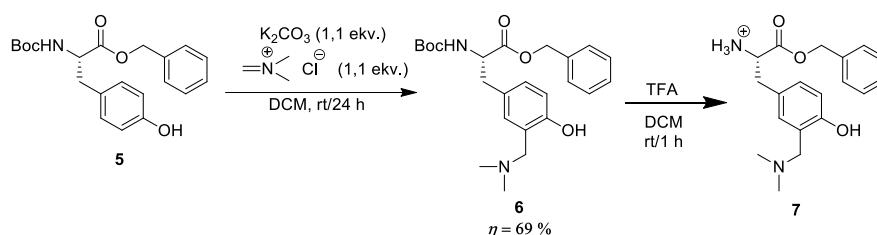
U spektru ^1H NMR spoja **5** vidljivo je 10 signala. U aromatskom području vidljiv je multiplet intenziteta 5H, koji pripada fenilnim protonima benzilne zaštite. Na 5,76 ppm nalazi se singlet za fenolni OH. U alifatskom području vidljiv je tzv. AB kvartet, odnosno dva dubleta na 5,18 ppm i 5,09 ppm, svaki intenziteta 1H s pripadajućom geminalnom konstantom sprege $J = 12,2$ Hz. Na 5,02 ppm nalazi se dublet od NH. U spektru ^{13}C NMR vidljivo je 15 signala, signali za karbamatni i esterski ugljik, osam signala u aromatskom području, te pet signala u alifatskom području. U alifatskom području na 67,3 ppm nalazi signal za CH_2 ugljik od benzilne zaštite, koji je odsjenjen jer se nalazi se uz kisik.

Kako bi se sintetizirao prekursor kinon-metida, **6**, provedena je elektrofilna aromatska supstitucija s *N,N*-dimetilmetaniminijevim kloridom u diklormetanu (DCM), (Shema 5). *N,N*-dimetilaminometilenska skupina uvedena je u *ortho*-položaj prema fenolnoj hidroksilnoj skupini tirozina. Hidroksilna skupina je aktivirajuća skupina koja usmjerava elektrofil u *ortho*- ili *para*-položaj¹³⁸. Spoj **6** sintetiziran je u dobrom iskorištenju, ($\eta = 68\%$), a okarakteriziran je spektroskopijom ^1H i ^{13}C NMR.

U spektru ^1H NMR spoja **6** vidljivo je 11 signala. Karakteristični signali za ovaj spoj su: dublet intenziteta 1H na 6,90 ppm s pripadajućom konstantom sprege $J = 6,8$ Hz, za fenilni proton uz fenolni OH; singlet intenziteta 1H na 6,75 ppm za fenilni proton uz *N,N*-dimetilaminometilensku skupinu; dublet na 6,71 ppm inteziteta 1H. Ovi signali pripadaju protonima na fenilnom prstenu tirozina, a iz njih se zaključuje da je *N,N*-dimetilaminometilenska skupina uvedena u *ortho*-položaj prema fenolnom OH. U alifatskom području pojavljuju se novi signali za *N,N*-dimetilaminometilensku skupinu i to singlet na 3,69 ppm intenziteta 2H za metilenske protone, te singlet na 2,30 ppm intenziteta 6H za dvije metilne skupine. U spektru ^{13}C NMR snimljenom APT tehnikom vidljivo je 18 signala. Na 173,7 ppm nalazi se singlet esterske skupine, u aromatskom području na: 157,6, ppm, 137,2, ppm, 128,6, ppm i 123,6 ppm nalaze se singleti za kvarterne (C atome bez vodika) fenilne ugljike tirozina i benzilne zaštite te singlet za karbamatni ugljik. Iako je očekivano ukupno šest singleta u aromatskom području, vidljivo je samo njih pet jer je došlo do preklapanja nekih od njih. U aromatskom području uočljivo je šest dubleta (C atomi koji imaju vezan jedan vodik) za fenilne ugljike tirozina i benzilne zaštite. U alifatskom području na 80,6 ppm

nalazi se singlet od kvarternog ugljika Boc-zaštitne skupine. Nadalje, na 67,8 ppm nalazi se triplet za CH₂ ugljik benzilne zaštite, u alifatskom području na 62,4 ppm prisutan je triplet za metilensku skupinu *N,N*-dimetilaminometilenske skupine. Kvartet na 44,7 ppm pripisuje se dvijema metilnim skupina *N,N*-dimetilaminometilenske skupine. Također, na 37,9 ppm vidljiv triplet za CH₂ ugljik tirozina.

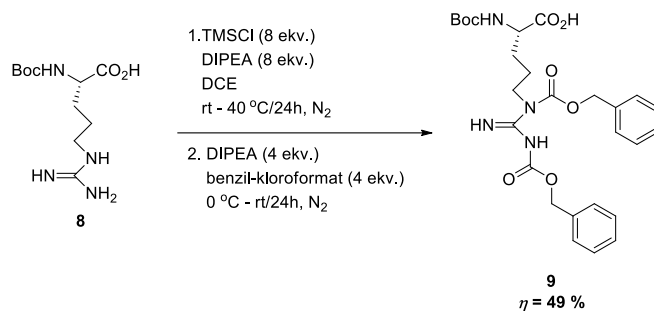
Sinteza spoja **7**, odnosno uklanjanje Boc-zaštitne skupine, provodi se uz TFA u DCM-u (Shema 5), neposredno prije sljedećeg koraka sinteze.



Shema 5. Sinteza spoja **6** i uklanjanje Boc-zaštitne skupine

3.2.2. Priprava bisarginina

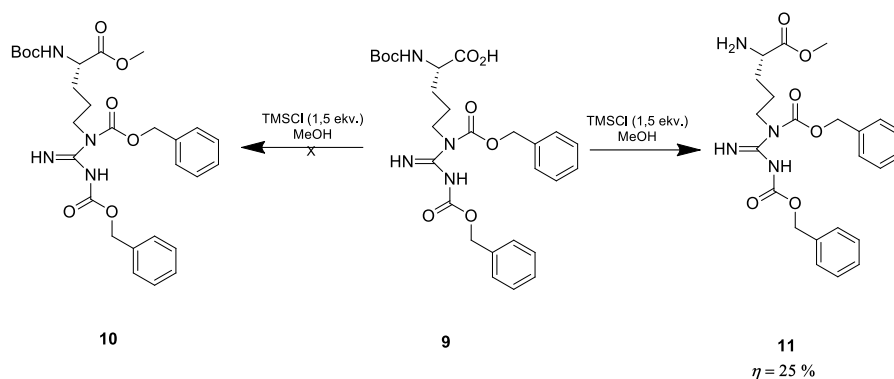
Drugi sinton kod priprave tripeptida bio je dipeptid Arg-Arg. Kako bi se pripraviio dipeptid, prvo je bilo potrebno zaštititi bočne ogranke aminokiseline Boc-Arg (**8**) sa *Z* skupinama, prema postupku iz literature¹³⁹. Provedena je dvostupanjska, *one-pot* reakcija. Između stupnjeva nema izolacije međuprodukata. U prvome stupnju reagira aminokiselina s trimetilsilil-kloridom (TMSCl) i bazom *N,N*-diizopropiletilaminom (DIPEA) u otapalu dikloretanu (DCE). Kao intermedijer nastaje *O,N*-trimetilsilil-supstituirana aminokiselina, koja u drugome stupnju reagira s benzilkloroformatom (*Z*-Cl) u prisustvu DIPEA. Tijekom ponavljanja ove reakcije na većoj skali, uslijedili su problemi u reakciji zbog vjerojatno loše kvalitete TMSCl reagensa. Ipak, dobiven je zaštićeni spoj **9** u umjerenom iskorištenju, ($\eta = 49\%$) (Shema 6).



Shema 6. Sinteza spoja 9

Spoj 9 okarakteriziran je spektroskopijom ¹H i ¹³C NMR. U spektru ¹H NMR vidljivo je 10 signala. Iznad 9 ppm uočena su dva singleta svaki s intenzitetom 1H koji se pripisuju protonima na dušicima. U aromatskom području nalazi se multiplet od 7,42 ppm – 7,27 ppm intenziteta 10H za fenilne protone Z zaštitnih skupina. Nadalje, dublet intenziteta 1H na 5,29 ppm s pripadajućom konstantom sprege $J = 6,7$ Hz, pripisuje se protonu na dušiku, a na 5,23 ppm i 5,14 ppm su dva singleta svaki s intenzitetom 2H za metilenske protone Z zaštitnih skupina. Ovi signali su odsjenjeni jer se nalaze uz kisik. U alifatskom području još su vidljivi, široki singlet (multiplet) intenziteta 1H za protone na kiralnom ugljiku, multiplet intenziteta 2H za metilenske protone uz dušik, multiplet intenziteta 4H za metilenske protone te singlet intenziteta 9H za tri metila Boc-zaštitne skupine. U spektru ¹³C NMR vidljiv je 21 signal. U aromatskom području su tri signala za karbamatne ugljike, signal za karboksilni ugljik, signal za iminski ugljik te osam signala za fenilne ugljike Z zaštita. U alifatskom području nalazi se signal za kvarterni ugljik Boc-zaštitne skupine na 80,4 ppm. Na 69,1 ppm i 67,2 ppm prisutni su signali od CH₂, benzilne skupine. U alifatskom području nalazi se još pet signala za ugljik kiralnog centra, ugljike s metilenskim protonima i metilima od Boc-zaštitne skupine.

Boc-argininu 9 sa zaštićenim bočnim ogrankom s dvije Z skupine, provedeno je zaštićivanje C-kraja prevođenjem u metilni ester (Shema 7). Prvotna zamisao bila je zaštititi karboksilni kraj molekule te u idućem sintetskom koraku ukloniti i Boc-zaštitnu skupinu kako bi se provela peptidna sinteza, odnosno nastajanje peptidne veze na N-kraju. Međutim, uočeno je da u reakcijskim uvjetima uvođenja metilne skupine tijekom 24 h dolazi do uklanjanja Boc-zaštitne skupine. Nije izoliran očekivani spoj 10, već spoj 11 u umjerenom iskorištenju ($\eta = 25\%$).

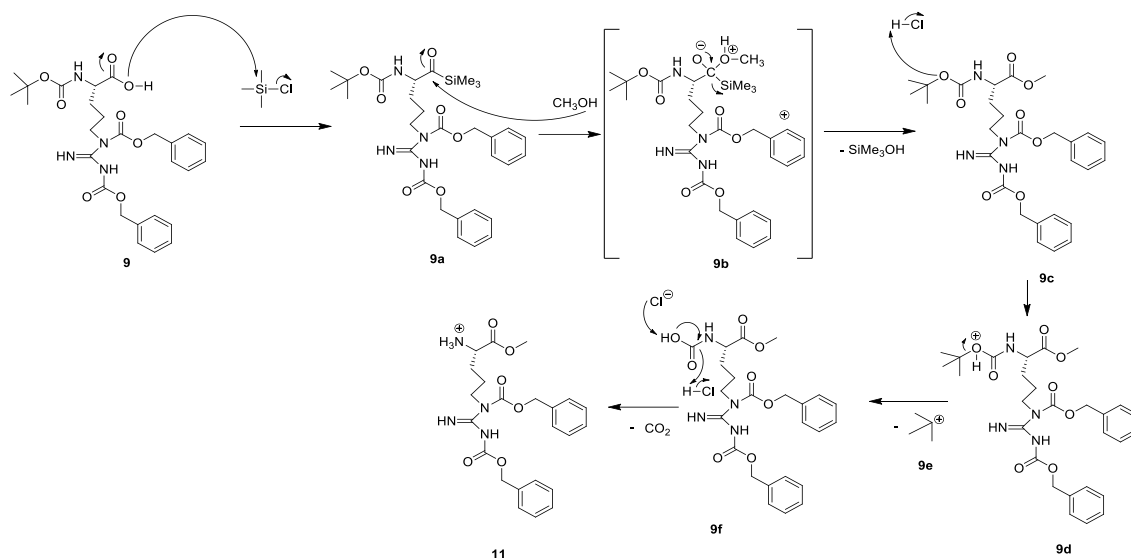


Shema 7. Pokušaj sinteze spoja **10** i sinteza spoja **11**

Spoj **11** okarakteriziran je spektroskopijom ^1H i ^{13}C NMR. U spektru ^1H NMR vidljivo je 10 signala. U alifatskom području vidljiv je singlet na 3,64 ppm intenziteta 3H, koji odgovara metilnoj zaštitnoj skupini, ali više nije vidljiv singlet intenziteta 9H za Boc-zaštitnu skupinu. U spektru ^{13}C NMR vidljivo je 25 signala, od toga u alifatskom području vidljiv je signal na 52,1 ppm za zaštitnu metoksi-skupinu na C-kraju, ali više ne vidimo signale na 28,4 ppm za metile i na 80,4 ppm za kvarterni ugljik, karakteristične za Boc-zaštitnu skupinu.

Poznato je da je Boc-zaštitna skupina osjetljiva na kisele uvjete, a pretpostavljamo da je do njenog uklanjanja došlo uslijed *in-situ* generiranja HCl-a. Ova reakcija ubrzala je sintezu jer je preskočen jedan sintetski korak. Reakcijski uvjeti prikazani su na Shemi 7, dok je pretpostavljeni mehanizam prikazan na Shemi 8. Provedena je nukleofilna supstitucija na acilnoj skupini adicijsko-eliminacijskim mehanizmom. U prvome stupnju dolazi do sililiranja kisika, nastaje spoj **9a**, koji u idućem stupnju reagira s metanolom. Kisik iz metanola nukleofilno napada karbonilni ugljik te nastaje tetraedarski međuprodukt **9b**. Silil odlazi kao dobro-odlazeća skupina, te nastaje metilni ester **9c**¹⁴⁰.

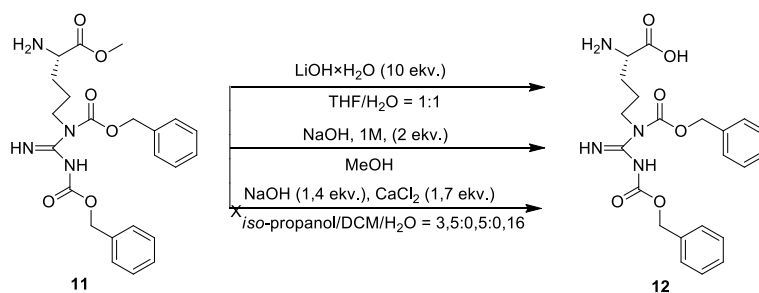
U reakciji nastaje HCl koja uklanja Boc-zaštitnu skupinu (Shema 8). Kisik u molekuli **9d** protonira se u prisustvu HCl-a. Odcjepljuje se *tert*-butilni kation **9e**. Kloridni anion deprotonira karboksilnu skupinu, a potom dolazi do dekarboksilacije **9f**. Konačno, nastaje spoj **11**, s protoniranom slobodnom amino-skupinom i metilnom zaštitom na karboksilnom kraju¹⁴¹.



Shema 8. Pretpostavljeni mehanizam uklanjanja Boc-zaštitne skupine uz TMSCl i uvođenje metilne zaštitne skupine

Uklanjanje zaštitne metilne skupine provodi se u lužnatom mediju (Shema 9). Provedene su tri reakcije pri različitim uvjetima, koji su prema literaturnim navodima korišteni za hidrolizu metilnih estera^{132, 142-144}.

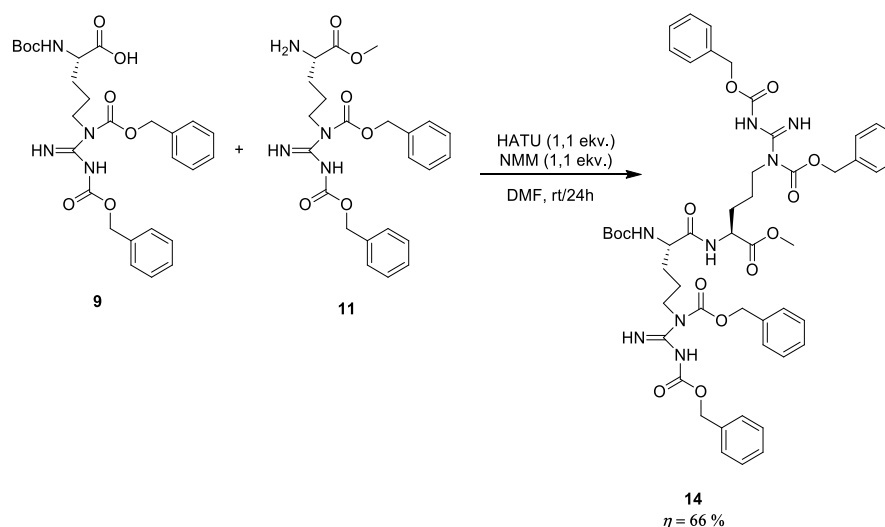
Tijek reakcija praćen je HPLC-om, a najbolje rezultate pokazali su reakcijski uvjeti uz LiOH × H₂O ili NaOH kao baze. Kromatogrami tih reakcija ukazivali su na znatno manje produkata od reakcije s CaCl₂ i NaOH, što je značilo veću selektivnost reakcije.



Shema 9. Pokušaji uklanjanja metilne zaštitne skupine na spoju **11**

U idućem sintetskom koraku provedena je peptidna sinteza između spoja **9** sa slobodnim C-krajem i **11** sa slobodnim N-krajem, za pripremu dipeptida **14**. Kondenzacijski reagens koji je korišten u ovoj reakciji je HATU. Odlučili smo se na HATU jer je vrlo jak aktivator karboksilne skupine, a nusprodukte reakcije aktivacijskog reagensa lako je ukloniti iz

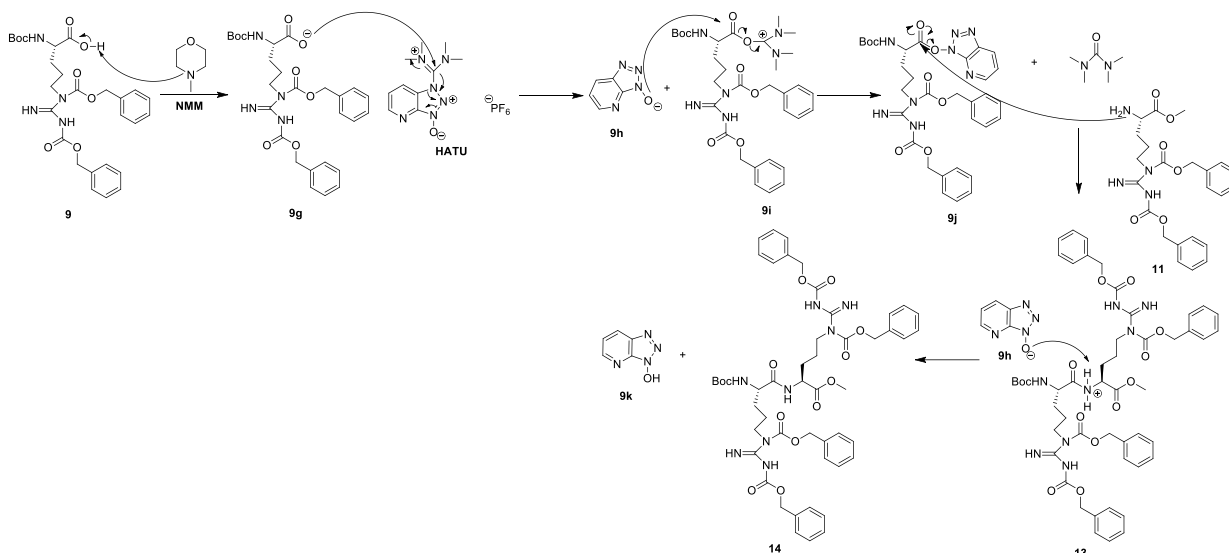
reakcijske smjese¹³⁵. Reakcija je provedena u DMF-u uz bazu NMM, (Shema 10). Spoj **14** izoliran je u dobrom iskorištenju, ($\eta = 66\%$).



Shema 10. Sinteza spoja **14**

Spoj **14** okarakteriziran je spektroskopijom ^1H i ^{13}C NMR. U spektru ^1H NMR vidljivo je 14 signala. Iznad 9 ppm nalaze se dva singleta intenziteta 2H, a u aromatskom području multiplet intenziteta 20H. Na oko 7 ppm vidljiv je dublet intenziteta 1H s pripadajućom konstantom sprege, $J = 8,0$ Hz koji se pripisuje karbamatnom protonu. U alifatskom području vidljiva su četiri singleta intenziteta 2H za metilenske protone uz kisik Z-zaštita. Nadalje, karakteristični signali su dva multiplata intenziteta 1H za protone na kiralnim ugljicima $\approx 4,4$ i $\approx 4,2$ ppm, singlet intenziteta 3H na 3,57 ppm za protone zaštitne metoksi-skupine te singlet intenziteta 9H na 1,40 ppm za zaštitnu Boc-skupinu. U spektru ^{13}C NMR snimljenom tehnikom APT ne vide se svi singleti u području iznad 134 ppm. Ipak, vidljiv je karakteristični signal (kvartet) za zaštitnu metoksi-skupinu na 52,1 ppm. Iako je u alifatskom području očekivano 15 signala, vidljivo je 12 signala jer je došlo do preklapanja nekih od njih.

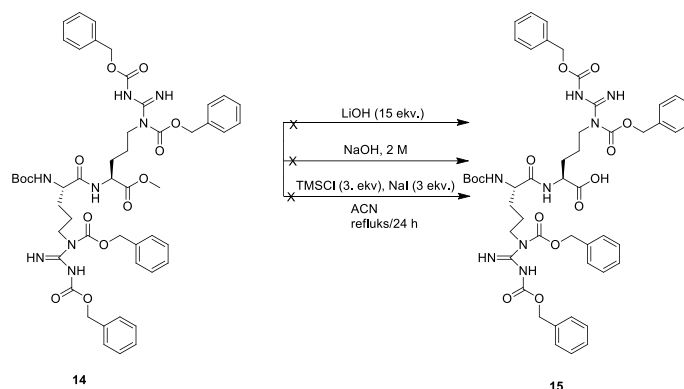
Mehanizam peptidne sinteze s HATU kondenzacijskim reagensom prikazan je Shemom 11. U ovoj reakciji baza, *N*-metilmorfolin (NMM), deprotonira karboksilnu skupinu na spoju **9**. Negativno nabijeni kisik na karboksilatu **9g** nukleofilno napada elektrofilni iminski ugljik na HATU. Pri tome nastaje **9h** kao dobra odlazeća skupina, a karboksilat se veže na amidinski dio reagensa uz nastajanje **9i**. Potom, negativno nabijeni kisik spoja **9h** kao nukleofil napada karboksilni ugljik **9i**, uz nastajanje **9j** i izlazak tetrametiluree. Slobodna amino-skupina na spoju **11**, nukleofilno napada aktivirani karboksilni ugljik na spoju **9j**, te dolazi do kondenzacije i nastajanja dipeptida **13**, koji se u zadnjem stupnju deprotonira do **14**.



Shema 11. Mehanizam peptidne sinteze s HATU aktivacijskim reagensom

Nakon što su pripravljena dva sintona, dipeptid Arg-Arg i modificirani tirozin, prije pripreve tripeptida bilo je potrebno ukloniti C-zaštitnu skupinu s dipeptida. Uklanjanje estera pokušano je s bezvodnim LiOH te s vodenom otopinom 2 M NaOH. Osim uklanjanja u lužnatom mediju, pokušali smo napraviti uklanjanje zaštitne skupine (Shema 12) uz TMSCl i NaI^{145, 146}. U ovom slučaju, jodid je nukleofil koji napada metilnu skupinu spoja **14**, a ne dolazi do nukleofilnog napada na karboksilnu skupinu.

Na žalost, analizom spektara NMR nisu utvrđeni karakteristični signali za dipeptid, ali nije uočen niti karakterističan signal za metilnu skupinu. Pretpostavljamo da provedeni uvjeti nisu bili pogodni za uklanjanje zaštite jer je došlo do raspada dipeptida.

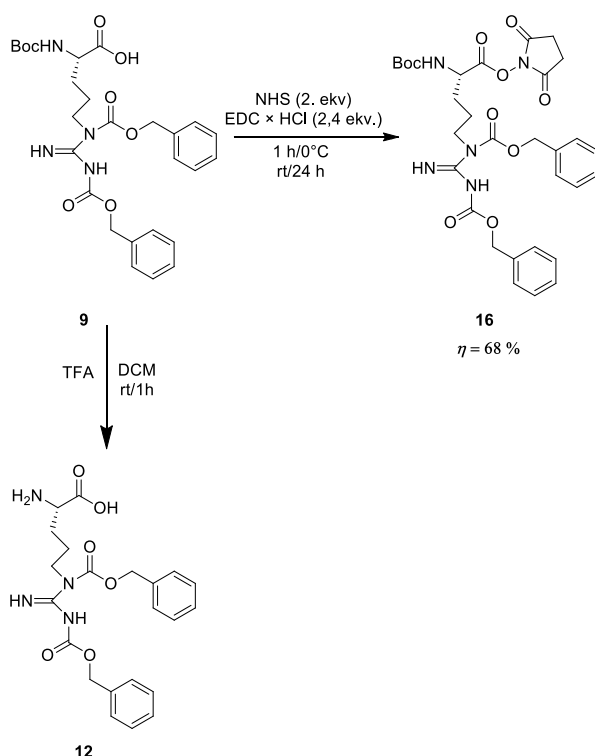


Shema 12. Pokušaji uklanjanja metilne zaštitne skupine na spoju **14**

Zbog navedenih problema hidrolize estera, krenuli smo u modifikaciju peptidne sinteze kojom je uz korištenje sukcinimidne aktivacije moguće spajanje s nezaštićenim aminokiselinama

(Shema 13). U tu svrhu sintetiziran je spoj **16**, koji na karboksilnom kraju ima, slabo aktivirajuću, dobro odlazeću skupinu koja potječe iz *N*-hidroksisukcinimida (NHS-a). Spoj **16** sintetiziran je u dobrom iskorištenju, ($\eta = 68\%$), a okarakteriziran je spektroskopijom ^1H i ^{13}C NMR.

U spektru ^1H NMR spoja **16** vidljivo je 10 signala, od čega je važno spomenuti singlet intenziteta 4H u alifatskom području na 2,76 ppm koji se pripisuje metilenskim protonima od NHS-a. U spektru ^{13}C NMR snimljenom APT tehnikom vidljivo je 22 signala, od čega tri singleta za karbamatne ugljike, singlet za esterski ugljik, singlet za iminski ugljik, singlet za karbonilne ugljike sukcinimidne skupine, te dva singleta za kvarterne fenilne ugljike *Z* zaštita. Nadalje, iako je očekivano šest dubleta za fenilne ugljike *Z* zaštita (C atomi koji imaju vezan 1 vodik), prisutno je samo njih pet jer je došlo do preklapanja nekih od njih. U alifatskom području vidljivo je devet signala, među kojima je triplet na 25,7 ppm koji se pripisuje sukcinimidnoj skupini.

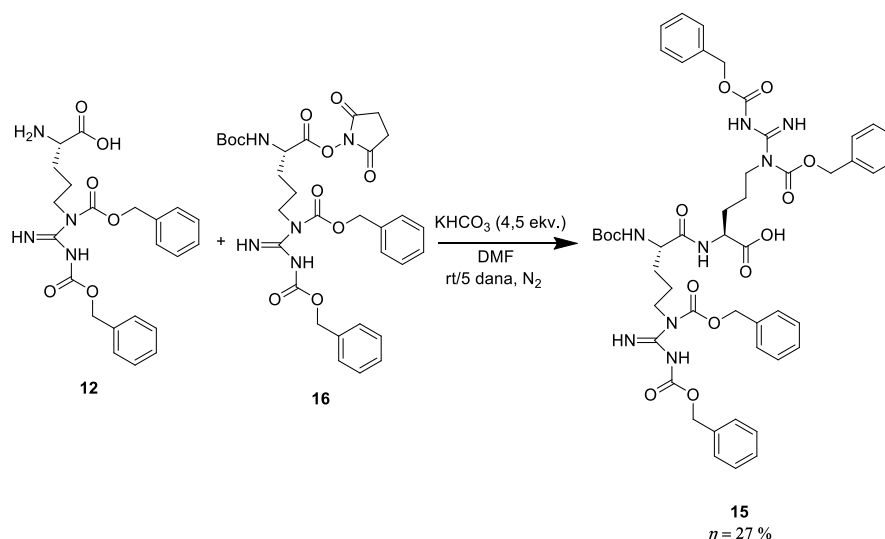


Shema 13. Sinteza spoja **16** i uklanjanje Boc-zaštitne skupine na spoju **9**

Sinteza spoja **12**, odnosno uklanjanje Boc-zaštitne skupine odvija se u kiselim uvjetima u prisutnosti TFA, neposredno prije sljedećeg koraka sinteze (Shema 13). U pokušaju pripreve

dipeptida, amino-skupina spoja **12** treba kao nukleofil napasti aktiviranu karboksilnu skupinu spoja **16**, te nastaje peptidna veza, dok je *N*-hidroksisukcinimid dobra odlazeća skupina (Shema 14). Spoj **15** sintetiziran je u umjerenom iskorištenju, ($\eta = 27\%$), a okarakteriziran spektrima ^1H i ^{13}C NMR.

U spektru ^1H NMR spoja **15** vidljivo je 10 signala. Ključni signali koji ukazuju na strukturu su: u aromatskom području multiplet intenziteta 20H, za protone fenilnih skupina. U alifatskom području vidljiva su četiri singleta svaki inenziteta 2H, za benzilne metilenske protone koji su odsjenjeni zbog kisika te dva široka singleta intenziteta 1H za kiralne ugljike na 4,31 ppm i 4,17 ppm. Nadalje, u alifatskom dijelu vidljiv je multiplet intenziteta 4H koji je odsjenjen zbog blizine dušika na $\approx 3,9$ ppm te multiplet intenziteta 8H za metilenske protone na $\approx 1,6$ ppm. Na 1,39 ppm nalazi se singlet intenziteta 9H koji se pripisuje Boc-zaštitnoj skupini. U spektru ^{13}C NMR snimljenom tehnikom APT vidljivo je 23 signala. Iako je u aromatskom području očekivano 13 singleta, uočljivo je samo devet. Isti slučaj je i s dubletima u aromatskom području, očekivano je 12 dubleta, a vidljivo je samo pet jer je došlo do preklapanja nekih od njih. Također, u alifatskom području očekivano je 10 tripleta, a zamijećeno je samo njih sedam. Nadalje, pretpostavljeno je da će se u alifatskom području pojaviti dva dubleta za dva ugljika kiralnog centra, ali uočen je samo jedan na 51,9 ppm. Međutim, očekivani kvartet za metile Boc-zaštitne skupine nalazi se na 28,4 ppm.



Shema 14. Sinteza spoja **15**

Prednost pripreve dipeptida uz sukcinimidnu aktivaciju je što je dobiven dipeptid **15** sa slobodnom karboksilnom skupinom. Stoga u narednim koracima nema potrebe za uklanjanjem esterske skupine na *C*-kraju, što se pokazalo problematičnim kod hidrolize

metilnog estera zaštićenog arginina **14**. U Tablici 2. prikazana je optimizacija metode dobivanja dipeptida. Najveće iskorištenje ($\eta = 27\%$) postignuto je s 4,5 ekvivalenta baze KHCO_3 i uz trajanje reakcije 5 dana. Iako je pretpostavljeno da će veća količina baze, duže vrijeme reakcije te zagrijavanje pozitivno utjecati na iskorištenje reakcije, to ovdje nije bio slučaj.

Tablica 2. Optimizacija metode dobivanja dipeptida **15** iz **12** i **16**

n (12)/mmol	n (16)/mmol	n (KHCO_3) [ekv.]	Vrijeme	Reakcijski uvjet ^b	$\eta^{\text{a}}/\%$
0,192	0,156	1	24 h	-	26
0,554	0,501	5	2 dana	-	-
1,042	0,677	5	2 dana	-	-
0,452	0,341	4,5	5 dana	N_2	27
1,291	0,840	8	7 dana	N_2 , grijanje [40 °C]	18

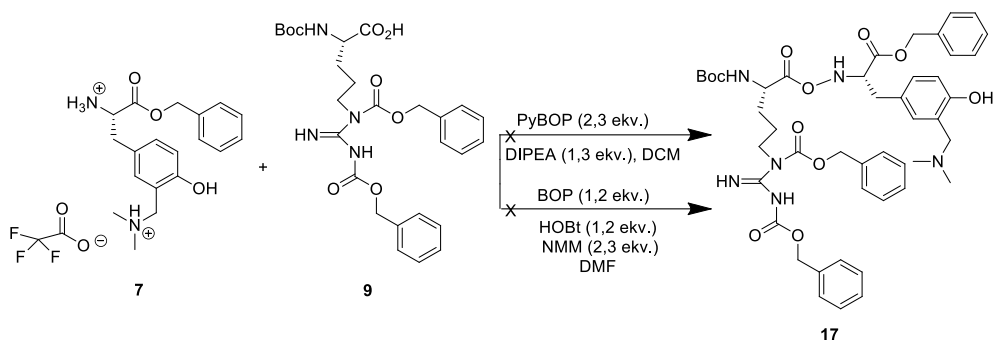
^a Iskorištenje reakcije izračunato je prema dobivenoj masi izoliranog produkta **15**.

^b - Kod reakcijskih uvjeta označava da reakcija nije provedena u atmosferi N_2 , niti je zagrijavana.

Treći sinton kojeg smo pokušali pripremiti bio je Arg-Tyr[*m*- $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$] (Shema 15). Ideja je bila pripremiti ovaj sinton te ako sinteza bude uspješna, na *N*- terminalnom kraju vezati još jedan Arg, odnosno provesti sintezu tripeptida od *C*- terminalnog kraja. Reakcijski uvjeti pod kojima smo pokušali pripremiti Arg-Tyr[*m*- $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$] prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Pokušaji pripreme sintona Arg-Tyr

n (6)/mmol	n (9)/mmol	Kondenzacijski reagensi	Reakcijski uvjeti
0,124	0,092	PyBOP	DIPEA DCM (1 mL)
0,124	0,092	BOP	HOBt NMM DMF (1 mL).



Shema 15. Pokušaj pripreve dipeptida Arg-Tyr[*m*-CH₂N(CH₃)₂]

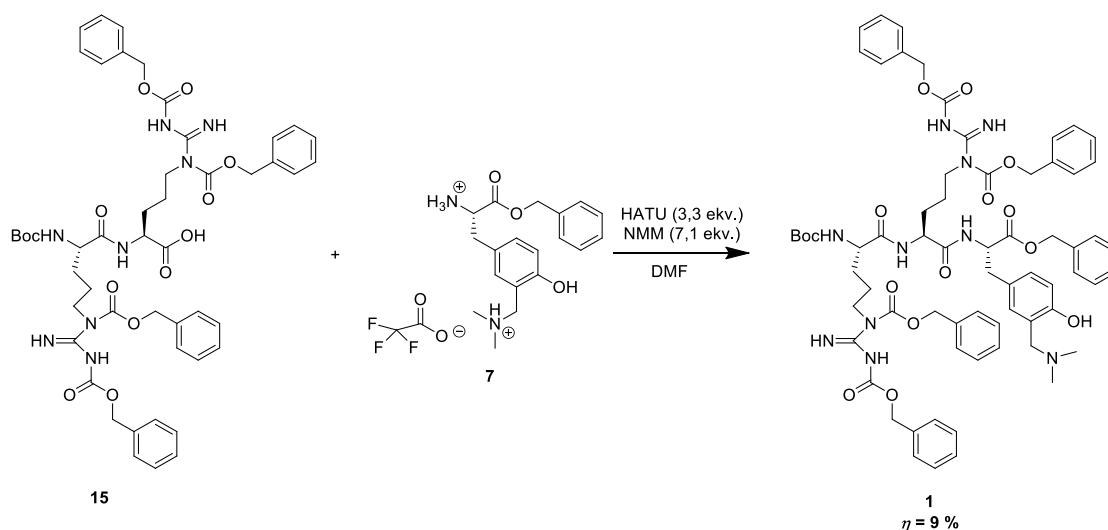
Na temelju analize reakcijskih smjesa pomoću HPLC-a vidjeli smo samo signale početnih spojeva te niti u jednom slučaju nije bilo naznaka nastanka produkta. Naime, upotrijebljen kondenzacijski reagensi nisu se pokazali pogodnima za provedbu ove reakcije, te nije nastao spoj **17**. Mogući razlozi za nemogućnost peptidne kondenzacije su reakcije s fenolnim kisikom te nestabilnosti nastalih depsida koji se raspadaju do početnih spojeva.

3.2.3. Pokušaji pripreve Arg-Arg-Tyr[*m*-CH₂N(CH₃)₂]

Nakon što je sintetiziran spoj **15**, provedena je sinteza peptida **1** uz modificirani tirozin **7** koristeći kondenzacijski reagens HATU (Shema 16). Isprobano je više reakcijskih uvjeta, koji su sumirani u Tablici 4. Spoj **1** dobiven je u vrlo niskom iskorištenju u smjesi s drugim spojevima, $\eta = 9\%$ (procijenjeno iskorištenje na temelju odvage frakcije i NMR te smjese), a okarakteriziran je spektroskopijom ¹H NMR.

Prema karakterističnim signalima u NMR spektrima, postoje naznake da je dobiven spoja **1**, iako on nije u potpunosti čist jer su uočeni i drugi signali nečistoća koje ne možemo pripisati ovom spoju. Tako je u spektru ¹H NMR vidljiv multiplet u aromatskom području koji se pripisuje fenilnim vodicima 4 *Z* zaštitne skupine i 1 benzilne zaštitne skupine intenziteta 25 H od 7,40 – 7,30 ppm. Karakteristični signali modificiranog tirozina intenziteta 1H uočljivi su na oko 7 ppm. Točnije, dublet na 6,80 ppm intenziteta 1H, s pripadajućom konstantom sprege $J = 8,5$ Hz, singlet intenziteta 1H na 6,71 ppm te dublet na 6,67 ppm intenziteta 1H. Nadalje, u alifatskom području vide se karakteristična tri multipleta kiralnih centara iz aminokiselina na $\approx 4,3$, $\approx 4,4$ i $\approx 4,7$ ppm. Prisutni su signali modificiranog tirozina i to singlet CH₂ skupine intenziteta 2H na 3,85 ppm te singlet N(CH₃)₂ skupine intenziteta 6H na 2,46 ppm. Singlet intenziteta 9H pripisuje se metilima Boc-zaštitne skupine nalazi se na 1,37 ppm. Na žalost,

dobivena je mala količina smjese obogaćene na produktu te se zbog toga odustalo od daljnjeg pročišćavanja.



Shema 16. Sinteza spoja **1**

Tablica 4. Optimizacija metode dobivanja tripeptida **1** iz dipeptida **15** i modificiranog tirozina **6**

n(6) / mmol	n(15) / mmol	Reakcijski uvjeti	Vrijeme	Spoj 1 ^a
0,042	0,031	HATU (1,1 ekv.), NMM (1,1 ekv.), DMF	24 h	m = 12 mg $\eta = 23\%$
0,111	0,083	HATU (3,3, ekv.), NMM (7,1 ekv.), DMF	3 dana	m = 9 mg $\eta = 9\%$
0,174	0,129	HBTU (1,1 ekv.), HOBt (1,1 ekv.), TEA (4 ekv.), DMF	3 dana	-

^a Na temelju mase izolirane smjese i NMR procijenjeno je iskorištenje ($\eta = 9\%$). Iako je za tu reakciju provedeno je pročišćavanje na preparativnom TLC-u, ipak nije izoliran spoj **1** odgovarajuće čistoće. Za prvu reakciju ($\eta = 23\%$) nisu provođena dodatna pročišćavanja na preparativnom TLC-u, već samo kolonska kromatografija.

Problemi koji su vjerojatno javljaju prilikom provedbe ove reakcije su steričke smetnje jer ciljna molekula sadrži u svojoj strukturi pet benzilnih skupina. Također, probleme mogu stvarati kompeticijske reakcije s fenolnim kisikom.

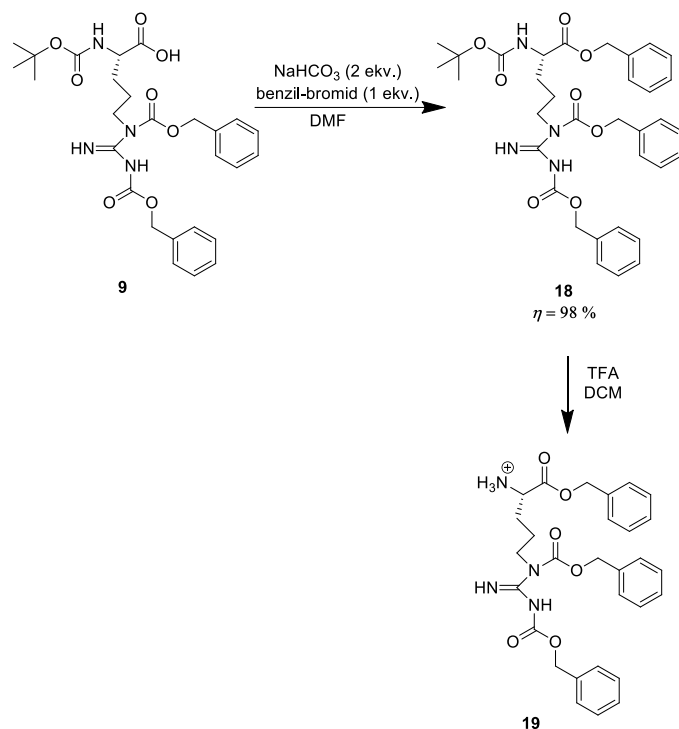
3.2.4. Priprava BODIPY-Arg-Arg

Priprava bisargininskog fragmenta s BODIPY fluoroforom temelji se na sintetskoj strategiji u kojoj se pripravi sinton Arg-Arg u otopini, koristeći benzilnu zaštitnu skupinu na karboksilnom kraju, dok se na *N*-terminalni kraj veže aktivirana BODIPY karboksilna kiselina. U zadnjem stupnju ideja je bila ukloniti, u jednom koraku, četiri zaštitne Z skupine s bočnog ogranka arginina i jednu benzilnu skupinu s α -karboksilnog kraja dipeptida.

Kako bi sinteza BODIPY dipeptida bila uspješno provedena, na spoj **9** prvo se uvela benzilna zaštitna skupina (Shema 17) te je dobiven spoj **18**, u izvrsnom iskorištenju, ($\eta = 98\%$), a okarakteriziran je spektroskopijom ^1H i ^{13}C NMR.

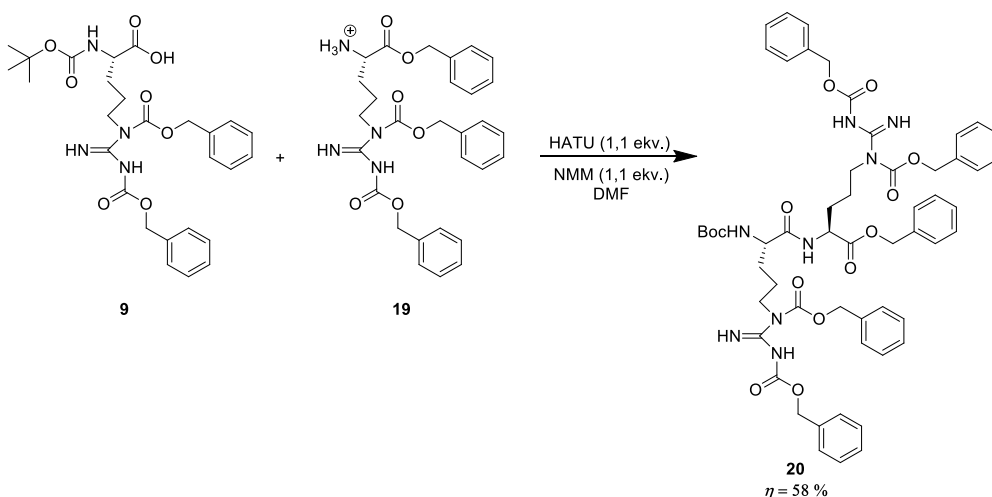
U spektru ^1H NMR spoja **18** vidljivo je 11 signala, dva singleta intenziteta 1H iznad 9 ppm, u aromatskom području multiplet intenziteta 15 H, što je pokazatelj da je uvedena još jedna fenilna skupina. U alifatskom području iznad 5 ppm prisutna su tri singleta, svaki intenziteta 2H za metilenske protone dvije Z i jedne benzilne zaštitne skupine. Također, uočljiv je multiplet za ugljik kiralnog centra na $\approx 4,3$ ppm. Nadalje, na 3,96 ppm nalazi se triplet intenziteta 2H s pripadajućom konstantom sprege, $J = 6,8$ Hz, za metilenske protone uz dušik. Singlet na 1,41 ppm intenziteta 9H pripisuje se metilima od Boc-zaštitne skupine. U spektru ^{13}C NMR vidljivo je 27 signala, od čega pet signala za karbamatne, esterske i iminske ugljike, te još 12 signala u aromatskom području i devet signala u alifatskom području. Dokaz da je uvedena benzilna skupina očituje se u većem broju signala u aromatskom području te je prisutan novi signal u alifatskom području na 69,0 ppm za metilenski ugljik benzilne-zaštitne skupine.

Zatim je na spoju **18** uklonjena Boc-zaštitna skupina u kiselim uvjetima, te je nastao spoj **19** (Shema 17), koji je također okarakteriziran spektroskopijom ^1H i ^{13}C NMR. Spektar ^1H NMR identičan je kao od spoja **18**, samo ne vidimo singlet intenziteta 9H od Boc-zaštitne skupine na 1,39 ppm. U spektru ^{13}C NMR vidljivo je 24 signala, ali ne vidimo signale za ugljike koji se pripisuju metilnim ugljicima Boc-zaštitne skupine na 28,4 ppm i za kvarterni ugljik na oko 80,0 ppm.



Shema 17. Sinteza spoja **18**; sinteza spoja **19** uklanjanjem Boc-zaštitne skupine na spoju **18**

U idućoj reakciji provedena je peptidna sinteza između spoja **9** i **19** uz kondenzacijski reagens HATU i bazu NMM u DMF-u (Shema 18). Dobiven je dipeptid **20** u umjerenom iskorištenju ($\eta = 58\%$), koji na karboksilnom kraju ima benzilnu zaštitnu skupinu.

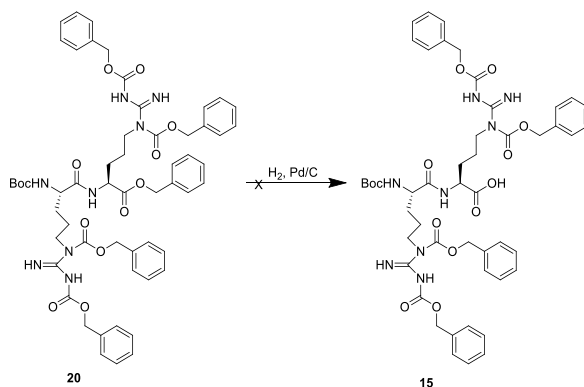


Shema 18. Sinteza spoja **20**

Spoj **20** okarakteriziran je spektroskopijom ^1H i ^{13}C NMR. U ^1H NMR spektru vidljiv je karakterističan signal u aromatskom području, multiplet intenziteta 25H koji se pripisuje fenilnim protonima. U alifatskom području uočljiv je tzv. AB kvartet, točnije dva dubleta na

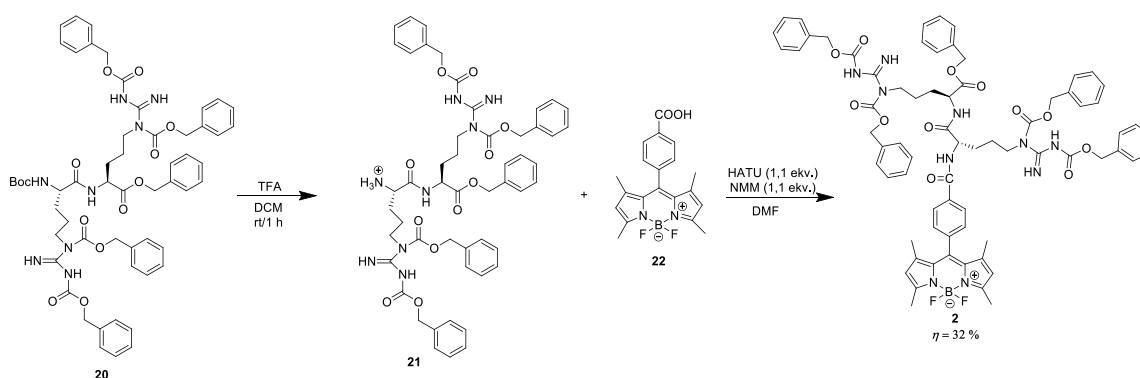
5,23 ppm i 5,16 ppm svaki intenziteta 2H, s pripadajućom konstantom sprege $J = 10,3$ Hz. Nadalje, prisutan je široki singlet na 5,10 ppm intenziteta 4H te singlet na 5,03 intenziteta 2H. Svi navedeni signali pripisuju se metilenskim protonima Z ili benzilne zaštitne skupine. Također, vidljivi su signali za protone kiralnih centara, dva multiplata svaki intenziteta 1H na $\approx 4,5$ i $\approx 4,3$ ppm. Također, prisutan je singlet intenziteta 9H za metilne protone Boc-zaštite na 1,40 ppm. U spektru ^{13}C NMR vidljivo je 36 signala. U aromatskom području očekivano je devet signala za karbamatne, iminske, esterske ugljike, ali je prisutno samo osam signala. Iako je vidljivo samo 15 signala za ugljike fenilnih skupina očekivano je 20 signala. Dok je u alifatskom području očekivano 15 signala, prisutno je samo 13 signala. Karakteristični signali koji ukazuju na strukturu ovog spoja su signali za ugljike metilenskih protona Z ili benzilne zaštitne skupine na 69,1 ppm, 69,0 ppm, 67,12 ppm, 67,11 ppm. Iako je očekivano pet signala, vidljivo je samo četiri signala jer je došlo do preklapanja nekih od njih. Nadalje, prisutni su signali za dva kiralna centra na 54,0 ppm i 52,3 ppm. Signal na 28,4 ppm pripisuje se metilima Boc-zaštitne skupine, dok se signal na 79,9 ppm pripisuje kvarternom ugljiku Boc-zaštitne skupine.

Kako bi priredili C-nezaštićeni dipeptid Boc-Arg-Arg u većoj količini i koristili ga u pripravi tripeptida s modificiranim tirozinom, pokušali smo selektivno ukloniti jednu, estersku benzilnu zaštitu pored četiri karbamatne skupine na spoju **20** (Shema 19). Hidrogeniranjem pri atmosferskom tlaku uz Pd/C kao katalizator, nije došlo do selektivnog uklanjanja ove zaštitne skupine te nije nastao spoj **15**. To smo dokazali spektrometrom masa jer u masenom spektru nismo pronašli karakteristične signale koji bi odgovarali molekulskoj masi spoja **15**. Pretpostavljamo da je došlo do djelomičnog uklanjanja i Z-zaštitnih skupina.



Shema 19. Pokušaj uklanjanja benziloksikarbonilne zaštite na spoju **20**

Neposredno prije sinteze spoja **2** bilo je potrebno ukloniti Boc-zaštitnu skupinu na α -amino kraju spoja **20**. Uklanjanje zaštite provedeno je kako je prikazano na Shemi 20. S ciljem nastanka peptidne veze između slobodne amino-skupine dipeptida **21** i slobodne karboksilne skupine BODIPY spoja **22** provedena je sinteza uz kondenzacijski reagens HATU i bazu NMM u DMF-u. Uspješno je dobiven spoj **2** u umjerenom iskorištenju ($\eta = 32\%$) (Shema 20).



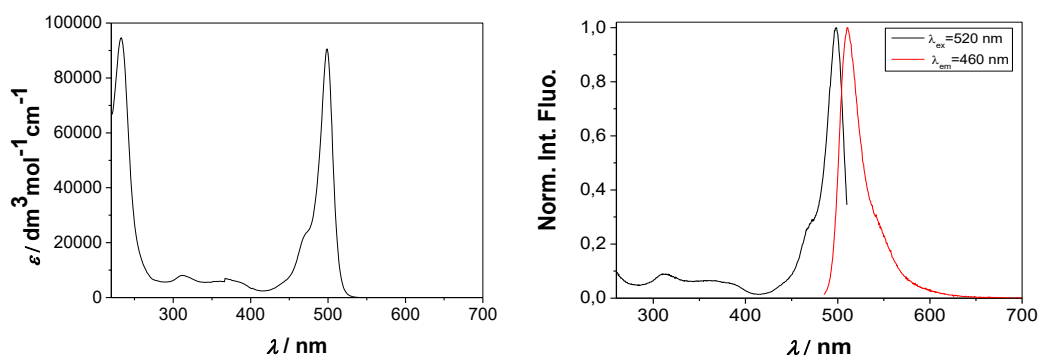
Shema 20. Uklanjanje Boc-zaštitne skupine na spoju **20** i sinteza spoja **2**

Spoj **2** okarakteriziran spektroskopijom ^1H i ^{13}C NMR. U spektru ^1H NMR vidljivo je 18 signala. Karakteristični signali u aromatskom području su multiplet intenziteta 21H i multiplet intenziteta 4H za fenilne protone zaštitnih skupina, te novi signali za CH protone na BODIPY-u dva dubleta na 7,88 ppm i 7,20 ppm s pripadajućom konstantom sprege $J = 7,5$ Hz i singlet pirolskih protona na 5,98 ppm intenziteta 2H. U alifatskom području prisutno je pet singleta svaki intenziteta 2H za metilenske protone četiri Z i jedne benzilne zaštitne skupine. Multipleti za protone kiralnih ugljika intenziteta 1H vidljivi na $\approx 4,8$ i $\approx 4,5$ ppm. Nadalje, singleti na 2,56 ppm i 1,30 ppm intenziteta 6H pripisuju se četirima metilnim skupinama na BODIPY jezgri. U spektru ^{13}C NMR vidljivo je 53 signala. U aromatskom području očekivano je 42 signala, od toga 20 signala za ugljike fenilnih zaštitnih skupina, 4 signala za benzenske ugljike BODIPY jezgre, devet signala za karbamatne, esterske i iminske ugljike te devet signala za BODIPY. Međutim, uočljivo je njih 39 jer je međusobno došlo do preklapanja nekih od njih. Na 166,4 ppm prisutan je novi signal za BODIPY karbonilni ugljik. U alifatskom području očekivano je 15 signala, ali vidljivo je samo njih 14. Signal na 14,8 ppm pripisuje se ugljiku s metilima na BODIPY jezgri. Iako je očekivano dva različita signala, vidljiv je samo jedan signal jer je došlo do preklapanja.

U masenom spektru vidljiv je signal molekulskog iona na 1307 m/z.

3.3. Fotofizička svojstva BODIPY-Arg-Arg

Spoj **2** je modelni spoj, koji se nakon uklanjanja benzilnih zaštita treba ispitati kao fluorofor koji se veže na polinukleotide. Prije uklanjanja benzilnih zaštitnih skupina pri čemu će se dobiti spoj topljiv u vodi, provedeno je ispitivanje fotofizičkih svojstava **2** u nevodenom mediju. Snimljeni su apsorpcijski i emisijski spektri u acetonitrilu (Slika 22). U spektru su vidljiva dva apsorpcijska maksimuma pri 233 nm i 499 nm. Apsorpcijska vrpca s maksimumom na 499 nm pripada $S_0 \rightarrow S_1$ prijelazu BODIPY kromofora s visokom vrijednošću molarog apsorpcijskog koeficijenta, $90500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ što je u skladu s literaturnim navodima za BODIPY^{108, 110, 147, 148}.



Slika 22. Apsorpcijski spektar spoja **2** u CH_3CN (lijevo) i ekscitacijski spektar detektiran pri valnoj duljini 520 nm te emisijski spektar izmjeren uz valnu duljinu pobude na 460 nm spoja **2** u CH_3CN (desno)

Ekscitacijski i emisijski spektar spoja **2** snimljeni su također u acetonitrilu, (Slika 22). Ekscitacijski spektar vrlo je sličan apsorpcijskom spektru, a emisijski i ekscitacijski spektar odnose se kao zrcalne slike, što ukazuje da su molekulske vibracije u osnovnom i pobuđenom stanju slične. Nakon populacije Franck-Condonove geometrije dolazi do vrlo male promjene geometrije te je stoga Stokesov pomak malen i iznosi 809 cm^{-1} , što je također u skladu s literaturnim navodima za BODIPY spojeve^{149, 150}.

Za acetonitrilnu otopinu spoja **2** određen je i kvantni prinos fluorescencije (Φ_F) i vrijeme života singletnog pobuđenog stanja. Kvantni prinos određen je uz rodamin B u metanolu kao referentni spoj ($\Phi_R = 0,66$)¹⁵¹. U acetonitrilnoj otopini dipeptid obilježen s BODIPY kromoforom je vrlo fluorescentna molekula s kvantnim prinosom $\Phi_F = 0,52 \pm 0,01$. Vrijeme života singletnog pobuđenog stanja određeno je vremenski koreliranim brojanjem pojedinačnih fotona (*engl. time-correlated single photon counting*, TC-SPC), a iznosi

$1,2 \pm 0,3$ ns. Na temelju kvantnog prinosa fluorescencije i vremena života izračunate su konstante brzine za deaktivaciju iz singletnog pobuđenog stanja zračenjem, $k_R = 4,3 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ i bez zračenja, $k_{NR} = 4,0 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$. Vidljivo je da su navedene vrijednosti gotovo jednake, a pogotovo visoke vrijednost k_R u skladu su s literaturnim navodima za BODIPY^{147, 148, 150, 152}, kojeg karakteriziraju vremena života pobuđenog singletnog stanja u nanosekundama^{110, 153}. U Tablici 5. sumirana su fotofizička svojstva fluorescentno obilježenog peptida **2**.

Tablica 5. Fotofizička svojstva dipeptida **2**.

Spoj	Φ_F^a	τ/ns^b	k_R/s^{-1}^c	k_{NR}/s^{-1}^d
2	$0,52 \pm 0,01$	$1,21 \pm 0,3$	$4,3 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$

^a Kvantni prinos fluorescencije, izmjeren uz rodamin B u metanolu kao referentni spoj ($\Phi_R = 0,66$)¹⁵¹. ^b Vrijeme života singletnog pobuđenog stanja određeno je TC-SPC metodom. ^c Konstanta brzine deaktivacije zračenjem. ^d Konstanta brzine deaktivacije bez zračenja.

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Opće napomene

Spektri NMR (^1H , ^{13}C) snimljeni su na Bruker Avance III HD 600/54 mm Ascend, pri frekvencijama 300 i 600 MHz (^1H) te 75 i 151 MHz (^{13}C) u otapalu CDCl_3 i CD_3OD pri sobnoj temperaturi. Instrument je opremljen 5 mm trokanalnom inverzijom TCI krio-probom Prodigy sa Z-gradijentnom zavojnicom (model CPP1.1 TCI600S3 H&F-C/N-D-05 Z XT) te pripadajućom opremom za hlađenje elektronike probe tekućim dušikom.

Tijek reakcije kao i čistoća produkata određeni su na HPLC uređaju Agilent 1260 Infinity II s DAD detektorom. Korištena je analitička kolona Phenomenex LC 150 \times 4,6 mm, LUNA 3 μm C18(2) 100 Å uz protok od 0,8 mL/min i gradijentnu metodu: 0 \rightarrow 20 min sustav B, 20 \rightarrow 30 min sustav A (A = 100% MeOH, B = MeOH/H₂O = 1/1 + 0,1% TFA).

Korištene su ploče za preparativnu tankoslojnu kromatografiju (PLC) proizvođača Merck Germany s nanesenim slojem silikagela debljine 1 mm, 0,5 mm, 0,25 mm na staklu te proizvođača Analtech debljine 1 mm.

Tijek reakcija praćen je na tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločama silika gela suspendiranog na aluminiju ili plastici (Silica gel 60 F₂₅₄ Merck, Germany).

Upotrebljena su komercijalno dostupna otapala ili otapala pročišćena destilacijom. Za sintezu su korištene kupovne kemikalije koje nisu dodatno pročišćavane.

Spojevi su imenovani prema IUPAC-ovoj nomenklaturi koju slijedi ChemDraw Ultra 12.0.

4.1.1. Temperatura taljenja

Temperatura taljenja izmjerena je na Original Kofler Mikroheiztisch instrumentu.

4.1.2. Masena spektrometrija

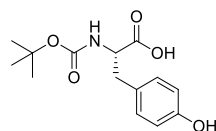
Instrument na kojem je snimljen maseni spektar je Shimadzu LCMS-2020 opremljen binarnom pumpom, degazerom, autosamplerom, peći (column oven) te quadropolom. Opremljen je ES ionizacijskim izvorom. Mobilna faza: A: 50% MiliQ + 0,1 % TFA B: 50 % Metanol (HPLC grade, proizvođač J. T. Baker). Protok mobilne faze iznosi 0,2 mL/min. Volumen injektiranja je 5 μ L. Kapilarni napon je 3,5 kV. Plin za sušenje je dušik, temperatura iznosi 350 °C, protok plina za sušenje iznosi 10 L/min. Protok nebulizacijskog plina je 1,5 L/min. DL temperatura je 250 °C. Temperatura peći iznosi 40 °C. TIC metoda: raspon 100-1000 amu, pozitivna i negativna ionizacija, event time 1 s, trajanje snimanja 2 min, scan speed 938 u/sekundi.

4.1.3. FTIR-ATR

Infrared Spectra (FTIR-ATR) snimljeni su na uređaju Fourier Transform Infrared Attenuated Total Reflection PerkinElmer UATR. Dva spektrometra u rasponu od 400 - 4000 cm^{-1} .

4.2. Sinteze spojeva

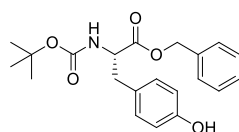
Sinteza (S)-2-[(*tert*-butoksikarbonil)amino]-3-(4-hidroksifenil)propanske kiseline (**4**)



U tikvici s okruglim dnom (250 mL) otopljeni su tirozin (**3**) (2,0 g, 11,0 mmol) i kalijev karbonat (4,58 g, 33,0 mmol, 3 ekv.) u smjesi otapala dioksan/voda (25 mL:25 mL, v:v). Potom je dokapan di-*tert*-butil-dikarbonat (2,53 mL, 11,0 mmol, 1 ekv.), otopljen u dioksanu (15 mL). Reakcijska smjesa je sat vremena miješana uz hlađenje na ledenoj kupelji pri temperaturi od 0 ° C, a potom na sobnoj temperaturi preko noći. U reakcijsku smjesu dodana je voda (70 mL) i kalijev hidrogensulfat do pH \approx 3-4 te je provedena ekstrakcija s etil-acetatom (3 \times 30 mL). Organski ekstrakti isprani su sa zasićenom otopinom natrijevog klorida, a zatim su osušeni iznad bezvodnog natrijevog sulfata. Nakon sušenja, organski sloj je profiltriran, a otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela uz heksan/etil-acetat/octena kiselina (2:1:0,25, v:v:v) kao eluens. Izoliran je spoj **4** (2,74 g, η = 88%) u obliku bezbojnih kristala.

^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ 7,04 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 6,70 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 4,29 – 4,26 (m, 1H), 3,04 (dd, J = 14,0 Hz, 5,2 Hz, 1H), 2,82 (dd, J = 14,0 Hz, 8,7 Hz, 1H), 1,39 (s, 9H).

Sinteza (S)-benzil-2-[(*tert*-butoksikarbonil)amino]-3-(4-hidroksifenil)propanoata (**5**)

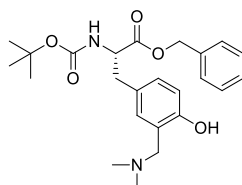


U tikvicu s okruglim dnom (250 mL) dodani su: spoj **4** (2,74 g, 0,972 mmol) i natrijev hidrogenkarbonat (0,817 g, 0,972 mmol, 1 ekv.) te su otopljeni u dimetilformamidu (DMF, 90 mL). Potom je oprezno dokapan benzil-bromid (1,16 mL, 0,972 mmol, 1 ekv.). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Prije ekstrakcije, DMF je uklonjen na rotacijskom uparivaču uz dodatak toluena. U ostatak, dodan je etil-acetat (30 mL) i zasićena vodena otopina amonijevog klorida (30 mL) te je provedena ekstrakcija s etil-acetatom (3 \times 30 mL). Organski ekstrakti sušeni su iznad bezvodnog natrijevog sulfata, profiltrirani, a otapalo

je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela uz heksan/etil-acetat (2:1, v:v) kao eluens. Izoliran je spoj **5** (2,35 g, $\eta = 65\%$) u obliku bezbojnih kristala.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7,38 – 7,29 (m, 5H), 6,87 (d, $J = 8,3\text{Hz}$, 2H), 6,66 (d, $J = 8,3\text{Hz}$, 2H), 5,76 (br s, 1H), 5,18 (d, $J = 12,2\text{Hz}$, 1H), 5,09 (d, $J = 12,2\text{Hz}$, 1H) 5,02 (d, $J = 8,4\text{Hz}$, 1H), 4,60 – 4,56 (m, 1H), 3,03 – 2,96 (m, 2H), 1,42 (s, 9H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 172,1, 155,4, 155,1, 135,3, 130,6, 128,73, 128,70, 128,6, 127,6, 115,6, 80,3, 67,3, 54,8, 37,6, 28,5.

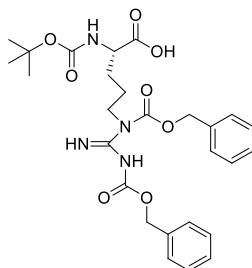
Sinteza (*S*)-benzil-2-[(*tert*-butoksikarbonil)amino]-3-{3-[(dimetilamino)metil]-4-hidroksifenil}propanoata (**6**)



U tikvicu s okruglim dnom (250 mL) dodani su: spoj **5** (1,99 g, 0,538 mmol), kalijev karbonat (828 mg, 0,592 mmol, 1,1 ekv.) i *N,N*-dimetilmetanaminijev klorid (554 mg, 0,592 mmol, 1,1 ekv.) te su otopljeni u diklormetanu (DCM, 55 mL). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Idući dan, reakcijska smjesa je profiltrirana, a otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na stupcu Al_2O_3 (akt. III) uz heksan/etil-acetat (2:1, v:v) kao eluens, uz povećanje polarosti s DCM/metanolom (1:0,03, v:v) kao eluensom. Izoliran je spoj **6** (1,56 g, $\eta = 69\%$) u obliku bezbojnih kristala.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,37 – 7,29 (m, 5H), 6,90 (d, $J = 6,8\text{Hz}$, 1H), 6,75 (s, 1H), 6,71 (d, $J = 6,8\text{Hz}$, 1H), 4,94 (d, $J = 7,7\text{Hz}$, 1H), 4,70 (s, 2H), 4,53 – 4,46 (m, 1H), 3,69 (s, 2H), 2,98 – 2,95 (m, 2H), 2,30 (s, 6H), 1,41 (s, 9H); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 173,7 (s), 157,6 (s), 137,2 (s), 131,1 (d), 130,5 (d), 129,5 (d), 129,3 (d), 128,6 (s), 128,0 (d), 123,6 (s), 116,6 (d), 80,6 (s), 67,8 (t), 62,4 (t), 57,0 (d), 44,7 (q), 37,9 (t), 28,7 (q).

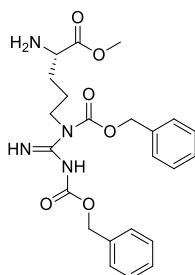
Sinteza (*S*)-5-[1,3-bis(benziloksikarbonil)gvanidin]-2-[(*tert*-butoksikarbonil)-amino]pentanske kiseline (**9**)



U dvogrloj tikvici s okruglim dnom (100 mL) otopljen je Boc-Arg **8** (2,00 g, 7,29 mol) u dikloretanu (DCE, 32 mL) na sobnoj temperaturi pod inertnom atmosferom dušika. Dodani su: *N,N*-diizopropiletilamin (DIPEA, 10 mL, 0,058 mol, 8 ekv.) i trimetilsilil-klorid (TMSCl, 7,4 mL, 0,058 mol, 8 ekv.). Reakcijska smjesa miješana je na 40 °C preko noći. Drugi dan, reakcijska smjesa ohlađena je na ledenoj kupelji i dokapan je DIPEA (5 mL, 0,029 mol, 4 ekv.). Nakon toga je polako dokapan benzil-kloroformat (4,2 mL, 0,029 mol, 4 ekv.). Reakcijska smjesa miješana je oko 30 min uz hlađenje na ledenoj kupelji, a zatim na sobnoj temperaturi preko noći. U reakcijsku smjesu dodan je etil-acetat (30 mL) i vodena otopina limunske kiseline (30 mL) te je provedena ekstrakcija s etil-acetatom (3×30 mL). Organski ekstrakti sušeni su iznad bezvodnog natrijevog sulfata, profiltrirani, a otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela uz heksan/etil-acetat/octena kiselina (2:1:0,25, v:v:v) kao eluens. Izoliran je spoj **9** (1,95 g, η = 49 %) u obliku bezbojne krutine.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9,41 (s, 1H), 9,27 (s, 1H), 7,42 – 7,27 (m, 10H), 5,29 (d, J = 6,7 Hz, 1H), 5,23 (s, 2H), 5,14 (s, 2H), 4,27 (br s, 1H), 4,01 – 3,98 (m, 2H), 1,83 – 1,68 (m, 4H), 1,41 (s, 9H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 176,2, 163,8, 160,6, 156,0, 155,9, 136,9, 134,7, 129,03, 128,98, 128,6, 128,5, 128,03, 127,99, 80,4, 69,1, 67,2, 53,4, 44,3, 29,0, 28,4, 25,0.

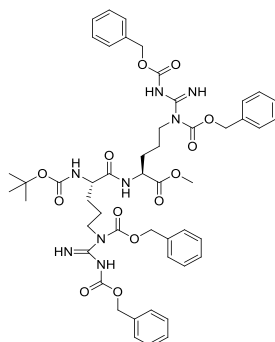
Sinteza (*S*)-metil-2-amino-5-{1,3-bis[(benziloksi)karbonil]guanidin}pentanoata (**11**)



U tikvici s okruglim dnom (25 mL) otopljen je spoj **9** (500 mg, 0,0922 mmol) u metanolu (4,5 mL) te je dokapan TMSCl (175,4 μ L, 0,138 mmol, 1,5 ekv.). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. U reakcijsku smjesu dodan je DCM (30 mL) i voda (30 mL) te je provedena ekstrakcija s DCM-om (3 \times 30 mL), a zatim je vodeni sloj ekstrahiran s etil-acetatom (2 \times 30 mL). Organski ekstrakti isprani su zasićenom otopinom natrijevog klorida, a potom su sušeni iznad bezvodnog natrijevog sulfata. Nakon filtracije, otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela uz DCM/metanol (1:0,1, v:v) kao eluens. Izoliran je spoj **11** (127 mg, η = 25 %) u uljastom obliku.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 9,44 (s, 1H), 9,25 (s, 1H), 7,40 – 7,34 (m, 10H), 5,24 (s, 2H), 5,14 (s, 2H), 4,01 – 3,97 (m, 2H), 3,64 (s, 3H), 3,45 – 3,43 (m, 1H), 1,85 – 1,69 (m, 2H), 1,44 – 1,28 (m, 2H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 176,3, 164,0, 160,7, 156,0, 137,1, 134,8, 129,00, 128,98, 128,95, 128,74, 128,68, 128,65, 128,6, 128,5, 128,3, 128,2, 128,1, 128,0, 69,1, 67,1, 54,0, 52,1, 44,4, 31,7, 25,0.

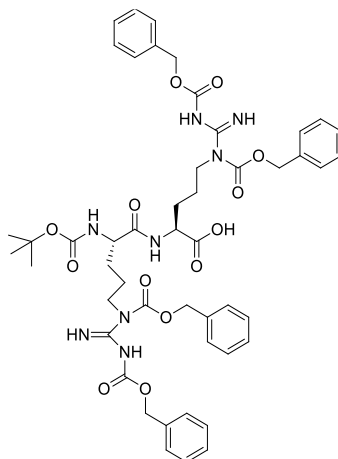
Sinteza (*S, S*)-metil-6-[(benziloksi)karbonil]-13-{3-[1,3-bis((benziloksi)karbonil)guanidin]propil}-10-[(*tert*-butoksikarbonil)amino]-5-imino-3,11-diokso-1-fenil-2-okso-4,6,12-triazatetradekan-14-oata (**14**)



U prvu tikvicu s okruglim dnom (25 mL) dodan je spoj **9** (150,6 mg, 0,277 mmol, 1 ekv.), koji je otopljen je u DMF-u (6 mL), pomiješan s 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinij-3-oksid heksafluorofosfat (HATU, 116 mg, 0,305 mmol, 1,1 ekv.) te je dokapan *N*-metilmorfolin (NMM, 33,6 μ L, 0,303 mmol, 1,1 ekv.). U drugoj tikvici s okruglim dnom (25 mL) otopljen je spoj **11** (127 mg, 0,2776 mmol) u DMF-u (3 mL) te je dodan NMM (33,6 μ L, 0,303 mmol, 1,1 ekv.). Sadržaj druge tikvice dokapan je u prvu tikvicu. Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Prije ekstrakcije, na rotacijskom uparivaču uklonjen je DMF. U reakcijsku smjesu dodan je etil-acetat (30 mL) i zasićena otopina amonijevog klorida (30 mL) te je provedena ekstrakcija s etil-acetatom (3 \times 30 mL). Organski ekstrakti sušeni su iznad bezvodnog natrijevog sulfata, profiltrirani, a otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela uz DCM/metanol (1:0,1, v:v) kao eluens. Izoliran je spoj **14** (195 mg, η = 66 %) u uljastom obliku.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 9,44 (s, 2H), 9,24 (s, 2H), 7,40 – 7,30 (m, 20H), 6,90 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,21 (s, 2H), 5,22 (s, 2H), 5,13 (s, 2H), 5,12 (s, 2H), 5,10 (s, 1H), 4,46 – 4,43 (m, 1H), 4,18 – 4,17 (m, 1H), 4,02 – 3,98 (m, 1H), 3,92 – 3,86 (m, 3H), 3,57 (s, 3H), 1,72 – 1,60 (m, 6H), 1,51 – 1,46 (m, 2H), 1,40 (s, 9H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 172,2 (s), 172,0 (s), 163,9 (s), 163,8 (s), 160,8 (s), 160,7 (s), 155,95 (s), 155,93 (s), 137,0 (s), 136,9 (s), 134,81 (s), 134,77 (s), 128,97 (d), 128,94 (d), 128,62 (d), 128,57 (d), 128,54 (d), 128,51 (d), 128,45 (d), 128,38 (d), 128,2 (d), 128,1 (d), 127,98 (d), 127,95 (d), 79,9 (s), 69,1 (t), 69,0 (t), 67,10 (t), 67,08 (t), 52,3 (d), 52,1 (d), 44,2 (t), 28,6 (t), 28,4 (q), 24,9 (t), 21,2 (q).

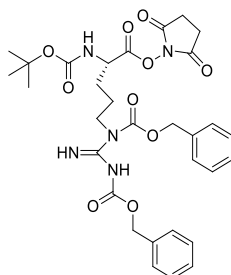
Sinteza (*S, S*)-6-[(benziloksi)karbonil]-13-{3-[1,3-bis((benziloksi)karbonil)guanidin]propil}-10-[(*tert*-butoksikarbonil)amino]-5-imino-3,11-diokso-1-fenil-2-oksa-4,6,12-triazatetradekan-14-ske kiseline (15**)**



U tikvicu s okruglim dnom (50 mL) dodani su: spoj **16** (218 mg, 0,341 mmol) i spoj **9** (200 mg, 0,368 mmol, 1 ekv.) na kojemu je prethodno uklonjena Boc-zaštita u sustavu otapala DCM/TFA (1 mL: 1 mL; v, v). Reakcijska smjesa miješana je 1 h na sobnoj temperaturi, a potom su otapala uklonjena na rotacijskom uparivaču. U reakcijsku smjesu spojeva **16** i deprotektiranog spoja **9**, dodan je KHCO₃ (204 mg, 2,04 mmol, 4,5 ekv.) te DMF (1 mL). Reakcijska je smjesa miješana na sobnoj temperaturi pod atmosferom dušika 5 dana. Prvi je dan dodano 3 ekv. KHCO₃, a drugi dan 1,5 ekv. KHCO₃. U reakcijsku smjesu dodani su etil-acetat (30 mL) i amonijev klorid (30 mL) te je provedena ekstrakcija s etil-acetatom (3×30 mL). Organski ekstrakti sušeni su iznad bezvodnog natrijevog sulfata, profiltrirani, a otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela uz heksan/etil-acetat/octena kiselina (1:6:0,25, v:v:v) kao eluens. Nakon provedene kolonske kromatografije produkt nije bio zadovoljavajuće čistoće, stoga je dodano pročišćen na PLC-u, razvijenima u sustavu DCM/10% metanol kao eluens. Izoliran je spoj **15** (89,1 mg, $\eta = 27\%$) u uljastom obliku.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 9,43 – 9,27 (m, 4H), 7,40 – 7,23 (m, 20H), 7,00 – 6,99 (m, 1H), 5,43 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 5,24 (s, 2H), 5,21 (s, 2H), 5,13 (s, 2H), 5,11 (s, 2H), 4,31 (br s, 1H), 4,17 (br s, 1H), 3,99 – 3,78 (m, 4H), 1,75 – 1,56 (m, 8H), 1,39 (s, 9H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 168,6 (s), 168,4 (s), 164,0 (s), 160,7 (s), 156,0 (s), 155,0 (s), 137,2 (s), 134,9 (s), 128,9 (d), 128,53 (d), 128,50 (d), 127,93 (d), 127,86 (d), 80,6 (s), 69,1 (t), 67,1 (t), 51,9 (d), 44,1 (t), 29,9 (t), 29,5 (t), 28,4 (q), 25,7(t), 24,7 (t).

Sinteza (S)-2,5-dioksopirolidin-1-il-5-{1,3-bis[(benziloksi)karbonil]guanidin}-2-[(*tert*-butoksikarbonil)amino]pentanoata (**16**)

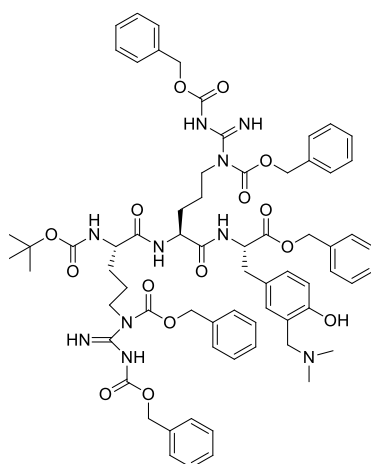


U tikvicu s okruglim dnom (50 mL) dodani su spoj **9** (300 mg, 0,553 mmol), *N*-hidroksisukcinimid (NHS, 63,6 mg, 0,553 mmol, 1 ekv.) i 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodimid hidroklorid (EDC×HCl, 127,2 mg, 0,664 mmol, 1,2 ekv.) te su

otopljeni u DCM-u (5 mL). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Sljedeći dan dodani su NHS (63,6 mg, 0,553 mmol, 1 ekv.), EDC×HCl (127,2 mg, 0,664 mmol, 1,2 ekv.) i DCM (5 mL) te je miješana još jedan dan na sobnoj temperaturi. U reakcijsku smjesu dodani su DCM (30 mL) i voda (30 mL) te je provedena ekstrakcija s DCM-om (3×30 mL). Organski ekstrakti sušeni su iznad bezvodnog natrijevog sulfata, profiltrirani, a otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela uz DCM/metanol (3:2, v:v) kao eluens. Izoliran je spoj **16** (242 mg, η = 68 %) u obliku bezbojnih kristala.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 9,45 (s, 1H), 9,25 (s, 1H), 7,41 – 7,27 (m, 10H), 5,26 (s, 2H), 5,14 (s, 2H), 4,69 – 4,68 (m, 1H), 4,06 – 4,01 (m, 2H), 2,76 (s, 4H), 1,95 – 1,78 (m, 4H), 1,42 (s, 9H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 168,6 (s), 168,4 (s), 164,0 (s), 160,7 (s), 156,0 (s), 155,1 (s), 137,1 (s), 135,0 (s), 129,0 (d), 128,53 (d), 128,50 (d), 127,93 (d), 127,87 (d), 73,0 (s), 69,1 (t), 67,1 (t), 51,9 (d), 44,1 (t), 29,5 (t), 28,4 (q), 25,7 (t), 24,7 (t).

Sinteza (S, S, S)-benzil-6-[(benziloksi)karbonil]-13-{3-[1,3-bis((benziloksi)karbonil)guanidin]propil}-10-[(*tert*-butoksikarbonil)amino]-16-{3-[(dimetilamino)metil]-4-hidroksibenzil}-5-imino-3,11,14-triokso-1-fenil-2-oksa-4,6,12,15-tetrazaheptadekan-17-olat (1)

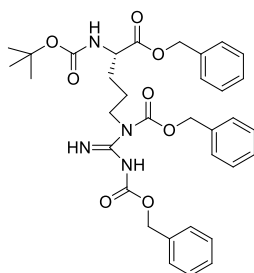


U tikvicu s okruglim dnom (25 mL) dodani su: spoj **15** (80 mg, 0,083 mmol) i spoj **6** (47,6 mg, 0,111 mmol, 1 ekv.) na kojemu je prethodno uklonjena Boc-zaštitna skupina (spoj **7**) u sustavu otapala DCM/TFA (1,33 mL: 300 μL ; v:v). Reakcijska smjesa miješana je 1 h na sobnoj temperaturi, a potom su otapala uklonjena na rotacijskom uparivaču. Zatim su dodani NMM (10 μL , 0,091 mmol, 1,1 ekv.) i HATU (31,4 mg, 0,091 mmol, 1,1 ekv.) u DMF-u (1,33

mL). Idući su dan dodani NMM (60 μ L, 0,546 mmol, 6 ekv.) i HATU (62,8 mg, 0,182 mmol, 2,2 ekv.). Treći su dan u reakcijsku smjesu dodani etil-acetat (30 mL) i zasićena otopina amonijevog klorida (30 mL) te je provedena ekstrakcija s etil-acetatom (3 \times 30 mL). Organski ekstrakti sušeni su iznad bezvodnog natrijevog sulfata, profiltrirani, a otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela uz DCM/metanol (1:0,15, v:v) kao eluens. Izolirana je frakcija obogaćena spojem **1** (m = 9 mg), u uljastom obliku.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 9,42 (s, 2H), 9,27 (s, 2H), 7,40 – 7,30 (m, 25 H), 6,80 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 6,71 (s, 1 H), 6,67 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 5,55 – 5,48 (m, 1H), 5,24 – 4,98 (m, 10H), 4,71 – 4,68 (m, 1H), 4,40 – 4,39 (m, 1H), 4,31 – 4,29 (m, 1H), 3,98 – 3,90 (m, 4H), 3,85 (s, 2H), 3,05 – 3,00 (m, 2 H), 2,46 (s, 6H), 1,50 – 1,40 (m, 8H), 1,37 (s, 9H).

Sinteza (S)-benzil-5-{1,3-bis[(benziloksi)karbonil]guanidin}-2-[(*tert*-butoksikarbonil)amino]pentanoat (**18**)

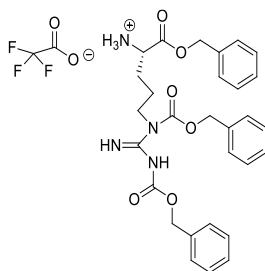


U tikvici s okruglim dnom (50 mL) otopljen je spoj **9** (330 mg, 0,608 mmol) u DMF-u (20 mL) te su dodani NaHCO_3 (102,2 mg, 0,122 mmol, 2 ekv.) i benzil-bromid (72 μ L, 0,608 mmol, 1 ekv.). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Sljedeći dan otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. U reakcijsku smjesu dodani su: etil-acetat (30 mL) i zasićena otopina amonijevog klorida (30 mL) te je provedena ekstrakcija s etil-acetatom (3 \times 30 mL). Organski ekstrakti sušeni su iznad bezvodnog natrijevog sulfata te su profiltrirani, a otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela uz heksan/etil-acetat (2:1, v:v) kao eluens. Izoliran je spoj **18** (377 mg, η = 98 %) u uljastom obliku.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9,44 (s, 1H), 9,23 (s, 1H), 7,40 – 7,27 (m, 15H), 5,20 (s, 2H), 5,13 (s, 2H), 5,09 (s, 2H), 4,35 – 4,32 (m, 1H), 3,96 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 1,80 – 1,75

(m, 1H), 1,69 – 1,61 (m, 3H), 1,41 (s, 9H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 172,5, 164,0, 160,6, 155,9, 155,5, 137,1, 135,5, 134,8, 128,99, 128,95, 128,7, 128,53, 128,50, 128,46, 128,4, 128,0, 127,9, 80,0, 69,0, 67,1, 60,5, 53,5, 44,3, 29,5, 28,4, 25,0.

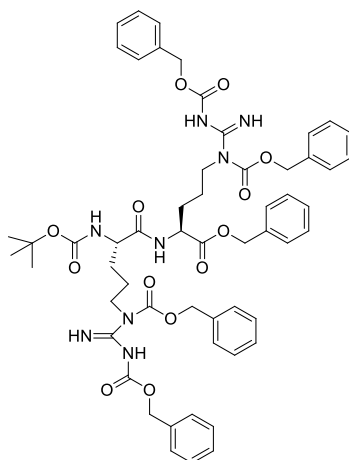
Sinteza (S)-6-[(benziloksi)karbonil]-5-imino-3,11-diokso-1,13-difenil-2,12-dioksa-4,6-diazatridekan-10-amin (19)



U tikvicu s okruglim dnom (25 mL) dodan je spoj **18** (84 mg, 0,133 mmol) koji je otopljen u DCM (1 mL) te je u tikvicu dokapana TFA (250 μL), a nakon 15 minuta dokapano je još TFA (250 μL). Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi sat vremena. Nakon sat vremena razvijen je TLC u sustavu otapala heksan/etil-acetat (2:1 ; v:v) te je pločica obojena u ninhidrinu. Narančasto obojenje ukazuje na slobodnu amino-skupinu. Otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Izoliran je spoj **19** u uljastom obliku.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10,48 (s, 3H, NH_3^+), 9,94 (s, 1H), 7,39 – 7,29 (m, 15H), 5,31 (s, 2H), 5,28 (s, 2H), 5,18 (s, 2H), 4,18 – 4,13 (m, 1H), 3,91 – 3,81 (m, 2H), 2,07 – 1,89 (m, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 168,6, 161,2, 160,7, 155,6, 153,8, 153,1, 134,2, 133,3, 132,8, 129,9, 129,6, 129,20, 129,18, 129,15, 129,08, 129,0, 128,9, 72,3, 70,7, 69,1, 67,1, 45,9, 26,4, 22,8.

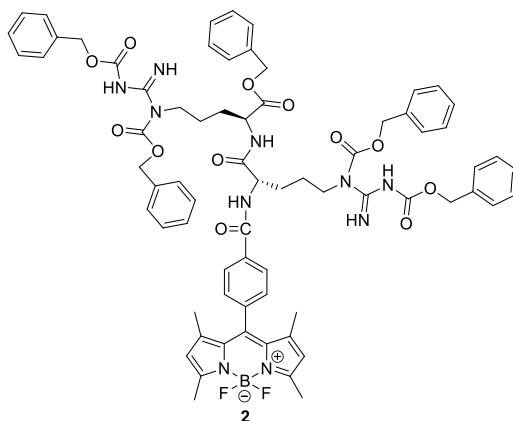
Sinteza (*S,S*)-benzil-6-[(benziloksi)karbonil]-13-{3-[1,3-bis((benziloksi)karbonil)guanidin]propil}-10-[(*tert*-butoksikarbonil)amino]-5-imino-3,11-diokso-1-fenil-2-oksa-4,6,12-triazatetradekan-14-olat (20**)**



U tikvicu s okruglim dnom (25 mL) dodani su spoj **9** (72 mg, 0,133 mmol, 1 ekv.) i spoj **19** (84 mg, 0,133 mmol). U prvoj tikvici spoj **9** otopljen je u 1,5 mL DMF-a i u istu tikvicu dodani su NMM (16 μ L, 0,146 mmol, 1,1 ekv.) te HATU (56 mg, 0,146 mmol, 1,1 ekv.). U drugoj tikvici otopljen je spoj **19** u 1 mL DMF-a, te je u istu tikvicu dodan NMM (16 μ L, 0,146 mmol, 1,1 ekv.). Sadržaji dviju tikvica su pomiješani. Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi preko noći. Idući dan, otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. U reakcijsku smjesu dodani su: etil-acetat (30 mL) i zasićena otopina amonijevog klorida (30 mL) te je provedena ekstrakcija s etil-acetatom (3 \times 30 mL). Organski ekstrakti sušeni su iznad bezvodnog natrijevog sulfata te su profiltrirani, a otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela uz heksan/etil-acetat (2:1, v:v) kao eluens. Izoliran je spoj **20** (82 mg, η = 58 %) u uljastom obliku.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9,41 (s, 2H), 9,24 (s, 2H), 7,41 – 7,22 (m, 25H), 6,92 (d, J = 8,1 Hz, 1 H), 5,36 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 5,23 (d, J = 10,3 Hz, 2H), 5,16 (d, J = 10,3 Hz, 2H), 5,10 (br s, 4H), 5,03 (s, 2H), 4,50 – 4,45 (m, 1H), 4,28 – 4,17 (m, 1H), 4,0 – 3,83 (m, 4H), 1,71 – 1,46 (m, 8H), 1,40 (s, 9H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 172,1, 171,6, 163,9, 163,8, 160,8, 160,7, 155,96, 155,92, 136,97, 136,92, 135,5, 134,8, 128,98, 128,96, 128,95, 128,67, 128,58, 128,56, 128,49, 128,47, 128,39, 128,1, 128,0, 79,9, 69,1, 69,0, 67,12, 67,11, 54,0, 52,3, 44,3, 44,2, 29,0, 28,6, 28,4, 24,9.

Sinteza (*S,S*)-benzil-6-[(benziloksi)karbonil]-13-{3-[1,3-bis((benziloksi)karbonil)guanidin]propil}-10-[(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetrametil-8-(4-karboksamidofenil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen)amino]-5-imino-3,11-diokso-1-fenil-2-oksa-4,6,12-triazatetradekan-14-olat (2**)**



U prvu tikvicu s okruglim dnom (10 mL) dodan je spoj **20** (60 mg, 0,0568 mmol), te je otopljen u DCM-u (3 mL). Uklonjena je Boc-zaštitna skupina u sustavu otapala DCM/TFA (2 mL : 0,7 mL ; v:v). Reakcijska smjesa miješana je 1 h na sobnoj temperaturi, a potom su otapala uklonjena na rotacijskom uparivaču. Nakon uklanjanja Boc-zaštite je spoj otopljen u DMF-u (2 mL) i u tikvicu je dodan NMM (9,37 μ L, 0,085 mmol, 1,5 ekv.) te je reakcijska smjesa miješana 15 minuta na sobnoj temperaturi. U drugu tikvicu s okruglim dnom (25 mL) otopljena je BODIPY kiselina **22** (21,25 mg, 0,062 mmol, 1,1 ekv) u DMF-u (3 mL) te su dodani NMM (6,87 μ L, 0,062 mmol, 1,1 ekv.) i HATU (23,76 mg, 0,062 mmol, 1,1 ekv.). Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi 15 min. Sadržaji dviju tikvica su pomiješani, tako da je sadržaj iz prve tikvice dokapan u drugu tikvicu. Zatim je reakcijska smjesa miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Idući je dan, otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. U reakcijsku smjesu dodani su etil-acetat (30 mL) i zasićena otopina amonijevog klorida (30 mL) te je provedena ekstrakcija s etil-acetatom (3 \times 30 mL). Organski ekstrakti sušeni su iznad bezvodnog natrijevog sulfata, te su profiltrirani, a otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela uz heksan/etil-acetat (1:1, v:v) kao eluens. Dobiveni produkt nije bio odgovarajuće čistoće, stoga je dodatno pročišćen na dva uzastupna PLC-a uz DCM/MeOH (1:0,05 ; v:v) te heksan/etil-acetat (1:1 ; v:v) kao eluens. Izoliran je spoj **2** (24 mg, η = 32 %) u obliku narančaste krutine.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 9,44 (s, 2H), 9,26 (s, 2H), 7,88 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,39 – 7,27 (m, 21H), 7,25 – 7,19 (m, 4H), 7,20 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 5,98 (s, 2H), 5,22 (s, 2H), 5,18 (s, 2H), 5,11 (s, 2H), 5,06 (s, 2H), 5,03 (s, 2H) 4,79 – 4,78 (m, 1H), 4,49 – 4,46 (m, 1H), 3,96 – 3,85 (m, 4H), 2,56 (s, 6H), 1,85 – 1,74 (m, 8H), 1,30 (s, 6H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 171,7, 171,4, 166,4, 163,9, 163,8, 161,0, 160,9, 160,74, 160,65, 156,1, 155,95, 155,93, 155,89, 143,0, 140,4, 138,7, 137,0, 136,8, 135,4, 134,77, 134,75, 134,6, 131,8, 131,2, 131,0, 129,00, 128,97, 128,96, 128,88, 128,7, 128,6, 128,5, 128,42, 128,40, 128,1, 128,03, 128,01, 127,9, 121,6, 69,10, 69,06, 67,2, 67,13, 67,10, 53,1, 52,6, 44,3, 44,1, 29,7, 28,3, 25,1, 24,9, 14,8.

FTIR-ATR (cm^{-1}): 3375, 2917, 1718, 1644, 1607, 1544, 1510, 1469, 1455, 1441, 1407, 1377, 1307, 1244, 1235, 1192, 1156, 1085, 1051, 1029, 1003, 979, 907, 807, 736, 697

$t_r = 155\text{-}185$ °C; HRMS: $\text{C}_{71}\text{H}_{73}\text{BF}_2\text{N}_{10}\text{O}_{12}$: ($[\text{M} + \text{H}^+]$) pronađeno: 1307,5585, izračunato: 1307,5674

4.3. UV-Vis i fluorescencijska spektroskopija

UV-Vis mjerenja provedena su sa spektrofotometrom PG T80/T80+ u acetonitrilnim otopinama spojeva ($c \approx 10^{-5}$ M) pri temperaturi od 25 °C u kivetama dimenzija 10×10 mm. Mjerenja stacionarne i vremenski razlučene fluorescencije provedena su na Edinburgh Instruments FS5 spektrometru. Za mjerenja fluorescencije apsorbancije otopina na valnoj duljini pobude bile su $< 0,1$ i prije mjerenja otopine su propuhane s Ar 20 min kako bi se uklonio otopljeni kisik. Fluorescencijski spektri snimani su uz pobuđivanje na 460, 470 i 480 nm, uz širinu pukotine koja odgovara propusnosti vrpce od 1 nm na monokromatorima za pobuđivanje i detekciju emisije. Fluorescencijski spektri korigirani su s obzirom na fluktuacije u intenzitetu lampe i s obzirom na propusnost monokromatora. Kvantni prinosi fluorescencije određeni su korištenjem rodamina B u metanolu ($\Phi_F = 0,66$)¹⁵¹ kao referentnog spoja. Relativni kvantni prinosi fluorescencije (Φ_F) dobiveni su kao srednja vrijednost izračunatih iz mjerenja na različitim valnim duljinama ekscitacije (460, 470 i 480 nm).

Kvantni prinos fluorescencije određen je prema izrazu:

$$\Phi_F = \Phi_R \frac{I_{AR}}{I_{RA}} \left(\frac{n_D}{n_R} \right)^2 \quad (1)$$

U izrazu (1) Φ_R predstavlja kvantni prinos fluorescencije referentnog spoja, rodamina B (0,66)^{151, 154}, I intenzitet fluorescencije otopine spoja **2**, I_R intenzitet fluorescencije referentnog spoja, A_R apsorbancija otopine referentnog spoja, A apsorbancija otopine spoja **2**, n_D indeks loma otapala (acetonitrila) (1,3441), n_D^R indeks loma metanola u kojem je otopljen referentni spoj (1,3284).

Mjerenje opadanja intenziteta fluorescencije provedeno je tehnikom vremenski koreliranog brojanja pojedinačnih fotona (*engl. time-correlated single photon counting*, TC-SPC). Za pobuđivanje korišten je pulsni laser valne duljine 445 nm, a trajanje impulsa bilo je 20 ns. Opadanje intenziteta fluorescencije na 520 nm izmjereno je u 1023 kanala s vremenskim prirastom od ≈ 20 ps po kanalu. Mjerenje je provedeno dok se nije doseglo 3000 fotona u kanalu s najvećim intenzitetom. Funkcija odziva instrumenta (*engl. instrument response function*, IRF) snimljena je koristeći suspenziju silikagela u vodi. Parametri matematičkog utočnjavanja (vremena života, τ , i pred-eksponencijalni faktori, α) određeni su minimiziranjem reducirane vrijednosti, χ^2 .

Izraz prema kojem je matematički opisano opadanje intenziteta fluorescencije:

$$F(t) = A + \alpha_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + \alpha_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) + \alpha_3 \exp\left(-\frac{t}{\tau_3}\right) + \dots \quad (2)$$

Opadanje intenziteta fluorescencije koja se opisuje monoeksponencijalnom konstantom brzine fluorescencije, k_R i deaktivacije bez zračenja, k_{NR} , izračunate su prema jednadžbama: $k_R = \frac{\Phi_R}{\tau}$, $k_{NR} = \frac{1 - \Phi_R}{\tau}$.

5. ZAKLJUČAK

Provedena je peptidna sinteza u otopini na *C*- terminalnom i *N*- terminalnom kraju. Prvo je na *C*-kraj uvedena zaštitna metoksi-skupina, međutim ova se zaštitna skupina prilikom uklanjanja nije pokazala pogodnom za daljnje sintetske korake jer provedeni uvjeti nisu bili pogodni zbog problema s hidrolizom. Također, pokušali smo pripremiti dipeptidni fragment s *C*-kraja Boc-Arg-Tyr[*m*-CH₂N(CH₃)₂]-OBn, što nije bilo uspješno. Iz toga razloga, upotrebljena je sukcinimidna aktivacija, bez uvođenja zaštitnih skupina, što se pokazalo uspješnim. Sinteza na *N*-kraju uspješno je provedena uz Boc-zaštitne skupine, a peptidna kondenzacija uključivala je upotrebnu kondenzacijskih reagensa, među kojima se istaknuo HATU kao jak aktivator karboksilne skupine.

Sintetizirani su spojevi: Boc-Tyr-OH (**4**, $\eta = 88\%$), Boc-Tyr-OBn (**5**, $\eta = 65\%$), Boc-Tyr[*m*-CH₂N(CH₃)₂]-OBn (**6**, $\eta = 69\%$), Boc-Arg(2Z)-OH (**9**, $\eta = 49\%$), Boc-Arg(2Z)-OMe (**11**, $\eta = 25\%$), Boc-Arg(2Z)-Arg(2Z)-OMe (**14**, $\eta = 66\%$), Boc-Arg(2Z)-ONHS (**16**, $\eta = 68\%$), Boc-Arg(2Z)-Arg(2Z)-OH (**15**, $\eta = 27\%$), Boc-Arg(2Z)-OBn (**18**, $\eta = 98\%$), Boc-Arg(2Z)-Arg(2Z)-OBn (**20**, $\eta = 58\%$), BODIPY-Arg(2Z)-Arg(2Z)-OBn (**2**, $\eta = 32\%$), dok je Boc-Arg(2Z)-Arg(2Z)-Tyr[*m*-CH₂N(CH₃)₂]-OBn (**1**, $\eta = 9\%$) dobiven u smjesi s drugim spojevima. Spojevi su okarakterizirani ¹H i ¹³C NMR spektroskopijom.

Ciljni spoj **1** nije odgovarajuće čistoće, a dobivena masa (9 mg, $\eta = 9\%$), nije bila dovoljna da bi se provela dodatna pročišćavanja.

Ciljni spoj **2** dobiven je u umjerenom iskorištenju (24 mg, $\eta = 32\%$) te je u potpunosti okarakteriziran osim spektroskopijom NMR i masenom spektrometrijom visoke rezolucije, FTIR-ATR-om i temperaturom tališta.

Ispitana su fotofizička svojstva za spoj **2** te su provedena UV-Vis i fluorescencijska mjerenja. U UV-Vis spektru u acetonitrilnoj otopini vidljiva su dva apsorpcijska maksimuma pri 233 nm i 499 nm. Apsorpcijska vrpca s maksimumom na 499 nm pripada S₀→S₁ prijelazu BODIPY kromofora s visokom vrijednošću molarnog apsorpcijskog koeficijenta, 90500 dm³ mol⁻¹ cm⁻¹. Određen je i kvantni prinos fluorescencije $\Phi_F = 0,52$ i vrijeme života pobuđenog stanja $\tau = 1,21$ ns.

6. LITERATURA

1. Wade, L. G., 24. Aminokiseline, peptidi i proteini. *Organska kemija*, 2017, 1153-1196.
2. Kaspar, A. A., Reichert, J. M., Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discov Today* 2013, 18 (17-18), 807-17.
3. Muttenthaler, M.; King, G. F.; Adams, D. J.; Alewood, P. F., Trends in peptide drug discovery. *Nature reviews Drug discovery* 2021, 20 (4), 309-325.
4. Neo, A. G., Carrillo, R. M., Delgado, J., Marcaccini, S., Marcos, C. F., A multicomponent approach to the synthesis of 1,3-dicarbonylic compounds. *Mol Divers* 2011, 15 (2), 529-39.
5. Lenci, E., Trabocchi, A., Peptidomimetic toolbox for drug discovery. *Chem. Soc. Rev.* 2020, 49 (11), 3262-3277.
6. deRonde, B. M., Tew, G. N., Development of protein mimics for intracellular delivery. *Biopolymers* 2015, 104 (4), 265-80.
7. Vagner, J., Qu, H., Hruby, V. J., Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 2008, 12 (3), 292-6.
8. Avan, I., Hall, C. D., Katritzky, A. R., Peptidomimetics via modifications of amino acids and peptide bonds. *Chem. Soc. Rev.* 2014, 43 (10), 3575-3594.
9. Sato, A. K.; Viswanathan, M.; Kent, R. B.; Wood, C. R., Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Current Opinion in Biotechnology* 2006, 17, 638-642.
10. Oh, J. E., Lee, K. H., Synthesis of Novel Unnatural Amino Acid as a Building Block and its Incorporation into an Antimicrobial Peptide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 1999, 7, 2985-2990.
11. Blaskovich, M. A., Unusual Amino Acids in Medicinal Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry* 2016, 59 (24), 10807-10836.
12. Kaminker, R., Anastasaki, A., Gutekunst, W. R., Luo, Y., Lee, S. H., Hawker, C. J., Tuning of protease resistance in oligopeptides through N-alkylation. *Chem Commun (Camb)* 2018, 54 (69), 9631-9634.
13. Vrettos, E. I., Mezo, G., Tzakos, A. G., On the design principles of peptide-drug conjugates for targeted drug delivery to the malignant tumor site. *Beilstein J. Org. Chem.* 2018, 14, 930-954.
14. Zolova, O. E., Mady, A. S., Garneau-Tsodikova, S., Recent developments in bisintercalator natural products. *Biopolymers* 2010, 93 (9), 777-790.

15. Rhoden Smith, A., Iverson, B. L., Threading polyintercalators with extremely slow dissociation rates and extended DNA binding sites. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135 (34), 12783-12789.
16. Matić, J., Tumir, L.-M., Radić Stojković, M., Piantanida, I., Advances in Peptide-based DNA/RNA-Intercalators. *Current Protein and Peptide Science* 2016, 17.
17. Maity, D., Selected peptide-based fluorescent probes for biological applications. *Beilstein J. Org. Chem.* 2020, 16, 2971-2982.
18. Ji, Y., Qiao, H., He, J., Li, W., Chen, R., Wang, J., Wu, L., Hu, R., Duan, J., Chen, Z., Functional oligopeptide as a novel strategy for drug delivery. *Journal of Drug Targeting* 2017, 25 (7), 597-607.
19. Kuchelmeister, H. Y., Karczewski, S., Gutschmidt, A., Knauer, S., Schmuck, C., Utilizing combinatorial chemistry and rational design: peptidic tweezers with nanomolar affinity to DNA can be transformed into efficient vectors for gene delivery by addition of a lipophilic tail. *Angew Chem Int Ed Engl* 2013, 52 (52), 14016-14020.
20. Boga, S., Bouzada, D., García Peña, D., Vázquez López, M., Vázquez, Eugenio, M., Sequence-Specific DNA Recognition with Designed Peptides. *European Journal of Organic Chemistry* 2018, 2018, 249-261.
21. Demeunynck, M. C. B., Wilson, W. D., *Small Molecule DNA and RNA Binders.* 2002.
22. Husak, A.; Noichl, B. P.; Šumanovac Ramljak, T.; Sohora, M.; Škalamera, Đ.; Budiša, N.; Basarić, N., Photochemical formation of quinone methides from peptides containing modified tyrosine. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2016, 14 (46), 10894-10905.
23. Basarić, N., Mlinarić-Majerski, K., Kralj M., Quinone Methides: Photochemical Generation and its Application in Biomedicine. *Current Organic Chemistry* 2014, 18, 3-18.
24. Dufasne, F., Gelbcke, M., Nève, J., Kiss, R., Kraus, J., Quinone Methides and their Prodrugs: A Subtle Equilibrium Between Cancer Promotion, Prevention, and Cure. *Current Medicinal Chemistry* 2011, 18, 3995-4011.
25. Erben, A., Sviben, I., Mihaljević, B., Piantanida, I., Basarić, N., Non-Covalent Binding of Tripeptides-Containing Tryptophan to Polynucleotides and Photochemical Deamination of Modified Tyrosine to Quinone Methide Leading to Covalent Attachment. *Molecules* 2021, 26 (4315), 1-18.
26. Freccero, M., Quinone Methides as Alkylating and Cross-Linking Agents. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* 2014, 1, 403-415.

27. Veldhuyzen, W. F., Pande, P., Rokita, S. E., A Transient Product of DNA Alkylation Can Be Stabilized by Binding Localization. *J. AM. CHEM. SOC.* 2003, 125, 14005-14013.
28. Percivalle, C., Doria, F. Freccero, M., Quinone Methides as DNA Alkylating Agents An Overview on Efficient Activation Protocols for Enhanced Target Selectivity. *Current Organic Chemistry* 2014, 18, 19-43.
29. Benoiton, N. L., 6.11 The Guanidino group of arginine In *Chemistry of Peptide Synthesis*, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada, 2006, 170.
30. Nandi, C. L., Singh, J., Thornton, J. M., Atomic environments of arginine side chains in proteins. *Protein Engineering* 1993, 6 (3), 247-259.
31. Zhang, Z., Xu, Z., Yang, Z., Liu, Y., Wang, J., Shao, Q., Li, S., Lu, Y., Zhu, W., The stabilization effect of dielectric constant and acidic amino acids on arginine-arginine (Arg-Arg) pairings: database survey and computational studies. *The Journal of Physical Chemistry B* 2013, 117 (17), 4827-4835.
32. Schug, K. A., Lindner, W., Noncovalent Binding between Guanidinium and Anionic Groups: Focus on Biological- and Synthetic-Based Arginine/Guanidinium Interactions with Phosph[on]ate and Sulf[on]ate Residues. *Chem. Rev.* 2005, 105, 67-113.
33. Feichtinger, K., Sings, H. L., Baker, T. J., Matthews, K., Goodman, M., Triurethane-Protected Guanidines and Triflyldiurethane-Protected Guanidines: New Reagents for Guanidinylation Reactions. *J. Org. Chem.* 1998, 63, 8432-8439.
34. Evans, R. W., Fernstrom, J. D., Thompson, J., Morris, S. M., Jr., Kuller, L. H., Biochemical responses of healthy subjects during dietary supplementation with L-arginine. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2004, 15 (9), 534-539.
35. Willson, C., Arginine. In *Reference Module in Biomedical Sciences*, 2015.
36. Preli, R. B., Klein, K. P., Herrington, D. M., Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. *Atherosclerosis* 2002, 162, 1–15.
37. Bauer, U. M., Dujat, S., Nielsen, S. J., Nightingale, K., Kouzarides T., Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO reports* 2002, 3 (1), 39–44.
38. Wang, H., Huang, Z., Xia, L. , Methylation of Histone H4 at Arginine 3 Facilitating Transcriptional Activation by Nuclear Hormone Receptor. *Science* 2001, 293, 853-857.
39. Zouali, M., Epigenetics and Autoimmune Diseases. In *The Autoimmune Diseases*, 2014; pp 381-401.
40. Miao, F., Li, S., Chavez, V., Lanting, L., Natarajan, R., Coactivator-associated arginine methyltransferase-1 enhances nuclear factor-kappaB-mediated gene transcription through methylation of histone H3 at arginine 17. *Mol Endocrinol* 2006, 20 (7), 1562-73.

41. Davydova, I. O., Ruban, O.A., Herbina, N.A, Pharmacological activity of amino acids and prospects for the creation of drugs based on them. *Annals of Mechnikov Institute* 2022, 4.
42. Gonzalez, A. M., Trexler, E. T., Effects of Citrulline Supplementation on Exercise Performance in Humans: A Review of the Current Literature. *Journal of Strength and Conditioning Research* 2020, 34 (5), 1480–1495.
43. <https://www.mdpi.com/2072-6643/15/6/1541> (pristup: 14.8.2023.).
44. Skwarecki, A. S., Milewski, S., Schielmann, M., Milewska, M. J., Antimicrobial molecular nanocarrier-drug conjugates. *Nanomedicine* 2016, 12 (8), 2215-2240.
45. Lindsay, M. A., Peptide-mediated cell delivery: application in protein target validation. *Current Opinion in Pharmacology* 2002, 2, 587–594.
46. Snyder, E. L.; Dowdy, S. F., Cell Penetrating Peptides in Drug Delivery. *Pharmaceutical Research* 2004, 21(3).
47. Yi, D., Guoming, L., Gao, L., Wei, L., Interaction of arginine oligomer with model membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007, 359, 1024–1029.
48. Mitchell, D. J., Kim, D.T., Steinman, L. , Fathman, C.G., Rothbard, J.B., Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J. Peptide Res.* 2000, 56, 318-325.
49. Li, M., Schlesiger, S., Knauer, S. K., Schmuck, C., A tailor-made specific anion-binding motif in the side chain transforms a tetrapeptide into an efficient vector for gene delivery. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2015, 54 (10), 2941-4.
50. Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., Sugiura, Y., Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem* 2001, 276 (8), 5836-40.
51. Futaki, S., Arginine-rich peptides: potential for intracellular delivery of macromolecules and the mystery of the translocation mechanisms. *Int J Pharm* 2002, 245 (1-2), 1-7.
52. Tunnemann, G., Ter-Avetisyan, G., Martin, R. M., Stockl, M., Herrmann, A., Cardoso, M. C., Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *Journal of Peptide Science* 2008, 14 (4), 469-76.
53. Kuchelmeister, H. Y., Gutschmidt, A., Tillmann, S., Knauer, S. K., Schmuck, C., Efficient gene delivery into cells by a surprisingly small three-armed peptide ligand. *Chemical Science* 2012, 3 (4).

54. Vazdar, M., Heyda, J., Mason, P. E., Tesei, G., Allolio, C., Lund, M., Jungwirth, P., Arginine "Magic": Guanidinium Like-Charge Ion Pairing from Aqueous Salts to Cell Penetrating Peptides. *Acc Chem Res* 2018, 51 (6), 1455-1464.
55. MacCallum, J. L., Bennett, W. F., Tieleman, D. P., Distribution of amino acids in a lipid bilayer from computer simulations. *Biophysical Journal* 2008, 94 (9), 3393-3404.
56. Mason, P. E., Neilson, G. W., Enderby, J. E., The Structure of Aqueous Guanidinium Chloride Solutions. *JACS* 2004, 126, 11462-11470.
57. Vondrasek, J., Mason, P. E., Heyda, J., Collins, K. D., The Molecular Origin of Like-Charge Arginine-Arginine Pairing in Water. *The Journal of Physical Chemistry B* 2009, 113, 9041-9045.
58. Mason, P. E., Brady, J. W., Neilson, G. W., Dempsey, C. E., The interaction of guanidinium ions with a model peptide. *Biophysical Journal* 2007, 93 (1), L04-6.
59. Cotton, F. A., Hazen, E. E., Legg, M. J., Staphylococcal nuclease: Proposed mechanism of action based on structure of enzyme-thymidine 3',5'-bisphosphate-calcium ion complex at 1.5-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979, 76, 2551-2555.
60. Best, M. D., Tobey, S. L., Anslyn, E. V., Abiotic guanidinium containing receptors for anionic species. *Coordination Chemistry Reviews* 2003, 240 (1-2), 3-15.
61. Blondeau, P., Segura, M., Perez-Fernandez, R., de Mendoza, J., Molecular recognition of oxoanions based on guanidinium receptors. *Chem. Soc. Rev.* 2007, 36, 198-210.
62. Hatai, J., Schmuck, C., Diverse Properties of Guanidiniocarbonyl Pyrrole-Based Molecules: Artificial Analogues of Arginine. *Acc. Chem. Res.* 2019, 52 (6), 1709-1720.
63. Ito, H., Ichikizaki, I., Ando, T., Synthesis and properties of arginine oligopeptides. *Int. J. Protein Research* 1970, 1.
64. Kim, T. I., Bai, C. Z., Nam, K., Park, J. S., Comparison between arginine conjugated PAMAM dendrimers with structural diversity for gene delivery systems. *Journal Control Release* 2009, 136 (2), 132-139.
65. Benoiton, N. L., 1. Fundamentals of Peptide Synthesis (1.2 - 1.6). *Chemistry of Peptide Synthesis*, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada, 2006, 1-7.
66. Aso, K., Kodaka, H., Fukushi, H., Lee, H., Trypsin-catalyzed synthesis of the arginyl-arginine dipeptide from L-arginine ethyl ester. *Biotechnology letters* 1992, 14 (6), 451-454.
67. Benoiton, N. L., 7.1 Notes on carbodiimides and their use. *Chemistry of Peptide Synthesis*, 2006, 197-198.
68. Svenson, S., Tomalia, D. A., Dendrimers in biomedical applications - reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005, 57 (15), 2106-29.

69. H., D., Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis.* 1997, 39, 287-324.
70. <https://medlineplus.gov/druginfo/natural/875.html>, (pristup: 10.8.2023.).
71. Camarena Pulido, E. E., García Benavides, L., Panduro Barón, J. G., Pascoe Gonzalez, S., Madrigal Saray, A. J., García Padilla, F. E., Totsuka Sutto, S. E., Efficacy of L-arginine for preventing preeclampsia in high-risk pregnancies: A double-blind, randomized, clinical trial. *Hypertension in Pregnancy* 2016, 35 (2), 217-225.
72. Čavka, A., Tadžić, R., Grizelj, I., Endotelna funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Medicinski vjesnik* 2012, 44, 135-146.
73. Tallon, M. A., Ring-Opening Metathesis Polymerization (ROMP) Using Maleic Anhydride-Based Monomers. In *Handbook of Maleic Anhydride Based Materials*, 2016; pp 311-398.
74. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/imunologija-i-alergije/biologija-imunosustava/komponente-imunosustava> (pristup: 8.9.2023.).
75. Boulet, H., Bentot, F., Hequet, A., Ganem-Elbaz, C., Bechara, C., Pacreau, E., Launay, P., Sagan, S., Jolival, C., Lacombe, C., Moumne, R., Karoyan, P., Small AntiMicrobial Peptide With in Vivo Activity Against Sepsis. *Molecules* 2019, 24 (9).
76. Demonchaux, P., Ganellin, C. R., Dunn, P. M., Haylett, D. G., Jenkinson, D. H., Search for the pharmacophore of the K⁺ channel blocker, apamin. *Eur J Med Chem* 1991, 26, 915-920.
77. Du, H., Cui, C., Wang, L., Liu, H., Cui, G., Novel tetrapeptide, RGDF, mediated tumor specific liposomal doxorubicin (DOX) preparations. *Mol Pharm* 2011, 8 (4), 1224-32.
78. Schneider, H. J., Agrawal, P., Yatsimirsky, A. K., Supramolecular complexations of natural products. *Chem Soc Rev* 2013, 42 (16), 6777-6800.
79. Avendano, C., Menendez, C., Alkylating and Non-Alkylating Compounds Interacting with the DNA Minor Groove. *Medical Chemistry of Anticancer Drugs* 2008, 177-196.
80. Bailly, C., Henichart, J.-P., Colson, P., Houssier, C., Drug-DNA Sequence-Dependent Interactions Analysed by Electric Linear Dichroism. *Journal of Molecular Recognition* 1992, 5, 155-171.
81. Wade, L. G., Nukleinske kiseline. In *Organska kemija*, 2017; pp 1137-1139.
82. <https://theory.labster.com/h-bonding-life-vdw/> (pristup: 12.8.2023.).
83. <http://pubs.sciepub.com/bb/2/1/1/> (pristup: 9.9.2023.).
84. Graves, D. E., Velea, L. M., Intercalative Binding of Small Molecules to Nucleic Acids. *Current Organic Chemistry* 2000, 4, 915-929.

85. Douteau-Guével, N., Perret, F., Coleman, A.W., Morel, J., Morel-Desrosiers, N., Binding of dipeptides and tripeptides containing lysine or arginine by p-sulfonatocalixarenes in water: NMR and microcalorimetric studies. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* 2002, (3), 524-532.
86. Muehldorf, A. V., Van Engen, D., Warner, J. C., Hamilton, A. D., Aromatic-Aromatic Interactions in Molecular Recognition: A Family of Artificial Receptors for Thymine That Shows Both Face-to-Face and Edge- to-Face Orientations. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 6561-6562
87. Hamilton, A. D., Design and Synthesis of Artificial Receptors Employing Directed Hydrogen Bonding interactions. *Journal of Chemical Education* 1990, 67, 821-828.
88. Avendano, C., Menendez, C., DNA Intercalators and Topoisomerase Inhibitors. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, 2008, 200-225.
89. Kapur, A., Beck, J. L., Sheil, M. M., Observation of Daunomycin and Nogalamycin Complexes with Duplex DNA Using Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999, 13, 2489–2497.
90. Gago, F., Stacking Interactions and Intercalative DNA Binding. *Methods* 1998, 14 (3), 277-292.
91. Glazer, A. N., Rye H. S. , Stable dye-DNA intercalation complexes as reagents for high-sensitivity fluorescence detection *Nature* 1992, 359, 859-861.
92. Brunner, J., Barton, J. K. , Targeting DNA Mismatches with Rhodium Intercalators Functionalized with a Cell-Penetrating Peptide. *Biochemistry* 2006, 45, 12295-12302.
93. Mitchel, P. J., Tjian, R., Transcriptional Regulation in Mammalian Cells by Sequence-Specific DNA Binding Proteins. *Science* 1989, 245, 371-378.
94. Nakasekot, Y., Neuhaus, D., Klug, A. , Adjacent Zinc-finger Motifs in Multiple Zinc-finger Peptides from SW15 Form Structurally Independent, Flexibly Linked Domains *J. Mol. Biol.* 1992, 228, 619-636.
95. Kumar, S., Nussinov, R., Close-Range Electrostatic Interactions in Proteins. *ChemBioChem* 2002, 3, 604 - 617.
96. Schwabe, J. W. R., Klug, A. , Zinc mining for protein domains. *Nat. Struct. Biol.* 1994, 1 (6), 345-349.
97. https://www.researchgate.net/figure/Zinc-finger-nucleases-a-DNA-binding-domain-b-DNA-cleavage-domain_fig1_334420367 (pristup: 8.8.2023.).
98. Klug, A., Schwabe J. W. R. , Zinc finger. *The FASEB Journal* 1995, 9.

99. Johnson, P. E., McKnight, S. L., Eukaryotic transcriptional regulatory proteins *Annu. Rev. Biochem.* 1989, 58, 799-839.
100. https://th.bing.com/th/id/OIP.PNp6iAkiLUQUbpNXC_ivvgHaIx?pid=ImgDet&rs=1 (pristup: 9.8.2023.).
101. Corden, J. L., Gene Expression. In *Cell Biology*, 2017; pp 165-187.
102. O'Neil, K. T., Hoess, R. H., DeGerado W. F., Design of DNA-Binding Peptides Based on the Leucine Zipper Motif. *Science* 1990, 249.
103. Caamano, A. M., Vazquez, M. E., Martinez-Costas, J., Mascarenas, J. L., A Light-Modulated Sequence-Specific DNA-Binding Peptide. *Angew. Chem.* 2000, 112 (17), 3234-3237.
104. Toseland, C. P., Fluorescent labeling and modification of proteins. *J. Chem. Biol.* 2013, 6 (3), 85-95.
105. Wu, J., Zou, Y., Li, C., Sicking, W., Piantanida, I., Yi, T., Schmuck, C., A molecular peptide beacon for the ratiometric sensing of nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134 (4), 1958-1961.
106. Boens, N., Leen, V., Dehaen, W., Fluorescent indicators based on BODIPY. *Chem Soc Rev* 2012, 41 (3), 1130-72.
107. Boens, N., Verbelen, B., Ortiz, M. J., Jiao, L., Dehaen, W., Synthesis of BODIPY dyes through postfunctionalization of the boron dipyrromethene core. *Coordination Chemistry Reviews* 2019, 399.
108. Kamkaew, A., Lim, S. H., Lee, H. B., Kiew, L. V., Chung, L. Y., Burgess, K., BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chem Soc Rev* 2013, 42 (1), 77-88.
109. Ekmekci, Z., Highly selective fluorescence 'turn-off' sensors for Cu²⁺ in aqueous environments. *Tetrahedron Letters* 2015, 56 (14), 1878-1881.
110. Poddar, M.; Misra, R., Recent advances of BODIPY based derivatives for optoelectronic applications. *Coordination Chemistry Reviews* 2020, 421.
111. Benstead, M., Mehl, G. H., Boyle, R. W., 4,4'-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenes (BODIPYs) as components of novel light active materials. *Tetrahedron* 2011, 67 (20), 3573-3601.
112. Squeo, B. M., Ganzer, L., Virgili, T., Pasini, M., BODIPY-Based Molecules, a Platform for Photonic and Solar Cells. *Molecules* 2020, 26 (153), 1-30.
113. Da Lama, A., Bartolomei, B., Rosso, C., Filippini, G., Martínez, M. M., Sarandeses, L. A., Prato, M., New Insights into the Exploitation of BODIPY Derivatives as Organic Photocatalysts. *European Journal of Organic Chemistry* 2022, 2022 (39).

114. Farinone, M., Urbanska, K., Pawlicki, M., BODIPY- and Porphyrin-Based Sensors for Recognition of Amino Acids and Their Derivatives. *Molecules* 2020, 25 (19).
115. Remers, W. A., Rao, S. N., Wunz, T. P., Kollmanl, P. A., Conformations of Complexes between Mitomycins and Decanucleotides. 3. Sequence Specificity, Binding at C-10, and Mitomycin Analogues. *J. Med. Chem.* 1988, 31, 1612-1620.
116. Angle, S. R., Rainier, J. D., Woytowicz, C., Synthesis and Chemistry of Quinone Methide Models for the Anthracycline Antitumor Antibiotics. *J. Org. Chem.* 1997, 62, 5884-5892.
117. Leary, G. J., Quinone Methides and the Structure of Lignin. *Wood Sci. Technol.* 1980, 14, 21-34.
118. Rosenau, T., Potthas, A., Elder, T., Kosma, P., Stabilization and First Direct Spectroscopic Evidence of the o-Quinone Methide Derived from Vitamin E. *Organic Letters* 2002, 4 (24), 4285-4288.
119. Hangarter, M. A., Hormann, A., Kamdzhilov, Y., Wirz, J., Primary photoreactions of phylloquinone (vitamin K1) and plastoquinone-1 in solution. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2003, 2 (5), 524-535.
120. Toteva, M. M., Moran M., Amyes, T. L., Richard, J. P. , Substituent Effects on Carbocation Stability: The pKR for p-Quinone Methide. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 8814-8819.
121. Bolon, D. A., o-Quinone Methides. II. Trapping with Production of Chromans. *J. Org. Chem.* 1970, 35 (11), 3666-3670.
122. Dorrestijn, E., Kranenburg, M., Ciriano, M. V., Mulder, P., The Reactivity of o-Hydroxybenzyl Alcohol and Derivatives in Solution at Elevated Temperatures. *J. Org. Chem.* 1999, 64, 3012-3018.
123. Yato, M., Ohwada, T., Shudo, K., 4H-1,ZBenzoxazines as Novel Precursors of o-Benzoquinone Methide. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 5341-5342
124. Pande, P., Shearer, J., Yang, J., Alkylation of Nucleic Acids by a Model Quinone Methide. *J. Am. Chem. Soc.* 121 (29), 6773-6779.
125. Diao, L., Yang, C., Wan, P., Quinone Methide Intermediates from the Photolysis of Hydroxybenzyl Alcohols in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 5369-5370.
126. Nakatani, K., Higashida, N., Saito, I., Highly Efficient Photochemical Generation of o-Quinone Methide from Mannich Bases of Phenol Derivates. *Tetrahedron Letters* 1997, 38 (28), 5005-5008.

127. Modica, E., Zanaletti, R., Freccero, M., Mella, M., Alkylation of Amino Acids and Glutathione in Water by o-Quinone Methide. Reactivity and Selectivity. *J. Org. Chem* 2001, 66, 41-52.
128. Bolton, J. L., Turnipseed, S. B., Thompson, J. A., Influence of quinone methide reactivity on the alkylation of thiol and amino groups in proteins: studies utilizing amino acid and peptide models. *Chemico-Biological Interactions* 1997, 107, 185–200.
129. Pochet, L., Doucet, C., Dive, G. , Coumarinic Derivatives as Mechanism-Based Inhibitors of α -Chymotrypsin and Human Leukocyte Elastase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2000, 8, 1489–1501.
130. Van De Water, R. W., Pettus T. R. R., o-Quinone methides: intermediates underdevelopment and underutilized in organic synthesis. *Tetrahedron* 2002, 58, 5367-5405.
131. Ouyang, A., Skibo, E. B., Design of a Cyclopropyl Quinone Methide Reductive Alkylating Agent. *J. Org. Chem.* 1998, 63, 1893-1900.
132. Goodman, M. H., 2.2.1. a-Carboxy Group, *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics* 2004; Vol. E 22 a, 193-417.
133. Isidro-Llobet, A.; Ivarez, M. A.; Albericio, F., Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* 2009, 109, 2455–2504.
134. Benoiton, N. L., 7.18 Phosphonium and Uronium/ Aminium/Guanidium salt-based reagents: properties and their use. *Chemistry of Peptide Synthesis*, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada: 2006, 229-230.
135. Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A., Recent development in peptide coupling reagents. *Journal of Saudi Chemical Society* 2012, 16 (2), 97-116.
136. Benoiton, N. L., Methods for the Formation of Peptide Bonds. *Chemistry of Peptide Synthesis*, 2006, 25-64.
137. Siddique, B., Duhamel, J., Effect of Polypeptide Sequence on Polypeptide Self-Assembly. *Langmuir* 2011, 27 (11), 6639-6650.
138. Wade, L. G., 17.6. Aktivirajući supstituenti koji usmjeravaju elektrofil u ortho i parapoložaj. In *Organska kemija*, 2017, 761-765.
139. Jetten, M.; Petters, C. A. M.; Nispen, J. W. F. M. v.; Ottenheijm, H. C. J., A One Pot Protection of L-Arginine. *Tetrahedron Letters* 1991, 32, 6025-6028.
140. Wade, L. G., 20.15. Sinteza i upotreba acil-klorida. *Organska kemija*, 2017., 969.
- 141.

http://commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_HCl_Mech.htm (pristup: 21.6.2023.).

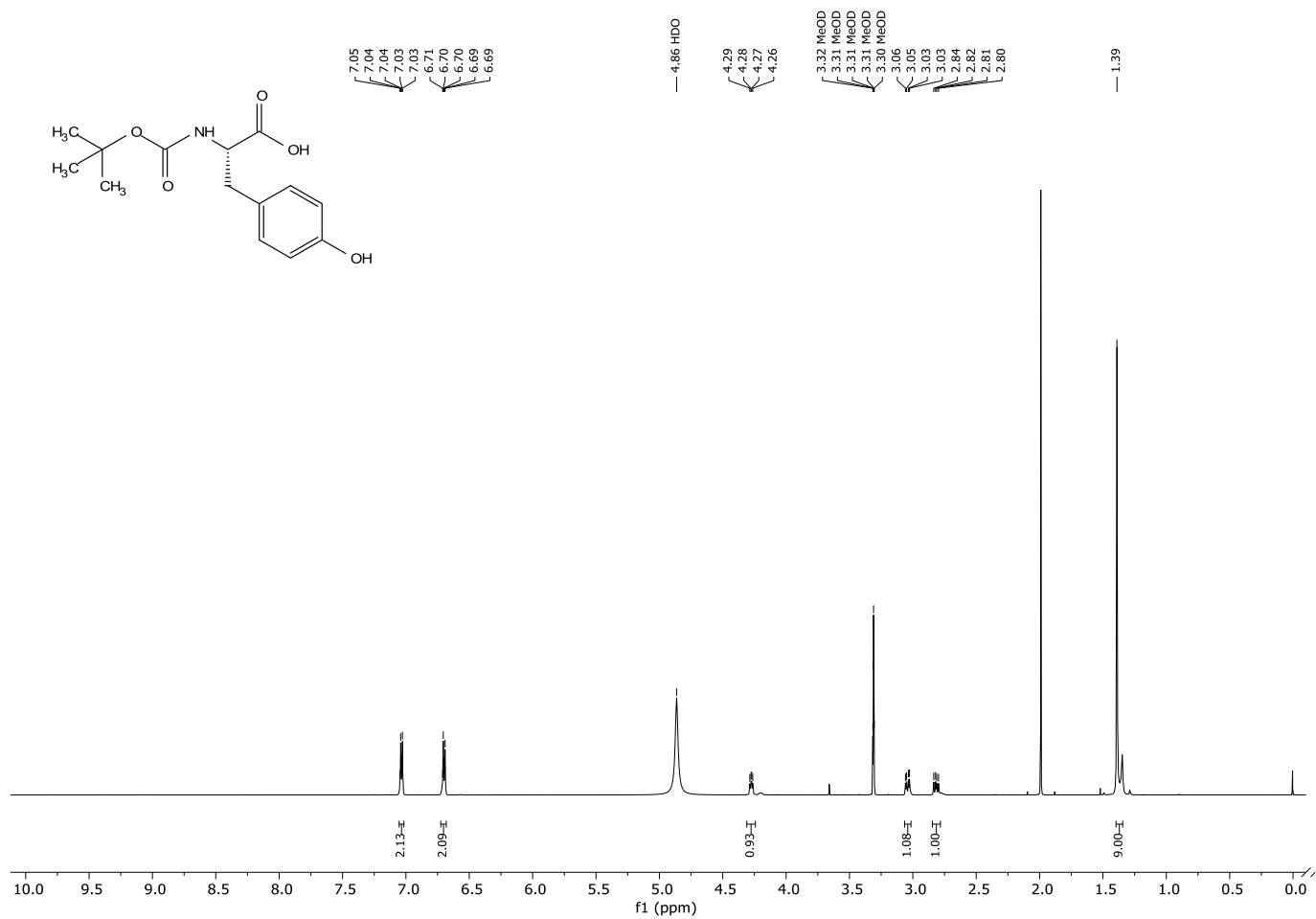
142. Touati-Jallabe, Y.; Tintillier, T.; Mauchauffee, E.; Boucher, J. L.; Leroy, J.; Ramassamy, B.; Hamze, A.; Mezghenna, K.; Bouzekrini, A.; Verna, C.; Martinez, J.; Lajoix, A. D.; Hernandez, J. F., Solid-Phase Synthesis of Substrate-Based Dipeptides and Heterocyclic Pseudo-dipeptides as Potential NO Synthase Inhibitors. *ChemMedChem* 2020, 15 (6), 517-531.
143. Pascal, R., Sola, R., Preservation of the Fmoc protective group under alkaline conditions by using CaCl_2 . Applications in peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* 1998, 39, 5031-5034.
144. Jiayi, X., Synthetic strategies of phosphonodepsipeptides. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 2021, 17, 461-484.
145. Olah, G. A., Narang, S. C., Gupta, B. G. B., Malhotra, R., Synthetic Methods and Reactions. 62.' Transformations with Chlorotrimethylsilane/Sodium Iodide, a Convenient in Situ Iodotrimethylsilane Reagent. *J. Org. Chem* 1979, 44 (8).
146. Rigby, J. H., Wilson, J. Z., Removal of methoxyethoxymethyl ethers with trimethylsilyl chloride-sodium iodide. *Tetrahedron Letters* 1984, 25 (14), 1429-1432.
147. Li, Z. L., L.-J., Sun, T., Liu, L., Xie, Z., Benzimidazole-BODIPY as optical and fluorometric pH sensor. *Dyes and Pigments* 2016, 128, 165-169.
148. Teknikel, E., Unaleroglu, C., Colorimetric and fluorometric pH sensor based on bis(methoxycarbonyl)ethenyl functionalized BODIPY. *Dyes and Pigments* 2015, 120, 239-244.
149. Bittel, A. M., Davis, A. M., Wang, L., Nederlof, M. A., Escobedo, J. O., Strongin, R. M., Gibbs, S. L., Varied Length Stokes Shift BODIPY-Based Fluorophores for Multicolor Microscopy. *Sci Rep* 2018, 8 (1), 4590.
150. Ksenofontova, K. V., Ksenofontov, Alexander A., Khodov, Ilya A., Rummyantsev, Evgeniy V., Novel BODIPY-conjugated amino acids: Synthesis and spectral properties. *Journal of Molecular Liquids* 2019, 283, 695-703.
151. Boens, N., Qin, W., Basarić, N., Hofkens, J., Ameloot, M., Supporting Information for Fluorescence Lifetime Standards for Time and Frequency Domain Fluorescence Spectroscopy.
152. Gupta, M. Synthesis, photo-physical and laser characterization of fluorescent dyes 2014.
153. Škorić, I., Odak, I., *Organska fotokemija, principi i primjena*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2017, 36-51.

154. Lawson-Wood, K., Upstone, S., Evans, K., Determination of Relative Fluorescence Quantum Yields using the FL6500 Fluorescence Spectrometer. PerkinElmer, I. S. G., UK, Ed. 2018.

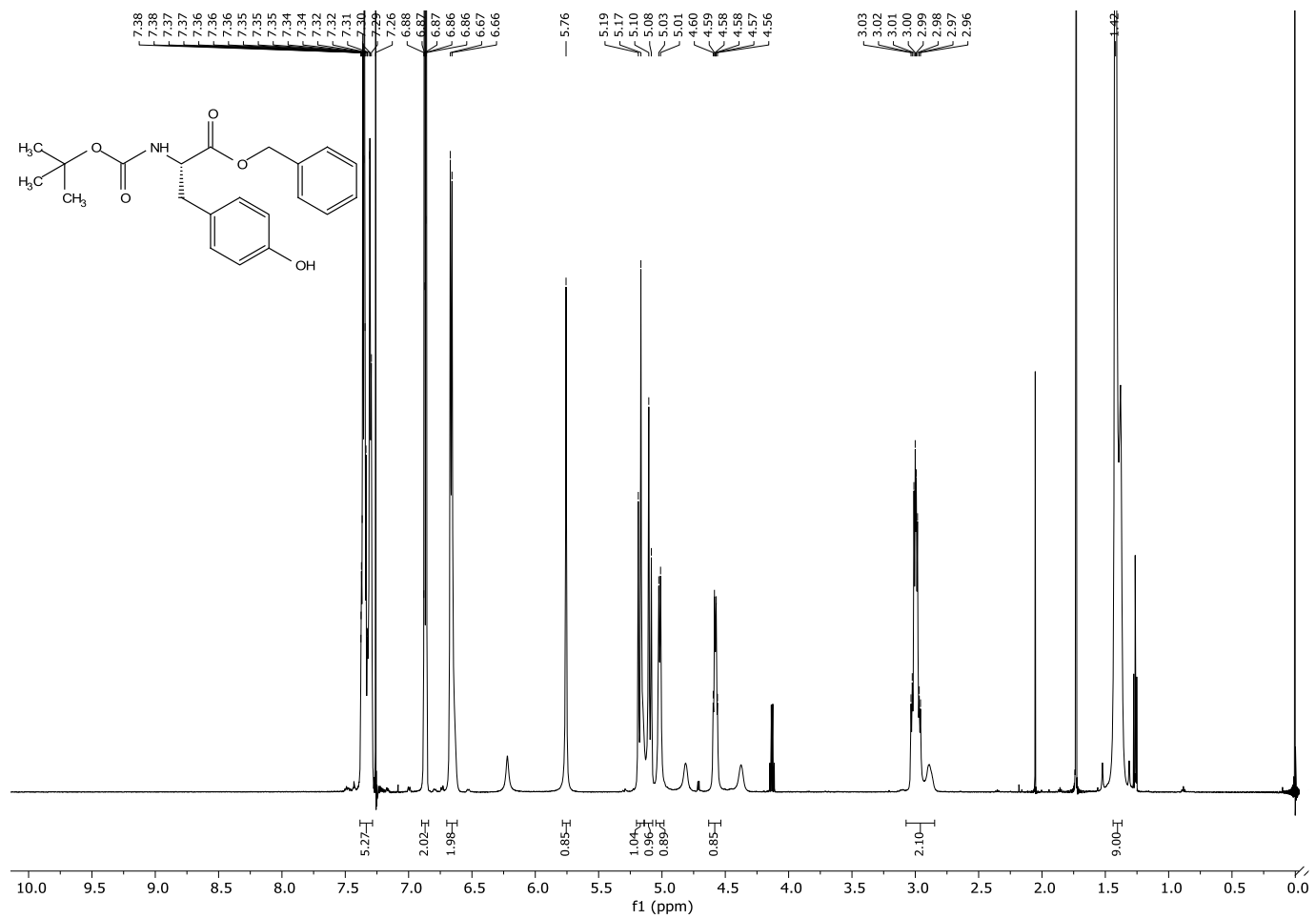
7. PRILOZI

7.1. Spektri NMR

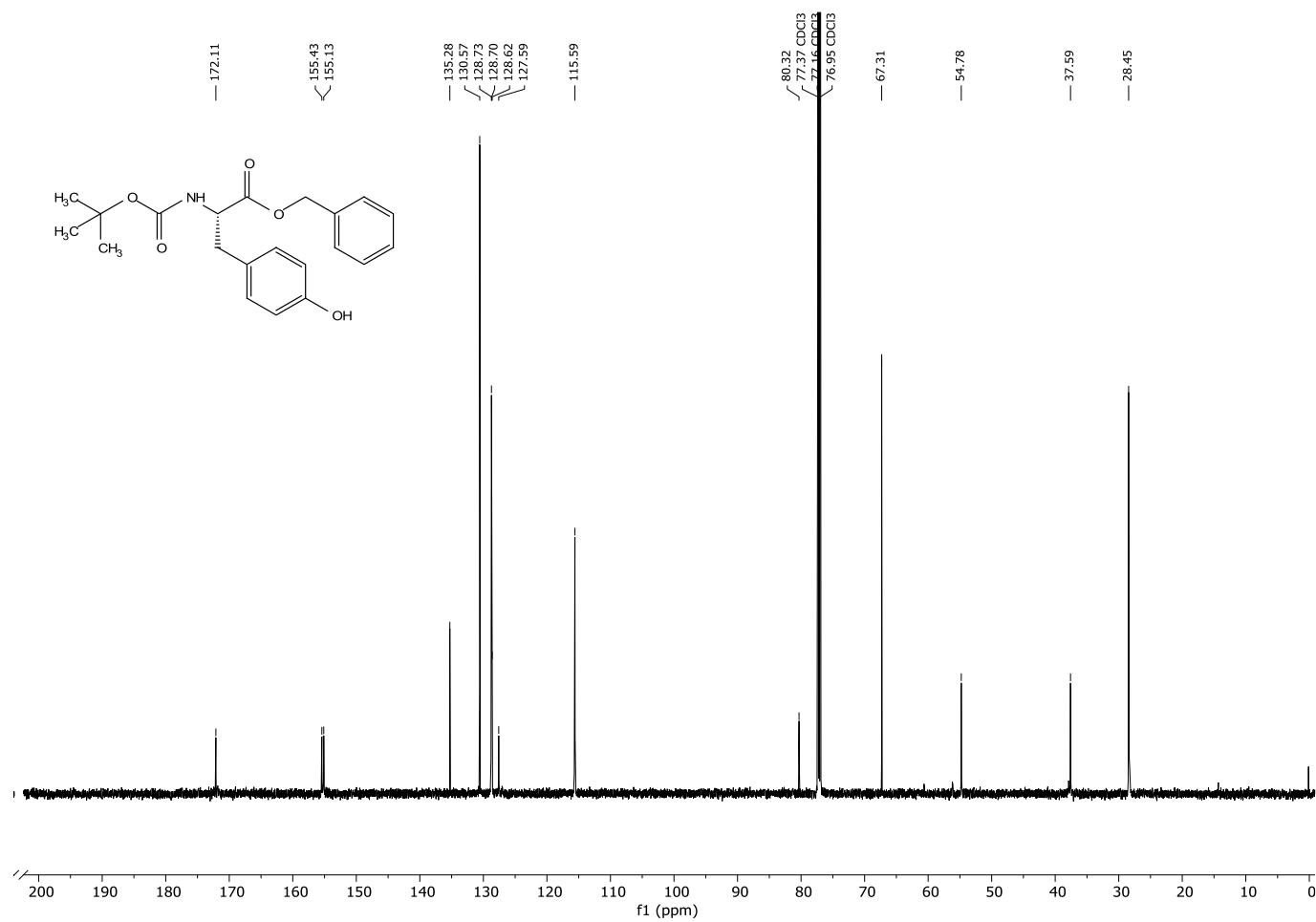
Prilog 1. ^1H NMR spektar (CD_3OD , 600 MHz) spoja 4



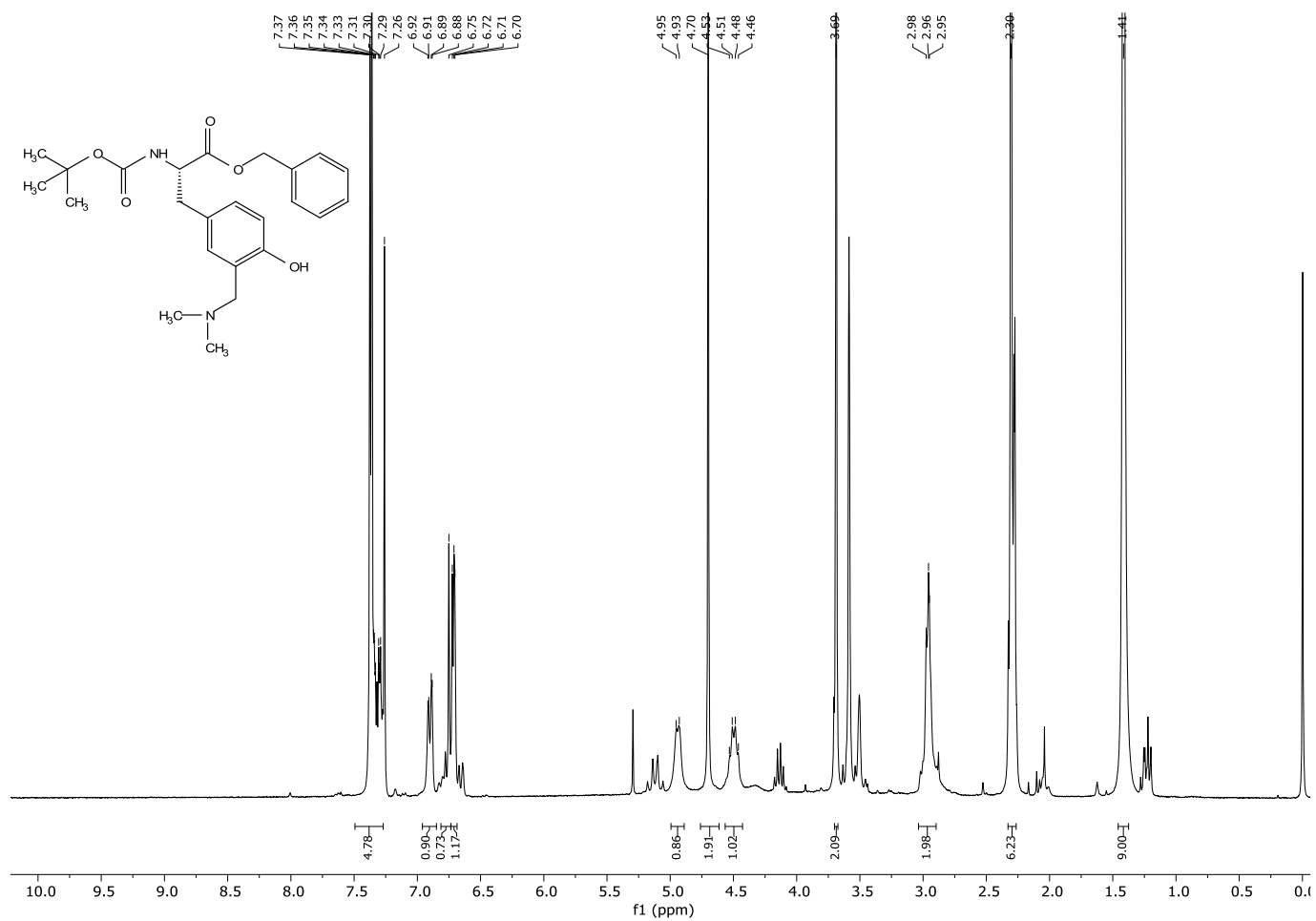
Prilog 2. ¹H NMR spektar (CDCl₃, 600 MHz) spoja 5



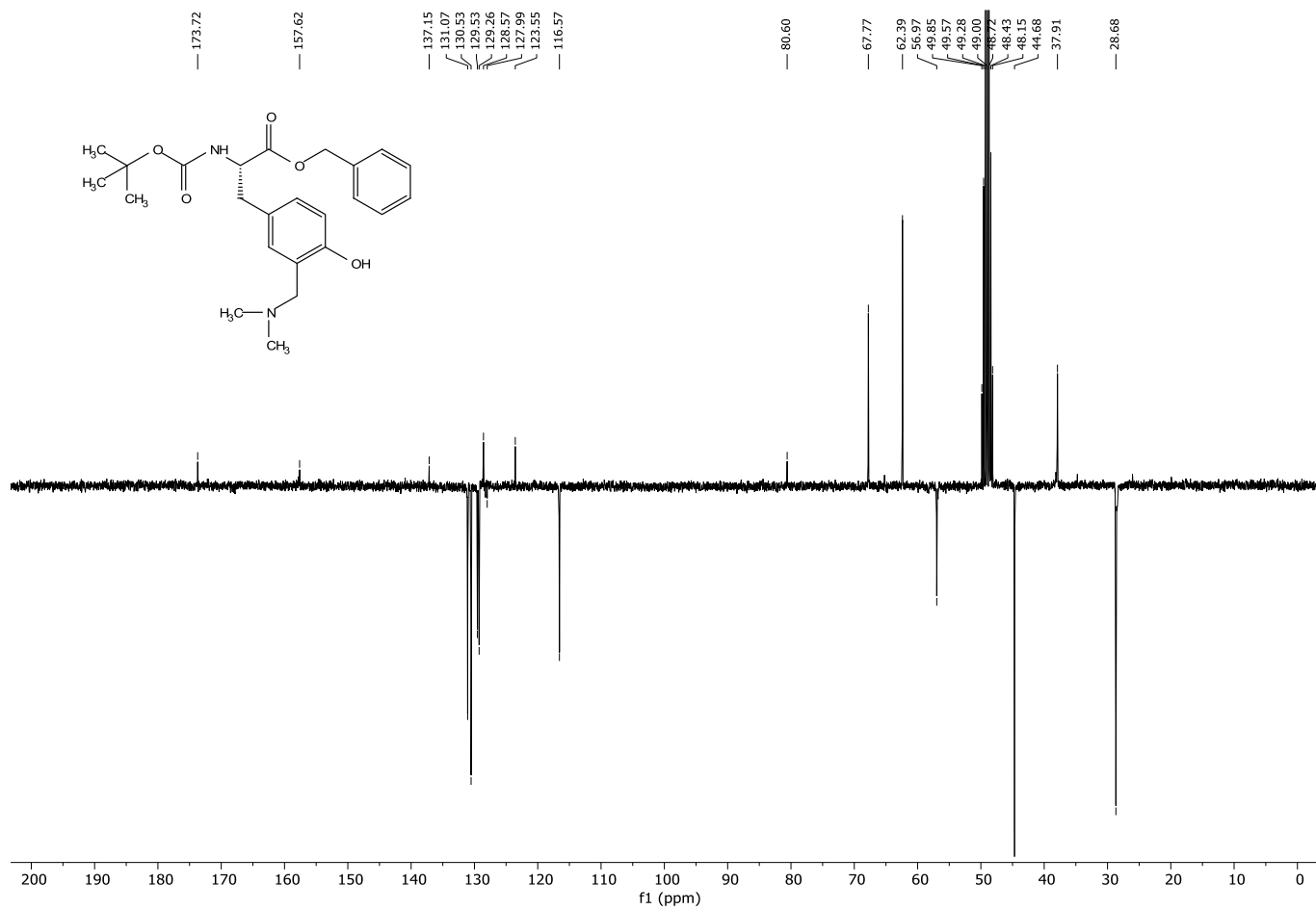
Prilog 3. ^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , 151 MHz) spoja 5



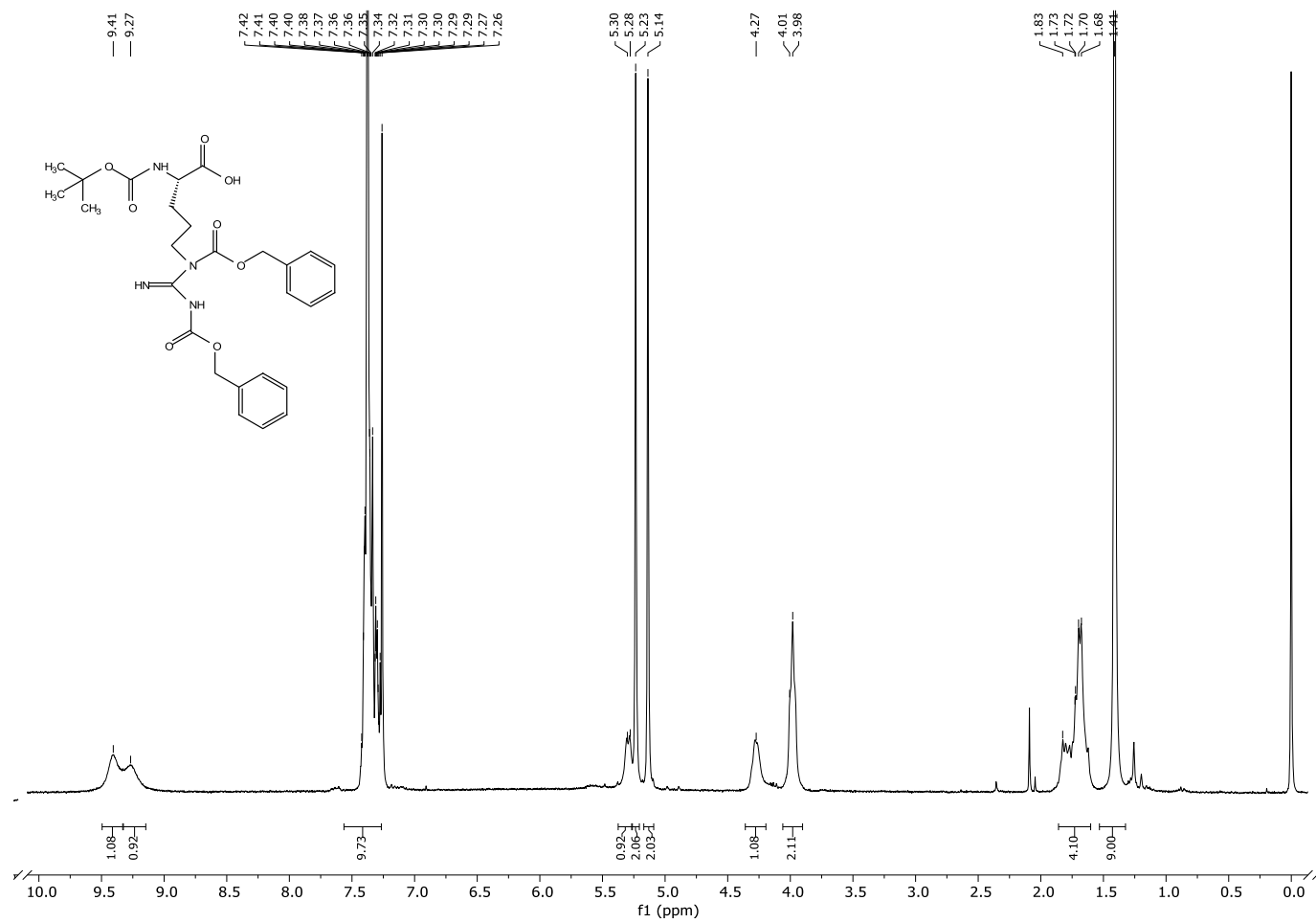
Prilog 4. ¹H NMR spektar (CDCl₃, 300 MHz) spoja 6



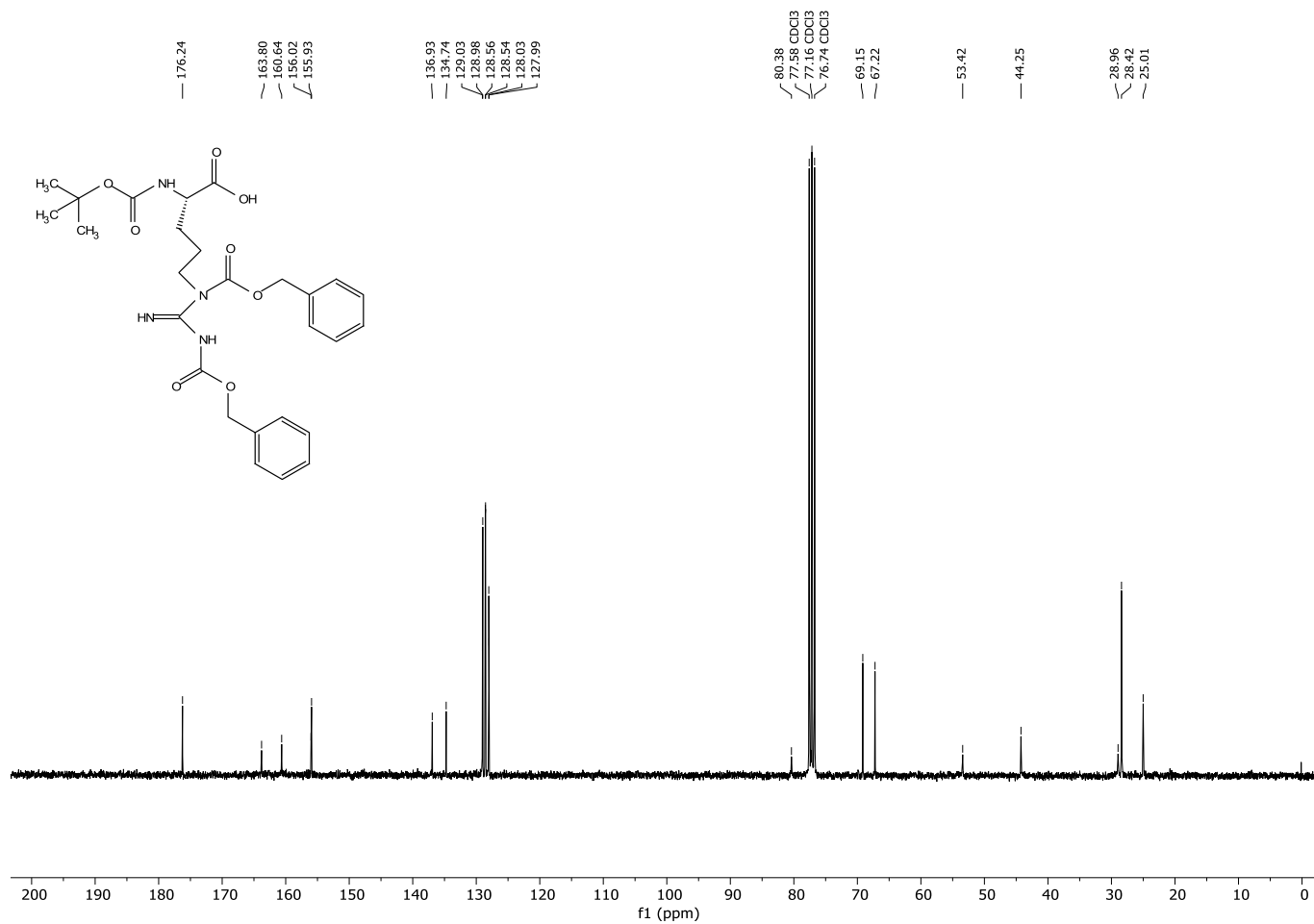
Prilog 5. ^{13}C NMR spektar (CD_3OD , 75 MHz) spoja 6



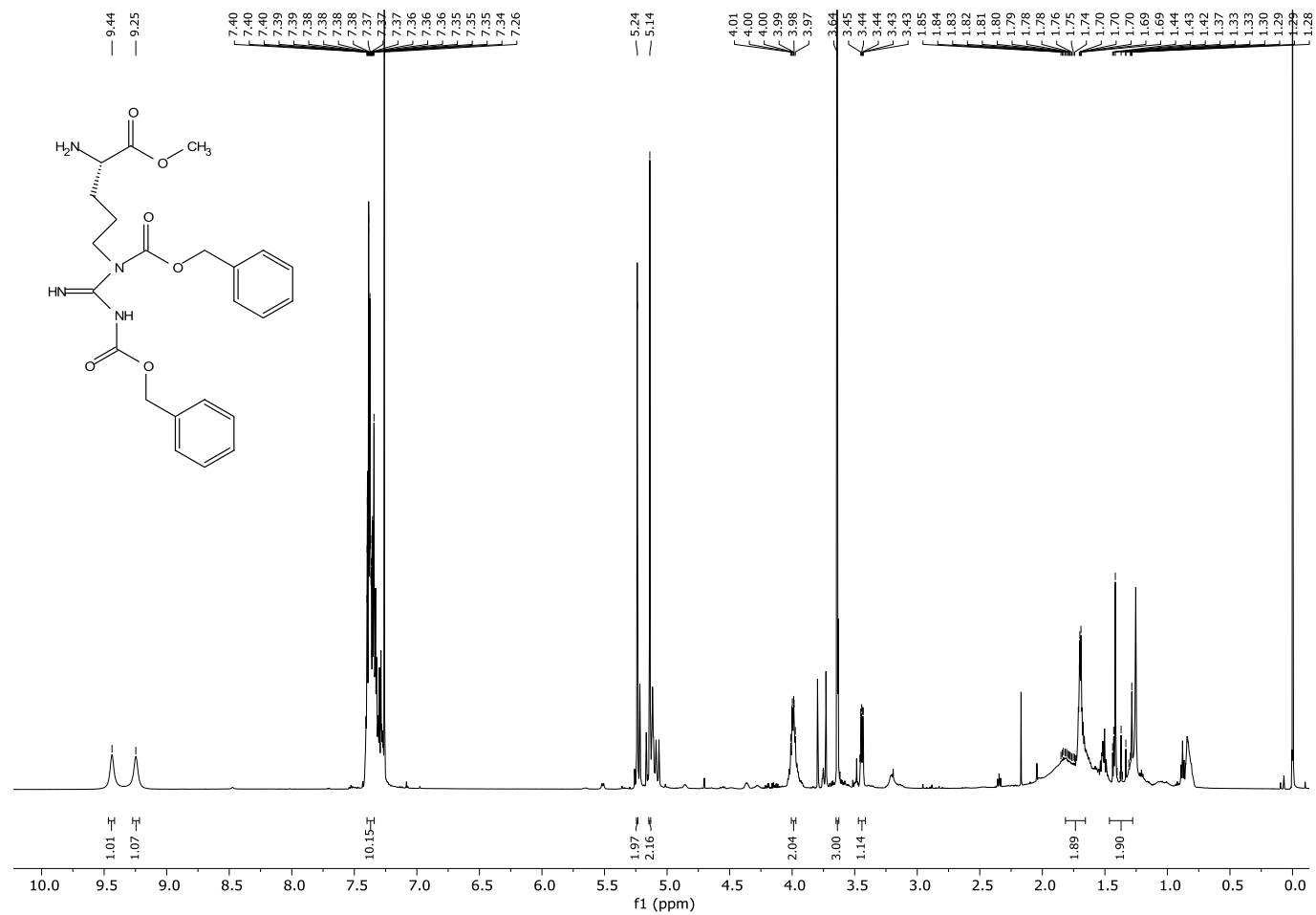
Prilog 6. ¹H NMR spektar (CDCl₃, 300 MHz) spoja 9



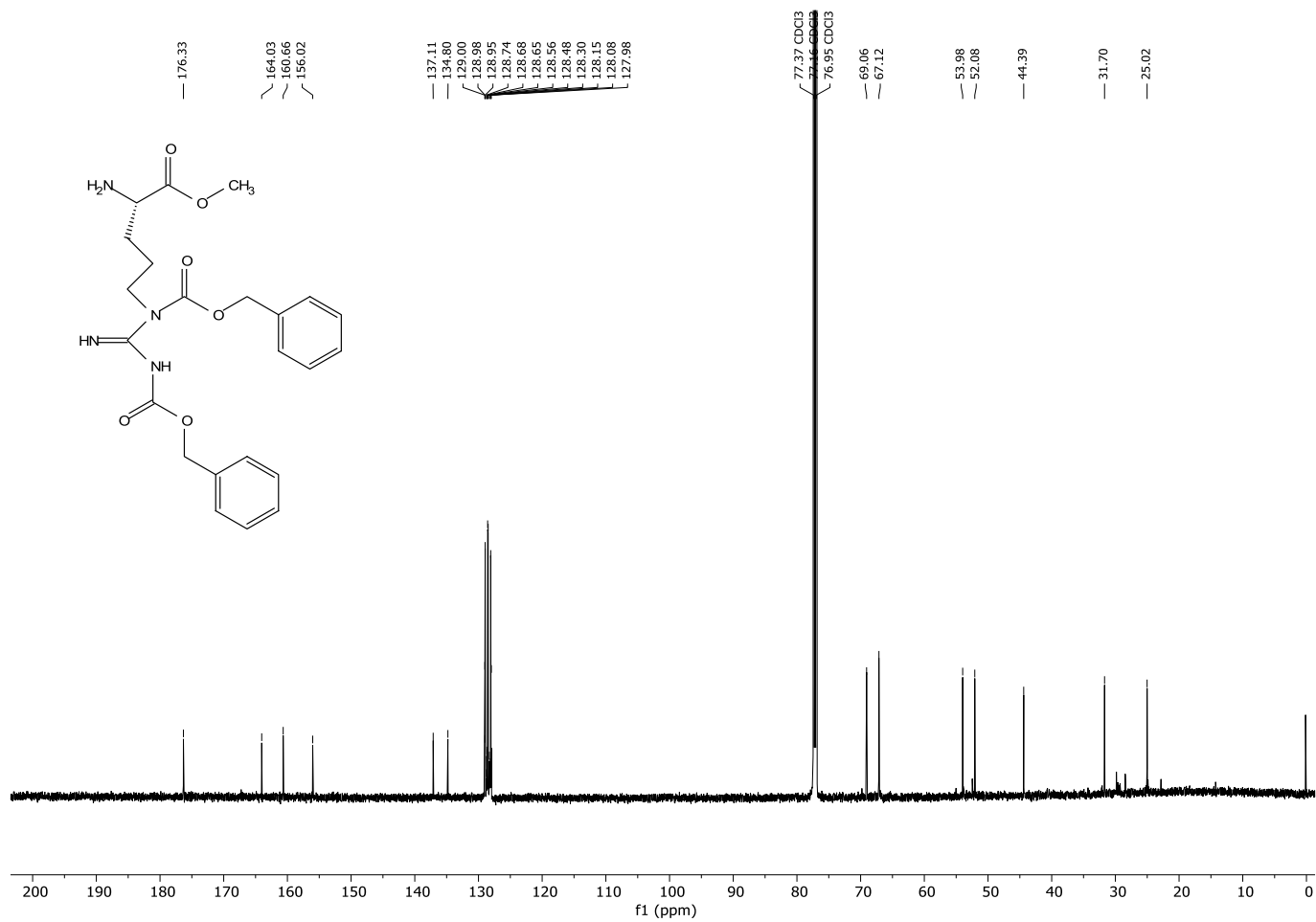
Prilog 7. ^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , 75 MHz) spoja 9



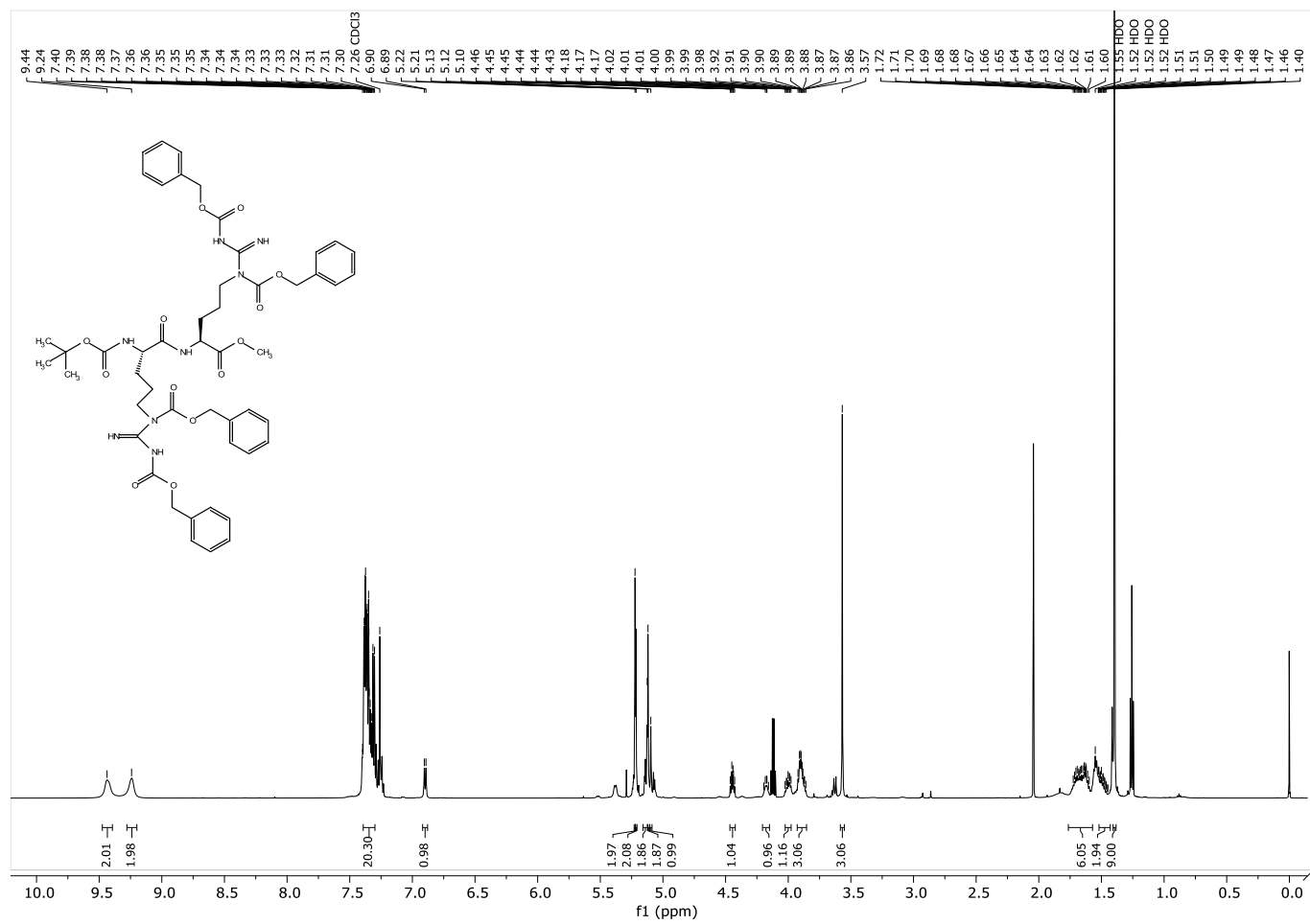
Prilog 8. ^1H NMR spektar (CDCl_3 , 600 MHz) spoja 11



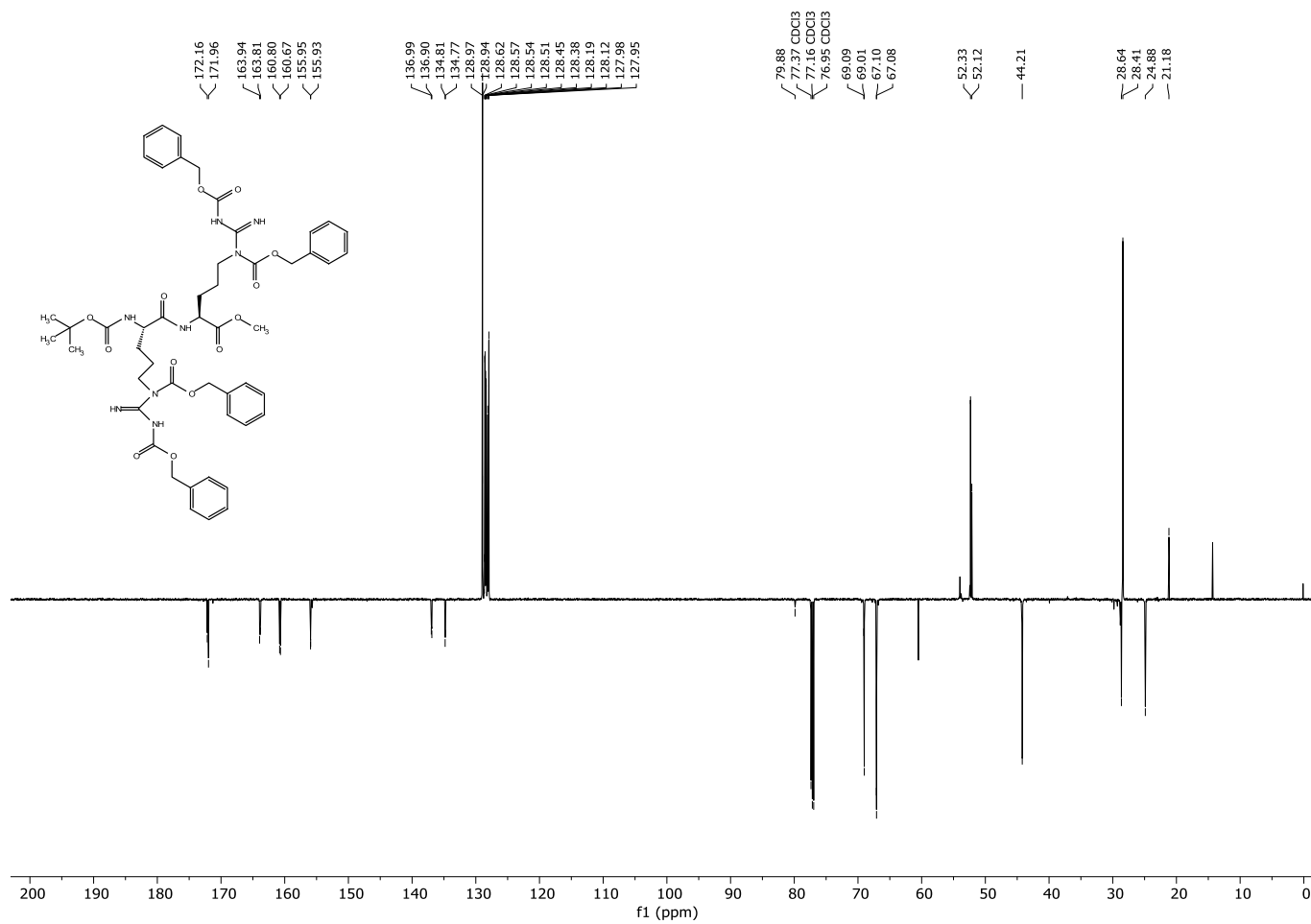
Prilog 9. ^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , 151 MHz) spoja 11



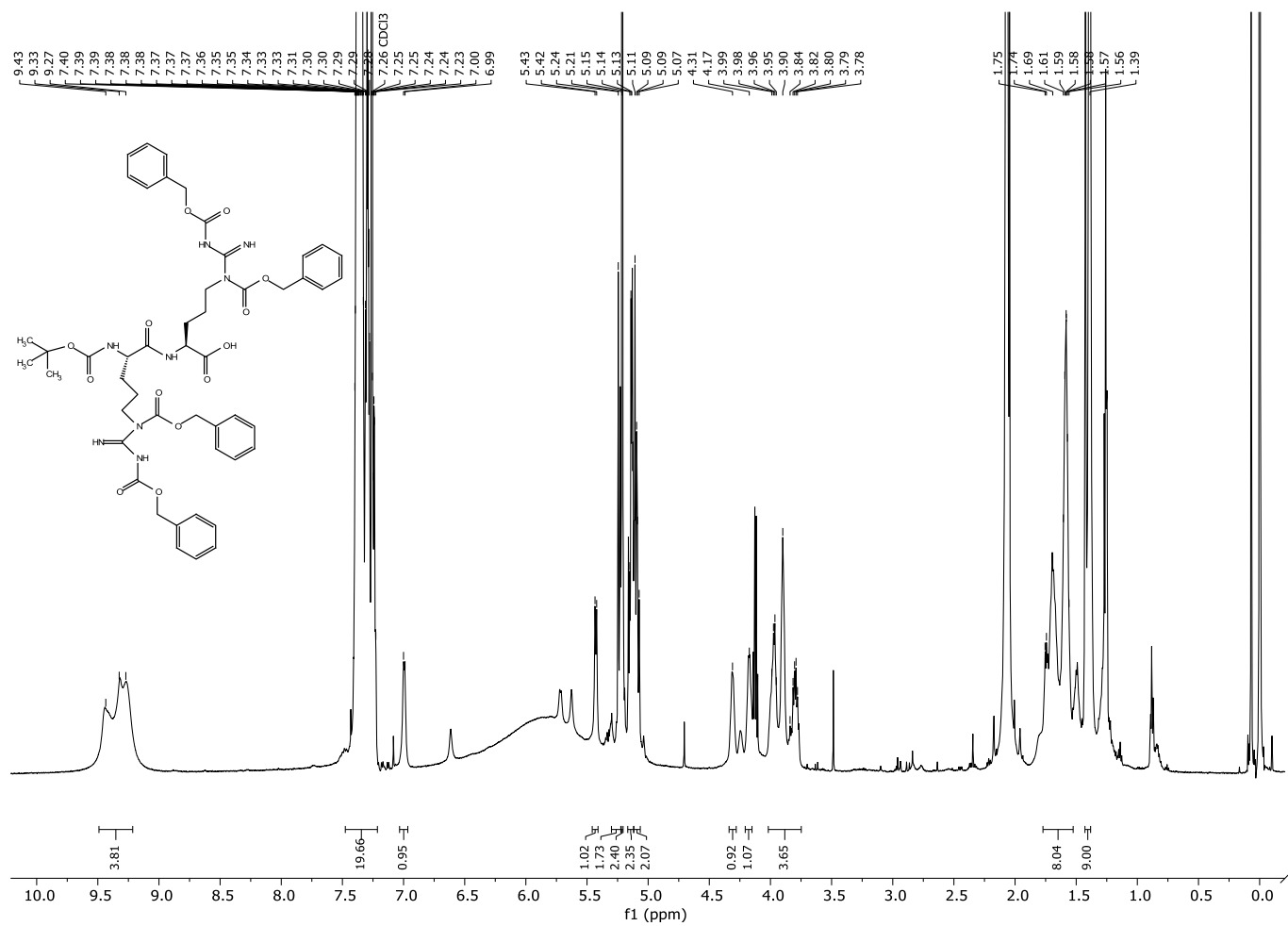
Prilog 10. ^1H NMR spektar (CDCl_3 , 600 MHz) spoja 14



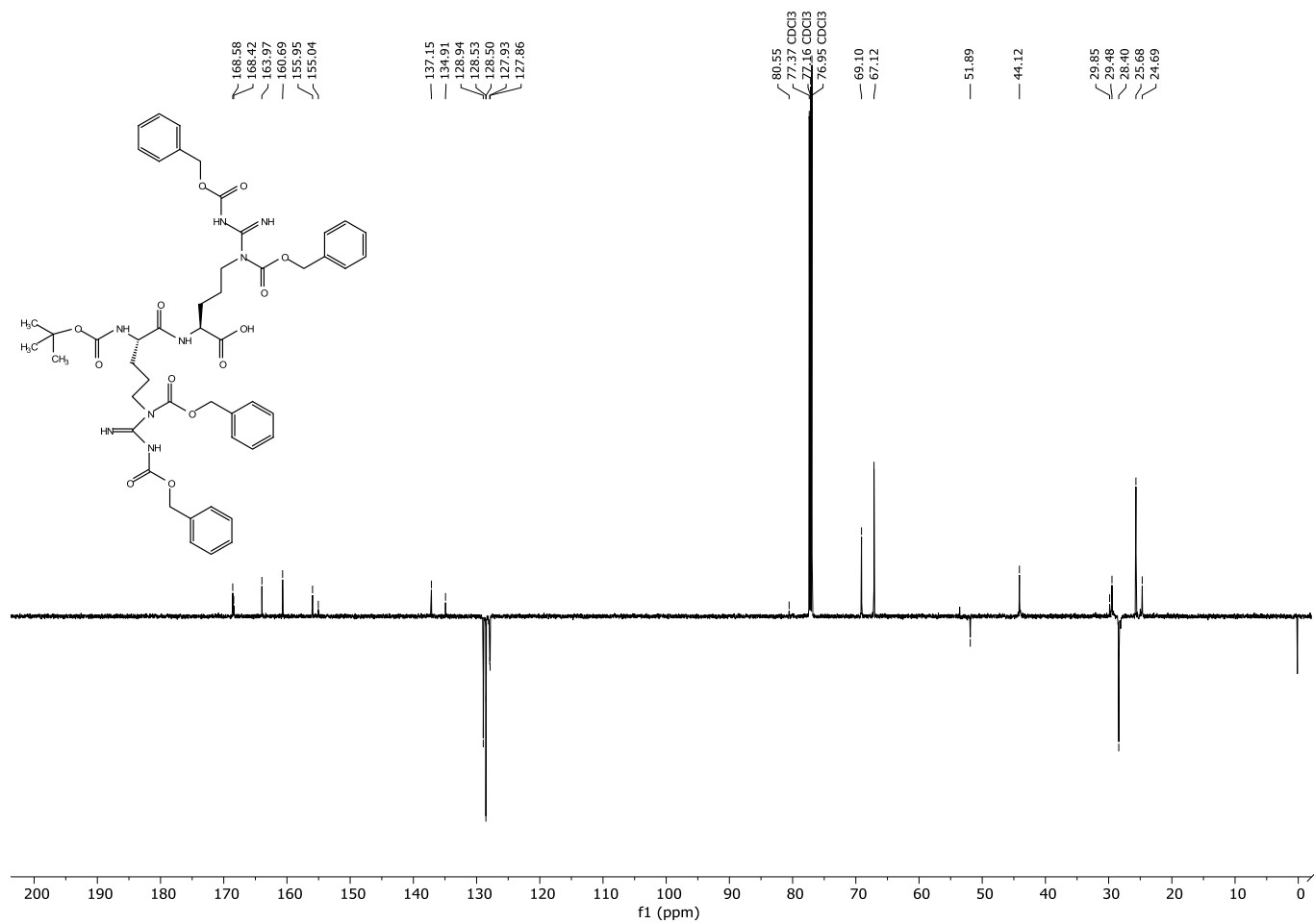
Prilog 11. ^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , 151 MHz) spoja 14



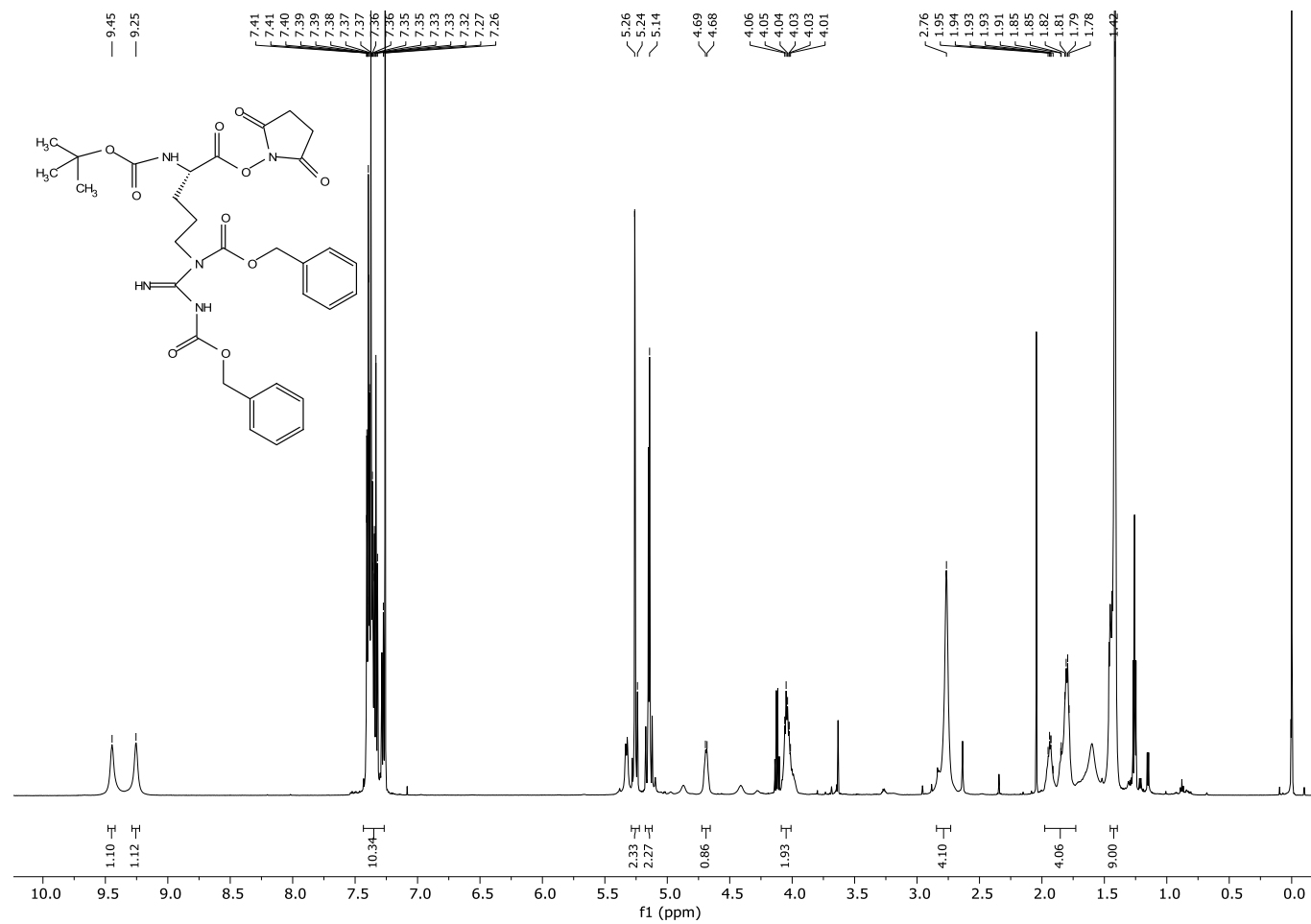
Prilog 12. ^1H NMR spektar (CDCl_3 , 600 MHz) spoja 15



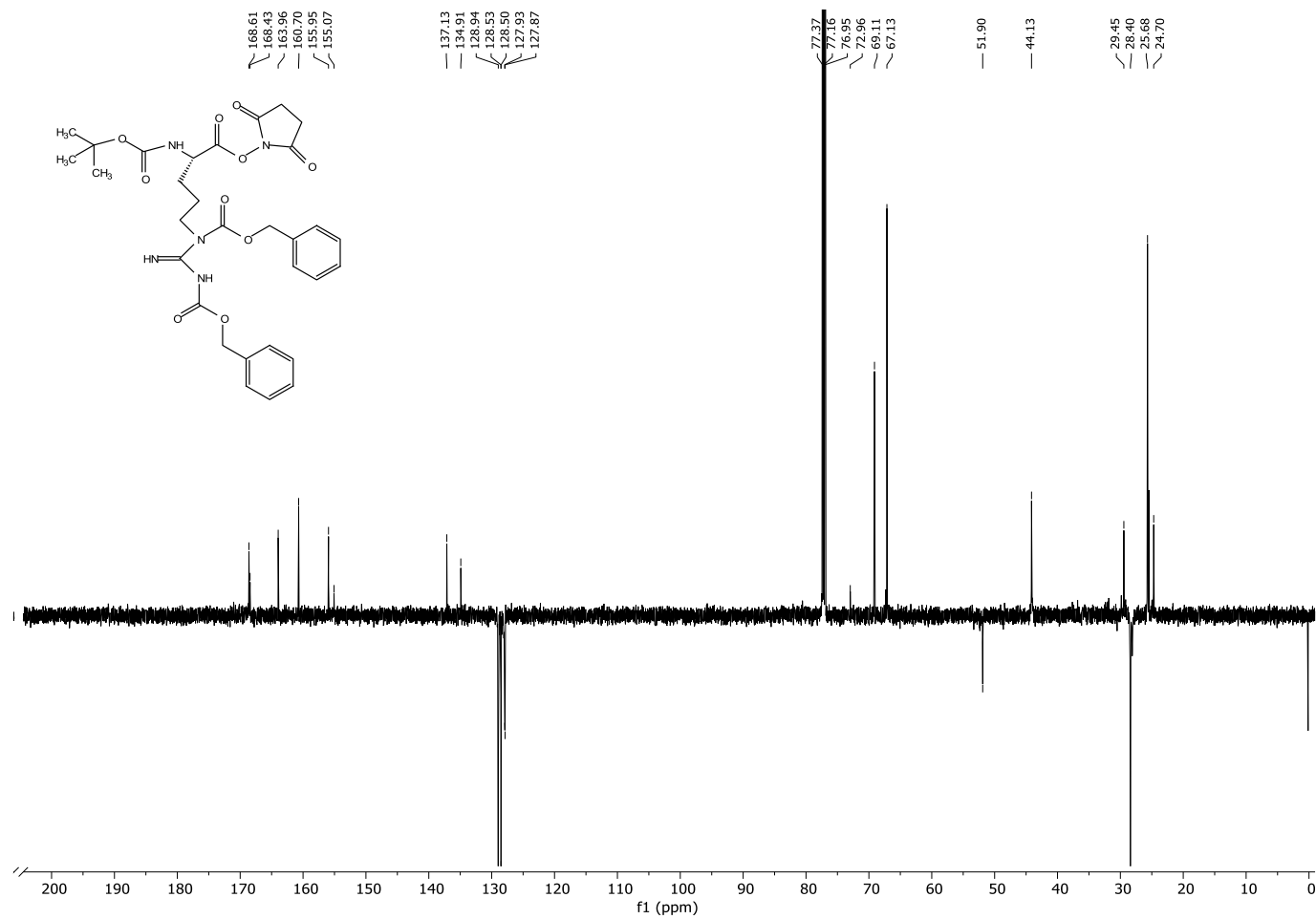
Prilog 13. ^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , 151 MHz) spoja 15



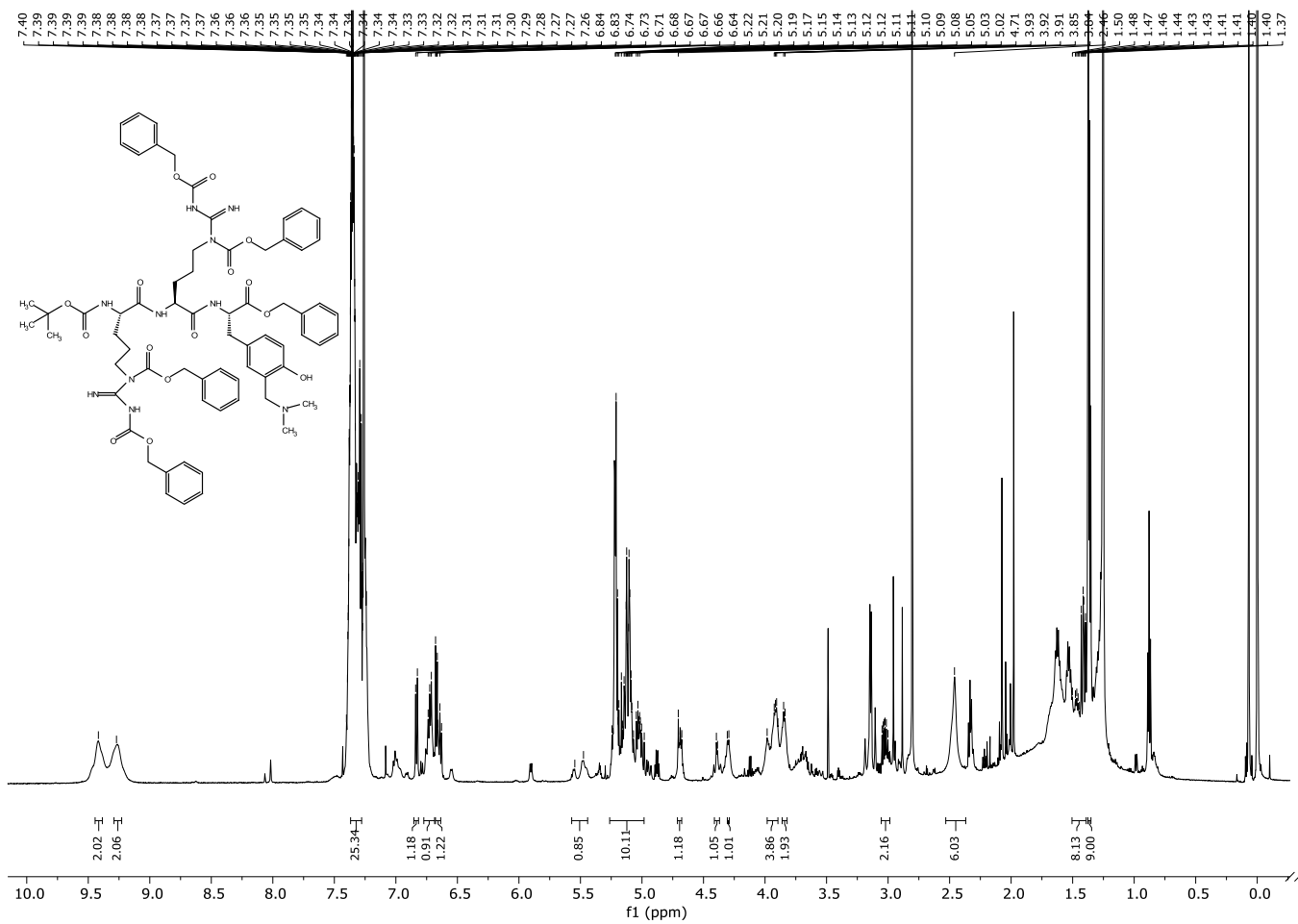
Prilog 14. ^1H NMR spektar (CDCl_3 , 600 MHz) spoja 16



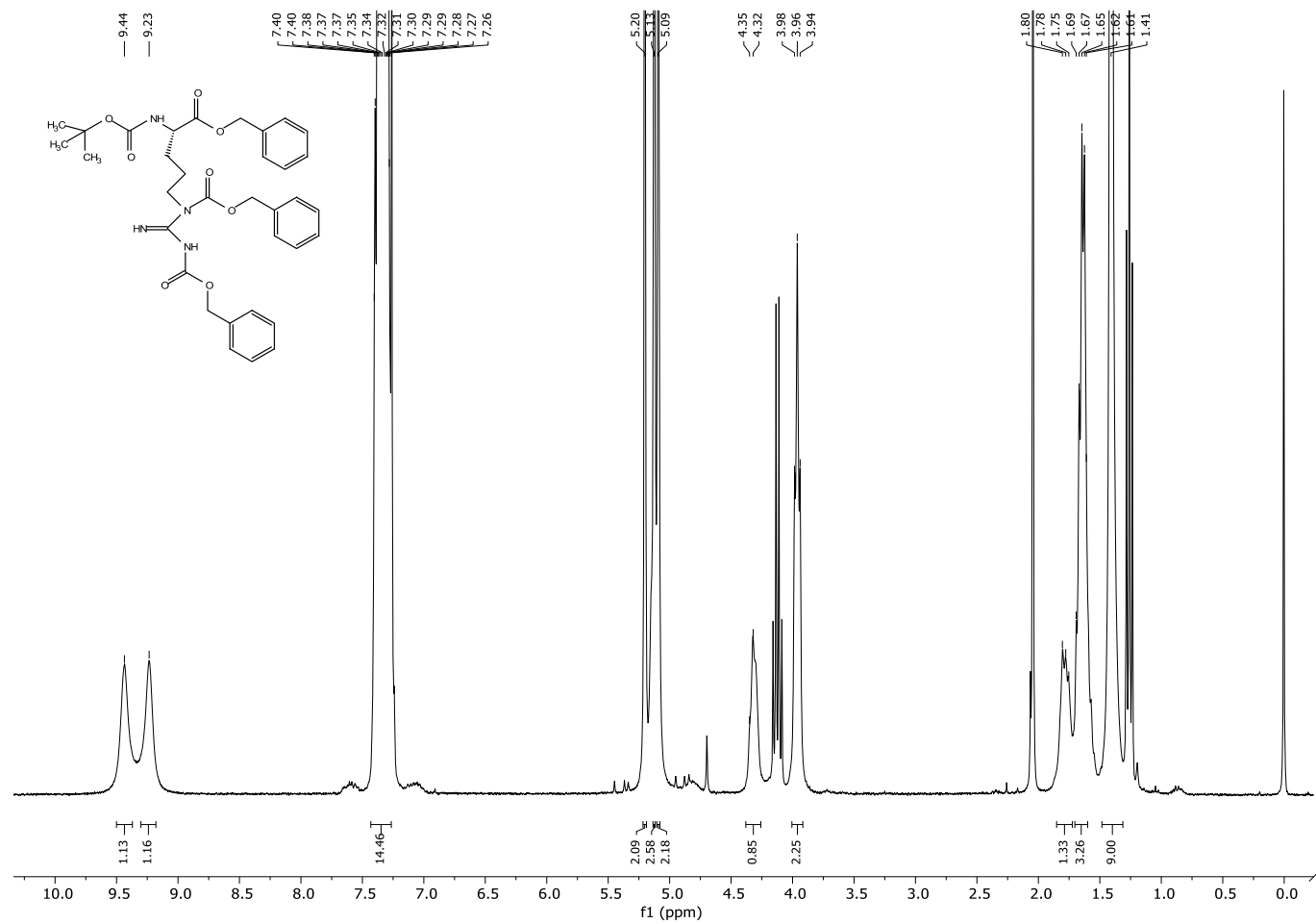
Prilog 15. ^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , 151 MHz) spoja 16



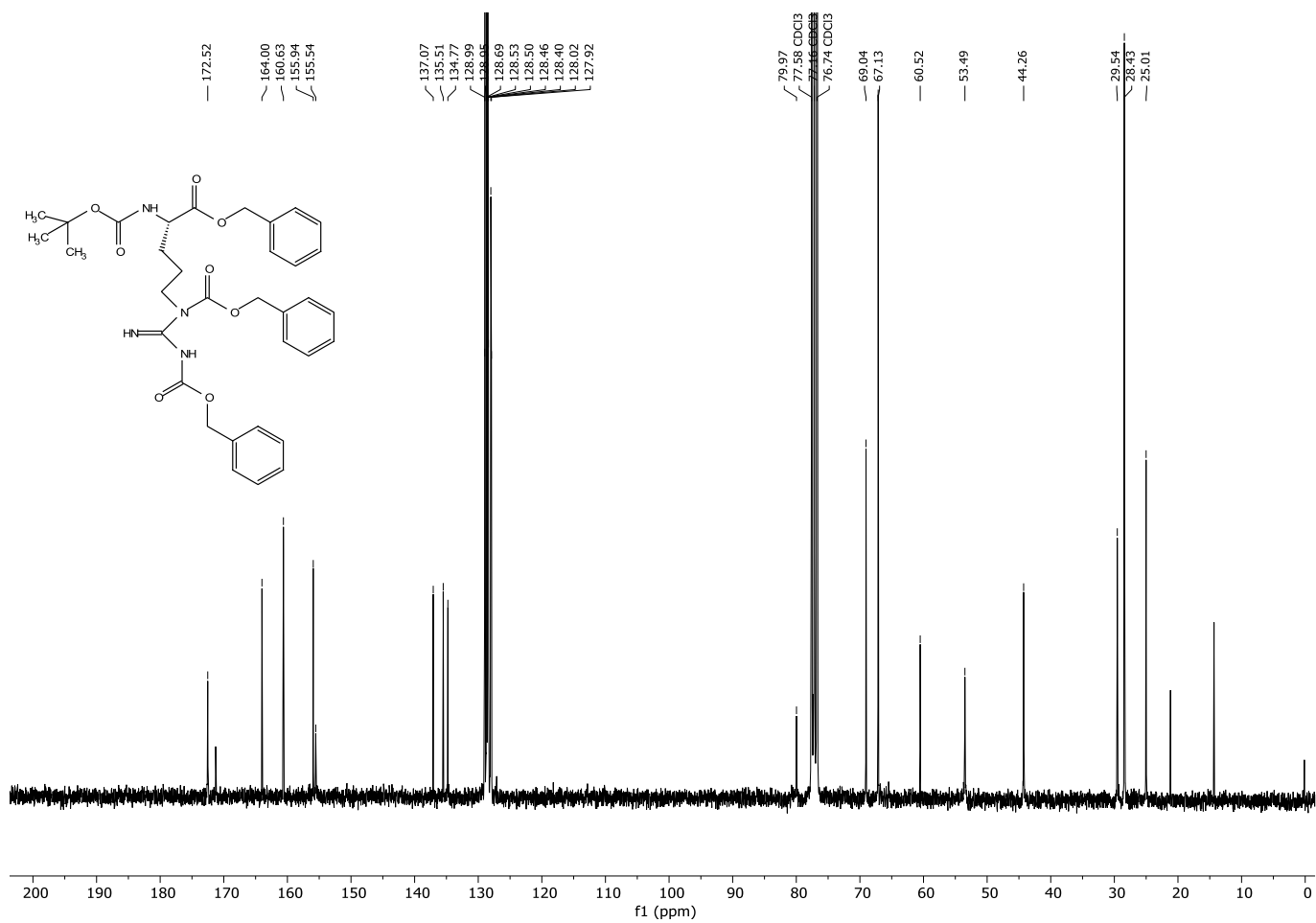
Prilog 16. ¹H NMR spektar (CDCl₃, 600 MHz) spoja 1



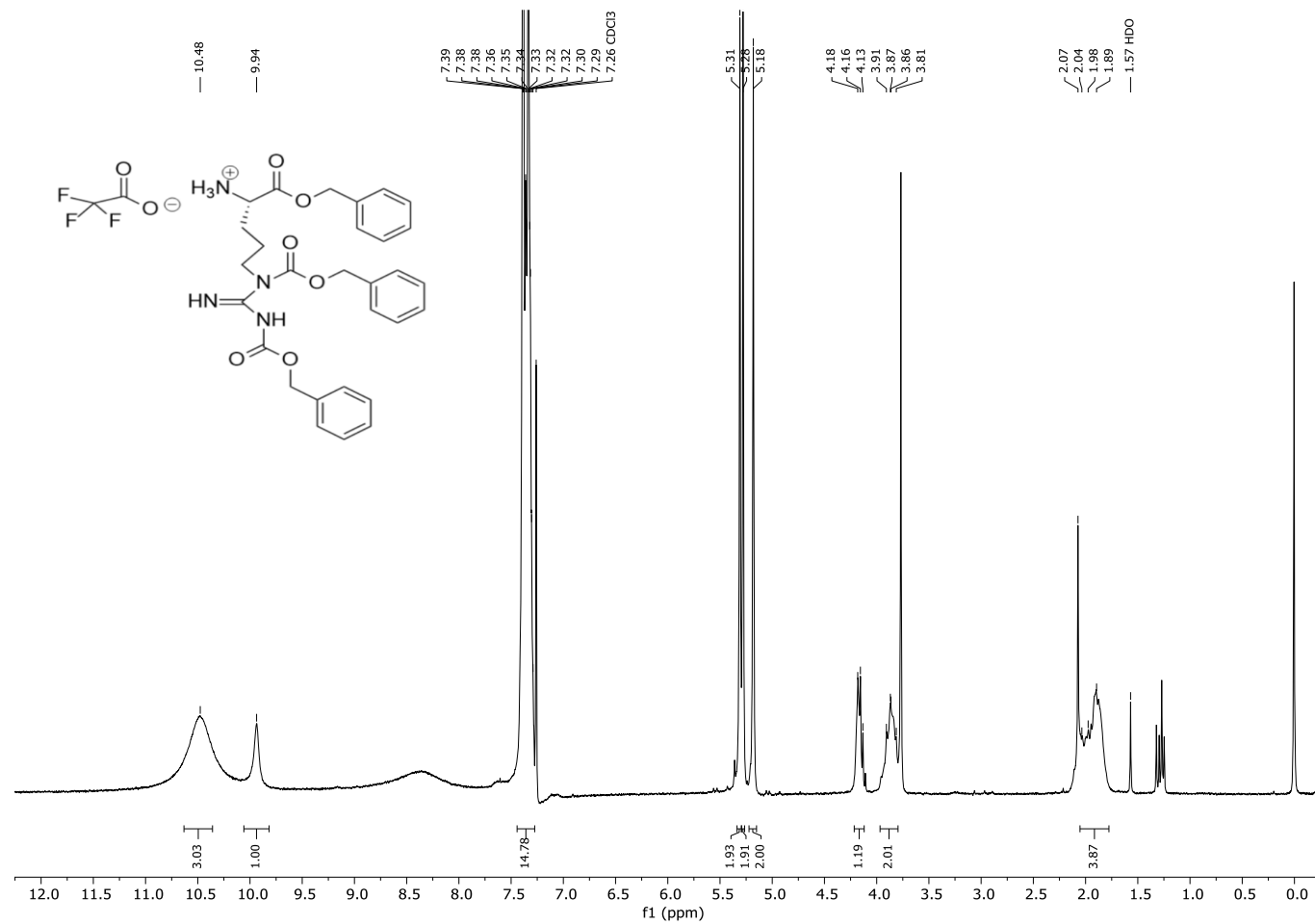
Prilog 17. ¹H NMR spektar (CDCl₃, 300 MHz) spoja 18



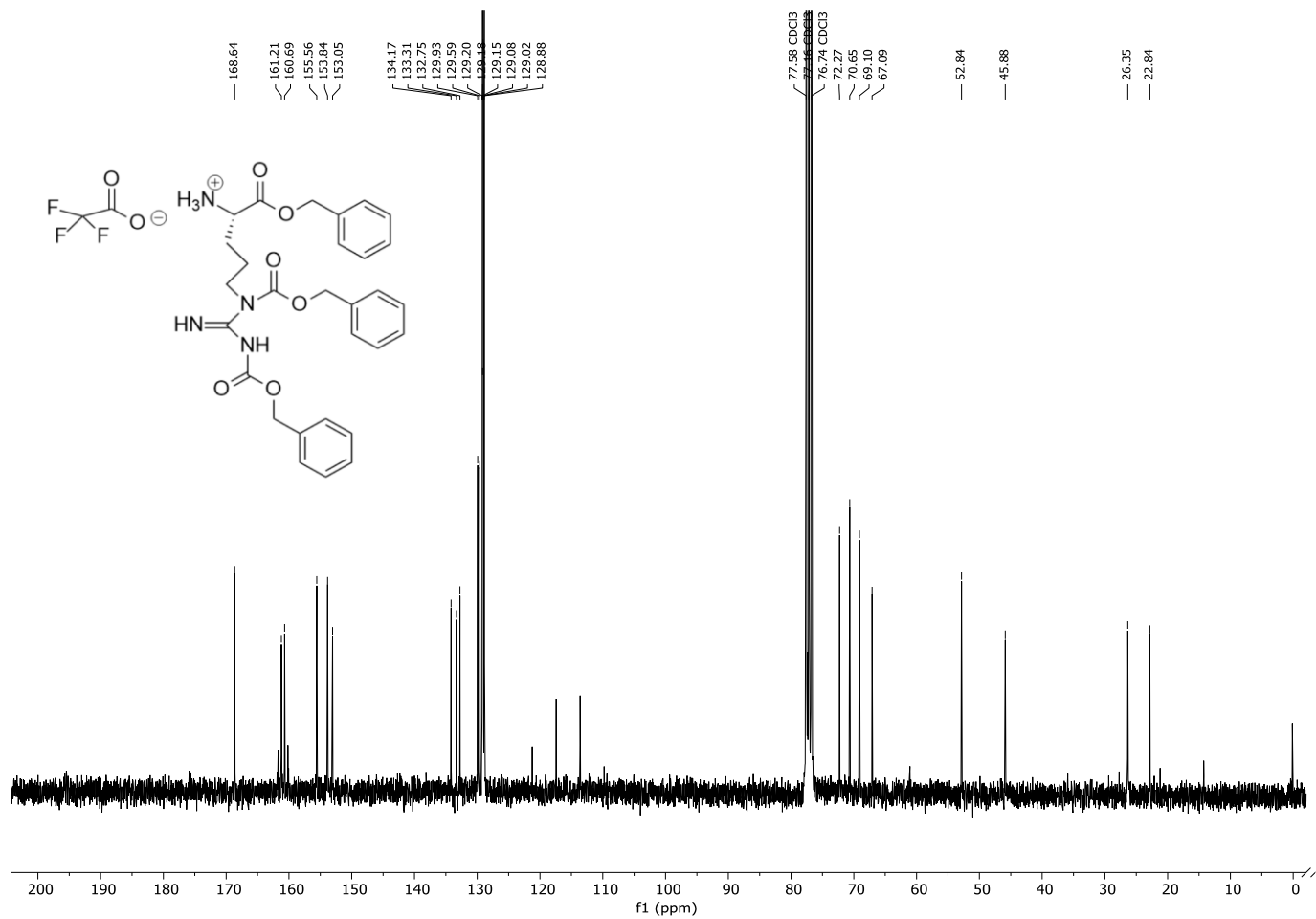
Prilog 18. ^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , 75 MHz) spoja 18



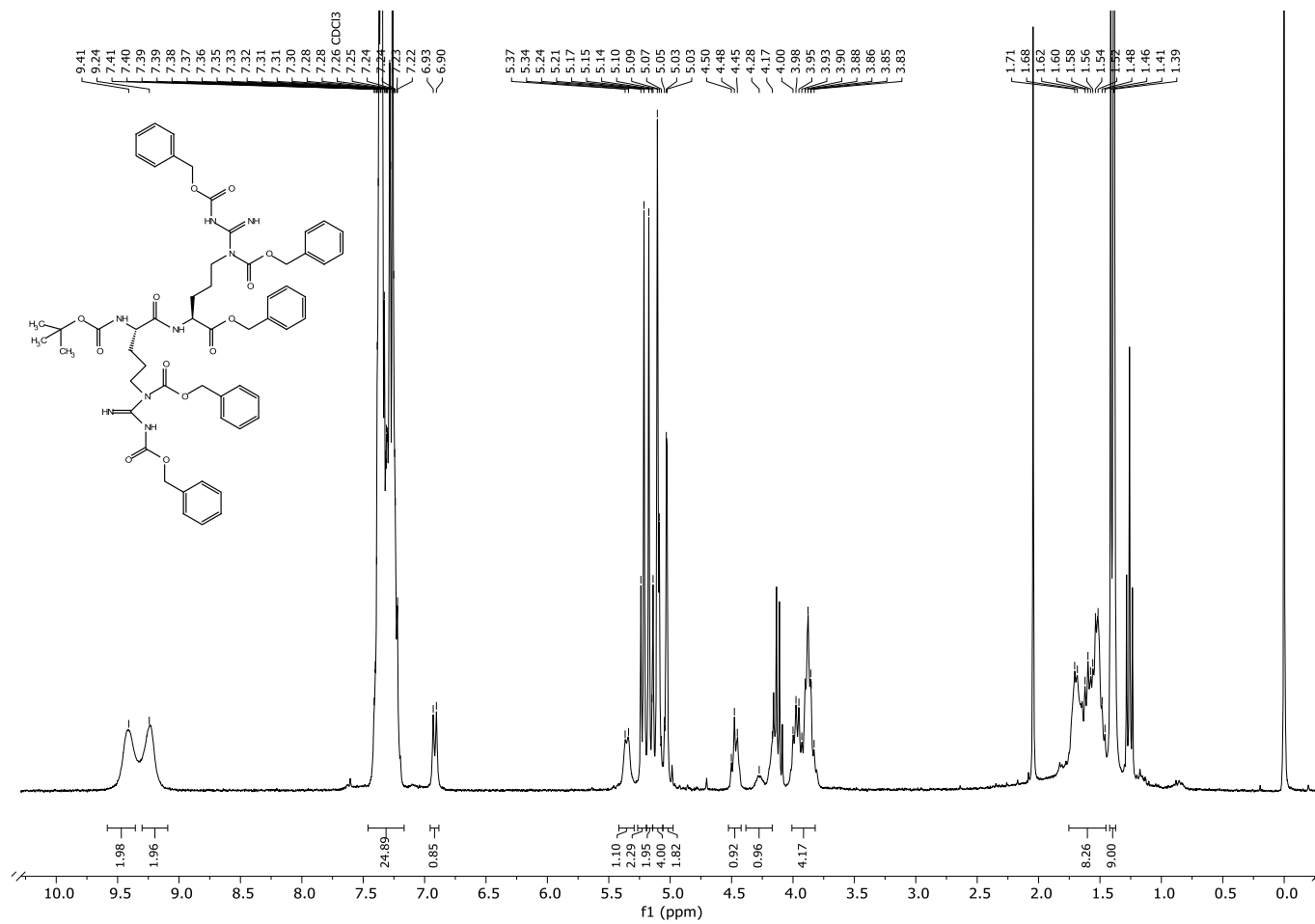
Prilog 19. ¹H NMR spektar (CDCl₃, 300 MHz) spoja 19



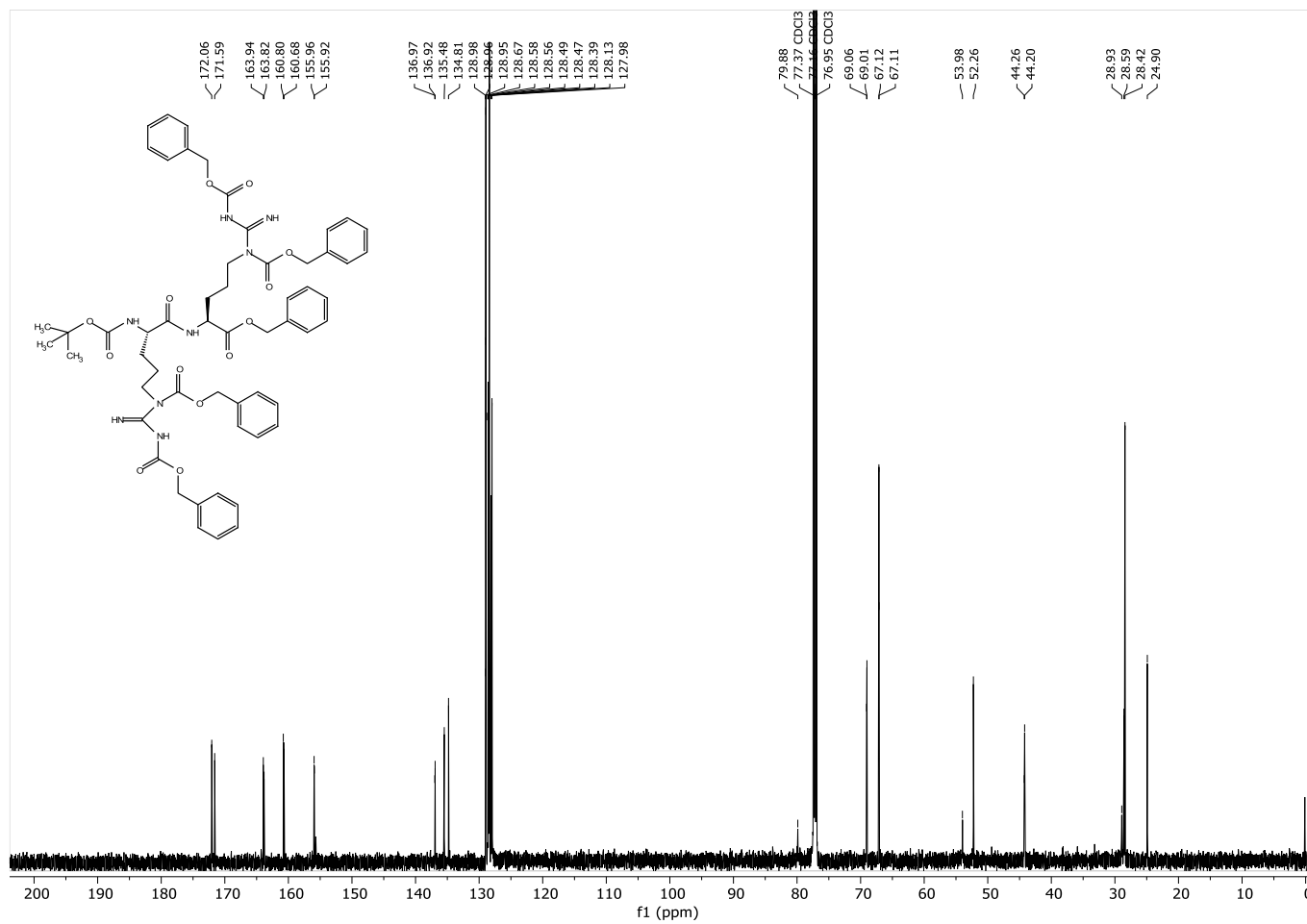
Prilog 20. ^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , 75 MHz) spoja 19



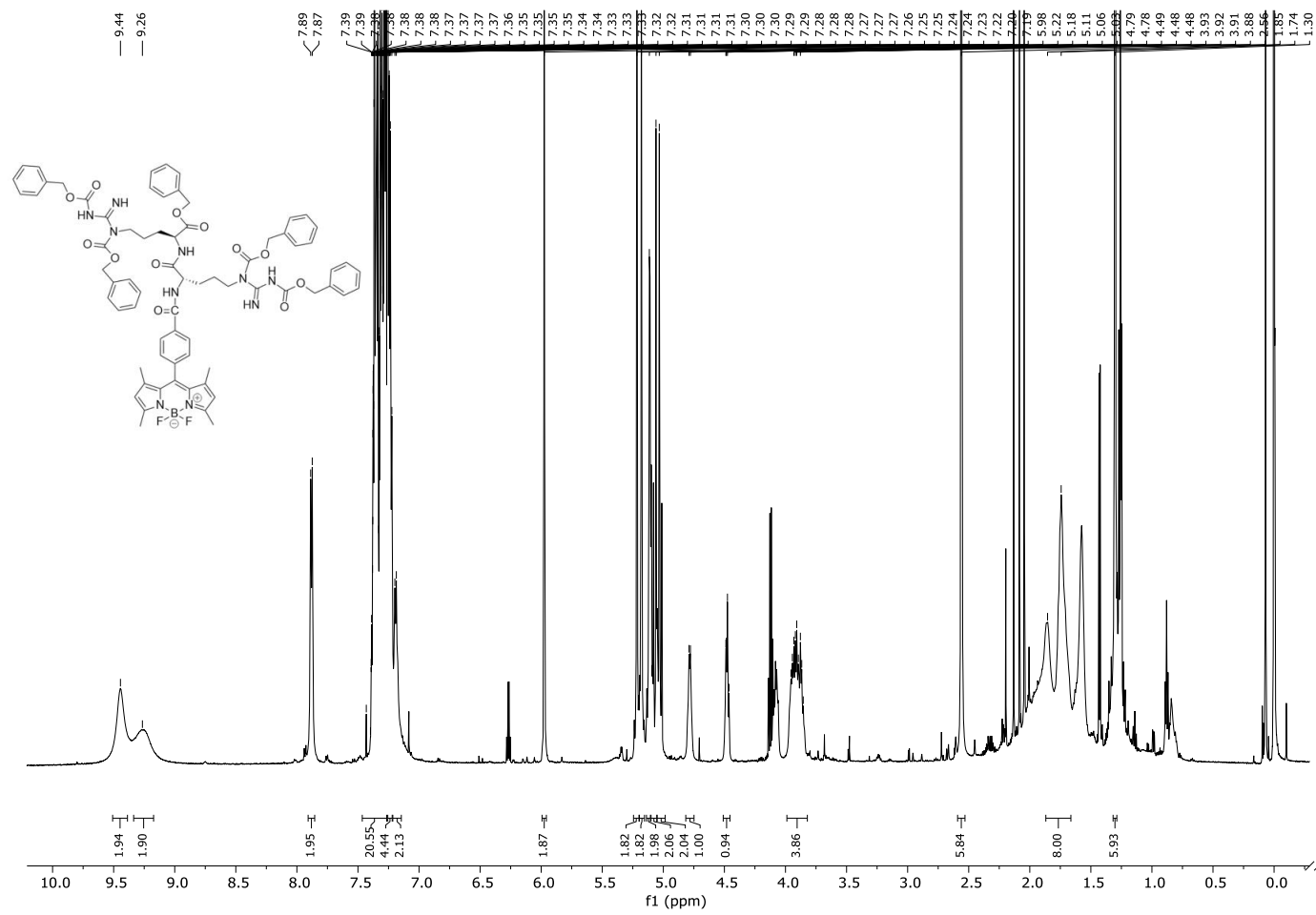
Prilog 21. ^1H NMR spektar (CDCl_3 , 300 MHz) spoja 20



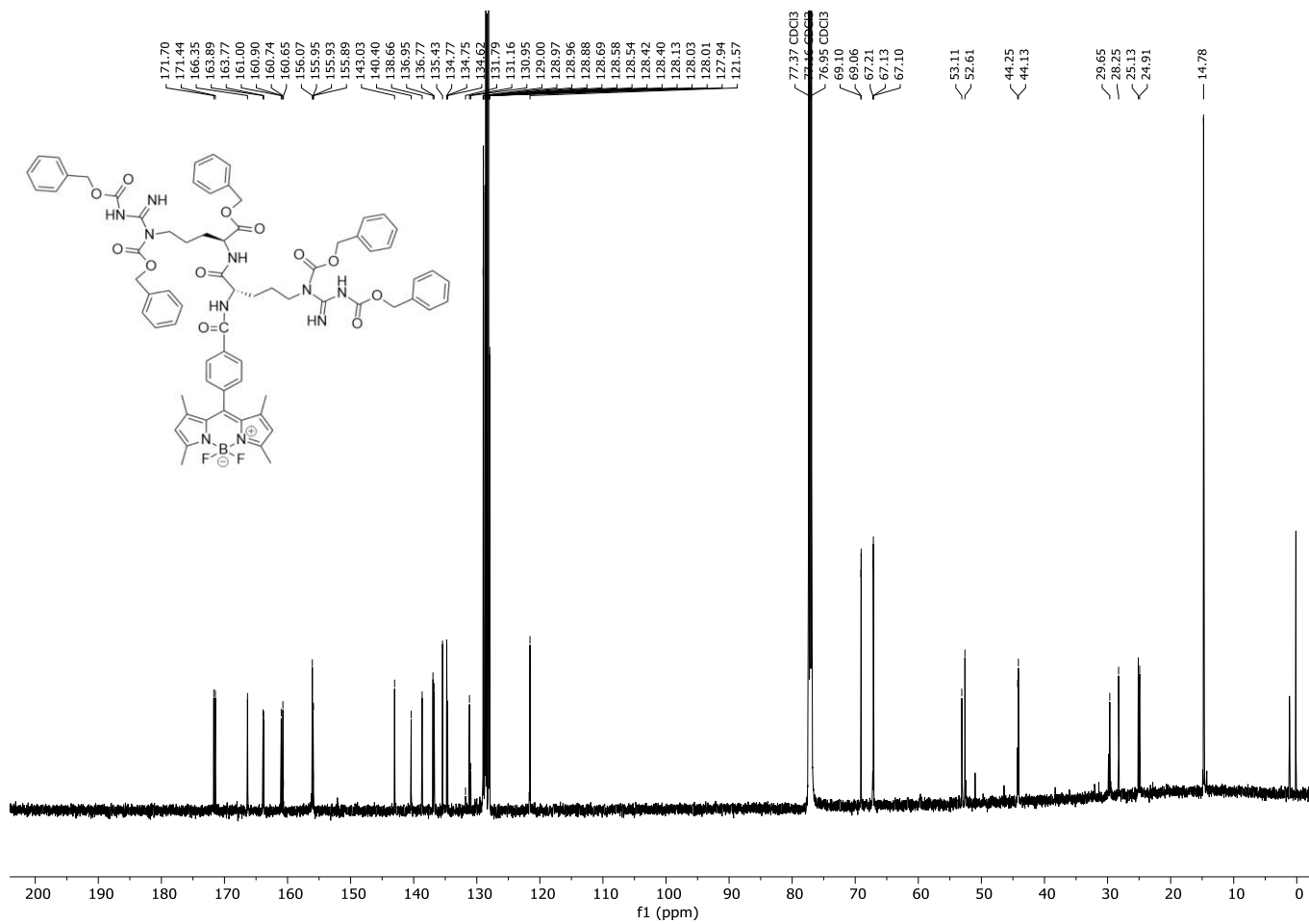
Prilog 22. ^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , 151 MHz) spoja 20



Prilog 23. ¹H NMR spektar (CDCl₃, 600 MHz) spoja 2

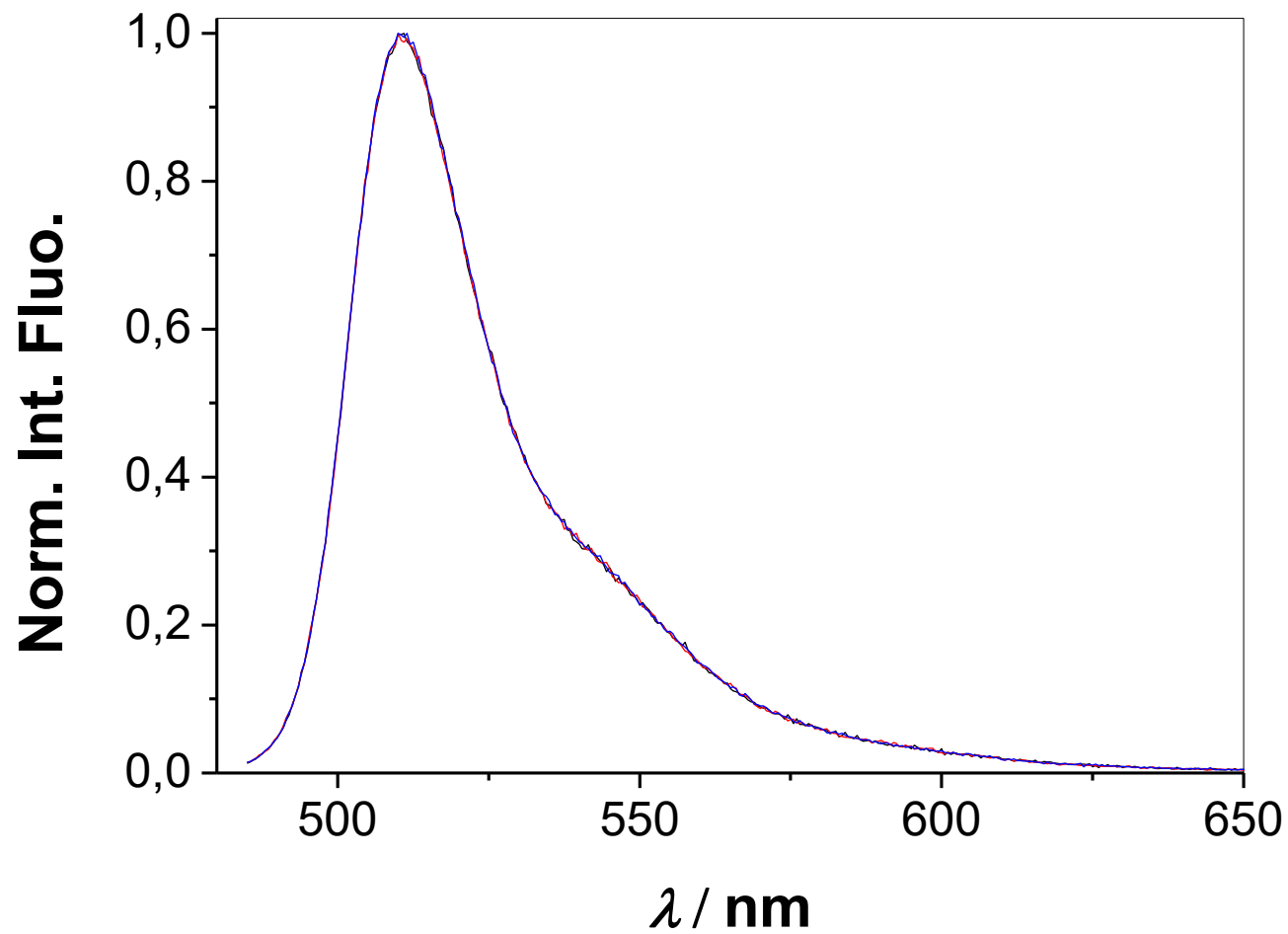


Prilog 24. ^{13}C NMR spektar (CDCl_3 , 151 MHz) spoja 2

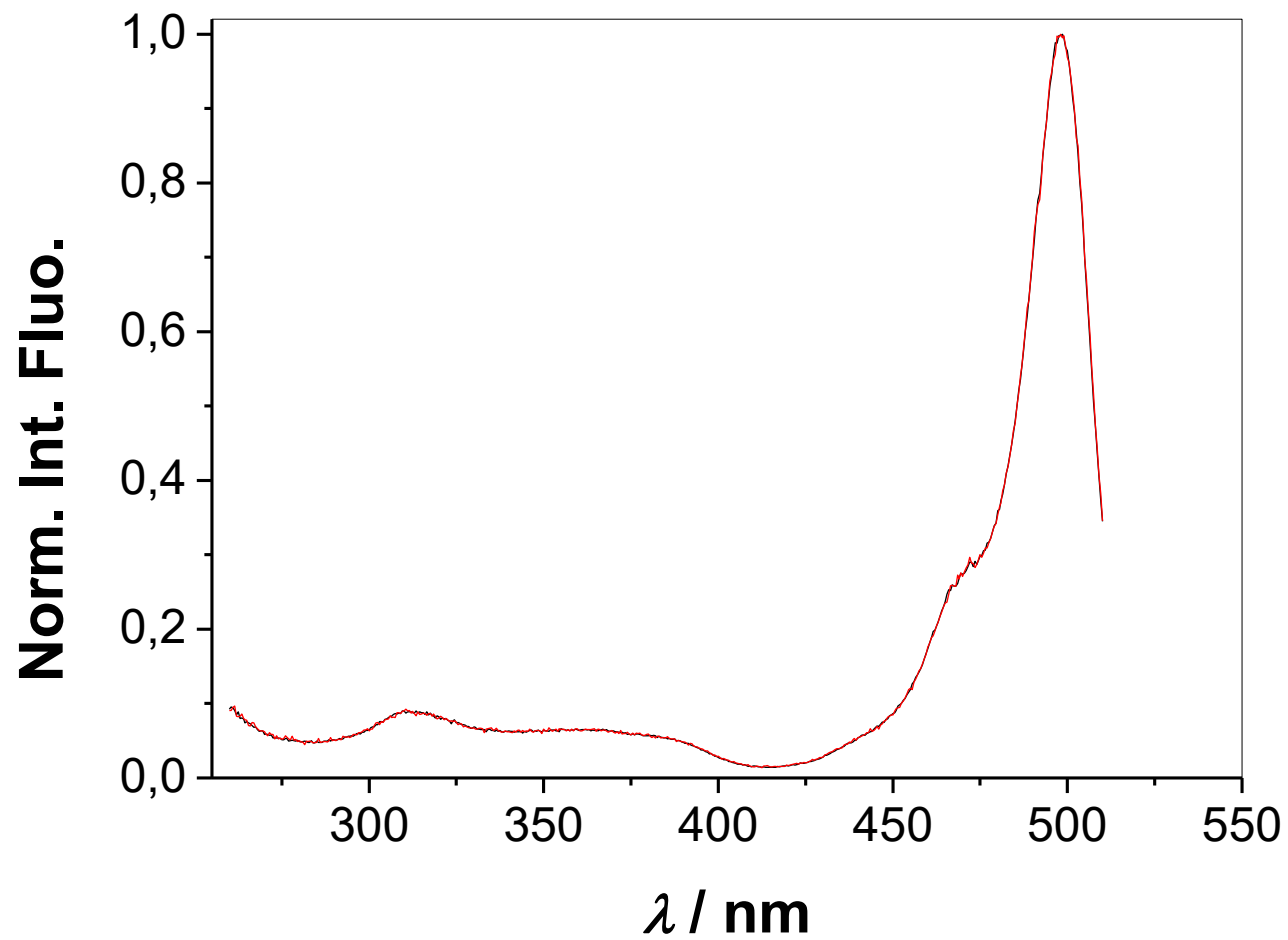


7.2. UV-Vis i fluorescencijska spektroskopija

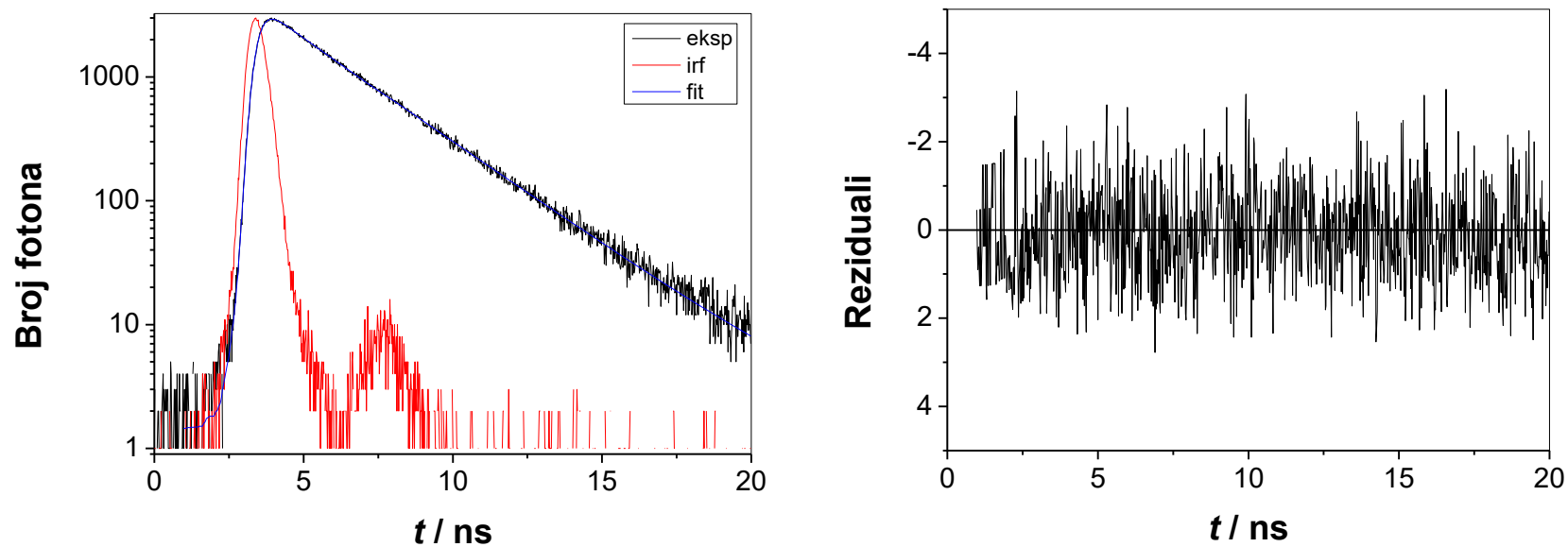
Prilog 25. Emisijski spektar spoja 2 u CH₃CN izmjeren uz valne duljine pobude na 460 nm, 470 nm i 480 nm



Prilog 26. Ekscitacijski spektar spoja **2** u CH₃CN detektiran pri valnim duljinama emisije 520 nm, 540 nm



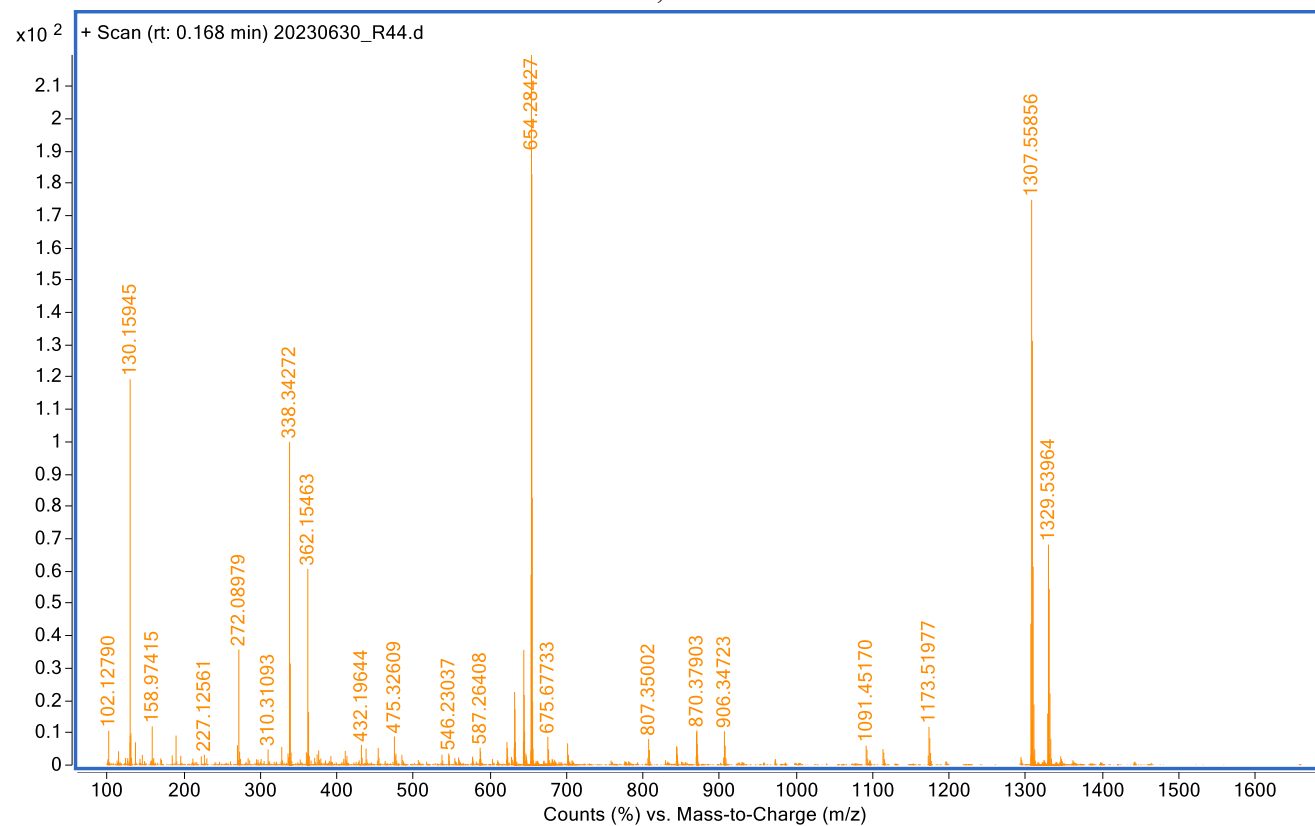
Prilog 27. Opadanje fluorescencije na valnoj duljini 520 nm za spoj **2** u CH₃CN ($\lambda_{\text{ex}} = 445$ nm) (lijevo) Razlika eksperimentalnih i utočnjenih podataka za spoj **2** (desno)



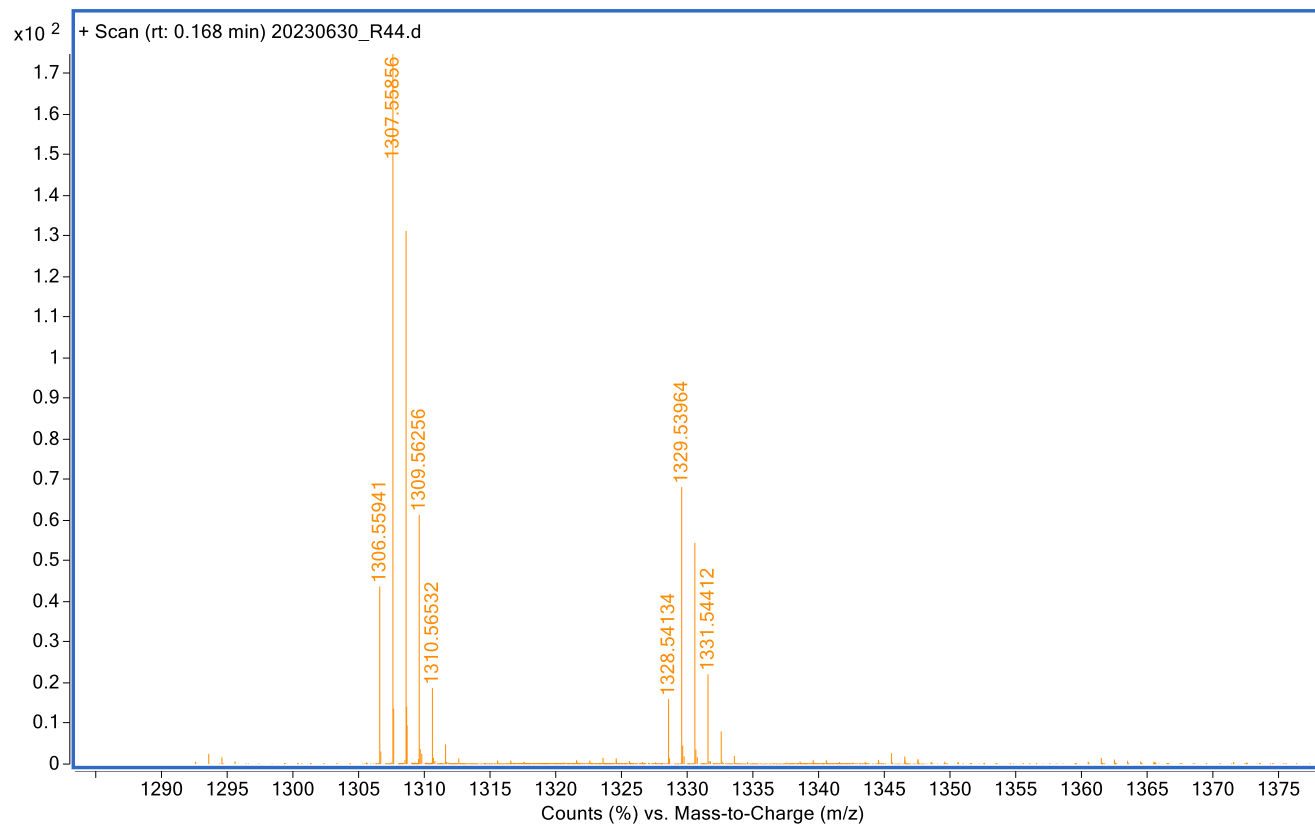
*Crna linija - eksperimentalni podatci, crvena linija - funkcija odziva instrumenta, plava linija - utočnjena vrijednost prema modelu monoeksponencijalnog opadanja (lijevo).

7.3. Spektri masa

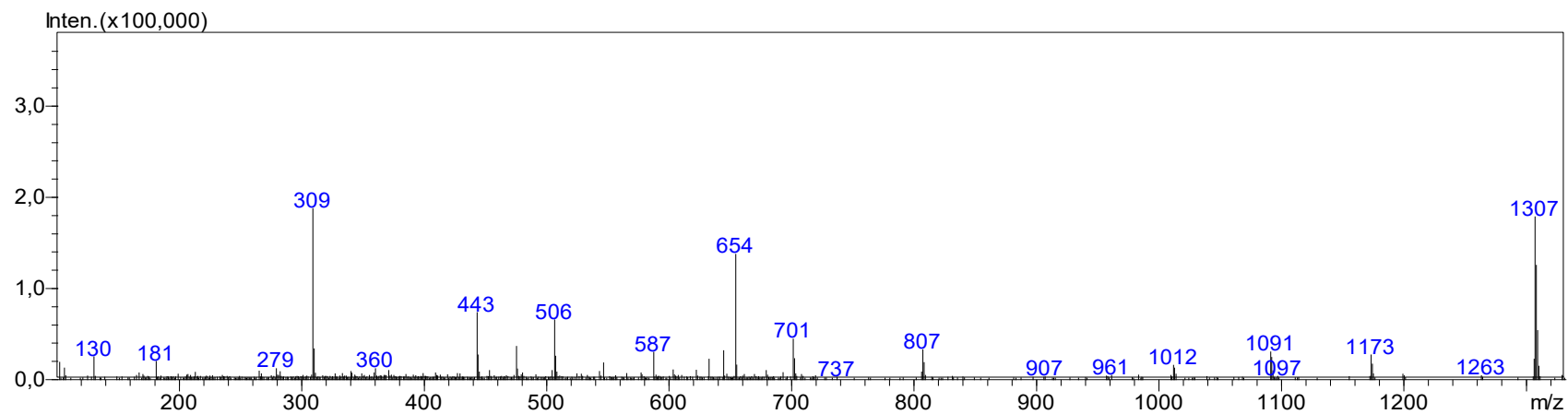
Prilog 28. Spektar masa visoke rezolucije spoja **2**. Molekulska formula: $C_{71}H_{73}BF_2N_{10}O_{12}$: ($[M + H^+]$) pronađeno: 1307,5585, izračunato: 1307,5674



Prilog 29. Spektar masa visoke rezolucije spoja **2**. Molekulska formula: $C_{71}H_{73}BF_2N_{10}O_{12}$: $([M + Na^+])$ pronađeno: 1329,5396, izračunato: 1329,5396.

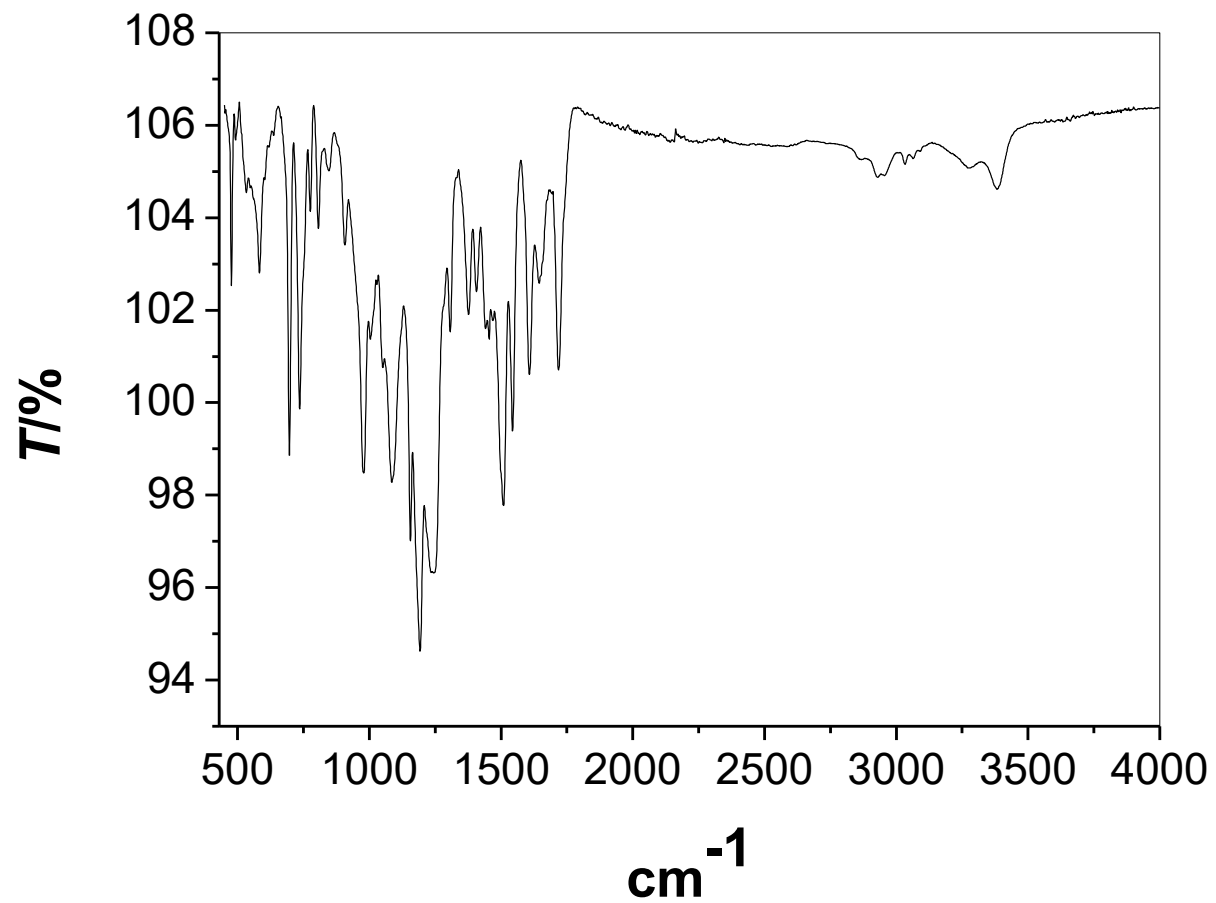


Prilog 30. Spektar masa spoja **2**. Molekulska formula: $C_{71}H_{73}BF_2N_{10}O_{12}$ pronađeno 1307, izračunato $M + 1,008 = 1306,55 + 1,008 = 1307,558$



7.4. FTIR-ATR spektar

Prilog 31. FTIR-ATR spektar spoja 2



8. ŽIVOTOPIS

Antonija Karakaš [REDACTED] Godine 2014. upisuje Gimnaziju "Matija Mesić" u Slavonskom Brodu, smjer - opća gimnazija, a maturirala je 2018. godine. Iste godine upisuje sveučilišni preddiplomski studij Primijenjena kemija, kojeg završava 2021. godine te upisuje sveučilišni diplomski studij Primijenjena kemija, modul Primijenjena organska kemija. Stručnu praksu odradila je na *Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za biomimetičku kemiju*. Kao student radila je na poziciji *Quality Assurance Technician* u *Coca-Coli HBC* u fizikalno-kemijskom i PET laboratoriju te u *Plivi d.o.o.* na opremanju lijekova. Četiri godine aktivna je članica *Studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa (HDKI)*, stoga je sudjelovala u organizaciji mnogih projekata. Zajedno s kolegama osvojila je Rektorovu nagradu za projekt *Boje inženjerstva* u ak. god. 2019./2020., dok je u ak.god. 2020./2021. bila voditeljica istoimenog projekta. U tu svrhu organizirala je brojne kemijsko-inženjerske radionice diljem Hrvatske. Kao predsjednica organizacijskog odbora u svibnju 2021. organizirala je *Znanstveni dan na FKIT-u*.