

Sinteza i strukturna karakterizacija konjugata metil 1-aminoferočen-1-karboksilata i dipeptida prolil-alanina

Šimunović, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:569644>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Lucija Šimunović
7809/PT

SINTEZA I STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA
KONJUGATÂ METIL 1'-AMINOFEROCEN-1-
KARBOKSILATA I DIPEPTIDA PROLIL-ALANINA

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Organska kemija

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Barišić

Zagreb, 2022.



Ovaj rad izrađen je u sklopu HRZZ projekta IP-2020-02-9162

"Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija"

čija je voditeljica prof. dr. sc. Lidija Barišić.

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

Sinteza i strukturna karakterizacija konjugatâ metil 1'-aminoferocen-1-karboksilata i dipeptida prolil-alanina Lucija Šimunović, 7809/PT

Sažetak:

Peptidomimetici u odnosu na prirodne peptide formiraju rigidniju strukturu i daleko su konformacijski i proteolitički stabilniji, što im omogućuje primjenu u dizajnu i sintezi lijekova i biološki aktivnih spojeva. „Zaključavanje“ peptidomimetika u stabilnu bioaktivnu konformaciju α -uzvojnice, β -ploče ili okreta smanjuje mogućnost interakcija s neželjenim receptorima u ljudskom organizmu umanjujući tako vjerojatnost nuspojava koje se nerijetko javljaju kod peptidnih lijekova. Budući da peptidomimetici preko svojih „hot-spot“ regija stupaju u interakcije s receptorima zahvaljujući komplementarnosti njihovih 3D struktura, njihov se dizajn zasniva na oponašanju sekundarnih strukturnih elemenata prisutnih u „hot-spot“ regijama. Poznati začetnik okretâ, metil 1'-aminoferocen-1-karboksilat, u ovom je završnom radu primjenom EDC/ HOBt metode kopuliran s homo- i/ili heterokiralnim Pro-Ala dipeptidima, a struktura nastalih biokonjugata **3-6** potvrđena je IR- i NMR-spektroskopijom.

Ključne riječi: ferocen, peptidi, strukturna karakterizacija, IR, NMR

Rad sadrži: 21 stranicu, 11 slika, 2 tablice, 14 literaturnih navoda, 12 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Barišić

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Monika Kovačević

Datum obrane: 16. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University Undergraduate Study Food Technology

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Synthesis and structural characterization of methyl 1'-aminoferrocene-1-carboxylate conjugates with prolyl-alanine dipeptide

Lucija Šimunović, 7809/PT

Abstract:

Compared to the natural peptide, peptidomimetics form a rigid structure and are much more stable in terms of conformational flexibility and proteolytic activity, which allows their use in the design and synthesis of drugs and biologically active compounds. "Locking" peptidomimetics into a stable bioactive conformation of α -helix, β -sheet or turn reduces the possibility of interaction with undesired receptors in the human body, thereby reducing the likelihood of side effects that are common with peptide drugs. Since peptidomimetics interact with receptors through their "hot-spot" regions thanks to the complementarity of their 3D structure, their design is based on mimicking the secondary structural elements present in the "hot-spot" regions. The well-described turn inducer, methyl 1'-aminoferrocene-1-carboxylate, was coupled with homo- and/or heterochiral Pro-Ala dipeptides using the EDC/ HOBt method, and the structure of the resulting bioconjugates **3-6** was determined by IR and NMR spectroscopy.

Keywords: ferrocene, peptides, structural characterization, IR, NMR

Thesis contains: 21 pages, 11 figures, 2 tables, 14 references, 12 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Lidija Barišić, PhD, Full Professor

Technical support and assistance: Monika Kovačević, PhD, Assistant Professor

Thesis defended: September 16, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PROTEINI I PEPTIDOMIMETICI.....	2
2.2. BIOORGANOMETALNA KEMIJA.....	4
2.2.1. FEROCENSKI BOKONJUGATI.....	4
3. EKSPERIMENTALNI DIO	6
3.1. MATERIJALI I METODE.....	6
3.2. POSTUPAK PRIPRAVE FEROCENSKIH PEPTIDA.....	7
3.2.1. POSTUPAK PRIPRAVE BOC-L-ALA-NH-FN-COOME (2).....	9
3.2.2. POSTUPAK PRIPRAVE BOC-D-PRO-L-ALA-NH-FN-COOME (3) I BOC-L-PRO-L-ALA-NH-FN-COOME (5).....	10
3.2.3. POSTUPAK PRIPRAVE AC-D-PRO-L-ALA-NH-FN-COOME (4) I AC-L-PRO-L-ALA-NH-FN-COOME (6).....	11
4. REZULTATI I RASPRAVA	12
4.1. REZULTATI.....	12
4.1.1. IR-SPEKTROSKOPIJA.....	15
4.1.2. NMR-SPEKTROSKOPIJA.....	16
5. ZAKLJUČCI	21
6. POPIS LITERATURE	22

PRILOZI

1. UVOD

Razumijevanje koncepta i namjene peptidomimetike započinje od razumijevanja strukture i funkcije proteina. U tu svrhu potrebno je napraviti korak unatrag i krenuti od njihovih osnovnih karakteristika i zadaća u živim organizmima. Proteini su osnovni i najvažniji makromolekulski sustavi u živom svijetu. Osim građevne uloge, najbitnije funkcije su im sudjelovanje u biosintetskim putevima, katalizi kemijskih reakcija, prijenosu informacija te održavanju stanične homeostaze.

Nabiranje proteina i peptida u uređene 3D-strukture komplementarne strukturama receptora i/ili liganda temelj je njihove funkcionalnosti. Znajući da sudjeluju u mnoštvu iznimno bitnih reakcija u ljudskom organizmu, razmatrani su i testirani kao potencijalni kandidati za lijekove. Međutim, primjena peptida u terapijske svrhe nailazi na zapreke uslijed njihove konformacijske fleksibilnosti i proteolitičke nestabilnosti. Posljedica konformacijske fleksibilnosti je zauzimanje brojnih različitih konformacija koje mogu biti komplementarne neželjenim receptorima (što će uzrokovati neželjene nuspojave) ili veznim mjestima proteolitičkih enzima (uslijed čega dolazi do hidrolize na manje, inaktivne fragmente).

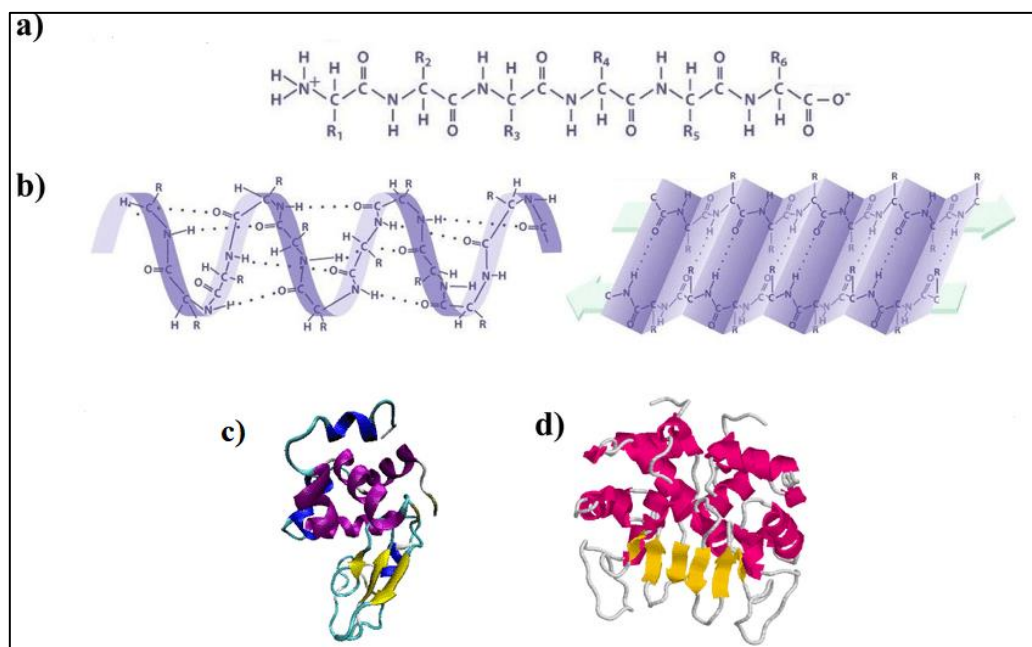
Da bi se prevladale spomenute zapreke, peptidi se podvrgavaju strukturnim modifikacijama čiji je cilj ograničiti konformacijsku fleksibilnost i zaključati strukturu u željenoj bioaktivnoj konformaciji. Rezultat takvih modifikacija su peptidomimetici, proteinske ili neproteinske molekule pomoću kojih se oponašaju elementi prirodnih peptidnih struktura koji su ključni za molekulsko prepoznavanje, a pri čemu se zadržava ili čak poboljšava njihova biološka aktivnost.

U ovom će radu biti opisana sinteza i strukturna karakterizacija ferocenskih peptidomimetika **3–6** sačinjenih iz metil 1'-aminoferocen-1-karboksilata kao začetnika okretâ te homo i heterokiralnih Pro-Ala dipeptida.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Proteini i peptidomimetici

Proteini su polimeri građeni od niza aminokiselina koje su međusobno povezane peptidnom vezom [slika 1(a)]. Pri sintezi se spontano nabiru u specifičnu trodimenzijsku strukturu koja je ponajviše diktirana primarnom strukturom tj. redoslijedom aminokiselinskih ostataka. Kao posljedica tvorbe vodikovih veza između C=O i N-H skupina iz okosnice slažu se u pravilne sekundarne ponavljajuće strukture poput α -uzvojnica, β -nabrane ploče i okreta [slika 1(b)]. S obzirom da svaka od 20 proteinogenih aminokiselina (osim glicina) ima bočne ogranke koji se razlikuju po obliku, naboju, hidrofobnosti i reaktivnosti, između udaljenih dijelova okosnice ostvaruju se hidrofobne interakcije, vodikove veze, disulfidni mostovi i ionske veze što omogućava uspostavu tercijarne strukture kao višeg elementa u proteinskoj arhitekturi [slika 1(c)]. Pojedini peptidi dodatno se mogu povezati nekovalentnim vezama tvoreći kvaternu strukturu [slika 1(d)] gdje svaki pojedini polipeptidni lanac predstavlja jednu podjedinicu [1].



Slika 1. Strukture proteina: a) primarna struktura, b) sekundarna struktura [α -uzvojnica (lijevo), β -nabrana ploča (desno)], c) tercijarna struktura, d) kvaterna struktura [4].

Poznato je da su proteini makromolekule u kojima se, primjerice kod prosječnog eukariota, nalazi oko 470 aminokiselina [2]. Važno je, međutim, imati na umu da sve aminokiseline iz

proteina nemaju ulogu u njegovoj funkcionalnosti, odnosno ne sudjeluju sve aminokiseline u interakciji s ligandom i/ili receptorom. Uobičajeno je za uspostavljanje biološki esencijalnih protein-protein interakcija zaslužna „hot-spot“ regija, relativno malo područje kojem prosječna površina iznosi 1500-3000 Å [5]. Konformacijskom analizom može se utvrditi ne samo kemijska struktura „hot-spot“ odsječka, već i njegova konformacija temeljena na sekundarnim strukturnim elementima.

Slijedeće je pitanje što se može učiniti kako bi se stabilizirala sekundarna struktura proteina, zadržavajući pri tome biološku aktivnost. Odgovor je ciljana modifikacija njihove strukture što rezultira konformacijski i proteolitički stabilnim peptidomimeticima, oponašateljima ne samo bioaktivne konformacije već i biološke aktivnosti prirodnih peptida i proteina. U literaturi se peptidomimetici svrstavaju u četiri karakteristične kategorije [3]:

- I. *Klasa A (modificirani peptidi) – mimetici koji su vrlo slični parentalnom peptidu, formirani uz nekoliko alteracija u okosnici ili bočnim lancima.*
- II. *Klasa B (foldameri) – peptidi s raznim modifikacijama bočnih lanaca i okosnice uljučujući foldamere i peptoide koji se u prostoru orijentiraju vrlo slično prirodnom peptidu.*
- III. *Klasa C (strukturni mimetici) – visokomodificirane molekule koje potpuno zamjenjuju oblik okosnice, a supstituenti su orijentirani analogno prirodnom peptidu.*
Klasa D (mehanistički mimetici) – molekule koje oponašaju mehanizam djelovanja prirodnog peptida iako nemaju slične bočne ogranke kao ciljani protein.

Primarni zadatak peptidomimetike je strukturna modifikacija proteina i peptida kako bi izvršavali željene zadaće na jednostavniji način uz što manju mogućnost štetnih ishoda za organizam. Tom cilju pristupa se iz tri općenita smjera [3]:

- Lokalne modifikacije (npr. zamjena amidne veze esterskom, promjena individualnog aminokiselinskog ostatka, supstitucija dipeptida s drugim fragmentom),
- Oponašanje sekundarne strukture (α -uzvojnice, β -nabrane ploče ili okreta),
- Globalne promjene (prilagodba cjelokupne konformacije nekog peptida).

Tako su se za indukciju α -uzvojnice počeli pripremljati peptoidi (molekule u kojima je bočni ogranak s kiralnog C-atoma premješten na amidni dušik) i β -peptidi te ugrađivati kovalentne spojnice između dijelova peptidne okosnice kako bi se induciralo nabiranje u uzvojnici. Za tvorbu β -nabrane ploče koriste se makrociklički ili aromatski kalupi, a također se pripremljaju peptidne nanocijevi koje se međusobno povezuju vodikovim vezama. S druge strane, indukcija

okreta može se realizirati umetanjem malih molekulskih kalupa, poput prikladno funkcionaliziranih ferocena, u peptidnu okosnicu [5]. Naime, udaljenost od $\sim 3,3$ Å između dvaju ferocenskih ciklopentadienilnih prstenova koja odgovara dužini vodikove veze omogućava interakcije između aminokiselina i malih peptida vezanih na ferocenske prstenove pri čemu se najčešće tvore 10-člane strukture β -okreta [5,10].

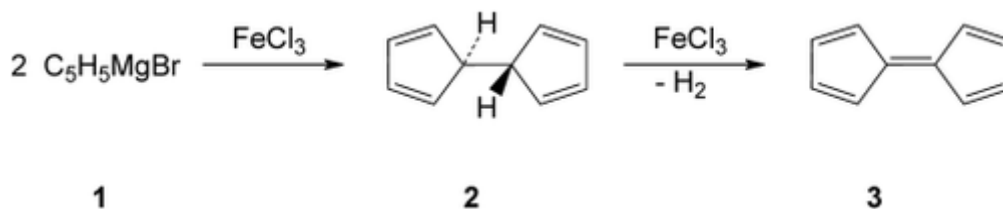
2.2. Bioorganometalna kemija

Propulzivni razvoj organometalne kemije, znanstvene discipline koja izučava spojeve u kojima je prisutna barem jedna veza između ugljika i metala, počinje još od spoznaje o enzimima koji sadrže metalne ione te imaju ključnu ulogu u pravilnoj funkciji organizma. Funkcija ljudskog organizma uvelike se bazira na reakcijama oksidacije i redukcije za transport tvari i prijenos energije u čemu najveću ulogu imaju metalni ioni. Atom metala potencijalno se može vezati sa 6 supstituenata što mu omogućuje postojanje u gotovo 30 različitih stereoizomera [6]. U većini organometalnih spojeva ugljik je s metalom povezan kovalentnom ili ionskom vezom, a nukleofilni karakter ugljikovog atoma iz organometalnog spoja omogućuje njegovu reakciju s elektrofilnim ugljikovim atomom iz organskih spojeva pri čemu nastaje nova C–C veza. Metali koji se u organizmima nalaze samo u tragovima poput cinka, nikla, bakra, molibdena ili željeza služe uglavnom za katalitičke reakcije. Najčešće su navedeni metali sastavni dio hidrogenaza, nitrogenaza, dehidrogenaza i metilaza koje zajedničkim imenom zovemo metaloenzimi [7].

Bioorganometalna kemija je relativno nova grana organometalne kemije kojoj je cilj modificirati biomolekule (peptide, ugljikohidrate, steroide, nukleozide itd.) s organometalnim izosterima kako bi se unaprijedila njihova biološka aktivnost.

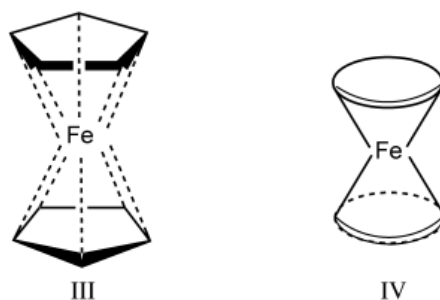
2.2.1 Ferocenski biokonjugati

Jedna od najviše istraživanih i najviše upotrebljivanih molekula u interdisciplinarnom području (bio)organometalne kemije je zasigurno ferocen. Sintetiziran je slučajno kada su Peter L. Pauson i Thomas J. Kealy sa fakulteta Duquesne u Pittsburghu pokušavali sintetizirati fulvalen ($C_{10}H_8$) za kojeg su vjerovali da će imati slična aromatska svojstva kao naftalen. Pri tom su Grignardov reagens, C_5H_5MgBr , tretirali s $FeCl_3$ kao oksidansom (slika 2).



Slika 2. Pretpostavka tijekom reakcije dobivanja fulvalena [8].

Rezultat navedene reakcije sbiliu narančasti kristali za koje se analizom utvrdila molekulska formula $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$. Fischer je zatim 1952. objavio rad u kojem predlaže sendvič-strukturu novonastale molekule, ferocena, gdje je atom željeza smješten tako da se svih 6 π -elektrona iz svakog prstena povezuju sa željezom što podrazumijeva da se atom mora nalaziti između njih (slika 3).



Slika 3. Prijedlozi za 3D-strukturu ferocena [8].

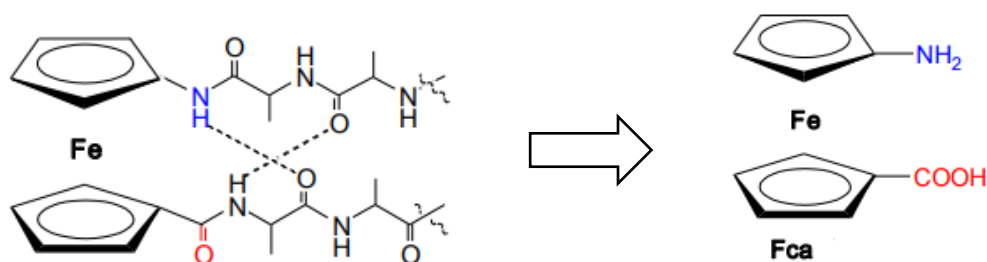
Daljnijim se istraživanjima utvrdilo da je ferocen topljiv u većini organskih otapala, iznimno stabilan u doticaju sa zrakom, vodom i jakim bazama te je otporan na temperature do $400\text{ }^\circ\text{C}$ [5].

Otkrićem ferocena započela je nova era moderne bioorganometalne kemije koja povezuje organsku kemiju s medicinom, biologijom i molekularnom biotehnologijom [9]. Njegova stabilnost, lipofilnost, niska toksičnost uz povoljna oksido-redukcijska svojstva i mogućnost tvorbe različitih derivata učinila ga je iznimno popularnim izborom za konjugiranje s biomolekulama te korištenje u terapijske svrhe.

Već se dugo vremena ferocen koristi u farmaceutskoj industriji tako da se kao izoster inkorporira u strukturu već postojećih lijekova povećavajući im učinkovitost. Ponajviše se koristi za liječenje raka, tumora i malarije, a pokazuje i dobra antifungalna svojstva. Primjerice, za liječenje malarije koristi se kombinacija nekoliko različitih lijekova, ali se zbog toga

povećava i vjerojatnost njihovog (potencijalno lošeg) međudjelovanja. Modifikacijom klorokina s ferocenskim fragmentom ne samo da je prevladana rezistencija na klorokin, već je postignuto i bolje djelovanje. Također hibridi ferocena s indolima, fenolima ili 1,2,4-trioksanom pokazuju jaka citotoksična svojstva prema tumorskim stanicama, osobito ferocetil-fenoli koji ciljano narušavaju mitohondrijski sustav tumorskih stanica [12].

U cilju realizacije Radnog plana HRZZ-projekta "*Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija*", u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu sintetiziraju se heteroanularno disupstituirani peptidni konjugati 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (**Fca**) kao kalupa za indukciju okreta (slika 4), kojima se određuje konformacija i testira biološka aktivnost.



Slika 4. Ferocenski peptidi pripremljeni iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (**Fca**) kao kalupa za indukciju okreta [11] (vodikove veze prikazane su crtkanim linijama).

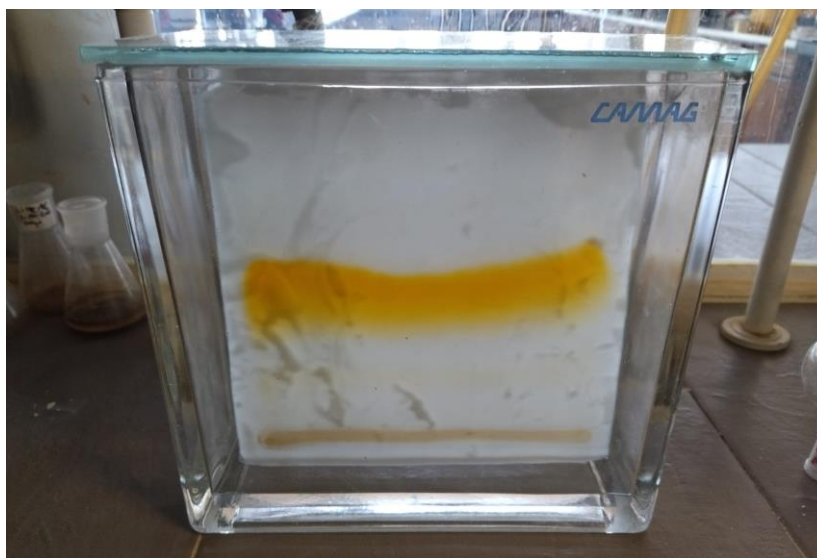
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

Sinteza ciljnih konjugata **3–6** provedena je s kemikalijama analitičke čistoće u atmosferi argona. Diklormetan (CH_2Cl_2) korišten za sintezu, tankoslojnu kromatografiju (TLC) i mjerenje infracrvenog spektra (IR) osušen je pomoću fosforovog pentoksida (P_2O_5), destiliran uz kalcijev hidrid (CaH_2) i skladišten na molekulskim sitima (4 \AA). Za sintezu konjugata **2**, **3** i **5** koriste se EDC (Acros Organics, Geel, Belgija) i HOBt (Aldrich, Santa Clara, CA, SAD), dok su Boc-D-Pro-OH i Boc-L-Pro-OH sintetizirani pomoću NaOH, dioksana i di-*tert*-butil dikarbonata. Peptidi **4** i **6** sintetizirani su Boc-deprotekcijom prekursora **3** i **5**, djelovanjem acetil-klorida (Aldrich, Santa Clara, CA, SAD).

Pročišćavanje peptida **3-6** izvodi se tankoslojnom kromatografijom na silikagelu

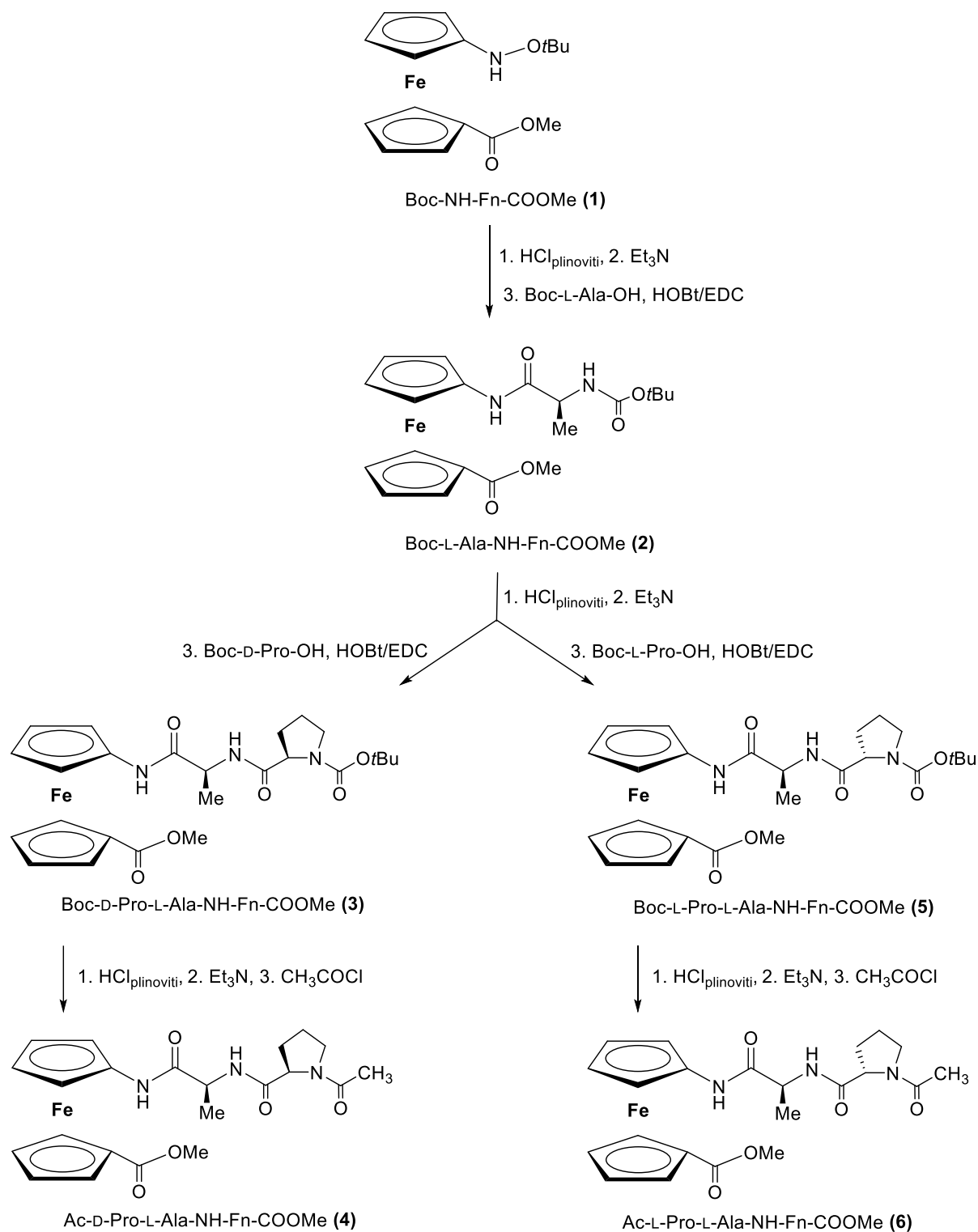
(„Merck“, Kieselgel 60 HF₂₅₄) uz etilacetat (EtOAc) kao eluens. Na dno ploče silikagela vodoravno se nanosi otopina peptida te stavlja u kadicu s etil-acetatom kao eluensom. Nakon što je etil-acetat eluirao do vrha, na sredini ploče se uočava horizontalna žuta fronta u kojoj se nalazi ciljani peptid (slika 5). Sloj silikagela koji sadrži opisanu frontu struganjem se skida s ploče, stavlja u sinter-lijevak te ispiru nekoliko puta s diklormetanom.



Slika 5. Tankoslojna kromatografija na silikagelu [autorski rad].

3.2. Postupak priprave ferocenskih peptida

Priprava ferocenskih peptida **3-6** započela je od prekursora Boc-NH-Fn-COOMe (Fca, **1**) i prikazana je na shemi 1 [11]. Sinteza navedenog prekursora **1** potrebnog za daljnje reakcije opisana je u literaturi [13].



Shema 1. Postupak priprave ferocenskih konjugata **3-6**.

3.2.1. Postupak pripreme Boc-L-Ala-NH-Fn-COOMe (2)

Prekursor Boc-NH-Fn-COOMe (1) (0,75 g, 2,9 mmol) otopi se u diklormetanu (10 mL) i izloži djelovanju plinovitog HCl kroz 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon što se TLC-om potvrdi da je Boc-deprotekcija provedena do kraja, otopina se upari do suha, a nastali hidroklorid ferocenske aminokiseline $\text{HCl} \times \text{NH}_2\text{-Fn-COOMe}$ (0,75 g, 2,9 mmol) suspendira se u 10 mL diklormetana i obradi uz suvišak trietilamina (pH~9) kako bi nastao slobodni amin pogodan za kopulaciju sa Boc-L-Ala-OH. Kopulacija se izvodi primjenom standardnog EDC/HOBt postupka: Boc-L-Ala-OH (0,66 g, 3,5 mmol) otopi se u diklormetanu, dodaje se slobodni amin $\text{NH}_2\text{-Fn-COOMe}$, te EDC (0,81 g, 4,2 mmol) i HOBt (0,57 g, 4,2 mmol) (tablica 1). U reakcijsku smjesu stavlja se magnetska miješalica, upuhuje argon i miješa oko 1 sat na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije prati se TLC-om.

Po završetku reakcije pristupa se obradi reakcijske smjese u lijevku za odjeljivanje u četiri koraka:

1. Ispiranje 5 %-tnom otopinom NaHCO_3 ,
2. Ispiranje 10 %-tnom otopinom limunske kiseline,
3. Ispiranje 5 %-tnom otopinom NaHCO_3 ,
4. Ispiranje zasićenom otopinom NaCl .

U Erlenmeyerovu tikvicu u kojoj se nalazi žličica bezvodnog Na_2SO_4 ispušta se donji organski sloj koji se kasnije prelijeva u tikvicu s okruglim dnom i uparava do suha u vakuum-uparivaču (slika 6). Nakon uparavanja dobiva se 1,14 g (94%) Boc-L-Ala-NH-Fn-COOMe (2) tamnosmeđe boje i uljaste konzistencije. Dobivena masa konjugata 2 dijeli se na dva jednaka dijela od kojih će jedan koristiti za kopulaciju s D-Pro (3,4), a drugi dio za kopulaciju s L-Pro (5,6).

Tablica 1. Molarni omjeri reagenasa za sintezu peptida 2.

Spoj	Masa(g)	Molarna masa (g mol^{-1})	Množina (mmol)	Molarni omjer
$\text{NH}_2\text{-Fn-COOMe}$	0,75	259,08	2,9	1
Boc-L-Ala-OH	0,66	189,21	3,5	1,2
EDC	0,81	191,7	4,2	1,44
HOBt	0,57	135,13	4,2	1,44



Slika 6. Uparavanje uzoraka u vakuum-uparivaču [autorski rad].

3.2.2. Postupak pripreme Boc-D-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (3) i Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (5)

U dvije tikvice okruglog dna izvaže se konjugat **2** (0,55 g, 1,39 mmol) te otapa u 10 mL diklormetana. Obje tikvice se dobro zatvore i miješaju 30 minuta pomoću magnetske mješalice uz dovod plinovitog HCl pri sobnoj temperaturi. Nakon završene Boc-deprotekcije, nastali hidrokloridi obrade se suviškom trietilamina te se dodaju Boc-D-Pro-OH (0,36 g, 1,67 mmol) odnosno Boc-L-Pro-OH (0,36 g, 1,67 mmol) prethodno aktivirani s HOBt (0,27 g, 2 mmol) i EDC (0,39 g, 2 mmol) i (tablica 2).

Dodatkom svih navedenih reaktanata i reagenasa, u prvoj tikvici započinje reakcija kopulacije Boc-D-Pro-OH s konjugatom **2** tvoreći peptid **3**, dok se u drugoj odvija kopulacija Boc-L-Pro-OH s konjugatom **2** dajući diastereomerni peptid **5**. Nakon 24 sata, reakcijske smjese se zatim podvrgavaju ispiranju u lijevku za odjeljivanje kako je opisano pod 3.2.1. te uparavanju u vakuum-uparivaču. Nakon uparavanja otopine iz prve tikvice dobije se 0,8 g

(89 %) Boc–D–Pro–L–Ala–NH–Fn–COOMe (**3**). Uparavanjem sadržaja druge tikvice dobiva se 0,7 g (92 %) Boc–L–Pro–L–Ala–NH–Fn–COOMe (**5**). Navedene se mase peptida **3** i **5** dijele na dva jednaka dijela od kojih se jedan pročišćava TLC-om na silikagelu za potrebu strukturne karakterizacije, dok se drugi koristi za sintezu peptida **4** odnosno **6**.

Tablica 2. Molarni omjeri reaktanata za pripravu peptida **3** i **5**.

Spoj	Masa (g)	Molarna masa (g mol ⁻¹)	Množina (mmol)	Molarni omjer
Boc–L–Ala–NH–Fn–COOMe (2)	0,55	393,84	1,39	1
Boc–D–Pro–OH ili Boc–L–Pro–OH	0,36	215,25	1,67	1,2
EDC	0,39	191,7	2,00	1,44
HOBt	0,27	135,13	2,00	1,44

3.2.3. Postupak priprave Ac–D–Pro–L–Ala–NH–Fn–COOMe (**4**) i

Ac–L–Pro–L–Ala–NH–Fn–COOMe (**6**)

U dvije tikvice s okruglim dnom izvažu se peptidi **3** (0,4 g, 0,7 mmol) i **5** (0,35 g, 0,6 mmol) te otope 5 mL diklormetana. Tikvice se zatim dobro zatvore i sadržaj se miješa oko 30 minuta pomoću magnetske miješalice uz tretiranje plinovitim HCl. Nakon provedbe reakcija, deprotektirani se uzorci upare do suha za korištenje u slijedećim reakcijama. U prvu trogrlu tikvicu uronjenu u led stavlja se magnetska mješalica i deprotektirani peptid **3** otopljen u 5 mL diklormetana i obrađen suviškom trietilamina. Uz konstantno miješanje polagano se dodaje 0,3 mL (4,32 mmol) acetil-klorida. U drugu trogrlu tikvicu stavlja se peptid **5** također otopljen u 5 mL diklormetana i obrađen suviškom trietilamina uz lagano dodavanje 0,27 mL (3,8 mmol) acetil-klorida. Nakon 15 minuta miješanja, TLC-om se potvrđuje pretvorba svih reaktanata u završni produkt, te se dodaje voda kako bi zaustavila reakciju. Smjese se zatim nekoliko puta ispiru zasićenom otopinom NaCl. Dobiveni organski sloj suši se dodatkom bezvodnog Na₂SO₄ i uparava do suha u vakuum-uparivaču. Sirovi peptidi **4** i **6** pročišćeni su tankoslojnom kromatografijom pri čemu su dobiveni narančasti kristali peptida **4** (60 %) odnosno **6** (64 %).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

Sintetiziranim peptidima **3-6** izmjereni su IR-spektri u diklormetanu i na kalijevom bromidu koristeći MB 100 mid-FTIR spektrometar (Bomem, Saint Jean Baptiste, Kanada). Signali IR-spektra označavaju se sa j (jako), sr (srednje) i sl (slabo). Jednodimenzijски (^1H ; ^{13}C) te dvodimenzijски (COSY) NMR-spektri snimljeni su u Centru za nuklearnu magnetsku rezonanciju Instituta Ruđer Bošković na Avance spektrometru (Bruker, Rheinstetten, Njemačka) uz tetrametilsilan kao unutarnji standard. Cijepanja signala na NMR-spektrima: s (singlet), d (dublet), t (triplet), q (kvartet), m (multiplet), dd (dublet dubleta), td (triplet dubleta), dq (dublet kvarteta). Za mjerenje tališta upotrebljava se Reichert Thermovar (Reichert, Beč, Austrija (tablice 3-6).

Tablica 3. Rezultati mjerenja za peptid **3**.

Boc-D-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (3)	
Rf-vrijednost	0,52 (EtOAc:CH ₂ Cl ₂ = 1:5)
Talište (t_i)	119,2 °C

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8.37 (s, 0.89H, NH_{Fn} *trans*), 7.70 (s, 0.11H, NH_{Fn} *cis*), 7.24 (d, *J* = 6.3 Hz, 0.89H, NH_{Ala} *trans*), 6.66 (d, 0.11H, NH_{Ala} *cis*), 5.09 (s, 1H, H-3), 4.81 (s, 2H, H-8), 4.72–4.69 (m, 2H, H-9, CH_{Ala}), 4.58 (s, 1H, H-4), 4.40 (s, 1H, H-7), 4.35 (s, 1H, H-10), 4.16 (s, 1H, CH-α (Pro)), 4.01 (s, 1H, H-2), 3.95 (s, 1H, H-5), 3.79 (s, 3H, COOMe), 3.53 (td, *J* = 10.3 Hz, 6,7 Hz, 1H, CH₂-δ (Pro)), 3.46 (s, 1H, CH₂-δ' (Pro)), 2.22–2.07 (m, 2H, CH₂-β, CH₂-β' (Pro)), 1.89–1.86 (m, 2H, CH₂-γ, CH₂-γ' (Pro)), 1.50 (s, 9H, (CH₃)₃ Boc), 1.48 (d, *J* = 7.30 Hz, 3H, CH₃ Ala).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 172.47 (CO_{Fn}), 172.10 (CO_{COOMe}), 170.89 (CO_{Ala}), 155.26 (CO_{Boc}), 96.31 (C-1, Fn), 80.37 (C_q Boc), 72.79 (C-7), 72.45 (C-10), 71.88 (C-6), 71.75 (C-8), 71.43 (C-9), 66.59 (C-2), 65.40 (C-5), 63.94 (C-4), 62.54 (C-3), 61.10 (C-α, Pro), 51.87 (CH₃ COOMe), 48.59 (CH_{Ala}), 47.53 (CH₂-δ, Pro), 29.87 (CH₂-β, Pro), 28.58 ((CH₃)₃ Boc), 24.96 (CH₂-γ, Pro), 17.56 (CH₃ Ala).

Tablica 4. Rezultati mjerenja za peptid **4**.

Ac-D-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (4)	
Rf-vrijednost	0,33 (EtOAc)
Talište (t_i)	132,3 °C

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8.58 (s, 1H, NH_{Fn}), 7.08 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, NH_{Ala}), 5.05 (s, 1H, H-3), 4.78 (s, 1H, H-8), 4.76 (s, 1H, H-9), 4.70 (s, 1H, H-4), 4.62 (dq, *J* = 8.5 Hz, 7.1 Hz, 1H, CH_{Ala}), 4.40 (s, 1H, H-7), 4.35 (s, 1H, H-10), 4.26 (dd, *J* = 7.7 Hz, 5,6 Hz, 1H, CH-α (Pro)), 3.98 (s, 1H, H-2), 3.95 (s, 1H, H-5), 3.77 (s, 3H, COOMe), 3.68 (td, *J* = 9.8 Hz, 6,9 Hz, 1H, CH₂-δ (Pro)), 3.55 (td, *J* = 9.8 Hz, 6,5 Hz, 1H, CH₂-δ' (Pro)), 2.28–2.23 (m, 1H, CH₂-γ Pro), 2.21–2.18 (m, 1H, CH₂-β (Pro)), 2.16 (s, 3H, CH₃ Ac), 2.15–2.11 (m, 1H, CH₂-β' (Pro)), 2.00–1.95 (s, 1H, CH₂-γ' (Pro)), 1.49 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃ Ala).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 172.08 (CO_{Ac}), 172.03 (CO_{COOMe}), 170.63 (CO_{Ala}), 170.31 (CO_{Fn}), 96.56 (C-1, Fn), 72.80 (C-7), 72.64 (C-10), 71.91 (C-6), 71.46 (C-8), 71.20 (C-9), 66.45 (C-2), 65.74 (C-5), 63.25 (C-4), 62.69 (C-3), 61.19 (C-α, Pro), 51.78 (CH₃ COOMe), 49.11 (CH_{Ala}), 48.66 (CH₂-δ, Pro), 29.23 (CH₂-β, Pro), 25.52 (CH₂-γ, Pro), 22.87 (CH₃ Ac), 17.55 (CH₃ Ala).

Tablica 5. Rezultati mjerenja za peptid 5.

Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (5)	
Rf-vrijednost	0,55 (EtOAc:CH ₂ Cl ₂ = 1:5)
Talište (t)	66,9 °C

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8.15 (s, 0.9H, NH_{Fn trans}), 7.74 (s, 0.1H, NH_{Fn cis}), 6.85 (d, *J* = 6.3 Hz, 0.9H, NH_{Ala trans}), 6.67 (d, 0.1H, NH_{Ala trans}), 4.81 (s, 1H, H-3), 4.76 (s, 2H, H-8, H-9), 4.60 (s, 1H, H-4), 4.48 (m, 1H, CH_{Ala}), 4.38 (s, 1H, H-7), 4.37 (s, 1H, H-10), 4.34 (s, 1H, CH-α (Pro)), 4.00 (s, 2H, H-2, H-5), 3.78 (s, 3H, COOMe), 3.50–3.45 (m, 2H, CH₂-δ, CH₂-δ' (Pro)), 2.22–2.16 (m, 2H, CH₂-β, CH₂-β' (Pro)), 1.92–1.91 (m, 2H, CH₂-γ, CH₂-γ' (Pro)), 1.49 (s, 9H, (CH₃)₃ Boc), 1.42 (d, *J* = 6.98 Hz, 3H, CH₃ Ala).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 172,35 (CO_{Fn}), 171.95 (CO_{COOMe}), 170.45 (CO_{Ala}), 156.34 (CO_{Boc}), 95.79 (C-1, Fn), 81.24 (C_q Boc), 73.08 (C-7), 72.97 (C-10), 71.90 (C-6), 71.41 (C-8), 71.08 (C-9), 66.56 (C-2), 66.39 (C-5), 63.15 (C-4), 62.71 (C-3), 60.97 (C-α, Pro), 51.70 (CH₃ COOMe), 49.74 (CH_{Ala}), 47.57 (CH₂-δ, Pro), 29.14 (CH₂-β, Pro), 28.54 ((CH₃)₃ Boc), 24.84 (CH₂-γ, Pro), 17.54 (CH₃ Ala).

Tablica 6. Rezultati mjerenja za peptid 6.

Ac-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (6)	
Rf-vrijednost	0,35 (EtOAc)
Talište (t)	125,1 °C

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7.99 (s, 0.95H, NH_{Fn trans}), 7.65 (s, 0.05H, NH_{Fn cis}), 7.22 (d, *J* = 7.1 Hz, 0.94H, NH_{Ala trans}), 6.86 (d, 0.06H, NH_{Ala cis}), 4.78 (s, 1H, H-8), 4.76 (s, 1H, H-3), 4.74 (s, 1H, H-9), 4.67 (s, 1H, H-4), 4.57 (m, 1H, CH-α (Pro)), 4.48 (dq, *J* = 8.4 Hz, 7,1 Hz, 1H, CH_{Ala}), 4.39 (s, 1H, H-7), 4.37 (s, 1H, H-10), 4.02 (s, 1H, H-2), 3.96 (s, 1H, H-5), 3.77 (s, 3H, COOMe), 3.67–3.64 (m, 1H, CH₂-δ, (Pro)), 3.52–3.50 (m, 1H, CH₂-δ' (Pro)), 2.32 (s, 1H, CH₂-γ, Pro), 2.18 (s, 3H, CH₃ Ac), 2.08–2.06 (m, 2H, CH₂-β, CH₂-β' (Pro)), 1.93 (s, 1H, CH₂-γ' (Pro)), 1.42 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃ Ala).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 171.82 (CO_{Ac}), 171.81 (CO_{COOMe}), 171.66 (CO_{Ala}), 170.28 (CO_{Fn}), 95.76 (C-1, Fn), 72.67 (C-7), 72.65 (C-10), 72.21 (C-6), 71.43 (C-8), 71.08 (C-9), 66.62 (C-2), 66.01 (C-5), 63.04 (C-4), 62.87 (C-3), 60.65 (C-α, Pro), 51.76 (CH₃ COOMe), 49.58 (CH_{Ala}), 48.67 (CH₂-δ, Pro), 28.68 (CH₂-β, Pro), 25.21 (CH₂-γ, Pro), 22.93 (CH₃ Ac), 17.22 (CH₃ Ala).

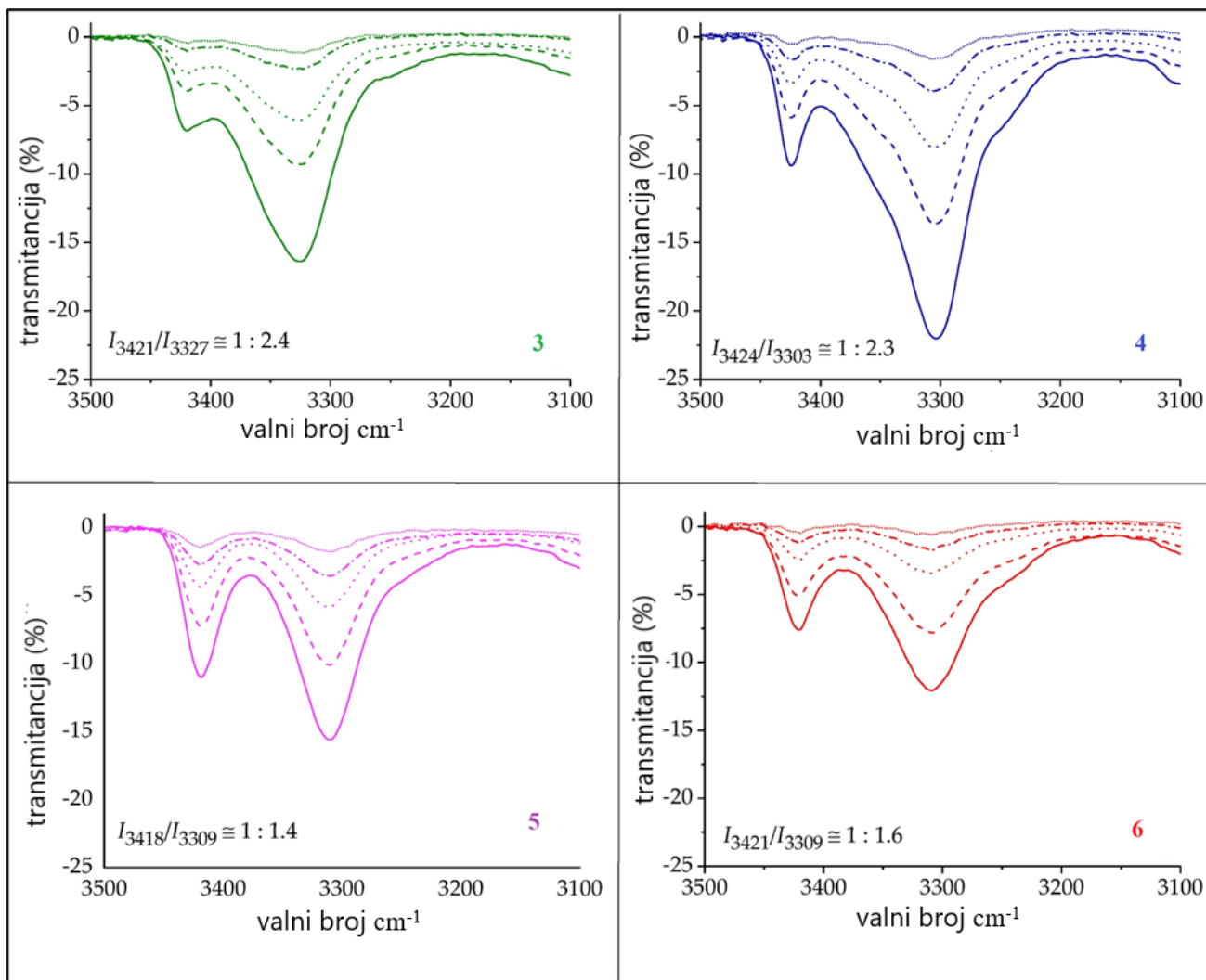
4.1.1. IR-spektroskopija

Infracrveno zračenje odnosi se na područje spektra između vidljive svjetlosti i mikrovalova pri valnim duljinama između 10000 i 100 cm^{-1} . Molekulske veze, ovisno o njihovim karakteristikama, apsorbiraju takvo zračenje što rezultira njihovim vibriranjem. Osobito važno u organskoj kemiji je područje između 4000 i 400 cm^{-1} pri kojem apsorbira većina organskih spojeva. Naravno, frekvencija koju neka molekula apsorbira i emitira ovisi o masama atoma, te jačini i geometriji samih molekulskih veza. U IR-spekttru prikazuju se karakteristične vrpce funkcijskih skupina u unaprijed definiranim područjima valnih brojeva gdje je na apscisi prikazan valni broj (cm^{-1}), a na ordinati transmitancija (%). Ovakvi spektri pružaju uvid u vrste molekulskih veza prisutne u nekoj molekuli te uz pomoć drugih spektara pomažu u određivanju strukture spojeva.

Elementi sekundarne strukture ostvaruju se nekovalentnim intrakcijama, među kojima je od osobite važnosti vodikova veza. Poznato je da se vodikove veze ostvaruju između proton-donora (X–H) i proton-akceptora (Y) gdje su atomi X i Y elektronegativni, dok Y sadrži i slobodni elektronski par. Kod organskih spojeva najčešće proton-donorske skupine su karboksilna, hidroksilna, amino- i amidne skupine, dok su proton akceptori najčešće kisik, dušik te halogeni atomi. Tvorba vodikove veze rezultirat će promjenom frekvencije rasteznih i deformacijskih vibracija donora i akceptora, što se u IR-spekttru prepoznaje po jačem intenzitetu i širenju vrpce. Razlikovanje inter- i intramolekulske vodikove veze postiže se mjerenjem IR-spektara pri različitim koncentracijama jer se udio intermolekulskih vodikovih veza smanjuje pri niskim koncentracijama, dok se intramolekulska veza događa u samoj molekuli i ne ovisi o koncentraciji.

IR-spektri peptida **3-6** ukazuju na prisutnost slobodnih ($\sim 3420 \text{ cm}^{-1}$) i asociranih ($\sim 3300\text{--}3325 \text{ cm}^{-1}$) NH skupina te smanjenje valnog broja rasteznih frekvencija C=O skupina što ukazuje na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama, kako u otopini tako i u čvrstom stanju (prilozi 1, 2, 3, 4).

Nadalje, snimanjem IR-spektara pri različitim koncentracijama, uočava se nepromijenjen omjer slobodnih i asociranih NH skupina što znači da asocirane NH skupine sudjeluju u intramolekulskim vodikovim vezama (IHB, eng. *Intramolecular Hydrogen Bond*). Također je bitno naglasiti da je udio asociranih NH skupina veći kod heterokiralnih spojeva **3** i **4** što znači da je vjerojatnost tvorbe IHB veća nego kod homokiralnih spojeva **5** i **6** (slika 7).



Slika 7. Rastezne vibracije NH skupina snimljene pri različitim koncentracijama u diklormetanu, te prikaz omjera slobodnih i asociраних NH skupina.

4.1.2 NMR-spektroskopija

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) jedna je od najvažnijih metoda za određivanje strukture molekula. Podrazumijeva apsorpciju energije u području radiovalova (300 GHz-3 kHz). Jezgre atoma s neparnim masenim brojem poput ^1H ili ^{13}C rotiraju u prostoru oko vlastite osi stvarajući jezgrin spin, a ukoliko se nalaze u magnetskom polju, njihovi se spinovi usmjeravaju istosmjerno (α -spin) ili suprotno od smjera vanjskog magnetskog polja (β -spin). Princip NMR-spektroskopije je smjestiti uzorak u magnetsko polje uređaja i ozračiti ga dodatnim radiozračenjem čija frekvencija odgovara razlici između α - i β -spina čime se ostvaruje glavni preduvjet za rezonanciju. Ovisno o kemijskoj okolini, svaka jezgra ima

različitu energiju rezonancije, te je na temelju različitih kemijskih pomaka u NMR-spektru moguće identificirati kemijski neekvivalentne protone. Iz ^1H NMR spektara očitavaju se 4 bitne informacije:

1. Broj signala koji označava broj različitih vrsta vodikovih atoma u uzorku,
2. Površina ispod signala koja je proporcionalna broju vodikovih atoma iste vrste,
3. Kemijski pomak ukazuje na vrstu vodikovih atoma,
4. Cijepanje signala odgovara broju susjednih vodikovih atoma u molekuli.

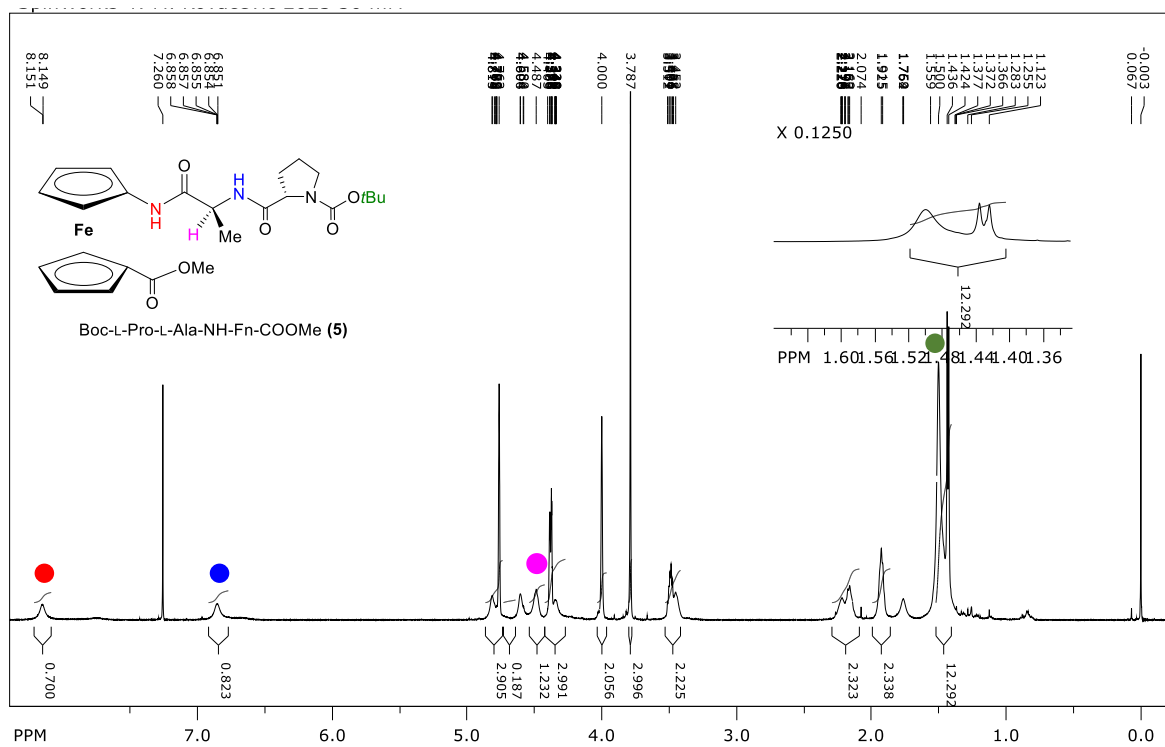
U ^{13}C NMR-spektrima vidi se po jedan pik za svaki ugljikov atom koji se od drugih razlikuje po kemijskoj okolini. Kemijski pomaci, slično kao i ^1H NMR, ovise o elektronskoj gustoći oko jezgre ugljika.

COSY (eng. *Correlation Spectroscopy*) je dvodimenzijaska tehnika za dobivanje informacija o sprezanju protona kroz kovalentne veze. COSY-spektri prikazuju susjedne jezgre koje su u međusobnoj sprezi unutar molekule, te izuzetno olakšavaju asignaciju spektara i strukturnu karakterizaciju.

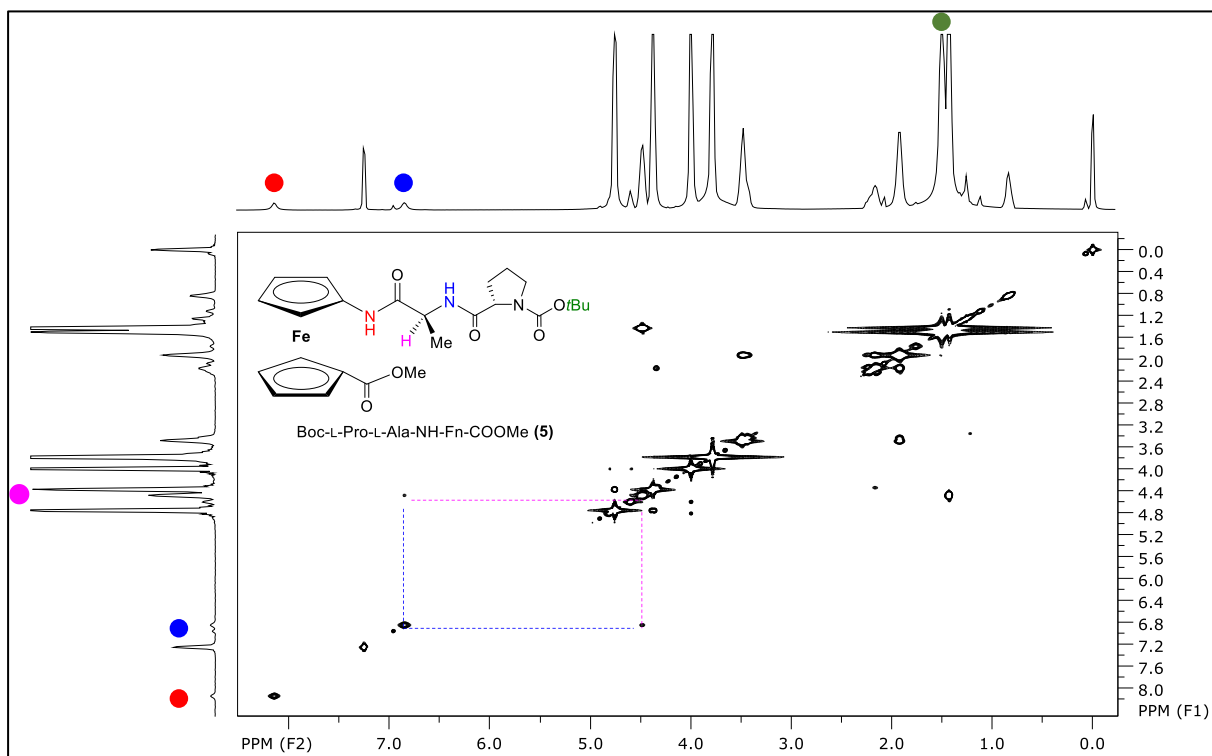
Asignacija NMR-spektara provedena je ^1H , ^{13}C i COSY tehnikama. Na slikama 8, 9, 10 i 11 prikazani su ^1H i COSY-spektri homokiralnih Boc-(**5**) i Ac-(**6**) peptida pri čemu su istaknuti unakrsni signali (eng. *cross peaks*) koji odgovaraju sprezi NH_{Ala} s CH_{Ala} protonima.

U ^1H NMR-spektru pojavljuje se singlet NH_{Fn} protona peptida **3** i **5** pri najvišem kemijskom pomaku što ukazuje na njihovo sudjelovanje u IHB. Usljed formiranja vodikovih veza, elektronska gustoća oko protona se smanjuje što dovodi do jačeg odsjerenja NH_{Fn} skupina [$\delta=8,37$ ppm (**3**); $\delta=8,15$ ppm (**5**)] u odnosu na NH_{Ala} skupine [$\delta=6,66$ ppm (**3**); $\delta=6,67$ ppm (**5**)]. Isto tako, kod peptida **3** i **5** javljaju se i dubleti protona NH_{Ala} skupina pri jačem polju što dovodi u pitanje njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama [$\delta=7,24$ ppm (**3**); $\delta=6,85$ ppm (**5**)]. Viši kemijski pomak NH_{Ala} protona iz heterokiralnog peptida **3** u odnosu na homokiralni peptid **5** indicira da kiralnost peptidne okosnice ima utjecaj na tvorbu IHB-obrazaca.

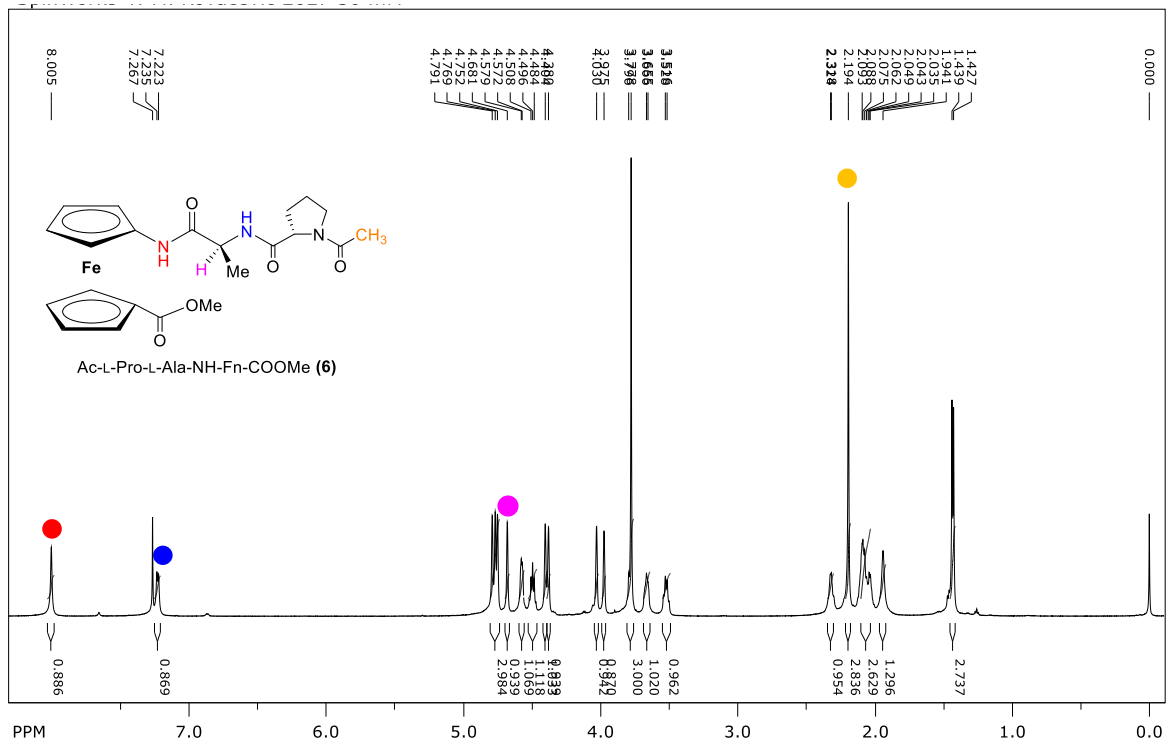
^1H NMR-spektri peptida **4** i **6** pripremljenih deprotekcijom Boc-prekursora **3** i **5** prikazuju očekivani gubitak signala *tert*-butilnih protona iz Boc-zaštitne skupine pri $\delta\sim 1,5$ ppm, te pojavu singleta koji odgovara metilnim protonima iz novonastale Ac-zaštitne skupine ($\delta\sim 2,17$ ppm). Visoki kemijski pomaci NH_{Fn} skupina iz peptida **4** ($\delta=8,58$ ppm) i **6** ($\delta=7,99$ ppm) ukazuju na njihovo sudjelovanje u IHB.



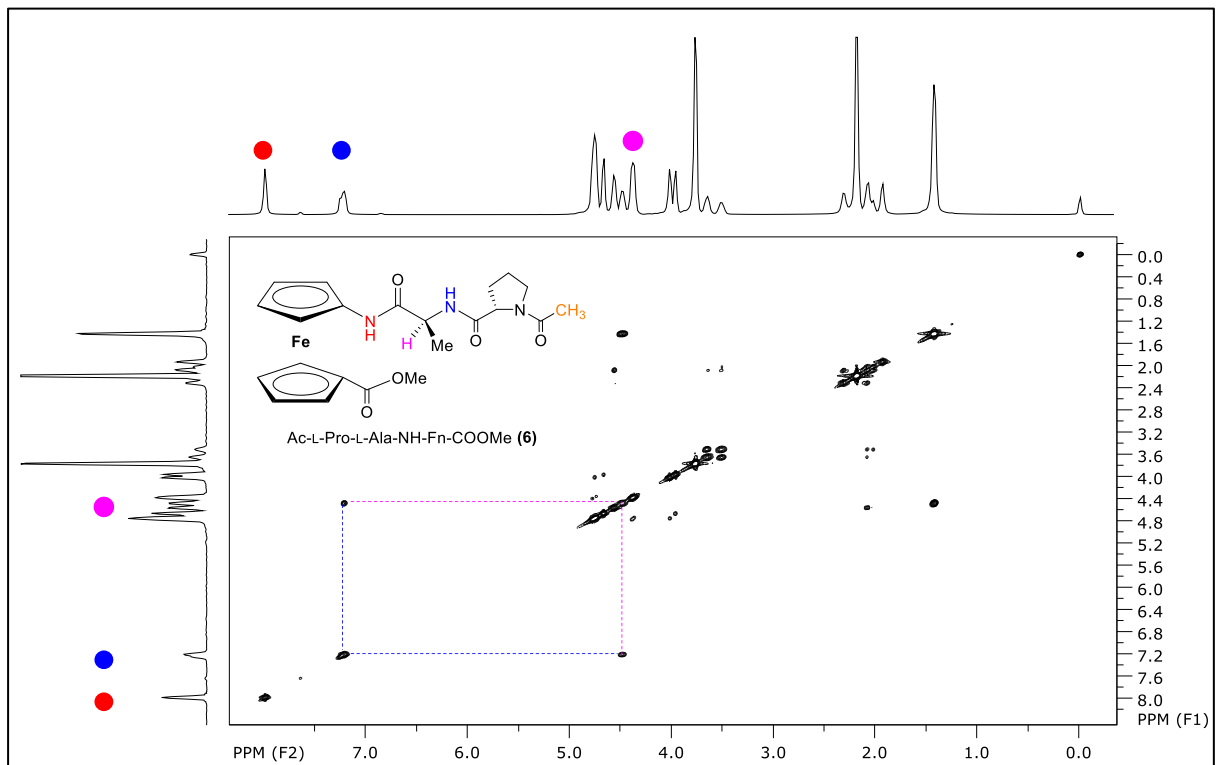
Slika 8. ^1H NMR-spektar peptida 5 ($c=5 \times 10^{-2}$ M)



Slika 9. ^1H - ^1H COSY NMR-spektar peptida 5 ($c=5 \times 10^{-2}$ M).



Slika 10. ¹H NMR-spektar peptida 6 ($c=5 \times 10^{-2}$ M)



Slika 11. ¹H-¹H COSY NMR-spektar peptida 6 ($c=5 \times 10^{-2}$ M).

^{13}C NMR-spektri peptida **3** i **5** odgovaraju strukturama predviđenima ^1H NMR-analizom; prisutni su signali CO_{Boc} [$\delta=155,26$ ppm (**3**); ($\delta=156,34$ ppm (**5**)] te signali koji pripadaju $(\text{CH}_3)_3\text{Boc}$ [$\delta=28,58$ ppm (**3**); ($\delta=28,54$ ppm (**5**)]. Opisani signali C-atoma iz karbamatnih skupina zamijenjeni su signalima karakterističnima za C-atome iz acetamidne zaštitne skupine u peptidima **4** i **6** [$\delta=172,08$ ppm (**4**); ($\delta=171,82$ ppm (**6**)].

Prikazanom asignacijom ^1H i ^{13}C NMR-spektara potvrđene su predložene strukture ciljnih peptida **3–6**. U nastavku istraživanja, a u sklopu HRZZ-projekta, provedena je detaljna konformacijska analiza i biološka evaluacija opisanih peptida što je rezultiralo objavljivanjem znanstvene publikacije [11].

5. ZAKLJUČCI

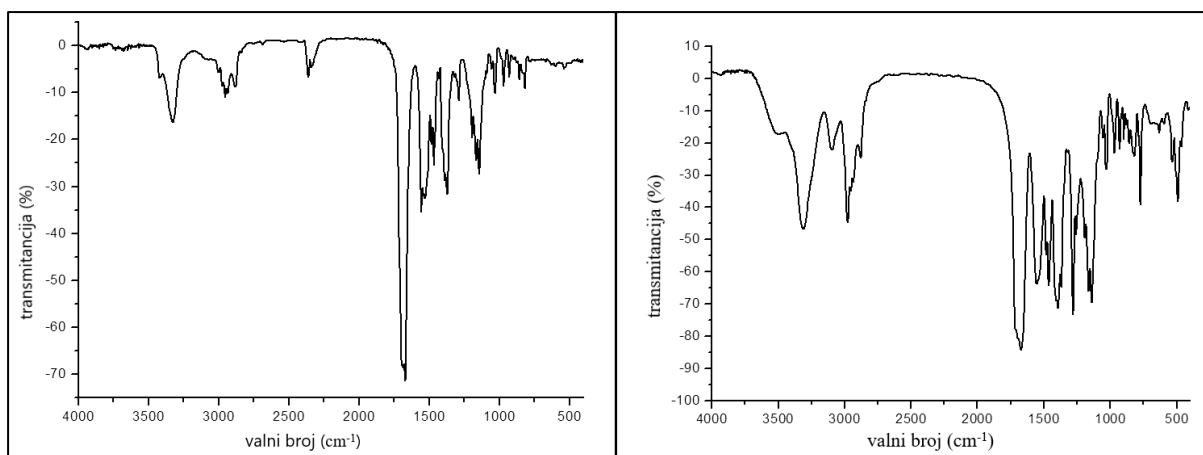
1. Peptidi Boc-D-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (**3**) i Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (**5**) uspješno su sintetizirani počevši od prekursora Boc-NH-Fn-COOMe (**1**) u iskorištenjima 89 % (**3**) i 92 % (**5**).
2. Deprotekcijom Boc-zaštitne skupine iz peptida **3** u prisutnosti acetil-klorida sintetiziran je njegov analog Ac-D-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (**4**) (60 %), dok je iz Boc-peptida **5** sintetiziran Ac-L-Pro-L-Ala-NH-Fn-COOMe (**6**) (62 %).
3. Pretvorba Boc-peptida **3** i **5** u Ac-analoge **4** i **6** rezultira očekivanim smanjenjem R_f -vrijednosti s $\sim 0,5$ na $\sim 0,3$.
4. Koncentracijski-ovisni IR-spektri peptida **3–6** prikazuju nepromijenjene omjere slobodnih i asociranih NH čime se sugerira njihovo sudjelovanje u IHB.
5. U ^1H NMR-spektrima peptida **3** i **5** opažaju se singleti karakteristični za protone Boc-zaštitne skupine ($\delta \sim 1,5$ ppm), no kod peptida **4** i **6** isti signali nestaju te se pri $\delta \sim 2,17$ ppm pojavljuju singleti protona iz Ac-zaštitne skupine.
6. U ^{13}C NMR-spektrima peptida **4** i **6** očekivano nestaju signali CO_{Boc} ($\delta \sim 155$ ppm) i $(\text{CH}_3)_3\text{Boc}$ ($\delta \sim 28$ ppm) te se javljaju novi signali CO_{Ac} ($\delta \sim 172$ ppm) što također potvrđuje uspješnu pretvorbu Boc-peptida **3** i **5** u Ac-analoge **4** i **6**.

6. POPIS LITERATURE

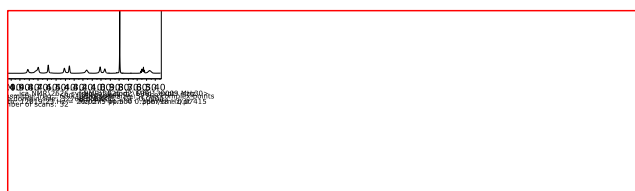
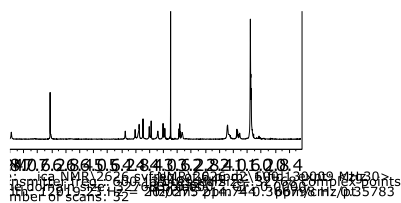
- [1] Stryer L (1991) Biokemija, 2. izd., (preveli Vuk-Pavlović i sur.), Školska knjiga, Zagreb.
- [2] Tiessen A, Pérez-Rodríguez P, Delaye-Arredondo LJ (2012) Mathematical modeling and comparison of protein size distribution in different plant, animal, fungal and microbial species reveals a negative correlation between protein size and protein number, thus providing insight into the evolution of proteomes. *BMC Res. Notes* **5**, <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-85>.
- [3] Giannis A, Kolter T (1993) Peptidomimetics for Receptor Ligands—Discovery, Development, and Medical Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **32**, 1244-1267. <https://doi.org/10.1002/anie.199312441>.
- [4] Schroer MA (2011) Small angle X-ray scattering studies on proteins under extreme conditions (doktorska disertacija), Tehničko sveučilište u Dortmundu, Dortmund. <http://dx.doi.org/10.17877/DE290R-2928>.
- [5] Barišić L (2018) Nastavni materijal iz peptidnih mimetika i pseudopeptida., nastavni materijal iz kolegija Peptidni mimetici i pseudopeptidi, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb. http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_kemiju_i_biokemiju/laboratorij_za_organisku_kemiju/peptidni_mimetici_i_pseudopeptidi (datum objave: 19. lipnja 2018.)
- [6] Rapić V, Čakić Semenčić M (2011) I. Organometalna i bioorganometalna kemija - Ferocen i metalni karbonili. *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske* **60**, 61-79. <https://hrcak.srce.hr/63839>.
- [7] Weigand W, Apfel UP (2020) Bioorganometallic Chemistry, 1. izd., De Gruyter, Berlin.
- [8] Werner H (2012) At Least 60 Years of Ferrocene: The Discovery and Rediscovery of the Sandwich Complexes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 6052-6058. <https://doi.org/10.1002%2Fanie.201201598>.

- [9] Van Staveren DR, Metzler-Nolte N (2004) Bioorganometallic chemistry of ferrocene. *Chem. Rev.* **2004**, 5931-5986. <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cr0101510>.
- [10] Čakić Semenčić M, Barišić L (2018) Ferrocene bioconjugates. *Croat. Chem. Acta* **2017**, 537–569. <http://dx.doi.org/10.5562/cca3246>.
- [11] Kovačević M, Čakić Semenčić M, Radošević K, Molčanov K, Roca S, Šimunović L, Kodrin I, Barišić L (2021) Conformational Preferences and Antiproliferative Activity of Peptidomimetics Containing Methyl 1'-Aminoferrocene-1-carboxylate and Turn-Forming Homo- and Heterochiral Pro-Ala Motifs. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 13532. <https://doi.org/10.3390/ijms222413532>.
- [12] Peter S, Aderibigbe BA (2019) Ferrocene-Based Compounds with Antimalaria/Anticancer Activity, *Molecules* **24**, 3604. <https://doi.org/10.3390/molecules24193604>.
- [13] Barišić L i sur. (2012) Synthesis and Conformational Analysis of Methyl *N*-Alanyl-1'-aminoferrocene-1-carboxylate, *Eur. J. Inorg. Chem.* **11**, 1810-1822. <https://doi.org/10.1002/ejic.201101270>.
- [14] Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ (2005) Spectrometric identification of organic compounds, 7. izd., John Wiley & Sons, New York.

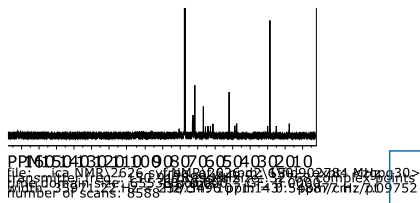
PRILOZI



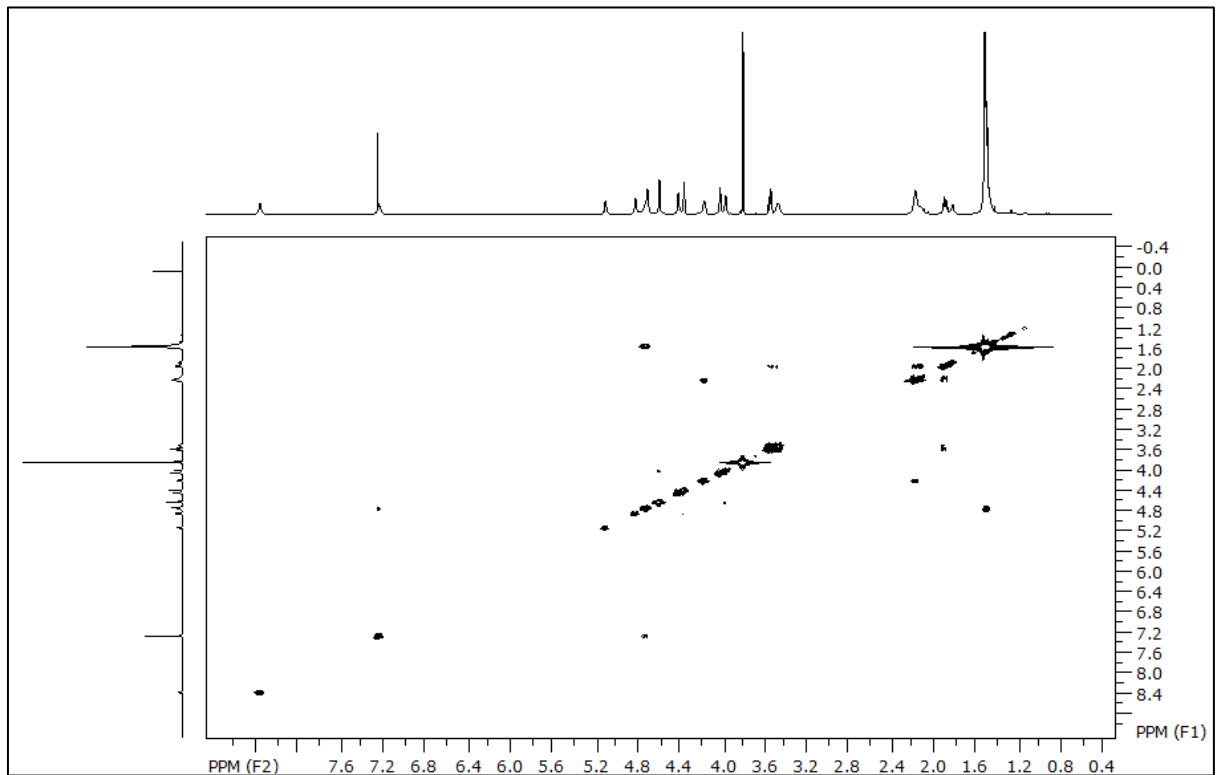
Slika 1. IR spektri peptida **3** ($c = 5 \times 10^{-2}$ M) u diklormetanu (*lijevo*) i u kalijevom bromidu (2 mg u 200 mg KBr, *desno*).



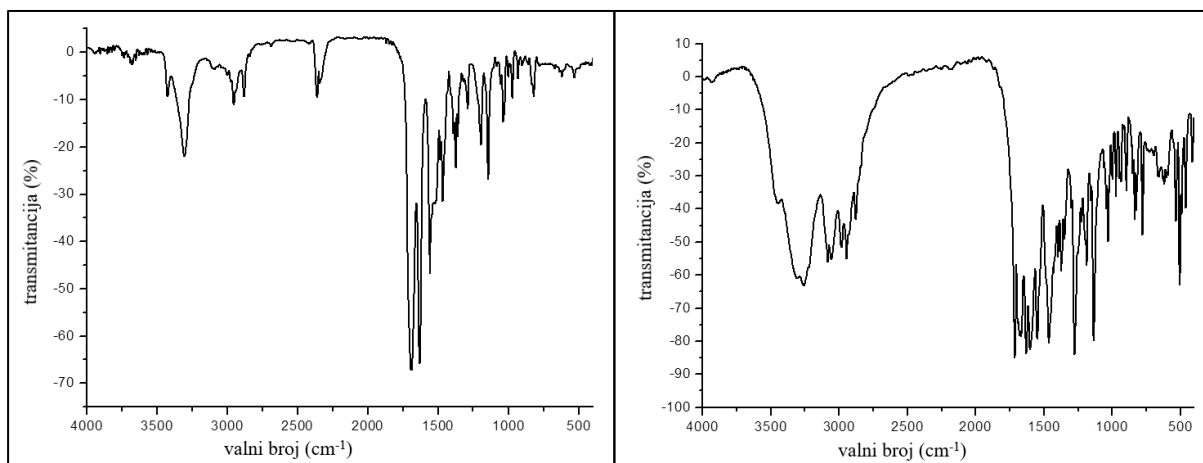
Slika 2. ^1H NMR-spektar peptida **3** ($c = 5 \times 10^{-2}$ M).



Slika 3. ^{13}C NMR-spektar peptida **3** ($c = 5 \times 10^{-2}$ M).



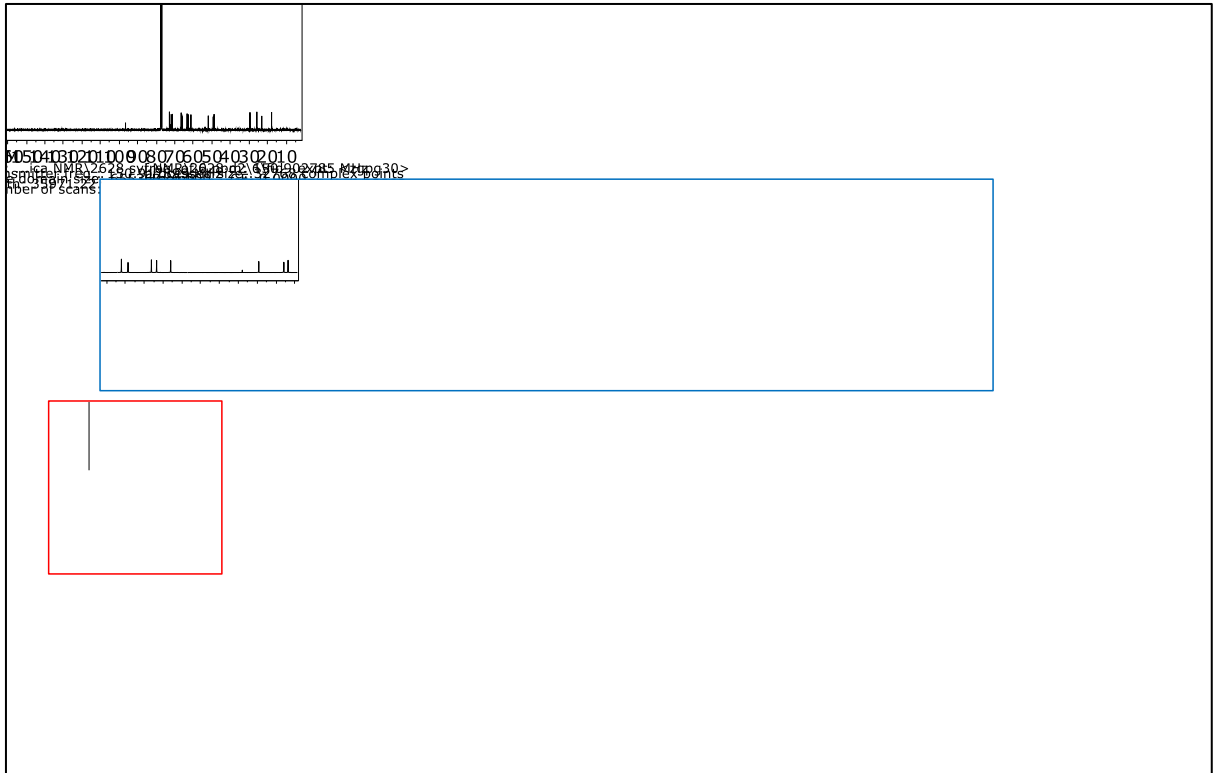
Slika 4. ^1H - ^1H COSY NMR-spektar peptida **3** ($c = 5 \times 10^{-2}$ M).



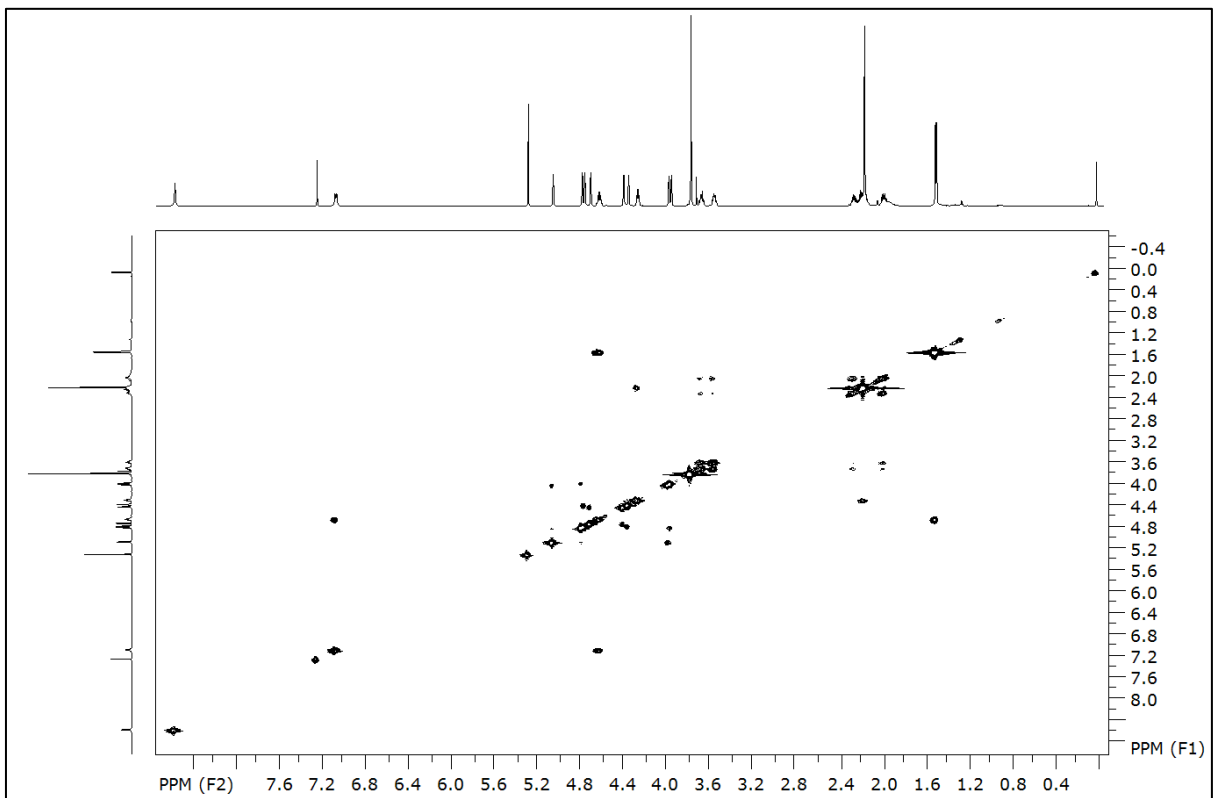
Slika 5. IR spektri peptida **4** ($c = 5 \times 10^{-2}$ M) u diklormetanu (*lijevo*) i u kalijevom bromidu (2 mg u 200 mg KBr, *desno*).



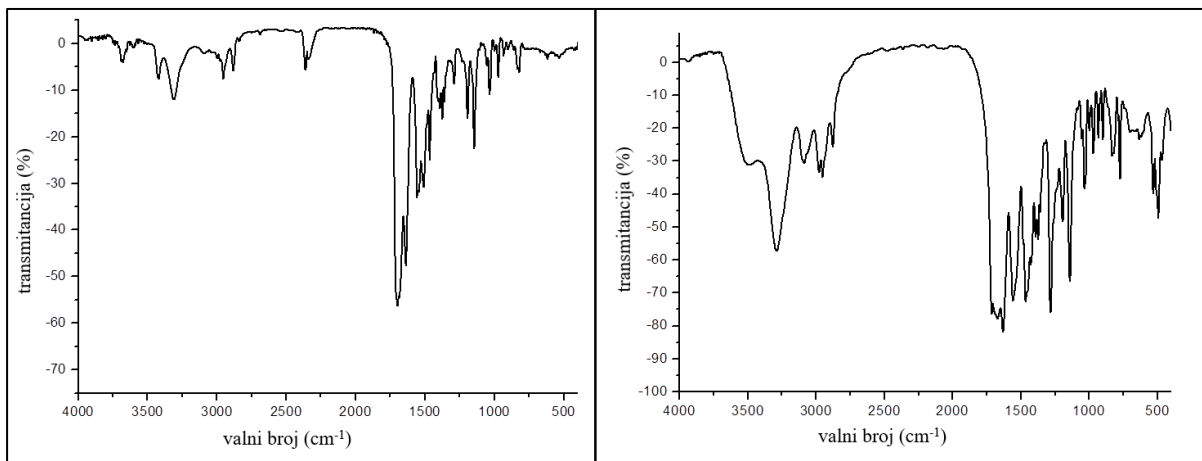
Slika 6. ^1H NMR-spektar peptida **4** ($c = 5 \times 10^{-2}$ M).



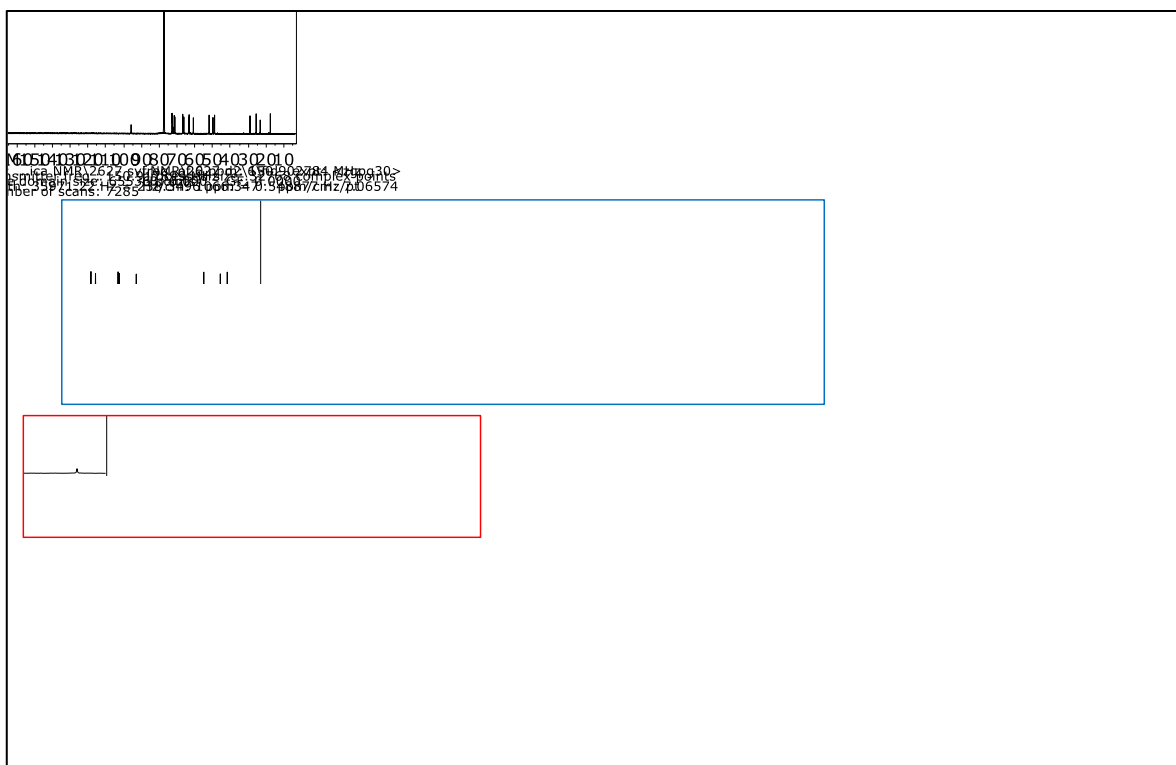
Slika 7. ¹³C NMR-spektar peptida **4** (c = 5 × 10⁻² M).



Slika 8. ¹H-¹H COSY NMR-spektar peptida **4** (c = 5 × 10⁻² M).



Slika 11. IR spektri peptida **6** ($c = 5 \times 10^{-2}$ M) u diklormetanu (*lijevo*) i u kalijevom bromidu (2 mg u 200 mg KBr, *desno*).



Slika 12. ¹³C NMR-spektar peptida **6** ($c = 5 \times 10^{-2}$ M).

Izjava o izvornosti

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

Lucija Šimunović
Vlastoručni potpis