

Sinteza i spektroskopska analiza ferocenskih dipeptida izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina i fenilalanina

Perica, Jana

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:195595>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Jana Perica

7550/BT

**SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA ANALIZA FEROCENSKIH
DIPEPTIDA IZVEDENIH IZ FEROCEN-1,1'-DIAMINA I
FENILALANINA**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:

Ovaj je rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2020-02-9162 (Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija)

Predmet: Organska kemija

Mentor: Doc. dr. sc. Monika Kovačević

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA ANALIZA FEROCENSKIH DIPEPTIDA IZVEDENIH IZ FEROCEN-1,1'-DIAMINA I FENILALANINA

Jana Perica, 0058212561

Sažetak:

Razmatrajući nedostatke prirodnih peptida koji se mogu prevladati konformacijskim modifikacijama, novija istraživanja se fokusiraju na male molekule koje ugradnjom u peptidne lance induciraju tvorbu različitih okreta i elemenata sekundarne strukture te omogućuju pravilno nabiranje proteinskih lanaca. U sklopu ovog završnog rada pripravit će se i spektroskopski analizirati (IR-, NMR- i CD-spektroskopija) ferocenski dipeptidi Boc–D-Phe–NH–Fn–COOMe (**1**) i Ac–D-Phe–NH–Fn–COOMe (**2**) izvedeni iz ferocenske aminokiseline i fenilalanina.

Dobiveni dipeptidi su pogodan model za istraživanje i nadogradnju spoznaja o utjecaju strukture i svojstava konstituirajućih aminokiselina na sekundarnu strukturu pripadajućih peptida kao i na njihov potencijalni terapijski učinak.

Ključne riječi: peptidomimetici, ferocen, fenilalanin, spektroskopska analiza, vodikova veza

Rad sadrži: 32 stranice, 17 slika, 2 tablice, 2 sheme, 49 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc. dr. sc. Monika Kovačević

Datum obrane: 9. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

SYNTHESIS AND SPECTROSCOPIC ANALYSIS OF FERROCENE DIPEPTIDES DERIVED FROM FEROCEN-1,1'-DIAMINE AND PHENYLALANINE

Jana Perica, 0058212561

Abstract:

Considering the limitation of natural peptides that can be overcome by conformational modifications, recent studies explore small molecules that (when incorporated into peptide chains) induce the formation of various turns and elements of secondary structure and allow proper folding of protein chains. As part of this Thesis, ferrocene dipeptides Boc-D-Phe-NH-Fn-COOMe (**1**) and Ac-D-Phe-NH-Fn-COOMe (**2**) were synthesized from the ferrocene amino acid and the phenylalanine and spectroscopically analyzed using IR-, NMR- and CD-spectroscopy.

The obtained dipeptides are a useful model for new researches and upgrade of knowledge about the influence of amino acid backbones on the secondary structure of peptides as well as their potential therapeutic effect.

Keywords: peptidomimetics, ferrocene, phenylalanine, spectroscopic analysis, hydrogen bond

Thesis contains: 32 pages, 17 figures, 2 tables, 2 scheme, 49 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Monika Kovačević, PhD, Assistant Professor

Defence date: September 9th 2021

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Bioorganometalna kemija.....	3
2.2. Ferocen.....	4
2.3. Peptidi i proteini.....	6
2.4. Peptidomimetici	9
2.5. Ferocenski konjugati s aminokiselinama	9
2.6. Fenilalanin	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
3.1 Materijali i metode	15
3.1.1 Postupak priprave peptida 1-6	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Uvod	20
4.2. IR-spektroskopska analiza.....	21
4.3. NMR-spektroskopska analiza	24
4.4. CD spektroskopska analiza	25
5. ZAKLJUČCI	28
6. LITERATURNI IZVORI	29

1. UVOD

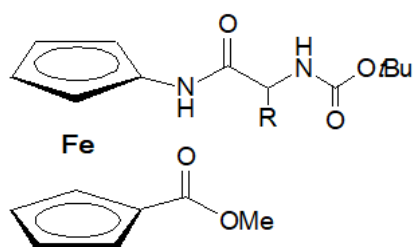
Proteini su biološke makromolekule koje se nalaze u svim stanicama, pri čemu imaju ključne funkcije u gotovo svim biološkim procesima. Kataliziraju enzimske reakcije, pružaju mehaničku čvrstoću, stvaraju i provode živčane impulse, sudjeluju u staničnom prepoznavanju i imunološkom odgovoru, kontroliraju rast i diferencijaciju stanica itd. Ovakva raznolika svojstva i funkcije omogućuje im velika strukturna raznolikost, kao posljedica točno definiranog slijeda aminokiselina. Međutim, velik terapijski potencijal peptida i proteina uvelike je ograničen zbog velike konformacijske fleksibilnosti, niske stabilnosti te otežane biodostupnosti u kontekstu metabolizma.

Znanstvenici su pronašli rješenje za poboljšanje aktivnosti terapeutika u vidu peptidomimetika. Peptidomimetici su peptidni ili nepeptidni spojevi koji oponašaju biološku aktivnost izvornih peptida, budući da sadrže sekundarne strukturne elemente, odgovorne za molekularno prepoznavanje, analogne prirodnim peptidima. Najčešći pristup u sintezi peptidomimetika uključuje ugradnju rigidnih molekularskih "kalupa" u strukturu peptida pri čemu tvorba elemenata sekundarne strukture ograničava fleksibilnost konformacije. Posljedično pripremljeni biokonjugati su stabilniji, pokazuju veću permeabilnost uz zadržavanje selektivnosti i odsutnost ozbiljnih nuspojava.

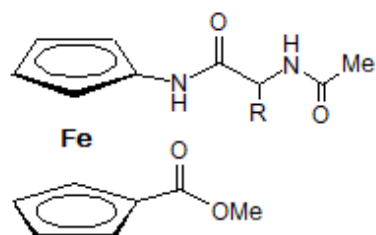
Otkriće ferocena stavlja organometalnu kemiju u središte znanstvenog fokusa te su antitumorska i antimikrobna svojstva njegovih derivata istraživana u mnogim kliničkim studijama i brojnim znanstvenim publikacijama. Jedan od uvelike proučavanih prethodno navedenih "kalupa" u dizajnu peptidomimetika jest 1,1'-disupstituirani ferocen, spoj koji ugradnjom u peptidnu sekvenciju inducira tvorbu vodikovih veza između aminokiselina, odnosno ima sposobnost indukcije kiralnog uređenja.

U sklopu ovog rada sintetizirat će se ferocenski dipeptid Ac-D-Phe-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (**6**) višestupanjskom sintezom konjugacijom ferocen-1,1'-diamina s prirodnom aminokiselinom fenilalaninom (D-Phe) te će se pripremljeni peptid i njegovi prekursori u budućim istraživanjima u sklopu HRZZZ podvrgnuti detaljnoj konformacijskoj analizi (slika 1). Nadalje, opisat će se i rezultati konformacijske analize njegovih prekursora Boc-Phe-NH-Fn-COOMe (**1**) i Ac-Phe-NH-Fn-COOMe (**2**) dobiveni standardnim spektroskopskim postupcima (IR-, NMR i CD). Rezultati će pružiti uvid na utjecaj alterirajućih zaštitnih skupina Boc, odnosno Ac na tvorbu IHB (eng. *Intramolecular Hydrogen Bonds*, intramolekulske vodikove veze) između peptidnih lanaca, što predstavlja začetak okreta sekundarne strukture.

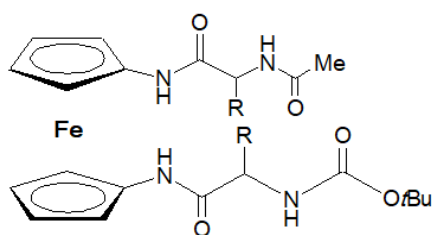
Također, proučavajući pripravljene biokonjugate ferocenskog kalupa s fenilalaninom može se istražiti i utvrditi utjecaj glomaznijih, sterički ograničavajućih i zahtjevnijih pobočnih ogranaka na tvorbu IHB.



1 (Boc-D-Phe-NH-Fn-COOMe)
R = -CH₂Ph



2 (Ac-D-Phe-NH-Fn-COOMe)
R = -CH₂Ph



6 (Ac-D-Phe-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc)
R = -CH₂Ph

Slika 1. Struktura prekursora **1**, **2** te ciljnog peptida **6**

2. TEORIJSKI DIO

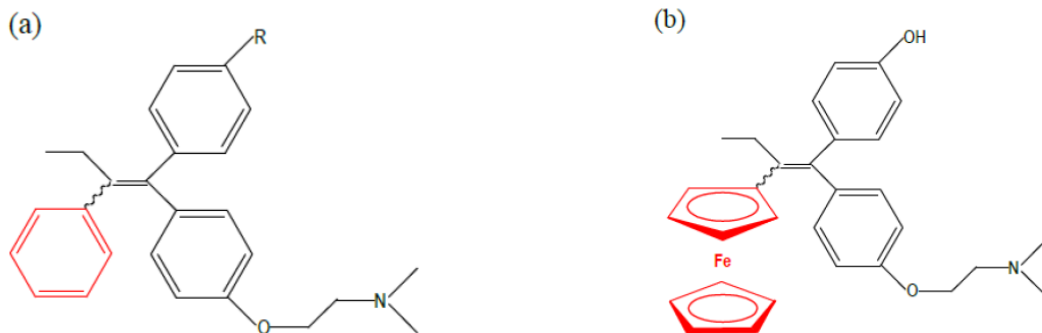
2.1. Bioorganometalna kemija

Područje bioorganometalne kemije bavi se proučavanjem konjugata organometalnih spojeva i biomolekula.^{1,2} Organometalni spojevi po definiciji sadrže barem jednu metal–ugljik vezu koja potječe iz organske molekule. Budući da navedena veza posjeduje elektronske i steričke efekte moguća je sinteza većih i kompleksnijih molekula iz manjih prekursora. Naime, ugljikov atom je elektronegativniji od atoma metala, stoga kao nukleofil može reagirati s elektrofilnim ugljikovim atomom drugih spojeva poput estera, alkil-halogenida, aldehida i ketona pri čemu nastaje nova C-C veza.³

U počecima, bioorganometalna kemija proučavala je samo organometalne spojeve koji imaju biološku funkciju te su dio bioloških transformacija u živom organizmu. Ubrzo su se pronašli iznimno stabilni organometalni spojevi u biološkim uvjetima, što je dovelo do spoznaje velikog potencijala ovih spojeva te eksponencijalnog razvoja same discipline.⁴ Danas je bioorganometalna kemija sastavni dio raznih istraživačkih područja poput terapeutika, bioanalize i senzora, enzima, peptida i proteina, toksikologije i okoliša itd.⁵

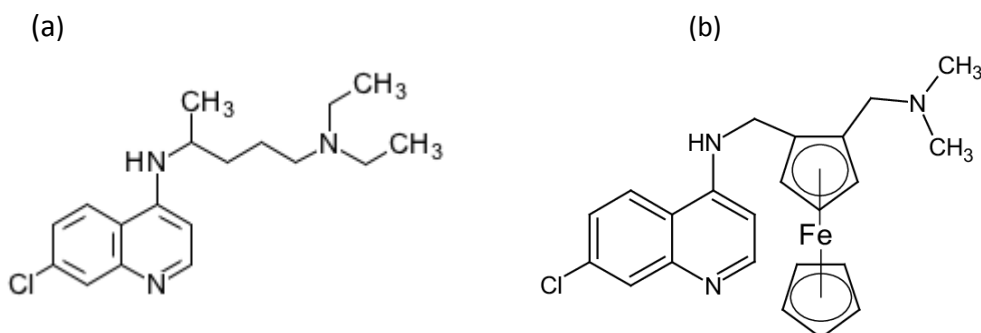
Znanstvenici uviđaju budućnost discipline specifično u sintezi konjugata organometalnih spojeva i biomolekula (aminokiseline, peptidi, DNA, ugljikohidrati, steroidi), a posebno mjesto zauzimaju konjugati metalocena s biomolekulama. Njihov potencijal se istražuje u terapiji karcinoma, zaraznih bolesti, molekuskog prepoznavanja i imunotestova te enzimskoj katalizi i toksikologiji.^{1,2} Zbog redoks-aktivnosti metala moguće su interakcije s različitim ligandima i organskim supstratima što dovodi do sinteze metalnih kompleksa koje karakterizira selektivno vezanje na ciljane biološke supstrate pri čemu dolazi do promjene mehanizama stanične proliferacije.⁶

Dokaz velikog potencijala spomenutih konjugata su jedni od najznačajnijih bioorganometalnih terapeutika, spojevi hidroksiferocifen i ferokin. Jedan fenilni prsten antikancerogenog terapeutika tamoksifena zamijenio se s ferocenom, što je dovelo do lijeka s poboljšanim antikancerogenim učinkom prema ER(+) i ER(-) tumorskim staničnim linijama, odnosno staničnim linijama karcinoma dojke (slika 2).⁷



Slika 2. (a) tamoksifen (R = H) (b) hidroksiferocifen

Kod sinteze ferokina, u strukturu antimalarijskog lijeka klorokina ugradila se ferocenska podjedinica što je rezultiralo unaprijeđenom antimalarijskom aktivnošću prema sojevima rezistentnima na klorokin (slika 3).^{8,9}



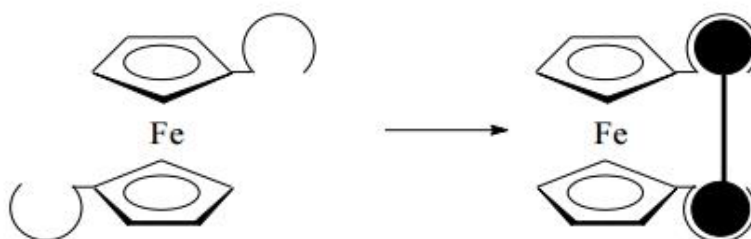
Slika 3. (a) klorokin (b) ferokin

2.2. Ferocen

Ferocen je otkriven slučajno 1951. godine (T. J. Kealy i P. L. Pauson) reakcijom ciklopentadienilnog magnezijevog-bromida i željezovog (III) klorida. Umjesto fulvalena, dobivena je narančasta krutina molekulske formule $\text{FeC}_{10}\text{H}_{10}$. Godinu dana nakon opisana je njegova tzv. struktura "sendviča" budući da se sastoji od dva ciklopentadienilna prstena (Cp) koji mogu donirati 6 π -elektrona željezovom kationu (Fe^{2+}) smještenom između njih.¹⁰ Otkriće ferocena potaknulo je intenzivni interes za istraživanja metalnih kompleksa aromatičnih ugljikovodika (metalocena). Zbog prisutne izravne veze metal-ugljik koja potječe iz organske molekule klasificira se u skupinu organometalnih spojeva.¹¹ Značajna svojstva ferocena koja ga smještaju u središte interesa bioorganometalne kemije su:

- kemijska stabilnost i netoksičnost
- lipofilnost
- stabilnost do 400 ° C
- reaktivnost kao superaromatski elektrofil
- blaga i reverzibilna oksidacija oko + 0,4 V u odnosu na zasićenu kalomelnu elektrodu
- dobra topljivost u svim uobičajenim organskim otapalima
- relativno jednostavna kemijska modifikacija¹²

Važno ferocensko svojstvo kod sinteze njegovih konjugatâ jest niska rotacijska barijera ferocenskih prstenova pri sobnoj temperaturi. Supstrat sam optimizira način vezanja disfunkcijskih molekula selektivnom prostornom rotacijom (slika 4).¹³



Slika 4. Vezanje disfunkcijske molekule na ferocenski receptor

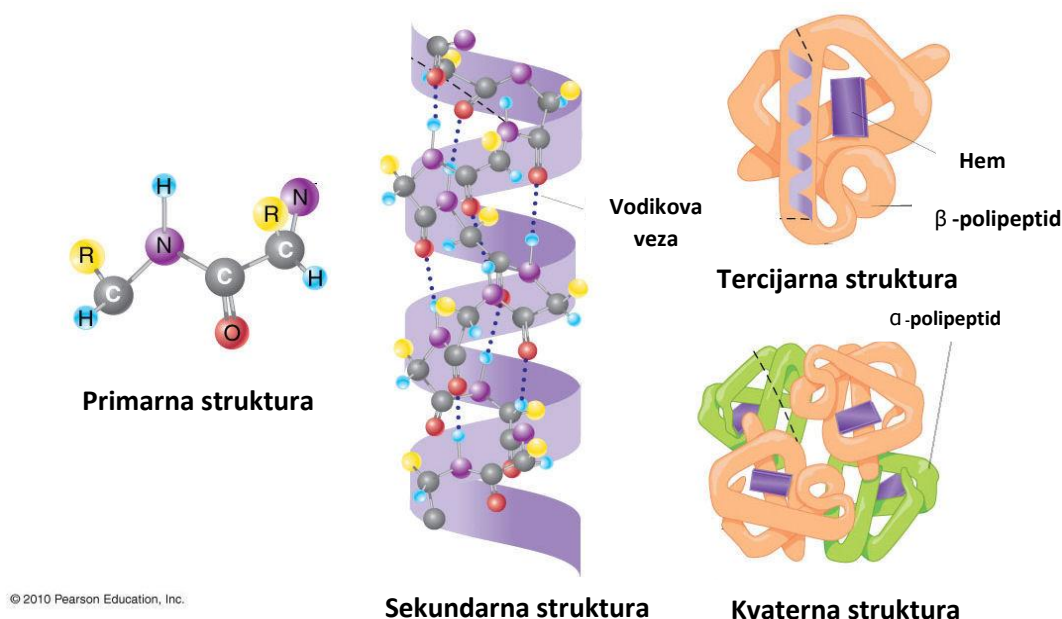
Konjugacija ferocena s biomolekulama poput ugljikohidrata, aminokiselina, šećera, steroida, i sl. rezultira biokonjugatima koji su opsežno istraživani u kliničkim studijama antitumorskog i antimikrobnog djelovanja. Osim navedene uloge ovakvih ferocenskih derivata u poboljšanju aktivnosti terapeutika, ferocen se koristi u znanosti o materijalima za proizvodnju ferocenskih senzora, elektrooptičkih materijala i raznih ferocenskih polimera te u biosenzorici, elektrokemiji i nelinearnoj optici.¹⁴

U ovom radu iskoristit ćemo svojstvo ferocena kao prikladnog spoja za indukciju elemenata sekundarne peptidne strukture, posebice kao mogućega začetnika okreta u peptidnom lancu.

2.3. Peptidi i proteini

Peptidi i proteini sastoje se od 20 aminokiselina koje se povezuju amidnom (peptidnom) vezom kao posljedica reakcije α -amino-skupine jedne aminokiseline i α -karboksilne skupine druge aminokiseline.^{15,16} Redoslijed aminokiselina definiran je genetskim kodom i u konačnici određuje funkciju i svojstva proteina. Strukturu svake aminokiseline čini središnji ugljikov atom povezan s atomom vodika, amino- i karboksilnom skupinom te jednim od bočnih ogranaka koji se razlikuju veličinom, nabojem, oblikom, reaktivnošću i mogućnošću za stvaranje vodikovih veza. Peptidna okosnica i aminokiselinski ostatci sudjeluju u različitim interakcijama što posljedično dovodi do nabiranja proteina i tvorbe visoko-uređenih trodimenzionalnih struktura određene biološke aktivnosti.^{16,17}

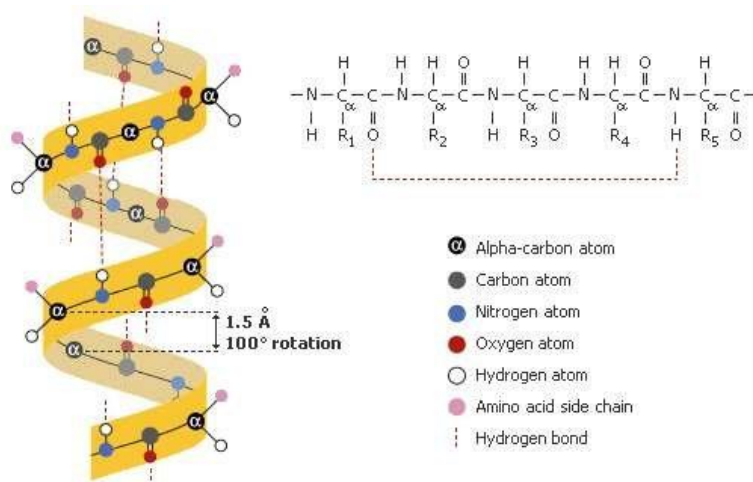
Razlikujemo četiri strukturne razine u proteinima: primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvaternu strukturu. (slika 5). Aminokiseline povezane peptidnom vezom unutar istog polipeptidnog lanca od *N*- prema *C*- kraju definiraju primarnu strukturu proteina. Sekundarna struktura određena je prostornim odnosom susjednih pobočnih ogranaka aminokiselina te nastaje formiranjem vodikovih mostova u osnovnom dijelu polipeptidnog lanca. Udaljeni aminokiselinski ostatci formiraju veze nekovalentne ili kovalentne prirode (disulfidni mostovi) čime nastaje tercijarna struktura proteina, te se posljedično oblikuje trodimenzionalna struktura. Kvaterna struktura nastaje povezivanjem više polipeptidnih lanaca ili podjedinica unutar istog proteina.¹⁵



Slika 5. Četiri strukturne razine peptida i proteina¹⁷

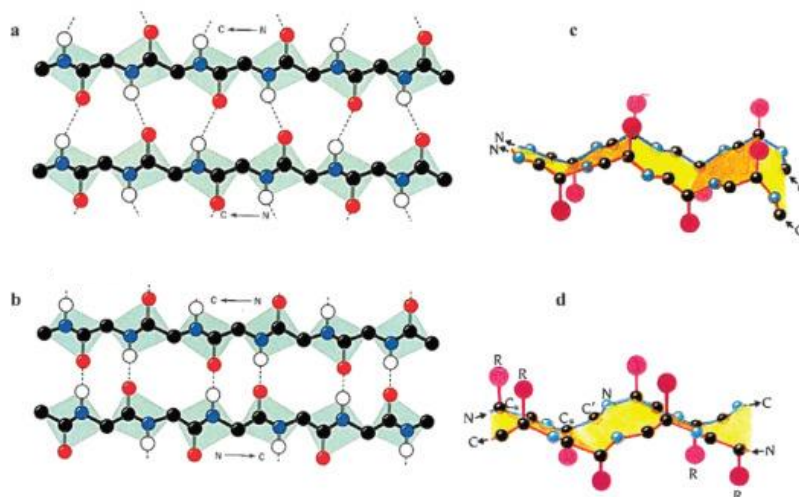
Uz brojne druge nekovalentne interakcije, i obrazac intramolekulskih vodikovih veza (IHB) određuje koje elemente sekundarne strukture će protein sadržavati: α -uzvojnica, β -nabranu ploču te različite okrete.

α -Uzvojnica je struktura slična štapiću, pri čemu čvrsto namotana polipeptidna okosnica čini unutrašnjost, a pobočni ogranci aminokiselina strše prema van. Strukturu stabiliziraju vodikove veze između CO skupine jednog ostatka i NH skupine četvrte po redu aminokiseline, pri čemu su sve skupine glavnog lanca uključene u tvorbu vodikovih veza osim krajnjih (slika 6).¹⁵



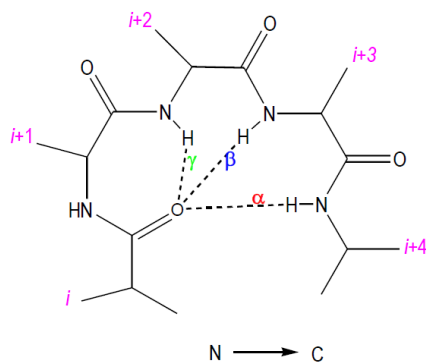
Slika 6. α -uzvojnica¹⁸

β -nabrana ploča znatno se razlikuje od štapičaste α -uzvojnice. Građena je od dvaju ili više polipeptidnih lanaca povezanih vodikovim vezama čiji se dijelovi zovu β -niti. β -nit zbog svoje izduženosti sterički dopušta niz struktura. Orijentacija lanaca određuje oblik β -nabrane ploče. Ukoliko je paralelna lanci su orijentirani u istom smjeru tvoreći 12-člane prstenove, a kod antiparalelne β -nabrane ploče lanci su orijentirani suprotno tvoreći 10- i 14-člane prstenove (slika 7).¹⁵



Slika 7. β-nabrana ploča (paralelna *gore*, antiparalelna *dolje*)²⁰

Okreti su odgovorni za kompaktni i globularni oblik polipeptida budući da omogućavaju nabiranje proteina i promjenu smjera proteinskih lanaca. Okreti se dijele na α-, β-, γ-, δ- i π-okrete ovisno o broju konstituirajućih aminokiselina. Najčešći su β-okreti koji nastaju zatvaranjem 10-članog prstena, a određuje ih tetrapeptidni niz kod kojih je udaljenost između C (*i*) i C (*i*+3) manja ili jednaka 7Å. Kod zatvaranja 7-članog prstena radi se o γ-okretu, 13-člani prsten odgovara α-uzvojnici, dok 16-člani prsten rezultira π-okretom (slika 8).¹⁵



Slika 8. α-, β-, γ-, okreti u peptidima

Navedene brojne trodimenzijske strukture omogućuju peptidima i proteinima iznimno raznovrsne biološke uloge koje ukazuju na veliki mogući terapijski potencijal. Međutim, upravo određena nepovoljna strukturna svojstva proteina su ograničavajući faktor njihove uporabe kao lijekova.

Zbog svoje konformacijske fleksibilnosti, proteini zauzimaju mnoge energetski ekvivalentne konformacije koje dovode do uspostave interakcija s različitim neželjenim

receptorima čija posljedica može biti neželjeni biološki odgovor. Također su podložni djelovanju proteolitičkih enzima koji su sastavni dio krvnog seruma i gastrointestinalnog sustava.²¹

Polarnost peptida i velika molekulska masa ograničavaju transport kroz stanične membrane i krvno-moždane barijere. Pogreške u nabiranju proteina te neželjeno nakupljanje proteinskih agregata mogu dovesti do stvaranja plaka (amiloidnih vlakana) koji uzrokuje teško kronično oboljenje amiloidozu te neurodegenerativna oboljenja poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti.^{21,22}

Kako bi se iskoristio terapijski potencijal i omogućila klinička primjena peptidnih lijekova, znanstvenici su proučavanjem neiscrpnog područja strukturnih modifikacija sintetizirali peptidomimetike.

2.4. Peptidomimetici

Peptidomimetici oponašaju prirodne peptide u njihovoj interakciji s receptorima. Mogu biti peptidni ili nepeptidni spojevi čiji su elementi sekundarne strukture odgovorni za molekulske prepoznavanje ili blokiranje biološkog učinka analogni onima u prirodnim peptidima. Posljedično mogu oponašati njihovu izvornu biološku funkciju.^{21,23}

Različiti su načini pripreme peptidomimetika: pomoću nepeptidnih analoga zamjenjuju se peptidne veze, nepeptidni kalupi ugrađuju se u peptidnu okosnicu, konjugiraju se aminokiselinski ostatci s malim molekulama ili dolazi do ciklizacije glavnog lanca.²⁴ Sve navedene metode temelje se na principu mimikrije α -uzvojnice, β -nabrane ploče te β - i γ -okreta. Često primjenjivana i uspješna metoda uključuje ograničavanje fleksibilnosti konformacije peptida uvođenjem strukturnih elemenata koji zadržavaju peptid u biološki aktivnoj konformaciji. Pri tome važno je prepoznati koji dio strukture je odgovoran za biološku funkciju peptida, odnosno koji pobočni ogranci aminokiselina sudjeluju u uspostavi interakcija s receptorom.²⁵

Upravo su se ferocenski kalupi pokazali pogodnima za pripremu konformacijski spregnutih peptida te otvorili vrata istraživanju ferocenskih biokonjugata.

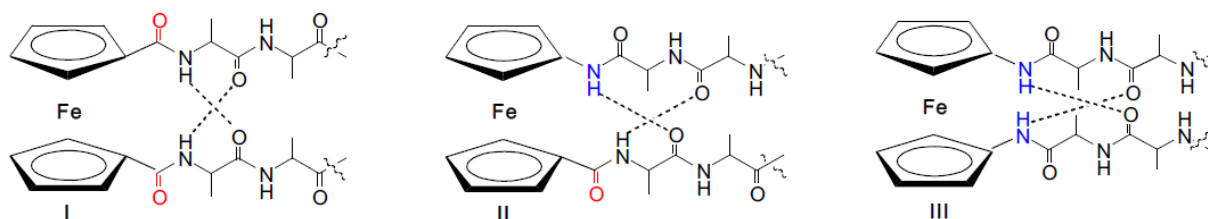
2.5. Ferocenski konjugati s aminokiselinama

Ugradnja 1,1'-disupstituiranog ferocenskog kalupa u peptidnu strukturu dovodi do ograničavanja konformacijske slobode čime se smanjuju interakcije s neželjenim receptorima. Naime, udaljenost ciklopentadienilnih prstenova iznosi 3,3 Å što osigurava tvorbu IHB između peptidnih lanaca vezanih na ferocenski kalup. Ferocen ima ulogu začetnika okreta, dok

međusobne interakcije peptidnih lanaca na Cp-prstenovima mogu dovesti do nastanka sekundarnih strukturnih oblika: α -uzvojnice, β -nabrane ploče te β - i γ -okreta.^{21,26,27}

Naspram drugih kalupa, prednosti ferocena očituju se u jednostavnosti sinteze derivata s biomolekulama, stabilnosti te elektrokemijskoj reverzibilnosti. Može se funkcionalizirati s istovjetnim ili različitim supstituentima, na jednom ili oba Cp-prstena čime nastali biokonjugati poprimaju oblik visokouređenih heličnih struktura uz zadovoljavajuću razinu supramolekulske kontrole.²⁸

Budući da ferocenski prekursor može biti akceptor ili donor vodikove veze, ferocenski peptidomimetici se dijele na tri glavne skupine: $\text{Fn}[\text{CO}-\text{AK}-\text{OMe}]_2$ (**I**) konjugati koji sažue 10-člani IHB-prsten, $\text{Y}-\text{AK}-\text{Fca}-\text{AK}-\text{OMe}$ (**II**) konjugati s 12-članim IHB-prstenom te $\text{Fn}[\text{NH}-\text{AK}-\text{Y}]_2$ (**III**) konjugati s 14-članim IHB-prstenom. Skupina **I** izvedena je iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (Fcd), skupina **II** iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca), dok su konjugati skupine **III** izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda) (slika 9).²¹



Slika 9. Ferocenski peptidomimetici **I-III** izvedeni iz Fcd, Fca i Fcda (IHB označavaju isprekidane linije)²¹

Ferocenski konjugati skupine **III** izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda) manje su istraženi od detaljno opisanih konjugata **I** i **II**. Kopulacijom Fcda s L- i D-Ala, Kraatz i sur. su prvi sintetizirali ove konjugate te istražili obrazac uspostavljenih vodikovih veza. U čvrstom stanju dobiveni ferocenski peptidi $\text{Fn}(\text{NH}-\text{Ala}-\text{Boc})_2$ i $\text{Fn}(\text{NH}-\text{D-Ala}-\text{Boc})_2$ tvorili su dva 10-člana IHB-prstena, odnosno ispoljavali su strukturu β -okreta.²⁹

Naš Laboratorij za organsku kemiju PBF-a sintetizirao je niz ovakvih ferocenskih konjugatâ te objavio brojne publikacije, detaljno istražujući obrasce nastalih sekundarnih strukturnih motiva. Rezultati su pokazali da alteriranjem *N*-terminalnih skupina i kiralnosti prirodnih aminokiselina dolazi do induciranja različitih IHB-prstenova u istraživanim biokonjugatima. Konjugati **III** s Ala uspostavili su 14-člani IHB-prsten te se ispitivanjem

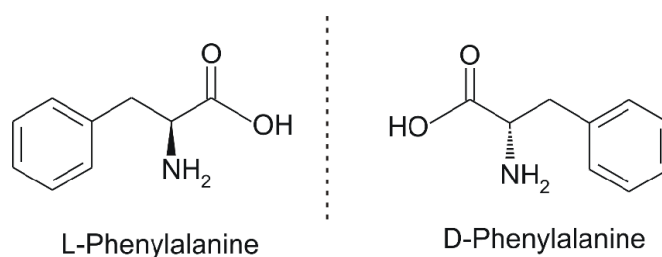
citotoksičnog učinka na staničnim linijama Hs578T i HepG2 utvrdio utjecaj lipofilnosti na njihovu biološku aktivnost.³⁰

Kako bismo utvrdili utjecaj određenih aminokiselina na sekundarne strukturne elemente, mora se istražiti afinitet aminokiselina k zauzimanju pojedinih strukturnih elemenata i utjecaj cjelovite polipeptidne sekvence.³¹ U sklopu ovog rada proučit će se utjecaj fenilalanina, lipofilne aminokiseline s voluminoznim bočnim ogrankom.

2.6. Fenilalanin

Fenilalanin (Phe, F) je proteinogena, esencijalna α -aminokiselina. Klasificira se kao neutralna i nepolarna zbog svoje inertne i hidrofobne prirode. Sadrži šestoročlani aromatski fenilni prsten te je građevni blok za mnoge peptide i proteine te hormone koji imaju važnu ulogu u kontroli metaboličkih procesa. Kao prekursor tirozina, fenilalanin ima značajnu ulogu u metabolizmu dušika i sintezi neurotransmitera dopamina, adrenalina i noradrenalina, serotonina, tiramina, inzulina te tjelesnog pigmenta melanina. Prirodni izvori fenilalanina su jaja, govedina, jetra mlijeko, soja i orašasti plodovi.^{32,33}

Strukturno gledano, Phe javlja se u obliku L- i D-stereoizomera ili kao njihova smjesa (slika 10).



Slika 10. Strukturna formula L- i D-fenilalanina ³⁴

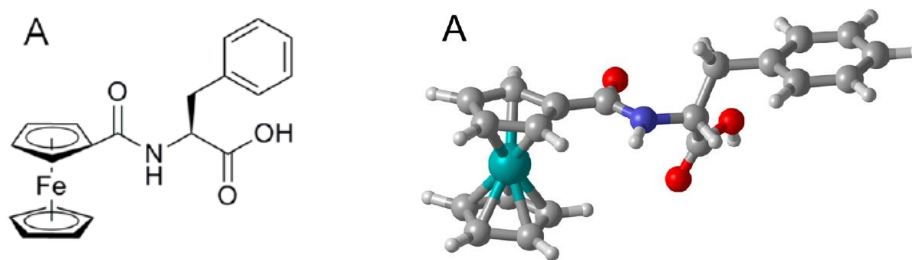
D-Phe (DPA) sintetizira se u laboratorijima, najčešće konvencionalnom organskom sintezom kao pojedinačni enantiomer ili izolacijom iz racemične smjese. Njegova funkcija nije dovoljno istražena, iako pojedine studije upućuju na farmakološko djelovanje na niacin receptor 2 (HCA₃).³⁵ Studije pokazuju terapijski potencijal i potrebu dodatnog istraživanja sinteze, konformacijske analize i biološke aktivnosti spojeva s D-Phe. Kod testiranja miševa-modela dijabetesa tipa II i pretilosti, utvrđena je poboljšana osjetljivost na inzulin, smanjene razine kolesterola i smanjen oksidativni stres jetre nakon oralne konzumacije Cr(D-Phe)₃.³⁶

Racemična D/L-smjesa (DLPA) upotrebljava se kao dodatak prehrani s ulogom ublažavanja simptoma depresije i kronične boli. Navodno antidepressivno djelovanje D/L-fenilalanina pripisuje se ulozi L-fenilalanina kao prekursora u sintezi neurotransmitera norepinefrina i dopamina, budući da se njihove povišene vrijednosti dovode u vezu s antidepressivnim učinkom.³⁷ Analgetska aktivnost objašnjava se mogućim inhibitornim djelovanjem D-fenilalanina na razgradnju enkefalina od strane enzima karboksipeptidaze A.³⁸ D-Fenilalanin može se apsorbirati unutar tankog crijeva te portalnom venom transportirati do jetre, pri čemu određeni dio D-fenilalanina prelazi u L-fenilalanin. Zabilježena je manja efikasnost u prijelazu krvno-moždane barijere D- u odnosu na L-stereoizomer, što dovodi do njegovog izlučivanja urinom bez aktiviranja centralnog živčanog sustava.³⁷

L-Fenilalanin je esencijalni oblik aminokiseline i sastavni dio proteina, enzima i hormona. Služi kao polazni materijal za sintezu esencijalne aminokiseline L-tirozina. Sintaza se odvija u jetri, pri čemu reakciju katalizira enzim fenilalanin hidroksilaza. Nedostatak ovog enzima uzrokuje nasljednu bolest fenilketonuriju u kojoj dolazi do nagomilavanja fenilalanina u krvotoku te oštećenja mozga i posljedično mentalne retardacije i zaostalosti. K tome, manjak tirozina dovodi do smanjene proizvodnje pigmenta melanina što se očituje u blijedom izgledu oboljele djece.³⁹ Uz navedeni potencijal ublažavanja simptoma depresije, mnoge studije upućuju na terapijski učinak L-fenilalanina. Kombinacijom oralne i topikalne uporabe L-fenilalanina poboljšani su rezultati repigmentacije kod osoba oboljelih od vitiliga.⁴⁰ Rektalna i oralna primjena dovela je do smanjenog unosa hrane i modulacije regija mozga zaslužnih za regulaciju apetita kod glodavaca.⁴¹

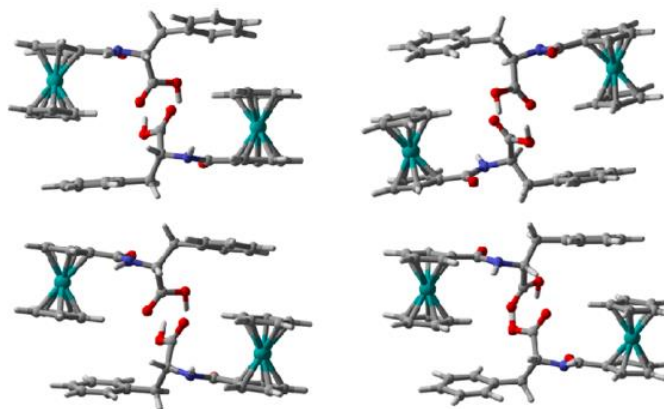
Treba se napomenuti veliki potencijal ferocenskih biokonjugata upravo s fenilalaninom, što potvrđuju brojne publikacije.

Sun i sur. otkrili su da monomeri ferocenskog derivata s fenilalaninom (Fc-F) formiraju agregate u vodi, pri čemu nastaju stabilni multireaktivni hidrogelovi (slika 11). Zamijećeno je da Fc-F reverzibilno i vrlo brzo reagira na promjene redoks-potencijala, pH, temperaturu i miješanje. U usporedbi s drugim poznatim mono- i multistimulirajućim gelovima, Fc-F je jedinstven zbog svoje male veličine, iznimno jednostavne molekularne strukture te ekonomičnosti komponenti koje tvore gel.



Slika 11. Strukturalni prikaz Fc-F monomera⁴²

Predložen je mogući mehanizam samostalne oligomerizacije molekula Fc-F koji posljedično dovodi do tvorbe gela. Analize indiciraju nastanak komplementarne $\pi-\pi$ interakcije između ferocenske podjedinice i fenilnog prstena iz Phe te tvorbu vodikovih veza između karboksilnih skupina tijekom formiranja dimera, što omogućuje njegovu stabilnost (slika 12). Jednaku važnost ima tvorba vodikovih i $\pi-\pi$ interakcija između 2 bliska dimera, pri čemu nastaju tetramerske strukturne jedinice. Velika stabilnost i izuzetno visoka tolerancija soli Fc-F gelova ukazuje njihovu moguću primjenu kao praktičnog medija za istraživanje lijekova i kemijskih supstanci.⁴²



Slika 12. Dva moguća $\pi-\pi$ modela slaganja dvaju obližnjih Fc-F dimera⁴²

Navedeni Fc-F hidrogel pripravili su Hou i sur. te iskoristili za proizvodnju elektrokemijskog imunosenzora koji detektira faktor tumorske nekroze α (TNF- α). Rezultati ispitivanja pomoću ovog imunosenzora potvrđeni su analizama kliničkog seruma.⁴³

U kemiji i znanosti o materijalima jedan od istraživačkih smjerova jest racionalni dizajn kiralnih nanostrukture s preciznom kontrolom. Moguća saznanja imaju praktičnu vrijednost za mnoga područja poput kirooptike, kiralnih senzora te za kemijske separacijske metode. Wang i sur. opisali su novi dizajn koji se temelji na hijerarhijskom sastavljanju ferocenskog derivata L-Phe-L-Phe-OH (Fc-FF). Preciznom ekspresijom molekularne kiralnosti ovog ferocenskog dipeptida dolazi do tvorbe raznolikih kiralnih nanostrukture.

Spektroskopske analize pokazale su da uvođenje suprotnih iona tijekom sastavljanja Fc-FF konjugata dovodi do promjene konformacije sekundarne strukture iz antiparalelne β -nabrane ploče u spiralno uvijenu β -ploču. Ova strategija omogućuje samostalno formiranje točno definiranih kiralnih nanostrukture sastavljenih od uvijenih β -nabranih ploča. Nadalje, primijetili su da povećanjem temperature helično uvijene plohe prelaze u dobro definirane nanostrukture, dok smanjenjem temperature nastaju nanostrukture trombocita ili jedan kristal. Također, utvrdili su da polarnost otapala inducira inverziju kiralnih interakcija, što dovodi do povećanih hidrofobnih interakcija između molekula Fc-FF te se posljedično omogućuje kontrola promjera i uređenosti nanostrukture.

Dakle, suptilnim modulacijama u obliku suprotnih iona i promjene temperature i otapala, precizno se može kontrolirati nagib, promjer i uređenost sastavljenih kiralnih nanostrukture s neviđenom razinom preciznosti. Fc-FF služi kao predložak za nove smjernice u dizajnu te se istražuju daljnje strategije kontrole drugih sastavljajućih peptida i primjene kiralnih nanomaterijala.⁴⁴

Zbog svoje biokompatibilnosti i niske toksičnosti, različiti inhibitori izvedeni iz peptida počinju se koristiti kao lijekovi za bolesti koje su uzrokovane pogrešnim smatanjem proteina. Kako bi proučili terapijske mogućnosti za poremećaje povezane s amiloidima, Yao i sur. sintetizirali su kratke ferocenske derivate L-Phe-L-Phe (Fc-FF) i L-Phe-L-Tyr (Fc-FY). Iskoristili su ih kao moguće inhibitore agregacije inzulina, na temelju pretpostavki nastanka jakih intermolekulskih reakcija između Fc-peptida i inzulina. ThT, DLS, CD i TEM analizama potvrđeno je da su Fc-FF i Fc-FY uspješno inhibirali umrežavanje inzulina te razgradili postojeće inzulinske agregate. Ovisno o dozi, oba Fc-peptida mogu imati snažno inhibitorno djelovanje pri čemu se produljuje lag faza, reducira formiranje β -nabranih ploha i smanjuje veličina inzulinskih fibrila.

Ovi rezultati upućuju da Fc-FF i Fc-FY konjugati mogu imati veliku ulogu u razvoju novih strategija i lijekova za poremećaje povezane s amiloidima te da simulacija molekularne dinamike ovakvih spojeva može pomoći u dizajnu prikladnih inhibitora.⁴⁵

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali i metode

Sve kemikalije korištene u sintezi bile su analitičke čistoće, dok su otapala korištena u radu pročišćena prema standardnim postupcima.⁴⁶

Tijek reakcija i čistoća sintetiziranih spojeva ispitivani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel) s fluorescentnim indikatorom (254 nm). Produkti su pročišćeni tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu ("Merck", Kieselgel 60 HF₂₅₄) uporabom smjesâ diklormetan/etil-acetat, diklormetan/metanol ili etilacetata kao eluensâ.

Karakterizacija sintetiziranih spojeva provedena je pomoću infracrvene spektroskopije (IR), spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i tekućinske kromatografije visoke razlučivosti sa spektrometrijom masa (HPLC-MS).

IR-spektri uzoraka snimljeni su na spektrofotometru Bomem MB 100 Mid FT u CH₂Cl₂.

¹H- i ¹³C-NMR-spektri određeni su u CDCl₃ i [D₆]-DMSO na spektrometrima Bruker AV300 ili Bruker AV600 uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard. ¹H- i ¹³C-NMR-spektri baždareni su prema CDCl₃ (7.26 ppm, odnosno 77.16 ppm). Kemijski pomaci (·) izraženi su u ppm.

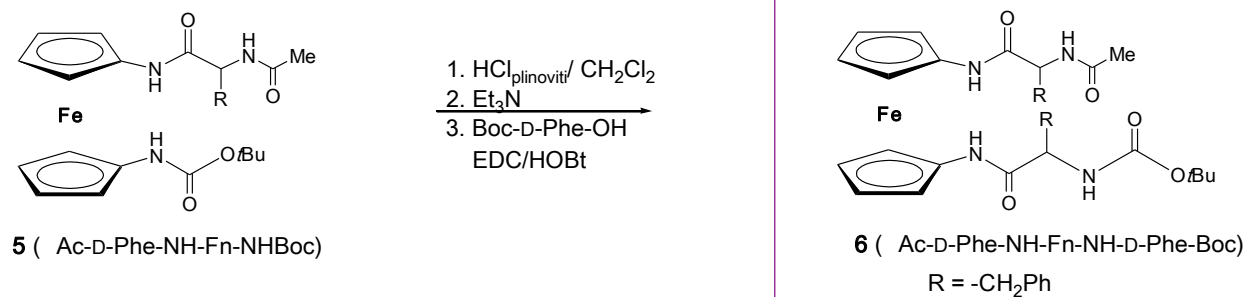
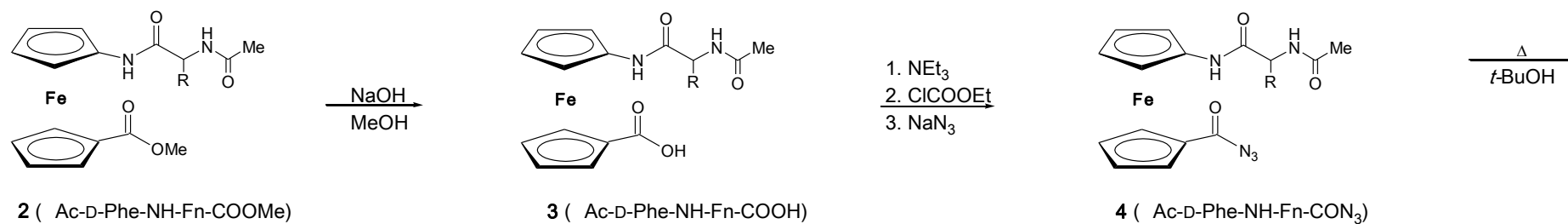
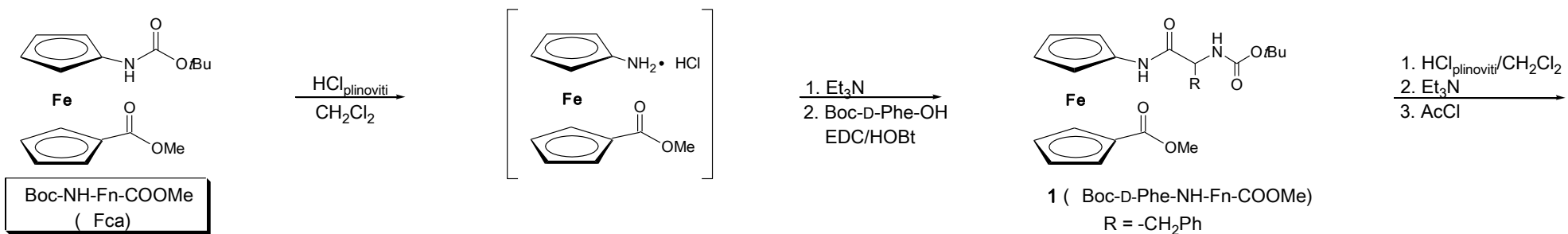
Tališta su određena na Reichert Thermovar HT 1 BT 11 i nisu korigirana.

CD-spektri snimljeni su na CD-spektrofotometru Jasco-810 u CH₂Cl₂ i DMSO, te na kalijevu bromidu.

IR- i NMR-spektri sintetiziranih spojeva nalaze se u Prilogu.

3.1.1 Postupak pripreme peptida 1-6

Ciljni ferocenski konjugat **6** pripravljen je iz Boc-NH-Fn-COOMe (Fca) postupcima prikazanim na shemi 1. Višestupanjska sinteza prekursora Boc-NH-Fn-COOMe (Fca) opisana je u literaturi.⁴⁷



Shema 1. Priprava biokonjugata 6

Priprava peptida Boc-D-Phe-NH-Fn-COOMe (1)

Prekursor Boc-NH-Fn-COOMe (Fca) (1 g, 2.8 mmol) otopi se u CH₂Cl₂, ohladi na 0 °C i izloži djelovanju plinovitog HCl. Nakon 15 minuta miješanja u ledenoj kupelji, uvođenje HCl-a nastavi se pri sobnoj temperaturi dok se TLC-om ne utvrdi završetak reakcije. Otapalo se otpari na rotacijskom vakuum-uparivaču, a nastali hidroklorid suspendira se u CH₂Cl₂ te obradi sa suviškom Et₃N do pH~9. Dobiveni se slobodni amin kopulira s Boc-D-Phe-OH (2,044 g, 7,7 mmol) primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon 48 sati miješanja pri sobnoj temperaturi, rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom NaHCO₃, 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz CH₂Cl₂ : EtOAc = 5 : 1 kao eluens. Dobiveno je 1,053 g (75%) produkta **1** u obliku narančaste smole.

Boc-D-Phe-NH-Fn-COOMe (1): R_f = 0.85 (CH₂Cl₂ :EtOAc = 10 : 1). IR (CH₂Cl) ν_{max}/cm⁻¹ = 3416 sr (NH_{slobodni}), 3324 sl (NH_{asocirani}), 1709 j (C=O_{COOMe}), 1685 j (C=O_{Boc}), 1640 sr (C=O_{CONH}), 1535 sr, 1496 sr, 1466 sr (amid II).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,33-7,25 (m, 5H, H_{fenil}), 7,32 (s, 1H, NH^a_{Fn}), 5,15 (s, 1H, NH_{Boc}), 4,71-4,69 (m, 1H, H_{Fn}), 4,67 (pt, 1H, H_{Fn}), 4,61 (s, 1H, H_{Fn}), 4,42 (s, 1H, H_{Fn}), 4,39 (d, J = 6,5 Hz, 1H, CH_α-Phe), 4,31 (pt, 2H, H_{Fn}), 4,02 (pt, 1H, H_{Fn}), 4,00 (s, 1H, H_{Fn}), 3,78 (s, 3H, CH₃-COOMe), 3,16 (m, 1H, CH_{2a}-Phe), 3,08 (m, 1H, CH_{2b}-Phe), 1,41 [s, 9H, (CH₃)₃-Boc].

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 171,87 (CO^a_{Fn}), 169,93 (CO^b_{Fn}), 148,84 (CO_{Boc}), 136,89 (C_qfenil), 129,53 (CH_{fenil}), 128,88 (CH_{fenil}), 127,14 (CH_{fenil}), 94,46 (C_qFn), 71,87 (C_qBoc), 72,77, 72,02 (C_qFn), 71,35, 71,31, 66,80, 66,57, 63,73, 63,25 (CH_{Fn}), 56,36 (CH_{Phe}), 51,84 (CH₃-COOMe), 38,38 (CH₂-Phe), 28,42[(CH₃)₃-Boc].

Priprava peptida Ac-D-Phe-NH-Fn-COOMe (2)

U otopinu Boc-D-Phe-NH-Fn-COOMe (**1**) (0,95 g, 1,88 mmol) u CH₂Cl₂ ohlađenu na 0 °C uvodi se plinoviti HCl. Nakon 3 sata miješanja na sobnoj temperaturi otapalo se upari, a rezultirajući hidroklorid suspendira se u suhom CH₂Cl₂ (5 ml) i otopi dodatkom 2,1 mL Et₃N do pH~9. Nastaloj se otopini, ohlađenoj na 0 °C, uz miješanje oprezno dokapa 0,9 mL AcCl. Nakon 15 minuta miješanja pri 0 °C, reakcija se prekine dodatkom vode. Potom se reakcijska smjesa više puta ekstrahira s CH₂Cl₂. Organski se sloj ispere zasićenom vodenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom

kromatografijom na silikagelu uz EtOAc kao eluens. Dobiveno je 370 mg (76%) produkta u obliku narančaste smole.

Ac-D-Phe-NH-Fn-COOMe (2): $R_f = 0.67$ (EtOAc). IR (CH_2Cl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3418$ sr ($\text{NH}_{\text{slobodni}}$), 3290 sr, 3248 sl ($\text{NH}_{\text{asocirani}}$), 1709 j ($\text{C}=\text{O}_{\text{COOMe}}$), 1696 j, 1668 j ($\text{C}=\text{O}_{\text{CONH}}$), 1574, 1558, 1540, 1535, 1516, 1507, 1498, 1466 (amid II).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 7,83 (s, 1H, NH_{Fn}), 7,31-7,24 (m, 5H, H_{fenil}), 6,52 (pt, 1H, NH_{Ac}), 4,80-4,76 (m, 1H, CH_{Phe}), 4,69 (m, 1H, H_{Fn}), 4,65 (m, 1H, H_{Fn}), 4,55 (m, 1H, H_{Fn}), 4,46 (m, 1H, H_{Fn}), 4,29 (m, 2H, H_{Fn}), 4,03 (m, 1H, H_{Fn}), 4,00 (m, 1H, H_{Fn}), 3,76 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-COOMe}$), 3,17-3,13 (m, 1H, $\text{CH}_{2\text{a-Phe}}$), 3,10-3,05 (m, 1H, $\text{CH}_{2\text{b-Phe}}$), 2,02 [s, 3H, CH_3Ac].

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 172,02 (CO_{bFn}), 170,62 (CO_{aFn}), 169,74 (CO_{Ac}), 136,75 (C_{qfenil}), 129,47, 129,45, 128,82, 127,18 (CH_{fenil}), 94,43 (C_{qFn}), 72,74 (CH_{Fn}), 72,35 (C_{qFn}), 71,38, 71,28, 66,84, 66,59, 63,79, 63,42 (CH_{Fn}), 54,97 (CH_{Phe}), 51,85 ($\text{CH}_3\text{-COOMe}$), 38,22 ($\text{CH}_2\text{-Phe}$), 23,35 ($\text{CH}_3\text{-Ac}$).

Priprava peptida Ac-D-Phe-NH-Fn-COOH (3)

U otopinu estera Ac-D-Phe-NH-Fn-COOMe (2) (320 mg, 0,72 mmol) u CH_3OH (5 mL, 0,14 mmol) doda se NaOH (28,7 mg, 0,72 mmol) i par kapi vode. Nakon 4 sata refluksiranja pri temperaturi od 65 °C, reakcijska se smjesa upari, a ostatak zakiseli 10%-tnom otopinom HCl te ekstrahira EtOAc. Organski sloj ispere se zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari. Dobiveno je 251 mg (81%) produkta 3 u bliku žutog praha.

Ac-D-Phe-NH-Fn-COOH (3): $R_f = 0.48$ (EtOAc), $t_{\text{t}} > 200^\circ\text{C}$. IR (CH_2Cl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3411$ sr ($\text{NH}_{\text{slobodni}}$), 3285 sr, 3256 sr ($\text{NH}_{\text{asocirani}}$), 3143-3073 š (OH, COOH), 1716 j, 1696 j, 1683 j, 1654 j ($\text{C}=\text{O}_{\text{COOH, CONH}}$), 1575, 1569, 1558, 1540, 1533, 1522, 1508, 1498, 1485, 1474 (amid II).

Priprava peptida Ac-D-Phe-NH-Fn-CON₃ (4)

Otopini kiseline 3 (251 mg, 0,58 mmol) u acetonu doda se voda. Reakcijskoj se smjesi, ohlađenoj na 0 °C, dokapa otopina Et_3N (66,8 mg, 0,66 mmol) u acetonu, te potom otopina ClCOOEt (47,8 mg, 0,87 mmol) u acetonu pazeći da temperatura ne prijeđe 5 °C. Nakon 30 minuta miješanja, doda se otopina NaN_3 (56,6 mg, 0,87 mmol) u vodi. Nakon 1h miješanja u ledenoj kupelji reakcijska se smjesa razrijedi hladnom vodom, ekstrahira s CH_2Cl_2 , ispere 5%-tnom zasićenom otopinom NaHCO_3 i zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha, pri čemu se dobije 62 mg (23%) produkta 4.

Ac-D-Phe-NH-Fn- CON₃ (4): $R_f = 0.64$ (EtOAc). IR (CH₂Cl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1} = 3419$ sr (NH_{slobodni}), 3290 sl (NH_{asocirani}), 2136 j (N₃), 1683 j (C=O_{CON₃, CONH}), 1558, 1540, 1507, 1498, 1453 (amid II).

Priprava peptida Ac-D-Phe-NH-Fn-NHBoc (5)

Otopina azida **4** (244 mg, 0,52 mmol) u *tert*-butil-alkoholu (20 mL) zagrijava se pri 65 °C sve dok tankoslojna kromatografija upućuje na prisutnost supstrata (~5h). Reakcijska se smjesa upari, a produkt pročisti tankoslojnom preparativnom kromatografijom uz EtOAc kao eluens. Dobije se 62 mg (93%) produkta u obliku žute smole.

Ac-D-Phe-NH-Fn- NHBoc (5) : $R_f = 0.78$ (EtOAc). IR (CH₂Cl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1} = 3427$ sr (NH_{slobodni}), 3318 sl (NH_{asocirani}), 1704 j, 1683 j, 1673 j (C=O_{CONH}), 1531, 1507, 1498, 1456 (amid II).

Priprava peptida Ac-D-Phe-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (6)

Boc- zaštićeni peptid **5** (150 mg, 0,295 mmol) otopi se u CH₂Cl₂, ohladi na 0 °C i izloži djelovanju plinovitog HCl. Nakon 15 minuta miješanja u ledenoj kupelji, uvođenje HCl-a nastavi se pri sobnoj temperaturi dok se TLC-om ne utvrdi završetak reakcije. Smjesa se otpari na rotacijskom vakuum-uparivaču, a nastali hidroklorid suspendira se u CH₂Cl₂ te obradi sa suviškom Et₃N do pH~9. Dobiveni se slobodni amin kopulira s Boc-D-Phe-OH (157 mg, 0,592 mmol) primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon 1 sat miješanja pri sobnoj temperaturi rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom NaHCO₃, 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Sirovi produkt (60 mg, 22%)pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz EtOAc kao eluens. Iskorištenje

Ac-D-Phe-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (6): $R_f = 0.51$ (CH₂Cl₂ :EtOAc = 5 : 1). IR (CH₂Cl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1} = 3430$ sr (NH_{slobodni}), 3302 j, 3266 j, 3217 sr (NH_{asocirani}), 1706 j, 1684 j, 1669 j, 1648 j (C=O_{CONH}) 1575, 1541, 1498, 1467, 1457 (amid II)

4. REZULTATI I RASPRAVA

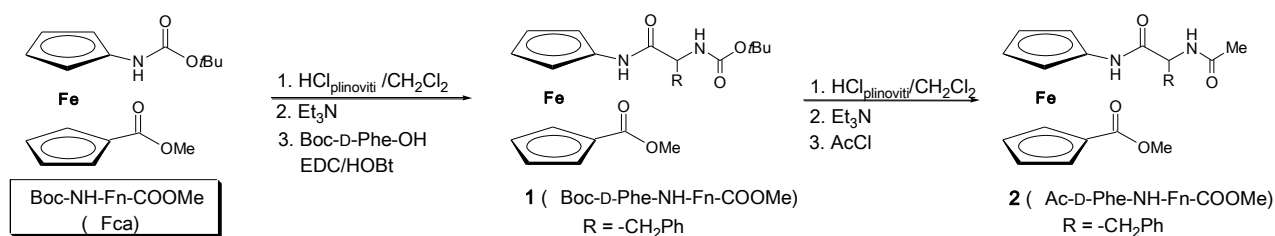
4.1. Uvod

Razmatrajući ranije opisane nedostatke prirodnih peptida koji se mogu prevladati konformacijskim modifikacijama, istraživanja se fokusiraju na male molekule "kalupa" koje ugradnjom u peptidne lance induciraju tvorbu različitih okreta i elemenata sekundarne strukture te omogućuju pravilno nabiranje proteinskih lanaca.

U sklopu ovog završnog rada sintetizirani su ferocenski dipeptidi **1** i **2** izvedeni iz ferocenske aminokiseline (Fca) i fenilalanina (shema 2). Dobiveni dipeptidi pogodan su model za istraživanje i nadogradnju spoznaja o utjecaju prostornog oblika i sekundarnih strukturnih elemenata na potencijalni terapijski učinak bioorganometalnih peptidomimetika. Pri tome, terminalna amino-skupina dipeptida **1** zaštićena je voluminoznom *tert*-butoksikarbonilnom (Boc) skupinom, dok je terminalna amino-skupina dipeptida **2** zaštićena acetilnom (Ac) skupinom. IR, NMR- te CD-spektri ovih dipeptida daje uvid u njihovo moguće prostorno uređenje, pri čemu je fokus na tvorbi i obrascu intramolekulskih vodikovih veza, odnosno prisutnosti okretâ u pripremljenim peptidima. Posljedično može se doći do pretpostavki i zaključaka o utjecaju terminalnih skupina (Boc-, Ac-) te mogućem utjecaju voluminoznog ogranka fenilalanina na tvorbu sekundarnih peptidnih struktura.

Daljnjom višestupanjskom sintezom dobiveni su biokonjugâti **3-6** (shema 1) čija će se konformacijska svojstva proučavati u sklopu daljnjih istraživanja u Laboratoriju za organsku kemiju PBF-a u Zagrebu.

Deprotekcijom amino-skupine iz Fca djelovanjem plinovitog HCl pripremljen je peptid **1**, tako da se nastali hidroklorid obradi s Et₃N nakon čega je uslijedila kopulacija slobodnog ferocenskog amina s Boc-D-Phe-OH primjenom standardne HOBt/EDC metode.



Shema 2. Priprava dipeptida **1** i **2** iz Fca

Umetanje fenilalaninske podjedinice u peptid **1** potvrđeno je multipletima signala protona bočnih ogranaka ($\delta = 7,31-7,24$ ppm, $\delta = 4,80-4,76$ ppm, $\delta = 3,17-3,13$ ppm, $\delta = 3,10-3,05$ ppm) u ^1H NMR-spektru peptida **2**. Navedene skupine također su vidljive u ^{13}C NMR-spektru pri $\delta = 136,75$ ppm (C_{qfenil}), $\delta = 129,47-127,18$ ppm (CH_{fenil}), $\delta = 54,97$ ppm (CH_{Phe}), te pri $\delta = 38,22$ ppm ($\text{CH}_2\text{-Phe}$).

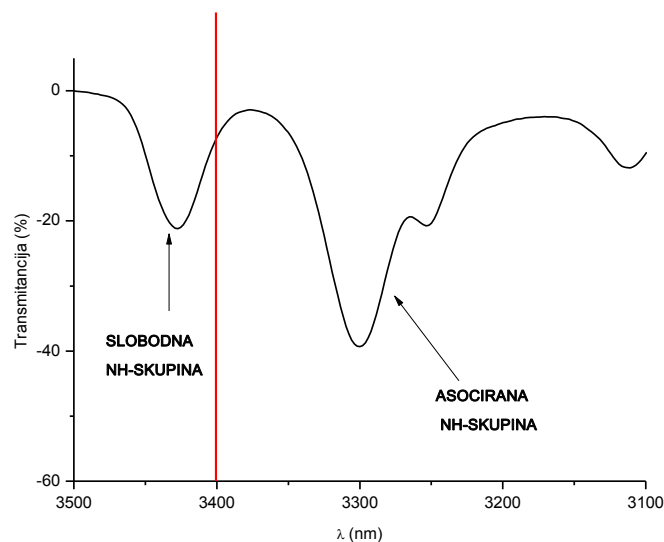
Prelazak karbamatne u acetamidnu skupinu registriran je gubitkom signala protona iz *tert*-butilne skupine spektra peptida **1** pri $\delta = 1,41$ ppm te pojavom karakterističnih singleta acetilnih protona pri $\delta = 2,02$ ppm u ^1H -NMR-spektru peptida **2**. Navedena transformacija skupina očituje se i u ^{13}C -NMR-spektrima izostankom signala karbonilnih C-atoma pri $\delta = 148,84$ ppm i *tert*-butilnih C-atoma pri $\delta = 28,42$ ppm te pojavom novih signala pri $\delta = 169,47$ ppm (CO_{Ac}) i $\delta = 23,35$ ppm ($\text{CH}_3\text{-Ac}$).

4.2. IR-spektroskopska analiza

Infracrvena spektroskopija (IR) instrumentalna je metoda koja pripada molekularnoj apsorpcijskoj spektrometriji. Princip metode temelji se na apsorpciji infracrvenog zračenja pri čemu infracrveni fotoni nemaju dovoljnu energiju da izazovu prijelaz elektrona već uzrokuju pojačanu vibraciju grupe atoma ovisno o prirodi njihovih međusobnih veza. Molekule apsorbiraju IR zračenje pri točno određenim valnim duljinama i frekvencijama te različite vibracije odgovaraju različitim energijama. IR-spektar dijeli se na dva područja: područje funkcijskih skupina ($4000-1400\text{ cm}^{-1}$) gdje većina funkcijskih skupina apsorbira zračenje te područje otiska prsta ($1400-600\text{ cm}^{-1}$) u kojem svaki pojedini spoj pokazuje jedinstveni oblik apsorpcijskih vrpce.⁴⁸

Tehnikom IR-spektroskopije mogu se ne samo određivati funkcijske skupine u organskim molekulama, već položaj apsorpcijskih vrpce NH- i CO-skupina indikator je njihovog sudjelovanja u slobodnim ili asociranim vodikovim vezama, čime je moguće dobiti uvid u konformacijski prostor peptida u otopini.

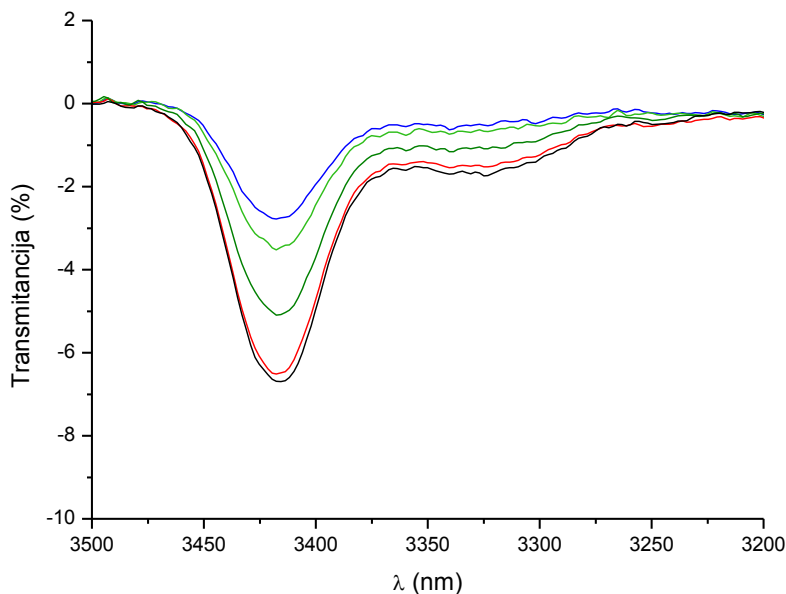
Apsorpcijske vrpce u području višem od 3400 cm^{-1} pripisuju se slobodnim NH-skupinama, dok signali koji se nalaze ispod 3400 cm^{-1} upućuju na sudjelovanje skupina u vodikovim vezama (slika 13). Istezne frekvencije karbonilnih esterskih skupina prisutne ispod 1730 cm^{-1} indiciraju njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.



Slika 13. Prikaz područja isteznih frekvencija NH-skupina⁴⁹

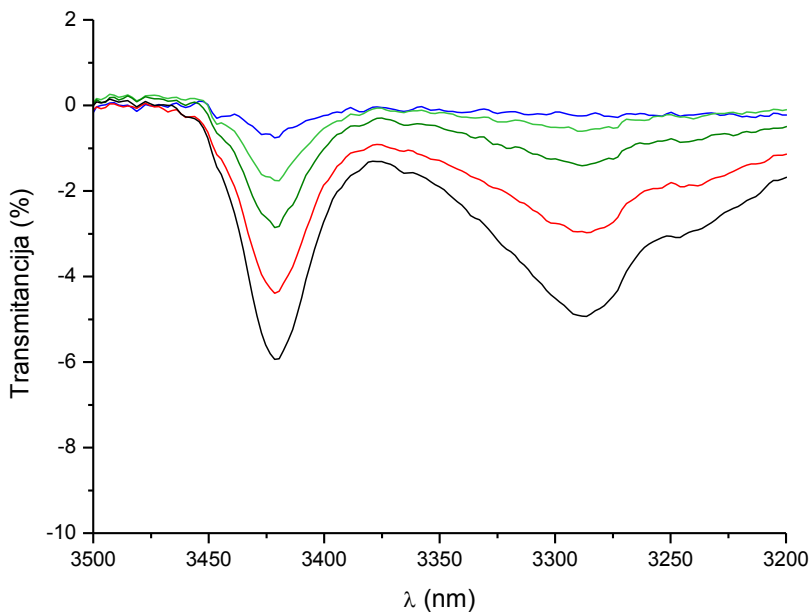
Mjerenjem koncentracijski-ovisnih IR-spektara utvrđuje se karakter vodikove veze (intra- ili intermolekulski). Ukoliko su u molekuli prisutne intramolekulske vodikove veze, postupnim razrjeđenjem otopine uzorka proporcionalno se smanjuje intenzitet vrpci slobodnih i asociраних NH-skupina, tj. njihov omjer je nepromijenjen. Nasuprot tome, ukoliko su u uzorku prisutne i intermolekulske vodikove veze postupnim razrjeđenjem povećava se intenzitet slobodne NH-skupine (niže od 3400 cm^{-1}) u odnosu na asociрану.

IR-spektri pokazuju istezne frekvencije slobodnih i asociраних NH-skupina analiziraniх peptida **1** i **2**. Nešto jači signal pri 3416 cm^{-1} u IR-spektру Boc-Phe-Fca-OMe (**1**) pripisuje se njegovim slobodnim NH-skupinama, dok slabiji signal pri 3324 cm^{-1} odgovara asociраним NH-skupinama (slika 14).



Slika 14. IR-spektar peptida Boc-D-Phe-Fca-OMe (**1**) [snimljen u CH₂Cl₂, [(—) $c = 5 \times 10^{-2}$ M, (—) $c = 2,5 \times 10^{-2}$ M, (—) $c = 1,25 \times 10^{-2}$ M, (—) $c = 6,13 \times 10^{-3}$ M, (—) $c = 3 \times 10^{-3}$ M].

Pretvorbom Boc-peptida **1** u Ac-peptid **2** može se primijetiti pojačanje intenziteta signala asociране NH-skupine što ukazuje na povećanje broja konformera koji sudjeluju u vodikovim vezama (slika 15).



Slika 15. IR-spektar peptida Ac-D-Phe-Fca-OMe (**2**) [snimljen u CH₂Cl₂, [(—) $c = 5 \times 10^{-2}$ M, (—) $c = 2,5 \times 10^{-2}$ M, (—) $c = 1,25 \times 10^{-2}$ M, (—) $c = 6,13 \times 10^{-3}$ M, (—) $c = 3 \times 10^{-3}$ M].

Mjerenjem koncentracijski-ovisnih IR-spektara indicirana je stabilizacija konformacije peptida **1** i **2** tvorbom intramolekulske vodikove veze (IHB) što se može zaključiti iz podjednagog opadanja omjera intenziteta slobodne i asocirane NH-skupine (slike 14 i 15).

4.3. NMR-spektroskopska analiza

NMR-spektroskopska analiza jedinstvena je metoda za određivanje kemijske strukture molekula te nam omogućava jasniji uvid u obrasce vodikovih veza, prethodno indiciranih IR-spektroskopijom. U peptidnoj kemiji NMR-spektar indicira prisutnost ili odsutnost stabilne sekundarne strukture. Naime, tom je tehnikom moguće razlikovati pojedine NH-skupine u molekuli te na temelju njihovih kemijskih pomaka zaključiti sudjeluju li u vodikovim vezama, pri čemu se kemijski pomaci iznad 7 ppm pripisuju asociranim NH-skupinama.⁴⁸

Registrirani visoki kemijski pomaci NH-skupina vezanih za ferocensku jezgru u peptidima **1** i **2** ($\delta > 7$ ppm) podržavaju vodikove veze prethodno indicirane IR spektroskopijom. NH-skupina iz Ac- zaštite detektirana je pri višem polju u ^1H NMR-spektaru (tablica 1).

Tablica 1. Kemijski pomaci (δ/ppm)^[a] amidnih protona biokonjugata **1** i **2**

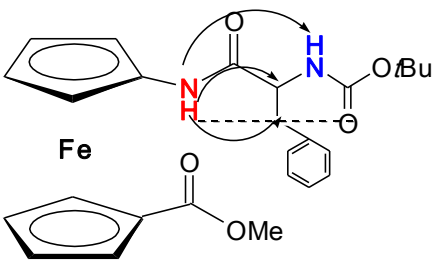
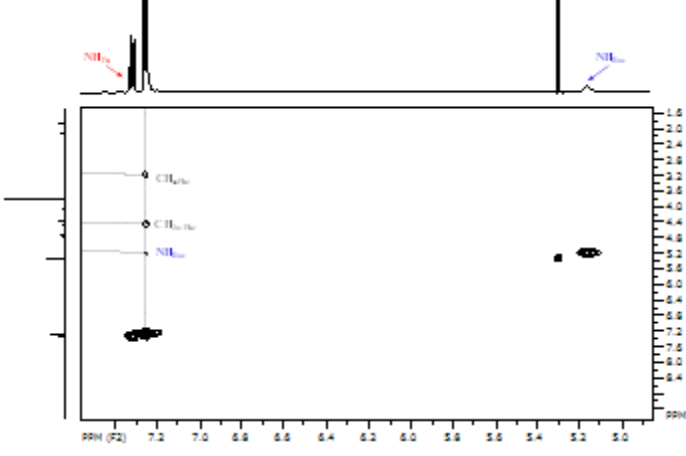
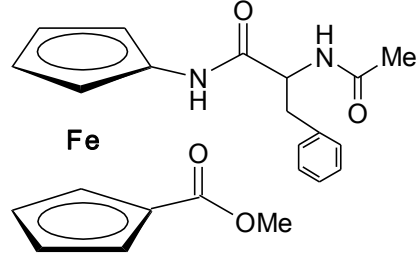
Spoj	Formula	δ ($\text{NH}_{\text{Boc/Ac}}$)	δ (NH_{Fn})
1	Boc-D-Phe-Fca-OMe	5,15	7,32
2	Ac-D-Phe-Fca-OMe	6,52	7,83

^[a]NMR-spektri snimljeni su u CDCl_3 pri $c = 5 \times 10^{-2}$ M i 298 K

Kako bismo stekli bolji uvid u obrazac IHB i konformaciju analiziranih peptida, istraženi su i NOE-kontakati amidnih skupina koje sudjeluju u vodikovim vezama. Poznato je da se analizom ^1H - ^1H NOE kontakata u NOESY NMR-spektrima peptida mogu odrediti kemijske i konformacijske promjene ispitivanih uzorka utvrđivanjem prostornog odnosa dviju jezgri, pri čemu udaljenost među jezgrama ne prelazi 5Å.

Na temelju rezultata spektroskopskih mjerenja te visokog kemijskog pomaka NH_{Fn} ($\delta > 7$ ppm), predložena je konformacija temeljena na unutarlančanoj IHB $NH_{Fn} \cdots OC_{Boc}$ u Boc-peptidu **1** koja rezultira 7-članim prstenom, odnosno γ -okretom (slika 16).

Slika 16. NOE-kontakti (strelice) i intramolekulske vodikove veze (isprekidane crte) u mogućim konformacijama peptida **1** i **2**

Mogući konformeri	NOE kontakti
 <p>Boc-D-Phe-NH-Fn-COOM (1)</p>	
 <p>Ac-D-Phe-NH-Fn-COOMe (2)</p>	<p>Nisu pronađeni odgovarajući kontakti u NOESY-spektru</p>

4.4. CD spektroskopska analiza

Dodatnu potvrdu prethodno indiciranih intramolekulskih vodikovih veza u peptidima omogućuje spektroskopska metoda cirkularni dikroizam (CD). CD-spektroskopija primjenjuje se pri proučavanju kiralnih molekula čime se mogu detektirati elementi peptidne sekundarne strukture. Proučavanjem ferocenskih peptida, pokazalo se da u području ferocenskog kromofora

($\lambda \sim 480$ nm) dolazi do povećanog intenziteta vrpce (tzv. Cottonov efekt) ukoliko su prisutne jake IHB koje omogućuju tvorbu visoko-uređenih kiralnih struktura u ferocenskim peptidima. Na sam predznak Cottonovog efekta utječu zaštitne skupine, otapalo i slijed vezanih prirodnih aminokiselina.⁴⁸

Prilikom analize karakterističnih apsorpcijskih vrpce pripremljenog biokonjugata **1** u UV/Vis-spektrima, pri 482 te 478 nm može se uočiti maksimumi negativnog predznaka i srednje jakog intenziteta, koji dodatno potvrđuju prisutnost unutarlančane IHB. S druge strane, u istom području spektra spoja **2** zamijećen je vrlo slabi signal (tablica 2).

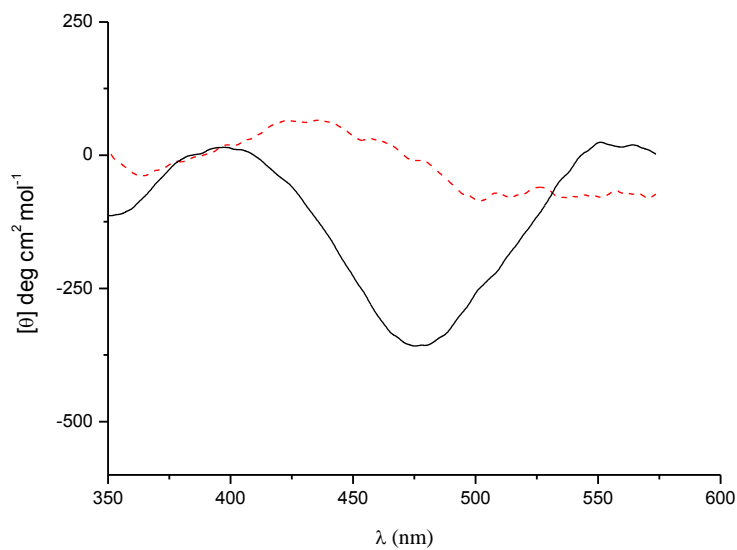
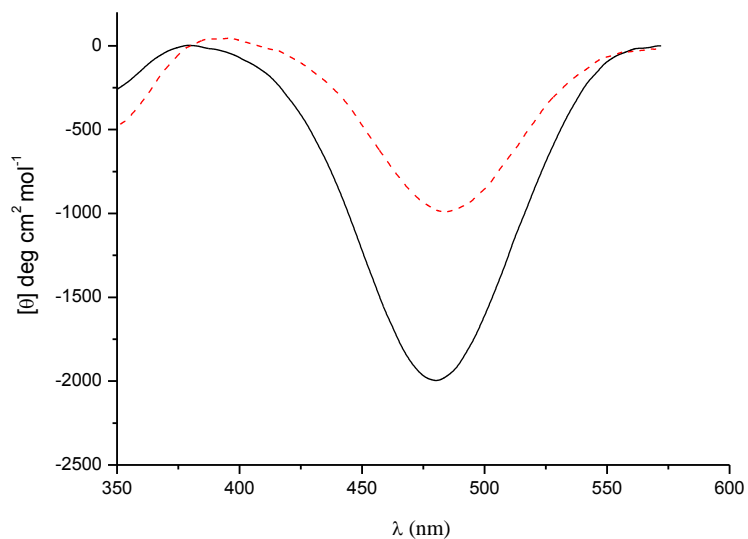
Tablica 2. UV/Vis-signal i Cottonovi efekti Boc- i Ac-dipeptida **1** - **2**

Spoj	Formula	λ_{\max} / nm	$[\theta]$ / deg cm ² dmol ⁻¹
1	Boc-D-Phe-Fca-OMe	482	-2009
2	Ac-D-Phe-Fca-OMe	478	-362

Dakle, rezultati IR-spektroskopije upućuju na stabilizaciju pripremljenih peptida intralančanim vodikovim vezama, dok rezultati NMR-spektroskopije ukazuju da samo peptid **1** tvori γ -okret, što potvrđuje i CD-aktivnosti peptida **1**, budući da IHB uzrokuju kiralnu uređenost oko ferocenskog kromofora ($\lambda \sim 480$ nm) što se očituje Cottonovim efektom (slika 17).

Srednje jaki negativni Cottonovi efekti u CD-spektrima dipeptida **1** potvrđuju uređenu kiralnu okolinu, pri čemu se vidi da struktura terminalne zaštitne skupine (Boc ili Ac) utječe na tvorbu i jakost IHB, odnosno intenzitet prikazanih vrpce (slika 17).

Indicirane vodikove veze koje tvore kiralno uređene strukture dodatno su ispitane titracijom s kompeticijskim otapalom. DMSO je polarno otapalo koje može cijepati intramolekulske vodikove veze čime se narušava uređena struktura, što dovodi do smanjenja CD-aktivnosti. Dodatkom 20% DMSO primjećuje se gotovo podjednako slabljenje Cottonovog efekta u oba dipeptida (slika 17).



Slika 17. CD-spektri dipeptida **1** (*gore*) i **2** (*dolje*) u CH_2Cl_2 $c = 5 \times 10^{-3} \text{M}$ (puna crta) i uz dodatak 20 % DMSO (isprekidana crta)

Ovaj rad predstavlja preliminarnu analizu dipeptida, a u nastavku istraživanja provest će se i mjerenje koncentracijskih i temperaturnih- NMR spektara, kao i titracija peptida s DMSO kao kompeticijskim otapalom, kako bi se stekao što precizniji uvid u konformacijski prostor tih peptida.

5. ZAKLJUČCI

- Dipeptidi Boc-D-Phe-Fca-OMe (**1**) i Ac-D-Phe-Fca-OMe (**2**) pripremljeni su koristeći standardne metode u visokom iskorištenju (75-85%).
- Struktura spojeva potvrđena je IR- i NMR-spektrima (^1H , ^{13}C , COSY- i NOESY-).
- U IR-spekttru biokonjugata **1** i **2** vidljive su dvije vrpce koje odgovaraju slobodnim i asociranim NH-skupinama.
- Razrjeđivanjem diklormetanske otopine peptida **1** i **2** nije utvrđeno značajno opadanje omjera intenziteta signala slobodne i asocirane NH-skupine, što je indicacija njihove stabilizacije intramolekulskim vodikovim vezama (IHB).
- Detektirani viši kemijski pomaci NH-skupina oba dipeptida ($\delta > 7$) upućuju na sudjelovanje navedenih amidnih protona u vodikovim vezama, prethodno indiciranih IR-spektroskopijom.
- NOE-kontakti sudjelujućih amidnih skupina peptida **1** (NH_{Fn} i NH_{Boc}) ukazuju na tvorbu unutarlančane IHB $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$ koja rezultira tvorbom 7-članog prstena, odnosno strukturom γ -okreta.
- Pretpostavka tvorbe uređenih kiralnih struktura u otopini potvrđena je CD-spektrom Boc-dipeptida **1** gdje je zabilježen Cottonov efekt u području ferocenskog kromofora.
- Može se zaključiti da zaštitna skupina utječe na kiralno uređenje peptida, budući da je tvorba unutarlančane IHB koja zatvara γ -okret potvrđena samo u peptidu **1**.

6. LITERATURNI IZVORI

1. G. Jaouen (ur.), *Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine*, John Wiley & Sons, Weinheim, 2006.
2. G. Simonneaux (ur.), *Bioorganometallic Chemistry (Topics in Organometallic Chemistry)*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
3. Barišić L. (2018), Prof. dr.sc. Lidija Barišić, Home Page, <http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_kemiju_i_biokemiju/laboratorij_za_organisku_kemiju/osnove_bioorganometalne_kemije> Pristupljeno 2.9.2021.
4. Rapić, V., Čakić Semenčić, M. (2011) Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocen i metalni karbonili. *Kemija u industriji* **60**: 61–79.
5. Rapić V., Kovačević M. (2012) III. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocenski peptidi. *Kemija u industriji* **61**: 71–120.
6. Ndagi U., Mhlongo N., Soliman M.E. (2017) Metal complexes in cancer therapy – an update from drug design perspective. *Drug Design, Development and Therapy* **11**: 599–616.
7. Jaouen, G., Top, S., Vessieres, A., Leclercq, G., & McGlinchey, M. (2004). The First Organometallic Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) and Their Relevance to Breast Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, **11**: 2505–2517.
8. Sullivan Jr, D. J., Matile, H., Ridley, R. G., Goldberg, D. E. (1998) A Common Mechanism for Blockade of Heme Polymerization by Antimalarial Quinolines. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 31103–31107.
9. Richie, T. L., Saul, A. (2002) Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature* **415**: 694–701.
10. Čakić Semenčić, M., Barišić, L. (2017) Ferrocene Bioconjugates. *Croat. Chem. Acta* **90**, 537–569.
11. Popović Z. (2012) *Osnove kemije organometalnih spojeva*, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
12. Astruc, D. (2016). Why is Ferrocene so Exceptional? *European Journal of Inorganic Chemistry*, **2017** (1): 6–29.
13. Constable, E. C. (1991) Sandwiches bring a new element to molecular recognition *Angewandte Chemie International Edition* **30** (4): 407-408.

14. Lal, B., Badshah, A., Altaf, A. A., Khan, N., Ullah, S. (2011) Miscellaneous applications of ferrocene-based peptides/amides. *Appl. Organometal. Chem.* **25**: 843–855.
15. Stryer, L. (1991) Biokemija (preveli Vuk-Pavlović, S., Kućan, Ž.), Školska knjiga, Zagreb. str. 40-46.
16. Liskamp, R. M. J., Rijkers, D. T. S., Kruijtzter, J. A. W., Kemmink, J. (2011) Peptides and Proteins as a Continuing Exciting Source of Inspiration for Peptidomimetics. *ChemBioChem.* **12**: 1626-1653.
17. Stryer L., Berg J., Tymoczko J. (2013) Biokemija, 6. izd., Školska knjiga, Zagreb. str. 34-35.
18. PJ Russell (2010) iGenetics: A Molecular Approach, 3rd Edition <https://www.mun.ca/biology/scarr/iGen3_06-04.html> Pristupljeno 18.kolovoza 2021.
19. Machine learning methods for prediction of disulphide bonding states of cysteine residues in proteins < https://www.researchgate.net/figure/An-a-helix-Hydrogen-bonds-are-formed-between-CO-Carboxyl-group-of-a-residue-with_fig4_46092678> Pristupljeno 18.kolovoza 2021.
20. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/parallel-beta-sheet> > Pristupljeno 18.kolovoza 2021.
21. Kovačević M. (2014) Ferrocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima, Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
22. Barišić L. (2019), Prof. dr. sc. Lidija Barišić, Home Page, <http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_kemiju_i_biokemiju/laboratorij_za_organisku_kemiju/peptidni_mimetic_i_pseudopeptidi> Pristupljeno 24.6.2019.
23. Jerić I. (2004) Peptide mimetics: why and how. *Kemija u industriji* **53**, 495-504.
24. Livnah, N., Yechezkel, T. (2005) Ferrocene bioconjugates with amino acids and carbohydrates. *Israel Journal of Chemistry* **20**: 32–42.
25. Giannis, A., Kolter, T. (1993) Peptidomimetics for Receptor Ligands: Discovery, Development, and Medical Perspectives. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **32** (9): 1244–1267.
26. Beheshti S., Lataifeh A., Kraatz H. B. (2011) Hydrogen-bonding interactions in ferrocene-peptide conjugates containing valine. *Journal of Organometallic Chemistry* **696**: 1117–1125.
27. Rapić V., Kovačević M. (2012) III. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferrocenski peptidi. *Kem u industriji* **61**: 71–120.
28. Martić S., Labib M., Shipman P. O., Kraatz H. B. (2011) Ferrocene-peptido conjugates: From synthesis to sensory applications. *Dalton Transactions*, **40** (28): 7264-7290.

29. Chowdhury, S., Mahmoud, K. A., Schatte, G., Kraatz, H.- B. (2005) Amino acid conjugates of 1,1'-diaminoferrocene. Synthesis and chiral organization. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 3018-3023.
30. Kovačević M., Kodrin I., Cetina M., Kmetič I., Murati T., Čakić Semenčić M., Roca S., Barišić L. (2015) The conjugates of ferrocene-1,1'-diamine and amino acids. A novel synthetic approach and conformational analysis. *Dalton transactions* **44**: 16405–16420.
31. Bellesia G., Jewett A. I., Shea J. E. (2010) Sequence periodicity and secondary structure propensity in model proteins. *Protein Science* **19**: 141-154.
32. Campbell, P. N. (1989). For the Love of Enzymes: The Odyssey of a Biochemist. *Biochemical Education*, **17** (4): 217.
33. Ihlefeldt, F. S., Pettersen, F. B., von Bonin, A., Zawadzka, M., & Görbitz, C. H. (2014). The Polymorphs of L-Phenylalanine. *Angewandte Chemie International Edition*, **53** (49): 13600–13604.
34. [A Review on Electrochemical Sensors and Biosensors Used in Phenylalanine Electroanalysis](https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-Phe-stereoisomers_fig1_340987456) <https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-Phe-stereoisomers_fig1_340987456 > Pristupljeno 17.srpnja 2021.
35. Irukayama-Tomobe Y, Tanaka H, Yokomizo T, Hashidate-Yoshida T, Yanagisawa M, Sakurai T. (2009) Aromatic D-amino acids act as chemoattractant factors for human leukocytes through a G protein-coupled receptor, GPR109B. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106** (10). 3930–3934.
36. Yang, X., Li, S.-Y., Dong, F., Ren, J., & Sreejayan, N. (2006). Insulin-sensitizing and cholesterol-lowering effects of chromium (d-Phenylalanine)₃. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **100** (7): 1187–1193.
37. Lehmann, W. D.; Theobald, N.; Fischer, R.; Heinrich, H. C. (1983-03-14). "Stereospecificity of phenylalanine plasma kinetics and hydroxylation in man following oral application of a stable isotope-labelled pseudo-racemic mixture of L- and D-phenylalanine". *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. **128** (2–3): 181–198.
38. 1. Christianson DW, Mangani S, Shoham G, Lipscomb WN. (1989) Binding of D-phenylalanine and D-tyrosine to carboxypeptidase A. *J Biol Chem*, **264** (22): 12849–53.
39. <<https://www.healthline.com/health/phenylketonuria#symptoms>> Pristupljeno 10.srpnja 2021.
40. Antoniou, C., Schulpis, H., Michas, T., Katsambas, A., Frajis, N., Tsagaraki, S., & Stratigos, J. (1989). Vitiligo Therapy with Oral and Topical Phenylalanine with UVA Exposure. *International Journal of Dermatology*, **28** (8): 545–547.

41. Norton M., Cao Y., Amarsi R., Fernandes Freitas I., Alamshah A., Murphy K. (2017) Rectal and oral administration of L-Phenylalanine suppresses food intake and modulates neuronal activation in appetite-regulating brain regions in rodents. *Endocrine Abstracts* **50**: 321.
42. Sun, Z., Li, Z., He, Y., Shen, R., Deng, L., Yang, M., ... Zhang, Y. (2013). Ferrocenoyl Phenylalanine: A New Strategy Toward Supramolecular Hydrogels with Multistimuli Responsive Properties. *Journal of the American Chemical Society*, **135** (36): 13379–13386.
43. Hou, Y., Li, T., Huang, H., Quan, H., Miao, X., & Yang, M. (2013). Electrochemical immunosensor for the detection of tumor necrosis factor α based on hydrogel prepared from ferrocene modified amino acid. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **182**: 605–609.
44. Wang, Y., Qi, W., Huang, R., Yang, X., Wang, M., Su, R., & He, Z. (2015). Rational Design of Chiral Nanostructures from Self-Assembly of a Ferrocene-Modified Dipeptide. *Journal of the American Chemical Society*, **137** (24): 7869–7880.
45. Yao P., Zhang J., You S., Qi W., Su R. & He Z. (2020) Ferrocene-modified peptides as inhibitors against insulin amyloid aggregation based on molecular simulation. *Journal of Materials Chemistry B*.
46. Perrin D. D., Armarego W. L. F. (1998) Purification of laboratory chemicals, Pergamon Press.
47. Barišić L., Rapić V., Kovač V. (2002) Ferrocene Compounds. XXIX.* Efficient Syntheses of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid Derivatives. *Croatica Chemica Acta* **75**: 199-210.
48. Kovačević, M., Kodrin, I., Roca, S., Molčanov, K., Shen, Y., Adhikari, B., Kraatz, H. & Barišić, L. (2017) Helically chiral peptides that contain ferrocene- 1, 1'-diamine scaffold as a turn inducer. *Chemistry : a European journal*, **23** (43): 1037-10395.
49. Stipčić T. (2020) Priprava i konformacijska analiza ferocenskih tripeptida Ala-Pro sekvence izvedenih iz ferocen-1,1'- diamina, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

A handwritten signature in dark ink on a light yellow background. The signature is cursive and appears to read 'Jana Perica'.

Jana Perica