

# Sinteza i fotokemija oligopeptida i njihova potencijalna primjena u dijagnostici i terapiji

---

**Erben, Antonija**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:227851>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I  
ISTRAŽIVANJA LIJEKOVA

Antonija Erben

**SINTEZA I FOTOKEMIJA  
OLIGOPEPTIDA I NJIHOVA  
POTENCIJALNA  
PRIMJENA U  
DIJAGNOSTICI I TERAPIJI**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2024.



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I  
ISTRAŽIVANJA LIJEKOVA

Antonija Erben

**SINTEZA I FOTOKEMIJA  
OLIGOPEPTIDA I NJIHOVA  
POTENCIJALNA  
PRIMJENA U  
DIJAGNOSTICI I TERAPIJI**

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Nikola Basarić

Komentor: dr. sc. Ivo Piantanida

Rijeka, 2024.



UNIVERSITY OF RIJEKA  
FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND  
DRUG RESEARCH

Antonija Erben

**SYNTHESIS AND  
PHOTOCHEMISTRY OF  
OLIGOPEPTIDES AND  
THEIR POTENTIAL  
APPLICATION IN  
DIAGNOSTICS AND  
THERAPY**

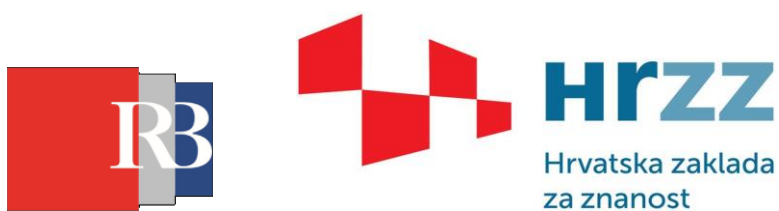
DOCTORAL THESIS

Rijeka, 2024.

Mentor rada: dr. sc. Nikola Basarić

Doktorski rad obranjen je dana, 17. svibnja 2024., pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Milan Mesić (FABRI, predsjednik povjerenstva)
2. doc. dr. sc. Toni Todorovski (FABRI)
3. dr. sc. Ivanka Jerić (IRB)



Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za sintetsku organsku kemiju, Zavoda za organsku kemiju i biokemiju, Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Nikole Basarića, mentora doktorskog rada u sklopu HrZZ projekta IP-2019-04-8008: „Fotokemija: Reakcijski mehanizmi i primjene u organskoj sintezi i biologiji (PhotoApp)“.

## Zahvale

*Zahvaljujem svom mentoru dr. sc. Nikoli Basariću na odabiru teme, korisnim raspravama, stručnim savjetima i pomoći prilikom izrade ove doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem komentoru dr. sc. Ivi Piantanidi na podršci i savjetima.*

*Zahvaljujem svim članovima Laboratorija za sintetsku organsku kemiju na vrlo ugodnoj radnoj atmosferi, podršci, savjetima i pomoći. Posebno hvala Tanji na pomoći i svemu što me naučila. Hvala dr. sc. Josipi Matić što me naučila kako provoditi mjerenja i obraditi podatke te članovima labosa LBIS na pomoći i savjetima oko provedbe mjerenja te obrade podataka. Hvala dr. sc. Igoru Svibenu na provedenim mjerenjima.*

*Hvala djelatnicima Centra za NMR na snimanju velikog broja spektara i na susretljivosti.*

*Hvala mojim roditeljima i sestri Petri koji su mi podrška kroz cijeli život i školovanje.*

*I na kraju, najveće hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju.*

*Antonija*



Sveučilište u Rijeci  
Fakultet biotehnologije i istraživanja lijekova

Doktorski rad

## SAŽETAK

### SINTEZA I FOTOKEMIJA OLIGOPEPTIDA I NJIHOVA POTENCIJALNA PRIMJENA U DIJAGNOSTICI I TERAPIJI

Peptidi su obećavajući kandidati za lijekove te ih se sve više istražuje zbog farmaceutskih i medicinskih primjena. Međutim, poznato je da su peptidi skloni enzimskoj razgradnji unutar stanice, što predstavlja velik problem za njihovu primjenu, a jedan od pristupa je priređivanje neprirodnih derivata koje enzimi ne mogu prepoznati. U okviru doktorske disertacije pripremljena je neprirodna aminokiselina, derivat tirozina, koja u fotokemijskim reakcijama stvara reaktivne intermedijere kinon-metide. Novopripremljena neprirodna aminokiselina ugrađena je u oligopeptide koji kao jedinicu za prepoznavanje polinukleotida sadrže dva triptofana, fenantridin ili piren. Za pripravu oligopeptida korištena je sinteza peptida u otopini uz standardne aktivacijske protokole i Boc zaštitnu skupinu. Novim dipeptidima i tripeptidima ispitana je fotokemijska reaktivnost, a kinon-metidi su detektirani laserskom pulsnom fotolizom. Peptidima su ispitana i fotofizička svojstva (molarni apsoprcijski koeficijent, kvatni prinos fluorescencije, vrijeme života singletnog pobuđenog stanja), što je važno za potencijalnu primjenu u dijagnostici kao i za ispitivanje nekovalentnog vezanja na polinukleotide. Konstante stabilnosti kompleksa s polinukleotidima određene su fluorescencijskim titracijama, a ispitan je i utjecaj spojeva na termičku denaturaciju dok je način vezanja utvrđen korištenjem CD spektroskopije. Kovalento vezanje novopripremljenih oligopeptida na oligonukleotide i polinukleotide ispitano je ozračivanjem njihovih kompleksa te različitim spektroskopskim i kromatografskim analizama.

Ključne riječi: neprirodna aminokiselina, oligopeptidi, kinon-metidi, fotokemija, nekovalentno i kovalentno vezanje na polinukleotide



University of Rijeka

Doctoral dissertation

Faculty of Biotechnology and Drug Development

**ABSRTACT****SYNTHESIS AND PHOTOCHEMISTRY OF OLIGOPEPTIDES AND THEIR POTENTIAL APPLICATIONS IN DIAGNOSTICS AND THERAPY**

Peptides are promising drug candidates and their further development and research is important for pharmaceutical and medicinal applications. However, peptides have some limitations due to short half-life *in vivo* and fast clearance from the circulation by the liver and kidneys. One way/possibility to solve these obstacles is by incorporation of unnatural amino acids, which enzymes cannot recognize. This PhD thesis describes the preparation of an unnatural amino acid, a tyrosine derivative, which in the photochemical reaction generates reactive intermediate quinone methide. The unnatural amino acid was incorporated into oligopeptides containing bis-tryptophane unit, phenanthridine or pyrene. The synthetic protocol for the preparation of oligopeptides was based on the standard peptide activation protocols in solution and Boc protective groups. The photochemical reactivity of the oligopeptides was investigated, and the quinone methides were detected by laser flash photolysis. The photophysical properties (molar absorption coefficient, quantum yield of fluorescence and singlet excited state lifetime) of the oligopeptides were investigated, which is important for their potential diagnostic applications, as well as for the investigation of noncovalent binding to polynucleotides. The stability constants of the peptide-polynucleotide complexes were determined by fluorescence titrations, and the effect of the compounds on the thermal denaturation was investigated. The binding modes to polynucleotides were probed by CD spectroscopy. The ability of the peptides to covalently bind to oligonucleotides and polynucleotides was examined by irradiating their complexes and detecting adducts by various spectroscopic and chromatographic techniques.

Keywords: unnatural amino acids, oligopeptides, quinone methides, photochemistry, noncovalent and covalent binding to polynucleotides

## Sadržaj

<b>§ 1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Ciljevi i hipoteze istraživanja.....	2
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>4</b>
2.1. Kratki peptidi u raznim terapijama.....	4
2.1.1. Primjeri dipeptidnih lijekova.....	5
2.1.2. Primjeri tripeptidnih biološki aktivnih spojeva i lijekova.....	7
2.1.3. Primjeri tetrapeptidnih lijekova.....	10
2.1.4. Primjeri pentapeptidnih lijekova.....	15
2.2. Vežanje oligopeptida na polinukleotide.....	18
2.2.1. Nukleinske kiseline DNA i RNA.....	18
2.2.2. Načini vežanja malih organskih molekula na DNA i RNA.....	21
2.2.3. Interakcije oligopeptida s DNA i RNA.....	22
2.2.4. Interakcije oligopeptida s proteinima i enzimima.....	31
2.3. Kinon-metidi.....	35
2.3.1. Općenito o kinon-metidima.....	35
2.3.2. Reakcije kinon-metida s biološkim nukleofilima.....	39
2.3.3. Reakcije kinon-metida s proteinima.....	43
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>47</b>
3.1. Opće napomene.....	47
3.2. Priprava N,N-dimetilaminmetilnih derivata tirozina.....	48
3.2.1. Priprava N-Boc-L-tirozina (1).....	48
3.2.2. Opći postupak priprave benzilnog estera.....	48
3.2.2.1. Priprava benzilnog estera N-Boc-L-tirozina (2).....	49
3.2.3. Priprava nepravodne aminokiseline derivata tirozina (Boc-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-OBn) (3).....	49
3.2.4. Opći postupak uklanjanja benzilne zaštite s nepravodne aminokseline.....	50
3.2.4.1. Postupak uklanjanja benzilne zaštite s nepravodne aminokseline derivata tirozina.....	50
3.2.5. Postupak uvođenja dimetilaminometilne skupine na Boc-Tyr-OH.....	51
3.2.6. Opći postupak uklanjanja Boc-zaštite i priprave trifluoracetatnih soli.....	51
3.2.6.1. Priprava TFA-soli benzilnog estera nepravodne aminokiseline derivata tirozina 5.....	52
3.2.6.2. Priprava TFA-soli nepravodne aminokiseline derivata tirozina 6.....	53

<b>3.2.7. Preparativna fotometanoliza <i>N,N</i>-dimetilaminometilnog derivata tirozina</b> .....	53
<b>3.3. Priprava dipeptida</b> .....	<b>54</b>
<b>3.3.1. Opći postupak priprave sukcinimidnog estera</b> .....	54
3.3.1.1. Priprava sukcinimidnog estera <i>N</i> -Boc-fenilalanina (8) .....	54
<b>3.3.2. Priprava benzilnog estera Boc-<i>L</i>-fenilalanina (9)</b> .....	<b>55</b>
<b>3.3.3. Priprava TFA-soli benzilnog estera tirozina (10)</b> .....	<b>55</b>
<b>3.3.4. Priprava TFA-soli fenilalanina (11)</b> .....	<b>56</b>
<b>3.3.5. Opći postupak priprave peptida</b> .....	<b>56</b>
3.3.5.1. Priprava dipeptida Boc-Phe-Tyr-OBn (12).....	57
3.3.5.2. Priprava dipeptida Boc-Phe-Tyr-OH (13).....	57
3.3.5.3. Priprava dipeptida Boc-Phe-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-OBn (14) .....	58
<b>3.3.6. Opći propis priprave dipeptida s HBTU aktivacijskim reagensom</b> .....	59
3.3.6.1. Pokušaj priprave Boc-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-Phe-OMe (15) .....	59
<b>3.3.7. Pokušaj priprave Boc-Tyr-Phe-OBn (17)</b> .....	<b>60</b>
<b>3.3.8. Postupak uklanjanja benzilne zaštitne skupine s dipeptida Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn</b>	<b>60</b>
<b>3.3.9. Opći postupak priprave dipeptida koji sadrže dvije dimetilaminometilne skupine</b> .....	<b>61</b>
3.3.9.1. Priprava dipeptida Boc-Phe-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> -OBn (19).....	62
3.3.9.2. Priprava dipeptida Boc-Phe-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> -OH (20).....	63
<b>3.3.10. Preparativna fotometanoliza dipeptida</b> .....	<b>63</b>
3.3.10.1. Preparativna fotometanoliza dipeptida Boc-Phe-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-OBn (14).....	64
3.3.10.2. Preparativna fotometanoliza dipeptida Boc-Phe-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> -OBn (19) .....	65
3.3.10.3. Preparativna fotometanoliza dipeptida Boc-Phe-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> -OH (20).....	66
<b>3.4. Priprava tripeptida</b> .....	<b>66</b>
<b>3.4.1. Priprava benzilnog estera <i>N</i>-Boc-<i>L</i>-triptofana (25)</b> .....	<b>66</b>
<b>3.4.2. Priprava TFA-soli triptofana (26)</b> .....	<b>67</b>
<b>3.4.3. Priprava sukcinimidnog estera <i>N</i>-Boc-<i>L</i>-triptofana (27)</b> .....	<b>68</b>
<b>3.4.4. Priprava dipeptida Boc-Trp-Trp-OH (28)</b> .....	<b>68</b>
<b>3.4.5. Priprava dipeptida Boc-Trp-Trp-OBn (29)</b> .....	<b>69</b>
<b>3.4.6. Priprava sukcinimidnog estera dipeptida Boc-Trp-Trp-OH (30)</b> .....	<b>69</b>
<b>3.4.7. Priprava tripeptida Boc-Trp-Trp-Phe-OBn (31)</b> .....	<b>70</b>
<b>3.4.8. Priprava tripeptida Boc-Trp-Trp-Tyr-OBn (32)</b> .....	<b>71</b>
<b>3.4.9. Priprava tripeptida Boc-Trp-Trp-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (33)</b> .....	<b>72</b>
<b>3.4.10. Opći postupak za pripravu hidrokloridnih soli</b> .....	<b>72</b>
3.4.10.1. Priprava hidrokloridne soli tripeptida HCl×H-Trp-Trp-Phe-OBn (34).....	73
3.4.10.2. Priprava hidrokloridne soli tripeptida HCl×H-Trp-Trp-Tyr-OBn (35).....	74
3.4.10.3. Priprava hidrokloridne soli tripeptida 2HCl×H-Trp-Trp-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-OBn (36) .....	75



3.4.11. Preparativna fotometanoliza tripeptida Boc-Trp-Trp-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-OBn.....	76
3.5. Priprava dipeptida koji sadrže dvije neprirodne aminokiseline.....	77
3.5.1. Opći propis uklanjanja metilne zaštite s derivata aminokiseline.....	77
3.5.1.1. Uklanjanje metilne zaštite s derivata aminokiseline koja sadrži fenantridin.....	77
3.5.1.2. Uklanjanje metilne zaštite s derivata aminokiseline koja sadrži piren.....	78
3.5.2. Priprava dipeptida Boc-Phen-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-OBn (40).....	79
3.5.3. Priprava hidrokloridne soli dipeptida 3HCl×H-Phen-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-OBn (41).....	80
3.5.4. Priprava dipeptida Boc-Pyr-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-OBn (42).....	81
3.6. Priprava dipeptida koji sadrže pirenkarboksilnu kiselinu i modificirani tirozin.....	82
3.6.1. Priprava sukcinimidnog estera pirenkarboksilne kiseline (43).....	82
3.6.1.1. Nusprodukt priprave sukcinimidnog estera pirenkarboksilne kiseline (43).....	83
3.6.2. Priprava pirenskog derivata piren-1-karbonil-L-alanin (45).....	83
3.6.3. Priprava dipeptida piren-alanin-modificirani tirozin (Pyr)-Ala-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ](46).....	84
3.6.4. Priprava pirenskog derivata (Boc-DAP(Pyr)-OH) (39) bez izolacije sukcinimidnog estera....	85
3.6.5. Priprava pirenskog derivata (Boc-DAP(Pyr)-OH) (39).....	86
3.6.6. Priprava sukcinimidnog estera Boc-DAP(Pyr)-OH (47).....	87
3.6.7. Pokušaji priprave dipeptida (Boc-DAP(Pyr)-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-OBn) (42).....	87
3.6.8. Priprava dipeptida (Boc-Lys(Pyr)-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-OBn) (49).....	89
3.6.9. Preparativna fotometanoliza dipeptida Boc-Lys(Pyr)-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-OBn (49).....	90
3.6.10. Uklanjanje Boc- zaštitne skupine s dipeptida Boc-Lys(Pyr)-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-OBn (49).....	92
3.7. Određivanje kvantnih prinosa za reakcije preparativnih fotometanoliza.....	92
3.8. Fotofizička svojstva spojeva.....	94
3.8.1. Kvantni prinos fluorescencije tripeptida.....	94
3.9. Ispitivanje interakcija oligopeptida s polinukleotidima.....	95
3.9.1. Priprema polinukleotida.....	95
3.9.2. Određivanje promjene temperature „mekšanja“ (ΔT <sub>m</sub> ) polinukleotida.....	95
3.9.3. Spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD).....	96
3.9.4. Fluorescencijske titracije.....	97
3.10. Laserska pulsna fotoliza (LFP).....	97
3.11. Kovalentno vezanje oligopeptida na oligonukleotide.....	98
3.11.1. Priprema oligonukleotida.....	98
3.11.2. Fotokemijsko ozračivanje oligonukleotida i tripeptida 36.....	99
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>100</b>
4.1. N,N-dimetilaminometilni derivati tirozina (3-6) i dipeptidi koji sadrže N,N-dimetilaminometilni derivat tirozina (14, 18-20).....	102

4.1.1. Priprava <i>N,N</i> -dimetilaminometilnih derivata tirozina (3-6) i dipeptida koji sadrže <i>N,N</i> -dimetilaminometilni derivat tirozina (14, 18-20).....	102
4.1.2. Istraživanje fotokemijske reaktivnosti spojeva 3-6, 14, 18-20.....	104
4.1.3. Kvantni prinosi za reakciju fotometanolize spojeva (3-5, 14, 18 i 20).....	105
4.1.4. Fotofizička svojstva spojeva 14 i 20.....	106
4.1.5. Laserska pulsna fotoliza spojeva 14 i 20.....	108
4.2. Tripeptidi koji sadrže ditriptofanski fragment i fenilalanin, tirozin ili <i>N,N</i> -dimetilaminometilni derivat tirozina.....	110
4.2.1. Priprava tripeptida.....	110
4.2.2. Istraživanje fotokemijske reaktivnosti tripeptida Boc-Trp-Trp-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-OBn (33).....	112
4.2.3. Kvantni prinosi za reakciju fotometanolize spojeva 33 i 36.....	113
4.2.4. Fotofizička svojstva tripeptida 31-33 i njihovih hidrokloridnih soli 34-36.....	113
4.2.5. Laserska pulsna fotoliza spoja 33.....	116
4.2.6. Interakcije spojeva 34-36 s polinukleotidima.....	117
4.2.6.1. Određivanje temperature „mekšanja“ ct-DNA.....	117
4.2.6.2. CD titracije s ct-DNA.....	119
4.2.6.3. Fluorescencijska titracija s polinukleotidima.....	120
4.2.7. Kovalentno vezanje oligopeptida s polinukleotidima.....	121
4.3. Dipeptidi koji sadrže dvije neprirodne aminokiseline – fenantridin i modificirani tirozin.....	124
4.3.1. Priprava Phen-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].....	124
4.3.2. Nekovalentne interakcije spoja 41 s različitim polinukleotidima.....	125
4.3.2.1. Određivanje temperature mekšanja spoja 41 s različitim polinukleotidima.....	125
4.3.2.2. CD titracije dipeptida 41 s različitim polinukleotidima.....	126
4.3.2.3. Fluorescencijska titracija dipeptida 41 s različitim polinukleotidima.....	128
4.4. Dipeptidi koji sadrže dvije neprirodne aminokiseline – piren i <i>N,N</i> -dimetilaminometilni derivat tirozina.....	130
4.4.1. Priprava pirenskih derivata.....	130
4.4.2. Priprava Boc-Lys(Pyr)-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-OBn.....	134
4.4.3. Istraživanje fotokemijske reaktivnosti tripeptida Boc-Lys(Pyr)-Tyr[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-OBn (49).....	134
4.4.4. Interakcije spojeva 42xHCl i 51 s različitim polinukleotidima.....	135
4.5. Usporedba interakcija oligopeptida s različitim polinukleotidima.....	136
<b>§ 5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>137</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>140</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>142</b>
<b>§ 8. DODATAK.....</b>	<b>XIII</b>
8.1. Dodatak poglavlju 4.2.5.....	lviii
8.2. Dodatak poglavlju 4.2.6.....	lix

---

8.3. Dodatak poglavlju 4.1.5.....	lxv
8.4. Dodatak poglavlju 4.2.5.....	lxvii
8.1. Dodatak poglavlju 4.2.7.....	lxxvii
8.2. Dodatak poglavlju 4.3.2.....	lxxxviii
§ 9. ŽIVOTOPIS .....	XCV

## § 1. UVOD

Posljednjih dvadestak godina peptidi se sve više istražuju zbog terapijskog djelovanja koje im omogućuje raznoliku primjenu u farmaceutskoj industriji, medicini i biotehnologiji.<sup>1</sup> Peptidi i proteini sudjeluju u molekularnom prepoznavanju i raznim biološkim funkcijama kao što su metabolizam, probava, imunološki i neurološki sustav, a djeluju kao ligandi (hormoni, neurotransmiteri, citokini itd.).<sup>2</sup> Racionalnim računskim metodama s visokom specifičnošću dizajnirani su oligopeptidi koji sadrže 2-20 aminokiselina s ciljem moduliranja interakcija ciljanog proteina.<sup>3</sup> Oligopeptidi kao terapeutici imaju nekoliko važnih prednosti u odnosu na proteine i antitijela, male su molekulske mase te imaju sposobnost prolaska kroz stanične membrane. Također, imaju visoku aktivnost, specifičnost i afinitet, biološku i kemijsku raznolikost. Dodatna prednost upotrebe oligopeptida kao lijekova je ta što se ne nakupljaju u određenim organima (npr. bubrezima ili jetri), što može umanjiti njihove toksične nuspojave. Većinom se mogu brzo sintetizirati i lako modificirati, a manje su imunogeni od rekombinantnih antitijela ili proteina.<sup>4</sup> Međutim, oligopeptidima je glavni nedostatak kratko vrijeme poluživota jer se brzo razgrađuju proteolitičkim enzimima u gastrointestinalnom traktu i serumu, te brzo uklanjanje iz organizma u trajanju od nekoliko minuta do nekoliko sati nakon primjene. Osim brze enzimske razgradnje, probleme predstavljaju i loša propusnost kroz crijevne membrane i smanjena lipofilnost.<sup>5</sup> Stabilnost oligopeptida može se povećati raznim kemijskim modifikacijama kao što su zamjena prirodnih enantiomera L-aminokiselina s D-aminokiselinama, lipidiranjem, *N*-metilacijom ili ciklizacijom.<sup>1</sup>

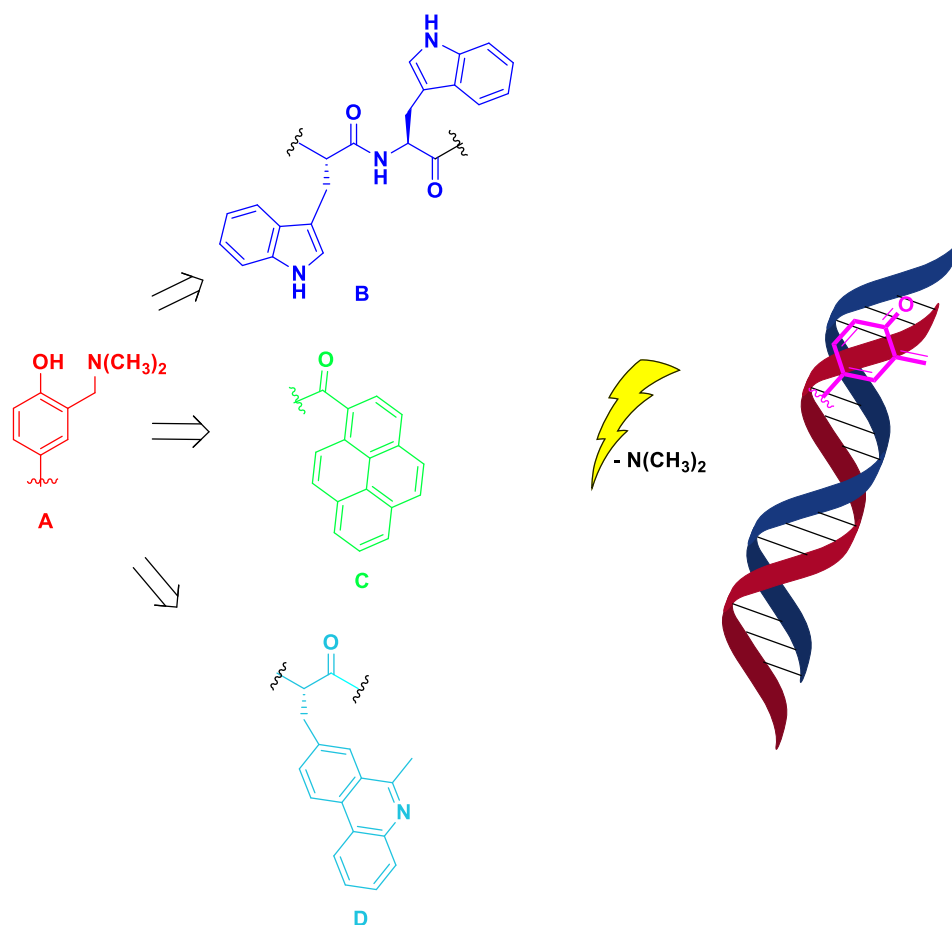
Osim primjene peptida kao aktivnih supstanci za liječenje, peptidi imaju primjenu i u dijagnostici.<sup>6</sup> Integriranje organskog fluorofora sa specifičnom peptidnom sekvencom uobičajeni je pristup dizajniranju peptidnih fluorescentnih indikatora, a fluorofori na peptidnim lancima djeluju kao glasnici tijekom interakcije s biomolekulama. Interakcija s biomolekulama dovodi do promjene fotofizičkih i spektralnih svojstava, što omogućuje primjenu peptidnih fluorescentnih indikatora za različite biomolekule. Schmuck i suradnici dizajnirali su strukturno modificirani peptid s ugrađenim aminonaftalimidom kao fluoroforom, koji se veže za nukleozidne trifosfate.<sup>7</sup> Nadalje, uspješno su priredili peptide bogate lizinom za vezanje na polinukleotide, dok je fluorescentni odgovor bio omogućen triptofanom, pirenom<sup>8</sup> ili fluorescentnim rezonantnim prijenosom energije (FRET) između naftalena i dansila.<sup>9</sup> U svrhu

razvoja molekula koje stupaju u interakcije s DNA i RNA, Piantanida i suradnici priredili su seriju peptidnih derivata fenantridina.<sup>10</sup> Međutim, uz nekovalentno vezivanje za polinukleotide, što može imati primjenu u dijagnostici, ali i u terapiji, brojni antikancerogeni lijekovi svoje djelovanje temelje na kovalentnoj modifikaciji DNA, gdje križno povezivanje vodi do toksičnosti a zatim i do smrti stanice.<sup>11</sup>

U ranijim istraživanjima u Laboratoriju za sintetsku organsku kemiju, Instituta Ruđer Bošković, pokazano je da se reakcijom fotodeaminacije iz *N,N*-dimetilaminometilnih derivata fenola generiraju kinon-metidi (QM).<sup>12</sup> QM su reaktivni intermedijeri koji su često prisutni u kemiji i fotokemiji fenola i njima srodnih spojeva.<sup>13</sup> Njihova polarna priroda čini ih vrlo reaktivnima te stoga reagiraju s elektrofilima i nukleofilima i u reakcijama cikloadicije. QM reagiraju s nukleofilima na metilenskom položaju dajući produkte Michaelove adicije. Zbog svoje visoke reaktivnosti s nukleofilima, primijenjivi su u organskoj sintezi i biološkim sustavima gdje mogu alkilirati biološki važne nukleofile: proteine i polinukleotide.<sup>13</sup> Sposobnost QM da križno povezuju DNA svrstava ih u potencijalne antitumorske terapeutike. Tako na primjer, antitumorski antibiotik mitomicin temelji svoju antiproliferativnu aktivnost na reaktivnom intermedijeru QM koji umrežava DNA.<sup>14</sup> Biološka aktivnost QM<sup>15</sup> uglavnom je povezana s reaktivnošću prema nukleozidima<sup>16</sup> i alkilacijom DNA.<sup>17</sup> Rokita i suradnici proučavali su reakcije QM s deoksinukleozidima i nukleinskim kiselinama, te su otkrili reaktivna mjesta na pojedinoj bazi DNA.<sup>18</sup> Međutim, za učinkovitu alkilaciju i umrežavanje DNA važno je da se na prekursor QM vežu skupine koje se mogu vezati za DNA nekovalentnim interakcijama.<sup>19</sup>

## 1.1. Ciljevi i hipoteze istraživanja

Cilj istraživanja doktorske disertacije je provesti sintezu neprirodne aminokiseline, derivata tirozina koji je fotokemijski reaktivan te u reakciji fotodeaminacije stvara reaktivne intermedijere kinon-metide (slika 1). Nadalje, drugi cilj je ugraditi modificirani tirozin u seriju oligopeptida koji imaju različite strukturne motive što im omogućuje nekovalentno vezanje na polinukleotide. Osim toga, završni cilj je sintetiziranim peptidima istražiti fotokemijsku reaktivnost, fotofizička svojstva te mogućnost nekovalentnog i kovalentnog vezanja na polinukleotide.



Slika 1. Ugradnja fotoreaktivnog derivata tirozina **A** u oligopeptide koji sadrže različite skupine koje prepoznaju polinukleotide: ditriptofanski fragment **B**, derivat fenantridina **C** ili derivat pirena **D**, za koje se očekuje nekovalentno i kovalentno vezanje na polinukleotide

Hipoteza je da će ugradnjom aminokiseline s kinon-metidnim prekursorom pripremljeni oligopeptidi postati fotokemijski reaktivni, a fluorofori u molekuli će istovremeno omogućiti studije supramolekulskih interakcija fluorescencijskom spektroskopijom. Nadalje, hipoteza je da će se pripremljeni peptidni spojevi vezati na polinukleotide nekovalentnim interakcijama, a nakon fotokemijske aktivacije tih kompleksa doći će do kovalentnog vezanja spojeva na polinukleotide. Studija nekovalentnog i kovalentnog vezanja oligopeptida provedena u okviru ove disertacije tako pruža nova znanja koja trebaju pomoći u racionalnom dizajnu nove generacije oligopeptida s dijagnostičkom ili terapijskom primjenom.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

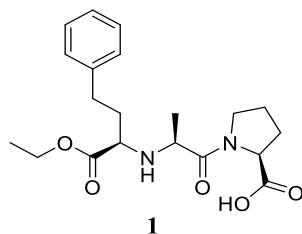
### 2.1. Kratki peptidi u raznim terapijama

Peptidi su spojevi prirodnog i sintetskog podrijetla, uključeni u razne biološke uloge. Djeluju kao hormoni, supstrati i inhibitori enzima, antibiotici i biološki regulatori.<sup>20</sup> Peptidi igraju bitnu ulogu u biotehnološkoj primjeni kao terapijska i dijagnostička sredstva, a njihove prednosti su: biokompatibilnost, niska cijena, podesiva bioaktivnost, kemijska raznolikost i specifično ciljanje bioloških meta.<sup>21</sup> Terapijski peptidi jedinstvena su klasa farmaceutskih spojeva, obično s molekularnom težinom od 500-5000 Da.<sup>22</sup> Istraživanja terapijskih peptida započela su temeljnim studijama prirodnih ljudskih hormona, uključujući inzulin, oksitocin, vazopresin i gonadotropin oslobađajući hormon (GnRH), te njihove specifične fiziološke aktivnosti u ljudskom tijelu.<sup>23</sup> Od sinteze prvog terapijskog peptida, inzulina, prošlo je cijelo stoljeće i postignuta su izuzetna otkrića koja su rezultirala odobrenjem više od 80 peptidnih lijekova za razne bolesti: dijabetes, rak, osteoporozu, multiplu sklerozu, infekciju HIV-om i kroničnu bol.<sup>24</sup> Razvoj peptidnih lijekova tako je postao jedna od zanimljivih tema u farmaceutskim istraživanjima.<sup>24</sup>

Racionalnim metodama s visokom specifičnošću dizajnirani su oligopeptidi (grč. *oligo* – malen, kratak) koji sadrže 2-20 aminokiselina s ciljem moduliranja interakcija ciljanog proteina. Važne prednosti oligopeptida kao terapeutika u odnosu na proteine i antitijela su mala molekulska masa, laka sinteza i dobar prolazak kroz stanične membrane.<sup>3</sup> Oligopeptidi imaju visoku aktivnost, specifičnost i afinitet, biološku i kemijsku raznolikost. Njihova dodatna prednost upotrebe kao lijekova je u tome što se ne nakupljaju u određenim organima (npr. bubrezima ili jetri).<sup>25</sup> Glavni nedostatak oligopeptida je kratko vrijeme poluživota jer se brzo razgrađuju proteolitičkim enzimima u gastrointestinalnom traktu i serumu, te brzo uklanjanje iz organizma u trajanju od nekoliko minuta do nekoliko sati nakon primjene.<sup>26</sup> Osim brze enzimske razgradnje, probleme predstavljaju i loša propusnost kroz crijevne membrane i smanjena lipofilnost.<sup>5</sup> Stabilnost oligopeptida može se povećati raznim kemijskim modifikacijama kao što su zamjena prirodnih enantiomera L-aminokiselina D-aminokiselinama, lipidiranjem, *N*-metilacijom ili ciklizacijom.<sup>1</sup> S obzirom da oligopeptidnih farmokofora ima jako puno i to je

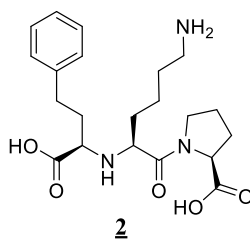
široko područje istraživanja, u ovom literaturnom pregledu navedeni su oligopeptidi koji sadrže 2-5 aminokiselina.

### 2.1.1. Primjeri dipeptidnih lijekova



Slika 2. Struktura enalapрила

Enalapril<sup>27</sup> je dipeptidni prolijek koji pripada skupini inhibitora angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE inhibitor), koji se koriste za regulaciju krvnog tlaka. Enalapril postaje učinkovit nakon brze metaboličke aktivacije u enalaprilat u jetri. Enalaprilat kompetitivno inhibira ACE kako bi omeo proizvodnju angiotenzina II. Angiotenzin II potiče vazokonstrikciju i bubrežnu reapsorpciju natrijevih iona. Enalapril je odobrila FDA 1985. godine pod trgovačkim nazivom Vasotec, i koristi se za liječenje povišenog krvnog tlaka (hipertenzije), zatajenja srca i asimptomatske disfunkcije lijeve klijetke. Za liječenje hipertenzije nalazi se i u kombinaciji s hidroklorotiazidom.<sup>28</sup>

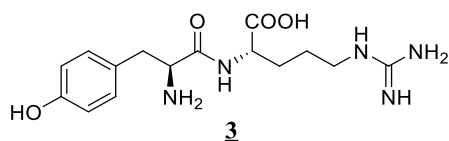


Slika 3. Struktura lizinopрила

Lizinopril je također dipeptidni lijek koji pripada skupini ACE inhibitora.<sup>29</sup> Za razliku od enalapрила koji na *N*-kraju ima L-alanin, sastoji se od L-lizina na *N*-kraju i L-prolina na *C*-kraju. Primjenjuje se za liječenje hipertenzije, zatajenja srca, infarkta srca (srčani udar), te za liječenje bubrežnih komplikacija u bolesnika koji boluju od šećerne bolesti tipa II i povišenog krvnog tlaka. Lizinopril, kompetitivno se veže i inhibira ACE, čime blokira pretvorbu angiotenzina I u angiotenzin II. To sprječava snažno vazokonstrikтивно djelovanje angiotenzina II i rezultira vazodilatacijom.<sup>30</sup> Također smanjuje lučenje aldosterona induciranog angiotenzinom II u

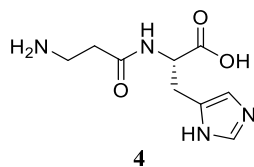


korteksu nadbubrežne žlijezde, što dovodi do povećanja izlučivanja natrija i nakon toga povećava se i gubitak vode. Lizinopril je odobrila FDA 1987. godine.



Slika 4. Struktura kyotorphina

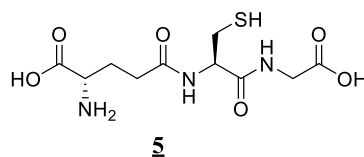
Kyotorphin (L-tirozil-L-arginin) je neuroaktivni prirodni dipeptid koji ima ulogu u regulaciji boli u mozgu. Izolirali su ga japanski znanstvenici 1979. godine iz goveđeg mozga.<sup>31</sup> Ueda i suradnici proučavali su kyotorphin dugi niz godina te su došli do zaključaka da je kyotorphin neravnomjerno raspoređen u mozgu, nalazi se u visokim koncentracijama u regijama uključenim u analgeziju morfija;<sup>32</sup> i u živčanim završecima.<sup>33</sup> Specifična tirozin-sintetaza (TyrRS) stvara kyotorphin iz tirozina i arginina koristeći adenzin-trifosfat (ATP).<sup>34</sup> Kyotorphin ima specifičan receptor vezan za G-proteine (GPCR) koji posreduje u aktivaciji fosfolipaze C i inhibiciji adenilil ciklaze,<sup>35</sup> dok dipeptid Leu-Arg djeluje kao antagonist receptora kyotorphina.<sup>33</sup> Njihove su studije pokazale da kyotorphin sudjeluje u liječenju Alzheimerove bolesti, epilepsije, upala i kroničnih bolova, te se očekuju daljnja istraživanja ovog dipeptida.<sup>33</sup>



Slika 5. Struktura L-karnozina

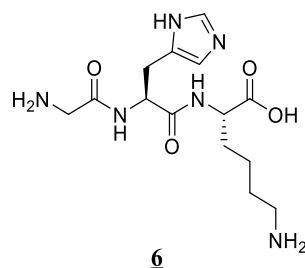
L-karnozin ( $\beta$ -Ala-L-His,  $\beta$ -AH) je dipeptid koji ima antioksidativna svojstva za ugljikohidrate (antiglikacija)<sup>36</sup> i lipide (antilipoksidacija).<sup>37</sup>  $\beta$ -alanin može izravno reagirati s oksidiranim ugljikohidratima i lipidima, dok se histidin može vezati na ione prijelaznih metala.<sup>38</sup> Karnozin je prisutan u mišićnom i živčanom tkivu, kao i u mozgu.<sup>39</sup> Karnozin je predložen kao lijek za Alzheimerovu bolest,<sup>40</sup> a također se pokazalo da odgađa starenje uzgojenih staničnih kultura, što se pripisuje antioksidativnim svojstvima peptida.<sup>41</sup> Karnozin se prirodno proizvodi u tijelu u jetri iz  $\beta$ -alanina i histidina.<sup>42</sup>

### 2.1.2. Primjeri tripeptidnih biološki aktivnih spojeva i lijekova



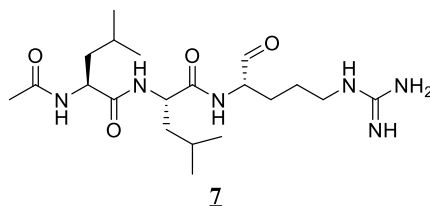
Slika 6. Glutation

Glutation ( $\gamma$ -glutamylcisteinilglicin, GSH) je prirodni tripeptid koji se sastoji od 3 osnovne aminokiseline: glutamata, cisteina i glicina. Njegova primarna struktura otkrivena je 1935. godine.<sup>43</sup> Stabilnost potječe od neobične  $\gamma$ -glutamilne veze i jake nukleofilne prirode centralnog cisteina koji mu daju jedinstvena strukturna svojstva.<sup>44</sup> Glutation je najzastupljeniji tiol unutar stanice, a s obzirom da je antioksidans, ima ulogu u detoksifikaciji stanice tako što uklanja razne elektrofilne spojeve i perokside putem katalize glutathion S-transferazama (GST) i glutathion peroksidazama (GPx).<sup>45</sup> GSH se nalazi u biljkama, sisavcima, gljivama i nekim prokariotskim organizmima.<sup>46</sup> Osim detoksikacije, GSH ima ulogu u drugim staničnim reakcijama, uključujući sustav glioksalaze, redukciju ribonukleotida u deoksiribonukleotide, regulaciju ekspresije proteina i gena.<sup>45</sup> Tripeptid može postojati intracelularno u oksidiranom (GSSG) ili reduciranom (GSH) obliku.<sup>47</sup> Nedostatak GSH dovodi do mogućeg oksidativnog oštećenja stanice, neravnoteža GSH opaža se pri starenju,<sup>48</sup> te u raznim bolestima kao što su rak,<sup>49</sup> cistična fibroza,<sup>50</sup> HIV<sup>51</sup> i neurodegenerativne bolesti.<sup>52</sup>



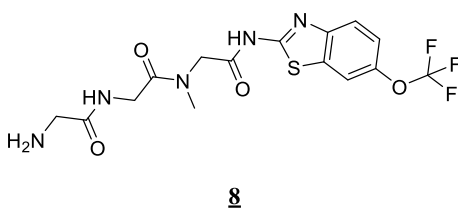
Slika 7. Struktura prezatida

Prezatin je tripeptid koji se sastoji od aminokiselina glicina, histidina i lizina, te lako tvori kompleks s bakrom.<sup>53</sup> Prvi ga je izolirao Pickart 1973. godine iz ljudske plazme.<sup>54</sup> Prezatin potiče zacjeljivanje rana i privlačenje imunoloških stanica, ima antioksidativno i protuupalno djelovanje, te stimulira sintezu kolagena i glikozaminoglikana u fibroblastima kože.<sup>55</sup> Koristi se u kozmetičkim proizvodima za kožu i kosu.<sup>56</sup> Provedena su i istraživanja o njegovoj potencijalnoj primjeni za kronične plućne bolesti<sup>57</sup> i metastatski karcinom debelog crijeva.<sup>58</sup>



Slika 8. Struktura leupeptina

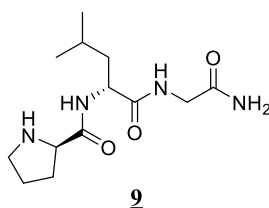
Leupeptin je acetilirani tripeptidni aldehid koji se sastoji od 2 leucina i arginina. Inhibitor je proteaze koji proizvode bakterije vrste *Streptomyces*.<sup>59</sup> Enzim koji inaktivira leupeptin pripada vrsti metaloproteaza.<sup>60</sup> Poznato je da leupeptin inhibira lizosomske hidrolaze sisavaca, olakšavajući njegovu upotrebu kao kemijskog inhibitornog modela u istraživanju autofagije.<sup>61</sup> Ovaj inhibitor proteaze sprječava aktivnost nekih od ovih vrsta enzima, kao što su tripsin i proteinaza K, dok je neučinkovit s drugim kao što su kimotripsini.<sup>62</sup>



Slika 9. Struktura troriluzola

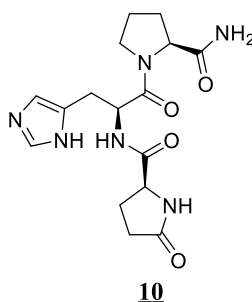
Troriluzol (Trigriluzole, BHV-4157, FC-4157) je tripeptidni prolijek riluzola (HY-B0211) treće generacije i novi kemijski entitet koji modulira glutamat,<sup>63</sup> najzastupljeniji ekscitatorni neurotransmiter u ljudskom tijelu. Troriluzol se uzima oralno, a aminopeptidaze u krvi oslobađaju riluzol iz tripeptidnog nosača.<sup>63</sup>

Primarni način djelovanja troriluzola je smanjenje sinaptičkih razina glutamata. Troriluzol povećava unos glutamata iz sinapse, povećavajući ekspresiju i funkciju ekscitatornih transportera aminokiselina (tj. EAAT2) smještenih na glijalnim stanicama koje imaju ključnu ulogu u čišćenju glutamata iz sinapse.<sup>64</sup> Glutamatergična disfunkcija je uključena u patofiziologiju širokog spektra poremećaja uključujući amiotrofičnu lateralnu sklerozu (ALS), spinocerebelarnu ataksiju (SCA), Alzheimerovu bolest (AD), depresiju, opsesivno kompulzivni poremećaj (OCD), kroničnu bol i razne vrste raka.<sup>64</sup>



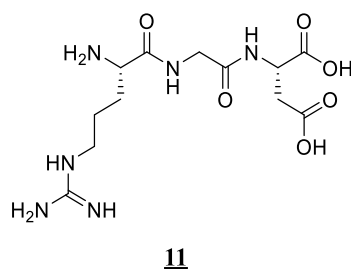
Slika 10. Struktura faktora inhibicije hormona koji stimulira oslobađanje melanocita (MIF-1)

Faktor inhibicije hormona koji stimulira oslobađanje melanocita (MIF-1) je endogeni moždani peptid čija aminokiselinska struktura je Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub> (PLG), a dobiva se cijepanjem hormona oksitocina<sup>65</sup> i ima različite farmakološke učinke na središnji živčani sustav.<sup>66</sup> Kliničke studije su pokazale da MIF-1 može ublažiti simptome Parkinsonove bolesti i mentalne depresije.<sup>67</sup> MIF-1 je bio prvi peptid za koji se pokazalo da djeluje na hipotalamus, a ne samo na hipofizu.<sup>68</sup> Terapeutski potencijal MIF-1 ukazuje na važnost daljnjeg utvrđivanja njegovog djelovanja na mozak. MIF-1 aktivira CNS putove povezane s opijatskim i dopaminergičkim sustavima.<sup>69,70</sup>



Slika 11. Struktura hormona koji oslobađa tireotropin

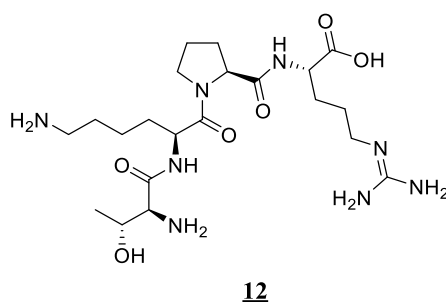
Hormon koji oslobađa tireotropin (TRH) je tripeptid koji se sastoji od aminokiselina L-piroglutamila, L-histidila i L-prolinamida.<sup>71</sup> TRH je hormon koji oslobađa hipotalamus, a stimulira oslobađanje hormona koji stimulira štitnjaču (TSH) i prolaktina iz prednjeg režnja hipofize.<sup>72</sup> Farmaceutski dostupni sintetski analog endogenog peptida TRH je protirelin,<sup>73</sup> ali trenutno, od strane FDA, nije odobren ni u jednom proizvodu. TRH se primjenjuje intravenozno (Relefact TRH)<sup>74</sup> za ispitivanje odgovora prednjeg režnja hipofize, a ovaj postupak je poznatiji kao TRH test. TRH test je dijagnostički test poremećaja štitnjače kao što je sekundarna hipotireoza i akromegalija. TRH ima antidepresivna i antisuicidna svojstva.<sup>75</sup> Istraživanja su pokazala da TRH kod miševa djeluje kao sredstvo protiv starenja, te na taj način ima ulogu u regulaciji metaboličkih i hormonskih funkcija.<sup>76</sup>



Slika 12. Stuktura RGD-a

RGD je tripeptid Arg-Gly-Asp i minimalna je adhezivna sekvenca prisutna u adhezijskim proteinima (fibronektin, fibrinogen i vitronektin) koji sadrže integrinske ligande. RGD se koristi i kao sekvenca za prepoznavanje adhezije u drugim proteinima ekstracelularnog matriksa (npr. laminin).<sup>77</sup> Koristi se kao kanonski motiv stanične adhezije u istraživanjima biomaterijala, u interakciji s  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  i  $\alpha\text{v}\beta\text{5}$  receptorima, a izvorno je identificiran kao ključni čimbenik u angiogenezi.<sup>78</sup> RGD sekvenca je neophodna za vezanje na staničnu membranu.<sup>79</sup> Takav motiv vezanja RGD na stanicu ima izuzetnu važnost u područjima onkologije, tkivnog inženjerstva i regenerativne medicine. Zbog svoje stanične adhezivne aktivnosti, RGD peptidi se često ugrađuju u biomaterijale dizajnirane za promicanje cijeljenja rana.<sup>80</sup> Često se koristi u ciljanoj terapiji, kao na primjer, za ciljanje stanica raka na kojima su integrini stanične membrane pojačano regulirani u usporedbi sa zdravim stanicama.<sup>81</sup>

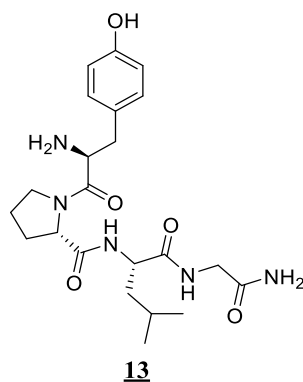
### 2.1.3. Primjeri tetrapeptidnih lijekova



Slika 13. Struktura tuftsina

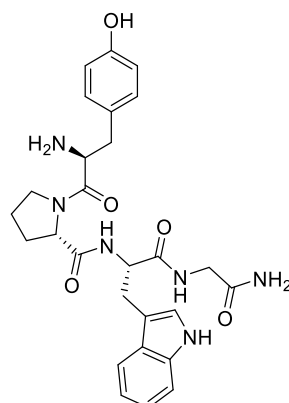
Tuftsina je prirodni tetrapeptid Thr-Lys-Pro-Arg (TKPR) koji se nalazi u Fc-domeni teškog lanca imunoglobulina G (aminokiselinski ostaci 289-292).<sup>82</sup> Otkriven je 1983. godine na Sveučilištu Tufts po kojem je i dobio ime.<sup>82</sup> Istraživanja pokazuju da tuftsina ima značajan antitumorski učinak, ali ne na način da direktno ubija tumorske stanice već djelovanjem fagocitnih stanica. Nakon vezanja receptora na polimorfonuklearnim staničnim površinama,

tuftsina aktivira migraciju fagocitnih stanica koje progutaju stanicu raka i postižu antitumorski učinak.<sup>83</sup> Postojeća istraživanja su pokazala da tuftsina jasno povećava fagocitozu i antitumorske učinke,<sup>84</sup> prvenstveno povećanjem pokretljivosti i aktivnosti fagocita makrofaga, dok istovremeno luči citokine, poput interleukina (IL)-1 i faktora tumorske nekroze (TNF)<sup>85</sup>, ali njihov način djelovanja nije potpuno jasan.



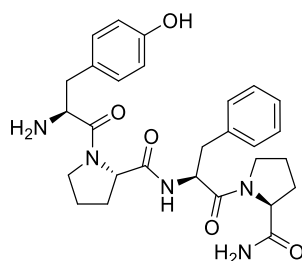
Slika 14. Struktura Tyr-MIF-1

Tyr-MIF-1 je prirodni tetrapeptid Tyr-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub> i predstavnik je MIF skupine endogenih peptida (MIF - Faktor inhibicije hormona koji stimulira oslobađanje melanocita). Izoliran je iz goveđeg hipotalamusa i ljudskog parijetalnog korteksa što sugerira njegovu uključenost u nocicepciju.<sup>86</sup> Primarni produkt razgradnje Tyr-MIF-1 nije MIF-1 kako bi se očekivalo, već Tyr-Pro, odnosno može se zaključiti da Tyr-MIF-1 nije prekursor MIF-1.<sup>87</sup> Tyr-MIF-1 djeluje kao opijatni agonist. Veže se selektivno i s visokim afinitetom na  $\mu$ -opioidne receptore u usporedbi s  $\delta$ - i  $\kappa$ -opioidnim receptorima. Tyr-MIF-1 se veže i na svoj specifični neopijatni receptor u mozgu s afinitetom prema vlastitom receptoru koji je 50 puta veći nego na  $\mu$ -receptor, te djeluje kao antagonist inhibicijskih učinaka opioida.<sup>88</sup> Zhang i suradnici otkrili su da Tyr-MIF-1 smanjuje aktivnost protein kinaze A ovisne o cAMP.<sup>89</sup> Ovaj peptid može utjecati na dio glavnog puta prijenosa signala, koji je uključen neovisno o njegovom vezanju za opijatske receptore.

**14**

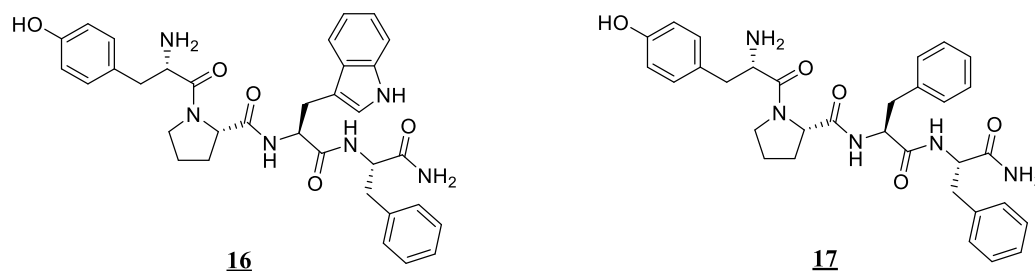
Slika 15. Struktura Tyr-W-MIF-1

Tyr-W-MIF-1 je neuromodulatorni peptid iz MIF-1 skupine peptida koji djeluje kao antagonist na  $\mu$ 2-opioidnim receptorima. Kada se daje sam, Tyr-W-MIF-1 inducira mješovite učinke ovisne o dozi na  $\mu$ -opioidne receptore; Tyr-W-MIF-1 inhibira analgetsko i antinociceptivno djelovanje opioida kada se daju istodobno. Ovaj peptid inhibira izlučivanje adrenokortikotropnog hormona (ACTH) i kortikosterona uzrokovanog stresom.<sup>90</sup>

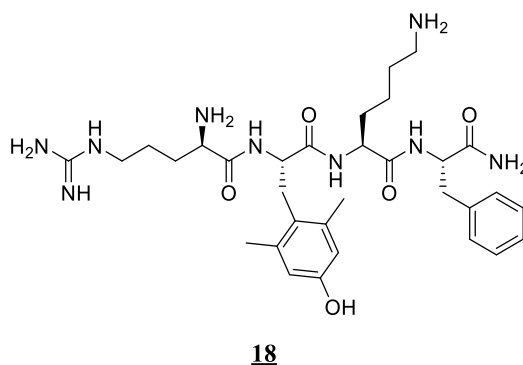
**15**

Slika 16. Struktura morficeptina

Morficeptin (Tyr-Pro-Phe-Pro-NH<sub>2</sub>) je tetrapeptid koji je selektivni agonist  $\mu$ -opioidnih receptora. Potječe iz  $\beta$ -kazomorfinu i ima preko 1000 puta bolju selektivnost za  $\mu$ - nego za  $\delta$ -opioidne receptore. Antidot nalokson je poništio analgetske učinke morficeptina, što znači da je analgetski učinak posredovan  $\mu$ -opioidnim receptorom.<sup>91</sup>

Slika 17. Strukture endomorfina-1 (**16**) i endomorfina-2 (**17**)

Endomorfini su prirodni opioidni neurotransmiteri za ublažavanje boli. Poznata su 2 endomorfina koji su tetrapeptidi po svojoj strukturi i to su endomorphin-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>) i endomorphin-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>).<sup>92</sup> Ove peptidne sekvence savijaju se u tercijarne strukture s visokom specifičnošću i afinitetom za vezanje na  $\mu$ -opioidni receptor. Vezani  $\mu$ -opioidni receptori obično induciraju inhibitorne učinke na neuronsku aktivnost.<sup>93</sup> Budući da endomorfini aktiviraju  $\mu$ -opioidni receptor, koji je ciljani receptor morfija i njegovih derivata, endomorfini posjeduju značajan potencijal kao analgetici sa smanjenim nuspojavama i rizikom od ovisnosti. Vezanje endomorfina uzrokuje ekscitaciju, gdje njegova aktivacija fosfolipaze C i adenilil ciklaze inicira povećanje koncentracije kalcijevih iona, staničnu depolarizaciju i oslobađanje norepinefrina i serotonina.<sup>94</sup> Oni imaju ulogu i u imunološkim odgovorima i funkcijama gastrointestinalnog, respiratornog, kardiovaskularnog i neuroendokrinog sustava.<sup>94</sup>

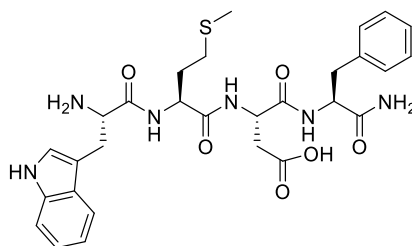


Slika 18. Struktura elamipretida

Elamipretid (SS-31, MTP-131 i Bendavia) je kationski tetrapeptid (D-Arg-dimetil-Tyr-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>) koji lako prodire u stanične membrane i prolazno se lokalizira na unutarnjoj mitohondrijskoj membrani gdje se povezuje s kardiolipinom.<sup>95</sup> Kroz ovaj mehanizam djelovanja, smatra se da elamipretid, normalizira strukturu unutarnje mitohondrijske



membrane, potiče proizvodnju ATP-a (adenozin-trifosfata) te prekida stvaranje štetnog oksidativnog stresa.<sup>96</sup> U prekliničkim studijama, elamipretid je povećao sintezu ATP-a i smanjio proizvodnju reaktivnih vrsta kisika bez obzira na specifičnu abnormalnost mitohondrija koja uzrokuje oštećeno mitohondrijsko disanje. Nije uočen učinak na normalno funkcioniranje mitohondrija.<sup>97</sup>

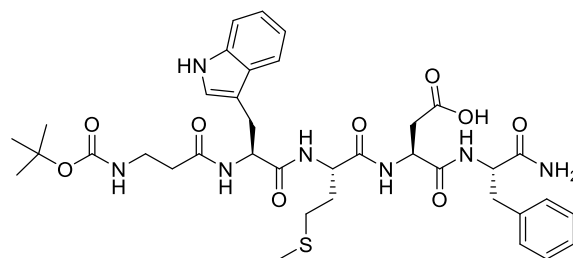


19

Slika 19. Struktura kolecistokinina

Kolecistokinin (CCK-4, tetragastrin) je tetrapeptidni fragment Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> izveden iz većeg peptidnog hormona kolecistokina.<sup>98</sup> Za razliku od kolecistokina koji ima različite uloge u gastrointestinalnom sustavu, CCK-4 djeluje prvenstveno u mozgu kao anksiogen, iako zadržava neke gastrointestinalne učinke.<sup>98</sup> CCK-4 pouzdano uzrokuje teške simptome anksioznosti kada se daje ljudima u dozi od samo 50 µg,<sup>98</sup> i obično se koristi u znanstvenim istraživanjima za izazivanje napadaja panike u svrhu testiranja novih anksiolitičkih lijekova.<sup>99</sup> Budući da se radi o peptidu, CCK-4 se mora davati parenteralno jer se brzo razgrađuje nakon ulaska u tijelo.

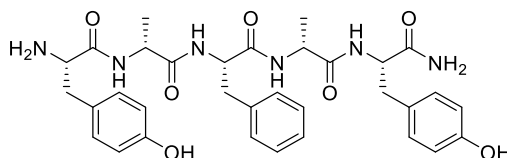
#### 2.1.4. Primjeri pentapeptidnih lijekova



**20**

Slika 20. Struktura pentagastrina

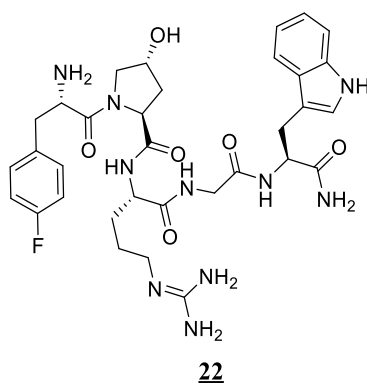
Pentagastrin je sintetski pentapeptid Boc- $\beta$ -Ala-L-Trp-L-Met-L- $\alpha$ -Asp-L-Phe-NH<sub>2</sub> koji ima učinke poput gastrina kada se daje parenteralno.<sup>100</sup> Potiče lučenje želučane kiseline, pepsina i intrinzičnog faktora,<sup>101</sup> a koristi se kao dijagnostička pomoć za pentagastrinom-stimulirani kalcitoninski test. Pentagastrin se veže na kolekistokinin- $\beta$  receptor, koji je široko eksprimiran u mozgu.<sup>101</sup> Aktivacija ovih receptora aktivira sustav drugog glasnika fosfolipaze C.<sup>101</sup> Ukoliko se daje intravenozno, može izazvati napade panike.<sup>102</sup>



**21**

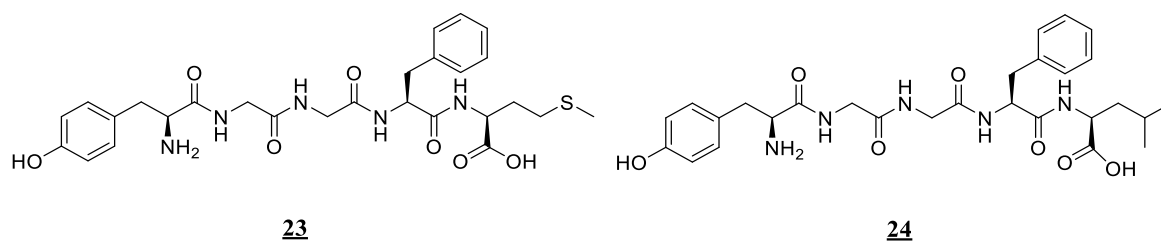
Slika 21. Struktura kazokefamida

Kazokefamid (INN,  $\beta$ -kazomorfin 4027), specifičan je sintetski opioidni pentapeptid Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-NH<sub>2</sub> koji se veže na  $\mu$ - i  $\delta$ -opioidne receptore.<sup>103</sup> Izveden iz sekvence  $\beta$ -kazomorfin, te dizajniran s namjerom poboljšanja otpornosti na probavne enzime kako bi se mogao koristiti kao lijek protiv proljeva. U kliničkoj studiji utvrđeno je da je kazokefamid učinkovit oralnim putem u liječenju kroničnih proljeva i nije proizveo nikakve nuspojave.<sup>104</sup>



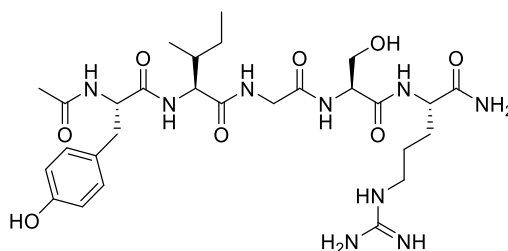
Slika 22. Struktura nemifitida

Nemifitid je antidepresivni lijek s pentapeptidnom strukturom sličnom faktoru inhibicije melanocita (MIF-1), a peptidna sekvenca je 4-F-Phe-4-OH-Pro-Arg-Gly-Trp-NH<sub>2</sub>.<sup>105</sup> Nemifitid je pokazao mješovitu učinkovitost u ublažavanju simptoma depresije.<sup>106</sup> Zanimljivo je da je unatoč vrlo kratkom poluživotu u većini studija koje procjenjuju njegovu učinkovitost nemifitid davan samo jednom dnevno potkožno, a ipak je učinkovit protiv depresije.<sup>105</sup> Mehanizam djelovanja nemifitida nije jasan. Vjerojatno se veže na nekoliko receptora uključujući 5-HT<sub>2A</sub> (gdje se pokazalo da djeluje kao antagonist), NPY<sub>1</sub>, bombesin te MC<sub>4</sub> i MC<sub>5</sub>, iako samo u mikromolarnim koncentracijama.<sup>107</sup>

Slika 23. Strukture enkefalina **23** i **24**

Enkefalini (Met- **23** i Leu-enkefalin **24**) su pentapeptidi koji pripadaju skupini endogenih opioidnih peptida. Peptidna sekvenca Met-enkefalina je Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, a Leu-enkefalina je Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu. Oba se ponajprije vežu na δ-opioidne receptore. Enkefalini su široko rasprostranjeni u središnjem živčanom sustavu i reguliraju široku paletu funkcija središnjeg živčanog sustava, uključujući, između ostalog, nocicepciju, raspoloženje, pokrete i neuroendokrine funkcije.<sup>108</sup> Ovi pentapeptidi djeluju kao neurotransmiteri i neuromodulatori u cijelom živčanom sustavu i raznim ciljevima krajnjih organa.<sup>109</sup> Nadalje, istraživanje je

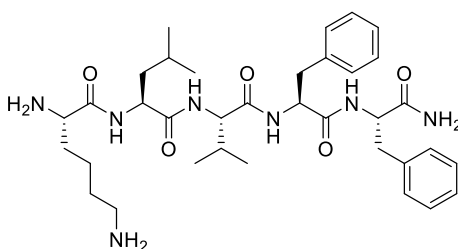
pokazalo da Met-enkefalin ima bitnu ulogu u proliferaciji stanica i organizaciji tkiva tijekom razvoja i često ga se naziva opioidnim faktorom rasta.<sup>110</sup>



25

Slika 24. Struktura YIGSR-a

YIGSR (Ac-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>) je pentapeptid koji je stanična adhezijska sekvenca iz proteina ekstracelularnog matriksa laminina, prisutnog u bazalnoj membrani.<sup>111</sup> Zabilježeno je da i poli(RGD) i poli(YIGSR) pokazuju antikancerogeno djelovanje protiv tumora pluća u miševa.<sup>112</sup> Multimerni YIGSR inhibira angiogenezu i rast tumora stanica humanog fibrosarkoma kod miševa.<sup>113</sup> YIGSR i pentapeptid IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val) stvaraju hibridne peptidne amfifile koji podržavaju opstanak neurona i njihovu morfogenezu (rast dendrita i aksona), ukoliko se pomiješaju s kolagenom kako bi se formirala vlaknasta struktura.<sup>114</sup>



26

Slika 25. Struktura sekvence 16-20 amiloida β peptida

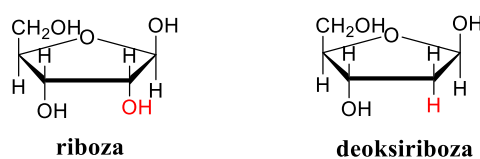
Amiloid β (Aβ) peptid igra ključnu ulogu u Alzheimerovoj bolesti, te se sve više istražuje uloga Aβ peptida u izazivanju smrti neuronskih stanica te napredovanju bolesti.<sup>115</sup> Vjeruje se da je ključna peptidna sekvenca Lys-Leu-Val-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> (KLVFF) amiloidnog β (Aβ) peptida (sekvenca 16-20) jezgra agregacije.<sup>115</sup> Peptidi koji uključuju ove fragmente mogu vezati duge peptide i tako spriječiti fibrilizaciju.<sup>116</sup> Fragmenti temeljeni na KLVFF-u dizajnirani su da

inhibiraju fibrilizaciju A $\beta$ 40 i A $\beta$ 42. Racionalni principi dizajna temeljeni na poznavanju sekvence vezanja pentapeptida doveli su do pripreme Leu-Pro-Phe-Phe-Asp (LPFFD), koji je poznat kao peptid za razbijanje  $\beta$ -ploče.<sup>117</sup> Ovaj peptid uključuje prolin, za koji je poznato da ometa agregaciju  $\beta$ -ploče, a utvrđeno je da smanjuje taloženje amiloida *in vivo* kod modela štakora i rastavlja prethodno oblikovane fibrile *in vitro*.<sup>117</sup> Dipeptidni fragment Phe-Phe (FF) ovih pentapeptida ima važnu ulogu u stvaranju amiloida zbog  $\pi$ - $\pi$  interakcija.<sup>118</sup> FF ima izvanredna svojstva samoudruživanja, te u vodenoj otopini tvori nanocijevi,<sup>119</sup> a u organskim otapalima moguće je pripremiti vezikule ili nanočestice.<sup>77</sup>

## 2.2. Vezanje oligopeptida na polinukleotide

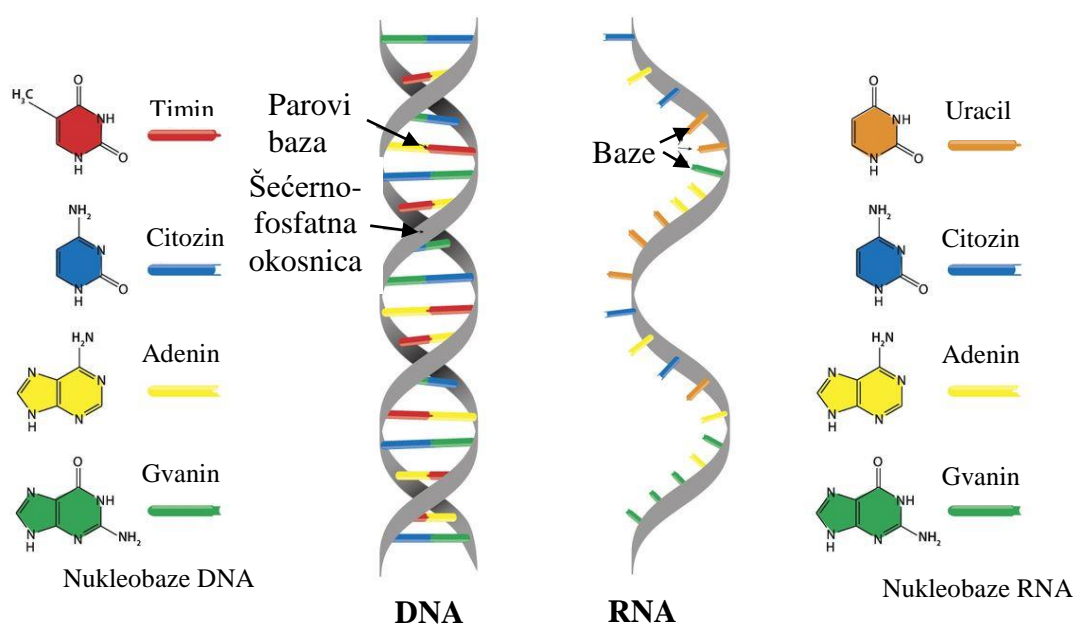
### 2.2.1. Nukleinske kiseline DNA i RNA

DNA i RNA su dugi linearni polimeri koji nose informaciju u obliku koji se može prenositi s jedne generacije na drugu. Te se makromolekule sastoje od velikog broja povezanih monomernih jedinica zvanih nukleotidi, od kojih svaki sadržava šećer, fosfat i bazu. Šećer u DNA je deoksiriboza, dok je u RNA riboza (slika 26). Šećeri povezani fosfatima čine zajedničku okosnicu koja ima strukturnu ulogu dok redoslijed baza duž lanca nukleinske kiseline nosi genetičku informaciju.<sup>120</sup>



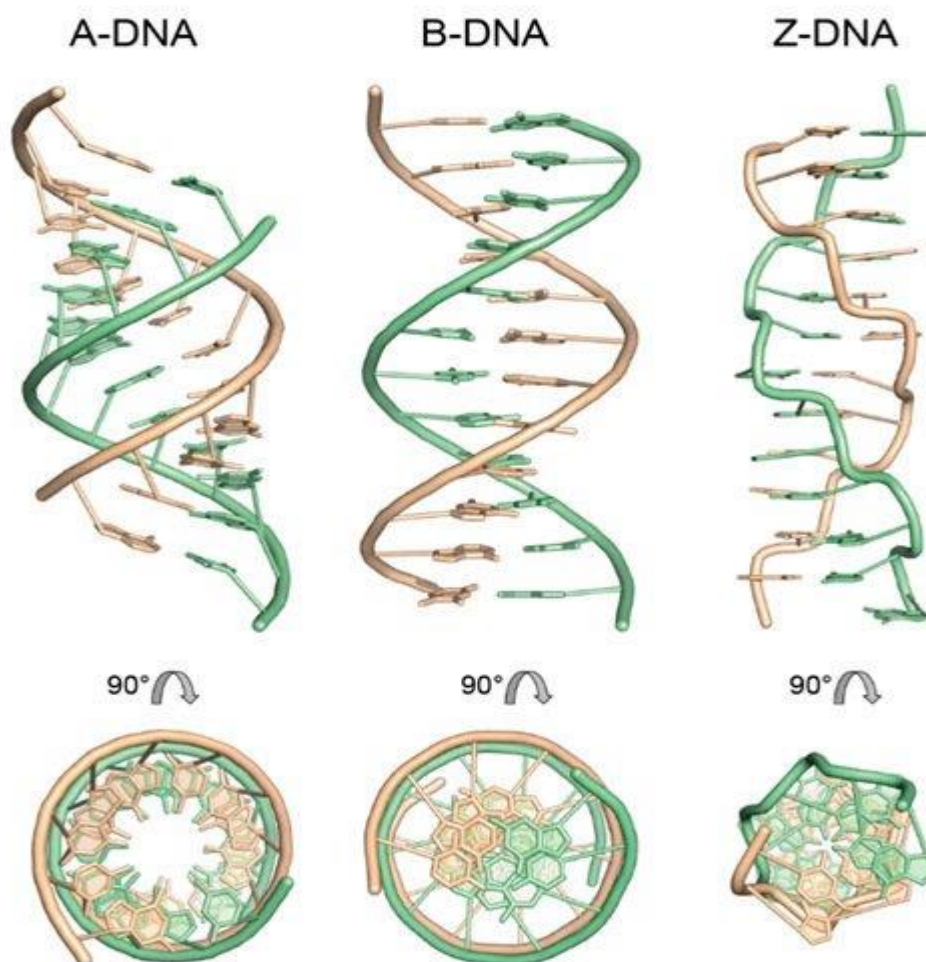
Slika 26. Strukture šećera riboze i deoksiriboze (preuzeto iz Styrrer, 2013.)<sup>120</sup>

Molekula DNA ima oblik dvostruke uzvojnice, spiralne strukture koja se sastoji od dvaju komplementarnih lanaca nukleinskih kiselina. DNA i RNA su dugi nerazgranati polimeri sastavljeni od nukleotida međusobno povezanih 3'-5'- fosfodieterskim mostovima. Usporedba strukture molekule DNA i RNA prikazana je na slici 27. Purinske i pirimidinske baze stvaraju parove preko vodikovih veza pri čemu se timin (T) veže s adeninom (A) kod DNA, adenin (A) s uracilom (U) kod RNA, te gvanin (G) s citozinom (C) i kod DNA i RNA.<sup>120</sup>



Slika 27. Usporedba strukture DNA i RNA (preuzeto s Tehnology Networks)<sup>121</sup>

DNA se može nalaziti u tri glavna oblika: A, B i Z koji se međusobno razlikuju prema sljedećim karakteristikama: visina, širina utora, orijentacija baza i konformacijske promjene na šećeru (tablica 1).<sup>122</sup> Najveće razlike između A- i B-oblika DNA su u konformacijskim promjenama na šećeru i njihovim širinama utora. A-DNA ima uzak veliki utor, dok je mali utor širok/plitak. Nasuprot tome, mali utor B-DNA je uzak s prosječnom širinom od 5,7 Å.<sup>123</sup> A- i B-DNA su obje desne dvolančane uzvojnice, dok je Z-DNA lijeva dvolančana uzvojnica koja se sastoji od izmjeničnih parova baza, a sadrži i neke značajke A- i B-DNA (slika 28).<sup>124</sup> RNA i većina kompleksa DNA-RNA se nalazi u A-obliku.

Slika 28. Usporedba struktura A-, B- i Z-DNA (preuzeto Heinemann, *Symmetry*. 2020)<sup>125</sup>Tablica 1. Razlike A-, B- i Z-DNA<sup>122</sup>

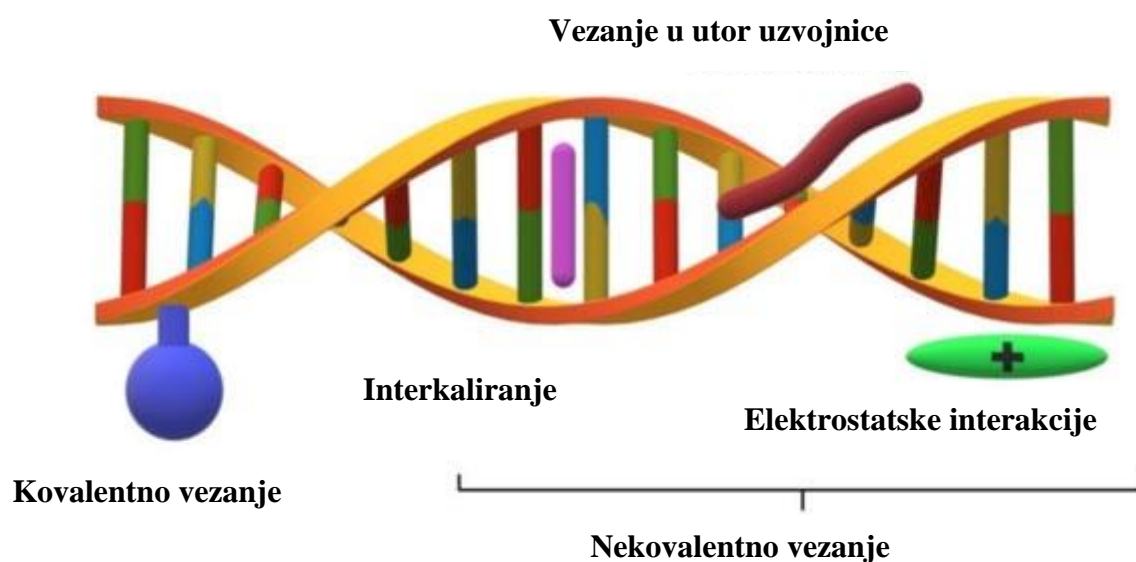
Tip uzvojnice	A	B	Z
Uzvojnica	desna	desna	lijeva
Broj baznih parova po navoju	11	10,4	12
Visina navoja/Å	25,3	35,4	45,6
Promjer uzvojnice/Å	25,5	23,7	18,4
Glikozidna veza	anti	anti	izmjena anti i sin
Veliki utor	vrlo uzak i vrlo dubok	širok i srednje dubok	plošan
Mali utor	vrlo širok i plitak	uzak i srednje dubok	vrlo uzak i dubok

Dvije komplementarne nukleinske kiseline mogu formirati antiparalelne dvolančane strukture u vodenim otopinama i u živim organizmima. Molekularnu strukturu DNA prvi su otkrili Watson i Crick 1953., proširivši biološka istraživanja na molekularnu razinu.<sup>126</sup> Watson i

Crickov predloženi model dvolančane strukture DNA definiran je kao B-oblik. Kristalografske studije pokazale su da je u fiziološkim uvjetima dvostruka uzvojnica DNA strukturno slična modelu B-DNA (10,5 parova baza po navoju), čija površina sadrži dva utora.<sup>127</sup> Područje u kojem su dva lanca jedan blizu drugog naziva se manjim utorom, dok se područje u kojem su dva lanca udaljena jedan od drugog naziva veliki utor. Na fleksibilnost DNA utječe broj vodikovih veza između komplementarnih baza. Parovi baza GC su "krutiji" u usporedbi s parovima baza koji su bogati AT.

### 2.2.2. Načini vezanja malih organskih molekula na DNA i RNA

Interakcije nukleinskih kiselina DNA i RNA s malim organskim molekulama proučavaju se više od 50 godina.<sup>122</sup> Interakcije malih organskih molekula s DNA i RNA mogu biti nepovratne kod kojih nastaju kovalentne veze male molekule s polinukleotidima ili dolazi do cijepanja polinukleotidnih lanca, te ravnotežne interakcije kod kojih nastaju nekovalentni kompleksi.<sup>128</sup> Najčešći oblik vezanja malih molekula na DNA i RNA su ravnotežne interakcije koje se mogu podijeliti na 3 osnovna tipa vezanja: elektrostatske interakcije, vezanje u mali ili veliki utor uzvojnice i interkaliranje (umetanje između parova baza) (slika 29).



Slika 29. Vrste vezanja malih molekula na polinukleotide<sup>127</sup>

Struktura polinukleotida, odnosno dimenzije i geometrija utora, važni su elementi prepoznavanja kako bi se ligandi ispravno vezali na polinukleotid. Potrebna je visoka



konformacijska labilnost strukture liganda da bi se spoj prilagodio obliku utora. Karakteristična značajka spojeva koji se vežu u utor je prisutnost nekoliko pojedinačnih prstenova povezanih kratkom razmaknicom.<sup>127</sup> Stabilnost formiranog kompleksa karakteriziraju fizikalno-kemijske interakcije (obično vodikove veze) između funkcionalnih skupina liganda i funkcionalnih skupina unutar malog utora. Spojevi koji stupaju u interakciju s polinukleotidima u malom utoru obično imaju veći afinitet prema regijama bogatim AT parovima baza.<sup>129</sup> Interkaliranje je vrsta nekovalentnih interakcija s DNA ili RNA koje molekuli omogućuje umetanje između parova baza dvostruke uzvojnice. Interkaliranje molekule stabiliziraju  $\pi$ - $\pi$  interakcije između parova baza DNA ili RNA. Interkalatori su planarne aromatske molekule, a zbog fluorescentnih svojstava neki se fenantridnski derivati, kao što je etidij-bromid mogu primjenjivati kao markeri u biološkim istraživanjima.<sup>128</sup> Štoviše, interkaliranje ima ključnu ulogu u djelovanju antitumorskih lijekova, npr. daunomicina i nekih antibiotika kao što je aktinomicin D.<sup>130</sup>

### 2.2.3. Interakcije oligopeptida s DNA i RNA

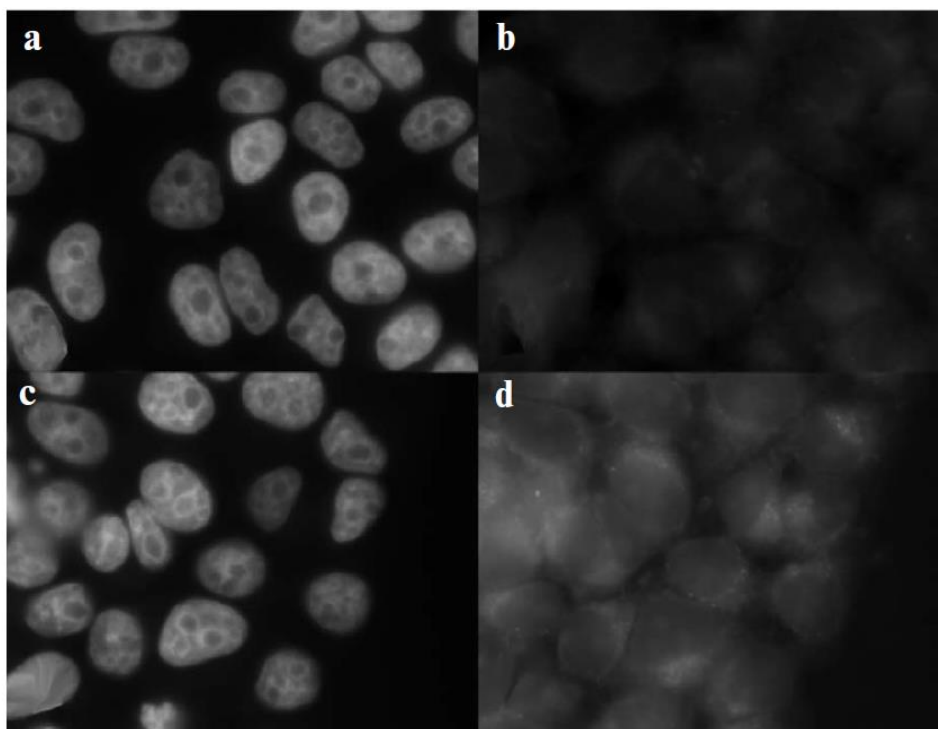
Peptidi i proteini stupaju u interakcije s DNA pri čemu mjesto vezanja odnosno način vezanja ovisi o aminokiselinama koje peptid sadrži. Kada peptid sadrži uglavnom negativno nabijene aminokiseline (Asp, Glu), DNA veže kisele peptide u veliki utor dvostruke uzvojnice.<sup>131</sup> Struktura DNA postaje lomljivija i razdvajanje lanaca se događa bez velikih utrošaka energije, čime se pojednostavljuje početak transkripcije i replikacije DNA. Kada peptid sadrži uglavnom pozitivno nabijene aminokiseline (Lys, Arg), DNA veže peptid u mali utor gdje peptid može stvarati elektrostatske interakcije s O atomima fosfatnih dijelova.<sup>131</sup>

Postojanje specifičnog vezanja oligopeptida s jednolančanim oligonukleotidima može imati poseban značaj, pogotovo ako se radi o replikaciji DNA, popravku i rekombinaciji. Oligopeptidi mogu prodrijeti u jezgru i selektivno se vezati za određene oligonukleotide i nukleotidne sekvence DNA *in vitro*. Stoga se može utjecati na genetske procese na različite načine u različitim tkivima (stanicama), jezgri i mitohondrijima, u mladim i starim stanicama, te u normalnim i malignim stanicama.<sup>132</sup> Podrijetlo regulatornih oligopeptida u zdravim organizmima otkrili su Ciechanover, Hershko i Rose razgradnjom proteina s ubikvitinom (Nobelova nagrada za kemiju 2004.), a pokazali su da se jedan makromolekularni protein može hidrolizirati proteazama na nekoliko različitih načina kako bi se stvorili razni kratki peptidi.<sup>131</sup> Ovaj mehanizam može proizvesti peptide s biološkim funkcijama koje se uvelike razlikuju od

onih u početnoj makromolekuli.<sup>133</sup> Na primjer, kratki peptidi u obliku autokrinih hormona i neuropeptida važni su za širenje bioloških informacija.<sup>131</sup>

Istraživanje Khavinsona i suradnika pokazalo je da dipeptidi i tetrapeptidi mogu komunicirati s kromatinom stanice i sudjelovati u regulaciji transkripcije gena.<sup>134</sup> Khavinson i suradnici su predstavili model komplementarnog vezanja sintetskog peptida Ala-Glu-Asp-Gly na nukleotidnu sekvencu ATTTG unutar glavnog lanca dvostruke uzvojnice DNA koji se ponavlja više puta na promotorskim mjestima gena telomeraze i RNA polimeraze II.<sup>135</sup> Tako su pokazali da oligopeptidi igraju ključnu ulogu u regulaciji ekspresije gena, a time i sinteze proteina u stanicama različitih organizama.<sup>135</sup> Solvoyev i suradnici ispitali su molekularni mehanizam u modelnom sustavu i pokazali da interakcija sintetskog tetrapeptida AEDG s poli[dAdT]-poli[dA-dT] uzrokuje hiperkromni učinak i da odgovor ovisi o koncentraciji peptida.<sup>136</sup>

Oligopeptidi čine sustav signalnih molekula koji reguliraju funkcije organizma na molekularnoj, genetskoj, međustaničnoj, staničnoj i tkivnoj razini.<sup>137</sup> Jedan kratki peptid može regulirati desetke gena, ali molekularni mehanizam ovog procesa i dalje je neistražen. Kratki peptidi ulaskom u stanicu vežu se za komplementarne sekvence u promotorima gena, što rezultira sintezom relevantne mRNA i pokretanjem procesa translacije.<sup>138</sup> To je način na koji oligopeptidi reguliraju ekspresiju gena i sintezu proteina određujući najvažnije faze vitalne aktivnosti stanice: proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu.<sup>138</sup> Stoga specifične interakcije peptida i DNA mogu regulirati genetske funkcije stanice. Khavinson i suradnici pokazali su da FITC-obilježeni (fluorescein izotiocijanat) dipeptidi i tripeptidi ulaze u citoplazmu, jezgre i jezgre HeLa stanica.<sup>132</sup> (slika 30)



Slika 30. Fluorescencija FITC konjugiranog pinealona u jezgrama HeLa stanica: a, b) kontrola; c, d) nakon 6 h inkubacije stanica s FITC konjugiranim pinealonom ( $1,2 \times 10^{-6}$  M); a, c) nakon tretmana stanica s DAPI; b, d) fluorescencija FITC konjugiranog pinealona u jezgrama. (preuzeto iz Feodoreyeva 2011)<sup>132</sup>

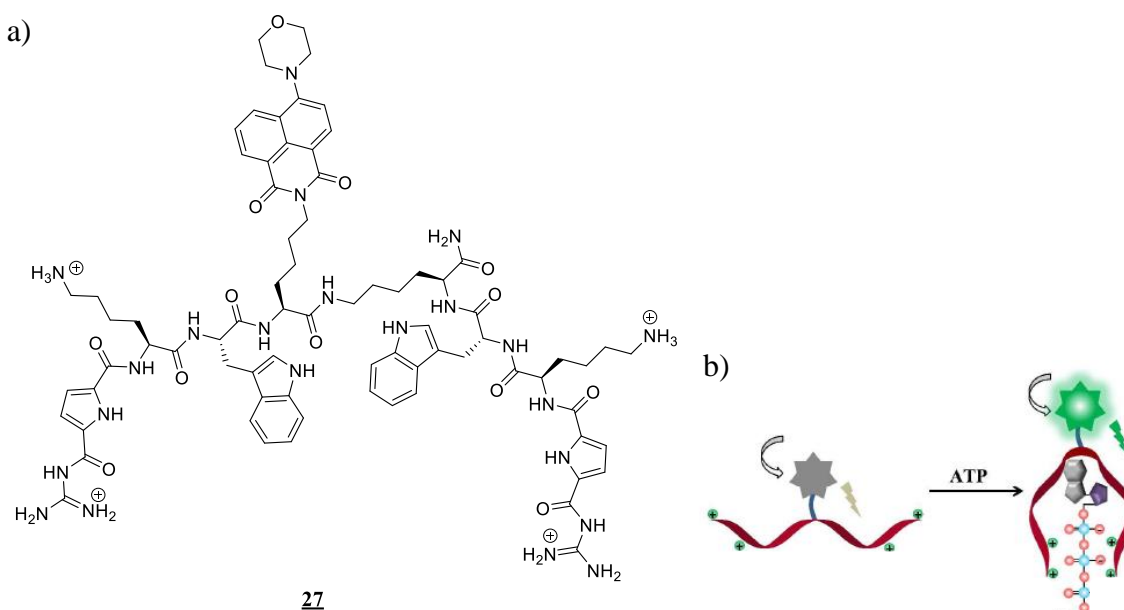
Kratki biološki aktivni peptidi stupaju u interakcije s jednolančanom i dvolančanom DNA. Ala-Glu-Asp-Gly (Epithalon) se snažnije veže na jednolančane oligonukleotide, dok Lys-Glu-Asp-Trp (Pancreagen) stvara jaču interakciju s dvolančanom DNA, vjerojatno stvaranjem veza na površini molekule DNA.<sup>132</sup>

Peptidna sekvenca može se modificirati s određenim funkcionalnim skupinama aminokiselina za selektivno ciljanje meta biomolekula. Peptidi su dovoljno veliki da sadrže značajan broj aminokiselina s određenim funkcionalnim skupinama bočnih lanaca koji mogu utjecati na afinitet i specifične interakcije s ciljnim receptorima. Dostupno je mnogo rendgenskih ili NMR strukturnih podataka koji se mogu iskoristiti za racionalno dizajniranje specifičnih peptidnih receptora.

Fluorescentni peptidni indikatori sadrže organski fluorofor sa specifičnom peptidnom sekvencom,<sup>6</sup> a fluorofori na peptidnim lancima djeluju kao glasnici tijekom interakcije s biomolekulama. Promjene fotofizičkih i spektralnih svojstava omogućuju primjenu peptidnih

fluorescentnih indikatora za različite biomolekule.<sup>139</sup> Istraživačka skupina profesora Schmucka uspješno je razvila nekoliko peptidnih indikatora za ciljanje važnih biomolekula uključujući nukleotide,<sup>7</sup> DNA,<sup>8</sup> proteine,<sup>140</sup> i lipide u vodenom mediju.<sup>141</sup> Fluorescentni peptidi su također korišteni za praćenje lizosoma i njihovu vizualizaciju.<sup>142</sup>

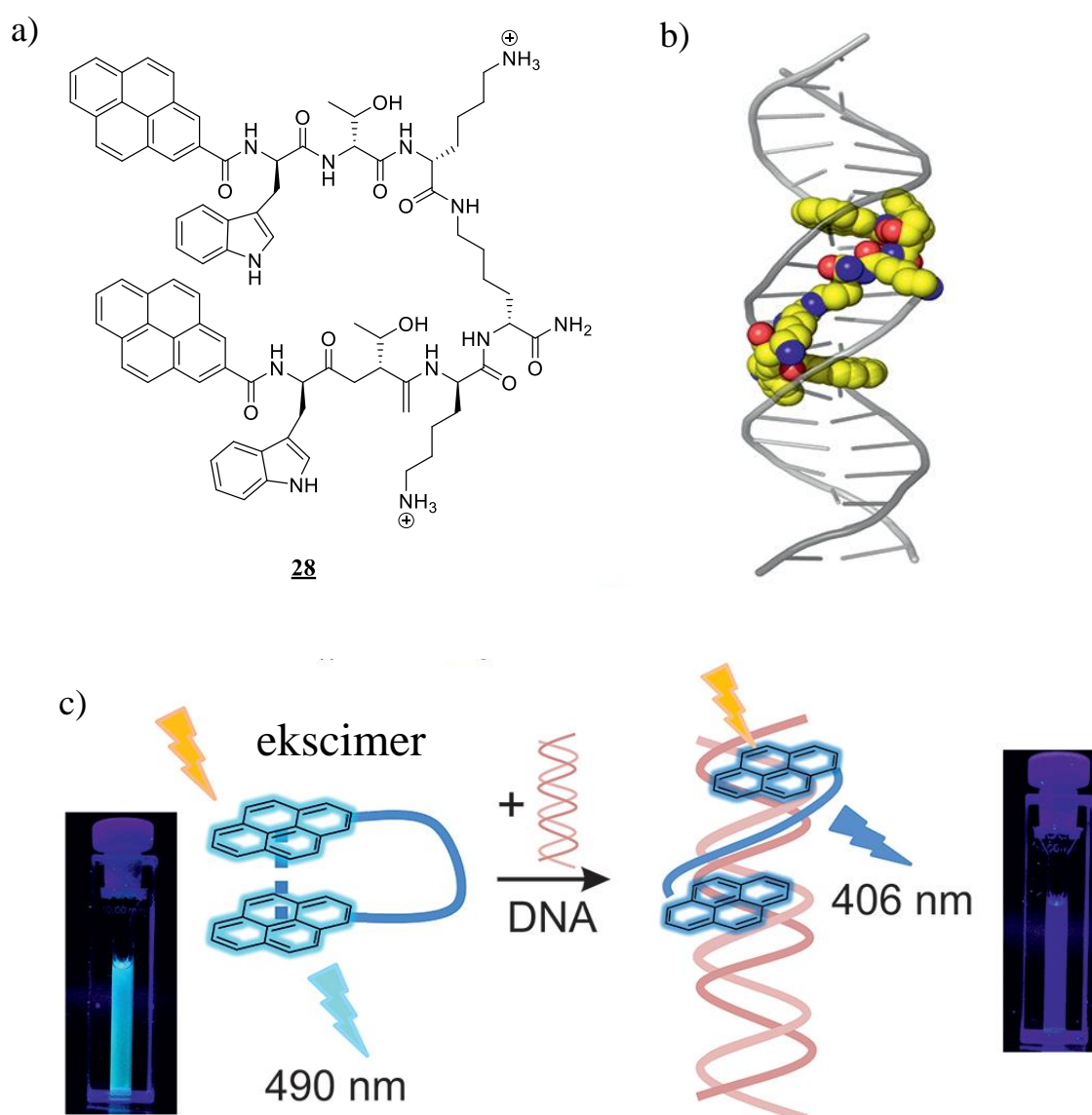
Schmuck i suradnici dizajnirali su indikator, strukturno modificirani peptid (**27**) funkcionaliziran aminonaftalimidom kao fluoroforom, koji se veže za nukleozidne trifosfate.<sup>7</sup> Indikator sadrži dva simetrična peptidna kraka koja imaju modificirano mjesto za vezanje aniona na bazi gvanidinijevog kationa ili gvanidino–karbonil–pirola (GCP), lizin za elektrostatske interakcije i triptofan koji je odgovoran za  $\pi$ – $\pi$  interakciju s nukleobazama (slika 31). U sredini se nalazi aminonaftalimidni fluorofor koji uslijed vezanja nukleotida pokazuje promjene u fluorescenciji. Struktura peptidnog indikatora vrlo je fleksibilna što mu omogućuje vezanje za ATP na način sličan pinceti.



Slika 31. a) Peptidni indikator **27**; b) Shematski prikaz vezanja na ATP-a (preuzeto iz Schmuck 2016)<sup>7</sup>

Nukleinske kiseline koje nose genetske informacije prisutne su u gotovo svim živim organizmima. Praćenje fluorescencije nukleinskih kiselina postaje sve važnije u medicinskoj dijagnostici, otkrivanju lijekova, praćenju okoliša te sigurnosti hrane.<sup>143</sup> Schmuck i suradnici dizajnirali su fluorescentne indikatore za detekciju nukleinskih kiselina.<sup>141</sup> Peptidni indikator na bazi pirena sadrži dvije tripeptidne sekvence Trp-Thr-Lys, od kojih je svaka spojena preko

svog C-kraja na središnju lizinsku razmaknicu. Na svom N-kraju, svaki peptidni krak funkcionaliziran je pirenom. Piren se često koristi kao indikator za polinukleotide osjetljiv na polarost jer se ne može samo interkalirati u ds-DNA već se može i vezati u utore.<sup>144</sup> Nevezani peptidni indikator u presavijenoj konformaciji pokazuje tipičnu emisiju ekscimera pirena na 490 nm. Prilikom vezanja na ds-DNA peptidni indikator prolazi kroz strukturnu promjenu iz presavijene u linearnu konformaciju koja više ne prikazuje fluorescenciju ekscimera već emisiju monomera na 406 nm. Pri tome se dva pirena interkaliraju između parova baza dok se peptidna razmaknica veže u mali utor nukleinske kiseline dodatnim elektrostatskim interakcijama između pozitivno nabijenih bočnih lanaca lizina i fosfatne okosnice. Mjereći omjer intenziteta fluorescencije na dvije valne duljine (406 i 490 nm) omogućuje se određivanje koncentracije nukleinskih kiselina.

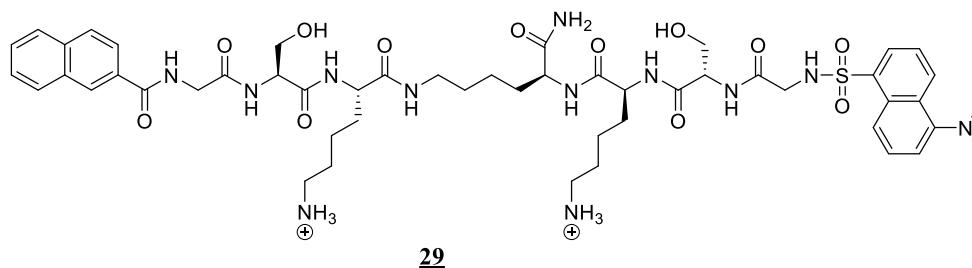


Slika 32. a) struktura spoja **28**; b) moguć način vezanja spoja **28** na poli (dA-dT)<sub>2</sub>; c) prikaz peptidnog indikatora u interakciji s nukleinskom kiselinom (preuzeto iz Schmuck 2012.)<sup>8</sup>

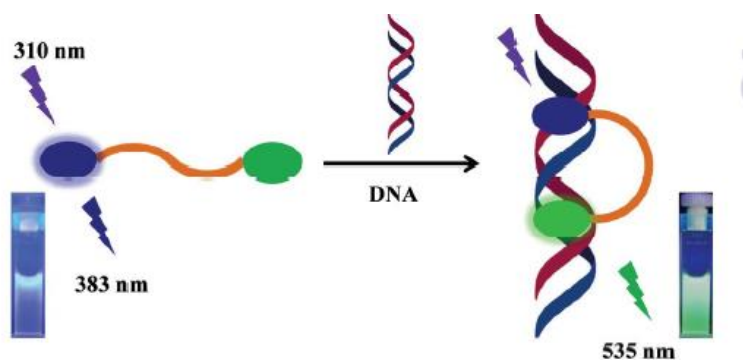
Schmuck i suradnici uspješno su priredili i peptide bogate lizinom koji se vežu na polinukleotide i pokazuju Försterov prijenos rezonancijske energije (FRET).<sup>9</sup> Ovaj peptidni indikator sadrži dvije tripeptidne sekvence Gly-Ser-Lys povezane preko svog C-kraja na središnju lizinsku razmaknicu. N-kraj peptidnog indikatora funkcionaliziran je FRET parom, naftalenom i dansilom. Promjena konformacije spoja **29** nakon vezanja za ds-DNA, dovodi do promjene učinkovitosti FRET-a između dva fluorofora i pokazuje porast intenziteta fluorescencije spoja **29** u prisustvu ds-DNA. Peptidni indikator u prisutnosti ds-DNA emitira na 535 nm nakon pobuđivanja pri 310 nm, dok njegov nevezni oblik pri istoj valnoj duljini

probude pokazuje emisiju naftalena pri 383 nm. Pokazali su da se peptidni indikator najvjerojatnije veže u mali utor DNA. Peptidni indikatori (Trp-Thr-Lys i Gly-Ser-Lys) mogu se koristiti za otkrivanje različitih polinukleotida, jer pokazuju izraženiji intenzitet fluorescencije za polinukleotide bogate AT parovima baza nego polinukleotide bogate GC.<sup>139</sup>

a)

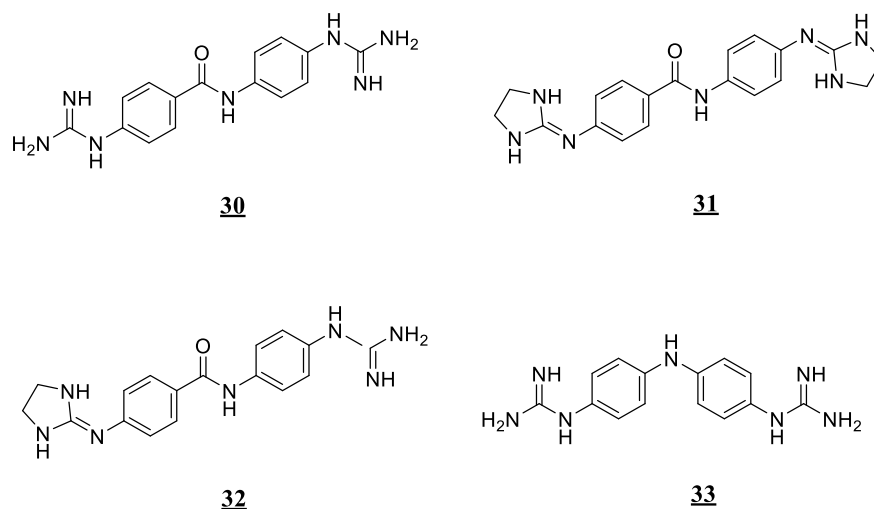


b)

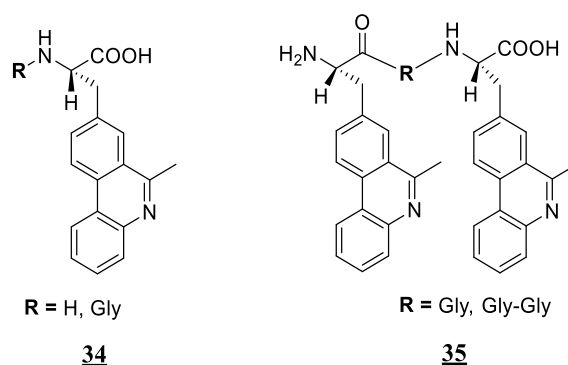


Slika 33. a) struktura peptidnog indikatora **29**; b) peptidni indikator i interakcija s DNA (preuzeto iz Schmuck 2016)<sup>7</sup>

Rozas i suradnici sintetizirali su seriju asimetričnih bis-kationskih liganada međusobno povezanih peptidnom razmaknicom čija se linearna okosnica veže u manji utor DNA (slika 34).<sup>145</sup> Korištenjem eksperimenata kao što su rezonancija površinskih plazmona (eng. *surface plasmon resonance*) i cirkularni dikroizam otkrili su da zbog prisutnosti planarne amidne poveznice između fenilnih prstenova, ligandi **30-32** pokazuju poboljšanu sposobnost vezanja u mali utor A-T parova baza za razliku od derivata sličnih gvanidiniju sa zakrivljenim jezgrama **33**.<sup>145</sup>

Slika 34. Bisguanidinski ligandi za polinukleotide<sup>145</sup>

Piantanida i suradnici sintetizirali su seriju aminokiselina s fenantridinom na bočnom lancu (slika 35).<sup>146</sup> Bis-fenantridinski derivat s kratkom, rigidnom poveznicom stvara intramolekularni ekscimer karakteriziran specifičnom fluorescentnom vrpcom osjetljivom na pH kao i na interakcije s ds-DNA. Zanimljivo je da su svi fenantridinski peptidi pokazali izvrsnu topljivost u vodi u kombinaciji s niskom toksičnošću *in vitro*, te su stoga dobri kandidati za razvoj novih sigurnih fluorescencijskih indikatora za DNA i RNA.

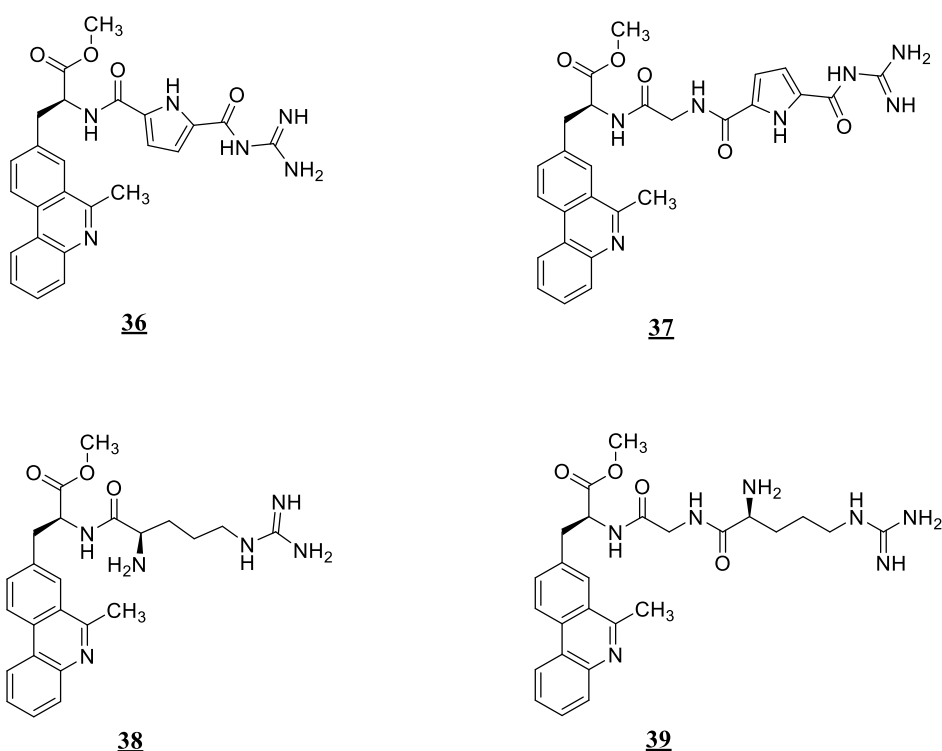


Slika 35. Serija aminokiselina s fenantridinom

Kako bi razvili peptidne fluorescentne indikatore koji specifično prepoznaju DNA, RNA ili proteine, Piantanida, Schmuck i suradnici također su sintetizirali peptidne derivate fenantridina povezane razmaknicom različite duljine s gvanidinopirolnom ili gvanidinskom skupinom (slika 36).<sup>147</sup> Zbog svog pozitivnog naboja u širokom rasponu pH vrijednosti, gvanidinska skupina može sudjelovati u elektrostatskim interakcijama i djelovati kao učinkovit



donor vodikove veze.<sup>148</sup> Gvanidnino–karbonil–pirolna (GCP) skupina može prepoznati jednolančane RNA pomoću dva izosterična konjugata nukleobaza-GCP.<sup>149</sup> Peptidni derivati fenantridina dodatno su se razlikovali po duljini razmaknice, točnije u prisutnosti odnosno odsutnosti glicina. Glicin može osigurati konformacijsku fleksibilnost peptidima što zauzvrat može utjecati na interakcije s polinukleotidima. Istraživanja su pokazala kako manje promjene u strukturi kratkih fluorescentnih oligopeptida mogu značajno utjecati na njihovu konformaciju i vezanje na DNA i RNA, te na vezanje na enzim dipeptidil peptidazu III (DPP III).<sup>150</sup> U usporedbi s rezultatima vezanja konjugata nukleobaza-GCP, fenantridinski peptidi s gvanidinom su pokazali bolje afinitete vezanja za dvolančane, ali i jednolančane polinukleotide.<sup>150</sup> Stoga, fino podešavanje strukturnih značajki spojeva **36** i **39** u budućim istraživanjima nudi obećavajući put prema selektivnijim interakcijama s DNA/RNA, posebno prema jednolančanim polinukleotidima. Fluorescentni indikatori mogu se koristiti kao potencijalni markeri za DNA bogatu gvanozinom koja je važna u nekoliko bioloških procesa, kao što su replikacija DNA, ekspresija gena i rekombinacija.<sup>151</sup>



Slika 36. Strukture peptidnih derivata fenantridina<sup>150</sup>

Oligopeptidi igraju ključnu ulogu u regulaciji ekspresije gena, a time i sinteze proteina u stanicama različitih organizama, određujući najvažnije faze vitalne aktivnosti stanice:

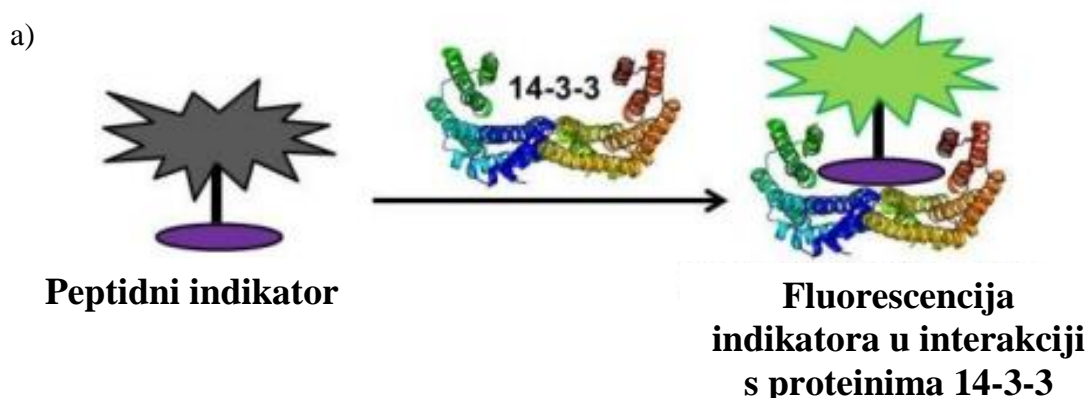
proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu.<sup>137</sup> Primjena peptidnih fluorescentnih indikatora za različite biomolekule moguća je zbog interakcije fluorofora na peptidnim lancima s biomolekulama koja dovodi do promjene fotofizičkih i spektralnih svojstava. Uspješno su razvijeni peptidni indikatori za prepoznavanje važnih biomolekula uključujući nukleotide, DNA, proteine, i lipide u vodenom mediju. Za praćenje lizosoma i njihovu vizualizaciju također se koriste fluorescentni peptidi.

#### *2.2.4. Interakcije oligopeptida s proteinima i enzimima*

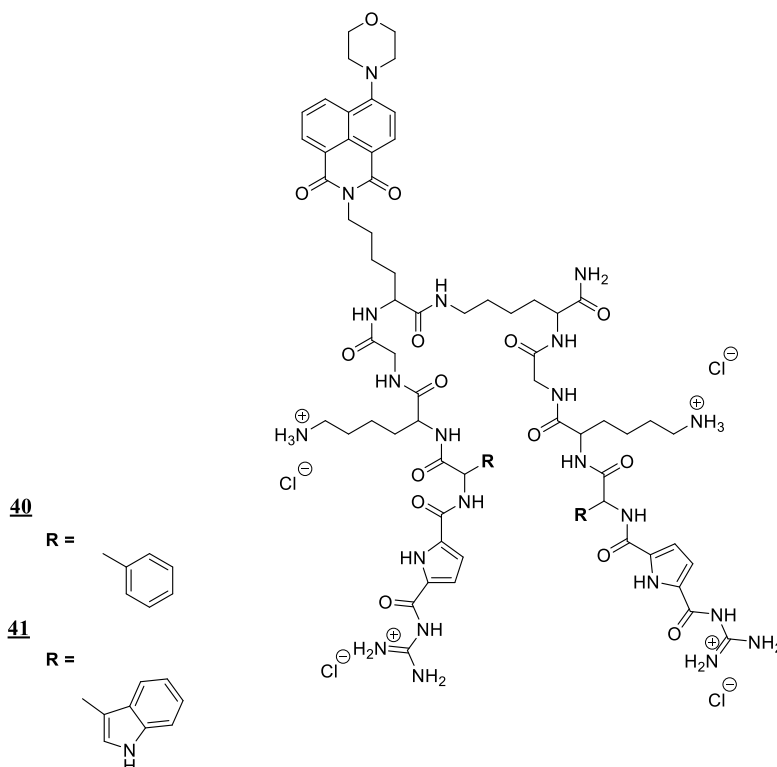
Molekularno prepoznavanje aminokiselina i peptida s proteinskim receptorima ili enzimima važan je faktor u biokemijskim i medicinskim procesima. Aminokiseline djeluju kao biosintetski gradivni blokovi ili kao signalne molekule.<sup>152</sup> Na primjer, poznati neurotransmiteri glutamat i  $\gamma$ -aminomaslačna kiselina povezuju se s proteinskim receptorima vezanjem na membranu i pokreću promjene receptora s naknadnim signaliziranjem preko membrane.<sup>153</sup> Nekovalentne interakcije (H-veze i van der Waalsove interakcije) osnova su selektivnog molekularnog prepoznavanja između GPCR (receptora na koje su vezani G-proteini) i vezane molekule glutamata. GPCR prenose izvanstanični signal aktivirajući unutrastanične molekule koje su posrednici u daljnjoj aktivaciji preostalih komponenti signalnog puta te potiču stanični odgovor. Vezanjem izvanstaničnih signalnih molekula dolazi do konformacijskih promjena u citoplazmatskim receptorskim domenama pri čemu se aktivira G protein, koji dalje prenosi signal.<sup>154</sup> Peptidi često djeluju kao signalne molekule ili hormoni, poput malih neuropeptidnih endorfina, koje proizvodi središnji živčani sustav kako bi ublažio stres, a u interakciji s opijatskim receptorima stvaraju signalne kaskade u mozgu.<sup>139</sup> Ponekad receptori vezani na staničnu membranu snažno stupaju u interakciju s kratkim peptidnim segmentima većeg proteinskog lanca, a primjer je prepoznavanje RGD sekvence (arginin – glicin – asparaginska kiselina; Arg-Gly-Asp) receptorima za integrin.<sup>155</sup> Ciklički pentapeptidi koji sadrže RGD sekvencu poznati su kao selektivni i afini oligopeptidi prema  $\alpha\beta3$  integrinu i koriste se za ciljnu terapiju ili snimanje različitih tumora.<sup>156</sup> Vankomicin, glikopeptidni antibiotik koji se koristi se za liječenje rezistentnih bakterijskih infekcija, odličan je primjer interakcije malih peptida sa staničnom stijenkom bakterija.<sup>157</sup> Dipeptid D-Ala-D-Ala-OH je ključan za način djelovanja antibiotika vankomicina protiv gram-pozitivnih bakterija. Vankomicin se veže na

dipeptid s visokim afinitetom ( $K = 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ), čime sterički blokira križno povezivanje enzima transpeptidaze s bočnim lanacima peptidoglikana, koji djeluju kao prekursori tijekom biosinteze bakterijske stanične stijenke. Na taj način dolazi do smanjenja mehaničke stabilnosti stanične stijenke, a nakon toga i do raspada stanice pri promjenama osmotskog tlaka.<sup>158</sup>

Proteini 14-3-3 su skupina koja se sastoji od 7 izoformi ( $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\tau$ ,  $\theta$ ,  $\sigma$  i  $\zeta$ ), a njihove uloge u ljudskoj fiziologiji su: metabolizam, odgovor na stres, kontrola staničnog ciklusa, prijenos signala, apoptoza i neurotransmisija.<sup>159</sup> Stoga su Schmuck i Ottmann razvili fluorescentne indikatore za praćenje proteina 14-3-3.<sup>140</sup> Indikatori prikazani na slici 37. sadrže dva simetrična peptidna ogranka GCP-Phe/Trp-Lys-Gly i umjetni anion GCP na oba kraja za prepoznavanje proteina 14-3-3. Kao treći ogranak ugradili su aminonaftalimidni fluorofor koji služi kao reporter za fluorescenciju. Spojevi Phe/Trp-Lys-Gly pokazuju slabu fluorescenciju oko 545 nm. Međutim, fluorescencija indikatora se povećava u različitoj mjeri nakon dodavanja različitih izoformi proteina 14-3-3. Računalne studije potvrdile su da je pojačanje fluorescencije posljedica vezanja naftalimidnog fluorofora u hidrofobno vezno mjesto u proteinu. Indikatori pokazuju selektivni odgovor u odnosu na druge proteine uključujući  $\beta$ -triptazu, tripsin, kimotripsin i goveđi serumski albumin. Kontrolne studije potvrdile su da je GCP dio ključan za selektivno prepoznavanje proteina 14-3-3.



b)

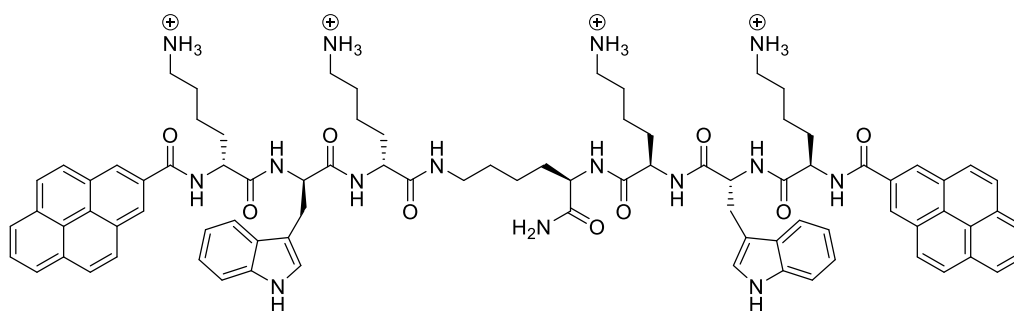


Slika 37. a) promjena fluorescencije peptidnog indikatora u prisutstvu proteina 14-3-3;

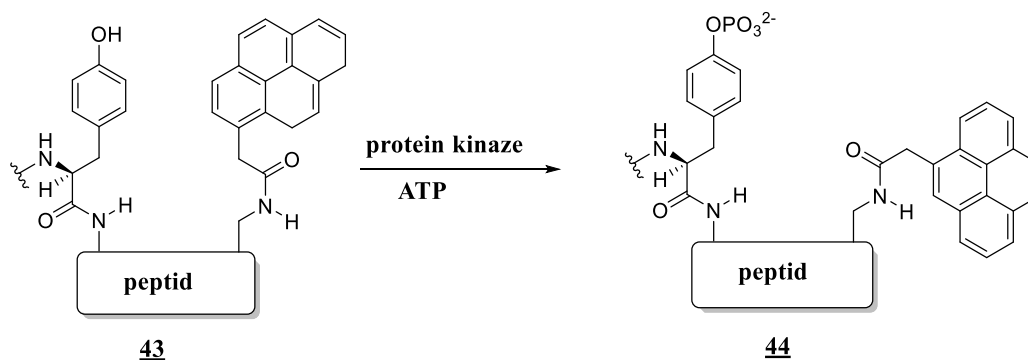
b) struktura peptidnog indikatora (preuzeto iz Schmuck 2019.)<sup>140</sup>

$\beta$ -triptaza je dominantna serinska proteaza dobivena iz serinskih granula humanih mastocita i poznato je da je uključena u patogenezu astme i drugih alergijskih i upalnih poremećaja.<sup>160</sup> Struktura enzima je tetramerna, sastavljena od četiri identične podjedinice raspoređene oko središnje pore u dvije različite orijentacije. *In vivo*, heparin stabilizira tetramernu strukturu, a u nedostatku triptaze disocira se u neaktivne monomere. Tetravalentni kationski ligandi vežu se na površinu proteina, blokiraju pristup aktivnim mjestima i inhibiraju aktivnost enzima.<sup>161</sup> Schmuck i suradnici dizajnirali su kationski fluorescentni peptidni inhibitor  $\beta$ -triptaze.<sup>162</sup> (slika 38) Peptid se sastoji od dvije tripeptidne sekvence Lys-Trp-Lys povezane na središnji lizin preko C-kraja. Na N-krajevima smješteni su pireni. Peptid **42** pokazuje emisiju pirenskog monomera na 400 nm, i emisiju pirenskog ekscimera na 520 nm nešto slabijeg intenziteta.<sup>162</sup> U prisutnosti  $\beta$ -triptaze (0-20 nM), emisija monomera se značajno povećava dok se emisija ekscimera gasi. Kako bi ispitali selektivnost peptidnog liganda za  $\beta$ -triptazu, proveli su test inhibicije za dva strukturno slična proteina, tripsin i kimotripsin, kao i albumin goveđeg seruma, te utvrdili da peptidni ligand ne pokazuje značajne promjene s navedena tri proteina. Molekularno modeliranje pokazuje četiri kationske amonijeve skupine koje tvore ionske parove

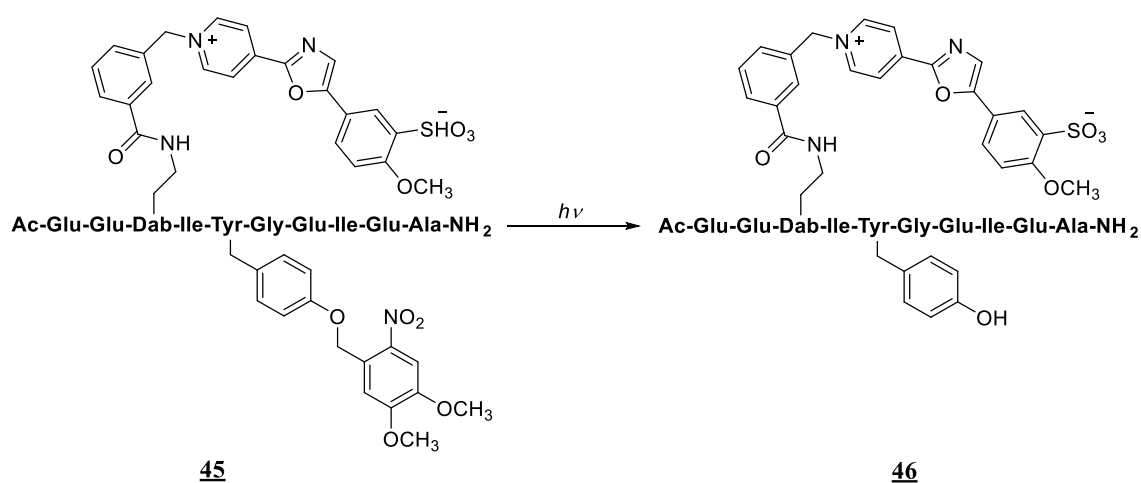
i vodikove veze s negativno nabijenim ostacima, kao što su Glu217, Asp60B, Asp147 i Glu217, odnosno potpuno blokiraju središnju poru.<sup>162</sup> Stoga peptidni ligand djeluje kao inhibitor sprečavajući supstrat da dođe do aktivnih mjesta u  $\beta$ -triptazi. Konfokalna laserska skenirajuća mikroskopija (CLSM) potvrđuje da je peptid **42** permeabilan za mastocite i pokazuje inhibitornu aktivnost unutar stanica potiskivanjem njihovog rasta.<sup>162</sup>

**42**Slika 38. Kationski fluorescentni peptidni inhibitor  $\beta$ -triptaze

Peptidi su važni supstrati za proteaze i kinaze i naširoko se koriste u praćenju aktivnosti enzima, probiru inhibitora enzima i kontroli oslobađanja lijekova.<sup>163</sup> Senzori za proteaze i kinaze obično su konstruirani na temelju enzimske katalize peptidnih supstrata (slika 39). Konjugacija signalnih markera na peptidni supstrat jedan je od najučinkovitijih načina za pretvaranje enzimske informacije u mjerljivi signal u enzimskim sensorima. Senzori za kinaze pripremljeni su na temelju činjenice da tirozinski ostaci u sekvenci peptida za prepoznavanje kinaza mogu gasiti fluorescenciju nekih kromofora.<sup>163</sup> Tako su fluorofori vezani uz prisutnost tirozina u sekvenci peptida za prepoznavanje kinaza. Fosforilacija tirozina može promijeniti hidrofobnu interakciju između fluorofora i tirozina, što rezultira značajnim povećanjem fluorescencije.<sup>164</sup>

Slika 39. Način djelovanja senzora za protein kinaze<sup>163</sup>

Lawrence i suradnici razvili su senzor za tirozin kinaze čiji je tirozinski ostatak modificiran fotoreaktivnom nitrobenzilnom skupinom koja se odcjepljuje u fotokemijskoj reakciji (shema 1). Promjena intenziteta fluorescencije, nakon fosforilacije, uzrokovana je fosfatima koji utječu na interakcije između fluorofora i tirozinskog dijela. Nitrobenzilna skupina se eliminira pri fotolizi, a oslobođeni tirozin podliježe fosforilaciji, što omogućuje praćenje vremenski ovisnog povećanja intenziteta fluorescencije. Fotokemijski uklonjiva skupina (fotokavez) omogućuje kronološko uočavanje aktivnosti senzora za tirozin kinaze tijekom eksperimenta.<sup>165</sup>



Shema 1. Senzor za tirozin kinaze uslijed pobude svjetlom

Proteini i enzimi imaju ključnu ulogu u biokemijskim i medicinskim procesima. Kako bi se lakše pratilo njihovo djelovanje, dizajnirani su fluorescentni peptidni indikatori. Promjenom intenziteta fluorescencije prati se način vezanja proteina odnosno enzima i peptidnog liganda.

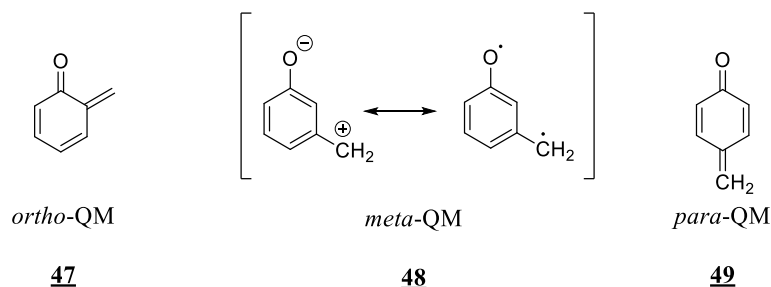
## 2.3. Kinon-metidi

### 2.3.1. Općenito o kinon-metidima

Kinon-metidi (eng. *quinone methides*, QM)<sup>i</sup> su reaktivni intermedijeri koji su često prisutni u kemiji i fotokemiji fenola i njima srodnih spojeva.<sup>13,166,167</sup> QM se sastoje od cikloheskadienskog

<sup>i</sup> Iako je IUPAC-ov ispravan naziv kinometan, u disertaciji smo se odlučili koristiti stari naziv koji je uvriježen u literaturi

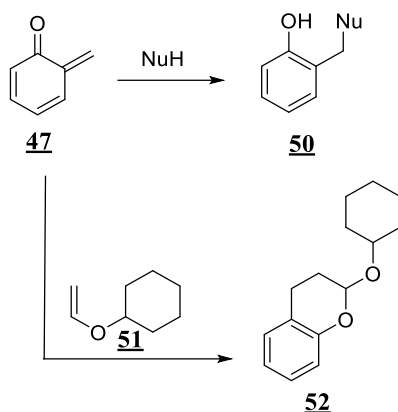
prstena na kojem su vezane metilenska i karbonilna skupina. Ovisno o položaju metilenske i karbonilne skupine, moguća su 3 osnovna izomera: *ortho*-QM (**47**), *meta*-QM (**48**) i *para*-QM (**49**). *ortho*- i *para*-QM su neutralne molekule, dok se *meta*-QM može prikazati kao rezonancijski hibrid zwitteriona i biradikala (slika 40).



Slika 40. Strukture osnovnih izomera QM

Polarna priroda QM čini ih vrlo reaktivnim u reakcijama s elektrofilima i nukleofilima, a podliježu i reakcijama cikloadicije.<sup>168</sup> QM su kratkoživuće vrste s vremenom života tipično od <1 ns do nekoliko sekundi ili minuta.<sup>169</sup> S obzirom na kratko vrijeme života, potrebno je koristiti vremenski razlučene spektroskopske tehnike kao što je laserska pulsna fotoliza kako bi ih proučavali. Zbog svoje visoke reaktivnosti s nukleofilima, primijenjivi su u organskoj sintezi<sup>166,167,170</sup> i u biološkim sustavima gdje mogu alkilirati biološki važne nukleofile: alkohole,<sup>171</sup> tiole,<sup>172,173</sup> nukleinske kiseline,<sup>18,174</sup> proteine<sup>175,176,177</sup> i fosfodiesterne.<sup>178</sup> QM se mogu generirati termičkim<sup>167,179</sup> i fotokemijskim metodama.<sup>180</sup>

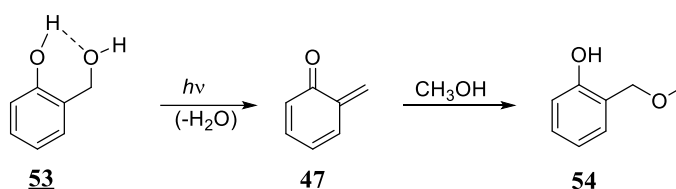
QM reagiraju s elektrofilima preko kisikovog atoma, na način koji je tipičan za fenolate, a s nukleofilima reagiraju na metilenskom položaju pri čemu nastaju produkti Michaelove adicije.<sup>181</sup> Kako su QM znatno reaktivniji od običnih enona kakvi su npr.  $\alpha,\beta$ -nezasićeni ketoni, oni mogu reagirati i u [4+2] cikloadicijskim reakcijama (Diels-Alder) s dienofilima (**51**) bogatim elektronima dajući kao produkte derivate kromana (**52**) (shema 2).<sup>179</sup>



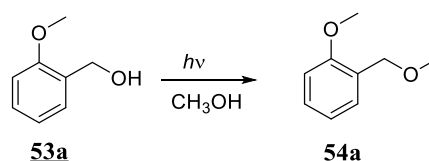
Shema 2. Reakcije QM-a

P. Wan je 1986. godine prvi započeo sistematično proučavanje fotokemije hidroksibenzilnih alkohola, a rezultati istraživanja postali su temelj za razumijevanje fotokemijskih reakcija fotodehidratacije.<sup>182,183</sup> Provedena su ozračivanja *o*- i *m*- hidroksibenzilnih alkohola u vodenoj otopini metanola, te je pokazano da u pobuđenom stanju dolazi do prijenosa protona uz gubitak vode. Pri tome nastaje reaktivni QM koji reagira s prisutnim nukleofilnim otapalom - metanolom dajući hidroksibenzilne etere **54**. (shema 3)

a)



b)

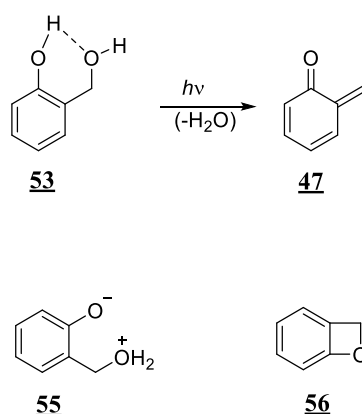


Shema 3. Fotokemija a) hidroksibenzilnih alkohola; b) etera hidroksibenzilnog alkohola

Wan i suradnici proučavali su fotosolvolize derivata fenola, te su pokazali da spoj **53** ( $\Phi = 0,23$ ) ima veći kvantni prinos fotosolvolize nego metoksi derivat **53a** ( $\Phi = 0,058$ ) (shema 3). Zaključili su da kod metoksi derivata **53a** ne može doći do intramolekulskog prijenosa protona u pobuđenom stanju – ESIPT (engl. *excited state intramolecular proton transfer*), te je izlazak benzilne  $-OH$  skupine puno teži. Nekoliko godina kasnije, detektirali su QM laserskom

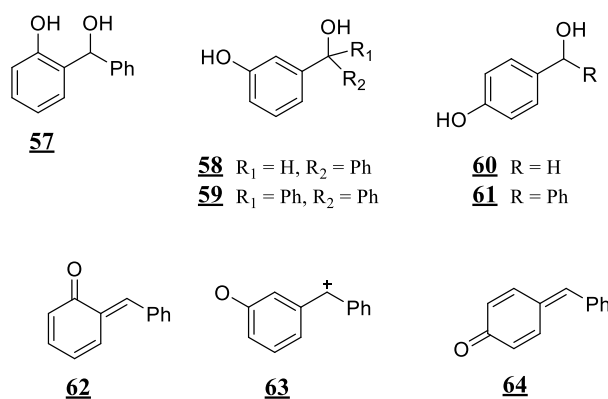


pulsnom fotolizom (LFP).<sup>184</sup> U laboratoriju na Institutu Ruđer Bošković proučavana je fotokemijska reaktivnost 2-hidroksimetilfenola pri kriogenim uvjetima te je pokazano da su produkti fotodehidracije pri 14 K QM **47** i benzokset **56**, što je potvrđeno spektroskopijom IR. Femtosekundnom spektroskopijom i računskim studijima ustanovljeno je da se fotodehidracija 2-hidroksimetilfenola odvija u ultrabrzoj adijabatskoj fotokemijskoj reakciji bez međuprodukta, dajući QM **47** u pobuđenom stanju. Pobuđeno stanje QM **47** ( $S_1$ ) deaktivira se do  $S_0$  dajući QM **47** ( $S_0$ ), a vjerojatno iz **47** ( $S_1$ ) nastaje i benzokset **56** (slika 41).<sup>185</sup>



Slika 41. Fotodehidracija 2-hidroksimetilfenola

Wan i suradnici proširili su istraživanje na različito supstituirane hidroksibenzilne alkohole **57-61** koji na benzilnom položaju imaju vodik i jednu ili dvije fenilne skupine (slika 42).<sup>186</sup>

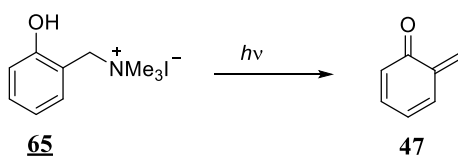


Slika 42. Različito supstituirani hidroksibenzilni alkoholi **57-61** i odgovarajući QM **62-64**

Odredili su vrijeme života i kvantne prinose nastajanja QM te su pokazali da dulje vrijeme života imaju oni QM koji na metilenskom položaju imaju fenilni supstituent. Zaključili su i da *o*-supstituirani derivati imaju veće kvantne prinose nastanka QM zbog postojanja vodikove

veze između fenolne –OH i benzilne –OH skupine, pa lako dolazi do ESIPT-a koji je u sprezi s dehidratacijom.<sup>187</sup>

Deaminacija je drugi važni fotokemijski način generiranja QM, a prvi su ga opisali Saito i suradnici.<sup>188</sup> Pripremili su seriju spojeva, Mannichove baze fenola, bifenila i naftalena te su proveli reakcije fotoeliminacije amina u kojima nastaju odgovarajući QM. Ozračivanja su provodili u prisutnosti etil-vinil-etera, a cikloadicijske produkte su izolirali u dobrim iskorištenjima.<sup>188</sup> Istraživanja je proširio Freccero koji je sa svojim suradnicima ozračivao kvaterne amonijeve soli,<sup>189</sup> te su pronašli da su pri neutralnom pH, čak i reaktivnije nego Mannichove baze, a pokazale su nekoliko prednosti: niža nukleofilnost, veći kvantni prinosi nastanka QM pri visokom pH i bolja topljivost u vodi (shema 4). Navode da kvaterne amonijeve soli imaju znatno veći kvantni prinos nastanka QM **47** ( $\Phi = 0,98$ )<sup>189</sup> u vodi od odgovarajućeg alkoholnog derivata **53** ( $\Phi = 0,23$ ).<sup>169</sup> U Laboratoriju za sintetsku organsku kemiju Instituta Ruđer Bošković detaljno je objašnjen mehanizam fotodeaminacije Mannichovih derivata *p*-krezola.<sup>12</sup> Utvrđeno je da mehanizam stvaranja QM ovisi o polaznim spojevima, jesu li slobodni amini ili soli. Mehanizam fotodeaminacije je sličan prethodno opisanom mehanizmu fotodehidratacije, te se odvija u ultrabrznoj adijabatskoj reakciji generirajući odgovarajuće QM.<sup>185</sup> Nastanak QM iz odgovarajućih amonijeve soli dodatno su potvrdili femtosekundnom tranzijentnom apsorpcijskom spektroskopijom i računskim studijama.<sup>190</sup>



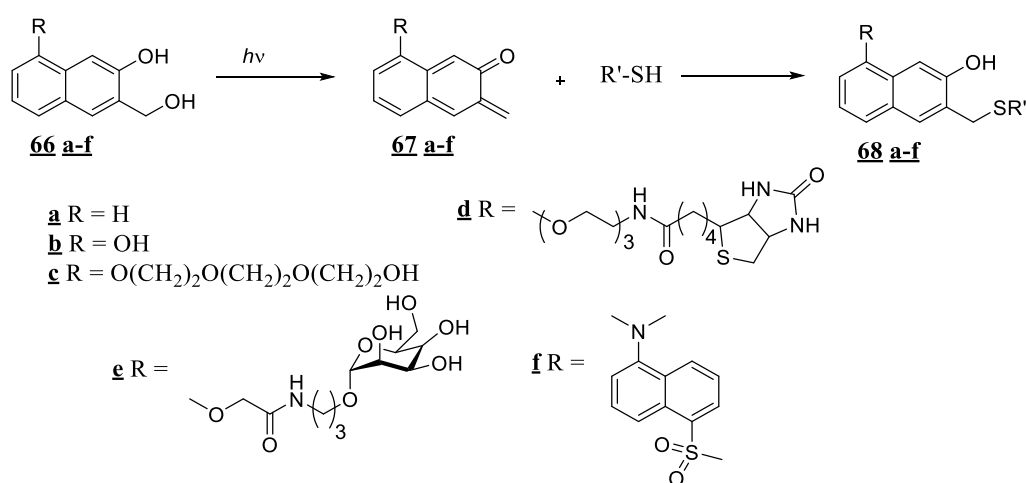
Shema 4. Fotoeliminacija amonijeve soli

### 2.3.2. Reakcije kinon-metida s biološkim nukleofilima

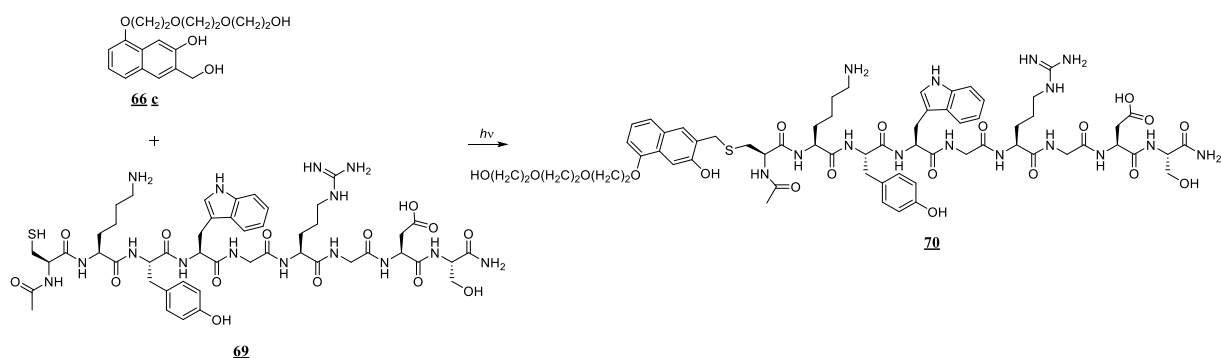
Freccero i suradnici ispitali su reaktivnost termički i fotolitički generiranog *o*-QM u vodi (kiseli, bazni i neutralni uvjeti) s aminokiselinama glicinom, serinom, cisteinom, lizinom i tirozinom, te glutationom.<sup>189</sup> *o*-QM su generirali i termički i fotolitički iz trimetilamonijeve soli **65**, a dobiveni su alkilirani produkti aminokiselina. Pokazano je da kemoselektivnost alkilacije lizina i tirozina ovisi o pH otopine. Omjer produkata alkiliranja na  $\alpha$ -aminu ili bočnom ogranku

mijenja se prelaskom iz baznih u neutralne uvjete. L-tirozin, zagrijavanjem na 80 °C pri neutralnim uvjetima ne reagira s QM, dok su pri pH 8,5 (boratni pufer) izolirani produkti *N*-alkilacije i *O*-alkilacije. Istraživanjem su zaključili da se QM mogu regenerirati zagrijavanjem ili ozračivanjem aminokiselinskih produkata u ovisnosti o pH otopine.<sup>189</sup>

Popik i suradnici opisali su učinkovitu fotokemijsku metodu za selektivno označavanje slobodnih cisteinskih ostataka u peptidima i proteinima (shema 5).<sup>176</sup> Ozračivanjem vodenih otopina naftola dolazi do stvaranja *o*-QM koji se kovalentno vežu na peptide ili proteine koji imaju slobodne tiolne skupine (shema 6).



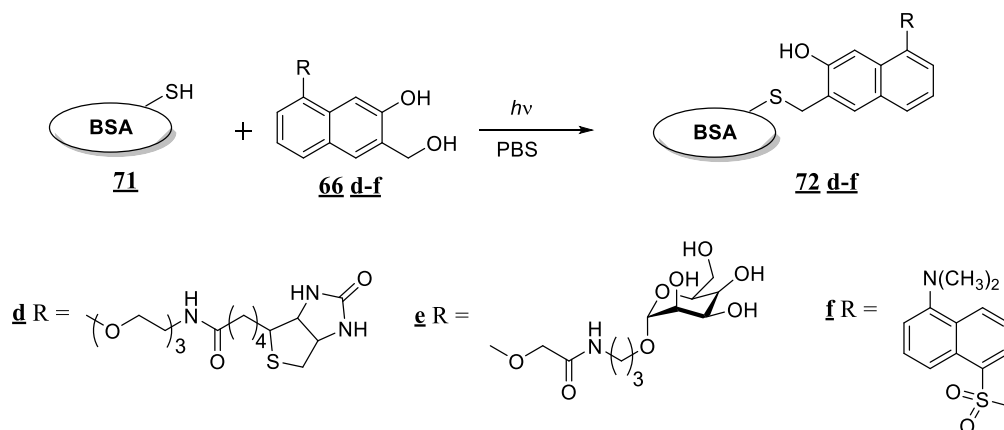
Shema 5. Stvaranje QM koji se vežu na slobodne tiolne skupine



Shema 6. Selektivno označavanje cisteinskih ostataka u peptidima

Popik i suradnici pokazali su da ukoliko se cistein zamijeni histidinom ili dolazi do dimerizacije između cisteina stvaranjem disulfidnih mostova, generirani QM neće reagirati s oligopeptidom i nema označavanja.<sup>176</sup> Uspješno obilježavanje peptida potaknulo ih je da istraže selektivnost

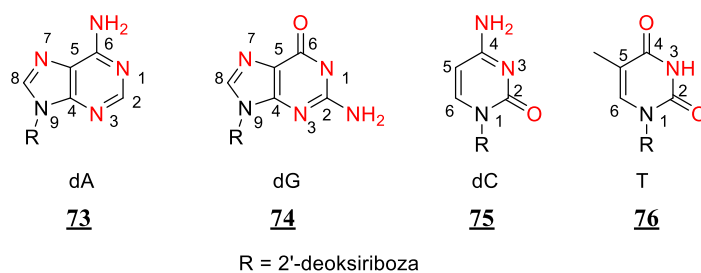
QM prema slobodnom cisteinu u proteinima. Uspješno su proveli ispitivanje reaktivnosti na goveđem serumskom albuminu (BSA) koji sadrži cistein (Cys-34) izložen otapalu, s različitim kinon-metidnim prekursorima: biotin (**66 d**), manozna (**66 e**) ili fluorescentna boja (**66 f**). Pokazali su da uslijed ozračivanja derivata (**66 d-f**) dolazi do označavanja proteina (shema 7).<sup>176</sup>



Shema 7. Ispitivanje fotokemijske reaktivnosti na goveđem serumskom albuminu (BSA)

Nadalje, pripremili su i analog BSA kojem je Cys-34 pretvoren u eter i uslijed ozračivanja u prisutstvu **66 d** ne dolazi do selektivnog označavanja proteina.

Reaktivnost QM s nukleinskim kiselinama i nukleozidima je vrlo dobro istražena.<sup>191,192</sup> QM može alkilirati nukleinsku kiselinu na fosfatnoj okosnici i na samoj nukleobazi.<sup>18,192,193</sup> Rokita i suradnici proučavali su reakcije QM s deoksinukleozidima i nukleinskim kiselinama i odredili su reaktivna mjesta na pojedinoj bazi DNA (slika 43).<sup>18</sup>

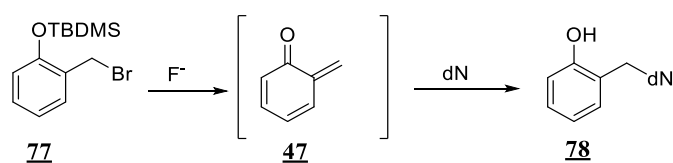


Slika 43. Alkilacijska mjesta purinskih i pirimidinskih nukleobaza označena su crvenom bojom

QM reagiraju s purinskim nukleobazama, dA i dG, preko egzocikličkih amino-skupina na položajima C6, odnosno C2.<sup>174</sup> Nukleobaza dC reagira preko dušika N3 u prstenu, dok dT ne daje adukte s QM jer je vrlo slab nukleofil.<sup>16</sup> Reakcija s citozinom je više od 10 puta brža od

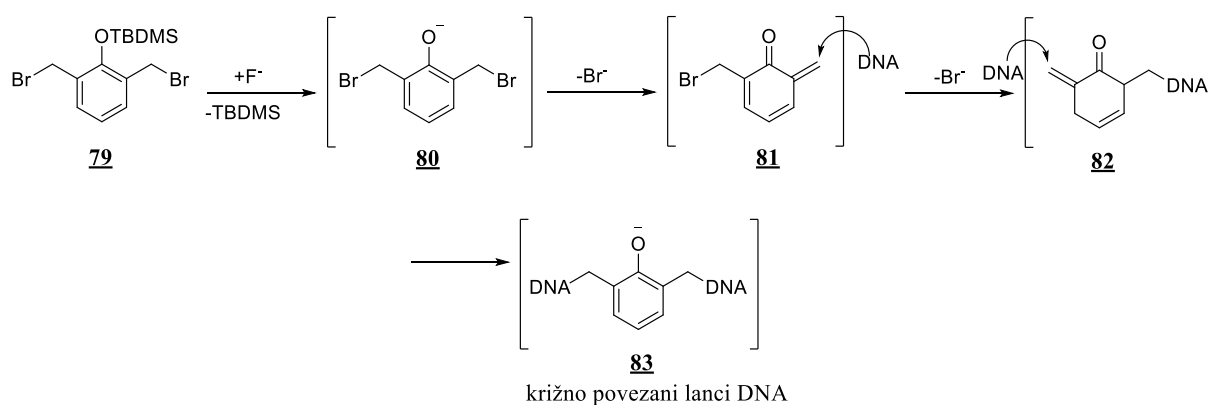
reakcije s adenozinom ili gvaninom što je potvrđeno kompeticijskim eksperimentima s deoksinukleozidima.<sup>18</sup> Reaktivnost nukleobaza koje su dio DNA molekule puno je manja, a ponajviše je smanjena reaktivnost citozina (>3600 puta), dok reaktivnost gvanina ovdje dolazi do izražaja pa on u dvostrukoj zavojnici DNA postaje glavna meta za reakcije s QM, ponajprije na egzocikličkoj amino skupini na položaju C2.<sup>18</sup>

Reakcija fluoridom inducirane desililacije je važna metoda nastanka QM, a razvili su je Rokita i suradnici (shema 8).<sup>18,194</sup> Ukoliko je fenolna OH skupina zaštićena sililom, a u *o*-benzilnom položaju je vezana bromidna ili acetilna skupina, u reakciji s fluoridima dolazi do desililacije i nastanka QM.



Shema 8. Reakcija fluoridom inducirane desililacije

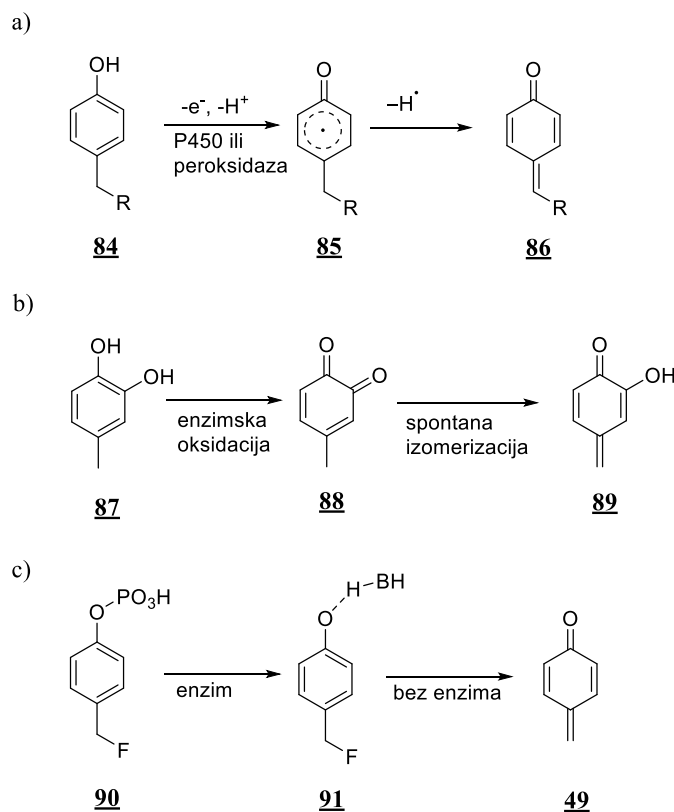
Na shemi 9. je prikazan spoj koji sadrži na oba *o*-benzilna položaja vezane bromidne skupine, u reakciji s fluoridom dolazi do desililacije i eliminacije bromida, te nastanka QM. Novonastali QM reagira s oligonukleotidima dajući produkte **83**. Na taj način se može alkilirati i križno povezati molekulu DNA.<sup>195</sup>



Shema 9. Stvaranje QM (**81**) u reakciji fluoridom inducirane desililacije i reakcija nastalog QM s DNA

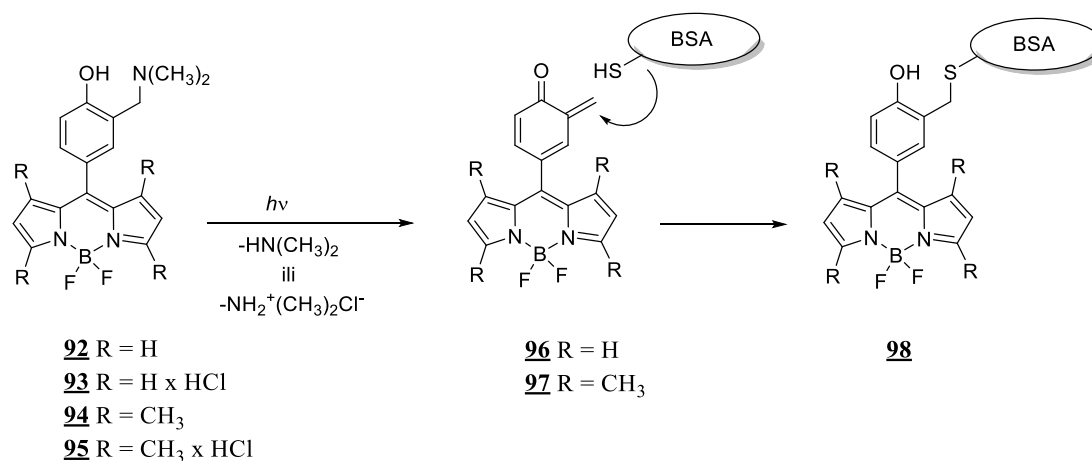
### 2.3.3. Reakcije kinon-metida s proteinima

Za citotoksičnost i genotoksičnost roditeljskih fenola odgovorni su reaktivni QM koji nastaju iz raznih sintetskih i prirodnih fenola, a u biološkim sustavima mogu reagirati s aminokiselinama, peptidima i proteinima.<sup>196</sup> Postoje dva glavna načina kojima se međuprodukti stvaraju *in vivo*, enzimska oksidacija i izomerizacija *o*-kinona.<sup>197</sup> Kod enzimске oksidacije, uzastopno uklanjanje dva elektrona (ili elektrona i atoma vodika) iz 4-alkil-supstituiranih fenola obično kataliziraju citokromi P450, a u nekim slučajevima pokazalo se da i peroksidaza katalizira nastanak QM (shema 10).<sup>198</sup> 4-Alkilkateholi se mogu oksidirati u *o*-kinone koji ovisno o kiselosti vodika na 4-alkilnom ugljiku, spontano izomeriziraju u *o*-hidroksi-*p*-QM (shema 10b). Fenoli s odgovarajućom odlazećom grupom u benzilnom položaju, kao što je fluorid, mogu generirati QM spontanom hidrolizom (shema 10c).<sup>198</sup> Nastanak QM može biti kataliziran bazičnom aminokiselinom.<sup>196</sup> Rusnak i suradnici pokazali su da iz 4-(fluormetil)fenilfosfata prvo dolazi do enzimске hidrolize fosfata nakon čega slijedi neenzimsko stvaranje QM.<sup>198</sup> London i suradnici pokazali su neenzimsko stvaranje QM iz 4-trifluormetilfenola u fiziološkim uvjetima.<sup>175</sup>



Shema 10. Načini nastanka QM u biološkim uvjetima: a) enzimska oksidacija; b) izomerizacija *o*-kinona; c) spontana hidroliza

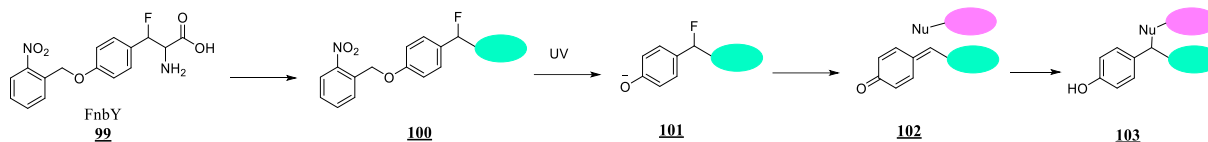
U biološkim sustavima, BODIPY boje/markeri se koriste za označavanje specifičnih proteina kovalentnim vezanjem BODIPY kromofora na aminokiseline u proteinima.<sup>199</sup> Modifikacija BODIPY kromofora omogućila je nove protokole obilježavanja boja s lizinom,<sup>200</sup> tirozinom<sup>201</sup> ili cisteinom.<sup>202</sup> Međutim, za primjenu u biologiji poželjno je razviti fotokemijske aktivacijske protokole koji će omogućiti pričvršćivanje markera u blagim, biološki prihvatljivim uvjetima.<sup>203</sup> Stoga su u Laboratoriju za sintetsku organsku kemiju Instituta Ruđer Bošković uspješno proveli fotokemijsku aktivaciju BODIPY prekursora za kovalentnu modifikaciju proteina (shema 11).<sup>204</sup> Zanimljivo je da BODIPY-QM prekursori reagiraju u fotokemijskim reakcijama samo pri pobuđivanju u viša singletna pobuđena stanja, u suprotnosti s „Kashinim pravilom“.<sup>205</sup> Primjenjivost anti-Kashine fotokemije u označavanju proteina pokazana je fotoinduciranim fluorescentnim obilježavanjem goveđeg serumskog albumina (BSA).<sup>204</sup>



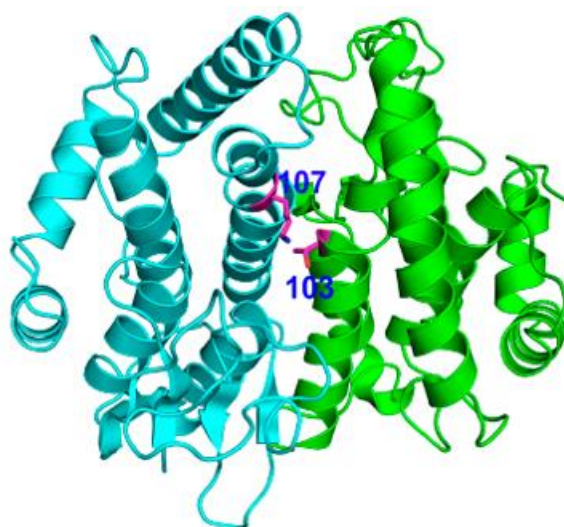
Shema 11. Fotokemijska aktivacija BODIPY prekursora za kovalentnu modifikaciju proteina

Prikrivene bioreaktivne neprirodne aminokiseline reagiraju s cisteinom (Cys), lizinom (Lys), histidinom (His), glutaminskom kiselinom (Glu) i tirozinom (Tyr).<sup>206,207,208</sup> Wang i suradnici pripremili su prikrivenu bioreaktivnu neprirodnu aminokiselinu, FnbY, koja uslijed fotokemijskog pobuđivanja generira QM.<sup>209</sup> (shema 12) QM generiran iz FnbY *in situ* reagira s biološkim nukleofilima stvarajući kovalentnu vezu s prirodnim aminokiselinskim ostacima u proteinima živih stanica. Zatim su FnbY ugradili na mjesto 103 proteina GST kojeg eksprimiraju stanice *E. coli*, ozračili UV svjetlom te pokazali da se fotoaktivirana FnbY kovalentno veže s lizinom (Lys107) koji se nalazi u neposrednoj blizini (slika 44).<sup>209</sup> Omogućili su i korištenje FnbY u stanicama sisavaca tako što su testirali i optimizirali ugradnju neprirodne aminokiseline u zeleni fluorescentni protein (GFP) u HeLa stanicama.<sup>209</sup> Fotoaktivirana FnbY reagira s biološkim nukleofilima, što omogućuje dizajniranje kovalentnog vezanja te olakšava

detekciju mjesta umrežavanja masenom spektrometrijom. Očekivali su da će fotoreaktivna FnbY proširiti raznolikost proteina i opseg primjene podložnih kovalentnom vezivanju *in vivo* za kemijsku biologiju, bioterapeutiku i proteinsko inženjerstvo.



Shema 12. Generiranje QM iz FnbY i njegova reakcija s biološkim nukelofilima

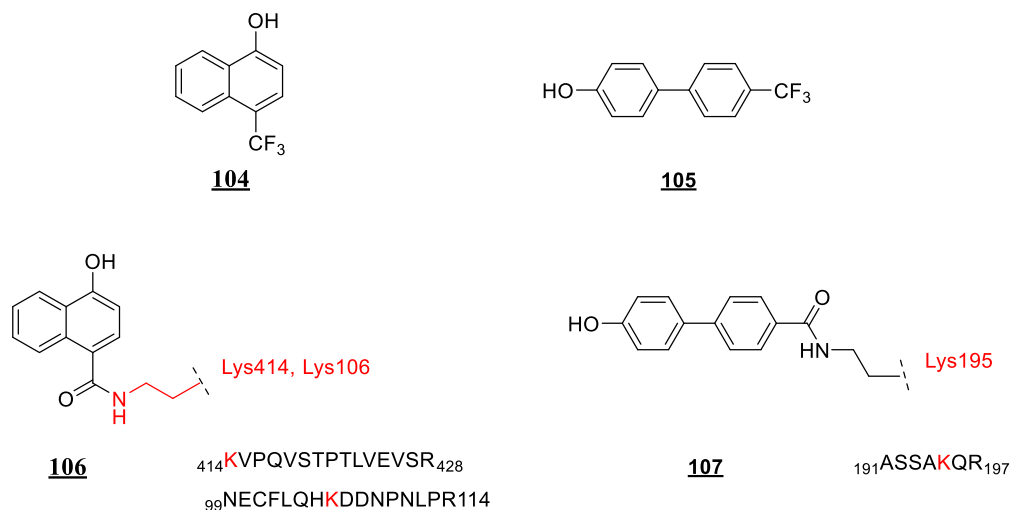


Slika 44. Kristalna struktura proteina GST

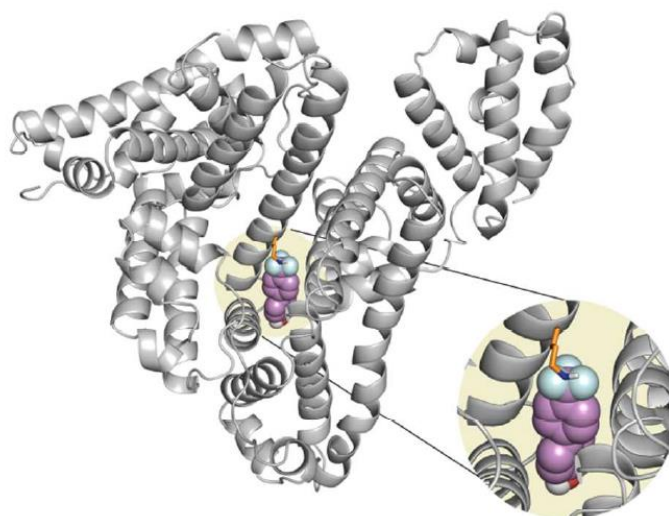
U posljednjih nekoliko godina za otkrivanje lijekova sve se više koriste prikriveni elektrofil koji su nereaktivni ukoliko se ne aktiviraju prilikom vezanja s određenom metom.<sup>177</sup> Kovalentna inhibicija zahtijeva katalitičko djelovanje proteina za pretvaranje liganda u odgovarajući prikriveni elektrofil unutar aktivnog mjesta. Jedna od zanimljivih mogućnosti je korištenje fotokemijske reakcije za stvaranje prikrivenog elektrofila iz liganda. Najčešće korištene reakcije za inaktivaciju proteina su stvaranje ireverzibilnih adukata – alkilacija ili Michaelova adicija.<sup>210</sup> Poznato je da se fotohidroliza trifluorometil supstituiranih fenola i naftola događa stvaranjem QM.<sup>211</sup> Stoga su Jimenez i suradnici istražili kovalentnu inhibiciju kroz fotokemijsko stvaranje prikrivenih elektrofila i naknadnu reakciju s ciljanim proteinima.<sup>177</sup> Pripremili su 4-trifluorometil-1-naftol (**104**) i 4-(4-trifluorometilfenil)fenol (**105**) kao QM prekursora za reakcije s lizinom, a kao modelnu metu koristili su humani serumski albumini (HSA) (slika 45). Eksperimentalni i teorijski rezultati pokazali su da QM generirani iz



trifluorometilfenola mogu biti odgovarajući prikriveni elektrofilni za postizanje selektivne reakcije s lizinom. Dobiveni rezultati jasno su pokazali da stvaranje kompleksa između liganada i HSA dovodi do stabilnih adukta između fotogeneriranih prikrivenih elektrofila i lizinskih ostataka lokaliziranih u veznim utorima HSA.



Slika 45. Kinon-metidni prekursori za reakcije s lizinom



Slika 46. Stvaranje kompleksa između liganada **105** i HSA<sup>177</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

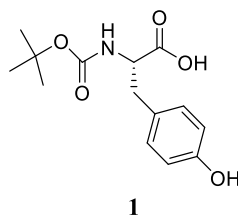
### 3.1. Opće napomene

Novi spojevi pripremljeni u okviru doktorske disertacije okarakterizirani su spektroskopskim metodama ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, IR, MS).  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri snimljeni su na instrumentima Bruker Avance 300 MHz i Bruker Avance 600 MHz u deuteriranim otapalima, uz TMS ili otapalo kao unutarnji standard. Temperature tališta određene su na Original Kofler Mikroheitz Tisch aparatu i nisu korigirane. HRMS spektri snimljeni su na Applied Biosystems Voyager DE STR MALDI-TOF/TOF instrumentu, a ESI-MS spektri snimljeni su na Agilent Technologies 6410 Triple Quadrupole Mass Spectrometer instrumentu. UV-vis spektri snimljeni su na spektrofotometrima PG Instruments Limited T80+ i Varian Cary 100 Bio, dok su fluorescencijski spektri snimljeni na spektrometrima Varian Cary Eclipse i Agilent Eclipse, Photon Technology International (PTI) Quanta-Master QM-2. Fluorescencijske titracije provedene su na spektrometru Cary Eclipse Varian. Temperature mekšanja određene su na spektrofotometru Varian Cary 100 Bio, a CD spektri snimljeni su na spektrometru Jasco J-815. HPLC analize provedene su na instrumentima Varian Pro Star i Shimadzu uz UV ili DAD detektor, a preparativne HPLC analize provedene su na Varian Pro Star. Korištene su kolone Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 i Phenomenex Luna 3u C18 za analitičke, a Phenomenex Jupiter C18 (5 $\mu$  300A) za preparativne svrhe.

U fotokemijskim i fotofizičkim eksperimentima korišteni su metanol i acetonitril HPLC čistoće i Mili-Q voda. Fotokemijske reakcije provedene su u Luzchem i Rayonet fotokemijskim reaktorima uz korištenje 8 ili 11 lampi (1  $\times$  8 W) s maksimumom emisije pri 300 nm.

## 3.2. Priprava *N,N*-dimetilaminmetilnih derivata tirozina

### 3.2.1. Priprava *N*-Boc-*L*-tirozina (**1**)<sup>212</sup>

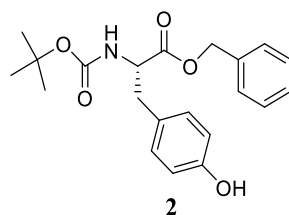


U smjesi dioksana i vode (1:1, v/v, 100 mL) otopljen je  $K_2CO_3$  (9,12 g, 66,0 mmol). Pripravljena smjesa ohlađena je na 0 °C nakon čega je uz miješanje dodan *L*-tirozin (4,00 g, 22,0 mmol), te iz lijevka za dokapavanje di-*tert*-butil dikarbonat,  $Boc_2O$  (4,80 g, 22,0 mmol) otopljen u dioksanu (30 mL). Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi 24 sata. Dodana je  $H_2O$  (200 mL), a potom zasićena otopina  $KHSO_4$  do pH = 4. Smjesa je ekstrahirana etil-acetatom ( $3 \times 100$  mL). Organski sloj sušen je bezvodnim  $MgSO_4$ , profiltriran te je otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Dobiven je uljasti produkt **1** (6,05 g, 98 %).

**Boc-Tyr-OH (1):**  $^1H$  NMR ( $CD_3OD$ , 300 MHz)  $\delta/ppm$ : 7,03 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 6,70 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 4,32-4,23 (m, 1H), 3,04 (dd,  $J = 13,8, 5,2$  Hz, 1H), 2,81 (dd,  $J = 13,8, 5,2$  Hz, 1H), 1,39 (s, 9H).

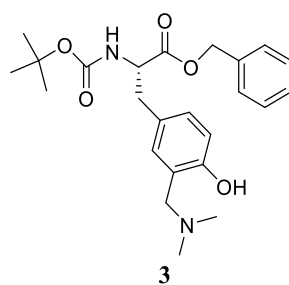
### 3.2.2. Opći postupak priprave benzilnog estera

Boc-zaštićenoj aminokiselini dodana je smjesa dioksana i DMF (1:1, v/v, 150 mL), te je nastala suspenzija u koju su dodani benzilbromid i  $NaHCO_3$ . Reakcijska smjesa miješana je 24 sata na 90 °C. Otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču dok je produkt otopljen u etil-acetatu (100 mL). Smjesa je prana zasićenom otopinom natrijevog klorida (100 mL) pri čemu se odvojio vodeni sloj dok je organski sloj pran vodom (100 mL). Organski sloj sušen je bezvodnim magnezijevim sulfatom, profiltriran i otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču.

3.2.2.1. Priprava benzilnog estera *N*-Boc-L-tirozina<sup>213</sup> (**2**)

Priprava spoja **2** provedena je prema općem postupku za pripravu benzilnog estera opisanom u §3.2.2. iz *N*-Boc-L-tirozina (**1**) (5,83 g, 20,7 mmol) otopljenog u smjesi dioksana i DMF (1:1, 150 mL), a zatim su dodani benzilbromid (2,46 mL, 20,7 mmol) i NaHCO<sub>3</sub> (1,74 g, 20,7 mmol). Dobiven je žuti uljasti produkt **2** (6,87 g, 89 %).

**Boc-Tyr-OBn (2):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) δ/ppm: 7,37-7,24 (m, 5H), 6,96 (d, *J*= 8,0 Hz, 2H), 6,67 (d, *J*= 8,0 Hz, 2H), 5,10 (d, *J*= 12,8 Hz, 1H), 5,07 (d, *J*= 12,8 Hz, 1H), 4,34-4,23 (m, 1H), 2,97 (dd, *J*= 13,3, 6,4 Hz, 1H), 2,84 (dd, *J*= 13,3, 6,4 Hz, 1H), 1,38 (s, 9H);  
<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) δ/ppm: 173,8 (s), 157,8 (s), 157,3 (s), 137,1 (s), 131,3 (d), 129,5 (d), 129,3 (d), 129,2 (d), 128,8 (s), 116,2 (d), 80,7 (s), 67,8 (t), 57,0 (d), 37,9 (t), 28,7 (q, 3C).

3.2.3. Priprava neprirodne aminokiseline derivata tirozina (*Boc-Tyr*[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn) (**3**)<sup>214</sup>

Benzilni ester Boc-L-tirozina (**2**) (1,11 g, 3,0 mmol) otopljen je u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 mL) te su dodani K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,21 g, 1,5 mmol) i Eschenmoserova sol (*N,N*-dimetilmетенiminijev klorid, 0,28 g, 3,0 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 5 dana na sobnoj temperaturi. Otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču te je dodana 0,5 M HCl (100 mL) i reakcijska smjesa je ekstrahirana etil-acetatom (3×100 mL). Etil-acetat je uklonjen na rotacijskom uparivaču, a dobiveni sirovi produkt pročišćen kromatografijom na stupcu aluminiyevog oksida (akt. II-III) uz 0→5 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Dobiven je uljasti produkt **3** (0,72 g, 56 %).

**Boc-Tyr**[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**3**): Talište: 85–87 °C;

**<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,35-7,22 (m, 5H), 6,91 (dd, *J* = 1,6, 8,0 Hz, 1H), 6,84 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H), 6,64 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 5,12 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 5,06 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 4,37-4,23 (m, 1H), 3,53 (s, 2H), 2,96 (dd, *J* = 6,4, 13,6 Hz, 1H), 2,84 (dd, *J* = 8,0, 13,6 Hz, 1H), 2,26 (s, 6H), 1,38 (s, 9H);

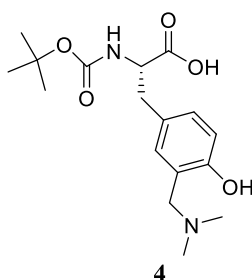
**<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) δ/ppm: 173,7 (s), 157,8 (s), 157,7 (s), 137,1 (s), 131,1 (d), 130,5 (d, 3C), 129,5 (d), 129,3 (d), 128,6 (s), 123,5 (s), 116,6 (d), 80,6 (s), 67,8 (t), 62,4 (t), 56,9 (d), 44,7 (q, 2C), 37,9 (t), 28,6 (q, 3C);

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski *m/z* [M + H]<sup>+</sup> za C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 429,2389, eksperimentalni *m/z* 429,2368.

### 3.2.4. Opći postupak uklanjanja benzilne zaštite s neprirodne aminokseline

Benzilni ester otopljen je u apsolutnom etanolu (40 mL) u boci za hidriranje te je dodan 10 % Pd/C. Boca je spojena na aparaturu za hidriranje i reakcija je provedena 4 sata pri tlaku vodika od 63 psi. Reakcijska smjesa je profiltrirana preko filter papira (plava vrpca, veličina pora 2-3 μm) i otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Dobiveni uljasti produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz 20→100 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens.

#### 3.2.4.1. Postupak uklanjanja benzilne zaštite s neprirodne aminokseline derivata tirozina<sup>214</sup>



Priprava spoja **4** provedena je prema općem postupku za uklanjanje benzilne zaštite opisanom u §3.2.4. iz benzilnog estera neprirodne aminokiseline (**3**) (0,39 g, 0,9 mmol) otopljenog u etanolu (40 mL) u boci za hidriranje i dodanog 10 % Pd/C (0,20 g). Dobiveni uljasti produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz 20→100 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Dobiven je bezbojni produkt **4** (0,27 g, 89 %).

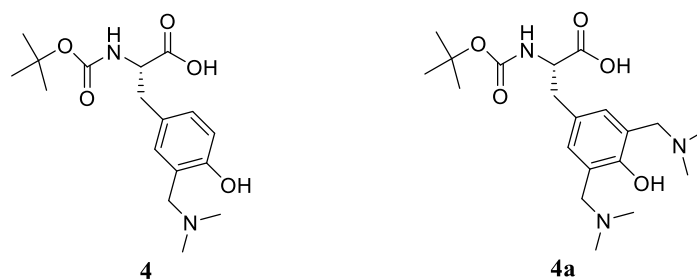
**Boc-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OH (4): Talište:** 133–135 °C;

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,10 (s, 1H), 7,09 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 6,79 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 4,16 (s, 2H), 3,34 (s, 2H), 3,03 (dd,  $J = 5,0, 13,5$  Hz, 1H), 2,88 (dd,  $J = 6,5, 13,5$  Hz, 1H), 2,77 (s, 6H), 1,39 (s, 9H);

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 178,3 (s), 157,2 (s), 156,4 (s), 134,1 (d), 133,8 (d), 130,9 (s), 117,7 (s), 116,1 (d), 80,0 (s), 58,4 (t), 58,3 (d), 43,3 (q, 2C), 38,9 (t, 1C), 28,8 (q, 3C);

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  za  $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$  339,1920, eksperimentalni  $m/z$  339,1911.

### 3.2.5. Postupak uvođenja dimetilaminometilne skupine<sup>215</sup> na Boc-Tyr-OH



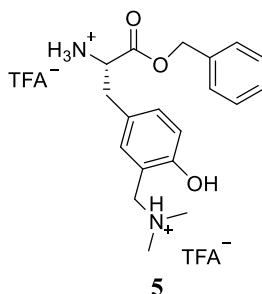
Boc-Tyr-OH (**1**) (1,55 g, 5,5 mmol) otopljen je u  $\text{CH}_3\text{OH}$  (10 mL). U lijevku za dokapavanje pomiješani su 40 % vodena otopina  $\text{Me}_2\text{NH}$  (1,4 mL, 11,0 mmol) i 37 % vodena otopina formaldehida (0,6 mL, 8,25 mmol) u  $\text{CH}_3\text{OH}$  (5 mL), a zatim je smjesa lagano dokapana. Reakcijska smjesa je miješana 20 sati na sobnoj temperaturi, a zatim sat vremena uz zagrijavanje na temperaturi vrenja. Smjesa je prebačena u lijevak za ekstrakciju, dodana je zasićena otopina  $\text{NaCl}$  (50 mL) i ekstrahirano je etil-acetatom ( $3 \times 50$  mL). Organski sloj je sušen bezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , profiltriran, a otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz 10→50 %  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  kao eluens. Izoliran je neizreagirani reaktant **1** (0,32 g, 21 %), produkt **4** (0,71 g, 38 %) i produkt **4a** (0,10 g, 4 %).

### 3.2.6. Opći postupak uklanjanja Boc-zaštite i priprave trifluoracetatnih soli<sup>216</sup>

Aminokiselina s Boc-zaštićenim *N*-terminalnim krajem (1,0 mmol) otopljena je u  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 mL) te je dodana smjesa trifluoroctene kiseline i  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $\text{TFA}:\text{CH}_2\text{Cl}_2=1:1$ , v/v, 4 mL). Reakcijska smjesa je miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja otapala pod

sniženim tlakom dobivena je trifluoracetatna sol slobodne aminokiseline u obliku ulja u kvantitativnom iskorištenju.

### 3.2.6.1. Priprava TFA-soli benzilnog estera neprirodne aminokiseline derivata tirozina **5**<sup>214</sup>

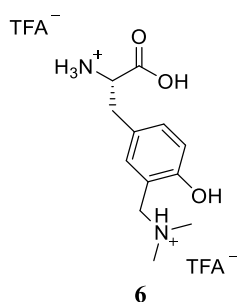


Priprava je provedena prema općem postupku za pripravu trifluoracetatnih soli opisanom u §3.2.6. iz benzilnog estera neprirodne aminokiseline (**3**) (0,34 g, 0,8 mmol) otopljenog u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL), a zatim je dodana smjesa TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, v/v, 4 mL). Nakon uklanjanja otapala pod sniženim tlakom dobivena je trifluoracetatna sol derivata tirozina **5** u obliku smeđkastog ulja u kvantitativnom iskorištenju.

**2TFA×H-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (5):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,41-7,28 (m, 5H), 7,14-7,09 (m, 2H), 6,86 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 5,26 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 5,20 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 4,31 (dd(t), *J* = 7,0 Hz), 4,22 (d, *J* = 12,9 Hz, 1H), 4,13 (d, *J* = 12,9 Hz, 1H), 3,15 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 2,79 (d, *J* = 7,5 Hz, 6H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) δ/ppm: 169,9 (s), 157,5 (s), 136,2 (s), 134,4 (d), 134,0 (d), 129,9 (d), 129,8 (d, 2C), 129,7 (d, 2C), 126,6 (s), 118,0 (s), 117,0 (d), 69,3 (t), 58,2 (t), 55,2 (d), 43,2 (q, 2C), 36,5 (t);

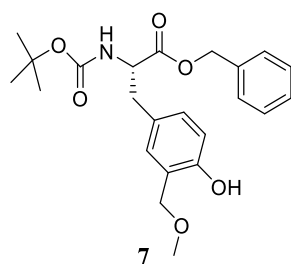
**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski *m/z* [M]<sup>+</sup> za C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>F<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 556,1644, eksperimentalni *m/z* 556,1635.

3.2.6.2. Priprava TFA-soli neprirodne aminokiseline derivata tirozina **6**<sup>214</sup>

Priprava je provedena prema općem postupku za pripravu trifluoroacetatnih soli opisanom u §3.2.6. iz Boc-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OH (**4**) (0,35 g, 1,0 mmol) otopljenog u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL), a zatim je dodana smjesa TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, v/v, 6 mL). Nakon uklanjanja otapala pod sniženim tlakom dobivena je trifluoroacetatna sol *N,N*-dimetilaminmetilnog derivata tirozina **6** u obliku smeđkastog ulja u kvantitativnom iskorištenju.

**2TFA×H-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OH (6):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,29-7,21 (m, 2H), 6,94 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 4,34-4,24 (m, 2H), 4,24-4,17 (m, 1H), 3,22 (dd, *J* = 6,0, 14,5 Hz, 1H), 3,13 (dd, *J* = 7,0, 14,5 Hz, 1H), 2,85 (d, *J* = 6,0 Hz, 6H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) δ/ppm: 171,2 (s), 157,5 (s), 134,6 (d), 134,0 (d), 127,0 (d, 2C), 118,1 (s), 117,0 (d), 58,2 (t), 55,2 (d), 43,4 (q), 43,2 (q), 36,4 (t).

3.2.7. Preparativna fotometanoliza *N,N*-dimetilaminometilnog derivata tirozina<sup>214</sup>

U kvarcnoj cijevi za fotolizu otopljen je derivat tirozina **3** (54 mg, 0,12 mmol) u CH<sub>3</sub>OH (100 mL). Otopina je propuhivana argonom 30 min, a zatim je ozračena u fotokemijskom reaktoru Rayonet s 11 lampi na 300 nm ukupno 45 min uz konstantno propuhivanje argonom i hlađenje vodenim hladilom. Otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču te je dobiveno 52 mg smjese koja je nanosena na TLC ploču (silikagel, 500 μm) u eluensu 10 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Izolirano je 14 mg (28 %) čistog produkta **7** u obliku bezbojnog ulja.



**Boc-Tyr[CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>]-OBn (7):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,38-7,26 (m, 6H), 6,86 (d, *J*= 8,4 Hz, 1H), 6,74 (d, *J*= 8,4 Hz, 1H), 6,68 (s, 1H), 5,17 (d, *J*= 12,6 Hz, 1H), 5,08 (d, *J*= 12,6 Hz, 1H), 4,96 (d, *J*=7,6 Hz, 1H), 4,60-4,45 (m, 3H), 3,40 (s, 3H), 3,05-2,89 (m, 2H), 1,41 (s, 9H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) δ/ppm: 171,8 (s), 155,5 (s), 155,1 (s), 135,3 (s), 130,3 (d), 128,9 (d, 2C), 128,6 (d), 128,5 (d, 2C), 127,9 (s), 127,0 (s), 122,0 (d), 116,6 (d), 79,9 (s), 74,0 (t), 67,0 (t), 58,2 (q), 54,6 (d), 37,4 (t), 28,7 (q, 3C);

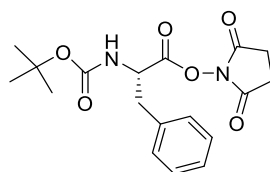
**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski *m/z* [M]<sup>+</sup> za C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>6</sub> 415,2073, eksperimentalni *m/z* 415,2094.

### 3.3. Priprava dipeptida

#### 3.3.1. Opći postupak priprave sukcinimidnog estera

*N*-Boc-zaštićena aminokiselina (10 mmol), *N*-hidroksisukcinimid (NHS, 11 mmol) i 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC, 11 mmol) otopljeni su u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL). Reakcijska smjesa miješana je 2 sata uz hlađenje ledenom kupelji te je stajala u hladnjaku preko noći. Sirova reakcijska smjesa oprana je 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (30 mL), H<sub>2</sub>O (30 mL), 0,5 M HCl (30 mL) i konačno H<sub>2</sub>O (30 mL). Organski sloj sušen je iznad bezvodnog magnezijevog sulfata, profiltriran i otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Dobiven je sirovi produkt koji je korišten u sljedećem stupnju bez pročišćavanja.<sup>216</sup>

##### 3.3.1.1. Priprava sukcinimidnog estera *N*-Boc-fenilalanina (**8**)<sup>216</sup>



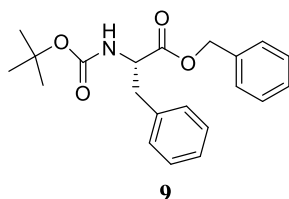
**8**

Priprava spoja **8** provedena je prema općem postupku za pripravu sukcinimidnog estera opisanom u §3.3.1. iz *N*-Boc-fenilalanina (3,00 g, 11,3 mmol), NHS (1,43 g, 12,4 mmol) i EDC (1,93 g, 12,4 mmol) otopljenih u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL). Dobiven je bezbojni pjenasti produkt **8** (2,38 g, 6,6 mmol, 58 %).

**Boc-Phe-OSu (8):**  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,34-7,19 (m, 5H), 4,74 (dd,  $J= 4,8$ , 9,8 Hz, 1H), 3,02 (dd,  $J= 9,8$ , 14 Hz, 1H), 2,85 (s, 4H), 1,36 (s, 9H);

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 171,3 (s, 2C), 169,9 (s), 157,5 (s), 137,6 (s), 130,5 (d, 2C), 129,5 (d, 2C), 128,0 (d), 80,9 (s), 54,8 (d), 38,6 (t), 28,6 (q, 3C), 26,5 (t, 2C).

### 3.3.2. Priprava benzilnog estera Boc-L-fenilalanina (9)<sup>213</sup>

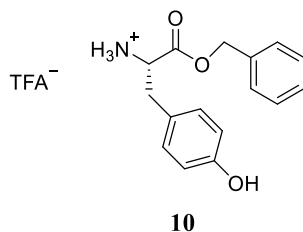


Priprava spoja **9** provedena je prema općem postupku za pripravu benzilnog estera opisanom u §3.2.2. iz *N*-Boc-L- fenilalanina (2,00 g, 7,5 mmol) otopljenog u smjesi dioksana i DMF-a (1:1, 80 mL), a zatim su dodani benzilbromid (0,89 mL, 7,5 mmol) i  $\text{NaHCO}_3$  (0,63 g, 7,5 mmol). Sirovi žuti uljasti produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz 0→5 %  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  kao eluens. Dobiven je uljasti produkt **9** koji stajanjem kristalizira (2,35 g, 88 %).

**Boc-Phe-OBn (9):**  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,37-7,26 (m, 6H), 7,26-7,20 (m, 2H), 7,19-7,13 (m, 2H), 5,14 (d,  $J= 12,0$  Hz, 1H), 5,09 (d,  $J= 12,0$  Hz, 1H), 4,38 (m,  $J= 5,9$ , 8,7Hz, 1H), 3,09 (dd,  $J= 5,9$ , 13,7 Hz, 1H), 3,02 (dd,  $J= 8,7$ , 13,7 Hz, 1H), 1,37 (s, 9H);

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 170,1 (s), 158,3 (s), 136,2 (s), 131,5 (s), 129,9 (d, 2C), 129,8 (d), 129,7 (d, 2C), 125,4 (s, 2C), 116,9 (d, 2C), 69,1 (t), 55,4 (d), 36,7 (t).

### 3.3.3. Priprava TFA-soli benzilnog estera tirozina (10)<sup>216</sup>



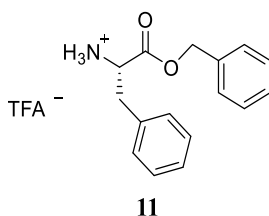
Priprava je provedena prema općem postupku za pripravu trifluoracetatnih soli opisanom u §3.2.6. iz benzilnog estera Boc-tirozina (**2**) (1,00 g, 2,7 mmol),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL), i smjese

TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, v/v, 5 mL). Nakon uklanjanja otapala pod sniženim tlakom dobivena je trifluoroctena sol tirozina **10** u obliku ulja u kvantitativnom iskorištenju.

**TFA×H-Tyr-OBn (10):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,39-7,29 (m, 5H), 6,97 (d, *J*= 8,6 Hz, 2H), 6,71 (d, *J*= 8,6 Hz, 2H), 5,25 (d, *J*= 12,0 Hz, 1H), 5,20 (d, *J*= 12,0 Hz, 1H), 4,26 (dd(t), *J*= 6,7 Hz, 1H), 3,09 (dd, *J*= 2,6, 6,7 Hz, 2H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) δ/ppm: 170,1 (s), 158,3 (s), 136,2 (s), 131,5 (s), 129,9 (d, 2C), 129,8 (d), 129,7 (d, 2C), 125,4 (s, 2C), 116,9 (d, 2C), 69,1 (t), 55,4 (d), 36,7 (t).

### 3.3.4. Priprava TFA-soli fenilalanina (11)



Priprava je provedena prema općem postupku za pripravu trifluoroacetatnih soli opisanom u §3.2.6. iz benzilnog estera Boc-fenilalanina (**9**) (0,76 g, 2,1 mmol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL), i smjese TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, v/v, 6 mL). Nakon uklanjanja otapala pod sniženim tlakom dobivena je trifluoroctena sol fenilalanina **11** u obliku ulja koje stajanjem kristalizira u kvantitativnom iskorištenju.

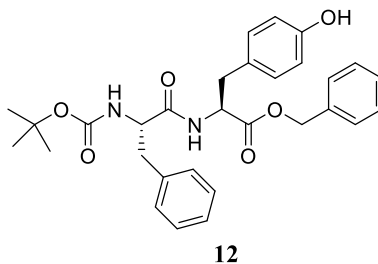
**TFA×H-Phe-OBn (11):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,39-7,34 (m, 3H), 7,34-7,28 (m, 5H), 7,17 (dd, *J* = 7,5, 2,3 Hz, 2H), 5,24 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 5,22 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 4,34 (dd(t), *J* = 6,3 Hz, 1H), 3,22 (dd, *J* = 6,9, 14,4 Hz, 1H), 3,17 (dd, *J* = 6,9, 14,4 Hz, 1H).

### 3.3.5. Opći postupak priprave peptida<sup>217,218</sup>

Otopina sukcinimidnog estera Boc-zaštićene aminokiseline (2,75 mmol) u THF-u (15 mL) polagano je dokapana u suspenziju soli aminokiseline (2,5 mmol) i NaHCO<sub>3</sub> (5 mmol, ili 10 mmol ako se koristi TFA-sol aminokiseline) u smjesi THF i voda (1:1, v/v, 20 mL). Reakcijska smjesa miješana je 3 dana na sobnoj temperaturi. THF je uklonjen na rotacijskom uparivaču, provjeren je pH vodenog sloja te je zakiseljeno 0,5 M HCl do pH 2-3 i ekstrahirano etil-acetatom (3×50 mL). Organski sloj sušen je iznad natrijevog sulfata, profiltriran i otapalo je

uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Dobiven je sirovi produkt koji je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz 1→20 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens.

### 3.3.5.1. Priprava dipeptida Boc-Phe-Tyr-OBn (**12**)<sup>214</sup>

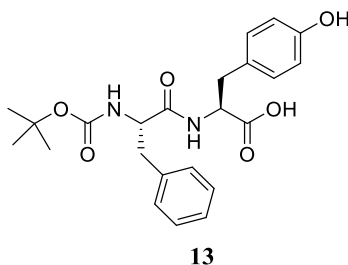


Priprava je provedena prema općem postupku za pripravu peptida opisanom u §3.3.5. iz sukcinimidnog estera Boc-fenilalanina (**8**) (0,84 g, 2,3 mmol), TFA soli benzilnog estera tirozina (**10**) (0,57 g, 2,1 mmol) i NaHCO<sub>3</sub> (0,71 g, 8,4 mmol) u smjesi THF i voda (1:1, v/v, 24 mL). Dobiven je žuti uljasti produkt koji je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz 2→5 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Dobiven je pjenasti bezbojni produkt **12** (0,55 g, 50 %).

**Boc-Phe-Tyr-OBn (12):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,36-7,26 (m, 5H), 7,24-7,15 (m, 5H), 6,94 (d, *J*= 8,0 Hz, 2H), 6,66 (d, *J*= 8,0 Hz, 1H), 4,70-4,60 (m, 1H), 4,34-4,23 (m, 1H), 3,06-2,65 (m, 4H), 1,34 (s, 9H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) δ/ppm: 174,2 (s), 172,5 (s), 157,5 (s), 157,4 (s), 138,5 (s), 137,0 (s), 131,4 (d, 2C), 130,3 (d, 2C), 129,5 (d, 2C), 129,4 (d, 2C), 129,3 (d, 2C), 128,3 (s), 127,7 (d), 127,6 (d), 116,3 (d, 2C), 80,7 (s), 68,0 (t), 57,1 (d), 55,5 (d), 39,2 (t), 37,7 (t), 28,6 (q, 3C).

### 3.3.5.2. Priprava dipeptida Boc-Phe-Tyr-OH (**13**)<sup>214</sup>



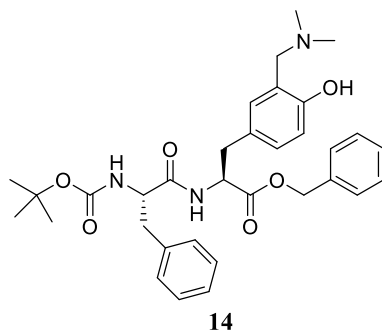
Priprava je provedena prema općem postupku za pripravu peptida opisanom u §3.3.5. iz sukcinimidnog estera Boc-fenilalanina (**8**) (1,0 g, 2,75 mmol), tirozina (0,45 g, 2,5 mmol) i

NaHCO<sub>3</sub> (0,42 g, 5,0 mmol) u smjesi THF i voda (1:1, v/v, 22 mL). Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz 2→5 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Dobiven je pjenasti bezbojni produkt **13** (0,81 g, 81 %).

**Boc-Phe-Tyr-OBn (13):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,28-7,14 (m, 5H), 7,02 (d, *J*= 8,0 Hz, 2H), 6,69 (d, *J*= 8,0 Hz, 2H), 4,64-4,50 (m, 1H), 4,31-4,19 (m, 1H), 3,13-3,00 (m, 2H), 2,92 (dd, *J*= 7,6 Hz, 1H), 2,79-2,68 (m, 1H), 1,34 (s, 9H);

<sup>13</sup>C NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, 75 MHz) δ/ppm: 172,9 (s), 171,7 (s), 156,1 (s), 155,2 (s), 138,2 (s), 130,2 (d, 2C), 129,2 (d, 2C), 128,1 (d, 2C), 127,4 (s), 126,2 (d), 115,1 (d, 2C), 78,2 (s), 55,8 (d), 53,7 (d), 37,6 (t), 36,2 (t), 28,2 (q, 3C).

### 3.3.5.3. Priprava dipeptida Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**14**)<sup>214</sup>



Priprava je provedena prema općem postupku za pripravu peptida opisanom u §3.3.5. iz sukcinimidnog estera Boc-fenilalanina (**8**) (0,73 g, 2,0 mmol), TFA-soli benzilnog estera neprirodne aminokiseline (**5**) (0,59 g, 1,8 mmol) i NaHCO<sub>3</sub> (0,605 g, 7,2 mmol) u smjesi THF-a i vode (1:1, v/v, 24 mL). Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagelu uz 5→10 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Dobiven je pjenasti bezbojni produkt **14** (0,59 g, 57 %).

**Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (14):** Talište: 92-94 °C;

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,37-7,27 (m, 5H), 7,25-7,15 (m, 5H), 7,11 (s, 1H), 7,08 (d, *J*= 8,1 Hz, 1H), 6,78 (d, *J*= 8,1 Hz, 1H), 5,12 (s, 2H), 4,68 (ddd(t), *J*= 7,0 Hz, 1H), 4,30-4,22 (m, 1H), 4,13 (s, 2H), 3,09 (dd, *J*= 6,0, 14,0 Hz, 1H), 3,02-2,89 (m, 2H), 2,75 (s, 6H), 2,75-2,65 (m, 1H), 1,34 (s, 9H);

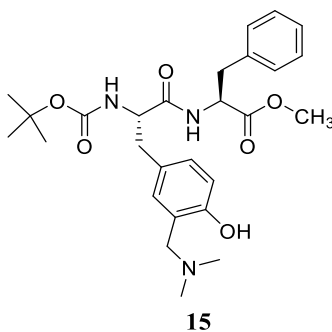
$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz)  $\delta$ /ppm: 174,3 (s), 172,3 (s), 157,5 (s), 156,7 (s), 138,5 (s), 137,0 (s), 134,1 (d), 133,9 (d), 134,0 (d), 133,0 (d), 129,6 (d), 129,5 (d), 129,4 (d), 129,4 (s), 129,3 (d), 129,2 (d), 127,7 (d), 127,5 (d), 118,2 (s), 116,4 (d), 80,6 (s), 68,0 (t), 58,3 (t), 57,1 (d), 55,3 (d), 43,2 (q, 2C), 39,3 (t), 37,1 (t), 28,6 (q, 3C);

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  za  $\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_6$  576,3074, eksperimentalni  $m/z$  576,3087.

### 3.3.6. Opći propis pripreve dipeptida s HBTU aktivacijskim reagensom<sup>219</sup>

U troglu tikvicu pod atmosferom dušika su preko septuma iglom dodani aminokiselina (0,08 mmol), HBTU (0,08 mmol) i 1-hidroksibenzotriazol, HOBT (0,08 mmol) otopljeni u suhom  $\text{CH}_3\text{CN}$ , zatim je dodan trietilamin, TEA ili *N,N*-diizopropiletilamin, DIPEA (0,32 mmol). Nakon 30 min miješanja, dokapana je sol benzilnog estera aminokiseline (0,08 mmol) otopljena u suhom  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču te je dobiven uljasti produkt koji je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz 20→100 %  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  kao eluens.

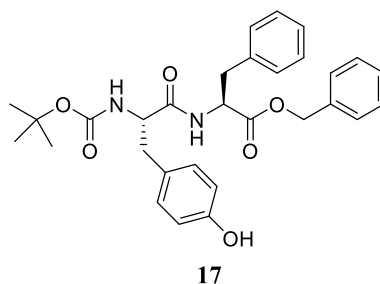
#### 3.3.6.1. Pokušaj pripreve Boc-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]-Phe-OMe (15)



Priprava spoja **15** provedena je prema općem postupku za pripravu dipeptida opisanom u §3.3.6. Boc-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]-OH (**4**) (0,10 g, 0,30 mmol) i HBTU (0,34 g, 0,90 mmol) otopljeni su u  $\text{CH}_3\text{CN}$  (30 mL). Dodana je *N,N*-diizopropiletilamin, DIPEA (0,18 ml, 1,05 mmol), a zatim  $\text{HCl}\times\text{H-PheOMe}$  (0,07g, 0,33 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 20 sati na sobnoj temperaturi. Otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču, a produkt je otopljen u etil-acetatu (50 mL). Smjesa je prana  $\text{H}_2\text{O}$  (50 mL) i zasićenom otopinom  $\text{NaCl}$  ( $3\times 50$  mL). Organski sloj sušen je iznad bezvodnog natrijevog sulfata, profiltriran i otapalo uklonjeno. Dobivena je uljasta

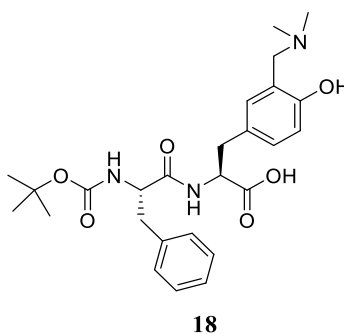
narančasta smjesa (0,30 g) koja je razdvajana kromatografijom na stupcu silikagela pri čemu su dobivene frakcije koje prema NMR-u nisu pokazale prisutnost željenog dipeptida.

### 3.3.7. Pokušaj pripreve Boc-Tyr-Phe-OBn (17)



Otopina sukcinimidnog estera Boc-tirozina (**16**) (0,60 g, 1,6 mmol) u THF (13 mL) polagano je dokapana u suspenziju benzilnog estera fenilalanina (0,31 g, 1,45 mmol) i NaHCO<sub>3</sub> (0,49 g, 5,8 mmol) u smjesi THF i voda (1:1, v/v, 22 mL). Reakcijska smjesa miješana je 3 dana na sobnoj temperaturi. THF je uklonjen na rotacijskom uparivaču, provjeren je pH vodenog sloja te je zakiseljeno 0,5 M HCl do pH 2-3 i ekstrahirano etil-acetatom (3×50 mL). Organski sloj sušen je na natrijevom sulfatu, profiltriran i otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Dobivena smjesa razdvajana je kromatografijom na stupcu silikagela, ali nije dobiven željeni produkt.

### 3.3.8. Postupak uklanjanja benzilne zaštitne skupine s dipeptida Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn<sup>214</sup>



Priprava spoja **18** provedena je prema općem postupku za uklanjanje benzilne zaštite opisanom u §3.2.4. iz Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**14**) (0,26 g, 0,4 mmol) otopljenog u apsolutnom etanolu (40 mL) u boci za hidriranje uz dodatak 10 % Pd/C (0,10 g). Dobiveni uljasti produkt

je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz 20→100 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Izoliran je čisti produkt **18** u obliku žutog ulja (0,22 g, 99 %).

**Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OH (18):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,29-7,13 (m, 7H), 6,84 (d, *J*= 8,0 Hz, 1H), 4,63-4,56 (m, 1H), 4,32-4,18 (m, 3H), 3,15 (dd, *J*= 5,0, 14,0 Hz, 1H), 3,04 (dd, *J*= 5,0, 14,0 Hz, 1H), 2,99-2,88 (m, 1H), 2,83 (s, 6H), 2,78-2,69 (m, 1H), 1,35 (s, 9H);

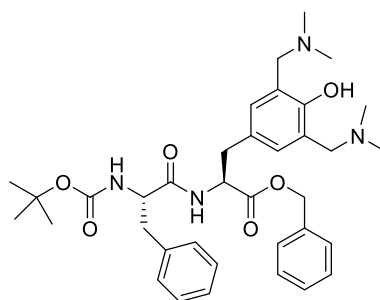
<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) δ/ppm: 174,6 (s), 174,0 (s), 157,6 (s), 156,5 (s), 138,6 (s), 134,3 (d), 134,1 (d), 130,3 (d, 2C), 130,0 (s), 129,4 (d, 2C), 127,7 (d), 117,4 (s), 116,4 (d), 80,7 (s), 58,3 (t), 57,4 (d), 55,5 (d), 43,3 (q, 2C), 39,2 (t), 37,8 (t), 28,7 (q, 3C), nije uočen signal za 1C atom (s);

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski *m/z* [M+H]<sup>+</sup> za C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> 486,2604, eksperimentalni *m/z* 486,2627.

### 3.3.9. Opći postupak pripreve dipeptida koji sadrže dvije dimetilaminometilne skupine

Dipeptid (1,0 mmol) je otopljen u 40 %-tnoj vodenoj otopini Me<sub>2</sub>NH (2 mL, 3,0 mmol). U nastalu suspenziju dokapana je 37 %-tna vodena otopina H<sub>2</sub>CO (1 mL, 2,5 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 1 sat na sobnoj temperaturi, a zatim 2 sata na 80-90 °C uz zagrijavanje preko vodene kupelji. Nastala je žuta uljasta smjesa kojoj je dodana zasićena otopina NaCl (40 mL). Reakcijska smjesa je miješana 20 minuta na sobnoj temperaturi, te ekstrahirana etil-acetatom (3×50 mL). Nakon sušenja nad bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i filtracije, otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu aluminijevog oksida (akt. V) uz 5→100 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens.



3.3.9.1. Priprava dipeptida Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>-OBn (**19**)<sup>214</sup>**19**

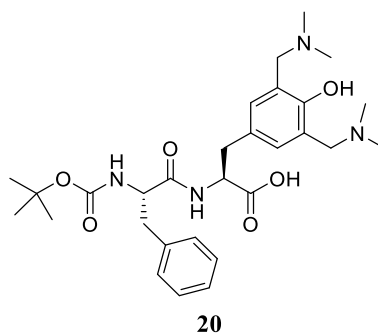
Priprava spoja **19** provedena je prema općem postupku za pripravu dipeptida koji sadrži dvije dimetilaminometilne skupine opisanom u §3.3.9. iz Boc-Phe-Tyr-OBn (**12**) (0,50 g, 1,0 mmol) otopljenog u 40 %-tnoj vodenoj otopini Me<sub>2</sub>NH (2 mL, 3,0 mmol). U nastalu suspenziju dokapana je 37 %-tna vodena otopina H<sub>2</sub>CO (1 mL, 2,5 mmol). Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu aluminijevog oksida (akt. V) uz 5→100 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Dobiven je uljasti produkt **19** (68 mg, 11 %).

**Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>-OBn (**19**):**

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) δ/ppm: 7,36-7,27 (m, 5H), 7,25-7,21 (m, 2H), 7,20-7,15 (m, 3H), 6,87 (s, 2H), 5,10 (s, 2H), 4,68 (ddd(t), *J*=7,0 Hz, 1H), 4,31-4,24 (m, 1H), 3,55 (d, *J*= 13,0 Hz, 2H), 3,51 (d, *J*= 13,0 Hz, 2H), 3,06-2,97 (m, 2H), 2,93 (dd, *J*= 7,5, 13,5 Hz, 1H), 2,73-2,67 (m, 1H), 2,26 (s, 12H), 1,34 (s, 9H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) δ/ppm: 174,1 (s), 174,0 (s), 157,2 (s), 157,1 (s), 138,5 (s), 136,9 (s), 131,6 (d, 2C), 130,4 (d, 2C), 129,6 (d), 129,4 (d, 2C), 128,2 (d), 127,9 (d), 127,8 (s), 127,7 (d, 2C), 123,4 (s, 2C), 80,6 (s), 67,9 (t), 60,7 (t, 2C), 57,2 (d), 55,2 (d), 44,7 (q, 4C), 39,4 (t), 37,7 (t), 28,7 (q, 3C);

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski *m/z* [M+H]<sup>+</sup> za C<sub>36</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> 633,3652, eksperimentalni *m/z* 633,3623.

3.3.9.2. Priprava dipeptida Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>-OH (**20**)<sup>214</sup>

Priprava spoja **20** provedena je prema općem postupku za pripravu dipeptida koji sadrži dvije dimetilaminometilne skupine opisanom u §3.3.9. iz Boc-Phe-Tyr-OH (**13**) (0,20 g, 0,5 mmol) otopljenog u 40 %-tnoj vodenoj otopini Me<sub>2</sub>NH (1 mL, 7,8 mmol). U nastalu suspenziju dokapana je 37 %-tna vodena otopina H<sub>2</sub>CO (0,5 mL, 6,4 mmol). Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu aluminijevog oksida (akt. V) uz 10→100 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Dobiven je uljasti produkt koji stajanjem kristalizira (0,02 g, 8 %).

**Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>-OH (**20**): Talište:** 124-126 °C;

**<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,30-7,15 (m, 5H), 7,04 (s, 2H), 4,39 (ddd(t), *J*=5,0 Hz, 1H), 4,27-4,19 (m, 1H), 4,00 (d, *J*= 13,6 Hz, 2H), 3,95 (d, *J*= 13,6 Hz, 2H), 3,15-2,95 (m, 3H), 2,80-2,65 (m, 1H), 2,59 (s, 12H), 1,35 (s, 9H);

**<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) δ/ppm: 177,2 (s), 173,3 (s), 158,6 (s), 157,5 (s), 138,8 (s), 133,3 (d), 130,3 (d, 2C), 129,8 (s), 129,4 (d, 2C), 127,7 (d, 2C), 120,2 (s, 2C), 80,4 (s), 60,4 (t, 2C), 57,7 (d), 57,4 (d), 43,8 (q, 4C), 39,3 (t), 38,2 (t), 28,7 (q, 3C);

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski *m/z* [M+H]<sup>+</sup> za C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> 543,3183, eksperimentalni *m/z* 543,3177.

### 3.3.10. Preparativna fotometanoliza dipeptida

U kvarcnoj cijevi za fotolizu otopljen je dipeptid u CH<sub>3</sub>OH (100 mL). Otopina je propuhivana argonom 30 min, a zatim je ozračena u fotokemijskom reaktoru Rayonet s 11 lampi (11×8 W) na 300 nm uz konstantno propuhivanje argonom i hlađenje vodenim hladilom. Tijek reakcije nastajanje fotoproducta praćen je HPLC analizom. Otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču te je smjesa pročišćena kromatografijom na stupcu silikagela uz 2→10 %

CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens ili tankoslojnom kromatografijom (silikagel, 1000 mikrona) korištenjem 5 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluensa.

HPLC analiza provedena je pri sljedećim uvjetima:

Instrument: Varian Pro Star

Kolona: Agilent XDB 4,6×50 mm (1,8 μm)

Detektor: UV (254 nm)

Protok: 0,8 mL/min

Injektirani volumen: 2,5 μL

Mobilna faza: 25 % A, 75 % C (izokratna metoda)

A: H<sub>2</sub>O + 0,5 % CH<sub>3</sub>COOH

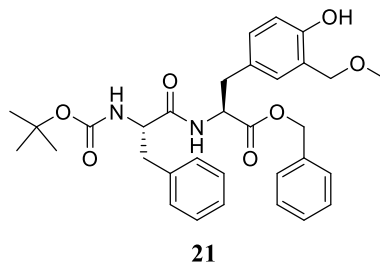
B: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (1:1)

C: CH<sub>3</sub>OH

Diluent: CH<sub>3</sub>OH

Trajanje analize: 20 min

### 3.3.10.1. Preparativna fotometanoliza dipeptida Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**14**)<sup>214</sup>



Priprava spoja **21** provedena je prema općem postupku za preparativnu fotometanolizu opisanom u §3.3.7. Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**14**) (62 mg) otopljen je u CH<sub>3</sub>OH (100 mL). Nakon 30 min ozračivanja, otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču te je dobiveno 62 mg smjese koja je pročišćena kromatografijom na stupcu silikagela uz 10 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Nakon toga je 33 mg smjese nanoseno na TLC ploču (SiO<sub>2</sub>, 1000 μm) korištenjem 5 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluensa. Dobiveno je 13 mg (21 %) čistog produkta **21**.

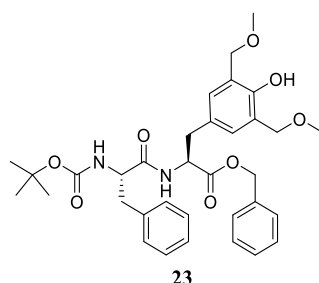
**Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>]-OBn (**21**):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) δ/ppm: 7,38-7,33 (m, 3H), 7,30-7,24 (m, 5H), 7,24-7,18 (m, 1H), 7,17 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H), 6,70-6,65 (m, 2H), 6,59 (s, 1H), 6,28 (br, s), 5,10 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 5,07 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 4,97 (br, s), 4,77-4,73 (m, 1H),

4,49 (d,  $J= 12,5$  Hz, 1H), 4,46 (d,  $J= 12,5$  Hz, 1H), 4,32 (br, s), 3,38 (s, 3H), 3,02 (d,  $J= 6$  Hz, 2H), 2,94 (d,  $J= 6$  Hz, 2H), 1,34 (s, 9H);

$^{13}\text{C}$  NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 170,8 (s), 170,7 (s), 155,2 (s), 136,5 (s), 135,0 (s), 130,2 (d), 129,4 (d), 129,0 (d), 128,7 (d), 128,6 (s), 128,54 (d), 128,51 (d), 126,9 (d), 126,6 (s), 122,1 (s), 116,5 (d), 80,2 (s), 73,8 (t), 67,1 (t), 58,2 (q), 55,7 (d), 53,4 (d), 38,3 (t), 37,0 (t), 28,2 (q), nije uočen jedan singlet;

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski  $m/z$   $[\text{M}+\text{K}]^+$  za C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 601,2316, eksperimentalni  $m/z$  601,2328.

### 3.3.10.2. Preparativna fotometanoliza dipeptida Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>-OBn (**19**)<sup>214</sup>

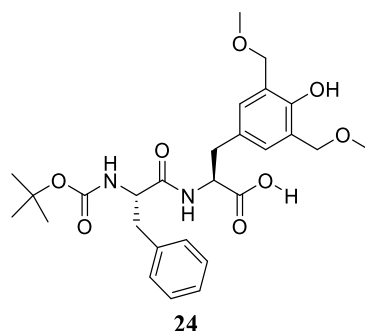


Priprava spoja **23** provedena je prema općem postupku za preparativnu fotometanolizu opisanom u §3.3.7. Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>-OBn (**19**) (28 mg, 0,04 mmol) otopljen je u CH<sub>3</sub>OH (50 mL). Nakon ozračivanja 45 min, otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču te je dobiveno 33 mg uljastog produkta koji je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz 2→10 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Izolirano je 5 mg (21 %) čistog produkta **23**.

**Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>-OBn (**23**):**  $^1\text{H}$  NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)  $\delta$ /ppm: 7,38-7,33 (m, 5H), 7,31-7,27 (m, 2H), 7,25-7,21 (m, 2H), 7,21-7,15 (m, 5H), 6,71 (s, 2H), 5,11-5,08 (s, 2H), 4,81-4,73 (m, 1H), 4,46 (s, 4H), 4,39-4,28 (m, 1H), 3,42-3,36 m, 6H), 3,13-2,88 (m, 4H), 1,37 (s, 9H);

$^{13}\text{C}$  NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 170,8 (s), 153,1 (s), 136,8 (s), 135,1 (s), 129,4 (d), 129,1 (d), 128,64 (d), 128,60 (d), 128,5 (d), 128,4 (d), 126,9 (d), 126,4 (s), 123,6 (s), 80,5 (s), 71,6 (t), 67,1 (t), 58,3 (q), 53,5 (d), 53,4 (d), 38,2 (t), 37,1 (t), 28,7 (q), nisu uočena 2 singleta;

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski  $m/z$   $[\text{M}+\text{K}]^+$  za C<sub>34</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 645,2578, eksperimentalni  $m/z$  645,2570.

3.3.7.3. Preparativna fotometanoliza dipeptida Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>-OH<sub>2</sub>14

Priprava spoja **24** provedena je prema općem postupku za preparativnu fotometanolizu opisanom u §3.3.7. Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>-OH (**20**) (59 mg) otopljen je u CH<sub>3</sub>OH (100 mL). Nakon ozračivanja 75 min, otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču te je dobiveno 51 mg narančastog uljaste smjese koja je pročišćena kromatografijom na stupcu silikagela uz 2→10 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Izolirano je 5 mg (9 %) čistog produkta **24**.

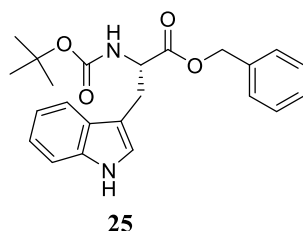
**Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>-OH (**24**):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,30-7,15 (m, 5H), 7,04 (s, 2H), 6,94-6,84 (m, 1H), 4,68-4,57 (m, 1H), 4,54-4,50 (m, 4H), 4,31-4,24 (m, 1H), 3,38 (s, 6H), 3,19-2,98 (m, 2H), 2,76-2,63 (m, 2H), 1,33 (s, 9H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) δ/ppm: 174,0 (s), 157,5 (s), 154,0 (s), 138,7 (s), 131,2 (d), 130,3 (d, 2C), 129,4 (d, 2C), 129,0 (s), 127,6 (d), 125,4 (s, 2C), 80,7 (s), 72,0 (t, 2C), 58,5 (q, 2C), 57,5 (d), 55,3 (d), 39,2 (t), 37,6 (t), 28,6 (q, 3C), nije uočen jedan singlet;

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski *m/z* [M+K]<sup>+</sup> za C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 555,2109, eksperimentalni *m/z* 555,2083.

### 3.4. Priprava tripeptida

#### 3.4.1. Priprava benzilnog estera *N*-Boc-*L*-triptofana (**25**)<sup>220</sup>



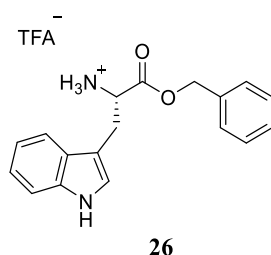
Priprava spoja **25** provedena je prema općem postupku za pripravu benzilnog estera opisanom u §3.2.2. iz *N*-Boc-*L*-triptofana (**1**) (3,00 g, 9,9 mmol) otopljenog u smjesi dioksana i DMF (1:1,

90 mL), a zatim su dodani benzilbromid (1,17 mL, 9,9 mmol) i NaHCO<sub>3</sub> (0,83 g, 9,9 mmol). Dobiven je žuti praškasti produkt **25** (3,63 g, 93 %).

**Boc-Trp-OBn (25):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,52 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,34 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,31-7,25 (m, 3H), 7,23-7,13 (m, 2H), 7,09 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,00 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,97 (s, 1H), 6,76 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 5,04 (s, 2H), 4,46 (dd, *J* = 6,4, 7,3 Hz, 1H), 3,25 (dd, *J* = 6,4, 14,6 Hz, 1H), 3,13 (dd, *J* = 7,3, 14,6 Hz, 1H), 1,38 (s, 9H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) δ/ppm: 174,1 (s), 157,8 (s), 138,0 (s), 129,4 (d, 2C), 129,19 (d, 2C), 129,16 (d), 128,8 (s), 124,5 (d), 122,4 (d), 119,8 (d), 119,2 (d), 112,3 (d), 110,7 (s), 80,7 (s), 67,9 (t), 56,3 (d), 28,8 (t), 28,7 (q, 3C).

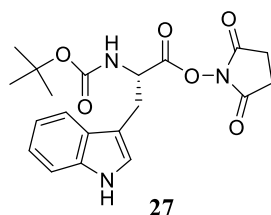
### 3.4.2. Priprava TFA-soli triptofana (**26**)<sup>220</sup>



Priprava spoja **26** je provedena prema općem postupku za pripravu trifluoracetatnih soli opisanom u §3.2.6. iz benzilnog estera Boc-triptofana (**25**) (1,00 g, 2,5 mmol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL), i smjese TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, v/v, 5 mL). Nakon uklanjanja otapala pod sniženim tlakom dobiven uljasti produkt **26** u kvantitativnom iskorištenju.

**TFA×H-Trp-OBn (26):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,52 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,40 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,36-7,29 (m, 3H), 7,27-7,20 (m, 2H), 7,19-7,11 (m, 1H), 7,08 (br s, 1H), 7,06-7,02 (m, 1H), 5,21 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 5,15 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 4,35 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H), 3,48-3,35 (m, 2H).

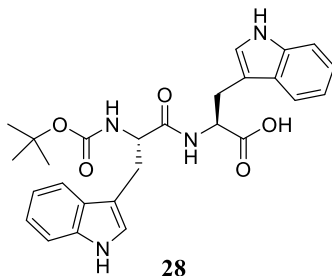
### 3.4.3. Priprava sukcinimidnog estera *N*-Boc-*L*-triptofana (**27**)<sup>221</sup>



Priprava spoja **27** provedena je prema općem postupku za pripravu sukcinimidnog estera opisanom u §3.3.1. iz *N*-Boc-triptofana (5,00 g, 16,4 mmol), NHS (2,07 g, 18,0 mmol) i DCC (3,72 g, 18,0 mmol) otopljenih u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL). Dobiven je žuti pjenasti produkt **27** (6,07 g, 89 %).

**Boc-Trp-OSu (27):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,58 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,33 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,22 (s, 1H), 7,10 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,03 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 4,80 (dd, *J* = 5,0, 8,0 Hz, 1H), 3,47 (dd, *J* = 5,0, 14,7 Hz, 1H), 3,22 (dd, *J* = 8,0, 14,7 Hz, 1H), 2,84 (s, 4H), 1,36 (s, 9H).

### 3.4.4. Priprava dipeptida *Boc*-*Trp*-*Trp*-*OH* (**28**)<sup>222</sup>

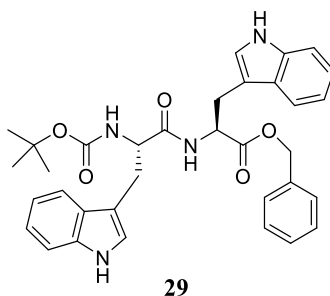


Priprava dipeptida **28** provedena je prema općem postupku za pripravu peptida opisanom u §3.3.5. iz sukcinimidnog estera *Boc*-triptofana (**27**) (2,21 g, 5,5 mmol) u THF-u (28 mL), triptofana (1,02 g, 5,0 mmol) i NaHCO<sub>3</sub> (0,84 g, 10,0 mmol) u smjesi THF i voda (1:1, v/v, 48 mL). Dobiven je bezbojni pjenasti produkt **28** (2,34 g, 95 %).

**Boc-Trp-Trp-OH (28):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,57 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,32 (t, *J* = 7,9 Hz, 3H), 7,13-6,96 (m, 5H), 6,90 (t, *J* = 6,5 Hz 1H), 4,77-4,67 (m, 1H), 4,37-4,27 (m, 1H), 3,25-3,13 (m, 3H), 3,09-2,97 (m, 1H), 1,28 (s, 9H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) δ/ppm: 174,9 (s), 174,4 (s), 157,4 (s), 138,1 (s), 137,9 (s), 128,9 (s), 128,8 (s), 124,7 (d), 124,5 (d), 122,42 (d), 122,40 (d), 119,85 (d), 119,81 (d), 119,4 (d), 119,2 (d), 112,3 (d), 112,2 (d), 110,9 (s), 110,4 (s), 80,7 (s), 56,7 (d), 54,6 (d), 28,9 (t), 28,5 (q, 3C), 28,3 (t).

### 3.4.5. Priprava dipeptida *Boc-Trp-Trp-OBn* (**29**)<sup>222</sup>

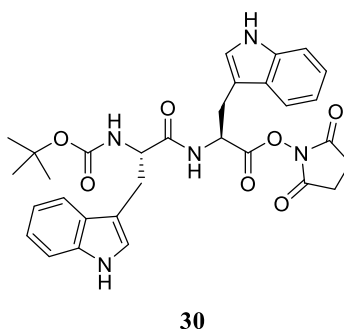


Priprava dipeptida **29** provedena je prema općem postupku za pripravu peptida opisanom u §3.3.5. iz sukcinimidnog estera Boc-triptofana (**27**) (0,75 g, 1,9 mmol) u THF-u (11 mL), TFA-soli benzilnog estera triptofana (**26**) (0,50 g, 1,7 mmol) i NaHCO<sub>3</sub> (0,57 g, 6,8 mmol) u smjesi THF i voda (1:1, v/v, 48 mL). Dobiven je bezbojni pjenasti produkt (2,34 g, 95 %). Organski sloj je sušen nad natrijevim sulfatom, profiltriran i otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Sirovi smeđkasti pjenasti produkt (1,053 g) je pročišćen kromatografijom na stupcu aluminijevog oksida (akt. V) uz 2→5 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Dobiven je pjenasti produkt **29** (0,30 g, 31 %).

**Boc-Trp-Trp-OBn (29):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,55 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,38-7,21 (m, 6H), 7,19-6,96 (m, 6H), 6,94-6,80 (m, 1H), 6,83 (s, 1H), 5,02 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 4,95 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 4,76 (t, *J* = 6,5 Hz, 1H), 4,36 (t, *J* = 6,5 Hz, 1H), 3,21-2,98 (m, 4H), 1,31 (s, 9H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) δ/ppm: 174,5 (s), 172,8 (s), 157,4 (s), 138,1 (s), 138,0 (s), 137,0 (s), 129,5 (d, 2C), 129,3 (d, 2C), 129,2 (d), 124,7 (s, 2C), 124,7 (d), 124,6 (d), 122,5 (d), 122,4 (d), 119,9 (d), 119,8 (d), 119,4 (d), 119,1 (d), 112,35 (d), 112,30 (d), 110,9 (s), 110,0 (s), 80,7 (s, 1C), 68,0 (t), 56,7 (d), 54,9 (d), 29,1 (t), 28,6 (q, 3C), 28,4 (t).

### 3.4.6. Priprava sukcinimidnog estera dipeptida *Boc-Trp-Trp-OH* (**30**)<sup>221</sup>

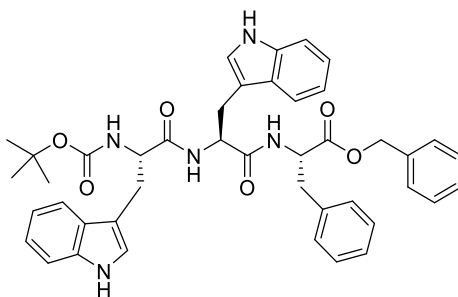




Priprava spoja **30** provedena je prema općem postupku za pripravu sukcinimidnog estera opisanom u §3.3.1. iz Boc-Trp-Trp-OH (**28**) (0,96 g, 2,0 mmol), NHS (0,25 g, 2,2 mmol) i EDC (0,34 g, 2,2 mmol) otopljenih u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL). Organski sloj je sušen bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Dobiven je pjenasti produkt **30** (0,70 g, 72 %).

**Boc-Trp-Trp-OSu (30):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,55 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,37-7,26 (m, 2H), 7,20 (s, 1H), 7,14-6,80 (m, 6H), 5,13 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H), 4,37-4,25 (m, 1H), 3,35-3,00 (m, 4H), 2,81 (s, 4H), 1,25 (s, 9H).

#### 3.4.7. Priprava tripeptida Boc-Trp-Trp-Phe-OBn (**31**)<sup>222</sup>



**31**

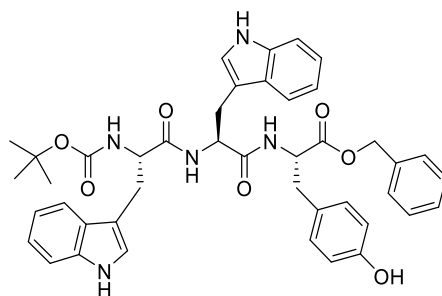
Priprava tripeptida **31** provedena je prema općem postupku za pripravu peptida opisanom u §3.3.5. iz otopine sukcinimidnog estera Boc-Trp-Trp-OH (**30**) (0,38 g, 0,65 mmol) u THF (6 mL), TFA soli benzilnog estera fenilalanina (**11**) (0,24 g, 0,6 mmol), NaHCO<sub>3</sub> (0,25 g, 3,0 mmol) u smjesi THF i voda (1:1, 12 mL). Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz 0→5 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Dobiven je uljasti produkt **31** (0,25 g, 30 %).

**Boc-Trp-Trp-Phe-OBn (31):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,56 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,36 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,33-7,26 (m, 4H), 7,24-7,18 (m, 2H), 7,18-7,12 (m, 4H), 7,12-7,07 (m, 2H), 7,05 (s, 1H), 7,03-6,97 (m, 3H), 6,93-6,86 (m, 1H), 6,82 (s, 1H), 5,04 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 4,98 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 4,61-4,52 (m, 2H), 4,23 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H), 3,18-3,02 (m, 3H), 2,97-2,87 (m, 1H), 2,83-2,67 (m, 2H), 1,22 (s, 9H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) δ/ppm: 174,3 (s), 173,4 (s), 172,1 (s), 138,1 (s), 138,0 (s), 137,7 (s), 137,0 (s), 130,2 (d, 2C), 129,5 (d, 4C), 129,4 (d, 2C), 129,3 (d), 128,9 (s), 128,8 (s), 127,9 (d), 124,9 (d), 124,8 (d), 122,6 (d), 122,5 (d), 120,0 (d, 2C), 119,5 (d), 119,2 (d), 112,4 (d, 2C),

110,7 (s), 110,0 (s), 80,9 (s), 67,9 (t), 57,1 (d), 55,6 (d), 55,1 (d), 38,6 (t), 28,6 (t), 28,5 (q, 3C), 28,1 (t).

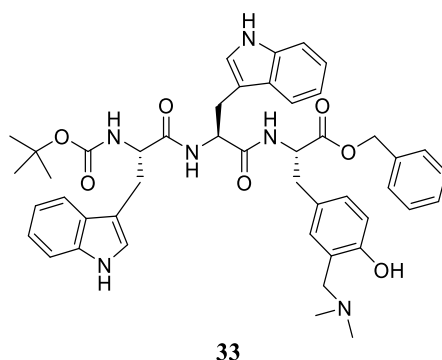
### 3.4.8. Priprava tripeptida *Boc-Trp-Trp-Tyr-OBn* (**32**)<sup>222</sup>



Priprava tripeptida **32** provedena je prema općem postupku za pripravu peptida opisanom u §3.3.5. iz otopine sukcinimidnog estera *Boc-Trp-Trp-OH* (**30**) (0,38 g, 0,65 mmol) u THF (6 mL), TFA soli benzilnog estera tirozina (**10**) (0,23 g, 0,6 mmol), NaHCO<sub>3</sub> (0,25 g, 3,0 mmol), smjesa THF i voda (1:1, 12 mL). Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz 1→10 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Dobiven je uljasti produkt **32** (0,13 g, 30 %).

**Boc-Trp-Trp-Tyr-OBn (32):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,56 (d, *J*= 7,8 Hz, 1H), 7,39-7,24 (m, 5H), 7,24-7,16 (m, 1H), 7,16-6,96 (m, 6H), 6,96-6,76 (m, 4H), 6,62 (d, *J*= 8,4 Hz, 2H), 5,00 (s, 2H), 4,60-4,46 (m, 2H), 4,24 (t, *J*= 6,5 Hz, 1H), 3,19-3,02 (m, 3H), 2,87-2,65 (m, 3H), 1,22 (s, 9H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) δ/ppm: 174,6 (s), 173,5 (s), 172,5 (s), 157,4 (s), 138,04 (s), 138,00 (s), 137,0 (s), 131,4 (d, 2C), 129,5 (d, 2C), 129,3 (d), 129,2 (d), 128,8 (s), 128,7 (d), 128,3 (s), 124,7 (d), 124,6 (d), 122,5 (d, 2C), 120,0 (d), 119,9 (d), 119,44 (d), 119,40 (d), 116,3 (d), 112,3 (d, 2C), 110,9 (s), 110,3 (s), 80,7 (s), 67,4 (t), 57,5 (d), 55,8 (d), 55,1 (d), 37,8 (t), 29,0 (t), 28,7 (q, 3C), 28,5 (t).

**3.4.9. Priprava tripeptida Boc-Trp-Trp-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (33)<sup>223</sup>**

Priprava tripeptida **33** provedena je prema općem postupku za pripravu peptida opisanom u §3.3.5. iz otopine sukcinimidnog estera Boc-Trp-Trp-OH (**30**) (0,32 g, 0,66 mmol) u THF (6 mL), TFA soli benzilnog estera neprirodne aminokiseline (**5**) (0,32 g, 0,6 mmol) i NaHCO<sub>3</sub> (0,25 g, 3,0 mmol) u smjesi THF i voda (1:1, 12 mL). Sirovi uljasti produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz 10→20 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Dobiven je uljasti produkt **33** (0,14 g, 29 %).

**Boc-Trp-Trp-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (33):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) δ/ppm: 7,52 (d, *J*= 7,5 Hz, 1H), 7,36-7,29 (m, 5H), 7,29-7,25 (m, 3H), 7,11-7,06 (m, 2H), 7,02-6,98 (m, 1H), 6,94 (b.s., 3H), 6,90 (s, 1H), 6,86 (d, *J*= 7,5 Hz, 1H), 6,68 (d, *J*= 8,0 Hz, 1H), 5,06 (s, 2H), 4,58-4,49 (m, 2H), 4,23-4,18 (m, 1H), 3,90 (s, 2H), 3,10-3,03 (m, 3H), 2,95 (dd, *J*= 6,4, 14,0 Hz, 1H), 2,90 (dd, *J*= 6,4, 14,7 Hz, 1H), 2,81 (dd, *J*= 6,7, 14,0 Hz, 1H), 2,50 (s, 6H), 1,27 (s, 9H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) δ/ppm: 174,6 (s), 173,5 (s), 172,0 (s), 156,9 (s), 138,1 (s), 138,0 (s), 137,0 (s), 133,5 (d), 132,8 (d), 129,60 (d, 2C), 129,58 (d, 2C), 129,4 (d), 128,8 (s, 2C), 128,7 (d), 124,9 (d), 124,8 (d), 122,56 (d), 122,54 (d), 119,96 (d), 119,95 (d), 119,4 (d), 119,2 (d), 116,5 (d), 112,4 (d, 2C), 110,6 (s), 110,2 (s), 81,0 (s), 68,0 (t), 59,1 (t), 57,5 (d), 55,6 (d), 55,2 (d), 43,6 (q, 2C), 37,2 (t), 28,7 (t), 28,5 (q, 3C), 28,2 (t).

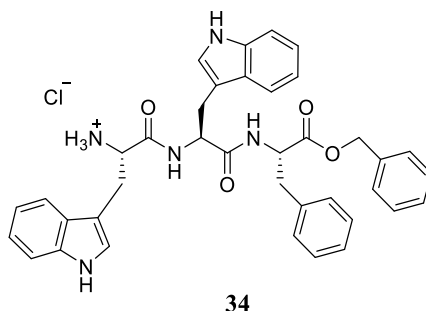
**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski *m/z* [M + H]<sup>+</sup> za C<sub>46</sub>H<sub>52</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> 801,3976 eksperimentalni *m/z* 801,3989.

**3.4.10. Opći postupak za pripravu hidrokloridnih soli**

Boc-zaštićeni tripeptid otopljen je u zasićenoj otopini HCl-a u etil-acetatu (5 M, 1 mL). Reakcijska smjesa miješana je 1 sat na sobnoj temperaturi. Otapalo je uklonjeno pri sniženom

tlaku (vodena sisaljka), dodan je etil-acetat (5 mL) te je otapalo ponovno uklonjeno. Dodatkom etil-acetata nastaju kristali koji su oprani Et<sub>2</sub>O, a zatim posušeni na rotacijskom uparivaču.

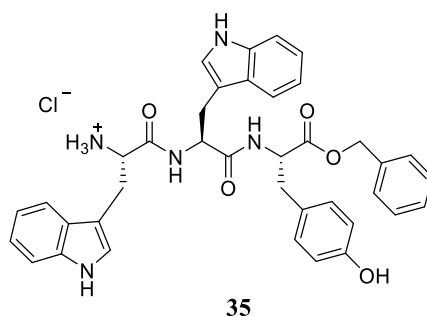
#### 3.4.10.1. Priprava hidrokloridne soli tripeptida HCl×H-Trp-Trp-Phe-OBn (**34**)<sup>222</sup>



Priprava spoja **34** provedena je prema općem postupku za pripravu hidrokloridnih soli opisanom u §3.4.10. iz Boc-Trp-Trp-Phe-OBn (**31**) (20 mg, 0,03 mmol) otopljenog u zasićenoj otopini HCl-a u etil-acetatu (1 mL). Produkt je pročišćen tankoslojnom kromatografijom (SiO<sub>2</sub>, 500 μm) uz 20 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Dobiven je uljasti produkt **34** (10 mg, 55 %).

**HCl×H-Trp-Trp-Phe-OBn (34):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 7,64 (d, *J*= 8,1 Hz, 1H), 7,58 (d, *J*= 7,8 Hz, 1H), 7,37 (t, *J*= 8,1 Hz, 2H), 7,33-7,27 (m, 3H), 7,26-7,21 (m, 3H), 7,20-7,15 (m, 3H), 7,14-7,05 (m, 6H), 7,04 (s, 1H), 7,02-6,96 (m, 2H), 5,08 (d, *J*= 12,1 Hz, 1H), 5,02 (d, *J*= 12,1 Hz, 1H), 4,73 (t, *J*= 7,0 Hz, 1H), 4,65 (dd, *J*=6,4, 7,8 Hz, 1H), 4,07 (dd, *J*=5,6, 8,7 Hz, 1H), 3,21 (dd, *J*=6,4, 14,7 Hz, 1H), 3,15-3,02 (m, 3H), 2,94 (dd, *J*= 7,8, 13,7 Hz, 1H);

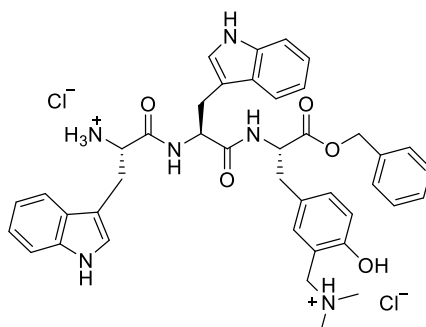
<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) δ/ppm: 173,2 (s), 172,3 (s), 169,8 (s), 138,3 (s), 138,1 (s), 137,8 (s), 136,9 (s), 130,4 (d), 129,5 (d, 3C), 129,4 (d), 128,7 (s), 128,2 (s), 127,9 (d), 125,8 (d), 124,8 (d), 122,9 (d), 122,5 (d), 120,3 (d), 119,8 (d), 119,4 (d), 119,3 (d), 119,1 (d), 112,6 (d), 112,4 (d), 110,5 (s), 107,9 (s), 68,0 (t), 55,55 (d), 55,53 (d), 54,7 (d), 38,4 (t), 29,2 (t), 28,9 (t).

3.4.10.2. Priprava hidrokloridne soli tripeptida HCl×H-Trp-Trp-Tyr-OBn (**35**)<sup>222</sup>

Priprava spoja **35** provedena je prema općem postupku za pripravu hidrokloridnih soli opisanom u §3.4.10. iz Boc-Trp-Trp-Tyr-OBn (**32**) (20 mg, 0,03 mmol) otopljenog u zasićenoj otopini HCl-a u etil-acetatu (1 mL). Produkt je pročišćen tankoslojnom kromatografijom (SiO<sub>2</sub>, 500 μm) uz 20 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Dobiven je uljasti produkt **35** (11 mg, 61 %).

**HCl×H-Trp-Trp-Tyr-OBn (35):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) δ/ppm: 7,57 (d, *J*= 8,0 Hz, 1H), 7,35 (d, *J*= 8,0 Hz, 1H), 7,33-7,27 (m, 5H), 7,22 (dd, *J*= 1,8, 8,0 Hz, 2H), 7,11-7,08 (m, 1H), 7,07-7,03 (m, 1H), 7,02 (s, 1H), 7,01-6,99 (m, 1H), 6,92-6,89 (m, 1H), 6,88 (s, 1H), 6,77 (dd, *J*= 1,8, 6,8 Hz, 2H), 6,56 (dt, *J*= 1,8, 3 Hz, 2H), 5,04 (d, *J*= 12,0 Hz, 1H), 5,02 (d, *J*= 12,0 Hz, 1H), 4,65 (t, *J*= 6,5 Hz, 1H), 4,57 (t, *J*= 7,0 Hz, 1H), 3,60 (dd, *J*=5,4, 7,0 Hz, 1H), 3,07 (dd, *J*=5,4, 14,6 Hz, 1H), 3,02 (dd, *J*=7,0, 14,6 Hz, 1H), 2,94 (dd, *J*=6,4, 14,6 Hz, 1H), 2,90 (dd, *J*=7,2, 14,0 Hz, 1H), 2,86 (dd, *J*=6,4, 14,0 Hz, 1H), 2,79 (dd, *J*=7,2, 14,0 Hz, 1H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) δ/ppm: 176,2 (s), 173,5 (s), 172,4 (s), 157,4 (s), 138,2 (s), 138,0 (s), 131,4 (d, 2C), 129,52 (d, 2C), 129,51 (d, 2C), 129,3 (d), 128,85 (s), 128,83 (s), 128,2 (s), 125,0 (d), 124,8 (d), 122,6 (d), 122,4 (d), 120,0 (d), 119,8 (d), 119,5 (d), 119,4 (d), 116,3 (d), 112,4 (d), 112,3 (d), 110,6 (s), 110,3 (s), 67,9 (t), 56,1 (d), 55,5 (d), 55,0 (d), 37,7 (t), 31,1 (t), 28,8 (t).

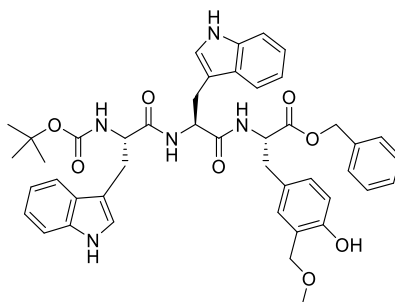
3.4.10.3. Priprava hidrokloridne soli tripeptida  $2\text{HCl}\times\text{H-Trp-Trp-Tyr}[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2]\text{-OBn}$  (**36**)<sup>223</sup>

Priprava spoja **36** provedena je prema općem postupku za pripravu hidrokloridnih soli opisanom u §3.4.10. iz Boc-Trp-Trp-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**33**) (23 mg, 0,03 mmol) otopljenog u zasićenoj otopini HCl-a u etil-acetatu (1 mL). Produkt je pročišćen tankoslojnom kromatografijom (SiO<sub>2</sub>, 500 μm) uz 20 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Dobiven je uljasti produkt **36** (14 mg, 66 %).

**2HCl×H-Trp-Trp-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**36**):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) δ/ppm: 7,57 (d, *J*= 8,0 Hz, 1H), 7,38-7,21 (d, *J*= 8,0 Hz, 1H), 7,33-7,21 (m, 8H), 7,09 (dd, *J*= 7,0, 14,0 Hz, 2H), 7,05-6,97 (m, 2H), 6,91 (d, *J*= 7,0 Hz, 1H), 6,89-6,85 (m, 1H), 6,76 (dd, *J*= 1,8, 7,8 Hz, 1H), 6,68 (d, *J*= 1,8 Hz, 1H), 6,57 (d, *J*= 8,0 Hz, 1H), 5,05 (s, 2H), 4,66-4,55 (m, 2H), 3,59-3,49 (m, 3H), 3,07 (dd, *J*=5,4, 14,6 Hz, 1H), 3,02 (dd, *J*=7,0, 14,6 Hz, 1H), 2,96-2,76 (m, 4H), 2,28 (s, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) δ/ppm: 177,0 (s), 173,6 (s), 172,3 (s), 157,5 (s), 138,2 (s), 138,0 (s), 137,0 (s), 131,5 (d), 131,1 (s), 129,6 (d, 2C), 129,5 (d, 2C), 129,4 (d), 129,3 (s), 128,3 (s), 128,2 (s), 124,9 (d), 124,8 (d), 122,6 (d), 122,5 (d), 122,4 (s), 119,94 (d), 119,86 (d), 119,6 (d), 119,4 (d), 116,6 (d), 112,42 (d), 112,37 (d), 111,0 (s), 110,3 (s), 68,0 (t), 61,7 (t), 56,4 (d), 55,4 (d), 55,0 (d), 44,4 (q, 2C), 37,6 (t), 31,5 (t), 28,7 (t).

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski *m/z* [M + H]<sup>+</sup> za C<sub>41</sub>H<sub>44</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> 701,3451, eksperimentalni *m/z* 701,3445.

3.4.11. Preparativna fotometanoliza tripeptida Boc-Trp-Trp-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn<sup>223</sup>

37

Shema 48. Priprava spoja **37**

U 4 kvarcne epruvete pripremljene su istovrsne otopine tripeptida Boc-Trp-Trp-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**33** 10 mg, 0,013 mmol) u CH<sub>3</sub>OH (15 mL). Otopine su propuhivane dušikom 30 min, a zatim su ozračene u fotokemijskom reaktoru Luzchem s 10 lampi na 300 nm tijekom 15 min. Tijek reakcije praćen je HPLC-om. Otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču te je dobiveno 35 mg smjese koja je nanescna na TLC ploču (silikagel, 1000 μm) u eluensu 10 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Izolirano je 9 mg (22 %) čistog fotoprodukta **37** u obliku ulja, te 8 mg početnog spoja **33**.

HPLC analiza provedena je pri sljedećim uvjetima:

Instrument: Shimadzu

Kolona: Phenomenex Luna 3u C18

Detektor: DAD

Protok: 0,8 mL/min

Injektirani volumen: 10 μL

Mobilna faza: gradijentna metoda

A: CH<sub>3</sub>OH

B: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (1:1) + 0,1 % CH<sub>3</sub>COOH

Tablica 2. Gradijentna metoda

t / min	0	10	20
% B	100	0	0

Diluent: CH<sub>3</sub>OH

Trajanje analize: 20 min

**Boc-Trp-Trp-Tyr[CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>]-OBn (37):**

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) δ/ppm: 8,01 (br. s., 1H), 7,93 (br. s., 1H), 7,66 (d, *J*= 8,5 Hz, 1H), 7,41-7,30 (m, 7H), 7,27 (d, *J*= 8,2 Hz, 1H), 7,22 (t, *J*= 7,5 Hz, 2H), 7,13 (t, *J*= 7,5 Hz, 2H), 6,92-6,86 (m, 1H), 6,82 (br.s., 1H), 6,63 (d, *J*= 8,0 Hz, 1H), 6,58 (d, *J*= 8,0 Hz, 1H), 6,43 (br. s., 1H), 6,22-6,16 (m, 1H), 5,14 (d, *J*= 12,6 Hz, 1H), 5,08 (d, *J*= 12,6 Hz, 1H), 4,70 (dd, *J*= 6,6, 13,8 Hz, 1H), 4,59 (dd, *J*= 6,4, 12,3 Hz, 1H), 4,43-4,33 (m, 3H), 3,42 (s, 3H), 3,37-3,29 (m, 1H), 3,16-3,10 (m, 1H), 3,07 (dd, *J*= 7,7, 14,8 Hz, 1H), 2,88 (dd, *J*= 5,8, 14,1 Hz, 1H), 2,88-2,76 (m, 1H), 2,73-2,67 (m, 1H), 1,33 (s, 9H);  
<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ/ppm: 171,6 (s), 171,1 (s), 170,7 (s), 155,1 (s), 136,4 (s), 136,1 (s), 130,4 (d), 129,3 (d), 128,80 (d, 2C), 128,77 (d, 2C), 128,7 (d), 127,4 (s), 127,2 (s), 123,5 (d), 123,4 (d), 122,6 (d), 122,3 (d), 122,2 (s), 120,0 (d), 119,8 (d), 119,3 (d), 118,7 (d), 116,6 (d), 111,4 (d), 111,3 (d), 110,6 (s), 109,8 (s), 73,8 (t), 67,3 (t), 58,6 (q), 55,2 (d), 53,8 (d), 53,5 (d), 36,9 (t), 28,2 (q, 3C), 27,30 (t), 27,29 (t), nisu uočena 3 singleta.

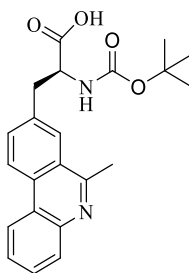
**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski *m/z* [M + Na]<sup>+</sup> za C<sub>45</sub>H<sub>49</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub> 810,3479, eksperimentalni *m/z* 810,3480.

### 3.5. Priprava dipeptida koji sadrže dvije neprirodne aminokiseline

#### 3.5.1. Opći propis uklanjanja metilne zaštite s derivata aminokiseline

Aminokiselina (50 mg, 0,13 mmol) je otopljena u smjesi dioksan/voda (3:1, v/v, 2 mL) te je dodana otopina NaOH (330 μL, 1M). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo je uklonjeno pri sniženom tlaku.

##### 3.5.1.1. Uklanjanje metilne zaštite s derivata aminokiseline koja sadrži fenantridin<sup>224</sup>



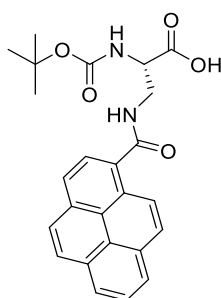
38



Priprava spoja **38** provedena je prema općem postupku za uklanjanje metilne zaštite opisanom u §3.5.1. iz fenantridinskog derivata (**38-Me**) (50 mg, 0,13 mmol) otopljenog u smjesi dioksan/voda (3:1, v/v, 2 mL) i dodana je otopina NaOH (330  $\mu$ L, 1M). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Sirova reakcijska smjesa nanescena je na preparativnu TLC ploču (SiO<sub>2</sub>, 1 mm) uz 25 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Izoliran je uljasti produkt **38** (30 mg, 62 %).

**Phen-OH (38):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)  $\delta$ /ppm: 8,60-8,38 (m, 2H), 8,04 (s, 1H), 7,89 (d,  $J= 8,0$  Hz, 1H), 7,74 (d,  $J= 6,0$  Hz, 1H), 7,62 (t,  $J= 7,0$  Hz, 1H), 7,53 (t,  $J= 7,0$  Hz, 1H), 4,53-4,29 (m, 1H), 3,49-3,36 (m, 1H), 3,20-3,05 (m, 1H), 2,92 (s, 3H), 1,29 (s, 9H).

3.5.1.2. Uklanjanje metilne zaštite s derivata aminokiseline koja sadrži piren

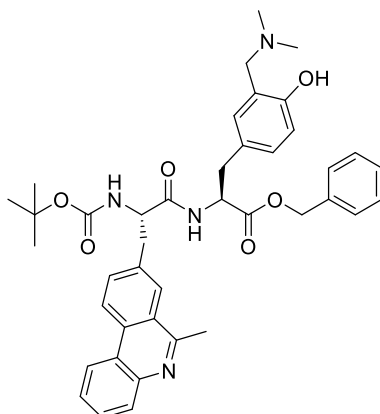


**39**

Priprava spoja **39** provedena je prema općem postupku za uklanjanje metilne zaštite opisanom u §3.5.1 iz pirenskog derivata (100 mg, 0,20 mmol) otopljen u dioksanu/vodi (3:1, v/v, 2 mL) i dodano je NaOH (0,5 mL, 1M). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo je uklonjeno pri sniženom tlaku. Dobiven je čisti produkt **39** (170 mg, 96 %).

**Boc-DAP(Pyr)-OH (39):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)  $\delta$ /ppm: 8,54 (d,  $J= 9,0$  Hz, 1H), 8,31-8,11 (m, 7H), 8,07 (dd,  $J= 5,5, 13,0$  Hz, 1H), 4,93-4,28 (m, 1H), 3,97 (dd,  $J= 4,5, 13,0$  Hz, 1H), 3,82 (dd,  $J= 8,0, 13,0$  Hz, 1H), 1,46 (s, 9H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz)  $\delta$ /ppm: 177,0 (s), 173,1 (s), 133,9 (s), 132,63 (s), 132,62 (s), 132,1 (s), 129,7 (s), 129,6 (d), 129,5 (d), 128,3 (d), 127,5 (d), 126,9 (d), 126,7 (d), 126,2 (d), 125,8 (d), 125,7 (s), 125,4 (d), 80,3 (s), 57,3 (d), 44,1 (t), 28,8 (q, 3C), nisu uočena 2 singleta.

3.5.2. Priprava dipeptida Boc-Phen-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**40**)<sup>225</sup>

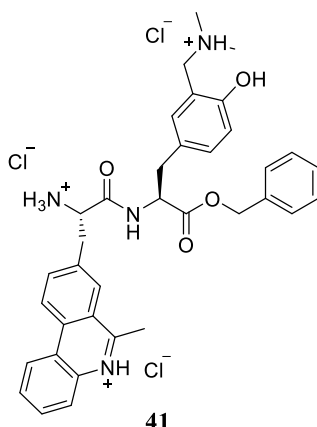
40

Priprava spoja **40** provedena je prema općem postupku za pripravu dipeptida opisanom u §3.3.6 iz reaktanta (Boc-Phen-OH (**38**), 2TFA×H-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**5**), HBTU i HOBT) koji su sušeni preko noći u eksikatoru uz P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Pod atmosferom dušika dodana je fenantridinska aminokiselina **38** (30 mg, 0,08 mmol), HBTU (30 mg, 0,08 mmol) i HOBT (10 mg, 0,08 mmol) otopljeni u suhom CH<sub>3</sub>CN, zatim je dodan TEA (40 μL, 0,32 mmol). Nakon 30 min miješanja, dokapana je TFA sol benzilnog estera neprirodne aminokiseline (**5**) (40 mg, 0,08 mmol) otopljena u suhom CH<sub>3</sub>CN. Otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču te je dobiven uljasti produkt koji je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz 20→100 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens, te je izolirano (11 mg, 20 %) čistog spoja **40**.

**Boc-Phen-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**40**):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) δ/ppm: 8,63 (t, *J*= 8,4 Hz, 2H), 8,11 (s, 1H), 8,00 (d, *J*= 7,8 Hz, 1H), 7,79 (dd, *J*= 1,5, 8,6 Hz, 1H), 7,71 (t, *J*= 7,4 Hz, 1H), 7,65 (dd, *J*= 8,4 Hz, 1H), 7,32-7,26 (m, 3H), 7,21-7,16 (m, 2H), 7,07-7,01 (m, 2H), 6,74 (d, *J*= 9,0 Hz, 1H), 4,95 (s, 2H), 4,68 (d, *J*= 7,0 Hz, 1H), 4,45 (dd, *J*= 5,8, 9,0 Hz, 1H), 3,98 (s, 2H), 3,28-3,22 (m, 1H), 3,08-3,01 (m, 1H), 3,01-2,96 (m, 3H), 2,93 (dd, *J*= 8,0, 14,0 Hz, 1H), 2,62 (s, 6H), 1,28 (s, 9H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) δ/ppm: 160,6 (s), 144,0 (s), 138,6 (s), 138,5 (s), 134,0 (d), 132,7 (s), 131,3 (d), 130,8 (d), 130,7 (d), 129,8 (d), 129,5 (d), 129,34 (d), 129,29 (d), 129,1 (d), 128,5 (d), 128,1 (s), 128,0 (d), 127,9 (d), 127,0 (s), 123,7 (d), 123,4 (d), 116,6 (d), 67,8 (t), 62,1 (t), 56,9 (d), 55,5 (d), 44,6 (q, 2C), 37,7 (t), 28,6 (q, 3C).

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski *m/z* [M+H]<sup>+</sup> za C<sub>41</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> 691,3496, eksperimentalni *m/z* 691,3483.

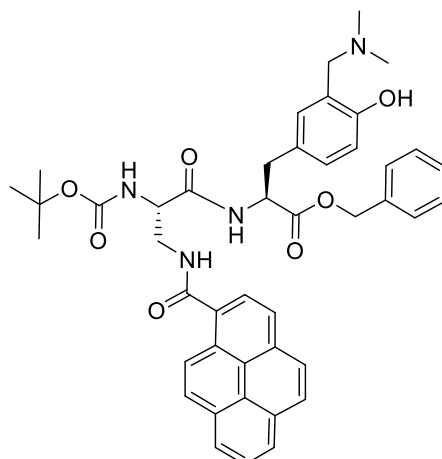
3.5.3. Priprava hidrokloridne soli dipeptida  $3\text{HCl}\times\text{H-Phen-Tyr}[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2]\text{-OBn}$  (**41**)<sup>225</sup>

Priprava spoja **41** provedena je prema općem postupku za pripravu hidrokloridnih soli opisanom u §3.4.10. iz dipeptida Boc-Phen-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**40**) (6 mg, 0,01 mmol) otopljenog u zasićenoj otopini HCl-a u EtOAc-u (1 mL). Dobiven je produkt **35** (7 mg, 99 %) u obliku ulja.

**3HCl×H-Phen-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**41**):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 9,10-8,86 (m, 2H), 8,76-8,59 (m, 1H), 8,24 (s, 2H), 8,02 (s, 2H), 7,41-7,05 (m, 7H), 6,88-6,74 (m, 1H), 5,08-4,91 (m, 2H), 4,75-4,64 (m, 1H), 4,35-4,16 (m, 2H), 3,76-3,43 (m, 2H), 3,20-2,93 (m, 2H), 2,81 (d, *J*= 9,0 Hz, 6H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) δ/ppm: 169,3 (s), 163,1 (s), 156,8 (s), 140,1 (s), 136,8 (s), 135,2 (s), 134,5 (d), 134,0 (d), 133,9 (d), 133,7 (d), 133,6 (d), 132,6 (d), 131,9 (d), 131,1 (d), 129,6 (d), 129,4 (d), 129,2 (d), 129,0 (s), 125,7 (s), 125,33 (d), 125,29 (d), 124,9 (d), 117,6 (s), 116,6 (d), 68,0 (t), 58,0 (t), 55,9 (d), 55,4 (d), 43,3 (q, 2C), 38,3 (t), 37,4 (t), nisu uočena 2 singleta.

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski *m/z* [M + H]<sup>+</sup> za C<sub>36</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> 591,2971, eksperimentalni *m/z* 591,2982.

**3.5.4. Priprava dipeptida Boc-Pyr-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (42)**

42

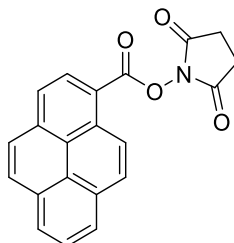
Priprava spoja **42** provedena je prema općem postupku za pripravu dipeptida opisanom u §3.3.6. iz reaktanta (Boc-DAP(Pyr)-OH (**39**), TFA×H-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**5**), HBTU i HOBT) koji su sušeni preko noći u eksikatoru uz SiO<sub>2</sub>. Pod atmosferom dušika dodani su spoj **39** (56 mg, 0,13 mmol), HBTU (49 mg, 0,13 mmol) i HOBT (20 mg, 0,13 mmol) otopljeni u suhom CH<sub>3</sub>CN, zatim je dodan i TEA (73 μL, 0,52 mmol). Nakon 20 min miješanja, dokapana je TFA sol benzilnog estera neprirodne aminokiseline (**5**) (72 mg, 0,13 mmol) otopljena u suhom CH<sub>3</sub>CN. Dobiveni uljasti produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz 0→20 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens, zatim tankoslojnom kromatografijom (SiO<sub>2</sub>, 500 μm) uz 10 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens, te je izolirano (10 mg, 10 %) čistog spoja **42**.

**Boc-Pyr-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (42):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 8,49 (dd, *J*= 3,0, 9,3 Hz, 1H), 8,27 (dd, *J*= 3,6, 7,8 Hz, 2H), 8,24-8,15 (m, 3H), 8,14 (b.s., 1H), 8,12-8,04 (m, 2H), 7,35-7,26 (m, 4H), 7,24-7,18 (m, 1H), 7,01 (d, *J*= 8,1 Hz, 2H), 6,71 (d, *J*= 8,1 Hz, 1H), 5,13 (d, *J*= 2,8 Hz, 1H), 5,05 (d, *J*= 2,8 Hz, 1H), 4,76-4,71 (m, 1H), 4,58-4,50 (m, 1H), 3,79 (d, *J*= 12,1 Hz, 2H), 3,70-3,53 (m, 2H), 3,16-3,06 (m, 1H), 3,05-2,93 (m, 1H), 2,46 (d, *J*= 9,0 Hz, 6H), 1,44 (s, 9H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) δ/ppm: 134,1 (s), 132,6 (s), 132,1 (s), 129,8 (d), 129,7 (d), 129,6 (d), 129,59 (d), 129,56 (d), 129,39 (d), 129,38 (d), 128,2 (d), 127,6 (d), 127,0 (d, 2C), 126,8 (d), 126,2 (d), 125,54 (d), 125,50 (d), 125,4 (d), 116,7 (d), 80,9 (s), 68,1 (t), 55,5 (d), 54,8 (d), 44,1 (q, 2C), 43,1 (t), 37,5 (t), 28,8 (q, 3C), nije uočeno 12 singleta.

### 3.6. Priprava dipeptida koji sadrže pirenkarboksilnu kiselinu i modificirani tirozin

#### 3.6.1. Priprava sukcinimidnog estera pirenkarboksilne kiseline (43)



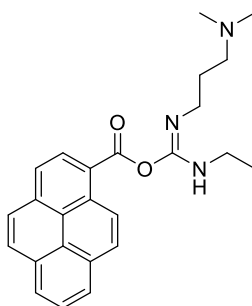
43

Priprava spoja **43** provedena je prema općem postupku za pripravu sukcinimidnog estera opisanom u §3.3.1. iz pirenkarboksilne kiseline, Pyr-OH (320 mg, 1,3 mmol), EDC (283 mg, 1,43 mmol) i NHS (166 mg, 1,3 mmol) otopljenih u suhom CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL), te je reakcijska smjesa miješana pod atmosferom dušika 3 h uz hlađenje preko ledene kupelji a zatim na sobnoj temperaturi do sljedećeg dana. Smjesa je prebačena u lijevak za ekstrakciju i prana vodenom otopinom Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (30 mL), H<sub>2</sub>O (30 mL), HCl (30 mL) i H<sub>2</sub>O (30 mL). Organski sloj sušen je bezvodnim MgSO<sub>4</sub>, profiltriran, a otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Dobiveno je 330 mg (74 %) produkta **43** u obliku fluorescentno žute krutine.

**Pyr-OSu (43):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 9,09 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 8,80 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 8,39 (t, *J* = 7,8 Hz, 3H), 8,35 (dd, *J* = 1,5, 6,2 Hz, 2H), 8,23 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 8,17 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 3,00 (s, 4H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) δ/ppm: 172,2 (s, 2C), 164,3 (s), 132,4 (s), 132,0 (s, 2C), 131,70 (d), 131,67 (s), 129,7 (d), 128,4 (d), 128,22 (d), 128,18 (d), 128,1 (d), 125,5 (d), 124,9 (d), 26,7 (t) (nije uočeno 5 singleta);

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski *m/z* [M]<sup>+</sup> za C<sub>21</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub> 343,0845, eksperimentalni *m/z* 343,0830.

**3.6.1.1. Nusprodukt priprave sukcinimidnog estera pirenkarboksilne kiseline (43)**

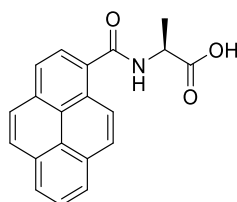
44

Priprava spoja **43** provedena je prema općem postupku za pripravu sukcinimidnog estera opisanom u §3.3.1. iz pirenkarboksilne kiseline, Pyr-OH (350 mg, 1,4 mmol) i EDC (295 mg, 1,54 mmol) otopljenih su u suhom CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL), te je reakcijska smjesa miješana pod atmosferom dušika, nakon pola sata dodan je NHS (177 mg, 1,54 mmol) i smjesa je miješana 3 h uz hlađenje preko ledene kupelji a zatim na sobnoj temperaturi do sljedećeg dana. Nakon obrade reakcije, otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču, a produkti su pročišćeni kromatografijom na stupcu silikagela uz 5 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Izolirano je 50 mg Pyr-OSu (**43**) (10 %) i 180 mg Pyr-EDC (**44**) (32 %).

**Pyr-EDC (44):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 8,31 (dd, *J* = 4,5, 7,5 Hz, 3H), 8,27-8,16 (m, 3H), 8,14-8,11 (m, 1H), 8,11-8,05 (m, 2H), 3,76 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,28-3,20 (m, 2H), 2,76 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 2,55 (s, 6H), 1,95-1,83 (m, 2H), 1,0 3,76 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) δ/ppm: 175,2 (s), 156,7 (s), 133,8 (s), 132,6 (s), 132,0 (s), 131,7 (s), 130,5 (d), 130,0 (d), 128,5 (s), 128,2 (d), 127,9 (d), 127,5 (d), 127,2 (d), 125,7 (d), 125,6 (s), 125,4 (s), 124,8 (d), 124,4 (d), 56,6 (t), 44,7 (t), 43,8 (q, 2C), 36,5 (t), 26,4 (t), 14,7(q);

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski *m/z* [M]<sup>+</sup> za C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 401,2103, eksperimentalni *m/z* 401,2104.

**3.6.2. Priprava pirenskog derivata piren-1-karbonil-L-alanin (45)**

45

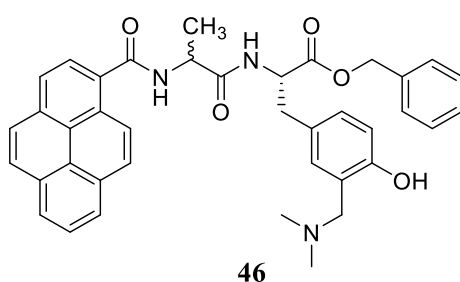
L-Alanin (114 mg, 1,28 mmol) otopljen je u suhom DMF-u (10 mL) i dodan je  $\text{KHCO}_3$  (128 mg, 1,28 mmol) te je nakon 15 min dokapan Pyr-OSu (**43**) (400 mg, 1,16 mmol) otopljen u suhom DMF-u (5 mL). Reakcijska smjesa miješana je 5 dana na sobnoj temperaturi. DMF je uklonjen na rotacijskom uparivaču, a zaostala smjesa otopljena u EtOAc (30 mL) i prana HCl (0,5 M, 30 mL),  $\text{H}_2\text{O}$  (30 mL),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,5 M, 30 mL) i  $\text{H}_2\text{O}$  (30 mL). Organski sloj sušen je bezvodnim  $\text{MgSO}_4$  i profiltriran, a otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Čisti produkt **45** (305 mg, 83 %) dobiven je pročišćavanjem kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela uz 10→20 %  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  kao eluens.

**Pyr-Ala-OH (45):**  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 8,56 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H), 8,27-8,18 (m, 3H), 8,17-8,11 (m, 3H), 8,11-8,00 (m, 2H), 4,68 (dd,  $J = 7,3, 14,6$  Hz, 1H), 1,58 (d,  $J = 7,1$  Hz, 3H);

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 179,5 (s), 172,5 (s), 133,9 (d), 132,5 (d), 132,3 (s), 132,2 (d), 132,06 (d), 132,00 (s), 130,5 (s), 130,0 (s), 129,68 (d), 129,66 (d), 129,61 (s), 129,5 (d), 128,2 (d), 128,1 (s), 127,9 (s), 127,53 (d), 127,47 (s), 127,18 (s), 126,9 (d), 126,8 (s), 126,7 (d), 126,1 (d), 125,7 (s), 125,7 (d), 125,5 (d), 125,4 (d), 125,3 (s), 125,2 (s), 124,9 (s), 124,3 (s), 51,7 (d), 18,2 (q);

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski  $m/z$   $[\text{M}]^+$  za  $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{NO}_3$  317,1052, eksperimentalni  $m/z$  317,1050.

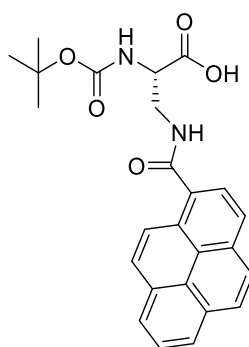
### 3.6.3. Priprava dipeptida piren-alanin-modificirani tirozin (Pyr)-Ala-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ](**46**)



Priprava spoja **46** provedena je prema općem postupku za pripravu dipeptida opisanom u §3.3.6. iz Pyr-Ala-OH (**45**) (240 mg, 0,75 mmol) otopljenog u suhom DMF-u (10 mL) pod strujom dušika, te su dokapane otopine HBTU (284 mg, 0,75 mmol) i HOBt (101 mg, 0,75 mmol) u DMF-u (5 mL). Zatim je dodan TEA (380  $\mu\text{L}$ , 2,72 mmol). Nakon pola sata miješanja dodan je  $2\text{TFA}\times\text{H-Tyr}[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2]\text{-OBn}$  (**5**) (380 mg, 0,68 mmol) te je reakcijska smjesa miješana 2 dana na sobnoj temperaturi. DMF je uklonjen na rotacijskom uparivaču, a ostatak otopljen u

EtOAc (30 mL). Smjesa je prebačena u lijevak za ekstrakciju i prana 0,5M HCl (30 mL) i zasićenom vodenom otopinom NaCl (30 mL). Organski sloj je sušen bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i profiltriran, a otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Produkt **46** (28 mg, 6 %) je dobiven pročišćavanjem kromatografijom na stupcu aluminijevog oksida (akt. III-IV) uz 5 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens, a zatim rekromatografijom na stupcu silikagela uz 1→10 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Dobivene su smjese diastereomernih produkata.

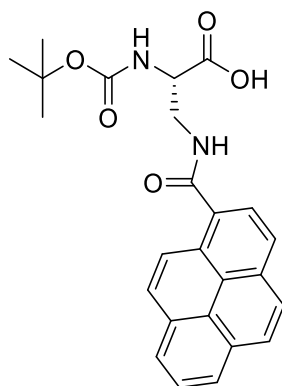
#### 3.6.4. Priprava pirenskog derivata (*Boc-DAP(Pyr)-OH*) (**39**) bez izolacije sukcinimidnog estera

**39**

Pirenkarboksilna kiselina (Pyr-OH) (300 mg, 1,2 mmol) je otopljena u suhom DMF-u pod strujom dušika i dodani su EDC (253 mg, 1,32 mmol) i NHS (152 mg, 1,32 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 3 h uz hlađenje preko ledene kupelji. Zatim su dodani *N*<sub>α</sub>-Boc-L-2,3-diaminopropionskom kiselinom (Boc-DAP-OH) (245 mg, 1,2 mmol) i KHCO<sub>3</sub> (240 mg, 2,4 mmol) i reakcijska smjesa je miješana 3 dana na sobnoj temperaturi. DMF je uklonjen na rotacijskom uparivaču, a produkt je otopljen u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) te opran 0,5 M HCl (30 mL) i zasićenom otopinom NaCl (30 mL). Organski sloj je sušen bezvodnim MgSO<sub>4</sub>, profiltriran te je otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Čisti produkt **39** (160 mg, 41%) je dobiven pročišćavanjem kromatografijom na stupcu silikagela uz 5→10 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, a zatim prekrizacijom ili tankoslojnom kromatografijom (2000 μm, silikagel) uz 20 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens.



### 3.6.5. Priprava pirenskog derivata (Boc-DAP(Pyr)-OH) (39)

**39**

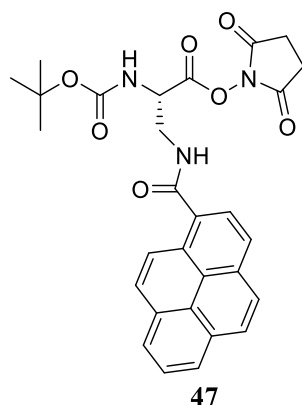
Boc-DAP-OH (190 mg, 0,93 mmol) je otopljen u suhom DMF-u (10 mL) i dodan je  $\text{KHCO}_3$  (186 mg, 1,86 mmol). Reakcijska smjesa miješana je pod dušikom, te je nakon 15 min dokapan Pyr-OSu (**43**) (320 mg, 0,93 mmol) otopljen u suhom DMF-u (5 mL). Reakcijska smjesa miješana je 3 dana na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je profiltrirana, a talog je ispran EtOAc. Otapalo iz filtrata uklonjeno je na rotacijskom uparivaču. Dobiven je čisti uljasti produkt **39** u kvantitativnom iskorištenju (400 mg).

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 8,54 (d,  $J = 9,1$  Hz, 1H), 8,26 (d,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 8,23-8,15 (m, 4H), 8,12 (d,  $J = 9,1$  Hz, 1H), 8,06 (t,  $J = 7,8$  Hz, 1H), 4,34 (dd,  $J = 4,8, 7,2$  Hz, 1H), 3,97 (dd,  $J = 4,8, 12,7$  Hz, 1H), 3,83 (dd,  $J = 7,8, 13,9$  Hz, 1H), 1,46 (s, 9H);

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 133,9, 132,6, 132,1, 129,6, 129,5, 128,3, 127,5, 126,8, 126,7, 126,2, 125,7, 125,4, 80,3, 57,3, 44,1, 28,8, (nije uočeno 7 signala);

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski  $m/z$   $[\text{M}]^+$  za  $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$  432,1685, eksperimentalni  $m/z$  432,1700.

### 3.6.6. Priprava sukcinimidnog estera Boc-DAP(Pyr)-OH (47)

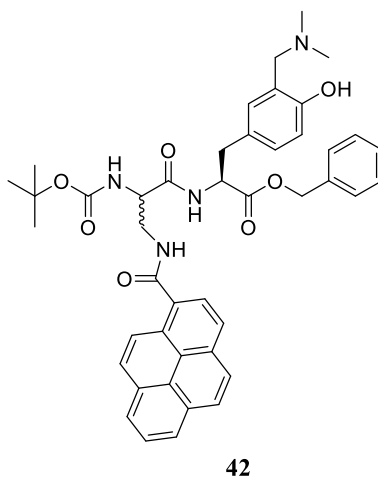


Boc-DAP(Pyr)-OH (**39**) (80 mg, 0,18 mol) je otopljen u suhom DMF-u pod dušikom, te su dodani EDC (39 mg, 0,20 mmol) i NHS (21 mg, 0,18 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 3 h uz hlađenje preko ledene kupelji a zatim preko noći na sobnoj temperaturi. DMF je uklonjen na rotacijskom uparivaču, a uljasti produkt **47** (32 mg, 34 %) je dobiven pročišćavanjem kromatografijom na stupcu silikagela uz 5 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens.

**Boc-DAP(Pyr)-OSu (47):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) δ/ppm: 8,44 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 8,23 (d, *J* = 7,6 Hz, 3H), 8,18-8,10 (m, 4H), 8,09-8,01 (m, 4H), 4,59 (t, *J* = 6,5 Hz, 1H), 3,94-3,86 (m, 2H), 3,82 (s, 4H), 1,46 (s, 9H);

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) δ/ppm: 173,4, 172,9, 172,4, 164,8, 157,9, 133,9, 132,5, 132,03, 132,00, 129,7, 129,6, 129,5, 128,2, 127,5, 126,9, 126,8, 126,0, 125,7, 125,4, 125,3, 80,9, 53,0, 42,3, 28,7 (q, 3C).

### 3.6.7. Pokušaji priprave dipeptida (Boc-DAP(Pyr)-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn) (42)



**Metoda A:** Priprema spoja **42** provedena je prema općem postupku za pripremu dipeptida opisanom u §3.3.6. iz Boc-DAP(Pyr)-OH (**39**) (160 mg, 0,37 mmol) otopljenog u suhom DMF-u (10 mL) pod strujom dušika, te su dokapane otopine HBTU (140 mg, 0,37 mmol) i HOBt (49 mg, 0,37 mmol) u DMF-u (5 mL). Zatim je dodan TEA (189  $\mu$ L, 1,36 mmol). Nakon pola sata miješanja dodan je 2TFA $\times$ H-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**5**) (189 mg, 0,34 mmol) te je reakcijska smjesa miješana 4 dana na sobnoj temperaturi pod strujom dušika. Otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču, a ostatak otopljen u EtOAc (30 mL). Smjesa je prana zasićenom otopinom NaCl (30 mL). Organski sloj je sušen na Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, profiltriran te je otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Dobiveno je 410 mg sirovog produkta **42** koji je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz 2 $\rightarrow$ 10 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Napravljeno je 5 kromatografija te su dobivene dijastereomerne smjese produkta – cca 50 mg (20 %).

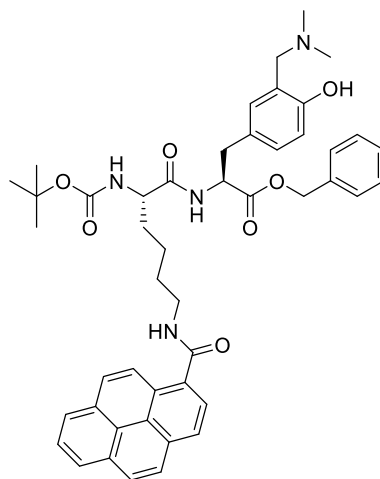
**Boc-DAP(Pyr)-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**42**):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)  $\delta$ /ppm: 8,47 (dd,  $J = 2,6, 9,2$  Hz, 1H), 8,24 (dd,  $J = 4,3, 7,3$  Hz, 2H), 8,20-8,12 (m, 3H), 8,11-8,01 (m, 2H), 7,35-7,23 (m, 4H), 7,22-7,17 (m, 1H), 7,01-6,95 (m, 1H), 6,94-6,90 (m, 1H), 6,67 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H), 5,11 (d,  $J = 3,2$  Hz, 1H), 5,03 (d,  $J = 2,8$  Hz, 1H), 4,74 (t,  $J = 7,0$  Hz, 1H), 4,60-4,50 (m, 1H), 3,86-3,73 (m, 1H), 3,69 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 3,64-3,55 (m, 1H), 3,15-3,04 (m, 1H), 3,03-2,93 (m, 1H), 2,37 (d,  $J = 6,6$  Hz, 6H), 1,44 (s, 9H).

**Metoda B:** Boc-DAP(Pyr)-OH (**39**) (110 mg, 0,25 mmol), benzotriazol-1-il-oksi-trispirolidino-fosfonij heksafluorofosfat, PyBOP (166 mg, 0,37 mmol), *N*-metilmorfolin, NMM (82  $\mu$ L, 0,75 mmol) i katalitička količina 4-dimetilaminopiridin, DMAP (3 mg, 0,02 mmol) su otopljeni u DMF-u (9 mL) i miješani pod dušikom 30 min na sobnoj temperaturi. Zatim su dodani TFA $\times$ H-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**5**) (140 mg, 0,25 mmol) i NMM (20  $\mu$ L) otopljeni u DMF-u (2 mL). Reakcijska smjesa miješana je 3 dana. Otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču, a ostatak pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz 5 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens, a zatim je polovica smjese čišćena tankoslojnom kromatografijom (silikagel, 1 mm, 10 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) te je izolirano 20 mg (11 %) smjese dijastereomera (prema HPLC-u i NMR-u).

**Metoda C:** TFA $\times$ H-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**5**) (84 mg, 0,15 mmol) otopljen je u DMF-u (2 mL), a zatim je dodan KHCO<sub>3</sub> (30 mg, 0,30 mmol). Reakcijska smjesa miješana je pola sata na

sobnoj temperaturi a zatim je dokapan Boc-DAP(Pyr)-OSu (**47**) (80 mg, 0,15 mmol) otopljen u DMF-u (3 mL). Reakcijska smjesa miješana je 5 dana na sobnoj temperaturi. Otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Kromatografijom na stupcu silikagela uz 1→5 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens nije dobiven očekivani spoj.

### 3.6.8. Priprava dipeptida (Boc-Lys(Pyr)-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn)<sup>226</sup>



**49**

Priprava spoja **49** provedena je prema općem postupku za pripravu dipeptida opisanom u §3.3.6. iz Boc-Lys(Pyr)-OH (270 mg, 0,60 mmol) otopljenog u suhom DMF-u (10 mL) pod strujom dušika, te su dodani HBTU (270 mg, 0,71 mmol) i HOBT (95 mg, 0,68 mmol) otopljeni u DMF-u (5 mL). Zatim je dodan TEA (836 μL, 6,00 mmol). Nakon pola sata miješanja dodan je 2TFA×H-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**5**) (600 mg, 1,08 mmol) te je reakcijska smjesa miješana 2 dana na sobnoj temperaturi pod strujom dušika. DMF je uklonjen na rotacijskom uparivaču, a ostatak otopljen u EtOAc (30 mL). Smjesa je prana zasićenom otopinom NaCl (30 mL). Organski sloj je sušen bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i profiltriran, a otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Sirov produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz 0→5 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Dobiven je produkt **49** (150 mg, 32%) u obliku pjenaste bezbojne krutine.

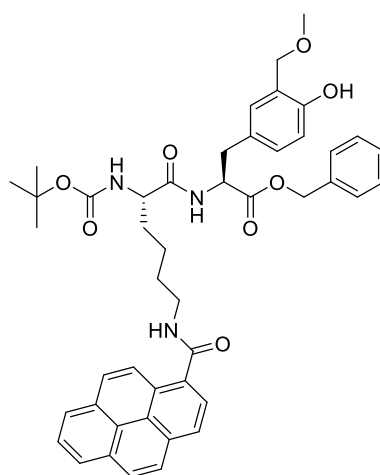
**Boc-Lys(Pyr)-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**49**):** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) δ/ppm: 8,45 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 8,26 (dd, *J* = 3,5, 7,6 Hz, 2H), 8,21 (dd, *J* = 7,8, 14,9 Hz, 2H), 8,16 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 8,11-8,09 (m, 2H), 8,06 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,29-7,26 (m, 3H), 7,15-7,12 (m, 2H), 6,92 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 6,88 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 6,65 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 4,92 (d, *J* = 12,0

Hz, 1H), 4,91 (d,  $J = 12,0$  Hz, 1H), 4,65 (t,  $J = 7,4$  Hz, 1H), 4,07 (t,  $J = 6,8$  Hz, 1H), 3,67 (s, 2H), 3,58-3,48 (m, 2H), 3,00 (dd,  $J = 6,8, 14,8$  Hz, 1H), 2,92 (dd,  $J = 8,5, 15,4$  Hz, 1H), 2,37 (s, 6H), 1,77-1,69 (m, 3H), 1,68-1,61 (m, 1H), 1,56-1,47 (m, 2H), 1,39 (s, 9H);

$^{13}\text{C}$  NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz)  $\delta$ /ppm: 175,0, 173,3, 172,9, 172,7, 157,7, 157,3, 136,8, 133,8, 132,8, 132,6, 132,1, 132,03, 132,0, 131,7, 131,6, 129,7, 129,62, 129,58, 129,50, 129,3, 128,7, 128,5, 128,2, 128,0, 127,6, 127,0, 126,8, 126,0, 125,8, 125,6, 125,5, 125,4, 121,5, 116,5, 80,6, 67,9, 65,2, 61,1, 61,07, 55,4, 55,2, 44,23, 44,20, 40,82, 40,80, 37,6, 33,2, 33,1, 30,14, 30,12, 28,7 (3C);

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  za C<sub>47</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 785,3914, eksperimentalni  $m/z$  785,3907.

### 3.6.9. Preparativna fotometanoliza dipeptida Boc-Lys(Pyr)-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**49**)<sup>226</sup>



**50**

U 4 kvarcne epruvete pripremljene su istovrsne otopine dipeptida Boc-Lys(Pyr)-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**49**) (7 mg, 0,009 mmol) u CH<sub>3</sub>OH (15 mL). Otopine su propuhivane dušikom 30 min, a zatim su ozračene u fotokemijskom reaktoru Luzchem s 8 lampi (8×8 W) na 300 nm ukupno 60 min. Tijek fotometanolize praćen je HPLC-om. Otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču te je dobiveno 24 mg smjese koja je pročišćena kromatografijom na stupcu silikagela uz 10 % CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Izolirano je 9,3 mg (34 %) čistog fotoproducta **50**, te 4 mg početnog spoja **49**.

HPLC analiza provedena je pri sljedećim uvjetima:

Instrument: Shimadzu

Kolona: Phenomenex Luna 3u C18

Detektor: DAD

Protok: 0,8 mL/min

Injektirani volumen: 10  $\mu$ L

Mobilna faza: gradijentna metoda

A: CH<sub>3</sub>OH

B: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (1:1) + 0,1 % CH<sub>3</sub>COOH

Tablica 3. Gradijentna metoda

t / min	0	10	20
% B	100	0	0

Diluent: CH<sub>3</sub>OH

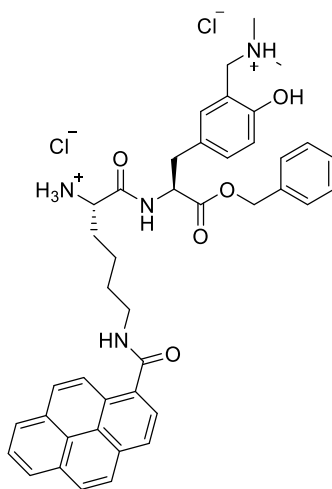
Trajanje analize: 20 min

**<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 8,44 (d,  $J$  = 9,1 Hz, 1H), 8,27 (d,  $J$  = 7,7 Hz, 2H), 8,21 (dd,  $J$  = 8,0, 14,9 Hz, 2H), 8,15 (d,  $J$  = 9,1 Hz, 1H), 8,08 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 2H), 8,06 (t,  $J$  = 7,5 Hz, 1H), 7,27 (dd,  $J$  = 1,6, 4,7 Hz, 3H), 7,15-7,12 (m, 2H), 7,02 (s, 1H), 6,86 (d,  $J$  = 8,1 Hz, 1H), 6,65 (d,  $J$  = 8,1 Hz, 1H), 4,93 (d,  $J$  = 12,1 Hz, 1H), 4,89 (d,  $J$  = 12,1 Hz, 1H), 4,65 (t,  $J$  = 7,5 Hz, 1H), 4,40 (s, 2H), 4,09-4,05 (m, 1H), 3,57-3,50 (m, 2H), 3,32 (s, 3H), 3,02-2,91 (m, 2H), 1,77-1,68 (m, 3H), 1,67-1,59 (m, 1H), 1,55-1,46 (m, 2H), 1,39 (s, 9H);

**<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 174,9, 172,9, 172,8, 157,7, 155,7, 136,8, 133,8, 132,8, 132,6, 132,1, 131,6, 130,8, 129,65, 129,62, 129,59, 129,50, 129,32, 129,27, 128,2, 127,6, 127,0, 126,8, 126,0, 125,8, 125,6, 125,5, 125,4, 116,2, 80,6, 70,9, 67,9, 58,4, 55,8, 55,4, 40,8, 37,7, 33,2, 30,2, 28,7 (3C), 24,3;

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski  $m/z$  [M + Na]<sup>+</sup> za C<sub>46</sub>H<sub>49</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>+Na<sup>+</sup> 794,3417, eksperimentalni  $m/z$  794,3435.

### 3.6.10. Uklanjanje Boc- zaštitne skupine s dipeptida Boc-Lys(Pyr)-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (49)



51

Priprava spoja **51** provedena je prema općem postupku za pripravu hidrokloridnih soli opisanom u §3.4.10. iz Boc-Lys(Pyr)-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**49**) (18 mg, 0,023 mmol) otopljenog u HCl/EtOAc (2 mL), te je reakcijska smjesa miješana 2h na sobnoj temperaturi. Otapalo uklonjeno pri sniženom tlaku, a produkt otopljen u EtOAc. Dodatkom etera dolazi do taloženja produkta **51** (99 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ/ppm: 8,45 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 8,32-8,00 (m, 8H), 7,35-7,12 (m, 5H), 7,08-6,95 (m, 2H), 6,81-6,72 (m, 1H), 4,77-4,62 (m, 3H), 4,16 (s, 2H), 4,06-3,93 (m, 1H), 3,56 (s, 2H), 3,01 (s, 2H), 2,74 (s, 6H), 2,02-1,90 (m, 2H), 1,76 (s, 1H), 1,61 (s, 2H);

**HRMS (MALDI-TOF)** teorijski *m/z* [M<sup>2+</sup>-H<sup>+</sup>]<sup>+</sup> za 685,3390, eksperimentalni *m/z* 685,3359.

### 3.7. Određivanje kvantnih prinosa za reakcije preparativnih fotometanoliza

Kvantni prinosi reakcije fotometanolize određeni su u N<sub>2</sub>-propuhanim otopinama CH<sub>3</sub>OH kojima je izmjerena apsorbancija pri 254 nm i koja je u rasponu 0,4-0,8. Uz otopine spojeva, istovremeno je ozračivana i otopina aktinometra (KI/KIO<sub>3</sub>, Φ<sub>254</sub> = 0,74)<sup>227</sup> u kivetu za snimanje UV-vis spektara s optičkim putem *l* = 1 cm i uz jednak volumen svih ozračenih otopina. Ozračivanje je provedeno u Luzchem reaktoru s jednom Hg-lampom na 254 nm. Sve kivete su tijekom ozračivanja postavljene na jednakoj udaljenosti od izvora zračenja, kako bi se osiguralo da jednak fotonski tok dolazi iz izvora do svakog uzorka/aktinometra. Na taj način je ozračenost svih otopina bila jednaka (ozračenost je množina fotona koja pada na jedinicu površine).

Kvantni prinos fotokemijske reakcije definiran je s izrazom (1):

$$\Phi = \frac{n(\text{produkta})}{n(\text{apsorbiranih fotona})} \quad (1)$$

Konverzija za aktinometar je određena UV-vis spektroskopijom.

Bit mjerenja je odrediti brojnik i nazivnik u izrazu (1). Brojnik (množina nastalog fotoprodukta) se dobiva iz mjerenja konverzije početnog spoja u fotoprodukt (HPLC analizom), a nazivnik (množina apsorbiranih fotona) iz konverzije aktinometra i transmitancije otopine spoja.

Broj apsorbiranih (tj. ukupni broj) fotona za KI/KIO<sub>3</sub> aktinometar<sup>227</sup> određen je iz:

$$n(\text{apsorbiranih fotona}) \approx n(\text{ukupnofotona}) = \frac{\Delta A_{352} \times V_{\text{ozr}}}{\epsilon_{352} \times l \times \Phi_{\text{lit}}} \quad (2)$$

gdje su:

$\Delta A_{352}$  – razlika u apsorbanciji pri 352 nm za ozračeni i neozračeni uzorak aktinometra

$V_{\text{ozr}}$  – volumen otopine koji je ozračen

$\epsilon_{352}$  – molarni apsorpcijski koeficijent za trijodid, I<sub>3</sub><sup>-</sup>, u otopini koja sadrži smjesu jodida (I<sup>-</sup>) i jodata (IO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Iznosi 27600 mol<sup>-1</sup>dm<sup>3</sup>cm<sup>-1</sup>

$l$  – duljina optičkog puta (1 cm u svim eksperimentima)

$\Phi_{\text{lit}}$  – kvantni prinos aktinometra, poznat iz literature,  $\Phi_{254} = 0,74$ .<sup>227</sup> Kako ovisi o koncentraciji jodidnih iona i temperaturi ( $\vartheta$  / °C), uz korekcije upotrebom izraza:

$$c(\text{I}^-) = A_{300} / 1,061 \text{ [mol dm}^{-3}\text{]}$$

$$\Phi = 0,75 \times [1 + 0,02(\vartheta - 20,7)] \times [1 + 0,23(c(\text{I}^-) - 0,577)]$$

HPLC analiza provedena je pri sljedećim uvjetima:

Instrument: Varian Pro Star

Kolona: Agilent XDB 4,6×50 mm (1,8 μm)

Detektor: UV (254 nm)

Protok: 0,8 mL/min

Injektirani volumen: 2,5 μL



Mobilna faza: 25 % A, 75 % C

A: H<sub>2</sub>O + 0,5 % CH<sub>3</sub>COOH

B: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (1:1)

C: CH<sub>3</sub>OH

Diluent: CH<sub>3</sub>OH

Trajanje analize: 20 min

### 3.8. Fotofizička svojstva spojeva

Snimljeni su fluorescencijski spektri tripeptida **31-33** u CH<sub>3</sub>CN, te njihovih HCl-soli **34-36** u 10 % CH<sub>3</sub>CN/kakodilatni pufer ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7,0). Pripremljenim otopinama spojeva su snimani apsorpcijski spektri tako da apsorpcija na valnoj duljini pobuđivanja bude manja od 0,1. Fluorescencijski spektri su snimani na spektrofotometru Cary Eclipse (Agilent Technologies) pri temperaturi 25 °C korištenjem iste ulazne i izlazne širine pukotine (5 nm). Emisijski spektri su snimani u rasponu od 300 do 450 nm pri valnoj duljini pobude,  $\lambda_{\text{exc}} = 270, 280$  ili 290 nm. Mjerenja su provedena pri sobnoj temperaturi, 25 °C. Fluorescencijski spektri su korigirani s obzirom na propusnost optike.

#### 3.8.1. Kvantni prinos fluorescencije tripeptida

Kvantni prinosi fluorescencije zaštićenih tripeptida **31-33** su određeni u CH<sub>3</sub>CN, dok su kvantni prinosi odgovarajućih HCl-soli određeni **34-36** u 10 % CH<sub>3</sub>CN/kakodilatni pufer ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7,0). Otopina NATA u mQ H<sub>2</sub>O korištena je kao standard ( $\Phi_F = 0,14$ ).<sup>228</sup>

Otopine spojeva pripremljene su tako da im apsorpcija pri valnim duljinama pobude bude manja od 0,1, a zatim su propuhivane argonom 30 min. Otopina standarda je pripremljena tako da mu apsorpcija pri valnoj duljini bude približno 0,03. Propuhanim otopinama su snimljeni apsorpcijski, a zatim emisijski spektri pri 25 °C. Emisijski spektri su snimljeni uz valnu duljinu pobude  $\lambda_{\text{ex}} = 270, 280$  i 290 nm, a širina ulazne i izlazne pukotine je 5 nm. Svi spektri su korigirani obzirom na odgovarajuće otapalo te obzirom na propusnost optike.

Kvantni prinosi fluorescencije su izračunati prema jednadžbi:

$$\Phi = \Phi_R \left( \frac{n}{n_R} \right)^2 \frac{I}{I_R} \frac{A_R}{A}$$

$\Phi$  – kvantni prinos fluorescencije spoja

$\Phi_R$  – kvantni prinos fluorescencije standarda  
 $n$  – indeks loma otapala u kojemu je otopljen spoj  
 $n_R$  – indeks loma otapala u kojemu je otopljen standard;  
 $A$  – apsorbancija spoja pri valnoj duljini pobude  
 $A_R$  – apsorbancija standarda pri valnoj duljini pobude  
 $I$  – površina ispod fluorescencijske krivulje spoja  
 $I_R$  – površina ispod fluorescencijske krivulje standarda.

### 3.9. Ispitivanje interakcija oligopeptida s polinukleotidima

#### 3.9.1. Priprema polinukleotida

Otopine polinukleotida poli A-poli U, poli (dAdT)<sub>2</sub>, poli (dG dC), poli (dGdC)<sub>2</sub> i *ct*-DNA su pripremljene otapanjem u kakodilatnom puferu (pH = 7,0,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Otopina *ct*-DNA je dodatno sonificirana te profiltrirana kroz filter (veličina pora = 0,45  $\mu\text{m}$ ) kako bi se ujednačila duljina lanaca.<sup>229</sup> Koncentracija otopina polinukleotida određena je spektrofotometrijski kao koncentracija fosfata.<sup>230</sup>

#### 3.9.2. Određivanje promjene temperature „mekšanja“ ( $\Delta T_m$ ) polinukleotida

Eksperimenti temperaturnog mekšanja polinukleotida, spoja i kompleksa spoj/polinukleotid određeni su spektrofotometrijski korištenjem UV-vis spektrofotometra Cary 100 Bio (Agilent Varian). Praćene su promjene apsorbancije pri 260 nm u temperaturnom području od 25 °C do 98 °C u koracima od 0,5 °C korištenjem kvarcne kivete optičkog puta 1 cm.<sup>231</sup>

Temperature mekšanja,  $T_m$ , određene su derivacijom u točki infleksije krivulje ovisnosti promjene apsorbancije o promjeni temperature.<sup>232</sup>

Vrijednosti  $\Delta T_m$  su izračunate kao razlika  $T_m$  vrijednosti kompleksa ispitivanih spojeva s polinukleotidima i vrijednosti  $T_m$  određenih za čiste polinukleotide. Izračunate vrijednosti  $\Delta T_m$  su srednje vrijednosti najmanje dva paralelna mjerenja. Pogreška mjerenja je  $\Delta T_m \pm 0,5 \text{ °C}$ .

$$\Delta T_m = T_m (\text{kompleks}) - T_m (\text{dvolančani polinukleotid})$$

Pripremljene su otopine spojeva **34** i **35** u mQ H<sub>2</sub>O ( $c = 1,46 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> i  $c = 1,85 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>), kao i stock otopine polinukleotida ( $c(ct\text{-DNA}) = 2,6 \times 10^{-2}$  mol dm<sup>-3</sup> u kakodilatnom puferu (pH = 7,0,  $c = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>).

Pripremljena je otopina spoja **36** u mQ H<sub>2</sub>O ( $c = 1,74 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>), zatim stock otopine polinukleotida ( $c(ct\text{-DNA}) = 1,6 \times 10^{-2}$  mol dm<sup>-3</sup> u kakodilatnom puferu (pH = 7,0,  $c = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>). Za mjerenje, priređena otopina polinukleotida u kivetu je razrijeđena kakodilatnim puferom ( $c(\text{polinukleotida}) = 3 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) dok je spoj dodan u omjeru (spoj/polinukleotid),  $r = 0,3$ . Pripremljene su 2 istovrsne serije otopina pri čemu je jedna od njih osvjetljena (Luzchem fotokemijski reaktor, 8 lampi,  $\lambda = 300$  nm, 3 minute), a druga nije.

Pripremljene su otopine spoja **41** u mQ H<sub>2</sub>O ( $c = 1,0 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> ili  $1,43 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>) i stock otopine polinukleotida u kakodilatnom puferu (pH = 7,0,  $c = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>) koje su bile korištene za mjerenja:  $c(ct\text{-DNA}) = 1,46 \times 10^{-2}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $c(\text{poli A} - \text{poli U}) = 5,0 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> i  $c(\text{poli (dAdT)}_2) = 1,68 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>.

Za mjerenje, priređena otopina polinukleotida u kivetu je razrijeđena kakodilatnim puferom ( $c(\text{polinukleotida}) = 3 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) dok je spoj dodan u omjeru (spoj/polinukleotid),  $r = 0,3$ . Za polinukleotide, *ct*-DNA i  $c(\text{poli (dAdT)}_2)$  pripremljene su 2 istovrsne serije otopina pri čemu je jedna od njih ozračena (Luzchem fotokemijski reaktor, 8 lampi,  $\lambda = 300$  nm, 3 minute), a druga nije.

### 3.9.3. Spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD)

Spektri cirkularnog dikroizma snimljeni su na spektropolarimetru Jasco J-815, u kvarcnim kivetama optičkog puta 1 cm pri 25 °C. Otopine polinukleotida su pripremljene u kakodilatnom puferu (pH = 7,0,  $c = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>). Titracije su provedene tako da je u otopinu polinukleotida ( $c = 3 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) dodavana otopina spoja ( $c \sim 1 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>) u rasponu molarnih omjera  $r[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,1 - 0,7$ . CD spektri su snimljeni u rasponu valnih duljina od 220 nm do 600 nm, brzina snimanja 200 nm/min i broj akumulacija je 2.

### 3.9.4. Fluorescencijske titracije

Fluorescencijski spektri su snimani na spektrofotometru Cary Eclipse (Agilent Technologies) korištenjem kvarcne kivete (3,0 mL) optičkog puta 1 cm pri temperaturi 25 °C. Fluorescencijske titracije spojeva **34-36** su provedene tako da je u otopinu spoja u malim alikvotima dodavana otopina polinukleotida. Otopine spojeva **34-36** pripremljene su tako da je koncentracija spoja u kivetu  $c = 3,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> ili  $2,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>, a koncentracija polinukleotida  $c = 1,2 \times 10^{-6}$ - $6,7 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> ili  $3,8 \times 10^{-6}$ - $2,9 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>. Vrijeme inkubacije nakon svakog dodatka alikvota polinukleotida je 2 min. Za pobudu je korištena valna duljina,  $\lambda_{\text{ex}} = 295$  ili 310 nm, a emisija je snimana od 300 do 600 nm. Za fluorescencijske titracije s polinukleotidima: *ct*-DNA, poli A – poli U, poli (dAdT)<sub>2</sub>, poli (dGdC)<sub>2</sub> korištena je širina ekscitacijske pukotine 10 nm, a emisijske pukotine 20 nm. Fluorescencijske titracije spojeva **34-36** s polinukleotidima proveo je dr. sc. Igor Sviben.

Fluorescencijske titracije spoja **41** su provedene s polinukleotidima poli A – poli U, poli (dAdT)<sub>2</sub>, poli (dG dC), poli (dGdC)<sub>2</sub> i *ct*-DNA na pH 5,0 i 7,0, jer je pri pH 5,0 fenantridinski derivat protoniran dok pri pH 7,0 nije protoniran te se očekivalo da će to utjecati na njegovu interakciju s polinukleotidima. Koncentracija spoja u kivetu je  $c = 2,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>, a otopina polinukleotida koja je dodavana spoju je koncentracije  $c = 5,0 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>. Vrijeme inkubacije nakon svakog dodatka alikvota polinukleotida je 2 min. Za pobudu je korištena valna duljina,  $\lambda_{\text{ex}} = 330$  nm, a emisijski spektri snimani su od 350 do 600 nm. Za fluorescencijsku titraciju s *ct*-DNA i poli A – poli U je korištena širina ekscitacijske pukotine 10 nm, a emisijske pukotine 20 nm, dok je kod titracije s poli (dAdT)<sub>2</sub>, poli (dG dC) i poli (dGdC)<sub>2</sub> širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm.

Konstante stabilnosti (*K*s) izračunate su nelinearnom regresijom prema Scatchardovoj jednačini.<sup>233</sup> Za sva mjerenja, korelacijski faktor između eksperimentalnih i izračunanih vrijednosti bio je veći od 0,99.

## 3.10. Laserska pulsna fotoliza (LFP)

Mjerenja laserske pulsne fotolize (eng. *laser flash photolysis*, LFP) spoja **5** proveo je dr.sc. Nikola Basarić na University of Victoria. Instrument se sastoji od Quanta-Ray Lab 130-4 pulsno Nd:YAG lasera emisije pri 266 nm. Energija pulsa je <20 mJ, a trajanje pulsa 10 ns. U

mjerenjima su korištene kivete dimenzija  $7 \times 7$  mm. Otopine su prije mjerenja propuhane s  $N_2$  ili  $O_2$  kroz 30 min. Apsorbancije pri 266 nm su bile oko 0,3-0,4.

Mjerenja laserske pulsne fotolize (eng. *laser flash photolysis*, LFP) spojeva **34-36** proveo je dr. sc. Nikola Basarić na Institutu Ruđer Bošković. Instrument se sastoji od LP980 Edinburgh Instruments spektrometra i Q450 Quantel YAG lasera emisije pri 266 nm. Energija pulsa je 20 mJ, a trajanje pulsa 7 ns. Apsorbancije pri 266 nm su bile oko 0,3-0,4. Otopine su prije mjerenja propuhane s  $N_2$  ili  $O_2$  kroz 20 min.

### 3.11. Kovalentno vezanje oligopeptida na oligonukleotide

#### 3.11.1. Priprema oligonukleotida

Eksperimenti pripreme oligonukleotida su provedeni na UV-vis spektrofotometru Cary 100 Bio (Agilent Varian) korištenjem kvarcnih kiveta (1 mL) optičkog puta 1 cm. U kvarcnu kivetu od 1 mL dodano je 250  $\mu$ L otopine oligonukleotida dG<sub>12</sub> ( $c = 1 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>) u amonijevom acetatnom puferu (0,1 mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7,0) i 250  $\mu$ L otopine oligonukleotida dC<sub>12</sub> ( $c = 1 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>) u amonijevom acetatnom puferu (0,1 mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7,0). Pripremljene smjese su zagrijane do 95 °C, a zatim ohlađene na 10 °C.

U kvarcnu kivetu od 1 mL dodano je 180  $\mu$ L otopine oligonukleotida dA<sub>10</sub> ( $c = 1 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>) u amonijevom acetatnom puferu (0,1 mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7,0) i 180  $\mu$ L otopine oligonukleotida dT<sub>10</sub> ( $c = 1 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>) u amonijevom acetatnom puferu (0,1 mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7,0). Pripremljene smjese su zagrijane do 95 °C, a zatim ohlađene na 10 °C.

Pripremljenim oligonukleotidima određene su temperature mekšanja i snimljeni su spektri cirkularnog dikroizma.

Za eksperimente temperaturnog mekšanja oligonukleotida praćene su promjene apsorbancije pri 260 nm u temperaturnom području od 25 °C do 95 °C u koracima od 0,5 °C korištenjem kvarcne kivete optičkog puta 1 cm. Za mjerenje, koncentracija otopina oligonukleotida (G-C ili A-T) u kiveti je razrjeđena amonij acetatnim puferom (0,1 mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7,0) ( $c(\text{oligonukleotida}) = 2 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>). Pripremljene su dvije istovrsne otopine.

Spektri cirkularnog dikroizma snimljeni su na spektropolarimetru Jasco J-815, u kvarcnim kivetama optičkog puta 1 cm pri 25 °C. Otopine oligonukleotida su pripremljene u amonijevom acetatnom puferu (0,1 mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7,0). Titracije su provedene tako da je u amonijev acetatni

pufer ( $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) dodana otopina oligonukleotida ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ). CD spektri su snimljeni u rasponu valnih duljina od 220 nm do 400 nm, brzina snimanja 200 nm/min i broj akumulacija je 2.

### 3.11.2. Fotokemijsko ozračivanje oligonukleotida i tripeptida 36

U kvarcnu kivetu od 1 mL dodano je 40  $\mu\text{L}$  otopine oligonukleotida G-C u amonijevom acetatnom puferu ( $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) te je otopina razrijeđena sa 60  $\mu\text{L}$  amonijevog acetatnog pufera. Pripremljena smjesa ozračena je u Luzchem fotokemijskom reaktoru s 8 lampi od 300 nm u vremenu od 15 i 60 min. Tijek reakcije je praćen HPLC-om.

U kvarcnu kivetu od 1 mL dodano je 50  $\mu\text{L}$  otopine spoja **36** u DMSO te je otopina razrijeđena s 150  $\mu\text{L}$  amonijevog acetatnog pufera ( $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ). Pripremljena smjesa je ozračena u Luzchem fotokemijskom reaktoru s 8 lampi od 300 nm u vremenu od 15 i 60 min. Tijek reakcije je praćen HPLC-om.

U kvarcnoj kiveti od 1 mL pomiješano je 390  $\mu\text{L}$  otopine oligonukleotida G-C ( $c=3 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) u amonijevom acetatnom puferu ( $0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) i 100  $\mu\text{L}$  otopine spoja **36** u DMSO. Pripremljena smjesa je ozračena u Luzchem fotokemijskom reaktoru s 8 lampi od 300 nm u vremenu od 15 i 60 min. Tijek reakcije je praćen HPLC-om.

HPLC analiza provedena je pri sljedećim uvjetima:

Instrument: Shimadzu

Kolona: Agilent XPS (5  $\mu\text{m}$ ) 300 A

Protok: 0,5 mL/min

Mobilna faza:

A:  $\text{NH}_4\text{Ac}$

B:  $\text{CH}_3\text{CN}$

Tablica 4. Gradijentna metoda

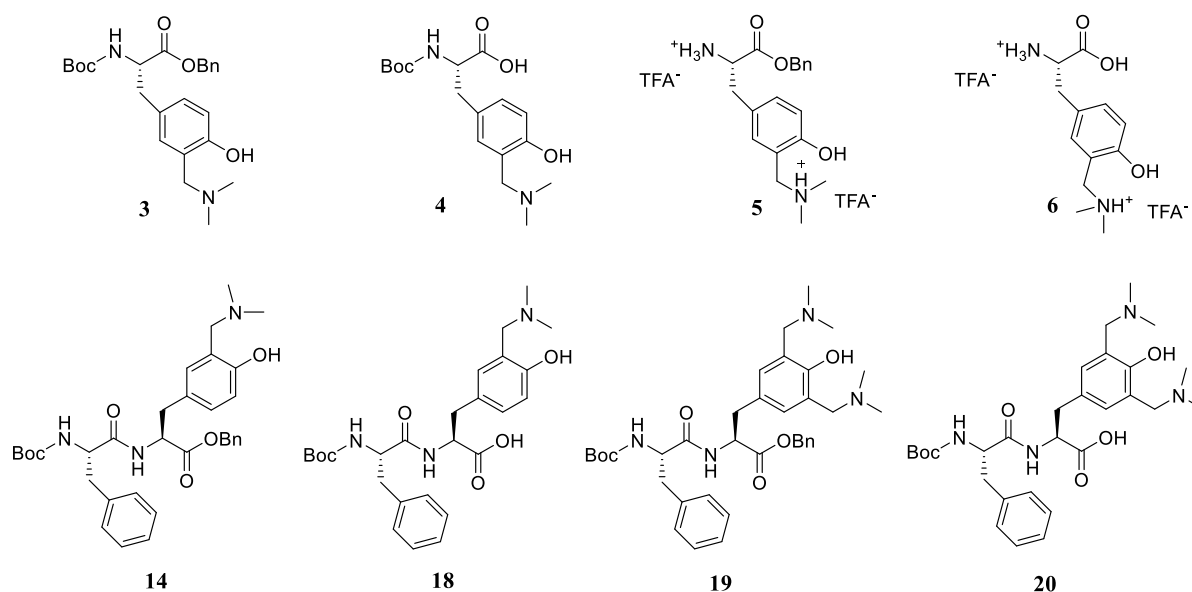
t / min	5	15	20	25	32	40
% B	5	40	100	100	5	5

Diluent:  $\text{NH}_4\text{Ac}$

Trajanje analize: 40 min

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

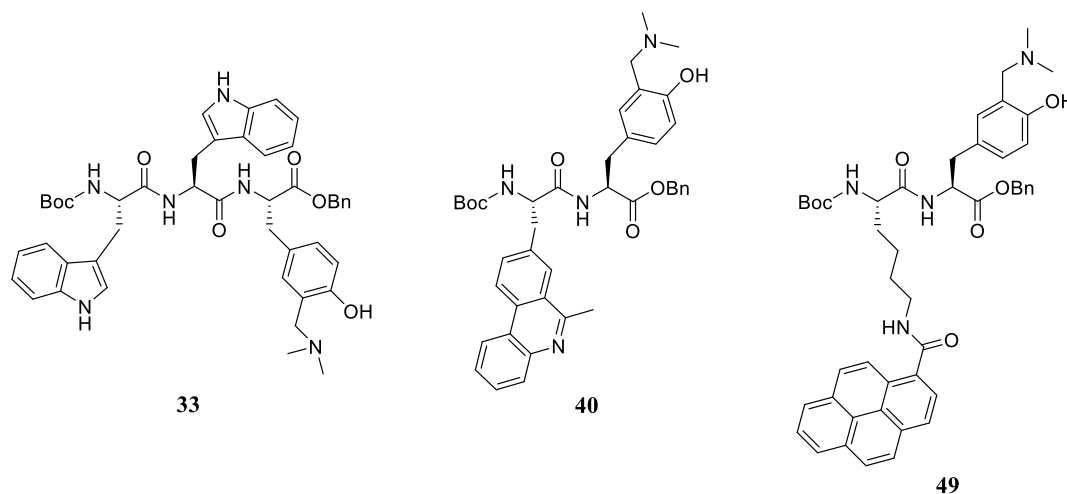
U okviru doktorske disertacije pripravljena je neprirodna aminokiselina, *N,N*-dimetilaminometilni derivat tirozina koji je fotokemijski reaktivan te u reakciji fotodeaminacije stvara reaktivne intermedijere kinon-metide (QM).<sup>214</sup> U ranijim istraživanjima u Laboratoriju za sintetsku organsku kemiju, Instituta Ruđer Bošković, pokazano je da se reakcijom fotodeaminacije iz aminmetilnih derivata fenola generiraju kinon-metidi.<sup>12,190</sup> Novopripremljenoj neprirodnoj aminokiselini **3** uklonjene su zaštitne skupine na C- i N- kraju **4-6** kako bi se mogla koristiti u peptidnim reakcijama spajanja, a ispitana je i fotokemijska reaktivnost derivata tirozina **3-6**. Novopripremljena neprirodna aminokiselina **3** uspješno je ugrađena u dipeptide **14**, **18-20** koji sadrže fenilalanin, te je ispitana fotokemijska reaktivnost i fotofizička svojstva navedenih spojeva (slika 47).



Slika 47. Neprirodna aminokiselina **3** i njeni derivati s uklonjenim zaštitnim skupinama te dipeptidi koji sadrže neprirodnu aminokiselinu **3**

S obzirom da je ugradnjom u dipeptide novopripremljena neprirodna aminokiselina zadržala svoju fotokemijsku reaktivnost, pripremljeni su i tripeptidi **31-33** koji sadrže ditriptofanski fragment i neku od sljedećih aminokiselina: fenilalanin, tirozin ili *N,N*-dimetilaminometilni derivat tirozina. U okviru istraživanja, pripravljani su i dipeptidi **40** i **49** (slika 48) koji sadrže

dvije neprirodne aminokiseline gdje je jedna od njih derivat tirozina dok druga u bočnom ogranku sadrži fenantridin ili piren za koje je poznato da stupaju u interakcije s DNA ili RNA.<sup>147,234</sup>



Slika 48. Struktura tripeptida **33** te dipeptida **40** i **49**

Novopripremljenim oligopeptidima ispitana je fotokemijska reaktivnost. Provedena su ozračivanja peptida u metanolnim otopinama, a nastajanje metilnih etera, produkta fotometanolize indirektno je potvrdilo postojanje QM kao intermedijera. Reakcijama fotometanolize određeni su i kvantni prinosi reakcija. Za primjenu oligopeptida u dijagnostici, te za ispitivanje nekovalentnih interakcija s polinukleotidima bilo je važno istražiti i fotofizička svojstva novih molekula za što su korištene UV-vis te stacionarna i vremenski razlučena fluorescencijska spektroskopija.

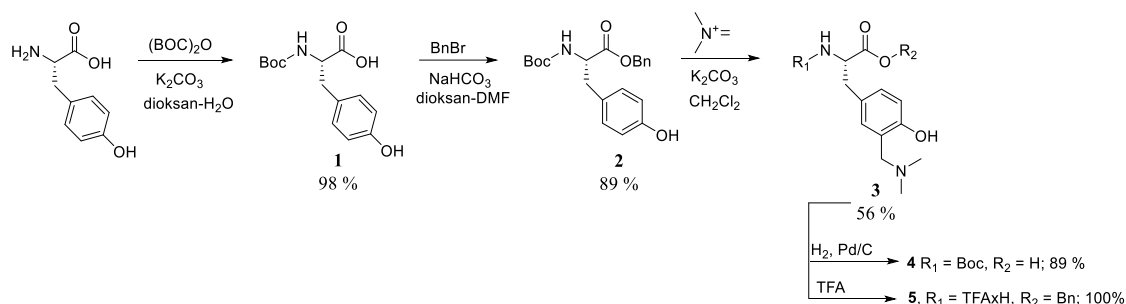
Ispitivanje nekovalentnog vezanja oligopeptida na polinukletide provedeno je korištenjem spektroskopskih metoda. Fluorescencijskim titracijama peptida s polinukleotidima određene su konstante vezanja na polinukleotide, a eksperimentalni podaci obrađeni su metodama nelinearne regresije upotrebom Scatchardovog modela te McGhee i von Hippelovog pojednostavljenja.<sup>233</sup> Kako bi se odredio način vezanja peptidnih molekula na polinukleotide, korištena je spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD). S obzirom da su polinukleotidi kiralne molekule, nastajanje kompleksa s peptidima (također kiralne molekule) interkaliranjem ili vezanjem peptida u utore znatno utječe na CD spektre, a oblici promjena govore o načinu vezanja. Eksperimenti temperaturnog mekšanja polinukleotida, spoja i kompleksa spoj/polinukleotid provedeni su spektrofotometrijski, prateći promjene apsorbancije u ovisnosti o temperaturi. Kao modelni polinukleotidi korišteni su dvolančana DNA: *ct*-DNA (*calf thymus*,



izolirana iz timusne žlijezde teleta), dvolančani homopolinukleotidi: poli A – poli U i poli (dGdC), te alternirajući polinukleotidi: poli (dAdT)<sub>2</sub> i poli (dGdC)<sub>2</sub>.

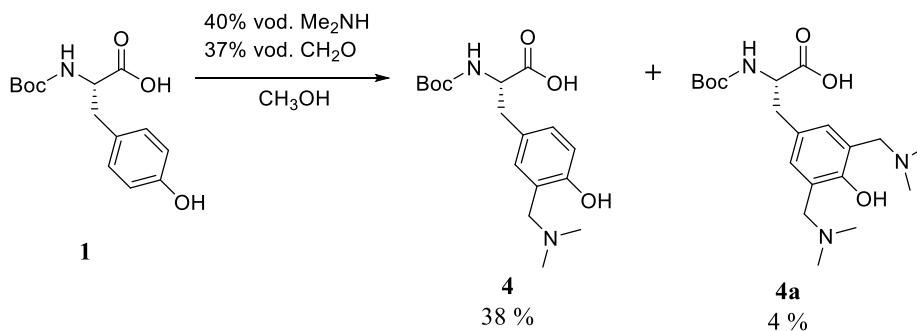
#### 4.1. *N,N*-dimetilaminometilni derivati tirozina (3-6) i dipeptidi koji sadrže *N,N*-dimetilaminometilni derivat tirozina (14, 18-20)

##### 4.1.1. Priprava *N,N*-dimetilaminometilnih derivata tirozina (3-6) i dipeptida koji sadrže *N,N*-dimetilaminometilni derivat tirozina (14, 18-20)<sup>214</sup>



Shema 13. Priprava neprirodne aminokiseline, derivata tirozina Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (**3**)

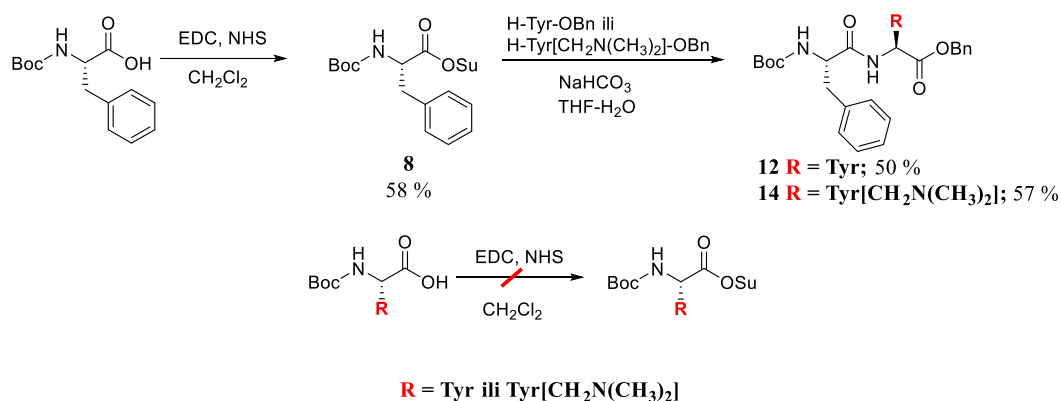
Prva ciljna molekula u okviru disertacije, neprirodna aminokiselina, derivat tirozina Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (**3**), dobivena je u tri koraka. U prvom stupnju je na N-kraj L-tirozina uvedena Boc- zaštitna skupina u baznim uvjetima, dok je u drugom stupnju uvedena benzilna zaštita na karboksilnu skupinu. Ključni korak je Mannichova reakcija s Eschenmoserovom soli na potpuno zaštićenoj aminokiselini **2** kojom se selektivno uvodi elektrofil u *ortho*-položaj do fenolne skupine. Kako bi se neprirodna aminokiselina **3** mogla koristiti dalje u sintezi bilo je neophodno ukloniti zaštitne skupine na N- ili C-kraju, što je provedeno uz TFA, odnosno katalitičkim hidrogeniranjem u visokim iskorištenjima (shema 13).



Shema 14. Priprava Boc-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OH (**4**)

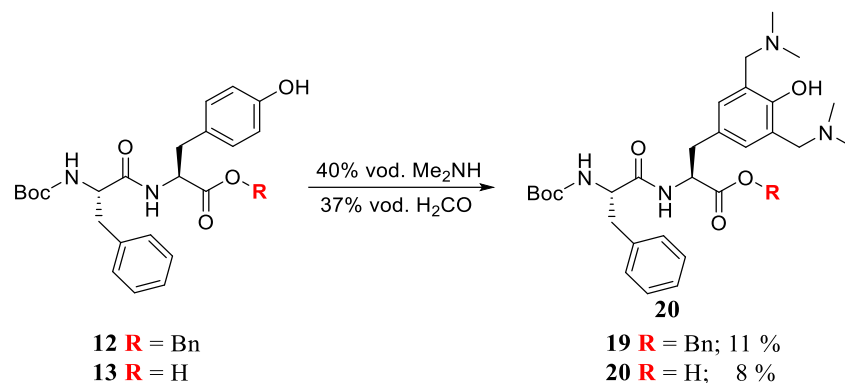
Osim što je, Boc-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OH (**4**) dobiven hidrogeniranjem iz spoja **3** u 89 %-tnom iskorištenju, pripremljen je i iz **1** reakcijom dimetilamina i formaldehida *in situ*, ali kao nusprodukt dobiven je derivat koji sadrži dvije dimetilaminometilne skupine **4a** u iskorištenju od 4 % (shema 14).

Nadalje, ideja je bila novopripremljenu neprirodnu aminokiselinu ugraditi u dipeptide na C- ili N-kraj. Strategija pripreme dipeptida tijekom istraživanja temeljila se na sintezi peptida u otopini uz aktivaciju karboksilne skupine prevođenjem u sukcinimidni ester,<sup>216</sup> kako je prikazano na shemi 15. Sukcinimidni ester pripremljen je uz EDC kao aktivacijski reagens.<sup>214,216</sup> Uspješno je provedena sinteza dipeptida u kojoj je *N,N*-dimetilaminometilni derivat tirozina **3** vezan na N-kraj. Međutim, reakcija aktivacije karboksilne skupine *N,N*-dimetilaminometilnog derivata tirozina kao i samog tirozina uz EDC kao aktivacijski reagens nije uspješno provedena. Pokušana je priprava dipeptida u drugim reakcijskim uvjetima, uz upotrebu jačih aktivacijskih reagensa HBTU i DIPEA,<sup>219</sup> ali ni u ovom slučaju nije uspješno pripremljen navedeni dipeptid. Pretpostavljeno je da karboksilna skupina nije aktivirana zbog fenolne OH skupine tirozina, stoga bi u daljnoj sintezi trebalo pokušati zaštititi fenolnu OH skupinu te zatim pokušati aktivirati karboksilnu skupinu. Taj način bi nam omogućio pripremu dipeptida koji imaju neprirodnu aminokiselinu, derivat tirozina, vezan na C-kraj.



Shema 15. Priprava dipeptida **12** i **14**

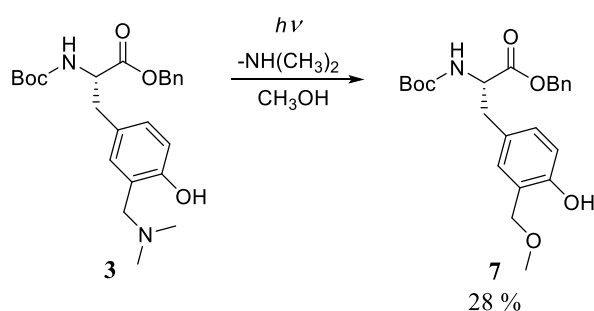
Pripremljenim dipeptidima Boc-Phe-Tyr-OH i Boc-Phe-Tyr-OBn uspješno su uvedene dvije *N,N*-dimetilaminometilne skupine u baznim uvjetima u nešto nižim iskorištenjima (shema 16). Dipeptidi koji sadrže dvije dimetilaminometilne skupine su zanimljivi jer se očekuje da će moći križno spajati lance DNA nakon fotokemijske aktivacije.



Shema 16. Uvođenje dimetilaminometilne skupine na dipeptide **12** i **13**

#### 4.1.2. Istraživanje fotokemijske reaktivnosti spojeva 3-6, 14, 18-20

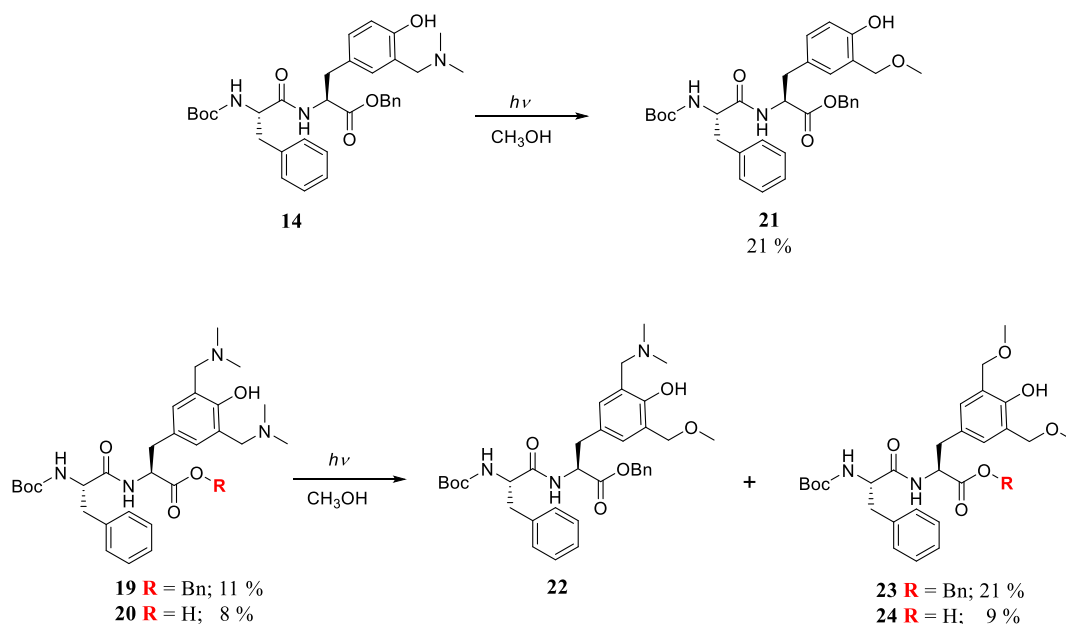
Poznato je da derivati fenola u fotokemijskim reakcijama reagiraju stvarajući reaktivne intermedijere kinon-metide, koji potom reagiraju s  $\text{CH}_3\text{OH}$  dajući etere.<sup>12,183,185,194</sup> Kako bi se ispitala fotokemijska reaktivnost modificirane aminokiseline, provedene su preparativne fotometanolize, a radi lakše izolacije fotokemijskih produkata, odabran je derivat koji je zaštićen na C- i N- kraju. Boc-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]-OBn (**3**) otopljen u  $\text{CH}_3\text{OH}$  ozračivan je na 300 nm i tijekom reakcije je praćen HPLC-om. Nakon 45 minuta, postignuta je konverzija od 44 %, a fotoprodukt **7** je dobiven u iskorištenju od 28 %.



Shema 17. Preparativna fotometanoliza spoja **3** u  $\text{CH}_3\text{OH}$ .

Provedena je također preparativna fotometanoliza dipeptida **14** koji sadrži neprirodnu aminokiselinu, a ima zaštitne skupine na C- i N-kraju zbog lakše izolacije produkata. Tako je ozračivanjem Boc-Phe-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]-OBn (**14**) nakon 30 minuta postignuta konverzija od 63 %, a fotoprodukt je izoliran u 21 %-tnom iskorištenju. Preparativne fotometanolize dipeptida koji sadrži dvije reaktivne *N,N*-dimetilaminometilne skupine također su uspješno provedene te

su izolirani konačni dieterski produkti. Ozračivanjem dipeptida Boc-Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>-OBn (**19**) tijekom 45 minuta u Rayonet fotokemijskom reaktoru s 11 lampi pri 300 nm postignuta konverzija od 68 %, dok je dimetoksi fotoprodukt izoliran u iskorištenju od 21 %. Dipeptid, Boc-Phe-Tyr([CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)]-OH (**20**) koji ima slobodnu karboksilnu skupinu ozračivan je 75 min, postignuta je 40 %-tna konverzija i uspješno je izoliran dimetoksi fotoprodukt u iskorištenju od 5 %. Preparativne fotometanolize dipeptide **14**, **19** i **20** prikazane su na shemi 18.



Shema 18. Preparativna fotometanoliza dipeptida **14**, **19** i **20**

Nastajanje metilnih etera u reakcijama fotometanolize iz modificiranog tirozina i peptida s ugrađenim modificiranim tirozinom sugeriraju da su QM reaktivni intermedijeri u njihovim fotokemijskim reakcijama.

#### 4.1.3. Kvantni prinosi za reakciju fotometanolize spojeva (3-5, 14, 18 i 20)

Kako bi se mogla uspoređivati fotokemijska reaktivnost različitih spojeva određeni su kvantni prinosi za reakciju fotometanolize.<sup>214</sup> Za određivanje kvantnih prinosa fotometanolize spojeva **3-5**, **14**, **18** i **20** u CH<sub>3</sub>OH korišteni su primarni aktinometar KI/KIO<sub>3</sub> ( $\Phi_{254} = 0,74$ )<sup>227</sup> i sekundarni aktinometar 2-hidroksibenzilni alkohol koji reagira u fotokemijskoj reakciji metanolize ( $\Phi_{254} = 0,23$ ).<sup>183</sup> Ozračivanje otopina provedeno je uz monokromatski izvor svjetlosti pri 254 nm, a fotokemijske reakcijske smjese analizirane su HPLC-om te su dobiveni

podaci o konverziji. Kvantni prinosi prikazani su u tablici 5. i izračunati su kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

Tablica 5. Kvantni prinosi fotometanolize ( $\Phi_R$ ) u  $\text{CH}_3\text{OH}$ <sup>a</sup>

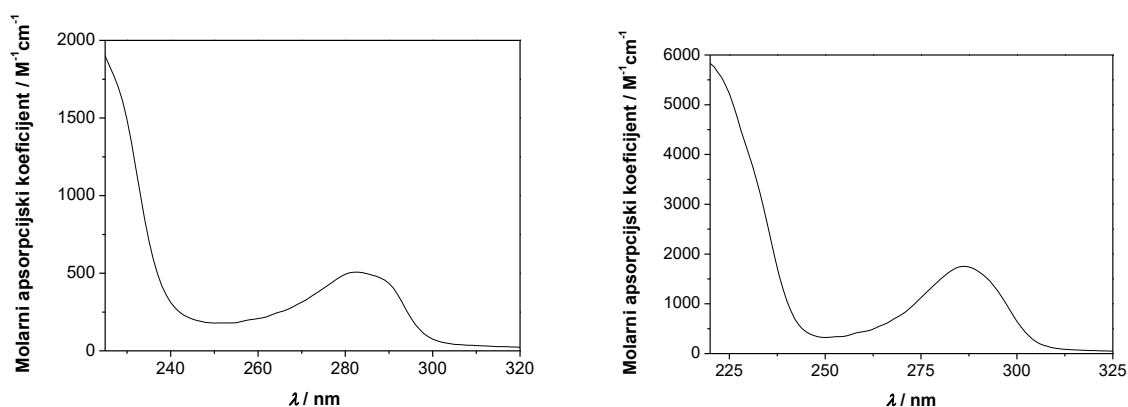
Spoj	$\Phi_R$
<b>3</b>	0,17 ± 0,04
<b>4</b>	0,17 ± 0,03
<b>5</b>	0,23 ± 0,04
<b>14</b>	0,28 ± 0,04
<b>18</b>	0,32 ± 0,05
<b>20</b>	0,07 ± 0,02

<sup>a</sup>Izračunate vrijednosti kvantnih prinosa su srednje vrijednosti dvaju mjerenja, a navedena greška predstavlja maksimalno standardno odstupanje. Za određivanje kvantnih prinosa fotometanolize korišteni su primarni aktinometar KI/KIO<sub>3</sub> ( $\Phi_{254} = 0,74$ )<sup>227</sup> i sekundarni aktinometar 2-hidroksibenzilni alkohol ( $\Phi_{254} = 0,23$ )<sup>183</sup>

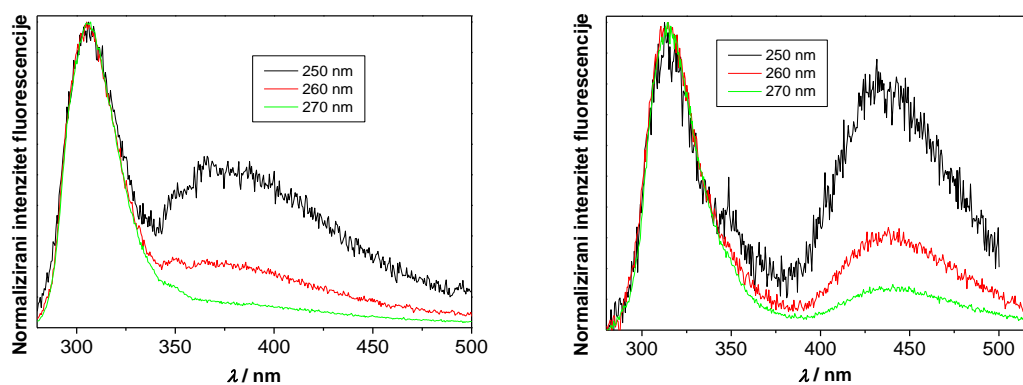
Kvantni prinosi za spojeve **3-5** su sličnih vrijednosti te je pokazano da zaštitne skupine ne utječu na fotoreaktivnost. Također, modificirani derivat tirozina (**3**) ugradnjom u dipeptide zadržava svoju fotokemijsku reaktivnost.

#### 4.1.4. Fotofizička svojstva spojeva 14 i 20

Apsorpcijski spektri dipeptida **14** i **20** su snimljeni u  $\text{CH}_3\text{CN}$  te se vidi maksimum apsorpcije na ~ 280 nm koji odgovara apsorpciji tirozina. Zanimljivo je bilo ispitati fotofizička svojstva dipeptida (Tablica 6.) jer sadrže dva kromofora: fenilalanin i modificirani tirozin. U emisijskim spektrima u  $\text{CH}_3\text{CN}$  dipeptid **14** ima maksimum na 305-315 nm i rame na 370 nm, dok dipeptid **20** ima isti maksimum, a rame na 430 nm. Dualna fluorescencija (pojava dodatne vrpce u obliku ramena) odgovara emisiji fenola i fenolata, a asignacija se temelji na usporedbi s literaturno poznatim spektrima.<sup>12</sup> (slike 49 i 50)



Slika 49. Apsorpcijski spektar spoja **14** (lijevo) i spoja **20** (desno) u  $\text{CH}_3\text{CN}$ .



Slika 50. Normalizirani emisijski spektri spoja **14** (lijevo) i spoja **20** (desno) u  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

U ranijim istraživanjima *N,N*-dimetilaminometilnih derivata fenola, pokazano je da ukoliko se fenolna OH skupina i dušik dimetilaminometilne skupine nalaze u neposrednoj blizini može doći do intramolekulskog prijenosa protona (engl. *excited state intramolecular proton transfer*, ESIPT), što se u fluorescencijskim spektrima opaža kao emisija fenolata.<sup>12</sup> Kvantni prinosi fluorescencije dipeptida općenito imaju niske vrijednosti i ovise o valnoj duljini pobude, a određeni su upotrebom otopine anisola u cikloheksanu kao standarda (tablica 6).

Tablica 6. Fotofizička svojstva dipeptida u CH<sub>3</sub>CN.

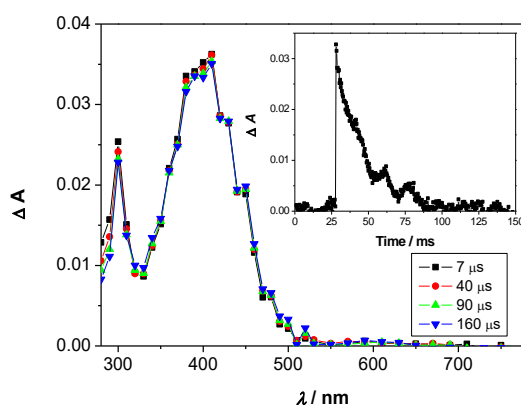
	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm}$ ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{em}} / \text{nm}$	$\Phi_{\text{F}}^{\text{a}}$	$\tau^{\text{b}} / \text{ns}$
<b>14</b>	282 (500)	305	$\approx 0.006$	0.28 $\pm$ 0.05 (0.32) 0.71 $\pm$ 0.06 (0.44) 5.0 $\pm$ 0.1 (0.24)
<b>20</b>	286 (1700)	315	$\approx 0.007$	0.22 $\pm$ 0.04 (0.26) 0.75 $\pm$ 0.03 (0.54) 6.0 $\pm$ 0.1 (0.12)

<sup>a</sup> Kvantni prinosi fluorescencije određeni su upotrebom otopine anisola u cikloheksanu kao standarda ( $\Phi_{\text{F}} = 0.29$ )<sup>228</sup> pri pobuđivanju na 260 nm; <sup>b</sup> vrijeme nestajanja (decay time) izmjereno TC-SPC metodom, brojevi u zagradi su doprinos pojedine komponente vremena nestajanja

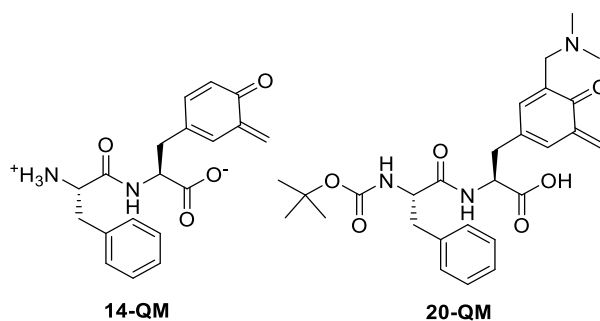
#### 4.1.5. Laserska pulsna fotoliza spojeva 14 i 20

Provedena je laserska pulsna fotoliza (engl. *laser flash photolysis*, LFP) za spojeve **14** i **20** kako bi se detektirali očekivani QM i drugi potencijalni intermedijeri u njihovim fotokemijskim reakcijama. Mjerenja su provedena u otopinama CH<sub>3</sub>CN i CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1:1) propuhanim N<sub>2</sub> ili O<sub>2</sub> uz pobuđivanje Nd:YAG laserom na 266 nm. Razlika u spektrima otopina propuhanih N<sub>2</sub> ili O<sub>2</sub> govori nam o detekciji tripletnog pobuđenog stanja ili radikalima koji se gase O<sub>2</sub>, dok se QM ne gase.

Dipeptid **14** je loše topljiv u čistom CH<sub>3</sub>CN, stoga je pripravljena otopina spoja **14** u smjesi otapala CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1:1). Detektiran je intermedijer koji apsorbira svjetlost u području 280-500 nm s maksimumom na 400 nm (slika 51). Opadanje intenziteta tranzijentne apsorcije opisuje kinetiku prvog reda i nije primijećeno gašenje s kisikom.



Slika 51. Tranzijentni apsorpcijski spektri spoja **14** u otopini CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1:1) propuhanoj O<sub>2</sub>. Umetak: opadanje intenziteta tranzijentne apsorpcije na 400 nm.



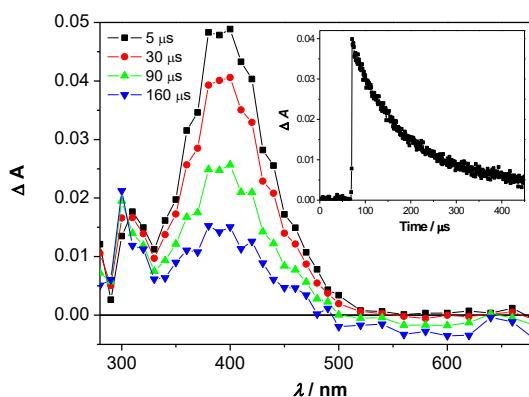
Slika 52. Kinon-metidni prekursori dipeptida

Tranzijentni apsorpcijski spektar s maksimumom na 400 nm odgovara kinon-metidu dipeptida **14** (**14-QM**), a vrijeme života u kisikom-propuhanoj otopini je  $20 \pm 2$  ms. Asignacija tranzijenta provedena je na temelju usporedbe s poznatim spektrima QM.<sup>12,235</sup> Dodatna potvrda da se radi o QM dobivena je u eksperimentima gašenja s različitim nukleofilima: etanolaminom (EtAm) i natrijevim azidom (NaN<sub>3</sub>), te etil-vinil-eterom (EVE) koji reagira s QM u Diels-Alderovoj reakciji. Izmjerene konstante brzine reakcija nalaze se u tablici 7. i usporedive su s literaturnim podacima o reaktivnosti QM.<sup>12,236,237</sup>

Tranzijentni apsorpcijski spektar otopine dipeptida **20** u CH<sub>3</sub>CN otopini propuhanoj kisikom također prikazuje apsorpcijski maksimum na 400 nm. Detektirani tranzijent nestaje kinetikom prvog reda a ima vrijeme života  $110 \pm 10$  μs. Na tranzijent nastalog **20-QM** nije utjecao O<sub>2</sub>, ali se gasi etanolaminom, što potvrđuje asignaciju da se radi o QM. Isti tranzijent je detektiran i u otopini dipeptida **20** u smjesi otapala CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O, ali vrijeme života je 13 ms. Nadalje, gašenje tranzijenta otopine spoja **20** u CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O ispitano je etanolaminom i etil-vinil-eterom, a



konstante brzine reakcije nalaze se u tablici 7. Tranzijentni apsorpcijski spektri dipeptida **14** i **20** nalaze se u Dodacima, Prilozi 99-105.



Slika 53. Tranzijentni apsorpcijski spektri spoja **20** u otopini CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1:1) propuhanoj O<sub>2</sub>. Umetak: opadanje intenziteta tranzijentne apsorpcije na 400 nm.

Tablica 7. Podaci dobiveni LFP mjerenjima za spojeve **14** i **20**.

Tranzijent	$\tau$ / ms	$k_q$ (EtAm) <sup>a</sup> / M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	$k_q$ (NaN <sub>3</sub> ) <sup>a</sup> / M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	$k_q$ (EVE) <sup>a</sup> / M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
<b>14-QM</b>	20 ± 2 <sup>a</sup>	2,3 × 10 <sup>5</sup>	1,1 × 10 <sup>7</sup>	9,9 × 10 <sup>2</sup>
<b>20-QM</b>	13 ± 3 <sup>a</sup> 0,11 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,3 × 10 <sup>5</sup> <sup>b</sup> 9,9 × 10 <sup>4</sup>	-	5,8 × 10 <sup>3</sup>

<sup>a</sup> Mjerenje provedeno u smjesi otapala CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1 : 1). <sup>b</sup> Mjerenje provedeno u CH<sub>3</sub>CN.

## 4.2. Tripeptidi koji sadrže ditriptofanski fragment i fenilalanin, tirozin ili *N,N*-dimetilaminometilni derivat tirozina

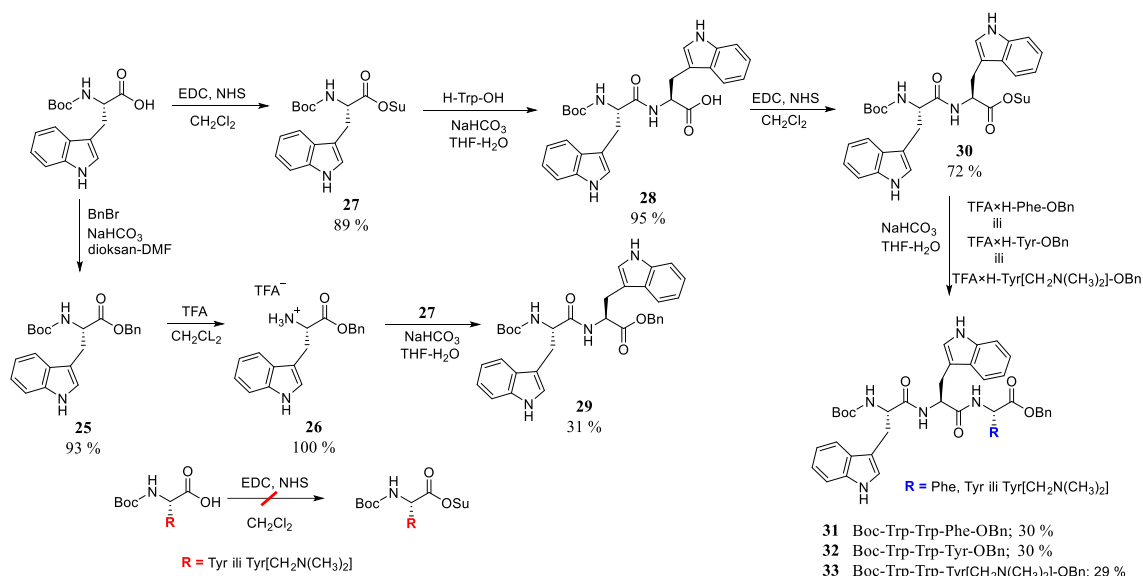
### 4.2.1. Priprava tripeptida

Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio je pripremiti tripeptide koji sadrže ditriptofanski fragment te jednu od ove tri aminokiseline: fenilalanin, tirozin ili modificirani tirozin. Takvi tripeptidi odabrani su stoga što je literaturno poznato da se peptidi koji sadrže ditriptofanski segment vežu nekovalentnim interakcijama na DNA.<sup>222,238</sup> Nadalje, ditriptofanski fragment je odgovoran za fluorescenciju peptida jer se triptofan može selektivno pobuditi na valnoj duljini od 295 nm, te se tako izbjegava nespecifična pobuda drugih aromatskih aminokiselina.

Pripremljenim oligopeptidima koji sadrže *N,N*-dimetilaminometilni derivat tirozina (Trp-Trp-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]) ispitana je fotokemijska reaktivnost te su određeni kvantni prinosi za reakciju fotometanolize.

Cilj istraživanja je bio pokazati da se ditriptofanski fragment može nalaziti na C i N-kraju peptida. Strategija pripreme tripeptida temelji se na sintezi peptida u otopini. U oba slučaja prvo je priređen dipeptid Trp-Trp, a potom smo pokušali vezati aminokiseline na N- ili C-kraj.

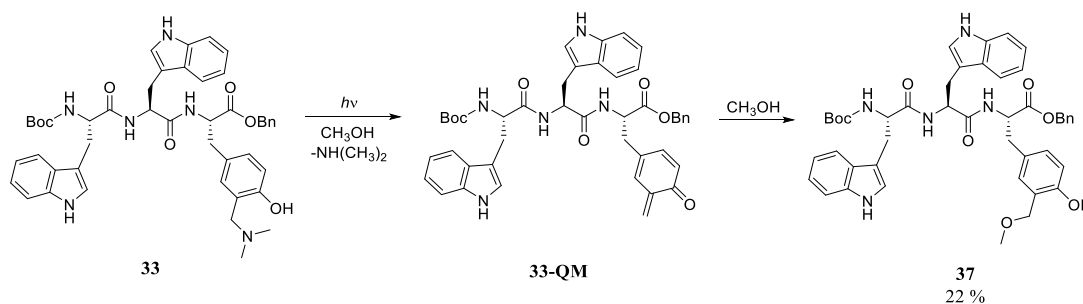
Dipeptid Trp-Trp pripremljen je korištenjem sukcinimidnog aktivacijskog protokola.<sup>216</sup> Najprije je pripremljen benzilni ester Boc-triptofana, a zatim je uklonjena Boc zaštitna skupina. U sljedećem koraku je pripremljen sukcinimidni ester Boc-triptofana **27** koji u reakciji peptidnog unakrsnog spajanja s benzilnim esterom triptofana **26** koji ima slobodan N-kraj daje dipeptid Boc-Trp-Trp-OBn (**29**) u iskorištenju od 31 %. Zaštićenom dipeptidu, Boc-Trp-Trp-OBn (**29**) uklonjena je Boc-zaštitna skupina s N-kraja (shema 19). Pokušali smo provesti reakciju peptidnog spajanja s N-slobodnim dipeptidom Trp-Trp-OBn kako bi se dobili odgovarajući tripeptidi Boc-Phe-Trp-Trp-OBn, Boc-Tyr-Trp-Trp-OBn, Boc-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-Trp-Trp-OBn. Međutim, sukcinimidni ester tirozina nije uspješno pripremljen te je zaključeno da aktivaciju karboksilne skupine nije moguće provesti uz slobodnu fenolnu OH skupinu tirozina. Stoga smo odustali od pripreme triptofanskih tripeptida s različitim aminokiselinom na N-kraju. Sintaza peptida s modificiranom aminokiselinom na C-kraju je također uključivala pripremu Trp-Trp dipeptida. Pri tome je iz sukcinimidnog estera Boc-triptofana **26** i nezaštićenog triptofana dobiven dipeptid sa slobodnom karboksilnom skupinom, Boc-Trp-Trp-OH (**28**) u iskorištenju od 95 %. Karboksilna kiselina u dipeptidu se u daljnjoj sintezi može aktivirati i vezati za N-nezaštićene benzilne estere sljedećih aminokiselina: fenilalanina, tirozina ili modificiranog tirozina kako bi se dobili odgovarajući tripeptidi Trp-Trp-Phe, Trp-Trp-Tyr, Trp-Trp-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. Uvođenje treće aminokiseline također je provedeno korištenjem sukcinimidne aktivacije (shema 19), pri čemu su dobiveni peptidi **31-33** u umjerenim iskorištenjima.

Shema 19. Načini priprave tripeptida **31**, **32** i **33**

Za ispitivanja interakcija oligopeptida s polinukleotidima, pripremljenim tripeptidima **31-33** je uklonjena Boc-zaštitna skupina korištenjem zasićene otopine HCl-a u etil-acetatu.

#### 4.2.2. Istraživanje fotokemijske reaktivnosti tripeptida Boc-Trp-Trp-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**33**)

Kako bi se ispitala fotokemijska reaktivnost tripeptida s modificiranim tirozinom, provedene su preparativne fotometanolize, a radi lakše izolacije fotoprodukata, za preparativnu fotometanolizu opet je odabran peptid koji ima zaštitne skupine na C- i N-kraju. Ozračivanjem Boc-Trp-Trp-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**33**) u CH<sub>3</sub>OH na valnoj duljini od 300 nm postignuta je konverzija od 65 %, a tijekom nastajanja fotoprodukata praćen je HPLC-om. Iz foto-reakcije izoliran je fotoprodukt **37** u iskorištenju od 22 %. (shema 20)

Shema 20. Fotometanoliza tripeptida **33**

#### 4.2.3. Kvantni prinosi za reakciju fotometanolize spojeva 33 i 36

Za određivanje kvantnih prinosa fotometanolize spojeva **33** i **36** u CH<sub>3</sub>OH korišten je primarni aktinometar KI/KIO<sub>3</sub> ( $\Phi_{254} = 0,74$ ).<sup>227</sup> Fotokemijske reakcijske smjese analizirane su HPLC-om te su dobiveni podaci o konverziji. Kvantni prinosi prikazani su u tablici 8. i izračunati su kao srednja vrijednost dvaju mjerenja. Fotometanoliza se odvija učinkovito i kod potpuno zaštićenog tripeptida **33** koji sadrži modificirani derivat tirozina i kod njegove hidrokloridne soli **36**.

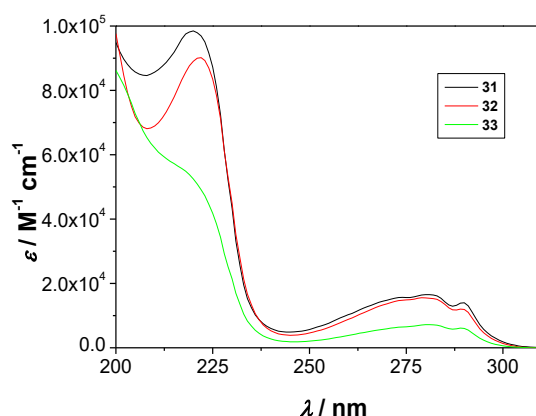
Tablica 8. Kvantni prinosi fotometanolize

Spoj	$\phi$ (CH <sub>3</sub> OH)
<b>33</b>	0,13±0,01
<b>36</b>	0,11±0,02

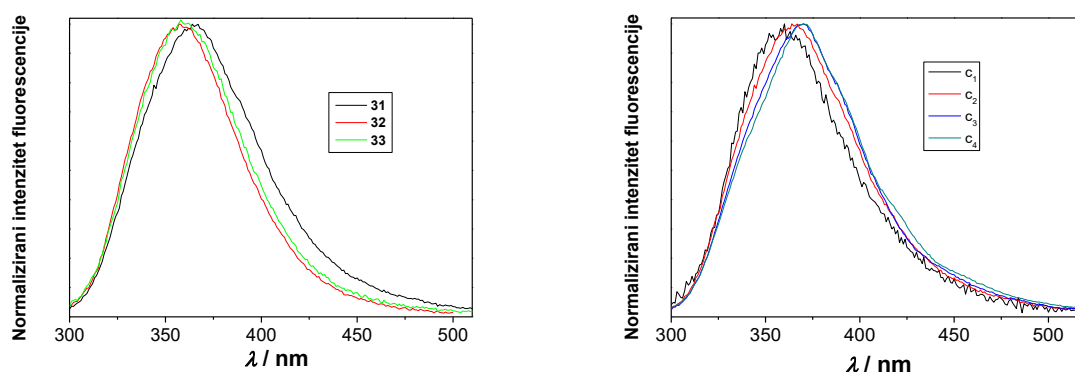
Korišten je primarni aktinometar KI/KIO<sub>3</sub> ( $\Phi_{254} = 0,74$ ).<sup>227</sup>

#### 4.2.4. Fotofizička svojstva tripeptida 31-33 i njihovih hidrokloridnih soli 34-36

Bilo je važno istražiti fotofizička svojstva tripeptida te njihovih hidrokloridnih soli zbog ispitivanja interakcija s polinukleotidima, te ispitivanja fotokemijske reaktivnosti tripeptida koji sadrži modificirani derivat tirozina **33**. Snimljeni su fluorescencijski spektri tripeptida **31-33** u CH<sub>3</sub>CN, te njihovih HCl-soli **34-36** u smjesi 10 % CH<sub>3</sub>CN/kakodilatni pufer ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7,0). Apsorpcijski spektri spojeva **31-33** snimljeni u CH<sub>3</sub>CN prikazuju maksimum na 280 nm i rame na 225 nm što je tipično za triptofane (slika 54). Iz spektara vidimo da treća aminokiselina (fenilalanin, tirozin ili modificirani derivat tirozina) gotovo i nema utjecaj na apsorpciju te da spojevi **31** i **32** imaju nešto bolju apsorptivnost od spoja **33**. Postoji mogućnost da tripeptidi **31-33** tvore  $\alpha$ -uzvojnica ukoliko su prva i treća aminokiselina u međusobnoj interakciji što dovodi do hiperkromnog utjecaja kod spojeva **31** i **32**, te hipokromnog kod spoja **33**.

Slika 54. ApSORpcijski spektri spojeva **31-33** u CH<sub>3</sub>CN.

Fluorescencijski spektri spojeva **31-33** snimljeni u CH<sub>3</sub>CN imaju karakterističan maksimum emisije na 358 nm za spojeve **32** i **33**, dok spoj **31** ima maksimum na 366 nm (slika 55., lijevo). Maksimum emisije te oblik spektra ne ovise o valnoj duljini pobude što nam sugrerira da je za emisiju odgovoran jedino triptofan. Nadalje, snimljeni fluorescencijski spektri spoja **31** ( $c = 2$  mM) u vodenom mediju (kakodilatni pufer) u ovisnosti o koncentraciji (slika 55., desno) pokazuju batokromni pomak od 10 nm s povećanjem koncentracije, što nam govori da se radi o agregaciji molekula.

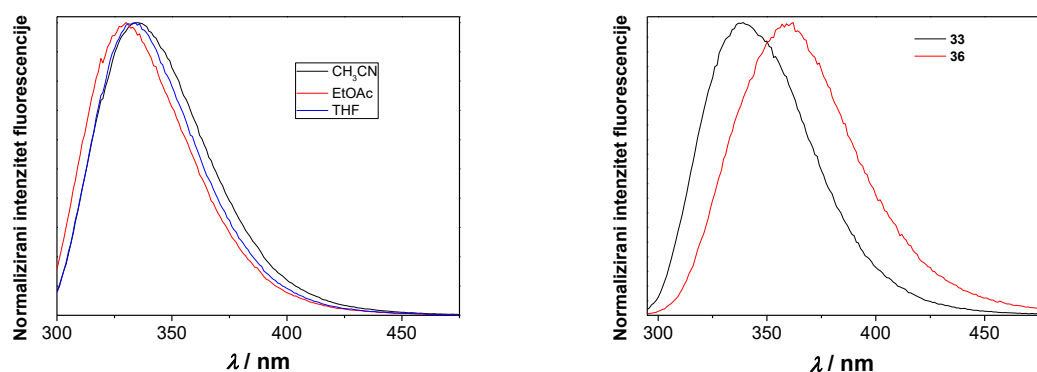


Slika 55. Normalizirani fluorescencijski spektri ( $\lambda_{\text{ex}} = 280$  nm) spojeva **31, 32** i **33** u CH<sub>3</sub>CN; (lijevo) Ovisnost normaliziranih fluorescencijskih spektara ( $\lambda_{\text{ex}} = 280$  nm) o koncentraciji spoja **31** ( $5 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-6}$  M), u kakodilatnom puferu (pH 7,0, 50 mM) (desno).

Fluorescencijska spektroskopija u biokemiji se koristi za praćenje peptida i proteina, te istraživanje konformacijskih promjena, vezanja i interakcija proteina. Intrinzična fluorescencija proteina nastaje uslijed pobuđivanja aromatskih aminokiselina: fenilalanin, tirozina i

triptofana.<sup>239</sup> Najznačajniji doprinos ukupnoj fluorescenciji daje triptofan koji apsorbira pri višim valnim duljinama i ima najveći molarni apsorpcijski koeficijent, te ga mogućnost njegove selektivne pobude pri valnoj duljini od 295 nm čini pogodnim fluorescentnim indikatorom u biološkim sustavima.<sup>240</sup>

Fotofizička svojstva triptofana ovise i o polarnosti otapala.<sup>241</sup> Stoga se maksimum emisije u fluorescencijskim spektrima triptofana u proteinima pomiče batokromno ukoliko je triptofan izložen vodi, dok su izraženi hipsokromni pomaci ako se triptofan nalazi u lipofilnom džepu. Normalizirani fluorescencijski spektri spoja **33** otopljenog u THF-u, etil-acetatu i acetonitrilu prikazani su na slici 56. Zanimljivo je primijetiti da promjena otapala vrlo malo utječe na vrijednost valne duljine maksimuma u fluorescencijskim spektrima, ali u polarnijem otapalu dolazi do malog batokromnog pomaka, što je u skladu s fluorosolvatokromnim svojstvima triptofana.<sup>242</sup> Za razliku od polarnosti, protičnost otapala je imala znatan utjecaj. Tako je razlika maksimuma emisije u fluorescencijskim spektrima spoja **33** u CH<sub>3</sub>CN i spoja **36** u smjesi 10 % CH<sub>3</sub>CN/kakodilatni pufer, 23 nm što također odgovara svojstvima derivata triptofana u otapalima različite polarnosti i protičnosti.<sup>241</sup> Proučavanje fotofizičkih svojstava koja ovise o polarnosti i protičnosti otapala važna je za istraživanje nekovalentog vezanja novopripremljenih peptida za makrobiomolekule uključujući polinukleotide.



Slika 56. Normalizirani fluorescencijski spektar ( $\lambda_{\text{ex}} = 280$  nm) spoja **33** u CH<sub>3</sub>CN, EtOAc i THF (lijevo); Normalizirani fluorescencijski spektar ( $\lambda_{\text{ex}} = 280$  nm) spoja **33** u CH<sub>3</sub>CN i spoja **36** u 10 % CH<sub>3</sub>CN/kakodilatni pufer ( $c = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7,0) (desno).

Kvantni prinosi fluorescencije zaštićenih tripeptida su određeni u CH<sub>3</sub>CN, dok su kvantni prinosi odgovarajućih HCl-soli određeni u smjesi 10 % CH<sub>3</sub>CN/kakodilatni pufer ( $c = 0,05$  mol

dm<sup>-3</sup>, pH = 7,0). Otopina *N*-acetiltryptofanamida (NATA) u mQ H<sub>2</sub>O korištena je kao standard ( $\Phi_F = 0,14$ ).<sup>241,243</sup> Kvantni prinosi fluorescencije tripeptida ovise o valnoj duljini pobuđivanja, a izraženi su kao srednja vrijednost triju mjerenja i prikazani su u tablici 9. Slična vrijednost kvantnog prinosa je izražena za spojeve **31** i **32** u CH<sub>3</sub>CN, te isto tako za njihove soli **34** i **35** u vodenom mediju. Međutim, vrijednost kvantnog prinosa fluorescencije za spoj **33** i njegovu hidrokloridnu sol **36** je dvostruko manja što bi moglo odgovarati deaktivaciji bez zračenja koja uključuje nastanak QM u fotokemijskoj reakciji.

Tablica 9. Kvantni prinos fluorescencije ( $\phi_F$ )

Spoj	$\phi_F$ (CH <sub>3</sub> CN)	Spoj	$\phi_F$ (10 % CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O, Na-kakodilatni pufer, pH=7,0)
<b>33</b>	0,06±0,01	<b>36</b>	0,03±0,01
<b>32</b>	0,11±0,02	<b>35</b>	0,06±0,01
<b>31</b>	0,11±0,03	<b>34</b>	0,06±0,01

Otopina NATA u mQ H<sub>2</sub>O korištena je kao standard ( $\Phi_F = 0,14$ ).<sup>241</sup>

#### 4.2.5. Laserska pulsna fotoliza spoja 33

Kako bi detektirali QM u fotokemijskoj reakciji spoja **33**, provedeni su eksperimenti LFP. Mjerenja su provedena u otopinama CH<sub>3</sub>CN i CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1:1) propuhanim N<sub>2</sub> ili O<sub>2</sub> uz pobuđivanje Nd:YAG laserom na 266 nm. Spektri i kinetika nestajanja tranzijenata snimljeni su u CH<sub>3</sub>CN i CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1:1) gdje se očekuje da će doći do ESPT-a koji je moguć samo u vodenom mediju.

U spektrima otopine spoja **33** u CH<sub>3</sub>CN propuhanoj Ar uočene su dvije tranzijentne vrste koje apsorbiraju u širokom području vanih duljina, preko cijelog spektra, s maksimumom na  $\approx 350$  nm. Vrijeme života jednog tranzijenta je  $200 \pm 50$  ns u Ar-propuhanoj otopini, dok se s kisikom taj tranzijent gasi te je, temeljem toga, pripisan tripletnom pobuđenom stanju ili radikalu. Detektiran je i duže-živući tranzijent vremenom života  $450 \pm 100$   $\mu$ s koji je pripisan **33-QM** jer u otopini propuhanoj kisikom ima slično vrijeme života  $\approx 400$   $\mu$ s. Spektri pokazuju i dodatne tranzijentne vrste koje apsorbiraju na  $\approx 350$  nm i  $\approx 550$  nm i ne gase se kisikom, a mogu biti

generirani iz triptofana, kao što su indolil radikal-kation i N-radikal.<sup>244,245,246</sup> U spektrima otopine spoja **33** u smjesi otapala CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1:1) propuhanoj argonom uočene su dvije tranzijentne vrste vremena života 10-30 ns (tripletno pobuđeno stanje ili radikal) i  $190 \pm 10 \mu\text{s}$  (odgovara QM), dok je otopini propuhanoj kisikom vrijeme života QM  $\approx 150\text{-}200 \mu\text{s}$ .

U LFP eksperimentima za hidrokloridnu sol tripeptida **36** u otopini propuhanoj Ar uočene su tri tranzijentne vrste vremena života od  $\approx 10$  ns, što vjerojatno odgovara tripletnom pobuđenom stanju ili radikal, zatim  $10,6 \pm 0,6 \mu\text{s}$  te  $1,3 \pm 0,6$  ms, koji je pripisan QM. Slične tranzijentne vrste vremena života  $\approx 0,5 - 10$  ms uočene su u otopini propuhanoj O<sub>2</sub>, međutim određivanje kinetike nestajanja bilo je teško zbog vrlo niskog intenziteta i dugog vremena života.

#### 4.2.6. Interakcije spojeva 34-36 s polinukleotidima

##### 4.2.6.1. Određivanje temperature „mekšanja“ ct-DNA

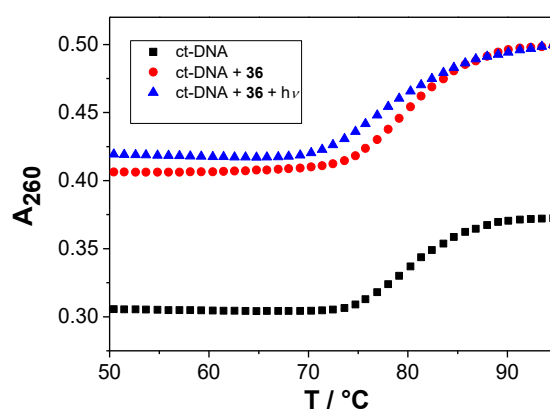
Temperatura mekšanja ( $T_m$ ) polinukleotida je temperatura pri kojoj je otprilike pola dvolančane uzvojnice prešlo u dvije jednolančane, a karakteristična je za svaki dvolančani polinukleotid i ovisi o sastavu i redosljedu nukleobaza unutar polinukleotida. Polinukleotid koji sadrži A-T(U) nukleobaze vezane dvjema vodikovim vezama, razdvaja se pri nižim temperaturama u usporedbi s polinukleotidom sastavljenim od G-C nukleobaza, vezanim trima vodikovim vezama.<sup>124</sup> Određivanje temperature mekšanja može se pratiti nizom spektroskopskih metoda kao što su: NMR, CD i kalorimetrija, no najčešće se koristi UV spektroskopija, gdje se razdvajanje nukleinskih kiselina prati mjerenjem rezultirajućeg hiperkromnog efekta (obično pri 260 nm) u ovisnosti o temperaturi otopine. Vrijednost temperature mekšanja polinukleotida,  $T_m$  najčešće se određuje očitavanjem maksimuma prve derivacije krivulje mekšanja.<sup>247</sup>

Metodom određivanja temperature mekšanja polinukleotida mogu se uspoređivati interakcije spojeva koji se vežu na određeni polinukleotid ili interakcije jednog spoja prema više različitih polinukleotida. S obzirom na različite načine vezanja spojeva na DNA ili RNA može doći do stabilizacije ili destabilizacije dvostruke uzvojnice, te vrijednosti  $\Delta T_m$  mogu biti i pozitivne i negativne. Ograničenje ove metode je što ispitivani spojevi moraju biti termički stabilni na temperaturama višim od standardne.

Provedeni su eksperimenti temperaturnog mekšanja spoja **36** s polinukleotidom ct-DNA, te je pokazano da spoj ima neznatan učinak na dvostruku uzvojnici DNA (slika 57), odnosno  $\Delta T_m$  je 0,5 što je unutar eksperimentalne pogreške. Međutim, nakon ozračivanja (300 nm, 5 min) ct-



DNA u prisutnosti spoja **36**, stabilnost dvostruke uzvojnice se smanjila ( $\Delta T_m = -2,2$  °C), što nam ukazuje na destabilizaciju dvostruke uzvojnice koja može biti posljedica fotokemijske alkilacije. Rezultati eksperimenta temperaturnog mekšanja prikazani su u tablici 10. Prilikom pripremanja otopina za provođenje eksperimenata temperaturnog mekšanja uočeno je da su spojevi **34** i **35** prilično loše topljivi u vodi, stoga je dodano 20 % DMSO kako bi se poboljšala njihova topljivost i da bi se mogla provesti preliminarna ispitivanja vezanja spojeva **34** i **35** s polinukleotidom *ct*-DNA.



Slika 57. Krivulje mekšanja *ct*-DNA, kompleksa spoja **36** – *ct*-DNA i kompleksa spoja **36** – *ct*-DNA nakon ozračivanja (Luzchem fotokemijski reaktor,  $8 \times 300$  nm, 5 min) pri omjeru

$$r_{(\text{spoj})/(\text{polinukleotid})} = 0,3; \text{pH} = 7,0 \text{ (kakodilatni pufer, } c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}\text{)}.$$

Tablica 10. Promjene temperature mekšanja<sup>a</sup> ( $\Delta T_m/\text{°C}$ ) prije i nakon ozračivanja (Luzchem fotokemijski reaktor,  $8 \times 300$  nm, 5 min) *ct*-DNA uslijed vezanja spoja **36** pri omjeru  $r^b = 0,3$ ; 7,0 (kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

<sup>b</sup> $r = 0,3$	pH = 7,0
<b>36</b>	0,5
<b>36 + hv</b>	-2,2

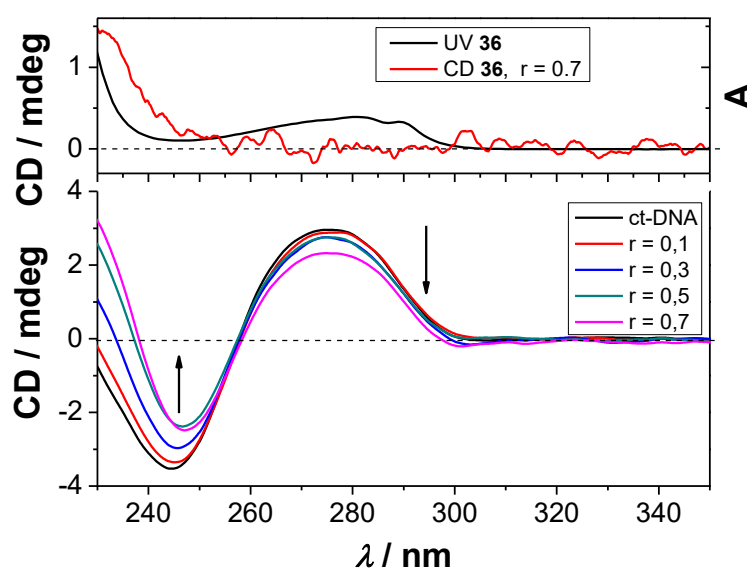
<sup>a</sup> Pogreška mjerenja  $\Delta T_m$ :  $\pm 0,5$ °C

<sup>b</sup>  $r = (\text{koncentracija ispitivanog spoja})/(\text{koncentracija polinukleotida})$

4.2.6.2. CD titracije s *ct*-DNA

Iz CD (cirkularni dikroizam) spektara kompleksa malih organskih molekula i polinukleotida mogu se dobiti informacije o konformacijskim promjenama u sekundarnoj strukturi polinukleotida nastalim uslijed vezanja malih molekula na polinukleotide.<sup>248</sup> Također, male akiralne molekule, prilikom vezanja na polinukleotide, mogu uzrokovati nastajanje induciranih CD spektara (ICD spektri). Na temelju tih spektara mogu se izvesti zaključci o međusobnoj orijentaciji osi malih molekula i polinukleotida, a time i o načinu vezanja (interkalator, vezanje u utor) malih molekula na polinukleotide.<sup>249,250</sup>

Ispitivanja nekovalentnih interakcija oligopeptida **34-36** s polinukleotidima provedena su CD titracijom *ct*-DNA s otopinom spoja u kakodilatnom puferu. CD spektri prikazani su na slici 58., te se vidi da dodatkom spoja **36** dolazi do promjena u CD spektrima u rasponu od 230–260 nm. Tako dolazi do smanjenja pozitivne vrpce *ct*-DNA na 275 nm i povećanja vrpce na 220 nm. Pri tome valja napomenuti da peptid **36** ima svoj CD spektar. Unatoč tome, promjene u spektru (slika 58.) ukazuju na promjenu kiralnosti DNA uslijed vezanja male molekule. Pri tome je to vezanje nespecifično, vrlo vjerojatno ostvareno u utoru DNA.

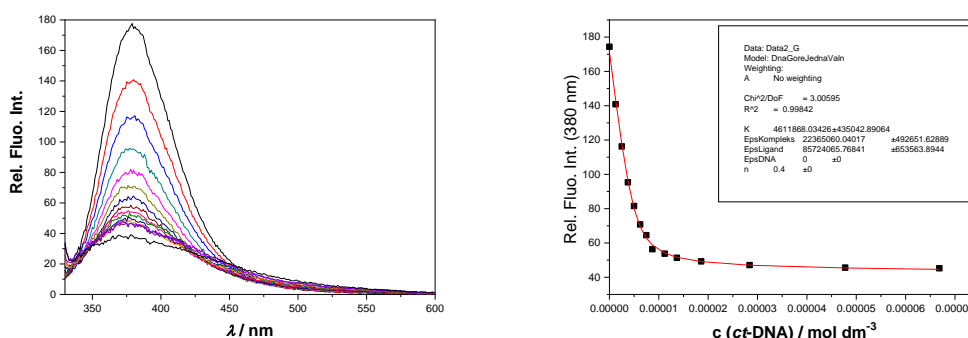


Slika 58. Utjecaj promjene koncentracije spoja **36** kod različitih omjera  $r[\mathbf{36}]/[\text{polinukleotid}]$ , na CD spektre *ct*-DNA ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

Analogno tome, nakon dodatka spoja **36** polinukleotidima poli A – poli U i poli (dGdC)<sub>2</sub> uočeno je manje smanjenje pozitivnih vrpci u rasponu od 260–290 nm (Dodaci, Prilozi 90 i 89), dok je za poli (dAdT)<sub>2</sub> promjena bila zanemariva (Dodaci, Prilog 88). Promjena u CD spektrima *ct*-DNA s **34** (s 20% DMSO) i **35** (Dodaci, Prilog 86 i 87) je zanemariva. Iz provedenih eksperimenata temperaturnog mekšanja i CD titracija zaključeno je da se spoj **36** veže u utor DNA.

#### 4.2.6.3. Fluorescencijska titracija s polinukleotidima

Za proučavanje nekovalentnog vezanja oligopeptida **34-36** s polinukleotidima, provedene su i fluorescencijske titracije spojeva s DNA i RNA uz valnu duljinu pobude na 295 nm.



Slika 59. Fluorescencijski spektri spoja **36** ( $c = 3,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{\text{exc}} = 295$  nm) prilikom titracije s *ct*-DNA ( $c = 1,2 \times 10^{-6} - 6,7 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>). Titracija je provedena na 25 °C (lijevo); Ovisnost intenziteta emisije spoja **36** o koncentraciji *ct*-DNA na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\text{max}} = 380$  nm. Točke su izmjerene vrijednosti, a linija predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe. (desno)

Kako bi se izračunale konstante vezanja oligopeptida na DNA ili RNA, podaci dobiveni fluorescencijskim titracijama obrađeni su nelinearnom regresijskom analizom prema Scatchardovom modelu (McGhee, von Hippel).<sup>233</sup> Dobiveni podaci su prikazani u tablici 11. Fluorescencijski spektri s različitim polinukleotidima nalaze se u Dodacima, Prilozi 91-98.

Tablica 11. Konstante stabilnosti i spektroskopska svojstva kompleksa  ${}^a\log K_a/{}^b\text{Int}$  za soli **34-36** s dvolančanim polinukleotidima izračunate na osnovu fluorimetrijskih titracija ( $c = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri pH = 7,0 (kakovilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

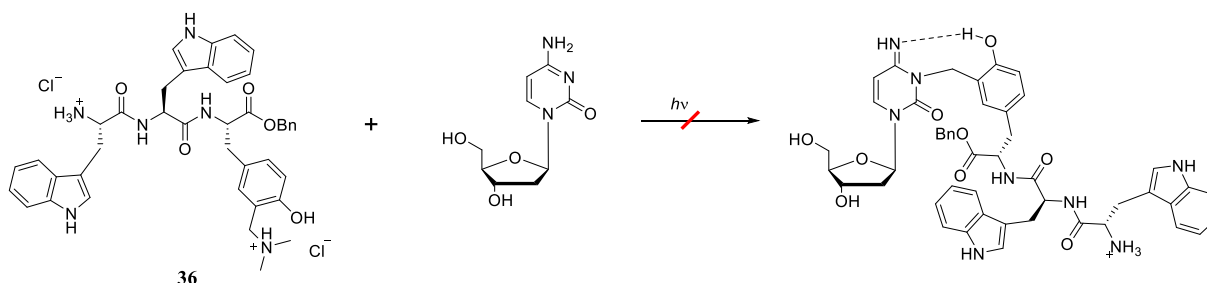
	<i>ct</i> -DNA	poli (dAdT) <sub>2</sub>	poli (dGdC) <sub>2</sub>	poli A – poli U
<b>34</b>	<sup>e</sup> 5.7/0.62	-	-	-
<b>35</b>	6.8/0.69	<sup>c</sup>	6.5/0.3	<sup>d</sup> 5.0/3
<b>36</b>	6.5/0.24	5.9/1.02	6.4/0.48	6.0/1.48

<sup>a</sup> vrijednosti  $\log K_a$  izračunate prema Scatchardovoj jednadžbi za vrijednosti omjera  $n$  ( $[\text{vezani spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,2$  i  $0,4$ ); <sup>b</sup> omjer intenziteta fluorescencije kompleksa računatog prema Scatchardu i fluorescencije uzorka; <sup>c</sup> premale promjene; <sup>d</sup> gotovo linearno povećanje omogućilo je samo aproksimaciju  $\log K_a$  i  $\text{Int}^b$ ; <sup>e</sup> mjerenje provedeno u 20 % DMSO/kakovilatni pufer, te nije usporedivo s ostalim vrijednostima.

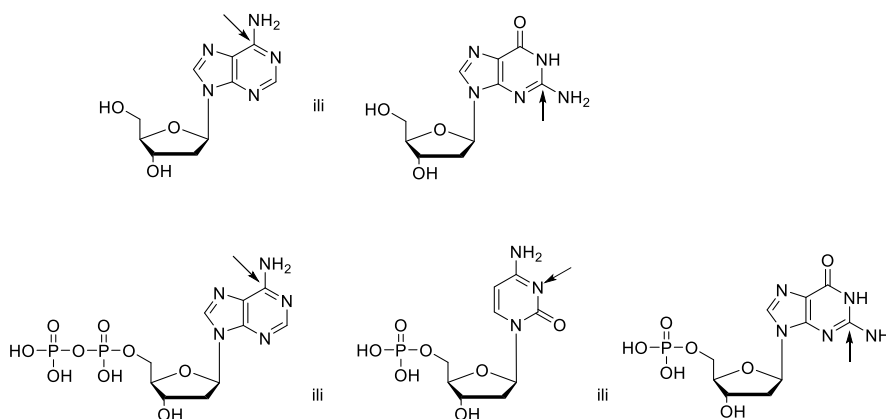
Konstante vezanja za spojeve **35** i **36** s navedenim polinukleotidima su sličnih vrijednosti ( $\log K_a = 6,0\text{--}6,8$ ), a razlike koje su uočene u fluorescencijskim spektrima mogle bi biti posljedica položaju fluorofora unutar veznog mjesta DNA/RNA.

#### 4.2.7. Kovalentno vezanje oligopeptida s polinukleotidima

Ispitivanje kovalentnog vezanja tripeptida **36** s polinukleotidima provedeno je ozračivanjem spoja **36** (1 mM) u otopini amonijevog acetatnog pufera u prisutstvu nukleotida (10 mM): 2'-deoksiadenozin, 2'-deoksicitidin, 2'-deoksigvanidin, 2'-deoksiadenozin-5'-difosfat, 2'-deoksicitidin-5'-monofosfat i 2'-deoksigvanidin-5'-monofosfat (shema 21).



Shema 21. Neuspješni pokušaj fotokemijske alkilacije 2'-deoksicitidina s tripeptidom **36**



Slika 60. Nukleotidi koji su korišteni u fotokemijskim eksperimentima s tripeptidom **36** i strelicom su označena mjesta očekivane alkilacije s QM

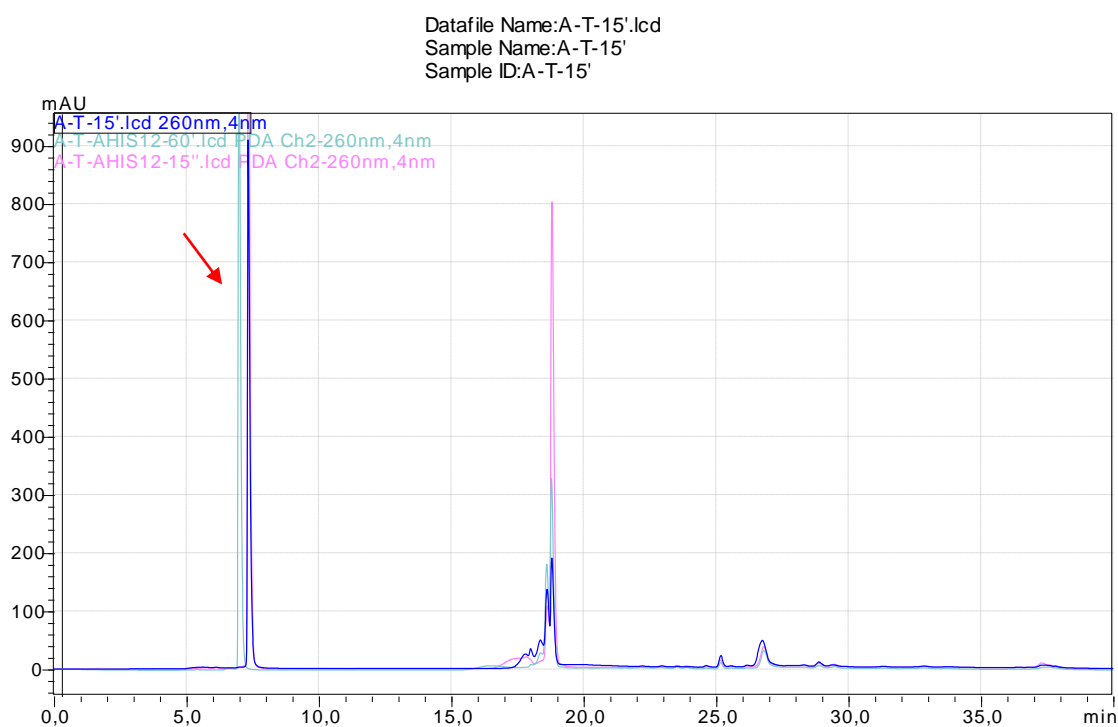
HPLC-MS analizom je potvrđeno da nisu nastali novi adukti s nukleotidima što odgovara literaturnim podacima da je za alkilaciju potrebno nekovalentno vezanje prekursora QM na DNA.<sup>19</sup>

Zatim je istraženo može li generirani QM tripeptida **36** alkilirati dvostruku uzvojnica DNA. Pripremljene su otopine oligonukleotida dG<sub>12</sub> i dC<sub>12</sub> te dA<sub>10</sub> i dT<sub>10</sub> u vodenoj otopini amonijevog acetata tako da se pomiješaju ekvimolarne količine jednostrukih oligonukleotida u volumnom omjeru 1 : 1, te su lanci anelirani zagrijavanjem na 90 °C kroz 60 min a zatim ohlađeni na sobnu temperaturu. Pripremljenim otopinama dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> i dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub> određene su temperature mekšanja i snimljeni su CD spektri, te su otopine analizirane HPLC-om. Otopina dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> u kromatogramu ima 1 signal retencijskog vremena 7 min, dok otopina dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub> ima 2 signala retencijskih vremena 7 min i 19 min, koji odgovaraju protoniranom i deprotoniranom obliku. Ovisno o pH postoje dva konformacijska oblika polinukleotida A, jedan gdje je poli A potpuno protoniran, te jedan gdje je poluprotoniran. U kiselim uvjetima (pH < 5) jednolančani polinukleotid (poli A) zbog protoniranja tvori dvostruke uzvojnice, što omogućuje ispitivanje selektivnosti vezanja između dvolančanih i jednolančanih analoga.<sup>251</sup>

Iz kromatograma (Dodaci, Prilog 138) vidimo da je dodatkom tripeptida **36** otopini oligonukleotida dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> retencijsko vrijeme signala 0,3 min sporije nego kada se radi o otopini dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub>. Zatim su otopine: **36**, dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> i smjesa **36**- dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> ozračene 15 i 60 min u Luzchem fotokemijskom reaktoru pri 300 nm, te su analizirane HPLC-om. Preklapanjem

kromatograma dobivenih nakon ozračivanja nisu primijećeni novi signali koje bi mogli pripisati alkilaciji oligonukleotida (Dodaci, Prilog 143).

Otopina tripeptida **36** je dodana otopini oligonukleotida dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub>, provedena je HPLC analiza i vidljiva je promjena u retencijskom vremenu signala na 7,5 min, odnosno signal se pojavljuje 0,5 min ranije. Zatim su otopine: **36**, dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub> i smjesa **36**- dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub> ozračene 15 i 60 min u Luzchem fotokemijskom reaktoru pri 300 nm, te su analizirane HPLC-om. Preklapanjem kromatograma dobivenih nakon ozračivanja uočen je novi signal na 16,5 min koje bi mogli pripisati alkilaciji oligonukleotida (slika 61, ostali kromatogrami nalaze se u Dodacima, Prilog 149-153). Tripeptid **36** se veže u mali utor AT sekvence prilikom čega vjerojatno adenin reagira s QM.



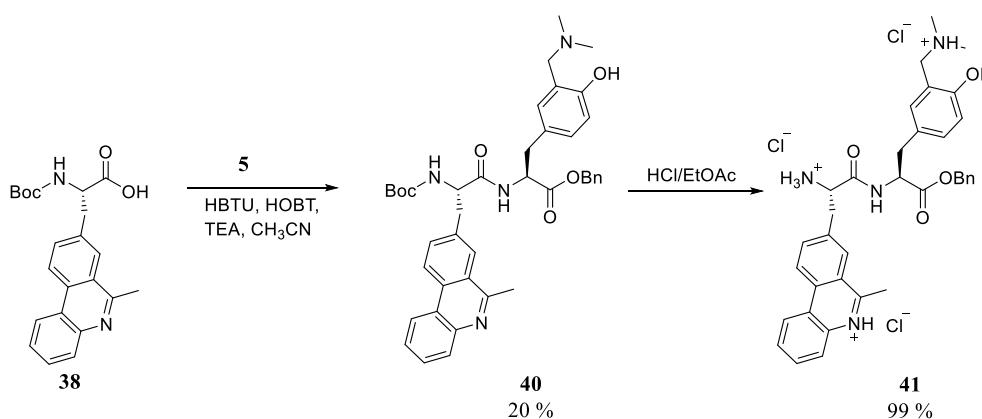
Slika 61. Preklopljeni HPLC kromatogrami dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub> ozračeno 15 min ( $t_R = 7,4$  min i 17,5-18,8 min), smjese **36**-dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub> ozračenih 15 min ( $t_R = 7,4$  min i 16,5-17 min i 18,8 min) i smjese **36**-dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub> ozračenih 60 min ( $t_R = 7,0$  min i 18,6 min i 18,8 min)

### 4.3. Dipeptidi koji sadrže dvije neprirodne aminokiseline – fenantridin i modificirani tirozin

Poznato je da se fenantridinski derivati koji sadrže različite alkilne poveznice<sup>10</sup> nekovalentno vežu s jednom<sup>252</sup> ili dvije nukleobaze.<sup>253</sup> Ispitivanjem nekovalentnih interakcija fenantridinskih derivata s različitim polinukleotidima otkrivena su posebno zanimljiva svojstva fenantridinskih derivata vezanih za adenin, a selektivno su prepoznali poli U.<sup>254,255</sup> Međutim, uz nekovalentno vezivanje za polinukleotide, brojni antikancerogeni lijekovi svoje djelovanje temelje na kovalentnoj modifikaciji DNA, gdje križno povezivanje vodi do toksičnosti a zatim i do smrti stanice.<sup>11</sup> S obzirom da je *N,N*-dimetilaminometilni derivat tirozina uspješno ugrađen u dipeptide koji sadrže fenilalanin, te tripeptide koji imaju ditriptofanski fragment, a zadržao je svoju fotokemijsku reaktivnost, odlučili smo pripremiti dipeptid koji sadrži modificirani tirozin i fenantridin.

#### 4.3.1. Priprava *Phen-Tyr*[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]

Dipeptid *Phen-Tyr*[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (**40**) pripravljen je peptidnom kondenzacijskom reakcijom u kojoj je karboksilna skupina Boc- zaštićenog fenantridinskog derivata aktivirana uz HBTU i HOBT,<sup>230</sup> te vezana za benzilni ester *N,N*-dimetilaminmetilnog derivata tirozina. S obzirom da nam je cilj ispitati i nekovalentne interakcije s različitim polinukleotidima, uklonjena je Boc zaštitna skupina zasićenom otopinom HCl-a u etil-acetatu (shema 22).



Shema 22. Priprava dipeptida **40** i njegove hidrokloridne soli **41**

### 4.3.2. Nekovalentne interakcije spoja **41** s različitim polinukleotidima

Ispitivanje nekovalentnih interakcija dipeptida **41** s različitim polinukleotidima je provedeno eksperimentima temperaturnog mekšanja te fluorescencijskom i CD spektroskopijom. Važno je bilo proučiti ponašanje novopripravljenog dipeptida kako bi se mogao koristiti kao fluorescentni indikator za različite biomolekule.

Pripremljene su otopine spoja **41** u mQ H<sub>2</sub>O, zatim stock otopine polinukleotida u kakodilatnom puferu (pH = 5,0 i 7,0,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) koje su bile korištene za mjerenja: *ct*-DNA, poli A – poli U, poli (dGdC), poli (dGdC)<sub>2</sub> i poli (dAdT)<sub>2</sub>. Mjerenja su provedena u kakodilatnom puferu pri pH = 5,0 i pH = 7,0 jer je poznato da je  $pK_a$  fenantridinskog dušika,  $pK_a \approx 6$ ,<sup>256</sup> pa su pri pH = 5,0,<sup>10</sup> fenantridinski derivati u protoniranom obliku za razliku od pH = 7,0 gdje nisu protonirani.

#### 4.3.2.1. Određivanje temperature mekšanja spoja **41** s različitim polinukleotidima

Mnogi fenantridinski derivati interkaliraju u dvostruku uzvojnici DNA ili RNA,<sup>257</sup> a dobro poznat primjer je etidij-bromid.<sup>258,259</sup> Rezultat interkaliranja je jaka stabilizacija dvostruke uzvojnice polinukleotida.<sup>229</sup> Međutim, fenantridinski peptid **41** pokazao je destabilizaciju polinukleotida poli A – poli U te slabu stabilizaciju *ct*-DNA i poli (dAdT)<sub>2</sub> pri pH = 5, dok su pri pH = 7,0 dobiveni podaci unutar greške mjerenja. Izmjerene vrijednosti, dobivene iz krivulja mekšanja (slika 62) nalaze se u Tablici 12. Zanimljivo je da peptid **41** pri pH 7 destabilizira dvostruke uzvojnice RNA, dok stabilizira DNA, što potencijalno omogućuje neke primjene i važan je podatak u racionalnom dizajnu sljedeće generacije peptida za nekovalentno vezanje na polinukleotide.



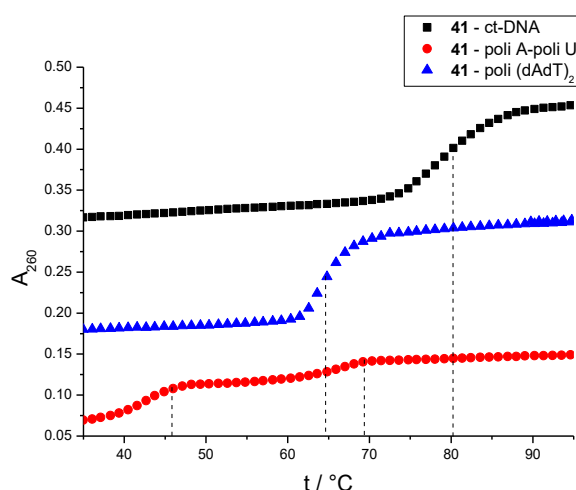
Tablica 12. Promjene temperature mekšanja<sup>a</sup> ( $\Delta T_m/^\circ\text{C}$ ) dvolančanih DNA i RNA polinukleotida uslijed vezanja spoja **41** (Phen-Tyr) pri omjeru  $r^b = 0,3$ ; pH = 5,0 i 7,0 (kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

$r = 0,3$	pH = 5,0	pH = 7,0
<b>ct-DNA</b>	3,4	0,3
<b>poli A – poli U</b>	-3.3; -1.1 <sup>c</sup>	-0.6; 0.3 <sup>c</sup>
<b>poli (dAdT)<sub>2</sub></b>	5,5	1,0

<sup>a</sup> Pogreška mjerenja  $\Delta T_m : \pm 0,5^\circ\text{C}$

<sup>b</sup>  $r = (\text{koncentracija ispitivanog spoja})/(\text{koncentracija polinukleotida})$

<sup>c</sup> krivulja s dva prijelaza

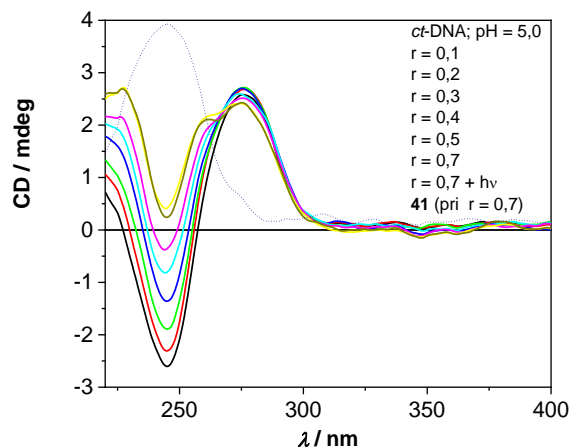


Slika 62. Krivulje mekšanja kompleksa spoja **41** – ct-DNA, **41** – poli A – poli U i **41** – poli (dAdT)<sub>2</sub> pri omjeru  $r_{(\text{spoj})/(\text{polinukleotid})} = 0,3$ ; pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

#### 4.3.2.2. CD titracije dipeptida **41** s različitim polinukleotidima

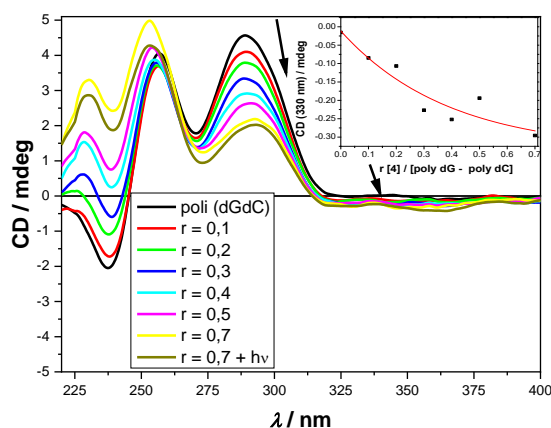
Provedene su CD titracije otopine polinukleotida s dipeptidom **41** pri pH = 5,0 i 7,0, te nakon dodatka spoja u molarnom omjeru  $r[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,7$ , pripremljena otopina je i ozračena 3 min u Luzchem fotokemijskom reaktoru na 300 nm. Iz svih CD spektara je vidljivo da dodatak spoja **41** otopini polinukleotida smanjuje negativni signal polinukleotida koji je u rasponu od 220-280 nm. Na slici 63. prikazan je CD spektar titracije ct-DNA sa spojem **41**, te

je iscrtkanom linijom prikazan CD signal spoja **41** pri omjeru  $r = 0,7$  s maksimumom na 245 nm. CD spektri su korigirani za utjecaj samog spoja, te nema znatnih promjena u spektrima. Rezultati dobiveni mjerenjima svih polinukleotida na oba pH ukazuju da se dipeptid **41** nespecifično veže u utore dvostruke uzvojnice DNA ili RNA.



Slika 63. Utjecaj promjene koncentracije spoja **41** kod različitih ( $r[\mathbf{41}]/[\text{polinukleotid}]$ ) na CD spektre *ct*-DNA ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri pH = 5,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

CD spektar u kojem je uočeno značajno smanjenje CD signala na 289 nm praćeno batokromnim pomakom od 5 nm dobiven je CD titracijom polinukleotida poli (dGdC) sa spojem **41** pri pH = 5,0. Detaljnijim proučavanjem spektra prikazanog na slici 64. uočeni su slabi negativni ICD signali u rasponu od 300-370 nm koji se nelinearno povećavaju dodatkom spoja. Dobiveni podaci nam ukazuju na interkaliranje spoja u dvostruku uzvojnica polinukleotida. Bitno je spomenuti da kod alternirajućeg polinukleotida poli (dGdC)<sub>2</sub> pri istom pH ne dolazi do interkaliranja i nisu vidljivi ICD signali te se u CD spektru vidi utjecaj spoja **41** u rasponu od 250-300 nm.



Slika 64. Utjecaj promjene koncentracije spoja **41** kod različitih omjera ( $r[\mathbf{41}]/[\text{polinukleotid}]$ ) na CD spektre poli (dGdC) ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri pH = 5,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); umetak: ovisnost inducirano signala pri  $r[\mathbf{41}]/\text{poli (dGdC)}$  na 330 nm.

U CD spektrima za polinukleotid poli A – poli U se vidi smanjenje CD signala na 262 nm s hipsokromnim pomakom od 2 nm za koje nije odgovoran sam utjecaj spoja, a isto kao i kod polinukleotida poli (dGdC)<sub>2</sub> nisu zapaženi ICD signali koji upućuju na interkalaciju. CD spektri za polinukleotide poli A – poli U, poli (dAdT)<sub>2</sub> i poli (dGdC)<sub>2</sub> nalaze se u Dodacima, Prilozi 155-158.

Prilikom provedbe CD titracija, nakon što je polinukleotidu dodan spoj **41** u omjeru  $r = 0,7$ , kiveta sa smjesom polinukleotid-dipeptid **41** je ozračena u Luzchem fotokemijskom reaktoru pri 300 nm, te je snimljen i njen CD spektar. Promjene u CD spektrima sugeriraju da dipeptid koji sadrži modificirani tirozin fotodeaminacijom stvara QM koji može alkilirati DNA ili RNA.<sup>19</sup>

#### 4.3.2.3. Fluorescencijska titracija dipeptida **41** s različitim polinukleotidima

Kako bi odredili konstante stabilnosti kompleksa dipeptida **41** s različitim polinukleotidima: *ct*-DNA, poli A - poli U, poli (dAdT)<sub>2</sub>, poli dGdC, poli (dGdC)<sub>2</sub>, provedene su fluorescencijske titracije u kakodilatnom puferu pri pH 5,0 i 7,0. Kod svih provedenih titracija, dodavanje polinukleotida spoju **41** rezultiralo je gašenjem fluorescencije. Dobiveni podaci su obrađeni nelinearnom regresijskom analizom Scatchardovom jednačbom<sup>233</sup> te su izračunate vrijednosti za konstante stabilnosti kompleksa dipeptid **41**-polinukleotid s fiksnom vrijednosti  $n = 0,2$ .

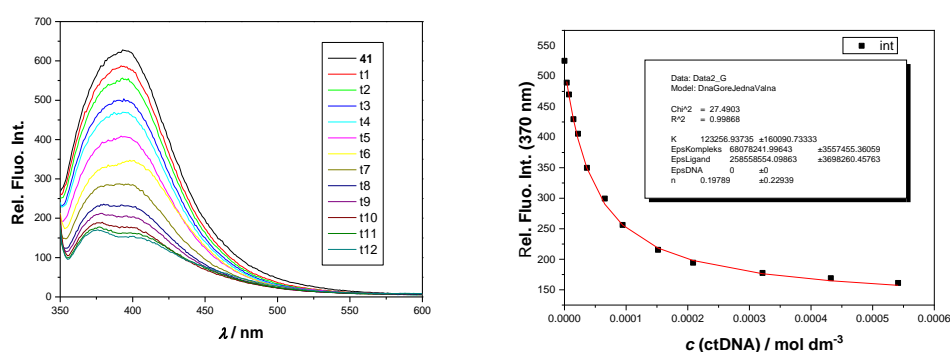
Konstante stabilnosti ( $\log K$ ) prikazane u tablici 13. su sličnih vrijednosti,  $\log K_a \approx 5$ , neovisno o polinukleotidu te o pH pri kojem je mjerenje provedeno. Iz dobivenih podataka je zaključeno da se dipeptid **41** neselektivno veže na polinukleotide DNA i RNA. Fluorescencijski spektri spoja **41** prilikom titracije s *ct*-DNA pri pH 5,0 se nalaze na slici 65., dok se fluorescencijski spektri titracije s različitim polinukleotidima pri pH 5,0 i 7,0 nalaze u Dodacima, Prilozi 159-168. Dobivene su slične vrijednosti konstante stabilnosti što ukazuje da peptid **41** ne pokazuje selektivnost s obzirom na vezanje na različite tipove dvostrukih uzvojnica.

Tablica 13. Konstante stabilnosti ( $\log K_s$ )<sup>a</sup> izračunate na osnovu fluorescencijskih titracija za komplekse spoja **41** s dvolančanim polinukleotidima na pH = 5,0 i 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

	pH = 5,0		pH = 7,0	
	$\log K_a$	$I/I_0^b$	$\log K_a$	$I/I_0^b$
<b>ct-DNA</b>	5,1	0,3	4,9	0,3
<b>poli A - poli U</b>	5,2	0,4	5,0	0,6
<b>poli dGdC</b>	5,3	0,2	5,1	0,2
<b>poli (dGdC)<sub>2</sub></b>	5,9	0,2	5,1	0,3
<b>poli (dAdT)<sub>2</sub></b>	5,1	0,3	5,9	0,5

<sup>a</sup> vrijednosti  $\log K_s$  izračunate prema Scatchardovoj jednadžbi za  $n_{[\text{vezani spoj}]/[\text{polinukleotid}]}$ . Vrijednost omjera  $n$  ( $[\text{vezani spoj } \mathbf{41}]/[\text{polinukleotid}]$ ) je fiksna,  $I = 0,2$ .

<sup>b</sup>  $I_0$  je početni intenzitet fluorescentne emisije ispitivanog spoja **41**;  $I$  je intenzitet fluorescentne emisije kompleksa **41**/polinukleotid izračunat prema Scatchardovoj jednadžbi



Slika 65. Fluorescencijski spektri spoja **41** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$ ) prilikom titracije s *ct*-DNA ( $c = 3,6 \times 10^{-6} - 5,4 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri pH = 5,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Titracija je provedena na 25 °C. (lijevo); Ovisnost intenziteta emisije spoja **41** o koncentraciji *ct*-DNA na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\text{max}} = 370 \text{ nm}$ . Točke su izmjerene vrijednosti, a linija predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe. (desno)

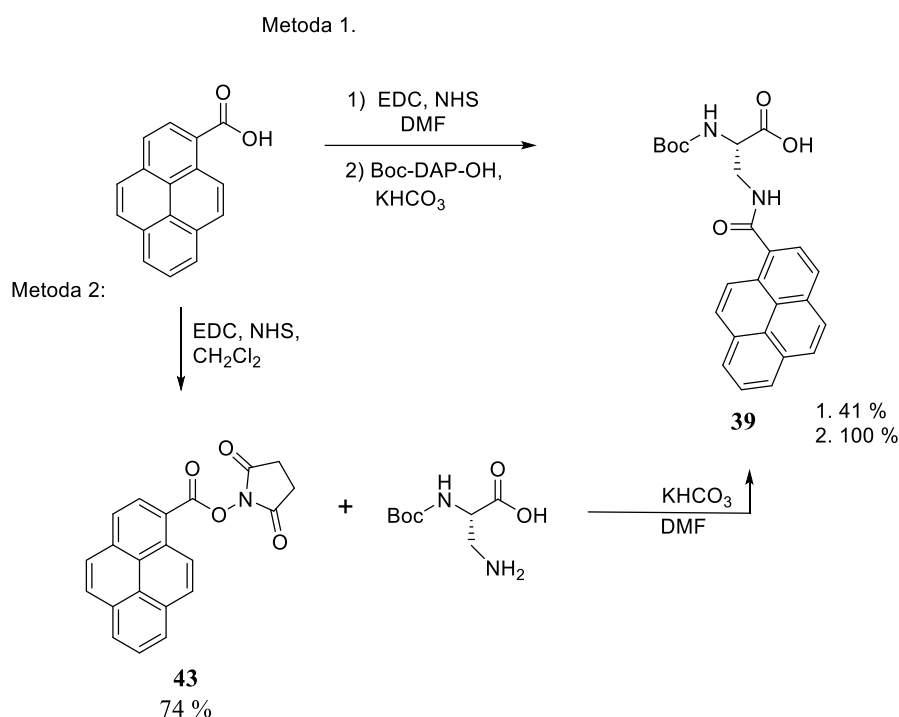
#### 4.4. Dipeptidi koji sadrže dvije neprirodne aminokiseline – piren i *N,N*-dimetilaminometilni derivat tirozina

Piren se često koristi kao indikator za polinukleotide osjetljiv na polarnost, s tim da ne samo da se može interkalirati u ds-DNA, već se može i vezati u utore.<sup>144</sup> Schmuck i suradnici su dizajnirali peptidne fluorescentne indikatore na bazi pirena za detekciju nukleinskih kiselina.<sup>141</sup> Primjena peptidnih fluorescentnih indikatora za različite biomolekule moguća je zbog interakcije fluorofora na peptidnim lancima s biomolekulama koja dovodi do promjene fotofizičkih i spektralnih svojstava. Ranija istraživanja su pokazala da i male promjene u strukturi kratkih fluorescentnih oligopeptida mogu značajno utjecati na njihovu konformaciju i vezanje na DNA i RNA, te na vezanje na enzim dipeptidil peptidazu III (DPP III).<sup>150</sup> Stoga smo odlučili pripremiti dipeptide s različitom duljinom razmaknice između pirena i aminmetilnog derivata tirozina te ispitati nekovalentno i kovalentno vezanje na polinukleotide.

##### 4.4.1. Priprava pirenskih derivata

Strategija pripreme dipeptida koji sadrži dvije neprirodne aminokiseline temelji se na sintezi peptida u otopini. Jedan od načina pripreme spoja **39** je priprava „one pot“ gdje je

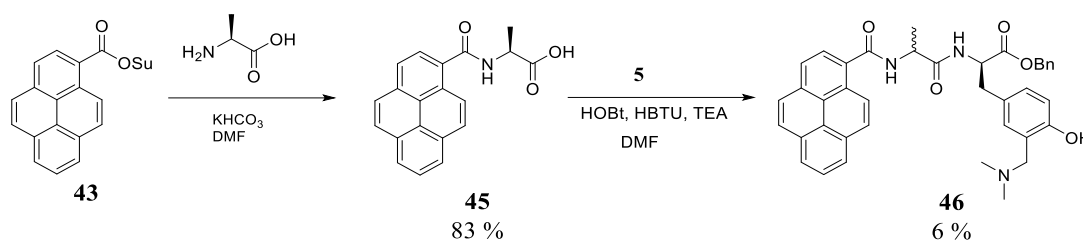
pirenkarboksilna kiselina aktivirana EDC-om, a zatim peptidnom reakcijom spajanja vezana s *N* $\alpha$ -Boc-L-2,3-diaminopropionskom kiselinom (Boc-DAP-OH) (shema 23).



Shema 23. Priprava pirenskog derivata **39**

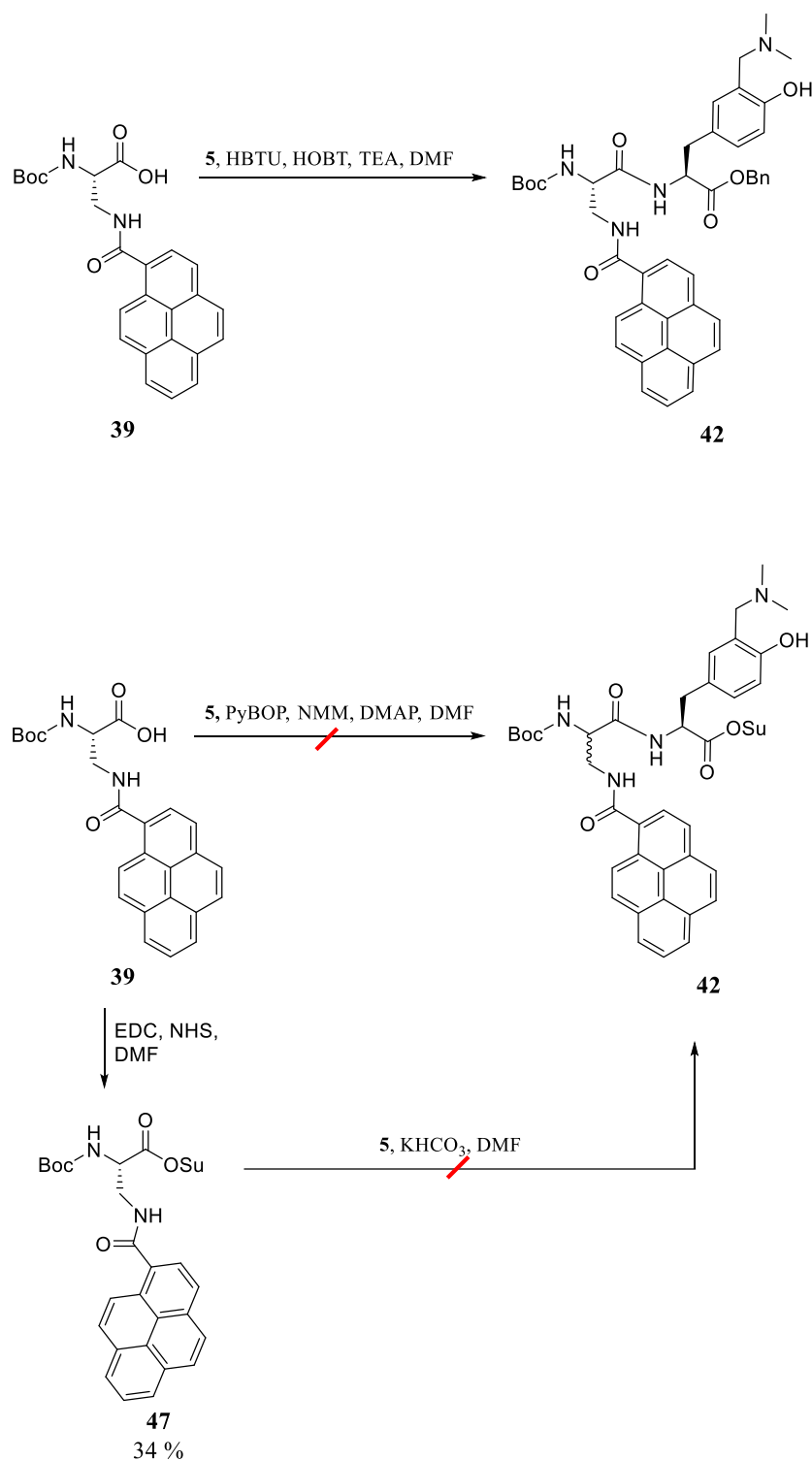
Drugi način priprave uključuje izolaciju sukcinimidnog estera pirenkarboksilne kiseline, a zatim peptidnu reakcija spajanja s Boc-DAP-OH, pri čemu je u ovom slučaju dobiven čisti produkt Boc-DAP(Pyr)-OH (**39**) u kvantitativnom iskorištenju.

Priprava spoja **45** provedena je izolacijom sukcinimidnog estera pirenkarboksilne kiseline koji je zatim korišten u peptidnoj reakciji spajanja s L-alaninom. Čisti produkt **45** izoliran je kromatografijom u iskorištenju od 83 %. Pokušaj priprave dipeptida (Pyr)-Ala-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (**46**) proveden je peptidnom kondenzacijskom reakcijom u kojoj je karboksilna skupina Boc- zaštićenog pirenskog derivata aktivirana uz HBTU i HOBt, te vezana za benzilni ester *N,N*-dimetilaminmetilnog derivata tirozina (shema 24). Nakon više provedenih rekromatografija, izoliran je spoj **46** u vrlo niskom prinosu od 6 % za koji je ustanovljeno prema HPLC-u i NMR-u da se radi o smjesi diastereomera. Zbog vrlo malih iskorištenja i epimerizacije u reakcijama peptidnog spajanja, odustalo se od priprave spoja **46**.



Shema 24. Priprava spojeva 45 i 46

Za pripravu dipeptida Boc-DAP(Pyr)-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**42**) isprobana su 3 različita načina sinteze. Prvi način uključivao je peptidnu reakciju spajanja u kojoj je karboksilna skupina Boc-DAP(Pyr)-OH aktivirana uz HBTU i HOBt, te vezana za benzilni ester *N,N*-dimetilaminmetilnog derivata tirozina (shema 25). Nakon više provedenih rekromatografija, izolirano je 50 mg spoja **42** (20 %) za koji je ustanovljeno prema HPLC-u i NMR spektrima da se radi o smjesi diastereomera. U peptidnoj reakciji došlo je do epimerizacije na jednom centrm kiralnosti, vrlo vjerojatno u pirenskoj aminokiselini na kojoj se provodila aktivacija. Drugi pokušaj priprave je aktivacija karboksilne skupine Boc-DAP(Pyr)-OH s PyBOP i NMM u DMF-u, a zatim dodavanje benzilnog estera *N,N*-dimetilaminmetilnog derivata tirozina i NMM. Nakon obrade reakcije te kromatografskog pročišćavanja, prema HPLC-u i spektrima NMR, zaključeno je da je dobivena također smjesa diastereomera spoja **42**. Treći pokušaj priprave je dokapavanje prethodno pripravljenog sukcinimidnog estera Boc-DAP(Pyr)-OH na zatim benzilni ester *N,N*-dimetilaminmetilnog derivata tirozina. Međutim, ni ovom reakcijom nije dobiven željeni produkt.



Shema 25. Priprava dipeptida Pyr-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]

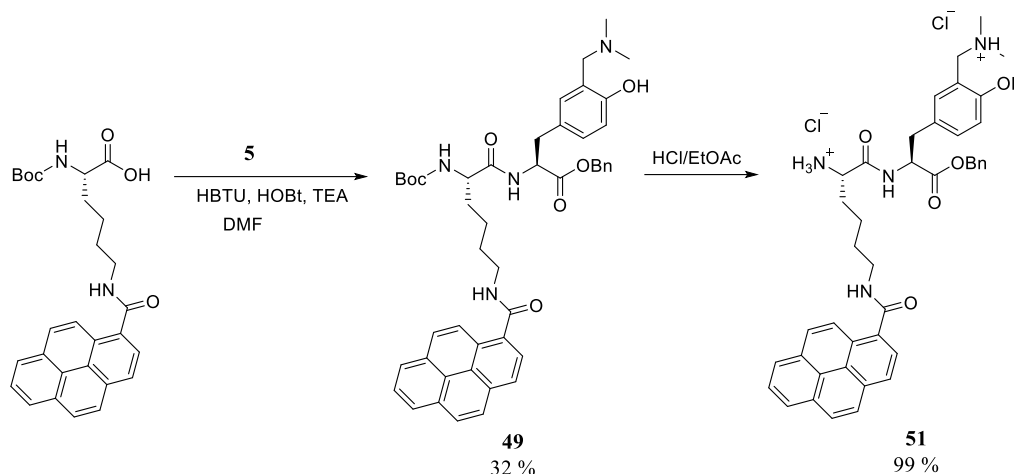
U Laboratoriju za sintetsku organsku kemiju, Instituta Ruđer Bošković ipak je uspješno pripremljen dipeptid **42** uz HBTU/HOBT aktivacijski protokol,<sup>230</sup> te je za potrebe ispitivanja nekovalentnih interakcija s različitim polinukletidima uklonjena Boc- zaštitna skupina.



#### 4.4.2. Priprava Boc-Lys(Pyr)-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn

U Laboratoriju za sintetsku organsku kemiju, Instituta Ruđer Bošković pripremljen je pirenski derivat Boc-Lys(Pyr)-OH iz Boc-Lys-OH sa slobodnom amino skupinom na ogranku i pirenkarboksilne kiseline **43** aktivirane sa sukcinimidom.<sup>216,226</sup>

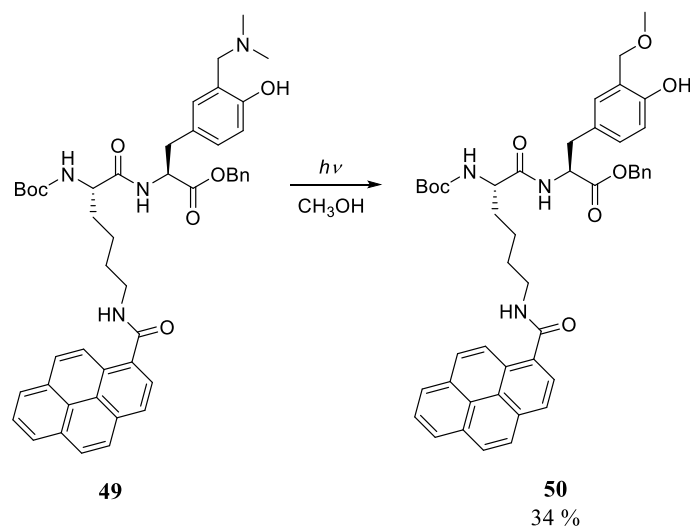
Dipeptid Boc-Lys(Pyr)-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**49**) je pripravljen peptidnom kondenzacijskom reakcijom u kojoj je karboksilna skupina Boc- zaštićenog pirenskog derivata aktivirana uz HBTU i HOBt, te vezana za benzilni ester *N,N*-dimetilaminmetilnog derivata tirozina. S obzirom da nam je cilj ispitati i nekovalentne interakcije s različitim polinukleotidima, zasićenom otopinom HCl-a u etil-acetatu uklonjena je Boc zaštitna skupina (shema 26).



Shema 26. Priprava dipeptida Boc-Lys(Pyr)-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**49**) i soli **51**

#### 4.4.3. Istraživanje fotokemijske reaktivnosti tripeptida Boc-Lys(Pyr)-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**49**)

Kako bi se ispitala fotokemijska reaktivnost modificiranog derivata tirozina uspješno ugrađenog u dipeptide, provedene su preparativne fotometanolize. (shema 27) Pretpostavka je da će u reakciji fotometanolize nastati metilni eter.<sup>214</sup> Tijek fotometanolize praćen je HPLC-om, dok je čisti fotoprodukt **50** izoliran kromatografijom u iskorištenju od 34 %. Osim fotoprodukta **50**, izolirano je i 4 mg početnog spoja **49**.

Shema 27. Preparativna fotometanoliza dipeptida **49**

#### 4.4.4. Interakcije spojeva **42xHCl** i **51** s različitim polinukleotidima

Pripremljeni su dipeptidi koji sadrže dvije neprirodne aminokiseline, od kojih je jedna piren koji služi za prepoznavanje polinukleotida te kao fluofofor. Druga aminokiselina je modificirani tirozin koji u fotokemijskim reakcijama generira QM i omogućuje potencijalno kovalentno vezanje za polinukleotide. Ispitivanje nekovalentnih interakcija dipeptida **42xHCl** i **51** s polinukleotidima *ct*-DNA, poli A – poli U, poli (dGdC)<sub>2</sub> i poli (dAdT)<sub>2</sub> provedeno je eksperimentima temperaturnog mekšanja te fluorescencijskom i CD spektroskopijom.<sup>226</sup> Eksperimenti temperaturnog mekšanja pokazali su slabu stabilizaciju polinukleotida *ct*-DNA i poli A – poli U. Kod svih provedenih fluorescencijskih titracija, dodavanje polinukleotida spojevima **42xHCl** i **51** rezultiralo je gašenjem fluorescencije, a iz dobivenih podataka koji su obrađeni nelinearnom regresijskom analizom Scatchardovom jednačbom<sup>233</sup> izračunate su konstante stabilnosti ( $\log K_a > 6$ ). Konstante stabilnosti sa sličnim vrijednostima govore da ne postoji neka selektivnost vezanja s obzirom na vrstu polinukleotida. CD titracije dipeptida **42xHCl** i **51** s različitim polinukleotidima pokazale su, na temelju ICD signala, da se oba spoja vežu u mali utor DNA te u utore RNA. Nadalje, provedeno je i ozračivanje kompleksa **51**-A<sub>10</sub>T<sub>10</sub> koje je pokazalo da generiranje QM inicira alkilaciju, te na taj način omogućuje potencijalno kovalentno fluorescentno označavanje oligonukleotida.<sup>226</sup>

### 4.5. Usporedba interakcija oligopeptida s različitim polinukleotidima

Iz literature je poznato da fenantridinski derivati interkaliraju dvostruku uzvojnica DNA ili RNA.<sup>257</sup> U našem slučaju peptida **41** s fenantridinskom aminokiselinom, iz CD spektara vidljivo je da se dipeptid pri pH 7,0 nespecifično veže u utore dvostruke uzvojnice DNA ili RNA. Međutim, pri pH 5,0 CD ukazuje na interkaliranje spoja **41** u dvostruku uzvojnica poli (dGdC). Unatoč različitom načinu vezanja, nastaju kompleksi sličnih konstanti stabilnosti ( $\log K_a \approx 5$ ), a pri nastajanju kompleksa dolazi do gašenja fluorescencije. Također je zanimljivo da je pri pH 5,0 uočena blaga stabilizacija dvostrukih uzvojnica DNA i destabilizacija RNA.

Pirenski derivati također su poznati po svom vezanju u utore DNA, ali mogu i interkalirati.<sup>144</sup>

U slučaju naših peptida s pirenskim aminokiselinama pokazali smo da se vjerojatno preferirano vežu u mali utor DNA te u utore RNA. Konstante vezanja ne ovise o udaljenosti dva aromatska supstituenta i nešto su viših vrijednosti no za fenantridinski dipeptid ( $\log K_a \approx 5-7$ ), ali konstante stabilnosti ne pokazuju trend i selektivnost s obzirom na vrstu dvostruke uzvojnice (AT ili GC-DNA ili RNA). Nekovalentnim vezanjem peptida na polinukleotide ne ostvaruje se termička stabilnost dvostrukih uzvojnica DNA ili RNA.

U CD spektrima vidljivo je da se ditriptofanski tripeptid **36** veže u mali utor dvostruke uzvojnice DNA. Nadalje, pri pH 7,0 tripeptid **36** ima neznatan učinak na stabilnost dvostruke uzvojnice DNA. S obzirom da je poznato da se ditriptofanski fragment veže na DNA, određene su konstante vezanja tripeptida **35** i **36** ( $\log K_a = 6,0 - 6,8$ ) koje su sličnih vrijednosti kao i kod peptida s pirenskim aminokiselinama. Nastajanje kompleksa polinukleotid-tripeptid, rezultiralo je gašenjem fluorescencije koje je uočeno i kod pirenskih i kod fenantridinskih derivata.

Ozračivanjem kompleksa peptida s polinukleotidima dolazi do nastajanja QM u kompleksu te do alkilacije polinukleotida. Tako je kod tripeptida demonstrirano stvaranje reaktivnog intermedijera QM koji alkilira dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub>, vjerojatno u malom utoru, a foto-alkilacija oligonukleotida dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub> uočena je i kod pirenskih dipeptida. Peptidi koji sadrže fotoreaktivnu skupinu i imaju mogućnost alkiliranja polinukleotida mogu se potencijalno primjenjivati za fluorescentno označavanje te imati niz primjena u biomedicini.

## § 5. ZAKLJUČAK

U okviru doktorske disertacije pripremljena je neprirodna aminokiselina, derivat tirozina **3** kojem je u *ortho* položaj do fenolne OH uvedena *N,N*-dimetilaminometilna skupina. *N,N*-dimetilaminometilni derivat tirozina (**3**) je fotokemijski reaktivan te u reakciji fotodeaminacije stvara reaktivne intermedijere kinon-metide (QM). Pripremljeni su i dipeptidi Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], **14** i **18**, Phe-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>, **19** i **20**, koji sadrže neprirodnu aminokiselinu i fenilalanin, te su ispitana njihova fotokemijska reaktivnost i fotofizička svojstva. Pripremljeni peptidi su slabo-fluorescentne molekule čija fotofizička svojstva najviše određuje prisutnost modificiranog tirozina, a kvantni prinosi fluorescencije kreću se u rasponu 0,006-0,007. Provedeno je ozračivanje neprirodne aminokiseline **3** i dipeptida **14**, **18-20** u metanolnoj otopini, a nastajanje metilnih etera potvrdilo je postojanje QM kao intermedijera. Reakcijama fotometanolize određeni su i kvantni prinosi reakcija, koji se kreću u rasponu 0,07-0,32. *N,N*-dimetilaminometilni derivat tirozina **3** ugradnjom u dipeptide zadržao je svoju fotokemijsku reaktivnost. Prisutnost QM detektirana je LFP-om, pri čemu su detektirani tranzijenti vremena života 13-20 ms koji apsorbiraju svjetlost na oko 400 nm i nestaju kinetikom prvog reda.

Uspješnom pripravom neprirodne aminokiseline, derivata tirozina koja sadrži fotoreaktivnu skupinu te ugradnjom takve aminokiseline u oligopeptide, proširen je kemijski prostor neprirodnih aminokiselina i peptida s različitim namjenama. Nadalje, kako aminokiselina ugradnjom u peptide zadržava svoju fotoreaktivnost, omogućuje se potencijalna napredna primjena tih peptida koji uz pobudu UV-zračenjem mogu djelovati kao foto-sklopke. Time je povećano i fundamentalno znanje o QM te proširena mogućnost njihove primjene.

Sintetizirana je serija tripeptida TrpTrp-Phe (**31**), Trp-Trp-Tyr (**32**) i Trp-TrpTyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (**33**). Sinteza je provedena u otopini uz sukcinimidnu aktivaciju karboksilnih skupina. U svrhu ispitivanja fotokemijske reaktivnosti tripeptida **33**, provedeno je ozračivanje u metanolu uz izolaciju metilnog etera koji ukazuje na prisutnost QM intermedijera u foto-reakciji. Nastajanje QM u reakciji fotometanolize spoja **33** potvrđeno je i LFP-om pri čemu je detektiran tranzijent koji apsorbira pri 350 nm i ima vrijeme života 450 ± 100 μs. Određeni su kvantni prinosi za reakciju fotometanolize tripeptida **33** te njegove hidrokloridne soli **36** te su dobivene vrijednosti

0,14 i 0,10. Snimljeni su apsorpcijski i fluorescencijski spektri tripeptida **31-33** u CH<sub>3</sub>CN, te njihovih HCl-soli **34-36** u smjesi 10 % CH<sub>3</sub>CN/kakodilatni pufer ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7,0). Apsorpcijski spektri spojeva **31-33** snimljeni u CH<sub>3</sub>CN prikazuju maksimum na 280 nm i rame na 225 nm što je tipično za triptofane. Fotofizička svojstva triptofana ovise i o polarnosti i protičnosti otapala. Kvantni prinosi fluorescencije imaju vrijednosti u rasponu 0,03-0,11.

U CD spektrima vidljivo je da se ditriptofanski tripeptid **36** veže u mali utor dvostruke uzvojnice DNA. Nadalje, pri pH 7,0 tripeptid **36** ima neznatan učinak na dvostruku uzvojnica DNA. S obzirom da je poznato da se ditriptofanski fragment veže na DNA, određene su konstante vezanja tripeptida **35** i **36** ( $\log K_a = 6,0 - 6,8$ ) koje su sličnih vrijednosti kao i kod peptida s pirenskim aminokiselinama. Nastajanje kompleksa polinukleotid-tripeptid, rezultiralo je gašenjem fluorescencije koje je uočeno i kod pirenskih i kod fenantridinskih derivata.

Derivat tirozina **3** uspješno je ugrađen u dipeptide koji sadrže dvije neprirodne aminokiseline, modificirani tirozin i fenantridin **40** ili piren **49**, koji su imali ulogu fluorofora te jedinice koja omogućuje nekovalentno vezanje peptide na polinukleotide. Sinteza je provedena u otopini uz različite aktivacijske protokole karboksilnih skupina. Provedena su ispitivanja fotofizičkih svojstava, fotokemijske reaktivnosti te nekovalentnog vezanja na polinukleotide. U svrhu ispitivanja fotokemijske reaktivnosti peptida s pirenskom aminokiselinom **49**, provedeno je ozračivanje u metanolu uz izolaciju metilnog etera koji ukazuje na prisutnost QM intermedijera u foto-reakciji. U CD spektrima vidljivo je da se dipeptid **41** s fenantridinskom aminokiselinom pri pH 7,0 nespecifično veže u utore dvostruke uzvojnice DNA ili RNA. Međutim, pri pH 5,0 CD ukazuje na interkaliranje spoja **41** u dvostruku uzvojnica poli (dGdC). Pri nastajanja kompleksa peptid-polinukleotid dolazi do gašenja fluorescencije, dok su konstante stabilnosti nastalih kompleksa sličnih vrijednosti ( $\log K_a \approx 5$ ). U eksperimentima određivanja temperature mekšanja pri pH 5,0 uočena je blaga stabilizacija dvostrukih uzvojnica DNA i destabilizacija RNA. Peptidi s pirenskim aminokiselinama se vjerojatno preferirano vežu u mali utor DNA te u utore RNA. Konstante vezanja ne ovise o udaljenosti dva aromatska supstituenta i nešto su viših vrijednosti no za fenantridinski dipeptid ( $\log K_a \approx 5-7$ ). Nekovalentnim vezanjem peptida na polinukleotide ne ostvaruje se termička stabilnost dvostrukih uzvojnica DNA ili RNA.

Pripravljene peptidne spojevi **36** i **51** vežu se nekovalentnim interakcijama na polinukleotide, a nakon fotokemijske pobude tih kompleksa dolazi do nastajanja QM u kompleksu te zatim alkilacije DNA.

Na nekoliko primjera fotoreaktivnih oligopeptida pokazali smo da peptidi koji sadrže fotoreaktivni tirozin i imaju mogućnost alkiliranja polinukleotida mogu imati potencijalnu primjenu za fluorescentno označavanje u biomedicini, a rezultati usporedbe strukture peptida, fotokemijske reaktivnosti i mogućnosti stvaranja nekovalentnih interakcija s polinukleotidima važne su informacije za dizajn sljedeće generacije peptida s primjenom u dijagnostici ili terapiji.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ACE – angiotenzin konvertirajući enzim

ACTH - adrenokortikotropni hormon

ATP – adenzin-trifosfat

Boc<sub>2</sub>O – di-tert-butil dikarbonat

BSA – goveđi serumski albumin

CD – cirkularni dikroizam

*ct*-DNA - *calf thymus*, DNA izolirana iz timusne žlijezde teleta

DIPEA – *N,N*-diizopropiletilamin

DMAP – 4-dimetilaminopiridin

DMF – *N,N*-dimetil formamid

DMSO – dimetil-sulfoksid

ds-DNA – dvolančana DNA

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid

ESIPT – intramolekulski prijenos protona u pobuđenom stanju

EtOAc – etil-acetat

FRET – fluorescentni rezonantni prijenos energije

GCP – gvanidnino–karbonil–pirolna skupina

GFP – zeleni fluorescentni protein

GnRH – gonadotropin oslobađajući hormon

GPCR – receptor vezan za G-proteine

GPx - glutation peroksidaza

GSH – glutation

GST – glutation S-transferaza

HBTU – 2-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev heksafluorofosfat

HOBT – 1-hidroksibenzotriazol

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

HRMS – spektrometrija masa visoke rezolucije

HSA – humani serumski albumini

LFP – laserska pulsna fotoliza

MIF – faktor inhibicije hormona koji stimulira oslobađanje melanocita  
NMM – *N*-metilmorfolin  
NMR – nuklearna magnetska rezonancija  
NHS – *N*-hidroksisukcinimid  
PyBOP – benzotriazol-1-il-oksi-tris-pirolidino-fosfonij heksafluorofosfat  
QM – kinon-metidi  
TFA – trifluoroctena kiselina  
THF – tetrahidrofuran  
TLC – tankoslojna kromatografija  
 $t_R$  – retencijsko vrijeme  
TyrRS – tirozin-sintetaza  
UV - ultraljubičasti



## § 7. LITERATURNI IZVORI

- [1] A. Ellert-Miklaszewska, K. Poleszak, B. Kaminska, *Future Med. Chem.* **9** (2) (2017) 199-221.
- [2] U. Dietrich, R. Dürr, J. Koch, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **14** (5) (2013) 501-512.
- [3] Y. Ji, H. Qiao, J. He, W. Li, R. Chen, J. Wang, L. Wu, R. Hu, J. Duan, Z. Chen, *J. Drug. Target.* **25** (7) (2017) 597-607.
- [4] S. Marqus, E. Pirogova, T.J. Piva, *J. Biomed. Sci.* **24** (2017) 21.
- [5] V. Apostolopoulos, J. Bojarska, T.-T. Chai, S. Elnagdy, K. Kaczmarek, J. Matsoukas, R. New, K. Parang, O.P. Lopez, H. Parhiz, C.O. Perera, M. Pickholz, M. Remko, M. Saviano, M. Skwarczynski, Y. Tang, W.M. Wolf, T. Yoshiya, J. Zabrocki, P. Zielenkiewicz, M. AlKhazindar, V. Barriga, K. Kelaidonis, E.M. Sarasia, I. Toth, *Molecules* **26** (2021) 430.
- [6] S. Pavan, F. Berti, *Anal. Bioanal. Chem.* **402** (2012) 3055–3070.
- [7] D. Maity, M. Li, M. Ehlers, C. Schmuck, *Chem. Commun.*, **53** (2017) 208-211.
- [8] J. Wu, Y. Zou, C. Li, W. Sicking, I. Piantanida, T. Yi, C. Schmuck, *J. Am. Chem. Soc.* **134** (2012) 1958-1961.
- [9] D. Maity, J. Jiang, M. Ehlers, J. Wu, C. Schmuck, *Chem. Commun.* **52** (2016) 6134-6137.
- [10] L.-M. Tumir, M. Radić Stojković, I. Piantanida, *Beilstein J. Org. Chem.* **10** (2014) 2930-2954.
- [11] S. R. Rajski, R. M. Williams, *Chem. Rev.* **98** (1998) 2723-2796.
- [12] Đ. Škalamera, C. Bohne, S. Landgraf, N. Basarić, *J. Org. Chem.* **80** (21) (2015) 10817-10828.
- [13] S. E. Rokita, (Ed.) *Quinone Methides*, Wiley, Hoboken, 2009.
- [14] V. S. Li, H. Kohn, *J. Am. Chem. Soc.* **113** (1991) 275–283.
- [15] M. Freccero, *Mini Rev. Org. Chem.* **1** (2004) 403–415.
- [16] S. E. Rokita, J. Yang, P. Pande, W. A. Greenberg, *J. Org. Chem.*, **62** (1997) 3010–3012.
- [17] M. Chatterjee, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994) 1690–1697.
- [18] P. Pande, J. Shearer, J. Yang, W. A. Greenberg, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 6773–6779.
- [19] W. F. Veldhuyzen, P. Pande, P., S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 14005-14013.

- [20] D. Tesauro, A. Accardo, C. Diaferia, V. Milano, J. Guillon, L. Ronga, F. Rossi, *Molecules*. **24** (2) (2019) 351.
- [21] C. M. Ruber Perez, N. Stephanopoulos, S. Sur, S. S. Lee, C. Newcomb, S. I. Stupp, *Ann. Biomed. Eng.* **43** (2015) 501–514.
- [22] A. Henninot, J. C. Collins, J. M. Nuss, *J. Med Chem.* **61** (2018) 1382–1414.
- [23] M. Muttenthaler, G. F. King, D. J. Adams, P. F. Alewood, *Nat Rev Drug Discov* **20** (2021) 309–325.
- [24] L. Wang, N. Wang, W. Zhang, X. Cheng, Z. Yan, G. Shao, X. Wang, R. Wang, C. Fu, *Sig Transduct Target Ther* **7** (2022) 48.
- [25] L. Diao, B. Meibohm, *Clin. Pharmacokinet.* **52** (10) (2013) 855–868.
- [26] R. I. Mahato, A. S. Narang, L. Thoma, D. D. Miller, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **20** (2–3) (2003) 153–214.
- [27] R. O. Davies, H. J. Gomez, J. D. Irvin, J. F. Walker, *Br J Clin Pharmacol* **18** (1984) (Suppl 2) 215S-229S.
- [28] [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/018998s083lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/018998s083lbl.pdf)
- [29] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lisinopril>
- [30] S. Laurent, *Pharmacol Res.* **124** (2017) 116-125.
- [31] H. Takagi, H. Shiomi, H. Ueda, H. Amano, *Nature*. **282** (1979) 410–412.
- [32] H. Ueda, H. Shiomi, H. Takagi, *Brain Res.* **198** (1980) 460–464.
- [33] H. Ueda, K. Tatsumi, H. Shiomi, H. Takagi, *Brain Res.* **231** (1982) 222–224.
- [34] T. Tsukahara, S. Yamagishi, H. Neyama, H. Ueda, *Peptides*. **101** (2018) 60–68.
- [35] H. Ueda, Y. Yoshihara, H. Misawa, N. Fukushima, T. Katada, M. Ui, H. Takagi, M. Satoh, *J Biol Chem.* **264** (1989) 3732–3741.
- [36] C. Brownson, A. R. Hipkiss, *Free Radical Biol. Med.* **28** (2000) 1564–1570.
- [37] A. A. Boldryev, A. M. Dupin, A. Y. Bunin, M. A. Babizhaev, S. E. Severin, *Biochem. Int.* **15** (1987) 1105–1113.
- [38] V. Castelletto, G. Cheng, B. W. Greenland, I. W. Hamley, P. J. Harris, *Langmuir* **27** (6) (2011) 2980–2988.
- [39] S. E. Gariballa, A. J. Sinclair, *Age Aging* **29** (2000) 207–210.
- [40] L. J. Hobart, I. Seibel, G. S. Yeargans, N. W. Seidler, *Life Sci.* **75** (2004) 1379–1389.
- [41] J. E. Preston, A. R. Hipkiss D. T. Himsworth, I. A. Romero, J. N. Abbott, *Neurosci Lett.* **242** (2) (1998) 105-108.

- [42] E. T. Trexler, A. E. Smith-Ryan, J. R. Stout, J. R. Hoffman, C. D. Wilborn, C. Sale, R. B. Kreider, R. Jäger, C. P. Earnest, L. Bannock, B. Campbell, *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. **12** (2015) 30.
- [43] A. Meister, S. S. Tate, *Annu Rev Biochem* **45** (1976) 559–604.
- [44] M. J. May, T. Vernoux, C. Leaver, M. Van Montagu, D. Inzé, *Journal of Experimental Botany* **49** (1998) 649-666.
- [45] D. M. Townsend, K. D. Tew, H. Tapiero, *Biomed Pharmacother.* **57**(3-4) (2003) 145-155.
- [46] M. E. Anderson, *Chem Biol Interact* **111** (1998) 1–14.
- [47] P. Mullineaux, G. P. Creissen, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
- [48] R. J. Mallis, M. J. Hamann, W. Zhao, T. Zhang, S. Hendrich, J. A. Thomas, *Biol Chem* **383** (2002) 649–662.
- [49] G. K. Balendiran, R. Dabur, D. Fraser, *Cell Biochem Funct.* **22** (6) (2004) 343-352.
- [50] V. Hudson, *Free Radical Biol Med* **30** (2001) 1440–1461.
- [51] R. Buhl, H. A. Jaffe, K. J. Holroyd, F. B. Wells, A. Mastrangeli, C. Saltini, A. M. Cantin, R. G. Crystal, *Lancet* **2** (1989) 1294–1298.
- [52] E. L. K. Sofic, K. Jellinger, P. Riederer, *Neurosci Lett* **142** (1992) 128–130.
- [53] L. Pickart, J. M. Vasquez-Soltero, A. Margolina, *Biomed Res Int.* **2015** (2015) 648108.
- [54] L. Pickart, M. M. Thaler, *Nature New Biology.* **243** (124) (1973) 85–87.
- [55] F. X. Maquart, L. Pickart, M. Laurent, P. Gillery, J. C. Monboisse, J. P. Borel, *FEBS Letters.* **238** (2) (1988) 343–346.
- [56] L. Pickart, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* **19** (8) (2008) 969–988.
- [57] A. Gruchlik, M. Jurzak, E. Chodurek, Z. Dzierzewicz, *Acta Poloniae Pharmaceutica.* **69** (6) (2012) 1303–1306.
- [58] Y. Hong, T. Downey, K. W. Eu, P. K. Koh, P. Y. Cheah, *Clinical & Experimental Metastasis.* **27** (2) (2010) 83–90.
- [59] T. Aoyagi, T. Takeuchi, A. Matsuzaki, K. Kawamura, S. Kondo, *J. Antibiot.* **22** (1969) 283-286.
- [60] S. Kim, Y. B. Kim, K. J. Lee, *Biochem. J.* **331** (2) 1998, 539-545.
- [61] J. Haspel, R. S. Shaik, E. Ifedigbo, K. Nakahira, T. Dolinay, J. A. Englert, A. M. Choi, *Autophagy* **7** (2011) 629-642.

- [62] P. Suder, P. Novák, V. Havlíček, A. Bodzoń-Kułakowska, *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (Second Edition)*, The Crossroads, 25–49, 2016.
- [63] [https://www.alzdiscovery.org/uploads/cognitive\\_vitality\\_media/Troriluzole\\_UPDATE\\_1.pdf](https://www.alzdiscovery.org/uploads/cognitive_vitality_media/Troriluzole_UPDATE_1.pdf)
- [64] <https://www.biohavenpharma.com/science-pipeline/glutamate/troriluzole>
- [65] M. Petersson, K. Uvnäs-Moberg, *Physiology & Behavior*. **83** (3) (2004) 475–481.
- [66] W. Pan, A. J. Kastin, *Peptides*, **28** (12) (2007) 2411–2434.
- [67] D. Xu, *Acta Universitatis Medicinalis Secundae Shanghai*, **6** (1986) 328–329.
- [68] W. Pan, A. J. Kastin, *Transmitters and Modulators in Health and Disease*, New Frontiers in Neuroscience, 3–17, Springer, New York, 2009.
- [69] A. J. Kastin, R. D. Olson, R. H. Ehrensing, M. C. Berzas, A. V. Schally, D. H. Coy, *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, **11** (6) (1979) 721–723.
- [70] N. P. Plotnikoff, A. J. Kastin, *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, **211** (2) (1974) 211–224.
- [71] J. Boler, F. Enzmann, K. Folkers, C. Y. Bowers, A. V. Schally, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37** (4) (1969) 705–710.
- [72] A. Ben-Shlomo, S. Melmed, *The Pituitary*, 23–45 Elsevier: London, (2017).
- [73] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Protirelin>
- [74] <https://www.tabletwisely.com/canada/relefact-trh-injection-liquid>
- [75] L. B. Marangell, M. S. George, A. M. Callahan, T. A. Ketter, P. J. Pazzaglia, T. A. L'Herrou, G. S. Leverich, R. M. Post, *Arch. Gen. Psychiatry*. **54** (3) (1997) 214–222.
- [76] W. Pierpaoli, *Curr Aging Sci*. **6** (1) (2013) 92–98.
- [77] W. Hamley, *Chem. Rev.* **117** (24) (2017) 14015–14041.
- [78] E. Ruoslahti, *Annual Review of Biochemistry*. **57** (1988). 375–413.
- [79] F. Li, S. D. Redick, H. P. Erickson, V. T. Moy, *Biophysical Journal*. **84** (2003) 1252–1262.
- [80] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials*. **24** (24) (2003) 4385–4415.
- [81] E. Garanger, D. Boturyn, P. Dumy, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. **7** (5) (2007) 552–558.
- [82] V. A. Najjar, *Ann. New York Acad. Sci* (1983) 1–11.
- [83] J. C. Nissen, D. L. Selwood, S. E. Tsirka, *J Neurochem*. **127** (2013) 394–402.
- [84] Z. Siemion, A. Kluczyk, *Peptides*. **20** (1999) 645–674.

- [85] M. Fridkin, V. A. Najjar, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **24** (1989) 1–40.
- [86] A. Bocheva, R. Zamfirova, T. Pajpanova, S. Todorov, M. Georgieva, E. Golovinsky, *Archives of Physiology and Biochemistry*, **106** (5) (1998) 378–383.
- [87] A. Kastin, K. Hahn, J. Zadina, *Life Sci* **69** (2001) 1305–1312.
- [88] J. Zadina, A. Kastin, *Pharmacol Biochem Behav* **25** (1986) 1303–1305.
- [89] X. Zhang, J. Zadina, M. Ehrlich, A. Kastin, *Mol Cell Neurosci.* **3** (4) (1992) 348–53.
- [90] <https://lktlabs.com/product/tyr-w-mif-1/>
- [91] K.-J. Chang, *NIDA Research Monograph Series* **69** (1986) 101–111.
- [92] R. J. Bodnar, *Peptides.* **101** (2018) 167–212.
- [93] G. Horvath, *Pharmacology & Therapeutics.* **88** (3) (2000) 437–463.
- [94] Z.-H. Gu, B. Wang, Z.-Z. Kou, Y. Bai, Chen, Y.-L. Dong, H. Li, Y. Q. Li, *Neurosignals.* **25** (1) (2017) 98–116.
- [95] W. M. Seganish, J. J. Lynch Jr., S. Sorota, *Comprehensive Medicinal Chemistry III, Treatments for Heart Failure*, 628–662 (2017).
- [96] H. Szeto, *Br J Pharmacol* **171** (2014) 2029–2050.
- [97] A. Karaa, R. Haas, A. Goldstein, J. Vockley, W. D. Weaver, B. H. Cohen, *Neurology*, **90** (14) (2018) 1212–1221.
- [98] D. Eser, F. di Michele, P. Zwanzger, A. Pasini, T. C. Baghai, C. Schule, R. Rupperecht, E. Romeo, *Neuropsychopharmacol* **30** (2005) 192–195.
- [99] D. Eser, G. Leicht, J. Lutz, S. Wenninger, V. Kirsch, C. Schüle, S. Karch, T. Baghai, O. Pogarell, C. Born, R. Rupperecht, C. Mulert, *Human Brain Mapping.* **30** (2) (2009) 511–522.
- [100] J. M. Braganza, K. Herman, P. Hine, G. Kay, *The Journal of Physiology.* **289** (1979) 9–16.
- [101] <https://dbpedia.org/page/Pentagastrin>
- [102] H. J. van Megen, H. G. Westenberg, J. A. den Boer, J. R. Haigh, M. Traub, *Psychopharmacology.* **114** (3) (1994) 449–455.
- [103] V. Brantl, D. Picone, P. Amodeo, P. A. Temussi, *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **191** (3) (1993) 853–859.
- [104] E. Schulte-Frohlinde, W. Reindl, D. Bierling, C. Lerch, V. Brantl, H. Teschemacher, V. Schusdziarra, *Peptides.* **21** (3) (2000) 439–442.

- [105] P. E. Holtzheimer, C. B. Nemeroff, *Current Psychiatry Reports*. **10** (6) (2008) 465–473.
- [106] J. J. Rakofsky, P. E. Holtzheimer, C. B. Nemeroff, *Current Opinion in Chemical Biology*. **13** (3) (2009) 291–302.
- [107] R. D. Alarcón, *Antidepressants: past, present, and future*. Springer. 575 (2004).
- [108] E. Duque-Díaz, O. Alvarez-Ojeda, R. Coveñas, *Vitam Horm*. **111** (2019) 147–193.
- [109] J. E. Holden, Y. Jeong, J. M. Forrest, *AACN Clin Issues*. **16** (3) (2005) 291–301.
- [110] S. Zagon, M. F. Verderame, P. J. McLaughlin, *Brain Res Brain Res Rev*. **38** (3) (2002) 351–376.
- [111] J. Graf, Y. Iwamoto, M. Sasaki, G. R. Martin, H. K. Kleinman, F. A. Robey, Y. Yamada, *Cell* **48** (1987) 989–996.
- [112] I. Saiki, J. Murata, J. Iida, T. Sakurai, N. Nishi, K. Matsuno, I. Azuma, *Br. J. Cancer* **60** (1989) 722–728.
- [113] Y. Iwamoto, M. Nomizu, Y. Yamada, Y. Ito, K. Tanaka, Y. Sugioka, *Br. J. Cancer* **73** (1996) 589–595.
- [114] S. Sur, E. T. Pashuck, M. O. Guler, M. Ito, S. I. Stupp, T. Launey, *Biomaterials* **33** (2012) 545–555.
- [115] E. Khalili Samani, M. R. Mofid, M. Malakoutikhah, *J Pept Sci*. **26** (2) (2020) 3227.
- [116] L. O. Tjernberg, J. Naslund, F. Lindqvist, J. Johansson, A. R. Karlstrom, J. Thyberg, L. Terenius, C. Nordstedt, *J. Biol. Chem*. **271** (1996) 8545–8548.
- [117] C. Soto, E. M. Sigurdsson, L. Morelli, R. A. Kumar, E. M. Castaño, B. Fragnone, *Nat. Med*. **4** (1998) 822–826.
- [118] E. Gazit, *FASEB J*. **16** (2002) 77–83.
- [119] C. H. Görbitz, *Chem. Eur. J*. **7** (2001) 5153–5159.
- [120] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Medicinska naklada, 2013.
- [121] <https://www.technologynetworks.com/genomics/lists/what-are-the-key-differences-between-dna-and-rna-296719>
- [122] S. Bhaduri, N. Ranjan, D. P. Arya, *Beilstein J. Org. Chem*. **14** (2018) 1051–1086.
- [123] N. V. Hud, J. Plavec, *Biopolymers* **69** (2003) 144–158.
- [124] W. Saenger, In *Principles of Nucleic Acid Structure* Springer, New York, 1984.
- [125] U. Heinemann, Y. Roske, *Symmetry*. **12** (5) (2020) 737.
- [126] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **171** (1953) 737–738.

- [127] S. Ramotowska, A. Ciesielska, M. Makowski, *Molecules*. **26** (11) (2021) 3478–3501.
- [128] I. Piantanida, *Kem. Ind.* **52** (2003) 545–552.
- [129] X. Zhou, G. Zhang, J. Pan, *Int. J. Biol. Macromol.* **74** (2015) 185–194.
- [130] A. Bendic, M. Enache, E. Volanschi, *J. Mol. Graph. Model.* **24** (2005) 10–16.
- [131] A. Y. Solovyev, S. I. Tarnovskaya, I. A. Chernova, L. K. Shataeva, Y. A. Skorik, *Int J Biol Macromol* **78** (2015) 39–45.
- [132] L. I. Fedoreyeva, I. I. Kireev, V. Kh. Khavinson, B. F. Vanyushin, *Biochemistry (Mosc)*. **76** (11) (2011) 1210–1219.
- [133] V. T. Ivanov, A. A. Karelin, M. M. Philippova, I. V. Nazimov, V. Z. Pletnev, *Biopolymers*, **43** (1997) 171–188.
- [134] V. K. Khavinson, L. Shataeva, A. Chernova, *Neuroendocrinology Letters*, **26** (2005) 237–241.
- [135] V. K. Khavinson, A. Y. Solovyov, L. K. Shataeva, *Bull Exp Biol Med*. **141** (4) (2006) 457–461.
- [136] V. K. Khavinson, A. Y. Solovyov, L. K. Shataeva, *Bull Exp Biol Med*. **146** (2008) 624–626.
- [137] V. K. Khavinson, I. G. Popovich, N. S. Linkova, E. S. Mironova, A. R. Ilina, *Molecules*. **26** (22) (2021) 7053.
- [138] V. K. Khavinson, N. S. Lin'kova, S. I. Tarnovskaya, *Bull Exp Biol Med* **162** (2016) 288–292.
- [139] D. Maity, *Beilstein J. Org. Chem.* **16** (2020) 2971–2982.
- [140] D. Maity, A. Gigante, P. A. Sánchez-Murcia, E. Sijbesma, M. Li, D. Bier, S. Mosel, S. Knauer, C. Ottmann, C. Schmuck, *Org. Biomol. Chem.* **17** (2019) 4359–4363.
- [141] J. Wu, A. Zawistowski, M. Ehrmann, T. Yi, C. Schmuck, *J. Am. Chem. Soc.* **133** (2011) 9720–9723.
- [142] L. Chen, J. Wu, C. Schmuck, H. Tian, *Chem. Commun.* **50** (2014) 6443–6446.
- [143] L. H. Hurley, *Nat. Rev. Cancer* **2** (2002) 188–200.
- [144] M. E. Østergaard, P. J. Hrdlicka, *Chem. Soc. Rev.* **40** (2011) 5771–5788.
- [145] P. S. Nagle, F. Rodriguez, B. Nguyen, W. D. Wilson, I. Rozas, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 4397–4406.
- [146] M. Dukši, D. Baretić, V. Čaplar, I. Piantanida, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 2671–2676.

- [147] J. Matić, F. Šupljika, T. Tandarić, M. Dukši, P. Piotrowski, R. Vianello, A. Brozovic, I. Piantanida, C. Schmuck, M. R. Stojković, *Int. J. Biol. Macromol* **134** (2019) 422–434.
- [148] R. M. C. Dawson, *Data for Biochemical Research*, Clarendon Press, 1986.
- [149] Ž. Ban, B. Žinić, R. Vianello, C. Schmuck, I. Piantanida, *Molecules* **22** (12) (2017) 2213.
- [150] J. Matić, F. Šupljika, N. Tir, P. Piotrowski, C. Schmuck, M. Abramić, I. Piantanida, S. Tomić, *RSC Adv.* **6** (86) (2016) 83044–83052.
- [151] L. B. Yuan, T. Tian, Y. Chen, S. Y. Yan, X. W. Xing, Z. A. Zhang, Q. Q. Zhai, L. Xu, S. O. Wang, X. C. Weng, B. F. Yuan, Y. Q. Feng, X. Zhou, *Sci Rep* **3** (2013) 01811.
- [152] R. Dalangin, A. Kim, R. E. Campbell, *Int J Mol Sci.* **21** (17) (2020) 6197.
- [153] P. Wellendorph, H. Bräuner-Osborne, H. *Br. J. Pharmacol.* **156** (2009) 869–884.
- [154] K. Pierce, R. Premont, R. Lefkowitz, *Nat Rev Mol Cell Biol* **3** (2002) 639–650.
- [155] A. Corti, F. Curnis, *J. Cell Sci.* **124** (2011) 515–522.
- [156] Y. Miura, T. Takenaka, K. Toh, S. Wu, H. Nishihara, M. R. Kano, Y. Ino, T. Nomoto, Y. Matsumoto, H. Koyama, H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, *ACS Nano* **10** (2013) 8583–8592.
- [157] J. C. J. Barna, D. H. Williams, *Annu. Rev. Microbiol.* **38** (1984) 339–357.
- [158] D. H. Williams, B. Bardsley, *Angew Chem* **111** (1999) 1264–1286.
- [159] P. F. Boston, P. Jackson, R. J. Thompson, *J. Neurochem.* **38** (1982) 1475–1482.
- [160] D. N. Gosalia, C. M. Salisbury, J. A. Ellman, S. L. Diamond, *Mol. Cell. Proteomics* **4** (2005) 626–636.
- [161] P. R. Wich, C. Schmuck, *Angew. Chem.* **49** (2010) 4113.
- [162] Q. Wang, X. Shi, X. Zhu, M. Ehlers, J. Wu, C. Schmuck, *Chem. Commun.* **50** (2014) 6120–6122.
- [163] Q. Liu, J. Wang, B. J. Boyd, *Talanta.* **136** (2015) 114–127.
- [164] Q. Z. Wang, Z. H. Dai, S. M. Cahill, M. Blumenstein, D. S. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 14016–14017.
- [165] D. S. Lawrence, Q. Wang, *Chembiochem.* **8** (4) 2007 373–378.
- [166] M. S. Singh, A. Nagaraju, N. Anand, S. Chowdhury, *RSC Adv.* **4** (2014) 55924–55959.
- [167] W.-J. Bai, J. G. David, Z.-G. Feng, M. G. Weaver, K.-L. Wu, T. R. R. Pettus, *Acc. Chem. Res.* **47** (12) (2014) 3655–3664.
- [168] O. L. Chapman, C. L. McIntosh, *J. Chem. Soc. D: Chem. Commun.* (1971) 383–384.



- [169] P. Wan, B. Barker, L. Diao, M. Fisher, Y. Shi, C. Yang, *Can. J. Chem.* **74** (1996) 465–475.
- [170] T. P. Pathak, M. S. Sigman, *J. Org. Chem.* **76** (2011) 9210–9215.
- [171] D. W. Brousmiche, M. Xu, M. Lukeman, P. Wan, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (42) (2003) 12961–12970.
- [172] K. Ramakrishnan, J. Fisher, *J. Med. Chem.* **29** (1986) 1215–1221.
- [173] H. M. Awad, M. G. Boersma, S. Boeren, P. J. van Bladeren, J. Vervoort, I. M. C. M. Rietjens, *Chem. Res. Toxicol.* **16** (2003) 822–831.
- [174] M. A. Lewis, D. Graff Yoerg, J. L. Bolton, J. A. Thompson, *Chem. Res. Toxicol.* **9** (1996) 1368–1374.
- [175] D. C. Thompson, K. Perera, R. London, *Chem.-Biol. Interact.* **126** (2000) 1–14.
- [176] S. Arumugam, J. Guo, N. E. Mbua, F. Friscourt, N. Lin, E. Nekongo, G.-J. Boons, V. V Popik, *Chem. Sci.* **5** (2014) 1591–1598.
- [177] R. Perez-Ruiz, O. Molins-Molina, E. Lence, C. Gonzalez-Bello, M. A. Miranda, M Consuelo Jimenez, *J. Org. Chem.* **83** (21) (2018) 13019–13029.
- [178] Q. Zhuo, K. D. Turnbull, *J. Org. Chem.* **64** (1999) 2847–2851.
- [179] R. W. Van De Water, T. R. R. Pettus, *Tetrahedron* **58** (2002) 5367–5405.
- [180] N. Basarić, K. Mlinarić-Majerski, M. Kralj, *Curr. Org. Chem.* **18** (2014) 3–18.
- [181] M. M. Toteva, J. P. Richard, *Adv. Phys. Org. Chem.* **45** (2011) 39–91.
- [182] P. Wan, B. Chak, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2* (1986) 1751–1756.
- [183] L. Diao, C. Yang, P. Wan, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 5369–5370.
- [184] B. Baker, L. Diao, P. Wan, *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.* **104** (1997) 91–96.
- [185] Đ. Škalamera, I. Antol, K. Mlinarić-Majerski, H. Vančik, D. L. Phillips, J. Ma, N. Basarić, *Chem. Eur. J.* **24** (2018) 9426–9435.
- [186] L. Diao, P. Wan, *Can. J. Chem.* **86** (2008) 105–118.
- [187] Y. Shi, P. Wan, *Can. J. Chem.* **83** (2005) 1306–1323.
- [188] K. Nakatani, N. Higashida, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **38** (1997) 5005–5008.
- [189] E. Modica, R. Zanaletti, M. Freccero, M. Mella, *J. Org. Chem.* **66** (2001) 41–52.
- [190] J. Ma, M. Šekutor, Đ. Škalamera, N. Basarić, D.L. Phillips, *J. Org. Chem.* **84** (13) (2019) 8630–8637.
- [191] C. Percivalle, F. Doria, M. Freccero, *Current Organic Chemistry* **18** (1) (2014) 19–43.

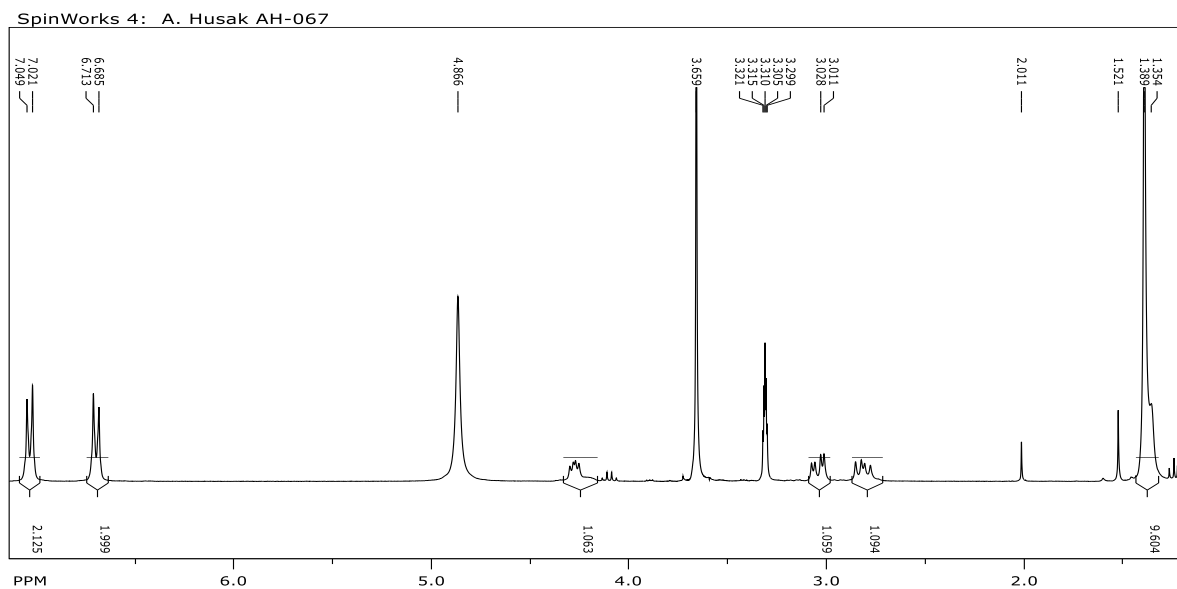
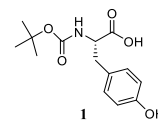
- [192] S. N. Richter, S. Maggi, S. C. Mels, M. Palumbo, M. Freccero, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 13973–13979.
- [193] Q. Zhou, K. D. Turnbull, *J. Org. Chem.* **65** (2000) 2022–2029.
- [194] E. E. Weinert, R. Dondi, S. Colloredo-Melz, K. N. Frankenfield, C. H. Mitchell, M. Freccero, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 11940–11947.
- [195] Q. Zeng, S. E. Rokita, *J. Org. Chem.* **61** (1996) 9080–9081.
- [196] J. L. Bolton, J. A. Thompson, Quinone Methides, S. E. Rokita (ur.), John Wiley&Sons, Hoboken, 2009.
- [197] D. C. Thompson, J. A. Thompson, M. Sugumaran, P. Moldeus, *Chem.-Biol. Interact.* **86** (1993) 129–162.
- [198] T. L. Born, J. K. Myers, T. S. Widlanski, F. Rusnak, *J. Biol. Chem.* **270** (1995) 25651–25655.
- [199] L. Mendive-Tapia, R. Subiros-Funosas, C. Zhao, F. Albericio, N. D. Read, R. Lavilla, M. Vendrell, *Nature Protocols.* **12** (2017) 1588–1619.
- [200] D. Kim, D. Ma, M. Kim, Y. Jung, N. H. Kim, C. Lee, S. Won Cho, S. Park, Y. Huh, J. Jung, K. Han Ahn, *J. Fluoresc.* **27** (2017) 2231–2238.
- [201] M. H. Y. Cheng, H. Savoie, F. Bryden, R. W. Boyle, *Photochem. Photobiol. Sci.* **16** (2017) 1260–1267.
- [202] Y. Chen, K. Tsao, S. L. Acton, J. W. Keillor, *Angew. Chem. Int. Ed.* **130** (2018) 12570–12574.
- [203] D. P. Murale, S. C. Hong, Md. M. Haque, J.-S. Lee, *Proteome Sci.* **15** (14) (2017) 1–34.
- [204] K. Zlatić, I. Antol, L. Uzelac, A.-M. Mikecin Dražić, M. Kralj, C. Bohne, N. Basarić, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **12** (1) (2020) 347–351.
- [205] A. P. Demchenko, V. I. Tomin, P.-T. Chou, *Chem Rev.* **117** (2017) 13353–13381.
- [206] Z. Xiang, H. Ren, Y. S. Hu, I. Coin, J. Wei, H. Cang, L. Wang, *Nat Methods* **10** (2013) 885–888.
- [207] J. L. Furman, M. Kang, S. Choi, Y. Cao, E. D. Wold, S. B. Sun, V. V. Smider, P. G. Schultz, C. H. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **136** (23) (2014) 8411–8417.
- [208] N. Wang, B. Yang, C. Fu, H. Zhu, F. Zheng, T. Kobayashi, J. Liu, S. Li, C. Ma, P. G. Wang, Q. Wang, L. Wang, *J Am Chem Soc.* **140** (15) (2018) 4995–4999.

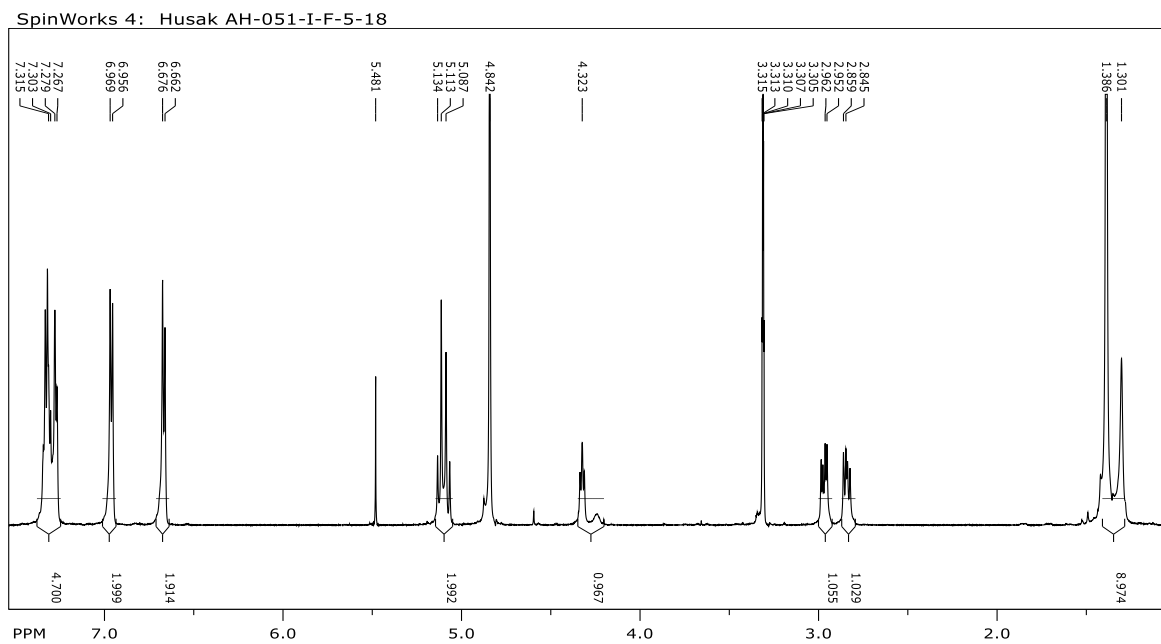
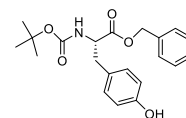
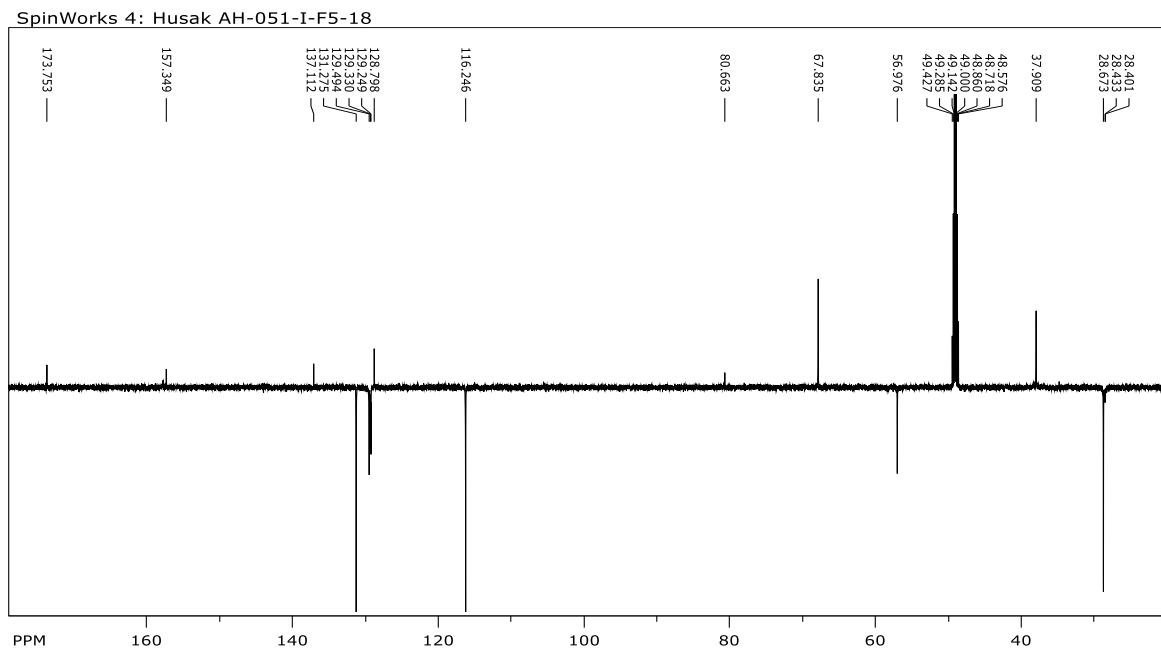
- [209] J. Liu, S. Li, N. A. Aslam, F. Zheng, B. Yang, R. Cheng, N. Wang, S. Rozovsky, P. G. Wang, Q. Wang, L. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **141** (2019) 9458–9462.
- [210] M. C. Noe, A. M. Gilbert, *Annu. Rep. Med. Chem.* **47** (2012) 413–439.
- [211] W. Horspool, F. Lenci, *Handbook of Organic Chemistry and Photobiology* 2nd Ed; CRC Press: Boca Raton (2004).
- [212] O. Keller, W. E. Keller, G. van Look, G. Wersin, *Org. Synth.* **7** (1990) 70–78.
- [213] *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, ed. A. Felix, L. Moroder, C. Toniolo, Thieme, Stuttgart, 2004, vol. 22.
- [214] A. Husak, B. P. Noichl, T. Šumanovac Ramljak, M. Sohora, Đ. Škalamera, N. Budiša, N. Basarić, *Org. Biomol. Chem.* **14** (2016) 10894–10905.
- [215] A. Tamiselvi, G. Muyesh, *Inorg. Chem.* **50** (2011) 749–756.
- [216] B. Siddique, J. Duhamel, *Langmuir* **27** (2011) 6639–6650.
- [217] J. R. Luly, N. Yi, J. Soderquist, H. Stein, J. Cohen, T. J. Perun, J. J. Plattner, *J. Med. Chem.* **30** (1987) 1609–1616.
- [218] S. Liaqat, S. S. Panda, A. Rauf, A. O. Al-Youbi, A. Katritzky, *Synthesis* (2014) 67–72.
- [219] V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis* (1984) 572–575.
- [220] N. Naganna, N. Madhavan, *J. Org. Chem.* **79** (2014) 11549–11557.
- [221] N. Kumar Mishra, K. Ballabh Joshi, S. Verma, *Mol. Pharmaceutics* **10** (2013) 3903–3912.
- [222] H. Chen, P. Gao, M. Zhang, W. Liao, J. Zhang, *New J. Chem.* **38** (2014) 4155–4166.
- [223] A. Erben, I. Sviben, B. Mihaljević, I. Piantanida, N. Basarić, *Molecules* **26** (2021) 4315.
- [224] M. Dukši, D. Baretić i I. Piantanida, *Acta Chim. Slov.* **59** (2012) 464–472.
- [225] A. Erben, J. Matić, N. Basarić, I. Piantanida, *Croat. Chem. Acta*, **92** (2019) 249–258.
- [226] I. Sviben, M. Glavaš, A. Erben, T. Bachelart, D. Pavlović Saftić, I. Piantanida, N. Basarić, *Molecules*, **28** (2023) 7533.
- [227] S. Goldstein, J. Rabani, *J. Photochem. Photobiol.* **193** (2008) 50–55.
- [228] M. Montalti, A. Credi, L. Prodi, M. T. Gandolfi, *Handbook of Photochemistry*; CRC Taylor and Francis: Boca Raton, FL, USA, 2006.
- [229] G. Malojčić, I. Piantanida, M. Marinić, M. Žinić, M. Marjanović, M. Kralj, K. Pavelić, H.-J. Schneider, *Org. Biomol. Chem.* **3** (2005) 4373–4381.

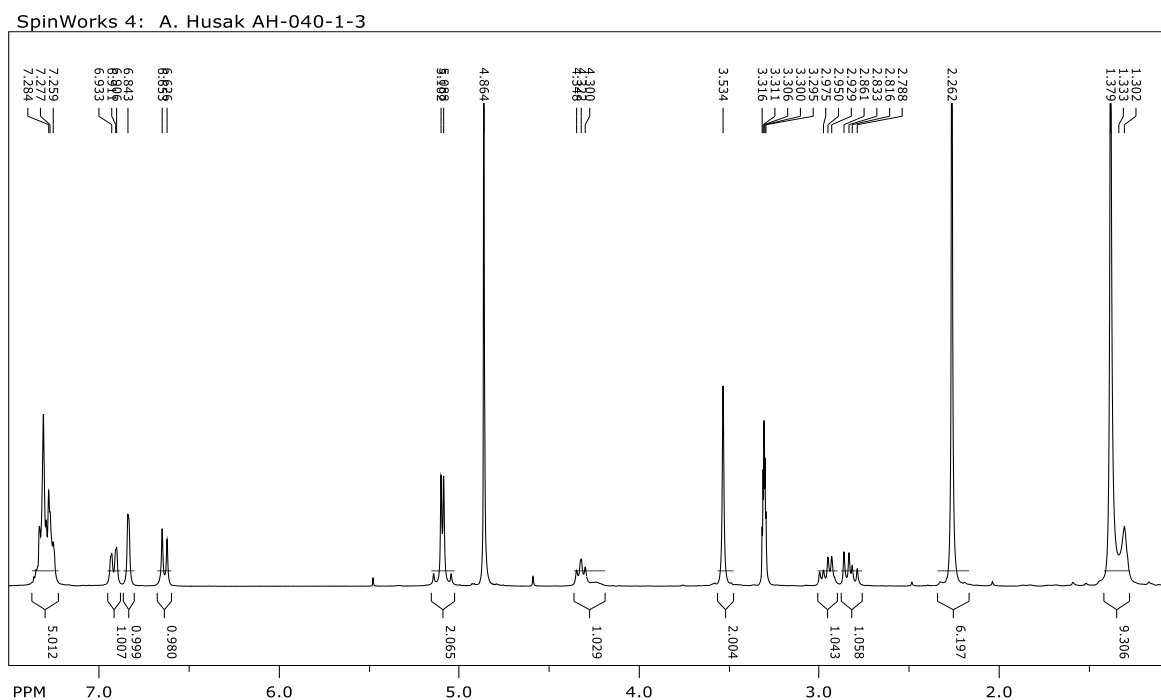
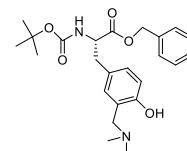
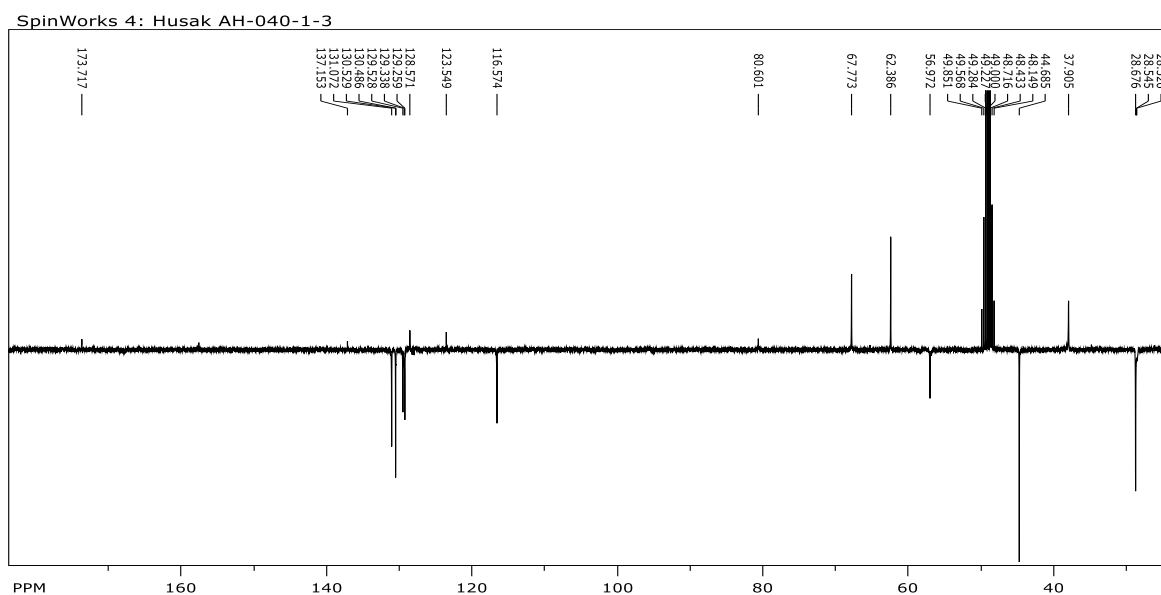
- [230] L. Mergny, L. Lacroix, *Oligonucleotides* **13** (2003) 515–537.
- [231] I. Piantanida, B. S. Palm, P. Čudić, M. Žinić, H. J. Schneider, *Tetrahedron* **60** (2004) 6225–6231.
- [232] E. Trinquet, G. Mathis, *Mol. Bio Syst.* **2** (2006) 380–387.
- [233] D. McGhee, P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.* **103** (1976) 679–681.
- [234] I. Krošl, M. Koščak, K. Ribičić, B. Žinić, D. Majhen, K. Božinović, I. Piantanida, *Int. J. Mol. Sci.* **23** (2022) 7006.
- [235] N. Basarić, I. Žabčić, K. Mlinarić-Majerski, P. Wan, *J. Org. Chem.*, **75** (2010) 102–116.
- [236] S. Arumugam, V. V. Popik, *J. Am. Chem. Soc.* **131** (2009) 11892–11899.
- [237] N. Basarić, N. Došlić, J. Ivković, Y.-H. Wang, J. Veljković, K. Mlinarić-Majerski, P. Wan, *J. Org. Chem.* **78** (2013) 1811–1823.
- [238] X. Zhang, Y. Yang, M. Zhao, L. Liu, M. Zheng, Y. Wang, J. Wu, S. Peng, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 3410–3419.
- [239] F. W. Teale, G. Weber, *Biochem J.* **65** (3) (1957) 476–482.
- [240] J. T. Vivian, P. R. Callis, *Biophys. J.* **80** (2001) 2093–2109.
- [241] E. H. Strickland, C. Billups, E. Kay, *Biochemistry* **11** (1972) 3657–3662.
- [242] B. L. Van Duuren, *J. Org. Chem.* **26** (1961) 2954–2960.
- [243] N. Boens, W. Qin, N. Basarić, J. Hofkens, M. Ameloot, J. Pouget, J.-P. Lefèvre, B. Valeur, E. Gratton, M. van de Ven, N. D. Silva, Y. Engelborghs, K. Willaert, A. Sillen, G. Rumbles, D. Phillips, A. J. W. G. Visser, A. van Hoek, J. R. Lakowicz, H. Malak, I. Gryczynski, A. G. Szabo, D. T. Krajcarski, N. Tamai, A. Miura, *Anal. Chem.* **79** (2007) 2137.
- [244] D. V. Bent, E. Hayon, *J. Am. Chem. Soc.* **97** (1975) 2612–2619.
- [245] F. Dudley Bryant, R. Sanfusl, L. I. *J. Phys. Chem.* **79** (1975) 2711–2716.
- [246] N. Basarić, A. Franco-Cea, M. Alešković, K. Mlinarić-Majerski, P. Wan, *Photochem. Photobiol. Sci.* **9** (2010) 779–790.
- [247] B. S. Palm, I. Piantanida, M. Žinić, H. J. Schneider, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2** (2000) 385–392.
- [248] A. Rodger, B. Norden, *Circular Dichroism and Linear Dichroism*; Oxford University Press: New York, 1997.

- [249] N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody, *Circular Dichroism Principles and Applications*; Wiley-VCH: New York, 2000.
- [250] M. Eriksson, B. Norden, *Methods in enzymology* **340** (2001) 68–98.
- [251] C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry, Part III: The Behavior of Biological Macromolecules* Freeman, San Francisco (1980), pp. 1109–1181.
- [252] L.-M. Tumir, I. Piantanida, P. Novak, M. Žinić, *J. Phys. Org. Chem.* **15** (2002) 599–607.
- [253] L.-M. Tumir, I. Piantanida, M. Žinić, I. Juranović-Cindrić, Z. Meić, M. Kralj, S. Tomić, *Eur. J. Med. Chem.* **41** (2006) 1153–1166.
- [254] Juranović, Z. Meić, I. Piantanida, L.-M. Tumir, M. Žinić, *Chem. Commun.* (2002) 1432–1433.
- [255] L.-M. Tumir, I. Piantanida, I. Juranović Cindrić, T. Hrenar, Z. Meić, M. Žinić, *J. Phys. Org. Chem.* **16** (2003) 891–899.
- [256] R. L. Jones, W. D. Wilson, *Biopolymers* **20** (1981) 141–154.
- [257] M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson, *Small Molecule DNA and RNA Binders: From Synthesis to Nucleic Acid Complexes*, Wiley-VCH, 2004.
- [258] B. C. Baguley, M. LeBret, *Biochemistry* **23** (1984) 937.
- [259] R. Morgan, J. S. Lee, D. E. Pulleyblank, N. L. Murray, D. H. Evans, *Nucleic Acid Res.* **7** (1978) 547.

## § 8. DODATAK

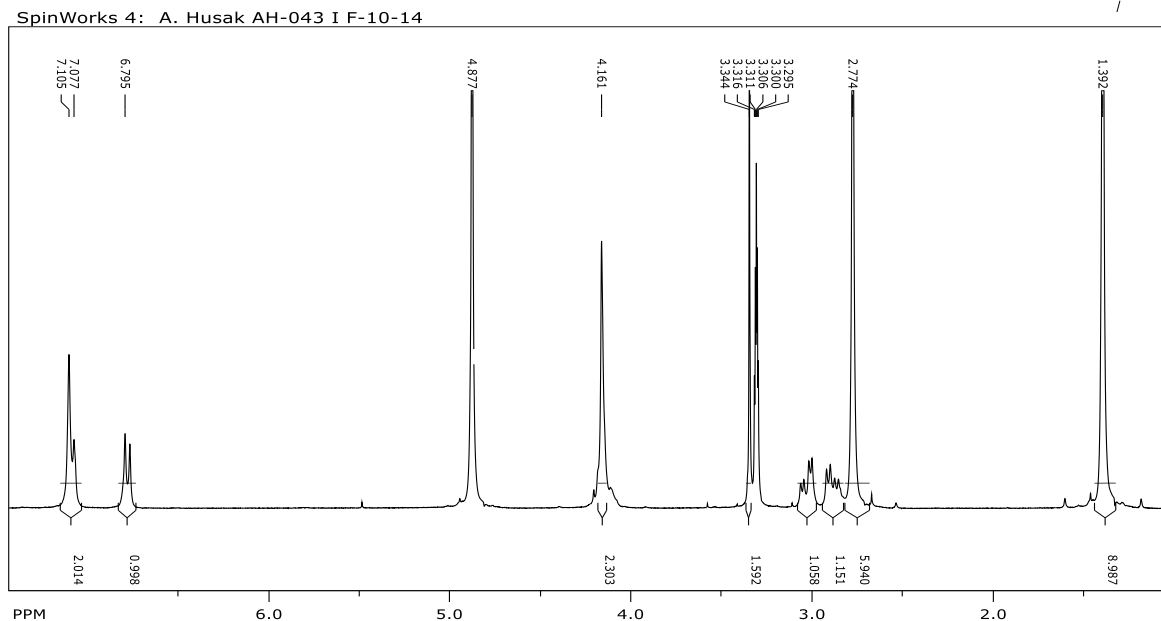
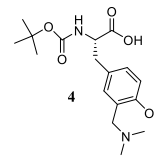
Prilog 1.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Boc-Tyr-OH (1)

Prilog 2.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) spektar Boc-Tyr-OBn (**2**)Prilog 3.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz, APT) spektar Boc-Tyr-OBn (**2**)

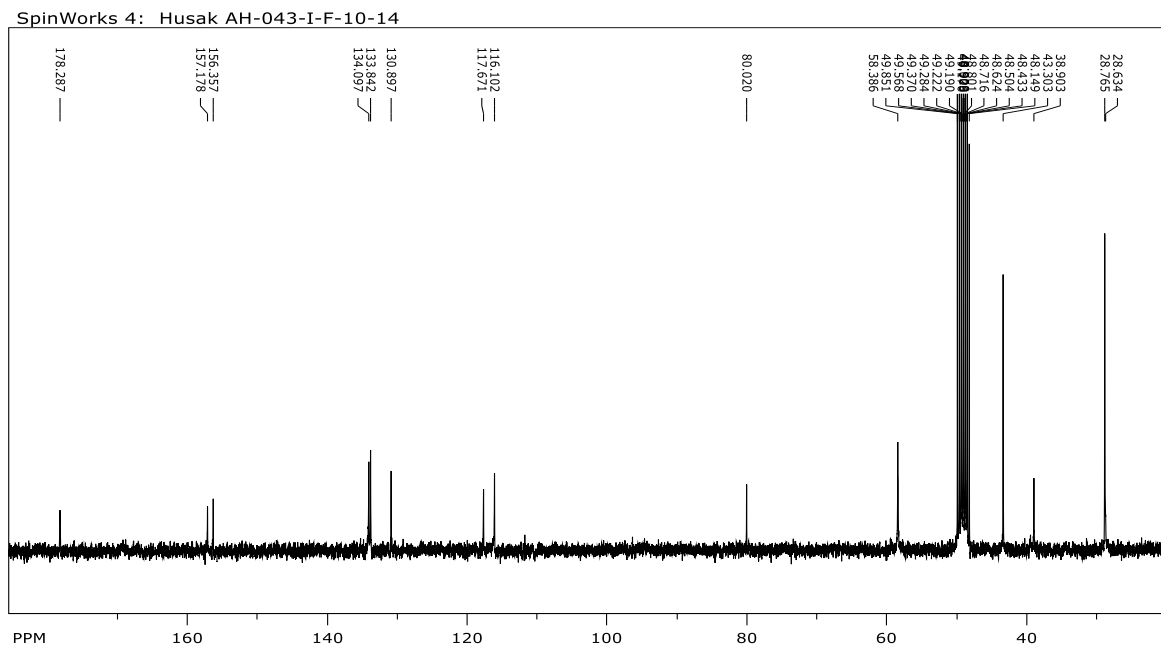
Prilog 4.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Boc-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]-OBn (**3**)Prilog 5.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz, APT) spektar Boc-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]-OBn (**3**)

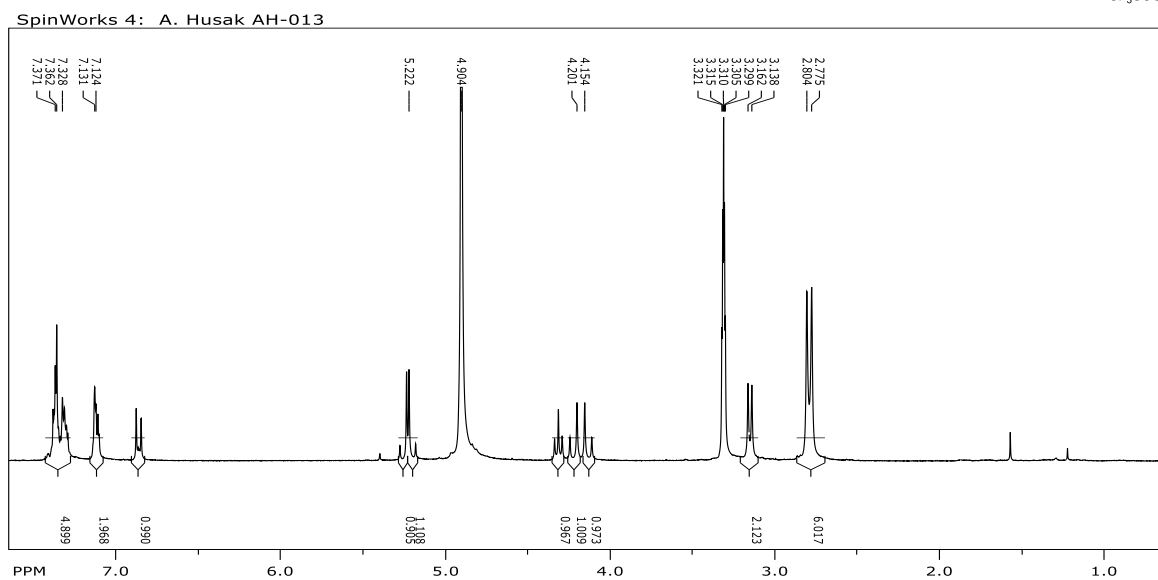
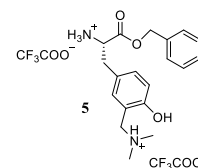
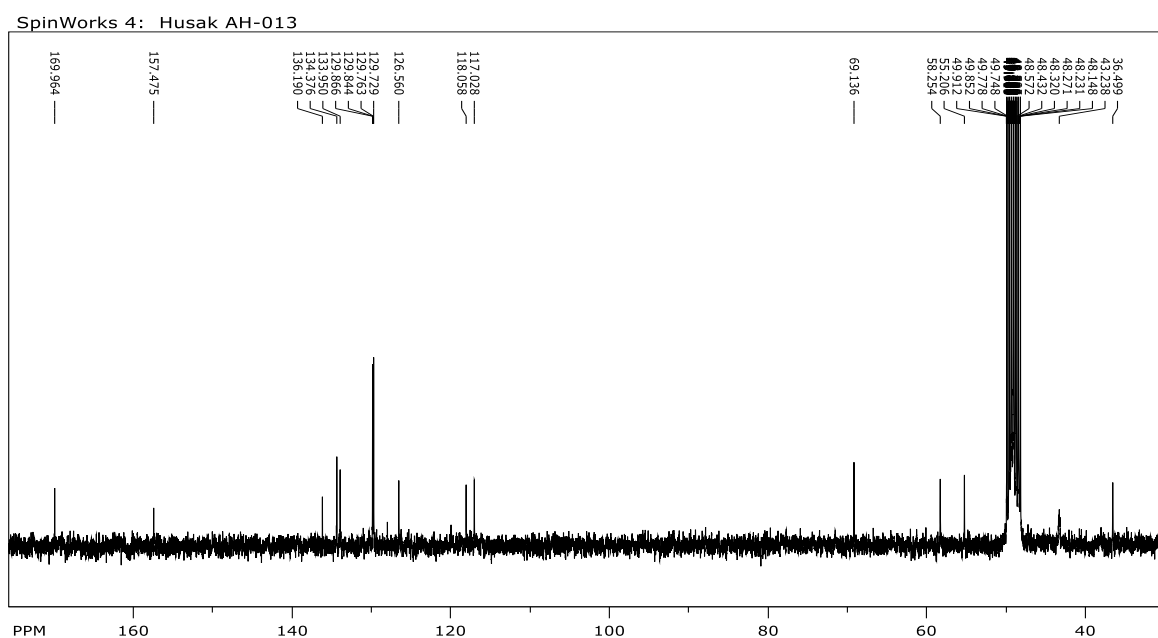


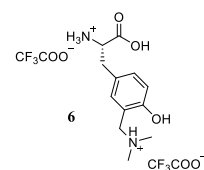
Prilog 6. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) spektar Boc-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OH (**4**)



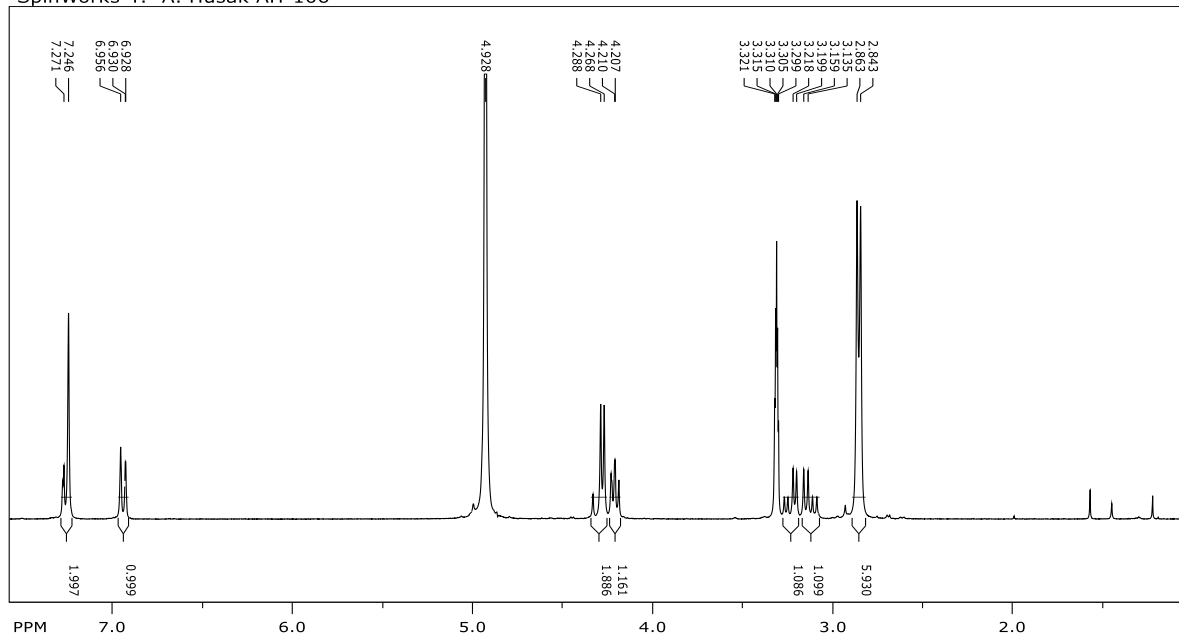
Prilog 7. <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) spektar Boc-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OH (**4**)



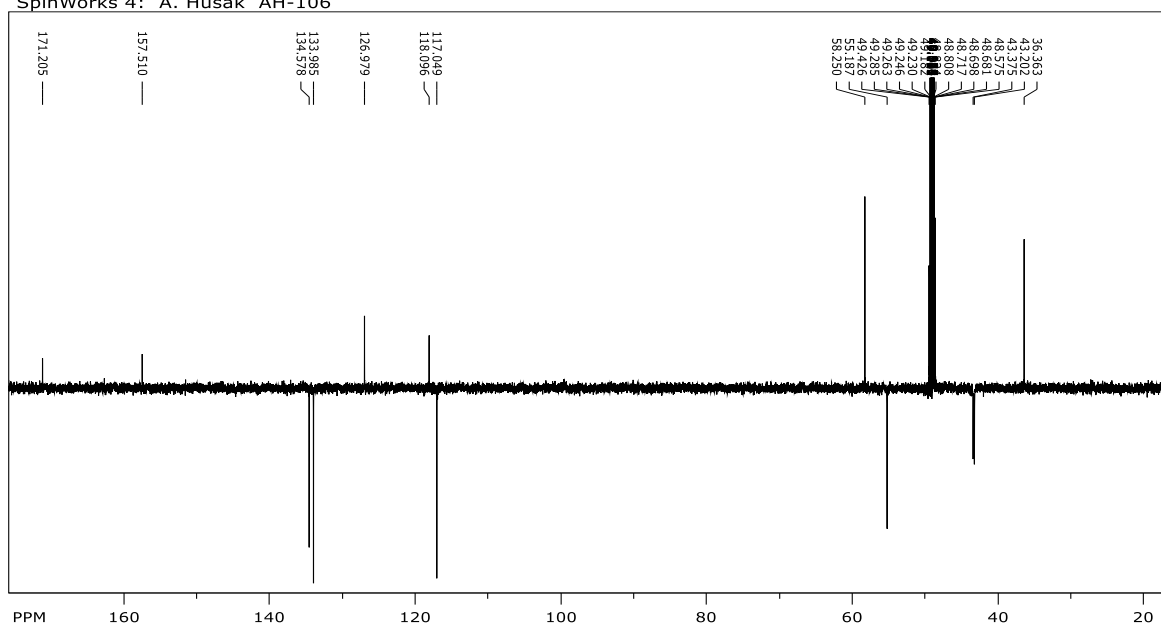
Prilog 8.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar  $2\text{TFA}\times\text{H-Tyr}[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2]\text{-OBn}$  (**5**)Prilog 9.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz) spektar  $2\text{TFA}\times\text{H-Tyr}[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2]\text{-OBn}$  (**5**)

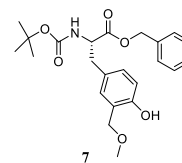
Prilog 10.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar  $2\text{TFA}\times\text{H-Tyr}[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2]\text{-OH}$  (6)

SpinWorks 4: A. Husak AH-106

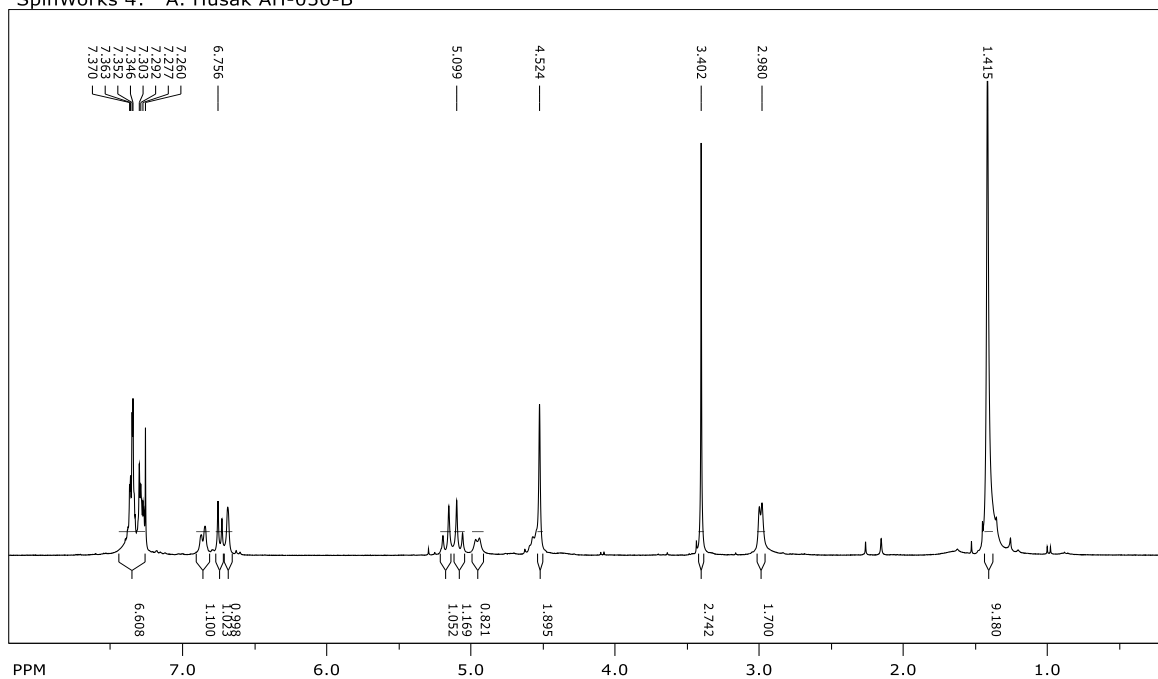
Prilog 11.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz) spektar  $2\text{TFA}\times\text{H-Tyr}[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2]\text{-OH}$  (6)

SpinWorks 4: A. Husak AH-106

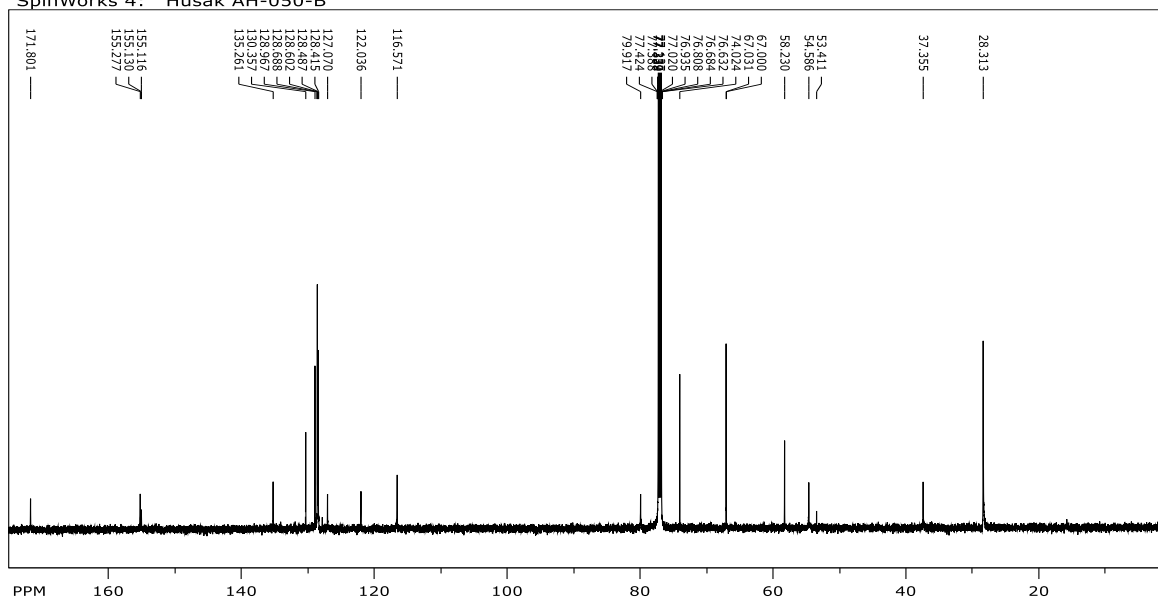


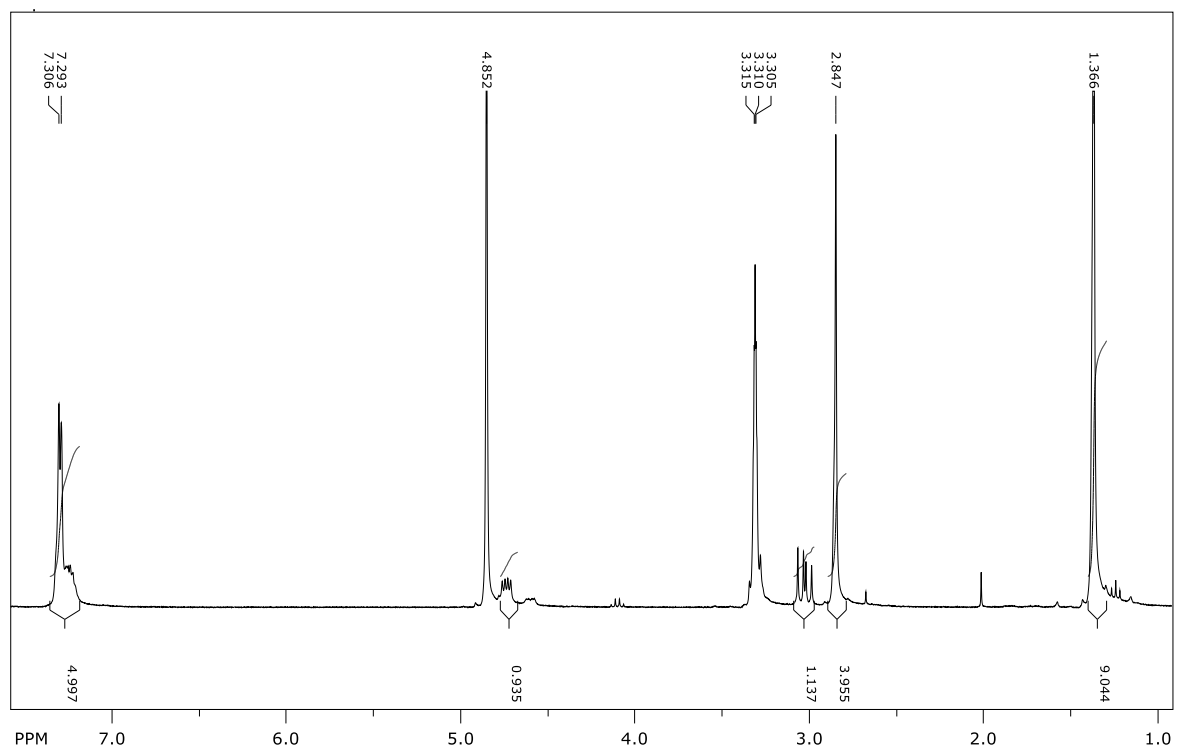
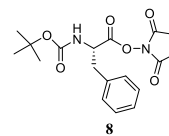
Prilog 12.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) spektar Boc-Tyr[ $\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ]-OBn (7)

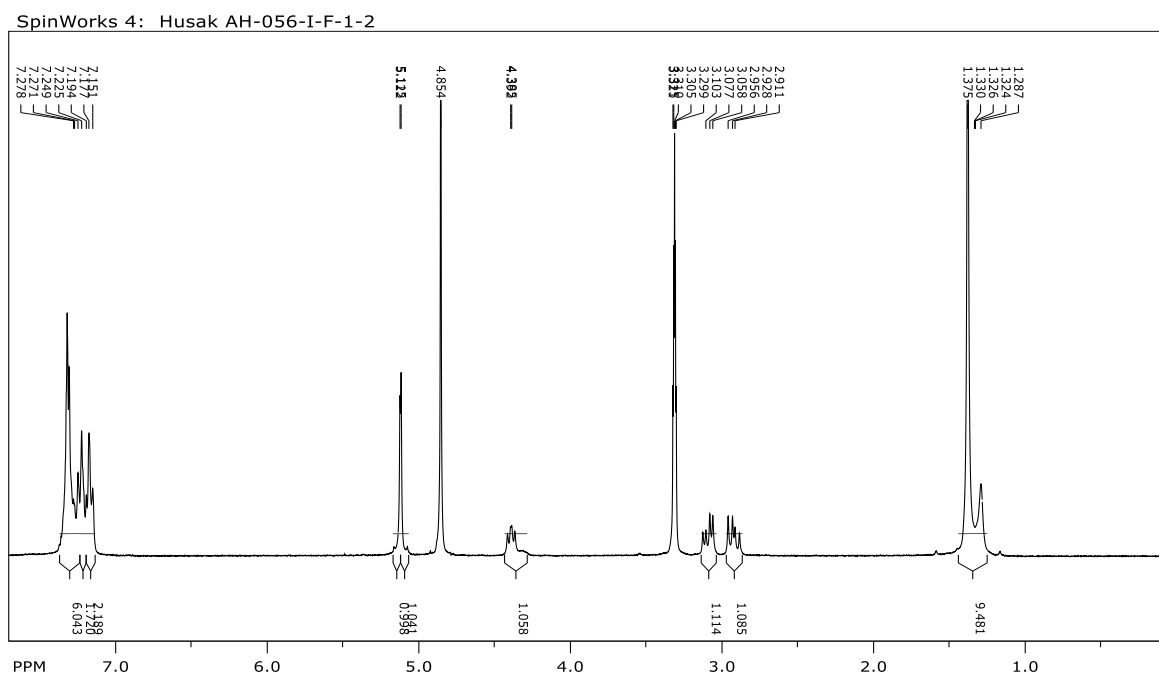
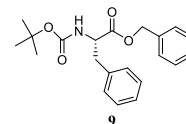
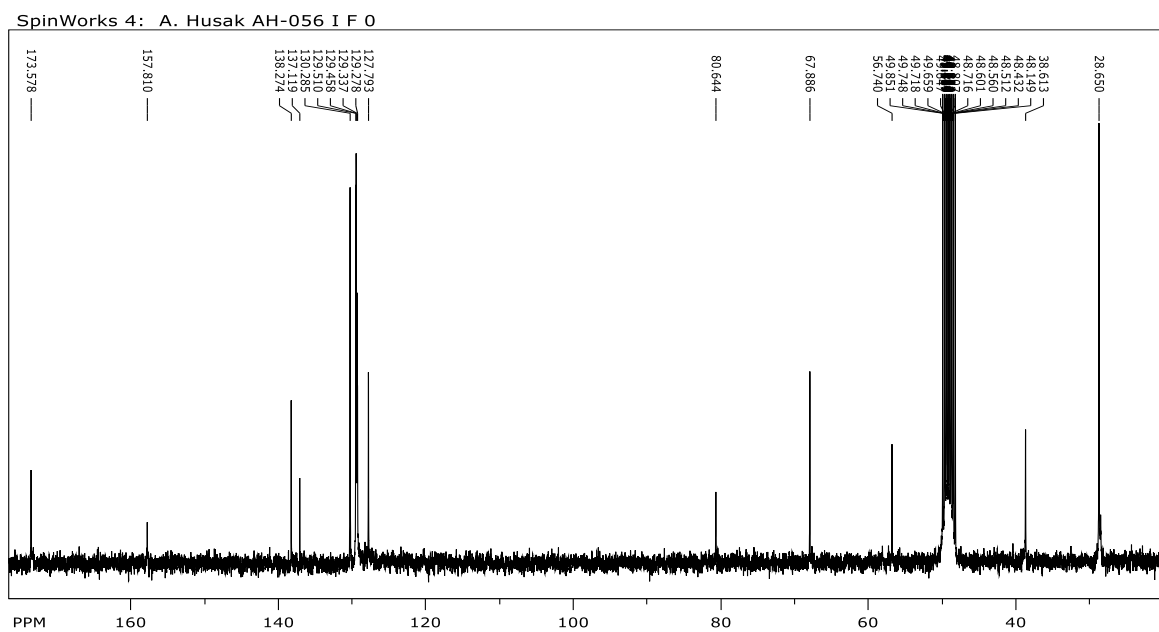
SpinWorks 4: A. Husak AH-050-B

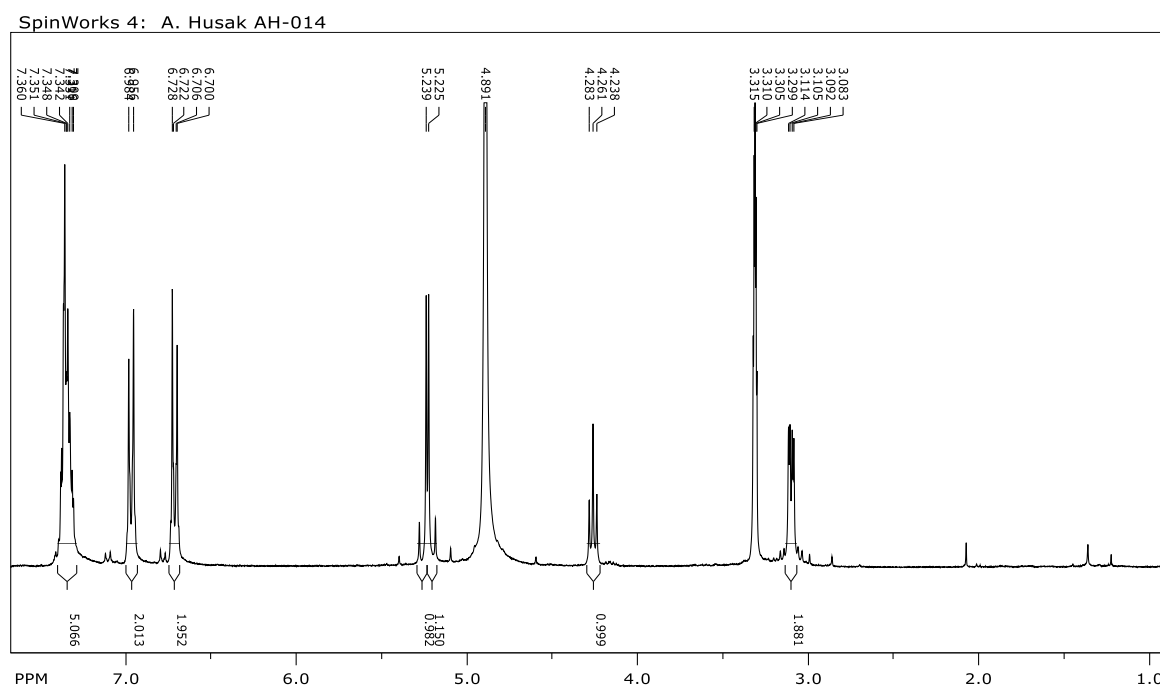
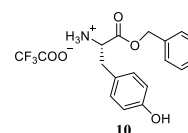
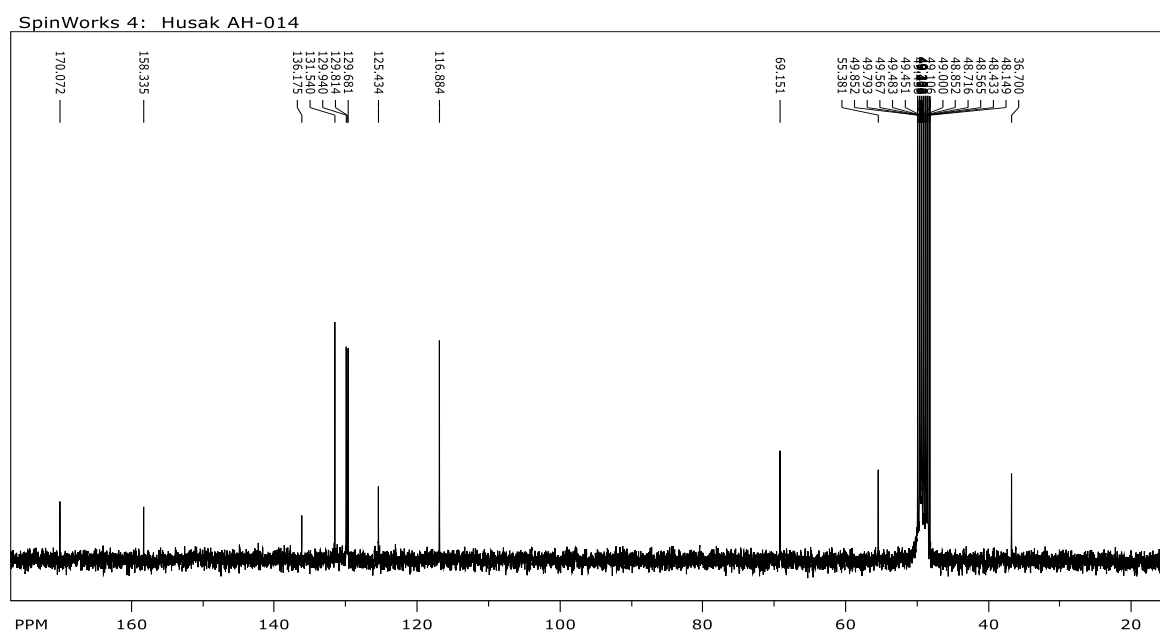
Prilog 13.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) spektar Boc-Tyr[ $\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ]-OBn (7)

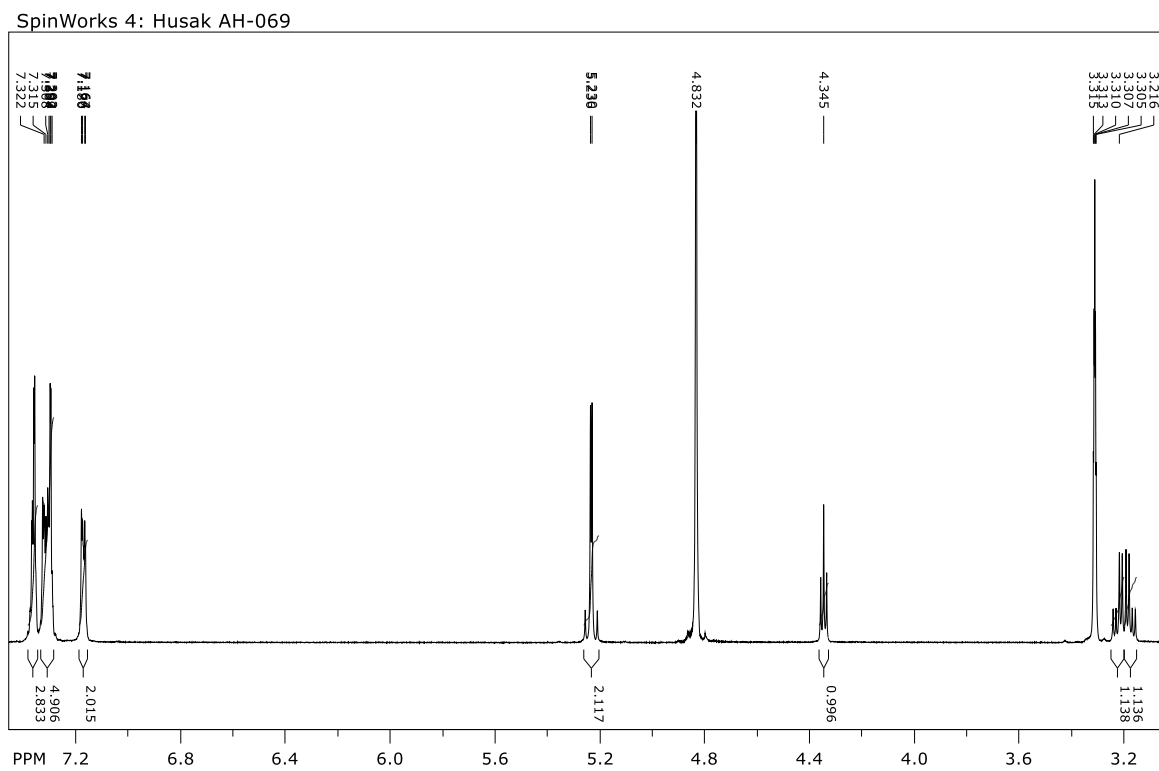
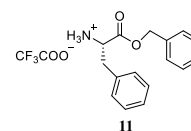
SpinWorks 4: Husak AH-050-B



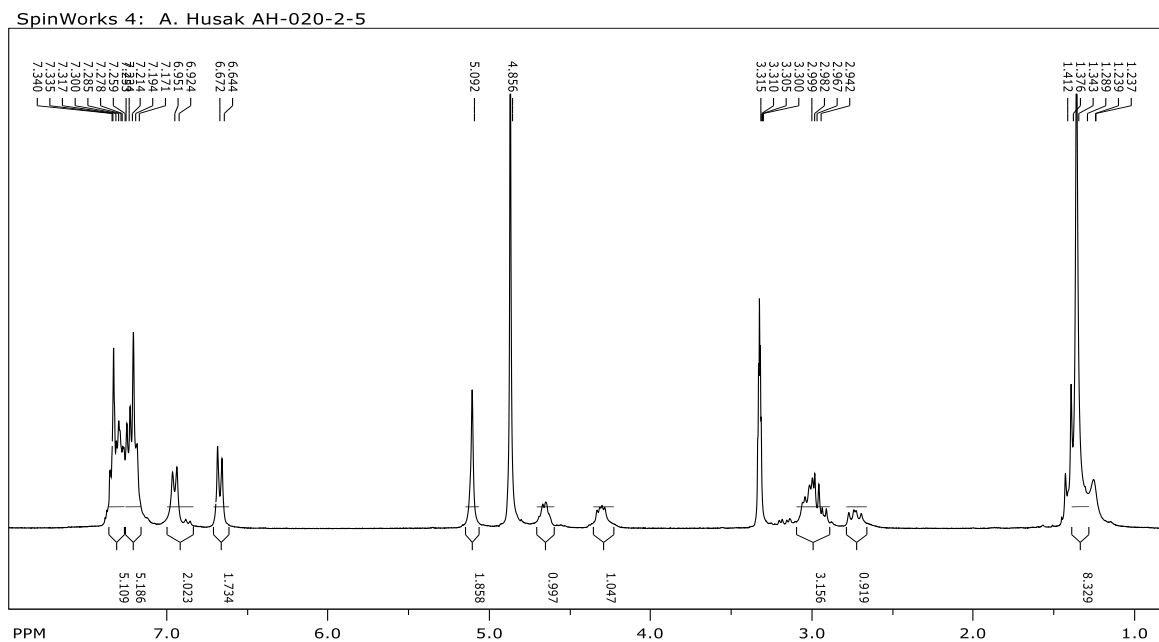
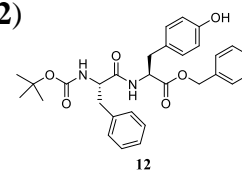
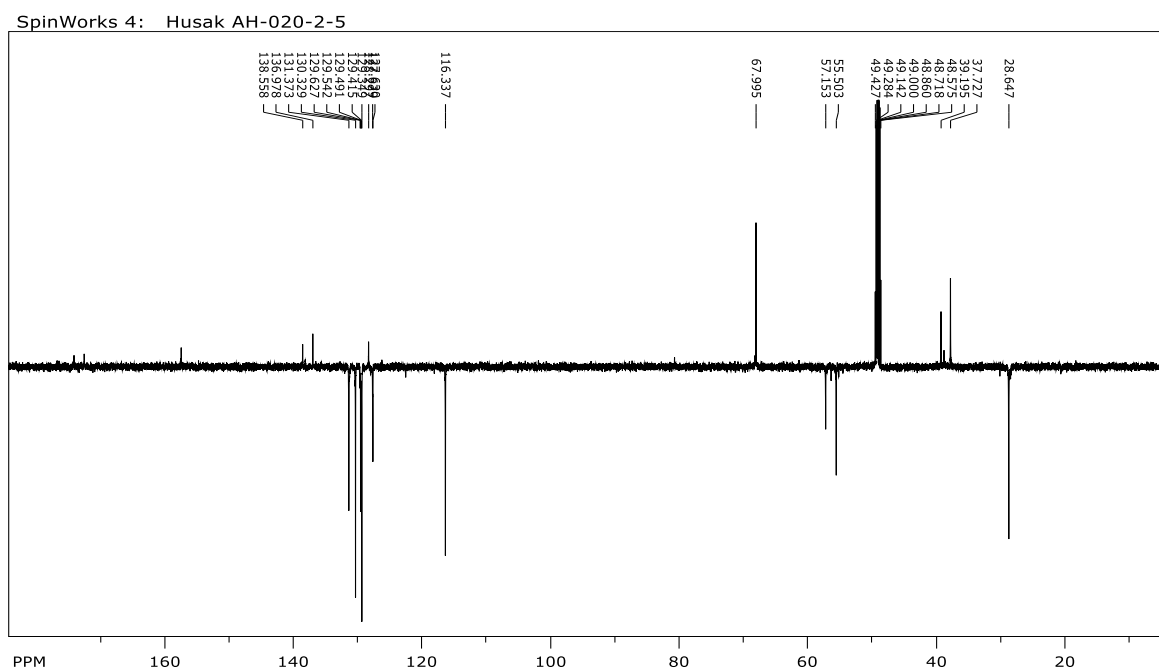
Prilog 14.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Boc-Phe-OSu (**8**)

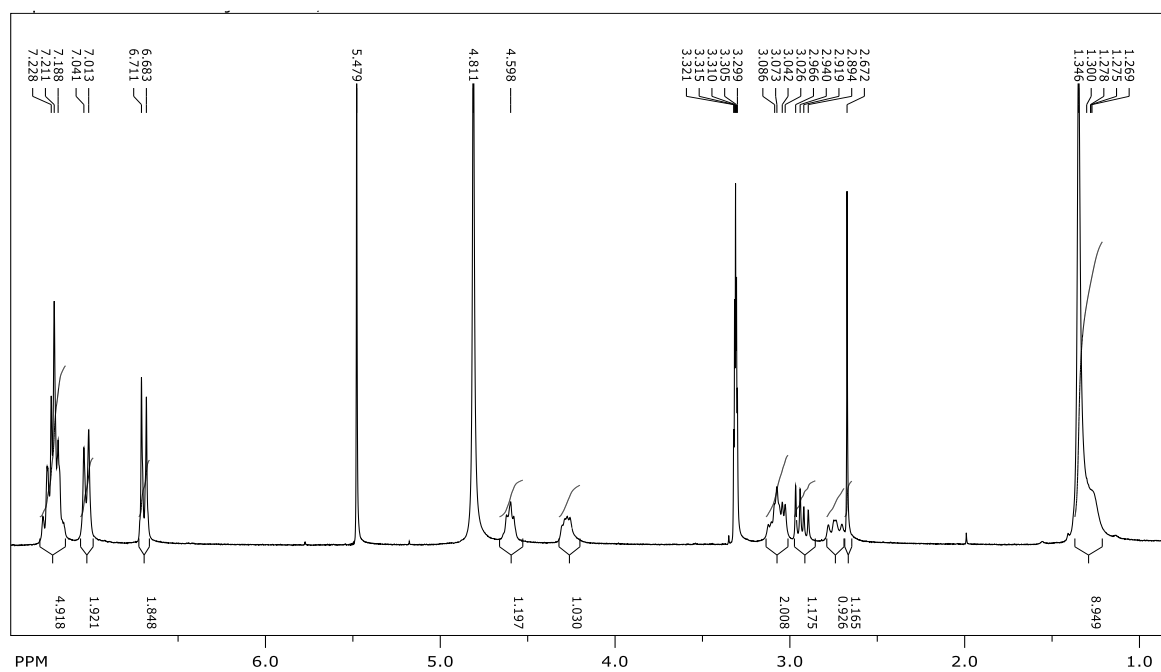
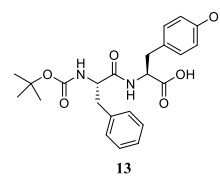
Prilog 15.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Boc-Phe-OBn (**9**)Prilog 16.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz) spektar Boc-Phe-OBn (**9**)

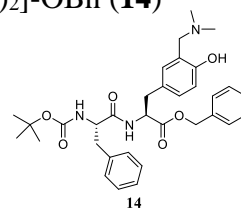
Prilog 17.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar  $\text{TFA}\times\text{H-Tyr-OBn}$  (**10**)Prilog 18.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz) spektar  $\text{TFA}\times\text{H-Tyr-OBn}$  (**10**)

Prilog 19.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) spekter TFA $\times$ H-Phe-OBn (**11**)

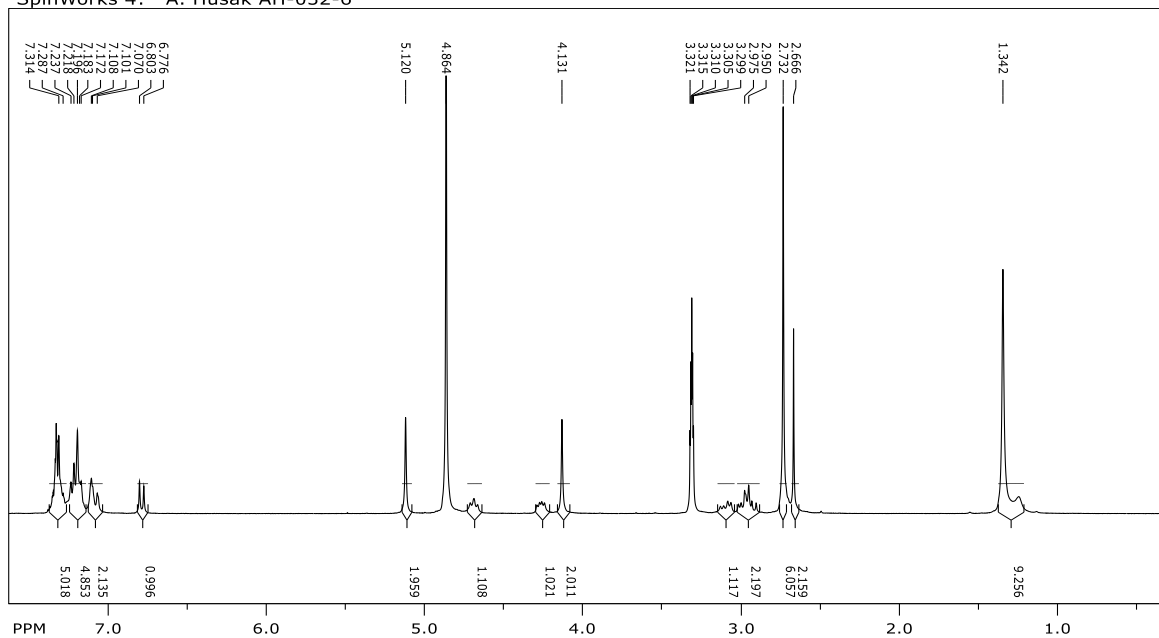


Prilog 20.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Boc-Phe-Tyr-OBn (**12**)Prilog 21.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) spektar Boc-Phe-Tyr-OBn (**12**)

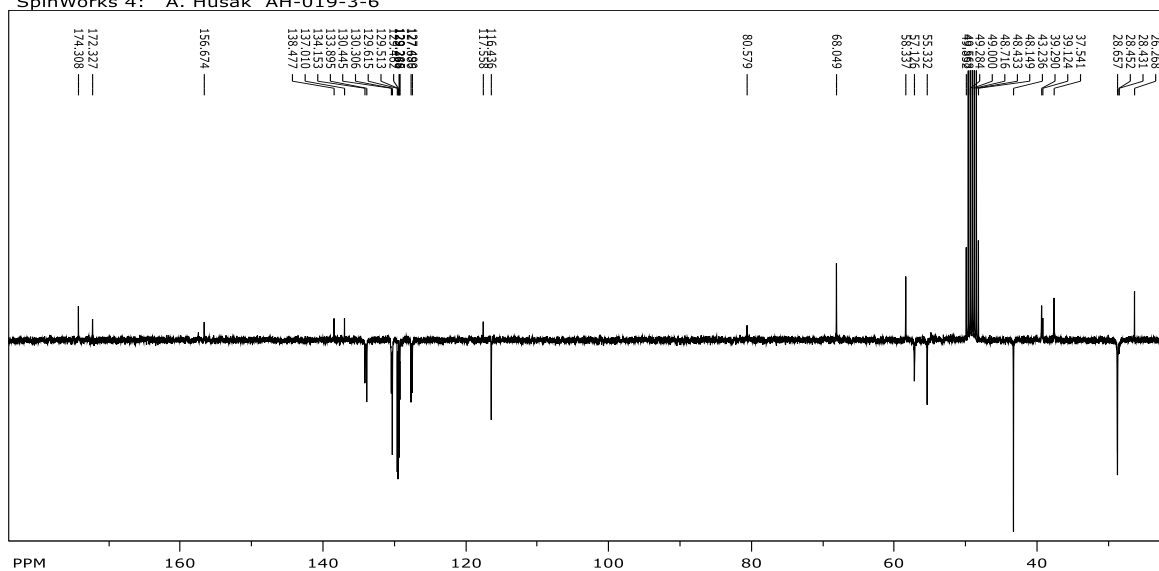
Prilog 22.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Boc-Phe-Tyr-OH (**13**)

Prilog 23.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Boc-Phe-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]-OBn (**14**)

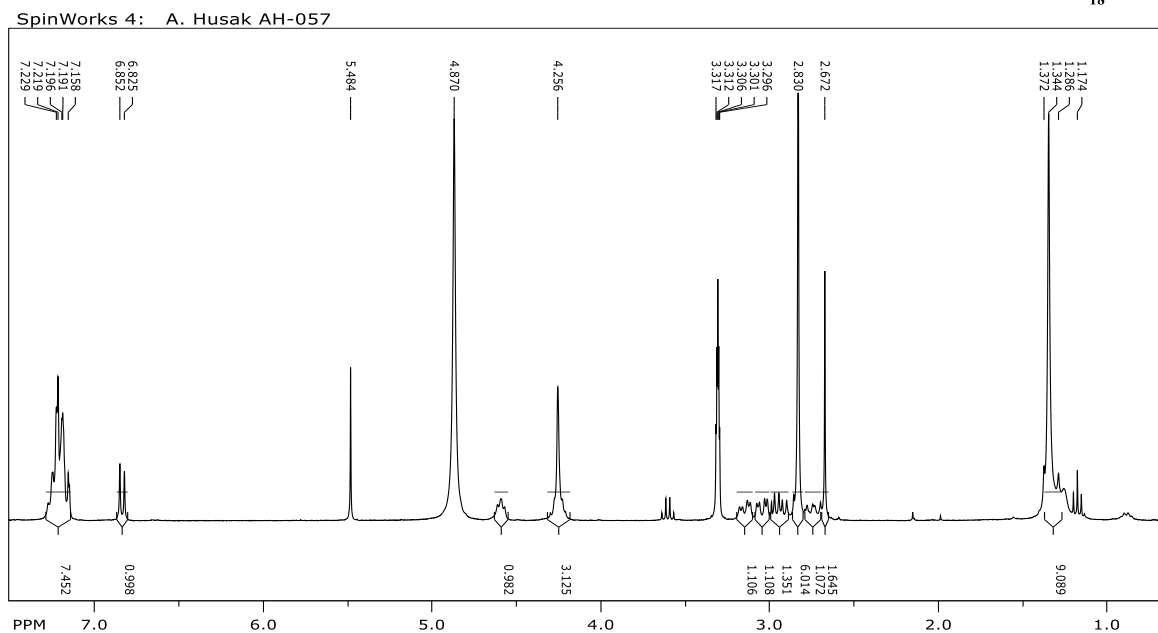
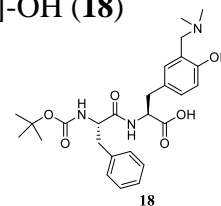
SpinWorks 4: A. Husak AH-032-6

Prilog 24.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz) spektar Boc-Phe-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]-OBn (**14**)

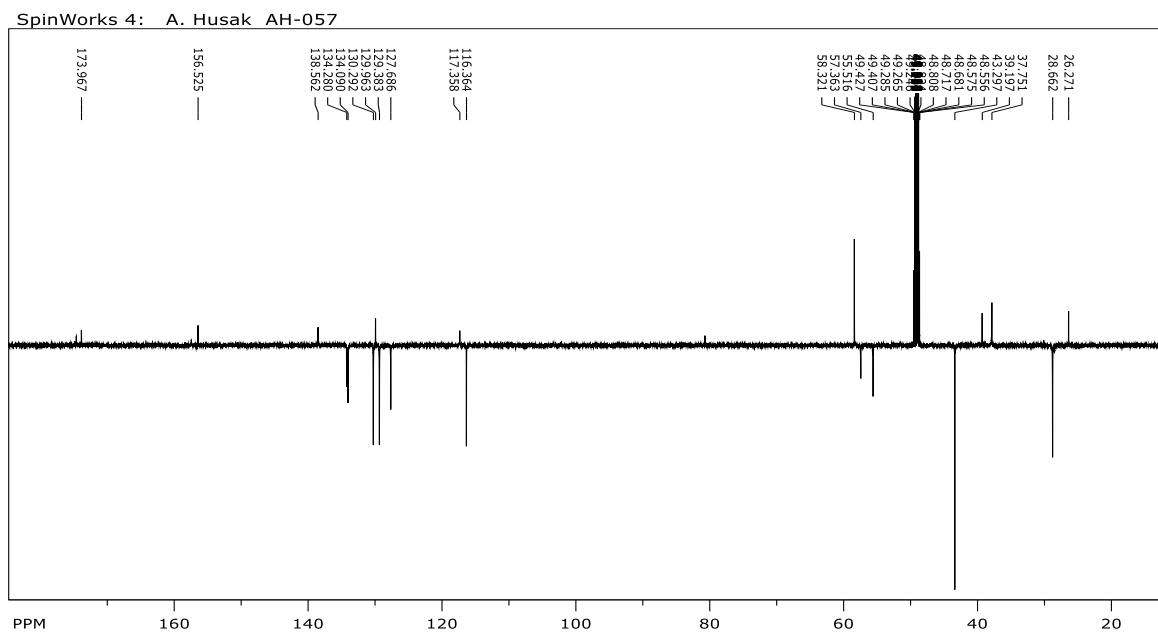
SpinWorks 4: A. Husak AH-019-3-6

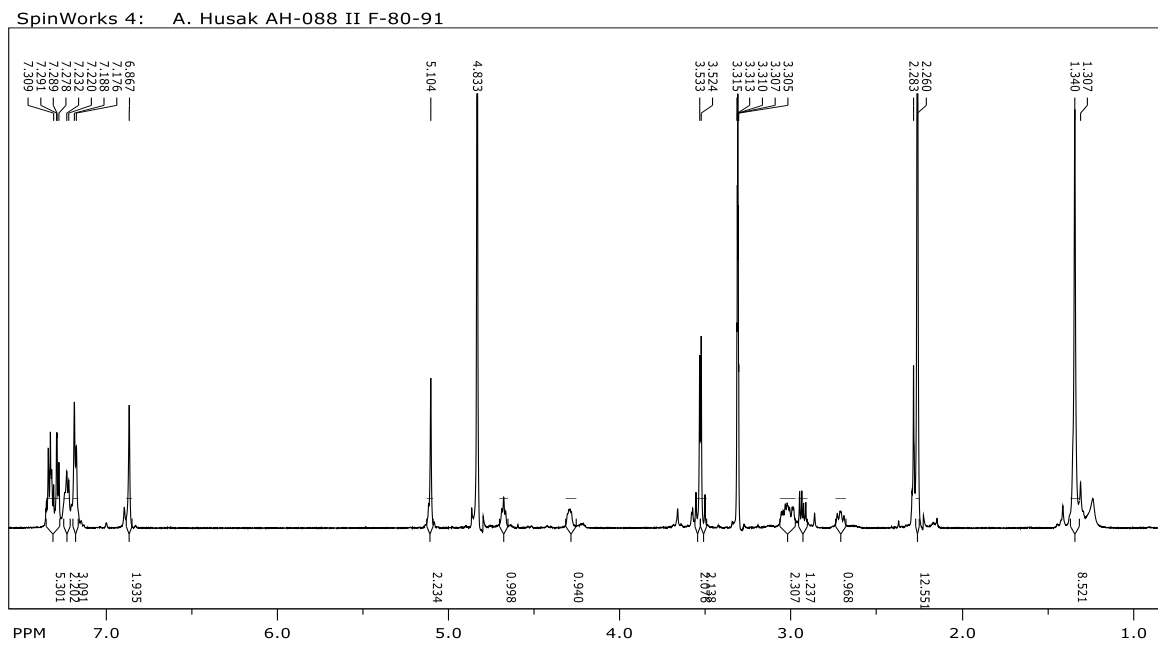
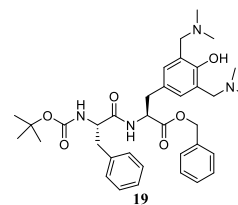
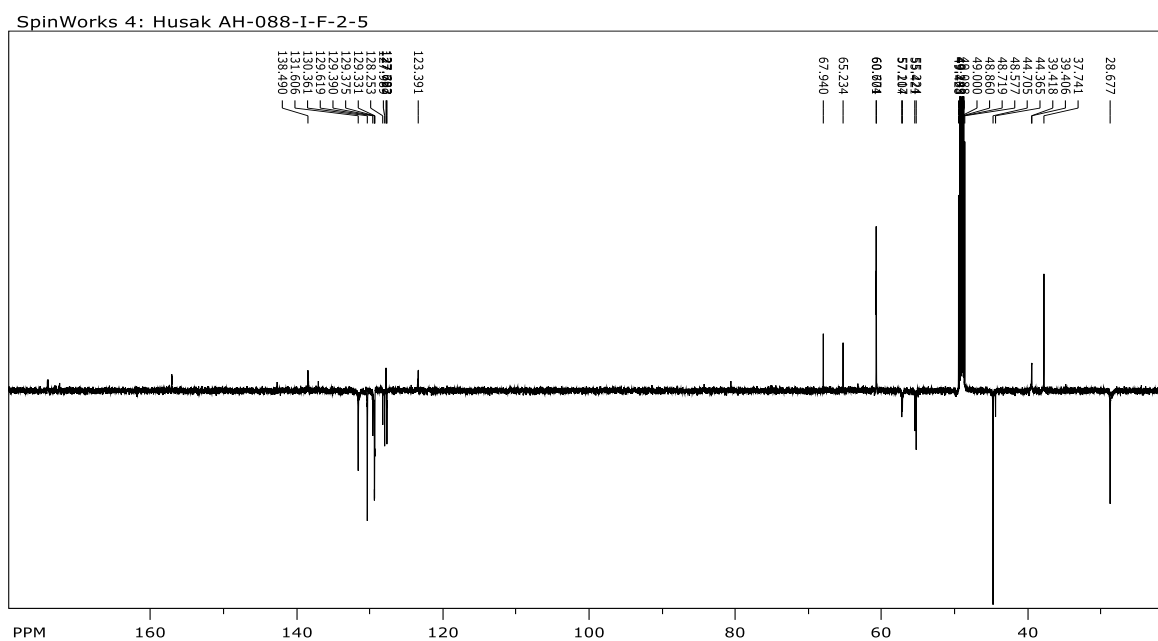


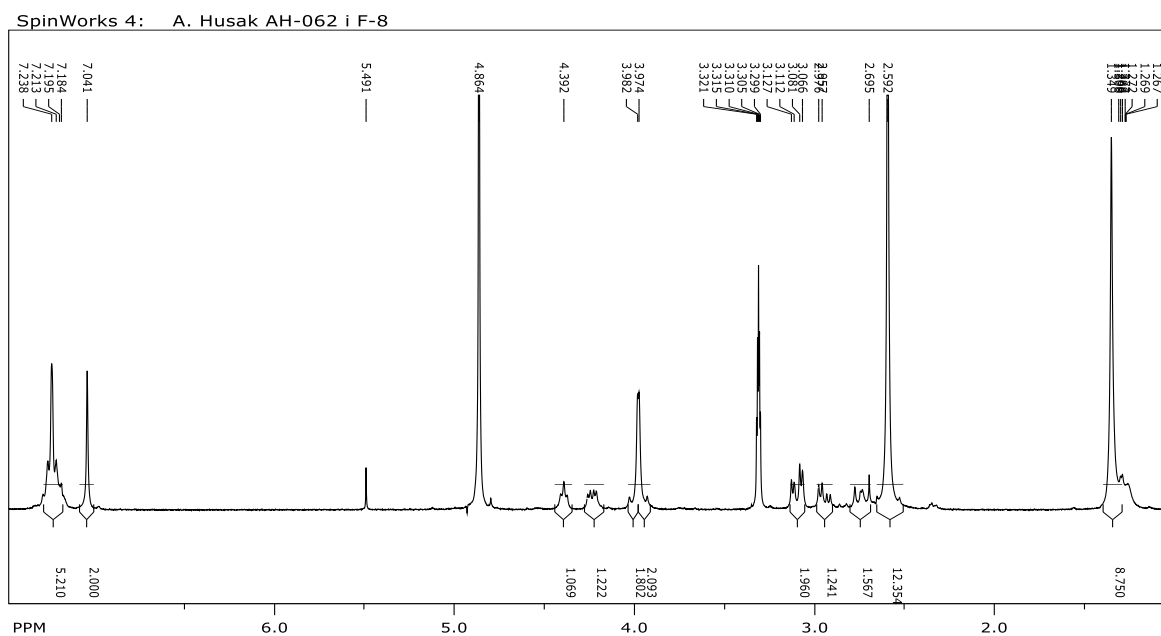
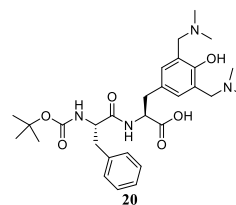
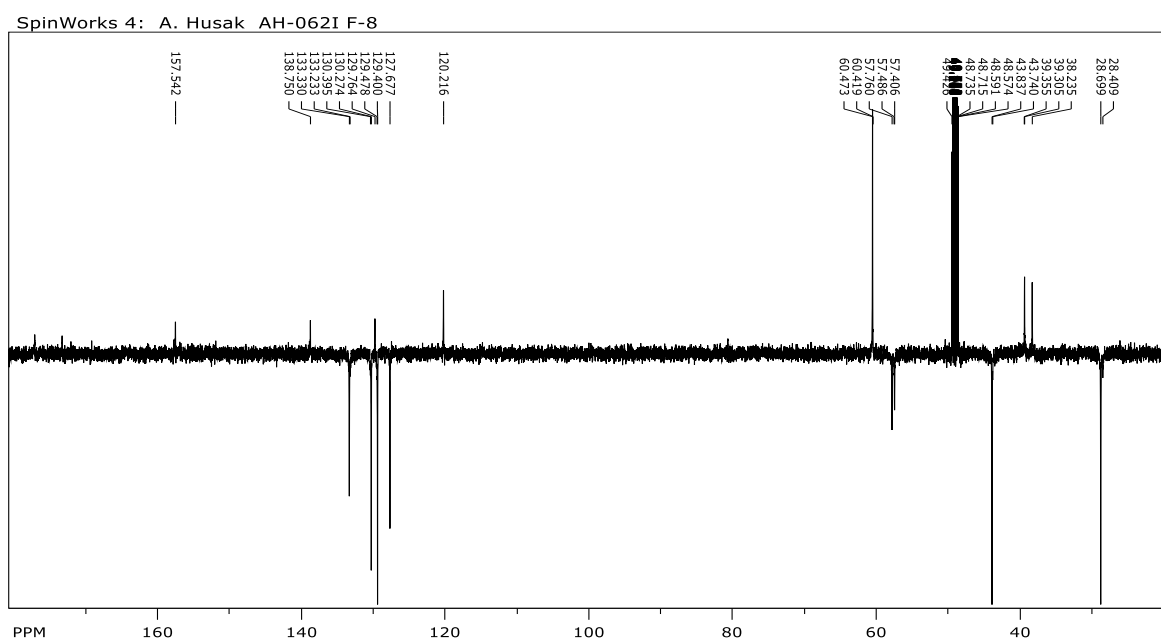
Prilog 25.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Boc-Phe-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]-OH (**18**)

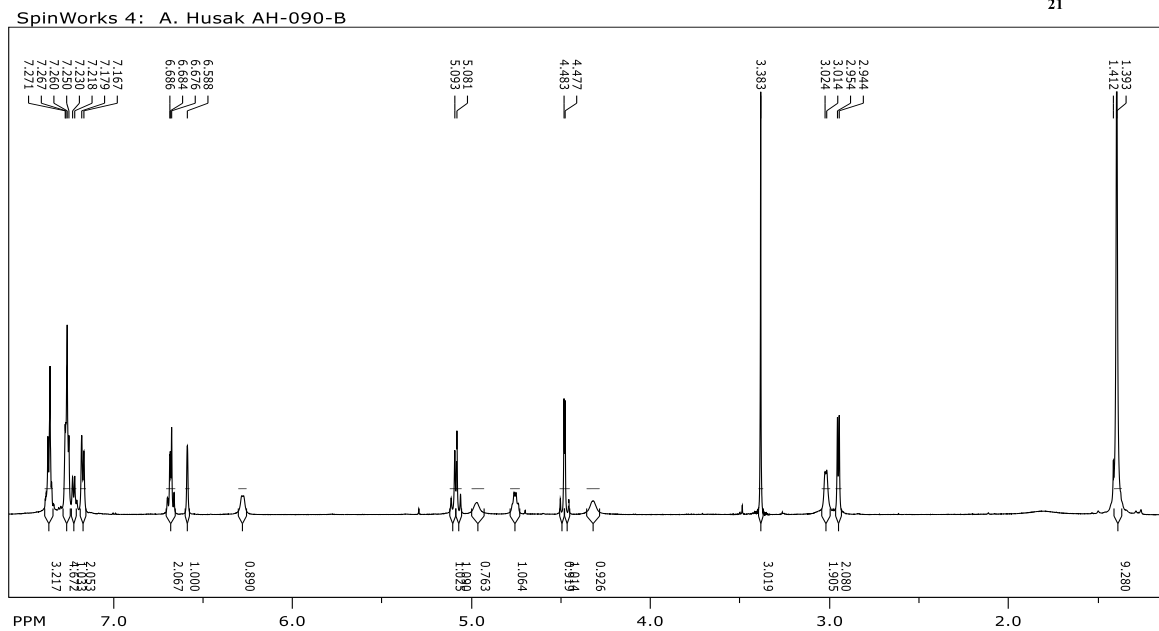
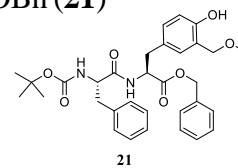
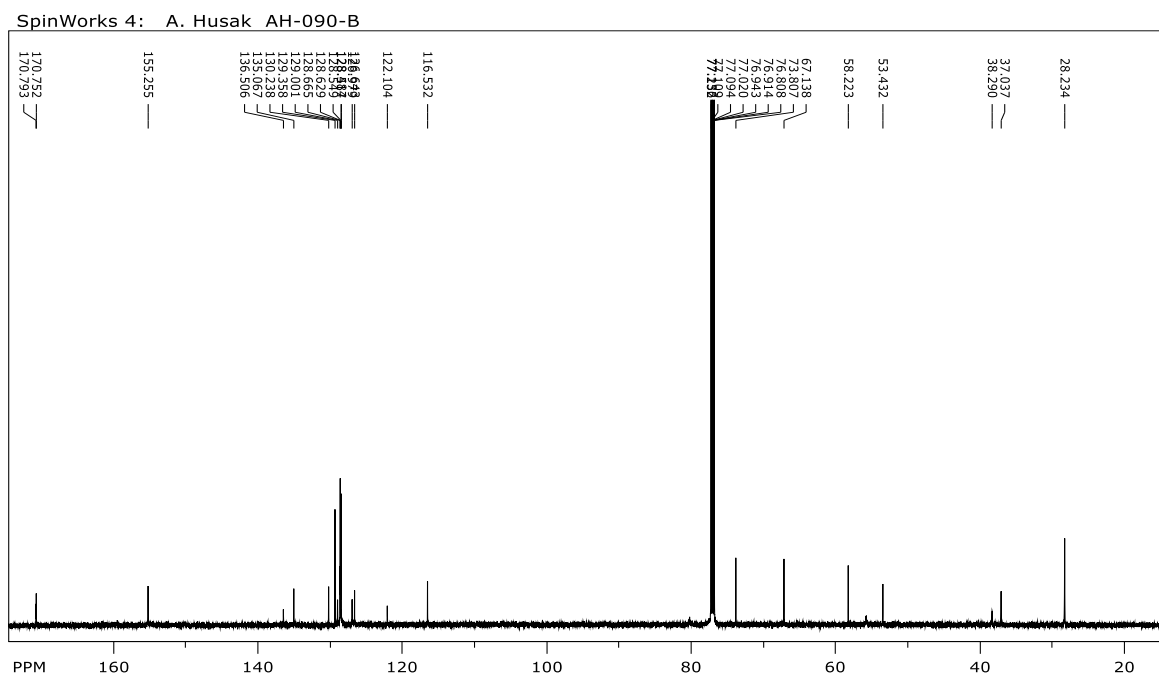


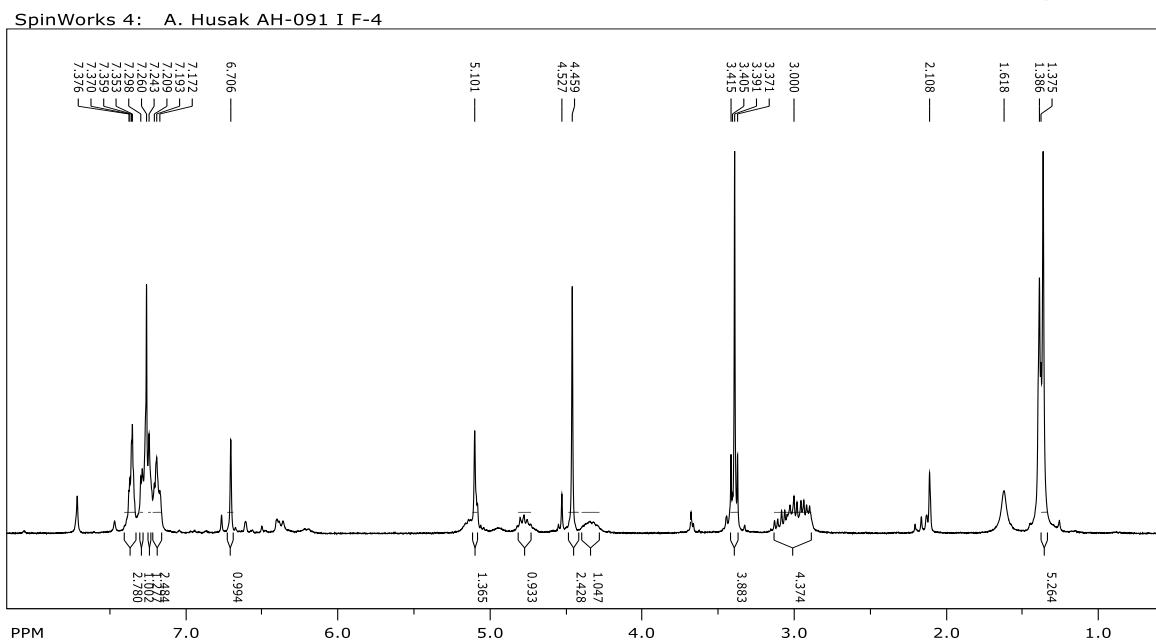
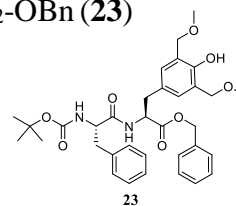
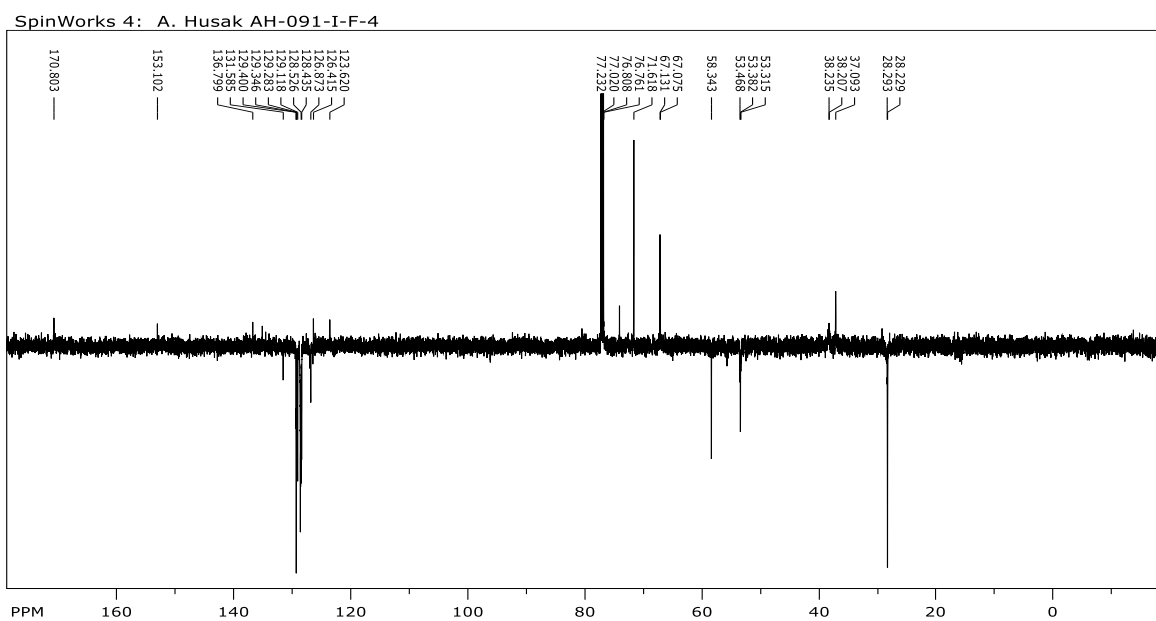
Prilog 26.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz, APT) spektar Boc-Phe-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]-OH (**18**)



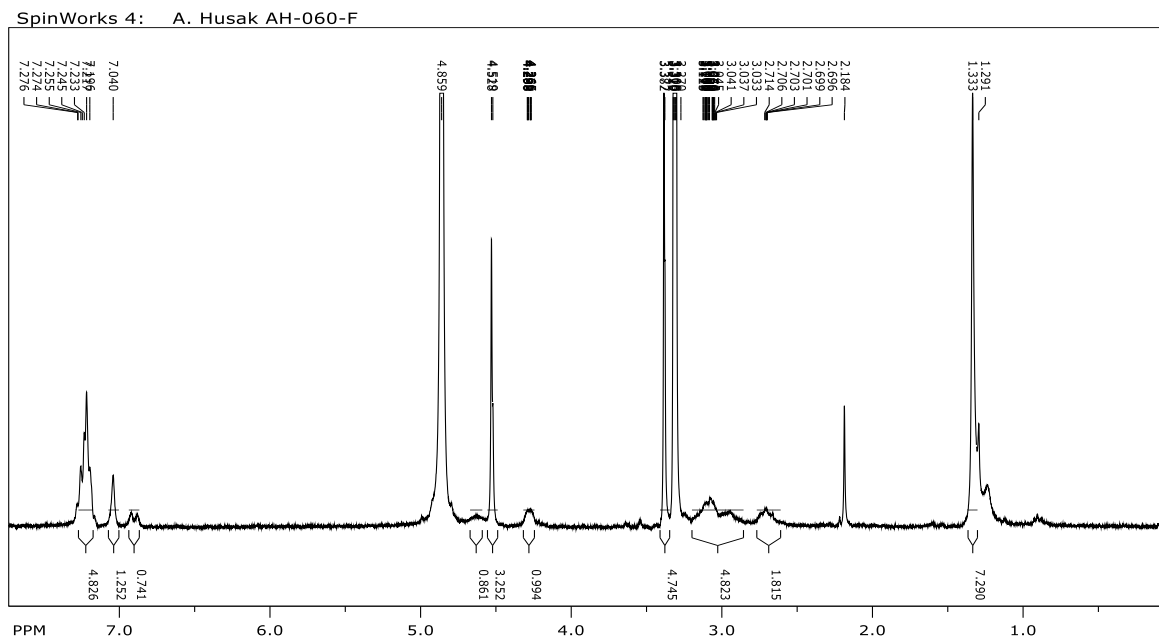
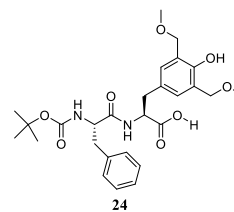
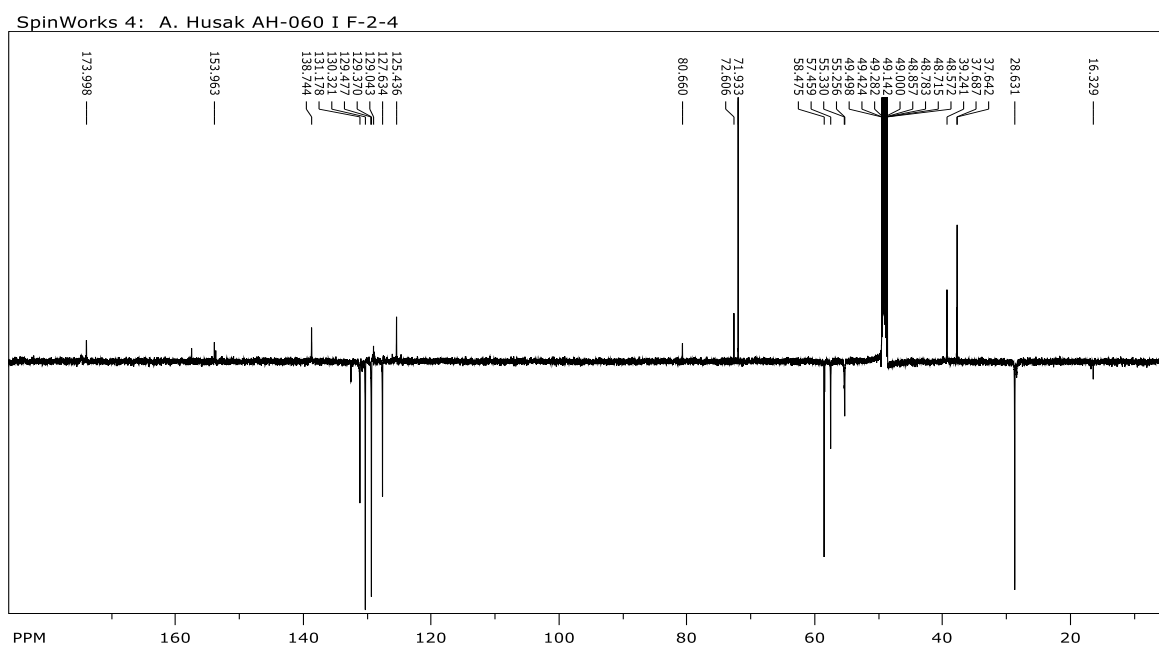
Prilog 27.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) spektar Boc-Phe-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ] $_2$ -OBn (**19**)Prilog 28.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz, APT) spektar Boc-Phe-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ] $_2$ -OBn (**19**)

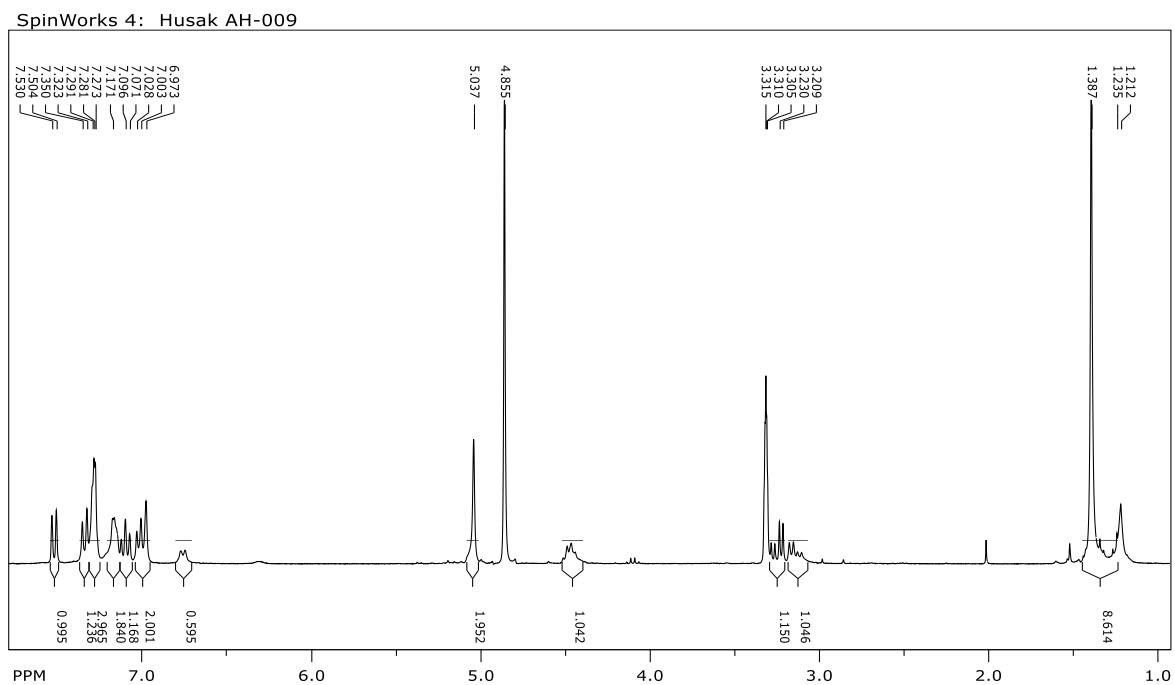
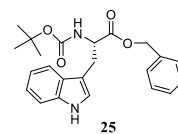
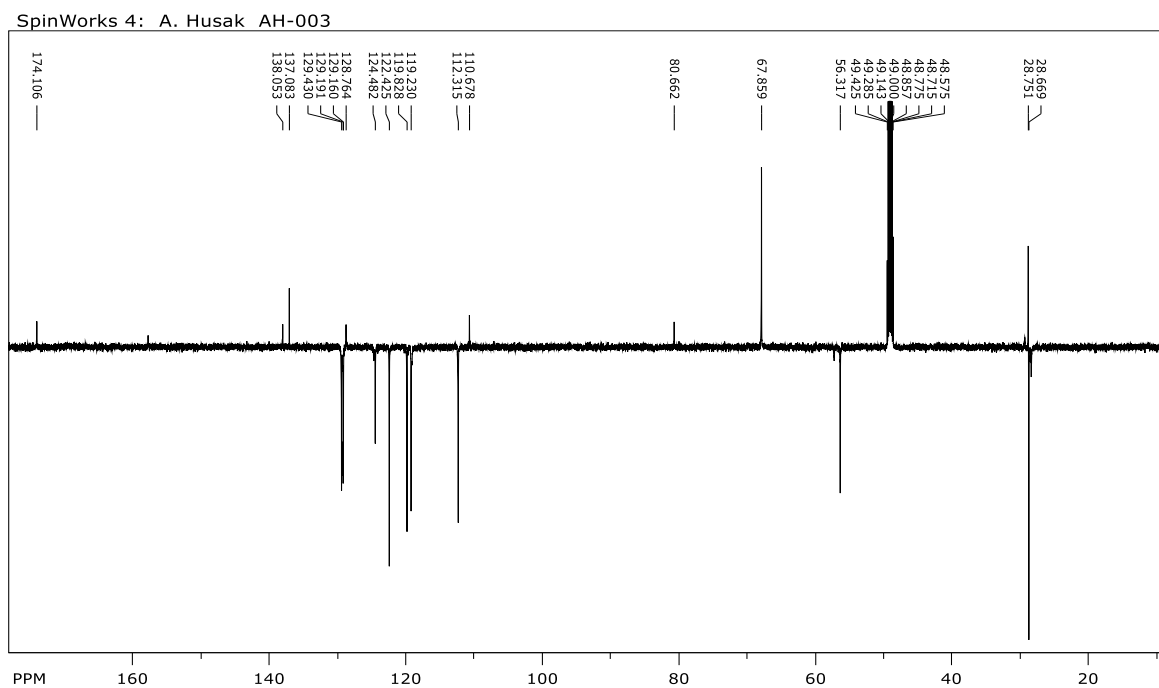
Prilog 29.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Boc-Phe-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ] $_2$ -OH (**20**)Prilog 30.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz, APT) spektar Boc-Phe-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ] $_2$ -OH (**20**)

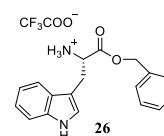
Prilog 31.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) spektar Boc-Phe-Tyr[ $\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ]-OBn (**21**)Prilog 32.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) spektar Boc-Phe-Tyr[ $\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ]-OBn (**21**)

Prilog 33.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) spektar Boc-Phe-Tyr[ $\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ] $_2$ -OBn (**23**)Prilog 34.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) spektar Boc-Phe-Tyr[ $\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ] $_2$ -OBn (**23**)

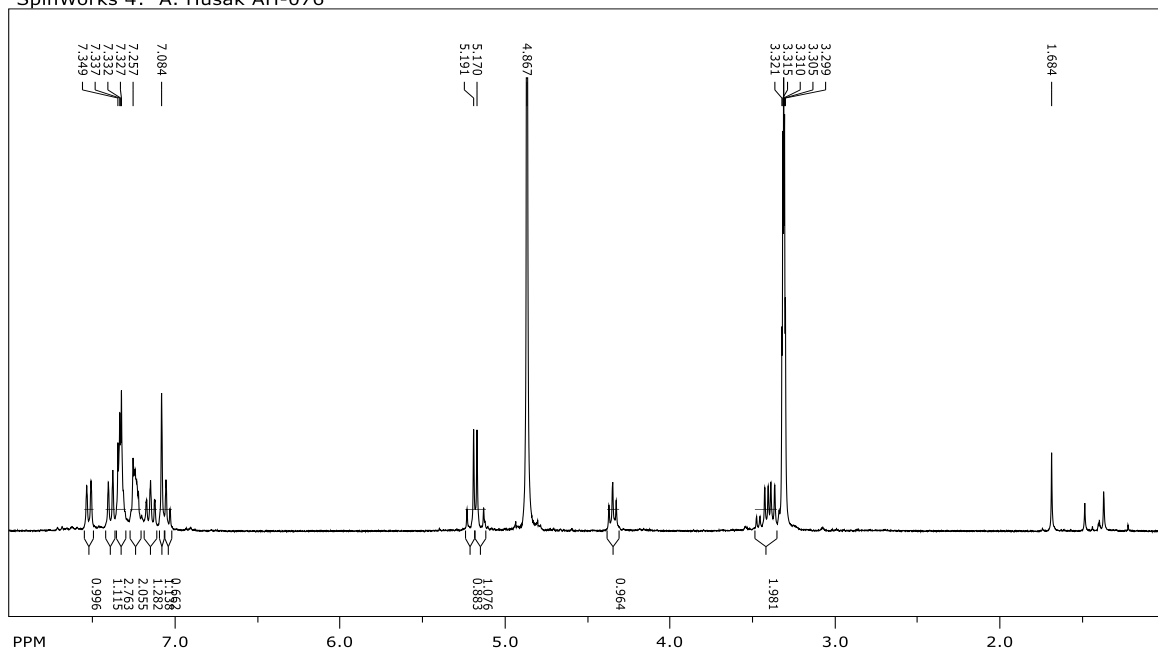
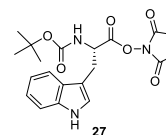


Prilog 35.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Boc-Phe-Tyr[ $\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ] $_2$ -OH (**24**)Prilog 36.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) spektar Boc-Phe-Tyr[ $\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ] $_2$ -OH (**24**)

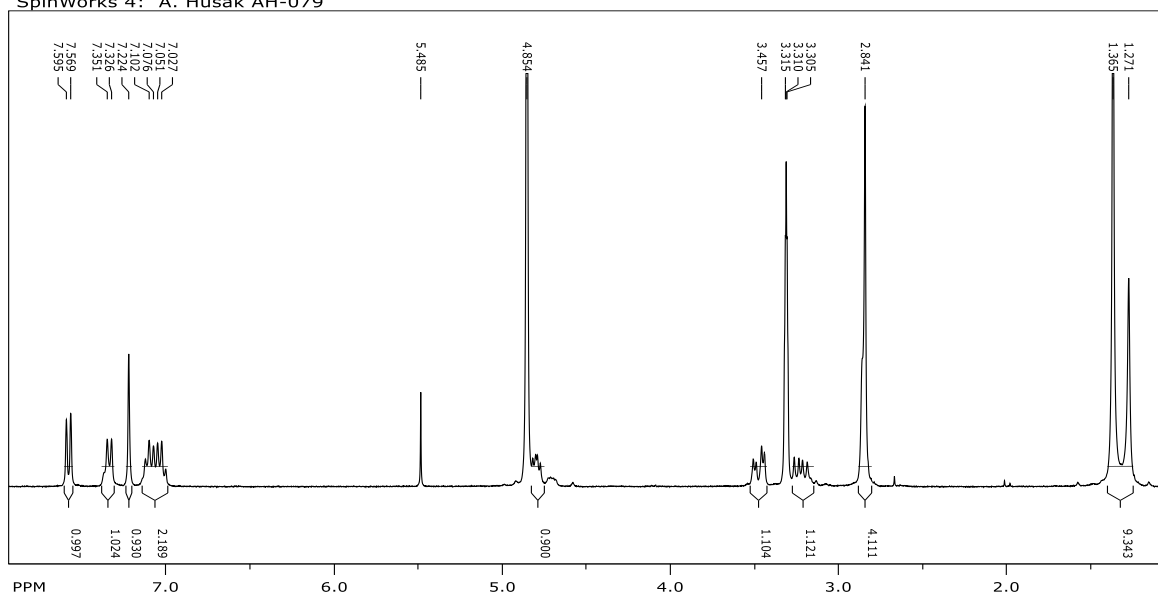
Prilog 37.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektrar Boc-Trp-OBn (**25**)Prilog 38.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) spektrar Boc-Trp-OBn (**25**)

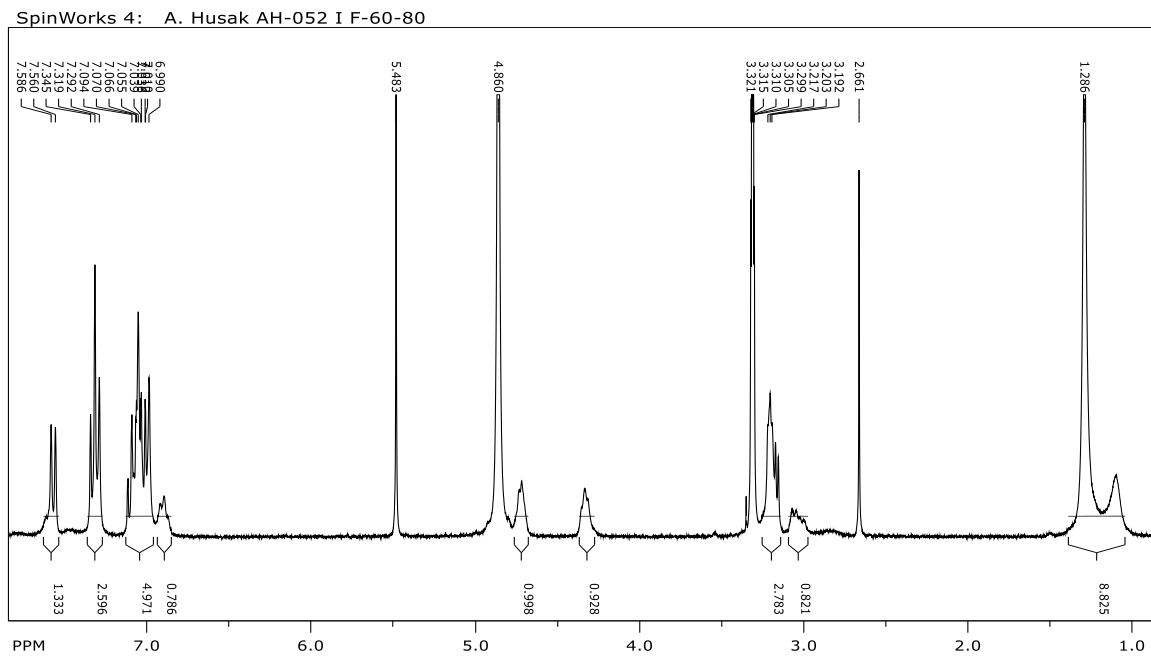
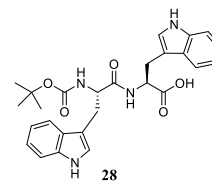
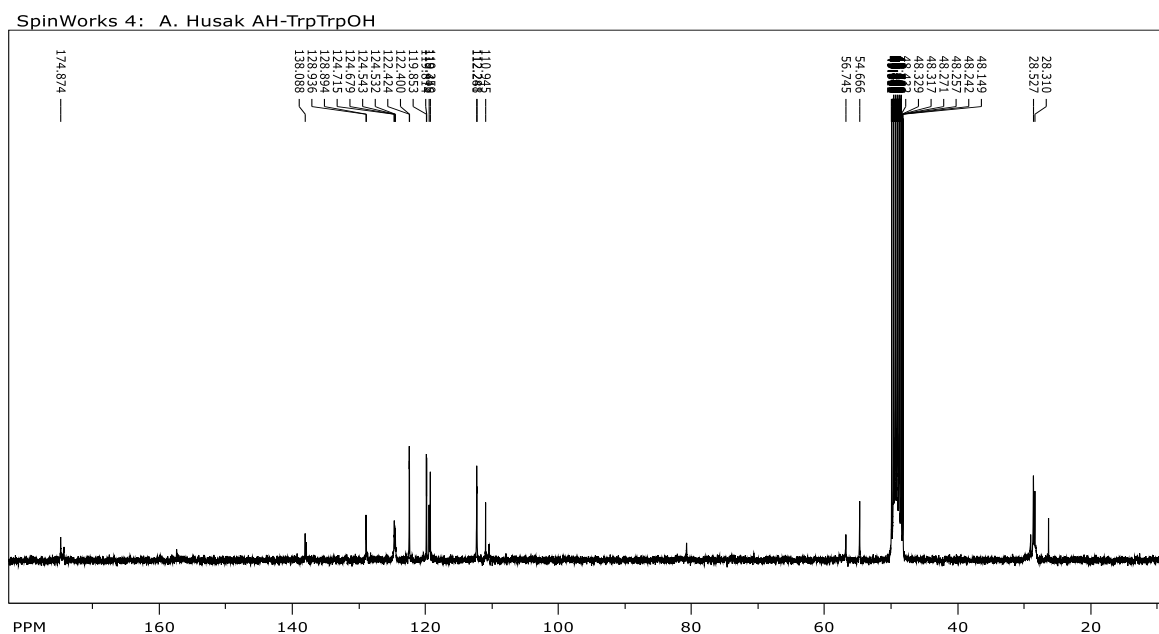
Prilog 39.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar  $\text{TFA}\times\text{H-Trp-OBn}$  (**26**)

SpinWorks 4: A. Husak AH-076

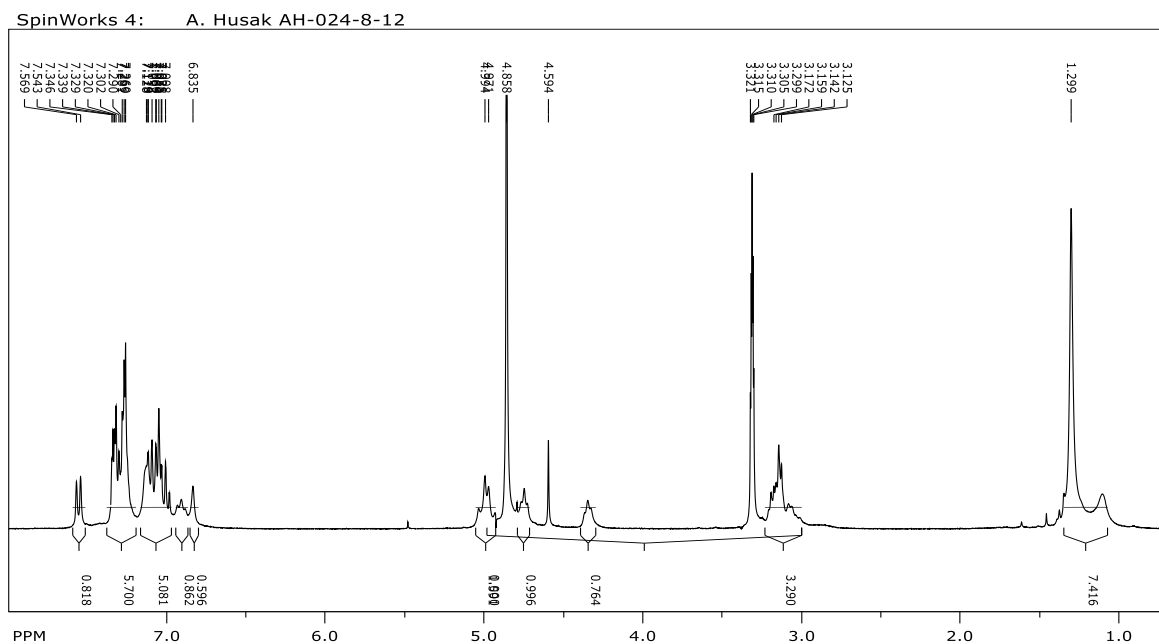
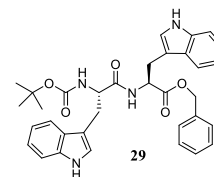
Prilog 40.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Boc-Trp-OSu (**27**)

SpinWorks 4: A. Husak AH-079

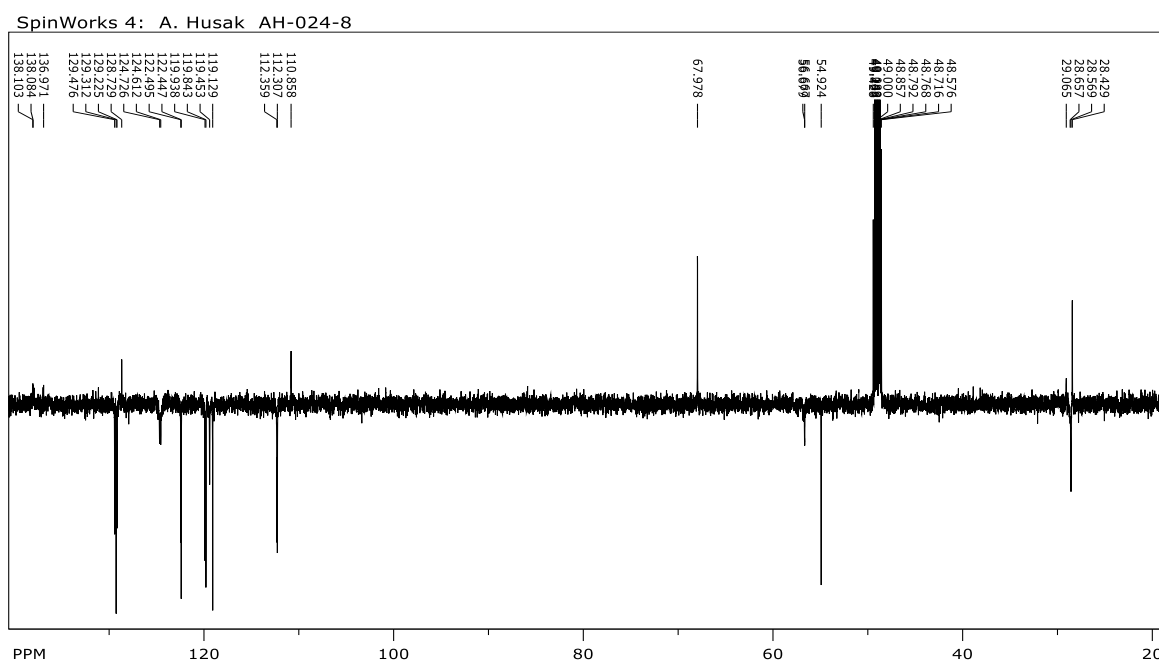


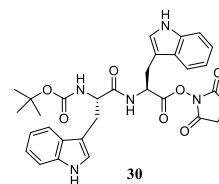
Prilog 41.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Boc-Trp-Trp-OH (**28**)Prilog 42.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz) spektar Boc-Trp-Trp-OH (**28**)

Prilog 43. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) spektar Boc-Trp-Trp-OBn (**29**)

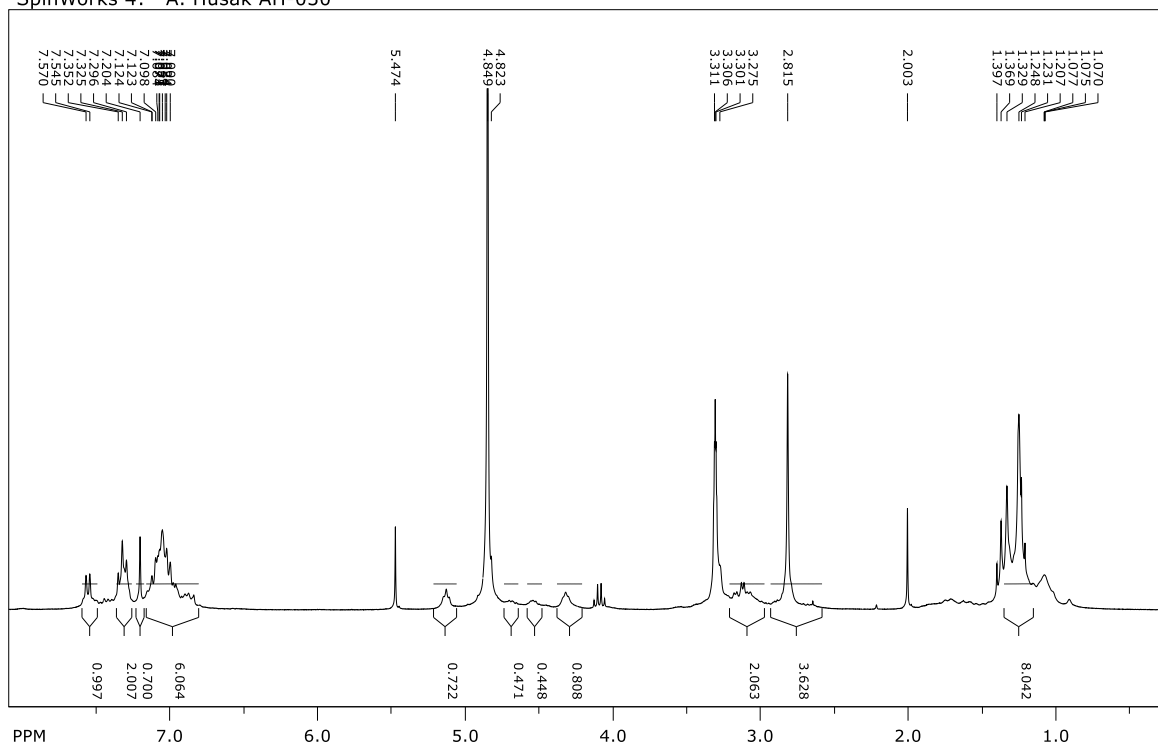


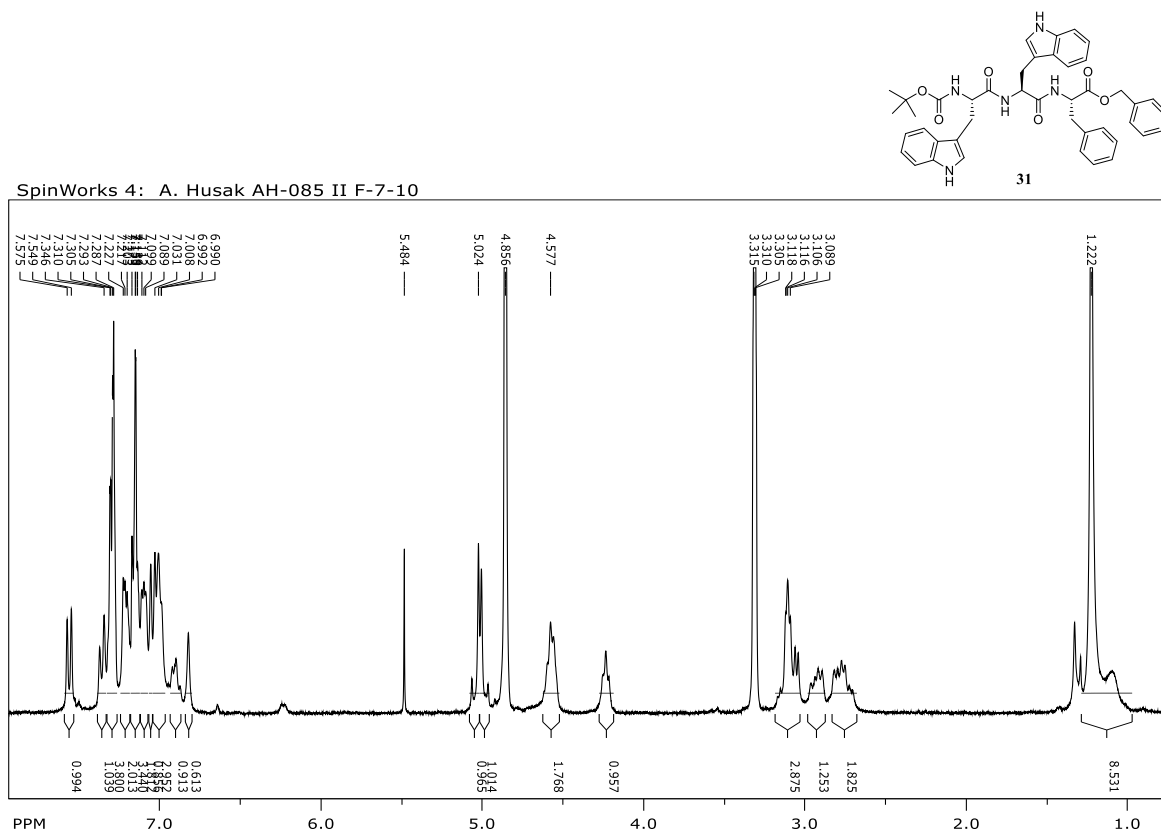
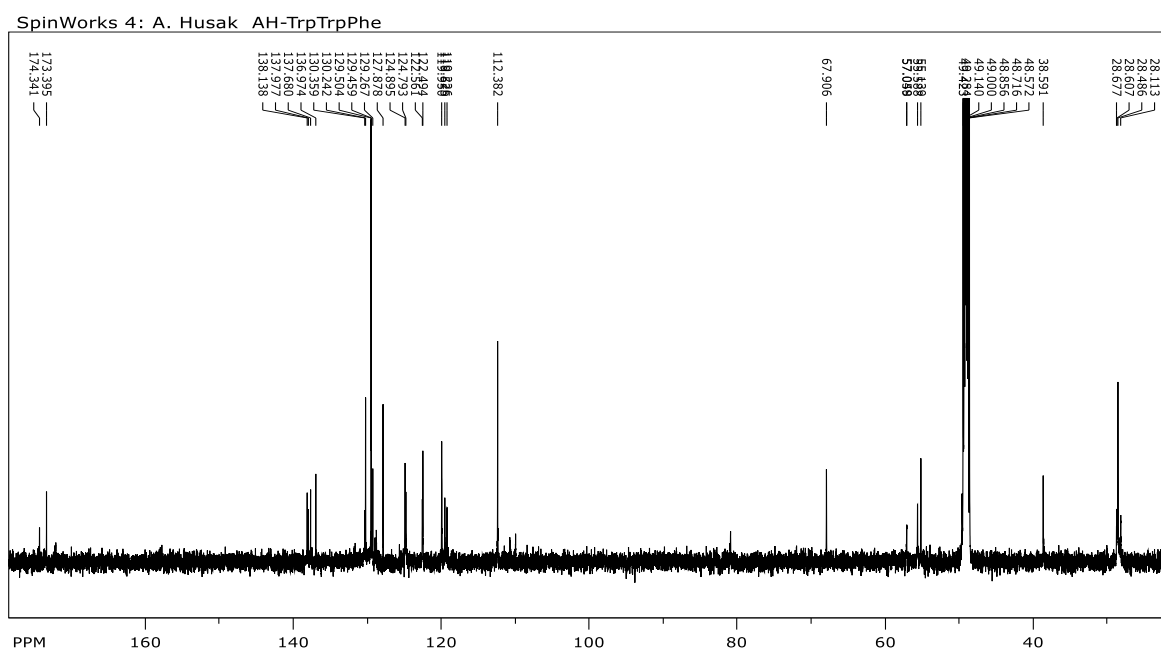
Prilog 44. <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz, APT) spektar Boc-Trp-Trp-OBn (**29**)

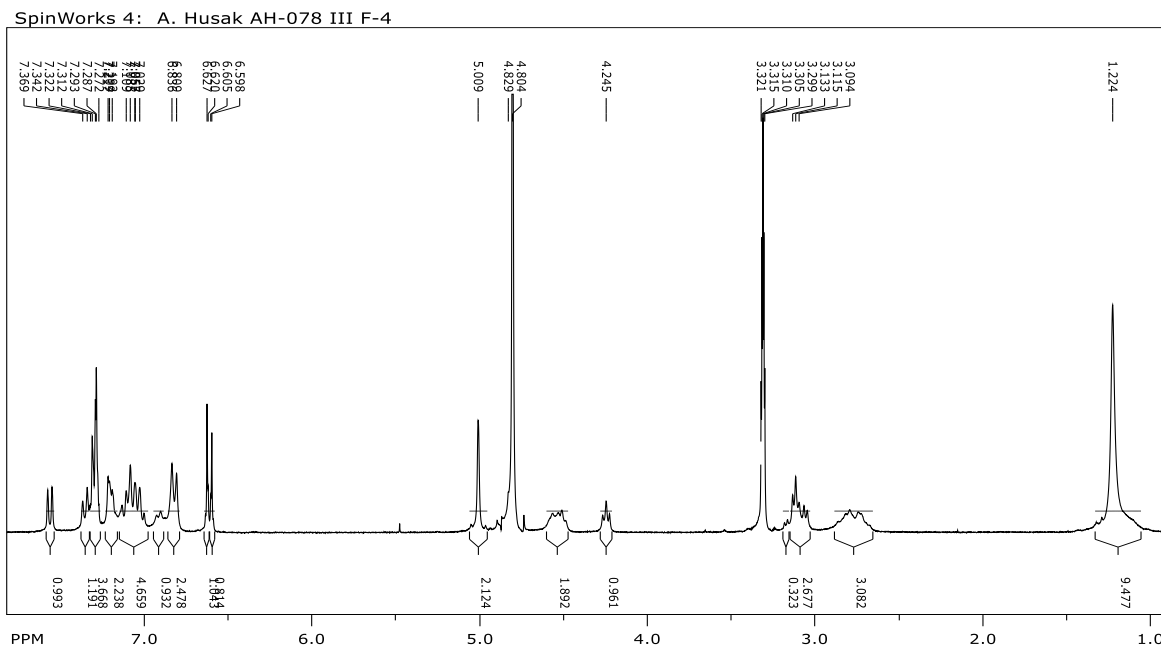
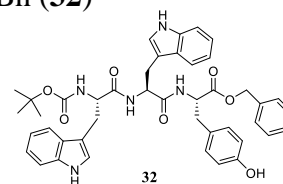
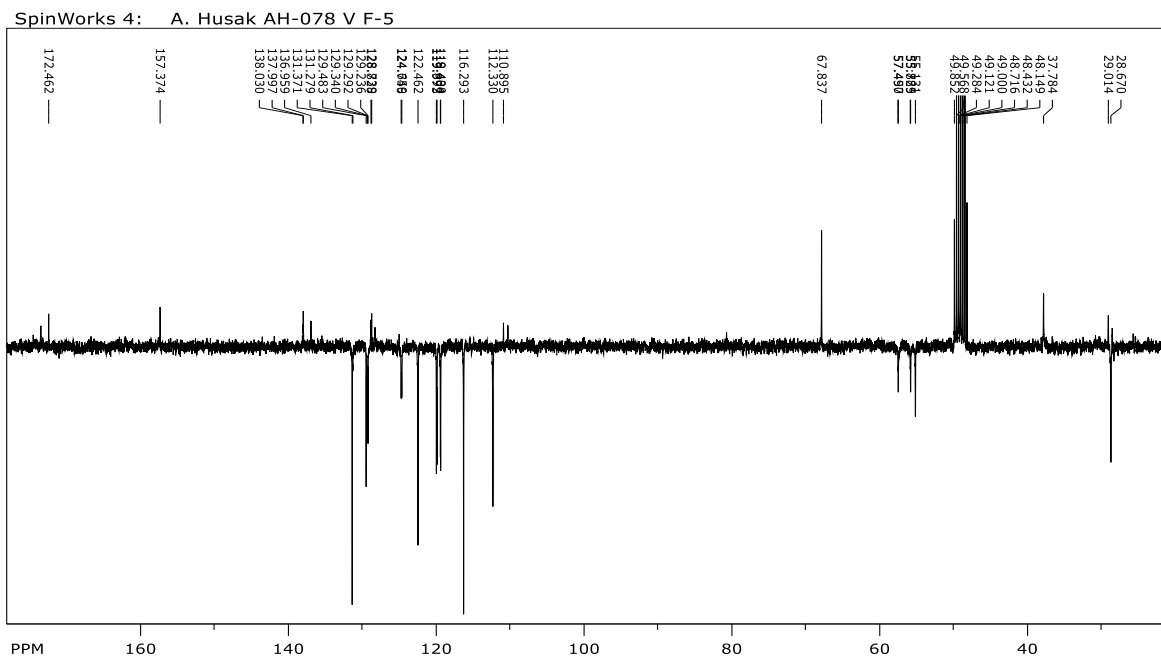


Prilog 45.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Boc-Trp-Trp-OSu (**30**)

SpinWorks 4: A. Husak AH-030

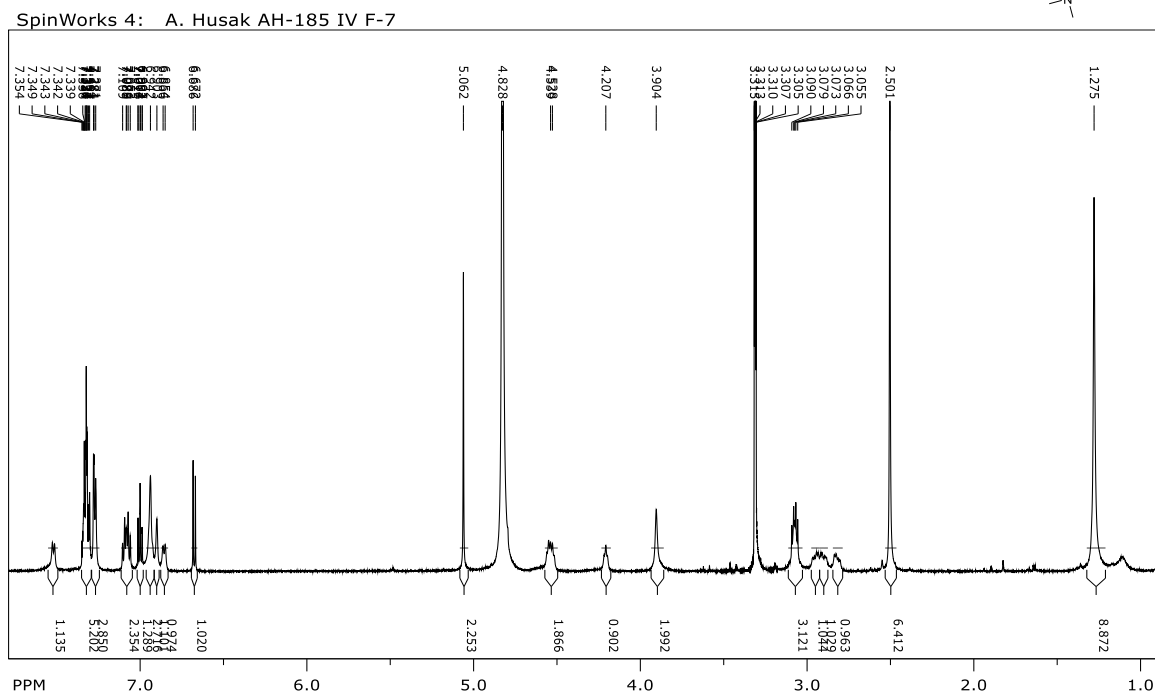
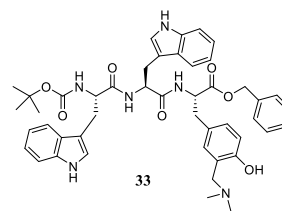


Prilog 46. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) spektar Boc-Trp-Trp-Phe-OBn (**31**)Prilog 47. <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) spektar Boc-Trp-Trp-Phe-OBn (**31**)

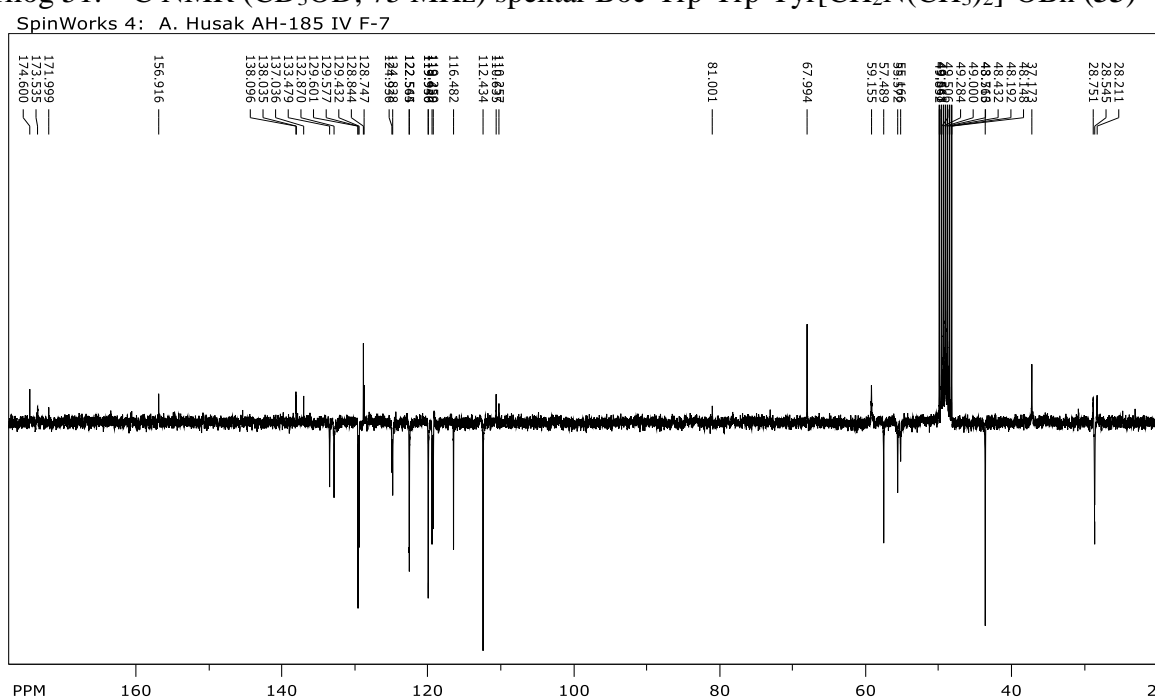
Prilog 48.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Boc-Trp-Trp-Tyr-OBn (**32**)Prilog 49.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz) spektar Boc-Trp-Trp-Tyr-OBn (**32**)

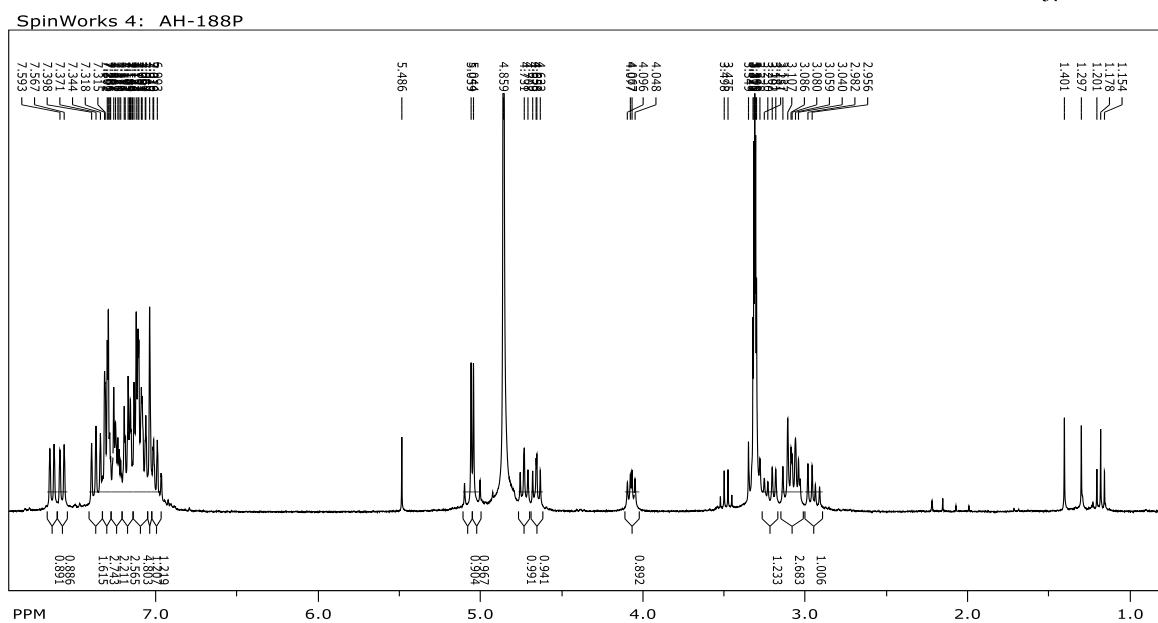
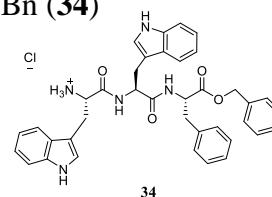
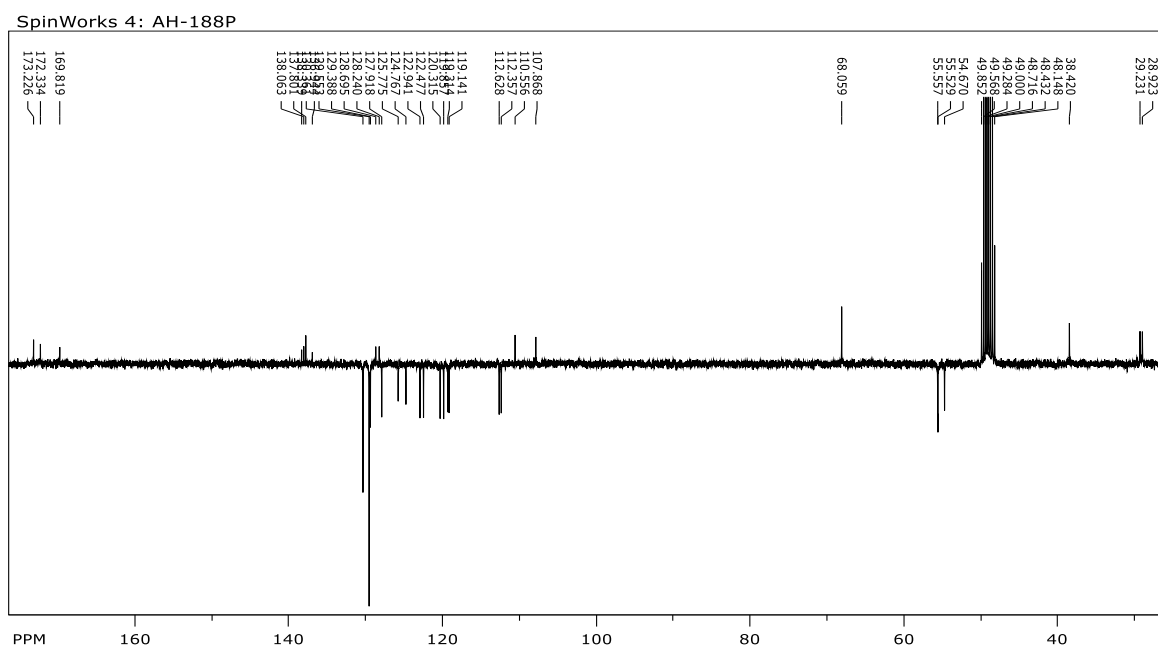


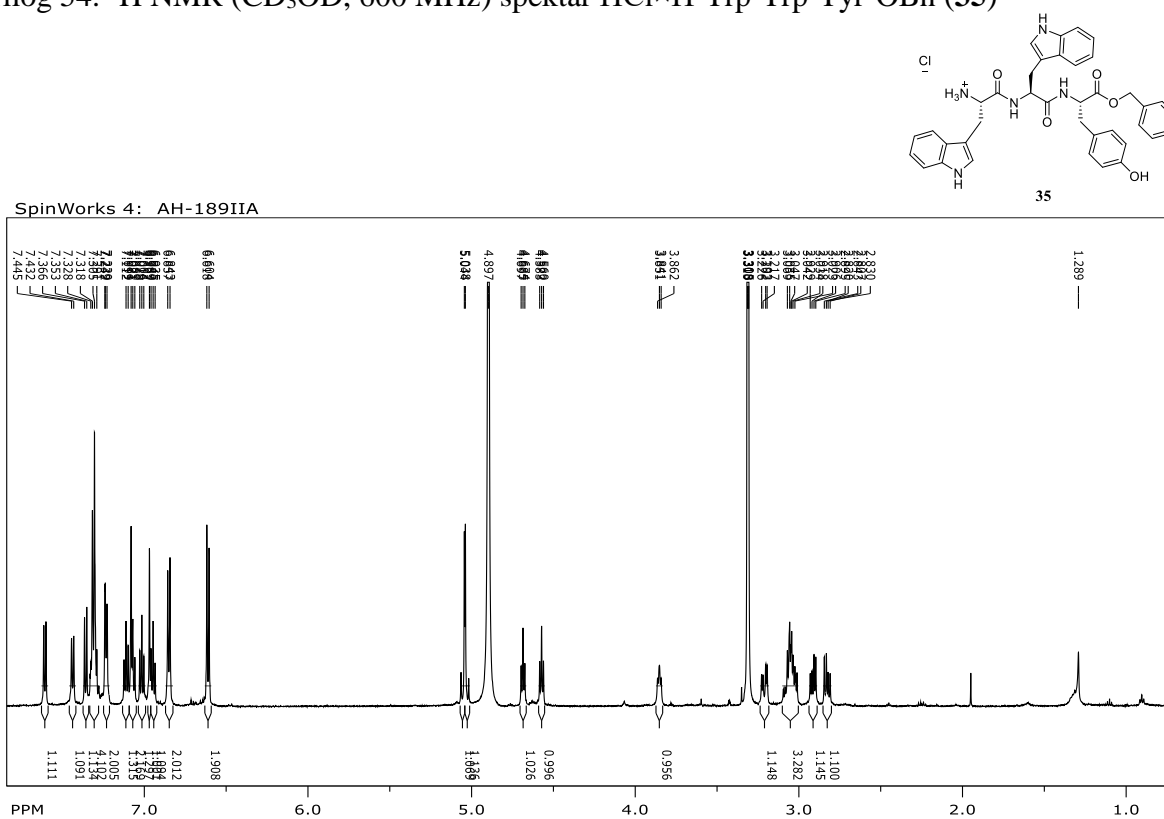
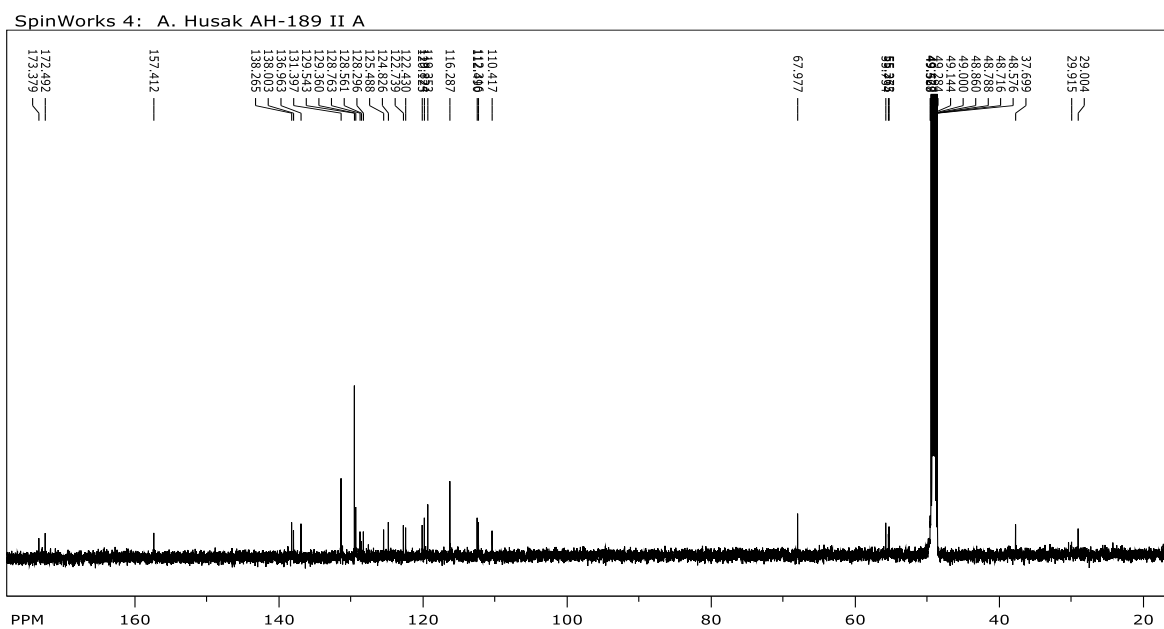
Prilog 50. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) spektar Boc-Trp-Trp-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**33**)

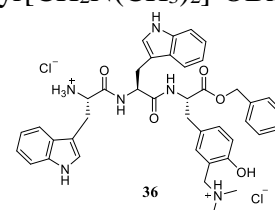


Prilog 51. <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) spektar Boc-Trp-Trp-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**33**)

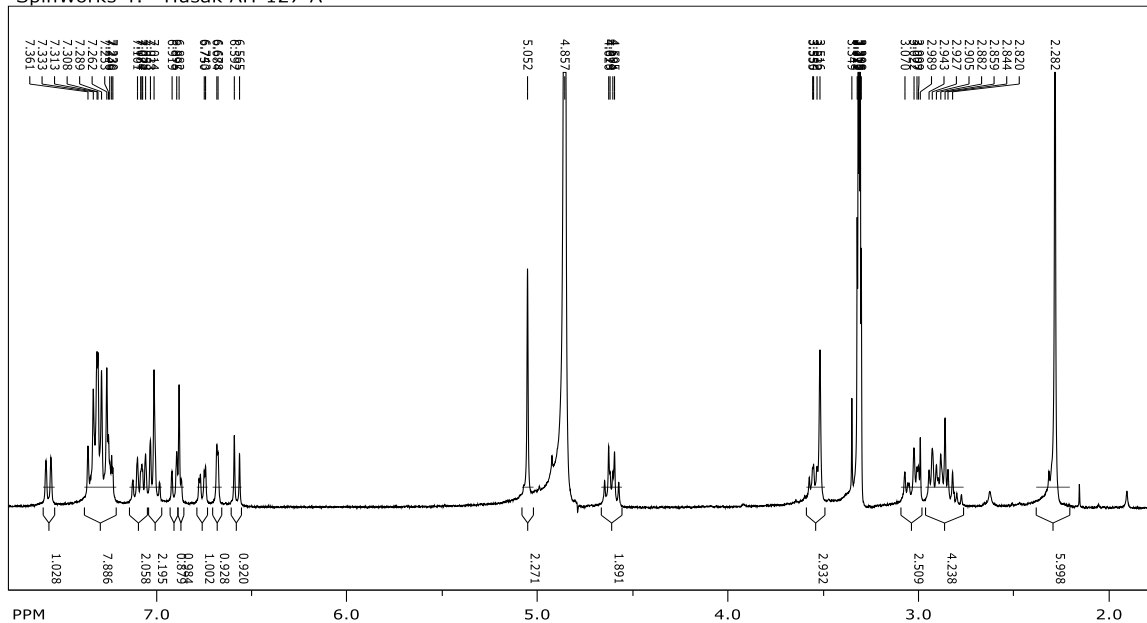


Prilog 52.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar  $\text{HCl}\times\text{H-Trp-Trp-Phe-OBn}$  (**34**)Prilog 53.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz) spektar  $\text{HCl}\times\text{H-Trp-Trp-Phe-OBn}$  (**34**)

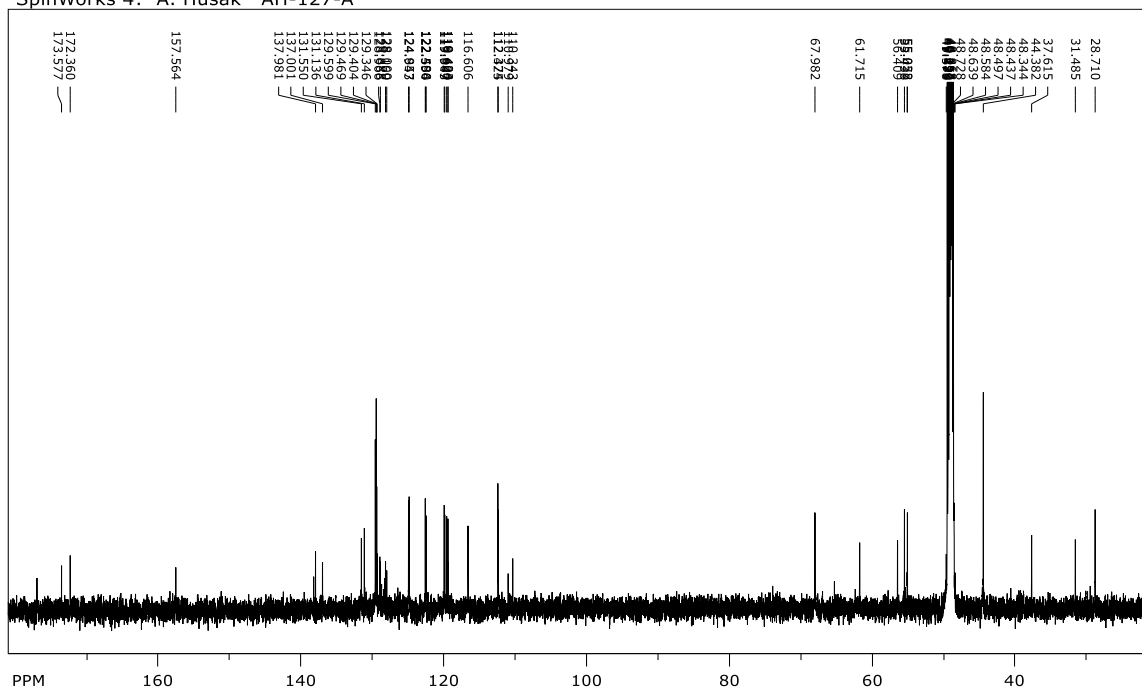
Prilog 54.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) spektar  $\text{HCl} \times \text{H-Trp-Trp-Tyr-OBn}$  (**35**)Prilog 55.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) spektar  $\text{HCl} \times \text{H-Trp-Trp-Tyr-OBn}$  (**35**)

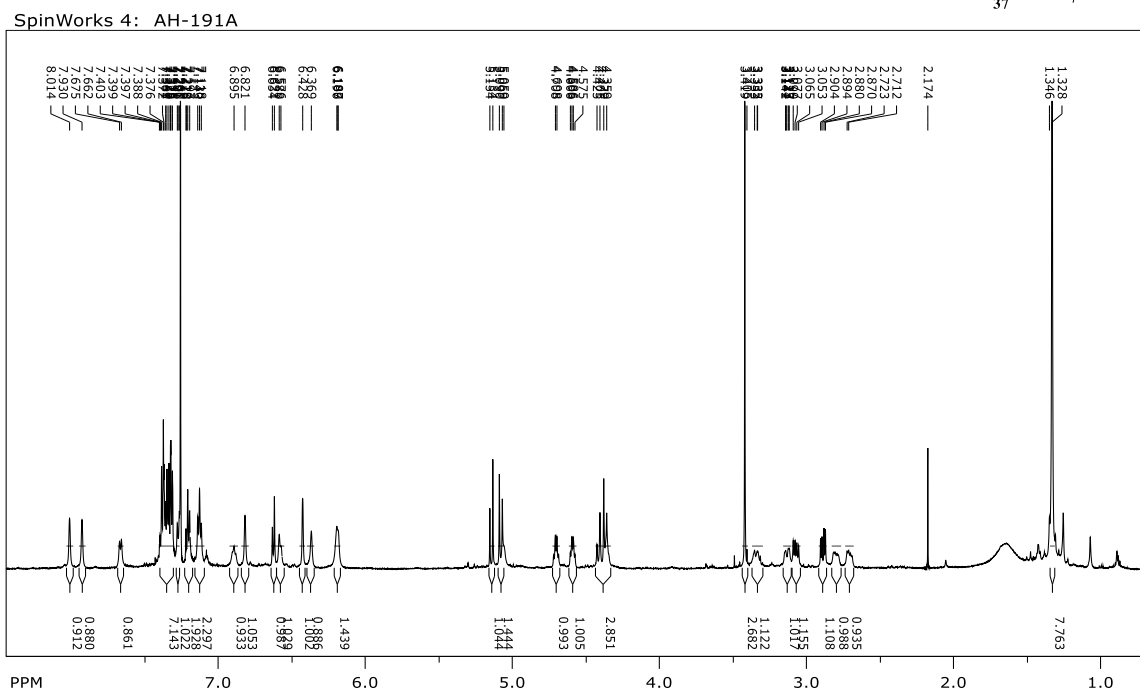
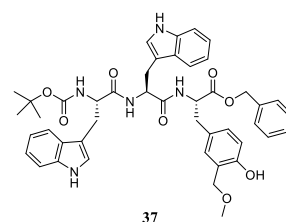
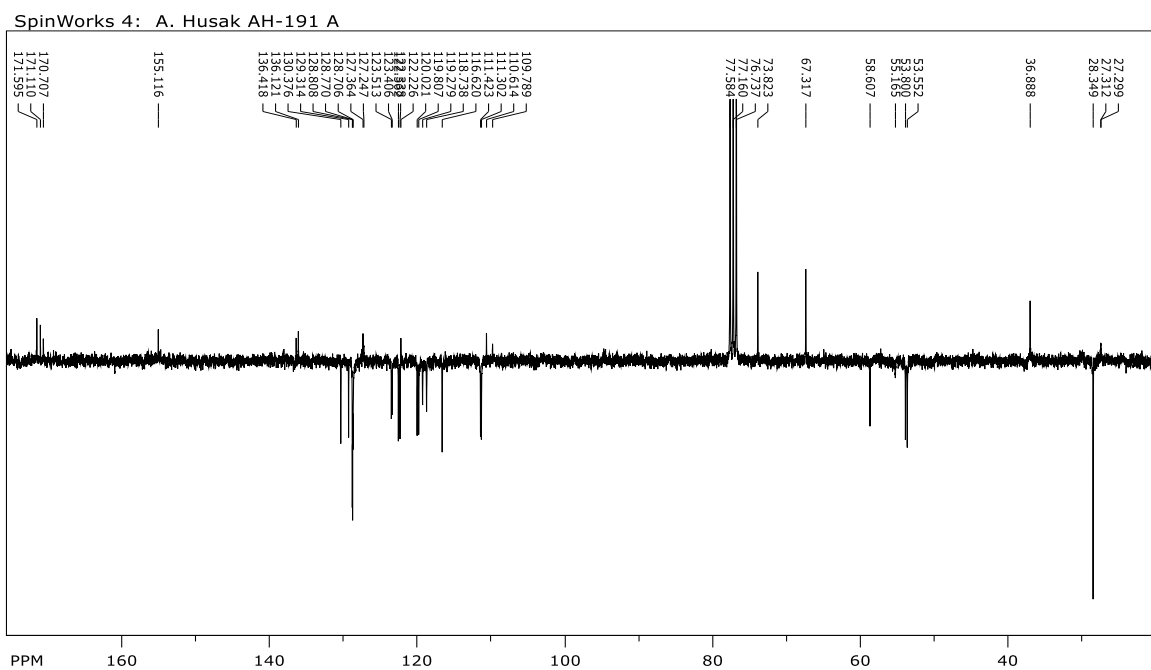
Prilog 56.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektr  $2\text{HCl}\times\text{H-Trp-Trp-Tyr}[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2]\text{-OBn}$  (36)

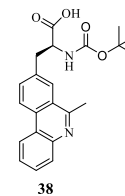
SpinWorks 4: Husak AH-127-A

Prilog 57.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) spektr  $2\text{HCl}\times\text{H-Trp-Trp-Tyr}[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2]\text{-OBn}$  (36)

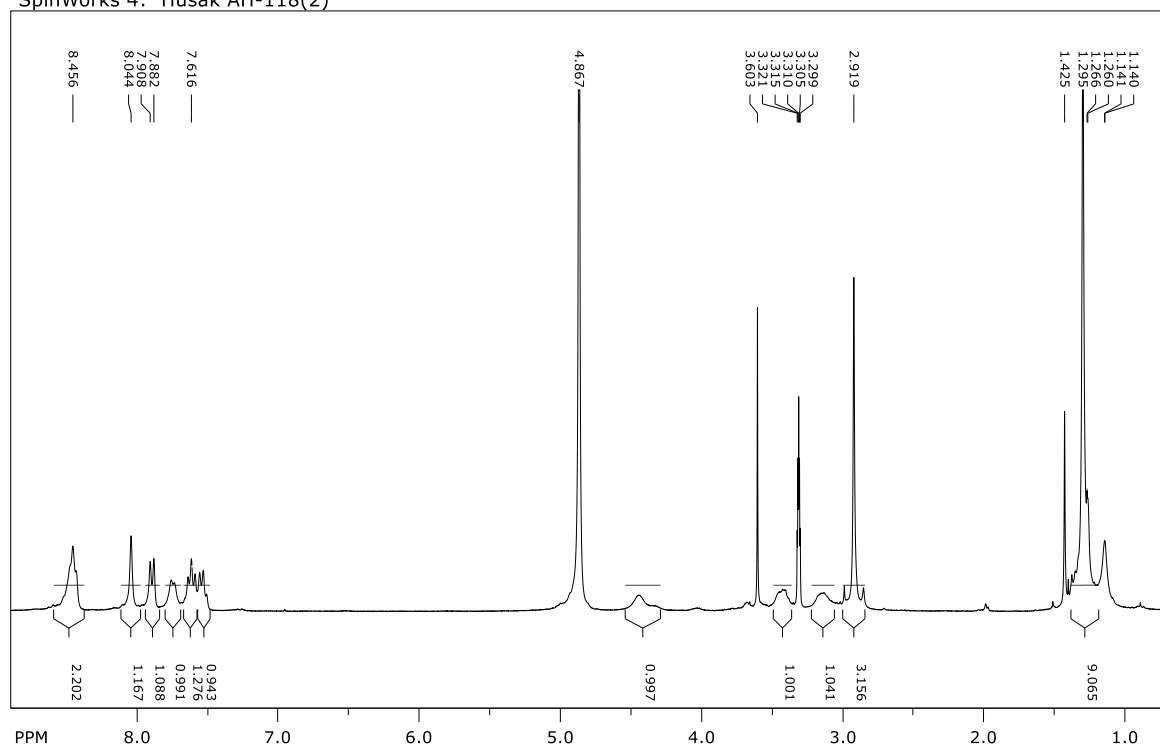
SpinWorks 4: A. Husak AH-127-A

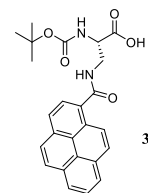


Prilog 58. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) spektrar Boc-Trp-Trp-Tyr[CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>]-OBn (**37**)Prilog 59. <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) spektrar Boc-Trp-Trp-Tyr[CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>]-OBn (**37**)

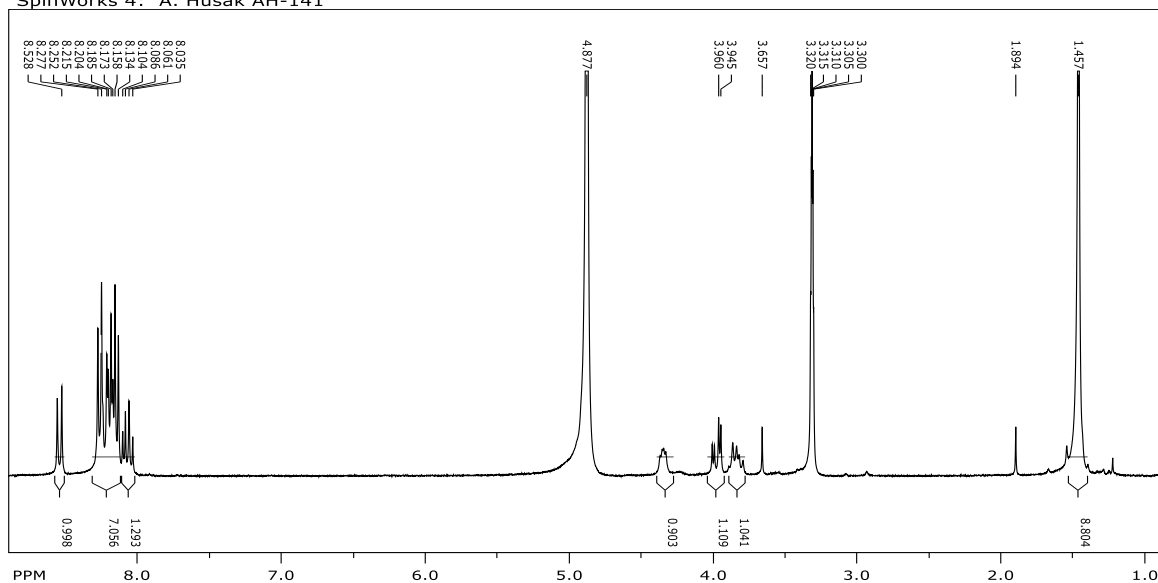
Prilog 60.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Phen-OH (**38**)

SpinWorks 4: Husak AH-118(2)

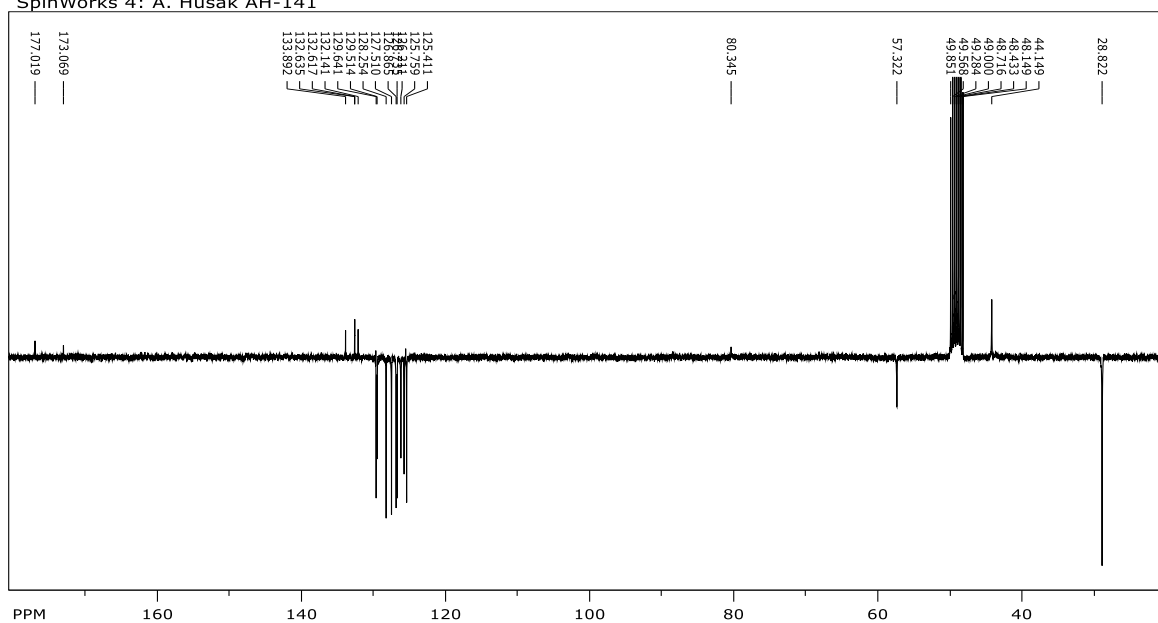


Prilog 61.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Boc-DAP(Pyr)-OH (**39**)

SpinWorks 4: A. Husak AH-141

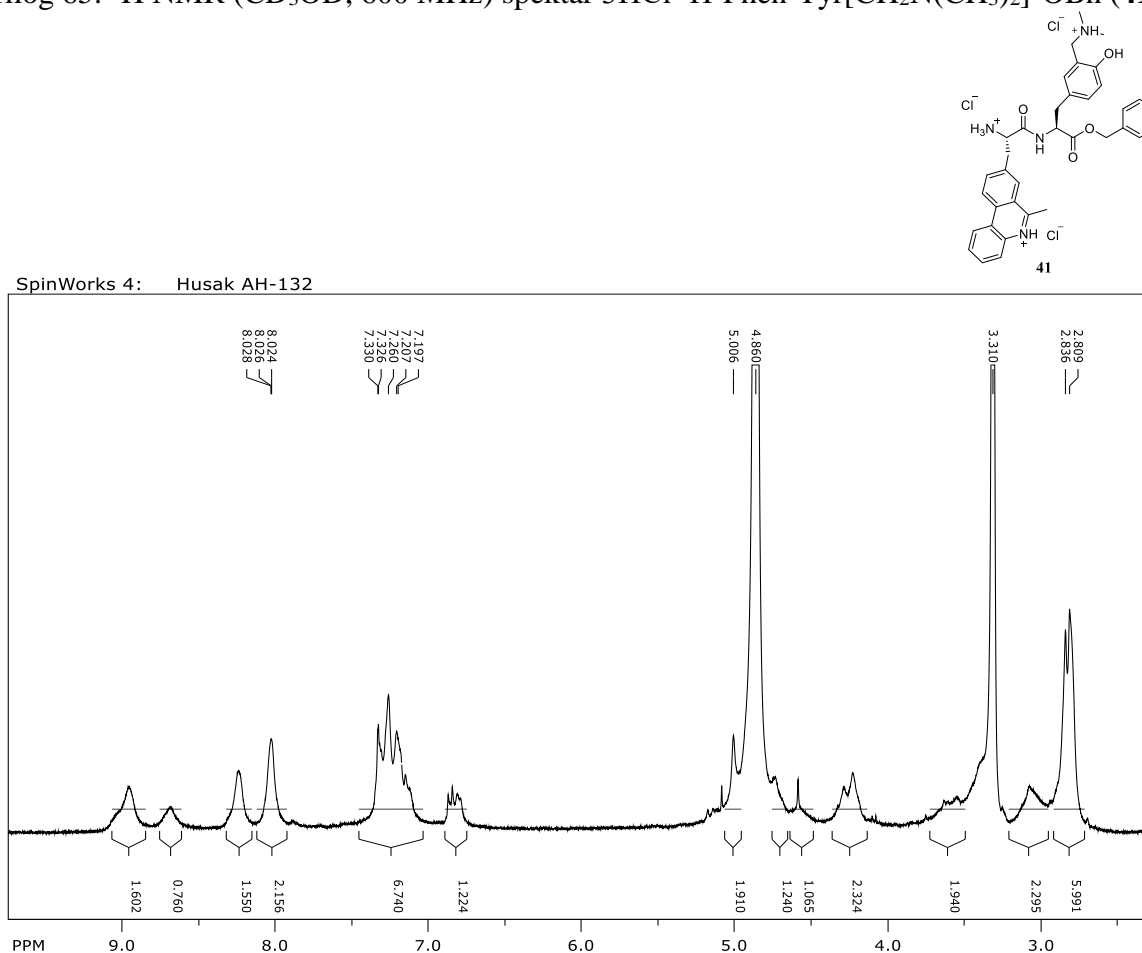
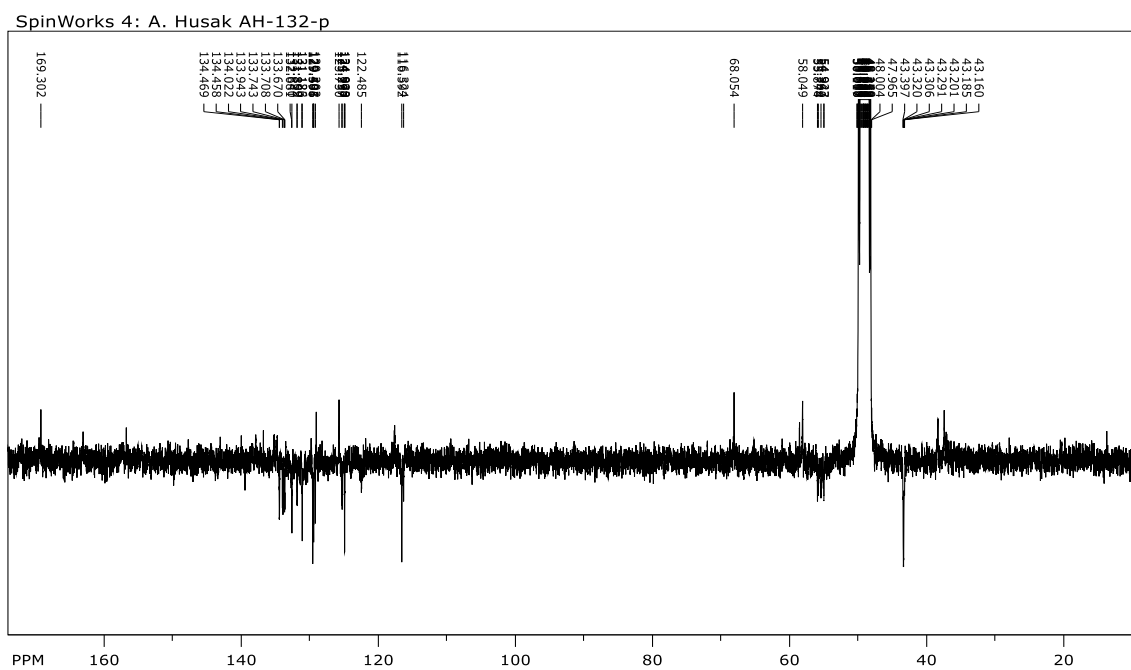
Prilog 62.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) spektar Boc-DAP(Pyr)-OH (**39**)

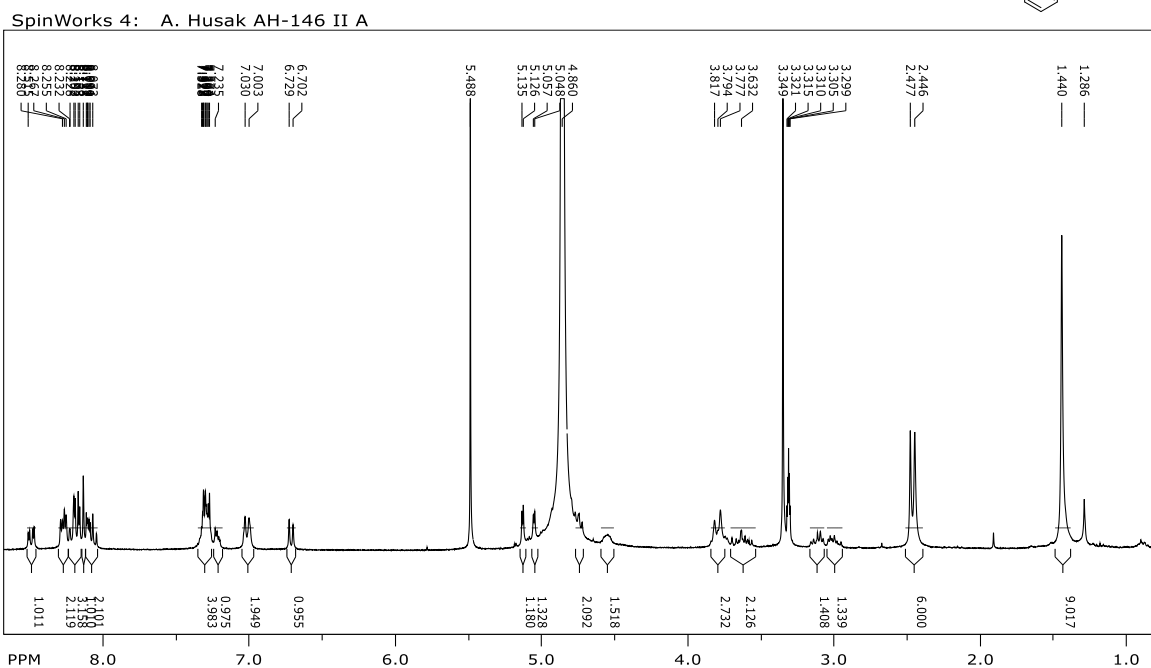
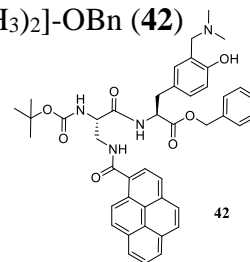
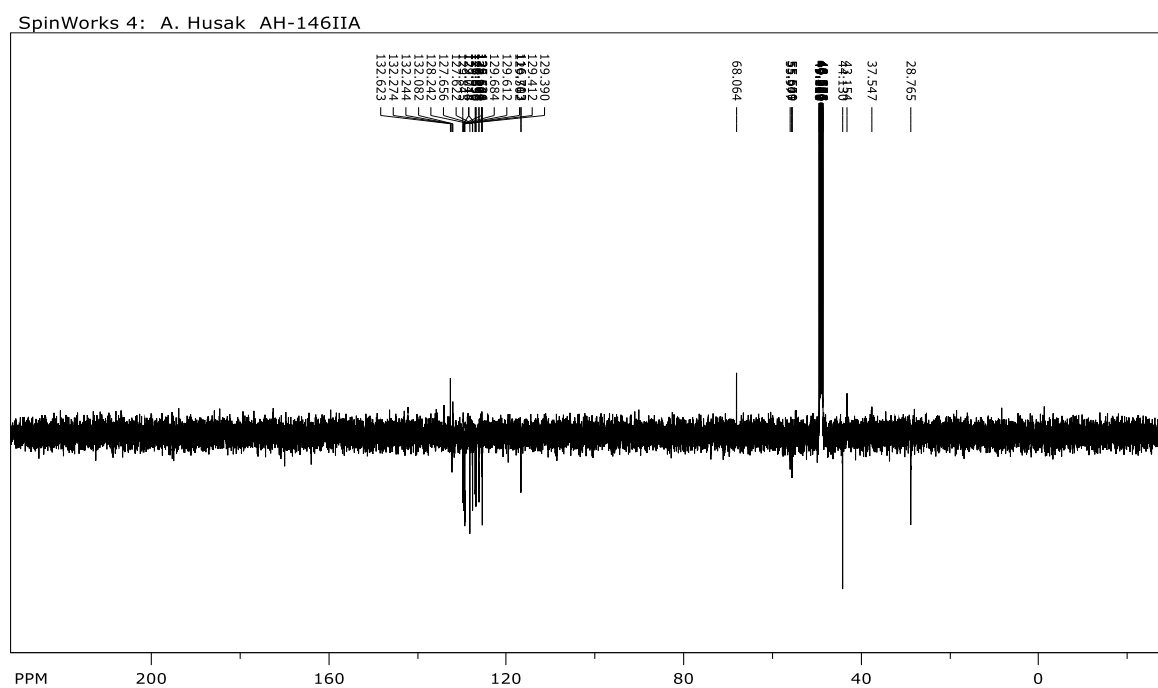
SpinWorks 4: A. Husak AH-141



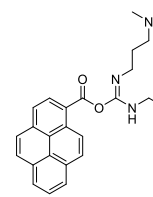




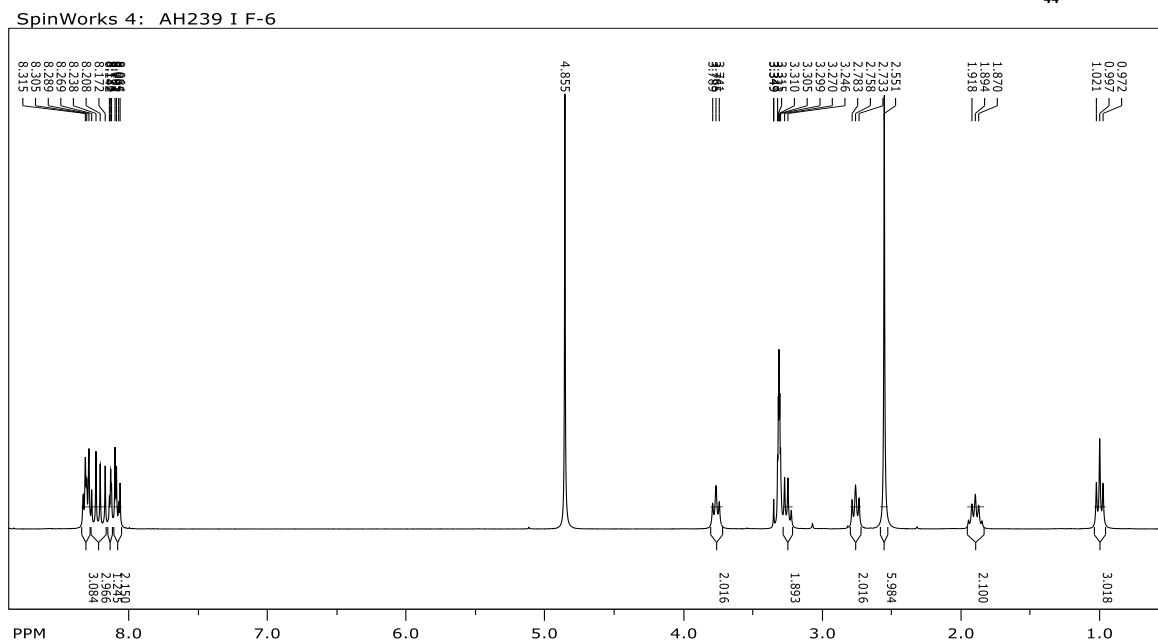
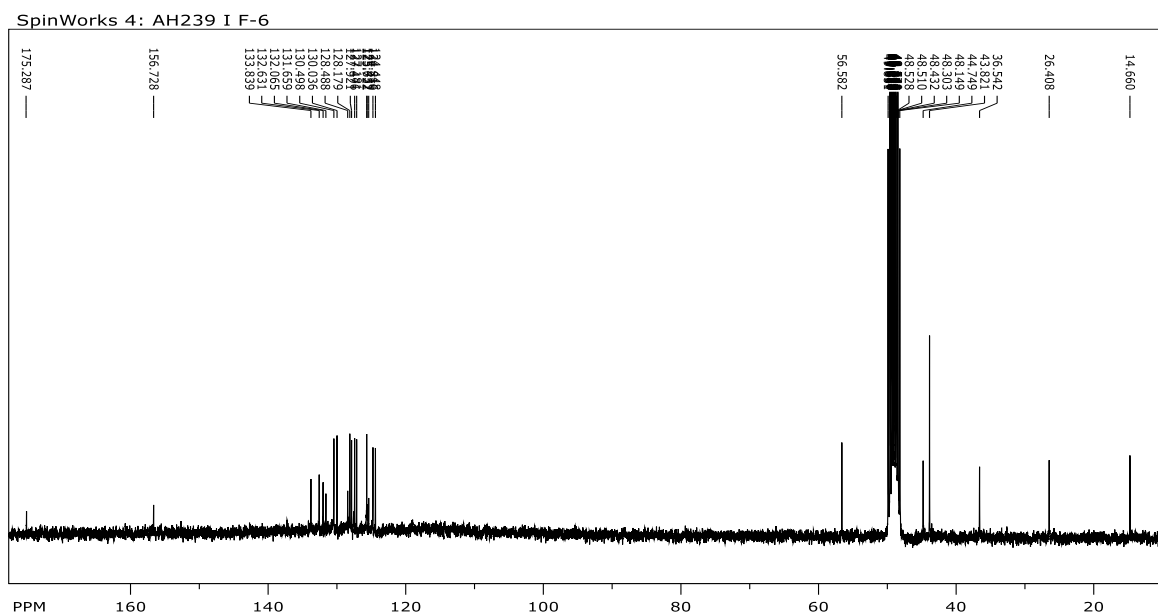
Prilog 65.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) spekter  $3\text{HCl}\times\text{H-Phen-Tyr}[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2]\text{-OBn}$  (**41**)Prilog 66.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) spekter  $3\text{HCl}\times\text{H-Phen-Tyr}[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2]\text{-OBn}$  (**41**)

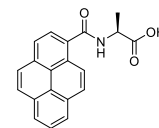
Prilog 67.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Boc-Pyr-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]-OBn (**42**)Prilog 68.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz, APT) spektar Boc-Pyr-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]-OBn (**42**)



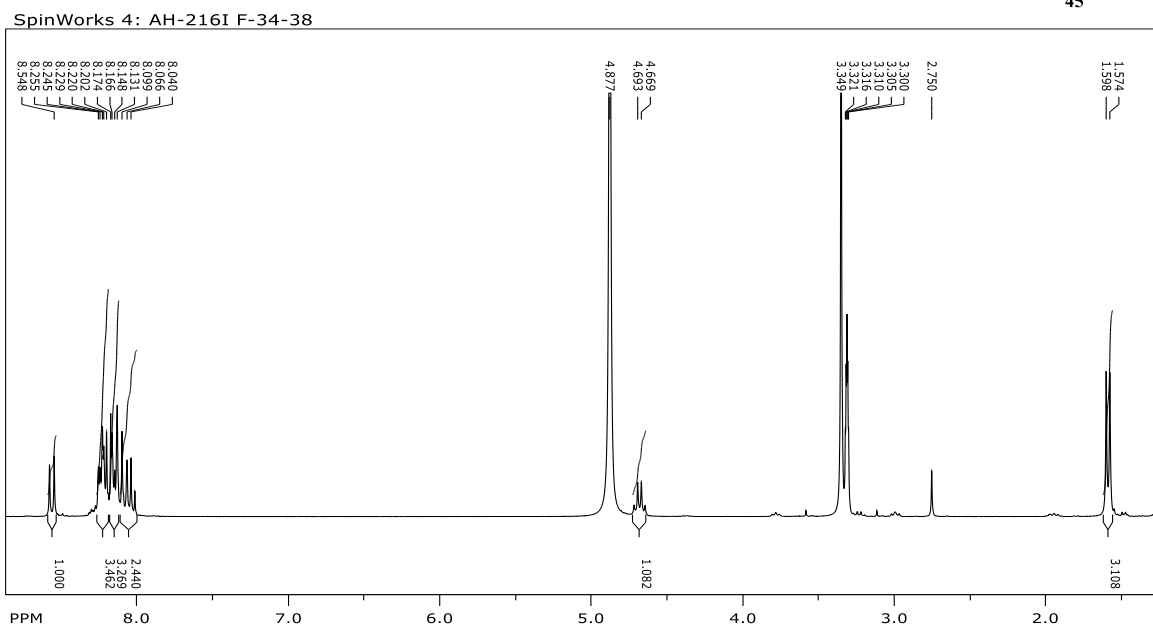
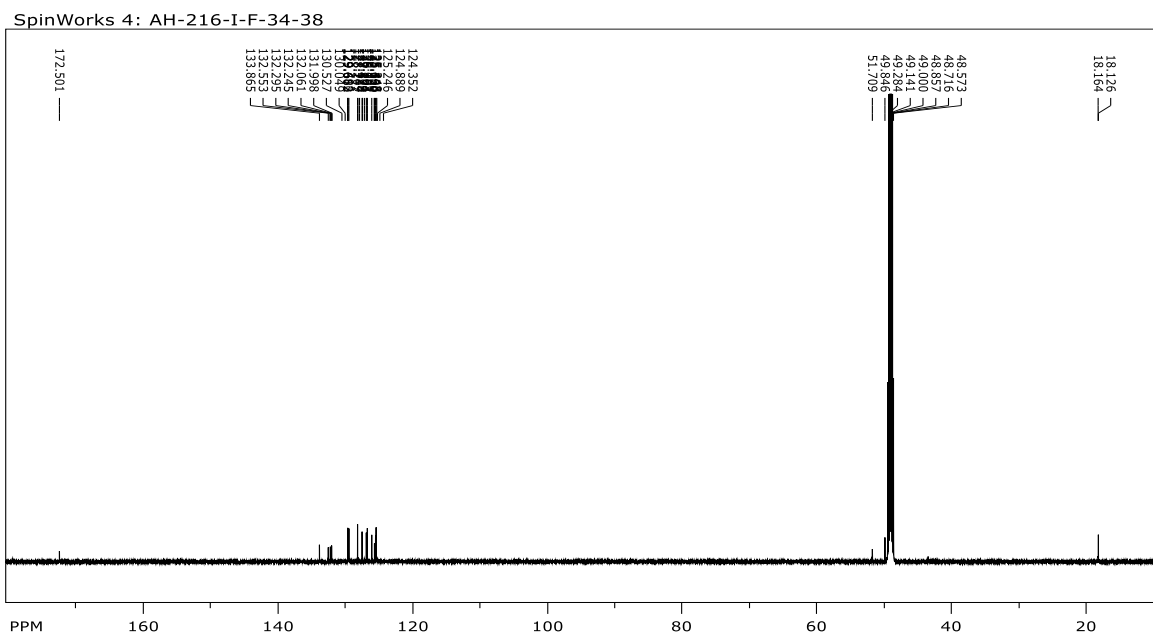
Prilog 71.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Pyr-EDC (**44**)

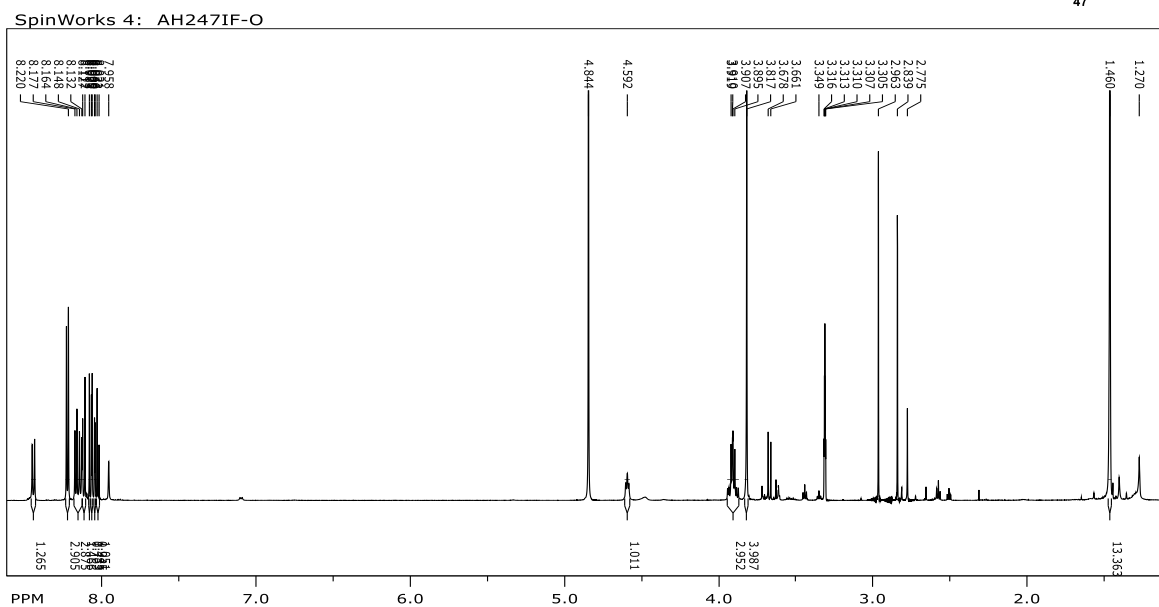
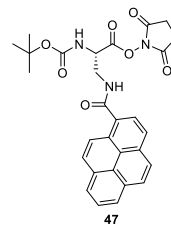
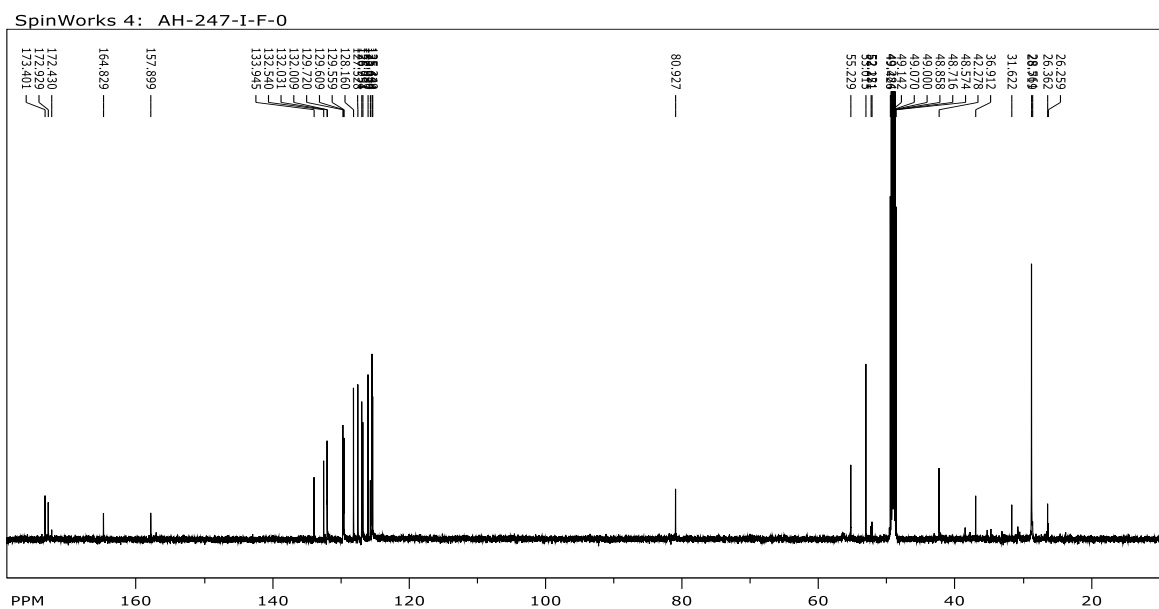
44

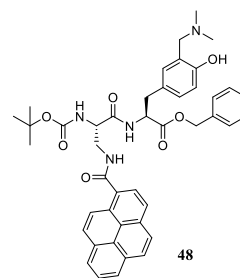
Prilog 72.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz) spektar Pyr-EDC (**44**)

Prilog 73.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Pyr-Ala (**45**)

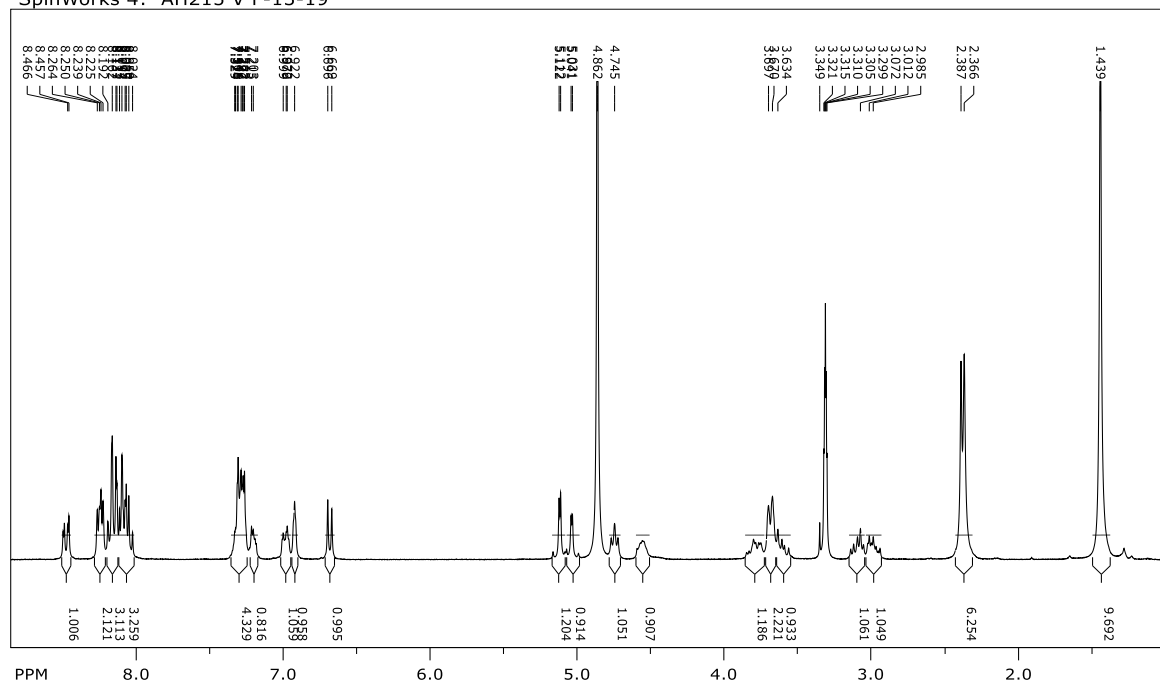
45

Prilog 74.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) spektar Pyr-Ala (**45**)

Prilog 75.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) spektar Boc-DAP(Pyr)-OSu (**47**)Prilog 76.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) spektar Boc-DAP(Pyr)-OSu (**47**)

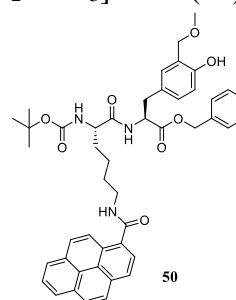
Prilog 77.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar Boc-DAP(Pyr)-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]-OBn (**48**)

SpinWorks 4: AH215 V F-13-19

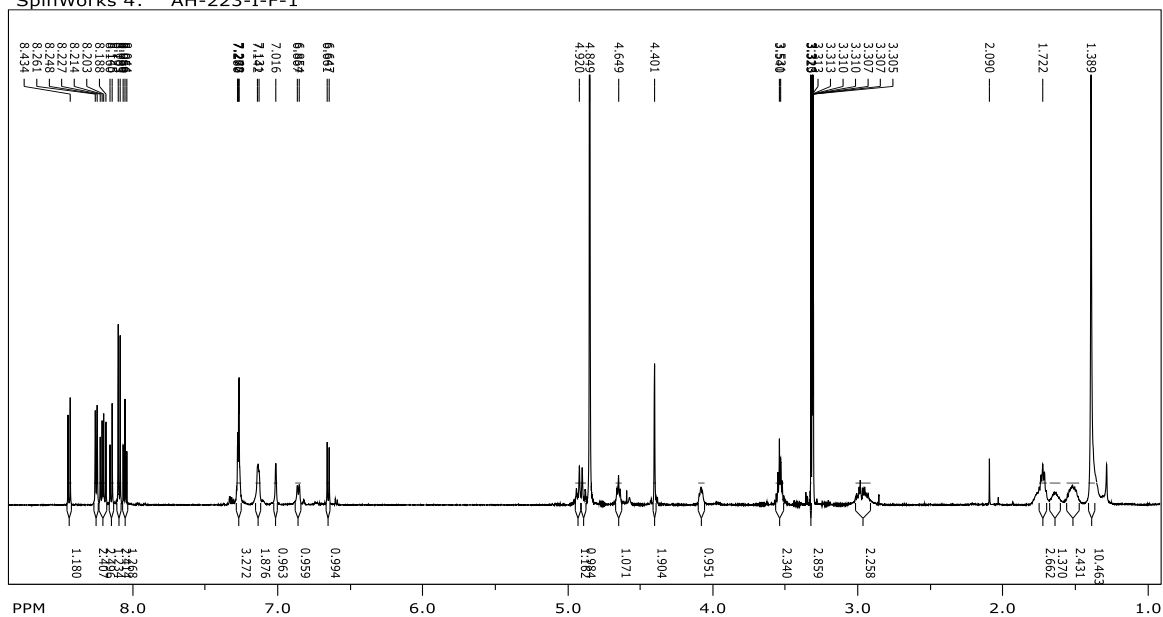




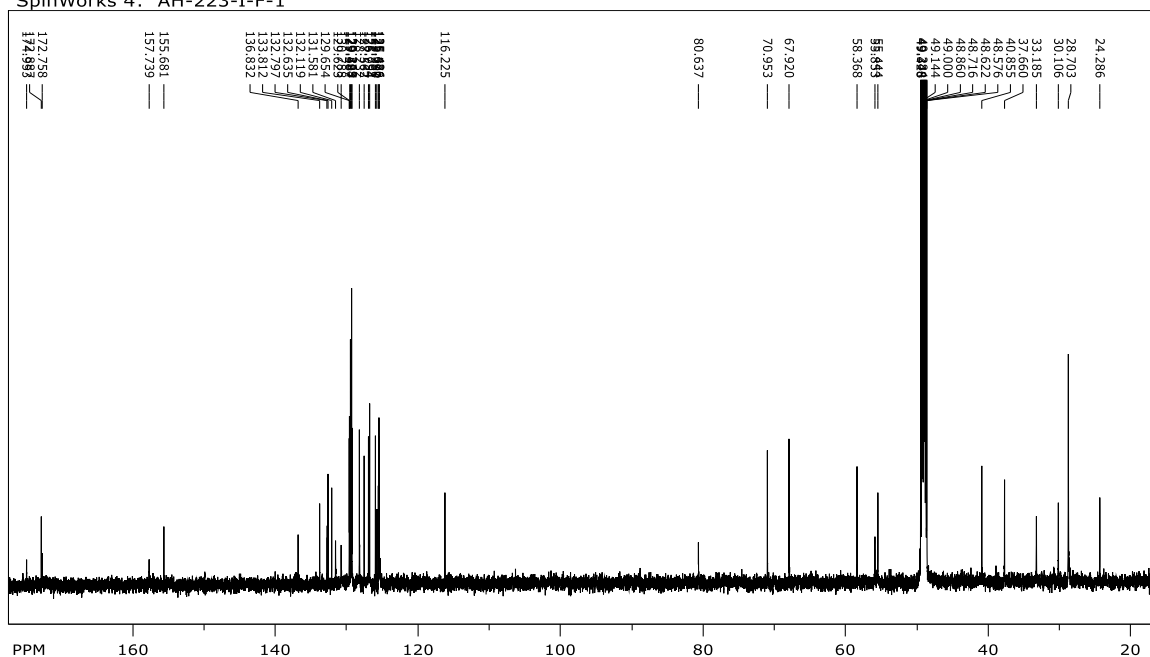


Prilog 80.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) spektrar Boc-Lys(Pyr)-Tyr[ $\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ]-OBn (**50**)

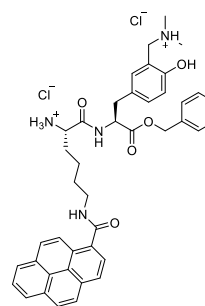
SpinWorks 4: AH-223-I-F-1

Prilog 81.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) spektrar Boc-Lys(Pyr)-Tyr[ $\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ]-OBn (**50**)

SpinWorks 4: AH-223-I-F-1

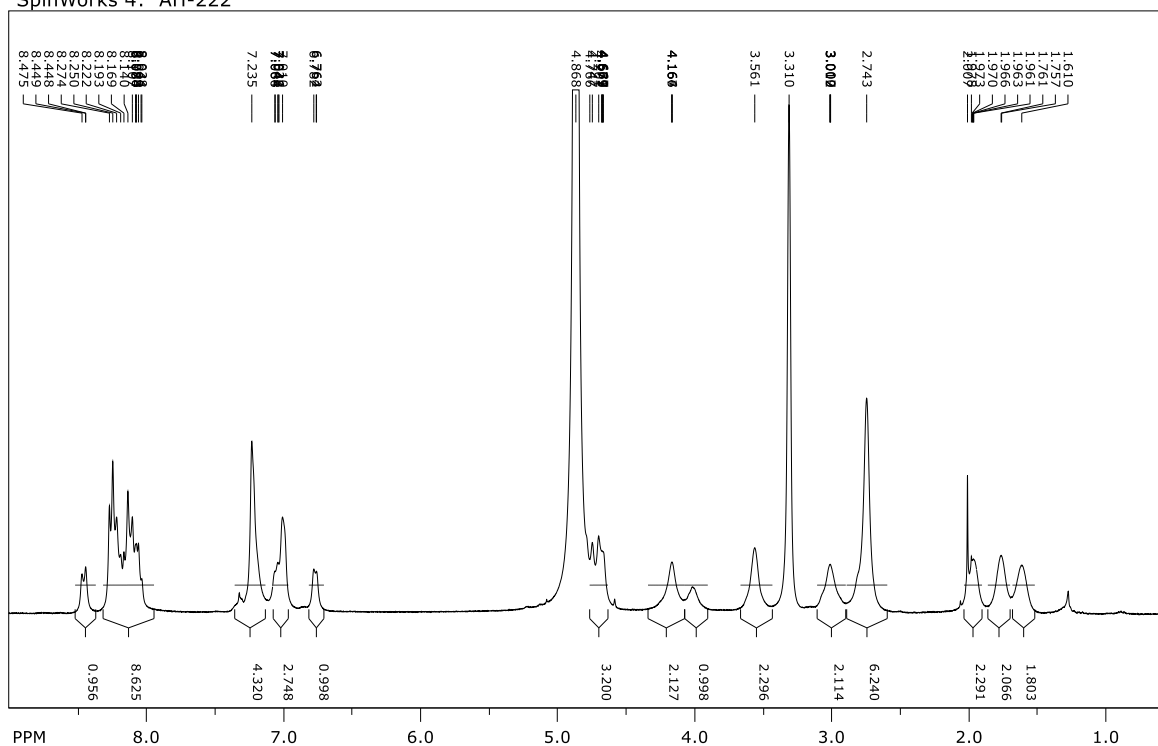


Prilog 82.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) spektar  $2\text{HCl}\times\text{H-Lys(Pyr)-Tyr}[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2]\text{-OBn}$  (51)



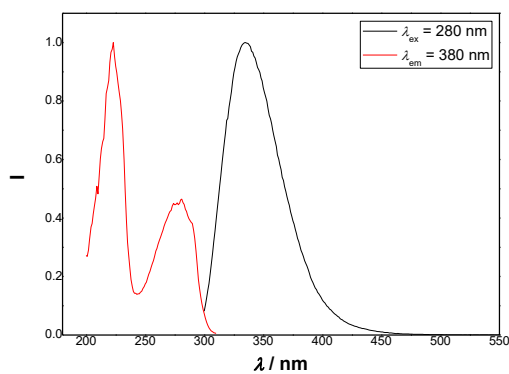
51

SpinWorks 4: AH-222

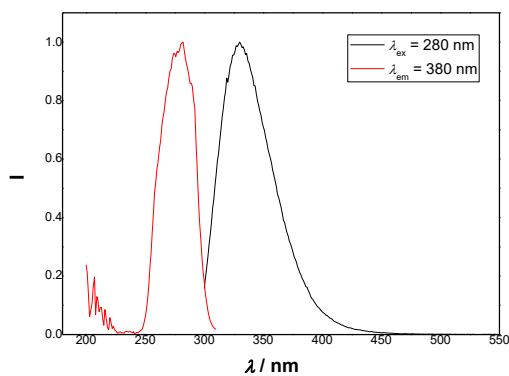


### 8.1. Dodatak poglavlju 4.2.5.

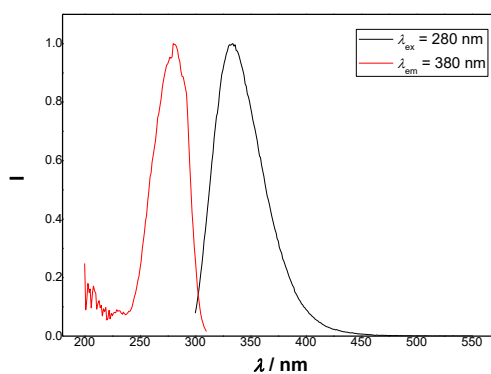
Prilog 83. Normalizirani fluorescencijski ( $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ ) i ekscitacijski spektar ( $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$ ) spoja **33** u  $\text{CH}_3\text{CN}$ .



Prilog 84. Normalizirani fluorescencijski ( $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ ) i ekscitacijski spektar ( $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$ ) spoja **33** u EtOAc.

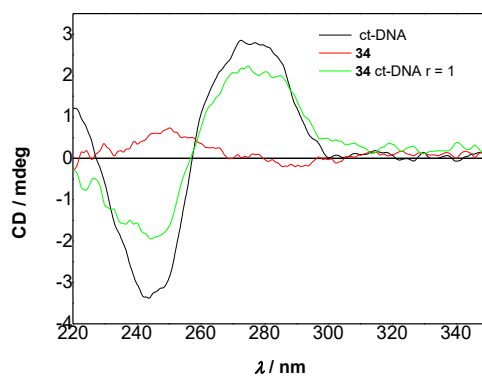


Prilog 85. Normalizirani fluorescencijski ( $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ ) i ekscitacijski spektar ( $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$ ) spoja **33** u THF-u.

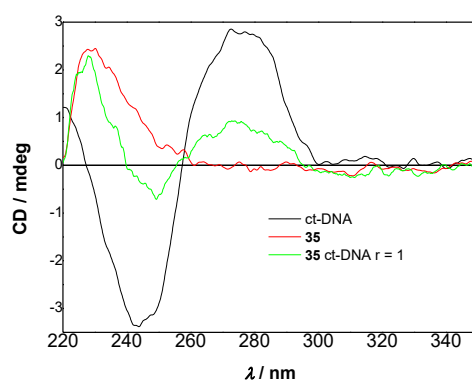


## 8.2. Dodatak poglavlju 4.2.6.

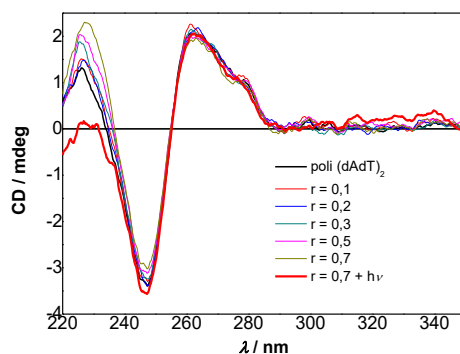
Prilog 86. CD spektri *ct*-DNA ( $c = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ), spoja **34** i smjese spoja **34** i *ct*-DNA  $r[\mathbf{34}]/[ct\text{-DNA}] = 1$  pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , 20 % DMSO).



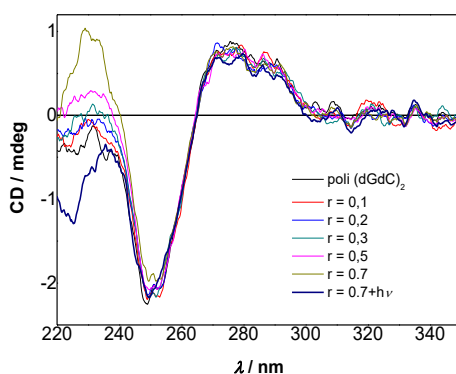
Prilog 87. CD spektri *ct*-DNA ( $c = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ), spoja **35** i smjese spoja **35** i *ct*-DNA  $r[\mathbf{35}]/[ct\text{-DNA}] = 1$  pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , 20 % DMSO).



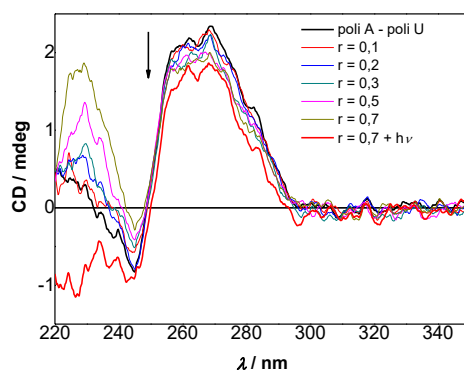
Prilog 88. Utjecaj promjene koncentracije spoja **36** kod različitih  $r[\mathbf{36}]/[\text{polinukleotid}]$  na CD spektre poli (dAdT)<sub>2</sub> ( $c = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



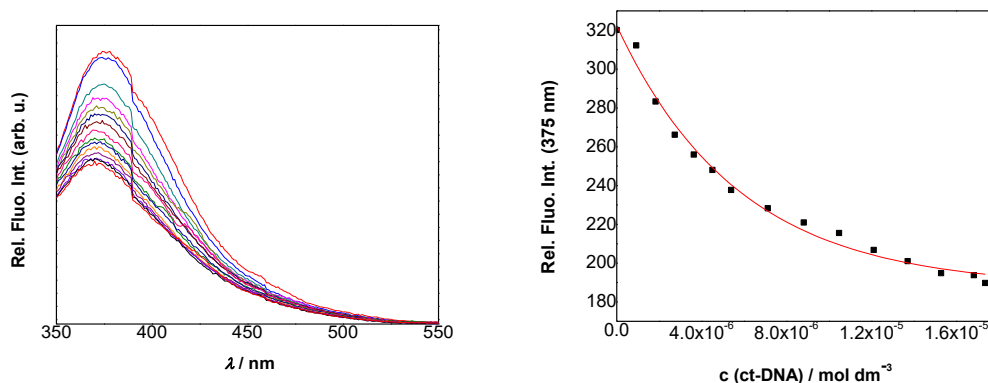
Prilog 89. Utjecaj promjene koncentracije spoja **36** kod različitih  $r[\mathbf{36}]/[\text{polinukleotid}]$  na CD spektre poli (dGdC)<sub>2</sub> ( $c = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



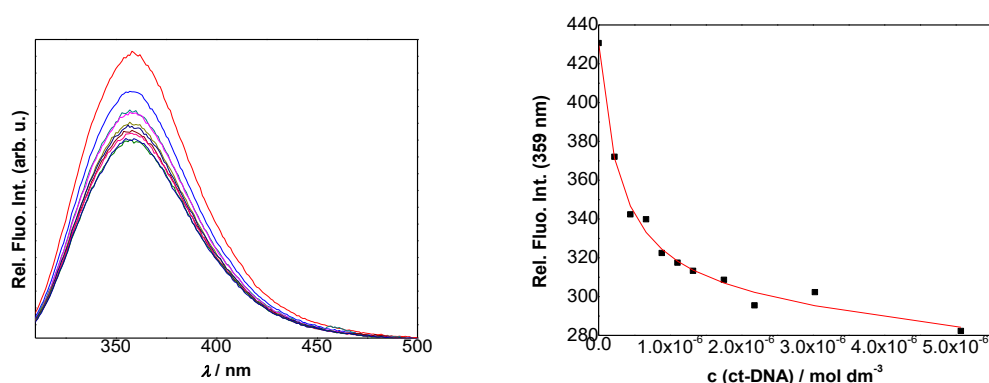
Prilog 90. Utjecaj promjene koncentracije spoja **36** kod različitih  $r[\mathbf{36}]/[\text{polinukleotid}]$  na CD spektre poli A – poli U ( $c = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



Prilog 91. Fluorescencijski spektri spoja **34** ( $c = 3,3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$ ) prilikom titracije s *ct*-DNA ( $c = 1,2 \times 10^{-6} - 6,7 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri pH = 7,0 (20 % DMSO/kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Titracija je provedena na 25 °C. (lijevo); Ovisnost intenziteta emisije spoja **34** o koncentraciji *ct*-DNA na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\text{max}} = 375 \text{ nm}$ . Točke su izmjerene vrijednosti, a linija predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe. (desno)

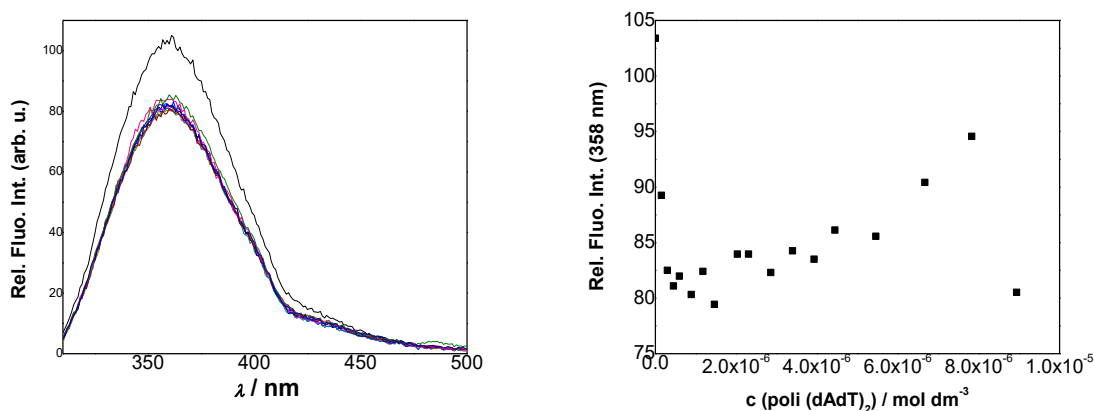


Prilog 92. Fluorescencijski spektri spoja **35** ( $c = 2,4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$ ) prilikom titracije s *ct*-DNA ( $c = 1,2 \times 10^{-6} - 6,7 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri pH = 7,0 (20 % DMSO/kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Titracija je provedena na 25 °C. (lijevo); Ovisnost intenziteta emisije spoja **35** o koncentraciji *ct*-DNA na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\text{max}} = 359 \text{ nm}$ . Točke su izmjerene vrijednosti, a linija predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe. (desno)

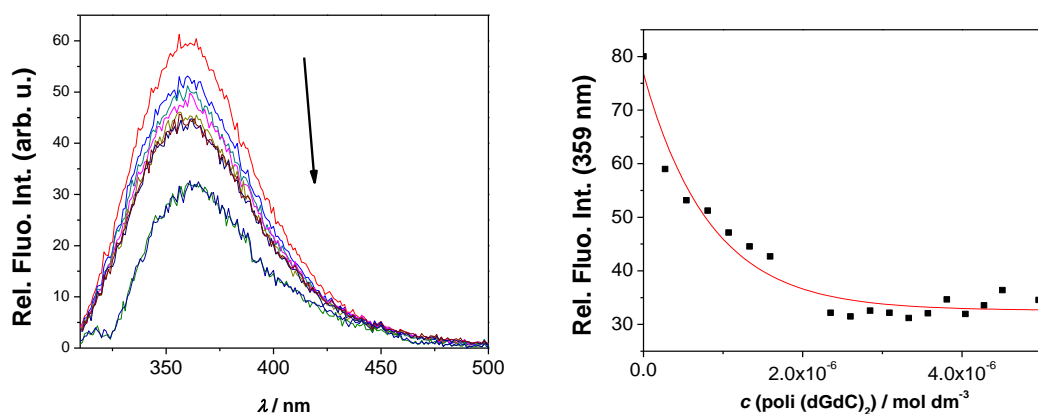


Prilog 93. Fluorescencijski spektri spoja **35** ( $c = 3,9 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$ ) prilikom titracije s poli (dAdT)<sub>2</sub> pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Titracija je

provedena na 25 °C. (lijevo); Ovisnost intenziteta emisije spoja **35** o koncentraciji poli (dAdT)<sub>2</sub> na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\max} = 358$  nm. (desno)

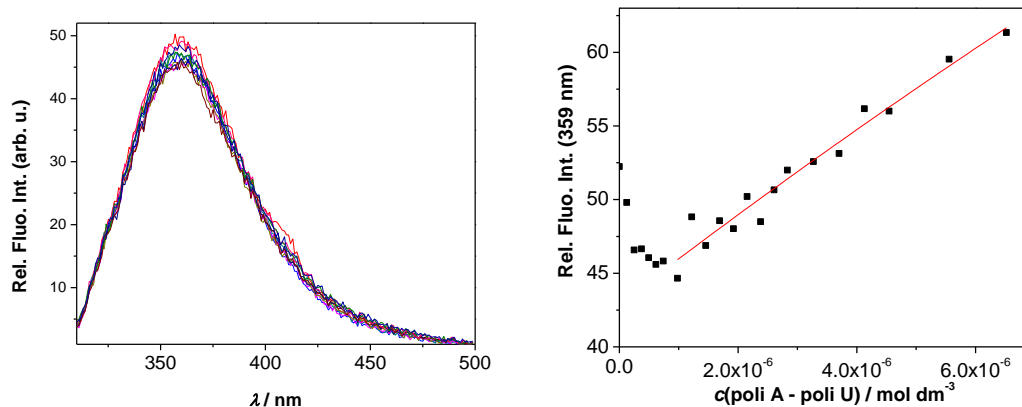


Prilog 94. Fluorescencijski spektri spoja **35** ( $c = 3,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{\text{exc}} = 295$  nm) prilikom titracije s poli (dGdC)<sub>2</sub> pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>). Titracija je provedena na 25 °C. (lijevo); Ovisnost intenziteta emisije spoja **35** o koncentraciji poli (dGdC)<sub>2</sub> na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\max} = 359$  nm. Točke su izmjerene vrijednosti, a linija predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe s vrijednosti  $n = [\text{spoj } \mathbf{35}]/[\text{polinukleotid}] = 0,3$ . (desno)

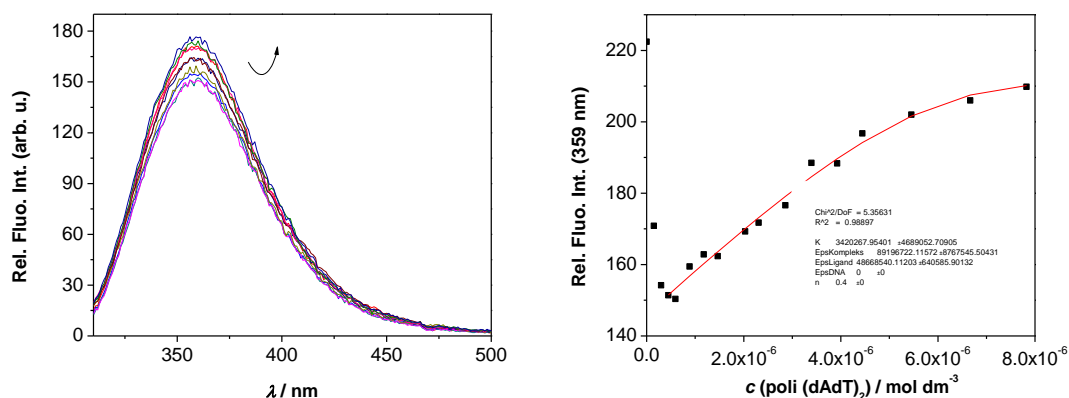


Prilog 95. Fluorescencijski spektri spoja **35** ( $c = 3,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{\text{exc}} = 295$  nm) prilikom titracije s poli A – poli U pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>). Titracija je provedena na 25 °C. (lijevo); Ovisnost intenziteta emisije spoja **35** o koncentraciji poli A – poli U na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\max} = 359$  nm. Točke su izmjerene vrijednosti, a linija

predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe s vrijednosti  $n = [\text{spoj } 35]/[\text{polinukleotid}] = 0,3$ . (desno)

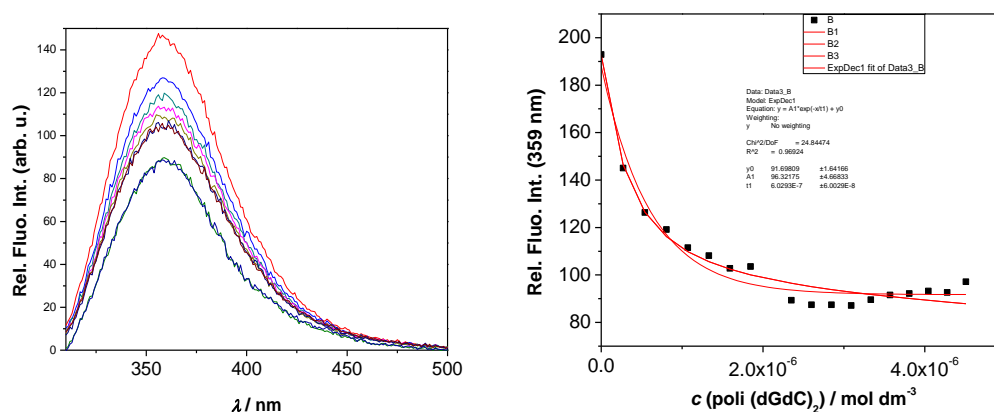


Prilog 96. Fluorescencijski spektri spoja **36** ( $c = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$ ) prilikom titracije s poli (dAdT)<sub>2</sub> pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Titracija je provedena na 25 °C; b) Ovisnost intenziteta emisije spoja **36** o koncentraciji poli (dAdT)<sub>2</sub> na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\text{max}} = 359 \text{ nm}$ . Točke su izmjerene vrijednosti, a linija predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe i  $n[\mathbf{36}]/[\text{dAdT}]_2 = 0,4$ .

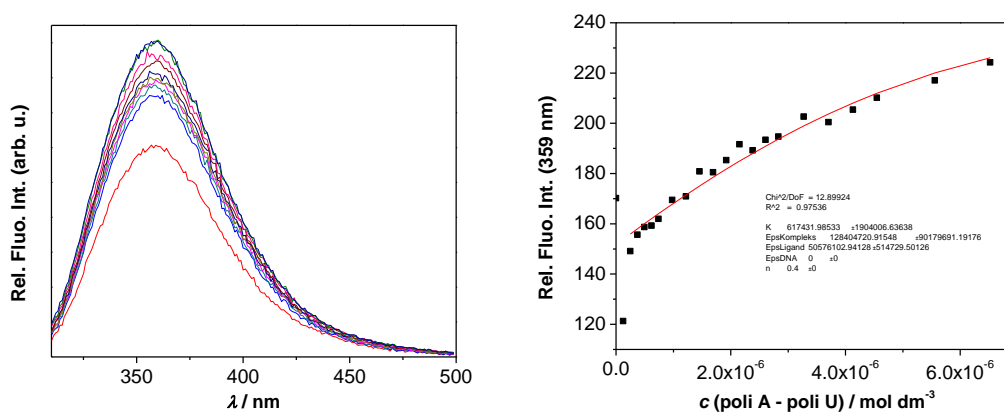




Prilog 97. Fluorescencijski spektri spoja **36** ( $c = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ) prilikom titracije s poli (dGdC)<sub>2</sub> pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Titracija je provedena na 25 °C; b) Ovisnost intenziteta emisije spoja **36** o koncentraciji poli (dGdC)<sub>2</sub> na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\text{max}} = 359 \text{ nm}$ . Točke su izmjerene vrijednosti, a linija predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe i  $n[\mathbf{36}]/[\text{dGdC}]_2 < 1$ .

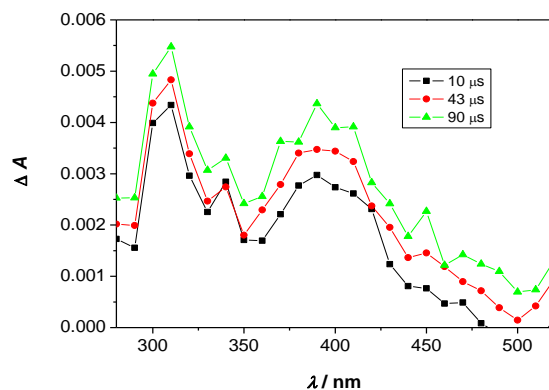


Prilog 98. Fluorescencijski spektri spoja **36** ( $c = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$ ) prilikom titracije s poli A – poli U pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Titracija je provedena na 25 °C; b) Ovisnost intenziteta emisije spoja **36** o koncentraciji poli A – poli U na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\text{max}} = 359 \text{ nm}$ . Točke su izmjerene vrijednosti, a linija predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe i  $n[\mathbf{36}]/[\text{poli A – poli U}] = 0,4$ .

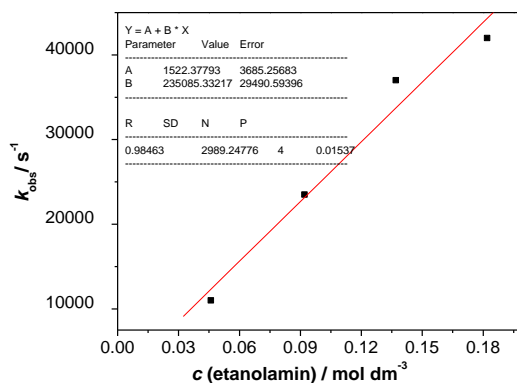


### 8.3. Dodatak poglavlju 4.1.5.

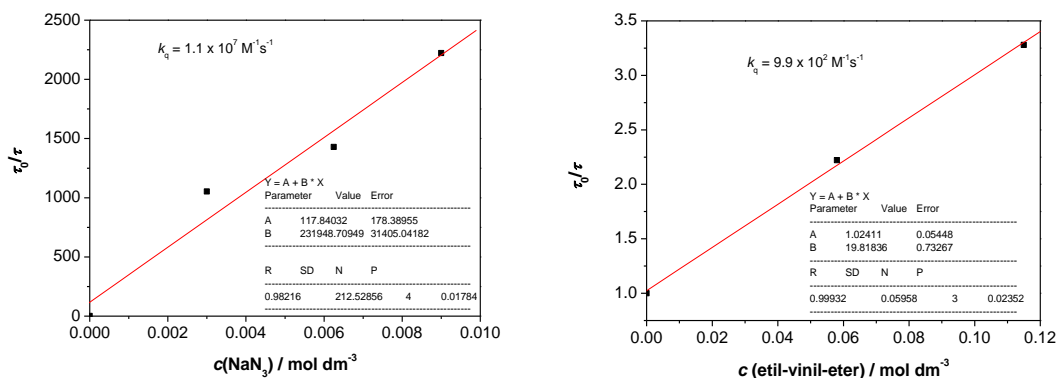
Prilog 99. Tranzijentni apsorpcijski spektri otopine spoja **14** u CH<sub>3</sub>CN propuhane N<sub>2</sub>.



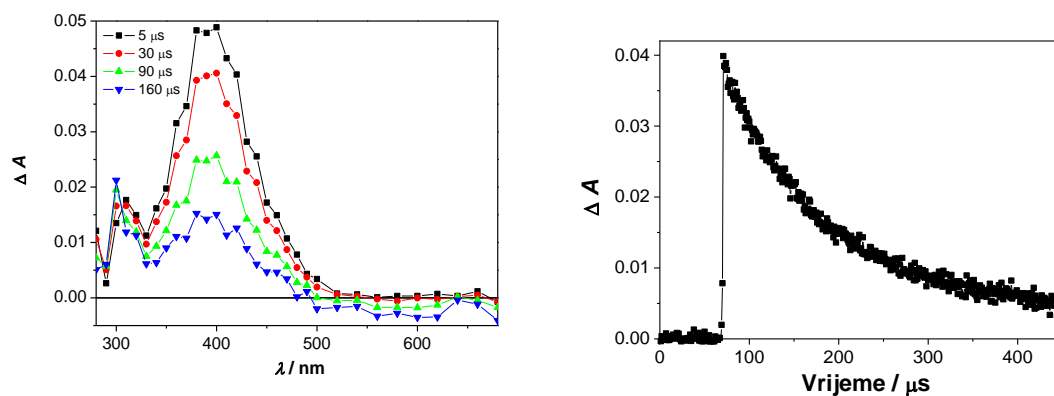
Prilog 100. Stern-Volmer ovisnost gašenja tranzijentnog signala dodatkom etanolamina otopini spoja **14** u CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1:1). Vrijednost konstante gašenja ( $k_q$ ) etanolaminom je procijenjena na  $k_q = 2,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .



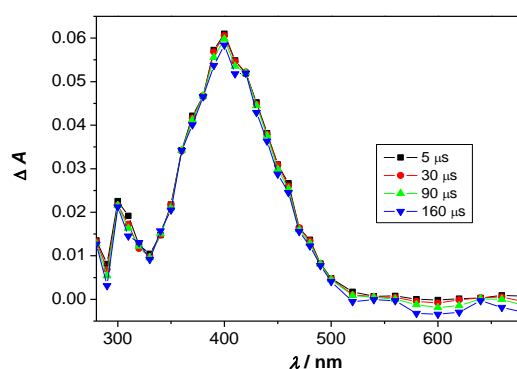
Prilog 101. Stern-Volmer ovisnost gašenja tranzijentnog signala ( $\tau = 20 \pm 2 \text{ ms}$ ) dodatkom NaN<sub>3</sub> (lijevo) i etil-vinil-etera (desno) otopini spoja **14** u CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1:1).



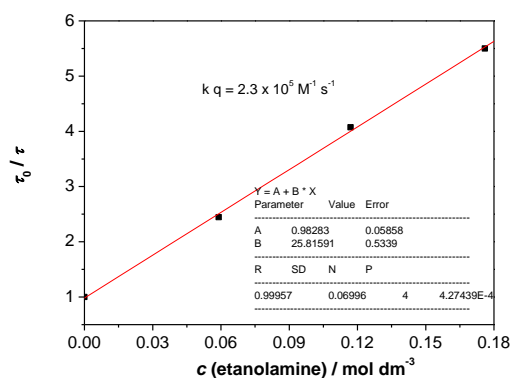
Prilog 102. Tranzijentni apsorpcijski spektri otopine spoja **20** u CH<sub>3</sub>CN propuhane N<sub>2</sub> (lijevo); Opadanje intenziteta tranzijentne apsorpcije na 400 nm otopine spoja **20** u CH<sub>3</sub>CN propuhane N<sub>2</sub> (desno).



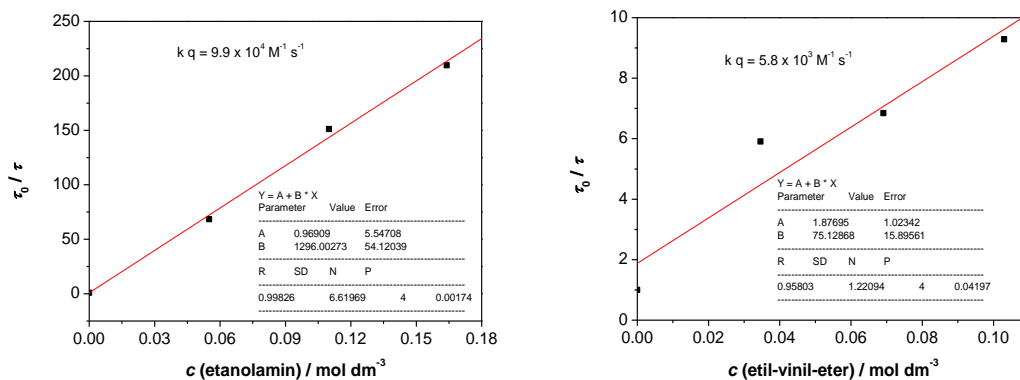
Prilog 103. Tranzijentni apsorpcijski spektri otopine spoja **20** u CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1:1) propuhane O<sub>2</sub>.



Prilog 104. Stern-Volmer ovisnost gašenja tranzijentnog signala ( $\tau = 110 \pm 10 \mu\text{s}$ ) dodatkom etanolamina otopini spoja **20** u CH<sub>3</sub>CN.

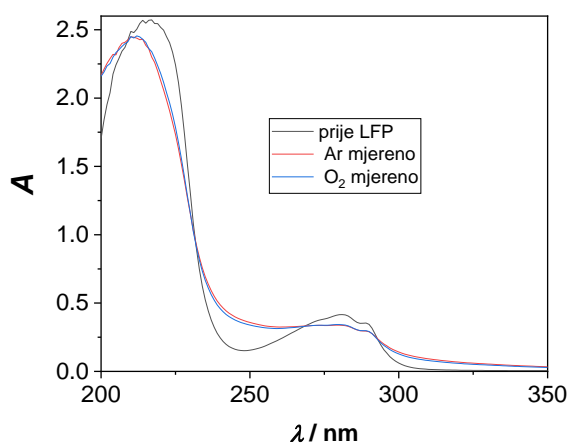


Prilog 105. Stern-Volmer ovisnost gašenja tranzijentnog signala ( $\tau = 13 \pm 3$  ms) dodatkom etanolamina (lijevo) i etil-vinil-etera (desno) otopini spoja **20** u  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1).

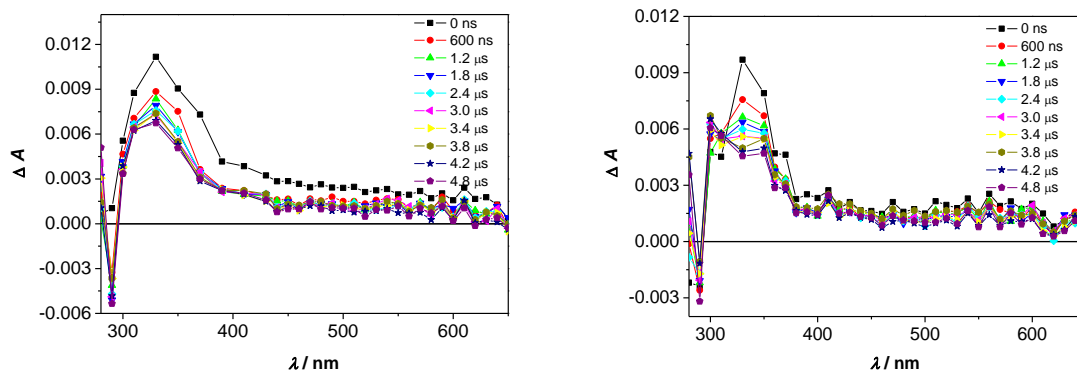


#### 8.4. Dodatak poglavlju 4.2.5.

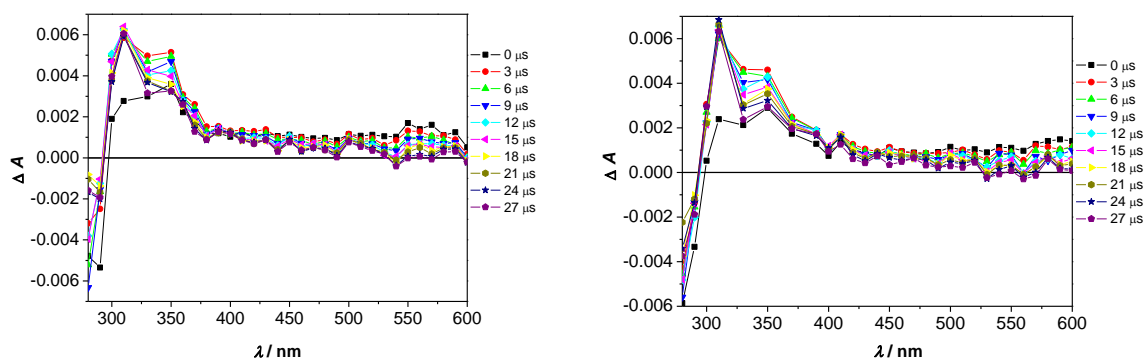
Prilog 106. UV-vis spektar tripeptida Boc-Trp-Trp-Tyr[ $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]-OBn (**33**) in  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $c = 6,1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) prije i poslije provođenja LFP mjerenja.



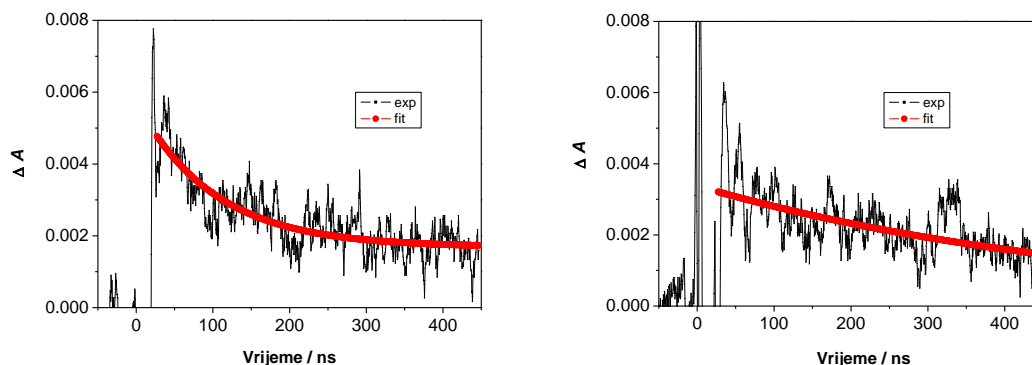
Prilog 107. Tranzijentni apsorpcijski spektri otopine spoja **33** u  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $c = 6,1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) propuhane Ar (lijevo) i  $\text{O}_2$  (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.



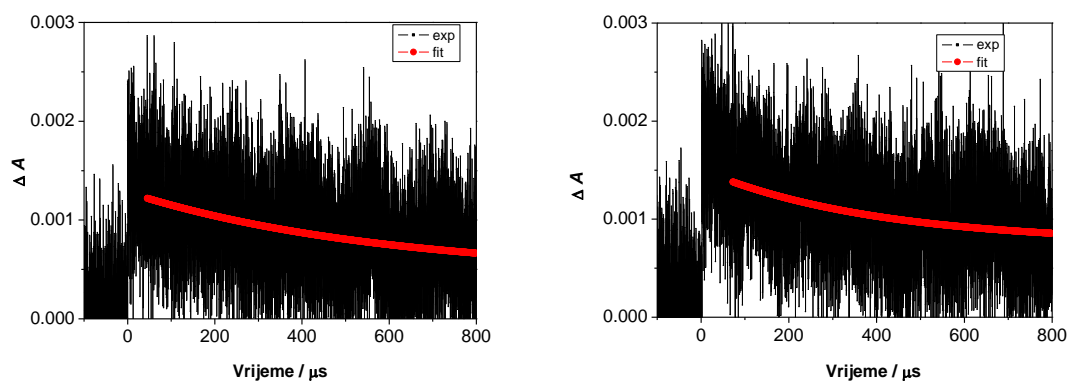
Prilog 108. Tranzijentni apsorpcijski spektri otopine spoja **33** u  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $c = 6,1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) propuhane Ar (lijevo) i  $\text{O}_2$  (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.



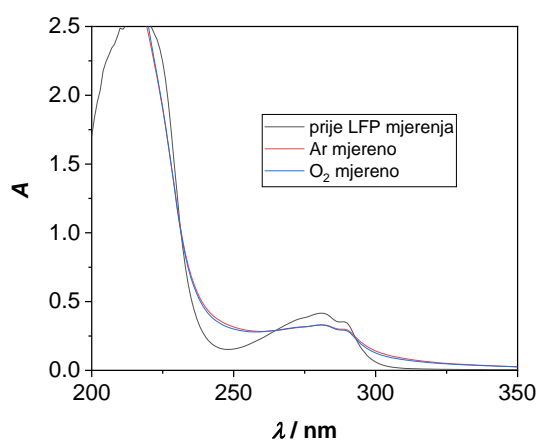
Prilog 109. Opadanje intenziteta tranzijentne apsorpcije na 380 nm otopine spoja **33** u  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $c = 6,1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) propuhane Ar (lijevo) i  $\text{O}_2$  (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.



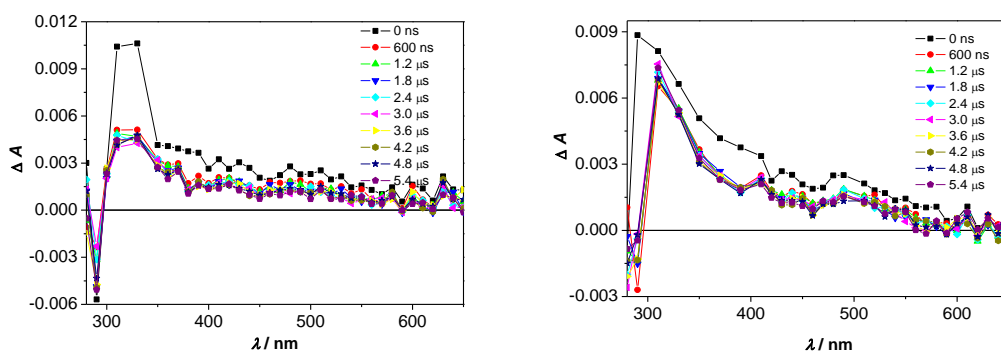
Prilog 110. Opadanje intenziteta tranzijentne apsorpcije na 380 nm otopine spoja **33** u CH<sub>3</sub>CN ( $c = 6,1 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) propuhane Ar (lijevo) i O<sub>2</sub> (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.



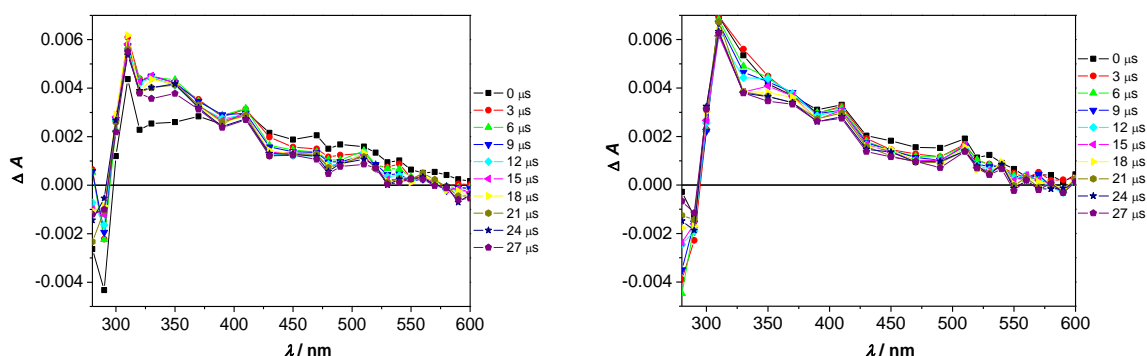
Prilog 111. UV-vis spektar tripeptida Boc-Trp-Trp-Tyr[CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-OBn (**33**) ( $c = 6,1 \times 10^{-5}$  M) in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1:1, prisutstvo fosfatnog pufera,  $c = 50$  mM, pH = 7,0) prije i poslije provođenja LFP mjerenja.



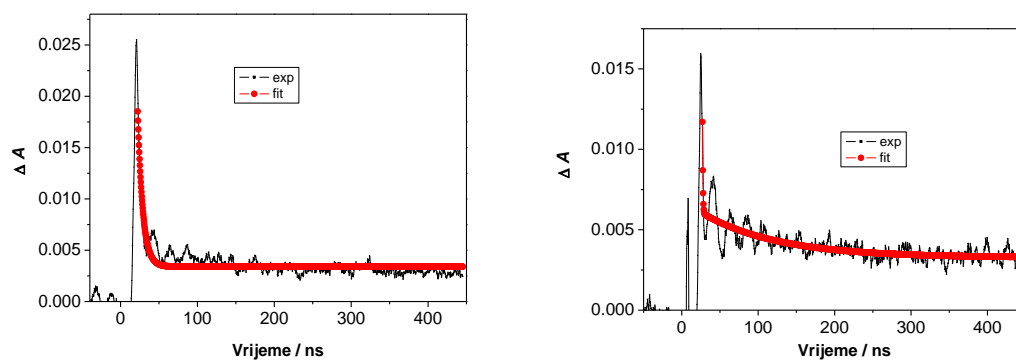
Prilog 112. Tranzijentni apsorpcijski spektri otopine spoja **33** ( $c = 6,1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, prisutstvo fosfatnog pufera,  $c = 50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) propuhane Ar (lijevo) i  $\text{O}_2$  (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.



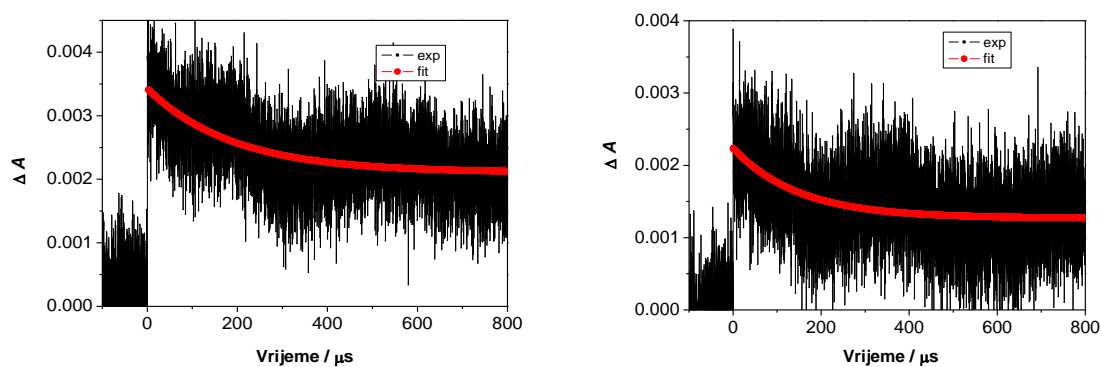
Prilog 113. Tranzijentni apsorpcijski spektri otopine spoja **33** ( $c = 6,1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, prisutstvo fosfatnog pufera,  $c = 50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) propuhane Ar (lijevo) i  $\text{O}_2$  (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.



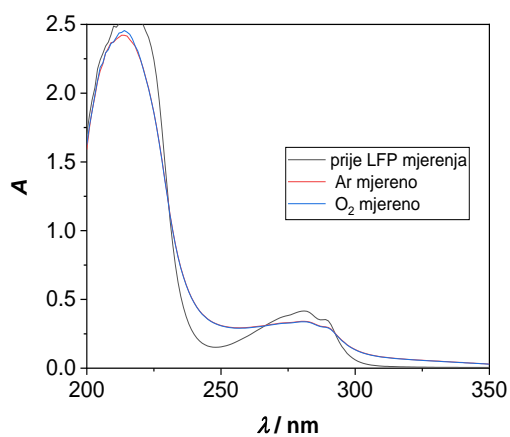
Prilog 114. Opadanje intenziteta tranzijentne apsorpcije na 400 nm otopine spoja **33** ( $c = 6,1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, prisutstvo fosfatnog pufera,  $c = 50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) propuhane Ar (lijevo) i  $\text{O}_2$  (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.



Prilog 115. Opadanje intenziteta tranzijentne apsorpcije na 380 nm otopine spoja **33** ( $c = 6,1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, prisutstvo fosfatnog pufera,  $c = 50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) propuhane Ar (lijevo) i  $\text{O}_2$  (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.

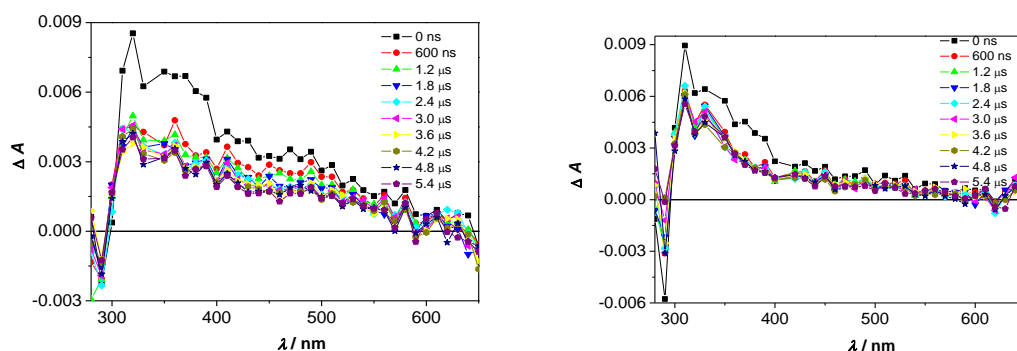


Prilog 116. UV-vis spektar tripeptida  $2\text{HCl} \times \text{H-Trp-Trp-Tyr}[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2]-\text{OBn}$ , **36** ( $c = 9,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) in  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, prisutstvo fosfatnog pufera,  $c = 50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) prije i poslije provođenja LFP mjerenja.

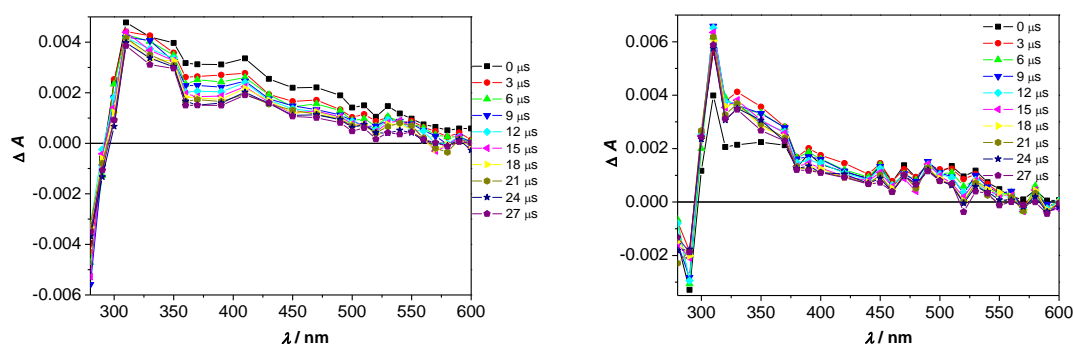




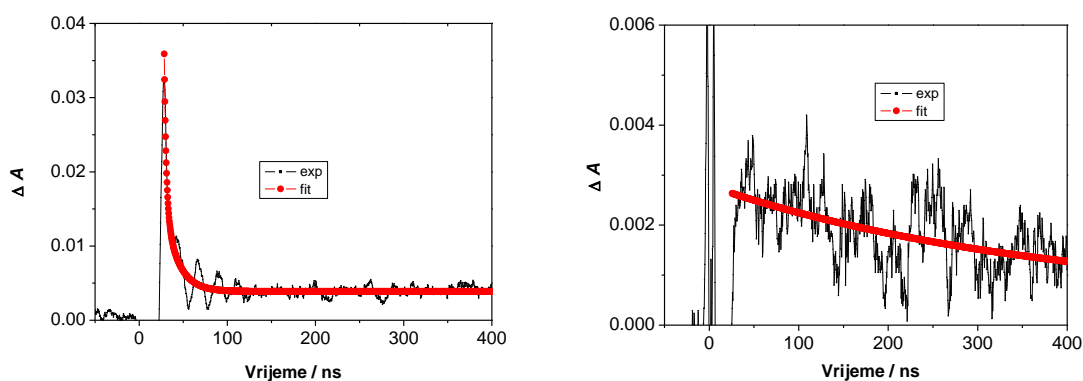
Prilog 117. Tranzijentni apsorpcijski spektri otopine spoja **36** ( $c = 9,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, prisutstvo fosfatnog pufera,  $c = 50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) propuhane Ar (lijevo) i  $\text{O}_2$  (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.



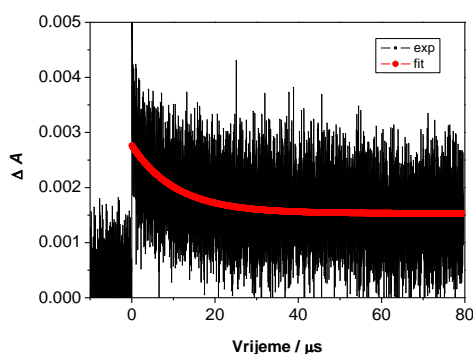
Prilog 118. Tranzijentni apsorpcijski spektri otopine spoja **36** ( $c = 9,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, prisutstvo fosfatnog pufera,  $c = 50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) propuhane Ar (lijevo) i  $\text{O}_2$  (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.



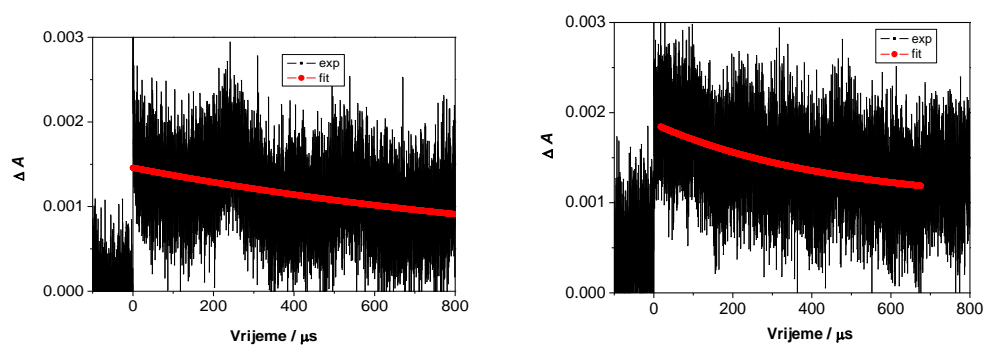
Prilog 119. Opadanje intenziteta tranzijentne apsorpcije na 380 nm otopine spoja **36** ( $c = 9,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, prisutstvo fosfatnog pufera,  $c = 50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) propuhane Ar (lijevo) i  $\text{O}_2$  (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.



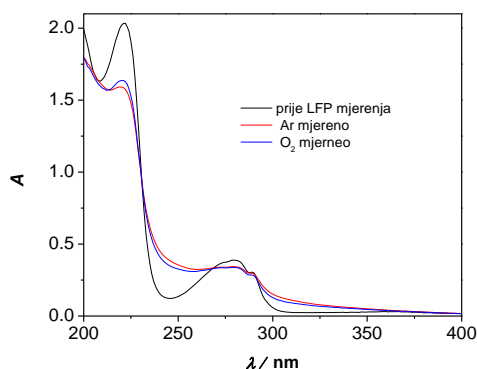
Prilog 120. Opadanje intenziteta tranzijentne apsorpcije na 400 nm otopine spoja **36** ( $c = 9,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, prisutstvo fosfatnog pufera,  $c = 50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) propuhane Ar snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.



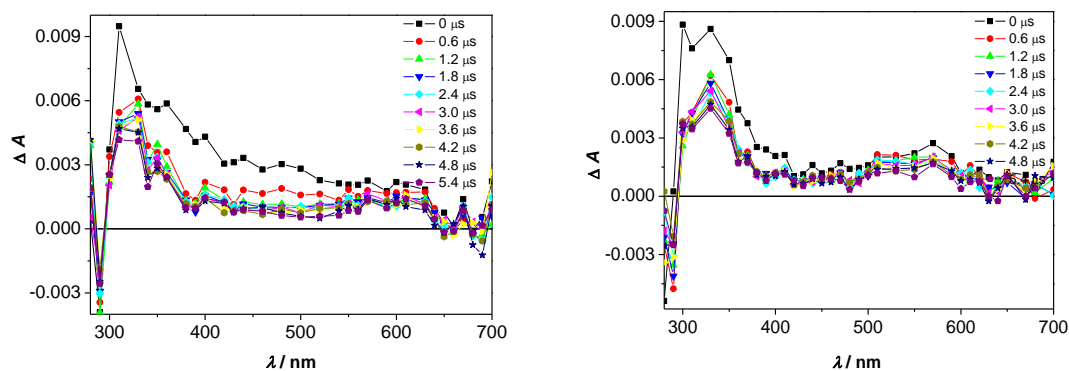
Prilog 121. Opadanje intenziteta tranzijentne apsorpcije na 400 nm otopine spoja **36** ( $c = 9,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, prisutstvo fosfatnog pufera,  $c = 50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) propuhane Ar (lijevo) i  $\text{O}_2$  (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.



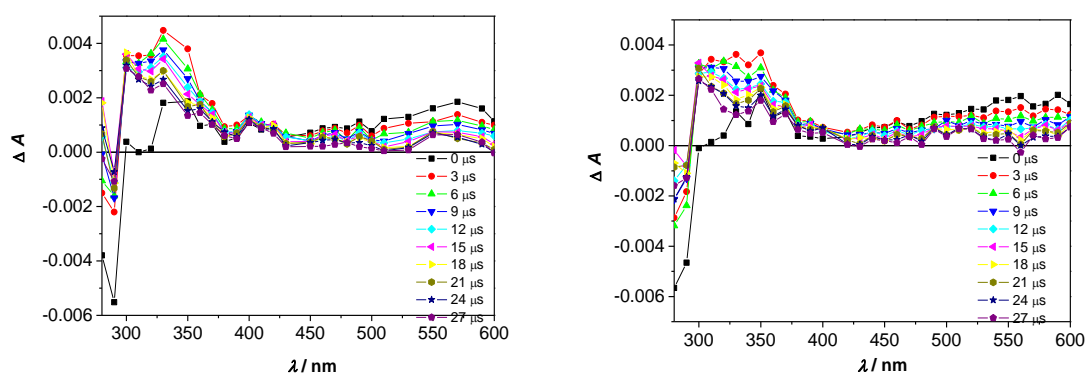
Prilog 122. UV-vis spektar tripeptida Boc-Trp-Trp-Tyr-OBn, **32** ( $c = 2,95 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) in  $\text{CH}_3\text{CN}$  prije i poslije provođenja LFP mjerenja.



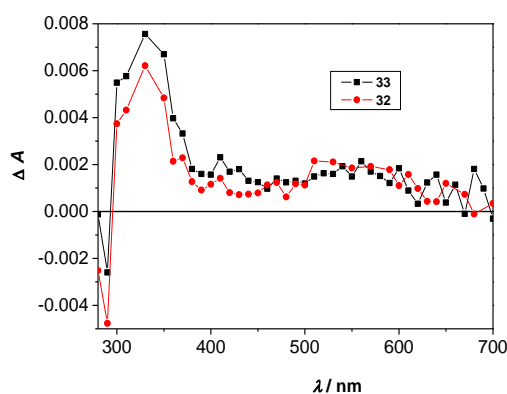
Prilog 123. Tranzijentni apsorpcijski spektri otopine spoja **32** u  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $c = 2,95 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) propuhane Ar (lijevo) i  $\text{O}_2$  (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.



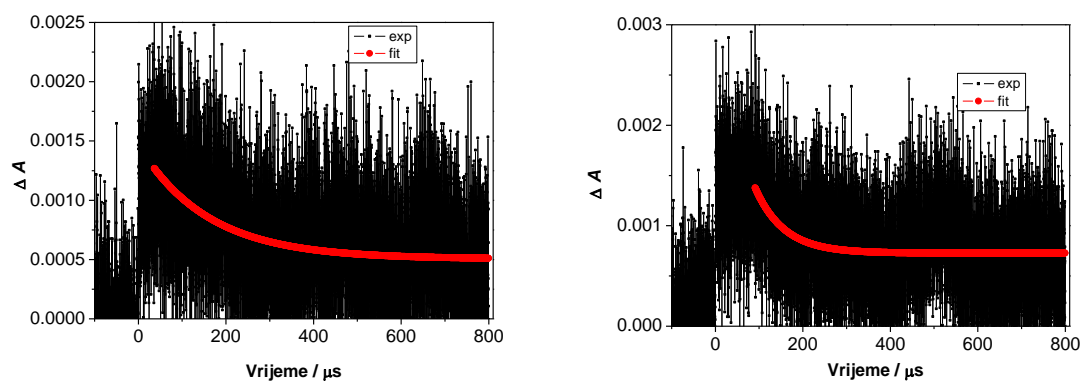
Prilog 124. Tranzijentni apsorpcijski spektri otopine spoja **32** u  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $c = 2,95 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) propuhane Ar (lijevo) i  $\text{O}_2$  (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.



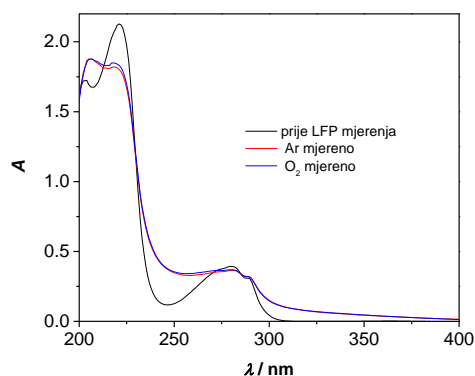
Prilog 125. Tranzijentni apsorpcijski spektri otopine spoja **32** u  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $c = 2,95 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i **33** u  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $c = 6,1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u propuhane  $\text{O}_2$  snimljeni 600 ns nakon laserskog pulsa.



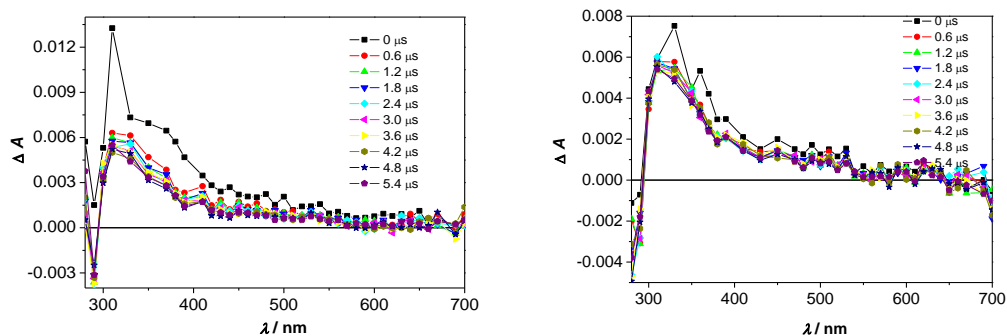
Prilog 126. Opadanje intenziteta tranzijentne apsorpcije na 380 nm otopine spoja **32** u CH<sub>3</sub>CN ( $c = 2,95 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) propuhane Ar (lijevo) i O<sub>2</sub> (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.



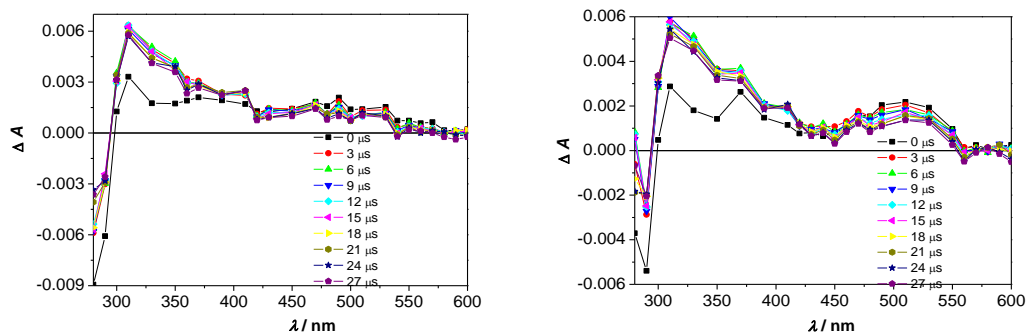
Prilog 127. UV-vis spektar tripeptida Boc-Trp-Trp-Tyr-OBn (**32**) ( $c = 3,2 \times 10^{-5}$  M) in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1:1, prisutstvo fosfatnog pufera,  $c = 50$  mM, pH = 7,0) prije i poslije provođenja LFP mjerenja.



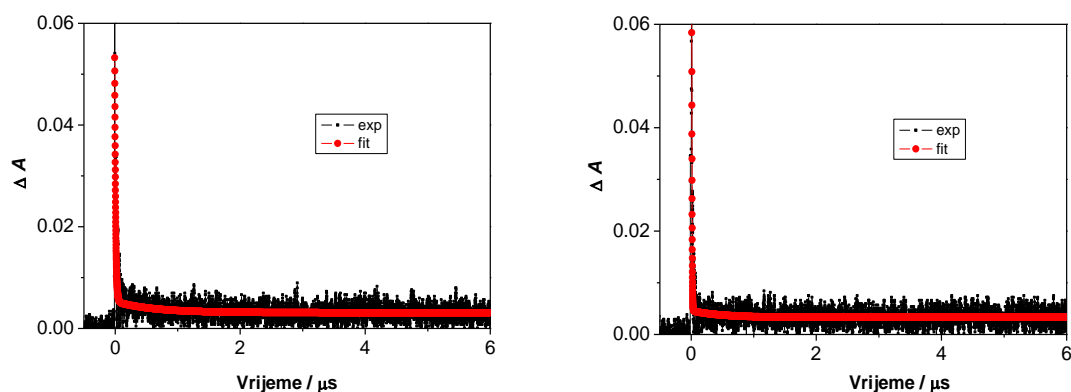
Prilog 128. Tranzijentni apsorpcijski spektri otopine spoja **32** ( $c = 3,2 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) u CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1:1, prisutstvo fosfatnog pufera,  $c = 50$  mM, pH = 7,0) propuhane Ar (lijevo) i O<sub>2</sub> (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.



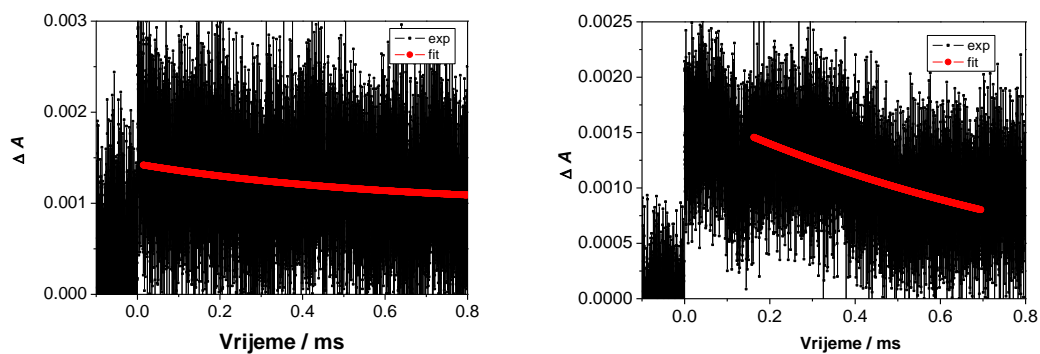
Prilog 129. Tranzijentni apsorpcijski spektri otopine spoja **32** ( $c = 3,2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, prisutstvo fosfatnog pufera,  $c = 50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) propuhane Ar (lijevo) i  $\text{O}_2$  (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.



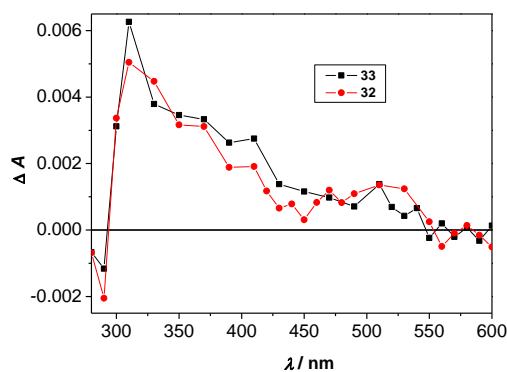
Prilog 130. Opadanje intenziteta tranzijentne apsorpcije na 360 nm otopine spoja **32** ( $c = 3,2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, prisutstvo fosfatnog pufera,  $c = 50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) propuhane Ar (lijevo) i  $\text{O}_2$  (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.



Prilog 131. Opadanje intenziteta tranzijentne apsorpcije na 360 nm otopine spoja **32** ( $c = 3,2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, prisutstvo fosfatnog pufera,  $c = 50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) propuhane Ar (lijevo) i  $\text{O}_2$  (desno) snimljeni uz pobudu zračenjem valne duljine 266 nm.

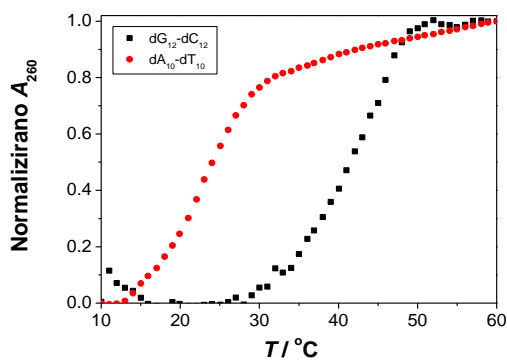


Prilog 132. Tranzijentni apsorpcijski spektri otopine spoja **32** ( $c = 3,2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i **33** ( $c = 6,1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, prisutstvo fosfatnog pufera,  $c = 50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) propuhane  $\text{O}_2$  snimljeni 600 ns nakon laserskog pulsa.

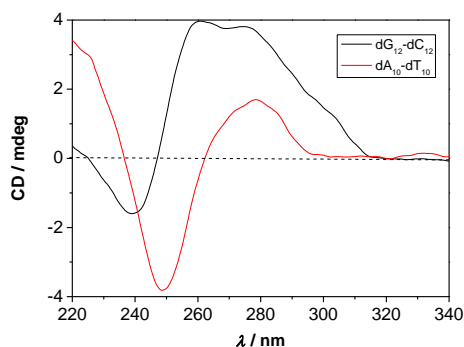


### 8.1. Dodatak poglavlju 4.2.7.

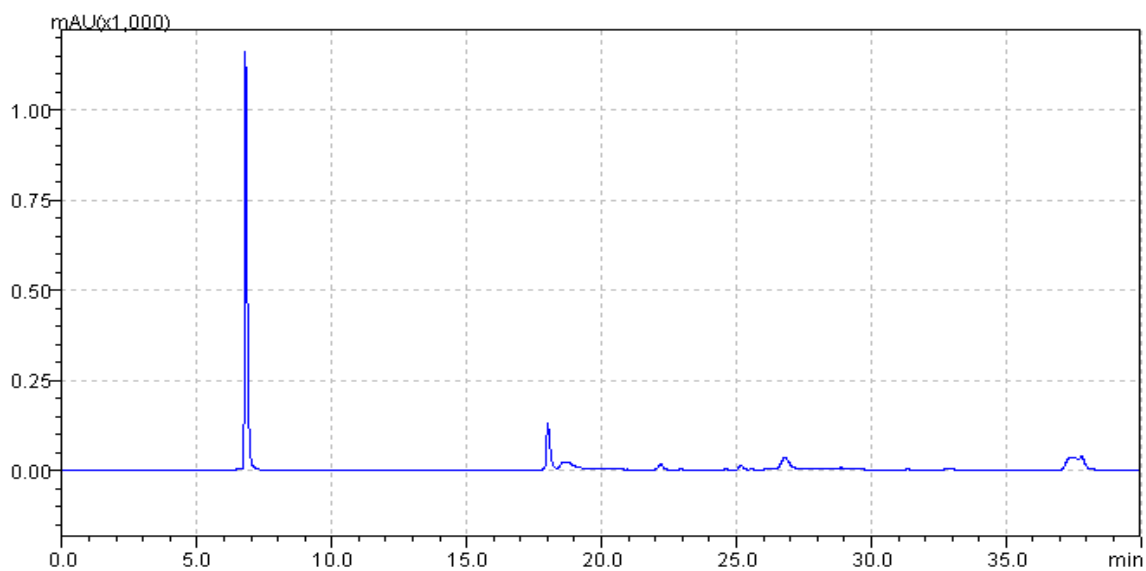
Prilog 133. Krivulje mekšanja za  $dG_{12}-dC_{12}$  i  $dA_{10}-dT_{10}$  ( $c = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u amonijevom acetatnom puferu ( $\text{pH} = 7,0$ ,  $100 \text{ mM}$ ). Izmjerena temperature mekšanja,  $T_m$  za  $dG_{12}-dC_{12}$  je  $40^\circ\text{C}$ , a za  $dA_{10}-dT_{10}$  je  $22^\circ\text{C}$ .



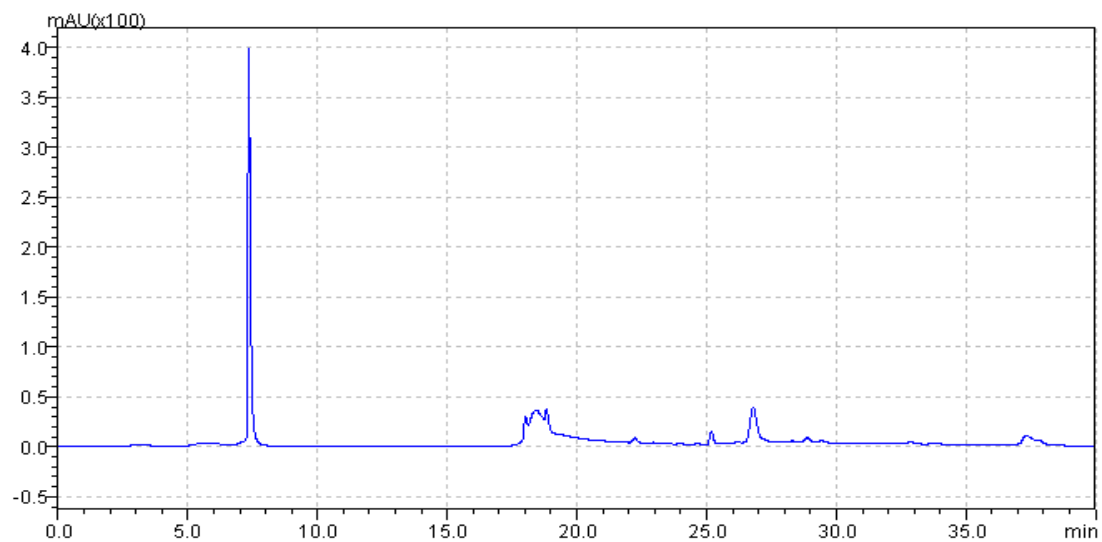
Prilog 134. CD spektri za dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> i dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub> ( $c = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u amonijevom acetatnom puferu (pH = 7,0, 100 mM) pri 25 °C.



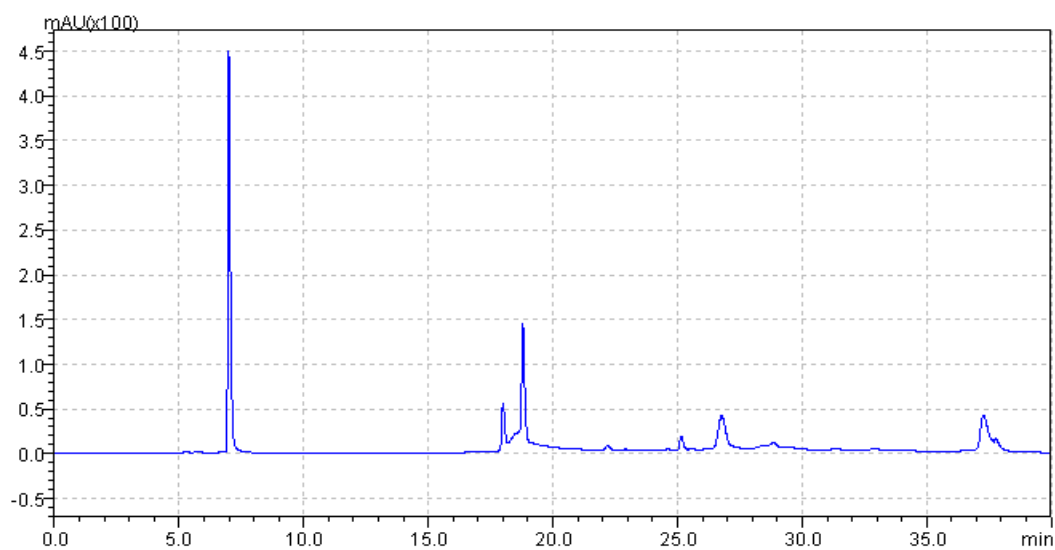
Prilog 135. HPLC kromatogram dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> ( $t_R = 18 \text{ min}$ ).



Prilog 136. HPLC kromatogram dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> nakon ozračivanja na 300 nm 15 min ( $t_R = 18,8$  min).

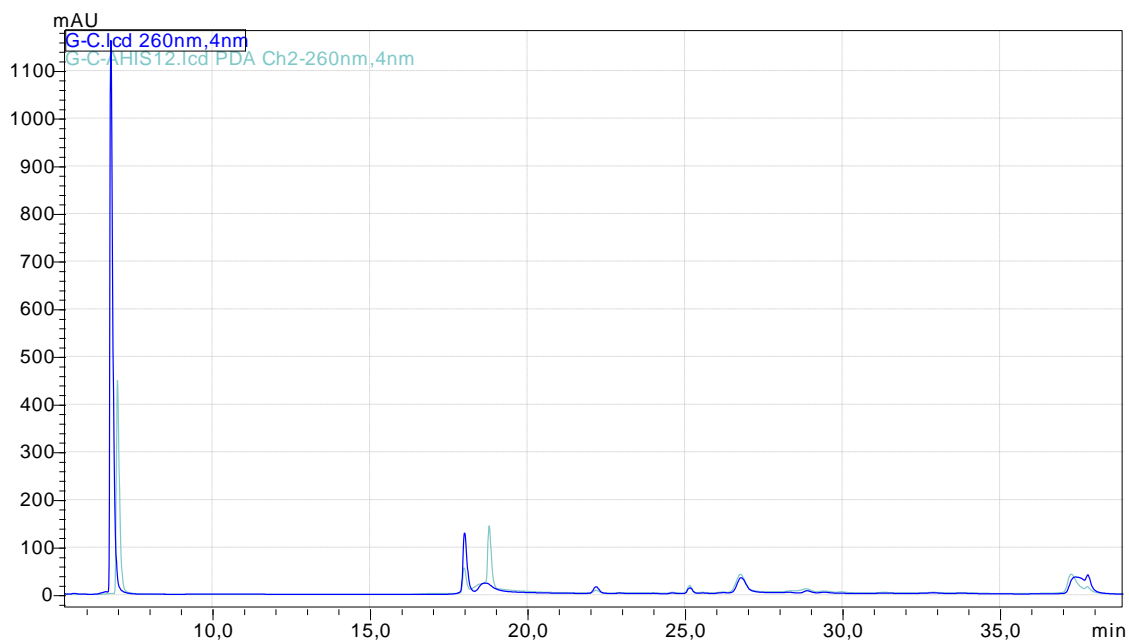


Prilog 137. HPLC kromatogram smjese dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> i **36** prije ozračivanja ( $t_R = 18,8$  min).

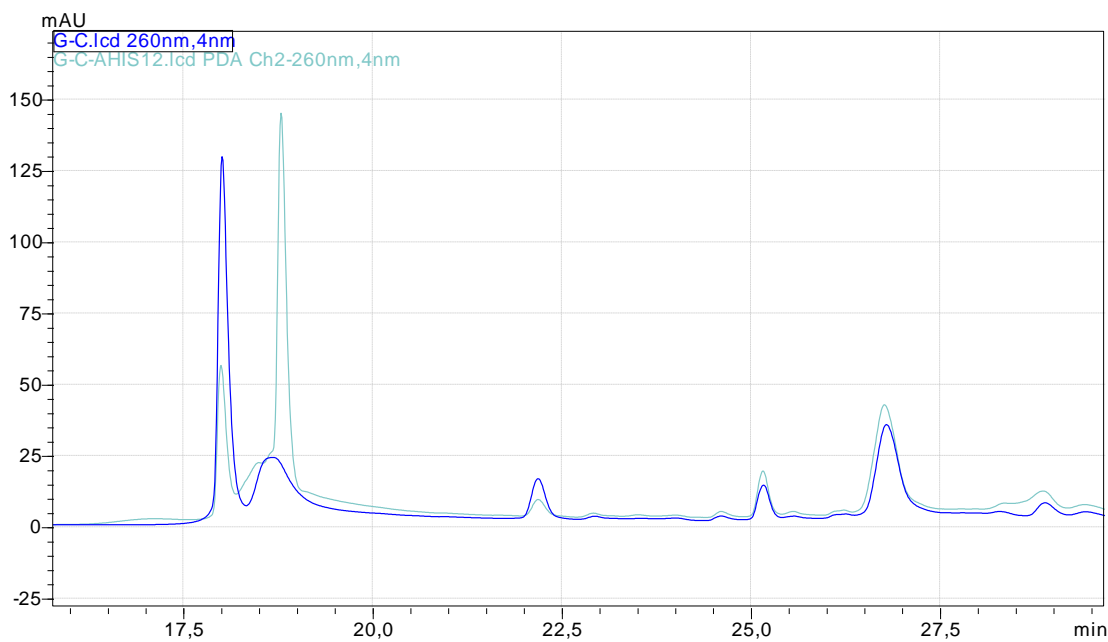




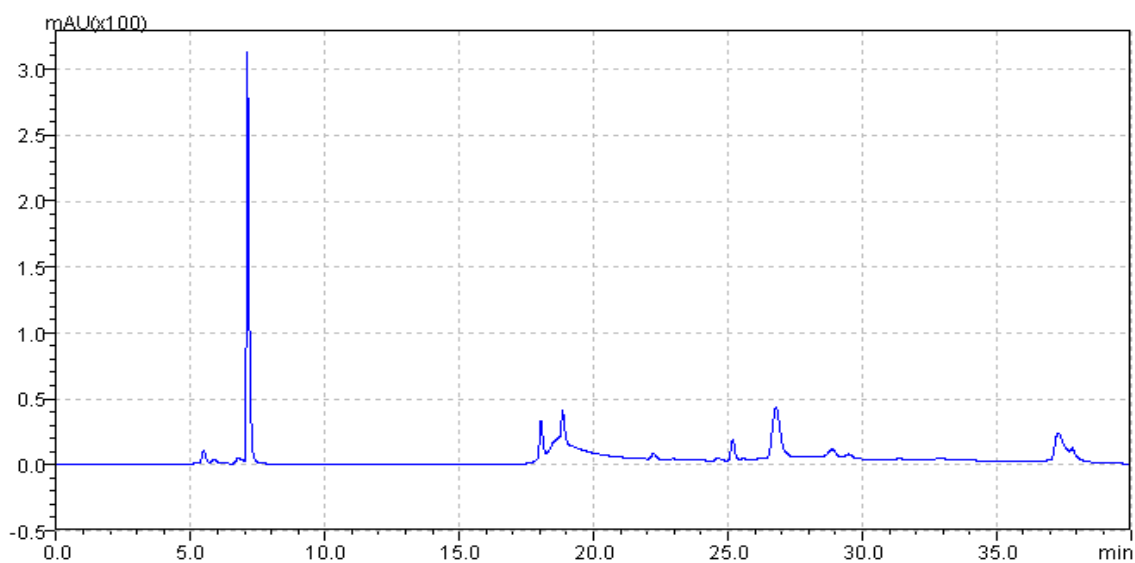
Prilog 138. Preklopljeni HPLC kromatogrami dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> ( $t_R = 18$  min) i smjese dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> i **36** ( $t_R = 18,8$  min) prije ozračivanja.



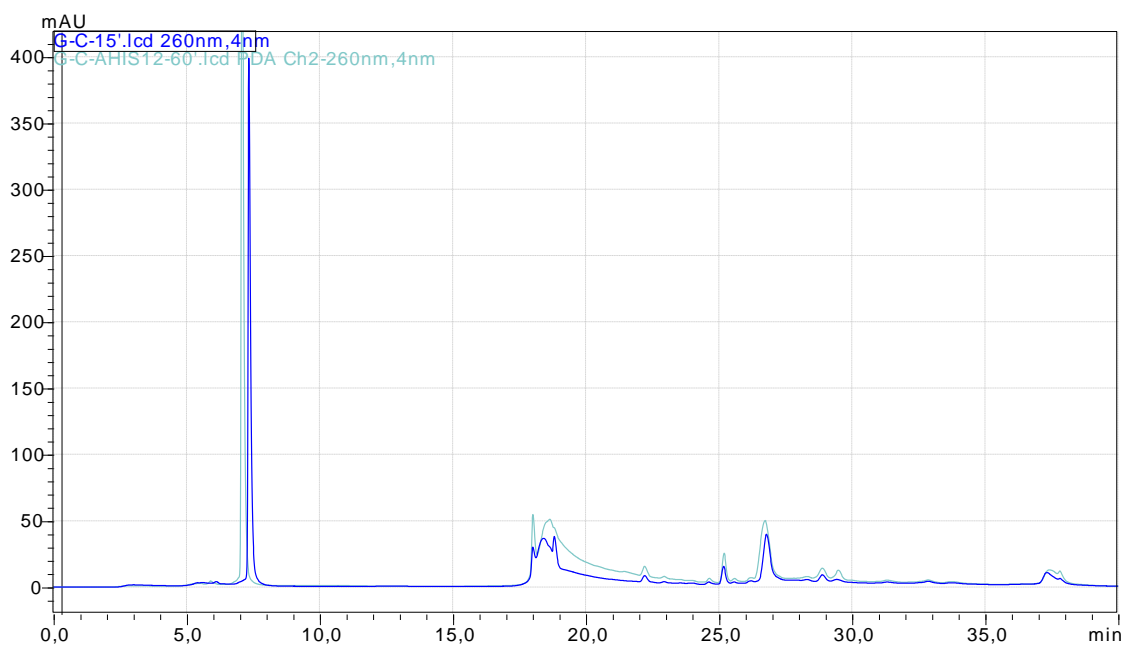
Prilog 139. Preklopljeni HPLC kromatogrami dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> ( $t_R = 18$  min) i smjese dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> i **36** prije ozračivanja ( $t_R = 18,8$  min).



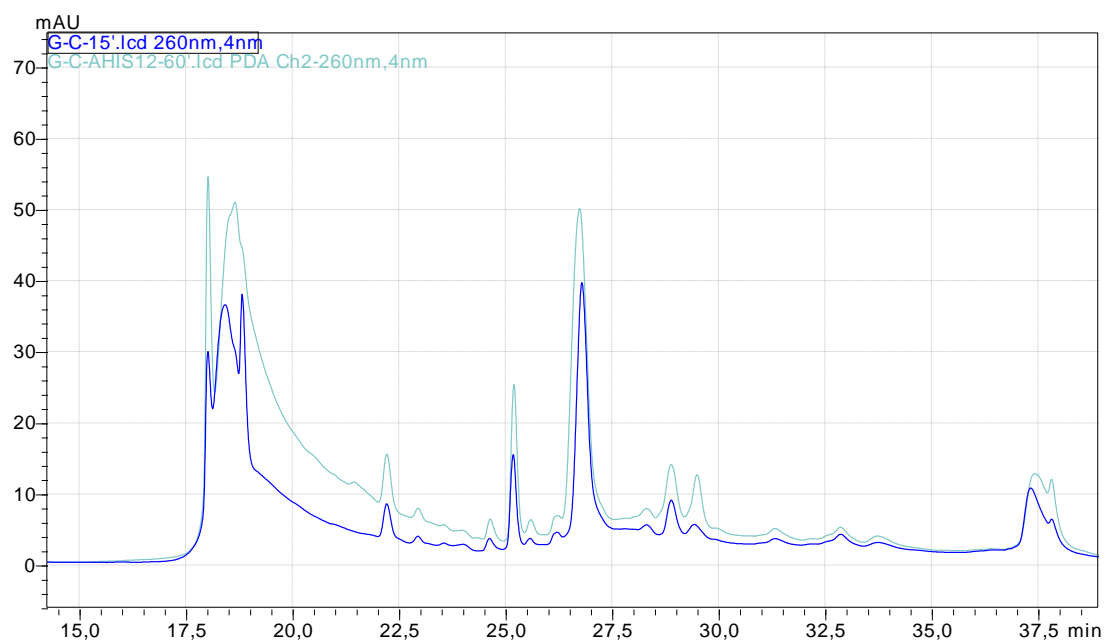
Prilog 140. HPLC kromatogram smjese dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> i **36** nakon ozračivanja na 300 nm 15 min ( $t_R = 18$  min).



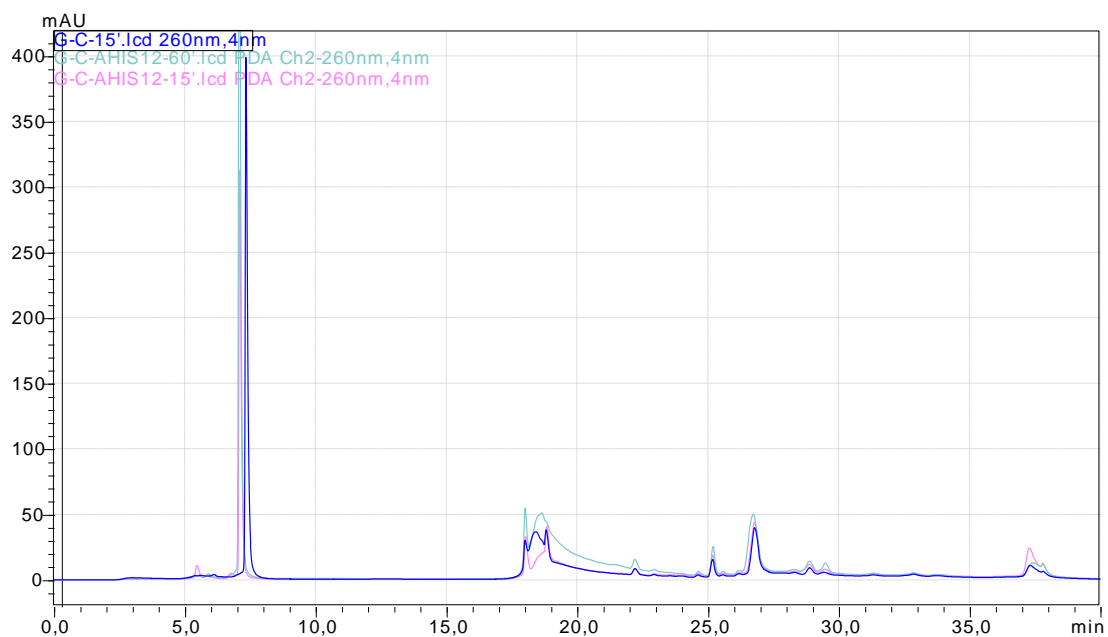
Prilog 141. Preklopljeni HPLC kromatogrami dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> ozračen 15 min i smjese dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> i **36** ( $t_R = 17,5-19$  min) ozračene 60 min na 300 nm.



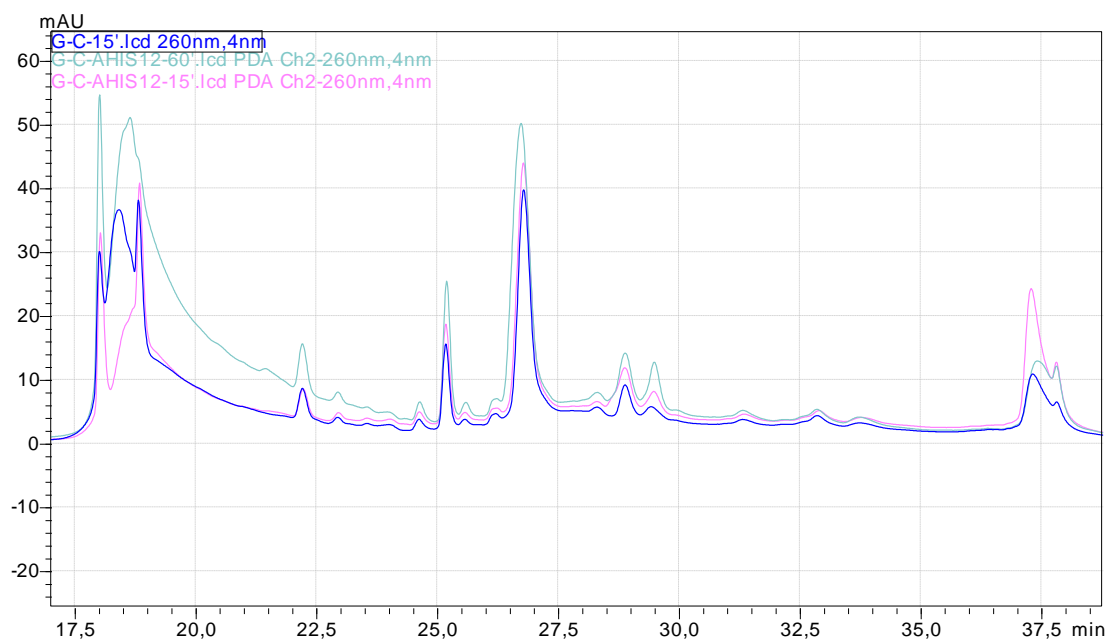
Prilog 142. Preklopljeni HPLC kromatogrami dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> ozračen 15 min ( $t_R = 17,5-19$  min) i smjese dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> i **36** ozračene 60 min ( $t_R = 17,5-19$  min) na 300 nm.



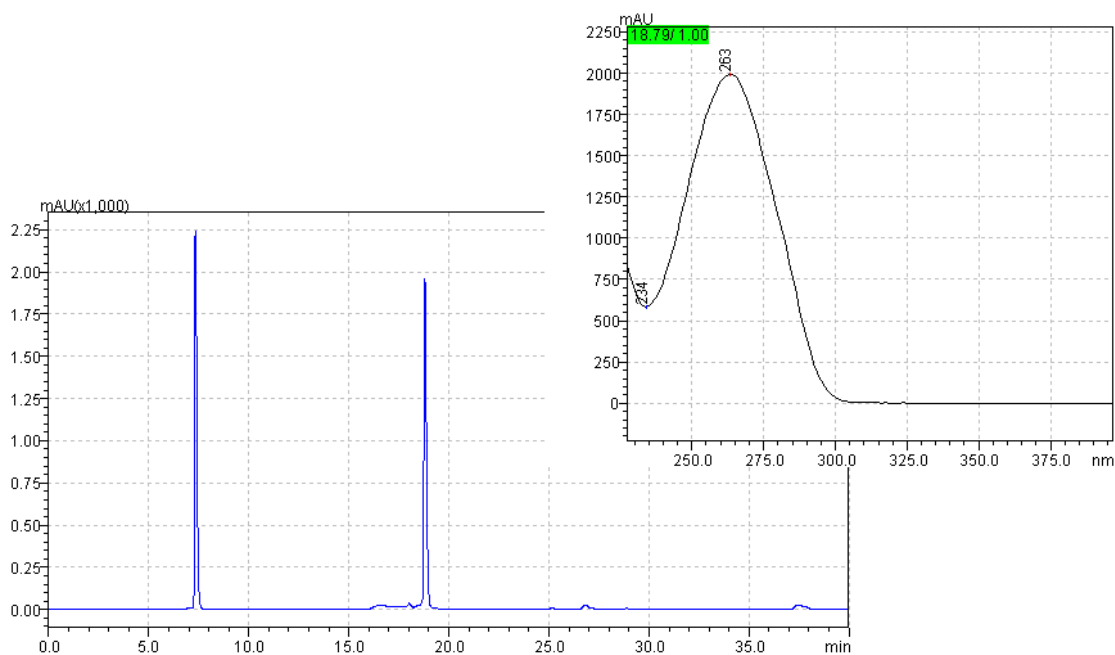
Prilog 143. Preklopljeni HPLC kromatogrami dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> ozračen 15 min, te smjese dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> i **36** ozračene 15 min i 60 min ( $t_R = 17,5-19$  min) na 300 nm.



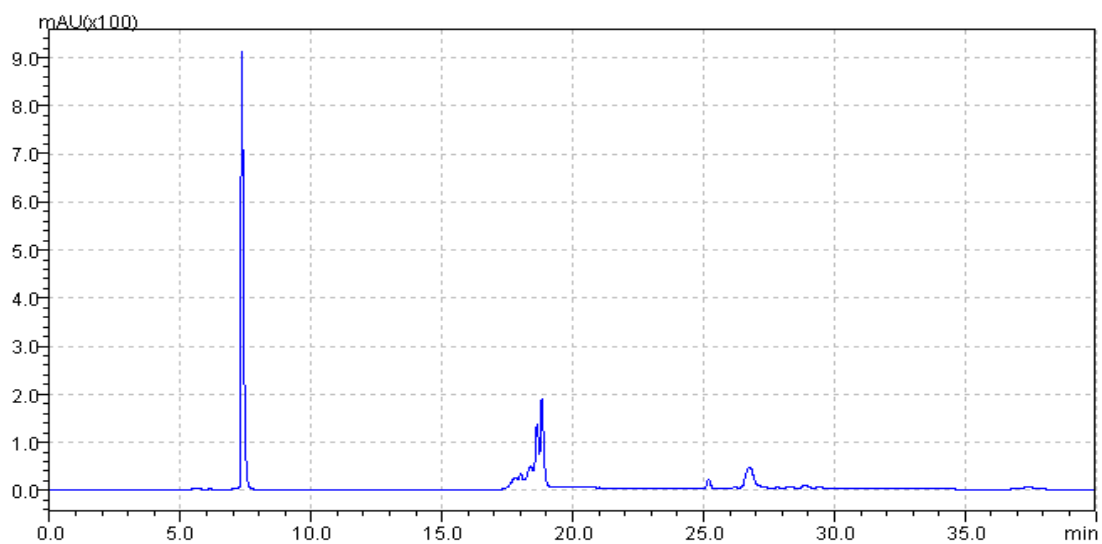
Prilog 144. Preklopljeni HPLC kromatogrami dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> ozračen 15 min, te smjese dG<sub>12</sub>-dC<sub>12</sub> i **36** ozračene 15 min i 60 min ( $t_R = 17,5-19$  min) na 300 nm.



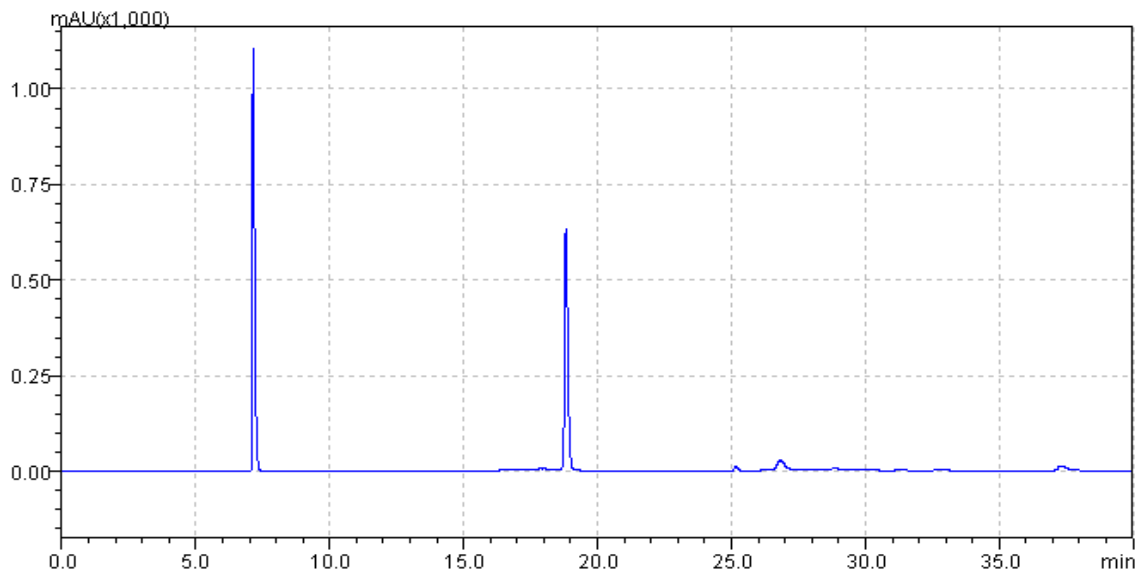
Prilog 145. HPLC kromatogram dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub> ( $t_R = 7$  i 18 min) (umetak: apsorpcijski spektar signala retencijskog vremena 18,8 min)



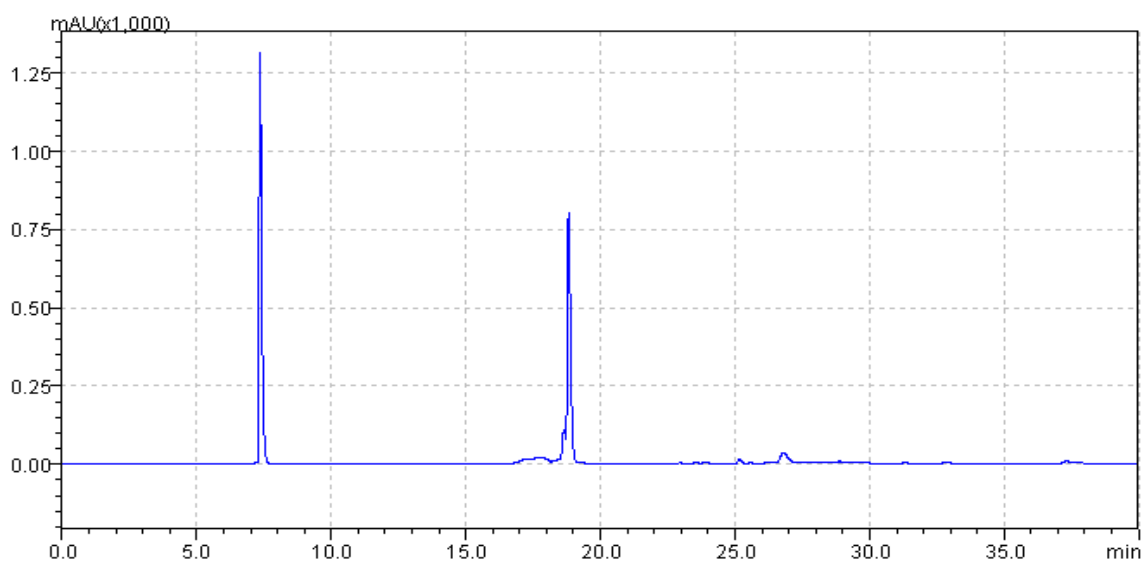
Prilog 146. HPLC kromatogram  $dA_{10}$ - $dT_{10}$  nakon ozračivanja na 300 nm 15 min ( $t_R = 18,6$  i 18,8 min).



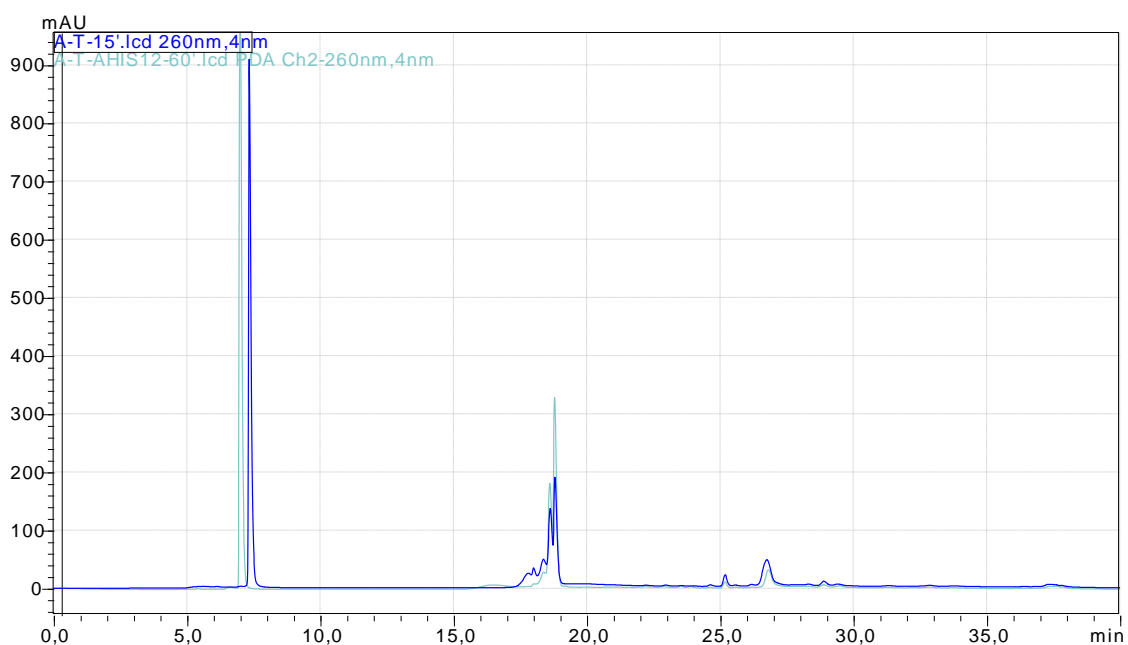
Prilog 147. HPLC kromatogram smjese  $dA_{10}$ - $dT_{10}$  i **36** prije ozračivanja ( $t_R = 7$  i 18 min).



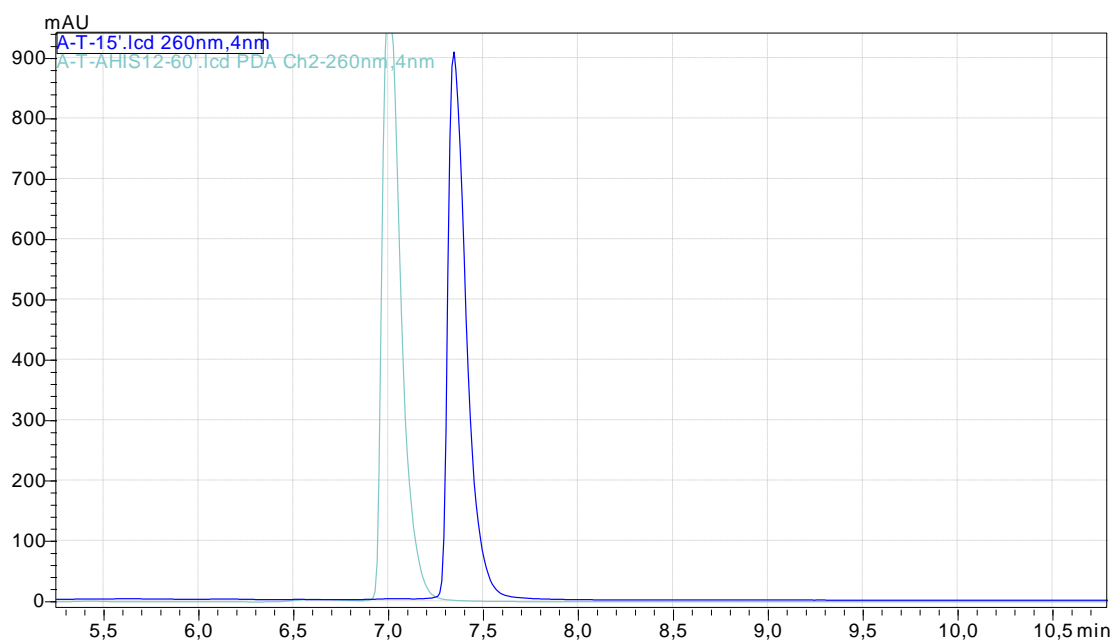
Prilog 148. HPLC kromatogram smjese dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub> i **36** ozračene na 300 nm 15 min ( $t_R = 7$  i 18,8 min).



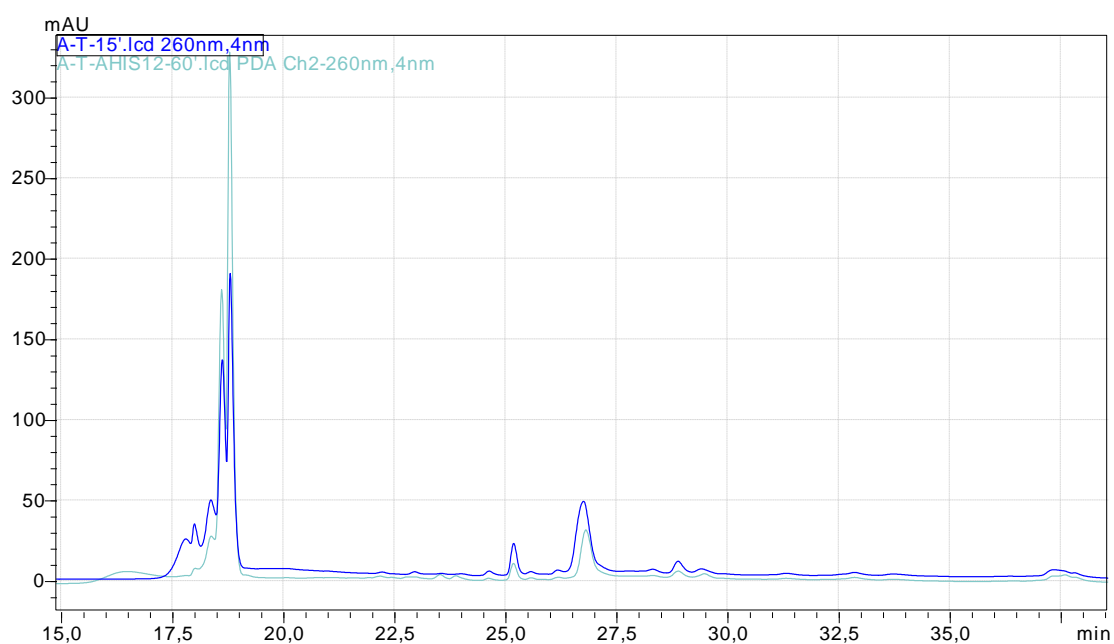
Prilog 149. Preklopljeni HPLC kromatogrami dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub> ozračene 15 min ( $t_R = 7,4$  min i 18,8 min) i smjese dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub> i **36** ( $t_R = 7,0$  min i 18,8 min) ozračene 60 min na 300 nm.



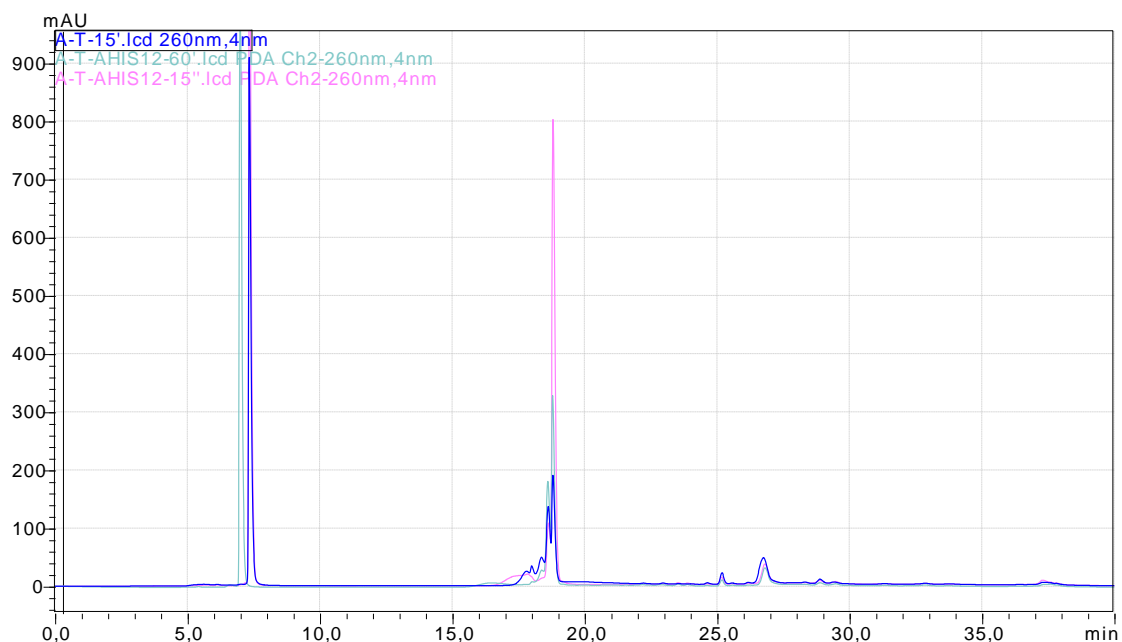
Prilog 150. Preklopljeni HPLC kromatogrami dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub> ozračene 15 min ( $t_R = 7,4$  min) i smjese dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub> i **36** ( $t_R = 7,0$  min) ozračene 60 min na 300 nm.



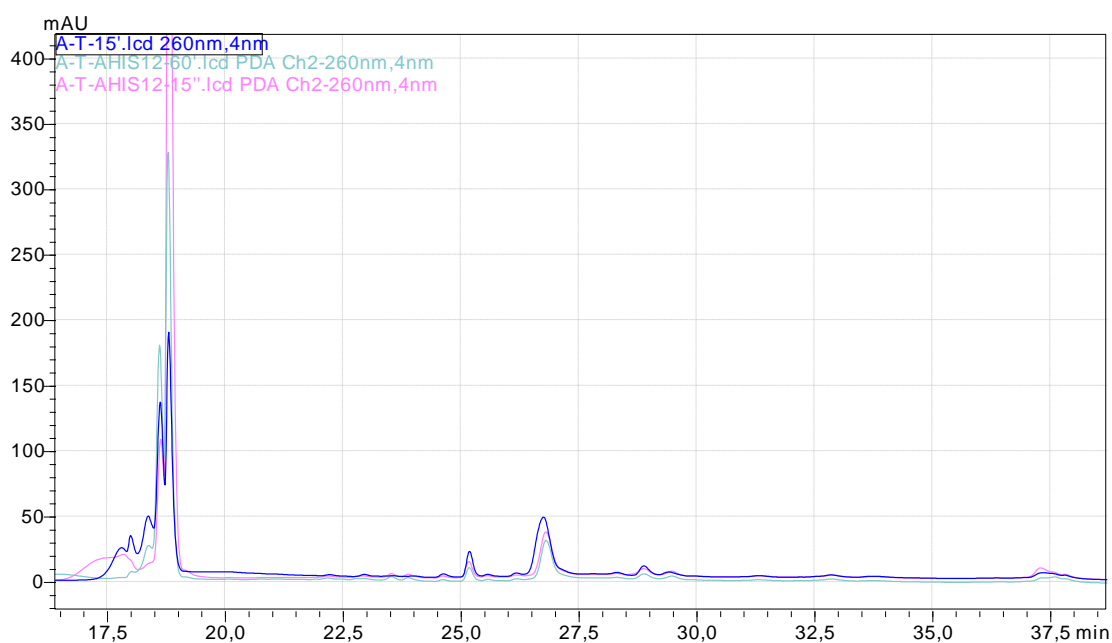
Prilog 151. Preklopljeni HPLC kromatogrami otopine dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub> ozračene 15 min ( $t_R = 17,5$ - $18,8$  min) i smjese dA<sub>10</sub>-dT<sub>10</sub> i **36** ( $t_R = 18,6$  i  $18,8$  min) ozračene 60 min na 300 nm.



Prilog 152. Preklopljeni HPLC kromatogrami otopine  $dA_{10}$ - $dT_{10}$  ( $t_R = 7,4$  min i 17,5-18,8 min) ozračene 15 min, te smjese  $dA_{10}$ - $dT_{10}$  i **36** ozračene 15 min ( $t_R = 7,4$  min i 18,8 min) i 60 min ( $t_R = 7,0$  min i 18,8 min) na 300 nm.



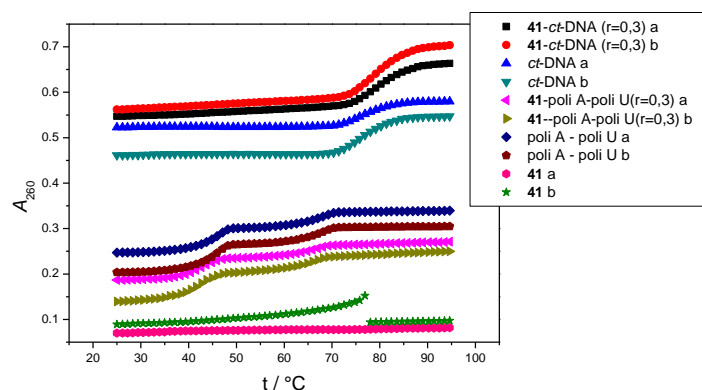
Prilog 153. Preklopljeni HPLC kromatogrami otopine  $dA_{10}$ - $dT_{10}$  ozračene 15 min ( $t_R = 17,5$ -18,8 min), te smjese  $dA_{10}$ - $dT_{10}$  i **36** ozračene 15 ( $t_R = 17,5$  i 18,8 min) i 60 min ( $t_R = 18,6$  i 18,8 min) na 300 nm.



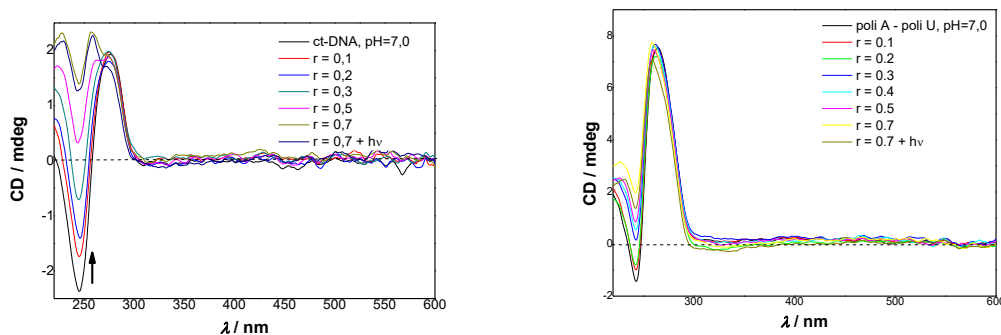


## 8.2. Dodatak poglavlju 4.3.2.

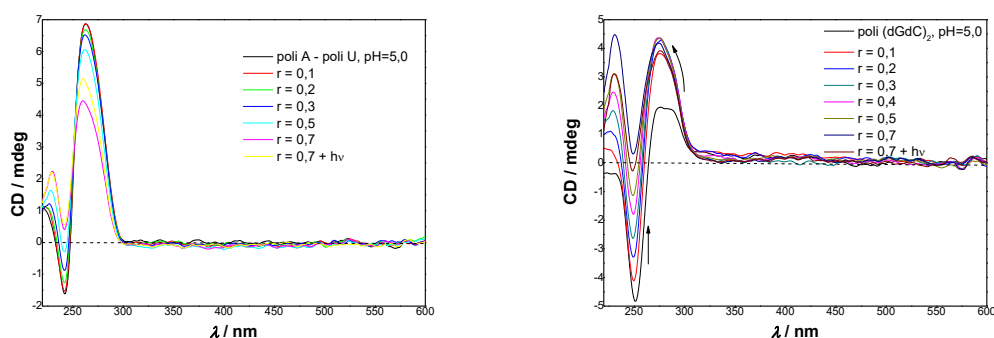
Prilog 154. Krivulje mekšanja *ct*-DNA, poli A – poli U i kompleksa spoja **41** – *ct*-DNA, **41** – poli A – poli U pri omjeru  $r_{(\text{spoj})}/(\text{polinukleotid}) = 0,3$ ; pH = 5,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



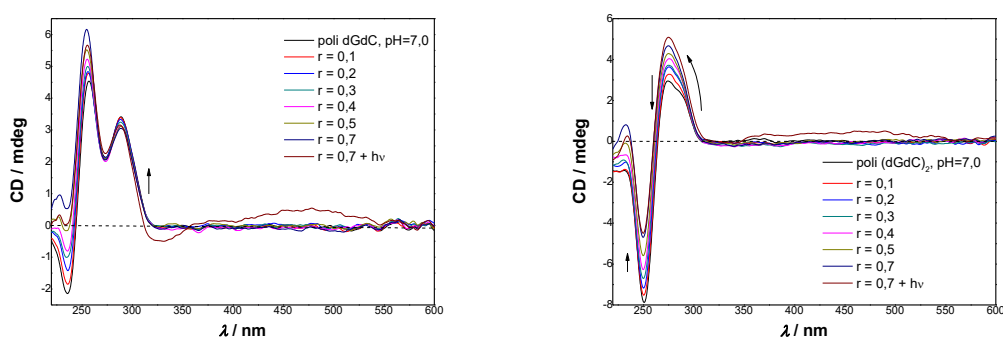
Prilog 155. Utjecaj promjene koncentracije spoja **41** kod različitih  $r[\mathbf{41}]/[\text{polinukleotid}]$ , na CD spektre *ct*-DNA ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) (lijevo) i poli A – poli U ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) (desno) na pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



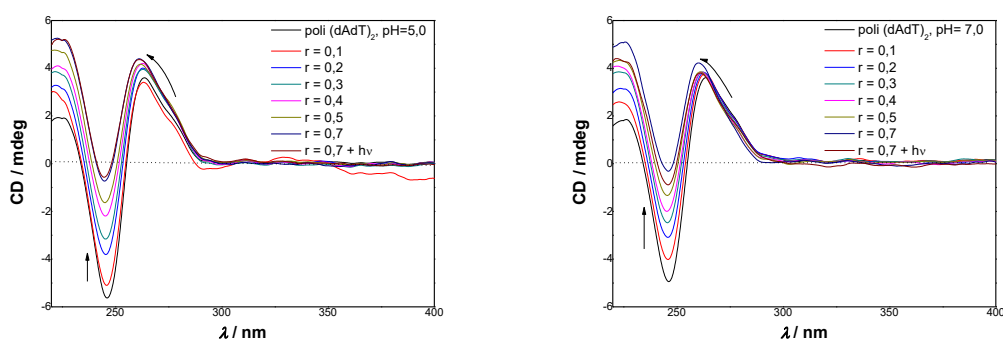
Prilog 156. Utjecaj promjene koncentracije spoja **41** kod različitih ( $r[41]/[\text{polinukleotid}]$ ) na CD spektre poli A – poli U ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) (lijevo) i poli (dCdG)<sub>2</sub> ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) (desno) na pH = 5,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



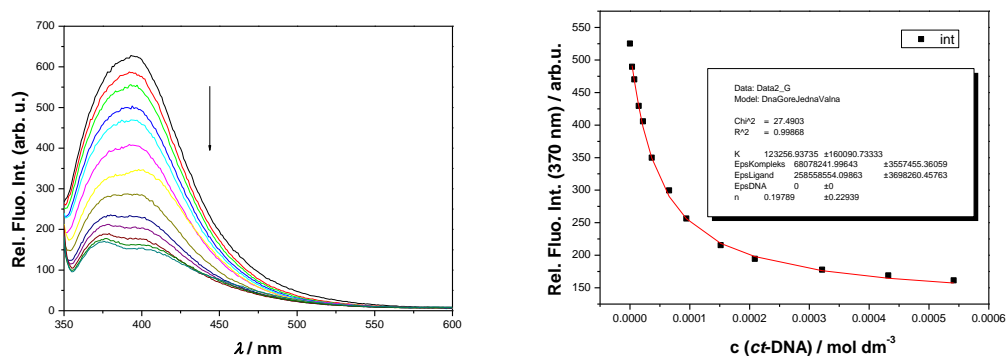
Prilog 157. Utjecaj promjene koncentracije spoja **35** kod različitih ( $r[35]/[\text{polinukleotid}]$ ) na CD spektre poli (dGdC) ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) (lijevo) i poli (dCdG)<sub>2</sub> ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) (desno) na pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



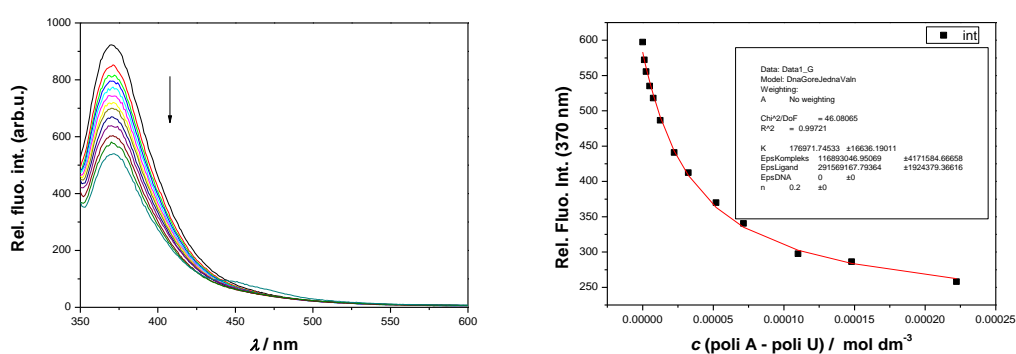
Prilog 158. Utjecaj promjene koncentracije spoja **41** kod različitih ( $r[41]/[\text{polinukleotid}]$ ) na CD spektre poli (dAdT)<sub>2</sub> ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri pH = 5,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) (lijevo) i poli (dAdT)<sub>2</sub> ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) (desno).



Prilog 159. Fluorescencijski spektri spoja **41** ( $c = 2,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{\text{exc}} = 330$  nm) prilikom titracije s *ct*-DNA ( $c = 3,6 \times 10^{-6}$ – $5,4 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>) pri pH = 5,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>). Titracija je provedena na 25 °C. (lijevo); Ovisnost intenziteta emisije spoja **41** o koncentraciji *ct*-DNA na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\text{max}} = 370$  nm. Točke su izmjerene vrijednosti, a linija predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe (desno).

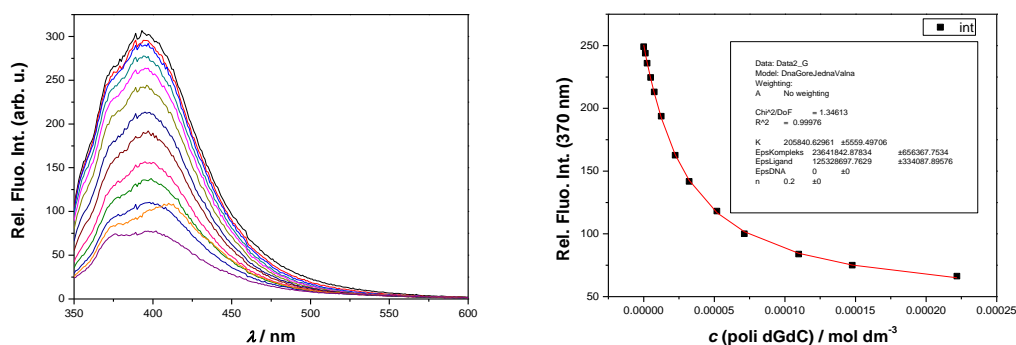


Prilog 160. Fluorescencijski spektri spoja **41** ( $c = 2,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{\text{exc}} = 330$  nm) prilikom titracije s poli A – poli U ( $c = 1,3 \times 10^{-6}$ – $2,2 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>) pri pH = 5,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>). Titracija je provedena na 25 °C. (lijevo); Ovisnost intenziteta emisije spoja **41** o koncentraciji poli A – poli U na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\text{max}} = 370$  nm. Točke su izmjerene vrijednosti, a linija predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe. (desno).

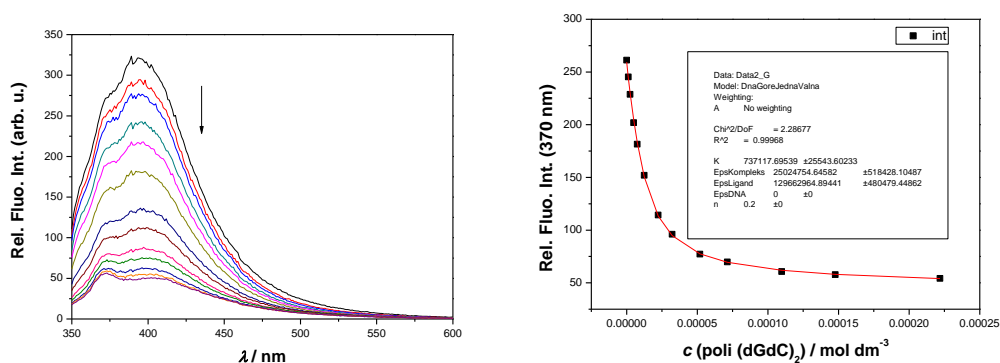


Prilog 161. Fluorescencijski spektri spoja **41** ( $c = 2,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{\text{exc}} = 330$  nm) prilikom titracije s poli (dGdC) ( $c = 1,3 \times 10^{-6}$ – $2,2 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>) pri pH = 5,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>). Titracija je provedena na 25 °C.(lijevo); Ovisnost intenziteta emisije spoja **41**

o koncentraciji poli (dGdC) na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\max} = 370$  nm. Točke su izmjerene vrijednosti, a linija predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe. (desno)

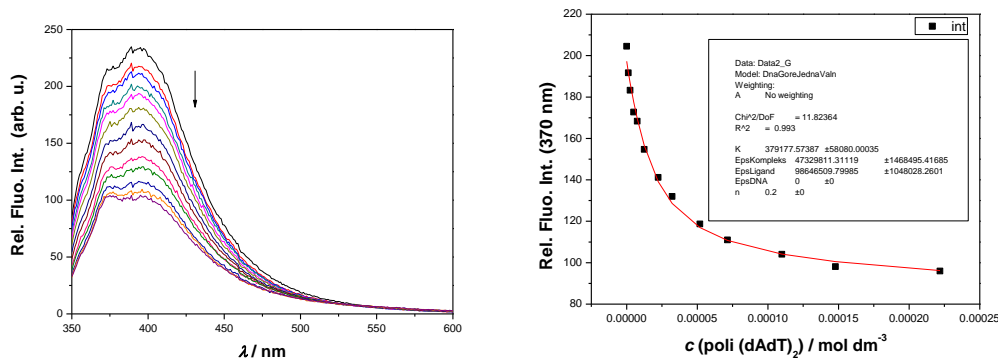


Prilog 162. Fluorescencijski spektri spoja **41** ( $c = 2,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{\text{exc}} = 330$  nm) prilikom titracije s poli (dGdC)<sub>2</sub> ( $c = 1,3 \times 10^{-6}$ – $2,2 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>) pri pH = 5,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>). Titracija je provedena na 25 °C. (lijevo); Ovisnost intenziteta emisije spoja **41** o koncentraciji poli (dGdC)<sub>2</sub> na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\max} = 370$  nm. Točke su izmjerene vrijednosti, a linija predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe. (desno)

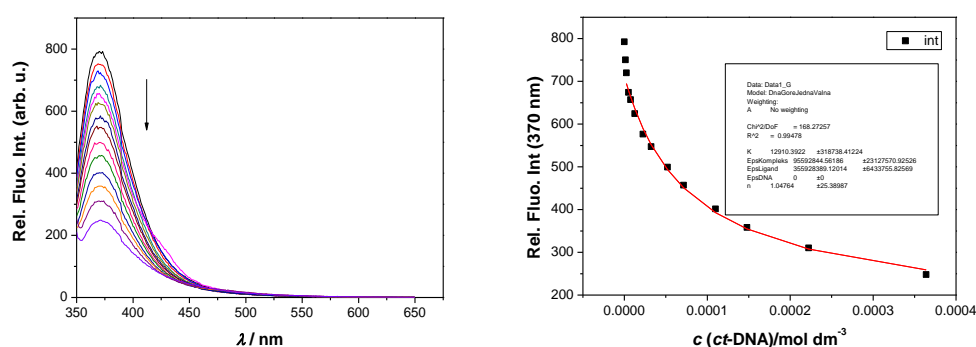


Prilog 163. Fluorescencijski spektri spoja **41** ( $c = 2,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{\text{exc}} = 330$  nm) prilikom titracije s poli (dAdT)<sub>2</sub> ( $c = 1,3 \times 10^{-6}$ – $2,2 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>) pri pH = 5,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>). Titracija je provedena na 25 °C. (lijevo); Ovisnost intenziteta emisije spoja **41** o koncentraciji poli (dAdT)<sub>2</sub> na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\max} = 370$  nm. Točke su

izmjerene vrijednosti, a linija predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe. (desno)

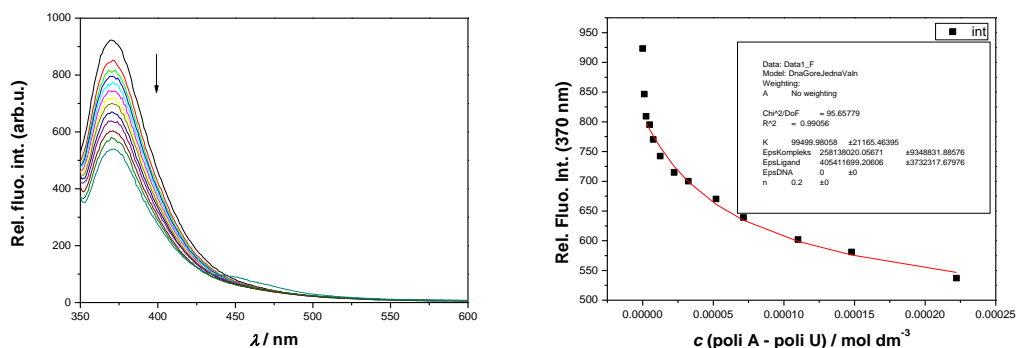


Prilog 164. Fluorescencijski spektri spoja **41** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$ ) prilikom titracije s *ct*-DNA ( $c = 1,3 \times 10^{-6} - 3,6 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Titracija je provedena na 25 °C. (lijevo); b) Ovisnost intenziteta emisije spoja **41** o koncentraciji *ct*-DNA na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\text{max}} = 370 \text{ nm}$ . Točke su izmjerene vrijednosti, a linija predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe. (desno)

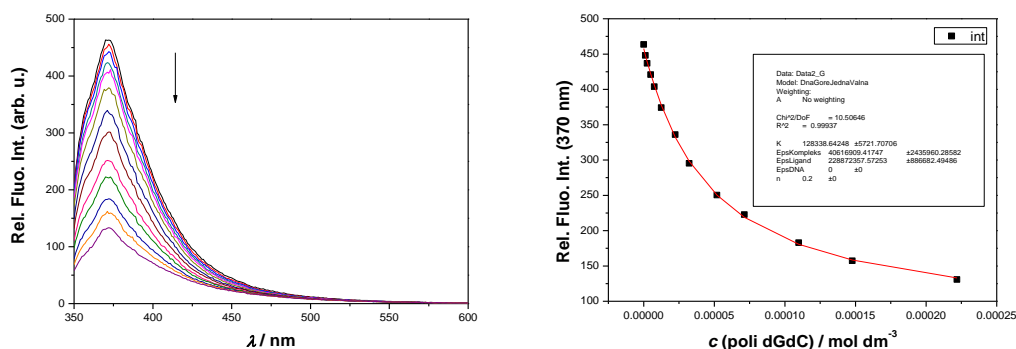


Prilog 165. Fluorescencijski spektri spoja **41** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$ ) prilikom titracije s poli A – poli U ( $c = 1,3 \times 10^{-6} - 2,2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Titracija je provedena na 25 °C. (lijevo); Ovisnost intenziteta emisije spoja **41** o koncentraciji poli A – poli U na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\text{max}} = 370 \text{ nm}$ . Točke

su izmjerene vrijednosti, a linija predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe.

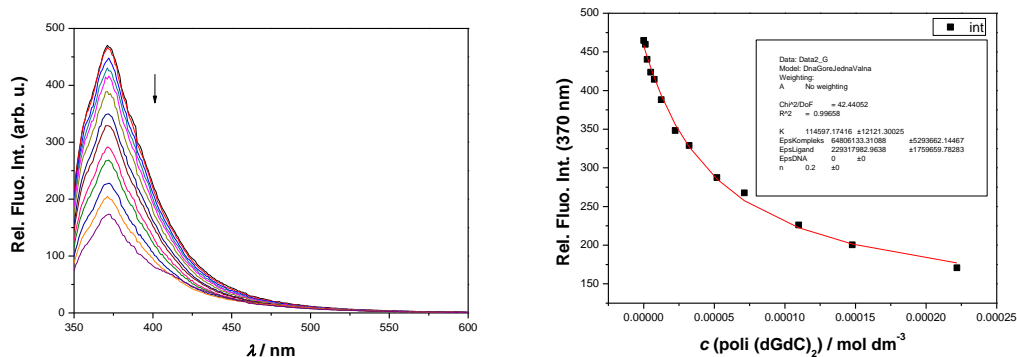


Prilog 166. Fluorescencijski spektri spoja **41** ( $c = 2,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{\text{exc}} = 330$  nm) prilikom titracije s poli (dGdC) ( $c = 1,3 \times 10^{-6} - 2,2 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>) pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>). Titracija je provedena na 25 °C. (lijevo); Ovisnost intenziteta emisije spoja **41** o koncentraciji poli (dGdC) na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\text{max}} = 370$  nm. Točke su izmjerene vrijednosti, a linija predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe. (desno)

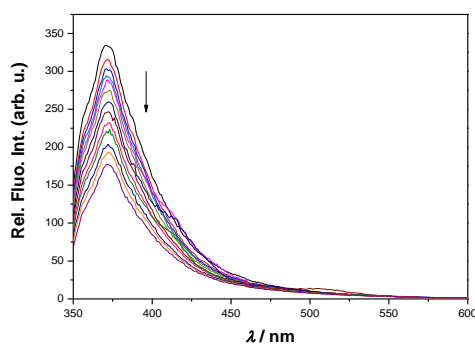


Prilog 167. Fluorescencijski spektri spoja **41** ( $c = 2,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{\text{exc}} = 330$  nm) prilikom titracije s poli (dGdC)<sub>2</sub> ( $c = 1,3 \times 10^{-6} - 2,2 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>) pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>). Titracija je provedena na 25 °C. (lijevo); Ovisnost intenziteta emisije spoja **41** o koncentraciji poli (dGdC)<sub>2</sub> na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\text{max}} = 370$  nm. Točke su

izmjerene vrijednosti, a linija predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe. (desno)



Prilog 168. Fluorescencijski spektri spoja **41** ( $c = 2,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{\text{exc}} = 330$  nm) prilikom titracije s poli (dAdT)<sub>2</sub> ( $c = 1,3 \times 10^{-6} - 2,2 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>) pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer,  $c = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>). Titracija je provedena na 25 °C. (lijevo); Ovisnost intenziteta emisije spoja **41** o koncentraciji poli (dAdT)<sub>2</sub> na valnoj duljini maksimuma emisije,  $\lambda_{\text{max}} = 370$  nm. Točke su izmjerene vrijednosti, a linija predstavlja izračunatu vrijednost pomoću Scatchardove jednadžbe. (desno)



## § 9. ŽIVOTOPIS

<b>Osobni podaci</b>	Datum rođenja:	31.01.1991.
	Mjesto rođenja:	Virovitica
	e-mail:	antonija.erben@irb.hr
<b>Obrazovanje</b>	2015. –	Poslijediplomski (doktorski) sveučilišni studij <i>Medicinska kemija,</i> Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci
	2013. – 2015.	Diplomski studij Primijenjena kemija, modul: Primijenjena organska kemija Sveučilište u Zagrebu magistra primijenjene kemije (mag. appl. chem.)
	2009. – 2013.	Preddiplomski studij Primijenjena kemija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb sveučilišna prvostupnica primijenjene kemije (bacc. univ. appl. chem.)
	2005. – 2009.	srednja školska sprema, Medicinska škola Bjelovar smjer: farmaceutski tehničar
<b>Radno iskustvo</b>	2016. - danas	<b>Asistent</b> Laboratorij za sintetsku organsku kemiju, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković
	2015. – 2016.	<b>Suradnik</b> na ESF projektu <i>„Jačanje kapaciteta u medicinskoj kemiji i istraživanju bioaktivnih sustava“</i> Laboratorij za sintetsku organsku kemiju, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković



**Znanstveni boravak na institucijama** kolovoz 2016. 2 tjedna znanstvenog boravka na Sveučilištu Duisburg-Essen, Istraživačka grupa prof. Schmucka, Essen, Njemačka, sinteza dipeptida i tripeptida koji sadrže gvanidinopirrol u okviru ESF projekta

### Znanstveni radovi

- Sviben, M. Glavaš, A. Erben, T. Bachelart, D. Pavlović Saftić, I. Piantanida, N. Basarić: „Dipeptides containing pyrene and modified photochemically reactive tyrosine: non-covalent and covalent binding to polynucleotides”, *Molecules* **28** (2023) 7533.
- M. Sambol, P. Benčić, A. Erben, M. Matković, B. Mihaljević, I. Piantanida, M. Kralj, N. Basarić: „Photochemical reactivity of naphthol-naphthalimide conjugates and their biological activity”, *Molecules* **26** (2021) 3355.
- A. Erben, I. Sviben, B. Mihaljević, I. Piantanida, N. Basarić: „Non-Covalent Binding of Tripeptides-Containing Tryptophan to Polynucleotides and Photochemical Deamination of Modified Tyrosine to Quinone Methide Leading to Covalent Attachment”, *Molecules* **26** (2021) 4315.
- A. Erben, J. Matić, N. Basarić, I. Piantanida: „The Phenanthridine-modified Tyrosine Dipeptide: Synthesis and Non-covalent Binding to DNA and RNA“, *Croatica Chem. Acta*, **92** (2019) 249-258.
- M. Sambol, K. Ester, A. Husak, Đ. Škalamera, I. Piantanida, M. Kralj, N. Basarić: „Bifunctional Phenol Quinone Methide Precursors: Synthesis and Biological Activity“, *Croatica Chem. Acta*, **92** (2019) 29-41.
- A. Husak, B. P. Noichl, T. Šumanovac Ramljak, M. Sohora, Đ. Škalamera, N. Budiša, N. Basarić: „Photochemical formation of quinone methides from peptides containing modified tyrosine“, *Org. Biomol. Chem.* **14** (2016) 10894-10905.

### Sudjelovanje na znanstvenim skupovima i školama

- A. Husak, N. Basarić: „Photo-activable tripeptides for targeting proteins and DNA“, Central European Conference on Photochemistry// CECF 2018, Bad Hofgastein, Austrija (poster).

- 
- A. Husak, J. Matic, I. Piantanida, N. Basarić: „Synthesis of dipeptides containing photochemically reactive modified tyrosine and evaluation of their dna binding“//10th Joint Meeting of Medicinal Chemistry, 2017., Dubrovnik, Hrvatska, (poster)
  - A. Husak: „Photo-activable oligopeptides for targeting proteins and DNA“// European School of Medicinal Chemistry (ESMEC), 2016., Urbino, Italija (poster).
  - *XVI. International Chromatography School*, 09.-10.06.2016, Zagreb, Hrvatska
  - A. Husak, T. Šumanovac Ramljak, N. Basarić: „Synthesis of tripeptides with modified tyrosine,“// SMLKI, XI. Susret mladih kemijskih inženjera, 2016. Zagreb, (poster).
  - A. Husak, T. Šumanovac Ramljak, N. Basarić: „Synthesis of photo-activable oligopeptides for targeting biomolecules“//E-WISPOC 2016, Functional Surfaces in Chemistry and Biology, Šklola fizikalno-organske kemije, 2016. Bressanone, Italija, (poster)