

# Priprava i konformacijska analiza ferocenskih dipeptida pripremljenih iz ferocen-1,1'-diamina s valinom i alaninom

---

Orešković, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:661428>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, veljača 2024

Nikolina Orešković

PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA  
ANALIZA FEROCENSKIH  
DIPEPTIDA PRIPRAVLJENIH IZ  
FEROCEN-1,1'-DIAMINA S  
VALINOM I ALANINOM

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

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

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



*Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Moniki Kovačević na trudu i pomoći tijekom izrade diplomskog rada te nesebičnom prenošenju znanja i vještina.*

*Hvala i mojim prijateljima tijekom studiranja Mandici i Lovri koji su uspomenu na studentske dane učinili ljepšom i zabavnijom.*

*Posebnu zahvalnost iskazujem svojoj obitelji na ljubavi, potpori i motivaciji tijekom cijelog školovanja i odrastanja.*

*Na kraju zahvaljujem i mom Tončeku za svu ljubav i potporu na ovom putovanju.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Biotehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Molekularna biotehnologija

PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA ANALIZA FEROCENSKIH DIPEPTIDA PRIPRAVLJENIH IZ  
FEROCEN-1,1'-DIAMINA S VALINOM I ALANINOM

*Nikolina Orešković*, univ. bacc.ing. biotechn., 0006033879

## Sažetak:

Da bi se postigla željena biološka aktivnost sintetski pripremljenih peptida, nekoliko je važnih uvjeta koje takvi peptidi moraju zadovoljiti: hidrofobnost, neto naboj, amfipatski karakter i sekundarna struktura. Sekundarna struktura peptidomimetika, dobivenih iz ferocena, može se prilagoditi brojem i vrstom aminokiselina iz kojih je pripremljen, modificiranjem njihove kiralnosti i steričke kompleksnosti C- i N-zaštitnih skupina, počevši od odabira ferocenske osnove: ferocenske aminokiseline [(Fca), -OC-Fn-NH-] ili simetrično disupstituirane ferocenske dikiseline [(Fcd), -OC-Fn-CO-] i diamina [(Fcda), -NH-Fn-NH-].

U sklopu ovog diplomskog rada pripremljeni su ferocenski biokonjugati iz ferocen-1,1'-diamina i aminokiseline alanina i valina (Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-L/D-Val-Boc). Utjecaj kiralnosti valina, kao i zamjena alanina sa sterički zahtjevnijim valinom ispitani su spektroskopskom analizom (IR-, NMR- i CD-spektroskopija). Pokazalo se da heterokiralni analog (Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-L-Val-Boc) nije moguće pripremiti u količini potrebnoj za konformacijsku analizu, dok konformacijski prostor homokiralnog analoga (Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Val-Boc) odgovara prije pripremljenim konjugatima s alaninom, odnosno valinom. Zaključeno je da uvođenjem valina ne dolazi do promjene u obrascima vodikovih veza.

**Ključne riječi:** peptidomimetik, ferocen, konformacijska analiza, valin, alanin

**Rad sadrži:** 49 stranica, 24 slike, 1 tablicu, 77 literaturnih navoda, 4 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Lidija Barišić (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Monika Kovačević (mentor)
3. doc. dr. sc. Anita Horvatić (član)
4. izv. prof. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino (zamjenski član)

**Datum obrane:** 6. veljače 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Molecular Biotechnology

### SYNTHESIS AND CONFORMATIONAL ANALYSIS OF FERROCENE DIPEPTIDES DERIVED FROM FERROCENE-1,1'-DIAMINE WITH VALINE AND ALANINE

*Nikolina Orešković, univ. bacc.ing. biotechn., 0006033879*

#### **Abstract:**

In order to achieve the desired biological activity of synthetically prepared peptides, these peptides must fulfill several important conditions: hydrophobicity, net charge, amphipathic character and secondary structure. The secondary structure of peptidomimetics derived from ferrocene can be adjusted by the number and type of amino acids from which they are prepared, by changing their chirality and the steric complexity of the *C*- and *N*-protecting groups, starting with the selection of the ferrocene base: ferrocene amino acids [(Fca), -OC-Fn- NH-] or symmetrically disubstituted ferrocene diacid [(Fcd), -OC-Fn-CO-] and diamine [(Fcda), -NH-Fn-NH-].

In this work, ferrocene bioconjugates were prepared from ferrocene-1,1'-diamine and the amino acids alanine and valine (Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-L/D-Val-Boc). The influence of valine chirality and the replacement of alanine by the sterically more demanding valine, were examined by spectroscopic analyses (IR, NMR and CD spectroscopy). It was found that the heterochiral analogue (Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-L-Val-Boc) can not be prepared in the amount required for conformational analysis, whereas the conformational space of the homochiral analogue (Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Val-Boc) corresponds to the previously prepared conjugates with alanine or valine. It was found that the introduction of valine does not alter the hydrogen bonding patterns.

**Keywords:** peptidomimetic, ferrocene, conformational analysis, valine, alanine

**Thesis contains:** 49 pages, 24 figures, 1 table, 77 references, 4 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Monika, Kovačević, PhD, Associate professor

#### **Reviewers:**

1. Lidija, Barišić, PhD, Full professor (president)
2. Monika, Kovačević, PhD, Associate professor (mentor)
3. Anita, Horvatić, PhD, Assistant professor (member)
4. Antonela, Ninčević Grassino, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** February 6<sup>th</sup>, 2024



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. PEPTIDI I PROTEINI</b> .....	<b>2</b>
<b>2.2. SEKUNDARNA STRUKTURA PEPTIDA I PROTEINA</b> .....	<b>3</b>
<b>2.3. SPEKTROSKOPSKA ANALIZA SEKUNDARNIH STRUKTURA PROTEINA</b> .....	<b>5</b>
<b>2.4. HIDROFOBNE AMINOKISELINE</b> .....	<b>6</b>
2.4.1. Valin – struktura, značaj i uloga .....	7
2.4.2. Alanin - struktura, značaj i uloga .....	8
<b>2.5. FEROCEN I BIOORGANOMETALNA KEMIJA</b> .....	<b>10</b>
<b>2.6. PEPTIDOMIMETICI</b> .....	<b>12</b>
<b>2.7. FEROCENSKI PEPTIDI</b> .....	<b>13</b>
<b>2.8. FEROCENSKI PEPTIDI IZVEDENI IZ FEROCEN-1,1'-DIAMINA</b> .....	<b>14</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2. PRIPRAVA FEROCENSKIH PEPTIDA</b> .....	<b>18</b>
3.2.1. Priprava peptida Boc-D-Ala-NH-Fn-COOMe (1) .....	21
3.2.2. Priprava Ac-D-Ala-NH-Fn-COOMe (2) .....	22
3.2.3. Priprava Ac-D-Ala-NH-Fn-COOH (3) .....	23
3.2.4. Priprema Ac-D-Ala-NH-Fn-CON <sub>3</sub> (4) .....	23
3.2.5. Priprema Ac-D-Ala-NH-Fn-NHBoc (5) .....	23
3.2.6. Priprema Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-L-Val-Boc (6) i Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Val-Boc (7) .....	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1. UVOD</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2. Priprava ciljnog ferocenskog peptida Ac-D-Ala-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-D-Val-Boc (7)</b> .....	<b>26</b>
<b>4.3. IR spektroskopska analiza</b> .....	<b>29</b>
<b>4.4. Nuklearna magnetna rezonancija (NMR)</b> .....	<b>33</b>
4.4.1. Temperaturni <sup>1</sup> H NMR-spektar spoja 7 .....	35

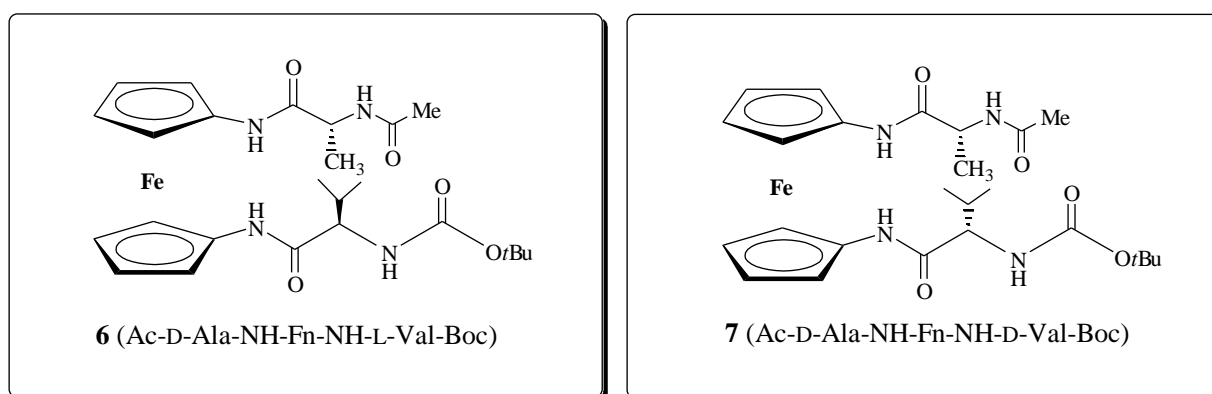
4.4.2. Koncentracijski $^1\text{H}$ NMR-spektar spoja <b>7</b> -----	37
<b>4.5. Titracija s DMSO</b> -----	<b>37</b>
<b>4.6. CD-spektroskopska analiza</b> -----	<b>39</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> -----	<b>42</b>
<b>6. LITERATURA</b> -----	<b>43</b>
<b>7. PRILOZI</b> -----	<b>1</b>

# 1. UVOD

Peptidi i proteini su temeljni gradivni elementi živoga svijeta te imaju ključnu ulogu u raznovrsnim biološkim procesima i funkcijama organizama, od sudjelovanja u enzimskim katalizama do prijenosa impulsa između živčanih stanica te aktivnosti u zaštiti imunskog sustava. Složenost bioloških funkcija proteina proizlazi iz njihove trodimenzionalne strukture, koja se može podijeliti na četiri razine: primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvarternu, pri čemu je sekundarna struktura, poput okreta,  $\alpha$ -uzvojnica i  $\beta$ -nabranih ploča, ključna za razumijevanje biološke aktivnosti proteina. Budući da su prirodni peptidi podložni proteolitičkoj razgradnji, visokoj konformacijskoj fleksibilnosti, niskoj stabilnosti te biodostupnosti, primjena peptidomimetika kao alternativnih spojeva omogućuje njihovu primjenu u terapijske svrhe, smanjujući njihovu fleksibilnost i osjetljivost na proteolitičku razgradnju. Posebno se ističu ferocenski peptidi koji pokazuju zanimljiva svojstva, uključujući tvorbu specifičnih intramolekulskih vodikovih veza, a samim time i induciranje različitih elemenata sekundarne strukture.

Otkriće ferocena i njegova jedinstvena "sendvič" struktura, koja mu pruža izuzetnu stabilnost, označava početak moderne bioorganometalne kemije, znanosti koja povezuje organsku kemiju s biologijom, medicinom i biotehnologijom.

Ovaj diplomski rad, uz sintezu, obuhvatio je i konformacijsku analizu, tj. tvorbu sekundarnih strukturnih elemenata u pripravljenim ferocenskim dipeptidima **6** i **7** [Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-L(D)-Val-Boc, Fn = ferocenilen, Ac = acetil, Boc = *tert*-butoksikarbonil] (slika 1), s naglaskom na istraživanje intramolekulskih vodikovih veza (IHB, engl. *Intramolecular Hydrogen Bonds*), koristeći različite spektroskopske metode poput NMR, CD i IR-spektroskopije.



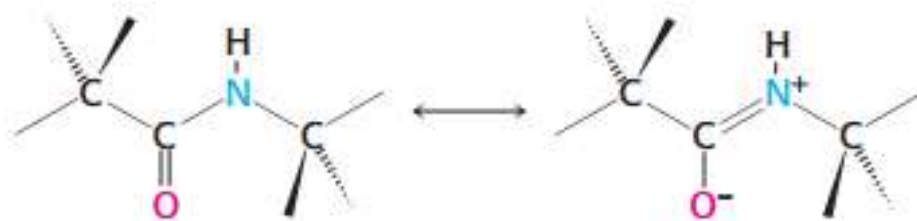
Slika 1. Ciljni dipeptidi **6** i **7**

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PEPTIDI I PROTEINI

Peptidi i proteini posjeduju važnu ulogu u mnogim biološkim procesima te su ključan izvor tvari potrebnih za rast i razvoj tkiva u svim organizmima. Osim toga su i sastavni dio svake stanice te sudjeluju u svim važnim procesima, poput enzimske katalize, prijenosu impulsa između živčanih stanica i molekula, zaštiti imunskog sustava te kontroli rasta i diferencijaciji stanica (1).

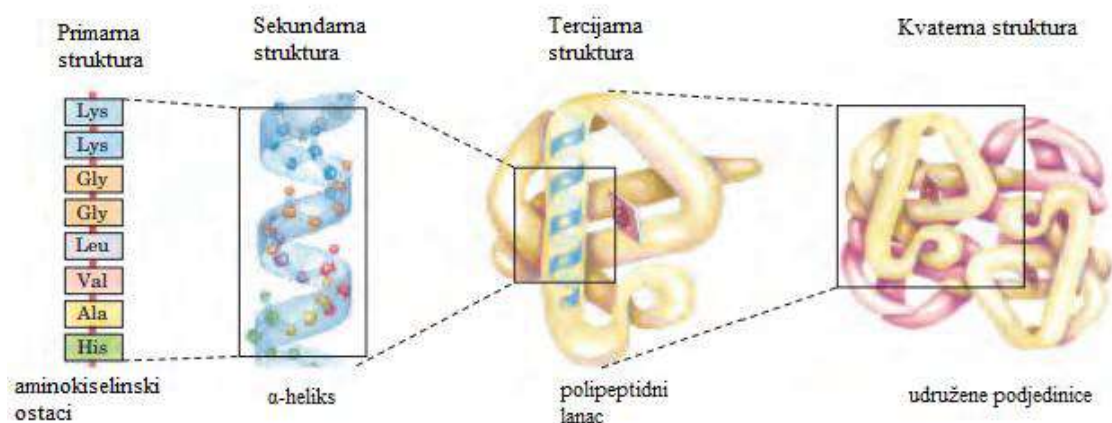
Peptidi su kratki polimeri aminokiselinskih monomera povezanih peptidnom vezom. Peptidna veza posebna je vrsta amidne veze koja nastaje reakcijom amino skupine jedne aminokiseline s karboksilnom skupinom druge aminokiseline. Stabilnost peptidne veze proizlazi iz činjenice da formira dvije rezonantne strukture, koje joj omogućuju svojstva dvostruke veze, iako se zapravo radi o jednostrukoj amidnoj vezi (slika 2). Uz navedeno, ograničena rotacija oko peptidne veze, uz istodobnu slobodnu rotaciju skupina vezanih na  $\alpha$ -ugljikov atom, određuje trodimenzionalnu strukturu proteina. Povezivanjem najmanje dvije aminokiseline nastaju peptidi, dok peptide nastale polimerizacijom više od devet aminokiselina nazivamo proteinima. Aminokiseline se međusobno razlikuju po pobočnim ograncima koji su različite duljine, naboja, hidrofилnosti, odnosno hidrofobnosti, stoga su različito reaktivni. Raznolikost pobočnih ogranka, kao i mogućnost različite polimerizacije, doprinosi raznovrsnosti peptida i proteina u prirodi te utječe na konačnu strukturu polimera, koja određuje njihovu funkciju i biološku aktivnost.



Slika 2. Rezonantne strukture peptidne veze (2)

Struktura proteina može se podijeliti na 4 razine: primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvaternu. Primarna struktura proteina određena je aminokiselinskim slijedom u peptidnom lancu, dok tvorba intramolekulskih vodikovih veza između donorskih i akceptorskih skupina definira njihovu sekundarnu strukturu. Najvažnije sekundarne strukture su  $\alpha$ -uzvojnica,  $\beta$ -

nabrana ploča i različiti okreti, od kojih je najčešći i najpoznatiji  $\beta$ -okret. Tercijarna struktura predstavlja prostorni raspored aminokiselinskih ostataka koji su u primarnoj strukturi znatno udaljeni jedan od drugog, no smatanjem peptida, odnosno proteina, približavaju se i stupaju u interakciju. Kvaterna se struktura odnosi na prostorni odnos između polipeptidnih lanaca ili podjedinica istog proteina (slika 3).



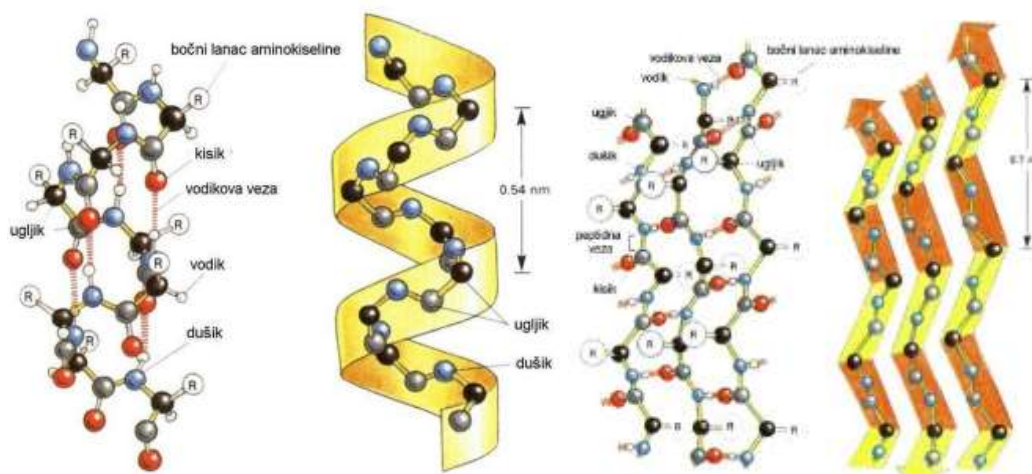
**Slika 3.** Četiri strukturne razine peptida i proteina (3)

## 2.2. SEKUNDARNA STRUKTURA PEPTIDA I PROTEINA

Sekundarna struktura predstavlja najvažniju proteinsku strukturu te je nužna za određivanje trodimenzionalne strukture proteina (4). Gotovo 50 posto strukturnih elemenata svakog peptida uključuje sekundarne strukture. Formiranje intramolekulskih vodikovih veza (IHB) između donorskih i akceptorskih skupina unutar istog ili susjednih peptidnih lanaca rezultira nabiranjem lanaca i stvaranjem sekundarne strukture proteina. Obrazac IHB određuje koji će od navedenih oblika sekundarne strukture ( $\alpha$ -uzvojnica,  $\beta$ -nabrana ploča ili okreti) zauzeti određeni peptid (1).

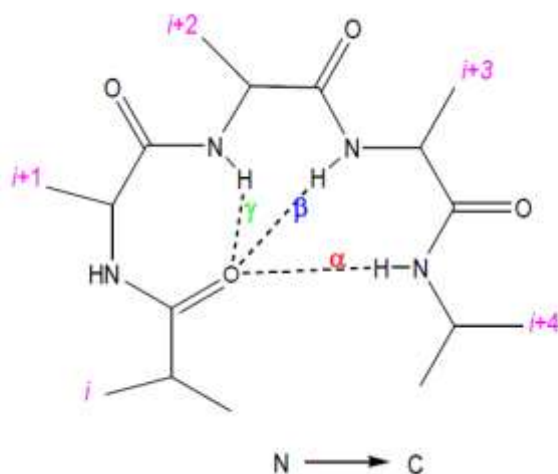
$\alpha$ -Uzvojnica štapičasta je sekundarna struktura građena od čvrsto uvijene polipeptidne okosnice te pobočnih ogranaka aminokiselina izbočenih na vanjskoj strani same uzvojnice. U prirodnim peptidima uzvojnice su (*P*) - ili desne orijentacije. Karbonilna skupina svake aminokiseline *n* povezana je vodikovom vezom s amino skupinom aminokiseline *n*+4 (5) (slika 4, lijevo).  $\beta$ -Nabranu ploču karakterizira polipeptidni lanac koji je istegnut, za razliku od uvijenog lanca koji poprima  $\alpha$ -uzvojnica. Sama struktura ploče stabilizirana je vodikovim vezama između karbonilnih i amino skupina različitih polipeptidnih lanaca. Ovisno o tome kako

su polipeptidni lanci orijentirani,  $\beta$ -nabrana ploča može biti paralelna (lanci orijentirani u istom smjeru) ili antiparalelna (lanci obrnuto usmjereni) (2) (slika 4, desno).



**Slika 4.** Sekundarne strukture proteina (lijevo  $\alpha$ -uzvojnica; desno  $\beta$ -nabrana ploča) (6)

Različiti okreti omogućuju promjenu smjera polipeptidnih lanaca pa stoga dolazi do tvorbe globularnih (smotanih) i kompaktnih oblika proteina. Osim što utječu na savijanje proteina, okreti utječu i na njihovu stabilnost. Dijele se na  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - i  $\pi$ - okrete, s obzirom na broj konstituirajućih ostataka (slika 5). Budući da su stabilizirani intramolekulskim vodikovim vezama zatvaranjem 7-članog prstena dolazio do tvorbe  $\gamma$ -okreta, 10-člani prsten odgovara  $\beta$ -okretu, dok 13-člani prsten rezultira  $\alpha$ -okretom.  $\beta$ -Okreti su najčešći formirani okreti, a definiraju se kao tetrapeptidne sekvence u kojima udaljenost između  $C_{\alpha}(i)$  i  $C_{\alpha}(i+3)$  mora biti manja ili jednaka  $7\text{\AA}$  što dovodi do naglog okreta polipeptidnog lanca (2). Odlikuju se vrlo izraženim hidrofilnim svojstvima zbog čega su smješteni na površini proteinske molekule, te sudjeluju u procesima molekuskog prepoznavanja, kao i u interakcijama peptidnih supstrata s njihovim receptorima.



**Slika 5.** Prikaz najčešćih okreta ( $\gamma$ →sedmeročlani prsten,  $\beta$ →deseteročlani prsten i  $\alpha$ →trinaesteročlani prsten) (2)

### 2.3. SPEKTROSKOPSKA ANALIZA SEKUNDARNIH STRUKTURA PROTEINA

Budući da biološka aktivnost proteina izravno ovisi o sekundarnoj strukturi, kao i njezinoj mogućoj promjeni, navedeno se može iskoristiti u svrhu istraživanja i razvoja proteina u terapijske svrhe (7). Tako se iz istraživanja koje su proveli Zeeshan, Thành, i Mai sa svojim suradnicima može vidjeti da, u slučaju antimikrobnih peptida, analozi peptida sa strukturom  $\alpha$ -uzvojnice pokazuju jaču antimikrobnu aktivnost na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, u odnosu na one peptide koji tvore  $\beta$ -nabranu ploču (7-9). U svrhu dokazivanja sekundarne strukture koristi se nekoliko metoda: IR-spektroskopija (*engl. Infrared Spectroscopy*), NMR-spektroskopija (*engl. Nuclear Magnetic Resonance*) i CD-spektroskopija (*engl. Circular Dichroism*). Navedena spektroskopska mjerenja služe procjeni stabilnosti proteina i strukturnih značajki koje se smatraju odlučujućima za biološku aktivnost proteina (10).

Nuklearna magnetska rezonanca spektroskopska je analitička metoda koja daje pouzdan i detaljan uvid u strukturu makromolekula, uključujući i proteine. Omogućuje određivanje molekulske strukture (geometrijski raspored i udaljenost atoma unutar molekule proteina), uz određivanje trodimenzionalne strukture makromolekule. Najvažnija značajka NMR-a jest da pruža mogućnost lociranja sekundarnih strukturnih elemenata unutar sekvence proteina (10). NMR omogućuje i prikupljanje informacija o trodimenzionalnoj strukturi proteina te odnosu konformacije i funkcije proteina. NMR proteina provodi se u vodenim otopinama proteina

visoke čistoće i koncentracije (0,1 – 3 mM) te je ograničena na relativno male proteine (do 35 kDa). Poželjno je da se proteini obilježe izotopima  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$ , jer prirodno prisutni  $^{12}\text{C}$  nije spektroskopski aktivan, dok jezgra  $^{14}\text{N}$  izotopa daje nisku rezoluciju signala. Zajedno s podacima o sekvenci ispitivanog proteina i poznatim geometrijskim odnosima među atomima (kiralnost, van der Waalsovi radijusi, duljine i kutevi veza), u bazama podataka moguće je pronaći i podatke o sličnim molekulama te ih usporediti s eksperimentalno dobivenim rezultatima.

CD spektroskopija je metoda koja služi i za karakterizaciju proteina, pri čemu je poželjno da molekule budu neionizirane i otopljene. Kiralnost proteina omogućuje apsorpciju u različitim dijelovima spektra svjetlosti, čime se analiziraju sekundarni strukturni elementi proteina. Osim za ispitivanje sekundarnih struktura, CD spektroskopija koristi se i za ispitivanje tercijskih struktura. Iako ova metoda daje uvid u postojanje  $\alpha$ -uzvojnica i  $\beta$ -nabranih ploča, ne omogućuje određivanje aminokiselina koje sudjeluju u stvaranju tih strukturnih elemenata. Koristi se za usporedbu strukture proteina iz različitih izvora te strukture mutiranih i nativnih proteina. Nadalje, korisna je metoda pri ispitivanju utjecaja temperature, pH ili drugih vanjskih čimbenika te različitih interakcija (protein-protein ili protein-ligand) na konformaciju proteina.

Jedna od najčešće korištenih spektroskopskih tehnika, IR-spektroskopija, daje informaciju o konformacijskom prostoru peptida u otopini. Pomoću ove metode procjenjuje se proteinska struktura, određivanjem frekvencije pri kojoj kemijske veze apsorbiraju infracrveno zračenje, a jačina apsorpcije raste povećanjem polarnosti kemijskih veza (10-12). Prednost je IR spektroskopije što se iz spektra mogu dobiti informacije o strukturi i koncentraciji molekula. Određivanje IR-spektra relativno je brzo i jednostavno te jeftino, a važna je i visoka osjetljivost same metode. Bitno je istaknuti da je metoda minimalno invazivna, što ju ističe u odnosu na druge spektroskopske metode.

## **2.4. HIDROFOBNE AMINOKISELINE**

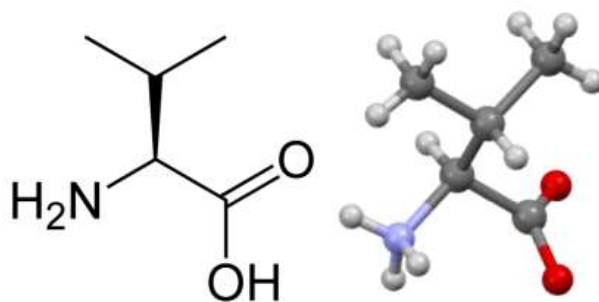
Aminokiseline su bitne za živa bića, budući da samo njih 20 tvori cijelu raznolikost proteina. Svaka aminokiselina sadrži amino- i karboksilnu skupinu, a podjela aminokiselina ovisi o vrsti pobočnog ogranka aminokiseline, pa se aminokiseline dijele na one sa i bez naboja, pri neutralnom pH. Nadalje se aminokiseline bez naboja mogu podijeliti na hidrofobne ili nepolarne i hidrofilne ili polarne, dok se aminokiseline koje nose naboj mogu podijeliti na bazične i kisele. Aminokiseline od interesa u sklopu ovog rada su hidrofobne aminokiseline Val



(valin) (slika 6) i Ala (alanin) (slika 7) (2). Karakteristika valina je i to da je esencijalna aminokiselina, što znači da ga tijelo ne može *de novo* sintetizirati u organizmu, nego ga mora unijeti iz vanjskih izvora, tj. hranom ili dodacima prehrani. Hidrofobnost aminokiselina iznimno je bitna karakteristika te se detaljno proučava, budući da hidrofobne interakcije imaju glavnu ulogu u stabilizaciji proteinskih struktura (13,14). Aminokiseline s hidrofobnim pobočnim ograncima obično se nalaze u unutrašnjosti proteina, kako bi se reducirao njihov mogući kontakt s vodom, pa se ta sklonost može približno odrediti mjerenjem raspodjele aminokiselina između vode i organske faze (15).

#### 2.4.1. Valin – struktura, značaj i uloga

Valin (Val, V) aminokiselina je koja kao pobočni ogranak sadrži izopropilnu skupinu, što je prema prethodno navedenim kriterijima svrstava u nepolarne alifatske aminokiseline bez naboja (slika 6). To je esencijalna aminokiselina, dakle organizam nema mogućnost samostalne biosinteze valina, stoga je dostatnu količinu za normalno funkcioniranje organizma potrebno osigurati prehranom (2). Budući da razgranata struktura izopropilne skupine valina uzrokuje steričke smetnje pri tvorbi  $\alpha$ -uzvojnice, osnovna je karakteristika valina da u peptidima i proteinima ima tendenciju tvorbe  $\beta$ -nabrane ploče. Pobočni ogranak valina vrlo se jednostavno smješta u  $\beta$ -nabrano ploču na način da izviruje iz ravnine glavnoga lanca (2).



**Slika 6.** Struktura aminokiseline valin (Val) (2)

Valin je aminokiselina koja pomaže u uklanjanju viška dušika iz jetre i može ga prenositi drugim tkivima u tijelu prema potrebi. Također, prilikom konjugacije valina s ferocenskim peptidima, dolazi do tvorbe  $\beta$ -nabranih ploča pa takve molekule predstavljaju zanimljive modelne spojeve za ispitivanje Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Valin je korišten u istraživanjima gdje je konjugacijom s ferocenskim peptidima pokazao zanimljive molekulske

modele za bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Ta istraživanja ukazuju na to da  $\beta$ -nabrane ploče igraju ključnu strukturnu ulogu (16). Valin pripada u skupinu aminokiselina razgranatog lanca (*engl. Branched Chain Amino Acid, BCAA*), koje su važne za različite metaboličke procese, uključujući sintezu proteina i izlučivanje inzulina. Čak i male promjene u metabolizmu BCAA mogu uzrokovati različite bolesti, poput dijabetesa, raka i zatajenja srca (17). Valin je nužan za održavanje hematopoetskih matičnih stanica te ima ključnu ulogu u procesu njihove samoobnove (18). Također, sudjeluje u procesima poput procesiranja nukleotida u reverznoj transkriptazi humane telomeraze (19). Valin je važan i za strukturnu stabilnost enzima, primjerice ribonukleaze A (20). Osim toga, valin snažno utječe na homeostazu tjelesnih tekućina, aktivirajući transportere  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Na}^{2+}$  u bubrežnim kanalčićima (21). Također je povezan s povećanim unosom glukoze u mišićima, što rezultira većim sadržajem glikogena (22). Međutim, u određenim situacijama, poput srpaste anemije i inzulinske rezistencije, valin može imati štetno djelovanje. Srpasta anemija, primjerice, uzrokuje zamjenu glutaminske kiseline s valinom, što mijenja agregaciju hemoglobina (23). Također, valin je povezan s inzulinskom rezistencijom, a nusprodukt njegovog metabolizma može dovesti do pojave dijabetesa (24).

#### 2.4.2. Alanin - struktura, značaj i uloga

Alanin (Ala, A) ili 2-aminopropionska kiselina neesencijalna je aminokiselina, za razliku od valina, a dobiva se reduktivnom aminacijom piruvata tijekom metabolizma. Ciklusi u čijim reakcijama sudjeluje su ciklus limunske kiseline, glikoliza i glukoneogeneza. Alanin spada u hidrofobne aminokiseline bez naboja te kao pobočni ogranak ima nepolarnu metilnu skupinu ( $-\text{CH}_3$ ) (slika 7), što je svrstava među najmanje, najjednostavnije i aminokiseline koje sterički najmanje ometaju stvaranje veza ili konformacijskih struktura.



**Slika 7.** Struktura aminokiseline alanin (Ala) (2)

Razgradnjom mišića, koji su u velikom dijelu sastavljeni od proteina, alanin se u povećim

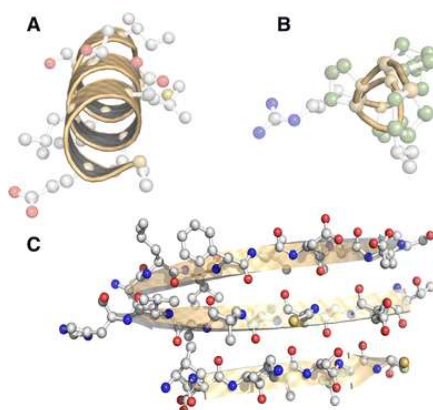
količinama oslobađa u krvotok te se u jetri konvertira u glukozu, koja služi kao izvor energije skeletnim mišićima (25). Alanin je bitan izvor energije za mišićno tkivo, mozak i centralni živčani sustav, jedna je od važnijih aminokiselina za imunost u proizvodnji antitijela te sudjeluje u metabolizmu šećera i organskih kiselina. U tijelu ova aminokiselina stupa u interakciju s još jednom aminokiselinom, histidinom, kako bi stvorile dipeptid karnozin. Ovaj prirodni mišićni dipeptid, koji inhibira katalizu oksidacije lipida, svojim snažnim antioksidativnim svojstvom djeluje protiv slobodnih radikala (26).

Prilikom istraživanja vodikovih veza između peptida i molekula vode, primijećeno je da  $\alpha$ -uzvojnica nije potpuno stabilna u vodi, jer se vodikove veze natječu s onima u uzvojnici peptida (27,28). Marqusee i sur. proučavali su formiranje  $\alpha$ -uzvojnica u peptidima koji sadrže samo alanin i nekoliko drugih aminokiselina. Njihovi rezultati sugeriraju da alanin ima ključnu ulogu u stabilizaciji kratkih uzvojnica, vjerojatno zbog visokog potencijala pojedinih alaninskih ostataka pri njihovoj tvorbi, bez interakcija pobočnih lanaca koje bi ih mogli dodatno stabilizirati (27).

Alanin je proteinogena aminokiselina, najviše podložna stvaranju sekundarne strukture proteina tvorbom  $\alpha$ -uzvojnice, pri čemu se smanjuje konformacijska sloboda glavnoga lanca u nesmotanom stanju, zahvaljujući nepolarnoj  $\text{CH}_3$  skupini u pobočnom ogranku alanina (29). Peptidi s oko 10 alaninskih ostataka koji stvaraju  $\alpha$ -uzvojnice nisu topljivi u vodi, zbog nedostatka vodikovih veza (30). Dodavanjem triju ili više nabijenih ostataka, poput lizina ili glutaminske kiseline, može se poboljšati topljivost alaninskih peptida (28).

Istraživanja su pokazala da zamjena aminokiseline alanin s aminokiselinom glicin može destabilizirati  $\alpha$ -uzvojnici u peptidima, i to u ovisnosti o omjeru količine alanina i glicina (27, 31-33). S druge strane, istraživanja temeljena na konformaciji kratkih alaninskih peptida pokazala su sasvim drukčije rezultate. Zaključak je istraživanja na trialaninu da on zauzima dvije konformacije pri sobnoj temperaturi. Prva konformacija odnosi se na strukturu sličnu poliprolin II uzvojnici ( $\geq 80\%$ ), dok je druga konformacija  $\alpha_R$ -uzvojnica (34). Međutim, temeljem spektroskopskih mjerenja utvrđena je prisutnost 50 % poliprolin II uzvojnice i 50 % strukture slične  $\beta$ -nabranoj ploči (35,36), dok tetraalanin zauzima većinom oblik poliprolin II uzvojnice u vodi (37). U svakom slučaju, poliprolin II uzvojnica pokazala se dominantnom konformacijom alaninskih peptida. Bitno je naglasiti da se vjerojatnost stvaranju iste povećava se s brojem alaninskih ostataka (39,40). Graf i suradnici utvrdili su kako otprilike 90 % trialanina zauzima strukturu poliprolin II uzvojnice, a približno 10 % strukturu  $\beta$ -nabrane ploče, dok struktura  $\alpha$ -

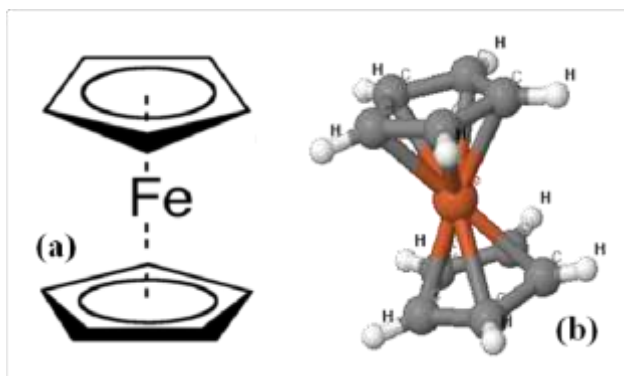
uzvojnice nije pronađena (slika 8). Konačno je zaključeno da produljenjem lanca na sedam alaninskih ostataka nije došlo do promjene količine određene konformacije (40).



**Slika 8.** Usporedba sekundarnih struktura: A:  $\alpha$ -uzvojnica; B: Poliprolin II uzvojnica te C:  $\beta$ -nabrana ploča (41)

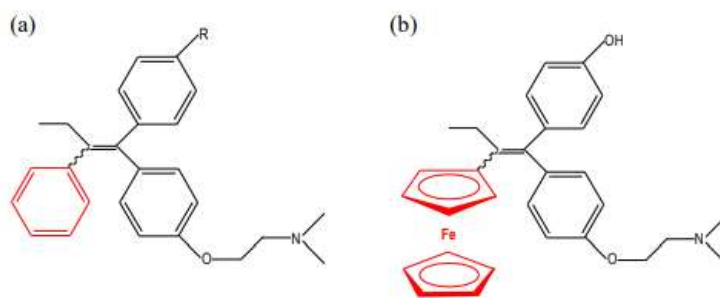
## 2.5. FEROCEN I BIOORGANOMETALNA KEMIJA

Otkriće ferocena i rasvjetljavanje njegove izvanredne strukture nedvojbeno je početna točka za razvoj moderne bioorganometalne kemije. Godine 1951. sintetizirana je nova molekula kemijske formule  $\text{FeC}_{10}\text{H}_{10}$  koja sadrži željezo i dva ciklopentadienidna prstena, a 1952. godine Woodward je novoj molekuli dodijelio naziv ferocen (42). Naime, T. J. Kealy i P. L. Pauson (43) su reakcijom željezovog(III) klorida i ciklopentadienilnog magnezijevog bromida sintetizirali molekulu ferocena, čiji karbociklički prstenovi pokazuju sličnost s benzenom. Ferocen karakterizira aromatska struktura nalik „sendviču“, koja ferocenu daje izuzetnu stabilnost (slika 9) (44,45).



**Slika 9.** Struktura ferocena (a) i njegova trodimenzionalna struktura (b) (46)

Izraz „sendvič spoj“ danas je univerzalno prihvaćen za mnogo širu klasu spojeva. Ferocen se ubraja u skupinu organometalnih spojeva, zbog direktne veze između metala i ugljika te je glavni predmet istraživanja bioorganometalne kemije. Posljednjih se godina bioorganometalna kemija razvila kao potentno i brzorastuće područje koje povezuje klasičnu organometalnu kemiju s biologijom, medicinom i molekularnom biotehnologijom (47-49). Bioorganometalna kemija fokusira se na proučavanje konjugata organometalnih spojeva i biomolekula, odnosno spojeva koji sadrže barem jednu vezu između metala i ugljika, pri čemu takva veza uzrokuje različite steričke i elektronske efekte. Konjugati organometalnih spojeva i biomolekula, poput DNA, ugljikohidrata, steroida, aminokiselina te peptida, značajni su zbog moguće primjene u biokemiji, biologiji i biomedicini (terapija karcinoma i zaraznih bolesti, imunotestovi, molekulsko prepoznavanje, enzimska kataliza i toksikologija) (50). Ferocen se primjenjuje u bioorganometalnoj kemiji i zbog lipofilnosti, koja omogućuje prolazak kroz stanične membrane, mogućnosti razmjene liganda, redoks i katalitičkih svojstava. Također, konjugacijom ferocena s biomolekulama pripremljeni su biokonjugati koji su pokazali izuzetnu antitumorsku, antimikrobnu i antioksidativnu učinkovitost (51,52). Tako je, primjerice, otkriveno izraženo antitumorsko i antiproliferativno djelovanje ferocenskih spojeva na melanom B16, Lewisov plućni karcinom te antimikrobno djelovanje na Gram-pozitivne bakterije, a glavni je cilj razviti učinkovite i primjenjive lijekove. Tako je razvijen ferocifen, terapeutik sintetiziran po uzoru na tamoksifen (slika 10(a)) i hidroksitamoksifen (slika 10(b)), koji se koriste u terapiji raka dojke.



**Slika 10.** Struktura tamoksifena (a) i hidroksitamofena (b) (1)

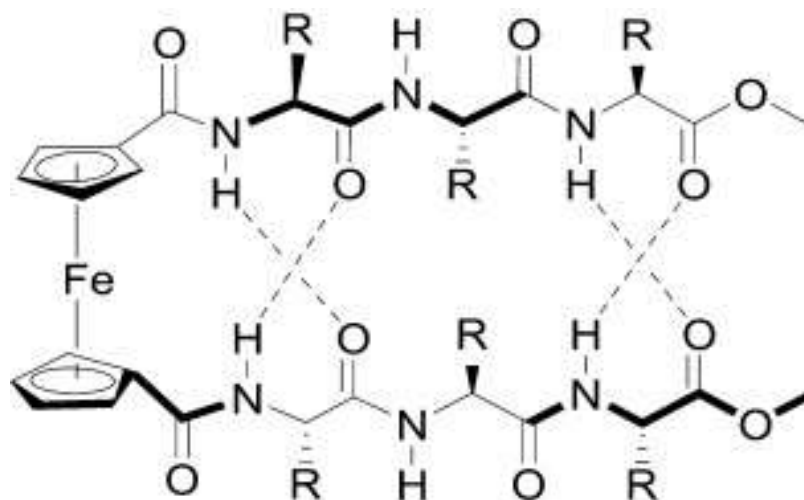
Analozi ferocena sintetizirani su i radi pojave rezistencije na poznate antimalarijske lijekove, stoga su provedena različita istraživanja na lijekovima, poput feroklorokina. Osim toga, pripremljeni su i konjugati ferocena s dobro poznatim lijekovima, primjerice, s antibioticima kao

što su penicilini i cefalosporini, kao i varijacije lijekova s ferocenskom jedinicom, poput ferocetil aspirina i ferokina (53-57).

## 2.6. PEPTIDOMIMETICI

Peptidi i njihovi derivati pripadaju u skupinu molekula srednje veličine. Iako sudjeluju u važnim imunološkim i neurološkim procesima, peptidi nisu pogodni za korištenje u terapijske svrhe iz nekoliko razloga. Najprije, njihova velika fleksibilnost odgovorna je za interakciju s različitim receptorima, što rezultira nepoželjnim nuspojavama. Također, podliježu proteolitičkom djelovanju peptidaza iz probavnog trakta i krvnog seruma te njihova velika molekulaska masa i polarni karakter otežavaju transport kroz staničnu membranu i moždano-krvnu barijeru. Peptidomimetici su spojevi čiji esencijalni farmakoforni elementi oponašaju 3D-strukturu prirodnih peptida i zadržavaju njihovu sposobnost interakcije s biološkim ciljevima pri čemu ostvaruju identičan učinak (58). Peptidomimetici moraju zadovoljiti određena farmakološka svojstva kao što su minimalne nuspojave, metabolička stabilnost, dobra brzina apsorpcije lijeka u cirkulaciji te visok afinitet i selektivnost za receptore. Afinitet i selektivnost za receptore postiže se smanjenjem konformacijske slobode, odnosno uvođenjem različitih konformacijskih ograničenja, što rezultira zauzimanjem čvrste i rigidne konformacije. Peptidomimetik je spoj čija su sekundarna strukturalna svojstva analogna prirodnom peptidu, zbog čega može oponašati njegovu biološku funkciju. Smatanje peptida u točno određenu sekundarnu strukturu ( $\alpha$ -uzvojnica,  $\beta$ -ploču ili okret) omogućeno je protein-protein interakcijama (*PPI*, engl. *Protein-Protein Interactions*). PPI je moguće ostvariti hidrofobnim interakcijama, van der Waalsovima interakcijama te vodikovim i ionskim vezama (2). Proteini najčešće tvore  $\alpha$ -uzvojnice te se upravo zato peptidomimetici dizajniraju tako da i oni tvore ovakvu sekundarnu strukturu. Tvorba  $\beta$ -okreta, kao sekundarnog strukturalnog elementa, omogućena je mijenjanjem smjera polipeptidnog lanca, zbog tvorbe vodikovih veza (IHB).  $\beta$ -okret ima važnu ulogu u biološkim sustavima. Zamjenom određenih ostataka aminokiselina s inicijatorima okreta omogućeno je usmjeravanje pobočnih ogranaka na isti način kao i u prirodnim peptidima, što uzrokuje veću proteolitičku aktivnost mimetika. Struktura  $\beta$ -okreta stabilizirana je vodikovim vezama između susjednih lanaca, a posljedica tog vezanja je zaklanjanje okosnice peptida koji u tom slučaju gubi mogućnost vezanja s drugim molekulama. Vezanje je omogućeno samo pobočnim ograncima (2). Veliki izazov predstavlja mimikrija  $\beta$ -nabrane ploče, budući da se radi o sekundarnoj strukturi koja se temelji na interakcijama međusobno udaljenih aminokiselina.

Ključna prednost svih sekundarnih elemenata, prilikom pripreve peptidnih mimetika, jest mogućnost umetanja rigidnih kalupa u strukture peptida. Heteroanularno disupstituirani ferocenski biokonjugati koriste se kao temelj za stvaranje molekulskih kalupa s karakteristikama okreta i struktura sličnih  $\beta$ -nabranim pločama (slika 11). U ovim molekulama, ciklopentadienski (Cp) prstenovi, koji gotovo slobodno rotiraju, udaljeni su oko 3.3 Å. Ova udaljenost je idealna za formiranje IHB u konjugatima koji se sastoje od prirodnih aminokiselina (1,59,60).



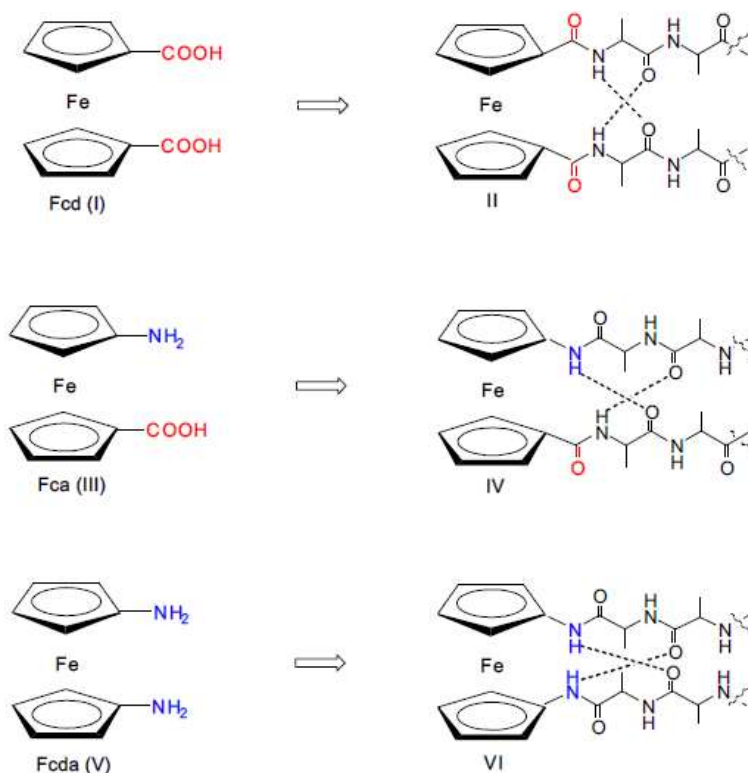
**Slika 11.** Struktura slična  $\beta$ -nabranim pločama koja uključuje ferocen (61)

## 2.7. FEROCENSKI PEPTIDI

Ferocenski konjugati s aminokiselinama često se koriste u pripravi peptidomimetika. Ovisno o strukturi ferocenskog prekursora, 1,1'-disupstituirani ferocenski peptidi dijele se u tri skupine (slika 12):

1.  $\text{Fn}[\text{CO}(\text{AA})_m\text{OMe}]_2$  (**II**), izvedeni iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (Fcd, **I**)
2.  $\text{Y}(\text{AA})_n\text{Fca}(\text{AA})_m\text{OMe}$  (**IV**), izvedeni iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca, **III**)
3.  $\text{Fn}[\text{NH}(\text{AA})_m\text{Y}]_2$  (**VI**), izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda, **V**).

[Fn=ferocenilen, AA = prirodna aminokiselina, Y = Ac (acetil), Boc (*tert*butoksikarbonil), m = 1, 2,...; n = 1, 2,...] (60)

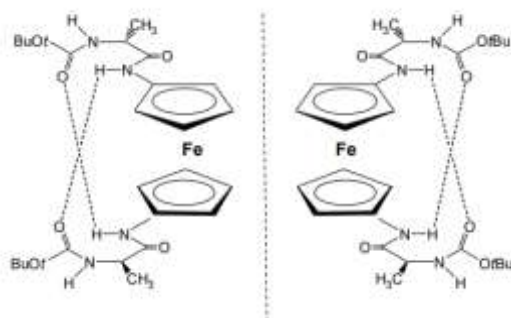


**Slika 12.** Ferocenski peptidi **II**, **IV**, **VI** izvedeni iz Fcd (**I**), Fca (**III**) i Fcda (**V**) (IHB su označene isprekidanim crtama) (1,60)

## 2.8. FEROCENSKI PEPTIDI IZVEDENI IZ FEROCEN-1,1'-DIAMINA

Ferocenski konjugati izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda, **V**) slabo su istraženi, a prve takve konjugate sintetizirali su Kraatz i suradnici kopulacijom Fcda (**V**) s L- i D-Ala (62). Tim istraživanjem dobivena su dva simetrično disupstituirana homokiralna peptida: Fn-(NH-Ala-Boc)<sub>2</sub> (**VII**) i Fn-(NH-D-Ala-Boc)<sub>2</sub> (**VIII**), koji tvore dva 10-člana IHB-prstena. Ti prstenovi rezultat su interlančanih NH<sub>Fn</sub>...OC<sub>Boc</sub> vodikovih veza, što odgovara strukturi β-okreta (slika 13). CD-spektroskopskom analizom utvrđena je helična kiralnost istoimenih peptida u otopini: **VII** poprima pozitivan Cottonov efekt u ferocenskom području, što upućuje na *P*-heličnost, dok **VIII** poprima efekt suprotnog predznaka, što odgovara *M*-heličnosti ferocena.



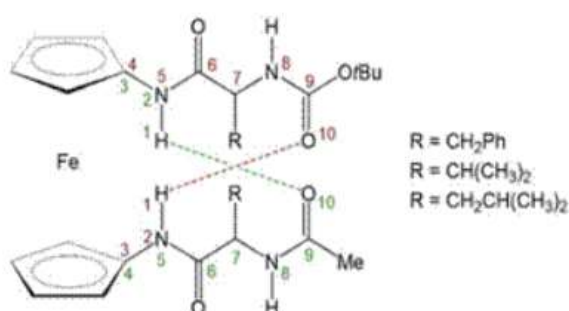


**Slika 13.** Shematski prikaz IHB dipeptida  $\text{Fn}-(\text{NH-Ala-Boc})_2$  (**VII**, lijevo) i  $\text{Fn}-(\text{NH-D-Ala-Boc})_2$  (**VIII**, desno)

Kovačević i suradnici 2015. godine primijenili su novi sintetski pristup prema asimetrično supstituiranim ferocenima slabo istraženih biokonjugata koji se sastoje od ferocen-1,1'-diamina te strukturno i kiralno različitih aminokiselinskih sekvenci. Do sada je ferocen-1,1'-diamin bio pogodan za sintezu spojeva s identičnim aminokiselinskim sekvencama na svojim *N*-krajevima, što je dovelo do sinteze simetrično disupstituiranih homokiralnih biokonjugata, stabiliziranih kroz 14-člani intramolekularni prsten. Prvi je put objavljena sinteza ortogonalno zaštićenog homokiralnog produkta  $\text{Ac-Ala-NH-Fn-NH-Ala-Boc}$  (**IX**). Detaljna konformacijska analiza provedena na novim spojevima:  $\text{Ac-Ala-NH-Fn-NH-Ala-Boc}$  (**IX**) i  $\text{Fn}-(\text{NH-Ala-Ac})_2$  (**X**) pokazuju veliku sklonost tvorbi 14-članih prstenova između dva supstituenta, bez obzira na Boc i/ili Ac zaštitne skupine. Spektroskopska analiza (IR, NMR, CD) novih spojeva, potkrijepljena DFT studijama, sugerira zanimljivu značajku okosnice ferocen-1,1'-diamina. Naime, isti uzorak vodikovih veza, tj. 14-člani prsten kojeg tvore vodikove veze utvrđen je i u otopini i u krutom stanju, što spojeve **IX** i **X** čini obećavajućim i jednostavnim peptidomimeticima koji mogu oponašati sekundarnu strukturu  $\beta$ -nabrane ploče. Budući da je prethodno opisani Boc-zaštićeni biokonjugat **VIII** stabiliziran s dvije  $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$  IHB, uključene u 14-člani prsten, njihov je cilj bio istražiti hoće li zamjena jedne ili obje Boc-skupine peptida **VIII** sa sterički manje zahtjevnim Ac-skupinama u peptidima **IX** i **X** utjecati na obrazac IHB. Stoga se nije očekivalo da će nepolarni i relativno mali pobočni lanac alanina interferirati s vodikovim vezama. Ovi rezultati ostavljaju prostor za sintezu složenijih sustava, poput onog opisanog u ovom diplomskom radu. Ovdje korišteni ferocen-1,1'-diamin (Fcda), kao sastavni dio još neistražene skupine peptidomimetika **VI**, pokazuje veliki potencijal za očuvanje  $\beta$ -okreta u otopini, oponašajući tako uzorak vodikovih veza  $\beta$ -nabranih ploča u prirodnim peptidima (59).

Kiralne peptide koji sadrže ferocen-1,1'-diamin kao induktor okreta proučavali su također Kovačević i suradnici 2017. godine. Prvotno je sintetiziran niz peptida koji sadrže homo- i heterokiralne Ala-Pro sekvence, konjugirane s ferocen-1,1'-diaminom. Tako sintetizirani peptidomimetici zatim su detaljno analizirani IR-, NMR- i CD-spektroskopijom, kako bi se definirao utjecaj kiralne okosnice i *N*- terminalne skupine (Boc/Ac) novosintetiziranih peptidomimetika na njihova konformacijska svojstva. Štoviše, analiziran je utjecaj *N*-terminalnih Ac ili Boc skupina te kiralnosti aminokiselina na raspodjelu IHB. Ustanovljeno je da homokiralni peptidi, koji imaju najstabilniju konformaciju, tvore desetoročlane i trinaesteročlane prstenove, povezane intermolekulskim vodikovim vezama. Zajedničko obilježje najstabilnijih heterokiralnih peptida bilo je stvaranje struktura sličnih sekundarnoj strukturi  $\beta$ -okreta. Takve strukture tvorile su sedmeročlane prstenove, povezane IHB te šesnaesteročlane prstenove, povezane intermolekulskim vodikovim vezama. Dokazano je kako je utjecaj zamjene dviju *N*- terminalnih skupina na preraspodjelu vodikovih veza nešto veći kod homokiralnih, nego kod heterokiralnih derivata (63).

Uzimajući u obzir veliku važnost okreta kao sekundarne strukture, Kovačević i suradnici 2022. godine sintetizirali su derivate ferocen-1,1'-diamina i različitih hidrofobnih aminokiselina: **XI** (D-Val), **XII** (L-Val), **XIII** (L-/D-Phe) te **XIV** (L-/D- Leu). Cilj je ovog rada bio istražiti inducira li ferocen-1,1'-diamin  $\beta$ -okret nakon konjugacije s aminokiselinom te utječe li veličina i/ili razgranatost pobočnih ogranaka Phe, Val i Leu na obrazac vodikovih veza. Ustanovljeno je kako ovi homokiralni konjugati doista tvore stabilne strukture koje se sastoje od dva 10-člana prstena stabilizirana intramolekulskim vodikovim vezama, tvoreći strukturu nalik dva  $\beta$ -okreta (slika 14) (64).



**Slika 14.** Intramolekulske vodikove veze u peptidima **XI- XIV**  
(dva 10-člana IHB prstena, tj. dva  $\beta$ -okreta)

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI I METODE

Sve kemikalije korištene u sintezi bile su analitičke čistoće, dok su otapala korištena u radu pročišćena prema standardnim postupcima (65).

Za praćenje tijeka kemijskih reakcija korištena je tankoslojna kromatografija (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel), s fluorescentnim indikatorom valne duljine 254 nm. TLC je primijenjena i za kontrolu čistoće sintetiziranih spojeva. Za detekciju neferocenskih spojeva provedena je tankoslojna kromatografija pomoću ultraljubičaste (UV) svjetlosti, pri valnoj duljini od 254 nm, te ninhidrinom, uz paralelno zagrijavanje.

Sintetizirani produkti pročišćeni su uporabom smjese etil-acetata i diklormetana, kao eluensa, tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu („Merck“, Kieselgel 60 HF254).

Karakterizacija sintetiziranih spojeva napravljena je pomoću tekućinske kromatografije visoke razlučivosti sa spektrometrijom masa (HPLC-MS), nuklearnom magnetskom rezonancom (NMR) te infracrvenom spektroskopijom (IR).

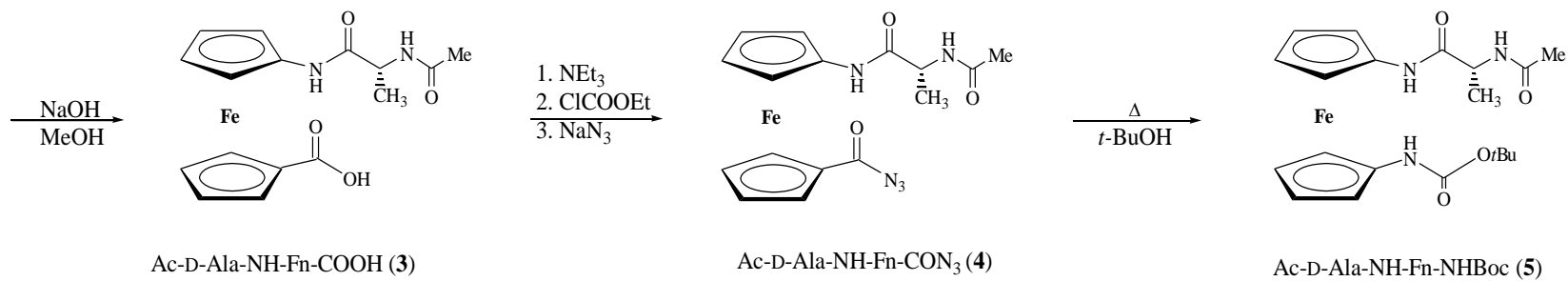
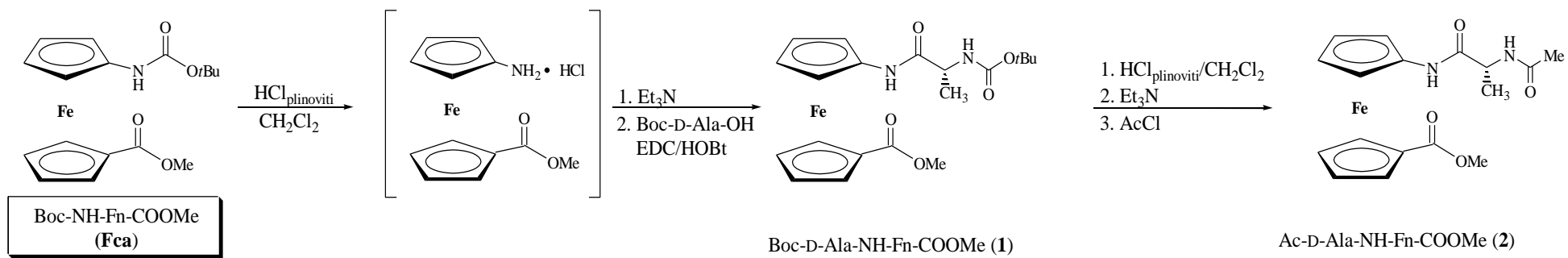
Tališta su određena na Reichert Thermovar HT 1 BT 11 i nisu korigirana. UV/Vis- (ultraljubičasto-vidljiv) i CD-spektri (cirkularni dikroizam) snimljeni su na CD-spektrofotometru Jasco-810 u diklormetanu ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) i dimetil-sulfoksidu (DMSO). Na spektrofotometru PerkinElmer Spectrum Two u  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  snimljeni su IR-spektri uzoraka. Maseni spektri izmjereni su ESI ionizacijom (*engl.*, *Electrospray ionization*) na Agilent Technologies 6410 Triple Quadrupole Mass Spectrometer.  $^{13}\text{C}$ -NMR- i  $^1\text{H}$ -spektri određeni su u  $\text{CDCl}_3$  na spektrometru Bruker AV600, uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard. Kemijski pomaci ( $\delta$ ) izraženi su u jedinici ppm. DFT-računi (*engl.*, *density functional theory*) načinjeni su pomoću programa Gaussian 09/DFT (B3LYP, MO6 i MO6-2X).

### Popis korištenih kemikalija:

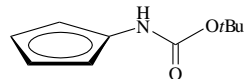
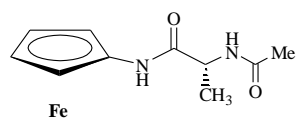
- diklormetan,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$
- natrijev klorid,  $\text{NaCl}$
- sulfatna kiselina,  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- EDC, *N'*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilkarbodiimid-hidroklorid
- HOBT, 1-hidroksibenzotriazol-hidrat
- trietilamin,  $\text{Et}_3\text{N}$
- natrijev hidrogenkarbonat,  $\text{NaHCO}_3$
- bezvodni natrijev sulfat,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$
- etil-acetat, EtOAc (Et-etil; Ac-acetil)
- metanol,  $\text{CH}_3\text{OH}$
- acetil-klorid,  $\text{CH}_3\text{COCl}$
- natrijev hidroksid,  $\text{NaOH}$
- aceton (propanon),  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$
- etil-kloroformat,  $\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}_2$
- natrijev nitrid,  $\text{Na}_3\text{N}$
- *tert*-butil-alkohol,  $(\text{CH}_3)_3\text{COH}$
- limunska kiselina (2-hidroksipropan-1,2,3-trikarboksilna kiselina),  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}$
- dimetil-sulfoksid, DMSO

### 3.2. PRIPRAVA FEROCENSKIH PEPTIDA

Ciljni ferocenski konjugati (**2**, **3**, **4**, **5**, **6** i **7**) pripremljeni su postupcima prikazanim na shemama 1 i 2. Priprava Boc-Fca izvedena je prema propisima opisanim u radu Barišić i suradnika te spektroskopski podatci odgovaraju podacima u literaturi (66).



**Shema 1.**

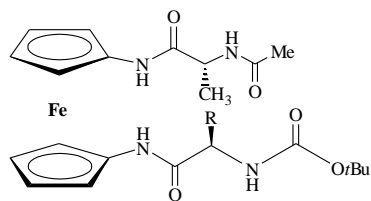


**5** (Ac-D-Ala-NH-Fn-NHBoc)

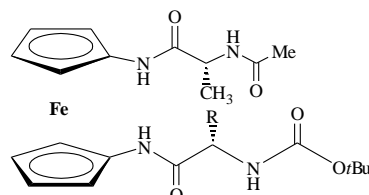
1. HCl<sub>plinoviti</sub>  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>  
2. Et<sub>3</sub>N

3. Boc-L-Val-OH  
EDC/HOBt

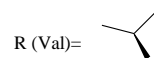
3. Boc-D-Val-OH  
EDC/HOBt



**6** (Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-L-Val-Boc)



**7** (Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Val-Boc)



**Shema 2.**

### 3.2.1. Priprava peptida Boc-D-Ala-NH-Fn-COOMe (1)

Nakon izračuna potrebnih količina reaktanata, Boc-zaštićena ferocenska aminokiselina Fca I (1 g, 2,8 mmol) otopi se u diklormetanu, ohladi na 0 °C i izloži djelovanju plinovitog klorovodika. HCl je pripremljen *in situ* reakcijom natrijevog klorida i sulfatne kiseline. Nakon 30-minutnog miješanja u ledenoj kupelji te otparavanja na rotacijskom vakuum-uparivaču, nastali se hidroklorid suspendira u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i obradi sa suviškom trietilamina (pH~9). Dobiveni se ferocenski amin kopulira s Boc-D-Ala-OH (1,18 g, 5,5 mmol), prethodno aktiviranim primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon jednosatnog miješanja na sobnoj temperaturi (ili dok reakcija ne završi), reakcijska se smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata (NaHCO<sub>3</sub>), 10 %-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim natrijevim sulfatom (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu, uz CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOAc = 5:1 kao eluens.

Ovako pripremljen sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom kromatografijom na način da se homogena smjesa uz pomoć kapalice s vatom nanese u obliku tanke linije na staklenu ploču presvučenu sa slojem silikagela. Prethodno se ispita koji sustav otapala odgovara za optimalno pročišćavanje produkta. U taj sustav otapala stavi se ploča te se pričekava, dok se spojevi iz smjese ne razdijele. Nakon razvijanja kromatograma, mrlja koja po R<sub>f</sub> vrijednosti odgovara produktu sastruže se uz pomoć špatule te se prenese u Sinterov lijevak, a potom ispire otapalom, dok se silikagel u lijevku ne obezboji. Otapalo se upari te se čisti produkt prenese u izvaganu tikvicu. Količina potrebna za snimanje koncentracijskih IR-spektara odmah se pripremi u jednu epruvetu, uzme se mala količina za određivanje tališta, te se ostavi 100 mg čistog uzorka za naknadna snimanja (NMR).

#### **Boc-D-Ala-NH-Fn-COOMe (1)**

$t_t = 102-107^\circ\text{C}$ ;  $R_f = 0,49$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : EtOAc = 5 : 1).

**IR** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3422 sr (NH<sub>slobodni</sub>), 3316 sl (NH<sub>asocirani</sub>), 1707 (C=O<sub>COOMe</sub>), 1536, 1498, 1369 (amid II).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,63 [s, 1H, NH<sub>Fn</sub>]; 5,14 [d,  $J = 6,93$  Hz, 1H, NH<sub>Ala</sub>]; 4,76 (m, 2H, 7-H, 10-H); 4,68 (s, 1H, 2-H); 4,57 (s, 1H, 5-H); 4,38 (m, 2H, 8-H, 9-H); 4,22 [m, 1H, CH<sub>Ala</sub>]; 4,04 (m, 1H, 4-H); 4,02 (m, 1H, 3-H); 3,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COOMe); 1,48 [s,

9H, CH<sub>3</sub>Boc]; 1,43 [d,  $J = 6.98$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>Ala].

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 171,88 [CO<sub>COOMe</sub>]; 171,17 [CO<sub>Ala</sub>]; 156,02 [CO<sub>Boc</sub>]; 95,28 (C-1); 80,61 [C<sub>q</sub>Boc]; 72,70 (2C, C-8, C-9); 72,13 (C-6); 71,39 (C-10); 71,25 (C-7); 66,64 (C-4); 66,38 (C-3); 63,30 (C-2); 62,99 (C-5); 51,80 [2C, CH<sub>3</sub>COOMe, CH<sub>Ala</sub>], 28.51 [CH<sub>3</sub>Boc]; 17,94 [CH<sub>3</sub>Ala].

### 3.2.2. Priprava Ac-D-Ala-NH-Fn-COOMe (2)

U suspenziju Boc-peptida **1** (800 mg; 1,52 mmol) u EtOAc, ohlađenu na 0 °C, uvodi se plinoviti HCl dobivenog postupkom kao pri pripremi peptida **1**. Nakon što se uz pomoć tankoslojne kromatografije utvrdi potpuno deprotektiranje peptida, otapalo se upari, a rezultirajući se hidroklorid peptida **1** suspendira u suhom diklormetanu (8 mL) i otopi uz dodatak Et<sub>3</sub>N (1,67 mL; 12,1 mmol). Ovako pripremljenoj otopini, prethodno ohlađenoj na 0 °C, uz miješanje, oprezno se dokapa acetilklorid (649  $\mu$ L; 9,12 mmol) te, nakon 15 minuta miješanja pri 0 °C, slijedi izlijevanje reakcijske smjese u vodu i višestruka ekstrakcija diklormetanom. Prethodno izdvojeni organski sloj ispire se zasićenom vodenom otopinom natrijevog klorida NaCl, a zatim suši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i uparava do suhog. Nastali sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu, uz eluens EtOAc.

#### Ac-D-Ala-NH-Fn-COOMe (2)

$t_r = 127^\circ\text{C}$ ;  $R_f = 0,4$  (EtOAc).

**IR** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3421 sr (NH<sub>slobodni</sub>), 3295 sr š (NH<sub>asocirani</sub>), 1712, 1661 (C=O<sub>COOMe</sub>, C=O<sub>CONH</sub>), 1561, 1466, 1372 (amid II).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 8,23 [s, 1H, NH<sub>Fn</sub>]; 6,54 [d,  $J = 7,29$  Hz, 1H, NH<sub>Ala</sub>]; 4,75 (m, 1H, 7-H); 4,73 (m, 1H, 10-H); 4,67 (m, 1H, 2-H); 4,61 [m, 2H, CH<sub>Ala</sub>]; 4,38 (m, 2H, 8-H, 9-H); 4,04 (m, 1H, 4-H); 4,01 (m, 1H, 3-H); 3,79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COOMe); 2,09 [s, 3H, CH<sub>3</sub>Ac]; 1,45 [d,  $J = 6,96$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>Ala].

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 171,88 [CO<sub>COOMe</sub>]; 170,86 [CO<sub>Ala</sub>]; 170,63 [CO<sub>Ac</sub>]; 95,32 (C-1); 72,61 (2C, C-8, C-9); 72,19 (C-6); 71,40 (C-10); 71,25 (C-7); 66,63 (C4); 66,31 (C-3); 63,34 (C-2); 63,04 (C-5); 51,80 [CH<sub>3</sub>COOMe]; 49,41 [CH<sub>Ala</sub>]; 23,43 [CH<sub>3</sub>Ac]; 18,13 [CH<sub>3</sub>Ala].



### 3.2.3. Priprava Ac-D-Ala-NH-Fn-COOH (3)

U otopinu estera **2** (800 mg, 1,7 mmol), u 7 mL metanola, dodaje se 100 mg natrijevog hidroksida NaOH (1,7 mmol) i par kapi vode. Nakon jednog sata refluksiranja, pri temperaturi od 65 °C, reakcijska se smjesa upari, ostatak zakiseli 20 %-tnom otopinom HCl-a te ekstrahira etilacetatom. Organski sloj ispere se zasićenom otopinom NaCl-a, osuši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari.

#### Ac-D-Ala-NH-Fn-COOH (3)

$t_f = 128\text{--}134^\circ\text{C}$ ;  $R_f = 0,23$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : EtOAc = 1 : 1).

**IR** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3420 sl (NH<sub>slobodni</sub>), 3296 sr (NH<sub>asocirani</sub>), 3109-2800 (m, OH, COOH), 1710, 1697, 1653 (C=O<sub>COOH</sub>, C=O<sub>CONH</sub>), 1576 (amid II).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/\text{ppm}$ : = 4,71 (s, 1H, H<sub>Fn</sub>); 4,66 (s, 2H, H<sub>Fn</sub>); 4,52-4,48 (m, 2H, H<sub>Fn</sub>, CH<sub>Ala</sub>); 4,29 (s, 1H, H<sub>Fn</sub>); 4,27 (s, 1H, H<sub>Fn</sub>); 4,01 (m, 2H, H<sub>Fn</sub>); 2,05 (s, 3H, CH<sub>3Ac</sub>); 1,36 (d,  $J = 5,6$  Hz, 3H, CH<sub>3Ala</sub>);

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/\text{ppm}$ : 173,67 (CO<sub>Fn</sub>, CO<sub>COOH</sub>, CO<sub>Ac</sub>), 95,67, 79,51 (C<sub>qFn</sub>), 72,83, 72,38, 72,13, 67,04, 66,93, 64,46, 64,42 (CH<sub>Fn</sub>), 50,98 (CH<sub>Ala</sub>), 22,66 (CH<sub>3Ac</sub>), 18,03 (CH<sub>3Ala</sub>).

### 3.2.4. Priprema Ac-D-Ala-NH-Fn-CON<sub>3</sub> (4)

Otopini kiseline **3** (1 g, 2,19 mmol) u 10 mL acetona dodaje se par kapi vode. Reakcijskoj se smjesi, ohlađenoj na 0 °C, dokapa otopina Et<sub>3</sub>N (0,26 g, 2,49 mmol) u acetonu, te otopina etil-kloroformata ClCOOEt (0,052 g, 1,64 mmol) u acetonu, pazeći da temperatura ne prijeđe 5 °C. Nakon 30 minuta miješanja, doda se otopina NaN<sub>3</sub> (0,215 g, 3,29 mmol) u vodi. Nakon jednosatnog miješanja u ledenoj kupelji, reakcijska se smjesa razrijedi hladnom vodom, ekstrahira diklormetanom, ispere 5 %-tnom zasićenom otopinom NaHCO<sub>3</sub> i zasićenom otopinom NaCl-a, osuši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari do suha.

### 3.2.5. Priprema Ac-D-Ala-NH-Fn-NHBoc (5)

Budući da je otopina azida nestabilna, njegova pregradnja u karbamat vrši se *in situ*. Otopina azida (400 mg) u 8 mL *tert*-butil-alkohola zagrijava se pri 65 °C sve dok na tankoslojnoj kromatografiji ima tragova reaktanta. Trajanje je ovog postupka približno 5 sati. Kada je reakcija

gotova, reakcijska se smjesa upari, a produkt pročisti tankoslojnom preparativnom kromatografijom uz EtOAc.

**Ac-D-Ala-NH-Fn-NHBoc (5)**

$t_r = 142\text{--}145^\circ\text{C}$ ;  $R_f = 0,33$  (EtOAc).

**IR** ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3428 j ( $\text{NH}_{\text{slobodni}}$ ), 3313 sr ( $\text{NH}_{\text{asocirani}}$ ), 1703, 1682, 1665 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{CONH}}$ ), 1530, 1513 (amid II).

**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 8,30 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{aFn}}$ ); 6,58 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H,  $\text{NH}_{\text{Ala}}$ ); 6,23 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{Boc}}$ ); 4,61–4,53 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{Fn}}$ ,  $\text{CH}_{\text{Ala}}$ ); 4,35–4,30 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Fn}}$ ); 4,13–4,01 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{Fn}}$ ); 2,05 (s, 3H,  $\text{CH}_3_{\text{Ac}}$ ); 1,50 [s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{Boc}$ ]; 1,44 (d,  $J = 6,9$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3_{\text{Ala}}$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 171,20 ( $\text{CO}_{\text{Fn}}$ ); 170,54 ( $\text{CO}_{\text{Ac}}$ ); 80,54 ( $\text{C}_{\text{qBoc}}$ ); 65,93; 65,53; 65,47; 65,15; 62,95 ( $\text{CH}_{\text{Fn}}$ ); 49,51 ( $\text{CH}_{\text{Ala}}$ ); 28,55 [ $(\text{CH}_3)_3\text{Boc}$ ]; 23,37 ( $\text{CH}_3_{\text{Ac}}$ ); 18,43 ( $\text{CH}_3_{\text{Ala}}$ ).

**3.2.6. Priprema Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-L-Val-Boc (6) i Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Val-Boc (7)**

Boc-zaštićeni prekursor **5** (300 mg, 0,57 mmol) otopi se u EtOAc, ohladi na  $0^\circ\text{C}$  i izloži djelovanju plinovitog HCl. Nakon 30 minuta miješanja u ledenoj kupelji te otparavanja na rotacijskom vakuum-uparivaču, nastali se hidroklorid suspendira u  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i obradi sa suviškom  $\text{Et}_3\text{N}$  (pH~9). Dobiveni se slobodni amin kopulira s 250 mg (1,14 mmol) Boc-D/L-Val-OH, primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon jednog sata miješanja pri sobnoj temperaturi, rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom  $\text{NaHCO}_3$ , 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl-a. Organski se sloj osuši bezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOAc} = 5:1$  kao eluens.

Prilikom kopulacije hidroklorida spoja **5** s Boc-L-Val-OH, a s ciljem dobivanja heterokiralnog dipeptida Ac-D-Ala-NH-Fn-L-Val-Boc (**6**) uočeno je da ne dolazi do stvaranja mrlje produkta.

**Ac-D-Ala-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-D-Val-Boc (7)**

$t_r = >338^\circ\text{C}$ ;  $R_f = 0,63$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{EtOAc} = 1 : 5$ ).

**IR** ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3431 sr ( $\text{NH}_{\text{slobodni}}$ ), 3295 j ( $\text{NH}_{\text{asocirani}}$ ), 1712, 1677, 1670 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{CONH}}$ ), 1564, 1535, 1503 (amid II).

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 9,09 (s, 2H, NH<sup>1</sup><sub>Fn</sub>, NH<sup>2</sup><sub>Fn</sub>); 6,67 (d, *J* = 5,12 Hz, 1H, NH<sub>Ala</sub>); 5,37 (s, 1H, H-10); 5,34 (s, 1H, H-7); 5,24 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, NH<sub>Val</sub>); 4,87 (dq, *J* = 4,6 Hz, 6,5 Hz, 1H, CH<sub>Ala</sub>); 4,10 (s, 2H, H-2, H-5); 4,00-3,95 (m, 4H, H-3, H-4, H-8, H-9); 4,58 (t, *J* = 7,6 Hz, 6,5 Hz, 1H, CH<sub>Val</sub>); 2,07 (s, 3H, CH<sub>3-Ac</sub>); 2,04-1,94 (m, 1H, CH<sub>β-Val</sub>); 1,46 [s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc]; 1,39 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H, CH<sub>3-Ala</sub>); 1,01 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H, CH<sub>3-Val</sub>); 0,99 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H, CH<sub>3-Val</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 171,79 (CO<sub>Fn1</sub>); 171,27 (CO<sub>Fn2</sub>); 170,83 (CO<sub>Ac</sub>); 157,26 (CO<sub>Boc</sub>); 130,15 (C-1); 129,89 (C-6); 80,72 (C<sub>qBoc</sub>); 65,91 (C-8); 65,84 (C-9); 65,04 (C-3); 65,01 (C-4); 62,98 (C-7); 62,83 (C-10); 61,75 (C-2); 61,36 (CH<sub>Val</sub>); 61,31 (C-5); 50,26 (CH<sub>Ala</sub>); 30,37 (CH<sub>β-Val</sub>); 28,58 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Boc]; 23,09 (CH<sub>3-Ac</sub>); 19,44 (CH<sub>3-Val</sub>); 19,29 (CH<sub>3-Val</sub>); 17,35 (CH<sub>3-Ala1</sub>).

**ESI-MS:** izračunato za C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Fe: 528,44; dobiveno [M+H]<sup>+</sup> na *m/z* 529,44  
Snipljeni spektri biokonjugata **7** prikazani su u prilogima 7.1 do 7.4.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. UVOD

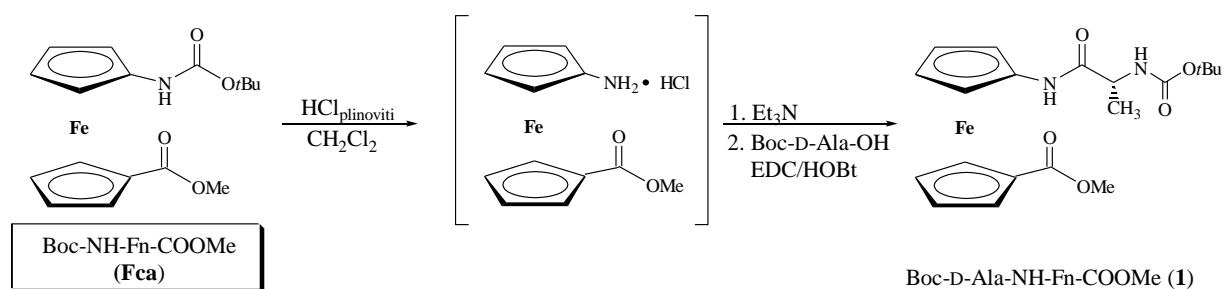
Kako je opisano u Teorijskom dijelu ovog Diplomskog rada, peptidi i proteini koji se nalaze u prirodi posjeduju brojne nedostatke. Budući da udaljenost između dva ciklopentadienilna prstena u molekuli ferocena iznosi 3,3 Å, omogućena je tvorba vodikovih veza, a njegovo umetanje u peptidne lanace omogućit će tvorbu različitih strukturnih elemenata (uzvojnice, plohe i okreti). Struktura ferocenskog sintona [(Fcd (**I**), Fca (**III**), Fcda (**V**)), kao i struktura i apsolutna konfiguracija kopuliranih prirodnih aminokiselina određuju obrasce IHB na kojima se temelji tvorba sekundarnih strukturnih elemenata u peptidima **II**, **IV** i **VI**.

U Laboratoriju za organsku kemiju PBF-a po prvi su puta pripremljeni ferocenski peptidi izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina i alanina (59). Daljnja istraživanja bila su usmjerena na ispitivanje utjecaja vrste i kiralnosti umetnutih aminokiselina (63,64,67) na konformacijska svojstva takvih biokonjugata.

Cilj ovog diplomskog rada bio je opisati pripremu biokonjugata nastalih kopulacijom ferocen-1,1'-diamina (Fcda, **V**) s aminokiselinama alaninom i valinom, a posljedično i utjecaj bočnog ogranka i kiralnosti na tvorbu IHB i elemenata sekundarne strukture. Zato su pripremljeni ferocenski biokonjugati uvođenjem D-alanina i D-, odn. L-valina. Budući da se heterokiralni biokonjugat s L-valinom (**6**) tijekom sinteze raspadao te nije pokazao stabilnost koja bi omogućila daljnji nastavak istraživanja, konformacijski prostor takvog biokonjugata nije istražen. U nastavku ćemo opisati sintezu i konformacijsku analizu homokiralnog ferocenskog peptida s D-valinom, Ac-D-Ala-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-D-Val-Boc (**7**).

### 4.2. Priprava ciljnog ferocenskog peptida Ac-D-Ala-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-D-Val-Boc (**7**)

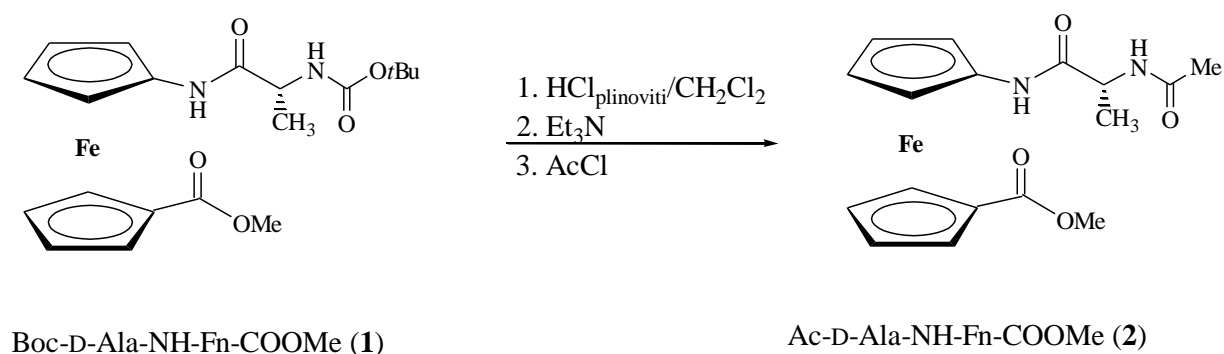
Prvi korak u pripravi ciljnog dipeptida **7** jest sinteza peptida **1** (shema 3), koji se dobija iz ferocenske aminokiseline deprotekcijom njezine amino-skupine djelovanjem plinovitog HCl-a. Pri tome nastaje hidroklorid koji se obrađuje s Et<sub>3</sub>N, a zatim slijedi kopulacija slobodnog ferocenskog amina s Boc-D-Ala-OH, primjenom standardne HOBt/EDC metode, pri čemu je dobiven peptid **1**.



**Shema 3.** Sinteza peptida **1**

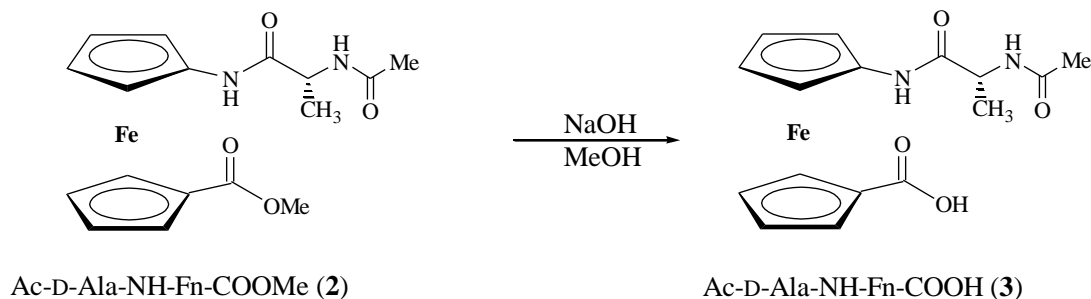
Uvođenje D-Ala na ferocenski *N*-terminus Fca (**III**) očituje se u  $^1\text{H-NMR}$ -spektrima konjugata **1** dubletom ( $\delta \sim 1,3$  ppm) i multipletom ( $\delta \sim 4,51$  ppm) metilnog, odn. metinskog protona, dok se alaninski signali u  $^{13}\text{C-NMR}$ -spektrima javljaju pri  $\delta \sim 48$  ppm ( $\text{CH}_{\text{Ala}}$ ) te  $\delta \sim 18$  ppm ( $\text{CH}_3_{\text{Ala}}$ ). Karbonilna skupina iz novonastale peptidne veze spoja **1** registrirana je signalom pri  $\delta \sim 173$  ppm.

Transformacija Boc-peptida **1** u Ac-analog **2** prikazan je na shemi 4, a karakterizira ga gubitak singleta *tert*-butilnog protona pri  $\delta \sim 1,5$  ppm te javljanjem singleta acetilnog protona pri  $\delta \sim 2$  ppm u  $^1\text{H-NMR}$ -spektrima. U  $^{13}\text{C-NMR}$ -spektru ova se zamjena očituje gubitkom signala karbonilnih i *tert*-butilnih C-atoma pri  $\delta \sim 155$  ppm odn.  $\delta \sim 28$  ppm te javljanjem novih signala pri  $\delta \sim 169$  ppm ( $\text{CO}_{\text{Ac}}$ ) i  $\delta \sim 23$  ppm ( $\text{CH}_3_{\text{Ac}}$ ).



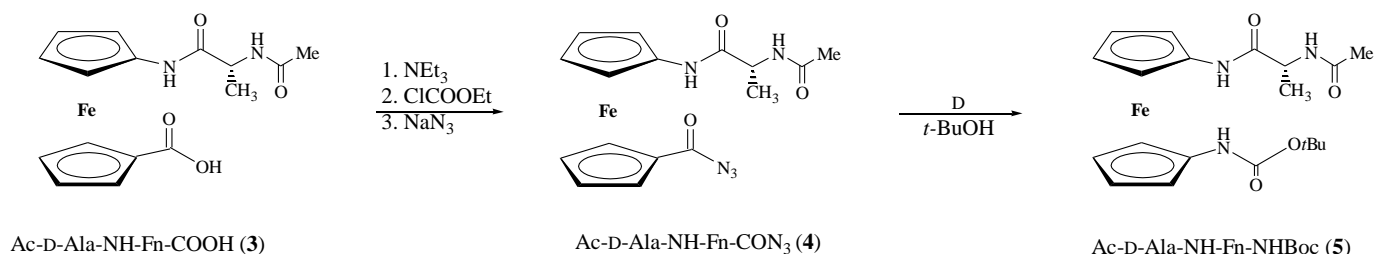
**Shema 4.** Skidanje zaštite i nastanak acetamida **2**

Na shemi 5 prikazana je hidroliza esterske skupine dipeptida **2** vezane na donji ciklopentadienilni prsten koja je provedena u iznimno blagim uvjetima, kako bi se izbjegla racemizacija pripravljenog biokonjugata **3** – za pripremu kiseline korištena je ekvimolarna količina NaOH, a reakcija je provedena pri 65 °C (tijekom 1 h).



**Shema 5.** Hidroliziranje esterskih skupina **2** i nastanak kiseline **3**

Ortogonalno zaštićeni ciljni prekursor **5** pripremljen je *in situ* Curtiusovom pregradnjom nestabilnog azida **4**, dobivenog iz kiseline **3** (shema 6). Kako bi se izbjegla pretvorba međuprodukta izocijanatne skupine u neželjeni spoj, koji bi se mogao pojaviti tijekom reakcije, *t*-BuOH je svježe osušen, a temperatura reakcije održavana je na 65 °C.



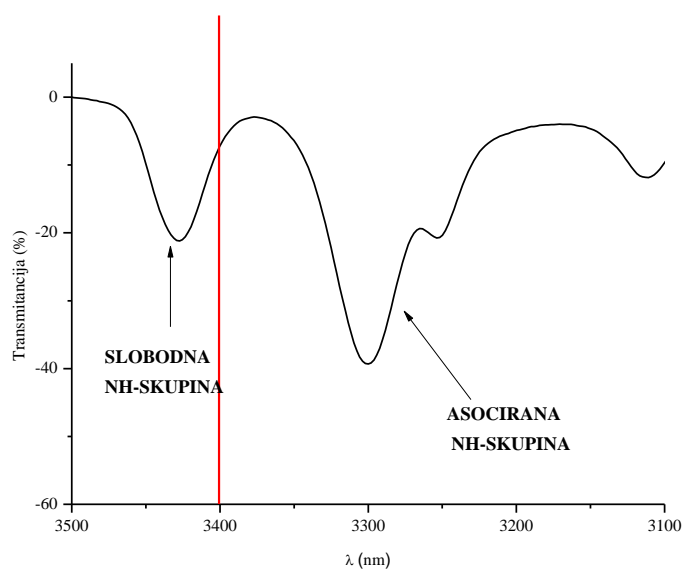
**Shema 6.** Priprava ciljnog prekursora **5** reorganizacijom azida **4** iz kiseline **3**

Završni korak pripreme ciljnih peptida **6** i **7** (shema 2) proveden je deprotekcijom karbamatne skupine prekursora **5**, čime se omogućila kopulacija *C*-aktiviranih Boc–D–Val–OH i Boc–L–Val–OH s njegovim slobodnim *N*-terminusom. Kao što je ranije navedeno, prilikom sinteze došlo je do raspada spoja **6** te daljnja spektroskopska mjerenja nisu bila moguća. Prilikom kopulacije s bočnim ogrankom valina, evidentirani su pomaci metinskih skupina pri 4,58 i 2,04 ppm u <sup>1</sup>H-NMR spektru, dok se metilenske skupine nalaze pri 1,39 i 1,01 ppm.

Metinske skupine pripadajućeg valinskog ogranka u  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektru dipeptida **7** javljaju se pri 61,36 i 30,37 ppm, dok se metilenske skupine nalaze pri 19,44 i 19,29 ppm.

### 4.3. IR spektroskopska analiza

Kako je već navedeno u teorijskom dijelu ovog rada, jedna od najčešće korištenih spektroskopskih tehnika, IR-spektroskopija, daje informaciju o konformacijskom prostoru peptida u otopini (10-12). Pomoću ove metode, procjenjuje se proteinska struktura određivanjem frekvencije pri kojoj kemijske veze apsorbiraju infracrveno zračenje, a jačina apsorpcije raste povećanjem polarnosti kemijskih veza. Prednost IR spektroskopije je što IR spektar daje informacije o strukturi i koncentraciji molekula. Istezne frekvencije NH-skupina u području nižem od  $3400\text{ cm}^{-1}$  ukazuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama, dok se signali iznad  $3400\text{ cm}^{-1}$  pripisuju slobodnim NH-skupinama (slika 15). Apsorpcijske vrpce karbonilnih esterskih skupina ispod  $1730\text{ cm}^{-1}$  upućuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.



**Slika 15.** Prikaz područja isteznih frekvencija NH-skupina

Kada su N–H ili C=O skupine uključene u vodikove veze, njihove se istezne frekvencije u IR-spektru pomiču prema području ispod  $3400\text{ cm}^{-1}$ . Područje amidnog signala ( $3300\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ ) proučavanog peptida **7** sadrži dva različita signala NH skupina. Po jedan iznad i ispod  $3400\text{ cm}^{-1}$ , što ukazuje na tvorbu konformacija povezanih vodikovom vezom (slika 15 i tablica 1).

**Tablica 1.** Istezne vibracije<sup>[a]</sup> NH- i CO-skupina dipeptida **7**

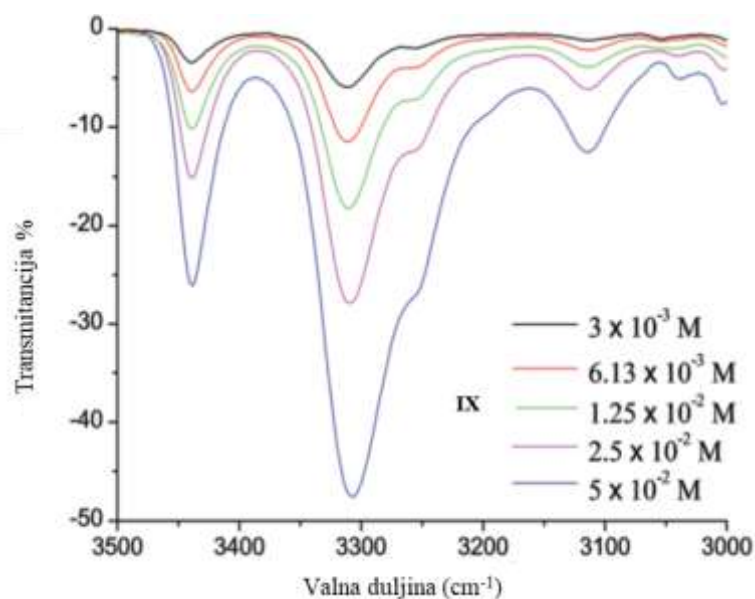
Spoj	Formula	$\nu_{\text{NH}}$ (slob.) <sup>[b]</sup>	$\nu_{\text{NH}}$ (asoc.) <sup>[c]</sup>	$\nu_{\text{CO}}$ (amid I)	$\nu_{\text{CO}}$ (amid II)
<b>7</b>	Ac-D-Ala-NH <sup>1</sup> -Fn-NH <sup>2</sup> -D-Val-Boc	3431sr	3295j	1712 1677 1670	1564 1535 1503

<sup>[a]</sup>IR-spektri snimljeni su u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,  $c = 5 \times 10^{-2}$  M.

Mjerenjem koncentracijski ovisnih IR-spektara određuje se intramolekulski ili intermolekulski karakter vodikove veze. Intermolekulske vodikove veze cijepaju se stupnjevitim razrjeđivanjem 50 mM otopine ispitivanog uzorka, a to uzrokuje znatno opadanje intenziteta signala intermolekulskih vodikovih veza u području nižem od 3400 cm<sup>-1</sup>. S druge strane, intenzitet intramolekulskih vodikovih veza razrjeđivanjem slabi proporcionalno slabljenju signala slobodne NH-skupine.

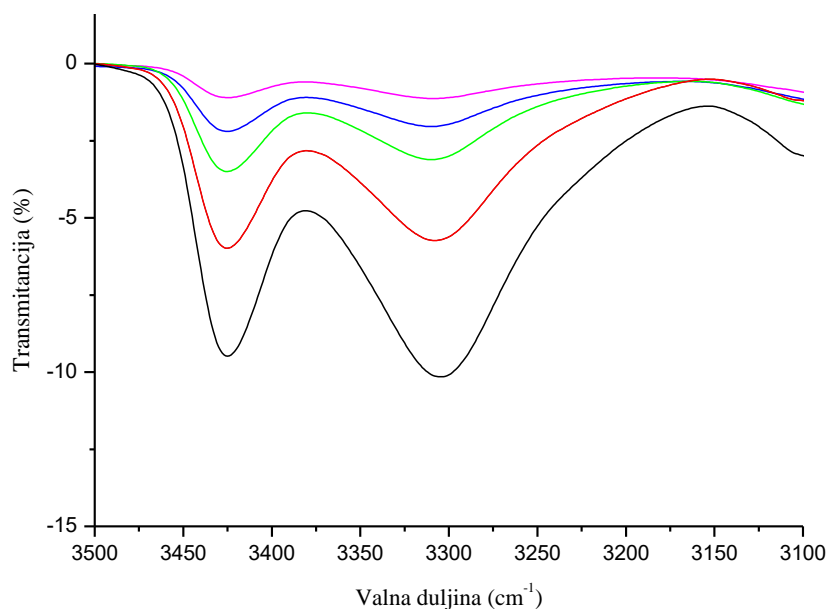
Kovačević i suradnici 2015.godine proučavali su sličan spoj (59). Naime, njihov peptid Ac-Ala-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-Ala-Boc (**IX**) analog je spoja **7** te služi kao modelni spoj za proučavanje utjecaja zamjene jednog alanina s valinom. Zaključeno je da intenzitet signala slobodnih NH skupina ostaje nepromijenjen pri razrjeđivanju od  $5 \times 10^{-2}$  M do  $1,25 \times 10^{-2}$  M, za razliku od odgovarajućih signala asociranih NH skupina, koji su smanjeni (slika 16). Iz ovoga se može zaključiti da je u ovom slučaju došlo do dominacije intramolekulskih vodikovih veza, u odnosu na intermolekulske vodikove veze. Ipak, omjer vodikom vezanih i slobodnih NH skupina ostao je nepromijenjen tijekom daljnjeg razrjeđivanja. Ovi podatci potvrđuju dominaciju intramolekulskih vodikovih veza, ali i postojanje intermolekulski vezanih NH grupa.





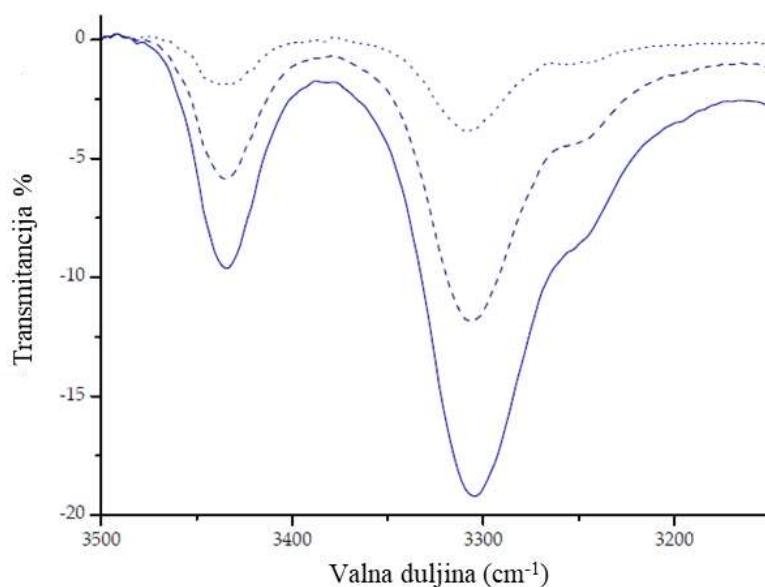
**Slika 16.** Koncentracijski-ovisni IR-spektri spoja Ac-Ala-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-Ala-Boc (**IX**) u području NH skupina (59)

Na slici 17 mogu se vidjeti koncentracijski-ovisni IR-spektri spoja **7** u području NH skupina, iz kojih je vidljiv jednak omjer slobodnih i asociраних NH-skupina. Postupnim razrjeđivanjem diklormetanske otopine u koncentracijskom rasponu od  $5 \times 10^{-2}$  M do  $3 \times 10^{-3}$  M dolazi do proporcionalnog slabljenja vrpce asociраних i slobodnih NH-skupina. Zbog toga je predložena stabilizacija ispitivanog peptida **7** intramolekulskim vodikovim vezama.



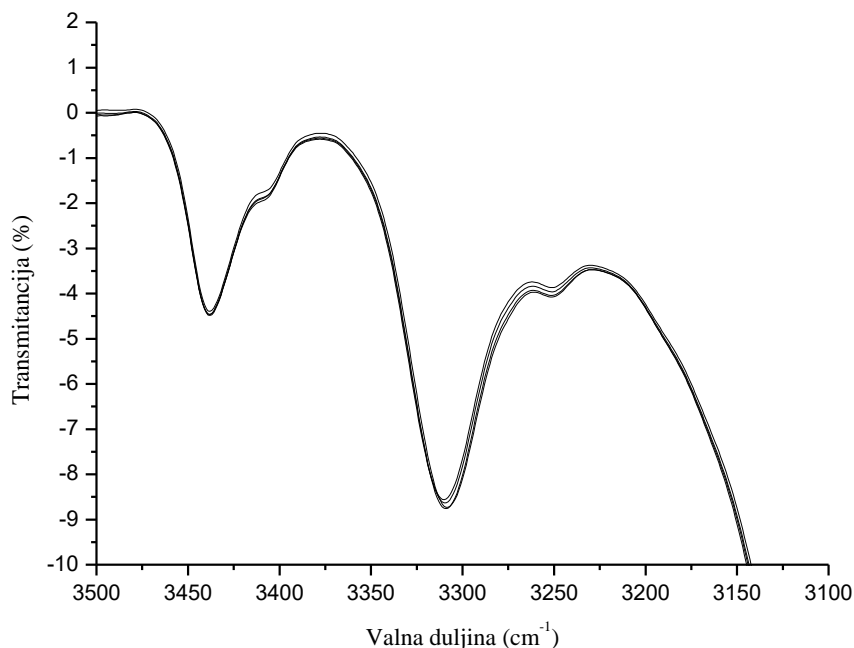
**Slika 17.** Koncentracijski-ovisni IR-spektri spoja **7** u području NH skupina (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, [(—)  $c = 5 \times 10^{-2}$  M, (—)  $c = 2,5 \times 10^{-2}$  M, (—)  $c = 1,25 \times 10^{-2}$  M, (—)  $c = 6,13 \times 10^{-3}$  M, (—)  $c = 3 \times 10^{-3}$  M].

Kovačević i suradnici 2022. godine sintetizirali su još jedan spoj analogan spoju **7** (64), ali i spoju Ac-Ala-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-Ala-Boc (**IX**). Naime, radi se o spoju Ac-D-Val-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-D-Val-Boc (**XI**). Koncentracijski IR spektar pokazao je da se omjeri slobodnih i asociranih NH skupina nisu mijenjali pri razrjeđivanju od  $5 \times 10^{-2}$  M do  $1,25 \times 10^{-2}$  M, što ukazuje na potpunu dominaciju IHB-a (slika 18). Uobičajeno je da intenzitet intermolekulski asociranih NH skupina opada pri razrjeđivanju, u usporedbi sa slobodnim NH skupinama, kao što je bilo i u slučaju spoja Ac-Ala-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-Ala-Boc (**IX**) (59).



**Slika 18.** Koncentracijski-ovisni IR-spektri spoja Ac-D-Val-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-D-Val-Boc (**XI**) u području NH skupina [(—)  $c = 5 \times 10^{-2}$  M, (-----)  $c = 2.5 \times 10^{-2}$  M, (···)  $c = 1.25 \times 10^{-2}$  M]

Temperaturno ovisni IR spektar koristi se kako bi se proučile promjene u vibracijskim svojstvima molekula s promjenom temperature. Ova tehnika mjerenja može pružiti informacije o termodinamičkim i strukturnim svojstvima molekula te njihovom ponašanju pri različitim temperaturama. Temperaturne promjene mogu utjecati na stabilnost vodikovih veza unutar molekula. Proučavanje temperaturnih promjena u IR spektru može pružiti uvid u prirodu vodikovih veza, uključujući promjene u duljinama veza i jačini veza. Nadalje, molekule mogu mijenjati konformaciju ovisno o temperaturi.



**Slika 19.** Temperaturno-ovisni IR-spektri spoja **7** u području NH skupina ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25-45 °C).

Iz temperaturno ovisnog IR spektra spoja **7** (slika 19) može se zaključiti kako povišenjem temperature od 25 °C do 45 °C ne dolazi do promjene u intenzitetu vrpce asociirane i slobodne NH-skupine, iz čega proizlazi stabilizacija dipeptida **7** intramolekulskim vodikovim vezama (zagrijavanje nije promjenilo omjer prikazanih apsorpcijskih vrpce).

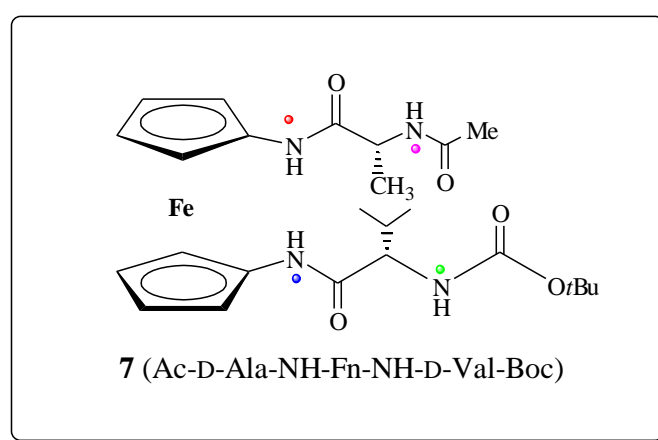
#### 4.4. Nuklearna magnetna rezonancija (NMR)

Iz teorijskog pregleda ovog istraživanja vidljivo je da nuklearna magnetska rezonanca (NMR) predstavlja spektroskopsku analitičku metodu koja pruža pouzdane i detaljne uvide u strukturu peptida (10). Ova tehnika omogućuje određivanje molekulske strukture, uključujući geometrijski raspored i udaljenost atoma unutar molekule proteina. Bitno je napomenuti da se ovom metodom mogu prilično sigurno locirati sekundarni strukturni elemenata unutar sekvence proteina, ukoliko je došlo do njihove tvorbe.

NMR ne samo da omogućuje prikupljanje informacija o trodimenzionalnoj strukturi otopljene makromolekule, već također dopušta analizu odnosa između konformacije (oblika) i funkcije proteina. Ukratko, NMR predstavlja ključni alat za razumijevanje strukture proteina, pružajući uvide u njegovu funkcionalnost i dinamiku, posebno u kontekstu interakcija s drugim molekulama, poput liganada (10).

Ova metoda omogućuje razlikovanje pojedinih NH-skupina u molekuli na temelju njihovih kemijskih pomaka. Na taj se način može utvrditi sudjeluju li pojedine NH-skupine u vodikovim vezama. Pokazalo se da NH skupine koje sudjeluju u vodikovim vezama rezoniraju pri  $\delta > 7$  ppm, dok su slobodne NH skupine registrirane pri višem polju ( $\delta < 7$  ppm). Moguća su i odstupanja od ovog pravila ovisno o kemijskoj okolini donorske NH-grupe (66).

U sklopu istraživanja, prilikom izrade ovog diplomskog rada, određeni su koncentracijski i temperaturni  $^1\text{H}$  NMR-spektar spoja **7** u kloroformu. Za lakše praćenje pomaka pojedinih amidnih protona tijekom izvođenja eksperimenata (slika 21 i 22), na slici 20 isti su obilježeni različitim bojama.



**Slika 20.** Amidni protoni u dipeptidu **7**

Peptid **7**, analiziran je primjenom  $^1\text{H}$ -NMR i  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrometrije te su kemijski pomaci amidnih protona, vezanih direktno na ferocen ( $\text{NH}^1_{\text{Fn}}$  i  $\text{NH}^2_{\text{Fn}}$ ), registrirani pri  $\delta > 9$  ppm, što upućuje na to da sudjeluju u vodikovim vezama. Suprotno tome, alaninski amidni protoni ( $\text{NH}_{\text{Ala}}$ ) javljaju se pri višem polju ( $\delta = 6,67$  ppm), što je indikacija da je njihovo sudjelovanje u intramolekulskim vodikovim vezama slabo vjerojatno, no ta mogućnost nije u potpunosti isključena. S druge strane, vrlo nizak kemijski pomak NH-skupina ( $\text{NH}_{\text{Val}}$ ) aminokiseline D-Val ( $\delta = 5,24$  ppm) sugerira kako one ne sudjeluju u vodikovim vezama.

Slično je zabilježeno i u slučaju spoja Ac-Ala-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-Ala-Boc (**IX**) (59). Zaključeno je da oba alanina imaju kemijske pomake manje od 7, što pokazuje da ne sudjeluju u stvaranju IHB. Ono što je također istovjetno peptidu **7** jesu kemijski pomaci amidnih protona, direktno vezanih na ferocen, koji baš kao i u slučaju peptida **7**, rezoniraju oko 9 ppm. Kada se

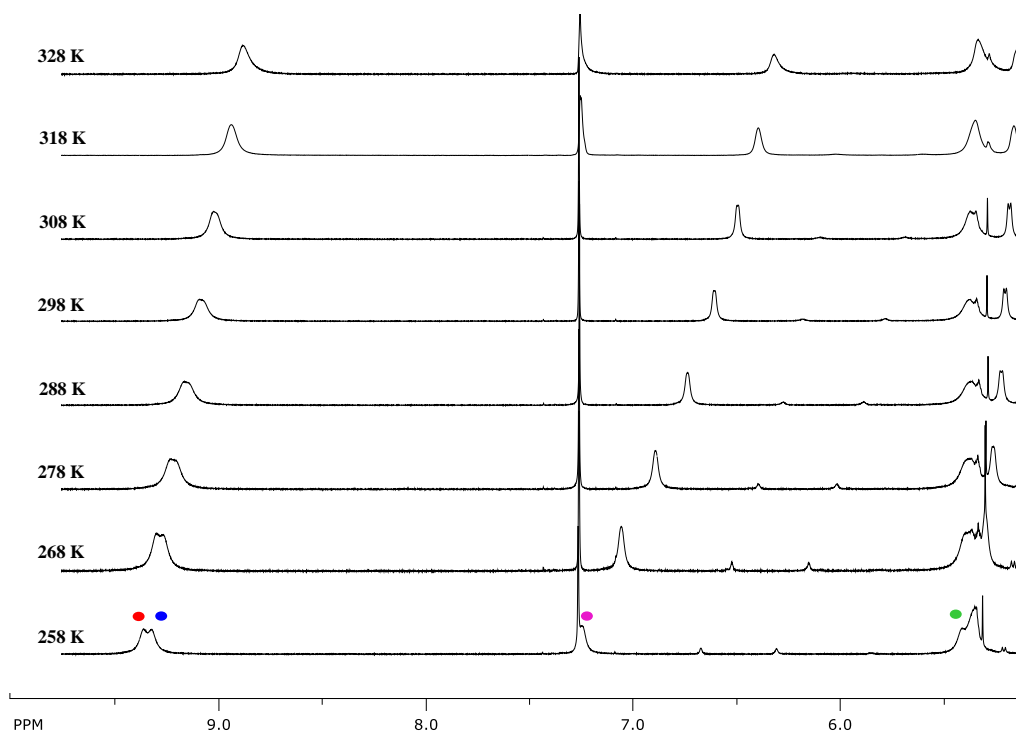
obradi pažnja na spoj Ac-D-Val-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-D-Val-Boc (**XI**), signali rezonancije NH<sub>Fn</sub> u rasponu od približno 9 ppm, kod sintetiziranog peptida, potvrđuju da se doista radi o njihovom sudjelovanju u snažnim vodikovim vezama. Signali NH<sub>Boc</sub> značajno su pomaknuti prema višem kemijskom pomaku (približno 5 ppm). S obzirom na navedenu činjenicu o kemijskom pomaku, ne očekuje se sudjelovanje u vodikovim vezama. Posljednje navedeno o pomacima NH<sub>Boc</sub> odnosi se na sva tri uspoređivana peptida (peptid **7**, **IX**, **XI**).

Usporedbom NMR spektara tri poprilično slična spoja (Ac-Ala-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-Ala-Boc (**IX**), spoj Ac-D-Val-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-D-Val-Boc (**XI**) te peptid **7** iz istraživanja kojim se bavi ovaj diplomski rad), NH<sub>Boc</sub> i NH<sub>Ac</sub> pokazali su niže vrijednosti kemijskog pomaka, u usporedbi s amidnom grupom vezanom na ferocensku jezgru, što sugerira smanjeni potencijal za tvorbu intramolekulskih vodikovih veza.

Kako bi se bolje istražilo konformacijsko ponašanje bioorganometalnog spoja **7**, provela su se mjerenja koja ovise o koncentraciji i temperaturi (slika 21 i 22).

#### 4.4.1. Temperaturni <sup>1</sup>H NMR-spektar spoja **7**

Pri povećanju temperature, vodikove veze slabe, a kemijski se pomak amidnog protona pomiče prema višem polju. Taj je učinak manje izražen kod amidnih protona koji su uključeni u jače intramolekulske vodikove veze (IHB) i stabilnije konformacije (68). Signali NH<sub>Fn</sub> pokazali su manje pomake prema višem polju ( $\Delta\delta < 0,5$  ppm), potvrđujući pretpostavku da sudjeluju u snažnim IHB-ima. Kod signala NH<sub>Ac</sub> uočeni su veći pomaci prema višem polju ( $\Delta\delta > 1$  ppm), što je sigurno rezultat njihova sudjelovanja u manje stabilnim strukturama (slika 21). Kada se uspoređuju rezultati peptida **7** sa spojevima **IX** i **XI**, može se zaključiti da i Ac-D-Val-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-D-Val-Boc (**XI**) i Ac-Ala-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-Ala-Boc (**IX**) pokazuju slično ponašanje amidnih protona kao i peptid **7**.

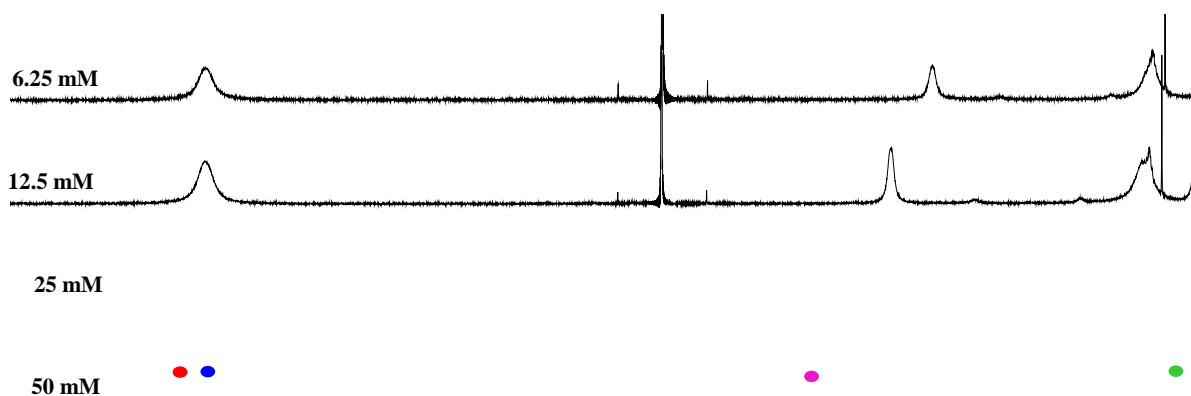


**Slika 21.** Temperaturni  $^1\text{H}$  NMR-spektar spoja **7** ( $c = 25\text{mM}$ ) u kloroformu

Veće ovisnosti o temperaturi tumače se kao pokazatelj prvotno zaštićenih NH skupina koje su postale izložene otapalu pri disocijaciji proteinskih nakupina (agregata) ili razvijanju uređenih konformacija pri višim temperaturama (69). Stoga se niska vrijednost  $\Delta\delta/\Delta T$   $\text{NH}_{\text{Boc}}$  pripisuje izlaganju otapalu, dok razmatanje proteina dovodi do povećanih ovisnosti o temperaturi za prvotno zaštićene  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  i  $\text{NH}_{\text{Ac}}$  (59).

#### 4.4.2. Koncentracijski $^1\text{H}$ NMR-spektar spoja 7

Prema Kovačević i sur. (59), nisu primijećene značajne koncentracijsko-ovisne promjene u kemijskim pomacima  $\text{NHFn}$  ( $\Delta\delta = 0,06\text{--}0,13$  ppm) te je time njihovo sudjelovanje u intramolekulskim vodikovim vezama dodatno potvrđeno. Sukcesivno razrjeđivanje nije značajno utjecalo na kemijski pomak protona nevezanog  $\text{NHBoc}$ , dok su protoni  $\text{NHAc}$  pokazali primjetnije pomake prema višem polju, što bi moglo ukazivati na njihovo manje uključivanje u međumolekulske vodikove veze. Ono što su zaključili Kovačević i sur. može se primijeniti i na peptid 7. Naime, na slici 22 prikazan je koncentracijski  $^1\text{H}$  NMR-spektar spoja 7 u kloroformu te je vidljivo da su promjene u kemijskim pomacima  $\text{NHFn}$  gotovo beznačajne te potvrđuju postojanje IHB. Amidni protoni  $\text{NHAc}$  doživjeli su primjetnije pomake prema višem polju, što bi moglo ukazivati na njihovo manje uključivanje u međumolekulske vodikove veze. Iako koncentracijski neovisni IR-spektar ukazuje da ne postoji mogućnost stvaranja međumolekulskih interakcija, ovakvi rezultati ostavljaju mogućnost za to.

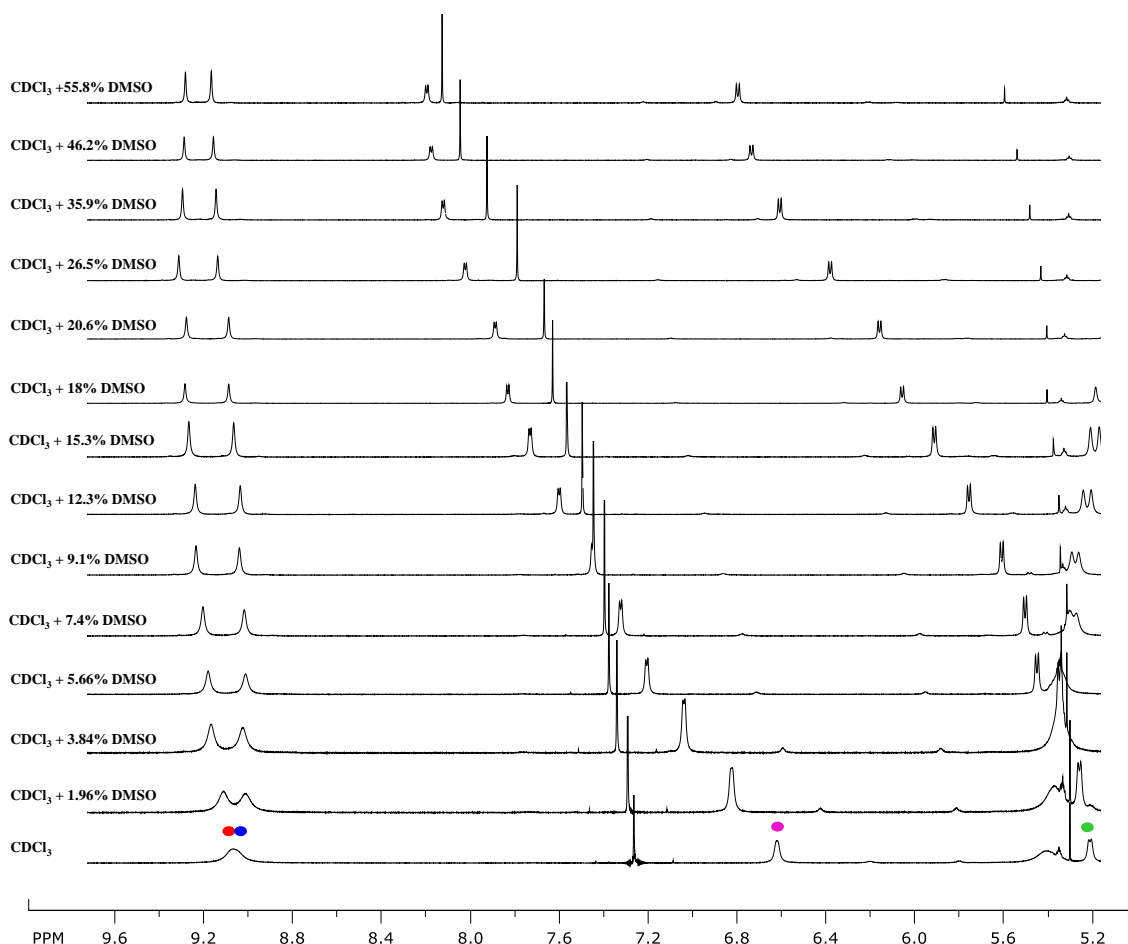


Slika 22. Koncentracijski  $^1\text{H}$  NMR-spektar spoja 7 u kloroformu

#### 4.5. Titracija s DMSO

Smatanje proteina omogućeno je djelovanjem nekoliko nekovalentnih interakcija, uključujući hidrofobne, vodikove, Coulombove i van der Waalsove interakcije (70). Budući da su intramolekulske vodikove veze važan faktor u smatanju peptidomimetika, standardna konformacijska analiza uključuje i ispitivanje njihove jačine titracijom kloroformske otopine peptida s kompeticijskim otapalom DMSO (70-77). DMSO je organsko otapalo koje posjeduje

snažnu sklonost prema amidnim protonima koji su izloženi otapalu, uzrokujući pritom pomake prema višem polju. Ukoliko su amidni protoni nedostupni djelovanju DMSO-a zbog njihovog sudjelovanja u vodikovim vezama, neće se primijetiti značajne promjene u kemijskim pomacima.



**Slika 23.** Titracija spoja **7** s DMSO-om

Nakon provedene titracije bioorganometalnog spoja **7** (slika 23) te proučavanjem rezultata, primijećeno je da očuvanje visokih vrijednosti kemijskih pomaka  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  protona ( $\Delta\delta < 0,2$  ppm), tijekom titracije s DMSO-om, ukazuje na njihovo sudjelovanje u snažnim intramolekulskim vodikovim vezama. Nasuprot tome, vidljivo je da protoni  $\text{NH}_{\text{Boc}}$  i  $\text{NH}_{\text{Ac}}$  pokazuju značajne promjene kemijskih pomaka ( $\Delta\delta > 1,7$  ppm), potvrđujući prethodno opisanu tezu. Može se zaključiti da  $\text{NH}_{\text{Boc}}$  ne sudjeluje u tvorbi vodikovih veza, dok  $\text{NH}_{\text{Ac}}$  sudjeluje u tvorbi slabih vodikovih veza. Razmatranja o ponašanju vodikovih veza do sada pripremljenih peptida doprinose definiranju njihovog konformacijskog prostora, na temelju međulančanih vodikovih veza  $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc/Ac}}$ .

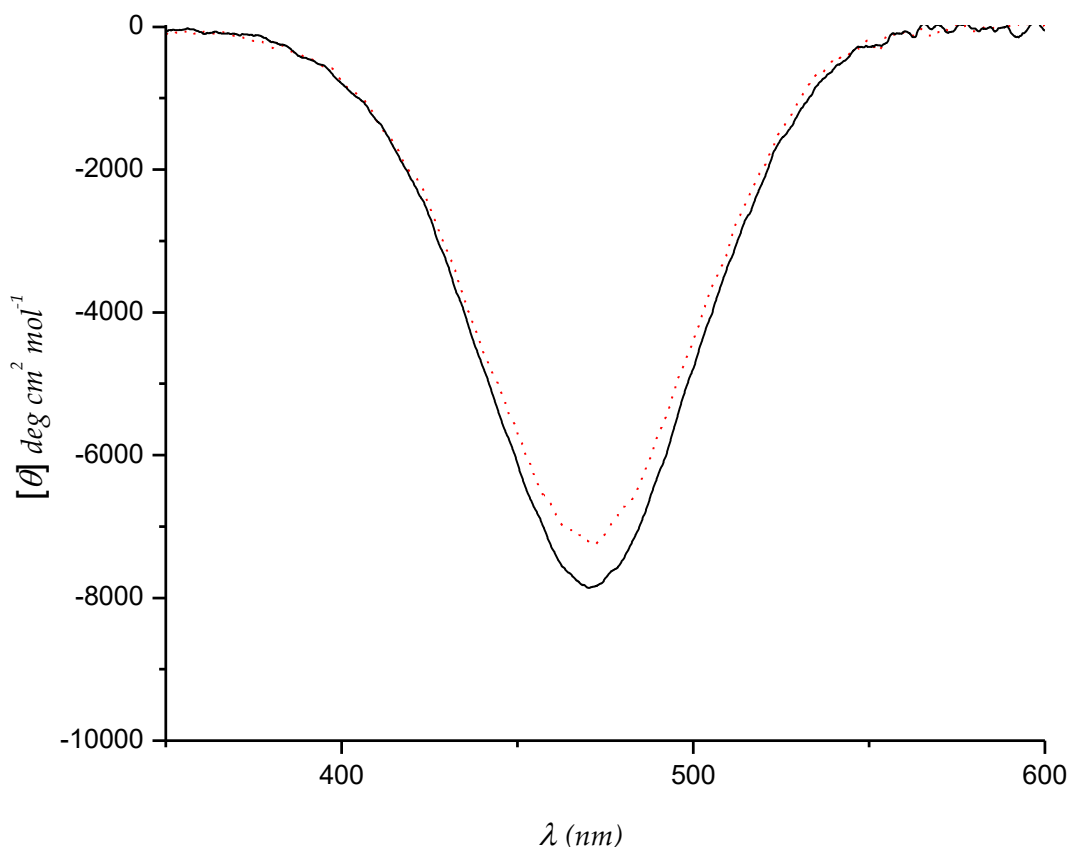


Kemijski pomaci  $\text{NH}_{\text{Fn}}$ , koji su se u prijašnjim mjerenjima pokazali neovisni o koncentraciji i temperaturi, nisu čak niti u prisutnosti 55 % DMSO-a promijenili svoj pomak ( $\Delta\delta \sim 0,1$  ppm) (slika 23), što svakako ukazuje na njihovo sudjelovanje u snažnim intramolekulskim vodikovim vezama. Kako se očekivalo,  $\text{NH}_{\text{Ac}}$ , čiji kemijski pomaci ovise o koncentraciji i temperaturi, pokazao je značajnu osjetljivost i na kompeticijsko otapalo ( $\Delta\delta \geq 1,5$  ppm), što se može pripisati njegovom sudjelovanju u slabijim vodikovim vezama.

Uspoređujući rezultate ispitivanog peptida **7** (Ac-D-Ala-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-D-Val-Boc) s peptidima **IX** (Ac-Ala-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-Ala-Boc) (59) i **XI** (Ac-D-Val-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-D-Val-Boc) (64), može se primijetiti kako spoj **7** dobro korelira s rezultatima prikazanim u tim radovima. Kovačević i suradnici dobili su istovjetne rezultate ovom istraživanju te su također zaključili da  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  stvaraju vodikove veze, dok  $\text{NH}_{\text{Boc}}$  ne stupa u takve interakcije. Konačno,  $\text{NH}_{\text{Ac}}$  stupa u slabe vodikove veze.

#### 4.6. CD-spektroskopska analiza

Kiralnost proteina svojstvo je koje omogućuje apsorpciju različitih dijelova svjetlosti, čime se mogu analizirati sekundarne strukture proteina. Ova metoda daje uvid u postojanje  $\alpha$ -uzvojnica i  $\beta$ -nabranih ploča, no bitno je naglasiti da, iako metoda daje uvid u udio pojedinih sekundarnih struktura proteina, nije moguće odrediti koje aminokiseline sudjeluju u stvaranju tih sekundarnih struktura. Za detaljniji uvid u strukturu potrebno je izraditi NMR spektar. Ako se u kiralno peptidno okruženje uvede ferocenski kromofor ( $\lambda \sim 480$  nm), a prisutne su i jake IHB, inducira se Cottonov efekt, na čiji predznak utječu zaštitne skupine, otapalo te vrsta i slijed vezanih prirodnih aminokiselina (66). Poznato je da vodikove veze induciraju kiralno uređenje oko ferocenskog kromofora ( $\lambda \sim 480$  nm), stoga se očekuje CD aktivnost analiziranih peptida. Kada ferocenski peptidi zauzimaju konformacije poput okreta i  $\beta$ -nabranih ploča koje su stabilizirane IHB, ograničena je slobodna rotacija oko ferocenskog prstena, što rezultira heličnom kiralnošću ferocenske jezgre i odražava se u Cottonovom efektu oko 470 nm. Intenzitet Cottonovog efekta proporcionalan je stabilnosti konformacije, a pozitivan ili negativan predznak ovisi o desnom ili lijevom spinu ferocenske jezgre (60).



**Slika 24.** CD-spektri spoja **7** u diklormetanu

[ $c = 5 \times 10^{-3} \text{M}$  (puna crna crta)] i uz dodatak 20 % DMSO (isprekidana crvena crta).

Kako je vidljivo iz slike 24, CD-aktivnost peptida **7** u području ferocenskog kromofora potvrđuje pretpostavke o tvorbi uređenih struktura u otopini, što potvrđuje i jaki intenzitet Cottonovog efekta ( $\sim 8000 \text{ deg cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ ). Kovačević i suradnici (64) ponudili su usporedbu u kojoj, za razliku od alaninskih peptida, koji imaju niže vrijednosti intenziteta Cottonovog efekta (59) (za spoj  $\text{Ac-Ala-NH}^1\text{-Fn-NH}^2\text{-Ala-Boc}$  (**IX**)  $\sim 23000 \text{ deg cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ ), peptidi s izopropilnim pobočnim ograncima pokazuju više vrijednosti intenziteta Cottonovog efekta. Njihov spoj  $\text{Ac-D-Val-NH}^1\text{-Fn-NH}^2\text{-D-Val-Boc}$  (**XI**), s kojim je već ranije napravljena usporedba, daje povećane vrijednosti intenziteta Cottonovog efekta ( $\sim 27000 \text{ deg cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ ). S obzirom da je razlika između peptida **7** i  $\text{Ac-D-Val-NH}^1\text{-Fn-NH}^2\text{-D-Val-Boc}$  (**XI**) u jednom D-valinu, za očekivati je dobiveni rezultat, gdje je intenzitet Cottonovog efekta peptida **7** niži, u odnosu na spoj  $\text{Ac-D-Val-NH}^1\text{-Fn-NH}^2\text{-D-Val-Boc}$  (**XI**). Ono što je zanimljivo je da je predznak peptida s dva alanina pozitivan, dok uvođenjem barem jednog D-valina predznak postaje negativan (spoj **7** i **XI**). S obzirom da je intenzitet Cotton efekta proporcionalan stabilnosti konformacije, a pozitivan ili negativan predznak ovisi o desnom ili lijevom spinu ferocenske jezgre, može se zaključiti kako uvođenjem

dva D-valina (Ac-D-Val-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-D-Val-Boc, **XI**) dolazi do stabilizacije konformacije i do promjene spina ferocenske jezgre, dok uvođenjem samo jednog D-valina (**7**) drastično opada stabilnost konformacije (približno tri puta) i dolazi do promjene spina ferocenske jezgre odnosno predznaka intenziteta Cottonovog efekta.

Alaninski homokiralni peptid (Ac-Ala-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-Ala-Boc, **IX**) zauzima konformaciju definiranu 14-članim prstenom (dva β-okreta u kojem sudjeluje 10 članova) (59). Homokiralni konjugat Ac-D-Val-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-D-Val-Boc (**XI**) tvori vrlo čvrsti strukturni motiv sastavljen od dva 10-člana prstena (dva β-okreta) (64).

Ukoliko u otopini postoje visokouređene strukture, dodatak DMSO-a neće zamjetno utjecati na intenzitet Cottonovog efekta. Titracija otopine peptida **7** s kompeticijskim otapalom (DMSO) omogućuje ispitivanje jakosti prisutnih IHB-a. Iz slike 24 vidljivo je da dodatak DMSO-a ne utječe na jakost CD-signalu (redukcija signala je ~5 %).

Podatci CD-a pokazali su očuvanje 95 % aktivnosti, u odnosu na mjerenje bez DMSO-a, potvrđujući da kompetitivno otapalo DMSO nije značajno narušilo dobivene stabilne strukture. Vjeruje se da se promjene u ponašanju vodikovih veza događaju u vodenom okolišu, što proizlazi iz sposobnosti vode da prihvaća i donira vodikove veze.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Sinteza peptida Ac-D-Ala-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-D-Val-Boc (**7**) uspješno je provedena u dobrom iskorištenju.
2. Sinteza peptida Ac-D-Ala-NH<sup>1</sup>-Fn-NH<sup>2</sup>-L-Val-Boc (**6**) nije uspjela zbog nestabilnosti i raspadanja konjugata tijekom sinteze.
3. IR-spektroskopijom utvrđuje se prisutnost slobodnih ( $< 3400 \text{ cm}^{-1}$ ) i asociranih NH-skupina ( $> 3400 \text{ cm}^{-1}$ ), a u koncentracijskom IR spektru peptida **7** ne dolazi do mijenjanja omjera slobodnih i asociranih NH skupina što ukazuje na potpunu dominaciju IHB.
4. Iz temperaturno ovisnog IR spektra spoja **7** može se zaključiti kako povišenjem temperature ne dolazi do promjene u omjerima apsorpcijskih vrpce slobodne i asocirane NH-skupine, što sugerira tvorbu intramolekulskih vodikovih veza.
5. Iz NMR spektra može se zaključiti da u peptidu **7** amidni protoni direktno vezani na ferocen (NH<sup>1</sup><sub>Fn</sub> i NH<sup>2</sup><sub>Fn</sub>) sudjeluju u vodikovim vezama. Suprotno tome, amidna skupina D-Val (NH<sub>Val</sub>) ne sudjeluje u tvorbi vodikovih veza, dok je sudjelovanje alaninskih amidnih protona (NH<sub>Ala</sub>) upitno.
6. Analizom koncentracijski i temperaturno-ovisnih NMR-spektara, potvrđuje se intramolekulski karakter vodikovih veza u kojima sudjeluju NH<sup>1</sup><sub>Fn</sub> i NH<sup>2</sup><sub>Fn</sub>, dok je sudjelovanje alaninskih i valinskih amidnih protona (NH<sub>Ala</sub> i NH<sub>Val</sub>) manje vjerojatno, mada ne i posve isključeno.
7. Jakost intramolekulskih vodikovih veza (IHB) testirana je titracijom NMR-uzorka s kompeticijskim otapalom (DMSO), pri čemu nije uočena značajnija promjena kemijskih pomaka NH<sub>Fn</sub>-atoma, što je indicacija njihovog sudjelovanja u jakim IHB.
8. CD-aktivnost peptida **7** u području ferocenskog kromofora potvrđuje pretpostavke o tvorbi uređenih struktura u otopini.
9. Titracija 5 mM otopine peptida **7** s kompeticijskim otapalom (DMSO) omogućuje ispitivanje jakosti prisutnih IHB-a. Budući da dodatak DMSO-a nije zamjetno utjecao na intenzitet Cottonovog efekta (95 % aktivnosti očuvano), zaključeno je da su uspostavljene IHB u otopini jake.

## 6. LITERATURA

1. Kovačević M (2014) Ferocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima (doktorski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
2. Stryer L (2013) Biokemija, 1. izd. (preveli Weygand Đurašević i sur.), Školska knjiga, Zagreb, str. 40-55.
3. Nelson DL, Cox MM (2004) Lehninger principles of biochemistry, 4. izd., Freeman and Company, New York, str. 120-143.
4. Ji YY, Li YQ (2010) The role of secondary structure in protein structure selection. *Eur Phys J* **32**, 103–107. <https://doi.org/10.1140/epje/i2010-10591-5>
5. Gromiha MM (2010) Protein bioinformatics: From sequence to function, Academic Press, New Delhi, str. 1-27.
6. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) Molecular biology of the cell., 4. izd., Garland Science, New York. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg023>
7. Zeeshan F, Tabbassum M, Kesharwani P (2019) Investigation on secondary structure alterations of protein drugs as an indicator of their biological activity upon thermal exposure. *Protein J* **38**, 551-564. <https://doi.org/10.1007/s10930-019-09837-4>
8. Thành MX (2015) Effect of secondary structure on biological activities of antimicrobial peptides. *VNU J Sci: Nat Sci and Techn* **31**, 44-53. <https://doi.org/10.1002/psc.2767>
9. Mai X-T, Huang J, Tan J, Huang Y, Chen Y (2015) Effects and mechanisms of the secondary structure on the antimicrobial activity and specificity of antimicrobial peptides. *J Pept Sci* **21**, 561-568. <https://doi.org/10.1002/psc.2767>
10. Pelton J, McLean L (2000) Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Anal Biochem* **277**, 167-176. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4320>
11. Ganesh S, Jayakumar R (2002) Role of N - t - Boc group in helix initiation in a novel tetrapeptide. *J Peptide Res* **59**, 249-256. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2002.02989.x>
12. Barth A (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta, Bioenerg* **1767**, 1073-1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>
13. Tanford C (1962) Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins. *J Am Chem Soc* **84**, 4240–4247. <https://doi.org/10.1021/ja00881a009>
14. Biswas KM, DeVido DR, Dorsey JG (2003) Evaluation of methods for measuring amino acid hydrophobicities and interactions. *J Chromatogr A* **1000**, 637–655.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00182-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00182-1)

15. Nozaki Y, Tanford C (1971) The solubility of amino acids and two glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions. *J Biol Chem* **246**, 2211–2217.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)77210-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)77210-X)

16. Beheshti S, Lataifeh A, Kraatz HB (2011) Hydrogen-bonding interactions in ferrocenepeptide conjugates containing valine. *J Organomet Chem* **696** (5): 1117– 1125.

<https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2010.10.061>

17. Neinast M, Murashige D, Arany Z (2018) Branched chain amino acids. *Annu Rev Physiol* **81** (1), 139-164. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114455>

18. Taya Y, Ota Y, Wilkinson AC, Kanazawa A, Watarai H, Kasai M, i sur. (2016) Depleting dietary valine permits nonmyeloablative mouse hematopoietic stem cell transplantation. *Science* **354** (6316), 1152–1155. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2018.04.004>

19. Drosopoulos WC, Prasad VR (2007) The active site residue Valine 867 in human telomerase reverse transcriptase influences nucleotide incorporation and fidelity. *Nucleic Acids Res* **35** (4), 1155–1168. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm002>

20. Coll MG, Protasevich II, Torrent J, Ribó M, Lobachov VM, Makarov AA, Vilanova M (1999) Valine 108, a chain-folding initiation site-belonging residue, crucial for the ribonuclease A stability. *Biochem Biophys Res Commun* **265** (2), 356–360. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1672>

21. Dias J, Axelband F, Lara LS, Muzi-Filho H, Vieyra A (2017) Is angiotensin-(3–4) (ValTyr), the shortest angiotensin II-derived peptide, opening new vistas on the renin– angiotensin system? *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* **18** (1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.166012>

22. Morifuji M, Koga J, Kawanaka K, Higuchi M (2009) Branched-chain amino acid containing dipeptides, identified from whey protein hydrolysates, stimulate glucose uptake rate in L6 myotubes and isolated skeletal muscles. *J Nutr Sci* **55** (1), 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.062>

23. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, i sur. (2018) Sick cell disease. *Nat Rev Dis* **4**, 1-22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.10>

24. Jang C, Oh SF, Wada S, Rowe GC, Liu L, Chan MC, i sur. (2016) A branched-chain amino acid metabolite drives vascular fatty acid transport and causes insulin resistance. *Nat Med* **22** (4), 421–426. <https://doi.org/10.1038/nm.4057>

25. Litwack G (2018) Human biochemistry, 2. izd., Academic Press, London/ San Diego/ Cambridge/ Oxford, str. 191-192.
26. Kralik G, Kralik Z, Gvozdanović K (2022) Karnozin – polifunkcionalan biološki aktivan sastojak. *Poljoprivreda* **28**, 81-88. <https://doi.org/10.18047/poljo.28.2.11>
27. O'Neil KT, DeGrado WF (1990) A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids. *Science* **250**, 646-651. <https://doi.org/10.1126/science.2237415>
28. Marqusee, S, Robbins VH, Baldwin RL (1989) Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5286-5290. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.14.5286>
29. Lotan N, Yaron A, Berger A (1966) The stabilization of the  $\alpha$ -helix in aqueous solution by hydrophobic side-chain interaction. *Biopolymers* **4**, 365-368. [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(92\)90170-C](https://doi.org/10.1016/0959-440X(92)90170-C)
30. Scholtz JM, Baldwin RL (1992) The mechanism of alpha-helix formation by peptides. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**, 95-118. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.21.060192.000523>
31. Padmanabhan S, Marqusee S, Ridgeway T, Laue TM, Baldwin RL (1990) Relative helix-forming tendencies of nonpolar amino acids. *Nature* **344**, 268-270. <https://doi.org/10.1038/344268a0>
32. Merutka G, Lipton W, Shalongo W, Park S-H, Stellwagen E (1990) Effect of central-residue replacements on the helical stability of a monomeric peptide. *Biochem* **29**, 7511-7515. <https://doi.org/10.1021/bi00484a021>
33. Lyu PC, Liff MI, Marky LA, Kallenbach NR (1990) Side chain contributions to the stability of alpha-helical structure in peptides. *Science* **250**, 669-673. <https://doi.org/10.1126/science.2237416>
34. Woutersen S, Pfister R, Hamm P, Mu Y, Kosov DS, Stock G (2002) Peptide conformational heterogeneity revealed from nonlinear vibrational spectroscopy and molecular dynamics simulations. *J Chem Phys* **117**, 6833-6840. <https://doi.org/10.1063/1.1506151>
35. Eker F, Cao X, Nafie L, Schweitzer-Stenner R (2002) Tripeptides adopt stable structures in water. A combined polarized visible raman, FTIR, and VCD spectroscopy study. *J Am Chem Soc* **124**, 14330-14341. <https://doi.org/10.1021/ja027381w>
36. Eker F, Griebenow K, Schweitzer-Stenner R (2003) Stable conformations of tripeptides in aqueous solution studied by UV circular dichroism spectroscopy. *J Am Chem Soc* **125**, 8178-

8185.<https://doi.org/10.1021/ja034625j>

37. Schweitzer-Stenner R, Eker F, Griebenow K, Cao X, Nafie LA (2004) The conformation of tetraalanine in water determined by polarized raman, FT-IR, and VCD spectroscopy. *J Am Chem Soc* **126**, 2768-2776. <https://doi.org/10.1021/ja039452c>

38. Shi Z, Olson CA, Rose GD, Baldwin RL, Kallenbach NR (2002) Polyproline II structure in a sequence of seven alanine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9190-9195. <https://doi.org/10.1073/pnas.112193999>

39. McColl IH, Blanch EW, Hecht L, Kallenbach NR, Barron LD (2004) Vibrational raman optical activity characterization of poly (L-proline) II helix in alanine oligopeptides. *J Am Chem Soc* **126**, 5076–5077. <https://doi.org/10.1021/ja049271q>

40. Graf J, Nguyen P, Stock G, Schwalbe H (2007) Structure and dynamics of the homologous series of alanine peptides: a joint molecular dynamics/NMR study. *J Am Chem Soc* **129**, 1179-1189. <https://doi.org/10.1021/ja0660406>

41. Narwani TJ, Santuz H, Shinada N, Melarkode Vattekatte A, Ghouzam Y, Srinivasan N, i sur. (2017) Recent advances on polyproline II. *Amino Acids* **49**, 705–713. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2385-6>

42. Woodward RB, Rosenblum M, Whiting MC (1952) A new aromatic system. *J Am Chem Soc* **74**, 3458–3459. <https://doi.org/10.1021/ja01133a543>

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

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

45. Fischer EO, Pfab WZ (1952) Cyclopentadien-Metallkomplexe, ein neuer Typ metallorganischer Verbindungen. *Z Naturforsch* **7b**, 377-379. <https://doi.org/10.1515/znb-1952-0701>

46. Visconti P, Primiceri P, Longo D, Strafella L, Carlucci P, Lomascolo M, i sur. (2017) Photo-ignition process of multiwall carbon nanotubes and ferrocene by continuous wave Xe lamp illumination. *Beilstein J Nanotechnol* **8**, 134–144. <https://doi.org/10.3762/bjnano.8.14>

47. Jaouen G, Vessieres A, Butler IS (1993) Bioorganometallic chemistry: a future direction for transition metal organometallic chemistry? *Acc Chem Res* **26(7)**, 361-369. <https://doi.org/10.1021/ar00031a002>

48. Jaouen G, Fish RH (2003) Bioorganometallic chemistry: Structural diversity of



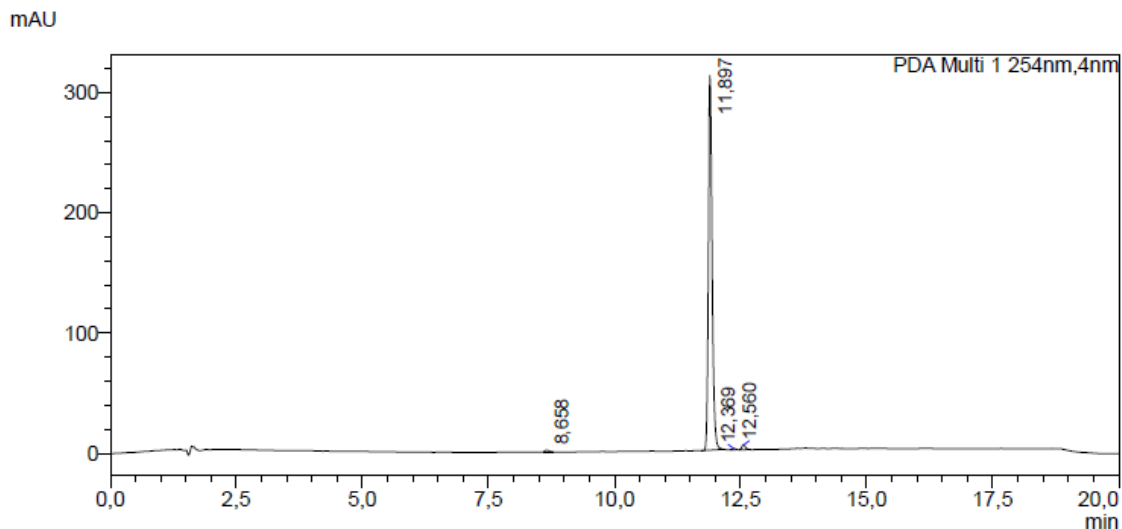
- organometallic complexes with bioligands and molecular recognition studies of several supramolecular hosts with biomolecules, alkali-metal ions, and organometallic pharmaceuticals. *Organometallics* **22** (11), 2166-2177. <https://doi.org/10.1021/om0300777>
49. Metzler-Nolte N (2001) Markierung von biomolekülen für medizinische anwendungen – sternstunden der bio-organometallchemie. *Angew Chem*, **113**, 1072-1076. <https://doi.org/10.1002/1521-3757>
50. Rapić V, Čakić Semenčić M (2011) I. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocen i metalni karbonili. *Kemija u industriji* **60**, 61–79.
51. Astruc D (2016) Why is ferrocene so exceptional? *Eur J Inorg Chem* **2017**, 6–29. <https://doi.org/10.1002/ejic.201600983>
52. Lal B, Badshah A, Altaf AA, Khan N, Ullah S (2011) Miscellaneous applications of ferrocene-based peptides/amides. *Appl Organometal Chem* **25**, 843–855. <https://doi.org/10.1002/aoc.1843>
53. Scutaru D, Mazilu I, Vâță M, Tătaru L, Vlase A, Lixandru T, Simionescu C (1991) Heterodisubstituted derivatives of ferrocene: ferrocene-containing penicillins and cephalosporins. *J Organomet Chem* **401(1-2)**, 87–90. [https://doi.org/10.1016/0022-328X\(91\)86198-Y](https://doi.org/10.1016/0022-328X(91)86198-Y)
54. Scutaru D, Tataru L, Mazilu I, Vata M, Lixandru T, Simionescu C (1993) Contributions to the synthesis of some ferrocene-containing antibiotics. *Appl Organomet Chem* **7(4)**, 225–231. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15082044>
55. Top S, Vessières A, Leclercq G, Quivy J, Tang J, Vaissermann J, i sur. (2003) Synthesis, biochemical properties and molecular modelling studies of organometallic specific estrogen receptor modulators (SERMs), the ferrocifens and hydroxyferrocifens: Evidence for an antiproliferative effect of hydroxyferrocifens on both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. *Chem Eur J* **9(21)**: 5223–5236. <https://doi.org/10.1002/chem.200305024>
56. Biot C, Glorian G, Maciejewski LA, Brocard JS, Domarle O, Blampain G, i sur. (1997) Synthesis and antimalarial activity *in vitro* and *in vivo* of a new ferrocene–chloroquine analogue. *J Med Chem* **40(23)**, 3715–3718. <https://doi.org/10.1021/jm970401y>
57. Biot C, Caron S, Maciejewski LA, Brocard JS (1998) Synthesis and characterisation of a double deuterium-labelled ferrochloroquine. *J Labelled Comp Radiopharm* **41(10)**, 911–918. <https://doi.org/10.1021/jm970401y>

58. Giannis A, Kulter T (1993) Peptidomimetics for receptor ligands—Discovery, development, and medical perspectives. *Angew Chem Int Ed Engl* **32**, 1244. <https://doi.org/10.1002/anie.199312441>
59. Kovačević M, Kodrin I, Cetina M, Kmetič I, Murati T, Čakić Semenčić M, i sur. (2015) The conjugate of  $\beta$ -turn-nucleating ferrocene-1,1'-diamine and amino acids. A novel synthetic approach and conformational analysis. *Dalton Trans* **44**, 16405–16420. <https://doi.org/10.1039/C5DT01610J>
60. Kirin SI, Kraatz HB, Metzler-Nolte N (2006) Systematizing structural motifs and nomenclature in 1, n'-disubstituted ferrocene peptides. *Chem Soc Rev* **35(4)**, 348–354. <https://doi.org/10.1039/B511332F>
61. Chowdhury S, Schatte G, Heinz-Bernhard K (2008) How useful is ferrocene as a scaffold for the design of  $\beta$ -Sheet foldamers? *Angew Chem* **47(37)**, 7056-7059. <https://doi.org/10.1002/anie.200801460>
62. Chowdhury S, Schatte G, Kraatz H-B (2006) Rational design of bioorganometallic foldamers: A potential model for parallel  $\beta$ -helical peptides. *Angew Chem Int Ed Engl* **45(41)**, 6882–6884. <https://doi.org/10.1002/anie.200602248>
63. Kovačević M, Kodrin I, Roca S, Molčanov K, Shen Y, Adhikari B (2017) Helically chiral peptides that contain ferrocene-1,1'-diamine scaffolds as a turn inducer. *Chem Eur J* **23(43)**, 10372-10395. <https://doi.org/10.1002/chem.201701602>
64. Kovačević M, Markulin D, Zelenika M, Marjanović M, Lovrić M, Polančec D, i sur. (2022) Hydrogen bonding drives helical chirality via 10-membered rings in dipeptide conjugates of ferrocene-1,1'-diamine. *Int J Mol Sci* **23**, 12233. <https://doi.org/10.3390/ijms232012233>
65. Perrin DD, Armarego WLF (1988) Purification of laboratory chemicals, 3. izd., Pergamon Press, Oxford/New York.
66. Barišić L, Rapić V, Kovač V (2002) Ferrocene compounds. XXIX. Efficient syntheses of 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid derivatives. *Croat Chem Acta* **75**, 199-210. <https://doi.org/10.3390/molecules190812852>
67. Kovačević M, Čakić Semenčić M, Kodrin I, Roca S, Perica J, Mrvčić J, i sur. (2023) Biological evaluation and conformational preferences of ferrocene dipeptides with hydrophobic amino acids. *Inorganics* **11(1)**, 29. <https://doi.org/10.3390/inorganics11010029>
68. Liu JY, Sun XY, Tang Q, Song J-J, Li X-Q, Gong B, i sur. (2021) An unnatural tripeptide structure containing intramolecular double H-bond mimics a turn-hairpin conformation. *Org*

69. Stevens ES, Sugawara N, Bonora GM, Toniolo C (1980) Conformational analysis of linear peptides. 3. Temperature dependence of NH chemical shifts in chloroform. *J Am Chem Soc* **102**, 7048–7050. <https://doi.org/10.1021/ja00543a025>
70. Curran TP, Marques KA, Silva MV (2005) Conformationally rigid cyclic tungsten bis-alkyne complexes derived from 1,1'-dialkynylferrocenes, *Org Biomol Chem* **3**, 4134–4138. <https://doi.org/10.1039/B508608F>
71. Hanessian S, Papeo G, Fettis K, Therrien E, Viet MTP (2004) Left- and right- handed alpha-helical turns in homo- and hetero- chiral helical scaffold. *J Org Chem* **69**, 4891–4899. <https://doi.org/10.1021/ja9065283>
72. Maji SK, Haldar D, Bhattacharyya D, Bannerjee A (2003) Conformational heterogeneity of a turn mimetic pseudo-peptide: comparison of crystal state, solution and theoretically derived structures. *J Mol Struct* **646**, 111–123. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(02\)00619-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(02)00619-1)
73. Vijayalakshmi S, Rao RB, Karle IL, Balaram P (2000) Comparison of helix-stabilizing effects of alpha,alpha-dialkyl glycines with linear and cycloalkyl side chains. *Biopolymers* **53**(1), 84–98. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(200001\)53:1<84::AID-BIP8>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(200001)53:1<84::AID-BIP8>3.0.CO;2-W)
74. Jain RM, Rajashankar KR, Ramakumar S, Chauhan VS (1997) Design of a helical motif using .alpha.,.beta.-dehydrophenylalanine residues: crystal structure of Boc-Val-.DELTA.Phe-Phe-Ala-Phe-.DELTA.Phe-Val-.DELTA.PHe-Gly-OCH<sub>3</sub>, a 310-helical nonapeptide. *J Am Chem Soc* **119**, 3205–3211. <https://doi.org/10.1021/ja00049a086>
75. Herrick RS, Jarret RM, Curran TP, Dragoli DR, Flaherty MB, Lindyberg SE, i sur. (1996) Ordered conformations in bis (amino acid) derivatives of 1,1'-ferrocenedicarboxylic acid. *Tetrahedron Lett* **37**, 5289–5292.
76. Mollica A, Paglialunga Paradisi M, Torino D, Spisani S, Lucente G (2006) Hybrid  $\alpha/\beta$ -peptides: For-Met-Leu-Phe-OMe analogues containing geminally disubstituted  $\beta_{2,2}$ - and  $\beta_{3,3}$ -amino acids at the central position. *Amino Acids* **30**, 453–459. <https://doi.org/10.1007/s00726-006-0260-y>
77. Sladojevich F, Guarna A, Trabocchi A (2010) Evaluation of stereochemically dense morpholine-based scaffolds as proline surrogates in  $\beta$ -turn peptides. *Org Biomol Chem* **7**, 916–924. <https://doi.org/10.1039/B913444A>

# 7. PRILOZI

## 7.1. Prilog 1. HPLC i ESI-MS-kromatogram spoja 7

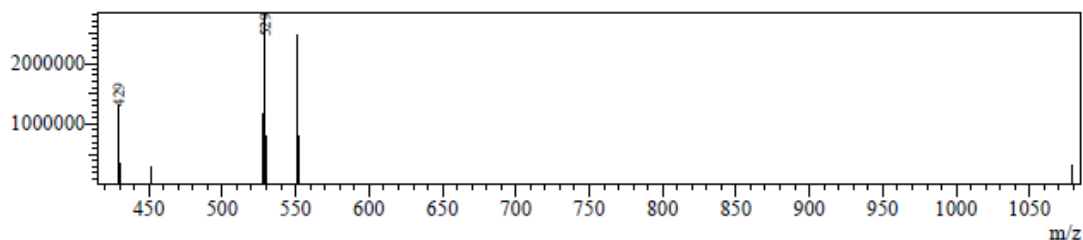


Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	8.658	6547	1273	0.397		M	
2	11.897	1617322	311414	98.168		M	
3	12.369	4292	1031	0.261		M	
4	12.560	19348	4106	1.174		M	
Total		1647510	317824				

MS Spectrum

Line#:1 R.Time:----(Scan#:----)  
 MassPeaks:9  
 Spectrum Mode:Averaged 11.900-11.967(715-719) Base Peak:529(2825938)  
 BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1



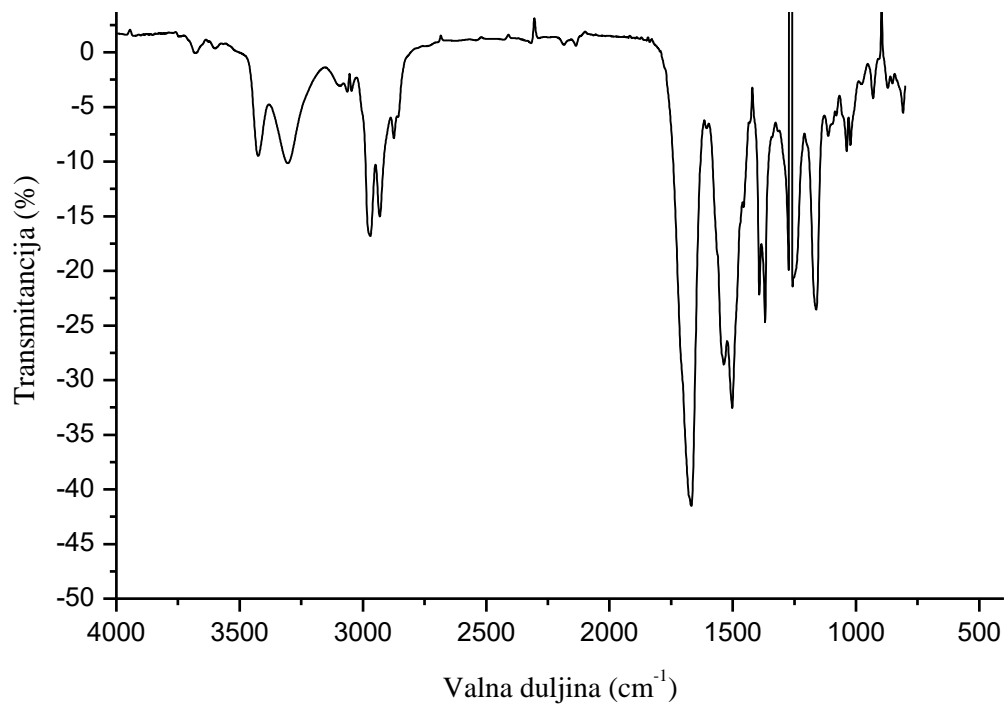
Line#:1 R.Time:----(Scan#:----)  
 MassPeaks:9  
 Spectrum Mode:Averaged 11.900-11.967(715-719) Base Peak:529(2825938)  
 BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

#	m/z	bsolute Inten	relative Inten
1	429.10	1293781	45.78
2	430.10	355248	12.57
3	451.05	290805	10.29

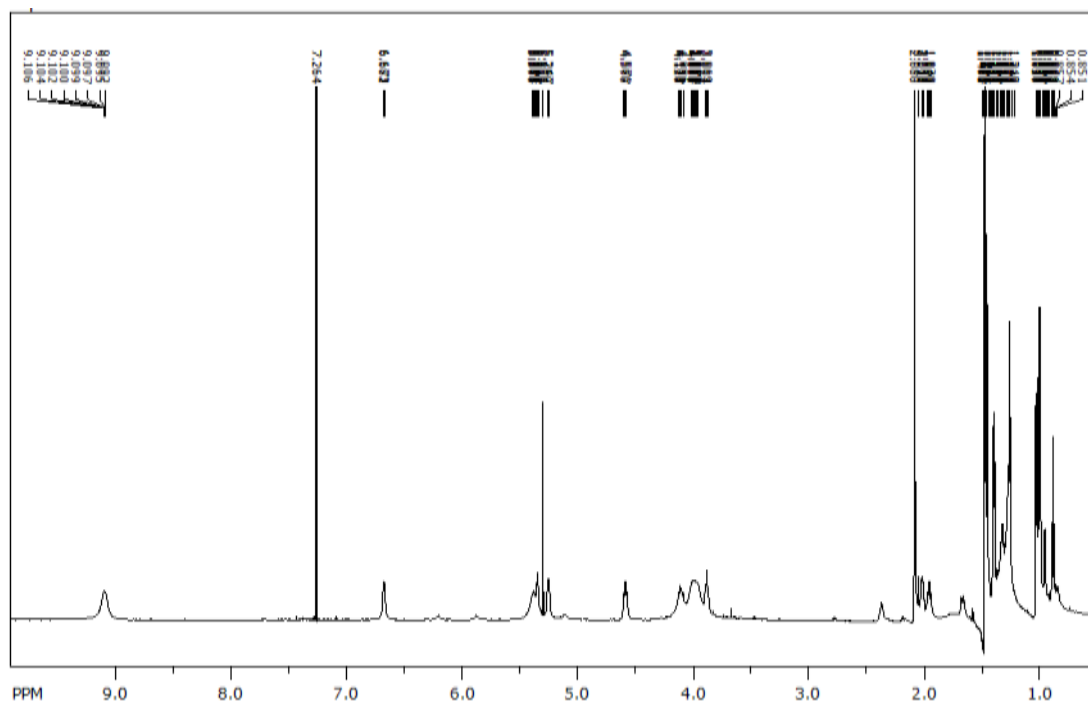
#	m/z	bsolute Inten	relative Inten
4	528.15	1155269	40.88
5	529.15	2825938	100.00
6	530.15	806165	28.53

#	m/z	bsolute Inten	relative Inten
7	551.15	2460431	87.07
8	552.15	806023	28.52
9	1079.15	314972	11.15

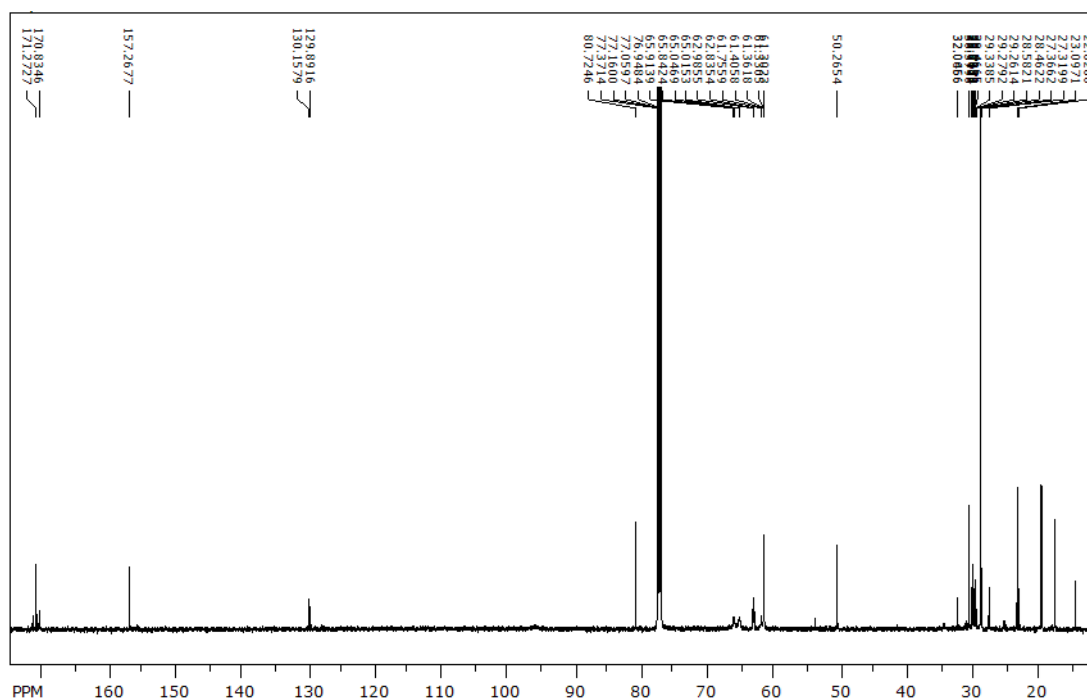
**7.2. Prilog 2.** IR-spektar spoja **7** snimljen u diklometanu ( $c = 50 \text{ mM}$ )



**7.3. Prilog 3.** <sup>1</sup>H-NMR spektar spoja **7** snimljen u kloroformu ( $c = 50 \text{ mM}$ )



7.4. Prilog 4.  $^{13}\text{C}$ -NMR spektar spoja 7 snimljen u kloroformu ( $c = 50 \text{ mM}$ )



## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Nikolina Orešković

Vlastoručni potpis