

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Lovro Marjanović, Jana Perica i Klara Širić

Utjecaj ferocenskog templata (Fcd, Fca, Fcda) na konformacijski prostor peptidomimetika pripremljenih iz ferocena i hidrofobnih aminokiselina (Val, Leu i Phe)

Zagreb, 2023.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za organsku kemiju Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Monike Kovačević te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2022./2023.

Rad je financiran iz projekta IP-2020-02-9162 Hrvatske zaklade za znanost.

KRATICE

Cp = ciklopentadienilna skupina

Val = valin

Leu = leucin

Phe = fenilalanin

IHB = intramolekulske vodikove veze

Fcd = ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina

Fca = 1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina

Fcda = ferocen-1,1'-diamin

Fn = ferocenilen

AK = prirodna aminokiselina

Ac = acetil

Boc = *tert*-butoksikarbonil

TLC = tankoslojna tekućinska kromatografija

EDC = *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilkarbodiimid-hidroklorid

HOBt = 1-hidroksibenzotriazol-hidrat

NMR = spektroskopija nuklearne magnetske rezinancije

IR = infracrvena spektroskopija

CD = cirkularni dikroizam

DMSO = dimetil-sulfoksid

*t*Bu = *tert*-butoksikarbonil

R_f = engl. *Retention factor*

CHC = engl. *Central Hydrophobic Cluster*, središnji hidrofobni klaster

SADRŽAJ

§ 1. UVOD.....	1
1.1. Bioorganometalna kemija - ferocen.....	1
1.2. Peptidomimetici	2
1.3. Peptidi s hidrofobnim aminokiselinama Val, Leu i Phe	5
1.3.1. Hidrofobne aminokiseline.....	5
1.3.2. Utjecaj hidrofobnih aminokiselina na formiranje vodikovih veza.....	6
1.4. Ferocenski peptidi izvedeni iz ferocen-1, 1'-dikarboksilne kiseline	9
1.5. Ferocenski peptidi izvedeni iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline	15
1.6. Ferocenski peptidi izvedeni iz ferocen-1, 1'-diamina	18
§ 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI.....	23
2.1. Opći i specifični ciljevi.....	23
§ 3. MATERIJALI I METODE.....	24
3.1. Materijali	24
3.1.1. Materijali za sintezu i konformacijsku analizu peptida tipa II, IV i VI.....	24
3.2. Metode	26
3.2.1. Metode za sintezu i konformacijsku analizu peptida tipa II, IV i VI	26
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. Uvod.....	30
4.2. Sinteza i konformacijska analiza ferocenskih peptida tipa II, IV i VI	32
4.2.1. Sinteza peptida II (XVII, 1, XVIII), IV (XXXVIII, 3, 5) i VI (XLVI, XLVII, XLVIII)	32
4.2.2. IR-spektroskopska analiza peptida II (XVII, 1, XVIII), IV (XXXVIII, 3, 5) i VI (XLVI, XLVII, XLVIII).....	33
4.2.3. NMR-spektroskopska analiza peptida II (XVII, 1, XVIII), IV (XXXVIII, 3, 5) i VI (XLVI, XLVII, XLVIII)	37
4.2.4. CD-spektroskopska analiza peptida II (XVII, 1, XVIII), IV (XXXVIII, 3, 5) i VI (XLVI, XLVII, XLVIII).....	44
§ 5. ZAKLJUČCI	48
5.1. Zaključci.....	48
6. Zahvale	

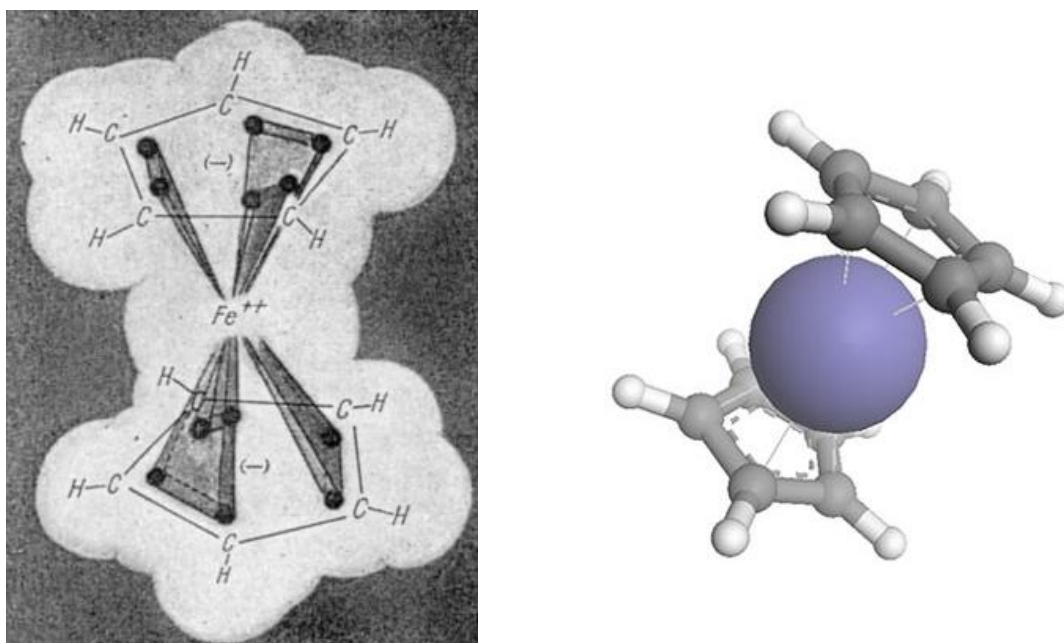
§ 7. LITERATURA	49
8. Sažetak	56
9. Summary	57

§ 1. UVOD

1.1. Bioorganometalna kemija - ferocen

Relativno mlada grana kemije koja proučava pripremu i aktivnost konjugata organometalnih spojeva i biomolekula u koje spadaju aminokiseline, peptidi, DNA, steroidi, šećeri, vitamini i enzimi naziva se bioorganometalna kemija. Upravo u činjenici da organometalni spojevi mogu tvoriti nove C-C veze leži njihova važnost, što omogućuje da se iz polaznih manjih molekula sintetiziraju kompleksnije molekule. Karakterizira ih prisustvo barem jedne ugljik-metal veze, zbog čega nukleofilni ugljikov atom iz organometalne molekule može tvoriti vezu u reakciji s drugim elektrofilnim ugljikovim atomom. Atom metala na sebe može vezati do 6 supstituenata što znači da postoji do 30 stereoizomera takve molekule. Ova strukturna raznolikost daje prednost organometalnim kompleksima u odnosu na čiste organske spojeve.¹

Pauson i Kealy su krajem 1951. godine pripravili molekulu kemijske formule $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$, odnosno bis (ciklopentadienil) željezo (slika 1) za koji je 1952. godine Woodward, predložio ime ferocen koje je od tada prihvaćeno u znanstvenom svijetu.²



Slika 1. Jedan od prvih crteža strukture ferocena (*lijevo*), 3D struktura ferocena (*desno*)^{2,3,4,5}

U molekuli ferocena atom željeza nalazi se između dva ciklopentadienilna prstena. Prema tome, ferocen se sastoji od jednog kationa (Fe^{2+}) i dva aniona (C_5H_5^-), a karakteriziraju ga tri izuzetna svojstva:^{1,6}

- Stabilnost do 400 °C (talište pri 172,5 °C) sa željeznim središtem koje ima zasićenu elektronsku strukturu kriptona;
- Reaktivnost kao superaromatski elektrofil;
- Blaga i reverzibilna oksidacija oko +0,4 V u odnosu na zasićenu kalomelsku elektrodu.

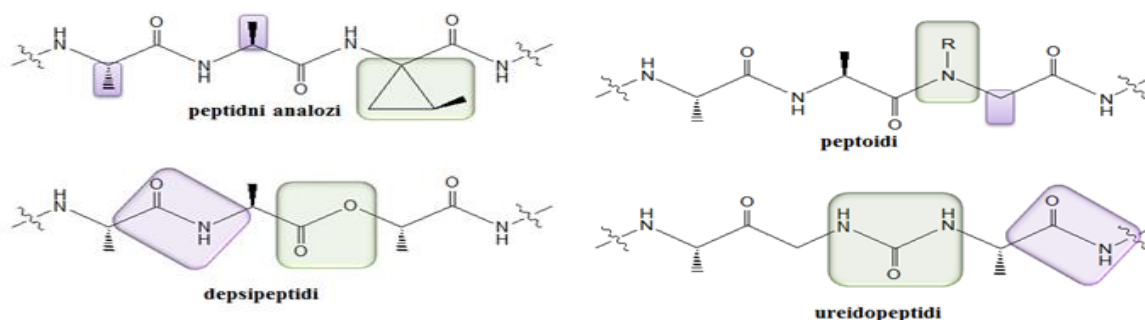
Ferocen ima 18 valentnih elektrona što ga čini iznimno stabilnim.¹ Uz to, dobro je topljiv u svim poznatim organskim otapalima, stabilan je u kontaktu sa zrakom te u fiziološkom mediju. Toksičnost ferocena je niska, a lipofilni karakter mu omogućuje lakši prolazak kroz stanične membrane.⁷

1.2. Peptidomimetici

Postoje dvije opće prihvaćene definicije peptidomimetika:

- Peptidomimetik je spoj koji kao ligand može oponašati ili blokirati biološki učinak peptidnog receptora.
- Peptidomimetik je spoj čiji esencijalni farmakoforni elementi oponašaju 3D-strukturu prirodnog peptida i proteina i zadržavaju njegovu sposobnost interakcije s biološkim ciljanim sustavima pri čemu zadržavaju jednak biološki učinak.⁷

Iz slike 2 vidljive su moguće modifikacije u peptidnoj strukturi, pa se peptidomimetici dizajniraju tako da oponašaju glavni lanac peptida, bočne ogranke ili oboje.^{7,8}



Slika 2. Peptidomimetici⁷

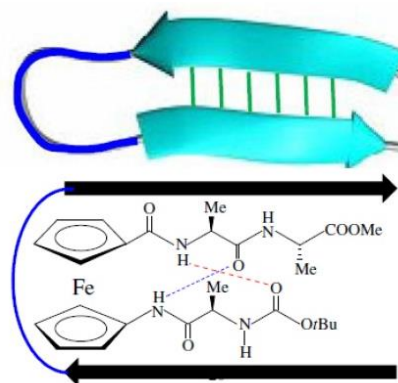
Glavna svrha njihove pripreme je prevladavanje nedostataka prirodnih peptida kao što su proteolitička nestabilnost i slaba bioraspoloživost, dok neka druga svojstva poput selektivnosti receptora mogu biti u znatnoj mjeri poboljšana pa imaju veliki potencijal u otkriću novih lijekova.

Smatanje peptida u jednu od konformacija, tj. jednu od točno uređenih sekundarnih struktura u obliku α -uzvojnice, β -ploče ili okreta omogućuju protein-protein interakcije (PPI, engl. *Protein-Protein Interactions*), koje je moguće ostvariti hidrofobnim, vodikovim i ionskim vezama, kao i van der Waalsovima interakcijama.⁹

α -Uzvojnica nastaje smatanjem lanca na način da je karbonilna skupina svake aminokiseline vezana s NH-skupinom aminokiseline koja je smještena četiri ostatka dalje. Proteini se najčešće smataju u ovu konformaciju te se iz tog razloga peptidomimetici dizajniraju tako da i oni tvore ovakvu sekundarnu strukturu.

Okret kao sekundarna struktura omogućena je mijenjanjem smjera polipeptida zbog tvorbe unutarmolekulskih vodikovih veza (IHB, engl. *Intramolecular Hydrogen Bond*). Postoje α , β , γ i π -okreti, a razlikuju se ovisno o broju članova u IHB prstenu. β -Okreti imaju važnu ulogu u biološkim sustavima, a zamjenom odgovarajućih aminoskiselinskih ostataka sa začetnicima okreta omogućeno je usmjeravanje bočnih ogranka na isti način kao i u prirodnim peptidima što uzrokuje veću proteolitičku aktivnost mimetika.

β -Ploča je sekundarna struktura proteina kod koje se okosnica nalazi u ravnini, a bočni ogranci su raspoređeni iznad i ispod te ravnine. Ova struktura stabilizirana je vodikovim vezama između susjednih niti, a posljedica vezanja je zaklanjanje okosnice koja se ne može vezati s drugim molekulama, već je to omogućeno samo bočnim ograncima.⁹ β -Ploče imaju ključnu ulogu u interakcijama proteolitičkih enzima i supstrata, protein-protein prepoznavanju, dimerizaciji proteina, te u agregaciji peptida i proteina. Mimikrija β -ploče predstavlja izazov budući da se radi o elementu sekundarne strukture koji uključuje interakcije između udaljenih aminokiselinskih ostataka (slika 3).⁷ Strategija sinteze peptidnih mimetika β -ploče je "umetanje" rigidnih kalupa u peptidnu strukturu.

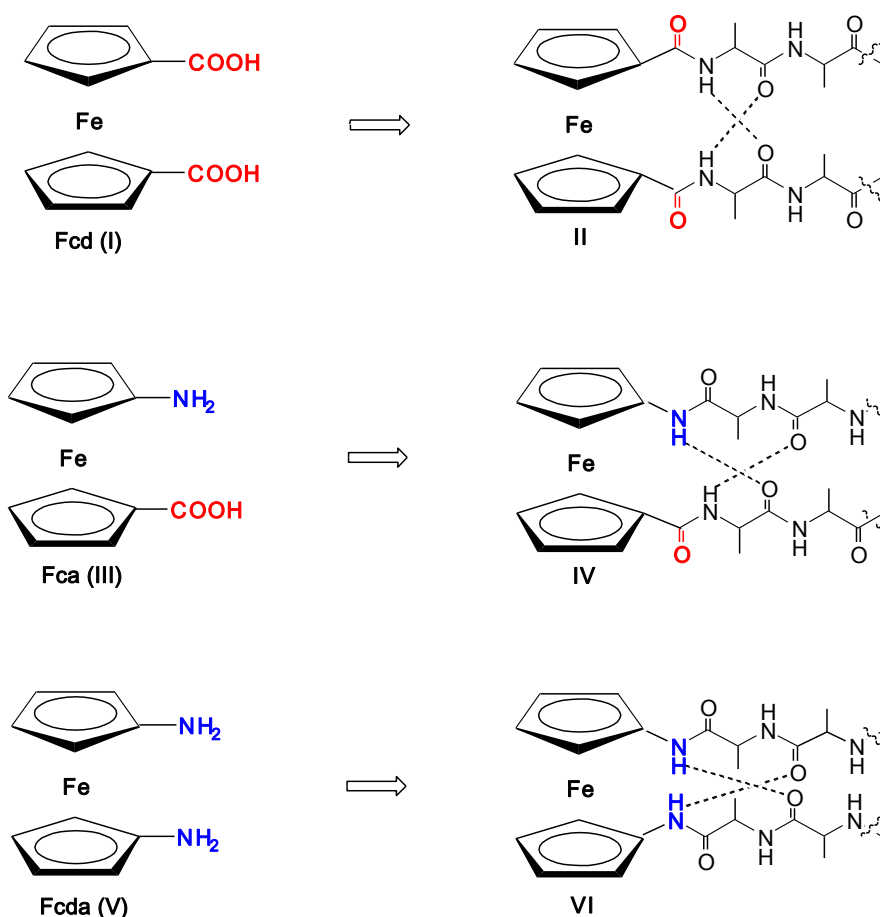


Slika 3. Induciranje β -antiparalelnih ploča umetanjem ferrocenskog kalupa ⁷

Heteroanularno disupstituirani feroceni su osnova molekularnih predložaka za dizajn okreta i struktura sličnim β -plohamama kod kojeg su skoro slobodno rotirajući ciklopentadienski (Cp) prstenovi udaljeni oko 3.3 Å, što je idealno za uspostavljanje intramolekularnih vodikovih veza u konjugatima koji se sastoje od prirodnih aminokiselina (slika 4).^{10,11,12}

Ovisno o strukturi ferocenskog prekursora, 1,1'-disupstituirani ferocenski peptidi dijele se u tri glavne skupine:

- Fn-[CO-(AA)_m-OMe]₂ (II) izvedeni iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (Fcd, I),
- Y-(AA)_n-Fca-(AA)_m-OMe (IV) izvedeni iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca, III) te
- Fn-[NH-(AA)_m-Y]₂ (VI) izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda, V).

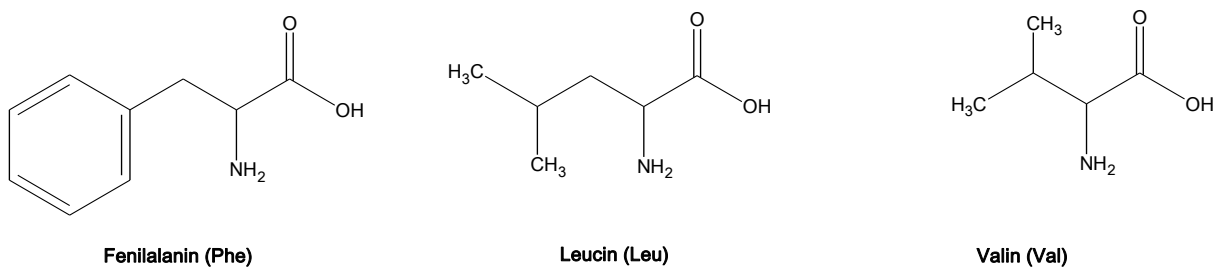


Slika 4. Ferocenski peptidi II, IV, VI izvedeni iz Fcd (I), Fca (III) i Fcda (V) (IHB su označene isprekidanim crtama)^{11,12}

1.3. Peptidi s hidrofobnim aminokiselinama valinom, leucinom i fenilalaninom

1.3.1. Hidrofobne aminokiseline

Aminokiseline su za život bitne molekule, budući da samo njih 20 tvore raznovrsne proteine.⁹ Svaka sadrži amino- i karboksilnu skupinu, a ovisno o vrsti pobočnih ogranaka (R) aminokiseline se dijele na (i) nenabijene kod neutralnog pH (hidrofobne ili nepolarne i hidrofилne ili polarne), te na (ii) nabijene (bazične i kisele). Aminokiseline kojima se bavimo u sklopu ovog rada su hidrofobne aminokiseline Phe (Fenilalanin), Leu (Leucin) i Val (Valin) (slika 5).⁹ Njihova karakteristika je i to da su esencijalne aminokiseline što znači da ih tijelo ne može *de novo* sintetizirati u organizmu, nego ih mora unijeti iz vanjskih izvora, tj. hranom ili dodacima prehrani.



Slika 5. Aminokiseline Phe, Leu i Val ⁹

- **Valin** sprječava razgradnju mišića tako da ih opskrbljuje dodatnom količinom glukoze koja služi za proizvodnju energije tijekom intenzivne tjelesne aktivnosti. Pomaže ukloniti toksični višak dušika iz jetre, te ima mogućnosti prenijeti ga po potrebi drugim tkivima u tijelu. Valin može pomoći u liječenju bolesti jetre i žučnog mjehura, kao i oštećenja tih organa uzrokovane alkoholizmom i zlouporabom droga. Pomaže kod liječenja jetrene encefalopatije ili oštećenja mozga. Prirodni izvori valina su mesni i mliječni proizvodi, gljive, kikiriki i sojini proteini.
- **Leucin** je jedina aminokiselina koja stimulira sintezu mišićnih proteina pa se kao dodatak prehrani koristi u svrhu usporavanja propadanja mišićnog tkiva te služi kao pomoć kod ljudi koji pate od fenilketonurije. Leucin se koristi i za poboljšanje i obnavljanje funkcije jetre, a u masnom i mišićnom tkivu se koristi za sintezu sterola. Regulira koncentraciju šećera u krvi, koristi se pri regeneraciji koštanog tkiva i služi za

sintezu hormona rasta. Prirodni izvori leucina su proteinima bogata hrana animalnog porijekla kao što je piletina, riba, teletina, svinjetina, jaja, mliječni proizvodi i lisnato povrće.

- **Fenilalanin** se u tijelu prevodi u aminokiselinu tirozin koja je potrebna za izgradnju tiroidnih hormona epinefrina, norepinefrin, dopamina, hormona štitnjače tiroksina te melanina. Budući da razina norepinefrina utječe na raspoloženje, različiti oblici fenilalanina koriste se u svrhu liječenja depresije. Fenilalanin se koristi i kod liječenja Parkinsonove bolesti i vitiliga. Najvažniji izvor fenilalanina je visoko proteinska hrana poput mesa, jaja, mliječnih proizvoda, sjemenki i orašastih plodova, no najviše ga ima u pšeničnim klicama i grahu. D-Fenilalanin je prisutan u psihofarmaceuticima, odnosno grupi lijekova koji djeluju na centralni živčani sustav blokirajući određene enzime u središnjem živčanom sustavu; D-fenilalanin je laboratorijski produkt i ne može se naći u hrani.

1.3.2. Utjecaj hidrofobnih aminokiselina na formiranje vodikovih veza

U predhodnim poglavljima ukratko su opisani elementi sekundarne i tercijarne strukture proteina koji stabiliziraju strukturu proteina. Pitanje koje si znanstvenici postavljaju je kakvu ulogu ima lokalni (proizašao iz same sklonosti aminokiselina da tvore elemente sekundarne strukture) ili nelokalni utjecaj (proistekao iz sekvence aminokiselina u cjelini) na smatanje proteina u cjelosti. Bellesia i sur. ustanovili su da je prilikom bilo kakvog zaključivanja o utjecaju pojedinih aminokiselina na elemente sekundarne strukture potrebno uzeti u obzir ne samo sklonost aminokiselina ka zauzimanju pojedinih strukturnih elemenata, nego također i utjecaj cijele sekvence aminokiselina koje tvore protein.¹³

Kombinacijom nekovalentnih interakcija kao što su vodikove veze, π - π privlačenja te elektrostatske i hidrofobne interakcije dolazi do samozdruživanja građevnih podjedinica u proteinima, prilikom čega nastaju strukture s određenom biološkom funkcijom kao što su membrane, DNA uzvojnica, mikrotubule i mikrofilamenti. Nažalost, procesi samozdruživanja mogu rezultirati i tvorbom patogenih elemenata, kao što su amiloidna vlakna odgovorna za brojne neurološke bolesti.¹⁴ Malene građevne podjedinice difenilalaninske osnove imaju jednaku sekvencu aminokiselina kao i središnji hidrofobni klaster (CHC, engl. *Central Hydrophobic Cluster*) u Alzheimerovom β -amiloidnom motivu. Bera i sur. pripravili su takav dipeptid - Boc-Phe-Phe-OMe (**VII**) te tirozinom modificirane analoge Boc-Phe-Tyr-OMe (**VIII**), Boc-Tyr-Phe-OMe (**IX**) te Boc-Tyr-Tyr-OMe (**X**). Pri jednakim uvjetima u slučaju dipeptida **VII** dolazi do samozdruživanja te tvorbe fibrila, dok dipeptidi **VIII**, **IX** i **X** daju mikrosfere, tj. dolazi do inhibicije tvorbe fibrila.¹⁵

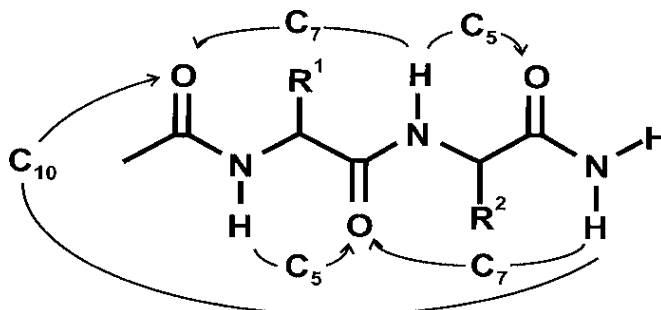
Veliki utjecaj na tvorbu amiloidnih vlakana tj. na nemogućnost tvorbe istih imaju i π - π privlačenja, što se dokazalo zamjenom aromatskih jedinica alaninom¹⁶⁻¹⁸ ili izbacivanjem¹⁹ istih iz peptidne sekvence. Bowerman i sur. istraživali su i utjecaj hidrofobnih interakcija (uz π - π privlačenja) na modelnom amfipatnom peptidu Ac-(XKXK)₂·NH₂ (**XI**) gdje je pozicija X supstituirana valinom, izoleucinom i fenilalaninom. Zamjenom aromatskih aminokiselina hidrofobnom, nearomatskom aminokiselinom leucinom očuvana je mogućnost tvorbe amiloidnih vlakana, pa ostaje nejasno imaju li veći utjecaj na tvorbu spomenutih elemenata, hidrofobne interakcije ili π - π privlačenja.²⁰ Na temelju istraživanja Sota i sur.²¹ gdje je utvrđeno da uvođenjem elemenata poput prolina ili α -aminoizobutirične kiseline (Aib) dolazi do zaustavljanja tvorbe β -nabrane ploče (odgovorna za tvorbu amiloidnih vlakana), Gupta i sur.²² odlučili su fenilalanin zamijeniti Δ Phe (α,β -dehidrofenilalaninom) što je rezultiralo inhibicijom tvorbe amiloidnih vlakana.

Tang i sur. utvrdili su da u Fmoc-zaštićenim fenilalaninskim dipeptidima, dolazi do tvorbe hidrogelova, bilo da je sekvenca difenilalaninska ili je jedna od aminokiselina supstituirana leucinom.²³ Hidrogelovi i organogelovi su iznimno zanimljivi produkti zbog moguće primjene pri razvoju tkiva, biosenzora, prijenosa lijekova i gena, te kontrole zagađenja vode.²⁴ Pažljivim molekularnim projektiranjem građevnih elemenata moguće je kontrolirati morfologiju, strukturu, fizikalno-kemijska svojstva i funkcionalnost rezultirajućih gelatora na molekularnoj razini. Za razliku od sintetskih polimera koji daju gelove, peptidni gelovi imaju prednost zbog male molekulske mase što smanjuje rizik od biološke i kemijske kontaminacije tijekom razdvajanja i sinteze. Ostale prednosti peptidnih gelatora su biokompatibilnost, biorazgradivost, strukturna sličnost s ekstracelularnim matricama i odgovornost prema okolišu. Chen i sur. su zamjenom hidrofobne aminokiseline valina izoleucinom pokušali utvrditi kako jača hidrofobnost izoleucina utječe na tvorbu hidrogelova u rezultirajućem 20-aminokiselinskom peptidu **XII**. Spomenutom zamjenom postigli su pet puta brže geliranje koje su potvrdili oscilacijskom reometrijom i cirkularnim dikroizmom.²⁵

Ferocenoil-fenilalanin je molekula koja brzom agregacijom u vodi daje hidrogel, a specifična je zato što za razliku od drugih poznatih hidrogelatora, sama molekula mala te jednostavna za sintezu.²⁶

Chin i sur. su utvrdili da peptidni lanac koji sadrži Ala i Pro formira strukturu γ -okreta, dok je u slučaju tvorbe peptida iz aromatskih aminokiselina (Phe, Trp i Tyr) najstabilnija konformacija β -okreta karakterizirana interakcijom između NH skupine C₅ i OH skupine na aromatskom prstenu. Dodatno ju stabilizira i interakcija aromatskog prstena i NH-skupine na C terminalnom amidu (slika 6; C₅ se odnosi na β -nabranu ploču ili β -okret, C₇ na γ -okret, a

C₁₀ na β-okret). Ostatak Phe ne ometa tvorbu γ-okreta susjednih ostataka i djeluje kao "gledatelj" ili kao neka vrsta *N*-terminalne zaštitne skupine u odnosu na drugi ostatak (XIII).²⁷

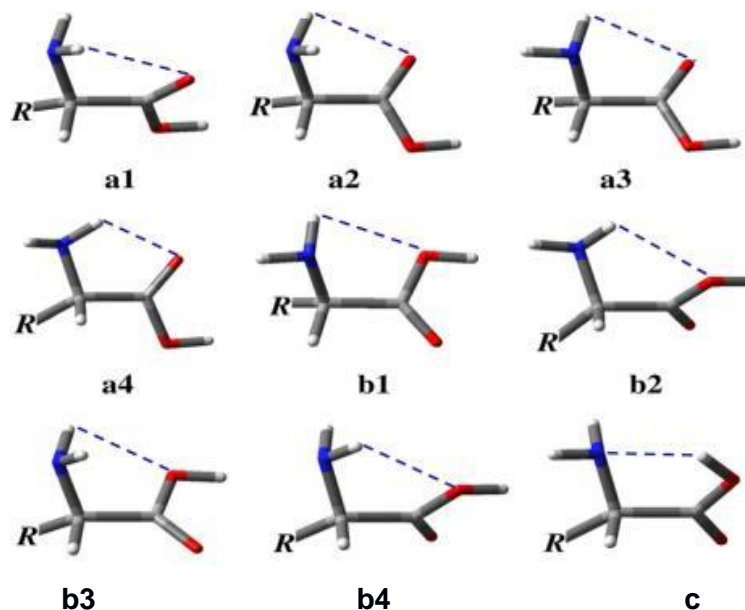


Slika 6. Moguće intramolekulske interakcije u modelnom dipeptidu Ac-Phe-Xxx-NH₂ (XIII).

[R¹ = Phe, R² = XXX (Gly, Ala, Val, Pro)].²⁷

Dutt i sur.su pripravili dva peptida Boc-Phe¹-Aib²-Leu³-OMe (XIV) i Boc-Phe¹-Leu²-Aib³-OMe (XV), a njihovo je istraživanje pružilo informacije o stvaranju strukturne okosnice ovisno o različitim interakcijama između aminokiselinskih ostataka. Peptid XIV pokazuje jedan od najstabilnijih β-okreta proučenih u literaturi koji rezultira iz dviju intramolekulskih vodikovih veza. Ovi rezultati pokazuju da je fragment Phe¹-Aib² jednako učinkovit u poticanju β-okreta poput struktura u tripeptidu kao što su Ala¹-Aib² i Leu¹-Aib². Peptid XV u kojem je položaj posljednje dvije aminokiseline (Aib i Leu) zamjenjen, poprima β-okretu sličnu strukturu.²⁸

Relativna stabilnost energetski najnižih konformacija svih aminokiselina uglavnom ovisi o interakciji vodikove veze i o orijentaciji pobočnih lanaca. Snaga vodikove veze ovisi vrsti formirane veze, ali i o faktoru torzije između NH₂ i COOH skupine. Kod energetski najnižih konformera Val, Leu i Ile prisutne su tri vrste vodikovih intramolekulskih interakcija između NH₂ i COOH skupina koje su klasificirane kao N-H---O=C, N-H----O-H i O-H----N-H. Najstabilniji konformer svake amino kiseline je stabiliziran s N-H----O=C vodikovom vezom.²⁹ Vrste intramolekulskih vodikovih veza (IHB) odabranih konformera proučavali su Dokmarisijan i sur. i prikazani su na slici 7.²⁹

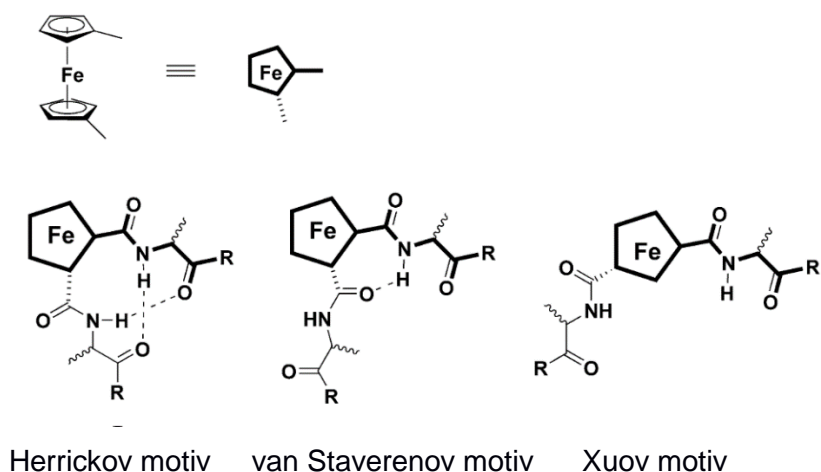


Slika 7. Tri vrste intramolekulskih vodikovih veza između NH_2 i COOH skupine [$(\text{N-H}\cdots\text{O}=\text{C}$ (**a1-a4**), $\text{N-H}\cdots\text{O-H}$ (**b1-b4**) i $\text{O-H}\cdots\text{N-H}$ (**c**)]²⁹

Padyana i sur. sintetizirali su heksapeptid $\text{Boc-Val}^1\text{-}\Delta\text{Phe}^2\text{-Leu}^3\text{-Ala}^4\text{-}\Delta\text{Phe}^5\text{-Ala}^6\text{-OMe}$ (**XVI**) koji poprima 3_{10} -spiralnu strukturu i u otopini i u kristalnom stanju, zahvaljujući ΔPhe ostataku. Molekulu karakteriziraju četiri uzastopna β -okreta (tri tipa-III, slijedi jedan tip-I β okret), svaki stabiliziran $1 \rightarrow 4$ intramolekulskom $\text{NH}\cdots\text{OC}$ vodikovom vezom, te jedinstvenom $\text{C-H}\cdots\text{OC}$ vodikovom vezom.³⁰

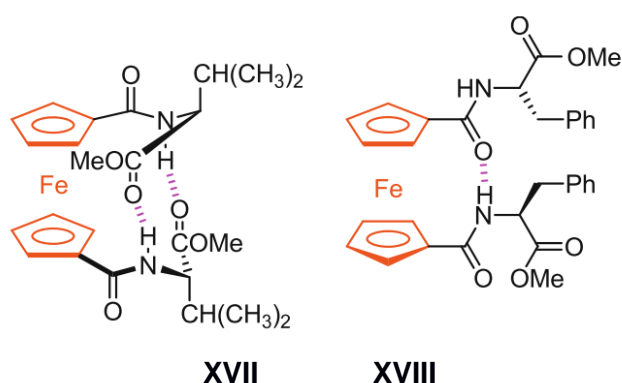
1.4. Ferocenski peptidi izvedeni iz ferocen-1, 1'-dikarboksilne kiseline

Kako je već ranije spomenuto, izbor ferocenskog kalupa diktira usmjerenost peptidnog lanca i utječe na rigidnost molekule ovisno o obrascu uspostavljenih vodikovih veza. Ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina (Fcd, **I**) (slika 2) može se koristiti kao kalup za sintezu Fc-peptidnih konjugata. Na primjer, aminokiselinski ili peptidni konjugati Fc-dikarboksilne kiseline najčešće uspostavljaju intramolekulske interlančane vodikove veze s terminalnim esterskim karbonilnim skupinama koje tvore 10-člane prstenove (slika 3). Dakle, umetanjem ferocena omogućena je tvorba dvaju β -okreta u nastaloj C_2 -simetričnoj peptidnoj strukturi. Ovaj strukturni motiv poznat je kao "Herrickova" konformacija. Alternativni motivi se rjeđe opažaju, poput interakcije samo jednom interlančanom IHB koja zatvara 7-člani prsten γ -okreta, tzv. "van Staverenova" konformacija ili "Xuova" otvorena konformacija u kojoj ne dolazi do intramolekulskih interakcija vodikovim vezama (slika 8).^{31,32,33}



Slika 8. Obrasci vodikovih veza i orijentacija dvaju peptidnih supstituenata uočenih u peptidnim konjugatima Fc-dikarboksilne kiseline³¹

Herrick i sur. prvi su sintetizirali niz konjugata Fcd s aminokiselinama, formule $\text{Fn}[\text{CO-Aaa-OMe}]_2$ (Aaa = Val, Phe, Pro). Reprezentativni primjer ovih konjugata $\text{Fn}[\text{CO-L-Val-OMe}]_2$ (**XVII**) uspostavlja dvije ekvivalentne intramolekulske vodikove veze između amidne NH skupine jednog lanca i karbonilne CO skupine suprotnog lanca, što rezultira tvorbom 10-članog prstena uočenog kod motiva antiparalelne β -nabrane ploče. Kristalografska analiza potvrdila je da je Herrickov obrazac IHB (dvije intramolekulske interlančane $\text{NHVal}\cdots\text{OCCOOMe}$ vodikove veze) zadržan i u čvrstom stanju te se radi se o slabim vodikovim vezama (slika 9).^{34,35,36}



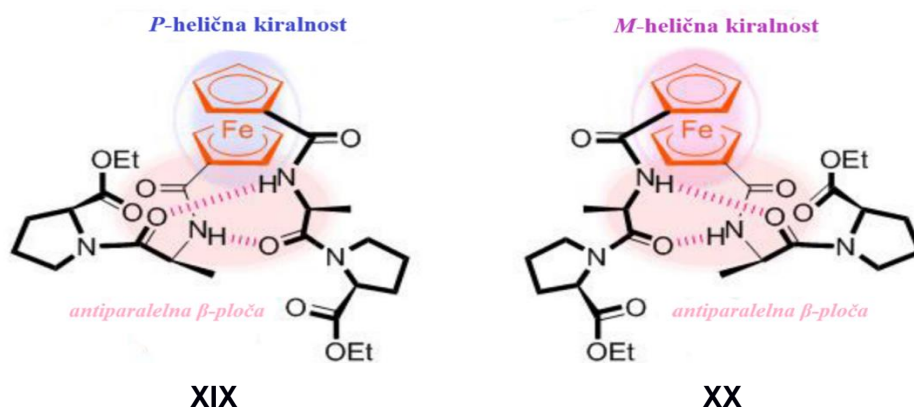
Slika 9. Shematski prikaz IHB ferocenskih peptida $\text{Fn}[\text{CO-L-Val-OMe}]_2$ (**XVII**) i $\text{Fn}[\text{CO-L-Phe-OMe}]_2$ (**XVIII**)³⁵

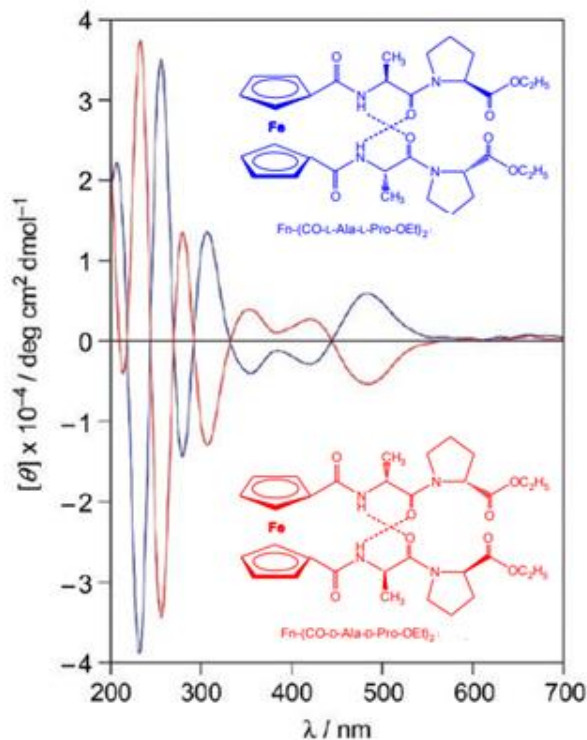
Njihovo istraživanje je pokazalo da se ferocen može koristiti za postavljanje dvaju estera aminokiselina u uređenu konformaciju koju stabiliziraju intramolekulske vodikove veze.

Dobivenu uređenu konformaciju lako je potvrditi spektroskopskim istraživanjem peptidne i ferocenske podjedinice. Ovo je potaknulo značajan interes za istraživanje definiranih sekundarnih struktura peptida koje se mogu dobiti različitim obrascima vezivanja između ferocenske okosnice i aminokiselina ili peptida.³⁴

Za razliku od ferocenskog konjugata valina, Van Staveren i sur. su utvrdili da Fn-[CO-L-Phe-OMe]₂ (**XVIII**) uspostavlja samo jednu intramolekulsku vodikovu vezu između karbonilne skupine u susjedstvu ferocenske jedinice i amidne skupine drugog lanca (slika 9). Očigledno, prisutnost glomaznog fenilalaninskog prstena u usporedbi s manjim izopropilnim bočnim lancem rezultira različitim interakcijama i konačnim prostornim uređenjem molekula u čvrstom stanju. Zanimljivost ovog slučaja je tvorba 8-članog prstena u čvrstom stanju kao posljedica interlančane NHPh_e...OCFn vodikove veze, dok u otopini struktura poprima simetričnu 11-članu prstenastu strukturu kao posljedica NHPh_e...OCPh_e povezivanja.^{35,36}

Hirao i sur. istraživali su utjecaj slijeda i konfiguracije prirodnih aminokiselina na konformacijski prostor ferocen-peptidnih biokonjugata koristeći homo- i heterokiralne peptidne sekvence Ala-Pro/Pro-Ala. Kristalografska analiza konjugata izvedenih iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline koji sadrže L-dipeptidne lance (-L-Ala-L-Pro-OEt) (**XIX**) potvrđuje "Herrickovu" konformaciju pri čemu obje alaninske podjedinice sudjeluju u dvjema interlančanim NHAla...OCAla intramolekulskim vodikovim vezama koje zatvaraju 10-člane prstenove, što dovodi do indukcije kiralno organizirane strukture. CD-spektroskopska analiza pokazuje pozitivan Cottonov efekt, što upućuje na *P*-heličnost ferocena. Kristalna struktura konjugata **XX** sastavljena od odgovarajućih D-dipeptidnih lanaca (-D-Ala-D-Pro-OEt) pokazuje negativan Cottonov efekt što odgovara *M*-heličnosti ferocena. Molekularne strukture **XIX** i **XX** predstavljaju konformacijske enantiomere pri čemu prvi tvori desno (*P*), a drugi lijevo usmjerenu uzvojniju (*M*) (slika 10).³⁷

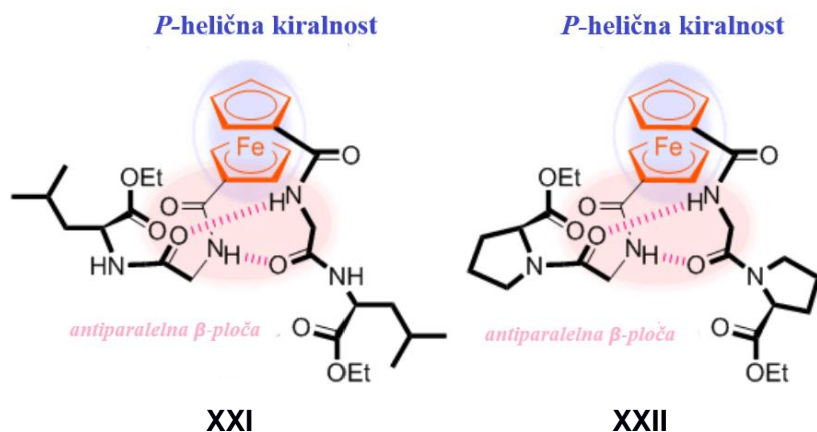




Slika 10. Shema obrasca IHB i CD-spektri konformacijskih enantiomera $\text{Fn}-(\text{CO-L-Ala-L-Pro-OEt})_2$ (**XIX**) i $\text{Fn}-(\text{CO-D-Ala-D-Pro-OEt})_2$ (**XX**)^{12,38}

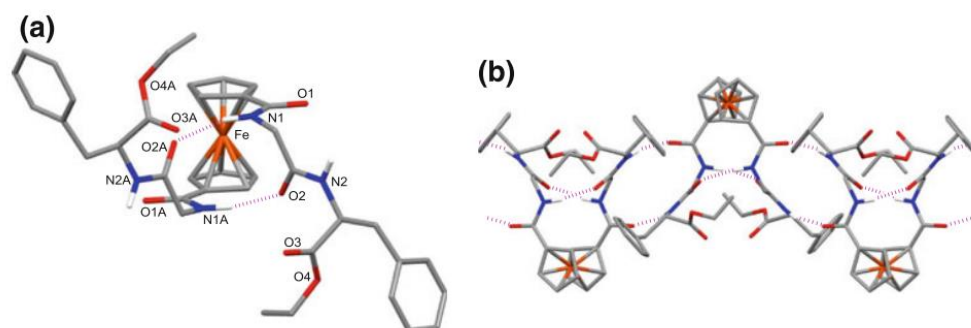
Konfiguracija i slijed aminokiselina smatraju se ključnim faktorom u tvorbi kiralno organiziranih biosustava s visoko uređenim strukturama.³⁷

Kristalografska analiza konjugata $\text{Fn}-(\text{CO-Gly-L-Leu-OEt})_2$ (**XXI**) ukazuje na dvije interlančane $\text{CO}_{\text{Gly}} \cdots \text{NH}_{\text{Gly}}$ intramolekulske vodikove veze, čime se uspostavlja visoko-uređena kiralna struktura iste konformacije kao što je uočeno kod ferocenskog konjugata **XIX** (slika 6). Zanimljivo je da se *P*-1,2' spiralna konformacija ferocena može inducirati i u ovom konjugatu gdje se kao susjedna aminokiselina nalazi akiralni glicin. Kod ovog konformera amidna skupina leucina je dostupna za uspostavu inermolekulskih vodikovih veza s karbonilnom skupinom u blizini ferocenske jedinice, stvarajući visoko organiziranu kristalnu strukturu gdje je svaka molekula vezana sa četiri susjedne molekule. Ferocenski peptid sastavljen od -Gly-L-Pro-OEt (**XXII**) dipeptidnih lanaca također sadrži *P*-heličnu ferocensku jezgru te 10-člani IHB-prsten uspostavljen s dvije intralančane $\text{NH}_{\text{Gly}} \cdots \text{OC}_{\text{Gly}}$ vodikove veze inducira kiralno organiziranu "Herrickovu" konformaciju istovjetnu kao kod spomenutog biokonjugata **XIX** (slika 11). S druge strane, u slučaju ferocenskog konjugata koji se sastoji od -L-Pro-Gly-OEt dipeptidnih lanaca pretpostavlja se formiranje 14-članog IHB prstena.^{38,39,40}



Slika 11. Ferocen dipeptidni konjugati Fn-(CO-Gly-L-Leu-OEt)₂ (**XXI**) i Fn-(CO-Gly-L-Pro-OEt)₂ (**XXII**)³⁸

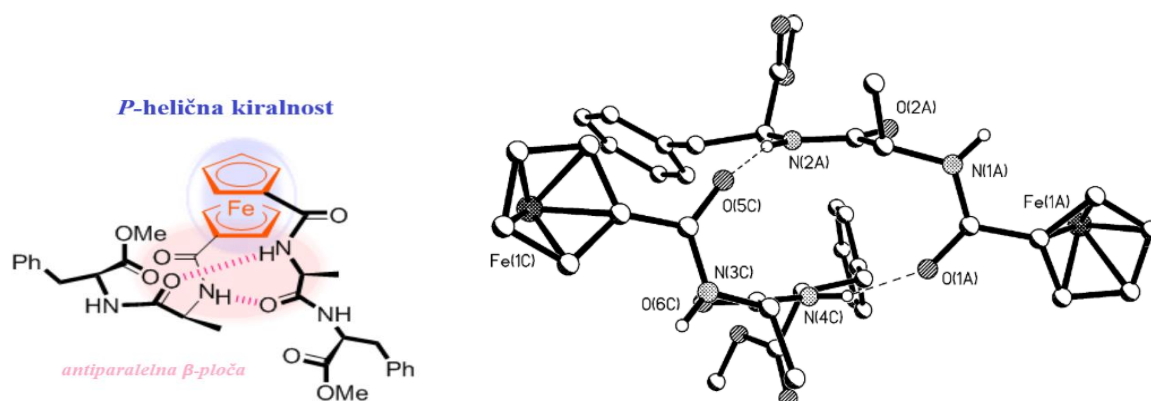
Kristalna struktura konjugata **XXIII** Fn-(CO-Gly-L-Phe-OEt)₂ pokazuje istu kiralno organiziranu strukturu „Herrickovog“ obrasca temeljenu na dvije C₂-simetrične intramolekulske NH_{Gly}...OC_{Gly} vodikove veze. Međutim, utvrđen je drugačiji raspored molekula u kristalu. Svaka molekula je povezana s dvije susjedne molekule, pri čemu svaki dipeptidni lanac tvori 14-člani prsten s dipeptidnim lancem susjedne molekule preko dva para simetričnih intermolekulskih vodikovih veza (slika 12).^{36,38}



Slika 12. (a) ORTEP-dijagram strukture konjugata Fn-(CO-Gly-L-Phe-OEt)₂ (**XXIII**)
 (b) Formiranje 14-članih prstenova povezivanjem intramolekulskim vodikovim vezama određuje raspored molekula konjugata **XXIII** u kristalnoj strukturi.³⁶

Ferocen-dipeptidni konjugat **XXIV** Fn-(CO-L-Ala-L-Phe-OMe)₂ također karakterizira kiralno organizirana struktura kao posljedica obrasca interlančanih intramolekulskih vodikovih veza koje nalikuju na antiparalelnu β-nabranu ploču, uz *P*-heličnost ferocenske jezgre. Kao i u slučaju biokonjugata **XXIII**, uočena je slična prostorna organizacija formiranja 14-članih prstenova pri čemu se uz dvije interlančane NH_{Ala}...OC_{Ala} intramolekulske vodikove veze uspostavlja i intermolekulska interakcija putem amidnih skupina fenilalanina i karbonilne

skupine ferocenske jedinice (slika 13). U ovom slučaju je utvrđena prisutnost dviju kristalografski neovisnih molekula u sklopu jedne jedinične ćelije.^{35,38}



Slika 13. Shema IHB prstena ferocenskog dipeptida $\text{Fn}(\text{CO-L-Ala-L-Phe-OMe})_2$ (**XXIV**), lijevo; Vizualizacija zatvaranja 14-članog prstena između dvije molekule konjugata **XXIV** intermolekulskim vodikovim interakcijama, desno.^{35,36}

Ferocenski peptidi poprimaju konformaciju β -okreta i zbog toga mogu poslužiti i kao zanimljivi molekularni modeli za razne bolesti kod kojih β -okret ima strukturno važnu ulogu (već spomenute Alzheimerova i Parkinsonova bolest). Pokazalo se da priroda vodikovih veza igra značajnu ulogu u stabilnosti amiloidnih vlakana.^{41,42} Na temelju toga Beheshti i sur. su sintetizirali dipeptide Leu-Val (LV), Val-Phe (VF), Gly-Val (GV) i tripeptid Val-Phe-Phe (VFF) i konjugirali ih s Fc-dikarboksilnom kiselinom u namjeri da prouče interakcije između peptidnih supstituenata. Sintetizirali su 5 peptida: $\text{Fc}[\text{CO-Leu-Val-OMe}]_2$ (**XXV**), $\text{Fc}[\text{CO-Val-Phe-OMe}]_2$ (**XXVI**), $\text{Fc}[\text{CO-Val-Phe}^1\text{-Phe}^2\text{-OMe}]_2$ (**XXVII**), $\text{Fc}[\text{CO-Leu-Val-OH}]_2$ (**XXVIII**), $\text{Fc}[\text{CO-Val-Phe-OH}]_2$ (**XXIX**). Peptidi **XXX** i $\text{Fc}[\text{CO-Gly-Val-OH}]_2$ (**XXXI**) u krutom stanju poprimaju "Herrick-ovu" konformaciju (antiparalelni β -okret) iako su na molekularnoj razini jako različiti. Fleksibilnost Gly kao proksimalne Fc aminokiseline i prisutnost slobodne karboksilne skupine značajno doprinosi razlici intermolekulskih vodikovih veza spoja **XXXI** u odnosu na spoj **XXX**. Kod spoja **XXX** intermolekulske vodikove veze utječu na formiranje "glava-rep" strukture i na taj način tvore beskonačan lanac, dok kristalna struktura peptida **XXXI** pokazuje formiranje hidrofobnih kanala koji proizlaze iz interlančanih H-veza NH skupine Val i slobodne karboksilne skupine. Fc-peptidni sustav prikazan u ovom radu ima visok potencijal za interakcije s hidrofobnim dijelom amiloidnog β -peptida.⁴³

Beheshti i sur. sintetizirali su i dva ferocenska tetrapeptida: $\text{Fc}[\text{CO-Gly-Val-Phe-OMe}]_2$ (**XXXII**) te $\text{Fc}[\text{CO-Gly-Val-Phe-Phe-OMe}]_2$ (**XXXIII**) koji su karakterizirani masenom spektrometrijom, NMR i IR- spektroskopijom, te cirkularnim dikroizmom (CD). Za spoj **XXXII** nije opažena promjena u kemijskim pomacima amidnih protona Gly i Phe u rasponu

koncentracija od 6-20 mM. Nasuprot tome, na kemijski pomak amidnih protona Val značajno je utjecala promjena koncentracije. U slučaju spoja **XXXIII** amidni protoni Val i Phe sudjeluju u intramolekulskim vodikovim vezama. U otopini spomenuti tetrapeptidi pokazuju IHB i potencijalno samookupljanje putem međumolekulskih interakcija.⁴⁴

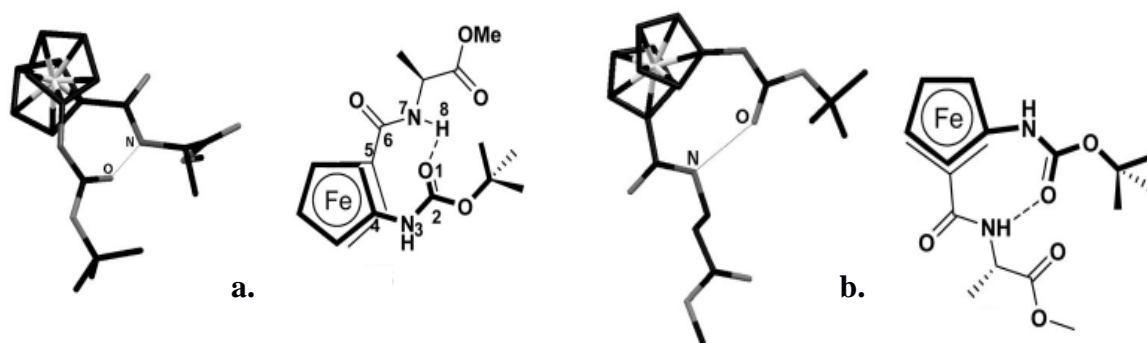
1.5. Ferocenski peptidi izvedeni iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline

Sinteza složenijih ferocenskih biokonjugata, u svrhu istraživanja tvorbe uređenih struktura, započinje od ferocenskih prekursora. Odabir ferocenskog kalupa određuje usmjerenost peptidnog lanca i rigidnost molekule stvaranjem intramolekulskih vodikovih veza (IHB). Bitna karakteristika ferocenske aminokiseline je ta da, za razliku od ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (Fcd) i ferocen-1,1'-diamina (Fcda), omogućava antiparalelan položaj peptidnih lanaca konjugata izvedenih iz Fca. Antiparalelna orijentacija lanaca je češće svojstvo prirodnih peptida,⁴⁵ što ferocensku aminokiselinu čini vjernim peptidomimetikom, a uzimajući u obzir svojstva same molekule ferocena, ferocenska aminokiselina predstavlja i začetak sekundarne strukture β -okreta.⁴⁶ Derivati ferocenske aminokiseline pogoduju stvaranju takvih intramolekulskih vodikovih veza koje rezultiraju zatvaranjem 12-članog prstena (slika 3, slika 4). Kako se konformacija peptida izvedenih iz ferocenske aminokiseline može modificirati vrstom i brojem aminokiselina, ispitivana su različita svojstva takvih biokonjugata. Tako su se, na primjer, proteinski konjugati ferocenske aminokiseline pokazali kao mogući modifikatori elektroda za detekciju i imobilizaciju papaina,⁴⁷ ali i kao molekule koje mogu vezati proteine HIV-a koji kontroliraju sposobnost tog virusa da zarazi stanicu.⁴⁸ Također, ferocenski dipeptidi izvedeni iz Fca i hidrofobnih aminokiselina (Phe, Val, Leu) pokazali su antimikrobnu aktivnost (prema bakterijama *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas aeruginosa*), antioksidativnu aktivnost, kao i visoku otpornost na proteolitičko cijepanje čime je pokazano kako Fca igra važnu ulogu u stabilizaciji dipeptida enzimskom razgradnjom.⁴⁹ U istom je istraživanju potvrđeno kako kiralnost aminokiselinskih skupina i polaritet zaštitnih skupina djeluju na antimikrobnu i antioksidacijsku aktivnost spojeva radi različitih uzoraka stvorenih vodikovih veza. Radi navedenih razloga, potrebno je poznavati sekundarnu strukturu pripremljenih biokonjugata te uzorke intramolekulskih vodikovih veza kao i ostale interakcije unutar peptidomimetika. Kako sekundarna struktura peptida definira konačnu strukturu, stabilnost i funkciju proteina, pokušava se detektirati i kontrolirati kako bi nastali spojevi bili stabilniji, konformacijski pogodni i time primjenjiviji.

Jedan od prvih oligopeptidnih derivata bio je izveden iz Fca i L-alanina čime je bilo potvrđeno kako ferocenska aminokiselina doista inducira zaokretnu strukturu tetrapeptida.

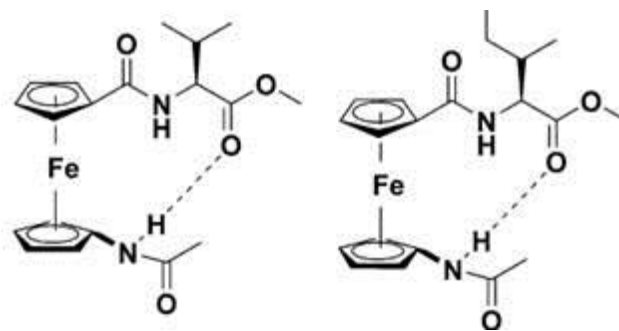
Također je ustanovljeno da je orijentacija dva peptidna lanca antiparalelna te da je spoj stabiliziran dvjema intramolekulskim vodikovim vezama što rezultira s *P*-heličnosti ferocenske jezgre.⁵⁰ Sintetiziran je i bioknjugat ferocenske aminokiseline kojim je potvrđen očekivani uzorak intramolekulskih vodikovih veza čime je dokazano da ferocenska aminokiselina inducira približni β -okret, odnosno 9-člane i 11-člane prstenove.⁵¹ Bitna je karakteristika ovakvih vodikovih veza da ostaju stabilne i pri povišenim temperaturama te u uvjetima prisutnosti metanola.³¹

Peptidni se lanac može vezati na C- ili *N*-kraj ferocenske aminokiseline, što potencijalno dovodi do različitih stereoizomera. Dokazano je kako heličnost ferocenske jezgre u biokonjugatima ovisi o karakteristikama aminokiseline vezane na amino skupinu ferocenske aminokiseline.⁵² Enantiomerni dipeptidi Fca s L- i D-Ala poprimaju *M*- odnosno *P*-heličnost (slika 14).³¹



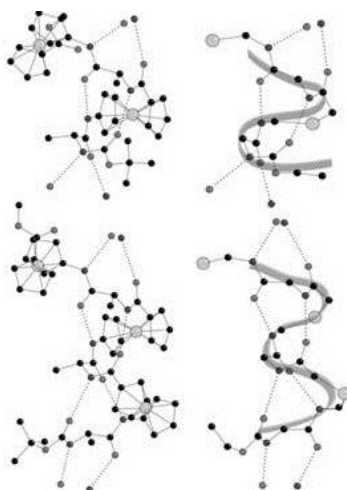
Slika 14. (a) Kristalografska struktura Boc-Fca-L-Ala-OMe (XXXIV) i (b) Boc-Fca-D-Ala-OMe (XXXV) te prikaz formacije osmeročlanog prstena s *L,M* konformacijom i *D,P* konformacijom

Nasuprot tome, konjugat koji sadrži L-Ala na obje terminalne grupe Boc-L-Ala-Fca-L-Ala-L-Ala-OMe (XXXVI) poprima *P*-heličnost u čvrstom stanju i u otopini, i također zatvara približni β -okret. Dokazano je da vezanje L-Val ili L-Ile na C-terminalni dio ferocenske aminokiseline inducira *P*-heličnost ferocenske jezgre,⁵³ što je potkrijepljeno izračunima koji dokazuju kako je to najstabilnija konformacija i to pokazuje sa bi konjugati ferocenske aminokiseline trebali rezultirati određenim uzorkom IHB veza (slika 15) i *P*-heličnosti. Isti izračuni pokazuju kako su drugi uzorci stvaranja IHB veza mogući, ali manje vjerojatni.



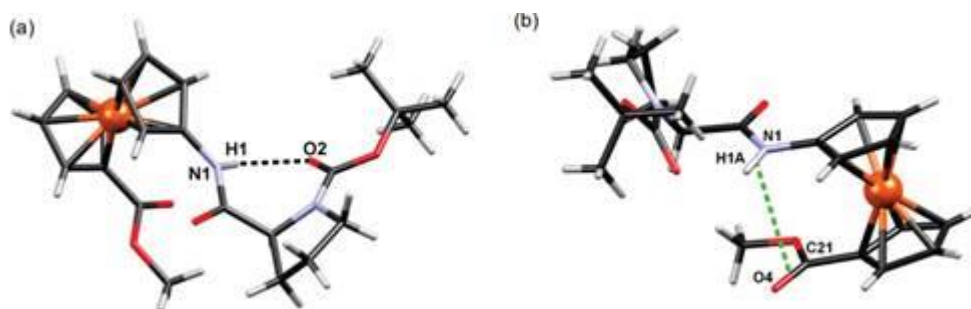
Slika 15. Pretpostavljeni uzorak stvaranja IHB veza ³¹

Kao što je ranije spomenuto, Fca posjeduje specifičnu strukturu koja inducira β -okrete između peptidnih lanaca, pa je to svojstvo iskorišteno za dizajniranje biokonjugata koji tvore strukture nalik na β -nabranu ploču.⁵¹ Takvi biokonjugati L-Ala i D-Ala s Fca pokazali su suprotnu heličnost i stvaranje IHB interakcija između peptidnih lanaca koje su dovele do struktura koje su slične β -nabranoj plohi (slika 16).



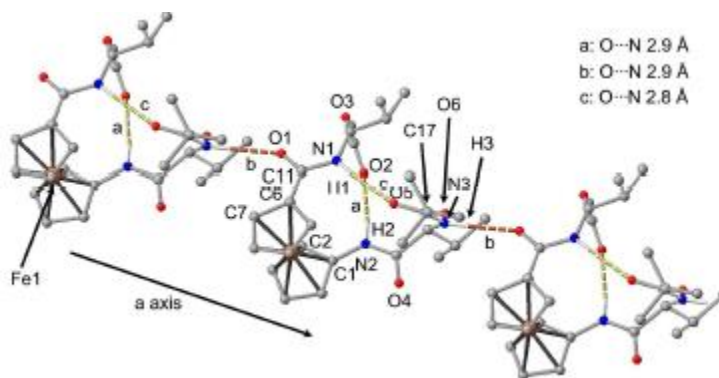
Slika 16. Prikaz strukture Fca-oligomera nalik na β -nabranu plohu ⁵¹

Istraživani su i biokonjugati ferocenske aminokiseline s prolinom radi sposobnosti prolina da inducira različite okrete, čime je dokazano kako takvi biokonjugati stvaraju 9-člane i 7-člane IHB prstenove (slika 17).⁵⁴



Slika 17. (a) Konformacija Boc–Pro–NH–Fn–COOMe (**XXXVII**) u kristalu stabiliziranom unutarlančanim 7-članim IHB-prstenom (γ -zaokret), (b) dodatna stabilizacija intramolekulskim dipolarnim interakcijama⁵⁴

U svojoj Disertaciji, Čakić je opisala i istražila pripravu i konformacijski prostor konjugata Fca i različitih aminokiselina (Gly, L-Ala, L-Val), da bi ispitali utjecaj veličine bočnog ogranka ugrađene prirodne aminokiseline i *N*-zaštitne skupine (Boc, Ac) na stabilizaciju tih sustava putem IHB u otopini i u čvrstom stanju. Strukturnom analizom kiralnih tripeptida Boc-Val-Fca-Val-OMe (**XXXVIII**), Ac-Ala-Fca-Ala-OMe (**XXXIX**) i Ac-Val-Fca-Val-OMe (**XL**) nađene su dvije međulančane IHB. Pri tome, vodikova veza između NH-skupine ferocenske aminokiseline i esterske karbonilne skupine rezultira 9-članim prstenom (N \cdots O 2,9-3,0 Å), a 11-člani prsten je posljedica vodikove veze između karbonilne skupine NHX-ostatka i amino-skupine C-terminusa aminokiselinske podjedinice (N \cdots O 2,8-2,9 Å) (slika 18).⁵⁵

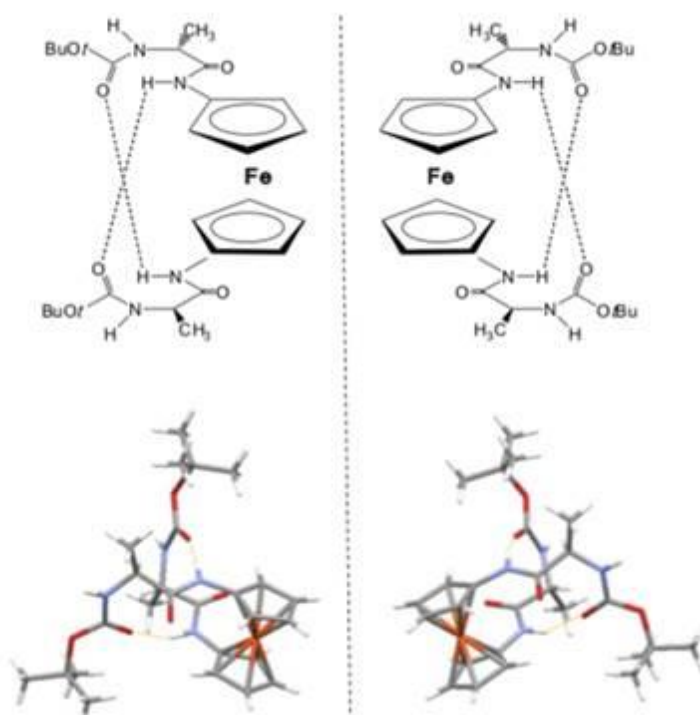


Slika 18. Kristalna struktura tripeptida Boc-Val-Fca-Val-OMe (**XXXVIII**)

1.6. Ferocenski peptidi izvedeni iz ferocen-1, 1'-diamina

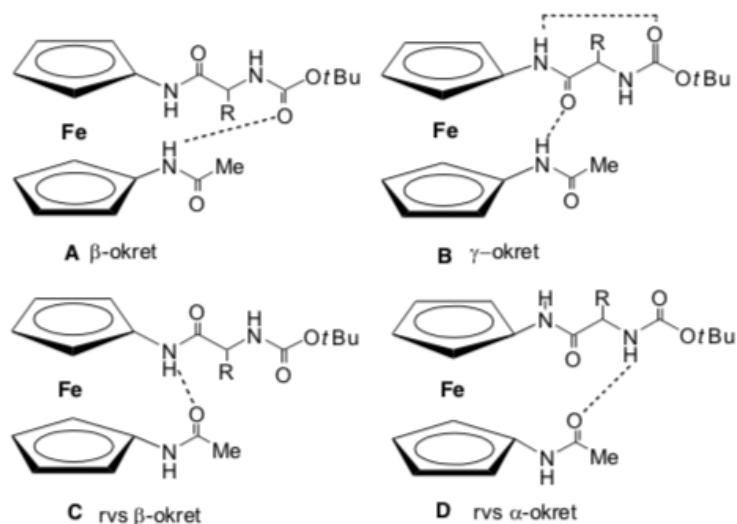
U usporedbi s ostalim ferocenskim konjugatima, konjugati izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda, **V**) vrlo su slabo istraženi. Prve takve konjugate sintetizirali su Kraatz i suradnici kopolacijom Fcda (**V**) s L- i D-Ala.⁵⁶ Dobiveni konjugati Fn-(NH-Ala-Boc)₂ (**XLI**) i Fn-

(NH-D-Ala-Boc)₂ (**XLII**) u čvrstom stanju tvore dva 10-člana IHB-prstena koji su rezultat intrerlančanih NH_{Fn}---OC_{Boc} vodikovih veza što rezultira stvaranjem strukture β-okreta (slika 19). Primjenom IR-, CD- i NMR-spektroskopije, pronađen je jednak motiv i u otopini pri čemu **XLI** poprima pozitivan Cottonov efekt u ferocenskom području što upućuje na *P*-heličnost, dok **XLII** poprima negativan Cottonov efekt što odgovara *M*-heličnosti. Ovakva konformacija olakšava stvaranje 14-članih prstena između simetričnih spojenih peptidnih lanaca, vrlo sličnih onima koji se nalaze u antiparalelnim β-pločama. Ova karakteristika nije zamijećena u ostalim ferocenskim konjugatima što ga čini poželjnim strukturnim elementom.



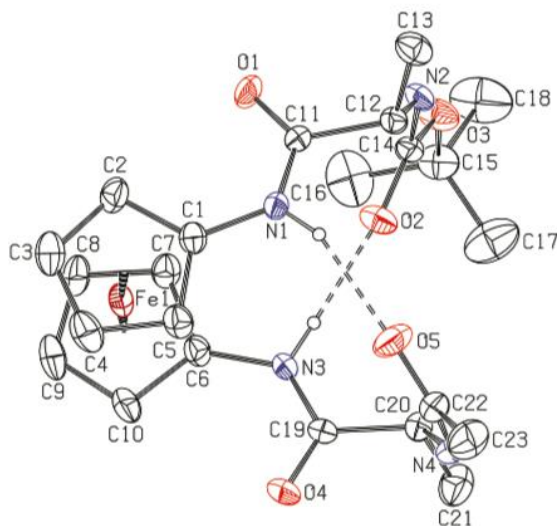
Slika 19. Shematski prikaz IHB i ORTEP-dijagrami enantiomernih dipeptidâ Fn-(NH-Ala-Boc)₂ (**XLI**, lijevo) i Fn-(NH-D-Ala-Boc)₂ (**XLII**, desno)

U daljnjim istraživanjima, provedenim u Laboratoriju za organsku kemiju PBF-a, pripremljeni su asimetrični konjugati Boc-AA-NH-Fn-NH-Ac (**XLIIIa-d**, AA = L-Ala, D-Ala, Val, Gly) postupkom „desimertizacije“ ferocenskih peptida **VI**.⁵⁷ Pripremljeni konjugati **XLIIIa-d** u otopini zauzimaju više različitih konformacija na temelju intramolekulskih vodikovih veza. U stvaranju tih intramolekulskih vodikovih veza sudjeluju NH-skupine koje su izravno vezane na ferocen, dok bočni ogranci aminokiseline nemaju nikakav utjecaj (slika 20). Pozitivan Cottonov efekt u ferocenskom području poprima **XLIIIb** što ukazuje na *P*-heličnost, dok **XLIIIa** poprima negativan Cottonov efekt ukazujući na *M*-heličnost.



Slika 20. Hipotetske konformacije **A-D** peptida Boc-AA-NH-Fn-NH-Ac (**XLIIIa-d**) u otopini

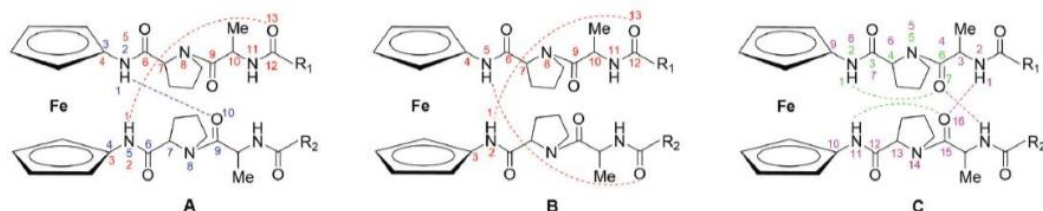
Nadalje, u našem laboratoriju su sintetizirani konjugati Ac-Ala-NH-Fn-NH-Ala-Boc (**XLIVa**) i Fn-(NH-Ala-Ac)₂ (**XLIVb**) u kojima su konformacijskom analizom utvrđeni prisutnosti dvaju simultanih 10-članih struktura (14-člani prsten) nalik β-okretu između dva supstituenta neovisno o zaštitnim skupinama (Boc ili Ac). Ista struktura prisutna je u tekućem, kao i u čvrstom stanju gdje strukturu dodatno stabiliziraju unakrsne intermolekulske vodikove veze (slika 21).¹⁰



Slika 21. Molekulska struktura **XLIVa** (IHB prikazane su isprekidanim crtama).

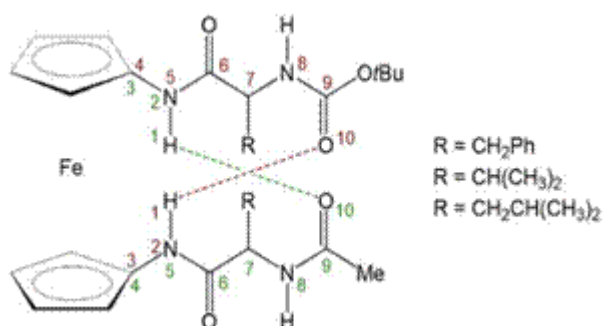
Nastavak istraživanja ferocenskih peptida **VI** u laboratoriju bio je usmjeren prema sintezi homo- i heterokiralnih ferocenskih peptida **XLVa-b** s Ala-Pro sekvencama.⁵⁸ Nakon sinteze

Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-Ac (**XLVc**), konformacijskom analizom potvrđena je prisutnost dvaju interlančanih intramolekulskih vodikovih veza koje tvore 13-člane prstenove (slika 22, A). Shodno tome, u peptidima Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-Boc (**XLVa**) i Boc-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-Boc (**XLVh**) također je potvrđena prisutnost jednog 13-članih prstena, ali i 10-članog prstena stabiliziranog interlančanih $\text{NH}_{\text{Fn}}\cdots\text{OC}_{\text{Ala}}$ intramolekulskim vodikovim vezama (slika 22, B). Međutim, zamjenom L-Ala s D-Ala u heterokiralnim peptidima Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-D-Ala-Boc (**XLVb**) i Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-D-Ala-Ac (**XLVd**) struktura 13-članog prstena se narušava te dolazi do pojave 7-članih intralančanih i 16-članih interlančanih intramolekulskih vodikovih veza (slika 22, C).



Slika 22. Intramolekulske vodikove veze u homokiralnim **XLVa** i **XLVh** (A i B) i heterokiralnim peptidima **XLVb** i **XLVd** (C); **XLVa** i **XLVb** ($\text{R}_1 = \text{Me}$, $\text{R}_2 = \text{OtBu}$), **XLVc** i **XLVd** ($\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{Me}$), **XLVh** ($\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{OtBu}$).

U recentnom istraživanju napravljenom u Laboratoriju za organsku kemiju, pripremljeni su derivati ferocem-1,1'-diamina i različitih hidrofobnih aminokiselina **XLVI** (L-/D-Val), **XLVII** (L-/D-Leu) te **XLVIII** (L-/D-Phe).⁵⁹



Slika 23. Intramolekulske vodikove veze u konjugatima tvoreći dva 10-člana prstana (dva β -okreta)

Svrha ovog rada bila je istražiti inducira li ferocen-1,1'-diamin β -okret nakon konjugacije s aminokiselinom te utječe li glomaznost ili razgranatost bočnih ogranaka Phe, Val i Leu na

obrazac vodikovih veza. Ustanovljeno je kako ovi homokiralni konjugati usitinu tvore stabilne strukture koje se sastoje od dva 10-člana prstena stabilizirana intramolekulskim vodikovim vezama tvoreći strukturu nalik dva β -okreta (slika 23).

§ 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI

2.1. Opći i specifični ciljevi

Budući da biološka aktivnost, konformacijska stabilnost, fleksibilnost, te korištenje peptida i proteina u terapijske ovisi o njihovoj sekundarnoj strukturi, važno je naglasiti da je osnovni cilj prilikom dizajna i pripreme sintetskih peptida i proteina upravo tvorba elemenata sekundarne strukture. Jedna od dobro prihvaćenih i primjenjenih metoda prilikom pripreme peptidomimetika (peptidni ili nepeptidni spojevi koji oponašaju elemente sekundarne strukture proteina, kao i biološku aktivnost, ekvivalentno prirodnim peptidima) jest ugradnja rigidnih kalupa koji služe kao začetnici različitih vrsta okreta poput ferocena.

Ugrađivanjem određenih ferocenskih kalupa u strukturu peptida dolazi do tvorbe vodikovih veza koje uzrokuju nastajanje različitih elemenata sekundarne strukture proteina. Tri su osnovna ferocenska kalupa iz kojih je moguće pripremiti peptide, a to su ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina (Fcd, **I**), 1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina (Fca, **III**) te ferocen-1,1'-diamin (Fcda, **V**).

Tijekom istraživanja na području ferocenskih peptida, u našem su Laboratoriju kopuliranjem Fca i Fcda s pogodno zaštićenim prirodnim aminokiselinama tijekom proteklih 15 godina pripremljeni ferocenski peptidi koji su opisani u brojnim publikacijama.

Imajući u vidu ulogu ferocena kao mogućeg začetnika β -okreta, te naše znanje na području konformacijske analize peptida, odlučili smo istražiti utjecaj ferocenskog templata (Fcd, Fca i Fcda) na indukciju intramolekulskih vodikovih veza između podandnih peptidnih lanaca koji će se vezati na njih.

Pri tome će se ferocenski kalupi vezati s tri različite hidrofobne aminokiseline (Val, Leu i Phe), da bi se ispitaio utjecaj veličine bočnog ogranka aminokiseline. Njihovu strukturu dokazati ćemo NMR-spektroskopijom, a obrazac intramolekulskih vodikovih veza istražiti ćemo mjerenjem koncentracijski-ovisnih IR- i NMR-spektara, temperaturno-ovisnih NMR-spektara, CD-spektara te titracijom NMR- i CD-uzoraka s DMSO.

§ 3. *MATERIJALI I METODE*

3.1. Materijali

3.1.1. Materijali za sintezu i konformacijsku analizu peptida tipa II, IV i VI

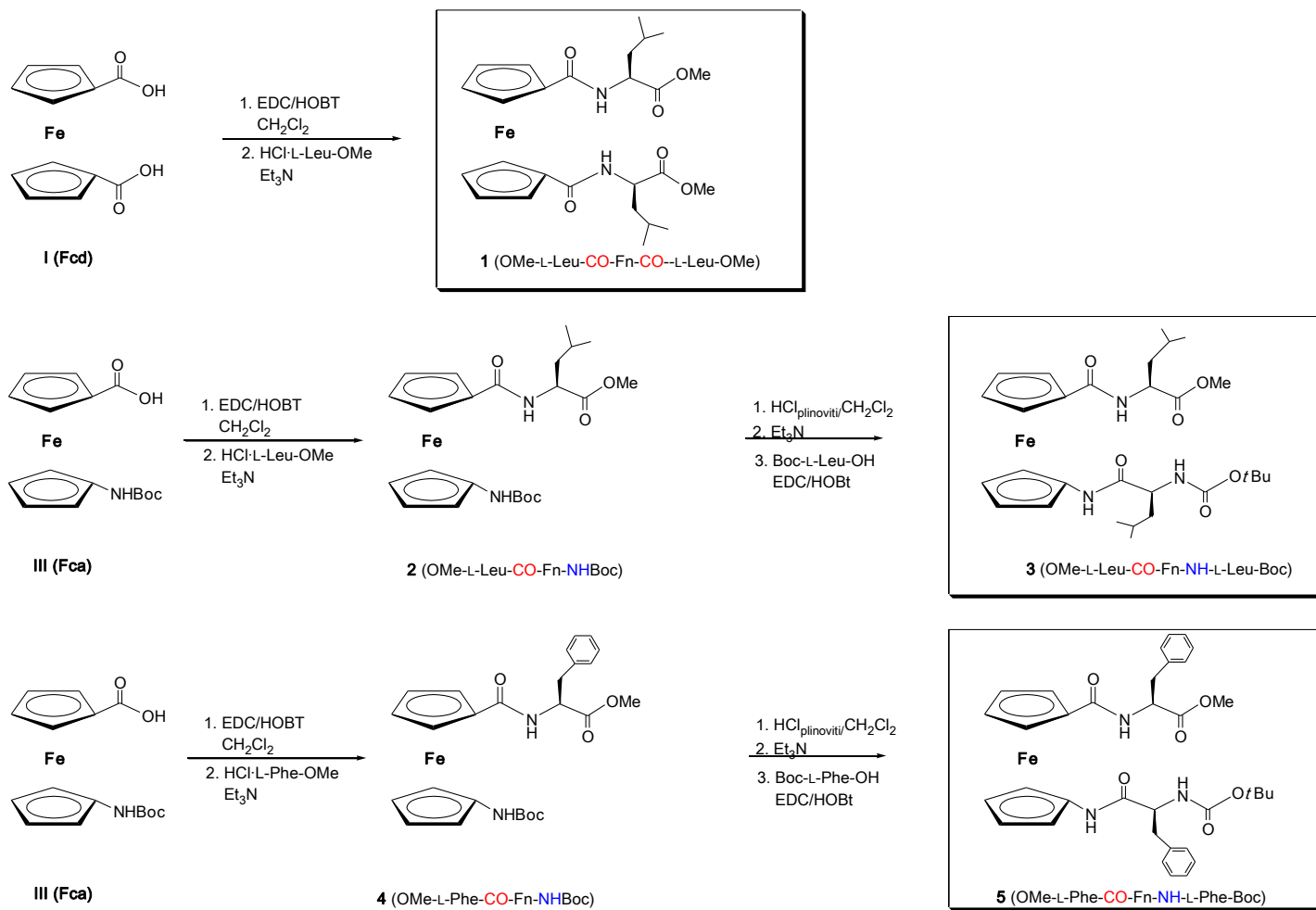
Otapala koja su korištena u radu pročišćena su prema standardnim postupcima,⁶⁰ a sve kemikalije korištene u sintezi bile su analitičke čistoće. Tijek reakcija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva ispitivani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel) s fluorescentnim indikatorom (254 nm). Detekcija neferocenskih spojeva provedena je korištenjem UV-svjetlost valne duljine 254 nm ili ninhidrinom uz zagrijavanje. Produkti su pročišćeni tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu ("Merck", Karakterizacija sintetiziranih spojeva provedena je pomoću infracrvene spektroskopije (IR), nuklearne magnetske rezonance (NMR) i tekućinske kromatografije visoke razlučivosti sa spektrometrijom masa (HPLC-MS). Tališta su određena na Reichert Thermovar HT 1 BT 11 i nisu korigirana.

IR-spektri uzoraka snimljeni su na spektrofotometru Spectrum Two-FTIR u kalijevu bromidu ili CH₂Cl₂.

¹H- i ¹³C-NMR-spektri određeni su u CDCl₃ ili [D₆]-DMSO na spektrometrimu Bruker AV600 uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard, baždareni su prema CDCl₃ (7.26 ppm, odnosno 77.16 ppm). NMR titracija provedena je dodavanjem po 10 μL [D₆]-DMSO u 12,5 mM otopinu peptida u CDCl₃. Snimanje spektra provodilo se nakon svakog dodatka [D₆]-DMSO sve do izostanka promjene u kemijskom pomaku promatranih NH skupina (spektri su baždareni prema TMS). Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm.

UV/Vis- i CD-spektri snimljeni su na CD-spektrofotometru Jasco-810 u CH₂Cl₂ i DMSO, te u kalijevu bromidu.

Sinteza Boc-Fca (III) i Fcd (I) opisana je u literaturi te dobiveni spektroskopski podaci odgovaraju literaturnima.



Shema 1. Postupak priprave ciljnih tripeptida 1-5

3.2. Metode

3.2.1. Metode za sintezu i konformacijsku analizu peptida tipa II, IV i VI

OMe-L-Leu-CO-Fn-CO-L-Leu-OMe (1)

Ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina (I) (200 mg, 0.73 mmol) aktivira se miješanjem s EDC (340 mg, 2.19 mmol) i HOBt (300 mg, 2.19 mmol) u CH₂Cl₂ 1 sat pri 0°C. Potrebna količina (500 mg, 2.91 mmol) hidroklorida HCl·Leu-OMe suspendira se u suhom diklormetanu, otopi uz dodatak Et₃N (pH~8) i doda kiselini. Nakon što se tankoslojnom kromatografijom u EtOAc utvrdi da je sav slobodan amin izreagirao, otopina se ispere zasićenom otopinom NaHCO₃, 10%-tnom otopinom limunske kiseline u vodi i nekoliko puta zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Dobiveni se produkt očisti tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz smjesu diklormetana i etil-acetata (5:1) kao eluens. Dobiveno je 250 mg (88%) produkta u obliku žutog praha.

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3429 sl (N–H slobodni), 3372 j (N–H asocirani), 1729 j (C=O, COOCH₃), 1650 j (C=O, CONH), 1536. **¹H-NMR** (CDCl₃) δ/ppm : 7.75 (d, 2H, NH_{CO}), 4.91 (pt, 2H, H-2, H-5, Fn), 4.81 (m, 2H, H-7, H-10, Fn), 4.79 (m, 2H, C _{α} H_{Leu}), 4.55 (m, 1H, H-3, H-4, Fn), 4.33 (m, 1H, H-8, H-9, Fn), 3.80 (s, 6H, COOCH₃), 1.83-1.80 (m, 4H, C _{β} H_{2Leu}), 1.57-1.53 (s, 2H, C _{γ} H_{2Leu}), 0.93-0.91 (m, 12H, 2×C _{δ} H_{3Leu}). **¹³C-NMR**, APT (CDCl₃) δ/ppm : 176.79 (COOCH₃), 170.61 (CONH), 75.91 (C-1, C-6, Fn), 72.12 (C-2, C-5, Fn), 71.43 (C-7, C-10, Fn), 70.42 (C-3, C-4, Fn), 70.29 (C-8, C-9, Fn), 52.69 (C _{α} Leu), 50.97 (COOCH₃), 39.67 (CH_{2Leu}), 25.05 (CH_{Leu}), 23.35 (CH_{3Leu}), 21.08 (CH_{3Leu}).

OMe-L-Leu-CO-Fn-NHBoc (2)

Boc-Fca III (200 mg, 0.579 mmol) suspendira se u suhom diklormetanu (4 ml) i otopi dodatkom HOBt (105.6 mg, 0.637 mmol) i EDC (122.1 mg, 0.637 mmol). Nakon 1 sat miješanja pri sobnoj temperaturi nastaje aktivirana kiselina, te se HCl·Leu-OMe (210.4 mg, 1.16 mmol) suspendira u suhom diklormetanu (5 ml) prethodno ohlađenom na 0 °C i otopi dodatkom suhog NEt₃ (0.48 ml, 3.45 mmol) do pH~8. Tako dobivena otopina Leu-OMe doda se gore opisanoj reakcijskoj smjesi. Nakon 3 sata miješanja pri sobnoj temperaturi rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere nekoliko puta destiliranom vodom, zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Tankoslojnom preparativnom kromatografijom ostatka (CH₂Cl₂ : EA = 10 : 1) dobiveno je 224 mg (82%) žute smole.

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3434 sr (N–H slobodni), 3329 sr (N–H asocirani), 1731 j (C=O, COOCH_3), 1716 j (C=O, $\text{COO}t\text{-Bu}$), 1654 j (C=O, CONH), 1538. **$^1\text{H-NMR}$** (CDCl_3) δ/ppm : 6.71 (šs, 1H, NH_{Boc}), 6.50 (s, 1H, NH_{CO}), 4.72 (m, 2H, H-2, H-5, Fn), 4.48 (m, 2H, H-7, H-10, Fn), 4.46 (m, 1H, $\text{C}_\alpha\text{H}_{\text{Leu}}$), 4.39 (m, 1H, H-3, Fn), 4.33 (m, 1H, H-4, Fn), 4.08 (m, 1H, H-8, Fn), 3.99 (m, 1H, H-9, Fn), 3.79 (s, 3H, COOCH_3), 1.74 (m, 2H, $\text{C}_\beta\text{H}_{2\text{Leu}}$), 1.65 (s, 1H, $\text{C}_\gamma\text{H}_{2\text{Leu}}$), 1.52 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.98 (t, 6H, $2 \times \text{C}_\delta\text{H}_{3\text{Leu}}$). **$^{13}\text{C-NMR}$** , APT (CDCl_3) δ/ppm : 174.59 (COOCH_3), 170.50 (CONH), 153.49 ($\text{COO}t\text{Bu}$), 97.02 (C-6, Fn), 80.22 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 71.25 (C-2, Fn), 71.95 (C-5, Fn), 69.57 (C-7, Fn), 69.45 (C-10, Fn), 65.84 (C-3, Fn), 65.28 (C-4, Fn), 62.90 (C-8, Fn), 62.24 (C-9, Fn), 52.32 ($\text{C}_\alpha\text{Leu}$), 50.88 (COOCH_3), 40.96 ($\text{CH}_{2\text{Leu}}$), 28.28 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 24.96 (CH_{Leu}), 22.93 ($\text{CH}_{3\text{Leu}}$), 21.66 ($\text{CH}_{3\text{Leu}}$).

OMe-L-Leu-CO-Fn-NH-L-Leu-Boc (3)

U prethodnom koraku pripremljeni Boc-zaštićeni dipeptid OMe-L-Leu-CO-Fn-NHBoc (**2**) (100 mg, 0.21 mmol) otopi se u EtOAc, ohladi na 0 °C i izloži djelovanju plinovitog HCl. Nakon 30' miješanja u ledenoj kupelji te otparavanja na rotacijskom vakuum-uparivaču nastali se hidroklorid suspendira u CH_2Cl_2 i obradi sa suviškom Et_3N (pH~9). Dobiveni se slobodni amin kopulira s Boc-L-Leu-OH (98 mg, 4.42 mmol) primjenom standardnog EDC/HOBt postupka: doda se EDC (122 mg, 0.63 mmol) i HOBt (86 mg, 0.63 mmol). Nakon 1 sat miješanja pri sobnoj temperaturi rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom NaHCO_3 , 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz (CH_2Cl_2 : EtOAc = 5 : 1) kao eluens: dobiveno je 98mg (84%) produkta kao žuti prah.

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3434 sr (N–H slobodni), 3372, 3322 j (N–H asocirani), 1724 j (C=O, COOCH_3), 1694, 1646 j (C=O, CONH), 1571. **$^1\text{H-NMR}$** (CDCl_3) δ/ppm : 9.33 (s, 1H, NH_{Fn}), 7.62 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H, NH_{CO}), 5.39 (s, 1H, H-2, H-5, Fn), 5.01 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, NH_{Boc}), 4.94 (m, 1H, $\text{C}_\alpha\text{H}_{\text{Leu1}}$), 4.91 (m, 1H, $\text{C}_\alpha\text{H}_{\text{Leu2}}$), 4.87 (pt, 1H, H-7, Fn), 4.51 (pt, 1H, H-10, Fn), 4.46 (pt, 1H, H-3, Fn), 4.24 (pt, 1H, H-4, Fn), 4.12 (pt, 1H, H-8, Fn), 3.96 (pt, 1H, H-9, Fn), 3.80 (s, 3H, COOCH_3), 1.81-1.79 (m, 2H, $\text{C}_\beta\text{H}_{2\text{Leu}}$), 1.73-1.67 (m, 2H, $\text{C}_\beta\text{H}_{2\text{Leu}}$), 1.62- 1.51 (m, 2H, $\text{C}_\gamma\text{H}_{2\text{Leu}}$), 1.46 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.96-.87 (m, 12H, $2 \times \text{C}_\delta\text{H}_{3\text{Leu}}$). **$^{13}\text{C-NMR}$** , APT (CDCl_3) δ/ppm : 177.76 (COOCH_3), 171.61 (NHCO), 171.05 (CONH), 156.71 ($\text{COO}t\text{Bu}$), 95.71 (C-6, Fn), 80.69 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 75.39 (C-1, Fn), 72.48 (C-2, Fn), 71.28 (C-5, Fn), 70.42 (C-7, Fn), 69.95 (C-10, Fn), 65.90 (C-3, Fn), 65.31 (C-4, Fn), 64.59 (C-8, Fn), 63.02 (C-9, Fn), 54.18 ($\text{C}_\alpha\text{Leu1}$), 52.82 ($\text{C}_\alpha\text{Leu2}$), 50.92 (COOCH_3),

41.00 ($\text{CH}_{2\text{Leu1}}$), 39.92 ($\text{CH}_{2\text{Leu2}}$), 29.83 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.66 (CH_{Leu1}), 28.50 (CH_{Leu2}), 25.05 ($\text{CH}_{3\text{Leu1}}$), 24.74 ($\text{CH}_{3\text{Leu1}}$), 23.28 ($\text{CH}_{3\text{Leu2}}$), 22.7 ($\text{CH}_{3\text{Leu2}}$).

OMe-L-Phe-CO-Fn-NHBoc (4)

Boc-Fca **III** (300 mg, 0.869 mmol) aktivira se kako je opisano za spoj **3**. Potom se HCl·Phe-OMe (374.7 mg, 1.738 mmol) suspendira u suhom diklormetanu (5 ml) prethodno ohlađenom na 0 °C i otopi dodatkom suhog NEt_3 (0.72 ml, 5.21 mmol) do pH~8. Tako dobivena otopina Phe-OMe doda se aktiviranoj Boc-Fca-OBt. Nakon 3 sata miješanja pri sobnoj temperaturi rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere nekoliko puta destiliranom vodom, zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha. Tankoslojnom preparativnom kromatografijom ostatka (CH_2Cl_2 : EA = 10 : 1) dobiveno je 387 mg (88%) žute smole.

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3433 sr (N–H slobodni), 3324 sr (N–H asocirani), 1724 j (C=O, COOCH_3 i $\text{COO}t\text{-Bu}$), 1658 j (C=O, CONH), 1534, 1512. **$^1\text{H-NMR}$** (CDCl_3) δ/ppm : 7.26 (m, 5H, H_{Ar}), 6.45 (šs, 1H, NH_{Boc}), 6.34 (s, 1H, NH_{CO}), 5.02 (q, 1H, $\text{C}_{\alpha}\text{H}_{\text{Phe}}$), 4.65 (m, 1H, H-2, Fn), 4.45 (m, 1H, H-5, Fn), 4.35 (m, 4 H, H-3 H-4 H-8 H-9, Fn), 3.99 (q, 1H, H-7, Fn), 3.93 (m, 1H, H-10, Fn), 3.78 (s, 3H, COOCH_3), 3.26 (q, 1H, $\text{C}_{\beta}\text{H}_{\text{Phe}}$), 3.20 (q, 1H, $\text{C}_{\beta}\text{H}_{\text{Phe}}$), 1.50 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$). **$^{13}\text{C-NMR}$** , APT (CDCl_3) δ/ppm : 173.03 (COOCH_3), 169.91 (CONH), 153.46 ($\text{COO}t\text{Bu}$), 136.22 (C_{Ar}), 96.71 (C-6, Fn), 77.51 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 75.41 (C-1, Fn), 71.30 (C-2, Fn), 71.11 (C-5, Fn), 69.52 (C-7, Fn), 69.17 (C-10, Fn), 65.84 (C-3, Fn), 65.51 (C-4, Fn), 62.92 (C-8, Fn), 62.32 (C-9, Fn), 53.07 ($\text{C}_{\alpha}\text{Phe}$), 52.40 (COOCH_3), 37.77 ($\text{C}_{\beta}\text{Phe}$), 28.29 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

OMe-L-Phe-CO-Fn-NH-L-Phe-Boc (5)

U suspenziju Boc-dipeptida OMe-L-Phe-CO-Fn-NHBoc **(4)** (200 mg, 0.39 mmol) u suhom etil-acetatu (10 ml) ohlađenu na 0 °C uvodi se 2 sata suhi plinoviti HCl. Nakon uparavanja rezultirajući se hidroklorid suspendira u suhom diklormetanu i otopi uz dodatak NEt_3 do pH ~ 8. Ta se otopina slobodne baze doda otopini odgovarajuće aktivirane kiseline (209 mg, 0.788 mmol) u diklormetanu, prethodno aktiviranoj standardnim postupkom EDC (150 mg, 0.47mmol) i HOBt (106 mg, 0.47 mmol). Reakcijska se smjesa miješa pri sobnoj temperaturi 2-4 sata, a kopulaciju se prati tankoslojnom kromatografijom. Nastali produkt obrađuje se tako da se prvo ispere zasićenom vodenom otopinom NaHCO_3 , 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom

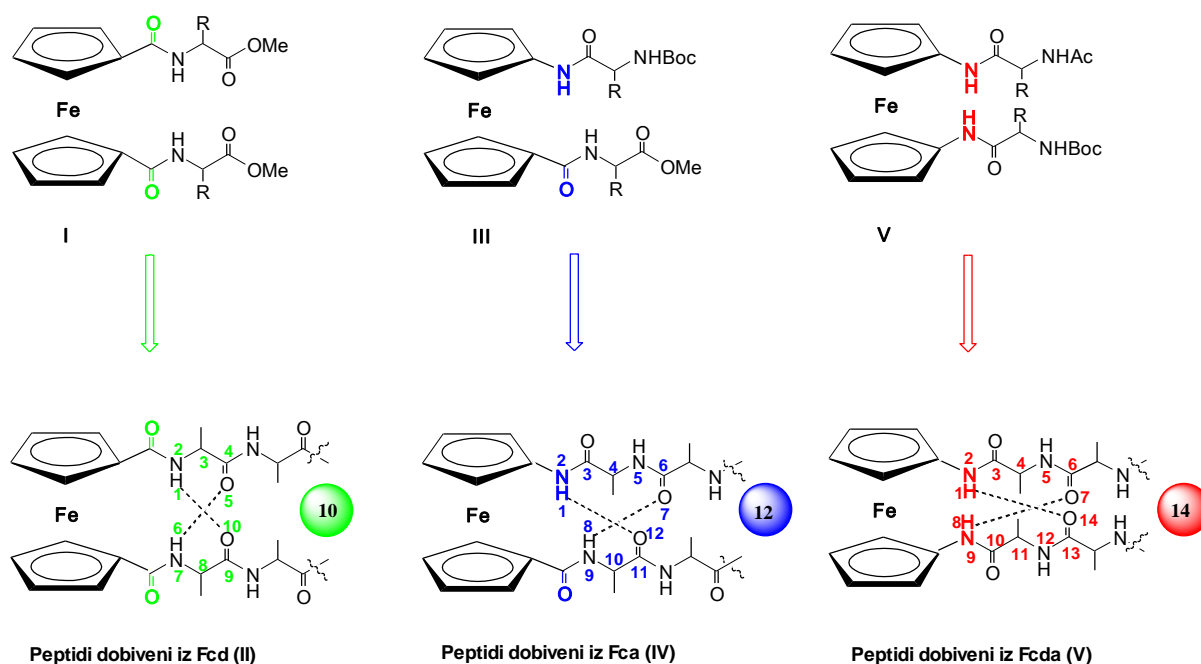
kromatografijom na silikagelu uz (CH_2Cl_2 : EtOAc = 5 : 1) kao eluens: dobiveno je 200 mg (69%) produkta kao žuta smola.

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3430 j (N–H slobodni), 3375, 3326 j (N–H asocirani), 1725 j (C=O, COOCH_3), 1692, 1648 j (C=O, CONH), 1571, 1521, 1497. **$^1\text{H-NMR}$** (CDCl_3) δ/ppm : 8.98 (s, 1H, NH_{Fn}), 7.50 (s, 1H, NH_{CO}), 7.33-7.19 (m, 5H, H_{Ar}), 5.37 (d, 1H, NH_{Boc}), 5.28 (pt, 1H, H-2, Fn), 5.21 (m, 1H, H-5, Fn), 5.08 (q, 1H, $\text{C}_{\alpha}\text{H}_{\text{Phe1}}$), 4.82 (pt, 1H, H-3, Fn), 4.49 (s, 1H, H-4, Fn), 4.47 (s, 1H, H-7, Fn), 4.34 (q, 1H, $\text{C}_{\alpha}\text{H}_{\text{Phe2}}$), 4.24 (s, 1H, H-10, Fn), 4.09 (pt, 1H, H-8, Fn), 3.95 (m, 1H, H-9, Fn), 3.77 (s, 3H, COOCH_3), 3.53-3.49 (q, 1H, $\text{C}_{\beta}\text{H}_{\text{Phe1}}$), 3.18-2.92 (q, 3H, $\text{C}_{\beta}\text{H}_{\text{Phe1}}$, $\text{C}_{\beta}\text{H}_{\text{Phe2}}$), 1.41 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$). **$^{13}\text{C-NMR}$** , APT (CDCl_3) δ/ppm : 176.30 (COOCH_3), 171.04 (NHCO), 170.83 (CONH), 156.58 ($\text{COO}t\text{Bu}$), 136.94, 136.80, 129.71, 129.19, 129.00, 128.77, 128.71, 128.58, 128.48, 127.18, 127.00, 126.91 (CH_{Ar}), 95.35 (C-6, Fn), 80.85 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 79.68 (C-1, Fn), 72.72 (C-2, Fn), 70.96 (C-5, Fn), 70.66 (C-7, Fn), 69.94 (C-10, Fn), 66.02 (C-3, Fn), 65.47 (C-4, Fn), 64.59 (C-8, Fn), 63.15 (C-9, Fn), 57.10 ($\text{C}_{\alpha}\text{Phe1}$), 53.96 ($\text{C}_{\alpha}\text{Phe2}$), 52.77 (COOCH_3), 41.78, 40.66, 40.55, 38.24 ($\text{C}_{\beta}\text{Phe}$), 28.59 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

Organometalni konjugati izvedeni iz 1,n-disupstituiranih ferocena i različitih aminokiselina (Ala, Pro, Val, Leu, Phe, Gly) opsežno su proučavani zbog njihove sposobnosti tvorbe intramolekulskih vodikovih veza (IHB) čime se induciraju različiti strukturni elementi (uzvojnice, plohe i okreti). Obrasci vodikovih veza, njihova donorsko/akceptorska svojstva, na kojima se temelji tvorba sekundarnih strukturnih elemenata u peptidima **II**, **IV** i **VI**, određeni su strukturom ferocenskog templata (Fcd, Fca, Fcda) te strukturom i apsolutnom konfiguracijom prirodnih aminokiselina: poznato je da do tvorbe 10-članih međulančanih prstenova s vodikovom vezom dolazi u konjugatima gdje Fca ili Fcd služe kao početna ferocenska osnova, gdje također nastaju i 12-člani prstenovi u konjugatima s -NH-Fn-CO- osnovom, dok je konjugacija s diamino ferocenskom osnovom inducirala tvorbu 14-članih prstenova (slika 24).



Slika 24. Simetrično disupstituirani ferocenski peptidi **II**, **IV** i **VI**

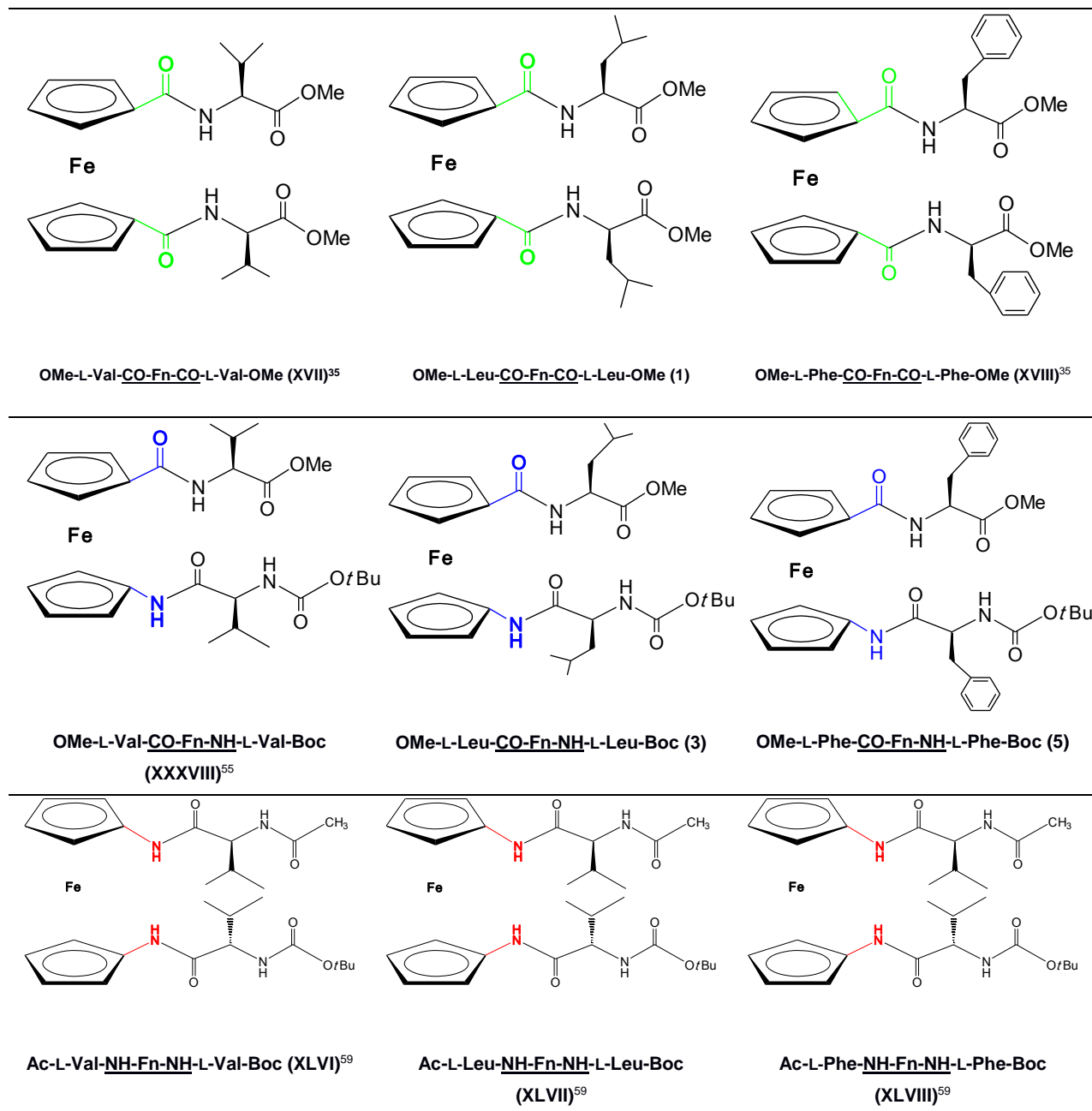


Ovaj rad nastavak je istraživanja provedenih u sklopu istraživačkog projekta IP-2020-02-9162 Hrvatske zaklade za znanost.

Želja nam je bila ustanoviti:

- utjecaj ferocenskog templata (Fcd, Fca, Fcda) na obrazac stvaranja IHB,
- utjecaj razgranatosti bočnog ogranka prirodne aminokiseline na obrazac stvaranja IHB.

Pri tome smo sintetizirali tri ciljna peptida (**1**, **3** i **5**), dok je priprava ostalih 6 provedena prema postupcima opisanim u literaturi (slika 25). Svih 9 peptida podvrgnuto je konformacijskoj analizi pri istim uvjetima da bi se rezultati mogli usporediti.



Slika 25. Prikaz pripremljenih peptida

Peptidi izvedeni iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline **XVII, 1** i **XVIII** pripremaju se standardnom aktivacijom kiseline EDC/HOBt postupkom te kopulacijom s L-Val, odnosno L-Leu, tj. L-Phe.

Ciljni tripeptidi **XXXVIII, 3** i **5** izvedeni iz Fca pripravljaju se tako da se na prsten s karboksilnom kiselinom uvede željena aminokiselina, te se nakon toga deprotektira amino-skupine iz Fca, djelovanjem plinovitog HCl-a. Dobiveni hidroklorid obradi se s Et₃N, a zatim slijedi kopulacija slobodnog ferocenskog amina s Boc-L-Val-OH, Boc-L-Leu-OH ili Boc-L-Phe-OH primjenom standardne HOBt/EDC metode, pri čemu su dobiveni tripeptidi **XXXVIII, 3** i **5**.

Sinteza ciljnih tripeptida **XLVI, XLVII** i **XLVIII** počinje deprotekcijom amino-skupine iz Fca djelovanjem plinovitog HCl. Nakon obrade nastalog hidroklorida s Et₃N uslijedila je kopulacija slobodnog ferocenskog amina s Boc-L-Val-OH, Boc-L-Leu-OH ili Boc-L-Phe-OH primjenom standardne HOBt/EDC metode pri čemu su dobiveni Boc-zaštićeni dipeptidi. Nakon pretvorbe terminalne Boc-zaštitne skupine pripremljenih dipeptida u Ac-zaštićene analoge, uslijedila je hidroliza estera na donjem ferocenskom prstenu pri čemu su nastale kiseline koje se prevode u azide. Curtiusovom pregradnjom one daju Boc-zaštićene amine, a završni korak obuhvaća deprotekciju Boc-zaštićene amino-skupine s donjeg prstena te njezinu kondenzaciju s Boc-L-Val-OH, Boc-L-Leu-OH ili Boc-L-Phe-OH.

Primjenom opisanog postupka pripravili smo ciljne peptide tipa **II, IV** i **VI** (slika 25) u visokom iskorištenju u kojima su L-aminokiseline vezane na različite ferocenske template (Fcd, Fca i Fcda).

4.2. Sinteza i konformacijska analiza ferocenskih peptida tipa II, IV i VI

4.2.1. Sinteza peptida II (XVII, 1, XVIII), IV (XXXVIII, 3, 5) i VI (XLVI, XLVII, XLVIII)

Kao što je prethodno naglašeno, u ovom radu opisana je priprava triju peptida (**1, 3** i **5**), dok je prema literaturnim postupcima ponovljena sinteza za **XVII**³⁵ i **XVIII**³⁵, **XXXVIII**⁵⁵, te **XLVI**⁵⁹, **XLVII**⁵⁹ i **XLVIII**⁵⁹. Svi literaturni spektroskopski podaci odgovaraju pripremljenim peptidima.

Uvođenje leucina i fenilalanina očituje se u ¹H- i ¹³C-NMR-spektrima peptida **1, 3** i **5** karakterističnim signalima njihovih metilnih, odnosno metinskih te fenilnih protona, dok se

karbonilna skupina iz novonastale peptidne veze spojeva registrira signalom pri $\delta \sim 170$ ppm. U protonskim spektrima javlja se dodatni signal amidnog protona iz peptidne veze pri $\sim 9-6$ ppm, ovisno o njegovom angažmanu u vodikovoj vezi. Svi karakteristični signali vidljivi su iz NMR spektara. Svi spojevi dobiveni su u visokom iskorištenju (preko 60%).

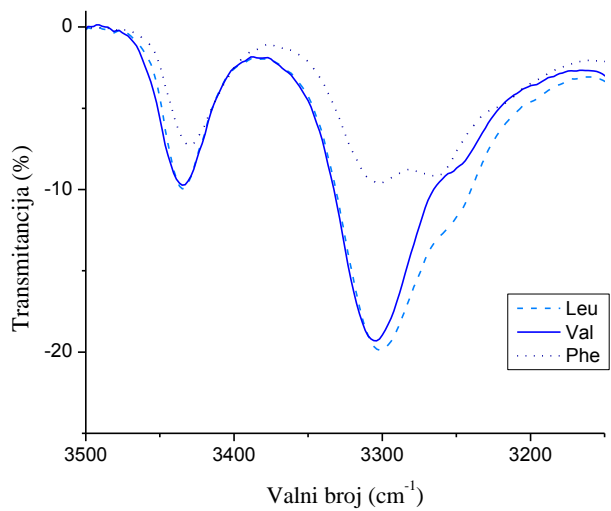
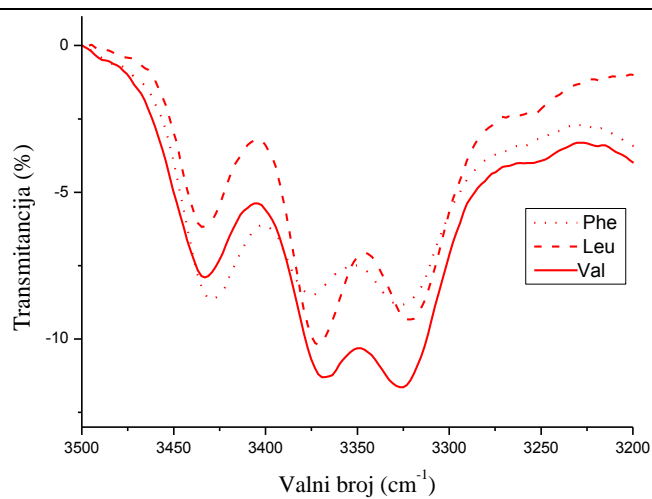
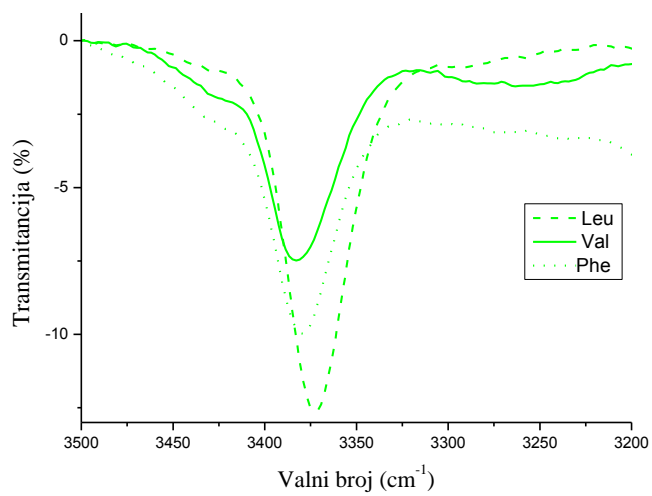
4.2.2. IR-spektroskopska analiza peptida II (XVII, 1, XVIII), IV(XXXVIII, 3, 5) i VI(XLVI, XLVII, XLVIII)

Infracrvena spektroskopija (IR) instrumentalna je metoda koja mjeri valnu duljinu i intenzitet apsorpcije infracrvenog zračenja te, identifikacijom funkcijskih skupina peptida, daje pouzdan uvid u konformacijski prostor peptida u otopini.⁶¹ Istezne frekvencije iznad 3400 cm^{-1} pripisuju se slobodnim NH-skupinama, dok istezne frekvencije NH-skupina u području nižem od 3400 cm^{-1} ukazuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama (tablica 1, tablica 2).

U diklormetanskim otopinama svih devet tripeptida ($c = 5 \times 10^{-2}$ M) opažena su dva seta signala u području isteznih vibracija NH-skupina, pri čemu dominiraju signali asociranih NH-skupina ($< 3400\text{ cm}^{-1}$) (tablica 1). Iz grafa na kojem su prikazane istezne vibracije u području NH-skupina peptida pripremljenih iz Fcd, vidljivo je da su gotovo sve NH-skupine asocirane.

Apsorpcijske vrpce karbonilnih esterskih skupina ispod 1730 cm^{-1} , indiciraju njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama. Ukoliko i uretanske karbonilne skupine apsorbiraju pri valnim duljinama nižim od 1700 cm^{-1} onda je također indicirano njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama (tablica 2).¹² Uretanske karbonilne skupine svih konjugata apsorbiraju pri nižim valnim duljinama čime je indicirana njihova uloga akceptora vodikove veze. Isto tako, Položaj apsorpcijskih vrpca esterskih skupina peptida II i IV ($< 1730\text{ cm}^{-1}$) dopušta mogućnost njihovog sudjelovanja u IHB.

Tablica 1. IR spektri peptida II, IV i VI u NH-području

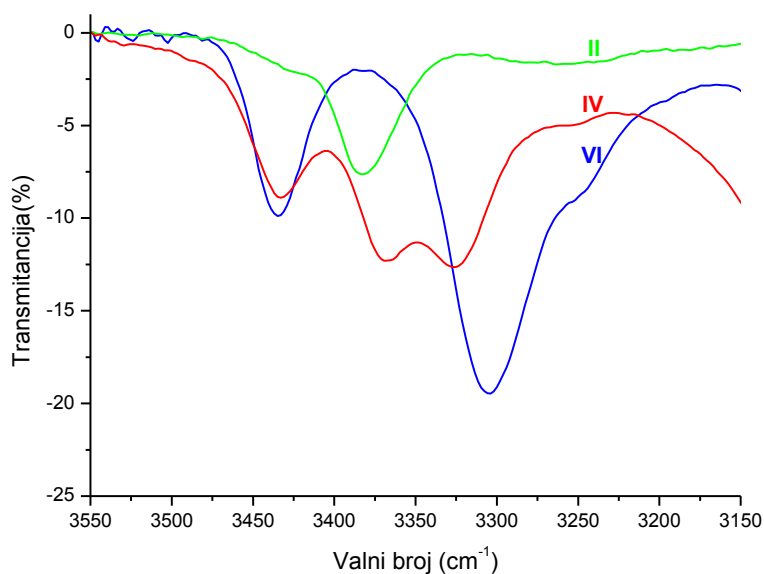


Tablica 2. Istezne vibracije^[a] NH- i CO-skupina peptida II, IV i VI

Spoj	Formula	ν_{NH} (slob.) ^[b]	ν_{NH} (asoc.) ^[c]	ν_{CO} (amid I)	ν_{CO} (amid II)
XVII	OMe-L-Val- <u>CO-Fn-CO</u> -L-Val-OMe	3430	3389	1729	1649 1531
1	OMe-L-Leu- <u>CO-Fn-CO</u> -L-Leu-OMe	3429	3372	1729	1650 1536
XVIII	OMe-L-Phe- <u>CO-Fn-CO</u> -L-Phe-OMe	3434	3378	1730	1650 1533
XXXVIII	OMe-L-Val- <u>CO-Fn-NH</u> -L-Val-Boc	3433	3369 3326	1720	1693 1647 1568 1520
3	OMe-L-Leu- <u>CO-Fn-NH</u> -L-Leu-Boc	3434	3372 3322	1724	1694 1646 1571
5	OMe-L-Phe- <u>CO-Fn-NH</u> -L-Phe-Boc	3430	3375 3326	1725 1692	1648 1571 1521 1497
XLVI	Ac-L-Val- <u>NH-Fn-NH</u> -L-Val-Boc	3422	3324	1710	1683 1636 1534 1498
XLVII	Ac-L-Leu- <u>NH-Fn-NH</u> -L-Leu-Boc	3425	3320	1708	1685 1654 1534
XLVIII	Ac-L-Phe- <u>NH-Fn-NH</u> -L-Phe-Boc	3416	3324	1709	1685 1640 1535

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

Da bi se zaključilo koja ferocenska okosnica pogoduje asocijaciji NH-skupina, na slici 26 prikazani su peptidi dobiveni kopulacijom valina s tri ferocenske osnove. Vidljivo je da tvorbi vodikovih veza najviše pogoduje diaminska osnova, budući da je pri istoj koncentraciji, udio asocirane vrpce najveći. Sljedeći templat pogodan za tvorbu IHB je Fca, dok je zadnja Fcd, iako i ona sadržava najveći broj asociranih NH-skupina.



Slika 26. NH-područje peptida **XVII**, **XXXVIII** i **XLVI**

Da bi se vodikove veze dodatno karakterizirale (inter- ili intramolekulska asocijacija), potrebno je izmjeriti koncentracijski-ovisne IR-spektre. Naime, postupnim razrjeđivanjem otopine ispitivanog uzorka cijepaju se intermolekulske vodikove veze uslijed čega uočljivo opada intenzitet njihovih signala u području nižem od 3400 cm⁻¹. Ukoliko su, pak, u molekuli prisutne intramolekulske vodikove veze njihov intenzitet razrjeđivanjem slabi proporcionalno slabljenju signala slobodne NH-skupine.

Da bi se utvrdio karakter asociranih amino-skupina u našim tripeptidima, pristupilo se opisanom mjerenju koncentracijski ovisnih IR-spektara. Postupnim smanjenjem koncentracije uzoraka, dolazi do proporcionalnog slabljenja signala kako asociranih tako i slobodnih NH-skupina. Takvi rezultati sugeriraju **intramolekulski** karakter vodikovih veza u svim pripremljenim peptidima.

4.2.3. NMR-spektroskopska analiza peptida II (XVII, 1, XVIII), IV (XXXVIII, 3, 5) i VI (XLVI, XLVII, XLVIII)

Nuklearna magnetska rezonanca (NMR) metoda je koja omogućava određivanje kemijske strukture molekula, ali i omogućuje jasniji uvid u obrasce vodikovih veza, koji se prethodno predlažu IR-spektroskopijom. Ova metoda omogućuje razlikovanje pojedinih NH-skupina u molekuli, na temelju njihovih kemijskih pomaka. Na taj se način može utvrditi sudjeluju li u pojedine NH-skupine u vodikovim vezama, stoga ako NH-skupina ima kemijski pomak iznad 7 ppm, takva je skupina asocirana NH-skupina (sudjeluje u vodikovim vezama).

Karakteristika svih konjugata jest visok kemijski pomak amidnih protona izravno ili neposredno vezanih za ferocensku jezgru što indicira njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama. Obzirom da se aminokiselinska NH-skupina (NH_{Ac} i NH_{Boc}) peptida registrira pri višem polju ($\delta < 7$ ppm), upitan je njihov donorski angažman u HB (tablica 3).

Peptidi tipa II, koji peptidnu vezu s aminokiselinama Val, Leu ili Phe tvore preko karbonilne skupine uz ferocen, pokazuju nešto niži kemijski pomak ($\delta < 8,0$ ppm) od peptida IV i VI gdje je NH skupina vezana izravno na ferocen ($\delta > 9,0$ ppm).

Tablica 3. Kemijski pomaci (δ/ppm)^[a] amidnih protona peptida II, IV i VI

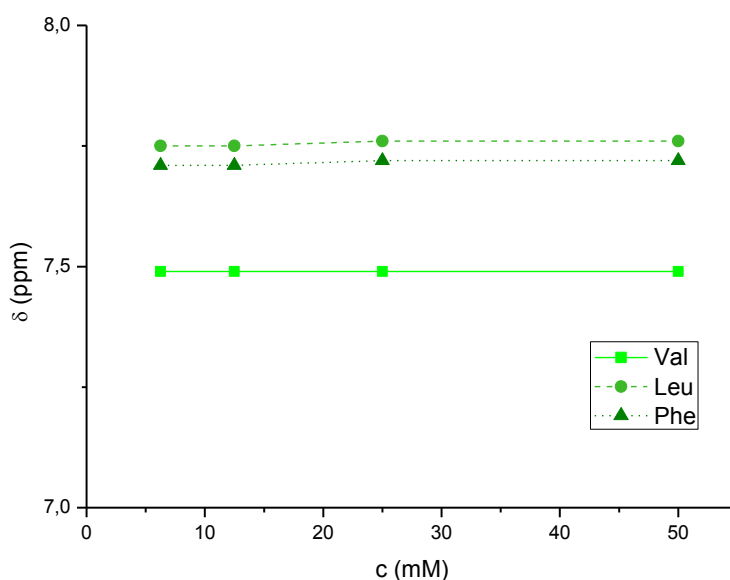
Spoj	Formula	(NH_{Co}) δ (ppm)	(NH_{Fna}) δ (ppm)	(NH_{Fnb}) δ (ppm)	(NH_{Ac}) δ (ppm)	(NH_{Boc}) δ (ppm)
XVII	OMe-L-Val-CO-Fn-CO-L-Val-OMe	7.49				
1	OMe-L-Leu-CO-Fn-CO-L-Leu-OMe	7.76				
XVIII	OMe-L-Phe-CO-Fn-CO-L-Phe-OMe	7.72				
XXXVIII	OMe-L-Val-CO-Fn-NH-L-Val-Boc	7.5	9.01			5.11
3	OMe-L-Leu-CO-Fn-NH-L-Leu-Boc	7.62	9.33			5.01
5	OMe-L-Phe-CO-Fn-NH-L-Phe-Boc	7.5	8.98			5.2
XLVI	Ac-L-Val-NH-Fn-NH-L-Val-Boc		9.21	9.04	6.75	5.21
XLVII	Ac-L-Leu-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc		9.38	9.16	7.3	5.16

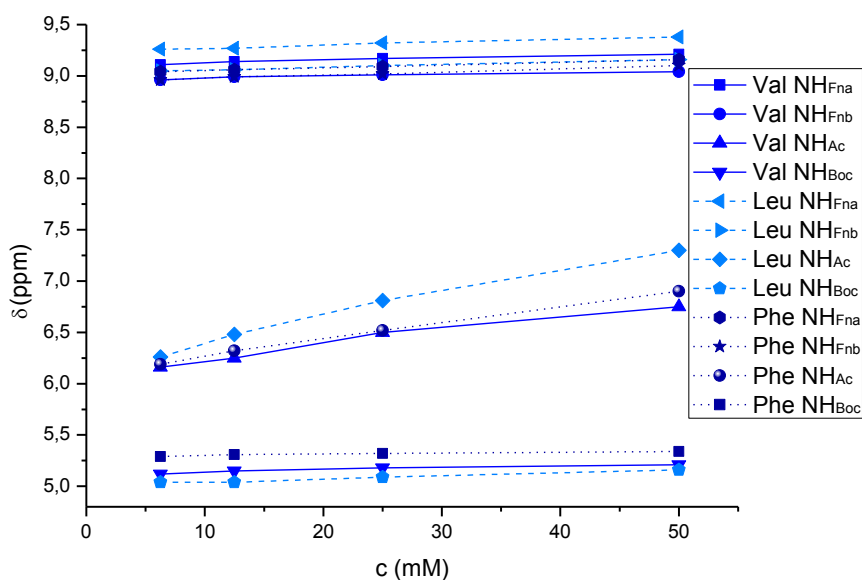
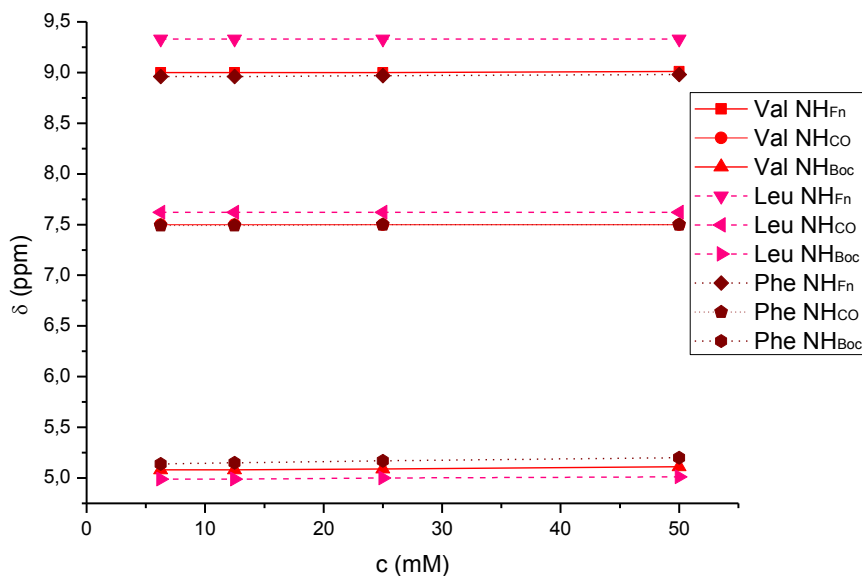
XLVIII	Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc		9.16	9.1	6.9	5.34
---------------	------------------------------------	--	------	-----	-----	------

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

U prethodnom smo poglavlju na temelju koncentracijski-neovisnih IR-spektara pretpostavili *intramolekulski karakter vodikovih veza* u peptidima **II**, **IV** i **VI** koji će se u nastavku pokušati dodatno potvrditi mjerenjima koncentracijski- i temperaturno-ovisnih ¹H-NMR spektara. Pri tome treba znati da se razrjeđivanjem ili zagrijavanjem cijepaju intermolekulske vodikove veze što uzrokuje pomak amidnih protona u više polje. Kako je vidljivo iz grafova iz tablice 4 postupnim smanjivanjem koncentracije u CDCl₃ nije došlo do značajnijih promjena kemijskih pomaka NH-skupina, pa je intramolekulski karakter vodikovih veza, predložen IR-spektroskopijom, dodatno potvrđen (tablica 4).

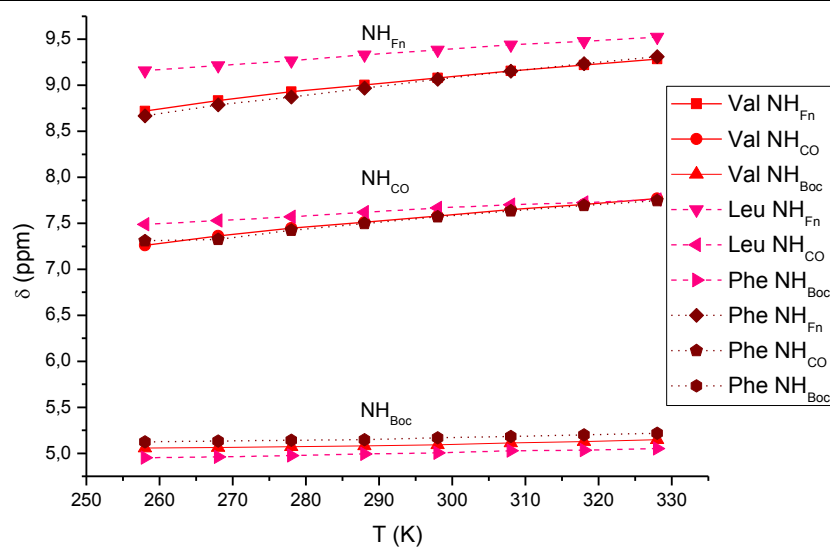
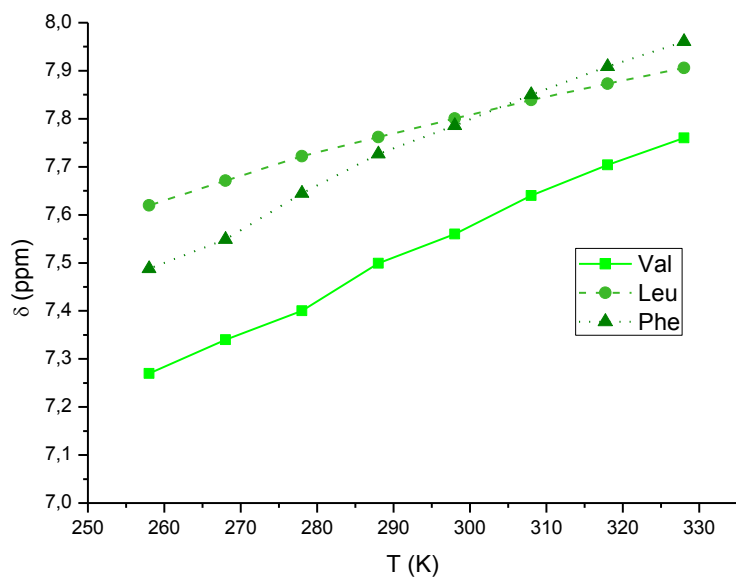
Tablica 4. Koncentracijska ovisnost amidnih protona peptida [gore: **II**, sredina: **IV**, dolje: **VI**]

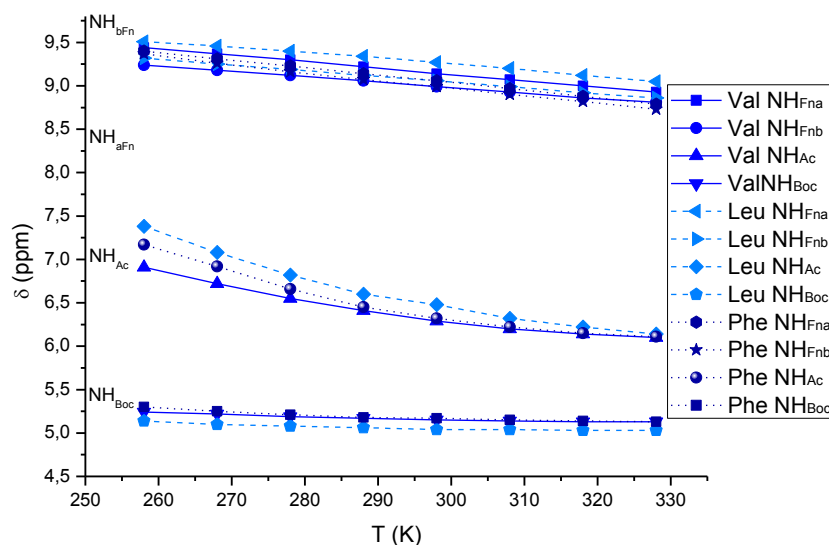




Nadalje, da bi se potvrdio *intramolekulski karakter vodikovih veza* u peptidima **II**, **IV** i **VI** provedeno je temperaturno-ovisno snimanje 12,5 mM otopine tripeptida u CDCl_3 u rasponu od 250-330 K (tablica 5). U našim prethodnim istraživanjima utvrdili smo da zagrijavanjem otopina peptida u rasponu od 250-330 K, kemijski pomaci slobodnih amidnih protona ili onih koji su uključeni u tvorbu IHB ostaju jednaki ili se neznatno mijenjaju- ta promjena u rasponu razlike u pomaku protona iznosi do 0.3 ppm. Ukoliko amidni protoni sudjeluju u intermolekulskim vodikovim vezama, promjena kemijskog pomaka je zamjetnija i iznosi $\Delta\delta \sim 1\text{-}4$ ppm.

Tablica 5. Temperaturna ovisnost amidnih protona peptida [gore: **II**, sredina: **IV**, dolje: **VI**]





Iz grafova temperaturene ovisnosti peptida **II**, vidljivo je da je promjena kemijskih pomaka NH svih triju peptida neznatna ($\Delta\delta < 0.4$ ppm), neovisno o konstituirajućoj aminokiselini, pa je potvrđen *intramolekulski* karakter vodikovih veza u ovoj vrsti peptida.

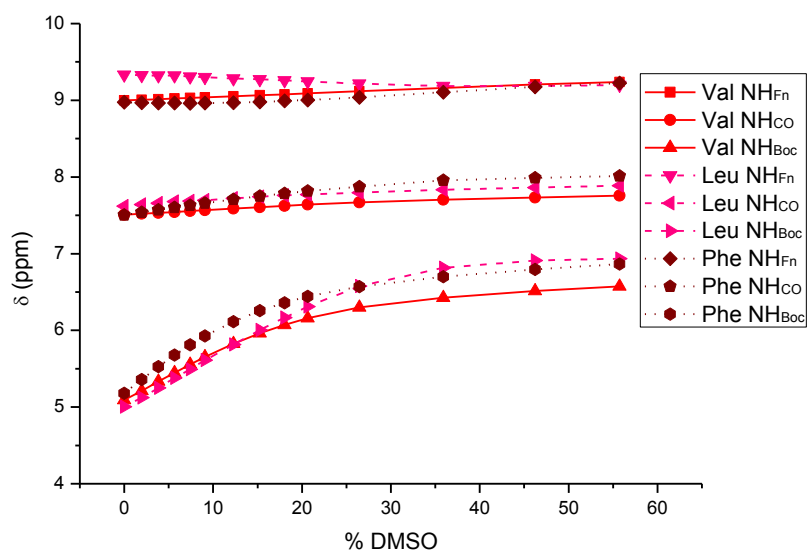
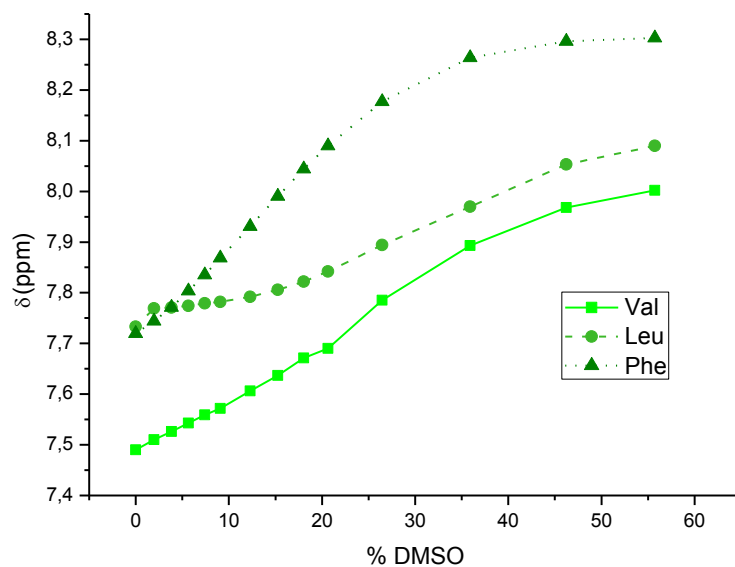
Ista razlika u pomaku amidnih protona vidljiva je i iz grafa temperaturene ovisnosti peptida tipa **IV**, kao i peptida tipa **VI**, pa je i za njih predložen intramolekulski angažman vodikovih veza.

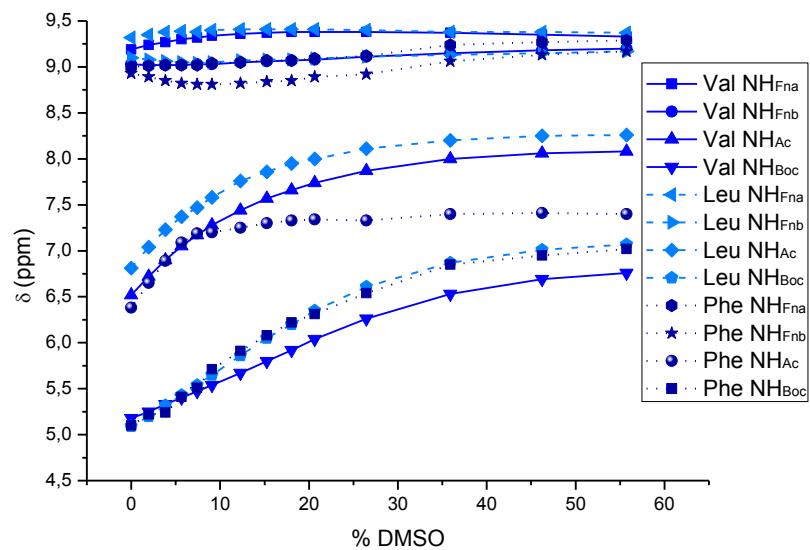
Jakost IHB, na čiju tvorbu upućuju naprijed opisani rezultati IR- i NMR-analize, ispitana je titracijom s DMSO. Pri tome se očekuje značajan pomak u niže polje onih NH-protona koji su izloženi polarnom DMSO. S druge strane, ne očekuju se značajnije promjene kemijskih pomaka NH-protona doniranih u jake vodikove veze (tablica 6).

Titracijom 12,5 mM otopina peptida **II**, **IV** i **VI** u CDCl_3 s kompeticijskim otapalom (0-40% DMSO) ispitana je jakost pretpostavljenih IHB. Vidljivo je da u prisutnosti DMSO dolazi do značajnih promjena NH iz **II**, te NH koje potječu iz zaštitnih skupina aminokiselina u peptidima **IV** i **VI** ($\Delta\delta > 0,6$ ppm) neovisno o aminokiselini, pa je indicirano njihovo sudjelovanje u slabim IHB.

Za razliku od njih, kod amidnih protona (NH_{Fn} , NH_{Fna} , NH_{Fnb}) koji se nalaze u nižem polju, te su izravno vezani na ferocensku jezgru, ne dolazi do promjene u kemijskom pomaku dodatkom DMSO, pa je za njih pretpostavljeno sudjelovanje u jakim intramolekulskim vodikovim vezama.

Tablica 6. Titracija peptida s DMSO [gore: II, sredina: IV, dolje: VI]





Svi naprijed opisani rezultati sugeriraju prisutnost IHB u peptidima **II**, **IV** i **VI**. Naime, IR-apsorpcijske vrpce karbonilnih esterskih i karbamatnih skupina indikacija su njihovog angažmana u vodikovim vezama, dok NMR-analiza upućuje na sudjelovanje NH-skupina vezanih na ferocen u jakim intramolekulskim vodikovim vezama.

4.2.4. CD-spektroskopska analiza peptida II (XVII, 1, XVIII), IV(XXXVIII, 3, 5) i VI(XLVI, XLVII, XLVIII)

Cirkularni dikroizam (CD) spektroskopska je metoda koja omogućuje određivanje sekundarnih strukturnih elemenata u kiralnim peptidima. Ako se u kiralno peptidno okruženje uvede ferocenski kromofor ($\lambda \sim 480$ nm), a prisutne su i jake IHB, inducira se Cottonov efekt, na čiji predznak utječu zaštitne skupine, otapalo te vrsta i slijed vezanih prirodnih aminokiselina. Poznato je da vodikove veze induciraju kiralno uređenje oko ferocenskog kromofora ($\lambda \sim 480$ nm), stoga se očekuje CD-aktivnost analiziranih peptida.

Kako su IR- i NMR-analize pripremljenih peptida II, IV i VI ukazale na tvorbu interlančanih IHB, CD-analizom smo istražili moguću heličnu kiralnost ispitanih peptida (tablica 7).

Tablica 7. UV/Vis-signal i Cottonovi efekti u peptidima II, IV i VI

Spoj	Formula	[θ] / deg cm ² dmol ⁻¹	
		CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂ + DMSO
XVII	OMe-L-Val-CO-Fn-CO-L-Val-OMe	4449	3779
1	OMe-L-Leu-CO-Fn-CO-L-Leu-OMe	5595	5032
XVIII	OMe-L-Phe-CO-Fn-CO-L-Phe-OMe	2683	2577
XXXVIII	OMe-L-Val-CO-Fn-NH-L-Val-Boc	9923	5364
3	OMe-L-Leu-CO-Fn-NH-L-Leu-Boc	10515	8530
5	OMe-L-Phe-CO-Fn-NH-L-Phe-Boc	6663	3284
XLVI	Ac-L-Val-NH-Fn-NH-L-Val-Boc	25958	21125
XLVII	Ac-L-Leu-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc	21828	18709
XLVIII	Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc	15001	10994

^[a]CD-spektri mjereni su u CH₂Cl₂ ($c = 5 \times 10^{-3}$ M) i uz dodatak 20 % DMSO

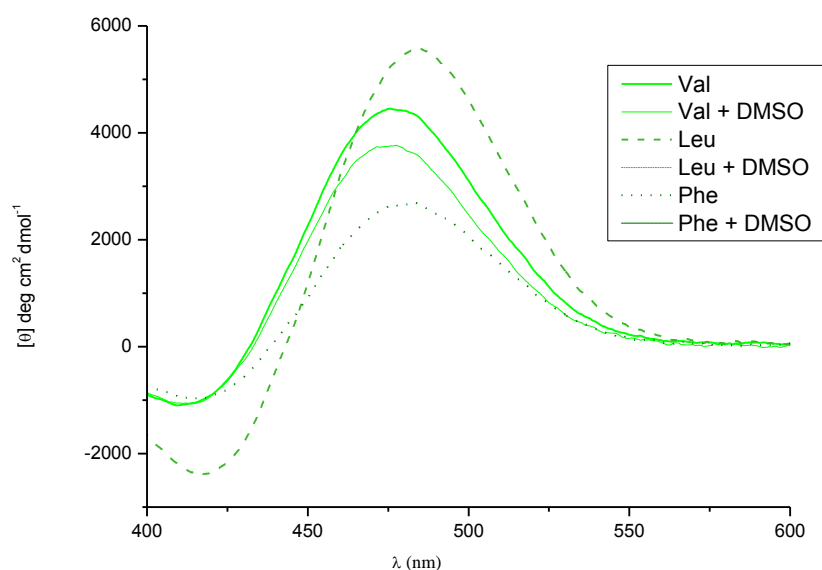
Kako je vidljivo iz tablice 7, svi peptidi pokazuju pozitivni Cottonovi efekti u CD-spektrima u području ferocenskog kromofora te potvrđuju visokouređenu kiralnu okolinu, odnosno

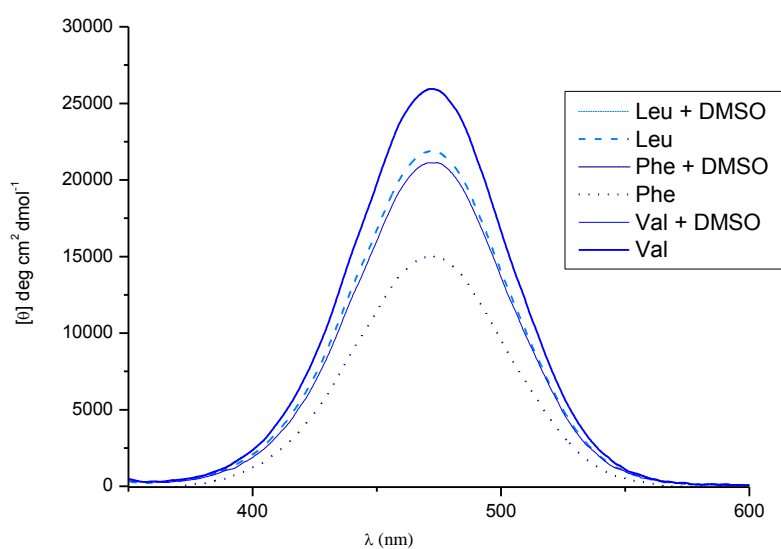
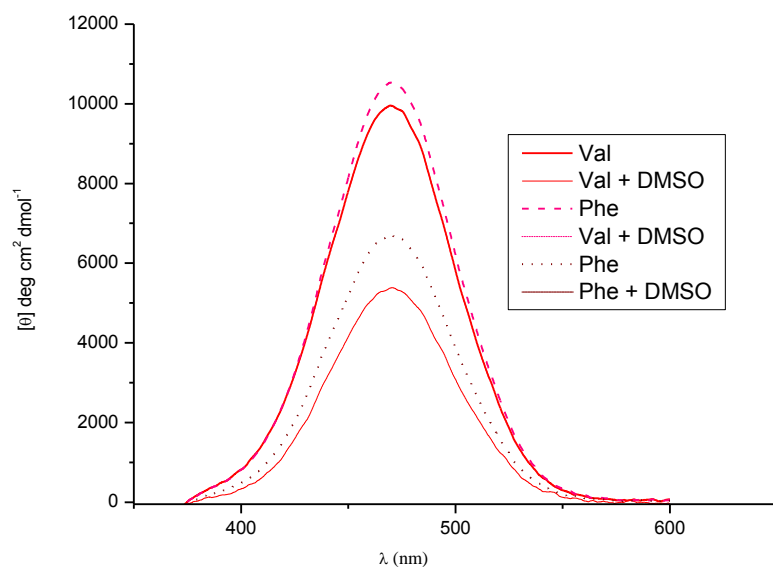
indicičaju tvorbu stabilne *P*-uzvojnice. Zanimljivo je da upravo peptidi tipa **VI**, koji su pokazali tvorbu jačih IHB, imaju uočljivo viši Cottonov efekt nego peptidi **IV**, a posebno peptidi **II**. Također se može zaključiti da svi peptidi s konstituirajućom aminokiselinom fenilalaninom, imaju slabije izražene Cottonove efekte nego manje razgranate aminokiseline valin i leucin, što ukazuje na moguće ometanje kiralnog uređenja zbog sterički zahtjevne fenilne skupine u bočnom ogranku.

Titracija 5 mM otopine peptida s kompeticijskim otapalom (DMSO) omogućuje ispitivanje jakosti prisutnih IHB-a. Ukoliko u otopini postoje visokouređene strukture, dodatak DMSO-a neće zamjetno utjecati na intenzitet Cottonovog efekta.

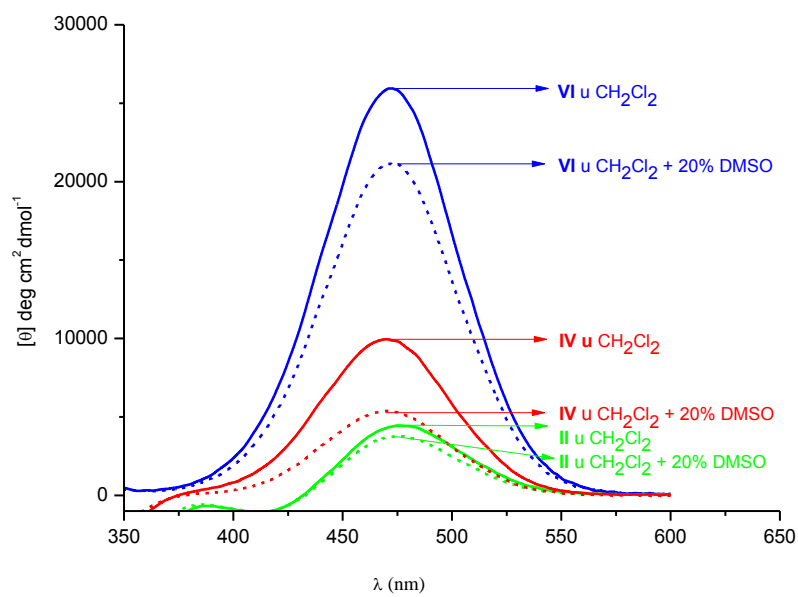
DMSO (20%) uzrokuje slabljenje Cottonova efekta do 16% u peptidima tipa **II**, puno zamjetnije slabljenje u peptidima tipa **IV** (50%), dok u peptidima tipa **VI** Cottonov efekt se smanjuje do 25% (tablica 7, tablica 8).

Tablica 8. Cottonovi efekti u CD-spektrima peptida **II**, **IV** i **VI**





Da bi vjernije prikazali koliko ferocenski templat utječe na kiralno uređenje pripremljenih peptida, na slici 27 prikazani su valinski derivati peptida **II**, **IV** i **VI**. Vidljivo je da peptidi tipa **VI**, izvedeni iz diamina pokazuju gotovo pet puta veći Cottonov efekt nego peptidi **II** izvedeni iz dikiseline.



Slika 27. Cottonovi efekti u CD-spektrima valinskih peptida **II**, **IV** i **VI** u diklormetanu [$c = 5 \times 10^{-3} \text{M}$ (puna crta)] i uz dodatak 20 % DMSO (isprekidana crta).

§ 5. ZAKLJUČCI

5.1. Zaključci

U ovom radu opisana je sinteza tri nova ferocenska peptida **1**, **3** i **5**, te je napravljena konformacijska analiza peptida tipa **II**, **IV** i **VI** s konstituirajućim hidrofobnim aminokislinama Val, Leu i Phe:

- ✓ Ciljni peptidi pripremljeni su u izvrsnim iskorištenjima do 90%.
- ✓ U IR-spektrima svih peptida ($c = 5 \times 10^{-2}$ M) vidljiva su dva seta signala u području isteznih vibracija NH-skupina pri čemu dominiraju signali asociiranih NH-skupina.
- ✓ Koncentracijski-ovisna IR-spektroskopija peptida ukazuje na karakter asocijacija NH-skupina: dolazi do ravnomjernog slabljenja intenziteta apsorpcijskih vrpca i slobodnih i asociiranih NH-skupina, pa zaključujemo da se radi o *intramolekulskim vodikovim vezama* (IHB).
- ✓ Visok kemijski pomak amidnih protona (NH_{CO}) peptida **IV** te (NH_{Fn1} i NH_{Fn2}) peptida **VI** ($\delta > 8$ ppm), ukazuje na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.
- ✓ Aminokiselinske NH-skupine tj. NH skupine iz zaštitnih skupina (NH_{Ac} i NH_{Boc}) registriraju se pri višem polju ($\delta < 7$ ppm) pa je upitna njihova donorska uloga u HB.
- ✓ Intramolekulski karakter vodikovih veza potvrđen je NMR-spektroskopskom analizom, pri čemu su se kemijski pomaci NH_{Fn} i NH_{CO} atoma pokazali koncentracijski i temperaturno neovisnima.
- ✓ Jakost intramolekulskih vodikovih veza (IHB) testirana je titracijom NMR-uzoraka s kompeticijskim otapalom (DMSO), pri čemu nije uočena značajnija promjena kemijskih pomaka NH_{Fn} -atoma, što je indicacija njihovog sudjelovanja u jakim IHB.
- ✓ Amidni protoni peptida **II** su temperaturno ovisni, te prilikom titracije s DMSO pokazuju veliku razliku u kemijskom pomaku pa se može zaključiti da sudjeluju u slabim IHB.
- ✓ Pozitivni Cottonovi efekti u CD-spektrima u području ferocenskog kromofora potvrđuju visokouređenu kiralnu okolinu svih peptida, odnosno indicira tvorbu stabilne *P*-uzvojnice.
- ✓ Za razliku od peptida **IV** i **VI**, peptidi **II** pokazuju slabiji Cottonov efekt što ukazuje na slabije uređenu kiralnu sredinu.

§ 6. ZAHVALA

Najprije bismo željeli izraziti svoju iskrenu zahvalnost Laboratoriju za organsku kemiju Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a posebice Voditeljici projekta u sklopu kojeg je izraden ovaj Rad, prof. dr. sc. Lidiji Barišić, na podršci koju smo primili tijekom našeg istraživanja i izrade ovog znanstvenog rada.

Također bismo htjeli istaknuti i zahvaliti dr. sc. Sunčici Roci za njezinu dragocjenu pomoć pri izradi i tumačenju NMR-spektara.

Posebnu zahvalnost i poštovanje iskazujemo našoj izvanrednoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Moniki Kovačević, koja nas je svojom predanošću, stručnošću i vedrom energijom nadahnula i motivirala tijekom svih faza izrade ovog izazovnog znanstvenog projekta. Njezina strpljivost, podrška i prijateljstvo uvijek su nam pomagali da nastavimo, a znanje, savjeti i iskustvo postavili divan primjer za daljnji razvoj.

Lovro, Jana i Klara

§ 7. LITERATURA

1. Barišić L. (2018) Osnove bioorganometalne kemije. Nastavni materijal preuzet s Merlina.
2. Werner H. (2012) At least 60 years of Ferrocene: The Discovery and Rediscovery of the Sandwich Complexes. *Angewandte Chemie International Edition* **51**: 6052–6058.
3. Fischer E. O., Jira R. (2001) An early drawing of the chemical structure of ferrocene. *J. Organomet. Chem.* **637–639**: 7–12.
4. Cantrill S. (2014), An iron-clad structure, Ferrocene, *Nature* **511**: 11.
5. Harrison, K, 3d struktura, 3DChem.com
6. Astruc, D. (2017) Why is Ferrocene so Exceptional? *European Journal of Inorganic Chemistry* **2017**: 6–29.
7. Barišić L. (2018) Peptidni mimetici i pseudopeptidi. Nastavni materijal preuzet s Merlina.
8. Jerić I. (2004) Peptide Mimetics: Why and How? *Kem. Ind.* **53(11)**: 495–504.
9. Berg J. M., Tymoczko J., Stryer L. (2013) Biokemija, 1. izd., Školska knjiga.
10. Kovačević M., Kodrin I., Cetina M., Kmetič I., Murati T., Čakić-Semenčić M., Roca S., Barišić L. (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.
11. Kirin S. I., Kraatz H. B., Metzler-Nolte N. (2006) Systematizing structural motifs and nomenclature in 1, n'-disubstituted ferrocene peptides. *Chem. Soc. Rev.* **35(4)**: 348–354.
12. Kovačević M. (2014) Ferrocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima. Doktorski rad. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet.
13. Bellesia G., Jewett A. I., Shea J. E. (2010) Sequence periodicity and secondary structure propensity in model proteins. *Protein Science* **19(1)**: 141–154.

14. (a) Bali J., Gheinani A. H., Zurbriggen S., Rajendran L. (2012) Role of genes linked to sporadic Alzheimer's disease risk in the production of β -amyloid peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109(38)**: 15307–15311. (b) Jang H., Arce F. T., Ramachandran S., Capone R., Azimova R., Kagan B. L., Nussinov R., Lal R. (2010) Truncated beta-amyloid peptide channels provide an alternative mechanism for Alzheimer's Disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107(14)**: 6538–6543. (c) Lansbury P. T. Jr. (1996) *Acc. Chem. Res.* **29**: 317–321. (d) Berchtold L. A., Størling Z. M., Ortis F., Lage K., Berthelsen C. B., Bergholdt R., Hald J., Brorsson C. A., Eizirik D. L., Pociot F., Brunak S., Størling J. (2011) Huntingtin-interacting protein 14 is a type 1 diabetes candidate protein regulating insulin secretion and -cell apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**: E681–E688. (e) Chen S., Ferrone F. A., Wetzel R. (2002) Huntington's disease age-of-onset linked to polyglutamine aggregation nucleation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 11884–11889. (f) Marzban L., Verchere C. B. (2004) *Diabetes* **28**: 39–47. (g) Petersen K. F., Dufour S., Morino K., Yoo P. S., Cline G. W., Shulman G. I. (2012) The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**: 8236–8240. (h) Ng S. B. L., Doig A. J. (1997) *Chem. Soc. Rev.* **26**: 425–432. (i) Prusiner S. B. (1998) Prions *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 13363–13383.
15. Bera S., Jana P., Maity S. K., Haldar D. (2014) Inhibition of fibril formation by tyrosine modification of diphenylalanine: crystallographic insights. *Crystal Growth Design* **14(3)**: 1032–1038.
16. Azriel R., Ehud G. J. (2001) Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide. An experimental support for the key role of the phenylalanine residue in amyloid formation. *Biol. Chem.* **276(36)**: 34156–34161.
17. Platt G. W., Routledge K. E., Homans S. W., Radford S. E. (2008) Fibril Growth Kinetics Reveal a Region of β 2-microglobulin Important for Nucleation and Elongation of Aggregation. *J. Mol. Biol.* **378(1)**: 251–263.
18. Marshall K. E., Morris K. L., Charlton D., O'Reilly N., Lewis L., Walden H., Serpell L. C. (2011) Hydrophobic, aromatic, and electrostatic interactions play a central role in amyloid fibril formation and stability. *Biochemistry* **50(12)**: 2061–2071.
19. Tenidis K., Waldner M., Bernhagen J., Fischle W., Bergman M., Weber M., Merkle M., Voelter W., Brunner H., Kapurniotu A. (2000) Identification of a penta-

- and hexapeptide of islet amyloid polypeptide (IAPP) with amyloidogenic and cytotoxic properties. *J. Mol. Biol.* **295(4)**:1055–1071.
20. Bowerman C. J., Liyanage W., Federation A. J., Nilsson B. L. (2011) Tuning β -sheet peptide self-assembly and hydrogelation behavior by modification of sequence hydrophobicity and aromaticity. *Biomacromolecules* **12**: 2735–2745.
21. a) Soto C., Sigurdsson E. M., Morelli L., Kumar R. A., Castano E. M., Frangione B. (1998) Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat. Med.* **4 (7)**: 822–826; b) Soto C. (2001) Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS Lett.* **498**: 204–207.
22. Gupta M., Acharya R., Mishra A., Ramakumar S., Ahmed F., Chauhan V. S. (2008) Dehydrophenylalanine (DeltaPhe) as a beta breaker: Extended structure terminated by a DeltaPhe-induced turn in the pentapeptide Boc-Phe1-Ala2-Ile3-DeltaPhe4-Ala5-OMe. *Chembiochem. ChemBioChem* **9**: 1375–1378.
23. Tang C., Ulijn R. V., Saiani A. (2013) Self-assembly and gelation properties of glycine/leucine Fmoc-dipeptides *Eur. Phys. J. E.* **36**: 111–122.
24. Pasc A., Akong F. O., Cosgun S., Gérardin C., Beilstein J. (2010) Differences between β -Ala and Gly-Gly in the design of amino acids-based hydrogels. *Org. Chem.* **6**: 973–977.
25. Chen C., Gu Y., Deng L., Han S., Sun X., Chen Y., Lu J. R., Xu H. (2014) Tuning gelation kinetics and mechanical rigidity of β -hairpin peptide hydrogels via hydrophobic amino acid substitutions. *Appl. Mater. Interfaces* **6(16)**: 14360–14368.
26. Sun Z., Li Z., He Y., Shen R., Deng L., Yang M., Liang Y., Zhang Y. (2013) Ferrocenoyl phenylalanine: a new strategy toward supramolecular hydrogels with 6 multistimuli responsive properties. *J. Am. Chem. Soc.* **136**: 13379–13386.
27. Chin W., Piuze F., Dognon J. P., Dimicoli I., Mons M. (2005) Gas-phase models of γ turns: Effect of side-chain/backbone interactions investigated by IR/UV spectroscopy and quantum chemistry. *J. Chem. Phys.* **123**, 084301–084302.

28. Dutt A., Fröhlich R., Pramanik A. (2005) β -Turn mimic in tripeptide with Phe(1)-Aib(2) as corner residues and β -strand structure in an isomeric tripeptide: an X-ray diffraction study. *Org. Biomol. Chem.* **3**: 661–665.
29. Dokmaisrijan S., Lee V. S., Nimmanpipug P. (2010) The gas phase conformers and vibrational spectra of valine, leucine and isoleucine: An ab initio study. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **953**: 28–38.
30. Padyana A. K., Ramakumar S., Mathumar P., Jagannathan N. R., Chauhan V. S. (2003) Role of a two-residue spacer in an α , β didehydrophenylalanine containing hexapeptide: Crystal and solution structure of Boc-Val- Δ Phe-Leu-Ala- Δ Phe-Ala-OMe. *J. Peptide Sci.* **9** 54–63.
31. Lataifeh A., Beheshti S., Kraatz H. B. (2009) Designer peptides: Attempt to control peptide structure by exploiting ferrocene as a scaffold. *Eur J Inorg Chem* **2009(22)**: 3205–3218.
32. Kirin S. I., Wissenbach D., Metzler-Nolte N. (2005) Unsymmetrical 1,n'-disubstituted ferrocenoyl peptides: convenient one pot synthesis and solution structures by CD and NMR spectroscopy. *New J. Chem.* **29**: 1168–1173.
33. Kovač V., Radolović K., Habuš I., Siebler D., Heinze K., Rapić V. (2009) Conformational analysis of β -lactam-containing ferrocene peptides. *Eur J Inorg Chem* **2009(3)**: 389–399.
34. Herrick R. S., Jarret R. M., Curran T. P., Dragoli D. R., Flaherty M. B., Lindyberg S. E., (1996) Ordered conformations in bis(amino acid) derivatives of 1,1'-ferrocenedicarboxylic acid. *Tetrahedron Lett* **37**: 5289–5292.
35. van Staveren D. R., Weyhermüller T., Metzler-Nolte N. (2003) Organometallic β -turn mimetics. A structural and spectroscopic study of inter-strand hydrogen bonding in ferrocene and cobaltocenium conjugates of amino acids and dipeptides. *Dalt Trans* **2**: 210–220.
36. Moriuchi T., Hirao T. (2012) Dipeptide-induced chirality organization. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* **74**: 23–40.
37. Moriuchi T., Hirao T. (2010) Design of ferrocene-dipeptide bioorganometallic conjugates to induce chirality-organized structures. *Acc Chem Res* **43**: 1040–1051.

38. Moriuchi T., Ohmura S. D., Moriuchi-Kawakami T. (2018) Chirality induction in bioorganometallic conjugates. *Inorganics* **6**: 111–125
39. Moriuchi T., Nomoto A., Yoshida K., Hirao T. (2001a) Intramolecular conformational control in ferrocenes bearing podand dipeptide chains. *Organometallics* **20**: 1008–1013.
40. Moriuchi T., Nomoto A., Yoshida K., Ogawa A., Hirao T. (2001b) Chirality organization of ferrocenes bearing podand dipeptide chains: Synthesis and structural characterization. *J Am Chem Soc* **123**: 68–75.
41. Kheterpal I., Zhou, S., Cook, K. D., Wetzel, R. (2000) β amyloid fibrils possess a core structure highly resistant to hydrogen exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 13597–13601.
42. Balbach J. J., Ishii Y., Antzutkin O. N., Leapman R. D., Rizzo N. W., Dyda F., Reed J., Tycko R. (2000) Amyloid fibril formation by A β 16–22, a seven-residue fragment of the Alzheimer's beta-amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR. *Biochemistry* **39(45)**: 13748–13759.
43. Beheshti S., Lataifeh A., Kraatz, H. B. (2011) Hydrogen-bonding interactions in ferrocene-peptide conjugates containing valine. *J. Organomet. Chem.* **696(5)**: 1117–1125.
44. Beheshti S., Martić S., Kraatz H. B. (2012) Hierarchical organization of ferrocene peptides. *Chem. Eur. J.* **18**: 9099–9105.
45. Tsutsumi M., Otaki J. M. (2011) Parallel and Antiparallel β -Strands Differ in Amino Acid Composition and Availability of Short Constituent Sequences. *Journal of Chemical Information and Modeling* **51(6)**: 1457–1464.
46. Rapić V., Kovačević M. (2012) III. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferrocenski peptidi. *Kemija u industriji* **61(2)**: 71–120
47. Tharamani C. N., Mahmoud K. A., Vasanthakumar G. R., Kraatz H.-B. (2009) Studies into the interaction of a ferrocene-conjugates of Gly-Gly-Arg-Tyr with papain: AC voltammetry, impedance spectroscopy and surface plasmon resonance studies. *Sensors and Actuators B: Chemical* **137(1)**: 253–258

48. Kerman K., Kraatz H.-B. (2009) Electrochemical probing of HIV enzymes using ferrocene-conjugated peptides on surfaces. *The Analyst* **134(12)**: 2400
49. Kovačević M., Čakić Semenčić M., Kodrin I., Roca S., Perica J., Mrvčić J., Stanzer D., Molčanov K., Milašinović V., Brkljačić L., Barišić L. (2023) Biological Evaluation and Conformational Preferences of Ferrocene Dipeptides with Hydrophobic Amino Acids. *Inorganics* **11(29)**: 1–21
50. Barišić L., Dropučić M., Rapić V., Pritzkow H., Kirin S. I., Metzler-Nolte N. (2004). The first oligopeptide derivative of 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid shows helical chirality with antiparallel strands. *Chem. Commun.* **17**: 2004–2005.
51. Chowdhury S., Schatte G., Kraatz H.-B. (2006). Rational Design of Bioorganometallic Foldamers: A Potential Model for Parallel β -Helical Peptides. *Angewandte Chemie International Edition* **45(41)**: 6882–6884.
52. Barišić L., Čakić M., Mahmoud K.A., Liu Y. N., Kraatz H. B., Pritzkow H., Kirin S. I., Metzler-Nolte N., Rapić V. (2006) Helically Chiral Ferrocene Peptides Containing 1'-Aminoferrocene-1-Carboxylic Acid Subunits as Turn Inducers. *Chem. Eur. J.* **12**: 4965–4980.
53. Heinze K., Beckmann M. (2005). Conformational Analysis of Chiral Ferrocene-Peptides. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2005(17)**: 3450–3457.
54. Kovačević M., Molčanov K., Radošević K., Srček V., Roca S., Čače A., Barišić L. (2014) Conjugates of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid and Proline: Synthesis, Conformational Analysis and Biological Evaluation. *Molecules* **19(8)**: 12852–12880.
55. Čakić M. (2009) Priprava i konformacijska analiza ferocenskih aminokiselina i oligopeptida. Doktorski rad. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet.
56. Chowdhury S., Mahmoud K. A., Schatte G., Kraatz H. B. (2005) Amino acid conjugates of 1,1'-diaminoferrocene. Synthesis and chiral organization. *Org. Biomol. Chem.* **3**: 3018–3023.
57. Čakić Semenčić M., Siebler D., Heinze L., Rapić V. (2009) Bis- and trisamides derived from 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid and α -amino acids: Synthesis and conformational analysis, *Organometallics* **28**: 2028–2037.

58. Kovačević M., Kodrin I., Roca S., Molčanov K., Shen Y., Adhikari B., Kraatz H. B., Barišić L. (2017) Helically chiral peptides containing ferrocene-1,1'-diamine scaffold as a turn inducer. *Chem. Eur. J.* **23**: 10372–10395.
59. Kovačević M., Markulin D., Zelenika M., Marjanović M., Lovrić M., Polančec D., Ivančić M., Mrvčić J., Molčanov K., Milašinović V. (2022) Hydrogen Bonding Drives Helical Chirality via 10-Membered Rings in Dipeptide Conjugates of Ferrocene-1,1'-Diamine. *International Journal of Molecular Sciences* **23(20)**: 12233.
60. Perrin D. D., Armarego W. L. F. (1988) Purification of laboratory chemicals, Pergamon Press, Oxford.
61. Kong J, Yu S (2007) Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim Biophys Sin* **39**, 549–559.

8. Sažetak

Lovro Marjanović, Jana Perica i Klara Širić

Utjecaj ferocenskog templata (Fcd, Fca, Fcda) na konformacijski prostor peptidomimetika pripremljenih iz ferocena i hidrofobnih aminokiselina (Val, Leu i Phe)

Ključne riječi: ferocen, peptidomimetici, konformacijska analiza, hidrofobne aminokiseline

Sažetak:

Budući da biološka aktivnosi, konformacijska stabilnost, fleksibilnost, te korištenje peptida i proteina u terapijske ovisi o njihovoj sekundarnoj strukturi, važno je naglasiti da je osnovni cilj prilikom dizajna i priprave sintetskih peptida i proteina upravo tvorba elemenata sekundarne strukture. Ugrađivanjem određenih ferocenskih kalupa u strukturu peptida dolazi do tvorbe vodikovih veza koje uzrokuju nastajanje različitih elemenata sekundarne strukture proteina. Tri su osnovna ferocenska kalupa iz kojih je moguće pripremiti peptide, a to su ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina (Fcd, **I**), 1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina (Fca, **III**) te ferocen-1,1'-diamin (Fcda, **V**).

Imajući u vidu ulogu ferocena kao mogućeg začetnika β -okreta, te naše znanje na području konformacijske analize peptida, odlučili smo istražiti utjecaj ferocenskog kalupa (Fcd, Fca i Fcda) na indukciju intramolekulskih vodikovih veza između podandnih peptidnih lanaca koji će se vezati na njih. Želja nam je bila ustanoviti utjecaj ferocenske osnove na obrazac stvaranja IHB kao i utjecaj razgranatosti bočnog ogranka prirodne aminokiseline na obrazac stvaranja IHB.

Pri tome smo sintetizirali tri ciljna peptida (**1**, **3** i **5**), dok je priprava ostalih 6 provedena prema postupcima opisanim u literaturi.

Njihovu strukturu kao i obrazac intramolekulskih vodikovih veza istražili smo mjerenjem koncentracijski-ovisnih IR- i NMR-spektara, temperaturno-ovisnih NMR-spektara, CD-spektara te titracijom NMR- i CD-uzoraka s DMSO.

Dokazali smo da na obrazac stvaranja vodikovih veza u peptidima **II**, **IV** i **VI** najveći utjecaj ima ferocenska osnova, dok je utjecaj bočnog ogranka aminokiselina manji, osim u slučaju fenilalaninskih derivata.

9. Summary

Lovro Marjanović, Jana Perica i Klara Širić

Influence of ferrocene template (Fcd, Fca, Fcda) on the conformational preferences of peptidomimetics derived from ferrocene and hydrophobic amino acids (Val, Leu i Phe)

Keywords: ferrocene, peptidomimetics, conformational analysis, hydrophobic amino acids

Summary:

Since the biological activities, conformational stability, flexibility, and therapeutic uses of peptides and proteins depend on their secondary structure, it is important to emphasize that the main goal in the design and preparation of synthetic peptides and proteins is the formation of secondary structure elements. The incorporation of certain ferrocene templates into the peptide structure leads to the formation of hydrogen bonds, which cause the formation of various elements of the secondary structure of the protein. There are three basic ferrocene templates from which peptides can be prepared, namely ferrocene-1,1'-dicarboxylic acid (Fcd, **I**), 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid (Fca, **III**), and ferrocene-1,1'-diamine (Fcda, **V**).

Given the role of ferrocene as a possible initiator of β -turns and our knowledge in the field of conformational analysis of peptides, we decided to investigate the influence of the ferrocene template (Fcd, Fca, and Fcda) on the induction of intramolecular hydrogen bonding between the podand peptide chains that will bind to them. We aimed to determine the influence of ferrocene base on the pattern of IHB formation as well as the influence of branching of the side branch of a natural amino acid on the pattern of IHB formation.

To this end, we synthesized three target peptides (**1**, **3**, and **5**), while the preparation of the other six peptides followed the procedures described in the literature.

We investigated their structure as well as the pattern of intramolecular hydrogen bonding by measuring concentration-dependent IR and NMR spectra, temperature-dependent NMR spectra, CD spectra, and titration of NMR and CD samples with DMSO.

We demonstrated that the ferrocene base has the greatest influence on the pattern of hydrogen bonds in the peptides **II**, **IV** and **VI**, while the influence of the side branches of the amino acids is less, except in the case of the phenylalanine derivatives.