

# Biokonjugati ferocenske aminokiseline s dipeptidom Pro-Ala: sinteza i konformacijska analiza

---

Ivančić, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

*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:159:942498>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-21**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Marina Ivančić**

7293/PT

**BIOKONJUGATI FEROCENSKE AMINOKISELINE  
S DIPEPTIDOM PRO-ALA:  
SINTEZA I KONFORMACIJSKA ANALIZA**  
Završni rad

**Predmet:** Organska kemija

**Mentor:** Prof. dr. sc. Lidija Barišić

**Zagreb, 2019.**

## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**Završni rad**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za kemiju i biokemiju**

**Laboratorij za organsku kemiju**

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

### **BIOKONJUGATI FEROCENSKE AMINOKISELINE S DIPEPTIDOM PRO-ALA: SINTEZA I KONFORMACIJSKA ANALIZA**

Marina Ivančić, 0058209585

**Sažetak:** Najveći izazov u peptidomimetici predstavlja modifikacija strukture prirodnih peptida i dizajn odgovarajućih peptidomimetika s ciljem unapređenja njihovog biološkog učinka i prevladavanja ograničenosti terapijske primjene. U ovom radu opisana je sinteza i konformacijska analiza tripeptida Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (Fn = 1,1'-ferocenilen), nastalog kopuliranjem 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca) s homokiralnom Pro-Ala sekvencom. Cilj rada bio je ispitati utjecaj slijeda, kiralnosti i bočnog ogranka prirodnih aminokiselina (Pro i Ala) kao i potencijal Fca u indukciji elemenata sekundarne peptidne strukture. Sintetizirani tripeptid podvrgnut je strukturnoj analizi primjenom IR-, NMR- (ovisnim o koncentraciji, temperaturi i otapalu) i CD- spektroskopije, u svrhu utvrđivanja njegovog konformacijskog prostora koji je ključan za potencijalni farmakološki učinak. Prema rezultatima analize, osobitost pripremljenog biokonjugata jest dominacija intramolekulskih vodikovih veza srednje jakosti koje doprinose stabilizaciji molekule, odnosno induciraju tvorbu 7- članih i 10-članih IHB-prstenova (IHB, engl. *Intramolecular Hydrogen Bond*), odnosno  $\gamma$ -i  $\beta$ -okreta u peptidnom lancu.

**Ključne riječi:** intramolekulska vodikova veza, konformacijska analiza, ferocen, peptidomimetici, okret

**Rad sadrži:** 27 stranica, 16 slika, 1 shemu, 4 tablice, 45 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** Prof. dr. sc. Lidija Barišić

**Pomoć pri izradi:** Doc. dr. sc. Monika Kovačević

**Datum obrane:** 15. srpnja 2019.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Bachelor 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:** Food Technology

### **BIOCONJUGATES OF FERROCENEAMINOACID WITH DIPEPTIDE PRO-ALA: SYNTHESIS AND CONFORMATIONAL ANALYSIS**

Marina Ivančić, 0058209585

**Summary:** The greatest challenge in the field of peptidomimetic chemistry is the modification of the structure of natural peptides and the design of appropriate peptidomimetics with the aim of enhancing their biological effect and overcoming the limitation of therapeutic application. This study has explored the synthesis and conformational analysis of Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (Fn = 1,1'-ferrocenylene) tripeptide obtained by copulation of 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid (Fca) with homochiral Pro – Ala sequence. The main goal of this study was to explore the influence of the sequence, chirality and side chain of natural amino acids (Pro and Ala) as well as the potential of Fca in the induction of secondary peptide structure elements. The synthesized tripeptide was subjected to detail structural analysis by IR, NMR (concentration-, temperature- and solvent-dependent) and CD spectroscopy in order to determine its conformational space, which has a crucial impact on potential pharmacological effect. The obtained spectroscopic results revealed the predominance of intramolecular hydrogen bonds of medium strength that contribute to the stabilization of the compound by inducing the formation of 7- and 10-membered IHB-rings (IHB, Intramolecular Hydrogen Bond), *i.e.*  $\gamma$ - and  $\beta$ -turns within the peptide chain.

**Keywords:** IHB, conformational analysis, ferrocene, peptidomimetics, turns

**Paper contains:** 27 pages, 16 figures, 1 scheme, 4 tables, 45 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Ph.D. Lidija Barišić, Full Professor

**Technical support and assistance:** Ph. D. Monika Kovačević, Assistant Professor

**Defence date:** 15. srpnja 2019.

*Srdačno se zahvaljujem dragoj mentorici, prof. dr. sc. Lidiji Barišić, na svesrdnoj podršci, prenesenom znanju, susretljivosti i ukazanom povjerenju.*

*Najtopliju zahvalnost iskazujem doc. dr. sc. Moniki Kovačević na nesebičnoj pomoći, razumijevanju, uloženom trudu i korisnim savjetima prilikom izrade rada.*

## Sadržaj:

<b>§1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>§2. TEORIJSKI DIO</b> .....	
2.1. Struktura i svojstva proteina .....	2
2.2. Peptidomimetici .....	4
2.3. Bioorganometalna kemija .....	6
2.3.1. Bioorganometalna kemija ferocena .....	7
2.3.2. Ferocenski biokonjugati s aminokiselinama.....	7
2.4. Kemijska biotehnologija- interdisciplinarna znanost u razvoju.....	8
<b>§ 3 . EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	
3.1. Materijali i metode rada.....	10
3.2. Sintaza tripeptida Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe <b>(3)</b> .....	10
3.2.1 Sintaza dipeptida Boc-L-Ala-NH-Fn-COOMe <b>(2)</b> .....	10
3.2.2. Sintaza tripeptida Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe <b>(3)</b> .....	12
<b>§4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	
4.1. Uvod .....	14
4.1.2. <i>Cis-trans</i> izomerizacije prolinske imidne veze.....	14
4.2. Sintaza i konformacijska analiza tripeptida Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe <b>(3)</b> .....	16
4.2.1. IR-spektroskopska analiza tripeptida <b>3</b> .....	16
4.2.2. NMR-spektroskopska analiza tripeptida <b>3</b> .....	18
4.2.3. CD-spektroskopska analiza tripeptida <b>3</b> .....	22
<b>§5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>23</b>
<b>§ 6. LITERATURA</b> .....	<b>24</b>

## ***§1. UVOD***

Proteini su linearni polimeri (makromolekule) koji za osnovne građevne jedinice imaju aminokiseline čiji slijed definira njihova svojstva i funkciju u biološkim sustavima.<sup>1</sup> Zahvaljujući svojoj strukturnoj raznolikosti sudjeluju u mnogim biološkim procesima u kojima imaju ulogu građevnih elemenata i enzimskih katalizatora, a nužni su za pravodoban imunološki odgovor, rast i diferencijaciju stanica i sl. Usprkos velikom terapijskom potencijalu, njihova primjena je ograničena uslijed proteolitičke i konformacijske nestabilnosti.<sup>2,3</sup> U svrhu prevladavanja nedostataka prirodnih peptida razvio se interdisciplinarni pristup koji podrazumijeva suradnju i međusobno nadopunjavanje relativno mladih znanstvenih disciplina kao što su peptidomimetika i medicinska kemija, a u skorije vrijeme može se govoriti i o razvoju kemijske biotehnologije. Peptidomimetici su male peptidne ili nepeptidne molekule koje oponašaju elemente peptidne sekundarne strukture koji sudjeluju u molekulskom prepoznavanju te su stoga doprinose unaprijeđenoj biološkoj aktivnosti. Među brojnim različitim pristupima u dizajnu peptidomimetika izdvaja se korištenje malih, rigidnih molekulskih kalupa koji nakon umetanja u neuređeni peptidni lanac induciraju tvorbu uređene sekundarne strukture.

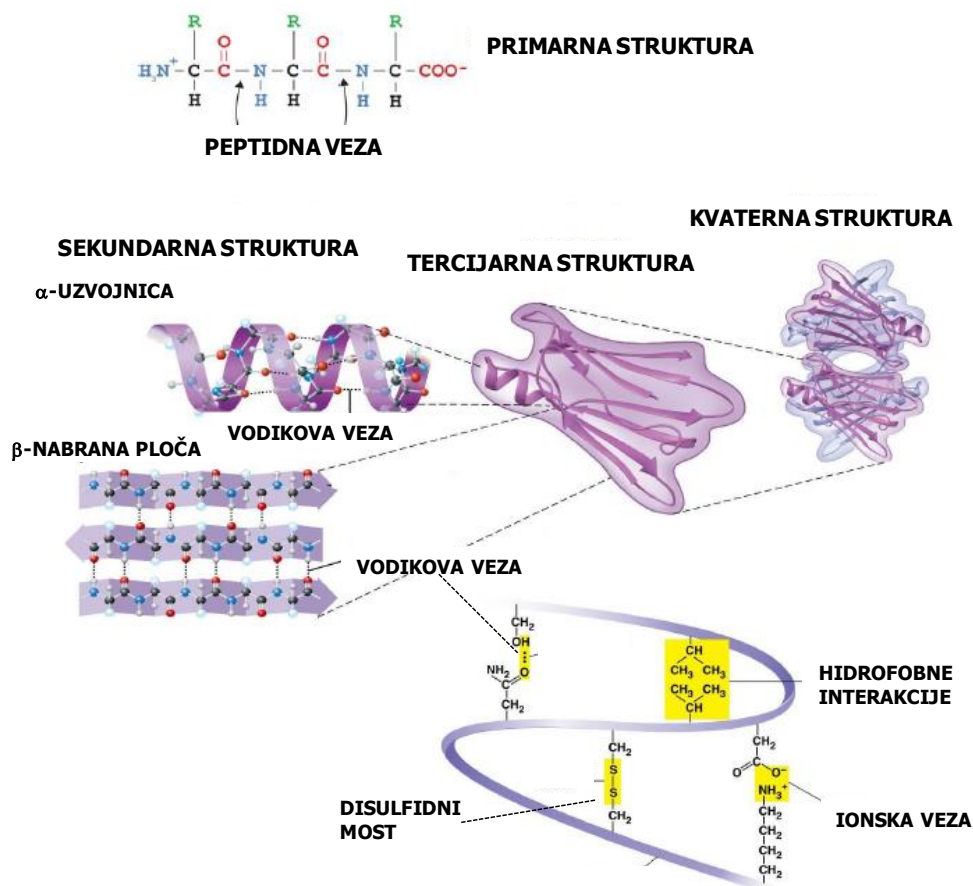
Tijekom posljednjih 10-ak godina u Laboratoriju za Organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta istražuju se 1,1'-disupstituirani feroceni kao mogući kalupi za pripremu konformacijski spregnutih peptida, što je rezultiralo objavljivanjem brojnih znanstvenih publikacija.<sup>4</sup> U nastavku tih istraživanja, a u sklopu ovog završnog rada, opisan će se sinteza homokiralnog tripeptida Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe. Uloga ferocenskog kalupa u indukciji okretâ, kao i utjecaj prirodnih aminokiselina (Ala i Pro) na konformacijska svojstva izvedenog biokonjugata u otopini ispitat će se uobičajenim spektroskopskim metodama (IR-, NMR- i CD-spektroskopija). Na temelju rezultata prethodnih istraživanja, očekuje se tvorba intramolekulskih vodikovih veza [IHB, (engl. *Intramolecular Hydrogen Bond*)] unutar peptidnog lanca. Nadalje, očekuje se potvrda ranije opisane uloge Pro kao začetnika  $\beta$ -okreta u homokiralnim peptidima. Osim toga, u suradnji s Laboratorijem za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije našeg Fakulteta provodi se ispitivanje citotoksičnog i antitumorskog djelovanja nosintetiziranog tripeptida.



## ***§2. TEORIJSKI DIO***

## 2.1. Struktura i svojstva proteina

Proteini predstavljaju izuzetno važne biološke makromolekule jer imaju ključnu ulogu u raznim biološkim procesima poput procesa staničnog prepoznavanja, prijenosa živčanih impulsa, enzimske katalize, održavanju strukture i funkcionalnosti. Nastaju povezivanjem proteinogenih aminokiselina reakcijom karboksilne skupine jedne aminokiseline s amino-skupinom druge aminokiseline pri čemu se stvara rigidna i planarna amidna (peptidna) veza, koja je zapravo rezonancijski hibrid dviju doprinosećih rezonancijskih struktura.  $\alpha$ -Aminokiseline su derivati organskih karboksilnih kiselina kod kojih je vodikov atom u  $\alpha$ -položaju zamijenjen amino-skupinom pri čemu rezultira stereogeni centar koji je u prirodnim aminokiselinama i peptidima L-konfiguracije. U strukturi svake aminokiseline prisutan je središnji ugljikov atom (C $\alpha$ -atom) na kojeg su vezane amino- i karboksilna skupina, atom vodika te bočni ogranci koji se međusobno razlikuju nabojem, veličinom, oblikom, kemijskom reaktivnošću i sposobnošću stvaranja vodikovih veza.<sup>5,6</sup> Zahvaljujući interakcijama između okosnice i aminokiselinskih ogranaka, proteini se nabiru i zauzimaju visoko-uređene trodimenzijske strukture što omogućava njihovu biološku aktivnost. Poznate su četiri razine u strukturi peptida i proteina: primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna struktura (slika 1).



Slika 1. Strukturne razine peptida i proteina<sup>7</sup>

Primarna struktura peptida određena je slijedom kovalentno vezanih aminokiselina u polipeptidnom lancu.

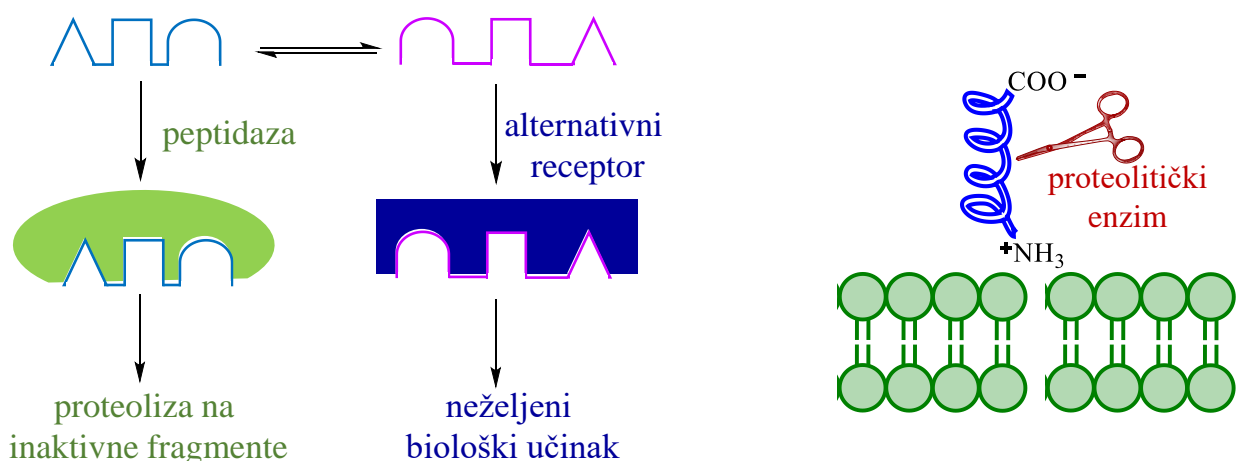
Sekundarna struktura predstavlja prostorni odnos aminokiselinskih ostataka koji su u linearnom slijedu međusobno blizu. Razlikujemo dvije periodične strukture stabilizirane vodikovim vezama između donorske (N-H) i akceptorske (C=O) skupine iz peptidne okosnice:  $\alpha$ -uzvojnica i  $\beta$ -nabranu ploču. Osim njih, u elemente sekundarne strukture ubrajaju se i okreti.  *$\alpha$ -Uzvojnica* je štapićasta, zbijena i čvrsta struktura nastala nabiranjem polipeptidne okosnice prilikom stvaranja vodikove veze između NH-skupine aminokiselinskog ostatka  $i$  te C=O skupine aminokiselinskog ostatka  $i+4$  što rezultira zatvaranjem 13-članih IHB-prstenova.  *$\beta$ -Nabrana ploča* izgrađena je od dvaju ili više polipeptidnih lanaca povezanih NH $\cdots$ CO vodikovim vezama, a ovisno o orijentaciji lanaca  $\beta$ -nabrana ploča poprima odgovarajući oblik. U paralelnim  $\beta$ -nabranim pločama lanci su orijentirani paralelno tvoreći 12-člane prstenove, dok se antiparalelne  $\beta$ -nabrane ploče odlikuju suprotnom orijentacijom lanaca te 10- i 14-članim prstenovima. *Okreti* su aperiodički opći strukturni elementi u građi proteina odgovorni za promjenu smjera peptidnih lanaca, nabiranje proteina i stvaranje globularnog oblika proteinskih molekula. Uspostavljanje intramolekulskih vodikovih veza unutar istog peptidnog lanca za posljedicu ima savijanje lanca, a najčešće ih induciraju Asn, Gly i Pro zahvaljujući svojim torzijskim svojstvima. Ovisno o broju konstituirajućih aminokiselinskih ostataka razlikujemo  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  i  $\pi$ -okrete. Ukoliko je zatvoren 7-člani prsten radi se o  $\gamma$ -okretu, 10-člani prsten odgovara  $\beta$ -okretu, 13-člani prsten rezultira  $\alpha$ -uzvojnicom, dok je  $\pi$ -okret posljedica tvorbe 16-članog IHB-prstena.  $\beta$ -Okreti su najčešći strukturni elementi globularnih proteina, a obuhvaćaju četiri aminokiselinska ostatka kod kojih udaljenost između  $C\alpha(i)$  i  $C\alpha(i+3)$  ne prelazi 7Å. Smješteni su na površini proteinske molekule, ostvaruju interakcije s različitim receptorima te tako izravno sudjeluju u imunološkim, metaboličkim, hematološkim i endokrinološkim reakcijama zbog čega postoji veliki interes za razvoj malih spregnutih mimetika  $\beta$ -okreta koji bi se mogli primjenjivati kao jaki i selektivni terapijski agensi.

Tercijarna struktura prikazuje prostorni odnos vrlo udaljenih aminokiselinskih ostataka u linearnom slijedu, a stabilizirana je različitim vezama između bočnih ogranaka koje mogu biti nekovalentne ili kovalentne prirode (npr. disulfidni mostovi).

Kvaternu strukturu imaju proteini koji se sastoje od najmanje dva polipeptidna lanca čiji su aminokiselinski bočni ogranci povezani nekovalentnim vezama te rjeđe disulfidnim mostovima.<sup>7,8</sup>

## 2.2. Peptidomimetici

Esencijalni biološki procesi regulirani su protein-protein interakcijama (PPI), koje se odvijaju na njihovoj dodirnoj površini. Poremećaji u PPI za posljedicu imaju različita patološka stanja, kronična i infektivna oboljenja.<sup>9</sup> Velika biološka i strukturna raznolikost proteina ukazuje na potencijalnu terapijsku primjenu, ali zbog njihovih nepovoljnih svojstava takva uporaba je ograničena. Naime, biološka funkcionalnost proteina uvjetovana je povezivanjem sa željenim receptorima što je uvjetovano strukturnom komplementarnošću, tj. 3D-strukture liganada i receptora moraju odgovarati jedna drugoj oblikom, nabojem, veličinom te hidrofobnim i hidrofilnim svojstvima. Izražena konformacijska fleksibilnost omogućava proteinima zauzimanje mnoštva konformacija te uspostavljanje znatnog broja interakcija s različitim receptorima što može dovesti do neželjenog biološkog odgovora (slika 2).



Slika 2. Povezanost različitih peptidnih konformacijskih svojstava i (ne)povoljnih bioloških odgovora<sup>10</sup>

Nadalje, peptidi su podložni proteolizi u gastrointestinalnom traktu i krvnom serumu, a radi polarnog karaktera i velike molekulske mase otežan im je prolazak kroz staničnu membranu i krvno-moždanu barijeru. Osim toga, pogreške u nabiranju proteinskih lanaca i njihova neželjena agregacija može dovesti do tvorbe amiloidnih vlakana (plaka) koji nakupljanjem u tkivima uzrokuju teška kronična oboljenja (amilodiodza), dok nakupljanjem amiloidnog plaka u mozgu dolazi do neurodegenerativnih oboljenja (Alzheimerova, Parkinsonova bolest).<sup>10</sup>

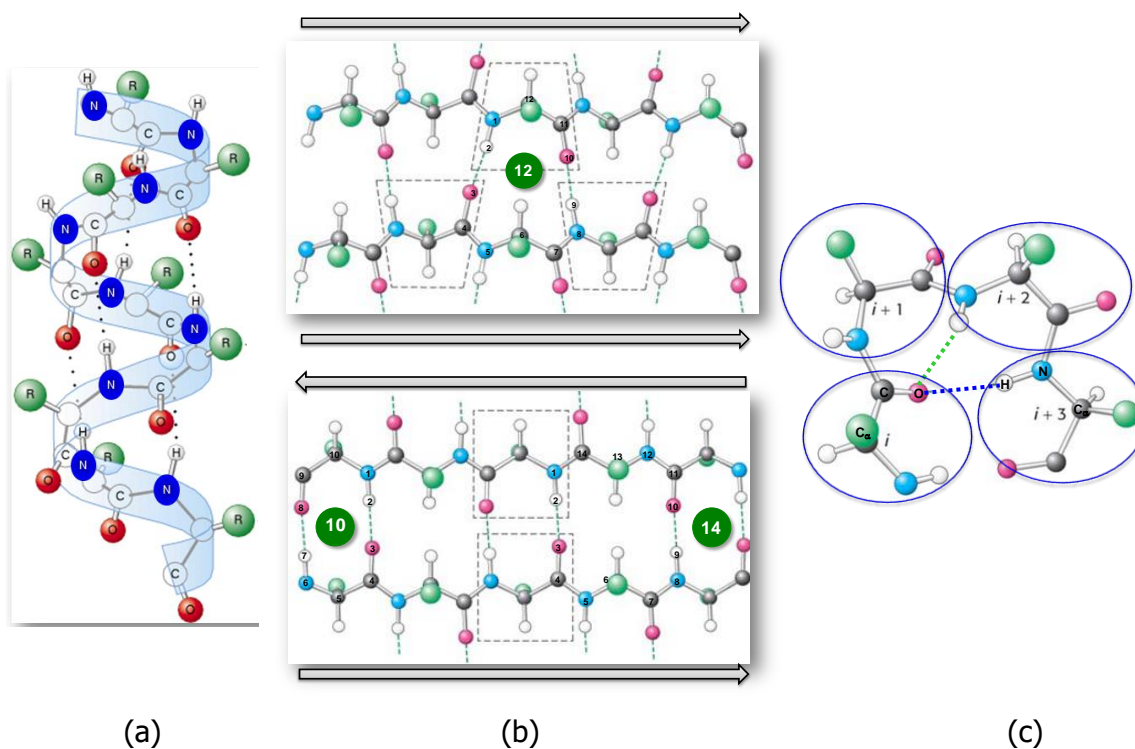
Modifikacijom nepovoljnih farmakoloških i biofarmaceutskih svojstava prirodnih peptida omogućava se njihova klinička primjena.<sup>11,12</sup> Jedan od najučinkovitijih pristupa rješavanju navedenih nedostataka jest ograničavanje peptidne fleksibilnosti uvođenjem

različitim konformacijskih ograničenja u cilju "zaključavanja" bioaktivne konformacije. Na taj se način pripravlja mimetici koji zauzimaju bioaktivnu konformaciju te pri tom ostvaruju povećani afinitet i selektivnost za određeni tip receptora. Peptidne ili nepeptidne molekule koje oponašaju elemente peptidne sekundarne strukture odgovorne za molekulsko prepoznavanje ili blokiranje biološkog učinka peptidnog receptora nazivamo peptidomimeticima. Određena strukturna regija u molekuli peptida odgovorna za farmakološko, odnosno biološko djelovanje naziva se farmakofofor.<sup>3,13</sup> Sve veća potreba za prevladavanjem ranije navedenih nedostataka prirodnih peptida pridonijela je razvoju peptidomimetike, interdisciplinarnog znanstvenog područja koje objedinjuje organsku kemiju, medicinsku kemiju, farmakologiju i biokemiju.

Postoji nekoliko različitih pristupa u dizajnu i sintezi peptidomimetika:<sup>14</sup>

- ugradnja nepeptidnih kalupa u peptidnu sekvencu,
- zamjena peptidne veze nepeptidnim analogima,
- konjugacija aminokiselinskih bočnih ogranaka s malim molekulama,
- ciklizacija glavnog lanca.

Oponašanje ili mimikrija elemenata sekundarne strukture (slika 3) zajednički je cilj navedenih pristupa.

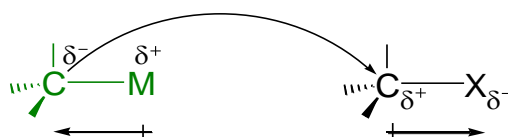


Slika 3. (a) α-uzvojnica, (b) β-nabrana ploča (paralelna *gore*, antiparalelna *dolje*), (c) okreti (β-..., γ-...)<sup>16,17</sup>

Kao mimetici  $\alpha$ -uzvojnice upotrebljavaju se peptoidi, foldameri s heterogenom okosnicom,  $\beta$ -peptidi, "uvezani" (eng. *stapled*), ferocenski peptidi itd. Biciklički laktami, dibenzofurani, feroceni i spirociklički kalupi koriste se kao mimetici okreta. Za oponašanje  $\beta$ -ploče koriste se ciklički i aciklički peptidi s umetnutim molekulskim kalupima.<sup>15</sup>

### 2.3. Bioorganometalna kemija

Bioorganometalna kemija je znanstvena disciplina koja proučava konjugate organometalnih spojeva i biomolekula.<sup>18,19</sup> Organometalni spojevi sadrže barem jednu vezu metal-ugljik koja potječe iz organske molekule.<sup>20</sup> Zahvaljujući elektronskim i steričkim efektima veze između metalnog i ugljikovog atoma moguće je kontrolirati biološku aktivnost. Pripadajuće molekule mogu apsorbirati naboj i stvarati ionske veze čime se omogućuje izvođenje različitih reakcija nužnih za prijenos tvari i energije. Reakcijom nukleofilnog ugljikovog atoma iz organometalnog spoja s elektrofilnim ugljikovim atomom (iz alkilhalogenida, estera, aldehida, ketona) stvara se nova C–C veza (slika 4), čime se otvara mogućnost sinteze kompleksnih molekula iz manjih prekursora.<sup>21</sup>



Slika 4. Nukleofilni karakter ugljikovog atoma u organometalnom spoju

Bioorganometalni spojevi mogu poslužiti za izradu osjetljivih sondi, kromofora, kemosenzora, kao receptori te u toksikologiji i kemiji okoliša, a istražuje se i njihova potencijalna terapijska uporaba za liječenje kancerogenih oboljenja i infekcija.<sup>22</sup> Za razliku od slobodnog liganda (bioaktivne molekule), metalni kompleks bioaktivnih molekula i metalnih iona ima poboljšani terapijski potencijal, smanjenu toksičnost, izražen lipofilni karakter zbog kojeg ima olakšan prolaz kroz staničnu membranu.<sup>23</sup> Zahvaljujući redoksaktivnosti metalâ i njihovim interakcijama s različitim ligandima i organskim supstratima, sintetiziraju se metalni kompleksi karakterizirani selektivnom sposobnošću vezanja na biološke mete pri čemu dolazi do promjene u mehanizmima stanične proliferacije. Osim toga, metalne komplekse je moguće oblikovati prema željenoj biološkoj meti.<sup>24</sup> Jedan od najpoznatijih i najvažnijih prirodnih bioorganometalnih spojeva je vitamin B<sub>12</sub>.

### 2.3.1. Bioorganometalna kemija ferocena

Ferocen  $[(C_5H_5)_2Fe]$  je organometalni spoj iz skupine metalocena, odnosno „sendvič-molekula“ u kojem se željezov kation ( $Fe^{2+}$ ) nalazi između dva ciklopentadienilna liganda (Cp), a zbog niza povoljnih svojstava nalazi se u središtu interesa bioorganometalne kemije. Naime, odlikuje se lipofilnošću, podložnošću reakcijama elektrofilne supstitucije, stabilnošću u fiziološkim uvjetima, niskom toksičnošću te doprinosi esencijalnom procesu nabiranja peptida kao začetnik okreta. Mogućnost rotacije oko veze Cp-Fe-Cp i mogući gubitak koplanarnosti Cp-prstenova pridonosi velikoj fleksibilnosti molekule. Pripravljene su mnogi antimikrobni i antitumorski agensi konjugiranjem ferocena s farmakofornim skupinama iz aminokiselina, peptida i šećera.<sup>25,26</sup> Osim toga, ferocen je prikladan spoj za oponašanje elemenata sekundarne peptidne strukture i prepoznat kao začetnik najčešće  $\beta$ -okreta u peptidnom lancu. Različiti ferocenski biokonjugati s ugljikohidratima i aminokiselinama sintetizirani su u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

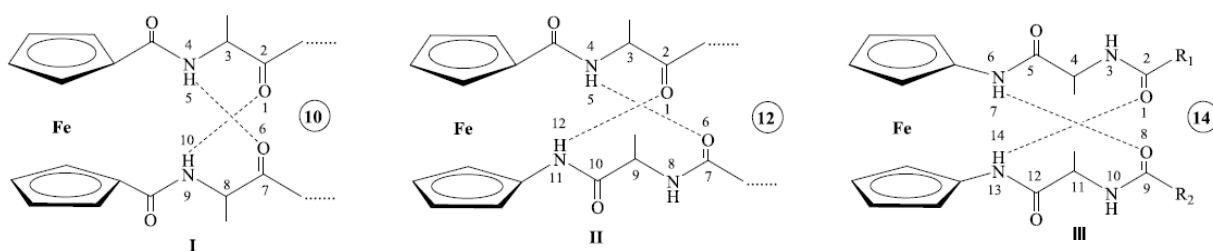
### 2.3.2. Ferocenski biokonjugati s aminokiselinama

Sintezu peptidomimetika moguće je provesti „umetanjem“ rigidnih kalupa u peptidnu strukturu kako bi se ograničila konformacijska sloboda i spriječilo međudjelovanje s nepoželjnim receptorima. 1,1'-Disupstituirani feroceni pogodan su kalup za pripravu konformacijski spregnutih peptida zahvaljujući udaljenosti između ciklopentadienilnih prstenova od 3,3 Å koja dopušta tvorbu intramolekulskih vodikovih veza između podandnih peptidnih lanaca. Povezanost homo/heterokiralnosti peptidne okosnice i veličine IHB-prstena omogućuje dizajn i sintezu ferocenskih peptida s precizno podešenom konformacijom iz čega se da zaključiti kako se malom molekulom, u ovom slučaju ferocenom, može manipulirati nabiranjem proteina.

Ovisno o strukturi ferocenskog prekursora (donor ili akceptor vodikove veze), razlikujemo tri glavne skupine ferocenskih peptidomimetika (slika 5):<sup>27,28,29</sup>

- **Fn-[CO-*AK*-OMe]<sub>2</sub> (I)** izvedeni iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (Fcd) i prirodnih aminokiselina (*AK*) karakteristični su po prisutnosti 10-članog IHB-prstena,
- **Y-*AK*-Fca-*AK*-OMe (II)** izvedeni iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca) i prirodnih aminokiselina (*AK*) odlikuju se prisutnošću 12-članog IHB-prstena,
- **Fn-[NH-*AK*-Y]<sub>2</sub> (III)** izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda) i prirodnih aminokiselina (*AK*), a stvaraju 14-člani IHB-prsten (2 simultana 10-člana IHB-prstena

ili strukture nalik  $\beta$ -okretima) [Fn = ferocenilen, Y = Ac (acetil), Boc (*tert*-butoksikarbonil)].



Slika 5. Ferocenski peptidomimetici **I-III**- IHB su označene isprekidanim crtama

Najbolje istraženi i opisani konjugati su **I** i **II**, dok su konjugati **III** izvedeni iz Fcda opisani su u samo tri publikacije<sup>9,30,31</sup>, a dvije su rezultat istraživanja provedenih u Laboratoriju za organsku kemiju PBF-a. Za razliku od disupstituiranih derivata **I** i **III** u kojima su lanci usmjereni paralelno, u konjugatu **II** Fca omogućava antiparalelnu orijentaciju peptidnih lanaca.<sup>32</sup> Ferocenska aminokiselina (Fca) je najjednostavnija organometalna kiselina koja se integrira u peptidne lance kopulacijom s *N*- i *C*-terminusom prirodnih aminokiselina, a njezini derivati u čvrstom stanju poprimaju IHB-obrasce preko kojih se povezuju u dimerne strukture, trodimenzijske mreže ili beskonačne helične lance. Utvrđeno je kako na stabilizaciju i konformacijska svojstva takvih mimetika utječu broj i pozicija donora vodikove veze te zaštitne skupinena *N*- i *C*-terminusu. Ferocenska aminokiselina topljiva je u vodi, netopljiva u organskim otapalima i ima visoko talište.<sup>33</sup> Također, veliki utjecaj na biološku aktivnost izvedenog peptidomimetika imaju i aminokiseline koje se nalaze u regijama okreta i sudjeluju u procesu molekuskog prepoznavanja pri čemu mogu predstavljati strukturalna ograničenja u peptidu i pridonijeti zaključavanju u rigidnu konformaciju. Prema rezultatima ranijih istraživanja<sup>10</sup>, variranjem kiralnosti prirodnih aminokiselina i *N*-terminalnih skupina moguće je inducirati tvorbu IHB-prstenova različitih veličina u biokonjugatima. Shea i sur. ustanovili su da je za utvrđivanje bilo kakvog utjecaja pojedinih aminokiselina na elemente sekundarne strukture potrebno razmotriti sklonost aminokiselina k zauzimanju pojedinih strukturalnih elemenata i utjecaj cijele proteinske sekvence.<sup>34</sup>

#### 2.4. Kemijska biotehnologija- interdisciplinarna znanost u razvoju

Prilikom sinteze potencijalnih terapeutika nužno je pronaći malu molekulu koja je u mogućnosti inducirati odgovarajući biološki odgovor.<sup>35,36</sup> Stoga je za dobivanje funkcionalnih molekula u svrhu manipuliranja biološkim sustavima potreban integrirani (interdisciplinarni) pristup u čime se objedinjuju spoznaje prirodnih znanosti i tehnologije. Posljednjih godina



razvoj metoda molekularne biologije u kombinaciji s medicinskom kemijom ubrzao je procese otkrivanja potencijalnih lijekova. Pored toga, nagli razvoj kemijske biologije potaknuo je razvitak graničnih disciplina poput sintetske biologije i *kemijske biotehnologije* koja je dio nastavne i znanstvene aktivnosti na vodećim svjetskim sveučilištima. Kemijska biotehnologija istražuje *utjecaj malih kemijskih molekula na unapređenje specifičnih bioloških procesa*, što u konačnici vodi k poboljšanju zdravlja i kvalitete života.<sup>37</sup>

U području kemijske biologije i biotehnologije mnoga istraživanja usmjerena su na sintezu malih molekula koje oponašaju 3D-strukturu i funkciju proteinskih prepoznavajućih domena kao što su  $\alpha$ -uzvojnica, okreta,  $\beta$ -ploča i  $\beta$ -niti. Dizajn mimetika usmjeren je i na povećanje konformacijske i proteolitičke stabilnosti, biodostupnosti i lipofilnosti. Prethodno utvrđena uloga ferocena u esencijalnom biološkom procesu nabiranja peptida i njegovo umetanje u polipeptidni lanac kao rigidnog kalupa predstavlja jedan od istraživačkih ciljeva upodručju kemijske biotehnologije. Kao indikacija da je malom molekulom poput ferocena moguće utjecati na ključne procese staničnih prepoznavanja putem PPI, može poslužiti činjenica da su se u 2011. godini među najprodavanijim lijekovima nalazili uglavnom heterociklički bioizosteri<sup>38</sup>. Najpoznatiji ferocenski bioizosteri su ferocetil-penicilin, ferocetil-cefalosporin te ferocifena (analoga tamoksifena) kod kojih je fenilni prsten zamijenjen s ferocenom pri čemu je opažena citotoksičnost kao posljedica oksidacije ferocena u biološkom mediju.<sup>39</sup> Također, pokazalo se da ferocenski derivati opioida etorfina inhibiraju proliferaciju stanica karcinoma dojke, a potvrđeno je i inhibicijsko djelovanje ferocenskih konjugata s manozom na hemaglutinacije uropatogene *E. coli*.<sup>8,26</sup>

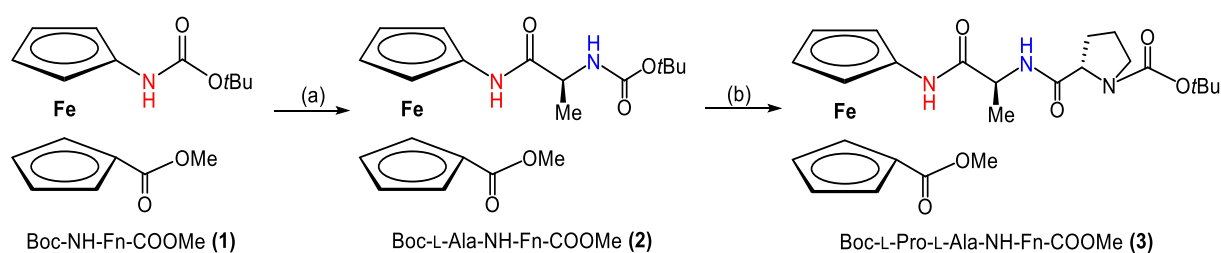
### ***§ 3 . EKSPERIMENTALNI DIO***

### 3.1. Materijali i metode rada

Kemikalije korištene tijekom sinteze bile su analitičke čistoće, dok su otapala pročišćena prema standardnim postupcima.<sup>40</sup> Kontrola čistoće sintetiziranih spojeva i tijek reakcija ispitivani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel) s fluorescentnim indikatorom (254 nm). Produkti su pročišćeni tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu ("Merck", Kieselgel 60 HF254) i uporabom smjesâ diklormetan/etil-acetat kao eluensâ. Karakterizacija sintetiziranih spojeva provedena je pomoću infracrvene spektroskopije (IR) i nuklearne magnetske rezonance (NMR). Tališta su određena na Reichert Thermovar HT 1 BT 11 i nisu korigirana. IR-spektri uzoraka snimljeni su na spektrofotometru Bomem MB 100 Mid FT u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. <sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR-spektri određeni su u CDCl<sub>3</sub> na spektrometru Bruker AV300 uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm. UV/Vis-i CD-spektri snimljeni su na CD-spektrofotometru Jasco-810 u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Sinteza Boc- zaštićene Fca (**IX**)<sup>21,32a</sup> opisana je u literaturi te njezini spektroskopski podaci odgovaraju literaturnima. Jakost apsorpcijskih vrpca u IR-spektrima: j (jaki), sr (srednji) sl (slabi), š (široki). Cijepanja signala u NMR-spektrima: s (singlet), d (dublet), t (triplet), q (kvartet), pt (pseudotriplet).

### 3.2. Sinteza tripeptida Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (3)

Sinteza ciljnog konjugata provedena je iz zaštićene Fca **1** prema shemi 1:



(a) 1. HCl<sub>plinoviti</sub>, Et<sub>3</sub>N; 2. Boc-Ala-OH, EDC/HOBt, (b) 2. HCl<sub>plinoviti</sub>, Et<sub>3</sub>N; 2. Boc-Pro-OH

Shema 1. Priprava tripeptida Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (**3**)

#### 3.2.1 Sinteza dipeptida Boc-L-Ala-NH-Fn-COOMe (2)

Potpuno zaštićena Fca **1** otopljena je u EtOAc i podvrgnuta Boc-deprotekciji djelovanjem plinovitog HCl pri 0 °C. Nakon 30' miješanja u ledenoj kupelji te otparavanja na rotacijskom vakuum-uparivaču nastali se hidroklorid suspendira u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i obradi sa suviškom Et<sub>3</sub>N (pH~9). Dobiveni se slobodni ferocenski amin kopulira s Boc-L-Ala-OH primjenom

standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon 1 sat miješanja pri sobnoj temperaturi dobivena reakcijska smjesa ispere se zasićenom vodenom otopinom  $\text{NaHCO}_3$ , 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom  $\text{NaCl}$ . Tijek reakcije praćen je TLC-metodom uzimanjem uzorka iz reakcijske smjese. Organski se sloj osuši bezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i upari do suha. Cijeli postupak priprave odvija se u inertoj atmosferi argona. Aparatura za sintezu spoja **2** prikazana je na slici 6. U tablici 1. navedeni su supstrati i reagensi upotrijebljeni za njegovu pripravu, dok su rezultati provedenih mjerenja prikazani u tablici 2.



Slika 6. Aparatura za sintezu i TLC-praćenje napredovanja reakcije

Tablica 1. Supstrati i reagensi upotrijebljeni prilikom sinteze dipeptida **2**

Produkt	Supstrat (mg/mmol)	Aminokiselina (mg/mmol)	Reagensi za kopulaciju (mg/mmol)		Dobivena masa (mg/%)	Opis produkta
			EDC	HOBt		
<b>2</b>	<b>1</b> (137,5 mg, 0,53 mmol)	Boc-L-Ala-OH (200 mg, 1,06 mmol)	306,72 mg, 1,6 mmol	216,21 mg, 1,6 mmol	206,05 mg, (90,4%)	Narančasta smola

Tablica 2. Rezultati provedenih mjerenja za dipeptid **2**

R <sub>f</sub> -vrijednost
<u>0,76 (EtOAc)</u>
IR-spektroskopija
IR (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) ν <sub>max</sub> /cm <sup>-1</sup> : 3424 sr (NH <sub>slobodni</sub> ), 3324 sl (NH <sub>asocirani</sub> ), 1709 j (C=O <sub>CONH</sub> ), 1536 j, 1498 j (amid II).
<sup>1</sup> H NMR-spektroskopija
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ/ppm: 7,64 (s, 1H, NH <sub>Fn</sub> ); 5,14 (d, J = 7,6 Hz, 1H, NH <sub>Ala</sub> ); 4,76 (m, 2H, H-7, H-10); 4,68 (s, 1H, H-2); 4,57 (s, 1H, H-5); 4,38 (m, 2H, H-8, H-9); 4,23 (m, 1H, CH <sub>Ala</sub> ); 4,04 (m, 1H, H-4); 4,02 (m, 1H, H-3); 3,80 (s, 3H, COOMe); 1,48 [s, 9H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -Boc]; 1,42 (d, J = 7,1 Hz, 3H, CH <sub>3</sub> -Ala).
<sup>13</sup> C NMR-spektroskopija
<sup>13</sup> C-NMR (75MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ/ppm: 171,89 (CO <sub>Fn</sub> ); 171,19 (CO <sub>Ala</sub> ); 95,30 (C-1); 80,6 (C <sub>qBoc</sub> ); 72,71 (2C, C-8, C-9); 72,14 (C-6); 71,40 (C-10); 71,26 (C-7); 66,64 (C-4); 66,38 (C3); 63,31 (C-2); 62,99 (C-5); 51,81 [2C, CH <sub>3</sub> -COOMe, CH <sub>Ala</sub> ]; 28,52 [(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -Boc]; 17,95 (CH <sub>3</sub> -Ala).

### 3.2.2. Sinteza tripeptida Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (**3**)

Tripeptid **3** (slika 7) pripremljen je iz Boc-L-Ala-NH-Fn-COOMe (**2**) primjenom postupka za deprotekciju i kopulaciju opisanom u potpoglavlju 3.2.1. Deprotekcijom terminalne amino-skupine Boc-dipeptida **2**, tj. djelovanjem plinovitog HCl uz naknadnu obradu dobivenog hidroklorida s Et<sub>3</sub>N nastao je odgovarajući nestabilni amin koji je potom *in situ* kopuliran s prethodno aktiviranom Boc-zaštićenom aminokiselinom (Boc-L-Pro-COOH). Sirovi produkt pročišćen je tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc (5 : 1) nakon čega je podvrgnut konformacijskoj analizi. U tablici 3. navedeni su supstrati i reagensi upotrijebljeni za pripremu tripeptida **3**, dok su rezultati provedenih mjerenja prikazani u tablici 4.

Tablica 3. Supstrati i reagensi upotrijebljeni prilikom sinteze tripeptida **3**

Produkt	Supstrat (mg/mmol)	Aminokiselina (mg/mmol)	Reagensi za kopulaciju (mg/mmol)		Dobivena masa (mg/%)	Opis produkta
			EDC	HOBt		
<b>3</b>	<b>2</b> (206,05 mg, 0,45 mmol)	Boc-L-Pro -OH (193,72 mg, 0,90 mmol)	258,79 mg, 1,35 mmol	182,42 mg, 1,35 mmol	125,80 mg, (42%)	Narančasta smola (slika 7).



Slika 7. Novosintetizirani tripeptid Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (**3**)

Tablica 4. Rezultati provedenih mjerenja za tripeptid **3**

R <sub>f</sub> -vrijednost
0,81 (EtOAc)
Talište ( <i>t</i> <sub>t</sub> )
66,9 °C
IR-spektroskopija
IR (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) $\nu_{\max}$ /cm <sup>-1</sup> : 3419 j (N-H <sub>slobodni</sub> ), 3311 j (N-H <sub>asocirani</sub> ), 1705 j (C=O <sub>COOMe</sub> ), 1674 j (C=O <sub>amid I</sub> ), 1555 j, 1503 j (amid II).
<sup>1</sup> H NMR-spektroskopija
<sup>1</sup> H-NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) $\delta$ /ppm: 8,46 [s, 1 H, NH <sub>Fn</sub> ]; 6,75[d, <i>J</i> = 6,34 Hz, 1 H, NH <sub>Ala</sub> ]; 4,91 (s, 1 H, H-3); 4,76 (s, 2 H, H-8, H-9); 4,62 (s, 1 H, H-4); 4,40-4,38 (m, 1 H, H-7, H-10); 4,34 [dd, 1 H, CH- $\alpha$ Pro]; 4,01-3,98 (m, 2H, H-2, H-5); 3,77 (s, 3 H, COOMe); 3,52-3,50 [m, 2 H, CH <sub>2</sub> - $\delta$ , CH <sub>2</sub> - $\delta'$ Pro]; 2,21-2,16 [m, 2 H, CH <sub>2</sub> - $\beta$ , CH <sub>2</sub> - $\beta'$ Pro]; 1,95-1,93 [m, 2 H, CH <sub>2</sub> - $\gamma$ , CH <sub>2</sub> - $\gamma'$ Pro]; 1,50 [s, 9 H, CH <sub>3</sub> -Boc]; 1,42 [d, <i>J</i> = 6,98 Hz, 3 H, CH <sub>3</sub> Ala].
<sup>13</sup> C NMR-spektroskopija
<sup>13</sup> C-NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) $\delta$ / ppm: 172,36 [CO <sub>Fn</sub> ]; 171,96 [CO(COOCH <sub>3</sub> )]; 170,46 [CO <sub>Ala</sub> ]; 156,34 [CO <sub>Boc</sub> ]; 95,82 (C-1, Fn); 81,25 (C <sub>q</sub> Boc); 73,1-71,08 (dd, (C-7, C-10, C-6, C-8, C-9); 66,59 (C-2); 66,41 (C-5); 63,18 (C-4); 62,78 (C-3); 60,98 (C- $\alpha$ Pro); 51,70 [CH <sub>3</sub> , (COOCH <sub>3</sub> )]; 49,76 (CH <sub>Ala</sub> ); 47,56 (CH <sub>2</sub> - $\delta$ Pro); 29,16 (CH <sub>2</sub> - $\beta$ Pro); 28,54 [(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -Boc]; 24,83 (CH <sub>2</sub> - $\gamma$ Pro); 17,55 (CH <sub>3</sub> Ala).

#### ***§4. REZULTATI I RASPRAVA***

## 4.1. Uvod

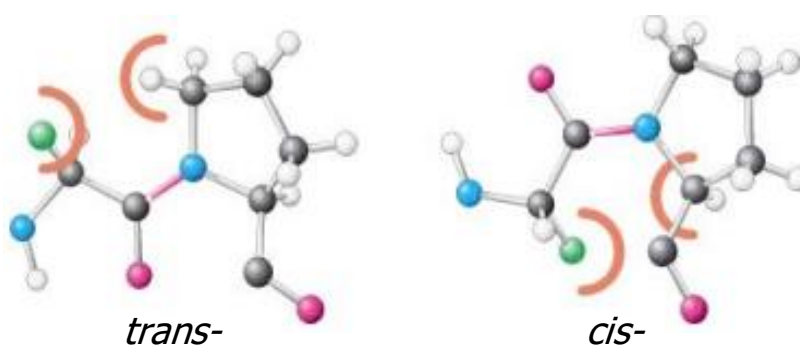
Imajući u vidu ranije opisane spoznaje o nedostacima prirodnih peptida koji se mogu prevladati korištenjem odgovarajućih peptidomimetika, u ovom završnom radu izvršena je sinteza i detaljna konformacijska analiza kopulacijskog produkta prirodnih aminokiselina s Fca s posebnim osvrtom na intramolekulske veze koje su od ključne važnosti za tvorbu preferentnih konformacija. Dakle, pripremljeni tripeptid predstavlja pogodan model za istraživanje i objedinjenje do sad poznatih zaključaka i rezultata o prostornom obliku i potencijalnom terapijskom učinku bioorganometalnih peptidnih mimetika. Prema prikazanoj osnovnoj podjeli ferocenskih peptida ovisno o strukturi njihovog ferocenskog prekursora (slika 5)<sup>26,27,28</sup>, može se zaključiti da ciljni biokonjugat **3** pripada višim homolozima ferocenskih peptida **II** izvedenih 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline. Nadalje, razmak među ferocenskim ciklopentadienilnim prstenovima na koje su pripojeni peptidni lanci iznosi 3,3 Å što odgovara prosječnoj duljini vodikove veze. Dakle, umetanjem ferocenskog kalupa u prirodnu peptidnu sekvencu omogućuje se tvorba intramolekulskih vodikovih veza (IHB) između podandnih peptidnih lanaca čime se induciraju različiti strukturni elementi (uzvojnice, plohe i okreti). Obrasci IHB u peptidima **I** i **II** određeni su strukturom ferocenskog sintona (Fcd, Fca) i apsolutnom konfiguracijom prirodnih aminokiselina. Ispitana je sekundarna struktura pripremljenog mimetika, za koju smo pretpostavili da će ovisiti o kiralnosti, slijedu prirodnih aminokiselina, njihovim međusobnim interakcijama kao i interakcijama s NH-/CO-skupinama iz ferocenskog kalupa te steričkom ometanju voluminozne Boc-zaštitne skupine. Konformacijska analiza provedena je spektroskopskim metodama (CD-, IR-, <sup>1</sup>H NMR-spektroskopija, NOESY, COSY). U skladu s dobivenim rezultatima predložen je i pretpostavljeni konformacijski oblik bioorganometalnog tripeptida s homokiralnom Pro-Ala sekvencom.

### 4.1.2. *Cis-trans* izomerizacije prolinske imidne veze

Posebnu pozornost prilikom ovog istraživanja privlači umetanje i utjecaj Pro, hidrofobne aminokiseline s alifatskim pobočnim lancem prepoznatljive cikličke strukture. Njegova sekundarna amino-skupina, bolje rečeno imino-skupina, zajedno s konformacijskim ograničenjima njegovog prstena smanjuju strukturnu fleksibilnost peptida. Zahvaljujući jedinstvenim strukturnim svojstvima, prolinski ostaci u linearnim, cikličkim i globularnim proteinima induciraju tvorbu 10-članog β-okreta koji je glavni objekt istraživanja u području sintetskih mimetika peptidne sekundarne strukture.<sup>41,42</sup> Naime, njegov bočni ogranak, vezan na dušikov atom glavnog lanca, zatvara pirolidinski prsten čime je onemogućeno



sudjelovanje u vodikovim vezama i rotacija oko N-C $\alpha$  veze što odgovara položaju  $\beta$  i  $\gamma$ -okreta. Prolin, tj. njegov hidroksilirani oblik izgrađuje kolagen, neophodan je za stvaranje i funkciju kože, hrskavice i kostiju, a linearni peptidi s konstituirajućim Pro-AA sekvencijama (AA = Gly, L-Ala, D-Ala) učinkoviti su inhibitori kolagenske prolil-hidrolaze. Osim strukturne uloge, prolin ima i zaštitnu funkciju, a prolinski ostaci u peptidnom lancu povećavaju otpornost na djelovanje proteolitičkih enzima i povećavaju biološku aktivnost.<sup>43</sup> Planarne amidne veze u peptidima najčešće imaju *trans*-konfiguraciju pa je omjer *trans*- i *cis*-oblika u prirodnim peptidima približno 95 : 5.<sup>8,44</sup> Prolinske imidne veze imaju smanjeni afinitet za *trans*-konfiguraciju te je omjer *trans*- i *cis*- oblika znatno promijenjen i iznosi 70 : 30 (slika 8).<sup>8</sup>

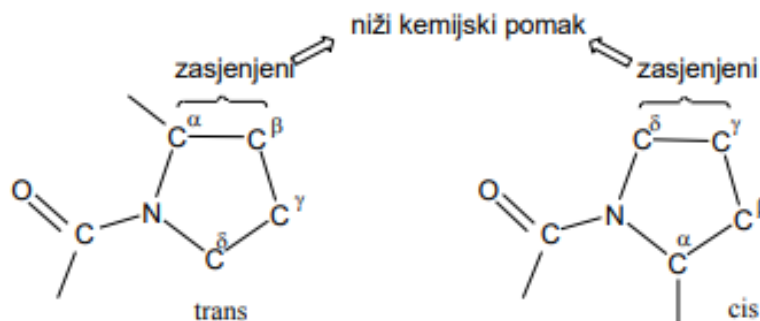


Slika 8. *Cis-trans* izomerizacija imidne veze u prolinskim peptidima

Interkonverzija izomera u prolinskim peptida je ravnotežan i brz proces što često otežava njihovo razdvajanje kromatografskim metodama. Međutim, <sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR spektroskopija pokazale su izraženiju moć razlučivanja prilikom detekcije *trans*- i *cis*- oblika u odnosu na druge metode. Za bolje razumijevanje ove pojave prilikom razdvajanja ovih dvaju konformera, potrebno je poznavati važnost *syn*-pozicije ugljikovih atoma (u odnosu na karbonilni kisikov atom) o kojoj ovisi njihova zasjenjenost (rezonancija) pri višem polju, odnosno (niži) kemijski pomak. U *trans*-izomeru su C $\alpha$ - i C $\beta$ -atomi zasjenjeniji i imaju niži kemijski pomak u odnosu na one C $\alpha$ - i C $\beta$ -atome iz *cis*-izomera. C $\gamma$ - i C $\delta$ -atomi zasjenjeniji su u *cis*-izomeru što njihov kemijski pomak čini nižim u odnosu na C $\gamma$ - i C $\delta$ -atome iz *trans*-izomera (slika 9). Zaključno, konformacija oko imidne veze utječe na kemijske pomake C $\beta$ - i C $\gamma$ - atoma pa se manja razlika kemijskih pomaka ( $\Delta\delta = 1-6$  ppm) pripisuje *trans*-izomerima, a veća ( $\Delta\delta = 8-10$  ppm) *cis*-izomerima.<sup>8</sup>

Omjer *cis*- i *trans*-izomera u <sup>1</sup>H spektrima određuje se integriranjem signala, a u <sup>13</sup>C-spektrima prema visini signala. Prilikom NMR-mjerenja ispituje se utjecaj temperature, otapala i vodikovih veza na *cis-trans* izomerizaciju pa se može reći kako pri povišenju

temperature dolazi do ubrzane pretvorbe izomera što se potvrđuje srastanjem njihovih signala koji su razdvojeni pri nižim temperaturama.<sup>8</sup> Udio *cis*-izomera raste u polarnim otapalima, a udio *trans*-izomera u nepolarnom okruženju. Osim toga, porast udjela *trans*-izomera pripisuje se utjecaju intramolekulskih vodikovih veza.<sup>45</sup>



Slika 9. Kemijski pomaci prolinskih C-atoma

## 4.2. Sinteza i konformacijska analiza peptida Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (3)

Dobiveni tripeptid **3** pripremljen je produljenjem *N*-terminusa dipeptida **2** s L-Pro. U njegovom <sup>1</sup>H NMR-spektru primijećena je pojava šest zasebnih signala u rasponu od  $\delta = 1,93-3,52$  ppm koji se pripisuju prolinskim metilenskim protonima ( $\beta/\beta', \gamma/\gamma', \delta/\delta'$ ), a njihovi metinski protoni javljaju se pri  $\delta \sim 4$  ppm. Dodatna potvrda strukture pripremljenog spoja jesu signali prolinskih [ $\text{CH}_\alpha\text{Pro}$  ( $\delta = 60,98$  ppm),  $\text{CH}_2\delta$  ( $\delta = 47,56$  ppm),  $\text{CH}_2\beta$  ( $\delta = 29,16$  ppm) te  $\text{CH}_2\gamma$  ( $\delta = 24,83$  ppm)] kao i karbonilnih ugljikovih atoma iz novih amidnih veza pri  $\delta \sim 170$  ppm u <sup>13</sup>C-NMR-spektrima.

### 4.2.1. IR-spektroskopska analiza tripeptida 3

IR pripada molekularnoj apsorpcijskoj spektrometriji. Osnovni princip IR metode jest pojava vibracija grupe atoma ovisna o prirodi njihovih međusobnih veza kao posljedica djelovanja infracrvenih fotona. Različite vibracije odgovaraju različitim energijama i molekule apsorbiraju infracrveno zračenje pri točno određenim valnim duljinama i frekvencijama. IR-spektar dijeli se na područje funkcijskih skupina ( $4000-1400\text{ cm}^{-1}$ ) gdje većina funkcijskih skupina apsorbira zračenje i područje otiska prsta ( $1400 - 600\text{ cm}^{-1}$ ) karakteristično za svaki pojedini spoj kao cjelinu, odnosno svaki spoj u ovom području pokazuje jedinstveni oblik apsorpcijskih vrpca.

Položaj apsorpcijskih vrpca NH i CO skupina indikator je njihovog sudjelovanja u IHB. U području N-H isteznih vibracija vidljive su dvije vrpce različitih intenziteta od kojih se ona iznad  $3400\text{ cm}^{-1}$  pripisuje slobodnim NH-skupinama, dok se vrpca ispod  $3400\text{ cm}^{-1}$  pripisuje

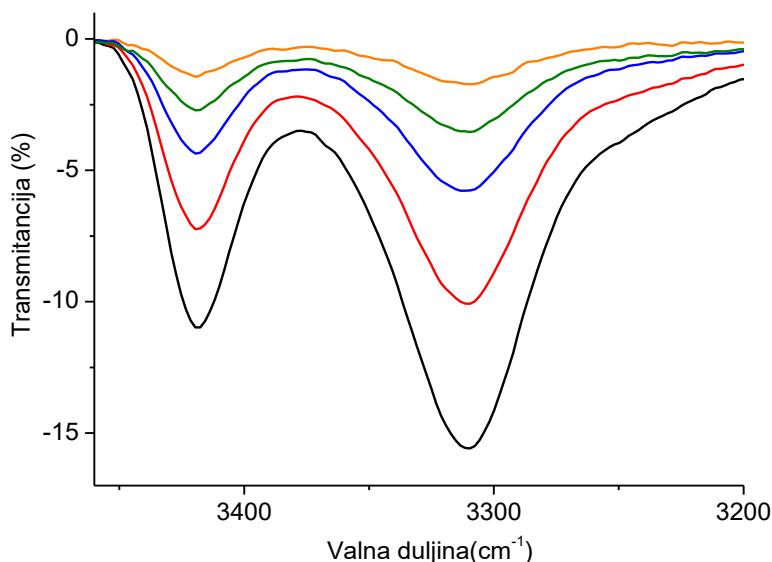
asociranim NH-skupinama. NH skupine uključene u vodikove veze registrirane su signalima <math>3400\text{ cm}^{-1}</math>. U IR-spekttru registrirane su i karbonilne skupine (esterske ili amidne) u području ispod  $1730\text{ cm}^{-1}$  što indicira na njihovo sudjelovanje u IHB (tablica 5).

Tablica 5. Istezne vibracije NH- i CO-skupina tripeptida **3**

Spoj	Formula	$\nu\text{NH}$ (slob.)	$\nu\text{NH}$ (asoc.)	$\nu\text{CO}$ (ester)	$\nu\text{CO}$ (amid I)	$\nu\text{CO}$ (amid II)
<b>3</b>	Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOME	3419j	3311j	1705j	1674j	1555j, 1503j

\*IR-spektri snimljeni su u  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $c = 5 \times 10^{-2}\text{ M}$ .

Karakter asocijacija indiciranih apsorpcijskom vrpcom <math>3400\text{ cm}^{-1}</math> analiziranog biokonjugata ispitan je postupnim razrjeđivanjem njegove diklormetanske otopine u rasponu koncentracija  $5 \times 10^{-2}\text{ M}$  do  $3 \times 10^{-3}\text{ M}$  pri čemu se promatrao utjecaj smanjenja koncentracije (razrjeđenja) na omjer intenziteta signala asociiranih i slobodnih NH-skupina. Primjećuje se kako smanjenjem koncentracije dolazi do slabljenja vrpce asociiranih i slobodnih NH-skupina (slika 10). Omjer njihovih intenziteta s početne 1,4:1 vrijednosti (pri najvećoj koncentraciji otopine) mijenja se do vrijednosti 1,2:1 (pri najnižoj koncentraciji) iz čega se može pretpostaviti intramolekulski angažman NH-skupina, popraćen s nešto intermolekulskih vodikovih veza (agregata).



Slika 10. Koncentracijski-ovisan IR-spektar biokonjugata **3**

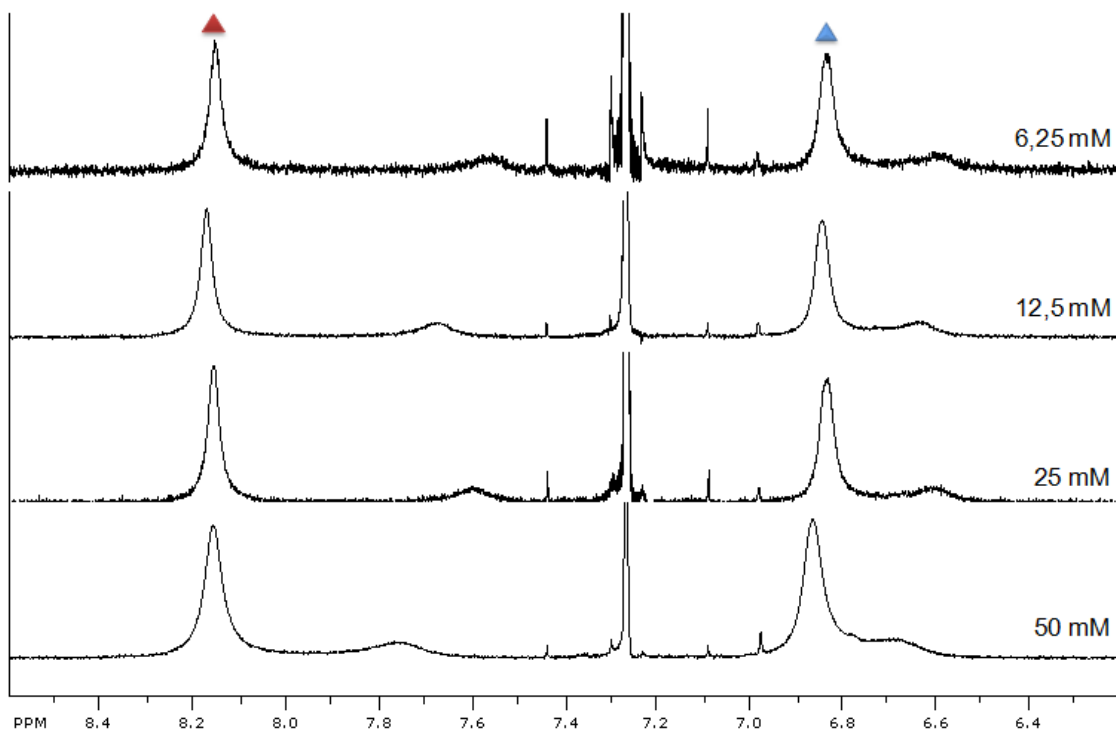
IR-spektri snimljeni su u  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , [(—)  $c = 5 \times 10^{-2}\text{ M}$ , (—)  $c = 2,5 \times 10^{-2}\text{ M}$ , (—)  $c = 1,25 \times 10^{-2}\text{ M}$ , (—)  $c = 6,13 \times 10^{-3}\text{ M}$ , (—)  $c = 3 \times 10^{-3}\text{ M}$ ].

### 4.2.2. NMR-spektroskopska analiza tripeptida **3**

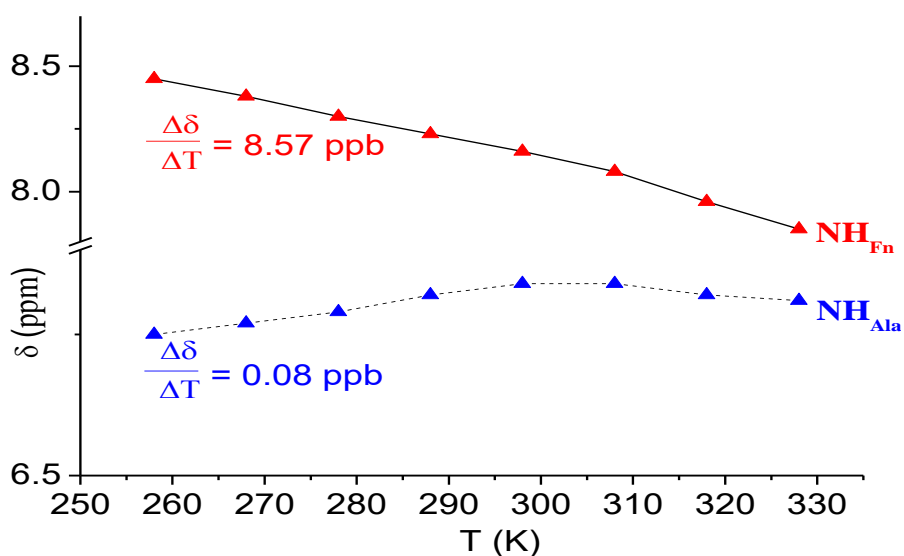
Kako bi se dobila jasnija predodžba o prirodi vodikovih veza u ispitivanom peptidu te potvrdili nalazi IR-mjerenja provedena je detaljna NMR-spektroskopska analiza. To je metoda koja omogućuje asignaciju amidnih protona iz Fca i Ala i pomaže predvidjeti koji je od tih protona uključen u vodikovu vezu. Amidni protoni iz alaninske podjedinice ( $\text{NH}_{\text{Ala}}$ ) predstavljeni su dubletima zahvaljujući svojoj sprezi sa susjednim metinskim protonima, a  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  kao singleti. Poznato je kako NH-skupine koje sudjeluju u vodikovim vezama rezoniraju pri  $\delta > 7$  ppm, a slobodne NH-skupine obično su registrirane pri višem polju. Također, treba napomenuti i mogućnost odstupanja od ovog pravila, ovisno o kemijskoj okolini donorske NH-grupe. Osobitost pripravljenog biokonjugata **3** jest visok kemijski pomak  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  ( $\delta = 8,46$  ppm) što podrazumijeva sudjelovanje u vodikovim vezama. Osim toga  $\text{NH}_{\text{Ala}}$  ( $\delta = 6,75$  ppm) registriran je pri nižem polju, što ponovno upućuje na angažman u vodikovim vezama. Također, treba istaknuti utjecaj temperature, polarnosti otapala i vodikovih veza na *cis-trans* izomerizaciju oko imidne veze. Budući da je već pri sobnoj temperaturi uočena pojava *cis-trans* izomerizacije, NMR asignacija treba se provoditi pri nižim temperaturama ( $-15^\circ\text{C}$ ).

Uzimajući u obzir da razrjeđivanje i zagrijavanje pospješuju kidanje veza, karakter vodikovih veza (inter- ili intramolekulski) indiciran rezultatima koncentracijski-ovisne IR-spektroskopije dodatno je ispitan koncentracijski- i temperaturno-ovisnim  $^1\text{H}$  NMR-spektrima. Prilikom postupnog smanjenja koncentracije (50-6,25 Mm), nije uočena znatna promjena kemijskih pomaka  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  i  $\text{NH}_{\text{Ala}}$  u tripeptidu **3** (slika 11). Zaključujemo kako slaba ovisnost kemijskog pomaka o koncentraciji upućuje na postojanje intramolekulskih veza.

Nadalje, signali amidnih protona homokiralnog tripeptida **3** pokazali su se i temperaturno neovisnima. Izračunate visoke temperaturne ovisnosti kemijskih pomaka ( $\Delta\delta/\Delta T$ )  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  ukazuju na njegovu početnu zaklonjenost od otapala, tj. sudjelovanje u vodikovim vezama. Prethodnim mjerenjima koncentracijski ovisnih IR-spektara, te koncentracijski- i temperaturno-ovisnih NMR-spektara indicirano je sudjelovanje  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  u intramolekulskim vodikovim vezama, kojima kojima se u ovom slučaju mogu pripisati visoki izračunati  $\Delta\delta/\Delta T$  omjeri (slika 12).



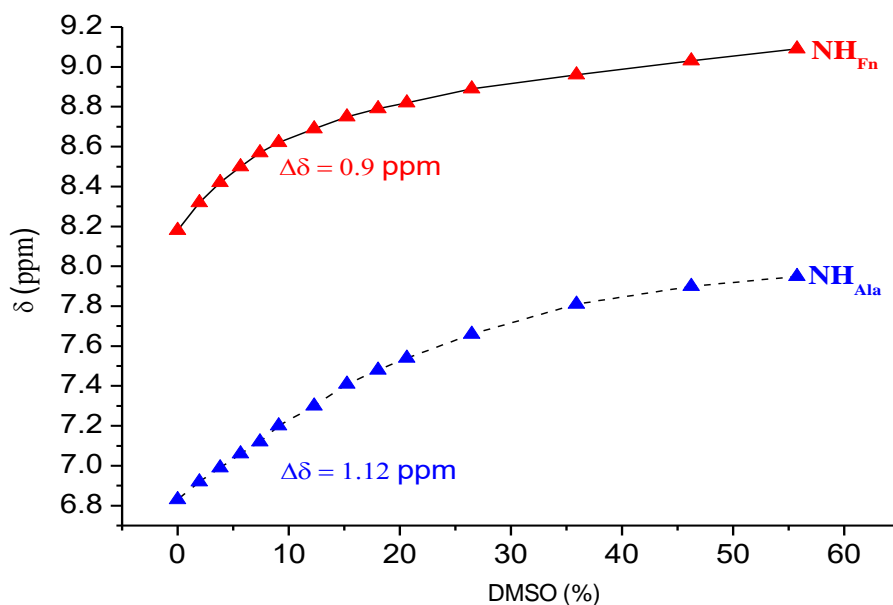
Slika 11. Koncentracijska ovisnost kemijskih pomaka  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  i  $\text{NH}_{\text{Ala}}$



Slika 12. Temperaturna ovisnost kemijskih pomaka  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  i  $\text{NH}_{\text{Ala}}$

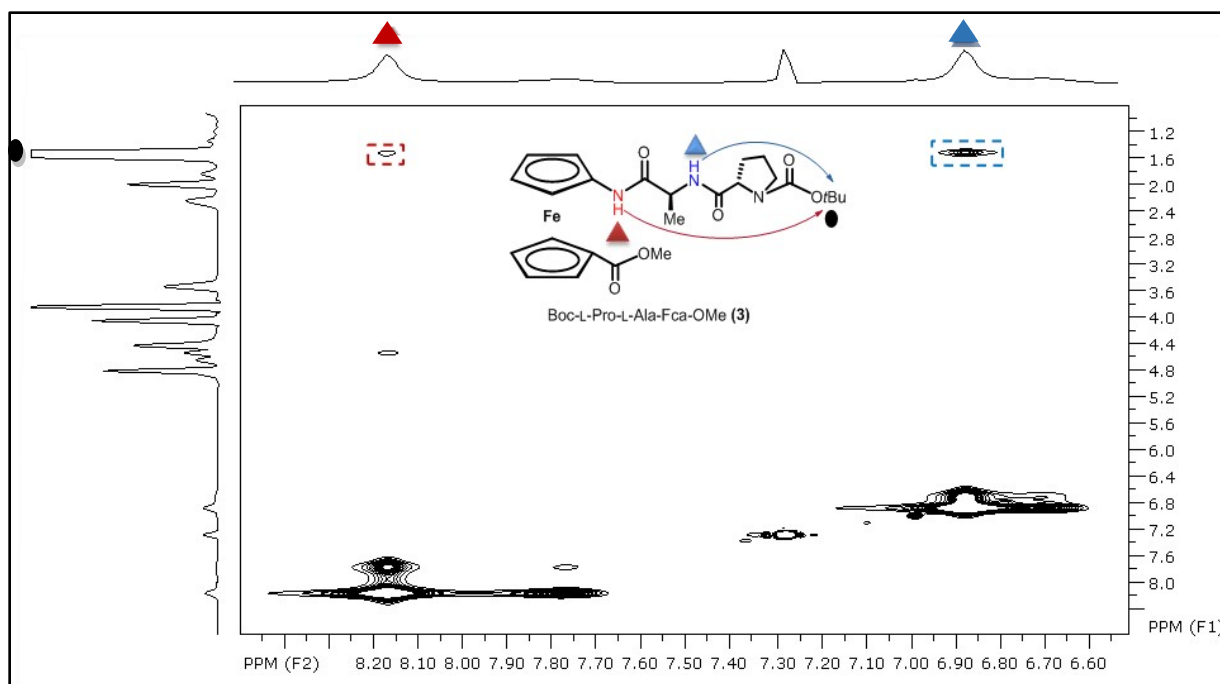
Jakost prethodno indiciranih intramolekulskih vodikovih veza u kojima kao donori sudjeluju  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  i  $\text{NH}_{\text{Ala}}$  ispitana je titracijom s DMSO, otapalom koje djeluje kompeticijski kao snažan akceptor vodikove veze. U skladu s tim saznanjem, može se utvrditi jakost postojećih IHB-obrazaca. Tako se signali amidnih protona izloženih otapalu pomjeraju u niže polje, a kemijski se pomaci amidnih protona uključenih u IHB, ovisno o jakosti, ne mijenjaju ili

pokazuju neznatno odstupanje u prisutnosti DMSO. Prema prikazanoj ovisnosti kemijskih pomaka  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  i  $\text{NH}_{\text{Ala}}$  o titraciji s DMSO i izračunatih  $\Delta\delta$  vrijednosti, još jednom se potvrđuje postojanost IHB-obrazaca. Vrijednosti  $\Delta\delta < 0,5$  ppm definiraju jake vodikove veze, dok su vrijednosti nešto iznad 0,5 ppm pripisane srednje jakim vodikovim vezama. Zaključno,  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  i  $\text{NH}_{\text{Ala}}$  pripadajućeg tripeptida **3** sudjeluju u srednje jakim vodikovim vezama, pri čemu je  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  u nešto jačim interakcijama što se može vidjeti iz njihovih izračunatih promjena u kemijskom pomaku (slika 13).



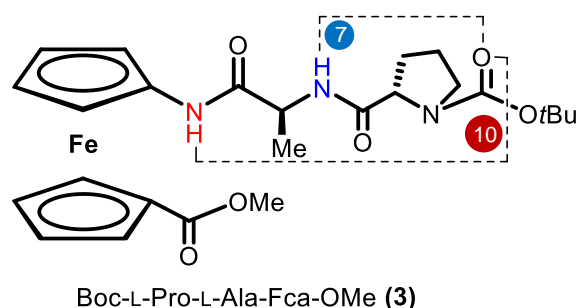
Slika 13. DMSO-titracija tripeptida **3**

Potencijalna uloga Pro kao začetnika okreta u pripravljenom homokiralnom biokonjugatu **3** ispitana je NOESY-spektroskopijom. NOESY predstavlja vrlo korisnu 2D NMR tehniku kojom je moguće utvrditi prostorni odnos dviju jezgri čija udaljenost nije veća od 5Å. Naime određivanje peptidnih sekundarnih strukturnih elemenata moguće je izvršiti analizama  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOE kontakata u njihovim NOESY NMR spektrima. NOESY-spektar peptida **3** pokazuje kontakte  $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$  koji se mogu pripisati 10-članom intralančanom prstenu ( $\beta$ -okretu). Uzimajući u obzir kemijski pomak  $\text{NH}_{\text{Ala}}$  te njegov NOE-kontakt s *tert*-butilnom skupinom možemo pretpostaviti i tvorbu  $\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$  IHB 7-članog prstena ili  $\gamma$ - okreta (slika 14).



Slika 14. NOE kontakti u tripeptidu **3**

U skladu s rezultatima NOE-analize predložena je konformacija tripeptida **3** bazirana na simultanim  $\gamma$ - i  $\beta$ -okretima (slika 15).

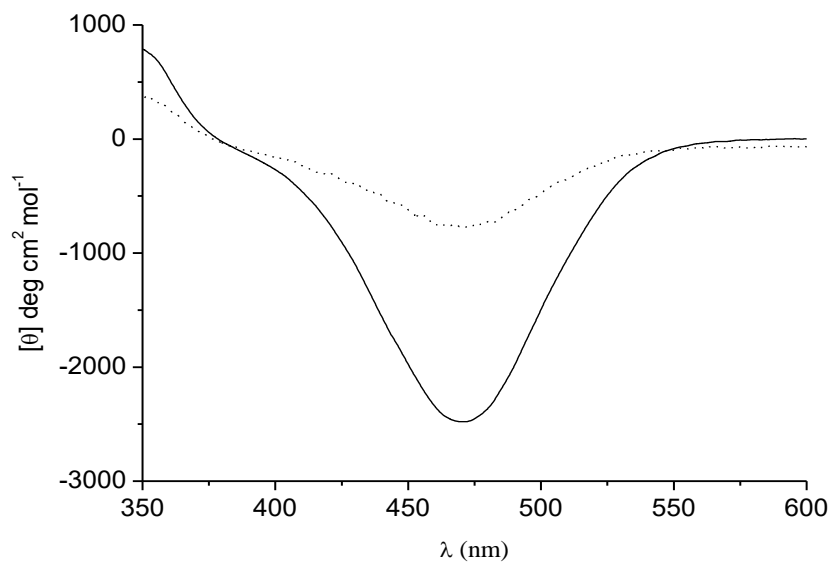


Slika 15. Predložene konformacije  $\beta$ - i  $\gamma$ -okreta u tripeptidu **3**

#### 4.2.3. CD-spektroskopska analiza tripeptida **3**

Cirkularni dikroizam (CD) je još jedna pogodna metoda istraživanja peptidnih sekundarnih struktura pa je tako CD-spektroskopska metoda primjenjiva i u analizi kiralno organiziranih ferocenskih peptida. IHB induciraju kiralno uređenje oko ferocenskog kromofora ( $\lambda \sim 480$  nm) pa se CD-aktivnost ispitanih peptida uzima kao dodatna potvrda predloženih IHB. Položaj apsorpcijskih vrpca karakterističnih za ferocenski kromofor (464 – 495 nm) ukazuje na kiralno uređenje ispitanoog peptida. Jaki CD-signal tripeptida **3** indikacija je visokouređene kiralne strukture, što je u skladu s rezultatima provedenih mjerenja IR- i NMR-spektroskopije. Dodatkom DMSO došlo je do vidljivog gubitka CD-aktivnosti, što je u

skladu s nalazima NMR-spektroskopije kojima je indicirana prisutnost srednje jakih IHB u peptidu **3** (slika 16).



Slika 16. CD-spektar tripeptida **3** mjereno u  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  [(—)  $c = 5 \times 10^{-3}$  M; (....)  $c = 5 \times 10^{-3}$  M uz dodatak 20% DMSO]



## ***§5. ZAKLJUČAK***

Na temelju provedenih spektroskopskih mjerenja mogu se pretpostaviti sljedeći zaključci:

1. Najčešći pristup sintezi peptidomimetika, umetanje rigidnih kalupa u peptidnu strukturu s ciljem ograničavanja konformacijske slobode, primijenjen je u ovom istraživanju.
2. Zahvaljujući specifičnoj strukturi koja dopušta tvorbu IHB između podandnih peptidnih lanaca, 1,1'-disupstituirani ferocenski kalup pokazao se pogodnim za indukciju struktura okreta u novosintetiziranom tripeptidu **3**.
3. Tripeptid Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (**3**) pripremljen je konjugiranjem ferocenske aminokiseline s prirodnim dipeptidom Pro-Ala.
4. Detaljnom konformacijskom analizom u otopini ispitana je ovisnost konformacije o homokiralnom aminokiselinskom slijedu te je istražena uloga ferocena i Pro kao začetnika okreta.
5. Koncentracijski ovisnom IR-spektroskopijom registrirani su signali slobodnih NH ( $< 3400 \text{ cm}^{-1}$ ) i u vodikovim vezama angažiranih NH-skupina ( $> 3400 \text{ cm}^{-1}$ ). Postupnim smanjenjem koncentracije dolazi do slabljenja vrpce asociiranih i slobodnih NH-skupina. Iz dobivenog omjera smanjenja intenziteta utvrđena je dominacija intramolekulskih veza popraćenih s neznatnim udjelom intermolekulskih agregata.
6. Koncentracijski- i temperaturno-neovisni kemijski pomaci NH-skupina [ $\text{NH}_{\text{Fn}}$  ( $\delta = 8,46 \text{ ppm}$ ),  $\text{NH}_{\text{Ala}}$  ( $\delta = 6,75 \text{ ppm}$ )] upućuju na njihovo sudjelovanje u IHB.
7. Jakost prethodno indiciranih intramolekulskih vodikovih veza s  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  i  $\text{NH}_{\text{Ala}}$  ispitana je titracijom s DMSO. Vrijednosti  $\Delta\delta > 0,5 \text{ ppm}$  potvrđuju postojanost srednje jakih IHB.
8. NOESY-spektar peptida **3** prikazuje kontakte  $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$  što odgovara 10-članom intralančanom prstenu ( $\beta$ -okretu). NOE-kontakt  $\text{NH}_{\text{Ala}}$  s *tert*-butilnom skupinom upućuje na stvaranje  $\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$  IHB 7-članog prstena ( $\gamma$ -okreta).
9. CD-aktivnost sintetiziranog biokonjugata **3** služi za dodatnu potvrdu predloženog IHB-motiva, baziranog na IHB. Njegov jaki CD-signal indikacija je visokoređene kiralne strukture i potvrda rezultata prethodno provedenih analiza. Nadalje, dodatkom DMSO uočen je gubitak CD-aktivnosti što je u skladu s rezultatima prethodnih mjerenja koji su indicirali prisutnost srednje jakih IHB.

## ***§ 6. LITERATURA***

- (1) Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2007) *Biochemistry*, 6. izd, W. H. Freeman and Company, New York. str. 40.
- (2) Giannis A., Kolter T. (1993) Peptidomimetics for Receptor Ligands-Discovery, Development and Medical Perspectives. *Angewandte Chemie International Edition in English* **32**, 1244-1267.
- (3) Jerić I. (2004) Peptide mimetics: why and how. *Kemija u industriji* **53**, 495-504.
- (4) (a) Barišić L., Dropučić M., Rapić V., Pritzkow H., Kirin S. I., Metzler-Nolte N. (2004) The first oligopeptide derivate of 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid shows helical chirality whit antiparallel strands. *Chemical Communications* **17**, 2004-2005., (b) Barišić L., Čakić M., Mahmoud K. A., Liu Y., Kraatz H.-B., Pritzkow H., Kirin S. I., Metzler-Nolte N., Rapić V. (2006) Helically chiral alanine peptides containing 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid subunit as turn inducer. *Chemistry – A European Journal* **12**, 4965-4980., (c) Barišić, L., Rapić V., Metzler-Nolte N. (2006) Incorporation of the Unnatural Organometallic Amino Acid 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid (Fca) into Oligopeptides by a Combination of Fmoc and Boc Solid-Phase Synthetic Methods. *European Journal of Inorganic Chemistry* **20**, 4019-4021., (d) Čakić Semenčić M., Siebler D., Heinze K., Rapić V. (2009) Bis and Trisamides Derived From 1'-Aminoferrocene-1carboxylic Acid and alpha-Amino Acids: Synthesis and Conformational Analysis. *Organometallics* **28**, 2028-2037., (e) Čakić Semenčić M., Heinze K., Forster C., Rapić V. (2010) Bioconjugates of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid with (S)-3Amino-2-methylpropanoic Acid and L-Alanine. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2010**, 1089-1097.
- (5) Stryer L., (1991) *Biokemija*, 2. izd., Školska knjiga, Zagreb. str. 13.
- (6) Stryer L., Berg J., Tymoczko J. (2013) *Biokemija*, 6. izd., Školska knjiga, Zagreb. str. 34-35.
- (7) (a) Nair R. V., Baravkar S. B., Ingolea T. S., Sanjayan G. J. (2014) Syntehtic turn mimetics and hairpin nucleators. *Chemical Communications* **50**, 13874–13884., (b) S. J. Hershberger, S. G. Lee, J. Chmielewski (2007) Scaffolds for blocking protein-protein interactions. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **7**, 928–942.
- (8) Kovačević, M. (2014) Ferocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima. Doktorski rad. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet.
- (9) Kovačević M., Kodrin I., Roca S., Molčanov K., Shen Y., Adhikari B., Kraatz H.-B., L. Barišić (2017) Helically Chiral Peptides That Contain Ferrocene-1,1'-diamine Scaffolds as a Turn Inducer. *Chemistry – A European Journal* **23**, 1037-10395.
- (10) Barišić L. (2019), Prof. dr.sc. Lidija Barišić, Home Page, <[http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod\\_za\\_kemiju\\_i\\_biokemiju/laboratorij\\_za\\_organ\\_sku\\_kemiju/peptidni\\_mimetic\\_i\\_pseudopeptidi](http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_kemiju_i_biokemiju/laboratorij_za_organ_sku_kemiju/peptidni_mimetic_i_pseudopeptidi)> Pristupljeno 24.6.2019.
- (11) Fosgerau K., Hoffmann T. (2015) Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug discovery today* **20**, 122-128.
- (12) Liskamp R. M. J., Rijkers D. T. S., Kruijtzter J. A. W, Kemmink J. (2011) Peptides and proteins as a continuing exciting source of inspiration for peptidomimetics. *ChemBioChem* **12**, 1626–1653.
- (13) Gante J. (1994) Peptidomimetics-Tailored Enzyme Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition in English* **33**, 1699-1720.

- (14) Livnah N., Yechezkel T. (2005) Peptidomimetic Chemistry for the Discovery of Novel Drugs for Metabolic Disorders. *Bulletin of the Israel Chemical Society* **20**, 32-42.
- (15) Ross N. T., Katt W. P., Hamilton A. D. (2010) Synthetic mimetics of protein secondary structure domains. *Philosophical Transactions of the Royal Society A* **368**, 989-1008.
- (16) Anonymous (2019)  $\beta$ -turn, <[www.ebi.ac.uk/pdbe-site/pdbemotif/betaturrnir](http://www.ebi.ac.uk/pdbe-site/pdbemotif/betaturrnir)> Pristupljeno 27.6.2019.
- (17) Anonymous (2019) Protein structure, <<http://oregonstate.edu/instruct/bb450/spring14/lecture/proteinstructureIoutline.htm>> Pristupljeno 27.6.2019.
- (18) Jaouen G., Beck W., McGlinchey M.J. (2005) Bioorganometallic Chemistry, Origins, and Founding Principles. U: Bioorganometallics-Biomolecules, Labeling, Medicine, 3. izd., Jaouen G., ur., John Wiley & Sons, Weinheim. str. 4-30.
- (19) Moriuchi T., Hirao T. (2006) Ferrocene-peptide bioconjugates. U: Bioorganometallic Chemistry, 17. izd., Simonneaux G., ur., Springer-Verlag Berlin Heidelberg. str. 143-175.
- (20) Popović Z. (2012) Osnove kemije organometalnih spojeva, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- (21) Rapić V., Čakić Semenčić M. (2011) I. Organometalna i bioorganometalna kemija-ferocen i metalni karbonili. *Kemija u industriji* **60**, 61-79.
- (22) Laine A. L. , Passirani C. (2012) The Importance of Metal-Based Drugs in Medicinal Inorganic Chemistry to Improve Life Quality of Patients. *Current Opinion in Pharmacology* **12**, 420.
- (23) Leung C.-H., Lin S., Zhong H.-J., Ma D.-L. (2015) Metal complexes as potential modulators of inflammatory and autoimmune responses. *Chemical Science - Royal Society of Chemistry* **6**, 871-884.
- (24) Ndagi U., Mhlongo N., Soliman M.E. (2017) Metal complexes in cancer therapy – an update from drug design perspective. *Drug Design, Development and Therapy* **11**, 599.
- (25) Barišić L. (2019), Prof. dr. sc. Lidija Barišić, Home Page <[http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod\\_za\\_kemiju\\_i\\_biokemiju/laboratorij\\_za\\_organ\\_sku\\_kemiju/osnove\\_bioorganometalne\\_kemije](http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_kemiju_i_biokemiju/laboratorij_za_organ_sku_kemiju/osnove_bioorganometalne_kemije)> Pristupljeno 30.6.2019.
- (26) (a) Barišić L., Kovačević M., Ribić R., Petrović Peroković V., Tomić S., Rapić V. (2012) Ferrocene conjugates with mannose: synthesis and influence of ferrocene aglycon on mannose-mediated adhesion of Escherichia coli. *Applied Organometallic Chemistry* **26**, 74., (b) Barišić L., Kovačević M., Rošćić M., Čakić Semenčić M. (2011) The first ferrocene analogues of muramyl dipeptide. *Carbohydrate Research* **346**, 678., (c) L. Barišić, Förster C., Kovačević M., Rapić V., Heinze K. (2012) Ferrocenyl-Labeled Sugar Amino Acids: Conformation and Properties. *Organometallics*. **31**, 3683., (d) Barišić L., Kovač V., Kmetič I. (2016) Facile Synthesis and Cytotoxic Activity of the First Ferrocene-Resveratrol Conjugate. *Croatica Chemica Acta* **89**, 339.
- (27) Kirin S. I., Kraatz H.-B., Metzler-Nolte N. (2006) Systematizing structural motifs and nomenclature in 1,n'-disubstituted ferrocene peptides. *Chemical Society Reviews* **35**, 348-354.

- (28) Barišić L., Čače A., Kovačević M., Molčanov K., Radošević K., Gaurina Srček V., Roca S. (2014) Conjugates of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid and Proline: Synthesis, Conformational Analysis and Biological Evaluation. *Molecules* **19**, 12852-12880.
- (29) Rapić V., Kovačević M. (2012) III. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocenski peptidi. *Kem u industriji* **61**, 71–120.
- (30) Chowdhury S., Mahmoud K.A., Schatte G., Kraatz H.-B. (2005) How Useful Is Ferrocene as a Scaffold for the Design of  $\beta$ -Sheet Foldamers? *Organic and Biomolecular Chemistry* **3**, 3018– 3023.
- (31) Kovačević M., Kodrin I., Cetina M., Kmetič I., Murati I., Čakić Semenčić M., Roca S., Barišić L. (2015) The conjugates of ferrocene-1,1'-diamine and amino acids. A novel synthetic approach and conformational analysis. *Dalton Transactions* **44**, 16405–16420.
- (32) (a) Barišić L., Rapić V., Kovač V. (2002) Sinteza i karakterizacija ferocenskih oligopeptida u otopini. *Croatica Chemica Acta* **75**, 199-210., (b) Barišić L., Rapić V., Pritzkow H., Pavlović G., Nemet I. (2003) Ferrocene compounds: Part XXXIII. Synthesis and characterization of amino acids containing skeletal 1,1'-ferrocenylene unit. *Journal of Organometallic Chemistry* **682**, 131-142.
- (33) Rapić V., Barišić L. (2012) II. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocenske aminokiseline. *Kemija u industriji* **61**, 9-12.
- (34) Bellesia G., Jewett A. I., Shea J. E. (2010) Sequence periodicity and secondary structure propensity in model proteins. *Protein Science* **19**, 141-154.
- (35) Bevan P., Ryder H., Shaw I. (1995) Identifying small-molecule lead compounds: the screening approach to drug discovery. *Trends in Biotechnology* **13**, 115-121.
- (36) Kleinberg M.L., Wanke L.A. (1995) New approaches and technologies in drug design and discovery. *American Journal of Health-System Pharmacy* **52**, 1323-1336.
- (37) Qian X., Zhao Z., Xu Y., Xu J.-H. (2013) Chemical Biotechnology and Bioengineering, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom
- (38) Baumann M., Baxendale I.R., Ley S. V., Nikbin N. (2011) An overview of the key routes to the best selling 5-membered ring heterocyclic pharmaceuticals. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **7**, 442–495
- (39) Chackalamanni S., Rotella D., Ward S. E. (2017) Comprehensive Medicinal Chemistry III, 3. izd., Elsevier Ltd. str. 4490-4520
- (40) D. D. Perrin, W. L. F. Armarego (1988) Purification of laboratory chemicals, 4. izd., Pergamon Press
- (41) Tyndall J.D., Pfeiffer B., Abbenante G., Fairlie D. P. (2005) Over one hundred peptide-activated G protein-coupled receptors recognize ligands with turn structure. *Chemical Reviews* **105**, 793–826.
- (42) (a) D. Seebach, S. Abele, K. Gademann, B. Jaun (1999) Pleated Sheets and Turns of  $\beta$ -Peptides with Proteinogenic Side Chains. *Angewandte Chemie International Edition in English* **38**, 1595– 1597., (b) Mothes C., Caumes C., Guez A., Boulet H., Gendrineau T., Darses S., Delsuc N., Moumné R., Oswald B., Lequin O., Karoyan P. (2013) 3-Substituted Prolines: From Synthesis to Structural Applications, from Peptides to Foldamers. *Molecules* **18**, 2307-2327.

- (43) Kay B. K., Williamson M. P., Sudol M. (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *The FASEB Journal* **14**, 231–241.
- (44) Joseph A.P., Srinivasan N., A. G. de Brevern (2012) Cis-trans peptide variations in structurally similar proteins. *Amino Acids* **43**, 1369-1381.
- (45) Deetz M.J., Fahey J.E., Smith B.D. (2001) NMR studies of hydrogen bonding interactions with secondary amide and urea groups. *Journal of Physical Organic Chemistry* **14**, 463-467.

## **Izjava o izvornosti**

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marija Lovrić", written over a horizontal line.

Ime i prezime studenta