

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Iva Dorić, Danijela Pfeifer i Josip Rešetar

**Sinteza i konformacijska analiza peptidomimetika s ferocen-1,1'-diaminom  
kao začetnikom okreta**

Zagreb, 2018.

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. Lidije Barišić i uz pomoć doc. dr. sc. Monike Kovačević, te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2017./2018.

## KRATICE

Cp = ciklopentadienilna skupina

Val = valin

Leu = leucin

Phe = fenilalanin

BCAA = aminokiseline razgranatog lanca

TGF- $\alpha$  = tumorski faktor rasta  $\alpha$

3-HIB = 3-hidroksi-izobutirat

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

Et = etil

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

HOBT = 1-hidroksibenzotriazol-hidrat

Me = metil

NMR = spektroskopija nuklearne magnetske rezinancije

IR = infracrvena spektroskopija

CD = cirkularni dikroizam

DMSO = dimetil-sulfoksid

NOESY = eng. *nuclear Overhauser effects spectroscopy*

NOE = eng. *nuclear Overhauser effect*

Ala = alanin

*t*Bu = *tert*-butoksikarbonil

R<sub>f</sub> = eng. *retention factor*

COSY = eng. *correlation spectroscopy*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Bioorganometalna kemija.....	1
1.2. Ferocen.....	1
1.3. Hidrofobne aminokiseline.....	2
1.4. Peptidomimetici.....	4
1.5. Ferocenski konjugati s aminokiselinama.....	6
<b>2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI</b> .....	8
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	9
3.1. Sinteza.....	9
3.1.1. Opći postupak pripreve peptidâ Boc–AK–NH–Fn–COOMe ( <b>1-3</b> ).....	11
3.1.2. Opći postupak pripreve peptidâ Ac–AK–NH–Fn–COOMe ( <b>4-6</b> ).....	14
3.1.3. Opći postupak pripreve peptidâ Ac–AK–NH–Fn–COOH ( <b>7-9</b> ).....	17
3.1.4. Opći postupak pripreve peptidâ Ac–AK–NH–Fn–CON <sub>3</sub> ( <b>10-12</b> ).....	19
3.1.5. Opći postupak pripreve peptidâ Ac–AK–NH–Fn–NHBoc ( <b>13-15</b> ).....	21
3.1.6. Opći postupak pripreve peptidâ Ac–L–Val–NH–Fn–NH–L–Val–Boc ( <b>16</b> ), Ac–L–Leu–NH–Fn–NH–L–Leu–Boc ( <b>17</b> ) i Ac–L–Phe–NH–Fn–NH–L–Phe–Boc ( <b>18</b> ) .....	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	28
4.1. IR-spektroskopska analiza.....	28
4.2. NMR-spektroskopska analiza.....	31
4.3. CD-spektroskopska analiza.....	39
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	42
<b>6. LITERATURA</b> .....	43
<b>7. ZAHVALE</b> .....	48
<b>8. SAŽETAK</b> .....	49
<b>9. SUMMARY</b> .....	50
<b>PRILOG</b>	

## ***§ 1. UVOD***

## 1.1. Bioorganometalna kemija

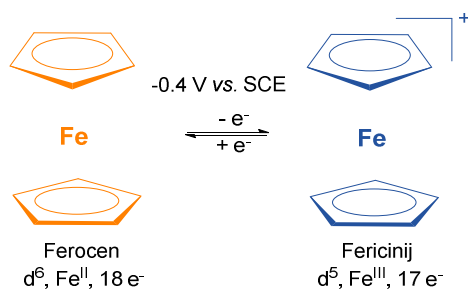
Područje bioorganometalne kemije obuhvaća sintezu i studij konjugata organometalnih spojeva s biomolekulama. Prema opće prihvaćenoj definiciji, organometalni spojevi sadrže barem jednu vezu metal–ugljik koja potječe iz organske molekule (Severin i sur., 1998; Rapić i Čakić Semenčić, 2011). Takva je veza izvor različitih elektronskih i steričkih efekata. Ugljikov je atom elektronegativniji od atoma metala, te stoga kao nukleofil reakcijom s elektrofilnim ugljikovim atomom iz halogenalkana, estera, aldehida ili ketone stvara novu vezu C–C, omogućujući sintezu većih molekula iz manjih prekursora.

Među bioorganometalnim spojevima posebno mjesto zauzimaju konjugati metalocenâ s biomolekulama koji svoju primjenu nalaze u biomedicinskim istraživanjima (terapija karcinoma i zaraznih bolesti, imunotestovi, molekulsko prepoznavanje, enzimska kataliza i toksikologija) (Jaouen i sur., 2006; Allardyce i Dyson, 2006).

Najznačajniji bioorganometalni spojevi su hidroksiferocifen i ferokin. Zamjena jednog fenilnog prstena iz antikancerogenog terapeutika tamoksifena s ferocenom rezultirala je unapređenjem antikancerogenog učinka prema staničnim linijama karcinoma dojke (Top i sur., 1996; Top i sur., 2003; Jouen i sur., 2004), dok je umetanje ferocenske podjedinice u strukturu antimalarijskog lijeka klorokina uzrokovalo poboljšanu aktivnost prema klorokin-rezistentnim parazitskim sojevima (Sullivan i sur., 1998; Winstanley, 2000; Richie i Saul, 2002).

## 1.2. Ferocen

Reakcijom ciklopentadienil-bromida s  $\text{FeCl}_2$  umjesto očekivanog fulvalena ( $\text{C}_{10}\text{H}_8$ ), dobiven je narančasto obojeni spoj molekulske formule  $\text{FeC}_{10}\text{H}_{10}$  (Kealy i Pauson, 1951). Godinu dana nakon otkrića opisana je njegova "sendvič" struktura izgrađena od dvaju ciklopentadienilnih prstenova (Cp) koji se odlikuju sposobnošću doniranja 6  $\pi$ -elektrona željezovom kationu ( $\text{Fe}^{2+}$ ) smještenom između njih (Wilkinson i sur., 1952). Zbog reaktivnosti koja je podsjećala na benzen i prisutnosti željezovog kationa, novi je spoj nazvan ferocenom (Werner, 2012). Ferocen se odlikuje topljivošću u organskim otapalima, stabilnošću pri visokim temperaturama (do  $400^\circ\text{C}$ ), te redoks-svojstvima (slika 1.).



**Slika 1.** Reverzibilna oksidacija ferocena

Ferocenski spojevi opisani su u više od 18000 publikacija što ferocen čini ikonom organometalne kemije. U recentnom pregledu ferocenskih spojeva opisana je njihova primjena u nanomedicini, industriji biosenzora i katalizi (Astruc, 2017). Zahvaljujući njegovoj lipofilnosti koja olakšava prolazak kroz staničnu membranu, stabilnosti u fiziološkom mediju, niskoj toksičnosti, oksido-redukcijskom kapacitetu i relativno jednostavnoj kemijskoj modifikaciji, ferocen se nalazi u središtu interesa bioorganometalne kemije. Različiti ferocenski derivati opsežno su istraživani u kliničkim studijama antitumorskog i antimikrobnog djelovanja. Poseban naglasak stavljen je na proučavanje ferocifena, analoga tamoksifena, kao potentnog kemoterapeutika s antiproliferativnim svojstvima na karcinogene stanice raka dojke (Top i sur., 2003). Modifikacijom  $\beta$ -laktamskih antibiotika (penicilina i cefalosporina) s ferocenom započelo je ispitivanje antimikrobnog potencijala ferocena (Edwards i sur., 1976; Scutaru i sur., 1991), a nastavljeno je konjugacijom ferocena s biomolekulama (aminokiselinama, šećerima, steroidima) u cilju pripreme bioorganometalnih konjugata s mogućim terapijskim učinkom (Kraatz, 2005).

### 1.3. Hidrofobne aminokiseline

Aminokiseline su osnovne građevne jedinice peptida i proteina. Svaka aminokiselina sastoji se od središnjeg ugljikovog atoma ( $C_\alpha$ ) na kojeg su vezane amino- i karboksilna skupina, vodikov atom i pobočni ogranak (R). Prirodni proteini građeni su iz 20 aminokiselina čiji kiralni  $C_\alpha$ -atomi imaju L- konfiguraciju (osim glicina). Klasifikacija aminokiselina u različite skupine ovisi o prirodni pobočnog ogranka pa je tako moguće izvršiti podjelu na (i) nenabijene aminokiseline pri neutralnoj pH-vrijednosti (polarne ili hidrofilne i nepolarne ili hidrofobne) i (ii) nabijene (kisele i bazične).



U ovom radu koristili smo valin (Val), leucin (Leu) i fenilalanin (Phe). S nutritivnog gledišta, sve tri aminokiseline pripadaju skupini esencijalnih aminokiselina, što znači da ih organizam ne može sintetizirati i/ili ih sintetizira u nedovoljnim količinama. Stoga je potreban njihov kontinuirani unos putem hrane ili dodataka prehrani kako bi se osiguralo adekvatno odvijanje metaboličkih procesa u organizmu.

Iako se valin u prirodi javlja u obliku L- i D- stereoizomera, isključivo L-stereoizomer izgrađuje humane protein (New World Encyclopedia, 2016). Pripada skupini aminokiselina razgranatog lanca [BCAA, (engl. *Branched Chain Amino Acid*)] koje čine oko 30% mišićnog tkiva, a ima bitnu ulogu i u mnogim drugim proteinima u tijelu [npr. nalazi se u aktivnom mjestu mnogih humanih enzima (Drosopoulos i Prasad, 2007), a supstitucija Val<sup>6</sup> s glutaminskom kiselinom u β-lancu hemoglobina rezultira pojavom srpaste anemije (Weatherall, 2001)]. Važan je građevni elementu u tumorskom faktoru rasta alfa TGF-α (Gregoret i Sauer, 1998; Puddicombe i sur., 1996). Valin se također nalazi u strukturi dipeptida angiotenzina-(3-4) te uz tirozin sudjeluje u uspostavljanju homeostaze tjelesnih tekućina djelovanjem u proksimalnim bubrežnim kanalicima na aktivne transportere iona Na<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup> (Dias i sur., 2017). Valin je prisutan u proteinima sirutke kao i u dipeptidima iz hidrolizata proteinâ sirutke koji stimuliraju povećanje zaliha glikogena u skeletnim mišićima (Morifuji i sur., 2009). Međutim, u nekim slučajevima valin može djelovati štetno. Međuprodukt katabolizma valina, 3-hidroksi-izobutirat (3-HIB), te općenito povećana razina valina kao i drugih razgranatih aminokiselina unesenih prehranom povezuje se s pojavom inzulinske rezistencije (Jang i sur., 2016), što može dovesti do dijabetesa. Neki prehrambeni izvori valina su suvježi sir, riba, perad, kikiriki i sezam.

Leucin, kao i valin, pripada skupini aminokiselina s razgranatim bočnim ogrankom. Ova je aminokiselina najbitnija za zdravlje mišićnog tkiva. Uz mišićno tkivo, leucin je potreban stanicama jetre, masnog tkiva i mozga, gdje ima ulogu u transaminaciji alfa-ketoglutarata u glutamat (Yudkoff, 2017). Poznato je da stimulira otpuštanje inzulina te na taj način potiče sintezu proteina, a inhibira njihovu degradaciju. Studija na miševima kojom je procijenjivan utjecaj leucina kao dodataka prehrani na sastav tijela pokazala je da niska doza leucina u obliku dodataka prehrani povećava gubitak masnog tkiva, poboljšava status jetrenih proteina i stimulira sintezu proteina (Donato i sur., 2006). Leucin je kao dodatak prehrani pokazao antiaterogeno djelovanje prigušujući stvaranje pjenastih stanica od strane makrofaga (Grajeda-Iglesia i sur., 2018). L-Stereoizomer leucina koristi se kao prehrambeni aditiv (E641) i klasificiran je kao pojačivač okusa. Medicinska primjena zabilježena je u prevenciji epileptičkih napadaja kao potencijalna buduća zamjena terapije diazepamom (Hartman i sur.,

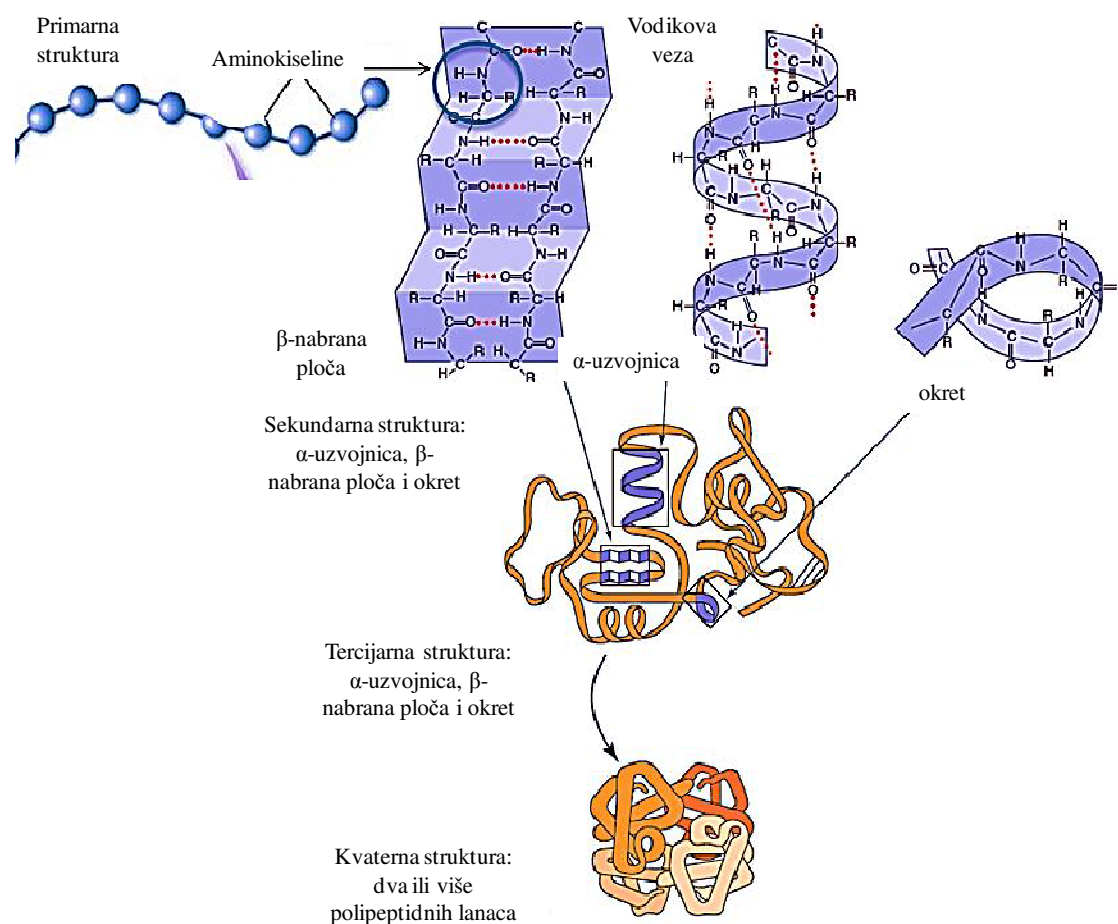
2015) te također u zaštiti srca i smanjenju prevalencije zastoja srca kod pacijenata koji primaju terapiju doxorubicinom (Fidale i sur., 2017). L-Leucin je zastupljen u mesu, soji, orašastim plodovima i ribi. Toksični učinak leucina manifestira se kao delirij i neurološka ugroženost te može dovesti do smrti. Visoke doze leucina također mogu uzrokovati ili pojačati simptome pelagre kod osoba s niskim statusom niacina.

S obzirom na kemijsku strukturu, fenilalanin se pojavljuje kao L- i D- stereoisomer te kao njihova smjesa. L-Izomer, ujedno i esencijalni oblik, jedini sudjeluje u izgradnji strukturnih proteina, enzima i hormona. L-Fenilalanin može se metabolizirati do L-tirozina koji služi kao prekursor za sintezu neurotransmitera dopamina, norepinefrina i epinefrina. D- Izomer može se izolirati iz racemične smjese, ali mu funkcija još u potpunosti nije razjašnjena. D/L-smjesa dobiva se sintetski, a koristi se kao dodatak prehrani namijenjen ublažavanju kronične boli ili simptoma depresije. L-Fenilalanin također se pokazao učinkovitim kod supresije apetita na nepotpuno razjašnjen način (Norton i sur., 2017), a zabilježeni su i pozitivni učinci u ublažavanju simptoma depresije (Roiser i sur., 2005). Dodatna medicinska primjena zabilježena je u terapiji vitiliga (Antoniou i sur., 1989), poremećaja hiperaktivnosti i deficita pažnje (Wood i sur., 1985) te tirozinemije tipa 1 (van Vliet i sur., 2014). Fenilalanin visoko je zastupljen u namirnicama kao što su meso, riba, jaja, mliječni proizvodi, mahunarke, orašasti plodovi sjemenke te u svim proizvodima koji sadrže zaslađivač aspartam. Rijetko su zabilježeni slučajevi trovanja fenilalaninom, iako fenilalanin može izazvati toksične pojave kod osoba koje boluju od fenilketonurije, nasljedne bolesti kod koje nedostaje enzim fenilalanin-hidroksilaza koja metabolizira fenilalanin u tirozin.

#### **1.4. Peptidomimetici**

Proteini sudjeluju u brojnim biološkim procesima kao što su enzimski kataliza, prijenos i pohrana malih molekula i iona, mehanička čvrstoća i imunosna zaštita, koordinirano kretanje, prijenos živčanih impulsa te kontrola rasta i diferencijacije stanica. Izgrađeni su iz 20 proteinogenih aminokiselina međusobno povezanih amidnom (peptidnom) vezom. Redoslijed aminokiselina, određen genetskim kodom, definira funkciju i svojstva proteina. Sintetizirani polipeptidni lanac poprima jedinstvenu trodimenzijsku strukturu u kojoj razlikujemo četiri strukturne razine prikazane na slici 2. Primarna je struktura definirana slijedom kovalentno vezanih aminokiselina unutar istog polipeptidnog lanca od *N*- prema *C*-kraju.  $\alpha$ -Uzvojnica,  $\beta$ -nabrana ploča i različiti okreti elementi su sekundarne strukture nastali nabiranjem polipeptidnog lanca uslijed tvorbe intramolekulskih vodikovih veza [IHB, (engl.

*Intramolecular Hydrogen Bond*)], čiji obrazac određuje koji će element sekundarne strukture polipeptid poprimiti. Tercijarna struktura predstavlja prostorni odnos u linearnom slijedu međusobno udaljenih bočnih ogranaka. Kvaternu strukturu imaju oligomeri, a opisuju relativnu orijentaciju pojedinih polipeptidnih lanaca (Stryer, 1991).



**Slika 2.** Strukturne razine polipeptida (PBF, 2018)

Biološka i strukturna raznolikost peptida i proteina ukazuje na veliki terapijski potencijal, no njihova upotreba kao lijekova limitirana je brojnim nepovoljnim svojstvima:

- *Konformacijska fleksibilnost*: odlikuju se sklonošću k zauzimanju energetski ekvivalentnih konformacija koje omogućuju interakcije s različitim receptorima što može dovesti do neželjenih nuspojava.
- *Proteolitička nestabilnost*: podložni su djelovanju peptidaza iz gastrointestinalnog trakta i seruma. Bilo kakva modifikacija koja dovodi do skraćivanja lanca uzrokuje gubitak native konformacije te nemogućnost interakcije sa željenim receptorom.

- *Velika molekulska masa i polarni karakter* otežavaju transport kroz staničnu membranu i krvno-moždanu barijeru (Chakraborty i sur., 2002).

Ograničavanje konformacijske slobode, te povećanje stabilnosti i permeabilnosti prirodnih peptida postiže se pripremom njihovih mimetika koji oponašaju element peptidne sekundarne strukture odgovoran za molekulske prepoznavanje, odnosno oponašaju biološku aktivnost izvornih peptida (Zorc, 2008; Jerić, 2004).

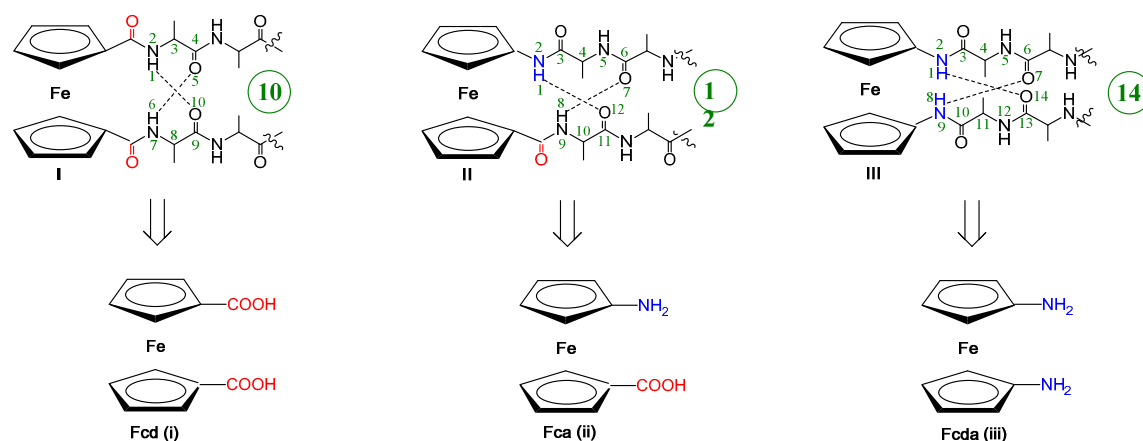
Opisano je nekoliko različitih pristupa u dizajnu i sintezi peptidomimetika: ugradnja nepeptidnih kalupa u peptidnu okosnicu, zamjena peptidne veze s nepeptidnim analogima, konjugiranje aminokiselinskih bočnih ograna s malim molekulama te ciklizacija glavnog lanca (Livnah i Yechezke, 2005). Njihov je osnovni cilj oponašanje ili mimikrija motiva sekundarne strukture ( $\alpha$ -uzvojnice,  $\beta$ -nabrane ploče te  $\beta$ - i  $\gamma$ -okreta). Kao mimetici  $\alpha$ -uzvojnice dizajniraju se i istražuju peptoidi,  $\beta$ -peptidi, foldameri s heterogenom okosnicom, „uvezani“ (eng. *stapled*) peptidi te male nepeptidne molekule i molekularni sklopovi. Mimikrija  $\beta$ -ploče najčešće se provodi primjenom kalupa koji umetanjem u peptidni lanac omogućuje uspostavu vodikovih veza po uzoru na  $\beta$ -ploču („ $\beta$ -sheet-like“ structure), dok se kao mimetici okretâ koriste začetnici okreta („turn-inducer“) kao što su biciklički laktami, dibenzofurani, feroceni te spirociklički kalupi (Ross i sur., 2010).

### 1.5. Ferocenski konjugati s aminokiselinama

Jedan od pristupa u sintezi peptidomimetika obuhvaća umetanje 1,1'-disupstituiranog ferocenskog kalupa u peptidnu sekvenciju s ciljem indukcije okreta. Zahvaljujući udaljenosti između ciklopentadienilnih prstenova od 3,3 Å, u takvim je konjugatima omogućena tvorba intramolekulskih vodikovih veza. Pri tomu ferocen ima ulogu začetnika okreta, a vodikove veze uspostavljene između peptidnih lanaca vezanih na ferocenski kalup dovode do tvorbe struktura nalik  $\beta$ -nabranim pločama (Beheshti i sur., 2011).

S obzirom na moguću ulogu ferocenskog kalupa kao donora ili akceptora vodikove veze, ostvaruju se tri glavna strukturalna motiva u ferocenskim peptidomimeticima. Iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (Fcd, **i**) izvedeni su peptidi  $\text{Fn}[\text{CO}-(\text{AK})_m\text{OMe}]_2$  (**I**) s 10-članim IHB-prstenom. 12-člani IHB-prstenovi uspostavljaju se u mimeticima  $\text{Y}-(\text{AK})_n\text{NH-Fn-CO}-(\text{AK})_m\text{OMe}$  (**II**) izvedenim iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca, **ii**), dok se u konjugatima  $\text{Fn}[\text{NH}-(\text{AK})_m\text{Y}]_2$  (**III**) izvedenim iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda, **iii**) stvara 14-člani IHB-prsten (2 simultana 10-člana IHB-prstena ili  $\beta$ -okreta) [Fn =

ferocenilen, AK = prirodna aminokiselina, Y = Ac (acetil), Boc (*tert*-butoksikarbonil),  $m = 1, 2, \dots; n = 1, 2, \dots$ ] (slika 3.) (Kovačević i sur., 2017).



**Slika 3.** Ferocenski peptidi **I-III** izvedeni iz Fcd (**i**), Fca (**ii**) i Fcda (**iii**)  
(IHB su označene isprekidanim crtama)

Za razliku od dobro istraženih i opisanih konjugata **I** i **II**, konjugati **III** izvedeni iz ferocen-diamina (**iii**) opisani su u svega tri publikacije (Chowdhury i sur., 2005, Kovačević i sur., 2015; Kovačević i sur., 2017), od čega su zadnje dvije rezultat istraživanja provedenih u Laboratoriju za organsku kemiju PBF-a.

U našem su Laboratoriju pripremljeni konjugati **III** sačinjeni iz ferocen-diamina (**iii**) i Ala, odnosno Ala-Pro dipeptida. Pokazalo se da je variranjem kiralnosti prirodnih aminokiselina, kao i *N*-terminalnih skupina moguće inducirati tvorbu IHB-prstenova različite veličine u takvim biokonjugatima. Nadalje, konjugati s Ala podvrgnuti su biološkim testovima u cilju ispitivanja citotoksičnog učinka na stanične linije Hs 578T i Hep G2, pri čemu je lipofilnost ispitivanih biokonjugata imala najveći utjecaj na njihovu biološku aktivnost (Kovačević i sur., 2015).

S obzirom da su 14-člani IHB-prstenovi, svojstveni prirodnim peptidima, nađeni u homokiralnim konjugatima **III** s Ala i Ala-Pro, u ovom smo radu odlučili pripremiti njihove homokiralne analoge Ac-AK-NH-Fn-NH-AK-Boc [**16-18**; AK = Val (**16**), Leu (**17**), Phe (**18**)], te istražiti utječu li voluminozni bočni ogranci na uspostavu 14-članog IHB-prstena nađenog u prethodno opisanim analogima s alaninom.

Buduća istraživanja u našem Laboratoriju bit će posvećena pripravi viših homologa peptida opisanih u ovom radu. Nadalje pripremit će se i njihovi analozi s Fcd- (**i**) i Fca- (**ii**) kalupima te će se istražiti konformacijski prostor tih spojeva kao i njihova biološka aktivnost.

## **§ 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI**

Kao esencijalni elementi antiparalelnih  $\beta$ -ploča,  $\beta$ -okreti omogućavaju približavanje dvaju peptidnih lanaca i njihovu interakciju putem vodikovih veza. Dok je pravilno smatanje proteinskih lanaca nužno za normalnu biološku funkciju, pogreške u njihovom nabiranju uzrokuju tvorbu ekstra- ili intracelularnih agregata, odnosno patološka stanja. Stoga se istražuju male molekule koje nakon umetanja u peptidne lance induciraju tvorbu okretâ i omogućuju njihovo pravilno nabiranje u strukture  $\beta$ -ploča.

U prethodnim istraživanjima u našem Laboratoriju opisana je uloga ferocen-1,1'-diamina (**iii**) kao začetnika dvaju simultanih  $\beta$ -okreta u konjugatima s Ala, odnosno Ala-Pro dipeptidom. Stoga smo u sklopu ovoga rada odlučili pripremiti konjugate kalupa **iii** s Val, Leu i Phe kako bismo istražili mogući utjecaj voluminoznijih bočnih ogranaka na tvorbu intramolekulskih vodikovih veza, odnosno struktura  $\beta$ -okretâ.

U tu svrhu provest ćemo višestupanjske sinteze ciljnih konjugata. Njihovu ćemo strukturu dokazati NMR- i MS-spektroskopijom. Nadalje, mjerenjem koncentracijski-ovisnih IR- i NMR-spektara, temperaturno-ovisnih NMR-spektara, CD-spektara te titracijom NMR- i CD-uzoraka s DMSO, utvrdit ćemo obrazac intramolekulskih vodikovih veza, odnosno moguću prisutnost  $\beta$ -okreta u pripremljenim peptidima.

### **§ 3. *MATERIJALI I METODE***



Sve kemikalije korištene u sintezi bile su analitičke čistoće, dok su otapala korištena u radu pročišćena prema standardnim postupcima (Perrin i sur., 1988). Tijek reakcija i čistoća sintetiziranih spojeva ispitivani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel) s fluorescentnim indikatorom (254 nm). Produkti su pročišćeni tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu ("Merck", Kieselgel 60 HF<sub>254</sub>) uporabom smjesâ diklormetan/etil-acetat, diklormetan/metanol ili etilacetata kao eluensâ.

Karakterizacija sintetiziranih spojeva provedena je pomoću infracrvene spektroskopije (IR), nuklearne magnetske rezonance (NMR) i tekućinske kromatografije visoke razlučivosti sa spektrometrijom masa (HPLC-MS).

IR-spektri uzoraka snimljeni su na spektrofotometru Bomem MB 100 Mid FT u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

<sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR-spektri određeni su u CDCl<sub>3</sub> i [D<sub>6</sub>]-DMSO na spektrometrima Bruker AV300 ili Bruker AV600 uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard. <sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR-spektri baždareni su prema CDCl<sub>3</sub> (7.26 ppm, odnosno 77.16 ppm). NMR titracija provedena je dodavanjem po 10 µL [D<sub>6</sub>]-DMSO u otopinu peptida **16**, **17** i **18** u CDCl<sub>3</sub>. Snimanje spektra provodilo se nakon svakog dodatka [D<sub>6</sub>]-DMSO sve do izostanka promjene u kemijskom pomaku promatranih NH skupina (spektri su baždareni prema TMS). Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm.

Maseni spektri visoke razlučivosti snimljeni su na 4800 MALDI TOF/TOF-MS analizatoru.

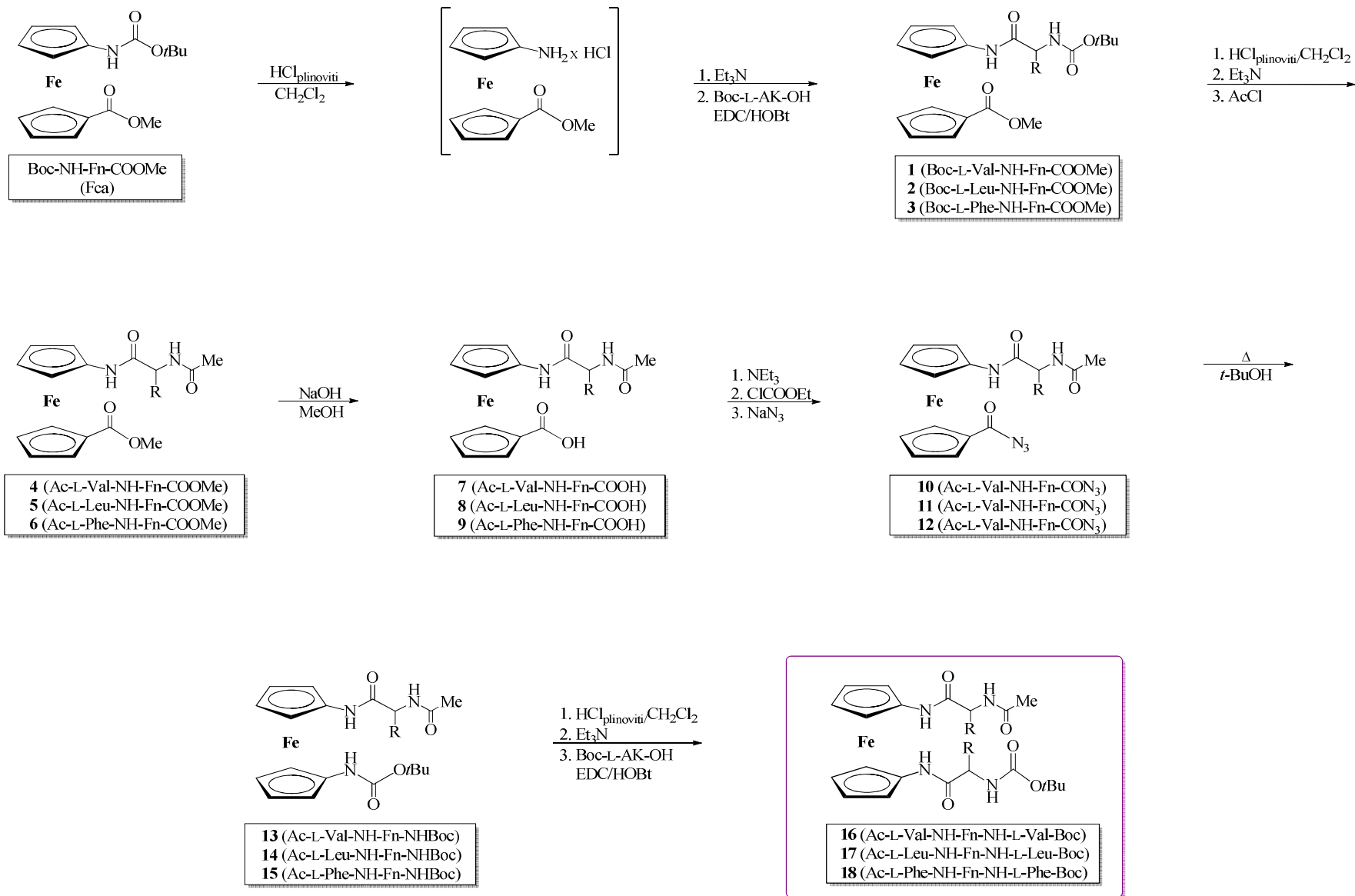
Tališta su određena na Reichert Thermovar HT 1 BT 11 i nisu korigirana.

CD-spektri snimljeni su na CD-spektrofotometru Jasco-810 u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i DMSO, te na kalijevu bromidu.

IR-, NMR-spektri i HPLC-MS sintetiziranih spojeva nalaze se u Prilogu.

### 3.1. Sinteza

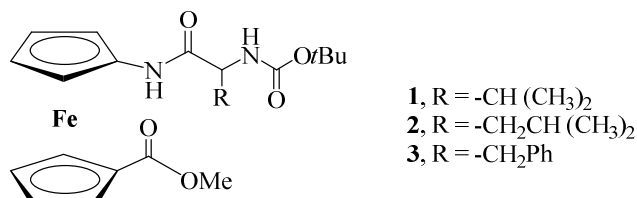
Ciljni ferocenski konjugati **16-18** pripremljeni su iz Boc-NH-Fn-COOMe (Fca) postupcima prikazanim na shemi 1. Višestupanjska sinteza prekursora Boc-NH-Fn-COOMe (Fca) opisana je u literaturi (Barišić i sur., 2002).



Shema 1. Priprava biokonjugata 16-18

### 3.1.1. Opći postupak pripreve peptidâ Boc–AK–NH–Fn–COOMe (1-3)

Prekursor Boc–NH–Fn–COOMe (Fca) otopi se u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ohladi na 0 °C i izloži djelovanju plinovitog HCl. Nakon 15 minuta miješanja u ledenoj kupelji, uvođenje HCl-a nastavi se pri sobnoj temperaturi dok se TLC-om ne utvrdi završetak reakcije. Otapalo se otpari na rotacijskom vakuum-uparivaču, a nastali hidroklorid suspendira se u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> te obradi sa suviškom Et<sub>3</sub>N do pH~9. Dobiveni se slobodni amin kopulira s Boc–AK–OH (AK = Val, Leu, Phe) primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon 48 sati miješanja pri sobnoj temperaturi, rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom NaHCO<sub>3</sub>, 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari do suha. Sirovi produkt (slika 4.) pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : EtOAc = 10 : 1 kao eluens. Količine upotrijebljenih supstrata i kemikalija prikazane su u tablici 1., a rezultati IR- i NMR-analize u tablicama 2. i 3.



Slika 4. Peptidi 1-3

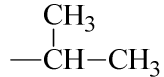
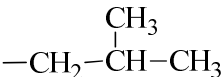
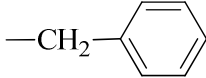
Tablica 1. Supstrati i reagensi upotrebljeni za pripravu Boc-dipeptida 1-3

Produkt	Supstrat (masa, množina)	Aminokiselina (masa, množina)	Reagensi za kopulaciju (masa, množina)		Dobivena masa (iskorištenje)	Opis produkta
			EDC	HOBt		
1	Fca (1 g, 2.8 mmol)	Boc–L–Val–OH (1.65 g, 7.59 mmol)	(1.75 g, 9.1 mmol)	(1.23 g, 9.1 mmol)	815.1 mg (64%)	Narančasti kristali
2	Fca (1 g, 2.8 mmol)	Boc–L–Leu–OH (1.79 g, 7.74 mmol)	(1.78 g, 9.3 mmol)	(1.26 g, 9.3 mmol)	850.1 mg (65%)	Žuti kristali
3	Fca (1 g, 2.8 mmol)	Boc–L–Phe–OH (2.044 g, 7.7 mmol)	(1.77 g, 9.24 mmol)	(1.25 g, 9.24 mmol)	1.053 g (75%)	Narančasta smola

**Tablica 2.** Tališta,  $R_f$ -vrijednosti i maksimumi apsorpcijskih vrpca za spojeve **1-3**

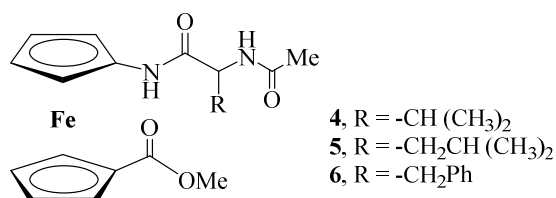
Spoj	R	$t_R/^\circ\text{C}$	$R_f$	IR(CH <sub>2</sub> Cl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$
<b>1</b>	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ -\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}$	139.4-143.1	0.79 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc = 10 : 1)	3422 sr (NH <sub>slobodni</sub> ), 3324 sl(NH <sub>asocirani</sub> ), 1710 j (C=O <sub>COOMe</sub> ), 1683 j (C=O <sub>Boc</sub> ), 1636 sr (C=O <sub>CONH</sub> ), 1534 sr, 1498 sr, 1466 sr (amid II)
<b>2</b>	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ -\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}$	146.5-148.3	0.89 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc = 10 : 1)	3425 sr (NH <sub>slobodni</sub> ), 3320 sl(NH <sub>asocirani</sub> ), 1708 j (C=O <sub>COOMe</sub> ), 1685 j (C=O <sub>Boc</sub> ), 1654 sr (C=O <sub>CONH</sub> ), 1534 sr, 1499 sr, 1467 sr (amid II)
<b>3</b>	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	/	0.85 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc = 10 : 1)	3416 sr (NH <sub>slobodni</sub> ), 3324 sl (NH <sub>asocirani</sub> ), 1709 j (C=O <sub>COOMe</sub> ), 1685 j (C=O <sub>Boc</sub> ), 1640 sr (C=O <sub>CONH</sub> ), 1535 sr, 1496 sr, 1466 sr (amid II)

Tablica 3. <sup>1</sup>H-NMR i <sup>13</sup>C-NMR spojeva 1-3

Spoj	R	<sup>1</sup> H-NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ/ppm	<sup>13</sup> C-NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ/ppm
1		7.35 (s, 1H, NH <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 5.14 (s, 1H, NH <sub>Boc</sub> ), 4.75 (s, 2H, H <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 4.65 (s, 1H, H <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 4.54 (s, 1H, H <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 4.39 (s, 2H, H <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 4.04 (s, 2H, H <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 3.94 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 1H, CH <sub>α-Val</sub> ), 3.81 (s, 3H, CH <sub>3</sub> -COOMe), 2.22 (s, 1H, CH <sub>β-Val</sub> ), 1.47 [s, 9H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -Boc], 1.02 [d, <i>J</i> = 6.7 Hz, 3H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>γ-aVal</sub> ], 0.98 [d, <i>J</i> = 6.7 Hz, 3H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>γ-bVal</sub> ]	172.04 (CO <sup>a</sup> <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 170.39 (CO <sup>b</sup> <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 156.25 (CO <sub>Boc</sub> ), 94.75 (C <sub>qF<sub>n</sub></sub> ), 80.26 (C <sub>qBoc</sub> ), 72.77 (CH <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 72.00 (C <sub>qF<sub>n</sub></sub> ), 71.42, 71.34, 66.80, 66.60, 63.70 (CH <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 63.36 (CH <sub>α-Val</sub> ), 51.85 (CH <sub>3</sub> -COOMe), 30.65 (CH <sub>β-Val</sub> ), 28.51 [(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -Boc], 19.59 [(CH <sub>3</sub> ) <sub>γ-aVal</sub> ], 17.94 [(CH <sub>3</sub> ) <sub>γ-bVal</sub> ]
2		7.57 (s, 1H, NH <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 5.01 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H, NH <sub>Boc</sub> ), 4.76 (pt, 2H, H <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 4.68 (s, 1H, H <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 4.55 (s, 1H, H <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 4.39 (pt, 2H, H <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 4.16-4.11 (m, 1H, CH <sub>α-Leu</sub> ), 4.04 (s, 1H, H <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 4.01 (s, 1H, H <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 3.81 (s, 3H, CH <sub>3</sub> -COOMe), 1.79-1.71 (m, 2H, CH <sub>2-β-Leu</sub> , CH <sub>γ-Leu</sub> ), 1.56-1.51 (m, 1H, CH <sub>2-β-Leu</sub> ), 1.48 [s, 9H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -Boc], 0.97 [t, <i>J</i> = 6.7 Hz, 6H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2-Leu</sub> ]	171.92 (CO <sup>a</sup> <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 171.11 (CO <sup>b</sup> <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 156.22 (CO <sub>Boc</sub> ), 95.17 (C <sub>qF<sub>n</sub></sub> ), 80.63 (C <sub>qBoc</sub> ), 72.81, 72.78 (CH <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 72.29 (C <sub>qF<sub>n</sub></sub> ), 72.03, 71.39, 71.27, 66.76, 66.46 (CH <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 63.43 (CH <sub>α-Leu</sub> ), 63.06 (CH <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 51.82 (CH <sub>3</sub> -COOMe), 40.91 [(CH <sub>2</sub> ) <sub>β-Leu</sub> ], 28.52 [(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -Boc], 24.95 (CH <sub>γ-Leu</sub> ), 23.14, 22.15 [(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -Leu]
3		7.34-7.24 (m, 5H, H <sub>fenil</sub> ), 7.32 (s, 1H, NH <sup>a</sup> <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 5.15 (s, 1H, NH <sub>Boc</sub> ), 4.72 (s, 1H, H <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 4.68 (s, 1H, H <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 4.61 (s, 1H, H <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 4.44 (s, 1H, H <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 4.39 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 1H, CH <sub>α-Phe</sub> ), 4.32 (s, 2H, H <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 4.02 (s, 1H, H <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 4.00 (s, 1H, H <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 3.78 (s, 3H, CH <sub>3</sub> -COOMe), 3.17 (dd, <i>J</i> <sub>1</sub> = 6.1 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 13.1 Hz, 1H, CH <sub>2a-Phe</sub> ), 3.09 (dd, <i>J</i> <sub>1</sub> = 7.1 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 13.5 Hz, 1H, CH <sub>2b-Phe</sub> ), 1.42 [s, 9H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -Boc]	171.84 (CO <sup>a</sup> <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 169.93 (CO <sup>b</sup> <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 155.66 (CO <sub>Boc</sub> ), 136.92 (C <sub>qfenil</sub> ), 129.53 (CH <sub>fenil</sub> ), 128.87 (CH <sub>fenil</sub> ), 127.14 (CH <sub>fenil</sub> ), 94.51 (C <sub>qF<sub>n</sub></sub> ), 80.62 (C <sub>qBoc</sub> ), 72.76, 72.05 (C <sub>qF<sub>n</sub></sub> ), 71.36, 71.32, 66.79, 66.57, 63.74, 63.25 (CH <sub>F<sub>n</sub></sub> ), 56.38 (CH <sub>Phe</sub> ), 51.81 (CH <sub>3</sub> -COOMe), 38.37 (CH <sub>2-Phe</sub> ), 28.43 [(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -Boc]

### 3.1.2. Opći postupak pripreve peptidâ Ac–AK–NH–Fn–COOMe (4-6)

U suspenziju odgovarajućeg Boc-peptida **1**, **2** ili **3** u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ohlađenu na 0 °C uvodi se plinoviti HCl. Nakon 3 sata miješanja na sobnoj temperaturi otapalo se upari, a rezultirajući hidroklorid suspendira se u suhom CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) i otopi dodatkom Et<sub>3</sub>N do pH~9. Nastaloj se otopini, ohlađenoj na 0 °C, uz miješanje oprezno dokapa AcCl. Nakon 15 minuta miješanja pri 0 °C, reakcija se prekine dodatkom vode. Potom se reakcijska smjesa više puta ekstrahira s CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Organski se sloj ispere zasićenom vodenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari do suha. Sirovi produkt (slika 5.) pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz EtOAc kao eluens. Količine upotrijebljenih supstrata i kemikalija prikazane su u tablici 4., a rezultati IR- i NMR-analize u tablicama 5. i 6.



Slika 5. Peptidi 4-6

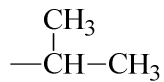
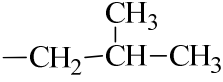
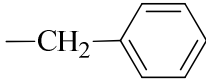
Tablica 4. Supstrati i reagensi upotrebljeni za pripravu Ac-peptidâ 4-6

Produkt	Supstrat (masa, množina)	Reagensi (volumen, množina)		Dobivena masa (iskorištenje)	Opis produkta
		Et <sub>3</sub> N	AcCl		
<b>4</b>	<b>1</b> (733.61 mg, 1.84 mmol)	(2 µl, 14.7 mmol)	(788 µl, 11.04 mmol)	495 mg (77,7%)	Žuti kristali
<b>5</b>	<b>2</b> (765.37 mg, 1.63 mmol)	(1.8 µl, 13 mmol)	(696 µl, 9.8 mmol)	405.6 mg (60%)	Narančasta smola
<b>6</b>	<b>3</b> (947 mg, 1.88 mmol)	(2.1 ml, 15 mmol)	(800 µL 11.3 mmol)	370 mg (76%)	Narančasta smola

**Tablica 5.** Tališta,  $R_f$ -vrijednosti i maksimumi apsorpcijskih vrpca za spojeve **4-6**

Spoj	R	$t_f/^\circ\text{C}$	$R_f$	IR(CH <sub>2</sub> Cl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$
4	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ -\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}$	145.8-148.7	0.46 (EtOAc)	3421 sr (NH <sub>slobodni</sub> ), 3287 sr, 3245 sr (NH <sub>asocirani</sub> ), 1711 j (C=O <sub>COOMe</sub> ), 1684 j, 1670 j, 1661 j (C=O <sub>CONH</sub> ), 1569, 1559, 1540, 1517, 1508, 1490, 1466 (amid II)
5	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ -\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}$	/	0.64 (EtOAc)	3425 sr (NH <sub>slobodni</sub> ), 3289 sr, 3241 sl (NH <sub>asocirani</sub> ), 1709 j (C=O <sub>COOMe</sub> ), 1693 j, 1673 j, 1669 j (C=O <sub>CONH</sub> ), 1562, 1557, 1538, 1520, 1515, 1467 (amid II)
6	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	/	0.67(EtOAc)	3418 sr (NH <sub>slobodni</sub> ), 3290 sr, 3248 sl (NH <sub>asocirani</sub> ), 1709 j (C=O <sub>COOMe</sub> ), 1696 j, 1668 j (C=O <sub>CONH</sub> ), 1574, 1558, 1540, 1535, 1516, 1507, 1498, 1466 (amid II)

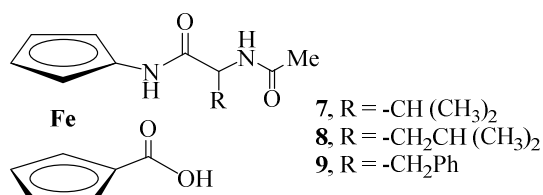
Tablica 6.  $^1\text{H-NMR}$  i  $^{13}\text{C-NMR}$  spojeva 4-6

Spoj	R	$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta/\text{ppm}$	$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta/\text{ppm}$
4		8.21 (s, 1H, $\text{NH}_{\text{Fn}}$ ), 6.49 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, $\text{NH}_{\text{Ac}}$ ), 4.74 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.73 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.61 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.60 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.41 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\alpha\text{-Val}}$ ), 4.37 (s, 2H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.03 (s, 2H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 3.78 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-COOMe}$ ), 2.18-2.13 (m, 1H, $\text{CH}_{\beta\text{-Val}}$ ), 2.10 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 1.04 [d, $J = 6.7$ Hz, 3H, $(\text{CH}_3)_{\gamma\text{-aVal}}$ ], 1.01 [d, $J = 6.7$ Hz, 3H, $(\text{CH}_3)_{\gamma\text{-bVal}}$ ]	172.04 ( $\text{CO}_{\text{Fn}}^{\text{b}}$ ), 170.70 ( $\text{CO}_{\text{Fn}}^{\text{a}}$ ), 170.25 ( $\text{CO}_{\text{Ac}}$ ), 95.00 ( $\text{C}_{\text{qFn}}$ ), 72.73, 72.68 ( $\text{CH}_{\text{Fn}}$ ), 72.01 ( $\text{C}_{\text{qFn}}$ ), 71.39, 71.22, 66.72, 66.60, 63.42 63.38 ( $\text{CH}_{\text{Fn}}$ ), 59.13 ( $\text{CH}_{\alpha\text{-Val}}$ ), 51.80 ( $\text{CH}_3\text{-COOMe}$ ), 31.16 ( $\text{CH}_{\beta\text{-Val}}$ ), 23.51 ( $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 19.50 [ $(\text{CH}_3)_{\gamma\text{-aVal}}$ ], 18.49 [ $(\text{CH}_3)_{\gamma\text{-bVal}}$ ]
5		8.07 (s, 1H, $\text{NH}_{\text{Fn}}$ ), 6.33 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, $\text{NH}_{\text{Ac}}$ ), 4.74 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.71 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.62 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.59 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.53 (q, $J = 8.3$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\alpha\text{-Leu}}$ ), 4.36 (pt, 2H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.03 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.00 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 3.80 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-COOMe}$ ), 2.07 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 1.81-1.76 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-}\beta\text{-Leu}$ ), 1.73-1.68 (m, 1H, $\text{CH}_{\gamma\text{-Leu}}$ ), 1.60-1.55 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-}\beta\text{-Leu}$ ), 0.98 [d, $J = 6.6$ Hz, 3H, $(\text{CH}_3)_{\delta\text{-a-Leu}}$ ], 0.96 [d, $J = 6.6$ Hz, 3H, $(\text{CH}_3)_{\delta\text{-b-Leu}}$ ]	171.95 ( $\text{CO}_{\text{Fn}}^{\text{b}}$ ), 170.90 ( $\text{CO}_{\text{Fn}}^{\text{a}}$ ), 170.78 ( $\text{CO}_{\text{Ac}}$ ), 95.17 ( $\text{C}_{\text{qFn}}$ ), 72.70, 72.66 ( $\text{CH}_{\text{Fn}}$ ), 72.08 ( $\text{C}_{\text{qFn}}$ ), 71.43, 71.22, 66.72, 66.39, 63.48, 63.21 ( $\text{CH}_{\text{Fn}}$ ), 52.29 ( $\text{CH}_{\alpha\text{-Leu}}$ ), 51.83 ( $\text{CH}_3\text{-COOMe}$ ), 40.83 [ $(\text{CH}_2)_{\beta\text{-Leu}}$ ], 24.99 ( $\text{CH}_{\gamma\text{-Leu}}$ ), 23.38 ( $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 23.04, 22.41 [ $(\text{CH}_3)_2_{\delta\text{-Leu}}$ ]
6		7.68 (s, 1H, $\text{NH}_{\text{Fn}}$ ), 7.33-7.24 (m, 5H, $\text{H}_{\text{fenil}}$ ), 6.43 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, $\text{NH}_{\text{Ac}}$ ), 4.77 (q, $J = 7.3$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{Phe}}$ ), 4.69 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.65 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.57 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.45 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.29 (s, 2H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.03 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.00 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 3.78 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-COOMe}$ ), 3.1 (dd, $J_1 = 7.4$ Hz, $J_2 = 13.8$ Hz, 1H, $\text{CH}_{2\text{a-Phe}}$ ), 3.09 (dd, $J_1 = 6.8$ Hz, $J_2 = 13.9$ Hz, 1H, $\text{CH}_{2\text{b-Phe}}$ ), 2.02 [s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ]	171.92 ( $\text{CO}_{\text{Fn}}^{\text{b}}$ ), 170.62 ( $\text{CO}_{\text{Fn}}^{\text{a}}$ ), 169.71 ( $\text{CO}_{\text{Ac}}$ ), 136.78 ( $\text{C}_{\text{qfenil}}$ ), 129.49, 129.46, 128.85, 127.21 ( $\text{CH}_{\text{fenil}}$ ), 94.40 ( $\text{C}_{\text{qFn}}$ ), 72.72 ( $\text{CH}_{\text{Fn}}$ ), 72.05 ( $\text{C}_{\text{qFn}}$ ), 71.40, 71.28, 66.84, 66.58, 63.89, 63.44 ( $\text{CH}_{\text{Fn}}$ ), 55.01 ( $\text{CH}_{\text{Phe}}$ ), 51.82 ( $\text{CH}_3\text{-COOMe}$ ), 38.23 ( $\text{CH}_2\text{-Phe}$ ), 23.35 ( $\text{CH}_3\text{-Ac}$ )



### 3.1.3. Opći postupak pripreve peptidâ Ac–AK–NH–Fn–COOH (7-9)

U otopinu estera u CH<sub>3</sub>OH doda se NaOH i par kapi vode. Nakon 4 sata refluksiranja pri temperaturi od 65 °C, reakcijska se smjesa upari, a ostatak zakiseli 10%-tnom otopinom HCl te ekstrahira EtOAc. Organski sloj ispere se zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari (slika 6., tablica 7.). Rezultati IR-analize dani su u tablici 8.



Slika 6. Peptidi 7-9

Tablica 7. Supstrati i reagensi upotrebljeni za priprevu Ac–AK–NH–Fn–COOH (7-9)

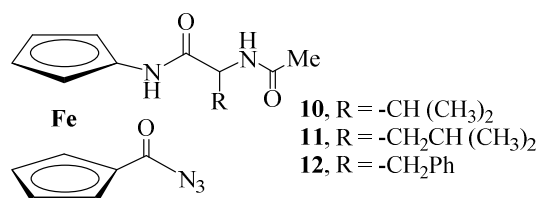
Produkt	Supstrat (masa, množina)	Reagensi (volumen, množina)		Dobivena masa (iskorištenje)	Opis produkta
		Metanol	NaOH		
7	4 (450 mg, 1.13 mmol)	(5 ml, 0.14 mmol)	(45.2 mg, 1.13 mmol)	364.6 mg (84%)	Žuti prah
8	5 (350 mg, 0.85 mmol)	(5 ml, 0.14 mmol)	(40 mg, 1 mmol)	290.76 mg (86%)	Žuti prah
9	6 (320 mg, 0.72 mmol)	(5 ml, 0.14 mmol)	(28.7 mg, 0.72 mmol)	251 mg (81%)	Žuti prah

**Tablica 8.** Tališta,  $R_f$ -vrijednosti i maksimumi apsorpcijskih vrpca za spojeve **7-9**

Spoj	R	$t_f/^\circ\text{C}$	$R_f$	IR(CH <sub>2</sub> Cl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$
7	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ -\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}$	> 200	0.34 (EtOAc)	3417 sr (NH <sub>slobodni</sub> ), 3280 sr, 3237 sr (NH <sub>asocirani</sub> ), 3152-3056 š (OH, COOH), 1712 j, 1684 j, 1656 j (C=O <sub>COOH, CONH</sub> ), 1574, 1540, 1521, 1478 (amid II)
8	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ -\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}$	> 200	0.51 (EtOAc)	3419 sr (NH <sub>slobodni</sub> ), 3287 sr, 3277 sr (NH <sub>asocirani</sub> ), 3161-3070 š (OH, COOH), 1714 j, 1696 j, 1686 j, 1653 j (C=O <sub>COOH, CONH</sub> ), 1569, 1558, 1539, 1533, 1528, 1522, 1509, 1472 (amid II)
9	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	> 200	0.48 (EtOAc)	3411 sr (NH <sub>slobodni</sub> ), 3285 sr, 3256 sr (NH <sub>asocirani</sub> ), 3143-3073 š (OH, COOH), 1716 j, 1696 j, 1683 j, 1654 j (C=O <sub>COOH, CONH</sub> ), 1575, 1569, 1558, 1540, 1533, 1522, 1508, 1498, 1485, 1474 (amid II)

### 3.1.4. Opći postupak pripreme peptidâ Ac–AK–NH–Fn–CON<sub>3</sub> (10-12)

Otopini kiseline **7**, **8** odnosno **9** u acetonu doda se voda. Reakcijskoj se smjesi, ohlađenoj na 0 °C, dokapa otopina Et<sub>3</sub>N u acetonu, te potom otopina ClCOOEt u acetonu pazeći da temperatura ne prijeđe 5 °C. Nakon 30 minuta miješanja, doda se otopina NaN<sub>3</sub> u vodi. Nakon 1h miješanja u ledenoj kupelji reakcijska se smjesa razrijedi hladnom vodom, ekstrahira s CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ispere 5%-tnom zasićenom otopinom NaHCO<sub>3</sub> i zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari do suha (slika 7.). Količine upotrijebljenih supstrata i kemikalija prikazane su u tablici 9., a rezultati IR-analize dani su u tablici 10.



Slika 7. Peptidi 10-12

Tablica 9. Supstrati i reagensi upotrebljeni za pripravu Ac–AK–NH–Fn–COOH (10-12)

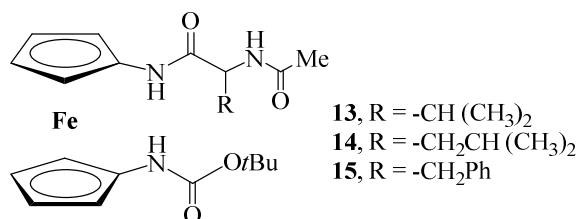
Produkt	Supstrat (masa, množina)	Reagensi (volumen, množina)			Dobivena masa (iskorištenje)	Opis produkt a
		NEt <sub>3</sub>	ClCOOEt	NaN <sub>3</sub>		
<b>10</b>	<b>7</b> (364.6 mg, 0.95 mmol)	(111 mg, 1.1 mmol); 5 ml aceton, 0.5 ml vode	(77.1 mg, 0.71 mmol),	(92.9 mg, 1.43 mmol), 0.2 ml vode	77.7 mg (20%)	Crveni kristali
<b>11</b>	<b>8</b> (290.76 mg, 0.7 mmol),	(79.9 mg, 0.79 mmol); 5 ml aceton, 0.5 ml vode	(57.6 mg, 0.53 mmol),	(65.1 mg, 1 mmol), 0.2 ml vode	112.6 mg (38%)	Crvena smola
<b>12</b>	<b>9</b> (251 mg, 0.58 mmol),	(66.8 mg, 0.66 mmol); 5 ml aceton, 0.5 ml vode	(47.8 mg, 0.44 mmol)	(56.6 mg, 0.87 mmol), 0.2 ml vode	61.1 mg (23%)	Crvena smola

**Tablica 10.** R<sub>F</sub>-vrijednosti i maksimumi apsorpcijskih vrpca za spojeve **10-12**

Spoj	R	R <sub>F</sub>	IR(CH <sub>2</sub> Cl) ν <sub>max</sub> /cm <sup>-1</sup>
<b>10</b>	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ -\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}$	0.54 (EtOAc)	3426 sr (NH <sub>slobodni</sub> ), 3334 sl (NH <sub>asocirani</sub> ), 2136 j (N <sub>3</sub> ), 1687 j, 1681 j (C=O <sub>CON3</sub> , CONH), 1563, 1537, 1511, 1504, 1451 (amid II)
<b>11</b>	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ -\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}$	0.72 (EtOAc)	3426 sr (NH <sub>slobodni</sub> ), 3287 sl (NH <sub>asocirani</sub> ), 2136 j (N <sub>3</sub> ), 1683 j (C=O <sub>CON3</sub> , CONH), 1557, 1540, 1508, 1451 (amid II)
<b>12</b>	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	0.64 (EtOAc)	3419 sr (NH <sub>slobodni</sub> ), 3290 sl (NH <sub>asocirani</sub> ), 2136 j (N <sub>3</sub> ), 1683 j (C=O <sub>CON3</sub> , CONH), 1558, 1540, 1507, 1498, 1453 (amid II)

### 3.1.5. Opći postupak pripreve peptidâ Ac–AK–NH–Fn–NHBoc (13-15)

Otopina azida **10**, **11** ili **12** (tablica 11.) u *tert*-butil-alkoholu zagrijava se pri 65 °C sve dok tankoslojna kromatografija upućuje na prisutnost supstrata (~5h). Reakcijska se smjesa upari, a produkt (slika 8.) pročisti tankoslojnom preparativnom kromatografijom uz EtOAc kao eluens. Rezultati IR- i NMR-analize prikazani su u tablicama 12. i 13.



Slika 8. Peptidi 13-15

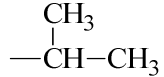
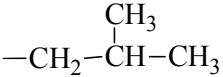
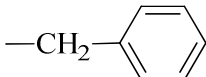
Tablica 11. Supstrati i reagensi upotrebljeni za pripravu Ac–AK–NH–Fn–NHBoc (13-15)

Produkt	Supstrat (masa, množina)	Reagensi (volumen, množina) <i>t</i> -BuOH	Dobivena masa (iskorištenje)	Opis produkta
<b>13</b>	<b>10</b> (77.7mg, 0.19 mmol)	20 ml	78.7 mg (91%)	Žuta smola
<b>14</b>	<b>11</b> (112.6 g, 0.266 mmol)	20 ml	74.35 mg (60%)	Žuta smola
<b>15</b>	<b>12</b> (61 mg, 0.13 mmol)	20 ml	61.1 mg (93%)	Žuta smola

**Tablica 12.** R<sub>F</sub>-vrijednosti i maksimumi apsorpcijskih vrpca za spojeve **13-15**

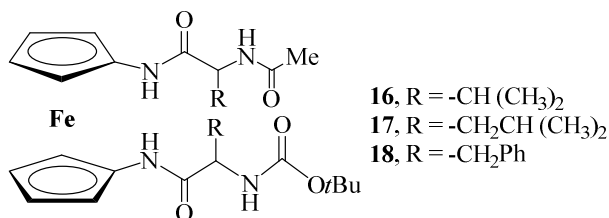
<b>Spoj</b>	<b>R</b>	<b>R<sub>F</sub></b>	<b>IR(CH<sub>2</sub>Cl) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup></b>
<b>13</b>	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ -\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}$	0.59 (EtOAc)	3427 (NH <sub>slobodni</sub> ), 3322 sl, 3311 sl, 3290 sl (NH <sub>asocirani</sub> ), 1704 j, 1684 j, 1671 j (C=O <sub>CONH</sub> ), 1630, 1507, 1457 (amid II)
<b>14</b>	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ -\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}$	0.8 (EtOAc)	3428 sr (NH <sub>slobodni</sub> ), 3306 sl(NH <sub>asocirani</sub> ), 1704 j, 1682 j, 1673 j (C=O <sub>CONH</sub> ), 1531, 1507, 1480, 1458, 1438, 1420 (amid II)
<b>15</b>	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	0.78 (EtOAc)	3427 sr (NH <sub>slobodni</sub> ), 3318 sl (NH <sub>asocirani</sub> ), 1704 j, 1683 j, 1673 j (C=O <sub>CONH</sub> ), 1531, 1507, 1498, 1456 (amid II)

**Tablica 13.**  $^1\text{H-NMR}$  i  $^{13}\text{C-NMR}$  spojeva **13-15**

Spoj	R	$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ /ppm	$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ /ppm
<b>13</b>		8.00 (s, 1H, $\text{NH}_{\text{Fn}}^{\text{a}}$ ), 6.25 (s, 1H, $\text{NH}_{\text{Ac}}$ ), 6.02 (s, 1H, $\text{NH}_{\text{Fn}}^{\text{b}}$ ), 4.66 (pt, 2H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.55 (pt, 2H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.30-4.39 (m, 1H, $\text{CH}_{\alpha\text{-Val}}$ ), 4.12 (s, 2H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.05 (s, 2H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 2.19-2.14 (m, 1H, $\text{CH}_{\beta\text{-Val}}$ ), 2.05 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 1.50 [s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{-Boc}$ ], 1.01 [d, $J = 6.3$ Hz, 3H, $(\text{CH}_3)_{\gamma\text{-aVal}}$ ], 0.98 [d, $J = 6.2$ Hz, 3H, $(\text{CH}_3)_{\gamma\text{-bVal}}$ ]	169.79 ( $\text{CO}_{\text{Fn}}^{\text{a}}$ ), 169.15 ( $\text{CO}_{\text{Ac}}$ ), 153.12 ( $\text{CO}_{\text{Fn}}^{\text{b}}$ ), 79.95 ( $\text{C}_{\text{qBoc}}$ ), 74.45 ( $\text{C}_{\text{qFn}}$ ), 72.93, 71.87, 70.81, 70.69, 67.45, 66.27, 63.54, 62.14 ( $\text{CH}_{\text{Fn}}$ ), 58.45 ( $\text{CH}_{\alpha\text{-Val}}$ ), 30.47 ( $\text{CH}_{\beta\text{-Val}}$ ), 27.87 [ $(\text{CH}_3)_3\text{Boc}$ ], 22.81 ( $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 18.81 [ $(\text{CH}_3)_{\gamma\text{-aVal}}$ ], 17.71 [ $(\text{CH}_3)_{\gamma\text{-bVal}}$ ]
<b>14</b>		8.02 (s, 1H, $\text{NH}_{\text{Fn}}$ ), 6.20 (s, 1H, $\text{NH}_{\text{Ac}}$ ), 6.02 (s, 1H, $\text{NH}_{\text{Fn}}^{\text{b}}$ ), 4.69-4.54 (m, 2H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.32 (s, 2H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.49-4.46 (m, 1H, $\text{CH}_{\alpha\text{-Leu}}$ ), 4.23-4.13 (m, 4H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 2.02 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 1.75-1.51 [m, 3H, $(\text{CH}_2)_{\beta\text{-Leu}}$ , $\text{CH}_{\gamma\text{-Leu}}$ ], 1.49 [s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{-Boc}$ ], 0.98-0.96 [m, 6H, $(\text{CH}_3)_{\delta\text{-a-Leu}}$ , $(\text{CH}_3)_{\delta\text{-b-Leu}}$ ]	170.62 ( $\text{CO}_{\text{Fn}}^{\text{a}}$ ), 170.52 ( $\text{CO}_{\text{Ac}}$ ), 150.30 ( $\text{CO}_{\text{Fn}}^{\text{b}}$ ), 80.56 ( $\text{C}_{\text{qBoc}}$ ), 70.76 ( $\text{C}_{\text{qFn}}$ ), 67.73, 63.05, 63.02, 62.82, 62.80 ( $\text{CH}_{\text{Fn}}$ ), 52.36 ( $\text{CH}_{\alpha\text{-Leu}}$ ), 41.29 [ $(\text{CH}_2)_{\beta\text{-Leu}}$ ], 28.57 [ $(\text{CH}_3)_3\text{Boc}$ ], 24.99 ( $\text{CH}_{\gamma\text{-Leu}}$ ), 23.38 ( $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 23.09, 22.41 [ $(\text{CH}_3)_2_{\delta\text{-Leu}}$ ]
<b>15</b>		7.77 (s, 1H, $\text{NH}_{\text{Fn}}^{\text{a}}$ ), 7.32-7.20 (m, 5H, $\text{H}_{\text{fenil}}$ ), 6.30 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, $\text{NH}_{\text{Ac}}$ ), 5.90 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, $\text{NH}_{\text{Fn}}^{\text{b}}$ ), 4.70 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{Phe}}$ ), 4.51 (pt, 2H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.32 (pt, 2H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.16-4.08 (m, 4H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 3.16-3.08 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{a-Phe}}$ , $\text{CH}_{2\text{b-Phe}}$ ), 1.99 [s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ], 1.49 [s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{-Boc}$ ]	170.98 ( $\text{CO}_{\text{Fn}}^{\text{a}}$ ), 169.46 ( $\text{CO}_{\text{Ac}}$ ), 153.87 ( $\text{CO}_{\text{Fn}}^{\text{b}}$ ), 136.75 ( $\text{C}_{\text{qfenil}}$ ), 129.58, 128.82, 127.20 ( $\text{CH}_{\text{fenil}}$ ), 80.62 ( $\text{C}_{\text{qBoc}}$ ), 62.63, 62.54, 62.53, 62.51 ( $\text{CH}_{\text{Fn}}$ ), 55.06 ( $\text{CH}_{\text{Phe}}$ ), 38.37 ( $\text{CH}_2\text{-Phe}$ ), 28.58 [ $(\text{CH}_3)_3\text{Boc}$ ], 23.37 ( $\text{CH}_3\text{-Ac}$ )

**3.1.6. Opći postupak pripreme peptidâ Ac-L-Val-NH-Fn-NH-L-Val-Boc (16), Ac-L-Leu-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc (17) i Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (18)**

Peptide **13**, **14** ili **15** otopi se u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ohladi na 0 °C i izloži djelovanju plinovitog HCl. Nakon 15 minuta miješanja u ledenoj kupelji, uvođenje HCl-a nastavi se pri sobnoj temperaturi dok se TLC-om ne utvrdi završetak reakcije. Smjesa se otpari na rotacijskom vakuum-uparivaču, a nastali hidroklorid suspendira se u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> te obradi sa suviškom Et<sub>3</sub>N do pH~9. Dobiveni se slobodni amin kopulira s Boc-AK-OH (AK = L-Val, L-Leu, L-Phe) primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon 1 sat miješanja pri sobnoj temperaturi rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom NaHCO<sub>3</sub>, 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari do suha. Sirovi produkt (slika 9.) pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz EtOAc kao eluens. Količine upotrijebljenih supstrata i kemikalija prikazane su u tablici 14., a rezultati IR- i NMR-analize u tablicama 15. i 16.



**Slika 9. Peptidi 16-18**



**Tablica 14.** Supstrati i reagensi upotrebljeni za pripravu Boc-tripeptida (**16-18**)

Produkt	Supstrat (masa, množina)	Aminokiselina (masa , množina/)	Reagensi za kopulaciju (masa, množina)		Dobivena masa (iskorištenje)	Opis produkta
			EDC	HOBt		
<b>16</b>	<b>13</b> (78.7 mg, 0.17 mmol)	Boc-L-Val-OH (73.9 mg, 0.4 mmol)	(130.1 mg, 0.68 mmol)	(91.9 mg, 0.68 mmol)	30 mg (27%)	Žuta smola
<b>17</b>	<b>14</b> (74 mg, 0.16 mmol)	Boc-L-Leu-OH (72.86 mg, 0.315 mmol)	(120.8 mg, 0.63 mmol)	(85.1 mg, 0.63 mmol)	30.2 mg (28%)	Žuta smola
<b>18</b>	<b>15</b> (61 mg, 0.12 mmol)	Boc-L-Phe-OH (63.7 mg, 0.24 mmol)	(92 mg, 0.48 mmol)	(64.9 mg, 0.48 mmol)	20 mg (22%)	Žuta smola

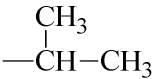
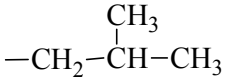
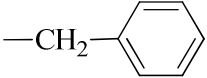
**HPLC-MS:**

ESI-MS: izračunato za C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Fe (**16**): 556.48; dobiveno (M+H)<sup>+</sup> m/z 557.5.

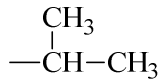
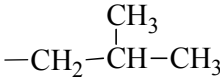
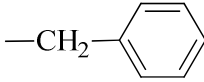
ESI-MS: izračunato za C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Fe (**17**): 584.54; dobiveno (M+H)<sup>+</sup> m/z 585.6.

ESI-MS: izračunato za C<sub>35</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Fe (**18**): 652.57; dobiveno (M+H)<sup>+</sup> m/z 653.6.

**Tablica 15.** R<sub>f</sub>-vrijednosti i maksimumi apsorpcijskih vrpca za spojeve **16-18**

Spoj	R	R <sub>f</sub>	IR(CH <sub>2</sub> Cl) ν <sub>max</sub> /cm <sup>-1</sup>
16		0.49 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc = 5 : 1)	3434 sr (NH <sub>slobodni</sub> ), 3305 j, 3249 sr (Nh <sub>asocirani</sub> ), 1715 j, 1683 j, 1668 j, 1637 j (C=O <sub>CONH</sub> ), 1571, 1540, 1505, 1458 (amid II)
17		0.71 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc = 5 : 1)	3434 sr (NH <sub>slobodni</sub> ), 3301 j, 3253 sr (NH <sub>asocirani</sub> ), 1693 j, 1683 j, 1668 j, 1653 j (C=O <sub>CONH</sub> ), 1573, 1540, 1506, 1457 (amid II)
18		0.51 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc = 5 : 1)	3430 sr (NH <sub>slobodni</sub> ), 3302 j, 3266 j, 3217 sr (Nh <sub>asocirani</sub> ), 1706 j, 1684 j, 1669 j, 1648 j (C=O <sub>CONH</sub> ) 1575, 1541, 1498, 1467, 1457 (amid II)

Tablica 16.  $^1\text{H-NMR}$  i  $^{13}\text{C-NMR}$  spojeva 16-18

Spoj	R	$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta/\text{ppm}$	$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta/\text{ppm}$
16		9.21 (s, 1H, $\text{NH}^b_{\text{Fn}}$ ), 9.04 (s, 1H, $\text{NH}^a_{\text{Fn}}$ ), 6.75 (d, $J = 7, 1$ Hz, 1H, $\text{NH}_{\text{Ac}}$ ), 5.36 (s, 2H, H-7 $_{\text{Fn}}$ , H-10 $_{\text{Fn}}$ ), 5.21 (d, $J = 8, 7$ Hz, 1H, $\text{NH}_{\text{Boc}}$ ), 4.16 (t, 1H, $\text{CH}^a_{\alpha\text{-Val}}$ ), 4.04 (s, 1H, H-2 $_{\text{Fn}}$ ), 3.98 (s, 2H, H-3 $_{\text{Fn}}$ , H-4 $_{\text{Fn}}$ ), 3.97 (t, 1H, $\text{CH}^b_{\alpha\text{-Val}}$ ), 3.94 (s, 1H, H-5 $_{\text{Fn}}$ ), 3.90 (s, 2H, H-8 $_{\text{Fn}}$ , H-9 $_{\text{Fn}}$ ), 2.12 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 2.03-2.02 (m, 1H, $\text{CH}^a_{\beta\text{-Val}}$ ), 1.97-1.95 (m, 1H, $\text{CH}^b_{\beta\text{-Val}}$ ), 1.47 [s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{-Boc}$ ], 1.06 (d, $J = 6.8$ , 3H, $\text{CH}_3^b_{\text{Val}}$ ), 1.04 [d, $J = 6.9$ , 6H, $(\text{CH}_3)_2^b_{\text{Val}}$ ], 1.01 [d, $J = 6.6$ Hz, 6H, $(\text{CH}_3)_2^a_{\text{Val}}$ ]	171.51 ( $\text{CO}_{\text{Ac}}$ ), 170.98 ( $\text{CO}^b_{\text{Fn}}$ ), 170.65 ( $\text{CO}^a_{\text{Fn}}$ ), 157.25 ( $\text{CO}_{\text{Boc}}$ ), 95.83 (C-6 $_{\text{Fn}}$ ), 95.54 (C-1 $_{\text{Fn}}$ ), 80.55 ( $\text{C}_{\text{qBoc}}$ ), 65.60 (C-8, C-9), 65.01 (C-5), 64.87 (C-4), 62.87 (C-7), 62.78 (C-10), 61.79 (C-3), 61.37 (C-2), 61.20 ( $\text{CH}^b_{\alpha\text{-Val}}$ ), 61.08 ( $\text{CH}^a_{\alpha\text{-Val}}$ ), 30.40 ( $\text{CH}^a_{\beta\text{-Val}}$ ), 30.19 ( $\text{CH}^b_{\beta\text{-Val}}$ ), 28.62 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-Boc}$ ], 23.33 ( $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 19.60 [ $(\text{CH}_3)_\gamma^b_{\text{Val}}$ ], 19.37 [ $(\text{CH}_3)_\gamma^a_{\text{Val}}$ ], 19.29 [ $(\text{CH}_3)_\gamma^b_{\text{Val}}$ ]
17		9.39 (s, 1H, $\text{NH}^b_{\text{Fn}}$ ), 9.16 (s, 1H, $\text{NH}^a_{\text{Fn}}$ ), 7.30 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, $\text{NH}_{\text{Ac}}$ ), 5.38 (s, 1H, H-7 $_{\text{Fn}}$ ), 5.37 (s, 1H, H-10 $_{\text{Fn}}$ ), 5.17 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, $\text{NH}_{\text{Boc}}$ ), 4.52-4.47 (m, 1H, $\text{CH}^a_{\alpha\text{-Leu}}$ ), 4.34-4.29 (m, 1H, $\text{CH}^b_{\alpha\text{-Leu}}$ ), 4.08 (s, 1H, H-3 $_{\text{Fn}}$ ), 4.01 (s, 1H, H-4 $_{\text{Fn}}$ ), 3.98 (s, 1H, H-2 $_{\text{Fn}}$ ), 3.93 (s, 1H, H-5 $_{\text{Fn}}$ ), 3.90 (s, 2H, H-8 $_{\text{Fn}}$ , H-9 $_{\text{Fn}}$ ), 2.12 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 1.79-1.69 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-}\beta\text{-Leu}$ , $\text{CH}^a_{\gamma\text{-Leu}}$ ), 1.62-1.54 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-}\beta\text{-Leu}$ , $\text{CH}^b_{\gamma\text{-Leu}}$ ), 1.48 [s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{-Boc}$ ], 0.95 [t, $J = 7.2$ Hz, 6H, $(\text{CH}_3)_2^b_{\text{Leu}}$ ], 0.89 [d, $J = 6.5$ Hz, 6H, $(\text{CH}_3)_2^a_{\text{Leu}}$ ]	171.90 ( $\text{CO}^b_{\text{Fn}}$ ), 171.68 ( $\text{CO}_{\text{Ac}}$ ), 171.61 ( $\text{CO}^a_{\text{Fn}}$ ), 157.22 ( $\text{CO}_{\text{Boc}}$ ), 96.10 (C-6 $_{\text{Fn}}$ ), 95.81 (C-1 $_{\text{Fn}}$ ), 80.68 ( $\text{C}_{\text{qBoc}}$ ), (C-8), 65.61 (C-9), 64.88 (C-5), 64.66 (C-2), 62.88 (C-7), 62.67 (C-10), 61.49 (C-4), 61.25 (C-3), 54.04 ( $\text{CH}^b_{\alpha\text{-Leu}}$ ), 53.87 ( $\text{CH}^a_{\alpha\text{-Leu}}$ ), 41.04 ( $\text{CH}_2^b_{\beta\text{-Leu}}$ ), 40.51 ( $\text{CH}_2^a_{\beta\text{-Leu}}$ ), 28.67 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-Boc}$ ], 24.98 ( $\text{CH}^b_{\gamma\text{-Leu}}$ ), 24.84 ( $\text{CH}^a_{\gamma\text{-Leu}}$ ), 23.39 ( $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 23.02, 22.97, 21.70, 21.62 [ $(\text{CH}_3)_\gamma^a_{\text{Val}}$ ]; $(\text{CH}_3)_\gamma^b_{\text{Val}}$
18		9.09 (s, 1H, $\text{NH}^b_{\text{Fn}}$ ), 9.04 (s, 1H, $\text{NH}^a_{\text{Fn}}$ ), 7.71-7.69; 7.53-7.52; 7.25-7.18 (m, 10H, $\text{H}_{\text{fenil}}$ ), 6.52 (d, 1H, $\text{NH}_{\text{Ac}}$ ), 5.32 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 5.29 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 5.20 (s, 1H, $\text{NH}_{\text{Boc}}$ ), 4.76 (s, 1H, $\text{CH}^a_{\text{Phe}}$ ), 4.58 (s, 1H, $\text{CH}^b_{\text{Phe}}$ ), 4.09 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 4.05 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 3.94 (s, 4H, $\text{H}_{\text{Fn}}$ ), 3.18-3.15 (m, 1H, $\text{CH}^a_{2a\text{-Phe}}$ ), 3.14-3.11 (m, 1H, $\text{CH}^b_{2a\text{-Phe}}$ ), 2.96-2.92 (m, 1H, $\text{CH}^a_{2b\text{-Phe}}$ ), 2.89-2.85 (m, 1H, $\text{CH}^b_{2b\text{-Phe}}$ ), 2.03 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 1.41 [s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{-Boc}$ ]	171.58 ( $\text{CO}^a_{\text{Fn}}$ ), 170.76 ( $\text{CO}^b_{\text{Fn}}$ ), 167.87 ( $\text{CO}_{\text{Ac}}$ ), 157.16 ( $\text{CO}_{\text{Boc}}$ ), 136.81, 136.50 ( $\text{C}_{\text{qfenil}}$ ), 129.51-127.02 ( $\text{CH}_{\text{fenil}}$ ), 80.92 ( $\text{C}_{\text{qBoc}}$ ), 68.34 ( $\text{C}_{\text{qFn}}$ ), 65.82, 63.13, 63.11, 62.86, 62.85, 61.90 ( $\text{CH}_{\text{Fn}}$ ), 56.51, 55.97 ( $\text{CH}_{\text{Phe}}$ ), 38.16 ( $\text{CH}_2\text{-Phe}$ ), 28.59 [ $(\text{CH}_3)_3\text{-Boc}$ ], 23.14 ( $\text{CH}_3\text{-Ac}$ )

## ***§ 4. REZULTATI I RASPRAVA***

Sinteza i konformacijska analiza ferocenskih peptida **16**, **17** i **18** izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina (**iii**) i prirodnih aminokiselina s voluminoznim bočnim ograncima provedena je s ciljem utvrđivanja združenog utjecaja ferocenskog kalupa i bočnih ogranaka na obrazac intramolekulskih vodikovih veza.

Ciljni spojevi pripremljeni su iz Boc-Fca-OMe (Fca = 1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina). Nakon Boc-deprotekcije djelovanjem plinovitog HCl i kopulacije s prirodnim Boc-zaštićenim aminokiselinama Boc-AK-OH (AK = L-Val, L-Leu, L-Phe), pripremljeni su peptidi **1-3**, što je u NMR-spektrima potvrđeno signalima atoma njihovih bočnih ogranaka. Uslijedila je transformacija karbamatne u acetamidnu skupinu prekursora **4-6**, što je u NMR-spektrima registrirano izostankom signala protona iz *tert*-butilne skupine ( $\delta = 1.5-1.4$  ppm) te pojavom signala karakterističnih za protone iz acetilne skupine ( $\delta = 2.1-2.0$  ppm). Nakon pročišćavanja, peptidi **4-6** podvrgnuti su saponifikaciji u prisutnosti ekvimolarne količine lužine u cilju sprječavanja racemizacije. Tvorba tih kiselina registrirana je u IR-spektrima širokim apsorpcijskim vrpama -OH skupina ( $3140-3100\text{ cm}^{-1}$ ). Tako dobivene kiseline **7-9** prevedene su djelovanjem ClCOOEt i  $\text{NaN}_3$  u odgovarajuće azide **10-12**, što je potvrđeno izostankom IR-apsorpcijskih vrpki karakterističnih za karboksilnu skupinu te pojavom apsorpcijskih vrpki azidne skupine [ $1683\text{ cm}^{-1}$  j ( $\text{C}=\text{O}_{\text{CON}_3}$ )]. Zagrijavanjem azida **10-12** u *tert*-butanolu sintetizirani su karbamati **13-15**, što je u NMR-spektrima registrirano signalima *t*Bu-skupina pri  $\delta \sim 1.5$  ppm te NH-atoma pri  $\delta \sim 5.2$  ppm. Djelovanjem plinovitog HCl deprotektirana je njihova *N*-terminalna skupina nakon čega je provedena kopulacija s Boc-AK-OH (AK = L-Val, L-Leu, L-Phe). Pripremljeni peptidi **16**, **17** i **18** podvrgnuti su detaljnoj konformacijskoj analizi [infracrvena spektroskopija (IR), spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i cirkularni dikroizam (CD)].

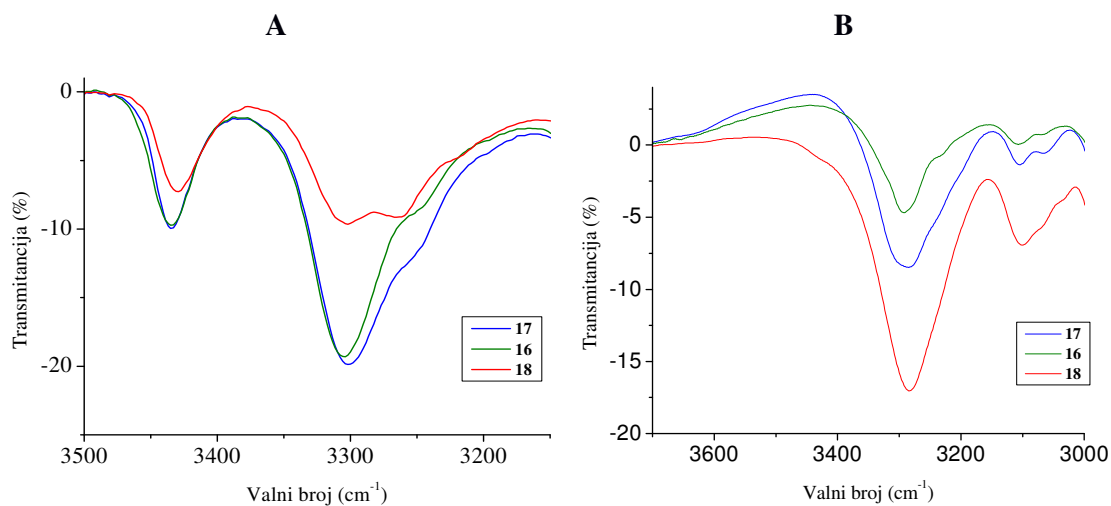
#### 4.1. IR-spektroskopska analiza

Konformacijska analiza započeta je razmatranjem rezultata koncentracijski-ovisne IR-spektroskopije. IR-spektroskopija je instrumentalna metoda koja služi ne samo za identifikaciju funkcijskih skupina, već i za razlikovanje slobodnih ( $> 3400\text{ cm}^{-1}$ ) i asociranih NH-skupina ( $< 3400\text{ cm}^{-1}$ ). Karakter asocijacija (intra- ili intermolekulski) utvrđuje se mjerenjem koncentracijski-ovisnih IR-spektara. Ukoliko su u molekuli prisutne intramolekulske vodikove veze, razrjeđenjem dolazi do proporcionalnog smanjenja intenziteta vrpki slobodnih i asociranih NH-skupina, odnosno njihov omjer se ne mijenja. Međutim,

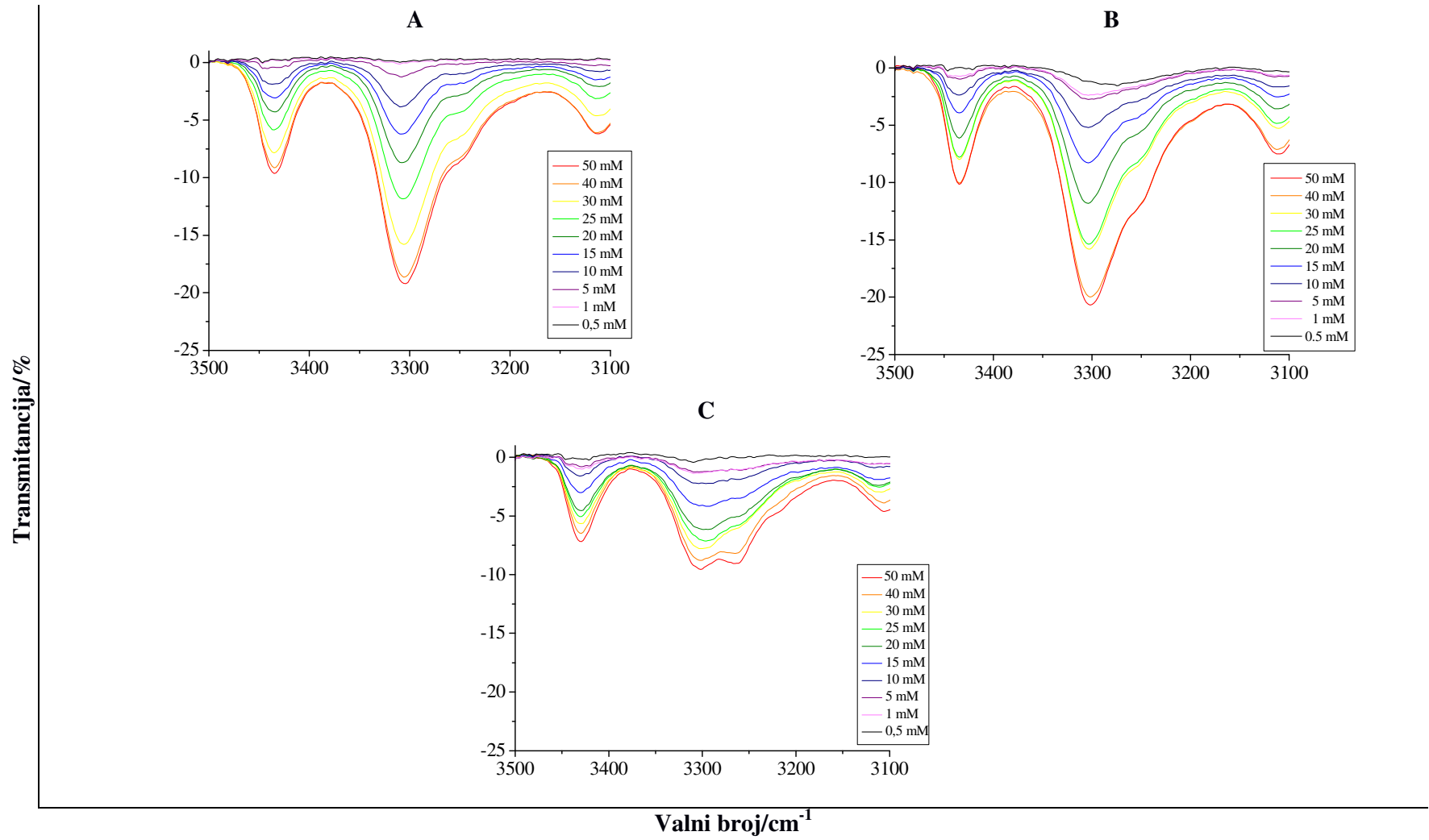
ukoliko se u uzorku javljaju i intermolekulske vodikove veze, postupnim razrjeđenjem dolazi do povećanja intenziteta slobodne NH-skupine u odnosu na asociranu.

Većina NH-skupina iz produkata **16-18** sudjeluje u vodikovim vezama, na što upućuju jači signali asociranih NH-skupina ( $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ ) (slika 10A). Nepromijenjen omjer intenziteta vrpce asociranih i slobodnih NH-skupina (2 : 1) nakon mjerenja koncentracijski-ovisnih IR-spektara, indicira intramolekulski angažman NH-skupina iz peptida **16** i **17**. Sličan zaključak nameće se nakon mjerenja koncentracijski-ovisnih spektara peptida **18** u kojima se omjer asociranih i slobodnih NH-skupina (1.3 : 1) ne mijenja razrjeđivanjem (slika 11.).

Provedena je i IR-spektroskopska analiza peptida **16-18** u čvrstom stanju (slika 10B) pri čemu je prema položaju vrpce NH-skupine pri  $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$  utvrđeno sudjelovanje svih NH-skupina u vodikovim vezama.



**Slika 10.** IR-spektri spojeva **16-18** snimljeni u (A) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i (B) čvrstom stanju (KBr)



**Slika 11.** Rastezne vibracije NH-skupina spojeva **16** (A), **17** (B) i **18** (C) u koncentracijski-ovisnim IR-spektrima (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

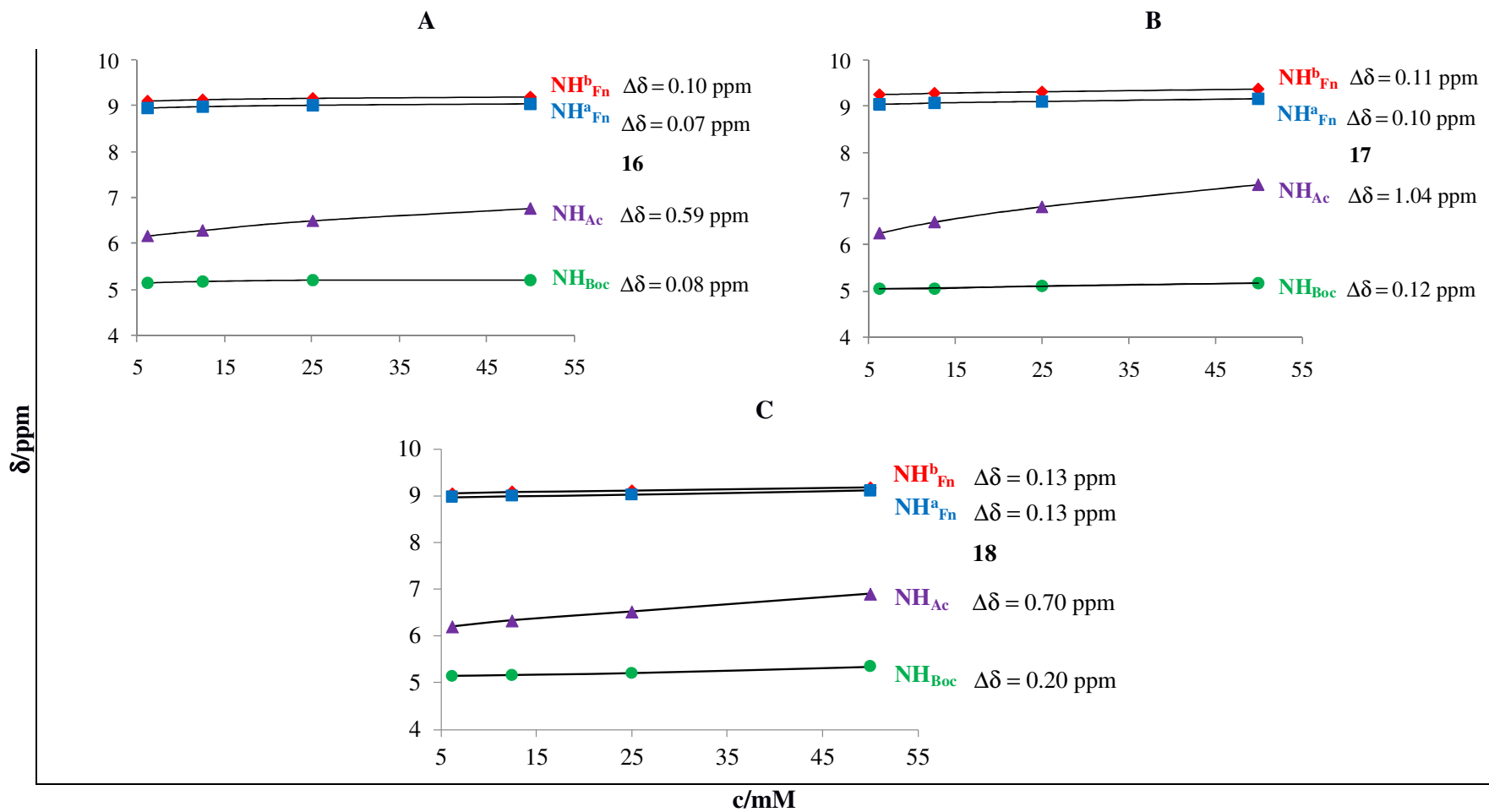
## 4.2. NMR-spektroskopska analiza

NMR-spektroskopija je najmoćnija spektroskopska metoda za određivanje strukture molekula, a u peptidnoj kemiji omogućuje razlikovanje slobodnih i asociranih NH-skupina. Pri tome kemijski pomaci iznad 7 ppm (slabije polje) odgovaraju NH-atomima uključenima u vodikovu vezu. Kako je opisano u prethodnom odjeljku, priroda asocijacija utvrđuje se mjerenjem koncentracijski-ovisnih spektara. Nepromijenjene ili neznatno promijenjene vrijednosti kemijskih pomaka pripisuju se NH-protonima uključenima u intramolekulske vodikove veze (IHB). Nadalje, mjerenjem temperaturno-ovisnih NMR-spektara i određivanjem koeficijenata temperaturne ovisnosti dodatno se ispituje priroda vodikovih veza u kojoj sudjeluju NH-atomi. Jakost IHB indiciranih prethodnim mjerenjima utvrđuje se titracijom NMR-uzoraka s DMSO. Jake IHB karakteriziraju neznatno promijenjeni kemijski pomaci NH-skupina nakon dodatka kompeticijskog otapala.

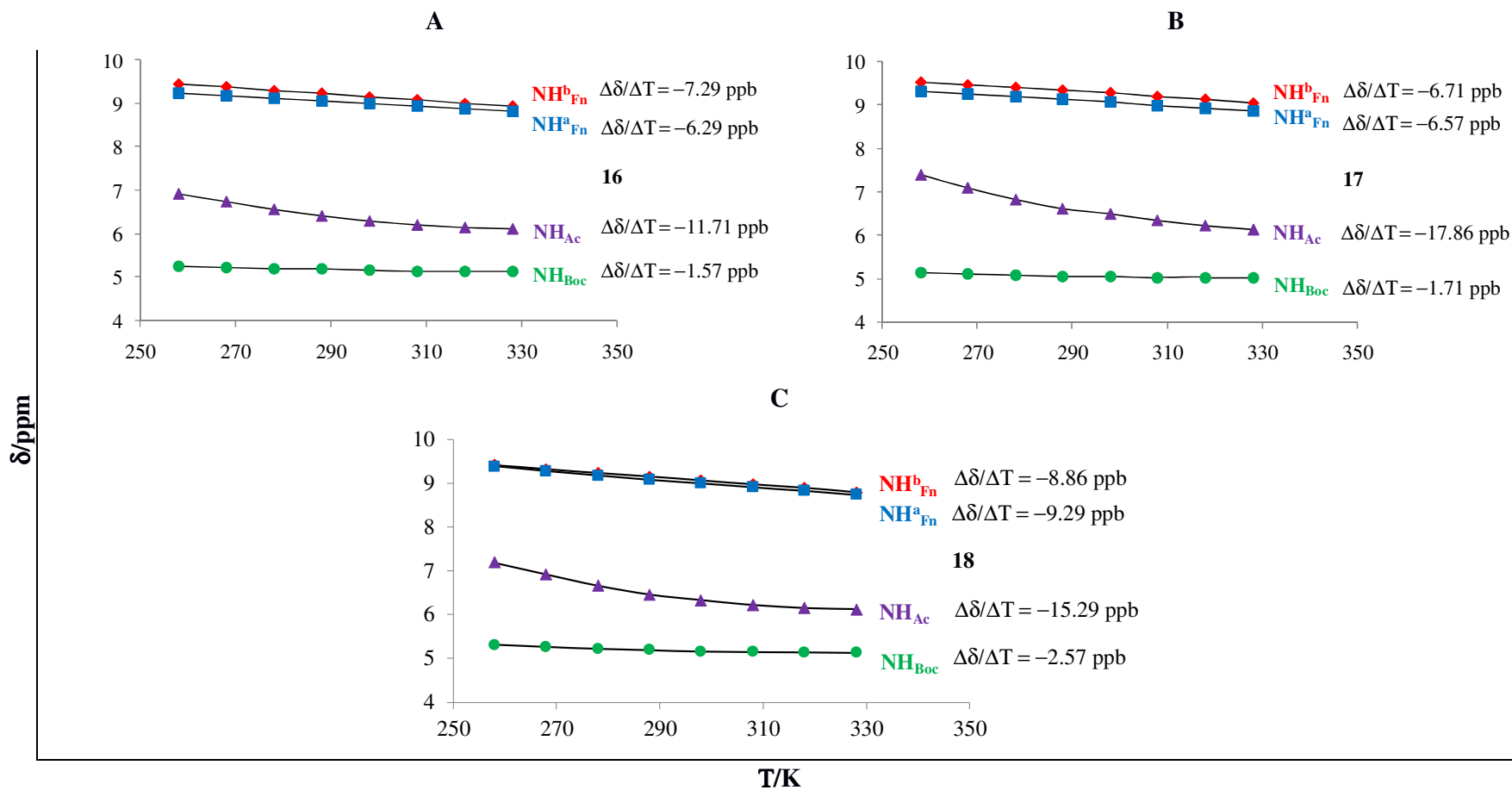
Iz kemijskih pomaka detektiranih u NMR-spektrima peptida **16-18** indicirano je sudjelovanje  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  u vodikovim vezama ( $\delta \geq 9$  ppm). Relativno visoki kemijski pomaci  $\text{NH}_{\text{Ac}}$  ( $\delta = 6.10\text{-}6.80$  ppm) ukazuju na njihovo moguće sudjelovanje u vodikovim vezama, dok niski kemijski pomaci detektirani za  $\text{NH}_{\text{Boc}}$  isključuju mogućnost njihovog sudjelovanja u vodikovim vezama ( $\delta \sim 5$  ppm). Priroda vodikovih veza ispitana je mjerenjem koncentracijski-ovisnih NMR-spektara. Kako su kemijski pomaci  $\text{NH}_{\text{Fn}}$ -atoma iz peptide **16-18** ostali gotovo nepromijenjeni ( $\Delta\delta = 0.07\text{-}0.13$  ppm) tokom razrjeđivanja, sugerirana je njihova participacija u intramolekulskim vodikovim vezama (IHB) (slika 12.). Suprotno tome, razlika u kemijskim pomacima  $\text{NH}_{\text{Ac}}$  detektirana nakon razrjeđenja ( $\Delta\delta = 0.59\text{-}1.04$  ppm) dopušta mogućnost njihovog sudjelovanja u intermolekulskim vodikovim vezama.

Gore opisani rezultati koncentracijski-ovisne IR- i NMR-spektroskopije sugeriraju prisutnost IHB u otopinama ispitanih peptida. Dodatna potvrda takve pretpostavke dobivena je određivanjem koeficijenata temperaturne ovisnosti ( $\Delta\delta/\Delta T$ ). Za razliku od niskih vrijednosti koeficijenata temperaturne ovisnosti ( $-2.4 \pm 0.5$  ppb/K) koje odgovaraju i zasjenjenim i nezasjenjenim protonima te stoga ne govore puno o sudjelovanju u vodikovim vezama, visoke vrijednosti uvijek indiciraju inicijalno zaklonjene NH-atome. Sukladno prethodnim rezultatima koncentracijski-neovisnih kemijskih pomaka  $\text{NH}_{\text{Fn}}$ -atoma, registrirane su visoke vrijednosti njihovih koeficijenata temperaturne ovisnosti ( $\Delta\delta/\Delta T > 6$  ppb). Nadalje, i  $\text{NH}_{\text{Ac}}$  bilježe vrlo visoke  $\Delta\delta/\Delta T$  vrijednosti ( $> 11$  ppb), što je u skladu s pretpostavkom o njihovom sudjelovanju u vodikovim vezama (slika 13.).





Slika 12. Koncentracijski-ovisni kemijski pomaci NH-atoma iz peptida 16 (A), 17 (B) i 18 (C)

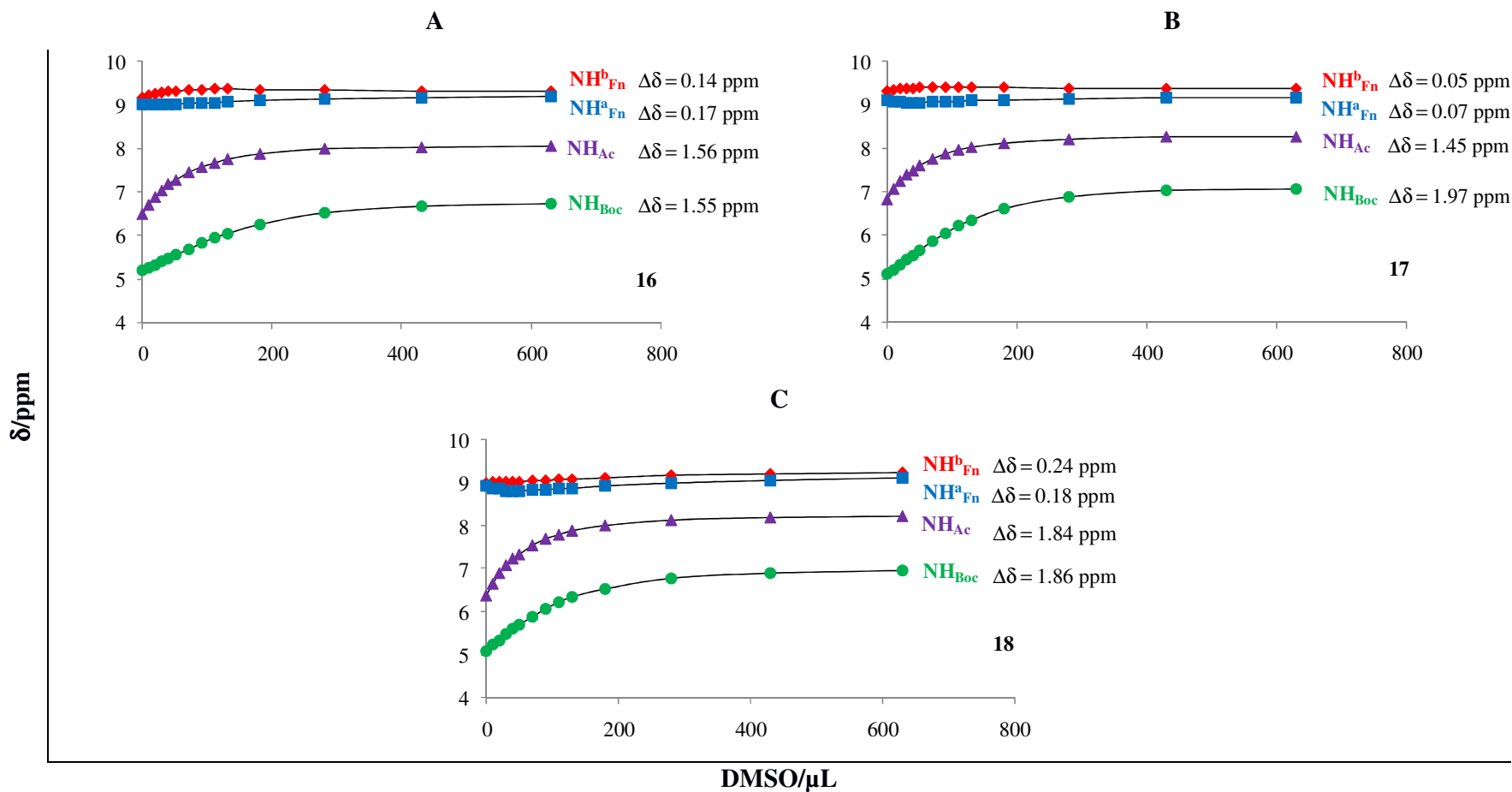


**Slika 13.** Temperaturno-ovisni kemijski pomaci NH-atoma iz peptida **16** (A), **17** (B) i **18** (C) ( $c = 25$  mM,  $\text{CDCl}_3$ )

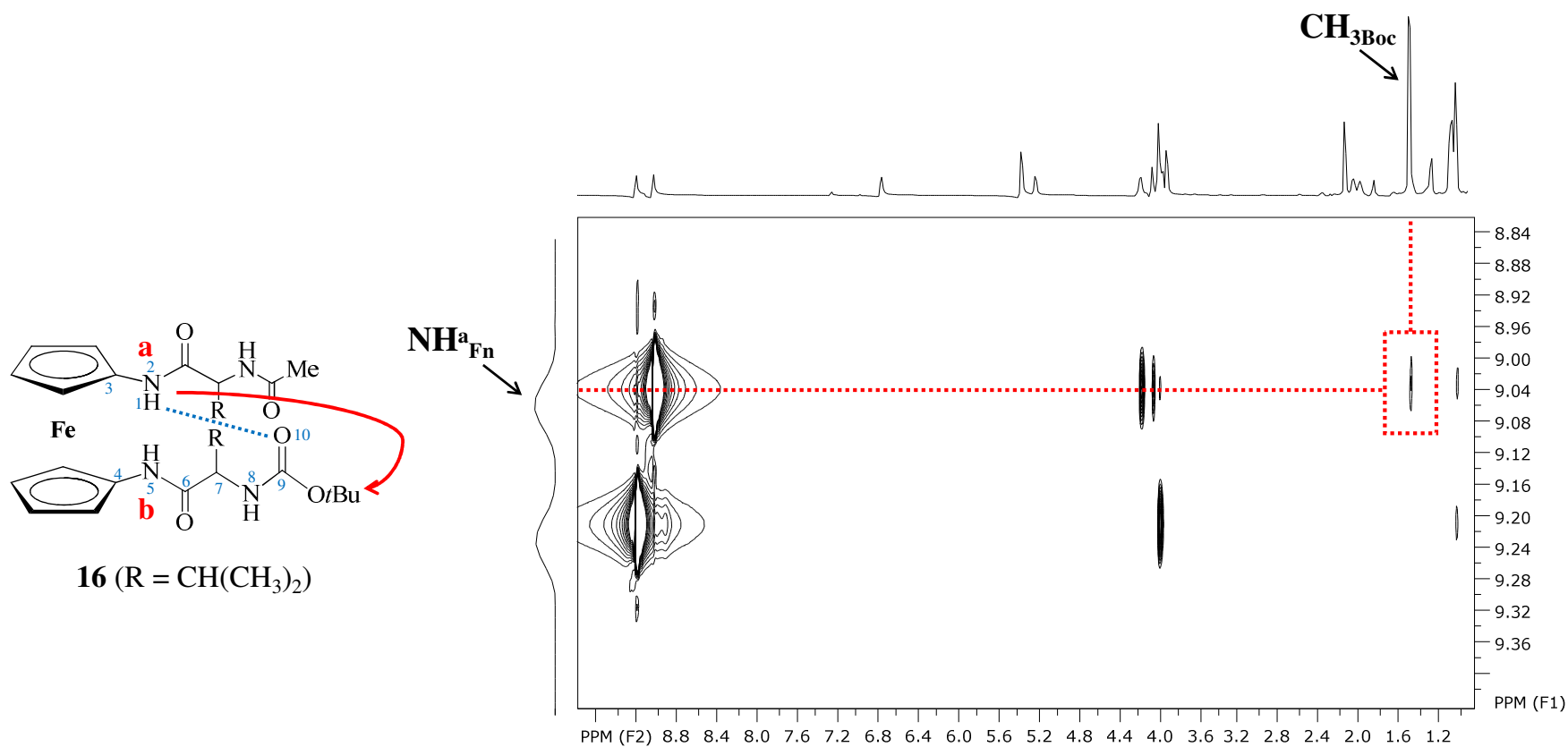
Jakost pretpostavljenih IHB ispitana je titracijom s DMSO. Ukoliko amidni protoni ne participiraju u jakim IHB, dodatak tog kompeticijskog otapala uzrokovat će naglašeni pomak njihovih signala u niže polje uslijed solvatacije. S druge strane, kemijski pomaci amidnih protona uključenih u jake IHB nakon dodatka DMSO ostat će praktički nepromijenjeni. Takav je trend uočen kod  $\text{NH}_{\text{Fn}}$ -atoma ( $\Delta\delta < 0.25$  ppm), što je dodatna pretpostavka njihovog sudjelovanja u jakim IHB. Suprotno tome, velike razlike u kemijskim pomacima  $\text{NH}_{\text{Ac}}$ -atoma ( $\Delta\delta > 1.4$  ppm) sugeriraju sudjelovanje acetamidne skupine u slabim vodikovim vezama (slika 14.).

Usporedbom dobivenih rezultata s rezultatima konformacijske analize ranije opisanih Ala-analoga (Kovačević i sur., 2015), nameće se zaključak o sličnom obrascu vodikovih veza u otopinama ovdje opisanih spojeva. Kako su  $\text{NH}_{\text{Fn}}$ -atomi iz Ala-analoga sudjelovali u dvjema interlančanim vodikovim vezama, prisutnost istog takvog IHB-motiva istražili smo u NOESY-spektrima peptida **16-18**.

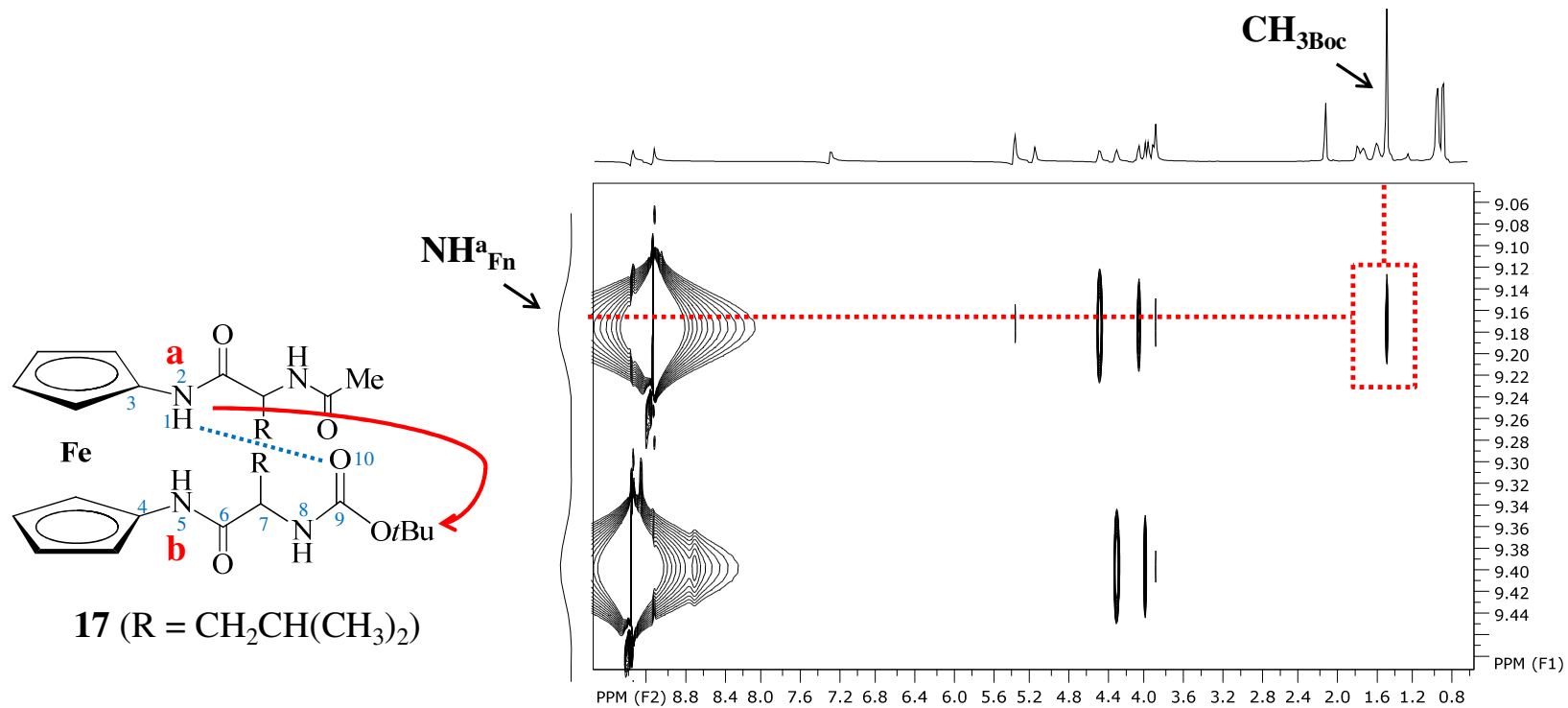
NOE-kontakti detektirani između  $\text{NH}_{\text{Fn}}^{\text{a}}$  i *t*Bu-skupine iz drugog lanca u NMR-spektrima peptida **16**, **17** i **18**, nađeni i kod njihovih Ala-analoga, predstavljaju jaku indiciju  $\text{NH}_{\text{Fn}}^{\text{a}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$  interlančanih IHB (deseteročlani IHB prsten,  $\beta$ -okret) (slike 15., 16. i 17.).



**Slika 14.** Kemijski pomaci NH-atoma peptida **16** (A), **17** (B) i **18** (C) registrirani tijekom titracije s DMSO

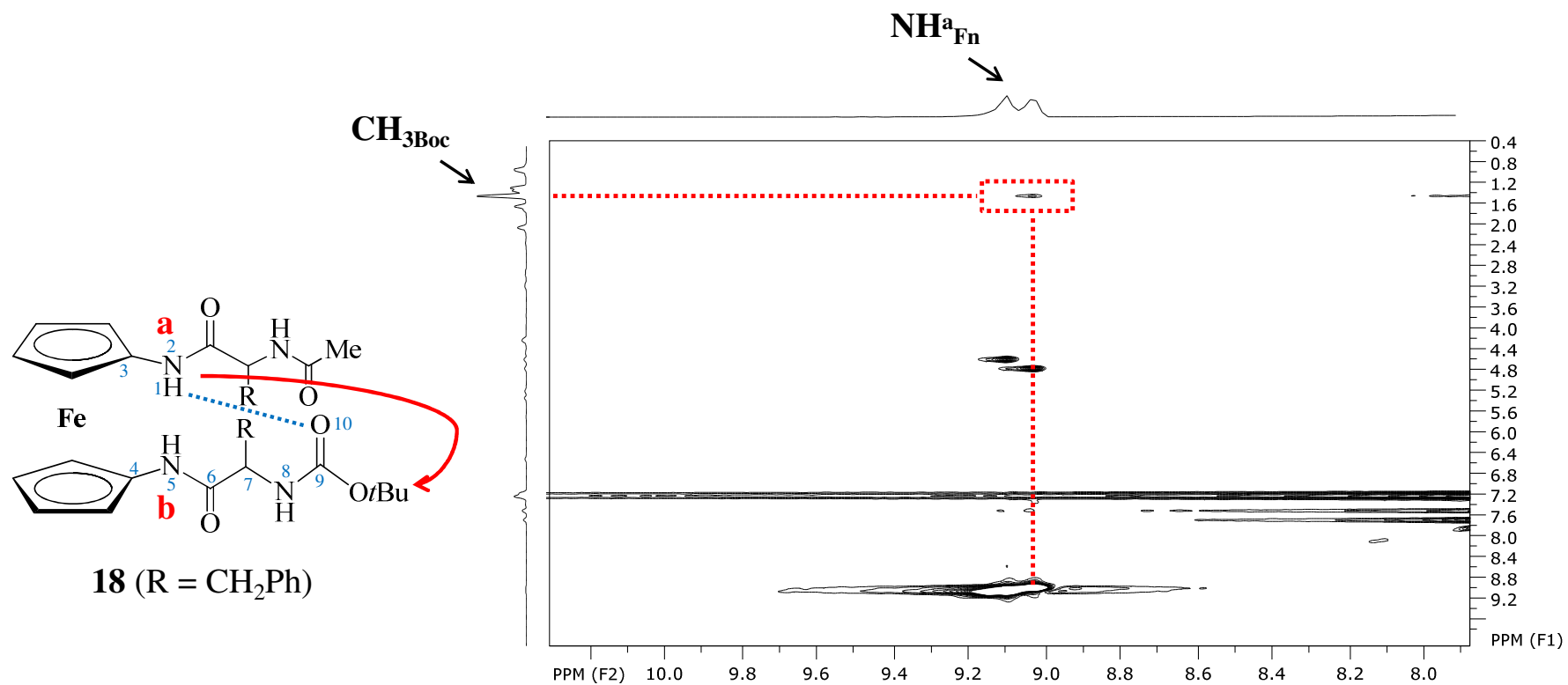


**Slika 15.** NOE-kontakt registriran u NMR-spektru peptida **16**  
 (na shemi spoja NOE-kontakt označen je strelicom, a IHB isprekidanom crtom)



**Slika 16.** NOE-kontakt registrirani u NMR-spektru peptida **17**

(na shemi spoja NOE-kontakt označen je strelicom, a IHB isprekidanom crtom)



**Slika 17.** NOE-kontakt registrirani u NMR-spektru peptida **18**  
 (na shemi spoja NOE-kontakt označen je strelicom, a IHB isprekidanom crtom)

### 4.3. CD-spektroskopska analiza

Cirkularni dikroizam (CD) je spektroskopska metoda koja se koristi pri proučavanju kiralnih molekula te za detekciju elemenata peptidne sekundarne strukture.

Jake IHB preduvjet su za tvorbu visoko-uređenih kiralnih struktura u ferocenskim peptidima, što omogućuje indukciju jakog Cottonovog efekta u području ferocenskog kromofora ( $\lambda \sim 470$  nm) (Kovačević i sur., 2015; Kovačević i sur., 2017). Dodatni dokaz prisutnosti jakih IHB, pretpostavljenih NMR-spektroskopijom, je očuvanje CD-aktivnosti nakon titracije s kompeticijskim otapalom (DMSO).

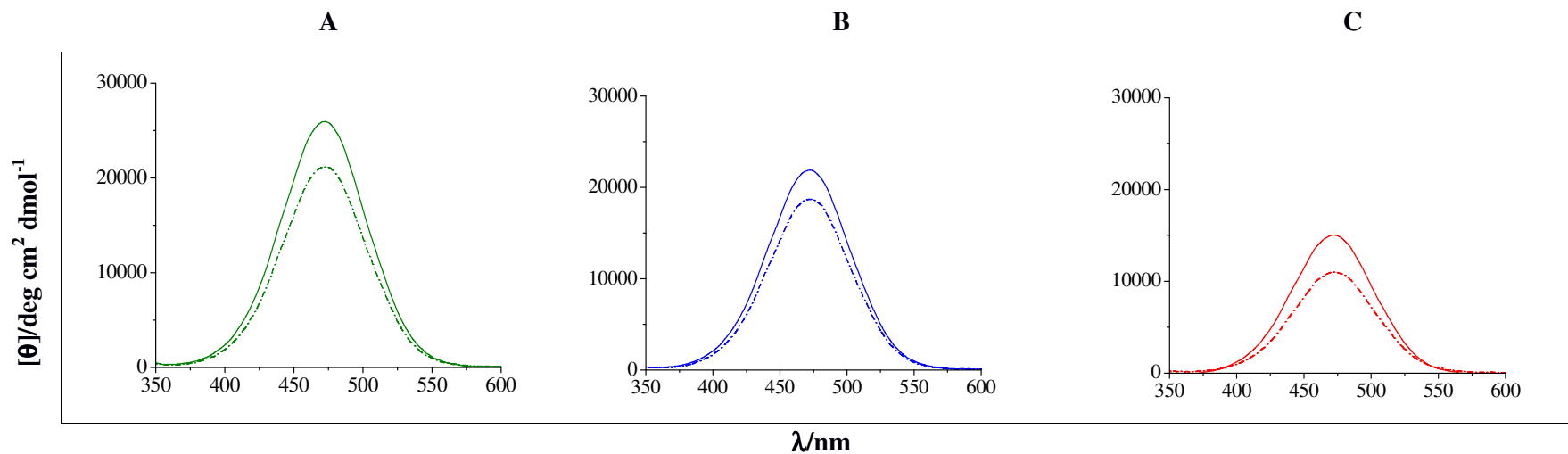
Očekivano, CD-spektroskopskom analizom peptida **16-18** u otopini registrirani su jaki Cottonovi efekti (tablica 17.) čiji je intenzitet posljedica prisutnosti jakih IHB, indiciranih prethodnim spektroskopskim mjerenjima. Dodatna potvrda jakosti IHB kao i visokog kiralnog uređenja vidljiva je iz očuvane CD-aktivnosti peptida **16-18** ( $> 70\%$ ) nakon dodatka kompeticijskog otapala (slika 18.).

IR-spektroskom analizom peptida **16-18** u čvrstom stanju indicirano je sudjelovanje svih NH-atoma u vodikovim vezama, što je potvrđeno Cottonovim efektima dobivenima CD-spektroskopskom analizom peptida **16-18** u čvrstom stanju (KBr) (slika 19.).

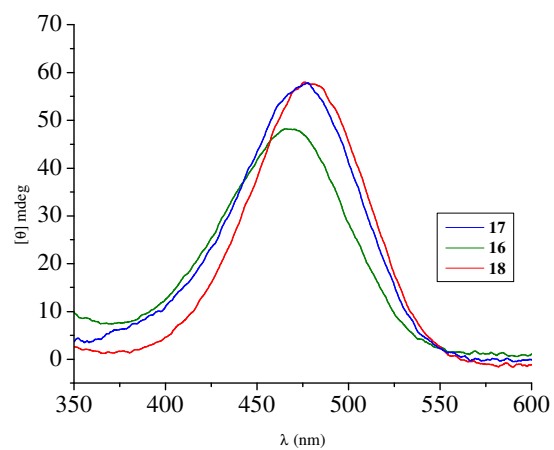
**Tablica 17.** Cottonovi efekti peptida **16-18** u  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  te uz dodatak 20% DMSO

Spoj	Formula	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$		$[\theta]/\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$	
		$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	$\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{DMSO}$	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	$\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{DMSO}$
<b>16</b>	Ac-L-Val-NH-Fn-NH-L-Val-Boc	473	472	25947	21127
<b>17</b>	Ac-L-Leu-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc	472	472	21902	18698
<b>18</b>	Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc	472	472	15033	10999



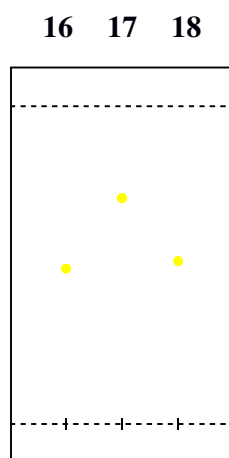


**Slika 18.** Cottonovi efekti u kiralno-organiziranim ferocenskim peptidima **16** (A), **17** (B) i **18** (C) [ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $c = 5 \text{ mM}$ ), puna crta; te uz dodatak 20 % DMSO, isprekidana crta]



**Slika 19.** CD-spektri spojeva **16-18** snimljeni u čvrstom stanju (KBr)

U nastavku započetih istraživanja provest će se biološka evaluacija ovdje opisanih ferocenskih peptidomimetika **16-18**. Kako su prethodna istraživanja biološke aktivnosti njihovih alaninskih analoga **III** (Kovačević i sur., 2015) ukazala na ključnu ulogu lipofilnosti, na temelju  $R_f$ -vrijednosti spojeva **16-18** možemo očekivati najveću biološku aktivnost leucinskog analoga **17** (slika 20.).



**Slika 20.**  $R_f$ -vrijednosti peptida **16**, **17** i **18** u sustavu  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{EtAc} = 5 : 1$

## **§ 5. ZAKLJUČAK**

1. U ovom radu opisana je sinteza i konformacijska analiza triju novih ferocenskih peptida Ac-L-Val-NH-Fn-NH-L-Val-Boc (**16**), Ac-L-Leu-NH-Fn-NH-L-Leu-Boc (**17**) i Ac-L-Phe-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (**18**), te su dobiveni rezultati uspoređeni s ranije opisanim alaninskim analogima.
2. Prema intenzitetu njihovih apsorpcijskih vrpca, vidljivo je da prevladavaju asociirane NH-skupine. Intramolekulska priroda tih asocijacija utvrđena je mjerenjem koncentracijski-ovisnih IR-spektara.
3. Intramolekulski karakter vodikovih veza potvrđen je NMR-spektroskopskom analizom, pri čemu su se kemijski pomaci  $\text{NH}_{\text{Fn}}$ -atoma pokazali koncentracijski neovisnima.
4. Intramolekulski angažman  $\text{NH}_{\text{Fn}}$ -atoma dodatno je potkrijepljen visokim vrijednostima koeficijenta temperature ovisnosti.
5. Jakost intramolekulskih vodikovih veza (IHB) testirana je titracijom NMR-uzoraka s kompeticijskim otapalom (DMSO), pri čemu nije uočena značajnija promjena kemijskih pomaka  $\text{NH}_{\text{Fn}}$ -atoma, što je indicacija njihovog sudjelovanja u jakim IHB. Opisani rezultati spektroskopske analize peptida **16-18** u potpunosti odgovaraju spektroskopskim podacima njihovih alaninskih analoga **III**, sugerirajući slična konformacijska svojstva.
6. NOE-kontakti u spektrima peptida **16-18**, koji odgovaraju onima nađenima u spektrima njihovih alaninskih analoga, dodatno potkrepljuju pretpostavku o prisutnosti 10-članih IHB-prstenova (struktura nalik  $\beta$ -okretu), odnosno sličnom konformacijskom prostoru svih do sada opisanih peptida tipa **III**, neovisno o voluminoznosti aminokiselinskih bočnih ogranaka.
7. Prisutnost jakih intramolekulskih vodikovih veza, sugerirana IR- i NMR-analizom, omogućila je tvorbu visoko-uređenih kiralnih struktura, što je u CD-spektrima indicirano jakim Cottonovim efektima u području ferocenskog kromofora.

## **§ 6. *LITERATURA***

Allardyce, C. S., Dyson, P. J. (2006) Medicinal Properties Of Organometallic Compounds, Bioorganometallic Chemistry (Topics in Organometallic Chemistry), Simonneaux, G., ur., Springer-Verlag Berlin Heidelberg. str. 177–211.

Antoniou C., Schulpis H., Michas T., Katsambas A., Frajis N., Tsagaraki S., Stratigos J. (1989) Vitiligo therapy with oral and topical phenylalanine with UVA exposure. *International Journal of Dermatology* **28(8)**: 545–547.

Astruc, D. (2017) Why is Ferrocene so Exceptional? *European Journal of Inorganic Chemistry* **2017**: 6–29.

Barišić, L., Rapić, V., Kovač, V. (2002) Ferrocene Compounds. XXIX. Efficient Syntheses of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid Derivatives. *Croatica Chemica Acta* **75**:199-210.

Beheshti S., Lataifeh A., Kraatz H. B. (2011) Hydrogen-bonding interactions in ferrocene-peptide conjugates containing valine. *Journal of Organometallic Chemistry* **696**: 1117–1125.

Chakraborty, T. K., Ghos, S., Jayaprakash, S. (2002) Sugar Amino Acids and Their Uses in Designing Bioactive Molecules. *Current Medicinal Chemistry* **9**: 421–435.

Chowdhury, S., Mahmoud, K. A., Schatte, G., Kraatz, H.–B. (2005) Amino acid conjugates of 1,1'-diaminiferrocene. Synthesis and chiral organization. *Organic & Biomolecular Chemistry* **3**: 3018–3023.

Dias J., Axelband F., Lara L. S., Muzi-Filho H., Vieyra A. (2017) Isangiotensin-(3-4) (Val-Tyr), the shortest angiotensin II-derived peptide, opening new vistas on the renin-angiotensin system? *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* **18(1)**: 1–7.

Donato J. Jr., Pedrosa R. G., Cruzat V. F., Pires I. S., Tirapequi J. (2006) Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. *Nutrition* **22(5)**: 520–527.

Drosopoulos W. C., Prasad V. R. (2007) The active site residue Valine 867 in human telomerase reverse transcriptase influences nucleotide incorporation and fidelity. *Nucleic Acids Research* **35**(4): 1155–1168.

Edwards, I. E., Epton, R., Marr, G. (1976) A new class of semi-synthetic antibiotics: ferrocenyl-penicillins and -cephalosporins. *Journal of Organometallic Chemistry* **107**: 351–357.

Fidale T. M., Antunes H. K. M., Alex Dos Santos L., Rodrigues de Souza F., Deconte SR., Borges Rosa de Moura F., Mantovani M. M., Alves Duarte P. R., Roever L., Resende E. S. (2017) Increased Dietary Leucine Reduces Doxorubicin-Associated Cardiac Dysfunction in Rats. *Frontiers in Physiology* **8**: 1042. doi: 10.3389/fphys.2017.01042.

Grajeda-Iglesias C., Rom O., Hamoud S., Volkova N., Hayek T., Abu-Saleh N., Aviram M. (2018) Leucine supplementation attenuates macrophage foam-cell formation: Studies in humans, mice, and cultured macrophages. *Biofactors* **0**: 1–18.

Gregoret L. M., Sauer R. T. (1998) Tolerance of a protein helix to multiple alanine and valine substitutions. *Folding and Design* **3**(2): 119–126.

Hartman A. L., Santos P., O'Riordan K. J., Stafstrom Ce., Hardwick J. M. (2015) Potent anti-seizure effects of D-leucine. *Neurobiology of Disease* **82**: 46–53.

Jang C., Oh S. F., Wada S., Rowe G. C., Liu L., Chan M. C., Rhee J., Hoshino A., Kim B., Ibrahim A., Baca L. G., Kim E., Ghosh C. C., Parikh S. M., Jiang A., Chu Q., Forman D. E., Lecker S. H., Krishnaiah S., Rabinowitz J. D., Weljie A. M., Baur J. A., Kasper D. L., Arany, Z. (2016) A branched chain amino acid metabolite drives vascular transport of fat and causes insulin resistance. *Nature Medicine* **22**(4): 421–426.

Jaouen, G., Beck, W., McGlinchey, M. J. (2006) A Novel Field of Research: Bioorganometallic Chemistry, Origins, and Founding Principles. U: Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine, Jaouen, G., ur., John Wiley & Sons, Weinheim, str. 1–37.

Jaouen, G., Top, S., Vesseieres, A., Leclercq, G., McGlinchey, M.J. (2004) The First Organometallic Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) and Their Relevance to Breast Cancer. *Current Medicinal Chemistry* **11**: 2505–2517.

- Jerić, I. (2004) Peptidni mimetici: zašto i kako? *Kemija u industriji* **53**: 495–504.
- Kraatz, H. B. (2005) Ferrocene-Conjugates of Amino Acids, Peptides and Nucleic Acids. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* **15**: 83–106.
- Kealy, T. J., Pauson, P. L. (1951) A New Type of Organo-Iron Compound. *Nature* **168**: 1039–1040.
- Kovačević M., Kodrin I., Cetina M., Kmetič I., Murati T., Čakić Semenčić M., Roca S., Barišić L. (2015) The conjugates of ferrocene-1,1'-diamine and amino acids. A novel synthetic approach and conformational analysis. *Dalton transactions* **44**: 16405–16420.
- Kovačević M., Kodrin I., Roca S., Molčanov K., Shen Y., Adhikari B., Kraatz H. B., Barišić L. (2017) Helically Chiral Peptides That Contain Ferrocene-1,1'-diamine Scaffolds as a Turn Inducer. *Chemistry: A European Journal* **23**: 10372–10395.
- Livnah, N., Yechezkel, T. (2005) Ferrocene bioconjugates with amino acids and carbohydrates. *Israel Journal of Chemistry* **20**: 32–42.
- Morifuji M., Koga J., Kawanaka K., Higuchi M. (2009) Branched-Chain Amino Acid-Containing Dipeptides, Identified from Whey Protein Hydrolysates, Stimulate Glucose Uptake Rate in L6 Myotubes and Isolated Skeletal Muscles. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **55(1)**: 81–86.
- New World Encyclopedia (2016) *Valine* <<http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Valine>> Pristupljeno 10. ožujka 2017.
- Norton M., Cao Y., Amarsi R., Fernandes Freitas I., Alamshah A., Murphy K. (2017) Rectal and oral administration of L-Phenylalanine suppresses food intake and modulates neuronal activation in appetite-regulating brain regions in rodents. *Endocrine Abstracts* **50**: 321.
- PBF (2018) Peptidni mimetici i pseudopeptidi, PBF – Prehrambeno-biotehnološki fakultet, <[http://www.pbf.unizg.hr/hr/zavodi/zavod\\_za\\_kemiju\\_i\\_biokemiju/laboratorij\\_za\\_organsku\\_kemiju/peptidni\\_mimetici\\_i\\_pseudopeptidi](http://www.pbf.unizg.hr/hr/zavodi/zavod_za_kemiju_i_biokemiju/laboratorij_za_organsku_kemiju/peptidni_mimetici_i_pseudopeptidi)> . Pristupljeno 03. travnja 2018.
- Perrin, D. D., Armarego, W. L. F. (1988) Purification of laboratory chemicals, Pergamon Press.



Puddicombe S. M., Chamberlin S. G., MacGarvie J., Richter A., Drummond D. R., Collins J., Wood L., Davies D. E. (1996) The Significance of Valine 33 as a Ligand-specific Epitope of Transforming Growth Factor  $\alpha^*$ . *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 15367–15372.

Rapić, V., Čakić Semenčić, M. (2011) Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocen i metalni karbonili. *Kemija u industriji* **60(2)**: 61–79.

Richie, T. L., Saul, A. (2002) Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature* **415**: 694–701.

Roiser J., McLean A., Ogilvie A., Blackwell A., Bamber D., Goodyer I., Jones P., Sahakian B. (2005) The Subjective and Cognitive Effects of Acute Phenylalanine and Tyrosine Depletion in Patients Recovered from Depression. *Neuropsychopharmacology volume* **30**: 775–785.

Ross, N. T., Katt, W. P., Hamilton, A. D. (2010) Synthetic mimetics of protein secondary structure domains. *Philosophical Transactions of the Royal Society A* **368**: 989-1008.

Scutaru, D., Tătaru, L., Mazilu, I., Diaconu, E., Lixandru, T., Simionescu, C. (1991) Monosubstituted derivatives of ferrocene. Ferrocene-containing penicillins and cephalosporins. *Journal of Organometallic Chemistry* **401**: 81–85.

Severin, K., Bergs, R., Beck, W. (1998) Bioorganometallic Chemistry – Transition Metal Complexes with  $\alpha$ -Amino Acids and Peptides. *Angewandte Chemie International Edition* **37**: 1634-1654.

Stryer, L. (1991) Biokemija, 2. izd. (preveli Vuk-Pavlović, S. i sur.) Školska knjiga, Zagreb. str. 29–30.

Sullivan Jr, D. J., Matile, H., Ridley, R. G., Goldberg, D. E. (1998) A Common Mechanism for Blockade of Heme Polymerization by Antimalarial Quinolines. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 31103–31107.

Top, S., Tang, J., Vessieres, A., Carrez, D., Provot, C., Jaouen, G. (1996) Ferrocenyl hydroxytamoxifen: a prototype for a new range of oestradiol receptor site-directed cytotoxics. *Chemical Communications* **0**: 955–956.

Top, S., Vesseieres, A., Leclercq, G., Quivy, J., Tang, J., Vaissermann, M., Muche, M., Jaouen, G. (2003) Synthesis, Biochemical Properties and Molecular Modelling Studies of Organometallic Specific Estrogen Receptor Modulators (SERMs), the Ferrocifens and Hydroxyferrocifens: Evidence for an Antiproliferative Effect of Hydroxyferrocifens on both Hormone-Dependent and Hormone-Independent Breast Cancer Cell Lines. *Chemistry – A European Journal* **9**: 5223–5236.

van Vliet D., van Dam E., van Rijn M., Derks T. G., Venema-Liefaard G., Hitzert M. M., Lusing R. J., Heiner-Fokkema M. R., van Spronsen F. J. (2014) Infants with Tyrosinemia Type 1: Should phenylalanine be supplemented? *JIMD Reports* **18**: 117–124.

Weatherall D. J. (2001) Sickle Cell Anemia. U: Encyclopedia of Genetics, 1. izd., Brenner S., Miller J. H., ur., A. P. str. 1828–1831.

Werner, H. (2012) At least 60 years of ferrocene: the discovery and rediscovery of the sandwich complexes. *Angewandte Chemie International Edition* **51(25)**: 6052–6058.

Wilkinson, G., Rosenblum, M., Whiting, M.C., Woodward, R.B. (1952) The structure of iron bis-cyclopentadienyl. *Journal of the American Chemical Society* **74 (8)**: 2125–2126.

Winstanley, P. A. (2000) Chemotherapy for Falciparum Malaria: The Armoury, the Problems and the Prospects. *Parasitology Today* **16**: 146–153.

Wood D. R., Reimherr F. W., Wender P. H. (1985) Treatment of attention deficit disorder with DL-phenylalanine. *Psychiatry Research* **16(1)**: 21–26.

Yudkoff M. (2017) Interactions in the Metabolism of Glutamate and the Branched-Chain Amino Acids and Ketoacids in the CNS. *Neurochemical Research* **42(1)**: 10–18.

Zorc, B. (2008) Peptidomimetici. *Farmaceutski glasnik* **64**: 113–121.

## 7. ZAHVALE

Zahvaljujemo se cijelom Laboratoriju za organsku kemiju Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujemo se dr. sc. Sunčici Roci, koja je snimljenim NMR-spektrima i pomoći pri tumačenju istih doprinijela izradi ovoga rada.

Neizostavno hvala tehničarki Jasmini Strčić koja nam je uvijek bila na raspolaganju. Hvala na svim pripremljenim pločama, kemikalijama te opuštenom i veselom radnom ambijentu.

Posebno se zahvaljujemo doc.dr.sc. Moniki Kovačević na velikom angažmanu, nesebičnoj podršci i savjetima od samoga početka. Bez Vaše svakodnevne motivacije i ugodne atmosfere u laboratoriju sve ovo ne bi bilo moguće.

Naposljetku, najviše se zahvaljujemo našoj mentorici izv. prof. dr. sc. Lidiji Barišić koja nas je naučila kako rješavati zamršene probleme u organskoj kemiji, bila tu za sva naša pitanja i izvan svog radnog vremena te nam je ukazala neizmjereno povjerenje. Nadamo se da ćemo jednoga dana ponovno surađivati s velikim stručnjacima poput Vas. Hvala Vam na svemu.

## 8. SAŽETAK

Iva Dorić, Danijela Pfeifer i Josip Rešetar

### Sinteza i konformacijska analiza peptidomimetika s ferocen-1,1'-diaminom kao začetnikom okreta

Biorganometalni konjugati sačinjeni iz diamino-funkcionaliziranog ferocenskog kalupa –NH–Fn–NH– (Fn = ferocenilen) i Ala odnosno Ala-Pro dipeptida stabiliziraju se dvjema simultanim,  $\beta$ -okretima nalik strukturama, temeljenim na dvjema interlančanim intramolekulskim vodikovim vezama (IHB) koje zatvaraju 14-člani prsten, oponašajući tako konformacije antiparalelnih  $\beta$ -nabranih ploča u prirodnim peptidima.

U ovom je radu opisana sinteza i konformacijska analiza biokonjugata Ac–L–Val–NH–Fn–NH–L–Val–Boc (**16**), Ac–L–Leu–NH–Fn–NH–L–Leu–Boc (**17**) i Ac–L–Phe–NH–Fn–NH–L–Phe–Boc (**18**) (Ac = acetil, Boc = *tert*-butoksikarbonil) dizajniranih tako da sadrže –NH–Fn–NH– kalup kao začetnik okreta te prirodne aminokiseline s voluminoznim bočnim ograncima. Primjenom standardnih spektroskopskih metoda (koncentracijski-ovisna IR-, koncentracijski- i temperaturno-ovisna NMR-, CD-spektroskopija te titracija NMR- i CD-uzoraka s DMSO) provedena je konformacijska analiza pripremljenih peptida **16-18** s ciljem utvrđivanja mogućeg steričkog utjecaja aminokiselinskih bočnih ograna na uspostavu struktura nalik prirodnim  $\beta$ -nabranim pločama, temeljenih na 14-članom IHB-prstenu.

**Ključne riječi:** ferocen, konformacijska analiza, peptidi, peptidomimetici, vodikova veza

## 9. SUMMARY

Iva Dorić, Danijela Pfeifer i Josip Rešetar

### Synthesis and conformational analysis of peptidomimetics containing ferrocene-1,1'-diamine as turn-inducer

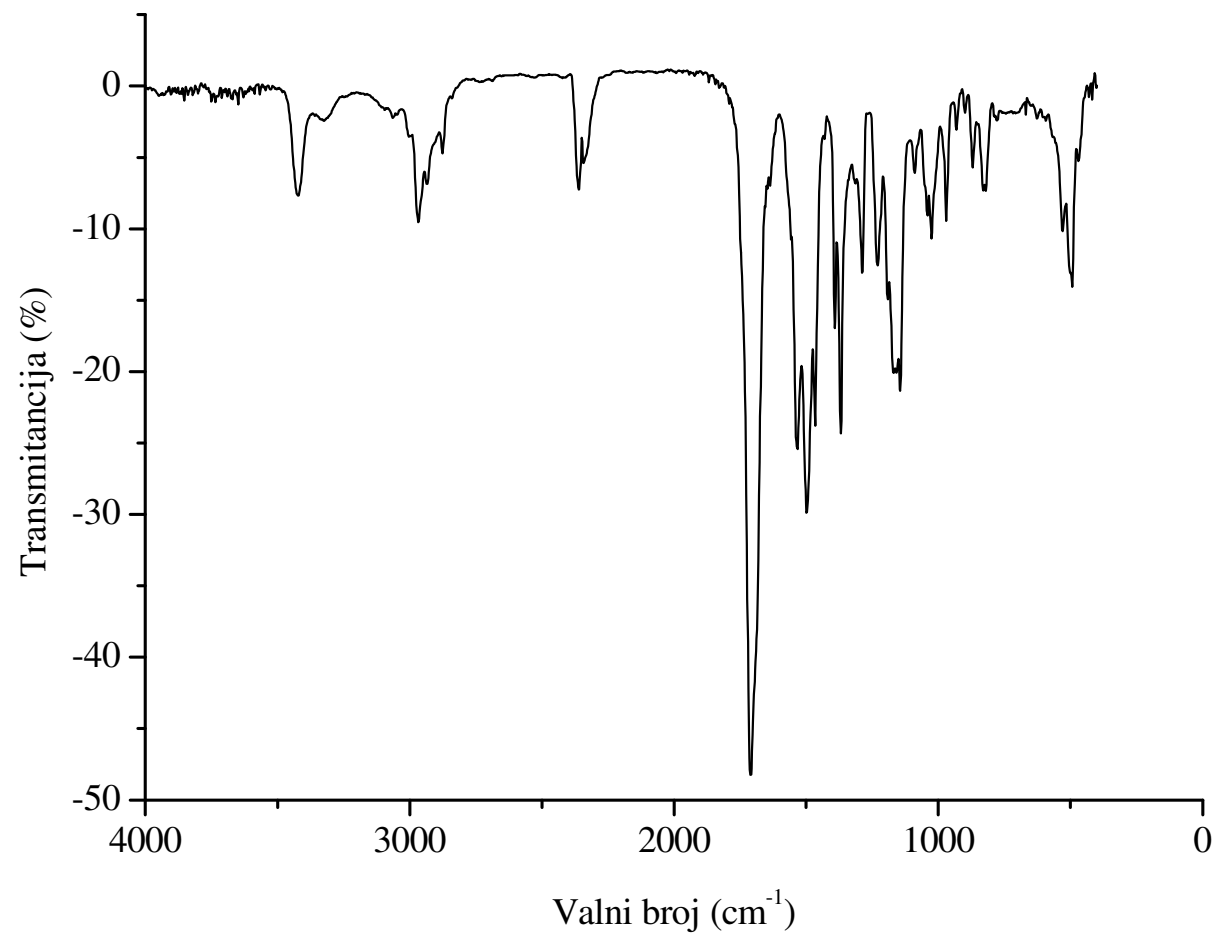
Biorganometallic conjugates composed of diamino-functionalized ferrocene template –NH–Fn–NH– (Fn = ferrocenylene) and Ala or Ala-Pro dipeptide were stabilized through two simultaneous  $\beta$ -turn-like structures, based on 14-membered interchain IHB-ring, as was found in antiparallel  $\beta$ -sheet structures of natural peptides.

Herein, the synthesis and conformational analysis of bioconjugates Ac–L–Val–NH–Fn–NH–L–Val–Boc (**16**), Ac–L–Leu–NH–Fn–NH–L–Leu–Boc (**17**) and Ac–L–Phe–NH–Fn–NH–L–Phe–Boc (**18**) (Ac = acetyl, Boc = *tert*-butoxycarbonyl), designed to contain –NH–Fn–NH– template as turn-inducer and amino acids with sterically hindered side chains. The conformational analysis of the goal compounds **16-18** was conducted by using standard spectroscopic methods (concentration-dependent IR, concentration- and temperature-dependent NMR, CD, solvent-dependent NMR and CD) aimed to determine the possible sterical impact of amino acid side chains on the formation of  $\beta$ -sheet-like structures, based on 14-membered IHB-ring.

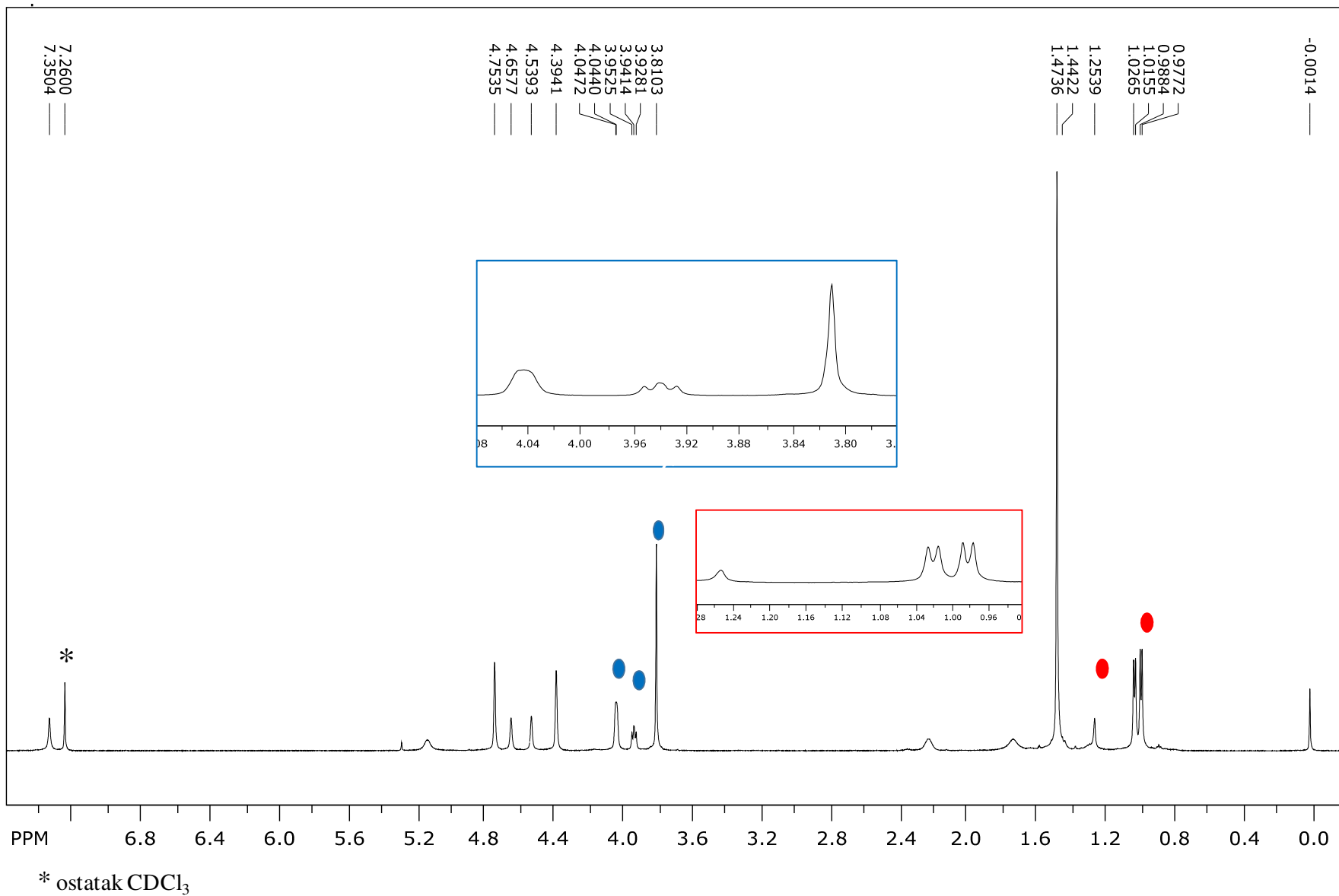
**Keywords:** ferrocene, conformational analysis, peptides, peptidomimetics, hydrogen bond

**§ PRILOG**

## Spoj 1

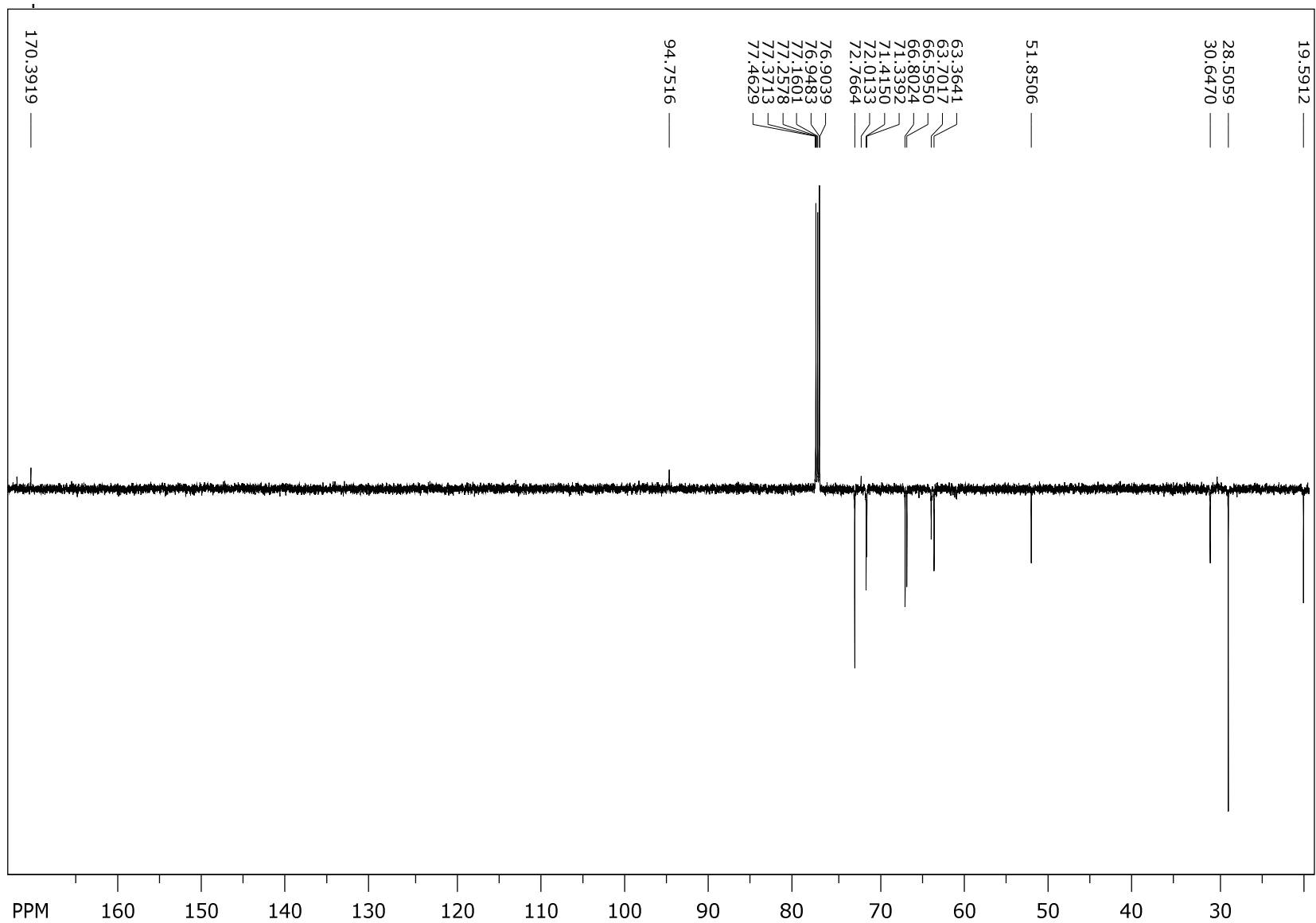


**Slika P1.** IR-spektar spoja **1** (c = 50 mM)

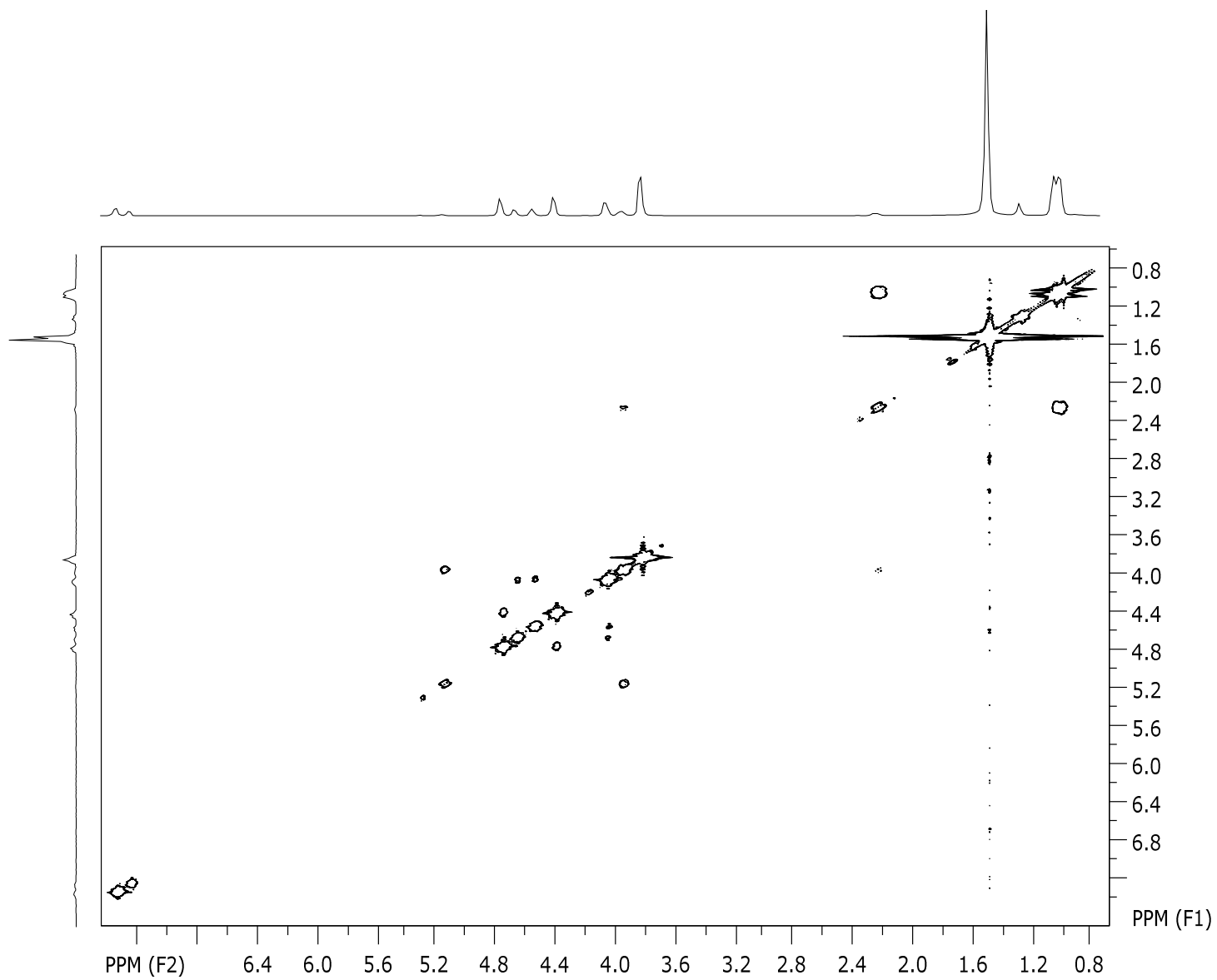


Slika P2.  $^1\text{H}$  NMR-spektar spoja **1** ( $c = 50 \text{ mM}$ )

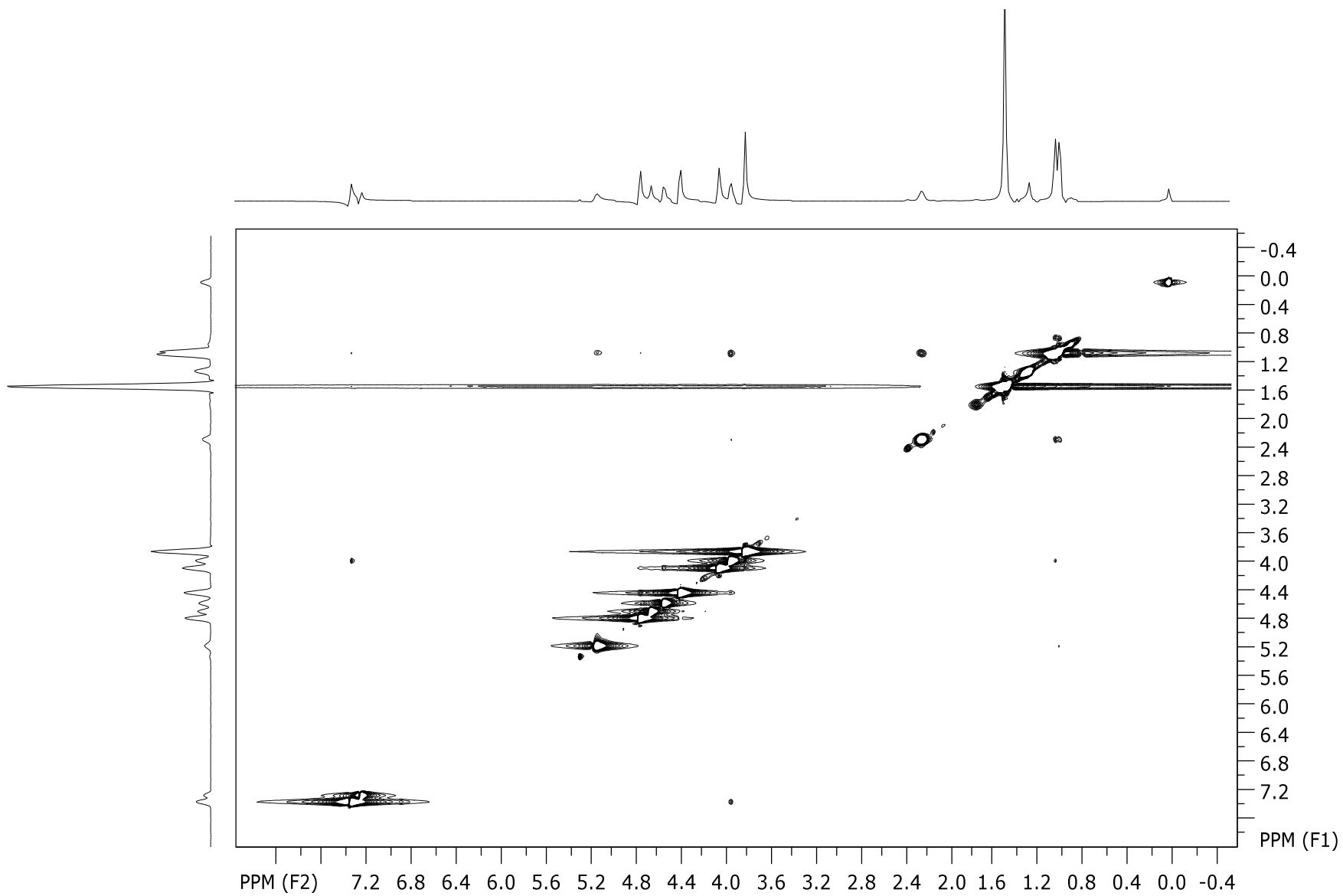




**Slika P3.**  $^{13}\text{C}$  NMR-spektar spoja **1** (c = 50 mM)

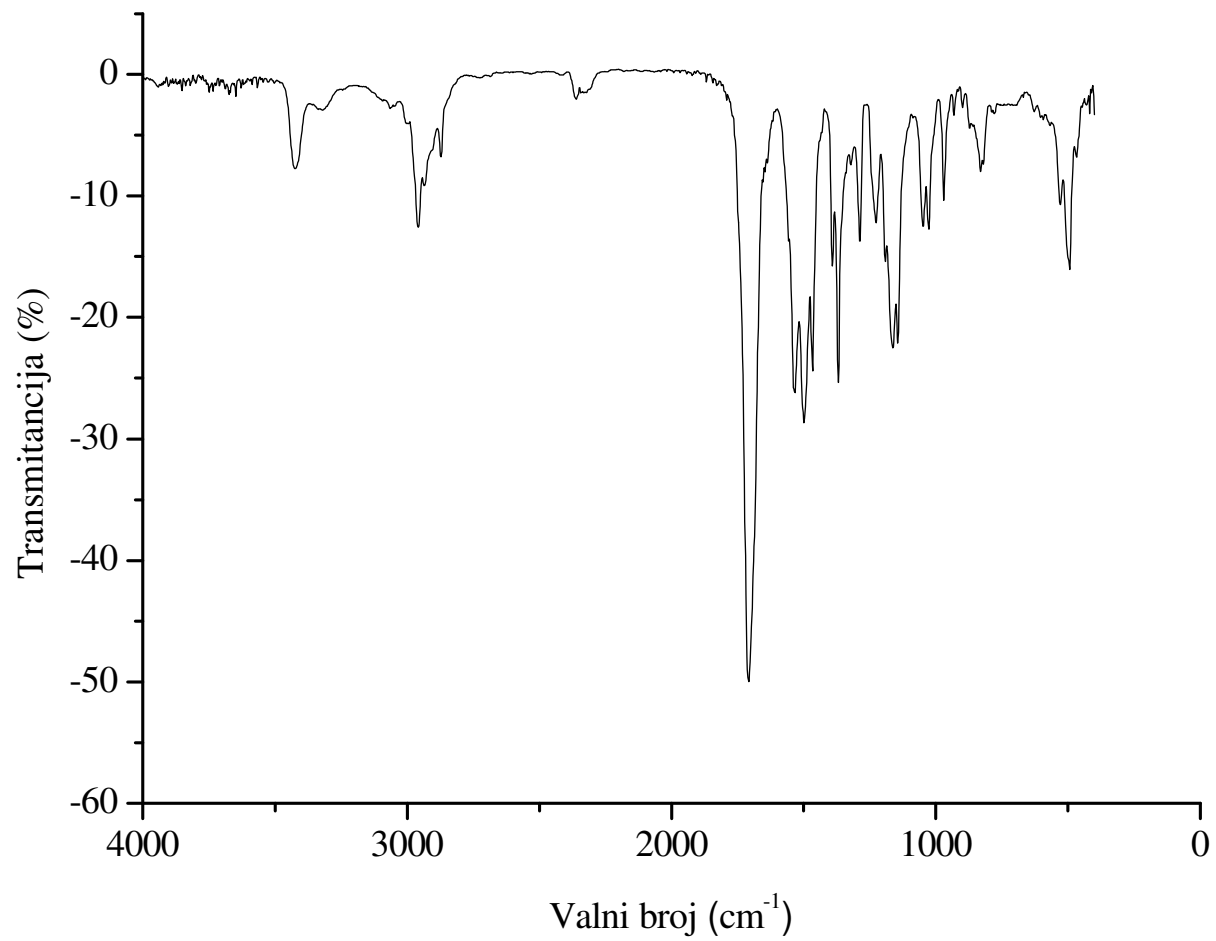


**Slika P4.** COSY NMR-spektar spoja **1** (c = 50 mM)

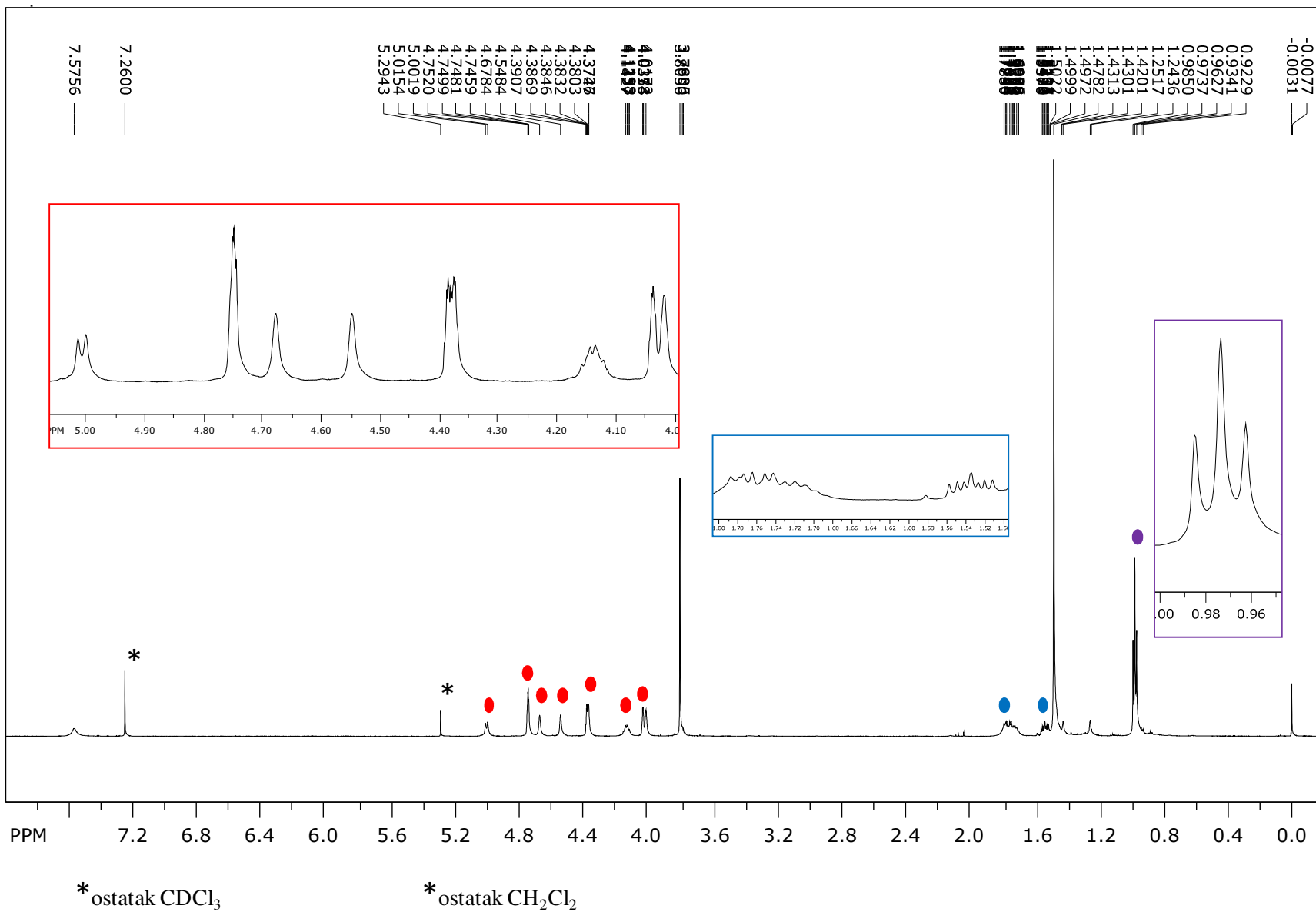


**Slika P5.** NOESY NMR-spektar spoja **1** (c = 50 mM)

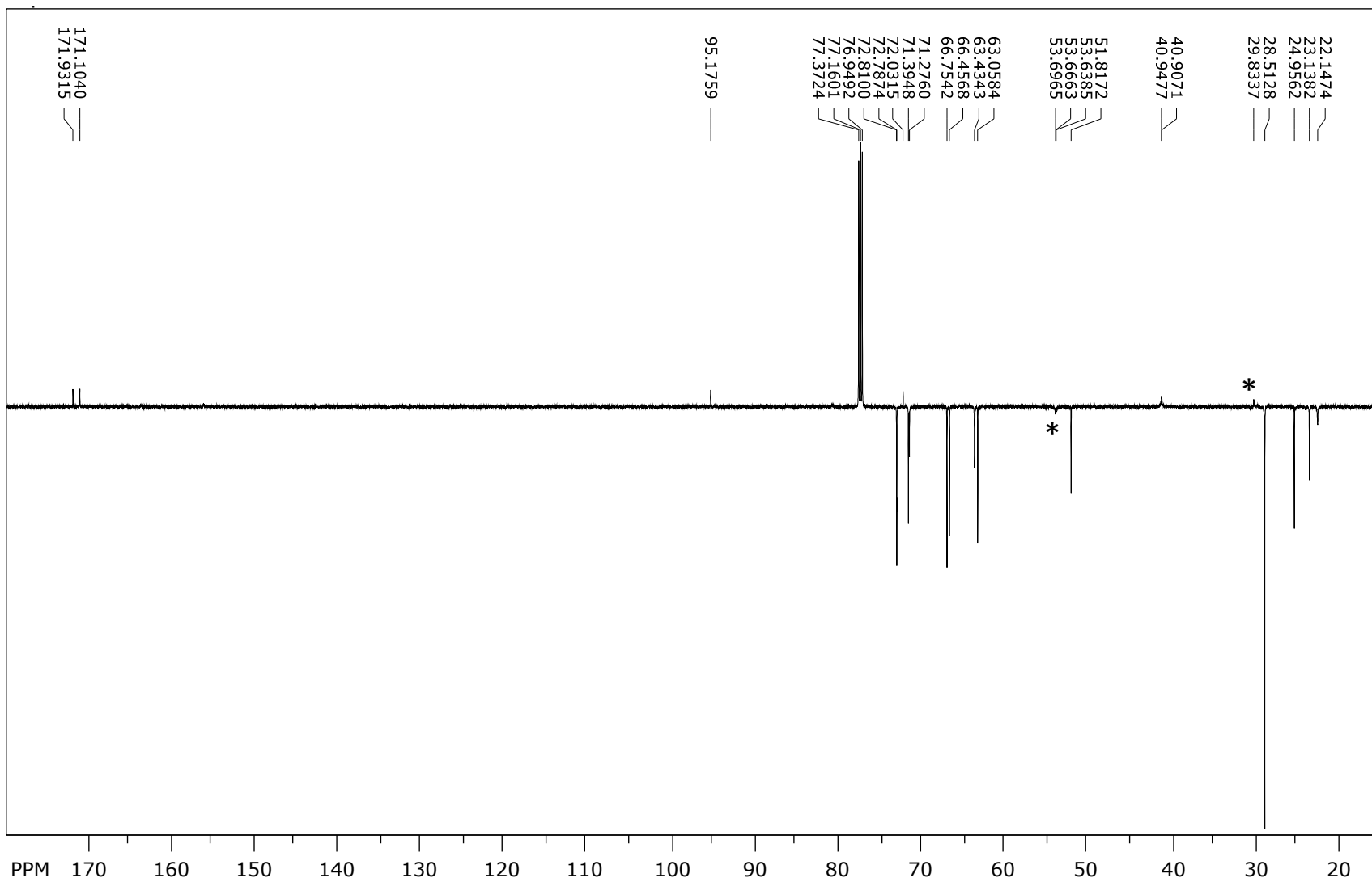
## Spoj 2



**Slika P6.** IR-spektar spoja 2 (c = 50 mM)



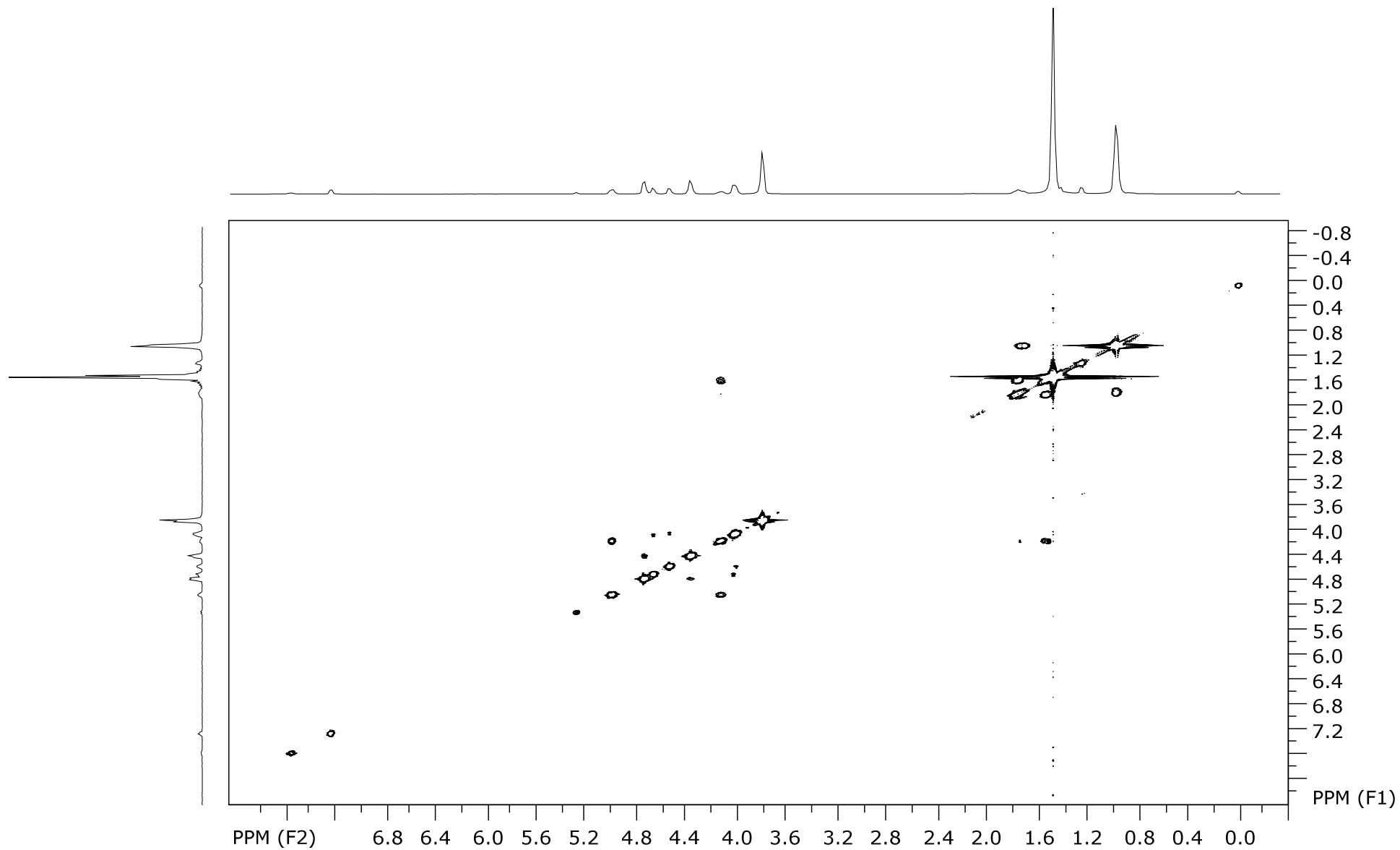
Slika P7.  $^1\text{H}$  NMR-spektar spoja **2** ( $c = 50 \text{ mM}$ )



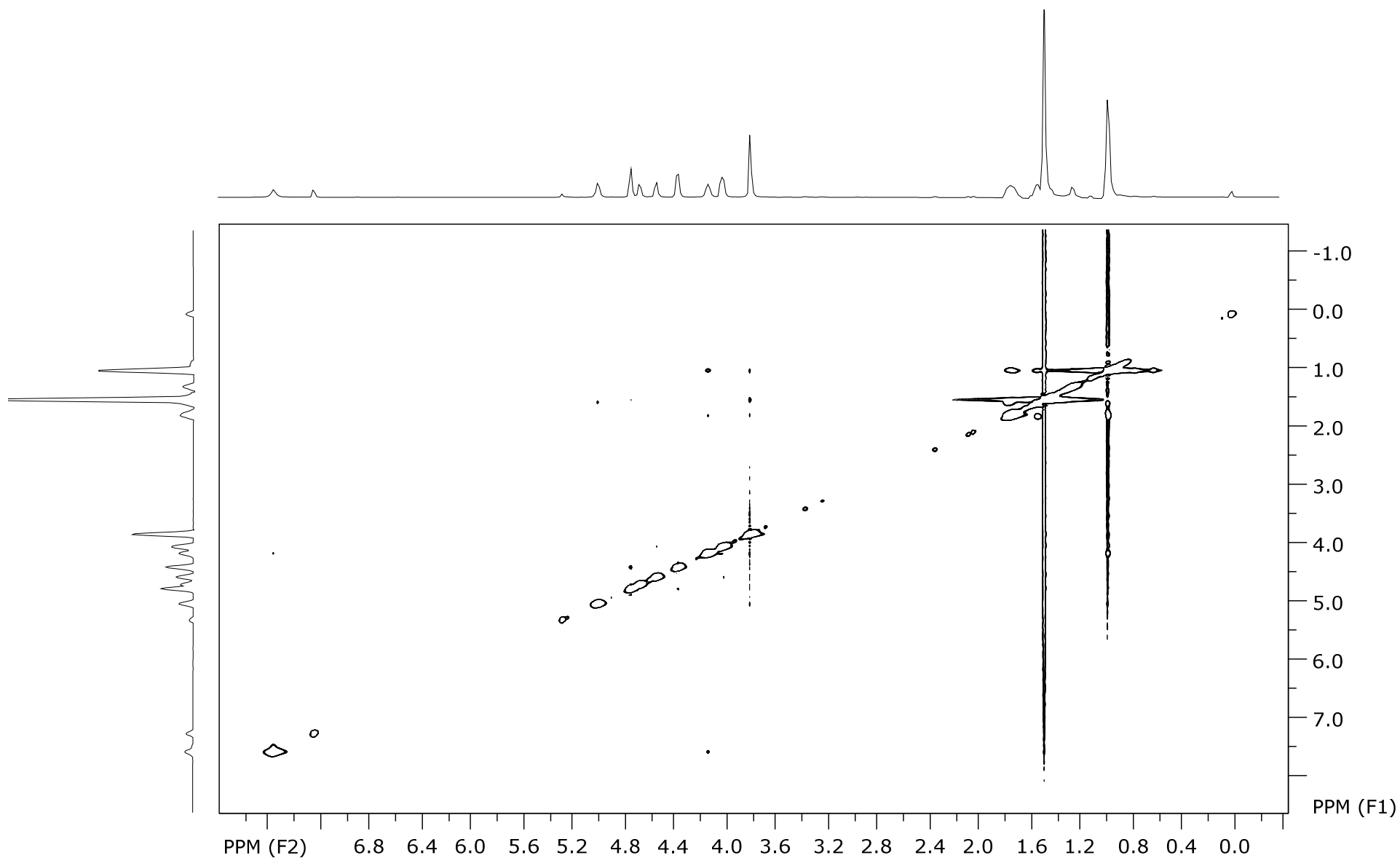
\*ostatak CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

\*ostatak ulja pumpe

**Slika P8.** <sup>13</sup>C NMR-spektar spoja **2** (c = 50 mM)



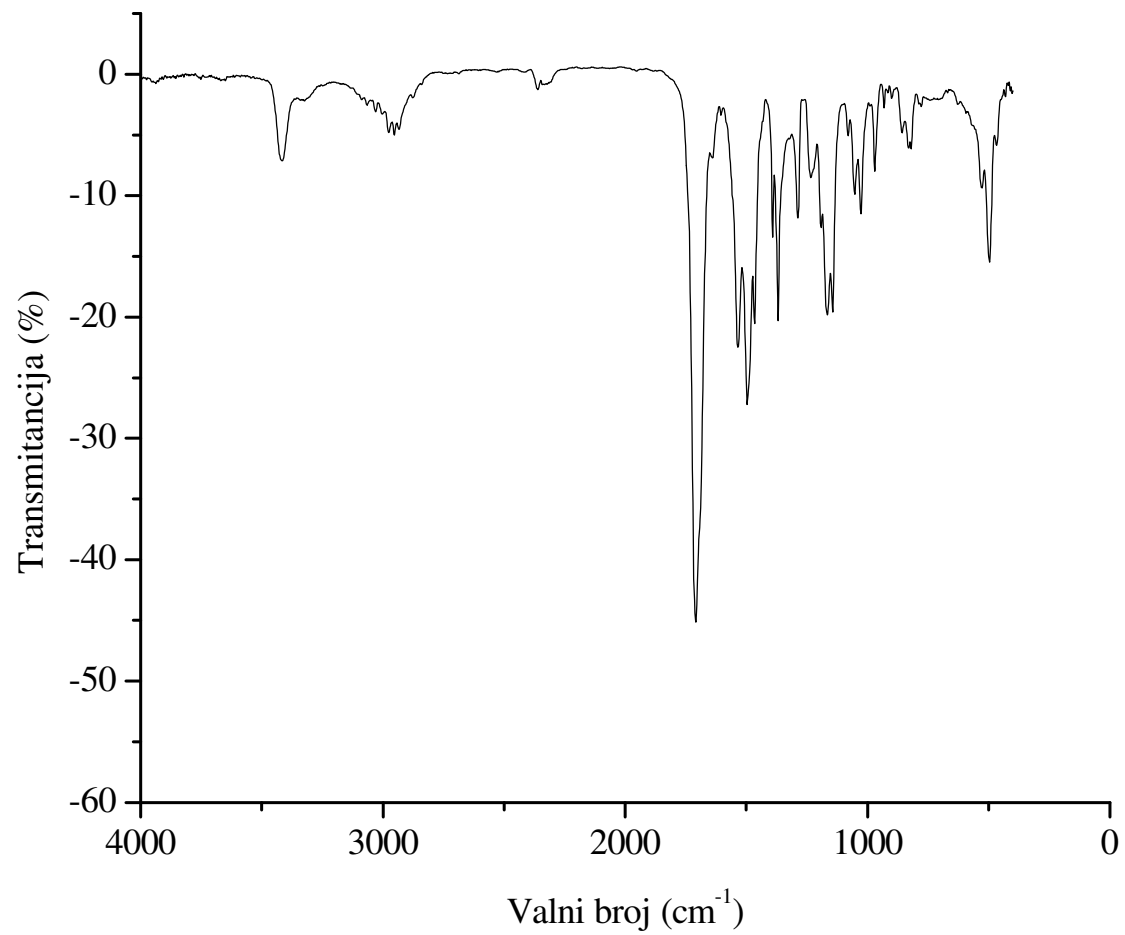
**Slika P9.** COSY NMR-spektar spoja **2** (c = 50 mM)



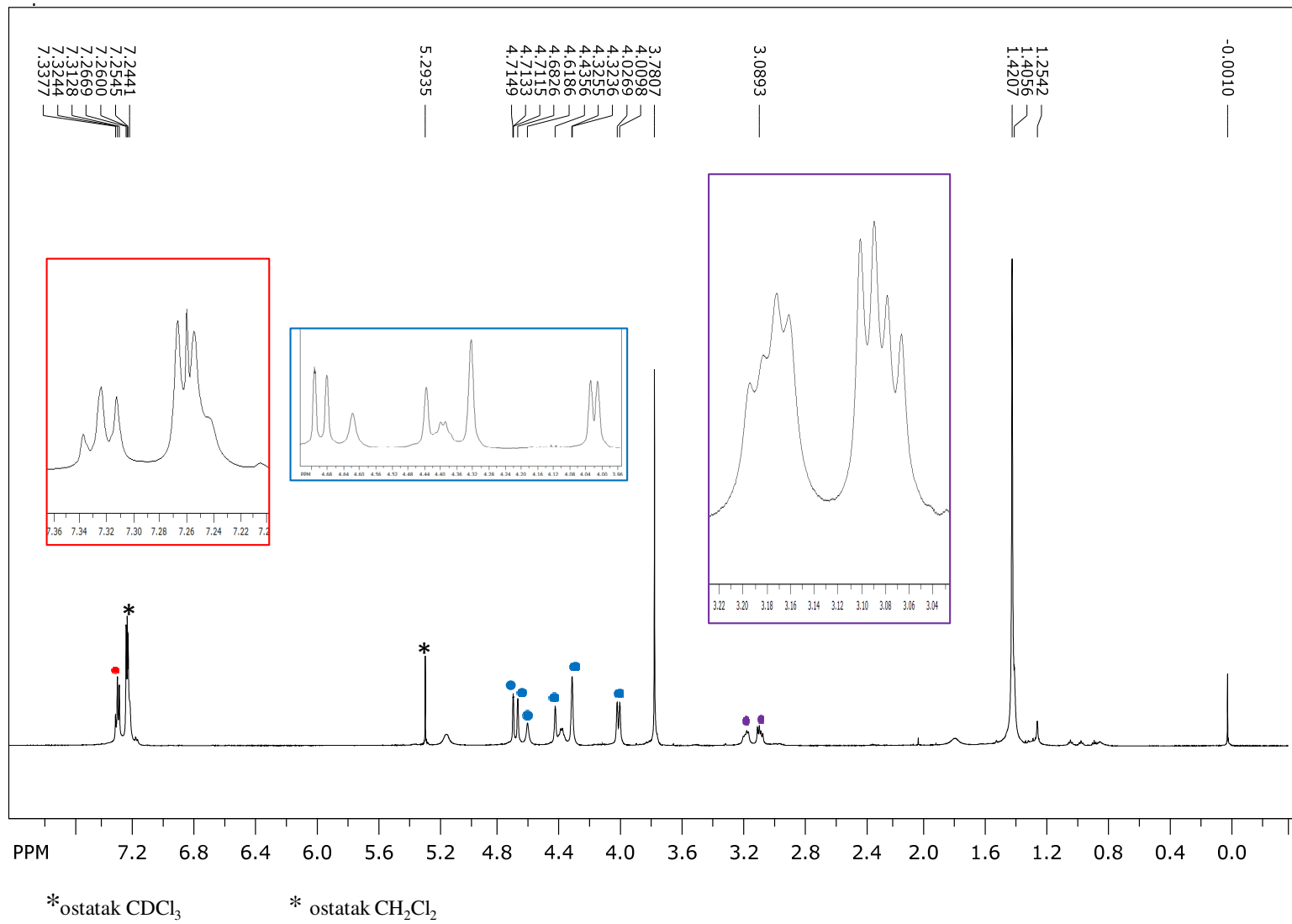
**Slika P10.** NOESY NMR-spektar spoja **2** (c = 50 mM)



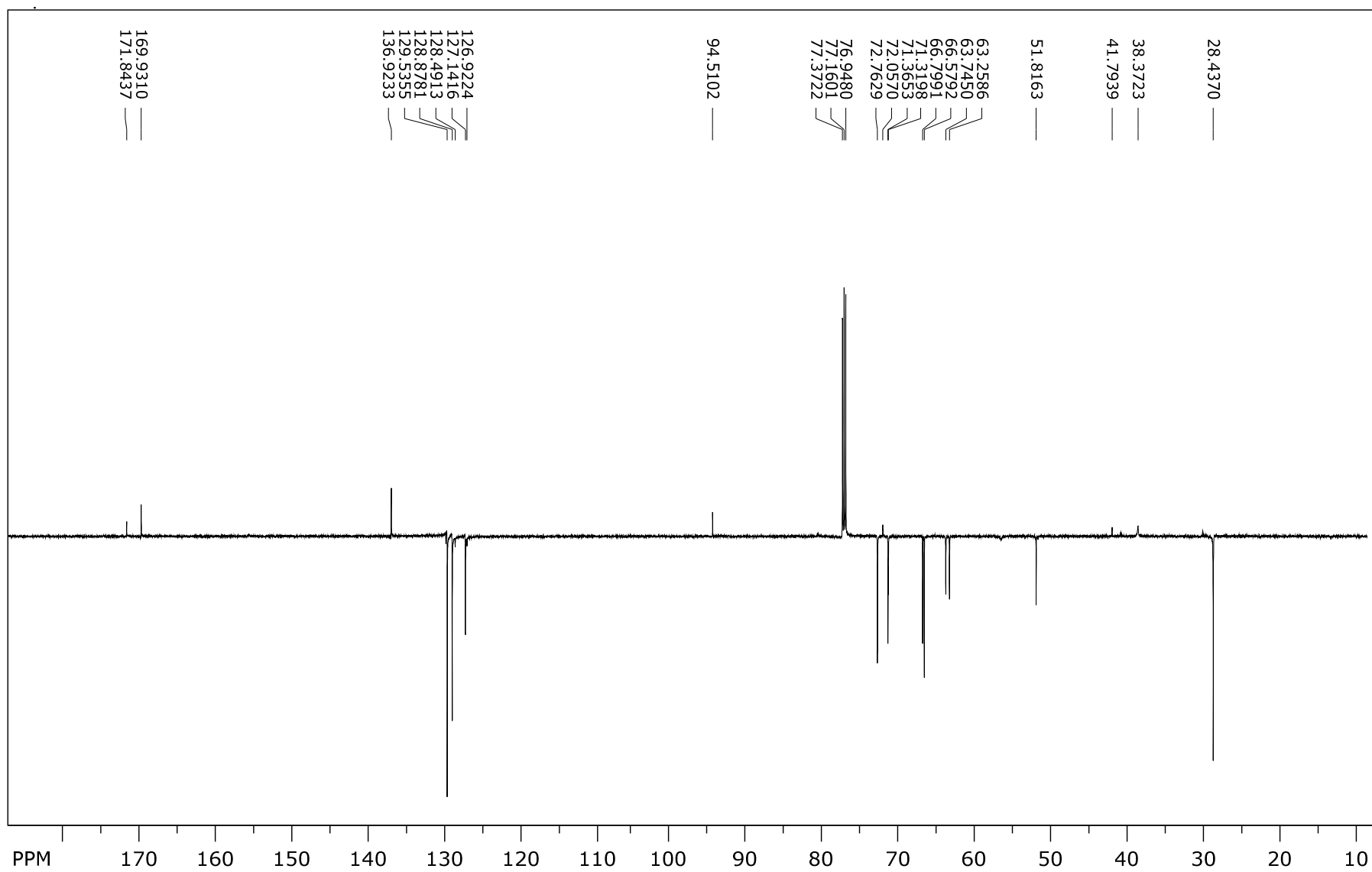
## Spoj 3



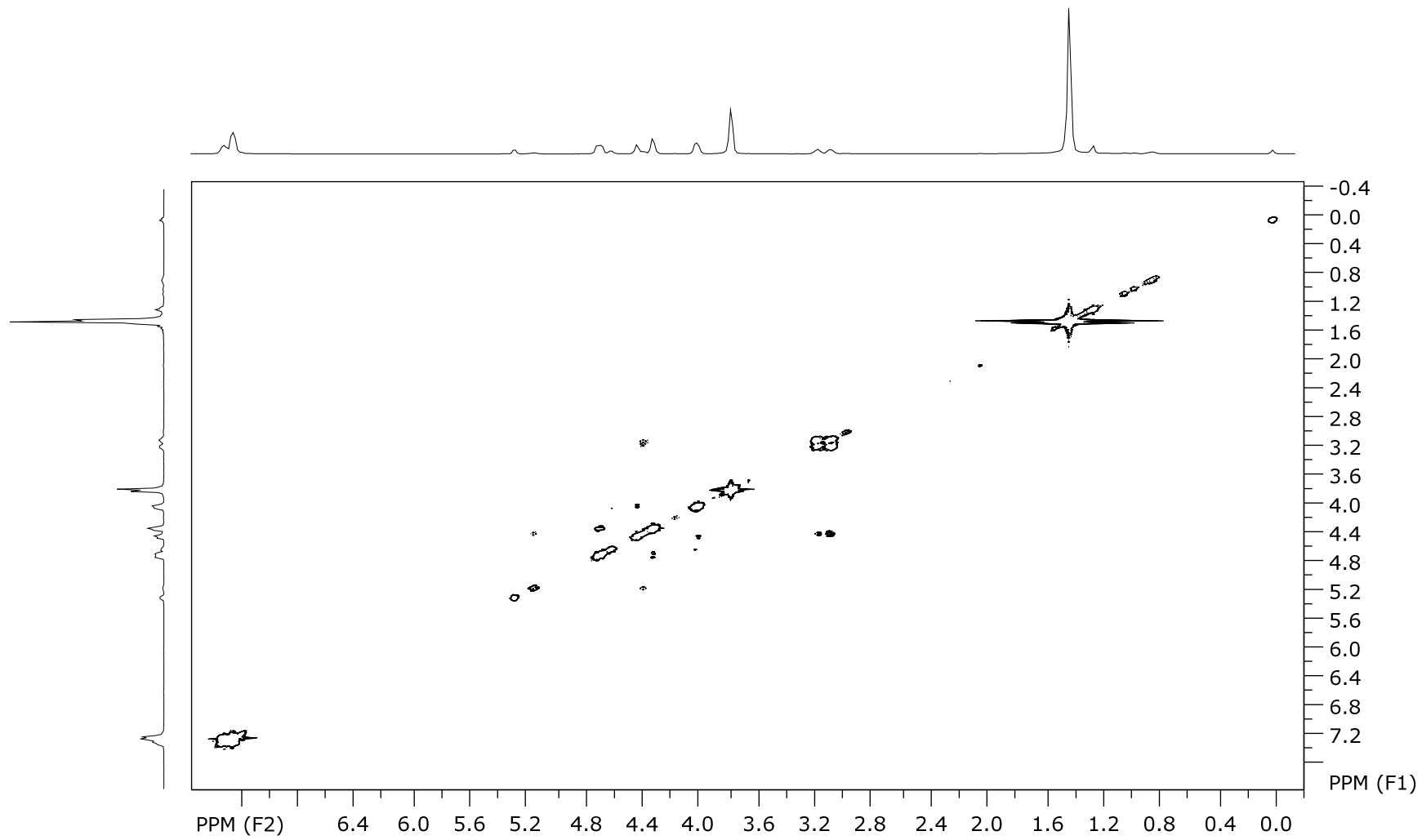
**Slika P11.** IR-spektar spoja **3** (c = 50 mM)



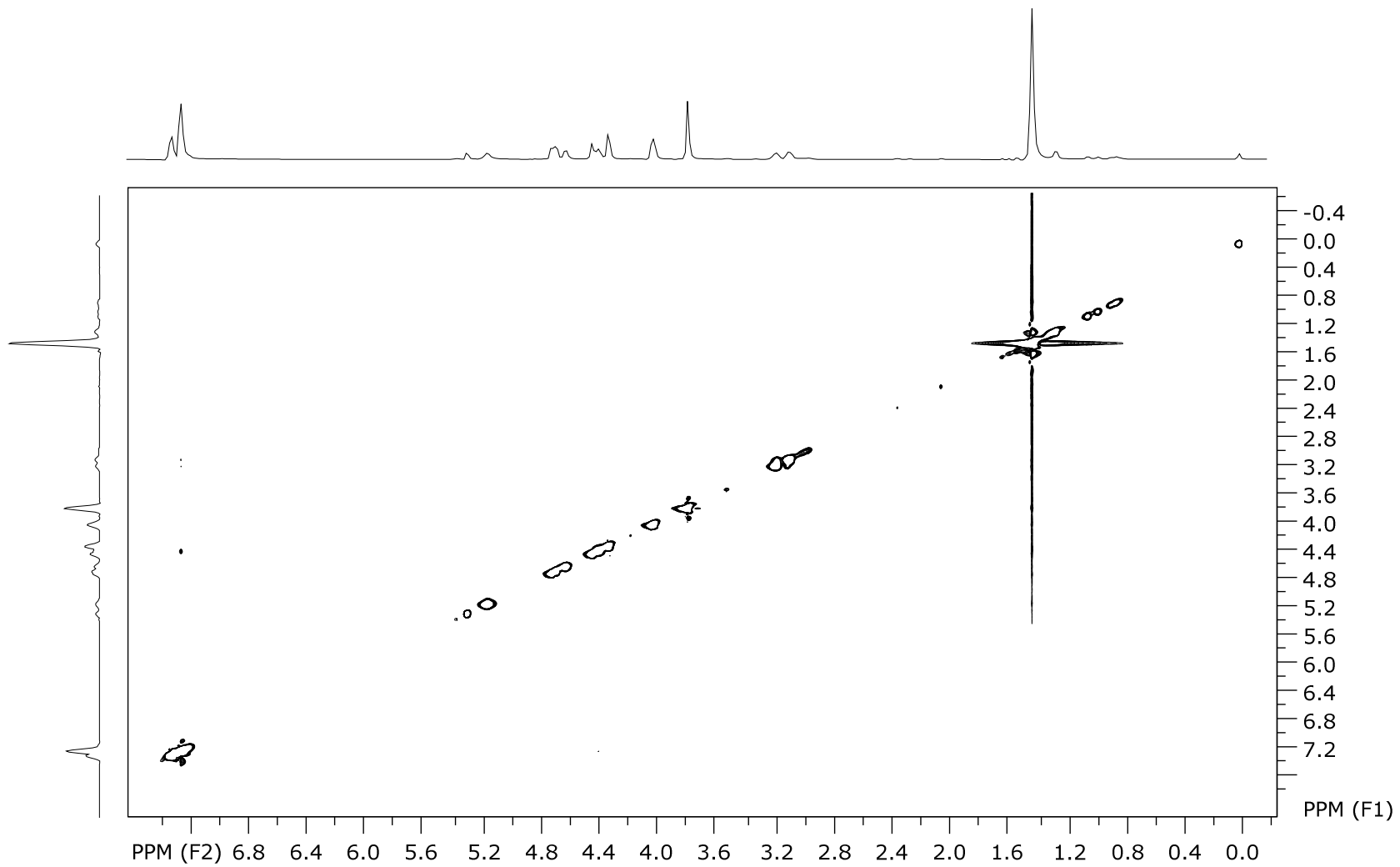
Slika P12.  $^1\text{H}$  NMR-spektar spoja **3** (c = 50 mM)



Slika P13. <sup>13</sup>C NMR-spektar spoja 3 (c = 50 mM)

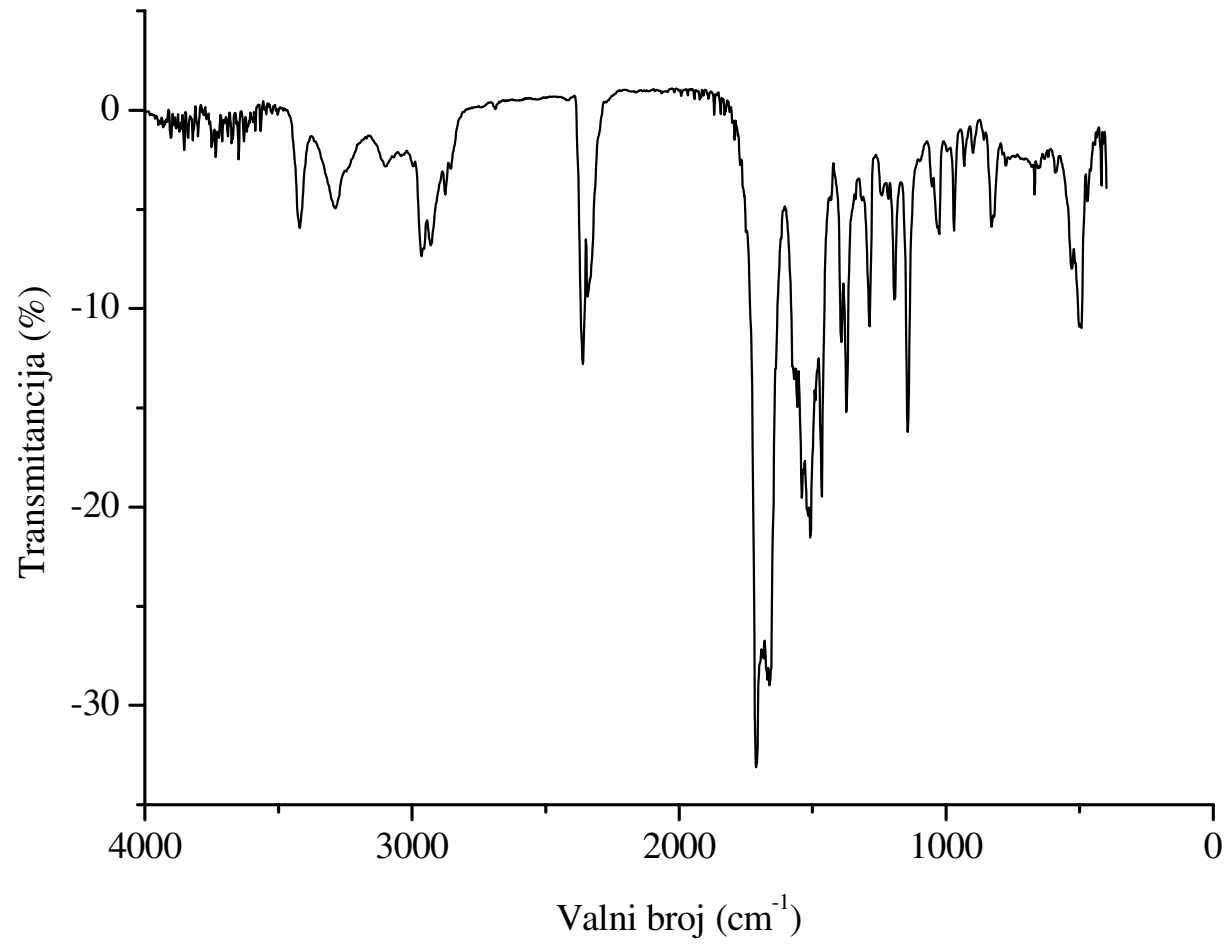


**Slika P14.** COSY NMR-spektar spoja **3** (c = 50 mM)

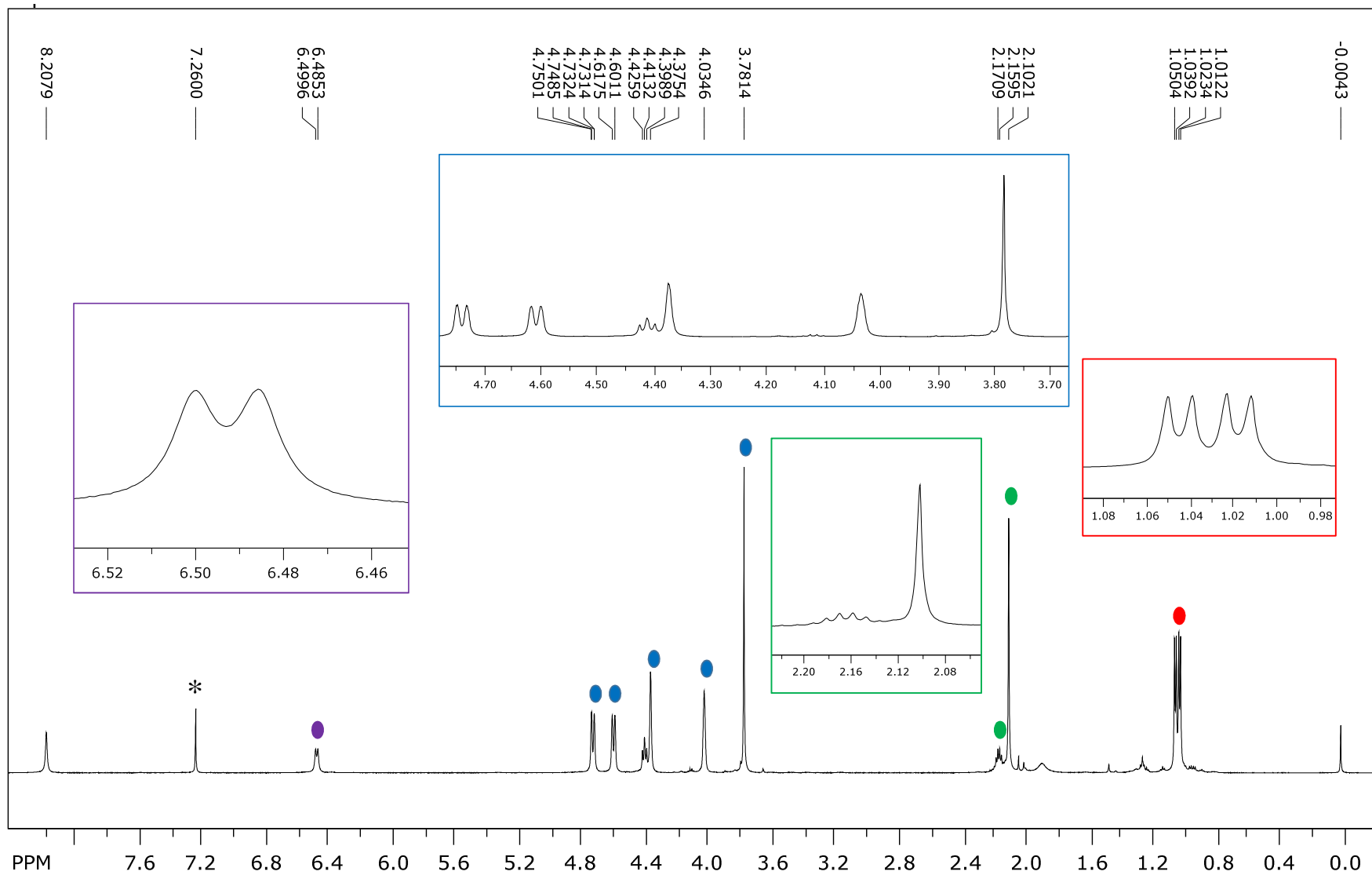


**Slika P15.** NOESY NMR-spektar spoja **3** (c = 50 mM)

## Spoj 4

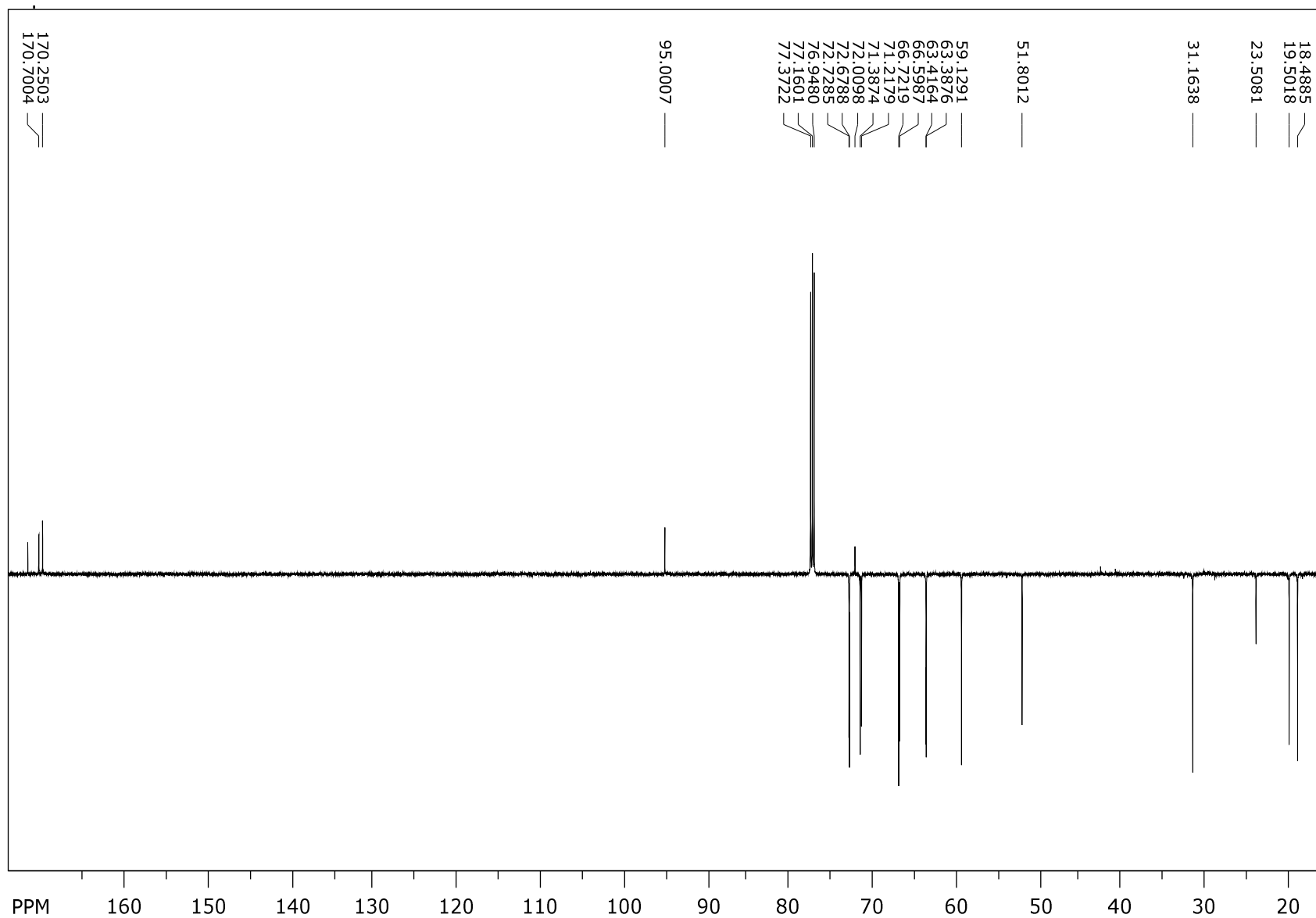


**Slika P16.** IR-spektar spoja **4** (c = 50 mM)



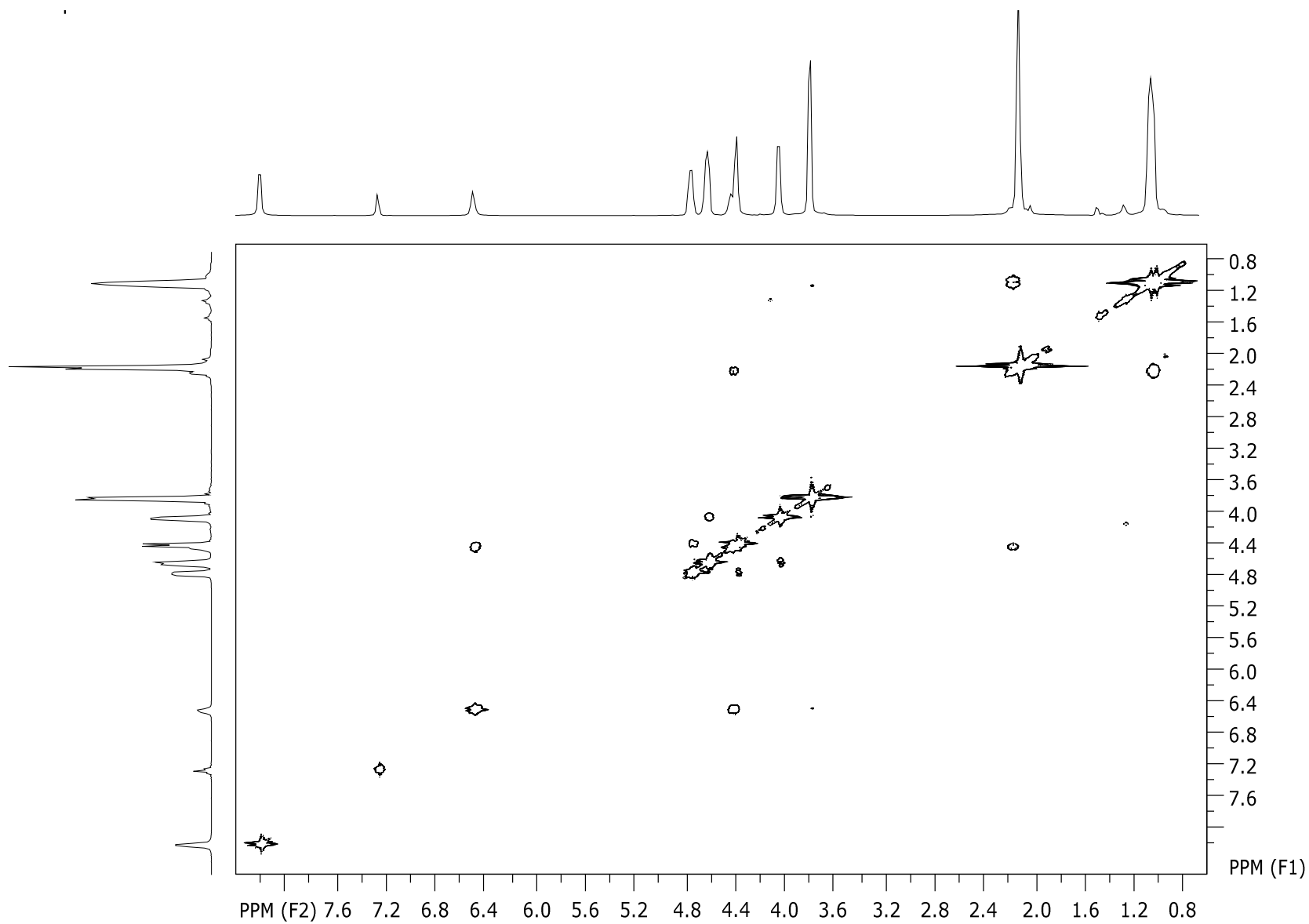
\* ostatak CDCl<sub>3</sub>

Slika P17. <sup>1</sup>H NMR-spektar spoja 4 (c = 50 mM)

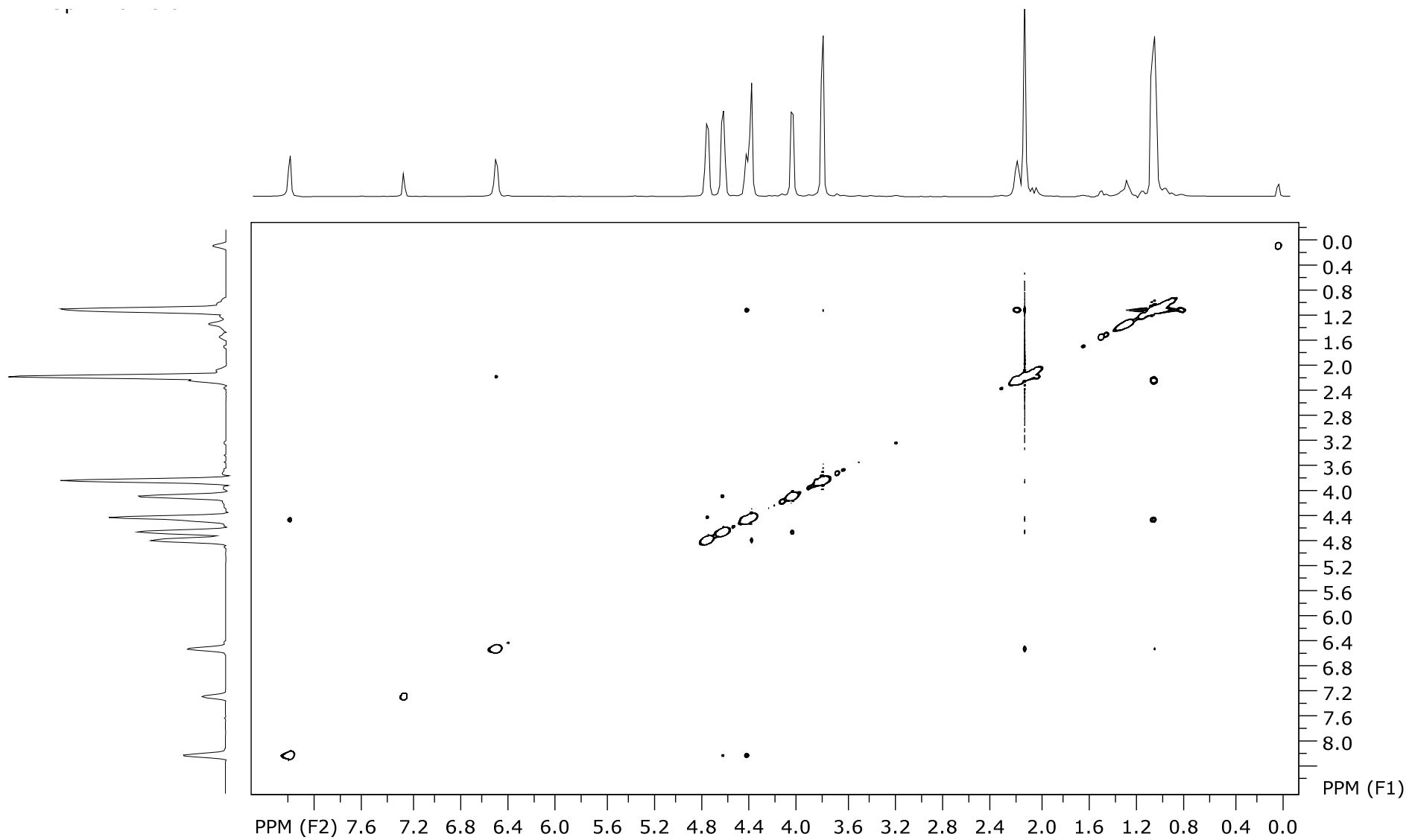


Slika P18. <sup>13</sup>C NMR-spektar spoja 4 (c = 50 mM)



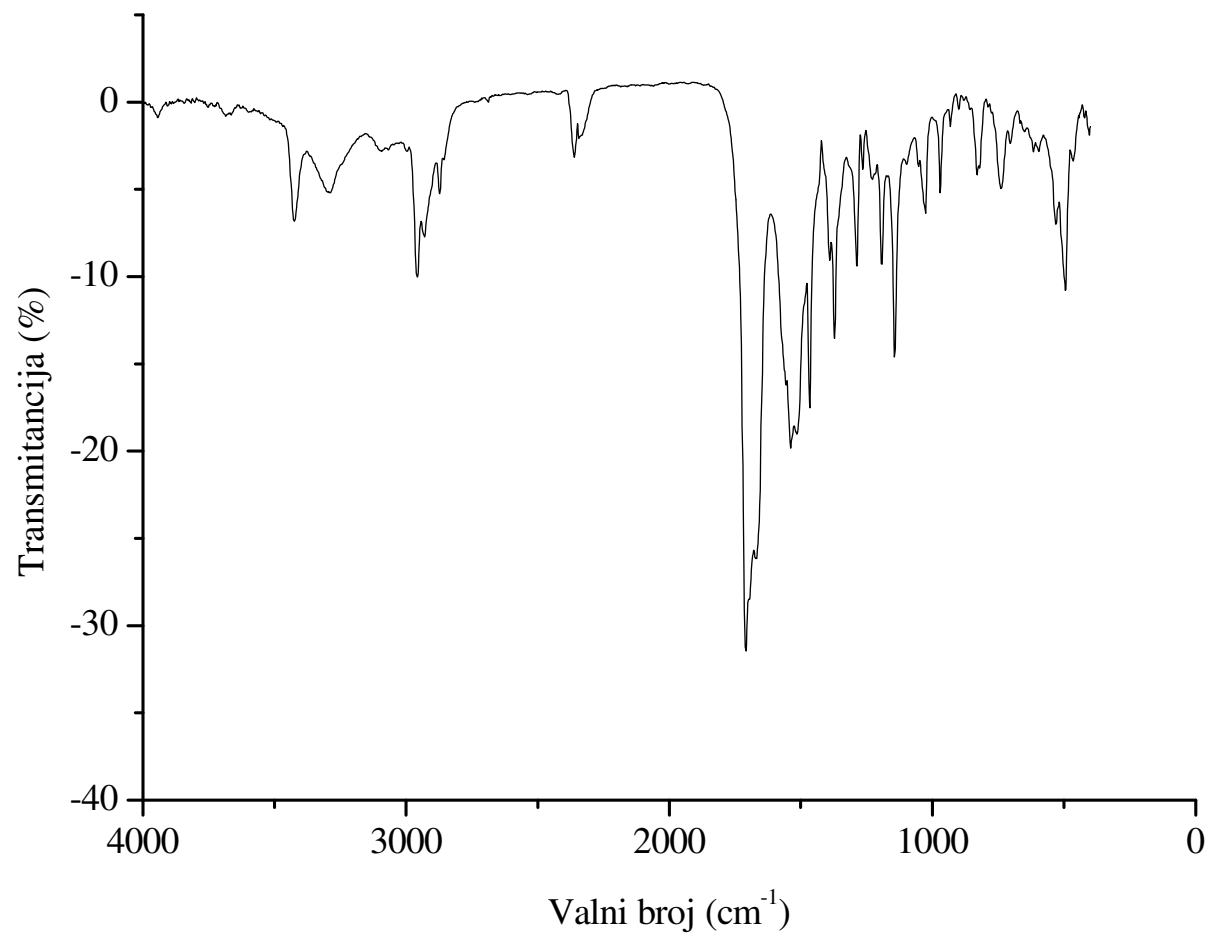


**Slika P19.** COSY NMR-spektar spoja **4** (c = 50 mM)

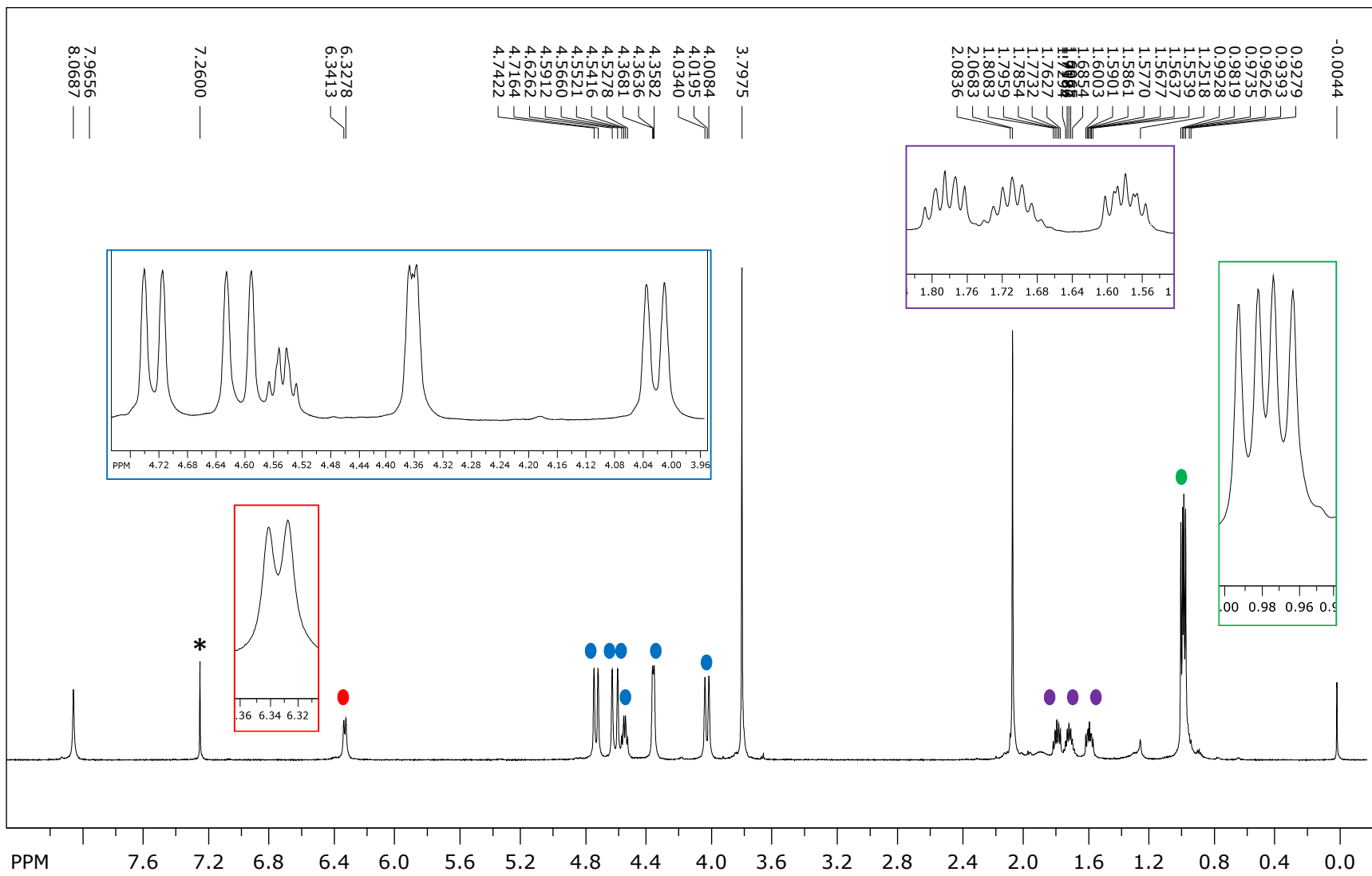


Slika P20. NOESY NMR-spektar spoja 4 (c = 50 mM)

## Spoj 5

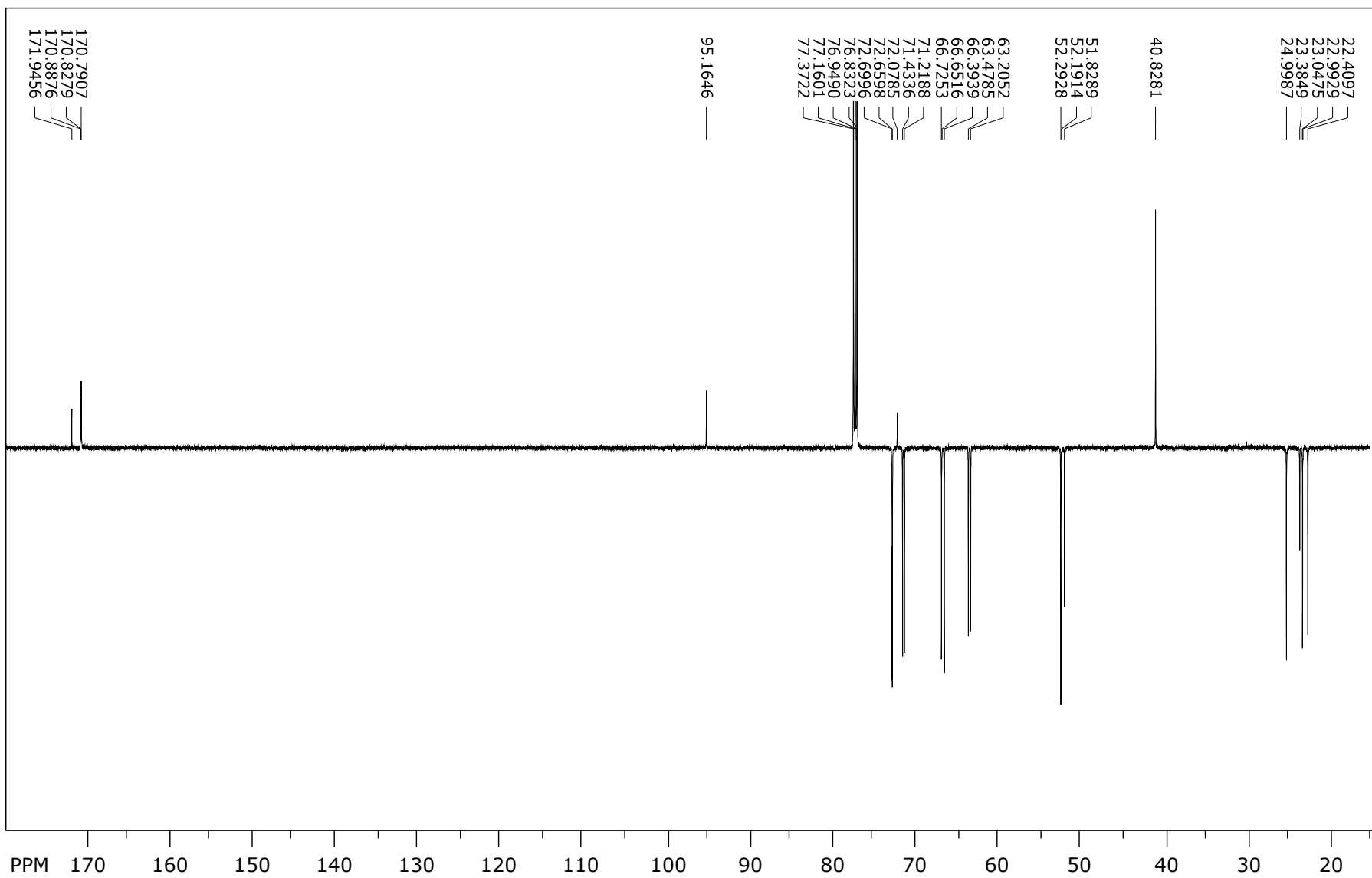


**Slika P21.** IR-spektar spoja **5** (c = 50 mM)

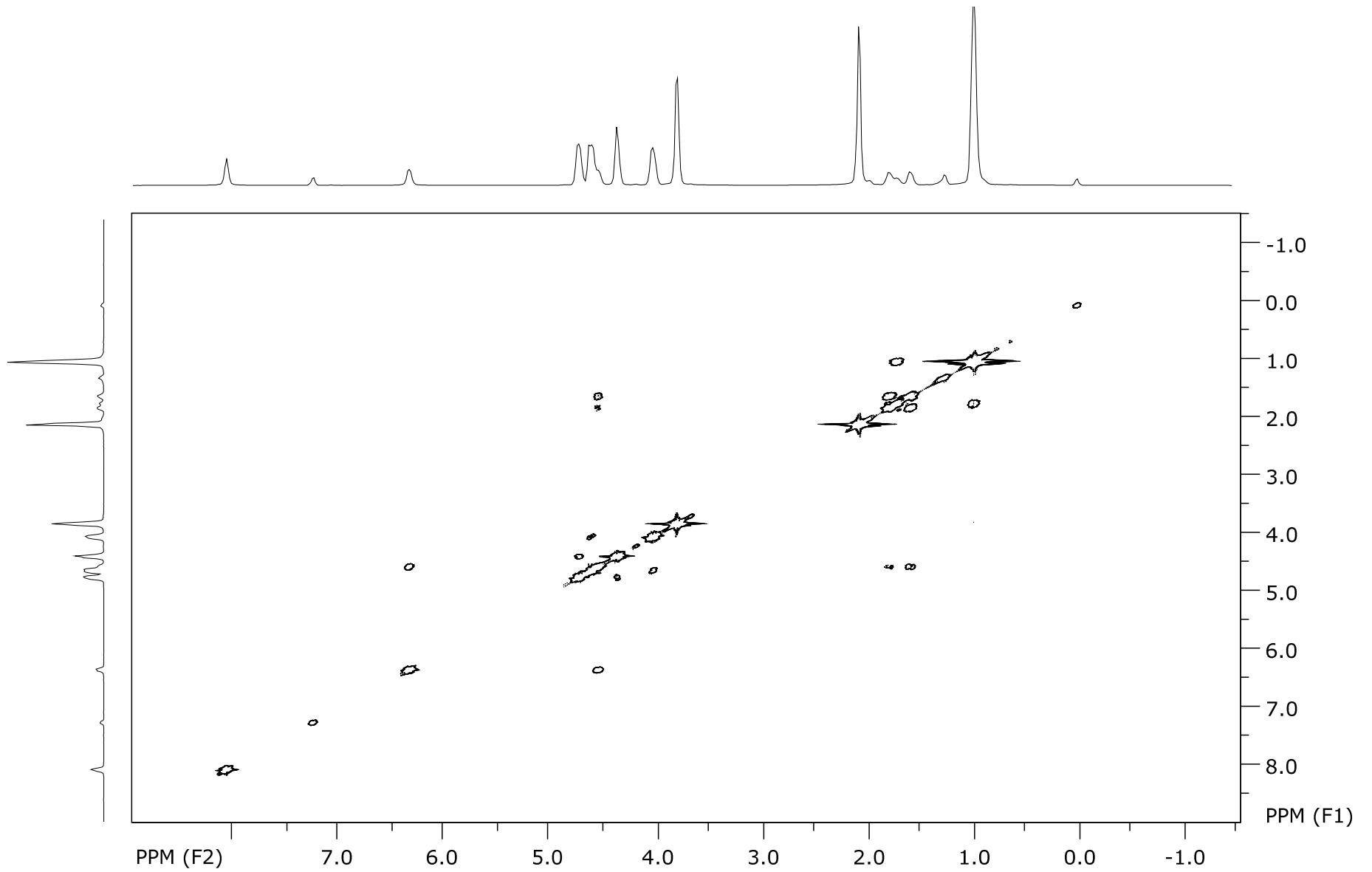


\*ostatak CDCl<sub>3</sub>

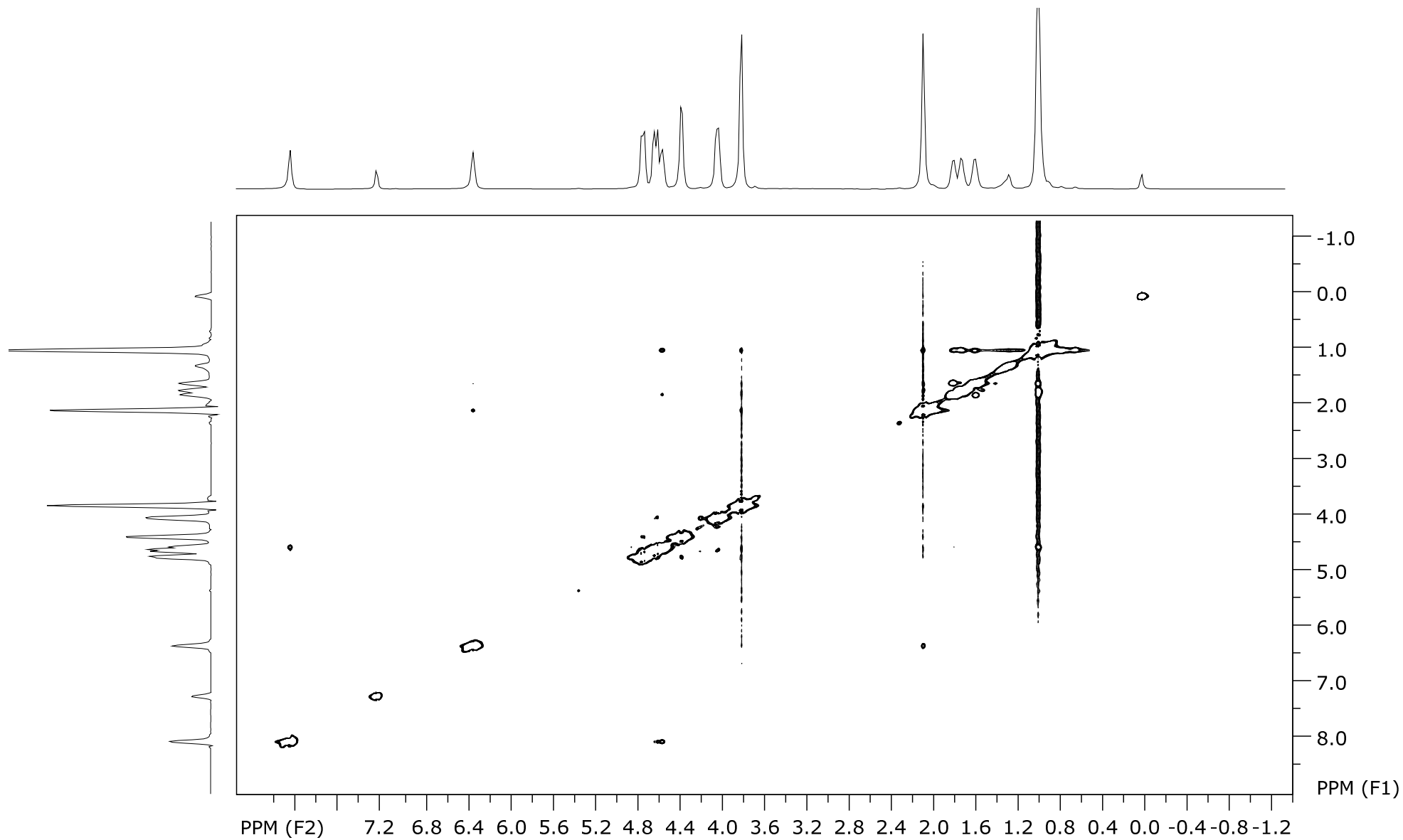
Slika P22. <sup>1</sup>H NMR-spektar spoja **5** (c = 50 mM)



Slika P23. <sup>13</sup>C NMR-spektar spoja 5 (c = 50 mM)

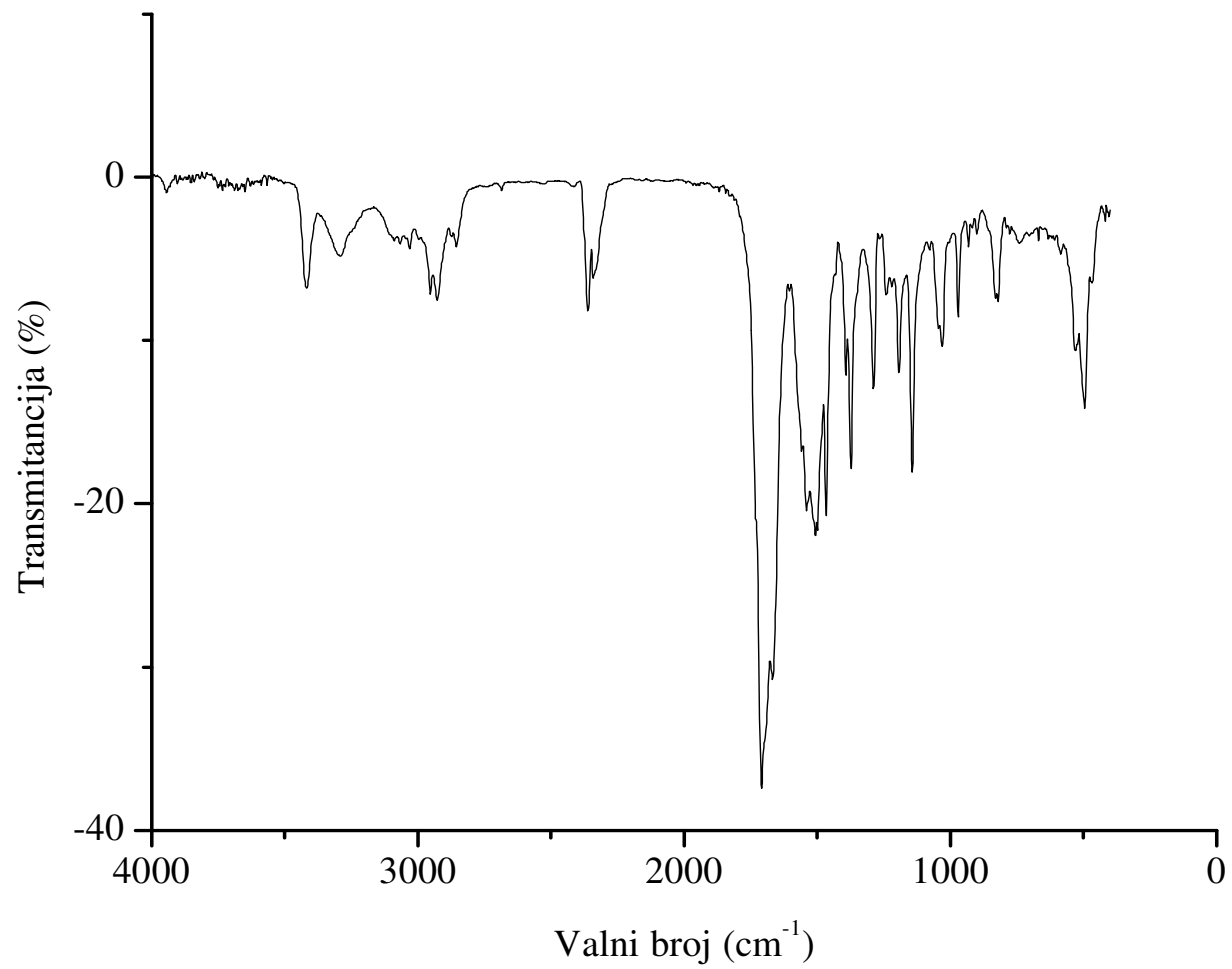


**Slika P24.** COSY NMR-spektar spoja **5** (c = 50 mM)



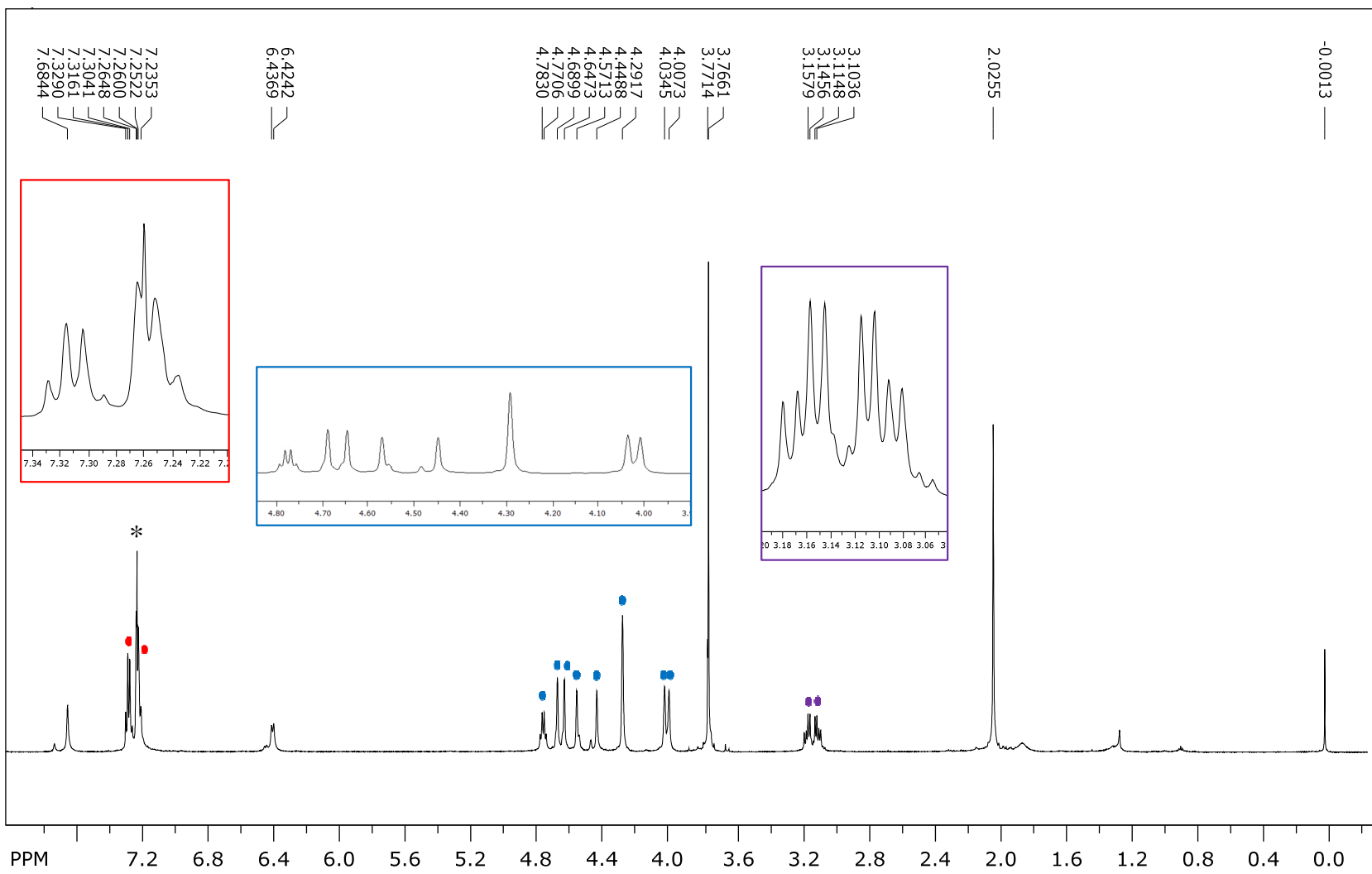
Slika P25. NOESY NMR-spektar spoja 5 (c = 50 mM)

## Spoj 6



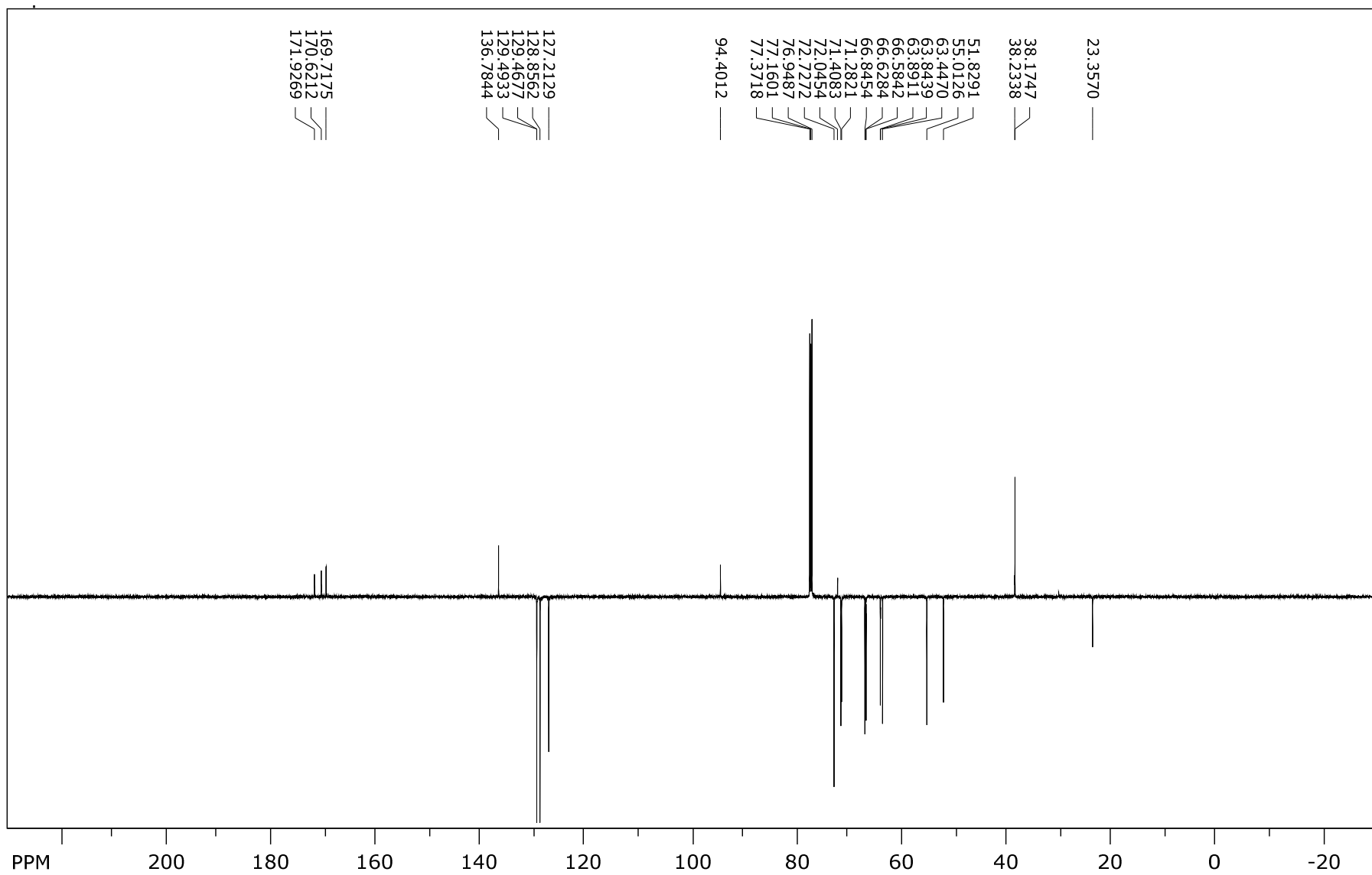
**Slika P26.** IR-spektar spoja **6** (c = 50 mM)



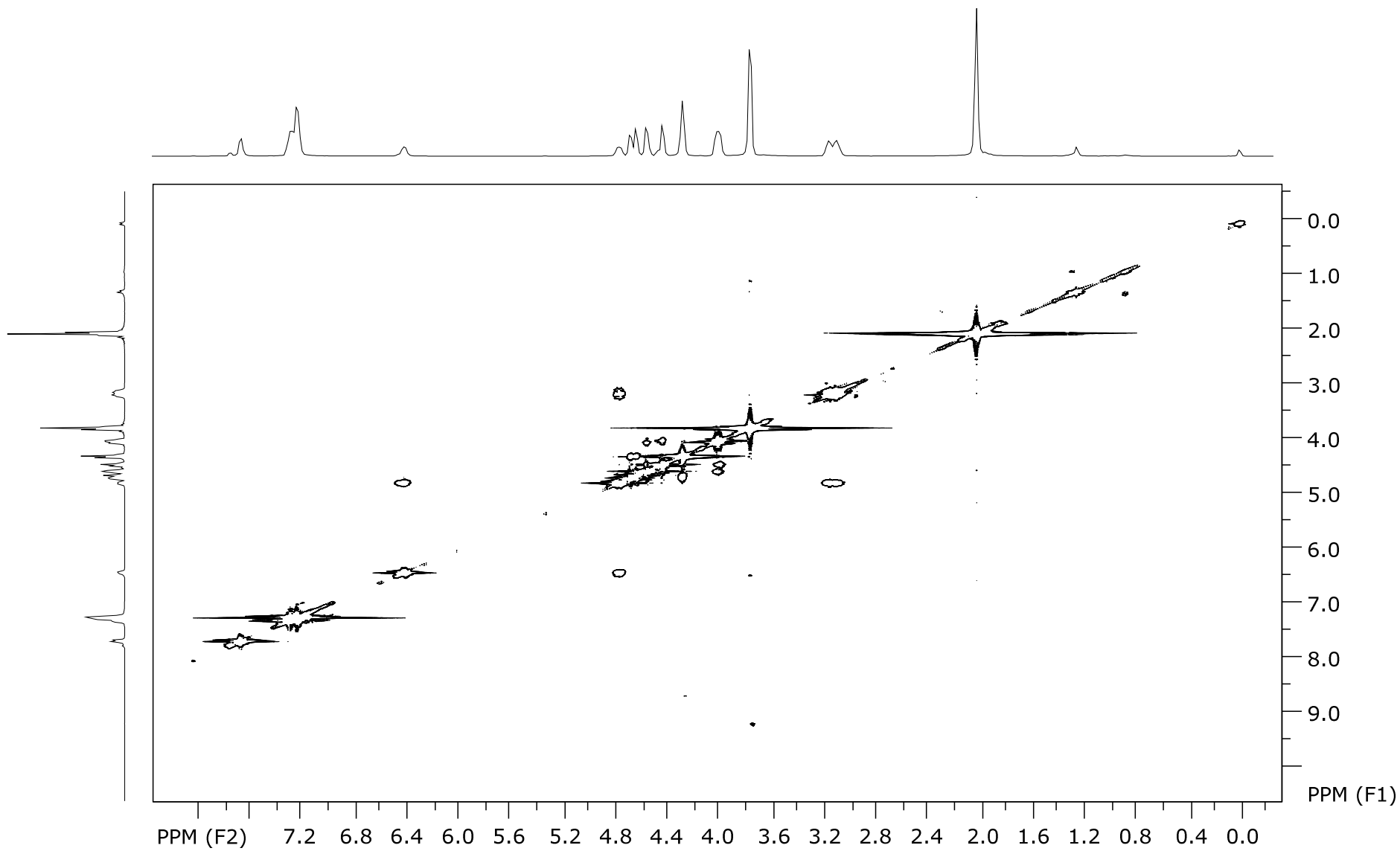


\* ostatak  $\text{CDCl}_3$

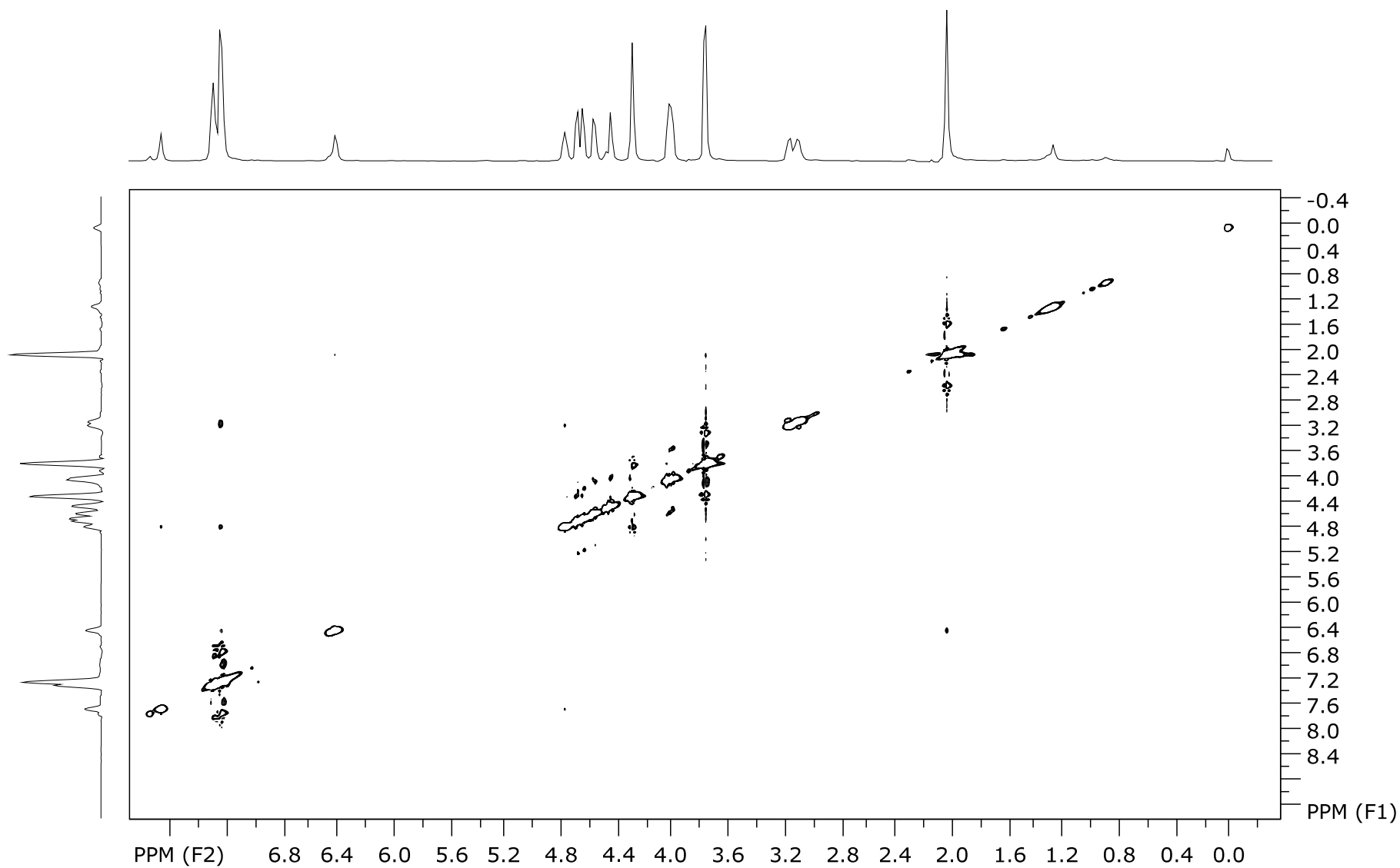
Slika P27.  $^1\text{H}$  NMR-spektar spoja **6** ( $c = 50 \text{ mM}$ )



Slika P28. <sup>13</sup>C NMR-spektar spoja 6 (c = 50 mM)

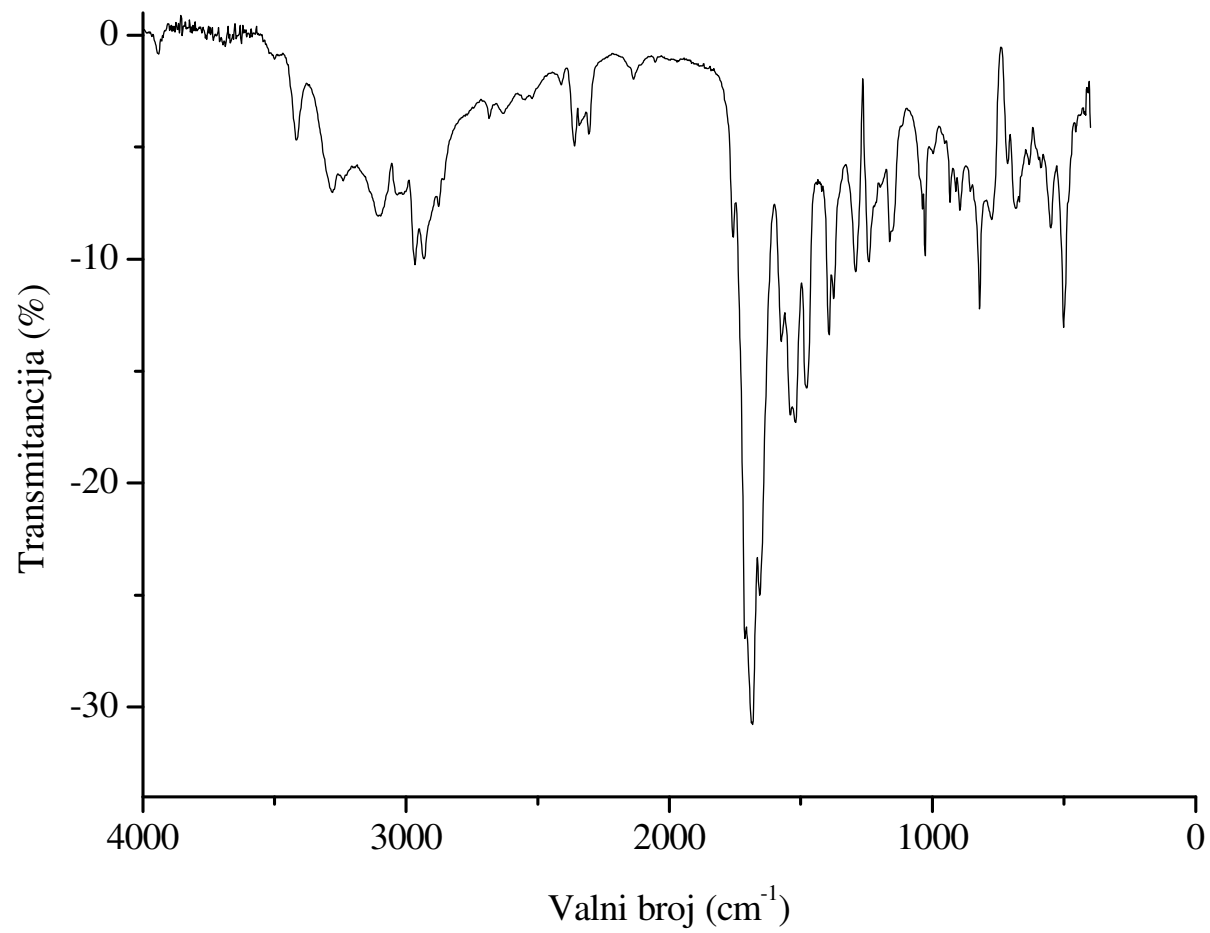


**Slika P29.** COSY NMR-spektar spoja **6** (c = 50 mM)



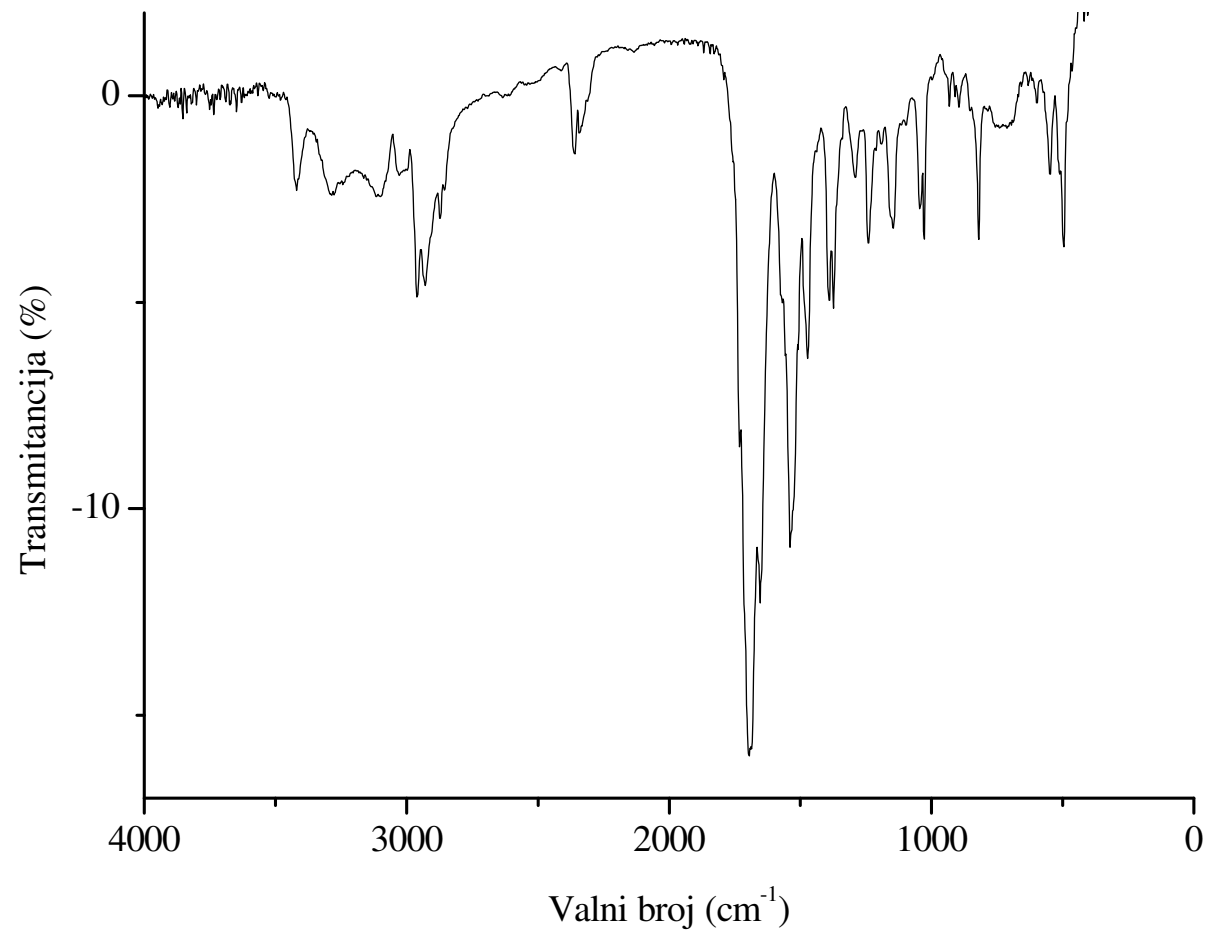
Slika P30. NOESY NMR-spektar spoja 6 (c = 50 mM)

## Spoj 7



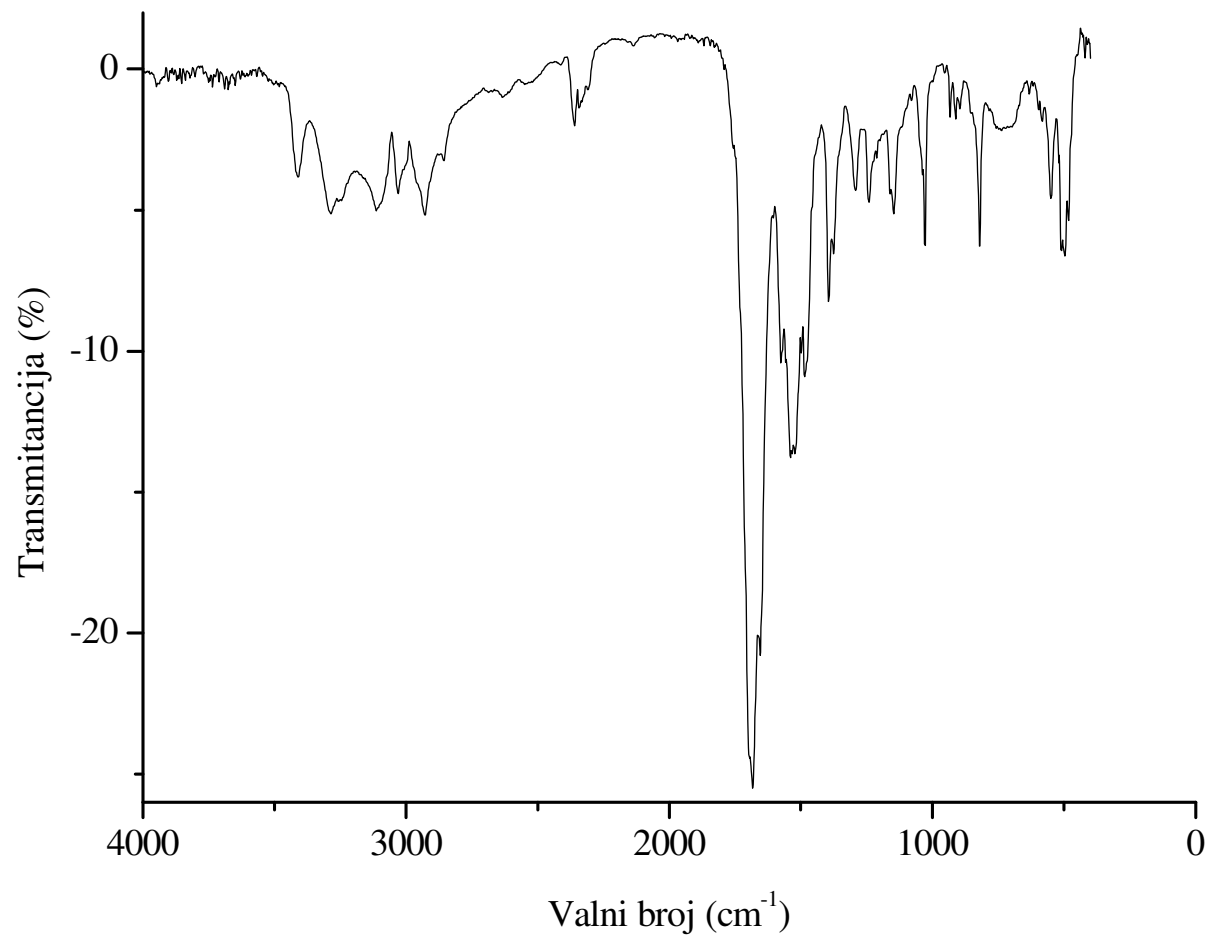
**Slika P31.** IR-spektar spoja 7 (c = 50 mM)

## Spoj 8



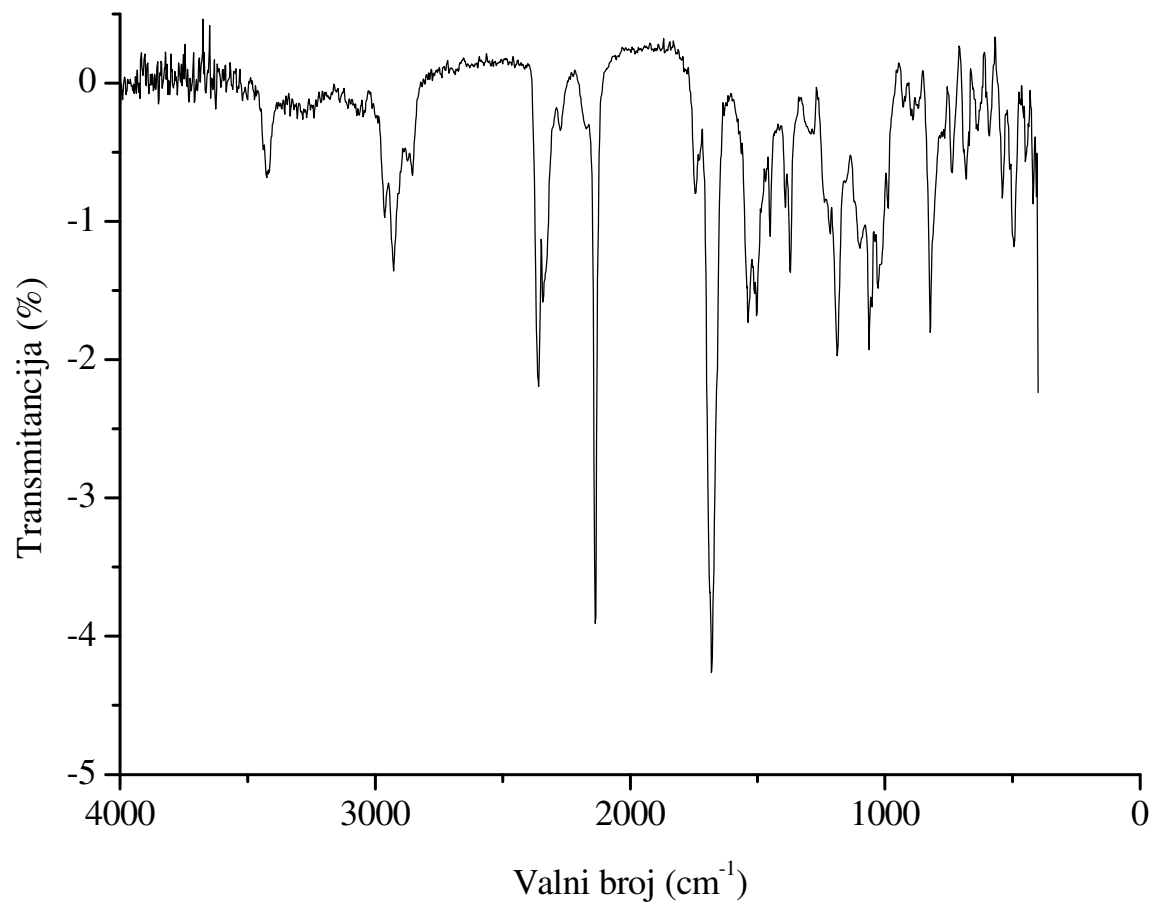
**Slika P32.** IR-spektar spoja **8** (c = 50 mM)

## Spoj 9



**Slika P33.** IR-spektar spoja **9** (c = 50 mM)

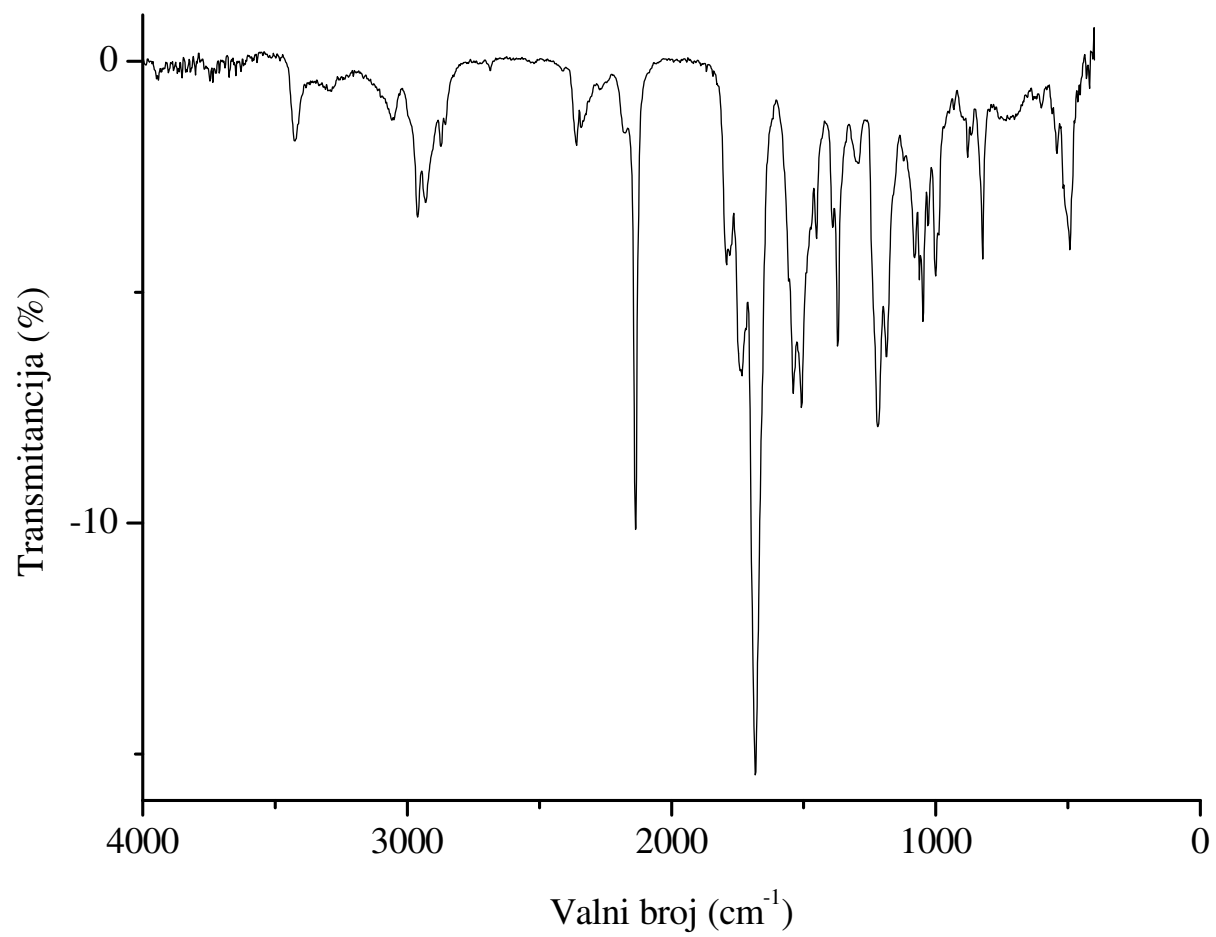
## Spoj 10



Slika P34. IR-spektar spoja **10** (c = 50 mM)

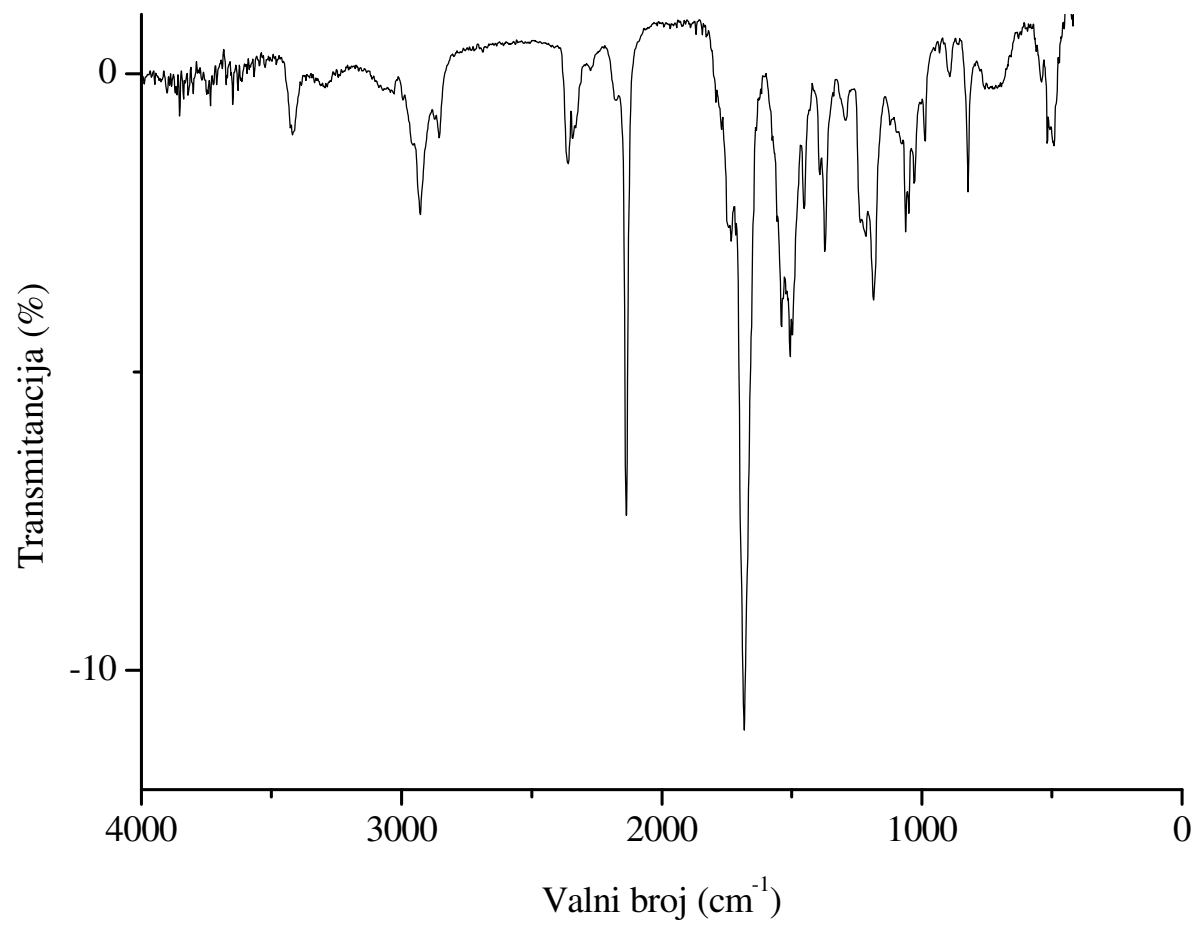


## Spoj 11



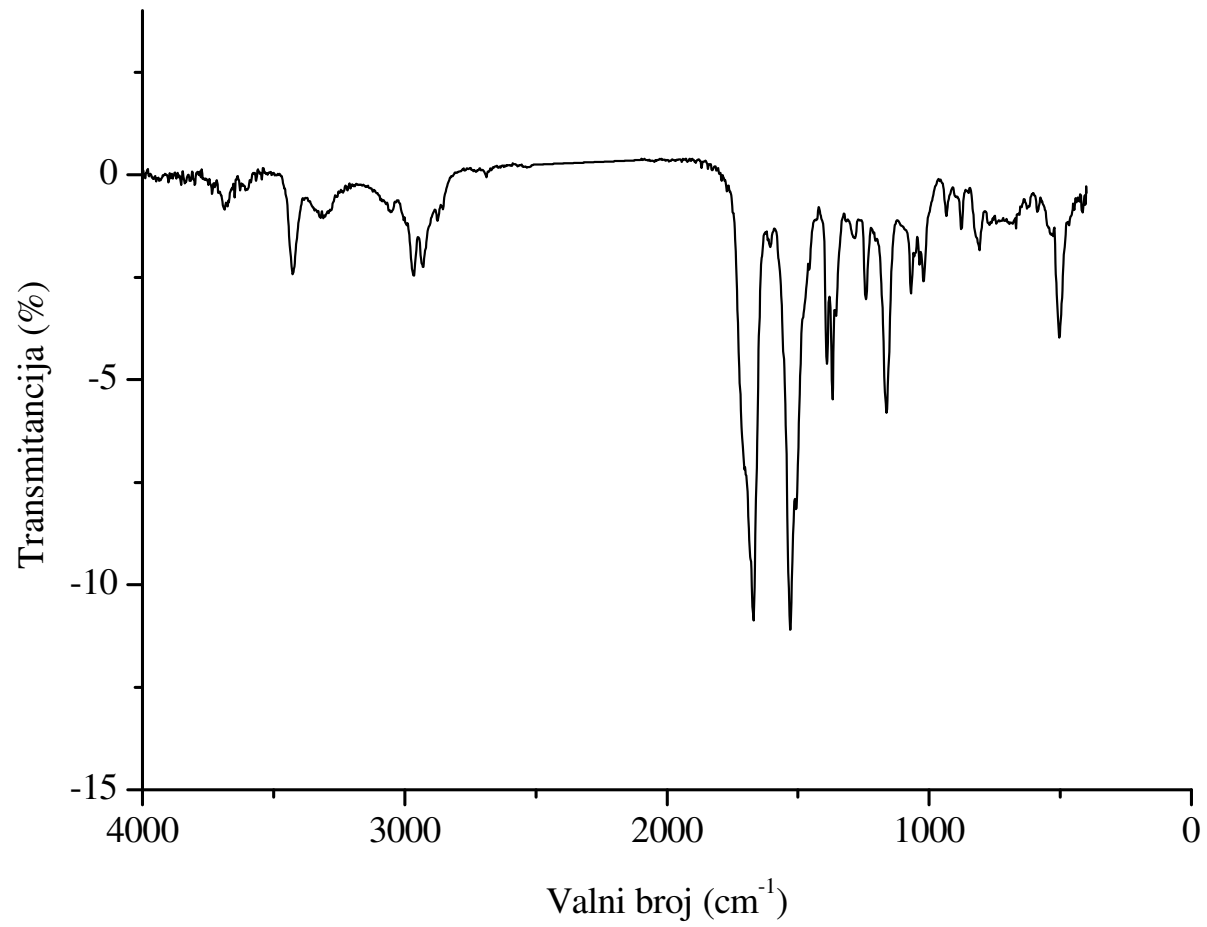
Slika P35. IR-spektar spoja **11** (c = 50 mM)

## Spoj 12

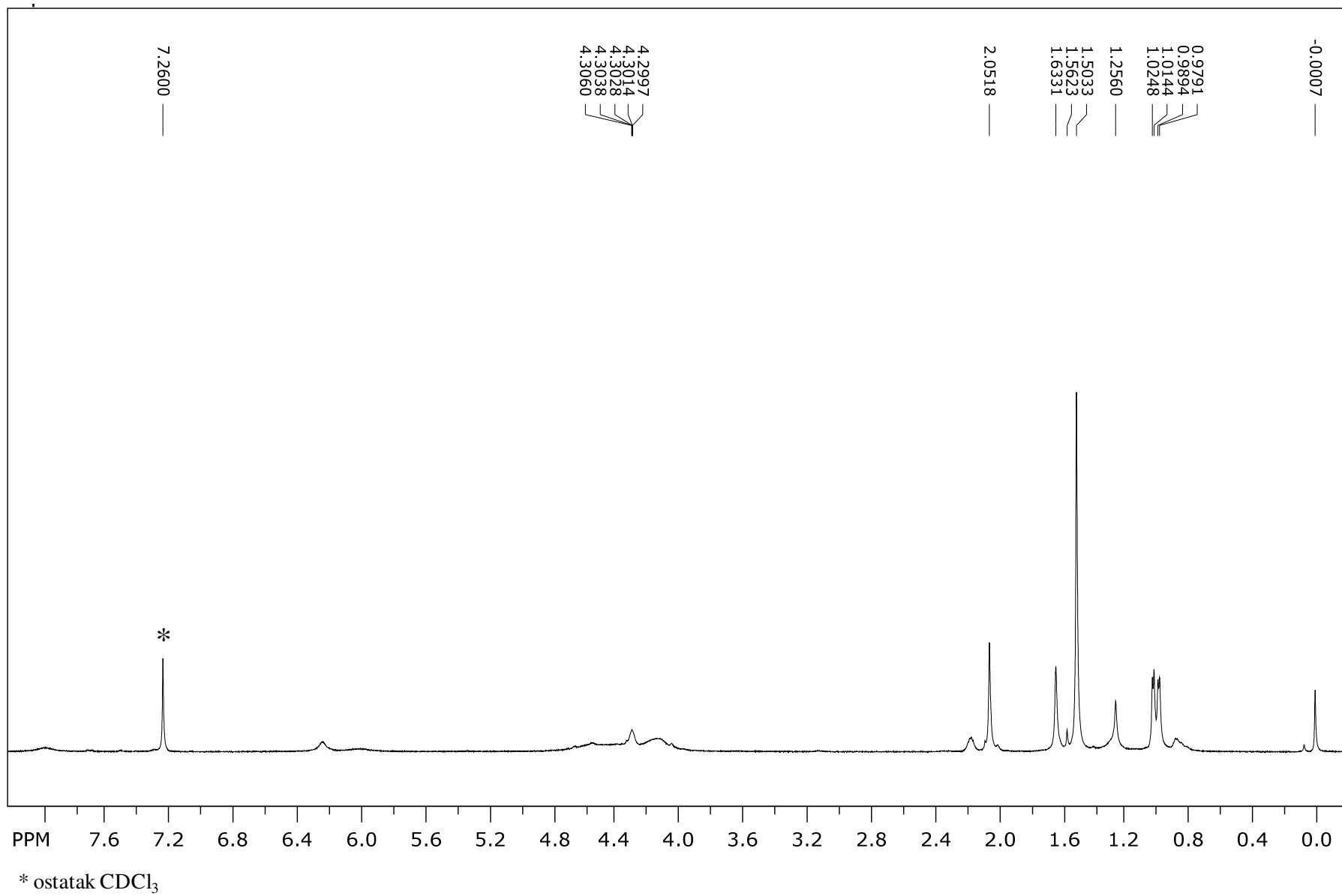


Slika P36. IR-spektar spoja 12 ( $c = 50 \text{ mM}$ )

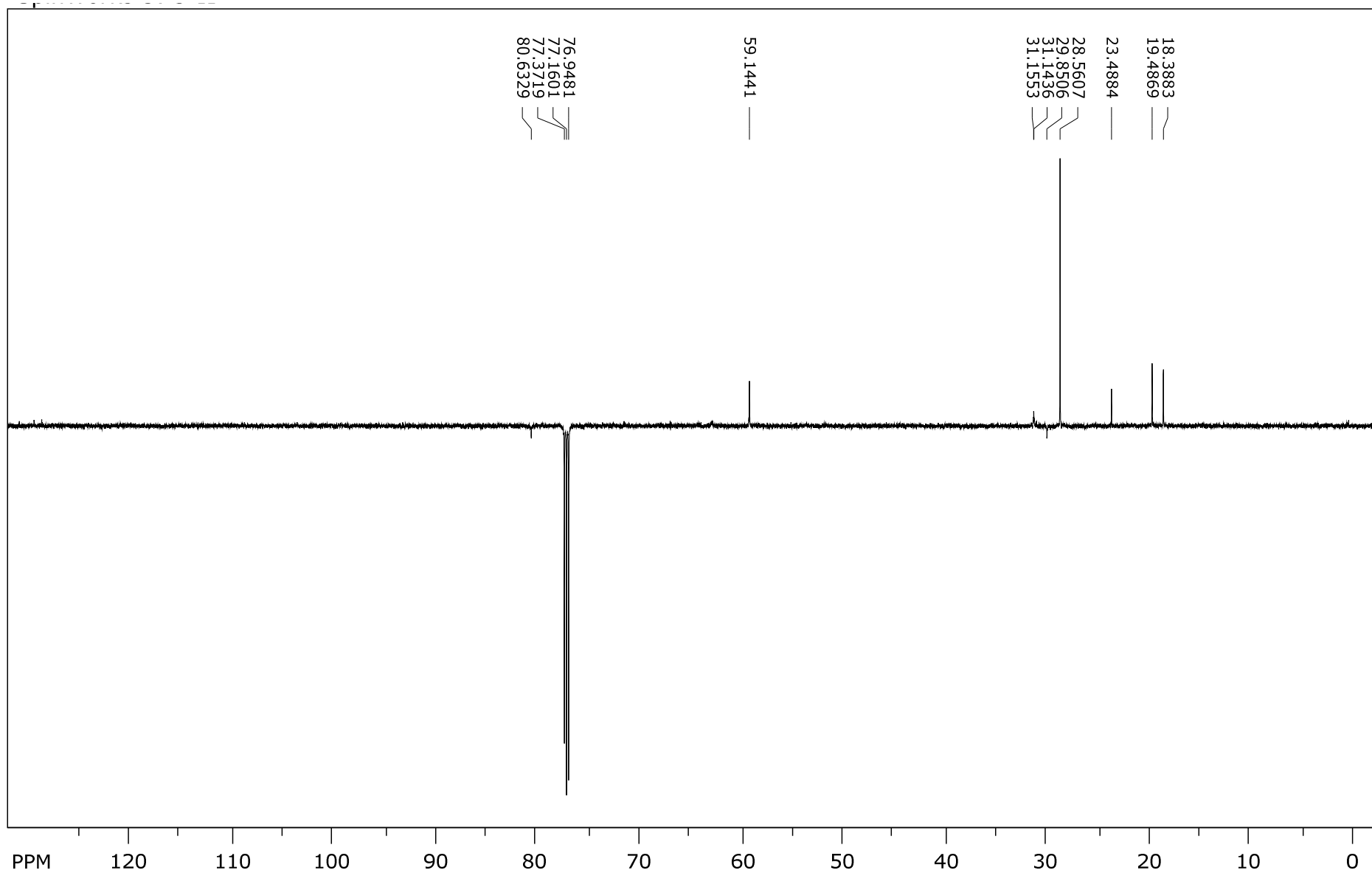
## Spoj 13



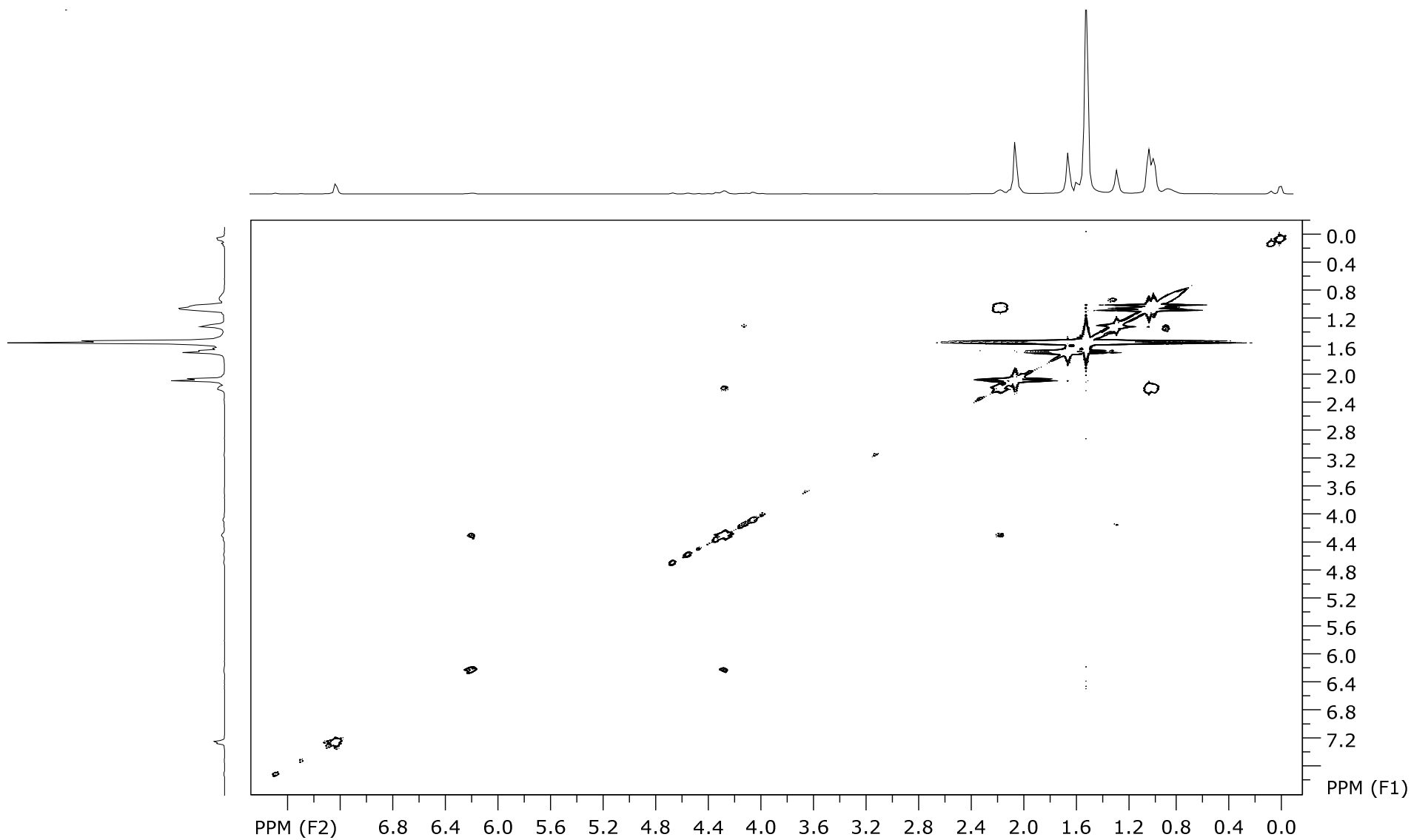
**Slika P37.** IR-spektar spoja **13** (c = 50 mM)



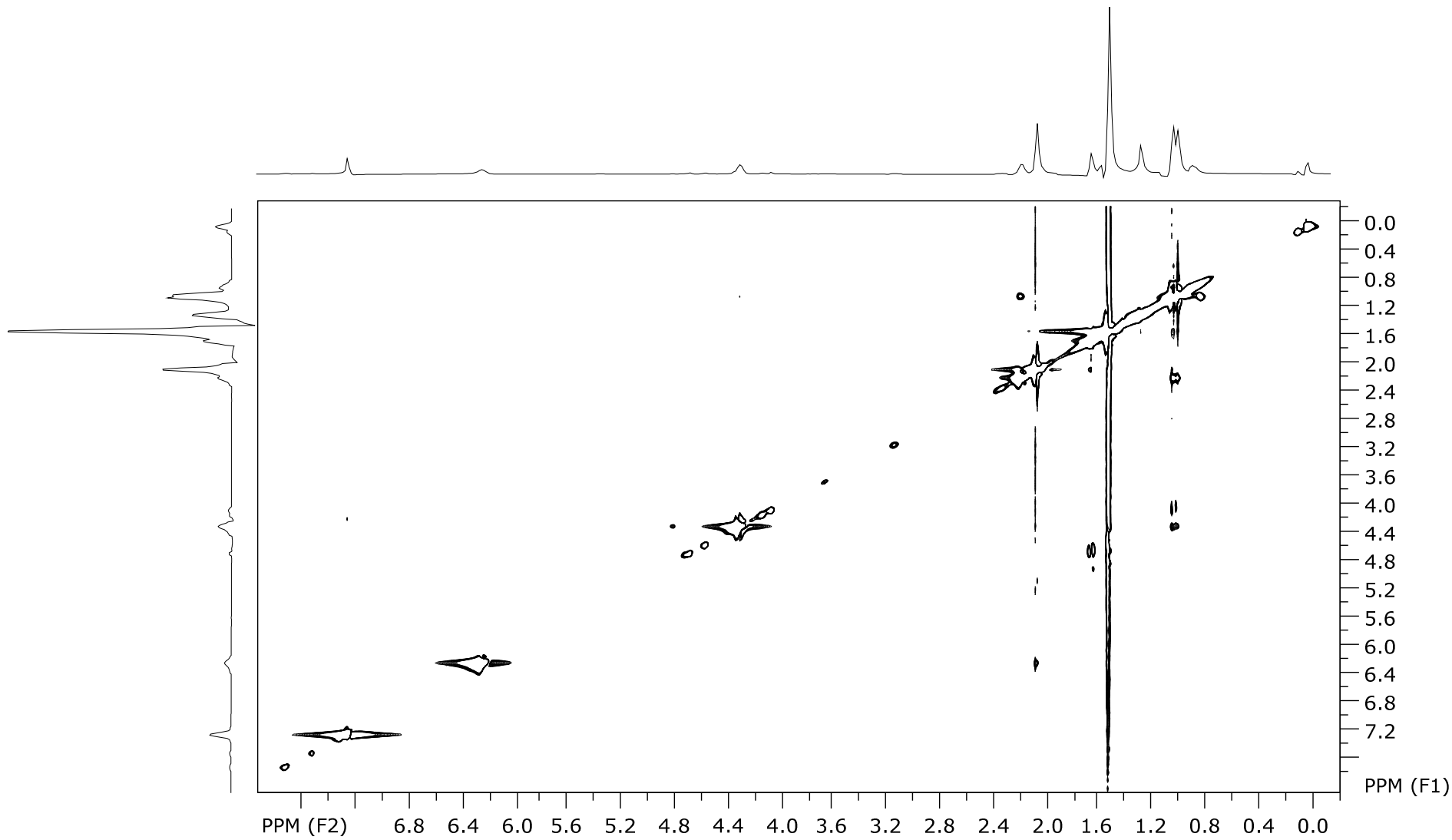
Slika P38. <sup>1</sup>H NMR-spektar spoja **13** (c = 5 mM)



Slika P39.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektar spoja **13** (c = 5 mM)

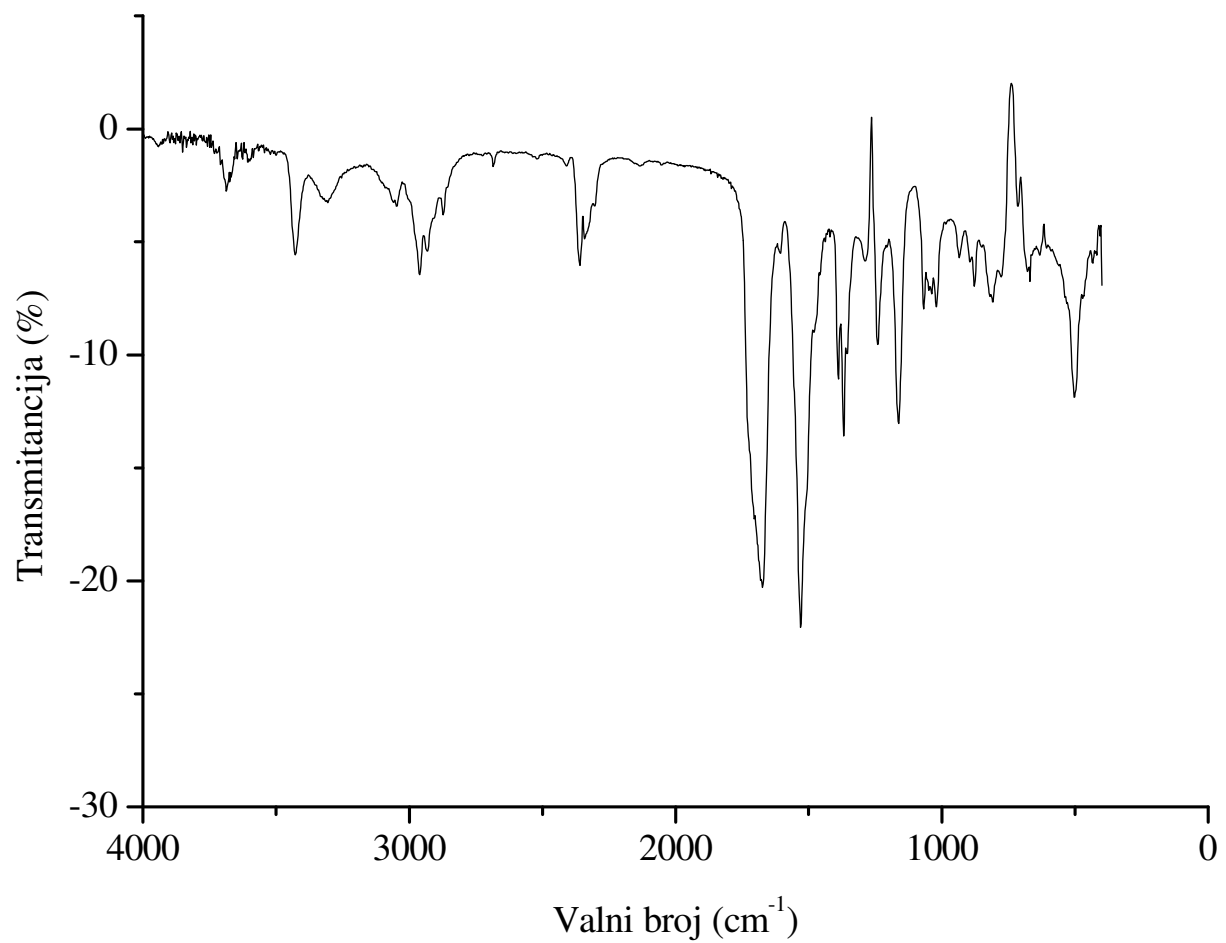


**Slika P40.** COSY NMR-spektar spoja **13** (c = 5 mM)



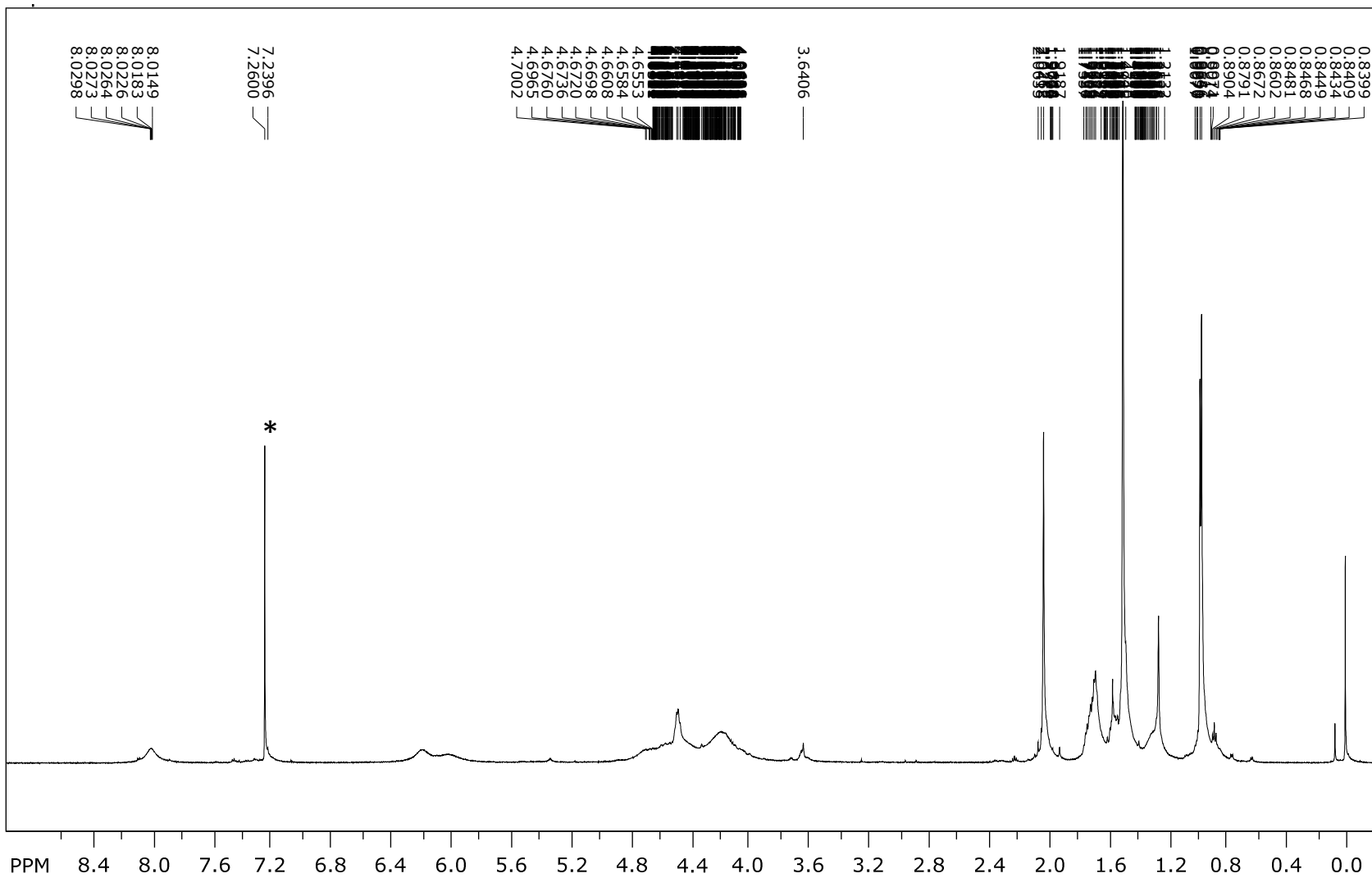
Slika P41. NOESY NMR-spektar spoja 13 (c = 5 mM)

## Spoj 14



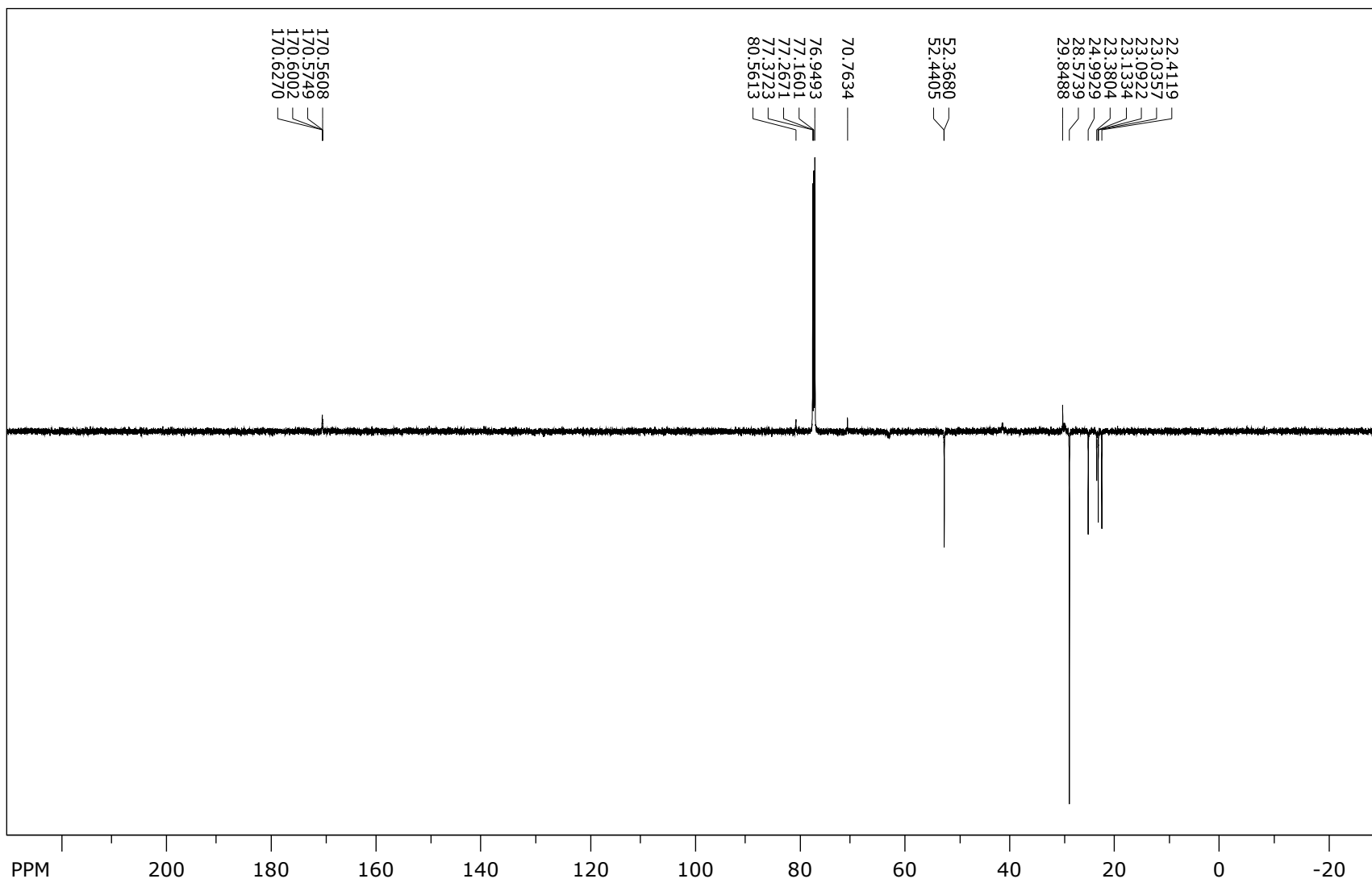
**Slika P42.** IR-spektar spoja **14** (c = 50 mM)



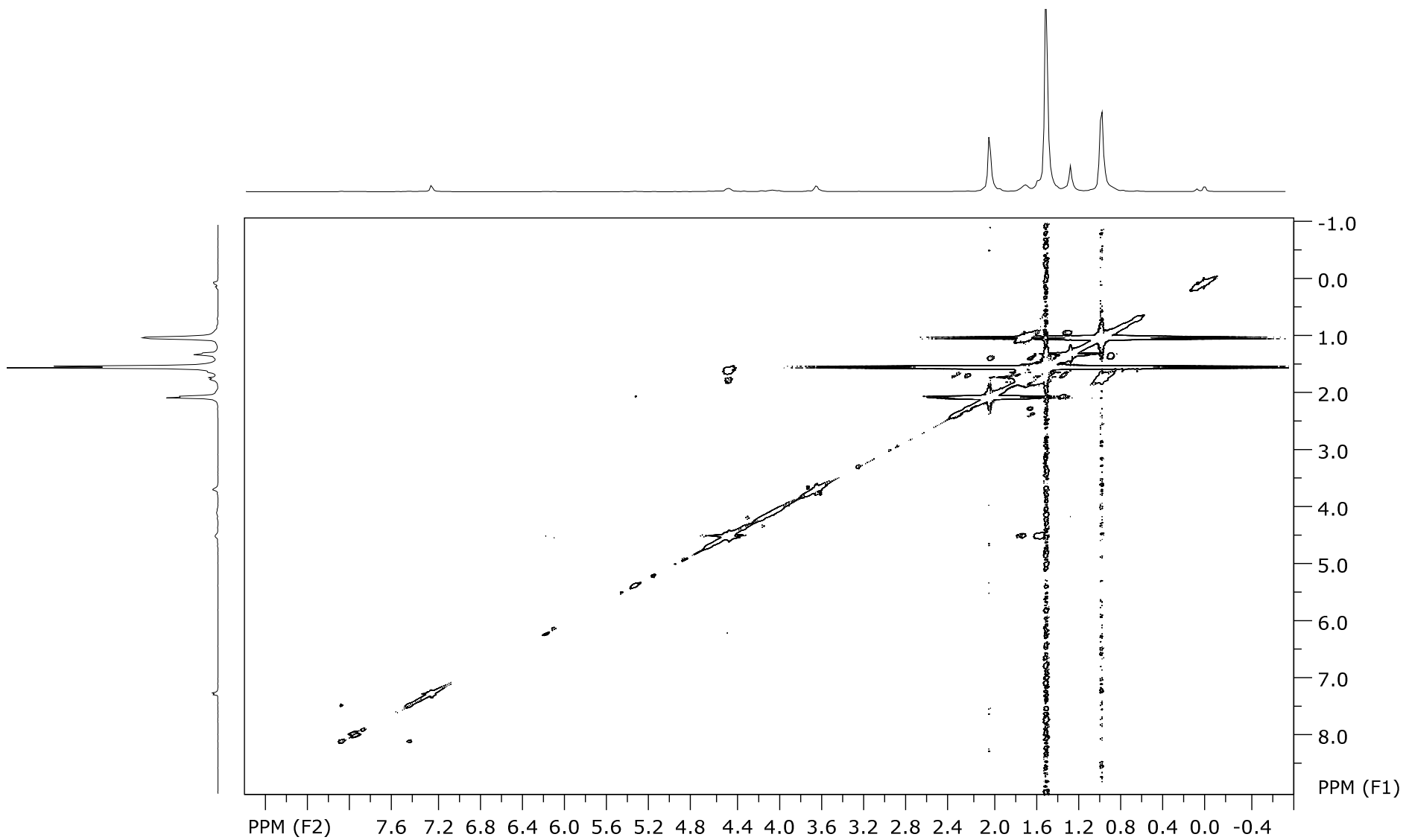


\* ostatak CDCl<sub>3</sub>

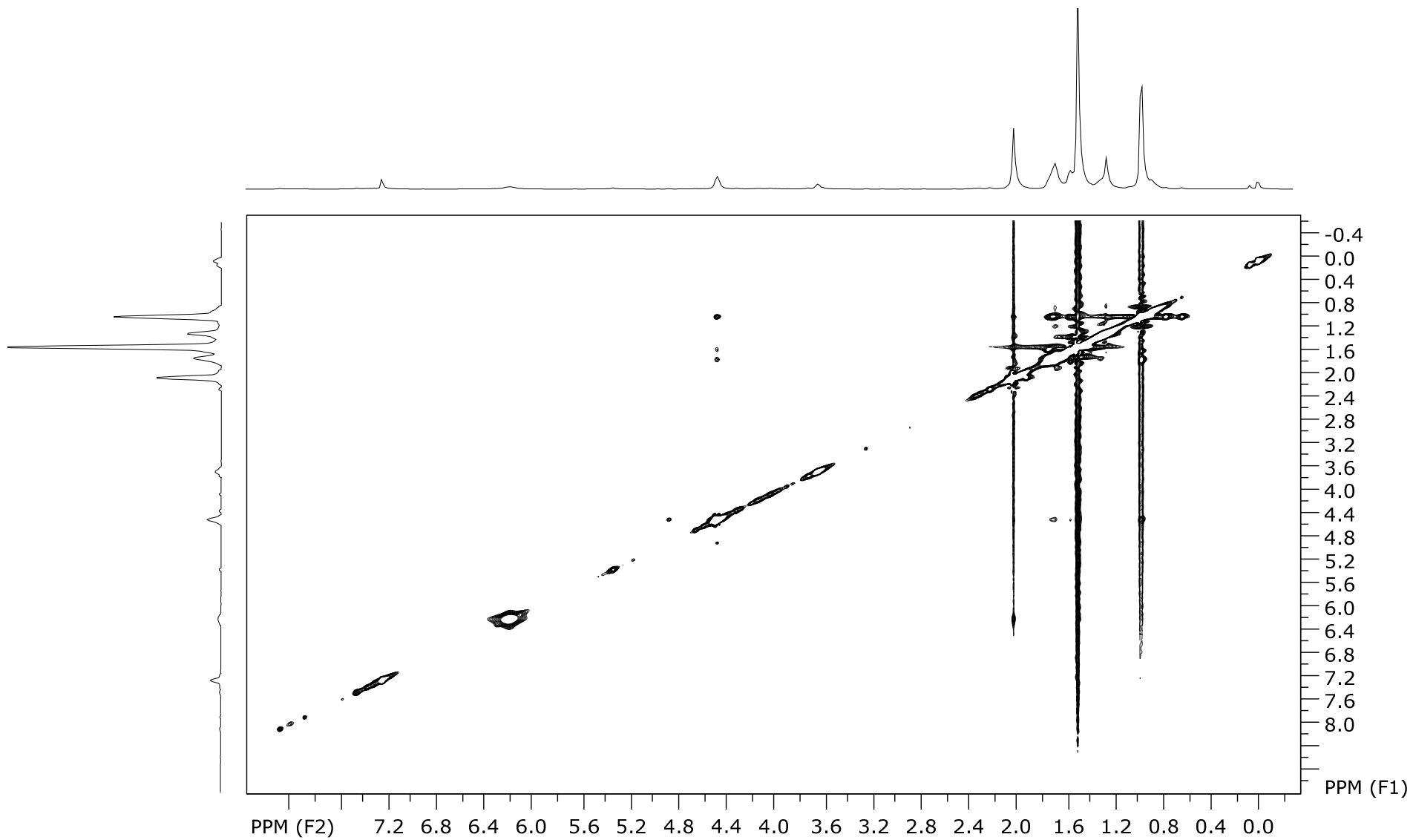
Slika P43. <sup>1</sup>H NMR-spektar spoja **14** (c = 5 mM)



Slika P44.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektar spoja **14** (c = 5 mM)

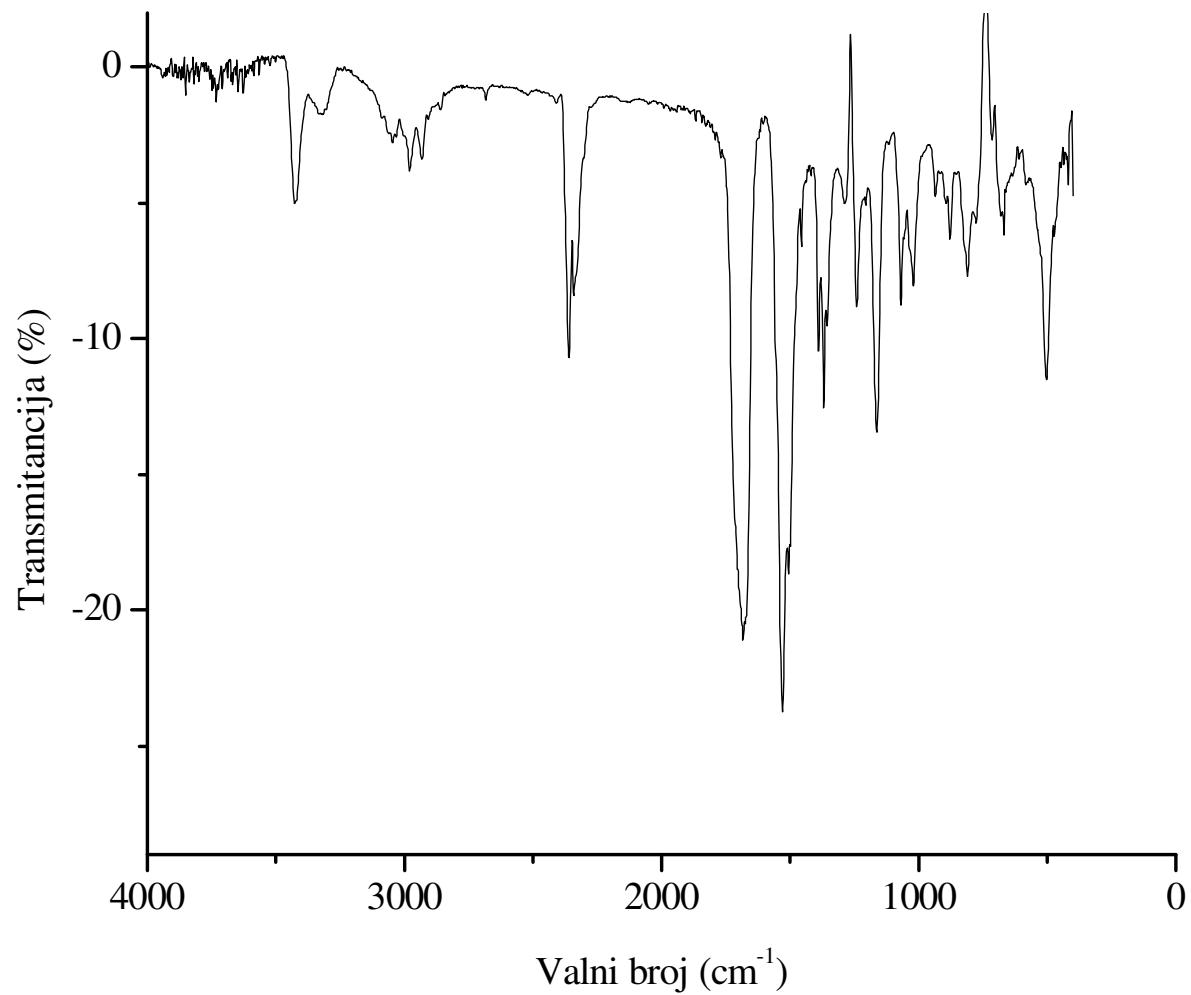


Slika P45. COSY NMR-spektar spoja **14** (c = 5 mM)

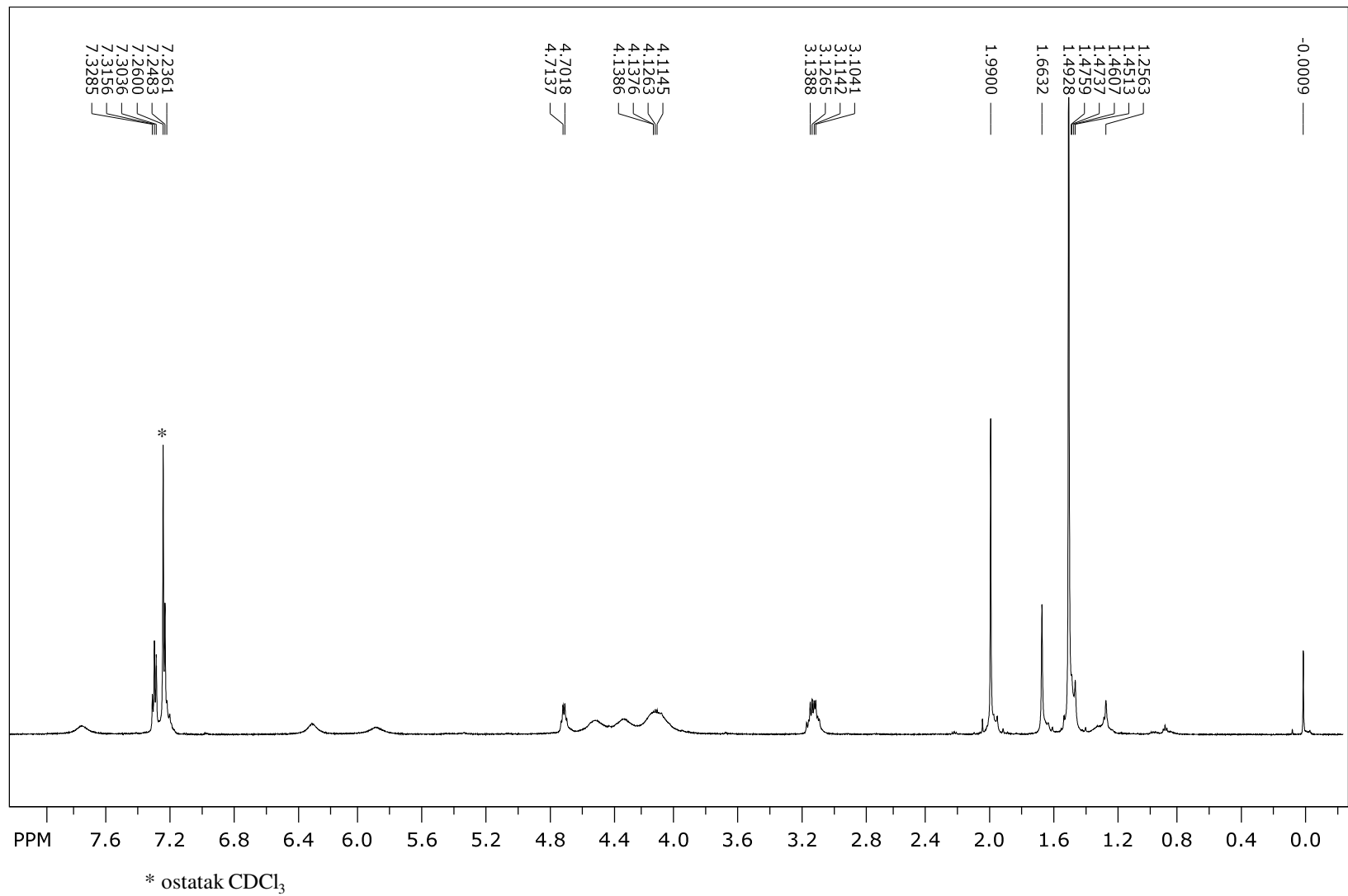


**Slika P46.** NOESY NMR-spektar spoja **14** (c = 5 mM)

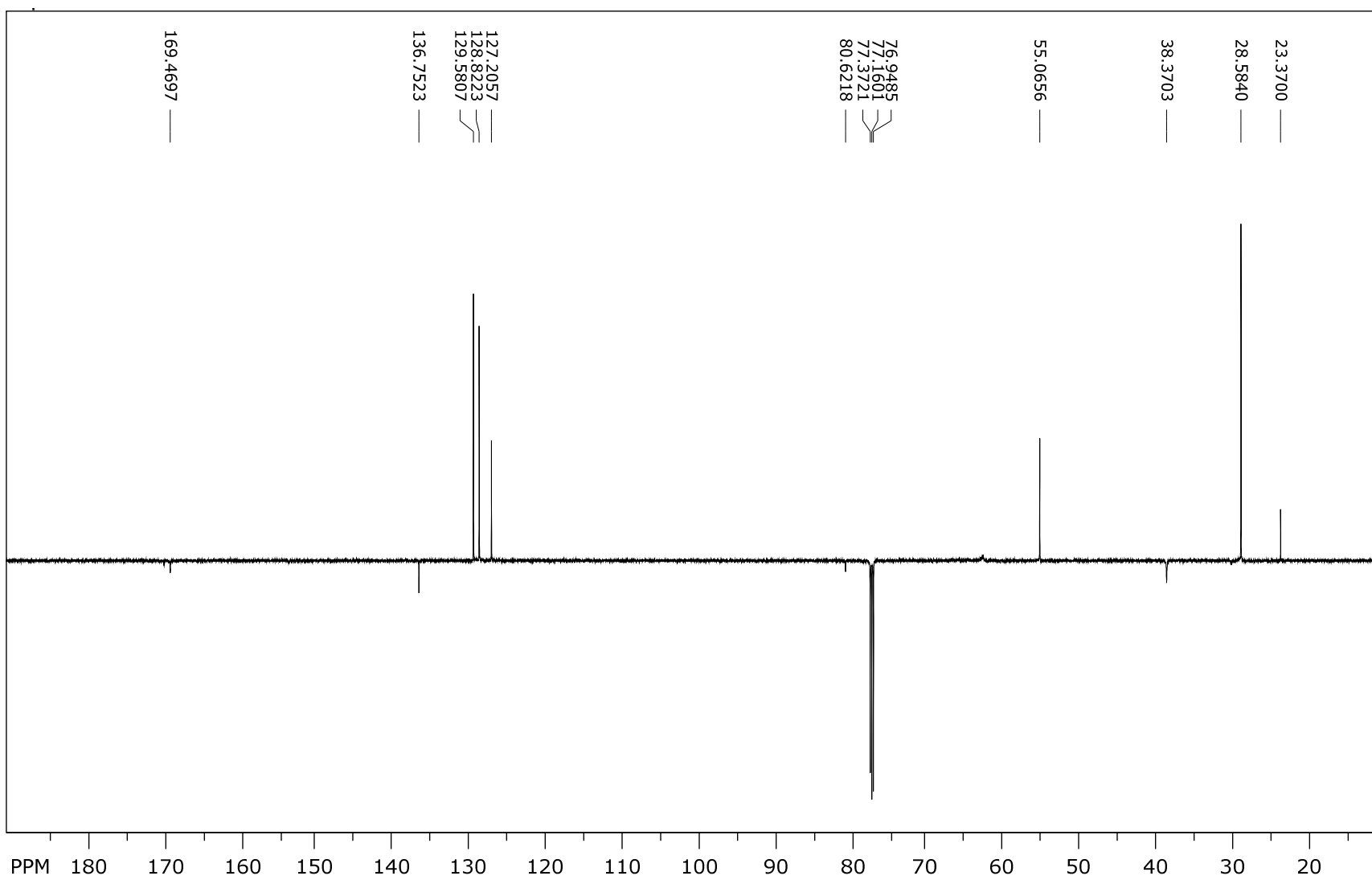
## Spoj 15



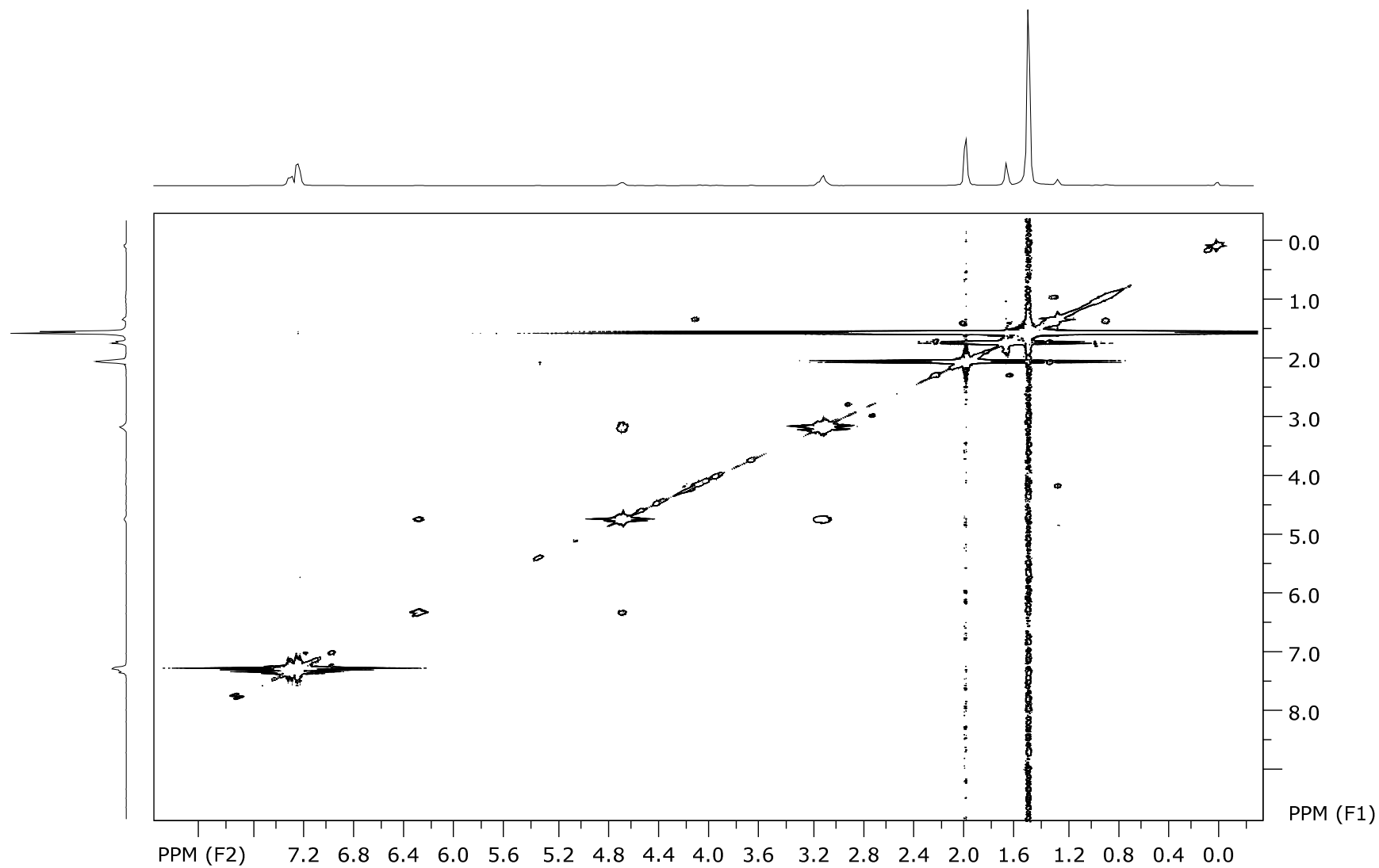
Slika P47. IR-spektar spoja **15** (c = 50 mM)



Slika P48. <sup>1</sup>H NMR-spektar spoja **15** (c = 5 mM)

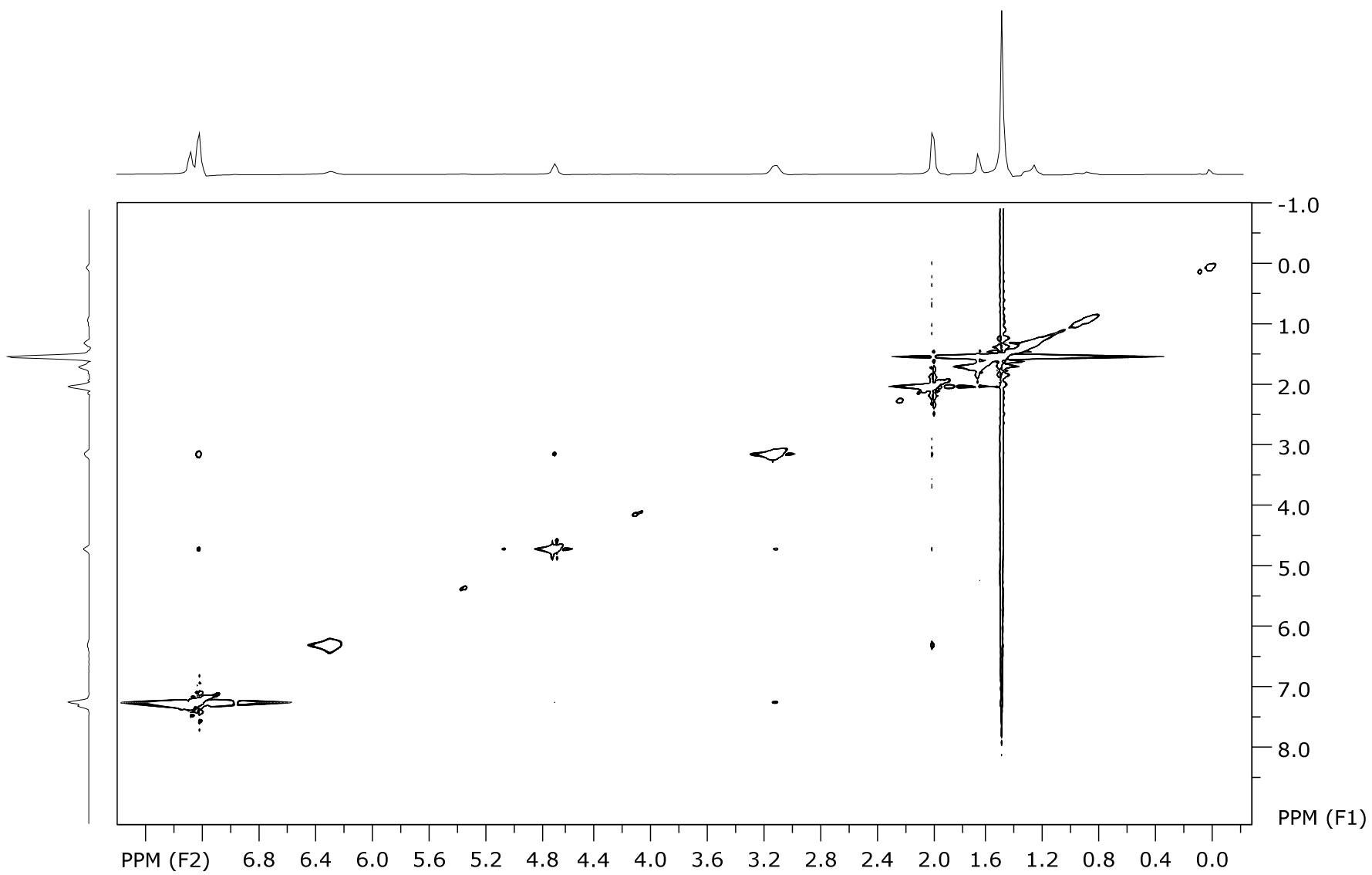


Slika P49.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektar spoja **15** (c = 5 mM)



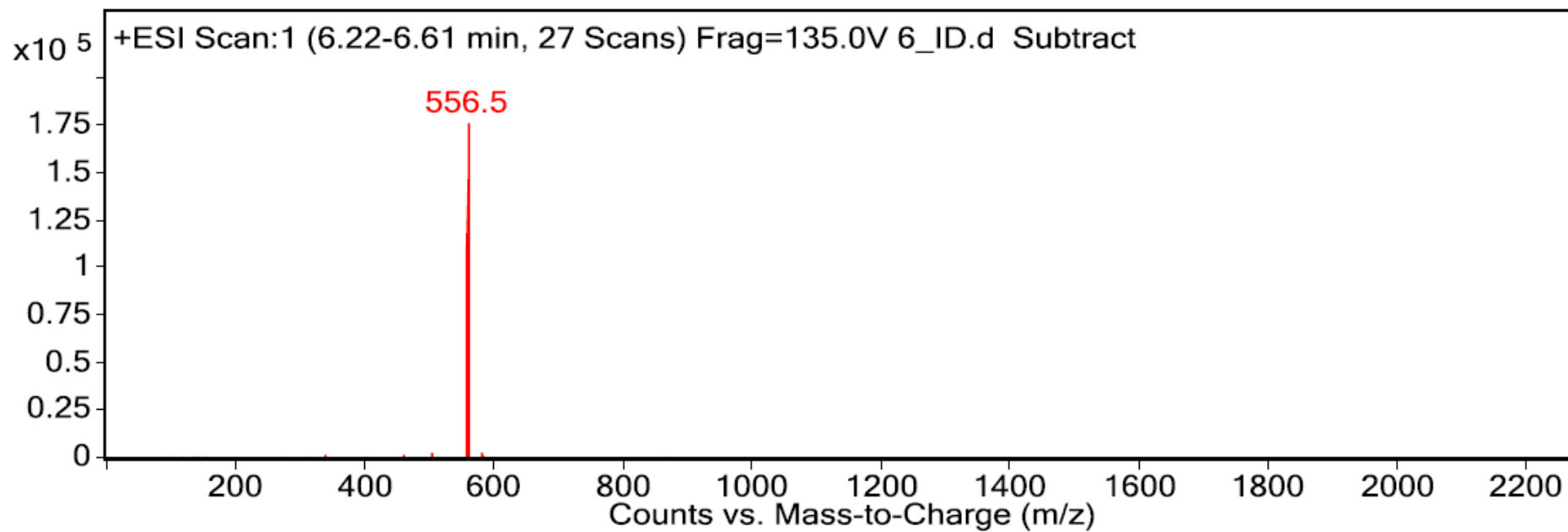
**Slika P50.** COSY NMR-spektar spoja **15** ( $c = 5 \text{ mM}$ )





Slika P51. NOESY NMR-spektar spoja **15** (c = 5 mM)

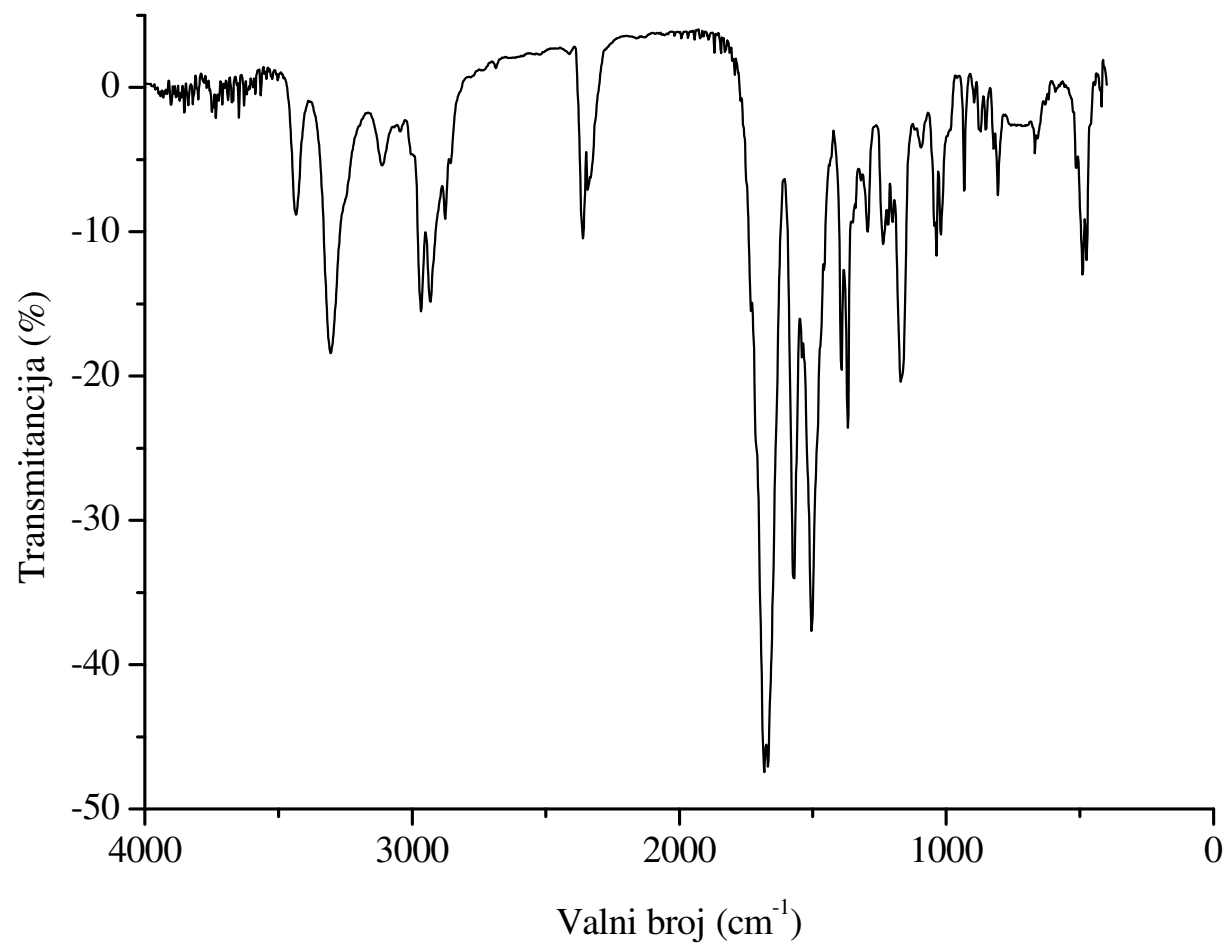
## Spoj 16



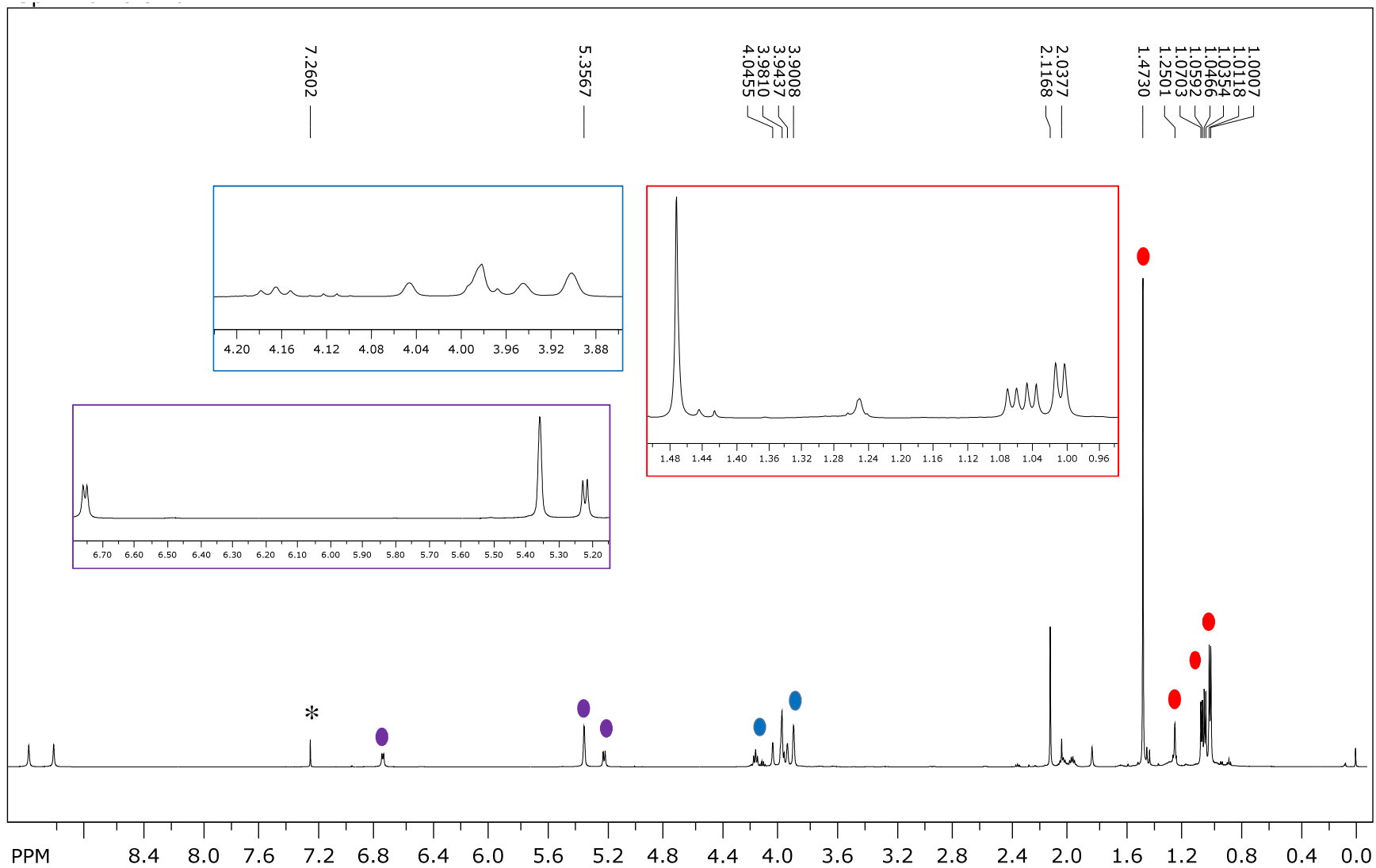
### Peak List

<i>m/z</i>	<i>z</i>	Abund
554.6		9902.1
556.5	1	176455.5
557.5	1	59323.8

Slika P52. ESI-MS-spektar spoja 16

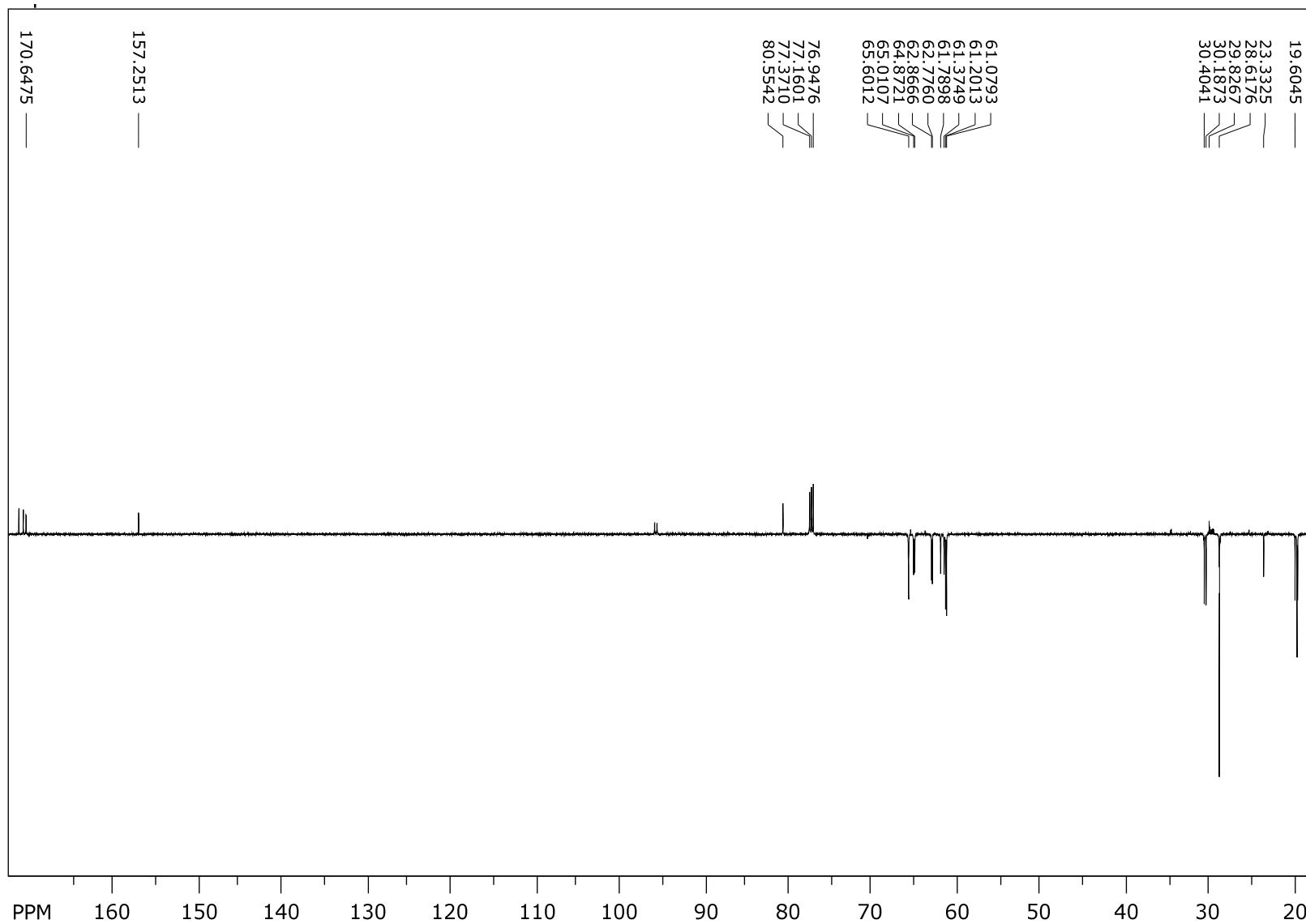


**Slika P53.** IR-spektar spoja **16** (c = 50 mM)

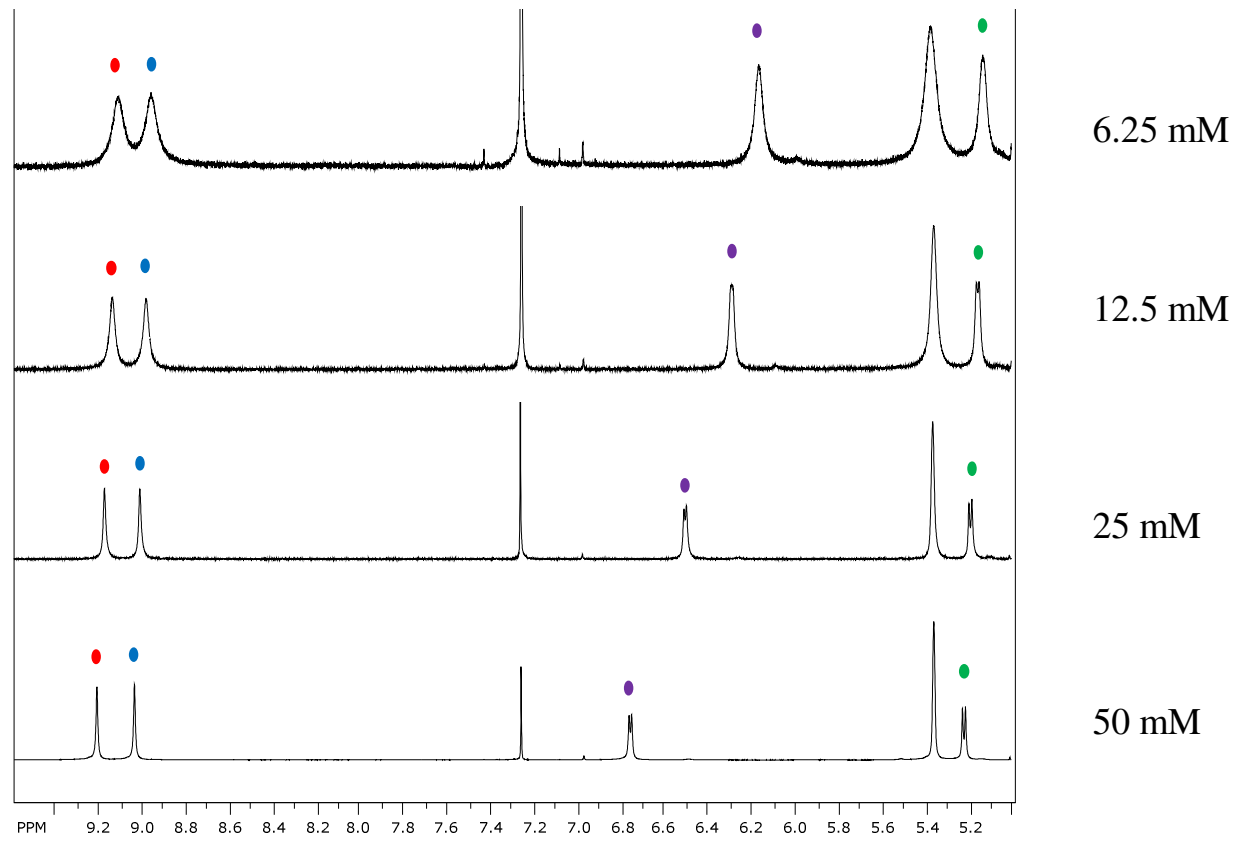
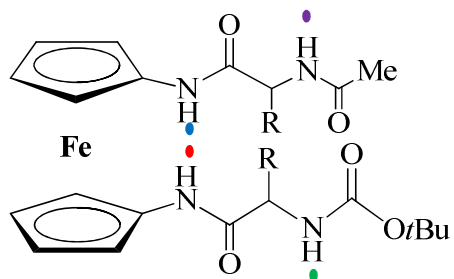


\* ostatak CDCl<sub>3</sub>

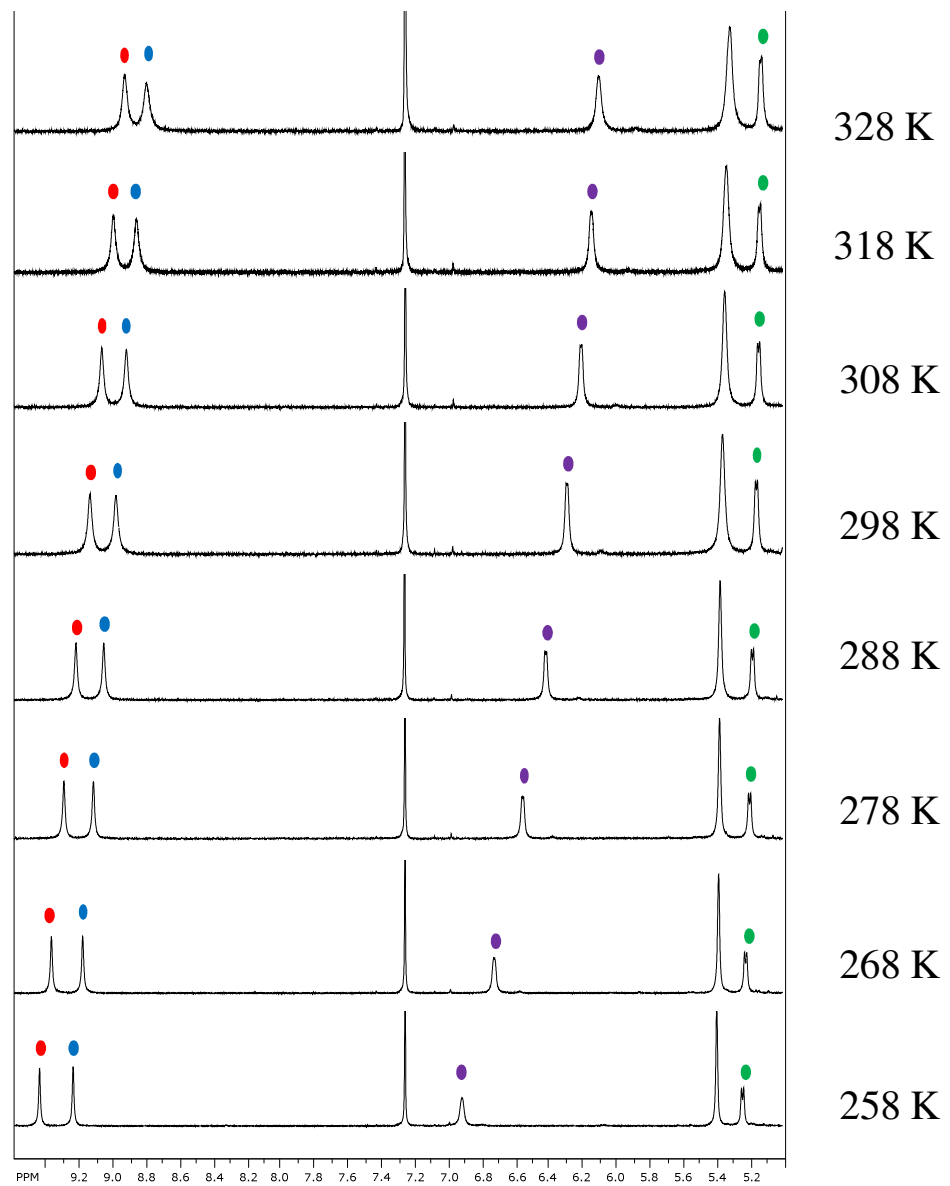
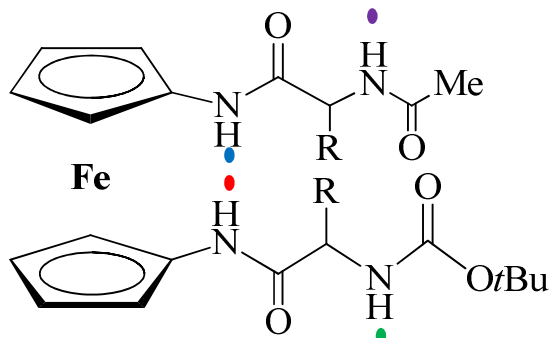
Slika P54. <sup>1</sup>H NMR-spektar spoja **16** (c = 50 mM)



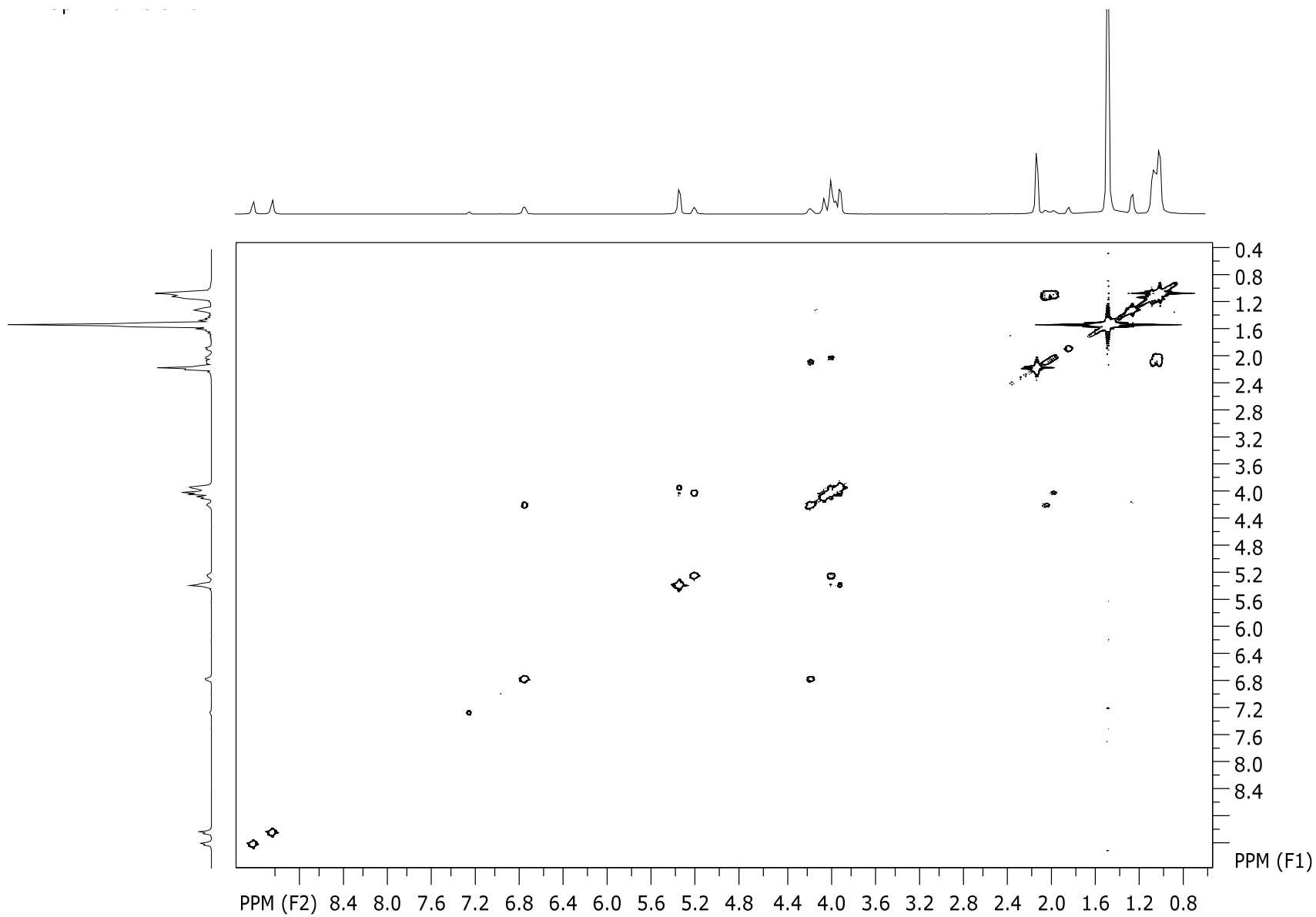
Slika P55.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektar spoja **16** (c = 50 mM)



**Slika P56.** Koncentracijski <sup>1</sup>H NMR-spektar spoja **16**

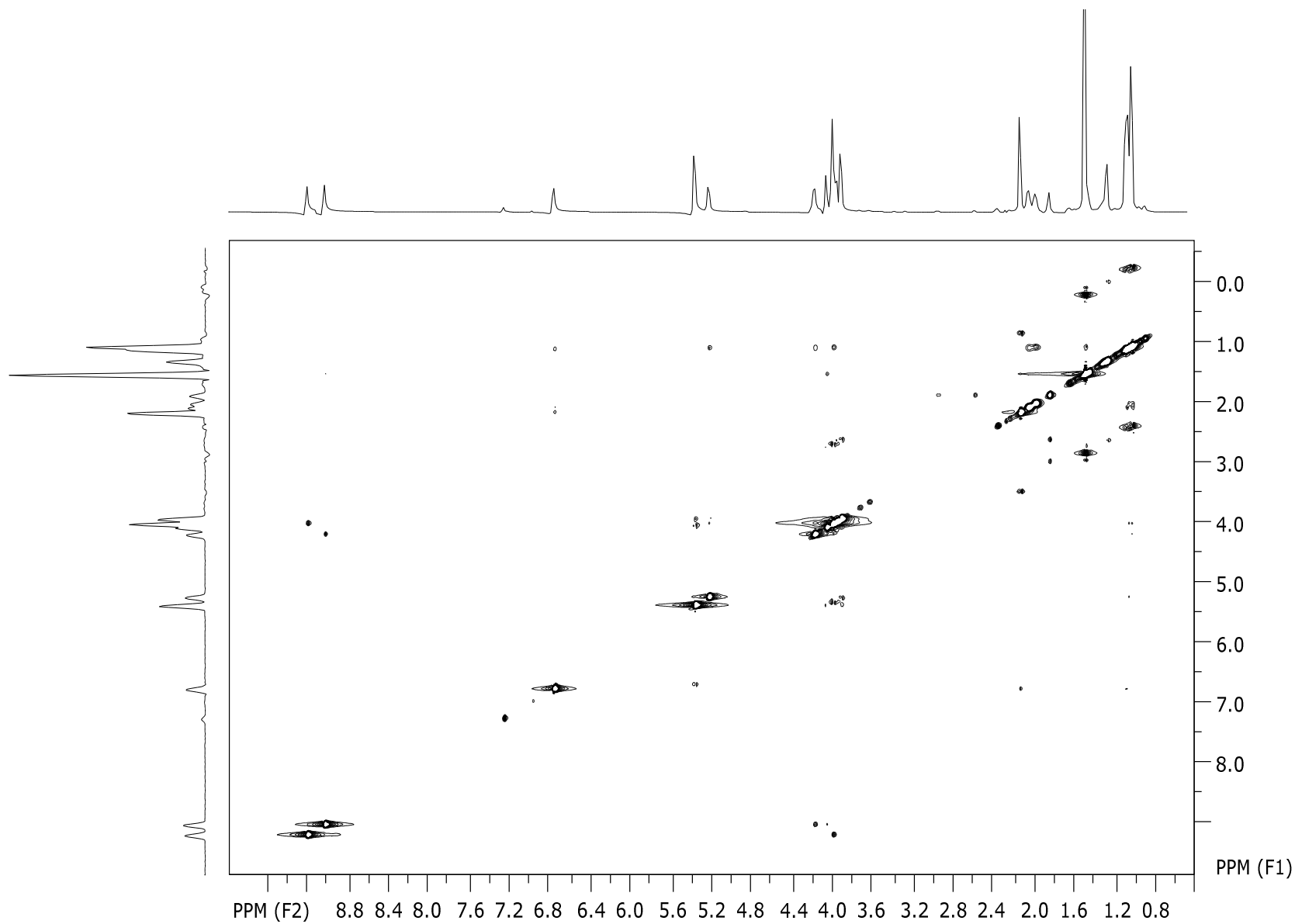


Slika P57. Temperaturni  $^1\text{H}$  NMR-spektar spoja **16** ( $c = 12.5$  mM)



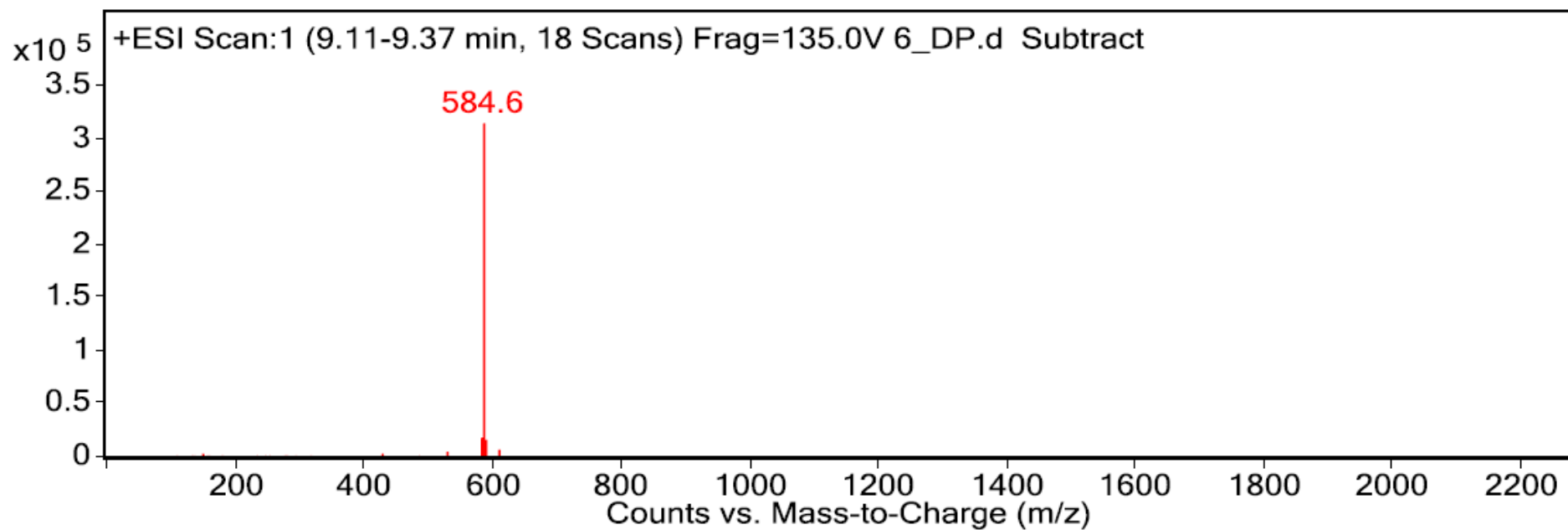
**Slika P58.** COSY NMR-spektar spoja **16** (c = 50 mM)





**Slika P59.** NOESY NMR-spektar spoja **16** (c = 50 mM)

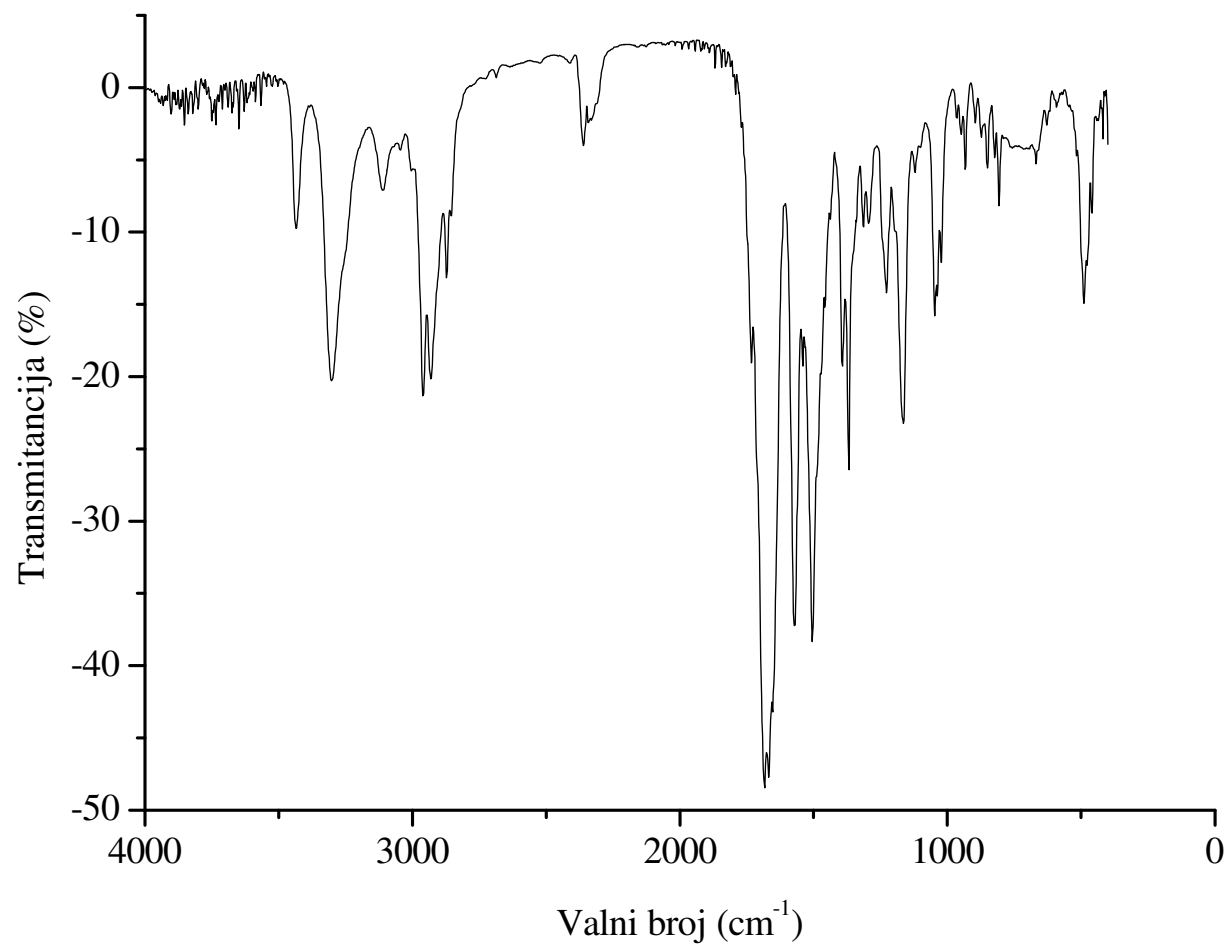
## Spoj 17



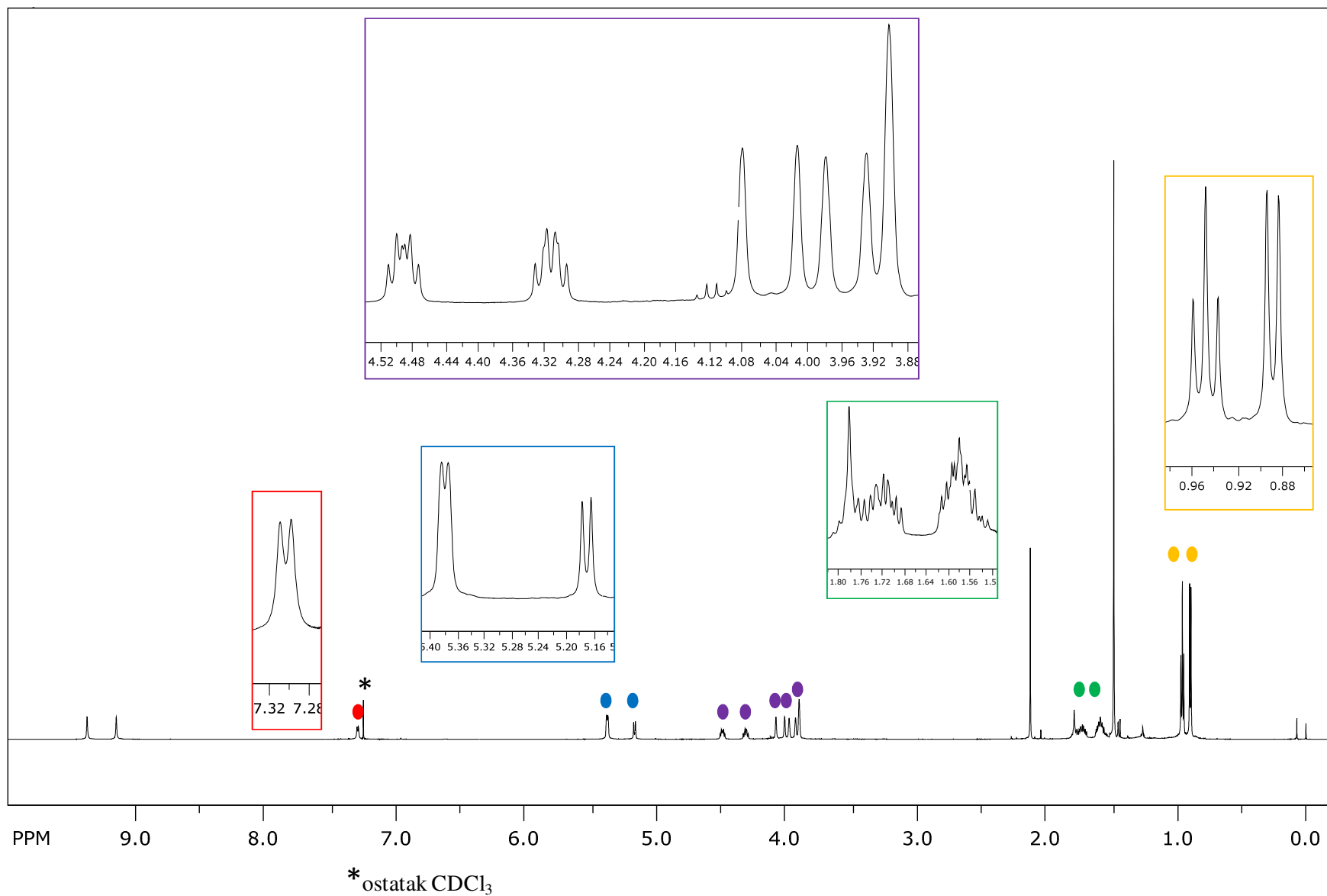
### Peak List

<i>m/z</i>	<i>z</i>	Abund
582.6		19671
584.6	1	314963.8
585.6	1	106235
586.6	1	17552.4

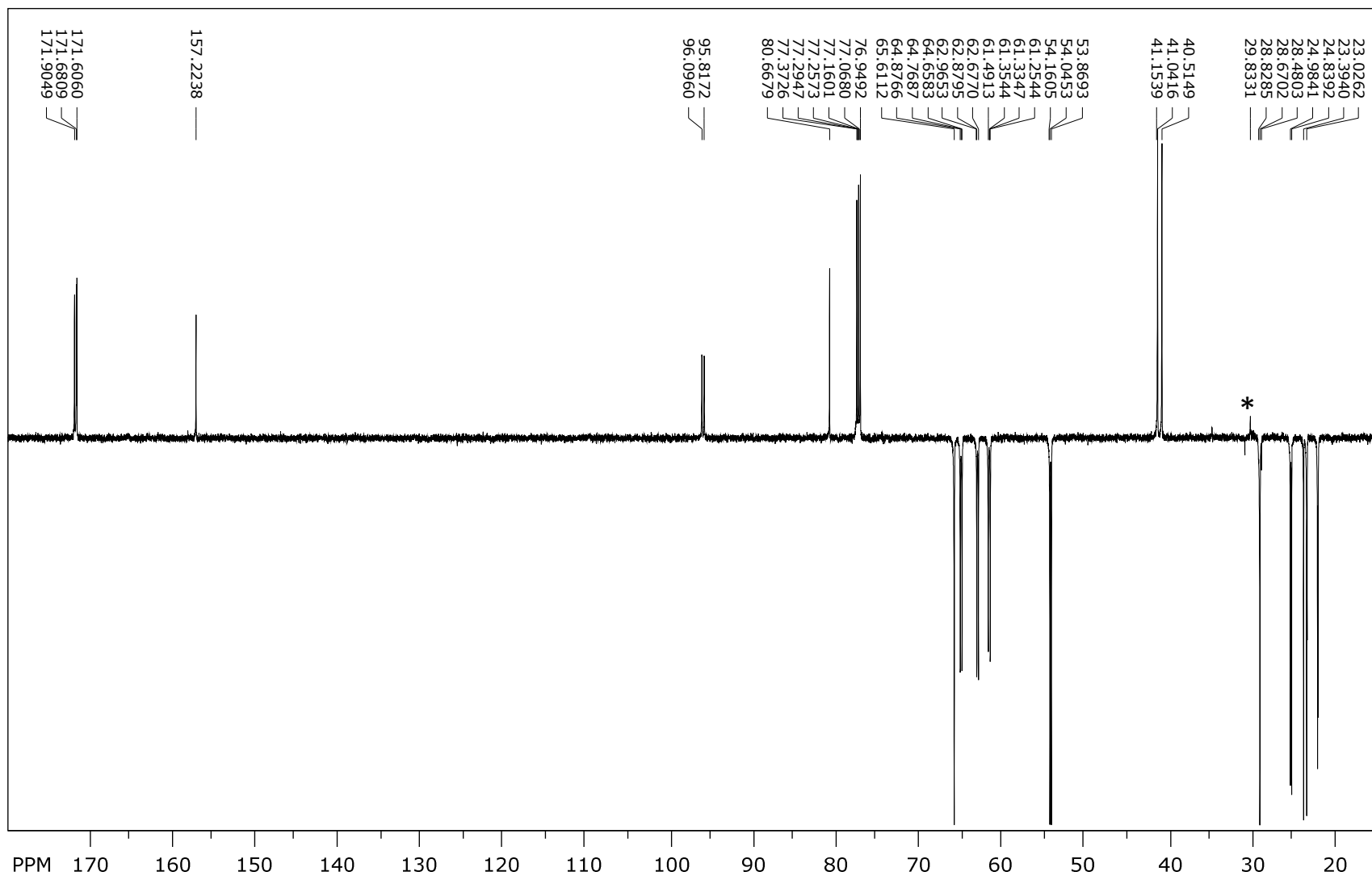
Slika P60. ESI-MS-spektar spoja 17



**Slika P61.** IR-spektar spoja **17** (c = 50 mM)

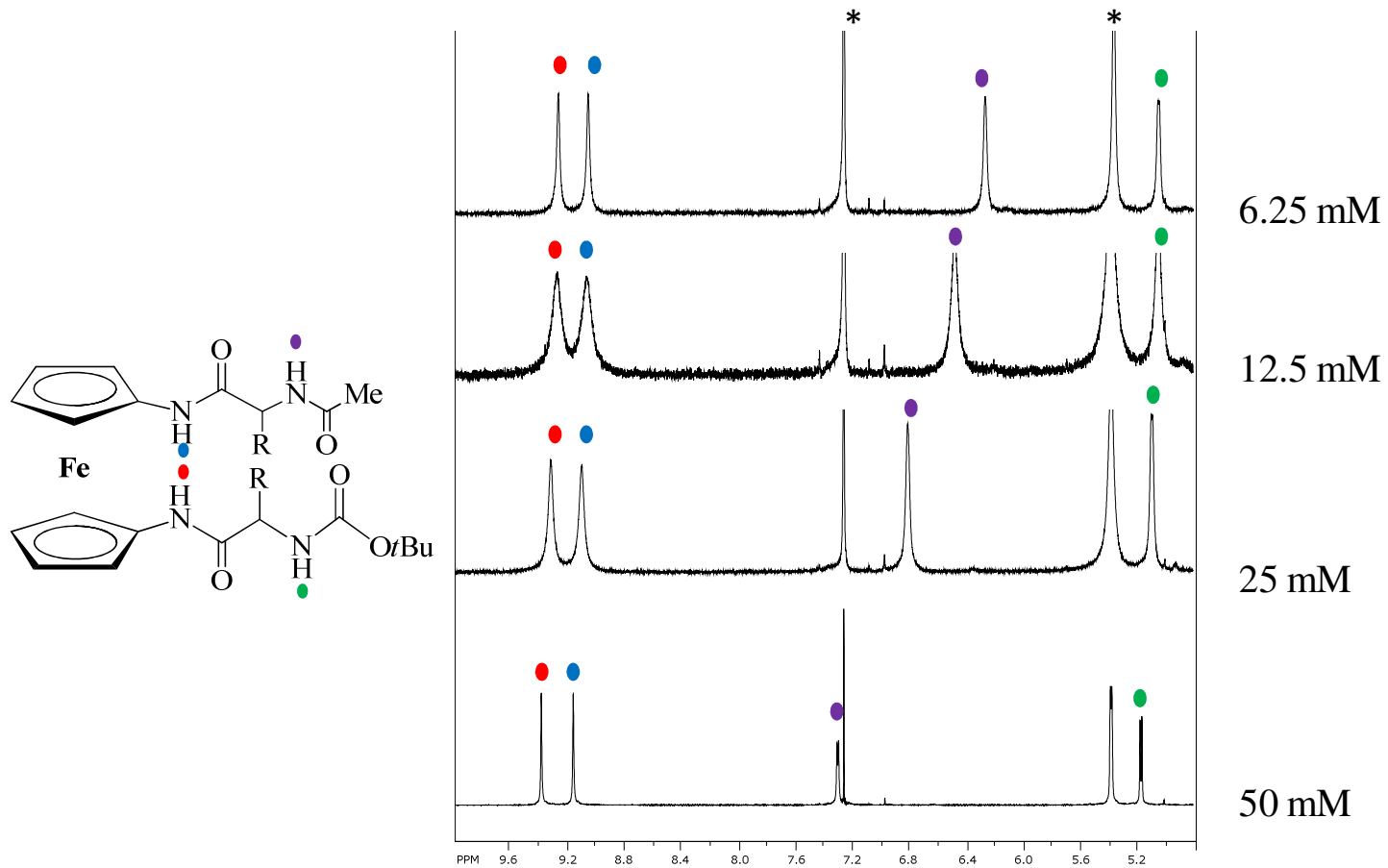


Slika P62.  $^1\text{H}$  NMR-spektar spoja **17** ( $c = 50 \text{ mM}$ )

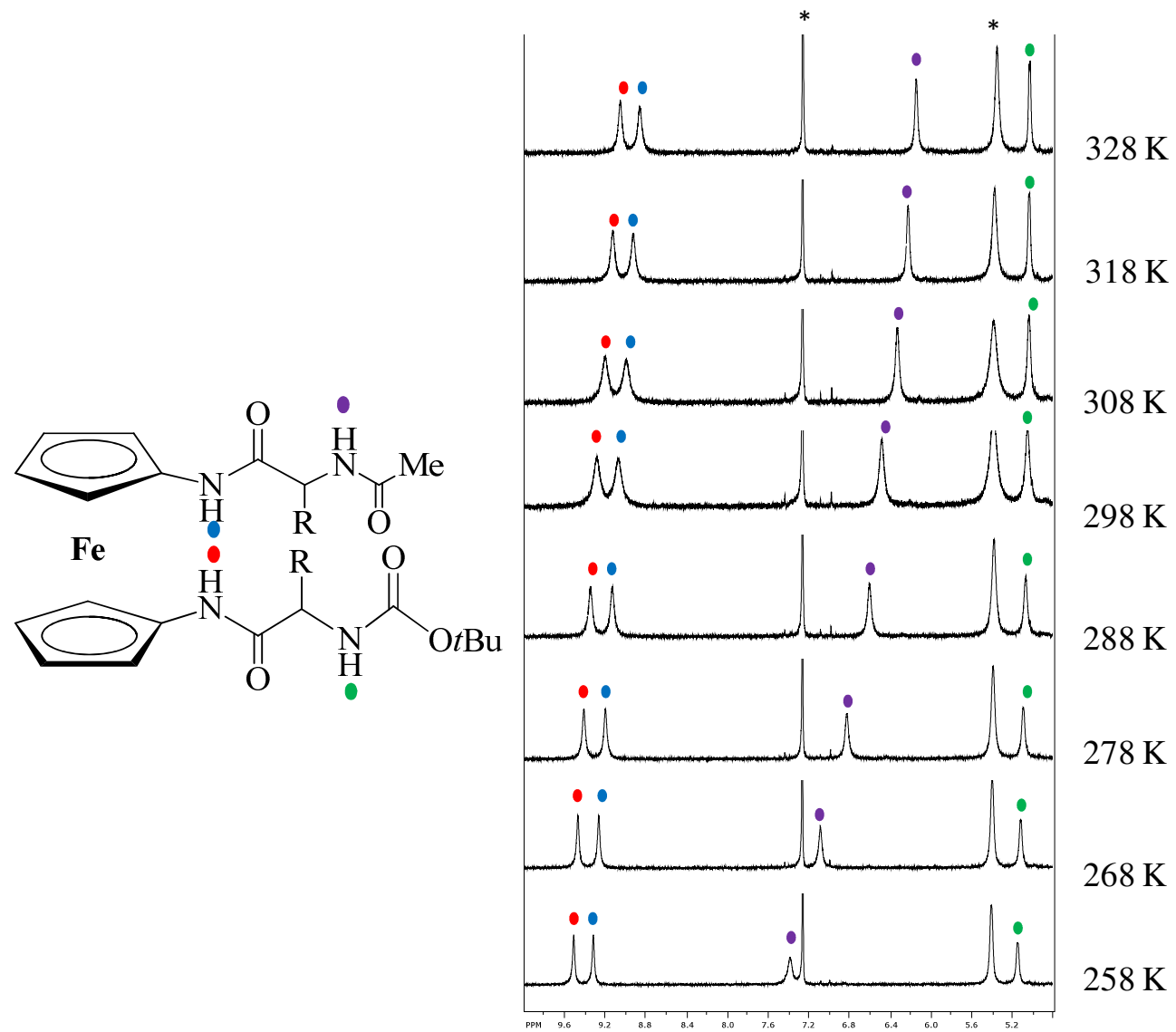


\* ostatak ulja pumpe

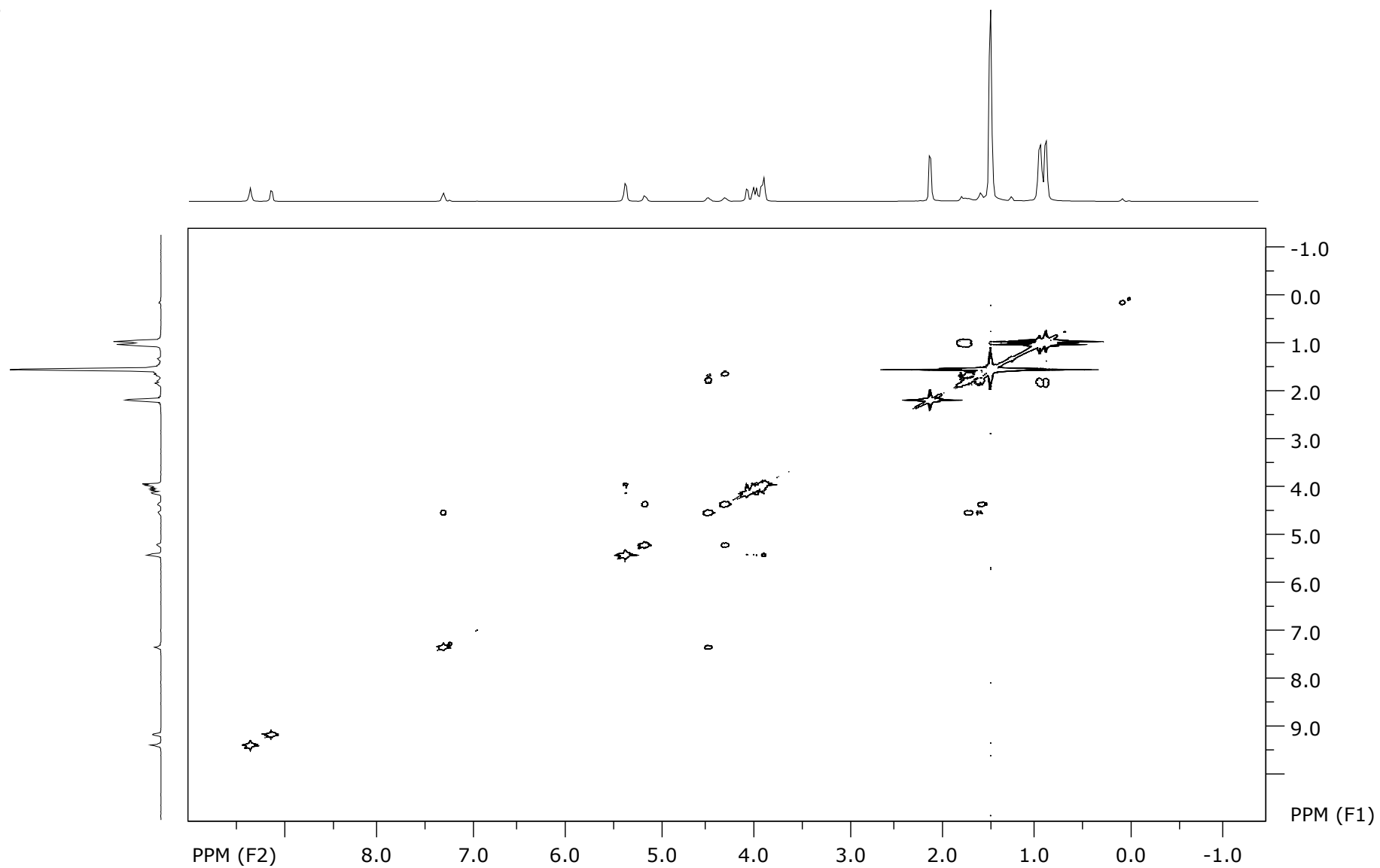
Slika P63.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektar spoja **17** (c = 50 mM)



**Slika P64.** Koncentracijski  $^1\text{H}$  NMR-spektar spoja **17**

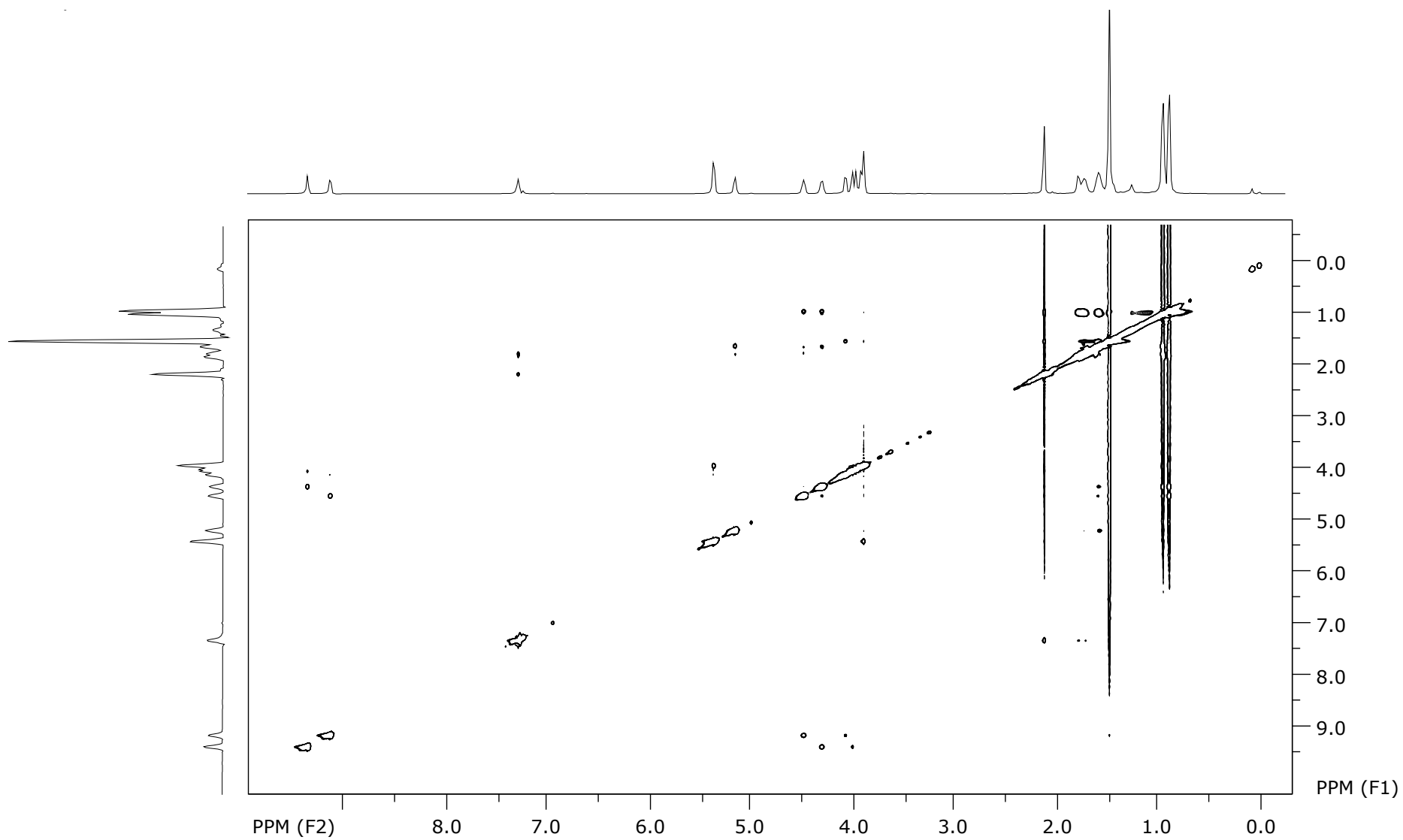


Slika P65. Temperaturni  $^1\text{H}$  NMR-spektar spoja **17** ( $c = 12.5$  mM)



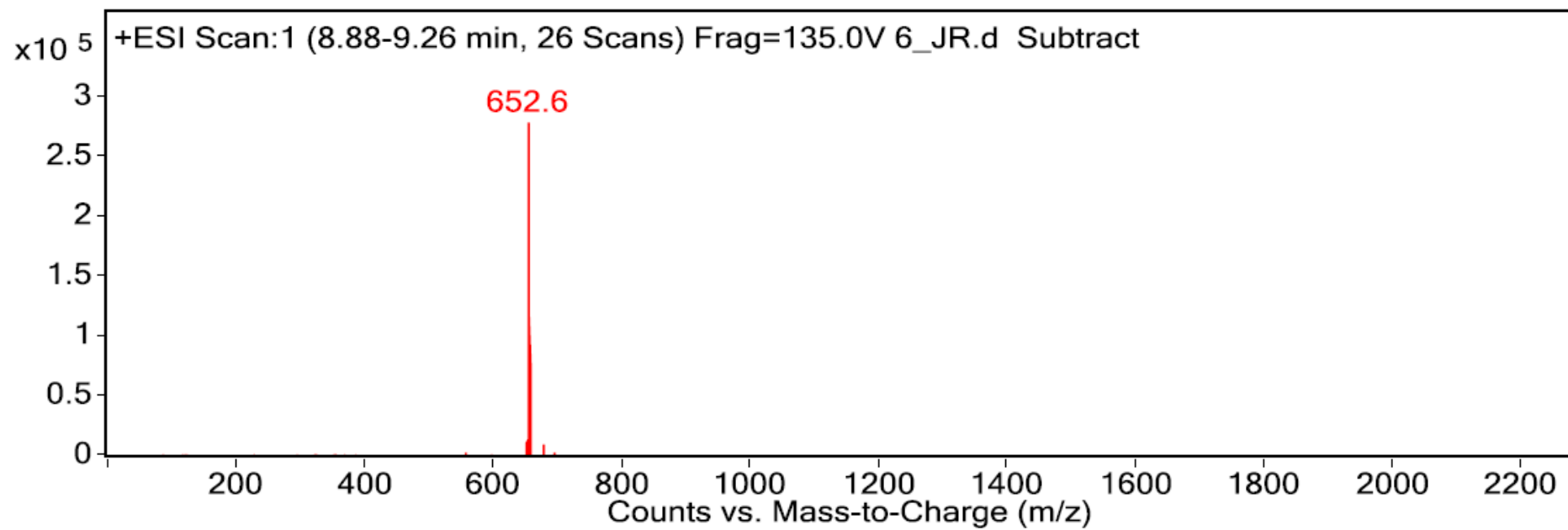
**Slika P66.** COSY NMR-spektar spoja **17** (c = 50 mM)





**Slika P67.** NOESY NMR-spektar spoja **17** (c = 50 mM)

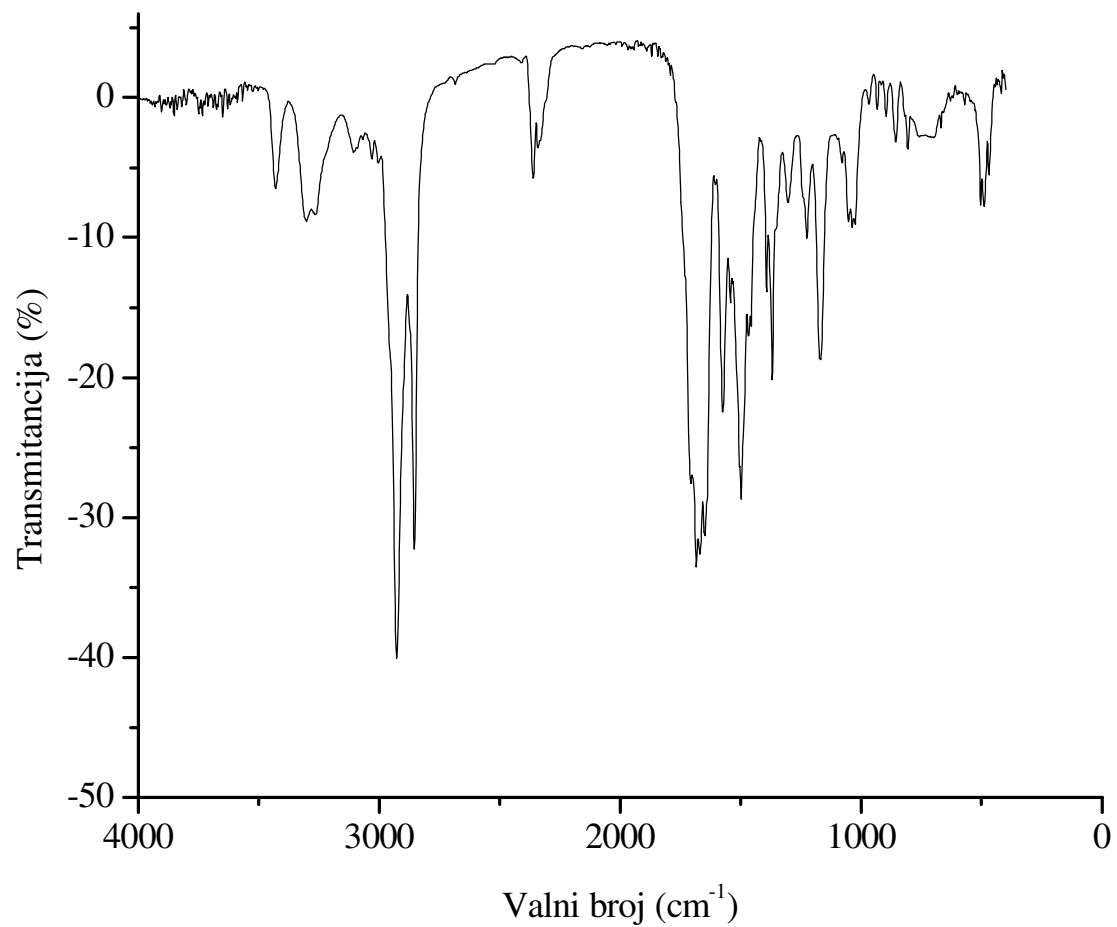
## Spoj 18



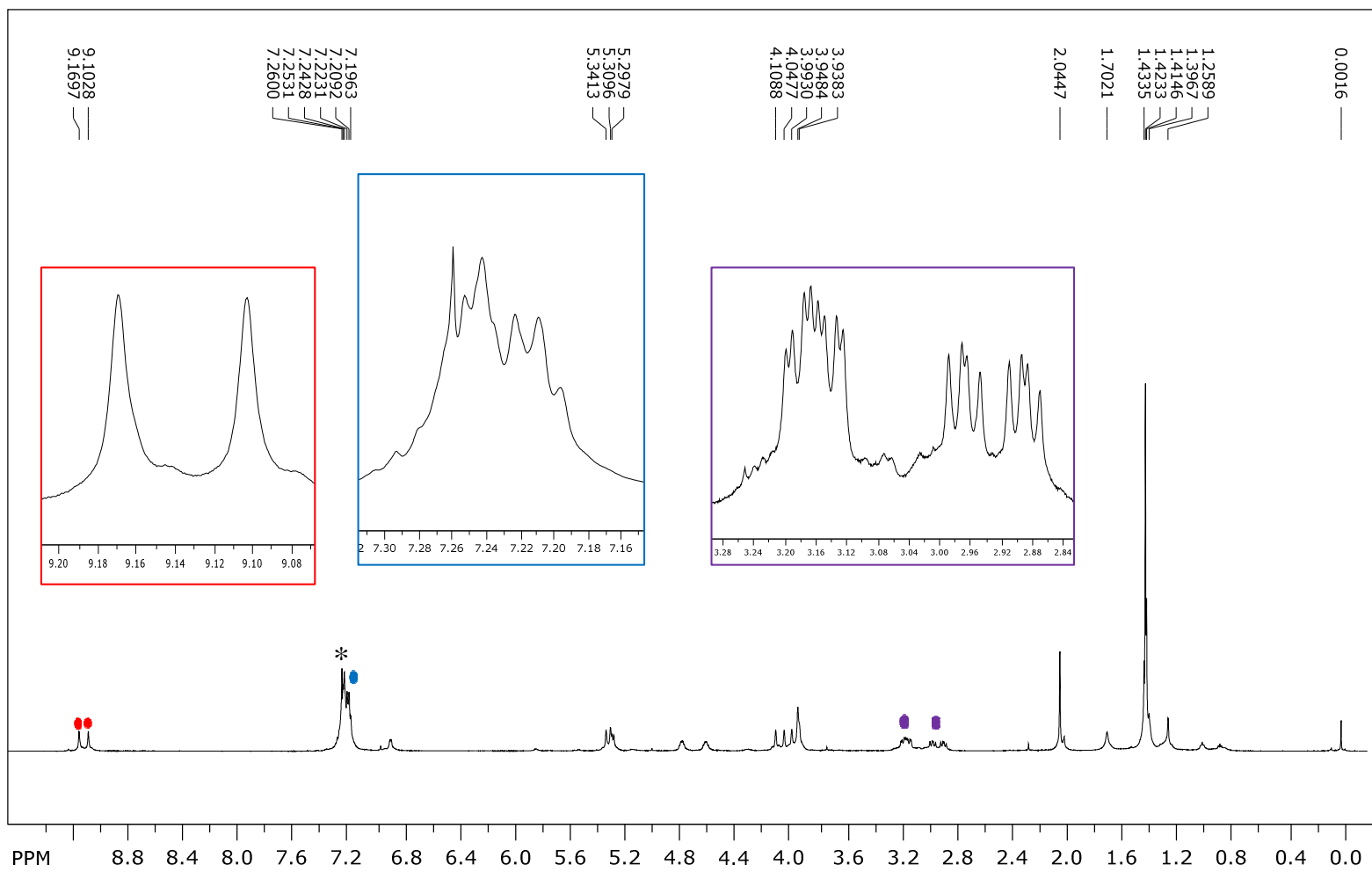
### Peak List

<i>m/z</i>	<i>z</i>	Abund
650.6		17542.6
652.6	1	278516.4
653.6	1	168428.5
654.6	1	38606.5

Slika P68. ESI-MS-spektar spoja 18

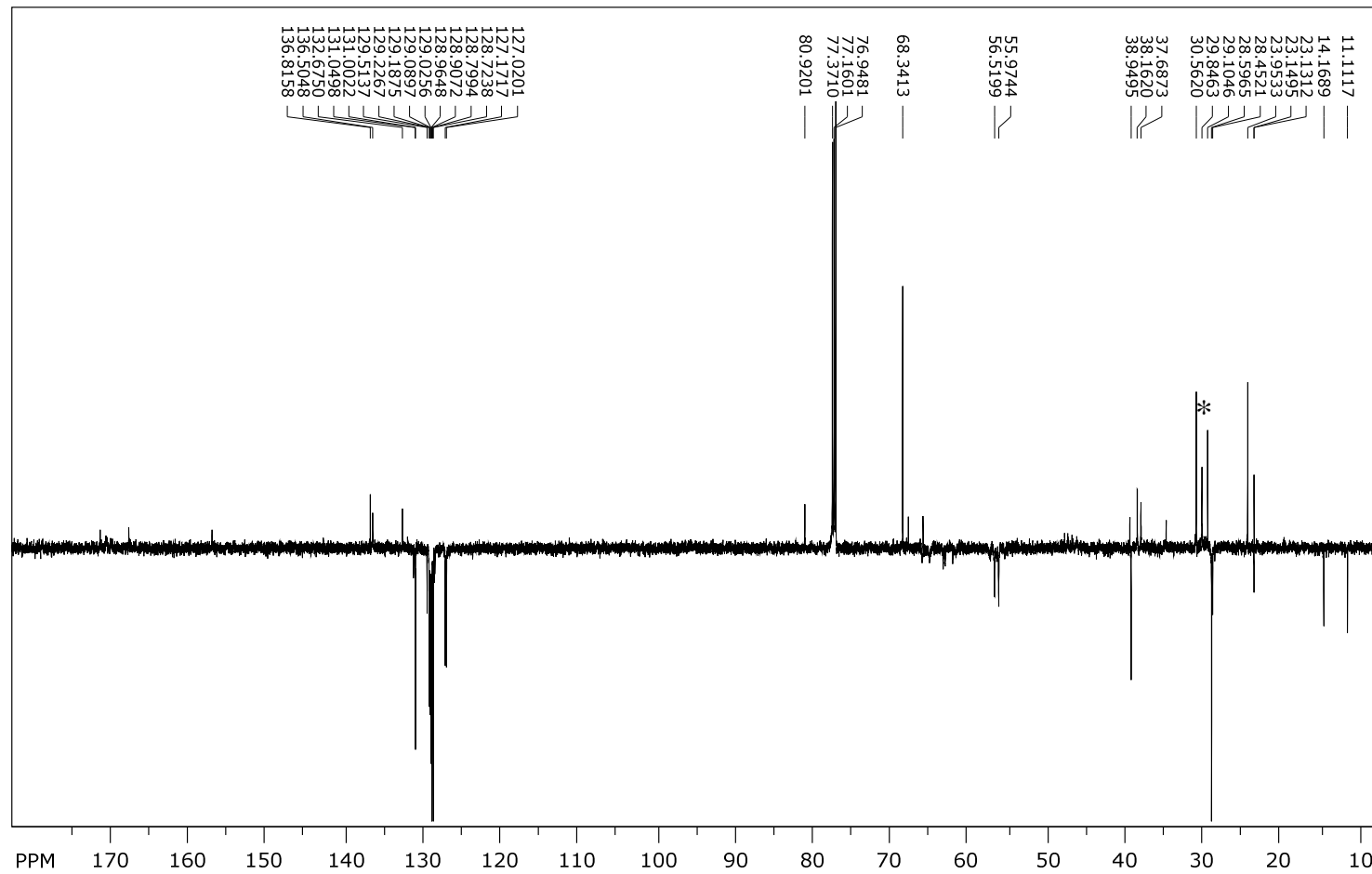


**Slika P69.** IR-spektar spoja **18** (c = 50 mM)



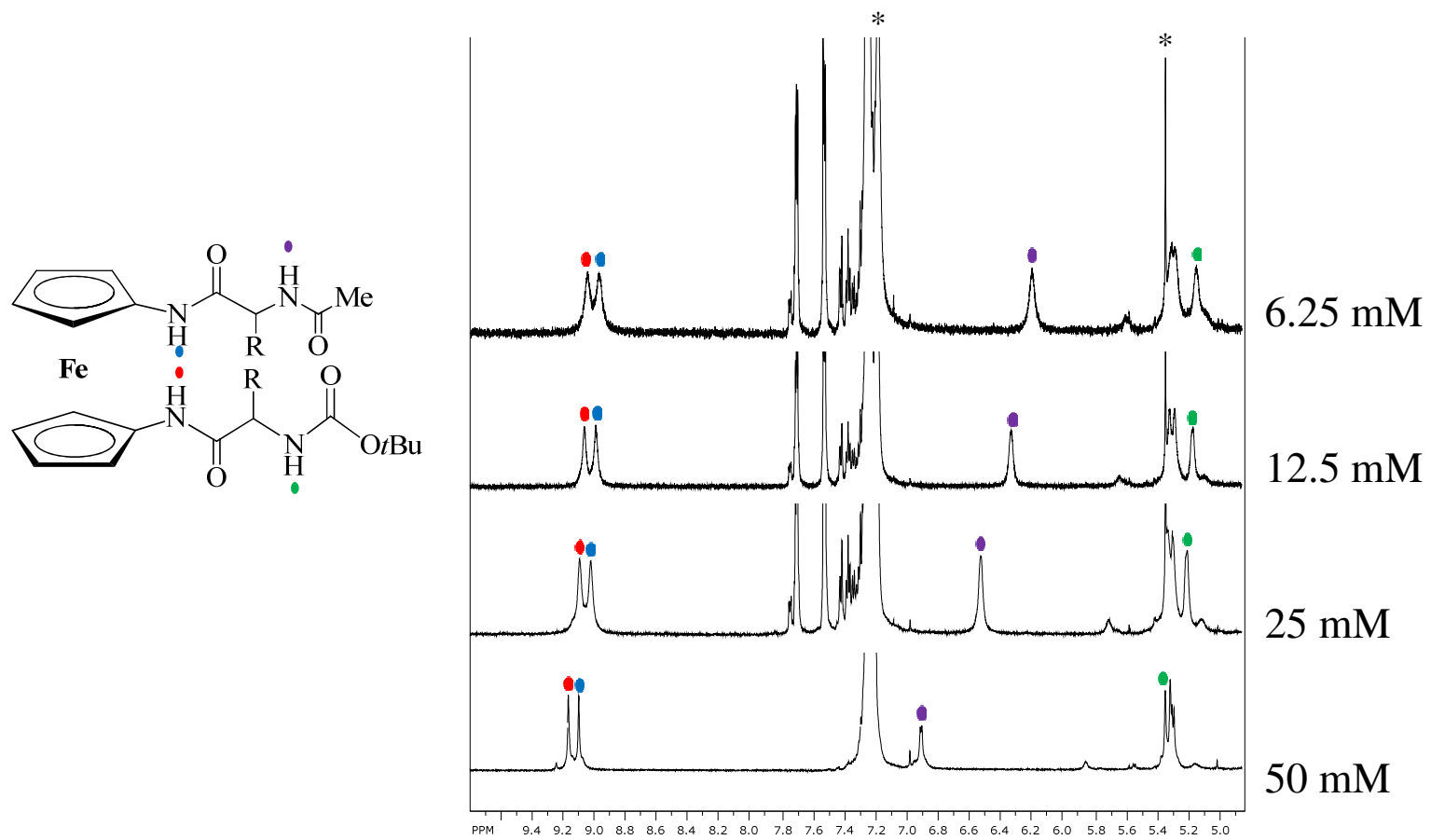
\* ostatak CDCl<sub>3</sub>

Slika P70. <sup>1</sup>H NMR-spektar spoja **18** (c = 50 mM)

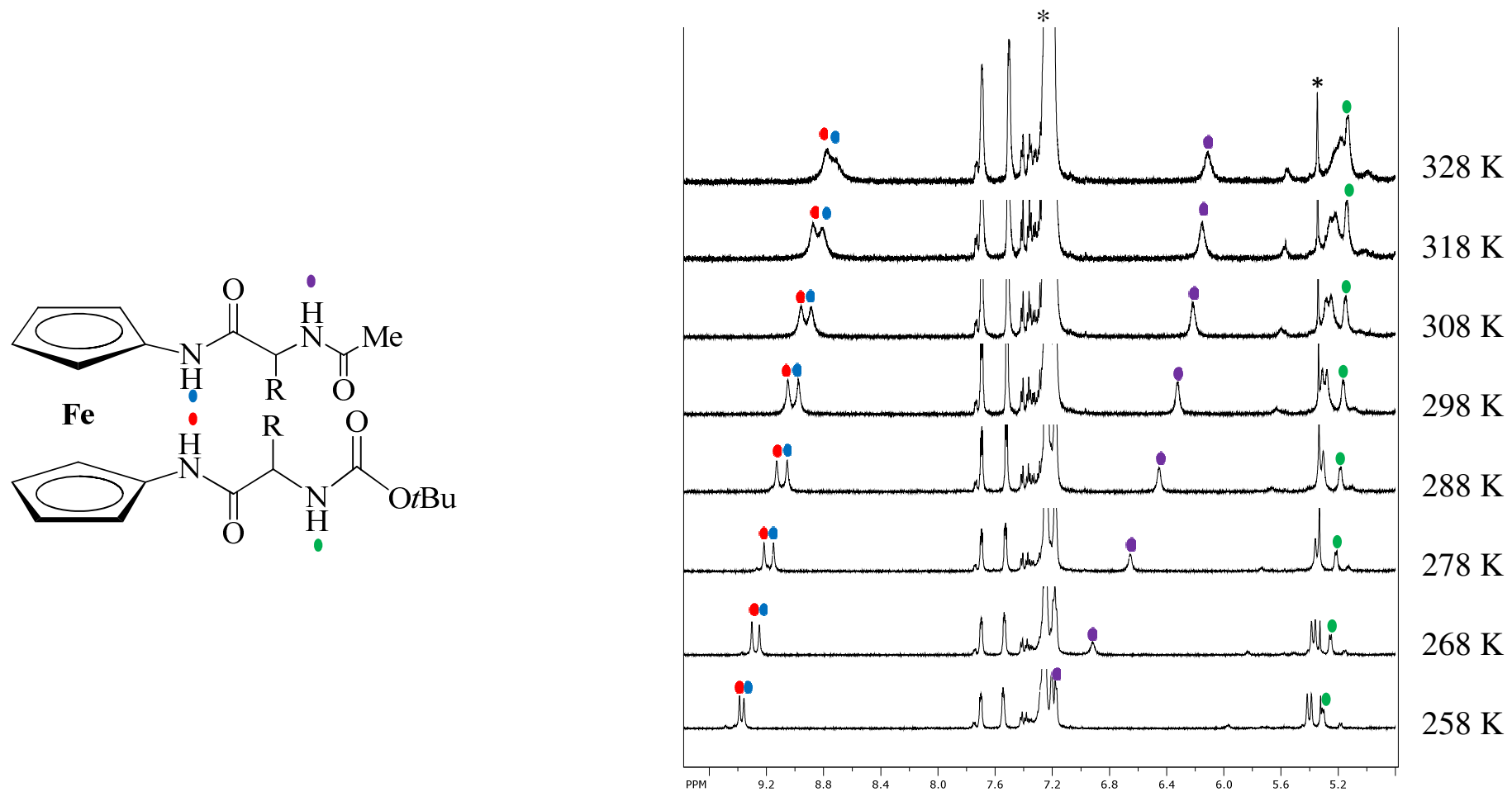


\* ostatak ulja pumpe

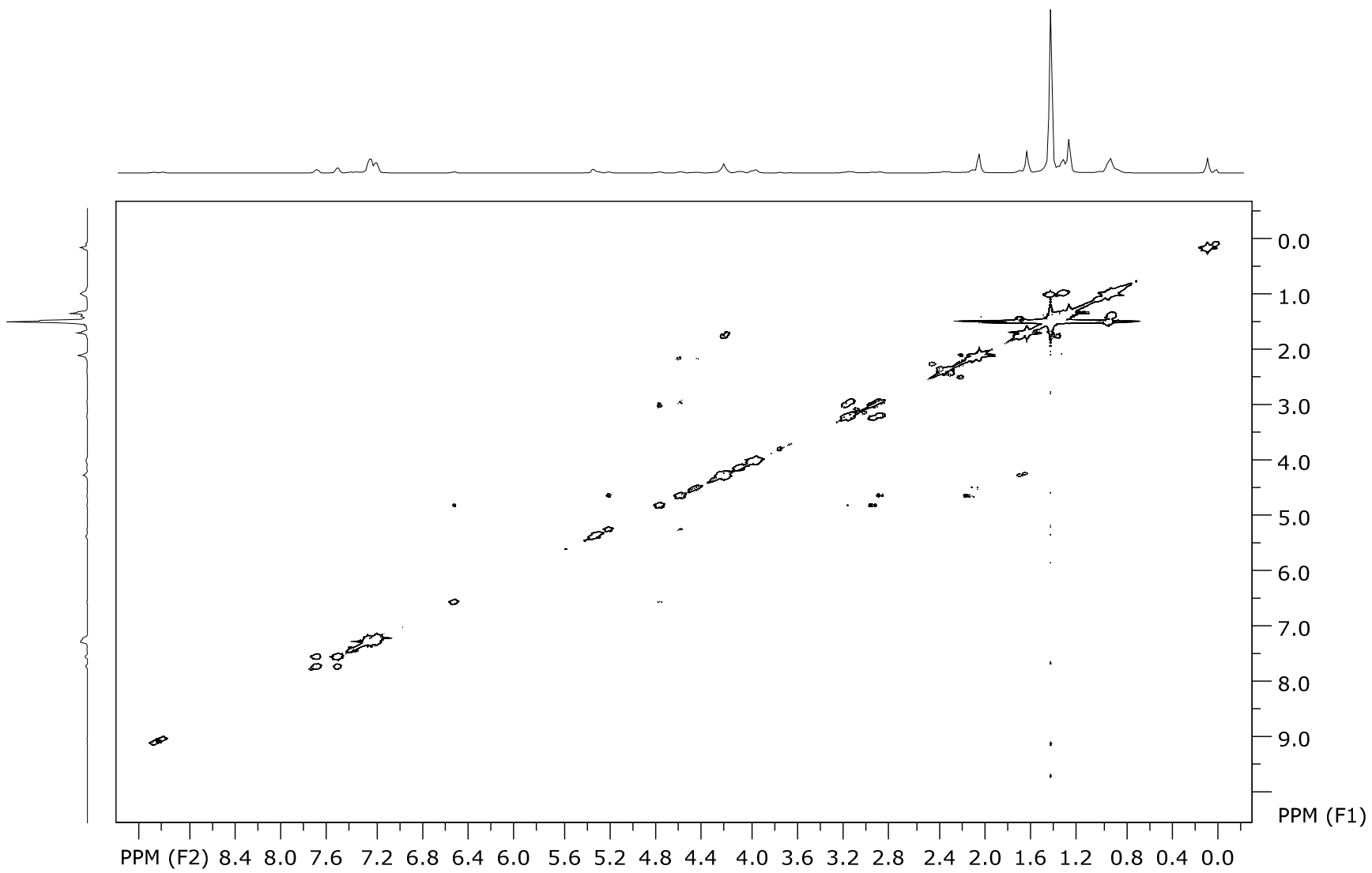
Slika P71.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektar spoja **18** (c = 25 mM)



Slika P72. Koncentracijski  $^1\text{H}$  NMR-spektar spoja 18

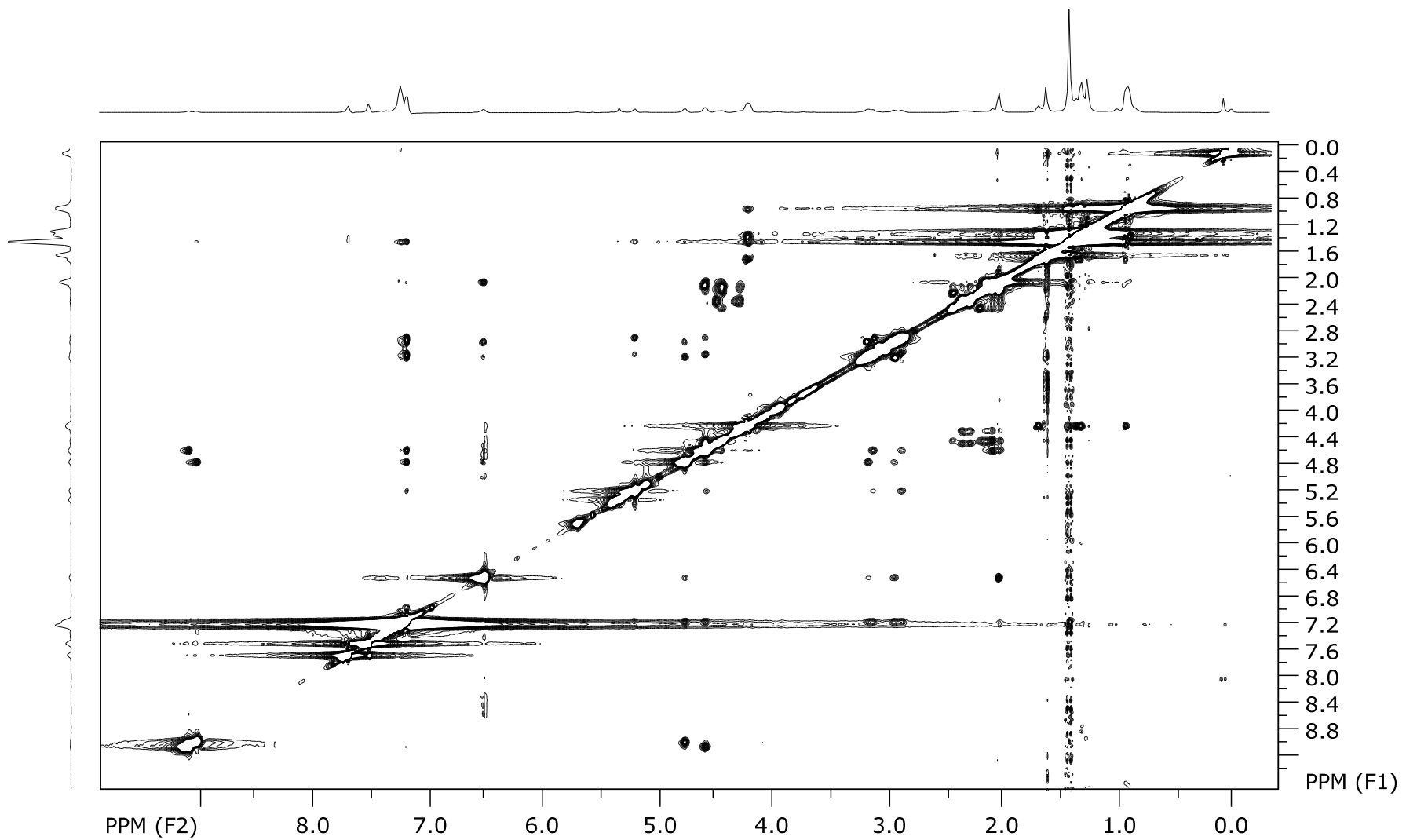


Slika P73. Temperaturni  $^1\text{H}$  NMR-spektar spoja **18** ( $c = 12.5$  mM)



**Slika P74.** COSY NMR-spektar spoja **18** (c = 25 mM)





Slika P75. NOESY NMR-spektar spoja 18 (c = 25 mM)