

Priprava i konformacijska analiza bis-ferocenskih peptida

Studen, Bosiljka

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:159:520121>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

Bosiljka Studen

786/MB

**PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA
ANALIZA BIS-FEROCENSKIH
PEPTIDA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za fizikalnu kemiju i koroziju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Mojce Čakić Semenčić, doc. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Marka Nuskola, mag. ing.

Neizmijerna zahvala mentorici doc.dr.sc. Mojci Čakić Semenčić na predloženoj temi, strpljivosti i riječima ohrabrenja i potpore.

Veliko hvala partneru u zločinu mag. ing. Marku Nuskolu pri izvedbi eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada.

Hvala koja se riječima ne može opisati mojim roditeljima na požrtvornosti, bezuvjetnoj potpori i ljubavi, te mom Šimi koja je uvijek stajala u mom kutu kroz dobro i loše.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA ANALIZA BIS-FEROCENSKIH PEPTIDA

Bosiljka Studen, 786/MB

Sažetak: Jednostavni konjugati aminoferocena i peptida mogu tvoriti uređene sekundarne strukturne elemente, a pritom homo- odnosno heterokiralnost aminokiselinske sekvencije uvjetuje tvorbu β -odnosno γ -okreta. U ovom radu opisana je priprava i konformacijska analiza homokiralnih bis-ferocenskih derivata **VI** [Fc-CO- L-Pro-L-Ala-NH-Fc; (**8**) i Fc-CO-D-Pro-D-Ala-NH-Fc; (**9**)]. Iscrpna spektroskopska analiza (CD-, IR-, ^1H - i 2D NMR), u kombinaciji s molekulskim modeliranjem i kristalografskom analizom, pokazala je kako se u najstabilnijim konformacijama **8** i **9** javljaju, vodikovim vezama podržani, 10-člani prstenovi (β -okreti). Cottonovi efekti opaženi u blizini UV/Vis apsorpcijskog maksimuma ferocena u CD-spektrima **8** i **9** proizlaze iz prijenosa kiralne informacije iz lokalne sekundarne strukture do akiralnog ferocenskog kromofora.

Ključne riječi: Ferocen, peptidi, konformacijska analiza, NMR-spektroskopija, β -okret

Rad sadrži: 46 stranica, 42 slike, 4 tablice, 34 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *doc.dr.sc. Mojca Čakić Semenčić*

Pomoć pri izradi: *Marko Nuskol, mag. ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. Lidija Barišić
2. Doc. dr. sc. Mojca Čakić Semenčić
3. Izv.prof.dr.sc. Veronika Kovač
4. Doc.dr.sc. Filip Šupljika (zamjena)

Datum obrane: 9. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Graduate Thesis

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

SYNTHESIS AND CONFORMATIONAL ANALYSIS OF BIS-FERROCENE PEPTIDES

Bosiljka Studen, 786/MB

Abstract: Simple conjugates of aminoferrocene and peptides are able to form ordered secondary structural elements, while homo- or heterochirality of the amino acid sequence determines the formation of β - or γ -turns. This thesis describes the synthesis and conformational analysis of homochiral bis-ferrocene derivatives **VI** [Fc-CO-L-Pro-L-Ala-NH-Fc; (**8**) and Fc-CO-D-Pro-D-Ala-NH-Fc; (**9**)]. Thorough spectroscopic analysis (CD-, IR-, ^1H - i 2D NMR), in combination with molecular modelling and X-ray diffraction, revealed the presence of 10-membered rings (β -turns), supported by hydrogen bonds, in the most stable conformations of **8** and **9**. Cotton effects observed near the UV/Vis absorption maximum of ferrocene in CD spectra of **8** and **9** originate from the transfer of chiral information from the local secondary structure to the achiral ferrocene chromophore.

Keywords: Ferrocene, peptide, conformational analysis, NMR-spectroscopy, β -turn

Thesis contains: 46 pages, 42 figures, 4 tables, 34 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *Mojca Čakić Semenčić, doc.dr.sc.*

Technical support and assistance: *Marko Nuskol, mag. ing.*

Reviewers:

1. PhD. *Lidija Barišić*, Associate professor
2. PhD. *Mojca Čakić Semenčić*, Assistant professor
3. PhD. *Veronika Kovač*, Associate professor
4. PhD. *Filip Šupljika*, Assistant professor (substitute)

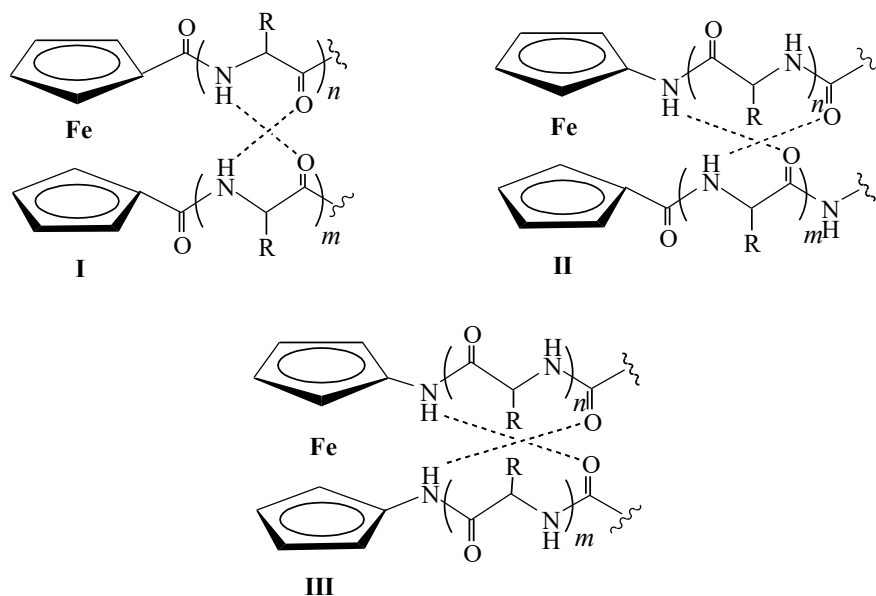
Thesis defended: 9 July 2018

Sadržaj	Stranica
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Okreti u peptidima.....	3
2.2. Konjugati heteroanularno disupstituiranih ferocena s α -aminokiselinama.....	5
2.2.1. Helična kiralnost heteroanularno disupstituiranih ferocena.....	6
2.3. Konjugati monosupstituiranih ferocena s α -aminokiselinama.....	8
2.3.1. Derivati ferocenkarboksilne kiseline i α -aminokiselina.....	8
2.3.2. Derivati aminoferocena i α -aminokiselina.....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Opće napomene.....	14
3.2. Priprava Boc-zaštićenog aminoferocena.....	15
3.2.1 Ferocenkarboksazid (2).....	15
3.2.2. <i>tert</i> -Butil-ferocenilkarbamat (3).....	15
3.3 Konjugati aminoferocena i aminokiselina.....	16
3.3.1. Priprava ferocenskih amida 4 i 5	16
3.3.2. Priprava mono-ferocenskih peptida (6 i 7).....	17
3.3.3. Priprava bis-ferocenskih peptida (8 i 9).....	18
3.3.4. Opći postupak priprave ferocenskih amida (4 i 5) i mono-ferocenskih peptida (6 i 7).....	19
3.3.4.1. Boc-L-Ala-NH-Fc (4).....	20
3.3.4.2. Boc-D-Ala-NH-Fc (5).....	20
3.3.4.3. Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fc (6).....	20
3.3.4.4. Boc-D-Pro-D-Ala-NH-Fc (7).....	21
3.3.5. Opći postupak priprave bis-ferocenskih dipeptida (8 i 9).....	21
3.3.5.1. Fc-CO-L-Pro-L-Ala-NH-Fc (8).....	22
3.3.5.2. Fc-CO-D-Pro-D-Ala-NH-Fc (9).....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. Uvod.....	23
4.2. Sinteza i karakterizacija.....	24
4.3. Konformacijska analiza.....	32
4.3.1. IR-spektroskopija.....	32
4.3.2. NMR-spektroskopija.....	33
4.3.3. CD-spektroskopija.....	37
4.3.4. DFT-račun.....	39
4.3.5. Kristalografska analiza.....	41
5. ZAKLJUČCI	42
6. LITERATURA	44

1. UVOD

Biološka aktivnost peptida i proteina posljedica je njihove dobro definirane trodimenzijske strukture odnosno konformacije. Lokalne konformacije peptidnih lanaca nazivamo sekundarnim strukturnim elementima a podržani su vodikovim vezama između karbonilnih i NH-skupina peptidnih veza. Vrsta nabiranja peptidnih lanaca proizlazi iz osnovnog aminokiselinskog slijeda a pritom su najpoznatiji motivi: α -uzvojnica, β -ploče, β -okreti i nešto rjeđi γ -okreti (1).

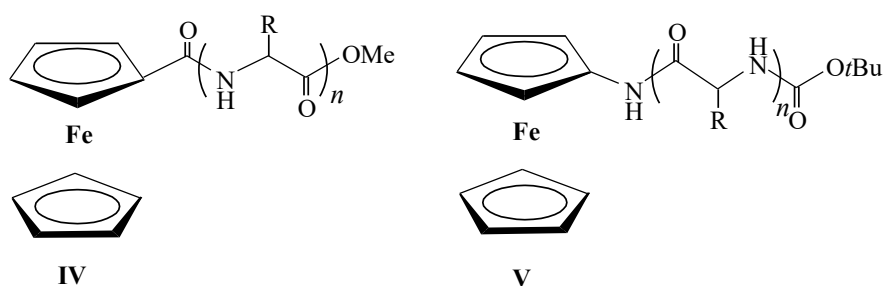
Poznato je da peptidi postoje u velikom broju termodinamički stabilnih konformacija podržanih različitim inter- i intramolekulskim interakcijama što značajno otežava njihova istraživanja. Kako bi se doskočilo tom problemu u aminokiselinsku sekvenciju umeću se rigidni kalupi koji ograničavaju konformacijsku fleksibilnost i omogućavaju pripremu razmjerno malih peptida stabiliziranih u određenoj konformaciji (2). Kao funkcionalni molekularni kalupi posljednjih se petnaestak godina intenzivno proučavaju različiti derivati heteroanularno disupstituiranih ferocena **I-III** prikazani na Slici 1 (3,4,5,6,7,8). Pritom je važno naglasiti kako su ciklopentadienilni prstenovi ferocena udaljeni za 3,3 Å što dopušta tvorbu različitih sekundarnih strukturnih elemenata podržanih intramolekulskim vodikovim vezama.



Slika 1. Peptidni derivati heteroanularno disupstituiranih ferocena

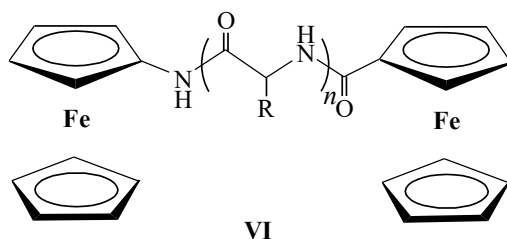
Za razliku od biokonjugata **I-III** u aminokiselinskim derivatima monosupstituiranih ferocena tipa **IV** i **V** (Slika 2) rijetko su se reproducirali strukturni motivi svojstveni prirodnim

peptidima (9, 10). No, nedavno je iscrpnom konformacijskom analizom pokazano da jednostavni ferocenski biokonjugati **V** ($n = 2$; $AA_1 = \text{Gly, L-Ala, D-Ala, L-Val}$; $AA_2 = \text{Gly, L-Ala, L-Val, L-Pro, D-Pro}$) također mogu tvoriti uređene sekundarne strukturne elemente a pritom homo- odnosno heterokiralnost aminokiselinske sekvencije uvjetuje tvorbu β - odnosno γ -okreta (11). Kiralno uređenje derivata **V** temeljeno na intramolekulskim vodikovim vezama induciralo je zamjetne Cottonove efekte u blizini UV/Vis-apsorpcijskog maksimuma ferocenskog kromofora što je do sada bilo svojstveno isključivo heteroanularno disupstituiranim biokonjugatima.



Slika 2. Aminokiselinski derivati monosupstituiranih ferocena

Cilj ovoga rada je priprava bis-ferocenskih derivata **VI** prikazanih na Slici 3 ($n = 2$; $AA_1 = \text{L-Ala, D-Ala}$; $AA_2 = \text{L-Pro, D-Pro}$) kako bi se ispitaio utjecaj umetanja dodatne organometalne podjedinice na konformaciju ferocenskih peptida tipa **V**, odnosno istražila eventualna promjena njihovih sekundarnih karakteristika i modifikacija kiroptičkih svojstava. Sustavna konformacijska analiza tih konjugata načinit će se na temelju CD-, IR-, ^1H - i 2D NMR spektroskopije te DFT računa.

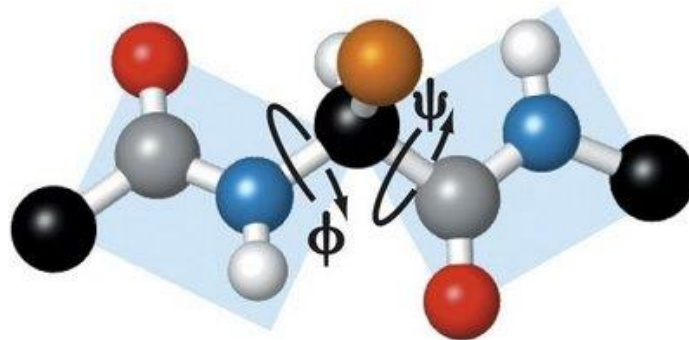


Slika 3. Bis-ferocenski peptidi

2. TEORIJSKI DIO

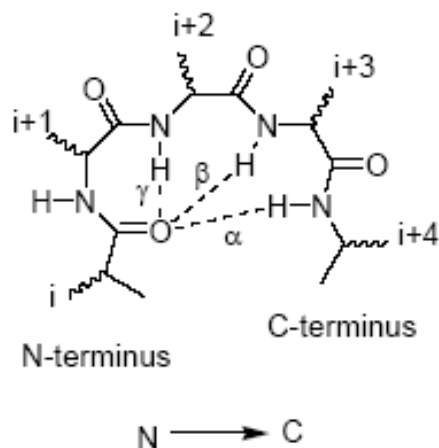
2.1. OKRETI U PEPTIDIMA

Aminokiseline u peptidima povezane su peptidnim vezama između karboksilne skupine jedne aminokiseline i amino skupine druge aminokiseline (Slika 4). Linus Pauling i Robert Corey otkrili su da je peptidna veza planarna i ima karakter dvostruke veze za razliku od jednostrukih veza između α -ugljikova atoma i karbonilnoga ugljikova odnosno dušikova atoma oko kojih postoji visoki stupanj rotacijske slobode. Biološka aktivnost proteina posljedica je njihove trodimenzionalne strukture odnosno konformacije koju određuje slijed aminokiselina u primarnoj sekvenciji. Konformacija polipeptidnog lanca potpuno je određena kada su poznati kutovi ϕ i ψ za svaki aminokiselinski ostatak.



Slika 4. Peptidna veza (12)

Većina proteina kompaktnog je oblika, a njihovi polipeptidni lanci često mijenjaju smjer. Okreti su aperiodički opći strukturni elementi u građi proteina odgovorni za promjenu smjera peptidnih lanaca. Često ih nalazimo na površini proteina gdje sudjeluju u molekulskom prepoznavanju. S obzirom na veličinu prstenâ koje vodikove veze zatvaraju razlikujemo: α -, β - i γ -okret koji rezultiraju 13-, 10- i 7-članim prstenovima prikazanima na Slici 5 (3).

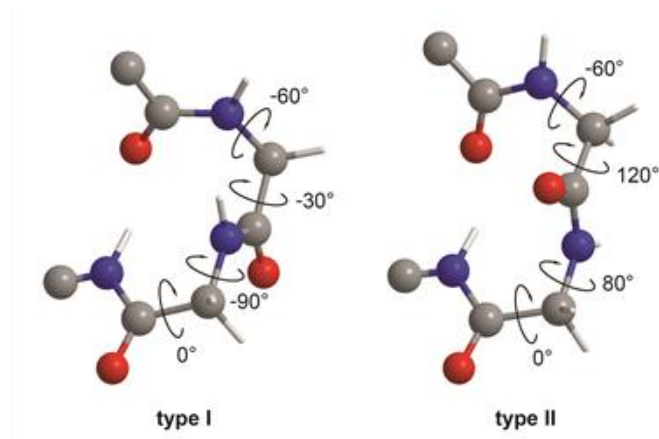


Slika 5. α -, β - i γ -okreti u peptidima

β -okreti su vrlo česti strukturni motivi u proteinima i polipeptidima a četiri aminokiselinska ostatka čine minimalnu peptidnu sekvenciju za postizanje ove konformacije. Može ih se definirati na dva načina: (i) okret koji nastaje povezivanjem vodikovom vezom karbonilne skupine aminokiseline i i NH-skupine aminokiseline $i + 3$ ili (ii) okreti u kojima je udaljenost između α -ugljikovih atoma aminokiselina i i $i + 3$ manja ili jednaka 7\AA . Nadalje, ovisno o diedarskim kutovima ϕ i ψ razlikuje se devet tipova β -okreta (Tablica 1) od kojih su najčešći tipovi I i II (Slika 6) i njihovi "obrnuti" analozi I' i II' (smjer $C \rightarrow N$) (13,14).

Tablica 1. Tipovi β -okreta u peptidima

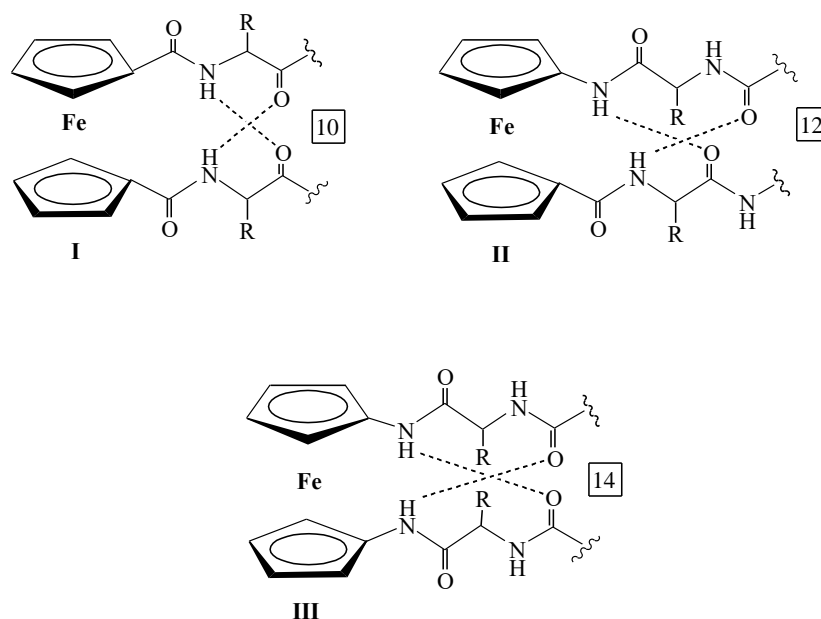
Tip β -okreta	Diedarski kutovi ($^{\circ}$)			
	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}
I	-60	-30	-90	0
I'	60	30	90	0
II	-60	120	80	0
II'	60	-120	-80	0
IV	-61	10	-53	17
VIa1	-60	120	-90	0
VIa2	-120	120	-60	0
Vib	-135	135	-75	160
VIII	-60	-30	-120	120



Slika 6. Tip I i II β -okreta (10)

2.2. KONJUGATI HETEROANULARNO DISUPSTITUIRANIH FEROCENA S α -AMINOKISELINAMA

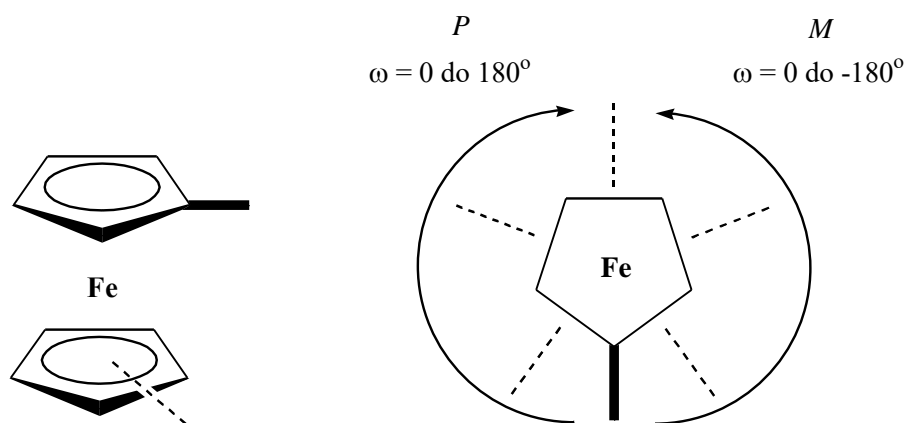
Derivati heteroanularno disupstituiranih ferocena i prirodnih aminokiselina posljednjih se desetak godina intenzivno proučavaju kao mimetici peptida odnosno spojevi koji imitiraju strukturu i/ili biološki učinak peptida (15). Pritom se ferocen, zahvaljujući udaljenost ciklopentadienilnih prstenova od 3,3 Å, pokazao odličnim kalupom za indukciju različitih strukturnih elemenata, primarno okreta, jer se u derivatima ferocena s α -aminokiselinama javljaju dobro definirane intramolekulske vodikove veze između podandnih peptidnih lanaca. Ovisno o heteroanularnoj funkcionalizaciji ferocena razlikujemo tri osnovna tipa petidnih konjugata: (i) $\text{Fn}[\text{CO}(\text{AA})_m\text{OMe}]_2$ (**I**) izvedeni iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (Fcd; 16,17,18,19,20,21), (ii) $\text{Y}(\text{AA})_n\text{Fca}(\text{AA})_m\text{OMe}$ (**II**) izvedeni iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca; 5,6,7) te (iii) $\text{Fn}[\text{NH}(\text{AA})_m\text{Y}]_2$ (**III**) izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda; 9) [Fn = ferocenilen, AA = prirodna aminokiselina, Y = Ac (acetil), Boc (*tert*-butoksikarbonil), $m = 1, 2, \dots$; $n = 1, 2, \dots$]. Odabirom različitih ferocenskih prekursora (Fcd, Fca ili Fcda) kao kalupa utječe se na motive vodikovih veza odnosno stabilne konformacije koje nalazimo u otopinama i čvrstom stanju ovih peptidomimetika. Pritom su kod aminokiselinskih derivata proizašlih iz Fcd, Fca odnosno Fcda pronađene dvije intramolekulske vodikove veze koje zatvaraju 10-, 12- odnosno 14-člane prstenove (Slika 7).



Slika 7. Ferocenski peptidi **I-III** izvedeni iz Fcd, Fca i Fcda (isprekidane crte prikazuju vodikove veze)

2.2.1. Helična kiralnost heteroanularno disupstituiranih ferocena

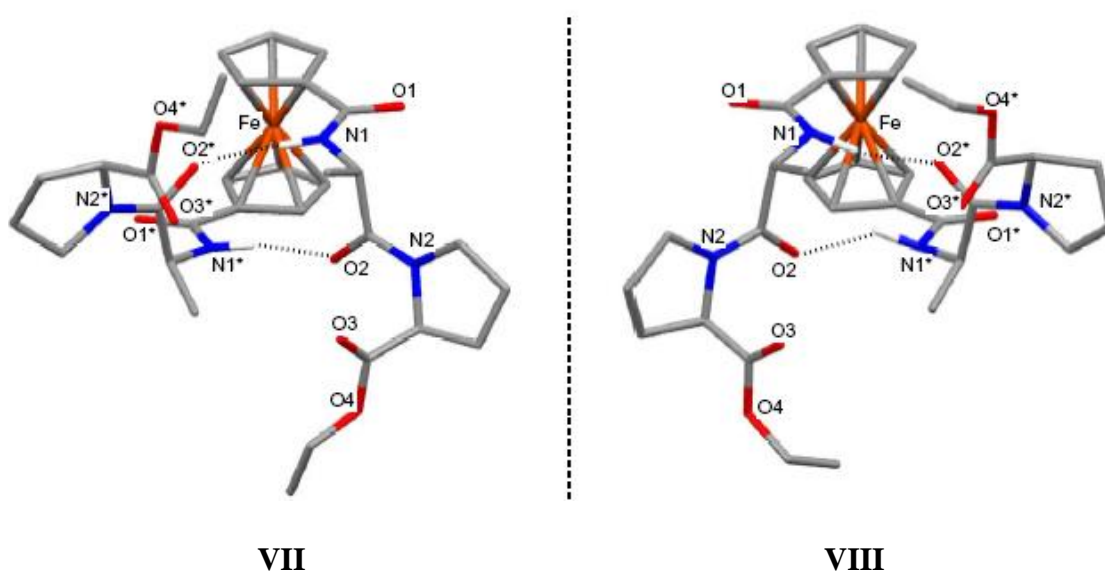
Ferocen je akiralan spoj visoke simetrije, no pogodno heteroanularno disupstituirani derivati u otopinama aprotinskih otapala i čvrstom stanju tvore kiralno uređene strukture fiksirane intramolekulskim vodikovim vezama (22). S obzirom na Cp-Fe-Cp os kiralni supstituenti ciklopentadienilnih prstenova zatvaraju torzijski kut ω ($0 - 180^\circ$) i pritom tvore rotacijske izomere. Bitno je naglasiti da je pri sobnoj temperaturi rotacijska barijera ciklopentadienilnih prstenova niska te nastupa brza izmjena rotamera. Intramolekulska vodikova veza između podandnih peptidnih lanaca uspostavlja rotacijsku barijeru i fiksira prstenove u obliku *P*- ili *M*-uzvojnice ovisno o tome koja je stabilnija. *P*-izomeri definirani su kutom $\omega = 0 - 180^\circ$ jer u odnosu na središnju os put od supstituenta na gornjem prstenu prema supstituentu na donjem prstenu odgovara smjeru kazaljke na satu. Suprotno, *M*-izomeri definirani su kutom $\omega = 0 - -180^\circ$ (Slika 8).



Slika 8. Shematski prikaz *M*- i *P*-helične kiralnosti u disupstituiranim ferocenima

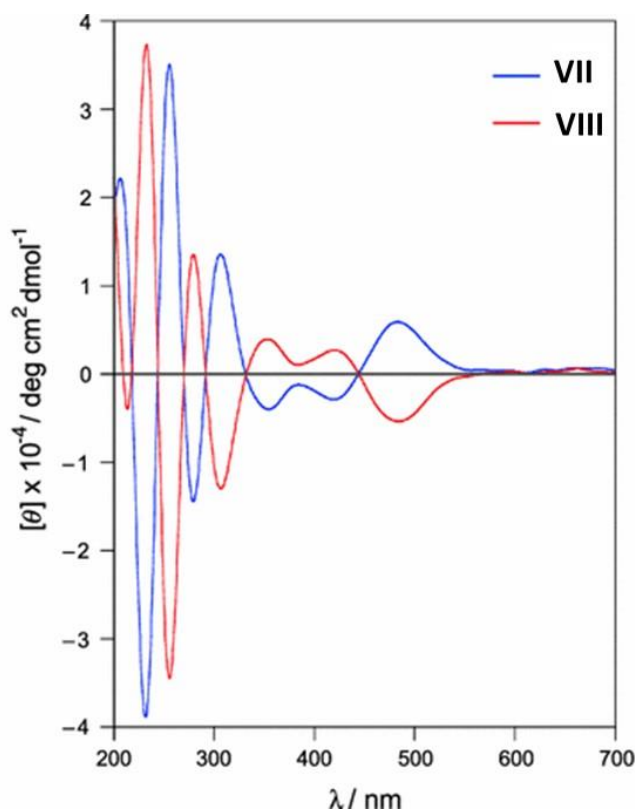
Helična kiralnost ferocena potvrđuje se CD-spektroskopijom, a pojava Cottonova efekta u blizini UV/Vis-apsorpcijskog maksimuma ferocenskog kromofora (~480 nm) posljedica je ostvarivanja intramolekulskih vodikovih veza između kiralnih peptidnih lanaca vezanih na ferocenski ostatak (17).

Na Slici 9 prikazani su ORTEP dijagrami konformacijskih enantiomera spojeva **VII** [Fn(CO-Ala-Pro-OEt)₂] i **VIII** [Fn(CO-D-Ala-D-Pro-OEt)₂] iz kojih je vidljivo kako je u slučaju **VII** riječ o desno-usmjerenom uzvojnici (*P*) dočim **VIII** predstavlja njezinu zrcalnu sliku (*M*-uzvojnici) (2).



Slika 9. ORTEP-dijagrami konformacijskih enantiomera **VII** i **VIII**

Helična kiralnost tih konjugata sačuvana je i u otopini: CD-spektroskopskom analizom **VII** utvrđen je pozitivan Cottonov efekt u području ferocenskog kromofora, a u slučaju **VIII** očekivano se javlja signal suprotnog predznaka i jednakoga intenziteta (Slika 10).

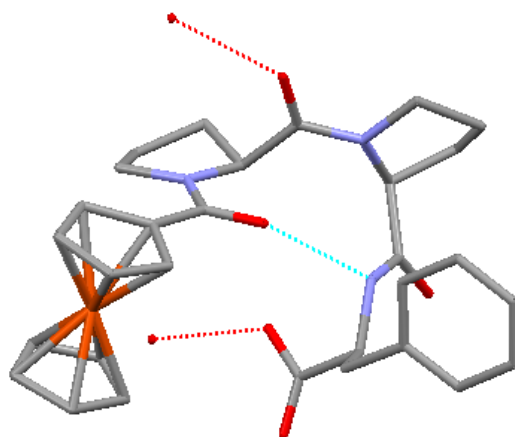


Slika 10. CD-spektri konformacijskih enantiomera **VII** i **VIII**

2.3. KONJUGATI MONOSUPSTITUIRANIH FEROCENA S α -AMINOKISELINAMA

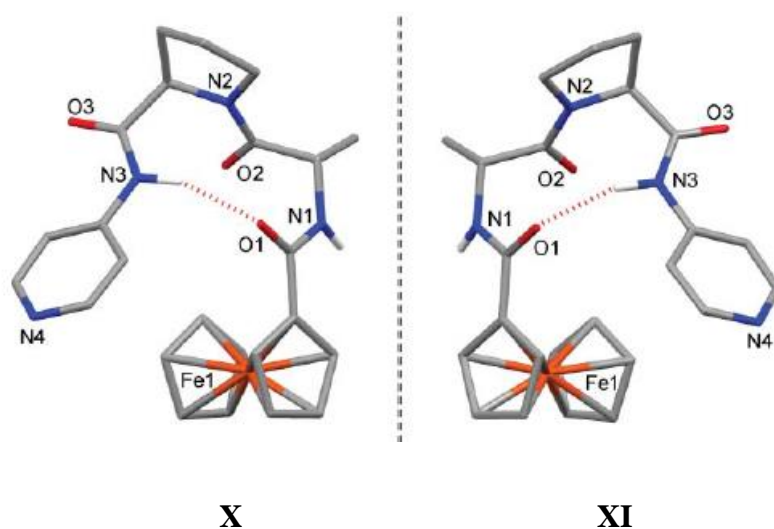
2.3.1. Derivati ferocenkarkoboksilne kiseline i α -aminokiselina

Kopulacijom ferocenkarkoboksilne kiseline i različitih α -aminokiselina pripremljeni su brojni peptidi čiji lanaci zauzimaju različite konformacije uvjetovane u većini slučajeva intermolekulskim vodikovim vezama. U čvrstom stanju, uslijed asocijacije molekula, često tvore visoko organizirane strukture, ponekad u obliku uzvojnica (10, 23, 24). Prvi primjer derivata ferocenkarkoboksilne kiseline i α -aminokiselina u čijoj je strukturi nađen β -okret predstavili su Kraatz i suradnici (25). Kristalografskom analizom Fc-CO-L-Pro-L-Pro-L-Phe-OH (**IX**) utvrđena je prisutnost jake intralančane vodikove veze, uspostavljene između karbonilne skupine ferocena i NH skupine Phe, koja inducira tvorbu 10-članog prstena (Slika 11).



Slika 11. β -okret u kristalu Fc-CO-L-Pro-L-Pro-L-Phe-OH (**IX**)

Hirao (26) i suradnici su kondenzacijom ferocenkarboksilne kiseline i heterokiralnih dipeptida pripravili enantiomerne konjugate Fc-CO-L-Ala-D-Pro-NH-4-Py (**X**) i Fc-CO-D-Ala-L-Pro-NH-4-Py (**XI**). Kao što je vidljivo na ORTEP-dijagrama prikazanih na Slici 12, u oba konjugata pronađena je intralančana vodikova veza između karbonilne skupine ferocena i NH skupine piridina koja zatvara 10-člani prsten što odgovara strukturi β -okreta. Vrijednosti torzijskih kutova nađenih u čvrstom stanju svrstavaju ove β -okrete u tip II [$(\phi_{i+1} (-57,0^\circ), \psi_{i+1} (125,7^\circ), \phi_{i+2} (68,9^\circ), \psi_{i+2} (16,8^\circ)$ za **X** i $\phi_{i+1} (57,6^\circ), \psi_{i+1} (-126,5^\circ), \phi_{i+2} (-68,3^\circ), \psi_{i+2} (-16,8^\circ)$ za **XI**]. Nadalje, zbog gotovo jednakih vrijednosti torzijskih kutova, koje se razlikuju samo u predznaku, konjugate **X** i **XI** svrstavamo u konformacijske enantiomere.

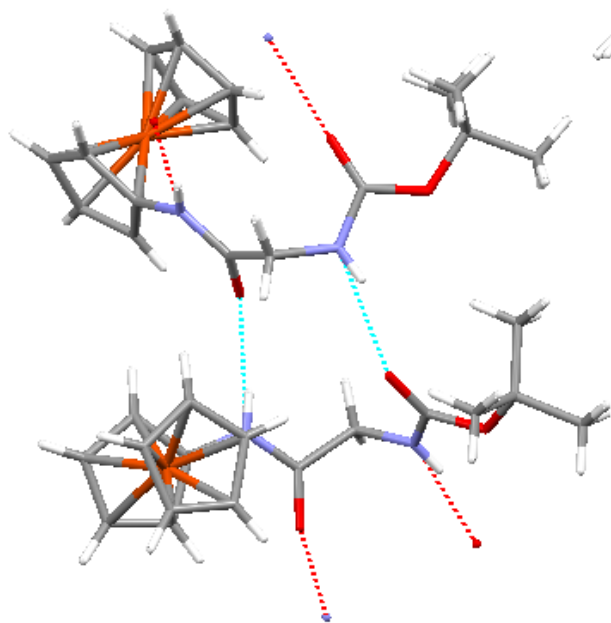


Slika 12. Kristalne strukture konformacijskih enantiomera **X** i **XI**

Detaljna spektroskopska analiza (IR-, NMR- i CD-spektroskopija) potvrdila je kako je kiralno uređenje peptida **X** i **XI**, podržano unutarmolekulskom vodikovom vezom nađenom u čvrstom stanju, najvjerojatnije zadržano i u otopini.

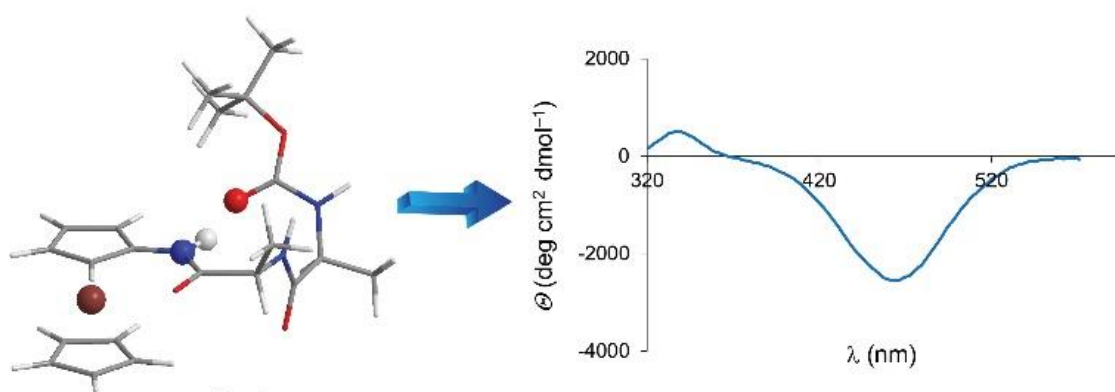
2.3.2. Derivati aminoferocena i α -aminokiselina

Za razliku od dobro opisanih konformacijskih obilježja peptida izvedenih iz ferocenkarboksilne kiseline, konformacijski prostor konjugata pripremljenih kopulacijom aminoferocena i α -aminokiselina znatno je manje istražen. Metzler-Nolte i suradnici istražili su konformacijske karakteristike najjednostavnijih derivata Boc-AA-NH-Fc, **XII** (AA = Gly, Leu, Phe, Val, Cys, Tyr) i utvrdili kako se u čvrstom stanju molekule Boc-Gly-NH-Fc povezuju mrežom međumolekulskih vodikovih veza što rezultira tvorbom beskonačnih lanaca (Slika 13). Spektroskopska analiza ukazuje na odsutnost značajnih unutarmolekulskih vodikovih veza u otopinama ovih konjugata, a nepostojanje kiralnog uređenja dodatno je potvrđeno slabim signalima u blizini apsorpcijskog maksimuma ferocenskog kromofora u CD-spektrima kiralnih derivata (27).



Slika 13. Intermolekulske vodikove veze u čvrstom stanju Boc-Gly-NH-Fc (**XII**)

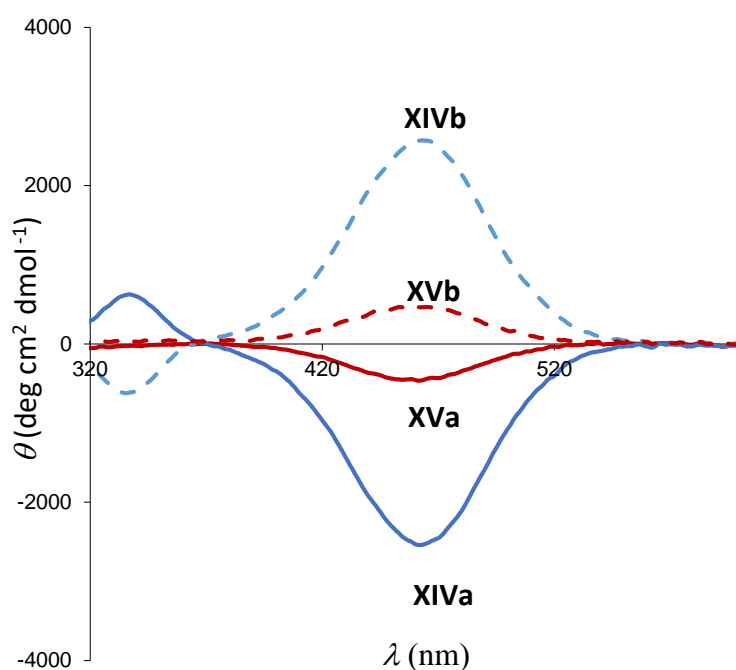
U našem su Laboratoriju pripravljena tri derivata aminoferocena i prirodnih aminokiselina [Boc-AA₂-AA₁-NH-Fc, **XIIIa**, AA_{1,2} = Gly; **XIIIb**, AA_{1,2} = L-Ala; **XIIIc**, AA_{1,2} = L-Val)] koji su trebali poslužiti kao modelni spojevi, koji nemaju mogućnost tvorbe jakih unutarmolekulskih vodikovih veza, u sklopu istraživanja desimetriziranih derivata tipa **II** (9). Suprotno očekivanom, detaljna strukturna analiza peptida **XIII** u otopini (IR-, NMR- i CD-spektroskopija kao i DFT računi) ukazala je na tvorbu unutarlančane vodikove veze između NH supine aminoferocena i uretanske karbonilne skupine koja podržava konformaciju β-okreta tipa I. Nadalje, iako se u literaturi opažanje CD-signala u blizini apsorpcijskog maksimuma ferocenskog kromofora pripisivalo fiksiranju ciklopentadienilnih prstenova vodikovim vezama između peptidnih lanaca heteroanularno supstituiranih biokonjugata, pokazali smo kako prijenos kiralne informacije s lokalne sekundarne strukture do ferocenskog kromofora također može rezultirati opažanjem jakih CD-signala (Slika 14).



Slika 14. Najstabilniji konformer i CD-spektar **XIIIb**

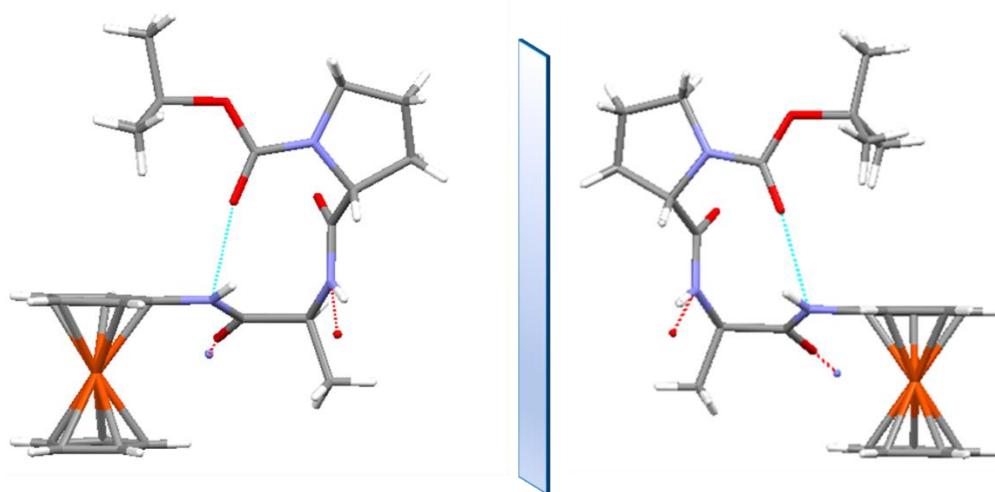
Potaknuti zanimljivim rezultatima u našem smo Laboratoriju pripravili konjugate **XIVa** (Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fc) i **XVa** (Boc-L-Pro-D-Ala-NH-Fc), te njihove enantiomere (**XIVb** i **XVb**), i dodatno istražili konformacijska obilježja i kirooptička svojstva monosupstituiranih ferocenskih peptida (11). Konformacijska analiza primjenom ¹H i 2D NMR-spektroskopije, IR-spektroskopije i molekuskog modeliranja potvrdila je tvorbu β-okreta (NH_{Fc}...OC_{Boc}) u otopinama homokiralnih derivata **XIV**. Kiralno uređenje tih konjugata potvrđeno je i CD-spektroskopskom analizom, u CD-spekttru **XIVa** utvrđen je negativan Cottonov efekt u ferocenskom području, dok se u CD-spekttru njegovog konformacijskog enantiomera **XIVb** očekivano javlja signal suprotnog predznaka i jednakoga intenziteta (Slika 15). Opaženu

sekundarnu strukturu homokiralnih derivata destabilizira promjena kiralnosti aminokiseline na položaju $i + 2$ odnosno $i + 1$ u rezultirajućim heterokiralnim derivatima **XVa** i **XVb**, što je vidljivo iz slabljenja NOE-kontakata karakterističnih za β -okret u njihovim 2D NMR-spektrima, kao i značajnog slabljenja signala u CD-spektrima. Na osnovu molekulskog modeliranja destabilizacija β -okreta u otopinama heterokiralnih derivata može se pripisati tvorbi konsektivnih γ -okreta između NH skupine ferocena i karbonilne skupine prolina, te NH skupine alanina i uretanskog karbonila. Nadalje, za razliku CD-spektara oligopeptida tipa II, gdje L-aminokiseline kao konstitutivne jedinice induciraju pozitivan a D-aminokiseline negativan Cottonov efekt, predznak CD-signal peptidnih derivata aminoferocena određen je kiralnošću aminokiseline na položaju $i + 1$. Pritom L-aminokiselina inducira negativan, a D-aminokiselina pozitivan Cottonov efekt.



Slika 15. CD-spektri konjugata **XIV** i **XV**

Za razliku od otopine, kristalografskom analizom utvrđene konformacije heterokiralnih peptida **XVa** i **XVb** u čvrstom stanju su gotovo idealni β -okreti tipa II koji su u enantiomernom odnosu (Slika 16).



XVb i XVa

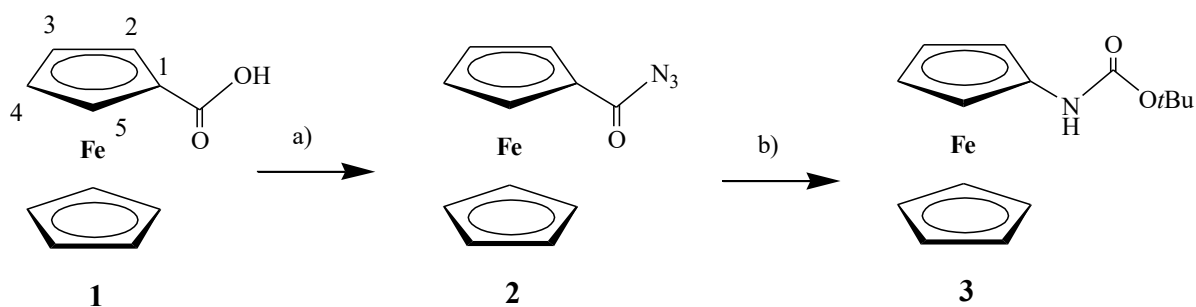
Slika 16. ORTEP-dijagrami konformacijskih enantiomera **XVb i XVa**

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. OPĆE NAPOMENE

- IR-spektri uzoraka su snimljeni na spektrofotometru Bomen MB 100 Mid FT u diklometanu.
- ^1H - i ^{13}C -NMR spektri snimljeni su u deuteriranom kloroformu i/ili DMSO na spektrometrima Bruker AV 300, Bruker AV 600 ili Bruker Avance III HD 400 uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard. Kemijski pomaci (δ) su izraženi u ppm.
- UV/VIS i CD-spektri snimljeni su na spektrofotometru Jasco J-810 u diklormetanu i DMSO.
- HRMS spektri snimljeni su primjenom MALDI tehnologije u Centru za proteomiku i spektrometriju masa Instituta Rudjer Bošković.
- Tališta (t_f) su određena Reichert Thermovar HT 1 BT 11 aparatom i nisu korigirana.
- DFT izračuni načinjeni su pomoću programa Gaussian 09/DFT (B3LYP, MO6 i MO6-2X).
- Optička skretanja mjerena su pri sobnoj temperaturi na instrumentu Schmidt + Haensch Polartronic NH8.
- Produkti su pročišćeni TLC (tankoslojna kromatografija na silikagelu, „Merck“, Kieselgel 60 HF₂₅₄) uporabom smjesa diklormetan/etil-acetat, čistog eluensa diklormetana i čistog eluensa etil-acetata.

3.2. PRIPRAVA BOC-ZAŠTIĆENOG AMINOFEROCENA



a) 1. ClCOOEt, NEt₃/acetone; 2. NaN₃/H₂O

b) *t*-BuOH, Δ

Slika 17.

3.2.1. Ferocenkarkoksazid (2)

Otopini ferocenkarkoksilne kiseline (**1**, 3g, 13,04 mmol) u acetonu (30 ml) doda se voda (2 ml). Reakcijskoj smjesi, ohlađenoj na 0 °C pomoću smjese leda i vode, polaganim dokapavanjem dodaje se otopina trietilamina (1515 mg, 15 mmol) u acetonu (6 ml), a zatim i otopina etil-kloroformijata (1820 mg, 16,7 mmol) u acetonu (6 ml). Miješanje se nastavlja pri istoj temperaturi dok se TLC-om (CH₂Cl₂) ne utvrdi kako je sav supstrat izreagirao u mješoviti anhidrid. Potom se reakcijskoj smjesi dodaje otopina natrijeva azida (1,7 g, 19,70 mmol u 4 ml vode) i nastavi s miješanjem dok TLC (CH₂Cl₂) ne pokaže da je sav reaktant izreagirao. Nastala reakcijska smjesa razrijedi se hladnom vodom, ekstrahira diklormetanom, ispere 5%-tnom zasićenom otopinom NaHCO₃ i zasićenom otopinom NaCl. Osuši se bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Dobiveno je 1,27 g (43%) crvenih kristala, *t*_f = 101-102 °C.

IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} / cm⁻¹: 2138 sr (N₃), 1687 j (C=O, CON₃).

¹H-NMR (CDCl₃) δ/ ppm: 4,83 (s, 2H, H-2, H-5), 4,52 (s, 2H, H-3, H-4), 4,27 (s, 5H, Fc nesupstituirani prsten).

3.2.2. *tert*-Butil-feroceniilkarbamat (3)

Otopina ferocenkarkoksazida **2** (1,27 g, 4.98 mmol) u *tert*-butil alkoholu (180 ml) zagrijava se između 80 i 90 °C približno 5 sati, odnosno sve dok na TLC-u (CH₂Cl₂) ima traga reaktanta. Reakcijska se smjesa uz dodatak *n*-heksana (252 ml) upari na rotacijskom vakuum

uparivaču, a sirovi produkt pročisti se kolonskom kromatografijom na silikagelu (CH_2Cl_2). Dobiveno je 570 mg (45%) narančastih kristala; $t_r = 142\text{-}145\text{ }^\circ\text{C}$.

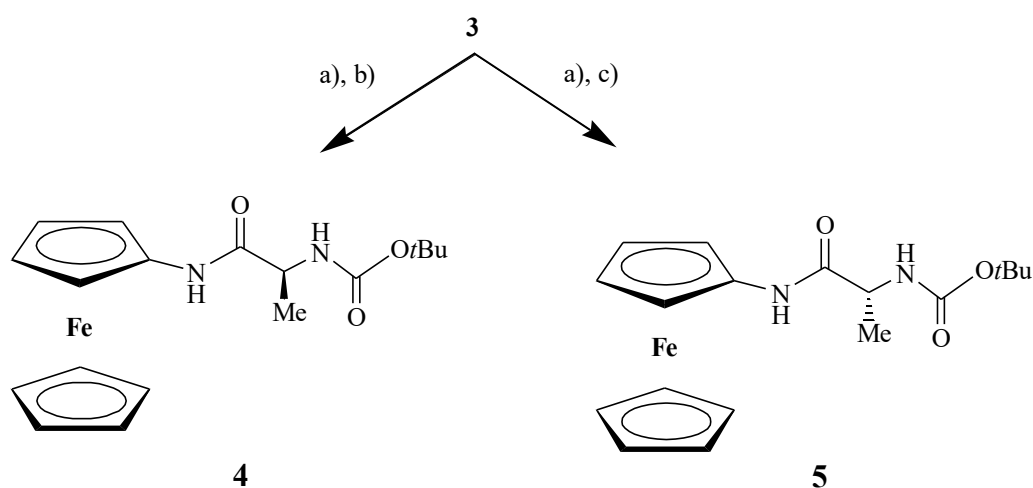
IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3436 sr (N-H slobodni), 1723 j (C=O, COOtBu).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ/ppm : 5,55 (bs, 1H, NH), 4,60 (bs, 2H, H-2, H-5), 4,24 (s, 5H, Fc nesupstituirani prsten), 4,11 (bs, 2H, H-3, H-4), 1,45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ/ppm : 8,50 (bs, 1H, NH), 4,44 (bs, 2H, H-2, H-5), 4,08 (s, 5H, Fc nesupstituirani prsten), 3,89 (bs, 2H, H-3, H-4), 1,45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

3.3. KONJUGATI AMINOFEROCENA I AMINOKISELINA

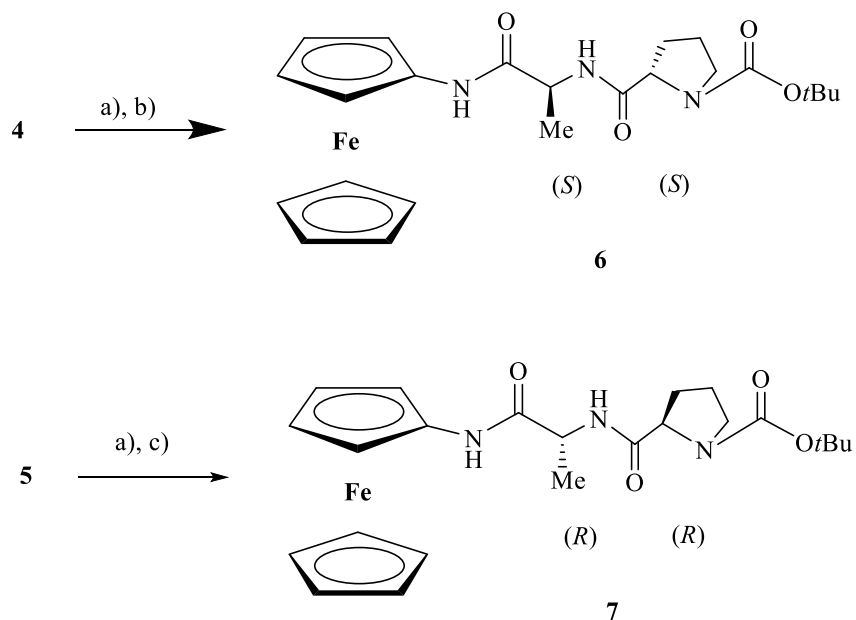
3.3.1. Priprava ferocenskih amida **4** i **5**



1. Plinoviti $\text{HCl}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$; 2. $\text{Et}_3\text{N}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$
- Boc-L-Ala-OH + HOBt + EDC/ CH_2Cl_2
- Boc-D-Ala-OH + HOBt + EDC/ CH_2Cl_2

Slika 18.

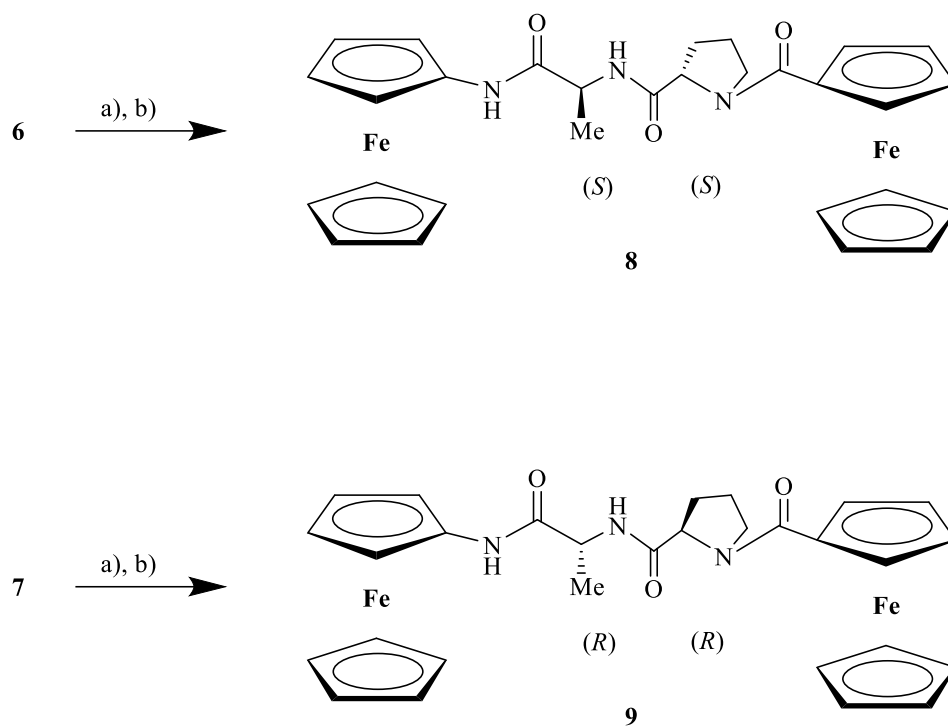
3.3.2. Priprava mono-ferocenskih dipeptida (6 i 7)



- a) 1. Plinoviti HCl/CH₂Cl₂; 2. Et₃N/CH₂Cl₂
b) Boc-L-Pro-OH + HOBt + EDC/CH₂Cl₂
c) Boc-D-Pro-OH + HOBt + EDC/CH₂Cl₂

Slika 19.

3.3.3. Priprava bis-ferocenskih dipeptida (**8** i **9**)



a) 1. Plinoviti HCl/CH₂Cl₂; 2. Et₃N/CH₂Cl₂

b) FcCOOH + HOBt + EDC/CH₂Cl₂

Slika 20.

3.3.4. Opći postupak pripreme ferocenskih amida (**4 i 5**) i mono-ferocenskih dipeptida (**6 i 7**)

U suspenziju Boc-zaštićenog prekursora u diklormetanu uvodi se suhi plinoviti HCl te se TLC kromatografijom utvđuje nastanak hidroklorida. Upareni hidroklorid suspendira se u diklormetanu i otopi uz dodatak Et₃N (pH ~ 8). Ta se otopina slobodnog amina doda otopini Boc-zaštićene aminokiseline u diklormetanu prethodno aktiviranoj primjenom standardnog HOBt/EDC postupka, a kopulaciju se prati tankoslojnom kromatografijom. Nakon 1 do 3 sata miješanja pri sobnoj temperaturi reakcijska se smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom NaHCO₃, 10%-tnom otopinom limunske kiseline u vodi i nekoliko puta zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz smjesu diklormetana i etil-acetata kao eluensâ.

Prethodno opisani postupak primjenjen je za pripravu ferocenskih amida (**4 i 5**) i mono-ferocenskih dipeptida (**6 i 7**) prikazanih na Slikama 18 i 19. Količine prekursora, reagensâ i iskorištenje kopulacija prikazano je u Tablici 2.

Tablica 2. Prekursori i reagensi upotrebljeni za pripravu ferocenskih amida (**4 i 5**) i mono-ferocenskih dipeptida (**6 i 7**) i iskorištenja kopulacija

Pro dukt	Prekursor [masa / mg, množina / mmol]	Aminokiselina [ekvivalentno, masa / mg, množina / mmol]	Aktivacijski reagensi [ekvivalentno, masa / mg, množina / mmol]		Dobiven a masa / mg (iskorište nje)	Vizualni opis produkta
			EDC	HOBt		
4	3 [800 mg, 2,66 mmol]	Boc-L-Ala-OH [1007 mg, 5,32 mmol]	1122 mg, 5,85 mmol	790 mg, 5,85 mmol	831 mg (84%)	Žuti kristali
5	3 [800 mg, 2,66 mmol]	Boc-D-Ala-OH [1007 mg, 5,32 mmol]	1122 mg, 5,85 mmol	790 mg, 5,85 mmol	760 mg (77%)	Žuti kristali
6	4 [415,5 mg, 1,12 mmol]	Boc-L-Pro-OH [482 mg, 2,24 mmol]	472 mg, 2,46 mmol	332 mg, 2,46 mmol	376 mg (72%)	Narančasti prah

7	5 [380 mg, 1,02 mmol]	Boc-D-Pro-OH [439 mg, 2,04 mmol]	429 mg, 2,24 mmol	303 mg, 2,24 mmol	420 mg (88%)	Narančasti prah
---	-----------------------	--	----------------------	----------------------	-----------------	--------------------

3.3.4.1. Boc-L-Ala-NH-Fc (4)

$t_t = 68 - 70$ °C.

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3425 sr (N-H slobodni), 3336 sl (N-H asocirani), 1697 j (C=O, COOtBu).

¹H-NMR (CDCl₃) δ/ppm : 6,83 (bs, 1H, NH_{Fc}), 5,55 (bs, 1H, NH_{Ala}), 5,20-4,10 (m, 9H, Fc), 3,95 (bs, 1H, CH α _{Ala}), 1,47 (s, 9H, Boc), 1,28 (d, ³J_{HH} = 6,20 Hz, 3H, CH₃_{Ala}).

¹H-NMR (DMSO) δ/ppm : 9,28 (s, 1H, NH_{Fc}), 7,0 [d, ³J_{HH} = 6,80 Hz, 1H, NH_{Ala}], 4,61 (s, 2H, H-2, H-5), 4,09 (s, 5H, Fc nesupstituirani prsten), 3,93 (s, 3H, CH α _{Ala}, H-3, H-4), 1,39 (s, 9H, Boc), 1,20 (d, ³J_{HH} = 7,08 Hz, 3H, CH₃_{Ala}).

¹³C-NMR (DMSO) δ/ppm : 171,5 (CO_{Ala}), 155,3 (CO_{Boc}), 95,6 (C-1, Fc), 78,2 (C(CH₃)₃_{Boc}), 68,9 (Fc nesupstituirani prsten), 63,9 (C-3), 63,8 (C-4), 60,9 (C-2), 60,6 (C-5), 50,4 (C α _{Ala}), 28,4 (C(CH₃)₃_{Boc}), 18,0 (CH₃_{Ala}).

3.3.4.2. Boc-D-Ala-NH-Fc (5)

Dobiveni su identični spektri kao kod enantiomera 4.

3.3.4.3. Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fc (6)

$t_t = 86 - 88$ °C. Optičko skretanje $[\alpha]_D^{22} = -102$ ($c = 1,0$, MeOH).

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3420 sl (N-H slobodni), 3318 sr (N-H asocirani), 1676 j (amid I), 1557 j, 1541 j, 1506 j (amid II).

¹H-NMR (CDCl₃) δ/ppm : 8,23 (s, 0,78 H, NH_{Fc trans}), 8,05 (bs, 0,22 H, NH_{Fc cis}), 6,79 (d, ³J_{HH} = 7,3 Hz, 1 H, NH_{Ala}), 4,76 (bs, 1 H, H-2), 4,58 (s, 1 H, H-5), 4,48 (m, 1 H, CH α _{Ala}), 4,30 (m, 1 H, CH α _{Pro}), 4,13 (s, 5 H, Fc nesupst. prsten), 3,96 (bs, 1 H, H-3), 3,95 (bs, 1 H, H-4), 3,53-3,41 (m, 2H, CH δ _{Pro}), 2,2-2,14 (m, 2H, CH β _{Pro}), 1,96-1,88 (m, 2H, CH γ _{Pro}), 1,5 (s, 9 H, Boc), 1,41 (d, ³J_{HH} = 7 Hz, 3 H, CH₃_{Ala}).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ / ppm: 172,3 (CO_{Pro}), 170,3 (CO_{Ala}), 156,2 (CO_{Boc}), 94,5 (C-1), 81,2 ($\text{C}(\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3\text{Boc})$), 69,3 (Fc nesupstituirani prsten), 64,7 (C-3), 64,4 (C-4), 61,9 (C-2), 61,3 ($\text{CH}_{\alpha\text{Pro}}$), 61,0 (C-5), 49,8 (CH_{Ala}), 47,6 ($\text{CH}_{\delta\text{Pro}}$), 29,4 ($\text{CH}_{\beta\text{Pro}}$), 28,5 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3\text{Boc}$), 24,8 ($\text{CH}_{\gamma\text{Pro}}$), 17,8 ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$).

HRMS(MALDI): izračunato za $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4\text{Fe}$, 469,1658; nađeno, 469,1666.

3.3.4.4. Boc-D-Pro-D-Ala-NH-Fc (7)

Dobiveni su identični spektri kao kod enantiomera **6**.

3.3.5. Opći postupak pripreme bis-ferocenskih dipeptida (**8** i **9**)

U otopinu Boc-zaštićenog dipeptida u dikormetanu uvodi se plinoviti HCl dok se TLC kromatografijom ne utvrdi nastanak hidroklorida. Upareni hidroklorid suspendira se u diklormetanu i obradi sa suviškom Et_3N (pH ~ 8). Dobiveni se slobodni amin kopulira sa Fc-COOH prethodno aktiviranom standardnim HOBt/EDC postupkom. Nakon 1 do 3 sata miješanja reakcijska se smjesa obradi na isti način kao u postupku **3.3.4.** a produkt pročisti tankoslojnom preparativnom kromatografijom uz etil-acetat kao eluens.

Tablica 3. Supstrati i reagensi upotrebljeni za pripravu bis-ferocenskih dipeptida (**8** i **9**) prikazanih na Slici 20.

Produkt	Prekursor [masa / mg, množina / mmol]	FcCOOH [ekvivalentno, masa / mg, množina / mmol]	Aktivacijski reagensi [ekvivalentno, masa / mg, množina / mmol]		Dobiven a masa / mg (iskorište nje)	Vizualni opis produkta
			EDC	HOBt		
8	6 [109,2 mg, 0,233 mmol]	70 mg, 0,303 mmol	98 mg, 0,51 mmol	69 mg, 0,51 mmol	59 mg (44%)	Crvena smola
9	7 [180,5 mg, 0,385 mmol]	106 mg, 0,462 mmol	163 mg, 0,85 mmol	115 mg, 0,85 mmol	105,7 mg (47%)	Crvena smola

3.3.5.1. *Fc-CO-L-Pro-L-Ala-NH-Fc* (**8**)

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3421 sl (N-H slobodni), 3298 sr (N-H asocirani), 1684 j (amid I), 1599 sr, 1558 sr, 1541 sr, 1506 j (amid II).

¹H-NMR (CDCl₃) δ/ppm : 8,23 (s, 1 H, NH_{Fc}), 6,77 (d, ³J_{HH} = 7,6 Hz, 1H, NH_{Ala}), 4,84-4,80 (m, 3H, H-2, H-2', H-5'), 4,73 (bs, 1H, H-5), 4,66 (bs, 1H, CH _{α Pro}), 4,50 (m, 1H, CH _{α Ala}), 4,43 (bs, 2H, H-3', H-4'), 4,23 (bs, 5H, Fc' nesupst. prsten), 4,17 (bs, 5H, Fc nesupst. prsten), 4,00 (bs, 2H, H-3, H-4), 3,94-3,87 (m, 2H, CH _{δ Pro}), 2,25-2,20 (m, 2H, CH _{β Pro}), 2,1-2,02 (m, 2H, CH _{γ Pro}), 1,45 (d, ³J_{HH} = 7,2 Hz, 3H, CH_{3Ala}).

¹³C NMR (CDCl₃) δ/ppm : 172,1 (CO_{Fc}), 171,8 (CO_{Pro}), 170,1 (CO_{Ala}), 94,9 (C-1), 75,8 (C-1'), 71,5 (C-2'), 71,0 (C-3'), 71,0 (C-4'), 70,2 (C-5'), 69,8 (Fc' nesupstirani prsten), 69,5 (Fc nesupstituirani prsten), 64,8 (C-3), 64,5 (C-4), 62,4 (CH _{α Pro}), 61,9 (C-2), 61,5 (C-5), 49,8 (CH _{α Ala}), 49,3 (CH _{δ Pro}), 28,4 (CH _{β Pro}), 26,0 (CH _{γ Pro}), 17,5 (CH_{3Ala}).

HRMS(MALDI): izračunato za C₂₉H₃₁N₃O₃Fe₂, 581,1065; nađeno, 581,1079.

3.3.5.2. *Fc-CO-D-Pro-D-Ala-NH-Fc* (**9**)

Dobiveni su identični spektri kao kod enantiomera **8**.

4. REZULTATI I RASPRAVA

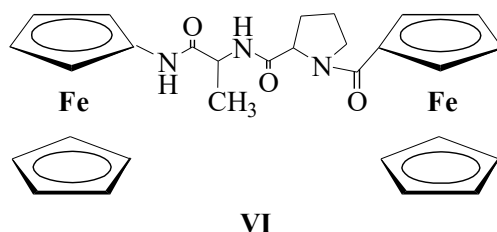
4.1. UVOD

U literaturi su opisani brojni derivati heteroanularno disupstituiranih ferocena i aminokiselina **I-III** u kojima su pronađeni različiti sekundarni strukturni elementi inducirani umetanjem ferocenskog templata u peptidni lanac (22). Na konformacijska svojstva ovih biokonjugata, odnosno obrasce intramolekulskih vodikovih veza koje podržavaju sekundarne strukturne elemente, utječe se: *i*) ferocenskom podjedinicom (Fca, Fcd, ili Fcda), *ii*) apsolutnom konfiguracijom konstituirajućih aminokiselina i *iii*) zaštitnim skupinama na *N*-odnosno *C*-terminusu.

Najveći doprinos istraživanju konformacijskih svojstava peptida proizašlih iz ferocenkarboksilne kiseline i α -aminokiselina (**IV**) dao je Hirao koji je ustanovio kako i ovi jednostavni biokonjugati, iako znatno rijede od disupstituiranih homologa, mogu tvoriti uređene sekundarne strukture kako u čvrstom stanju tako i u otopini (23,26,28). Nadalje, pokazao je kako u slučaju monosupstituiranih derivata tipa **IV** (Fc-CO-Ala-Pro-NH-X-Py, X = 2,4) presudan utjecaj na konformaciju u čvrstom stanju ima kiralnost aminokiselinske sekvencije i položaj dušika u piridilnom prstenu. Samoasocijacija podržana intermolekulskim vodikovim vezama dominira u homo- i heterokiralnim 2-piridil-aminokiselinskim derivatima, dok je u čvrstom stanju heterokiralnog 4-piridilnog derivata nađena struktura koja odgovara β -okretu tipa II (26).

Mogućnost tvorbe sekundarnih strukturnih elemenata u slučaju peptida proizašlih iz aminoferocena i α -aminokiselina (**V**) znatno je slabije istražena, vjerojatno zbog nestabilnosti aminoferocenskog prekursora, a njihova su konformacijska svojstva do sada opisana u samo tri publikacije (9,11,27). U našem su Laboratoriju pripremljeni i podvrgnuti konformacijskoj analizi aminoferocenski derivati Boc-AA₂-AA₁-NH-Fc (**XIIIa**, AA_{1,2} = Gly; **XIIIb**, AA_{1,2} = L-Ala; **XIIIc**, AA_{1,2} = L-Val, **XIVa**, AA₁ = L-Ala, AA₂ = L-Pro; **XIVb**, AA₁ = D-Ala, AA₂ = D-Pro; **XVa**, AA₁ = D-Ala, AA₂ = L-Pro; **XVb**, AA₁ = L-Ala, AA₂ = D-Pro). U nastavku istraživanja tih slabo opisanih biokonjugata, u ovom smo Diplomskom radu odlučili pripremiti enantiomerne himokiralne derivate tipa **VI** (Fc-CO-Pro-Ala-NH-Fc) koji se mogu smatrati dipeptidima čiji je *C*- i *N*-terminus zaštićen organometalnom podjedinicom (Slika 21). Prilikom konstrukcije ciljnih spojeva odlučili smo se za: *i*) umetanje prolina na *i* + 1 položaj peptidne sekvence zbog njegove rigidne strukture a time i sposobnosti indukcije β -okreta (29), i *ii*)

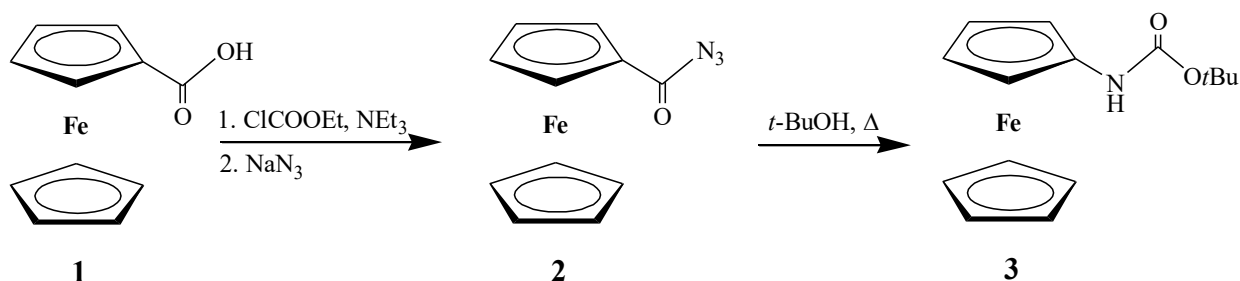
umetanje dodatne ferocenske podjedinice u peptide tipa **V** kako bi se ispitaio njezin utjecaj na kiralno uređenje tih spojeva kao i mogućitna promjena njihovih sekundarnih karakteristika. Sustavna konformacijska analiza konjugata **VI** načinjena je na temelju CD-, IR-, ¹H- i 2D NMR spektroskopije te DFT računa.



Slika 21. Ciljni peptidi **VI**

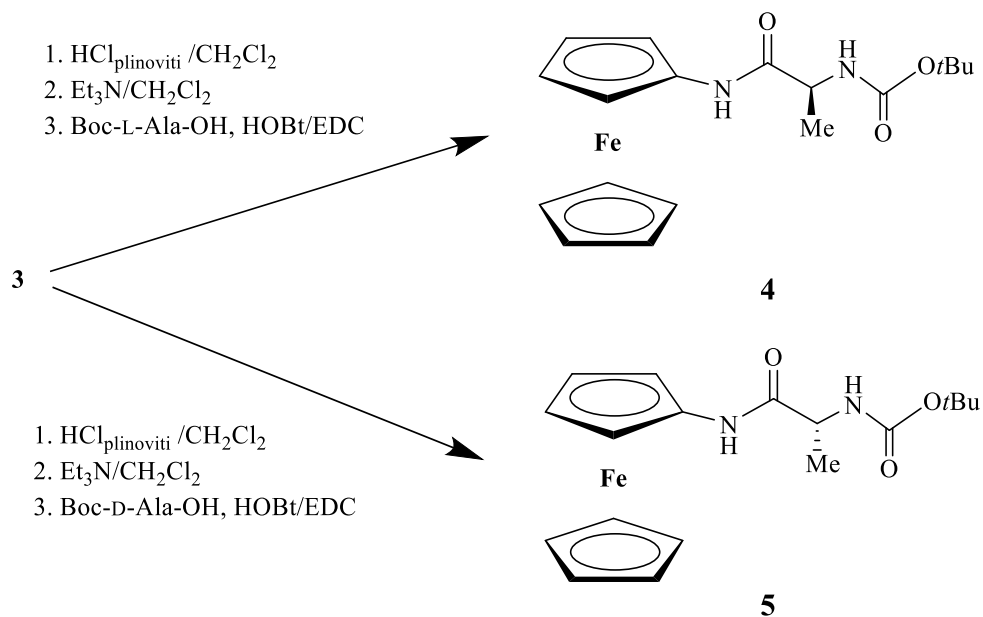
4.2. SINTEZA I KARAKTERIZACIJA

Služeći se postupcima opisanim u literaturi (5), Curtiusovom pregradnjom azida (**2**) dobivenog u 43%-tnom iskorištenju iz ferocenkarkobosilne kiseline (**1**), pripravili smo 45% Boc-NH-Fc (**3**), ključnog prekursora u sintezi ferocenskih peptida (Slika 22).



Slika 22. Priprava Boc-zaštićenog aminoferocena

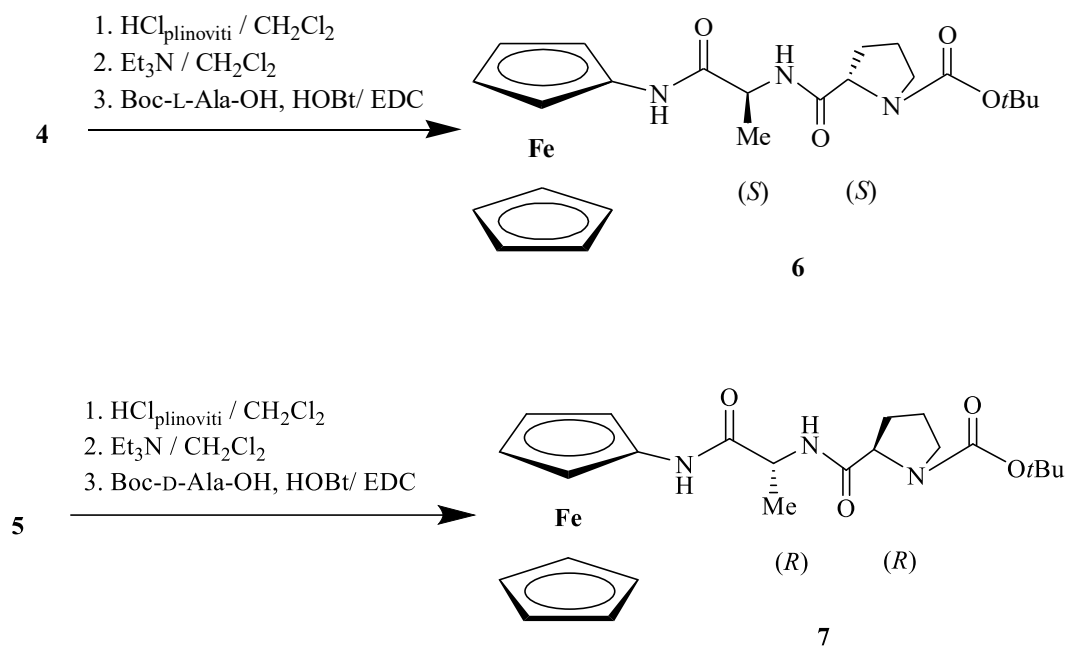
Sinteza ferocenskih amida **4** i **5** započinje deprotekcijom amino-skupine **3** djelovanjem plinovitog HCl u diklormetanu. Nastali hidroklorid obradom sa suviškom NEt₃ prelazi u slobodnu bazu koja je kondenzirana s aktiviranom Boc-AA-OH (AA = L-Ala, D-Ala) primjenom standardnog HOBt/EDC postupka dajući 84% konjugata **4** i 77% konjugata **5** (Slika 23).



Slika 23. Priprava ferocenskih amida **5** i **6**

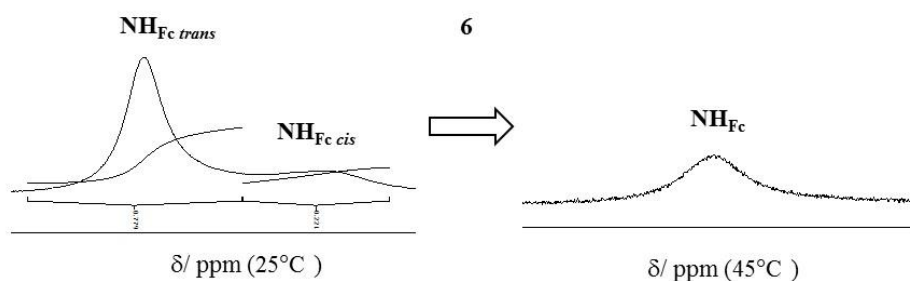
Ulazak alaninske podjedinice potvrđen je dubletom njezine metilne skupine ($\delta = 1,20$ ppm) u ¹H NMR-spektrima i signalima pri $\delta = 18,0$ ppm (CH_{3Ala}) i $\delta = 50,40$ ppm (C α _{Ala}) u ¹³C NMR-spektrima enantiomernih amida **4** i **5**.

U nastavku istraživanja na sličan su način pripremljeni enantiomerni dipeptidi Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fc (**6**) i Boc-D-Pro-D-Ala-NH-Fc (**7**). Kao što je prikazano na Slici 24, deprotekcijom **4** odnosno **5** i kopulacijom s aktiviranom Boc-AA-OH (AA = L-Pro, D-Pro) pripremljeni su dipeptidi **6** i **7** u 72% i 88%-tnom iskorištenju.



Slika 24. Priprava mono-ferocenskih dipeptida **6** i **7**

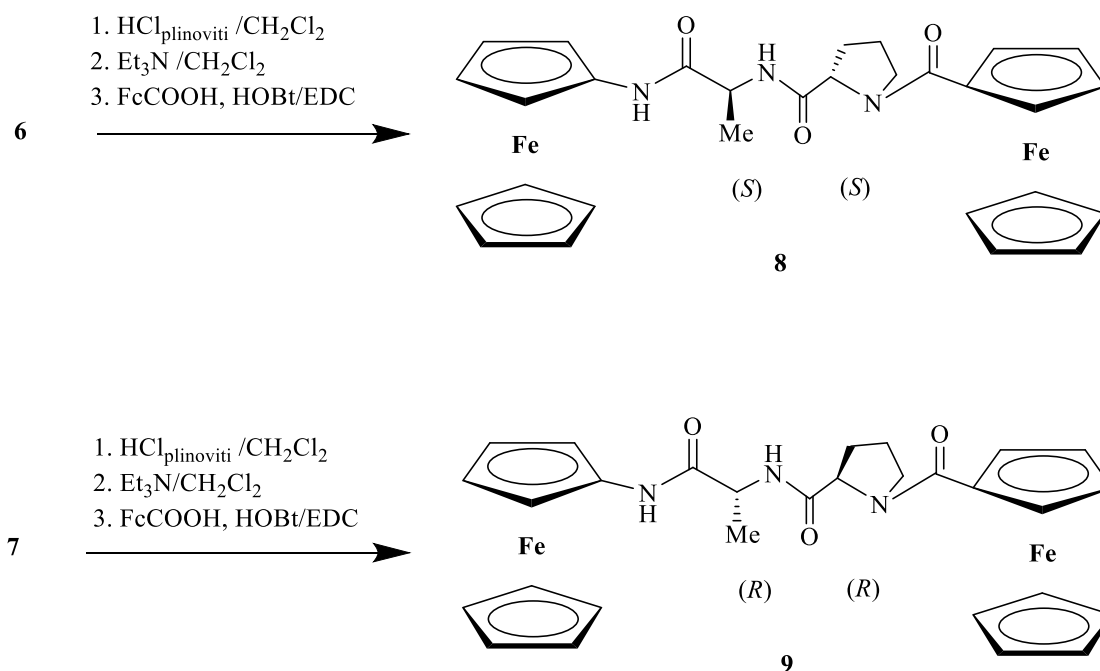
¹H-, ¹³C-, NOESY-, COSY-, HSQC- i HMBC-spektroskopijom najprije smo asignirali sve signale u ¹H- i ¹³C-NMR spektrima derivata **6** i **7**. U ¹H NMR-spektru peptida **6** opaženi su dvostruki signali NH_{Fc} skupine koji su pripisani *cis*- i *trans*-izomeru prolinske amidne veze (30). Kao što je prikazano na Slici 25, ti signali zagrijavanjem na 40 °C koalesciraju. Ulazak prolinske podjedinice registriran je u ¹H-NMR spektru **6** signalima njezinih metilenskih δ (δ = 3,55-3,36 ppm), β (δ = 2,26-2,05 ppm) i γ (δ = 2,01-1,85 ppm) protona te metinskih protona (δ ~ 4,3 ppm). Struktura dipeptida dodatno je potvrđena opažanjem signala pirolidinskih α (δ ~ 61 ppm), δ (δ ~ 48 ppm), β (δ ~ 29 ppm) i γ (δ ~ 25 ppm) ugljikovih atoma u ¹³C-NMR spektru **6**. Isti su signali opženi i u ¹H- i ¹³C-NMR spektru enantiomernog **7**.



Slika 25. Koalescencija signala amidnih protona pri povišenoj temperaturi u ¹H NMR-spektru

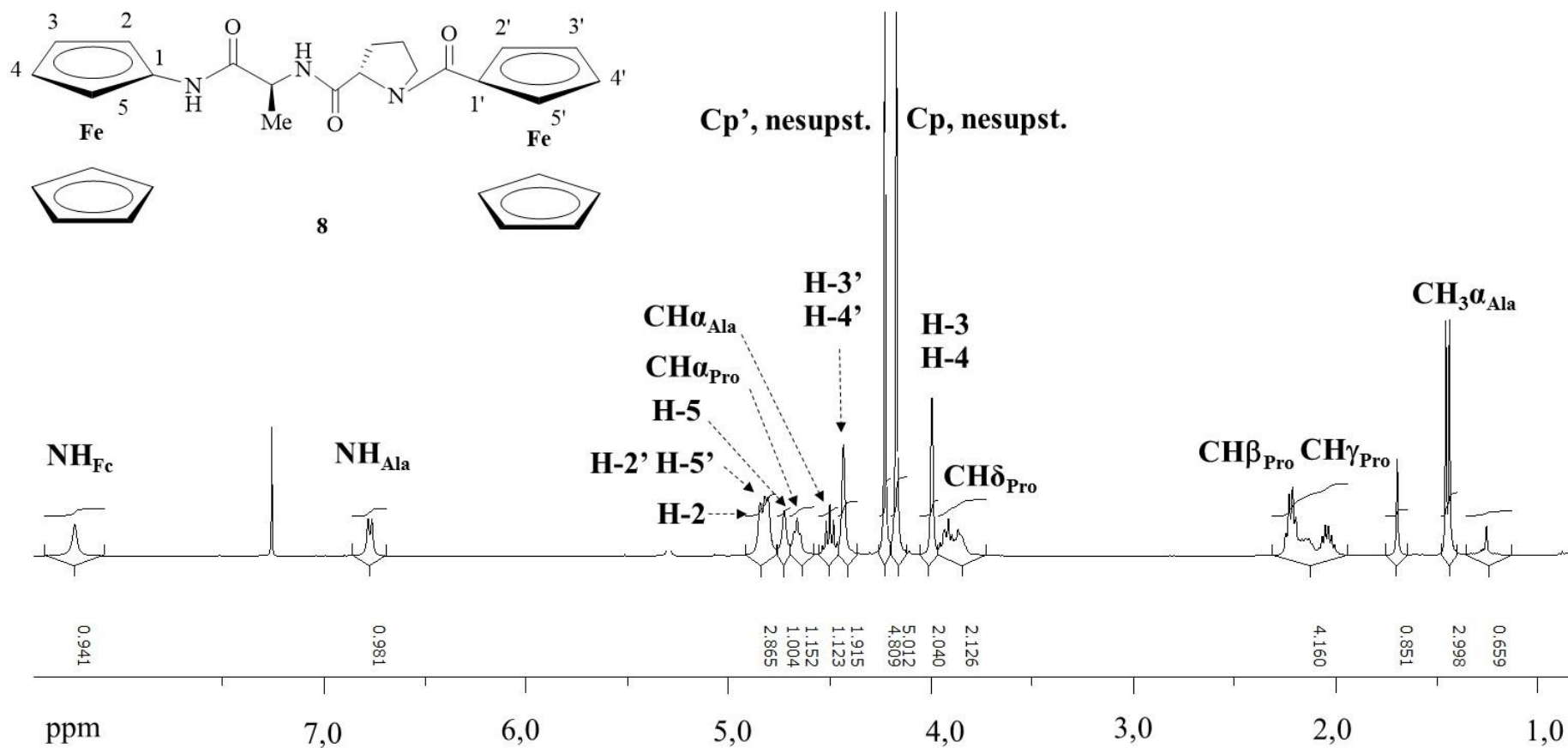
6

Završni korak u sintezi ciljnih bis-ferocenskih peptida **8** i **9** bilo je uvođenje ferocenoila na *N*-terminus dipeptida **6** i **7** (Slika 26). HOBt/EDC protokolom aktivirana je ferocenkarboksilna kiselina (**1**) i kopulirana sa slobodnim aminima dobivenim deprotekcijom Boc-zaštićenih prekursora **6** i **7** pri čemu su dobiveni enantiomerni dipeptidi **8** (44%) i **9** (47%).



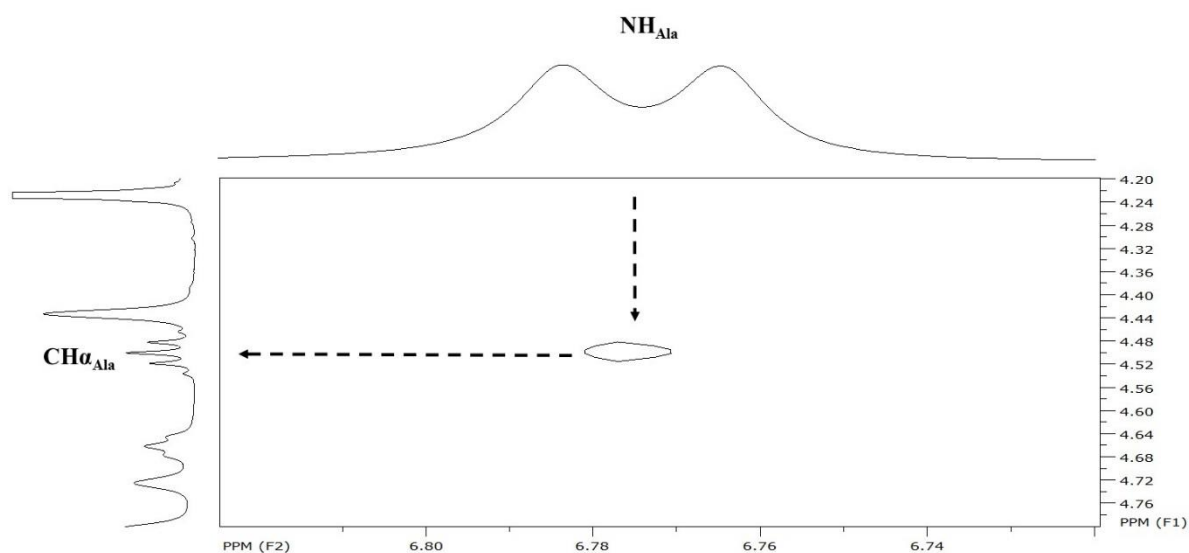
Slika 26. Priprava ciljnih bis-ferocenskih derivata **8** i **9**

Struktura derivata **8** i **9** potvrđena je primjenom dvodimenzijske homo- (COSY, NOESY) i heteronuklearne (HSQC, HMBC) NMR spektroskopije. Na primjeru derivata **8**, čiji je protonski spektar prikazan na Slici 27, objašnjena je potpuna asignacija svih kemijskih pomaka u ^1H -NMR spektru pomoću cijepanja signala, kemijskih pomaka i 2D-homonuklearne NMR tehnike. Nedvojbeno asignacija svih kemijskih pomaka u ^1H -NMR spektru neophodna je kako bi se strategijom baziranom na NOESY korelacijskoj spektroskopiji dobio uvid u prostornu organizaciju ciljnih biokonjugata.

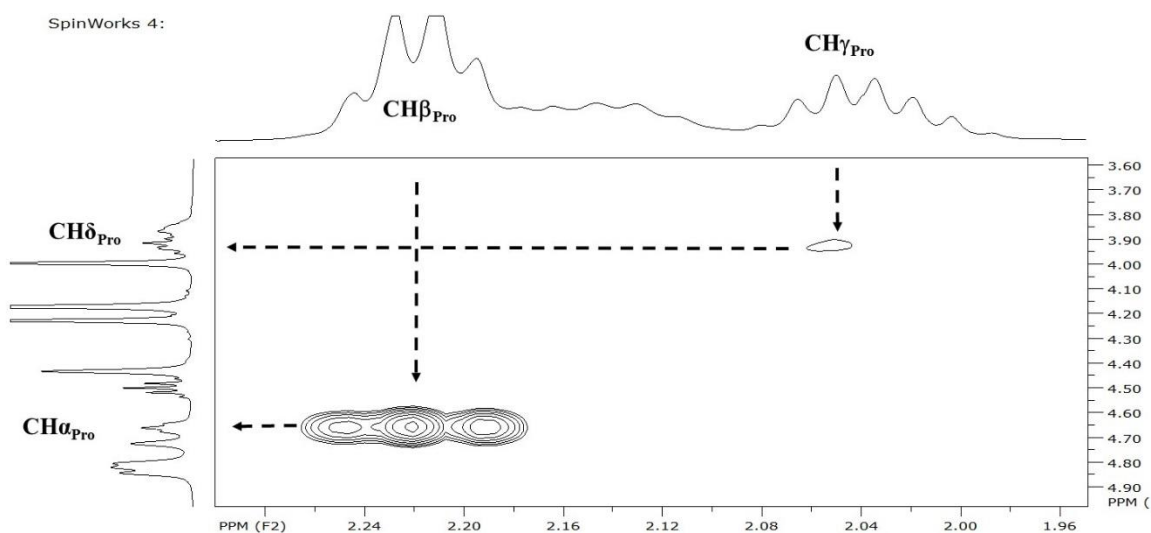


Slika 27. Asignirani ¹H-NMR spektar derivata **8**

U niskom polju opaža se singlet NH protona iz amidne skupine izravno vezane na ferocen ($\delta = 8,23$ ppm) i dublet amidnog protona alanina ($\delta = 6,77$ ppm) čija je metilna skupina također registrirana kao dublet pri $\delta = 1,45$ ppm. Asignacija preostalih signala načinjena je pomoću COSY spektroskopije koja se koristi za identifikaciju susjednih protona i NOESY-tehnike koja omogućava korelaciju kemijskih pomaka jezgara ukoliko je njihova prostorna udaljenost manja od 6 Å. Zbog COSY signala s NH_{Ala} multiplet pri $\delta = 4,50$ ppm pripisan je α -protonu alanina (Slika 28). Najzasjenjeniji signal pirolidinskih metilenskih skupina pripisan je γ -protonima ($\delta = 2,1 - 2,02$ ppm) koji u COSY spektru, prikazanom na Slici 29, pokazuju kontakt sa susjednim δ -protonima ($\delta = 3,94-3,87$ ppm). Signal pri 4,66 ppm asigniran je $\text{CH}_{\alpha_{\text{Pro}}}$ skupini zbog COSY kontakta s metilenskim β -protonima prolina opaženima kao multiplet pri $\delta = 2,25-2,20$ ppm.

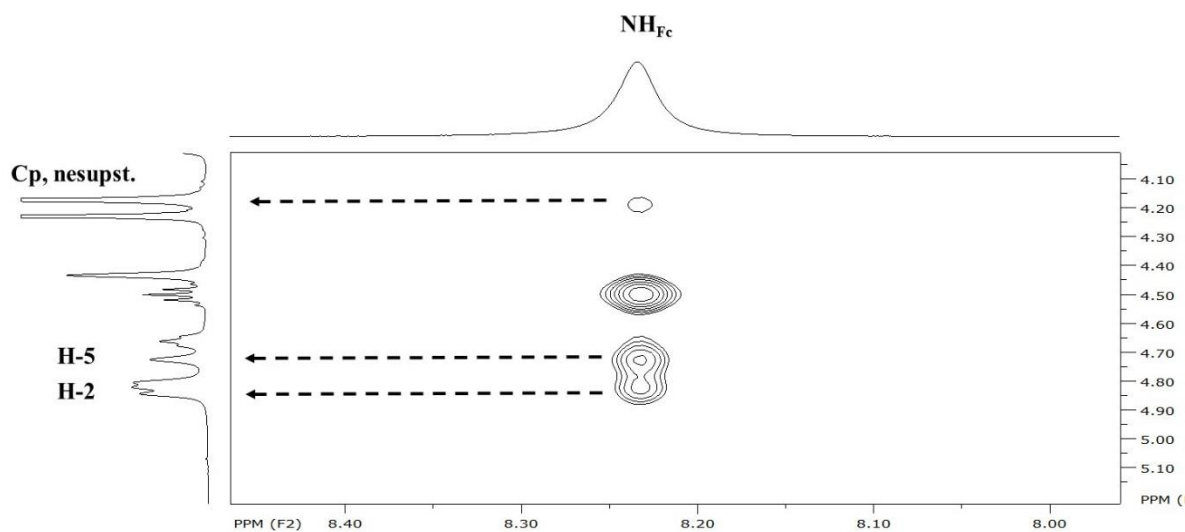


Slika 28. Dio COSY spektra derivata **8**

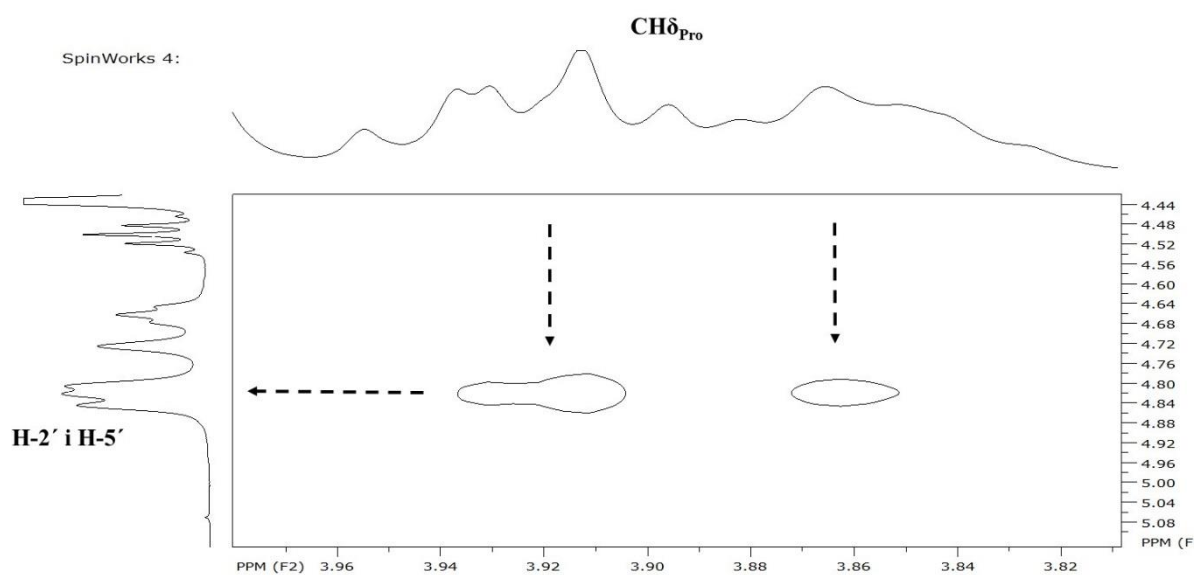


Slika 29. Dio COSY spektra derivata **8**

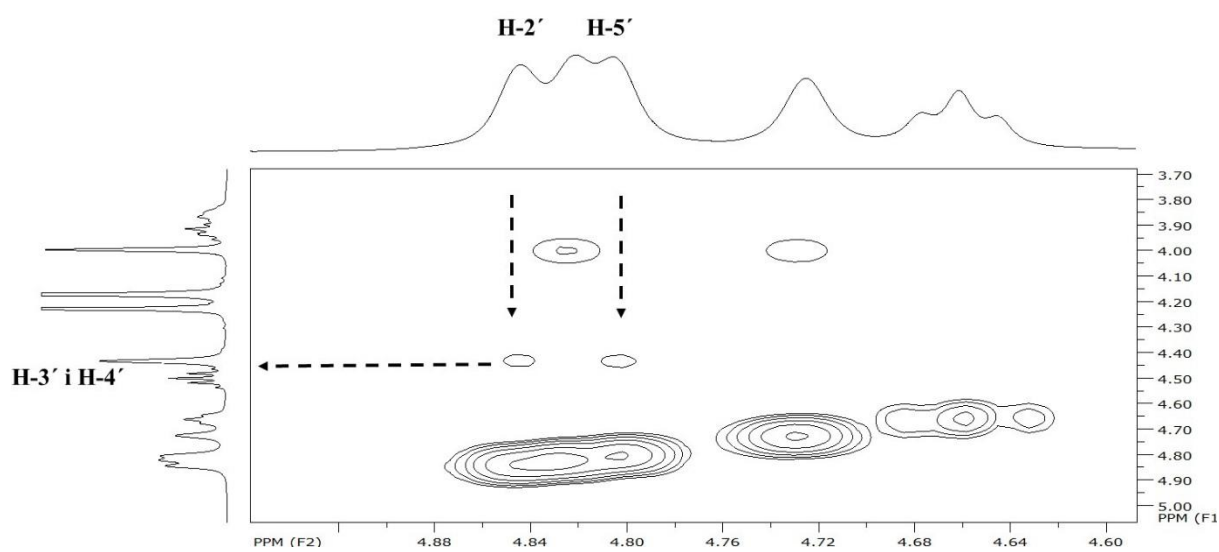
Nadalje, kemijski pomaci ferocenskih H-2 ($\delta = 4,84$ ppm), H-5 ($\delta = 4,73$ ppm) i protona C-terminalnog nesupstituiranog prstena ($\delta = 4,17$ ppm) asignirani su na osnovi njihovih NOE kontakata sa NH_{Fc} prikazanima na Slici 30. Temeljem NOE kontakata s $\text{CH}_{\delta\text{Pro}}$ signali pri 4,81 i 4,82 ppm pripisani su H-2' i H-5' (Slika 31), a potonji u COSY spektru, prikazanom na Slici 32, pokazuju kontakte sa H-3' i H-4' ($\delta = 4,43$ ppm). Preostali singlet pri 4,23 ppm može se pripisati N-terminalnom nesupstituiranom ciklopentadienilnom prstenu, a onaj opažen pri 4,0 ppm ferocenskim H-3 i H-4 protonima.



Slika 30. Dio NOESY spektra derivata **8**



Slika 31. Dio NOESY spektra derivata **8**



Slika 32. Dio COSY spektra derivata **8**

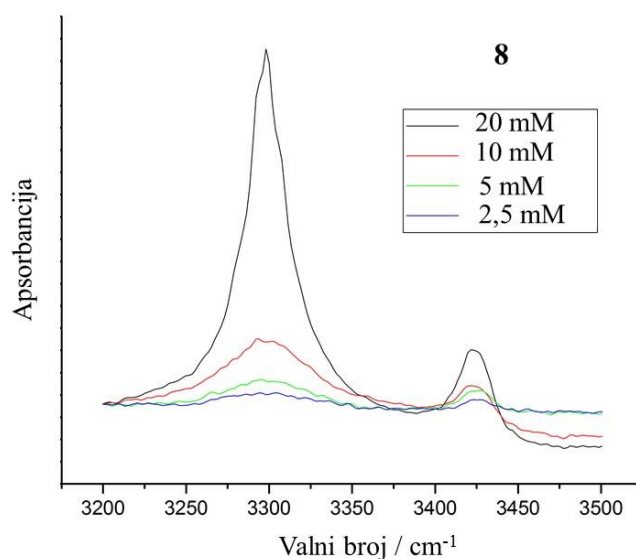
Nakon što je asigniran ^1H NMR-spektar derivata **8**, primjenom heteronuklearnih korelacija (HMBC, HSQC) nedvojbeno su pripisani i svi signali u njegovom ^{13}C NMR-spektaru.

4.3. KONFORMACIJSKA ANALIZA

4.3.1. IR-spektroskopija

Poznato je da je IR-spektroskopija brza i korisna metoda za detekciju slobodnih i NH-skupina koje sudjeluju u vodikovim vezama. Iako u otopini nastupa brza izmjena energijski bliskih konformacija, u IR-spektrima detektiraju se apsorpcijske vrpce NH-skupine za svaki prisutni oblik te je iz relativnog omjera intenziteta vrpce gdje kada moguće procijeniti udio pojedinih konformera. Pritom apsorpcijske vrpce u području valnih brojeva manjih od 3400 cm^{-1} upućuju na asocirane NH-skupine, dok se signali iznad 3400 cm^{-1} pripisuju slobodnim NH-skupinama. Nadalje, iz omjera intenziteta ovih vrpce tijekom postupnog razrijeđivanja otopina ispitivanih uzoraka može se procijeniti da li su u konformerima prisutne intra- ili intermolekulske vodikove veze. Ako razrijeđivanjem značajno opada intenzitet signala u području nižem od 3400 cm^{-1} u otopini ispitivanog uzorka prisutne su intermolekulske vodikove veze koje se razrijeđenjem kidaju. Ukoliko su u molekuli prisutne intramolekulske vodikove veze razrijeđivanjem oba signala slabe ali se ne mijenja omjer njihovog intenziteta.

Koncentracijski-ovisni IR-spektri peptida **8** prikazani su na Slici 33. Pri visokim koncentracijama ispitivanog uzorka (20 mM) dominiraju signali pri 3298 cm^{-1} koji se mogu pripisati asociranim NH-skupinama, dok su apsorpcijske vrpce slobodnih NH-skupina, registrirane pri 3421 cm^{-1} , znatno slabijeg intenziteta. Omjer intenziteta slobodnih i asociranih NH-skupina značajno se počinje mijenjati tek pri koncentracijama nižima od $1 \cdot 10^{-2}\text{ M}$ i pritom se opaža slabljenje intenziteta vrpce asociranih NH-skupina i njihovo širenje. Pri vrlo niskim koncentracijama (5 i $2,5\text{ mM}$) omjer intenziteta signala asociranih i slobodnih NH-skupina približno je jednak. Iz prethodno navedenog može se zaključiti kako su u razrijeđenim otopinama peptida **8** prisutne konformacije stabilizirane intramolekulskim vodikovim vezama u kojima sudjeluju pojedine NH-skupine. Preostale slobodne NH-skupine porastom koncentracije ulaze u intermolekulske vodikove veze i time sudjeluju u tvorbi samoudružujućih peptidnih agregata.



Slika 33. Koncentracijski ovisni IR-spektri biokonjugata **8** u apsorpcijskom području NH-skupina

4.3.2. NMR-spektroskopija

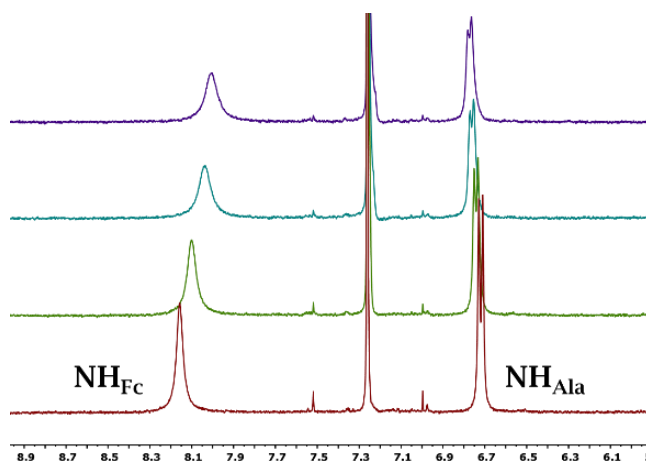
Poznato je da se kemijski pomaci amidnih protona povezanih vodikovim vezama nalaze pri većim δ -vrijednostima nego slobodni amidni protoni. Literaturno dostupni podaci o pomacima NH skupina u ferocenskim peptidima tipova **I-V** ukazuju kako se signali NH-skupina koje sudjeluju u vodikovim vezama opažaju pri $\delta > 7$ ppm, dok slobodne NH-skupine rezoniraju pri višem polju. Nadalje, konformeri u kojima postoje intramolekulske vodikove veze i slobodni oblici u otopini se nalaze u dinamičkoj ravnoteži, a zbog njihove brze izmjene u ¹H-NMR-spektru se opažaju samo prosječne vrijednosti kemijskih pomaka slobodnih i asociраних NH. U NMR spektru 50 mM otopine **8** u CDCl₃ opažen je visok kemijski pomak ($\delta = 8,23$ ppm) NH-skupine izravno vezane na ferocen koji se neznatno mijenja ($\Delta\delta = 0,06$ ppm) smanjenjem koncentracije na 2 mM. Suprotno tomu, NH-skupina iz alaninske podjedinice registrirana je pri višem polju ($\delta = 6,77$ ppm). Iz prethodno navedenog može se zaključiti kako u otopini **8** u aprotičnom CDCl₃ dominiraju konformacije u kojima NH-skupina izravno vezana na ferocen sudjeluje u intramolekularnoj vodikovoj vezi.

Jakost intramolekulskih vodikovih veza, na koje ukazuju rezultati naprijed opisane IR- i NMR-analize, ispitana je mjerenjem temperaturno ovisnih NMR spektara i titracijom s DMSO.

Temeljem ovisnosti kemijskih pomaka amidnih protona o temperaturi ($\Delta\delta/\Delta T$) može se procijeniti njihova izloženost otapalu (30). Zaključci proizašli iz proučavanja ovisnosti kemijskih pomaka o temperaturi su sljedeći:

- Velike temperaturne ovisnosti upućuju na NH-skupine koje su pri nižim temperaturama zaklonjene, ali porastom temperature postaju izložene otapalu
- Male temperaturne ovisnosti ($-2,4 \pm 0,5$ ppb/K) pripisuju se amidnim protonima izloženima otapalu ukoliko im je inicijalni kemijski pomak manji od 7 ppm, ili zaklonjenim protonima ako su pri nižim temperaturama registrirani iznad 7 ppm.

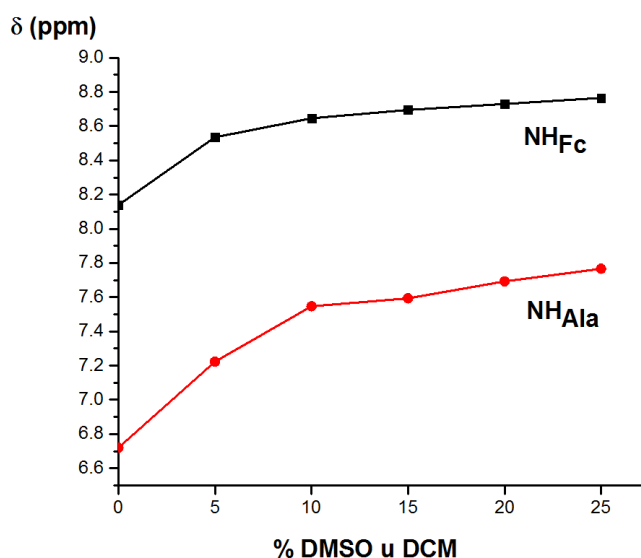
Temperaturno ovisni NMR spektri **8** snimani su pri $c = 10$ mM kako bi se isključila mogućnost samoudruživanja molekula (Slika 34). Temperaturni koeficijent NH_{Fc} [$\Delta\delta/\Delta T = -6,1$ ppb K^{-1}] ukazuje na početnu zaklonjenost od otapala, uslijed sudjelovanja u vodikovoj vezi, koja se porastom temperature smanjuje. Mala temperaturna ovisnost NH skupine alanina, registrirane u visokom polju NMR spektra **8** [$\Delta\delta/\Delta T = 2,1$ ppb K^{-1}], sugerira njezinu izloženost otapalu.



Slika 34. Temperaturna ovisnost kemijskih pomaka amidnih protona **8**

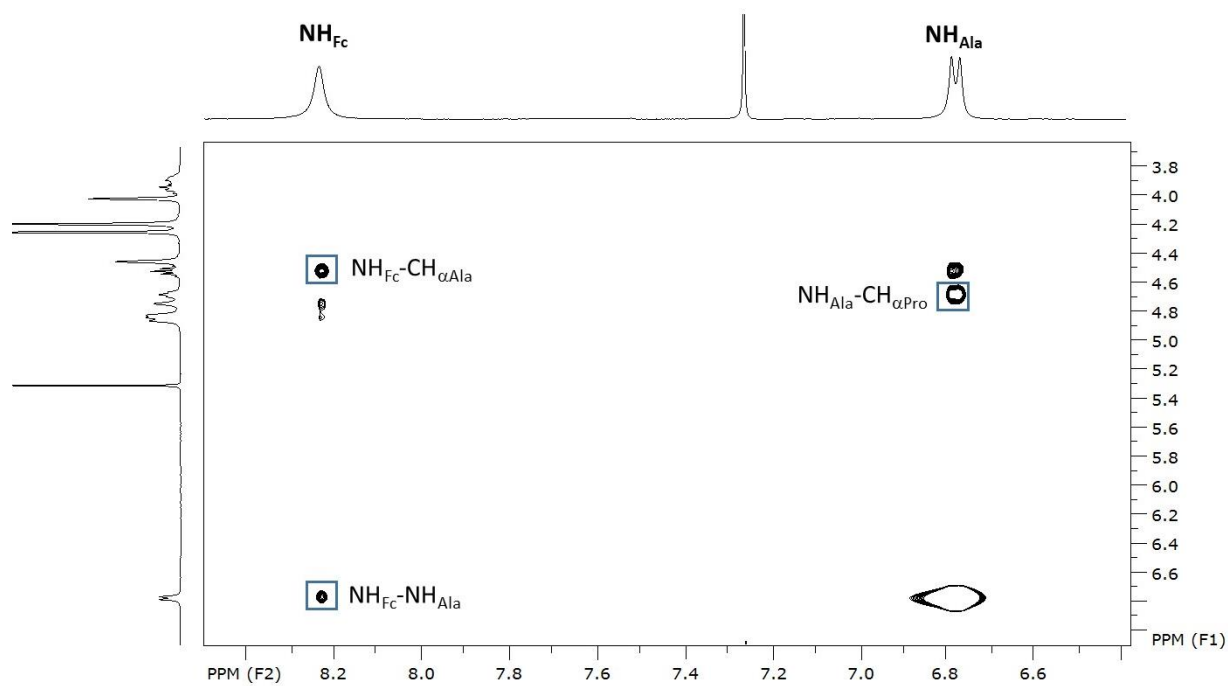
Nadalje, jakost intramolekulske vodikove veze u kojoj sudjeluje NH skupina izravno vezana na ferocen ispitana je titracijom 10 mM otopine konjugata **8** u CDCl_3 s DMSO. Polarno otapalo poput DMSO uzrokuje kidanje intramolekulskih vodikovih veza i nastanak solvata zahvaljujući jakom akceptorskim svojstvima toga otapala prema donorima vodikove veze. Pritom je za amidne skupine koje participiraju u intramolekulskim vodikovim vezama karakteristična mala promjena kemijskog pomaka uslijed dodatka DMSO (31). Kao što je vidljivo na titracijskoj krivulji derivata **8** (Slika 35), kompeticijsko otapalo (25% v/v) uzrokovalo je pomak NH

skupine izravno vezane na ferocen za 0,6 ppm što je u skladu s rezultatima prethodne analize koja indicira njezino sudjelovanje u vodikovoj vezi. Suprotno tomu, kemijski pomak alaninske NH skupine derivata **8** promjenio se za više od 1 ppm u prisutnosti DMSO, što sugerira kako je riječ o slobodnoj NH skupini.

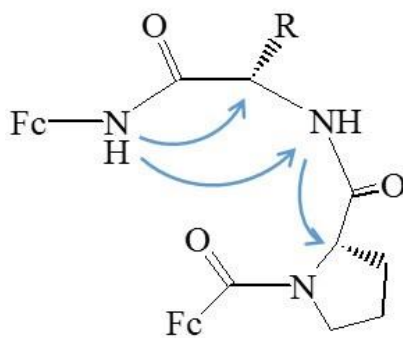


Slika 35. Titracijska krivulja **8**

Kako bismo dobili bolji uvid u konformacijski prostor peptida **8** istražili smo i NOE-kontakte između različitih skupina u njegovim 2D NMR-spektrima. S obzirom na primarnu strukturu peptidne sekvencije moguće, intramolekulskim vezama podržane, konformacije konjugata **8** su β - i γ -okreti. NOE-kontakte karakteristični za β -okret u kratkom peptidu su sekvencionalni $d_{NN}(i, i + 1)$ i $d_{\alpha N}(i, i + 1)$ (32). U NOESY spektru peptida **8** (Slika 36) vidljivi su NOE-kontakte: NH_{Fc}-NH_{Ala}, NH_{Fc}-CH _{α} Ala i NH_{Ala}-CH _{α} Pro. Navedeni kontakte, prikazani na Slici 37, podržavaju konformaciju β -okreta, za razliku od γ -okreta koji bi uslijed svojih geometrijskih parametara rezultirao slabim NH_{Fc}-NH_{Ala} i jakim NH_{Fc}-CH _{α} Ala signalom (11).



Slika 36. NOESY spektar peptida **8** (NOE-kontakti karakteristični za β -okret označeni su kvadratićima)



Slika 37. NOE-kontakti u peptidu **8**

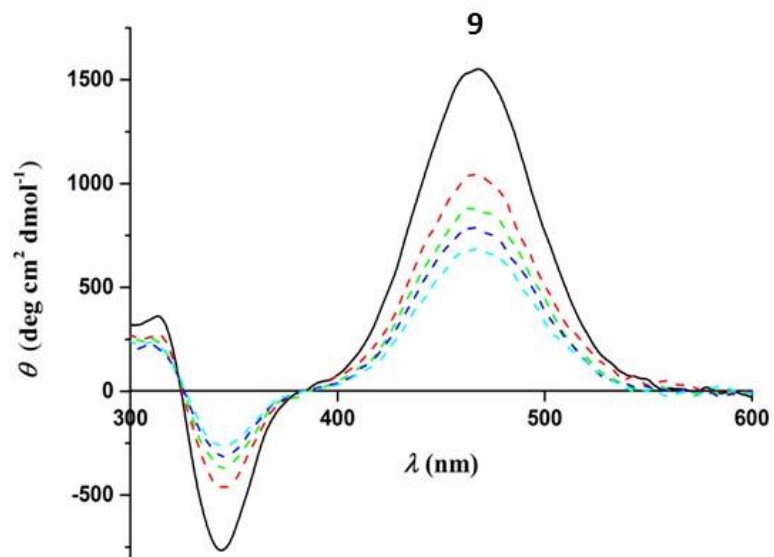
4.3.3. CD-spektroskopija

Imajući u vidu rezultate IR- i NMR-spektroskopije (koji ukazuju na mogućnost postojanja intramolekulskih vodikovih veza), odlučili smo ispitati kiralno uređenje enantiomernih **8** i **9** CD-spektroskopskom analizom. U UV/Vis-spektrima derivata **9** uočene su karakteristične apsorpcijske vrpce ferocenskog kromofora pri 447 nm u CH₂Cl₂, čiji se položaj ne mijenja dodatkom DMSO (Tablica 4).

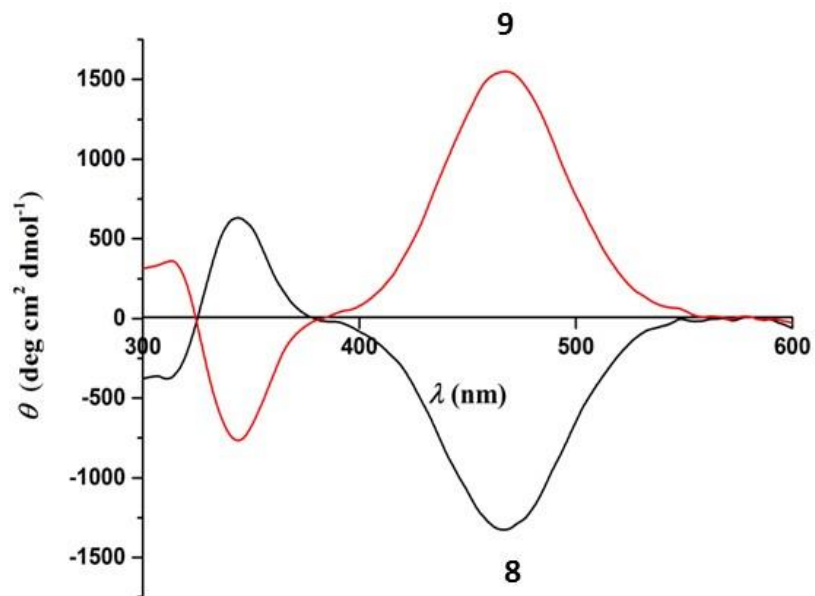
Tablica 4. UV/Vis-signal i CD-vrpce ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ M) **9** u CH₂Cl₂ i CH₂Cl₂/DMSO

	otapalo	9
λ_{\max}/nm ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	CH ₂ Cl ₂	447 (731)
	CH ₂ Cl ₂ /DMSO (vol% = 9%)	447 (715)
	CH ₂ Cl ₂ /DMSO (vol% = 17%)	447 (730)
	CH ₂ Cl ₂ /DMSO (vol% = 23%)	447 (691)
	CH ₂ Cl ₂ /DMSO (vol% = 29%)	447 (684)
λ_{\max}/nm ($\theta/\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$)	CH ₂ Cl ₂	469 (1556)
	CH ₂ Cl ₂ /DMSO (vol% = 9%)	464 (1052)
	CH ₂ Cl ₂ /DMSO (vol% = 17%)	464 (891)
	CH ₂ Cl ₂ /DMSO (vol% = 23%)	465 (794)
	CH ₂ Cl ₂ /DMSO (vol% = 29%)	467 (695)

U blizini apsorpcijskog maksimuma ferocenskog kromofora ($\lambda_{\max} = 464\text{-}470$ nm) CD-spektar dipeptida **9**, prikazan na Slici 38, pokazuje pozitivan Cottonov efekt srednjeg intenziteta ($M_{\theta} = 1556 \text{ deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$). U CD-spekttru **8**, koji je konformacijski enantiomer od **9**, očekivano se javlja signal jednakog intenziteta ali suprotnog predznaka (Slika 39). Imajući u vidu rezultate NMR- i IR-analize intenzitet ovih CD-signala ukazuje na kiralno uređene, vodikovim vezama podržane strukture u blizini ferocenskog kromofora, budući da u CD-spektrima ferocenskih peptida središnja kiralnost konstituirajućih aminokiselina ne rezultira opažanjem značajnih CD- vrpca ($M_{\theta} < 500 \text{ deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) (27, 33, 34). Porijeklo Cottonova efekta, kao i jakost vodikovih veza koje uzrokuju tvorbu kiralno uređenih struktura dodatno je ispitana titracijom s kompeticijskim otapalom (9- 29 % DMSO). Redukcija intenziteta Cottonovog efekta peptida **9** za 55 % ukazuje na vodikove veze srednje jakosti.

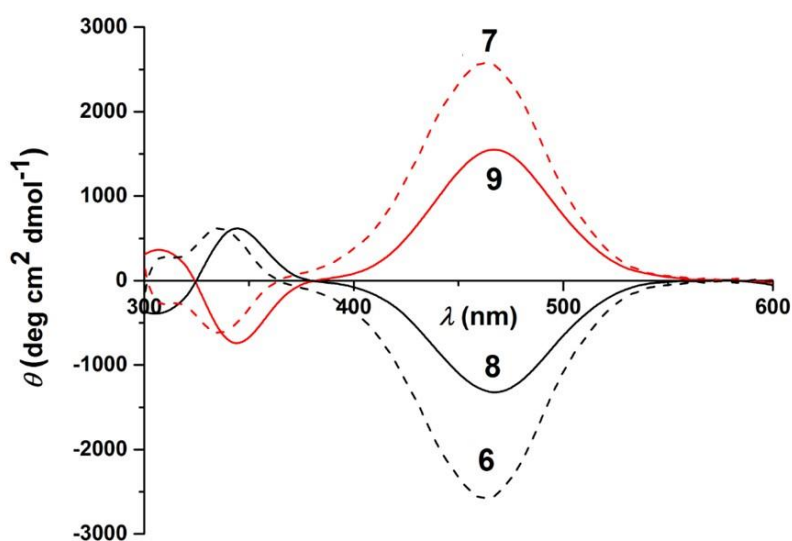


Slika 38. CD-spektri peptida **9** u CH_2Cl_2 [$c = 1 \cdot 10^{-3}$ M, (puna linija)] i uz dodatak 9-29 % DMSO (isprekidane linije)



Slika 39. CD-spektri konformacijskih enantiomera **8** (Fc-CO-L-Pro-L-Ala-NH-Fc) i **9** (Fc-CO-D-Pro-D-Ala-NH-Fc)

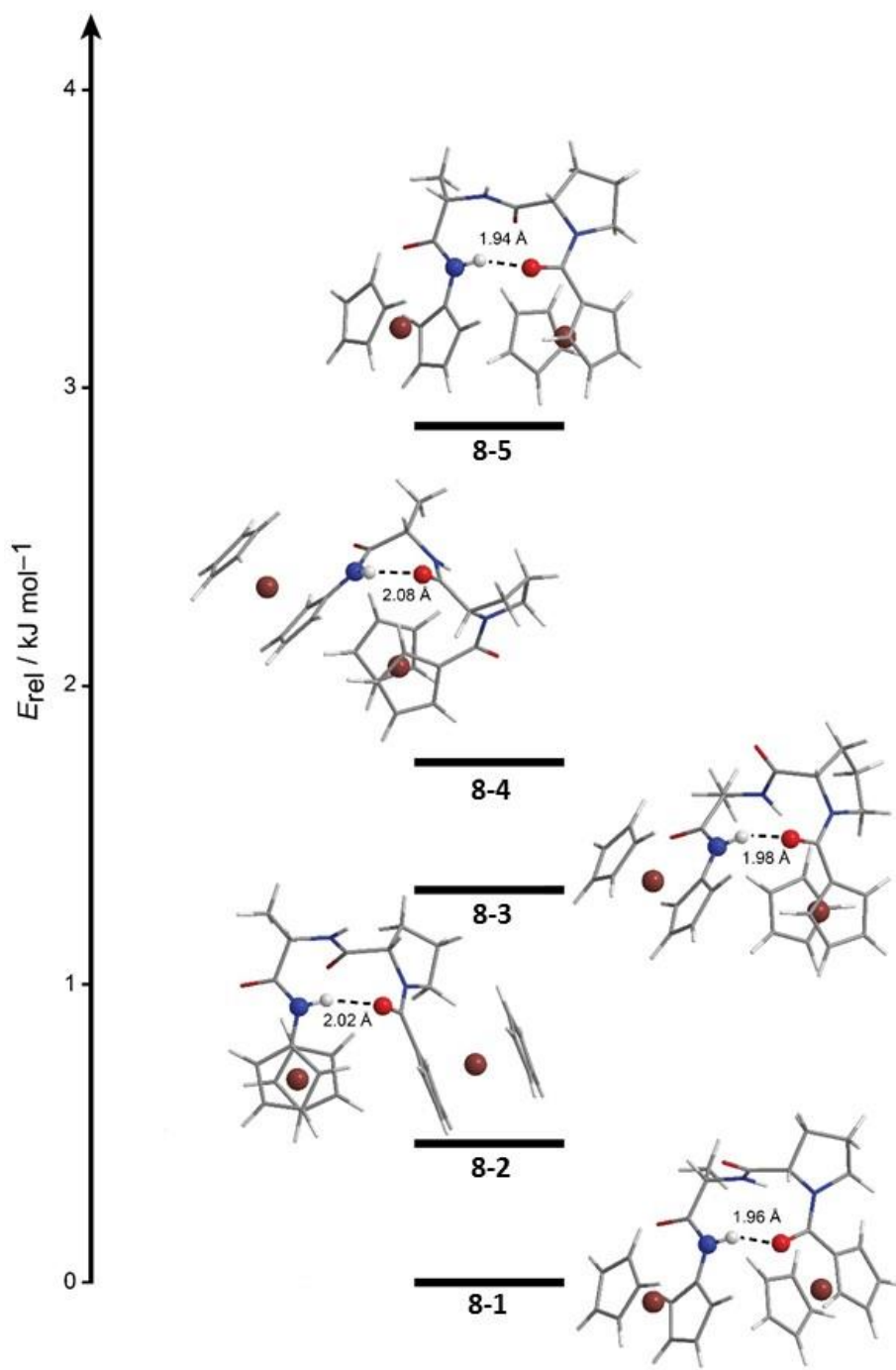
Također, proveli smo usporedbu CD-spektara mono-ferocenskih prekursora **6** i **7** i ciljnih bis-ferocenskih derivata kako bi ispitali utjecaj umetanja dodatne organometalne podjedinice na njihova kirooptičkih svojstva. Kao što je vidljivo na Slici 40., uvođenje ferocenske jezgre na *N*-terminus peptida **7** ($M_{\theta} = 2571 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$), odnosno **6** ($M_{\theta} = -2571 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$), uzrokovalo je 40 %-tno smanjenje signala, ali ne i promjenu predznaka Cottonova efekta u CD-spektrima rezultirajućih bis-ferocenskih peptida **9** i **8**.



Slika 40. Usporedba CD-spektara mono- (**6** i **7**) i iz njih izvedenih bis-ferocenskih peptida (**8** i **9**)

4.3.4. DFT-račun

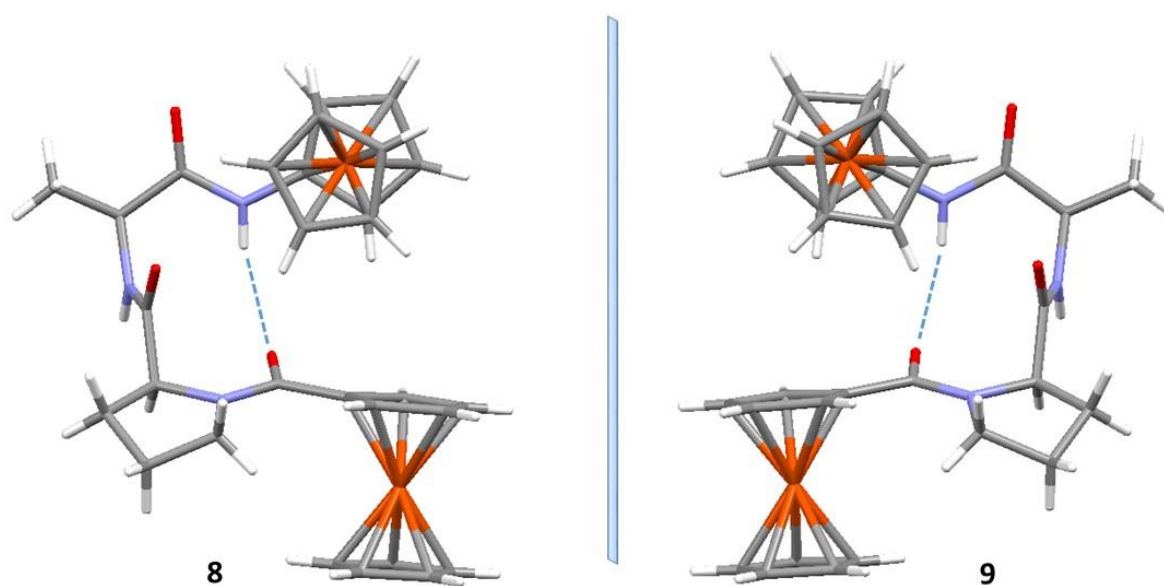
Kako bi se odredile najstabilnije konformacije bis-ferocenskih peptida u otopini provedeno je molekulsko modeliranje derivata **8** pomoću teorije funkcionala gustoće (DFT, Density Functional Theory). Konformacije dobivene optimizacijom struktura stabiliziranih intramolekulskim vodikovim vezama na razini MO6 i MO6-2X u klorformu prikazane su na Slici 41. U četirima, energijski bliskim, konformerima (**8-1**, **8-2**, **8-3** i **8-5**) nađena je intramolekulska vodikova veza između NH skupine izravno vezane na ferocen i uretanskog karbonila koja zatvara 10-člani prsten. 7-člani prsten, podržan vodikovom vezom između karbonilne skupine prolina i NH_{Fc} , detekriran je u jednom od konformera (**8-4**).



Slika 41. Konformacije **8** optimizirane MO6/6-31G(d) funkcionalom u CHCl_3

4.3.5. Kristalografska analiza

Rendgenskom strukturnom analizom peptida **8** i **9** nađena je intramolekulska vodikova veza $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{CO}_{\text{Fn}}$ (udaljenost $\text{N-H} \cdots \text{O}$ iznosi 2,29 Å) koja zatvara 10-člani prsten (β -okret tipa II). Iz ORTEP-dijagrama konformacijskih enantiomera **8** i **9** vidljivo je kako enantiomerni β -okreti induciraju suprotno usmjere uzvojnice (M-**8** i P-**9**). Nadalje, u čvrstom se stanju nađene intermolekulske vodikove veze između karbonilnih i amino skupina alanina susjednih molekula.



Slika 42. Molekulske strukture konformacijskih enantiomera Fc-CO-L-Pro-L-Ala-NH-Fc (**8**) i Fc-CO-D-Pro-D-Ala-NH-Fc (**9**) u čvrstom stanju

5. ZAKLJUČCI

1. Imajući u vidu da konjugati ferocena i kratkih peptidnih sekvencija mogu tvoriti uređene sekundarne strukturne elemente u prvom dijelu diplomskog rada pripremljeni su bis-ferocenski dipeptidi Fc-CO-L-Pro-L-Ala-NH-Fc (**8**) i Fc-CO-D-Pro-D-Ala-NH-Fc (**9**):
 - Ključni prekursor u sintezi ferocenskih peptida **3** pripremljen je u 45%-tnom iskorištenju Curtiusovom pregradnjom azida **2** dobivenog (43%) iz ferocenkarboksilne kiseline (**1**)
 - Kopulacijom HOBt/EDC-postupkom aktivirane Boc-AA-OH (AA = L-Ala, D-Ala) i deprotektiranog Boc-NH-Fc (**3**) pripremljeni su ferocenski amidi **4** (84%) i **5** (77%)
 - Deprotekcijom amino-skupine amida **4** i **5** i kondenzacijom s aktiviranom Boc-AA-OH (AA = L-Pro, D-Pro) pripremljeni su u 72% i 88%-tnom iskorištenju dipeptidi **6** i **7**
 - Ciljni derivati **8** i **9** pripremljeni su kopulacijom deprotektiranih **6** i **7** i aktivirane ferocenkarboksilne kiseline (**1**) (HOBt/EDC-postupak) uz iskorištenja 44 i 47%.
2. U drugom dijelu diplomskog rada načinjena je konformacijska analiza ciljnih biokonjugata s pomoću IR-, CD-, 2D i ¹H-NMR-spektroskopije, kristalografske analize te računalnih postupaka. Analizom **8** i njegovog enantiomera **9** utvrđeno je sljedeće:
 - U IR-spektrima opažene su apsorpcijske vrpce asociranih NH skupina što ukazuje kako su u razrijeđenim otopinama konjugata **8** i **9** prisutne konformacije stabilizirane intramolekulskim vodikovim vezama.
 - Kemijski pomaci protona NH-skupine izravno vezane na ferocen pri postupnom razrjeđivanju otopina oba derivata u CDCl₃ ne mijenjaju se i javljaju pri $\delta > 8$ ppm što indicira njihovo sudjelovanje u intramolekulskim vodikovim vezama. Suprotno tomu, NH-skupine iz alaninskih podjedinica, registrirane pri višem polju ($\delta < 7$ ppm), nisu donori vodikove veze.
 - Intramolekulski karakter veze u kojoj sudjeluje NH_{Fc} skupina dodatno je potvrđen mjerenjem temperaturno-ovisnih NMR spektara **8**. Za razliku od malog temperaturnog koeficijenta ($\Delta\delta/\Delta T = 2,1$ ppb K⁻¹) otapalu izložene NH_{Ala} skupine, temperaturna ovisnost kemijskog pomaka NH_{Fc} skupine znatno je veća ($\Delta\delta/\Delta T = -6,1$ ppb K⁻¹) što ukazuje na zaklonjenost od otapala, uslijed sudjelovanja u vodikovoj vezi.
 - Titracijom otopine **8** s DMSO kemijski pomak NH_{Fc} skupine promijenio se za manje od 1 ppm što je indicacija sudjelovanja ove skupine u jakoj intramolekulskoj vodikovoj vezi.

- Računalnim modeliranjem pronađene su najstabilnije konformacije enantiomernih peptida **8** i **9**. U četiri od pet energijski bliskih konformera uspostavlja se vodikova veza između NH_{Fc} skupine i uretanske karbonilne funkcije koja zatvara 10-člani prsten.
 - U NOESY spektrima **8** uočeni su sekvencionalni dNN ($i, i + 1$) i $\text{d}\alpha\text{N}$ ($i, i + 1$) NOE-kontakti karakteristični za β -okret što potvrđuje nalaze molekuskog modeliranja.
 - U kristalnim strukturama **8** i **9** pronađen je β -okret tipa II.
 - Prisutnost kiralnog uređenja, odnosno β -okreta u okolini ferocenskog kromofora **8** i **9** potkrijepljena je opažanjem značajnih CD-vrpca ($M_{\theta} \sim 1400 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) u blizini apsorpcijskog maksimuma ferocena. Redukcija intenziteta Cottonovog efekta peptida **9** uslijed dodatka DMSO nedvojbeno dokazuje kako signali u CD-spektrima proizlaze iz prijenosa kiralne informacije iz vodikovim vezama podržane lokalne sekundarne strukture do akiralnog ferocenskog kromofora.
3. Zaključci proizašli iz istraživanja utjecaj umetanja dodatne organometalne podjedinice na konformaciju i kirooptička svojstva homokiralnih peptida Boc-Pro-Ala-NH-Fc su sljedeći:
- Uvođenje ferocena na *N*-terminus homokiralnog peptida Boc-D-Pro-D-Ala-NH-Fc (**7**) nije narušilo strukturu β -okreta u rezultirajućem Fc-D-Pro-D-Ala-NH-Fc (**9**), ali je uzrokovalo 40 %-tno smanjenje pozitivnog signala u njegovom CD-spektru.

6. LITERATURA

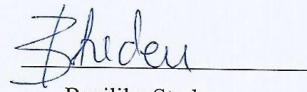
-
1. Stryer, L. (1991) Biokemija, 2. izd. (preveli Vuk-Pavlović, S. i sur.) Školska knjiga, Zagreb.
 2. Moriuchi, T., Hirao, T. (2012) Dipeptide-induced chirality organization. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **74**, 23-40.
 3. Van Staveren, D. R., Metzler-Nolte, N. (2004) Bioorganometallic chemistry of ferrocene. *Chem. Rev.* **104**, 5931-5985.
 4. Barišić, L., Dropučić, M., Rapić, V., Pritzkow, H., Kirin, S. I., Metzler-Nolte, N. (2004) The first oligopeptide derivative of 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid shows helical chirality with antiparallel strands. *Chem. Commun.* 2004-2005.
 5. Barišić, L., Čakić, M., Mahmoud, K. A., Liu, Y., Kraatz, H.-B., Pritzkow, H., Kirin, S. I., Metzler-Nolte, N., Rapić, V. (2006) Helically chiral ferrocene peptides containing 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid subunits as turn inducers. *Chem. Eur. J.* **12**, 4965-4980.
 6. Čakić Semenčić, M., Siebler, D., Heinze, K., Rapić, V. (2009) Bis- and trisamides derived from 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid and alpha-amino acids: synthesis and conformational analysis. *Organometallics* **28**, 2028-2037.
 7. Chowdhury, S., Mahmoud, K. A., Schatte, G., Kraatz, H.-B. (2005) Amino acid conjugates of 1,1'-diaminoferrocene. Synthesis and chiral organization. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 3018-3023.
 8. Kovačević, M., Kodrin, I., Cetina, M., Kmetič, I., Murati, T., Čakić Semenčić, M., Roca, S., Barišić, L. (2015) The conjugates of ferrocene-1,1'-diamine and amino acids. A novel synthetic approach and conformational analysis. *Dalton Trans.* **44**, 16405-16420.
 9. Kovač, V., Čakić Semenčić, M., Kodrin, I., Roca, S., Rapić, V. (2013) Ferrocene-dipeptide conjugates derived from aminoferrocene and 1-acetyl-1'-aminoferrocene: synthesis and conformational studies. *Tetrahedron* **69**, 10497-10506.
 10. Moriuchi, T., Hirao, T. (2006) Ferrocene-peptide bioconjugates. *Top Organomet. Chem.* **17**, 143-175.
 11. Čakić Semenčić, M., Kodrin, I., Barišić, L., Nuskol, M., Meden, A. (2017) Synthesis and conformational study of monosubstituted aminoferrocene-based peptides bearing homo- and heterochiral Pro-Ala sequences. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2**, 306-317.
 12. The University of Maine (2009) <<http://chemistry.umeche.maine.edu/MAT500/Proteins2>>

-
- html> Pristupljeno 12. lipnja 2017.
13. Hutchinson, G., Thornton, J.M. (1994) A revised set of potentials for β -turn formation in proteins. *Protein Science* **3**, 2207-2216.
 14. Venkatachalam, C.M. (1968) Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units. *Biopolymers* **6**, 1425–1436.
 15. Jerić, I. (2004) Peptidni mimetici: zašto i kako? *Kem. Ind.* **53**, 495—504.
 16. Nomoto, A., Moriuchi, T., Yamazaki, S., Ogawa, A., Hirao, T. (1998) A highly ordered ferrocene system regulated by podand peptide chains. *Chem. Commun.* 1963–1964.
 17. Moriuchi, T., Nomoto, A., Yoshida, K., Hirao, T. (1999) Characterization of ferrocene derivatives bearing podand dipeptide chains (-l-Ala-l-Pro-OR). *J. Organomet. Chem.* **589**, 50–58.
 18. Moriuchi, T., Nomoto, A., Yoshida, K., Hirao, T. (2001) Intramolecular Conformational Control in Ferrocenes Bearing Podand Dipeptide Chains. *Organometallics* **20**, 1008–1013.
 19. Moriuchi, T., Nomoto, A., Yoshida, K., Ogawa, A., Hirao, T. (2001) Chirality organization of ferrocenes bearing podand dipeptide chains: synthesis and structural characterization. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 68–75.
 20. Xu, Y., Saweczko, P., Kraatz, H.-B. (2001) 1,1'-Ferrocenoyl-oligoproline. A synthetic, structural and electrochemical study. *J. Organomet. Chem.* **637-639**, 335–342.
 21. Kraatz, H.-B., Galka, M. (2001) Ferrocenoyl amino acids and peptides: probing peptide structure. *Met. Ions Biol. Syst.* **38**, 385–409.
 22. G. Jaouen (2006) *Bioorganometallics: Biomolecules, Labelling, Medicine*, Wiley-VCH, Weinheim.
 23. Moriuchi, T., Nagai, T., Hirao, T. (2005) Chirality organization of ferrocenes bearing dipeptide chains of heterochiral sequence. *Org. Lett.* **7**, 5265-5268.
 24. Afrasiabi, R., Kraatz, H.-B. (2013) Stimuli-responsive supramolecular gelation in ferrocene-peptide conjugates. *Chem. Eur. J.* **19**, 17296-17300.
 25. Kraatz, H.-B., Leek, D. M., Houmam, A., Enright, G. D., Luszyk, J., Wayner, D. D. M. (1999) The ferrocene moiety as a structural probe: redox and structural properties of ferrocenoyl-oligoproline Fc-Pro_n-OBzl (n = 1-4) and Fc-Pro₂-Phe-Obzl. *J. Organomet. Chem.* **589**, 38-49.
 26. Moriuchi, T., Fujiwara, T., Hirao, T. (2009) β -Turn-structure-assembled palladium complexes by complexation-induced self-organization of ferrocene-dipeptide conjugates. *Dalton Trans.* 4286-4288.

-
27. Jios, J. L., Kirin, S. I., Buceta, N. N., Weyhmuller, T., Della Vedova, C. O., Metzler Nolte, N. (2007) Synthesis and structural characterization of metallated bioconjugates: C-terminal labeling of amino acids with aminoferrocene. *J. Organomet. Chem.* **692**, 4209-4214.
28. Moriuchi, T., Yoshida, K., Hirao, T. (2001) Structural characterization and complexation behavior of ferrocene bearing dipeptide chain (-L-Ala-L-Pro-NHPy). *J. Organomet. Chem.* **75**, 637-639.
29. Smith, J. A., Pease, L. G. (1980) Reverse turns in peptides and proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **8**, 315-399.
30. Kovačević, M., Molčanov, K., Radošević, K., Gaurina Srček, V., Roca, S., Čače, A., Barišić, L. (2014) Conjugates of 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid and proline: synthesis, conformational analysis and biological evaluation. *Molecules* **19**, 12852-12880.
31. Curran, T. P., Marques, K. A., Silva, M. V. (2005) Bis(amino acid) derivatives of 1,4-diamino-2-butyne that adopt a C₂-symmetric turn conformation. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 4134-4138.
32. Wuthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York.
33. Moriuchi, T., Kikushima-Honda, N., Ohmura, S. D., Hirao, T. (2010) Design and characterization of ferrocene-peptide-oligoaniline conjugates. *Tetrahedron Lett.* **51**, 4530-4533.
34. Lapić, J., Djaković, S., Kodrin, I., Mihalić, Z., Cetina, M., Rapić, V. (2010) Preparation and Conformation Analysis of N-(Ferrocenoyl)dipeptide Esters and Their 1'-Acetyl Derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* 2512-2524.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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


Bosiljka Studen