

Priprava i konformacijska analiza enantiomernih ferocenskih depsipectida s fenilalaninom

Vučičević, Vita

Master's thesis / Diplomski rad

2025

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:159:983615>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj 2025.

Vita Vučićević

**PRIPIRAVA I KONFORMACIJSKA ANALIZA
ENANTIOMERNIH FEROCENSKIH
DEPSIPEPTIDA S FENILALANINOM**

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

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:

Ovaj je rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2020-02-9162 (Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija) čija je voditeljica prof. dr. sc. Lidija Barišić.



Veliku zahvalnost upućujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Moniki Kovačević, koja me svojim savjetima, nesebično prenesenim znanjem i podrškom vodila kroz proces istraživanja i pisanja ovog Diplomskog rada. Hvala Vam na strpljenju, razumijevanju te neizmjerne pomoći, kako tijekom izrade rada, tako i kroz cijelo fakultetsko obrazovanje. Veliko hvala svim djelatnicima Laboratorija za organsku kemiju Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se dr. sc. Sunčici Roci, koja je snimljenim NMR-spektrima pridonijela izradi ovog Diplomskog rada. Posebnu zahvalnost dugujem svojoj obitelji, koja me nesebičnom ljubavi, podrškom i razumijevanjem pratila kroz sve izazove i uspjehe tijekom cijelog obrazovanja i odrastanja. Vaša vjera u mene bila je moj najveći oslonac i motivacija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA ANALIZA ENANTIOMERNIH FEROCENSKIH DEPSIPEPTIDA S
FENILALANINOM

Vita Vučićević, univ. bacc. ing. biotechn., 0058217302

Sažetak:

Iako sudjeluju u izrazito važnim fiziološkim mehanizmima i kontroliraju gotovo sve vitalne funkcije u organizmu, peptidi nisu pogodni za primjenu u terapijske svrhe, pa se različitim peptidomimetičkim modifikacijama nastoji prevladati njihova postojeća ograničenja. Umetanjem ferocenske osnove u različito strukturirane peptidne lance dolazi do formiranja intramolekulskih vodikovih veza koje uzrokuju nastajanje različitih sekundarnih strukturnih elemenata. Jedna od neistraženih modifikacija ferocenskih peptida jest zamjena jedne amidne veze esterskom vezom u svrhu pripreme nove vrste peptidomimetika koji se nazivaju depsipeptidi. Prirodni depsipeptidi pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti te predstavljaju potentne spojeve u razvoju novih sintetskih lijekova. Esterske veze uvode se u sintetičke depsipeptide s ciljem postizanja konformacijskih promjena koje utječu na karakter vodikovih veza i fleksibilnost.

Osnovni cilj ovog rada je istražiti utjecaj zamjene jedne amidne veze esterskom vezom na obrazac vodikovih veza i konformacijski prostor pripremljenih depsipeptida $\text{Ac-L-Phe-NH-Fn-CO-O-CH}_2\text{-CH[CH}_2\text{Ph]-NHBoc}$ (**13**) i $\text{Ac-D-Phe-NH-Fn-CO-O-CH}_2\text{-CH[CH}_2\text{Ph]-NHBoc}$ (**14**). U tu svrhu dva pripravljena ciljna depsipeptida te prije sintetizirani analogni spojevi konformacijski su analizirani i uspoređeni spektroskopskim metodama (IR-, NMR- i CD-spektroskopija).

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

Rad sadrži: 48 stranica, 14 slika, 3 tablica, 89 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Lidija Barišić (predsjednik)
2. Izv. prof. dr. sc. Monika Kovačević (mentor)
3. Izv. prof. dr. sc. Mojca Čakić Semenčić (član)
4. Doc. dr. sc. Anita Horvatić (zamjenski član)

Datum obrane: 24. siječnja 2025.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

PREPARATION AND CONFORMATIONAL ANALYSIS OF ENANTIOMERIC FERROCENE DEPSIPEPTIDES WITH PHENYLALANINE

Vita Vučićević, univ. bacc. ing. biotechn., 0058217302

Abstract:

Although they are involved in extremely important physiological mechanisms and control almost all vital functions in the body, peptides are not suitable for use for therapeutic purposes for several reasons. Therefore, various peptidomimetic modifications are applied to overcome the existing limitations of peptides. The insertion of a ferrocene base into differently structured peptide chains leads to the formation of intramolecular hydrogen bonds, which cause the formation of various secondary structural elements. One of the unexplored modifications of ferrocene peptides is the replacement of an amide bond by an ester bond to produce a new type of peptidomimetics, the depsipeptides. Natural depsipeptides exhibit a broad spectrum of biological activities and are leading compounds in the development of new synthetic drugs. In synthetic depsipeptides, ester bonds are introduced to achieve conformational changes that influence the character of hydrogen bonds and flexibility.

The main objective of this work is to investigate the influence of the replacement of an amide bond by an ester bond on the pattern of hydrogen bonds and the conformational space of the prepared depsipeptides Ac-L-Phe-NH-Fn-CO-O-CH₂-CH[CH₂Ph]-NHBoc (**13**) and Ac-D-Phe-NH-Fn-CO-O-CH₂-CH[CH₂Ph]-NHBoc (**14**). For this purpose, two specifically prepared depsipeptides and previously synthesized analogous compounds were investigated by conformational analysis and compared using spectroscopic methods (IR, NMR and CD spectroscopy).

Keywords: ferrocene, depsipeptides, peptidomimetics, phenylalanine, conformational analysis

Thesis contains: 48 pages, 14 figures, 3 tables, 89 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Monika Kovačević, PhD, Associate professor

Reviewers:

1. Lidija, Barišić, PhD, Full professor (president)
2. Monika, Kovačević, PhD, Associate professor (mentor)
3. Mojca, Čakić Semencić, PhD, Associate professor (member)
4. Anita, Horvatić, PhD, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: January 24th, 2025

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. FEROCEN KAO BIOORGANOMETALNI SPOJ	2
2.2. PEPTIDOMIMETICI	6
2.3. DEPSIPEPTIDI	11
2.4. AMINOKISELINA FENILALANIN	13
2.5. PRIMJERI DEPSIPEPTIDA S FENILALANINOM	15
2.5.1. Beauvericin.....	15
2.5.2. Beauveniatini.....	16
2.5.3. Nobilamid I	16
2.5.4. Klavatustidi A i B.....	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. MATERIJALI I METODE	19
3.2. POSTUPAK PRIPRAVE FEROCENSKIH PEPTIDA	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. UVOD	28
4.2. PRIPRAVA DEPSIPEPTIDA	31
4.3. IR-SPEKTROSKOPSKA ANALIZA	32
4.4. NMR- SPEKTROSKOPSKA ANALIZA	36
4.5. CD- SPEKTROSKOPSKA ANALIZA	39
5. ZAKLJUČCI	43
6. LITERATURA	44

1. UVOD

Bioorganometalna kemija relativno je mlada grana kemije koja je usmjerena na konjugate organometalnih spojeva i biomolekula kao što su DNA, aminokiseline, peptidi, ugljikohidrati, steroidi, šećeri, vitamini i enzimi. Sama organometalna kemija proučava aktivnost spojeva koji posjeduju barem jednu metak-ugljik vezu, poput metalocena, spojeva sa strukturom „sendviča“, čiji je najpoznatiji predstavnik ferocen. Karakteriziraju ga brojna izuzetna svojstva zbog kojih je našao raznovrsnu biološku primjenu te vezanje s različitim bioaktivnim farmakoforima, a njegovo otkriće označava početak razvoja moderne organometalne kemije. Iako proteini i peptidi sudjeluju u izrazito važnim procesima u organizmu, oni nisu pogodni za primjenu u terapijske svrhe zbog prevelike konformacijske fleksibilnosti i proteolitičke nestabilnosti, ali modifikacijom određenih farmakoloških i biofarmaceutskih svojstava moguća je njihova klinička primjena. Struktura prirodnih peptida može se poboljšati uvođenjem strukturnih modifikacija kojima se smanjuju njihovi nedostaci, uz zadržavanje strukturnih značajki odgovornih za biološku aktivnost peptida. Peptidomimetiци, u usporedbi s prirodnim peptidima, pokazuju znatna poboljšanja poput veće selektivnosti, bioraspoloživosti i produljene biološke aktivnosti. Depsipeptidi predstavljaju pseudopeptide u kojima je amidna veza zamijenjena esterskom vezom, a u spojeve se uvodi s ciljem postizanja konformacijskih promjena i povećanja lipofilnosti. Mnogi depsipeptidi i njihovi derivati pokazuju široki spektar bioloških aktivnosti, kao i značajan terapijski potencijal.

Cilj ovog Diplomskog rada bio je istražiti kako uvođenje nove, manje polarne esterske veze umjesto jedne amidne veze utječe na konformacijski prostor sintetiziranih depsipeptida. Naime, spomenuta zamjena amidne veze utječe na smanjenje broja dostupnih donora koji mogu sudjelovati u vodikovim vezama, a samim time i na mogućnost tvorbe više različitih elemenata sekundarne strukture.

Stoga će se u sklopu ovog Diplomskog rada višestupanjskim sintezama pripremiti $\text{Ac-L-Phe-NH-Fn-CO-O-CH}_2\text{-CH[CH}_2\text{Ph]-NHBoc}$ (13) i $\text{Ac-D-Phe-NH-Fn-CO-O-CH}_2\text{-CH[CH}_2\text{Ph]-NHBoc}$ (14) te će se njihova struktura dokazati infracrvenom spektroskopijom (IR) i spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR), a obrazac intramolekulskih vodikovih veza na kojima se temelji sekundarna struktura istražiti će se mjerenjem koncentracijski-ovisnih IR- i NMR-spektara, temperaturno-ovisnih IR- i NMR-spektara te CD-spektara.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FEROCEN KAO BIOORGANOMETALNI SPOJ

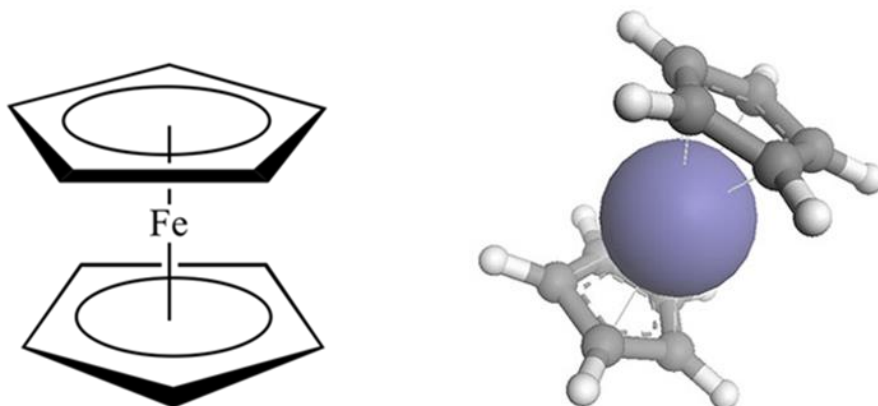
Bioorganometalna kemija predstavlja relativno mladu granu kemije koja je u posljednjem desetljeću doživjela eksplozivni razvitak, proučavajući konjugate organometalnih spojeva i biomolekula kao što su DNA, aminokiseline, peptidi, ugljikohidrati, steroidi, šećeri, vitamini i enzimi. [1] Posljednjih godina bioorganometalna kemija postala je brzo rastuće područje koje povezuje klasičnu organometalnu kemiju s biologijom, medicinom i molekularnom biotehnologijom. [2] Glavna istraživačka polja bioorganometalne kemije su terapija, bioanaliza (senzori), molekularno prepoznavanje, enzimi, toksikologija i okoliš. Organometalna kemija usmjerena je na bioaktivnost spojeva koje karakterizira prisutnost barem jedne metal-ugljik veze. [1] Važnost organometalnih spojeva proizlazi iz sposobnosti nukleofilnog ugljikovog atoma u organometalnom spoju da formira novu C-C vezu u reakciji s elektrofilnim ugljikovim atomom. Takva svojstva omogućavaju sintezu složenijih molekula iz jednostavnijih početnih spojeva. U organometalnim spojevima atom metala može vezati do šest supstituenata, što omogućava stvaranje do 30 stereoizomera takvih molekula. [3]

Otkriće ferocena i rasvjetljavanje njegove izvanredne strukture neupitno je početak razvoja moderne organometalne kemije. [2] Krajem 1951. godine Kealy i Pauson pokušali su pripremiti željeni spoj fulvalen kemijske formule $C_{10}H_8$, za koji se pretpostavljalo da će imati aromatska svojstva, slična izomernom naftalenu. Njihova prvotna ideja bila je pretvoriti anionski ciklopentadienilni ligand Grignardova reagensa u ciklopentadienilni radikal oksidacijom. Pritom bi spajanjem dvaju prethodno dobivenih radikala nastao dihidrofulvalen, iz kojeg bi dehidrogenacijom nastao željeni produkt fulvalen. Kao reagens za stvaranje ciklopentadienilnog radikala iz Grignardovog spoja te hidrogenaciju intermedijera korišten je $FeCl_3$. Nakon obrade reakcijske smjese dobiveni su žuti kristali čija je mikroanaliza pokazala da odgovaraju sastavu $Fe(C_5H_5)_2$, a ne željenom produktu. Na taj način sintetizirali su novu molekulu kemijske formule $Fe(C_5H_5)_2$, odnosno spoj bis(ciklopentadienil) željezo. Pritom je pripremljenom spoju zabilježena iznenađujuće visoka kemijska i toplinska stabilnost. Nakon ovog otkrića, mnogi drugi znanstvenici istraživali su sintezu i strukturu dobivene molekule. Woodward je 1952. godine, zbog slične reaktivnosti s benzenom, predložio ime ferocen koje je od tada prihvaćeno u znanstvenom svijetu, a ubrzo nakon toga preneseno na spojeve općeg sastava $M(C_5H_5)_2$, nazvane metaloceni. [4]

Ferocen je toplinski stabilna narančasta kristalna tvar. Najpoznatiji je predstavnik metalocena, spojeva sa strukturom „sendviča“, u kojima je atom metala uklopljen između organskih, aromatskih cikličkih struktura. [5] Naziv „sendvič“ spoj danas je univerzalno prihvaćen za mnogo širu skupinu spojeva. [2] Molekula ferocena sastoji se od dva

ciklopentadienilna prstena između kojih se nalazi središnji atom željeza. [5] Prema tome, ferocen se sastoji od jednog kationa (Fe^{2+}) i dva aniona (C_5H_5^-), a karakteriziraju ga tri izuzetna svojstva: [4,6]

- Stabilnost do 400 °C (talište pri 172,5 °C) sa željeznim središtem koje ima zasićenu elektronsku strukturu kriptona;
- Blaga i reverzibilna oksidacija oko + 0,4 V u odnosu na zasićenu kalomelsku elektrodu;
- Reaktivnost kao superaromatski elektrofil.



Slika 1. Struktura ferocena (*lijevo*) i njegova trodimenzijska struktura (*desno*) [7,8]

Ferocen je aromatski „sendvič“ spoj s 18-elektronskom strukturom, koji se odlikuje velikom stabilnošću i reakcijama elektrofilne supstitucije te pokazuje zanimljivu metal-ligand koordinaciju. Zbog mogućnosti rotacije oko Cp-Fe-Cp veze (Cp = ciklopentadienil), kao i mogućeg gubitka koplanarnosti Cp-prstenova riječ je o vrlo fleksibilnoj molekuli. [1,9] Ferocen ima konfiguraciju plemenitog plina te je prilično robusan, što omogućuje jednostavnu derivatizaciju prstenova reakcijama uobičajenim u organskoj kemiji. [10,11] Također, ferocen pokazuje elektrokemijsku stabilnost te potpuno reverzibilan proces oksidacije i redukcije kao odgovor na elektrokemijski potencijal. Idealan je redoks-marker za elektrokemijska mjerenja prijenosa naboja. [9] Uz to dobro je topljiv u svim uobičajenim organskim otapalima, stabilan je u fiziološkom mediju te u kontaktu sa zrakom. Jedna od važnih strukturnih karakteristika ferocena je udaljenost od 3,3 Å između dva ciklopentadienilna prstena, što omogućava stvaranje vodikovih veza, kao i drugih nekovalentnih interakcija između liganada povezanih na oba Cp prstena. Sve je veći broj derivata ferocena, kao i sintetiziranih spojeva koji u svojoj strukturi sadrže ferocen. [10]

Zbog povoljnih fizikalno-kemijskih svojstava ferocena i njegovih derivata, niske cijene, robusnosti i jednostavnosti rukovanja, pronašao je široku primjenu u brojnim područjima, uključujući katalizu, znanost o materijalima, biološke senzore i makromolekule. Osim toga, ferocen i njegovi derivati, kao i drugi organometalni spojevi sve veću primjenu pronalaze u

medicinskoj kemiji i nanomedicini. [10,11,12] Zahvaljujući svojoj netoksičnosti, lipofilnoj prirodi i strukturi „sendviča“, ferocen je postao interesantna jezgra za raznovrsnu biološku primjenu te vezanje s različitim bioaktivnim farmakoforima. [13] Zahvaljujući raznolikosti svojstava i funkcija, ferocen i njegovi derivati predmet su mnogih današnjih istraživanja te imaju veliki potencijal i svijetlu budućnost. [10]

Utvrđeno je da uvođenjem ferocena u druge molekule one poprimaju specifična svojstva. Naime, ferocen povećava lipofilnost, olakšava prodiranje kroz stanične membrane, značajno smanjuje toksičnost, doprinosi povoljnim elektrokemijskim svojstvima, poboljšava sposobnost prevladavanja krvno-moždane barijere te povećava stabilnost spojeva u biološkim medijima. Osim toga, različite kemijske modifikacije i komercijalna dostupnost čine organometalne spojeve temeljene na strukturi ferocena izuzetno korisnim, popularnim i obećavajućim predmetom istraživanja. Na osnovu jedinstvene prirode metalocena, a posebno ferocenskih spojeva, otkriveno je da posjeduju širok raspon farmakoloških aktivnosti. Poznati farmakološki aktivni agensi ili lijekovi modificirani su ferocenom ili drugim metalocenima s ciljem poboljšanja lipofilnosti, ugradnje redoks aktivne ferocenske jedinice i/ili smanjenja njihove toksičnosti. [11,14] S druge strane, sintetizirani su i evaluirani novi organometali koji nemaju analoga među lijekovima. To uključuje pripremu spojeva temeljenih na ferocenu, koji su prilagođeni farmakološkim aspektima. [14,15]

Ferocen ima značajnu ulogu u medicinskoj kemiji i privukao je veliku pozornost otkrićem metalolijekova, među kojima se posebno ističu derivati ferocena, ferokin i ferocifen, koji se primjenjuju za liječenje malarije i raka. [13] U ova dva spoja ferocenska skupina sudjeluje u važnim načinima djelovanja specifičnim za metal koji pridonose ukupnoj terapijskoj učinkovitosti molekula. [11] Ferokin je najčešće korišten lijek temeljen na ferocenu. Sadrži ferocenilnu skupinu između amino skupina kinolinske jezgre, odnosno ferocen je inkorporiran u osnovnu strukturu klorokina, najčešće korištenog lijeka protiv malarije. [10] Pokazao se obećavajućim za liječenje malarije te je ušao u drugu fazu kliničkih ispitivanja. Ferocifen, dobiven zamjenom fenilnog prstena iz tamoksifena s ferocenom, patentiran je 1994. godine, a pokazao se učinkovitim u liječenju hormonski ovisnog i hormonski neovisnog raka dojke te se trenutno nalazi u predkliničkim istraživanjima. [13] Također, otkriveno je da lijek na bazi ferocena inhibira infekciju virusom hepatitisa C. [16] Redoks par ferocen/fericinijev ionintenzivno se proučava i istražuje. Koristi se kao redoks-medijator za amperometrijsku detekciju glukoze u krvi, što je iznimno važno za analizu krvi kod osoba oboljelih od dijabetesa. [10]

Jedno od najrazvijenijih područja istraživanja ferocena je upravo istraživanje njegove antitumorske aktivnosti. [14] Antikancerogeno djelovanje ferocenskih spojeva prvi put je

zabilježeno 1978. godine. [10] Otkriveni su obećavajući načini konstruiranja niskotoksičnih, antitumorskih lijekova nove generacije temeljenih na ferocenu. [17] Provedena su brojna istraživanja spojeva modificiranih ferocenom koja ukazuju na njihovu potencijalnu *in vitro* i *in vivo* biološku aktivnost te široki spektar značajnih i zanimljivih bioloških svojstava. Konjugiranje ferocenske skupine s različitim farmakoforima može pružiti vrijedne terapijske učinke u liječenju različitih bolesti, osobito onih otpornih na lijekove, kao što je primjerice ferokin. [14] Osim što posjeduje antikancerogenu aktivnost, ferocen pokazuje i antibakterijsko, antifungalno i antiparazitsko djelovanje, a mnogi organometalni spojevi mogu djelovati i kao inhibitori enzima. [11] Primjerice, derivati penicilina i cefalosporina koji sadrže ferocen pokazali su umjereno antibakterijsko djelovanje. [11,18] Mnogi lijekovi koji u svojoj strukturi sadrže metalocen mogu biti snažniji inhibitori enzima u odnosu na svoje analoge. Osim u organske lijekove ferocen se ugrađuje kao strukturna komponenta u različite biološki aktivne komplekse prijelaznih metala. Na taj se način može iskoristiti aktivnost dvaju ili više metalnih fragmenata s ciljem multimodalnog ciljanja. Smatra se da pritom dolazi do aditivnog ili sinergističkog učinka različitih metalnih mjesta. [11]

Nedugo nakon otkrića ferocena, utvrđeno je da se ferocen i drugi ferocenski spojevi mogu koristiti kao antidetonatori te su se primjenjivali u gorivu za benzinske motore budući da su se pokazali sigurnijima od tetraetilolova. Željezo iz ferocena također poboljšava električnu provodljivost pa se koristi za pokrivanje svjećica u automobilima. [10] Polimeri koji sadrže ferocen primjenjuju se kao materijali u zrakoplovstvu. Također, ferocen je korišten kao prekursor za proizvodnju ugljikovih nanocijevi zagrijavanjem smjese ferocen/ksilen, ili drugih aromatskih spojeva, do temperature od 675 °C u kvarcnom reaktoru. [19] Heksasupstituirani benzenski prsten idealan je za konstrukciju heksaferocenskih spojeva nalik zvijezdama koji pokazuju izvanredna elektrostatička, elektrokemijska i redoks svojstva. [20] U takvim spojevima ferocenske jedinice nalaze se na krajevima. Budući da su ferocenske skupine smještene dalje od središnje benzenske jezgre, njihova svojstva prijenosa elektrona i elektrokemijska svojstva postaju međusobno manje ovisna, a jedinice ferocena su dovoljno udaljene jedna od druge. [10]

Iako su najpoznatije elektrofilne reakcije ferocena te reverzibilna oksidacija ferocena u fericinijev ion, reakcije izmjene liganada također su važan i sintetski vrlo koristan izvor makromolekula i nanomaterijala koji sadrže ferocen. [10] Od prve provedene homo- i kopolimerizacije derivata vinilferocena, ferocenski polimeri postali su važno područje razvoja te su se počeli primjenjivati u biomedicini, elektrokatalizi, sensorima, samoobnovljivim materijalima, plastici, baterijama, zrakoplovnim materijalima, tekućim kristalima, fotonaponskim stanicama te nelinearnoj optici. [10,21] Polimeri koji sadrže ferocen mogu sadržavati ferocenske jedinice u glavnom polimernom lancu ili u bočnim lancima polimera. [10]

Polimeri s bočnim lancima koji sadrže ferocen pokazuju različita korisna svojstva te se mogu primjenjivati za razvoj materijala za katodne baterije. [22]

2.2. PEPTIDOMIMETICI

Peptidomimetika predstavlja interdisciplinarno znanstveno područje koje povezuje organsku kemiju, biokemiju, farmakologiju i biotehnologiju. Peptidomimetik je molekula koja oponaša trodimenzijski prostor peptida, te ima sposobnost izazivanja biološkog učinka nakon vezanja na receptor. Postoje dvije opće prihvaćene definicije peptidomimetika:

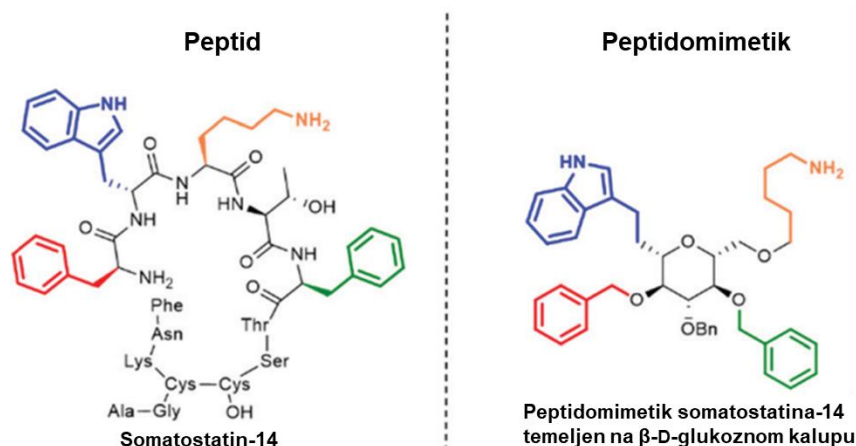
- Peptidomimetik je spoj koji kao ligand može oponašati ili blokirati biološki učinak peptidnog receptora.
- Peptidomimemtik je spoj čiji esencijalni farmakoforni elementi oponašaju 3D-strukturu prirodnog peptida i proteina i zadržavaju njegovu sposobnost interakcije s biološkim ciljanim sustavima pri čemu zadržavaju jednak biološki učinak. [23]

Iako sudjeluju u izrazito važnim fiziološkim mehanizmima i kontroliraju gotovo sve vitalne funkcije u organizmu, peptidi nisu pogodni za primjenu u terapijske svrhe iz sljedećih razloga: interakcije s različitim receptorima koje dovode do nepoželjnih nuspojava, slaba topljivost u vodi te slaba permeabilnost kroz biološke barijere, velika molekulska masa i polarni karakter što otežava transport peptida kroz staničnu membranu te krvno-moždanu barijeru te relativno brzo izlučivanje kroz jetru i bubrege. Prirodni peptidi građeni od L-aminokiselina veoma su nestabilni u prisutnosti endopeptidaza i egzopeptidaza te podliježu proteolizi. [23,24] Unatoč nepovoljnim svojstvima biološki aktivnih peptida, njihova klinička primjena moguća je modifikacijom određenih farmakoloških i biofarmaceutskih svojstava. Afinitet peptida prema ciljanom receptoru može se povećati smanjenjem njegove fleksibilnosti, što se postiže uvođenjem različitih konformacijskih ograničenja. Na taj način nastaje peptid s rigidnom bioaktivnom konformacijom. Danas su sve veći zahtjevi za modificiranim peptidima koji posjeduju unaprijeđena farmakodinamička i farmakokinetička svojstva, poput povećane selektivnosti, djelotvornosti, metaboličke stabilnosti i bioraspoloživosti, a smanjene toksičnosti. Peptidomimetici se mogu primjenjivati u terapijske svrhe ukoliko zadovoljavaju određene kriterije te posjeduju sljedeća farmakološka svojstva:

- (i) dobra bioraspoloživost (brzina apsorpcije i količina aktivne tvari, odnosno lijeka koji dospije u sistemska cirkulaciju te se zatim izlučuje kroz urin),
- (ii) metabolička stabilnost,
- (iii) afinitet i selektivnost prema receptorima,
- (iv) izazivanje minimalnih nuspojava. [23]

Struktura prirodnog peptida može se optimizirati uvođenjem strukturnih modifikacija koje smanjuju njegove nedostatke, uz zadržavanje značajki odgovornih za biološku aktivnost.

[25] Jedan primjer peptidomimetika predstavlja analog somatostatina, u kojem se β -D-glukopiranoza pokazala kao pogodan kalup za smještanje aminokiselinskih ostataka nađenih u regiji β -okreta u prirodnom peptidu somatostatinu (slika 2). Glukozi kalup ima prednost u odnosu na druge mimetike zbog mogućnosti uvođenja bočnih aminokiselinskih ostataka reakcijama esterifikacije. Mimetici β -okreta temeljeni na glukozi pokazuju poboljšana farmakokinetička svojstva u odnosu na mimetike temeljene na drugim cikličkim kalupima. [23,24,26] Raznovrsne modifikacije peptida te poboljšanje njihovih svojstava značajan su i sve prisutniji način u otkrivanju novih inovativnih spojeva i lijekova. U usporedbi s izvornim peptidima, peptidomimetici pokazuju znatna poboljšanja, uključujući veću selektivnost što rezultira manjim nuspojavama, veću bioraspoloživost i produljenu biološku aktivnost. [27] Primjerice, zamjenom amidne veze izosterima moguće je smanjiti proteolitičku razgradnju peptida, a farmakološka svojstva novog spoja mogu se pritom optimizirati, što rezultira povećanom stabilnošću i boljim transportom pa tako i smanjenim izlučivanjem. Nadalje, strukture koje mogu oponašati dio peptida odgovornog za vezanje na receptor mogu minimizirati vezanje na nespecifične receptore i na taj način povećati selektivnost terapijskog sredstva. [24]



Slika 2. Struktura peptida somatostatina-14 (*lijevo*) i njegovog peptidomimetika (*desno*) (prema Lenci i Trabocchi, 2020)

Nekoliko peptidomimetika već su odobreni kao lijekovi ili su u kasnoj fazi kliničkih ispitivanja te se primjenjuju u liječenju različitih bolesti, od zaraznih bolesti do karcinoma i rijetkih bolesti. U posljednje vrijeme došlo je do značajnog napretka u području peptidomimetike te u strategijama za dizajniranje i sintezu novih inovativnih peptidomimetika. Metode za njihov razvoj i sintezu značajno su se promijenile, od jednostavne zamjene peptidne okosnice do opsežnih modifikacija cijele strukture. U skladu s postignutim napretkom tijekom godina došlo je do promjene u klasifikaciji peptidomimetičkih spojeva. Prvo su se peptidomimetici klasificirali u tri skupine na osnovu njihove sličnosti s nativnim supstratom, odnosno prirodnim peptidom. Peptidomimetici tipa I ili strukturni mimetici analogni su nativnom

supstratu, budući da imaju istu prostornu orijentaciju i funkcionalna svojstva. Peptidomimetici tipa II ili funkcionalni mimetici nisu potpuno analogni nativnom supstratu, ali stupaju u slične interakcije s ciljnim receptorom ili enzimom te oponašaju funkciju prirodnog spoja. Peptidomimetici III ili funkcionalno-strukturni mimetici sadrže kalup znatno drugačiji od izvornog spoja, no dijelovi strukture koji stupaju u ključne interakcije nalaze se u istoj prostornoj orijentaciji. [24,28] Prema novoj klasifikaciji, koju su predložili Grossmann i suradnici, peptidomimetici se dijele na osnovu stupnja sličnosti s prirodnim peptidom u četiri skupine. [27,29] Peptidomimetici A skupine najbliži su prirodnom peptidu. Peptidomimetici se uglavnom sastoje od aminokiselinskog slijeda prirodnog peptida te se uvodi ograničen broj modificiranih aminokiselina, a konformacija okosnice i bočnih lanca slična je izvornom peptidu. [24,27] U nativnu strukturu peptida uvodi se ograničen broj lokalnih modifikacija s ciljem postizanja stabilnije konformacije te smanjenja proteolitičke razgradnje. Ova skupina odgovara mimeticima tipa I, budući da okosnica i bočni lanci odgovaraju strukturi prirodnog peptida. Peptidomimetici B skupine posjeduju značajni peptidni karakter, ali sadrže važnije modifikacije u svojoj strukturi, u okosnici i u bočnim lancima. Mogu sadržavati različite neprirodne aminokiseline, izolirane strukturne elemente malih molekula i mimetike peptidne okosnice. Ova skupina peptidomimetika odgovara mimeticima tipa II, budući da je analogija s izvornim peptidom vidljiva u dijelovima strukture koji stupaju u interakcije. No, ova skupina uključuje i peptidomimetike čija je okosnica potpuno modificirana, dok bočni lanci zadržavaju isti topološki raspored kao u nativnom peptidu. Peptidomimetike C skupine karakteriziraju izrazito modificirane strukture s karakterom malih molekula. [27] Sadrže neprirodni nepeptidni kalup koji u potpunosti zamjenjuje peptidnu okosnicu. Okosnica ovakvih mimetika u potpunosti je promijenjena, ali sadrži strukturne elemente koji stupaju u interakcije na isti način kao u biološki aktivnom nativnom peptidu. Ova skupina peptidomimetika povezana je s peptidomimeticima tipa III. Peptidomimetici koji su najmanje slični prirodnom peptidu čine D skupinu. Ovi spojevi oponašaju djelovanje bioaktivnih peptida bez izravne veze s funkcijama njegovih bočnih lanaca, a odgovaraju peptidomimeticima tipa II ili III, ovisno o stupnju analogije s izvornim peptidom. [24]

Postoji nekoliko različitih pristupa za konstruiranje peptidomimetika, a odabir strategije ovisi o onome što je poznato o ciljanom proteinu u smislu njegove strukture, sekvence, funkcije i karakteristika mjesta vezanja proteina. [24] Lokalne strukturne promjene predstavljaju minimalne modifikacije izvornog peptida te su najkonzervativnija, ali uspješna strategija u dizajnu peptidomimetika prve generacije, kao i inhibitora proteaza te liganda receptora. Ovaj pristup uključuje zamjenu specifičnih kemijskih skupina izosternim skupinama koje imaju približno istu elektronsku distribuciju i slična fizikalna svojstva kao izvorni peptid. Općenito, lokalne modifikacije ograničene su na pojedinačne aminokiseline, a uključuju zamjenu

peptidne okosnice, bočnih lanaca ili dipeptidne jedinice s konformacijski ograničenom i proteolitički stabilnom izosternom skupinom. [24,27] Tijekom godina zabilježeni su mnogi izosteri peptidnih veza, uključujući zamjenu amidne veze tioamidom, alkenom, triazolnim prstenom ili kemijskim skupinama koje mogu oponašati tetraedarsko prijelazno stanje. Također, razvijeno je nekoliko strategija za lokalnu modifikaciju bočnih aminokiselinskih lanaca. Za razvoj peptidomimetika primjenjuju se jednostavna C-alkilacija, homologacija s β - i γ -aminokiselinama te različiti ciklički spojevi s određenim konformacijskim ograničenjima. Nadalje, istovremena modifikacija dviju susjednih aminokiselina upotrebom dipeptidnih izostera, uključujući δ -aminokiseline, još je jedan pristup za razvoj peptidomimetika s poboljšanom stabilnošću i pojačanom biološkom aktivnošću. [24] Modifikacije peptidne okosnice općenito se odnose na uvođenje surogata amidne veze. Zamjena amidnih veza koje nisu izravno uključene u biološku interakciju s ciljanom molekulom, jedna je od najčešće korištenih strategija za poboljšanje proteolitičke stabilnosti peptida *in vivo*. Međutim, ove modifikacije mogu značajno utjecati na kemijske značajke peptidne veze, osobito one povezane s konformacijom i afinitetom vezanja s ciljanim proteinom. [24,27] Od pojave peptidomimetike predloženo je nekoliko različitih izostera amidne veze koji oponašaju strukturne značajke peptidne veze te moduliraju konformacijski profil, kao i sposobnost vezanja atoma vodika. [30,31] Modifikacije bočnih lanaca aminokiselina također se odnose na uvođenje lokalnih strukturnih promjena. U strukturu peptida uvode se od jednostavnijih D- ili β - i γ -aminokiselina do konformacijski ograničenijih aminokiselina. Primjenjuju se neprirodne aminokiseline s ciljem povećanja afiniteta za vezanje određenih dijelova strukture peptida s ciljanom molekulom. [24] Nadalje, moduliranjem hidrofobnog sadržaja peptida uvođenjem aromatskih skupina ili polarnih skupina utječe se na uspostavljanje važnih interakcija s ciljanim receptorom. Uvođenje modifikacija u bočnim aminokiselinskim lancima uglavnom modulira konformacijski profil peptida, regulirajući pritom fleksibilnost svih rotirajućih veza prisutnih u aminokiselinama. [27] Primjenjuju se različite strategije za uvođenje konformacijskih ograničenja u peptide, uključujući C α - i N-alkilaciju aminokiselina te primjenu N α -C α cikliziranih aminokiselina. Ograničavanje rotacije bočnih lanaca također se može postići uvođenjem dvostruke veze ili ciklopropanskog prstena u strukturu peptida, odnosno primjenom dehidroaminokiselina, odnosno α,β -nezasićenih α -aminokiselina, te ciklopropil-aminokiselina. Smanjenje rotacije bočnih lanaca važno je za razvoj biološki aktivnih peptidomimetika, osobito u slučaju kada su bočni lanci izravno uključeni u interakcije. [24,27] Zamjena dipeptida alternativnim molekulskim fragmentima koji ga mogu oponašati bez prisutnosti amidne veze jedna je od lokalnih modifikacija značajnih za razvoj peptidomimetika, osobito inhibitora proteaza. [24] Prvi uvedeni dipeptidni izoster je piperazinon laktam, a do danas je otkriven široki niz različitih izostera. [24,32] Drugi uobičajeni pristup zamjeni dipeptidnih jedinica jest

primjena linearnih ili cikličkih δ -aminokiselina koje pokazuju specifična strukturna svojstva za formiranje mimetika β -okreta. [24]

Protein-protein interakcije (PPI) uključene su u brojne biološke procese te igraju ključnu ulogu u raznim bolestima. PPI uvjetovane su hidrofobnošću, ionskim i vodikovim vezama, te van der Waalsovima interakcijama između površine dva proteina. Prema tome, molekule koje mogu ciljati PPI imaju značajan terapijski potencijal. Međutim, male molekule teško ciljaju PPI jer su vezne površine između proteina obično velike i plitke te uključuju mnoge polarne i hidrofobne interakcije. [23,24] Otkriveno je da se na površini proteina nalaze specifična mjesta, odnosno aminokiselinski ostaci koji imaju veliku sklonost k vezanju liganada te povoljno doprinose slobodnoj energiji vezanja. Takva mjesta nazivaju se proteinski „hot-spots“, a uglavnom se radi o visoko uređenim motivima sekundarne strukture (α -uzvojnice, β -ploče i β -okreti). [23] Otkriće i sinteza malih molekula koje oponašaju elemente sekundarne strukture te ostvaraju jednaka ili slična funkcionalna svojstva dovelo je do značajnog napretka peptidomimetike. [33] Mimetici sekundarne strukture uključuju mimetike α -uzvojnice, mimetike β -okreta te mimetike β -ploče. U ovu skupinu mogu se uključiti i mimetici β -ukosnice. [24]

Globalna ograničenja predstavljaju korisne pristupe za stvaranje konformacijski reduciranih peptidomimetičkih molekula ili za stabilizaciju peptida u njihovim sekundarnim strukturama. Transformacija linearnog peptida u makrocikličku strukturu predstavlja atraktivnu strategiju za stvaranje konformacijski reducirane peptidomimetičke molekule. Ovom metodom modificira se cjelokupni konformacijski profil ciljanog peptida. Makrociklički peptidi privukli su veliku pozornost kao potencijalni terapijski agensi, osobito za kontrolu protein-protein interakcija (PPI), koje su često teško dostupne malim molekulama. Osim, toga u usporedbi s linearnim peptidima, makrociklički peptidi pokazuju veću metaboličku otpornost te mogu zauzeti jasno definiranu konformaciju, što rezultira povećanjem selektivnosti prema receptorima te većim afinitetom vezanja. [24] Tijekom godina razvijeni su mnogi sintetski pristupi za ciklizaciju linearnog peptida u makrociklički. [34] Makrociklizacija posebno je značajna za stabilizaciju peptida u njihovim sekundarnim strukturama. [24]

Jedno od najuspješnijih područja primjene peptidomimetika u otkrivanju lijekova jest razvoj inhibitora enzima. Posebno su se proteaze pokazale kao izuzetno privlačne terapijske mete za liječenje različitih bolesti, s obzirom na ključne uloge koje imaju u biološkim procesima. Tijekom godina, osnovni koncepti i strategije vezane uz peptidomimetike značajno su se razvili, što omogućuje stvaranje raznovrsnih spojeva koji se prilagođavaju specifičnim terapijski važnim ciljevima. [27]

2.3. DEPSIPEPTIDI

Depsipeptidi se mogu definirati kao pseudopeptidi u kojima je amidna veza zamijenjena esterskom vezom (slika 3). Pritom je pseudopeptid (i) peptidomimetik koji sadržava pseudopeptidnu vezu kao surogat amidne veze ili (ii) poliamid građen iz neproteinogenih α -aminokiselina. Pseudopeptidne veze uvode se u spojeve s ciljem postizanja konformacijskih promjena koje utječu na karakter vodikovih veza i fleksibilnost. Nadalje, povećava se otpornost prema enzimskoj degradaciji te se povećavaju specifičnost, potencijal i biološka aktivnost receptora. [23]



Slika 3. Struktura peptida (*lijevo*) i struktura depsipeptida (*desno*) [35]

Poznato je više od 1300 cikličkih depsipeptida koji su prisutni u prirodi. De Spiegeleer i suradnici napravili su temeljitu klasifikaciju i bazu podataka o depsipeptidima na osnovu njihovih kemijskih svojstava. [36] Depsipeptide su klasificirali na temelju toga sadrže li jednu ili više esterskih veza, javljaju li se višestruke esterske veze pravilno ili nepravilno te je li kisikov atom u esterskoj vezi u α , β ili distalnom položaju. Postoji mnogo različitih biosintetskih puteva za sintezu depsipeptida koji se mogu klasificirati na različite načine. [37]

Prirodni proizvodi važan su izvor farmakološki aktivnih spojeva ili vodećih struktura za razvoj novih sintetskih lijekova. [38,39] Među prirodnim proizvodima posebno su interesantni peptidi zbog ključne uloge koju imaju u raznim fiziološkim procesima. Iako postoje ograničenja za primjenu peptida kao lijekova *per se*, njihova potencijalno visoka učinkovitost u kombinaciji s minimalnim nuspojavama učinila ih je vodećim spojevima u razvoju lijekova. [39] Međutim, nepovoljna svojstva peptida mogu se poboljšati različitim vrstama modifikacija. [40] Kao metoda za dobivanje konformacijski ograničenijih, a samim time stabilnijih i biološki aktivnijih peptida, često se primjenjuju različite peptidomimetičke modifikacije te ciklizacija linearnih peptida. [41] Amidne skupine podvrgnute su proteolitičkoj hidrolizi. Njihovom zamjenom esterskim skupinama nastaju stabilniji spojevi koji su manje podložni proteolizi. [42] Uz sve moguće modifikacije kojima se može unaprijediti metabolička stabilnost peptida, prirodni ciklički depsipeptidi, koji uz amidne veze sadrže jednu ili više esterskih veza, ističu se kao potencijalno važni kandidati za otkrivanje i razvoj novih lijekova. [39]

Ciklički depsipeptidi prisutni su u mnogim prirodnim organizmima poput gljiva, bakterija i morskih organizama. [43] Poznato je da ovi spojevi i njihovi derivati posjeduju širok spektar bioloških aktivnosti, uključujući antivirusno, antimikrobno, insekticidno, antitumorsko, protuupalno i imunosupresivno djelovanje. Ipak, najizraženiji terapijski potencijal pokazali su kao antikancerogeni i posebno antimikrobni agensi. Pojava mnogih patogena otpornih na više lijekova te hitna potreba za novim snažnijim antimikrobnim sredstvima usmjerila je pozornost na ovu skupinu prirodnih spojeva kao ključne kandidate za razvoj novih antibakterijskih sredstava. Mnogi depsipeptidi s antibakterijskim djelovanjem ostvaruju svoj učinak ometanjem pravilne sinteze ili funkcije bakterijske stanične stijenke ili membrane, što predstavlja njihov primarni mehanizam djelovanja. [39]

Među raznovrsnim terapijskim spojevima, prirodni ciklički peptidi istaknuli su se kao intenzivno istraživani spojevi s velikim potencijalom za ciljano djelovanje na tumore. [44] Zanimljivo je da depsipeptidi obuhvaćaju više od 1300 prirodnih molekula, koje osim prisutnosti esterske i amidne veze karakteriziraju raznolike acilne skupine i drugi strukturni elementi te širok spektar bioloških aktivnosti. [45] Detaljno su istraženi specifični depsipeptidi s poznatim sekvencama, razjašnjena je njihova molekularna struktura te su identificirani mehanizmi djelovanja kojima ciljaju tumorske stanice. [46] Depsipeptidi djeluju citotoksično putem različitih mehanizama, pri čemu se posebno ističe njihova sposobnost probijanja stanične membrane te destabilizacija tubulina i mikrotubula, što u konačnici dovodi do apoptoze. [47] Depsipeptidi s antitumorskim djelovanjem ostvaruju svoj učinak kroz različite mehanizme, uključujući induciranje apoptoze u tumorskim stanicama, induciranje autofagije u tumorskim stanicama, inhibiranje skupine proteaza, elastaza, inhibiranje histon deacetilaza, inhibiranje staničnog rasta, inhibiranje topoizomeraza, ometanje mikrofilamenata te induciranje onkoze. [46]

Izolacija i pročišćavanje većih količina prirodnih depsipeptida, zajedno s ograničenim pristupom njihovim sintetskim analogima, predstavljaju značajnu prepreku u njihovoj primjeni kao ključnih spojeva za razvoj novih lijekova. Međutim, do danas su razvijene različite metode kojima se mogu pročistiti depsipeptidi. Često se *in vitro*, pa čak *in vivo* testovi provode istovremeno s pročišćavanjem kako bi se analizirala biološka svojstva od interesa. [46] Sinteza cikličkih depsipeptida izazovna je zbog njihove strukturne raznolikosti i složenosti, osobito u makrocikličkoj domeni, te zbog složenosti bočnih lanaca, često lipidne prirode. Opća strategija sinteze može se podijeliti u tri glavna koraka:

- Priprema neuobičajenih građevnih blokova poput aminokiselina, lipida, šećera itd.
- Ugradnja tih građevnih blokova u peptidni lanac koristeći standardne metode sinteze peptida.

- Ciklizacija peptida u otopini ili na čvrstoj podlozi, kroz makrolaktamizaciju (stvaranje amidne veze) ili makrolaktonizaciju (stvaranje esterske veze).

Osnovne metode u sintezi depsipeptida su sinteza u otopini te sinteza na čvrstoj fazi. Iako je sinteza i ugradnja građevnih blokova tehnički zahtjevan postupak, ključni korak u procesu je zatvaranje prstena. Ovaj korak ima ključnu važnost s obzirom da utječe na uspješnost cjelokupnog procesa sinteze. [39] U provedenim istraživanjima uočeno je da ciklički depsipeptidi pokazuju prednost kao što je povećanje otpornosti na proteaze te sposobnosti vezanja proteina. [46,48]

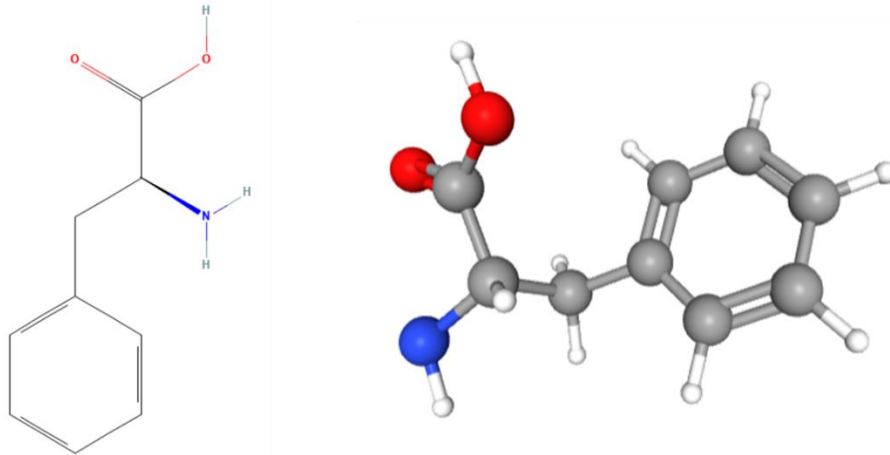
Depsipeptidi su kompleksne molekule koje su izazvale značajan interes u području onkologije. Do danas je identificirano nekoliko značajnih kandidata, s istraživanjima koja sežu od *in vitro* do kliničkih ispitivanja. Postoji mogućnost da bi upravo takvi spojevi mogli postati važan sastojak funkcionalne hrane. Ipak, u svom izvornom obliku, depsipeptidi su još uvijek daleko od integracije u prehrambene proizvode, prvenstveno zbog svoje složene strukture i osjetljivosti na okolne uvjete. Postignuti napredak u metodama pročišćavanja i sinteze značajno je unaprijedio sposobnost manipulacije ovih molekula. Kako bi se depsipeptidi u budućnosti mogli koristiti kao terapijska sredstva, potrebna su daljnja istraživanja usmjerena na razvoj učinkovitih tehnika kapsuliranja koje bi očuvale njihovu antitumorsku aktivnost. Uz to, važno je uzeti u obzir i fiziološki učinak njihovih produkata razgradnje. [46]

2.4. AMINOKISELINA FENILALANIN

Fenilalanin (Phe, F), kemijski poznat kao α -amino- β -fenilpropionska kiselina ($C_6H_5CH_2CH(NH_2)COOH$), esencijalna je proteogena aminokiselina (slika 4). [49] Fenilalanin u svom bočnom ogranku sadrži fenilni prsten. Zbog aromatske strukture bočnog ogranka, svrstava se u nepolarne (hidrofobne) aminokiseline te sudjeluje u hidrofobnim interakcijama. L-fenilalanin je bijeli kristalni prah bez mirisa te blago gorkog okusa. Fenilalanin je esencijalna aromatična kiselina, što znači da se mora unositi putem hrane. Ova aminokiselina ima ključnu ulogu u biosintezi drugih aminokiselina te je značajna za strukturu i funkciju mnogih proteina i enzima. [50]

U ljudskom metabolizmu, fenilalanin se procesom hidroksilacije pretvara u tirozin, koji je neophodan za biosintezu neurotransmitera poput dopamina i norepinefrina, ključnih za normalno funkcioniranje živčanog sustava. Međutim, prirodni nedostatak enzima koji katalizira reakciju hidroksilacije može dovesti do ozbiljnih posljedica, uključujući nakupljanje ketonskih razgradnih produkata u urinu, što je obilježje metaboličkog poremećaja poznatog kao fenilketonurija (PKU). [49,50] Osobe s fenilketonurijom imaju povišene razine fenilalanina u plazmi do 400 puta više od normalne. Fenilalanin je prekursor neurotransmitera koji se

nazivaju kateholamini, a to su tvari slične adrenalinu. Ova aminokiselina od velikog je značaja za sintezu proteina i pravilno funkcioniranje organizma, čineći njezin metabolizam izuzetno važnim za ljudsko zdravlje. [50]



Slika 4. Struktura fenilalanina (*lijevo*) i njegova trodimenzijska struktura (*desno*)
(NCBI, 2024)

L-fenilalanin ugrađuje se u proteine, dok se D-fenilalanin koristi kao lijek protiv bolova. Fenilalanin također apsorbira ultraljubičasto zračenje, što omogućava njegovu primjenu u kvantifikaciji količine proteina u laboratorijskim uvjetima. Ova aminokiselina prisutna je u visokoj koncentraciji u ljudskom mozgu i krvnoj plazmi. Za pravilan metabolizam fenilalanina neophodni su bipterin, željezo, niacin, vitamin B6, bakar i vitamin C. Preporučeni dnevni unos fenilalanina za odraslu osobu iznosi oko 5 grama, dok se ponekad optimalni unos može povećati do 8 grama dnevno. Najbogatiji izvori fenilalanina su visokoproteinske namirnice poput mesa, svježeg sira i pšeničnih klica. Osim toga, novi izvor fenilalanina postali su umjetni zaslađivači poput aspartama. L-fenilalanin potencijalno pokazuje antidepresivne učinke zahvaljujući svojoj ulozi prekursora u sintezi neurotransmitera, norepinefrina i dopamina. Što se tiče mogućeg djelovanja L-fenilalanina kod vitiliga, mehanizam još nije u potpunosti razjašnjen. Pretpostavlja se da bi mogao stimulirati sintezu melanina, pigmenta odgovornog za boju kože, posebno u zahvaćenim područjima. [50]

L-fenilalanin ima značajnu ulogu u modulaciji imunološkog odgovora, osobito u vezi sa supresijom funkcije T-stanica. Istraživanja ukazuju na to da smanjena razina fenilalanina, u kombinaciji s povećanom koncentracijom vodikova peroksida, može dovesti do supresije proliferacije T-stanica te narušiti njihove signalne puteve. To je posljedica djelovanja enzima Phe oksidaze koji katalizira oksidativnu deaminaciju Phe. [51,52] Istraživanja ukazuju na regulatornu ulogu fenilalanina i njegovog metabolizma u proliferaciji i aktivaciji T-stanica te u

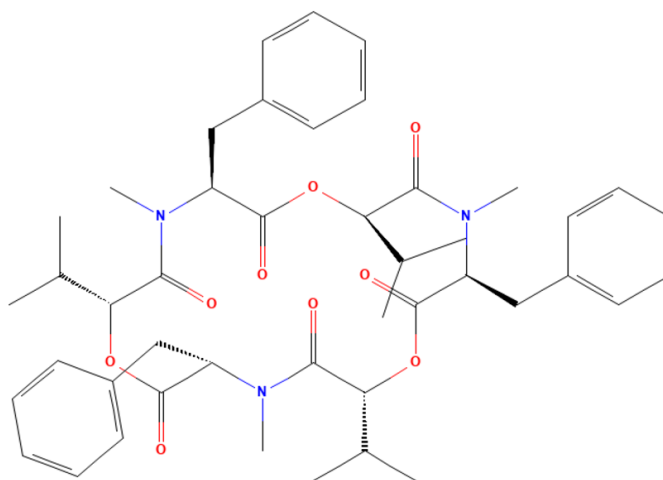
naknadnim imunološkim odgovorima. Ovo može biti značajno za razumijevanje određenih imunoloških poremećaja te potencijalnih terapijskih pristupa. [52]

2.5. PRIMJERI DEPSIPEPTIDA S FENILALANINOM

2.5.1. Beauvericin

Beauvericini i alobeauvericini, prvobitno izolirani iz kulture gljivice *Beauveria bassiana*, pripadaju skupini cikloheksadepsipeptida (slika 5). Njihova osnovna struktura sastoji se od tri jedinice *N*-Me-L-fenilalanina, koje su naizmjenično povezane s tri jedinice 2-hidroksi-D-izovalerijanske kiseline. [53] Zanimljivo je da se ovi spojevi mogu sintetizirati u malim količinama pomoću basianolid ili beauvericin sintetaza. Alternativno, moguće ih je sastaviti kao cikličke trimere iz tri D-Hiv-*N*-Me-L-aminokiselinska dipeptidolna monomera. [46,54]

Beauvericini pripadaju skupini depsipeptida koji induciraju apoptozu u tumorskim stanicama. Apoptoza kao oblik programirane stanične smrti ima važnu ulogu u regulaciji tumorskih stanica. Općenito, takvi depsipeptidi aktiviraju kaspazu-3, Fas/FasL, p21 i p27 te inhibiraju histonske deacetilaze, što u konačnici rezultira pro-apoptotskom signalizacijom. [46] Beauvericini su pokazali značajne antitumorske učinke protiv različitih vrsta karcinoma, uključujući stanice raka pluća, epitelni karcinom, višestruko rezistentni karcinom vrata maternice i karcinom vrata maternice. [53] Osim toga, njihova antitumorska aktivnost potvrđena je *in vivo*. Ovi spojevi djeluju na način da se integriraju u staničnu membranu, gdje formiraju kationski selektivni kanal koji narušava koncentraciju monovalentnih i dvovalentnih unutarstaničnih kationa. Također, povećavaju razine unutarstaničnog kalcija te induciraju apoptozu posredovanu oksidacijskim stresom. [46,55]



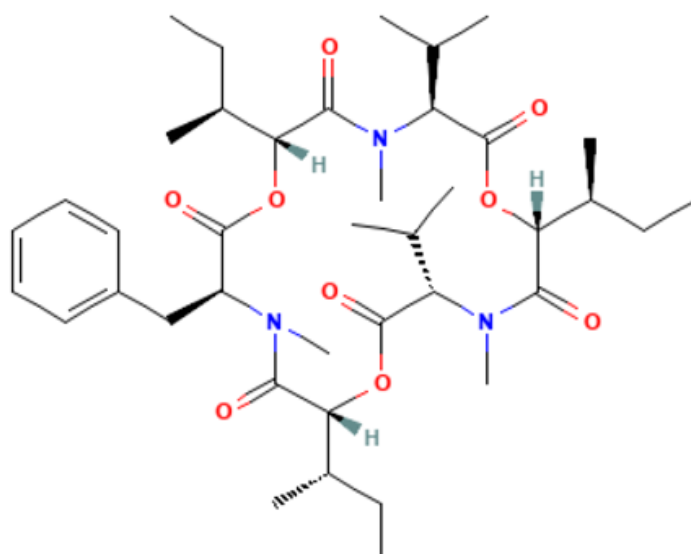
Slika 5. Struktura beauvericina (NCBI, 2024)

2.5.2. Beauveniatiini

Beauveniatiini (slika 6) prvi put su izolirani iz ekstrakta micelija vrste *Acremonium* spp., dok su dodatni analozi ovih spojeva proizvodi vrsta *Fusarium* i *Isaria* spp. [57] Strukturno, ovi spojevi predstavljaju hibrid aromatskih i alifatskih ciklodepsipeptida, a karakteristični su po prisutnosti *N*-Me-valina, *N*-Me-leucina i *N*-Me-fenilalanina. [46,54]

Beauveniatiini pripadaju skupini depsipeptida koji induciraju autofagiju u tumorskim stanicama. Oni mogu aktivirati unutarstanične glasnike poput protein kinaze aktivirane adenozin monofosfatom i transkripcijski faktor EB. Nadalje, mogu inhibirati molekule koje potiču preživljavanje čime induciraju autofagiju kroz različite mehanizme. [46]

Beauveniatin F pokazao je snažnu citotoksičnost protiv stanica mijelogene leukemije otpornih na adriamicin te sposobnost induciranja autofagije u fluorescentno zelenim protein-lakim lancima 3-stabilnih HeLa stanica. [58] Osim toga, ovi depsipeptidi pokazali su citotoksične učinke protiv stanica epitelnog karcinoma, limfoma i karcinoma pluća, s IC_{50} vrijednostima u rasponu od 1,00 do 2,29 μ M. Djelovanje je zabilježeno i na epitelne stanice bubrega, s IC_{50} vrijednostima u rasponu od 1,9 do 5,5 μ M. [59]



Slika 6. Struktura beauveniatina F (NCBI, 2024)

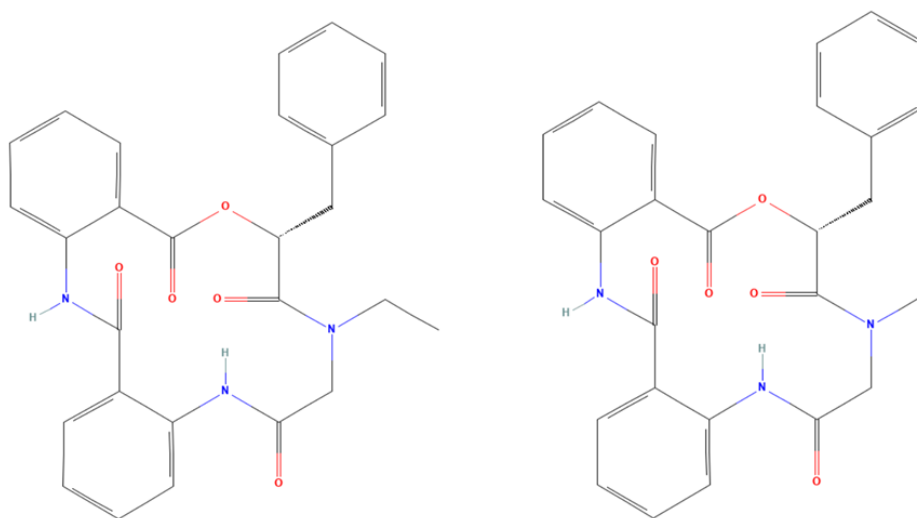
2.5.3. Nobilamid I

Nobilamid je prirodni spoj koji je prvotno izoliran iz bakterije *Streptomyces* sp. CN48, povezane s mekušcima (slika 7). [61] Radi se o linearnom heptapeptidu koji sadrži ostatak *Z*-di-dehidroaminobutanske kiseline, za koji se smatra da je odgovoran za inhibicijski učinak na

2.5.4. Klavatustidi A i B

Klavatustidi A i B, prvobitno izolirani iz uzgojenog micelija i bujona *Aspergillus clavatus*, predstavljaju depsipeptide koji sadrže dimer antranilne kiseline i D-fenil mliječnu kiselinu (slika 8). U svojoj strukturi sadrže D-fenilalanin. [46,64]

Klavatustidi pripadaju skupini depsipeptida koji inhibiraju histon deacetilaze. Inhibitori histon deacetilaza mogu inducirati apoptozu, odgoditi napredovanje staničnog ciklusa te inhibirati diferencijaciju stanica raka. [46] Ovi spojevi uzrokuju supresiju proliferacije staničnih linija hepatocelularnog karcinoma (Hep G2, SMMC-7721 i BEL-7402), induciraju zaustavljanje Hep G2 stanica u G1 fazi staničnog ciklusa te smanjuju udio stanica u S fazi. [65] Ključnu ulogu u inhibiciji prijelaza G1 u S fazu, izazvanoj klavatustidom B, ima ciklin E2, kako je dokazano na nekoliko staničnih linija raka. [66] Hep G2 stanice pokazale su veću osjetljivost na supresiju proliferacije izazvanu klavatustidima u usporedbi s normalnim ljudskim hepatocitima. Osim toga, klavatustid B učinkovito inhibira rast staničnih linija humanog karcinoma gušterače i raka prostate, koje su pokazale otpornost na kemoterapiju i radioterapiju. Ova otkrića ukazuju na značajan potencijal klavatustida za razvoj novih antitumorskih terapija. [46,67]



Slika 8. Struktura klavatustida A (*lijevo*) i klavatustida B (*desno*) (NCBI, 2024)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE

Sva otapala korištena za pripravu ciljanih depsipeptida pročišćena su prema standardnim postupcima, dok su kemikalije korištene u radu bile analitičke čistoće. [70]

Tijek kemijskih reakcija, kao i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva praćeni su pomoću tankoslojne kromatografije (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel), s fluorescentnim indikatorom valne duljine 254 nm. Detekcija neferocenskih spojeva provedena je primjenom tankoslojne kromatografije pomoću ultraljubičaste (UV) svjetlosti valne duljine 254 nm. Osim toga, naknadno je na pločice nanesen ninhidrin uz paralelno zagrijavanje.

Sintetizirani produkti pročišćeni su tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu (Kieselgel 60 HF254, KGaA, Darmstadt, Njemačka) primjenom smjese etil-acetata i diklormetana različitih omjera (1 : 10, 1 : 5, 1 : 1), koja je pritom služila kao eluens.

Karakterizacija sintetiziranih spojeva provedena je primjenom infracrvene spektroskopije (IR) i spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR). Tališta su određena na Reichert Thermovar HT 1 BT 11 i nisu korigirana. UV/Vis- (ultraljubičasto-vidljiv) i CD-spektri (cirkularni dikroizam) snimljeni su na CD-spektrofotometru Jasco-810 (Jasco, Tokyo, Japan) u diklormetanu (CH_2Cl_2) i dimetil-sulfoksidu (DMSO). IR-spektri uzoraka (koncentracijski i temperaturno ovisni) snimljeni su na spektrofotometru Spectrum Two (PerkinElmer, Ujedinjeno Kraljevstvo) u diklormetanu (CH_2Cl_2). ^{13}C -NMR- i ^1H -spektri određeni su u CDCl_3 na spektrometru Bruker AV600 (Bruker, Rheinstetten, Njemačka), uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u jedinici ppm, a cijepanja skraćenicama: s (singlet), d (dublet), t (triplet), pt (pseudotriplet), m (multiplet).

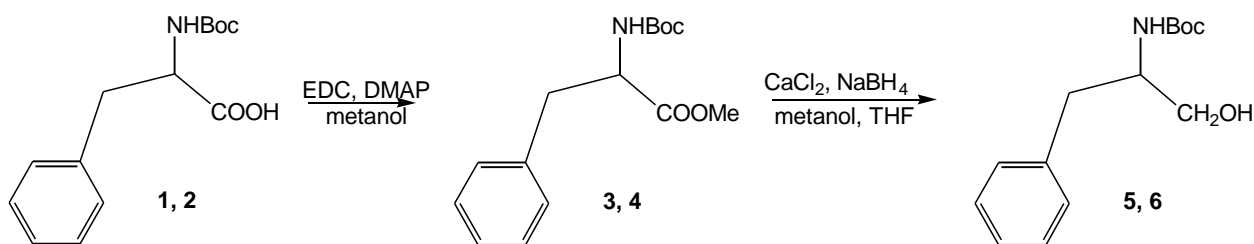
Popis kemikalija korištenih za sintezu depsipeptida u ovome radu:

- diklormetan, CH_2Cl_2 (p.a., Kemika)
- etil-acetat, EtOAc (Et-etil; Ac-acetil) (p.a., Kemika)
- dimetil-sulfoksid, DMSO (Merck)
- natrijev klorid, NaCl (Kemika)
- natrijev hidroksid, NaOH (Kemika)
- metanol, CH_3OH (p.a., Kemika)
- acetil-klorid, CH_3COCl (98 %, Alfa Aesar)
- klorovodična kiselina, HCl (37 %, Sigma-Aldrich)
- sumporna kiselina, H_2SO_4 (Sigma-Aldrich)
- limunska kiselina, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (Kemika)
- bezvodni natrijev sulfat, Na_2SO_4 (Kemika)

- natrijev hidrogenkarbonat, NaHCO₃ (Kemika)
- aceton , CH₃COCH₃ (p.a., Kemika)
- kloroform, CDCl₃ (p.a., Kemika)
- natrijev azid, NaN₃ (Kemika)
- etil-kloroformijat, C₃H₅ClO₂ (99 %, Acros Organics)
- *tert*-butanol, (CH₃)₃COH (Alfa Aesar)
- trietilamin, Et₃N (97 %, Sigma-Aldrich)
- 4-dimetilaminopiridin, DMAP (Aldrich, Santa Clara, CA, USA)
- N´-(3-dimetilaminopropil)-N-etilkarbodiimid-hidroklorid, EDC (99 %, Acros Organics, Geel, Belgija)

3.2. POSTUPAK PRIPRAVE FEROCENSKIH PEPTIDA

L- i D-fenilalaninol (**5,6**) te ferocenski peptidi (**7-14**) pripravljeni su postupcima koji su prikazani na shemama **1** i **2**. Sinteza *N*-zaštićene ferocenske aminokiseline (Boc-Fca) kao i D-fenilalaninola (**3**) opisani su u literaturi [71,72] te njihovi spektroskopski podaci odgovaraju onima prikazanim u literaturi.



Shema 1. Priprava L- i D-fenilalaninola

3.2.1. Priprava Boc-L-Phe-COOMe (**3**) i Boc-D-Phe-COOMe (**4**)

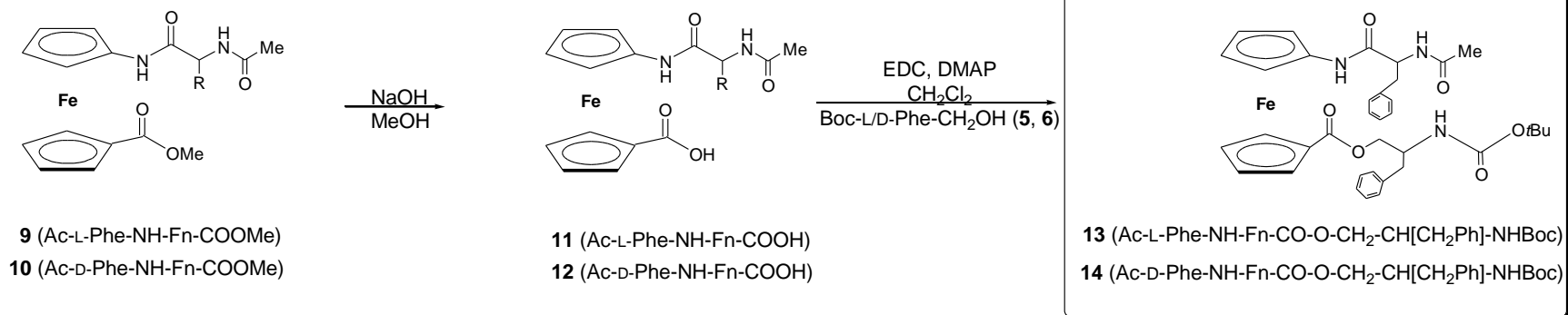
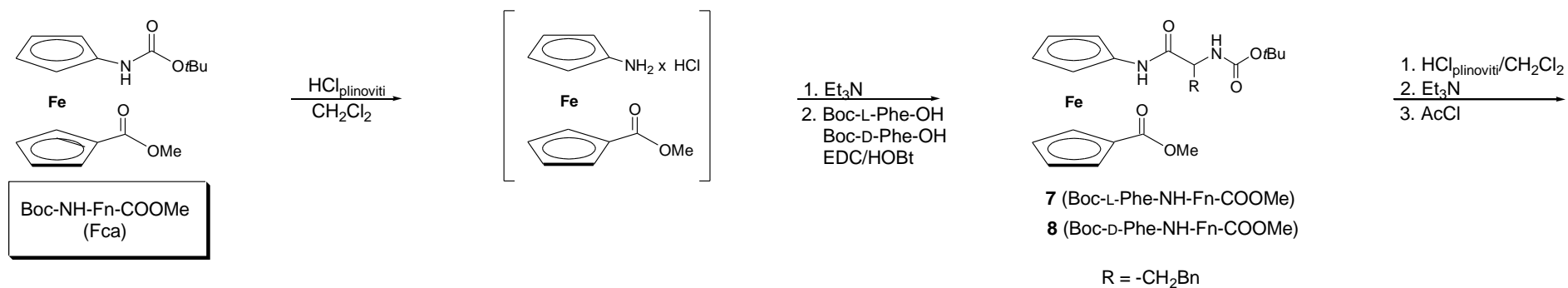
U suspenziju Boc-L-fenilalanina (**1**), odnosno Boc-D-fenilalanina (**2**) (100 mg, 0,37 mmol) u metanolu (5 mL) dodaju se EDC (58 mg, 0,37 mmol) i DMAP (37 g, 0,37 mmol). Reakcijska smjesa miješa se pri sobnoj temperaturi kroz naredna 24 sata. Nakon što se tankoslojnom kromatografijom (CH₂Cl₂:EtOAc = 10:1) ustanovi da je reakcija završena, metanol se upari, a u sirupasti produkt se doda diklormetan, ispere se 0,1 M HCl, 5% otopinom NaHCO₃ i zasićenom otopinom NaCl. Stajanjem u frižideru, dolazi do taloženja produkta u obliku bijelih kristala (98 %). R_f = 0.25 (etilacetat)

IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3430 sr (NH_{Boc}), 1742 j (C=O_{Boc}), 1714 j (C=O_{COOCH₃}).

3.2.2. Priprava Boc-L-Phe-CH₂OH (**5**) i Boc-D-Phe-CH₂OH (**6**)

U smjesu 1 mL metanola i 2 mL THF doda se svježe zdrobljeni CaCl₂ (300 mg) koji se nakon miješanja kroz pola sata otopi, nakon čega se pripremljena otopina dobro ohladi u ledenoj kupelji. Doda se 210 mg (5,5 mmol) NaBH₄ i lagano dokapa Boc-L-Phe-COOMe (**3**), odnosno Boc-D-Phe-COOMe (**4**) (500 mg, 1,89 mmol) otopljen u tetrahidrofuranu. Smjesa se lagano zagrijava do 70 °C te se ostavi da refluksira na toj temperaturi naredna 24 sata. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se izlije u hladnu vodu, te se produkt ekstrahira više puta diklormetanom. Organska faza ispere se vodom, zasićenom otopinom NaCl te se osuši na bezvodnom NaSO₄. Nakon uparavanja diklormetana, dobiveno je 90 % žutog sirupa. R_f = 0.3 (CH₂Cl₂:EtOAc = 5:1).

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3429 sr (NH_{Boc}), 3310 š (OH_{CH₂OH}), 1731 j (C=O_{Boc}).



Shema 2. Priprava prekursora (7-12) i ferocenskih depsipeptida 13 i 14

3.2.3. Priprava peptida Boc-L-Phe-NH-Fn-COOMe (7) i Boc-D-Phe-NH-Fn-COOMe (8)

Prekursor Boc-NH-Fn-COOMe (Fca) (1 g, 2.8 mmol) otopi se u CH₂Cl₂, ohladi na 0 °C i izloži djelovanju plinovitog HCl. Nakon 15 minuta miješanja u ledenoj kupelji, uvođenje HCl-a nastavi se pri sobnoj temperaturi dok se TLC-om ne utvrdi završetak reakcije. Otapalo se otpari na rotacijskom vakuum-uparivaču, a nastali hidroklorid suspendira se u CH₂Cl₂ te obradi sa suviškom Et₃N do pH~9. Dobiveni se slobodni amin kopulira s Boc-L-Phe-OH odnosno Boc-D-Phe-OH (2,044 g, 7,7 mmol) primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon 48 sati miješanja pri sobnoj temperaturi, rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom NaHCO₃, 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz CH₂Cl₂ : EtOAc = 5 : 1 kao eluens. Dobiveno je 1,05 g (75%) produkta u obliku narančaste smole.

Boc-L-Phe-NH-Fn-COOMe (7)

R_f = 0,85 (CH₂Cl₂ : EtOAc = 5 : 1)

IR (CH ₂ Cl ₂) ν _{max} /cm ⁻¹	3416 sr (NH _{slobodni}), 3324 sl (NH _{asocirani}), 1709 j (C=O _{COOMe}), 1685 j (C=O _{Boc}), 1640 sr (C=O _{CONH}), 1535 sr, 1496 sr, 1466 sr (amid II)
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	7,34-7,24 (m, 5H, H _{fenil}), 7,32 (s, 1H, NH ^a _{Fn}), 5,15 (s, 1H, NH _{Boc}), 4,72 (s, 1H, H _{Fn}), 4,68 (s, 1H, H _{Fn}), 4,61 (s, 1H, H _{Fn}), 4,44 (s, 1H, H _{Fn}), 4,39 (d, J = 6.6 Hz, 1H, CH _{α-Phe}), 4,32 (s, 2H, H _{Fn}), 4,02 (s, 1H, H _{Fn}), 4,00 (s, 1H, H _{Fn}), 3,78 (s, 3H, CH ₃ -COOMe), 3,17 (dd, J ₁ = 6.1 Hz, J ₂ = 13.1 Hz, 1H, CH _{2a-Phe}), 3,09 (dd, J ₁ = 7.1 Hz, J ₂ = 13.5 Hz, 1H, CH _{2b-Phe}), 1,42 [s, 9H, (CH ₃) ₃ -Boc]
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	171,84 (CO ^a _{Fn}), 169,93 (CO ^b _{Fn}), 155,66 (CO _{Boc}), 136,92 (C _q fenil), 129,53 (CH _{fenil}), 128,87 (CH _{fenil}), 127,14 (CH _{fenil}), 94,51 (C _q Fn), 80,62 (C _q Boc), 72,76, 72,05 (C _q Fn), 71,36, 71,32, 66,79, 66,57, 63,74, 63,25 (CH _{Fn}), 56,38 (CH _{Phe}), 51,81 (CH ₃ -COOMe), 38,37 (CH ₂ -Phe), 28,43 [(CH ₃) ₃ -Boc]

Boc-D-Phe-NH-Fn-COOMe (8) $R_f = 0,85$ (CH₂Cl₂ : EtOAc = 5 : 1)

IR (CH ₂ Cl ₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$	3418 sr (NH _{slobodni}), 3324 sl (NH _{asocirani}), 1710 j (C=O _{COOMe}), 1685 j (C=O _{Boc}), 1645 sr (C=O _{CONH}), 1535 sr, 1496 sr, 1468 sr (amid II)
¹H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	7,33-7,25 (m, 5H, H _{fenil}), 7,32 (s, 1H, NH ^a _{Fn}), 5,15 (s, 1H, NH _{Boc}), 4,71-4,69 (m, 1H, H _{Fn}), 4,67 (pt, 1H, H _{Fn}), 4,61 (s, 1H, H _{Fn}), 4,42 (s, 1H, H _{Fn}), 4,39 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H, CH _{α-Phe}), 4,31 (pt, 2H, H _{Fn}), 4,02 (pt, 1H, H _{Fn}), 4,00 (s, 1H, H _{Fn}), 3,78 (s, 3H, CH ₃ -COOMe), 3,16 (m, 1H, CH _{2α-Phe}), 3,08 (m, 1H, CH _{2β-Phe}), 1,41 [s, 9H, (CH ₃) ₃ -Boc].
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	171,87 (CO ^a _{Fn}), 169,93 (CO ^b _{Fn}), 148,84 (CO _{Boc}), 136,89 (C _{qfenil}), 129,53 (CH _{fenil}), 128,88 (CH _{fenil}), 127,14 (CH _{fenil}), 94,46 (C _{qFn}), 71,87 (C _{qBoc}), 72,77, 72,02 (C _{qFn}), 71,35, 71,31, 66,80, 66,57, 63,73, 63,25 (CH _{Fn}), 56,36 (CH _{Phe}), 51,84 (CH ₃ -COOMe), 38,38 (CH ₂ -Phe), 28,42[(CH ₃) ₃ -Boc].

3.2.4. Priprava peptida Ac-L-Phe-NH-Fn-COOMe (9) i Ac-D-Phe-NH-Fn-COOMe (10)

U otopinu Boc-L-Phe-NH-Fn-COOMe (7) / Boc-D-Phe-NH-Fn-COOMe (8) (0,95 g, 1,88 mmol) u CH₂Cl₂ ohlađenu na 0 °C uvodi se plinoviti HCl. Nakon 3 sata miješanja na sobnoj temperaturi otapalo se upari, a rezultirajući hidroklorid suspendira se u suhom CH₂Cl₂ (5 ml) i otopi dodatkom 2,1 mL Et₃N do pH~9. Nastalaj se otopini, ohlađenoj na 0 °C, uz miješanje oprezno dokapa 0,9 mL AcCl. Nakon 15 minuta miješanja pri 0 °C, reakcija se prekine dodatkom vode. Potom se reakcijska smjesa više puta ekstrahira s CH₂Cl₂. Organski se sloj ispere zasićenom vodenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz EtOAc kao eluens.

Ac-L-Phe-NH-Fn-COOMe (9) $t_r = 127^\circ\text{C}$; $R_f = 0,67$ (EtOAc)

IR (CH ₂ Cl ₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$	3418 sr (NH _{slobodni}), 3290 sr, 3248 sl (NH _{asocirani}), 1709 j (C=O _{COOMe}), 1696 j, 1668 j (C=O _{CONH}), 1574, 1558, 1540, 1535, 1516, 1507, 1498, 1466 (amid II)
¹H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	7,68 (s, 1H, NH _{Fn}), 7,33-7,24 (m, 5H, H _{fenil}), 6,43 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, NH _{Ac}), 4,77 (q, $J = 7.3$ Hz, 1H, CH _{Phe}), 4,69 (s, 1H,

	H _{F_n}), 4,65 (s, 1H, H _{F_n}), 4,57 (s, 1H, H _{F_n}), 4,45 (s, 1H, H _{F_n}), 4,29 (s, 2H, H _{F_n}), 4,03 (s, 1H, H _{F_n}), 4,00 (s, 1H, H _{F_n}), 3,78 (s, 3H, CH ₃ -COOMe), 3,1 (dd, <i>J</i> ₁ = 7.4 Hz, <i>J</i> ₂ = 13.8 Hz, 1H, CH _{2a} -Phe), 3,09 (dd, <i>J</i> ₁ = 6.8 Hz, <i>J</i> ₂ = 13.9 Hz, 1H, CH _{2b} -Phe), 2,02 [s, 3H, CH ₃ -Ac]
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	171,92 (CO ^b _{F_n}), 170,62 (CO ^a _{F_n}), 169,71 (CO _{Ac}), 136,78 (C _q fenil), 129,49, 129,46, 128,85, 127,21 (CH _{fenil}), 94,40 (C _q F _n), 72,72 (CH _{F_n}), 72,05 (C _q F _n), 71,40, 71,28, 66,84, 66,58, 63,89, 63,44 (CH _{F_n}), 55,01 (CH _{Phe}), 51,82 (CH ₃ -COOMe), 38,23 (CH ₂ -Phe), 23,35 (CH ₃ -Ac)

Ac-D-Phe-NH-Fn-COOMe (10)

*t*_f = 120°C; *R*_f = 0,67 (EtOAc)

IR (CH ₂ Cl ₂) <i>v</i> _{max} /cm ⁻¹	3410 sr (NH _{slobodni}), 3295 sr, 3245 sl (NH _{asocirani}), 1715 j (C=O _{COOMe}), 1696 j, 1668 j (C=O _{CONH}), 1574, 1558, 1540, 1535, 1516, 1507, 1498, 1466 (amid II)
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	7,83 (s, 1H, NH _{F_n}), 7,31-7,24 (m, 5H, H _{fenil}), 6,52 (pt, 1H, NH _{Ac}), 4,80-4,76 (m, 1H, CH _{Phe}), 4,69 (m, 1H, H _{F_n}), 4,65 (m, 1H, H _{F_n}), 4,55 (m, 1H, H _{F_n}), 4,46 (m, 1H, H _{F_n}), 4,29 (m, 2H, H _{F_n}), 4,03 (m, 1H, H _{F_n}), 4,00 (m, 1H, H _{F_n}), 3,76 (s, 3H, CH ₃ -COOMe), 3,17-3,13 (m, 1H, CH _{2a} -Phe), 3,10-3,05 (m, 1H, CH _{2b} -Phe), 2,02 [s, 3H, CH ₃ Ac].
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	172,02 (CO ^b _{F_n}), 170,62 (CO ^a _{F_n}), 169,74 (CO _{Ac}), 136,75 (C _q fenil), 129,47, 129,45, 128,82, 127,18 (CH _{fenil}), 94,43 (C _q F _n), 72,74 (CH _{F_n}), 72,35 (C _q F _n), 71,38, 71,28, 66,84, 66,59, 63,79, 63,42 (CH _{F_n}), 54,97 (CH _{Phe}), 51,85 (CH ₃ -COOMe), 38,22 (CH ₂ -Phe), 23,35 (CH ₃ -Ac).

3.2.4. Priprava peptida Ac-L-Phe-NH-Fn-COOH (11) i Ac-D-Phe-NH-Fn-COOH (12)

U otopinu estera Ac-L-Phe-NH-Fn-COOMe (**9**), odnosno Ac-D-Phe-NH-Fn-COOMe (**10**) (320 mg, 0,72 mmol) u CH₃OH (5 mL, 0,14 mmol) doda se NaOH (28,7 mg, 0,72 mmol) i par kapi vode. Nakon 4 sata refluksiranja pri temperaturi od 65 °C, reakcijska se smjesa upari, a ostatak zakiseli 10%-tnom otopinom HCl te ekstrahira EtOAc. Organski sloj ispere se zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari.

Ac-L-Phe-NH-Fn-COOH (11) $t_f = > 200^\circ\text{C}$; $R_f = 0,48$ (EtOAc)

IR (CH ₂ Cl ₂) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$	3411 sr (NH _{slobodni}), 3285 sr, 3256 sr (NH _{asocirani}), 3143-3073 š (OH, COOH), 1716 j, 1696 j, 1683 j, 1654 j (C=O _{COOH, CONH}), 1575, 1569, 1558, 1540, 1533, 1522, 1508, 1498, 1485, 1474 (amid II)
---	---

Ac-D-Phe-NH-Fn-COOH (12) $t_f = > 200^\circ\text{C}$; $R_f = 0,50$ (EtOAc)

IR (CH ₂ Cl ₂) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$	3415 sr (NH _{slobodni}), 3290 sr, 3250 sr (NH _{asocirani}), 3143-3073 š (OH, COOH), 1716 j, 1696 j, 1683 j, 1654 j (C=O _{COOH, CONH}), 1575, 1569, 1558, 1540, 1533, 1522, 1508, 1498, 1485, 1474 (amid II).
---	--

3.2.5. Priprava ciljnih depsipeptida Ac-L-Phe-NH-Fn-CO-O-CH₂-CH[CH₂Ph]-NHBoc (**13**) i Ac-D-Phe-NH-Fn-CO-O-CH₂-CH[CH₂Ph]-NHBoc (**14**)

U otopinu ferocenskih kiselina Ac-L-Phe-NH-Fn-COOH (**11**), tj. Ac-D-Phe-NH-Fn-COOH (**12**) (250 mg, 0,58 mmol) u diklormetanu dodaju se EDC (120 mg, 0,61 mmol) i DMAP (75 mg, 0,61 mmol). Nakon pola sata miješanja pri sobnoj temperaturi u reakcijsku smjesu se doda L- odnosno D-fenilalaninol (**5** i **6**) (150 mg, 0,82 mmol) te se nastavi miješati sve dok se tankoslojnom kromatografijom ne utvrdi da je reakcija gotova. Obrada reakcijske smjese obuhvaća ispiranje diklormetanske faze s 5 % NaHCO₃, 10 % limunskom kiselinom, zasićenom otopinom NaCl te sušenje na bezvodnom NaSO₄. Nakon uparavanja organske faze, sirovi produkt se pročisti u sustavu (CH₂Cl₂:EtOAc = 5:1) pri čemu se dobije 200 mg (28 %) žute smole.

Ac-L-Phe-NH-Fn-CO-O-CH₂-CH[CH₂Ph]-NHBoc (13) $t_f = 225-229^\circ\text{C}$; $R_f = 0,73$ (CH₂Cl₂ : EtOAc = 1 : 3)

IR (CH ₂ Cl ₂) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$	3434 sr (NH _{slobodni}), 3297 sr, 3231 sl (NH _{asocirani}), 1702 j, 1672 j, 1642 j (C=O _{CONH}) 1548, 1505, 1465 (amid II)
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	8,07 (s, 1H, NH _{Fn}), 7,34-7,28; 7,23-7,20; 7,15-7,09 (m, 10H, H _{fenil}), 6,74 (d, 1H, NH _{Ac}), 5,13 (s, 1H, NH _{Boc}), 4,77 (s, 1H, H _{Fn}), 4,69 (s, 1H, H _{Fn}), 4,59 (s, 1H, CH ^a _{Phe}), 4,34 (s, 1H, CH ^b _{Phe}), 4,28 (s, 1H, H _{Fn}), 4,18 (s, 1H, H _{Fn}), 4,14 (s, 4H, H _{Fn}), 3,18-3,15 (m, 2H, CH ^a _{2-Phe}), 3,14-3,11 (m, 2H, CH ^b _{2-Phe}), 2,96-2,92 (m, 2H, CH ^b _{2-Phe}), 2,04 (s, 3H, CH _{3-Ac}), 1,41 [s, 9H, (CH ₃) _{3-Boc}]

¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	171,58 (CO ^a _{F_n}), 170,94 (CO ^b _{F_n}), 170,76 (CO _{Ac}), 155,97 (CO _{Boc}), 137,34, 136,76 (C _{qfenil}), 129,51-127,02 (CH _{fenil}), 80,30 (C _{qBoc}), 79,82, 78,68 (C _{qF_n}), 72,76, 72,44, 72,35, 72,14, 71,74, 71,41, 71,26, 71,01 (CH _{F_n}), 63,03, 54,99 (CH _{Phe}), 60,41, 38,32, 37,71 (CH _{2-Phe}), 28,45 [(CH ₃) _{3-Boc}], 21,20 (CH _{3-Ac})
---	--

Ac-D-Phe-NH-Fn-CO-O-CH₂-CH[CH₂Ph]-NH₂Boc (14)

*t*_f = 225-229°C; *R*_f = 0,73 (CH₂Cl₂ : EtOAc = 1 : 3)

IR (CH ₂ Cl ₂) <i>v</i> _{max} /cm ⁻¹	3426 sr (NH _{slobodni}), 3318 sl (NH _{asocirani}), 1705 j, 1681 j, 1644 j (C=O _{CONH}) 1547, 1502, 1463 (amid II)
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	8,06 (s, 1H, NH _{F_n}), 7,72-7,16 (m, 10H, H _{fenil}), 6,70 (d, 1H, NH _{Ac}), 5,12 (s, 1H, NH _{Boc}), 4,77 (s, 1H, H _{F_n}), 4,69 (s, 1H, H _{F_n}), 4,59 (s, 1H, CH ^a _{Phe}), 4,34 (s, 1H, CH ^b _{Phe}), 4,28 (s, 1H, H _{F_n}), 4,18 (s, 1H, H _{F_n}), 4,14 (s, 4H, H _{F_n}), 3,18-3,15 (m, 2H, CH ^a _{2-Phe}), 3,14-3,11 (m, 2H, CH ^b _{2-Phe}), 2,96-2,92 (m, 2H, CH ^b _{2-Phe}), 2,04 (s, 3H, CH _{3-Ac}), 1,49 [s, 9H, (CH ₃) _{3-Boc}]
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ/ppm	171,73 (CO ^a _{F_n}), 171,15 (CO ^b _{F_n}), 170,86 (CO _{Ac}), 159,36 (CO _{Boc}), 136,76, 135,91 (C _{qfenil}), 129,34-126,48 (CH _{fenil}), 96,22 (C _{qF_n}), 80,34 (C _{qBoc}), 71,39 (C _{qF_n}), 72,70, 72,09, 71,39, 71,26, 71,01, 70,76, 65,80, 65,37 (CH _{F_n}), 63,17, 54,94 (CH _{Phe}), 64,55, 41,43, 38,37 (CH _{2-Phe}), 28,42 [(CH ₃) _{3-Boc}], 22,91 (CH _{3-Ac})

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UVOD

Kao što je navedeno u *Teorijskom dijelu* ovog Diplomskog rada, peptidi čine iznimno važnu skupinu spojeva sudjelujući u mnogobrojnim biološkim procesima, no zbog određenih nepovoljnih farmakoloških i biofarmaceutskih svojstava nisu pogodni za kliničku primjenu. Kako bi se biološki aktivni peptidi mogli primjenjivati u terapeutske svrhe, provode se različite funkcionalne modifikacije njihove strukture s ciljem poboljšanja njihovih svojstava. Ovakav pristup doveo je do razvoja skupine spojeva koji se nazivaju peptidomimetici, a osiguravaju prevladavanje ograničenja prirodnih peptida. [23,24] Depsipeptidi čine skupinu peptidomimetika karakterističnu po funkcionalnoj zamjeni amidne veze s esterskom vezom. Ono po čemu se značajno razlikuju jest smanjena sposobnost karbonilnog kisika da djeluje kao akceptor vodikove veze te izostanak donora vodikove veze kod estera. [23] S obzirom da je amidna skupina podložna proteolitičkoj hidrolizi, zamjena esterskom skupinom osigurava nastanak stabilnijih spojeva manje podložnih proteolizi. [42] Depsipeptidi pokazuju širok spektar različitih bioloških aktivnosti, a predstavljaju i vodeće spojeve za razvoj novih sintetskih lijekova. [38,39]

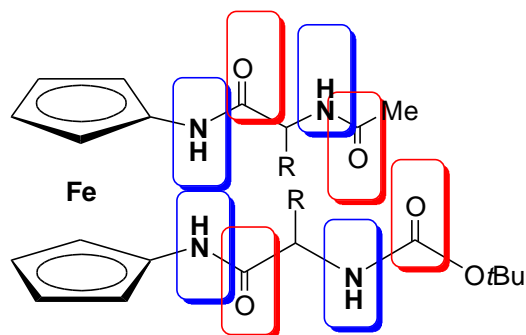
Ovaj rad nastavak je na istraživanja provedena u sklopu istraživačkog projekta 'Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija' (IP-2020-02-9162) Hrvatske zaklade za znanost, čiji je jedan od ciljeva priprava depsipeptidnih analoga ferocenskih peptida.

S obzirom da udaljenost između dva ciklopentadienilna prstena iznosi 3,3 Å, ferocen može poslužiti kao idealan kalup za uspostavljanje vodikovih veza. [10] Umetanjem ferocena u peptidne lance dolazi do formiranja intramolekulskih vodikovih veza (IHB), a posljedično i do tvorbe različitih strukturnih elemenata poput uzvojnica, ploha i okreta. Obrasci IHB, na kojima se temelji tvorba sekundarnih strukturnih elemenata u ferocenskim peptidima, određeni su strukturom ferocenskog sintona [(Fcd, -OC-Fn-CO-), (Fca, -OC-Fn-NH-), (Fcda, -NH-Fn-NH-)], kao i apsolutnom te strukturnom konfiguracijom kopuliranih prirodnih aminokiselina.

Do sada nisu sintetizirani i istraživani depsipeptidi izvedeni iz ferocena, stoga je osnovni cilj ovog Diplomskog rada istražiti kako uvođenje manje polarne esterske veze umjesto jedne amidne veze utječe na konformacijski prostor sintetiziranih depsipeptida, odnosno na obrazac tvorbe vodikovih veza, a samim time i tvorbu sekundarnih strukturnih elemenata.

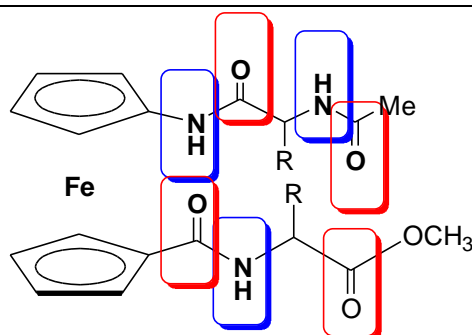
U sklopu ovog rada pripravljena su dva depsipeptida izvedena iz ferocena s D-fenilalaninom/fenilalaninolom, odnosno L-fenilalaninom/fenilalaninolom. S obzirom da osim same strukture ferocenskog sintona na tvorbu vodikovih veza utječe i kiralnost inkorporiranih

aminokiselina, pripravljeni su ferocenski homokiralni depsipeptidni analozi uvođenjem D/L-fenilalanina. Na taj način može se ispitati kako kiralnost aminokiseline fenilalanina utječe na konformacijska svojstva pripravljenih depsipeptida.



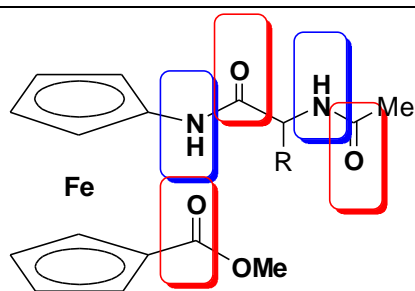
I (Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc)

R = -CH₂Ph



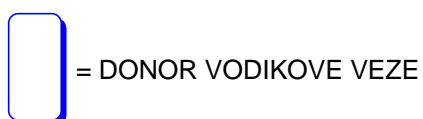
II (Ac-L-Phe-NH-Fn-CO-L-Phe-OMe)

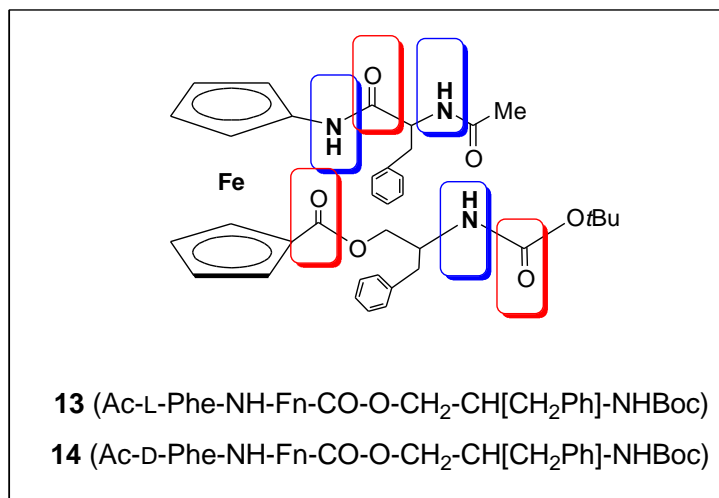
R = -CH₂Ph



III (Ac-L-Phe-NH-Fn-COOMe)

R = -CH₂Ph





Shema 3. Prikaz dostupnost akceptora i donora vodikove veze u ferocenskim peptidima **I**, **II** i **III** i depsipeptidima **13** i **14**

Da bi što bolje opisali sekundarnu strukturu pripremljenih depsipeptida, korisno će ih biti usporediti s već pripremljenim fenilalaninskim analogima: spojem **I** (Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc) [73], **II** (Ac-L-Phe-NH-Fn-CO-L-Phe-COOMe) [74] i **III** (Ac-L-Phe-NH-Fn-COOMe) [75].

Spoj **I** predstavlja homokiralni konjugat ferocen-1,1'-diamina s L-fenilalaninom. Riječ je o simetrično disupstituiranom ferocenskom peptidomimetiku koji u svojoj strukturi sadrži aminokiselinu fenilalanin te kalup -NH-Fn-NH- koji inducira stvaranje okreta. Udaljenost između ciklopentadienilnih prstenova (3,3 Å), kao i prisutnost donora vodikove veze omogućava formiranje intramolekulskih vodikovih veza (IHB) između peptidnih lanaca i posljedično rezultira tvorbom okreta u strukturi ferocenskog konjugata **I**. Uspostavljanje vodikovih veza ograničava slobodnu rotaciju ciklopentadienilnih prstenova te dovodi do helične kiralnosti ferocenske jezgre pripremljenog konjugata. U takvom homokiralnom konjugatu ferocen-1,1'-diamina s L-fenilalaninom dolazi do formiranja sekundarnih strukturnih elemenata, odnosno dva β-okreta. [73]

Priprava ferocenskog dipeptida **II** je opisana, međutim studija konformacije nije provedena. [74]

Spoj **III** predstavlja ferocenski dipeptid koji sadrži hidrofobnu aminokiselinu fenilalanin u strukturi. Konformacijska analiza provedena je snimanjem IR-, NMR- i CD-spektara na osnovu koje je utvrđeno postojanje slabih IHB. Zbog relativno kratkih supstituenata, jedne N-zaštićene aminokiseline (Phe) na gornjem ciklopentadienilnom prstenu i esterske skupine (COOMe) na

donjem ciklopentadienilnom prstenu, vodikove veze mogu se formirati samo između dva potencijalna donora vodikove veze i dva akceptora vodikove veze. Treći akceptor vodikove veze nalazi se preblizu obje NH-skupine da bi se mogla formirati vodikova veza. Konformacijskom analizom potvrđeno je postojanje tri različita obrasca IHB za ovaj tip spoja. [75] U nastavku će se opisati priprava, IR- i CD-spektroskopska konformacijska analiza obaju depsipeptida, dok će konformacijska analiza putem NMR-spektroskopije biti objašnjena na homokiralnom analogu **13**.

4.2. PRIPRAVA DEPSIPEPTIDA

Deprotekcijom amino-skupine iz Fca djelovanjem plinovitog HCl pripremljeni su peptidi **7** i **8**, tako da se nastali hidroklorid obradi s Et₃N nakon čega je uslijedila kopulacija slobodnog ferocenskog amina s Boc-L/D-Phe-OH primjenom standardne HOBt/EDC metode.

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

Pretvorba karbamatne u acetamidnu skupinu registriran je gubitkom signala protona iz *tert*-butilne skupine u spektrima peptida **7** i **8** pri $\delta = 1,41$ ppm te pojavom karakterističnih singleta acetilnih protona pri $\delta = 2,02$ ppm u ¹H-NMR-spektru peptida **9**. Navedena transformacija skupina očituje se i u ¹³C-NMR-spektrima izostankom signala karbonilnih C-atoma pri $\delta = 148,84$ ppm i *tert*-butilnih C-atoma pri $\delta = 28,42$ ppm te pojavom novih signala pri $\delta = 169,47$ ppm (CO_{Ac}) i $\delta = 23,35$ ppm (CH_{3-Ac}).

Hidroliza esterske skupine vezane na donje ciklopentadienilne prstene dipeptida **9** i **10** provedena je u iznimno blagim uvjetima, kako bi se izbjegla racemizacija pripremljenih biokonjugata **11** i **12** – za pripravu kiseline korištena je ekvimolarna količina NaOH, a reakcija je provedena pri 65 °C (tijekom 1 h). Spomenute promjene praćene su IR-spektroskopijom, pri čemu apsorpcijska vrpca esterskog karbonila nestaje, a tvorba kiseline očituje se detekcijom istežne vibracije kiselinskog karbonila i hidroksilne skupine.

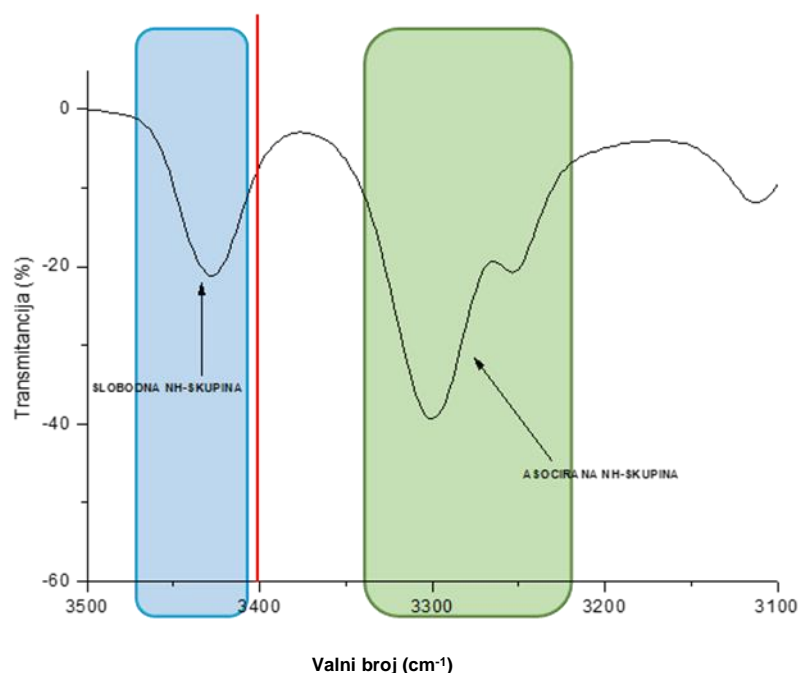
Završni korak pripreve depsipeptida obuhvaća esterifikaciju ferocenske kiseline s fenilalaninolom, i to u lužnatim uvjetima (Steglichova esterifikacija), budući da sam fenilalaninol sadrži NHBoc skupinu koja je osjetljiva na uvjete koji bi se upotrijebili prilikom Fischerove esterifikacije (upotrebljava se kiseli katalizator). Spomenuta esterifikacija očituje se novim setom signala fenilalaninola u ¹H NMR- i ¹³C NMR-spektrima, dok se prisutnost karbamatne

zaštitne skupine očituje singletom *tert*-butilnih protona pri $\delta = 1,41$ ppm u ^1H NMR-spektrima, a u ^{13}C NMR-spektru manifestira javljanjem signala karbonilnih i *tert*-butilnih C-atoma pri $\delta = 157,16$ ppm, odnosno $\delta = 28,59$ ppm.

4.3. IR-SPEKTROSKOPSKA ANALIZA

Infracrvena spektroskopija (IR) jedna je od najčešće korištenih instrumentalnih metoda koja pronalazi široku primjenu u brojnim područjima. Spektroskopska je tehnika za određivanje strukture, kao i koncentracije tvari na osnovu apsorpcije elektromagnetskog zračenja valnih duljina infracrvenog područja ($800 - 10^6$ nm). Koristi se za određivanje funkcijskih skupina prisutnih u organskim molekulama te praćenje promjena unutar molekula nastalih uslijed kemijskih i fizikalnih modifikacija pri čemu dolazi do nestanka vrpca nekih od postojećih skupina i pojave novih. [76] Također, pouzdana je metoda za određivanje konformacijskog prostora peptida u otopini. [77,78] Apsorpcija elektromagnetskog zračenja dovodi do pobuđivanja molekulskih vibracija, a specifičnost vibracije svake pojedine molekule omogućava njezinu identifikaciju, odnosno određivanje sastava funkcijskih skupina unutar molekule. [79] Molekule apsorbiraju infracrveno zračenje pri točno određenim valnim duljinama i frekvencijama koje su karakteristične za svaku pojedinu kovalentnu vezu. [80] Na taj način moguće je odrediti proteinsku strukturu, a jačina apsorpcije infracrvenog zračenja raste povećanjem polarnosti kemijskih veza. [77,78] Prolaskom infracrvenog zračenja kroz uzorak u instrumentu koji se naziva IR-spektrometar, nastaje IR-spektar, graf ovisnosti postotka transmitancije, odnosno apsorpcije o valnom broju (vrijednost recipročna valnoj duljini). IR-spektar može se podijeliti na područje funkcijskih skupina ($4000 - 1400\text{ cm}^{-1}$) u kojem većina funkcijskih skupina apsorbira infracrveno zračenje te na područje koje je karakteristično za pojedinu vrstu spoja, a naziva se područje otiska prsta ($1400 - 600\text{ cm}^{-1}$). Kako bi se odredila odgovarajuća struktura željenog spoja, IR-spektroskopiju potrebno je koristiti uz druge spektroskopske metode. [80] IR-spektroskopija relativno je brza, jednostavna i jeftina metoda, visoke osjetljivosti, a pritom minimalno invazivna. [77,78]

IR-spektar u području isteznih frekvencija NH-skupina (slika 9) ukazuje na prisutnost slobodnih i asociranih NH-skupina, odnosno na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama. Istezne frekvencije NH-skupina u području nižem od 3400 cm^{-1} pripisuju se asociranim skupinama, odnosno ukazuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama, dok signal iznad 3400 cm^{-1} odgovara slobodnim NH-skupinama. Apsorpcijske vrpce karbonilnih esterskih skupina koje se javljaju ispod 1730 cm^{-1} ukazuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.



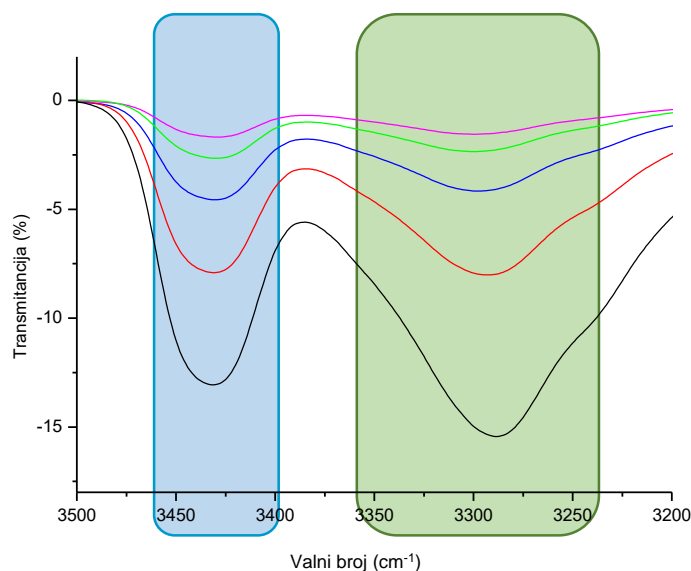
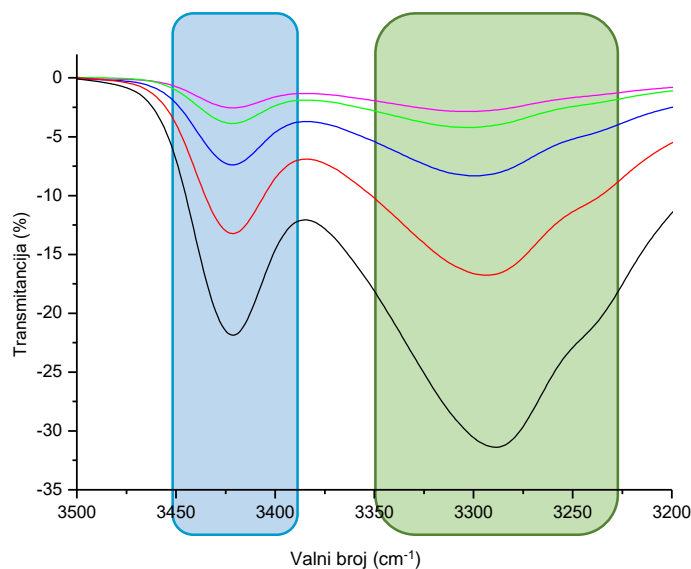
Slika 9. Prikaz područja isteznih frekvencija NH-skupina

Kada amino skupine sudjeluju u tvorbi vodikovih veza, njihove apsorpcijske vrpce u IR-spektru nalaze se prema području ispod 3400 cm^{-1} . U IR-spektrima pripremljenih diklormetanskih otopina depsipectida **13** i **14** u području isteznih vibracija NH-skupina ($3300\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$) javljaju se dvije apsorpcijske vrpce različitih intenziteta: jedna vrpca koja se pripisuje slobodnim NH-skupinama slabijeg intenziteta ($> 3400\text{ cm}^{-1}$) i druga koja se pripisuje asociiranim NH-skupinama srednjeg intenziteta ($< 3400\text{ cm}^{-1}$), što ukazuje na tvorbu konformacija povezanih vodikovih veza. Pri tome u oba depsipectida prevladava signal asociiranih NH-skupina: **13** ($I_{3424} : I_{3297} = 1:1,5$) i **14** ($I_{3426} : I_{3318} = 1:1,3$).

Mjerenje koncentracijski ovisnih IR-spektara omogućava utvrđivanje intra- odnosno intermolekuskog karaktera vodikovih veza. Naime, postupnim razrjeđivanjem 50 mM otopine ispitivanog depsipectida u diklormetanu dolazi do cijepanja intermolekulskih vodikovih veza uspostavljenih između molekula, uslijed čega se intenzitet signala NH-skupina u području ispod 3400 cm^{-1} znatno smanjuje. Ukoliko su u molekuli prisutne intramolekulske vodikove veze, njihov intenzitet postupnim razrjeđivanjem slabi proporcionalno slabljenju signala slobodne NH-skupine.

Kako bi se utvrdio karakter apsorpcijskih vrpca $< 3400\text{ cm}^{-1}$ u IR-spektrima analiziranih depsipectidima, provedeno je mjerenje koncentracijski ovisnih IR-spektara (slika 10). Karakter asociiranih amino-skupina ispitan je postupnim razrjeđivanjem diklormetanskih otopina uzoraka u koncentracijskom rasponu od 50 mM do 3 mM . Iz slike 10 vidljivo je da smanjenjem koncentracije dolazi do proporcionalnog slabljenja intenziteta signala kako asociiranih tako i

slobodnih amino-skupina za oba depsipeptida. Dobiveni rezultati sugeriraju da je karakter asociраних NH-skupina intramolekulskog karaktera, s obzirom da je smanjenje intenziteta obiju vrpce recipročno.



Slika 10. Koncentracijski-ovisni IR-spektri depsipeptida **13** i **14** u području NH-skupina

Kao što je vidljivo iz isteznih vibracija navedenih depsipeptida, u svim analizama depsipeptida prisutne su vrpce i asociраних i slobodnih amino-skupina (tablica 1). Kod dipeptida izvedenih iz Fcda i Fca jače su vrpce asociраних amino-skupina, dok vrpce srednje jakosti dipeptida **I** i slabe jakosti dipeptida **II** pripadaju slobodnim NH-skupinama. Kod dipeptida **III**, podjednaka je jakost vrpce slobodnih NH- i asociраних NH-skupina. Kod ciljnih depsipeptida **13**

i **14**, vrpce slobodnih i asociranih amino-skupina srednjeg su intenziteta, s blagom dominacijom asociranih NH-skupina.

Tablica 1. Istezne vibracije^[a] NH- i CO-skupina dipeptida **I**, **II**, **III** i depsipeptida **13** i **14**

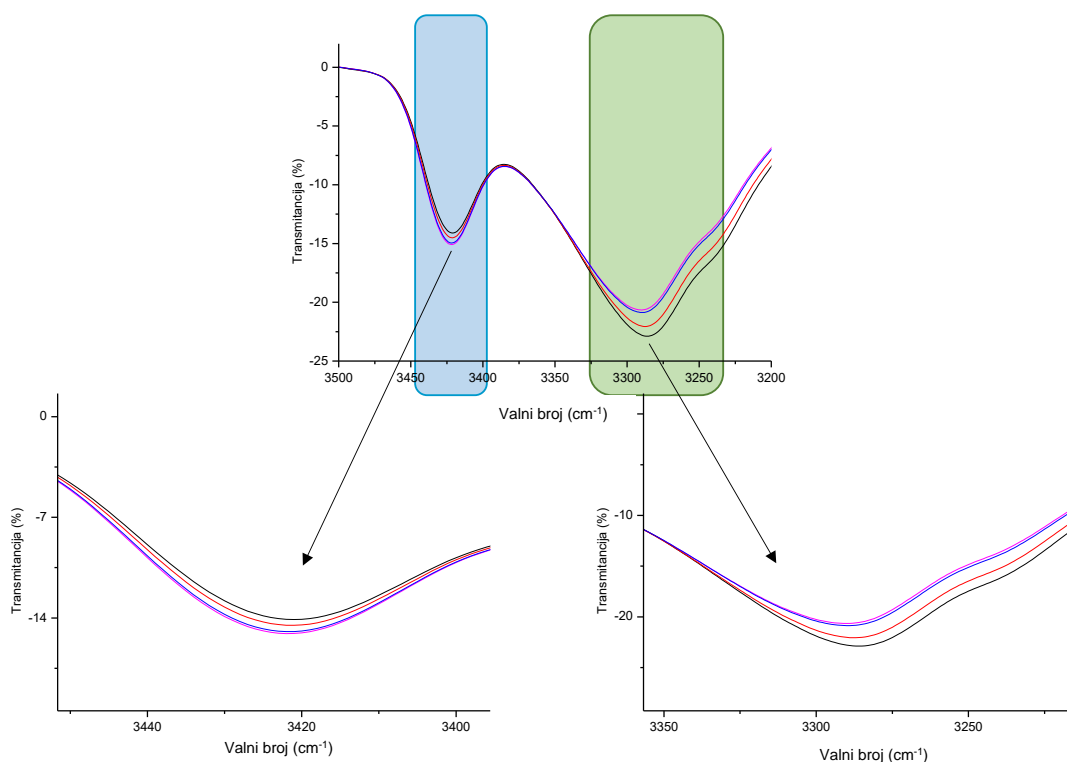
Oznaka	Spoj	ν NH (slob.)	ν NH (asoc.)	ν CO (amid I)	ν CO (amid II)
I	Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc	3430 sr	3302 j, 3266 j, 3217 sr	1706 j, 1684 j, 1669 j, 1648 j	1575, 1541, 1498, 1467, 1457
II	Ac-L-Phe-NH-Fn-CO-L-Phe-OMe	3437 sl	3328 j	1721 j, 1671 j, 1646 j	1572 j, 1524 j
III	Ac-L-Phe-NH-Fn-COOMe	3418 sr	3290 sr, 3248 sl	1709 j, 1696 j, 1668 j	1574, 1558, 1540, 1535, 1516, 1507, 1498, 1466
13	Ac-L-Phe-NH-Fn-CO-O-CH₂-CH[CH₂Ph]-NHBoc	3424 sr	3297 sr, 3231 sl	1702 j, 1672 j, 1642 sr	1548 j, 1505 j, 1465 j
14	Ac-D-Phe-NH-Fn-CO-O-CH₂-CH[CH₂Ph]-NHBoc	3426 sr	3318 sr	1705 j, 1681 j, 1644 sr	1547 j, 1502 j, 1463 j

^[a] IR-spektri snimljeni su u CH₂Cl₂, c = 5×10⁻² M.

Mjerenjem temperaturno ovisnih IR-spektara moguće je pratiti promjene u vibracijskim svojstvima molekula uslijed promjena temperature, pri čemu je koncentracija ispitivanih uzoraka tijekom mjerenja konstantna. Ova spektroskopska tehnika pruža informacije o ponašanju molekula pri različitim temperaturama, kao i o njihovim strukturnim i termodinamičkim svojstvima. Promjene temperature utječu na stabilnost vodikovih veza unutar molekula, a samim time i na konformaciju same molekule. Promjene intenziteta i položaja apsorpcijskih vrpca NH-skupina u IR-spektaru prilikom temperaturnih promjena pružaju uvid u prirodu i jakost vodikovih veza, odnosno stabilnost ostvarenih konformacija.

Iz prikazanog temperaturno ovisnog IR-spektra depsipeptida **13** (slika 11) vidljivo je kako povećanjem temperature u rasponu od 25 °C do 40 °C dolazi do blage promjene u intenzitetu apsorpcijskih vrpca slobodnih i asociranih NH-skupina. Takva promjena u vibracijskim frekvencijama NH-skupina ukazuje da povećanje temperature gotovo ne utječe na

uspostavljene vodikove veze, što ukazuje na stabilne obrasce IHB. Povećanjem temperature intenziteti vrpce asociranih i slobodnih NH-skupina ponašaju se obrnuto proporcionalno. To upućuje da na određeni, mali broj konformera koji tvori intramolekulske vodikove veze utječe povišenje temperature što se očituje u povećanju udjela slobodnih NH-skupina.



Slika 11. Temperaturno-ovisni IR-spektar deksipeptida **13** u području NH-skupina (CH_2Cl_2 , 25-40 °C)

4.4. SPEKTROSKOPIJA NUKELARNE MAGNETSKE REZONANCIJE (NMR)

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) pruža detaljniji uvid u obrasce vodikovih veza, koje su prethodno utvrđene IR-spektroskopijom. [81] Riječ je o nedestruktivnoj metodi primjenjivoj za plinovite, tekuće i čvrste uzorke koja omogućuje utvrđivanje kemijske strukture organskih i anorganskih molekula. [82] Jedna od važnih značajki jest mogućnost određivanja i lociranja sekundarnih strukturnih elemenata unutar proteina. Isto tako NMR-spektri pružaju informaciju o trodimenzionalnoj strukturi proteina te odnosu između njihove funkcije i konformacije. [77] Ova metoda omogućava razlikovanje pojedinih NH-skupina unutar molekule, a na osnovu njihovih kemijskih pomaka može se utvrditi sudjeluju li u tvorbi vodikovih veza. Naime, kemijski pomaci iznad 7 ppm odgovaraju asociranim NH-skupinama, dok oni ispod 7 ppm gotovo uvijek odgovaraju slobodnim amidnim protonima. [81] NMR spektroskopija koristi se za proučavanje različitih jezgara poput ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F i ^{31}P , dok su za određivanje

organskih molekula najučinkovitije ^1H i ^{13}C NMR spektroskopije. NMR spektroskopijom mogu se proučavati samo jezgre s neparnim atomskim ili neparnim masenim brojem jer imaju nuklearni spin. [83] Iz tog razloga poželjno je proteine obilježiti izotopima ^{13}C i ^{15}N , budući da jezgra ^{14}N daje nisku rezoluciju signala, a prirodno prisutan ^{12}C nije spektroskopski aktivan. [77]

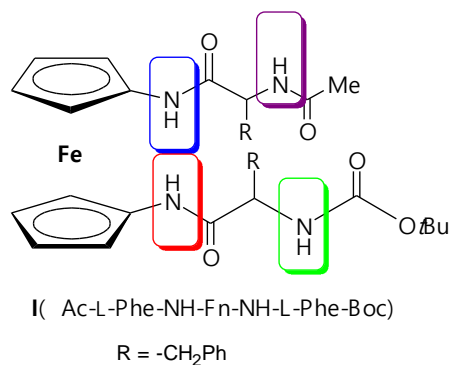
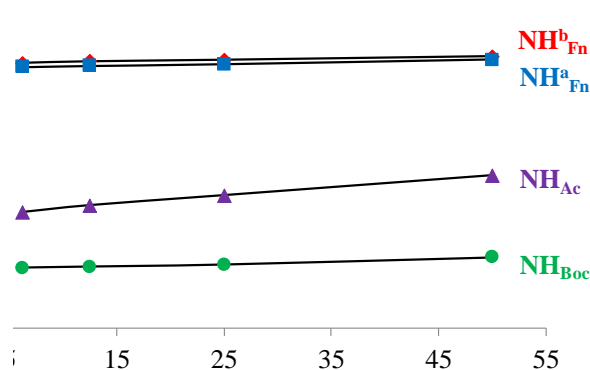
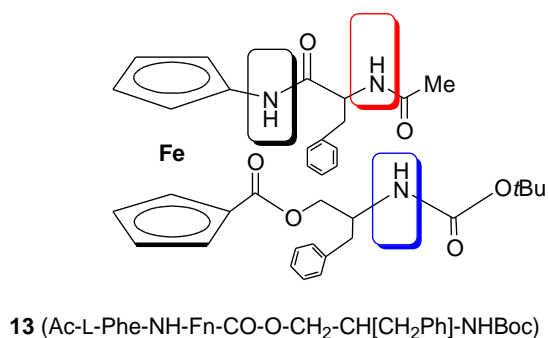
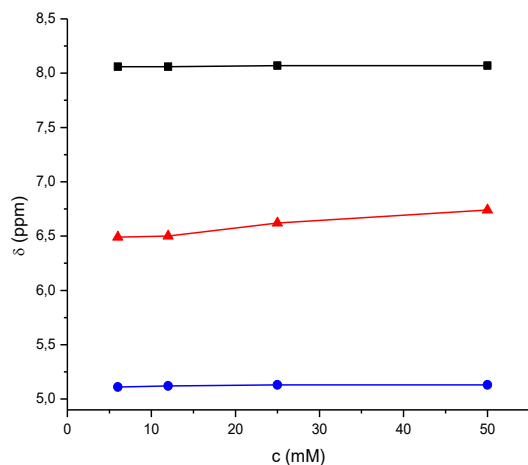
Tablica 2. Kemijski pomaci (δ/ppm)^[a] amidnih protona dipeptida **I**, **II**, **III** i depsipeptida **13** i **14**

Oznaka	Spoj	(NH _{Fnb}) δ (ppm)	(NH _{Fna}) δ (ppm)	(NH _{Ac}) δ (ppm)	(NH _{Boc}) δ (ppm)
I	Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc	9,09	9,04	6,52	5,20
II	Ac-L-Phe-NH-Fn-CO-L-Phe-OMe	9,01		6,50	5,24
III	Ac-L-Phe-NH-Fn-COOMe	7,68		6,43	
13	Ac-L-Phe-NH-Fn-CO-O-CH₂-CH[CH₂Ph]-NHBoc	8,07		6,74	5,13
14	Ac-D-Phe-NH-Fn-CO-O-CH₂-CH[CH₂Ph]-NHBoc	8,06		6,70	5,12

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

Kao što je vidljivo iz tablice, NH-skupine vezane na ferocensku jezgru u konjugatima **I** i **II** karakterizirani su visokim kemijskim pomacima njihovih protona ($\delta > 9$ ppm), dok je u slučaju dipeptida **III**, kao i ciljnih depsipeptida **13** i **14** taj pomak nešto niži i kreće se 7,68-8,07 ppm, pa se može zaključiti da takav kemijski pomak (> 7 ppm) indicira njihovo sigurno sudjelovanje u tvorbi vodikovih veza. Kemijski pomaci acetamidnih protona kreću se u rasponu $\delta = 6,4-6,7$ ppm, što dovodi u pitanje njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama, dok su amidni protoni iz karbamatne zaštitne skupine nađeni pri $\delta \sim 5$ ppm što ih eliminira iz studije vodikovih veza.

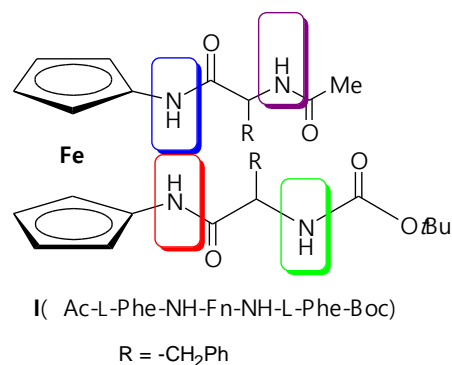
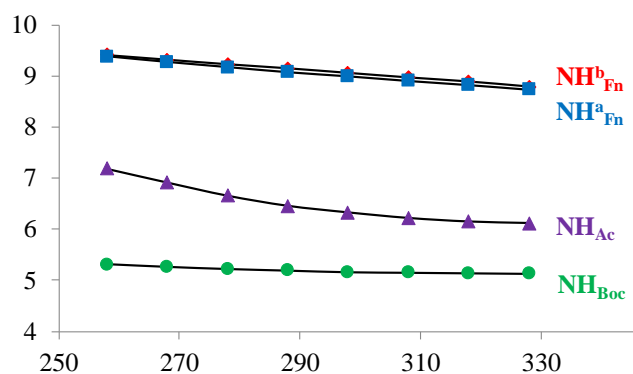
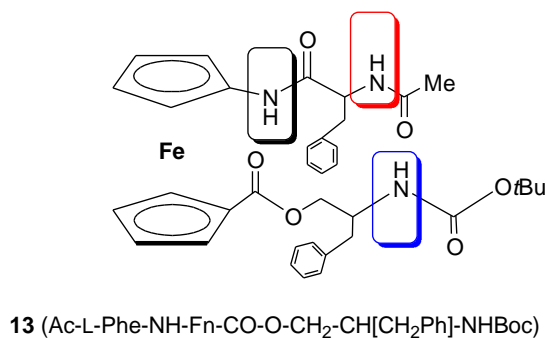
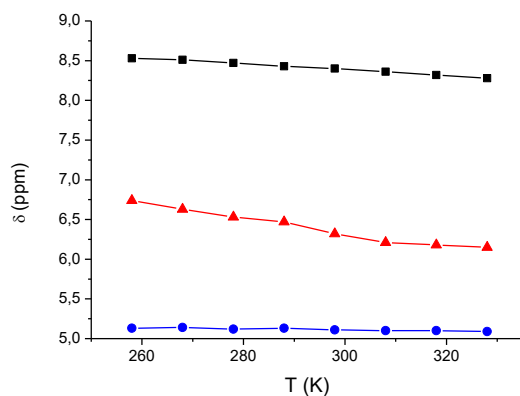
Da bi se potvrdio karakter prisutnih vodikovih veza (inter- ili intramolekulske) snimljeni su ^1H NMR- spektri u ovisnosti o koncentraciji i temperaturi čiji su rezultati navedeni u sljedećim poglavljima. Priroda vodikovih veza ispitana je mjerenjem koncentracijski-ovisnih NMR-spektara. Na slici 12 prikazani su koncentracijski-ovisni ^1H NMR-spektri depsipeptida **13** u kloroformu koji pokazuju da ne dolazi do promjene kemijskog pomaka NH-skupine vezane izravno na ferocen (NH_{Fn}) tijekom razrjeđivanja 50 mM otopine depsipeptida u kloroformu do 6 mM, što potvrđuje njegovo sudjelovanje u IHB. Izraženija promjena kemijskih pomaka ($\Delta\delta \sim 0,4$ ppm) amidnih protona NH_{Ac} ukazuje na njihovo sudjelovanje u slabijim IHB.



Slika 12. Koncentracijski-ovisni kemijski pomaci NH-atoma iz depsipeptida **13** (*gore*), peptida Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (**I**) (*dolje*)

Prema rezultatima iz 2022. godine, za spoj **I**, Kovačević i suradnici su, na temelju minimalne promjene kemijskih pomaka ($\Delta\delta < 0,16$ ppm), zaključili da NH-skupine iz ferrocenskog kalupa (NH_{Fn}^b i NH_{Fn}^a) sudjeluju u jakim IHB. Nasuprot tome, značajne promjene kemijskih pomaka NH_{Ac} sugeriraju sudjelovanje u slabim IHB (slika 12) [75].

Postupnim povećanjem temperature ne dolazi do značajnih promjena kemijskih pomaka NH_{Fn} u peptidu **13** (slika 13) iz čega se može zaključiti da sudjeluju u jakim IHB. Veće promjene kemijskih pomaka NH_{Ac} prema višem polju ukazuju na sudjelovanje u slabijim IHB. Slični rezultati temperaturno-ovisne NMR spektroskopije utvrđeni su za peptid **I** [73] (slika 13, *dolje*) i **II** [75].



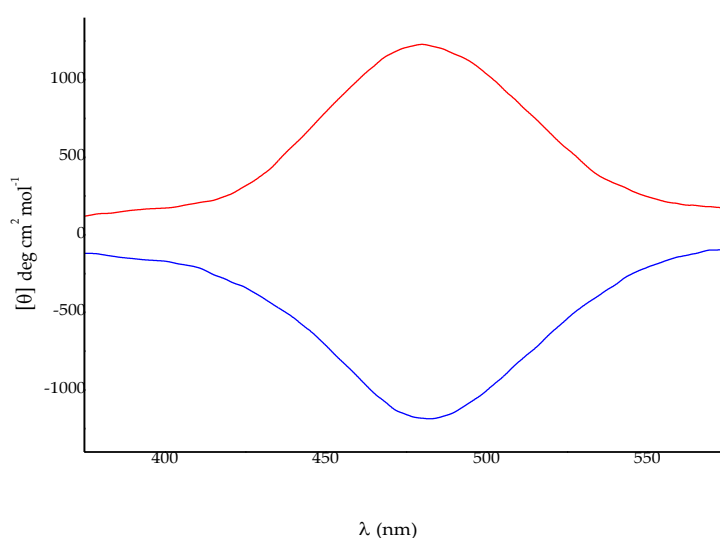
Slika 13. Temperaturno-ovisni NH kemijski pomaci NH-atoma iz depsipeptida **13** (*gore*), peptida Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (**I**) (*dolje*)

4.5. CD-SPEKTROSKOPSKA ANALIZA

Spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD) optička je spektroskopska metoda koja se primjenjuje za određivanje strukture proteina, polipeptida i peptida. [84] Kada se koristi za karakterizaciju proteina poželjno je da molekule pritom budu neionizirane i otopljene. CD-spektroskopijom određuje se različita apsorpcija lijevo i desno polariziranog zračenja kiralnih molekula ili molekula čija trodimenzionalna struktura osigurava kiralno okruženje. [85,86] Mjerenja se provode u vidljivom i ultraljubičastom području spektra pri čemu se prate elektronski prijelazi unutar molekula. [84] Cirkularni dikroizam daje uvid u sekundarne strukturne elemente proteina, ali se može koristiti i za ispitivanje tercijarne strukture. Vrlo je osjetljiva metoda kojom se mogu razlikovati konformacije α -uzvojnice i β -nabrane ploče, ali ne daje uvid koje aminokiseline sudjeluju u stvaranju navedenih strukturnih elemenata. Nadalje, može se koristiti za ispitivanje utjecaja temperature, pH vrijednosti ili drugih vanjskih čimbenika te naboja i različitih interakcija, poput protein-protein ili protein-ligand, na konformaciju proteina. [77,85,86,87]

Uvođenjem ferocena u kiralno peptidno okruženje uz prisutnost jakih IHB, dolazi do induciranja Cottonovog efekta, na čiji predznak značajno utječu otapalo, zaštitne skupine te slijed i kiralnost prirodnih aminokiselina inkorporiranih u strukturu peptida. [88] S obzirom da prisutnost vodikovih veza inducira kiralno uređenje oko umetnutog ferocenskog kromofora ($\lambda \sim 480$ nm), očekuje se CD aktivnost pripremljenih depsipectida **13** i **14**. Kada ferocenski peptidi zauzimaju konformacije poput okreta i β -nabranih ploča koje su pritom stabilizirane IHB, dolazi do ograničenja slobodne rotacije ferocenskih prstenova. Takvo ograničenje uzrokuje pojavu helične kiralnosti ferocenske jezgre, što se očituje u Cottonovom efektu u području oko 470 nm. Na intenzitet Cottonovog efekta utječe stabilnost konformacije, dok o desnom ili lijevom spinu ferocenske jezgre ovisi pozitivan ili negativan predznak. [89]

Na slici 14 prikazan je snimljeni CD-spektar pripremljenih depsipectida **13** i **14** u diklormetanu, dok su u tablici 3 navedeni Cottonovi efekti depsipectida **13** i **14**, kao i peptida **I**, **II** i **III**.



Slika 14. CD-spektre depsipectida **13** (—) i **14** (—) u diklormetanu

Na slici 14 vidljiva je CD-aktivnost pripremljenih depsipectida **13** i **14** u području ferocenskog kromofora što ukazuje na kiralno uređenje ovih dipeptida. S obzirom da je intenzitet Cottonova efekta proporcionalan stabilnosti konformacije, oba analizirana depsipectida pokazuju jednaku vrijednost intenziteta, što je vidljivo na slici 14 i u tablici 3. Ono po čemu se razlikuju jest pozitivan, odnosno negativan predznak koji je ovisan o desnom ili lijevom spinu ferocenske jezgre. Depsipectid s inkorporiranim L-fenilalaninom pokazuje pozitivan Cottonov efekt, dok kod depsipectida s D-fenilalaninom dolazi do promjene spina ferocenske jezgre zbog čega pokazuje negativan Cottonov efekt jednakog iznosa. Razlika u

predznaku Cottonova efekta je očekivana budući da se pripremljeni enantiomeri razlikuju po optičkoj aktivnosti.

Tablica 3. Cottonovi efekti u peptidima **I**, **II**, **III** i depsipeptidima **13** i **14**

Oznaka	Spoj	$[\theta]$ / deg cm ² dmol ⁻¹	λ_{\max} /nm
I	Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc	-9200	473
II	Ac-L-Phe-NH-Fn-CO-L-Phe-OMe	-5400	468
III	Ac-L-Phe-NH-Fn-COOMe	-362	478
13	Ac-L-Phe-NH-Fn-CO-O-CH₂-CH[CH₂Ph]-NHBoc	1150	472
14	Ac-D-Phe-NH-Fn-CO-O-CH₂-CH[CH₂Ph]-NHBoc	-1150	473

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

Iz tablice 3 vidljivo je da je intenzitet Cottonovog efekta za pripravljene depsipeptide **13** i **14** veći u odnosu na peptid **III**. S druge strane, može se uočiti značajan pad u intenzitetu Cottonovog efekta depsipeptida u usporedbi s peptidima **I** i **II**. Na osnovu toga moguće je zaključiti da uvođenje esterske veze u depsipeptide utječe na tvorbu manje uređenih kiralnih struktura u otopini.

5. ZAKLJUČCI

1. Sinteza ciljnih depsipeptida $\text{Ac-L-Phe-NH-Fn-CO-O-CH}_2\text{-CH[CH}_2\text{Ph]-NHBoc}$ (**13**) i $\text{Ac-D-Phe-NH-Fn-CO-O-CH}_2\text{-CH[CH}_2\text{Ph]-NHBoc}$ (**14**) uspješno je provedena.
2. IR-spektroskopijom potvrđuje se prisutnost slobodnih ($> 3400 \text{ cm}^{-1}$) i asociranih ($< 3400 \text{ cm}^{-1}$) NH-skupina, što ukazuje na tvorbu konformacija povezanih vodikovim vezama. Kod ciljnih depsipeptida **13** i **14**, jače su vrpce asociranih amino-skupina.
3. Mjerenjem koncentracijski ovisnih IR-spektara uočeno je proporcionalno slabljenje intenziteta signala asociranih i slobodnih NH-skupina za oba depsipeptida **13** i **14**. Obzirom da je smanjenje intenziteta obiju vrpce proporcionalno zaključuje se da su asocirane NH-skupine intramolekulskog karaktera.
4. Mjerenjem temperaturno ovisnih IR-spektara uočeno je da promjena temperature utječe na uspostavljanje vodikovih veza. Pritom se intenziteti vrpce asociranih i slobodnih NH-skupina ponašaju obrnuto proporcionalno, što posljedično sugerira povećanje udjela slobodnih NH-skupina.
5. NMR-spektroskopijom utvrđeno je da NH-skupine vezane na ferocensku jezgru (NH_{Fn}) s kemijskim pomacima $\delta > 7 \text{ ppm}$, sudjeluju u tvorbi vodikovih veza.
6. Snimanjem koncentracijski ovisnih ^1H NMR-spektara potvrđeno je sudjelovanje NH_{Fn} skupina u IHB te sudjelovanje amidnih protona NH_{Ac} u slabijim IHB. Povećanjem temperature ne dolazi do značajnih promjena kemijskih pomaka NH_{Fn} u depsipeptidu **13** iz čega se može zaključiti da sudjeluju u jačim IHB.
7. CD-spektroskopijom potvrđeno je kiralno uređenje pripremljenih depsipeptida **13** i **14**. Vrijednost intenziteta Cottonova efekta jednaka je za oba depsipeptida, no s obzirom da se radi o ferocenskim enantiomerima suprotnog su predznaka.
8. Budući da je uočen značajan pad intenziteta Cottonovog efekta u usporedbi s peptidima **I** i **II** moguće je zaključiti da uvođenje esterske veze u depsipeptide nije pridonijelo jačanju vodikovih veza, a posljedično niti stvaranju stabilnijih konformacija.

5. LITERATURA

1. Rapić V, Čakić Semenčić M (2010) Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocen i metalni karbonili. *Kem Ind* **60**(2), 61-79.
2. Van Staveren DR, Metzler-Nolte N (2004) Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene. *Chem Rev* **104**, 5931-5985.
3. Barišić L (2018) Osnove bioorganometalne kemije. Nastavni materijal preuzet s Merlina.
4. Werner H (2012) At least 60 years of Ferrocene: The Discovery and Rediscovery of the Sandwich Complexes. *Angew Chem Int Ed* **51**, 6052-6058.
5. ferocen. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013. – 2024. Pristupljeno 8. studenog 2024.
6. Barišić L (2018) Osnove bioorganometalne kemije. Nastavni materijal preuzet s Merlina.
7. Anonymus <https://www.chem.ucla.edu/~harding/IGOC/F/ferrocene.html>, pristupljeno 10. studenog 2024.
8. Anonymus <https://www.3dchem.com/Ferrocene.asp>, pristupljeno 10. studenog 2024.
9. Roy G, Gupta R, Sahoo SR, Saha S, Asthana D, Mondal PC (2022) Ferrocene as an iconic redox marker: From solution chemistry to molecular electronic devices. *Coord Chem Rev* **473**, 214816.
10. Astruc D (2016) Why is Ferrocene so Exceptional? *Eur JIC* **1**, 6-29.
11. Patra M, Gasser G (2017) The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nat Rev Chem* **1**(9), 66.
12. Stepnicka P (ed.) (2008) Ferrocenes: Ligands, Materials and Biomolecules, Wiley.
13. Yan J, Yue K, Fan X, Xu X, Wang J, Qin M (2023) Synthesis and bioactivity evaluation of ferrocene-based hydroxamic acids as selective histone deacetylase 6 inhibitors. *Eur J Med Chem* **246**, 115004.
14. Snegur LV (2022) Modern Trends in Bio-Organometallic Ferrocene Chemistry. *Inorg* **10**(12), 226.
15. Asghar F, Munir S, Fatima S, Murtaza B, Patujo J, Badshah A i sur. (2022) Ferrocene-functionalized anilines as potent anticancer and antidiabetic agents: Synthesis, spectroscopic elucidation, and DFT calculations. *J Mol Struct* **1249**, 131632.
16. Vausselin T, Calland N, Belouzard S, Descamp V, Douam F, Helle F i sur. (2013) The antimalarial ferroquine is an inhibitor of hepatitis C virus. *Hepatology* **58**, 86–97.
17. Kowalski K (2016) Ferrocenyl-nucleobase complexes: Synthesis, chemistry and applications. *Coord Chem Rev* **317**, 132–156.

18. Edwards EI, Epton R, Marr G (1976) 1,1'-Ferrocenyldiacetic acid anhydride and its use in the preparation of heteroannularly substituted ferrocenyl-penicillins and -cephalosporins. *J Organomet Chem* **122**, C49–C53 .
19. Sen R, Govindaraj A, Rao CNR (1997) Carbon nanotubes by the metallocene route. *Chem Phys Lett* **267**, 276– 280.
20. Peris E (2004) From long-chain conjugated oligomers to dendrimers: synthesis and physical properties of phenyl-ethenyl-ferrocenyl containing one- and two-dimensional complexes. *Coord Chem Rev* **248**, 279–297.
21. Arimoto FS, Haven Jr AC (1955) Derivatives of Dicyclopentadienyliron. *J Am Chem Soc* **77**, 6295.
22. Beladi-Mousavi SM, Sadaf S, Walder L, Gallei M, Rüttiger C, Eigler S i sur. (2016) Poly(vinylferrocene)–Reduced Graphene Oxide as a High Power/High Capacity Cathodic Battery Material. *Adv En Mater* **6**(12), 1600108.
23. Barišić L (2018) Peptidni mimetici i pseudopeptidi. Nastavni materijal preuzet s Merlina.
24. Lenci E, Trabocchi A (2020) Peptidomimetic toolbox for drug discovery. *Chem Soc Rev* **49**(11), 3262-3277.
25. Trabocchi A, Guarna A (2014) Peptidomimetics in Organic and Medicinal Chemistry: The Art of Transforming Peptides in Drugs, John Wiley & Sons, Ltd.
26. Gademann K, Ernst M, Hoyer D, Seebach D (1999) Synthesis and Biological Evaluation of a Cyclo- β -tetrapeptide as a Somatostatin Analogue. *Angew Chem Int Ed* **38**, 1223–1226.
27. Trabocchi A (2020) Principles and applications of small molecule peptidomimetics. *Small Molecule Drug Discovery*, 163-195.
28. Ripka AS, Rich DH (1998) Peptidomimetic design. *Curr Opin Chem Biol* **2**, 441–452.
29. Pelay-Gimeno M, Glas A, Koch O, Grossmann TN (2015) Structure-Based Design of Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Mimicking Peptide Binding Epitopes. *Angew Chem Int Ed* **54**, 8896–8927.
30. Avan I, Dennis Hall C, Katritzky AR (2014) For a comprehensive review on amino acid and peptide bond isosteres. *Chem Soc Rev* **43**, 3575–3594.
31. Choudhary A, Raines RT (2011) An evaluation of peptide-bond isosteres. *Chem Bio Chem* **12**, 1801e1807.
32. RM Freidinger (2003) Design and synthesis of novel bioactive peptides and peptidomimetics. *J Med Chem* **46**, 5553–5566 and references therein.
33. Ross NT, Katt WP, Hamilton AD (2010) Synthetic mimetics of protein secondary structure domains. *Phil Trans R Soc A* **368**, 989–1008.

34. White CJ, Yudin AK (2011) For a comprehensive review on peptide macrocyclization strategies. *Nat Chem* **3**, 509–524.
35. Anonymus https://www.researchgate.net/figure/Phosphonopeptides-phosphonodepsipeptides-peptides-and-depsipeptides_fig1_349339765, pristupljeno 14. studenog 2024.
36. Taevernier L, Wynendaele E, Gevaert B, Spiegeleer B (2017) Chemical classification of cyclic depsipeptides. *Curr Prot Peptide Sci* **18**, 425–452.
37. Alonzo DA, Schmeing TM (2020) Biosynthesis of depsipeptides or Depsi: The peptides with varied generations. *Prot Sci* **29**, 2316–2347.
38. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM (2003) Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *J Nat Prod* **66**, 1022–1037.
39. Stawikowski MJ, Cudic P (2007) Peptide Characterization and Application Protocols, 1. izd., Springer. str. 321 – 339.
40. Adessi C, Soto C (2002) Converting a peptide into drug: strategies to improve stability and bioavailability. *Curr Med Chem* **9**, 963–978.
41. Davies JS (2003) The cyclization of peptides and depsipeptides. *J Pept Sci* **9**, 471–501.
42. Arad O, Goodman M (1990) Depsipeptide analogues of elastin repeating sequences: synthesis. *Biopolymers* **29**, 1633–1649.
43. Davidson BS (1993) Ascidians: producers of amino acid-derived metabolites. *Chem Rev* **93**, 1771–1791.
44. Zhang JN, Xia YX, Zhang HJ (2021) Natural cyclopeptides as anticancer agents in the last 20 years. *Int J Mol Sci* **22**, 3973.
45. Lee Y, Phat C, Hong SC (2017) Structural diversity of marine cyclic peptides and their molecular mechanisms for anticancer, antibacterial, antifungal, and other clinical applications. *Peptides* **95**, 94–105.
46. Trinidad-Calderón PA, Varela-Chinchilla CA, García-Lara S (2023) Depsipeptides Targeting Tumor Cells: Milestones from In Vitro to Clinical Trials. *Molecules* **28**(2), 670.
47. Kang H, Choi M-C, Seo C, Park Y (2018) Therapeutic Properties and Biological Benefits of Marine-Derived Anticancer Peptides. *Int J Mol Sci* **19**, 919.
48. Alonzo DA, Schmeing TM (2020) Biosynthesis of depsipeptides, or Depsi: The peptides with varied generations. *Prot Sci* **29**, 2316–2347.
49. fenilalanin. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013. – 2024. Pristupljeno 18. studenog 2024.
50. NCBI (2024) Phenylalanine. NCBI-National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenylalanine>. Pristupljeno 18. studenog 2024.

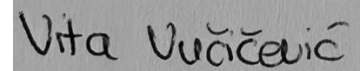
51. Yang BH, Wang X, Ren X (2012) Amino acid metabolism related to immune tolerance by MDSCs. *Int Rev Immunol* **31**(3), 177–183.
52. Sikalidis AK (2014) Amino Acids and Immune Response: A Role for Cysteine, Glutamine, Phenylalanine, Tryptophan and Arginine in T-cell Function and Cancer? *Pathol Oncol Res* **21**(1), 9-17.
53. Caloni F, Fossati P, Anadón A, Bertero A (2020) Beauvericin: The beauty and the beast. *Environ Toxicol Pharmacol* **75**, 103349.
54. Urbaniak M, Waskiewicz A, Stepień Ł (2020) Fusarium cyclodepsipeptide mycotoxins: Chemistry, biosynthesis, and occurrence. *Toxins* **12**, 765.
55. Mallebrera B, Prosperini A, Font G, Ruiz MJ (2018) In vitro mechanisms of Beauvericin toxicity: A review. *Food Chem Toxicol* **111**, 537–545.
56. NCBI (2024) Beauvericin. NCBI-National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3007984>. Pristupljeno 22. studenog 2024.
57. Urbaniak M, Stępień Ł, Uhlig S (2019) Evidence for naturally produced beauvericins containing N-Methyl-Tyrosine in Hypocreales Fungi. *Toxins* **11**, 182.
58. Tian J, Han JJ, Zhang X, He LW, Zhang YJ, Bao L i sur. (2016) New Cyclohexadepsipeptides from an Entomogenous Fungus *Fusarium proliferatum* and Their Cytotoxicity and Autophagy-Inducing Activity. *Chem Biodivers* **13**, 852–860.
59. Bunyapaiboonsri T, Vongvilai P, Auncharoen P, Isaka M (2012) Cyclohexadepsipeptides from the Filamentous Fungus *Acremonium* sp. BCC 2629. *Helv Chim Acta* **95**,963–972.
60. NCBI (2024) Beauvenniatin. NCBI-National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60149746>. Pristupljeno 22. studenog 2024.
61. Karuppiyah V, Sun W, Li Z (2016) Natural Products of Actinobacteria Derived from Marine Organisms. *Stud Nat Prod Chem* **48**, 417–446.
62. Yamashita T, Matoba H, Kuranaga T, Inoue M (2014) Total syntheses of nobilamides B and D: Application of traceless Staudinger ligation. *Tetrahedron* **70**, 7746–7752.
63. Le TC, Pulat S, Lee J, Kim GJ, Kim H, Lee E-Y (2022) Marine Depsipeptide Nobilamide I Inhibits Cancer Cell Motility and Tumorigenicity via Suppressing Epithelial–Mesenchymal Transition and MMP2/9 Expression. *ACS Omega* **7**, 1722-1732.
64. Chettu SK, Madhu RB, Raolji GB, Babu KR, Rao NSK, Gopalakrishnan S i sur. (2016) First total synthesis of cyclodepsipeptides clavatuside A and B and their enantiomers. *RSC Adv* **6**, 61555–61565.
65. Jiang W, Ye P, Chen CTA, Wang K, Liu P, He S i sur. (2013) Two novel hepatocellular carcinoma cycle inhibitory cyclodepsipeptides from a hydrothermal vent crab-associated fungus *Aspergillus clavatus* C2WU. *Mar Drugs* **11**, 4761.

66. Ye P, Shen L, Jiang W, Ye Y, Chen CTA, Wu X i sur. (2014) Zn-driven discovery of a hydrothermal vent fungal metabolite clavatustide C, and an experimental study of the anti-cancer mechanism of clavatustide B. *Mar Drugs* **12**, 3203.
67. Chettu SK, Konidena LNS, Korupolu RB, Kameswara Rao NS, Doddipalla R, Gandham HB i sur. (2017) Ring opening of benzoxazinones: An improved and efficient synthesis of clavatustides A & B. *Tetrahedron Lett* **58**, 3418–3420.
68. NCBI (2024) Clavatustid A. NCBI-National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/139587634>. Pristupljeno 22. studenog 2024.
69. NCBI (2024) Clavatustid B. NCBI-National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/139583980>. Pristupljeno 22. studenog 2024.
70. Perrin DD, Armarego WLF (1988) Purification of laboratory chemicals, 3. izd., Pergamon Press, Oxford/NewYork.
71. Kovač V, Rapić V, Alagić J, Barišić L (1999). Ferrocene Compounds. XXVI. C- and O-Ferrocenylalkylation of Methyl Salicylate. *Croat Chem Acta* **72** (1), 103-113.
72. Convenient process for the preparation of chiral or racemic phenylalaninols and their N-blocked derivatives. Patent US5367094A
73. Kovačević M, Markulin D, Zelenika M, Marjanović M, Lovrić M, Polančec D i sur. (2022) Hydrogen Bonding Drives Helical Chirality via 10-Membered Rings in Dipeptide Conjugates of Ferrocene-1,1'-Diamine. *Int J Mol Sci* **23**(20), 12233.
74. Kovačević M, Čakić Semenčić M, Kodrin I, Roca S, Perica J, Mrvčić J i sur. (2023) Biological Evaluation and Conformational Preferences of Ferrocene Dipeptides with Hydrophobic Amino Acids. *Inorg* **11**(1), 29.
75. Barišić L (2004) Priprava ferocenskih aminokiselina i peptida (doktorski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
76. Vučićević V (2022) IR-spektroskopska analiza seruma bolesnica s karcinomom dojke (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
77. Pelton J, McLean L (2000) Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Anal Biochem* **277**, 167-176.
78. Barth A (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta, Bioenerg* **1767**, 1073-1101.
79. Struna (2024) Infracrvena spektroskopija. Struna – Hrvatsko strukovno nazivlje, <http://struna.ihji.hr/naziv/infracrvena-spektroskopija/2869/>. Pristupljeno 2. prosinca 2024.

80. Stuart B (2005) Infrared Spectroscopy. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* **14**, 2-5.
81. Kovačević M (2014) Ferrocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima (doktorski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
82. Tampieri A, Szabó M, Medina F, Gulyás H (2020) A brief introduction to the basics of NMR spectroscopy and selected examples of its applications to materials characterization. *Phys Sci Rev* **6**, 20190086.
83. Wade LG Jr. (2010) Organic chemistry, 7. izd., Pearson Prentice Hall, Boston, str. 169–211, 561–611.
84. Whitmore L, Wallace BA (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers* **89**(5), 392–400.
85. Miles AJ, Wallace BA (2016) Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins. *Chem Soc Rev* **45**, 4859-4872.
86. Corrêa DHA, Ramos CHI (2009) The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *Afr J Biochem Res* **3**, 164-173.
87. Miles AJ, Janes RW, Wallace BA (2021) Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins: a tutorial review. *Chem Soc Rev* **50**, 8400–8413.
88. 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.
89. Kirin SI, Kraatz HB, Metzler-Nolte N (2006) Systematizing structural motifs and nomenclature in 1, n'-disubstituted ferrocene peptides. *Chem Soc Rew* **35**(4), 348–354.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

A rectangular box containing a handwritten signature in black ink. The signature reads "Vita Vučićević".

Vlastoručni potpis