

# Priprava i konformacijska analiza ferocenskih tripeptida Ala-Pro sekvence izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina

---

Stipčić, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:159:063241>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerađivanja 3.0](#)

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

Tea Stipčić

1186/N

**PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA  
ANALIZA FEROCENSKIH  
TRIPLEPTIDA ALA-PRO  
SEKVENCE IZVEDENIH IZ  
FEROCEN-1,1'-DIAMINA**

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

*Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Moniki Kovačević na svom prenesenom znanju, trudu i pomoći tijekom izrade diplomskog rada.*

*Veliko hvala svim djelatnicima Laboratorija za organsku kemiju te izv.prof.dr.sc. Vesni Petrović Peroković, doc.dr.sc. Ivanu Kodrinu i dr.sc. Sunčici Roca na susretljivosti i pomoći.*

*Hvala i mojim kolegicama i prijateljicama Dodo, Sandri i Anji koje su uspomenu na studentske dane učinile ljepšom i snažnijom.*

*Posebnu zahvalnost iskazujem svojoj obitelji, mami Snježani, tati Igoru te sestri Heli na bezuvjetnoj ljubavi, potpori i motivaciji tijekom cijelog školovanja i odrastanja.*

*Također zahvaljujem Mariji i Ivici na velikoj vjeri i potpori.*

*Hvala i mom Marku čija su me neizmjerena ljubav i vjera vodile k ovom uspjehu.*

# 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: Nutricionizam

## PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA ANALIZA FEROCENSKIH TRIPEPTIDA ALA-PRO SEKVENCE IZVEDENIH IZ FEROCEN-1,1'-DIAMINA

*Tea Stipčić, 1186/N*

### Sažetak:

Biološka primjena prirodnih peptida ograničena je njihovim nepoželjnim svojstvima (konformacijska fleksibilnost, niska stabilnost) zbog čega se intenzivno istražuje područje peptidomimetika. Ferocenski konjugati s aminokiselinama često se koriste kao peptidomimetici jer su se 1, *n*-disupstituirani ferocenski biokonjugati pokazali dobrim kalupom za tvorbu intramolekulskih vodikovih veza. Sekvence bogate alaninom i prolinom pokazuju brojna poželjna svojstva (visoka topljivost, stabilnost i biodostupnost), dok ferocenski diamin inducira tvorbu intramolekulskih vodikovih veza koje su stabilizirane 14-članim prstenovima.

U ovom Diplomskom radu opisana je sinteza i konformacijska analiza ferocenskih tripeptida **12-15** [Ac-L(D)-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-L(D)-Pro-Boc, Fn = ferocenilen, Ac = acetyl, Boc = *tert*-butoksikarbonil] kao i njihovih prekursora **2-5** [Boc(Ac)-L(D)-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe], izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina i peptidne sekvence Ala-Pro. Utjecaj kiralnosti pojedinih aminokiselina u peptidnom lancu, kao i *N*-terminalnih zaštitnih skupina (Boc, Ac) ispitani su spektroskopskom analizom (IR-, NMR- i CD-spektroskopija) te potkrijepljeni DFT-računima. Pokazalo se da promjenom kiralnosti aminokiselina dolazi do promjene u obrascima vodikovih veza, dok zaštitne skupine nemaju utjecaj na tvorbu istih.

**Glavne riječi:** ferocen, sekundarna struktura, konformacijska analiza, peptidomimetici, DFT

**Rad sadrži:** 69 stranica, 36 slika, 7 tablica, 5 shema, 118 literaturnih navoda, 6 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** doc.dr.sc. Monika Kovačević

### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Lidija Barišić
2. Doc. dr. sc. Monika Kovačević
3. Prof. dr. sc. Renata Teparić
4. Prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (zamjena)

**Datum obrane:** 16. srpnja 2020.

## 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:** Nutrition

### SYNTHESIS AND CONFORMATIONAL ANALYSIS OF FERROCENE TRIPEPTIDES DERIVED FROM FERROCENE-1,1'-DIAMINE AND ALA-PRO SEQUENCE

*Tea Stipčić, 1186/N*

#### **Abstract:**

The biological application of natural peptides is limited by their undesirable properties (conformational flexibility, low stability), therefore the field of peptidomimetics is being intensively investigated. As the 1, *n*-disubstituted ferrocene bioconjugates have been established as good motif for the formation of intramolecular hydrogen bonds, ferrocene conjugates with amino acids are often used as peptidomimetics. Regarding to that alanine- and proline-rich sequences exhibit a number of desirable properties (high solubility, stability, and bioavailability), as well as the ferrocene diamine induces the formation of intramolecular hydrogen bonds that are stabilized by forming 14-membered rings we have decided to prepare new type of peptidomimetics.

This Graduate Thesis describes the synthesis and conformational analysis of ferrocene tripeptides **12-15** [Ac-L(D)-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-L(D)-Pro-Boc, Fn = ferrocenylene, Ac = acetyl, Boc = *tert*-butoxycarbonyl] as well as their precursors **2-5** [Boc(Ac)-L(D)-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe], derived from ferrocene-1,1'-diamine and Ala-Pro peptide sequences. The influence of chirality of individual amino acids in the peptide chain, as well as *N*-terminal protecting groups (Boc, Ac) were examined by spectroscopic analysis (IR-, NMR- and CD-spectroscopy) and supported by DFT-calculations. It has been shown that change in the chirality of amino acids leads to change in the hydrogen bond patterns, while the protecting groups have no effect on their formation.

**Keywords:** ferrocene, secondary structure, conformational analysis, peptidomimetics, DFT

**Thesis contains:** 69 pages, 36 figures, 7 tables, 5 shemes, 118 references, 6 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD Monika Kovačević, Assistant Professor*

#### **Reviewers:**

1. PhD. Lidija Barišić, Full Professor
2. PhD. Monika Kovačević, Assistant Professor
3. PhD. Renata Teparić, Full Professor
4. PhD. Jasna Mrvčić, Full Professor (substitute)

**Thesis defended:** 16<sup>th</sup> July 2020

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
2.1. PEPTIDI I PROTEINI	2
2.2. SEKUNDARNA STRUKTURA PEPTIDA I PROTEINA	3
2.3. PROLIN I ALANIN	5
2.3.1. Prolin	5
2.3.2. Alanin	7
2.3.3. Važnost sekvence prolin/alanin	9
2.4. FEROCEN I FEROCENSKI PEPTIDI	9
2.4.1. Ferocen	9
2.4.2. Ferocenski peptidi	12
2.4.2.1. Ferocenski konjugati Fn-[CO-(AA) <sub>m</sub> -OMe] <sub>2</sub> ( <b>I</b> ) izvedeni iz Fcd ( <b>IV</b> )	14
2.4.2.2. Ferocenski konjugati Y-(AA) <sub>n</sub> -Fca-(AA) <sub>m</sub> -OMe ( <b>II</b> ) izvedeni iz Fca ( <b>V</b> )	17
2.4.2.3. Ferocenski konjugati Fn-[NH-(AA) <sub>m</sub> -Y] <sub>2</sub> ( <b>III</b> ) izvedeni iz Fcda ( <b>VI</b> )	20
2.5. TEORIJA FUNKCIONALNA GUSTOĆE (DFT, eng. <i>Density Functional Theory</i> )	23
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>24</b>
3.1. MATERIJALI I METODE	24
3.2. POSTUPAK PRIPRAVE FEROCENSKIH PEPTIDA	27
3.2.1. Postupak priprave dipeptida <b>1</b>	27
3.2.2. Postupak priprave tripeptida <b>2</b> i <b>3</b>	28
3.2.3. Postupak priprave tripeptida <b>4</b> i <b>5</b>	29
3.2.4. Postupak priprave Ac-L-Ala-D-Pro-Fca-OH ( <b>6</b> ) i Ac-D-Ala-D-Pro-Fca-OH ( <b>7</b> )	31
3.2.5. Postupak priprave Ac-L-Ala-D-Pro-Fca-CON <sub>3</sub> ( <b>8</b> ) i Ac-D-Ala-D-Pro-Fca-CON <sub>3</sub> ( <b>9</b> )	31
3.2.6. Postupak priprave Ac-L-Ala-D-Pro-Fn-NHBoc ( <b>10</b> ) i Ac-D-Ala-D-Pro-Fca-NHBoc ( <b>11</b> )	32
3.2.7. Postupak priprave tripeptida Ac-L-Ala-D-Pro <sup>1</sup> -NH <sup>1</sup> -Fn-NH <sup>2</sup> -L-Pro <sup>2</sup> -NBoc ( <b>12</b> ), Ac-L-Ala-D-Pro <sup>1</sup> -NH <sup>1</sup> -Fn-NH <sup>2</sup> -D-Pro <sup>2</sup> -NBoc ( <b>13</b> ), Ac-D-Ala-D-Pro <sup>1</sup> -NH <sup>1</sup> -Fn-NH <sup>2</sup> -L-Pro <sup>2</sup> -NBoc ( <b>14</b> ) i Ac-D-Ala-D-Pro <sup>1</sup> -NH <sup>1</sup> -Fn-NH <sup>2</sup> -D-Pro <sup>2</sup> -NBoc ( <b>15</b> )	33
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>36</b>
4.1. UVOD	36
4.2. SINTEZA I KONFORMACIJSKA ANALIZA PREKURSORA TRIPEPTIDA <b>IIIa</b>	37
4.2.1. Sinteza dipeptida Boc-D-Pro-Fca-OMe ( <b>1</b> )	37
4.2.2. Sinteza i konformacijska analiza tripeptidâ Boc-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe ( <b>2</b> ), Boc-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe ( <b>3</b> ), Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe ( <b>4</b> ) i Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe ( <b>5</b> )	38
4.2.2.1. Sinteza tripeptidâ <b>2-5</b>	38
4.2.2.2. IR-spektroskopska analiza tripeptidâ <b>2-5</b>	39
4.2.2.3. NMR-spektroskopska analiza tripeptidâ <b>2-5</b>	43
4.2.2.4. CD-spektroskopska analiza tripeptidâ <b>2-5</b>	45
4.3. SINTEZA I KONFORMACIJSKA ANALIZA TRIPEPTIDA <b>IIIa</b>	47
4.3.1. Sinteza i konformacijska analiza tripeptidâ Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc ( <b>12</b> ), Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc ( <b>13</b> ), Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc ( <b>14</b> ) i Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc ( <b>15</b> )	47

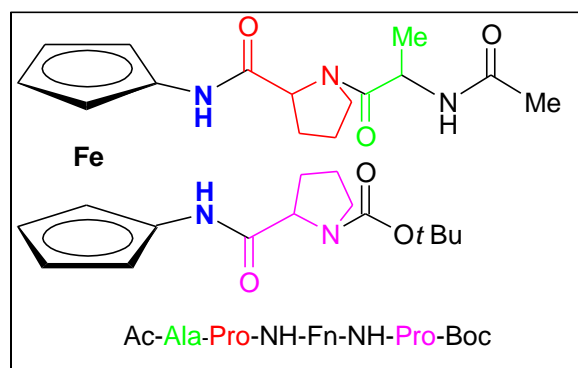


4.3.1.1. Sinteza tripeptidâ <b>12-15</b>	47
4.3.1.2. IR-spektroskopska analiza tripeptidâ <b>12-15</b>	48
4.3.1.3. NMR-spektroskopska analiza tripeptidâ <b>12-15</b>	51
4.3.1.4. CD-spektroskopska analiza tripeptidâ <b>12-15</b>	52
4.3.1.5. DFT-modeliranje tripeptidâ <b>12-15</b>	54
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>59</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>61</b>
<b>7. PRILOZI</b>	

# 1. UVOD

Odlučujući faktor biološke aktivnosti i primjene prirodnih peptida jesu njihova konformacijska fleksibilnost, niska stabilnost te biodostupnost što izravno ima utjecaj i na mogućnost korištenja proteina u terapijske svrhe, pa se stoga intenzivno istražuje područje peptidomimetika. Znanost o materijalima, medicina, organska sinteza, bioorganometalna kemija i biokemija, asimetrična kataliza, nelinearna optika, znanost o polimerima te biosenzorika i elektrokemija područja su široke primjene ferocena. Poboljšanje aktivnosti određenih terapeutika postiže se ugradnjom ferocena u bioaktivne ili molekule već postojećeg lijeka, a zahvaljujući lipofilnom karakteru molekule ferocena, ferocenski derivati lako prolaze stanične membrane. Stoga su istraživanja na ferocenskim derivatima usmjerena na razvoj visoko učinkovitih i slabo toksičnih lijekova gdje ferocenski peptidi zauzimaju posebno mjesto. Naime, konjugacijom ferocenske osnove (Fcd, Fca, Fcda) i različito strukturiranih peptidnih lanaca, dolazi do tvorbe *vodikove veze* koja inducira nastajanje više elemenata sekundarne strukture.

Cilj ovog rada bila je priprava i konformacijska analiza ferocenskih tripeptida **12-15** [Ac-L(D)-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-L(D)-Pro-Boc, Fn = ferocenilen, Ac = acetil, Boc = *tert*-butoksikarbonil] (Slika 1) kao i njihovih prekursora **2-5** [Boc (Ac)-L(D)-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe] izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina i peptidne sekvence Ala-Pro. Pri tome će se alterirati zaštitne skupine (Boc, Ac) kao i kiralnost uvedenih aminokiselina [L(D)-Pro, L(D)-Ala], da bi se ispitaio utjecaj spomenutih elemenata na tvorbu intramolekulskih vodikovih veza [IHB, (engl. *Intramolecular Hydrogen Bond*)] kao preduvjeta za tvorbu različitih okreta.



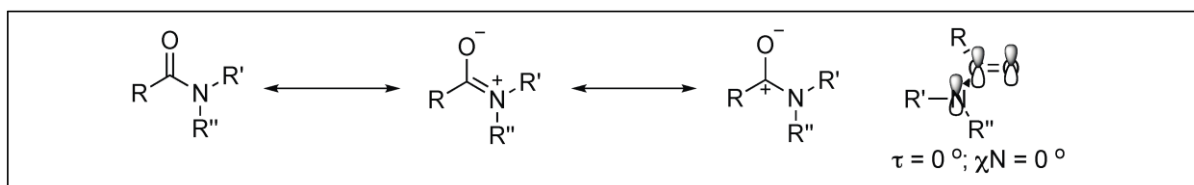
Slika 1. Ciljni tripeptidi **12-15**

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PEPTIDI I PROTEINI

Peptidi i proteini imaju važnu ulogu u brojnim životnim procesima uključujući enzimsku katalizu, prijenos i pohranu određenih molekula i iona, pokretljivost mišića, čvrstoću kosti i kože, zaštitu imunološkog sustava, stvaranje i provođenje živčanih impulsa te kontrolu rasta i diferencijaciju stanica. Sastavljeni su od 20 aminokiselina povezanih amidnom, odnosno peptidnom vezom, koje se međusobno razlikuju u veličini, obliku, sposobnosti stvaranja vodikovih veza, naboju te kemijskoj reaktivnosti. Zahvaljujući strukturnim različitostima aminokiselina i njihovim funkcijskim skupinama, peptidima i proteinima pripisuje se cijeli niz bioloških funkcija [1, 2].

Peptidna veza je amidna veza koja nastaje između  $\alpha$ -karboksilne skupine jedne i  $\alpha$ -amino skupine druge aminokiseline. Amidna veza pokazuje visoku stabilnost u različitim reakcijskim uvjetima (kiselim ili lužnatim) i u prisutnosti drugih kemikalija te pri visokim temperaturama. Visoka stabilnost amidne veze proizlazi iz sklonosti veze k stvaranju rezonantnih struktura (Slika 2), što joj daje svojstva dvostruke veze. Budući da veza između karbonilnog ugljika i dušikovog atoma peptidne jedinice djelomično posjeduje karakter dvostruke veze, oko nje nema slobodne rotacije, a iz toga proizlazi i planarnost peptidne veze. S druge strane, oko veza između  $\alpha$ -ugljikova atoma i karbonilnog ugljikova atoma te  $\alpha$ -ugljikova atoma i dušikova atoma s obje strane peptidne jedinice postoji visok stupanj slobodne rotacije. Upravo ta ograničena rotacija oko peptidne veze i slobodna rotacija oko  $\alpha$ -ugljikova atoma definiraju trodimenzionalnu strukturu svih proteina [1, 3, 4].



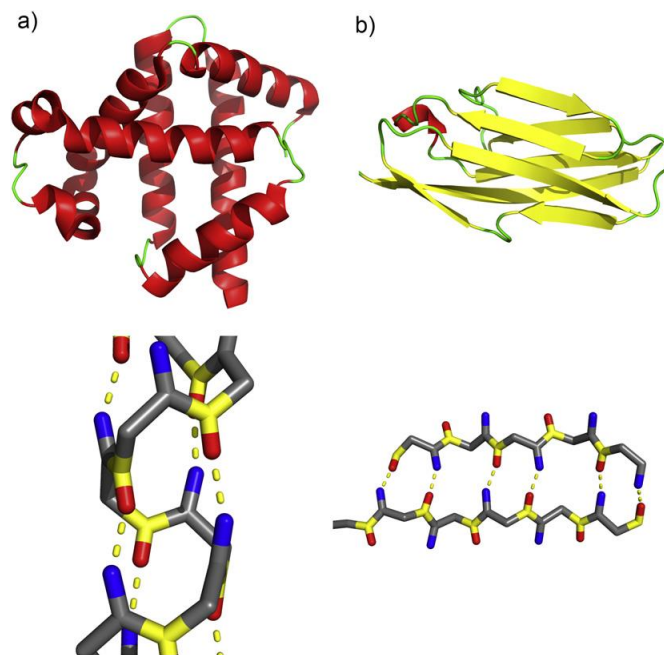
**Slika 2.** Rezonancija amidne veze

Proteinske molekule mogu se opisati pomoću četiri razine strukturnih elemenata: primarne, sekundarne, tercijarne i kvaterne strukture. Primarna struktura odnosi se na linearni slijed aminokiselina povezanih peptidnim vezama. Sekundarna struktura određena je

prostornim odnosom susjednih aminokiselinskih ostataka polipeptidnog lanca, a stabiliziraju ju vodikove veze između amino i karbonilne skupine na okosnici peptida. Prostorni odnos između svih aminokiselina polipeptidnog lanca predstavlja tercijarnu strukturu. Oblikovanje tercijarne strukture dovodi do približavanja aminokiselinskih ostataka koji su u primarnom slijedu aminokiselina udaljeni jedan od drugoga, a posljedično i do oblikovanja trodimenzionalne strukture polipeptida. Kvaterna struktura podrazumijeva prostorni odnos između polipeptidnih lanaca ili podjedinica unutar istog proteina [1, 5].

## 2.2. SEKUNDARNA STRUKTURA PEPTIDA I PROTEINA

Otpribliže 50 % strukture svih proteina zauzima jedan od oblika sekundarne strukture. Glavni predstavnici sekundarnih struktura jesu  $\alpha$ -uzvojnica i  $\beta$ -nabrana ploča (Slika 3) [6] te razni okreti.



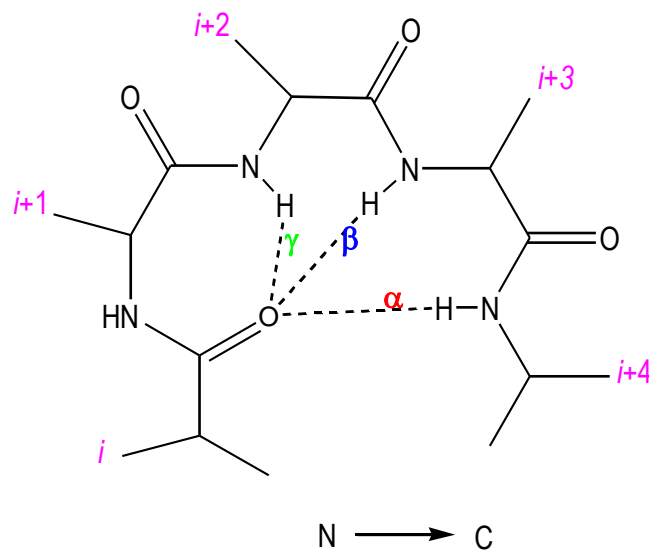
**Slika 3.** Sekundarne strukture: a)  $\alpha$ -uzvojnica i b)  $\beta$ -nabrana ploča

$\alpha$ -Uzvojnica je štapićasta struktura u kojoj je polipeptidna okosnica čvrsto uvijena, a pobočni ogranci aminokiselina izbočeni na vanjskoj strani same uzvojnice. Karbonilna skupina svake aminokiseline  $n$  povezana je vodikovom vezom s amino skupinom aminokiseline  $n+4$  [5].

$\beta$ -Nabranu ploču karakterizira istegnuti polipeptidni lanac, a stabilizirana je vodikovim vezama između karbonilnih i amino skupina različitih polipeptidnih lanaca. Ovisno o

usmjerenju polipeptidnih lanaca,  $\beta$ -nabrana ploča može biti paralelna pri čemu su lanci orijentirani u istom smjeru te antiparalelna pri čemu su lanci suprotnog usmjerenja [1].

Okreti omogućavaju promjenu smjera polipeptidnih lanaca pa tako tvore globularni i kompaktan oblik molekule proteina. Dijele se na  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - i  $\pi$ - okrete (Slika 4). Najčešći su  $\beta$ -okreti pri čemu je karbonylna skupina aminokiseline  $n$  povezana vodikovom vezom s amino skupinom aminokiseline  $n+3$  što dovodi do naglog okreta polipeptidnog lanca [1].



**Slika 4.** Prikaz najčešćih okreta ( $\gamma$ →7-člani prsten,  $\beta$ →10-člani prsten i  $\alpha$ →13-člani prsten)

Sekundarna struktura je vrlo važna razina hijerarhijske klasifikacije proteinskih struktura koja je nužna za prepoznavanje trodimenzionalne strukture proteina [7]. Zeeshan i suradnici pokazali su ovisnost biološke aktivnosti proteina o veličini promjene njihove sekundarne strukture, što posljedično može poslužiti u korištenju proteina u terapijske svrhe. Sekundarna struktura peptida ima važnu ulogu u biološkoj aktivnosti antimikrobnih peptida. Analizi peptida sa strukturom  $\alpha$ -uzvojnice pokazali su jaču antimikrobiološku aktivnost protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija u odnosu na  $\beta$ -nabrana ploču [8-10].

Sekundarna se struktura dokazuje pomoću IR-spektroskopije (IR, eng. *Infrared*), NMR-spektroskopije (NMR, eng. *Nuclear Magnetic Resonance*) i CD-spektroskopije (CD, eng. *Circular Dichroism*). Spektroskopska mjerenja služe za procjenu agregacije i stabilnosti proteina, ali i njegovih strukturnih značajki koje se smatraju kritičnima za biološku aktivnost proteina [11].

IR-spektroskopija daje informaciju o konformacijskom prostoru peptida u otopini. Pomoću nje se procjenjuje proteinska struktura određivanjem frekvencije pri kojoj kemijske veze apsorbiraju infracrveno zračenje, a jačina apsorpcije raste povećanjem polarnosti kemijskih veza [11-13].

Nuklearna magnetska rezonanca je spektroskopska metoda koja daje pouzdan i detaljan uvid u strukturu makromolekula, uključujući i proteine. Metoda pruža informaciju o lokaciji sekundarnih strukturnih elemenata unutar proteinske sekvence [11].

CD-spektroskopija je metoda koja opisuje različitu apsorpciju lijevog i desnog polariziranog zračenja kiralnih molekula ili molekula s trodimenzionalnom strukturom koja osigurava kiralno okruženje. Cirkularni dikroizam daje informaciju o strukturnim elementima koji sudjeluju u oblikovanju sekundarne strukture, ali i o utjecaju temperature, pH, naboja i liganda na istu [14, 15].

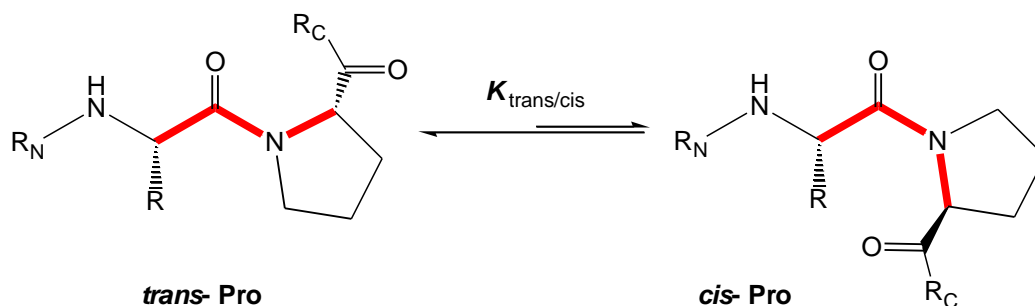
## 2.3. PROLIN I ALANIN

### 2.3.1. Prolin

Prolin je jedna od 20 proteinogenih aminokiselina koju odlikuje iznimna konformacijska krutost. Unutar prstena sadrži  $\alpha$ -dušikov atom koji utječe na bazičnost, ali i polarnost prolinskog ostatka. Sekundarni amin prolina, tijekom njegove ugradnje u biopolimere, prelazi u tercijarni amin što onemogućava stvaranje vodikove veze i može utjecati na prekid strukture peptida i proteina. Štoviše, smatra se kako prolin usporava brzinu sinteze proteina povećanjem entropije stvaranja peptidne veze [16-20].

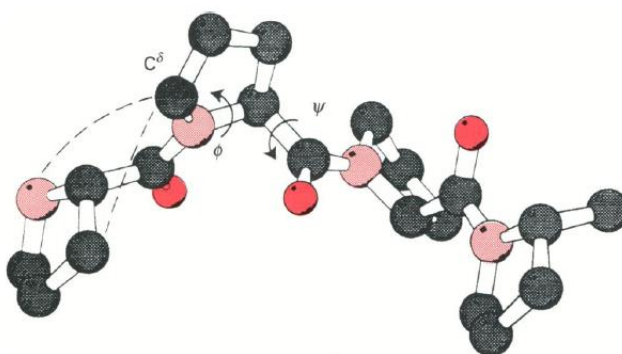
Usprkos tome, prolin stabilizira sekundarne strukture peptida poput okreta, osobito ako se nalazi ispred ili iza aromatske aminokiseline, i uzvojnica (poliprolin I i poliprolin II uzvojnica). Takva su konformacijska svojstva potakla brojna istraživanja vezana uz razvoj prolinskih analoga korisnih, između ostalog, i za sintezu bioaktivnih peptida [18, 21-24].

Amidna veza koju tvori prolin može biti u *cis* (5 %) i *trans* (95 %) položaju (Slika 5). Cis-trans izomerizacija prolinskih sekvenci utječe na funkcije peptida i proteina u biološkim sustavima poput ulaska u stanicu, oligomerizacije, smatanja i katalize [21, 25].



**Slika 5.** *Cis-trans* izomerizacija prolinske amidne veze

Peptidne sekvence bogate prolinom mogu stvarati konformaciju uzvojnice: poliprolin I (PPI, eng. *Polyproline I helix*) i poliprolin II uzvojnica (PPII, eng. *Polyproline II helix*). Poliprolin I uzvojnica posjeduje *cis*-amidne veze u polarnim organskim otapalima te njena struktura nije pronađena u biološkim sustavima. S druge strane, poliprolin II uzvojnica stvara *trans*-amidne veze u vodenim otopinama, a prisutna je u proteinima poput kolagenske trostruke uzvojnice i rjeđe u globularnim proteinima gdje se svaki zavoj uzvojnice sastoji od 3 aminokiselinska ostatka (Slika 6).



**Slika 6.** Dio poliprolin II uzvojnice

Karbonilne skupine su u PPII strukturi konformacijski ograničene i bogate elektronima, stoga predstavljaju dobra vezna mjesta za vodik. Osim toga, dostupnost PPII uzvojnica povećana je njihovim položajem na amino- ili karboksi-terminalnom kraju proteina, a njihova im krutost olakšava vezanje određenih molekula u odnosu na ostale peptidne sekvence. Veze koje stvaraju prolinom bogate sekvence slabije su od onih u globularnim domenama, no one, s druge strane, omogućuju brže i lakše moduliranje prolinom bogatih regija [18, 23, 26].

Prolin sudjeluje u zaštiti proteinskog integriteta smanjujući njihovu osjetljivost na većinu peptidaza te u povećanju aktivnosti raznih enzima [16, 17]. Proteinima slinje pripada 70 % prolinom bogatih proteina kojima se pripisuje nekoliko uloga, a vezanje biljnih polifenola (tanina) prisutnih u ljudskoj prehrani te smanjenje njihovih štetnih učinaka jedne su od najznačajnijih [27]. Pojedina istraživanja pripisuju prolinu i antioksidativna svojstva [28-32]:

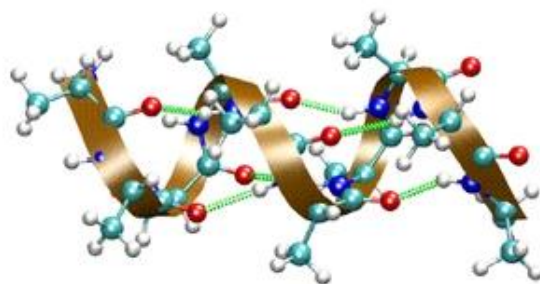
- smanjenje razine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, eng. *Reactive Oxygen Species*) u gljivica i kvasaca, a posljedično i sprječavanje programirane stanične smrti,
- zaštita ljudskih stanica od oksidativnog stresa koji može uzrokovati kancerogenezu te
- smanjenje lipidne peroksidacije u stanicama algi izloženih teškim metalima.

### 2.3.2. Alanin

Alanin je glukogena aminokiselina koja čini veliki udio svih aminokiselina većine proteina. Aminokiseline poput valina, leucina i izoleucina mogu se pretvoriti u alanin. Razgradnjom mišićnih proteina, tijekom posta ili drugog stresa, alanin se u velikim količinama oslobađa u krvotok te dopijeva u jetru gdje prelazi u piruvat, a potom i u glukozu koja može poslužiti skeletnim mišićima kao izvor energije [33].

Budući da se vodikove veze između peptida i molekula vode natječu s vodikovim vezama u uzvojnici peptida,  $\alpha$ -uzvojnica ne pokazuje potpunu stabilnost u vodi [34, 35]. Marqusee i suradnici uočili su oblikovanje  $\alpha$ -uzvojnice u peptidima koji sadrže samo alanin i manji broj nabijenih aminokiselinskih ostataka, lizina i glutamata što implicira ulogu alanina u stabiliziranju kratkih uzvojnica. Najvjerojatnije objašnjenje ovih rezultata je veliki potencijal individualnih alaninskih ostataka u oblikovanju uzvojnica, budući da nema interakcija pobočnih lanaca koje bi ih mogle stabilizirati [34]. Alanin je, među 20 proteinogenih aminokiselina, najviše sklon stvaranju uzvojnice (Slika 7), što ukazuje na ulogu metilnog pobočnog ogranka u smanjenju konformacijske slobode glavnog lanca u nesmotanom stanju [36].





**Slika 7.** Tvorba  $\alpha$ -uzvojnice u poli-Ala peptidu

Poli-Ala peptidi s otprilike 10 ostataka koji stvaraju  $\alpha$ -uzvojniciu nisu topljivi u vodi zbog nedostatka skupina koje mogu vezati vodik [37]. Topljivost alaninskih peptida može se povećati uvođenjem 3 ili više nabijenih ostataka, lizina ili glutaminske kiseline [34]. Supstitucija pojedinog alaninskog ostatka u peptidima nekom drugim aminokiselinom uzrokuje određene promjene u količini nastalih uzvojnica [36, 38-40]. Supstitucijom alanina glicinom u peptidima, ovisno o poziciji iste, dolazi do destabilizacije  $\alpha$ -uzvojnice ako je, prema Lifson-Roig teoriji, omjer  $s$  vrijednosti<sup>1</sup> za alanin:glicin velik [41].

S druge strane, konformacijski temeljena istraživanja na kratkolančanim alaninskim peptidima polučila su različite rezultate. Istraživanje kationskog trialanina dovelo je do zaključka da on zauzima dvije konformacije na sobnoj temperaturi: strukturu sličnu poliprolin II uzvojnici ( $\geq 80\%$ ) i manje  $\alpha$ -uzvojnici [42]. Međutim, temeljem spektroskopskih mjerenja utvrđena je prisutnost 50 % poliprolin II uzvojnice i 50 % strukture slične  $\beta$ -nabranoj ploči [44, 45], dok tetraalanin zauzima većinom oblik poliprolin II uzvojnice u vodi [46]. Poliprolin II uzvojnica pokazala se dominantnom konformacijom alaninskih peptida, a sklonost alanina stvaranju iste povećava se s brojem ostataka [47, 48]. Graf i suradnici utvrdili su kako približno 90 % trialanina zauzima strukturu poliprolin II uzvojnice, a približno 10 % strukturu  $\beta$ -nabrane ploče, dok struktura  $\alpha$ -uzvojnice nije pronađena. Produljenjem lanca s tri na sedam alaninskih ostataka nije došlo do promjena u raspodjeli konformacija [49].

---

<sup>1</sup>  $s$  vrijednost predstavlja parametar Zimm-Brag modela pomoću kojeg se određuje sklonost stvaranju uzvojnice [43].

### 2.3.3. Važnost sekvence prolin/alanin

Uvođenjem prolinskih ostataka u sekvencu poli-Ala peptida dolazi do ometanja vodikovih veza i alaninski ostaci ne mogu više stabilizirati strukturu uzvojnice [50]. Sekvence koje sadrže alanin i prolin imaju veću mobilnost od sekvenci koje sadrže samo alanin ili samo prolin [51]. Sekvence bogate prolinom i alaninom (PAS, eng. *Pro/Ala-rich sequences*) pokazuju visoku topljivost u puferima i odsutnost sekundarne i tercijarne strukture. Proteini konjugirani s biosintetskim polimerima građenima od prolina, alanina i/ili serina pokazuju brojna poželjna svojstva [52]:

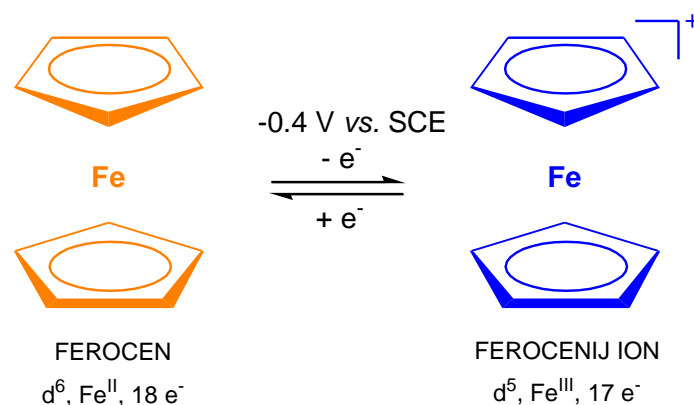
- visoka topljivost i stabilnost,
- potpuna biološka funkcionalnost u *in vitro* i životinjskim modelima,
- visoka biodostupnost tijekom subkutane, intraperitonealne i intramuskularne primjene,
- značajno produljeno vrijeme poluživota u plazmi ovisno o duljini PAS lanca.

## 2.4. FEROCEN I FEROCENSKI PEPTIDI

### 2.4.1. Ferocen

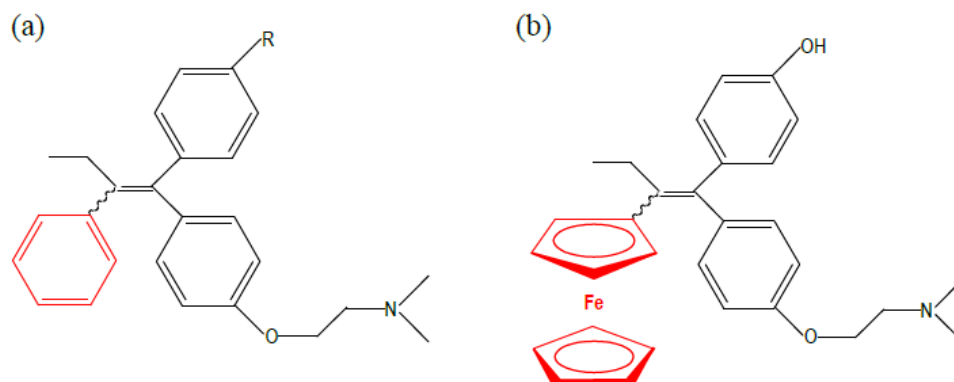
Ferocen  $[\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2]$  je slučajno otkrivena molekula građena od dva anionska ciklopentadienilna prstena koji doniraju 6  $\pi$  elektrona  $\text{Fe}^{2+}$  kationu smještenom između njih (struktura "sendviča") [53]. Iznimna svojstva čine ferocen vrlo važnom molekulom u organometalnoj kemiji [54]:

- stabilan je na zraku i do 400 °C,
- reagira kao superaromatski elektrofil,
- blago i reverzibilno oksidira oko + 0.4 V nasuprot zasićene kalomelne elektrode (Slika 8) i
- dobro je topljiv u organskim otapalima.



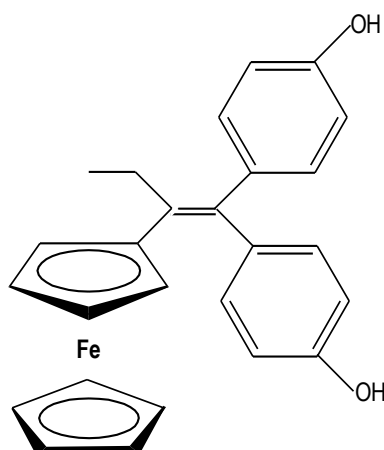
**Slika 8.** Reverzibilna oksidacija ferocena

Znanost o materijalima, medicina, organska sinteza, bioorganometalna kemija i biokemija, asimetrična kataliza, nelinearna optika, znanost o polimerima te biosenzorika i elektrokemija područja su široke primjene ferocena [55]. Poboljšanje aktivnosti određenih terapeutika postiže se ugradnjom ferocena u bioaktivne ili molekule već postojećeg lijeka (npr. ferokin) ili zamjenom fenilnog prstena s ferocenom (npr. ferocifen) [56]. Zahvaljujući lipofilnom karakteru molekule ferocena, ferocenski derivati lako prolaze stanične membrane [57]. Istraživanja na ferocenskim derivatima usmjerena su na razvoj visoko učinkovitih i slabo toksičnih antikanceroznih lijekova, a najvjerojatniji mehanizam djelovanja takvih lijekova jest inicijacija apoptoze tumorskih stanica pri čemu dolazi do zaštite telomere od djelovanja telomeraze i/ili smanjenja njezine aktivnosti [58]. Ferocifen je bioorganometalni terapeutik sintetiziran prema strukturi primarnih lijekova u terapiji raka dojke, tamoksifena i hidrotamoksifena (Slika 9), a pokazuje učinkovitost i prema hormonski ovisnim [ER (+)] i hormonski neovisnim [ER (-)] vrstama raka dojke [59]. Iako mehanizam antiproliferativnog učinka hidroksiferocifena nije u potpunosti razjašnjen, vjerojatnim se smatra vezanje ferocifena u aktivno mjesto estrogenskog receptora zahvaljujući interakcijama s His524 i Asp351 [60].



**Slika 9.** (a) Tamoksifen (R=H), hidroksitamoksifen (R=OH), (b) hidroksiferocifen

Ferocen posjeduje veliki potencijal u kreiranju antioksidansa što implicira njegovu primjenu u razvoju novih vrsta lijekova za bolesti inducirane reaktivnim kisikovim vrstama [61]. Polifenolne komponente, fitokemikalije s pozitivnim učinkom na bolesti povezane sa starenjem, koje sadrže ferocen mogu djelovati na stanice raka. Primjerice, difenolni spoj 1,1-di-(4'-hidroksifenil)-2-ferocenil-but-1-en (Slika 10) pokazuje značajniji antiproliferativni učinak na stanice ER (+) i ER (-) raka dojke u odnosu na 4-hidroksitamoksifen [62]. Osim antikancerogenog učinka, ferocenski derivati posjeduju antifungalna, antiparazitska i antibakterijska svojstva [57]. Tako su razvijeni i ferocenski spojevi s antimalarijskom aktivnosti poput ferokina i ferocenil meflokina [62].

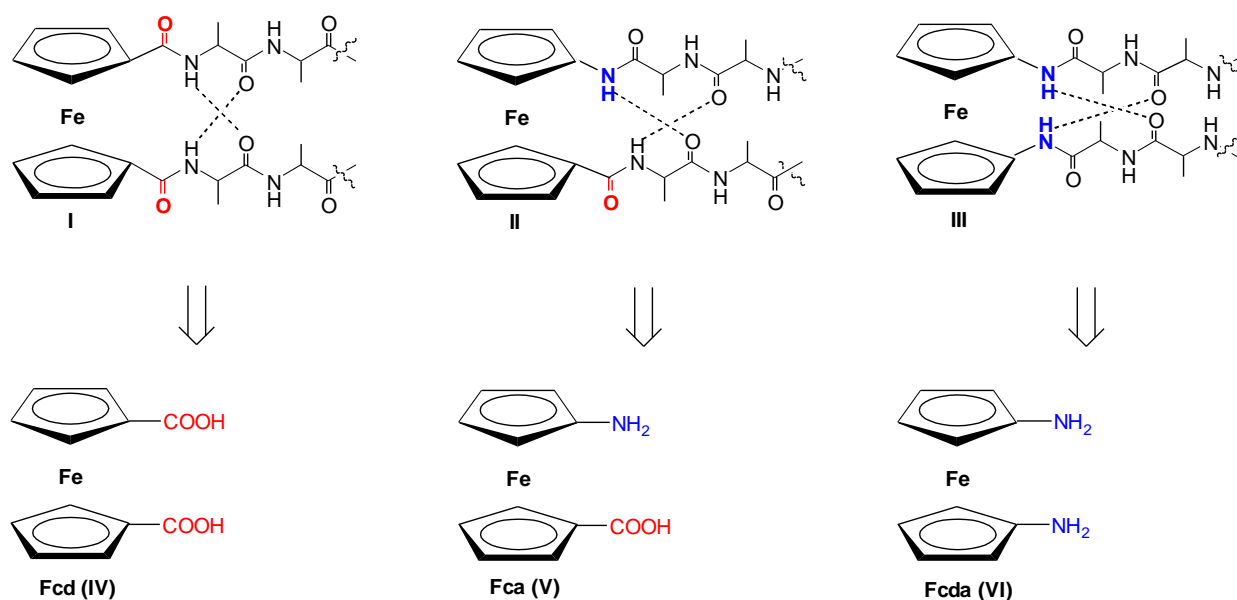


**Slika 10.** 1,1-di-(4'-hidroksifenil)-2-ferocenil-but-1-en

## 2.4.2. Ferocenski peptidi

Zahvaljujući svojim elektronskim i elektrokemijskim svojstvima te kemijskoj stabilnosti, ferocenski su polimeri, uključujući i ferocenske peptide, predmet velikog broja istraživanja [63]. Polimeri mogu sadržavati ferocen na glavnom polimerskom lancu ili na pobočnim lancima [54]. Unutar molekule ferocena, razmak između dva ciklopentadienilna prstena iznosi oko 3,3 Å što omogućuje ferocenu izgradnju proteinskih sekundarnih struktura poput  $\beta$ -nabrane ploče te  $\beta$ - i  $\gamma$ -okreta pomoću intramolekulskih vodikovih veza važnih za oblikovanje trodimenzionalne strukture i njihovo djelovanje u biološkim sustavima [64]. Tri su glavne skupine 1,1'-disupstituiranih ferocenskih peptida (Slika 11):

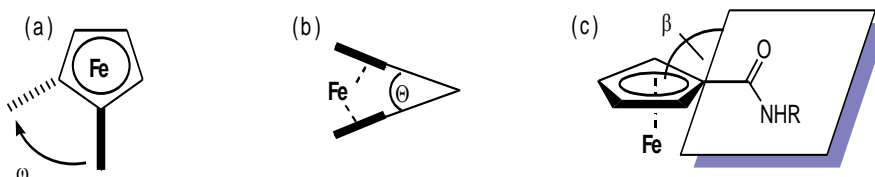
- $\text{Fn}[\text{CO}(\text{AA})_m\text{OMe}]_2$  (**I**) izvedeni iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (Fcd, **IV**)
- $\text{Y}(\text{AA})_n\text{Fca}(\text{AA})_m\text{OMe}$  (**II**) izvedeni iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca, **V**)
- $\text{Fn}[\text{NH}(\text{AA})_m\text{Y}]_2$  (**III**) izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda, **VI**) [Fn=ferocenilen, AA = prirodna aminokiselina, Y = Ac (acetil), Boc (*tert*-butoksikarbonil),  $m = 1, 2, \dots$ ;  $n = 1, 2, \dots$ ] [65].



**Slika 11.** Ferocenski peptidi **I-III** izvedeni iz Fcd (**IV**), Fca (**V**) i Fcda (**VI**)

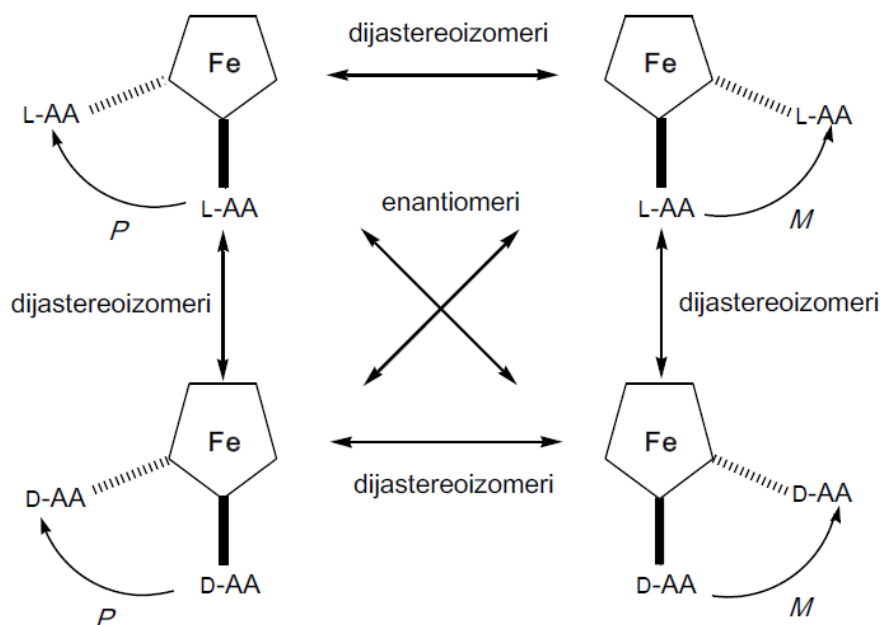
Najveći broj pripremljenih ferocenskih peptida pripada skupini **I** u kojoj je dikarboksilna kiselina s aminokiselinom povezana amidnom vezom [66]. Stvaranje paralelnih  $\beta$ -nabranih

ploča pripisuje se konjugatima izvedenima iz ferocenske dikarboksilne kiseline i ferocenskog diamina, dok konjugate izvedene iz ferocenske aminokiseline karakterizira antiparalelno usmjerenje peptidnih lanaca [65]. Torzijski kut  $\omega$  ( $0 - 180^\circ$ ) između dva peptida, kut iskrivljenosti  $\Theta$  ( $0 - 5^\circ$ ) između dva ciklopentadienilna prstena i kut izvijenosti  $\beta$  ( $5 - 30^\circ$ ) između ciklopentadienilnog prstena i amidne veze strukturni su parametri kojima peptidi **I-III** ostvaruju različite konformacije (Slika 12) [67, 68].



**Slika 12.** Deformacija fleksibilne ferocenske molekule: (a) torzijski kut, (b) kut iskrivljenosti i (c) kut izvijenosti

Ovisno o vrijednosti torzijskog kuta  $\omega$ , definiraju se 1,n'-rotacijski izomeri ( $n'=1-5$ ) koje tvore supstituenti na ciklopentadienilnim prstenovima (npr. ako je  $-36^\circ < \omega < 36^\circ$ , onda se 1, n'-izomer imenuje kao 1, 1'-izomer). Deskriptori helične kiralnosti, *P*- ili *M*-, važni su za naznaku smjera kiralnosti. U *P*-izomerima, supstituent s višim prioritetom smješten je na poziciju 1 "gornjeg" ciklopentadienilnog prstena, dok supstituent s nižim prioritetom zauzima 2' ili 3' poziciju na "donjem" ciklopentadienilnom prstenu što odgovara rotaciji u smjeru kazaljke na satu ( $\omega = 0 - 180^\circ$ ). S druge strane, supstituent na "donjem" prstenu *M*-izomera zauzima 4' ili 5' poziciju što odgovara rotaciji suprotnoj od *P*-izomera ( $\omega = 0 - -180^\circ$ ). Nastajanje enantiomernih i dijastereoizomernih ferocenskih konjugata s aminokiselinama omogućeno je zahvaljujući stereogenom centru aminokiseline vezane za ciklopentadienilni prsten (Slika 13) [65, 69].

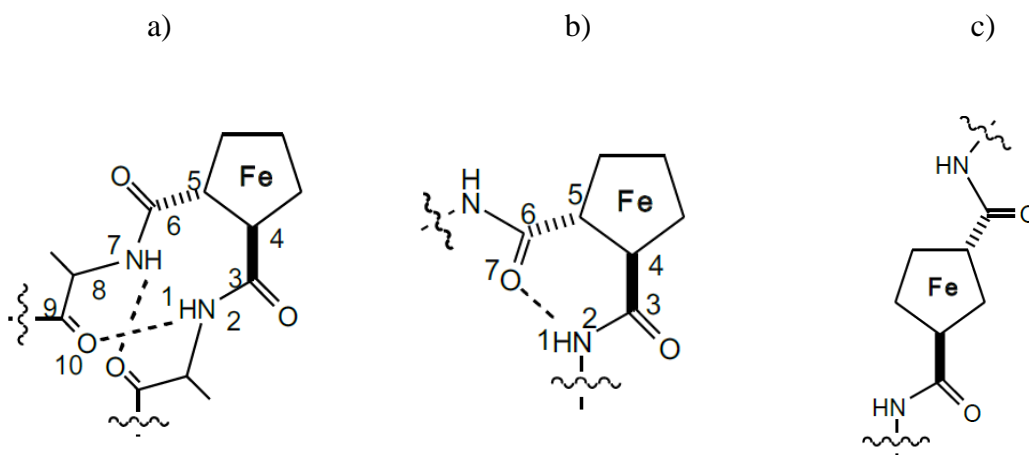


**Slika 13.** Stereokemijski odnosi *M*- i *P*-heličnih ferocenskih konjugata s L- i D-aminokiselinama

Ferocenski konjugati s aminokiselinama često se koriste u pripravi peptidomimetika. Peptidomimetici su peptidni ili nepeptidni spojevi koji posjeduju sekundarnu strukturu analognu prirodnim peptidima pri čemu mogu obavljati njihove biološke funkcije [2, 70-72]. Budući da je primjena prirodnih peptida kao lijekova ograničena njihovim nepoželjnim svojstvima (konformacijska fleksibilnost, niska stabilnost), detaljnija istraživanja i uporaba peptidomimetika usmjerena su u nadilaženju tih prepreka [70, 73].

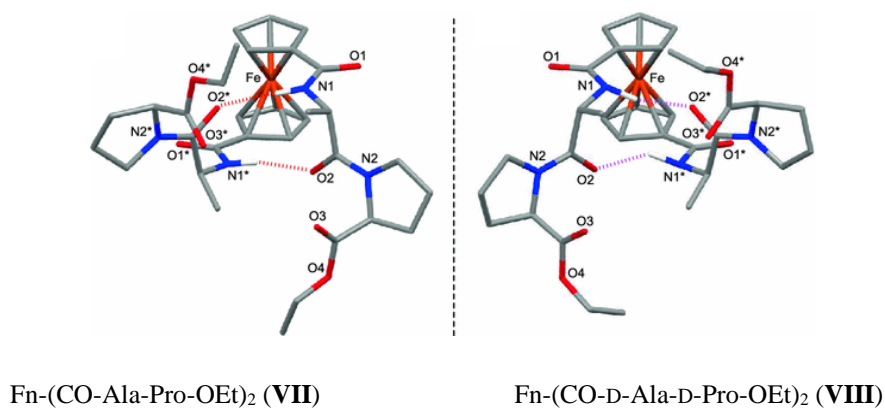
#### 2.4.2.1. Ferocenski konjugati $F_n-[CO-(AA)_m-OMe]_2$ (*I*) izvedeni iz *Fcd* (*IV*)

Ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina (*Fcd*, **IV**) aktivira se pretvorbom u sukcinimidni ili benzotriazolni ester (kiselinski klorid) te kopolira s *N*-terminalnim dijelom *C*-zaštićenih prirodnih aminokiselina pri čemu nastaju ferocenski konjugati **I**. Derivati **I** mogu zauzimati različite konformacije, a tri glavne skupine uključuju "Herrickovu", "van Staverenovu" i "Xuovu" konformaciju (Slika 14) [65].

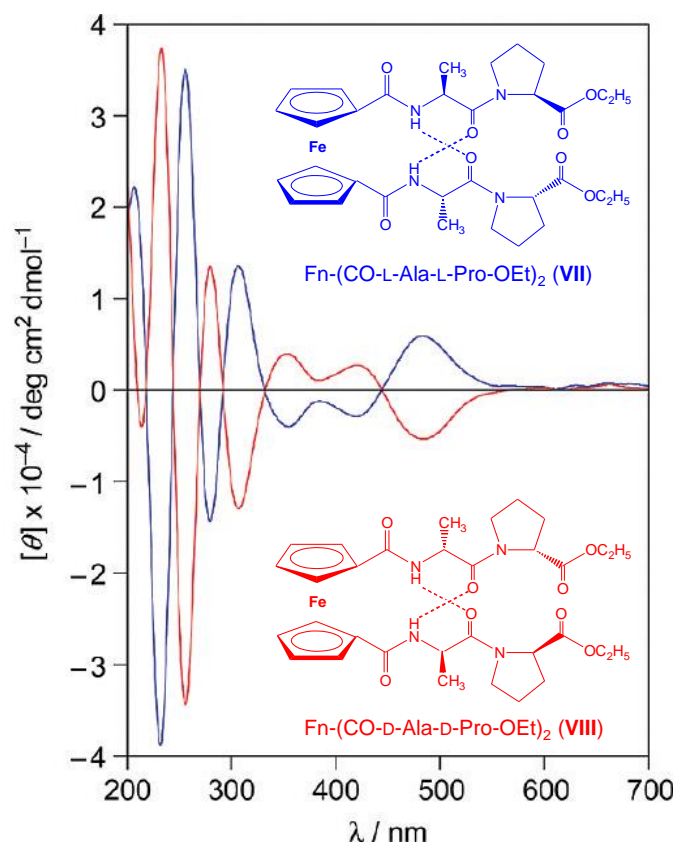


**Slika 14.** "Herrickova" konformacija (a), "Van Staverenova" konformacija (b) i "Xuova" konformacija (c)

Hirao i suradnici istraživali su utjecaj konfiguracije i slijeda prirodnih aminokiselina na konformacijski prostor peptida **I** dobivenih kopulacijom Fcd (**IV**) s homo- i heterokiralnim peptidnim sekvencama Ala-Pro/Pro-Ala. "Herrickova" konformacija utvrđena je kristalografskom analizom konjugata Fn-(CO-L-Ala-L-Pro-OEt)<sub>2</sub> (**VII**) pri čemu obje alaninske podjedinice sudjeluju u dvjema interlančanim NH<sub>Ala</sub>...O<sub>Ala</sub> intramolekulskim vodikovim vezama [74, 75]. Pozitivan Cottonov efekt u ferocenskom području utvrđen je CD-spektroskopskom analizom **VII** koji upućuje na *P*-heličnost ferocena, dok Fn-(CO-D-Ala-L-Pro-OEt)<sub>2</sub> (**VIII**) pokazuje negativan Cottonov efekt što se pripisuje *M*-heličnosti ferocena [76, 77]. Peptidi **VII** i **VIII** predstavljaju konformacijske enantiomere pri čemu prvi tvori desno, a drugi lijevo usmjerenu uzvojniju (Slika 15).

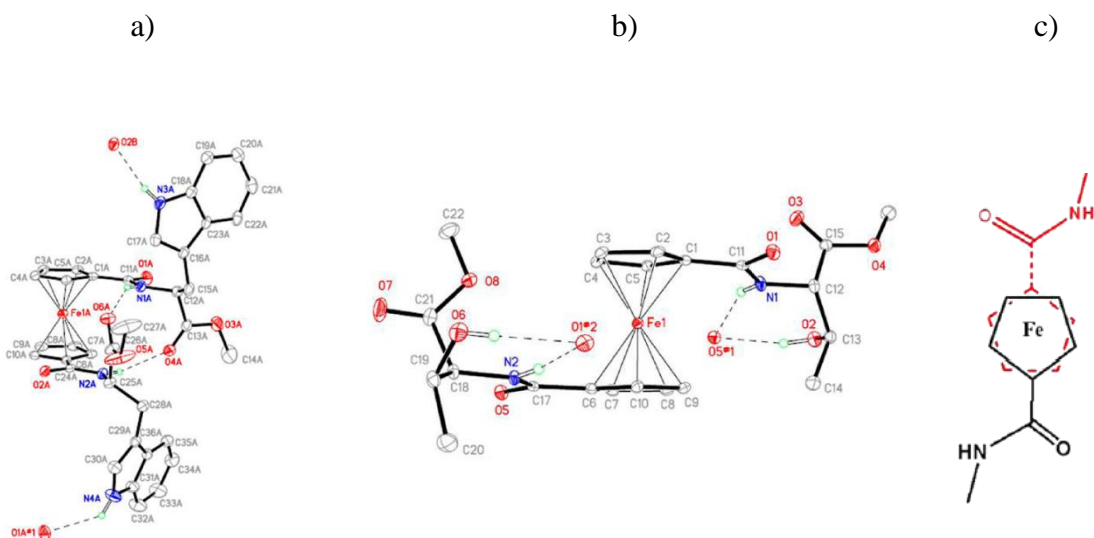






**Slika 15.** ORTEP-dijagrami (*gore*) i CD-spektri (*dolje*) konformacijskih enantiomera  $\text{Fn}(\text{CO-Ala-Pro-OEt})_2$  (**VII**) i  $\text{Fn}(\text{CO-D-Ala-D-Pro-OEt})_2$  (**VIII**)

Adhikari i suradnici su pripravom konjugata  $\text{Fn}(\text{CO-Trp-OMe})_2$  (**IX**) i  $\text{Fn}(\text{CO-Thr-OMe})_2$  (**X**) nastavili istraživati ferocenske peptide **I**. Kristalografskom analizom peptida **IX** utvrđena je prisutnost dvaju interlančanih  $\text{NH}_{\text{Trp}} \cdots \text{OC}_{\text{Trp}}$  intramolekulskih vodikovih veza koje tvore 10-člani IHB-prsten što odgovara  $\beta$ -okretu (Slika 16). Analizom kristalne strukture peptida **X** utvrđen je nedostatak intramolekulskih vodikovih veza, što upućuje na konformaciju definiranu kao antikonformacija (Slika 16), dok u otopini istoimeni peptid zauzima "Herrickovu" konformaciju. Pozitivan Cottonov efekt u ferocenskom području utvrđen je CD-spektroskopskom analizom  $\text{Fn}(\text{CO-L-Trp-OMe})_2$  **IXa** što se pripisuje *P*-heličnosti, dok  $\text{Fn}(\text{CO-D-Trp-OMe})_2$  **IXb** pokazuje efekt suprotnog predznaka što ukazuje na *M*-heličnost ferocena [78].

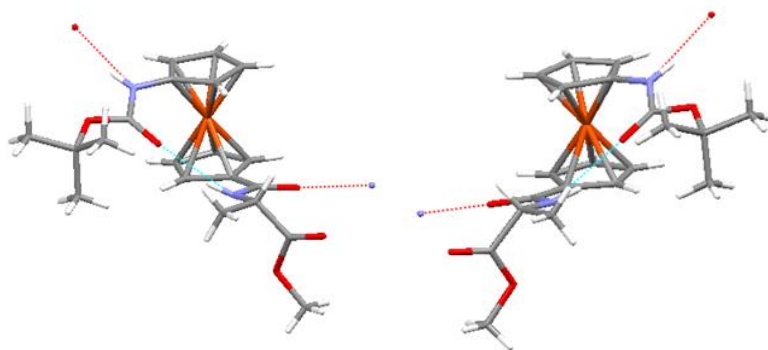


**Slika 16.** ORTEP dijagrami  $\text{Fn}-(\text{CO-Trp-OMe})_2$  (**IX**, a) i  $\text{Fn}-(\text{CO-Thr-OMe})_2$  (**X**, b) te antikonformacija (c)

#### 2.4.2.2. Ferocenski konjugati $Y-(\text{AA})_n\text{-Fca}-(\text{AA})_m\text{-OMe}$ (II) izvedeni iz Fca (V)

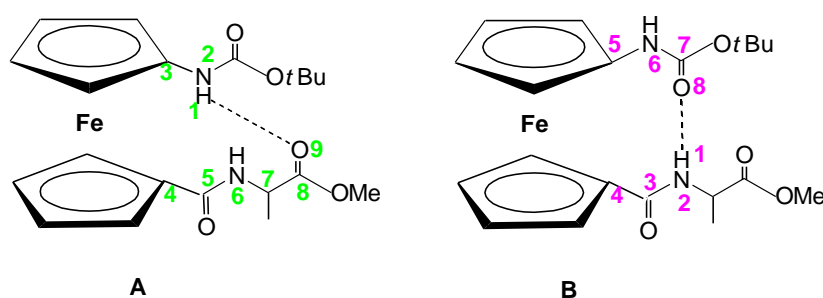
1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina (Fca, **V**) prva je i najjednostavnija bioorganometalna aminokiselina koja se, kopulacijom s C- i N- terminusom prirodnih aminokiselina, može ugraditi u peptide, a ujedno osigurava antiparalelnu orijentaciju peptidnih lanaca [79, 80]. Ferocenski peptidi dobiveni ugradnjom Fca u alaninske di-, tri-, tetra-, penta- i oktapeptide u otopini i čvrstom stanju pripremljeni su u Laboratoriju za organsku kemiju [80-91].

Konjugati Boc-Fca-L-Ala (**XIa**) i Boc-Fca-D-Ala (**XIb**) dobiveni su kopulacijom aktivirane Boc-Fca-OH s H-L-Ala-OMe i H-D-Ala-OMe. Iz kristalne strukture pripremljenih derivata vidljiva je prisutnost vodikovih veza između  $\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$  koje rezultiraju 8-članim IHB-prstenovima s heličnom kiralnosti: P-heličnost za **XIa** i M-heličnost za **XIb** (Slika 17) [82].



**Slika 17.** Shematski prikaz i ORTEP-dijagrami enantiomernih dipeptidâ *M*-Boc-Fca-L-Ala-OMe (**XIa**, *lijevo*) i *P*-Boc-Fca-D-Ala-OMe (**XIb**, *desno*)

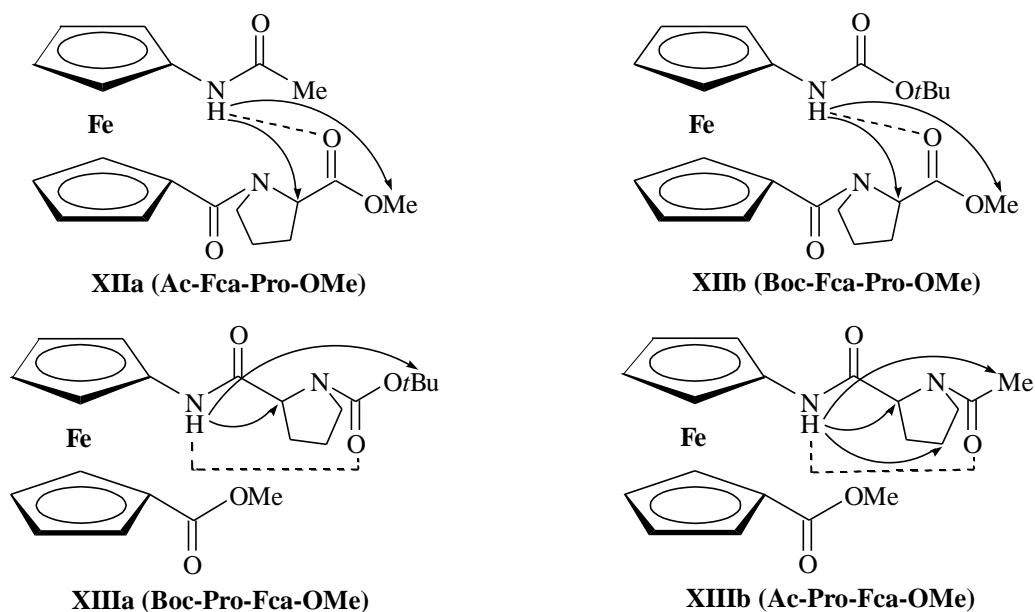
Pomoću IR-,  $^1\text{H-NMR}$ - i CD- spektroskopskih analiza te DFT-analize utvrđena su dva tipa konformerâ (**A** i **B**) ferocenskih peptida **XIa** i **XIb** u otopini neovisno o apsolutnoj konfiguraciji alaninske podjedinice (Slika 18). U konformerima **A** utvrđene su interlančane  $\text{NH}_{\text{Fca}}\dots\text{OC}_{\text{Ala}}$  intramolekulske vodikove veze koje tvore 9-člani prsten, dok interakcijom  $\text{NH}_{\text{Ala}}\dots\text{OC}_{\text{Boc}}$  u konformerima **B** tipa nastaje 8-člani prsten pri čemu interlančane vodikove veze omogućuju tvorbu heličnih konformera.



**Slika 18.** Hipotetske konformacije **XIa** i **XIb** u otopini

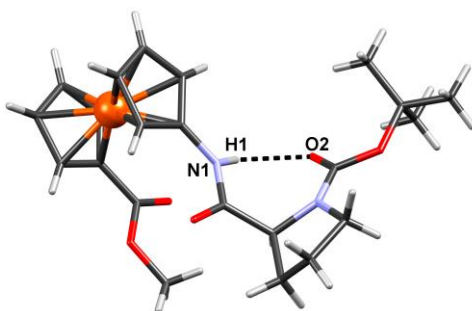
Barišić i suradnici nastavili su istraživanje ferocenskih peptida **II** pripremom konjugata Y-Fca-Pro-OMe **XIIa,b** (**XIIa**, Y=Ac; **XIIb**, Y=Boc) i Y-Pro-Fca-OMe **XIIIa,b** (**XIIIa**, Y=Boc; **XIIIb**, Y=Ac) kako bi utvrdili utjecaj prolina na njihova konformacijska svojstva [21]. Ferocenske konjugate **XIIa** i **XIIb** stabiliziraju interlančane  $\text{NH}_{\text{Fca}}\dots\text{OC}_{\text{Pro}}$  intramolekulske

vodikove veze tvoreći 9-člani IHB-prsten, dok peptidi **XIIIa** i **XIIIb** tvore 7-člani prsten što odgovara  $\gamma$ -okretu (Slika 19).



**Slika 19.** Intramolekulske vodikove veze u peptidima **XIIa** (Ac-Fca-Pro-OMe), **XIIb** (Boc-Fca-Pro-OMe), **XIIIa** (Boc-Pro-Fca-OMe) i **XIIIb** (Ac-Pro-Fca-OMe)

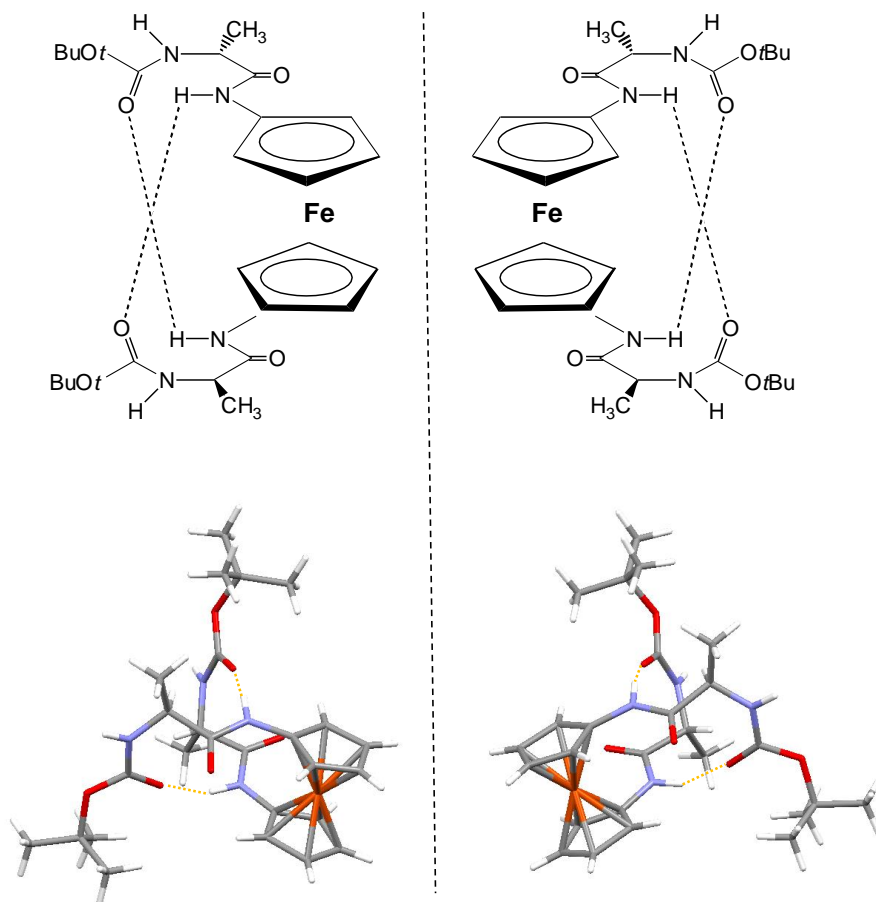
Kristalografskom analizom konjugata **XIIIa** utvrđena je konformacija stabilizirana jednom N-H $\cdots$ O i četiri slabe C-H $\cdots$ O intramolekulske vodikove veze, a dodatnu stabilizaciju osigurava interlančana dipolarna interakcija između CO-skupine jednog i NH-skupine drugog ciklopentadienilnog prstena (Slika 20).



**Slika 20.** Konformacija peptida Boc-Pro-Fca-OMe (**XIIIa**) u kristalu

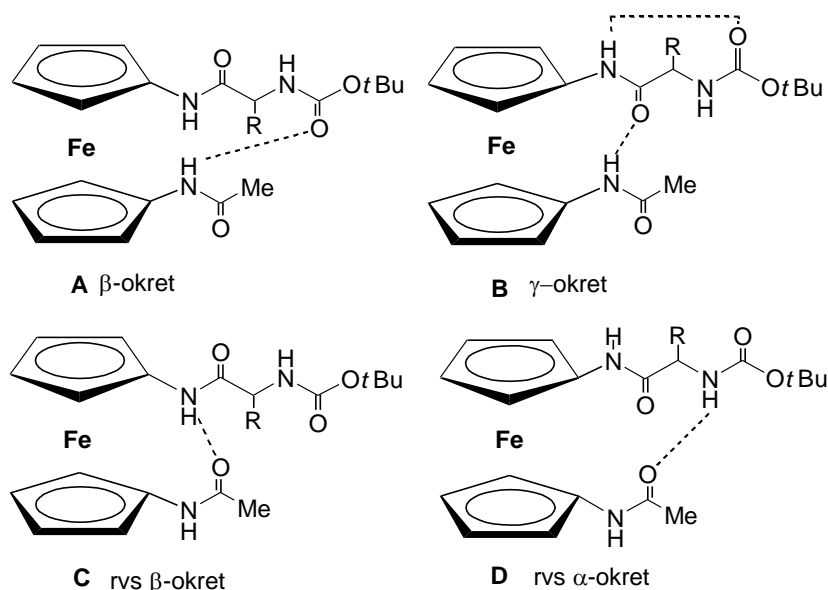
### 2.4.2.3. Ferocenski konjugati $Fn-[NH-(AA)_m-Y]_2$ (III) izvedeni iz $Fcda$ (VI)

Ferocenski konjugati izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina ( $Fcda$ , **VI**) slabo su istraženi, a prve takve konjugate sintetizirali su Kratz i suradnici kopulacijom  $Fcda$  (**VI**) s L- i D-Ala [92]. Dobiveni konjugati  $Fn-(NH-Ala-Boc)_2$  (**XIVa**) i  $Fn-(NH-D-Ala-Boc)_2$  (**XIVb**) u čvrstom stanju tvore dva 10-člana IHB-prstena koji su rezultat interlančanih  $NH_{Fn}\cdots OC_{Boc}$  vodikovih veza što odgovara strukturi  $\beta$ -okreta (Slika 21). CD-spektroskopskom analizom utvrđena je helična kiralnost istoimenih peptida u otopini: **XIVa** poprima pozitivan Cottonov efekt u ferocenskom području što upućuje na *P*-heličnost, dok **XIVb** poprima efekt suprotnog predznaka što odgovara *M*-heličnosti ferocena.



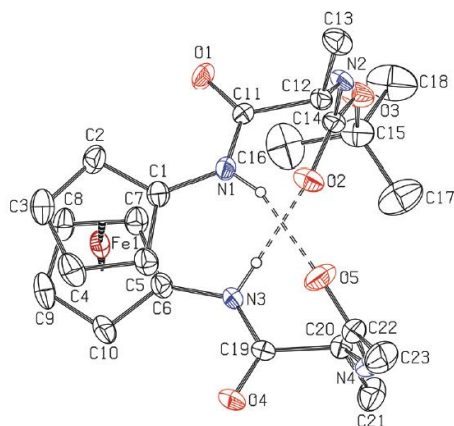
**Slika 21.** Shematski prikaz IHB i ORTEP-dijagrami enantiomernih dipeptidâ  $Fn-(NH-Ala-Boc)_2$  (**XIVa**, lijevo) i  $Fn-(NH-D-Ala-Boc)_2$  (**XIVb**, desno)

U Laboratoriju za organsku kemiju pripremljeni su asimetrični konjugati Boc-AA-NH-Fn-NH-Ac (**XVa-d**, AA = L-Ala, D-Ala, Val, Gly) "desimetrizacijom" ferocenskih peptida **III** [93]. U otopini konjugati **XVa-d** zauzimaju više različitih konformacija temeljenih na intramolekulskim vodikovim vezama [82, 94] pri čemu bočni ogranak prirodne aminokiseline nema utjecaja na IHB u kojima sudjeluju na ferocen izravno vezane NH-skupine (Slika 22). Očekivano, pozitivan Cottonov efekt u ferocenskom području poprma **XVb** što implicira na *P*-heličnost ferocena, dok se kod **XVc** javlja efekt suprotnog predznaka što ukazuje na *M*-heličnost ferocenske jezgre.



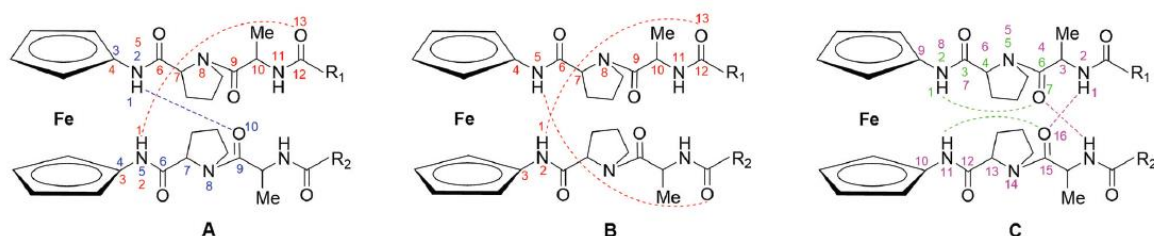
**Slika 22.** Hipotetske konformacije **A-D** peptida Boc-AA-NH-Fn-NH-Ac (**XVa-d**) u otopini

Barišić i suradnici sintetizirali su konjugate Ac-Ala-NH-Fn-NH-Ala-Boc (**XVIa**) i Fn-(NH-Ala-Ac)<sub>2</sub> (**XVIb**) čijom su konformacijskom analizom, u otopini i čvrstom stanju, utvrdili prisutnost dvaju simultanih 10-članih struktura nalik β-okretu između dva supstituenta neovisno o Boc ili Ac zaštitnim skupinama. U čvrstom stanju strukturu dodatno stabiliziraju unakrsne intermolekulske vodikove veze (Slika 23) [95, 96].



**Slika 23.** Molekulska struktura **XVIa** (IHB su prikazane isprekidanim crtama)

Daljnje istraživanje ferocenskih peptida **III** nastavili su Barišić i suradnici pripremom homo- i heterokiralnih ferocenskih peptida **XVIIa-h** s Ala-Pro sekvencama [97]. Konformacijskom analizom peptida Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-Ac (**XVIIc**) utvrđena je prisutnost dvaju interlančanih  $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Ac}}$  intramolekulskih vodikovih veza koje tvore 13-člane prstenove (Slika 24, obrazac **B**). U peptidima Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-Boc (**XVIIa**) i Boc-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-Boc (**XVIIh**) uočena je tvorba jednog 13-članog prstena, dok je drugi 10-člani prsten stabiliziran interlančanim  $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Ala}}$  intramolekulskim vodikovim vezama (Slika 24, obrazac **A**). Zamjenom L-Ala s D-Ala u heterokiralnim peptidima Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-D-Ala-Boc (**XVIIb**) i Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-D-Ala-Ac (**XVIIId**) dolazi do gubitka strukture 13-članog prstena čije mjesto zauzimaju 7-člane intralančane i 16-člane interlančane intramolekulske vodikove veze (Slika 24, obrazac **C**).



**Slika 24.** Obrazac IHB u homokiralnim peptidima **XVIIa**, **XVIIc** i **XVIIh** (obrazci **A** i **B**) i heterokiralnim peptidima **XVIIb** i **XVIIId** (obrazac **C**); **XVIIa** i **XVIIb** ( $\text{R}_1 = \text{Me}$ ,  $\text{R}_2 = \text{OtBu}$ ), **XVIIc** i **XVIIId** ( $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{Me}$ ), **XVIIh** ( $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{OtBu}$ ).

## 2.5. TEORIJA FUNKCIONALNA GUSTOĆE (DFT, eng. *Density Functional Theory*)

Računalna kemija ima sve važniju ulogu u proučavanju brojnih kemijskih fenomena i složenih sustava. Razvoj DFT-a omogućio je njegovu primjenu u razumijevanju i razvoju katalitičkih procesa u enzimima i zeolitima, transportu elektrona, prikupljanju i pretvaranju solarne energije, razvoju lijekova i drugim značajnim područjima znanosti i tehnologije [98].

Kvantno-mehaničke metode temelje se na rješavanju Schrödingerove jednadžbe koja opisuje dinamička svojstva čestica u sustavu čija rješenja uključuju kompleksne valne funkcije definirane točkama u konformacijskom prostoru [99]. Iako su Tomas i Fermi, potaknuti Schrödingerovim istraživanjima, već 1927. bili na tragu razvitka teorije, začetkom moderne teorije funkcionala gustoće smatra se 1964. godina kada su Hohenberg i Kohn ustanovili da ukupna elektronska gustoća  $\rho$  točno određuje sva svojstva N-elektronskog sustava pri čemu  $\rho$  predstavlja fundamentalnu varijablu u teoriji elektronske strukture [100]. Na taj se način Schrödingerova jednadžba rješava na temelju elektronske gustoće umjesto na temelju više valnih funkcija [101].

Teorija funkcionala gustoće opisana je dvama temeljnim Hohenberg-Kohnovim teoremima. Prvi se odnosi na funkcional elektronske gustoće koji određuje energiju osnovnog stanja bilo kojeg elektronskog sustava. Dakle, izračunom elektronske gustoće  $\rho$  u trodimenzionalnom prostoru određuju se svojstva osnovnog stanja elektronskog sustava, uključujući i energiju [102]. Drugi teorem odnosi se na princip varijacije za funkcional gustoće nalik prethodno navedenom principu [103]. Kohn-Shamove jednadžbe (KS-LCAO) riješile su problem koji predstavljaju Hohenberg-Kohnovi teoremi, budući da oni ne opisuju potencijalnu prirodu ili oblik funkcionala gustoće te načine njegova određivanja.

U istraživanju struktura ferocenskih peptida vrlo se često koriste računi vezani uz teoriju funkcionala gustoće (DFT) s ciljem određivanja relativne stabilnosti optimiziranih konformera na geometrijama koje sadrže različite funkcijske skupine. DFT računi pokazali su se iznimno važnima u objašnjavanju konformacija ferocenskih konjugata koji tvore IHB u otopini. Metoda je validirana eksperimentalnim metodama poput IR-, NMR- ili CD-spektroskopije [104].



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI I METODE

Kemikalije korištene u sintezi bile su analitičke čistoće, dok su otapala korištena u radu pročišćena prema standardnim postupcima [105]. Tijek reakcija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva ispitivani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel) s fluorescentnim indikatorom (254 nm). Detekcija neferocenskih spojeva provedena je korištenjem UV-svjetlosti valne duljine 254 nm i ninhidrinom uz zagrijavanje. Produkti su pročišćeni tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu ("Merck", Kieselgel 60 HF<sub>254</sub>) uporabom smjesâ diklormetan/etil-acetat 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). Tališta su određena na Reichert Thermovar HT 1 BT 11 i nisu korigirana.

IR-spektri uzoraka snimljeni su na spektrofotometru PerkinElmer Spectrum Two u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

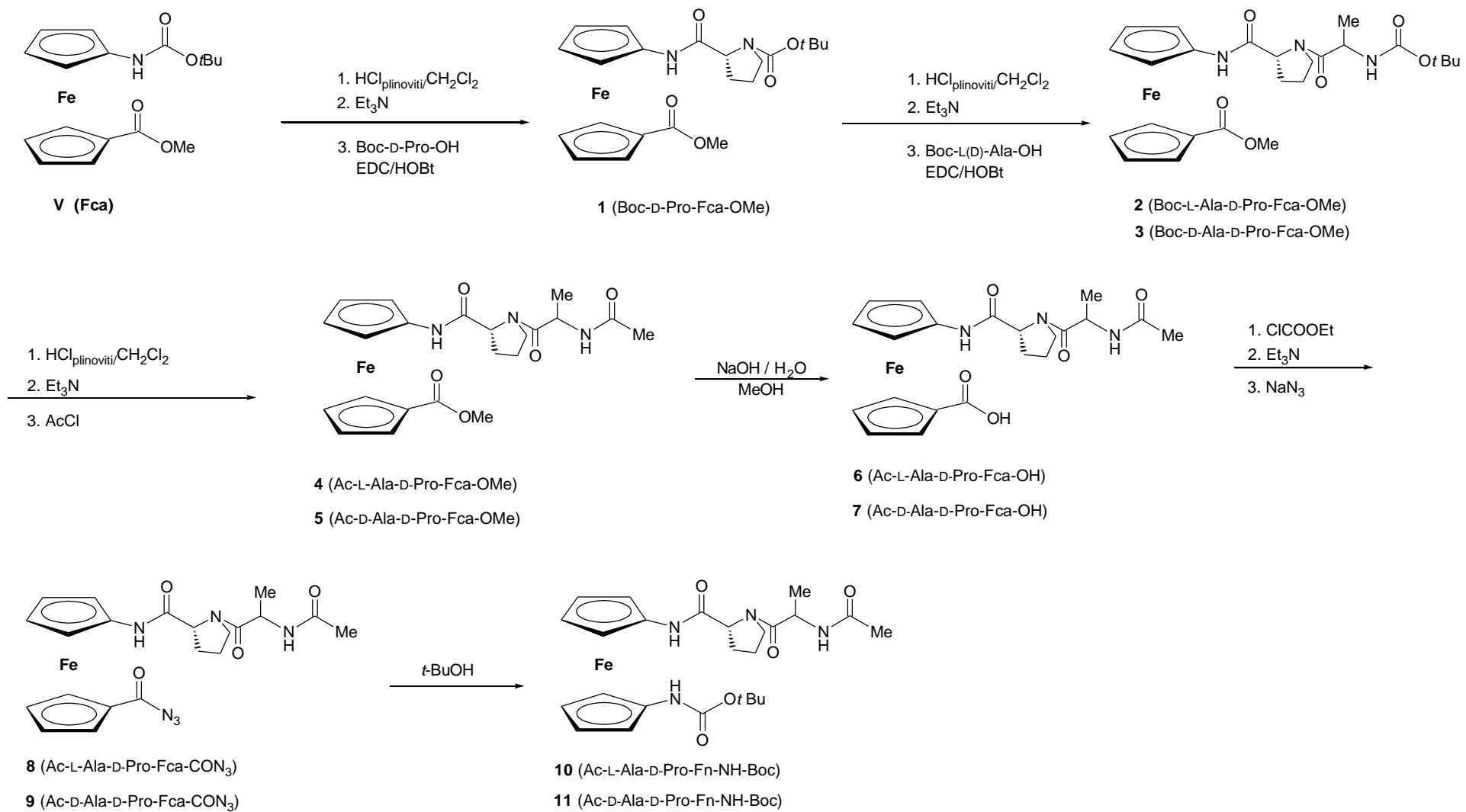
<sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR-spektri određeni su u CDCl<sub>3</sub> na spektrometru Bruker AV600 uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm.

UV/Vis- i CD-spektri snimljeni su na CD-spektrofotometru Jasco-810 u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i DMSO.

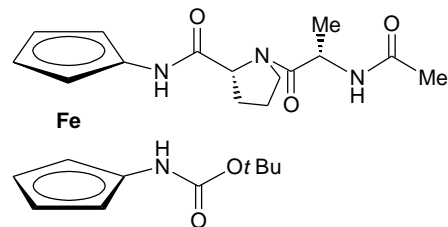
Maseni spektri izmjereni su na Agilent Technologies 6410 Triple Quadrupole Mass Spectrometer (ESI ionizacija).

DFT-računi načinjeni su pomoću programa Gaussian 09/DFT (B3LYP, MO6 i MO6-2X).

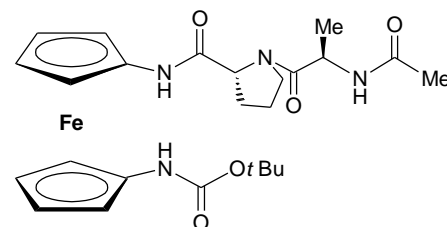
Sinteza Boc-Fca (**V**) [79] opisana je u literaturi te njezini spektroskopski podaci odgovaraju literaturnima.



**Shema 1.**



**10** (Ac-L-Ala-D-Pro-Fn-NH-Boc)



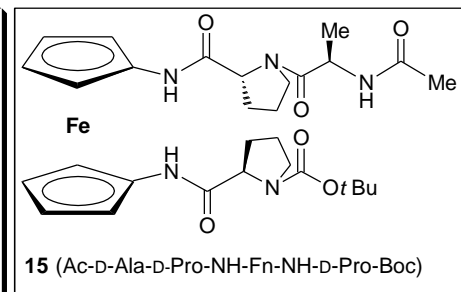
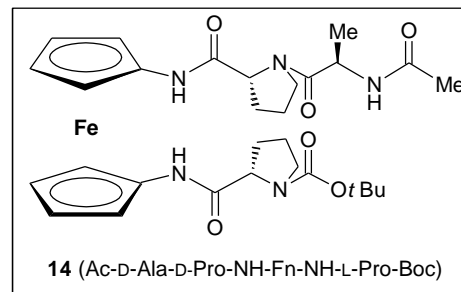
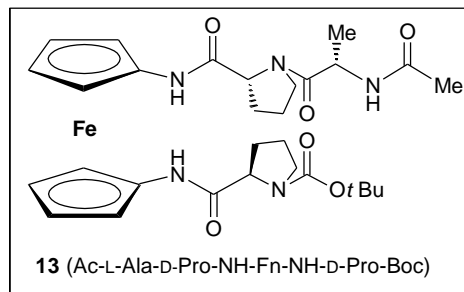
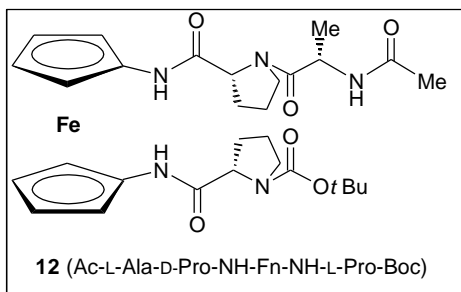
**11** (Ac-D-Ala-D-Pro-Fn-NH-Boc)

1. HCl<sub>plinoviti</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>
2. Et<sub>3</sub>N
3. Boc-L-Pro-OH  
EDC/HOBt

1. HCl<sub>plinoviti</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>
2. Et<sub>3</sub>N
3. Boc-D-Pro-OH  
EDC/HOBt

1. HCl<sub>plinoviti</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>
2. Et<sub>3</sub>N
3. Boc-L-Pro-OH  
EDC/HOBt

1. HCl<sub>plinoviti</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>
2. Et<sub>3</sub>N
3. Boc-D-Pro-OH  
EDC/HOBt



**Shema 2.**

## 3.2. POSTUPAK PRIPRAVE FEROCENSKIH PEPTIDA

### 3.2.1. Postupak priprave dipeptida 1

Boc-zaštićena ferocenska aminokiselina Fca **V** (1 g, 2,8 mmol) otopi se u diklormetanu, ohladi na 0 °C i izloži djelovanju plinovitog HCl. Nakon 30' miješanja u ledenoj kupelji te otparavanja na rotacijskom vakuum-uparivaču nastali se hidroklorid suspendira u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i obradi sa suviškom Et<sub>3</sub>N (pH~9). Dobiveni se slobodni amin kopulira s Boc-D-Pro-OH (1,18 g, 5,5 mmol) primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon 1 sat 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.

#### **Boc-D-Pro-Fca-OMe (1)**

$t_r = 128-132$  °C;  $R_f = 0,33$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : EtOAc = 5 : 1).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{max}/cm^{-1}$ : 3419 sr, 3405 sr (NH<sub>slobodni</sub>), 3290 sr, 3234 sl (NH<sub>asocirani</sub>), 1706 j (C=O<sub>COOMe</sub>), 1694 j (C=O<sub>Boc</sub>), 1655 j (C=O<sub>CONH</sub>), 1561 j (amid II).

<sup>1</sup>H NMR\* (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/ppm$ : 8,78 (s, 0,66H, NH<sub>trans</sub>); 7,52 (s, 0,33H, NH<sub>cis</sub>); 4,78 (s, 0,66H, CH<sub>Fn trans</sub>); 4,77 (s, 0,66H, CH<sub>Fn trans</sub>); 4,74 (s, 0,66H, CH<sub>Fn trans</sub>); 4,71-4,69 (m, 0,66H, CH<sub>Fn trans</sub>); 4,64 (s, 0,33H, CH<sub>Fn cis</sub>); 4,49 (s, 0,34H, CH<sub>Fn cis</sub>); 4,47 (s, 0,65H, CH<sub>Fn trans</sub>); 4,43 (s, 0,34H, CH<sub>Fn cis</sub>); 4,40 (s, 0,34H, CH<sub>Fn cis</sub>); 4,38 (s, 0,7H, CH<sub>Fn trans</sub>); 4,37 (s, 0,33H, CH<sub>Fn cis</sub>); 4,36 (s, 1,03H, CH<sub>Fn cis</sub> + CH <sub>$\alpha$ Pro trans</sub>); 4,27 (dd, 0,34H,  $J = 3,4$  Hz,  $J = 8,7$  Hz, CH <sub>$\alpha$ Pro trans</sub>); 4,11-4,09 (s, 0,68H, CH<sub>Fn cis</sub>); 4,00 (brs, 1,35H, CH<sub>Fn trans</sub>); 3,80 (s, 0,96 H, CH<sub>3COOMe trans</sub>); 3,78 (s, 2,06 H, CH<sub>3COOMe cis</sub>); 3,64-3,61 (m, 0,36H, CH <sub>$\delta$ Pro cis</sub>); 3,53-3,50 (m, 0,36H, CH <sub>$\delta$ Pro cis</sub>); 3,46-3,43 (m, 0,7H, CH <sub>$\delta$ Pro trans</sub>); 3,31-3,26 (m, 0,7H, CH <sub>$\delta$ Pro trans</sub>); 2,47 (šj, 0,3H, CH <sub>$\beta$ Pro cis</sub>); 2,42-2,40 (m, 0,7H, CH <sub>$\beta$ Pro trans</sub>); 2,26-2,24 (m, 0,3H, CH <sub>$\beta$ Pro cis</sub>); 1,96-1,91 (m, 2H, CH <sub>$\gamma$ Pro</sub>); 1,89-1,85 (m, 0,72H, CH <sub>$\beta$ Pro</sub>); 1,49 (s, 6H, CH<sub>3Boc trans</sub>); 1,45 (s, 3H, CH<sub>3Boc cis</sub>).

<sup>13</sup>C NMR\*, APT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/ppm$ : 172,39 (CO<sub>COOMe cis</sub>); 172,21 (CO<sub>COOMe trans</sub>); 171,52 (CO<sub>CO-NH cis</sub>); 170,24 (CO<sub>CO-NH trans</sub>); 156,34 (CO<sub>Boc trans</sub>); 155,06 (CO<sub>Boc cis</sub>); 95,30 (C<sub>qFn trans</sub>); 93,94 (C<sub>qFn cis</sub>); 81,19 (C<sub>qFn</sub>); 80,91 (C<sub>qBoc trans</sub>); 73,04; 71,10; 70,69; 66,54; 66,33; 62,54; 62,40; (CH<sub>Fn trans</sub>); 72,74; 71,44; 70,95; 66,84; 66,82; 63,77; 62,98 (CH<sub>Fn cis</sub>); 72,90 (CH<sub>Fn</sub>); 61,59 (CH <sub>$\alpha$ Pro cis</sub>); 59,83 (CH <sub>$\alpha$ Pro trans</sub>); 52,25 (CH<sub>3COOMe cis</sub>); 52,08 (CH<sub>3COOMe trans</sub>); 47,17 (CH<sub>2 $\delta$ Pro</sub>); 31,21 (CH<sub>2 $\beta$ Pro cis</sub>); 28,33 (CH<sub>3Boc</sub>); 27,21 (CH<sub>2 $\beta$ Pro trans</sub>); 24,71 (CH<sub>2 $\gamma$ Pro trans</sub>); 23,77 (CH<sub>2 $\gamma$ Pro cis</sub>).

\*Zbog slabog razdvajanja signala pri sobnoj temperaturi, NMR-spektri snimljeni su pri 228 K.

HRMS analiza za  $C_{22}H_{28}N_2O_5Fe$  (456,1342) nađeno: 456,132.

### 3.2.2. Postupak pripreve tripeptida **2** i **3**

Boc-zaštićen dipeptid **1** (800 mg, 1,75 mmol) otopi se u diklormetanu te se ohlađen na 0 °C izloži djelovanju plinovitog HCl. Nakon 30' miješanja u ledenoj kupelji te otparavanja na rotacijskom vakuum-uparivaču nastali se hidroklorid suspendira u  $CH_2Cl_2$  i obradi sa suviškom  $Et_3N$  (pH~9). Dobiveni se slobodni amin kopulira s Boc-L-Ala-OH (662 mg, 3,5 mmol) i Boc-D-Ala-OH (662 mg, 3,5 mmol) primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon 1 sat miješanja pri sobnoj temperaturi rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom  $NaHCO_3$ , 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim  $Na_2SO_4$  i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz  $CH_2Cl_2$  : EtOAc = 5 : 1 kao eluens.

#### **Boc-L-Ala-D-Pro-Fca-OMe (2)**

$R_f = 0,61$  (EtOAc).

IR ( $CH_2Cl_2$ )  $\nu_{max}/cm^{-1}$ : 3432 j ( $NH_{slobodni}$ ), 3345 sr ( $NH_{asocirani}$ ), 1708 j ( $C=O_{COOMe}$ ), 1659 j, 1629 j ( $C=O_{CONH}$ ), 1561 j, 1544 j, 1499 j (amid II).

$^1H$ -NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta/ppm$ : 8,40 (s, 1H,  $NH_{Fca}$ ); 5,50 (d,  $J = 6,60$  Hz, 1H,  $NH_{Ala}$ ); 4,73 (s, 1H, H-10); 4,70 (s, 1H, H-7), 4,65-4,63 [m, 3H,  $CH-\alpha$  (Pro), H-3, H-4]; 4,48-4,46 [m, 1H,  $CH_{Ala}$ ], 4,37 (pt, 2H, H-8, H-9); 4,00 (pt, 1H, H-2, H-5); 3,86 [pt, 1H,  $CH_2-\delta$  (Pro)]; 3,80 (s, 3 H, COOMe); 3,51 [q, 1H,  $J = 7,69$  Hz,  $J = 9,14$  Hz,  $CH_2-\delta'$  (Pro)]; 2,51-2,48 [m, 1H,  $CH_2-\beta$  (Pro)]; 2,17-,16 [m, 1H,  $CH_2-\gamma$  (Pro)]; 2,05-2,03 [m, 1H,  $CH_2-\gamma'$  (Pro)]; 1,93 [pt, 1 H,  $CH_2-\beta'$  (Pro)]; 1,93-1,91 [m, 1H,  $CH_2-\beta'$  (Pro)]; 1,39 [s, 9 H,  $(CH_3)_3-Boc$ ]; 1,35 (d,  $J = 6,86$  Hz, 3 H,  $CH_3-Ala$ ).

$^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta/ppm$ : 173,22 ( $CO_{Ala}$ ); 172,01 ( $CO_{COOMe}$ ); 169,17 ( $CO_{Fca}$ ); 155,59 ( $CO_{Boc}$ ); 95,66 (C-1, Fn); 80,04 ( $C_{qBoc}$ ); 72,73 (C-8); 72,64 (C-9); 71,81 (C-6); 71,38 (C-10); 71,34 (C-7); 66,40 (C-3); 66,13 (C-4); 63,28 (C-5); 63,18 (C-2); 60,86 (C- $\alpha$ , Pro); 51,74 ( $CH_3-COOMe$ ); 48,42 ( $CH_{Ala}$ ); 47,29 ( $CH_2-\delta$ , Pro); 28,56 [ $(CH_3)_3-Boc$ ]; 27,71 ( $CH_2-\beta$ , Pro); 24,88 ( $CH_2-\gamma$ , Pro); 17,74 ( $CH_3-Ala$ ).

ESI-MS: izračunato za  $C_{25}H_{33}N_3O_6Fe$ : 527,4; dobiveno  $[M]^+$  na  $m/z$  527,3.

### Boc-D-Ala-D-Pro-Fca-OMe (**3**)

$t_f = 184\text{ }^\circ\text{C}$ ;  $R_f = 0,78$  (EtOAc).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3431 j (NH<sub>slobodni</sub>), 3303 sr (NH<sub>asocirani</sub>), 1707 j (C=O<sub>COOMe</sub>), 1657 j, 1634 j (C=O<sub>CONH</sub>), 1555 j, 1549 j, 1498 j (amid II).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/\text{ppm}$ : 8,83 (s, 0,14H, NH<sub>Fca cis</sub>); 8,47 (s, 0,86H, NH<sub>Fca trans</sub>); 5,35 (d,  $J = 7,39$  Hz, 0,86H, NH<sub>Ala trans</sub>); 5,11 (d,  $J = 7,39$  Hz, 0,14H, NH<sub>Ala cis</sub>); 4,90 (s, 0,14H, H-10<sub>cis</sub>); 4,86 (s, 0,14H, H-7<sub>cis</sub>); 4,74 (s, 0,86H, H-10<sub>trans</sub>); 4,71 (s, 0,86H, H-7<sub>trans</sub>); 4,66 [s, 0,34H, CH- $\alpha$ (Pro)<sub>cis</sub>, H-3<sub>cis</sub>]; 4,65 [s, 1,66H, CH- $\alpha$ (Pro)<sub>trans</sub>, H-3<sub>trans</sub>]; 4,51 [m, 1,62H, CH<sub>Ala trans</sub>, H-4<sub>trans</sub>]; 4,49 (m, 0,22H, CH<sub>Ala cis</sub>); 4,42-4,41 (m, 0,16H, H-4<sub>cis</sub>); 4,35 (s, 0,86H, H-8<sub>trans</sub>); 4,33 (s, 0,86H, H-9<sub>trans</sub>); 4,04 (s, 0,28H, H-2<sub>cis</sub>, H-5<sub>cis</sub>); 3,99 (s, 1H, H-2<sub>trans</sub>); 3,98 (s, 1H, H-5<sub>trans</sub>); 3,79 (s, 2,54H, COOMe<sub>trans</sub>); 3,76 (s, 0,46H, COOMe<sub>cis</sub>); 3,69-3,66 [m, 0,86H, CH<sub>2</sub>- $\gamma'$  (Pro)<sub>trans</sub>]; 3,60 [td, 0,86H, CH<sub>2</sub>- $\gamma$ (Pro)<sub>trans</sub>]; 3,36 [m, 0,14H, CH<sub>2</sub>- $\gamma'$  (Pro)<sub>cis</sub>]; 3,27 [m, 0,14H, CH<sub>2</sub>- $\gamma$ (Pro)<sub>cis</sub>]; 2,72-2,68 [m, 0,56H, CH<sub>2</sub>- $\beta$  (Pro)<sub>cis</sub>, CH<sub>2</sub>- $\delta$  (Pro)<sub>cis</sub>, CH<sub>2</sub>- $\delta'$  (Pro)<sub>cis</sub>, CH<sub>2</sub>- $\beta'$  (Pro)<sub>cis</sub>]; 2,48 [m, 0,86H, CH<sub>2</sub>- $\beta$  (Pro)]; 2,19-2,17 [m, 0,86H, CH<sub>2</sub>- $\delta$  (Pro)<sub>trans</sub>]; 2,06-2,02 [m, 0,86H, CH<sub>2</sub>- $\delta'$  (Pro)<sub>trans</sub>]; 1,93-1,91 [m, 0,86H, CH<sub>2</sub>- $\beta'$  (Pro)<sub>trans</sub>]; 1,51 [s, 1,64H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc<sub>cis</sub>]; 1,44 [s, 7,36H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc<sub>trans</sub>]; 1,38 (d,  $J = 6,74$  Hz, 2,4H, CH<sub>3</sub>-Ala<sub>trans</sub>); 1,32 (d,  $J = 6,74$  Hz, 0,6H, CH<sub>3</sub>-Ala<sub>cis</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/\text{ppm}$ : 173,86 (CO<sub>Ala trans</sub>); 172,75 (CO<sub>Ala cis</sub>); 171,68 (CO<sub>COOMe trans</sub>); 169,13 (CO<sub>Fca trans</sub>); 168,90 (CO<sub>Fca cis</sub>); 156,68 (CO<sub>Boc cis</sub>); 155,34 (CO<sub>Boc trans</sub>); 96,22 (C-1,Fn<sub>cis</sub>); 95,66 (C-1,Fn<sub>trans</sub>); 80,57 (C<sub>q</sub>Boc<sub>cis</sub>); 79,99 (C<sub>q</sub>Boc<sub>trans</sub>); 72,65 (C-8<sub>trans</sub>); 72,60 (C-9<sub>trans</sub>); 72,43 (C-8<sub>cis</sub>); 72,33 (C-9<sub>cis</sub>); 72,12 (C-6<sub>trans</sub>); 71,99 (C-6<sub>cis</sub>); 71,30 (C-10<sub>trans</sub>); 71,24 (C-10<sub>cis</sub>); 71,13 (C-7<sub>trans</sub>); 70,93 (C-7<sub>cis</sub>); 66,49 (C-3<sub>trans</sub>); 66,34 (C-4<sub>trans</sub>); 65,86 (C-3<sub>cis</sub>, C-4<sub>cis</sub>); 63,37 (C-2<sub>cis</sub>, C-5<sub>cis</sub>); 63,02 (C-5<sub>trans</sub>); 62,81 (C-2<sub>trans</sub>); 61,42 (C- $\alpha$ , Pro<sub>cis</sub>); 60,48 (C- $\alpha$ , Pro<sub>trans</sub>); 51,73 [CH<sub>3</sub>COOMe<sub>trans</sub>]; 49,06 (CH<sub>Ala cis</sub>); 47,99 (CH<sub>Ala trans</sub>); 47,50 (CH<sub>2</sub>- $\delta$ , Pro<sub>trans</sub>); 46,76 (CH<sub>2</sub>- $\delta$ , Pro<sub>cis</sub>); 31,25 (CH<sub>2</sub>- $\beta$ , Pro<sub>cis</sub>); 28,62 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc<sub>cis</sub>]; 28,51 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc<sub>trans</sub>]; 26,75 (CH<sub>2</sub>- $\beta$ , Pro<sub>trans</sub>); 25,34 (CH<sub>2</sub>- $\gamma$ , Pro<sub>trans</sub>); 22,27 (CH<sub>2</sub>- $\gamma$ , Pro<sub>cis</sub>); 18,63 (CH<sub>3</sub>Ala<sub>trans</sub>).

ESI-MS: izračunato za C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Fe: 527,4; dobiveno [M]<sup>+</sup> na  $m/z$  527,3.

#### 3.2.3. Postupak priprave tripeptida **4** i **5**

U suspenziju Boc-peptida **2** (800 mg, 1,52 mmol), odnosno **3** (800 mg, 1,52 mmol), u EtOAc ohlađenu na 0 °C uvodi se plinoviti HCl. Nakon 20 minuta miješanja u ledenoj kupelji otapalo se upari, a rezultirajući hidroklorid peptida **2**, odn. **3** suspendira u suhom diklormetanu

(8 ml) i otopi uz dodatak Et<sub>3</sub>N (1,67 mL, 12,1 mmol). Nastalaj se otopini, ohlađenoj na 0 °C, uz miješanje oprezno dokapa acetil-klorid (649 µL, 9,12 mmol). Nakon 15 min. miješanja pri 0 °C, reakcijska se smjesa izlije u vodu i više puta ekstrahira diklormetanom. 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 eluensâ.

#### Ac-L-Ala-D-Pro-Fca-OMe (4)

$R_f = 0,61$  (*n*-BuOH : CH<sub>3</sub>COOH : H<sub>2</sub>O = 60 : 25 : 15).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3438 j (NH<sub>slobodni</sub>), 3322 j (NH<sub>asocirani</sub>), 1707 j (C=O<sub>COOMe</sub>), 1669, 1659 (C=O<sub>CONH</sub>), 1548, 1510 (amid II).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/\text{ppm}$ : 8,33 (s, 1H, NH<sub>Fca</sub>); 6,79 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1H, NH<sub>Ala</sub>); 4,75 (s, 1H, H-2); 4,71 (s, 1H, H-5), 4,67-4,64 (m, 3H, CH<sub>Ala</sub>, H-7, H-10); 4,60 [m, 1H, CH- $\alpha$  (Pro)]; 4,41 (s, 1H, H-8); 4,37 (s, 1H, H-9); 4,00 (s, 1H, H-3); 3,99 (s, 1H, H-5); 3,92 [pt, 1H, CH<sub>2</sub>- $\delta$  (Pro)]; 3,78 (s, 3H, COOMe); 3,51 [q, 1 H,  $J = 3,5$  Hz,  $J = 3,5$  Hz, CH<sub>2</sub>- $\delta'$  (Pro)]; 2,42-2,41 [m, 1H, CH<sub>2</sub>- $\beta$  (Pro)]; 2,14-2,12 [m, 1H, CH<sub>2</sub>- $\gamma$  (Pro)]; 2,05-2,03 [m, 2H, CH<sub>2</sub>- $\gamma'$  (Pro), CH<sub>2</sub>- $\beta'$  (Pro)]; 1,93-1,91 [m, 1H, CH<sub>2</sub>- $\beta'$  (Pro)]; 2,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac); 1,37 (d,  $J = 6,8$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-Ala).

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/\text{ppm}$ : 172,62 (CO<sub>Ala</sub>); 172,37 (CO<sub>COOMe</sub>); 170,76 (CO<sub>Ac</sub>); 169,32 (CO<sub>Fca</sub>); 95,93 (C-1, Fn); 72,94 (C-8); 72,79 (C-9); 71,58 (C-6); 71,39 (C-10); 71,18 (C-7); 66,43 (C-3); 66,22 (C-4); 63,08 (C-5); 63,03 (C-2); 61,08 (C- $\alpha$ , Pro); 51,76 (CH<sub>3</sub>-COOMe); 47,69 (CH<sub>Ala</sub>); 47,39 (CH<sub>2</sub>- $\delta$ , Pro); 28,39 (CH<sub>2</sub>- $\beta$ , Pro); 24,71 (CH<sub>2</sub>- $\gamma$ , Pro); 23,00 (CH<sub>3</sub>-Ac); 16,90 (CH<sub>3</sub>-Ala).

ESI-MS: izračunato za C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Fe: 469,3; dobiveno [M]<sup>+</sup> na  $m/z$  469,3.

#### Ac-D-Ala-D-Pro-Fca-OMe (5)

$t_t = 57$  °C;  $R_f = 0,65$  (*n*-BuOH : CH<sub>3</sub>COOH : H<sub>2</sub>O = 60 : 25 : 15).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3422 j (NH<sub>slobodni</sub>), 3289 sr (NH<sub>asocirani</sub>), 1708 j (C=O<sub>COOMe</sub>), 1674, 1638 (C=O<sub>CONH</sub>), 1555, 1539, 1510 (amid II).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/\text{ppm}$ : 9,11 (s, 0,14H, NH<sub>Fca cis</sub>); 8,43 (s, 0,86H, NH<sub>Fca trans</sub>); 6,51 (d,  $J = 7,2$  Hz, 0,86H, NH<sub>Ala trans</sub>); 6,27 (d,  $J = 5,1$  Hz, 0,14H, NH<sub>Ala cis</sub>); 4,78 (dq,  $J = 7,6$  Hz, 7,1 Hz, 1H, CH<sub>Ala</sub>); 4,74 (pt, 1H, H-10); 4,70 (pt, 1H, H-7); 4,66 (pt, 1H, H-3); 4,61 [dd,  $J = 8,2$  Hz, 3,0 Hz, 1 H, CH- $\alpha$  (Pro)]; 4,47 [pt, 1H, H-4], 4,37 (pt, 1H, H-8); 4,34 (pt, 1H, H-9); 4,04 (pt, 0,14H, H-2<sub>cis</sub>, H-5<sub>cis</sub>); 3,99 (pt, 1,86H, H-2<sub>trans</sub>, H-5<sub>trans</sub>); 3,78 (s, 2,6H,

COOMe<sub>trans</sub>); 3,76 (s, 0,4H, COOMe<sub>cis</sub>); 3,72-3,70 [m, 1H, CH<sub>2</sub>-δ'(Pro)]; 3,62 [td, 1H, CH<sub>2</sub>-δ (Pro)]; 2,42 [m, 1H, CH<sub>2</sub>-γ (Pro)]; 2,23-2,18 [m, 1H, CH<sub>2</sub>-γ' (Pro)]; 2,04-2,01 [m, 1H, CH<sub>2</sub>-β' (Pro)]; 2,06 (s, 0,4H, CH<sub>3</sub>-Ac<sub>cis</sub>); 2,00 (s, 2,6H, CH<sub>3</sub>-Ac<sub>trans</sub>); 1,97-1,93 [m, 1H, CH<sub>2</sub>-β (Pro)]; 1,41 (d, *J* = 6,8 Hz, 2,45H, CH<sub>3</sub>-Ala<sub>trans</sub>); 1,36 (d, *J* = 6,9 Hz, 0,55H, CH<sub>3</sub>-Ala<sub>cis</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 173,28 (CO<sub>Ala trans</sub>); 172,02 (CO<sub>Ala cis</sub>); 171,91 (CO<sub>COOMe cis</sub>); 171,81 (CO<sub>COOMe trans</sub>); 171,22 (CO<sub>Fca cis</sub>); 169,68 (CO<sub>Fca trans</sub>); 169,22 (CO<sub>Ac trans</sub>); 168,86 (CO<sub>Ac cis</sub>); 96,19 (C-1<sub>cis</sub>); 95,60 (C-1<sub>trans</sub>); 72,65 (C-8); 72,56 (C-9); 72,10 (C-6); 71,41 (C-10); 71,13 (C-7); 66,58 (C-2<sub>cis</sub>); 66,45 (C-2<sub>trans</sub>); 66,38 (C-5<sub>trans</sub>); 65,99 (C-5<sub>cis</sub>); 63,52 (C-3<sub>cis</sub>); 63,24 (C-4<sub>cis</sub>); 63,14 (C-3<sub>trans</sub>); 62,84 (C-4<sub>trans</sub>); 61,49 (C-α, Pro<sub>cis</sub>); 60,56 (C-α, Pro<sub>trans</sub>); 51,75 (CH<sub>3</sub>-COOMe<sub>trans</sub>); 51,74 (CH<sub>3</sub>-COOMe<sub>cis</sub>); 47,62 (CH<sub>2</sub>-δ, Pro); 46,84 (CH<sub>Ala</sub>); 31,43 (CH<sub>2</sub>-β, Pro<sub>cis</sub>); 27,24 (CH<sub>2</sub>-β, Pro<sub>trans</sub>); 25,28 (CH<sub>2</sub>-γ, Pro<sub>trans</sub>); 23,27 (CH<sub>3</sub>-Ac<sub>trans</sub>); 22,84 (CH<sub>2</sub>-γ, Pro<sub>cis</sub>); 22,27 (CH<sub>3</sub>-Ac<sub>cis</sub>); 18,40 (CH<sub>3</sub>-Ala<sub>trans</sub>); 16,46 (CH<sub>3</sub>-Ala<sub>cis</sub>).

ESI-MS: izračunato za C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Fe: 469,3; dobiveno [M+H]<sup>+</sup> na *m/z* 470,3.

### 3.2.4. Postupak pripreme Ac-L-Ala-D-Pro-Fca-OH (**6**) i Ac-D-Ala-D-Pro-Fca-OH (**7**)

U otopinu estera **4** (800 mg, 1,7 mmol), odnosno **5** (800 mg, 1,7 mmol) u 7 mL metanola doda se 100 mg NaOH (1,7 mmol) i par kapi vode. Nakon 1 sat refluksiranja pri temperaturi od 65 °C, reakcijska se smjesa upari, ostatak zakiseli 20%-tnom otopinom HCl te ekstrahira etil-acetatom. Organski sloj ispere se zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari.

**Ac-L-Ala-D-Pro-Fca-COOH (6)** *R<sub>f</sub>* = 0,23 (EtOAc).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) *v*<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>: 3432 sl (NH<sub>slobodni</sub>), 3306 j (NH<sub>asocirani</sub>), 3118 š (OH, COOH), 1710, 1673, 1632 (C=O<sub>COOH, CONH</sub>), 1544 j (amid II).

**Ac-D-Ala-D-Pro-Fca-COOH (7)** *R<sub>f</sub>* = 0,23 (EtOAc).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) *v*<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>: 3420 sr (NH<sub>slobodni</sub>), 3300 j (NH<sub>asocirani</sub>), 3114-3001 š (OH, COOH), 1692, 1626 (C=O<sub>COOH, CONH</sub>), 1542 j (amid II).

### 3.2.5. Postupak pripreme Ac-L-Ala-D-Pro-Fca-CON<sub>3</sub> (**8**) i Ac-D-Ala-D-Pro-Fca-CON<sub>3</sub> (**9**)

Otopini kiselina **6** (1 g, 2,19 mmol), odnosno **7** (1 g, 2,19 mmol) u 10 mL acetona doda se par kapi vode. Reakcijskoj se smjesi, ohlađenoj na 0 °C, dokapa otopina Et<sub>3</sub>N



(0,26 g, 2,49 mmol) u acetonu, te otopina ClCOOEt (0,052 g, 1,64 mmol) u acetonu pazeći da temperatura ne prijeđe 5 °C. Nakon 30 minuta miješanja, doda se otopina NaN<sub>3</sub> (0,215 g, 3,29 mmol) u vodi. Nakon 1h miješanja u ledenoj kupelji reakcijska se smjesa razrijedi hladnom vodom, ekstrahira diklormetanom, 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.

Zbog nepredviđene situacije vezane za COVID-19 i nedostupnosti instrumenata, spojevi nisu podrobno spektroskopski identificirani.

**Ac-L-Ala-D-Pro-Fca-CON<sub>3</sub> (8):**

$R_f = 0,17$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 9 : 1).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3438 sr (NH<sub>slobodni</sub>), 3317 j (NH<sub>asocirani</sub>), 2135 j (N<sub>3</sub>), 1711, 1677, 1625 (C=O<sub>CON<sub>3</sub></sub>, CONH), 1545, 1511 (amid II).

**Ac-D-Ala-D-Pro-Fca-CON<sub>3</sub> (9):**

$R_f = 0,21$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 9 : 1).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3423 sr (NH<sub>slobodni</sub>), 3291 sr (NH<sub>asocirani</sub>), 2136 j (N<sub>3</sub>), 1711, 1680, 1625 (C=O<sub>CON<sub>3</sub></sub>, CONH), 1557, 1510 (amid II).

3.2.6. Postupak pripreve Ac-L-Ala-D-Pro-Fn-NHBoc (**10**) i Ac-D-Ala-D-Pro-Fca-NHBoc (**11**)

Otopina azida (400 mg) u 8 mL *tert*-butil-alkohola zagrijava se pri 65 °C sve dok na TLC ima traga supstrata (~5h). Reakcijska se smjesa upari, a produkt pročisti tankoslojnom preparativnom kromatografijom (EtOAc).

**Ac-L-Ala-D-Pro-Fn-NHBoc (10)**

$R_f = 0,33$  (EtOAc).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3437 sr (NH<sub>slobodni</sub>), 3329 j (NH<sub>asocirani</sub>), 1714 j, 1666 j (C=O<sub>CONH</sub>), 1543 j (amid II).

**Ac-D-Ala-D-Pro-Fca-NHBoc (11)**

$R_f = 0,25$  (EtOAc).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3426 j (NH<sub>slobodni</sub>), 3305 sr (NH<sub>asocirani</sub>), 1674, 1641 (C=O<sub>CONH</sub>), 1556 j, 1532 j (amid II).

3.2.7. Postupak pripreve tripeptida Ac-L-Ala-D-Pro<sup>1</sup>-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-L-Pro<sup>2</sup>-NBoc (**12**), Ac-L-Ala-D-Pro<sup>1</sup>-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-D-Pro<sup>2</sup>-NBoc (**13**), Ac-D-Ala-D-Pro<sup>1</sup>-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-L-Pro<sup>2</sup>-NBoc (**14**) i Ac-D-Ala-D-Pro<sup>1</sup>-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-D-Pro<sup>2</sup>-NBoc (**15**)

Boc-zaštićeni prekursor **10** tj. **11** (300 mg, 0,57 mmol) otopi se u EtOAc, ohladi na 0 °C i izloži djelovanju plinovitog HCl. Nakon 30' miješanja u ledenoj kupelji te otparavanja na rotacijskom vakuum-uparivaču nastali se hidroklorid suspendira u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i obradi sa suviškom Et<sub>3</sub>N (pH~9). Dobiveni se slobodni amin kopulira s 250 mg (1,14 mmol) Boc-D/L-Pro-OH primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon 1 sat 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.

**Ac-L-Ala-D-Pro<sup>1</sup>-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-L-Pro<sup>2</sup>-NBoc (12)**

$t_r = 109,7$  °C;  $R_f = 0,41$  (EtOAc).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3434 sl (NH<sub>slobodni</sub>), 3308 j (NH<sub>asocirani</sub>), 1691, 1674, 1648 (C=O<sub>CONH</sub>), 1549, 1533, 1478 (amid II).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/\text{ppm}$ : 8,48 [s, 1H, NH<sup>1</sup><sub>Fn</sub>]; 8,33 [s, 1H, NH<sup>2</sup><sub>Fn</sub>]; 8,01 (s, 1H, NH<sub>Ala</sub>); 5,37 (s, 1H, H-10); 5,31 (s, 1H, H-7); 4,84 (dq,  $J = 7,5$  Hz, 6,8 Hz, 1H, CH<sub>Ala</sub>); 4,64 [dd,  $J = 8,5$  Hz, 4,6 Hz, 1H, CH- $\alpha$  (Pro1)]; 4,21 (pt, 2H, H-2, H-5); 4,14 [m, 1H, CH- $\alpha$  (Pro2)]; 3,95 (s, 2H, H-3, H-4); 3,91 (s, 1H, H-8); 3,90 (s, 1H, H-9); 3,84-3,82 [m, 1H, CH<sub>2</sub>- $\delta'$  (Pro2)]; 3,65 [ddd,  $J = 10,5$  Hz, 7,8 Hz, 5,5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>- $\delta$  (Pro1)]; 3,58 [td,  $J = 10,1$  Hz, 6,9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>- $\delta$  (Pro2)]; 3,42 [td,  $J = 10,3$  Hz, 7,0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>- $\delta'$  (Pro1)]; 2,26 [m, 1H, CH<sub>2</sub>- $\gamma$  (Pro2)]; 2,19 [m, 1H, CH<sub>2</sub>- $\gamma$  (Pro1)]; 2,12-2,07 [m, 2H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ , CH<sub>2</sub>- $\beta'$  (Pro1)]; 2,06-2,03 [m, 2H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ , CH<sub>2</sub>- $\beta'$  (Pro2)]; 2,00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac); 1,98-1,93 [m, 1H, CH<sub>2</sub>- $\gamma'$  (Pro1)]; 1,85-1,83 [m, 1H, CH<sub>2</sub>- $\gamma'$  (Pro2)]; 1,48 [s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc]; 1,35 (d,  $J = 6,66$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-Ala).

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/\text{ppm}$ : 171,43 (CO<sub>Ala</sub>); 171,25 (CO<sub>Fn2</sub>); 169,94 (CO<sub>Fn1</sub>); 169,29 (CO<sub>Ac</sub>); 155,08 (CO<sub>Boc</sub>); 96,37 (C-6); 96,08 (C-1); 80,72 (C<sub>q</sub>Boc); 65,81 (C-8); 65,65 (C-9); 64,72 (C-3); 64,69 (C-4); 62,44 (C-7); 62,39 (C-10); 61,20 (C-2); 61,19 (C-5); 60,91 (C- $\alpha$ , Pro2); 60,60 (C- $\alpha$ , Pro1); 48,02 (CH<sub>2</sub>- $\delta$ , Pro2); 47,40 (CH<sub>2</sub>- $\delta$ , Pro1); 47,32 (CH, Ala); 30,54 (CH<sub>2</sub>- $\beta$ , Pro2); 29,68 (CH<sub>2</sub>- $\beta$ , Pro1); 28,65 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc]; 25,03 (CH<sub>2</sub>- $\gamma$ , Pro1); 24,76 (CH<sub>2</sub>- $\gamma$ , Pro2); 23,50 (CH<sub>3</sub>-Ac); 18,80 (CH<sub>3</sub>-Ala).

ESI-MS: izračunato za C<sub>30</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Fe: 623,5; dobiveno [M+H]<sup>+</sup> na  $m/z$  624,6.

**Ac-L-Ala-D-Pro<sup>1</sup>-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-D-Pro<sup>2</sup>-NBoc (13)**

$t_r = 109,7$  °C;  $R_f = 0,41$  (EtOAc).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3424 sl (NH<sub>slobodni</sub>), 3305 j, 3255 j (NH<sub>asocirani</sub>), 1686, 1665, 1629 (C=O<sub>CONH</sub>), 1570, 1508, 1481 (amid II).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/\text{ppm}$ : 9,44 [s, 0,9H, NH<sup>1</sup><sub>Fn trans</sub>]; 9,22 [s, 0,1H, NH<sup>1</sup><sub>Fn cis</sub>]; 9,16 [s, 0,9H, NH<sup>2</sup><sub>Fn trans</sub>]; 9,10 [s, 0,1H, NH<sup>2</sup><sub>Fn cis</sub>]; 6,65 (s, 0,1H, NH<sub>Ala cis</sub>); 6,54 (d,  $J = 7,26$  Hz, 0,9H, NH<sub>Ala trans</sub>); 5,37 (s, 1H, H-10); 5,31 (s, 1H, H-7); 4,84 (dq,  $J = 7,5$  Hz, 6,8 Hz, 1H, CH<sub>Ala</sub>); 4,64 [dd,  $J = 8,5$  Hz, 4,6 Hz, 1H, CH- $\alpha$  (Pro1)]; 4,21 (pt, 2H, H-2, H-5); 4,14 [m, 1H, CH- $\alpha$  (Pro2)]; 3,95 (s, 2H, H-3, H-4); 3,91 (s, 1H, H-8); 3,90 (s, 1H, H-9); 3,84-3,82 [m, 1H, CH<sub>2</sub>- $\delta'$ (Pro2)]; 3,65 [ddd,  $J = 10,5$  Hz, 7,8 Hz, 5,5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>- $\delta$  (Pro1)]; 3,58 [td,  $J = 10,1$  Hz, 6,9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>- $\delta$  (Pro2)]; 3,42 [td,  $J = 10,3$  Hz, 7,0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>- $\delta'$  (Pro1)]; 2,26 [m, 1H, CH<sub>2</sub>- $\gamma$  (Pro2)]; 2,19 [m, 1H, CH<sub>2</sub>- $\gamma$  (Pro1)]; 2,12-2,07 [m, 2H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ , CH<sub>2</sub>- $\beta'$  (Pro1)]; 2,06-2,03 [m, 2H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ , CH<sub>2</sub>- $\beta'$  (Pro2)]; 2,00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac); 1,98-1,93 [m, 1H, CH<sub>2</sub>- $\gamma'$  (Pro1)]; 1,85-1,83 [m, 1H, CH<sub>2</sub>- $\gamma'$  (Pro2)]; 1,48 [s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc]; 1,35 (d,  $J = 6,66$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-Ala).

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/\text{ppm}$ : 171,43 (CO<sub>Ala</sub>); 171,25 (CO<sub>Fn2</sub>); 169,94 (CO<sub>Fn1</sub>); 169,29 (CO<sub>Ac</sub>); 155,08 (CO<sub>Boc</sub>); 96,37 (C-6); 96,08 (C-1); 80,72 (C<sub>qBoc</sub>); 65,81 (C-8); 65,65 (C-9); 64,72 (C-3); 64,69 (C-4); 62,44 (C-7); 62,39 (C-10); 61,20 (C-2); 61,19 (C-5); 60,91 (C- $\alpha$ , Pro2); 60,60 (C- $\alpha$ , Pro1); 48,02 (CH<sub>2</sub>- $\delta$ , Pro2); 47,40 (CH<sub>2</sub>- $\delta$ , Pro1); 47,32 (CH, Ala); 30,54 (CH<sub>2</sub>- $\beta$ , Pro2); 29,68 (CH<sub>2</sub>- $\beta$ , Pro1); 28,65 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc]; 25,03 (CH<sub>2</sub>- $\gamma$ , Pro1); 24,76 (CH<sub>2</sub>- $\gamma$ , Pro2); 23,50 (CH<sub>3</sub>-Ac); 18,80 (CH<sub>3</sub>-Ala).

ESI-MS: izračunato za C<sub>30</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Fe: 623,5; dobiveno [M+H]<sup>+</sup> na  $m/z$  624,6.

**Ac-D-Ala-D-Pro<sup>1</sup>-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-L-Pro<sup>2</sup>-NBoc (14)**

$t_r = 109,7$  °C;  $R_f = 0,41$  (EtOAc).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3417 sl (NH<sub>slobodni</sub>), 3302 j (NH<sub>asocirani</sub>), 1689, 1675, 1647 (C=O<sub>CONH</sub>), 1564, 1545, 1534, 1513 (amid II).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/\text{ppm}$ : 8,56 [s, 1H, NH<sup>1</sup><sub>Fn</sub>]; 8,27 [s, 1H, NH<sup>2</sup><sub>Fn</sub>]; 6,92 (s, 1H, NH<sub>Ala</sub>); 5,37 (s, 1H, H-10); 5,31 (s, 1H, H-7); 4,84 (dq,  $J = 7,5$  Hz, 6,8 Hz, 1H, CH<sub>Ala</sub>); 4,64 [dd,  $J = 8,5$  Hz, 4,6 Hz, 1H, CH- $\alpha$  (Pro1)]; 4,21 (pt, 2H, H-2, H-5); 4,14 [m, 1H, CH- $\alpha$  (Pro2)]; 3,95 (s, 2H, H-3, H-4); 3,91 (s, 1H, H-8); 3,90 (s, 1H, H-9); 3,84-3,82 [m, 1H, CH<sub>2</sub>- $\delta'$ (Pro2)]; 3,65 [ddd,  $J = 10,5$  Hz, 7,8 Hz, 5,5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>- $\delta$  (Pro1)]; 3,58 [td,  $J = 10,1$  Hz, 6,9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>- $\delta$  (Pro2)]; 3,42 [td,  $J = 10,3$  Hz, 7,0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>- $\delta'$  (Pro1)]; 2,26 [m, 1H, CH<sub>2</sub>- $\gamma$  (Pro2)]; 2,19 [m, 1H, CH<sub>2</sub>- $\gamma$  (Pro1)]; 2,12-2,07 [m, 2H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ , CH<sub>2</sub>- $\beta'$  (Pro1)]; 2,06-2,03 [m,

2H, CH<sub>2</sub>-β, CH<sub>2</sub>-β' (Pro2)]; 2,00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac); 1,98-1,93 [m, 1H, CH<sub>2</sub>-γ' (Pro1)]; 1,85-1,83 [m, 1H, CH<sub>2</sub>-γ' (Pro2)]; 1,48 [s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc]; 1,35 (d, *J* = 6,66 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-Ala).

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 171,43 (CO<sub>Ala</sub>); 171,25 (CO<sub>Fn2</sub>); 169,94 (CO<sub>Fn1</sub>); 169,29 (CO<sub>Ac</sub>); 155,08 (CO<sub>Boc</sub>); 96,37 (C-6); 96,08 (C-1); 80,72 (C<sub>qBoc</sub>); 65,81 (C-8); 65,65 (C-9); 64,72 (C-3); 64,69 (C-4); 62,44 (C-7); 62,39 (C-10); 61,20 (C-2); 61,19 (C-5); 60,91 (C-α, Pro2); 60,60 (C-α, Pro1); 48,02 (CH<sub>2</sub>-δ, Pro2); 47,40 (CH<sub>2</sub>-δ, Pro1); 47,32 (CH, Ala); 30,54 (CH<sub>2</sub>-β, Pro2); 29,68 (CH<sub>2</sub>-β, Pro1); 28,65 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc]; 25,03 (CH<sub>2</sub>-γ, Pro1); 24,76 (CH<sub>2</sub>-γ, Pro2); 23,50 (CH<sub>3</sub>-Ac); 18,80 (CH<sub>3</sub>-Ala).

ESI-MS: izračunato za C<sub>30</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Fe: 623,5; dobiveno [M+H]<sup>+</sup> na *m/z* 624,6.

### Ac-D-Ala-D-Pro<sup>1</sup>-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-D-Pro<sup>2</sup>-NBoc (15)

*t*<sub>f</sub> = 110,3 °C; *R*<sub>f</sub> = 0,56 (EtOAc).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) *v*<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>: 3424 sl (NH<sub>slobodni</sub>), 3302 j, 3254 j (NH<sub>asocirani</sub>), 1690, 1667, 1629 (C=O<sub>CONH</sub>), 1571, 1511, 1481 (amid II).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 9,38 (s, 1H, NH<sup>1</sup><sub>Fn</sub>); 9,23 (s, 1H, NH<sup>2</sup><sub>Fn</sub>); 6,23 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, NH<sub>Ala</sub>); 5,37 (s, 1H, H-10); 5,30 (s, 1H, H-7); 4,80 (dq, *J* = 7,8 Hz, 7,1 Hz, 1H, CH<sub>Ala</sub>); 4,69 [dd, *J* = 8,3 Hz, 5,3 Hz, 1H, CH-α (Pro1)]; 4,28 [dd, *J* = 8,1 Hz, 4,7 Hz, 1H, CH-α (Pro2)]; 4,19 (s, 1H, H-2); 4,09 (s, 1H, H-5); 3,94 (s, 1H, H-3); 3,93 (s, 1H, H-4); 3,90 (s, 1H, H-8); 3,89 (s, 1H, H-9); 3,80 [td, *J* = 10,0 Hz, 7,0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-δ'(Pro1)]; 3,72 [td, *J* = 10,0 Hz, 7,0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-δ (Pro1)]; 3,63 [ddd, *J* = 10,5 Hz, 7,7 Hz, 5,6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-δ'(Pro2)]; 3,42 [td, *J* = 10,6 Hz, 7,0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-δ (Pro2)]; 2,22-1,98 [m, 8H, CH<sub>2</sub>-γ, CH<sub>2</sub>-γ' (Pro1), CH<sub>2</sub>-γ, CH<sub>2</sub>-γ' (Pro2), CH<sub>2</sub>-β, CH<sub>2</sub>-β' (Pro1), CH<sub>2</sub>-β, CH<sub>2</sub>-β' (Pro2)]; 1,99 [s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac]; 1,47 [s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc]; 1,46 (d, *J* = 7,15 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-Ala).

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 171,57 (CO<sub>Fn2</sub>); 171,43 (CO<sub>Ala</sub>); 169,92 (CO<sub>Fn1</sub>); 169,57 (CO<sub>Ac</sub>); 155,00 (CO<sub>Boc</sub>); 96,40 (C-6); 96,24 (C-1); 80,60 (C<sub>qBoc</sub>); 65,79 (C-8); 65,71 (C-9); 64,65 (C-3); 64,62 (C-4); 62,34 (C-7); 62,31 (C-10); 61,18 (C-2); 61,14 (C-5); 60,62 (C-α, Pro1); 60,44 (C-α, Pro2); 47,98 (CH<sub>2</sub>-δ, Pro1); 47,36 (CH<sub>2</sub>-δ, Pro2); 46,98 (CH<sub>Ala</sub>); 30,52 (CH<sub>2</sub>-β, Pro2); 29,60 (CH<sub>2</sub>-β, Pro1); 28,62 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc]; 25,26 (CH<sub>2</sub>-γ, Pro1); 24,77 (CH<sub>2</sub>-γ, Pro2); 23,33 (CH<sub>3</sub>-Ac); 18,07 (CH<sub>3</sub>-Ala).

ESI-MS: izračunato za C<sub>30</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Fe: 623,5; dobiveno [M]<sup>+</sup> na *m/z* 623,3.

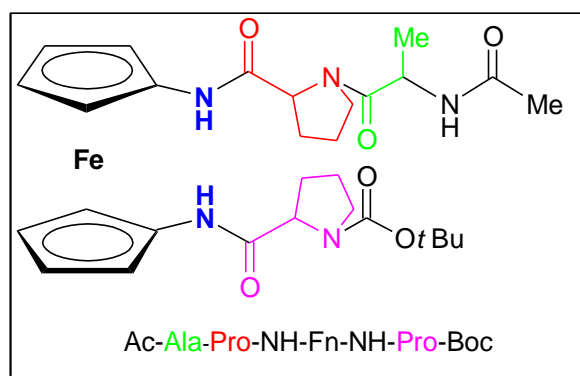
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. UVOD

U Teorijskom dijelu ovog Diplomskog rada napravljen je pregled konformacijskih svojstava ferocenskih biokonjugata **I**, **II** i **III** koji su pripremljeni kopulacijom ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline Fcd (**IV**) odnosno 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline Fca (**V**) s prirodnim aminokiselinama (Slika 11).

Budući da je ferocen idealan kalup za tvorbu vodikovih veza (udaljenost između dva ciklopentadienilna prstena iznosi 3,3 Å) [106], njegovo umetanje u peptidne lance omogućit će tvorbu različitih strukturnih elemenata (uzvojnice, plohe i okreti). Obrasci IHB na kojima se temelji tvorba sekundarnih strukturnih elemenata u peptidima **I**, **II** i **III** određeni su strukturom ferocenskog sintona (Fcd, Fca, Fcda) te strukturom i apsolutnom konfiguracijom prirodnih aminokiselina.

U nastavku istraživanja vezanih za pripremu peptida izvedenih iz Fcda koja su provedena u sklopu Disertacije [96], odlučili smo pripremiti i strukturno karakterizirati stereoizomerne više homologe peptida **IIIa** (tripeptidi **12-15**) (Slika 25).



Slika 25. Stereoizomerni ferocenski tripeptidi **IIIa**

Kako smo prethodno napomenuli, na tvorbu vodikovih veza osim same strukture ferocenskog sintona utječe i kiralnost uvedenih aminokiselina. Zato smo odlučili pripremiti ferocenske homo- i heterokiralne tripeptide **IIIa** uvođenjem D/L prolina i D/L alanina te utvrditi kako promjena kiralnosti aminokiselina utječe na tvorbu IHB. U nastavku ćemo opisati sintezu i konformacijsku analizu ferocenskih tripeptida **IIIa**:

- Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc (**12**), heterokiralan tripeptid
- Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (**13**), heterokiralan tripeptid
- Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc (**14**), heterokiralan tripeptid
- Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (**15**), homokiralan tripeptid

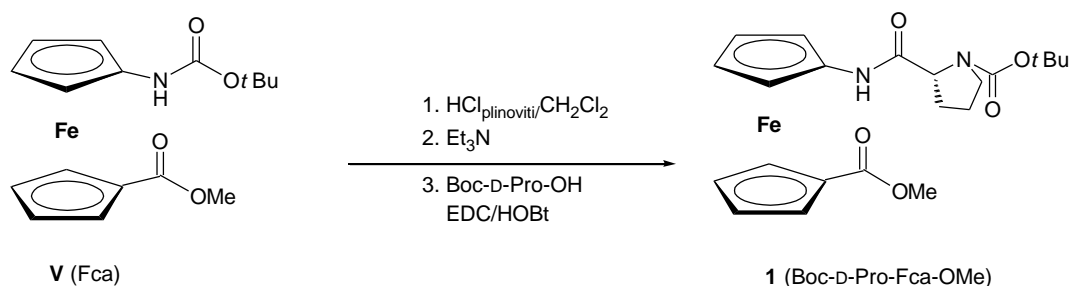
te njihovih prekursora:

- Boc-D-Pro-Fca-COOMe (**1**), dipeptid
- Boc-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe (**2**), heterokiralan tripeptid
- Boc-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe (**3**), homokiralan tripeptid
- Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe (**4**), heterokiralan tripeptid
- Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe (**5**), homokiralan tripeptid

## 4.2. SINTEZA I KONFORMACIJSKA ANALIZA PREKURSORA TRIPEPTIDA **IIIa**

### 4.2.1. Sinteza dipeptida Boc-D-Pro-Fca-OMe (**1**)

Priprava peptida **1** započinje 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-Pro-OH primjenom standardne HOBt/EDC metode pri čemu je dobiven peptid **1** (Shema 3) [107].



**Shema 3.** Priprava dipeptida **1** (predstavnik peptida **II**) iz Fca (**V**)

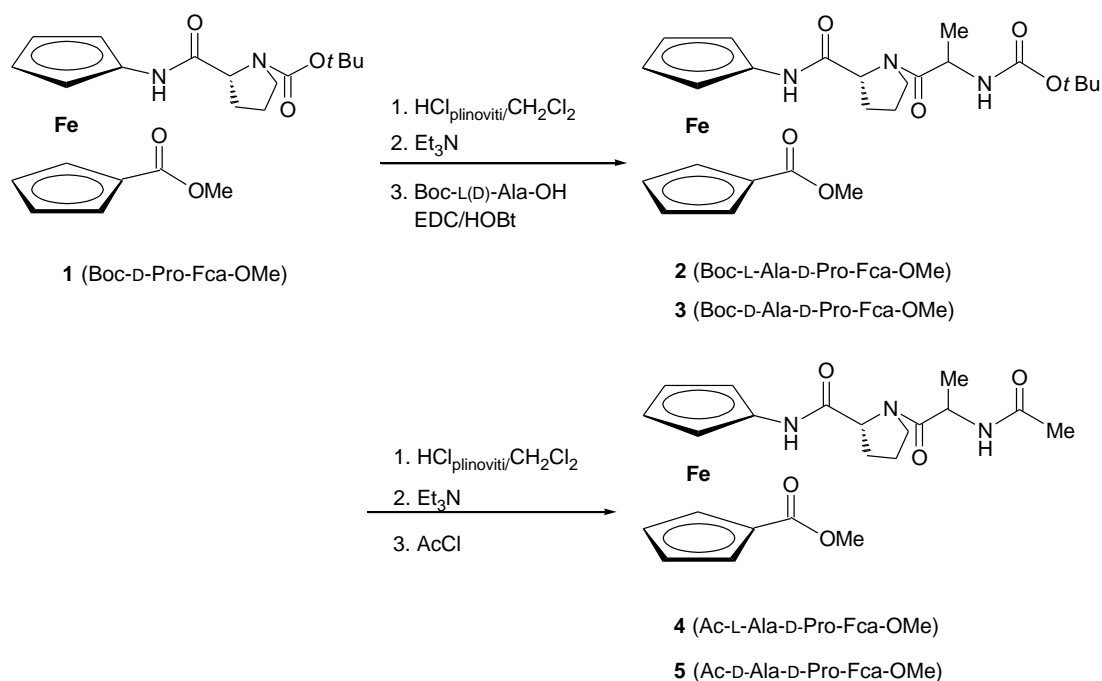
Mjerenjem <sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR-spektara prolinskog peptida **1** pri sobnoj temperaturi dobiveni su prošireni i srasli signali koje nije bilo moguće asignirati. Njegova je struktura stoga određena mjerenjem NMR-spektara pri 228 K pri čemu je uočen dupli set signala koji odgovara *cis*- i *trans*-izomerima.

$^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, COSY- i HMBC-spektroskopijom najprije smo asignirali prolinske *trans*- i *cis*- $\text{C}_\gamma$ -atome pri  $\delta = 24,37$  odn.  $23,43$  ppm. Pri tomu smo viši kemijski pomak pripisali *trans*-izomeru, a prema visinama signala odredili njihov omjer (*trans* : *cis* = 67 : 33). Razlika kemijskih pomaka  $\text{C}_\beta$ - ( $\delta = 26,87$  ppm) i  $\text{C}_\gamma$ - atoma ( $\delta = 24,37$  ppm) iznosi 2,5 ppm čime je dodatno potvrđena dominacija *trans*-izomera.

4.2.2. Sinteza i konformacijska analiza tripeptidâ Boc-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe (**2**), Boc-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe (**3**), Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe (**4**) i Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe (**5**)

#### 4.2.2.1. Sinteza tripeptidâ 2-5

Tripeptidi **2-5** pripremljeni su iz Boc-D-Pro-Fca-OMe (**1**) prema postupcima za deprotekciju i kopulaciju opisanih u prethodnom poglavlju. Deprotekcijom terminalnih amino-skupina Boc-dipeptida **1** djelovanjem plinovitog HCl uz naknadnu obradu dobivenih hidroklorida s  $\text{Et}_3\text{N}$  dobiveni su odgovarajući nestabilni amini koji su potom *in situ* kopulirani s prethodno aktiviranim Boc-zaštićenim aminokiselinama (L-Ala, D-Ala) u Boc-tripeptide **2** (89 %) i **3** (95 %). Njihovi su acetamidni analozi **4** (54 %) i **5** (61 %) pripremljeni djelovanjem AcCl na slobodne amine nastale nakon deprotekcije odgovarajućih Boc-tripeptida prethodno opisanim postupkom (Shema 4).



**Shema 4.** Priprava tripeptida **2-5** iz dipeptida **1**

Kopulacija L- odn. D-Ala s prolinskim *N*-terminusom dipeptida **1** očituje se u <sup>1</sup>H-NMR-spektrima konjugata **2** i **3** dubletima ( $\delta \sim 1,3$  ppm) i multipletima ( $\delta \sim 4,51$  ppm) njihovih metilnih, odn. metinskih protona, dok se alaninski signali u <sup>13</sup>C-NMR-spektrima javljaju pri  $\delta \sim 48$  ppm (CH<sub>Ala</sub>) te  $\delta \sim 18$  ppm (CH<sub>3Ala</sub>). Karbonilna skupina iz novonastale peptidne veze spojeva **2** i **3** registrirana je signalom pri  $\delta \sim 173$  ppm. Transformacija Boc-peptida **2** i **3** u Ac-analoge **4** i **5** očituje se gubitkom singleta *tert*-butilnih protona pri  $\delta \sim 1,5$  ppm te javljanjem singleta acetilnih protona pri  $\delta \sim 2$  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  $\delta \sim 155$  ppm odn.  $\delta \sim 28$  ppm te javljanjem novih signala pri  $\delta \sim 169$  ppm (CO<sub>Ac</sub>) i  $\delta \sim 23$  ppm (CH<sub>3Ac</sub>).

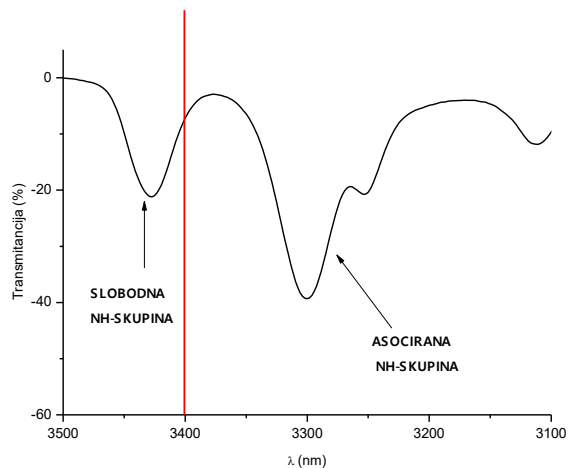
S obzirom da pripravljeni tripeptidi sadrže homo- (**3** i **5**) odn. heterokiralne (**2** i **4**) Ala-Pro sekvence s različitim terminalnim zaštitnim skupinama, u nastavku ovoga poglavlja opisat ćemo utjecaj kiralnosti i strukture zaštitnih skupina na njihova konformacijska svojstva.

#### 4.2.2.2. IR-spektroskopska analiza tripeptida 2-5

Kako je spomenuto u Teorijskom dijelu, IR-spektroskopija je metoda koja daje pouzdan uvid u konformacijski prostor peptida u otopini [108]. Istezne frekvencije NH-skupina u području nižem od 3400 cm<sup>-1</sup> ukazuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama, dok se



signali iznad  $3400\text{ cm}^{-1}$  pripisuju slobodnim NH-skupinama (Slika 26). Apсорpcijske vrpce karbonilnih esterskih skupina nađene ispod  $1730\text{ cm}^{-1}$  upućuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.



**Slika 26.** Prikaz područja istežnih frekvencija NH-skupina

Karakter vodikove veze (inter- ili intramolekulski) određuje se mjerenjem koncentracijski ovisnih IR-spektara. Postupnim razrjeđivanjem 50 mM otopine ispitivanog uzorka cijepaju se *intermolekulske vodikove veze* uslijed čega znatno opada intenzitet njihovih signala u području nižem od  $3400\text{ cm}^{-1}$ . Ako su u molekuli prisutne *intramolekulske vodikove veze* njihov intenzitet razrjeđivanjem slabi proporcionalno slabljenju signala slobodne NH-skupine.

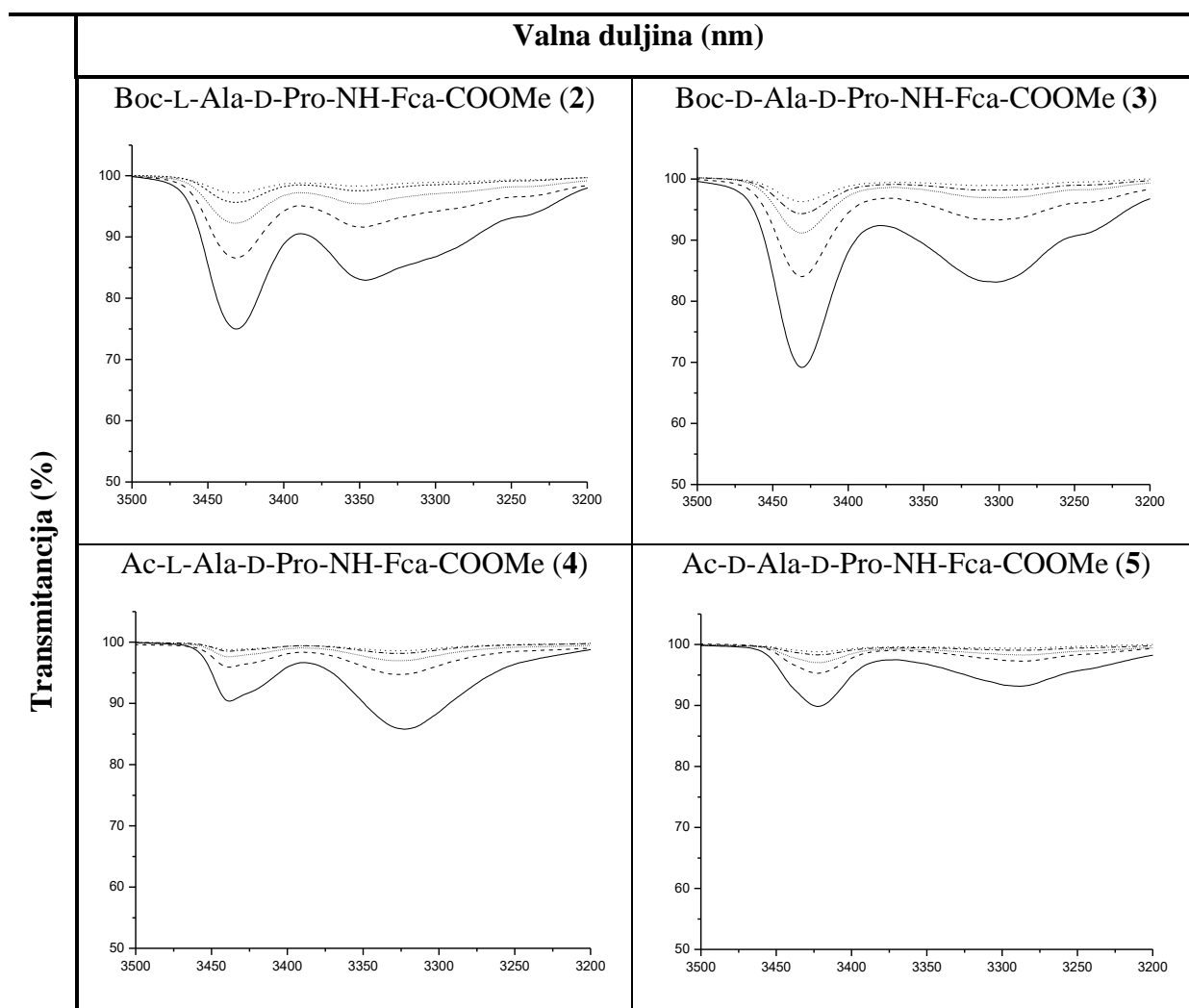
IR-spektri Boc- i Ac-zaštićenih tripeptida **2-5** u području N-H istežnih vibracija sadrže dvije vrpce različitih intenziteta koje se pripisuju slobodnim ( $> 3400\text{ cm}^{-1}$ ) odn. asociranim ( $< 3400\text{ cm}^{-1}$ ) NH-skupinama. Pri tomu u Boc-tripeptidima (**2** i **3**) te Ac-tripeptidu (**5**) prevladava signal slobodnih NH-skupina, dok kod Ac-heterokiralnog tripeptida (**4**) prevladava signal asociranih NH-skupina (Tablica 1).

Tablica 1. Istezne vibracije<sup>[a]</sup> NH- i CO-skupina tripeptidâ 2-5

Spoj	Formula	$\nu_{\text{NH}}$ (slob.)	$\nu_{\text{NH}}$ (asoc.)	$\nu_{\text{CO}}$ (ester)	$\nu_{\text{CO}}$ (amid I)	$\nu_{\text{CO}}$ (amid II)
2	Boc-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe	3432j	3345sr	1708	1659 1629	1561 1544 1499
3	Boc-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe	3431j	3303sr	1707	1657 1634	1555 1549 1498
4	Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe	3438sr	3322j	1707	1669 1659	1548 1510
5	Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe	3422j	3289sr	1708	1674 1638	1555 1539 1510

<sup>[a]</sup>IR-spektri snimljeni su u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,  $c = 5 \times 10^{-2}$  M.

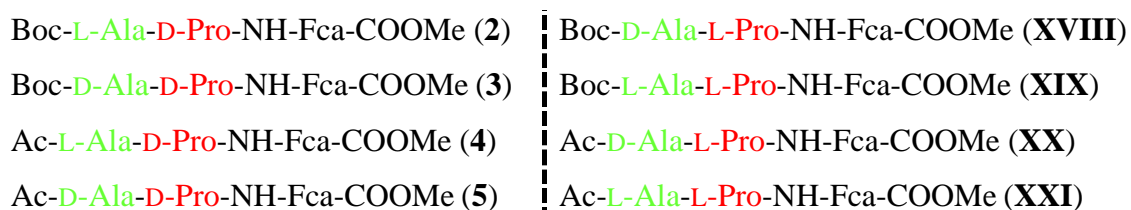
Da bi se utvrdio karakter apsorpcijskih vrpca  $< 3400 \text{ cm}^{-1}$  u IR-spektrima analiziranih biokonjugatâ 2-5, njihova asocijacija ispitana je postupnim razrjeđivanjem njihovih diklormetanskih otopina u koncentracijskom rasponu od  $5 \times 10^{-2}$  M do  $3 \times 10^{-3}$  M. Kako se može vidjeti iz Slike 27, smanjenjem koncentracije dolazi do proporcionalnog slabljenja vrpca asociраних и слободних NH-skupina u svim otopinama tripeptida. Zbog toga je predložena stabilizacija ispitivanih tripeptida *intramolekulskim vodikovim vezama* (IHB).



**Slika 27.** Koncentracijski-ovisni IR-spektri<sup>[a]</sup> biokonjugata **2-5**

<sup>[a]</sup>IR-spektri snimljeni su u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, [(—)  $c = 5 \times 10^{-2}$  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].

U sklopu Disertacije [96] pripremljeni su enantiomeri naših tripeptida prikazani na Slici 28.



**Slika 28.** Stereoizomerni odnosi pripremljenih tripeptida

Usporedbom IR-spektara stereoizomera te enantiomera može se zaključiti da kod prethodno pripremljenih heterokiralnih tripeptida **16** i **18** prevladava signal asociranih NH-skupina. Takav obrazac u ovom radu prati samo heterokiralni tripeptid **4**. Bitno je spomenuti da su tripeptidi **4** i **18** u enantiomernom odnosu, stoga su se takve asocijacije i očekivale.

#### 4.2.2.3. NMR-spektroskopska analiza tripeptida 2-5

NMR-spektroskopska analiza omogućava jasniji uvid u obrasce vodikovih veza koje se prethodno predlažu IR-spektroskopijom. Tom je tehnikom moguće razlikovati pojedine NH-skupine u molekuli te na temelju njihovih kemijskih pomaka zaključiti sudjeluju li u vodikovim vezama. Ako NH-skupina ima kemijski pomak iznad 7 ppm, takva će se skupina proglasiti asociranom.

U većini predstavnika ranije opisanih ferocenskih peptida **I** i **II** pokazalo se da NH-skupine koje sudjeluju u vodikovim vezama rezoniraju pri  $\delta > 7$  ppm, dok su slobodne NH-skupine registrirane pri višem polju ( $\delta < 7$  ppm). Moguća su i odstupanja od ovog pravila ovisno o kemijskoj okolini donorske NH-grupe.

Primjenom 2D NMR-spektroskopije (COSY, HMBC) provedena je asignacija  $^1\text{H}$ - i  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektara pripremljenih konjugata.

Karakteristika svih peptida **2-5** jest visok kemijski pomak NH-skupina iz Fca ( $\delta > 8$  ppm) što upućuje na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama. Kemijski pomaci alaninskih amidnih protona ( $\delta < 7$  ppm) sugeriraju da NH-skupine udaljene od ferocenske jezgre (**2-5**) nisu donori vodikove veze. Na temelju kemijskih pomaka prolinskih metilenskih skupina [ $\delta(\text{C}_\alpha/\text{C}_\beta) < \delta(\text{C}_\gamma/\text{C}_\delta)$ ] te razlike u kemijskim pomacima  $\text{C}_\beta$ - i  $\text{C}_\gamma$ -atoma ( $\Delta\delta < 6$  ppm), zaključili smo da svi ispitivani biokonjugati zauzimaju *trans*-položaj oko imidne veze (Tablica 2).

U NMR spektrima Boc- i Ac-tripeptida (**2** i **4**) s konstituirajućim heterokiralnim Ala-Pro sekvencama pojavljuju se i signali *cis*-izomera. Integriranjem površina amidnih protona u  $^1\text{H}$ -NMR-spektrima te određivanjem omjera visine signala prolinskih ugljikovih atoma u  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrima određen je omjer *trans*- i *cis*-izomera koji pri 298 K u peptidima **2** i **4** iznose 86:14.

Tablica 2. Kemijski pomaci ( $\delta$ )<sup>[a]</sup> amidnih protona u tripeptidima **2-5**

Spoj	Formula	(NH <sub>Fca</sub> ) <sub>trans</sub> $\delta$ (ppm)	(NH <sub>Fca</sub> ) <sub>cis</sub> $\delta$ (ppm)	(NH <sub>Ala</sub> ) <sub>trans</sub> $\delta$ (ppm)	(NH <sub>Ala</sub> ) <sub>cis</sub> $\delta$ (ppm)
<b>2</b>	Boc-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOME	8,47 (0,86 H)	8,83 (0,14 H)	5,35 (0,86 H)	5,11 (0,14 H)
<b>3</b>	Boc-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOME	8,40	/	5,50	/
<b>4</b>	Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOME	8,43 (0,86 H)	9,11 (0,14 H)	6,51 (0,86 H)	6,27 (0,14 H)
<b>5</b>	Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOME	8,33	/	6,80	/

<sup>[a]</sup>NMR-spektri snimljeni su u CDCl<sub>3</sub> pri  $c = 5 \times 10^{-2}$  M i 298 K.

Dodatni uvid u obrasce i karakter vodikovih veza daju koncentracijski i temperaturno ovisni spektri te titracija 50 mM otopine konjugata s kompeticijskim otapalom DMSO. Iako je kao dio ovog Diplomskog rada bilo predviđeno i provođenje spomenutih spektroskopskih mjerenja, zbog situacije s pandemijom COVID-19 te posljedične nedostupnosti instrumenta za analizu mjerenja se nisu provela.

Potencijalnu ulogu prolina kao začetnika  $\beta$ -okretâ u svim ispitivanim homokiralnim i heterokiralnim tripeptidima **2-5** ispitali smo NOESY NMR-spektroskopskom analizom.

**Određivanje peptidnih sekundarnih strukturnih elemenata** temelji se na analizi <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H NOE kontakata u njihovim NOESY-NMR-spektrima [104, 109, 110].

NOESY-NMR-spektroskopske analize tripeptida **2** sugeriraju njegovu stabilizaciju intramolekulskom vodikovom vezom u kojoj sudjeluju NH-skupina vezana na ferocen te karbonilna karbamatna skupina. Prema strukturi tripeptida **2**, takva bi se IHB mogla realizirati unutar peptidnog lanca vezanog na gornji ferocenski prsten koja rezultira 10-članim IHB prstenom (NH<sub>Fca</sub>···OC<sub>Boc</sub>) (Prilog 1).

Slično, u homokiralnom analogu **3** NH-skupina vezana na ferocen prema prethodno opisanim analizama tvori intralančanu vodikovu vezu s karbamatnom skupinom (NH<sub>Fca</sub>···OC<sub>Boc</sub>) inducirajući  $\beta$ -okret (Prilog 1).

Zamjenom terminalne zaštitne skupine mijenja se obrazac vodikovih veza u NOESY spektrima Ac-analogâ **4** i **5** pa na temelju kontakata možemo pretpostaviti da se u ovim peptidima uspostavljaju NH<sub>Fca</sub>···NH<sub>Ala</sub> vodikove veze koje tvore 8-člani IHB prsten (Prilog 2).

#### 4.2.2.4. CD-spektroskopska analiza tripeptidâ 2-5

Cirkularni dikroizam (CD) je spektroskopska metoda koja se koristi za određivanje *sekundarnih strukturnih elemenata u kiralnim peptidima* [11, 104]. Pokazalo se da uvođenjem ferocenskog kromofora ( $\lambda \sim 480$  nm) u kiralno peptidno okruženje **I** i **II** dolazi do pojave Cottonovog efekta koji je posljedica helične kiralnosti uzrokovane interlančanim IHB [67, 75-77, 79-91, 111-117]. Na predznak Cottonovog efekta utječu otapalo, zaštitne skupine te vrsta i slijed vezanih prirodnih aminokiselina.

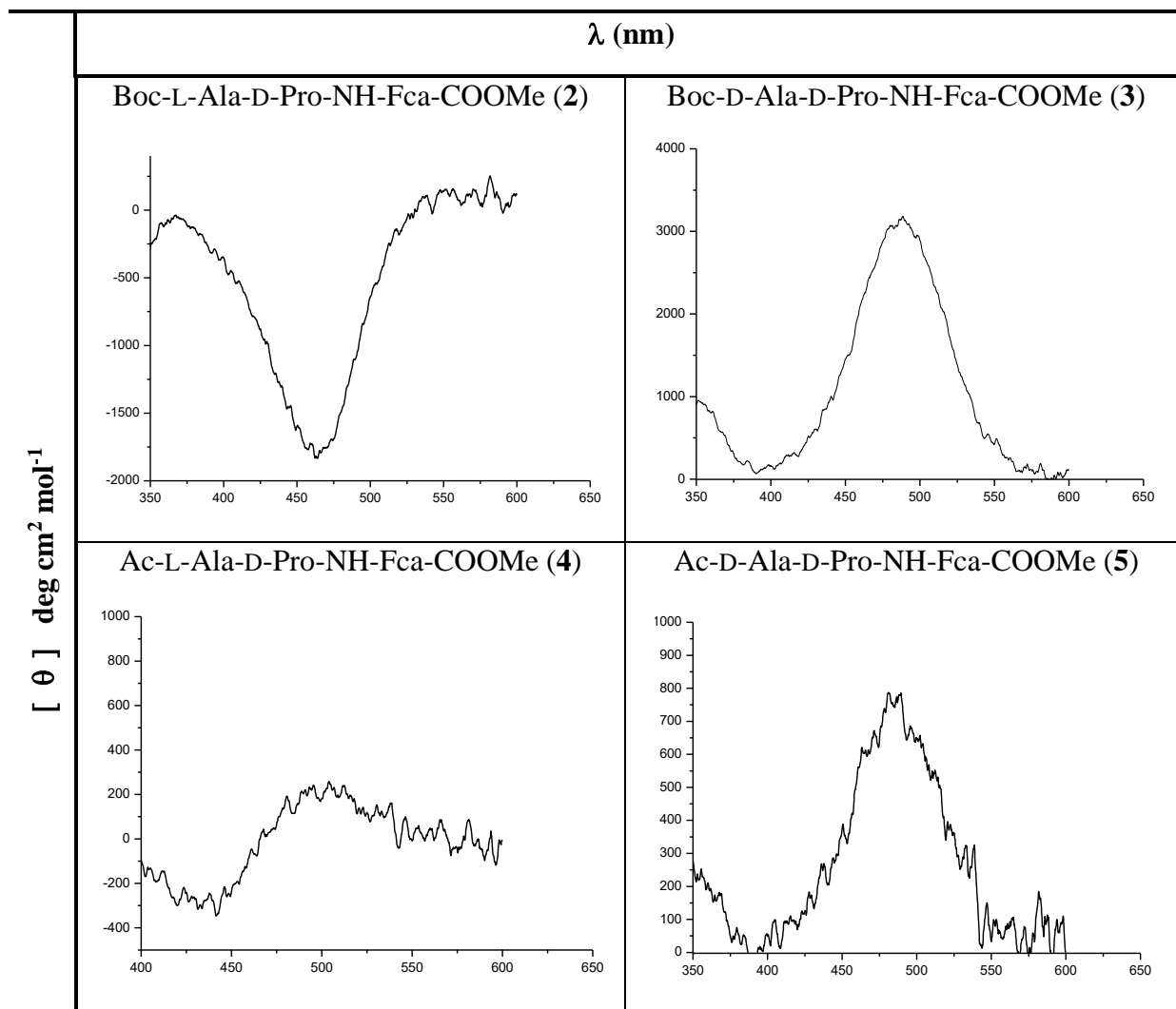
Kako smo na temelju IR- i NMR-spektroskopskih mjerenja pretpostavili tvorbu intralančanih vodikovih veza  $\text{NH}_{\text{Fca}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc/Ac}}$  koje dovode do tvorbe  $\beta$ -okretâ u peptidima **2** i **3** te  $\text{NH}_{\text{Fca}} \cdots \text{N}_{\text{Ala}}$  8-članim prstenovima u peptidima **4** i **5**, odlučili smo provesti CD-spektroskopsku analizu. Kako vodikove veze induciraju kiralno uređenje oko ferocenskog kromofora ( $\lambda \sim 480$  nm) očekuje se CD-aktivnost ispitanih peptida.

Položaj apsorpcijskih vrpci karakterističnih za ferocenski kromofor (464 – 496 nm) ukazuje na kiralno uređenje ispitanih peptida. Širok raspon apsolutnih vrijednosti Cottonovih efekata (242 do 3073  $\text{deg cm}^2 \text{mol}^{-1}$ ) upućuje na različite stupnjeve kiralnog uređenja (Tablica 3). Niže vrijednosti Cottonovih efekata ( $M_\theta < 1000 \text{ deg cm}^2 \text{mol}^{-1}$ ) u peptidima **4** i **5** mogu se objasniti prisutnošću malog suviška uređenih konformera u njihovim otopinama. Jači CD-signal peptida **2** i **3** upućuju na prisutnost visokouređenih kiralnih struktura, što potkrepljuje nalaze IR- i NMR-spektroskopije (Slika 29).

Tablica 3. UV/Vis-signal i Cottonovi efekti u tripeptidima 2-5<sup>[a]</sup>

Spoj	Formula	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$		$[\theta] / \text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$	
		$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	$\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{DMSO}$	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	$\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{DMSO}$
<b>2</b>	Boc-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe	464	454	1832	388
<b>3</b>	Boc-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe	481	482	3073	3606
<b>4</b>	Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe	496	486	242	876
<b>5</b>	Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe	490	485	786	919

<sup>[a]</sup>CD-spektri mjereni su u  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $c = 5 \times 10^{-3} \text{M}$ ) i uz dodatak 20 % DMSO.



**Slika 29.** Cottonovi efekti u CD-spektrima peptida 2-5<sup>[a]</sup>

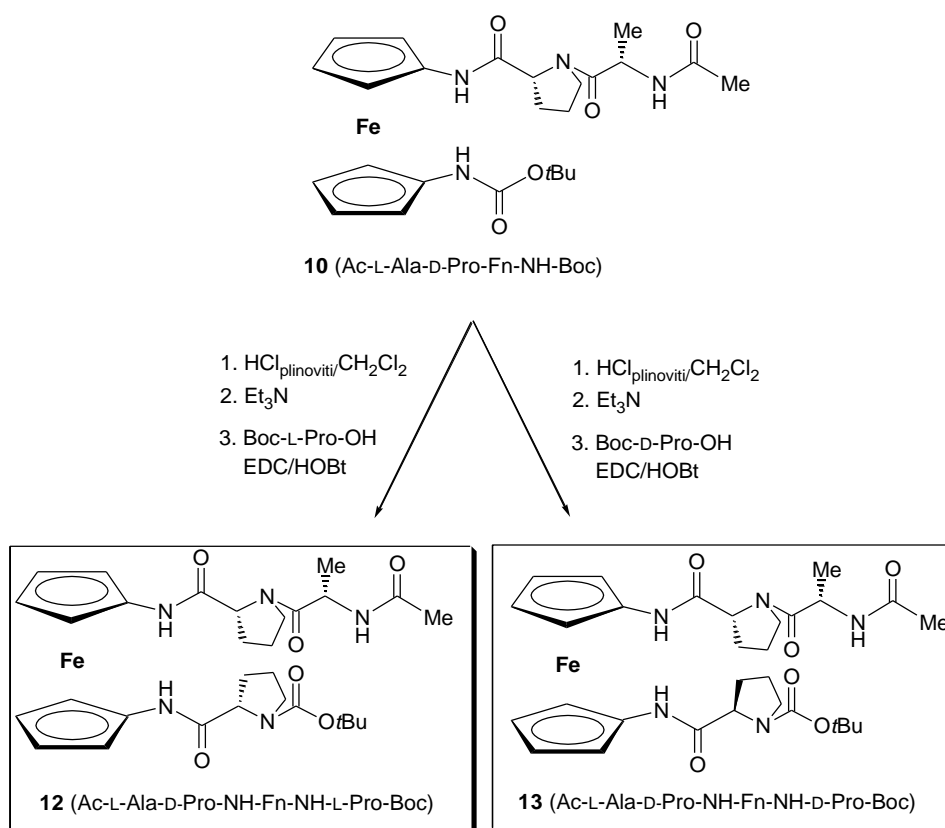
<sup>[a]</sup>CD-spektri mjereni su u diklormetanu ( $c = 5 \times 10^{-3} \text{M}$ ).

### 4.3. SINTEZA I KONFORMACIJSKA ANALIZA TRIPEPTIDA **IIIa**

4.3.1. Sinteza i konformacijska analiza tripeptidâ Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc (**12**), Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (**13**), Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc (**14**) i Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (**15**)

#### 4.3.1.1. Sinteza tripeptidâ **12-15**

Peptidi **12-15** pripravljeni su iz peptida **10** i **11** deprotekcijom Boc-zaštićenih amino-skupina djelovanjem plinovitog HCl te su odgovarajući hidrokloridi obrađeni s Et<sub>3</sub>N. Uobičajenim HOBt/EDC postupkom dobiveni slobodni amini kopulirani su s Boc-D/L-Pro-OH u 72 % i 74 % tripeptida **12** i **13**, odn. 84 % i 80 % tripeptida **14** i **15** (Shema 5).





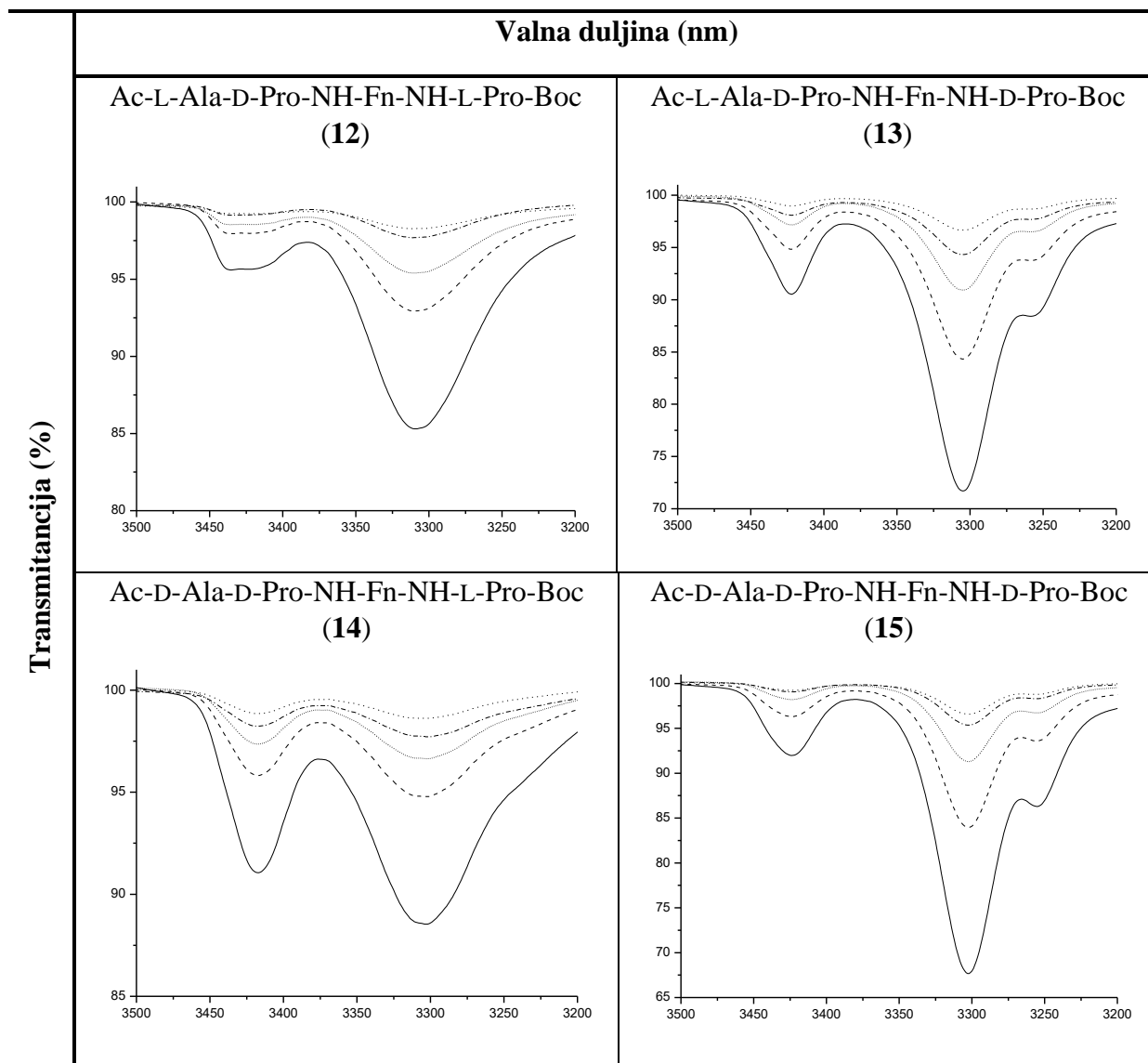


Tablica 4. Istezne vibracije<sup>[a]</sup> NH- i CO-skupina tripeptida **12-15**

Spoj	Formula	$\nu_{\text{NH}}$ (slob.) <sup>[b]</sup>	$\nu_{\text{NH}}$ (asoc.) <sup>[c]</sup>	$\nu_{\text{CO}}$ (amid I)	$\nu_{\text{CO}}$ (amid II)
<b>12</b>	Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc	3434sl	3308j	1691	1549
				1674	1533
				1648	1478
<b>13</b>	Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc	3424sl	3305j 3255j	1686	1570
				1665	1508
				1629	1481
<b>14</b>	Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc	3417sl	3302j	1689	1564
				1675	1545
				1647	1534
					1513
<b>15</b>	Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc	3424sl	3302j 3254j	1690	1571
				1667	1511
				1629	1481

<sup>[a]</sup>IR-spektri snimljeni su u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,  $c = 5 \times 10^{-2}$  M.

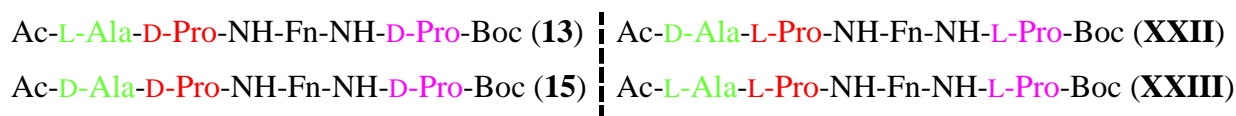
Na Slici 30 vidljivo je da tripeptidi **13** i **15** imaju izražajnije signale asociranih NH-skupina. Mjerenjem IR-spektara postupnim razrjeđivanjem diklormetanskih otopina ispitivanih uzoraka tripeptida **12-15** dolazi do proporcionalnog slabljenja signala i slobodne i asocirane NH-skupine, što sugerira sudjelovanje asociranih NH-skupina u *intramolekulskim vodikovim vezama* (IHB) u tripeptidima **12-15**.



**Slika 30.** Koncentracijski-ovisni IR-spektri<sup>[a]</sup> biokonjugata **12-15**

<sup>[a]</sup>IR-spektri snimljeni su u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, [(—)  $c = 5 \times 10^{-2}$  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].

U sklopu Disertacije [96] pripremljeni su enantiomeri naših tripeptida prikazani na Slici 31.



**Slika 31.** Enantiomerni odnosi pripremljenih tripeptida

Sva 4 enantiomera pokazuju dominaciju signala asociраних NH-skupina.

### 4.3.1.3. NMR-spektroskopska analiza tripeptidâ 12-15

Karakteristika svih tripeptida jest visok kemijski pomak amidnih protona ( $\text{NH}^1_{\text{Fn}}$  i  $\text{NH}^2_{\text{Fn}}$ ) vezanih za ferocensku jezgru ( $\delta > 8$  ppm) što ukazuje na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama. Budući da se alaninske NH-skupine tripeptida **13**, **14** i **15** registriraju pri višem polju ( $\delta < 7$  ppm), upitna je njihova donorska uloga u HB (Tablica 5). Zamjetan je pomak alaninske NH-skupine tripeptida **12** u niže polje (8,01 ppm) što govori o sudjelovanju tog protona u vodikovoj vezi. Razlika u kemijskim pomacima prolinskih metilenskih skupina [ $\delta (\text{C}_\alpha/\text{C}_\beta) < \delta (\text{C}_\gamma/\text{C}_\delta)$ ] te razlika u kemijskim pomacima  $\text{C}_\beta$ - i  $\text{C}_\gamma$ - atoma ( $\delta < 6$  ppm) indiciraju da tripeptidi **12-15** zauzimaju *trans*-položaj oko imidne veze. U NMR spektrima heterokiralnog tripeptida **13** javljaju se i signali *cis*-izomera čiji je udio (10%) određen integriranjem površina amidnih protona u  $^1\text{H}$ -NMR-spektrima i određivanjem omjera visine signala prolinskih ugljikovih atoma u  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektrima.

Tablica 5. Kemijski pomaci ( $\delta$ )<sup>[a]</sup> amidnih protona u tripeptidima **12-15**

Spoj	Formula	( $\text{NH}^1_{\text{Fn}}$ ) <i>trans</i> $\delta$ (ppm)	( $\text{NH}^1_{\text{Fn}}$ ) <i>cis</i> $\delta$ (ppm)	( $\text{NH}^2_{\text{Fn}}$ ) <i>trans</i> $\delta$ (ppm)	( $\text{NH}^2_{\text{Fn}}$ ) <i>cis</i> $\delta$ (ppm)	( $\text{NH}_{\text{Ala}}$ ) <i>trans</i> $\delta$ (ppm)	( $\text{NH}_{\text{Ala}}$ ) <i>cis</i> $\delta$ (ppm)
<b>12</b>	Ac-L-Ala-D-Pro <sup>1</sup> -NH <sup>1</sup> - Fn-NH <sup>2</sup> -L-Pro <sup>2</sup> -NBoc	8,48	/	8,33	/	8,01	/
<b>13</b>	Ac-L-Ala-D-Pro <sup>1</sup> -NH <sup>1</sup> - Fn-NH <sup>2</sup> -D-Pro <sup>2</sup> -NBoc	9,44 (0,90 H)	9,22 (0,10 H)	9,16 (0,90 H)	9,10 (0,10 H)	6,54 (0,90 H)	6,65 (0,10 H)
<b>14</b>	Ac-D-Ala-D-Pro <sup>1</sup> -NH <sup>1</sup> - Fn-NH <sup>2</sup> -L-Pro <sup>2</sup> -NBoc	8,56	/	8,27	/	6,92	/
<b>15</b>	Ac-D-Ala-D-Pro <sup>1</sup> -NH <sup>1</sup> - Fn-NH <sup>2</sup> -D-Pro <sup>2</sup> -NBoc	9,38	/	9,23	/	6,23	/

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

NOE-kontakti u spektrima peptida **12-15** dani su u Prilozima 3-6 te upućuju na tvorbu vodikovih veza koje su uspostavljene putem različitih IHB-prstenova. Tripeptidi **13** i **15** tvore 10- ( $\text{NH}^1_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$ ) i 13-člane ( $\text{NH}^2_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Ac}}$ ) IHB-prstenove. Tripeptid **12** ostvaruje vodikove

veze  $\text{NH}^2_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Ala}}$  i  $\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$  putem. Prema NOESY spektrima tripeptid **14** tvori vodikove veze sudjelovanjem samo amidnog  $\text{NH}^2_{\text{Fn}}$  protona u vodikovoj vezi s  $\text{OC}_{\text{Ac}}$  i  $\text{OC}_{\text{Ala}}$ . Očito je da D-Pro koji je vezan na obje ciklopentadienilne jedinice pogoduje tvorbi 10- ( $\text{NH}^1_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$ ) i 13-članih ( $\text{NH}^2_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Ac}}$ ) IHB-prstenova. Promjenom kiralnosti prolina na donjem prstenu dolazi do onemogućavanja sudjelovanja  $\text{NH}^1_{\text{Fn}}$  protona u tvorbi vodikovih veza. Može se zaključiti da promjenom kiralnosti peptidne sekvence dolazi do promjene obrasca vodikovih veza.

#### 4.3.1.4. CD-spektroskopska analiza tripeptida **12-15**

Kako prethodne analize tripeptida **12-15** ukazuju na prisutnost IHB, očekuje se i visok stupanj kiralnog uređenja u otopini što se očituje izrazitom CD-aktivnošću. Višestruko povećane vrijednosti Cottonovih efekata heterokiralnog peptida **13** ( $24093 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ ) i homokiralnog peptida **15** ( $31472 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ ) u odnosu na analoge **12** i **14** upućuju na postignuti viši stupanj kiralnog uređenja zbog jakih vodikovih veza (Tablica 6).

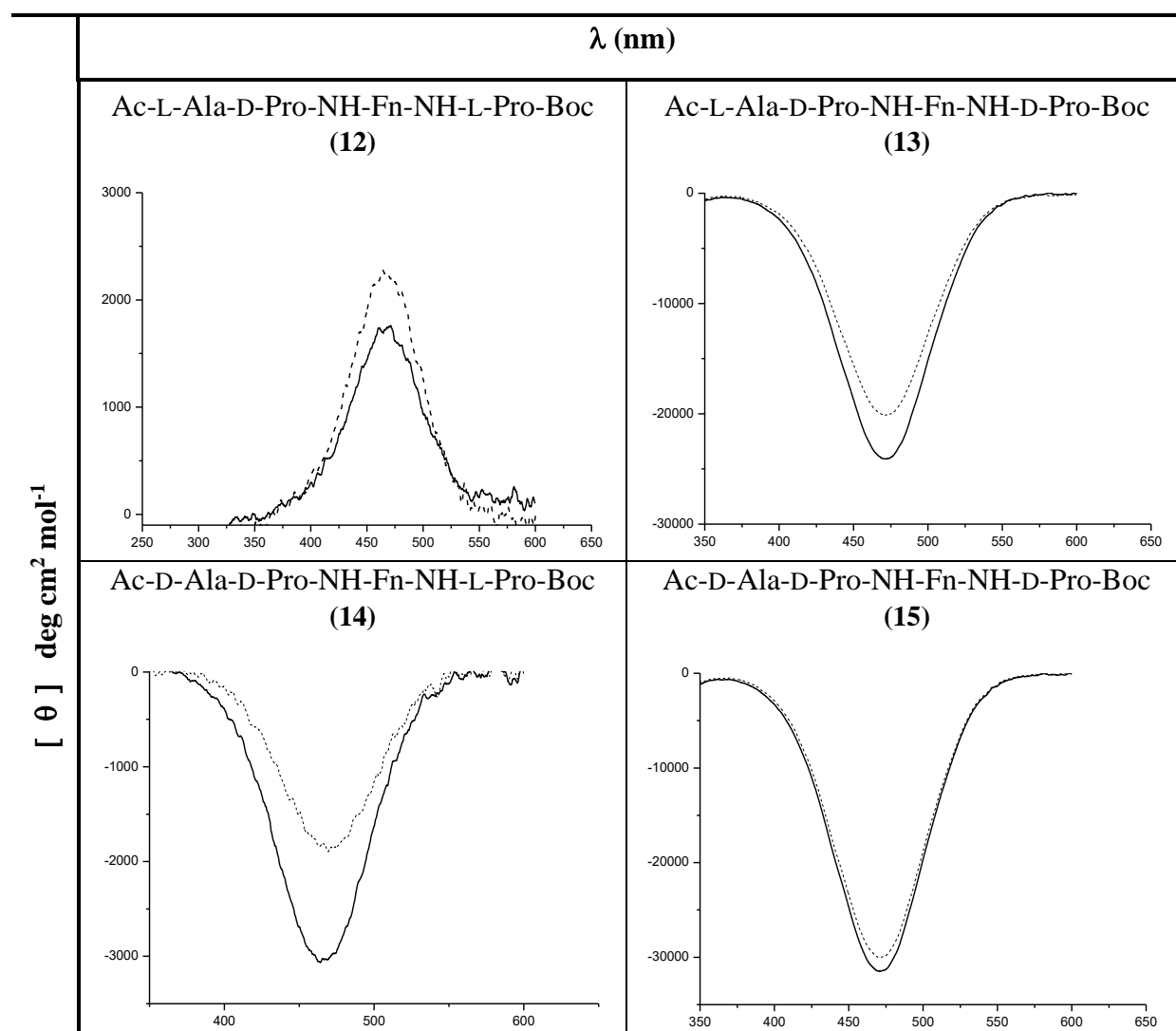
Tablica 6. UV/Vis-signal i Cottonovi efekti u tripeptidima **12-15**<sup>[a]</sup>

Spoj	Formula	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$		$[\theta] / \text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$	
		$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	$\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{DMSO}$	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	$\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{DMSO}$
<b>12</b>	Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc	477	464	1603	2279
<b>13</b>	Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc	472	472	24093	20124
<b>14</b>	Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc	464	469	3066	1897
<b>15</b>	Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc	471	471	31472	30013

<sup>[a]</sup>CD-spektri mjereni su u  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $c = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) i uz dodatak 20 % DMSO.

Pretpostavku o jakim IHB moguće je dodatno ispitati titracijom 5 mM otopine peptida s kompeticijskim otapalom (DMSO). Ukoliko u otopini postoje visokouređene strukture, dodatak DMSO-a neće zamjetno utjecati na intenzitet Cottonovog efekta. Iz Tablice 9 vidljivo je da dodatak DMSO-a kod heterokiralnog peptida **13** uzrokuje nešto zamjetnije slabljenje Cottonova efekta (16 %), dok njegov dodatak gotovo ne utječe na jakost CD-signal (5 %) homokiralnog peptida **15** što ukazuje na njegovu stabilizaciju jačim IHB (Tablica 6, Slika 32).

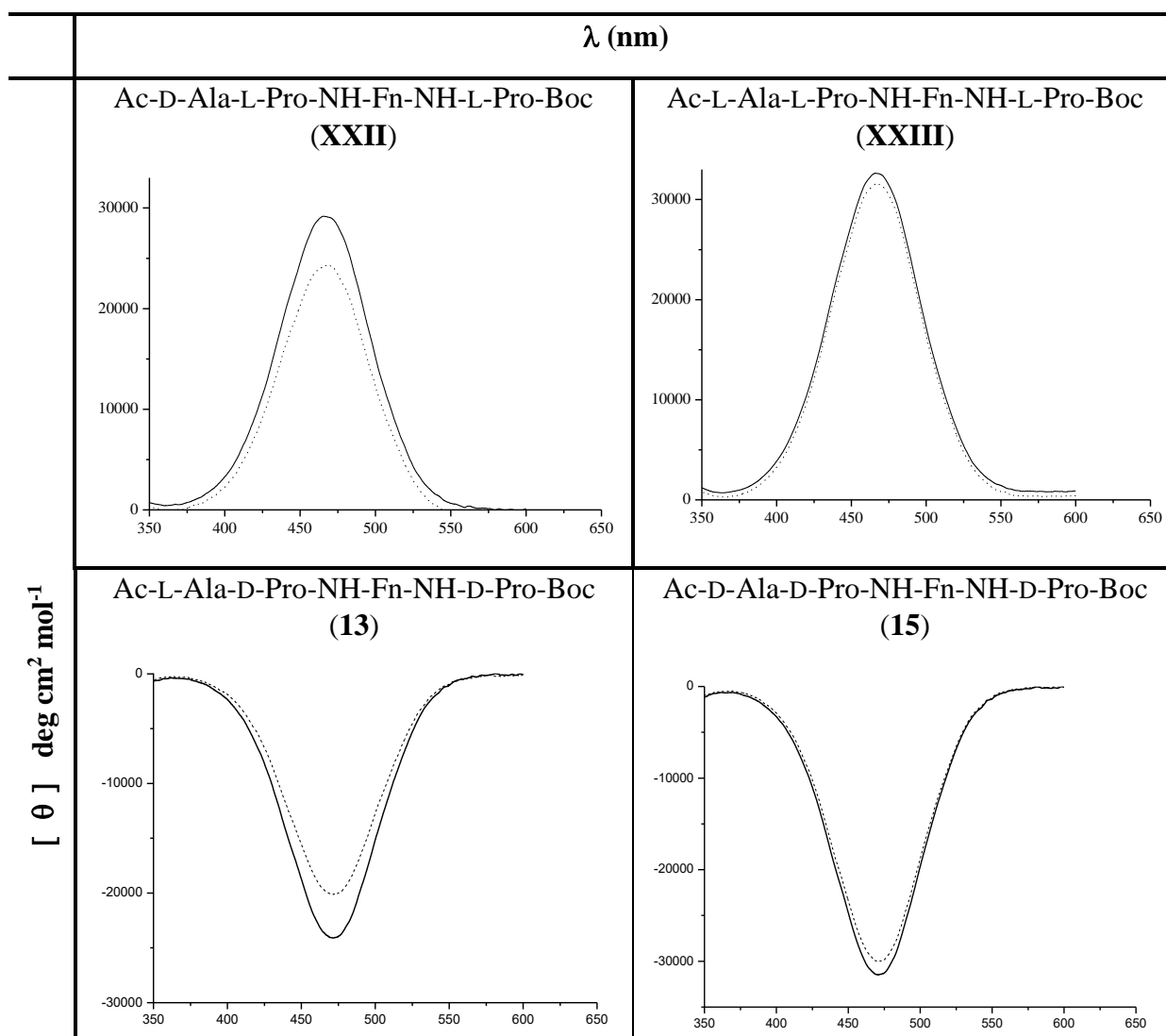
Zamjetniji pad jakosti CD-signalu od 38 % vidljiv je kod tripeptida **14**, dok kod tripeptida **12** dolazi do povećanja intenziteta u signalu nakon dodatka DMSO (42 %).



**Slika 32.** Cottonovi efekti u CD-spektrima peptida **12-15**

<sup>[a]</sup>CD-spektri mjereni su u diklormetanu [ $c = 5 \times 10^{-3} \text{M}$  (puna crta)] i uz dodatak 20 % DMSO (isprekidana crta).

Na Slici 31 prikazani su enantiomeri (**XXII** i **XXII**) tripeptida **13** i **15** koji su prethodno pripremljeni u sklopu Disertacije [96]. Enantiomeri pokazuju suprotan predznak CD-aktivnosti, dok je iznos Cottonovog efekta u potpunosti jednak, kao i redukcija signala nakon dodatka DMSO (Slika 33).



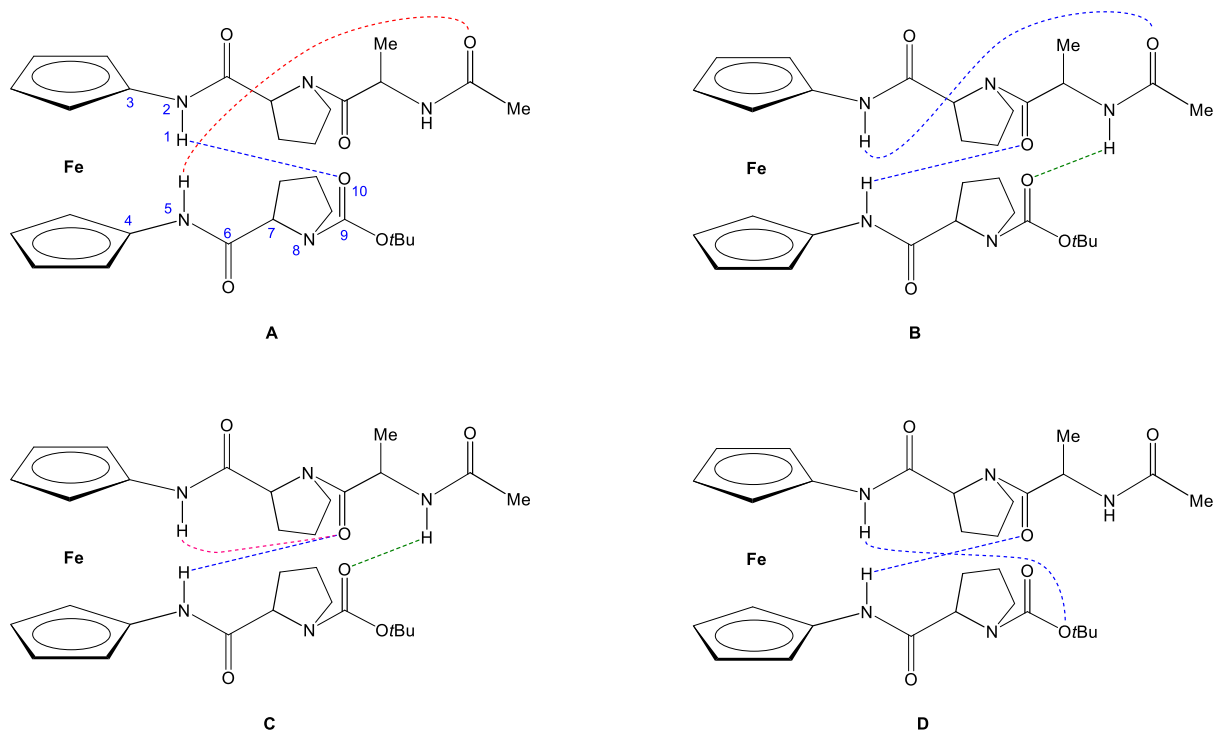
**Slika 33.** Cottonovi efekti u CD-spektrima peptida **13** i **15** te njihovih enantiomera **XXII** i **XXIII**

<sup>[a]</sup>CD-spektri mjereni su u diklormetanu [ $c = 5 \times 10^{-3}$  M (puna crta)] i uz dodatak 20 % DMSO (isprekidana crta)

#### 4.3.1.5. DFT-modeliranje tripeptida 12-15

DFT (teorija funkcionala gustoće, engl. *Density Functional Theory*) je računalna metoda koja može poslužiti za proučavanje konformacijskog prostora koje zauzimaju ferocenski konjugati [118].

Matematičkim modeliranjem tripeptida **12-15** moguće je dobiti jednu od prikazane 4 konformacije **A**, **B**, **C** i **D** (Slika 34).



**Slika 34.** Hipotetske konformacije tripeptida **12-15**

U Tablici 7 prikazane su konformacije kojeg svaki tripeptida može zauzeti, pri čemu je najstabilnija ona koja ima  $0 \text{ kJ mol}^{-1}$  energije.

Tablica 7. Relativna energija (u  $\text{kJ mol}^{-1}$ ) najstabilnijih konformera u kloroformu pri  $298 \text{ K}^*$

KONFORMER	$E_{\text{rel}}$	IHB OBRAZAC	$\text{NH}_{\text{Fc}(\text{Ac})} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$ 10-člani	$\text{NH}_{\text{Fc}(\text{Ac})} \cdots \text{OC}_{\text{Ac}}$ 10-člani	$\text{NH}_{\text{Fc}(\text{Ac})} \cdots \text{OC}_{\text{Ala}}$ 7-člani	$\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$ 16-člani	$\text{NH}_{\text{Fc}(\text{Boc})} \cdots \text{OC}_{\text{Ac}}$ 13-člani	$\text{NH}_{\text{Fc}(\text{Boc})} \cdots \text{OC}_{\text{Ala}}$ 10-člani
<b>15-1</b>	0.00	<b>A</b>	2.85	-	-	-	2.83	-
<b>15-2</b>	2.02	<b>A</b>	2.87	-	-	-	2.84	-
<b>15-3</b>	4.32	<b>A</b>	2.86	-	-	-	2.82	-
<b>13-1</b>	0.00	<b>A</b>	2.87	-	-	-	2.86	-
<b>13-2</b>	0.12	<b>A</b>	2.86	-	-	-	2.86	-
<b>13-3</b>	0.71	<b>A</b>	2.85	-	-	-	2.86	-
<b>13-4</b>	0.88	<b>A</b>	2.85	-	-	-	2.87	-
<b>12-1</b>	0.00	<b>B</b>	-	2.95	-	2.83	-	2.96
<b>12-2</b>	0.70	<b>B</b>	-	2.94	-	2.83	-	2.93
<b>12-3</b>	2.09	<b>C</b>	-	-	2.85	2.86	-	2.93
<b>12-4</b>	3.74	<b>C</b>	-	-	2.85	2.86	-	2.95
<b>14-1</b>	0.00	<b>D</b>	3.17	-	-	-	-	2.88
<b>14-2</b>	4.11	<b>C</b>	-	-	2.92	2.89	-	2.87

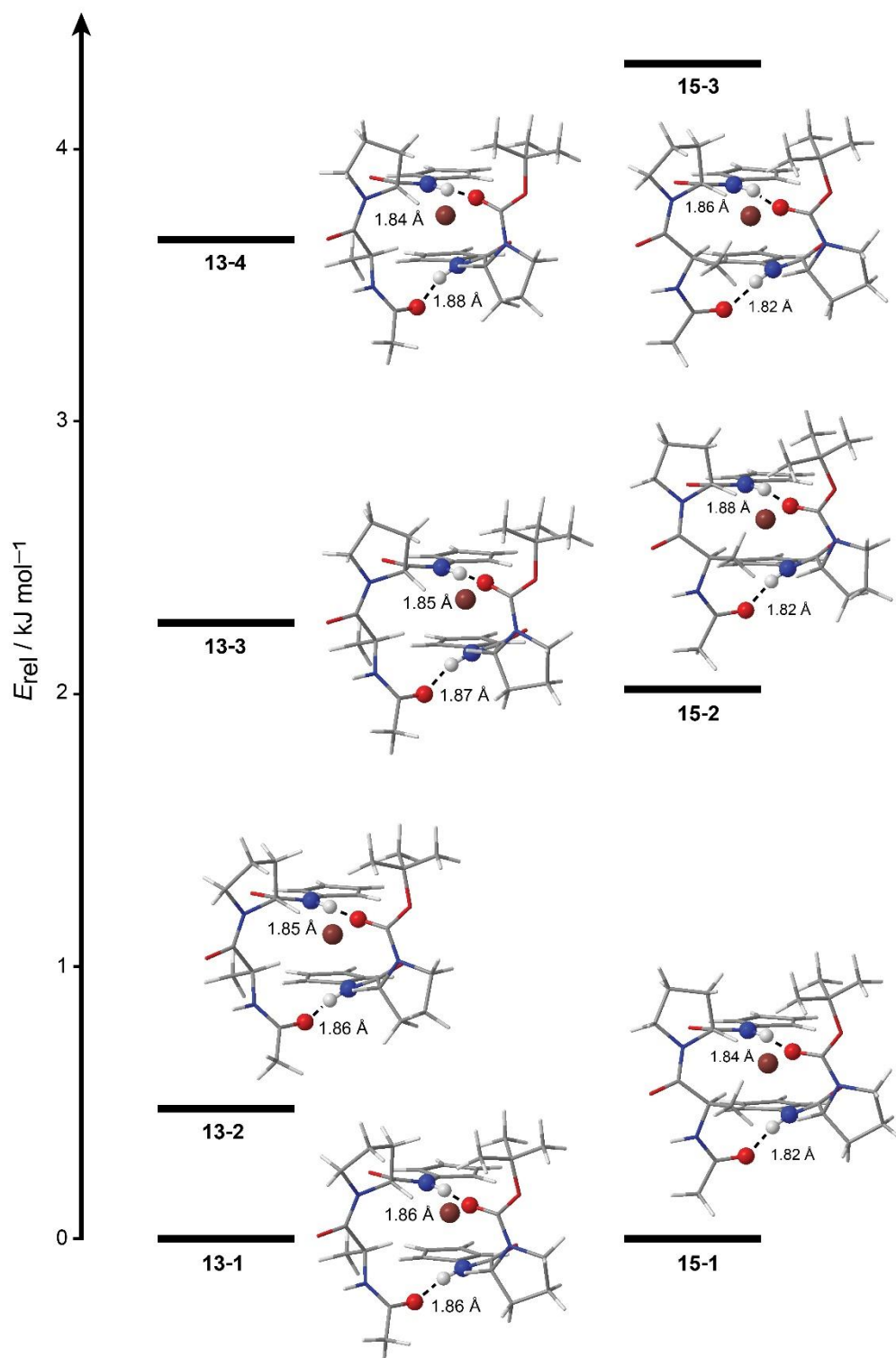
\*Obrazac IHB veza prikazan je na Slici 34.



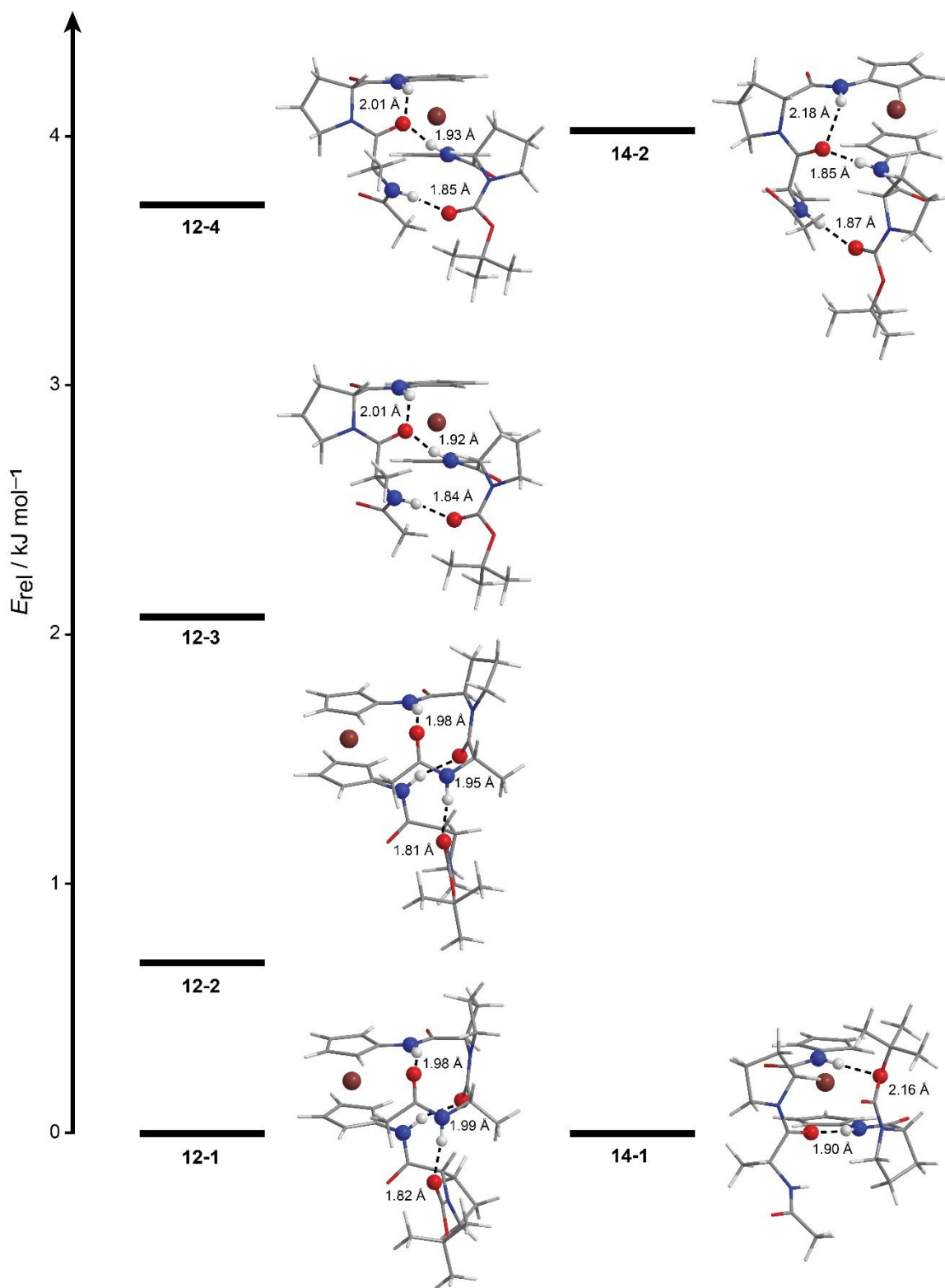
Iz Tablice 7, kao i sa Slike 35 može se vidjeti da najstabilniju konformaciju tripeptida **13** i **15** karakteriziraju dvije interlančane IHB uspostavljene između NH-skupina vezanih na ferocenski prsten i karbonila iz zaštitnih skupina zatvarajući 10-člane i 13-člane prstenove ( $\text{NH}^1\cdots\text{OC}_{\text{Boc}}$  i  $\text{NH}^2\cdots\text{OC}_{\text{Ac}}$ ) što odgovara konformaciji tipa **A**. Računalno pretpostavljeni IHB obrasci odgovaraju pronađenim kontaktima u NOESY spektrima tripeptida **13** i **15** (Prilog 4, Prilog 6).

Tripeptid **12** (Slika 36, Tablica 7) ostvaruje najnižu energiju stabilizacijom putem konformacije **B**, koja pretpostavlja tvorbu triju IHB veza: intralančane  $\text{NH}^1\cdots\text{OC}_{\text{Ac}}$  (10-člani prsten),  $\text{NH}^2\cdots\text{OC}_{\text{Ala}}$  (10-člani prsten) te  $\text{NH}_{\text{Ala}}\cdots\text{OC}_{\text{Boc}}$  (16-člani prsten). Uspoređujući DFT modelirane vodikove veze s NOESY spektrima tripeptida **12** (Prilog 3) može se zaključiti da su vodikove veze  $\text{NH}^2\cdots\text{OC}_{\text{Ala}}$  te  $\text{NH}_{\text{Ala}}\cdots\text{OC}_{\text{Boc}}$  ostvarene u oba slučaja, dok u NMR spektru izostaju kontakti koji bi potvrdili postojanje intralančane  $\text{NH}^1\cdots\text{OC}_{\text{Ac}}$  koja zatvara 10-člani IHB prsten.

Najstabilnija konformacija tripeptida **14** stabilizirana je intramolekulskim vodikovim vezama prikazanim u konformeru **D** (Slika 34) pri čemu dolazi do zatvaranja dvaju 10-članih prstenova:  $\text{NH}^1\cdots\text{OC}_{\text{Boc}}$  te  $\text{NH}^2\cdots\text{OC}_{\text{Ala}}$ . U NOESY spektrima pronađeni su kontakti koji podržavaju tvorbu  $\text{NH}^2\cdots\text{OC}_{\text{Ala}}$  te  $\text{NH}^2\cdots\text{OC}_{\text{Ac}}$  (Prilog 5).



Slika 35. Grafički prikaz odnosa u relativnoj energiji najstabilnijih konformera tripeptida **13** i **15** s udaljenostima X–H···Y veza (u Å)



**Slika 36.** Grafički prikaz odnosa u relativnoj energiji najstabilnijih konformera tripeptida **12** i **14** s udaljenostima X–H···Y veza (u Å)

## 5. ZAKLJUČCI

1. Prvi dio ovog diplomskog rada obuhvaća pripravu i konformacijsku analizu tripeptida Boc-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe (**2**), Boc-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe (**3**), Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe (**4**) i Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe (**5**):

- ✓ Boc-tripeptidi **2** i **3** pripremljeni su u izvrsnim iskorištenjima od 89 % tj. 95 % dok su njihovi acetamidni analozi **4** i **5** pripremljeni u nešto nižem iskorištenju od 54 % odn. 61 %.
- ✓ U Boc-tripeptidima (**2** i **3**) te Ac-tripeptidu (**5**) prevladava signal slobodnih NH-skupina, dok kod Ac-heterokiralnog tripeptida (**4**) prevladava signal asociраних NH-skupina.
- ✓ Karakteristika svih peptida **2-5** jest visok kemijski pomak NH-skupina iz Fca ( $\delta > 8$  ppm) što upućuje na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.
- ✓ Na temelju kemijskih pomaka prolinskiх metilenskih skupina te razlike u kemijskim pomacima C $\beta$ - i C $\gamma$ -atoma zaključili smo da svi ispitivani biokonjugati zauzimaju *trans*-položaj oko imidne veze.
- ✓ Prema rezultatima spektroskopskih analiza, homo- i heterokiralni Boc-tripeptidi **2** i **3** ostvaruju konformaciju  $\beta$ -okreta uspostavljanjem NH<sub>Fca</sub>...OC<sub>Boc</sub> IHB.
- ✓ Zamjena zaštitnih skupina Boc-peptida **2** i **3** odrazila se na IHB-obrasce rezultirajućih Ac-analoga **4** i **5**. Uvedena Ac-skupina ne akceptira H-vezu te se pripadajući peptidi stabiliziraju 8-članim NH<sub>Fca</sub>...N<sub>Ala</sub> IHB-prstenovima.
- ✓ Širok raspon apsolutnih vrijednosti Cottonovih efekata peptida **2-5** (242 do 3703 deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>) upućuje na različite stupnjeve kiralnog uređenja.

2. Uvođenjem amino-skupine na *N*-terminus donjeg ciklopentadienilnog prstena prekursora **10** i **11** pripremljeni su Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc (**12**), Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (**13**), Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc (**14**) i Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (**15**) za koje je načinjena konformacijska analiza primjenom IR-, CD- i <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopije i računalnih postupaka:

- ✓ Iskorištenje reakcije za tripeptide **12** i **13** iznosi 72 % i 74 %, odn. 84 % i 80 % za tripeptide **14** i **15**.

- ✓ U IR-spektrima svih tripeptida ( $c = 5 \times 10^{-2}$  M) vidljiva su dva seta signala u području isteznih vibracija NH-skupina pri čemu dominiraju signali asociranih NH-skupina.
- ✓ Tripeptidi **13** i **15** imaju izražajnije signale asociranih NH-skupina.
- ✓ Koncentracijski-ovisna IR-spektroskopija tripeptida **12-15** ukazuje na karakter asocijacija NH-skupina: dolazi do ravnomjernog slabljenja intenziteta apsorpcijskih vrpca i slobodnih i asociranih NH-skupina, pa zaključujemo da se radi o *intramolekulskim vodikovim vezama* (IHB).
- ✓ Visok kemijski pomak amidnih protona ( $\text{NH}^1_{\text{Fn}}$  i  $\text{NH}^2_{\text{Fn}}$ ) tripeptida **12-15** vezanih za ferocensku jezgru ( $\delta > 8$  ppm) ukazuje na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.
- ✓ Alaninske NH-skupine registriraju se pri višem polju ( $\delta < 7$  ppm) pa je upitna njihova donorska uloga u HB.
- ✓ Na temelju kemijskih pomaka prolinskih metilenskih skupina te razlike u kemijskim pomacima  $\text{C}_{\beta-}$  i  $\text{C}_{\gamma-}$  atoma zaključili smo da tripeptidi **12-15** zauzimaju *trans*-položaj oko imidne veze.
- ✓ U IR-spektrima dominiraju intramolekulski asocirane NH-skupine; NMR-analiza upućuje na  $\text{NH}_{\text{Fn}}$ -skupine kao donore vodikove veze.
- ✓ Prema NOESY spektrima tripeptida **12-15** može se zaključiti da promjenom kiralnosti peptidne sekvence dolazi do promjene obrasca vodikovih veza.
- ✓ Jaki pozitivni Cottonovi efekti ( $\sim 30000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ ) za tripeptide **13** i **15** čiji se intenzitet tek neznatno mijenja dodatkom DMSO indiciraju tvorbu visokouređenih *M*-uzvojnica.
- ✓ Računalno pretpostavljeni IHB obrasci odgovaraju pronađenim kontaktima u NOESY spektrima tripeptida **13** i **15** [njihovi NOE-kontakti upućuju na tvorbu vodikove veze koja je uspostavljena putem 10- ( $\text{NH}^1_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$ ) i 13-članih ( $\text{NH}^2_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Ac}}$ ) IHB-prstenova].
- ✓ Usporedbom DFT analize s NOESY spektrima tripeptida **12** vidljivo je da su vodikove veze  $\text{NH}^2 \cdots \text{OC}_{\text{Ala}}$  te  $\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$  ostvarene su u oba slučaja, dok u NMR spektru izostaju kontakti koji bi potvrdili postojanje intralančane  $\text{NH}^1 \cdots \text{OC}_{\text{Ac}}$  koja zatvara 10-člani IHB prsten.
- ✓ U NOESY spektrima tripeptida **14** pronađeni su kontakti koji podržavaju tvorbu  $\text{NH}^2 \cdots \text{OC}_{\text{Ala}}$  te  $\text{NH}^2 \cdots \text{OC}_{\text{Ac}}$ , dok su DFT analizom predložene vodikove veze koje se ostvaruju  $\text{NH}^1 \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$  te  $\text{NH}^2 \cdots \text{OC}_{\text{Ala}}$  putem.

## 6. LITERATURA

1. Stryer, L. (1991) *Biokemija* (preveli Vuk-Pavlović, S., Kućan, Ž.), Školska knjiga, Zagreb.
2. Liskamp, R. M. J., Rijkers, D. T. S., Kruijtzter, J. A. W., Kemmink, J. (2011) Peptides and Proteins as a Continuing Exciting Source of Inspiration for Peptidomimetics. *ChemBioChem*. **12**, 1626-1653.
3. Gilbert, H. F (2010) Peptide Bonds, Disulfide Bonds and Properties of Small Peptides. U: *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
4. Mahesh, S., Tang, K.-C., Raj, M. (2018) Amide Bond Activation of Biological Molecules. *Molecules* **23**, 2615-2658.
5. Gromiha, M. M. (2010) *Protein Bioinformatics: From Sequence to Function*. Academic Press, A Division of Reed Elsevier India Pvt. Ltd., New Delhi, str. 1-27.
6. Reeb, J., Rost, B. (2019) Secondary Structure Prediction. U: *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics* (Ranganathan, S., Nakai, K., Schönbach, C., Gribskov, M., ured.), Elsevier, Amsterdam/Boston/Heidelberg/London/New York/Oxford/Paris/San Diego/San Francisco/Singapur/Sydney/Tokio.
7. Ji, Y. Y., Li, Y. Q. (2010) The Role of Secondary Structure in Protein Structure Selection. *Eur. Phys. J. E* **32**, 103–107.
8. Zeeshan, F., Tabbassum, M., Kesharwani, P. (2019) Investigation on Secondary Structure Alterations of Protein Drugs as an Indicator of Their Biological Activity Upon Thermal Exposure. *Protein J.* **38**, 551-564.
9. Thành, M. X. (2015) Effect of Secondary Structure on Biological Activities of Antimicrobial Peptides. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology* **31**, 44-53.
10. Mai, X.- T., Huang, J., Tan, J., Huang, Y., Chen, Y. (2015) Effects and mechanisms of the secondary structure on the antimicrobial activity and specificity of antimicrobial peptides. *J. Pept. Sci.* **21**, 561-568.
11. Pelton, J., McLean, L. (2000) Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure. *Anal. Biochem.* **277**, 167-176.
12. Ganesh, S., Jayakumar, R. (2002) Role of N-t-Boc group in helix initiation in a novel tetrapeptide. *J. Peptide Res.* **59**, 249-256.
13. Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **1767**, 1073-1101.
14. Miles, A. J., Wallace, B. A. (2016) Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 4859-4872.

15. Corrêa, D. H. A., Ramos, C. H. I. (2009) The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *Afr. J. Biochem. Res.* **3**, 164-173.
16. Szabados, L., Savouré, A. (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* **15**, 89-97.
17. Yaron, A., Naider, F. (1993) Proline-Dependent Structural and Biological Properties of Peptides and Proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 31-81.
18. Mothes, C., Caumes, C., Guez, A., Boulet, H., Gendrineau, T., Darses, S., Delsuc, N., Moumné, R., Oswald, B., Lequin, O., Karoyan, P. (2013) 3-Substituted Prolines: From Synthesis to Structural Applications, from Peptides to Foldamers. *Molecules* **18**, 2307-2327.
19. Melnikov, S., Mailliot, J., Rigger, L., Neuner, S., Shin, B., Yusupova, G., Dever, T., Micura, R., Yusupov, M. (2016) Molecular insights into protein synthesis with proline residues. *EMBO Rep.* **17**, 1776-1784.
20. Doerfel, L. K., Wohlgemuth, I., Kubyskin, V., Starosta, A. L., Wilson, D. N., Budisa, N., Rodnina, M. V. (2015) Entropic Contribution of Elongation Factor P to Proline Positioning at the Catalytic Center of the Ribosome. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 12997 – 13006.
21. Kovačević, M., Molčanov, K., Radošević, K., Srček, V., Roca, S., Čače, A., Barišić, L. (2014) Conjugates of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid and Proline: Synthesis, Conformational Analysis and Biological Evaluation. *Molecules* **19**, 12852-12880.
22. Vanhoof, G., Goossens, F., De Meester, I., Hendriks, D., Scharpé, S. (1995) Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.* **9**, 736–744.
23. Kay, B. K., Williamson, M. P., Sudol, M. (2000) The importance of being proline: The interaction of proline-rich motifs in signalling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* **14**, 231–241.
24. Troganis, A., Gerothanassis, I. P., Athanassiou, Z., Mavromoustakos, T., Hawkes, G. E., Sakarellos, C. (2000) Thermodynamic origin of cis/trans isomers of a proline-containing beta-turn model dipeptide in aqueous solution: A combined variable temperature  $^1\text{H}$ -NMR, two-dimensional  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  gradient enhanced nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY), one-dimensional steady-state intermolecular  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  NOE, and molecular dynamics study. *Biopolymers* **53**, 72–83.
25. Pandey, A., Naduthambi, D., Thomas, K., Zondlo, N. (2013) Proline Editing: A General and Practical Approach to the Synthesis of Functionally and Structurally Diverse Peptides. Analysis of Steric versus Stereoelectronic Effects of 4-Substituted Prolines on Conformation within Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 4333-4363.

26. Williamson, M. P. (1994) The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* **297**, 249-260.
27. Mehansho, H., Butler, L. G., Carlson, D. M. (1987) Dietary Tannins and Salivary Proline-Rich Proteins: Interactions, Induction, and Defense Mechanisms. *Annu. Rev. Nutr.* **7**, 423-440.
28. Smirnoff, N., Cumbes, Q. J. (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**, 1057–1060.
29. Matysik, J., Alia, A., Bhalu, B., Mohanty, P. (2002) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Curr. Sci.* **82**, 525–532.
30. Chen, C., Dickman, M. B. (2005) Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3459–3464.
31. Krishnan, N., Dickman, M. B., Becker, D. F. (2008) Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radical Biol. Med.* **44**, 671–681.
32. Mehta, S. K., Gaur, J. P. (1999) Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytol.* **143**, 253–259.
33. Litwack, G. (2018) *Human Biochemistry*. Academic Press, London/San Diego/Cambridge/Oxford, str. 191-192.
34. Marqusee, S., Robbins, V. H., Baldwin, R. L. (1989) Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 5286-5290.
35. Lotan, N., Yaron, A., Berger, A. (1966) The stabilization of the  $\alpha$ -helix in aqueous solution by hydrophobic side-chain interaction. *Biopolymers* **4**, 365-368.
36. O'Neil, K. T., DeGrado, W. F. (1990) A Thermodynamic Scale for the Helix-Forming Tendencies of the Commonly Occurring Amino Acids. *Science* **250**, 646-651.
37. Scholtz, J. M., Baldwin, R. L. (1992) The Mechanism of Alpha-Helix Formation by Peptides. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 95-118.
38. Padmanabhan, S., Marqusee, S., Ridgeway, T., Laue, T. M., Baldwin, R. L. (1990) Relative Helix-Forming Tendencies of Nonpolar Amino Acids. *Nature* **344**, 268-270.
39. Merutka, G., Lipton, W., Shalongo, W., Park, S.- H., Stellwagen, E. (1990) Effect of Central-Residue Replacements on the Helical Stability of a Monomeric Peptide. *Biochemistry* **29**, 7511-7515.
40. Lyu, P. C., Liff, M. I., Marky, L. A., Kallenbach, N. R. (1990) Side Chain Contributions to the Stability of Alpha-Helical Structure in Peptides. *Science* **250**, 669-673.
41. Chakrabarty, A., Schellman, J. A., Baldwin, R. L. (1991) Large differences in the helix propensities of alanine and glycine. *Nature* **351**, 586-588.



42. Woutersen, S., Pfister, R., Hamm, P., Mu, Y., Kosov, D. S., Stock, G. (2002) Peptide conformational heterogeneity revealed from nonlinear vibrational spectroscopy and molecular-dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* **117**, 6833-6840.
43. Zimm, B. H., Brag, J. K. (1959) Theory of the Phase Transition between Helix and Random Coil in Polypeptide Chains. *J. Chem. Phys.* **31**, 526-535.
44. Eker, F., Cao, X., Nafie, L., Schweitzer-Stenner, R. (2002) Tripeptides Adopt Stable Structures in Water. A Combined Polarized Visible Raman, FTIR, and VCD Spectroscopy Study. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14330-14341.
45. Eker, F., Griebenow, K., Schweitzer-Stenner, R. (2003) Stable Conformations of Tripeptides in Aqueous Solution Studied by UV Circular Dichroism Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8178-8185.
46. Schweitzer-Stenner, R., Eker, F., Griebenow, K., Cao, X., Nafie, L. A. (2004) The Conformation of Tetraalanine in Water Determined by Polarized Raman, FT-IR, and VCD Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 2768-2776.
47. Shi, Z., Olson, C. A., Rose, G. D., Baldwin, R. L., Kallenbach, N. R. (2002) Polyproline II Structure in a Sequence of Seven Alanine Residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9190-9195.
48. McColl, I. H., Blanch, E. W., Hecht, L., Kallenbach, N. R., Barron, L. D. (2004) Vibrational Raman optical activity characterization of poly(L-proline) II helix in alanine oligopeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 5076–5077.
49. Graf, J., Nguyen, P., Stock, G., Schwalbe, H. (2007) Structure and Dynamics of the Homologous Series of Alanine Peptides: A Joint Molecular Dynamics/NMR Study. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 1179-1189.
50. Breibeck, J., Skerra, A. (2017) The polypeptide biophysics of proline/alanine-rich sequences (PAS): Recombinant biopolymers with PEG-like properties. *Biopolymers* **109**, 23069-23081.
51. Turner, S. L., Russell, G. C., Williamson, M. P., Guest, J. R. (1993) Restructuring an interdomain linker in the dihydrolipoamide acetyltransferase component of the pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli*. *Protein Eng.* **6**, 101–108.
52. Binder, U., Skerra, A. (2017) PASylation®: A versatile technology to extend drug delivery. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **31**, 10-17.
53. Čakić Semenčić, M., Barišić, L. (2017) Ferrocene Bioconjugates. *Croat. Chem. Acta* **90**, 537–569.
54. Astruc, D. (2016) Why is Ferrocene so Exceptional? *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 6-29.

55. Lal, B., Badshah, A., Altaf, A. A., Khan, N., Ullah, S. (2011) Miscellaneous applications of ferrocene-based peptides/amides. *Appl. Organometal. Chem.* **25**, 843-855.
56. Realista, S., Quintal, S., Martinho, P. N., Melato, A. I., Gil, A., Esteves, T., Carvalho, M. d. D., Ferreira, L. P., Vaz, P. D., Calhorda, M. J. (2017) Electrochemical studies and potential anticancer activity in ferrocene derivatives. *J. Coord. Chem.* **70**, 314-327.
57. Ludwig, B. S., Correia, J. D. G., Kühn, F. E. (2019) Ferrocene derivatives as anti-infective agents. *Coord. Chem. Rev.* **396**, 22-48.
58. Babin, V. N., Belousov, Y. A., Borisov, V. I., Gumenyuk, V. V., Nekrasov, Y. S., Ostrovskaya, L. A., Sviridova, I. K., Sergeeva, N. S., Simenel, A. A., Snegur, L. V. (2014) Ferrocenes as potential anticancer drugs. Facts and hypotheses. *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* **63**, 2405-2422.
59. Vessieres, A., Top, S., Beck, W., Hillard, E., Jaouen, G. (2006) Metal complex SERMs (selective oestrogen receptor modulators). The influence of different metal units on breast cancer cell antiproliferative effects. *Dalton Trans.* **4**, 529-541.
60. Jaouen, G., Top, S., Vessières, A., Leclercq, G., McGlinchey, M. J. (2004) The First Organometallic Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) and Their Relevance to Breast Cancer. *Curr. Med. Chem.* **11**, 2505-2517.
61. Liu, Z. Q. (2011) Potential Applications of Ferrocene as a Structural Feature in Antioxidants. *Mini-rev. Med. Chem.* **11**, 345-358.
62. Fouda, M. F. R., Abd-Elzaher, M. M., Abdelsamaia, R. A., Labib, A. A. (2007) On the medicinal chemistry of ferrocene. *Appl. Organometal. Chem.* **21**, 613-625.
63. Hussein, M. A., Asiri, A. M. (2012) Organometallic Ferrocene- and Phosphorus-Containing Polymers: Synthesis and Characterization. *Des. Monomers Polym.* **15**, 207-251.
64. Moriuchi, T., Hirao, T. (2019) Design of Bioorganometallic Conjugates Composed of Dipeptides or Nucleobases to Induce Chirality-Organized Structures. U: *Advances in Bioorganometallic Chemistry* (Hirao, T., Moriuchi, T., ured.), Elsevier, Amsterdam/Oxford/Cambridge, str. 35-56.
65. Kirin, S. I., Kraatz, H.- B., Metzler-Nolte, N. (2006) Systematizing structural motifs and nomenclature in 1,n'-disubstituted ferrocene peptides *Chem. Soc. Rev.* **35**, 348-354.
66. van Staveren, D. R., Metzler-Nolte, N. (2004) Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene. *Chem. Rev.* **104**, 5931-5986.
67. van Staveren, D. R., Weyhermüller, T., Metzler-Nolte, N. (2003) Organometallic  $\beta$ -turn mimetics. A structural and spectroscopic study of inter-strand hydrogen bonding in ferrocene and cobaltocenium conjugates of amino acids and dipeptides. *Dalton Trans.*, 210-220.

68. de Hatten, X., Weyhermüller, T., Metzler-Nolte, N. (2004) Ferrocenoyl peptides with sulfur-containing side chains: Synthesis, solid state and solution structures. *J. Organomet. Chem.* **689**, 4856-4867.
69. Rapić, V., Kovačević, M. (2012) III. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocenski peptidi. *Kem. Ind.* **61**, 71-120.
70. Giannis, A., Kolter, T. (1993) Peptidomimetics for Receptor Ligands—Discovery, Development, and Medical Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**, 1244-1267.
71. Gante, J. (1994) Peptidomimetics-Tailored Enzyme Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **33**, 1699-1720.
72. Kahn, M. (1993) Peptide Secondary Structure Mimetics: Recent Advances and Future Challenges. *Synlett* **11**, 821-826.
73. Ko, E., Liu, J., Burgess, K. (2011) Minimalist and universal peptidomimetics. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 4411-4421.
74. Moriuchi, T., Hirao, T. (2010) Design of Ferrocene-Dipeptide Bioorganometallic Conjugates To Induce Chirality-Organized Structures. *Acc. Chem. Res.* **43**, 1040-1051.
75. Moriuchi, T., Hirao, T. (2012) Dipeptide-Induced Chirality Organization. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **74**, 23-40.
76. Moriuchi, T., Nomoto, A., Yoshida, K., Hirao, T. (1999) Characterization of Ferrocene Derivatives Bearing Podand Dipeptide Chains (-L-Ala-L-Pro-OR). *J. Organomet. Chem.* **589**, 50-58.
77. Moriuchi, T., Nomoto, A., Yoshida, K., Ogawa, A., Hirao, T. (2001) Chirality Organization of Ferrocenes Bearing Podand Dipeptide Chains: Synthesis and Structural Characterization. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 68-75.
78. Adhikari, B., Lough, A. J., Barker, B., Shah, A., Xiang, C., Kraatz, H.-B. (2014) Bis-amino Acid Derivatives of 1,1'-Ferrocenedicarboxylic Acid: Structural, Electrochemical, and Metal Ion Binding Studies. *Organometallics* **33**, 4873-4887.
79. 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.
80. Barišić, L., Rapić, V., Pritzkow, H., Pavlović, G., Nemet, I. (2003) Ferrocene compounds: Part XXXIII. Synthesis and characterization of amino acids containing skeletal 1,1'-ferrocenylene unit. *J. Organomet. Chem.* **682**, 131-142.

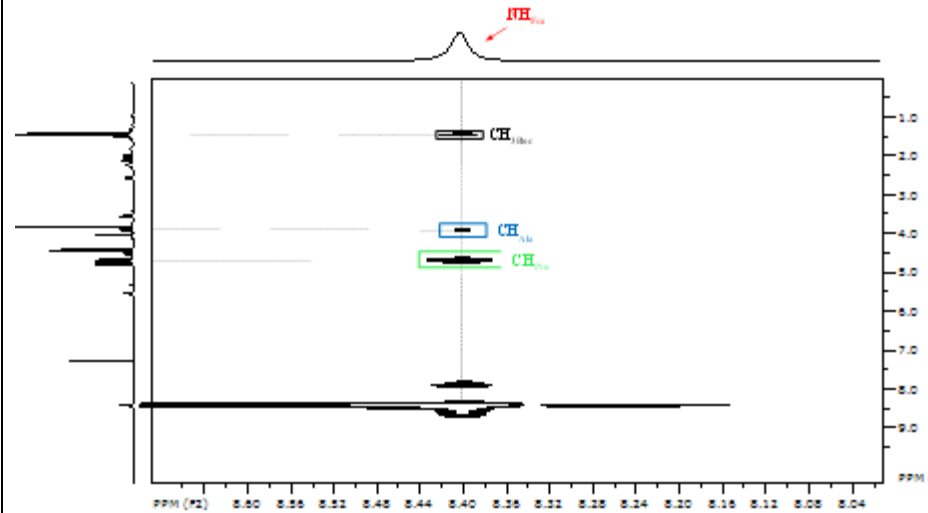
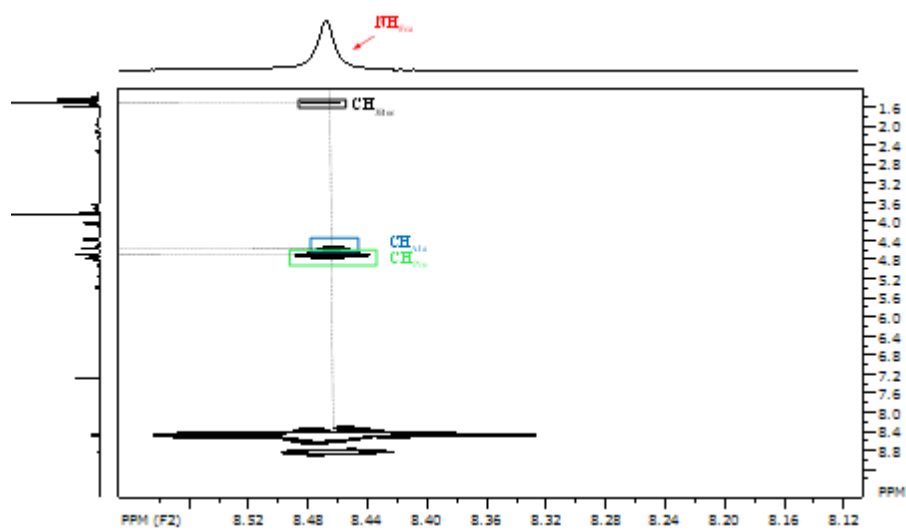
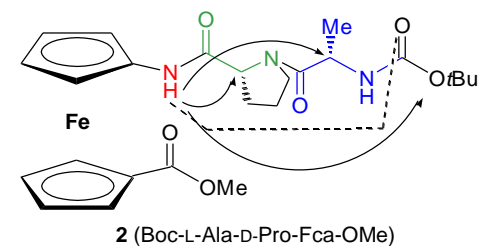
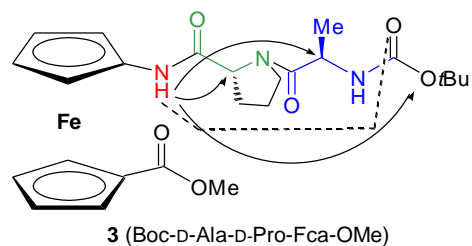
81. Barišić, L., Dropučić, M., Rapić, V., Pritzkow, H., Kirin, S. I., Metzler-Nolte, N. (2004) The first oligopeptide derivative of 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid shows helical chirality with antiparallel strands. *Chem. Commun.*, 2004-2005.
82. Barišić, L., Čakić, M., Mahmoud, K. A., Liu, Y., Kraatz, H.- B., Pritzkow, H., Kirin, S. I., Metzler-Nolte, N., Rapić, V. (2006) Helically Chiral Ferrocene Peptides Containing 1'-aminoferrocene-1-carboxylic Acid Subunits as Turn Inducers. *Chem. Eur. J.* **12**, 4965-4980.
83. Čakić Semenčić, M., Dropučić, M., Barišić, L., Rapić, V. (2006) Synthesis of the first heteroannularly substituted ferrocene amino acid and isomeric carbamic acid derivatives containing chiral centres. *Croat Chem. Acta* **79**, 599-612.
84. Čakić Semenčić, M., Barišić, L., Rapić, V. (2007) Approaches to (R)- and (S)-1'-(1-aminoethyl)ferrocene-1-carboxylic acid derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry* **18**, 2125-2128.
85. Lapić, J., Pavlović, G., Siebler, D., Heinze, K., Rapić, V. (2008) Structural, spectroscopic, and theoretical study of ferrocene ureidopeptides. *Organometallics* **27**, 726-735.
86. Čakić Semenčić, M., Siebler, D., Heinze, K., Rapić, V. (2009) Bis- and Trisamides Derived From 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid and  $\alpha$ -Amino Acids: Synthesis and Conformational Analysis. *Organometallics* **28**, 2028-2037.
87. Lapić, J., Djaković, S., Cetina, M., Heinze, K., Rapić, V. (2010) C<sub>2</sub>-Symmetric Ferrocene–Bis(ureido)peptides: Synthesis, Conformation and Solid-State Structure. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 106-114.
88. Lapić, J., Djaković, S., Kodrin, I., Mihalić, Z., Cetina, M., Rapić, V. (2010) Preparation and Conformation Analysis of N-(Ferrocenoyl)dipeptide Esters and Their 1'-Acetyl Derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* **13**, 2512-2524.
89. Čakić Semenčić, M., Heinze, K., Förster, C., Rapić, V. (2010) Bioconjugates of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid with (S)-3-Amino-2-methylpropanoic Acid and L-Alanine. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1089-1097.
90. Kovač, V., Čakić Semenčić, M., Kodrin, I., Roca, S., Rapić, V. (2013) Ferrocene-dipeptide conjugates derived from aminoferrocene and 1-acetyl-1'-aminoferrocene: synthesis and conformational studies. *Tetrahedron* **69**, 10497-10506.
91. Djaković, S., Kodrin, I., Smrečki, V., Novak, P., Mihalić, Z., Žiher, D., Lapić, J., Rapić, V. (2014) 1'-Acetylferrocene amino acid esters and amides. A simple model for parallel  $\beta$ -helical peptides. *Tetrahedron* **70**, 2330-2342.
92. Chowdhury, S., Mahmoud, K. A., Schatte, G., Kraatz, H.- B. (2005) Amino acid conjugates of 1,1'-diaminoferrocene. Synthesis and chiral organization. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 3018-3023.

93. Djaković, S., Siebler, D., Čakić Semenčić, M., Heinze, K., Rapić, V. (2008) Spectroscopic and theoretical study of asymmetric 1,1'-diaminoferrocene conjugates of  $\alpha$ -amino acids. *Organometallics* **27**, 1447-1453.
94. Rapić, V., Čakić Semenčić, M. (2011) I. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocen i metalni karbonili. *Kem. Ind.* **60**, 61-79.
95. 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 Trans.* **44**, 16405-16420.
96. Kovačević, M. (2014) *Ferocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima*, Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
97. Kovačević, M., Kodrin, I., Roca, S., Molčanov, K., Shen, Y., Adhikari, B., Kraatz, H.- B., Barišić, L. (2017) Helically chiral peptides containing ferrocene-1,1'-diamine scaffold as a turn inducer. *Chem. Eur. J.* **23**, 10372-10395.
98. Cohen, A. J., Mori-Sánchez, P., Yang, W. (2012) Challenges for Density Functional Theory. *Chem. Rev.* **112**, 289–320.
99. Somsikov, V. (2017) Extension of the Schrodinger equation. *EPJ Web Conf.* **138**, 07003.
100. Hohenberg, P., Kohn, W. (1964) Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* **136**, B864-B871.
101. Hasnip, P. J., Refson, K., Probert, M. I. J., Yates, J. R., Clark, S. J., Pickard, C. J. (2014) Density functional theory in the solid state. *Phil. Trans. R. Soc. A* **372**, 20130270.
102. Chermette, H. (1998) Density functional theory. A powerful tool for theoretical studies in coordination chemistry. *Coord. Chem. Rev.* **178-180**, 699-721.
103. Sahni, V. (2004) The Hohenberg-Kohn Theorems and Kohn-Sham Density Functional Theory. U: *Quantal Density Functional Theory*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, str. 99-123.
104. Heinze, K., Hüttinger, K., Siebler, D. (2011) Elucidation of the Conformational Freedom of Ferrocene Amino Acid (Bio)Conjugates: A Complementary Theoretical and Experimental Approach. U: *Modeling of Molecular Properties* (Comba, P., ured.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 325-346.
105. Perrin, D. D., Armarego, W. L. F (1988) *Purification of laboratory chemicals*, 3. izd., Pergamon Press, Oxford/New York.
106. Karle, I. L. (1999) Hydrogen bonds in molecular assemblies of natural, synthetic and 'designer' peptides. *J. Mol. Struct.* **474**, 103–112.

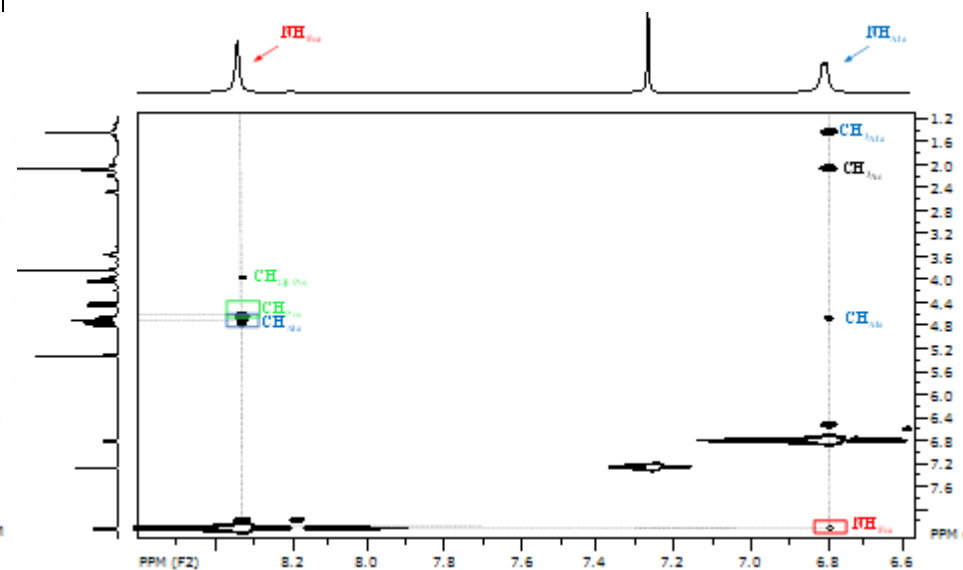
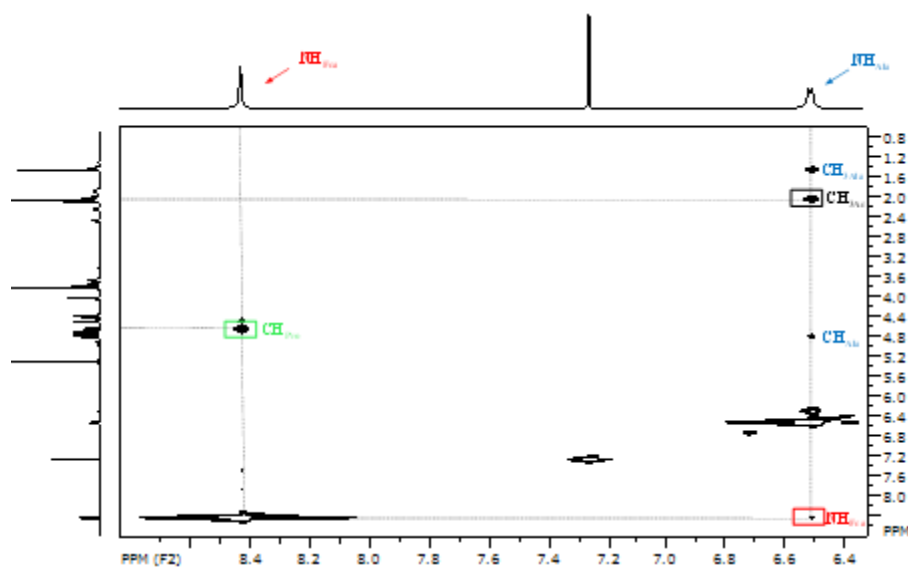
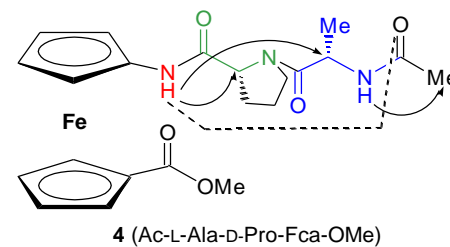
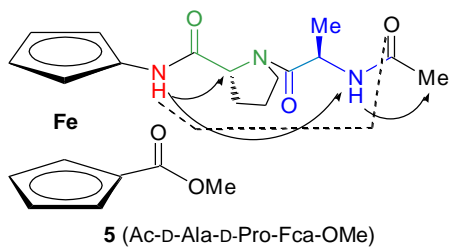
107. Barišić, L., Kovačević, M., Mamić, M., Kodrin, I., Mihalić, Z., Rapić, V. (2012) Synthesis and Conformational Analysis of Methyl N-Alanyl-1'-aminoferrocene-1-carboxylate. *Eur. J. Inorg. Chem.* **11**, 1810-1822.
108. Kong, J., Yu, S. (2007) Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **39**, 549-559.
109. Wüthrich, K., Billeter, M., Braun, W. (1984) Polypeptide secondary structure determination by nuclear magnetic resonance observation of short proton-proton distances. *J. Mol. Biol.* **180**, 715-740.
110. Jin, Y., Tonan, K., Ikawa, S. (2002) Competitive formation of 10- and 7-membered hydrogen-bonded rings of proline-containing model peptides. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **58**, 2795-2802.
111. Moriuchi, T., Nomoto, A., Yoshida, K., Hirao, T. (2001) Intramolecular Conformational Control in Ferrocenes Bearing Podand Dipeptide Chains. *Organometallics* **20**, 1008-1013.
112. Herrick, R. S., Jarret, R. M., Curran, T. P., Dragoli, D. R., Flaherty, M. B., Lindyberg, S. E., Slate, R. A., Thornton, L. C. (1996) Ordered conformations in bis(amino acid) derivative of 1,1'-ferrocenedicarboxylic acid. *Tetrahedron Lett.* **37**, 5289-5292.
113. Kirin, S. I., Wissenbach, D., Metzler-Nolte, N. (2005) Unsymmetrical 1,n'-disubstituted ferrocenoyl peptides: convenient one pot synthesis and solution structures by CD and NMR spectroscopy. *New J. Chem.* **29**, 1168-1173.
114. Xu, Y., Saweczko, P., Kraatz, H.- B. (2001) 1,1'-Ferrocenoyl-oligoprolines. A synthetic, structural and electrochemical study. *J. Organomet. Chem.* **637**, 335-342.
115. Moriuchi, T., Hirao, T. (2010) Design of Ferrocene-Dipeptide Bioorganometallic Conjugates To Induce Chirality-Organized Structures. *Acc. Chem.Res.* **43**, 1040-1051.
116. Moriuchi, T., Nagai, T., Hirao, T. (2005) Chirality Organization of Ferrocenes Bearing Dipeptide Chains of Heterochiral Sequence. *Org. Lett.* **7**, 5265-5268.
117. Moriuchi, T., Nagai, T., Hirao, T. (2006) Induction of  $\beta$ -Turn-Like Structure in Ferrocene Bearing Dipeptide Chains via Conformational Control. *Org. Lett.* **8**, 31-34.
118. Kodrin, I. (2011) *Konformacijska analiza ferocenskih peptida*, Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

## 7. PRILOZI

7.1. Prilog 1. Predložene konformacije  $\beta$ -okreta u peptidima **2** i **3** (NOE-kontakti označeni su kvadratićima, a predložene IHB crticama)

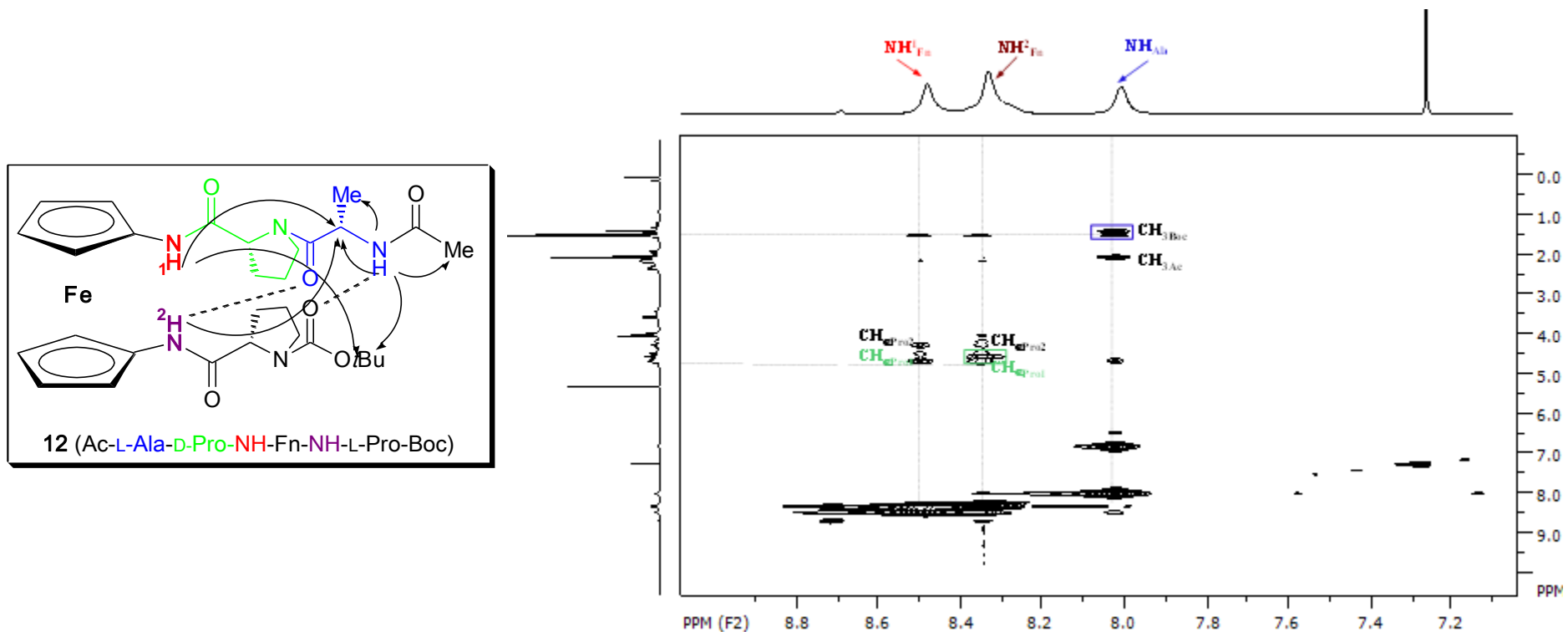


7.2. Prilog 2. Predložene konformacije  $\beta$ -okreta u peptidima **4** i **5** (NOE-kontakti označeni su kvadratićima, a predložene IHB crticama)

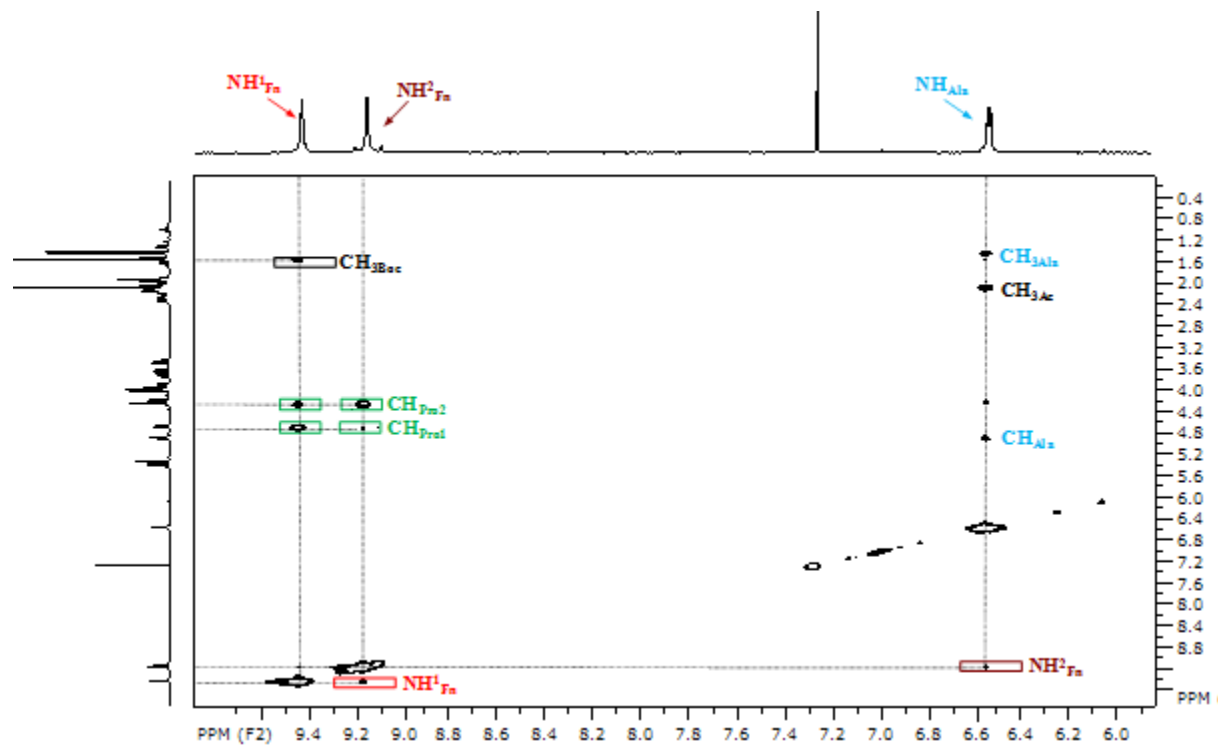
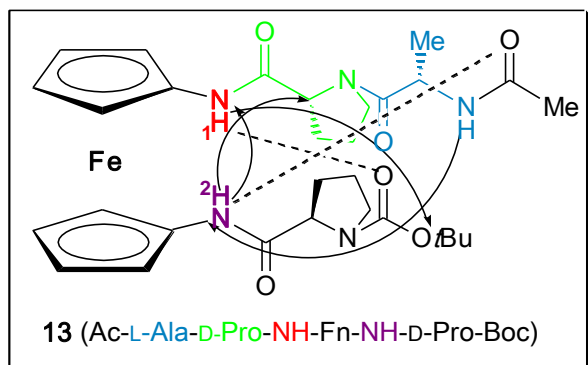




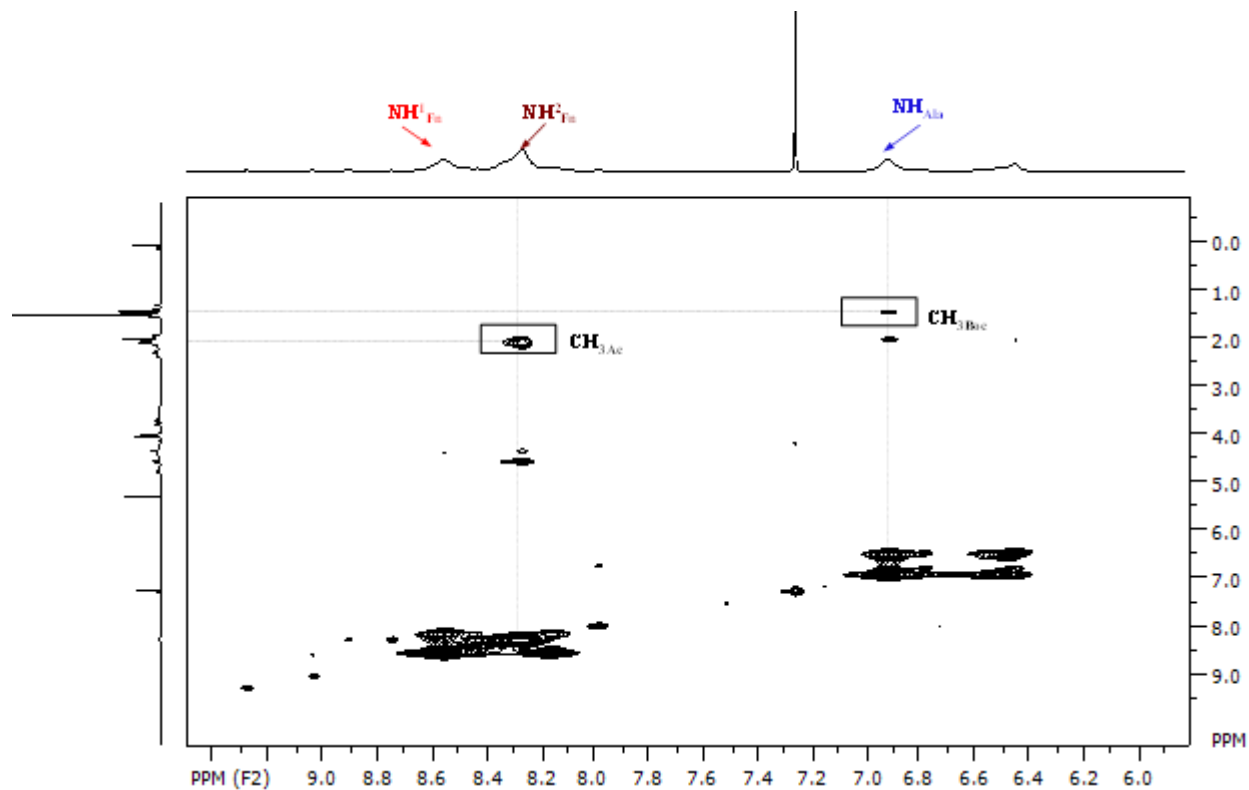
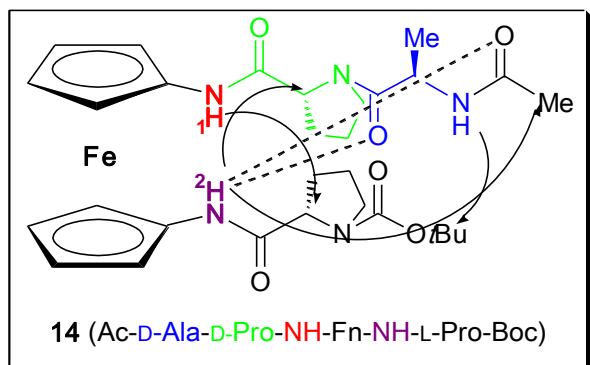
7.3. Prilog 3. Predložene konformacije u peptidu **12** (NOE-kontakti označeni su kvadratićima, a predložene IHB crticama)



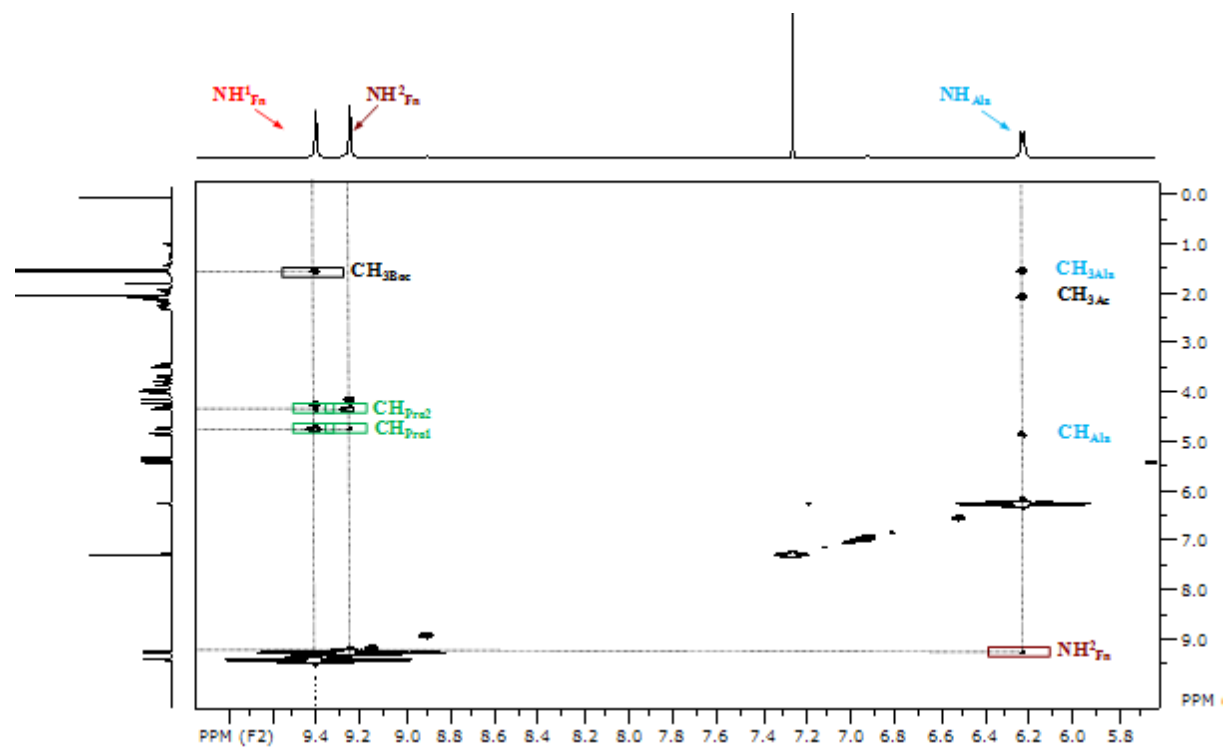
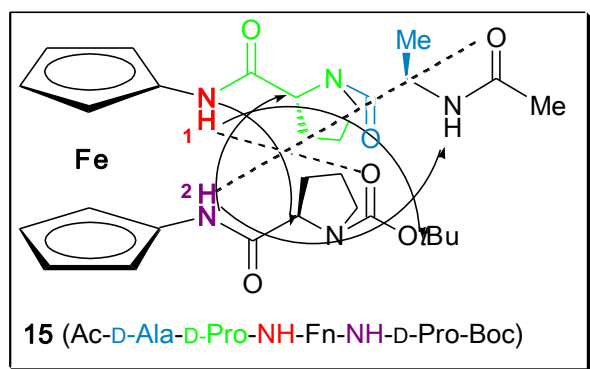
7.4. Prilog 4. Predložene konformacije u peptidu **13** (NOE-kontakti označeni su kvadratićima, a predložene IHB crticama)



7.5. Prilog 5. Predložene konformacije u peptidu **14** (NOE-kontakti označeni su kvadratićima, a predložene IHB crticama)



7.6. Prilog 6. Predložene konformacije u peptidu **15** (NOE-kontakti označeni su kvadratićima, a predložene IHB crticama)



## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

*Tea Stipčić*

---

Tea Stipčić