

Priprava i konformacijska analiza ferocenskih depsipectida s alaninom i leucinom

Galić, Leona

Master's thesis / Diplomski rad

2025

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:131587>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-06**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj 2025.

Leona Galić

**PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA ANALIZA
FEROCENSKIH DEPSIPEPTIDA S
ALANINOM I LEUCINOM**

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 se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Moniki Kovačević na prenesenom znanju, strpljenju i pomoći tijekom izrade diplomskog rada te na vedroj atmosferi u laboratoriju.

*Posebno hvala mojim roditeljima na podršci i motivaciji tijekom cijelog školovanja.
Hvala mojoj sestri Anđeli što je provela neizmjeran broj sati učeći za stolom kraj mojeg i što mi je dala najveću snagu i motivaciju tijekom cijelog studija.*

Hvala Vidu što je svaki moj uspjeh bio i njegov.

Hvala baki i didi što su uvijek pokazivali da smo mi njihov ponos.

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 DEPSIPEPTIDA S ALANINOM I LEUCINOM

Leona Galić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058217958

Sažetak:

Ferocenski biokonjugati s aminokiselinama često se koriste kao peptidomimetici. Uvođenje ferocenskog kalupa u peptidne lanace inducira tvorbu intermolekulskih vodikovih veza što omogućava nastanak različitih elemenata sekundarne strukture poput okreta, uzvojnica i β -ploča o čemu ovisi funkcija samog peptida. Jedna od neistraženih modifikacija ferocenskih peptidomimetika je zamjena jedne amidne veze esterskom vezom s ciljem pripreme depsipeptida. Depsipeptidi, u odnosu na peptide, pokazuju veću otpornost prema enzimskoj degradaciji, povećanu specifičnost te konformacijske izmjene koje se odražavaju na karakter vodikovih veza i fleksibilnost.

U sklopu ovog diplomskog rada pripremljeni su spojevi Ac-D-Leu-NH-Fn-CO-O-CH₂-CH[CH₂CH(CH₃)₂]-NHBoc (**7**) i Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-O-CH₂-CH[CH₂CH(CH₃)₂]-NHBoc (**11**) kako bi se ispitalo utjecaj zamjene jedne amidne veze esterskom vezom na obrazac i brojnost vodikovih veza i utjecaj na tvorbu elemenata sekundarne strukture pripremljenih spojeva. Sintetizirani depsipeptidi analizirani su IR-, NMR- i CD-spektroskopijom kako bi se odredila njihova sposobnost formiranja intramolekulskih vodikovih veza.

Ključne riječi: ferocen, peptidomimetici, depsipeptidi, alanin, leucin, konformacijska analiza

Rad sadrži: 46 stranica, 22 slike, 3 tablice, 64 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 24. siječnja 2025.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

SYNTHESIS AND CONFORMATIONAL ANALYSIS OF FERROCENE DEPSIPEPTIDES WITH ALANINE AND LEUCINE

Leona Galić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058217958

Abstract:

Ferrocene bioconjugates, which contain amino acids, are often used as peptidomimetics. The introduction of ferrocene favors the formation of intermolecular hydrogen bonds, and its insertion into peptide chains allows the formation of various secondary structural elements such as turns, coils and surfaces, on which the function of the peptide itself depends. One of the still unexplored modifications of ferrocene peptides is the replacement of an amide bond by an ester bond with the aim of producing the depsipeptides. Compared to peptides, depsipeptides exhibit greater resistance to enzymatic degradation, higher specificity and conformational changes that reflect the character of hydrogen bonds and flexibility.

In this work, the compounds $\text{Ac-D-Leu-NH-Fn-CO-O-CH}_2\text{-CH}[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2]\text{-NH-Boc}$ (**7**) and $\text{Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-O-CH}_2\text{-CH}[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2]\text{-NH-Boc}$ (**11**) were synthesized to investigate the effects of replacing an amide bond with an ester bond on the pattern and number of hydrogen bonds and the effects on the formation of elements of the secondary structure of the synthesized compounds. The synthesized depsipeptides were analyzed by IR, NMR and CD spectroscopy to determine their ability to form intramolecular hydrogen bonds.

Keywords: ferrocene, peptidomimetics, depsipeptides, alanine, leucine, conformational analysis

Thesis contains: 46 pages, 22 figures, 3 tables, 64 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Monika, Kovačević, PhD, Associate professor

Reviewers:

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

Thesis defended: January 24th, 2025

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. PEPTIDI I PROTEINI.....	2
2.2. PEPTIDOMIMETICI.....	3
2.3. DEPSIPEPTIDI.....	5
2.4. FEROCEN.....	6
2.5. AMINOKISELINA LEUCIN	10
2.6. DEPSIPEPTIDI S LEUCINOM	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. MATERIJALI I METODE	16
3.2. POSTUPAK PRIPRAVE FEROCENSKIH DEPSIPEPTIDA.....	17
3.2.1. Priprava Boc-D-Leu-COOMe (2)	18
3.2.2. Priprava Boc-D-Leu-CH ₂ OH (3).....	18
3.2.3. Priprava peptida Boc-D-Leu-NH-Fn-COOMe (4).....	19
3.2.4. Priprava peptida Ac-D-Leu-NH-Fn-COOMe (5).....	19
3.2.5. Priprava peptida Ac-D-Leu-NH-Fn-COOH (6)	20
3.2.6. Priprava ciljnog depsipeptida Ac-D-Leu-NH-Fn-CO-O-CH ₂ - CH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]-NHBoc (7).....	20
3.2.7. Priprava peptida Boc-D-Ala-NH-Fn-COOMe (8).....	23
3.2.8. Priprava peptida Ac-D-Ala-NH-Fn-COOMe (9).....	23
3.2.9. Priprava peptida Ac-D-Ala-NH-Fn-COOH (10)	24
3.2.10. Priprava ciljnog depsipeptida Ac-D-Ala-NH-Fn- CO-O-CH ₂ - CH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]-NHBoc (11).....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	26
4.1. UVOD	26
4.2. SINTEZA CILJNIH FEROCENSKIH DEPSIPEPTIDA Ac-D-Leu-NH-Fn- CO-O-CH ₂ -CH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]-NHBoc (7) i Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-O-CH ₂ - CH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]-NHBoc (11).....	28
4.3. IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA	29
4.4. NUKLEARNA MAGNETSKA REZONANCIJA (NMR).....	33
4.5. CD-SPEKTROSKOPSKA ANALIZA.....	38
5. ZAKLJUČCI.....	40
6. LITERATURA.....	41

1. UVOD

Peptidi i proteini sastavni su dio svake stanice, sudjeluju u svim važnim biološkim procesima te su ključan izvor tvari za rast i razvoj tkiva u svim organizmima. Unatoč brojnim prednostima koje posjeduju, peptide karakteriziraju svojstva poput slabe selektivnosti prema receptorima, proteolitičke nestabilnosti i slabe bioraspoloživosti što ih čini nepogodnima za terapijsku primjenu. [1]

S ciljem prevladavanja nedostataka prirodnih peptida pripremaju se peptidomimetici. Peptidomimetik, analog peptida ili peptidni mimetik, je spoj čiji esencijalni farmakoforni elementi oponašaju 3D strukturu prirodnog peptida i proteina te zadržavaju njegovu sposobnost interakcije s biološkim ciljanim sustavima pri čemu zadržavaju jednak biološki učinak. Peptidomimetici pokazuju veću metaboličku stabilnost, bolju bioraspoloživost, veću selektivnost i minimalne nuspojave u usporedbi s prirodnim peptidima. [2]

Kako bi se spriječila interakcija peptida s neželjenim receptorima i ograničila konformacijska sloboda peptida pripremaju se njihovi mimetici umetanjem rigidnih kalupa, kao što je organometalni spoj ferocen. [4] U usporedbi s drugim bioorganometalnim spojevima, ferocen ima brojne prednosti u odnosu na druge kalupe korištene za indukciju elemenata sekundarne strukture, a elektrochemijska reverzibilnost i stabilnost te jednostavna derivatizacija s biomolekulama samo su neke od njih. [3]

Cilj ovog rada je bio istražiti kako promjene u strukturi djeluju na konformacijski prostor pripremljenih depsi-peptida. Zamjena jedne amidne veze, manje polarnom esterskom vezom smanjuje broj dostupnih donora vodikove veze, a može se pretpostaviti da će navedena zamjena uzrokovati i smanjenu mogućnost tvorbe više različitih elemenata sekundarne strukture.

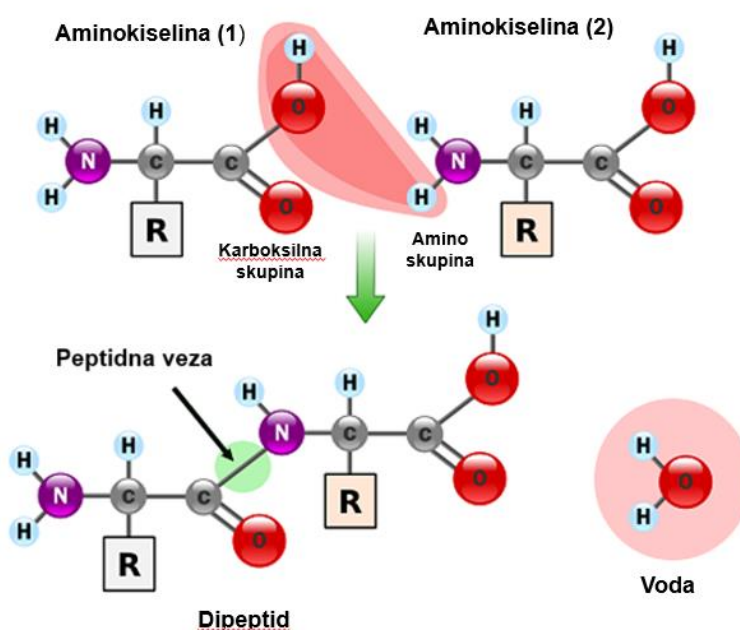
Da bi se ispitaio spomenuti utjecaj pripremit će se $\text{Ac-D-Leu-NH-Fn-CO-O-CH}_2\text{-CH[CH}_2\text{CH(CH}_3)_2\text{]-NHBoc}$ (**7**) i $\text{Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-O-CH}_2\text{-CH[CH}_2\text{CH(CH}_3)_2\text{]-NHBoc}$ (**11**) višestupanjskim sintezama te će se njihova struktura dokazati spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR), a obrazac intramolekulskih vodikovih veza (IHB, engl. *Intramolecular Hydrogen Bonds*) na kojima se temelji sekundarna struktura istražiti će se mjerenjem koncentracijski-ovisnih IR- i NMR-spektara, temperaturno-ovisnih IR- i NMR-spektara te CD-spektara.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PEPTIDI I PROTEINI

Proteini su najsvestranije molekule u živim sustavima koje sudjeluju u svim biološkim procesima i u njima obavljaju važne funkcije kao što su: prijenos i pohrana molekula (npr. kisik), mehanička potpora, imunološka zaštita, prijenos živčanih impulsa te kontrola rasta i diferencijacije. [1]

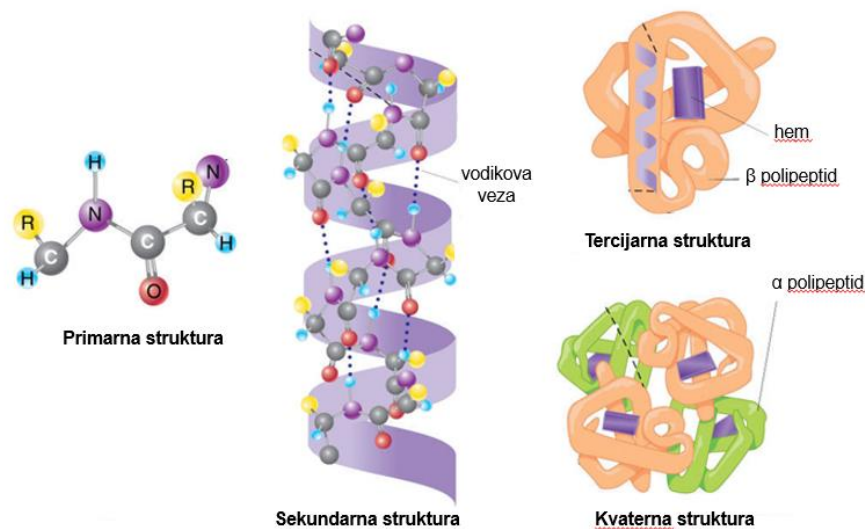
Peptidi su molekule koje se smatraju manjom verzijom proteina, a njihova se struktura sastoji od niza aminokiselina povezanih amidnim vezama koje se u peptidima nazivaju i peptidnim vezama. Amidne veze su kovalentne veze koje nastaju konjugiranjem karboksilne skupine jedne aminokiseline s amino-skupinom druge aminokiseline, pri čemu se oslobađa molekula vode (slika 1). [5]



Slika 1. Nastanak peptidne veze [prema 6]

Peptid sastavljen od dvije aminokiseline povezane jednom peptidnom vezom naziva se dipeptid, zatim slijede tripeptidi, tetrapeptidi itd. Polipeptid je dugi, kontinuirani i nerazgranati lanac aminokiselina. Peptidi se razlikuju od proteina prema veličini, pri čemu se često koristi granica od približno 50 aminokiselina kako bi se razlikovali od proteina. Proteini se sastoje od jednog ili više polipeptidnih lanaca raspoređenih na funkcionalan način s tendencijom spontanog slaganja u trodimenzijske strukture. [7]

Postoje četiri strukturne razine proteina (slika 2). Primarna struktura predstavlja slijed aminokiselina u lancu, sekundarna struktura predstavlja prostorni odnos aminokiselinskih ostataka koji su u linearnom slijedu međusobno blizu, tercijarna struktura predstavlja prostorni odnos aminokiselinskih ostataka koji su u linearnom slijedu udaljeni, a kvaterna struktura se odnosi na proteine građene od više polipeptidnih lanaca, odnosno na prostorni razmještaj tih polipeptidnih lanaca i prirodu njihovih interakcija. [2]



Slika 2. Strukturne razine proteina [8]

Iako se laboratorijske tehnike koje se koriste za istraživanje peptida, polipeptida i proteina razlikuju (npr. elektroforeza, kromatografija), granice veličina koje ih razlikuju nisu strogo definirane. Dugi peptidi, kao što je β-amiloid, nazivaju se proteinima, dok se manji proteini, poput inzulina, mogu smatrati peptidima. U kemijskoj sintezi peptida najčešće se koriste metoda pripreve u otopini i metoda sinteze na čvrstoj fazi [9]

2.2. PEPTIDOMIMETICI

Peptidi i peptidni derivati su najčešće molekule srednje veličine (0,5-5 kDa). Iako imaju važnu ulogu u imunološkim i neurološkim procesima, njihova terapijska primjena je ograničena. Peptidi imaju visoku fleksibilnost zbog koje je moguća interakcija s mnogim receptorima, a kao posljedica nastaju neželjene nuspojave. Također, velika molekulska masa i polarni karakter peptida otežavaju prolazak kroz stanične membrane i krvno-moždanu barijeru dok peptidaze u probavnom traktu i krvnom serumu uzrokuju njihovu razgradnju. [10]

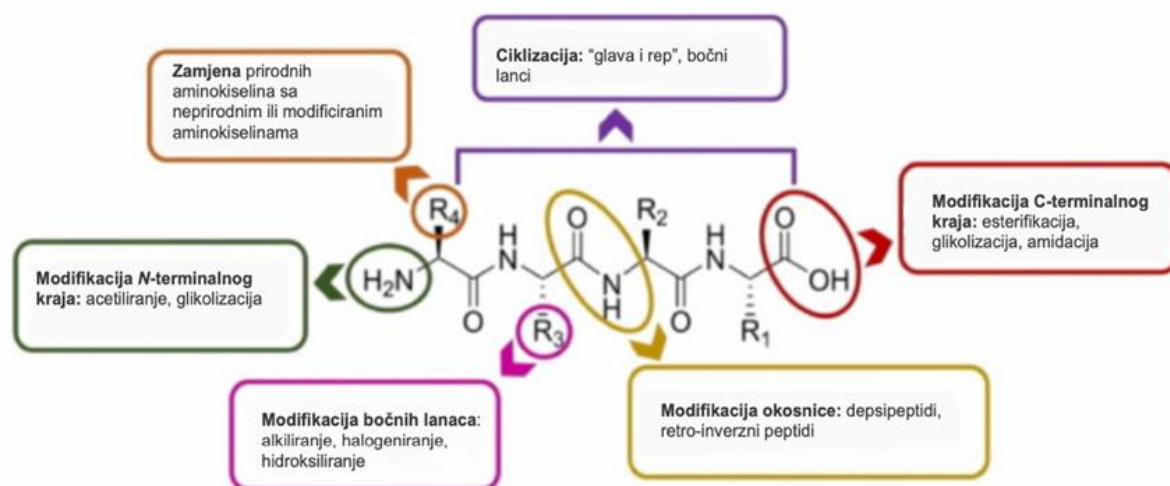
Peptidomimetici su spojevi koji oponašaju trodimenzijsku strukturu peptida koji se nalaze u prirodi i zadržavaju njihovu sposobnost interakcije s biološkim ciljevima, postižući slično djelovanje. Postoje dvije opće prihvaćene definicije peptidomimetika:

- (i) Peptidomimetik je spoj koji kao ligand može oponašati ili inhibirati biološki učinak peptidnog receptora.
- (ii) Peptidomimetik je spoj čiji esencijalni farmakoforni elementi oponašaju 3D-strukturu prirodnog peptida i proteina zadržavajući tako ne samo njegovu sposobnost interakcije s biološkim sustavima već i jednak ili čak poboljšani biološki učinak [11].

Riječ je o spojevima čija 3D-struktura oponaša glavni lanac i/ili bočni ogranak prirodnog peptida. Peptidomimetici se konstruiraju tako da njihova struktura omogućava prevladavanje nedostataka prirodnih peptida poput slabe selektivnosti prema receptorima, proteolitičke nestabilnosti, slabe bioraspodivnosti itd. [10]

Male molekule peptidomimetika imaju mogućnost oponašati kompleksne proteinske interakcije. Strukturne konformacije proteina iz prirodnih izvora rezultat su smatanja proteina i imaju funkcionalnu važnost u molekulskom prepoznavanju. Takve konformacije koriste se kao kalup za razvoj mimetika prirodnih peptida kao potencijalnih terapeutika. Razvijene su brojne tehnologije i pristupi za dizajn malih molekula peptidomimetika koji služe kao model velikih molekula nativnih proteina. U svrhu optimalnog dizajna peptidnih mimetika koriste se informacije dobivene proučavanjem odnosa aktivnosti i konformacijskih svojstava prirodnih peptida. [12].

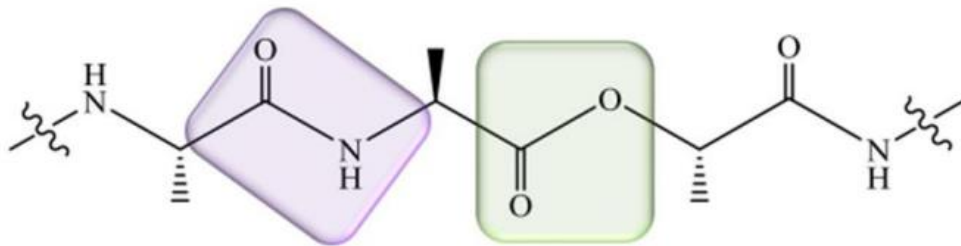
Dizajn peptidomimetičkih lijekova bazira se na uvođenju promjena u strukturi prirodnih peptida: zamjena prirodne L-aminokiseline s D-aminokiselinom, umetanje neprirodnih aminokiseline u peptidnu okosnicu, modifikacija ili ciklizacija dijelova okosnice i/ili bočnih ogranaka, modifikacija N- ili C- terminalnog kraja (slika 3). [2]



Slika 3. Strategije modifikacije peptida s ciljem poboljšanja terapijskih i biokemijskih karakteristika [prema 13]

2.3. DEPSIPEPTIDI

Depsipeptidi su peptidomimetički spojevi kod kojih je jedna ili više amidnih veza u peptidu zamijenjena s esterskom vezom (slika 4). Ovi spojevi prisutni su i u prirodi, a najčešće se mogu pronaći kao produkti u velikom broju organizama kao što su gljive, bakterije i morski organizmi. Depsipeptidi i njihovi derivati pokazuju potencijal za razvoj novih sintetskih lijekova jer posjeduju velik spektar bioloških aktivnosti, uključujući insekticidna, antivirusna, antimikrobna, antitumorska i protuupalna djelovanja. Međutim, najveći naglasak stavlja se na njihov terapijski potencijal jer djeluju kao antikancerogena i antimikrobna sredstva. [14]



Slika 4. Struktura depsipeptida [2]

Neki od primjera depsipeptida su: daptomicin koji se koristi kao antibiotik za teške oblike infekcija, antimicin koji djeluje kao pesticid u industrijskom uzgoju ribe, valinomicin koji posjeduje antikancerogeno i antikoronavirusno djelovanje te surfaktin koji ima potencijal kao industrijski tenzid. Neki depsipeptidi su odgovorni za patogenost mikroorganizama kao što je toksin cereulid kojeg stvaraju bakterije *Bacillus cereus*. [15]

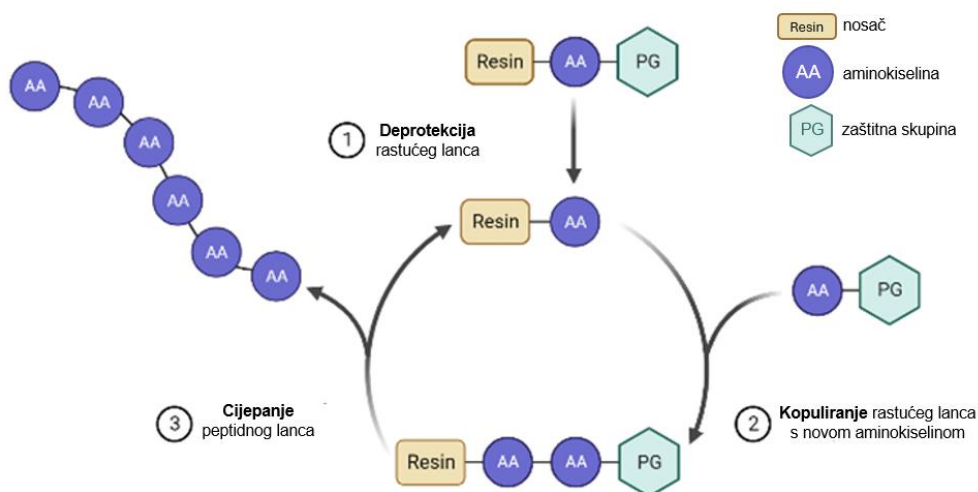
Depsipeptidi u prirodi imaju različite funkcije, pospješuju rast i opstanak mikroorganizma u okolini bez kalija i sudjeluju u simbiozi kod morskih i kopnenih organizmima. U simbiozi između mikroorganizama i mrava aktinomicin, valinomicin i antimicin sudjeluju u tripartitnom simbiotskom odnosu između *Streptomyces sp.* i mrava rezača lišća, dok dentigerumicin kojeg stvaraju aktinobakterije iz roda *Pseudonocardia* pomaže u kontroli patogenog rasta gljivica u gljivičnim vrtovima koje uzgajaju mravi. [15]

Apratoksin A, otkriven u cijanobakteriji *Lyngbya majuscula*, pokazao je snažno citotoksično djelovanje na stanične linije humanih tumora i pokazao IC_{50} vrijednosti (koncentracija inhibitora koja uzrokuje 50%-tnu inhibiciju) u rasponu od 0,36 nM i 0,52 nM u LoVo stanicama karcinoma debelog crijeva i stanicama raka epidermalnog KB karcinoma. [16]

Depsipeptidi su izvorno sintetizirani kako bi se poboljšala topljivost ultra-dugih peptida dodavanjem ostatka vezanog za ester koji bi promijenio linearnu strukturu. Osim prisutnosti

najmanje jedne esterske i jedne amidne veze u svojim strukturama, većina depsipectida sadrži veliki broj acilnih skupina i ostataka koji se dodaju u strukturu osnovnog lanca peptida (slika 3) [17].

Sinteza depsipectida najčešće se provodi pomoću metode sinteze peptida na čvrstoj fazi (slika 5) s fluorenilmetoksikarbonilom (Fmoc) kao zaštitnom skupinom na *N*-kraju, lizinom ili asparaginom kao nabijenim skupinama i mliječnom kiselinom kao izvorom esterske skupine za održavanje hidrofobnosti. Primjećeno je da dodavanje malih količina organskih kiselina poboljšava sintezu i minimizira nastanak sekundarnih reakcija [18].

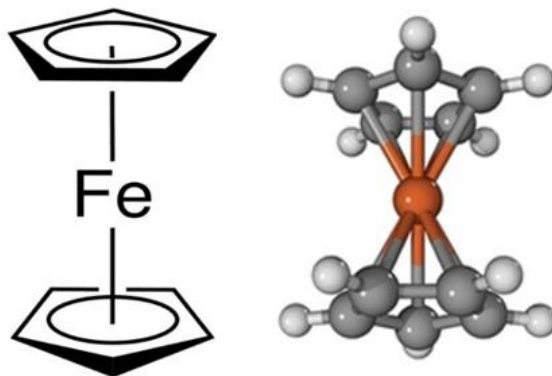


Slika 5. Metoda sinteze peptida na čvrstoj fazi [prema 19]

Depsipectidi djeluju citotoksično putem različitih mehanizama, primjerice mogu uzrokovati probijanje staničnih membrana što dovodi do neravnoteže tubulina i mikrotubula uzrokujući apoptozu stanica. Ove molekule ciljaju tumorske stanice, te je potrebno njihovo daljnje istraživanje kako bi se postigla potencijalna terapijska primjena. [16]

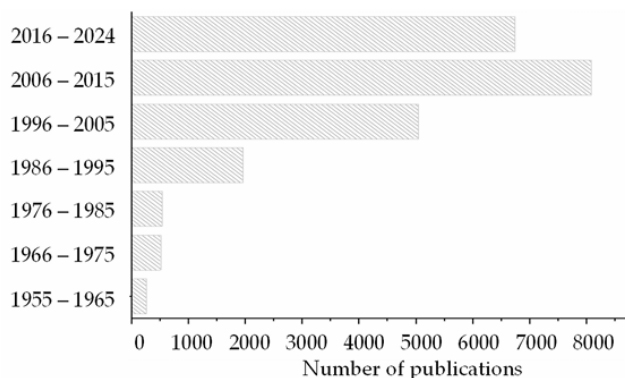
2.4. FEROCEN

Ferocen $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ (slika 6) je metallocenski spoj u čijoj je strukturi željezov kation (Fe^{2+}) smješten između dvaju ciklopentadienilnih prstenova (Cp) a takva se struktura naziva „sendvič struktura“. Prvi put je sintetiziran 1951. godine reakcijom natrijevog ciklopentadienida ($\text{C}_5\text{H}_5\text{BrMg}$) sa željezovim (II) kloridom (FeCl_3), a strukturno je okarakteriziran 1952. godine. Otkriće ferocena predstavlja začetak moderne bioorganometalne kemije. [20]



Slika 6. Struktura ferocena (*lijevo*) i njegova trodimenzionalna struktura (*desno*) [21,22]

Ferocen je narančasti kristalinični spoj koji lako prolazi kroz staničnu membranu što je posljedica njegovog lipofilnog karaktera dok konfiguracija plemenitog plina i aromatičnost doprinose njegovoj izrazitoj stabilnosti u fiziološkim uvjetima. Osim toga, karakteriziraju ga dobra topljivost u organskim otapalima, niska toksičnost, povoljna elektrokemijska svojstva, netopljivost u vodi te robusnost. Ovaj metalocen se odlikuje nizom izvrsnih fizikalno kemijskih svojstava što ga čini prikladnim za dizajn mnogobrojnih derivata. [23] Ferocenski derivati objavljeni su u više od 23000 publikacija na Web of Science (slika 7). [24]



Slika 7. Broj publikacija po desetljeću sa Web of Science za članke s temama koje se odnose na ferocen [24]

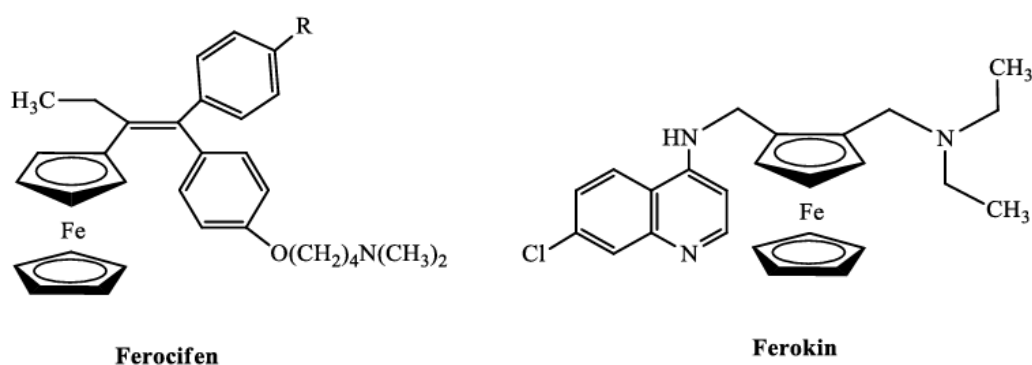
Devedesetih godina, nakon otkrića cisplatina koji je danas najzastupljeniji lijek u terapiji karcinoma, započela je potraga za antitumorskim lijekovima na bazi metala. No, s obzirom na ograničenu primjenu cisplatina koju uzrokuju njegova visoka toksičnost, mnoge nuspojave i rezistencija nekih tumora na cisplatin, potreban je razvoj novih lijekova s platinom ili drugim metalima. Ferocenski derivati s platinom, rutenijem i željezom pokazuju dobre citotoksične učinke uz smanjenu toksičnost i manji broj nuspojave. Istraživanje biološke aktivnosti ovih spojeva traje gotovo 70 godina pri čemu je glavni cilj unaprjeđenje terapijske učinkovitosti

postojećih lijekova izosternom zamjenom dijela strukture bioaktivne molekule s ferocenom. [25,26]

Poznato je da ferocenski derivati imaju važne uloge u medicinskoj kemiji zbog niza karakteristika: (i) voluminozni je izoster koji se može čvrsto uklopiti u hidrofobni džep ciljne molekule, povećavajući vezni afinitet, (ii) djeluje kao redoks-medijator koji u pretvorbi neaktivnog prolijeka u aktivni lijek, kao što je utvrđeno za ferocenski analog tamoksifena i (iii) omogućava nastanak reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) u biološkim medijima što je dokazano za ferocenski analog klorokina. [24]

Nova istraživanja elektroaktivnih ferocenskih spojeva konjugiranih s aminokiselinama se odnose na njihovu upotrebu kao elektroaktivnih redoks proba za otkrivanje hipoklorične kiseline u živim sustavima i uzorcima hrane, mjerenje aktivnosti alkalne fosfataze kao biomarkera za kliničku dijagnozu bolesti kostiju i hepatobilijarnog sustava, detekciju kontaminacije salmonelom u hrani i vodi te detekciju tumorskog markera alfa fetoproteina. Pokazano je da aminoferoceni prelaze u ione aminoferocena pri oksidativnim uvjetima, nakon čega se razgrađuju do slobodnih iona željeza koji učinkovito kataliziraju proizvodnju ROS i potiču oksidativni stres i staničnu smrt. [24]

Ferocifen i ferokin (slika 8) su dva najistaknutija derivata ferocena. Otkriveni su 1990-ih godina i od tada se opsežno proučavaju u svrhu liječenja karcinoma dojke i malarije. Za ukupnu terapijsku učinkovitost molekula ferocifena i ferokina odgovorna je ferocenilna skupina koja sudjeluje u važnim kemijskim interakcijama. [26]



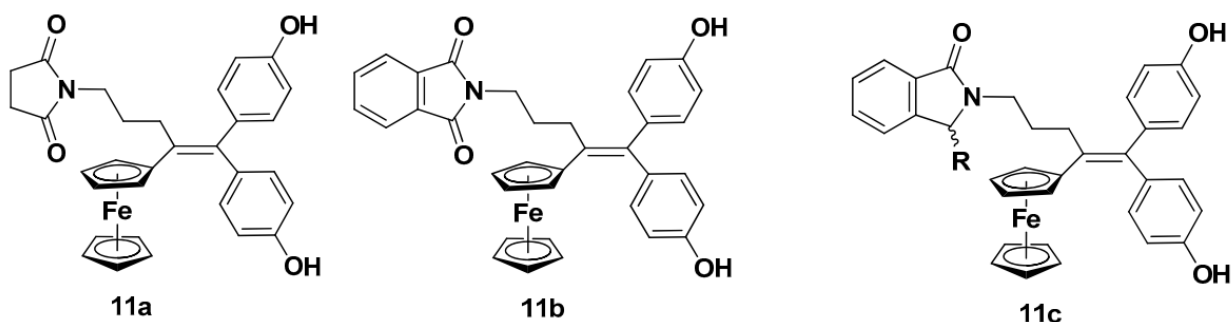
Slika 8. Kemijska struktura ferocifena i ferokina [27]

Ferokin je derivat antimalarika klorokina, a poznat je kao prvi organometalni lijek u kojem je ferocenilna skupina kovalentno povezana s 4-aminokinolinom i alkilaminom. Prvi put je dizajniran 1994. godine na Sveučilištu u Lille-u, a danas se uspješno sintetizira ugradnjom ferocena u osnovni kostur klorokina. Djeluje protiv uzročnika malarije *Plasmodium falciparum* otpornog na klorokin pri čemu ne pokazuje imunotoksične učinke kod inficiranih štakora. [28]

Ferokin, jednako kao i klorokin, djeluje na način da se nakuplja u vakuoli što uzrokuje smrt parazita. Za razliku od klorokina, njegova biološka aktivnost ovisi o ferocenskoj podjedinici i stvaranju reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) točnije hidroksilnih radikala (OH·) u Fentonovoj reakciji. [29] Mnoga istraživanja posvećena su razvoju derivata ferokina kao sigurne alternative antimalarijskoj kemoterapiji kako bi se povećala učinkovitost, smanjile nuspojave i spriječila rezistencija malarijskih parazita. [28]

Ferocifen je derivat tamoksifena u kojem je fenilna skupina zamijenjena ferocenskim prstenom. Biološka aktivnost različitih hidroksiferocifena je određena afinitetom relativnog vezanja kojim se ispituje vezanje spojeva na estrogenski receptor u konkurenciji sa samim estrogenom. Rezultati su pokazali da hidroksiferocifeni inhibiraju djelovanje hormona estrogena čime sprječavaju rast tumorskih stanica dojke iz linije MCF-7 te pokazuju antiproliferativno ponašanje na estrogen-neovisnoj staničnoj liniji MDA-MB-231. [30]

Uvođenjem sukcinimida (**11a**), ftalimida (**11b**) i drugih supstituenata koji sadrže laktam (**11c**), Vessières i suradnici su 2021. godine sintetizirali niz ferocifena (slika 9). Istraživanje aktivnosti ovih konjugata ferocifena provedeno je na 15 molekularnih staničnih linija karcinoma izoliranih iz bolesnika s glioblastomom, najčešćim primarnim karcinomom mozga. Dobiveni su zadovoljavajući rezultati prema kojima je vrijednost IC₅₀ za spoj **11b** iznosila 10,39 μM [31].



Slika 9. Strukturne formule ferocifena **11a**, **11b** i **11c** [31]

Poboljšana biološka aktivnost i unaprjeđenje terapijske učinkovitosti postojećih lijekova je rezultat uvođenja ferocena u strukturu tamoksifena i klorokina. Izosterna zamjena dijela strukture bioaktivne molekule s ferocenom rezultirala je pripravom različitih metalocenskih derivata, izostera ferocena poput rutenocenskih, renijevih i cimantrinskih derivata kod kojih je poboljšana biološka aktivnost izostala zbog razlika u elektrokemijskoj aktivnosti i elektronskoj strukturi. [32]

2.5. AMINOKISELINA LEUCIN

Prema prirodi pobočnog ogranka aminokiseline se mogu podijeliti na:

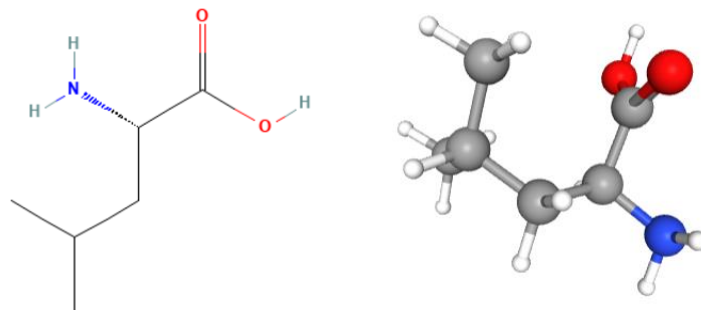
- (i) nenabijene aminokiseline pri neutralnoj pH-vrijednosti (polarne ili hidrofilne i nepolarne ili hidrofobne)
- (ii) nabijene (kisele i bazične)

Raspored polarnih i nepolarnih aminokiselina u strukturi proteina utječe na smatanje proteina, a posljedično i na njegovu funkciju. Polarni i nabijeni bočni ogranci nalaze se na površini molekule proteina kako bi uspostavili vodikove veze s vodom i drugim polarnim molekulama u stanici, dok se nepolarni (hidrofobni) bočni ogranci nalaze u unutrašnjosti molekule kako bi izbjegli kontakt s vodenom okolinom. Smatanje proteinskih lanaca ovisi o slabim nekovalentnim interakcijama koje se uspostavljaju između različitih dijelova lanca. Velik broj nekovalentnih interakcija u proteinu omogućava stvaranje specifične trodimenzionalne struktura proteina o čemu ovisi njegova funkcija. [2]

Hidrofobne interakcije imaju glavnu ulogu u stabilizaciji proteinskih struktura, pa se iz tog razloga hidrofobnost aminokiselina detaljno proučava. [33,34]

Pogreške u nabiranju proteinskih lanaca mogu rezultirati patološkim stanjima. Neadekvatna agregacija proteinskih lanaca dovodi do tvorbe amiloidnih vlakana (plaka), koja se nakupljaju u tkivima te uzrokuju teška kronična oboljenja (amilodioze) kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest koje uzrokuje nakupljanje amiloidnog plaka u mozgu. [2]

Leucin (slika 10) pripada skupini hidrofobnih aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom.



Slika 10. Kemijska struktura aminokiseline leucina (*lijevo*) i trodimenzijska struktura leucina (*desno*) [35]

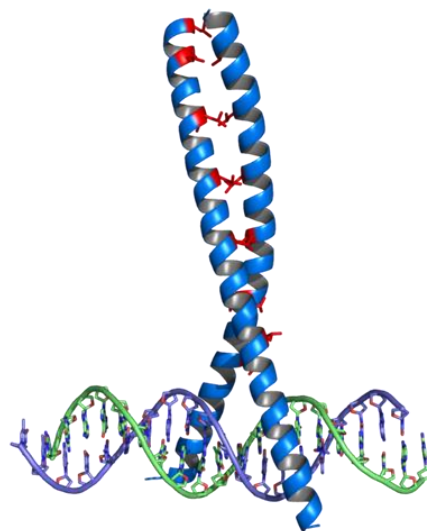
Ima ulogu u transaminaciji alfa-ketoglutarata u glutamat u stanicama jetre, masnog tkiva i mozga, a osim toga leucin je i najbitnija aminokiselina za zdravlje mišićnog tkiva. Potiče

sintezu proteina, a inhibira njihovu degradaciju jer stimulira otpuštanje inzulina. [36] Donato i suradnici su ispitali utjecaj leucina kao dodatka prehrani na sastav tijela i dokazali da niska doza leucina u obliku dodatka prehrani povećava gubitak masnog tkiva, poboljšava status jetrenih proteina i stimulira sintezu proteina [37]. Kao dodatak prehrani pokazao je i antiaterogeno djelovanje inhibicijom stvaranja pjenastih stanica djelovanjem makrofaga. [38]

L-Stereoizomer leucina koristi se kao prehrambeni aditiv (E641) i pojačivač okusa. L-Leucin se nalazi u orašastim plodovima, soji, mesu i ribi. Visoke doze leucina povezuju se s pojavom simptoma pelagre kod osoba s niskim statusom niacina, a njegov toksičan učinak manifestira se kao delirij i neurološka ugroženost te može dovesti do smrti. [39] U medicinske svrhe, leucin se koristi u prevenciji epileptičkih napadaja kao potencijalna buduća zamjena terapije diazepamom [39] te u svrhu smanjenja prevalencije zastoja srca kod pacijenata koji primaju terapiju doxorubicinom. [40]

2.5.1. Utjecaj leucina na sekundarnu strukturu peptida

U leucinom bogatim peptidima nastaje trodimenzijski strukturni motiv pod nazivom leucinski zatvarač (*engl.*, *leucine zipper*). Prvi su ga opisali Landschulz i suradnici 1988. godine kada su otkrili vrlo karakterističan segment od 30 aminokiselina. U α -uzvojnici uočeno je periodičko ponavljanje leucinskih ostataka na svakoj sedmoj poziciji, u području od osam zavoja heliksa. Predloženo je da peptidni segmenti s ovim periodičnim nizovima leucinskih ostataka stvaraju sekundarnu strukturu α -uzvojnice, pri čemu se bočni ostatci leucina iz jedne uzvojnice isprepliću s onima iz uzvojnice drugog peptida (slika 11) i time omogućuju dimerizaciju. [41]



Slika 11. Leucinski zatvarač [42]

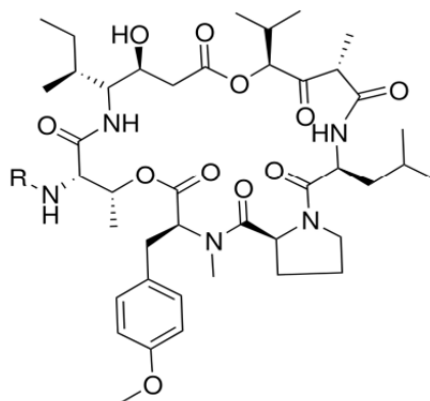
Dimerizacija proteina ključna je za formiranje funkcionalnog transkripcijskog faktora pri čemu je važan položaj leucinskih ostataka kako bi nastala α -uzvojnica. Nakon nastanka dimera, transkripcijski faktor prepoznaje specifične sekvence u promotorskoj regiji DNA molekule i posljedično dolazi do regulacije ekspresije gena. Transkripcijski faktori koji sadrže leucinski zatvarač, poput AP-1, sudjeluju u regulaciji raznih bioloških procesa, uključujući stanični rast, diferencijaciju i odgovor na stres. [43]

O'Shea i suradnici 1989. istražili su dimerizaciju GCN4 eukariotskog transkripcijskog faktora iz kvasca. U eukariota, leucinski zatvarač motiv je za dimerizaciju unutar bZip (*engl., basic region leucine zipper*) bazične domene koja se nalazi u eukariotskim transkripcijskim faktorima. Ova domena duga je 60 do 80 aminokiselina i sadrži visoko konzerviranu baznu regiju koja se veže na DNA i leucinski zatvarač za dimerizaciju. Ovaj peptid asocira u rasponu mikromolarnih koncentracija i tvori vrlo stabilan dimer s α -uzvojnica u paralelnoj orijentaciji. [44]

2.6. DEPSIPEPTIDI S LEUCINOM

2.6.1. Didemnini B i didemnini C

Didemnini čine obitelj cikličkih depsipeptida a dobiveni su iz karipskog morskog plaštenjaka *Trididemnum solidum* iz obitelji *Didemnidae*. Osim antitumorske aktivnosti, pokazuju i značajna antimikrobna svojstva, a njihova aktivnost temelji se na ometanju prijenosa mitogenog signala poput inhibicije kinaza, fosfataze i faktora elongacije. [45] 1982. godine Donia i suradnici utvrdili su da didemnini B (slika 12) ima *in vitro* inhibitorno djelovanje na viruse koji uzrokuju groznicu riftske doline i žutu groznicu te venezuelanski konjski encefalomijelitis. Kod miševa zaraženih virusom groznice riftske doline kod kojih je primjenjena terapija didemninom B u dozi od 0,25mg/kg uočeno je preživljenje od 90%. [46]



R = Lac-Pro-N-Me-L-Leu : Didemnin B
 R = Lac-N-Me-L-Leu : Didemnin C

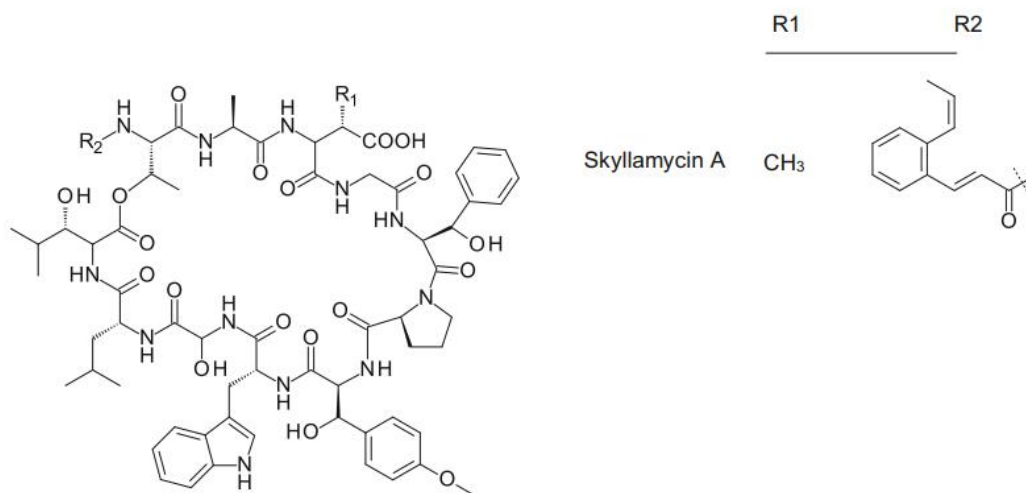
Slika 12. Struktura didemnina B i C [47]

U istraživanjima vezanim za liječenje leukemije Didemnin B pokazao je kemoterapijsko djelovanje dok je njegov analog dehidrodidemnin B testiran za liječenje akutne limfoblastične leukemije (ALL) no njihovo terapijsko djelovanje nije ograničeno samo na hematološki zloćudne bolesti. Klinička ispitivanja didemnina B i dehidrodidemnina B provedena su na širokom spektru tumora uključujući rak debelog crijeva, rak jednjaka, maligni melanom, medularni karcinom štitnjače, metastatski rak dojke, rak pluća i bubrega i karcinom cerviksa. [47]

Identifikacijom i karakterizacijom staničnih linija izvedenih iz tumora koje iznimno reagiraju na didemnin B, Potts i suradnici otkrili su da spoj snažno inducira apoptozu dvostrukom inhibicijom palmitoil proteinske tioesteraze 1 (PPT1) i eukariotskog elongacijskog translacijskog faktora 1 alfa 1 (EEF1A1). [47]

2.6.2. Skilamicin A

Ciklički depsipeptid skilamicin A (slika 13) snažan je inhibitor signalnog puta faktora rasta koji potječe iz trombocita (PDGF) inhibicijom vezanja homodimernog PDGF vezujućeg proteina na PDGF β -receptor.

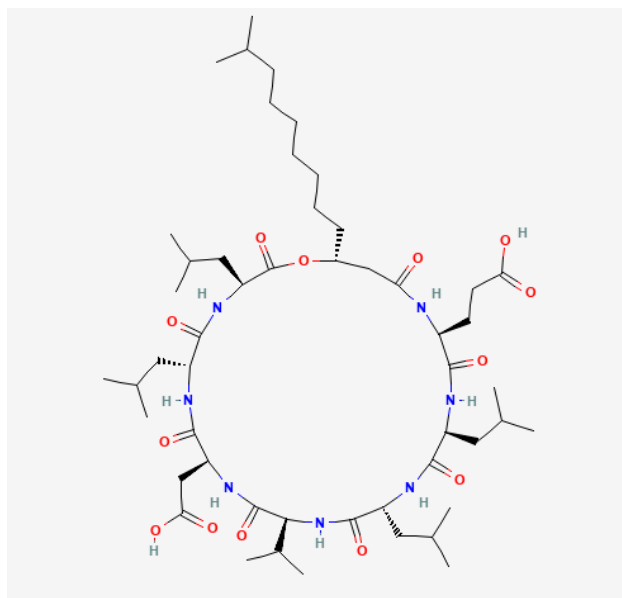


Slika 13. Struktura skilamicina A [48]

Osim uobičajenih aminokiselina kao što je leucin, njegova struktura sadrži bočni lanac cinamoila i pokazuje veliku količinu β hidroksiliranih aminokiselina kao i neuobičajeni α -hidroksiglicinski dio kao rijetku strukturnu modifikaciju. Biosintetski genski klaster skilamicina kloniran je i sekvencioniran iz *Streptomyces sp. Acta 2897*. Njegova analiza otkrila je prisutnost otvorenih okvira čitanja koji kodiraju proteine za biosintezu prekursora masnih kiselina, neribosomalne peptidne sintetaze, regulatorne i transportne proteine. [43] Skilamicin A inhibira put faktora rasta uzrokujući inhibiciju mitoze u tumorskim stanicama jer selektivno blokira vezanje homodimera faktora rasta BB na β -receptor. Ovakvo djelovanje skilamicina A upućuje na potencijalne slične učinke na rak, poput lijeka imatiniba, osobito protiv kronične mijeloične leukemije. [49,17]

2.6.3. Surfaktin

Surfaktin (slika 14), bakterijski ciklički lipopeptid kojeg proizvode različiti sojevi *Bacillus subtilis* prvotno je imao ulogu kao jedan od najučinkovitijih biosurfaktanata. Ima sposobnost smanjenja površinske napetosti vode sa 72 na 27 mN/m pri koncentraciji od samo 0,005 %. Struktura surfaktina sastoji se od sedam aminokiselina vezanih na karboksilne i hidroksilne skupine masne kiseline s 14 ugljika. Surfaktin posjeduje niz bioloških aktivnosti kao što je sposobnost lize eritrocita, inhibicije stvaranja ugrušaka, lize bakterijskih sferoplasta i protoplasta i inhibicije cikličke 3',5-monofosfat diesteraze. Visoki troškovi proizvodnje i niski prinosi ograničili su njegovu upotrebu u raznim komercijalnim primjenama. [50]



Slika 14. Struktura surfaktina [51]

Neki biosurfaktanti mogu se koristiti kao alternativa sintetskim lijekovima i antimikrobnim sredstvima, a trenutno se istražuje njihova otpornost na meticilin i vankomicin. Ovi antibiotici koriste se u terapiji bolničkih infekcija uzrokovanih enterokokima i *Staphylococcus aureusom* te u terapiji izvanbolničkog *S. aureusa* rezistentnog na meticilin (caMRSA), koji je puno agresivniji od svojih bolničkih srodnika zbog sklonosti zaraze mladih i zdravih ljudi. [52]

Seydlova i suradnici u svojem istraživanju otkrili su protuupalni utjecaj surfaktina tijekom interakcije lipopolisaharida (LPS) s eukariotskim stanicama. Zabilježeno je da surfaktin inhibira LPS-induciranu ekspresiju upalnih medijatora (IL-1b i iNOS) i smanjuje razinu endotoksina, TNF-a i dušikovog oksida u plazmi kao odgovor na septički šok u štakora. Također, surfaktin suzbija interakciju lipida A s LPS veznim proteinom (LBP) koji posreduje u transportu LPS do njegovih receptora pri čemu surfaktin nije utjecao na vitalnost ispitivanih eukariotskih staničnih linija. [52]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE

Pročišćavanje otapala korištenih u radu provedeno je prema standardnim postupcima, dok su za pripremu ciljnih spojeva i njihovih prekursora korištene kemikalije analitičke čistoće.

Tijek provedenih kemijskih reakcija praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel), s fluorescentnim indikatorom valne duljine 254 nm. Osim toga, ista TLC metoda korištena je i za kontrolu čistoće sintetiziranih spojeva. Aminokiseline i neferocenski spojevi detektirani su tankoslojnom kromatografijom pomoću ultraljubičaste (UV) svjetlosti, pri valnoj duljini od 254 nm, te naknadnim špricanjem pločica s ninhidrinom uz zagrijavanje.

Pročišćavanje sintetiziranih produkata provedeno je tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu („Merck“, Kieselgel 60 HF254) pri čemu je smjesa etil-acetata i diklormetana u različitim omjerima (1 : 10; 1 : 5; 1 : 1) služila kao eluens.

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i infracrvena spektroskopija (IR) poslužile su kao metode za provođenje strukturne karakterizacije ciljnih spojeva.

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

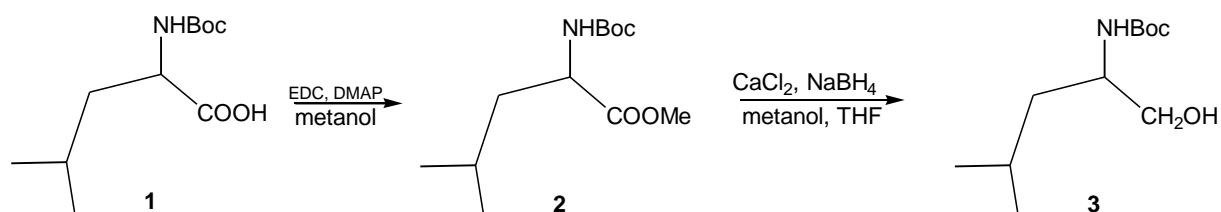
Popis kemikalija korištenih u pripremi prekursora i ciljnih spojeva:

- diklormetan, CH_2Cl_2
- natrijev klorid, NaCl
- sumporna kiselina, H_2SO_4
- *N'*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilkarbodiimid-hidroklorid, EDC
- 1-hidroksibenzotriazol-hidrat, HOBt
- dimetilaminopiridin, DMAP

- trietilamin, Et₃N
- natrijev hidrogenkarbonat, NaHCO₃
- bezvodni natrijev sulfat, Na₂SO₄
- etil-acetat, EtOAc (Et–etil; Ac–acetil)
- metanol, CH₃OH
- acetil-klorid, CH₃COCl
- natrijev hidroksid, NaOH
- aceton, CH₃COCH₃
- etil-kloroformat, C₃H₅ClO₂
- natrijev nitrid, Na₃N
- *tert*-butil-alkohol, (CH₃)₃COH
- limunska kiselina, C₆H₈O
- dimetil-sulfoksid, DMSO

3.2. POSTUPAK PRIPRAVE FEROCENSKIH DEPSIPEPTIDA

D–leucinol (**3**) te ferocenski peptidi (**4-11**) pripravljeni su postupcima koji su prikazani na shemama **1**, **2** i **3**. Sinteza *N*-zaštićene ferocenske aminokiseline (Boc–Fca) kao i D–leucinola (**3**) opisani su u literaturi [53, 54] te njihovi spektroskopski podaci odgovaraju onima prikazanim u literaturi.



Shema 1. Priprava D-leucinola

3.2.1. Priprava Boc-D-Leu-COOMe (2)

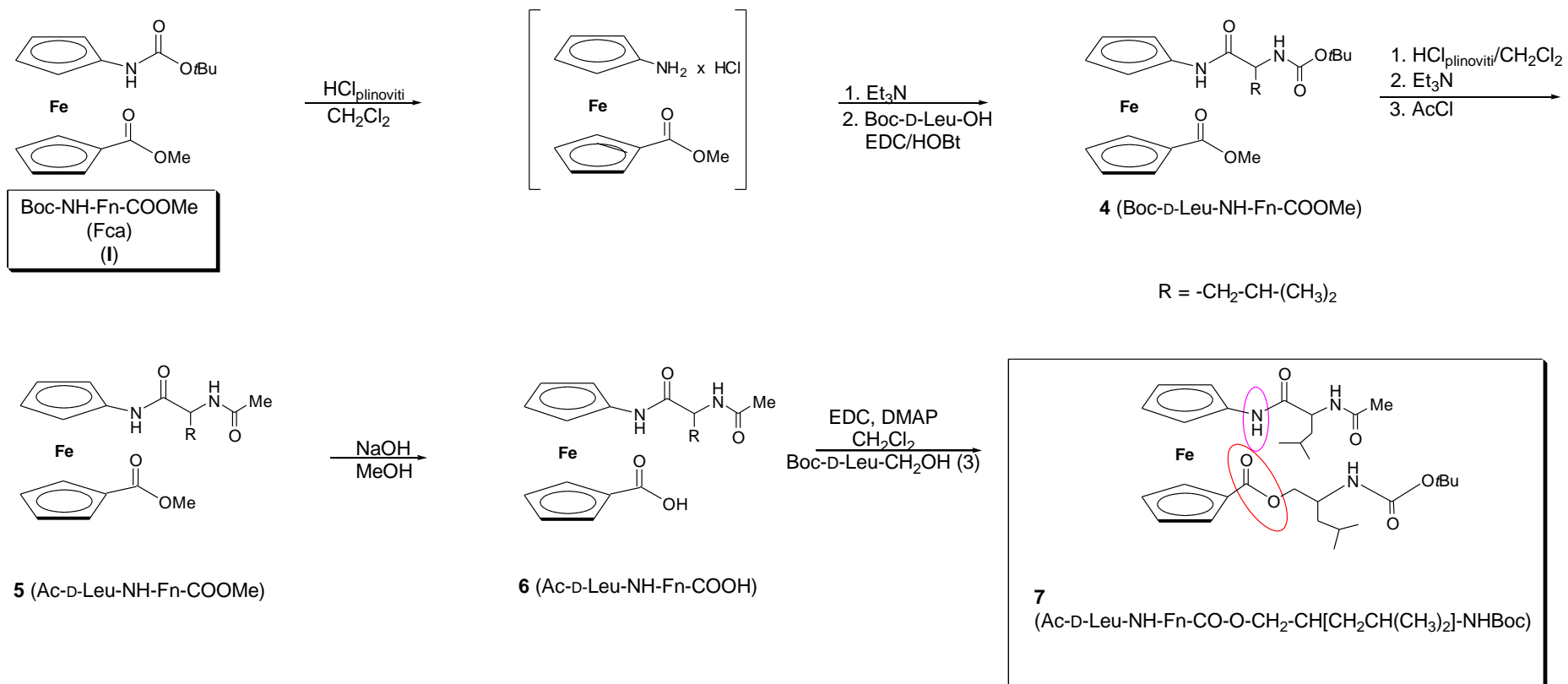
U suspenziju Boc-D-leucina (1) (100 g, 0,26 mmol) u metanolu (35 ml) dodaju se EDC (56 mg, 0,59 mmol) i DMAP (35 mg, 0,29 mmol). Reakcijska smjesa miješa se pri sobnoj temperaturi kroz naredna 24 sata. Nakon što se tankoslojnom kromatografijom ustanovi da je reakcija završena, metanol se upari, a u sirupasti produkt se doda diklormetan, ispere se 0,1 M HCl, 5% otopinom NaHCO₃ i zasićenom otopinom NaCl. Stajanjem u frižideru, dolazi do taloženja produkta u obliku bijelih kristala (98 %). R_f = 0.3 (etilacetat)

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3438 sr (NHBoc), 1743 j (C=O, Boc)., 1716 j (C=O, COOCH₃).

3.2.2. Priprava Boc-D-Leu-CH₂OH (3)

U smjesu 1 mL metanola i 2 mL THF doda se svježe zdrobljeni CaCl₂ (300 mg), koji se nakon miješanja kroz pola sata otopi, nakon čega se pripremljena otopina dobro ohladi u ledenoj kupelji. Doda se 210 mg (5,5 mmol) NaBH₄ i lagano dokapa Boc-D-Leu-COOMe (2) (500 mg, 2,16 mmol) otopljen u tetrahidrofuranu. Smjesa se lagano zagrijava do 70 °C te se ostavi da refluxira naredna 24 sata. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se izlije u hladnu vodu, te se produkt ekstrahira više puta diklormetanom. Organska faza ispere se vodom, zasićenom otopinom NaCl te se posuši na bezvodnom NaSO₄. Nakon uparavanja diklormetana, dobiveno je 90 % žutog sirupa. R_f = 0.39 (CH₂Cl₂:EtOAc = 5:1).

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3430 sr (NHBoc), 3310 š (OH, CH₂OH)., 1731 j (C=O, Boc).



Shema 2. Priprava prekursora (4-6) i ferocenskog depsipeptida 7

3.2.3. Priprava peptida Boc-D-Leu-NH-Fn-COOMe (4)

Boc-NH-Fn-COOMe (Fca) (1 g, 2,8 mmol) otopi se u CH₂Cl₂, ohladi na 0 °C i podvrgne djelovanju plinovitog HCl. Nakon 15 minuta miješanja u ledenoj kupelji, uvođenje HCl-a nastavi se pri sobnoj temperaturi dok se kromatografski ne utvrdi završetak reakcije. Otapalo se otpari na rotacijskom vakuum-uparivaču, a nastali hidroklorid suspendira se u CH₂Cl₂ te obradi sa suviškom Et₃N do pH~9. Dobiveni se slobodni amin kopulira s Boc-D-Leu-OH (1,79 g, 7,74 mmol) primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon 48 sati miješanja pri sobnoj temperaturi, rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom NaHCO₃, 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz CH₂Cl₂:EtOAc = 5:1 kao eluens. Dobivena je narančasta smola (0,85 g, 65%).

Boc-D-Leu-NH-Fn-COOMe (4): IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm^{-1} : 3416 s (NH_{slob.}), 3322 m (NH_{asoc.}), 1709 s (C=O_{COOMe}), 1685 s (C=O_{Boc}), 1603 m (C=O_{CONH}), 1584 s, 1534 m, 1506 m, 1499 m (amid II). **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.62 (s, 1H, NH_{Fn}), 5.03 (d, *J* = 8.03 Hz, 1H, NH_{Boc}), 4.74 (pt, 2H, CH_{Fn}), 4.67 (s, 1H, CH_{Fn}), 4.55 (s, 1H, CH_{Fn}), 4.37 (pt, 2H, CH_{Fn}), 4.15-4.12 (m, 1H, CH _{α -Leu}), 4.03 (s, 1H, CH_{Fn}), 4.01 (s, 1H, CH_{Fn}), 3.80 (s, 3H, CH₃-COOMe), 1.78-1.70 (m, 2H, CH_{2- β -Leu}, CH _{γ -Leu}), 1.55-1.51 (m, 1H, CH_{2- β -Leu}), 1.47 [s, 9H, (CH₃)₃-Boc], 0.97 [t, *J* = 6.3 Hz, 6H, (CH₃)_{2- δ -Leu}] ppm. **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃) δ : 171.96 (1C, CO^a_{Fn}), 171.12 (1C, CO^b_{Fn}), 154.34 (1C, CO_{Boc}), 100.13 (1C, C_q_{Boc}), 95.17 (1C, C_{q-1}_{Fn}), 72.81 (1C, CH_{Fn}), 72.79 (1C, C_{q-6}_{Fn}), 71.95, 71.35, 71.24, 66.73, 66.44 (5C, CH_{Fn}), 63.37 (1C, CH _{α -Leu}), 63.01 (1C, CH_{Fn}), 51.83 (1C, CH₃-COOMe), 40.90 [1C, (CH₂) _{β -Leu}], 28.49 [3C, (CH₃)₃-Boc], 24.91 (1C, CH _{γ -Leu}), 23.13, 22.15 [2C, (CH₃)_{2- δ -Leu}] ppm.

3.2.4. Priprava peptida Ac-D-Leu-NH-Fn-COOMe (5)

U diklormetansku otopinu Boc-D-Leu-NH-Fn-COOMe (4) (0,76 g, 1,63 mmol) ohlađenu na 0 °C uvodi se plinoviti HCl. Nakon 3 sata miješanja na sobnoj temperaturi otapalo se upari, a rezultirajući hidroklorid suspendira se u suhom CH₂Cl₂ (5 ml) i otopi dodatkom Et₃N (1,8 μ L, 13 mmol) do pH~9. Nastaloj se otopini, ohlađenoj na 0 °C, uz miješanje oprezno dokapa AcCl (0,7 mL, 9,8 mmol). Nakon 15 minuta miješanja pri 0 °C, reakcija se prekine dodatkom vode te se reakcijska smjesa više puta ekstrahira s CH₂Cl₂. Organski se sloj ispere zasićenom vodenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz EtOAc kao

eluens. Dobiveno je 405 mg (60%) narančaste smole.

Ac-D-Leu-NH-Fn-COOMe (5): IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm^{-1} : 3421 m (NH_{slob.}), 3290 m, 3241 w (NH_{asoc.}), 1708 s (C=O_{COOMe}), 1699 s, 1652 s, 1636 s (C=O_{CONH}), 1574, 1556, 1541, 1516, 1508, 1488 (amid II). **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ : 8.23 (s, 1H, NH_{Fn}), 6.47 (d, *J* = 8.22 Hz, 1H, NH_{Ac}), 4.73 (pt, 1H, CH_{Fn}), 4.71 (pt, 1H, CH_{Fn}), 4.61 (pt, 2H, CH_{Fn}), 4.54 (q, *J* = 8.3 Hz, 1H, CH _{α} -Leu), 4.02 (pt, 2H, CH_{Fn}), 4.00 (pt, 2H, CH_{Fn}), 3.79 (s, 3H, CH₃-COOMe), 2.05 (s, 3H, CH₃-Ac), 1.78-1.74 (m, 1H, CH_{2- β} -Leu), 1.71-1.69 (m, 1H, CH _{γ} -Leu), 1.60-1.55 (m, 1H, CH_{2- β} -Leu), 0.98 [d, *J* = 6.6 Hz, 3H, (CH₃) _{δ -a}-Leu], 0.96 [d, *J* = 6.6 Hz, 3H, (CH₃) _{δ -b}-Leu] ppm. **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃) δ : 171.97 (1C, CO^b_{Fn}), 170.90 (1C, CO^a_{Fn}), 169.92 (1C, CO_{Ac}), 95.22 (1C, C_{q-1}_{Fn}), 72.71, 72.67 (2C, CH_{Fn}), 71.99 (1C, C_{q-6}_{Fn}), 71.38, 71.19, 66.67, 66.40, 63.34, 63.16 (6C, CH_{Fn}), 52.28 (1C, CH _{α} -Leu), 51.82 (1C, CH₃-COOMe), 40.86 [1C, (CH₂) _{β} -Leu], 24.97 (1C, CH _{γ} -Leu), 23.34 (1C, CH₃-Ac), 23.03, 22.39 [2C, (CH₃)_{2- δ} -Leu] ppm.

3.2.5. Priprava peptida Ac-D-Leu-NH-Fn-COOH (6)

U otopinu estera **5** (0,35 g, 0,85 mmol) u metanolu (5 mL) doda se NaOH (40 mg, 1 mmol) i par kapi vode. Nakon 4 sata refluksiranja pri temperaturi od 65 °C, reakcijska se smjesa upari, a ostatak zakiseli 10%-tnom otopinom HCl te ekstrahira EtOAc. Organski sloj ispere se zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari.

Ac-D-Leu-NH-Fn-COOH (6): IR (CH₂Cl) ν_{max}/cm^{-1} : 3421 m (NH_{slob.}), 3290 m, 3241 m (NH_{asoc.}), 3161-3071 š (OH, COOH), 1715 s, 1699 s, 1652 s, 1636 s (C=O_{COOH}, CONH), 1574, 1556, 1541, 1516, 1508, 1488 (amid II).

3.2.6. Priprava ciljnog depsipeptida Ac-D-Leu-NH-Fn-COO-D-Leu-Boc (7)

Ferocenska kiselina Ac-D-Leu-NH-Fn-COOH (**6**) (500 mg, 1,44 mmol) otopi se u diklormetanu te joj se dodaju EDC (305 mg, 1,59 mmol) i DMAP (195 mg, 1,59 mmol). Nakon pola sata miješanja na sobnoj temperaturi u reakcijsku smjesu se doda D-leucinol (**3**) (380 mg, 2,16 mmol) te se miješa dok se tankoslojnom kromatografijom ne utvrdi da je reakcija gotova. Obrada reakcijske smjese sastoji se od ispiranja diklormetanske faze s 5 % NaHCO₃, 10 % limunskom kiselinom, zasićenom otopinom NaCl te sušenjem na bezvodnom NaSO₄. Nakon uparavanja organske faze, sirovi produkt se pročisti u sustavu (DCM:EtOAc = 5:1) pri čemu se dobije 200 mg (28 %) žute smole.

Ac-D-Leu-NH-Fn-COO-D-Leu-Boc (7):

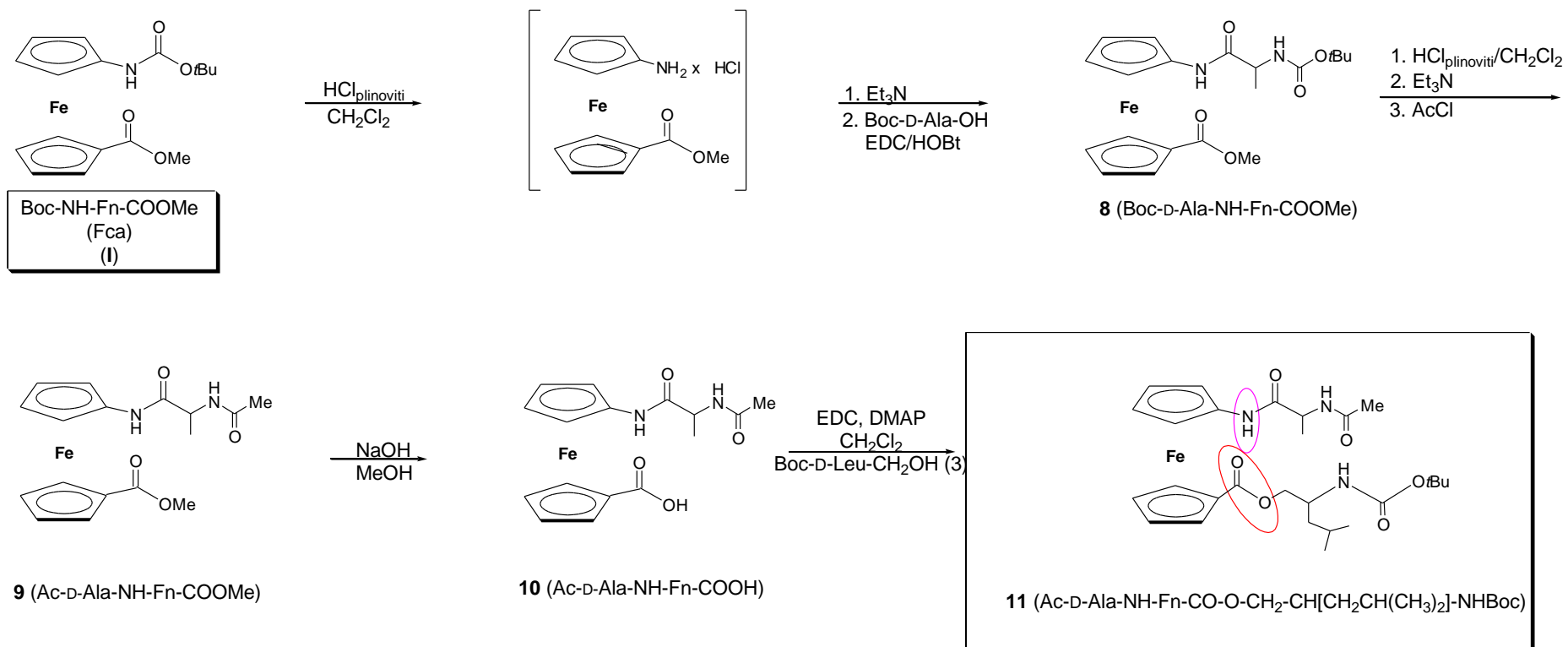
R_f = 0,71 (CH₂Cl₂: EtOAc = 5:1)

IR (CH₂Cl) ν_{max}/cm^{-1} : 3428 sr (NH_{slobodni}), 3304 sr, 3236 sl (NH_{asocirani}), 1706 sl, 1663 j

(C=O_{CONH}), 1539 j, 1505 j (amid II)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 8,16 (s, 1H, NH_{Fn}), 6,69 (s, 1H, NH_{Ac}), 5,40 (s, 2H, H-7_{Fn}, H-10_{Fn}), 5,20 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H, NH_{Boc}), 4,85 (pt, 1H, H-3_{Fn}), 4,30 (pt, 1H, H-4_{Fn}), 4,11 (q, 1H, CH^b_{α-Leu}), 4,02-3,97 (s, 2H, H-2_{Fn}, H-5_{Fn}), 3,92-3,90 (m, 3H, H-8_{Fn}, H-9_{Fn}, CH^b_{α-Leu}), 2,11 (s, 3H, CH_{3-Ac}), 1,79-1,67 (m, 3H, CH_{2-β-Leu}, CH^a_{γ-Leu}), 1,59-1,55 (m, 3H, CH_{2-β-Leu}, CH^b_{γ-Leu}), 1,47 [s, 9H, (CH₃)_{3-Boc}], 0,94 [t, *J* = 6,7 Hz, 6H, (CH₃)_{2^b-Leu}], 0,88 [d, *J* = 6,51 Hz, 6H, (CH₃)_{2^a-Leu}] ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ: 171,87 (CO^b_{Fn}), 171,62 (CO_{Ac}), 171,59 (CO^a_{Fn}), 157,17 (CO_{Boc}), 99,72 (C-6_{Fn}, C-1_{Fn}), 80,65 (C_{qBoc}), 65,70 (C-8, C-9), 64,96 (C-5), 64,75 (C-2), 62,90 (C-7), 62,70 (C-10), 61,49 (C-4), 61,24 (C-3), 53,98 (CH^b_{α-Leu}), 53,80 (CH^a_{α-Leu}), 40,96 (CH_{2^b-β-Leu}), 40,44 (CH_{2^a-β-Leu}), 28,64 [(CH₃)_{3-Boc}], 24,93 (CH^b_{γ-Leu}), 24,79 (CH^a_{γ-Leu}), 23,38 (CH_{3-Ac}), 23,01, 22,95, 21,66, 21,58 [(CH₃)_{γ^a-Leu}; (CH₃)_{γ^b-Leu}] ppm.



Shema 3. Priprava prekursora (**8-10**) i ferocenskog depsipeptida **11**

3.2.7. Priprava peptida Boc-D-Ala-NH-Fn-COOMe (8)

Prvi korak je otapanje Boc-zaštićene ferocenske aminokiseline Fca I (1 g, 2,8 mmol) u diklormetanu, nakon čega se ohladi na 0 °C i izloži djelovanju plinovitog klorovodika. Plinoviti klorovodik (HCl) pripremljen je *in situ* reakcijom koristeći natrijev klorid i sulfatnu kiselinu. Nakon 30 minuta miješanja u ledenoj kupelji te naknadnim otparavanjem na rotacijskom vakuum-uparivaču, nastali se hidroklorid suspendira u CH₂Cl₂ i obrađuje sa suviškom trietilamina (Et₃N) (pH~9). Ferocenski amin, dobiven ovim postupkom, kopulira s Boc-D-Ala-OH (1,18 g, 5,5 mmol) koji je prethodno aktiviran primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon miješanja u trajanju od jednog sata pri sobnoj temperaturi (ili dok reakcija ne završi), dobivena reakcijska smjesa se ispire zasićenom vodenom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata (NaHCO₃) 10 %-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski sloj se zatim osuši bezvodnim natrijevim sulfatom (Na₂SO₄) i upari do suha. Dobiveni sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu, koristeći CH₂Cl₂:EtOAc = 5:1 kao eluens.

Boc-D-Ala-NH-Fn-COOMe (8): IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm^{-1} : 3422 sr (NH_{slobodni}), 3316 sl (NH_{asocirani}), 1707 (C=O_{COOMe}), 1536, 1498, 1369 (amid II). **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ : 7,63 [s, 1H, NH_{Fn}]; 5,14 [d, J = 6,93 Hz, 1H, NH_{Ala}]; 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_{Ala}]; 4,04 (m, 1H, 4-H); 4,02 (m, 1H, 3-H); 3,80 (s, 3H, CH₃COOMe); 1,48 [s, 22 9H, CH₃Boc]; 1,43 [d, J = 6,98 Hz, 3H, CH₃Ala] ppm. **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃) δ : 171,88 [CO_{COOMe}]; 171,17 [CO_{Ala}]; 156,02 [CO_{Boc}]; 95,28 (C-1); 80,61 [Cq_{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, CH₃COOMe, CH_{Ala}], 28,51 [CH₃Boc]; 17,94 [CH₃Ala] ppm.

3.2.8. Priprava peptida Ac-D-Ala-NH-Fn-COOMe (9)

U prethodno pripremljenu suspenziju Boc-peptida **8** (800 mg; 1,52 mmol) i EtOAc, koja je ohlađena na 0 °C, uvodi se plinoviti HCl dobiven istim postupkom kao pri pripremi peptida **1**. Tankoslojnom kromatografijom utvrđuje se potpuno deprotektiranje peptida, nakon čega se otapalo upari, a dobiveni hidroklorid peptida **8** suspendira se u suhom diklormetanu (8mL) i otopi uz dodatak Et₃N (1,67 mL; 12,1 mmol). U pripravljenu otopinu, koja je prethodno ohlađena na 0 °C, dokapava se acetil-klorid (649 μ L; 9,12 mmol) uz konstantno miješanje. Nakon 15 minuta miješanja pri 0 °C, potrebno je smjesu izliti u vodu nakon čega slijedi višestruka ekstrakcija diklormetanom. Prethodno izdvojeni organski sloj ispire se zasićenom vodenom otopinom natrijevog klorida (NaCl), a zatim suši bezvodnim Na₂SO₄ i uparava do suhog. Nastali

sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu, uz eluens EtOAc.

Boc-D-Ala-NH-Fn-COOMe (9): IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm^{-1} : 3422 sr (NH_{slobodni}), 3316 sl (NH_{asocirani}), 1707 (C=O_{COOMe}), 1536, 1498, 1369 (amid II). **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ : 8,23 [s, 1H, NH_{Fn}]; 6,54 [d, $J = 7,29$ Hz, 1H, NH_{Ala}]; 4,75 (m, 1H, 7-H); 4,73 (m, 1H, 10-H); 4,67 (m, 1H, 2-H); 4,61 [m, 1H, CH_{Ala}]; 4,38 (m, 2H, 8-H, 9-H); 4,04 (m, 1H, 4-H); 4,01 (m, 1H, 3-H); 3,79 (s, 3H, CH₃-COOMe); 2,09 [s, 3H, CH_{3Ac}]; 1,45 [d, $J = 6,96$ Hz, 3H, CH_{3Ala}] ppm. **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃) δ : 171,88 [CO_{COOMe}]; 170,86 [CO_{Ala}]; 170,63 [CO_{Ac}]; 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 [CH₃-COOMe]; 49,41 [CH_{Ala}]; 23,43 [CH_{3Ac}]; 18,13 [CH_{3Ala}] ppm.

3.2.9. Priprava peptida Ac-D-Ala-NH-Fn-COOH (10)

U otopinu estera **2** (800 mg, 1,7 mmol) i 7 mL metanola, dodaje se 100 mg natrijevog hidroksida NaOH (1,7 mmol) i par kapi vode. Nakon dodavanja NaOH slijedi jednosatno refluksiranje, pri temperaturi od 65 °C, nakon čega se smjesa upari, ostatak zakiseli 20 %-tnom otopinom HCl-a te ekstrahira etilacetatom. Organski sloj ispere se zasićenom otopinom NaCl-a, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari.

Ac-D-Ala-NH-Fn-COOH (10): IR (CH₂Cl) ν_{max}/cm^{-1} : 3420 sl (NH_{slobodni}), 3296 sr (NH_{asocirani}), 3109-2800 (m, OH, COOH), 1710, 1697, 1653 (C=O_{COOH}, C=O_{CONH}), 1576 (amid II).

3.2.10. Priprava ciljnog depsipectida Ac-D-Ala-NH-Fn-COO-D-Leu-Boc (11)

Ferocenska kiselina Ac-D-Ala-NH-Fn-COOH (**10**) (500 mg, 1,44 mmol) otopi se u diklormetanu te joj se dodaju EDC (305 mg, 1,59 mmol) i DMAP (195 mg, 1,59 mmol). Nakon pola sata miješanja na sobnoj temperaturi u reakcijsku smjesu se doda D-leucinol (**3**) (380 mg, 2,16 mmol) te se miješa dok se tankoslojnom kromatografijom ne utvrdi da je reakcija gotova. Obrada reakcijske smjese sastoji se od ispiranja diklormetanske faze s 5 % NaHCO₃, 10 % limunskom kiselinom, zasićenom otopinom NaCl te sušenjem na bezvodnom NaSO₄. Nakon uparavanja organske faze, sirovi produkt se pročisti u sustavu (DCM:EtOAc = 5:1) pri čemu se dobije 200 mg (28 %) žute smole.

Ac-D-Ala-NH-Fn-COO-D-Leu-Boc (11):

$R_f = 0,71$ (CH₂Cl₂ : EtOAc = 5 : 1)

IR (CH₂Cl) ν_{max}/cm^{-1} : 3426 sr (NH_{slobodni}), 3317 sr (NH_{asocirani}), 1705 j, 1681 j, 1644 j

(C=O_{CONH}), 1547, 1502, 1463 (amid II)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 8,24 (s, 1H, NH_{Fn}), 6,60 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H, NH_{Ac}), 5,36 (s, 2H, H-7_{Fn}, H-10_{Fn}), 5,14 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, NH_{Boc}), 4,16 (m, 1H, CH _{α -Ala}), 4,04 (s, 1H, H-2_{Fn}), 3,98 (s, 2H, H-3_{Fn}, H-4_{Fn}), 3,97 (t, 1H, CH^b _{α -Leu}), 3,94 (s, 1H, H-5_{Fn}), 3,90 (s, 2H, H-8_{Fn}, H-9_{Fn}), 2,12 (s, 3H, CH_{3-Ac}), 2,03-2,02 (m, 1H, CH^a _{β -Leu}), 1,97-1,95 (m, 1H, CH^b _{β -Leu}), 1,47 [s, 9H, (CH₃)_{3-Boc}], 1,39 (d, 3H, CH_{3-Ala}), 1,06 (d, $J = 6,8$, 3H, CH_{3^b-Leu}), 1,04 [d, $J = 6,9$, 3H, (CH₃)_{2^b-Leu}], 1,01 [d, $J = 6,6$ Hz, 3H, (CH₃)_{2^a-Leu}] ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 172,81 (CO_{Ac}), 171,73 (CO_{Fn}), 171,09 (CO_{Fn}), 155,91 (CO_{Boc}), 95,83 (C-1_{Fn}), 79,56 (C_{qBoc}), 70,66 (C-6_{Fn}), 65,60 (C-8, C-9), 65,01 (C-5), 64,87 (C-4), 62,87 (C-7), 62,78 (C-10), 61,79 (C-3), 61,37 (C-2), 61,20 (CH _{α -Ala}), 61,08 (CH^a _{α -Leu}), 49,40 (CH_{3-Ala}), 30,40 (CH^a _{β -Leu}), 28,62 [(CH₃)_{3-Boc}], 23,33 (CH_{3-Ac}), 19,60 [(CH₃) _{γ ^b-Leu}], 19,29 [(CH₃) _{γ ^b-Leu}] ppm.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UVOD

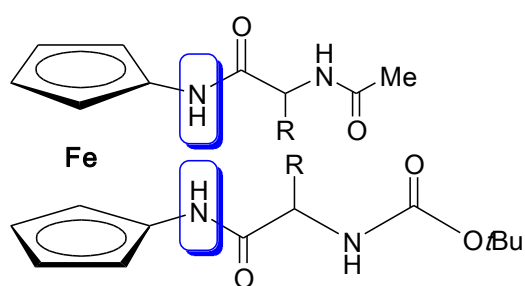
Do razvoja velikog broja peptidomimetika dovela je potreba za sintezom modificiranih peptida koji posjeduju poboljšana farmakodinamička i farmakokinetička svojstva, kao što su povećana djelotvornost, selektivnost, metabolička stabilnost i bioraspoloživost, a smanjena toksičnost. [10]

Uvođenje ferocena u strukturu spojeva poznate biološke aktivnosti dovodi do poboljšane biološke aktivnosti zbog njegovih iznimnih karakteristika. U molekuli ferocena, udaljenost između dva ciklopentadienilna prstena iznosi 3,3 Å, što pogoduje tvorbi vodikovih veza, a njegovo umetanje u peptidne lanace omogućava nastanak različitih elemenata sekundarne strukture poput okreta, uzvojnica i ploha. [24]

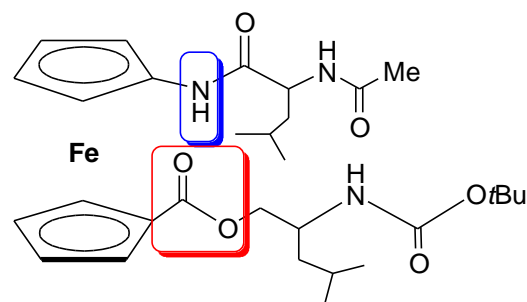
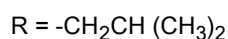
Depsipeptidi predstavljaju obećavajuće spojeve za otkrivanje novih lijekova. Manje su osjetljivi na proteolizu jer se amidne skupine, koje su podložne proteolizi, zamjenjuju s esterskim skupinama. [2] Do sada je u Laboratoriju za organsku kemiju PBF-a provedena priprava i konformacijska analiza velikog broja peptidomimetika izvedenih iz ferocena i različitih aminokiselina. [55] U dosadašnjim istraživanjima dokazano je da ferocenski templat (Fcd, Fca i Fcda), voluminoznost i kiralnost bočnog ogranka konjugiranih aminokiselina te zaštitne skupine utječu na indukciju intramolekulskih vodikovih veza između podandnih peptidnih lanaca kao i na njihovu biološku aktivnost.

Budući da ferocenski depsipeptidi do sada nisu poznati niti sintetizirani, osnovni je cilj ovog rada ispitati utjecaj zamjene jedne amidne veze esterskom vezom na obrazac i brojnost vodikovih veza i utjecaj na stvaranje elemenata sekundarne strukture pripremljenih depsipeptida kao ferocenskih derivata.

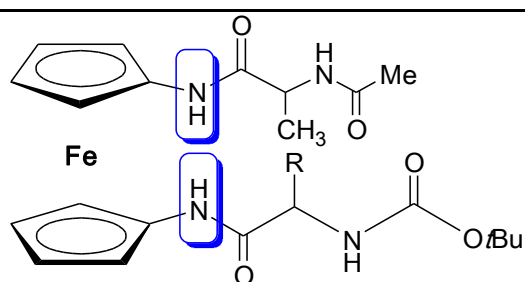
U sklopu Projekta financiranog od HRZZ-a koji se trenutno provodi u Laboratoriju za organsku kemiju PBF-a, predviđena je priprava disupstituiranih homokiralnih peptida izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda) i različitih hidrofobnih aminokiselina s ciljem utvrđivanja postignute sekundarne strukture takvih biokonjugata. Na slici 15 prikazani su analozi ciljnih depsipeptida **7** i **11** - ferocenski dipeptid Ac-D-Leu-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (**II**) i Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (**III**), čije su pripreme i konformacijski prostor opisani [56,57], a u sklopu ovog Diplomskog rada njihovi će se rezultati usporediti s rezultatima ciljnih depsipeptida.



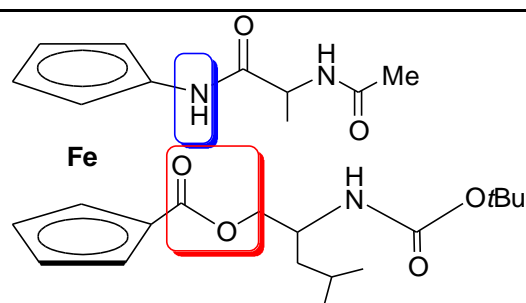
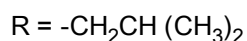
II(Ac-D-Leu-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc)



7 (Ac-D-Leu-NH-Fn-CO-O-CH₂-CH[CH₂CH(CH₃)₂]-NHBoc)



III(Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc)



11 (Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-O-CH₂-CH[CH₂CH(CH₃)₂]-NHBoc)

Slika 15. Prikaz strukture dipeptida **II** i **III** (*lijevo*) i ciljnih depsipeptida **7** i **11** (*desno*)

Postizanje određene sekundarne strukture (kao što su primjerice okreti) imaju veliku važnost u funkciji proteina kao sudionika raznih bioloških procesa. Kovačević i suradnici pokazali su da ferocen-1,1-diamin inducira stabilne okrete u peptidima pripremljenima konjugacijom s Ala i Ala-Pro, a 2022. godine sintetizirali su spoj Ac-D-Leu-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (**II**). [56] Pripremljen je homokiralni konjugat ferocen-1,1-diamina L-/D-Leu kako bi se istražilo inducira li organometalni templat nastanak strukture okreta prilikom konjugacije s aminokiselinama, i utječu li razgranati bočni lanci kao što je leucin na vodikove veze.

Detaljnim spektroskopskim (IR, NMR, CD), rendgenskim i DFT analizama konjugata uočen je vrlo robustan strukturni motiv koji se sastoji od dva intramolekulski, vodikovim vezama, povezana 10-člana prstena (dva β-okreta). Ferocenska jezgra služi kao kalup za vezanje dviju N-zaštićenih aminokiselina na paralelne ciklopentadienilne prstenove. Postignut je isti obrazac intramolekulskih vodikovih veza i minimiziran učinak različitih konformacija kako bi se biološka aktivnost pripremljenog spoja (**II**) mogla jedinstveno pripisati bočnom lancu kiralne aminokiseline (Leu) ili suprotnoj kiralnosti svake aminokiseline. [56]

Antitumorska aktivnost Ac-D-Leu-NH¹-Fn-NH²-D-Leu-Boc (II) sugerira da bočni lanac aminokiseline ima veći utjecaj na inhibitorni učinak u usporedbi s apsolutnom konfiguracijom. Preliminarni rezultati biološke evaluacije pokazuju da je ovaj spoj povezan s indukcijom zastoja staničnog ciklusa u fazi G0/G1 u staničnoj liniji HeLa (stanice raka vrata maternice). [56]

Budući da je spoj Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (III) analog spoja Ac-D-Leu-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (II), rezultati njegovih analiza promatrani su u usporedbi sa spojem (II). [57] Kovačević i sur. 2015. godine, po prvi su put pripravili ferocenske peptide izvedene iz ferocen-1,1'-diamina i alanina te je kod njih bila ostvarena struktura β okreta. S obzirom da bočni ogranci aminokiseline mogu različito utjecati na sekundarnu strukturu peptidomimetika, sintetiziran je spoj Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (III) kod kojeg je alaninska podjedinica na donjem ferocenskom lancu zamijenjena aminokiselinskom podjedinicom s razgranatim bočnim ogrankom, L-Leu odnosno D-Leu. Cilj sinteze spoja (III) bio je utvrditi kako bočni ogranak i kiralnost spomenute aminokiseline utječe na tvorbu vodikovih veza između ili unutar podandnih peptidnih lanaca, te odrediti djeluje li ferocenski kalup kao začetnik okreta. [57]

Rezultati različitih analiza (IR-spektroskopija, NMR, CD) spoja (III) bili su vrlo slični kao i kod spoja (II) pa su tako zaključci doneseni u radu Kovačević i sur. [56], primjenjivi i na analiziranom peptidu (III). Rezultati IR- spektroskopije pokazuju da ne dolazi do promjene omjera intenziteta slobodnih i asociranih NH vrpca bez obzira na zamjenu metilnog alaninskog s voluminoznijim izobutilnim leucinskim bočnim ogrankom, čime se može zaključiti da sterički voluminozniji leucin ne utječe na tvorbu IHB. NMR spektroskopijom dokazano je kako NH protoni iz ferocenskog kalupa (NH¹_{Fn} i NH²_{Fn}) imaju važnu ulogu u stvaranju IHB, dok NH skupina D-Leu (NH_{Ac}) ne sudjeluje u stvaranju vodikovih veza. Prilikom CD analize dipeptidi (II) i (III) induciraju jaki Cottonov efekt u području ferocenskog kromofora što dodatno potvrđuje prisutnost visokouređenih kiralnih struktura. [57]

Spojevi Ac-D-Leu-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (II) i Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (III) analozi su spojeva 7 i 11 pripremljenih u ovom Diplomskom radu i služe kao modelni spojevi za usporedbu rezultata provedenih analiza.

4.2. SINTEZA CILJNIH FEROCENSKIH DEPSIPEPTIDA Ac-D-Leu-NH-Fn-COO-D-Leu-Boc (7) i Ac-D-Ala-NH-Fn-COO-D-Leu-Boc (11)

Deprotekcijom terminalne Boc-zaštitne skupine ferocenske aminokiseline (I) te *in situ* kopulacijom nastalog amina s aktiviranim D-Leu/ D-Ala pripravlja se dipeptidi 4 i 8 (shema 2 i 3) u jako dobrom iskorištenju. Ulazak alaninske/leucinske podjedinice potvrđen je signalima

protona bočnih ogranaka u ^1H - i ^{13}C -NMR-spektrima peptida **4** i **8**.

Pretvorba karbamatne u acetamidnu skupinu očituje se u gubitkom singleta *tert*-butilnih protona pri $\delta \sim 1,46$ ppm te javljanjem dubleta acetilnih protona pri $\delta = 2,10$ ppm u ^1H -NMR-spektrima peptida **5** i **9**. U ^{13}C -NMR-spektrima ova se zamjena manifestira gubitkom signala karbonilnih i *tert*-butilnih C-atoma pri $\delta \sim 156$ ppm odnosno $\delta \sim 28$, ppm te javljanjem novih signala pri $\delta \sim 170$ ppm (CO_{Ac}) i $\delta = 23$ ppm ($\text{CH}_{3\text{Ac}}$).

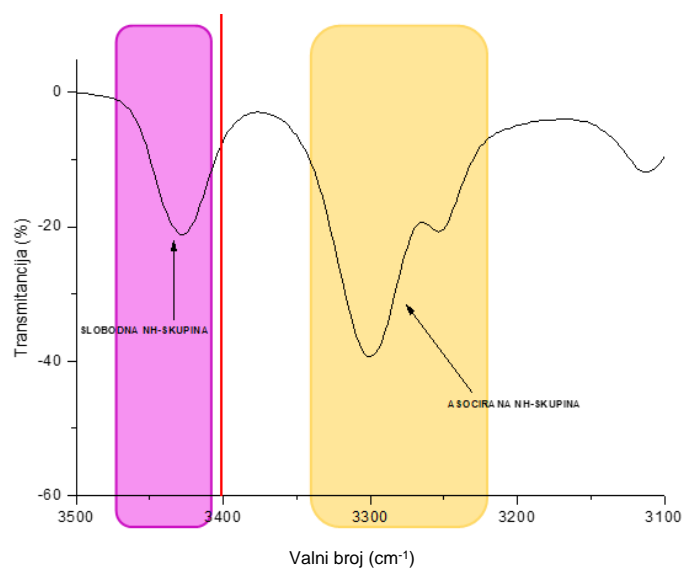
Hidroliza esterske skupine vezane na donje ciklopentadienilne prstene dipeptida **5** i **9** provedena je u iznimno blagim uvjetima, kako bi se izbjegla racemizacija pripremljenih biokonjugata **6** i **10** – za pripravu kiseline korištena je ekvimolarna količina NaOH, a reakcija je provedena pri $65\text{ }^\circ\text{C}$ (tijekom 1 h). Spomenute promjene praćene su IR-spektroskopijom, pri čemu apsorpcijska vrpca esterskog karbonila nestaje, a tvorba kiseline očituje detekcijom istezne vibracije kiselinskog karbonila i hidroksilne skupine.

Uvođenje leucinske jedinice na donji Cp-prsten peptida **5** i **9** registrirano je u ^1H - i ^{13}C -NMR-spektrima karakterističnim pomacima njegovih metinskih, metilnih te metilenskih skupina.

4.3. IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA

Infracrvena spektroskopija (IR) pripada molekularnoj apsorpcijskoj spektrometriji. Ova instrumentalna metoda temelji se na apsorpciji infracrvenog zračenja pri čemu infracrveni fotoni nemaju dovoljnu energiju da izazovu prijelaz elektrona već stvaraju pojačanu vibraciju grupe atoma ovisno o tipu njihovih međusobnih veza. Molekule apsorbiraju IR zračenje pri točno određenim valnim duljinama i frekvencijama te različite vibracije odgovaraju različitim energijama. Postoje dva područja IR spektra: područje funkcijskih skupina ($4000\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$) gdje većina funkcijskih skupina apsorbira zračenje te područje otiska prsta ($1400\text{--}600\text{ cm}^{-1}$) u kojem svaki pojedini spoj pokazuje jedinstveni oblik apsorpcijskih vrpca. 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 a time i uvid u konformacijski prostor peptida u otopini. [58-60]

Istezne frekvencije NH-skupina u području nižem od 3400 cm^{-1} ukazuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama, dok se signali iznad 3400 cm^{-1} pripisuju slobodnim NH skupinama (slika 16). Apsorpcijske vrpce u području ispod 1730 cm^{-1} upućuju na sudjelovanje karbonilnih esterskih skupina u vodikovim vezama. Istezne frekvencije N–H ili C=O skupina koje su uključene u vodikove veze pomiču se prema području ispod 3400 cm^{-1} u IR spektru.



Slika 16. Prikaz područja isteznih frekvencija NH-skupina

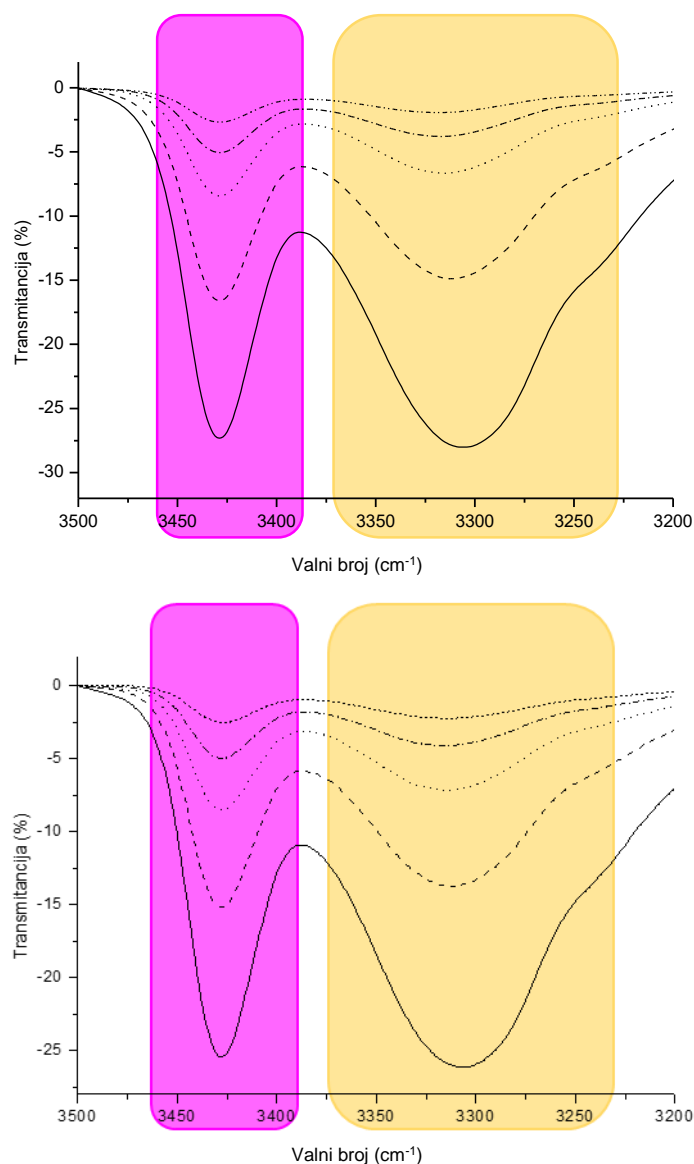
U tablici 1 dan je prikaz isteznih vibracija referentnih i ciljnih ferocenskih peptida da bi se usporedio omjer intenziteta njihovih asociranih i slobodnih NH-skupina.

Tablica 1. Istezne vibracije^[a] NH- i CO-skupina dipeptida I-IV, i depsipeptida 7 i 11

Spoj	Formula	ν NH (slob.)	ν NH (asoc.)	ν CO (amid I)	ν CO (amid II)
II	Ac-D-Leu-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc	3434 sr	3292 j 3250 sr	1733 j, 1662 j	1492
III	Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc	3437 sr	3301 j, 3239 sr	1723 j, 1682 j, 1667 j	1572, 1567, 1505
IV	Ac-D-Leu-NH-Fn-COOMe	3421 sr	3290 sr, 3241 sl	1708 j, 1699 j, 1652 j, 1636 j	1574, 1556, 1541, 1516, 1508
V	Ac-D-Ala-NH-Fn-COOMe	3422 sr	3316 sl	1707 j,	1536, 1498
7	Ac-D-Leu-NH-Fn-COO-D-Leu-Boc	3428 sr	3303 sr, 3236 sl	1706 j, 1663 j,	1539, 1505
11	Ac-D-Ala-NH-Fn-COO-D-Leu-Boc	3426 sr	3317 sr	1705 j, 1681 j, 1644 sr	1547 j, 1502 j, 1463 j

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

Područje amidnog signala ($3300\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$) pripremljenih peptida **7** i **11** sadrži dva različita signala NH skupina, jedan iznad 3400 cm^{-1} koji odgovara NH-skupinama koje nisu u vodikovoj vezi, i jedan ispod 3400 cm^{-1} koji ukazuje na tvorbu konformacija koje su povezane vodikovom vezom (slika 17 i tablica 1). Kod dipeptida **II**, **III**, **IV** i **V** prisutne su jače vrpce asociiranih amino-skupina dok vrpce srednje jakosti pripadaju slobodnim NH-skupinama. Kod dipeptida **IV** i **V** te depsipeptida **7** i **11** vrpce slobodnih i asociiranih NH skupina podjednako su intenziteta. S druge strane, spojevi **II** i **III** imaju jači signal asociiranih NH skupina što upućuje na prisutnost više konformera koji su u vodikovoj vezi.



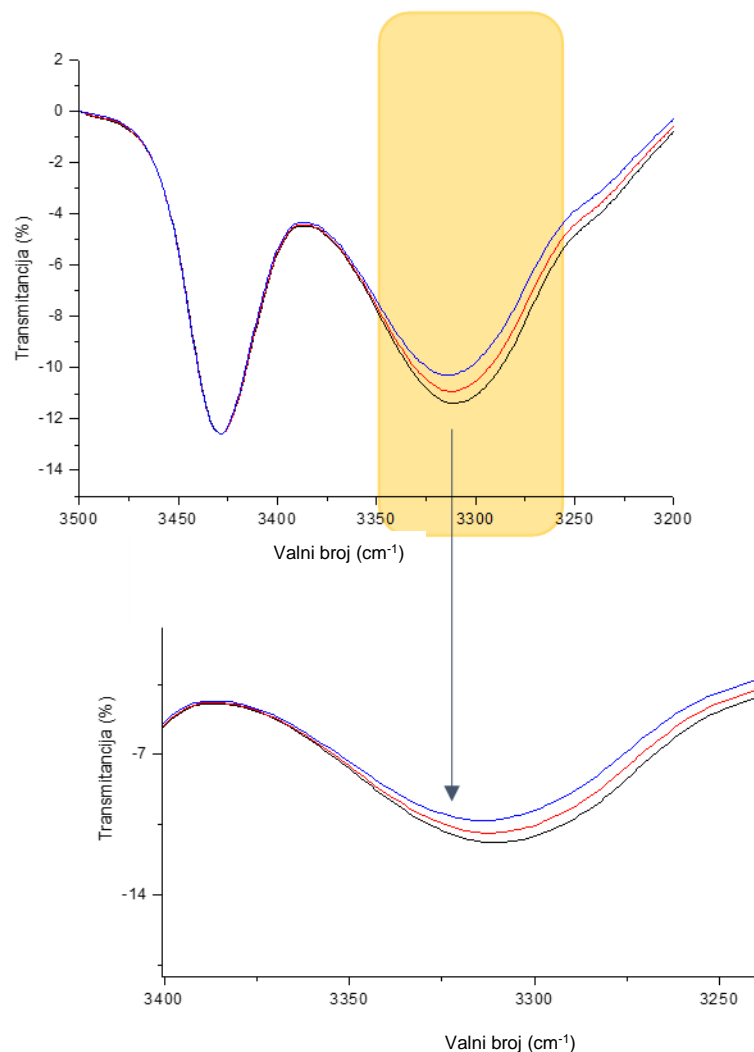
Slika 17. Koncentracijski-ovisni IR-spektri spojeva Ac-D-Leu-NH-Fn-COO-D-Leu-Boc (**7**) (*gore*) i Ac-D-Ala-NH-Fn-COO-D-Leu-Boc (**11**) (*dolje*) [snimljeni u CH_2Cl_2 , [(—) $c = 5 \times 10^{-2}$ M, (- - -) $c = 2,5 \times 10^{-2}$ M, (- · - ·) $c = 1,25 \times 10^{-2}$ M, (· · ·) $c = 6,13 \times 10^{-3}$ M, (····) $c = 3 \times 10^{-3}$ M]

Pomoću koncentracijski ovisnih IR-spektara moguće je dobiti informacije o intramolekulskom ili intermolekulskom karakteru vodikove veze. Stupnjevitim binarnim razrjeđivanjem 50 mM otopine ispitivanog uzorka dolazi do cijepanja intermolekulskih vodikovih veza, a to se očituje znatnim opadanjem intenziteta signala intermolekulskih vodikovih veza u području nižem od 3400 cm^{-1} . S druge strane, intenzitet intramolekulskih vodikovih veza razrjeđivanjem slabi proporcionalno slabljenju signala slobodne NH-skupine.

Kao što je vidljivo iz slike 17. signali slobodnih i asociраних NH skupina postupnim razrjeđivanjem podjednako slabe što ukazuje na to da su vodikove veze unutar pripremljenih depsipectida intramolekulskog karaktera.

Temperaturno-ovisna IR spektroskopija omogućava praćenje promjena vibracijskih svojstva molekule koje nastaju zbog promjene temperature. Temperature promjene utječu na stabilnost intramolekulskih vodikovih veza, a posljedično i na konformaciju same molekule. Tijekom promjene temperature dolazi do promjene položaja i intenziteta apsorpcijskih vrpca NH skupina prema čemu možemo procijeniti jakost intramolekulskih vodikovih veza odnosno stabilnost konformacije molekule.

Na slici 18. prikazani su temperaturno ovisni IR-spektri depsipectida **7** koji ukazuju da postupnim zagrijavanjem dolazi do blagog smanjenja intenziteta vrpce koja pripada asociраним NH-skupinama, što govori o neznatnom narušavanju postignute konformacije koja je posljedica tvorbe vodikovih veza unutar molekule.



Slika 18. Temperaturno-ovisni IR-spektri spoja **7** u području NH skupina (CH_2Cl_2 , 25-35 °C).

4.4. SPEKTROSKOPIJA NUKLEARNE MAGNETSKE REZONANCIJE (NMR)

NMR-spektroskopija je metoda koja se temelji na izvrtanju jezgre atoma pod utjecajem magnetskog polja elektromagnetskog zračenja, a odnosi se na područje frekvencije radiovalova 107-109 nm. Izvrtanje jezgre iz jednog magnetskog usmjerenja u drugo pod utjecajem radiovalova naziva se rezonancija. Rezonancija označava apsorpciju energije vezane uz promjenu nuklearnih energijskih stanja. Nakon izlaganja radiozračenju mogu rezonirati samo jezgre koje imaju neparan atomski ili neparan maseni broj. [61]

NMR-spektar je graf koji prikazuje ovisnost apsorbirane energije o jakosti vanjskog magnetskog polja, a u peptidnoj kemiji upućuje na prisutnost ili odsutnost stabilne sekundarne strukture. NMR-spektroskopskom analizom moguće je odrediti prirodu i obrasce vodikovih veza

u peptidima, pri čemu rezultati NMR-analize moraju podržavati strukturne motive indicirane IR-spektroskopskom analizom. [62]

Tablica 2. Kemijski pomaci (δ /ppm)^[a] amidnih protona dipeptida **I-IV**, i depsipectida **7** i **11**

Spoj	Formula	(NH _{Fnb}) δ (ppm)	(NH _{Fna}) δ (ppm)	(NH _{Ac}) δ (ppm)	(NH _{Boc}) δ (ppm)
II	Ac-D-Leu-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc	9,37	9,15	7,27	5,16
III	Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc	9,25	9,15	6,87	5,34
IV	Ac-D-Leu-NH-Fn-COOMe	8,23		6,47	
V	Ac-D-Ala-NH-Fn-COOMe	8,23		6,54	
7	Ac-D-Leu-NH-Fn-COO-D-Leu-Boc	8,16		6,69	5,20
11	Ac-D-Ala-NH-Fn-COO-D-Leu-Boc	8,24		6,68	5,14

^[a]NMR-spektri snimljeni su u CDCl₃ pri $c = 5 \times 10^{-2}$ M i 298 K.

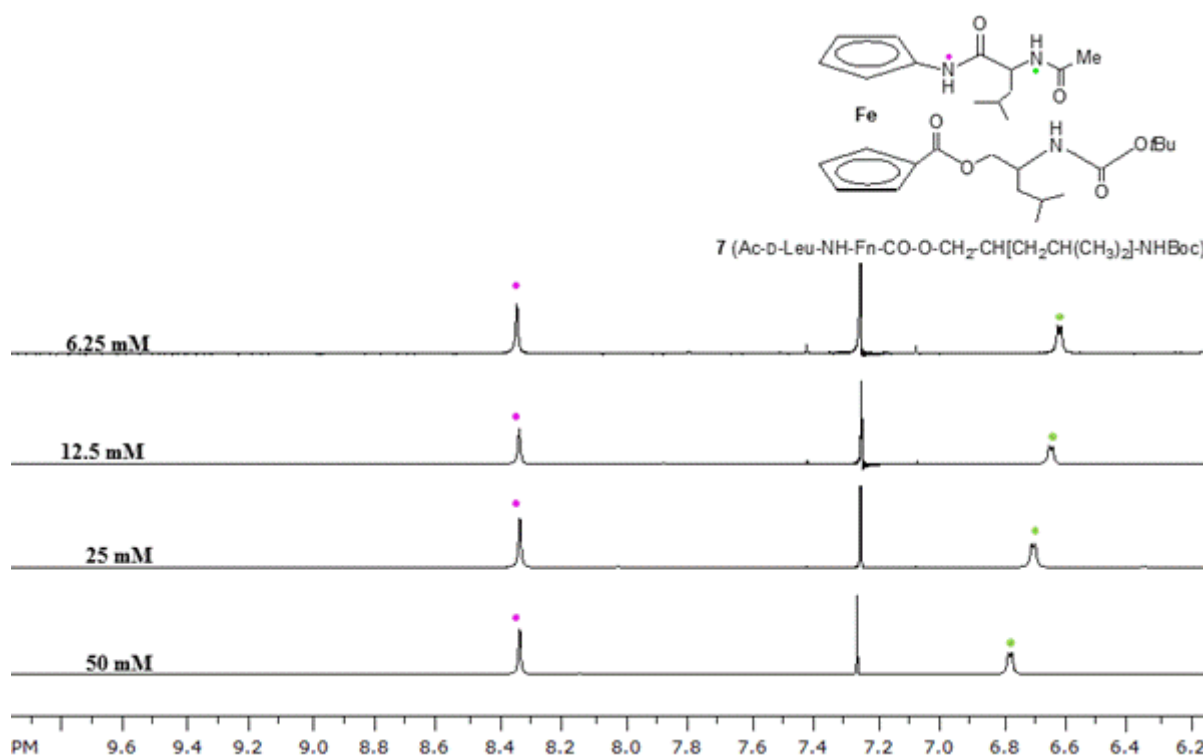
Depsipectidi **7** i **11** analizirani su primjenom ¹H-NMR i ¹³C-NMR spektroskopije te su registrirani visoki kemijski pomaci pri $\delta > 8$ ppm za NH skupine iz ferocenskog kalupa (NH_{Fn}), što upućuje na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama (tablica 2). Kemijski pomak NH_{Ac} iznosi $\sim 6,68$ ppm što je indicacija da je njihovog upitnog sudjelovanja u intramolekulskim vodikovim vezama. Kemijski pomaci NH_{Boc} registrirani su pri višem polju ($\delta \sim 5$ ppm) pa se može zaključiti da se radi o amidnim protonima koji vjerojatno ne sudjeluju u tvorbi vodikovih veza zbog čega se njihov angažman u daljnjem razmatranju ne ispituje.

U NMR spektrima modelnih spojeva zabilježeni su vrlo slični rezultati kao i kod pripremljenih depsipectida, pri čemu su kod dipeptida **II** i **III** prisutni kemijski pomaci NH skupina iz ferocenskog kalupabili registrirani pri $\delta > 9$ ppm sugerirajući njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama. Spojevi **IV** i **V** imali su nešto niže kemijske pomake $\delta \sim 8$ ppm što upućuje na sudjelovanje NH skupina iz ferocenskog kalupa u vodikovim vezama. Kemijski pomaci NH-skupine iz Ac- zaštitnih skupina peptida **II**, **III**, **IV** i **V** registrirane su pri višem polju kao i kod depsipectida **7** i **11** te se pretpostavlja da postoji vjerojatnost da sudjeluju u vodikovim vezama, dok je kemijski pomak amidnog protona iz karbamatne zaštite isključen iz razmatranja.

Razrjeđivanje ili zagrijavanje otopine depsipectida uzrokuje cijepanje intermolekulskih vodikovih veza a posljedično i pomak amidnih protona u više polje. Kako bi se bolje istražilo

konformacijsko ponašanje depsipeptida **7**, u sklopu ovog Diplomskog rada izmjereni su ^1H -NMR-spektri u ovisnosti o koncentraciji i temperaturi (slike 19 i 20).

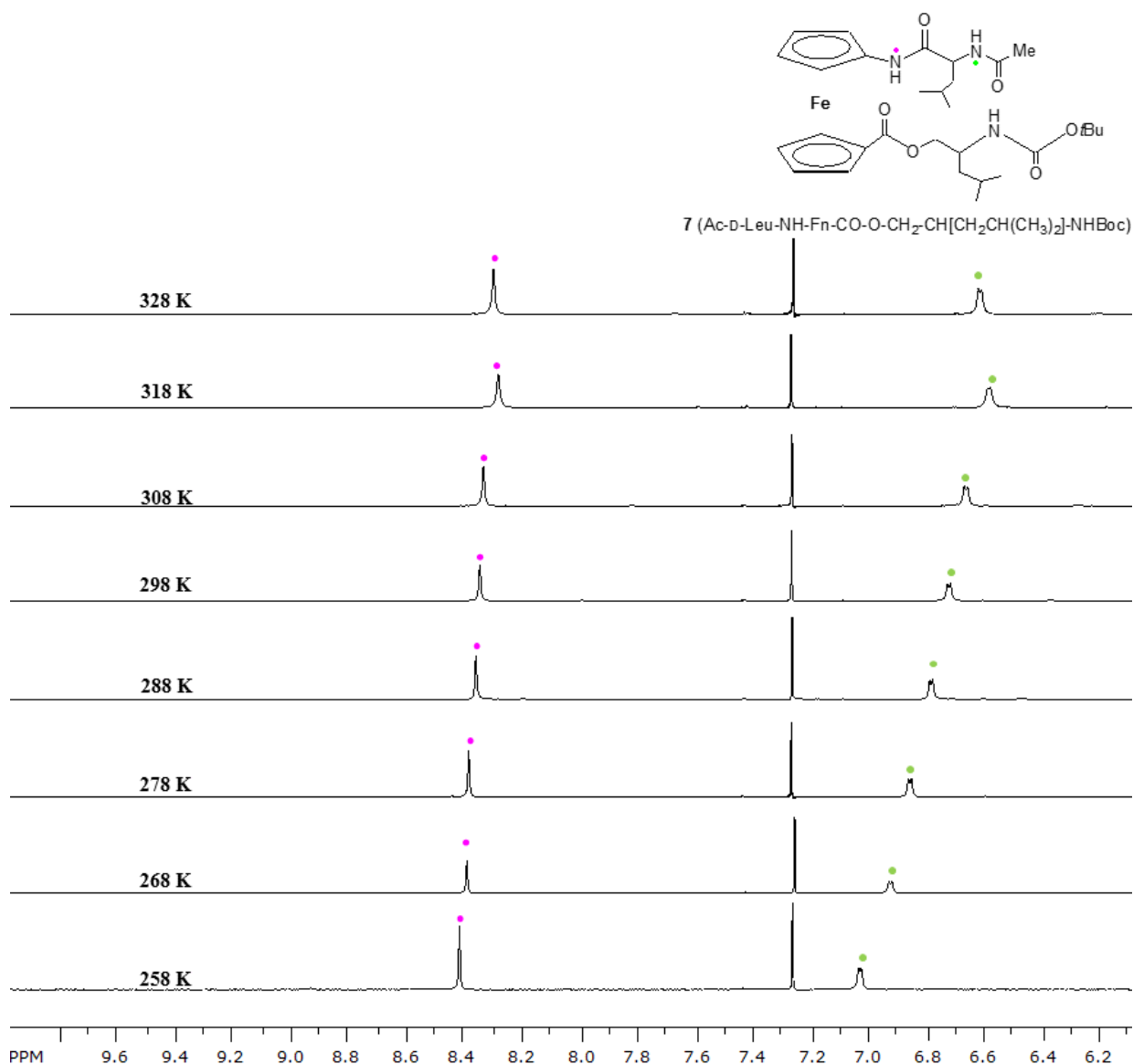
Koncentracijski ovisni spektri snimaju se razrjeđivanjem početne 50 mM otopine peptida u kloroformu do 6 mM kako bi se dodatno ispitala i potvrdila priroda vodikovih veza. Koncentracijski ovisan ^1H -NMR spektar depsipeptida **7** (slika 19) pokazuje da ne dolazi do značajne promjene kemijskih pomaka NH-skupina koje su vezane na ferocen (NH_{Fn}) tijekom razrjeđivanja otopine depsipeptida što potvrđuje njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama. Nešto veća promjena u kemijskim pomacima može se uočiti kod amidnih protona NH_{Ac} ($\Delta\delta \sim 0,2$ ppm) što sugerira moguće sudjelovanje u intermolekulskim vodikovim vezama.



Slika 19. Koncentracijski ^1H NMR-spektar spoja **7** u kloroformu

Temperaturno-ovisni spektri dobivaju se analizom 25 mM otopine peptida u kloroformu, pri 8 različitih temperatura (258-328 K). Pri povećanju temperature, vodikove veze slabe, a kemijski se pomak tako odsjenjenog amidnog protona pomiče prema višem polju (slika 20). Takav pomak je manje izražen kod amidnih protona koji su uključeni u jače intramolekulske vodikove veze (IHB) i stabilnije konformacije [56]. NH-skupine vezane na ferocen (NH_{Fn}) pokazuju vrlo malu promjenu u kemijskim pomacima ($\Delta\delta < 0,1$ ppm), i time potvrđuju sudjelovanje u snažnim IHB. Kod signala NH_{Ac} uočeni su također relativno mali pomaci prema

višem polju ($\Delta\delta < 0,5$ ppm), što također sugerira njihovo moguće sudjelovanje u jačim vodikovim vezama. NH_{Fn} skupine u spojevima Ac-D-Leu-NH¹-Fn-NH²-D-Leu-Boc (II) i Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (III) pokazuju također male promjene kemijskih pomaka prema višem polju ($\Delta\delta < 0,5$ ppm) [56,57] čime potvrđuju i sudjelovanje u jakim IHB. S druge strane, za razliku od spoja **7**, pomaci amidnih protona NH_{Ac} veći su i iznose više od 1 ppm, što je zasigurno rezultat njihova sudjelovanja u slabijim vodikovim vezama [56,57]

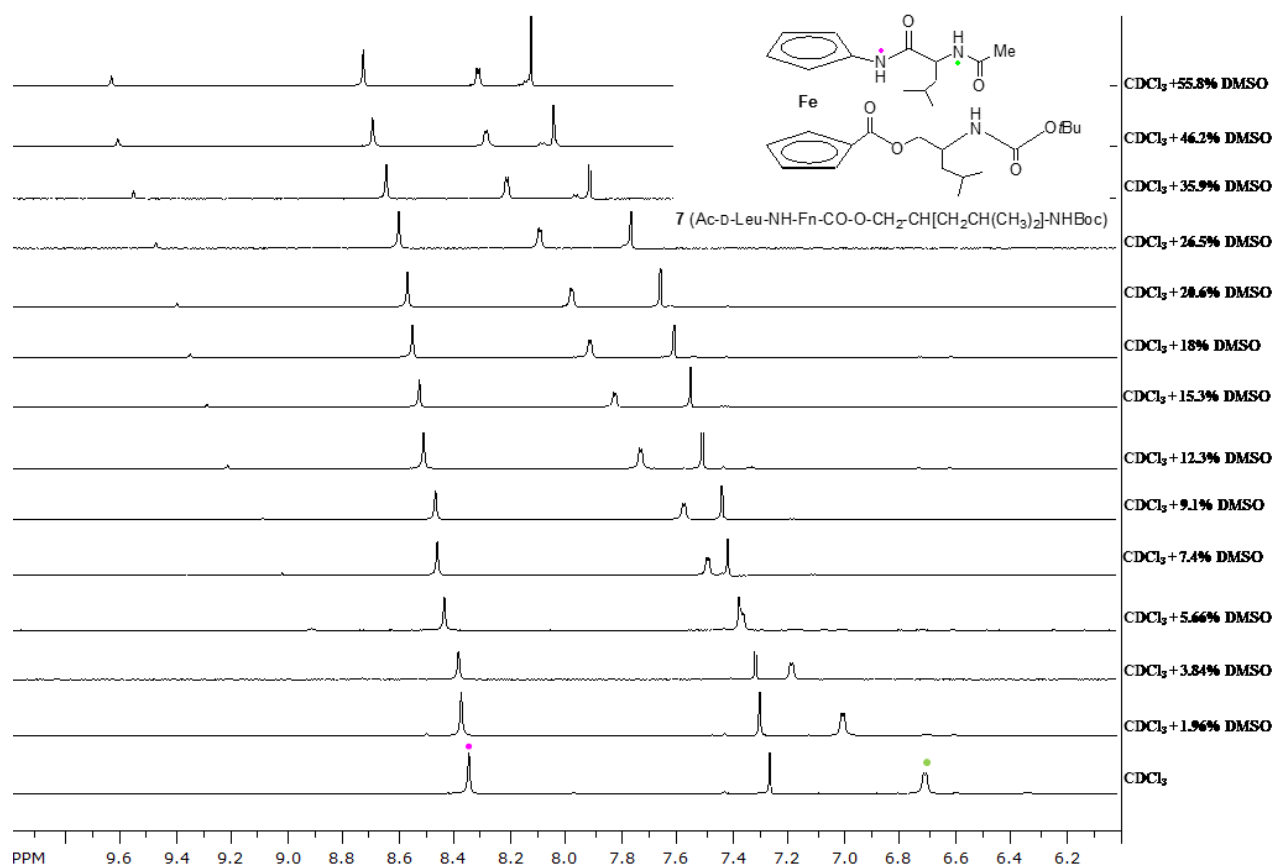


Slika 20. Temperaturni $^1\text{H NMR}$ -spektar spoja **7** ($c = 12,5$ mM) u kloroformu

Smatanje proteina važno je funkcijsko svojstvo peptida i njihovih peptidomimetika, a omogućeno je djelovanjem nekoliko nekovalentnih interakcija, uključujući hidrofobne, vodikove, Coulombove i van der Waalsove interakcije. Budući da se vjeruje da su IHB važan faktor u

nabiranju ispitivanih depsipeptida, testirali smo njihovu jakost titracijom kloroformske otopine peptida s kompeticijskim otapalom DMSO. DMSO solvatira izložene NH protone, uzrokujući veliku promjenu njihovih kemijskih pomaka u niže polje. Međutim, amidni NH protoni uključeni u jake vodikove veze zaštićeni su od otapala te njihovi kemijski pomaci tijekom titracije s DMSO ne pokazuju značajne promjene.

Kao i u prijašnjim mjerenjima, promjene kemijskih pomaka NH_{Fn} bili su vrlo slabe ($\Delta\delta \sim 0,3$ ppm) (slika 21) čak i u prisutnosti 55 % DMSO, što upućuje na njihovo sudjelovanje u jakim IHB. Očekivano, NH_{Ac} , čiji kemijski pomaci prema dosadašnjim mjerenjima relativno slabo ovise o koncentraciji i temperaturi, pokazao je značajne kemijske pomake ($\Delta\delta > 1,5$ ppm) u prisutnosti kompetitivnog otapala DMSO, što se može pripisati njegovom sudjelovanju u slabijim vodikovim vezama. Ako usporedimo rezultate konformacijske analize ispitivanog depsipeptida **7** sa spojevima Ac-D-Leu-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (**II**) i Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc (**III**), može se uočiti dobra korelacija što sugerira da su u tim peptidima prisutni slični IHB obrasci. [56,57] Kovačević i suradnici dobili su jednake rezultate i zaključili da je NH_{Fn} uključen u jake vodikove veze, NH_{Boc} ne sudjeluje u vodikovim vezama, a NH_{Ac} sudjeluje u slabim vodikovim vezama. [56]



Slika 21. Titracija kloroformne otopine spoja **7** s DMSO

4.5. CD-SPEKTROSKOPSKA ANALIZA

Cirkularni dikroizam (CD) spada u kirooptičke metode ovisne o kiralnosti istraživanog spoja. Kiralne (optički aktivne) molekule ne posjeduju ravninu simetrije te zakreću ravninu polariziranog svjetla za određeni kut (α) pri određenoj valnoj duljini (λ). CD predstavlja razliku u apsorpciji lijevo cirkularno polariziranog svjetla (L-CPL) i desno cirkularno polariziranog svjetla (R-CPL), a javlja se kod molekula koje imaju jednu ili više kiralnih skupina koje apsorbiraju svjetlo, tzv. kromofori.

Mjerenja se provode praćenjem elektronskih prijelaza u vidljivom i ultraljubičastim području spektra. CD signal se bilježi kod molekula koje imaju kiralne kromofore jer tada dolazi do apsorpcije jednog CPL-a u većoj mjeri od drugog. CD signal je pozitivan ako je L-CPL apsorbirano u većoj mjeri nego R-CPL, a negativan ako je u manjoj. [63]

Ova spektroskopska metoda koristi se za identifikaciju elemenata sekundarne strukture (α uzvojnica i β -nabrana ploča) i određivanje konformacijskih promjena proteina koji su kiralni.

Ferocenski peptidi koji se nalaze u kiralnom peptidnom okruženju inducira jaki Cottonov efekt u području ferocenskog kromofora ($\lambda \sim 470$ nm) [56] tako što IHBu otopinama kiralnih ferocenskih peptida omogućavaju stvaranje uređenih struktura. Slobodna rotacija oko ferocenskog prstena je ograničena zbog nastanka sekundarnih struktura što rezultira heličnom kiralnošću ferocenske jezgre i odražava se u Cottonovom efektu oko 470 nm. [64]

Tablica 3. Cottonovi efekti u dipeptidima I-IV, i depsipeptidima 7 i 11

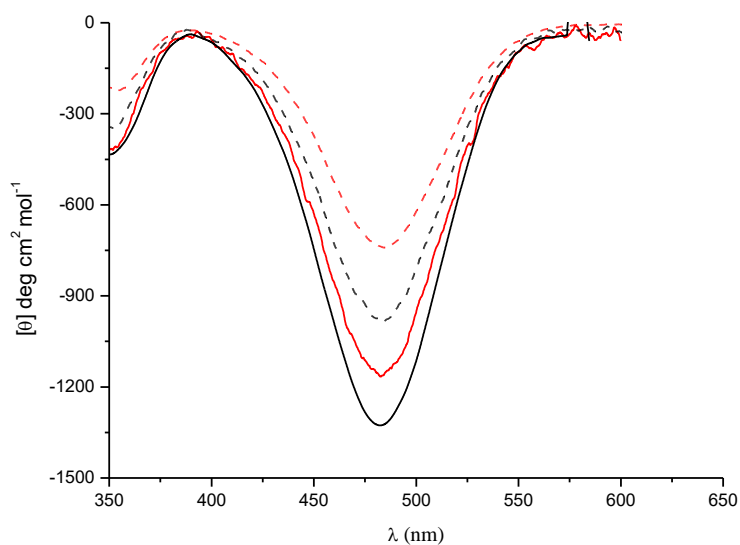
Spoj	Formula	$[\theta]$ / deg cm ² dmol ⁻¹	λ_{\max} /nm
II	Ac-D-Leu-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc	-15000	473
III	Ac-D-Ala-NH-Fn-NH-D-Leu-Boc	-8000	468
IV	Ac-D-Leu-NH-Fn-COOMe	-1100	465
V	Ac-D-Ala-NH-Fn-COOMe	-1150	470
7	Ac-D-Leu-NH-Fn-COO-D-Leu-Boc	-1200	475
11	Ac-D-Ala-NH-Fn-COO-D-Leu-Boc	-1370	473

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

Na slici 22 može se vidjeti CD-aktivnost depsipeptida 7 i 11 u području ferocenskog kromofora što ukazuje na njihovo kiralno uređenje. Relativno nizak Cottonov efekt ($M_0 = -1200$

deg cm² mol⁻¹ i -1370 deg cm² mol⁻¹) (tablica 3) upućuje na prisutnost nižeg stupnja kiralnog uređenja za razliku od spojeva II i III kod kojih je zabilježen jači Cottonov efekt (-15000 deg cm² mol⁻¹ i -8000 deg cm² mol⁻¹), koji upućuje na postojanje visokouređenih struktura u otopini.

Dodatak DMSO depsipeptidima **7** i **11** uzrokuje 38%-tno i 22%-tno slabljenje Cottonova efekta što upućuje na to da je postignuta relativno visoko uređenja kiralna organizacija ovih depsipeptida.



Slika 22. CD-spektri spojeva **7** i **11** u diklormetanu

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

5. ZAKLJUČCI

1. Sinteza depsipeptida Ac-D-Leu-NH-Fn-COO-D-Leu-Boc (**7**) i Ac-D-Ala-NH-Fn-COO-D-Leu-Boc (**11**) uspješno je provedena u dobrom iskorištenju.
2. IR spektroskopijom utvrđuje se prisutnost slobodnih ($< 3400 \text{ cm}^{-1}$) i asociranih NH skupina ($> 3400 \text{ cm}^{-1}$)
3. U koncentracijskom IR spektru depsipeptida **7** i **11** ne dolazi do promjene 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 vrpca slobodne i asocirane NH-skupine, što upućuje na stabilnost postignute konformacije.
5. Provedenom NMR spektroskopijom zaključuje se da u depsipeptidima **7** i **11** amidni protoni direktno vezani na ferocen (NH_{Fn}) sudjeluju u vodikovim vezama. Suprotno tome, amidni protoni iz karbamatne zaštitne skupine (NH_{Boc}) ne sudjeluju u tvorbi vodikovih veza, dok je sudjelovanje acetamidnih amidnih protona (NH_{Ac}) upitno.
6. Uvidom u koncentracijske i temperaturno-ovisne NMR-spektre, potvrđuje se intramolekulski karakter vodikovih veza u kojima sudjeluju NH_{Fn} .
7. Titracijom NMR-uzorka s DMSO određena je jakost IHB pri čemu nije uočena značajnija promjena kemijskih pomaka NH_{Fn} -atoma, što je indicacija njihovog sudjelovanja u jakim IHB.
8. Depsipeptidi **7** i **11** pokazali su CD aktivnost u području ferocenskog kromofora što potvrđuje pretpostavke o tvorbi uređenih struktura u otopini.
9. Titracija 5 mM otopine peptida **7** i **11** s DMSO nije zamjetno utjecala na intenzitet Cottonovog efekta, te se može dodatno potvrditi da su uspostavljene IHB u otopini relativno jake.

6. LITERATURA

1. Stryer L (1991) Biokemija, 2. izd. (preveli Vuk-Pavlović i sur.), Školska knjiga, Zagreb
2. Barišić L (2018) Peptidni mimetici i pseudopeptidi. Nastavni materijal preuzet s Merlina.
3. Kovačević M (2014) Ferrocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima (doktorski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
4. Moriuchi T, Hirao T (2006) Ferrocene–Peptide Bioconjugates. U: Simonneaux G. (ured.) Bioorganometallic Chemistry. Topics in Organometallic Chemistry, 17 izd., Springer Berlin, Heidelberg, str. 143–175.
5. Stawikowski MJ, Cudic P (2007) Peptide Characterization and Application Protocols, 1. izd., Springer. str. 321 - 339
6. Anonymus <<https://study.com/learn/lesson/peptide-bond-formation-examples.html>>, pristupljeno 2.11.2024.
7. Parsons DE, Lee SH, Sun YJ, Velez G, Bassuk AG, Smith M i sur. (2021) Peptidomimetics Therapeutics for Retinal Disease. *Biomolecules* **11**, 339
8. Anonymus <https://www.mun.ca/biology/scarr/iGen3_06-04.html>, pristupljeno 4.11.2024.
9. Ross NT, Katt WP, Hamilton AD (2010) Synthetic mimetics of protein secondary structure domains. *Philos Trans R Soc A* **368**, 989-1008
10. Giannis A, Kulter T (1993) Peptidomimetics for receptor ligands—Discovery, development, and medical perspectives. *Angew Chem Int Ed Engl* **32**, 1244
11. Gante J (1994) Peptidomimetics- Tailored Enzyme Inhibitors. *Angew Chem* **33**(17), 1699-1720
12. Horwell DC (1995) The peptoid approach to the design of nonpeptide small molecule agonists and antagonists of neuropeptides. *Trends Biotechnol* **13**, 132-134
13. Sharma K, Sharma KK, Sharma A, Jain R (2023) Peptide-based drug discovery: Current status and recent advances. *Drug Discov Today* **28**(2), 103464
14. Jerić I. (2004) Peptidni mimetici: zašto i kako? *Kem Ind* **53**, 495 - 504
15. Alonzo DA, Schmeing TA (2020) Biosynthesis of depsipeptides, or Depsi: The peptides with varied generations. *Protein Sci* **29**, 2316–2347
16. Kang HK, Choi MC, Seo CH, Park Y (2018) Therapeutic Properties and Biological Benefits of Marine-Derived Anticancer Peptides. *Int J Mol Sci* **19**, 919-959
17. Trinidad-Calderón PA, Varela-Chinchilla CD, García-Lara S (2023) Depsipeptides Targeting Tumor Cells: Milestones from In Vitro to Clinical Trials. *Molecules* **28**, 670-700

18. Pieszka M, Sobota AM, Gačanin J, Weil T, Ng DYW (2019) Orthogonally Stimulated Assembly/Disassembly of Depsipeptides by Rational Chemical Design. *ChemBioChem* **20**, 1376–1381
19. Anonymus <<https://www.biorender.com/template/peptide-synthesis>>, pristupljeno 13.11.2024.
20. Staveren DR, Metzler-Nolte N (2004) Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene. *Chem Rev* **104** (12), 5931-5986
21. Anonymus <<https://www.scientificlabs.com/en/product/-nocategory-/f408-100g>>, pristupljeno 13.11.2024.
22. Anonymus <[Ferrocene molecule - Stock Image - F003/4864 - Science Photo Library](#)>, pristupljeno 13.11.2024.
23. Čakić-Semenčić M, Barišić L (2017) Ferrocene Bioconjugates. *Croat Chem Acta* **90** (4), 537-569
24. Čakić Semenčić M, Kovačević M, Barišić L (2024) Recent Advances in the Field of Amino Acid-Conjugated Aminoferrocenes—A Personal Perspective. *International journal of molecular sciences* **9**, 4810-4839
25. Astruc D (2016) Why is Ferrocene so Exceptional? *Eur J Inorg Chem* **2017**, 6–29
26. Patra M, Gasser G (2017) The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nat Rev Chem* **1**, 0066
27. Tratnik M (2019) Biokonjugati ferrocena i derivati purina: sinteza i spektralna karakterizacija (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
28. Wani WA, Jameel E, Baig U, Mumtazuddin S, Hun LT (2015) Ferroquine and its derivatives: New generation of antimalarial agents. *Eur J Med Chem* **101**, 534–551
29. Biot C, Nosten F, Fraisse L, Ter-Minassian D, Khalife JDD (2011) The antimalarial ferroquine: From bench to clinic. *Parasite* **18**, 207-214
30. Braga S, Silva AMS (2013) A New Age for Iron: Antitumoral Ferrocenes. *Organometallics* **32**, 5626–5639
31. Vessières A, Quissac E, Lemaire N, Alentorn A, Domeracka P, Pigeon P i sur. (2021) Heterogeneity of Response to Iron-Based Metallodrugs in Glioblastoma Is Associated with Differences in Chemical Structures and Driven by FAS Expression Dynamics and Transcriptomic Subtypes. *Int J Mol Sci* **22**, 10404
32. Jaouen G, VessieresA, Top S (2015) Ferrocifen type anti cancer drugs. *Chem Soc Rev* **24**, 8802-8817
33. Tanford C (1962) Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins. *J Am Chem Soc* **84**, 4240–4247

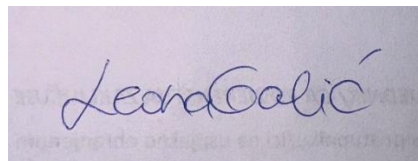
34. Biswas KM, DeVido DR, Dorsey JG (2003) Evaluation of methods for measuring amino acid hydrophobicities and interactions. *J Chromatogr A* **1000**, 637–655
35. Anonymus <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6106>>, pristupljeno 17.11.2024.
36. Yudkoff M (2017) Interactions in the Metabolism of Glutamate and the Branched-Chain Amino Acids and Ketoacids in the CNS. *Neurochemical Research* **42**(1), 10–18
37. Donato JJr, Pedrosa RG, Cruzat VF, Pires IS, Tirapequi J (2006) Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. *Nutrition* **22**(5), 520–527
38. Grajeda-Iglesias C, Rom O, Hamoud S., Volkova N., Hayek T., Abu-Saleh N., Aviram M. (2018) Leucine supplementation attenuates macrophage foam-cell formation: Studies in humans, mice, and cultured macrophages. *Biofactors* **0**, 1–18
39. Hartman AL, Santos P, O'Riordan KJ, Stafstrom C, Hardwick JM (2015) Potent anti-seizure effects of D-leucine. *Neurobiology of Disease* **82**, 46–53
40. Fidale T. M., Antunes H. K. M., Alex Dos Santos L., Rodrigues de Souza F., Deconte SR., Borges Rosa de Moura F., Mantovani M. M., Alves Duarte P. R., Roever L., Resende E. S. (2017) Increased Dietary Leucine Reduces Doxorubicin-Associated Cardiac Dysfunction in Rats. *Frontiers in Physiology* **8**, 1042
41. Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding protein. *Science* **240** (4860), 1759–1764
42. Anonymus <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leucine_zipper.png>, pristupljeno 29.11.2024.
43. Vinson CR, Sigler PB, McKnight SL (1989) Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper protein. *Science*. **246** (4932), 911–916
44. O'Shea E, Rutkowski R, Kim P (1989) Evidence that the leucine zipper is a coiled coil *Science* **243**(4890), 538–542
45. Vera MD, Joullie MM (2002) Natural products as probes of cell biology: 20 years of didemnin research. *Med Res Rev* **22**, 102-145
46. Donia M, Hamann MT (2003) Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infect Dis* **3**, 338-348
47. Potts MB, McMillan EA, Rosales TI, Kim HS, Ou YH, Toombs JE (2015) Mode of action and pharmacogenomic biomarkers for exceptional responders to didemnin B. *Nat Chem Biol* **6**, 401-409
48. Pohle S, Appelt C, Roux M, Fiedler HP, Süßmuth RD (2011) Biosynthetic gene cluster of the non-ribosomally synthesized cyclodepsipeptide skyllamycin: Deciphering

- unprecedented ways of unusual hydroxylation reactions. *J Am Chem Soc* **1**, 336194–6205
49. Sweeney P, Murphy CD, Caffrey P (2016) Exploiting the genome sequence of *Streptomyces nodosus* for enhanced antibiotic production. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 1285–1295
50. Shaligram NS i Singhal RS (2010) Surfactin– A Review on Biosynthesis, Fermentation, Purification and Applications. *Food Technol Biotechnol* **48** (2), 119–134
51. Anonymus < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/70789014>>, pristupljeno 20.11.2024.
52. Seydlová G, Svobodová J (2008) Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Cent Eur J Med* **3**, 123–133
53. 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.
54. Anonymus <<https://koreascience.kr/article/JAKO199713464467517.pdf>> pristupljeno 20.11.2024.
55. Kovačević M, Kodrin I, Cetina M, Kmetič I, Murati T, Čakić Semenčić M, i sur. (2015) The conjugate of β -turn-nucleating ferrocene-1,1'- diamine and amino acids. A novel synthetic approach and conformational analysis. *Dalton Trans* **44**, 16405–16420
56. 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
57. Mezić M (2024) Priprava i konformacijska analiza ferrocenskih dipeptida izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina s aminokiselinama leucinom i alaninom (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
58. Pelton J, McLean L (2000) Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Anal Biochem* **277**, 167-176
59. Ganesh S, Jayakumar R (2002) Role of N-t-Boc group in helix initiation in a novel tetrapeptide. *J Peptide Res* **59**, 249-256
60. Barth A (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta, Bioenerg* **1767**, 1073-1101
61. Gazivoda Kraljević, T., (2016) Određivanje struktura organskih spojeva, nastavni materijal kolegija Određivanje struktura organskih spojeva, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu <https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Odredjivanje_struktura_organskih_spojeva_nastavni_tekst.pdf> (datum objave: 20. siječnja 2016.)
62. Barišić, L. (2018), Instrumentalna analiza. Nastavni materijal preuzet s merlina.

63. Hinds MG, Norton RS (1997) NMR spectroscopy of peptides and proteins. *Molecular Biotechnology* **7**(3), 315–331
64. 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

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

A rectangular image showing a handwritten signature in blue ink that reads "Leona Galić". The signature is written in a cursive style. The background of the image is a light, slightly textured grey.

Vlastoručni potpis