

# Priprava i spektroskopska analiza ferocenskih dipeptida izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina i valina

---

Širić, Klara

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:159:157021>

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**

**Klara Širić**

7620/BT

**PRIPRAVA I SPEKTROSKOPSKA ANALIZA FEROCENSKIH DIPEPTIDA  
IZVEDENIH IZ FEROCEN-1,1'-DIAMINA I VALINA**

**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

## PRIPRAVA I SPEKTROSKOPSKA ANALIZA FEROCENSKIH DIPEPTIDA IZVEDENIH IZ FEROCEN-1,1'-DIAMINA I VALINA

Klara Širić, 7620/BT

### Sažetak:

Sekundarna struktura proteina ima bitnu ulogu u konačnoj strukturi proteina, stabilnosti, presavijanju, biološkim procesima i u samoj funkciji proteina, te se stoga pokušava predvidjeti i usmjeriti, kako bi proteini postali konformacijski fleksibilniji, stabilniji i time terapijski primjenjiviji.

U ovom je radu opisana sinteza i konformacijska analiza biokonjugata Boc-D-Val-NH-Fn-COOMe (**1**) i Ac-D-Val-NH-Fn-COOMe (**2**) (Ac = acetyl, Boc = *tert*-butoksikarbonil) koji su pripremljeni iz voluminozne aminokiseline valina i ferocenske aminokiseline. S ciljem utvrđivanja mogućeg steričkog utjecaja valinskog bočnog ogranaka na uspostavu sekundarne strukture rezultirajućih peptida, provedena je konformacijska analiza (IR-, NMR- i CD-spektroskopija).

**Ključne riječi:** ferocen, konformacijska analiza, valin, peptidomimetici, vodikova veza

**Rad sadrži:** 27 stranica, 8 slika, 3 tablice, 2 sheme, 37 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. 9. 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

### **PREPARATION AND SPECTROSCOPIC ANALYSIS OF FERROCENE DIPEPTIDES DERIVED FROM FERROCENE-1,1'-DIAMINE AND VALINE**

**Klara Širić, 7620/BT**

#### **Abstract:**

The secondary structure of a protein plays an important role in the final structure of the protein, stability, folding, biological processes and in the function of the protein itself. Therefore, scientific researches are made to predict and direct proteins to be more conformationally flexible, stable and therapeutically applicable.

This paper describes the synthesis and conformational analysis of the bioconjugates Boc-D-Val-NH-Fn-COOMe (**1**) and Ac-D-Val-NH-Fn-COOMe (**2**) (Ac = acetyl, Boc = tert-butoxycarbonyl) which are prepared from the voluminous amino acid valine and the ferrocene amino acid. In order to determine the possible steric influence of the valine backbone on the formation of the secondary structure of the resulting peptides, conformational analysis (IR, NMR and CD spectroscopy) was performed.

**Keywords:** ferrocene, conformational analysis, valine, peptidomimetics, hydrogen bond

**Thesis contains:** 27 pages, 8 figures, 3 tables, 2 schemes, 37 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:** 9. 9. 2021.

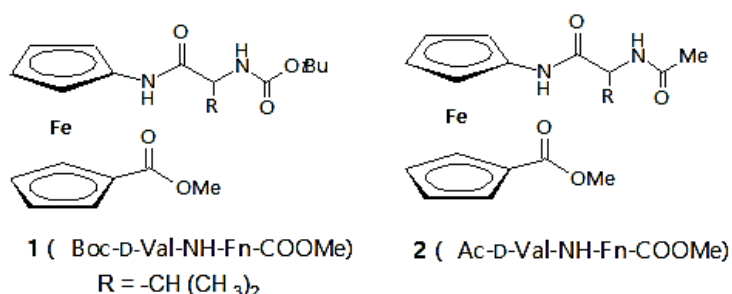
# SADRŽAJ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....   | <b>2</b>  |
| 2.1. Peptidi i proteini .....   | 2         |
| 2.1.1. Peptidomimetici.....   | 3         |
| 2.1.2. Valin.....   | 4         |
| 2.1.3. Važnost i uloga valina .....   | 5         |
| 2.2. Ferocen i organometalna kemija .....                                       | 6         |
| 2.2.1. Ferocenski konjugati s aminokiselinama.....                              | 8         |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....   | <b>10</b> |
| 3.1. Materijali i metode .....  | 10        |
| 3.2. Postupak pripreme ferocenskih dipeptida .....                              | 10        |
| 3.2.1. Postupak pripreme peptida <b>1</b> Boc-D-Val-NH-Fn-COOME .....           | 12        |
| 3.2.2. Postupak pripreme peptida <b>2</b> Ac-D-Val-NH-Fn-COOME .....            | 12        |
| 3.2.3. Postupak pripreme peptida <b>3</b> Ac-D-Val-NH-Fn-COOH .....             | 13        |
| 3.2.4. Postupak pripreme peptida <b>4</b> Ac-D-Val-NH-Fn-CON <sub>3</sub> ..... | 14        |
| 3.2.5. Postupak pripreme peptida <b>5</b> Ac-D-Val-NH-Fn-NH-Boc .....           | 14        |
| 3.2.6. Postupak pripreme peptida <b>6</b> Ac-D-Val-NH-Fn-NH-D-Val-Boc .....     | 14        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....  | <b>16</b> |
| 4.1. Uvod .....   | 16        |
| 4.2. IR-spektroskopska analiza .....  | 17        |
| 4.3. NMR-spektroskopska analiza .....   | 19        |
| 4.4. CD-spektroskopska analiza.....   | 21        |
| <b>5. ZAKLJUČCI</b> .....   | <b>23</b> |
| <b>6. POPIS LITERATURE</b> .....  | <b>24</b> |

# 1. UVOD

Sekundarna struktura proteina ima bitnu ulogu u konačnoj strukturi proteina, stabilnosti, presavijanju, biološkim procesima i u samoj funkciji proteina. Zbog toga je oduvijek bila predmet interesa, te se pokušavala predvidjeti i usmjeriti, promijeniti, kako bi proteini postali konformacijski fleksibilniji, stabilniji i time primjenjiviji. Veliku ulogu je imao i ferocen – stabilna narančasta kristalna tvar aromatskog karaktera u kojoj je formalno stabilni 6p-elektronski ciklopentadienilni anion ( $\text{Cp}^-$ ) vezan za željezov (II) ion. Riječ je o delokaliziranoj vezi u kojoj sudjeluju svi atomi liganda i ukupno 18 elektrona (po 6 iz dvaju prstenova i 6 iz iona željeza), što je svojstveno za strukturu plemenitog plina, time pogodujući stabilnosti ferocena [1]. Udaljenost između dva ciklopentadienilna prstena ferocena iznosi 3,3 Å što odgovara razmaku  $\text{N}\cdots\text{O}$  u  $\beta$ -nabranoj plohi. To ide u prilog nastajanju vodikovih veza u ferocenskim konjugatima s aminokiselinama i peptidima, što govori o potencijalu različitih lanaca peptida za stvaranje intramolekulskih vodikovih veza. Tako nastale vodikove veze induciraju tvorbu različitih oblika sekundarnih struktura.

Svrha ovog rada je sinteza ferocenskog dipeptida (Ac-D-Val-Fn-D-Val-Boc, Fn = ferocenilen, Ac = acetil, Boc = *tert*-butoksikarbonil) i konformacijska analiza njegovih prekursora **1** (Boc-D-Val-NH-Fn-COOMe) i **2** (Ac-D-Val-NH-Fn-COOMe) izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina i prirodne aminokiseline valina (Slika 1). Pripravljene spojevi podvrgnuti su spektroskopskim metodama (NMR-, IR- i CD-spektroskopija) kako bi se ispitaio utjecaj konjugacije valina s ferocenom na stvaranje intramolekulskih vodikovih veza kao induktora tvorbe sekundarne strukture, te utjecaj na konformaciju spoja. Uspoređivat će se i konformacijske promjene dipeptida nastale prelaskom terminalne Boc-zaštitne skupine u Ac-zaštitnu skupinu te utjecaj i promjene na stabilizaciju dipeptida **1** i **2** intramolekulskim vodikovima vezama.



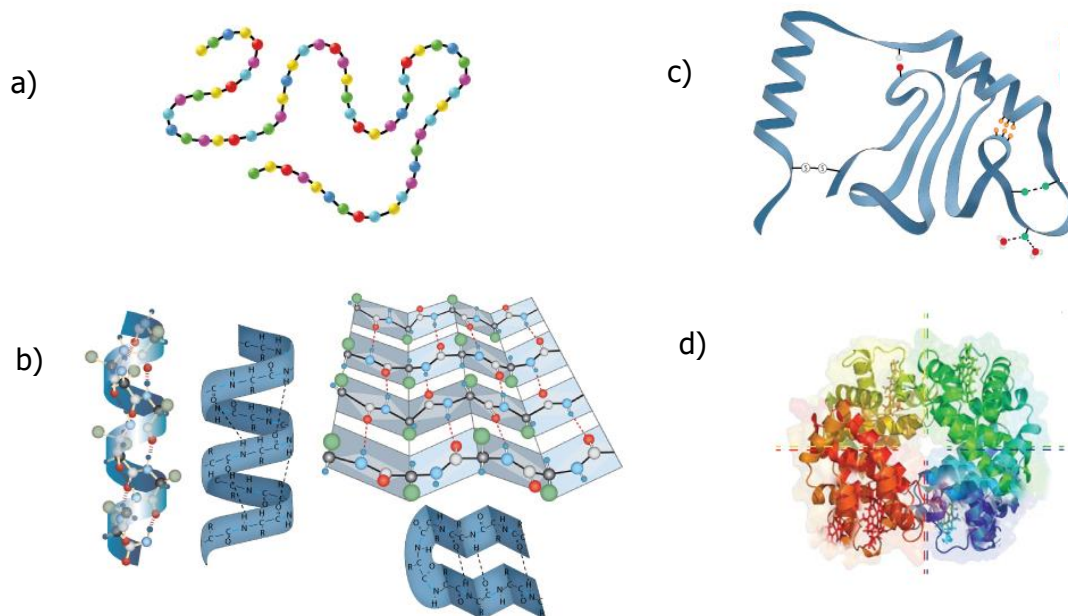
**Slika 1.** Struktura ferocenskog peptida **1** (Boc-D-Val-NH-Fn-COOMe) i **2** (Ac-D-Val-NH-Fn-COOMe)

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Peptidi i proteini

Peptidi i proteini najvažniji su čimbenici i glavni izvor tvari za rast i razvoj tjelesnih tkiva, sastavni su dio svake stanice i sudjeluju u svim životno važnim funkcijama poput enzimske katalize, prijenosu molekula i živčanih impulsa, zaštiti imunološkog sustava, kontroli rasta i diferencijaciji stanica [2]. Peptidi su polimeri nastali povezivanjem monomera (aminokiselina) vezani posebnom vrstom amidne veze – peptidnom vezom nastalom kemijskom reakcijom amino-skupine jedne aminokiseline i karboksilnom skupinom druge aminokiseline. Aminokiseline se međusobno razlikuju po bočnim lancima koji su različite strukture, veličine, naboja, hidrofilnosti, sposobnosti stvaranja veza i reaktivnosti. Upravo to doprinosi izuzetnoj raznolikosti peptida i proteina te utječe na krajnju strukturu tih polimera koja definira biološku aktivnosti i funkciju proteina. Razlikujemo četiri razine strukture proteina (Slika 2):

- Primarna struktura definirana je slijedom aminokiselina koje su u peptidnom lancu povezane peptidnom vezom.
- Nastajanje intramolekulskih vodikovih veza između donorskih i akceptorskih skupina između peptidnih lanaca dovodi do nastajanja sekundarnih struktura proteina od kojih su najbitniji  $\alpha$ -uzvojnica,  $\beta$ -nabrana ploha i različiti okreti. Intramolekulske vodikove veze određuju sekundarnu strukturu proteina pa tako  $\alpha$ -uzvojnica karakteriziraju vodikove veze između NH-skupine aminokiselinskog ostatka ( $i$ ) i CO-skupine aminokiselinskog ostatka ( $i+4$ ).  $\beta$ -nabrana ploha posljedica je vodikovih veza između dvaju različitih polipeptidnih lanaca i ovisno o njihovom usmjerenju ona može biti paralelna (lanci su orijentirani u istom smjeru) ili antiparalelna (lanci orijentirani u suprotnom smjeru). Okreti doprinose stabilnosti proteina, utječu na nabiranje i omogućavaju promjenu smjera polipeptidnih lanaca čime omogućuju kompaktni oblik proteina. Najčešći tip okreta je  $\beta$ -okret koji se definira kao tetrapeptidna sekvenca u kojoj je udaljenost između ostataka  $C\alpha(i)$  i  $C\alpha(i+3)$  manja ili jednaka  $7\text{\AA}$ .
- Tercijarna struktura predstavlja prostorni odnos aminokiselinskih ostataka koji su u linearnom slijedu udaljeni jedan od drugog, no oblikovanjem se približavaju.
- Kvaterna struktura odnosi se na prostorni odnos između polipeptidnih lanaca ili podjedinica istog proteina [2,3].



**Slika 2.** Razine strukture peptida i proteina: a) primarna struktura, b) sekundarna struktura ( $\alpha$ -uzvojnica,  $\beta$ -nabrana ploha), c) tercijarna struktura i d) kvaterna struktura [5]

Radi svoje važnosti u svim biološkim funkcijama i svoje raznolikosti pokazuju mogućnost primjene u terapijske svrhe, no njihova upotreba uvelike je ograničena nepovoljnim svojstvima. Proteini su vrlo nestabilne molekule podložne razgradnji s proteolitičkim enzimima i reakciji s neželjenim receptorima, te su polarne molekule koje ne mogu prolaziti kroz staničnu membranu [2].

Iz navedenih razloga, istražuju se peptidomimetici - spojevi nastali modifikacijom nepovoljnih farmakoloških svojstava prirodnih peptida kako bi se mogli koristiti u tražene kliničke svrhe.

### 2.1.1. Peptidomimetici

Upotrebom molekularnih kalupa (npr. ferocen) moguće je pripremiti peptide male molekulske mase, stabilizirane u određenoj konformaciji. Takvi peptidi nazivaju se peptidomimetici, a molekularni kalup uvođenjem intramolekulskih vodikovih veza (IHB) stvara određenu konformaciju potičući nastajanje sekundarne strukture.

Ferocen se pokazao odličnim kalupom za indukciju različitih strukturnih elemenata jer se u njegovim derivatima javljaju dobro definirane vodikove veze. Također, radi njegove strukture, moguće je postići kontrolu pri usmjeravanju i povezivanju peptidnih lanaca. Najviše su proučavani peptidomimetici priređeni iz  $\beta$ -aminokiselina (aminokiseline u kojima je amino-skupina vezana na  $\beta$ -ugljikov atom) koji su stabilni na djelovanje proteolitičkih enzima i



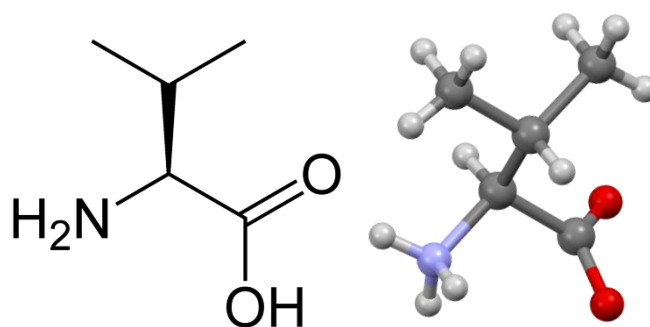
metaboličkih transformacija, biološki aktivni i imaju mogućnost vezanja na odgovarajuće receptore, a nazivaju se  $\beta$ -peptidima. Radi svoje stabilnosti koriste se u istraživanjima inhibitora proteaza, dizajnu peptidnih cjepiva (primjenjivih kod autoimunih bolesti) i antimikrobnih peptidomimetika [4].

Cilj peptidomimetika jest oponašanje elemenata sekundarne strukture ( $\alpha$ -uzvojnice,  $\beta$ -nabrane plohe i  $\beta$ -okreta), pa se tako kao mimetici  $\alpha$ -uzvojnice koriste peptoidi,  $\beta$ -peptidi, male molekule i ferocenski peptidi, dok se kao mimetici  $\beta$ -plohe uglavnom koriste ciklički i aciklički peptidi, te peptidi s umetnutim molekulskim kalupima [2].

U ovom radu sintetizirani su ferocenski konjugati s valinom te se ispituje tvore li ti peptidi definirane intramolekulske vodikove veze i tako pokazuju potencijal nastajanja uređene strukture.

### 2.1.2. Valin

Valin (Val, V) je aminokiselina koja kao pobočni ogranak sadrži izopropilnu grupu što ju čini nepolarnom alifatskom aminokiselinom (Slika 3). To je esencijalna aminokiselina, dakle organizam nema mogućnost biosinteze valina, stoga se dovoljna količina za normalnu funkciju organizma mora osigurati kroz prehranu [6].



**Slika 3.** Struktura valina

Valin je jedna od aminokiselina koja u proteinima i peptidima ima tendenciju tvorbe sekundarne strukture  $\beta$ -nabrane plohe. Smatra se da je razgranata struktura izopropilne skupine valina uzrok destabilizacije  $\alpha$ -uzvojnice radi steričkih smetnji, pa je tako pobočni ogranak valina pogodan za  $\beta$ -nabrane plohe u kojoj se lako smješta na način da izviruje iz ravnine glavnoga lanca [6].

Rađeni su konjugati ferocenskih peptida s valinom gdje su se pokazali kao zanimljiv molekularni model za bolesti u kojima  $\beta$ -nabrana ploha ima bitnu strukturnu ulogu, kao na primjer u Alzheimerovoj i Parkinsonovoj bolesti. Alzheimerova bolest povezana je s agregacijom amiloidnog  $\beta$ -peptida u fibrile u mozgu, stoga se stavio naglasak na identifikaciju peptidnih sekvenci ključnih za te agregacijske procese. Valin je u tim sekvencama nužan radi formiranja inicijalnih struktura, pa je korišten za proučavanje interakcija između peptidnih supstituenata u topivim bioorganometalnim modelnim sustavima. Ferocen je imao ulogu začetnika okreta, a uočene se vodikove veze između peptidnih lanaca s valinom, koje rezultiraju strukturama nalik  $\beta$ -nabranim ploham [7].

### **2.1.3. Važnost i uloga valina**

Valin je aminokiselina koja pripada skupini aminokiselina razgranatog lanca (engl. *Branched Chain Amino Acid*, BCAA) koje su gradivni elementi svih oblika života te djeluju kao signalne molekule aktivirajući različite metaboličke procese – od sinteze proteina do izlučivanja inzulina. Čak i manje promjene u metabolizmu BCAA uzrokuju brojne bolesti, uključujući dijabetes, rak i zatajenje srca [8].

Valin je nužan za samoobnovu i održavanje hematopoetskih matičnih stanica, do te mjere da se hematopoetske matične stanice ne mogu proliferirati u uvjetima nedostatka valina. Također, sugerirano je održavanje valina na potrebnoj razini kako bi se smanjile komplikacije kod transplantacije takvih stanica [9].

Reverzna transkriptaza humane telomerase sadrži očuvani slijed peptida u kojem valin ima ključnu ulogu vezanja i procesiranja nukleotida. Uklanjanje valina s njegovog položaja dovodi do značajne promjene u aktivnosti enzima što implicira da je valin ključan u točnosti i učinkovitosti ugradnje nukleotida [10].

Valin ima i ključnu ulogu u strukturnoj stabilnosti pojedinih enzima. Ribonukleaze su enzimi koji kataliziraju razgradnju RNA molekula, a ribonukleaza A je jedna od najprimjenjivijih nukleaza u istraživanjima. Zamjenom valina u pojedinoj regiji ribonukleaze A istraživao se utjecaj te aminokiseline na stabilizaciju molekule i na taj način se pokazalo kako hidrofobni ostatak valina ima ključnu ulogu za stabilnost navedenog enzima [11].

Nadalje, istraživao je periferin – membranski protein lokaliziran na organelima osjetljivim na svjetlost fotoreceptorskih stanica čija se mutacija povezuje s teškim oblicima gubitka vida. Iz

tog razloga, istraživana je sinteza tog proteina i uočeno je kako je pojedinačni ostatak valina na određenoj poziciji esencijalan za ovaj protein. Valin na traženoj poziciji je nezamjenjiv i visoko očuvan u svim vrstama, pa je ta aminokiselina od funkcionalne važnosti u periferinu [12].

Valin, uz tirozin, tvori peptid angiotensin-(3-4) koji ima snažan utjecaj na homeostazu tjelesnih tekućina djelovanjem na aktivne transportere  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Na}^{2+}$  bubrežnih kanalića, radi čega se istražuje njegova terapijska primjena [13]. Sadržan je u proteinima sirutke koji stimuliraju povećanje unosa glukoze u mišićima što rezultira većim sadržajem glikogena u skeletnim mišićima [14].

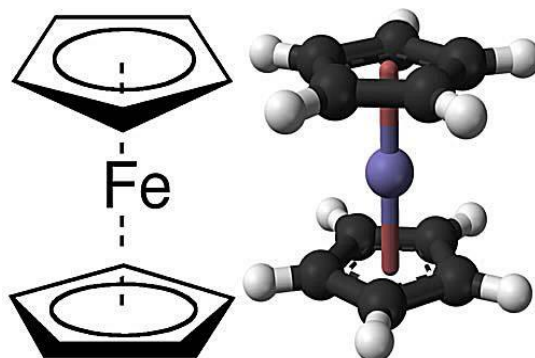
U slučajevima srpaste anemije i inzulinske rezistencije valin djeluje štetno. Srpasta anemija je nasljedna bolest uzrokovana mutacijom u genu HBB koji kodira za  $\beta$ -podjedinicu hemoglobina, a uzrokuje ju supstitucija adenina s timinom, što dovodi do zamjene glutaminske kiseline s valinom. Kako je valin hidrofobna aminokiselina, dolazi do promjene u agregaciji hemoglobina [15].

Dokazano je kako su aminokiseline razgranatog lanca, u koje spada i valin, povezane s razvitkom inzulinske rezistencije. Otkriveno je da se nusprodukt metabolizma valina (3-hidroksi-izobutirat, 3-HIB) izlučuje iz mišićnih stanica, aktivira transport masnih kiselina i stimulira akumulaciju lipida u mišićima, što dovodi do inzulinske rezistencije. To stanje može dovesti do pojave dijabetesa [16].

## 2.2. Ferocen i organometalna kemija

Godine 1951., reakcijom ciklopentadienilmagnezijevog-bromida sa željezovim (II) kloridom, prvi je puta pripremljen novi spoj okarakteriziran izvanrednom stabilnošću pripisanom diciklopentadienilnoj strukturi povezanoj s ionom željeza, molekulske formule  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Fe}$  (Slika 4) [17]. Ispravna struktura predložena je godinu kasnije [18,19], a spoj je nazvan ferocenom radi sličnosti njegovih karbocikličkih prstenova s benzenom [20]. Otkriće ferocena, kao i potpuno razjašnjavanje njegove aromatske "sendvič" strukture, dovelo je do bržeg razvitka organometalne kemije – znanstvene discipline na granici organske i anorganske kemije koja istražuje spojeve koji sadrže metal-ugljik vezu. Također, spajanjem organometalne kemije i biokemije, razvija se bioorganometalna kemija koja proučava konjugate organometalnih spojeva i biomolekula (aminokiseline, peptida, ugljikohidrata, DNA...) [1].

Upravo radi svoje strukture, stabilnosti do 400 °C (talište na 172,5 °C), reaktivnosti kao elektrofil, reverzibilne oksidacije, stabilnosti na zraku, dobre topivosti u organskim otapalima i mogućnosti tvorbe različitih derivata, ferocen je postao ikonom organometalne kemije. To je učinilo ferocen predmetom mnogih istraživanja što je rezultiralo s više od 18000 publikacija i njegovom primjenom u biomedicini, elektrokatalizi, industriji polimera, biosenzora, baterija i materijala i nanomedicini [21].

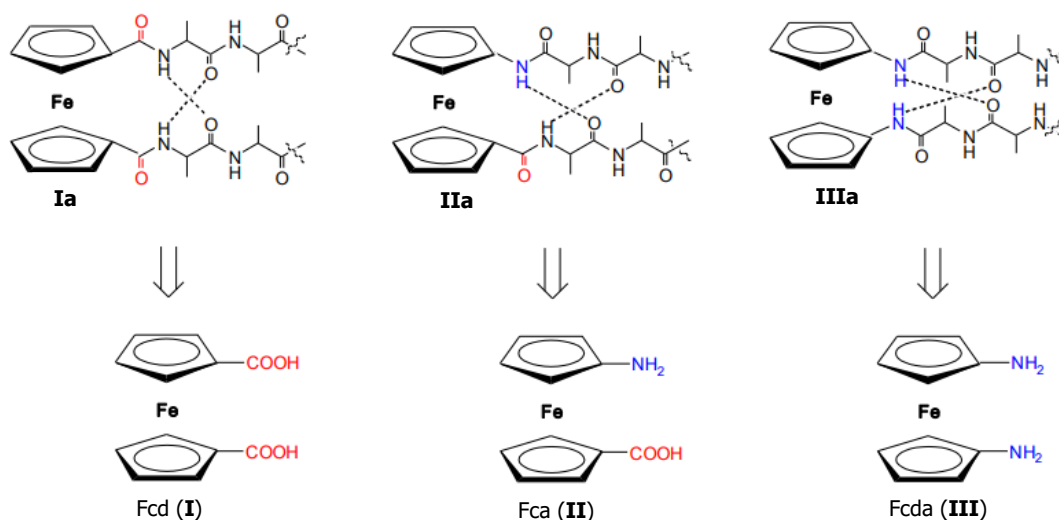


**Slika 4.** Strukturna formula i 3D struktura molekule ferocena

Tako je, na primjer, otkriveno izraženo antitumorsko i antiproliferativno djelovanje ferocenskih spojeva na melanom B16, Lewisov plućni karcinom i na različite humane tumore [22], te antimikrobno djelovanje prema Gram-pozitivnim bakterijama antibiotika (penicilin, cefalosporin i rifamicin) modificiranih ferocenom [23,24]. Koristi se u bioorganometalnoj kemiji radi lipofilnosti koja omogućava prolazak kroz stanične membrane, strukturne raznolikosti, mogućnost razmjene liganda, redoks i katalitičkih svojstava, stabilnosti i niske toksičnosti [25], a cilj je razviti učinkovite i primjenjive lijekove. Tako je razvijen ferocifen, terapeutik sintetiziran po uzoru na tamoksifen i hidroksitamoksifen koji se koriste u terapiji raka dojke, koji također pokazuje mogućnost takve primjene [26]. Analози ferocena sintetizirani su i radi pojave rezistencija na poznate antimalarične lijekove, pa su istraživani lijekovi poput feroklorokina, koji su pokazali tražena svojstva [27,28].

### 2.2.1. Ferocenski konjugati s aminokiselinama

Priprava složenijih ferocenskih molekula, u svrhu istraživanja tvorbe uređenih struktura i priprave peptidomimetika, započinje od ferocenskih prekursora. Umetanjem ferocenskih kalupa u peptidne strukture usmjerava se tvorba različitih elemenata složene sekundarne strukture. Ovisno o građi tih kalupa, ferocenske biokonjugate moguće je tvoriti iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (Fcd, **I**), 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca, **II**) ili ferocen-1,1'-diamina (Fcda, **III**) kopulacijom s aminokiselinama (Slika 5) [2].



**Slika 5.** Ferocenski peptidi izvedeni iz Fcd (**I**), Fca (**II**) i Fcda (**III**) [2]

U ovom Završnom radu ishodišna molekula za sintezu spojeva **1-6** je 1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina (Fca, **II**). Potrebno je uočiti da konjugat **IIa** izveden iz Fca ima peptidne niti položene u antiparalelnom smjeru, za razliku od derivata **Ia** i **IIIa** čiji su lanci usmjereni paralelno usmjereni. Također, spojevi **IIa** sintetizirani su zamjenom prirodne aminokiseline organometalnom kiselinom Fca. Navedeni razlozi takve spojeve čine vjernim mimeticima peptida, u kojima bi Fca mogla služiti kao začetnik  $\beta$ -okreta [4].

Takvi produkti, nastali ugradnjom redoks-aktivnih organometalnih molekula u peptidne sekvence, pokazali su se primjenjivima u mnogim istraživanjima. Redoks potencijal ferocenske grupe pod utjecajem je sekundarne strukture peptida i strukturnih promjena nastalih vezanjem peptida. U takvim konjugatima blizina dvaju Cp-prstenova omogućuje nastajanje intramolekulske vodikove veze (IHB) između amidnih grupa estera aminokiseline suprotnih Cp-prstenova, što omogućuje strukturnu stabilnost. Kristalografska istraživanja disuptuiranih

ferocenskih derivata u kojima oba Cp-prstena sadrže estere aminokiselina ili peptida pokazuju snažne vodikove veze, a u nekim slučajevima tvore kiralne supramolekulske sustave. Na nastale intramolekulske vodikove veze ne utječu interakcije sa susjednim molekulama – čak ni prisutnost jakih vodikovih veza ne narušava nastale IHB [29].

Upotreba ferocenskih biokonjugata je raznolika. Njihova svojstva koriste se za osiguravanje odgovarajućih mjesta vezivanja, što rezultira izgradnjom umjetnih receptora za selektivno prepoznavanje. Mogućnosti trodimenzionalnih strukturnih tvorbi proteina koriste se u svrhu sinteze traženih molekularnih receptora. Također su derivati ferocena pokazivali svojstva kiralnih redoks-aktivnih receptora. Reakcije prijenosa elektrona učestale su u biološkim sustavima, a njihovi redoks centri su okruženi visoko uređenim strukturama polipeptida, koji kontroliraju strukturno uređenje redoks centara, a time i reakcije prijenosa elektrona. Takve reakcije istražuju se pomoću ferocenskih peptida. Ti biokonjugati primjenu nalaze i u peptidnim nukleinskim kiselinama (engl. *Peptide nucleic acid*, PNA), analogima DNA. Ulagani su znatni naponi u sintezu funkcionalnih derivata PNA, i očekuje se da će uvođenje redoks-aktivnih derivata ferocena pružati nova otkrića [30].

## 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 [31]. 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 HF<sub>254</sub>) uporabom smjesâ diklormetan/etil-acetat, diklormetan/metanol ili etilacetata kao eluensâ.

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

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

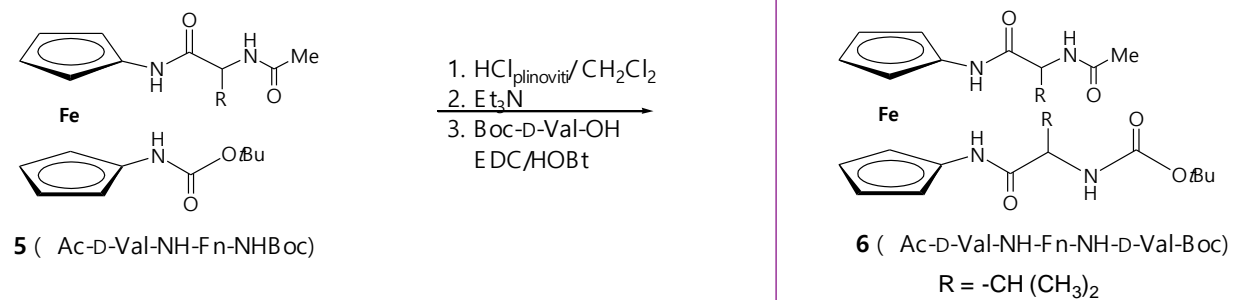
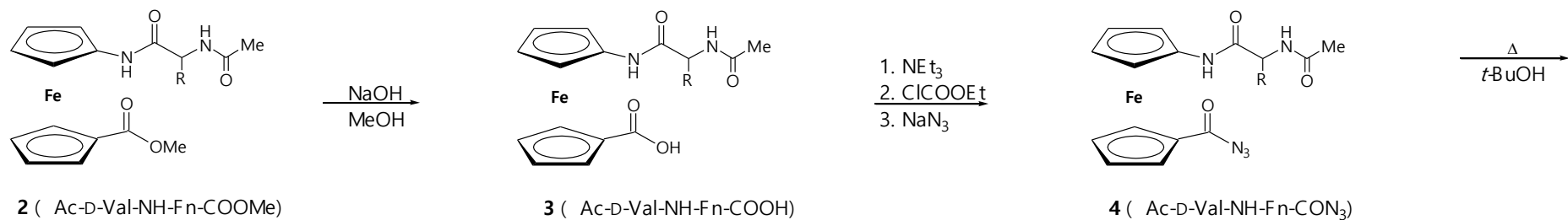
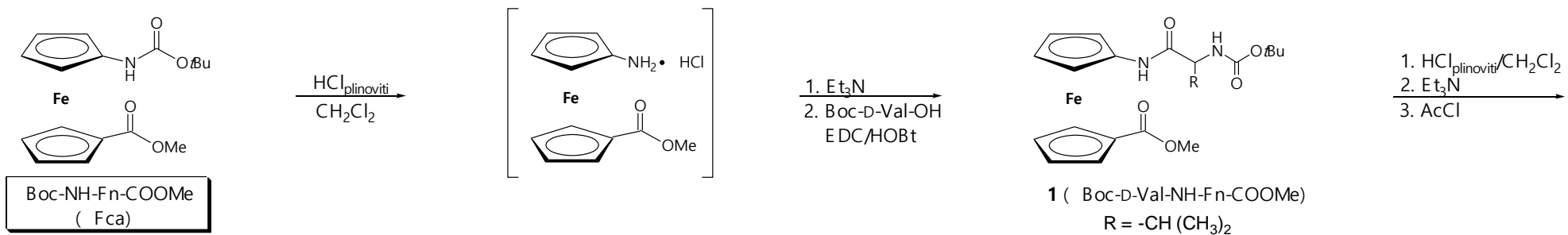
<sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR-spektri određeni su u CDCl<sub>3</sub> i [D<sub>6</sub>]-DMSO na spektrometrima Bruker AV300 ili Bruker AV600 uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard. <sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR-spektri baždareni su prema CDCl<sub>3</sub> (7.26 ppm, odnosno 77.16 ppm). Kemijski pomaci (δ) 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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i DMSO, te na kalijevu bromidu.

### 3.2. Postupak pripreve ferocenskih dipeptida

Ciljni ferocenski konjugat **6** pripremljen je iz Boc-NH-Fn-COOMe (Fca) postupcima prikazanim na shemi 1. Višestupanjska sinteza prekursora Boc-NH-Fn-COOMe (Fca) opisana je u literaturi [32].



**Shema 1.** Priprava biokonjugata **6**



### 3.2.1. Postupak pripreve peptida 1 Boc-D-Val-NH-Fn-COOMe

Prekursor Boc-NH-Fn-COOMe (Fca) (1 g, 2,8 mmol) otopi se u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> te obradi sa suviškom Et<sub>3</sub>N do pH~9. Dobiveni se slobodni amin kopulira s Boc-D-Val-OH (1,7 g, 7,6 mmol) primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon 48 sati miješanja pri sobnoj temperaturi, rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom NaHCO<sub>3</sub>, 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOAc = 5:1 kao eluens. Dobivena je narančasta smola (0,82 g, 64%).

**Boc-D-Val-NH-Fn-COOMe (1)** : R<sub>f</sub> = 0.79 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOAc = 10:1), t<sub>r</sub> = 139.4-143.1 °C. IR (CH<sub>2</sub>Cl) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> = 3422 sr (NH<sub>slobodni</sub>), 3324 sl (NH<sub>asocirani</sub>), 1710 j (C=O<sub>COOMe</sub>), 1683 j (C=O<sub>Boc</sub>), 1636 sr (C=O<sub>CONH</sub>), 1534 sr, 1498 sr, 1466 sr (amid II).

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ/ppm: 7,48 (s, 1H, NH<sub>Fn</sub>), 5,20 (d, J = 8,55 Hz, 1H, NH<sub>Boc</sub>), 4,74 (pt, 2H, H<sub>Fn</sub>), 4,65 (s, 1H, H<sub>Fn</sub>), 4,55 (s, 1H, H<sub>Fn</sub>), 4,38 (pt, 2H, H<sub>Fn</sub>), 4,03 (pt, 2H, H<sub>Fn</sub>), 3,96-3,93 (m, 1H, CH<sub>α-Val</sub>), 3,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-COOMe), 2,19 (s, 1H, CH<sub>β-Val</sub>), 1,46 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc), 1,02 (d, J = 6.8 Hz, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>γ-aVal</sub>), 0,98 (d, J = 6.9 Hz, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>γ-bVal</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ/ppm: 171,84 (CO<sup>a</sup><sub>Fn</sub>), 170,25 (CO<sup>b</sup><sub>Fn</sub>), 156,02 (CO<sub>Boc</sub>), 94,58 (C<sub>q</sub><sub>Fn</sub>), 77,01 (C<sub>q</sub><sub>Boc</sub>), 72,56 (CH<sub>Fn</sub>), 71,71 (C<sub>q</sub><sub>Fn</sub>), 71,15, 71,06, 66,55, 66,35, 63,33 (CH<sub>Fn</sub>), 63,06 (CH<sub>α-Val</sub>), 51,64 (CH<sub>3</sub>-COOMe), 30,51 (CH<sub>β-Val</sub>), 28,29 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc], 19,35 [(CH<sub>3</sub>)<sub>γ-aVal</sub>], 17,73 [(CH<sub>3</sub>)<sub>γ-bVal</sub>].

### 3.2.2. Postupak pripreve peptida 2 Ac-D-Val-NH-Fn-COOMe

U otopinu Boc-D-Val-NH-Fn-COOMe (**1**) (0,73 g, 1,84 mmol) u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) i otopi dodatkom Et<sub>3</sub>N (V=0,2 mL,

14,7 mmol) do pH~9. Nastaloj se otopini, ohlađenoj na 0 °C, uz miješanje oprezno dokapa AcCl (V=0,8 mL, 11 mmol). Nakon 15 minuta miješanja pri 0 °C, reakcija se prekine dodatkom vode. Potom se reakcijska smjesa više puta ekstrahira s CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Organski se sloj ispere zasićenom vodenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz EtOAc kao eluens.

**Ac-D-Val-NH-Fn-COOMe (2) : R<sub>f</sub> = 0.46 (EtOAc), t<sub>t</sub> = 145.8-148.7 °C. IR (CH<sub>2</sub>Cl) v<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> = 3421 sr (NH<sub>slobodni</sub>), 3287 sr, 3245 sr (NH<sub>asocirani</sub>), 1711 j (C=O<sub>COOMe</sub>), 1684 j, 1670 j, 1661 j (C=O<sub>CONH</sub>), 1569, 1559, 1540, 1517, 1508, 1490, 1466 (amid II)**

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm:** 8,2 (s, 1H, NH<sub>Fn</sub>), 6,49 (d, J = 9 Hz, 1H, NH<sub>Ac</sub>), 4,74 (pt, 2H, H<sub>Fn</sub>), 4,60 (pt, 2H, H<sub>Fn</sub>), 4,37 (pt, 2H, H<sub>Fn</sub>), 4,03 (pt, 2H, H<sub>Fn</sub>), 4,41 (t, J = 8,3 Hz, 1H, CH<sub>α-Val</sub>), 3,78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-COOMe), 2,19-2,13 (m, 1H, CH<sub>β-Val</sub>), 2,10 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 1,04 [d, J = 6,8 Hz, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>γ-aVal</sub>], 1,01 [d, J = 6,6 Hz, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>γ-bVal</sub>].

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm:** 171,97 (CO<sup>b</sup><sub>Fn</sub>), 170,49 (CO<sup>a</sup><sub>Fn</sub>), 170,09 (CO<sub>Ac</sub>), 94,76 (C<sub>qFn</sub>), 77,22, 77,02, 76,81, 72,59 (CH<sub>Fn</sub>), 71,80 (C<sub>qFn</sub>), 71,23, 71,06, 66,55, 66,43, 63,21 (CH<sub>Fn</sub>), 58,95 (CH<sub>α-Val</sub>), 51,67 (CH<sub>3</sub>-COOMe), 31,02 (CH<sub>β-Val</sub>), 23,39 (CH<sub>3</sub>-Ac), 19,36 [(CH<sub>3</sub>)<sub>γ-aVal</sub>], 18,32 [(CH<sub>3</sub>)<sub>γ-bVal</sub>].

### 3.2.3. Postupak pripreme peptida 3 Ac-D-Val-NH-Fn-COOH

U otopinu estera **2** (0,45 g, 1,13 mmol) u CH<sub>3</sub>OH (5 mL) doda se NaOH (45,2 mg, 1,13 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari.

**Ac-D-Val-NH-Fn-COOH (3) : R<sub>f</sub> = 0.79 (EtOAc), t<sub>t</sub> > 200°C. IR (CH<sub>2</sub>Cl) v<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> = 3417 sr (NH<sub>slobodni</sub>), 3280 sr, 3237 sr (NH<sub>asocirani</sub>), 3152-3056 š (OH, COOH), 1712 j, 1684 j, 1656 j (C=O<sub>COOH, CONH</sub>), 1574, 1540, 1521, 1478 (amid II).**

### 3.2.4. Postupak pripreve peptida 4 Ac-D-Val-NH-Fn-CON<sub>3</sub>

Otopini kiseline **3** (364 mg, 0,95 mmol) u acetonu doda se voda. Reakcijskoj se smjesi, ohlađenoj na 0 °C, dokapa otopina Et<sub>3</sub>N (111 mg, 1,1 mmol) u acetonu, te potom otopina ClCOOEt (77,1 mg, 0,71 mmol) u acetonu pazeći da temperatura ne prijeđe 5 °C. Nakon 30 minuta miješanja, doda se otopina NaN<sub>3</sub> (93 mg, 1,43 mmol) u vodi. Nakon 1h miješanja u ledenoj kupelji reakcijska se smjesa razrijedi hladnom vodom, ekstrahira s CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ispere 5%-tnom zasićenom otopinom NaHCO<sub>3</sub> i zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari do suha.

**Ac-D-Val-NH-Fn-CON<sub>3</sub> (4)** : R<sub>f</sub> = 0.54 (EtOAc). IR (CH<sub>2</sub>Cl)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  = 3426 sr (NH<sub>slobodni</sub>), 3334 sl (NH<sub>asocirani</sub>), 2136 j (N<sub>3</sub>), 1687 j, 1681 j (C=O<sub>CON<sub>3</sub></sub>, CONH), 1563, 1537, 1511, 1504, 1451 (amid II).

### 3.2.5. Postupak pripreve peptida 5 Ac-D-Val-NH-Fn-NH-Boc

Otopina azida **4** (78 mg, 0,19 mmol) u *tert*-butil-alkoholu (5 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.

**Ac-D-Val-NH-Fn-NHBoc (5)** : R<sub>f</sub> = 0.59 (EtOAc). IR (CH<sub>2</sub>Cl)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  = 3427 (NH<sub>slobodni</sub>), 3322 sl, 3311 sl, 3290 sl (NH<sub>asocirani</sub>), 1704 j, 1684 j, 1671 j (C=O<sub>CONH</sub>), 1630, 1507, 1457 (amid II).

### 3.2.6. Postupak pripreve peptida 6 Ac-D-Val-NH-Fn-NH-D-Val-Boc

Boc-zaštićeni peptid **5** (150 mg, 0,3223 mmol) otopi se u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> te obradi sa suviškom Et<sub>3</sub>N do pH~9. Dobiveni se slobodni amin kopulira s Boc-D-Val-OH (140 mg, 0,6446 mmol) primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon 1 sat miješanja pri sobnoj temperaturi

rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom  $\text{NaHCO}_3$ , 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom  $\text{NaCl}$ . Organski se sloj osuši bezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz  $\text{EtOAc}$  kao eluens.

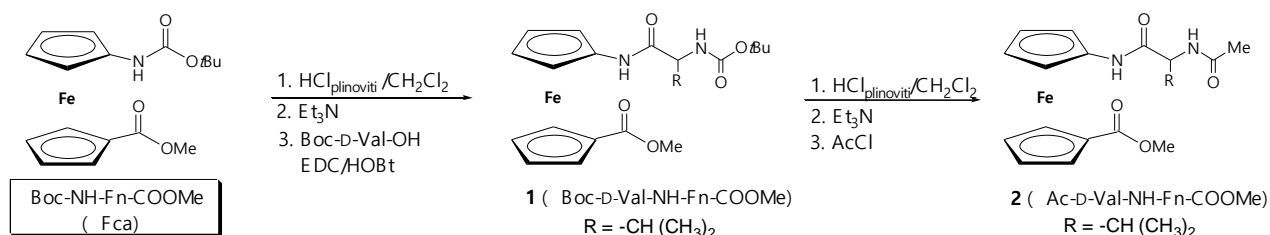
**Ac-D-Val-NH-Fn-NH-D-Val-Boc (6)** :  $R_f = 0.49$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOAc} = 5:1$ ). IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}$ )  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3434$  sr ( $\text{NH}_{\text{slobodni}}$ ), 3305 j, 3249 sr ( $\text{NH}_{\text{asocirani}}$ ), 1715 j, 1683 j, 1668 j, 1637 j ( $\text{C}=\text{O}_{\text{CONH}}$ ), 1571, 1540, 1505, 1458 (amid II).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Uvod

Proučavani ferocenski biokunjugati sintetizirani su kopulacijom 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca) s prirodnim aminokiselinama kako bi se utvrdio utjecaj ferocenskog kalupa i njegovih bočnih ogranaka na obrazac nastajanja intramolekulskih vodikovih veza (IHB). Nadogradnjom ferocenskog kalupa aminokiselinama inducirana je tvorba različitih strukturnih elemenata, budući da je razmak između ciklopentadienilnih prstenova molekule ferocena 3,3 Å što odgovara prosječnoj duljini vodikove veze [33]. Ferocenski dipeptidi (**1** i **2**) pripremljeni u ovom Završnom radu služe kao ishodišni dipeptidi za tvorbu ferocenskog tripeptida (**6**) koji će se koristiti u daljnjim istraživanjima.

Sinteza peptida **1** i **2** započeta je deprotekcijom amino-skupine iz Fca djelovanjem plinovitog HCl. Nakon obrade nastalog hidroklorida s Et<sub>3</sub>N uslijedila je kopulacija slobodnog ferocenskog amina s Boc-D-Val-OH primjenom standardne HOBt/EDC metode pri čemu su dobiveni peptidi **1** i **2** (Shema 2). Rezultirajući dipeptidi **1** i **2** dobiveni su u jako dobrom iskorištenju (70-80%) u obliku narančastih kristala.



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

Ulazak valinske podjedinice u peptidu **1** potvrđen je signalima protona bočnih ogranaka, tj. singletom CH<sub>β-Val</sub> skupine (δ = 2,19 ppm) te dubletima (CH<sub>3</sub>)<sub>γ-aVal</sub> (δ = 1,02 ppm), odnosno (CH<sub>3</sub>)<sub>γ-bVal</sub> (δ = 0,98 ppm) u <sup>1</sup>H NMR-spektru peptida **1**. Spomenute su skupine registrirane u <sup>13</sup>C NMR-spektru pri δ = 30,51 (CH<sub>β-Val</sub>), 19,35 [(CH<sub>3</sub>)<sub>γ-aVal</sub>], te 17,73 [(CH<sub>3</sub>)<sub>γ-bVal</sub>].

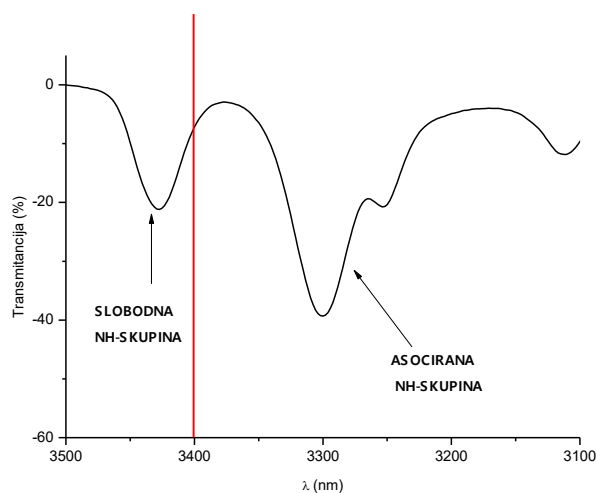
Prelazak karbamatne u acetamidnu skupinu očituje se u gubitkom singleta *tert*-butilnih protona pri δ = 1,46 ppm te javljanjem dubleta acetilnih protona pri δ = 2,10 ppm u njihovim <sup>1</sup>H-NMR-spektrima. U <sup>13</sup>C-NMR-spektrima ova se zamjena manifestira gubitkom signala karbonilnih i *tert*-

butilnih C-atoma pri  $\delta = 156,02$  ppm odnosno  $\delta = 28,29$  ppm te javljanjem novih signala pri  $\delta = 170,09$  ppm ( $\text{CO}_{\text{Ac}}$ ) i  $\delta = 23,39$  ppm ( $\text{CH}_{3\text{Ac}}$ ).

Pripravljene peptidi **1** i **2** podvrgnuti su konformacijskoj analizi infracrvenom spektroskopijom (IR), spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i cirkularnim dikroizmom (CD).

## 4.2. IR-spektroskopska analiza

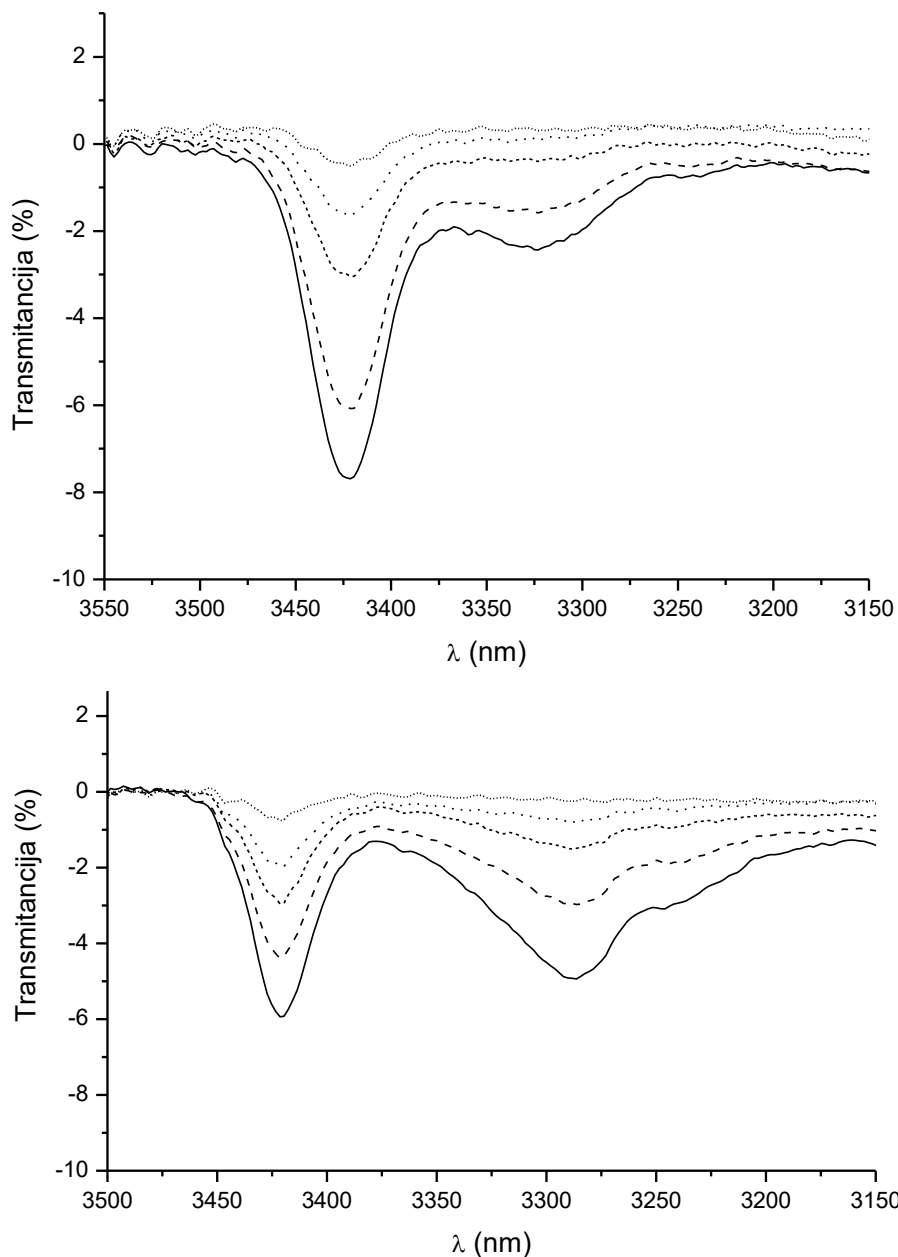
Konformacijska analiza dobivenih spojeva započeta je primjenom IR-spektroskopije. Ta instrumentalna metoda pruža uvid u sekundarnu strukturu polipeptida i proteina tako da mjeri valnu duljinu i intenzitet apsorpcije infracrvenog zračenja. Na taj se način identificiraju funkcijske skupine peptida te se dobiva pouzdan uvid u konformacijski prostor peptida u otopini [34]. Ukoliko su frekvencije istezanja NH-skupina prisutne u području nižem od  $3400\text{ cm}^{-1}$ , to ukazuje na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama (asocirane NH-skupine), dok se signali iznad  $3400\text{ cm}^{-1}$  pripisuju NH-skupinama koje ne sudjeluju u vodikovim vezama (slobodne NH-skupine) (Slika 6). Apsorpcijske vrpce karbonilnih esterskih skupina nađene ispod  $1730\text{ cm}^{-1}$  indiciraju njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.



**Slika 6.** Prikaz područja istezanja N-H veza u IR-spekttru [35]

U IR- spektru pripremljenih peptida **1** i **2** detektirane su vibracije istezanja slobodnih i asociраних NH-skupina. Peptid **1** iskazuje jači signal pri  $3422\text{ cm}^{-1}$  dok je signal asociране NH-skupine pri

3324  $\text{cm}^{-1}$  mnogo slabiji. Prevođenjem Boc-peptida **1** u Ac-peptid **2** dolazi do jačanja asocirane vrpce, što ukazuje na povećanje broja konformera koji sudjeluju u vodikovim vezama (Slika 7).



**Slika 7.** IR-spektri peptida Boc-D-Val-Fca-OMe (**1**) (*gore*) i peptida Ac-D-Val-Fca-OMe (**2**) (*dolje*) [snimljeni u  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , (—)  $c = 5 \times 10^{-2}$  M, (- - -)  $c = 2,5 \times 10^{-2}$  M, (----)  $c = 1,25 \times 10^{-2}$  M, (· · ·)  $c = 6,13 \times 10^{-3}$  M, (....)  $c = 3 \times 10^{-3}$  M]

Mjerenjem koncentracijski-ovisnih IR-spektara određuje se inter- ili intramolekulski karakter vodikove veze. Postupnim razrjeđivanjem otopine ispitivanog uzorka cijepaju se intermolekulske vodikove veze uslijed čega znatno opada intenzitet njihovih signala u području nižem od 3400  $\text{cm}^{-1}$ . Na potencijalno prisutne intramolekulske vodikove veze razrjeđivanje djeluje tako da se intenzitet vrpce slobodnih i asociраних NH-skupina proporcionalno smanjuje, odnosno da se njihov omjer ne mijenja.

Jaka indikacija stabilizacije konformacije peptida **1** i **2** vidljiva je iz podjednagog slabljenja omjera intenziteta slobodne i asociране NH-skupine (Slika 7) što je omogućeno tvorbom intramolekulskih vodikovih veza (IHB).

### 4.3. NMR-spektroskopska analiza

NMR-spektroskopija je najmoćnija spektroskopska metoda za određivanje strukture molekula, a u peptidnoj kemiji omogućuje razlikovanje slobodnih i asociраних NH-skupina. Sudjelovanje u vodikovim vezama određuje se pomoću kemijskog pomaka, pri čemu pomaci iznad 7 ppm (slabije polje) odgovaraju NH-skupinama uključenima u vodikovu vezu, odnosno asociраним NH-skupinama.

Visoki kemijski pomaci NH-skupina vezanih za ferocensku jezgru u peptidima **1** i **2** podržavaju vodikove veze indicirane nalazima IR-spektroskopije. NH-skupina iz Boc, odnosno Ac-zaštite registrirana je pri višem polju u  $^1\text{H}$  NMR-spektru (Tablica 1).

**Tablica 1.** Kemijski pomaci ( $\delta/\text{ppm}$ )<sup>[a]</sup> amidnih protona biokonjugata **1** i **2**

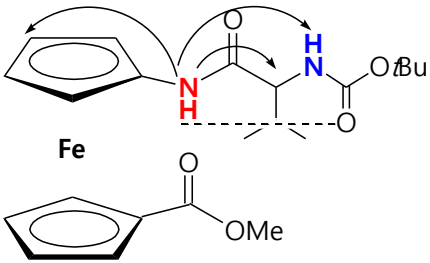
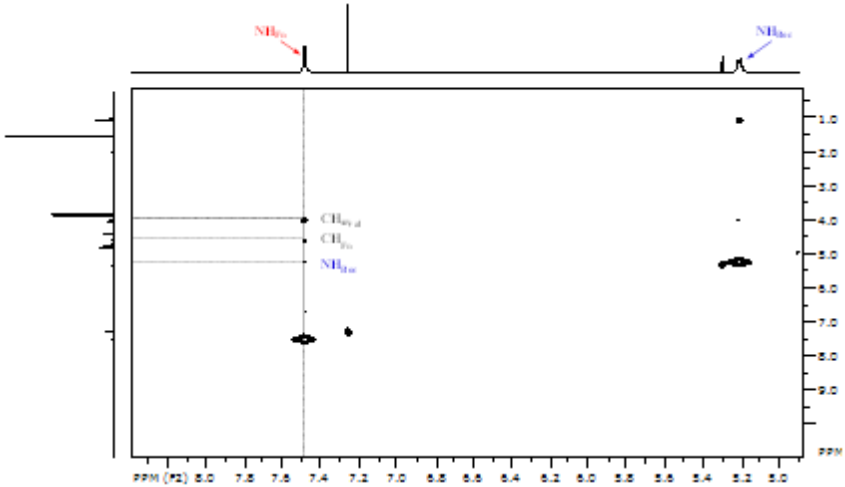
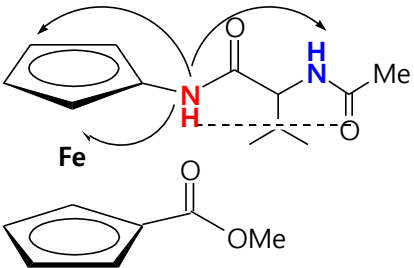
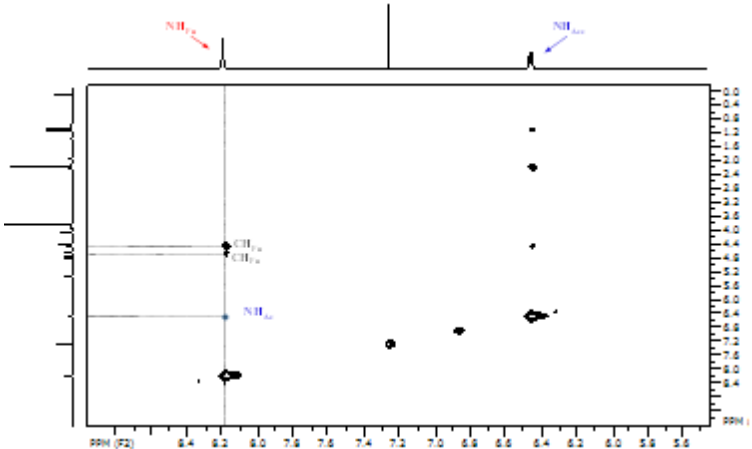
| Spoj     | Formula           | $\delta$ ( $\text{NH}_{\text{Boc/Ac}}$ ) | $\delta$ ( $\text{NH}_{\text{Fn}}$ ) |
|----------|-------------------|--|--------------------------------------|
| <b>1</b> | Boc-D-Val-Fca-OMe | 5,20                                     | 7,48                                 |
| <b>2</b> | Ac-D-Val-Fca-OMe  | 6,49                                     | 8,2                                  |

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



Kako bi se dodatno rasvijetlio obrazac IHB, istraženi su i NOE-kontakti amidnih skupina koje sudjeluju u vodikovim vezama (Tablica 2). Poznato je da se određivanje peptidnih sekundarnih strukturnih elemenata temelji na analizi  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOE kontakata u NOESY NMR-spektrima peptida.

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

| Mogući konformeri   | NOE kontakti   |
|---|--|
|  <p data-bbox="172 951 607 982"><b>1</b> ( Boc-D-Val-NH-Fn-COOMe)</p>    |   |
|  <p data-bbox="172 1503 594 1535"><b>2</b> ( Ac-D-Val-NH-Fn-COOMe)</p> |  |

Uzimajući u obzir kemijski pomak  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  ( $\delta > 7$  ppm) te njegov NOE-kontakt s *tert*-butilnom skupinom može se pretpostaviti i tvorba  $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$  IHB ( $\gamma$ -okret). Može se primijetiti da promjena karbamatne u acetamidnu skupinu ne dovodi do promjene obrasca vodikovih veza, budući da kontakti pronađeni u NOESY-spektru podržavaju tvorbu 7-članog prstena.

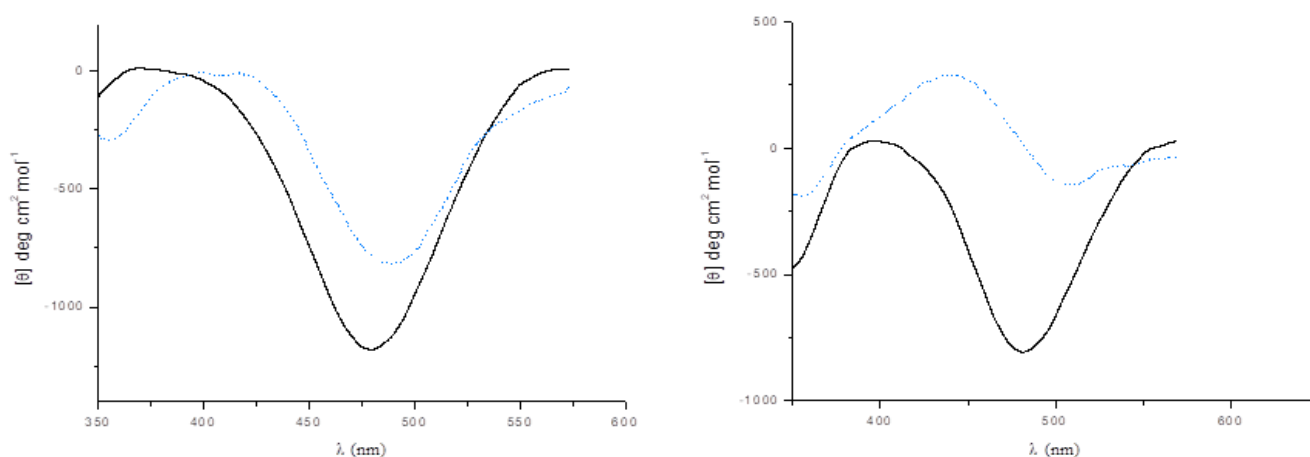
#### 4.4. CD-spektroskopska analiza

Cirkularni dikroizam (CD) je spektroskopska metoda koja se koristi za identifikaciju elemenata sekundarne strukture i određivanje konformacijskih promjena kiralnih proteina [36]. Za tvorbu kiralnih struktura potrebne su jake IHB i takvo kiralno peptidno okruženje ferocenskih peptida omogućuje indukciju jakog Cottonovog efekta u području ferocenskog kromofora ( $\lambda \sim 470$  nm) [37]. Intralančane vodikove veze u otopinama monosupstituiranih kiralnih ferocenskih peptida induciraju uređene strukture ispitanih peptida u otopini koje se detektiraju CD-signalom u ferocenskom području (Tablica 3).

**Tablica 3.** UV/Vis-signali i Cottonovi efekti Boc- i Ac-dipeptida **1** - **2**

| Spoj     | Formula               | $\lambda_{\max}$ / nm | $[\theta]$ / deg cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> |
|----------|-----------------------|-----------------------|---|
| <b>1</b> | Boc-D-Val-NH-Fn-COOMe | 477                   | -1190   |
| <b>2</b> | Ac-D-Val-NH-Fn-COOMe  | 480                   | -813  |

Prisutnost IHB, pretpostavljenih NMR-spektroskopijom, potvrđuje i očuvanje CD-aktivnosti nakon titracije s kompeticijskim otapalom (DMSO).



**Slika 8.** CD-spektri dipeptida **1** (lijevo) i **2** (desno) u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [ $c = 5 \times 10^{-3}$ M (puna crta)] i uz dodatak 20 % DMSO (isprekidana crta)

Srednje jaki pozitivni Cottonovi efekti u CD-spektrima dipeptida **1** i **2** u području ferocenskog kromofora potvrđuju uređenu kiralnu okolinu. Za razliku od heterokiralnog peptida **2** kod kojeg dodatak DMSO uzrokuje nešto zamjetnije slabljenje Cottonova efekta (16%), dodatak DMSO gotovo ne utječe na jakost CD-signalu (5%) homokiralnog peptida **1** što ukazuje na njegovu stabilizaciju jačim IHB (Slika 8).

## 5. ZAKLJUČCI

- Peptidi **1** i **2** pripremljeni su standardnim metodama u jako dobrom iskorištenju (70-80%)
- Struktura spojeva potvrđena je IR- i NMR-spektroskopijom ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY- NOESY-spektroskopija).
- IR-spektroskopijom peptida **1** i **2** utvrđeno je postojanje dviju vrpca koje odgovaraju NH-slobodnim i asociranim skupinama.
- Razrjeđivanjem diklormetanske otopine peptida Boc-D-Val-NH-Fn-COOMe (**1**) i Ac-D-Val-NH-Fn-COOMe (**2**) ne dolazi do signifikantnog smanjenja omjera intenziteta slobodne i asocirane NH-skupine što upućuje na tvorbu jakih intramolekulskih vodikovih veza (IHB).
- Visok kemijski pomak NH-skupina (8,2 ppm) upućuje na sudjelovanje navedenih amidnih protona u vodikovim vezama.
- NOE-kontakti amidnih skupina peptida **1** i **2** ( $\text{NH}_{\text{Fn}}$  i  $\text{NH}_{\text{Boc/Ac}}$ ) sugeriraju tvorbu intralančane  $\text{NHFn}\cdots\text{OCBoc}$  IHB koja rezultira 7-članim prstenom, odnosno  $\gamma$ -okretom.
- Terminalna zaštitna skupina (Boc- ili Ac-) peptida **1** i **2** nema utjecaja na obrazac IHB.

## 6. POPIS LITERATURE

- [1] Rapić, V., Čakić Semenčić, M. (2011) I. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocen i metalni karbonili. *Kemija u industriji* **60(2)**: 61–79.
- [2] Kovačević, M. (2014) Ferocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima, Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- [3] Stryer, L. (1991) Biokemija, 2. izd., (preveli S. Vuk-Pavlović i Ž. Kućan), Školska knjiga, Zagreb, str. 25-33.
- [4] Rapić, V., Kovačević, M. (2012) III. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocenski peptidi. *Kemija u industriji* **61(2)**: 71–120.
- [5] <<https://content.byui.edu/file/a236934c-3c60-4fe9-90aa-d343b3e3a640/1/module3/readings/proteins.html>> Pristupljeno 17. srpnja 2021.
- [6] Stryer, L., Tymoczko, J. L., Berg, J. M. (2002) Biochemistry, 5th edition: 86-97.
- [7] Beheshti, S., Lataifeh, A., Kraatz, H. B. (2011) Hydrogen-bonding interactions in ferrocene-peptide conjugates containing valine. *Journal of Organometallic Chemistry* **696(5)**: 1117–1125.
- [8] Neinast, M., Murashige, D., & Arany, Z. (2018) Branched Chain Amino Acids. *Annual Review of Physiology* **81(1)**: 139-164.
- [9] Taya, Y., Ota, Y., Wilkinson, A. C., Kanazawa, A., Watarai, H., Kasai, M., Nakauchi, H., Yamazaki, S. (2016) Depleting dietary valine permits nonmyeloablative mouse hematopoietic stem cell transplantation. *Science* **354(6316)**: 1152–1155.
- [10] Drosopoulos, W. C., i Prasad, V. R. (2007) The active site residue Valine 867 in human telomerase reverse transcriptase influences nucleotide incorporation and fidelity. *Nucleic Acids Research* **35(4)**: 1155–1168.
- [11] Coll, M. G., Protasevich, I. I., Torrent, J., Ribó, M., Lobachov, V. M., Makarov, A. A., Vilanova, M. (1999) Valine 108, a Chain-Folding Initiation Site-Belonging Residue, Crucial for the Ribonuclease A Stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **265(2)**: 356–360.

- [12] Salinas, R. Y., Baker, S. A., Gospe, S. M., Arshavsky, V. Y. (2013) A Single Valine Residue Plays an Essential Role in Peripherin/rds Targeting to Photoreceptor Outer Segments. *PLoS ONE* **8(1)**: 1-7.
- [13] Dias, J., Axelband, F., Lara, L. S., Muzi-Filho, H., Vieyra, A. (2017) Is angiotensin-(3–4) (Val-Tyr), the shortest angiotensin II-derived peptide, opening new vistas on the renin–angiotensin system?. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* **18(1)**: 1-7.
- [14] Morifuji, M., Koga, J., Kawanaka, K., Higuchi, M. (2009) Branched-Chain Amino Acid-Containing Dipeptides, Identified from Whey Protein Hydrolysates, Stimulate Glucose Uptake Rate in L6 Myotubes and Isolated Skeletal Muscles. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **55(1)**: 81–86.
- [15] Kato, G. J., Piel, F. B., Reid, C. D., Gaston, M. H., Ohene-Frempong, K., Krishnamurti, L., Smith, W.R., Panepinto, J. A., Weatherall, D.J., Costa, F. F., Vichinsky, E. P. (2018) Sickle cell disease. *Nature Reviews Disease Primers* **4**: 1-22.
- [16] Jang, C., Oh, S. F., Wada, S., Rowe, G. C., Liu, L., Chan, M. C., Rhee, J., Hoshino, A., Kim, B., Ibrahim, A., Baca, L. G., Kim, E., Ghosh C. C., Parikh, S. M., Jiang, A., Chu, Q, Forman, D. E., Lecker, S. H., Krishnaiah, S., Rabinowitz, J. D., Weljie, A. M., Baur, J. A., Kasper, D. L., Arany, Z. (2016) A branched-chain amino acid metabolite drives vascular fatty acid transport and causes insulin resistance. *Nature Medicine* **22(4)**: 421–426.
- [17] Kealy, T. J., Pauson, P. L. (1951) A New Type of Organo-Iron Compound. *Nature*: **168(4285)**: 1039–1040.
- [18] Wilkinson, G., Rosenblum, M., Whiting, M. C., Woodward, R. B. (1952) The structure of iron bis-cyclopentadienyl. *Journal of the American Chemical Society* **74(8)**: 2125–2126.
- [19] Fischer, E. O., Pfab, W. Z. (1952) Cyclopentadien-Metallkomplexe, ein neuer Typ metallorganischer Verbindungen. *Naturforsch* **7b**: 377-379.
- [20] Woodward, R. B., Rosenblum, M., Whiting, M. C. (1952) A new aromatic system. *Journal of the American Chemical Society* **74(13)**: 3458–3459.
- [21] Astruc, D. (2016) Why is Ferrocene so Exceptional?. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2017(1)**: 6–29.

- [22] Köpf-Maier, P., Köpf, H. (1987) Non-platinum group metal antitumor agents: History, current status, and perspectives. *Chemical Reviews* **87(5)**: 1137–1152.
- [23] Scutaru, D., Mazilu, I., Vâță, M., Tătaru, L., Vlase, A., Lixandru, T., Simionescu, C. (1991) Heterodisubstituted derivatives of ferrocene: Ferrocene-containing penicillins and cephalosporins. *Journal of Organometallic Chemistry* **401(1-2)**: 87–90.
- [24] Scutaru, D., Tataru, L., Mazilu, I., Vata, M., Lixandru, T., Simionescu, C. (1993) Contributions to the synthesis of some ferrocene-containing antibiotics. *Applied Organometallic Chemistry* **7(4)**: 225–231.
- [25] Gasser, G., Metzler-Nolte, N. (2012) The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology* **16(1-2)**: 84–91.
- [26] Top, S., Vessières, A., Leclercq, G., Quivy, J., Tang, J., Vaissermann, J., Huche, M., Jaouen, G. (2003) Synthesis, Biochemical Properties and Molecular Modelling Studies of Organometallic Specific Estrogen Receptor Modulators (SERMs), the Ferrocifens and Hydroxyferrocifens: Evidence for an Antiproliferative Effect of Hydroxyferrocifens on both Hormone-Dependent and Hormone-Independent Breast Cancer Cell Lines. *Chemistry - A European Journal* **9(21)**: 5223–5236.
- [27] Biot, C., Glorian, G., Maciejewski, L. A., Brocard, J. S., Domarle, O., Blampain, G., Millet, P., Georges, A. J., Abessolo, H., Dive, D., Lebibi, J. (1997) Synthesis and Antimalarial Activity in Vitro and in Vivo of a New Ferrocene–Chloroquine Analogue. *Journal of Medicinal Chemistry* **40(23)**: 3715–3718.
- [28] Biot, C., Caron, S., Maciejewski, L. A., i Brocard, J. S. (1998) Synthesis and characterisation of a double deuterium-labelled ferrochloroquine. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **41(10)**: 911–918.
- [29] Appoh, F. E., Sutherland, T. C., Kraatz, H.-B. (2004) Changes in the hydrogen bonding pattern in ferrocene peptides. *Journal of Organometallic Chemistry* **689(25)**: 4669–4677.
- [30] Moriuchi, T., Hirao, T. (2006) Ferrocene–Peptide Bioconjugates. *Bioorganometallic Chemistry* **17**: 143–175.
- [31] Perrin D. D., Armarego W. L. F. (1998) Purification of laboratory chemicals, Pergamon Press.

- [32] 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.
- [33] Karle, I. L. (1999) Hydrogen bonds in molecular assemblies of natural, synthetic and 'designer' peptides. *J. Mol. Struct.* **474**: 103–112.
- [34] Kong J., Yu S. (2007) Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **39**: 549-559.
- [35] Stipčić, T. (2020) Priprava i konformacijska analiza ferocenskih tripeptida Ala-Pro sekvence izvedenih iz ferocen-1,1'- diamina, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
- [36] Pelton J. T., McLean L. R. (2000) Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure. *Analytical Biochemistry* **277**: 167-176.
- [37] 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.



## Izjava o izvornosti

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

*Mara Širić*

ime i prezime studenta