

Sinteza i konformacijska analiza ferocenskih dipeptida izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina s fenilalaninom i alaninom

Radešić, Evelin

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:118872>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2024.

Evelin Radešić

**SINTEZA I KONFORMACIJSKA ANALIZA
FEROCENSKIH DIPEPTIDA IZVEDENIH IZ
FEROCEN-1,1'-DIAMINA S
FENILALANINOM I ALANINOM**

Rad je izrađen u Laboratoriju za organsku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Monike Kovačević.

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) čija je voditeljica prof. dr. sc. Lidija Barišić.



Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Moniki Kovačević na stručnim savjetima, podršci i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se kolegi Maju, tvoje prijateljstvo i podrška učinili su moje studentske dane znatno lakšim i ljepšim.

Hvala mojoj mami na podršci i razumijevanju tijekom cijelog studiranja. Posebno hvala mojoj sestri Niki. Hvala ti što si uvijek bila moj oslonac i podrška, tvoja neizmjerena ljubav dala mi je snagu u najtežim trenucima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

SINTEZA I KONFORMACIJSKA ANALIZA FEROCENSKIH DIPEPTIDA IZVEDENIH IZ FEROCEN-1,1'-DIAMINA S FENILALANINOM I ALANINOM

Evelin Radešić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058211704

Sažetak:

Recentna znanstvena istraživanja pokazuju važnost ferocena kao začetnika okreta u peptidomimeticima, s obzirom da umetanje ferocenskog kalupa u peptide diktira usmjerenost peptidnog lanca i utječe na njegovu rigidnost, ovisno o obrascu uspostavljenih intramolekulskih vodikovih veza. Heteroanularno disupstituirani feroceni čiji su ciklopentadienilni prstenovi udaljeni oko 3,3 Å (što odgovara prosječnoj duljini vodikove veze), predstavljaju molekulske kalupe za indukciju okreta i struktura sličnih β -pločama, u njihovim konjugatima s prirodnim aminokiselinama.

U ovom radu opisana je priprava homokiralnog dipeptida Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (**6**) te utjecaj ferocenskog kalupa i kiralnosti peptidne okosnice na uspostavu intramolekulskih vodikovih veza. Strukturna i konformacijska analiza dipeptida **6** provedena je mjerenjem koncentracijski- i temperaturno-ovisnih IR i NMR spektara, CD-spektara te titracijom NMR i CD uzoraka s DMSO.

Ključne riječi: ferocen, peptidomimetici, fenilalanin, alanin, konformacijska analiza

Rad sadrži: 40 stranica, 24 slike, 2 tablice, 33 literaturnih navoda, 4 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Monika Kovačević

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Lidija Barišić (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Monika Kovačević (mentor)
3. doc. dr. sc. Anita Horvatić (član)
4. izv. prof. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino (zamjenski član)

Datum obrane: 9. srpnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

SYNTHESIS AND CONFORMATIONAL ANALYSIS OF FERROCENE DIPEPTIDES
DERIVED FROM FERROCENE-1,1'-DIAMINE WITH PHENYLALANINE AND ALANINE

Evelin Radešić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058211704

Abstract:

Recent scientific research highlights the importance of ferrocene as a turn inducer in peptidomimetics, as the incorporation of a ferrocene template into peptides dictates the orientation of the peptide chain and influences its rigidity, depending on the pattern of established intramolecular hydrogen bonds. Heteroannular disubstituted ferrocenes, whose cyclopentadienyl rings are approximately 3.3 Å apart (corresponding to the average length of a hydrogen bond), provide molecular templates for inducing turns and β -sheet-like structures in their conjugates with natural amino acids.

This work describes the preparation of the homochiral dipeptide Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (**6**) and the influence of the ferrocene template and the chirality of the peptide backbone on the establishment of intramolecular hydrogen bonds. The structural and conformational analysis of dipeptide **6** was performed by measuring concentration- and temperature-dependent IR and NMR spectra, CD spectra, and by titration of NMR and CD samples with DMSO.

Keywords: *ferrocene, peptidomimetics, phenylalanine, alanine, conformational analysis*

Thesis contains: 40 pages, 24 figures, 2 tables, 33 references, 4 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Monika, Kovačević, PhD, Associate professor

Reviewers:

1. Lidija, Barišić, PhD, Full professor (president)
2. Monika, Kovačević, PhD, Associate professor (mentor)
3. Anita, Horvatić, PhD, Assistant professor (member)
4. Antonela, Ninčević Grassino, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: July 9th, 2024

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Bioorganometalna kemija	2
2.2. Ferocen.....	3
2.3. Peptidi i proteini	4
2.4. Peptidomimetici.....	7
2.5. Alanin.....	9
2.6. Fenilalanin	9
2.7. Ferocenski konjugati s aminokiselinama	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Materijali i metode	15
3.2. Postupak pripreve ferocenskih dipeptida	16
3.2.1. Priprava peptida Boc-D-Ala-NH-Fn-COOMe (1)	19
3.2.2. Priprava Ac-D-Ala-NH-Fn-COOMe (2).....	20
3.2.3. Priprava Ac-D-Ala-NH-Fn-COOH (3)	20
3.2.4. Priprava Ac-D-Ala-NH-Fn-CON ₃ (4)	21
3.2.5. Priprava Ac-D-Ala-NH-Fn-NHBoc (5)	21
3.2.6. Priprava Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (6) i Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (7).....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. Uvod	23
4.2. Priprava homokiralnog dipeptida Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (6)	23
4.3. Kristalografska analiza Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (6)	24
4.4. IR-spektroskopska analiza	25
4.5. NMR-spektroskopska analiza.....	28
4.6. Titracija s DMSO	33
4.7. CD-spektroskopska analiza.....	34
5. ZAKLJUČCI	37
6. LITERATURA	38

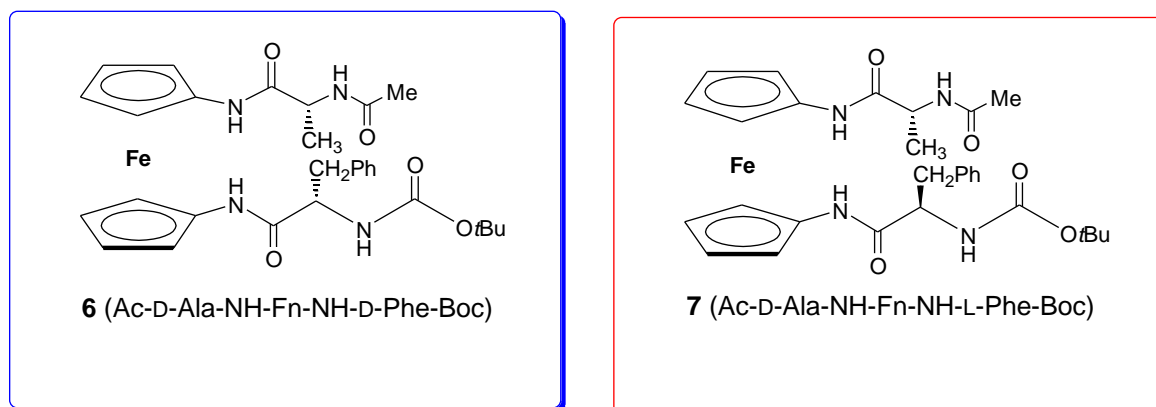
1. UVOD

Ovaj diplomski rad obuhvaća dio istraživanja koja se provode u sklopu interdisciplinarnog istraživačkog projekta "Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija". Po svojoj tematici uklapa se u područja bioorganometalne kemije i peptidomimetika.

Bioorganometalna kemija propulzivna je grana kemije koja proučava biološki aktivne komplekse u kojima su organometalni ligandi i biomolekule povezani vezom ugljik-metal. Biokonjugati organometalnih spojeva i biomolekula (DNA, ugljikohidrata, steroida, aminokiselina, peptida) primjenjuju se u terapiji karcinoma i zaraznih bolesti, imunotestovima, molekulskom prepoznavanju, enzimskoj katalizi i toksikologiji (1,2).

Peptidomimetici su peptidni ili nepeptidni spojevi koji oponašaju svojstva i biološku aktivnost prirodnih peptida zahvaljujući svojim sekundarnim strukturnim elementima koji su analogni prirodnim peptidima (3). Da bi se ograničila konformacijska sloboda, a samim time i interakcije peptida s neželjenim receptorima, pripremaju se njihovi mimetici i to umetanjem rigidnih kalupa, kao što je primjerice organometalni spoj ferocen. Kao učinkoviti bioorganometalni kalupi mogu poslužiti 1,1'-disupstituirani feroceni koji potiču kiralno uređenje izvedenih peptida (4).

Cilj ovog diplomskog rada bila je sinteza i konformacijska analiza ferocenskih dipeptida **6** i **7** [Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D(L)-Phe-Boc, Fn = ferocenilen, Ac = acetil, Boc = *tert*-butoksikarbonil] (slika 1) izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda) te aminokiselina alanin i fenilalanin. Konformacijska analiza dipeptida **6** provedena je standardnim spektroskopskim metodama (IR, NMR i CD spektroskopija) kako bi se utvrdila očekivana tvorba intramolekulskih vodikovih veza (IHB, engl. *Intramolecular Hydrogen Bond*) između peptidnih lanaca.



Slika 1. Strukture ferocenskih dipeptida **6** i **7**

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bioorganometalna kemija

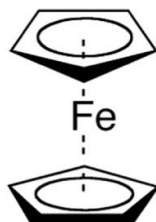
Bioorganometalna kemija je multidisciplinarno područje koje povezuje organometalnu kemiju, medicinsku kemiju i biokemiju, a u najširem smislu obuhvaća kemiju biomolekula i biološki aktivnih spojeva koji sadrže barem jedan ugljikov atom izravno vezan za atom metala. Napredak u začetcima bioorganometalne kemije bio je spor, jer su se organometalni kompleksi dugo smatrali nekompatibilnima s vodom i kisikom pa su stoga bili neprikladni za konjugiranje s biomolekulama. Tek krajem prošlog stoljeća bioorganometalna kemija počela je privlačiti više pažnje znanstvene javnosti i od tada se kontinuirano razvijala u različitim područjima, poput primjene u pripravi lijekova, analitičkoj kemiji i katalizi. U posljednjih nekoliko godina identificiran je širok spektar prirodnih bioorganometalnih spojeva, koji uključuju kobalt, bakar, nikal i željezne sustave. Povijesno gledano, B₁₂ koenzimi koji sadrže vezu kobalt–ugljik bili su prvi organometalni spojevi koji su otkriveni u prirodnim sustavima. Kasnije su posebno zanimljive postale [FeFe]-, [NiFe]- i monometalne [Fe]-hidrogenaze koje sadrže CO i CN ligande izravno vezane na željezov središnji atom. Razvoj sintetske bioorganometalne kemije potaknut je spomenutim otkrićima, poboljšanim razumijevanjem metal–ugljik veze, kao i značajnim napretcima u spektroskopiji, što je omogućilo identifikaciju i karakterizaciju kompleksa organometalnih spojeva s proteinima.

Široko područje bioorganometalne kemije obuhvaća i „tradicionalne“ organometalne komplekse koji imaju biološku aktivnost, a posebno je usmjereno na njihovu potencijalnu primjenu u medicinskoj kemiji. Priroda je neiscrpan izvor kiralnih molekula, počevši od aminokiselina niske molekulske mase i ugljikohidrata do makromolekula poput enzima i DNA. Ovi multifunkcijski građevni blokovi nose veliki potencijal za sintezu organometalnih spojeva, s primjenama u mnogim područjima, uključujući medicinsku kemiju, bioanalizu, znanost o materijalima i katalizu. Rastuće područje primijenjene bioorganometalne kemije može se podijeliti u dvije glavne grupe: organometalni kompleksi koji se vežu na makromolekulu, poput enzima i DNA, i metalni kompleksi koji sadrže malu, dobro definiranu biomolekulu kao ligand, kao što su aminokiseline, ugljikohidrati, nukleinske kiseline, steroidi i oligopeptidi.

Prirodne aminokiseline i kratki peptidi su, s obzirom na njihovu široku zastupljenost, homokiralnost i raznolikost funkcijskih skupina u svojim bočnim ograncima, posebno privlačni kao građevni blokovi za sintezu bioorganometalnih spojeva. Stoga ne čudi da je područje bioorganometalne kemije, koje se dijeli u tri glavne podskupine prema tipu veze ugljik–metal: metaloceni, metal-aren ("polusendvič") sustavi i metal-karben kompleksi proteklih 30 godina doživjelo značajan napredak (5).

2.2. Ferocen

Ferocen je organometalni spoj kemijske formule $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$. Spada u metallocene, organometalne spojeve sendvič-strukture čija su dva ciklopentadienilna prstena vezana na središnji atom metala (slika 2).



Slika 2: Strukturna formula ferocena (6)

Poput mnogih kemijskih spojeva, ferocen je otkriven slučajno 1951. godine kada su Peter L. Pauson i Thomas J. Kealy pokušavali pripremiti fulvalen reakcijom ciklopentadienil-magnezijevog bromida i željezovog(III) klorida. Umjesto fulvalena, dobili su svjetlo narančasti spoj izvanredne stabilnosti, kojem je pripisan aromatski karakter. „Sendvič“ strukturu su pretpostavili Robert B. Woodward i Geoffrey Wilkinson na temelju njegove reaktivnosti, pri čemu je Ernst O. Fischer, neovisno došao do istog zaključka o strukturi ferocena. Ubrzo je struktura ferocena potvrđena spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i rendgenskom kristalografijom. Fischer i Wilkinson su neovisno nastavili istraživati kemiju „sendvič spojeva“ što je rezultiralo Nobelovom nagradom za kemiju 1973. godine. Prepoznatljiva „sendvič“ struktura ferocena dovela je do naglog porasta interesa za spojeve metala s ugljikovodicima i pokrenula razvoj proučavanja organometalne kemije (7).

Ferocen je privukao pažnju znanstvenika zbog svoje jedinstvene strukture, izuzetnih svojstava i široke primjene u modernoj kemiji. Značajna strukturna karakteristika ferocena je udaljenost između dva ciklopentadienilna prstena koja iznosi 3,3 Å, što je pogodno za tvorbu vodikove veze, ali i drugih nekovalentnih interakcija između liganada vezanih na dva Cp prstena. Sa željeznim središtem koje ima zasićenu elektronsku strukturu kriptona, ferocen je termički stabilan do 400 °C, a stabilan je i u doticaju sa svjetlošću, kisikom i vlagom. Dobro se otapa u uobičajenim organskim otapalima i lako se funkcionalizira reakcijama elektrofillne supstitucije zahvaljujući negativno nabijenim i nuklofilnim Cp prstenovima. Pokazuje nisku toksičnost koja mu omogućuje upotrebu kao biozostera arilnih i heteroarilnih skupina u različitim bioaktivnim molekulama i nekim etabliranim lijekovima (8).

Također, odlikuje ga relativno niska cijena i jednostavna sinteza koja omogućuje široku dostupnost, dok kompleksne stereokemijske karakteristike omogućuju raznoliku primjenu u

katalizi i pripravi materijala. Fleksibilnost u modifikaciji ferocena omogućava stvaranje prilagođenih derivata za specifične aplikacije, dok izuzetna redoks-svojstva omogućuju upotrebu u područjima kao što su kataliza, baterijske tehnologije i elektronički materijali. Primjene u nanomedicini, biološkim sensorima, katalizi i drugim područjima dodatno proširuju spektar mogućnosti ovog spoja. Sve navedeno čini ferocen fascinantnim i izuzetno korisnim materijalom s obiljem potencijalnih aplikacija (9).

Dizajnirani su hibridni spojevi koji sadrže ferocen, a posjeduju raznolika biološka svojstva, uključujući antimalarijska, antikancerogena, antitumorska i antifungalna svojstva. Ovi derivati pokazuju povećanu učinkovitost zahvaljujući izvanrednim svojstvima ferocena poput stabilnosti na vodi i zraku, niskoj toksičnosti, jedinstvenoj redoks aktivnosti, sličnosti u aromatičnosti i kemijskoj prilagodljivosti. Uvođenje odgovarajućih supstituenata na ferocenske ciklopentadienilne prstenove poboljšava njegovu biološku aktivnost, dok zamjena arilne ili heteroarilne jezgre iz biološki aktivnih spojeva s ferocenom dovodi do značajnih promjena u svojstvima poput otapanja, hidrofobnosti i lipofilnosti. Derivati ferocena također su pokazali antiproliferativnu aktivnost protiv različitih tumorskih staničnih linija, s nižom toksičnošću prema zdravim stanicama u usporedbi s poznatim antikancerogenim agensima (10).

2.3. Peptidi i proteini

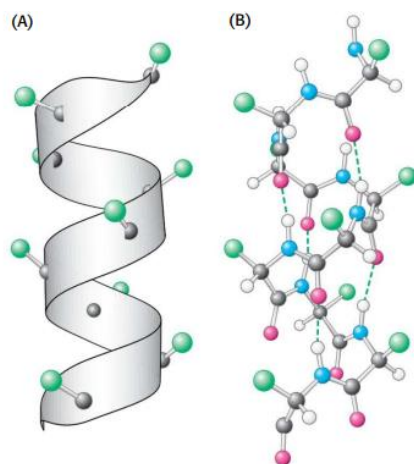
Proteini, biopolimeri α -aminokiselina igraju važnu ulogu u svim aspektima stanične strukture i funkcije. Fizikalna i kemijska svojstva proteina određena su njegovim konstitutivnim aminokiselinama. Pojedinačne aminokiseline povezane su amidnim vezama koje se nazivaju peptidne veze. Zbog velike varijabilnosti u sastavu aminokiselina, proteini posjeduju nevjerojatan raspon strukturnih i katalitičkih svojstava. Peptid je spoj koji sadrži dvije ili više aminokiselina povezanih peptidnim vezama između amino-skupine jedne aminokiseline i karboksilne skupine druge aminokiseline. Svaka aminokiselinska jedinica u peptidu naziva se ostatak. Polipeptid je peptid koji sadrži mnogo aminokiselinskih ostataka, ali obično ima molekulsku masu manju od 5000 Da. Proteini sadrže više jedinica aminokiselina, s molekulskom masom u rasponu od oko 6000 do oko 40.000.000 Da (11).

Biokemičari razlikuju nekoliko razina strukturne organizacije proteina. Primarnu strukturu definira slijed aminokiselina koji je određen genetičkom informacijom. Kako se polipeptidni lanac nabire, formira se određeni lokalizirani raspored aminokiselina koji čini sekundarnu strukturu. Ukupni trodimenzijski oblik koji polipeptid zauzima naziva se tercijska struktura. Proteini koji posjeduju više polipeptidnih lanaca (ili podjedinica) imaju kvaternu strukturu (12).

Sekundarna struktura polipeptida sastoji se od nekoliko ponavljajućih uzoraka. Najčešće proučavani elementi sekundarne strukture su α -uzvojnica, β -nabrana ploča te okreti. I α -

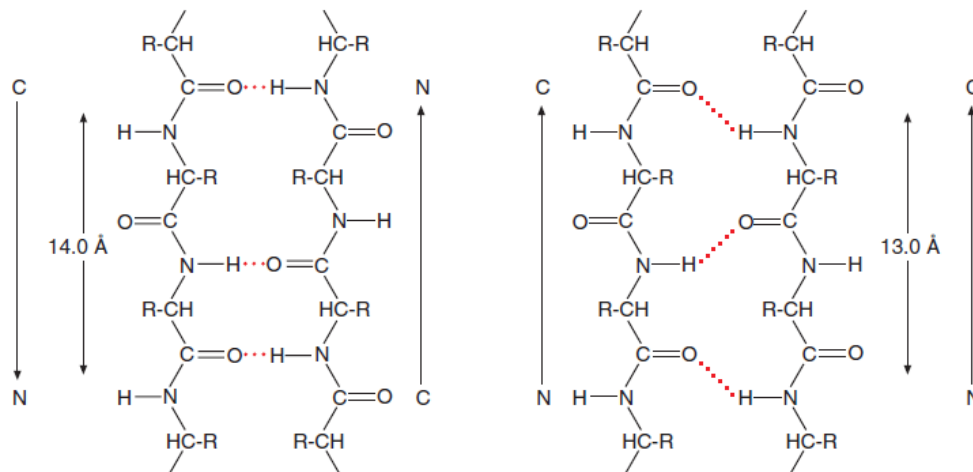
uzvojnice i β -nabrane ploče stabilizirane su vodikovim vezama između CO i NH skupina iz polipeptidne okosnice.

α -Uzvojnica je kruta, štapićasta struktura koja nastaje kada se polipeptidni lanac uvije u uzvojnici (slika 3). Vodikove veze stvaraju se između NH skupine aminokiseline i i CO skupine aminokiseline $i + 4$. Postoji 3,6 aminokiselinskih ostataka po zavoju uzvojnice, a visina zavoja, odnosno udaljenost između odgovarajućih dijelova po zavoju je 0,54 nm.



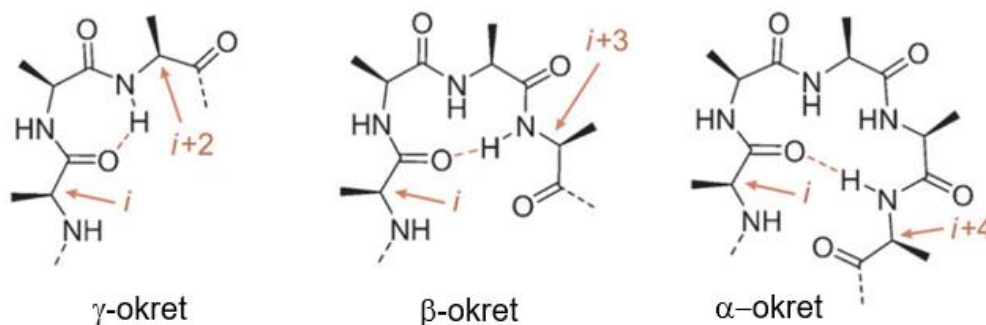
Slika 3: Struktura α -uzvojnice (13)

β -Nabrane ploče nastaju kada se dva ili više segmenata polipeptidnog lanca poredaju jedan pored drugog. Svaki pojedinačni segment naziva se β -lanac. Za razliku od uzvojnice koja je nabrana, β -lanci su istegnuti. β -Nabrane ploče stabilizirane su vodikovim vezama koje se stvaraju između NH i CO skupina iz polipeptidnih okosnica susjednih lanaca, a mogu biti paralelne ili antiparalelne (slika 4). U paralelnim β -nabranim pločama, vodikove veze u polipeptidnim lancima raspoređene su u istom smjeru, a u antiparalelnim lancima te su veze raspoređene u suprotnim smjerovima (12). Udaljenost između susjednih aminokiselina duž β -lanaca je približno 3,5 Å, za razliku od udaljenosti od 1,5 Å u α -uzvojnici (13).



Slika 4: Dvije forme β -nabrane ploče: antiparalelna (*lijevo*) i paralelna (*desno*) (12)

S duljinom od dvije do šest aminokiselina, okreti su nepravilni sekundarni strukturni elementi koji se razlikuju od uzvojnica i β -ploča po slabije organiziranim i neponavljajućim diedarskim kutovima svojih okosnica. Povijesno, strukture okreta definirane su kao regije koje dopuštaju polipeptidnom lancu da se presavije i naglo promijeni smjer, čime se omogućuje stvaranje globularnih proteina. Tijekom posljednjih desetljeća okreti su definirani na različite načine, a široko korištena definicija klasificira okrete u skladu s obrascem IHB formiranih između CO skupine na položaju i i NH skupine na položaju $i + n$ ($n = 2-5$). Tako se dijele na α -, β -, γ - i π -okrete s tri do šest konstitutivnih aminokiselina (slika 5). Uočen je reverzni obrazac vodikovih veza između NH na položaju i i CO na položaju $i + n$ u δ - i ε -okretima s $n = 1$, odnosno 2 (14).



Slika 5: Kemijska struktura γ -, β - i α - okreta (14)

Peptidi utječu na mnoge važne fiziološke mehanizme i kontroliraju gotovo sve vitalne funkcije u ljudi, uključujući obranu imunološkog sustava, probavu, metabolizam, reprodukciju, disanje i osjetljivost na bol. Peptidi pokazuju dobru učinkovitost i podnošljivost, povoljan farmakološki profil tijekom razvojnih faza, predvidljive metaboličke razgradne puteve i kratko

vrijeme ulaska na tržište. Zahvaljujući napretku u optimizaciji strukture, formulacije i proizvodnje, sve više peptida ulazi u klinička ispitivanja i odobrava se za upotrebu u obliku lijekova. Međutim, ove molekule i dalje imaju nekoliko nedostataka, uključujući ograničenu stabilnost prema proteolizi što rezultira poluživotom od nekoliko minuta u gastrointestinalnom traktu i serumu. Imaju loša apsorpcijska i transportna svojstva zbog relativno visoke molekulske mase i nedostatka specifičnih transportnih sustava pa često rezultiraju brzim izlučivanjem putem jetre i bubrega. Zbog svojstvene fleksibilnosti koju uzrokuje rotacija oko veza N–C_α i C_α–CO, peptidi stupaju u interakcije s više ciljnih molekula što dovodi do loše selektivnosti i neželjenih nuspojava.

Peptidomimetici su osmišljeni kako bi riješili ove nedostatke, jer su dizajnirani tako da pokažu veću metaboličku stabilnost, biodostupnost, selektivnost i afinitet prema receptorima. Struktura vodećeg peptida optimizira se unošenjem funkcijskih modifikacija koje su sposobne riješiti nedostatke peptida, dok se istovremeno održavaju strukturne značajke odgovorne za biološku aktivnost (15).

2.4. Peptidomimetici

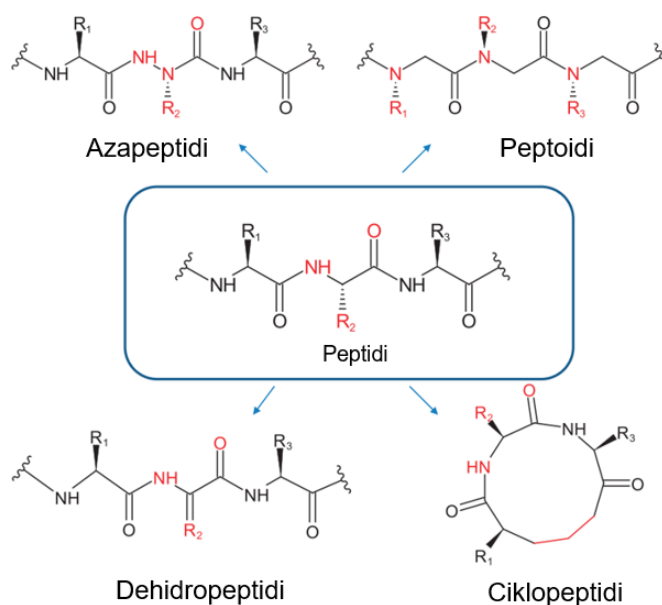
Uporaba peptida kao lijekova počela je još 1950-ih otkrićem hormona i neurotransmitera te liječenjem lijekovima na bazi peptida kao hormonske terapije. Popularnost lijekova čiji je dizajn baziran na peptidima naglo je porasla otkrićem trodimenzijske strukture proteina i njihove funkcije na površini stanice. Istraživanja strukture i funkcije proteina sugeriraju da su protein-protein interakcije (PPI) potrebne za proces signalizacije u stanicama. U imunološkom odgovoru te interakcije su dinamične prirode, a signal ovisi o snazi i trajanju interakcije. Peptidni fragmenti prisutni na površini proteina daju im visoku specifičnost i afinitet, ali i dinamičan karakter vezivanja. Budući da se površinske PPI odvijaju preko specifičnih peptidnih epitopa, mimetici površine proteina moduliraju PPI i signalizaciju (16).

Metalni ioni se mogu uključiti u različite vrste interakcija s terapijskim peptidima tako što mogu biti dio organometalnog peptidnog konjugata, ili mogu biti kompleksirani s peptidom ili stupati u interakcije s peptidom. Glavni nedostaci terapijskih peptida su metabolička nestabilnost tj. ubrzana proteoliza i nedovoljna propusnost kroz membranu. Slaba propusnost kroz membranu rezultira slabim djelovanjem lijeka ili nedovoljnom *in vivo* efikasnošću. Fizikalno-kemijske osobine poput veličine, lipofilnosti i hidrofobnosti mogu imati značajan utjecaj na propusnost membrane. Modificirani peptidi, kao što su peptoidi, ciklički peptidomimetici i peptidi koji sadrže neproteinogene aminokiseline imaju bolju permeabilnost kroz membrane u usporedbi s uobičajenim peptidima, ali i povećanu metaboličku stabilnost (17).

Novija klasifikacija koju su predložili Grossman i suradnici obuhvaća četiri klase peptidomimetika:

1. Klasa A – mimetici koji uglavnom sadrže sekvencu aminokiselina sličnu izvornim peptidima; promjene uključuju ograničen broj lokalnih modifikacija koje stabiliziraju konformaciju i ograničavaju stopu razgradnje proteolize.
2. Klasa B – uključuje daljnje modifikacije klase A mimetika s različitim neprirodnim aminokiselinama, malim molekulama i/ili značajnim promjenama okosnice peptida. Ova klasa također uključuje foldamere i peptoide.
3. Klasa C – uključuje visoko modificirane strukture s karakterom malih molekula koje potpuno zamjenjuju peptidnu okosnicu. Središte projicira supstituente analogno orijentaciji ključnih ostataka u bioaktivnoj konformaciji roditeljskog peptida.
4. Klasa D – klasa koja je najmanje slična roditeljskim peptidima i takvi mimetici oponašaju način djelovanja bioaktivnog peptida bez izravne veze s njegovim funkcijama bočnog lanca (14).

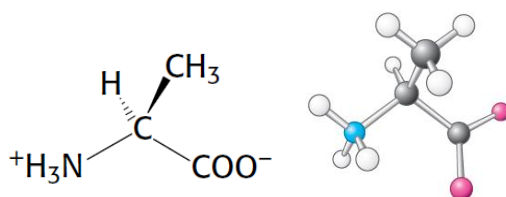
Važne strategije u dizajnu peptidomimetika uključuju terminalne modifikacije, unutarnje modifikacije (ciklizacija, disulfidni mostovi, fosforilacija, oksidacija, hidroksilacija, glikolizacija), modifikacije aminokiselina (D-, β - ili γ -aminokiseline), modifikacije bočnih lanaca aminokiselina i modifikacije osnovne strukture peptida. Modificirane aminokiseline i modificirani peptidi poput azapeptida, peptoida, ciklopeptida i dehidropeptida (slika 6) dobiveni putem gore navedenih modifikacija pokazuju ne samo veću otpornost na enzimsku hidrolizu, već i bolju biodostupnost te veću kemijsku raznolikost (17).



Slika 6: Primjeri modificiranih peptida (17)

2.5. Alanin

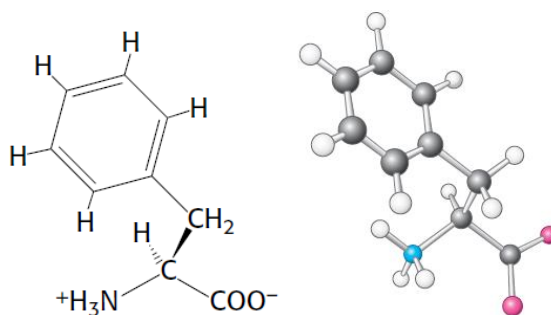
Alanin (Ala, A) je nepolarna aminokiselina koja ima metilnu skupinu kao svoj bočni ogranak (slika 7) (13). Alanin je mala neesencijalna aminokiselina koja se u plazmi pojavljuje u visokim količinama u slobodnom stanju. Proizvodi se transaminacijom iz piruvata te je jedna od najčešće korištenih aminokiselina za izgradnju proteina, a uključena je i u metabolizam triptofana i vitamina B₆. Također, sudjeluje u metabolizmu šećera i organskih kiselina, jača imunološki sustav i daje energiju za mišićno tkivo, mozak i središnji živčani sustav. Alanin je bijeli kristalni prah, bez mirisa i slatkog okusa (21).



Slika 7: Struktura alanina (13)

2.6. Fenilalanin

Fenilalanin (Phe, F) je esencijalna aminokiselina, što znači da je neophodna za organizam, ali ga ljudsko tijelo ne može samostalno sintetizirati pa se mora unositi u organizam putem hrane. Fenilalanin u svom bočnom ogranaku sadrži fenilni prsten umjesto jednog ugljikovog atoma iz alaninske metilne skupine (slika 8) (14). S obzirom na aromatski bočni ogranak, spada u nepolarne (hidrofobne) aminokiseline i može sudjelovati u hidrofobnim interakcijama. Zajedno s triptofanom i tirozinom, fenilalanin ima svojstvo apsorpcije ultraljubičastog svjetla što omogućuje znanstvenicima karakterizaciju proteina koristeći spektroskopske tehnike poput UV-spektroskopije (18).



Slika 8: Struktura fenilalanina (13)

Fenilalanin je bijeli kristalni prah bez mirisa, blago gorkog okusa. Topljiv je u vodi, a slabo topljiv u metanolu i etanolu. Ima ključnu ulogu u biosintezi drugih aminokiselina i važan je u strukturi i funkciji mnogih proteina i enzima. Fenilalanin se pretvara u tirozin, koji se koristi u biosintezi neurotransmitera dopamina i norepinefrina. L-oblik fenilalanina ugrađen je u proteine, dok D-oblik djeluje kao lijek protiv bolova (19).

Sun i sur. su istraživali svojstva ferocenoil-fenilalanina (Fc-F) kao multistimulativnog hidrogelatora koji pokazuje reverzibilne i brze odgovore na promjene redoks-potencijala, pH-vrijednosti i temperature. Fc-F se ističe izuzetno jednostavnom strukturom te se smatra najkompaktnijim hidrogelatorom osjetljivim na stimulanse koji je do sada zabilježen. Osim toga, dizajn Fc-F predstavlja jednostavan način za uvođenje elektrokemijski aktivnih organometalnih fragmenata u gel.

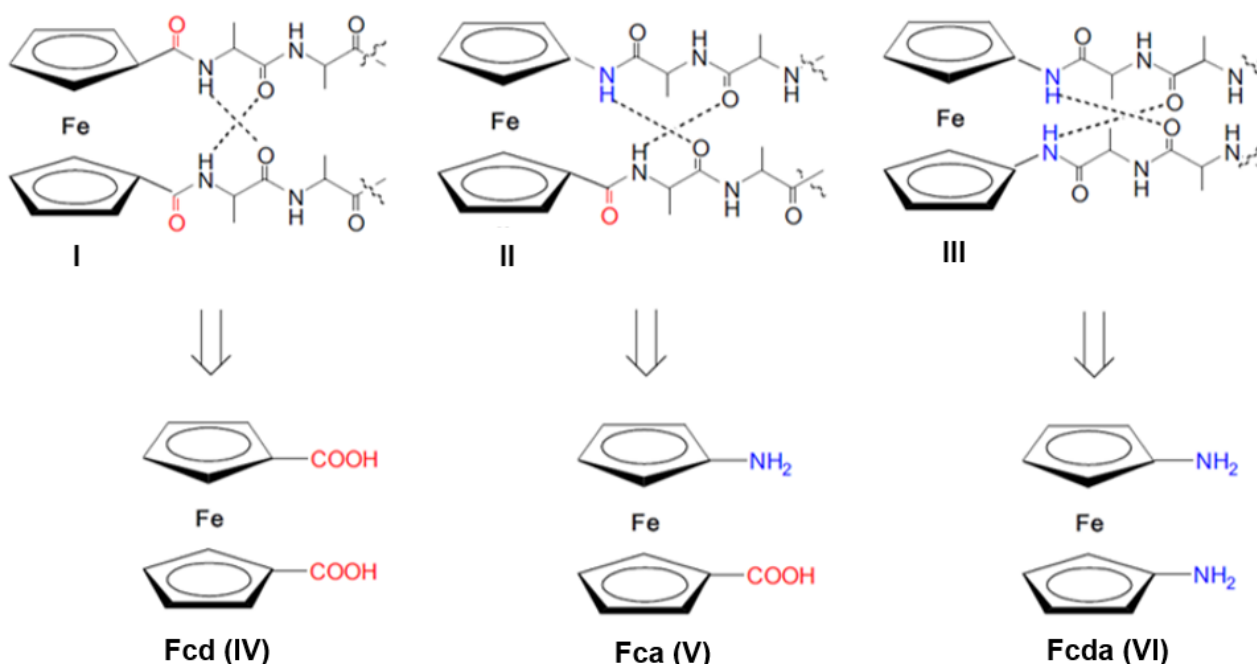
Korištenjem teorije funkcionala gustoće (DFT, engl. *Density Functional Theory*) predviđene su energije i moguće geometrije različitih aranžmana Fc-F tijekom procesa samozdruživanja koji dovodi do geliranja. Na temelju mikroskopskih tehnika snimanja predložen je mehanizam oligomerizacije koji uključuje komplementarno π - π i vodikovo vezanje između ferocenil i benzenskih prstenova fenilalaninskih ostataka, te između karboksilnih skupina tijekom formiranja dimera. Jednako važno je paralelno formiranje dva dimera kako bi se formirali tetrameri, potaknuti vodikovom vezom te π - π vezivanjem radi formiranja složenih tetramernih struktura. Fc-F gel pokazuje izvrsnu stabilnost i izuzetno visoku toleranciju na sol što upućuje na njegov potencijal kao kontroliranog medija za lijekove ili kiralnog katalizatora. Nadalje se očekuje da će Fc-F služiti kao odličan predložak za buduća istraživanja u dizajniranju novijih, višestruko osjetljivih hidrogelatora (20).

2.7. Ferocenski konjugati s aminokiselinama

Aminokiseline i peptidi modificirani ferocenom dobro su istraženi već od najranijih faza razvoja organometalne kemije. Od prve sinteze ferocenoilalanina samo šest godina nakon otkrića ferocena, opisani su različiti konjugati ferocena s aminokiselinama i peptidima (5).

Jedan od pristupa pripremi peptidomimetika uključuje uvođenje rigidnih kalupa u strukturu peptida kako bi se ograničila njihova konformacijska fleksibilnost i spriječilo njihovo međudjelovanje s neželjenim receptorima. Dobar primjer rigidnog kalupa za pripravu konformacijski spregnutih peptida su heteroanularno disupstituirani feroceni s ozbirom da se dva ciklopentadienilna prstena u ferocenu nalaze na udaljenosti od oko 3,3 Å, što omogućuje formiranje IHB između dva peptidna lanca. Temeljem strukture ferocenskog prekursora, 1,1'-disupstituirani ferocenski peptidi podijeljeni su u tri glavne skupine (slika 9):

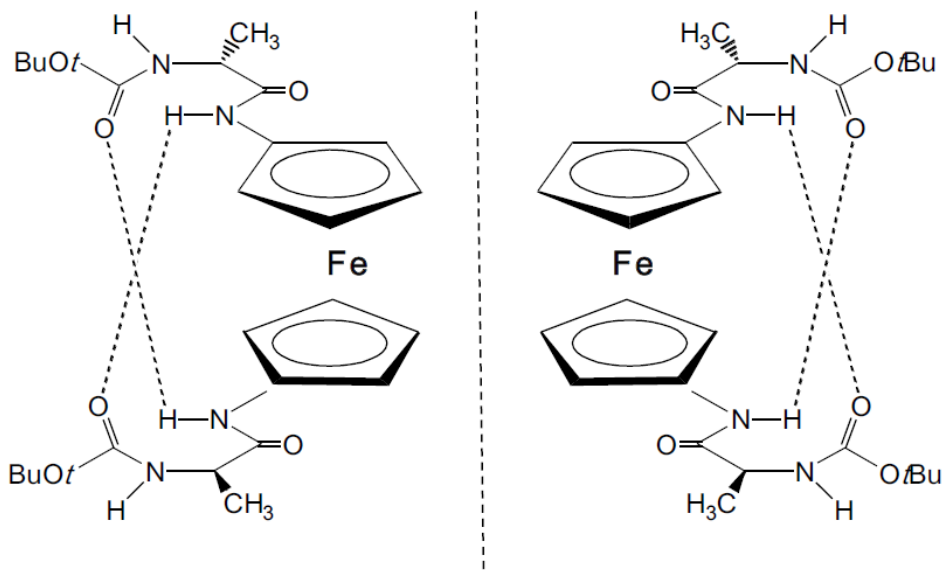
- (I) $\text{Fn}[\text{CO}(\text{AA})_m\text{OMe}]_2$ izvedeni iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (**Fcd, IV**),
 (II) $\text{Y}(\text{AA})_n\text{NHFnCO}(\text{AA})_m\text{OMe}$ izvedeni iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (**Fca, V**),
 (III) $\text{Fn}[\text{NH}(\text{AA})_m\text{Y}]_2$ izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (**Fcda, VI**).
 [Fn = ferocenilen, AA = prirodna aminokiselina, Y = Ac (acetil), Boc (*tert*-butoksikarbonil), $m = 1, 2, \dots$; $n = 1, 2, \dots$] (4).



Slika 9: Ferocenski peptidi **I-III** izvedeni iz **Fcd (IV)**, **Fca (V)** i **Fcda (VI)**

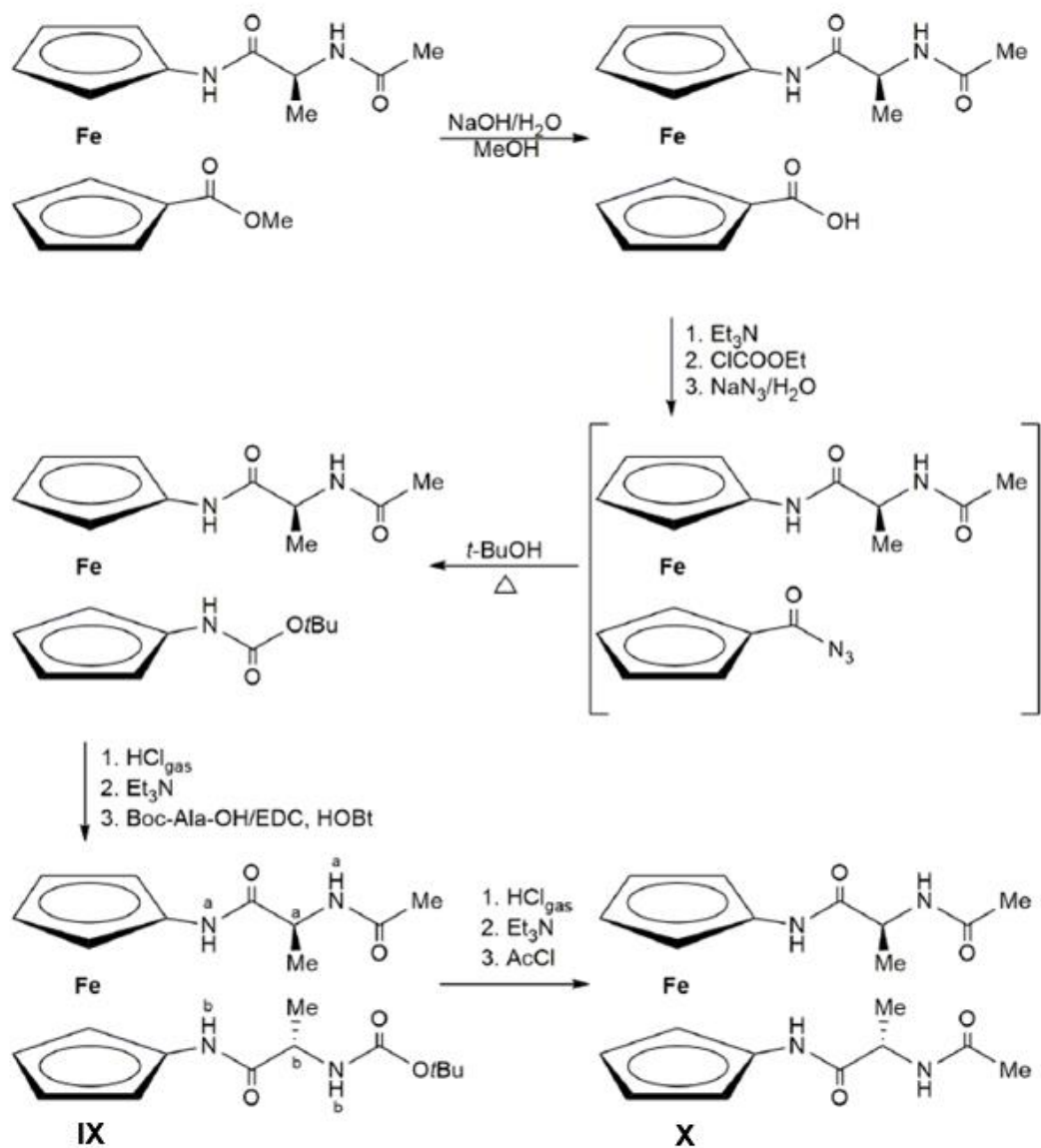
(IHB su označene isprekidanim crtama) (4)

U usporedbi s konjugatima iz skupina **I** i **II**, ferocenski konjugati **III** izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (**Fcda, VI**) manje su istraženi. Ferocenske peptide izvedene iz ferocen-1,1'-diamina prvi put su sintetizirali Kraatz i suradnici kopulacijom **Fcda (VI)** s L- i D-Ala. Dobivena su dva enantiomerna derivata $\text{Fn}(\text{NH-Ala-Boc})_2$ (**VII**) i $\text{Fn}(\text{NH-D-Ala-Boc})_2$ (**VIII**) koji u čvrstom stanju tvore dva 10-člana IHB-prstena i pritom omogućuju tvorbu β -okreta (slika 10). Kao što se i očekivalo za enantiomerni par, CD-spektroskopskom analizom dobiveni su signali jednakog intenziteta i suprotnog predznaka, što ukazuje da je kiralna čvrsta struktura podržana i u otopini (22).



Slika 10. Shematski prikaz IHB enantiomernih dipeptida Fc-(NH-Ala-Boc)₂ (**VII**, lijevo) i Fc-(NH-D-Ala-Boc)₂ (**VIII**, desno) (22)

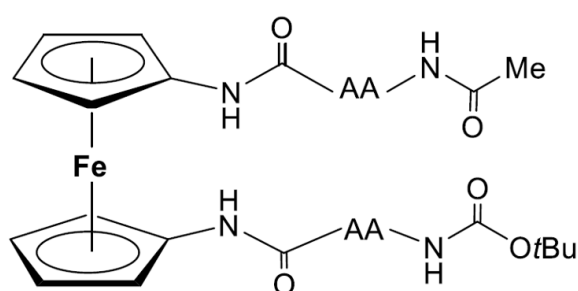
U Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kovačević i suradnici 2015. godine su opisali novi sintetički pristup za pripremu konjugata ferocen-1,1'-diamina sa strukturno i kiralno različitim aminokiselinskim sekvencama. Inicijalno, ferocen-1,1'-diamin bio je pogodan samo za sintezu spojeva s identičnim aminokiselinskim sekvencama na svojim *N*-krajevima, što bi dovelo do simetrično disupstituiranih homokiralnih produkata stabiliziranih 14-članim IHB prstenovima. Ključni korak novog sintetskog puta je transformacija Ac-Ala-NH-Fc-COOH u ortogonalno zaštićeni homokiralni produkt Ac-Ala-NH-Fc-NH-Ala-Boc (**IX**). Također, provedena je analiza Ac-zaštićenog konjugata Fc-(NH-Ala-Ac)₂ (**X**) (slika 11). Budući da je prethodno opisani Kraatzov Boc-zaštićeni konjugat **VII** bio stabiliziran dvjema simultanim NH_{Fc}...OC_{Boc} IHB kojima se zatvara 14-člani prsten, cilj je bio istražiti hoće li zamjena jedne ili obje Boc-skupine u konjugatu **VII** sa sterički manje zahtjevnim Ac-skupinama u **IX** i **X** utjecati na IHB obrazac. Pritom se nije očekivalo da će nepolarni metilni alaninski bočni ogranak ometati tvorbu IHB. Detaljna konformacijska analiza uz uporabu spektroskopske (IR, NMR, CD) i računalne studije zajedno s analizom kristalne strukture X-zrakama provedena je kako bi se razjasnili IHB obrasci sintetiziranih spojeva i raspravila sličnost u otopini i u čvrstom stanju. Konjugati **IX** i **X** pokazali su veliku sklonost formiranju 14-članih IHB prstenova (također označenih kao dva simultana 10-člana β-okreta), bez obzira na prisutnost Boc i/ili Ac zaštitnih skupina. Isti obrazac vodikovih veza, odnosno 14-člani IHB prsten, utvrđen je i u otopini i u čvrstom stanju, što ih čini obećavajućim, ali i jednostavnim modelima za oponašanje β-nabranih ploča iz prirodnih peptida (23).



Slika 11. Sinteza ciljnih spojeva IX i X (23)

Kovačević i suradnici 2017. godine su istraživali kiralne peptide koji sadrže ferocen-1,1'-diamin kao začetnik okreta. Sintetizirana je serija peptida koja sadrži homo- i heterokiralne Ala-Pro sekvence vezane za ferocen-1,1'-diaminski kalup kao začetnik okreta. Utjecaj kiralnosti okosnice i *N*-terminalne skupine (Boc/Ac) na konformacijska svojstva novih peptidomimetika detaljno su analizirani pomoću IR, NMR i CD spektroskopije te potvrđeni DFT studijama u otopini. Utvrdili su da homokiralni peptidi s najstabilnijom konformacijom tvore 10- i 13-člane IHB prstenove te da je zajednička karakteristika najstabilnijih heterokiralnih peptida usvajanje struktura nalik okretu, koje uključuju 7- i 16-člane IHB prstenove. Također, ustanovljeno je da kod homokiralnih derivata zamjena dviju *N*-terminalnih skupina ima nešto veći utjecaj na raspodjelu vodikovih veza nego kod heterokiralnih derivata (24).

Zbog velike važnosti proteinskih okreta u različitim biološkim procesima, poput PPI, uloženi su značajni napori u razvoj konformacijski i proteolitički stabilnih mimetika. Prethodno je pokazano da ferocen-1,1'-diamin inicira stabilnu strukturu okreta u peptidima pripremljenim konjugacijom s Ala i Ala-Pro. Stoga su Kovačević i suradnici 2022. godine pripremili homokiralne konjugate ferocen-1,1'-diamina s različitim aminokiselinama: L-/D-Phe (**XI/XIV**), L-/D-Val (**XII/XV**) i L-/D-Leu (**XIII/XVI**) kako bi istražili inducira li ferocen-1,1'-diamin tvorbu okreta nakon konjugacije s aminokiselinama te utječu li voluminozni i razgranati bočni ogranci iz Phe, Val i Leu na IHB obrazac (slika 12). Detaljne spektroskopske (IR, NMR, CD), rendgenske i DFT studije otkrile su prisutnost dva 10-člana IHB prstena, odnosno prisutnost dva β -okreta u ciljnim spojevima (25).



- XI** (Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc)
XII (Ac-L-Val-NH-Fn-NH-L-Val-Boc)
XIII (Ac-L-Leu-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc)
XIV (Ac-D-Phe-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc)
XV (Ac-D-Val-NH-Fn-NH-D-Val-Boc)
XVI (Ac-D-Leu-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc)

Slika 12. Homokiralni konjugati ferocen-1,1'-diamina s L-/D-Phe (**XI/XIV**), L-/D-Val (**XII/XV**) i L-/D-Leu (**XIII/XVI**) (25)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

Za pripravu prekursora i ciljnih spojeva upotrebene su kemikalije analitičke čistoće, dok su otapala korištena u radu pročišćena prema standardnim postupcima (26).

Za praćenje tijeka kemijskih reakcija korištena je tankoslojna kromatografija (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel), s fluorescentnim indikatorom valne duljine 254 nm. Tankoslojna kromatografija je primijenjena i za kontrolu čistoće sintetiziranih spojeva. Za detekciju aminokiselina i neferocenskih spojeva provedena je tankoslojna kromatografija pomoću ultraljubičaste (UV) svjetlosti, pri valnoj duljini od 254 nm, te naknadnim špricanjem pločica s ninhidrinom uz zagrijavanje.

Sintetizirani produkti pročišćeni su uporabom smjese etil-acetata i diklormetana u različitim omjerima (1 : 10; 1 : 5; 1 : 1), kao eluensa, tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu („Merck“, Kieselgel 60 HF254).

Čistoća sintetiziranih spojeva dokazana je pomoću tekućinske kromatografije visoke razlučivosti sa spektrometrijom masa (HPLC-MS), a strukturna karakterizacija provedena je spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR) te infracrvenom spektroskopijom (IR).

Tališta su određena na Reichert Thermovar HT 1 BT 11 i nisu korigirana. UV/Vis- (ultraljubičasto-vidljiv) i CD-spektri (cirkularni dikroizam) snimljeni su na CD-spektrofotometru Jasco-810 (Jasco, Tokyo, Japan) u diklormetanu i dimetil-sulfoksidu. Na spektrofotometru Spectrum Two (PerkinElmer, Ujedinjeno Kraljevstvo) u diklormetanu su snimljeni koncentracijski- i temperaturno-ovisni IR-spektri uzoraka. Spektri masa izmjereni su ionizacijom elektroraspršenjem (ESI, engl., *Electrospray ionization*) na Agilent Technologies 6410 Triple Quadrupole Mass Spectrometer r (Agilent, Palo Alto, CA, USA). ¹³C-NMR- i ¹H-spektri određeni su u CDCl₃ na spektrometru Bruker AV600 (Bruker, Rheinstetten, Njemačka), uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u jedinici ppm.

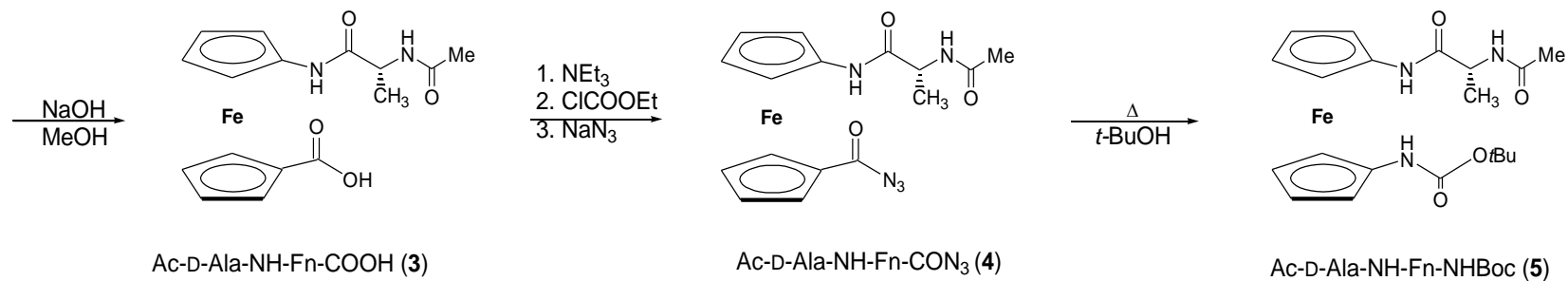
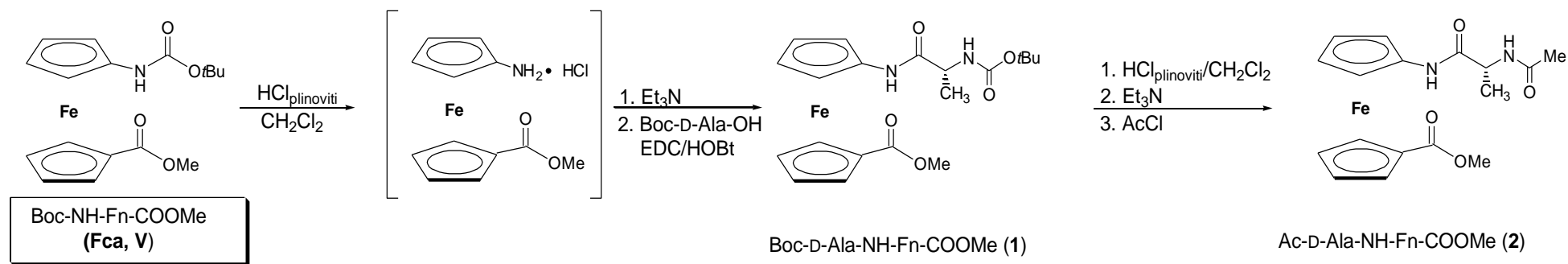
Popis kemikalija korištenih u pripravi prekursora i ciljnih spojeva:

- diklormetan (CH₂Cl₂) (p.a., Kemika)
- etil-acetat (EtOAc) (p.a., Kemika)
- dimetil-sulfoksid (DMSO) (Merck)
- kloroform (CDCl₃) (p.a., Kemika)
- 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC) (99 %, Acros Organics, Geel, Belgija)

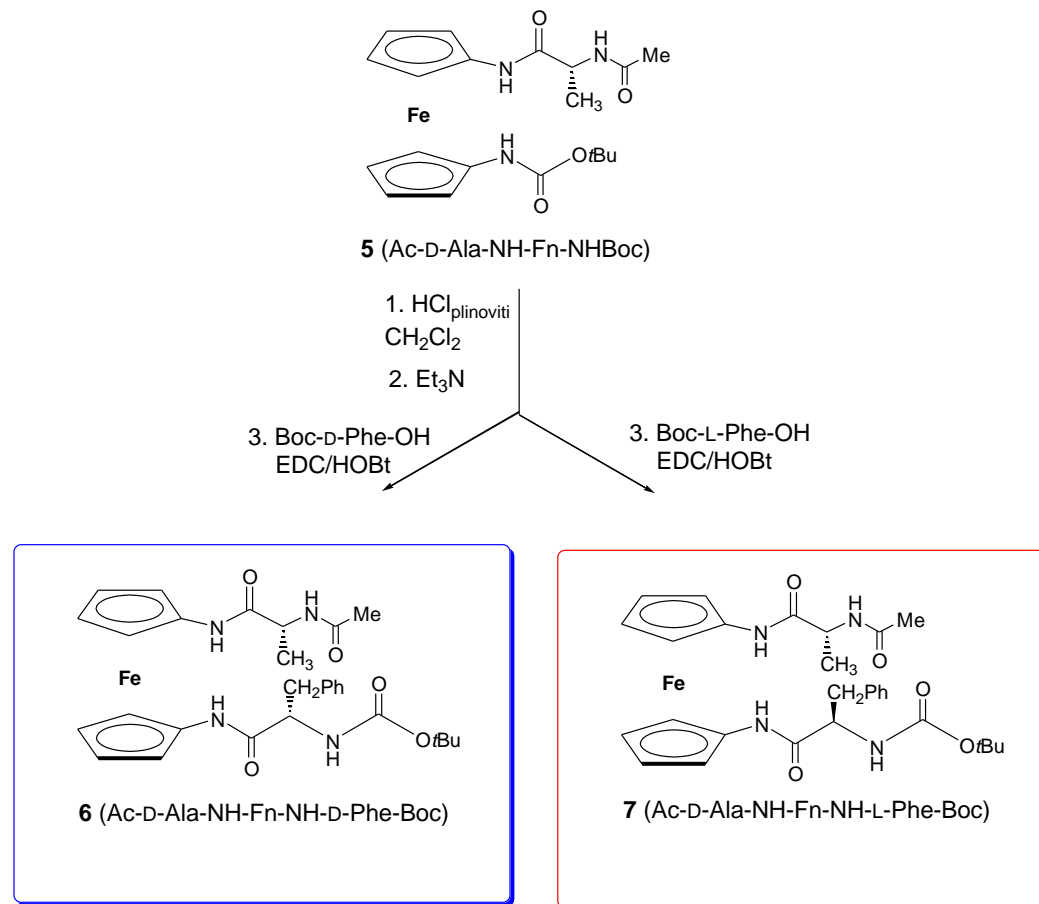
- 1-hidroksibenzotriazol (HOBt) (> 98 %, Aldrich, Santa Clara, CA, USA)
- natrijev klorid (NaCl) (Kemika)
- sumporna kiselina (H₂SO₄) (Sigma-Aldrich)
- trietilamin (Et₃N) (97 %, Sigma-Aldrich)
- natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO₃) (Kemika)
- limunska kiselina (2-hidroksipropan-1,2,3-trikarboksilna kiselina), (C₆H₈O₇) (Kemika)
- bezvodni natrijev sulfat (Na₂SO₄) (Kemika)
- klorovodična kiselina (HCl) (37 %, Sigma-Aldrich)
- acetil-klorid (CH₃COCl) (98 %, Alfa Aesar)
- metanol (CH₃OH) (p.a., Kemika)
- natrijev hidroksid (NaOH) (Kemika)
- aceton (CH₃COCH₃) (p.a., Kemika)
- etil-kloroformijat (ClCOOEt) (C₃H₅ClO₂) (99 %, Acros Organics)
- natrijev azid (NaN₃) (Kemika)
- *tert*-butil-alkohol ((CH₃)₃COH) (Alfa Aesar)

3.2. Postupak priprave ferocenskih dipeptida

Ciljni ferocenski konjugati (**2-7**) pripravljeni su postupcima prikazanim na shemama 1 i 2. Priprava Boc-Fca (**V**) izvedena je prema propisima opisanim u radu Barišić i suradnika te spektroskopski podatci odgovaraju podacima u literaturi (27).



Shema 1. Priprava prekursora 2-5



Shema 2. Priprava ciljnih spojeva **6** i **7**

3.2.1. Priprava peptida Boc-D-Ala-NH-Fn-COOMe (1)

Nakon izračuna potrebnih količina reaktanata, Boc-zaštićena ferocenska aminokiselina Fca **V** (1 g; 2,8 mmol) otopi se u diklormetanu, ohladi na 0 °C i izloži djelovanju plinovite klorovodične kiseline. HCl je pripremljen *in situ* reakcijom natrijevog klorida i sumporne kiseline. Nakon 30-minutnog miješanja u ledenoj kupelji te otparavanja na rotacijskom vakuum-uparivaču, nastali se hidroklorid suspendira u CH₂Cl₂ i obradi sa suviškom trietilamina (pH~9). Dobiveni se ferocenski amin kopulira s Boc-D-Ala-OH (1,18 g; 5,5 mmol), prethodno aktiviranim primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon jednosatnog miješanja na sobnoj temperaturi (ili dok reakcija ne završi), reakcijska se smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata (NaHCO₃), 10 %-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim natrijevim sulfatom (Na₂SO₄) i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu, uz CH₂Cl₂ : EtOAc = 5 : 1 kao eluens.

Ovako pripremljen sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom kromatografijom tako da se homogena smjesa uz pomoć kapalice s vatom nanese u obliku tanke linije na staklenu ploču presvučenu sa slojem silikagela. Prethodno se tankoslojnom kromatografijom ispita koji je sustav eluensa pogodan za pročišćavanje produkta. U eluens se stavi ploča nakon čega započinje eluiranje i razdjeljivanje komponenti iz smjese. Nakon razvijanja kromatograma, mrlja koja po retencijskom faktoru R_f odgovara produktu sastruže se uz pomoć špatule te se prenese u sinter-lijevak, a potom ispire otapalom dok se silikagel u lijevku ne obezboji. Otapalo se upari te se čisti produkt prenese u izvaganu tikvicu.

Količina potrebna za snimanje koncentracijskih IR-spektara odmah se pripremi u jednu epruvetu, uzme se mala količina za određivanje tališta, te se ostavi 100 mg čistog uzorka za naknadna snimanja (NMR).

Boc-D-Ala-NH-Fn-COOMe (1)

$t_f = 102-107$ °C; $R_f = 0,49$ (CH₂Cl₂ : EtOAc = 5 : 1).

IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm^{-1} : 3422 sr (NH_{slobodni}), 3316 sl (NH_{asocirani}), 1707 (C=O_{COOMe}), 1536, 1498, 1369 (amid II).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 7,63 [s, 1H, NH_{Fn}]; 5,14 [d, $J = 6,93$ Hz, 1H, NH_{Ala}]; 4,76 (m, 2H, 7-H, 10-H); 4,68 (s, 1H, 2-H); 4,57 (s, 1H, 5-H); 4,38 (m, 2H, 8-H, 9-H); 4,22 [m, 1H, CH_{Ala}]; 4,04 (m, 1H, 4-H); 4,02 (m, 1H, 3-H); 3,80 (s, 3H, CH₃COOMe); 1,48 [s, 9H, CH₃Boc]; 1,43 [d, $J = 6.98$ Hz, 3H, CH₃Ala].

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 171,88 [CO_{COOMe}]; 171,17 [CO_{Ala}]; 156,02 [CO_{Boc}]; 95,28 (C-1); 80,61 [Cq_{Boc}]; 72,70 (2C, C-8, C-9); 72,13 (C-6); 71,39 (C-10); 71,25 (C-7); 66,64

(C-4); 66,38 (C-3); 63,30 (C-2); 62,99 (C-5); 51,80 [2C, CH₃COOMe, CH_{Ala}], 28,51 [CH₃Boc]; 17,94 [CH_{3Ala}].

3.2.2. Priprava Ac-D-Ala-NH-Fn-COOMe (2)

U suspenziju Boc-peptida **1** (800 mg; 1,52 mmol) u EtOAc, ohlađenu na 0 °C, uvodi se plinoviti HCl dobiven postupkom kao pri pripremi peptida **1**. Nakon što se uz pomoć tankoslojne kromatografije utvrdi potpuno deprotektiranje peptida, otapalo se upari, a rezultirajući se hidroklorid peptida **1** suspendira u suhom diklormetanu (8 mL) i otopi uz dodatak Et₃N (1,67 mL; 12,1 mmol). Ovako pripremljenoj otopini, prethodno ohlađenoj na 0 °C, uz miješanje, oprezno se dokapa acetilklorid (649 µL; 9,12 mmol) te nakon 15 minuta miješanja pri 0 °C slijedi izlijevanje reakcijske smjese u vodu i višestruka ekstrakcija diklormetanom. Prethodno izdvojeni organski sloj ispire se zasićenom vodenom otopinom natrijevog klorida NaCl, a zatim suši bezvodnim Na₂SO₄ i uparava do suhog. Nastali sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu, uz eluens EtOAc.

Ac-D-Ala-NH-Fn-COOMe (2)

$t_f = 127$ °C; $R_f = 0,4$ (EtOAc).

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3421 sr (NH_{slobodni}), 3295 sr š (NH_{asocirani}), 1712, 1661 (C=O_{COOMe}, C=O_{CONH}), 1561, 1466, 1372 (amid II).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 8,23 [s, 1H, NH_{Fn}]; 6,54 [d, $J = 7,29$ Hz, 1H, NH_{Ala}]; 4,75 (m, 1H, 7-H); 4,73 (m, 1H, 10-H); 4,67 (m, 1H, 2-H); 4,61 [m, 2H, CH_{Ala}]; 4,38 (m, 2H, 8-H, 9-H); 4,04 (m, 1H, 4-H); 4,01 (m, 1H, 3-H); 3,79 (s, 3H, CH₃COOMe); 2,09 [s, 3H, CH_{3Ac}]; 1,45 [d, $J = 6,96$ Hz, 3H, CH_{3Ala}].

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 171,88 [CO_{COOMe}]; 170,86 [CO_{Ala}]; 170,63 [CO_{Ac}]; 95,32 (C-1); 72,61 (2C, C-8, C-9); 72,19 (C-6); 71,40 (C-10); 71,25 (C-7); 66,63 (C4); 66,31 (C-3); 63,34 (C-2); 63,04 (C-5); 51,80 [CH₃COOMe]; 49,41 [CH_{Ala}]; 23,43 [CH_{3Ac}]; 18,13 [CH_{3Ala}].

3.2.3. Priprava Ac-D-Ala-NH-Fn-COOH (3)

U otopinu estera **2** (800 mg; 1,7 mmol), u 7 mL metanola, dodaje se 100 mg NaOH (1,7 mmol) i par kapi vode. Nakon jednog sata refluksiranja, pri temperaturi od 65 °C, reakcijska se smjesa upari, ostatak zakiseli 20 %-tnom otopinom HCl-a te ekstrahira etilacetatom. Organski sloj ispere se zasićenom otopinom NaCl-a, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari.

Ac-D-Ala-NH-Fn-COOH (3)

$t_r = 128\text{--}134\text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,23$ (CH_2Cl_2 : $\text{EtOAc} = 1 : 1$).

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3420 sl ($\text{NH}_{\text{slobodni}}$), 3296 sr ($\text{NH}_{\text{asocirani}}$), 3109-2800 (m, OH, COOH), 1710, 1697, 1653 ($\text{C}=\text{O}_{\text{COOH}}$, $\text{C}=\text{O}_{\text{CONH}}$), 1576 (amid II).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ/ppm : = 4,71 (s, 1H, H_{Fn}); 4,66 (s, 2H, HFn); 4,52-4,48 (m, 2H, HFn , CH_{Ala}); 4,29 (s, 1H, HFn); 4,27 (s, 1H, HFn); 4,01 (m, 2H, HFn); 2,05 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{Ac}}$); 1,36 (d, $J = 5,6$ Hz, 3H, $\text{CH}_{3\text{Ala}}$);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 173,67 (CO_{Fn} , CO_{COOH} , CO_{Ac}), 95,67, 79,51 (Cq_{Fn}), 72,83, 72,38, 72,13, 67,04, 66,93, 64,46, 64,42 (CHFn), 50,98 (CH_{Ala}), 22,66 ($\text{CH}_{3\text{Ac}}$), 18,03 ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$).

3.2.4. Priprava Ac-D-Ala-NH-Fn-CON₃ (4)

Otopini kiseline **3** (1 g; 2,19 mmol) u 10 mL acetona dodaje se par kapi vode. Reakcijskoj se smjesi, ohlađenoj na 0 °C, dokapa otopina Et_3N (0,26 g; 2,49 mmol) u acetonu, te otopina etil-kloroformijata (0,052 g; 1,64 mmol) u acetonu, pazeći da temperatura ne prijeđe 5 °C. Nakon 30 minuta miješanja, doda se otopina NaN_3 (0,215 g; 3,29 mmol) u vodi. Nakon jednosatnog miješanja u ledenoj kupelji, reakcijska se smjesa razrijedi hladnom vodom, ekstrahira diklormetanom, ispere 5 %-tnom zasićenom otopinom NaHCO_3 i zasićenom otopinom NaCl -a, osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha.

3.2.5. Priprava Ac-D-Ala-NH-Fn-NHBoc (5)

Budući da je otopina azida nestabilna, njegova pregradnja u karbamat vrši se *in situ*. Otopina azida (400 mg) u 8 mL *tert*-butil-alkohola zagrijava se pri 65 °C sve dok se tankoslojnom kromatografijom detektiraju tragovi reaktanta. Trajanje je ovog postupka približno 5 sati. Kada je reakcija gotova, reakcijska se smjesa upari, a produkt pročisti tankoslojnom preparativnom kromatografijom uz EtOAc .

Ac-D-Ala-NH-Fn-NHBoc (5)

$t_r = 142\text{--}145\text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,33$ (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3428 j ($\text{NH}_{\text{slobodni}}$), 3313 sr ($\text{NH}_{\text{asocirani}}$), 1703, 1682, 1665 ($\text{C}=\text{O}_{\text{CONH}}$), 1530, 1513 (amid II).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 8,30 (s, 1H, NH_{aFn}); 6,58 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, NH_{Ala}); 6,23 (s, 1H, NH_{Boc}); 4,61–4,53 (m, 3H, HFn , CH_{Ala}); 4,35–4,30 (m, 2H, HFn); 4,13–4,01 (m, 4H, HFn); 2,05 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{Ac}}$); 1,50 [s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{Boc}$]; 1,44 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, $\text{CH}_{3\text{Ala}}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 171,20 (CO_{Fn}); 170,54 (CO_{Ac}); 80,54 (Cq_{Boc}); 65,93;

65,53; 65,47; 65,15; 62,95 (CH_{F_n}); 49,51 (CH_{Ala}); 28,55 [(CH₃)₃Boc]; 23,37 (CH_{3Ac}); 18,43 (CH_{3Ala}).

3.2.6. Priprava Ac-D-Ala-NH^a-Fn-NH^b-D-Phe-Boc (6) i Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (7)

Boc-zaštićeni prekursor **5** (300 mg; 0,57 mmol) otopi se u EtOAc, ohladi na 0 °C i izloži djelovanju plinovitog HCl. Nakon 30 minuta miješanja u ledenoj kupelji te otparavanja na rotacijskom vakuum-uparivaču, nastali se hidroklorid suspendira u CH₂Cl₂ i obradi sa suviškom Et₃N (pH~9). Dobiveni se slobodni amin kopulira s 250 mg (1,14 mmol) Boc-D/L-Phe-OH, primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon jednog sata miješanja pri sobnoj temperaturi, rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom NaHCO₃, 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl-a. 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.

Nažalost, prilikom kopulacije hidroklorida spoja **5** s Boc-L-Phe-OH, a s ciljem dobivanja heterokiralnog dipeptida Ac-D-Ala-NH-Fn-L-Phe-Boc (**7**), nije došlo do očekivane reakcije pa ciljni dipeptid **7** nije pripremljen.

Ac-D-Ala-NH^a-Fn-NH^b-D-Phe-Boc (6)

$t_r = 195,9-198,3$ °C; $R_f = 0,75$ (CH₂Cl₂ : EtOAc = 1 : 3).

IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm^{-1} : 3432 sr (NH_{slobodni}), 3307 j, 3255 sr (NH_{asocirani}), 1730, 1687, 1660 (C=O_{CONH}), 1572, 1540, 1448 (amid II).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 9,17 (s, 1H, NH¹_{Fn}); 9,09 (s, 1H, NH²_{Fn}); 7,32-7,24 (m, 5H, CH_{benzil}); 7,05 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H, NH_{Ala}); 5,37 (s, 2H, H-10, H-7); 5,25 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H, NH_{Phe}); 4,53-4,47 (m, 2H, CH_{Ala}, CH_{Phe}); 4,15 (s, 1H, H-2); 4,08 (s, 1H, H-5); 4,00-3,97 (m, 4H, H-3, H-4, H-8, H-9); 3,14 (dd, 1H, CH_{2-Phe}); 3,11 (dd, 1H, CH_{2-Phe}); 2,14 (s, 3H, CH_{3-Ac}); 1,43 [s, 9H, (CH₃)₃-Boc]; 1,37 (d, $J = 6,94$ Hz, 3H, CH_{3-Ala}).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 171,81 (CO_{Fn1}); 171,37 (CO_{Fn2}); 170,84 (CO_{Ac}); 156,94 (CO_{Boc}); 136,96; 129,49; 129,39; 128,72; 127,04 (CH_{Phe}) 80,86 (C_{qBoc}); 65,86 (C-8, C-9); 64,89 (C-3, C-4); 62,92 (C-7); 62,87 (C-10); 61,59 (C-2); 61,20 (C-5); 56,86 (CH_{Phe}); 50,37 (CH_{Ala}); 38,27 (CH_{2-Phe}); 31,05 (CH_{2-Phe}); 28,51 [(CH₃)₃-Boc]; 22,99 (CH_{3-Ac}); 17,39 (CH_{3-Ala}).

ESI-MS: teoretska masa C₂₉H₃₆N₄O₅Fe: 576,48; teoretska masa za C₂₉H₃₆N₄O₅Fe + H⁺: 577,21; izmjerena masa: [M+H]⁺ m/z 577,15.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

Ferocen je idealan kalup za formiranje vodikovih veza nakon ugradnje u peptide zahvaljujući specifičnoj udaljenosti od 3,3 Å između dva ciklopentadienilna prstena, pri čemu inducira tvorbu različitih elemenata sekundarne strukture poput okreta, uzvojnica i ploča. U Teorijskom dijelu ovog Diplomskog rada opisane su tri glavne skupine 1,1'-disupstituiranih ferocenskih peptida podijeljenih na temelju strukture ferocenskog prekursora (Fcd, Fca i Fcda). Ferocenski konjugati izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda, **VI**) i alanina po prvi put su sintetizirani u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta (23). Naknadna istraživanja fokusirala su se na ispitivanje utjecaja različitih vrsta i kiralnosti aminokiselinskih ostataka na konformacijska svojstva takvih konjugata (24,25,28).

U sklopu ovog Diplomskog rada sintetiziran je ferocenski dipeptid **6** izveden iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda) s D-alaninom i D-fenilalaninom. Također, istražen je utjecaj bočnih ogranaka i kiralnosti ovih aminokiselina na formiranje IHB i različitih elemenata sekundarne strukture. S obzirom da se tijekom sinteze heterokiralni dipeptid s L-fenilalaninom (**7**) raspadao te zbog nedostatka stabilnosti potrebne za daljnja istraživanja, konformacijska svojstva toga spoja nisu istražena. U nastavku je opisana sinteza i konformacijska analiza homokiralnog ferocenskog dipeptida s D-fenilalaninom, Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (**6**).

4.2. Priprava homokiralnog dipeptida Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (**6**)

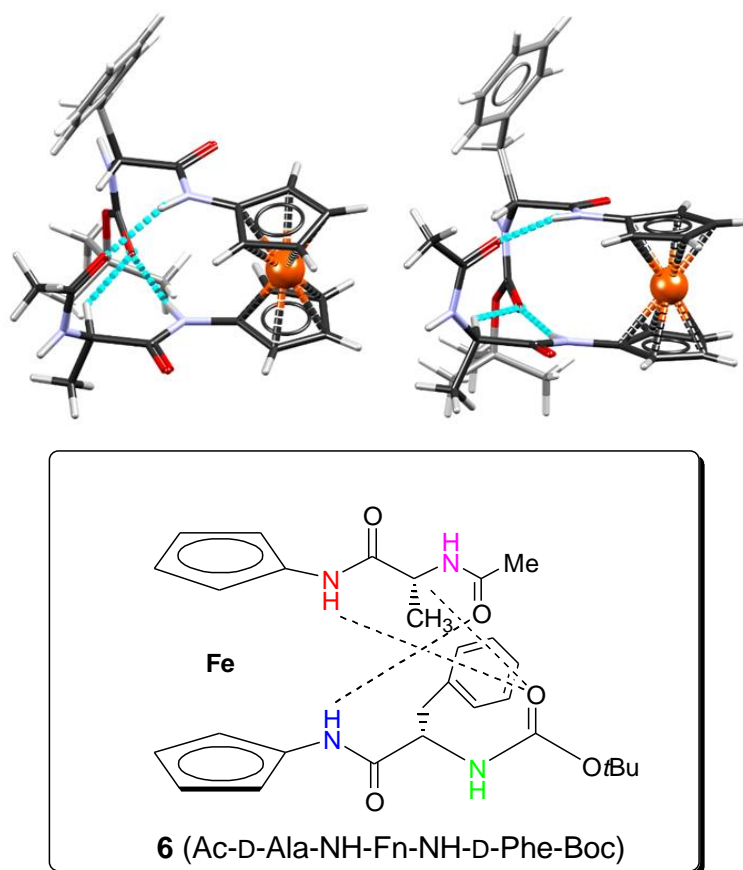
Prema dobro utvrđenoj proceduri iz našeg Laboratorija, pripremljeni su prekursori **1-5** ciljnih dipeptida **6** i **7** (shema 1). Deprotekcijom amino-skupine ferocenske aminokiseline (**V**) djelovanjem plinovitog HCl-a, nastaje hidroklorid koji se obrađuje s Et₃N, a zatim slijedi kopulacija slobodnog ferocenskog amina s Boc-D-Ala-OH, primjenom standardne HOBt/EDC metode, pri čemu je dobiven peptid **1**. Transformacija karbamatne u acetilnu zaštitnu skupinu provedena je deprotekcijom kao u prethodnom koraku uz naknadni dodatak Et₃N i AcCl. Hidroliza esterske skupine dipeptida **2** vezane na donji ciklopentadienilni prsten provedena je u iznimno blagim uvjetima (korištena je ekvimolarna količina NaOH, a reakcija je provedena pri 65 °C, tijekom 1 h), kako bi se izbjegla racemizacija pripremljenog biokonjugata **3**. Ortogonalno zaštićeni ciljni prekursor **5** pripremljen je *in situ* Curtiusovom pregradnjom nestabilnog azida **4**, dobivenog iz kiseline **3**. Završni korak priprave ciljnih peptida **6** i **7** (shema 2), proveden je deprotekcijom karbamatne skupine prekursora **5**, čime se omogućila kopulacija C-aktiviranih Boc-D-Phe-OH i Boc-L-Phe-OH s njegovim slobodnim N-terminusom. Željeni heterokiralni

dipeptid **7** nije pripremljen u količini dostatnoj za spektroskopsku karakterizaciju. Prilikom kopolacije s bočnim ogrankom fenilalanina, evidentirani su kemijski pomaci benzilne skupine pri 3,14 i 3,11 ppm ($-\text{CH}_2-\text{Ph}$), dok se kemijski pomaci vodikovih atoma iz fenilnog prstena registriraju pri 7,32-7,24 ppm. Metilenske skupine iz fenilalaninskog ogranka u ^{13}C -NMR-spektru dipeptida **6** javljaju se pri 38,27 i 31,05 ppm, dok se kemijski pomaci ugljikovih atoma iz fenilnog prstena nalaze pri 136,96, 129,49, 129,39, 128,72 i 127,04 ppm.

4.3. Kristalografska analiza Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Phe-Boc (**6**)

Rendgenskom strukturnom analizom dipeptida **6** dobili smo precizan uvid u njegovu trodimenzijsku strukturu u čvrstom stanju (slika 13, *gore*). Opažaju se tri IHB:

- $\text{NH}_{\text{Fna}} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{Boc}}$ IHB koja zatvara 11-člani prsten,
- $\text{NH}_{\text{Fnb}} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{Ac}}$ IHB koja zatvara 11-člani prsten,
- $\text{CH}_{\text{Fna}} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{Boc}}$ IHB koja zatvara 12-člani prsten (slika 13, *dolje*).



Slika 13. Kristalografska struktura ciljnog dipeptida **6** (*gore*) i pronađene IHB u ciljnom dipeptidu **6** (*dolje*)

4.4. IR-spektroskopska analiza

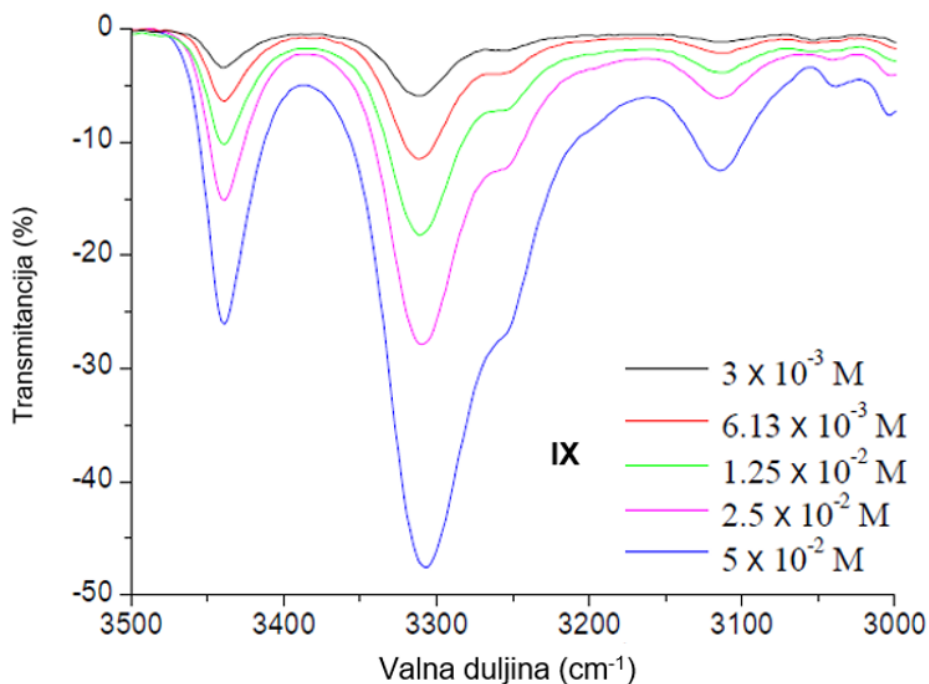
Infracrvena (IR) spektroskopija je tehnika koja se temelji na vibracijama veza, a daje informacije o vrsti veza i funkcijskih skupina u molekuli. IR spektar se dobiva propuštanjem IR zračenja kroz uzorak ili reflektiranjem zračenja s površine uzorka i zatim određivanjem koji je udio upadnog zračenja apsorbiran pri određenoj energiji. Energija pri kojoj se pojavljuje vrpca u apsorpcijskom spektru odgovara frekvenciji vibracije pojedine veze. Da bi molekula pokazala IR apsorpciju, mora imati električni dipolni moment. Što je dipolni moment veći, to će apsorpcijska vrpca biti jačeg intenziteta. Molekula može apsorbirati zračenje samo ako se frekvencija dolaznog infracrvenog zračenja podudara s frekvencijom vibracija veze u molekuli. Vibracije mogu uključivati promjenu duljine veze (rastezne vibracije) ili promjenu kuta veze (vibracije savijanja). Neke se veze mogu rastezati u fazi (simetrično istezanje) ili izvan faze (asimetrično istezanje). Infracrveni spektar prikazuje ovisnost apsorbanije ili transmitancije o valnom broju, ν , izraženom u jedinicama cm^{-1} .

IR spektar se može podijeliti u tri dijela prema valnoj duljini: daleko (FIR, engl. *far-infrared*), srednje (MIR, engl. *mid-infrared*) i blisko (NIR, engl. *near-infrared*) infracrveno područje. Najvažnije je srednje infracrveno područje (4000 do 400 cm^{-1}) pri kojem apsorbira većina organskih spojeva. Srednji IR spektar može se dalje podijeliti na područje funkcijskih skupina (4000 – 1500 cm^{-1}) u koje uključuje rastezanje veza s vodikovim atomima, područje trostruke i dvostruke veze te na područje otiska prsta (1500 – 400 cm^{-1}) (29).

IR-spektar pripremljenog dipeptida u području isteznih frekvencija NH-skupina može ukazati na njihovo sudjelovanje ili nesudjelovanje u vodikovim vezama. Naime, istezne frekvencije NH-skupina u području nižem od 3400 cm^{-1} ukazuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama, dok se signali iznad 3400 cm^{-1} pripisuju slobodnim NH-skupinama.

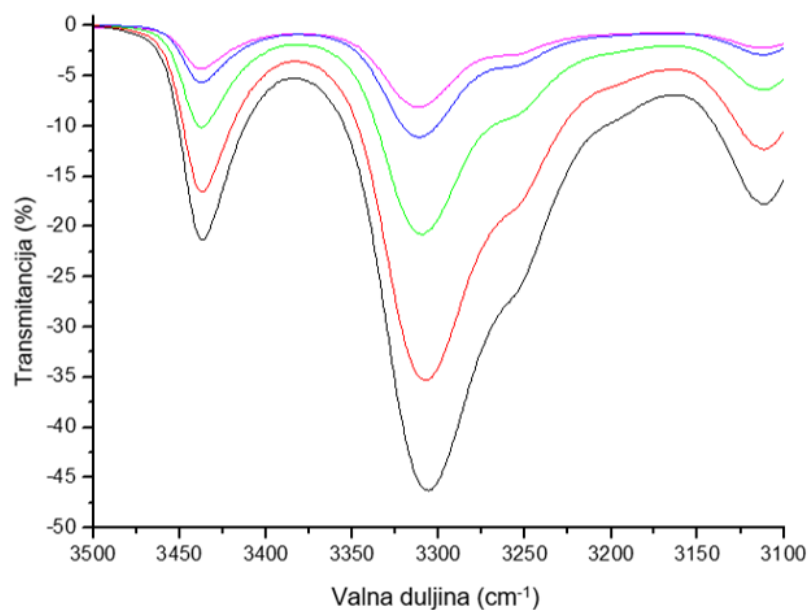
Karakter vodikove veze (intra- ili intermolekulski) određuje se mjerenjem koncentracijski-ovisnih IR-spektara. Intermolekulske vodikove veze cijepaju se postupnim razrjeđivanjem otopine ispitivanog uzorka, pri čemu se intenzitet signala asociраних NH skupina znatno smanjuje u odnosu na intenzitet signala slobodnih NH skupina. Ukoliko su prisutne intramolekulske vodikove veze u molekuli, postupnim razrjeđivanjem otopine uzorka proporcionalno se smanjuje intenzitet vrpce slobodnih i asociраних NH-skupina, pri čemu njihov omjer ostaje nepromijenjen (4).

Kovačević i suradnici su 2015. godine proučavali ferocenski dipeptid Ac-Ala-NH-Fn-NH-Ala-Boc (**IX**) (23) koji je analog spoja **6** te je idealan za istraživanje utjecaja zamjene alanina sa drugim aminokiselinama poput fenilalanina. U radu su zaključili da se omjer intenziteta signala slobodnih i asociраних NH-skupina ne mijenja pri razrjeđivanju otopine, što sugerira prisutnost IHB i isključuje mogućnost uspostave intermolekulskih agregata (slika 14).



Slika 14. Koncentracijski-ovisni IR-spektri spoja Ac-Ala-NH-Fn-NH-Ala-Boc (**IX**) u području NH-skupina (23)

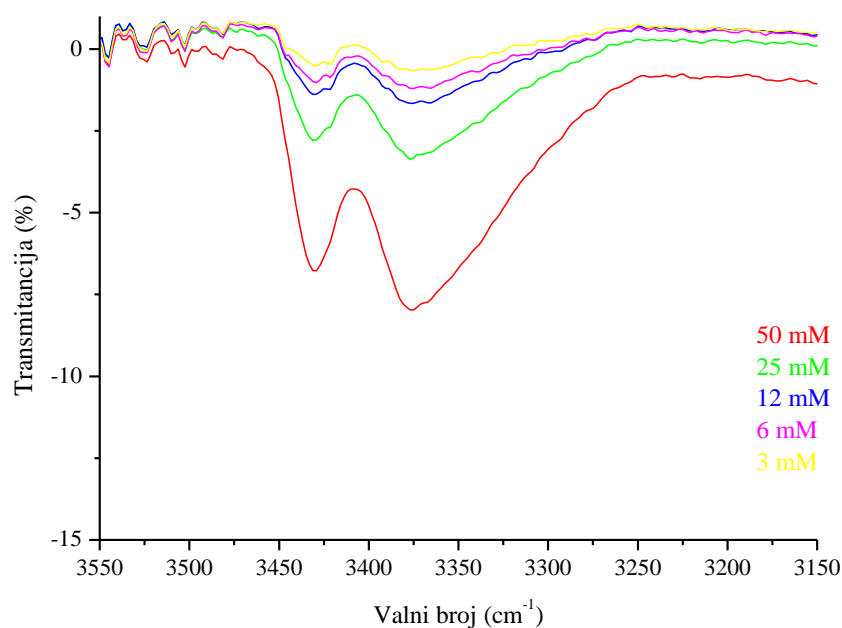
Prikazani su koncentracijski-ovisni IR-spektri spoja **6** u području NH skupina, iz kojih se može vidjeti jači signal pri $\approx 3310 \text{ cm}^{-1}$ koji odgovara asociranim NH-skupinama, u odnosu na signal pri $\approx 3440 \text{ cm}^{-1}$ koji se pripisuje slobodnim NH-skupinama, iz čega se može zaključiti da je većina NH skupina uključena u vodikove veze (slika 15). Postupnim razrjeđivanjem otopine ferocenskog dipeptida u diklormetanu u koncentracijskom rasponu od 50 mM do 3 mM, intenzitet signala slobodnih i asociranih NH-skupina se proporcionalno smanjivao što upućuje na stabilizaciju ispitivanog peptida **6** intramolekulskim vodikovim vezama, dok se prisutnost intermolekulskih agregata isključuje. Koncentracijski-neovisni IR spektri peptida **6** sugeriraju da zamjena jedne alaninske jedinice iz referentnog spoja **IX** s fenilalaninom ne ometa tvorbu IHB.



Slika 15. Koncentracijski-ovisni IR-spektri spoja **6** u području NH-skupina

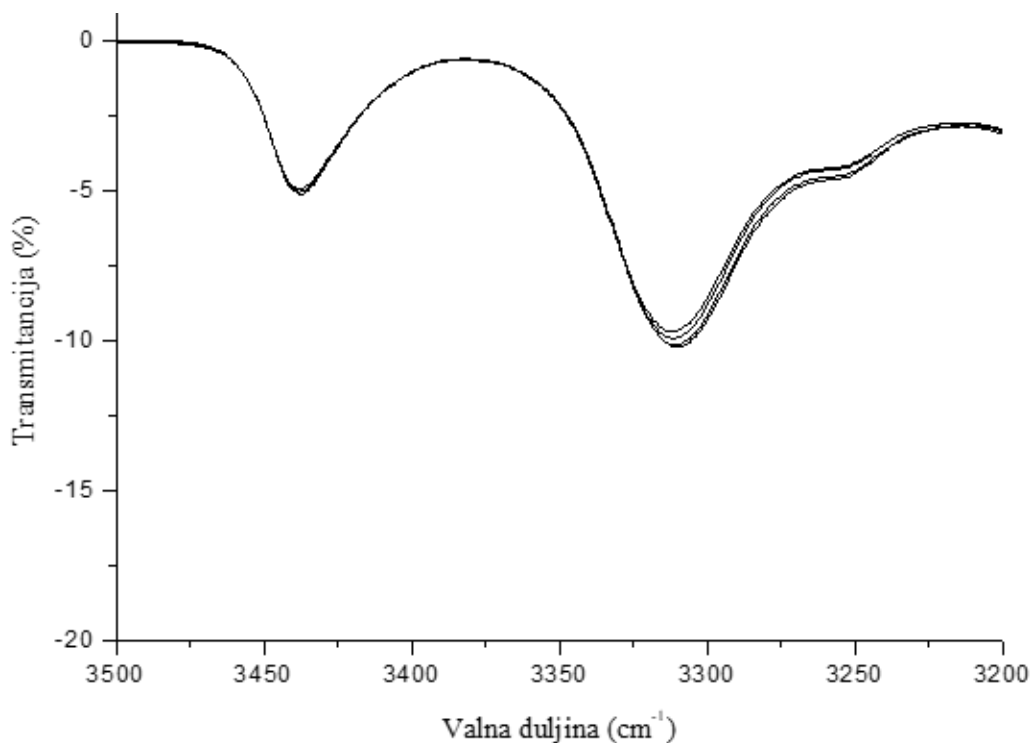
(CH₂Cl₂, [(—) $c = 5 \times 10^{-2}$ M, (—) $c = 2,5 \times 10^{-2}$ M, (—) $c = 1,25 \times 10^{-2}$ M, (—) $c = 6,13 \times 10^{-3}$ M, (—) $c = 3 \times 10^{-3}$ M].

Kovačević i suradnici su nastavili istraživati ferocenske dipeptide te su 2022. godine pripremili simetrično disupstituirane homokiralne konjugate ferocen-1,1'-diamina s fenilalaninom **XI** i **XIV** [Ac-L(D)-Phe-NH-Fn-NH-L(D)-Phe-Boc]. Vidljivo je da peptidi **XI** i **XIV** s dva fenilalaninska ostatka sadrže veći udio slobodnih NH skupina u odnosu na konjugate **6** i **IX**, a omjeri intenziteta slobodnih i asociраних NH-skupina u koncentracijski-ovisnom IR-spektru razrjeđivanjem se nisu mijenjali što sugerira prisutnost IHB (slika 16) (25).



Slika 16. Koncentracijski-ovisni IR-spektri spoja **XIV** u području NH-skupina

Temperaturno-ovisni IR-spektri omogućuju istraživanje utjecaja porasta temperature na vibracije veza i strukturne promjene u molekulama. Ova tehnika se koristi za analizu konformacijskih promjena, stabilnosti molekula te proučavanje inter- i intramolekulskih vodikovih veza.



Slika 17. Temperaturno-ovisni IR-spektri spoja **6** u području NH-skupina (CH_2Cl_2 , 25-45 °C).

Prema priloženom NH području IR spektara (slika 17), može se zaključiti da su istežne vibracije asociranih i slobodnih NH-skupina temperaturno neovisne što ukazuje na stabilizaciju spoja **6** jakim IHB.

4.5. NMR-spektroskopska analiza

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) je analitička metoda za utvrđivanje kemijske strukture organskih i anorganskih molekula. NMR je nedestruktivna analitička tehnika i primjenjiva je za plinovite, tekuće i čvrste uzorke (30). Također, NMR se rutinski koristi za strukturno određivanje proteina i proteinskih kompleksa, budući da pruža informacije o konformacijskim promjenama u proteinskim kompleksima (31).

U proteinskoj i peptidnoj kemiji NMR omogućuje razlikovanje slobodnih i asociраних NH skupina (kemijski pomaci iznad 7 ppm pripisuju se NH skupinama koje su odsjenjene uslijed sudjelovanja u vodikovim vezama) (24).

Provedena je analiza spoja **6** primjenom $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ spektroskopije te su registrirani visoki kemijski pomaci pri $\delta > 9$ ppm za NH skupine iz ferocenskog kalupa ($\text{NH}_{\text{Fn}}^{\text{a}}$ i $\text{NH}_{\text{Fn}}^{\text{b}}$), što upućuje na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama (tablica 1). Kemijski pomak NH_{Ac} iznosi 7,05 ppm što znači da vrlo vjerojatno sudjeluje u vodikovim vezama. NH_{Boc} registrirana je pri višem polju ($\delta < 7$ ppm) pa se može zaključiti da se radi o slobodnoj NH-skupini.

Kovačević i suradnici su 2015. godine zabilježili slične rezultate za peptid **IX** (23), kod kojeg su kemijski pomaci NH skupina iz ferocenskog kalupa također bili registrirani pri $\delta > 9$ ppm sugerirajući njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama. NH-skupine iz Ac- odn. Boc-zaštitnih skupina peptida **IX** s oba alaninska ostatka registrirane su pri višem polju čime je isključeno njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama. Slični rezultati dobiveni su i za simetrično disupstituirani peptid **XIV** koji sadrži dva fenilalaninska ostatka (25).

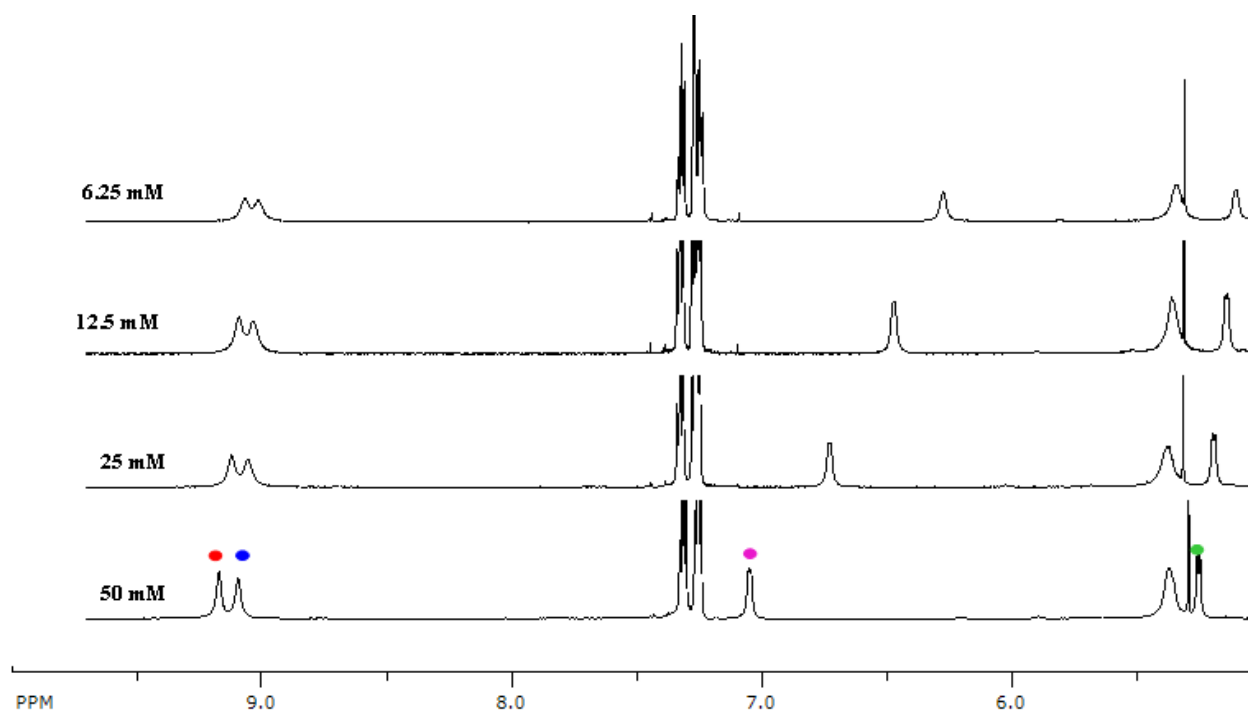
Tablica 1. Kemijski pomaci (δ/ppm)^[a] amidnih protona peptida **IX**, **XIV** i **6**

Spoj	Formula	($\text{NH}_{\text{Fn}^{\text{b}}}$) δ (ppm)	($\text{NH}_{\text{Fn}^{\text{a}}}$) δ (ppm)	(NH_{Ac}) δ (ppm)	(NH_{Boc}) δ (ppm)
IX	Ac-D-Ala-NH^a-Fn-NH^b-D-Ala-Boc	9,09	9,06	6,85	5,21
XIV	Ac-D-Phe-NH^a-Fn-NH^b-D-Phe-Boc	9,12	9,18	7,07	5,30
6	Ac-D-Ala-NH^a-Fn-NH^b-D-Phe-Boc	9,17	9,09	7,05	5,25

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

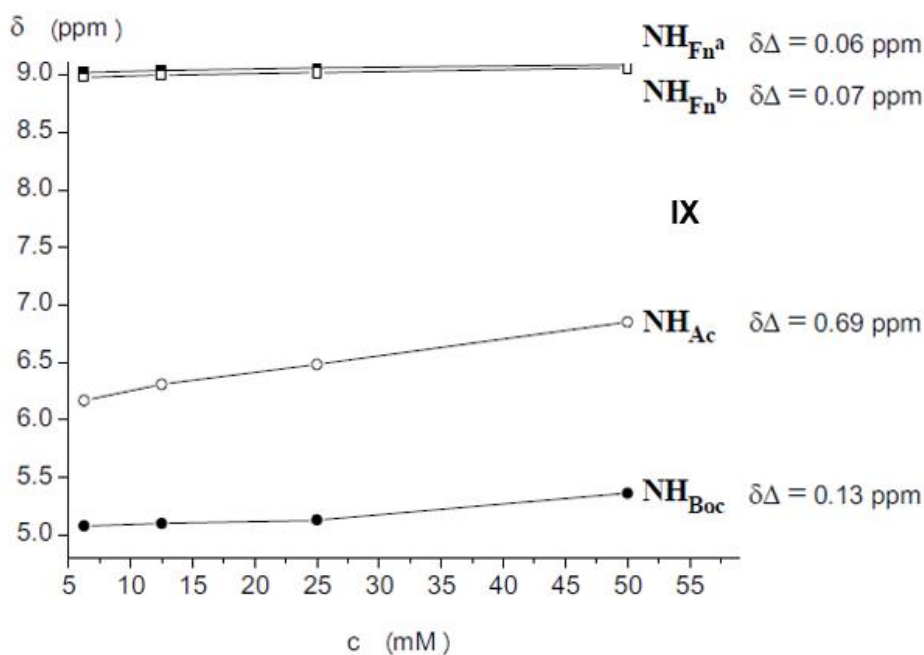
U sklopu ovog Diplomskog rada, izmjereni su koncentracijski- i temperaturno-ovisni spektri, budući da razrjeđivanjem ili zagrijavanjem dolazi do cijepanja intermolekulske vodikove veze što uzrokuje pomak amidnih protona u više polje. Koncentracijski-ovisni spektri snimaju se razrjeđivanjem početne 50 mM otopine peptida u kloroformu, a temperaturno ovisni spektri obuhvaćaju snimanje 25 mM otopine peptida u kloroformu, pri 8 različitih temperatura (258-328 K).

Na slici 18 prikazani su koncentracijski-ovisni ^1H NMR-spektri spoja **6** u kloroformu koji pokazuju da ne dolazi do promjene kemijskog pomaka NH-skupina vezanih direktno na ferocen (NH_{Fn^b} i NH_{Fn^a}) tijekom razrjeđivanja 50 mM otopine dipeptida u kloroformu do 6 mM, što potvrđuje njihovo sudjelovanje u IHB. Izraženija promjena kemijskih pomaka ($\Delta\delta \sim 0,8$ ppm) amidnih protona NH_{Ac} ukazuje na njihovo sudjelovanje u slabijim IHB.



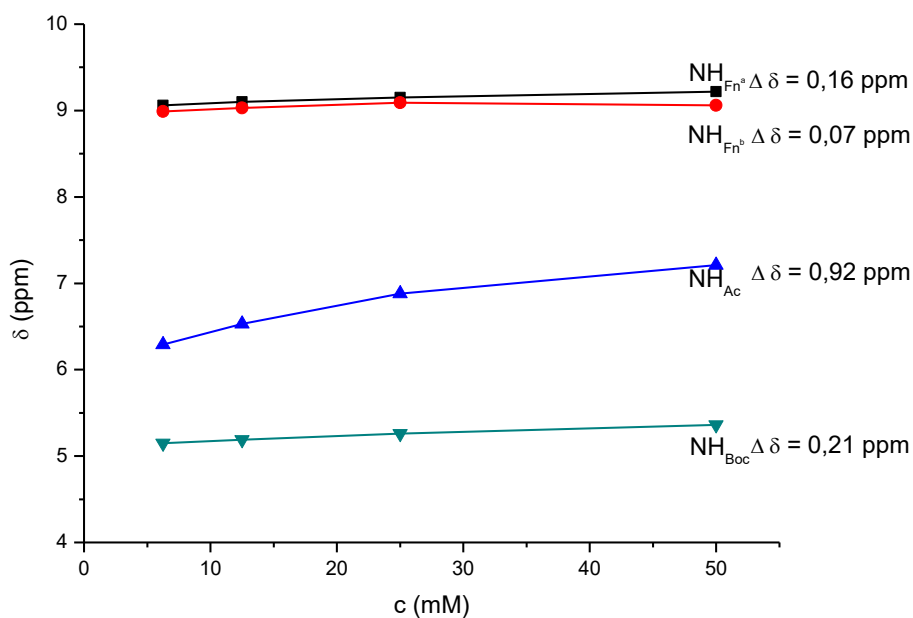
Slika 18. Koncentracijski ^1H NMR-spektar spoja **6** u kloroformu

Slične rezultate su opisali Kovačević i suradnici 2015. godine na temelju koncentracijski-ovisnih NMR-spektara peptida **IX** (slika 19) (23). Nisu zabilježene značajne promjene u kemijskom pomaku NH skupina direktno vezanih za ferocen što sugerira njihovo sudjelovanje u jakim IHB. Naglašenije promjene kemijskih pomaka NH_{Ac} prema višem polju također su ukazivale na njihovo sudjelovanje u slabijim IHB.



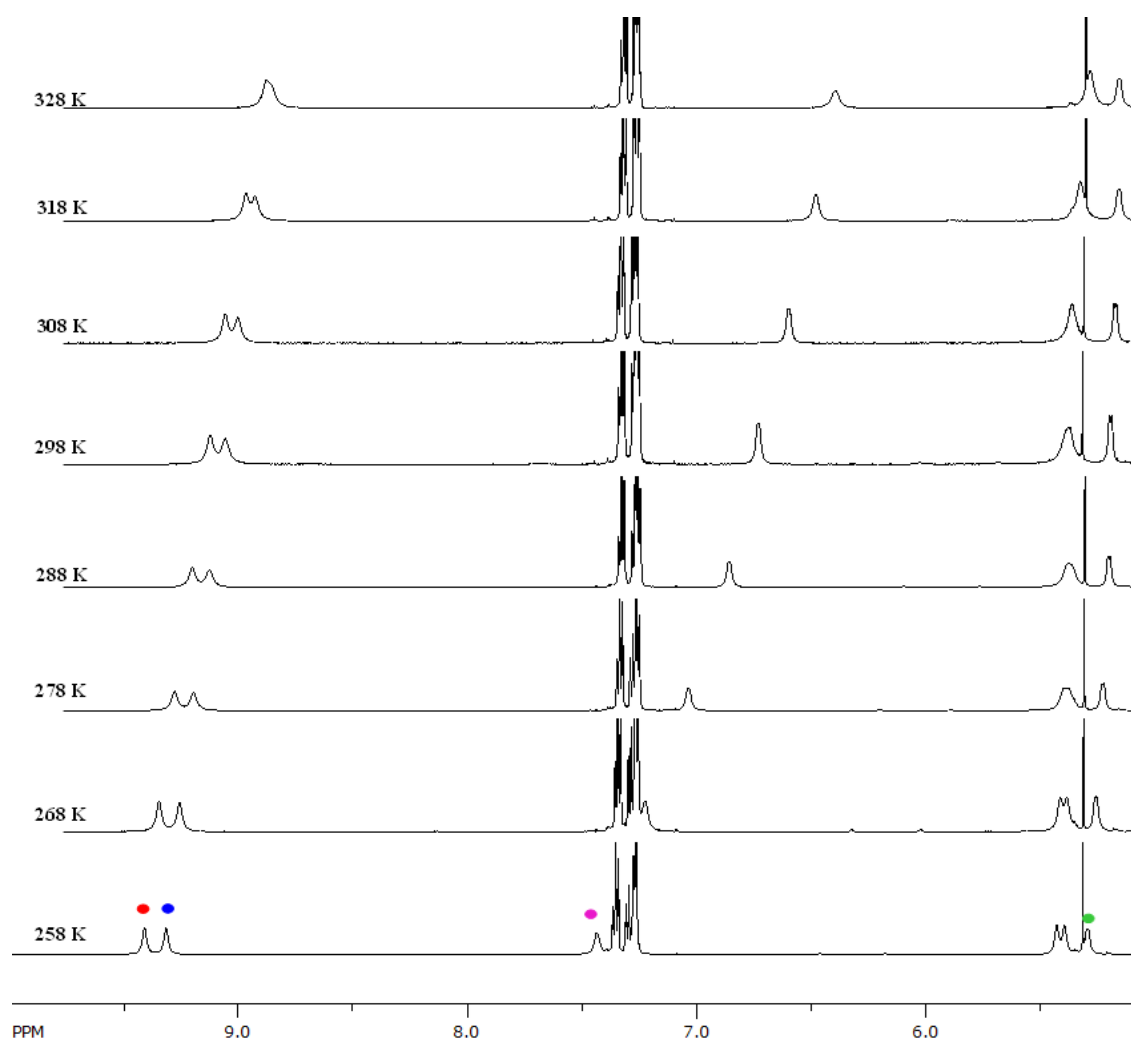
Slika 19. Koncentracijsko-ovisni NH kemijski pomaci spoja **IX** (23)

Prema rezultatima iz 2022. godine, za spoj **XIV** (slika 20), Kovačević i suradnici su, na temelju minimalne promjene kemijskih pomaka ($\Delta\delta < 0,16$ ppm), zaključili da NH-skupine iz ferocenskog kalupa (NH_{Fn^b} i NH_{Fn^a}) sudjeluju u jakim IHB. Nasuprot tome, značajne promjene kemijskih pomaka NH_{Ac} sugeriraju sudjelovanje u slabim IHB (25).

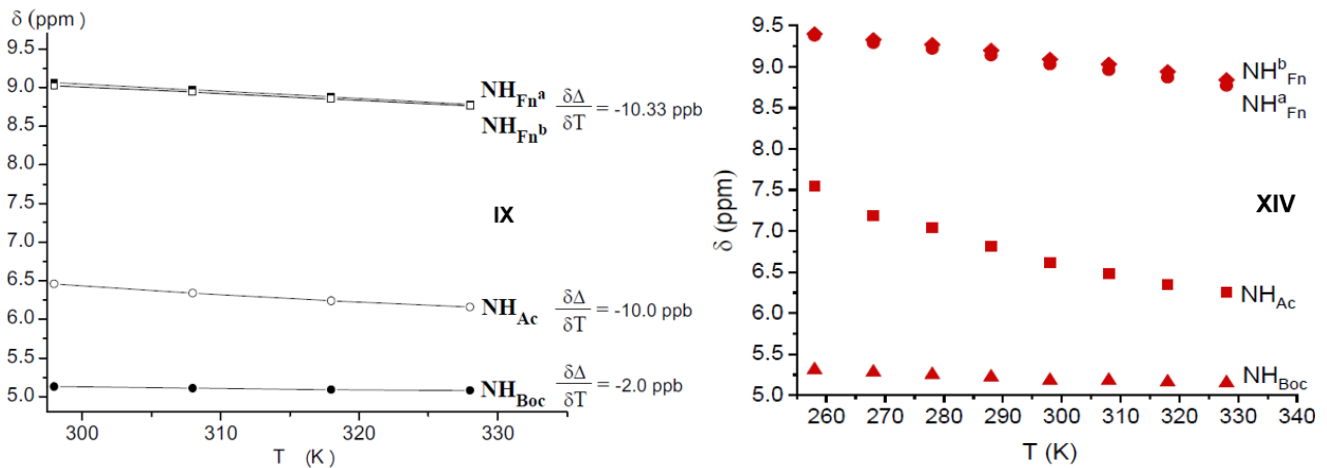


Slika 20. Koncentracijsko-ovisni NH kemijski pomaci spoja **XIV** (25)

Povećanjem temperature ne dolazi do značajnih promjena kemijskih pomaka $\text{NH}_{\text{Fn}}^{\text{b}}$ i $\text{NH}_{\text{Fn}}^{\text{a}}$ u peptidu **6** (slika 21) iz čega se može zaključiti da sudjeluju u jačim IHB. Veće promjene kemijskih pomaka NH_{Ac} prema višem polju ukazuju na sudjelovanje u slabijim IHB. Slični rezultati temperaturno-ovisne NMR spektroskopije utvrđeni su za peptide **IX** (23) (slika 22, lijevo) i **XIV** (25) (slika 22, desno).



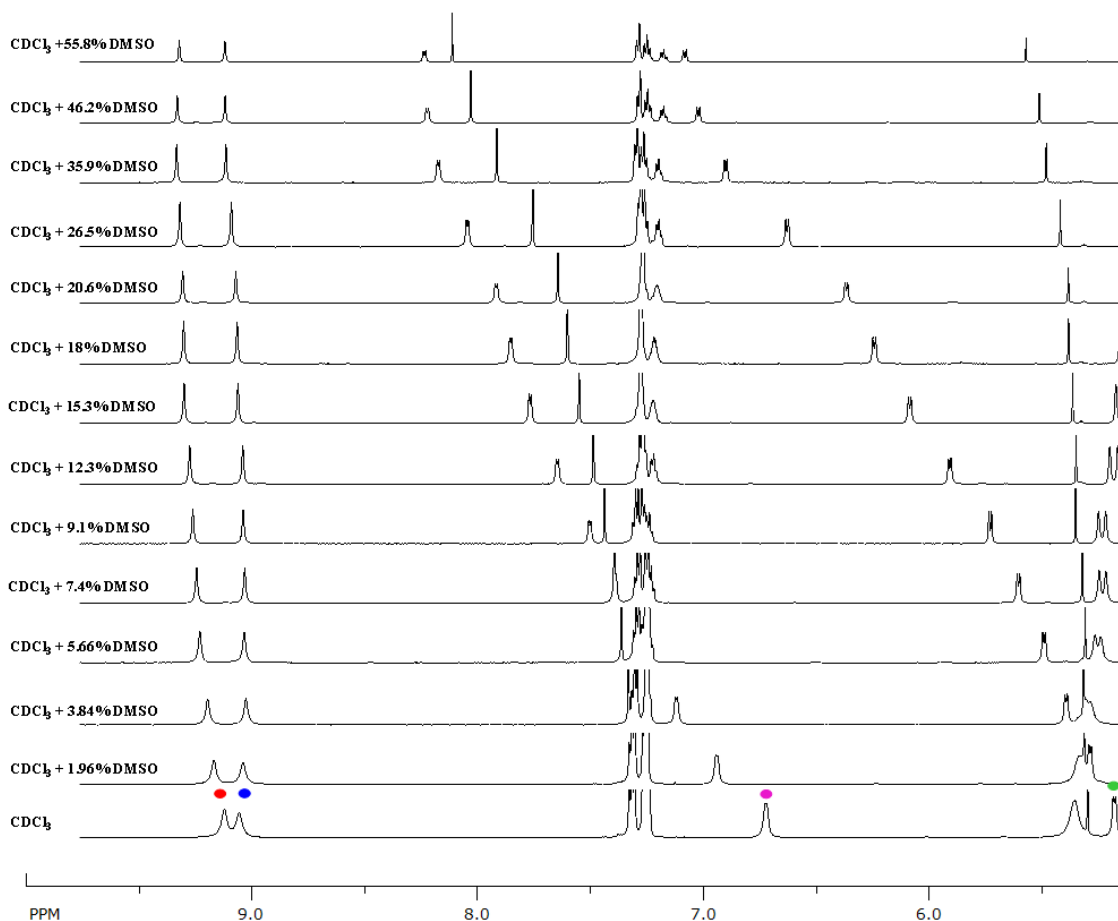
Slika 21. Temperaturni ^1H NMR-spektar spoja **6** ($c = 25 \text{ mM}$) u kloroformu



Slika 22. Temperaturno-ovisni NH kemijski pomaci spojeva IX (lijevo) i XIV (desno)

4.6. Titracija s DMSO

Titracijom s dimetilsulfoksidom (DMSO) ispitana je jakost IHB čija je prisutnost prethodno utvrđena IR- i NMR-analizom. Pritom se očekuje značajan pomak signala slobodnih NH-protona prema nižem polju uslijed solvatacije s DMSO, dok se za NH-protone zaklonjene od otapala jakim IHB ne očekuju značajne promjene kemijskih pomaka. Tijekom titracije spoja **6** s polarnim DMSO nije došlo do značajnih promjena u kemijskim pomacima $\text{NH}_{\text{Fn}^{\text{b}}}$ i $\text{NH}_{\text{Fn}^{\text{a}}}$ protona, što upućuje na njihovo sudjelovanje jakim IHB (slika 23). Nasuprot tome, protoni NH_{Ac} pokazali su izraženije promjene kemijskih pomaka što se pripisuje njihovom sudjelovanju u slabim IHB. Ako usporedimo rezultate konformacijske analize peptida **6**, **IX** (23) i **XIV** (25), može se uočiti dobra korelacija što sugerira da su u tim peptidima prisutni slični IHB obrasci.



Slika 23. DMSO-titracija otopine spoja 6 ($c = 25 \text{ mM}$) u kloroformu

4.7. CD-spektroskopska analiza

Spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD) je optička spektroskopska metoda koja daje informaciju o konformacijskim svojstvima proteina. Naširoko se koristi za otkrivanje sekundarne strukture proteina na temelju elektronskih prijelaza u dalekom ultraljubičastom (UV) području valne duljine ($\sim 170\text{-}240 \text{ nm}$) i za praćenje lokalnog okruženja tercijarne strukture aromatskih aminokiselinskih ostataka u bliskom UV području ($\sim 260\text{-}300 \text{ nm}$) (32).

CD spektroskopija je vrlo osjetljiva metoda koja može razlikovati konformacije α -uzvojnice, β -ploče i nasumične okrete. Iako su informacije koje se mogu dobiti CD spektroskopijom donekle ograničene u usporedbi s NMR ili rendgenskom (X-ray) difrakcijom, CD podaci su vrijedni kao preliminarni vodič za utvrđivanje konformacije peptida i proteina i konformacijske prijelaze u širokom rasponu uvjeta (33).

Uvođenje ferocena u kiralno peptidno okruženje uz prisutnost jakih IHB inducira Cottonov efekt, na čiji predznak utječe slijed prirodnih aminokiselina, vrsta zaštitnih skupina vezanih na

jezgru ferocena i otapalo (27). Intenzitet Cottonovog efekta je proporcionalan stabilnosti nabrane konformacije, a njegov pozitivan ili negativan signal ovisi o desnoj ili lijevoj heličnosti ferocenske jezgre u pripadajućem peptidu (25). S obzirom da vodikove veze induciraju kiralno uređenje oko ferocenskog kromofora ($\lambda \sim 480$ nm), očekuje se CD-aktivnost ferocenskog peptida.

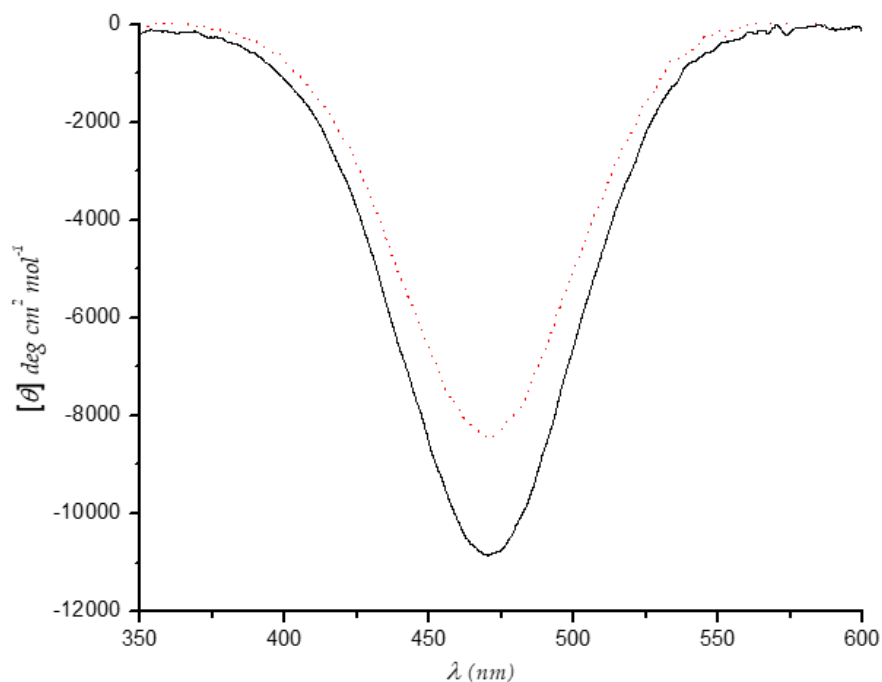
U tablici 2 navedeni su Cottonovi efekti dipeptida **6** kao i njegovih analoga, dok su na slici 23 prikazani Cottonovi efekti dipeptida **6**.

Tablica 2. Cottonovi efekti u peptidima **IX**, **XIV** i **6**

Spoj	Formula	$[\theta]$ deg cm ² dmol ⁻¹	
		CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂ + DMSO
IX	Ac-D-Ala-NH^a-Fn-NH^b-D-Ala-Boc	-24000	-15000
XIV	Ac-D-Phe-NH^a-Fn-NH^b-D-Phe-Boc	-9200	-5160
6	Ac-D-Ala-NH^a-Fn-NH^b-D-Phe-Boc	-11000	-8000

^[a]CD-spektri mjereni su u CH₂Cl₂ ($c = 5 \times 10^{-3}$ M) i uz dodatak 20 % DMSO

Na slici 24 može se vidjeti CD-aktivnost dipeptida **6** u području ferocenskog kromofora što ukazuje na kiralno uređenje dipeptida. Jači Cottonov efekt ($M_0 = -11000$ deg cm² mol⁻¹) upućuje na prisutnost visokouređene kiralne strukture, što se podudara sa rezultatima IR- i NMR-analize. S obzirom da je DMSO kompetitivno otapalo, poznato je da pokazuje snažnu tendenciju solvatacije NH skupina izloženih otapalu (NH skupine koje sudjeluju u slabim IHB ili uopće ne sudjeluju u vodikovim vezama). Dodatak DMSO peptidu **6** uzrokuje 27 %-tno slabljenje Cottonova efekta što upućuje na konformacijsku stabilnost peptida.



Slika 24. CD-spektri spoja **6** u diklormetanu

[$c = 5 \times 10^{-3}$ M (puna crna crta)] i uz dodatak 20 % DMSO (isprekidana crvena crta).

Iz tablice 2 može se zaključiti da uvođenje jedne fenilalaninske jedinice u peptidu **6** dovodi do slabljenja Cottonovog efekta ($M_0 = -11000 \text{ deg cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) u odnosu na dialaninski dipeptid **IX** ($M_0 = -24000 \text{ deg cm}^2 \text{ mol}^{-1}$). Dodatno uvođenje još jedne fenilalaninske jedinice u peptid **XIV** dovodi do daljnjeg smanjenja Cottonovog efekta ($M_0 = -9200 \text{ deg cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) što upućuje da sterički zahtjevniji fenilalaninski bočni ogranak smanjuje stupanj kiralnog uređenja odnosno konformacijsku stabilnost.

5. ZAKLJUČCI

1. Peptid Ac–D–Ala–NH–Fn–NH–D–Phe–Boc (**6**) sintetiziran je u dobrom iskorištenju.
2. Sinteza peptida Ac–D–Ala–NH–Fn–NH–L–Phe–Boc (**7**) nije bila moguća zbog nestabilnosti i raspada na neidentificirane razgradne produkte tijekom sinteze.
3. Kristalografskom analizom peptida **6** utvrđene su tri intramolekulske vodikove veze, $\text{NH}_{\text{Fn}^{\text{a}}}\cdots\text{OC}_{\text{Boc}}$, $\text{NH}_{\text{Fn}^{\text{b}}}\cdots\text{OC}_{\text{Ac}}$ i $\text{CH}_{\text{Fn}^{\text{a}}}\cdots\text{OC}_{\text{Boc}}$.
4. IR-spektar peptida **6** ukazuje na postojanje slobodnih i asociраних NH-skupina.
5. U koncentracijsko-ovisnom IR-spektaru utvrđeno je da se omjer intenziteta slobodnih i asociраних NH-skupina ne mijenja razrjeđivanjem diklormetanske otopine peptida **6**, što upućuje na njegovu stabilizaciju intramolekulskim vodikovim vezama (IHB).
6. U temperaturno-ovisnom IR-spektaru spoja **6** ne dolazi do promjene u omjerima apsorpcijskih vrpca slobodnih i asociраних NH-skupina pri različitim temperaturama, što je indicacija tvorbe jačih IHB.
7. NMR-spektar peptida **6**, pokazuje sudjelovanje NH skupina iz ferocenskog kalupa ($\text{NH}_{\text{Fn}^{\text{a}}}$ i $\text{NH}_{\text{Fn}^{\text{b}}}$) u IHB ($\delta > 8$ ppm).
8. Intramolekulski karakter vodikovih veza potvrđen je NMR-spektroskopskom analizom, pri čemu su se kemijski pomaci $\text{NH}_{\text{Fn}^{\text{a}}}$ i $\text{NH}_{\text{Fn}^{\text{b}}}$ pokazali koncentracijski i temperaturno neovisnima.
9. Jakost IHB testirana je titracijom s kompeticijskim otapalom (DMSO), pri čemu nije uočena značajnija promjena kemijskih pomaka NH skupina iz ferocenskog kalupa, što je dodatna indicacija njihovog sudjelovanja u jakim IHB.
10. CD-spektroskopska analiza peptida **6** rezultirala je Cottonovim efektima visokog intenziteta u području ferocenskog kromofora čime su potvrđene pretpostavke o tvorbi visokouređenih struktura u otopini.

6. LITERATURA

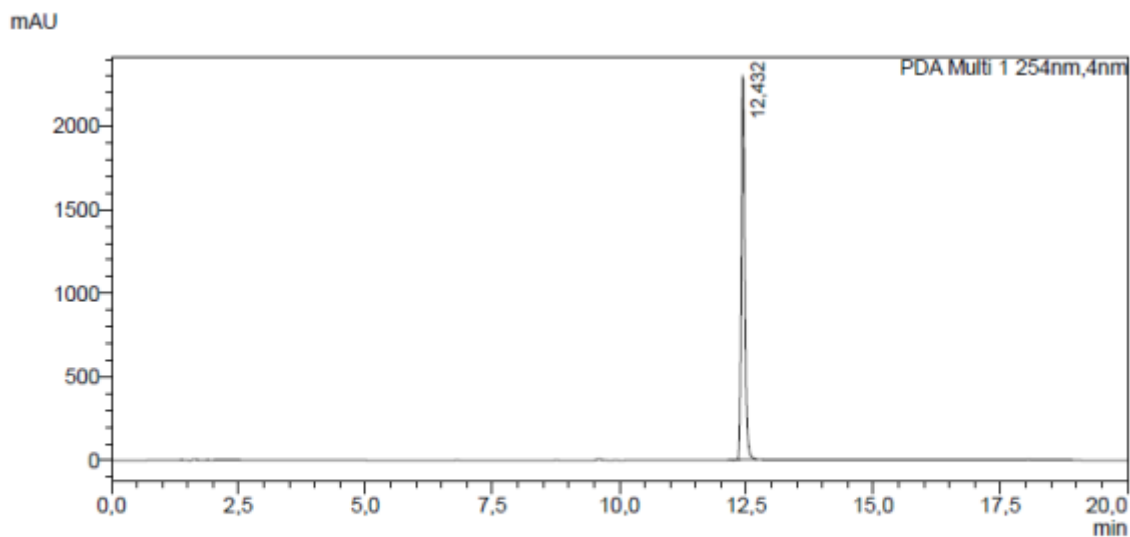
1. Jaouen G, Beck W, McGlinchey MJ (2006) A Novel Field of Research: Bioorganometallic Chemistry, Origins, and Founding Principles. U: Jaouen G (ured.) Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine, John Wiley & Sons, Weinheim, str. 1-37.
2. Simonneaux, G. (ur.) (2006), Bioorganometallic Chemistry (Topics in Organometallic Chemistry), Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
3. Barišić L (2018) Nastavni materijali iz peptidnih mimetika i pseudopeptida (interna skripta), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
4. Kovačević M (2014) Ferrocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima (doktorski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
5. Monney A, Albrecht M (2013) Transition metal bioconjugates with an organometallic link between the metal and the biomolecular scaffold. *Coord Chem Rev* **257**, 2420–2433. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.12.015>
6. Bitencourt C, Luz AP, Pagliosa C, Pandolfelli VC (2015) Role of catalytic agents and processing parameters in the graphitization process of a carbon-based refractory binder. *Ceram Int* **41**, 13320–13330. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.07.115>
7. Dagani R (2001) Fifty years of ferrocene chemistry. *Chem Eng News* **79**, 37–38. <https://doi.org/10.1021/cen-v079n049.p037>
8. Peluso P, Mamane V (2022) Ferrocene derivatives with planar chirality and their enantioseparation by liquid-phase techniques. *Electrophoresis* **44**, 158–189. <https://doi.org/10.1002/elps.202200148>
9. Astruc D (2016) Why is Ferrocene so Exceptional? *Eur J Inorg Chem* **2017**, 6–29. <https://doi.org/10.1002/ejic.201600983>
10. Peter S, Aderibigbe BA (2019) Ferrocene-Based Compounds with Antimalaria/Anticancer Activity. *Molecules* **24**, 3604. <https://doi.org/10.3390/molecules24193604>
11. Wade LG (2013) Organic Chemistry, 8. izd., Pearson, Boston.
12. McKee JR, McKee T (2019) Biochemistry: The molecular basis of life. 7. izd., Oxford University Press, New York.

13. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L (2015) Biochemistry, 8. izd., W.H. Freeman, New York.
14. Pelay-Gimeno M, Glas A, Koch O, Grossmann, TN (2015) Structure-Based Design of Inhibitors of Protein–Protein Interactions: Mimicking Peptide Binding Epitopes. *Angew Chem Int Ed Engl* **54**, 8896–8927. <https://doi.org/10.1002/anie.201412070>
15. Sai priya K, Raju Darla, Poojitha Gone (2022) Role of peptidomimetics for new drug discovery. *World J Adv Res Rev* **16**, 271–291. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2022.16.2.1150>
16. Gokhale AS, Satyanarayanajois S (2014) Peptides and peptidomimetics as immunomodulators. *Immunotherapy* **6**, 755–774. <https://doi.org/10.2217/imt.14.3>
17. Wąty J, Miller A, Kozłowski H, Rowińska-Żyrek M (2021) Peptidomimetics – An infinite reservoir of metal binding motifs in metabolically stable and biologically active molecules. *J Inorg Biochem* **217**, 111386. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111386>
18. NCBI (2024) Phenylalanine. NCBI-National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenylalanine>. Pristupljeno 22. travnja 2024.
19. Nelson DL, Cox MM (2004) Lehninger principles of biochemistry. 4. izd., W. H. Freeman, New York.
20. Sun Z, Li Z, He Y, Shen R, Deng L, Yang M i sur. (2013) Ferrocenoyl Phenylalanine: A New Strategy Toward Supramolecular Hydrogels with Multistimuli Responsive Properties. *J Am Chem Soc* **135**, 13379–13386. <https://doi.org/10.1021/ja403345p>
21. NCBI (2024) Alanine. NCBI-National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Alanine>. Pristupljeno 22. travnja 2024.
22. Chowdhury S, Mahmoud KA, Schatte G, Kraatz HB (2005) Amino acid conjugates of 1,1'-diaminoferrocene. Synthesis and chiral organization. *Org Biomol Chem* **3**, 3018-3023. <https://doi.org/10.1039/B506178D>
23. Kovačević M, Kodrin I, Cetina M, Kmetič I, Murati T, Čakić Semenčić M i sur. (2015) The conjugate of β -turn-nucleating ferrocene-1,1'-diamine and amino acids. A novel synthetic approach and conformational analysis. *Dalton Trans* **44**, 16405–16420. <https://doi.org/10.1039/C5DT01610J>

24. Kovačević M, Kodrin I, Roca S, Molčanov K, Shen Y, Adhikari B (2017) Helically chiral peptides that contain ferrocene-1,1'-diamine scaffolds as a turn inducer. *Chem Eur J* **23**, 10372-10395. <https://doi.org/10.1002/chem.201701602>
25. Kovačević M, Markulin D, Zelenika M, Marjanović M, Lovrić M, Polančec D, i sur. (2022) Hydrogen bonding drives helical chirality via 10-membered rings in dipeptide conjugates of ferrocene-1,1'-diamine. *Int J Mol Sci* **23**, 12233. <https://doi.org/10.3390/ijms232012233>
26. Perrin DD, Armarego WLF (1988) Purification of laboratory chemicals, 3. izd., Pergamon Press, Oxford/NewYork.
27. Barišić L, Rapić V, Kovač V (2002) Ferrocene Compounds. XXIX.* Efficient Syntheses of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid Derivatives. *Croat Chem Acta* **75**, 199-210.
28. Kovačević M, Čakić Semenčić M, Kodrin I, Roca S, Perica J, Mrvčić J, i sur. (2023) Biological evaluation and conformational preferences of ferrocene dipeptides with hydrophobic amino acids. *Inorganics* **11**, 29. <https://doi.org/10.3390/inorganics11010029>
29. Wolstenholme R, Jickells S, Forbes S (ur.) (2021) Analytical Techniques in Forensic Science, Wiley, Hoboken.
30. Tampieri A, Szabó M, Medina F, Gulyás H (2020) A brief introduction to the basics of NMR spectroscopy and selected examples of its applications to materials characterization. *Phys Sci Rev* **6**, 20190086. <https://doi.org/10.1515/psr-2019-0086>
31. Purslow JA, Khatiwada B, Bayro MJ, Venditti V (2020) NMR Methods for Structural Characterization of Protein-Protein Complexes. *Front Mol Biosci* **7**, 9. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00009>
32. Miles AJ, Janes RW, Wallace BA (2021) Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins: a tutorial review. *Chem Soc Rev* **50**, 8400–8413. <https://doi.org/10.1039/d0cs00558d>
33. Sewald N, Jakubke HD (2002) Peptides: Chemistry and Biology, Wiley-VCH, Weinheim.

7. PRILOZI

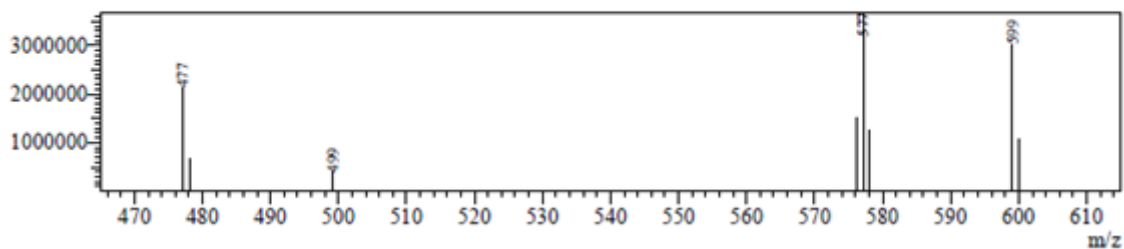
7.1. Prilog 1. HPLC kromatogram i ESI-MS spektar masa spoja 6



Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	12.432	11082237	2284619	100.000		M	
Total		11082237	2284619				

Line#:4 R.Time:----(Scan#:----)
 MassPeaks:8
 Spectrum Mode:Averaged 12.433-12.500(747-751) Base Peak:577(3673392)
 BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1



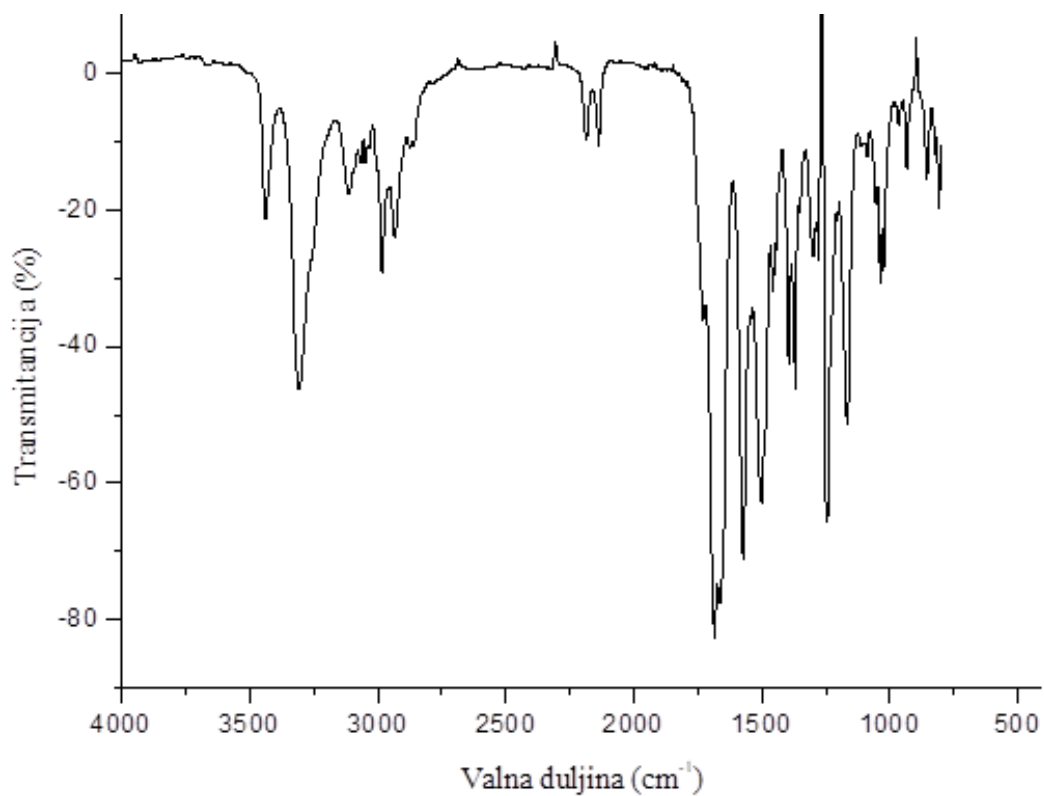
BG Mode Calc Segment 1 - Event 1

#	m/z	absolute	relative	intensity
1	477.05	2146558	58.44	
2	478.10	643995	17.53	
3	499.10	400018	10.89	

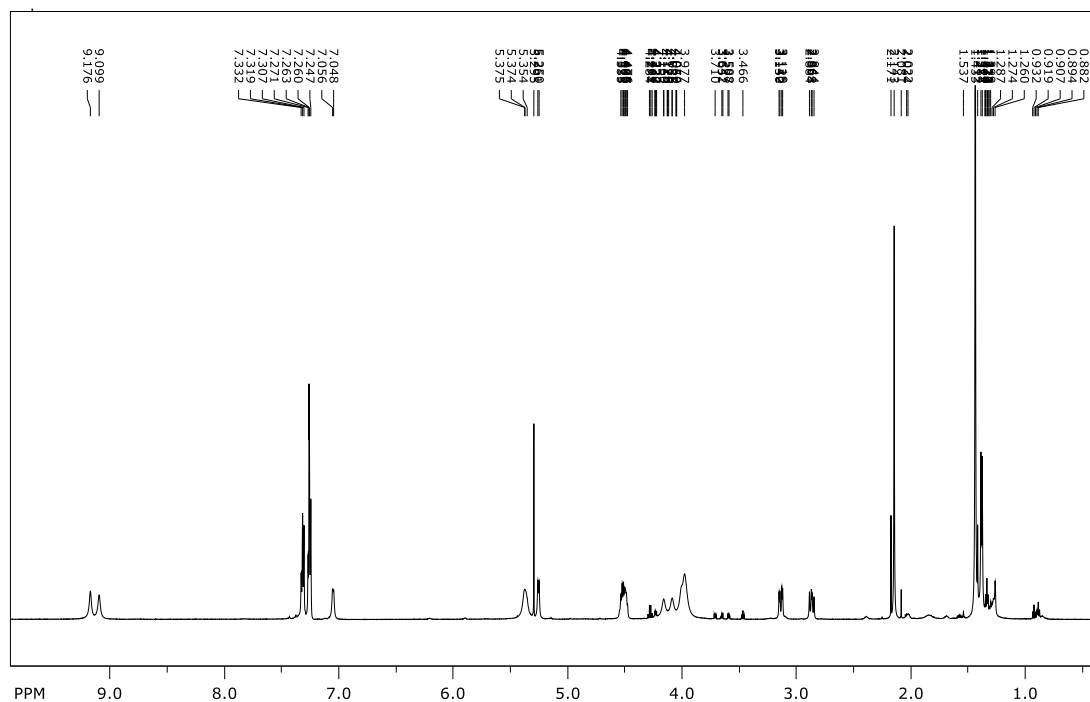
#	m/z	absolute	relative	intensity
4	576.15	1491342	40.60	
5	577.15	3673392	100.00	
6	578.15	1251021	34.06	

#	m/z	absolute	relative	intensity
7	599.10	3025977	82.38	
8	600.10	1077959	29.35	

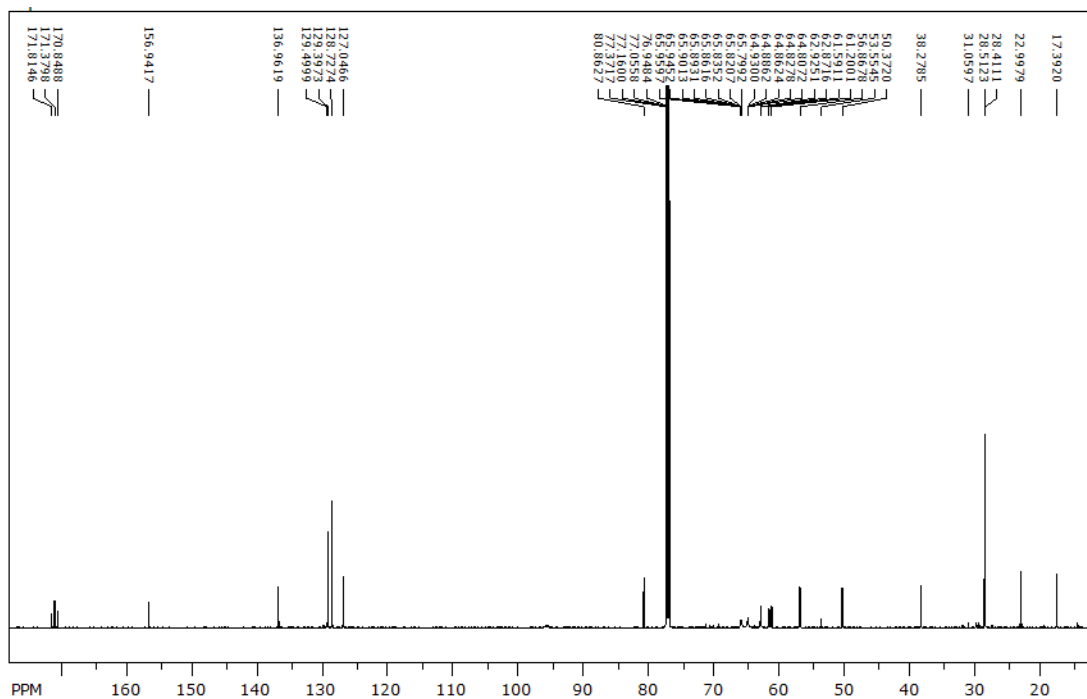
7.2. Prilog 2. IR-spektar spoja 6 snimljen u diklormetanu (c = 50 mM)



7.3. Prilog 3. ¹H-NMR spektar spoja 6 snimljen u kloroformu (c = 50 mM)



7.4. Prilog 4. ¹³C-NMR spektar spoja 6 snimljen u kloroformu (c = 50 mM)



IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja EVELIN RADEŠIĆ izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis