

# Utjecaj zaštitnih skupina i kiralnosti aminokiselina na konformaciju ferocenskih tripeptida Fn-Pro-Ala

---

**Damjanović, Antonio**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*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:159:354837>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Antonio Damjanović**  
0058215787

**UTJECAJ ZAŠTITNIH SKUPINA I KIRALNOSTI  
AMINOKISELINA NA KONFORMACIJU  
FEROCENSKIH TRIPEPTIDA Fn-Pro-Ala**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Organska kemija

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:**

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

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

**Zagreb, 2022.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

## Utjecaj zaštitnih skupina i kiralnosti aminokiselina na konformaciju ferocenskih tripeptida Fn-Pro-Ala Antonio Damjanović, 0058215787

### Sažetak:

Strukturne različitosti aminokiselina, a samim time i peptida te proteina, omogućuju brojne biološki važne funkcije proteina u stanici. Budući da je mogućnost korištenja peptida i proteina u terapijske svrhe ograničena, njihova svojstva moguće je poboljšati ugradnjom ferocenskog kalupa u strukturu peptida, što omogućuje tvorbu vodikove veze između peptidnih lanaca kao glavni preduvjet za tvorbu sekundarnih struktura, a samim time i za biološku aktivnost i funkciju peptida.

U ovom je radu opisana sinteza i konformacijska analiza tripeptida **2** i **3** (Boc-L(D)-Ala-D-Pro-NH-Fn-COOMe) te **4** i **5** (Ac-L(D)-Ala-D-Pro-NH-Fn-COOMe), izvedenih iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca) i Pro-Ala peptidne sekvence. Provedena je IR-, NMR- i CD-spektroskopska analiza dobivenih biokonjugata, s ciljem ispitivanja utjecaja kiralnosti i zaštitnih skupina (Boc/Ac) aminokiselina na mogućnost tvorbe intramolekulskih vodikovih veza te u konačnici i sekundarnih peptidnih struktura.

**Ključne riječi:** ferocen, konformacijska analiza, prolin, alanin, vodikova veza

**Rad sadrži:** 30 stranica, 8 slika, 4 tablice, 42 literaturna navoda, 3 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Datum obrane:** 19. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry  
Laboratory for Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

**Impact of protecting groups and chirality of amino acids on the conformation of  
ferrocene tripeptides Fn-Pro-Ala  
Antonio Damjanović, 0058215787**

### Abstract:

The structural differences of amino acids, and consequently of peptides and proteins, enable numerous biologically important functions of proteins in the cell. Since the possibility of using peptides and proteins for therapeutic purposes is limited, their properties can be improved by incorporating certain ferrocene templates into the peptide structure. Formation of hydrogen bond is main prerequisite for the formation of secondary structures, and thus for the biological activity and function of the peptides.

This paper describes the synthesis and conformational analysis of tripeptides **2** and **3** (Boc-L(D)-Ala-D-Pro-NH-Fn-COOMe), as well as the tripeptides **4** and **5** (Ac-L(D)-Ala-D-Pro-NH-Fn-COOMe), derived from 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid (Fca) and Pro-Ala peptide sequence. IR-, NMR- and CD-spectroscopic analysis of the obtained bioconjugates was carried out, with the aim of examining the influence of chirality and protective groups (Boc/Ac) of amino acids on the possibility of intramolecular hydrogen bond formation, and ultimately secondary peptide structures.

**Keywords:** ferrocene, conformational analysis, proline, alanine, hydrogen bond

**Thesis contains:** 30 pages, 8 figures, 4 tables, 42 references, 3 supplements

**Original in:** Croatian

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

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

**Thesis defended:** September 19<sup>th</sup> 2022

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. Ferocen .....	2
2.2. Peptidomimetici .....	3
2.3. Ferocenski konjugati s aminokiselinama .....	4
2.3.1. Alanin .....	6
2.3.2. Prolin .....	6
2.3.3. Pro-Ala dipeptid .....	7
2.3.4. Dosadašnja istraživanja .....	8
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	11
3.1. Materijali i metode .....	11
3.2. Postupak pripreve ferocenskih peptida .....	11
3.2.1. Postupak pripreve dipeptida Boc-D-Pro-Fca-OMe (1) .....	12
3.2.2. Postupak pripreve tripeptida Boc-L-Ala-D-Pro-Fn-OMe (2) i Boc-D-Ala-D-Pro-Fn-OMe (3) .....	14
3.2.3. Postupak pripreve tripeptida Ac-L-Ala-D-Pro-Fn-OMe (4) i Ac-D-Ala-D-Pro-Fn-OMe (5) .....	16
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	18
4.1. Uvod .....	18
4.2. IR-spektroskopska analiza tripeptida 2-5 .....	19
4.3. NMR-spektroskopska analiza tripeptida 2-5 .....	21
4.4. CD- spektroskopska analiza tripeptida 2-5 .....	24
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	26
<b>6. POPIS LITERATURE</b> .....	27
<b>PRILOZI</b>	

## 1. UVOD

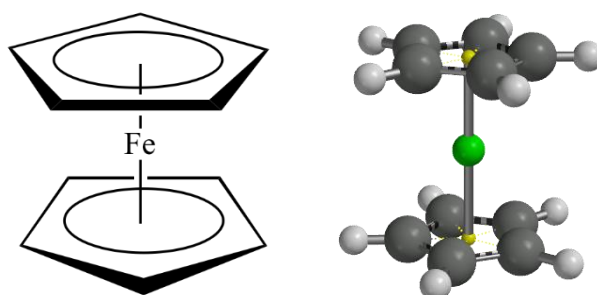
Strukturne različitosti aminokiselina, a posljedično i peptida te proteina, omogućuju brojne biološki važne funkcije proteina u stanici. Kontrola rasta i diferencijacije, enzimska kataliza reakcija, prijenos i pohrana određenih molekula, kao i sudjelovanje u imunološkom odgovoru samo su neke od ključnih bioloških aktivnosti koje proteini posjeduju u stanici. Sekundarna struktura proteina predstavlja jedan od ključnih elemenata u biološkoj aktivnosti, konformacijskoj stabilnosti, fleksibilnosti, ali i terapijskom djelovanju proteina. Budući da je mogućnost korištenja peptida i proteina u terapijske svrhe ograničena (niska stabilnost, kratko vrijeme poluživota, mala topljivost...), njihova svojstva mogu se poboljšati ugradnjom molekule ferocena u peptidnu strukturu proteina, pri čemu nastaju peptidomimetici. Peptidomimetici su peptidni ili nepeptidni spojevi koji oponašaju elemente sekundarne strukture proteina, kao i biološku aktivnost, ekvivalentno prirodnim peptidima, a za njihovu pripremu koristi se konjugacija ferocena s biomolekulama, što rezultira biokonjugatima koji imaju bolje terapijsko djelovanje. Štoviše, ugrađivanjem određenih ferocenskih kalupa u strukturu peptida nastaje vodikova veza koja uzrokuje nastajanje različitih elemenata sekundarne strukture proteina. Ferocen je stoga predmet brojnih istraživanja te se primjenjuje u biomedicini, nanomedicini, industriji biosenzora, polimera, baterija i materijala te elektrokatalizi, a njegovi konjugati pokazuju vrlo dobro antitumorsko, antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje.

U okviru ovog eksperimentalnog rada provedena je sinteza i konformacijska analiza tripeptida **2** i **3** (Boc-L(D)-Ala-D-Pro-NH-Fn-COOMe) te **4** i **5** (Ac-L(D)-Ala-D-Pro-NH-Fn-COOMe), izvedenih iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca) i Pro-Ala peptidne sekvence. Ovako sintetizirani tripeptidi sadrže heterokiralne (**2** i **4**) i homokiralne (**3** i **5**) Pro-Ala sekvence s različitim zaštitnim skupinama na svojim krajevima, stoga je provedena IR-, NMR- i CD-spektroskopska analiza dobivenih biokonjugata, s ciljem ispitivanja utjecaja kiralnosti i zaštitnih skupina (Boc/Ac) aminokiselina alanina i prolina na mogućnost tvorbe intramolekulskih vodikovih veza (engl. *Intramolecular Hydrogen Bonds*), a samim time i sekundarnih peptidnih struktura.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Ferocen

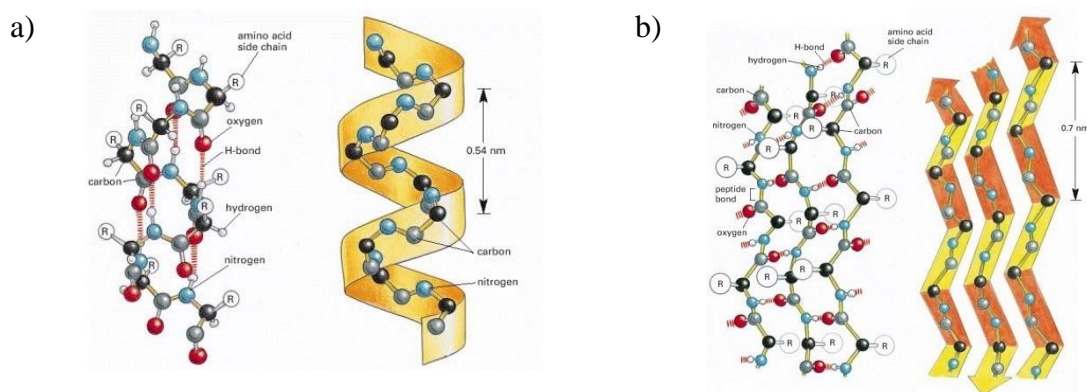
Otkriće ferocena datira u 1951. godinu, kada su T. J. Kealy i P. L. Pauson reakcijom željezovog (III) klorida i ciklopentadienilnog magnezijevog bromida sintetizirali molekulu kemijske formule  $\text{FeC}_{10}\text{H}_{10}$  (Kealy i Pauson, 1951), čija je sinteza dala priliku brojnim znanstvenicima za daljnja istraživanja. Naziv ferocen predložio je Woodward 1952. godine, budući da ferocenski karbociklički prstenovi pokazuju sličnost s benzenom (Woodward i sur., 1952). Iste te godine opisana je njegoa ispravna aromatska struktura „sendviča“. Radi se o diciklopentadienilnoj strukturi koju čine dva ciklopentadienilna prstena povezana s ionom željeza između njih (Slika 1), što daje ferocenu izuzetnu stabilnost (Fischer i Pfab, 1952; Wilkinson i sur., 1952). Ferocen se ubraja u skupinu organometalnih spojeva zbog direktne veze između metala i ugljika te služi kao glavno područje interesa bioorganometalne kemije. Bioorganometalna kemija bavi se istraživanjem biomolekula, poput DNA, ugljikohidrata, steroida, aminokiselina i sl., konjugiranih s organometalnim spojevima (Rapić i Čakić Semenčić, 2011). Osim što ferocen pokazuje iznimnu kemijsku stabilnost do 400 °C, karakteriziraju ga i druga važna svojstva: reaktivnost kao superaromatski elektrofil, blaga i reverzibilna oksidacija, stabilnost na zraku i u fiziološkom mediju, lipofilnost, dobra topljivost u organskim otapalima, niska toksičnost, mogućnost tvorbe različitih derivata. Upravo zbog svih tih svojstava ferocen je predmet brojnih istraživanja te se primjenjuje u biomedicini, nanomedicini, industriji biosenzora, polimera, baterija i materijala te elektrokatalizi. Također, konjugacija ferocena s biomolekulama rezultirala je biokonjugatima koji su pokazali iznimno antitumorsko, antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje (Astruc, 2016; Lal i sur., 2011).



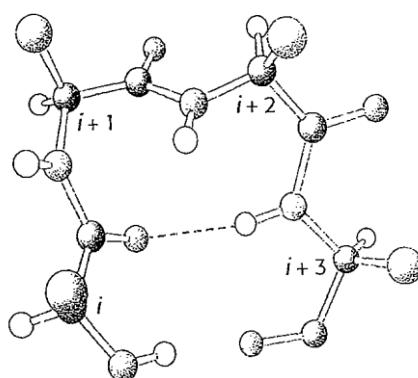
**Slika 1.** Kemijska struktura ferocena

## 2.2. Peptidomimetici

Peptidomimetici su peptidni ili nepeptidni spojevi koji oponašaju elemente sekundarne strukture proteina ( $\alpha$ -uzvojnica,  $\beta$ -nabranu ploču, razni okreti). Radi se pretežito o peptidima male molekulske mase koji oponašaju prirodne peptide u interakciji s receptorima (Liskamp i sur., 2011). Peptidomimetici oponašaju i biološku funkciju peptida te imaju svojstvo molekuskog prepoznavanja i blokiranja biološkog učinka, ekvivalentno prirodnim peptidima (Gante, 1994; Giannis i Kolter, 1993; Khan, 1993; Olsen i sur., 1993). Peptidomimetici moraju zauzeti točno određenu konformaciju da bi se specifično mogli povezati protein-protein interakcijama (PPI) s proteinom. Isto tako, moraju imati točno određenu sekundarnu strukturu, koja može biti u obliku  $\alpha$ -uzvojnice,  $\beta$ -nabrane ploče (Slika 2) ili nekog okreta [primjerice  $\beta$ -okreta (Slika 3)].



**Slika 2.** Struktura  $\alpha$ -uzvojnice i  $\beta$ -nabrane ploče (prema Alberts i sur., 2002)



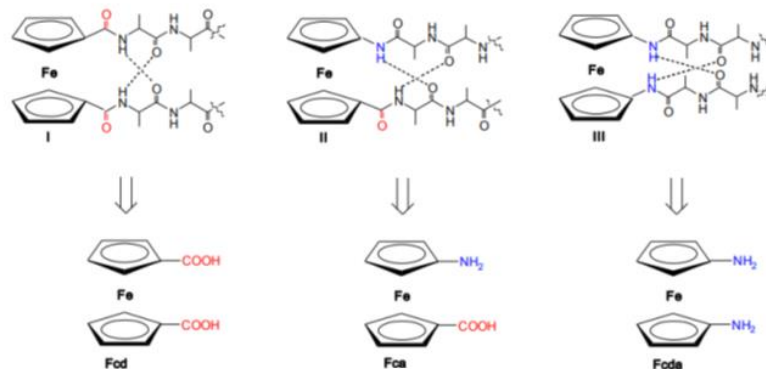
**Slika 3.** Struktura  $\beta$ -okreta (Berg i sur., 2013)



Protein-protein interakcije ostvaruju se smatanjem peptida u jednu od konformacija sekundarne strukture van der Waalsovih interakcijama, hidrofobnim interakcijama te vodikovim i ionskim vezama (Berg i sur., 2013). Peptidomimetici se pripremaju na različite načine, od kojih se svi temelje na principu mimikrije sekundarne strukture proteina: ugrađivanjem nepeptidnih kalupa u peptidnu okosnicu, zamjenjivanjem peptidnih veza s nepeptidnim analogima, ciklizacijom glavnog lanca peptida, konjugacijom aminokiselinskih ostataka s drugim malim molekulama te brojni drugi (Giannis i Kolter, 1993). Budući da je cilj peptidomimetika oponašanje elemenata sekundarne strukture, kao mimetici  $\alpha$ -uzvojnice koriste se male molekule, ferocenski peptidi, peptoidi i  $\beta$ -peptidi, a kao mimetici  $\beta$ -nabrane ploče koriste se peptidi s umetnutim molekulskim kalupima te aciklički i ciklički peptidi (Ross i sur., 2010). Najviše su istraživani peptidomimetici koji su biološki aktivni i imaju mogućnost vezanja na različite receptore, stabilni su na djelovanje proteolitičkih enzima i metaboličkih transformacija, a priređeni su iz  $\beta$ -aminokiselina i nazivaju se  $\beta$ -peptidima. Upravo zbog svojih svojstava koriste se u dizajniranju peptidnih cjepiva za autoimune bolesti te istraživanju antimikrobnih peptidomimetika i inhibitora proteaza (Rapić i Kovačević, 2012).

### 2.3. Ferocenski konjugati s aminokiselinama

Svojstva peptida mogu se ograničiti ugrađivanjem određenih ferocenskih kalupa u strukturu peptida, s ciljem pripreme peptidnih mimetika. Primjerice, ferocen-1,1'-disupstituirani peptidi omogućuju ograničavanje interakcija peptida s određenim nepoželjnim receptorima, a isto tako i konformacijske slobode. Zahvaljujući nastajanju intramolekulskih vodikovih veza (IHB) između peptidnih lanaca, pripremaju se konformacijski ograničeni peptidi, a za nastajanje IHB-a odgovorna je udaljenost između dva ciklopentadienilna prstena u molekulama ferocena, koja iznosi 3,3 Å. Tvorba elemenata sekundarne strukture kanalizira se ovisno o ferocenskim prekursorima koji se ugrađuju u peptidnu strukturu, stoga je ferocenske konjugate, ovisno o građi samih kalupa, moguće tvoriti iz tri skupine 1,1'-disupstituiranih ferocenskih peptida: **I.** Fn-[CO-(AA)<sub>m</sub>-OMe]<sub>2</sub>, izvedeni iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (Fcd), **II.** Y-(AA)<sub>n</sub>-Fca-(AA)<sub>m</sub>-OMe, izvedeni iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca) te **III.** Fn-[NH-(AA)<sub>m</sub>-Y]<sub>2</sub>, izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda) (Slika 4) (Kirin i sur., 2006).

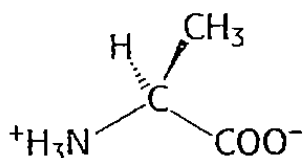


**Slika 4.** Ferocenski peptidi **I-III** izvedeni iz Fcd, Fca, Fcda (isprekidane linije označavaju IHB) (prema Kovačević, 2014)

Postoji jako mali broj radova koji opisuje izvedene ferocenske konjugate skupine **III**, međutim ferocenski konjugati skupine **I** i **II** puno su bolje istraženi. Disubstituirani ferocenski derivati, u kojima se esteri aminokiselina ili peptida konjugiraju u oba ciklopentadienilna prstena, tvore snažne intramolekulske vodikove veze, na koje ne utječu interakcije s ostalim molekulama (Appoh i sur., 2004). Ferocenske peptide izvedene iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda) prvi su istražili Kraatz i sur. tako da su prvotno sintetizirali Fcda te je daljnjim istraživanjima zaključeno da, zahvaljujući nastajanju intramolekularnih vodikovih veza koje tvore dva IHB prstena, konjugati koji su u čvrstom stanju, poprimaju sekundarnu strukturu u obliku  $\beta$ -okreta (Kraatz, 2005). Barišić i Kovačević iz Laboratorija za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, provele su daljnja istraživanja s ferocenskim konjugatima skupine **III** te su, na temelju rezultata, dokazale da raspored vodikovih veza u otopini ovisi o homokiralnosti peptida, budući da velike razlike u konformacijskim svojstvima ovise o kiralnosti derivata, odnosno da različiti IHB-prstenovi nastaju promjenom *N*-terminalnih skupina i kiralnosti prirodnih aminokiselina (Kovačević i sur., 2017). Zahvaljujući mogućnosti stvaranja trodimenzionalnih strukturnih tvorbi te svojstvu kiralnih redoks-aktivnih receptora, ferocenski biokonjugati pronalaze široku primjenu. Koriste se za istraživanje reakcija prijenosa elektrona u biološkim sustavima, osiguravanje odgovarajućih mjesta vezanja, što omogućuje nastajanje umjetnih receptora za selektivno prepoznavanje, a primjenu nalaze i u peptidnim nukleinskim kiselinama (analozi DNA) (Moriuchi i Hirao, 2006). Kako bi se utvrdio utjecaj pojedinih aminokiselina na elemente sekundarne strukture proteina, potrebno je istražiti afinitet aminokiselina prema zauzimanju pojedinih elemenata sekundarne strukture, kao i utjecaj cjelovite polipeptidne sekvence (Kovačević i sur., 2015).

### 2.3.1. Alanin

Alanin (Ala) ili 2-aminopropionska kiselina neesencijalna je aminokiselina i dobiva se reduktivnom aminacijom piruvata, a sudjeluje u reakcijama ciklusa limunske kiseline, glikolize i glukoneogeneze. Građena je tako da kao pobočni ogranak ima nepolarnu metilnu skupinu -CH<sub>3</sub> (Slika 5) te dolazi u obliku  $\alpha$  i  $\beta$  enantiomera (Berg i sur., 2013). Budući da većina proteina sadrži alanin u velikom udjelu, razgradnjom proteina mišića, alanin se u velikim količinama oslobađa u krvotok te se u jetri konvertira u glukozu, koja služi kao izvor energije (Litwack, 2018). Alanin je proteinogena aminokiselina koja je najviše podložna stvaranju sekundarne strukture proteina u obliku  $\alpha$ -uzvojnice, pri čemu se smanjuje konformacijska sloboda glavnoga lanca u nesmotanom stanju, zahvaljujući nepolarnoj metilnoj skupini u pobočnom ogranku alanina (O'Neil i DeGrado, 1990).

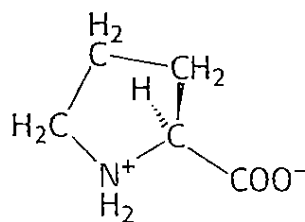


**Slika 5.** Strukturna formula alanina (Ala) (Berg i sur., 2013)

Marqusee i sur. (1989) proveli su eksperiment kojim su utvrdili veliki potencijal individualnih aminokiselinskih ostataka alanina u oblikovanju  $\alpha$ -uzvojnice, budući da nema interakcija pobočnih lanaca koje bi ih mogle stabilizirati. Takav potencijal utvrđen je zbog nastanka  $\alpha$ -uzvojnice u peptidima koji su sadržavali samo alanin te peptidima koji su, uz alanin, sadržavali manji broj nabijenih aminokiselinskih ostataka (lizin, glutamat), zbog čega se može naslutiti uloga alanina u stabiliziranju kratkih uzvojnica.

### 2.3.2. Prolin

Poput alanina, prolin (Pro) ili pirolidin-2-karboksilna kiselina također je neesencijalna i proteinogena aminokiselina. Prolin je građen u obliku prstena te sadrži alifatski pobočni ogranak koji, uz dvije vezane alkilne skupine, posjeduje i aaminski dušik. Takva građa ograničava konformacijsku slobodu prolina u peptidima (Slika 6) (Berg i sur., 2013). Kut torzije na taj je način ograničen na manje područje, a to negativno utječe na stvaranje sekundarne strukture peptida koji sadrže prolin, kao i na stabilnost same molekule peptida.



**Slika 6.** Strukturna formula prolina (Berg i sur., 2013)

Istraživanja su pokazala kako je peptid stabilniji, ukoliko se prolin nalazi na *N*-terminalnom kraju peptida koji ima konformaciju  $\alpha$ -uzvojnice (Lee i sur., 2014). S druge strane, aminokiselinski ostatci prolina u cikličkim, globularnim i linearnim proteinima tvore sekundarnu strukturu peptida u obliku  $\beta$ -okreta (Tyndall i sur., 2005).  $\beta$ -okret nužan je za brojne biološke aktivnosti prolina. Primjerice, enzimskom hidroksilacijom prolina dobiva se hidroksiprolin, aminokiselina nužna u strukturi kolagena, koji je neophodan je u građi kože, hrskavice i kostiju (Ananthanarayanan i Cameron, 1988). Također, prolin posjeduje zaštitnu i vezivnu funkciju. Budući da se nalazi u slini, veže i neutralizira štetne tanine iz hrane i pića, a sprječava i proteolitičku degradaciju (Kay i sur., 2000; Vanhoof i sur., 1995). Biološki važne funkcije prolina očituju se i u sposobnosti prolina koji, zbog utjecaja koji ima na sekundarnu strukturu peptida, povećava sposobnost prodiranja antimikrobnih peptida u stanicu te sprječava lizu stanice prilikom prolaska antimikrobnih peptida kroz staničnu membranu (Lai i sur., 2019; Mishra i sur., 2018). Isto tako, ova aminokiselina ima važnu ulogu u staničnom rastu, staničnoj bioenergetici, redoks signalizaciji te reakciji na oksidativni i osmotski stres (Liu i sur., 2017).

### 2.3.3. Pro-Ala dipeptid

Sekvence koje sadrže prolin i alanin imaju veću sposobnost pokretljivosti, za razliku od sekvenci koje sadrže samo alanin ili samo prolin. Između ostalog, pokazuju odsutnost sekundarne i tercijarne strukture te su dobro topljive u puferima. Takve sekvence utječu i na biosintetske polimere konjugirane s proteinima, stoga proteini dobivaju brojna poželjna svojstva: produljeno vrijeme poluživota u plazmi, ovisno o duljini lanca Pro-Ala sekvence, visoku stabilnost i topljivost, potpunu biološku funkcionalnost *in vitro*... Sekvence Pro-Ala nastaju kada se u sekvencu poli-Ala ugrade aminokiselinski ostatci prolina, pri čemu sekundarna struktura  $\alpha$ -uzvojnice više nije stabilizirana aminokiselinskim ostacima alanina, jer dolazi do ometanja vodikovih veza u sekvenci (Binder i Skerra, 2017; Breibeck i Skerra, 2017; Turner i sur., 1993).

#### 2.3.4. Dosadašnja istraživanja

Proučavanjem sekundarne strukture proteina i razumijevanjem važnog utjecaja sekundarne strukture na brojna svojstva proteina istraživanja se usmjeravaju na postupke kojima se dodatno mogu poboljšati ta svojstva. Novija se istraživanja temelje na peptidima izvedenim iz ferocena te utjecaju tako konjugiranih peptida na konformacijsku stabilnost, fleksibilnost, ali i terapijsko djelovanje proteina.

Primjerice, Kovačević i sur. (2017) proučavali su kiralne peptide koji sadrže ferocen-1,1'-diamin kao induktor okreta. Prvotno je sintetiziran niz peptida koji sadrže homo- i heterokiralne Ala-Pro sekvence, konjugirane s ferocen-1,1'-diaminom. Nastali su peptidomimetici zatim detaljno analizirani IR-, NMR- i CD-spektroskopijom, kako bi se ustanovio utjecaj kiralne okosnice i *N*- terminalne skupine (Boc/Ac) novosintetiziranih peptidomimetika na njihova konformacijska svojstva. Drugim riječima, analiziran je utjecaj *N*- terminalnih Ac ili Boc skupina te kiralnosti aminokiselina na raspodjelu intramolekularnih vodikovih veza. Utvrđeno je da homokiralni peptidi, koji imaju najstabilniju konformaciju, tvore desetoročlane i trinaesteročlane prstenove, povezane intermolekulskim vodikovim vezama. S druge strane, zajedničko obilježje najstabilnijih heterokiralnih peptida bilo je stvaranje struktura sličnih sekundarnoj strukturi okreta. Takve strukture tvorile su sedmeročlane prstenove, povezane intramolekulskim vodikovim vezama te šesnaesteročlane prstenove, povezane intermolekulskim vodikovim vezama. Primijećeno je kako je utjecaj zamjene dviju *N*-terminalnih skupina na preraspodjelu vodikovih veza nešto veći kod homokiralnih, nego kod heterokiralnih derivata te da homokiralni peptidi, koji sadrže pirimidinske dijelove, tvore komplekse s dvovalentnim metalnim kationima ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) u omjeru 1:1.

Biološka aktivnost na HeLa i MCF-7 tumorskim stanicama ispitana je na konjugatima 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca) i prolina. Kako bi se istražio utjecaj prolina, dobro poznatog induktora okreta, na konformacijska svojstva malih molekula organometalnih peptida, prvotno su pripremljeni novi biokonjugati: Y-Fca-Pro-OMe (1, Y = Ac; 2, Y = Boc; Fca=1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina) i Y-Pro-Fca-OMe (3, Y = Boc; 4, Y = Ac; Fca=1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina). Takvi peptidi podvrgnuti su detaljnoj spektroskopskoj analizi (CD, NMR, IR) te su u otopini ustanovljene konformacijske strukture navedenih peptida. Utvrđena je i konformacija peptida Y-Pro-Fca-OMe (3, Y = Boc) u čvrstom agregatnom stanju (kristalna struktura). Biološka je evaluacija za cilj imala pronaći vodeće strukture za buduću pretragu optimalnih kandidata za lijekove. Ovim je eksperimentom

ispitana sposobnost pripremljenih konjugata na inhibiciju rasta MCF-7 stanica tumora dojke, koje posjeduju receptore osjetljive na estrogen, te HeLa tumorskih stanica raka grlića maternice. Otkriveni su skromni ili nikakvi citotoksični učinci, stoga antiproliferativno djelovanje takvih peptida nije zadovoljavajuće. Međutim, rezultati su vrijedni kao dobra polazišna točka za daljnje usmjeravanje istraživanja prema odgovarajućim analogima s poboljšanim biološkim svojstvima (Kovačević i sur., 2014).

Pristup, koji se bazira na ugrađivanju različitih ferocenskih uzoraka u okosnicu peptida, pri čemu se inducira stvaranje okreta, a reducira konformacijska fleksibilnost, koristi se i u sljedećem eksperimentu. U ovom je istraživanju konjugiran metil-1'-aminoferocen-1-karboksilat s homo- i heterokiralnim Pro-Ala dipeptidima, s ciljem ispitivanja potencijala stvaranja okreta i antiproliferativnih svojstava peptidomimetika. Detaljne spektroskopske analize CD-om, IR-om, NMR-om, X-zrakama, kao i DFT (engl., Density Functional Theory) analiza, pokazali su da su heterokiralni konjugati prikladniji za formiranje  $\beta$ -okreta, a analizama vitalnosti stanice, klonogenosti te smrti stanice dokazano je da homokiralni Boc-peptid ima najveći biološki potencijal. Preciznije, za razliku od homokiralnih Pro-Ala sekvenci, koje iniciraju fleksibilniju konformaciju, heterokiralna Pro-Ala sekvenca inicira kompleksnije strukture, koje su građene od intralančano povezanih desetoročlanih prstenova te interlančano povezanih deveteročlanih prstenova. Također, ispitana je i biološka aktivnost na HeLa i MCF-7 tumorske stanice. Testirana su četiri peptida te je Boc-peptid pokazao najveći inhibicijski učinak na tumorske HeLa i MCF-7 stanice, kao i najveći potencijal u uzrokovanju apoptoze HeLa stanica te sposobnost preživljavanja kraj tretiranih HeLa stanica. Zaključno, dokazano je da Boc-peptid može poslužiti za razvitak antitumorskih lijekova te kao baza daljnjim istraživanjima (Kovačević i sur., 2021).

Valjano je i spomenuti važnost Ala-Pro sekvence u sintezi, biološkoj evaluaciji te konformacijskoj analizi tripeptida, izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina. Sintetizirana su dva nova ferocenska tripeptida: Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc i Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc i opisana je njihova konformacijska struktura (CD-, NMR- i IR-spektroskopija te antimikrobna (disk-difuzijska metoda i metoda razrjeđivanja hranjivog bujona) i antioksidacijska aktivnost. Konformacijska je analiza pokazala da oba tripeptida tvore intramolekulsku vodikovu vezu, koja dovodi do pojave  $\beta$ -okreta. Antimikrobna aktivnost sintetiziranih tripeptida nije polučila zadovoljavajuće rezultate u primijenjenoj koncentraciji, no zaključeno je da bi određene strukturne modifikacije te povećanje lipofilnosti, koja je glavni preduvjet za njihovu biološku aktivnost, poboljšali antimikrobnu aktivnost tripeptida, ali i da

antimikrobna aktivnost uvelike ovisi o različitim čimbenicima: korištenom otapalu, osobinama ciljane stanice (bakterijske/kvaščeve stanice, gram-pozitivne/gram-negativne bakterije) te uvjetima odvijanja eksperimenta (hidrofilnost, koncentracija, temperatura, pH). Analizom antioksidacijskog djelovanja potvrđeno je da ferocen ima veliku ulogu u pojačavanju antioksidacijskog učinka, zahvaljujući sposobnosti hvatanja radikala, smanjenju oksidacijskog potencijala te bi potencijalno mogao doprinijeti zaštiti DNA od oksidacije. Isto tako, antioksidativnom djelovanju sintetiziranih tripeptida značajno doprinose aminokiseline u njihovoj strukturi, a osobito prolin, čija antioksidacijska svojstva štite biljne, ali i ljudske stanice (Ivančić i Kovač, 2021).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

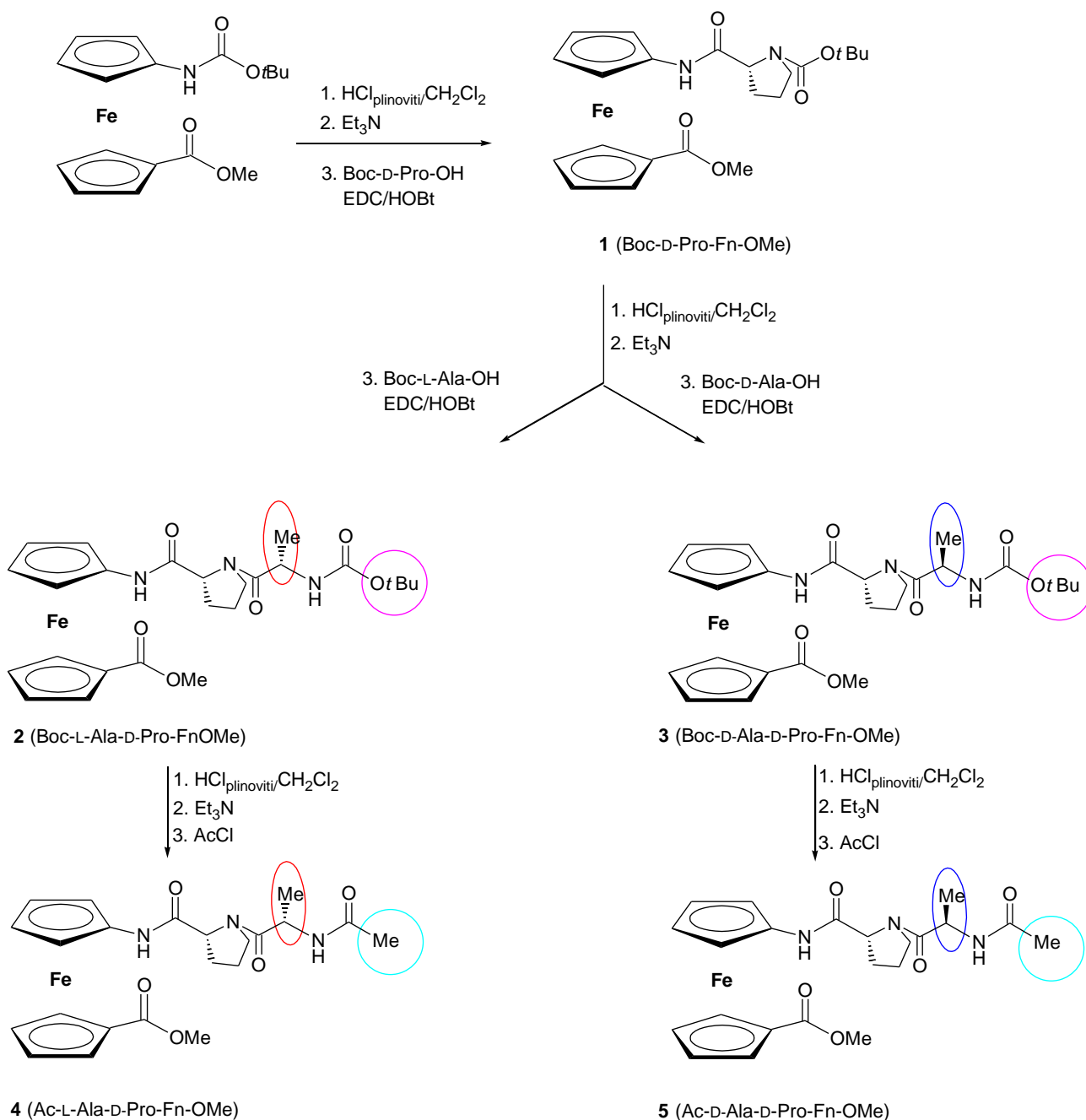
#### 3.1. Materijali i metode

Otapala i kemikalije, korišteni u sintezi, pročišćeni su prema standardnim protokolima (Perrin i Armarego, 1988) te je utvrđena analitička čistoća. Tankoslojna kromatografija (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel), s fluorescentnim indikatorom (254 nm), primijenjena je za praćenje tijekom reakcija i kontrolu čistoće sintetiziranih spojeva. Detekcija neferocenskih spojeva provedena je pomoću UV-svjetlosti, pri valnoj duljini od 254 nm, te ninhidrinom, uz zagrijavanje. Nastali produkti pročišćeni su uporabom smjese diklormetan/etil-acetat, kao eluensa tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu („Merck“, Kieselgel 60 HF<sub>254</sub>). Karakterizacija sintetiziranih spojeva provedena je pomoću tekućinske kromatografije visoke razlučivosti sa spektrometrijom masa (HPLC-MS), nuklearnom magnetskom rezonancom (NMR) te infracrvenom spektroskopijom (IR). Tališta su određena na Reichert Thermovar HT 1 BT 11 i nisu korigirana. UV/Vis- i CD-spektri snimljeni su na CD-spektrofotometru Jasco-810 u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i DMSO. Na spektrofotometru PerkinElmer Spectrum Two u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> snimljeni su IR-spektri uzoraka. Maseni spektri izmjereni su ESI ionizacijom (engl., Electrospray ionization) na Agilent Technologies 6410 Triple Quadrupole Mass Spectrometer. <sup>13</sup>C-NMR- i <sup>1</sup>H-spektri određeni su u CDCl<sub>3</sub> na spektrometru Bruker AV600, uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm. DFT-računi načinjeni su pomoću programa Gaussian 09/DFT (B3LYP, MO6 i MO6-2X).

#### 3.2. Postupak pripreve ferocenskih peptida

Ciljni ferocenski konjugati (**2**, **3**, **4** i **5**) pripremljeni su postupcima prikazanim na Shemi 1. Sinteza Boc-Fca opisana je u literaturi (Barišić i sur., 2002) te spektroskopski podatci odgovaraju literaturnima.





**Shema 1.** Sinteza biokonjugata 2 - 5

### 3.2.1. Postupak pripreve dipeptida Boc-D-Pro-Fn-OMe (1)

Ferocenska aminokiselina Fca (1 g; 2,8 mmol), koja je zaštićena Boc-skupinom, otopi se u diklormetanu, ohladi na 0 °C te se izloži djelovanju plinovitog HCl-a. Slijedi 30 minuta miješanja u ledenoj kupelji, a potom otparavanje na rotacijskom vakuum-uparivaču. Nastaje

hidroklorid koji se suspendira u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> te se tretira sa suviškom Et<sub>3</sub>N (pH~9). Za kopulaciju nastalog slobodnog amina koristi se Boc-D-Pro-OH (1,18 g; 5,5 mmol), uz primjenu standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon sat vremena miješanja reakcijska se smjesa ispire zasićenom vodenom otopinom NaHCO<sub>3</sub>, 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl-a. Organski se sloj osuši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari do suhog. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu, uz eluens CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOAc = 5:1.

### **Boc-D-Pro-Fn-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>)**  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3419 sr, 3405 sr (NH<sub>slobodni</sub>), 3290 sr, 3234 sl (NH<sub>asocirani</sub>), 1706 j (C=OCO<sub>OMe</sub>), 1694 j (C=OBoc), 1655 j (C=OCONH), 1561 j (amid II).

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

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

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

3.2.2. Postupak pripreve tripeptida Boc-L-Ala-D-Pro-Fn-OMe (**2**) i Boc-D-Ala-D-Pro-Fn-OMe (**3**)

Boc-zaštićen dipeptid **1** (800 mg; 1,75 mmol) otopi se u diklormetanu te se, nakon hlađenja na 0 °C, izloži djelovanju plinovitog HCl-a. Slijedi 30 minuta miješanja u ledenoj kupelji, a potom otparavanje na rotacijskom vakuum-uparivaču. Nastaje hidroklorid koji se suspendira u  $CH_2Cl_2$  te se tretira sa suviškom  $Et_3N$  (pH~9). Za kopulaciju nastalog slobodnog amina koristi se Boc-L-Ala-OH (662 mg; 3,5 mmol) i Boc-D-Ala-OH (662 mg; 3,5 mmol), uz primjenu standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon sat vremena miješanja reakcijska se smjesa ispire zasićenom vodenom otopinom  $NaHCO_3$ , 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl-a. Organski se sloj osuši bezvodnim  $Na_2SO_4$  i upari do suhog. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu, uz eluens  $CH_2Cl_2:EtOAc = 5:1$ .

**Boc-L-Ala-D-Pro-Fn-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<sub>2</sub>-γ, Pro); 17,74 (CH<sub>3</sub>-Ala).

**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.

**Boc-D-Ala-D-Pro-Fn-OMe (3):**

*t*<sub>t</sub> = 184 °C; *R*<sub>f</sub> = 0,78 (EtOAc).

**IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)** *v*<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>: 3431 j (NH<sub>slobodni</sub>), 3303 sr (NH<sub>asocirani</sub>), 1707 j (C=OCO<sub>OMe</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>)** δ/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-α(Pro)<sub>cis</sub>, H-3<sub>cis</sub>]; 4,65 [s, 1,66H, CH-α(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>-γ' (Pro)<sub>trans</sub>]; 3,60 [td, 0,86H, CH<sub>2</sub>-γ(Pro)<sub>trans</sub>]; 3,36 [m, 0,14H, CH<sub>2</sub>-γ' (Pro)<sub>cis</sub>]; 3,27 [m, 0,14H, CH<sub>2</sub>-γ(Pro)<sub>cis</sub>]; 2,72-2,68 [m, 0,56H, CH<sub>2</sub>-β (Pro)<sub>cis</sub>, CH<sub>2</sub>-δ (Pro)<sub>cis</sub>, CH<sub>2</sub>-δ' (Pro)<sub>cis</sub>, CH<sub>2</sub>-β' (Pro)<sub>cis</sub>]; 2,48 [m, 0,86H, CH<sub>2</sub>-β (Pro)]; 2,19-2,17 [m, 0,86H, CH<sub>2</sub>-δ (Pro)<sub>trans</sub>]; 2,06-2,02 [m, 0,86H, CH<sub>2</sub>-δ' (Pro)<sub>trans</sub>]; 1,93-1,91 [m, 0,86H, CH<sub>2</sub>-β' (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>)** δ/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>qBoc cis</sub>); 79,99 (C<sub>qBoc 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-α, Pro<sub>cis</sub>); 60,48 (C-α, 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>-δ, Pro<sub>trans</sub>); 46,76 (CH<sub>2</sub>-δ, Pro<sub>cis</sub>); 31,25 (CH<sub>2</sub>-β, 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>-β, Pro<sub>trans</sub>); 25,34 (CH<sub>2</sub>-γ, Pro<sub>trans</sub>); 22,27 (CH<sub>2</sub>-γ, 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 pripreve tripeptida Ac-L-Ala-D-Pro-Fn-OMe (**4**) i Ac-D-Ala-D-Pro-Fn-OMe (**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 miješanja u trajanju od 20 minuta, u ledenoj kupelji, otapalo se upari, a hidroklorid peptida **2**, odnosno **3**, koji pritom nastaje, suspendira se u 8 mL suhog diklormetana te otopi, uz dodatak Et<sub>3</sub>N (1,67 mL; 12,1 mmol). Ovako pripremljenoj otopini, prethodno ohlađenoj na 0 °C, uz miješanje, oprezno se dokapa acetil-klorid (649 µL; 9,12 mmol) te, nakon 15 minuta miješanja pri 0 °C, slijedi izlivanje reakcijske smjese u vodu i višestruka ekstrakcija diklormetanom. Prethodno izdvojeni organski sloj ispere se zasićenom vodenom otopinom NaCl-a, a zatim osuši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari do suhog. Nastali sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu, uz eluens EtOAc.

#### **Ac-L-Ala-D-Pro-Fn-OMe (4):**

*R<sub>f</sub>* = 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>)** *v*<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>: 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>)** δ/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-α (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>-δ (Pro)]; 3,78 (s, 3H, COOMe); 3,51 [q, 1 H, *J* = 3,5 Hz, *J* = 3,5 Hz, CH<sub>2</sub>-δ' (Pro)]; 2,42-2,41 [m, 1H, CH<sub>2</sub>-β (Pro)]; 2,14-2,12 [m, 1H, CH<sub>2</sub>-γ (Pro)]; 2,05-2,03 [m, 2H, CH<sub>2</sub>-γ' (Pro), CH<sub>2</sub>-β' (Pro)]; 1,93-1,91 [m, 1H, CH<sub>2</sub>-β' (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>)** δ/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-α, Pro); 51,76 (CH<sub>3</sub>-COOMe);

47,69 (CH<sub>Ala</sub>); 47,39 (CH<sub>2</sub>-δ, Pro); 28,39 (CH<sub>2</sub>-β, Pro); 24,71 (CH<sub>2</sub>-γ, 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-Fn-OMe (5):**

*t*<sub>t</sub> = 57 °C; *R*<sub>f</sub> = 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>)** *v*<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>: 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>)** δ/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-α (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 *cis*); 2,00 (s, 2,6H, CH<sub>3</sub>-Ac *trans*); 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 *trans*); 1,36 (d, *J* = 6,9 Hz, 0,55H, CH<sub>3</sub>-Ala *cis*).

**<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 *trans*); 51,74 (CH<sub>3</sub>-COOMe *cis*); 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 *trans*); 22,84 (CH<sub>2</sub>-γ, Pro<sub>cis</sub>); 22,27 (CH<sub>3</sub>-Ac *cis*); 18,40 (CH<sub>3</sub>-Ala *trans*); 16,46 (CH<sub>3</sub>-Ala *cis*).

**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.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Uvod

Prirodni peptidi posjeduju brojne nedostatke koji su opisani u teorijskom dijelu ovog završnog rada, stoga su proučavani ferocenski biokonjugati, nastali kopulacijom 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca) s aminokiselinama alaninom i prolinom, a posljedično i utjecaj kiralnosti i zaštitnih skupina aminokiselina na konformacijska svojstva takvih biokonjugata. Dobiveni dipeptid **1** služi kao polazna točka za sintezu tripeptida **2** i **3** te **4** i **5**, a ovisno o prisutnosti zaštitnih skupina (Boc/Ac), tripeptidima su ispitane mogućnosti tvorbe intramolekulskih vodikovih veza (IHB), a samim time i mogućnost tvorbe sekundarnih peptidnih struktura. Sintetizirani tripeptidi pogodan su model za daljnja istraživanja o potencijalnom terapijskom učinku peptidomimetika.

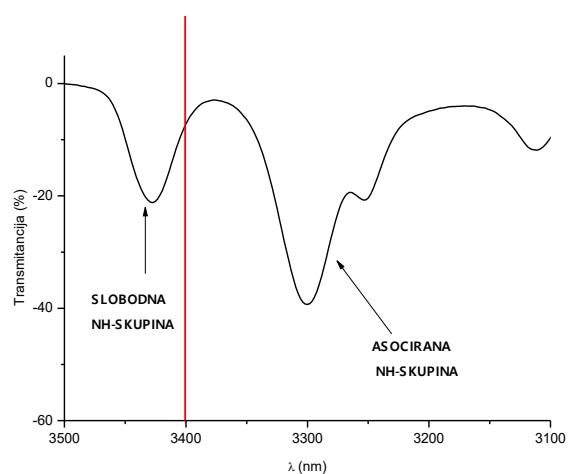
Peptid **1** priprema se tako da je prvo potrebno napraviti deprotekciju amino-skupine iz Fca, djelovanjem plinovitog HCl-a. Nastaje hidroklorid koji se obrađuje s Et<sub>3</sub>N, a zatim slijedi kopulacija slobodnog ferocenskog amina s Boc-D-Pro-OH primjenom standardne HOBt/EDC metode, pri čemu je dobiven peptid **1**.

Prema postupcima za deprotekciju i kopulaciju iz Boc-D-Pro-Fca-OMe (**1**) pripremljeni su tripeptidi **2-5**. Djelovanjem plinovitog HCl-a deprotektirane su terminalne amino-skupine Boc-dipeptida **1**, uz naknadnu obradu dobivenih hidroklorida s Et<sub>3</sub>N te su dobiveni odgovarajući nestabilni amini, koji su potom *in situ* kopulirani s prethodno aktiviranim Boc-zaštićenim aminokiselinama (L-Ala, D-Ala) u Boc-tripeptide **2**, uz iskorištenje od 89 % te **3**, uz iskorištenje 95 %. Njihovi su acetamidni analozi **4** i **5**, uz iskorištenje od 54%, odnosno 61%, pripremljeni djelovanjem AcCl na slobodne amine, nastale nakon deprotekcije odgovarajućih Boc-tripeptida prethodno opisanim postupkom (Shema 1).

Ovako sintetizirani tripeptidi sadrže heterokiralne (**2** i **4**) i homokiralne (**3** i **5**) Pro-Ala sekvence s različitim zaštitnim skupinama na svojim krajevima, stoga je provedena IR-, NMR- i CD-spektroskopska analiza dobivenih biokonjugata.

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

Infracrvena spektroskopija (IR) instrumentalna je metoda koja mjeri valnu duljinu i intenzitet apsorpcije infracrvenog zračenja te, identifikacijom funkcijskih skupina peptida, daje pouzdan uvid u konformacijski prostor peptida u otopini (Kong i Yu, 2007). Istezne frekvencije iznad  $3400\text{ cm}^{-1}$  pripisuju se slobodnim NH-skupinama, dok istezne frekvencije NH-skupina u području nižem od  $3400\text{ cm}^{-1}$  ukazuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama (Slika 7). Ispod  $1730\text{ cm}^{-1}$  utvrđene su i apsorpcijske vrpce karbonilnih esterskih skupina koje upućuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.



**Slika 7.** Prikaz područja istežnih frekvencija NH-skupina

Mjerenjem koncentracijski ovisnih IR-spektara određuje se intramolekulski ili intermolekulski karakter vodikove veze. Intermolekulske vodikove veze cijepaju se stupnjevitim razrjeđivanjem 50 mM otopine ispitivanog uzorka, a to uzrokuje znatno opadanje intenziteta signala intermolekulskih vodikovih veza u području nižem od  $3400\text{ cm}^{-1}$ . S druge strane, intenzitet intramolekulskih vodikovih veza razrjeđivanjem slabi proporcionalno slabljenju signala slobodne NH-skupine. Na temelju IR-spektara Boc- i Ac-zaštićenih tripeptida **2-5**, može se zaključiti da tripeptidi pokazuju po dvije vrpce različitih intenziteta, koje pripadaju slobodnim, odnosno asociranim NH-skupinama. Međutim, u Ac-heterokiralnom tripeptidu (**4**) dominira signal asociranih NH-skupina, a u Boc-tripeptidima (**2** i **3**) te Ac-tripeptidu (**5**) dominira signal slobodnih NH-skupina (Tablica 1).

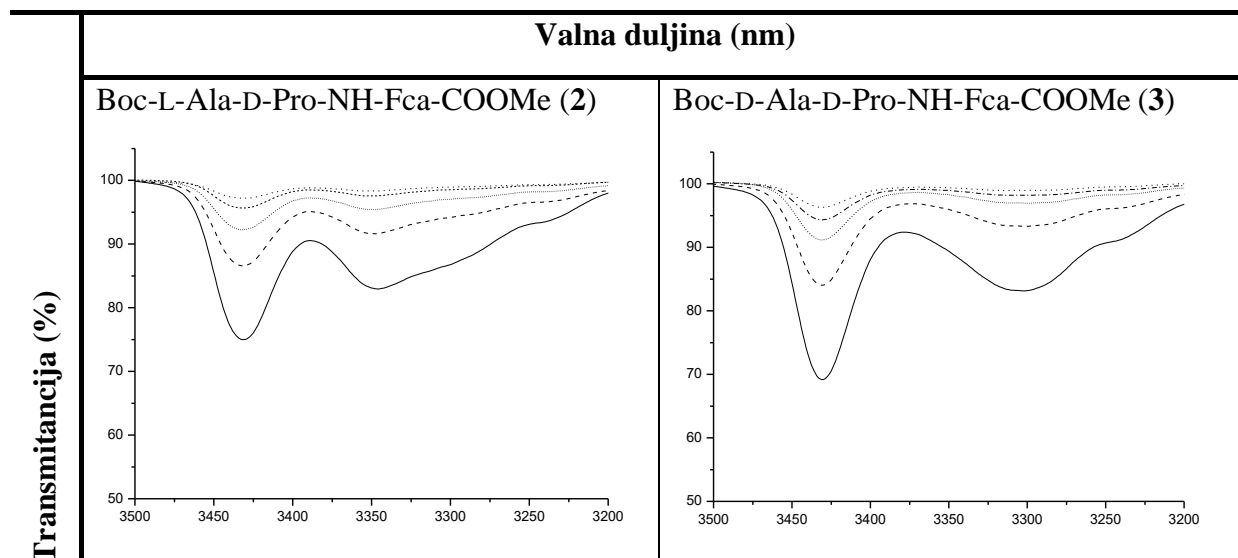


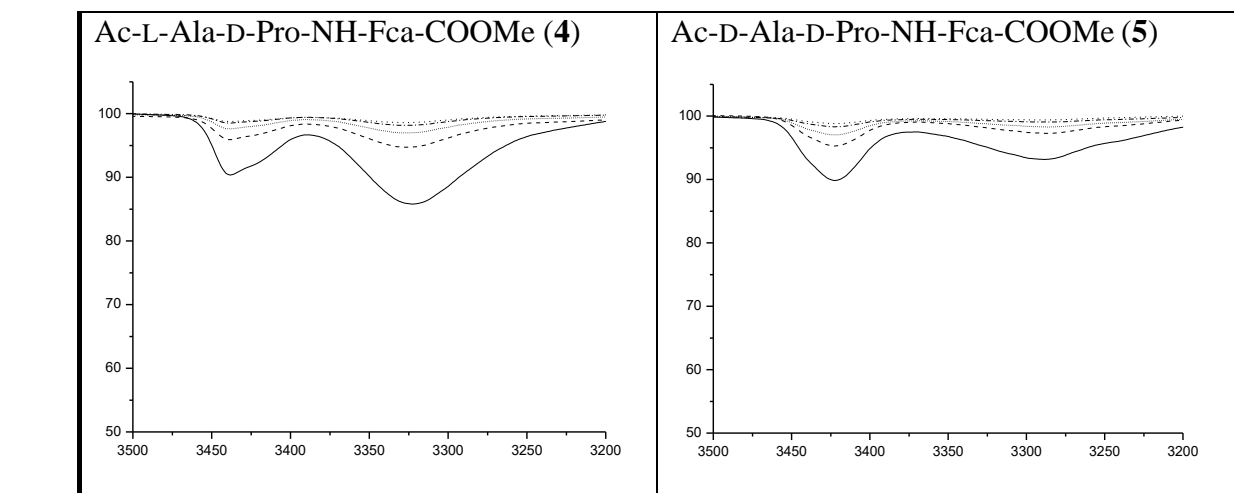
**Tablica 1.** Istezne vibracije<sup>[a]</sup> NH- i CO-skupina tripeptida 2-5

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  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $c = 5 \times 10^{-2}$  M.

Razrjeđivanjem diklormetanskih otopina analiziranih biokunjata 2-5 u koncentracijskom rasponu od  $5 \times 10^{-2}$  M do  $3 \times 10^{-3}$  M ispitana je njihova asocijacija, kako bi se utvrdio karakter apsorpcijskih vrpca  $< 3400 \text{ cm}^{-1}$  u IR-spektrima. Može se zaključiti da smanjenjem koncentracije proporcionalno slabe vrpce asociiranih i slobodnih NH-skupina u svim otopinama tripeptida (Tablica 2). Upravo je iz ovog razloga predložena stabilizacija ispitivanih tripeptida intramolekulskim vodikovim vezama (IHB).

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



<sup>[a]</sup>IR-spekttri 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].

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

Nuklearna magnetska rezonanca (NMR) metoda je koja omogućava određivanje kemijske strukture molekula, ali i omogućuje jasniji uvid u obrasce vodikovih veza, koji se prethodno predlažu IR-spektroskopijom. Ova metoda omogućuje razlikovanje pojedinih NH-skupina u molekuli, na temelju njihovih kemijskih pomaka. Na taj se način može utvrditi sudjeluju li u pojedine NH-skupine u vodikovim vezama, stoga ako NH-skupina ima kemijski pomak iznad 7 ppm, takva je skupina asocirana NH-skupina (sudjeluje u vodikovim vezama) (Kovačević i sur., 2017).

Ispitivanjem ranije opisanih ferocenskih peptida, slobodne NH-skupine utvrđene su pri višem polju ( $\delta < 7$  ppm), a NH-skupine koje sudjeluju u vodikovim vezama utvrđene su pri  $\delta > 7$  ppm. Ovisno o tome kakva je kemijska okolina donorske NH-grupe, moguća su i odstupanja.

Asignacija <sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR-spektara pripremljenih biokonjugata provedena je primjenom 2D NMR-spektroskopije (COSY, HMBC).

Visok kemijski pomak NH-skupina tripeptida (**2-5**) vezanih za ferocensku jezgru ( $\delta > 8$  ppm) upućuje na njihovu involviranost u tvorbi vodikovih veza. Na temelju kemijskih pomaka alaninskih amidnih protona ( $\delta < 7$  ppm), može se zaključiti da NH-skupine udaljene od ferocenske jezgre (**2-5**) nisu donori vodikove veze, dok kemijski pomaci prolinskih metilenskih skupina [ $\delta(C_{\alpha}/C_{\beta}) < \delta(C_{\gamma}/C_{\delta})$ ] te razlika u kemijskim pomacima C<sub>β</sub>- i C<sub>γ</sub>-atoma ( $\Delta\delta < 6$  ppm) sugerira da svi ispitivani biokonjugati zauzimaju trans-položaj oko imidne veze (Tablica 3).

Promatrajući NMR spektre Boc- i Ac-tripeptida (**2** i **4**) s konstituirajućim heterokiralnim Ala-Pro sekvencama, uočavaju se i signali cis-izomera. Omjer trans- i cis-izomera u peptidima **2** i **4** definiran je određivanjem omjera visine signala prolinskih ugljikovih atoma u  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrima te integriranjem površina amidnih protona u  $^1\text{H}$ -NMR-spektrima i, pri 298 K, iznosi 86:14.

**Tablica 3.** Kemijski pomaci ( $\delta$ )<sup>[a]</sup> amidnih protona u tripeptidima **2-5**

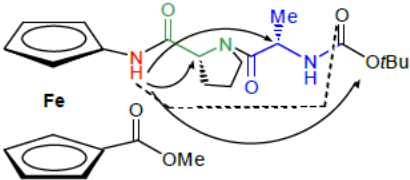
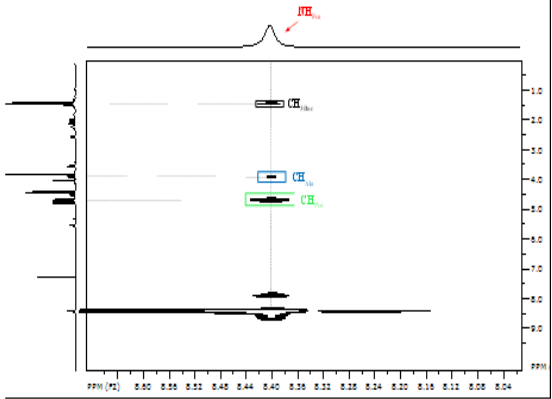
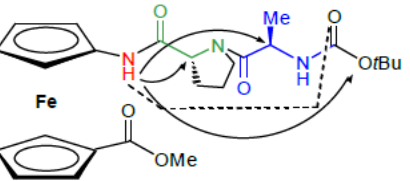
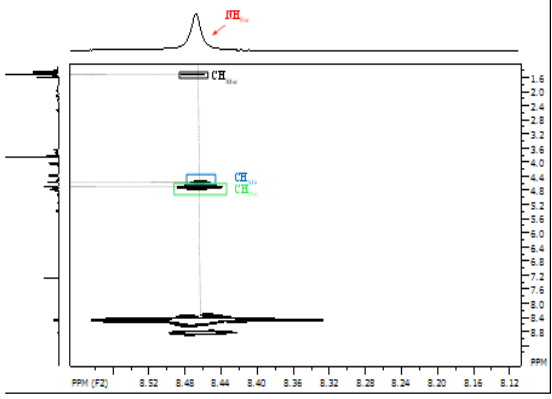
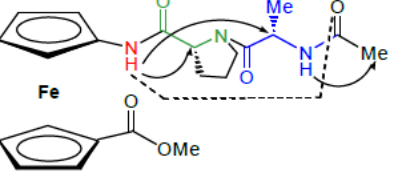
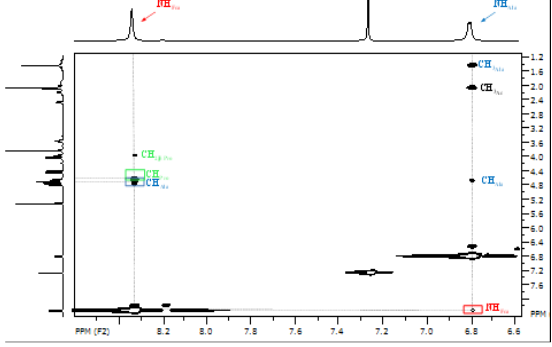
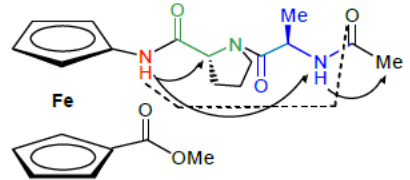
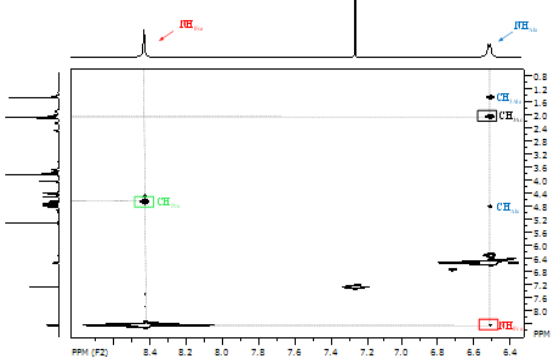
Spoj	Formula	(NH <sub>F<sub>n</sub></sub> ) <sub>trans</sub> $\delta$ (ppm)	(NH <sub>F<sub>n</sub></sub> ) <sub>cis</sub> $\delta$ (ppm)	(NH <sub>Ala</sub> ) <sub>trans</sub> $\delta$ (ppm)	(NH <sub>Ala</sub> ) <sub>cis</sub> $\delta$ (ppm)
<b>2</b>	Boc-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe	8,47 (0,86 H)	8,83 (0,14 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.

Karakter vodikovih veza može se bolje opisati koncentracijski (Prilog 1) i temperaturno (Prilog 2) ovisnim  $^1\text{H}$ -NMR-spektrima te titracijom 50 mM otopine konjugata kompeticijskim otapalom DMSO (Prilog 3).

U svim ispitivanim homokiralnim i heterokiralnim tripeptidima **2-5** provedena je NOESY NMR-spektroskopska analiza, koja se temelji na analizi  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOE kontakata u njihovim NOESY-NMR-spektrima, kako bi se bolje opisao karakter IHB-a, a samim time i potencijalna uloga prolina kao inicijatora  $\beta$ -okreta. Rezultati NOESY-NMR-spektroskopske analize pokazuju stabilizaciju tripeptida **2**, zahvaljujući intramolekulskoj vodikovoj vezi, u kojoj sudjeluju NH-skupina vezana na ferocen te karbonilna karbamatna skupina. Takva bi IHB mogla nastati unutar peptidnog lanca vezanog na gornji ferocenski prsten koja rezultira 10-članim IHB prstenom (NH<sub>F<sub>n</sub></sub>...OC<sub>Boc</sub>). Na sličan se način u homokiralnom tripeptidu **3** inducira  $\beta$ -okret, tako da NH-skupina, vezana na ferocen, tvori intralančanu vodikovu vezu s karbamatnom skupinom (NH<sub>F<sub>n</sub></sub>...OC<sub>Boc</sub>). S druge strane, kod Ac-analoga **4** i **5** uočena je promjena karaktera vodikovih veza u NOESY spektrima, zbog zamjene terminalne zaštitne skupine, stoga se na temelju NOE kontakata pretpostavlja da peptidi **4** i **5** uspostavljaju NH<sub>F<sub>n</sub></sub>...NH<sub>Ala</sub> vodikove veze koje tvore 8-člani IHB prsten (Tablica 4).

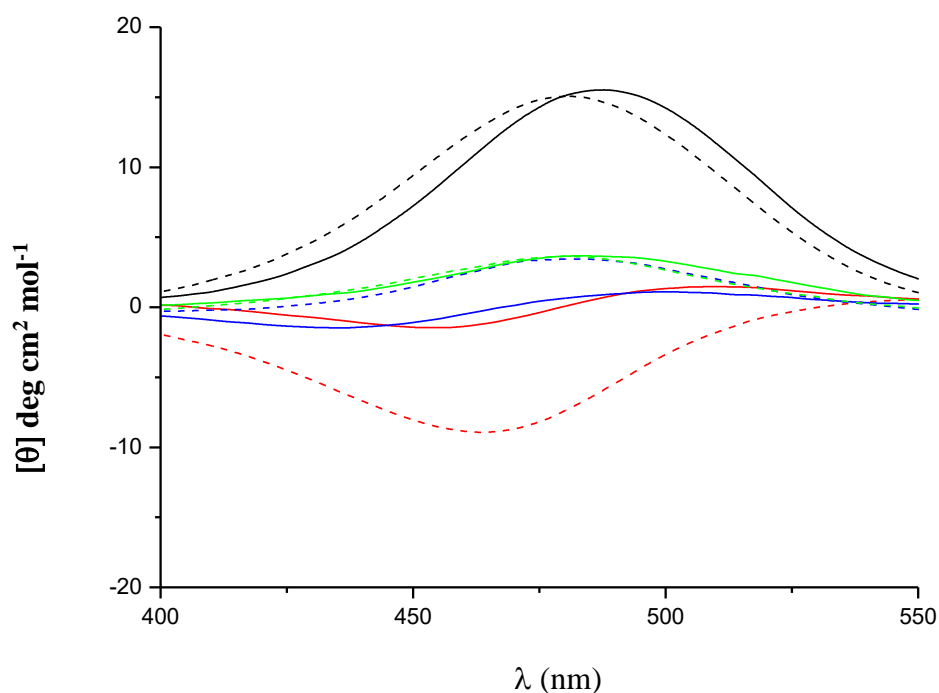
**Tablica 4.** Moguće konformacije peptida **2**, **3**, **4** i **5** (predložene IHB označene su isprekidanim crticama, a NOE kontakti strelicama)

Moguće konformacije peptida	NOE kontakti
<p><b>2</b> (Boc-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe)</p> 	
<p><b>3</b> (Boc-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe)</p> 	
<p><b>4</b> (Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe)</p> 	
<p><b>5</b> (Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe)</p> 	

#### 4.4. CD- spektroskopska analiza tripeptida 2-5

Budući da je pretpostavka IR- i NMR-spektroskopskih mjerenja bila tvorba intralančanih vodikovih veza  $\text{NH}_{\text{Fca}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc/Ac}}$ , koje dovode do  $\beta$ -okreta u peptidima **2** i **3** te  $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{N}_{\text{Ala}}$  8-članim prstenovima u peptidima **4** i **5**, kako bi se dodatno potvrdila prisutnost IHB-a, provedena je i CD-spektroskopska analiza. Cirkularni dikroizam (CD) spektroskopska je metoda koja omogućuje određivanje sekundarnih strukturnih elemenata u kiralnim peptidima. Ako se u kiralno peptidno okruženje uvede ferocenski kromofor ( $\lambda \sim 480$  nm), a prisutne su i jake IHB, inducira se Cottonov efekt, na čiji predznak utječu zaštitne skupine, otapalo te vrsta i slijed vezanih prirodnih aminokiselina (Kovačević i sur., 2017). Poznato je da vodikove veze induciraju kiralno uređenje oko ferocenskog kromofora ( $\lambda \sim 480$  nm), stoga se očekuje CD-aktivnost analiziranih peptida.

Kako je vidljivo iz Slike 8, CD-aktivnost peptida **2-5** u području ferocenskog kromofora potvrđuje pretpostavke o tvorbi uređenih struktura u otopini. Slabi intenziteti njihovih Cottonovih efekata ( $M_{\Theta} < 2000$  deg  $\text{cm}^2$   $\text{dmol}^{-1}$ ) odgovaraju ranije istraživanim kratkim ferocenskim peptidima. Pri tom homokiralni tripeptid **3** ima izraženiji Cottonov efekt.



**Slika 8.** Cottonovi efekti u CD-spektrima peptida **2-5**

<sup>[a]</sup>CD-spekttri mjereni su u diklormetanu [ $c = 5 \times 10^{-3}$  M (puna crta)] i uz dodatak 20 % DMSO (isprekidana crta). (–) = **2**, (–) = **3**, (–) = **4**, (–) = **5**.

Titracija 5 mM otopine peptida s kompeticijskim otapalom (DMSO) omogućuje ispitivanje jakosti prisutnih IHB-a. Ukoliko u otopini postoje visokouređene strukture, dodatak DMSO-a neće zamjetno utjecati na intenzitet Cottonovog efekta. Iz Slike 8 vidljivo je da dodatak DMSO-a ne utječe na jakost CD-signal (redukcija signal je ~5 %).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Tripeptidi **2-5** pripremljeni su u visokom iskorištenju.
2. U IR-spektrima tripeptida **2-5** pronađene su dvije vrpce koje odgovaraju NH-skupinama: slobodnim i asociranim NH-skupinama.
3. U Ac- heterokiralnom tripeptidu (**4**) dominira signal asociranih NH-skupina, a u Boc-tripeptidima (**2 i 3**) te Ac-tripeptidu (**5**) dominira signal slobodnih NH-skupina.
4. Omjer intenziteta slobodne i asocirane NH-skupine ne mijenja se razrjeđivanjem diklormetanske otopine tripeptida **2-5**, što je jaka indikacija njihove stabilizacije intramolekulskim vodikovim vezama (IHB).
5. Visok kemijski pomak NH-skupina podržava vodikove veze indicirane nalazima IR-spektroskopije.
6. Koncentracijski i temperaturno ovisni NMR-spektri potvrđuju intramolekulski karakter vodikovih veza koji je predložen IR-spektroskopijom.
7. DMSO-titracija otopina tripeptida **2-5** ne ukazuje na bitnije promjene kemijskog pomaka NH-skupina, što se tumači sudjelovanjem u jačoj IHB.
8. NOE-kontakti sudjelujućih amidnih skupina Boc-zaštićenih tripeptida **2 i 3** sugeriraju tvorbu intralančane  $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$  IHB, koja rezultira 10-članim IHB prstenom, dok se kod Ac analoga **4 i 5** uspostavljaju  $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{NH}_{\text{Ala}}$  vodikove veze koje tvore 8-člani IHB prsten.
9. CD-aktivnost tripeptida **2-5** u području ferocenskog kromofora potvrđuje pretpostavke o tvorbi uređenih struktura u otopini.

## 6. POPIS LITERATURE

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) Molecular biology of the cell. 4. izd., Garland Science, New York. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg023>

Ananthanarayanan VS, Cameron TS (1988) Proline-containing  $\beta$ -turns. *Int J Pept Protein Res* **31**, 399-411. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1988.tb00049.x>

Appoh FE, Sutherland TC, Kraatz HB (2004) Changes in the hydrogen bonding pattern in ferrocene peptides. *J Organomet Chem* **689**, 4669–4677. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2004.04.017>

Astruc D (2016) Why is ferrocene so exceptional? *Eur J Inorg Chem* **2017**, 6–29. <https://doi.org/10.1002/ejic.201600983>

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.

Berg JM, Tymoczko J, Stryer L (2013) Biokemija, 1. izd., Školska knjiga, Zagreb.

Binder U, Skerra A (2017) PASylation® A versatile technology to extend drug delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **31**, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.06.004>

Breibeck J, Skerra A (2017) The polypeptide biophysics of proline/alanine-rich sequences (PAS): Recombinant biopolymers with PEG-like properties. *Biopolymers* **109**, 23069-23081. <https://doi.org/10.1002/bip.23069>

Fischer EO, Pfab WZ (1952) Cyclopentadien-Metallkomplexe, ein neuer Typ metallorganischer Verbindungen. *Z Naturforsch* **7b**, 377-379.

Gante J (1994) Peptidomimetics-tailored enzyme inhibitors. *Angew Chem Int Ed* **33**, 1699-1720. <https://doi.org/10.1002/anie.199416991>

Giannis A, Kolter T (1993) Peptidomimetics for receptor ligands: Discovery, development, and medical perspectives. *Angew Chem, Int Ed Engl* **32**, 1244– 1267. <https://doi.org/10.1002/anie.199312441>

Ivančić M, Kovač G (2021) Sinteza, konformacijska analiza i biološka evaluacija tripeptida izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina s Ala-Pro sekvencom (rad za Rektorovu nagradu), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.



Kahn M (1993) Peptide secondary structure mimetics: Recent advances and future challenges. *Synlett* **11**, 821-826.

Kay BK, Williamson MP, Sudol M (2000) The importance of being proline: The interactions of proline-rich motifs in signalling proteins with their cognate domains. *FASEB J* **14**, 231–241.

Kealy TJ, Pauson PL (1951) A new type of organo-iron compound. *Nature* **168**, 1039–1040. <https://doi.org/10.1038/1681039b0>

Kirin SI, Kraatz HB, Metzler-Nolte N (2006) *Chem Soc Rew* **35**, 348-354.

Kong J, Yu S (2007) Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim Biophys Sin* **39**, 549-559. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>

Kovačević M, Čakić Semenčić M, Radošević K, Molčanov K, Roca S, Šimunović L i sur. (2021) Conformational preferences and antiproliferative activity of peptidomimetics containing methyl 1'-aminoferrocene-1-carboxylate and turn-forming homo- and heterochiral Pro-Ala motifs. *Int J Mol Sci* **22**, 13532. <https://doi.org/10.3390/ijms222413532>

Kovačević M, Kodrin I, Cetina M, Kmetič I, Murati T, Čakić Semenčić M i sur. (2015) The conjugates of ferrocene-1,1'-diamine and amino acids. A novel synthetic approach and conformational analysis. *Dalton Trans* **44**, 16405–16420. <https://doi.org/10.1039/c5dt01610j>

Kovačević M, Molčanov K, Radošević K, Srček VG, 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. <https://doi.org/10.3390/molecules190812852>

Kovačević M, Kodrin I, Roca S, Molčanov K, Shen Y, Adhikari B i sur. (2017) Helically chiral peptides that contain ferrocene- 1, 1'-diamine scaffold as a turn inducer. *Eur J Chem* **23**, 1037-10395. <https://doi.org/10.1002/chem.201701602>

Kraatz HB (2005) Ferrocene-conjugates of amino acids, peptides and nucleic acids. *J Inorg Organomet Polym Mater* **15**, 83–106. <https://doi.org/10.1039/C0DT01707H>

Lai P-K, Tresnak DT, Hackel BJ (2019) Identification and elucidation of prolinerich antimicrobial peptides with enhanced potency and delivery. *Biotechnol Bioeng* **116**, 2439-2450. <https://doi.org/10.1002/bit.27092>

- Lal B, Badshah A, Altaf AA, Khan N, Ullah S (2011) Miscellaneous applications of ferrocene-based peptides/amides. *Appl Organometal Chem* **25**, 843–855. <https://doi.org/10.1002/aoc.1843>
- Lee C, Kalmar L, Xue B, Tompa P, Daughdrill GW, Uversky VN, Kyou-Hoon H (2014) Contribution of proline to the pre-structuring tendency of transient helical secondary structure elements in intrinsically disordered proteins. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1840**, 993-1003. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.042>
- Liskamp RMJ, Rijkers DTS, Kruijtz JAW, Kemmink J (2011) Peptides and proteins as a continuing exciting source of inspiration for peptidomimetics. *ChemBioChem* **12**, 1626-1653. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000717>
- Litwack G (2018) Human Biochemistry. Academic Press, London/San Diego/Cambridge/Oxford, str. 191-192.
- Liu L-K, Becker DF, Tanner JJ (2017) Structure, function, and mechanism of proline utilization A (PutA). *Arch Biochem Biophys* **632**, 142-157. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.07.005>
- Marqusee S, Robbins VH, Baldwin RL (1989) Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5286-5290. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.14.5286>
- Mishra AK, Choi J, Moon E, Baek K-H (2018) Tryptophan-rich and proline-rich antimicrobial peptides. *Molecules* **23**, 815. <https://doi.org/10.3390/molecules23040815>
- Moriuchi T, Hirao T (2006) Ferrocene-peptide bioconjugates. *Bioorg Chem* **17**, 143–175. [https://doi.org/10.1007/3418\\_005](https://doi.org/10.1007/3418_005)
- Olsen GL, Bolin DR, Bonner MP, Böss M, Cook CM, Fry DC (1993) *J Med Chem* **136**, 3039-3049.
- O'Neil KT, DeGrado WF (1990) A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids. *Science* **250**, 646-651. <https://doi.org/10.1126/science.2237415>
- Perrin DD, Armarego WLF (1988) Purification of laboratory chemicals, 3. izd., Pergamon Press, Oxford/New York. <https://doi.org/10.1002/recl.19881071209>

Rapić V, Čakić Semenčić M (2011) I. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocen i metalni karbonili. *Kemija u industriji* **60**, 61–79.

Rapić V, Kovačević M (2012) III. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocenski peptidi. *Kemija u industriji* **61**: 71–120.

Ross NT, Katt WP, Hamilton AD (2010) *Phil Trans R Soc A* **368**, 989-1008.

Turner SL, Russell GC, Williamson MP, Guest JR (1993) Restructuring an interdomain linker in the dihydrolipoamide acetyltransferase component of the pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli*. *Protein Eng* **6**, 101–108. <https://doi.org/10.1093/protein/6.1.101>

Tyndall JDA, Pfeiffer D, Abbenante G, Fairlie DP (2005) Over one hundred peptide-activated G protein-coupled receptors recognize ligands with turn structure. *Chem Rev* **105**, 793–826. <https://doi.org/10.1021/cr040689g>

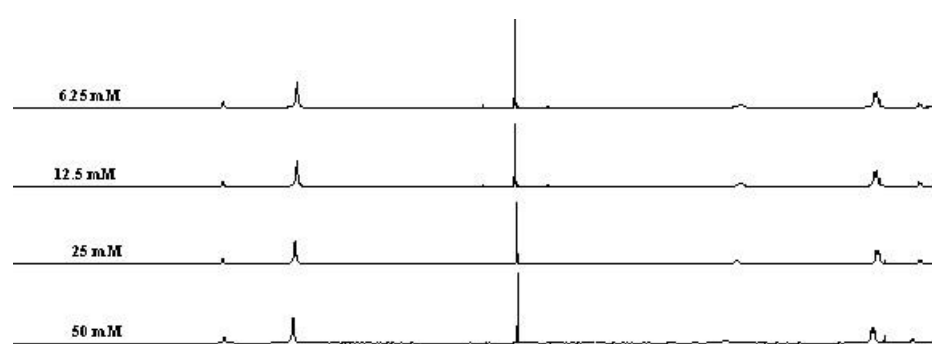
Vanhoof G, Goossens F, De Meester I, Hendriks D, Scharpé S (1995) Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J* **9**, 736-744.

Woodward RB, Rosenblum M, Whiting MC (1952) A new aromatic system. *J Am Chem Soc* **74**, 3458–3459.

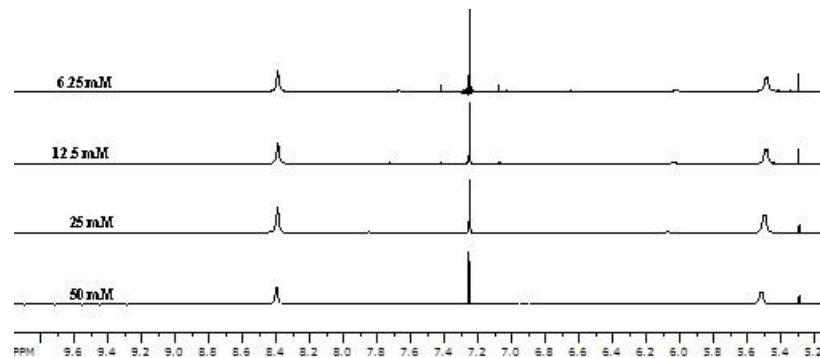
Wilkinson G, Rosenblum M, Whiting MC, Woodward RB (1952) The structure of iron bis-cyclopentadienyl. *J Am Chem Soc* **74**, 2125–2126. <https://doi.org/10.1021/ja01128a527>

## PRILOZI

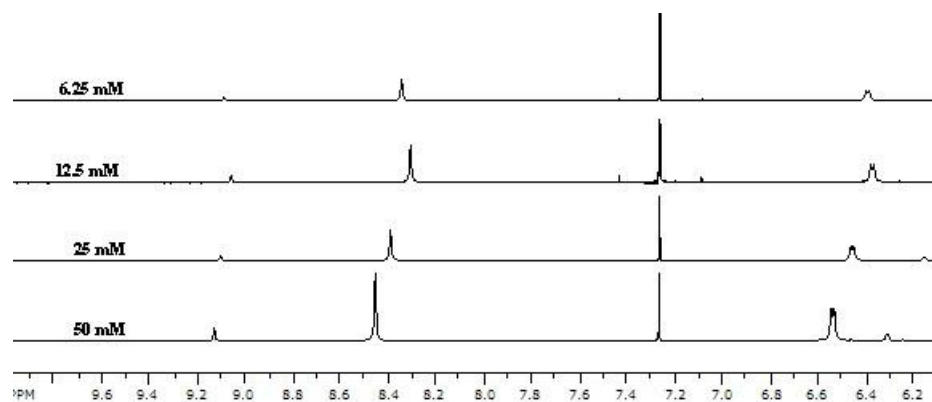
Prilog 1. Koncentracijski ovisni  $^1\text{H}$  NMR-spektri peptida **2**, **3**, **4** i **5** u kloroformu



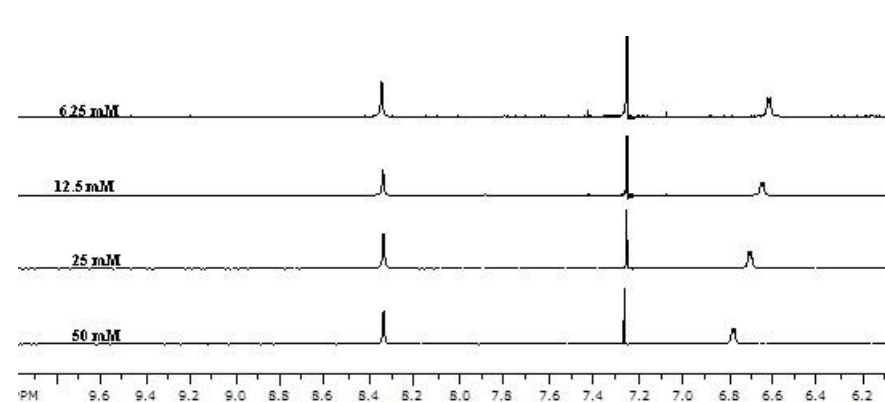
**2** (Boc-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOME)



**3** (Boc-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOME)

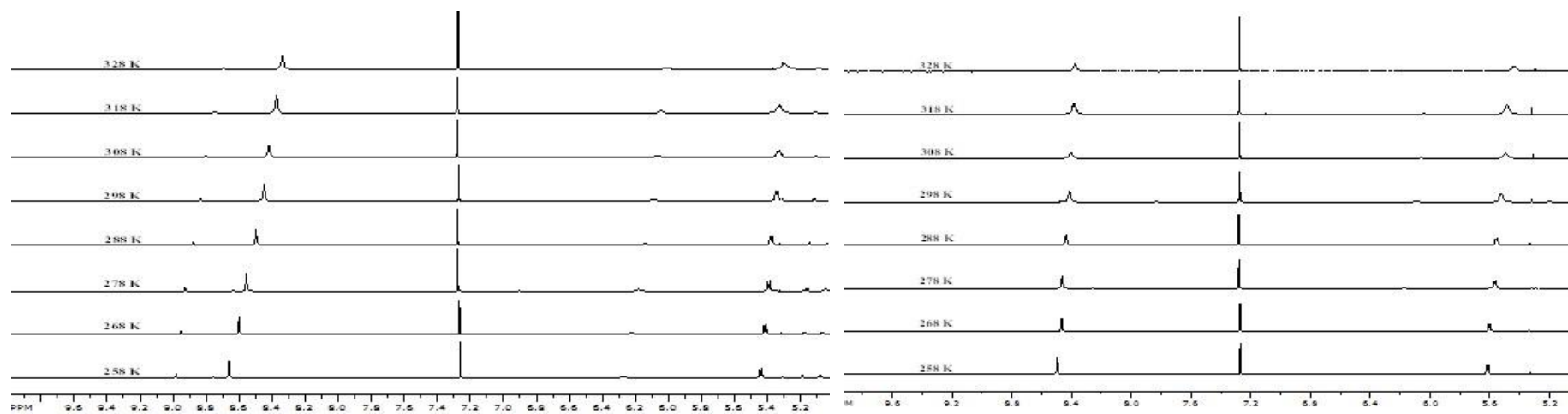


**4** (Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOME)



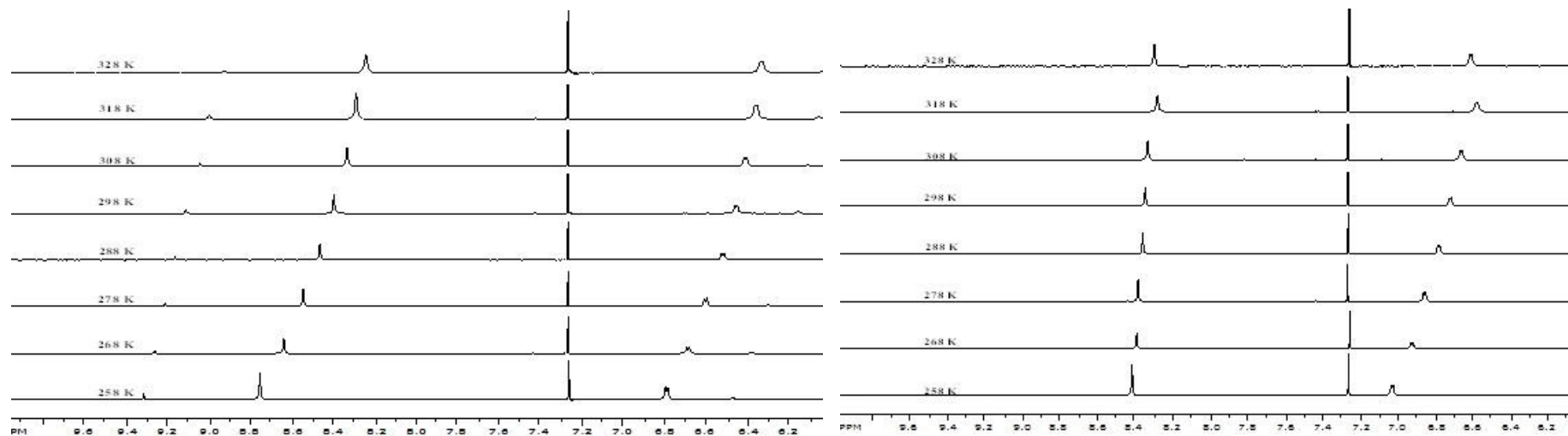
**5** (Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOME)

**Prilog 2.** Temperaturno ovisni  $^1\text{H}$  NMR-spektri peptida **2**, **3**, **4** i **5** u kloroformu ( $c = 25\text{mM}$ ).



**2** (Boc-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe)

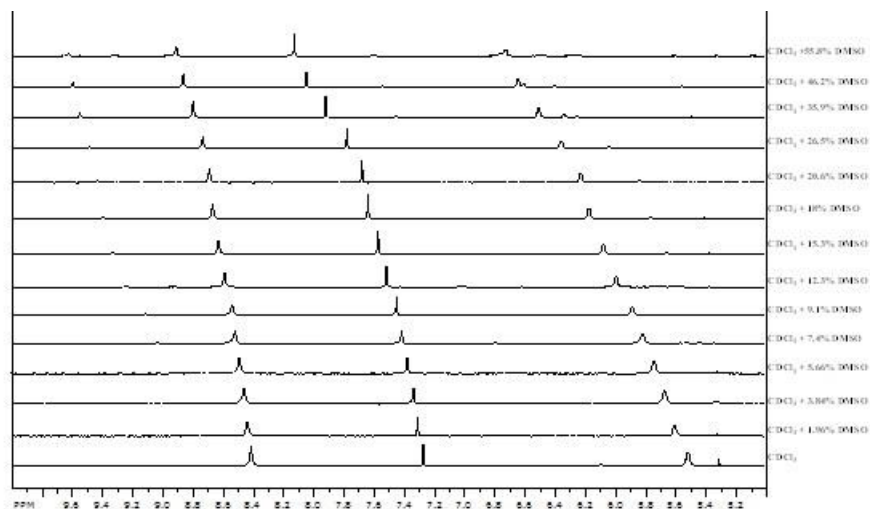
**3** (Boc-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe)



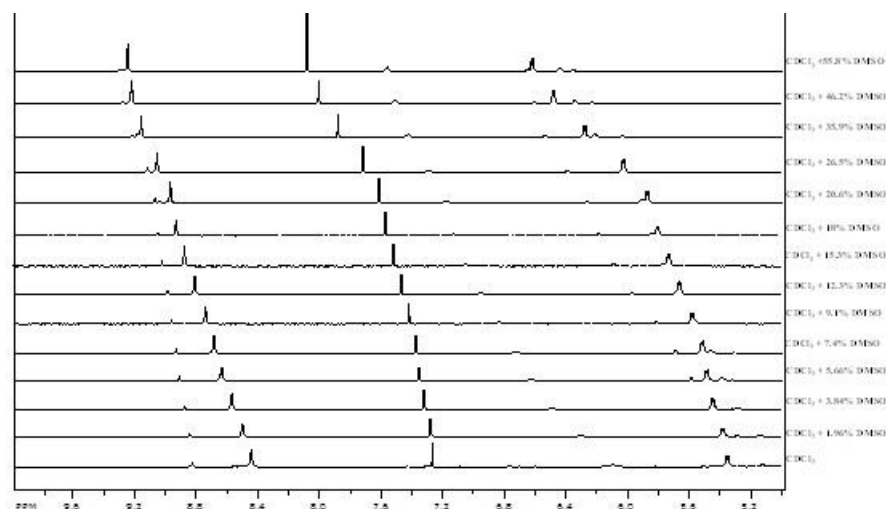
**4** (Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe)

**5** (Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe)

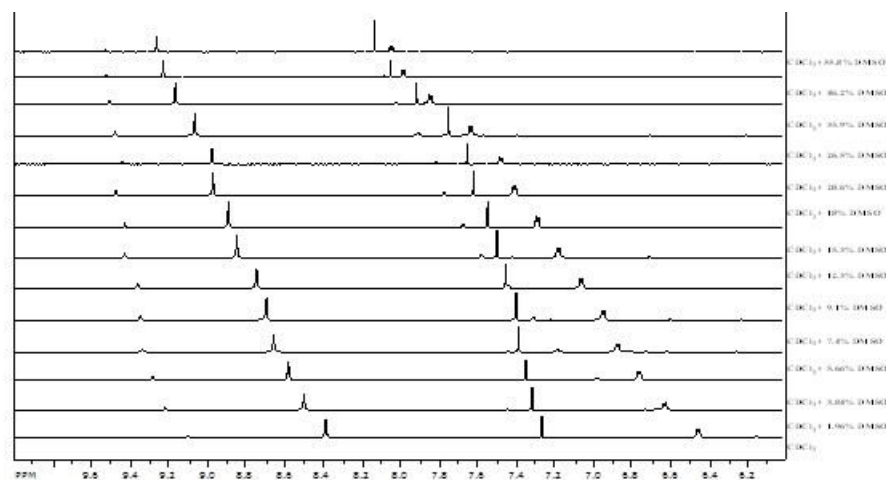
**Prilog 3.**  $^1\text{H}$  NMR-spektri titracije 50 mM otopine konjugata kompeticijskim otapalom DMSO



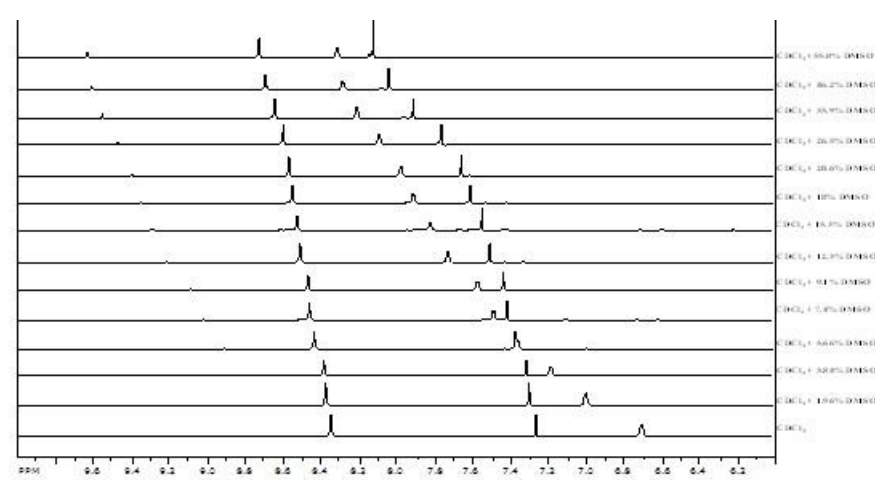
**2** (Boc-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe)



**3** (Boc-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe)



**4** (Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe)



**5** (Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fca-COOMe)

## Izjava o izvornosti

Ja Antonio Damjanović izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Antonio Damjanović

---

Vlastoručni potpis