

Priprava, konformacijska analiza i kirooptička svojstva peptidnih derivata aminoferocena

Nuskol, Marko

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:278070>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO–MATEMATIČKI FAKULTET

Marko Nuskol

**PRIPRAVA, KONFORMACIJSKA ANALIZA I
KIROOPTIČKA SVOJSTVA PEPTIDNIH DERIVATA
AMINOFEROCENA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
izv. prof. dr. sc. Mojca Čakić Semenčić

Zagreb, 2020.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Marko Nuskol

**SYNTHESIS, CONFORMATIONAL ANALYSIS AND
CHIROPTICAL PROPERTIES OF PEPTIDE
DERIVATIVES OF FERROCENE**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Ph.D. Mojca Čakić Semenčić, Associate Professor

Zagreb, 2020.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Mojci Čakić Semenčić na neumornoj predanosti oko sastavljanja ove disertacije te na trudu i vremenu koje je uložila usmjeravajući me prema razumijevanju bioorganometalne kemije. Drago mi je što mi je upravo ona mentorica i cijenim njezino vodstvo i podršku i nadasve prijateljski odnos tijekom izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Ivanu Kodrinu na vremenu utrošenom za račune i interpretaciju računalnog modeliranja (DFT) svih konformacija peptidnih derivata aminoferocena.

Zahvaljujem se voditeljici smjera Anorganska i strukturna kemija prof. dr. sc. Dubravki Matković-Čalogović koja se tijekom cijelog dokorskog studija pokazala kao izrazito dobra osoba koja me uvijek saslušala i rado pomogla.

Zahvaljujem se svojim kolegama na poslu (Anita, Filip, Marina, Mario, Mia i Mira) koji su tijekom šest godina „trpjeli“ moje filozofije, jadikovanja i gluposti. Izrazito sam im zahvalan što su me „držali na zemlji“ i usmjeravali prema uspjehu. Kako kažu, pohvala ekipi na ugodnoj radnoj atmosferi.

Za kraj želim ostaviti zahvalu svojoj curi (čitaj partnerici u zločinu) Tei Strmecky bez koje ne bi bilo mojeg doktoriranja. Da nije bilo nje ne bih prihvatio posao na IRB-u (koji me i doveo do PBF-a), ne bih udomio Slavka, Milivoja i Neru (i pomogao ostalima) koji mi ispunjavaju život srećom i veseljem. Hvala ti Tea što si me podržavala svih ovih godina i gurala me naprijed prema boljem.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Ciljevi i hipoteze rada.....	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Peptidi i proteini.....	4
2.2. Sekundarni strukturni elementi	5
2.2.1. α -Uzvojnica.....	5
2.2.2. β -Nabrane ploče.....	6
2.2.3. Okreti	7
2.3. Bioorganometalna kemija	9
2.4. Konjugati heteroanularno disupstituiranih ferocena s α-aminokiselinama.....	10
2.4.1. Helična kiralnost heteroanularno disupstituiranih ferocena.....	11
2.5. Konjugati monosupstituiranih ferocena s α-aminokiselinama.....	15
2.5.1. Derivati ferocenkarboksilne kiseline i α -aminokiselina	15
2.5.2. Derivati aminoferocena i α -aminokiselina	19
2.5.3. Derivati monosupstituiranih ferocena i α -aminoizobutirične kiseline.....	21
2.6. Tripeptidi s diprolinskim segmentom	23
2.7. CD-senzori za određivanje kiralnosti foldamera	27
2.7.1. <i>p</i> -Bromobenzamidni senzor.....	28
2.7.2. Tionoglicinski senzor	31
2.7.3. Dibenazepinski senzor.....	32
2.8. Priprava, svojstva i primjena aminoferocena	35
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	40
3.1. Materijali i metode.....	40
3.2. Sinteza ferocenkarboksilne kiseline (3), <i>tert</i>-butil-ferocenilkarbamata (5) i pripadajućih prekursora	42
3.2.1. <i>N,N</i> -difetil-karbamoil-ferocen (2).....	42
3.2.2. Ferocenkarboksilna kiselina (3)	43
3.2.3. Ferocenkarboksazid (4)	43
3.2.4. <i>tert</i> -Butil-ferocenilkarbamat (5).....	43
3.3. Sinteza ferocenskih amida (6 i 7), dipeptida (8–11) i tripeptida (12–19)	44

3.3.1. Sinteza ferocenskih amida 6 i 7 – opći postupak.....	44
3.3.1.1. Boc-L-Ala-NH-Fc (6).....	45
3.3.1.2. Boc-D-Ala-NH-Fc (7).....	45
3.3.2. Sinteza ferocenskih dipeptida 8–11 – opći postupak.....	45
3.3.2.1. Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fc (8).....	47
3.3.2.2. Boc-D-Pro-L-Ala-NH-Fc (9).....	48
3.3.2.3. Boc-L-Pro-D-Ala-NH-Fc (10).....	49
3.3.2.4. Boc-D-Pro-D-Ala-NH-Fc (11).....	49
3.3.3. Sinteza ferocenskih tripeptida 12–19 – opći postupak.....	49
3.3.3.1. Boc-L-Pro-L-Pro-L-Ala-NH-Fc (12).....	52
3.3.3.2. Boc-D-Pro-L-Pro-L-Ala-NH-Fc (13).....	53
3.3.3.3. Boc-L-Pro-D-Pro-L-Ala-NH-Fc (14).....	53
3.3.3.4. Boc-D-Pro-D-Pro-L-Ala-NH-Fc (15).....	54
3.3.3.5. Boc-L-Pro-L-Pro-D-Ala-NH-Fc (16).....	54
3.3.3.6. Boc-D-Pro-L-Pro-D-Ala-NH-Fc (17).....	54
3.3.3.7. Boc-L-Pro-D-Pro-D-Ala-NH-Fc (18).....	54
3.3.3.8. Boc-D-Pro-D-Pro-D-Ala-NH-Fc (19).....	55
3.4. Sinteza bis-ferocenskih dipeptida 20 i 21	55
3.4.1. Opći postupak.....	55
3.4.2. Fc-CO-L-Pro-L-Ala-NH-Fc (20).....	55
3.4.3. Fc-CO-D-Pro-D-Ala-NH-Fc (21).....	56
3.5. Sinteza konjugata aminoferocena i α-aminoizobutirične kiseline 22–27	57
3.5.1. Boc-Aib-NH-Fc (22).....	58
3.5.2. Sinteza Boc-L-Ala-Aib-NH-Fc (23) standardnim HOBt/EDC postupkom.....	58
3.5.3. Sinteza Boc-L-Ala-Aib-NH-Fc (23) HOBt/EDC postupkom potpomognuta mikrovalovima.....	59
3.5.4. Sinteza Boc-(Aib) ₂ -NH-Fc (24) standardnim HOBt/EDC postupkom.....	59
3.5.5. Sinteza Boc-(Aib) ₂ -NH-Fc (24) HOBt/EDC postupkom potpomognuta mikrovalovima.....	60
3.5.6. Sinteza Boc-L-Ala-(Aib) ₂ -NH-Fc (25) HOBt/EDC postupkom potpomognuta mikrovalovima.....	60
3.5.7. Sinteza Boc-(Aib) ₃ -NH-Fc (26) HOBt/EDC postupkom potpomognuta mikrovalovima.....	61
3.5.8. Sinteza Boc-(Aib) ₃ -NH-Fc (26) uz HATU reagens.....	61
3.5.9. Sinteza Boc-L-Ala-(Aib) ₃ -NH-Fc (27) uz HATU reagens potpomognuta mikrovalovima.....	62
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	63
4.1. Sinteza, konformacijska analiza i kirooptička svojstva ferocenskih dipeptida 8–11.	65
4.1.1. Sinteza dipeptida 8–11	65

4.1.2. Konformacijska analiza	70
4.1.2.1. Analiza IR spektroskopijom.....	70
4.1.2.2. Analiza spektroskopijom NMR	72
4.1.2.3. Kristalografska analiza	78
4.1.2.4. Analiza spektroskopijom CD	79
4.1.2.5. DFT–modeliranje i usporedba teorijskih i eksperimentalnih rezultata	82
4.2. Sinteza, konformacijska analiza i kirooptička svojstva ferocenskih tripeptida 12–1989	
4.2.1. Sinteza tripeptida 12–19	89
4.2.2. Konformacijska analiza	93
4.2.2.1. Analiza IR– spektroskopijom.....	93
4.2.2.2. Analiza spektroskopijom NMR.....	94
4.2.2.3. Analiza spektroskopijom CD	102
4.2.2.4. DFT–modeliranje tripeptida 12–15 i usporedba teorijskih i eksperimentalnih rezultata	104
4.2.2.5. Kristalografska analiza derivata 13.....	115
4.3. Sinteza, konformacijska analiza i kirooptička svojstva bis–ferocenskih dipeptida 20 i 21	116
4.3.1. Sinteza bis–ferocenskih dipeptida 20 i 21.....	116
4.3.2. Konformacijska analiza	117
4.3.2.1. Analiza IR spektroskopijom.....	117
4.3.2.2. Analiza spektroskopijom NMR.....	118
4.3.2.3. Analiza spektroskopijom CD	120
4.3.2.4. Kristalografska analiza	122
4.3.2.5. DFT–modeliranje 20 i usporedba teorijskih i eksperimentalnih rezultata	124
4.4. Sinteza, konformacijska analiza i kirooptička svojstva derivata aminoferocena i α–aminoizobutirične kiseline (22–27).....	128
4.4.1. Sinteza 22–27.....	128
4.4.2. Konformacijska analiza	133
4.4.2.1. Analiza IR spektroskopijom.....	133
4.4.2.2. Analiza spektroskopijom NMR.....	135
4.4.2.3. Analiza spektroskopijom CD	142
4.4.2.4. DFT–modeliranje 22–27 i usporedba teorijskih i eksperimentalnih rezultata.....	143
§ 5. ZAKLJUČAK	150
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ.....	154
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	157
§ 8. DODATAK.....	XVI
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

PRIPRAVA, KONFORMACIJSKA ANALIZA I KIROOPTIČKA SVOJSTVA PEPTIDNIH DERIVATA AMINOFEROCENA

Marko Nuskol

Prehrambeno–biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva ulica 6, 10 000 Zagreb

U okviru ove doktorske disertacije provedena je sinteza i konformacijska analiza peptidnih konjugata aminoferocena [Boc–(AA)_n–NH–Fc, Fc = ferocetil, AA = D(L)–Pro, D(L)–Ala, Boc (*tert*–butoksikarbonil), Aib (α –aminoizobutirična kiselina), $n = 2–4$] kao i dinuklearnih ferocenskih derivata [Fc–CO–(AA)₂–NH–Fc, AA = D(L)–Pro, D(L)–Ala] kako bi se istražio utjecaj nabiranja aminokiselinskog slijeda na kirooptička svojstva organometalnog kromofora. Konformacijskom analizom (IR–spektroskopija, spektroskopija NMR i CD, kristalografska analiza, računalno modeliranje) utvrđeno je da su pripremljeni spojevi, u otopini i u čvrstom stanju, stabilizirani unutarmolekulskim vodikovim vezama koje podržavaju okrete i uzvojnice slične onima u prirodnim peptidima. Kombiniranim teorijskim i eksperimentalnim pristupom pokazano je kako kiralno uređenje peptidnog segmenta inducira Cottonov efekt u blizini UV/Vis apsorpcijskog maksimuma ferocena čiji je predznak u korelaciji s diedarskim kutom koji opisuju rotaciju oko veze između ferocenskog kromofora i peptidnog segmenta.

(175 stranica, 103 slika, 21 tablica, 133 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: Spektroskopija cirkularnog dikroizma / kirooptička svojstva / konformacijska analiza / aminoferocen / peptidi / bioorganometalna kemija

Mentor: izv. prof. Mojca Čakić Semenčić

Rad prihvaćen: 02. prosinca 2020. godine.

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Ivan Kodrin, PMF, Zagreb
2. prof. dr. sc. Predrag Novak, PMF, Zagreb
3. prof. dr. sc. Lidija Barišić, PBF, Zagreb



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

SYNTHESIS, CONFORMATIONAL ANALYSIS AND CHIROPTICAL PROPERTIES OF PEPTIDE DERIVATIVES OF AMINOFERROCENE

Marko Nuskol

Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Pierottijeva ulica 6, 10 000 Zagreb

In this PhD thesis peptide derivatives of aminoferrocene [Boc-(AA)_n-NH-Fc, Fc = ferrocenyl, AA = D(L)-Pro, D(L)-Ala, Aib, Boc (*tert*-butoxycarbonyl), Aib (α -aminoisobutyric acid), $n = 2-4$] as well as the dinuclear ferrocene derivatives [Fc-CO-(AA)₂-NH-Fc, AA = D(L)-Pro, D(L)-Ala] were synthesized. The novel compounds were subjected to conformational analysis in order to investigate the influence of folding of amino acid sequence on the chiroptical properties of organometallic chromophore. Conformational analysis (IR, NMR, and CD spectroscopy, crystallographic analysis, computational modeling) of the prepared compounds revealed that they are stabilized by intramolecular hydrogen bonds, that support turns and helices similar to those in natural peptides, in solution as well as in solid state. The combined theoretical and experimental approach has shown that the chiral arrangement of the peptide segment induces Cotton effect near the UV/Vis absorption maximum of ferrocene, whose sign is in correlation with dihedral angle which describes rotation around ferrocene-peptide linkage.

(175 pages, 103 figures, 21 tables, 133 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: Circular dichroism spectroscopy / chiroptical properties / conformational analysis / aminoferrocene / peptide / bioorganometallic chemistry

Supervisor: Dr. Mojca Čakić Semenčić, Associate Professor

Thesis accepted: December 2th, 2020.

Reviewers:

Dr. sc. Ivan Kodrin, Assistant Professor
Dr. sc. Predrag Novak, Professor
Dr. sc. Lidija Barišić, Professor

§ 1. UVOD

Proteini su prirodni polimeri aminokiselina neophodni za očuvanje strukture i funkcionalnosti svih oblika života. Njihova se uloga proteže od izgradnje svih tjelesnih tkiva, zaštite imuniteta, prijenosa živčanih impulsa pa sve do hormonalne regulacije različitih fizioloških procesa. U pravilu su građeni iz 20 osnovnih proteinogenih aminokiselina čijom kombinacijom mogu nastati kovalentni nizovi koji sadru iznimno veliki broj aminokiselina. Prosječni peptidni lanac u proteinima sadrži približno 100 aminokiselinskih ostataka čijom se permutacijom može formirati 20^{100} izomernih peptida.¹

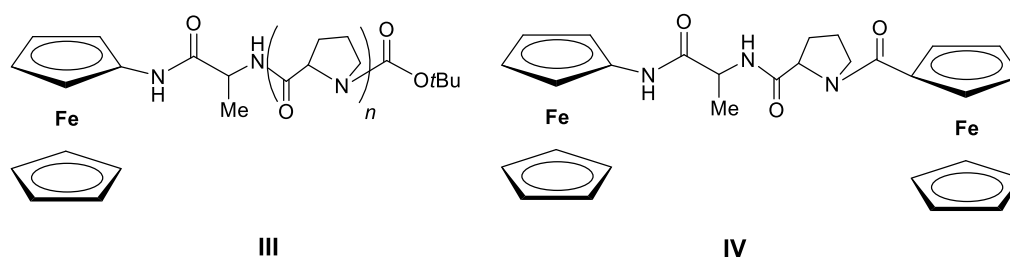
Bioorganometalna kemija je mlada znanstvena disciplina koja se počela razvijati 90-tih godina 20. stoljeća. Nastala je združivanjem biokemije i organometalne kemije, a danas, između ostalog, pridonosi otkrićima vezanima za pripravu različitih spojeva čija je primarna funkcija oponašanje svojstava i biološke aktivnosti prirodnih peptida (peptidomimetika). Naime, prirodni su proteini vrlo fleksibilne makromolekule prisutne u mnoštvu konformacija, pri čemu svaka pojedinačna konformacija omogućava vezanje za specifični receptor. Upravo sposobnost zauzimanja brojnih energijski ekvivalentnih konformacija i posljedično vezivanje na neželjene receptore smanjuje mogućnost upotrebe peptida i proteina kao lijekova što je dovelo do razvoja peptidomimetika. Peptidomimetici su spojevi koji oponašaju trodimenzijsku strukturu prirodnih peptida ili proteina i pritom zadržavaju sposobnost interakcije s receptorima te potiču jednak ili pojačan biološki odgovor.²⁻⁵ Jedan od pristupa kojim se ograničava fleksibilnost prirodnih peptida, a koji rezultira stabilizacijom peptida u određenoj konformaciji te povećanim afinitetom za željeni receptor, jest ugradnja neprirodnih aminokiselina ili nekih drugi molekulskih „kalupa“ u peptidni lanac. Pri tome molekulski „kalup“, indukcijom vodikovih veza ili kombinacijom vodikovih veza i hidrofobnih interakcija, inducira nastajanje određene sekundarne strukture.⁶

Kao funkcionalni molekulski kalupi posljednjih se petnaestak godina intenzivno proučavaju različiti peptidni derivati 1,1'-disupstituiranih ferocena **I** [Fn-(COOH)₂, Fn-(NH₂)₂, NH₂-Fn-COOH, Fn = ferocenilen].^{7,8} Ovisno o ferocenskom prekursoru, slijedu i kiralnosti aminokiselina u pripravljenim su peptidomimeticima pronađeni različiti kiralno

uređeni strukturni elementi stabilizirani unutar molekularnim vodikovim vezama (IHB). Vodikove veze pritom ograničavaju rotaciju cp prstenova oko zajedničke osi u Fc sustavu i time induciraju heličnu kiralnost što rezultira opažanjem Cottonova efekta u blizini UV/Vis-apsorpcijskog maksimuma ferocenskog kromofora. Za razliku od prethodno opisanih biokonjugata, konformacijska svojstva aminokiselinskih derivata monosupstituiranih ferocena, ferocenkarkoksilne kiseline (**II**) i aminoferocena (**III**), slabije su istražena te se u njima rijetko nalaze kiralno uređeni strukturni motivi svojstveni prirodnim peptidima. U našem su Laboratoriju pripravljena tri derivata tipa **III** [Boc-AA₂-AA₁-NH-Fc, **IIIa**, AA_{1,2} = Gly; **IIIb**, AA_{1,2} = L-Ala; **IIIc**, AA_{1,2} = L-Val] čija je detaljna konformacijska analiza ukazala na tvorbu unutarlančane vodikove veze koja podržava konformaciju β-okreta tipa I.⁹ Nadalje, iako se u literaturi opažanje CD-signala u blizini apsorpcijskog maksimuma ferocenskog kromofora pripisivalo ograničavaju rotaciju cp prstenova oko zajedničke osi u Fc sustavu, vodikovim vezama između peptidnih lanaca heteroanularno supstituiranih biokonjugata, dokazano je kako prijenos kiralne informacije s lokalne sekundarne strukture do ferocenskog kromofora također može rezultirati opažanjem jakih CD-signala.⁹

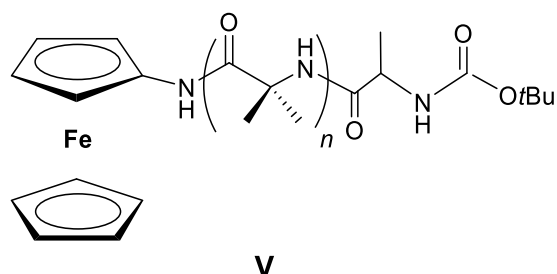
1.1. Ciljevi i hipoteze rada

Imajući u vidu da jednostavni peptidni konjugati aminoferocena mogu tvoriti kiralno uređene sekundarne strukturne elemente što inducira zamjetne Cottonove efekte u blizini UV/Vis-apsorpcijskog maksimuma ferocenskog kromofora, cilj ovog rada bio je priprava svih stereoizomera ferocenskih dipeptida i tripeptida tipa **III** i dinuklearnih derivata **IV** (slika 1.). Očekuje se kako različiti strukturni elementi (okreti, uzvojnice) prisutni u termodinamički najpovoljnijim konformacijama derivata **III** i **IV** rezultiraju različitim oblicima i predznacima CD-krivulja u blizini apsorpcijskog maksimuma ferocenskog kromofora.



Slika 1. Dipeptidni (**III**, $n = 1$), tripeptidni (**III**, $n = 2$) i dinuklearni (**IV**) derivati aminoferocena.

Nadalje, pripremljeni su i derivati tipa **V** (slika 2.) u kojima je između ferocena i alanina umetnuta razmaknica koja sadrži jednu do tri molekule α -aminoizobutirične kiseline (Aib) kako bi se istražio utjecaj udaljenosti začetnika nabiranja peptidnog lanca (L-Ala) od akiralnog kromofora na kirooptička svojstva ferocena.



Slika 2. Alaninski derivati aminoferocena i α -aminoizobutirične kiseline ($n = 1-3$).

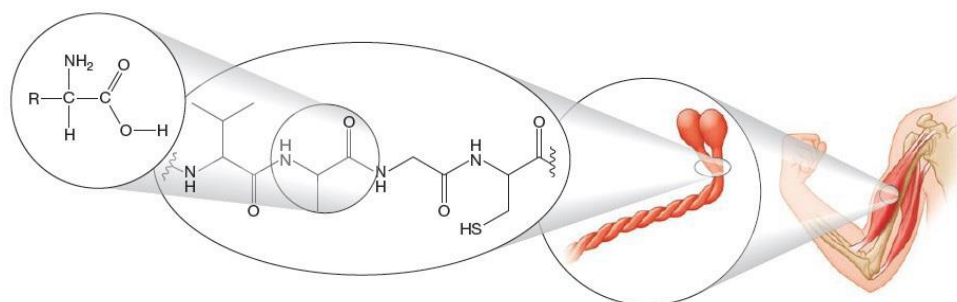
Ciljni spojevi **III-V** pripremljeni su kopulacijom aminoferocena i odgovarajućih aminokiselina (Ala, Pro, Aib), odnosno ferocenkarkoksilne kiseline. Kako bi se identificirale dominantne konformacije te istražio njihov utjecaj na kirooptička svojstva ferocena svi ciljni derivati su karakterizirani i podvrgnuti iscrpnoj konformacijskoj analizi temeljenoj na eksperimentalnim i teorijskim metodama. Karakterizacija i konformacijska analiza u otopini i čvrstom stanju provedena je primjenom: ^1H - i ^{13}C - spektroskopije NMR, korelacijske spektroskopije NMR (COSY, NOESY, HSQC, HMBC), spektroskopije NMR u ovisnosti o koncentraciji i temperaturi, IR i UV/VIS spektroskopije, spektroskopije CD, masene spektrometrije, računalnog modeliranja te kristalografske analize.

U ovoj disertaciji glavna je hipoteza istraživanja da stupanj kiralnog uređenja peptidnog slijeda, temeljen na vodikovim vezama, izravno utječe na CD-aktivnost u apsorpcijskom području ferocenskog kromofora. Također, hipoteza je da heličnost peptidnog segmenta određuje predznak Cottonova efekta u ferocenskom području, a stabilnost lokalne konformacije njegov intenzitet.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Peptidi i proteini

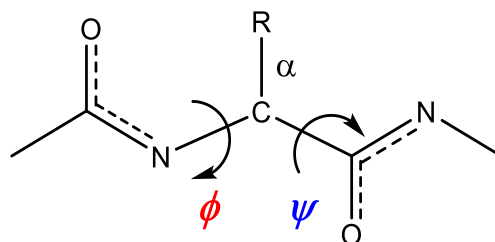
Proteini i peptidi imaju vrlo bitnu biološku ulogu i neophodni su za normalno funkcioniranje svih živih organizama (slika 3.). Zbog raznolikosti procesa u kojima sudjeluju teško ih je klasificirati, ali može se navesti nekoliko bitnih primjera njihove biološke aktivnosti. Zaslužni su za izgradnju kostiju, mišića i zglobova (kolagen). Kosa i vanjski sloj kože sadrže keratin. Zmijski i biljni otrovi, koji štite organizme od predatora, po kemijskom su sastavu peptidi. Proteini također imaju ulogu kod zgrušavanja krvi i time štite krvožilni sustav kada dođe do ozlijede. Antitijela i antibiotici na bazi proteina štite od raznih bolesti dok enzimi i hormoni kataliziraju i reguliraju brojne reakcije unutar stanica.¹⁰



Slika 3. Primjer funkcije peptida. Slika preuzeta iz ref.¹¹

Proteini se od peptida razlikuju po složenosti građe i veličini molekula. Peptidi su kratki polimeri aminokiselina nastali povezivanjem α -karboksilne skupine jedne aminokiseline i α -amino skupine druge aminokiseline peptidnim odnosno amidnim vezama. Zbog djelomičnog dvostrukog karaktera, rotacija oko amidne veze je onemogućena te se šest atoma iz susjednih aminokiselina ($C\alpha$ -CO-NH- $C\alpha$) nalazi u istoj ravnini. Nasuprot tome, oko jednostrukih veza između α -ugljikova atoma i karbonilnoga ugljikova odnosno dušikova atoma (slika 4.) postoji visok stupanj rotacijske slobode zbog čega peptidi mogu zauzimati brojne različite konformacije. Konformacija polipeptidnog lanca potpuno je određena kada su poznati kutevi ϕ i ψ za svaki aminokiselinski ostatak. Redoslijed povezivanja aminokiselina u primarnom

slijeda peptida određuje njegovu trodimenzijsku strukturu, odnosno konformaciju, a time i biološku aktivnost.



Slika 4. Mogućnost rotacije oko veza u polipeptidnom lancu.

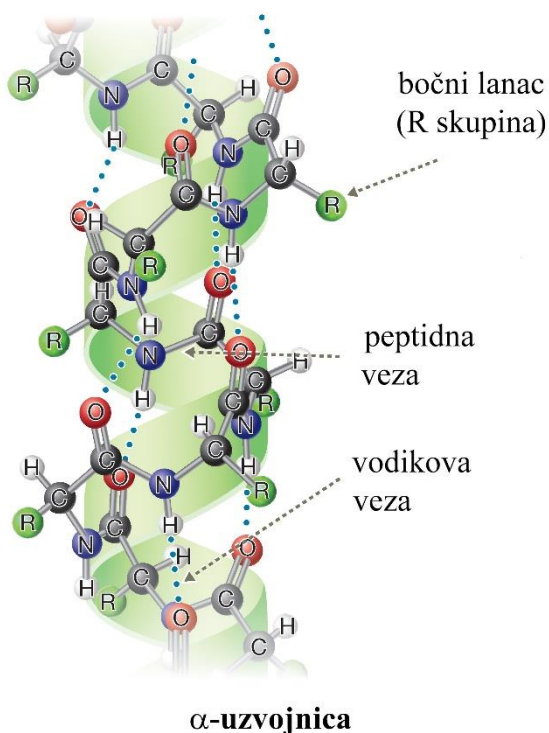
2.2. Sekundarni strukturni elementi

Struktura proteina vrlo je složena i podijeljena na više razina pri čemu se razlikuju: primarni, sekundarni, tercijarni i kvaterni strukturni elementi. Primarnu strukturu proteina i peptida određuje slijed aminokiselina koje su međusobno povezane amidnim vezama.¹¹ Do nabiranja peptidnih lanaca dolazi uslijed tvorbe vodikovih veza između karbonilnog kisikovog atoma iz jedne amidne skupine i amidnog vodikovog atoma iz druge amidne skupine. Nabiranja proizašla iz ovakvog unutarmolekulskog povezivanja, unutar istog ili između susjednih peptidnih lanaca, induciraju tvorbu sekundarnih strukturnih elemenata poput α -uzvojnice, β -nabrane ploče i okreta.

2.2.1. α -Uzvojnica

α -Uzvojnica nastaje uvijanjem polipeptidne okosnice u oblik spirale pri čemu su bočni ogranci aminokiselina orijentirani lateralno (slika 5.). Unutarmolekulske vodikove veze između NH-skupine aminokiselinskog ostatka i i CO-skupine aminokiselinskog ostatka $i + 4$ zatvaraju 13-člane prstenove i time stabiliziraju uzvojnici. Gotovo sve α -uzvojnice nađene u proteinima desno su orijentirane jer su desne uzvojnice građene od prirodnih aminokiselina L-konfiguracije, zbog manjih steričkih smetnji između bočnih ogranaka i proteinske okosnice, energijski povoljnije od lijevih uzvojnica. Svaki okret α -uzvojnice sadrži 3,6 aminokiselina, a vertikalna udaljenost između dva susjedna okreta iznosi 5,4 Å. Osim što ju je najlakše

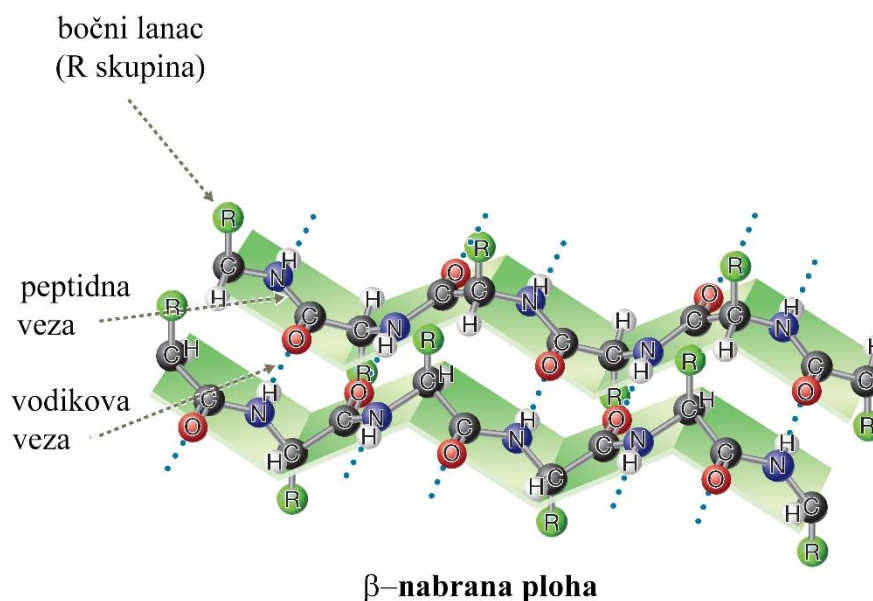
predvidjeti iz primarnog slijeda aminokiselina, α -uzvojnica je ujedno najpravilnija i najčešća lokalna sekundarna struktura proteina.



Slika 5. Prikaz α -uzvojnice prilagođen iz ref.¹¹

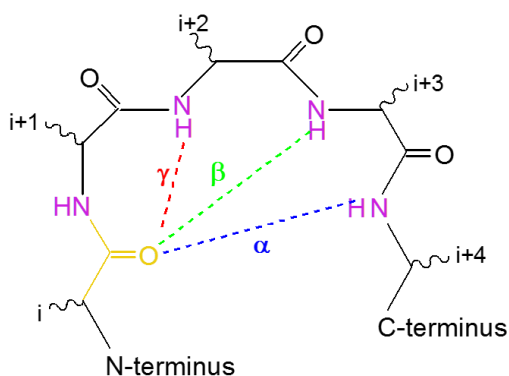
2.2.2. β -Nabrane ploče

Za razliku od α -uzvojnice, u β -nabranoj ploči polipeptidni lanac gotovo je sasvim izdužen, a vodikove veze između amino- i karbonilnih skupina nastaju unutar istog ili između različitih peptidnih lanaca. Ovisno o usmjerenosti vodikovim vezama povezanih lanaca, razlikuju se paralelne i antiparalelne β -nabrane ploče. Kod paralelnih β -nabranih ploča peptidni su lanci, u odnosu na *N*- i *C*-terminus, orijentirani u istom smjeru i međusobno povezani vodikovim vezama koje zatvaraju 12-člane prstenove. Različita usmjerenost peptidnih lanaca, međusobno povezanih vodikovim vezama koje zatvaraju 10- i 14-člane prstenove je karakteristika antiparalelnih β -nabranih ploča (slika 6.).

Slika 6. Prikaz antiparalelne β-nabrane ploče prilagođen iz ref.¹¹

2.2.3. Okreti

Uz α -uzvojnici i β -nabrane ploče, iznimno važni i učestali sekundarni strukturni elementi peptida i proteina su okreti. Okreti su odgovorni za promjenu smjera peptidnih lanaca i zahvaljujući njima većina proteina ima kompaktnu globularnu strukturu. Često ih nalazimo na površini proteina gdje stupaju u interakcije s drugim molekulama. Ovisno o broju konstituirajućih aminokiselinskih ostataka postoji više tipova okreta od kojih su najpoznatiji α , β - i γ -okreti. Svi su okreti stabilizirani unutarmolekulskom $\text{NH}\cdots\text{OC}$ vodikovom vezom koja u slučaju α -okreta zatvara 13-člani, β -okreta 10-člani, a γ -okreta 7-člani prsten¹² (slika 7.).

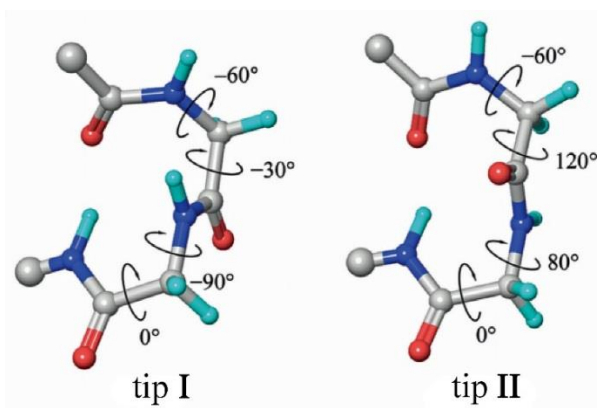


Slika 7. Tipovi okreta kod peptida.

β -Okreti su vrlo česti strukturni motivi u proteinima i polipeptidima (oko 25% svih ostataka u proteinima sudjeluje u β -okretima).¹³ Minimalni peptidni slijed za postizanje ove konformacije čine 4 aminokiselinska ostatka. Može ih se definirati na dva načina: (i) okret koji nastaje vodikovom vezom između karbonilne skupine aminokiseline i i NH-skupine aminokiseline $i + 3$ ili (ii) okret u kojemu je udaljenost između α -ugljikovih atoma aminokiseline i i $i + 3$ manja ili jednaka 7Å. Nadalje, ovisno o diedarskim kutovima ϕ i ψ razlikuje se devet tipova β -okreta (tablica 1.) od kojih su najčešći tipovi I i II (slika 8.) i njihovi "obrnuti" analozi I' i II' (smjer $C \rightarrow N$).^{14,15}

Tablica 1. Tipovi β -okreta u peptidima.

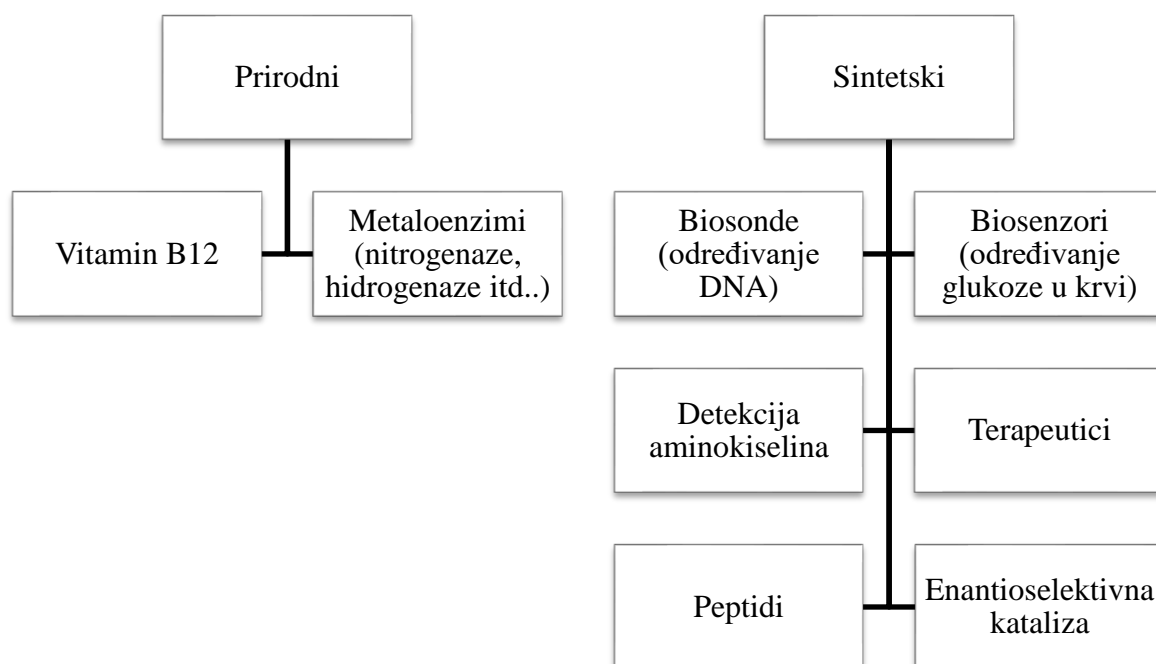
Tip β -okreta	Diedarski kutovi (°)			
	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}
I	-60	-30	-90	0
I'	60	30	90	0
II	-60	120	80	0
II'	60	-120	-80	0
IV	-61	10	-53	17
VIa1	-60	120	-90	0
VIa2	-120	120	-60	0
VIb	-135	135	-75	160
VIII	-60	-30	-120	120



Slika 8. Najčešći tipovi β -okreta. Slika preuzeta iz ref.¹⁶

2.3. Bioorganometalna kemija

Objedinjavanjem biokemije i organometalne kemije prije dvadesetak godina nastalo je znanstveno područje bioorganometalne kemije koju danas definiramo kao disciplinu koja proučava konjugate organometalnih spojeva i biomolekula.¹⁷ Godine 2002. u Parizu održan je prvi međunarodni simpozij o bioorganometalnoj kemiji (ISBOMC), čime je i formalno usvojeno to novo područje. Organometalni spojevi opisuju se kao kompleksi u kojima postoji minimalno jedna veza između metala i ugljika koji potječe iz organske molekule,¹⁸ a jedan od najpoznatijih predstavnika tih spojeva je ferocen. Bioorganometalni spojevi mogu biti prirodni i sintetski. Iako je prirodnih bioorganometalnih spojeva, poput vitamina B12, malo iznimno su važni za normalno funkcioniranje živih organizama. U posljednjih su 20-tak godina pripremljeni brojni sintetski bioorganometalni spojevi čija je podjela, funkcija i primjena prikazana na slici 9.



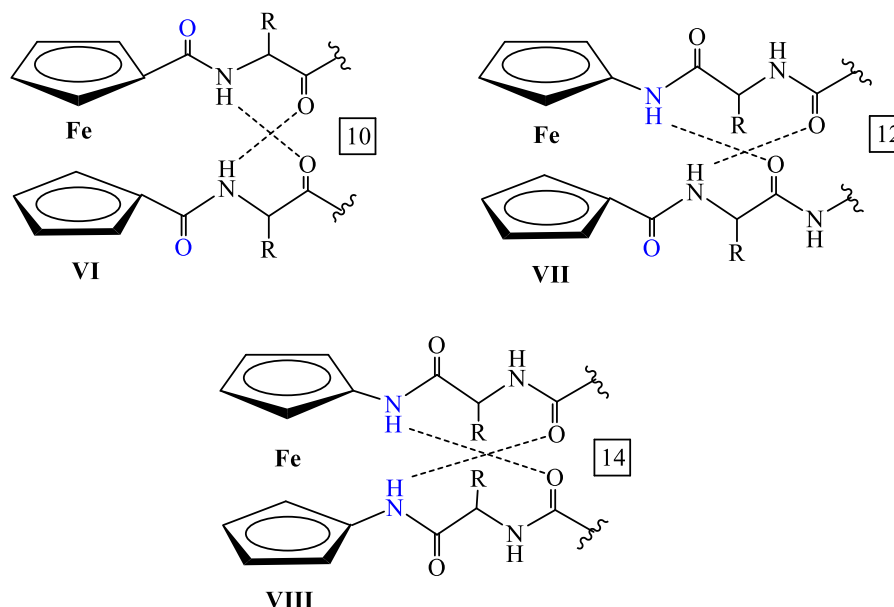
Slika 9. Podjela bioorganometalnih spojeva i njihova primjena.

2.4. Konjugati heteroanularno disupstituiranih ferocena s α -aminokiselinama

Derivati heteroanularno disupstituiranih ferocena i prirodnih aminokiselina su bioorganometalni spojevi koji se posljednjih desetak godina intenzivno proučavaju kao mimetici peptida odnosno spojevi koji imitiraju strukturu i/ili biološki učinak peptida.¹⁹ Prirodni peptidi i proteini spojevi su od velike važnosti za čitav niz imunoloških i neuroloških procesa, a bilo kakvi poremećaji u njihovoj funkciji mogu dovesti do razvoja kroničnih ili infektivnih oboljenja (Alzheimerova bolest, multipla skleroza itd.). Njihova biološka aktivnost proizlazi iz dobro definirane trodimenzijske strukture, odnosno bioaktivne konformacije koja im omogućava vezanje za točno određeni receptor. Međutim, prirodni su peptidi vrlo fleksibilne molekule koje mogu zauzeti brojne energijski ekvivalentne konformacije čime je njihova terapijska primjena limitirana. Kako bi se ograničila fleksibilnost peptida i time povećao afinitet za željeni receptor, u prirodne se peptide ugrađuju neprirodne aminokiseline ili neki drugi molekularni kalupi koji ih stabiliziraju u određenoj bioaktivnoj konformaciji.²⁰ Pri tome molekularni kalup, indukcijom vodikovih veza ili kombinacijom vodikovih veza i hidrofobnih interakcija, inducira nastajanje određene sekundarne strukture. Zahvaljujući udaljenosti ciklopentadienilnih prstenova od 3,3 Å, ferocen se pokazao odličnim kalupom za indukciju različitih strukturnih elemenata, primarno okreta, jer se u derivatima ferocena s α -aminokiselinama tvore IHB između podandnih peptidnih lanaca.

Ovisno o heteroanularnoj funkcionalizaciji ferocena razlikuju se tri osnovna tipa peptidnih konjugata: (i) $\text{Fn}[\text{CO}(\text{AA})_m\text{OMe}]_2$ (**VI**) izvedeni iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (**Fcd**),²¹⁻²⁹ (ii) $\text{Y}(\text{AA})_n\text{Fca}(\text{AA})_m\text{OMe}$ (**VII**) izvedeni iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (**Fca**)³⁰⁻³⁵ te (iii) $\text{Fn}[\text{NH}(\text{AA})_m\text{Y}]_2$ (**VIII**) izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (**Fcda**)³⁶⁻³⁸ [Fn = ferocilen, AA = prirodna aminokiselina, Y = Ac (acetil), Boc (*tert*-butoksikarbonil), $m = 1, 2, \dots$; $n = 1, 2, \dots$]. Odabirom različitih ferocenskih prekursora (Fcd, Fca ili Fcda) kao kalupa utječe se na motive vodikovih veza, odnosno stabilne konformacije koje nalazimo u otopinama i čvrstom stanju ovih peptidomimetika. Pritom su kod derivata **VI-VIII**, uglavnom pronađene dvije IHB koje ovisno o ferocenskom prekursoru

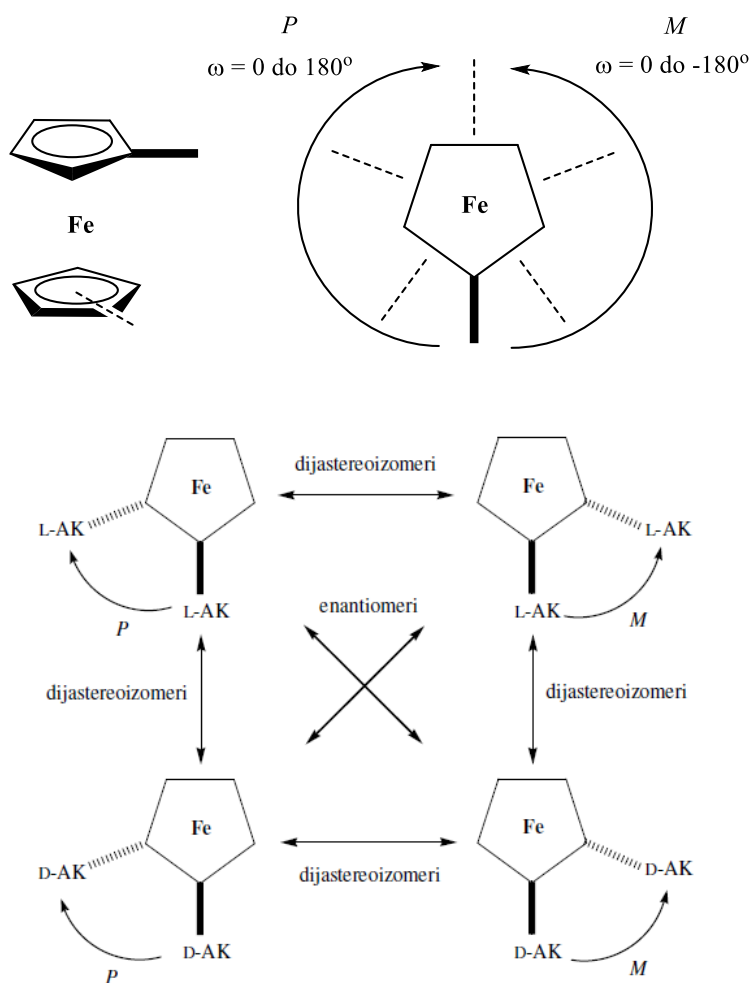
zatvaraju 10-, 12- odnosno 14-člane prstenove (slika 10.). Osim ferocenskog kalupa, na konformaciju ovih derivata utječe apsolutna konfiguracija konstituirajućih aminokiselina i zaštitne skupine na *N*- odnosno *C*-terminusu.



Slika 10. Ferocenski peptidi **VI–VIII** izvedeni iz **Fcd**, **Fca** i **Fcda** (crtkane linije prikazuju vodikove veze).

2.4.1. Helična kiralnost heteroanularno disupstituiranih ferocena

Ferocen je visoko simetričan akiralni kompleks čiji ciklopentadienilni (Cp) prstenovi u otopinama slobodno rotiraju oko Cp–Fe–Cp osi. No, unutarmolekulske vodikove veze koje nalazimo kod derivata **VI–VIII** mogu ograničavati rotaciju cp prstenova oko zajedničke osi u Fc sustavu i time inducirati kiralno uređenje u otopinama aprotičnih otapala i u čvrstom stanju tih derivata.³⁹ Rotacijski izomeri nastali uslijed ograničavanja rotacije cp prstenova oko zajedničke osi u Fc sustavu razlikuju se u torzijskom kutu ω koji kiralni supstituenti zatvaraju s obzirom na Cp–Fe–Cp os. Pri tom su *P*-helične strukture definirane s $0 < \omega < 180^\circ$, dok je za *M*-izomere $0 < \omega < -180^\circ$ (slika 11.). Nadalje, ovisno o kiralnosti konstituirajućih aminokiselina helično kiralni ferocenski derivati mogu biti u enantiomernom ili diastereoizomernom odnosu.

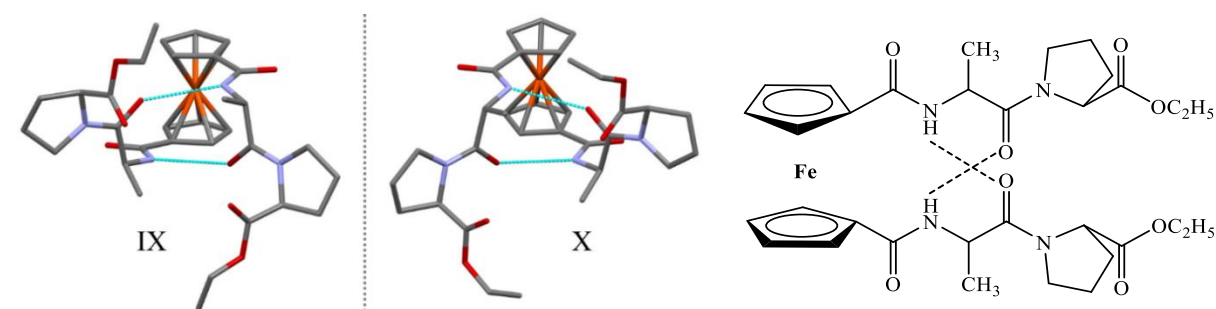


Slika 11. Shematski prikaz *M*- i *P*-helične kiralnosti (gore) i stereokemijski odnosi *M*- i *P*-heličnih ferocenskih derivata supstituiranih s L- i D-aminokiselinama (dolje).

Slika preuzeta iz ref.⁴⁰

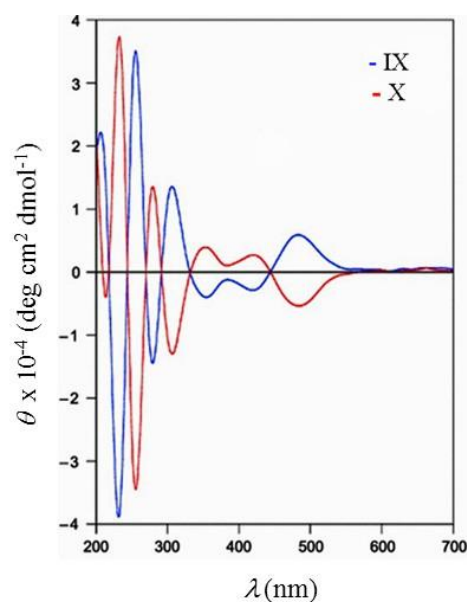
Heličnu kiralnost derivata **VI**–**VIII**, koja je izravna posljedica unutarmolekulskih vodikovih veza između kiralnih peptidnih lanaca vezanih na ferocenski kalup, moguće je potvrditi spektroskopijom cirkularnog dikroizma (CD). U čvrstom stanju biokonjugata izvedenih iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (**VI**) koji sadrže L-aminokiseline pronađene su dvije IHB koje zatvaraju 10-člane prstenove i ograničavaju rotaciju cp prstenova oko zajedničke osi u Fc sustavu u obliku *P*-uzvojnice. Snažni pozitivni Cottonovi efekti ($\theta \sim 5000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) u blizini UV/Vis apsorpcijskog maksimuma ferocenskog kromofora ($\lambda_{\text{max}} \sim 460 \text{ nm}$) opaženi u spektrima CD derivata **VI** potvrđuju da je kiralno uređenje prisutno u čvrstom stanju zadržano i u otopini. Suprotno tomu, konjugate građene iz D-aminokiselina karakteriziraju negativni CD-signal i *M*-heličnost ferocenske jezgre. Na slici 12. prikazani su ORTEP-

dijagrami konformacijskih enantiomera spojeva **IX** $[\text{Fn}(\text{CO-L-Ala-L-Pro-OEt})_2]$ i **X** $[\text{Fn}(\text{CO-D-Ala-D-Pro-OEt})_2]$, izvedenih iz **Fcd**, a iz kojih je vidljivo kako je u slučaju **IX** riječ o desno usmjerenoj uzvojnici (*P*), dok je kod enantiomera **X** nađena njezina zrcalna slika odnosno *M*-uzvojnica.²²



Slika 12. Molekulske strukture konformacijskih enantiomera **IX** i **X** prema podacima iz ref.²² (lijevo) i shematski prikaz IHB (crtkana linija) pronađenih u čvrstom stanju (desno).

Analizom spektroskopijom CD potvrđena je helična kiralnost konjugata **IX** i **X**. U otopini, **IX** pokazuje pozitivan Cottonov efekt u području ferocenskog kromofora, dok se u otopini njegovog enantiomera **X** očekivano javlja signal suprotnog predznaka i jednakoga intenziteta (slika 13.).



Slika 13. Spektri CD konformacijskih enantiomera **IX** i **X**. Slika obrađena i preuzeta iz ref.²²

Oligoamidi tipa **VII**, u kojima je na *C*- i *N*-terminus **Fca** vezana minimalno jedna *L*-aminokiselina, pokazuju *P*-heličnost ferocenske jezgre i jak pozitivan CD-signal iznad 450 nm ($\theta \sim 10000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$), dok peptidi dobiveni iz *D*-aminokiselina očekivano pokazuju negativan Cottonov efekt istog intenziteta.^{31,33} Kiralnost metalocenske jezgre konjugata tipa **VII** u koje su uključene aminokiseline *D*- i *L*-konfiguracije određena je konfiguracijom prve aminokiseline vezane na amino-skupinu iz ferocena. Pritom *L*-aminokiseline induciraju *P*-heličnost ferocenske jezgre i pozitivne CD-signale. Kirooptička svojstva peptida **VII** koji uz **Fca** sadrže samo jednu aminokiselinu puno je teže opisati jer u otopini predstoje kao smjesa energijski bliskih konformera *P*- i *M*-heličnosti stabiliziranih s po jednom srednje jakom IHB. Povećanje voluminoznosti bočnog ogranka prirodne aminokiseline ili male promjene polarnosti otapala mogu destabilizirati pojedine konformere i time promijeniti predznak Cottonova efekta. Intenzitet njihova CD-signala je u usporedbi s višim homologima u svim slučajevima približno jedan red veličine manji te se kreće u rasponu $\theta = -1000$ do $+1000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$. Homokiralni peptidi tipa **VIII**,^{37,38} izgrađeni iz *L*-aminokiselina, u kojima se kiralna organizacija postiže dvjema jakim unakrsnim vodikovim vezama pokazuju *P*-heličnost ferocenske jezgre i iznimno jaku CD-aktivnost u slučaju viših homologa ($\theta = 10000 - 60000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$). Heličnost ferocenske jezgre i predznak CD-signala njihovih heterokiralnih analoga određena je kiralnošću prve aminokiseline vezane na ferocen. U slučaju *L*-aminokiselina inducira se *P*-helično kiralno uređenje te opaža pozitivan Cottonov efekt.

Zaključno, iz rezultata proizašlih iz istraživanja kirooptičkih svojstava homokiralnih **VI–VIII** može se zaključiti sljedeće:

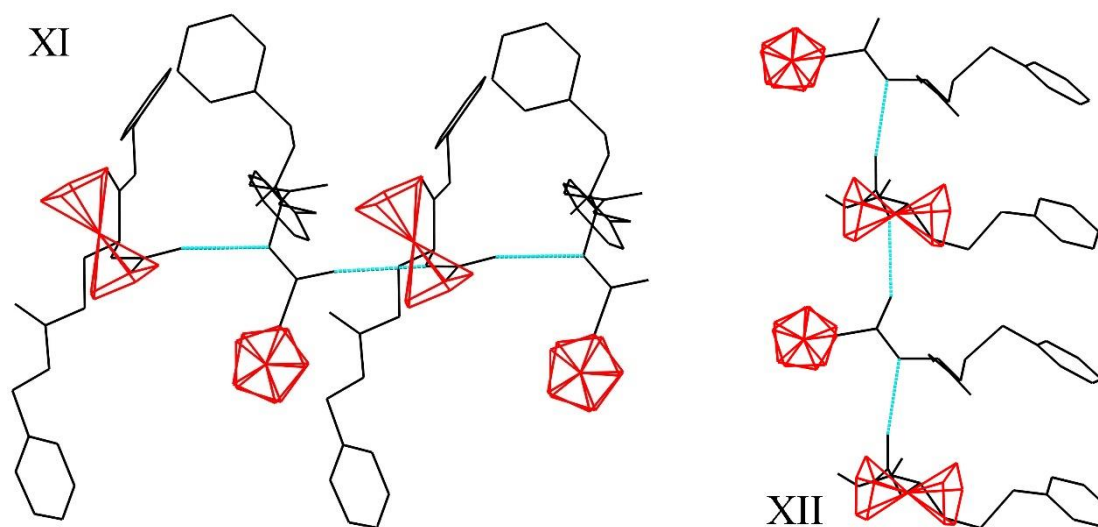
- Kiralno uređenje ferocenske jezgre u oblik *P*- ili *M*-uzvojnice postiže se ograničavanjem rotacije cp prstenova oko zajedničke osi u Fc sustavu međulančanim vodikovim vezama između kiralnih peptidnih lanaca.
- U spektrima CD otopina i čvrstog stanja helično kiralnih derivata opaža se Cottonov efekt u blizini UV/Vis apsorpcijskog maksimuma ferocenskog kromofora ($\lambda \sim 460 \text{ nm}$).²⁶
- *L*-Aminokiseline induciraju tvorbu *P*-heličnih struktura, dok *D*-aminokiseline induciraju *M*-heličnost.
- *P*-Helične strukture pokazuju pozitivan, a *M*-uzvojnice negativan CD-signal,

- Intenzitet CD–signala razmjernan je jakosti uspostavljenih međulančanih vodikovih veza, odnosno stupnju kiralnog uređenja,^{20,25,27}

2.5. Konjugati monosupstituiranih ferocena s α –aminokiselinama

2.5.1. Derivati ferocenkarboksilne kiseline i α –aminokiselina

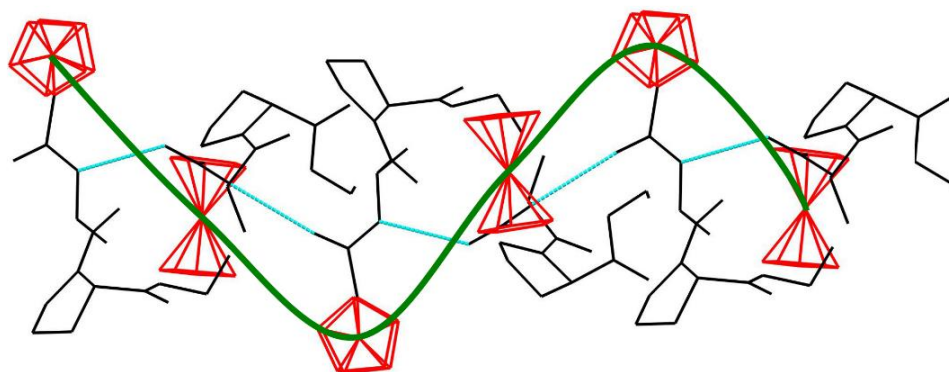
Kopulacijom ferocenkarboksilne kiseline i različitih α –aminokiselina pripremljeni su brojni peptidi čiji lanci zauzimaju različite konformacije uvjetovane u većini slučajeva međumolekulskim vodikovim vezama.^{23,41} U čvrstom stanju, uslijed asocijacije molekula, mogu tvoriti visoko organizirane strukture, ponekad u obliku uzvojnica. U kristalnoj strukturi derivata koji sadrže samo jedan aminokiselinski ostatak, **XI** [Fc–CO–L–Glu–(OBn)₂] i **XII** [Fc–CO–L–Cys(SBn)–OMe], pronađeni su linearni lanci molekula međusobno povezanih međumolekulskim vodikovim vezama (slika 15.).⁴²



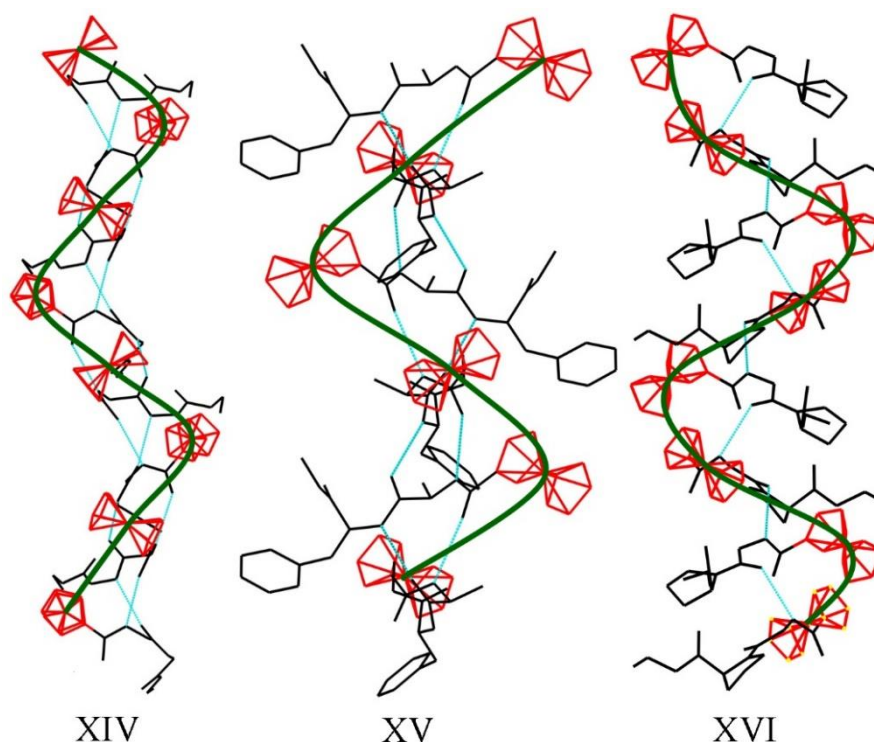
Slika 14. Prikaz pakiranja molekula u kristalnoj strukturi spojeva **XI** i **XII** (međumolekulske vodikove veze označene su svijetlo plavom bojom). Slika prema podacima iz ref.⁴²

Visokoorganizirana struktura u obliku lijeve uzvojnice (slika 15.), nastala međumolekulskim povezivanjem karbonilne skupine iz ferocenskog kalupa i amino–skupine iz susjednog alanina, pronađena je u čvrstom stanju homokiralnog konjugata **XIII** (Fc–CO–L–Ala–L–Pro–

OEt).²⁵ Kristalografskom analizom dipeptidnih derivata **XIV** (Fc-CO-L-Leu-L-Phe-OMe)⁴³ i **XV** (Fc-CO-L-Ala-L-Phe-OMe)⁴⁴ utvrđeno je slično, međumolekulskim vodikovim vezama podržano helično uređenje koje je u slučaju derivata **XVI** (Fc-CO-Gly-L-Pro)²⁶ lijeve orijentacije (slika 16.).

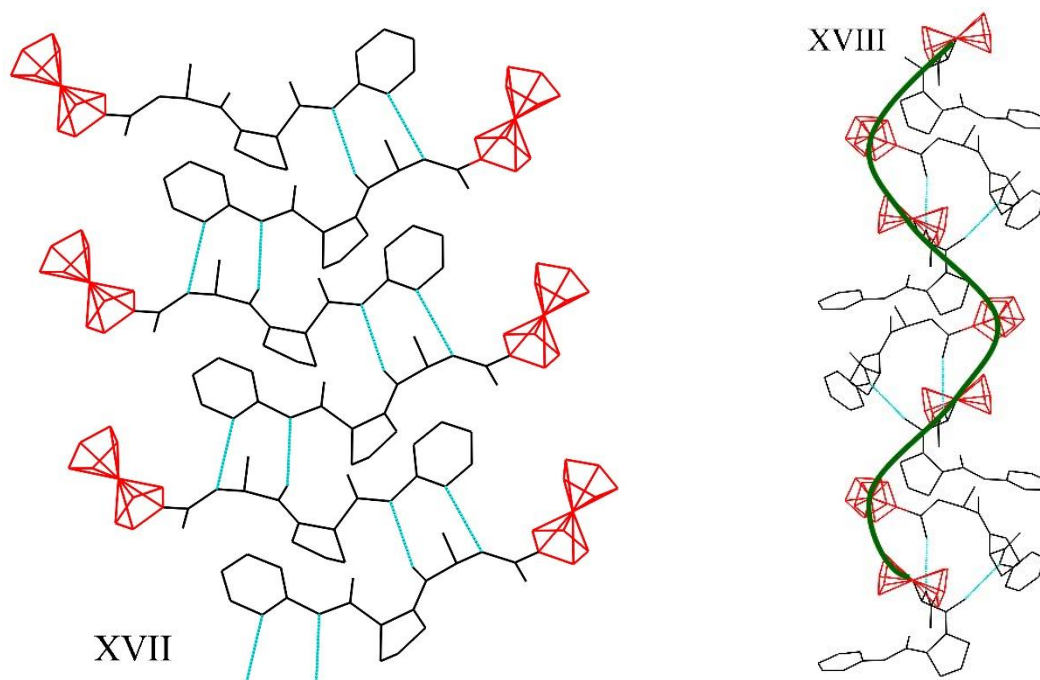


Slika 15. Prikaz pakiranja molekula **XIII** u lijevu uzvojniciu (međumolekulske vodikove veze označene su svijetlo plavom bojom). Slika prema podacima iz ref. ²⁵



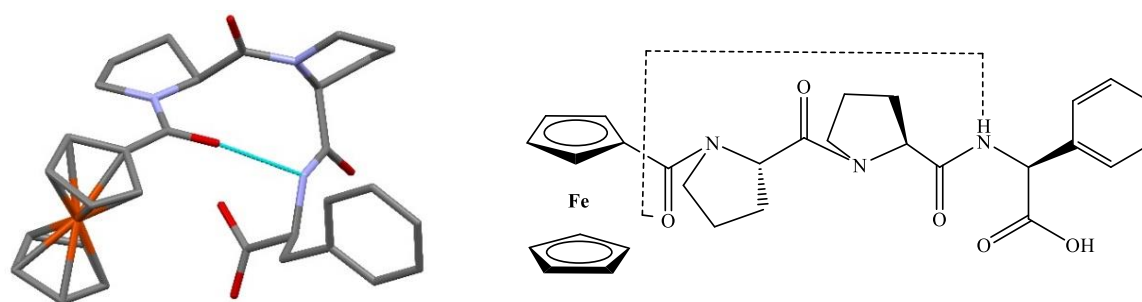
Slika 16. Prikaz pakiranja molekula u u uzvojniciu u kristalnoj strukturi spojeva **XIV**, **XV** i **XVI**. (međumolekulske vodikove veze označene su svijetlo plavom bojom). Slika prema podacima iz ref. ^{26,43,44}

Antiparalelni slojevi (slika 17.) nastali povezivanjem amino- i karbonilnih skupina susjednih molekula pronađeni su u čvrstom stanju derivata **XVII** koji sadrži homokiralni dipeptidni slijed ($-L-Ala-L-Pro-NH-2-Py$).⁴⁵ Međumolekulske vodikove veze pritom zatvaraju 9-člane prstenove. Suprotno tomu, prilikom pakiranja njegovog heterokiralnog analoga **XVIII** ($-L-Ala-D-Pro-NH-2-Py$) nastaje međumolekulskim vodikovim vezama podržano lijevo usmjereno helično uređenje.



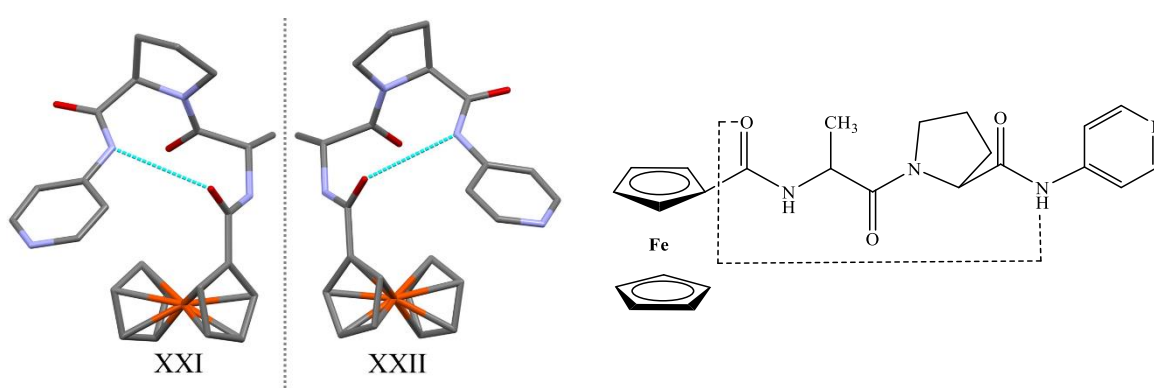
Slika 17. Prikaz pakiranja molekula u kristalnoj strukturi spojeva **XVII** i **XVIII** (međumolekulske vodikove veze označene su svjetlo plavom bojom). Slika prema podacima iz ref.⁴⁵

Prvi primjer derivata ferocenkarboksilne kiseline i α -aminokiselina u čijoj je strukturi pronađen β -okret predstavili su Kraatz i suradnici.⁴⁶ Kristalografskom analizom $Fc-CO-L-Pro-L-Pro-L-Phe-OH$ (**XIX**) utvrđena je prisutnost jake unutarlančane vodikove veze, uspostavljene između karbonilne skupine ferocenskog kalupa i NH -skupine iz Phe, koja inducira tvorbu 10-članog prstena (slika 18.). Suprotno tomu, kod sličnih je poliprolinskih derivata **XX** [$Fc-CO-(Pro)_n-OBn$, $n = 1-4$] pronađena lijeva poliprolinska II uzvojnica u kojoj su svi prolini u *trans* konformaciji.



Slika 18. Molekulska struktura derivata **XIX** prema podacima iz ref.⁴⁶ (lijevo) i shematski prikaz IHB (crtkana linija) pronađene u čvrstom stanju (desno).

Hirao i suradnici su kondenzacijom ferocenkarkoboksilne kiseline i heterokiralnih dipeptida pripravili enantiomerne konjugate Fc–CO–L–Ala–D–Pro–NH–4–Py (**XXI**) i Fc–CO–D–Ala–L–Pro–NH–4–Py (**XXII**).⁴⁷ Kao što je vidljivo na ORTEP–dijagramima (slika 19.), u čvrstom stanju obaju konjugata pronađena je unutarlančana vodikova veza između karbonilne skupine ferocenskog kalupa i piridinske NH–skupine koja zatvara 10–člani prsten što odgovara strukturi β –okreta. Vrijednosti torzijskih kutova nađenih u čvrstom stanju svrstavaju ove β –okrete u tip II [$(\phi_{i+1} (-57,0^\circ), \psi_{i+1} (125,7^\circ), \phi_{i+2} (68,9^\circ), \psi_{i+2} (16,8^\circ)$ za **XXI** i $\phi_{i+1} (57,6^\circ), \psi_{i+1} (-126,5^\circ), \phi_{i+2} (-68,3^\circ), \psi_{i+2} (-16,8^\circ)$ za **XXII**]. Nadalje, zbog gotovo jednakih vrijednosti torzijskih kutova, koji se razlikuju samo u predznaku, konjugate **XXI** i **XXII** svrstavamo u konformacijske enantiomere.

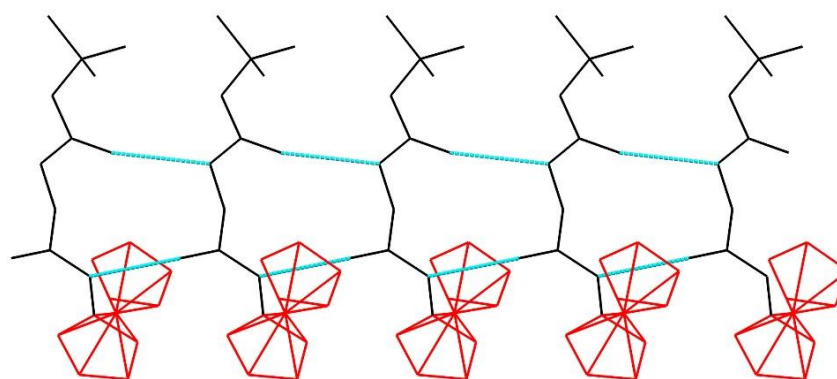


Slika 19. Molekulske strukture konformacijskih enantiomera **XXI** i **XXII** prema podacima iz ref.⁴⁷ (lijevo) i shematski prikaz IHB (crtkana linija) koja podržava β –okret tipa II (desno).

Detaljna analiza, provedena pomoću IR–spektroskopije te spektroskopije NMR i CD, potvrdila je kako je kiralno uređenje peptida **XXI** i **XXII**, podržano unutarmolekulskom vodikovom vezom nađenom u čvrstom stanju, najvjerojatnije zadržano i u otopini. Nadalje, imajući u vidu kristalnu strukturu spoja **XVIII**, u kojoj nisu pronađeni unutarmolekulski kontakti, može se zaključiti kako položaj piridilnog dušika ima ključnu ulogu u procesu samoudruživanja molekula.

2.5.2. Derivati aminoferocena i α –aminokiselina

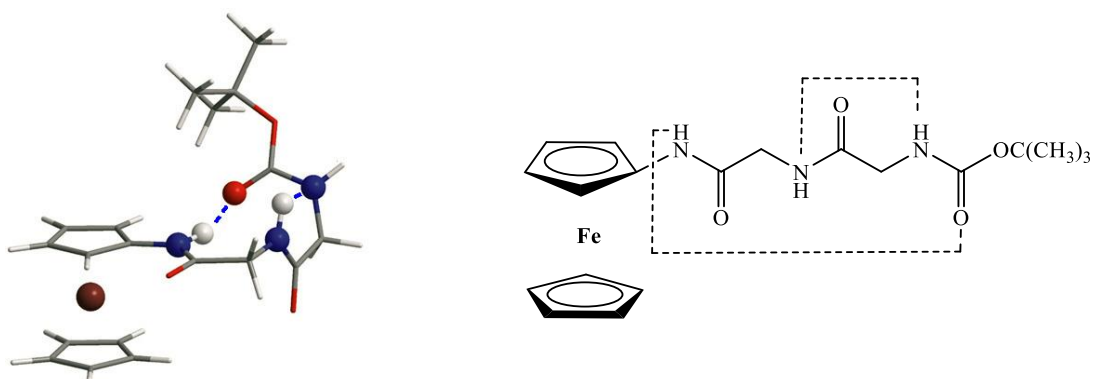
Za razliku od dobro opisanih konformacijskih obilježja peptida izvedenih iz ferocenkarkoboksilne kiseline, konformacijski prostor konjugata pripravljenih kopulacijom aminoferocena i α –aminokiselina znatno je manje istražen. Metzler–Nolte i suradnici istražili su konformacijske karakteristike najjednostavnijih derivata Boc–AA–NH–Fc, **XXIII** (AA = Gly, Leu, Phe, Val, Cys, Tyr) i utvrdili kako se u čvrstom stanju molekule Boc–Gly–NH–Fc povezuju mrežom međumolekulskih vodikovih veza što rezultira tvorbom beskonačnih lanaca (slika 20).⁴⁸ Spektroskopska analiza ukazuje na odsutnost značajnih unutarmolekulskih vodikovih veza u otopinama ovih konjugata, a nepostojanje kiralnog uređenja dodatno je potvrđeno slabim signalima u blizini apsorpcijskog maksimuma ferocenskog kromofora u spektrima CD kiralnih derivata.



Slika 20. Međumolekulske vodikove veze (svijetlo plave crte) u čvrstom stanju **XXIII**. Slika prema podacima iz ref. ⁴⁸

U sklopu istraživanja desimetriziranih derivata tipa **VII**⁹ [Boc-AA₂-AA₁-NH-Fc-COCH₃], u našem su Laboratoriju pripravljena tri derivata aminoferocena i prirodnih aminokiselina [Boc-AA₂-AA₁-NH-Fc, **XXIV**, AA_{1,2} = Gly; **XXV**, AA_{1,2} = L-Ala; **XXVI**, AA_{1,2} = L-Val]. Peptidi **XXIV**–**XVI** trebali su u konformacijskoj analizi **VII** poslužiti kao modelni spojevi, koji nemaju mogućnost tvorbe jakih unutarmolekulskih vodikovih veza. Suprotno očekivanom, spektroskopska analiza (IR i NMR) ferocenskih dipeptida **XXIV**–**XXVI** u nepolarnim otapalima (CH₂Cl₂, CDCl₃), kao i u DMSO-*d*₆, ukazala je na sudjelovanje NH-skupine aminoferocena u jakoj IHB. Također je ustanovljeno kako NH-skupine C-terminalnih aminokiselina ne sudjeluju u vodikovim vezama dok NH-skupina na položaju *i* + 3 oscilira između vezanog i nevezanog stanja.

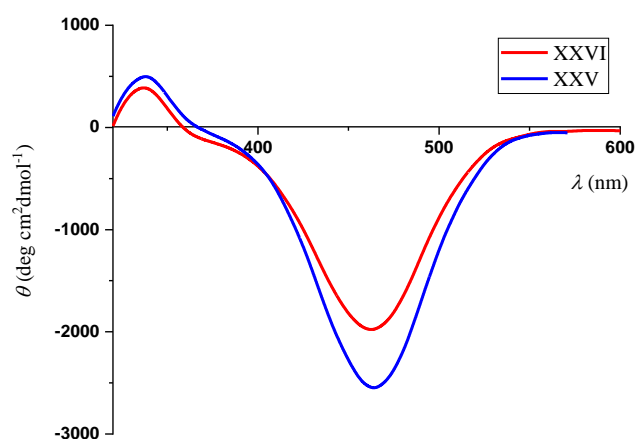
DFT-modeliranjem spojeva utvrđeno je da se u najstabilnijim konformerima **XXIV**–**XXVI** ferocenska amino-skupina povezuje s uretanskom karbonilnom grupom i pritom zatvara 10-člani prsten koji geometrijom odgovara konformaciji β-okreta tipa I (slika 21.). Nalazi proizašli iz DFT-računa dodatno su potkrijepljeni rezultatima NOESY-eksperimenta.



Slika 21. Najstabilniji konformer **XXIV** prema podacima iz ref. ⁹ optimiziran MO6/6-31G(d) funkcionalom u CHCl₃ s prikazanim vodikovim vezama (*lijevo*), shematski prikaz (*desno*).

Nadalje, u ferocenskom području spektara CD kiralnih derivata **XXV** i **XXVI** (slika 22.) registrirani su negativni signali čiji su intenziteti ($\theta = -2549$ i -1977 deg cm² dmol⁻¹) znatno jači od intenziteta Cottonovih efekata ranije istraživanih monosupstituiranih ferocenskih peptida. Redukcija CD-signalna izazvana dodatkom kompeticijskog otapala (20% DMSO) nedvojbeno je dokazala kako Cottonovi efekti u spektrima **XXV** i **XXVI** proizlaze iz prijenosa kiralne informacije iz vodikovim vezama podržane lokalne sekundarne strukture do

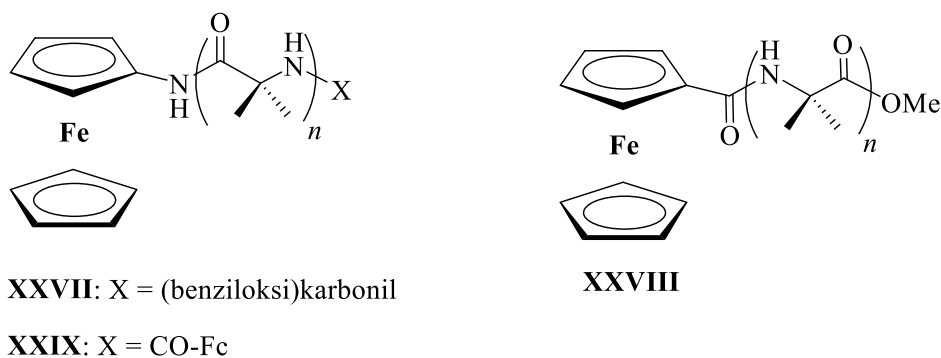
akiralnog ferocenskog kromofora. Iako se u literaturi opažanje CD–signala u blizini apsorpcijskog maksimuma ferocena pripisivalo ograničavaju rotaciju cp prstenova oko zajedničke osi u Fc sustavu, vodikovim vezama između peptidnih lanaca heteroanularno supstituiranih biokonjugata, ovim je istraživanjem utvrđeno kako helično uređenje peptidnog slijeda vezanog na aminoferocen također izravno utječe na CD–aktivnost pri $\lambda \sim 460$ nm.



Slika 22. Spektri CD derivata **XXV** i **XXVI**. Slika prema podacima iz ref.⁹

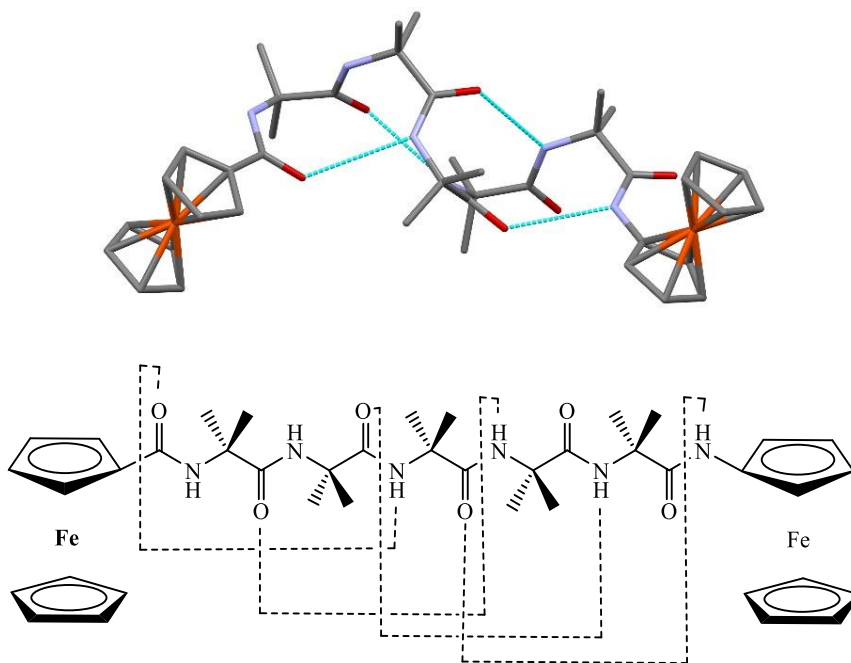
2.5.3. Derivati monosupstituiranih ferocena i α -aminoizobutirične kiseline

Kako bi se ograničila konformacijska fleksibilnost kratkih peptida, u njih se umeću α -alkilirane aminokiseline poput α -aminoizobutirične kiseline (Aib). Zaključci proizašli iz brojnih rendgenskih difrakcijskih analiza ukazuju na izrazitu tendenciju Aib–ovih ostataka da u kratkim peptidima, duljine do pet aminokiselina, induciraju nastanak 3_{10} uzvojnice podržane unutar-molekulskim vodikovim vezama.^{49,50} U sklopu istraživanja unutar-molekulskog prijenosa elektrona, kopuliranjem α -aminoizobutirične kiseline i aminoferocena odnosno ferocenkarboksilne kiseline, Santi i suradnici pripravili su (slika 23.) konjugate **XXVII** i **XXVIII**.⁵¹ Detaljna spektroskopska analiza akiralnih peptida **XXVII** i **XXVIII** ($n = 2-5$) ukazuje na formiranje 3_{10} -heliksa čija stabilnost raste s porastom broja Aib–ovih ostataka.



Slika 23. Konjugati ferocena i α -aminoizobutirične kiseline **XXVII–XIX** ($n = 1–5$).

U nastavku istraživanja, deprotekcijom **XXVII** i kopulacijom s ferocenkarkoksilnom kiselinom, pripremljeni su i derivati **XXIX** koji sadrže dodatnu organometalnu podjedinicu.⁵² Konformacijska analiza dinuklearnih konjugata **XXIX** kako u otopini tako i u čvrstom stanju ukazuje da i u ovom slučaju s porastom broja Aib-ostataka progresivno nastaje sve stabilnija 3_{10} uzvojnica (slika 24.). Nadalje, dokazano je kako je konformacija 3_{10} -uzvojnice koju zauzimaju homo-Aib peptidi stabilna ne samo u otapalima male polarnosti (CHCl_3 , CH_2Cl_2) već i u polarnim otapalima (DMSO) te pri povišenoj temperaturi.

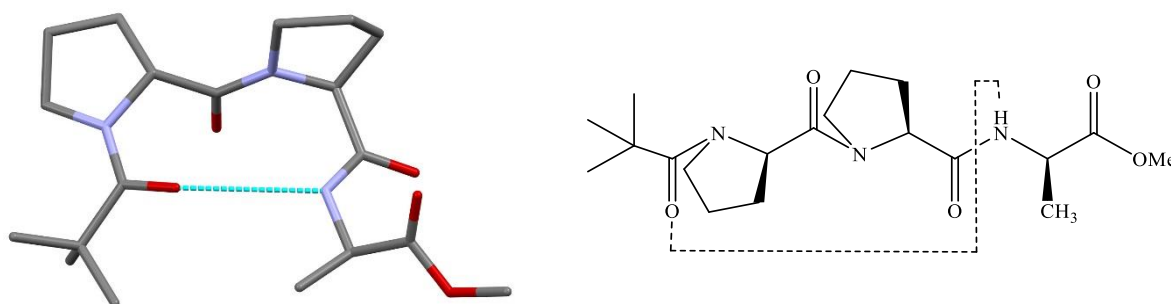


Slika 24. Molekulska struktura prema podacima iz ref. ⁵² (gore) i shematski prikaz unutarmolekulskih vodikovih veza 3_{10} uzvojnice (dolje) konjugata **XXIX** ($n = 5$).

2.6. Tripeptidi s diprolinskim segmentom

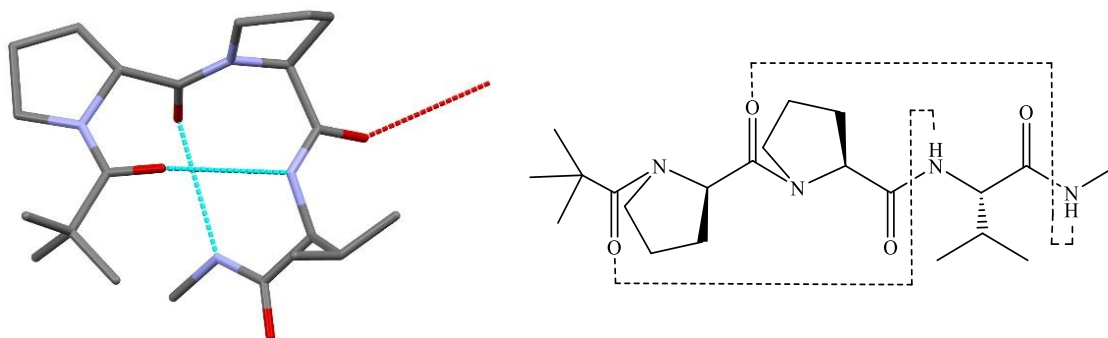
U dizajnu sintetskih peptida s precizno definiranom strukturom često se koristi diprolinski segment koji se zbog preferiranja pojedinih konformacija pokazao učinkovitim kalupom u pripravi peptidomimetika. Pritom homokiralni L-Pro-L-Pro segment inducira tvorbu heličnih konformacija,^{53–57} dok heterokiralni D-Pro-L-Pro slijed uzrokuje svijanje peptidnog lanca u konformaciju β -ukosnice.^{58–61} Zbog kovalentne veze koja povezuje bočni ogranak i dušik iz glavnog lanca prolin je jedinstven među 20 genetički kodiranih aminokiselina.

Izravna posljedica postojanja pirolidinskog prstena je ograničenje rotacije oko veze C α -N čime je vrijednost kuta ϕ za L-prolin limitirana na $-60 \pm 30^\circ$. Smanjena konformacijska sloboda čini prolin najučestalijim aminokiselinskim ostatkom pronađenim u različitim strukturama okreta; pritom se L-Pro najčešće javlja na položaju $i + 1$ β -okreta tipa I/III i II te na položaju $i + 2$ β -okreta tipa IV za koji je karakteristična *cis*-konfiguracija amidne veze koja mu prethodi. Najopsežniju studiju peptida s umetnutim homo- i heterokiralnim diprolinskim kalupom, u svrhu ograničenja konformacijske fleksibilnosti, načinili su Balaram i suradnici.⁶² U čvrstom stanju peptida Piv-D-Pro-L-Pro-NHMe (**XXX**) i tripeptida Piv-D-Pro-L-Pro-AA-OMe (**XXXIa**, AA = L-Val; **XXXIb**, AA = L-Phe; **XXXIc**, AA = D-Ala, Piv = pivaloil) pronađena je IHB koja povezuje karbonilni kisikov atom iz pivaloilne zaštitne skupine na položaju i s NH-grupom na položaju $i + 3$ te podržava konformaciju β -okreta tipa II' (slika 25.).



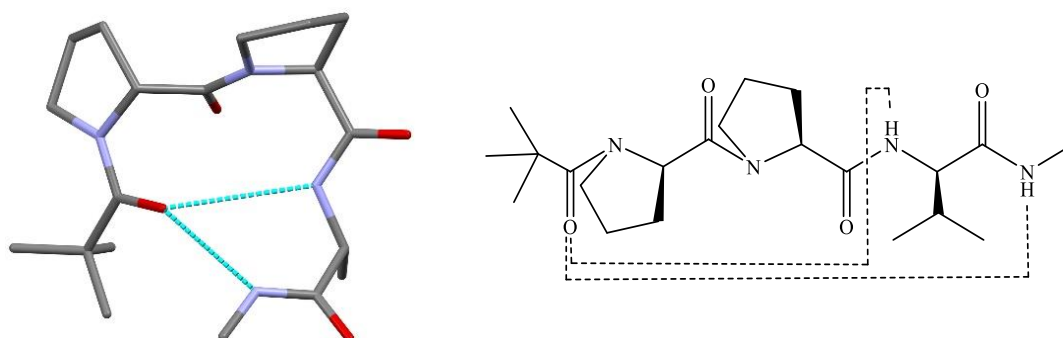
Slika 25. Molekulska struktura derivata **XXXIc** prema podacima iz ref. ⁶² (lijevo) i shematski prikaz IHB (crtkana linija) pronađene u čvrstom stanju (*desno*).

Zbog prisutnosti donorske NH-skupine na C-terminusu, N-metilamidi Piv-D-Pro-L-Pro-L-AA-NHMe (**XXXIIa**, AA = L-Val; **XXXIIb**, AA = L-Leu; **XXXIIc**, AA = L-Phe; **XXXIId**, AA = Gly; **XXXIIe**, AA = Aib, **XXXIIf**, AA = L-Ala) tvore dodatnu 4 → 1 vodikovu vezu te su u njihovim kristalnim strukturama utvrđeni uzastopni β-okreti tipa II'-I (slika 26.).



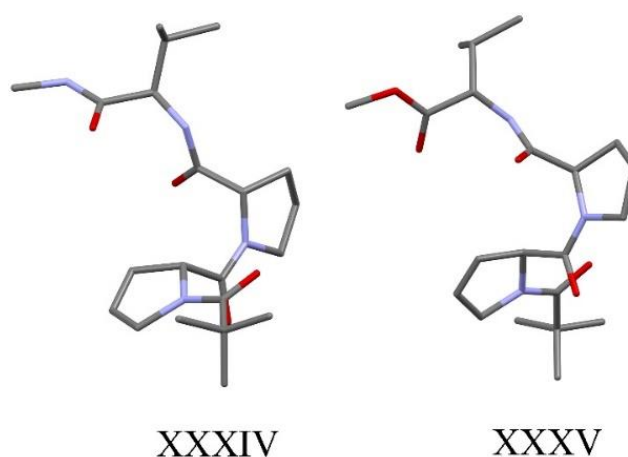
Slika 26. Molekulska struktura derivata **XXXIIa** prema podacima iz ref. ⁶² (lijevo) i shematski prikaz IHB (crtkane linije, desno).

Za razliku od uniformnih strukturnih karakteristika D-L-L peptida **XXXIIa-f**, u čvrstom stanju konjugata čiji je treći aminokiselinski ostatak D-konfiguracije (položaj $i + 3$) pronađene su različite konformacije. Diprolinski segment peptida Piv-D-Pro-L-Pro-D-Ala-NHMe (**XXXIII**) zauzima konformaciju β-okreta tipa II' podržanu CO_{Piv}...HN_{D-Ala} vezom, a dodatna 5 → 1 interakcija ostvarena je između PivC=O skupine i NH-grupe N-metilamida. Iako karbonilna skupina pivaloila sudjeluje u račvastoj (dvokrakoj) vodikovoj vezi razmatranje strukture **XXXIII** sugerira kako je potonja interakcija, kojom se zatvara 13-člani prsten (α-okret), dominantna (slika 27.).



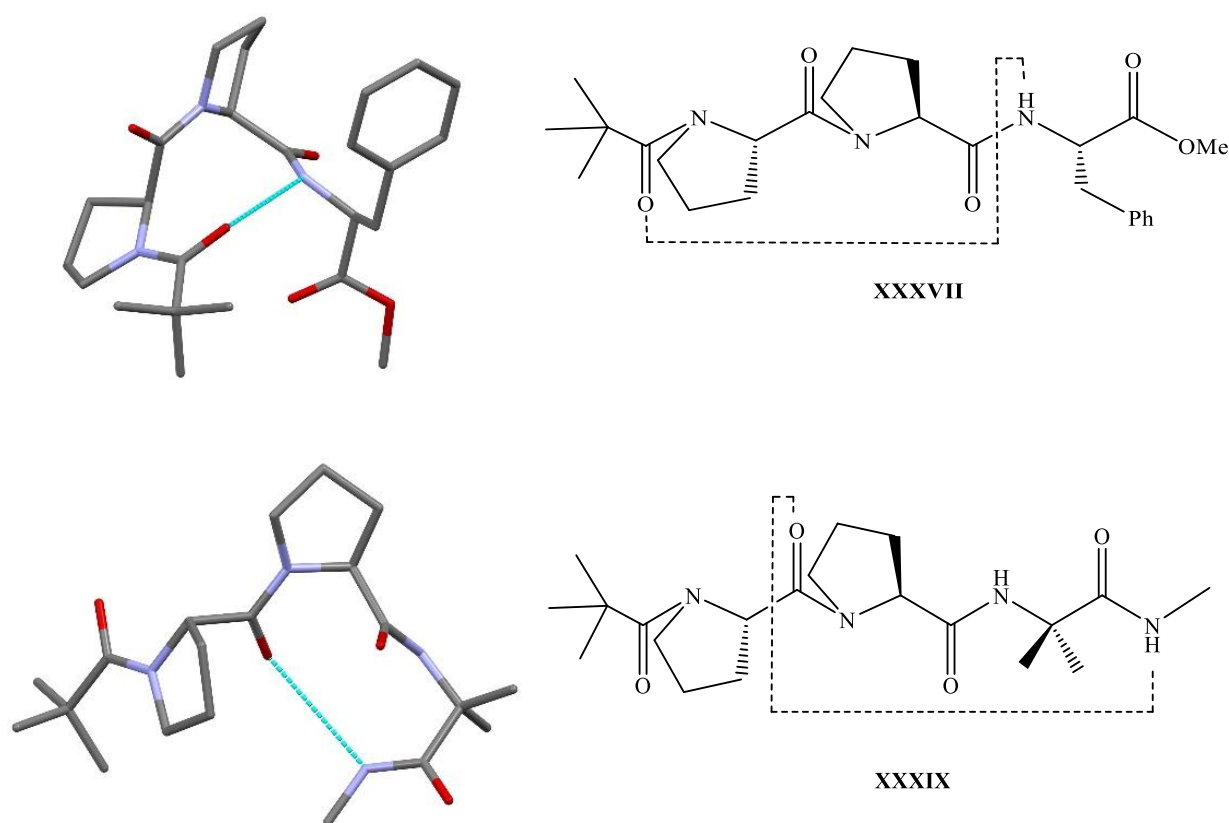
Slika 27. Molekulska struktura derivata **XXXIII** prema podacima iz ref. ⁶² (lijevo) i shematski prikaz IHB (crtkane linije, desno).

Neuobičajena konformacija karakterizirana *cis*-geometrijom peptidne veze i odsutnošću IHB (slika 28.) pronađena je u čvrstom stanju peptida Piv-D-Pro-L-Pro-D-Val-NHMe (**XXXIV**)⁶³ i njegovog esterskog analoga Piv-L-Pro-D-Pro-L-Val-OMe (**XXXV**). Budući da je u kristalnim strukturama racemičnog **XXXV** koji sadrži L-D-L i D-L-D slijed pronađena konformacija β -okreta tipa II, odnosno II', može se zaključiti kako, zbog brojnih konformacija prisutnih u otopini, tripeptid **XXXV** pri izmijenjenim uvjetima različito kristalizira. Nadalje, umjesto očekivanog β -okreta tipa II' u kojem sudjeluje D-Pro-L-Pro segment, u čvrstom stanju Piv-D-Pro-L-Pro-D-Leu-NHMe (**XXXVI**) C-terminalna L-Pro-D-Leu slijed zauzima konformaciju β -okreta tipa II.



Slika 28. Molekulske strukture derivata **XXXIV** i **XXXV** prema podacima iz ref.⁶³

Ista je skupina u nastavku istraživanja pripravila i odredila kristalne strukture peptida s homokiralnim diprolinskim segmentom: Piv-L-Pro-L-Pro-L-Phe-OMe (**XXXVII**), Piv-L-Pro-L-Pro-L-Val-NHMe (**XXXVIII**) i Piv-L-Pro-L-Pro-Aib-NHMe (**XXXIX**). U slučaju **XXXVII** pronađena je 4 \rightarrow 1 vodikova veza između PivC=O skupine i NH-grupe fenilalanina koja podržava β -okret tipa IVa (slika 29.). Za razliku od peptida **XXXVIII**, u čijoj kristalnoj strukturi nisu pronađene IHB, u čvrstom stanju **XXXIX** utvrđen je β -okret tipa II podržan 4 \rightarrow 1 interakcijom između karbonilne skupine N-terminalnog prolina i metilamidne NH-grupe. Kao i u slučaju ferocenskog derivata **XIX** opažena je *cis*-konfiguracija L-Pro-L-Pro amidne veze što se pripisuje tendenciji diprolinskog segmenta k zauzimanju *cis*-geometrije kad mu prethodi aromatski ostatak.



Slika 29. Molekulske strukture homokiralnih derivata **XXXVII** i **XXXIX** prema podacima iz ref.⁶³ (*lijevo*) i shematski prikaz IHB (crtkane linije, *desno*).

Prethodno opisane kristalografske studije kojima je utvrđena značajna konformacijska raznolikost, osobito u slučaju slijeda D-Pro-L-Pro-D-AA i L-Pro-L-Pro-L-AA, indikacija su zastupljenosti različitih konformera u otopinama peptida s diprolinskim segmentom. Stoga su u nastavku istraživanja autori pristupili određivanju konformacijskih preferencija peptida **XXX–XXXIX** u otopinama organskih otapala. Detaljna analiza Piv-D-Pro-L-Pro-L-AA-NHMe, primjenom NOESY korelacijske spektroskopije i određivanjem utjecaja kompeticijskog otapala na kemijske pomake amidnih protona, potvrdila je da su konformacije uzastopnih β -okreta tipa II'-I pronađene u čvrstom stanju **XXXIIa-c,e** prisutne i u otopini. Rezultati proizašli iz analize NMR peptida Piv-D-Pro-L-Pro-D-AA-NHMe (**XXXIII**, **XXXIV**, **XXXVI**), čije su kristalne strukture karakterizirane različitim geometrijama, sugeriraju kako je dominantna konformacija u otopinama ovih derivata β -okret, podržan PivCO...D-AANH vezom, uz prisutnost određenog stupnja konformacijske slobode C-terminalnog ostatka. Nadalje, za razliku od homokiralnog peptida **XXXVIII** koji je u otopini

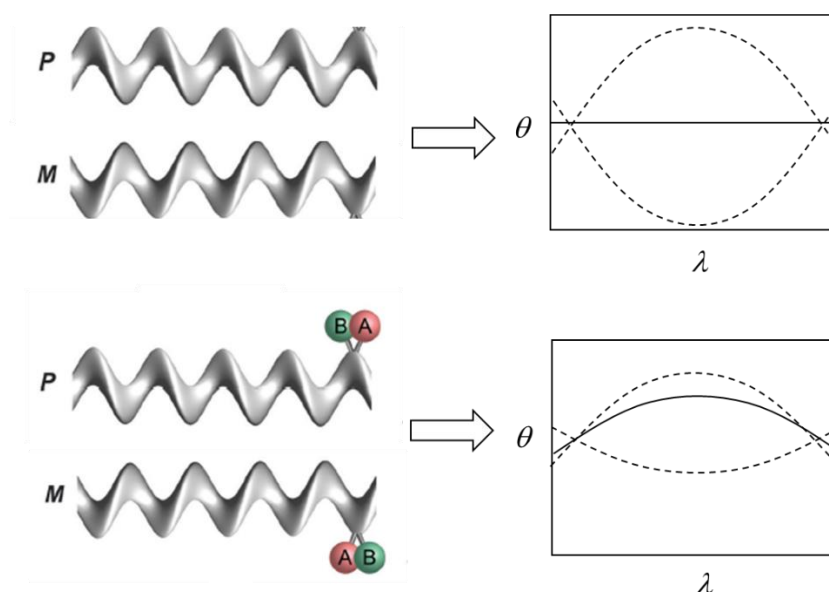
stabiliziran $4 \rightarrow 1$ vodikovom vezom u konformaciji β -okreta tipa IV, u 10-članom prstenu utvrđenom u **XXXIX** sudjeluje Pro(2)-Aib(3) slijed. Iz opsežnih istraživanja koja su proveli Balaram i suradnici može se zaključiti kako je jedino kod peptida D-L-L serije konformacijska homogenost prisutna u čvrstom stanju zadržana i u otopini.

2.7. CD-senzori za određivanje kiralnosti foldamera

Spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD) nalazi široku primjenu u stereokemijskoj analizi konfiguracionih i konformacijskih izomera, a ujedno je najmoćnija metoda za određivanje apsolutne konfiguracije kiralnih spojeva kada se ne mogu upotrijebiti kristalografske tehnike.⁶⁴ Mnogi se kiralni spojevi ne mogu izravno istraživati pomoću spektroskopije CD jer se zbog nedostatka snažnog kromofora u njihovim spektrima opažaju samo slabi ili zanemarivi Cottonovi efekti. Osim za određivanje apsolutne konfiguracije i enantiomernog sastava, posljednjih se godina CD-senzori, molekule koje prevode kiralnu informaciju u jak i karakterističan CD-signal, sve više koriste u istraživanjima kojima je cilj utvrđivanje helične kiralnosti različitih foldamera⁶⁵ kao oligomernih organskih spojeva koji oponašaju trodimenzijske strukture biopolimera. Zahvaljujući dobro definiranim molekulskim arhitekturama foldameri mogu sudjelovati u procesima vezanja molekula gostiju⁶⁶ ili drugih biomolekula⁶⁷ te selektivno katalizirati različite reakcije.⁶⁸ Iako se često podrazumijeva da je za biološku aktivnost foldamera nužno zauzimanje samo jedne biološki aktivne konformacije, treba imati na umu kako niti većina prirodnih peptida nije rigidna, već sadržavaju segmente koji postižu definiranu konformaciju tek nakon vezanja liganda.⁶⁹

U otopinama akiralnih foldamera, izgrađenih od ponavljajućih podjedinica npr. α -aminoizobutirične kiseline, jednako su zastupljene enantiomerne konformacije *P*- i *M*-orijentacije koje geometrijom odgovaraju 3_{10} -uzvojnici, odnosno ponavljajućim β -okretima.^{70,71} Budući da su u odsutnosti asimetrične indukcije *P*- i *M*-konformacije jednako populirane, njihovi se Cottonovi efekti poništavaju te se ne opaža signal u spektrima CD (slika 30.).⁶⁵ Kovalentnom modifikacijom, poput umetanja kiralne aminokiseline u akiralni foldamer ili uslijed interakcije s kiralnim ligandom nastat će dijastereoizomerne konformacije *P*- i *M*-heličnosti koje zbog razlike u energiji neće biti jednako zastupljene. Pritom će, ovisno o konfiguraciji nositelja kiralne informacije, doći do dominacije *P*- ili *M*-helično kiralnih

konformera što će rezultirati opažanjem CD–signala. U kiralnim foldamerima prijenos kiralne informacije kroz uzvojnici oponaša prijenos informacija u biološkim receptorima te su istraživani kao biomimetici kemo⁷² i fotosenzitivnih⁷³ receptorskih proteina. Iako je poznato da lijeva odnosno desna heličnost uzvojnice igra ključnu ulogu u komunikaciji na molekulskoj razini, još je uvijek teško eksperimentalno odrediti dominantne konformacije koje foldameri zauzimaju.

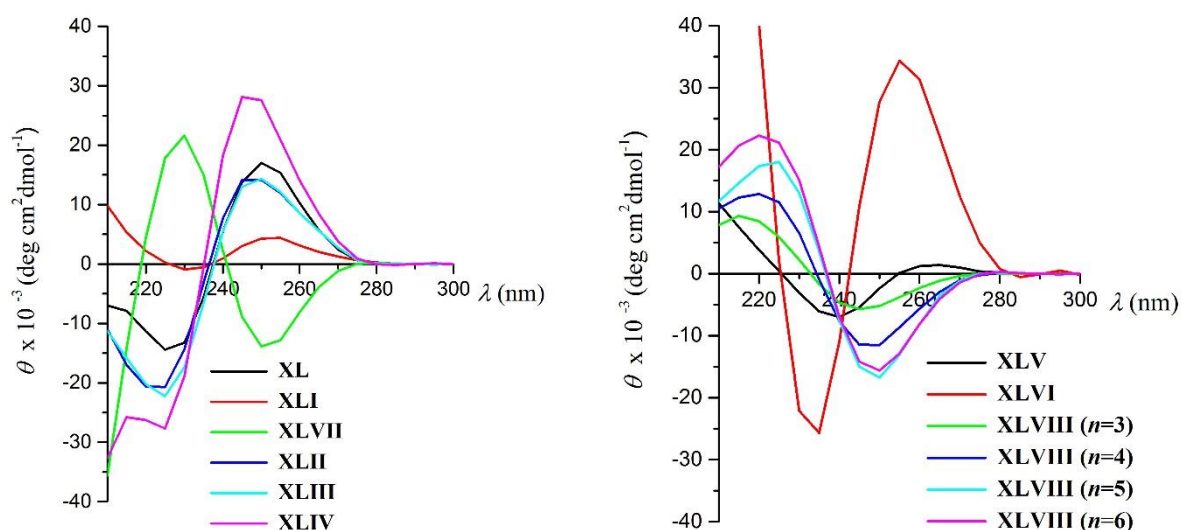


Slika 30. Enantiomerne (*gore*) i diastereoizomerne (*dolje*) uzvojnice i njihovi spektri CD (crtkane linije predstavljaju CD–signale konformera P– odnosno M–heličnosti, pune crte predstavljaju rezultatni spektar CD).

2.7.1. *p*–Bromobenzamidni senzor

Jedan od prvih primjera upotrebe aromatskog kromofora kao senzora heličnosti foldamera dali su Toniolo i suradnici koji su proučavali konformacijska svojstva peptida s inkorporiranim C α –metiliranim aminokiselinama.⁷⁴ U svojim su istraživanjima utvrdili kako se heličnost ovih peptida, u čijim otopinama dominira konformacija 3₁₀–heliksa, može odrediti praćenjem CD–aktivnosti u apsorpcijskom području *N*–terminalne *p*–bromobenzamidne zaštitne skupine ($\lambda = 210\text{--}300$ nm). Pritom su zaključili kako se u spektrima CD (slika 31.) oligomera koji preferiraju desnu uzvojnici: *p*BrBz–(Aib)₂–L–(α –Me)Val–(Aib)₂–OtBu (**XL**), *p*BrBz–(Aib)₂–D–(α –Me)Leu–(Aib)₂–OtBu (**XLI**), *p*BrBz–

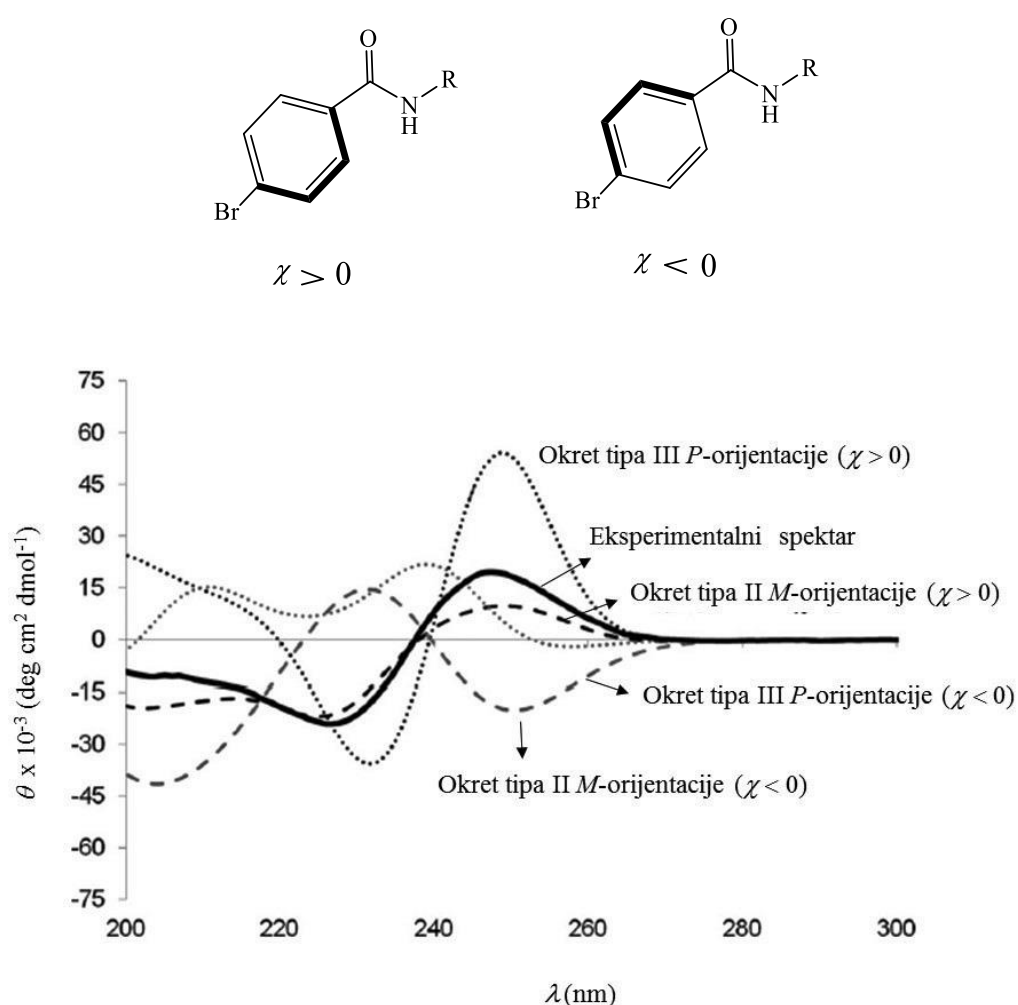
(Aib)₅-L-Leu-(Aib)₂-OMeu (**XLII**), *p*BrBz-(Aib-L-Ala)₃-OMe (**XLIII**), *p*BrBz-Aib-(L-Pro-Aib)₃-OMe (**XLIV**), *p*BrBz-[D-(α -Me)Leu]₄-OtBu (**XLV**) i *p*BrBz-[D-(α -Me)Phe]₄-OtBu (**XLVI**) opaža negativna vrpca pri približno 226 nm i pozitivan signal pri višoj valnoj duljini ($\lambda \sim 249$ nm). Vrpce suprotnog predznaka, pozitivna pri nižoj, a negativna pri višoj valnoj duljini, registrirane su u spektrima derivata kod kojih dominiraju uzvojnice lijeve orijentacije: *p*BrBz-(Aib)₂-L-(α -Me)Phe-(Aib)₂-OtBu (**XLVII**) i *p*BrBz-(D-Iva)_{*n*}-OtBu (**XLVIII**, *n* = 3–6). Nadalje, autori su pretpostavili kako intenzitet opaženih CD-signalâ ovisi o udjelu lijevo odnosno, desno orijentiranih uzvojnica prisutnih u konformerima pojedinog oligomera.



Slika 31. Cottonovi efekti u spektrima CD **XL–XLVIII**. Slika prema podacima iz ref.⁷⁴

Dvadesetak su godina kasnije Clayden i suradnici, tijekom istraživanja *N*-terminalne indukcije heličnosti u akiralnim peptidima, objavili su rezultate koji djelomično opovrgavaju Toniolove zaključke.⁷⁰ Utvrdili su kako CD-aktivnost u apsorpcijskom području *p*-bromobenzamidne zaštitne skupine nije indikator heličnosti peptidnog lanca ukoliko je na nju izravno vezana kiralna aminokiselina, vjerojatno zbog snažnijeg utjecaja konfiguracije aminokiseline, od smjera nabiranja peptidnog lanca, na aromatski kromofor. Spektri CD optimiziranih konformera dobiveni TD-DFT računima te izmjereni spektar peptida *p*BrBz-L-Val-(Aib)₄-Gly-NH₂ (**XLIX**) prikazani su na slici 32. Budući da su za konformere iste heličnosti peptidne okosnice izračunate CD-krivulje suprotnog predznaka, autori su kao ključni faktor koji određuje predznak Cottonova efekta u području 230–280 nm identificirali

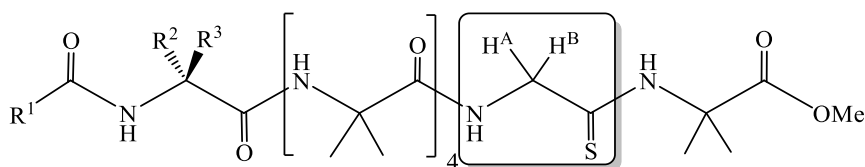
torzijski kut χ između fenilnog prstena i karbonilne skupine *p*-bromobenzamida. Drugim riječima, ako je na aromatski kromofor izravno vezana kiralna aminokiselina L-konfiguracije vrijednost kuta χ je pozitivna te se, neovisno o heličnosti peptidnog lanca, u spektru CD registrira pozitivan Cottonov efekt. Pritom vrijedi i suprotno, aminokiselina D-konfiguracije preferira negativnu vrijednost χ što rezultira negativnim intenzitetom CD-krivulje. Iako se ne može koristiti za određivanje heličnosti prethodno opisanih spojeva, autori su potvrdili preostale rezultate Toniolovih istraživanja te utvrdili kako je *p*-bromobenzamidni kromofor učinkovit senzor heličnosti oligomera ukoliko se ne nalazi u neposrednoj blizini kiralnih aminokiselina.



Slika 32. Torzijski kut χ (*gore*), izmjereni i izračunati spektri CD **XLIX** (*dolje*). Slika preuzeta i obrađena iz ref. ⁷⁰

2.7.2. Tionoglicinski senzor

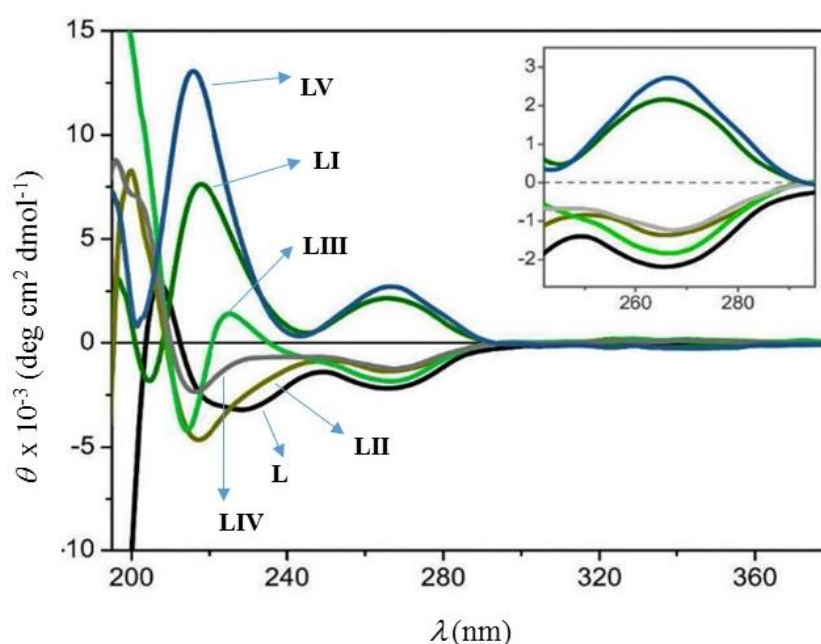
U nastavku istraživanja senzora za određivanje heličnih preferencija oligomera pomoću spektroskopije CD, Clayden i suradnici su u peptidne foldamere inkorporirali tionoglicinski ostatak $[-\text{HNCH}_2\text{C}(=\text{S})-]$.⁷⁵ Osim što je pogodan kao CD-senzor, zahvaljujući apsorpcijskom području koje je dovoljno udaljeno od CD-signala amidnih kromofora, tionoglicin sadrži i dvije diastereotopne ^1H jezgre što ga ujedno čini i potencijalnim NMR-senzorom. Ciljni peptidi (slika 33. i tablica 2.) dizajnirani su tako da je tionoglicin lociran u blizini C-terminusa i na dovoljnoj udaljenosti od najbližeg kiralnog ostatka, kako bi na njegovo kiralno okruženje utjecala isključivo heličnost peptidnog lanca.

Slika 33. Oligomeri **L–LV** s inkorporiranim tionoglicinskim senzorom (uokviren).Tablica 2. Ogranci i aminokiselinski ostaci u oligomerima **L–LV**.

Peptid	R ¹	R ²	R ³	L-AA
L	Me	H	<i>i</i> Pr	Val
LI	Me	Me	<i>i</i> Pr	(α -Me)Val
LII	OBn	H	<i>i</i> Pr	Val
LIII	OBn	H	Bn	Phe
LIV	OBn	H	Me	Ala
LV	OBn	Me	<i>i</i> Pr	(α -Me)Val

Na slici 34. prikazani su spektri CD foldamera **L–LV**. Unatoč lijevoj konfiguraciji *N*-terminalnog ostatka u spektrima je registriran različit predznak apsorpcijskih vrpca koje odgovaraju π - π^* prijelazu tioamidnog kromofora ($\lambda_{\text{max}} = 268 \text{ nm}$), **LI** i **LV** pokazuju pozitivan Cottonov efekt, dok su CD-signali **L** i **LII–LIV** negativnog predznaka. Ova su opažanja u skladu s literaturnim navodima prema kojima peptidi slijeda L-AA-Aib_n preferiraju *M*-helične strukture ukoliko je alfa-ugljikov atom kiralne aminokiseline tercijaran, a, *P*-helikse u slučaju kvaternih aminokiselina L-konfiguracije.^{70,71} Zaključno, pozitivan

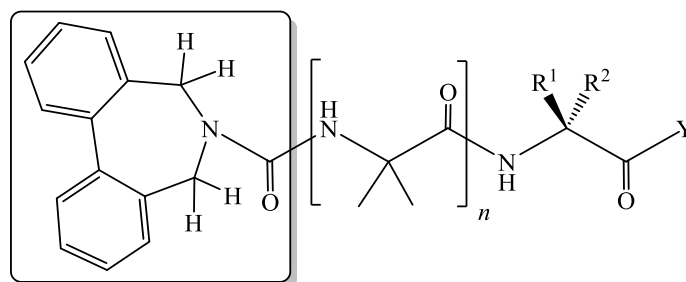
Cottonov efekt opaža se u spektrima foldamera u čijim su konformerima zastupljenije *P*-uzvojnice, dok će dominacija *M*-konformera rezultirati negativnim Cottonovim efektom u apsorpcijskom području tioamidnog kromofora. U nastavku istraživanja autori su korelirali izmjerenu molarnu eliptičnost s anizohronošću signala metilenskih protona (H^A i H^B) senzora u spektrima NMR jednadžbom: $\theta(268 \text{ nm}) = 10,6 \cdot \Delta\delta$ (u ppb). Time su otvorili mogućnost kvantificiranja konformacijskih preferencija oligomera mjerenjem signala u spektrima CD jer je $\Delta\delta$ vrijednost izravno povezana s “heličnim viškom” koji se zbog analogije s enantiomernim viškom definira kao $h. v. = \Delta\delta_{296 \text{ K}} / \Delta\delta_{213 \text{ K}} = (P - M) / (P + M)$.⁷⁶



Slika 34. Spektri CD foldamera L–LV. Slika preuzeta i obrađena iz ref.⁷⁵

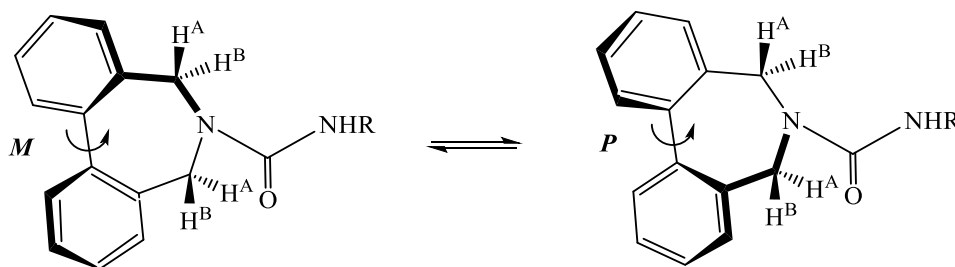
2.7.3. Dibenzazepinski senzor

Claydenova grupa predstavila je i najrecentniji primjer senzora za određivanje i kvantificiranje heličnosti peptidnog slijeda pomoću NMR u kombinaciji s spektroskopijom CD. Umetanjem dibenzazepinskog senzora na *N*-terminus te kiralnog aminokiselinskog ostatka na *C*-terminus oligomera α -amino izobutirične kiseline pripravili su kiralne foldamere LVI–LXVI (slika 35. i tablica 3.).⁷⁷

Slika 35. Oligomeri **LVI– LXVI** s *N*-terminalnim dibenzazepinskim senzorom.Tablica 3. Ogranci i aminokiselinski ostaci u oligomerima **LVI– LXVI**.

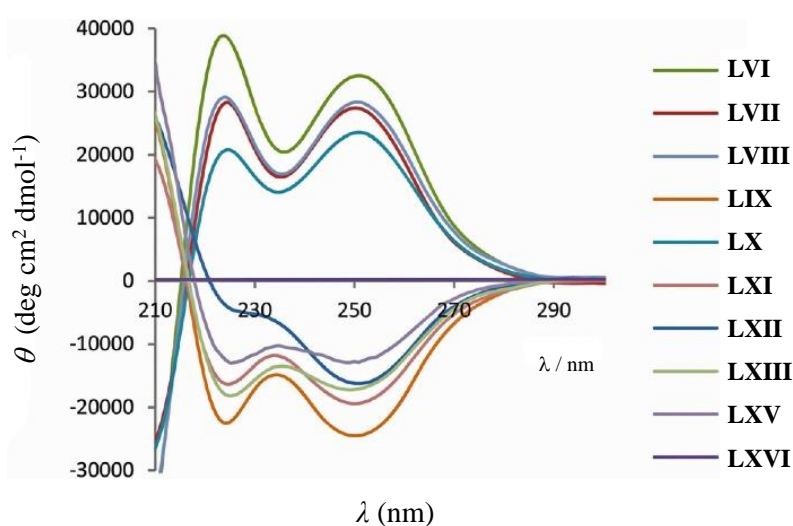
Peptid	<i>n</i>	AA	Y
LVI	4	L-Ala	NH <i>t</i> Bu
LVII	4	L-Phe	NH <i>t</i> Bu
LVIII	4	L- <i>t</i> -Leu	NH <i>t</i> Bu
LIX	4	L-Ala	O <i>t</i> Bu
LX	4	D-Ala	O <i>t</i> Bu
LXI	4	L-Val	O <i>t</i> Bu
LXII	4	L-Phe	O <i>t</i> Bu
LXIII	8	L-Ala	O <i>t</i> Bu
LXIV	11	L-Ala	O <i>t</i> Bu
LXV	12	L-Ala	O <i>t</i> Bu
LXVI	4	–	O <i>t</i> Bu

U odsutnosti kiralne informacije *P*- i *M*-konformeri biarilne podjedinice dibenzazepina (slika 36.) jednako su zastupljeni, no u kiralnoj okolini ove konformacije postaju nejednako populirane što dovodi do opažanja karakterističnog CD-signalu pri $\lambda = 250$ nm čiji je predznak koreliran s *M*- odnosno *P*-torzijom oko jednostruke veze koja spaja dva prstena. Pritom kiralno uređenje foldamernog slijeda u uzvojnici *P*-orijentacije inducira *M*-torziju i pozitivan Cottonov efekt u apsorpcijskom području senzora i suprotno.



Slika 36. Dibenzazepinski senzor.

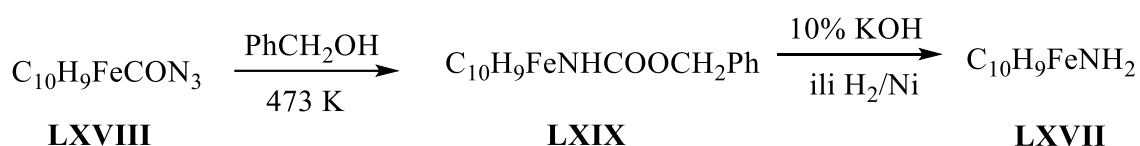
U spektrima CD (slika 37.) foldamera koji preferiraju *P*-orijentaciju uzvojnice (**LVI–LVIII** i **LX**) očekivano je opažen pozitivan Cottonov efekt, dok je signal suprotnog predznaka, koji ukazuje na dominaciju *M*-uzvojnica, registriran u spektrima **LIX** i **LXI–LXV**. Budući da intenzitet izmjerenog CD-signala **LVI–LXV** linearno raste s „heličnim viškom“ određenim pomoću ^{13}C -spektroskopije NMR autori su predložili jednadžbu pomoću koje je moguće kvantificirati helične preferencije foldamera izgrađenih od α -aminoizobutirične kiseline i to mjerenjem intenziteta CD-signala pri 250 nm: helični višak (%) = $100 \times \theta(250 \text{ nm}) / 41\,100$ (u metanolu). Nadalje, ukoliko je kiralna aminokiselina koja inducira dominaciju uzvojnica *P*- odnosno *M*-orijentacije dovoljno udaljena od dibenzazepinskog senzora, helični će višak biti izravno proporcionalan i razlici kemijskih pomaka neekvivalentnih H^{A} i H^{B} protona [h.v. (%) = $100 \cdot \Delta\delta(\text{ppb}) / 450$ (u metanolu)].

Slika 37. Spektri CD foldamera **LVI–LXVI**. Slika preuzeta i obrađena iz ref. ⁷⁷

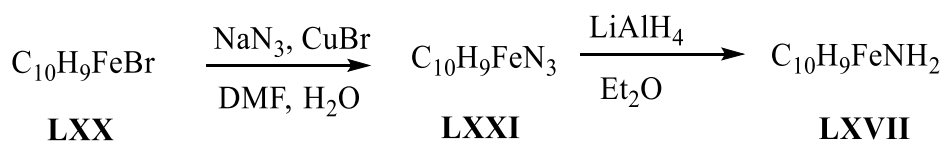
2.8. Priprava, svojstva i primjena aminoferocena

Početakom 1950-ih dvije su neovisne istraživačke skupine otkrile ferocen.⁷⁸ Iako se u početku pretpostavljalo kako su ciklopentadienilni prstenovi povezani s atomom željeza sigma-vezama ubrzo je predložena „sendvič“ struktura u kojoj su formalno stabilni 6π-elektronski ciklopentadienilni anioni delokaliziranom vezom vezani za željezov(II) ion. Funkcionalizirani derivati ferocena nalaze primjenu u raznim područjima istraživanja, a pritom se kao jedni od važnijih predstavnika mogu izdvojiti aminoferoceni koji se primjenjuju u sintezi bioorganometalnih konjugata i prolijekova, kao elektrokemijski i biosenzori te potencijalni antiparazitni i antikancerogeni lijekovi. Najjednostavniji predstavnik amino-funkcionaliziranih ferocena je aminoferocen (**LXVII**) koji se može pripremiti nekim od postupaka opisanim u literaturi:

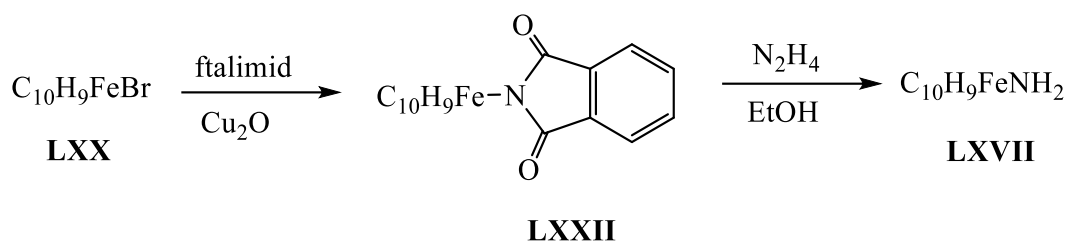
- (i) Hidroliza ili hidrogenoliza karbamata **LXIX** (96%) pripremljenog zagrijavanjem karboksazida **LXVIII** u benzilnom alkoholu (80%).^{79,80}



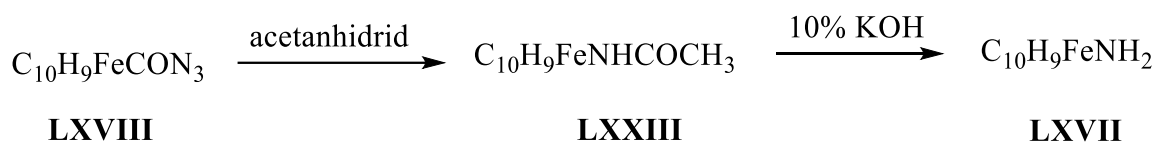
- (ii) Redukcijom bromoferocena (**LXX**) dobiva se azid **LXXI** koji se daljnom redukcijom s LiAlH_4 prevodi u aminoferocen (**LXVII**) u 72%-tnom iskorištenju.⁸¹



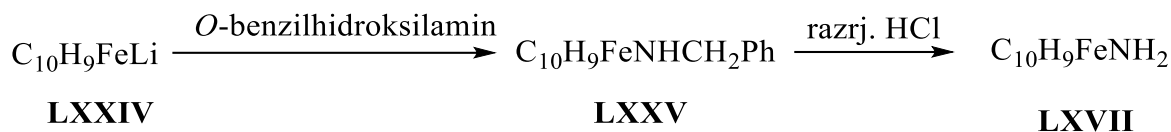
- (iii) Hidrazinolizom ftalimida **LXXII** (82%) pripremljenog iz ferocenil-bromida (**LXX**) i ftalimidbakra.⁸²



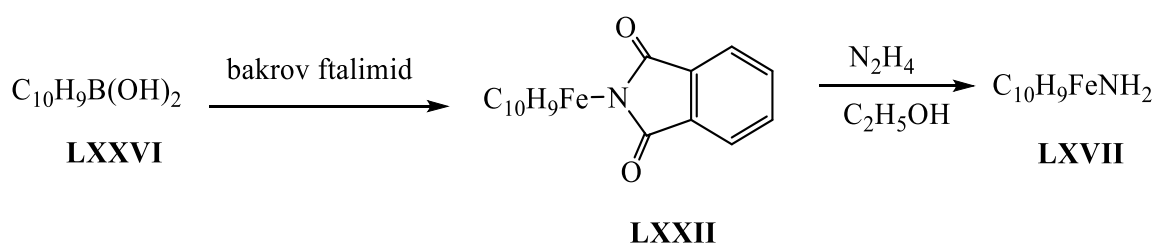
- (iv) Hidrolizom amida **LXXIII** (90%) dobivenog u reakciji acetanhidrida i karboksazida **LXVIII**.⁸³



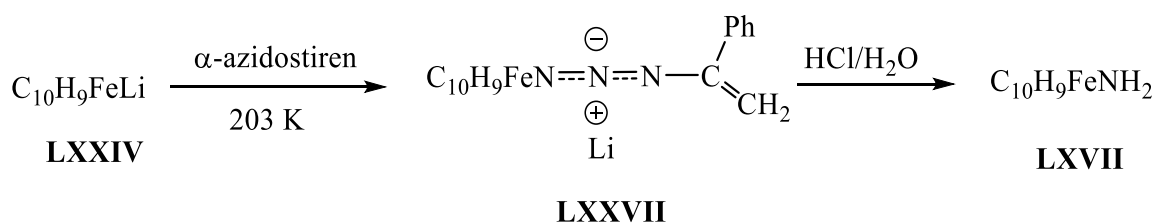
- (v) Tretiranjem **LXXV**, dobivenog u reakciji feroceni–litija (**LXXIV**) i *O*-benzilhidroksilamina, razrijeđenom klorovodičnom kiselinom pripravlja se **LXVII** u niskom iskorištenju (12–13%).⁸⁴



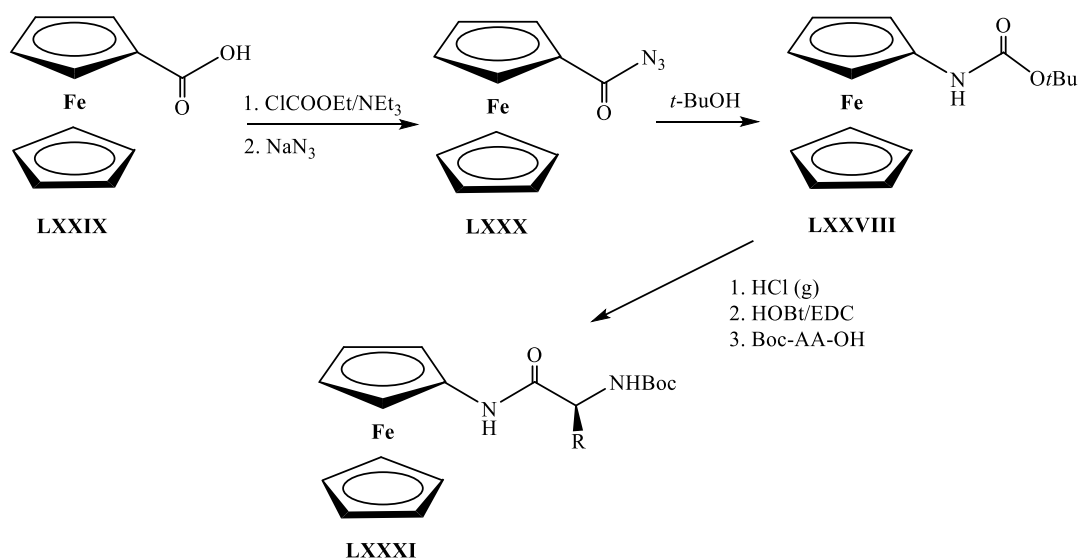
- (vi) Djelovanjem hidrazina na ftalimid **LXXII** (67%) dobiven iz kiseline **LXXVI**.⁸⁵



- (vii) Zakiseljavanjem azidostirena **LXXVII** (50%).⁸⁶



Budući da je aminoferocen (**LXVII**) nestabilan, kao polazni spoj za pripremu konjugata aminoferocena i aminokiselina (shema 1.) koristi se neki od njegovih *N*-zaštićenih derivata, najčešće *tert*-butil-ferocenilkarbamat (**LXXVIII**) koji se pripravlja iz ferocenkarboksilne kiseline (**LXXIX**).⁴⁰ Kiseline **LXXIX** prevodi se u azid **LXXX** koji Curtiusovim pregrađivanjem uz adiciju *t*-BuOH daje Boc-NH-Fc (**LXXVIII**). Deprotekcijom **LXXVIII** s pomoću plinovitog HCl nastaje hidroklorid Fc-NH₃Cl koji se obrađuje *in situ* sa suviškom Et₃N. Nastali aminoferocen (**LXVII**) potom se kopulira s Boc-zaštićenom aminokiselinom, prethodno aktiviranom HOBt/EDC protokolom, dajući aminokiselinske derivate **LXXXI**.

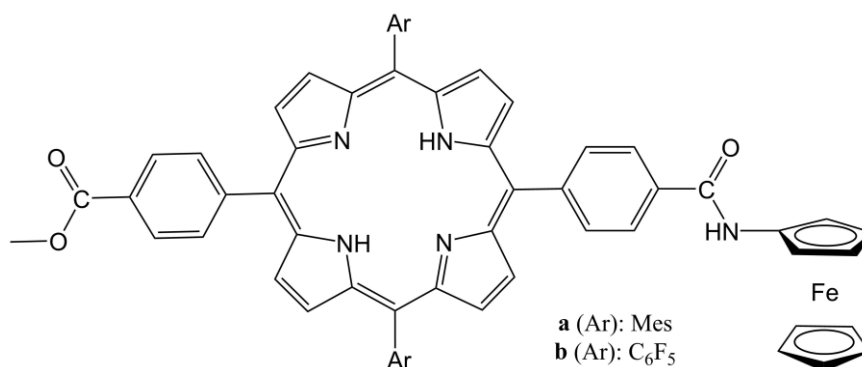


Shema 1. Postupak pripreme derivata aminoferocena i aminokiselina.

Osim za pripremu bioorganometalnih spojeva tipa **III** i dendrimera koji sadrže organometalne podjedinice koje mogu sudjelovati u reverzibilnim višeelektronskim redoks procesima, aminoferocen se zahvaljujući elektron-donorskim svojstvima koristi prilikom konstrukcije nelinearnih optičkih sustava, molekularnih žica i fotosintetskih modelnih sustava. Umjetni fotosintetski sustavi obično sadrže tri osnovne podjedinice: elektron-donorsku, elektron-akceptorsku i kromofornu. U te se sustave često ugrađuju porfirini koji se, unatoč donorskim i akceptorskim svojstvima, u reakcijskim centrima biomimetičkih modela koji sadrže ferocen ponašaju isključivo kao akseptori elektrona jer mnogi derivati ferocena mogu reducirati njihovo S1 pobuđeno stanje. Nedavno su Heinze i suradnici sintetizirali fotosintetske modelne sustave (trijade i tetrade) bazirane na amidno povezanim arhitekturama sa sljedećim građevnim blokovima: antrakinon-2-karboksilna kiselina kao akceptor elektrona, mezo

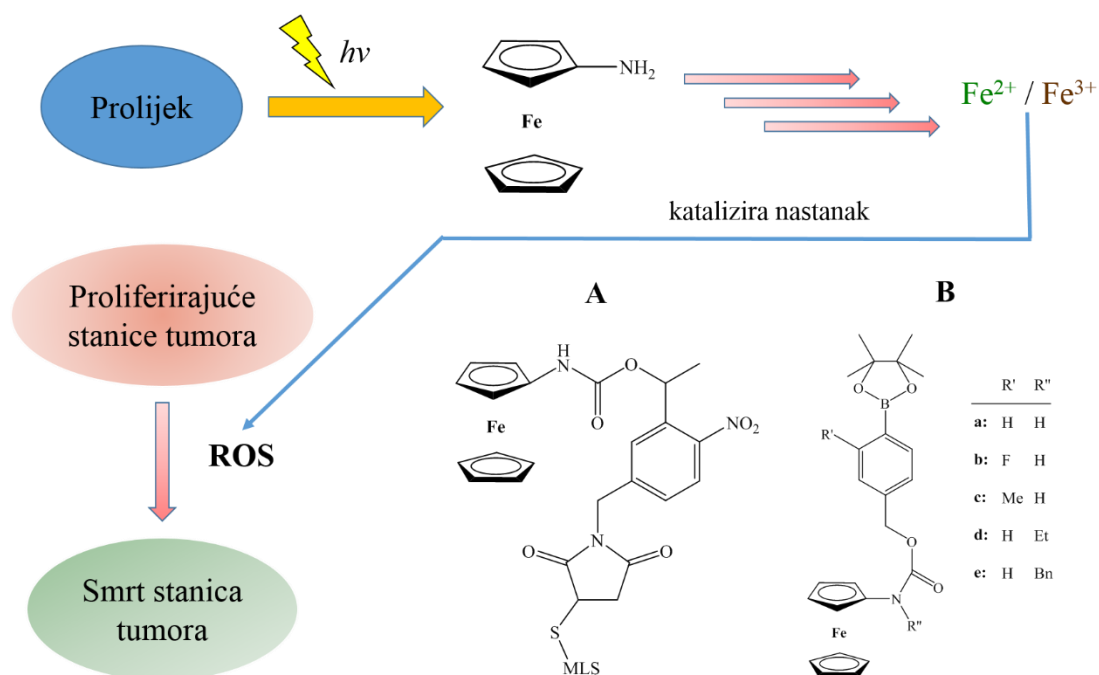
supstituirane porfirinske aminokiseline kao kromofori i aminoferocen kao donor elektrona.^{87,88}

Ti su konjugati pokazali drastično smanjenje kvantnog prinosa fluorescencije i vijeka pobuđenog stanja što je ukazalo da se fotoinducirani prijenos elektrona u tim sustavima odvija oksidativnim i reduktivnim putevima. U nastavku istraživanja reduktivnih puteva u umjetnim reakcijskim centrima ista je istraživačka skupina pripravila nove ferocenske derivate porfirina, jedan od njih (slika 38.) je s prilagodljivim elektronskim svojstvima. Rezultati proizašli iz proučavanja utjecaja supstituenata kao i nisko–temperaturnih eksperimenta potvrdili su kako je glavni put deaktivacije S1 pobuđenog stanja porfirina reduktivni fotoinducirani prijenos elektrona.



Slika 38. Fotosintetski modelni sustav s inkorporiranim aminoferocenom. Prikaz strukture preuzet iz ref.⁸⁸

Zahvaljujući stabilnosti i lipofilnosti, jednostavnoj funkcionalizaciji, elektrokemijskim svojstvima i najvažnije, niskoj toksičnosti brojni se derivati ferocena istražuju kao potencijalni terapeutici. Derivati aminoferocena koriste se u pripravi svjetlošću aktiviranih prolijekova. Nakon ozračivanja svjetlošću, iz prolijeka (slika 39., derivat **A**) oslobađa se aminoferocen koji se potom razgrađuje do Fe²⁺/ Fe³⁺ iona koji kataliziraju nastanak reaktivnih kisikovih vrsta (ROS).⁸⁹ Budući da je koncentracija ROS u stanicama raka često povišena, dodatne reaktivne vrste izazivaju oksidativni stres koji uzrokuje staničnu smrt. Sličan mehanizam djelovanja imaju i prolijekovi derivata **B**, koje u stanicama tumora aktivira vodikov peroksid te pokazuju bolju citotoksičnu aktivnost od hidroksiferocifena,^{90,91} ferocenskog derivata tamoksifena i ujedno jednog od najproučavanijih bioorganometalnih terapeutika.⁹²



Slika 39. Mehanizam djelovanja prolijekova. Slika preuzeta i obrađena iz ref.⁸⁹

Različiti derivati aminoferrocena koriste se u dizajnu selektivnih ionskih i molekularnih senzora koji ne samo da mogu pružiti uvid u fiziološku aktivnost bioloških sustava već nalaze primjenu i u procesima upravljanja otpadom i kontrole sigurnosti hrane. Kako bi se u ranoj dijagnostičkoj fazi povećala selektivnost, prilikom detekcije biomolekula povezanih s razvojem bolesti upotrebljava se metoda pojačanja signala. Zahvaljujući malim dimenzijama, relativnoj stabilnosti pri nižem potencijalu, lakoj funkcionalizaciji i dobro opisanim redoks-svojstvima, aminoferocen se ugrađuje u bisenzore kao signalna molekula koja pojačava elektrokemijski signal.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

Svi novi spojevi pripremljeni u okviru ove doktorske disertacije karakterizirani su pomoću infracrvene (IR) spektroskopije, nuklearne magnetske rezonance (NMR) i masene (MS) spektrometrije

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

IR spektri uzoraka snimljeni su na spektrofotometru Bomem MB 100 Mid FT u kalijevu bromidu ili CH_2Cl_2 .

Spektri ^1H -NMR i ^{13}C -NMR određeni su u deuteriranom DMSO, diklormetanu ili njihovoj smjesi na spektrometrima Bruker AV300, Bruker AV600 (Institut Ruđer Bošković) ili Bruker Advance DRX 400 (Prirodoslovno–matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu) uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm.

Spektri cirkularnog dikroizma snimljeni su na spektropolarimetru J-815 (Jasco), pri 25 °C u kvarcnim kivetama optičkog puta 1 cm u CH_2Cl_2 , smjesama CH_2Cl_2 i DMSO, te u kalijevu bromidu. Molarna eliptičnost (θ) izražena je u $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$.

HRMS–spektri (MALDI ionizacija) izmjereni su u Centru za proteomiku i spektrometriju masa Instituta Ruđer Bošković.

Optička skretanja određena su pri sobnoj temperaturi na instrumentu Schmidt + Haensch Polartronic NH8.

Sinteza potpomognuta mikrovalovima provedena je u mikrovalnom reaktoru Milestone Start S.

Podaci za određivanje strukture rendgenskom strukturnom analizom na jediničnim kristalima **9**, **10**, **20** i **21** prikupljeni su pomoću Rigaku SuperNova Dual difraktometra na Fakultetu za kemiju i kemijsku tehnologiju Sveučilišta u Ljubljani. Monokristal **13** mjereno je na difraktometru Oxford Diffraction Xcalibur3 na Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pri čemu je korišteno grafitno monokromatsko Mo K α zračenje.

Konformacijska analiza primjenom računalnih metoda napravljena je hijerarhijski. U prvom stupnju korištene su molekulske–mehaničke metode, a zatim DFT metode (program Gaussian16) korištenjem B3LYP i M06–2X funkcionala uz kombinaciju osnovnih skupova u suradnji s doc. dr. sc. Ivanom Kodrinom s Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.⁹³

Svi kupovni reagensi korišteni u sintezi bili su analitičke čistoće, prekursori su pripremljeni literaturno opisanim postupcima,³¹ a otapala pročišćena standardnim postupcima.⁹⁴ Napredak reakcije i čistoća pripremljenih spojeva ispitivani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel) s fluorescentnim indikatorom (254 nm). Ciljni spojevi pročišćeni su preparativnom tankoslojnom kromatografijom na silikagelu (“Merck”, Kieselgel 60 HF₂₅₄) uporabom diklormetana, etil–acetata ili njihovih smjesa.

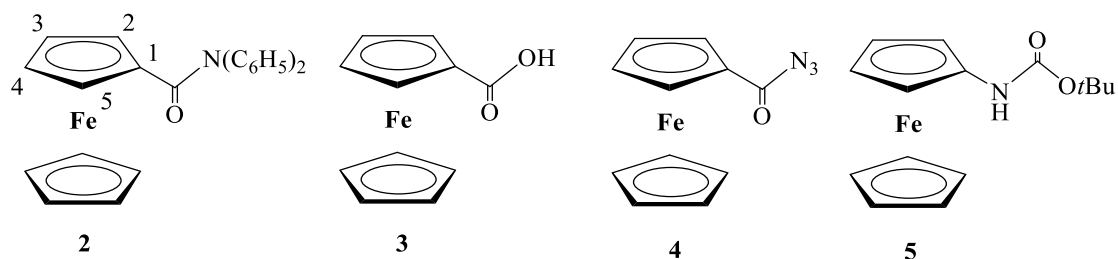
Konformacijska analiza svih ciljnih spojeva provedena je spektroskopskim mjerenjima (IR, NMR i CD):

- Prisutnost slobodnih kao i NH–skupina koje sudjeluju u vodikovim vezama, indicirana je apsorpcijskim vrpčama iznad odnosno ispod 3400 cm⁻¹ u IR–spektrima. Koncentracijski–neovisni IR–spektri sugeriraju prisutnost konformacija stabiliziranih unutarmolekulskim vodikovim vezama.
- Amidni protoni uključeni u vodikove veze identificirani su visokim kemijskim pomacima ($\delta > 7$ ppm) u spektrima NMR, a unutarmolekulski karakter veza indiciraju koncentracijski–neovisni spektri NMR.
- Visoki temperaturni koeficijenti koncentracijski–neovisnih protona sugeriraju njihovu inicijalnu zaklonjenost od otapala kao i izloženost otapalu pri višim temperaturama uslijed odmotavanja uređenih struktura.
- Jakost pretpostavljenih IHB testirana je titracijom s DMSO, pri čemu kemijski pomaci protona uključenih u jake IHB ostaju gotovo konzervirani u prisutnosti kompetitivskog otapala.
- Prostorna bliskost protona međusobno udaljenih u primarnom slijedu, do koje dolazi nabiranjem peptidnog lanca, utvrđena je NOESY–spektroskopijom.

- Najstabilnije konformacije ciljnih spojeva utvrđene su računalnim modeliranjem pomoću teorije funkcionala gustoće (DFT) te su teorijski nalazi uspoređeni s eksperimentalnim podacima.
- Perturbacija inherentno akiralnog ferocenskog kromofora izazvana kiralnim uređenjem peptidnog slijeda ispitana je spektroskopijom CD.

3.2. Sinteza ferocenkarboksilne kiseline (3), *tert*-butil-ferocenilkarbamata (5) i pripadajućih prekursora

Ferocenski prekursori (slika 40.), ferocenkarboksilna kiselina (3) i *tert*-butil-ferocenilkarbamata (5), za sintezu ciljnih spojeva pripremljeni su literaturno opisanim postupcima počevši iz ferocena (1).³¹



Slika 40. Strukturne formule ferocenkarboksilne kiseline (3), *tert*-butil-ferocenilkarbamata (5) i pripadajućih prekursora.

3.2.1. *N,N*-difenilkarbamoil-ferocen (2)

Otopini aluminijevog klorida (3,58 g, 26,8 mmol) u dikloretanu (25 mL) doda se otopina difenilkarbamoil-klorida (6,23 g, 26,8 mmol) u istom otapalu (25 mL). Reakcijskoj se smjesi, nakon 10 minuta miješanja, dokapa otopina ferocena (1, 5 g, 26,8 mmol) u dikloretanu (25 mL) i započne s refluksiranjem. Nakon što se TLC-om (CH₂Cl₂) utvrdi da je sav ferocen (1) izreagirao, reakcijska se smjesa upari na rotacijskom vakuum uparivaču. Zaostali talog otopi se u diklormetanu, profiltrira, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Dobiveno je 7,5 g (73%) tamno crvenog praha 2 koji je bez pročišćavanja korišten u sljedećem reakcijskom stupnju.

3.2.2. Ferocenkarkoboksilna kiselina (**3**)

Otopina **2** (7,5 g, 19,7 mmol) u etanolu (280 mL) refluksira se u prisutnosti kalijevog hidroksida (70 g, 1,25 mol) dok se TLC-om (10:01, CH₂Cl₂:C₄H₈O₂) ne utvrdi kako je sav supstrat izreagirao. Potom se reakcijska smjesa upari, prelije u čašu s hladnom vodom, filtrira i zakiseljava s koncentriranom klorovodičnom kiselinom. Istaloženi narančasti kristali **3** (3 g, 13,1 mmol, 66%) odsišu se Buchnerovom lijevku, $t_f = 153\text{--}155\text{ }^\circ\text{C}$.

IR (CH₂Cl₂) $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3347 sr (O–H), 1651 j (C=O), 1473 sr (C=C arom), 1280 sr (δ O–H), 1158 sl (C–C).

¹H–NMR (250 MHz, 295 K, CDCl₃, δ / ppm): 4,85 (t, 2H, H–2, H–5), 4,46 (t, H–3, H–4), 4,25 (s, 5H, C_pnesupstituirani).

3.2.3. Ferocenkarkoboksazid (**4**)

Otopini ferocenkarkoboksilne kiseline (**3**, 3 g, 13,1 mmol) u acetonu (30 ml) doda se voda (2 ml). Reakcijskoj smjesi, ohlađenoj na 0 °C pomoću smjese leda i vode, polaganim dokapavanjem dodaje se otopina trietilamina (1515 mg, 15 mmol) u acetonu (6 ml), a zatim i otopina etil–kloroformijata (1820 mg, 16,7 mmol) u acetonu (6 ml). Miješanje se nastavlja pri istoj temperaturi dok se TLC-om (CH₂Cl₂) ne utvrdi kako je sav supstrat izreagirao u mješoviti anhidrid. Potom se reakcijskoj smjesi dodaje otopina natrijeva azida (1,7 g, 19,7 mmol u 4 ml vode) i nastavi s miješanjem dok TLC (CH₂Cl₂) ne pokaže da je sav reaktant izreagirao. Nastala reakcijska smjesa razrijedi se hladnom vodom, ekstrahira diklormetanom, ispere 5%–tnom zasićenom otopinom NaHCO₃ i zasićenom otopinom NaCl. Osuši se bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Dobiveno je 1,27 g (4,98 mmol, 43%) crvenih kristala, $t_f = 101\text{--}102\text{ }^\circ\text{C}$.

IR (CH₂Cl₂) $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 2138 sr (N₃), 1687 j (C=O, CON₃).

¹H–NMR (CDCl₃) δ / ppm: 4,83 (s, 2H, H–2, H–5), 4,52 (s, 2H, H–3, H–4), 4,27 (s, 5H, C_pnesupstituirani).

3.2.4. tert–Butil–ferocenilkarbamat (**5**)

3.3.1.1. Boc-L-Ala-NH-Fc (6)

Prema općem postupku opisanom u 3.3.1, kopulacijom deprotektiranog Boc-zaštićenog aminoferocena (**5**) (400 mg, 1,33 mmol) i Boc-L-Ala-OH (503,3 mg, 2,66 mmol), aktiviranog primjenom EDC (562 mg, 2,93 mmol)/ HOBt (396 mg, 2,93 mmol) protokola, dobiveno je 416 mg (1,12 mmol, 84%) **6** u obliku žutog praha.

$t_f = 68-70\text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,65$ (CH_2Cl_2 : EtOAc = 10:1).

IR (CH_2Cl_2): $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3425 sr ($\text{NH}_{\text{slobodni}}$), 3336 sl ($\text{NH}_{\text{asocirani}}$), 1697 sl ($\text{C}=\text{O}_{\text{COOtBu}}$).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ/ppm : 6,83 (šs, 1H, NH_{Fc}), 5,55 (šs, 1H, NH_{Ala}), 5,20–4,10 (m, 9H, H_{Fc}), 3,95 (šs, 1H, CH_{Ala}), 1,47 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,28 (d, $J=6,2\text{ Hz}$, 3H, CH_3_{Ala}).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO) δ/ppm : 9,28 (s, 1H, NH_{Fc}), 7,00 (d, $J=6,8\text{ Hz}$, 1H, NH_{Ala}), 4,61 (s, 2H, H-2', H-5', Fc), 4,09 (s, 5H, $\text{Cp}_{\text{nesupstituirani}}$), 3,93 (s, 3H, CH_{Ala} , H-3', H-4', Fc), 1,39 (s, 9H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,20 (d, $J=7,08\text{ Hz}$, 3H, CH_3_{Ala}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO) δ/ppm : 171,5 (CO_{Ala}), 155,3 (COO_{tBu}), 95,6 (C-1', Fc), 78,2 ($\text{Cq}(\text{CH}_3)_3$), 68,9 ($\text{Cp}_{\text{nesupstituirani}}$), 63,9 (C-3', Fc), 63,8 (C-4', Fc), 60,9 (C-2', Fc), 60,6 (C-5', Fc), 50,4 (CH_{Ala}), 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 18,0 (CH_3_{Ala}).

3.3.1.2. Boc-D-Ala-NH-Fc (7)

Prema općem postupku opisanom u 3.3.1, kopulacijom deprotektiranog Boc-zaštićenog aminoferocena (**5**) (400 mg, 1,33 mmol) i Boc-D-Ala-OH (503,3 mg, 2,66 mmol), aktiviranog primjenom EDC (562 mg, 2,93 mmol)/ HOBt (396 mg, 2,93 mmol) protokola, dobiveno je 450 mg (1,21 mmol, 91%) **7** u obliku žutog praha. [$R_f = 0,7$; 10:01 (diklormetan : etil-acetat)].

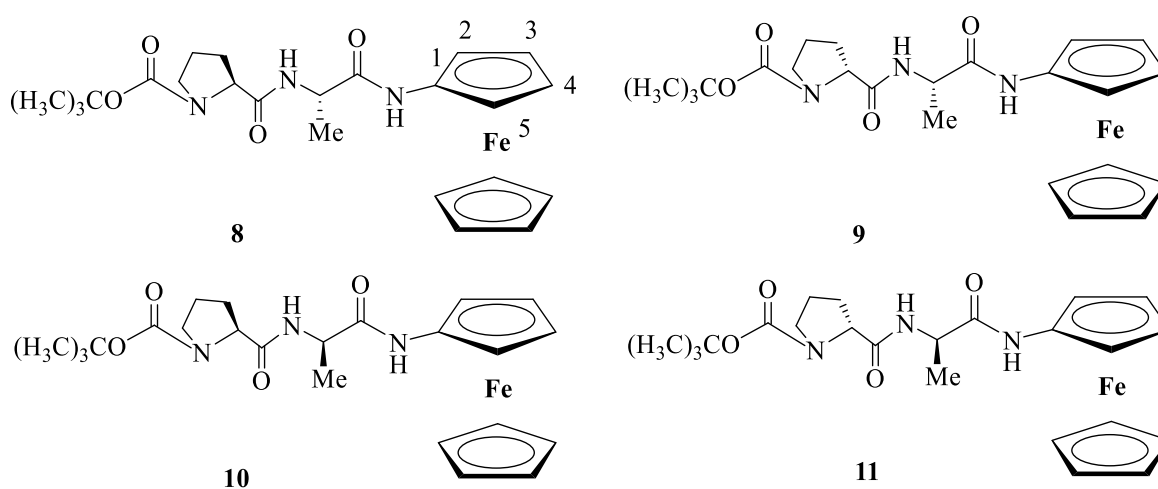
Dobiveni su identični spektri kao kod enantiomera (**6**)

3.3.2. Sinteza ferocenskih dipeptida **8-11** – opći postupak

U otopinu odgovarajućeg Boc-zaštićenog ferocenskog amida **6** ili **7** (1 ekv.) u suhom diklormetanu ohlađenu na $0\text{ }^\circ\text{C}$ uvodi se 2 sata suhi plinoviti HCl. Nakon uparivanja

rezultirajući se hidroklorid suspendira u suhom diklormetanu i otopi uz dodatak Et_3N do pH ~ 8. Ta se otopina slobodne baze doda otopini odgovarajuće Boc-AA-OH (2 ekv., AA = L-Pro, D-Pro) u diklormetanu [prethodno aktiviranoj standardnim postupkom HOBt (2,2 ekv.)/EDC (2,2 ekv)]. Reakcijska se smjesa miješa pri sobnoj temperaturi 2–4 sata, a kopulaciju se prati tankoslojnom kromatografijom. Nastali produkti obrađuju se i čiste na sličan način kao ferocenski amidi **6** i **7** (3.3.1)

Prethodno opisanim postupkom pripravljeni su ferocenski dipeptidi **8–11** (slika 42.). Količine prekursora, reagenasa, iskorištenje kopulacija i opis produkta navedeni su u tablici 4.



Slika 42. Strukturne formule ferocenskih dipeptida **8–11**.

Tablica 4. Prekursori i reagensi korišteni za pripravu su ferocenskih dipeptida **8–11**, iskorištenja kopulacija i opis produkta.

Produkt	Supstrat (masa / mg, množina / mmol)	Aminokiselina (masa / mg, množina / mmol)	Reagensi za kopulaciju (masa / mg, množina / mmol)		Dobivena masa (mg, iskorištenje %)	Opis produkta
			EDC	HOBt		
8	6 (400 mg, 1,08 mmol)	Boc-L-Pro- OH (465 mg, 2,16 mmol)	(456 mg, 2,38 mmol)	(322 mg, 2,38 mmol)	375 mg (74%)	Žuti prah
9	6 (400 mg, 1,08 mmol)	Boc-D-Pro- OH (465 mg, 2,16 mmol)	(456 mg, 2,38 mmol)	(322 mg, 2,38 mmol)	369 mg (73%)	Žuti prah
10	7 (400 mg, 1,08 mmol)	Boc-L-Pro- OH (465 mg, 2,16 mmol)	(456 mg, 2,38 mmol)	(322 mg, 2,38 mmol)	365 mg (72%)	Žuti prah
11	7 (400 mg, 1,08 mmol)	Boc-D-Pro- OH (465 mg, 2,16 mmol)	(456 mg, 2,38 mmol)	(322 mg, 2,38 mmol)	420 mg (83%)	Žuti prah

3.3.2.1. Boc-L-Pro-L-Ala-NH-Fc (8)

$t_i = 86 - 88 \text{ }^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -102$ ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, MeOH), $R_f = 0,45$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{EtOAc} = 10:1$).

IR (CH₂Cl₂): $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3420 sl (NH_{slobodni}), 3318 sr (NH_{asocirani}), 1676 j (amid I), 1557 j (amid II), 1541 j (amid II), 1506 j (amid II).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 8,23 (s, 0,84H, NH_{Fc-trans}), 8,05 (šs, 0,16H, NH_{Fc-cis}), 6,79 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, NH_{Ala}), 4,76 (šs, 1H, H-2, Fc), 4,58 (s, 1H, H-5, Fc), 4,48 (m, 1H, CH_{Ala}), 4,30 (m, 1H, CH _{α Pro}), 4,13 (s, 5H, Fc), 3,96 (šs, 1H, H-3, Fc), 3,95 (šs, 1H, H-4, Fc), 3,53–3,41 (m, 2H, CH _{δ Pro}), 2,2–2,14 (m, 2H, CH _{β Pro}), 1,96–1,88 (m, 2H, CH _{γ Pro}), 1,5 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,41 [d, $J = 7$ Hz, 3H, CH₃(Ala)].

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 172,3 (CO_{Pro}), 170,3 (CO_{Ala}), 156,2 (COO_{tBu}), 94,5 (C-1), 81,2 [Cq(CH₃)₃], 69,3 (Cp), 64,7 (C-3, Fc), 64,4 (C-4, Fc), 61,9 (C-2, Fc), 61,3 (CH _{α Pro}), 61,0 (C-5, Fc), 49,8 (CH_{Ala}), 47,6 (CH _{δ Pro}), 29,4 (CH _{β Pro}), 28,5 (C(CH₃)₃), 24,8 (CH _{γ Pro}), 17,8 (CH₃Ala).

HRMS(MALDI): izračunato za C₂₃H₃₁N₃O₄Fe 469,1658, izmjereno 469,1666.

3.3.2.2. Boc-D-Pro-L-Ala-NH-Fc (9)

$t_r = 181 - 183$ °C; $[\alpha]_D^{22} = +21$ ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³, CHCl₃), $R_f = 0,45$ (CH₂Cl₂ : EtOAc = 10:1).

IR (CH₂Cl₂): $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3422 sl (NH_{slobodni}), 3322 sr (NH_{asocirani}), 1676 j (amid I), 1672 j (amid I), 1557 j (amid II), 1541 j (amid II), 1509 j (amid II).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 8,16 (šs, 1H, NH_{Fc}), 6,94 (šs, 0,7H, NH_{Ala-trans}), 6,74 (šs, 0,3H, NH_{Ala-cis}), 4,63 (s, 2H, H-2, H-5, Fc), 4,55 (šs, 1H, CH_{Ala}), 4,23 (dd, $J = 7,9$ Hz, 1H, CH _{α Pro}), 4,12 (s, 5H, Fc), 3,96 (šs, 2H, H-3, H-4, Fc), 3,55–3,36 (m, 2H, CH _{δ Pro}), 2,26–2,05 (m, 2H, CH _{β Pro}), 2,01–1,85 (m, 2H, CH _{γ Pro}), 1,47 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,43 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H, CH₃Ala).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 173,0 (CO_{Pro}), 170,1 (CO_{Ala}), 155,6 (COO_{tBu}), 94,6 (C-1), 81,0 [Cq(CH₃)₃], 69,4 (Cp), 64,7 (C-3, Fc), 64,6 (C-4, Fc), 61,9 (C-2, Fc), 61,8 (C-5, Fc), 61,0 (CH _{α Pro}), 49,7 (CH_{Ala}), 47,5 (CH _{δ Pro}), 29,5 (CH _{β Pro}), 28,7 (C(CH₃)₃), 24,7 (CH _{γ Pro}), 17,3 (CH₃Ala).

HRMS(MALDI): izračunato za C₂₃H₃₁N₃O₄Fe 469,1658, izmjereno 469,1666.

Kristalografski podaci (CCDC 1451211): $C_{23}H_{31}FeN_3O_4$, $M = 469,37$, monoklinski kristalni sustav, $a = 10,2054(3)$, $b = 9,8647(3)$, $c = 12,1534(3)$ Å, $b = 106,110(3)$, $U = 1175,48(6)$ Å³, $T = 293$ K, prostorna grupa $P2_1$ (broj 4), $Z = 2$, 12663 očitanih refleksija, 4803 jedinstvenih ($R_{int} = 0,0489$), koje su korištene u izračunima. Konačni $R(F)$ ($F_o > 4\sigma(F_o)$) iznosi 0,0446 (0,0526 za sve podatke) i $wR(F^2)$ iznosi 0,1165 (svi podaci).

3.3.2.3. Boc-L-Pro-D-Ala-NH-Fc (10)

Dobiveni su identični spektri kao kod enantiomera (9).

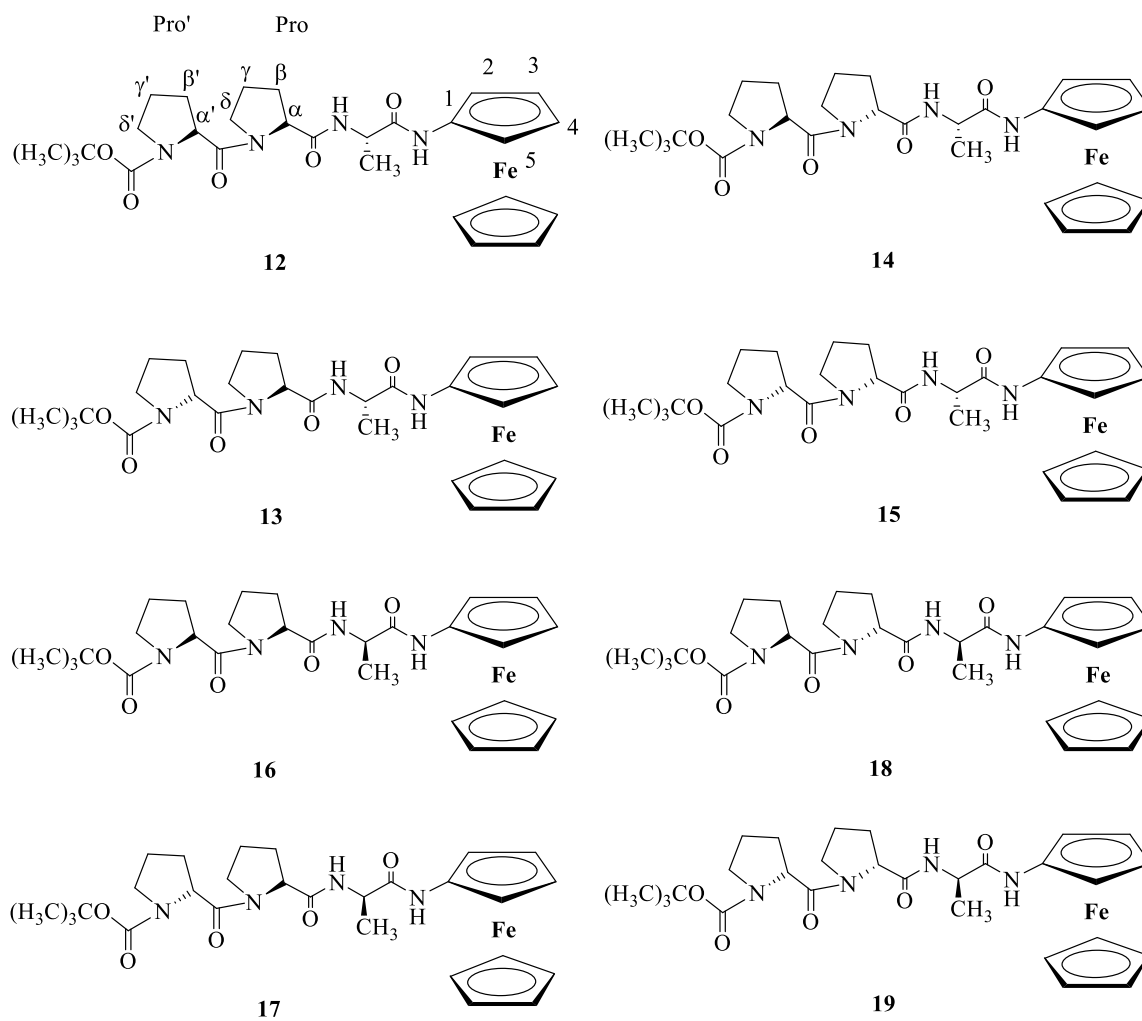
Kristalografski podaci (CCDC 1451212): $C_{23}H_{31}FeN_3O_4$, $M = 469,37$, monoklinski kristalni sustav, $a = 10,19847(19)$, $b = 9,8577(2)$, $c = 12,1563(2)$ Å, $b = 106,1489(19)$, $U = 1173,90(4)$ Å³, $T = 293$ K, prostorna grupa $P2_1$ (broj 4), $Z = 2$, 6598 očitanih refleksija, 3441 jedinstvenih ($R_{int} = 0,0481$), koje su korištene u izračunima. Konačni $R(F)$ ($F_o > 4\sigma(F_o)$) iznosi 0,0544 (0,0599 za sve podatke) i $wR(F^2)$ iznosi 0,1505 (svi podaci).

3.3.2.4. Boc-D-Pro-D-Ala-NH-Fc (11)

Dobiveni su identični spektri kao kod enantiomera (8).

3.3.3. Sinteza ferocenskih tripeptida 12–19 – opći postupak

Na sličan način kao u postupku 3.3.2 kopulacijom *N*-deprotektiranih dipeptida **8–11** (1 ekv.) i odgovarajuće Boc-AA-OH (2 ekv., AA = L-Pro, D-Pro), prethodno aktivirane dodatkom HOBt (2,2 ekv.) i EDC (2,2 ekv.), sintetizirani su tripeptidi **12–19** (slika 43.). Količine upotrijebljenih prekursora, reagenasa, iskorištenje kopulacija i opis produkta navedeni su u tablici 5.



Slika 43. Strukturne formule ferocenskih tripeptida 12–19.

Tablica 5. Prekursori i reagensi korišteni za pripravu su ferocenskih tripeptida **12–19**, iskorištenja kopulacija i opis produkta.

Produkt	Supstrat (masa / mg, množina / mmol)	Aminokiselina (masa / mg, množina / mmol)	Reagensi za kopulaciju (masa / mg, množina / mmol)		Dobivena masa (mg, iskorištenje %)	Opis produkta
			EDC	HOBt		
12	8 (188 mg, 0,40 mmol)	Boc–L–Pro– OH (172 mg, 0,8 mmol)	(169 mg, 0,88 mmol)	(119 mg, 0,88 mmol)	216 mg (95%)	Žuti prah
13	8 (188 mg, 0,40 mmol)	Boc–D–Pro– OH (172 mg, 0,8 mmol)	(169 mg, 0,88 mmol)	(119 mg, 0,88 mmol)	216 mg (95%)	Žuti prah
14	9 (185 mg, 0,39 mmol)	Boc–L–Pro– OH (168 mg, 0,78 mmol)	(165 mg, 0,86 mmol)	(116 mg, 0,86 mmol)	220 mg (97%)	Žuti prah
15	9 (185 mg, 0,39 mmol)	Boc–D–Pro– OH (168 mg, 0,78 mmol)	(165 mg, 0,86 mmol)	(116 mg, 0,86 mmol)	205 mg (90%)	Žuti prah
16	10 (185 mg, 0,39 mmol)	Boc–L–Pro– OH (168 mg, 0,78 mmol)	(165 mg, 0,86 mmol)	(116 mg, 0,86 mmol)	188 mg (83%)	Žuti prah

17	10 (185 mg, 0,39 mmol)	Boc-D-Pro- OH (168 mg, 0,78 mmol)	(165 mg, 0,86 mmol)	(116 mg, 0,86 mmol)	162 mg (71%)	Žuti prah
18	11 (210 mg, 0,45 mmol)	Boc-L-Pro- OH (194 mg, 0,90 mmol)	(190 mg, 0,99 mmol)	(134 mg, 0,99 mmol)	141 mg (62%)	Žuti prah
19	11 (210 mg, 0,45 mmol)	Boc-D-Pro- OH (194 mg, 0,90 mmol)	(190 mg, 0,99 mmol)	(134 mg, 0,99 mmol)	160 mg (71%)	Žuti prah

3.3.3.1. Boc-L-Pro-L-Pro-L-Ala-NH-Fc (**12**)

$t_f = 181 - 183$ °C, $R_f = 0,45$ (EtOAc).

IR (CH₂Cl₂): $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3410 sr (NH_{slobodni}), 3317 sr (NH_{asocirani}), 1682 sl (amid I), 1618 sr (amid I), 1556 sr (amid II), 1528 sr (amid II).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta/$ ppm: 8,26 (s, 1 H, NH_{Fc}), 7,66 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, NH_{Ala}), 4,86 (s, 1H, H-2, Fc), 4,79 (s, 1H, H-5, Fc), 4,6–4,56 (m, 1H, CH _{α Pro}), 4,51–4,44 (m, 2H, CH _{α Pro'}, CH_{Ala}), 4,15 (s, 5H, Fc), 3,93 (s, 1H, H-3, Fc), 3,92 (s, 1H, H-4, Fc), 3,64–3,60 (m, 2H, CH _{δ Pro'}), 3,40–3,37 (m, 2H, CH _{δ Pro}), 2,47–2,40 (m, 1H, CH _{β Pro'}), 2,38–2,30 (m, 1H, CH _{β Pro}), 2,11–2,05 (m, 1H, CH _{γ Pro}), 2,05–1,91 (m, 1H CH _{β Pro}, 1H CH _{β Pro'}, 1H CH _{γ Pro}, 2H CH _{γ Pro'}), 1,49 (šs, 3H, CH_{3Ala}), 1,46 (s, 9H, CH_{3Boc}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) $\delta/$ ppm: 172,1 (CO_{Pro'}), 171,4 (CO_{Pro}), 170,7 (CO_{Ala}), 154,9 (CO_{Boc}), 95 (C-1), 81,0 (C_{qBoc}), 69,3 (Cp), 64,4 (C-3, Fc), 64,3 (C-4, Fc), 62,4 (CH _{α Pro}), 62,3 (CH _{α Pro'}), 61,7 (C-2, Fc), 61,6 (C-5, Fc), 49,8 (CH_{Ala}), 47,0 (CH _{δ Pro'}), 46,8 (CH _{δ Pro}), 29,1 (CH _{β Pro'}), 28,6 (CH _{β Pro}), 28,5 (CH_{3Boc}), 24,8 (CH _{γ Pro'}), 26,1 (CH _{γ Pro}), 17,5 (CH_{3Ala}).

HRMS(MALDI): izračunato za $C_{28}H_{38}N_4O_5Fe$ 566,2191, izmjereno 566,2198.

3.3.3.2. Boc-D-Pro-L-Pro-L-Ala-NH-Fc (13)

$t_r = 179 - 180$ °C, $R_f = 0,45$ (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2): $\tilde{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 3323 sr ($NH_{asocirani}$), 1667 sl (amid I), 1651 sl (amid I), 1558 sr (amid II), 1540 sr (amid II), 1515 sr (amid II).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) $\delta/$ ppm: 8,26 (s, 1 H, NH_{Fc}), 7,10 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, NH_{Ala}), 5,01 (m, 1H, H-2, Fc), 4,63–4,55 (m, 2H, $CH_{\alpha Pro}$, CH_{Ala}), 4,43–4,40 (m, 2H, H-5 Fc, $CH_{\alpha Pro'}$), 4,16 (s, 5H, Fc), 4,09–4,04 (m, 1H, $CH_{\delta Pro'}$), 3,95 (m, 1H, H-3, Fc), 3,89 (m, 1H, H-4, Fc), 3,63–3,56 (m, 1H, $CH_{\delta Pro'}$), 3,40–3,37 (m, 2H, $CH_{\delta Pro}$), 2,36–2,27 (m, 1H, $CH_{\beta Pro}$), 2,25–2,13 (m, 2H $CH_{\beta Pro'}$, 1H $CH_{\gamma Pro}$), 2,10–2,02 (m, 1H $CH_{\beta Pro}$, 2H $CH_{\gamma Pro'}$), 1,96–1,86 (m, 1H, $CH_{\gamma Pro}$), 1,47 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH_3Ala), 1,26 (s, 9H, CH_3Boc).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) $\delta/$ ppm: 173,7 ($CO_{Pro'}$), 171,0 (CO_{Pro}), 170,0 (CO_{Ala}), 155,1 (CO_{Boc}), 94,6 (C-1), 80,7 (C_{qBoc}), 69,4 (Cp), 64,8 (C-3, Fc), 63,7 (C-4, Fc), 62,7 (C-2, Fc), 61,7 ($CH_{\alpha Pro}$), 61,1 (C-5, Fc), 57,8 ($CH_{\alpha Pro'}$), 49,7 (CH_{Ala}), 48,0 ($CH_{\delta Pro'}$), 47,5 ($CH_{\delta Pro}$), 29,7 ($CH_{\beta Pro}$), 29,7 ($CH_{\beta Pro'}$), 28,4 (CH_3Boc), 25,1 ($CH_{\gamma Pro}$), 24,9 ($CH_{\gamma Pro'}$), 17,2 (CH_3Ala).

HRMS(MALDI): izračunato za $C_{28}H_{38}N_4O_5Fe$ 566,2191, izmjereno 566,2192.

3.3.3.3. Boc-L-Pro-D-Pro-L-Ala-NH-Fc (14)

$t_r = 180 - 182$ °C, $R_f = 0,45$ (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2): $\tilde{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 3424 sr ($NH_{slobodni}$), 3346 sr ($NH_{asocirani}$), 3324 sr ($NH_{asocirani}$), 1670 sl (amid I), 1552 sr (amid II), 1520 sr (amid II).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) $\delta/$ ppm: 8,04 (s, 1 H, NH_{Fc}), 7,52 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz, NH_{Ala}), 4,70 (m, 1H, H-2, Fc), 4,67 (m, 1H, H-5, Fc), 4,64–4,62 (m, 1H, $CH_{\alpha Pro'}$), 4,46–4,42 (m, 1H, $CH_{\alpha Pro}$), 4,15 (s, 5H, Fc), 4,13–4,10 (m, 1H, CH_{Ala}), 3,99–3,95 (m, 1H, $CH_{\delta Pro'}$), 3,94–3,90 (m, 2H, H-3, H-4, Fc), 3,60–3,46 (m, 1H $CH_{\delta Pro'}$, 2H $CH_{\delta Pro}$), 2,28–1,88 (m, 2H $CH_{\beta Pro'}$, 2H $CH_{\beta Pro}$, 2 H $CH_{\gamma Pro'}$, 2H $CH_{\gamma Pro}$), 1,49 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_3Ala), 1,38 (s, 9H, CH_3Boc).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ / ppm: 173,1 ($\text{CO}_{\text{Pro}'}$), 171,5 (CO_{Pro}), 170,6 (CO_{Ala}), 155,0 (CO_{Boc}), 94,9 (C-1), 80,4 (C_{qBoc}), 69,3 (Cp), 64,4 (C-3, Fc), 64,3 (C-4, Fc), 61,7 (C-2, Fc), 61,6 (C-5, Fc), 60,8 ($\text{CH}_{\alpha\text{Pro}'}$), 58,0 ($\text{CH}_{\alpha\text{Pro}}$), 51,4 (CH_{Ala}), 47,5 ($\text{CH}_{\delta\text{Pro}'}$), 47,4 ($\text{CH}_{\delta\text{Pro}}$), 29,4 ($\text{CH}_{\beta\text{Pro}'}$), 28,6 ($\text{CH}_{3\text{Boc}}$), 28,4 ($\text{CH}_{\beta\text{Pro}}$), 25,0 ($\text{CH}_{\gamma\text{Pro}'}$), 24,8 ($\text{CH}_{\gamma\text{Pro}}$), 16,6 ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$).

HRMS(MALDI): izračunato za $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_5\text{Fe}$ 566,2191, izmjereno 566,2194.

3.3.3.4. Boc-D-Pro-D-Pro-L-Ala-NH-Fc (15)

$t_r = 181 - 183$ °C, $R_f = 0,45$ (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2): $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3423 sr ($\text{NH}_{\text{slobodni}}$), 3315 sr ($\text{NH}_{\text{asocirani}}$), 1691 sl (amid I), 1647 sl (amid I), 1557 sr (amid II), 1516 sr (amid II).

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ / ppm: 8,58 (s, 1 H, NH_{Fc}), 6,61 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, NH_{Ala}), 4,87 (m, 1H, H-2 Fc), 4,78 (m, 1H, H-5 Fc), 4,60–4,46 (m, 2H, $\text{CH}_{\alpha\text{Pro}'}$, CH_{Ala}), 4,42–4,30 (m, 1H, $\text{CH}_{\alpha\text{Pro}}$), 4,10 (s, 5H, Fc), 3,94–3,90 (m, 2H, H-3 Fc, H-4 Fc), 3,77–3,40 (m, 4H, $\text{CH}_{\delta\text{Pro}'}$, $\text{CH}_{\delta\text{Pro}}$), 2,22–1,94 (m, 2H $\text{CH}_{\beta\text{Pro}}$, 2H $\text{CH}_{\beta\text{Pro}'}$, 2H $\text{CH}_{\gamma\text{Pro}}$, 2H $\text{CH}_{\gamma\text{Pro}'}$), 1,50 (s, 9H, $\text{CH}_{3\text{Boc}}$), 1,42 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{Ala}}$).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ / ppm: 172,1 ($\text{CO}_{\text{Pro}'}$), 172,1 (CO_{Pro}), 170,1 (CO_{Ala}), 154,7 (CO_{Boc}), 95,3 (C-1), 79,9 (C_{qBoc}), 69,2 (Cp), 64,3 (C-3, Fc), 64,1 (C-4, Fc), 61,4 (C-2, Fc), 61,4 (C-5, Fc), 61,1 ($\text{CH}_{\alpha\text{Pro}'}$), 58,3 ($\text{CH}_{\alpha\text{Pro}}$), 49,5 (CH_{Ala}), 47,3 ($\text{CH}_{\delta\text{Pro}'}$), 47,2 ($\text{CH}_{\delta\text{Pro}}$), 29,3 ($\text{CH}_{\beta\text{Pro}'}$), 28,7 ($\text{CH}_{3\text{Boc}}$), 28,6 ($\text{CH}_{\beta\text{Pro}}$), 25,8 ($\text{CH}_{\gamma\text{Pro}'}$), 24,7 ($\text{CH}_{\gamma\text{Pro}}$), 17,7 ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$).

HRMS(MALDI): izračunato za $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_5\text{Fe}$ 566,2191, izmjereno 566,2195.

3.3.3.5. Boc-L-Pro-L-Pro-D-Ala-NH-Fc (16)

Dobiveni su identični spektri kao kod enantiomera (15)

3.3.3.6. Boc-D-Pro-L-Pro-D-Ala-NH-Fc (17)

Dobiveni su identični spektri kao kod enantiomera (14)

3.3.3.7. Boc-L-Pro-D-Pro-D-Ala-NH-Fc (18)

Dobiveni su identični spektri kao kod enantiomera (**13**)

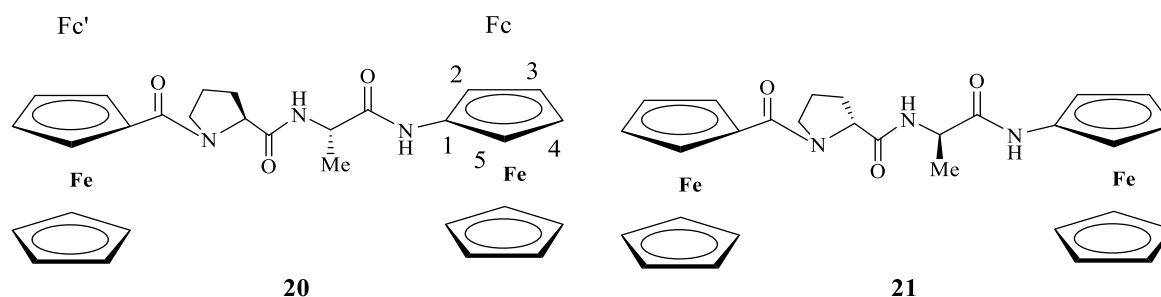
3.3.3.8. Boc-D-Pro-D-Pro-D-Ala-NH-Fc (**19**)

Dobiveni su identični spektri kao kod enantiomera (**12**)

3.4. Sinteza bis-ferocenskih dipeptida **20** i **21**

3.4.1. Opći postupak

U otopinu Boc-zaštićenog dipeptida (1 ekv.) u diklormetanu uvodi se plinoviti HCl dok se TLC kromatografijom ne utvrdi nastanak hidroklorida. Upareni hidroklorid suspendira se u diklormetanu i obradi sa suviškom Et₃N (pH ~ 8). Dobiveni se slobodni amin kopulira sa Fc-COOH (**3**, 1,3 ekv.) prethodno aktiviranom standardnim HOBt (2,2 ekv.) / EDC (2,2 ekv.) postupkom. Nakon 3 sata miješanja reakcijska se smjesa obradi na isti način kao u postupku 3.3.1, a produkti, čije su strukturne formule prikazane na slici 44, pročiste tankoslojnom preparativnom kromatografijom uz etil-acetat kao eluens.



Slika 44. Strukturne formule bis-ferocenskih peptida **20** i **21**.

3.4.2. Fc-CO-L-Pro-L-Ala-NH-Fc (**20**)

Prema općem postupku opisanom u 3.4.1, kopulacijom deprotektiranog Boc-zaštićenog dipeptida **8** (109,2 mg, 0,233 mmol) i **3** (503,3 mg, 2,66 mmol), aktivirane dodatkom HOBt (69 mg, 0,51 mmol) i EDC (98 mg, 0,51 mmol), dobiveno je 44% spoja **20** (59 mg, 0,103 mmol) u obliku crvene smole.

$R_f = 0,50$ (EtOAc).

IR (CH₂Cl₂): $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3421 sr (NH_{slobodni}), 3298 sr (NH_{asocirani}), 1684 sl (amid I), 1599, 1558, 1541 sr (amid II), 1506 sl (amid II).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 8,23 (s, 1 H, NH_{Fc}), 6,77 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, NH_{Ala}), 4,84–4,80 (m, 3H, H-2, H-2', H-5'), 4,73 (šs, 1H, H-5), 4,66 (šs, 1H, CH _{α Pro}), 4,50 (m, 1H, CH _{α Ala}), 4,43 (šs, 2H, H-3', H-4'), 4,23 (šs, 5H, Fc'), 4,17 (šs, 5H, Fc), 4,00 (šs, 2H, H-3, H-4), 3,94–3,87 (m, 2H, CH _{δ Pro}), 2,25–2,20 (m, 2H, CH _{β Pro}), 2,1–2,02 (m, 2H, CH _{γ Pro}), 1,45 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H, CH_{3Ala}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 172,1 (CO_{Fc}), 171,8 (CO_{Pro}), 170,1 (CO_{Ala}), 94,9 (C-1), 75,8 (C-1'), 71,5 (C-2'), 71,0 (C-3'), 71,0 (C-4'), 70,2 (C-5'), 69,8 (Fc'), 69,5 (Fc), 64,8 (C-3), 64,5 (C-4), 62,4 (CH _{α Pro}), 61,9 (C-2), 61,5 (C-5), 49,8 (CH _{α Ala}), 49,3 (CH _{δ Pro}), 28,4 (CH _{β Pro}), 26,0 (CH _{γ Pro}), 17,5 (CH_{3Ala}).

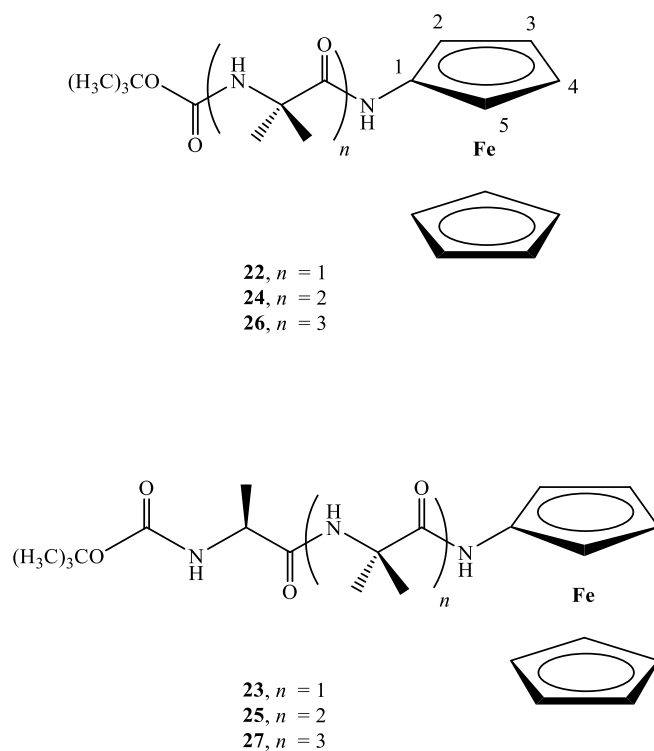
HRMS(MALDI): izračunato za C₂₉H₃₁N₃O₃Fe₂ 581,1065, izmjereno 581,1079.

3.4.3. Fc-CO-D-Pro-D-Ala-NH-Fc (**21**)

Prema općem postupku opisanom u 3.4.1, kopulacijom deprotektiranog Boc-zaštićenog dipeptida **11** (180,5 mg, 0,385 mmol) i **3** (106 mg, 0,462 mmol), aktivirane primjenom EDC (562 mg, 2,93 mmol)/ HOBt (163 mg, 0,85 mmol) protokola, dobiveno je 105,7 mg (0,181 mmol, 47%) **21** u obliku crvene smole (slika 44.).

Dobiveni su identični spektri kao kod enantiomera (**20**).

3.5. Sinteza konjugata aminoferocena i α -aminoizobutirične kiseline 22–27



Slika 45. Strukturne formule konjugata aminoferocena i α -amino izobutirične kiseline 22–27.

3.5.1. *Boc-Aib-NH-Fc (22)*

Prema općem postupku opisanom u 3.3.1, kopulacijom deprotektiranog Boc-zaštićenog aminoferocena (**5**) (121,5 mg, 0,404 mmol) i Boc-Aib-OH (123 mg, 0,606 mmol), aktivirane primjenom EDC (120 mg, 0,606 mmol)/ HOBt (82 mg, 0,606 mmol) protokola, dobiveno je 132 mg (0,342 mmol, 85%) **22** u obliku žutog praha.

$R_f = 0,65$ (CH_2Cl_2 : EtOAc = 10 : 1).

IR (CH_2Cl_2): $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3421 sr ($\text{NH}_{\text{slobodni}}$), 3294 sl ($\text{NH}_{\text{asocirani}}$), 1724 sr (amid I), 1623 sr (amid I)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 7,99 (šs, 1H, NH_{Fc}), 4,93 (s, 1H, NH_{Aib}), 4,61 (s, 2H, H-1, H-2), 4,17 (s, 5H, Fc), 3,98 (s, 2H, H-3, H-4), 1,52 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2_{\text{Aib}}$), 1,48 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 172,7 (CO_{Boc}), 155,2 (CO_{Aib}), 95,0 (C-1), 80,8 (C_{qBoc}), 69,3 (Cp), 64,6 (C-3, C-4), 61,3 (C-2, C-5), 57,4 ($\text{C}_{\alpha\text{Aib}}$), 28,5 (CH_3_{Boc}), 25,8 (CH_3_{Aib}).

3.5.2. *Sinteza Boc-L-Ala-Aib-NH-Fc (23) standardnim HOBt/EDC postupkom*

Prema općem postupku opisanom u 3.3.1, kopulacijom deprotektiranog Boc-zaštićenog **22** (70 mg, 0,181 mmol) i Boc-L-Ala-OH (74 mg, 0,362 mmol), aktivirane primjenom EDC (70 mg, 0,362 mmol)/ HOBt (49 mg, 0,362 mmol) protokola, dobiveno je 16 mg (0,04 mmol, 22%) **23** u obliku žutog praha.

$R_f = 0,65$ (CH_2Cl_2 : EtOAc = 10 : 1).

IR (CH_2Cl_2): $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3423 j ($\text{NH}_{\text{slobodni}}$), 3340 sr ($\text{NH}_{\text{asocirani}}$), 1699 sr (amid I)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 8,38 (s, 1H, NH_{Fc}), 6,45 (s, 1H, NH_{Aib}), 5,11 (šs, 1H, NH_{Ala}), 4,80 (s, 1H, H-2), 4,64 (s, 1H, H-5), 4,17 (s, 5H, Fc), 3,99 (m, 1H, $\text{CH}_{\alpha\text{Ala}}$), 3,95 (šs, 2H, H-3, H-4), 1,59 (s, 3H, CH_3_{Aib}), 1,50 (šs, 12H, CH_3_{Aib} , $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,40 (d, 3H, CH_3_{Ala}).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ / ppm: 172,2 (CO_{Boc}), 1720 (CO_{Aib}), 156,4 (CO_{Ala}), 95,5 (C-1), 81,3 (C_{qBoc}), 69,3 (Cp), 64,6 (C-3), 64,3 (C-4), 61,5 (C-2), 61,1 (C-5), 57,6 ($\text{C}_{\alpha\text{Aib}}$), 52,0 ($\text{CH}_{\alpha\text{Ala}}$), 28,5 ($\text{CH}_{3\text{Boc}}$), 26,7 ($\text{CH}_{3\text{Aib}}$), 25,0 ($\text{CH}_{3\text{Aib}}$), 17,4 ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$).

3.5.3. *Sinteza Boc-L-Ala-Aib-NH-Fc (23) HOBt/EDC postupkom potpomognuta mikrovalovima*

U otopinu deprotektiranog Boc-zaštićenog amida **22** (70 mg, 0,181 mmol) u etil-acetatu doda se Boc-L-Ala-OH (74 mg, 0,362 mmol) u etil-acetatu, prethodno aktivirana primjenom EDC (70 mg, 0,362 mmol)/ HOBt (49 mg, 0,362 mmol) postupka. Reakcijska se smjesa 35 minuta miješa u reaktoru izložena mikrovalnom zračenju (uvjeti: 15-minutno zagrijavanje na $T = 55$ °C uz $P = 200$ W, održavanje na $T = 55$ °C uz $P = 200$ W tijekom 20 minuta), a potom ispere zasićenom vodenom otopinom NaHCO_3 , 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz smjesu diklormetana i etil-acetata (10:1) kao eluens. Dobiveno je 32 mg (0,08 mmol, 40%) **23** u obliku žutog praha.

3.5.4. *Sinteza Boc-(Aib)₂-NH-Fc (24) standardnim HOBt/EDC postupkom*

Prema općem postupku opisanom u 3.3.1, kopulacijom deprotektiranog Boc-zaštićenog **22** (134 mg, 0,346 mmol) i Boc-Aib-OH (140 mg, 0,692 mmol), aktivirane primjenom EDC (132 mg, 0,692 mmol)/ HOBt (94 mg, 0,692 mmol) protokola, dobiveno je 36 mg (0,08 mmol, 22%) **24** u obliku žutog praha.

$R_f = 0,50$ (CH_2Cl_2 : EtOAc = 10 : 1).

IR (CH_2Cl_2): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ / cm^{-1} : 3423 sr ($\text{NH}_{\text{slobodni}}$), 3331 j ($\text{NH}_{\text{asocirani}}$), 1703 sr (amid I)

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ / ppm: 8,56 (s, 1H, NH_{Fc}), 6,39 (s, 1H, NH_{Aib1}), 4,98 (šs, 1H, NH_{Aib2}), 4,85 (s, 2H, H-2, H-5), 4,24 (s, 5H, Fc), 3,98 (s, 2H, H-3, H-4), 1,53 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,51 (šs, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{Aib1}$), 1,50 (šs, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{Aib2}$).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ / ppm: 172,6 (CO_{Aib1}), 172,3 (CO_{Aib2}), 155,7 (CO_{Boc}), 94,8 (C-1), 81,5 (C_{qBoc}), 70,4 (Cp), 64,9 (C-3, C-4), 60,7 (C-2, C-5), 57,3 ($\text{C}\alpha_{\text{Aib1}}$), 57,2 ($\text{C}\alpha_{\text{Aib2}}$), 28,5 ($\text{CH}_{3\text{Boc}}$), 26,0 ($\text{CH}_{3\text{Aib1}}$), 25,4 ($\text{CH}_{3\text{Aib2}}$).

3.5.5. *Sinteza Boc-(Aib)₂-NH-Fc (24) HOBt/EDC postupkom potpomognuta mikrovalovima*

Prema postupku opisanom u 3.5.3, kopulacijom deprotektiranog Boc-zaštićenog peptida (**22**) (67 mg, 0,173 mmol) i Boc-Aib-OH (70 mg, 0,346 mmol), aktivirane primjenom EDC (66 mg, 0,346 mmol)/ HOBt (47 mg, 0,346 mmol) protokola, dobiveno je 45 mg (0,095 mmol, 54%) **24** u obliku žutog praha.

3.5.6. *Sinteza Boc-L-Ala-(Aib)₂-NH-Fc (25) HOBt/EDC postupkom potpomognuta mikrovalovima*

Prema postupku opisanom u 3.5.3, kopulacijom deprotektiranog Boc-zaštićenog dipeptida (**24**) (89 mg, 0,189 mmol) i Boc-Ala-OH (58 mg, 0,284 mmol), aktivirane primjenom EDC (54 mg, 0,284 mmol)/ HOBt (38 mg, 0,284 mmol) protokola, dobiveno je 20 mg (0,037 mmol, 20%) **25** u obliku žutog praha.

$R_f = 0,30$ (CH_2Cl_2 : EtOAc = 5 : 1).

IR (CH_2Cl_2): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ / cm^{-1} : 3420 sr ($\text{NH}_{\text{slobodni}}$), 3337 j ($\text{NH}_{\text{asocirani}}$), 1683 j (amid I)

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ / ppm: 8,33 (s, 1H, NH_{Fc}), 7,04 (s, 1H, NH_{Aib1}), 6,55 (s, 1H, NH_{Aib2}), 5,10 (šs, 1H, NH_{Ala}), 4,97 (s, 1H, H-2), 4,89 (s, 1H, H-5), 4,28 (s, 5H, Fc), 4,02 (šs, 2H, H-3, H-4), 3,94 (m, 1H, $\text{CH}\alpha_{\text{Ala}}$), 1,55 (šs, 3H, $\text{CH}_{3\text{Aib1}}$), 1,53 (šs, 3H, $\text{CH}_{3\text{Aib1}}$), 1,51 (šs, 3H, $\text{CH}_{3\text{Aib2}}$), 1,47 (šs, 3H, $\text{CH}_{3\text{Aib2}}$), 1,45–1,43 (s, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $\text{CH}_{3\text{Ala}}$).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ / ppm: 173,2 (CO_{Aib1}), 173,0 (CO_{Boc}), 172,5 (CO_{Aib2}), 156,3 (CO_{Ala}), 94,0 (C-1), 81,5 (C_{qBoc}), 69,9 (Cp), 64,5 (C-3), 64,4 (C-4), 61,1 (C-2, C-5), 57,6 ($\text{C}\alpha_{\text{Aib1}}$), 57,0 ($\text{C}\alpha_{\text{Aib2}}$), 52,2 ($\text{CH}\alpha_{\text{Ala}}$), 28,4 ($\text{CH}_{3\text{Boc}}$), 26,5 ($\text{CH}_{3\text{Aib2}}$), 26,1 ($\text{CH}_{3\text{Aib2}}$), 25,2 ($\text{CH}_{3\text{Aib1}}$), 24,9 ($\text{CH}_{3\text{Aib1}}$), 17,1 ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$).

3.5.7. Sinteza Boc-(Aib)₃-NH-Fc (**26**) HOBt/EDC postupkom potpomognuta mikrovalovima

Prema postupku opisanom u 3.5.3, kopulacijom deprotektiranog Boc-zaštićenog dipeptida (**24**) (178 mg, 0,378 mmol) i Boc-Aib-OH (116 mg, 0,568 mmol), aktivirane primjenom EDC (108 mg, 0,568 mmol)/ HOBt (76 mg, 0,568 mmol) protokola, dobiveno je 33 mg (0,028 mmol, 17%) **26** u obliku žutog praha.

$R_f = 0,50$ (CH₂Cl₂ : EtOAc = 5 : 1).

IR (CH₂Cl₂): $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3422 sr (NH_{slobodni}), 3335 j (NH_{asocirani}), 1705 sr (amid I), 1682 j (amid II)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 8,50 (s, 1H, NH_{Fc}), 7,55 (s, 1H, NH_{Aib1}), 6,56 (s, 1H, NH_{Aib2}), 5,13 (s, 1H, NH_{Aib3}), 4,89 (s, 2H, H-2, H-5), 4,21 (s, 5H, Fc), 3,92 (s, 2H, H-3, H-4), 1,55 (s, 6H, (CH₃)_{2Aib1}), 1,50 (šs, 6H, (CH₃)_{2Aib2}), 1,49 (šs, 6H, (CH₃)_{2Aib3}), 1,46 (šs, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 174,6 (CO_{Aib1}), 173,4 (CO_{Aib2}), 172,8 (CO_{Aib3}), 155,5 (CO_{Boc}), 97,1 (C-1), 81,5 (C_{qBoc}), 69,6 (C_p), 64,2 (C-3, C-4), 61,0 (C-2, C-5), 57,7 (C α _{Aib1}), 57,2 (C α _{Aib3}), 56,9 (C α _{Aib2}), 28,3 (CH_{3Boc}), 25,9 (CH_{3Aib1}), 25,5 (CH_{3Aib3}), 25,3 (CH_{3Aib2}).

3.5.8. Sinteza Boc-(Aib)₃-NH-Fc (**26**) uz HATU reagens

U otopinu Boc-zaštićenog dipeptida (**24**, 168 mg, 0,356 mmol) u diklormetanu (ohlađenu na 0 °C) doda se TFA (3 mL) te se TLC-om prati nastanak hidroklorida. Aktivacija Boc-Aib-OH (109 mg, 0,534 mmol) odvija se u acetonitrilu (20 mL) uz dodatak Et₃N (450 μ L, 9 mmol) i HATU reagensa⁹⁵ (203 mg, 0,534 mmol) tijekom 15 minuta uz konstantno miješanje. Slobodni amin potom se pri sobnoj temperaturi kopulira s aktiviranom Boc-Aib-OH, a tijekom reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom. Nakon 20 sati miješanja reakcijska smjesa se upari do suha te ispere 10%-tnom otopinom limunske kiseline, zasićenom vodenom otopinom NaHCO₃ i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz smjesu diklormetana i etil-acetata (5:1) kao eluens. Dobiveno je 96 mg (0,08 mmol, 49%) **26** u obliku žutog praha.

3.5.9. Sinteza Boc–L–Ala–(Aib)₃–NH–Fc (27) uz HATU reagens potpomognuta mikrovalovima

U otopinu Boc–zaštićenog tripeptida (**26**) (66 mg, 0,121 mmol) u diklormetanu (ohlađenu na 0 °C) dodaje se TFA (1,5 mL) te se TLC–om prati nastanak hidroklorida. Boc–L–Ala–OH (35 mg, 0,182 mmol) aktivira se dodatkom Et₃N (450 µL, 6 mmol) i HATU reagensa (69 mg, 0,182 mmol) u acetonitrilu (20 mL) tijekom 15 minuta uz konstantno miješanje. Kopolucija deprotektiranog amina i aktivirane Boc–L–Ala–OH odvija se mikrovalnom reaktoru (uvjeti: 15–minutno zagrijavanje na $T = 55$ °C uz $P = 200$ W, održavanje na $T = 55$ °C uz $P = 200$ W tijekom 20 minuta). Reakcijska se smjesa upari do suha te ispere 10%–tnom otopinom limunske kiseline, zasićenom vodenom otopinom NaHCO₃ i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz smjesu diklormetana i etil–acetata (5:1) kao eluens. Dobiveno je 38 mg (0,06 mmol, 50%) **27** u obliku žutog praha.

$R_f = 0,20$ (CH₂Cl₂ : EtOAc = 10 : 1).

IR (CH₂Cl₂): $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3420 sr (NH_{slobodni}), 3331 j (NH_{asocirani}), 1676 j (amid I)

¹H–NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta/$ ppm: 8,51 (s, 1H, NH_{Fc}), 7,46 (s, 1H, NH_{Aib1}), 7,39 (s, 1H, NH_{Aib2}), 6,81 (s, 1H, NH_{Aib3}), 5,55 (šs, 1H, NH_{Ala}), 4,98 (s, 1H, H–2), 4,92 (s, 1H, H–5), 4,24 (s, 5H, Fc), 3,99 (šs, 2H, H–3, H–4), 3,88 (m, 1H, CH_{αAla}), 1,56 (šs, 3H, CH_{3Aib3}), 1,52 (šs, 6H, CH_{3Aib3}, CH_{3Aib2}), 1,48 (šs, 9H, CH_{3Aib2}, CH_{3Aib1}), 1,46 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,35 (d, 3H, CH_{3Ala}).

¹³C–NMR (100 MHz, CDCl₃) $\delta/$ ppm: 174,5 (CO_{Aib1}), 173,6 (CO_{Boc}), 173,6 (CO_{Aib2}), 173,1 (CO_{Aib3}), 156,5 (CO_{Ala}), 96,0 (C–1), 81,2 (C_{qBoc}), 70,4 (C_p), 64,8 (C–3), 64,7 (C–4), 61,0 (C–2), 61,0 (C–5), 57,4 (C_{αAib2}), 57,1 (C_{αAib1}), 56,7 (C_{αAib3}), 52,2 (CH_{αAla}), 28,4 (CH_{3Boc}), 26,4 (CH_{3Aib2}), 25,9 (CH_{3Aib1}), 24,9 (CH_{3Aib3}), 16,9 (CH_{3Ala}).

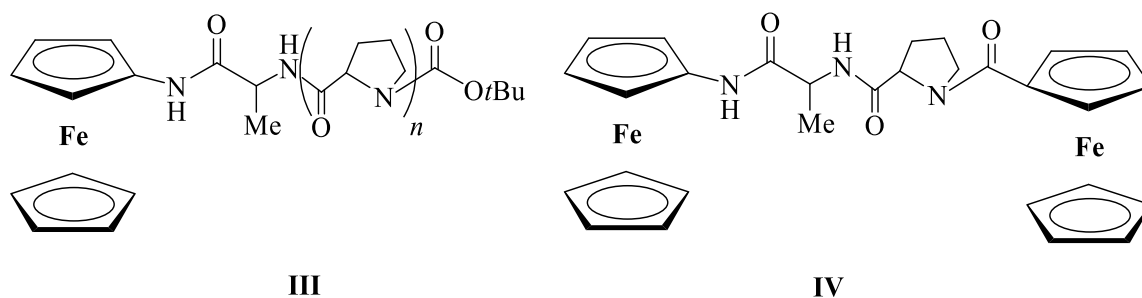
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Za razliku od biokonjugata **VI–VIII**, u aminokiselinskim derivatima ferocenkarboksilne kiseline (**II**) i aminoferocena (**III**) rijetko se nalaze strukturni motivi svojstveni prirodnim peptidima. U Literaturnom dijelu disertacije opisana su konformacijska svojstva peptida pripremljenih kopulacijom ferocenkarboksilne kiseline i različitih prirodnih aminokiselina koji u otopinama i čvrstom stanju zauzimaju različite konformacije, ponekad u obliku uzvojnica, uvjetovane u većini slučajeva međumolekulskim vodikovim vezama.^{23,41} Svega su tri literaturna primjera derivata tipa **II** sa strukturnim obilježjima nalik prirodnim peptidima. Prvi su primjer predstavili Kraatz i suradnici koji su u čvrstom stanju Fc–CO–L–Pro–L–Pro–L–Phe–OH opazili jaku unutarlančanu vodikovu vezu koja zatvara 10–člani prsten koji geometrijom odgovara β –okretu.⁴⁶ Isti je strukturni element Hirao pronašao u otopini i čvrstom stanju enantiomernih **XXI** i **XXII**.⁴⁷

Uslijed nestabilnosti ferocenskog prekursora peptidni derivati aminoferocena (**III**) znatno su slabije istraženi. Metzler–Nolte i suradnici istražili su konformacijske karakteristike najjednostavnijih homologa **XXIII** (Boc–AA–NH–Fc) i ustanovili kako su u čvrstom stanju i otopini stabilizirani isključivo međumolekulskim interakcijama.⁴⁸ U našem su Laboratoriju pripravljena tri dipeptidna derivata aminoferocena [Boc–AA₂–AA₁–NH–Fc, **XXIV**, AA_{1,2} = Gly; **XXV**, AA_{1,2} = L–Ala; **XXVI**, AA_{1,2} = L–Val] čija je detaljna konformacijska analiza ukazala na tvorbu unutarlančane vodikove veze između NH–skupine aminoferocena i uretanske karbonilne skupine koja podržava konformaciju β –okreta tipa I.⁹ Nadalje, jaki CD–signali opaženi u spektrima kiralnih derivata **XXV** i **XXVI** ukazali su da kiralno uređenje sekundarne strukture u peptidnom segmentu uzrokuje perturbaciju inherentno akiralnog ferocenskog kromofora i modifikaciju njegovih kiroptičkih svojstava.

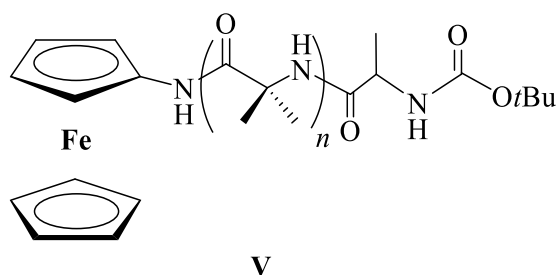
U nastavku tih istraživanja u prvom je dijelu ove disertacije opisana sinteza dipeptida (**III**, $n = 1$), tripeptida (**III**, $n = 2$) i dinuklearnih derivata (**IV**) izvedenih iz aminoferocena i odgovarajućih aminokiselina (Ala, Pro) odnosno ferocenkarboksilne kiseline (slika 46.). Nadalje, primjenom eksperimentalnih (IR–spektroskopija, spektroskopija NMR i CD) i teorijskih (DFT–račun) metoda načinjena je konformacijska analiza ciljnih konjugata kako bi

se identificirale dominantne konformacije te je istražen utjecaj kiralnog uređenja peptidnog slijeda na CD-aktivnost u apsorpcijskom području ferocenskog kromofora.



Slika 46. Dipeptidni (**III**, $n = 1$), tripeptidni (**III**, $n = 2$) i dinuklearni (**IV**) derivati aminoferocena.

Imajući u vidu recentne radove^{70,75,77} u kojima je opisana upotreba aromatskih kromofora kao senzora heličnosti peptidnog slijeda, u nastavku istraživanja pripremljeni su i derivati aminoferocena i α -aminoizobutirične kiseline (**V**, slika 47.). Na sličan način kao kod konjugata **III** i **IV** i ti su peptidi podvrgnuti konformacijskoj analizi kako bi se ispitao utjecaj udaljenosti između akiralnog kromofora i alaninske podjedinice, kao začetnika nabiranja peptidnog lanca, na kirooptička svojstva ferocena.



Slika 47. Alaninski derivati aminoferocena i α -amino izobutirične kiseline ($n = 1-3$).

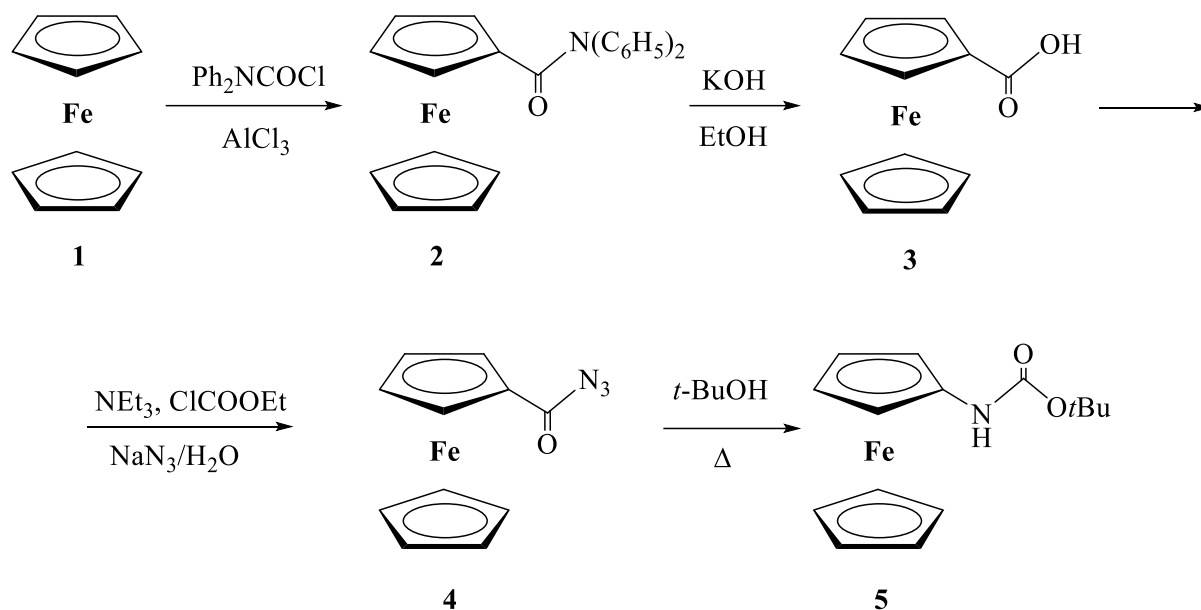
4.1. Sinteza, konformacijska analiza i kirooptička svojstva ferocenskih dipeptida 8–11

Kao što je opisano u poglavlju 2.5.2 naša je istraživačka skupina utvrdila kako kiralno uređenje peptidnog slijeda vezane na aminoferocen izravno utječe na CD-aktivnost u apsorpcijskom području ferocenskog kromofora. Kako bi stekli jasniji uvid u povezanost konformacijskih i kirooptičkih svojstava monosupstituiranih ferocenskih peptida pripravili smo četiri dipeptida izvedena iz aminoferocena Boc-AA₂-AA₁-NH-Fc (**8**, AA₁ = L-Ala, AA₂ = L-Pro; **9**, AA₁ = L-Ala, AA₂ = D-Pro; **10**, AA₁ = D-Ala, AA₂ = L-Pro; **11**, AA₁ = D-Ala, AA₂ = D-Pro). Prilikom dizajna ciljnih dipeptida odlučili smo se za homo- i heterokiralne Ala-Pro slijeda zbog: *i*) rigidne strukture prolina, a time i sposobnosti indukcije sekundarnih strukturnih elemenata te *ii*) dokumentirane prisutnosti specifičnih tipova okreta u heterokiralnim peptidima. Naime, poznato je da heterokiralni LD slijed na *i + 1* i *i + 2* položajima induciraju β-okrete tipa II, dok homokiralni LL analozi preferiraju geometrije tipa I.¹⁶

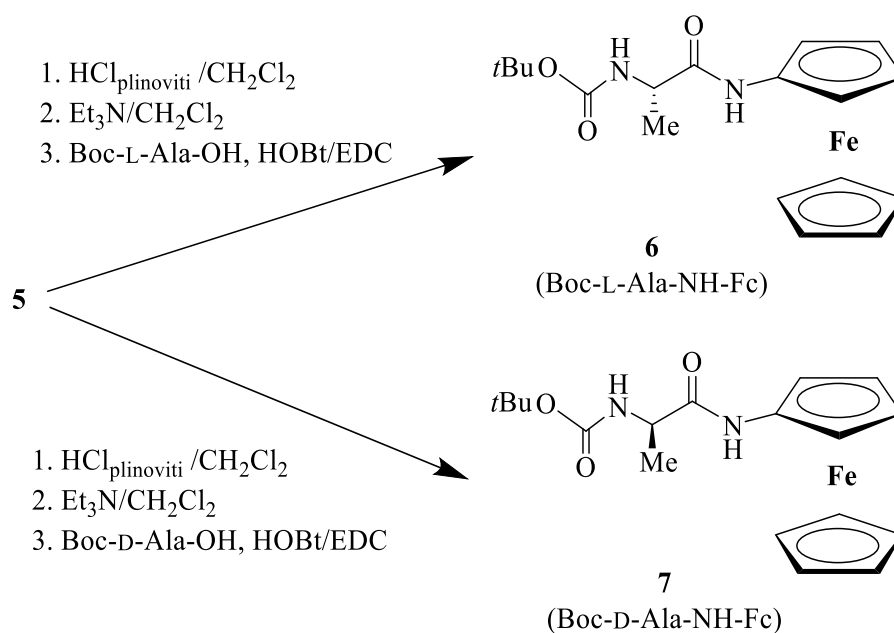
Konformacijska analiza pripremljenih spojeva provedena je spektroskopskim i teorijskim metodama čiji su nalazi uspoređeni. Također je određena i kristalna struktura spojeva **9** i **10**.

4.1.1. Sinteza dipeptida 8–11

Ključni prekursor za sintezu svih spojeva opisanih u ovoj disertaciji, *tert*-butilferocenilkarbammat (**5**), pripremljen je višestupanjskom sintezom (shema 2.) iz ferocena (**1**) koji je u prvom stupnju pretvoren u *N,N*-difetilkarbamoilferocen (**2**, 73%). Hidrolizom **2** u refluksirajućoj etanolnoj otopini kalijevog hidroksida dobiveno je 66% ferocenkarboksilne kiseline (**3**) koja je djelovanjem natrijeva azida na mješoviti anhidrid (prethodno generiran *in situ* reakcijom **3** i etil-kloroformijata uz Et₃N) prevedena u ferocenkarboksazid (**4**, 43%). Curtiusovom pregradnjom **4** u *tert*-butilalkoholu pri ~85 °C dobiveno je 45% stabilnog Boc-zaštićenog aminoferocena **5**.

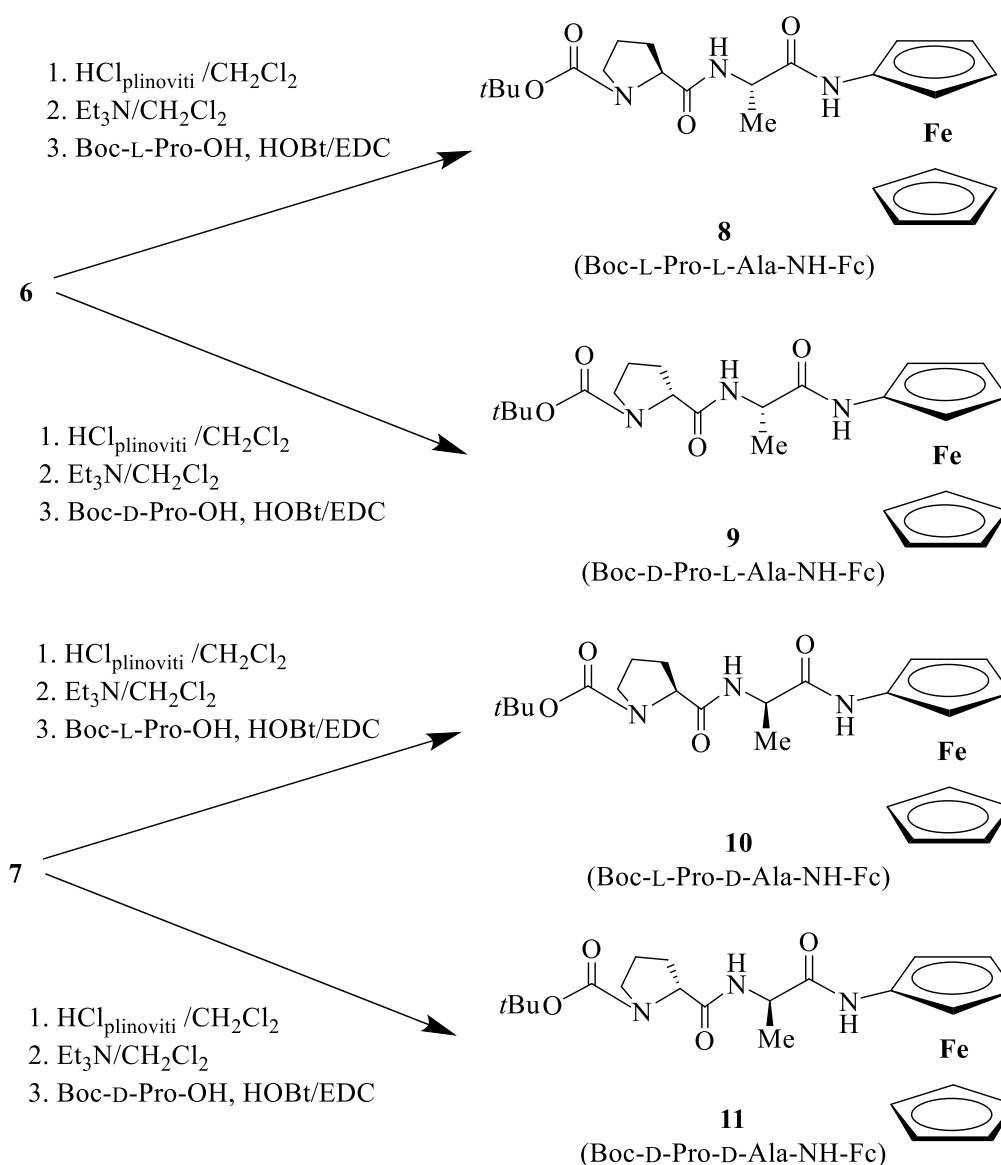
Shema 2. Sinteza *tert*-butil-ferocenilkarbamata (**5**).

Sinteza ferocenskih amida **6** i **7** započinje deprotekcijom amino-skupine **5** djelovanjem plinovitog HCl u diklormetanu. Nastali hidroklorid obradom sa suviškom Et_3N prelazi u slobodnu bazu koja je kondenzirana s aktiviranom Boc-AA-OH ($\text{AA} = \text{L-Ala}$, D-Ala) primjenom standardnog HOBt/EDC postupka dajući 84% konjugata **6** i 91% konjugata **7** (shema 3.).

Shema 3. Priprava ferocenskih amida **6** i **7**.

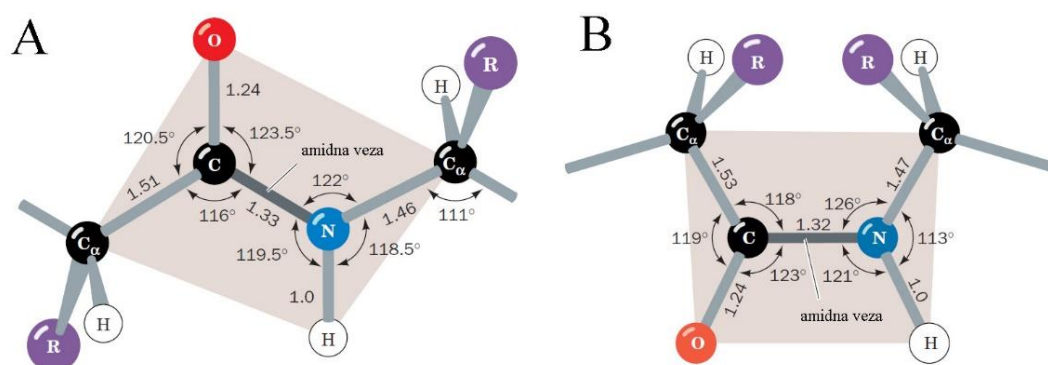
Uvođenje alaninske podjedinice potvrđen je dubletom njezine metilne skupine ($\delta = 1,20$ ppm) u spektrima $^1\text{H-NMR}$ i signalima pri $\delta = 18,0$ ppm ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$) i $\delta = 50,40$ ppm ($\text{C}\alpha_{\text{Ala}}$) u spektrima $^{13}\text{C-NMR}$ enantiomernih amida **6** i **7**.

Završni korak u sintezi ciljnih dipeptida **8–11** je uvođenje L- odnosno D-Pro na N-terminus amida **6** i **7**. Slično kao što je opisano za ferocenske amide, HOBt/EDC postupkom aktivirana je Boc-AA-OH (AA = L-Pro, D-Pro) nakon čega je uslijedila njezina kopulacija sa slobodnim aminima dobivenima deprotekcijom Boc-zaštićenih amida **6** i **7**. Dobiveno je 74% **8**, 93% **9**, 72% **10** i 83% dipeptida **11** (shema 4.).



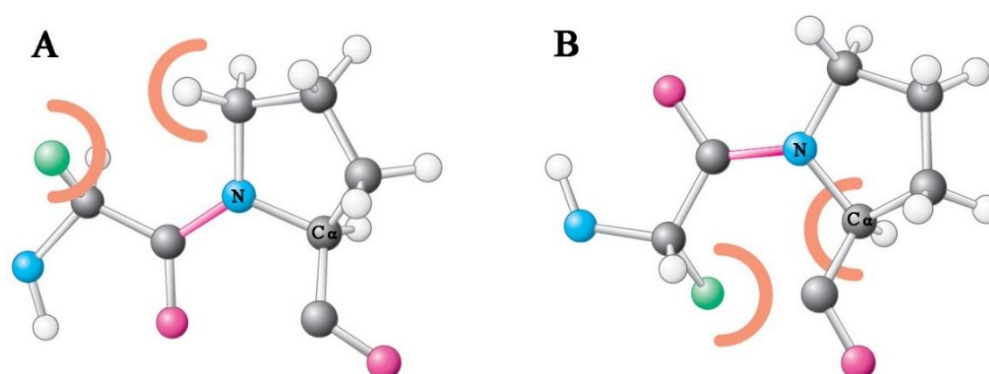
Shema 4. Priprava ferocenskih dipeptida **8–11**.

U spektrima $^1\text{H-NMR}$ svih dipeptida opaženi su dvostruki signali NH-skupina koji su pripisani *cis*- i *trans*-izomeru prolinske amidne veze.⁹⁶ Naime, u prirodnim peptidima većina amidnih veza zauzima *trans*-konfiguraciju u kojoj $\text{C}\alpha$ -atome susjednih aminokiselina nalazimo na suprotnim stranama veze (slika 48.). Na taj je način sterička napetost između bočnih ogranka susjednih aminokiselina svedena na minimum te je stoga uobičajen udio *trans*-izomera približno 95%.⁹⁷



Slika 48. Prikaz a) *trans*-amidne i b) *cis*-amidne veze u peptidima.⁹⁸

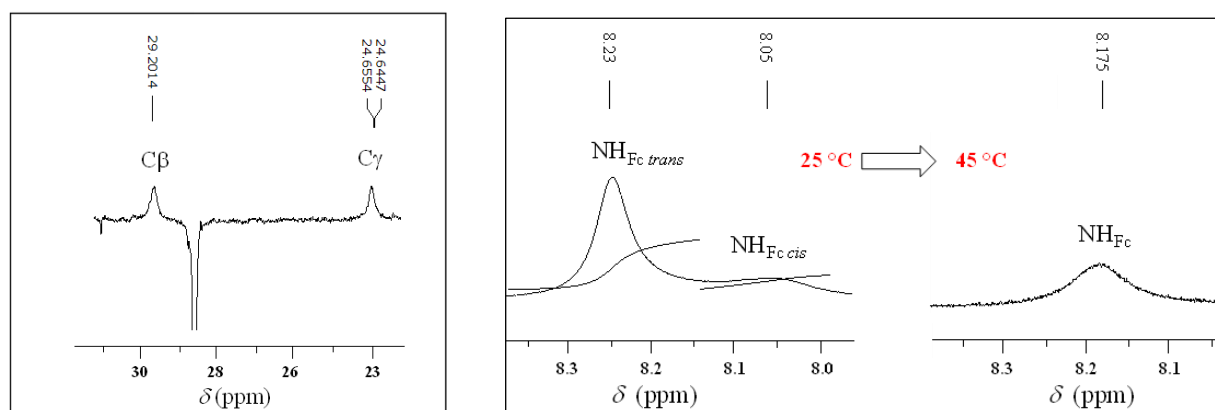
No, amidne veze u kojima sudjeluje prolin, zbog smanjene razlike u steričkoj napetosti između *trans*- i *cis*-oblika, jer na dušikov atom prolina nije vezan vodik već dva tetraedarska ugljikova atoma, pokazuju smanjen afinitet za *trans*-konfiguraciju (slika 49.). Pritom je udio *cis*-oblika obično do 10%,⁹⁹ no ukoliko prolinu prethodi glicin¹⁰⁰ ili aminokiselina s aromatskim bočnim ogrankom¹⁰¹ može se opaziti još veći udio *cis*-izomera čak i do 40% ako je prolin u vezi s aromatskom aminokiselinom.¹⁰²



Slika 49. Prikaz a) *trans*- i b) *cis*-imidne veze u prolinskim peptidima.¹⁰³

Cis-trans-izomerizaciju prolinske amidne veze moguće je utvrditi pomoću ^1H - i ^{13}C -spektroskopije NMR. Dijagnostički signali u spektrima ^{13}C -NMR su kemijski pomaci $\text{C}\beta$ - i $\text{C}\gamma$ -atoma; manja razlika njihovih kemijskih pomaka ($\Delta\delta = 1\text{--}6$ ppm) pripisuje se *trans*-izomeru, dok se veća razlika ($\Delta\delta = 8\text{--}10$ ppm) opaža kod *cis*-izomera. Integriranjem signala u spektrima ^1H -NMR ili usporedbom jačine signala u spektrima ^{13}C -NMR može se odrediti udio *cis*- i *trans*-izomera.^{104,105}

Budući da razlika kemijskih pomaka $\text{C}\beta$ - i $\text{C}\gamma$ -atoma u spektru ^{13}C -NMR homokiralnog derivata **8**, kao i njegovog enantiomera **11**, iznosi 4,5 ppm (slika 50., lijevo) može se zaključiti da dominantni signal NH_{Fc} skupine u spektru ^1H -NMR pripada *trans*-izomeru. Integracijom signala NH_{Fc} skupine određen je udio *trans*-izomera koji pri 25 °C za **8** iznosi 84%. Kao što je prikazano na slici 50. desno, signali *cis*- i *trans*-izomera zagrijavanjem na 45 °C koalesciraju zbog ubrzane međupretvorbe izomera. Na isti je način određeno da udio *trans*-izomera u slučaju heterokiralnih **9** i **10** iznosi 71% pri 25 °C. Preostali signali dominantnog *trans*-izomera u spektrima ^1H -NMR i ^{13}C -NMR dipeptida **8**–**11** asignirani su primjenom dvodimenzijske homo- (COSY, NOESY) i heteronuklearne (HSQC, HMBC) spektroskopije NMR.



Slika 50. Kemijski pomaci $\text{C}\beta$ - i $\text{C}\gamma$ -atoma u spektru ^{13}C -NMR derivata **8** (lijevo) i srastanje signala NH_{Fc} skupine *trans*- i *cis*-izomera u spektru ^1H -NMR (desno).

Uvođenje prolinske podjedinice registriran je u spektru ^1H -NMR **8** signalima njezinih metilenskih δ - ($\delta = 3,53\text{--}3,41$ ppm), β - ($\delta = 2,2\text{--}2,14$ ppm) i γ -protona ($\delta = 1,96\text{--}1,88$ ppm) te metinskih protona ($\delta = 4,3$ ppm). Struktura dipeptida dodatno je potvrđena opažanjem signala pirolidinskih α - ($\delta \sim 61$ ppm), δ - ($\delta \sim 48$ ppm), β - ($\delta \sim 29$ ppm) i γ -ugljikovih atoma

($\delta \sim 25$ ppm) u spektru ^{13}C -NMR **8**. Isti su signali opaženi i u spektrima ^1H -NMR i ^{13}C -NMR enantiomernog **11**.

Metilenski δ -, β - i γ -protoni u spektrima ^1H -NMR enantiomernih **9** i **10** registrirani su pri $\delta = 3,55$ – $3,36$ ppm, $\delta = 2,26$ – $2,05$ ppm odnosno $\delta = 2,01$ – $1,85$ dok su metinski protoni pirolidina opaženi pri $\delta = 4,2$ ppm. Pirolidinski α -, δ -, β - i γ -ugljikovi atomi heterokiralnih **9** i **10** rezoniraju pri ~ 61 , ~ 48 , ~ 30 odnosno ~ 25 ppm.

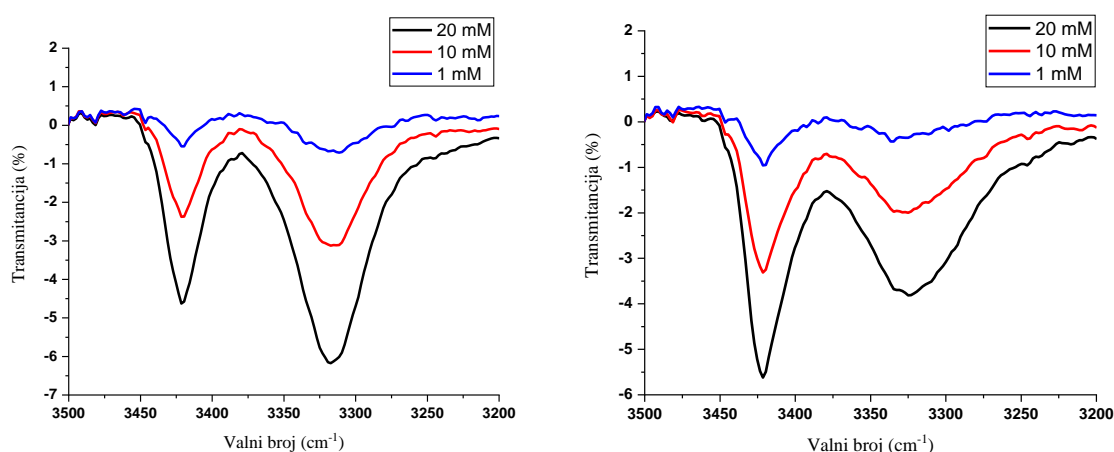
4.1.2. Konformacijska analiza

4.1.2.1. Analiza IR spektroskopijom

Poznato je da je IR spektroskopija brza i korisna metoda za detekciju slobodnih i NH-skupina koje sudjeluju u vodikovim vezama. Iako u otopini nastupa brza izmjena energijski bliskih konformacija, u IR spektrima detektiraju se apsorpcijske vrpce NH-skupina za svaki prisutni oblik te je iz relativnog omjera intenziteta vrpce moguće procijeniti udio pojedinih konformera. Pritom apsorpcijske vrpce u području valnih brojeva manjih od 3400 cm^{-1} upućuju na asocirane NH-skupine, dok se signali iznad 3400 cm^{-1} pripisuju slobodnim NH-skupinama. Nadalje, iz omjera intenziteta ovih vrpce tijekom postupnog razrjeđivanja otopina ispitivanih uzoraka može se procijeniti da li su u konformerima prisutne unutar- ili međumolekulske vodikove veze. Ako razrjeđivanjem značajno opada intenzitet signala u području nižem od 3400 cm^{-1} , u otopini ispitivanog uzorka prisutne su međumolekulske vodikove veze koje se razrjeđenjem kidaju. Ukoliko su u molekuli prisutne IHB, razrjeđivanjem oba signala slabe ali se ne mijenja omjer njihovog intenziteta.

Koncentracijski-ovisni IR spektri peptida **8** prikazani su na slici 51., *lijevo*. Pri visokim koncentracijama ispitivanog uzorka ($20 \times 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}$) dominiraju signali pri 3318 cm^{-1} koji se mogu pripisati asociranim NH-skupinama, dok su apsorpcijske vrpce slobodnih NH-skupina, registrirane pri 3420 cm^{-1} , slabijeg intenziteta. Budući da se omjer intenziteta slobodnih i asociranih NH-skupina gotovo i ne mijenja tijekom razrjeđenja do $c = 1 \times 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}$ može se zaključiti kako su u razrijeđenim otopinama peptida **8**, kao i enantiomernog **11**, prisutne konformacije stabilizirane unutarmolekulskim vodikovim vezama u kojima

sudjeluju pojedine NH–skupine. U IR spektrima heterokiralnih **9** i **10** (slika 51., *desno*) vrpce asociranih NH–skupina slabijeg su intenziteta nego kod homokiralnih analoga, no tijekom razrjeđenja ne dolazi do promjene njihova intenziteta s obzirom na intenzitet slobodnih NH–skupina što je indikacija njihovog sudjelovanja u unutarmolekulskim vodikovim vezama. Iako apsorpcijske vrpce u karbonilnom području IR spektra **8–11** ($1600–1800\text{ cm}^{-1}$) nisu dovoljno razlučene, signali koji indiciraju prisutnost slobodnih *N*–terminalnih uretanskih karbonilnih skupina (iznad 1700 cm^{-1}), nisu opaženi.¹⁰⁶



Slika 51. Koncentracijski ovisni IR spektri derivata **8** (*lijevo*) i **9** (*desno*) u CH_2Cl_2 .

IR spektri spojeva **8** i **9** snimljeni su i u čvrstom stanju (tablica 6.), u obliku KBr pastila (slike D1 i D2). Pritom su apsorpcijske vrpce NH– i uretanskih CO–skupina zabilježene pri valnim brojevima nižim od 3400 cm^{-1} odnosno 1700 cm^{-1} što ukazuje da su u čvrstom stanju *N*–terminalna CO– i sve NH–skupine uključene u vodikove veze (unutar– ili međumolekulskog karaktera).

Tablica 6. NH– i CO–područje IR spektara **8** i **9** u KBr (cm^{-1}).

Derivat	νNH (slobodne)	νNH (asocirane)	amid I	amid II
8	–	3292	1658	1563
9	–	3291	1695, 1677, 1652	1550, 1537

4.1.2.2. Analiza spektroskopijom NMR

Nakon što je pomoću IR analize utvrđeno da pojedine NH-skupine dipeptida **8–11** sudjeluju u vodikovim vezama, iste su skupine identificirane pomoću spektroskopije NMR. Poznato je da se kemijski pomaci amidnih protona povezanih vodikovim vezama nalaze pri većim δ -vrijednostima nego slobodni amidni protoni. Literaturno dostupni podaci o pomacima amidnih protona u ferocenskim peptidima **XXIV–XXVI** ukazuju kako se signali NH-skupina koje sudjeluju u vodikovim vezama opažaju pri $\delta > 7$ ppm, dok slobodne NH-skupine rezoniraju pri višem polju.⁹ Nadalje, konformeri stabilizirani unutarmolekulskim vodikovim vezama i slobodni oblici u otopini nalaze se u dinamičkoj ravnoteži, a zbog njihove brze izmjene u spektrima ¹H-NMR opažaju se samo prosječne vrijednosti kemijskih pomaka slobodnih i asociranih NH-skupina. Visoki kemijski pomaci NH-skupine aminoferocena u derivatima **8** i **9** ($\delta > 8$ ppm) ukazuju na njezino sudjelovanje u vodikovim vezama, dok NH_{Ala} rezonira u višem polju ($\delta \leq 7$ ppm) što sugerira kako potonja skupina oscilira između vezanog i nevezanog stanja (tablica 7.). Unutarmolekulski karakter prethodno utvrđenih veza potvrđen je snimanjem koncentracijski ovisnih spektara NMR u kojima nije opažena značajna promjena kemijskih pomaka amidnih protona **8** i **9** ($\Delta\delta < 0,2$ ppm) prilikom razrjeđenja do 2×10^{-3} mol dm⁻³ koncentracije.

Jakost unutarmolekulskih interakcija ispitana je snimanjem spektara NMR u prisutnosti DMSO. Polarno otapalo poput DMSO uzrokuje kidanje slabijih IHB i nastanak solvata zahvaljujući jakim akceptorskim svojstvima toga otapala prema donorima vodikove veze.¹⁰⁷ Pritom je za amidne skupine koje participiraju u jakim IHB karakteristična mala promjena kemijskog pomaka uslijed dodatka DMSO. Kao što je vidljivo iz tablice 7., kompeticijsko otapalo (φ DMSO = 0,1) neznatno je utjecalo na kemijske pomake NH_{Fc} i NH_{Ala} skupine homokiralnog derivata **8** ($\Delta\delta = 0,3$ odnosno $\Delta\delta = 0,26$ ppm) kao i NH_{Fc} ($\Delta\delta = 0,37$ ppm) iz heterokiralnog derivata **9**, sugerirajući njihovo sudjelovanje u jačim IHB. S druge strane, u spektrima ¹H-NMR peptida **9** opažen je značajan pomak signala NH_{Ala} u niže polje ($\Delta\delta = 0,64$ ppm), što se pripisuje njezinom sudjelovanju u slabijim vodikovim vezama.

Tablica 7. Kemijski pomaci [δ /ppm] amidnih protona **8** i **9** u CDCl_3 i $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$.

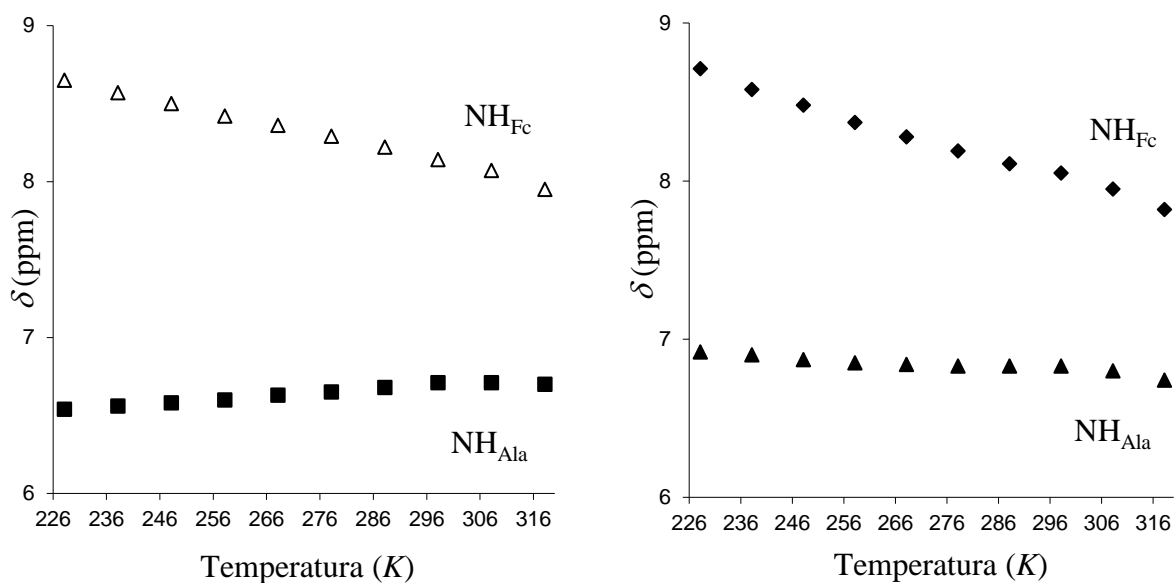
	8		9	
	NH_{Ala}	NH_{Fc}	NH_{Ala}	NH_{Fc}
CDCl_3 ($c = 4 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$)	6,79	8,23	6,94	8,15
CDCl_3 ($c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$)	6,67	8,16	6,77	7,98
$\text{CDCl}_3 / \text{DMSO}$ (9:1)	7,05	8,53	7,58	8,52

Temeljem ovisnosti kemijskih pomaka amidnih protona o temperaturi ($\Delta\delta/\Delta T$) može se procijeniti njihova izloženost otapalu.⁹⁶ Zbog nestabilnosti ferocenskih peptida u DMSO pri povišenoj temperaturi, temperaturno–ovisni eksperimenti NMR provode se u CDCl_3 . Literaturno dostupni podaci o ovisnosti kemijskih pomaka amidnih protona u CDCl_3 o temperaturi mogu se sažeti na sljedeći način:^{9,38,108,109}

- Visoke temperaturne ovisnosti (> -4 ppb/K) upućuju na NH–skupine koje su pri nižim temperaturama zaklonjene, ali porastom temperature postaju izložene otapalu.
- Male temperaturne ovisnosti ($-2,4 \pm 0,5$ ppb/K) pripisuju se amidnim protonima izloženima otapalu ukoliko im je inicijalni kemijski pomak manji od $\delta = 7$ ppm, odnosno zaklonjenim protonima ako su pri nižim temperaturama registrirani iznad $\delta = 7$ ppm.

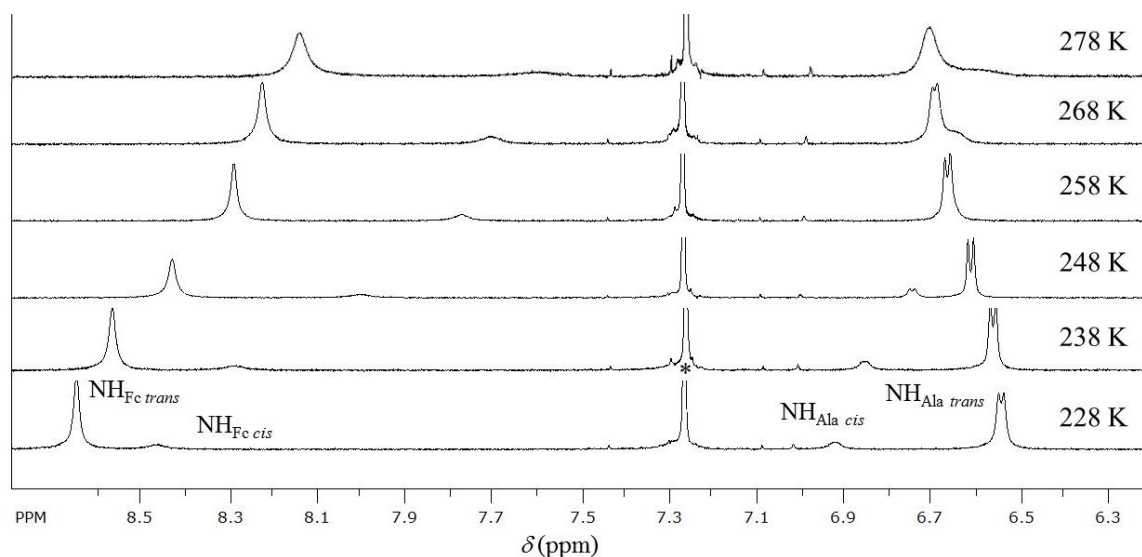
Temperaturno–ovisni spektri NMR **8** i **9** snimani su u temperaturnom rasponu od 228 K do 318 K i pri $c = 5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ kako bi se isključila mogućnost samoudruživanja molekula. Na slici 52. prikazana je ovisnost kemijskih pomaka NH_{Fc} i NH_{Ala} skupina iz spojeva **8** i **9** o temperaturi. Visoki temperaturni koeficijent NH_{Fc} skupine homokiralnog **8** (slika 52., *lijevo*) u rasponu od 298 K do 318 K [$\delta(\text{CDCl}_3) = 8,16$ ppm, $\Delta\delta/\Delta T = -8$ ppb K^{-1}] indiciraju je prvobitno zaštićene skupine koja s povećanjem temperature, uslijed odmotavanja konformacija uređenih unutarmolekulskim vodikovim vezama, postaje izložena otapalu. Nadalje, temperaturna ovisnost ovog kemijskog pomaka tijekom hlađenja od sobne temperature do 228 K [$\Delta\delta/\Delta T = -8$ ppb K^{-1}] ukazuje kako procesu smatanja pogoduju niže temperature. Ovi se rezultati mogu protumačiti fleksibilnošću IHB u malim peptidima na sobnoj temperaturi, koje uslijed optimizacije geometrije jačaju na nižim temperaturama.¹¹⁰

Kemijski pomak NH_{Fc} protona heterokiralnog **9** (slika 52., *desno*) slijedi sličan trend [δ (CDCl_3) = 7,98 ppm, $\Delta\delta / \Delta T$ (298–328 K) = $-11,5$ ppb K^{-1} , $\Delta\delta / \Delta T$ (228–298 K) = $-9,4$ ppb K^{-1}] s nešto zamjetnijom temperaturnom ovisnošću što ukazuje na izraženiju perturbaciju vodikovih veza uslijed zagrijavanja u usporedbi s **8**. Male temperaturne ovisnosti kemijskih pomaka NH_{Ala} **8** i **9** [**8**: δ (CDCl_3) = 6,67 ppm, $\Delta\delta / \Delta T = 1,8$ ppb K^{-1} ; **9**: δ (CDCl_3) = 6,77 ppm, $\Delta\delta / \Delta T = -2$ ppb K^{-1} , u rasponu 228–318 K] indiciraju su otapalu izloženih NH-skupina.

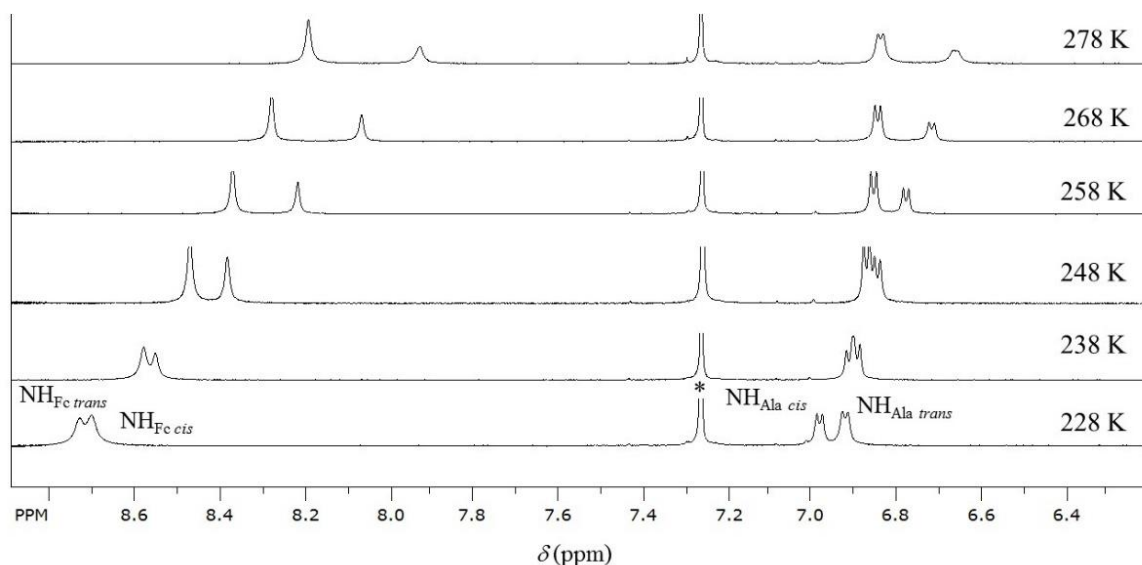


Slika 52. Ovisnost kemijskih pomaka amidnih protona **8** i **9** o temperaturi.

Kao što je navedeno u 4.1.2.2., pri sobnoj su temperaturi u spektrima NMR dijastereomernih **8** i **9** kao i enantiomernih **11** i **10**, opažena dva skupa signala koji zagrijavanjem srastaju te su pripisani *cis*- i *trans*-konformeru oko Boc-Pro veze. Za razliku od homokiralnog **8** kod kojeg nije detektirana promjena udjela dominantnog *trans*-izomera tijekom hlađenja (slika 53.), pri niskim temperaturama dolazi do značajnog jačanja signala *cis*-izomera heterokiralnog **9** (slika 54.). Pri 228 K udio *cis*-oblika **9** iznosi 45%, a kemijski pomak $\text{NH}_{\text{Fc } cis}$ [δ (CDCl_3) = 8,7 ppm] indicira njezino sudjelovanje u vodikovoj vezi.



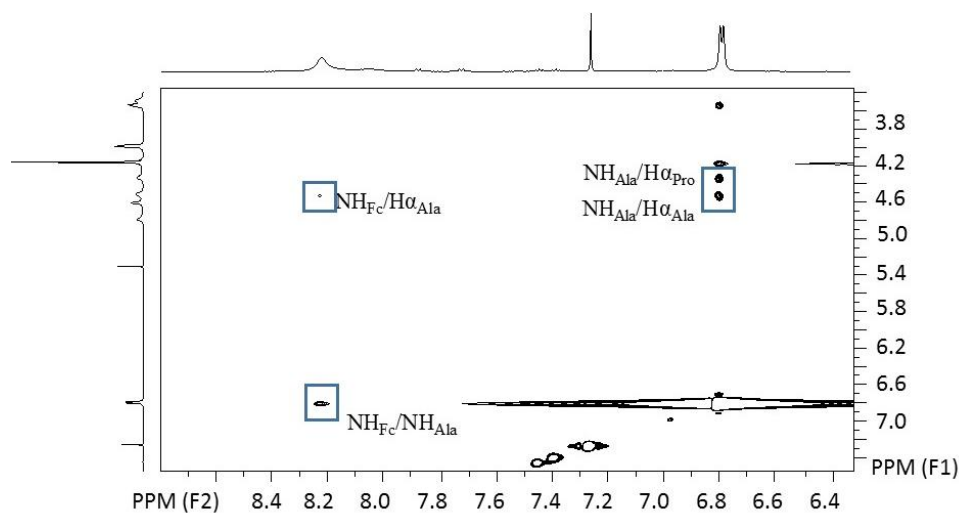
Slika 53. Amidno područje temperaturno–ovisnih spektara ^1H -NMR derivata **8** ($^*\text{CHCl}_3$, $c = 5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u CDCl_3).



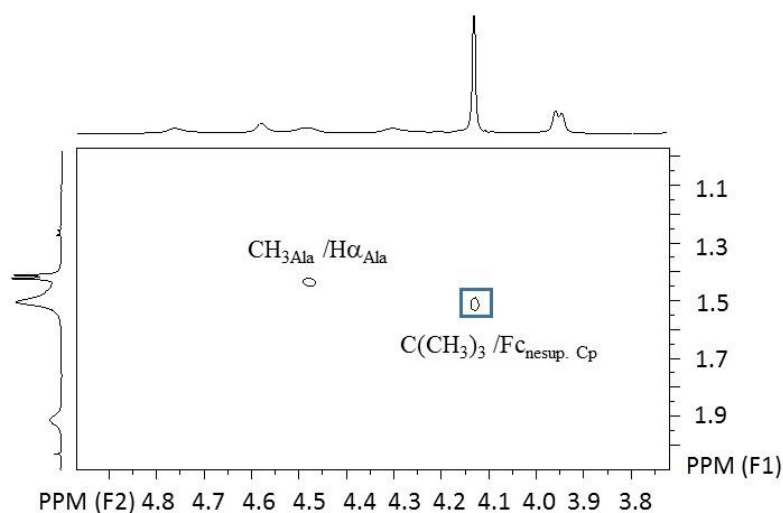
Slika 54. Amidno područje temperaturno–ovisnih spektara ^1H -NMR derivata **9** ($^*\text{CHCl}_3$, $c = 5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u CDCl_3).

Kako bismo dobili bolji uvid u konformacijski prostor peptida **8** i **9**, kao i enantiomernih **11** i **10**, istražili smo NOE–kontakte između različitih skupina u njihovim 2D spektrima NMR. S obzirom na primarnu strukturu peptidnog slijeda stabiliziranog unutarmolekulskim vezama, moguće konformacije ovih konjugata su β - i γ -okreti. U NOESY spektrima homokiralnih konjugata **8** i **11** opaženi su sekvencijalni $d_{\text{NN}}(i, i + 1)$ i $d_{\alpha\text{N}}(i, i + 1)$ između NH_{Ala} – NH_{Fc} ,

$H\alpha_{Pro}-NH_{Ala}$ i $H\alpha_{Ala}-NH_{Fc}$, karakteristični za β -okret u kratkim peptidima (slika 55).¹¹¹ Pored ovih sekvencijalnih signala, u spektrima svih dipeptida utvrđeni su i NOE-kontakti dugog doseg između C -terminalnog nesupstituiranog ciklopentadienilnog prstena i *tert*-butilne skupine na N -terminusu (slika 56).

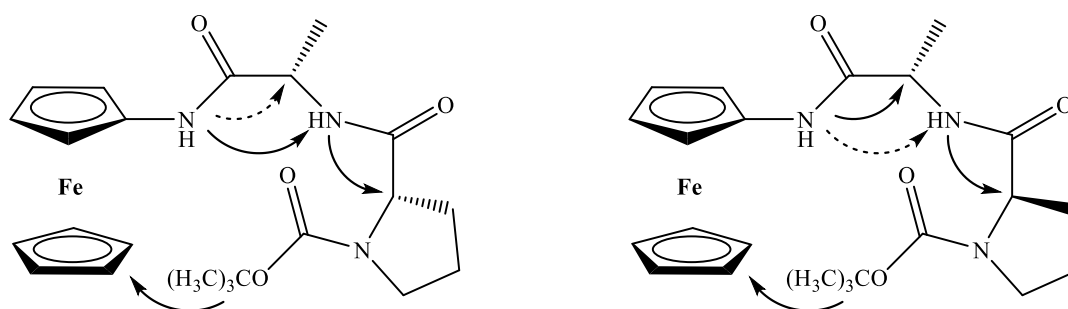


Slika 55. Sekvencijalne korelacije u NOESY spektru peptida **8** (kontakti karakteristični za β -okret su uokvireni).

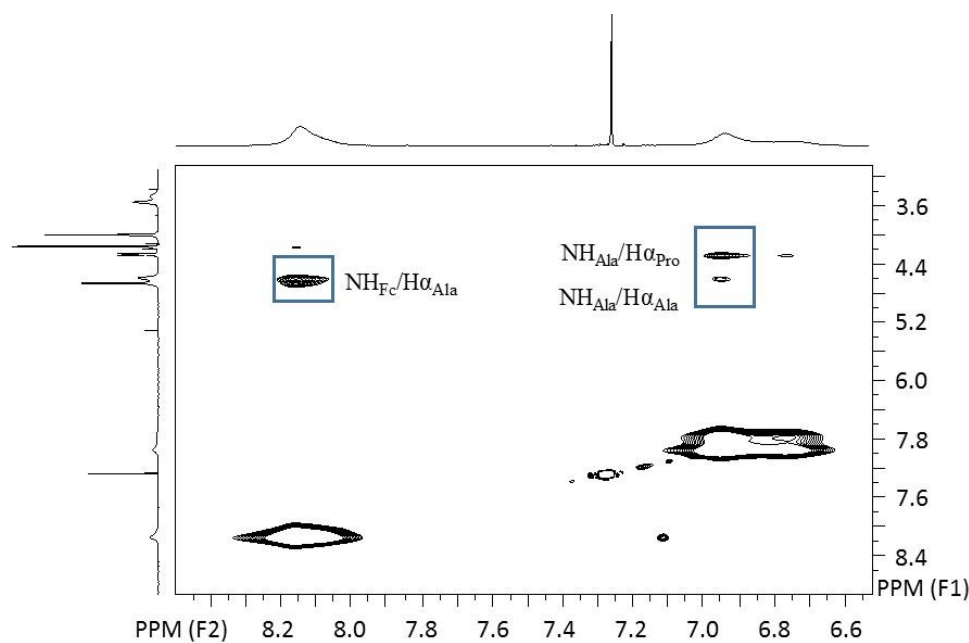


Slika 56. NOE kontakt dugog doseg u spektru peptida **8**.

Kao što se može vidjeti na slikama 55. i 56., promjena konfiguracije aminokiseline na položaju $i + 1$ uzrokovala je značajno slabljenje sekvencijalnih kontakata između NH_{Ala} i NH_{Fc} i jačanje $\text{H}\alpha_{\text{Ala}}\text{-NH}_{\text{Fc}}$ signala u NOESY spektru rezultirajućeg heterokiralnog **9** (slike 57. i 58.). Ovi nalazi ukazuju kako umetanje prolinskog ostatka D-konfiguracije destabilizira strukturu nalik β -okretu pronađenu u homokiralnom analogu **8**.



Slika 57. Shematski prikaz NOE interakcija opaženih u spektrima derivata **8** (*lijevo*) i **9** (*desno*). (Pune linije prikazuju jake ili signale srednje jakosti dok su slabi prikazani iscrtkanim linijama).

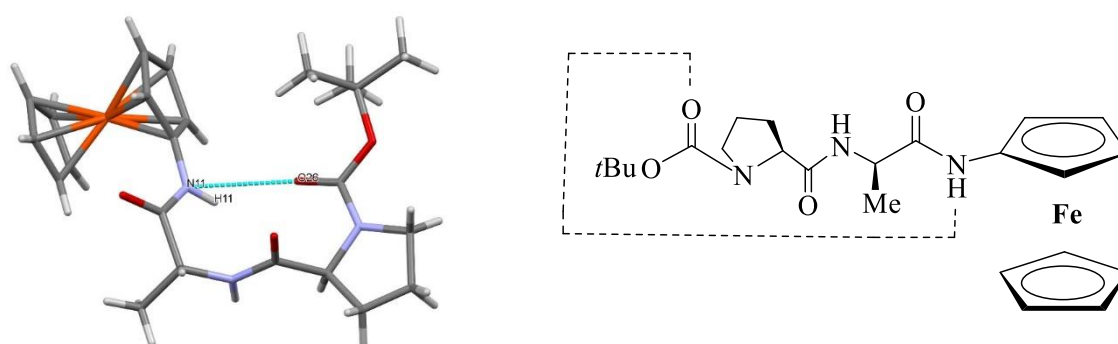


Slika 58. Sekvencijalne interakcije u NOESY spektru peptida **9**.

Prethodno opisani rezultati spektroskopske analize (IR i NMR) indiciraju stabilizaciju homokiralnih derivata **8** i **11** unutarlančanom vodikovom vezom između NH_{Fc} skupine i uretanske karbonilne funkcije koja zatvara 10-člani prsten i podržava konformaciju β -okreta. No, sudeći prema rezultatima istih analiza u otopinama heterokiralnih **9** i **10** prisutni su i drugi strukturni elementi podržani unutarmolekulskim interakcijama. U recentnim su publikacijama u kristalnim strukturama heterokiralnih peptida, iako znatno rjeđi od β -okreta, evidentirani γ -okreti. Pritom se γ -okreti najčešće nalaze kod peptida koji nisu stabilizirani međumolekulskim vodikovim vezama, bilo s otapalom ili s drugim molekulama.^{112,113} Također, rezultati proizašli iz studija konformacijskih preferencija malih peptida ($t\text{BuCO-Pro-AA-NHCH}_3$) u otopini ukazuju kako kod alaninskih derivata dolazi do kompetitivnog formiranja 10- i 7-članih prstenova podržanih vodikovim vezama.¹¹⁴

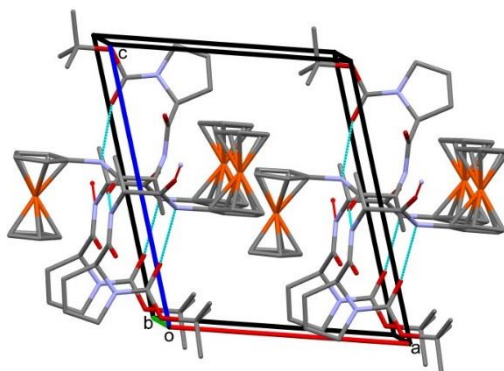
4.1.2.3. Kristalografska analiza

Kako bi se dobili monokristali prikladni za rendgensku strukturnu analizu, derivati **9** i **10** prekrystalizirani su iz diklormetana pri sobnoj temperaturi. Strukturna analiza je pokazala da su duljine kemijskih veza i kutovi u molekulama **9** i **10** unutar očekivanog raspona dok su ciklopentadienilni prstenovi ferocena u zasjenjenoj konformaciji. Konformacija derivata **10** u čvrstom je stanju stabilizirana jednom $\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$ IHB duljine 2,885 (5) Å koja zatvara 10-člani prsten i podržava konformaciju β -okreta (slika 59.).



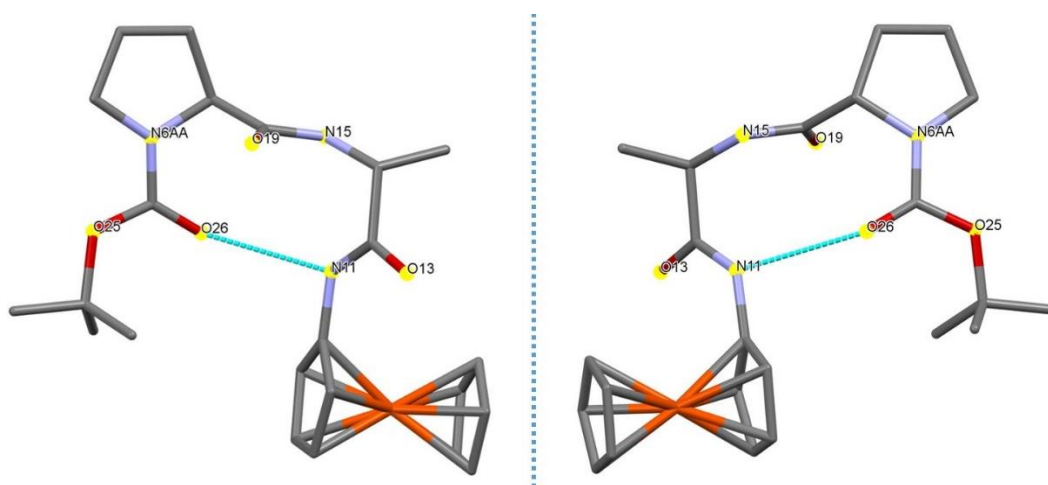
Slika 59. Molekulska struktura i shematski prikaz peptida **10** u čvrstom stanju.

Povezivanjem susjednih molekula **10** međumolekulskim vodikovim vezama između alaninskih amino- i karbonilnih skupina u smjeru kristalografske osi *b* nastaju visoko uređene strukture s periferno orijentiranim ferocenskim podjedinicama (slika 60.).



Slika 60. Međumolekulske vodikove veze u kristalu **10** [$d(\text{N15-H15}\cdots\text{O13}) = 2,895(5) \text{ \AA}$].

Budući da su **9** i **10** enantiomeri, njihove su geometrije (slika 61.) u zrcalnom odnosu.



Slika 61. Molekulske strukture konformacijskih enantiomera **9** i **10**.

4.1.2.4. Analiza spektroskopijom CD

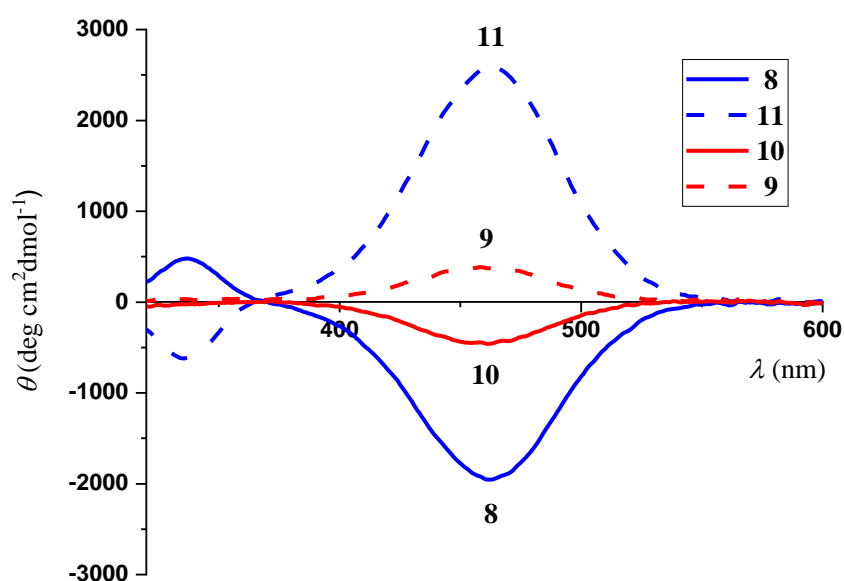
Kao što je navedeno u Literaturnom pregledu (2.4.1 i 2.7), spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD) je metoda koja se, osim za određivanje konfiguracije kiralnih spojeva, koristi i za predviđanje sekundarne strukture peptida.^{115,116} Ukoliko su u peptidnim konjugatima ferocena u blizini organometalnog kromofora prisutne kiralne strukture u njegovoj se

apsorpcijskom području ($\lambda \sim 460$ nm) opažaju Cottonovi efekti. Pritom središnja kiralnost konstituirajućih aminokiselina inducira slabe CD–signale ($\theta < 500$ deg cm² dmol⁻¹), dok su jaki Cottonovi efekti ($\theta > 5000$ deg cm² dmol⁻¹) indicacija visokouređenih kiralnih struktura podržanih međulančanim vodikovim vezama. Budući da monosupstituirani derivati ne mogu tvoriti međulančane vodikove veze (koje ograničavaju rotaciju cp prstenova oko zajedničke osi u Fc sustavu u konformaciju *P*– ili *M*–uzvojnice), signali opaženi u spektrima CD derivata **III** (Boc–AA₂–AA₁–NH–Fc) proizlaze iz prijenosa kiralne informacije s lokalne strukture u peptidnom lancu do ferocenskog kromofora.

Imajući u vidu rezultate prethodne spektroskopske analize (IR i NMR), odlučili smo ispitati kiralno uređenje **8–11** spektroskopijom CD. Molarni ekstinkcijski koeficijenti, valne duljine apsorpcijskih maksimuma d–d prijelaza, molarna eliptičnost i valne duljine maksimuma CD–vrpci derivata **8–11** prikazani su u tablici 8., a vidljivo područje spektara CD na slici 62. Prema očekivanjima, u spektrima enantiomernih konjugata **8** i **11** odnosno **9** i **10** u diklormetanskoj otopini registriran je signal suprotnog predznaka i jednakog intenziteta. Nadalje, intenzitet Cottonovih efekata u spektrima homokiralnih **8** i **11** gotovo je 5 puta jači od signala registriranog u spektrima heterokiralnih derivata **9** i **10** što ukazuje na viši stupanj kiralnog uređenja homokiralnih peptida. Budući da je u spektrima derivata **8** i **10** registriran Cottonov efekt negativnog predznaka, može se zaključiti kako je predznak CD–signala određen kiralnošću aminokiseline na položaju *i + 1*; ukoliko je aminokiselina L–konfiguracije predznak je negativan, a pozitivni Cottonov efekt proizlazi u slučaju da je *i + 1* aminokiselina D–konfiguracije.

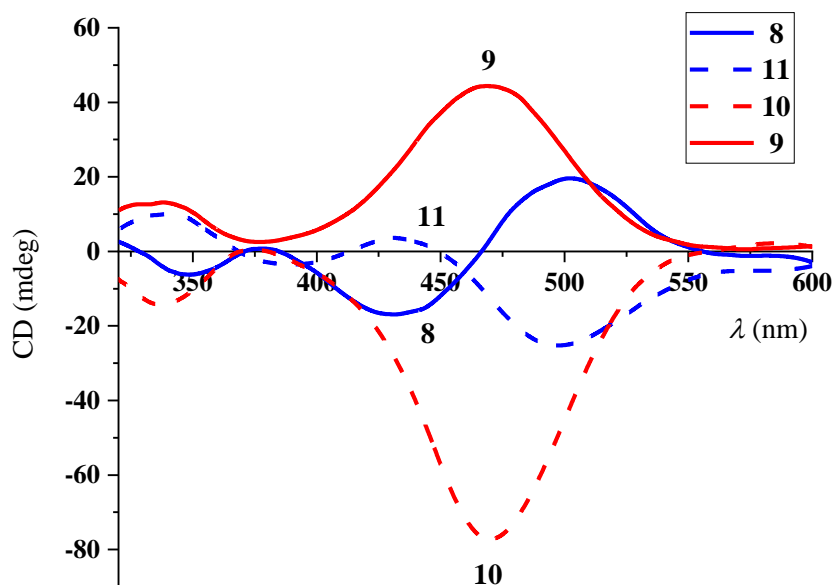
Tablica 8. UV/Vis i CD–podaci spojeva **8–11** ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³).

	otapalo	8	9	10	11
$\lambda_{\max}/$ nm ($\varepsilon/$ M ⁻¹ cm ⁻¹)	CH ₂ Cl ₂	445 (521)	445 (561)	445 (566)	445 (513)
$\lambda_{\max}/$ nm ($\theta/$ deg cm ² dmol ⁻¹)	CH ₂ Cl ₂	462 (-2540)	458 (480)	463 (-461)	462 (2571)



Slika 62. Cottonovi efekti u spektrima CD derivata **8–11** u CH_2Cl_2 pri $c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Kako bi ispitali kiralno uređenje **8–11** u čvrstom stanju izveli smo CD–mjerjenja pastila načinjenih homogeniziranjem uzoraka s kalijevim bromidom. Dobiveni rezultati (slika 63.) pokazuju da je i u čvrstom stanju prisutno kiralno uređenje. Za razliku od spektara CD u otopini, dominantni signal u području ferocenskog kromofora ($\lambda \sim 460 \text{ nm}$) homokiralnog **8** pozitivnog je predznaka, dok je kod njegovog enantiomera **11** zabilježen negativni predznak. S obzirom da su pokušaji pripreve monokristala **8** i **11** za kristalografsku analizu bili neuspješni, nismo mogli potvrditi pretpostavku da su takvi rezultati posljedica samoudruživanja molekula u čvrstom stanju odnosno međumolekulskih vodikovih veza. Spektri CD heterokiralnih derivata **9** i **10** u čvrstom stanju indiciraju su visoko uređene kiralne okoline u blizini ferocenskog kromofora čije je porijeklo intrinzično ili inducirano pakiranjem molekula u kristal.

Slika 63. Spektri CD **8–11** u čvrstom stanju.

4.1.2.5. DFT–modeliranje i usporedba teorijskih i eksperimentalnih rezultata

Teorija funkcionala gustoće (*engl.* Density Functional Theory)¹¹⁷ jedna je od najčešće korištenih metoda za *ab initio* proračune strukture atoma i molekula kao i njihovih interakcija te se, između ostalog, već duži niz godina primjenjuje u istraživanju konformacijskog prostora ferocenskih biokonjugata.^{9,16,37,38,118,119} Modeliranje dipeptida **8–11** provedeno je, u suradnji s doc. dr. sc. Ivanom Kodrinom s Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, B3LYP funkcionalom s uključenim Grimmeovim disperznim korekcijama u kombinaciji s Popleovim osnovnim skupom 6–311+G(d,p) dok je za atom željeza korišten skup efektivnog potencijala jezgre (*engl.* effective core potential, ECP) LanL2DZ. Kako bi se teorijski nalazi što bolje korelirali s eksperimentalnima u konačnim je izračunima kloroform tretiran kao polarizabilni dielektrični kontinuum. Budući da su derivati **8** i **11**, odnosno **9** i **10** u enantiomernom odnosu, računalno su analizirani diastereoizomerni **8** i **9**. Rezultati DFT–modeliranja sumirani su u tablici 9, a na slici 64 prikazane su konformacije **8** i **9** dobivene optimizacijom struktura stabiliziranih unutarmolekulskim vodikovim vezama. Konformeri su klasificirani prema obrascima IHB prikazanim na slici 65. Najstabilnije konformacije homokiralnog derivata **8** (**8c1–8c5**) stabilizirane su unutarmolekulskom vodikovom vezom

uspostavljenom između NH_{Fc} skupine i uretanske karbonilne funkcije koja zatvara 10-člani prsten i podržava konformaciju β -okreta tipa I.

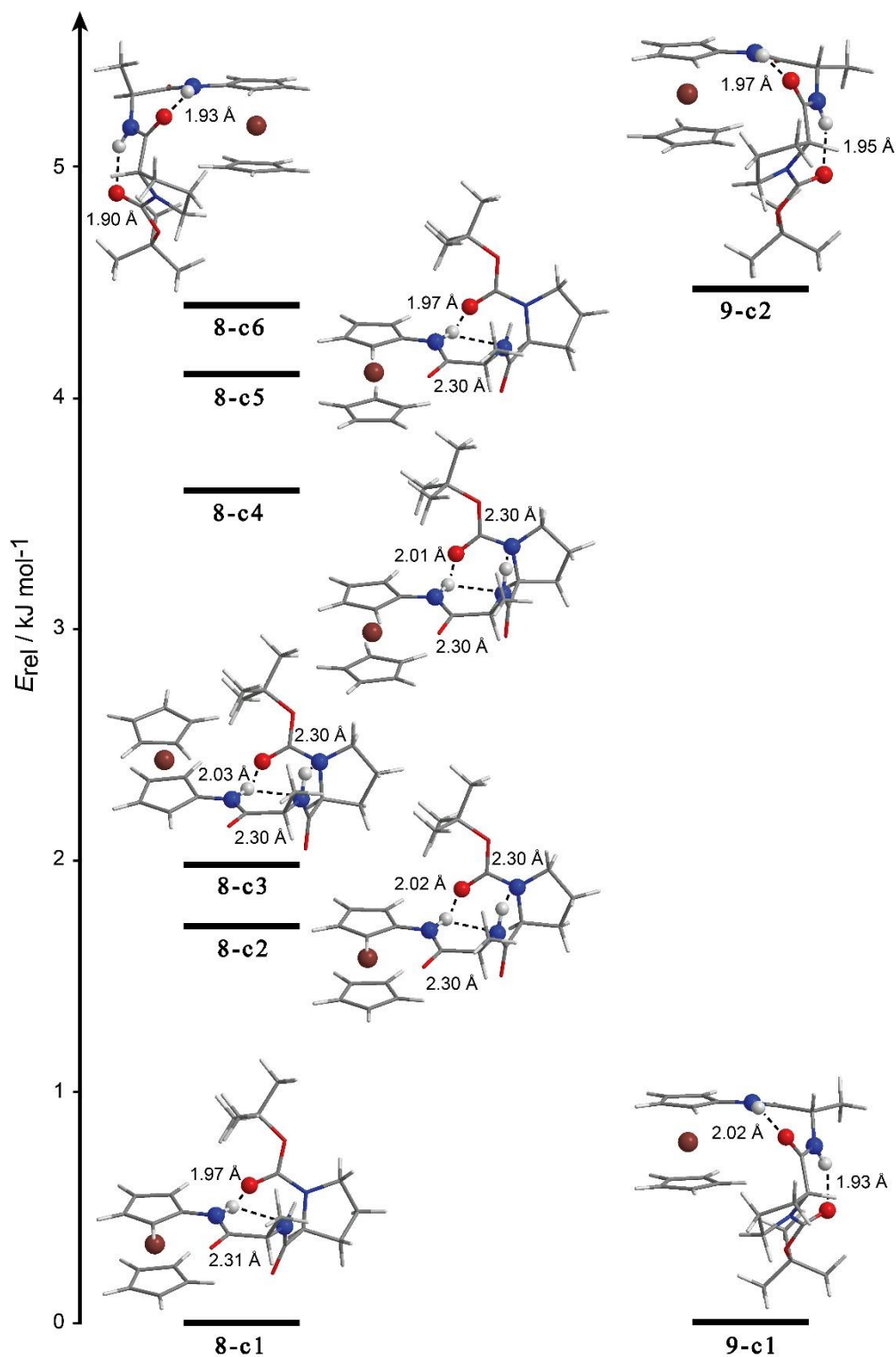
Prema rezultatima temeljenim na kvantnoj teoriji atoma u molekulama (*engl.* QTAIM), ti su konformeri dodatno stabilizirani $\text{N-H}\cdots\text{N}$ interakcijom između amidnih skupina susjednih aminokiselina. *Egzo*- i *endo*-konformacije pirolidinskog prstena utvrđene računalnim modeliranjem prikazane su na slici 65. (*dolje*) i u tablici 9. Budući da su *egzo*- (**8c1** i **8c5**) i *endo*-konformeri (**8c2**–**8c4**) energijski bliski te im je raspored vodikovih veza jednak svrstani su u obrazac A. Osim konformacije ciklopentadienilnih prstenova (zasjenjena: **8c1** i **8c2**, zvjezdasta: **8c3**–**8c5**) na relativnu stabilnost konformera **8c1**–**8c5** utječe i relativna orijentacija peptidnog segmenta prema nesupstituiranom ciklopentadienilnom prstenu (**8c3**) ili u suprotnom smjeru (**8c2**).

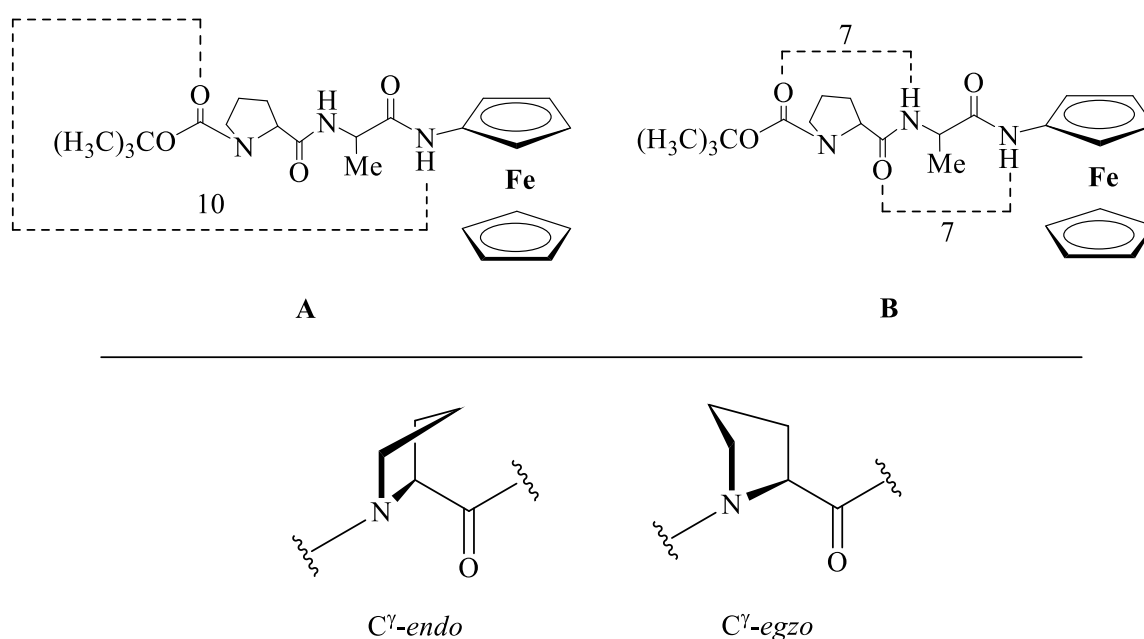
Najstabilnija konformacija heterokiralnog derivata **9** stabilizirana je dvjema IHB što rezultira dvama 7-članim prstenovima (obrazac B) odnosno uzastopnim γ -okretima. U oba najstabilnija konformera (**9c1** i **9c2**), koji se razlikuju u konformaciji ciklopentadienilnih prstenova (zasjenjena: **9c1**, zvjezdasta: **9c2**), pirolidinski prsten zauzima *endo*-konformaciju. Sličan obrazac B utvrđen je i u konformaciji **8c6** homokiralnog derivata **8**. Obrazac A (β -okret) svojstven najstabilnijim konformerima homokiralnih derivata **8c1**–**8c5** opažen je u konformeru **9c _{β}** čija je energija približno 9 kJ mol^{-1} veća od energije najstabilnijeg heterokiralnog konformera **9c1**. Nadalje, razlika u energiji između **9c1** i konformera dobivenog optimizacijom kristalne strukture **9** u kloroformu (**9c**) još je veća te iznosi približno 13 kJ mol^{-1} .

Tablica 9. Relativne energije najstabilnijih konformera **8** i **9** u kloroformu pri 298 K (populacije > 5% prema Boltzmannovoj raspodjeli konformera), konformacija pirolidinskog prstena prolina i obrazac IHB prema slici 65 (s tipovima β -okreta za obrazac A), duljina [\AA] vodikovih veza.

konformer	ΔE / kJ mol^{-1}	konf. Pro prstena	obrazac IHB	$\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$ 10-člani	$\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{N}_{\text{Ala}}$ 5-člani	$\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{N}_{\text{Pro}}$ 5-člani	$\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{OC}_{\text{Pro}}$ 7-člani	$\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$ 7-člani
8c1	0,00	<i>egzo</i>	A ^[a] (tip I)	2,95	2,77	–	–	–
8c2	1,72	<i>endo</i>	A ^[a] (tip I)	2,99	2,75	2,77	–	–
8c3	1,97	<i>endo</i>	A ^[a] (tip I)	3,00	2,75	2,77	–	–
8c4	3,60	<i>endo</i>	A ^[a] (tip I)	2,98	2,75	2,76	–	–
8c5	4,10	<i>egzo</i>	A ^[a] (tip I)	2,94	2,76	–	–	–
8c6	4,40	<i>endo</i>	B	–	–	–	2,83	2,85
9c1	0,00	<i>endo</i>	B	–	–	–	2,92	2,89
9c2	4,57	<i>endo</i>	B	–	–	–	2,89	2,86
9cβ	9,23	<i>egzo</i>	A (tip II')	3,09	–	–	–	–
9c	12,95	<i>egzo</i>	A (tip II')	2,94	–	–	–	–

[a] slično tipu A, ojačano s jednom ili dvije $\text{NH} \cdots \text{N}$ vodikove veze, prema QTAIM analizi

Slika 64. Najstabilniji konformeri **8** i **9** s prikazanim duljinama vodikovih veza.



Slika 65. Obrasci vodikovih veza u najstabilnijim konformacijama derivata **8** i **9** (*gore*) i konformacije pirolidinskog prstena prolina (*dolje*).

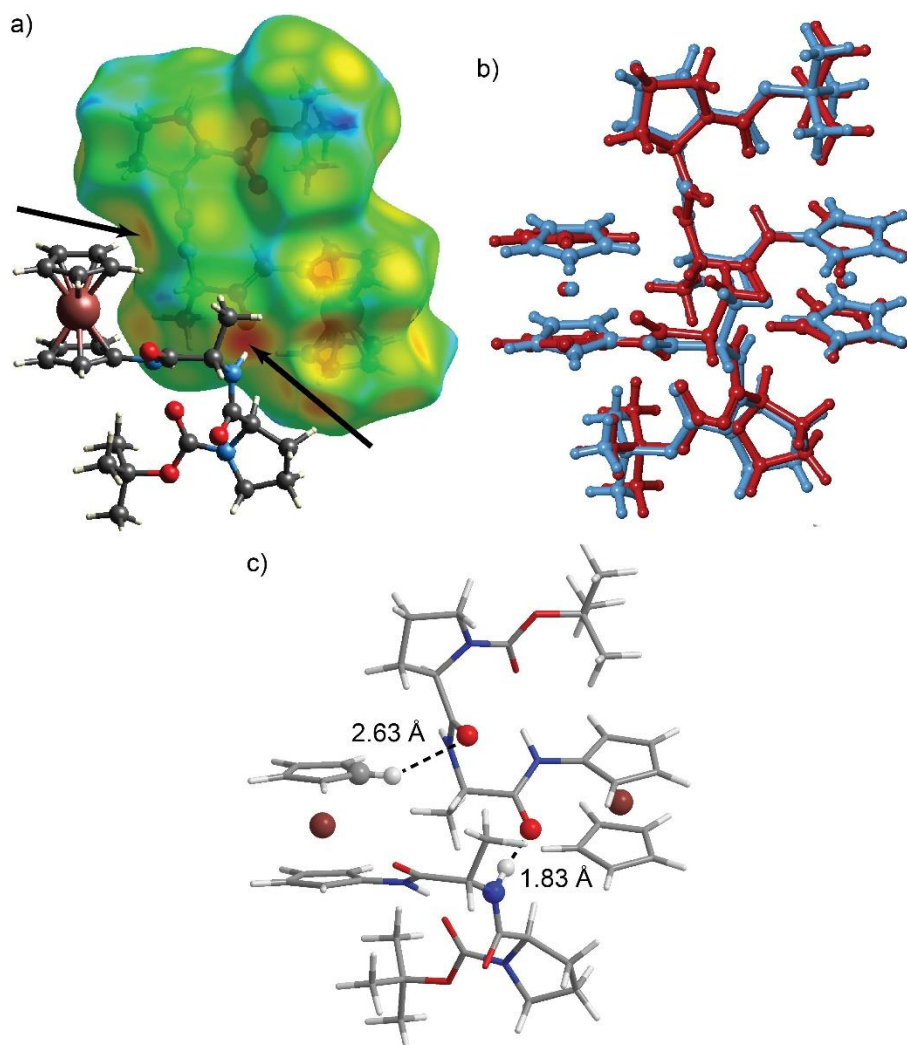
Kako bi se stekla jasnija saznanja o utjecaju ferocenske jezgre na svijanje peptidnog segmenta računalnom su modeliranju podvrgnuti i modelni analozi **8** i **9**, homokiralni derivat **m8** i heterokiralni **m9**, u kojima je organometalna podjedinica zamijenjena metilnom skupinom. Detaljni rezultati računalne analize **m8** i **m9** nalaze se u dodatku (tablica D1 i slika D3). Kao i kod ferocenskih konjugata, gdje je β -okret utvrđen u najstabilnijim konformerima homokiralnog **8**, strukturu β -okreta također nalazimo i u najstabilnijim konformacijama homo- (**m8**) i heterokiralnog modelnog spoja (**m9**). U energijski nepovoljnijim, no još uvijek značajno populiranim, konformacijama **m8** i **m9** javljaju se i γ -okreti što potvrđuje literaturno dostupne eksperimentalne podatke kojima je indicirana prisutnost 7- i 10-članih prstenova u peptidima s Pro-Ala slijedom.¹¹⁴ Zaključno, rezultati proizašli iz računalne studije sugeriraju da u heterokiralnim derivatima ferocenska podjedinica može inducirati γ -okrete dok homokiralni analozi preferiraju konformaciju β -okreta tipa I.

U nastavku istraživanja usporedili smo podatke proizašle iz DFT-računa s eksperimentalnim opažanjima. Spektroskopijom (IR i NMR) indicirano sudjelovanje pojedinih NH-skupina **8–11** u IHB modeliranjem je potvrđeno. Eksperimentalno registrirane slobodne NH-skupine mogu se na temelju DFT-računa identificirati kao NH_{Ala} grupa čije je

sudjelovanje u 5-članim prstenovima uočeno u samo pojedinim konformerima. Teorijski i eksperimentalni podaci ukazuju na β -okret kao dominantnu konformaciju homokiralnih **8** i **11**. Nadalje, NOESY i spektroskopijom CD detektirano narušavanje sekundarne strukture (β -okreta) izazvano zamjenom L-Pro s D-Pro u rezultirajućem heterokiralnom **9** može se objasniti pomoću nalaza DFT-modeliranja prema kojem dvije najstabilnije konformacije **9c1** i **9c2** sadrže γ -okrete. Također, analiza udaljenosti pojedinih skupina u računalno generiranim geometrijama **9c1** i **9c2** objašnjava iznimno slabe NH_{Ala} i NH_{Fc} te jake $\text{H}\alpha_{\text{Ala}}\text{-NH}_{\text{Fc}}$ signale u NOESY spektru **9**.

Budući da se konformacije heterokiralnih dipeptida **9** i **10** pronađene u čvrstom stanju (β -okret) razlikuju od struktura dobivenih optimizacijom izoliranih molekula (γ -okreti) provedena je analiza Hirshfeldove plohe derivata **9** kako bi se istražile interakcije između susjednih molekula. Uz očekivane N-H...O međumolekulske vodikove veze opažena je, i QTAIM analizom potvrđena, dodatna interakcija između karbonilnog kisika prolina i nesupstituiranog ciklopentadienilnog prstena susjedne molekule (slika 66a.). Kao što se može vidjeti na slici 66b., na kojoj je prikazana njihova superpozicija, eksperimentalna i optimizacijom dobivena geometrija dimera **9** sadrži β -okrete te su vrlo slične s RMS (root-mean-square) odstupanjem od 0,866 Å. Nadalje, izračunata energija interakcije prilikom nastanka dimera iznosi -91,0 kJ mol⁻¹, što je znatno više od energije potrebne za reorganizaciju uzastopnih γ -okreta u **9c1** i **9c2** u β -okrete (24,9 i 29,8 kJ mol⁻¹).

Zaključno, teorijske i eksperimentalne metode ukazuju kako najstabilnije konformacije izoliranih molekula heterokiralnih **9** i **10** sadrže uzastopne γ -okrete dok se uslijed povoljnih interakcija sa susjednim molekulama njihove geometrije mogu reorganizirati u manje stabilnu konformaciju β -okreta.



Slika 66. a) Hirshfeldova ploha molekule **9** (područja međumolekulskih vodikovih veza označena su strelicama) b) Superpozicija dimera **9** iz kristalne rešetke i optimiziranog konformera c) Optimizirana geometrija dimera **9** s prikazanim međumolekulskim vodikovim vezama.

4.2. Sinteza, konformacijska analiza i kirooptička svojstva ferocenskih tripeptida 12–19

U ovom su poglavlju opisani derivati Boc-AA₃-AA₂-AA₁-NH-Fc (**12–19**) izvedeni iz aminoferocena i tripeptidnih slijeda s diprolinskim segmentom čija su konformacijska svojstva opisana u Literaturnom dijelu disertacije (2.6):

12, AA₁ = L-Ala, AA₂ = L-Pro, AA₃ = L-Pro;

13, AA₁ = L-Ala, AA₂ = L-Pro, AA₃ = D-Pro;

14, AA₁ = L-Ala, AA₂ = D-Pro, AA₃ = L-Pro;

15, AA₁ = L-Ala, AA₂ = D-Pro, AA₃ = D-Pro;

16, AA₁ = D-Ala, AA₂ = L-Pro, AA₃ = L-Pro;

17, AA₁ = D-Ala, AA₂ = L-Pro, AA₃ = D-Pro;

18, AA₁ = D-Ala, AA₂ = D-Pro, AA₃ = L-Pro;

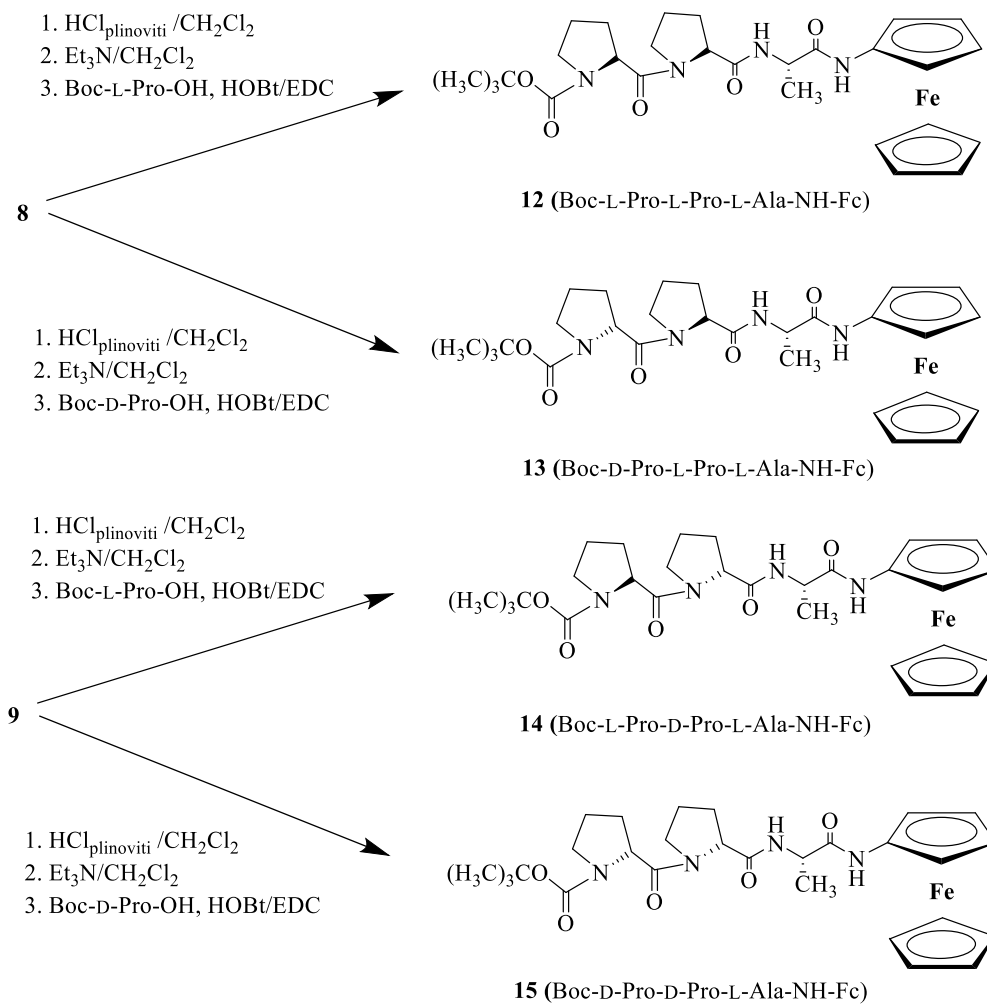
19, AA₁ = D-Ala, AA₂ = D-Pro, AA₃ = D-Pro.

Prilikom konstrukcije ciljnih spojeva odlučili smo se za uvođenje prolina na *N*-terminus dipeptida **8–11** jer u usporedbi s drugim aminokiselinama ne sadrži donora vodikove veze čime se ograničava dostupan konformacijski prostor. Također, ovi su derivati odabrani jer im tripeptidni slijed, uz donora i akceptora vodikove veze u aminoferocenu odnosno zaštitnoj skupini, omogućava tvorbu minimalnih uzvojnica. Pritom smo pretpostavili kako će različiti strukturni elementi (okreti, uzvojnice) prisutni u termodinamički najpovoljnijim konformacijama homo- (**12, 19**) i heterokiralnih (**13–18**) stereoizomera rezultirati različitim oblicima i predznacima CD-krivulja u blizini apsorpcijskog maksimuma ferocenskog kromofora.

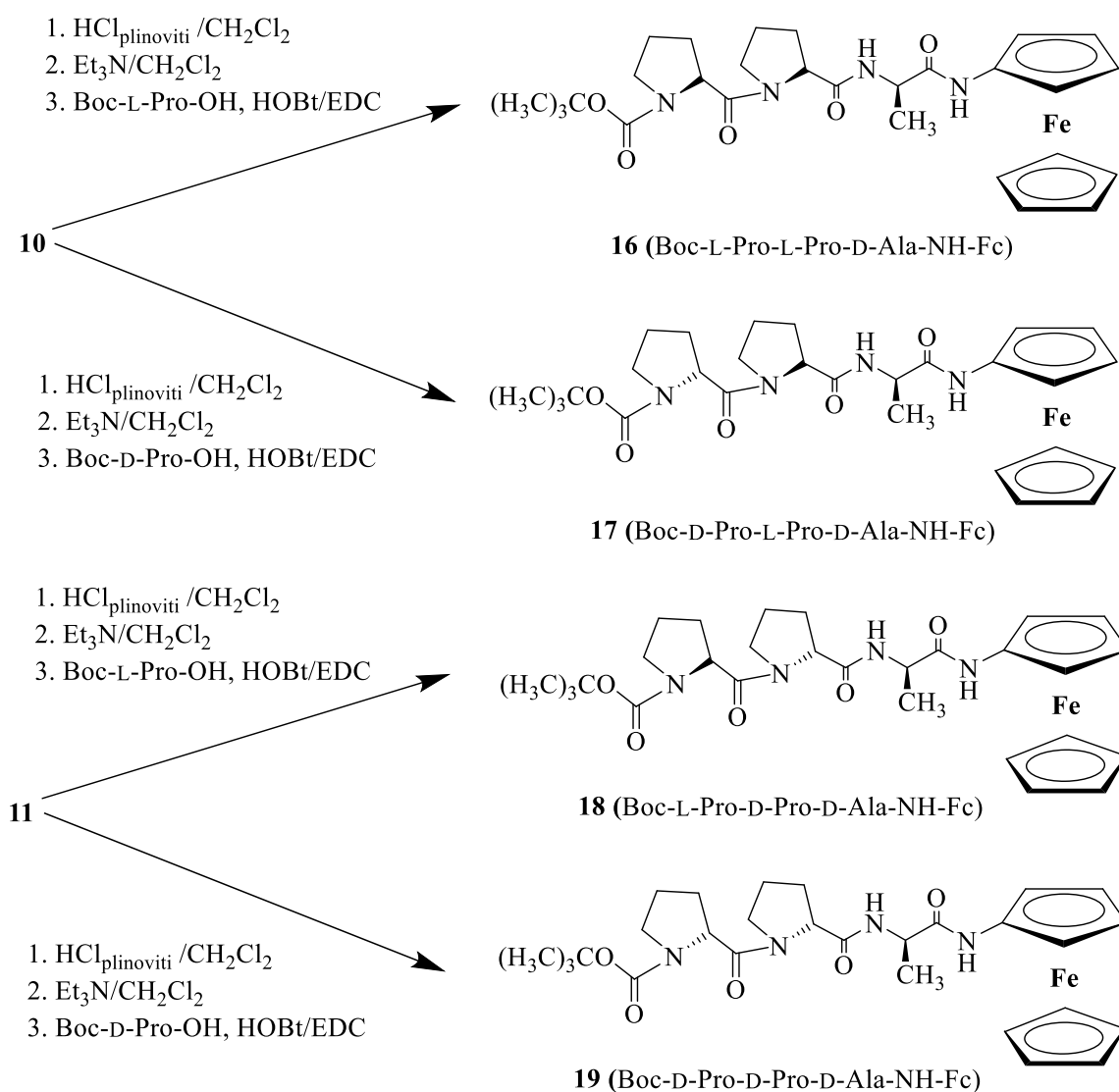
4.2.1. Sinteza tripeptida 12–19

Tripeptidi **12–19** pripremljeni su iz dipeptida **8–11** primjenom postupaka opisanih u poglavlju 4.1.1. Deprotekcijom Boc-zaštićenih amino-skupina dipeptida **8–11** djelovanjem plinovitog HCl pripremljeni su hidrokloridi koji su obradom s Et₃N prevedeni u odgovarajuće nestabilne amine. Amini su potom kopulirani s prethodno aktiviranim Boc-zaštićenim L-Pro odnosno

D-Pro pri čemu su dobiveni tripeptidi **12** (95%), **13** (95%), **14** (97%), **15** (90%), **16** (83%), **17** (71%), **18** (62%) i **18** (71%) (sheme 5. i 6).

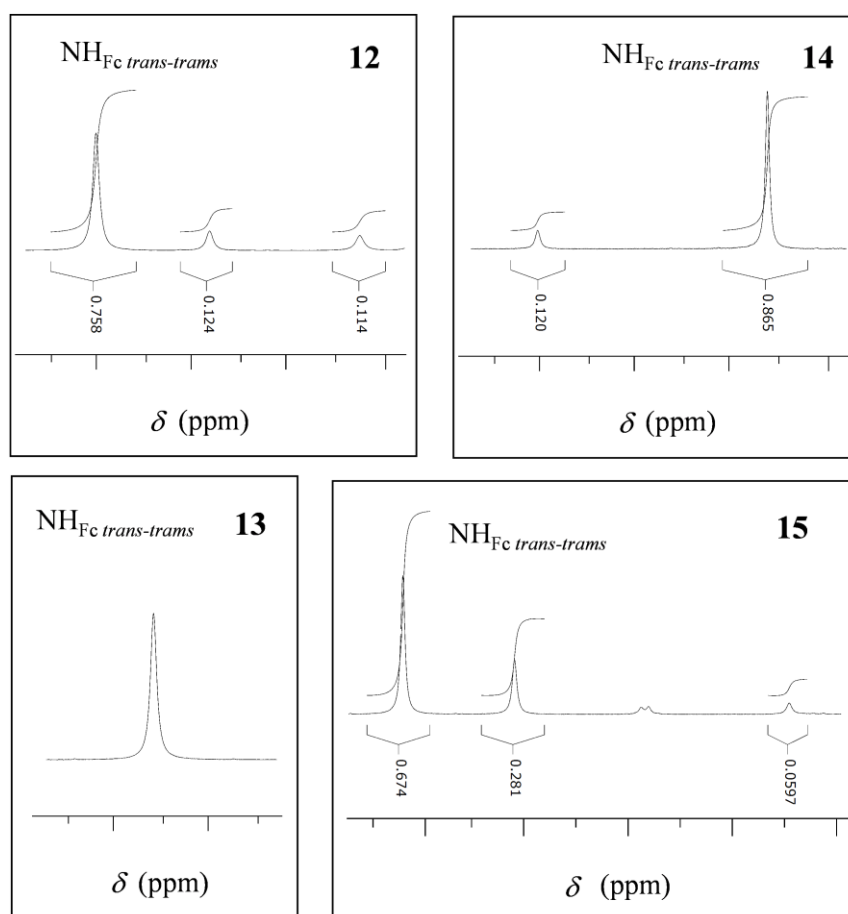


Shema 5. Sinteza ferocenskih tripeptida **12–15**.

Shema 6. Sinteza ferocenskih tripeptida **16–19**.

U većini spektara $^1\text{H-NMR}$ pripremljenih tripeptida opaženi su višestruki signali NH_{Fc} i NH_{Ala} skupina uzrokovani *cis-trans*-izomerizacijom prolinske imidne veze (slika 67.). Iznimka su tripeptid **13** i njegov enantiomer **18** u čijim je spektrima registriran samo jedan skup signala koji je na osnovi razlike u kemijskim pomacima $\text{C}\beta$ - i $\text{C}\gamma$ -atoma ($\Delta\delta < 6$ ppm) pripisan *trans-trans* izomeru. Integracijom signala amino-skupina u spektrima $^1\text{H-NMR}$ preostalih konjugata određen je udio dominantnog *trans-trans* izomera pri 25 °C; 76% za **12** i **19**, 87% za **14** i **17** te 67% za **15** i **16**.

Preostali signali *trans-trans* izomera u spektrima $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ tripeptida **12–19** asignirani su primjenom dvodimenzijske homo- (COSY, NOESY) i heteronuklearne (HSQC, HMBC) spektroskopije NMR. Uvođenje dodatnog L- odnosno D-Pro na *N*-terminus dipeptida **8–11** potvrđeno je multipletima njegovih metilenskih δ' - ($\delta \sim 3,8$ ppm), β' - ($\delta \sim 2,2$ ppm) i γ' -protona ($\delta \sim 2,0$ ppm) te metinskih protona ($\delta \sim 4,5$ ppm) registriranim u spektrima $^1\text{H-NMR}$ tripeptida **12–19**. Struktura tripeptida također je potvrđena opažanjem dodatnih signala pirolidinskih α' ($\delta \sim 60,5$ ppm), δ' ($\delta \sim 47,5$ ppm), β' ($\delta \sim 29,3$ ppm) i γ' ($\delta \sim 25,5$ ppm) ugljikovih atoma kao i karbonilnih C-atoma ($\delta \sim 173$ ppm) nove amidne veze u spektrima $^{13}\text{C-NMR}$ **12–19**.

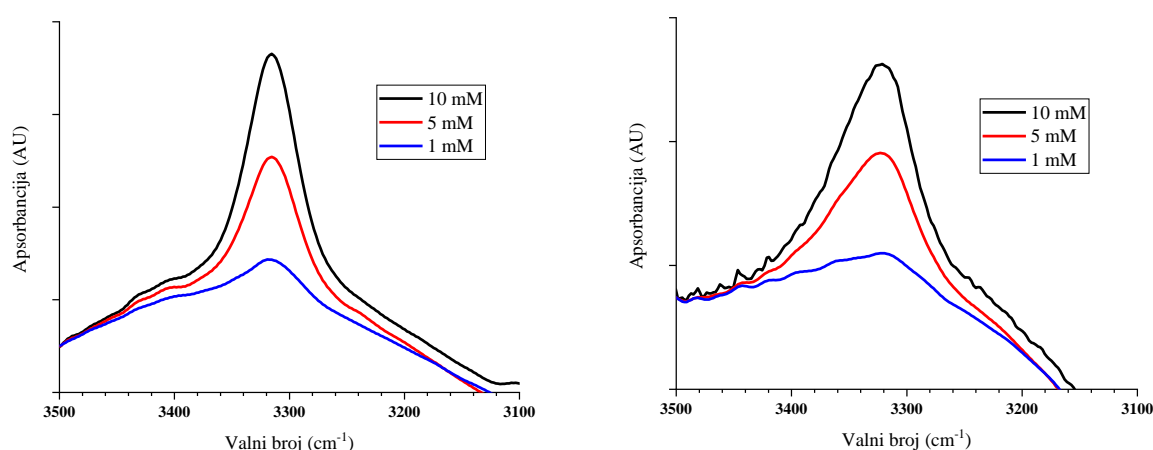


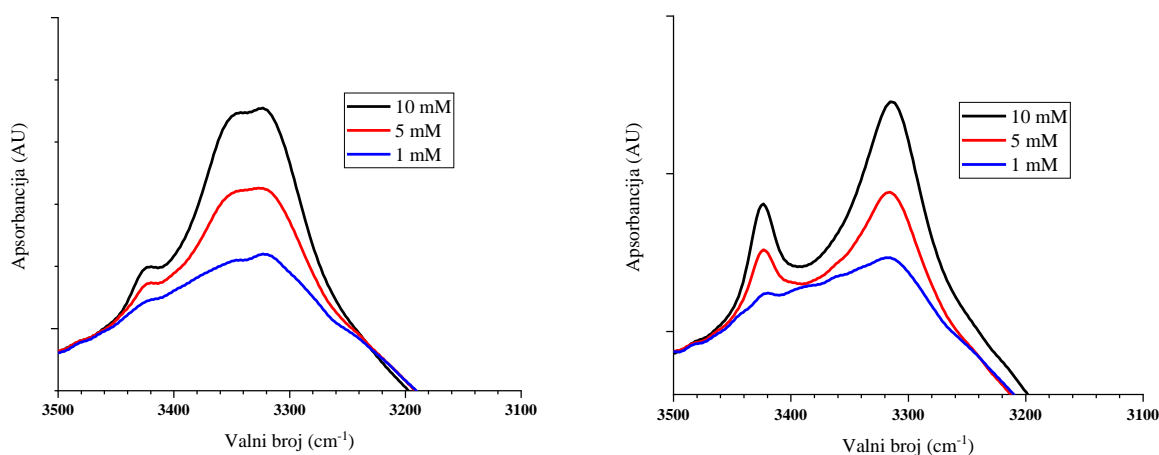
Slika 67. Signali NH_{Fc} skupine u spektrima $^1\text{H-NMR}$ **12–15** ($T = 298,15$ K).

4.2.2. Konformacijska analiza

4.2.2.1. Analiza IR–spektroskopijom

U IR–spektreu otopine homokiralnog derivata **12** u diklormetanu u području isteznih vibracija NH–skupina (slika 68.) registriran je jak signal asociраних NH–skupina ($< 3400 \text{ cm}^{-1}$) i apsorpcijska vrpca slobodnih skupina vrlo slabog intenziteta. IR spektar tripeptida **13** sadrži isključivo vrpce asociраних NH–skupina. Kako razrjeđivanjem od $c = 10 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ do $c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ne dolazi do značajne promjene omjera intenziteta vrpce slobodnih i asociраних NH–grupa može se pretpostaviti kako obje amino–skupine tripeptida **12** i **13**, kao i enantiomernih **19** i **18**, sudjeluju u unutarmolekulskim interakcijama. U amidnom području IR–spektra tripeptida **14** te enantiomernog **17** dominiraju signali asociраних NH–skupina dok su vrpce iznad 3400 cm^{-1} slabijeg intenziteta (slika 69.). Podjednako slabljenje intenziteta ovih vrpce tijekom razrjeđivanja ukazuje na unutarmolekulsku prirodu vodikovih veza registrirane ispod 3400 cm^{-1} . U usporedbi s prethodno opisanim derivatima **12–14** i **17–19**, u čijim spektrima nisu registrirane vrpce slobodnih NH–skupina ili im je intenzitet u usporedbi s vrpcama ispod 3400 cm^{-1} vrlo slab, u IR spektrima enantiomernih peptida **15** i **16** te su vrpce jačeg intenziteta. No, kako razrjeđivanjem ne dolazi do njihovog jačanja može se zaključiti kako u otopinama **15** i **16** također dominiraju konformacije koje sadrže unutarmolekulski asociране NH–skupine.

Slika 68. Koncentracijski–ovisni IR spektri derivata **12** (lijevo) i **13** (desno) u CH_2Cl_2 .



Slika 69. Koncentracijski ovisni IR spektri derivata **14** (lijevo) i **15** (desno) u CH₂Cl₂.

Nadalje, uretanske karbonilne skupine svih tripeptida (tablica 10.) apsorbiraju pri valnim duljinama nižim od 1700 cm⁻¹ što indicira njihovo sudjelovanje u IHB.¹⁰⁶

Tablica 10. NH- i CO-područje IR-spektara derivata **12–15** u CH₂Cl₂ ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³).

Derivat	ν NH (slobodne)	ν NH (asocirane)	amid I	amid II
12	–	3315	1666, 1629	1558, 1525
13	–	3323	1666	1556, 1541, 1515
14	3420	3326	1672	1541, 1520
15	3423	3315	1691, 1645	1556, 1541, 1514

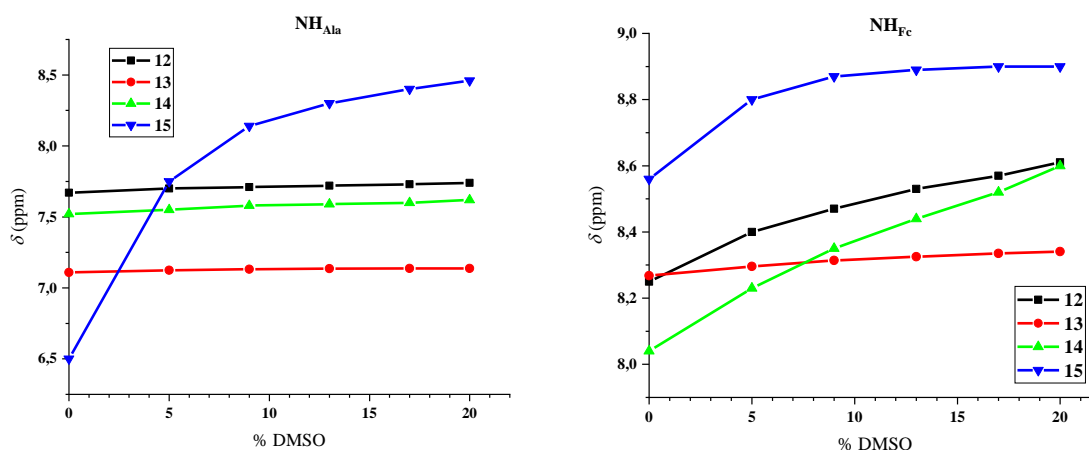
4.2.2.2. Analiza spektroskopijom NMR

U spektrima ¹H-NMR razrijeđenih otopina ($c = 2 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³) svih konjugata (tablica 11.) protoni NH-skupine vezane na ferocen registrirani su pri niskom polju ($\delta > 8$ ppm) što ukazuje na njihovo sudjelovanje u IHB. Također, kemijski pomak NH_{Ala}-protona iz testiranih tripeptida pri $\delta > 7$ ppm indicira njihovo sudjelovanje u unutarmolekulskim interakcijama, uz iznimku NH_{Ala}-protona iz derivata **15** čiji je kemijski pomak niži ($\delta = 6,5$ ppm).

Tablica 11. Kemijski pomaci [ppm] amidnih protona derivata **12–15** ($c = 2 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³).

12		13		14		15	
NH _{Fc}	NH _{Ala}	NH _{Fc}	NH _{Ala}	NH _{Fc}	NH _{Ala}	NH _{Fc}	NH _{Ala}
8,26	7,67	8,26	7,11	8,04	7,52	8,58	6,50

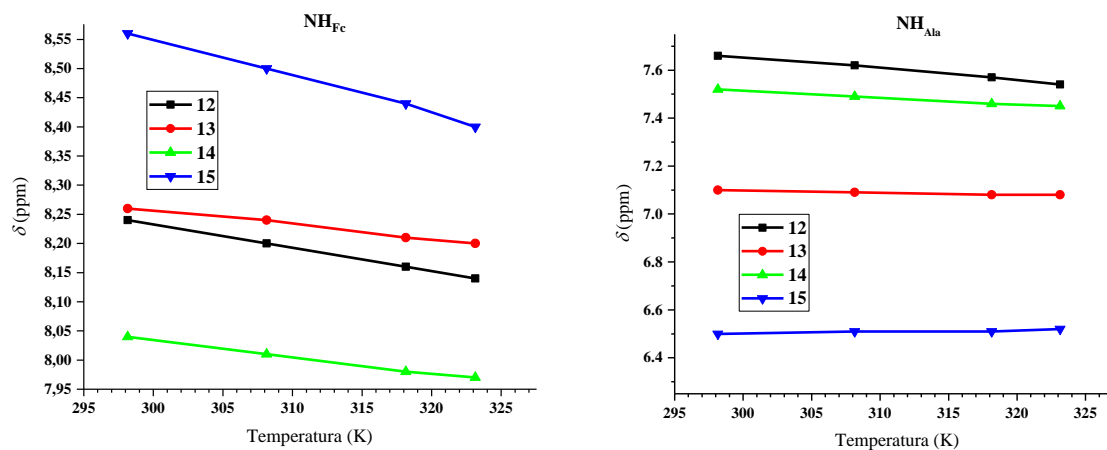
Jakost IHB, na čiju prisutnost ukazuju rezultati prethodno opisane spektroskopske analize (IR i NMR), ispitana je mjerenjem temperaturno–ovisnih spektara NMR i titracijom s DMSO. Slabe promjene kemijskih pomaka NH_{Fc} i NH_{Ala} derivata **12–15** uzrokovane dodatkom polarnog otapala (φ DMSO = 0,05–0,2) prikazane su na titracijskim krivuljama (slika 70.), a sugeriraju njihovo sudjelovanje u jačim IHB.



Slika 70. Ovisnost kemijskih pomaka NH_{Ala} (lijevo) i NH_{Fc} (desno) derivata **12** (—), **13** (—), **14** (—) i **15** (—) o volumnom udjelu *d*₆-DMSO u CDCl₃ ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³).

Kako je vidljivo na slici 70., NH_{Ala} -skupina derivata **15** iskusila je najveću perturbaciju kemijskog pomaka ($\Delta\delta = 1,96$ ppm) uslijed dodatka 20% DMSO što zajedno s njezinim inicijalnim pomakom u CDCl_3 ($\delta = 6,5$ ppm) indicira kako je riječ o slobodnoj, otapalu izloženoj NH -skupini. Vrlo male promjene kemijskih pomaka NH_{Ala} -skupine tripeptida **12** ($\Delta\delta = 0,07$ ppm), **13** ($\Delta\delta = 0,03$ ppm) i **14** ($\Delta\delta = 0,1$ ppm) u prisutnosti DMSO ($\varphi_{\text{DMSO}} = 0,20$), kao i NH_{Fc} skupine tripeptida **13** ($\Delta\delta = 0,07$ ppm) znak su njihovog sudjelovanja u jakim IHB. Na temelju registriranih pomaka NH_{Fc} skupine **12** ($\Delta\delta = 0,36$ ppm), **14** ($\Delta\delta = 0,55$ ppm) i **15** ($\Delta\delta = 0,34$ ppm) može se pretpostaviti kako i ove skupine sudjeluju u IHB, no nešto slabijim nego u slučaju tripeptida **13**.

Ovisnost kemijskih pomaka amidnih protona tripeptida **12–15** o temperaturi prikazana je na slici 71. Signali NH_{Fc} i NH_{Ala} iz derivata **13** pri sobnoj temperaturi, registrirani pri $\delta > 7$ ppm, iskusili su najmanji pomak u više polje tijekom izlaganja povišenoj temperaturi ($\Delta\delta/\Delta T = -2,4$ ppb K^{-1} odnosno $\Delta\delta/\Delta T = -0,8$ ppb K^{-1}) što zajedno s rezultatima IR-analize i DMSO-titracije potvrđuje njihovo sudjelovanje u jakim IHB. Isto se može zaključiti i za NH_{Fc} ($\Delta\delta/\Delta T = -2,8$ ppb K^{-1}) i NH_{Ala} iz tripeptida **14** ($\Delta\delta/\Delta T = -2,8$ ppb K^{-1}). Mali temperaturni koeficijent NH_{Ala} skupine derivata **15** ($\Delta\delta/\Delta T = 0,8$ ppb K^{-1}) je u suglasnosti s prethodnim nalazima kojima je indicirano kako ova NH -skupina ne sudjeluje u vodikovima vezama. Značajna ovisnost kemijskog pomaka NH_{Fc} -protona istog derivata o temperaturi ($\Delta\delta/\Delta T = -6,4$ ppb K^{-1}) pokazatelj je njegova sudjelovanja u strukturama podržanim unutarmolekulskim vodikovim vezama koje se u promatranom temperaturnom intervalu kidaju i skupina postaje izložena otapalu. Sličan trend, uz nešto manju temperaturnu ovisnost, slijede i NH_{Fc} i NH_{Ala} homokiralnog tripeptida **12** ($\Delta\delta/\Delta T = -4$ ppb K^{-1} odnosno $\Delta\delta/\Delta T = -4,8$ ppb K^{-1}).



Slika 71. Ovisnost kemijskih pomaka NH_{Fc} (lijevo) i NH_{Ala} (desno) derivata **12** (—), **13** (—), **14** (—) i **15** (—) o temperaturi ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$).

Poznato je da na *cis*–*trans*–izomerizaciju oko peptidne veze u kojoj sudjeluje prolin utječe temperatura, otapalo i pH–vrijednost.¹²⁰ Kao što se može vidjeti iz tablice 12., povećanje temperature je kod tripeptida **12**, **14** i **15** (koji podliježu izomerizaciji već pri sobnoj temperaturi) uzrokovalo smanjenje udjela dominantnog *trans*–*trans* izomera i porast udjela ostalih mogućih kombinacija izomera (*cis*–*trans*, *trans*–*cis*, *cis*–*cis*). Budući da u promatranom temperaturnom intervalu nije došlo do srastanja signala amidnih protona, njihovom integracijom određen je udio *trans*–*trans*–izomera koji pri 323,15 K iznosi 66% za **12**, 83% za **14** i 45% za **15**. Sličan je trend, smanjenje frakcije *trans*–*trans* izomera **12**, **14** i **15**, zabilježen i prilikom dodatka polarnog DMSO (tablica 13.) što je u skladu s literaturnim spoznajama o porastu udjela *cis*–izomera u polarnim otapalima.¹²¹ Izuzetak je tripeptid **13** u čijim je spektrima NMR u promatranom temperaturnom intervalu te u prisutnosti različitih volumnih udjela DMSO registriran isključivo *trans*–*trans* izomer.

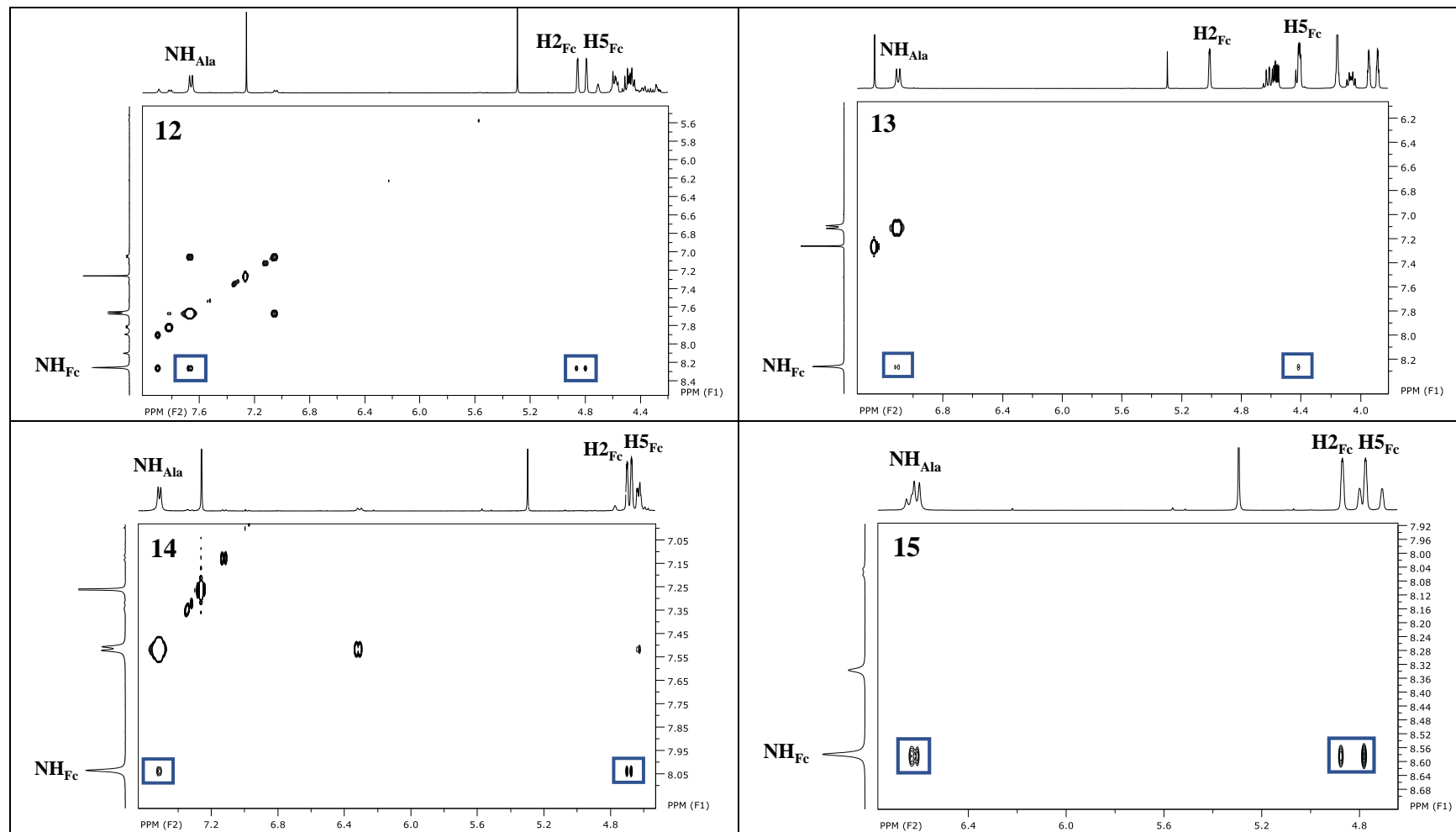
Tablica 12. Utjecaj temperature na *cis-trans* izomerizaciju oko imidne veze u tripeptidima 12–15.

Temperatura								
	298,15 K		308,15 K		318,15 K		323,15 K	
	<i>trans-trans</i> izomer (%)	ostali izomeri (%)	<i>trans-trans</i> izomer (%)	ostali izomeri (%)	<i>trans-trans</i> izomer (%)	ostali izomeri (%)	<i>trans-trans</i> izomer (%)	ostali izomeri (%)
12 (L-L-L-Fc)	76	13, 11	71	16, 12	66	18, 16	66	18, 16
13 (D-L-L-Fc)	100	–	100	–	100	–	100	–
14 (L-D-L-Fc)	87	13	85	15	82	18	83	17
15 (D-D-L-Fc)	67	27, 6	52	26, 22	48	27, 25	45	30, 25

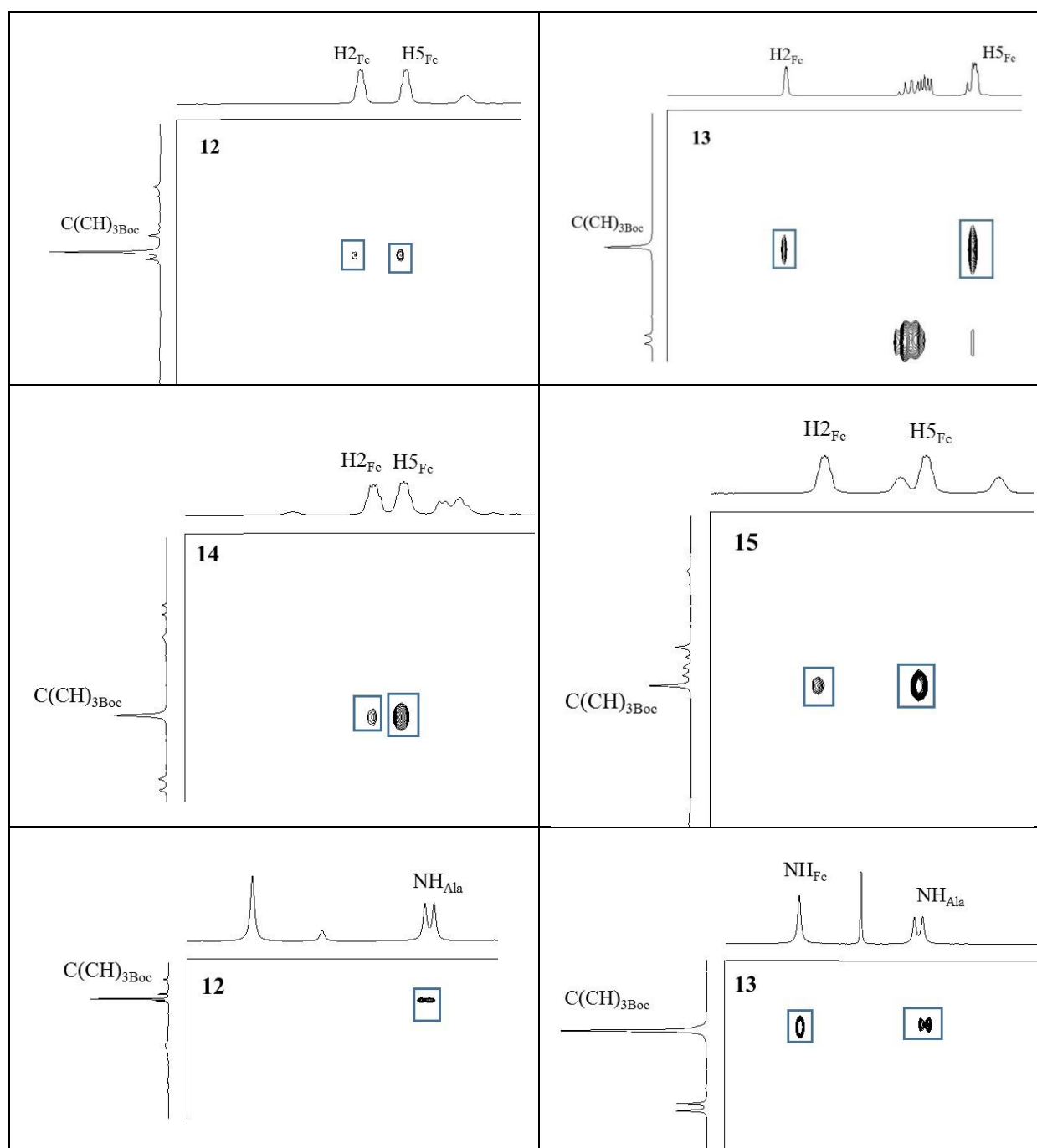
Tablica 13. Utjecaj volumnog udjela DMSO u CDCl₃ na *cis-trans* izomerizaciju oko imidne veze u tripeptidima 12–15.

	ϕ (DMSO)									
	0,05		0,09		0,13		0,17		0,2	
	<i>trans-trans</i> (%)	ostali iz. (%)	<i>trans-trans</i> (%)	Ostali iz. (%)	<i>trans-trans</i> (%)	ostali iz. (%)	<i>trans-trans</i> (%)	ostali iz. (%)	<i>trans-trans</i> (%)	ostali iz. (%)
12 (L-L-L-Fc)	83	17	63	25, 12	60	31, 9	60	31, 9	52	35, 13
13 (D-L-L-Fc)	100	–	100	–	100	–	100	–	100	
14 (L-D-L-Fc)	75	25	62	34, 4	46	28, 14, 12	41	35, 14, 10	40	39, 12, 9
15 (D-D-L-Fc)	67	33	63	37	64	36	58	42	58	42

Vodikovim vezama inducirano nabiranje peptidnog lanca u derivatima **12–15** potvrđeno je i opažanjem NOE–kontakata između skupina koje su udaljene u primarnom slijedu. Kao što se može vidjeti iz slike 72., u spektrima svih tripeptida registrirani su kontakti između amino–skupine ferocena i alanina, a također i interakcije između *N*–terminalne *tert*–butilne skupine i ferocenskih H2– i H5– atoma (slika 73.). U spektrima **12** i **13** vidljivi su i signali C(CH)₃–NH_{Ala} te C(CH)₃–NH_{Fc} (slika 73.) koji su u slučaju **14** vrlo slabi dok kod **15** izostaju. Nadalje, u spektrima **12** i **14** registrirani su kontakti između NH_{Fc} i dijastereotopnih H2– i H5–atoma iz ciklopentadienilnog prstena,¹²² čiji su kemijski pomaci bliski no signali su jasno razdvojeni (**12**; $\Delta\delta = 0,07$ ppm, **14**; $\Delta\delta = 0,03$ ppm) jednakog intenziteta. Nasuprot tome, u spektru tripeptida **13** opažena je značajnija razlika u pomacima ($\Delta\delta = 0,6$ ppm) kemijski neekvivalentnih ferocenskih H2 i H5 te registriran jaki signal između NH_{Fc} i protona u višem polju (arbitrirano H5) i vrlo slabi kontakt s odsjenjenim protonom (H2). Manja razlika u kemijskim pomacima ($\Delta\delta = 0,09$ ppm), no dominantna korelacija NH_{Fc} i protona u višem polju uočena je i u spektru **15**. Iz prethodno navedenog može se pretpostaviti kako u otopinama **13** i **15** dominiraju konformacije u kojima je jedan od dijastereotopnih vodikovih atoma ferocena odsjenjen, vjerojatno utjecajem karbonilne skupine, a drugi u blizini NH_{Fc}.



Slika 72. Sekvencijalne korelacije između NH_{Fc} i NH_{Ala} te signali NH_{Fc} - $H2_{Fc}/H5_{Fc}$ u NOESY spektrima 12–15.



Slika 73. NOE kontakti dugog $[C(CH_3)_3-H_{2Fc}/H_{5Fc}$ i $C(CH_3)_3-NH_{Fc}$] i srednjeg doseg $[C(CH_3)_3-NH_{Ala}]$ u spektrima 12–15.

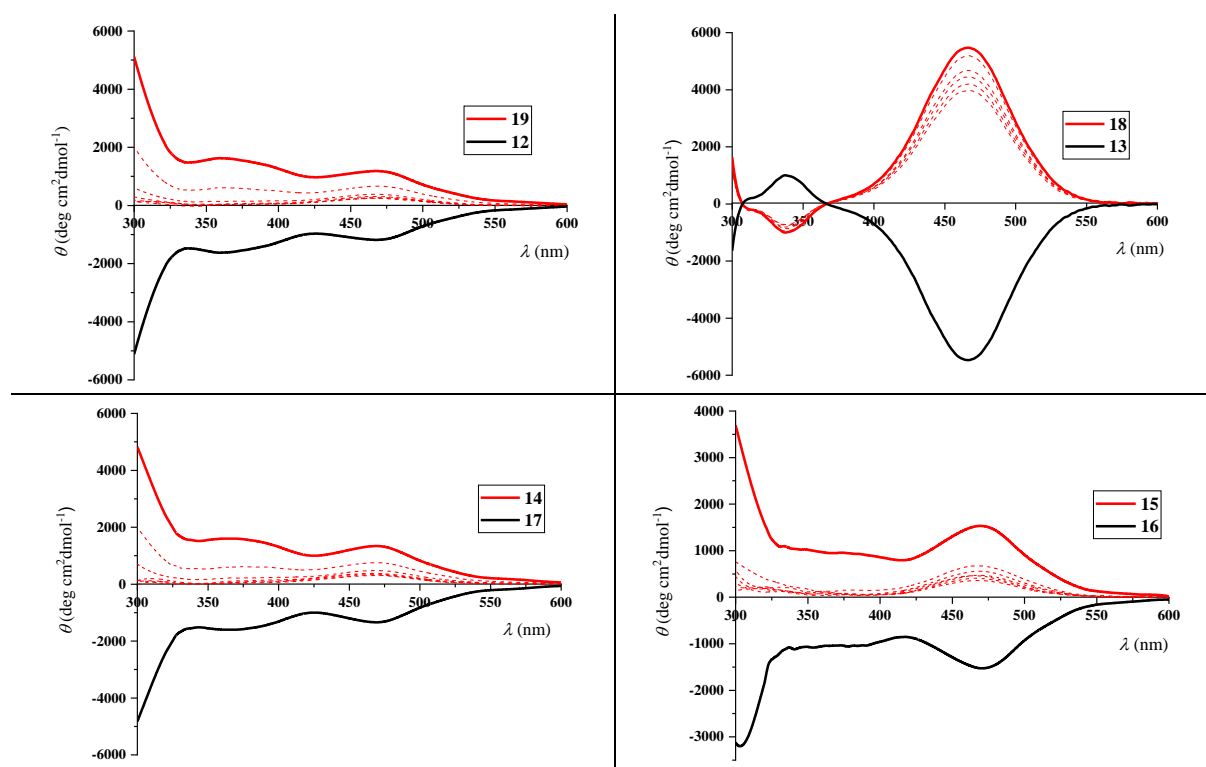
4.2.2.3. Analiza spektroskopijom CD

Kao što je navedeno u 2.5.2, CD-aktivnost u blizini apsorpcijskih vrpca d-d elektronskih prijelaza ferocenskog kromofora posljedica je kiralne perturbacije inducirane nabiranjem peptidnog slijeda. Kako su prethodne analize tripeptida **12–19** ukazale na prisutnost IHB koje induciraju kiralno uređenje, u vidljivom dijelu njihovih spektara CD očekivano su registrirani Cottonovi efekti. Molarni ekstinkcijski koeficijenti, valne duljine apsorpcijskih maksimuma d-d prijelaza, molarna eliptičnost i valne duljine maksimuma CD-vrpca spojeva prikazani su u tablici 14.

Tablica 14. UV/Vis i CD-podaci spojeva **12–15** u CH₂Cl₂ i smjesama CH₂Cl₂ i DMSO ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$).

$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	otapalo	12	13	14	15
	CH ₂ Cl ₂	452 (883)	452 (672)	452 (1005)	452 (1006)
	DMSO = 5%	452 (862)	452 (664)	452 (978)	452 (954)
	DMSO = 9%	452 (846)	452 (660)	452 (953)	452 (933)
	DMSO = 13%	452 (836)	452 (657)	452 (936)	452 (918)
	DMSO = 17%	452 (826)	452 (653)	452 (922)	452 (907)
	DMSO = 20%	452 (817)	452 (647)	452 (907)	452 (897)
	DMSO = 23%	452 (810)	452 (644)	452 (892)	452 (885)
$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ($\theta/\text{deg cm}^2\text{dmol}^{-1}$)	otapalo	12	13	14	15
	CH ₂ Cl ₂	471 (-1193)	466 (-5463)	469 (1352)	468 (1546)
	DMSO = 5%	467 (-680)	467 (-5180)	469 (761)	469 (684)
	DMSO = 9%	465 (-398)	467 (-4901)	468 (481)	470 (564)
	DMSO = 13%	467 (-662)	467 (-4666)	465 (393)	465 (477)
	DMSO = 17%	471 (-562)	468 (-4434)	466 (374)	465 (475)
	DMSO = 20%	469 (-528)	468 (-4189)	472 (343)	457 (408)
	DMSO = 23%	465 (-515)	467 (-3966)	468 (319)	461 (377)

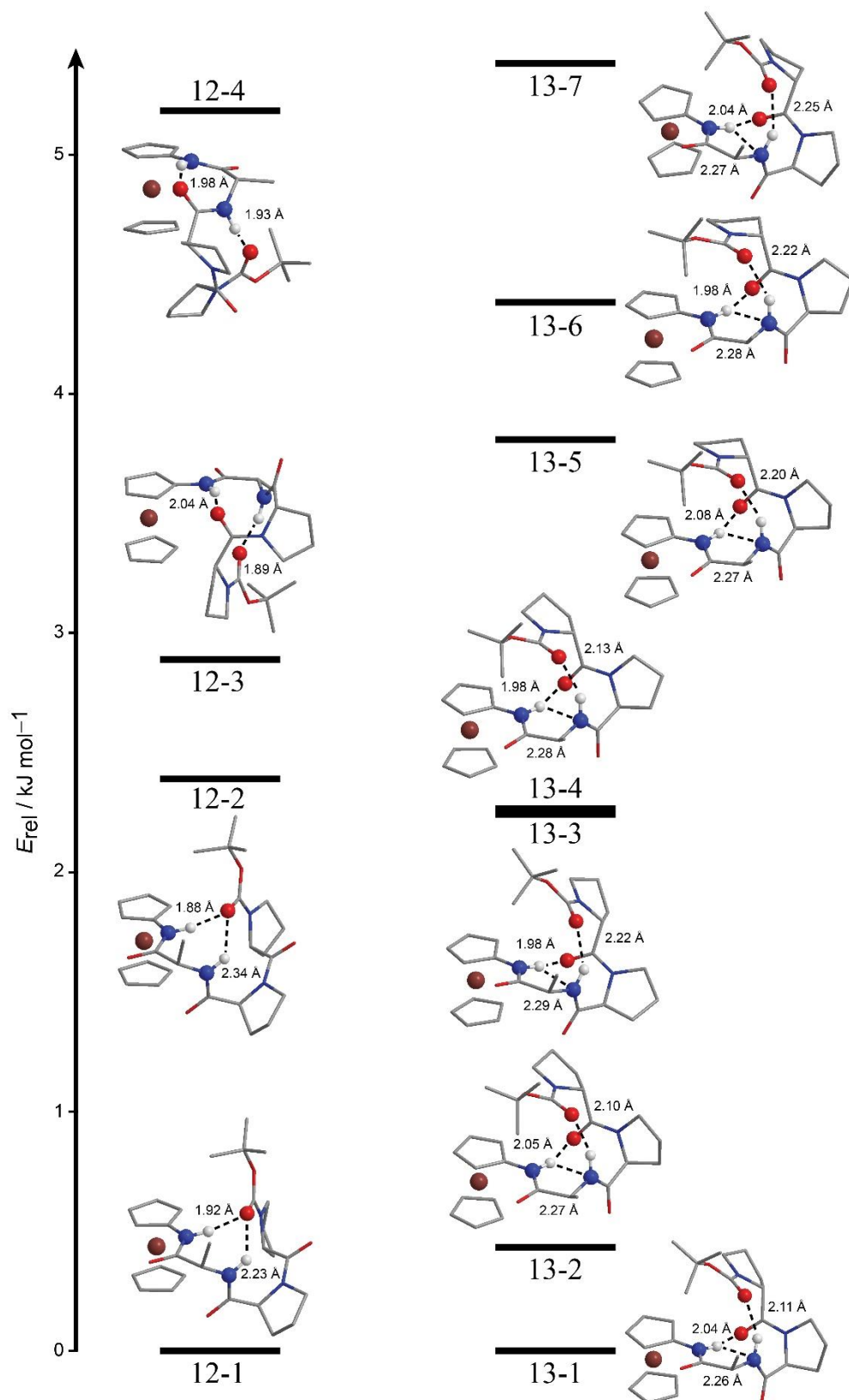
U vidljivom području valnih duljina spektara CD peptida **12–15**, prikazanoj na slici 74., opaženi su signali različitog predznaka i intenziteta. Pozitivna molarna eliptičnost s maksimumom pri ~ 460 nm registrirana je u spektrima CD derivata **14** i **15**, a signali suprotnog predznaka u spektrima **12** i **13**. Pritom najjaču CD–aktivnost u ferocenskom području pokazuje tripeptid **13**, dok su signali u spektrima **12**, **14** i **15** približno jednakog intenziteta. Prema očekivanju, u spektrima tripeptida **16–19** koji su u enantiomernom odnosu s **12–15** (**12/19**, **13/18**, **14/17** i **15/16**) registrirani su Cottonovi efekti jednakog intenziteta, ali suprotnog predznaka. S obzirom da su u spektrima CD tripeptida **12–15**, koji u primarnom slijedu na položaju $i + 3$ sadrže L–Ala, detektirani signali različitog predznaka može se isključiti pretpostavka kako je središnja kiralnost odnosno konfiguracija aminokiseline izravno vezane na aminoferocen uzrok opažene CD–aktivnosti. Ovaj je zaključak dodatno potkrijepljen titracijskim eksperimentima u kojima je u 1×10^{-3} mol dm⁻³ otopine tripeptida u CH₂Cl₂ dodavano kompeticijsko otapalo. Sukcesivan dodatak DMSO uzrokuje slabljenje CD–signala **18**, a time i enantiomernog **13**, što nedvojbeno dokazuje kako je izvor CD–aktivnosti kiralna organizacija inducirana unutar molekularnim vodikovim vezama. Redukcija intenziteta Cottonovih efekata **18** (**13**) za svega 27% u prisutnosti 25% DMSO potvrđuje pretpostavku o njihovoj stabilizaciji jakim vodikovim vezama. Suprotno tome, pri istim je uvjetima u spektrima tripeptida **12/19**, **14/17** i **15/16** opaženo izraženije smanjenje intenziteta CD–signala (80%, 77% i 76%). Ovi nalazi zajedno s rezultatima proizašlima iz analize spektroskopijom (NMR i IR) ukazuju kako je kiralna organizacija **18** (**13**) podržana najstabilnijim unutar molekularnim interakcijama.

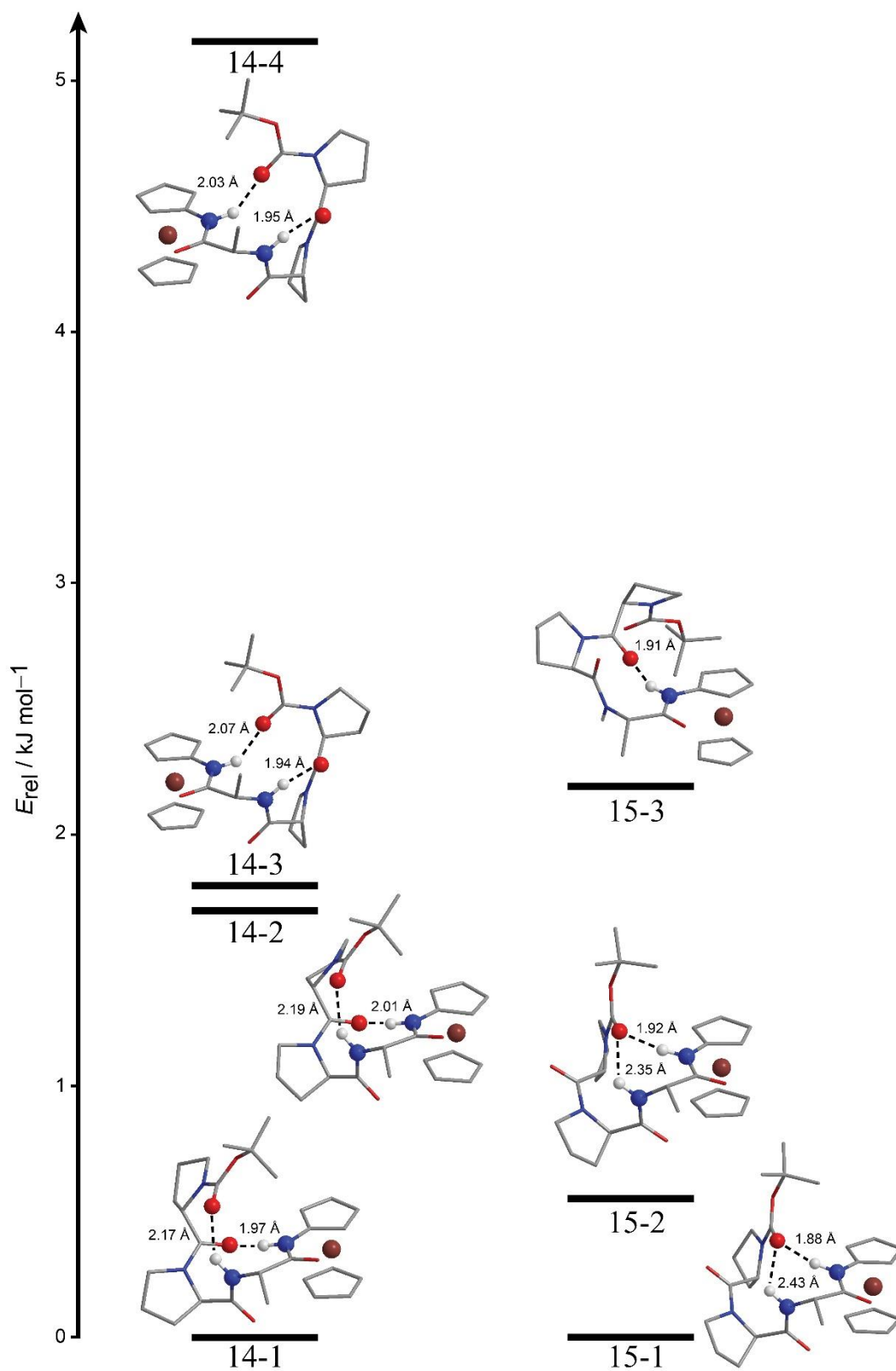


Slika 74. Spektri CD tripeptida **12–19** u CH_2Cl_2 ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) i redukcija signala uslijed dodatka 5–25% DMSO (crtkane linije).

4.2.2.4. DFT–modeliranje tripeptida **12–15** i usporedba teorijskih i eksperimentalnih rezultata

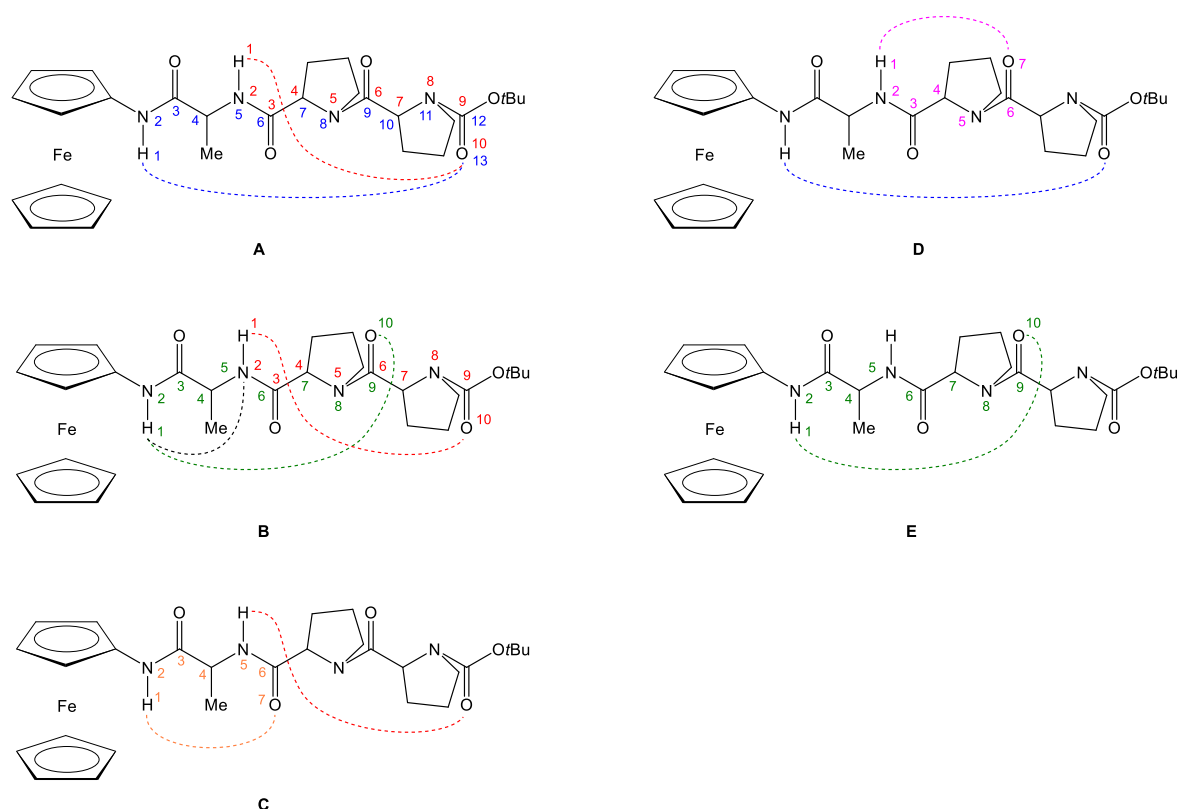
U suradnji s kolegama Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu provedeno je sustavno teorijsko pretraživanje konformacijskog prostora tripeptida **12–15**. Najstabilnije konformacije izračunate primjenom DFT–metode prikazane su na slikama 75. i 76., a rezultati modeliranja sumirani su u tablici 15. Konformeri su klasificirani prema obrascima IHB (A–E) prikazanim na slici 77.

Slika 75. Najstabilniji konformeri **12** i **13** s prikazanim duljinama vodikovih veza.

Slika 76. Najstabilniji konformeri **14** i **15** s prikazanim duljinama vodikovih veza.

Tablica 15. Relativne energije najstabilnijih konformera **12–15** u kloroformu pri 298 K, konformacije pirolidinskih prstena prolina i obrazac IHB prema slici 75., heličnost peptidnog segmenta, kut χ (slika 79.), duljina [Å] vodikovih veza.

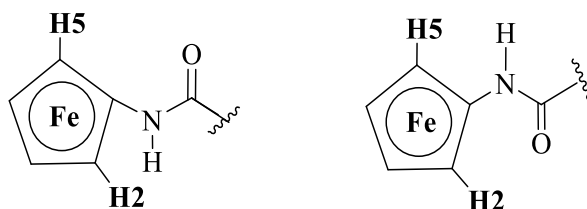
konformer	$E_{rel}/$ kJ mol ⁻¹	χ kut	Pro'	Pro	IHB obrazac	Hel.	NH _{Fc} ····OC _{Boc} 13-člani	NH _{Fc} ····OC _{Pro'} 10-člani	NH _{Fc} ····OC _{Pro} 7-člani	NH _{Fc} ····N _{Ala} 5-člani	NH _{Ala'} ····OC _{Boc} 10-člani	NH _{Ala'} ····OC _{Pro'} 7-člani
12-1	0,00	-78,9	<i>egzo</i>	<i>endo</i>	A	<i>P</i>	2,92				3,02	
12-2	2,39	-74,8	<i>endo</i>	<i>egzo</i>	A	<i>P</i>	2,88				3,05	
12-3	2,89	75,6	<i>egzo</i>	<i>endo</i>	B	<i>P</i>		3,02		2,74	2,87	
12-4	5,18	70,7	<i>egzo</i>	<i>endo</i>	C	<i>P</i>			2,90		2,85	
13-1	0,00	-106,4	<i>endo</i>	<i>egzo</i>	B	<i>P</i>		3,01		2,72	3,05	
13-2	0,44	-86,1	<i>endo</i>	<i>egzo</i>	B	<i>P</i>		3,02		2,72	3,07	
13-3	2,14	-98,0	<i>egzo</i>	<i>egzo</i>	B	<i>P</i>		2,95		2,75	3,09	
13-4	2,16	-82,8	<i>egzo</i>	<i>egzo</i>	B	<i>P</i>		2,97		2,73	3,07	
13-5	3,81	-85,8	<i>endo</i>	<i>endo</i>	B	<i>P</i>		3,06		2,72	3,15	
13-6	4,36	-79,7	<i>egzo</i>	<i>endo</i>	B	<i>P</i>		2,97		2,74	3,15	
13-7	5,38	-104,8	<i>endo</i>	<i>endo</i>	B	<i>P</i>		3,00		2,73	3,15	
14-1	0,00	98,3	<i>egzo</i>	<i>egzo</i>	B	<i>M</i>		2,94			3,03	
14-2	1,70	103,7	<i>endo</i>	<i>endo</i>	B	<i>M</i>		2,98		2,75	3,08	
14-3	1,79	-79,2	<i>endo</i>	<i>endo</i>	D	<i>P</i>	2,95					2,85
14-4	5,17	-77,2	<i>endo</i>	<i>egzo</i>	D	<i>P</i>	2,92					2,86
15-1	0,00	74,1	<i>endo</i>	<i>endo</i>	A	<i>M</i>	2,88				3,07	
15-2	0,55	79,4	<i>endo</i>	<i>egzo</i>	A	<i>M</i>	2,93				3,04	
15-3	1,76	81,6	<i>endo</i>	<i>endo</i>	E	<i>M</i>		2,88				



Slika 77. Obrasci vodikovih veza (A-E) opaženih u skupu najpovoljnijih konformera derivata **12–15**.

U najstabilnijim konformerima homokiralnog **12** (**12–1** i **12–2**) pronađene su račvaste IHB, uspostavljene između uretanske karbonilne grupe i NH-skupine aminoferocena odnosno alanina, koje zatvaraju 13- i 10-člane prstenove. Konformeri **12–1** i **12–2** razlikuju se u konformaciji obaju pirolidinskih prstenova. Deseteročlani prstenovi, odnosno uzastopni β -okreti ($\text{NH}_{\text{Fc}}\cdots\text{OC}_{\text{Pro}}$ i $\text{NH}_{\text{Ala}}\cdots\text{OC}_{\text{Boc}}$), od kojih je C-terminalni dodatno stabiliziran N–H \cdots N interakcijom (obrazac B) pronađeni su u **12–3**. Obrazac C, u kojem β -okretu ($\text{NH}_{\text{Ala}}\cdots\text{OC}_{\text{Boc}}$) prethodi 7-člani prsten ($\text{NH}_{\text{Fc}}\cdots\text{OC}_{\text{Pro}}$) pronađen je u energijski nepovoljnijoj geometriji **12–4**. Prisutnost različitih strukturnih elementa, odnosno konformacijska nehomogenost prema literaturnim je navodima (2.6) svojstvena homokiralnim peptidima s diprolinskim segmentom. Računalno generirane konformacije u skladu su s NMR- i IR-podacima koji su ukazali na sudjelovanje obje NH-skupine **12** u vodikovim vezama kao i signalima $\text{C}(\text{CH}_3)\text{--NH}_{\text{Ala}}$ i $\text{C}(\text{CH}_3)\text{--H}_2/\text{H}_{5\text{Fc}}$ opaženim u u NOESY spektrima. Također, može se pretpostaviti kako jednak intenzitet NOE signala između NH_{Fc} i dijastereotopnih atoma ciklopentadienilnog

prstena proizlazi iz suprotne orijentacije NH_{Fc} vodikovog atoma (slike 75. i 78.) u **12–1** i **12–2** (prema arbitrarno H5_{Fc}) u usporedbi s **12–3** i **12–4** (prema H2_{Fc}). Nadalje, integracijom određen udio *trans–trans* izomera **12** pri 25° iznosi 76% što se može objasniti *cis–*konfiguracijom L–Pro–L–Pro amidne veze u konformerima **12–1** i **12–2**.



Slika 78. Moguće orijentacije amidne veze u konformerima **12–15**.

U skupu najstabilnijih konformera **13** (**13–1–13–7**) uočen je isti obrazac vodikovih veza (B), a energijski bliske strukture razlikuju se u konformacijama pirolidinskih prstenova i orijentaciji *tert*–butilne–skupine. Budući da su u svim konformerima **13** pronađeni uzastopni β –okreti tipa II'–I može se zaključiti kako su nalazi računalnog modeliranja u skladu s literaturnim navodima o konformacijskoj homogenosti D–L–L peptida (2.6) kojima je svojstven ovaj strukturni motiv. Također, teorijska su saznanja potvrdila eksperimentalne nalaze (IR, NMR) koji su indicirali sudjelovanje obje NH–skupine **13** u jakim vodikovim vezama kao i pretpostavku proizašlu iz NOESY eksperimenata o različitoj kemijskoj okolini dijastereotopnih vodikovih atoma ferocena ($\text{H2}/\text{H5}$). Naime, u svim je konformerima **13** uočena ista orijentacija amidne veze (slike 75. i 78.) što rezultira jakim NOE–signalom između NH_{Fc} i H5_{Fc} te odsjenjenjem H2_{Fc} . Također, u svim konformerima obje prolinske imidne veze zauzimaju *trans*–konfiguraciju što je u skladu s opažanjem samo jednog skupa signala u spektrima NMR **13** koji je pripisan *trans–trans* izomeru.

Prema dobivenim rezultatima najstabilnije konformere tripeptida **14** (**14–1** i **14–2**) karakteriziraju uzastopni β –okreti (obrazac B). U preostalim konformerima (**14–3** i **14–4**) uspostavljaju se dvije vodikove veze ($\text{NH}_{\text{Fc}}\cdots\text{OC}_{\text{Boc}}$ i $\text{NH}_{\text{Ala}}\cdots\text{OC}_{\text{Pro}}$) koje zatvaraju 13–člane i 7–člane prstenove (obrazac D), odnosno podržavaju strukture nalik α – i γ –okretu. Imajući u vidu vrpce iznad 3400 cm^{-1} u IR spektrima **14** može se pretpostaviti kako je potonja interakcija, kojom se zatvara 7–člani prsten, slabija. Iako geometrije izoliranih α –okreta nisu svojstvene kratkim peptidima,⁶² ova je konformacija utvrđena u čvrstom stanju tripeptida

XXXIII koji je kao i **14** izgrađen iz aminokiselina alternirajuće konfiguracije (D–L–D). Također, jednak intenzitet NOE–signala između NH_{Fc} i dijastereotopnih atoma ciklopentadienilnog prstena može se objasniti suprotnom usmjerenošću amidne veze (slike 76. i 78.) u **14–1** i **14–2** u usporedbi s **14–3** i **14–4**. Iako računalno generirani konformeri **14** slijede različite obrasce vodikovih veza (D i B) u svim su strukturama imidne veze u *trans*–položaju što je u skladu s visokim udjelom *trans–trans* izomera (87%) u spektrima NMR spoja **14**.

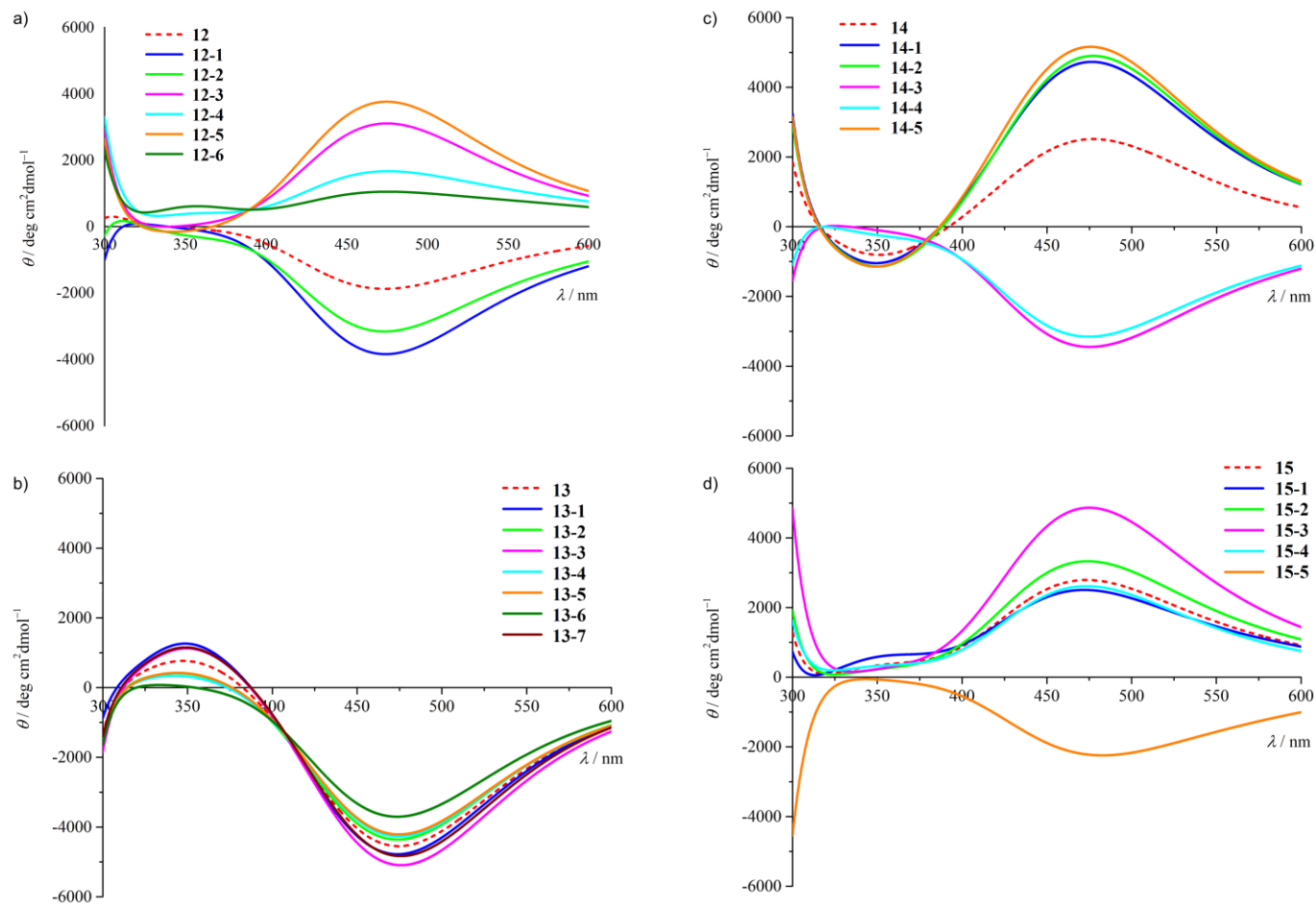
Energijski najpovoljniji konformeri tripeptida **15** (**15–1** i **15–2**) slijede obrazac A, stabilizirani su račvastim vodikovim vezama koje zatvaraju 10– ($\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$) i 13–člane prstenove ($\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$). Obrazac E, u kojem $\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{OC}_{\text{Pro}}$ veza zatvara 10–člani prsten pronađen je u energijski nepovoljnijoj geometriji **15–3**. Obrazac A uočen je i kod energijski najpovoljnijih konformera tripeptida **12** (**12–1** i **12–2**) koji kao i **15** sadrži homokiralni Pro–Pro slijed. Iako je u skupu najstabilnijih konformera **12** utvrđen i obrazac B (**12–3** i **12–5**) u slučaju **15** on izostaje što se može objasniti povećanom sklonošću **15** prema *cis–trans* izomerizaciji, što je detektirano NMR–om i računom (**15–1** i **15–2**). Kao i u slučaju **13**, može se zaključiti kako NOE signal između NH_{Fc} i samo jednog od dijastereotopnih H2/H5 atoma proizlazi iz jednake orijentacije amidne veze u skupu najstabilnijih konformera **15**.

Za razliku od nehomogenog konformacijskog prostora tripeptida **12** i **15**, konformeri s heterokiralnim Pro–Pro fragmentom (**13** i **14**) najčešće slijede obrazac B (s iznimkom **14–3** i **14–4**), što je u skladu s literaturnim navodima u kojima se kao uvjet za indukciju β –okreta ističe heterokiralnost diprolinskog segmenta.¹²³ Također, bez obzira na strukturni element prisutan u peptidnom lancu **13**, **14** i **15** može se uočiti kako se u svim konformerima peptidni segment svija u smjeru suprotnom od ferocenske podjedinice dok je kod pojedinih geometrija homokiralnog **12** (**12–3** i **12–4**) propagirajuća uzvojnica orijentirana prema ferocenu.

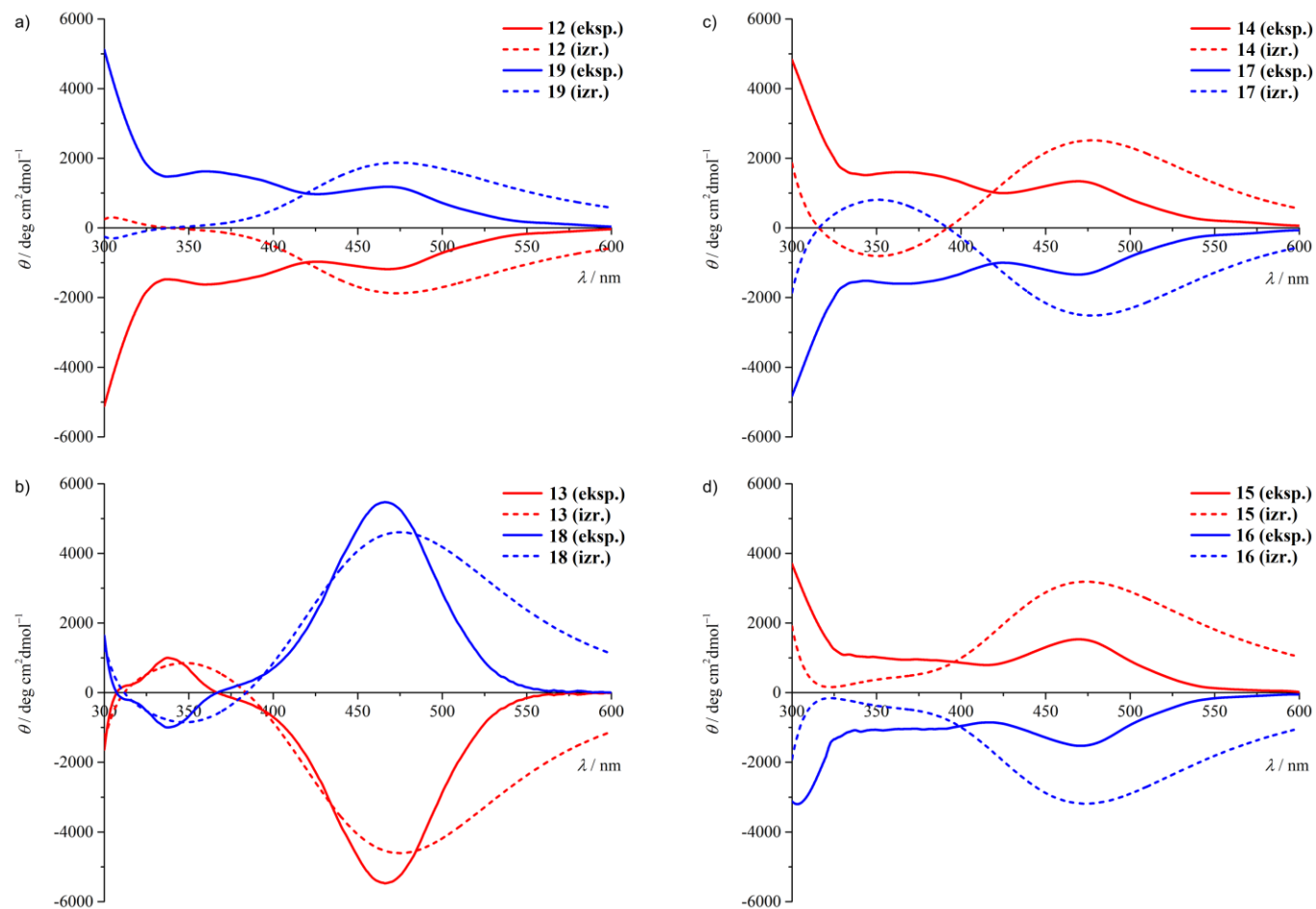
Nakon što su teorijskim pristupom identificirani skupovi najstabilnijih konformera **12–15**, a imajući u vidu da su u njihovim eksperimentalnim spektrima CD uočene krivulje različitog intenziteta i predznaka, u nastavku istraživanja primjenom TD–DFT–metode (*engl.* Time–Dependent Density Functional Theory) izračunati su njihovi spektri CD s ciljem utvrđivanja utjecaja kiralnog uređenja peptidnog slijeda na CD–aktivnost u apsorpcijskom području ferocenskog kromofora. Budući da smo očekivali kako orijentacija (*P*– ili *M*–)

strukturnog elementa izravno utječe na predznak CD–signala svim smo konformerima odredili heličnost (tablica 15.). Kako je u svim dijastereoizomerima **12–15** na aminoferocen izravno vezan L–Ala može se zaključiti kako je nabiranje peptidnog lanca određeno kiralnošću diprolinskog segmenta. Homokiralni Pro–Pro slijed, za koju je svojstven obrazac A, inducira desnu (*P*–) uzvojnici kada su oba prolina L–konfiguracije (**12**), a lijevu (*M*–) uzvojnici u slučaju D–konfiguracije (**15**). Slično tome, heterokiralni L–Pro–D–Pro segment inducira *P*–uzvojnici kod **13**, dok suprotna (D–Pro–L–Pro konfiguracija) inicira tvorbu *M*–uzvojnici kod **14**. U konformerima oba derivata dominira obrazac B.

Na slici 79. prikazani su izračunati spektri CD svih konformera **12–15**, a na slici 80. resultantne izračunate CD–krivulje uspoređene su s eksperimentalnima. Može se uočiti kako se izračunate CD–krivulje dobro podudaraju s eksperimentalnima, osobito u apsorpcijskom području ferocenskog kromofora ($\lambda \sim 460$ nm), te kod svih derivata predznak prosječne CD–krivulje slijedi predznak eksperimentalne. Nadalje, predznak CD–signala najstabilnijih konformera (**12–1** do **15–1**) sva četiri derivata jednak je predznaku eksperimentalno utvrđenih CD–krivulja, čime je neizravno potvrđena točnost teorijskog pristupa. Računalnim istraživanjem pokazano je kako svi energijski bliski konformeri derivata **13**, koji slijede isti obrazac vodikovih veza (B), pokazuju negativan Cottonov efekt. U spektrima CD derivata **13** opaža se gotovo savršeno podudaranje izračunatih i izmjerenih podataka, ne samo u području ferocenskog kromofora, već i području peptidne okosnice.



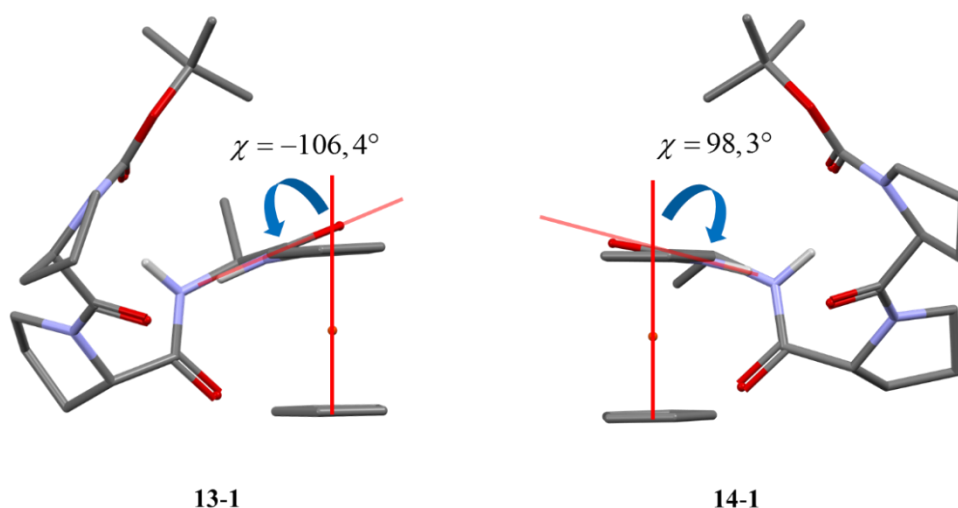
Slika 79. Izračunati spektri CD derivata **12–15** (pune linije). Rezultantni spektar pri 298 K prikazan je crvenom crtkanom linijom.



Slika 80. Eksperimentalne (CH_2Cl_2 , $c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) i izračunate CD-krivulje **12–19**.

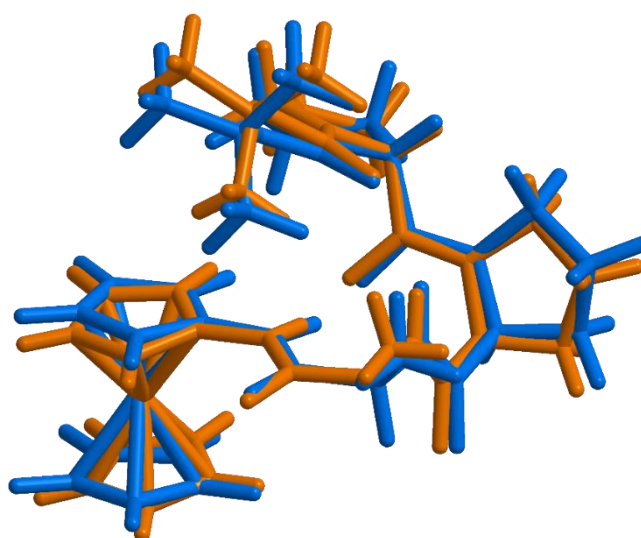
Nadalje, u svim se izračunatim konformacijama opaža otklon amidne ravnine, izravno vezane na ferocen, od ravnine u kojoj leži Cp-prsten na koji je vezana. Stoga smo pretpostavili kako je otklon amidne skupine, uzrokovan prijenosom kiralne informacije iz tripeptidnog segmenta uslijed nabiranja u *P*- ili *M*-uzvojnici, ključni element koji određuje predznak Cottonova efekta u apsorpcijskom području ferocenskog kromofora. Otklon koji opisuje rotaciju oko veze između ferocena i tripeptidnog segmenta definirali smo diedarskim kutom (χ) određenim s četiri atoma [dva centroida (C_g , po jedan za svaki Cp prsten), dušikov i ugljikov amidni atom], $C_{g_{Cp2}}-C_{g_{Cp1}}-N-C$ (slika 81.). Kod svih je energijski najpovoljnijih konformacija tripeptida (**12-1** – **15-1**) opažena korelacija između kuta χ , heličnosti peptidnog segmenta (tablica 15.) i predznaka CD-krivulje pri ~ 460 nm (slika 80.). Negativne vrijednosti χ (u rasponu od -75° do -106°) podudaraju se s negativnim Cottonovim efektom (*P*-heličnost), a pozitivne vrijednosti (u rasponu od 68° do 104°) s pozitivnim Cottonovim efektom (*M*-heličnost). Također, može se primijetiti kako prethodno opisana korelacija između heličnosti, kuta χ (tablica 15.) i predznaka CD-krivulje (slika 80.) vrijedi kod svih konformacija u kojima se peptidni segment svija u smjeru suprotnom od ferocenske podjedinice. Od prethodnog pravila odstupaju pojedine geometrije **12** (**12-3** i **12-4**) u kojima je propagirajuća uzvojnica orijentirana prema ferocenu. Naime, iako su u slučaju negativnih vrijednosti χ registrirani negativni Cottonovi efekti (i suprotno), ne vrijedi prethodna korelacija između heličnosti peptidnog lanca i predznaka CD-signal.

Zaključno, utvrđeno je kako je kod svih konformacija predznak Cottonova efekta određen kutom χ i pritom pozitivna vrijednost kuta rezultira pozitivnim signalom dok se negativan Cottonov efekt opaža u slučaju negativnih vrijednosti χ . Nadalje, ukoliko peptidni lanac propagira udaljavajući se od ferocena, tada *P*-heličnost rezultira negativnim kutem (negativni CD-signal), dok se kod *M*-heličnih struktura opaža pozitivan kut, a time i pozitivan Cottonov efekt. U slučaju konformacija u kojima se peptidni lanac svija prema ferocenu, *P*-heličnost se povezuje s pozitivnim kutom (pozitivnim CD-signalom), a pritom vrijedi i obrnuto.

Slika 81. Kut χ kod **13-1** i **14-1**.

4.2.2.5. Kristalografska analiza derivata **13**

Konformacija derivata **13** u čvrstom je stanju stabilizirana dvjema unutarmolekulskim vodikovim vezama $\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{OC}_{\text{Pro}}$ i $\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$ 2,885 (5) Å koje zatvaraju 10-člane prstenove i podržavaju konformaciju uzastopnih β -okreta. Geometrija konformera **13-5** odgovara onoj pronađenoj u kristalnoj strukturi **13** (slika 82.).

Slika 82. Superpozicija eksperimentalno određene (narančasta boja) i izračunate (**13-5**, plava boja) geometrije derivata **13**.

4.3. Sinteza, konformacijska analiza i kirooptička svojstva bis-ferocenskih dipeptida **20** i **21**

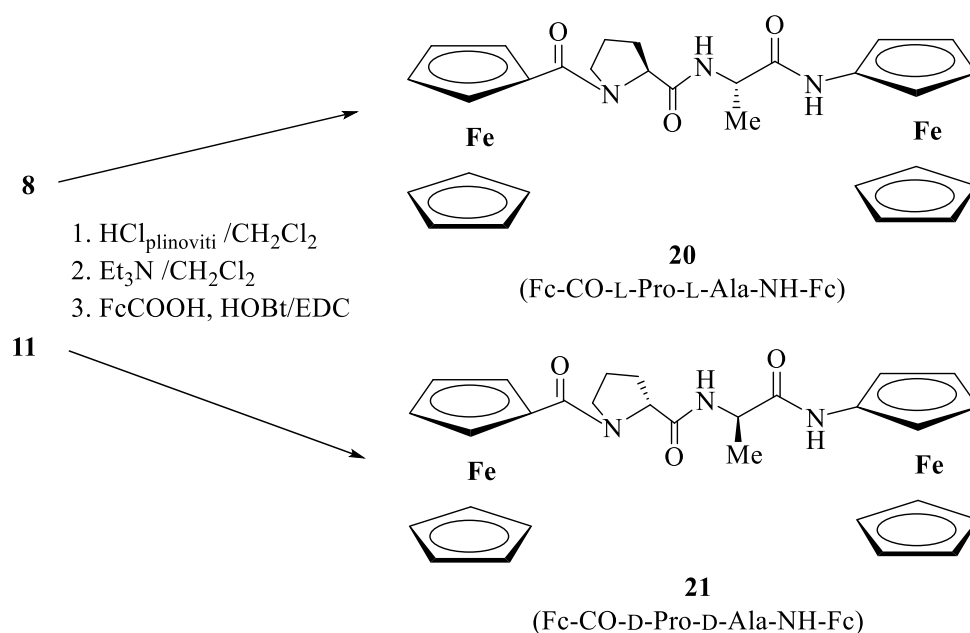
Homogena konformacijska svojstva homokiralnih dipeptida **XXIV–XVI** te **8** i **11** kao i izraženija CD-aktivnost u usporedbi s heterokiralnim **9** i **10** potakli su nas na pripravu dinuklearnih derivata Fc-CO-AA₂-AA₁-NH-Fc (**20**, AA₁ = L-Ala, AA₂ = L-Pro; **21**, AA₁ = D-Ala, AA₂ = D-Pro), odnosno dipeptida na čiji je C- i N-terminus uveden ferocen. Konjugati **20** i **21** podvrgnuti su iscrpnoj konformacijskoj analizi kako bi se ispitaio utjecaj umetanja dodatne organometalne podjedinice na β-okrete prisutne u najstabilnijim konformacijama **8** i **11** i istražila eventualna promjena njihovih sekundarnih karakteristika i modifikacija kirooptičkih svojstava.

4.3.1. Sinteza bis-ferocenskih dipeptida **20** i **21**

Dinuklearni derivati **20** i **21**, prikazani na shemi 7., pripremljeni su uvođenjem ferocenoila na N-terminus dipeptida **8** i **11**. Ferocenkarboksilna kiselina (**3**) aktivirana je primjenom standardne HOBt/EDC metode i kopulirana sa slobodnim aminima dobivenim deprotekcijom Boc-zaštićenih prekursora **8** i **11** pri čemu su dobiveni enantiomerni dipeptidi **20** (44%) i **21** (47%). Struktura derivata **20** i **21** potvrđena je primjenom dvodimenzijske homo- i heteronuklearne spektroskopije NMR. Na primjeru derivata **20**, u dodatku (slike D4–D11) je objašnjena potpuna asignacija svih kemijskih pomaka u spektru ¹H-NMR spektru pomoću cijepanja signala, kemijskih pomaka i 2D-homonuklearne NMR-tehnike. Nakon asignacije signala u spektrima ¹H-NMR, primjenom heteronuklearnih korelacija (HMBC, HSQC) nedvojbeno su pripisani i svi signali u spektrima ¹³C-NMR enantiomernih **20** i **21**.

Za razliku od prekursora **8** i **11** (poglavlje 4.1.2.2.) u spektrima NMR **20** i **21** prisutan je samo jedan skup signala koji je na temelju male razlike u kemijskim pomacima pirolidinskih β- i γ-ugljikovih atoma ($\Delta\delta = 2,4$ ppm) pripisan *trans*-izomeru. Uvođenje ferocenoilne podjedinice očituje se u spektrima ¹H-NMR multipletom njezinih H-2/H-5 protona ($\delta = 4,84$ – $4,80$ ppm), singletom H-3/H-4 protona ($\delta = 4,43$ ppm) te signalom nesupstituiranog ciklopentadienilnog prstena ($\delta = 4,23$ ppm). U usporedbi s **8** i **11**, spektri ¹³C-NMR **20** i **21**

sadrže dodatne signale ferocenskih C–2/C–5 ($\delta = 71,5$ i $70,2$ ppm) i C–3/C–4 ($\delta = 71$ ppm) ugljikovih atoma kao i dodatni signal nesupstituiranog Cp–prstena ($\delta = 69,8$ ppm).



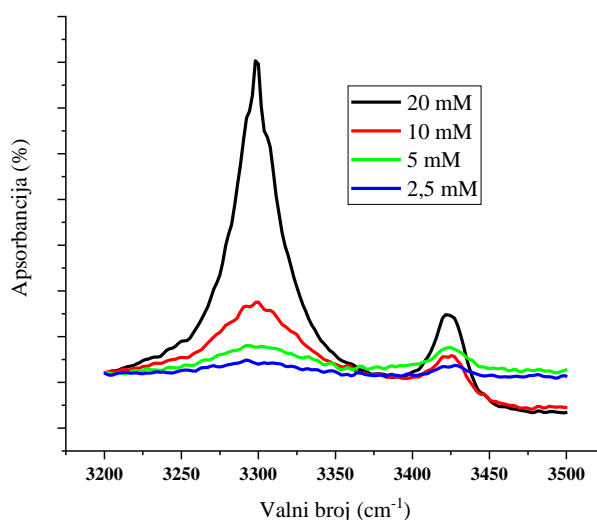
Shema 7. Sinteza bis–ferocenskih derivata **20** i **21**.

4.3.2. Konformacijska analiza

4.3.2.1. Analiza IR spektroskopijom

Koncentracijski–ovisni IR spektri peptida **20** prikazani su na slici 83. Pri visokim koncentracijama ispitivanog uzorka (20×10^{-3} mol dm⁻³) dominiraju signali pri 3298 cm⁻¹ koji se mogu pripisati asociranim NH–skupinama, dok su apsorpcijske vrpce slobodnih NH–skupina, registrirane pri 3421 cm⁻¹, znatno slabijeg intenziteta. Omjer intenziteta slobodnih i asociranih NH–skupina značajno se počinje mijenjati tek pri koncentracijama nižima od $c = 1 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³, pri čemu se opaža slabljenje intenziteta vrpce asociranih NH–skupina i njihovo širenje. Pri niskim koncentracijama ($c = 5 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³ i $2,5 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³) omjer intenziteta signala asociranih i slobodnih NH–skupina približno je jednak. Iz prethodno navedenog može se zaključiti kako su u razrijeđenim otopinama peptida **20** kao i enantiomernog **21** prisutne konformacije stabilizirane unutarmolekulskim vodikovim vezama u kojima sudjeluju pojedine NH–skupine. Preostale slobodne NH–skupine smanjenjem

koncentracije ulaze u međumolekulske vodikove veze i time sudjeluju u tvorbi samoudružujućih peptidnih agregata.



Slika 83. Koncentracijski ovisni IR spektri biokonjugata **20** u apsorpcijskom području NH–skupina.

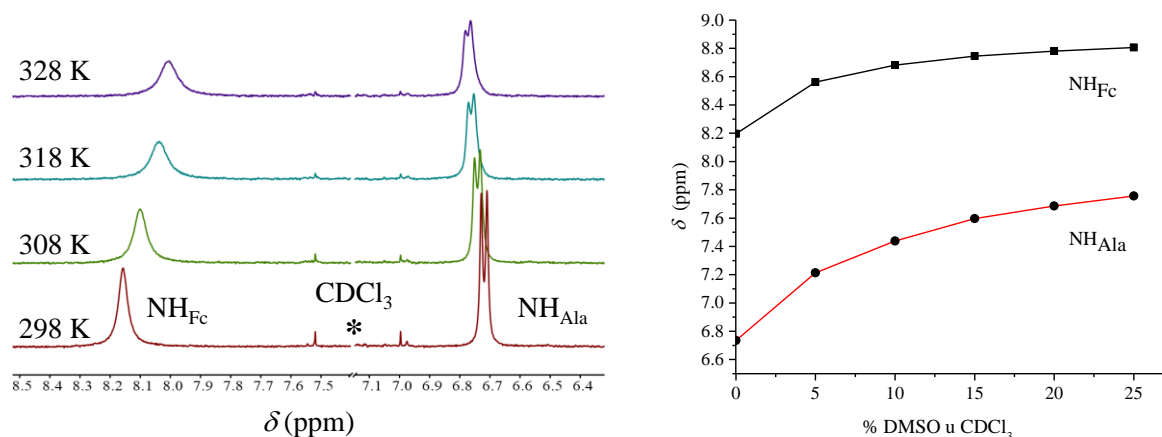
4.3.2.2. Analiza spektroskopijom NMR

U spektru ¹H–NMR $50 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ otopine **20** u CDCl₃ opažen je visok kemijski pomak ($\delta = 8,23 \text{ ppm}$) NH–skupine izravno vezane na ferocen koji se neznatno mijenja ($\Delta\delta = 0,06 \text{ ppm}$) smanjenjem koncentracije na $2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, sugerirajući njegovo sudjelovanje u IHB. Suprotno tomu, NH–skupina iz alaninske podjedinice registrirana je pri višem polju ($\delta = 6,77 \text{ ppm}$). Iz prethodno navedenog može se zaključiti da u otopinama **20** i **21** u aprotičnom CDCl₃ dominiraju konformacije u kojima NH–skupina izravno vezana na ferocen sudjeluje u IHB. Budući da analiza spektroskopijom (IR i NMR) ukazuje na prisutnost IHB, njihova je jakost ispitana mjerenjem temperaturno–ovisnih spektara NMR i titracijom s DMSO.

Temperaturno ovisni spektri NMR **20** snimani su pri $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ kako bi se isključila mogućnost samoudruživanja molekula (slika 84., *lijevo*). Visoki temperaturni koeficijent NH_{Fc} [$\Delta\delta / \Delta T = -6,1 \text{ ppb K}^{-1}$] ukazuje na početnu zaklonjenost od otapala uslijed sudjelovanja u IHB, a koja se porastom temperature smanjuje. Mala temperaturna ovisnost

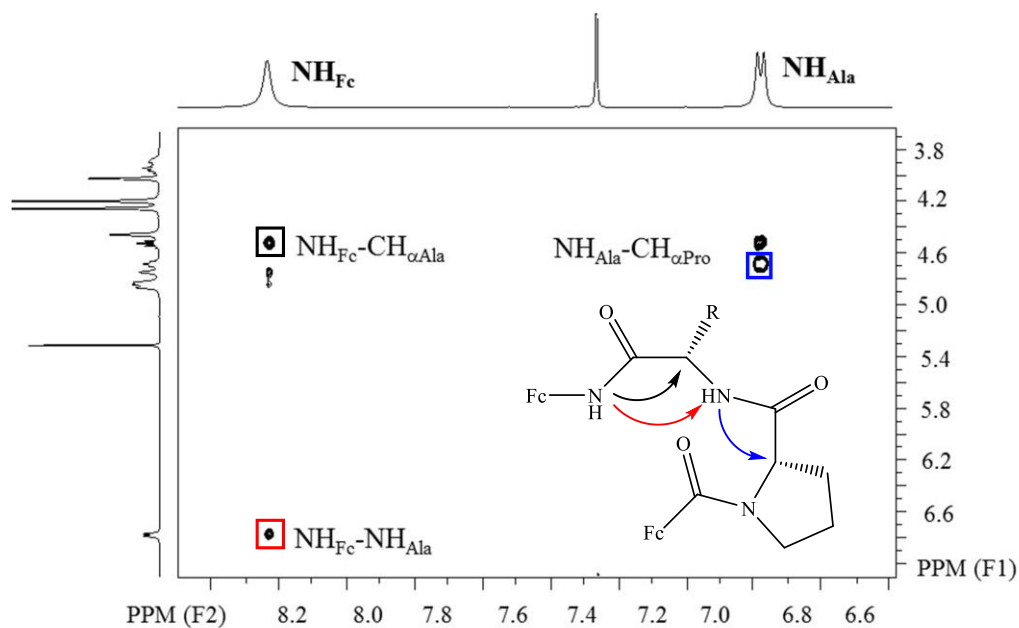
NH–skupine iz alanina, registrirane u visokom polju spektra NMR spoja **20** [$\Delta\delta/\Delta T = 2,1$ ppb K^{-1}], sugerira njezinu izloženost otapalu.

Nadalje, jakost IHB u kojoj sudjeluje NH–skupina izravno vezana na ferocen ispitana je titracijom 2×10^{-3} mol dm^{-3} otopine konjugata **20** u $CDCl_3$ s DMSO. Kao što je vidljivo na titracijskoj krivulji derivata **20** (slika 84., *desno*), kompeticijsko otapalo (φ DMSO = 0,25) uzrokovalo je pomak signala NH_{Fc} za svega 0,6 ppm što je indicacija njezinog sudjelovanja u jakoj IHB. Suprotno tomu, kemijski pomak alaninske NH–skupine derivata **20** promijenio se za više od 1 ppm u prisutnosti DMSO uslijed solvatacije s polarnim otapalom, a kao posljedica ili sudjelovanja u slaboj IHB ili nesudjelovanja u HB.



Slika 84. Temperaturna ovisnost kemijskih pomaka amidnih protona **20** (*lijevo*) i DMSO–titracija otopine **20** u $CDCl_3$ (*desno*).

U NOESY spektru peptida **20** (slika 85.) vidljivi su kontakti: NH_{Fc} – NH_{Ala} , NH_{Fc} – $CH_{\alpha Ala}$ i NH_{Ala} – $CH_{\alpha Pro}$. Navedeni kontakti podržavaju konformaciju β –okreta,⁴⁸ za razliku od γ –okreta koji bi uslijed svojih geometrijskih parametara rezultirao slabim NH_{Fc} – NH_{Ala} i jakim NH_{Fc} – $CH_{\alpha Ala}$ signalom.¹⁶ Nadalje, gotovo jednaki intenzitet sekvencijalnih signala u spektru **20** indicacija je β –okreta tipa I.



Slika 85. Signali u NOESY spektru peptida **20** (kontakti karakteristični za β -okret su uokvireni) i shematski prikaz opaženih interakcija.

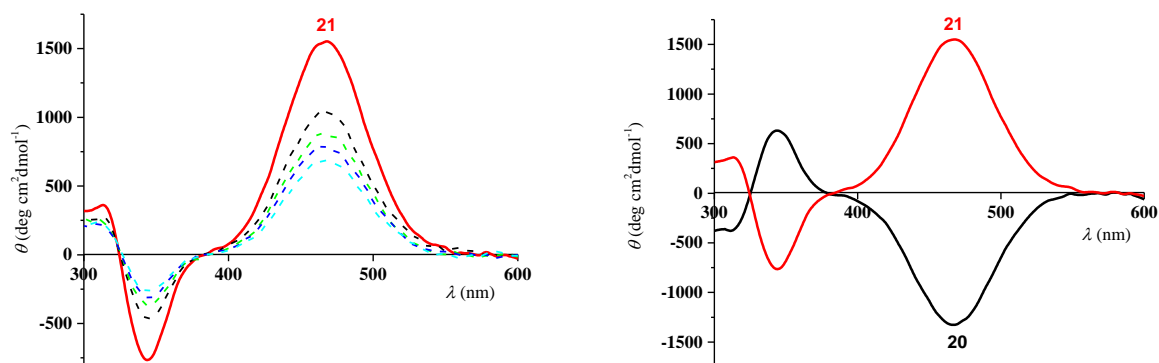
4.3.2.3. Analiza spektroskopijom CD

Imajući u vidu rezultate spektroskopskih mjerenja (IR i NMR) koji indiciraju stabilizaciju **20** i **21** unutarlančanom vodikovom vezom ($\text{NH}_{\text{Fn}}\cdots\text{CO}_{\text{Fn}}$) koja podržava konformaciju β -okreta, odlučili smo ispitati njihovo kiralno uređenje analizom spektroskopije CD. U UV/Vis-spektrima derivata **21** uočene su karakteristične apsorpcijske vrpce ferocenskog kromofora pri 447 nm u CH_2Cl_2 , čiji se položaj ne mijenja dodatkom DMSO (tablica 16.).

Tablica 16. UV/Vis–signali i CD–vrpce ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³) **21** u CH₂Cl₂ i smjesama CH₂Cl₂ i DMSO.

$\lambda_{\max}/$ nm ($\varepsilon/$ M ⁻¹ cm ⁻¹)	otapalo	21
	CH ₂ Cl ₂	447 (731)
	DMSO/ CH ₂ Cl ₂ = 9%	447 (715)
	DMSO/ CH ₂ Cl ₂ = 17%	447 (730)
	DMSO/ CH ₂ Cl ₂ = 23%	447 (691)
	DMSO/ CH ₂ Cl ₂ = 29%	447 (684)
$\lambda_{\max}/$ nm ($\theta/$ deg cm ² dmol ⁻¹)	otapalo	21
	CH ₂ Cl ₂	469 (1556)
	DMSO/ CH ₂ Cl ₂ = 9%	464 (1052)
	DMSO/ CH ₂ Cl ₂ = 17%	464 (891)
	DMSO/ CH ₂ Cl ₂ = 23%	465 (794)
	DMSO/ CH ₂ Cl ₂ = 29%	467 (695)

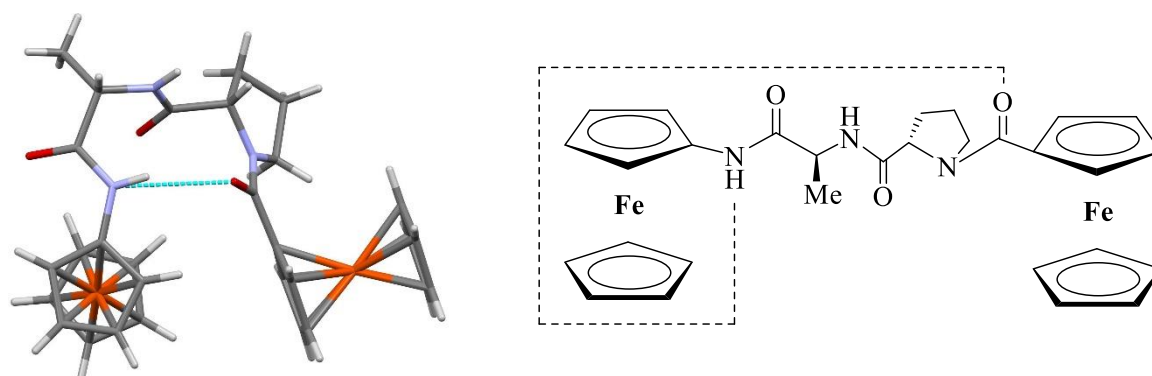
U blizini apsorpcijskog maksimuma ferocenskog kromofora ($\lambda_{\max} = \sim 460$ nm) spektar CD dipeptida **21**, prikazan na slici 86., *lijevo*, pokazuje pozitivan Cottonov efekt srednjeg intenziteta ($\theta = 1556$ deg cm² dmol⁻¹). U spektru CD njegovog enantiomera **21**, očekivano se javlja signal jednakog intenziteta, ali suprotnog predznaka (slika 86., *desno*). Imajući u vidu rezultate analize spektroskopijom (IR i NMR), intenzitet ovih CD–signala ukazuje na kiralno uređenje u blizini ferocenskog kromofora. Porijeklo Cottonova efekta, kao i jakost vodikovih veza koje uzrokuju tvorbu kiralno uređenih struktura dodatno je ispitana titracijom s kompeticijskim otapalom (φ DMSO = 0,9–0,29). Redukcija intenziteta Cottonovog efekta peptida **21** za 55% u prisustvu DMSO ($\varphi = 0,29$) ukazuje na vodikove veze srednje jakosti. Također, ako se usporede spektri CD prekursora **8** i **11** (4.1.2.4.) i ciljnih dinuklearnih derivata može se primijetiti kako je uvođenje ferocenske jezgre na *N*–terminus peptida **11** ($\theta = 2571$ deg cm² dmol⁻¹), odnosno **8** ($\theta = -2571$ deg cm² dmol⁻¹), uzrokovalo 40%–tno smanjenje signala, ali ne i promjenu predznaka Cottonova efekta u spektrima CD rezultirajućih bis–ferocenskih peptida **21** i **20**.



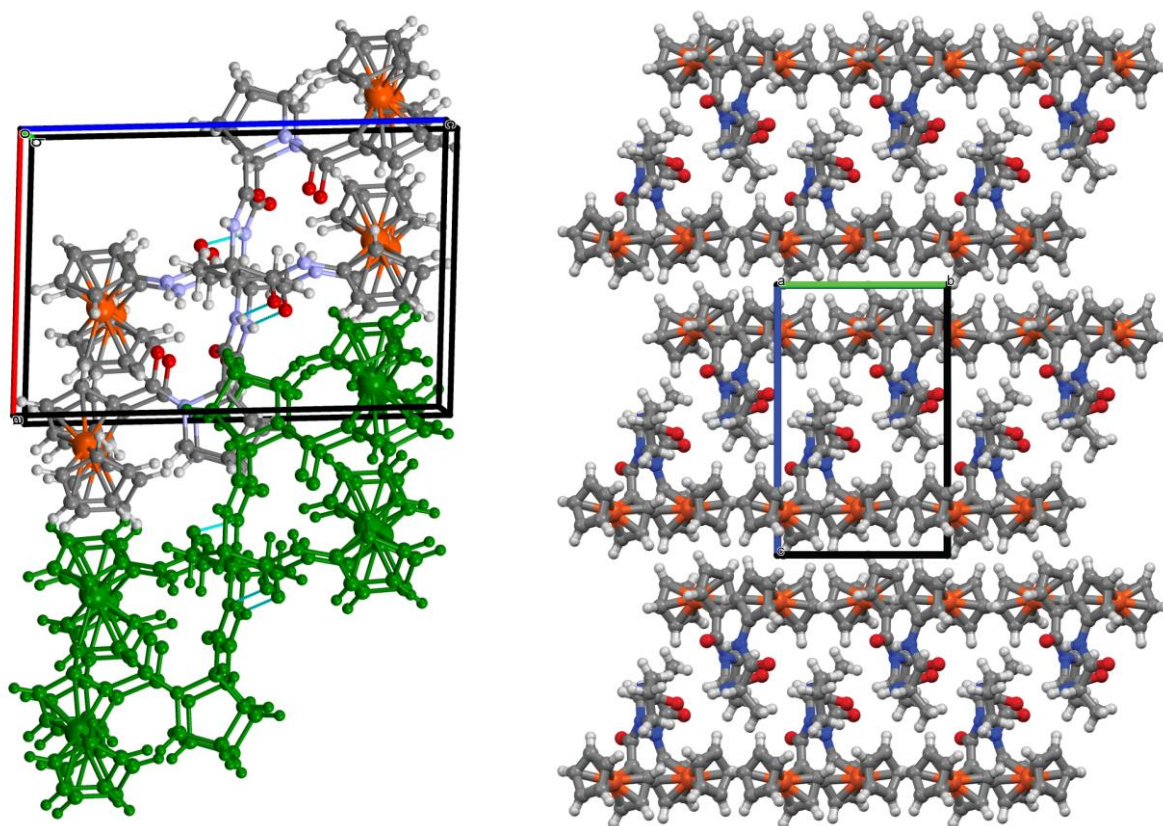
Slika 86. Spektri CD peptida **21** u CH_2Cl_2 [$c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, (puna linija)] i uz dodatak 9–29 % DMSO (crtkane linije)] (*lijevo*) i spektri CD konformacijskih enantiomera **20** i **21** (*desno*).

4.3.2.4. Kristalografska analiza

Rendgenskom strukturnom analizom peptida **20** i **21** nađena je slaba unutarmolekulska vodikova veza $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{CO}_{\text{Fn}'}$ (udaljenost N–O iznosi $\sim 3,06 \text{ \AA}$) koja podržava enantiomerne konformacije β -okreta dok relativno jake međumolekulske $\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{OC}_{\text{Ala}}$ veze (udaljenost N–O iznosi $\sim 2,785 \text{ \AA}$) povezuju molekule u beskonačne lance paralelne s kristalografskom osi b . Molekulska struktura i međumolekulske vodikove veze u kristalu **20** prikazane su na slikama 87. i 88. Lanci molekula **20** međusobno su povezani C–H \cdots O i Fc–Fc interakcijama i pritom formiraju slojeve u ab ravnini koji se mogu opisati kao dvosloj u čijoj se unutrašnjosti nalaze aminokiselinski ostaci dok su molekule ferocena orijentirane prema susjednom dvosloju.



Slika 87. Molekulska struktura i shematski prikaz peptida **20** u čvrstom stanju.



Slika 88. Lanci molekula **20** duž kristalografske osi *b* (međumolekulske H–veze svijetlo su plave, a susjedni lanac zelene boje) (*lijevo*) i organiziranje u dvoslojeve (*desno*).

4.3.2.5. DFT–modeliranje **20** i usporedba teorijskih i eksperimentalnih rezultata

Računalno je analiziran isključivo derivat **20** jer su zbog enantiomernog odnosa konformacije **20** i **21** zrcalno simetrične. Preliminarno pretraživanje konformacijskog prostora provedeno je metodama molekularne mehanike, a najstabilnije geometrije su reoptimizirane na M06–2X/6–311+G(d,p) razini teorije uz SMD solvatacijski model. Rezultati DFT–modeliranja sumirani su u tablici 17., a na slici 89. prikazane su konformacije **20** dobivene optimizacijom struktura stabiliziranih unutarmolekulskim vodikovim vezama. Konformeri su klasificirani prema obrascima IHB (A i B) prikazanim na slici 90.

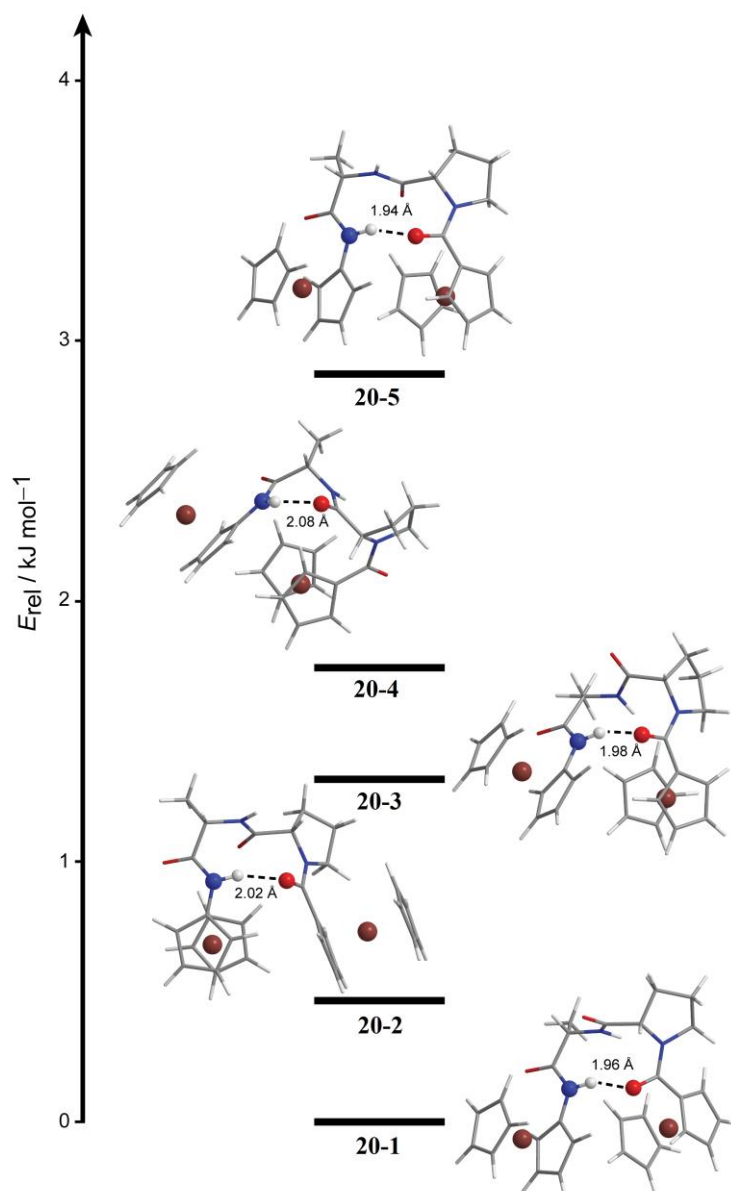
Tablica 17. Relativne energije najstabilnijih konformera **20** u kloroformu pri 298 K, konformacija pirolidinskog prstena prolina i obrazac IHB prema slici 84. (s tipovima β –okreta), duljina [\AA] vodikovih veza.

konformer	$\Delta E / \text{kJ mol}^{-1}$	konf. Pro prstena	IHB obrazac	$\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{OC}_{\text{Fc}}$ 10–člani	$\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{OC}_{\text{Pro}}$ 7–člani
20–1	0,00	<i>egzo</i>	A (β –okret tip I)	2,94	
20–2	0,46	<i>egzo</i>	A (β –okret tip II)	2,99	
20–3	1,21	<i>endo</i>	A (β –okret tip I)	2,95	
20–4	1,74	<i>endo</i>	B		2,95
20–5	2,88	<i>egzo</i>	A (β –okret tip II)	2,90	

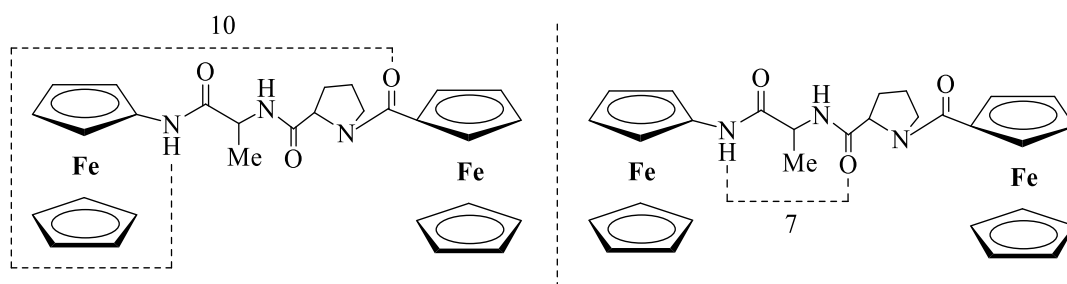
Najstabilnije konformacije **20** karakteriziraju β –okreti podržani unutarmolekulskom vodikovom vezom uspostavljenom između amino i karbonilnih skupina izravno vezanih na ferocenske podjedinice. Izračunate geometrije razlikuju se po konformaciji prolinskog prstena (*egzo* ili *endo*) i vrijednostima torzijskih kutova čime ih je moguće svrstati u tipove I i II β –okreta. U konformeru **20–4** vodikova veza između amino skupine ferocena i karbonilne grupe prolina zatvara 7–člani prsten (obrazac B) odnosno γ –okret. Geometrija konformera **20–2** odgovara onoj pronađenoj u kristalnoj strukturi **20**, a u usporedbi s najstabilnijom izračunatom konformacijom (**20–1**), osim različitog tipa okreta, karakterizirana je i različitom orijentacijom ferocenskih podjedinica. *N*–terminalni ciklopentadienilni prsten **20–2** usmjeren je suprotno od smjera svijanja peptidnog lanca čime je inicirano repozicioniranje C–terminalnog ferocena u položaj pogodan za interakcije nalik T–slaganju (T–stacking). Ove su

interakcije važne za organizaciju molekula **20** u čvrstom stanju jer sudjeluju u povezivanju susjednih dvoslojeva Fc...Fc interakcijama. Izračunata energija međumolekulske NH_{Ala}...OC_{Ala} interakcije kojom se povezuju dipeptidni slijedovi u unutrašnjosti dvoslojeva iznosi -63 kJ mol^{-1} , a Fc...Fc interakcije -63 kJ mol^{-1} (slika 91.).

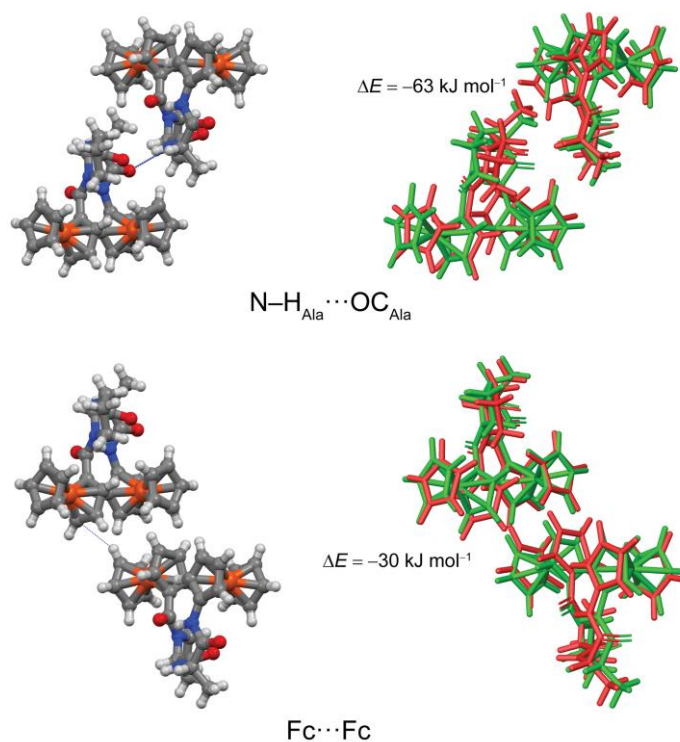
Preostali nalazi teorijske studije podupiru rezultate spektroskopske analize enantiomernih **20** i **21**. DFT-račun je potvrdio sudjelovanje NH_{Fc} skupine u IHB kao i formiranje 10-članog prstena u kojem participiraju amino i karbonilne grupe izravno vezane na ferocensku jezgru. Također, NOESY spektroskopijom pretpostavljena konformacija β -okreta tipa I računalnim je modeliranjem utvrđena u najstabilnijem konformeru (**20-1**). Slabiji Cottonovi efekti u spektrima CD dinuklearnih derivata, u usporedbi s homokiralnim dipeptidima **8** i **11**, mogu se objasniti različitom distribucijom konformera. Naime, za razliku od dominantne geometrije β -okreta tipa I u izračunatim konformerima **8** i **11** kod dinuklearnih derivata utvrđeni su i β -okreti tipa II kao i γ -okret te se može pretpostaviti kako je smanjena konformacijska homogenost uzrok reduciranim CD-signalima u spektrima dinuklearnih derivata.



Slika 89. Najstabilniji konformeri **20** s prikazanim duljinama vodikovih veza.



Slika 90. Obrasci vodikovih veza (*lijevo A, desno B*) u najstabilnijim konformacijama derivata **20**.



Slika 91. Dimer spoja **20** iz kristalne rešetke (*gore lijevo*) i superpozicija eksperimentalne i optimizirane geometrije dimera (*gore desno*) podržane $\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{OC}_{\text{Ala}}$ interakcijom; $\text{Fc} \cdots \text{Fc}$ interakcije između susjednih dvoslojeva u kristalu **20** (*dolje lijevo*) i superpozicija eksperimentalne i optimizirane geometrije dimera (*dolje desno*).

4.4. Sinteza, konformacijska analiza i kirooptička svojstva derivata aminoferocena i α -aminoizobutirične kiseline (22–27)

U poglavlju 2.7. opisani su organski kromofori koji se zahvaljujući apsorpcijskim maksimumima dovoljno udaljenim od dalekog UV-područja, u kojem apsorbiraju amidni kromofori i različita otapala, koriste za određivanje heličnih preferencija kiralnih foldamera pomoću spektroskopije CD. Kako bi se reducirao dostupan konformacijski prostor foldamera, odnosno postigla konformacijska homogenost u njih se često umeće jedna ili više podjedinica α -aminoizobutirične kiseline (Aib) koja inducira tvorbu 3_{10} uzvojnice. Budući da kiralno uređeni sekundarni strukturni elementi utječu na spektroskopska svojstva ferocenskog kromofora odlučili smo pripremiti derivate Aib i aminoferocena te istražiti njihove konformacijske i kirooptičke karakteristike. Pritom smo očekivali kako akiralni derivati Boc-(Aib)_n-NH-Fc (**22**, $n = 1$; **24**, $n = 2$; **26**, $n = 3$) predstoje kao smjesa jednakih količina interkonvergirajućih *P*- i *M*-uzvojnica te ne pokazuju CD-aktivnost. Međutim, uvođenjem L-Ala na *N*-terminus **22**, **24** i **26** izazvali bismo kiralnu perturbaciju za koju smo pretpostavili kako će uzrokovati nejednoliku zastupljenost *P*- i *M*-uzvojnica i time inducirati Cottonove efekte u apsorpcijskom području ferocenskog kromofora u spektrima CD rezultirajućih Boc-Ala-(Aib)_n-NH-Fc (**23**, $n = 1$; **25**, $n = 2$; **27**, $n = 3$). Namjera nam je bila istražiti: (i) je li favorizirana konformacija derivata **25–27** 3_{10} uzvojnica odnosno β -okret u slučaju derivata **23** i **24**, (ii) koju će usmjerenost (*P*- ili *M*-) preferirati kiralni derivati i kako će ona utjecati na kirooptička svojstva ferocena te (iii) utjecaj udaljenosti L-Ala, začetnika nabiranja uzvojnice (u pretpostavljamo dominantno jednom smjeru), od akiralnog kromofora na CD-aktivnost u apsorpcijskom području ferocena.

4.4.1. Sinteza 22–27

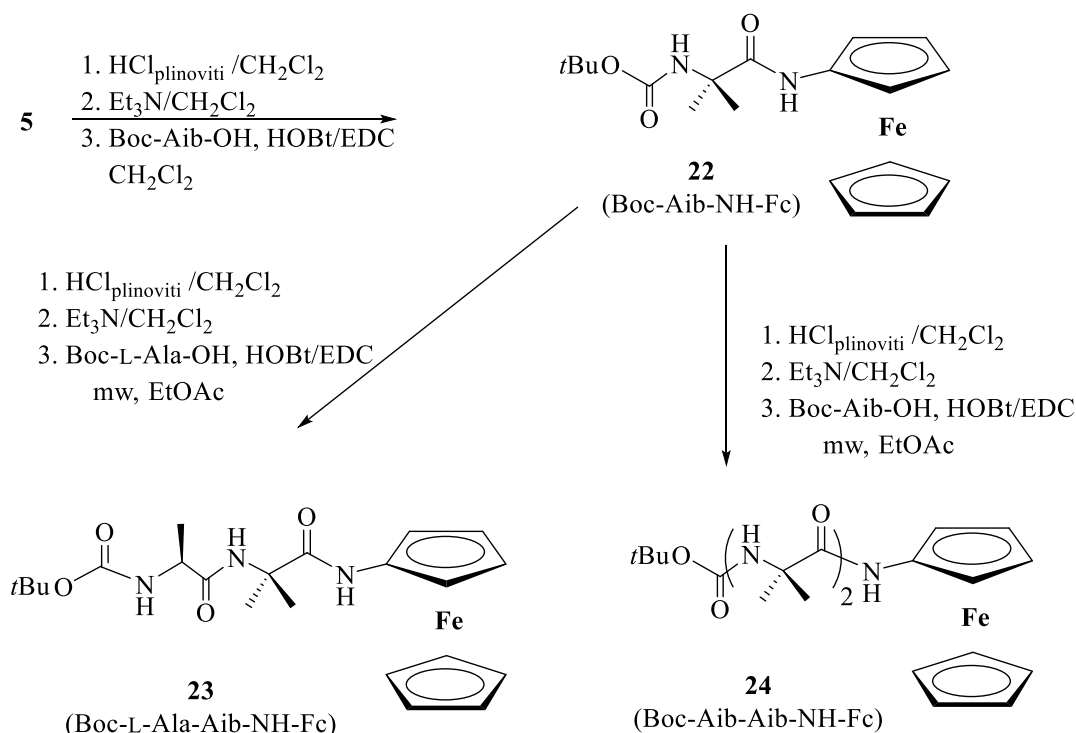
Najniži homolog Aib peptida, Boc-Aib-NH-Fc (**22**), pripremljen je u 85%-tnom iskorištenju služeći se postupkom opisanom u 4.4.1., a koji podrazumijeva deprotekciju Boc-zaštićenog aminoferocena **5** uz naknadnu kopulaciju s Boc-Aib-OH, prethodno aktiviranom standardnim postupkom EDC/HOBt (shema 8.). Uvođenje Aib-podjedinice potvrđen je singletom njezinih metilnih skupina ($\delta = 1,52$ ppm) u spektru $^1\text{H-NMR}$ te signalima pri $\delta = 25,8$ ppm [$(\text{CH}_3)_{2\text{Aib}}$]

i $\delta = 57,4$ ppm ($C_{\alpha_{Aib}}$) kao i karbonilnog C-atoma ($\delta = 172,7$ ppm) nove amidne veze u spektru ^{13}C -NMR derivata **22**. Iako se u literaturi često navodi da uvođenje α -aminoizobutirične kiseline u peptide rezultira niskim iskorištenjima (čak i uz produljeno reakcijsko vrijeme) ukoliko se koriste standardni aktivacijski reagensi,^{124,125} potaknuti dobrim iskorištenjem reakcije pripreve **22** na analogni smo način pokušali sintetizirati kiralni derivat Boc-L-Ala-Aib-NH-Fc (**23**). Sintezu **23** započeli smo uspješnom deprotekcijom **22** uz plinovit HCl, a nakon obrade nastalog hidroklorida s Et₃N slobodni je amin dodan u otopinu Boc-L-Ala-OH prethodno aktivirane EDC/HOBt postupkom. Budući da je nakon 48 sati kopulacije izolirano svega 20% spoja **23**, odlučili smo istražiti druge mogućnosti njegove pripreve.

U literaturi su opisani brojni eksperimentalni uvjeti koji mogu doprinijeti povećanju iskorištenja reakcija kopulacije u kojima sudjeluje Aib te skratiti reakcijska vremena. Neke od metoda korištenih prilikom sinteze peptida s inkorporiranim Aib-ostacima uključuju mješovite anhidride,¹²⁶ oksazolone,¹²⁷ aminokiselinske fluore¹²⁸ i širok spektar različitih aktivacijskih reagensa,¹²⁹ no niti jedna od njih ne daje uvijek reproducibilne rezultate. Također, 1-hidroksi-7-azabenzotriazol (HOAt) koji je u kombinaciji s EDC upotrijebljen prilikom sinteze ferocenskih derivata Aib **XXVII–XXIX** nije dostupan na našem tržištu. Iako je u literaturi opisan povoljan učinak umjerenog zagrijavanja na reakcije kopulacije u kojima sudjeluju sterički zahtjevni reaktanti poput Aib,¹³⁰ Sandaga i suradnici su pokazali kako je primjenom mikrovalnog (mw) zračenja, u usporedbi s konvencionalnim načinom zagrijavanja (uljna kupelj), moguće značajnije utjecati na iskorištenja i reakcijska vremena.¹³¹ Stoga smo odlučili primijeniti iste uvjete mikrovalnog zagrijavanja (15-minutno zagrijavanje reakcijske smjese na $T = 55$ °C uz $P = 200$ W, održavanje na $T = 55$ °C uz $P = 200$ W tijekom 20 minuta) prilikom kopulacije deprotektiranog derivata **22** i HOBt/EDC metodom aktivirane Boc-L-Ala-OH. Budući da se pri uvjetima eksperimenta reakcijska smjesa zagrijava na 55 °C kao otapalo smo koristili etil-acetat jer osim što učinkovito apsorbira mikrovalnu energiju dobra je alternativa diklormetanu u reakcijama u kojima se koriste uobičajeni kopulacijski reagensi.¹³² Prethodno opisanim postupkom derivat **23** pripremljen je u 40%-tnom iskorištenju, pokazavši se dvostruko učinkovitijim u odnosu na standardne metode peptidne sinteze.

Uvođenje alaninske podjedinice potvrđen je dubletom njezine metilne skupine ($\delta = 1,40$ ppm) i signalom metinske skupine ($\delta = 3,99$ ppm) u spektru $^1\text{H-NMR}$ te signalima pri $\delta = 17,4$ ppm ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$) i $\delta = 52,0$ ppm ($\text{C}\alpha_{\text{Ala}}$) kao i karbonilnog C-atoma ($\delta \sim 172$ ppm) nove amidne veze u spektru $^{13}\text{C-NMR}$ derivata **23**.

Iste smo uvjete mikrovalnog zagrijavanja u etil-acetatu primijenili i prilikom sinteze Aib dipeptida Boc-(Aib) $_2$ -NH-Fc (**24**), odnosno kondenzacije deprotektiranog derivata **22** i aktivirane Boc-Aib-OH (HOBt/EDC), jer je iskorištenje kopulacije istih reaktanata (4.4.1) miješanjem pri sobnoj temperaturi iznosilo svega 25%. U reakciji potpomognutoj mikrovalovima dobiveno je 54% spoja **24**. Uvođenje dodatne Aib jedinice na N-terminus derivata **22** registrirano je u njegovom spektru $^1\text{H-NMR}$ dodatnim signalom metilnih skupina ($\delta = 1,50$ ppm) te signalima pri $\delta = 25,4$ ppm [$(\text{CH}_3)_{2\text{Aib}}$] i $\delta = 57,2$ ppm ($\text{C}\alpha_{\text{Aib}}$) kao i signalom nove karbonilne skupine pri $\delta = 172,3$ ppm u spektru $^{13}\text{C-NMR}$ derivata **24**.



Shema 8. Sintaza amida (**22**) i dipeptida (**23** i **24**) s podjedinicama α -aminoizobutirične kiseline.

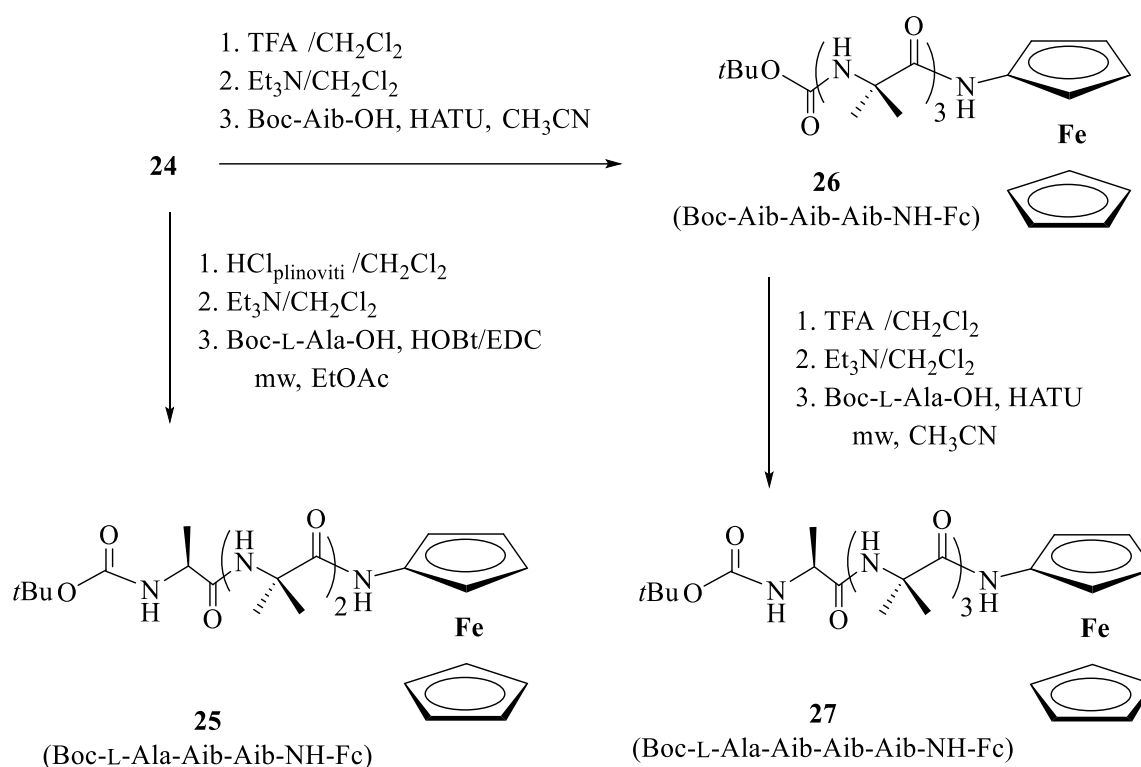
Imajući u vidu bolja iskorištenja mikrovalovima potpomognutih priprema dipeptida **23** i **24**, u usporedbi sa standardnim reakcijskim uvjetima, isti smo postupak primijenili za sintezu tripeptida Boc-L-Ala-(Aib)₂-NH-Fc (**25**). Kondenzacijom deprotektiranog Boc-zaštićenog dipeptida **24** i HOBt/EDC metodom aktivirane Boc-L-Ala-OH uz mikrovalno zagrijavanje dobiveno je 20% tripeptida **25** (shema 9.). Može se pretpostaviti kako je jedan od razloga niskog iskorištenja prethodne kopulacije višesatno uklanjanje Boc-zaštitne skupine s N-terminusa **24** djelovanjem plinovitog HCl što je rezultiralo raspadom dijela reaktanta koji se bez izolacije koristi u sljedećem reakcijskom stupnju. No, unatoč niskom iskorištenju nismo razmatrali druge sintetske mogućnosti jer je **25** ciljni spoj čija je struktura potvrđena spektralnom analizom. Tri metilna protona iz bočnog ogranka alanina rezultiraju multipletom $\delta = 1,45\text{--}1,43$ ppm, dok je metinski proton registriran pri $\delta = 3,94$ ppm. U spektru ¹³C-NMR signal asimetričnog ugljikovog atoma iz alanina zabilježen je pri $\delta = 52,2$ ppm, dok je metilni ugljikov atom registriran pri $\delta = 17,1$ ppm. Ugljikov atom iz nove amidne veze očituje se pri $\delta = 173$ ppm.

Unatoč niskom iskorištenju mikrovalovima potpomognute sinteze spoja **25** u prvom smo pokušaju pripreme njegovog akiralnog analoga Boc-(Aib)₃-NH-Fc (**26**) primijenili slične reakcijske uvjete. Kao i u prethodnom slučaju, višesatna deprotekcija prekursora **24** uz plinoviti HCl rezultirala je i djelomičnim raspadom reakcijske smjese. Nakon obrade nastalog hidroklorida s Et₃N, nastali je slobodni amin *in situ* podvrgnut reakciji kopulacije s prethodno aktiviranom Boc-Aib-OH, no niti nakon produljenog vremena izlaganja reakcijske smjese mikrovalovima i praćenja tijeka reakcije TLC-om nije opažen nastanak željenog produkta. Budući da je **26** ne samo ciljni spoj već i prekursor konjugata **27** odlučili smo ispitati alternativne sintetske strategije kako bismo ga pripravili u zadovoljavajućem iskorištenju. U cilju izbjegavanja dugotrajnog izlaganja prekursora **24** plinovitom HCl, njegovu smo N-deprotekciju proveli pomoću trifluoroctene kiseline³⁶ pri čemu nismo detektirali raspad reakcijske smjese. Nakon obrade rezultirajućeg trifluoroacetata s Et₃N uslijedila je kopulacija slobodnog amina s Boc-Aib-OH prethodno aktiviranom HATU reagensom. HATU je aktivacijski reagens koji se u kombinaciji s N,N-diizopropiletilaminom ili trietilaminom između ostalog koristi i za kopulacije sterički zahtjevnih reaktanata poput α,α -disupstituiranih aminokiselina.⁹⁵ Iako se uz HATU reagens kao otapalo najčešće koristi dimetilformamid kopulaciju smo, zbog nestabilnosti ferocenskih amina u DMF-u, proveli u acetonitrilu¹³³ i nakon 20 sati miješanja na sobnoj temperaturi izolirali 49% **26**. Uvođenje

treće Aib jedinice na *N*-terminus deprotektiranog derivata **24** registrirano je u njegovom spektru ¹H-NMR, uz već postojeće signale Aib-Aib segmenta, dodatnim signalom metilnih skupina ($\delta = 1,49$ ppm) te signalima pri $\delta = 25,5$ ppm [(CH₃)₂Aib] i $\delta = 57,2$ ppm (C α _{Aib}) kao i signalom nove karbonilne skupine pri $\delta = 172,8$ ppm u spektru ¹³C-NMR derivata **26**.

Prethodni je postupak uz manju modifikaciju korišten i za sintezu Boc-L-Ala-(Aib)₃-NH-Fc (**27**). U kopulaciji Boc-L-Ala-OH (prethodno aktivirane HATU reagensom) i *N*-deprotektiranog **26** (TFA) nakon 2 sata izlaganja mikrovalovima ($T = 55$ °C, $P = 200$ W) dobiven je ciljani konjugat **27** u 50%-tnom iskorištenju. Uvođenje alaninske podjedinice potvrđen je dubletom njezine metilne skupine ($\delta = 1,35$ ppm) i signalom metinske skupine ($\delta = 3,88$ ppm) u spektru ¹H-NMR te signalima pri $\delta = 16,9$ ppm (CH₃Ala) i $\delta = 52,2$ ppm (C α _{Ala}) kao i karbonilnog C-atoma ($\delta \sim 173$ ppm) nove amidne veze u ¹³C-NMR derivata **27**.

Zaključno, unatoč sintetskim izazovima ferocenski peptidi s inkorporiranim podjedinicama α -aminoizobutirične kiseline (**22–27**) pripremljeni su u zadovoljavajućim iskorištenjima. Osim standardnog HOBt/EDC protokola u pojedinim je sintezama ciljnih spojeva korišten HATU postupak, a neke od kopulacija bile su potpomognute mikrovalovima budući da nijedna od primijenjenih metoda nije davala konzistentne rezultate.



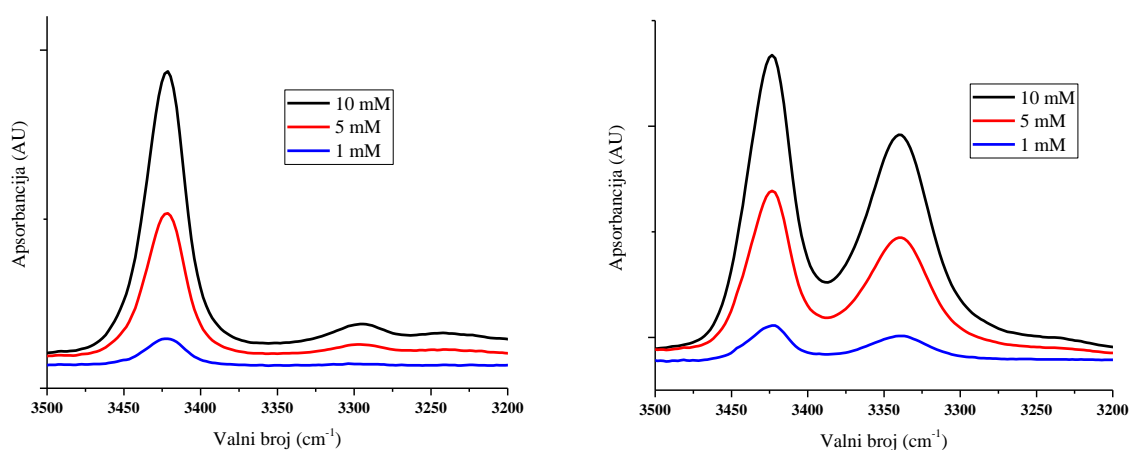
Shema 9. Sinteza tripeptida (**25** i **26**) i tetrapeptida (**27**) s inkorporiranim podjedinicama α -aminoizobutirične kiseline.

4.4.2. Konformacijska analiza

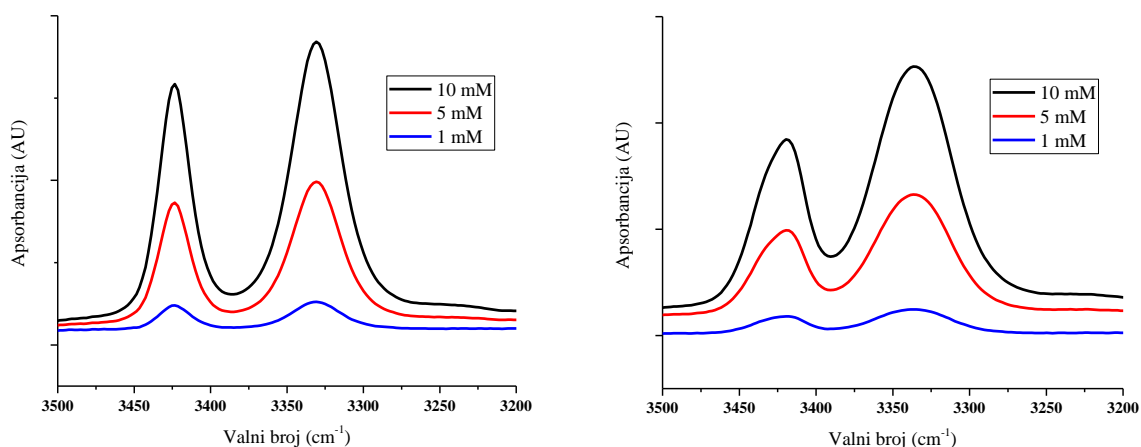
4.4.2.1. Analiza IR spektroskopijom

U diklormetanskoj otopini najnižeg homologa Aib-peptida **22** (pri koncentraciji $c = 1 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³) opažene su dvije apsorpcijske vrpce pri čemu dominira vrpca slobodnih NH-skupina (> 3400 cm⁻¹), dok slabi signal asociranih NH-skupina (< 3400 cm⁻¹) gotovo iščezava razrjeđivanjem otopine do 1×10^{-3} mol dm⁻³ koncentracije (slika 92.). U IR-spektrima preostalih derivata (**24–27**) vrpce asociranih amino-skupina jačeg su intenziteta od signala slobodnih NH-grupa (slike 93. i 94.). Kako se omjer njihovog intenziteta razrjeđivanjem ne mijenja može se pretpostaviti da u otopinama **24–27** dominiraju konformacije stabilizirane unutarmolekulskim vodikovim vezama. Iznimka je kiralni dipeptid **23** u čijem je spektru, u odnosu na više homologe, registriran nešto veći udio slobodnih NH-skupina. No, razmjerno slabljenje signala obiju vrpce tijekom razrjeđivanja sugerira kako je i u otopini **23** prisutna

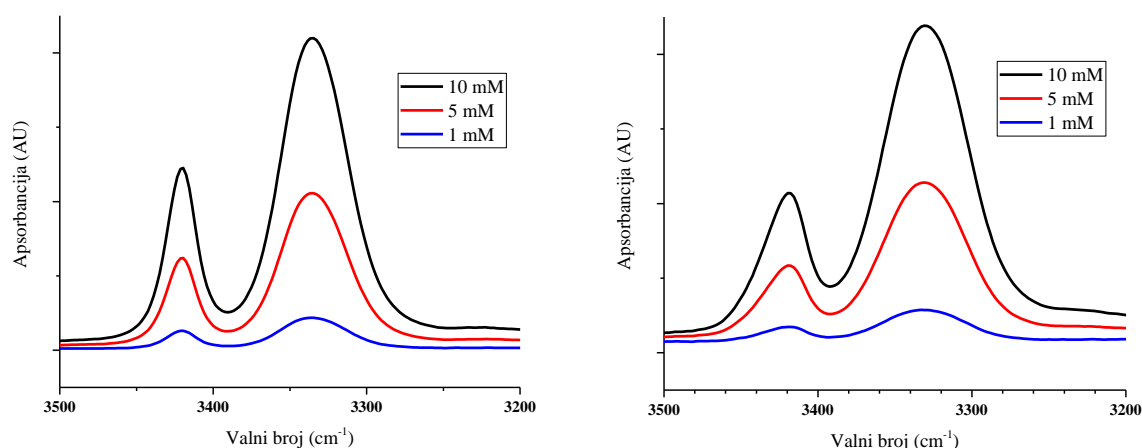
značajna populacija konformera s unutarmolekulski asociranim NH-skupinama. Također, može se primijetiti da udio asociranih NH-skupina, odnosno konformera stabiliziranih unutarmolekulskim vodikovim vezama, raste s porastom broja konstituirajućih aminokiselina. Uretanske karbonilne funkcije derivata **23–27** apsorbiraju oko ili ispod 1700 cm^{-1} čime je indicirano njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama (tablica 18.).¹⁰⁶ Istezna vibracija uretanske CO-skupine spoja **22** registrirana je pri višem valnom broju (1724 cm^{-1}) iz čega se može zaključiti da je riječ o slobodnoj skupini.



Slika 92. Koncentracijski ovisni IR–spektri derivata **22** (lijevo) i **23** (desno) u CH₂Cl₂.



Slika 93. Koncentracijski ovisni IR–spektri derivata **24** (lijevo) i **25** (desno) u CH₂Cl₂.

Slika 94. Koncentracijski ovisni IR–spektri derivata **26** (lijevo) i **27** (desno) u CH₂Cl₂.Tablica 18. NH– i CO–područje IR spektara derivata **22–27** u CH₂Cl₂ ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³).

Derivat	ν NH (slobodne)	ν NH (asocirane)	amid I	amid II
22	3421	3294	1724, 1623	–
23	3423	3340	1699	1558, 1539, 1506
24	3423	3331	1703	1552
25	3420	3337	1683	1552, 1518, 1504
26	3422	3335	1705, 1682	1553, 1520
27	3420	3331	1676	1553, 1520

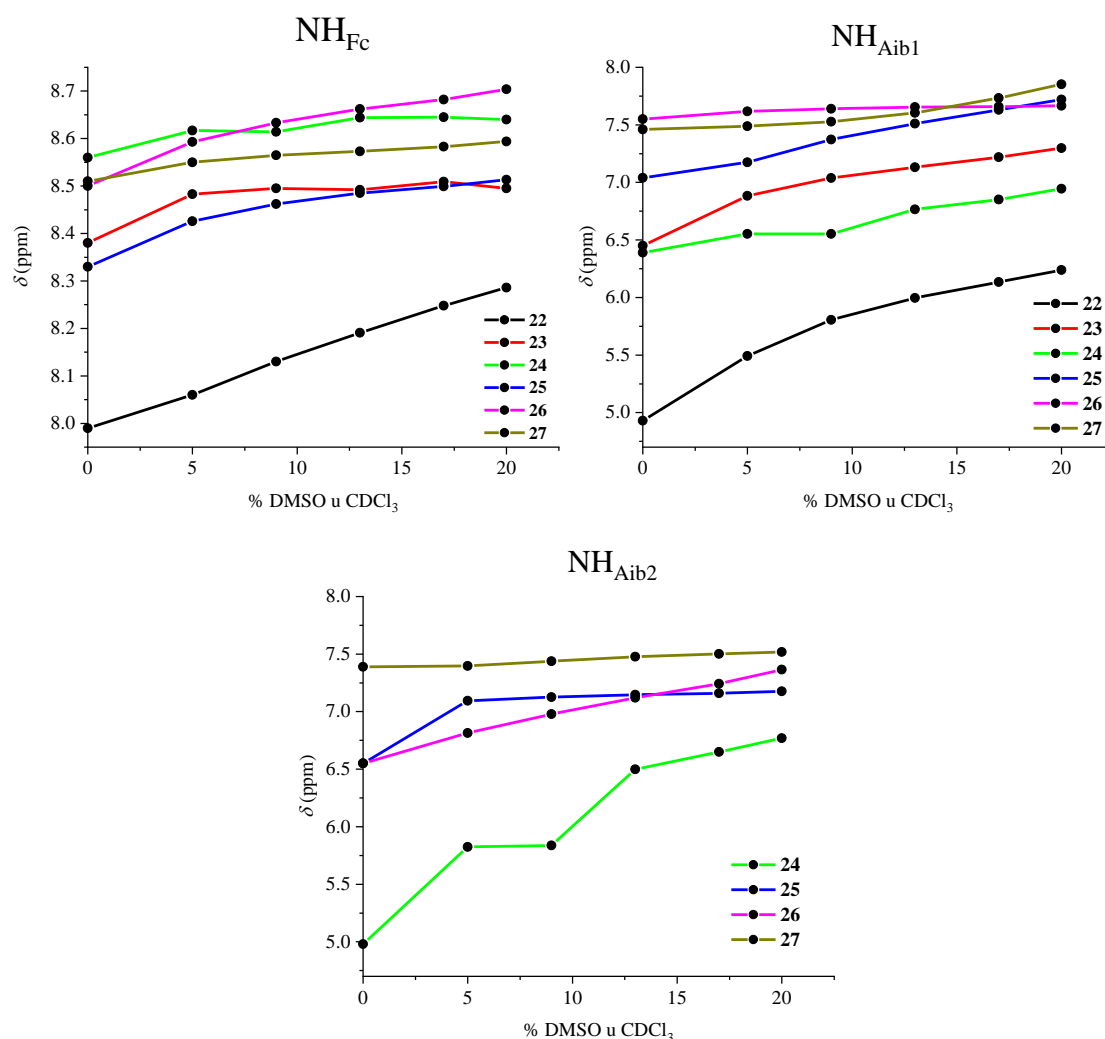
4.4.2.2. Analiza spektroskopijom NMR

U spektrima NMR svih konjugata (tablica 19.) registriran je velik kemijski pomak protona NH–skupine izravno vezane na ferocen ($\delta \geq 8$ ppm), kao i NH_{Aib1} derivata **25–27** te NH_{Aib2} tetrapeptida **27** ($\delta > 7$ ppm), što ukazuje na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama. Amidni protoni *N*–terminusa kod svih se derivata opažaju pri $\delta \sim 5$ ppm što znači da ne sudjeluju ni u kakvim vodikovim vezama, dok su preostali amidni protoni registrirani pri $\delta \sim 6,5$ ppm što njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama čini upitnim.

Tablica 19. Kemijski pomaci [ppm] amidnih protona derivata **22–27** ($c = 2 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³).

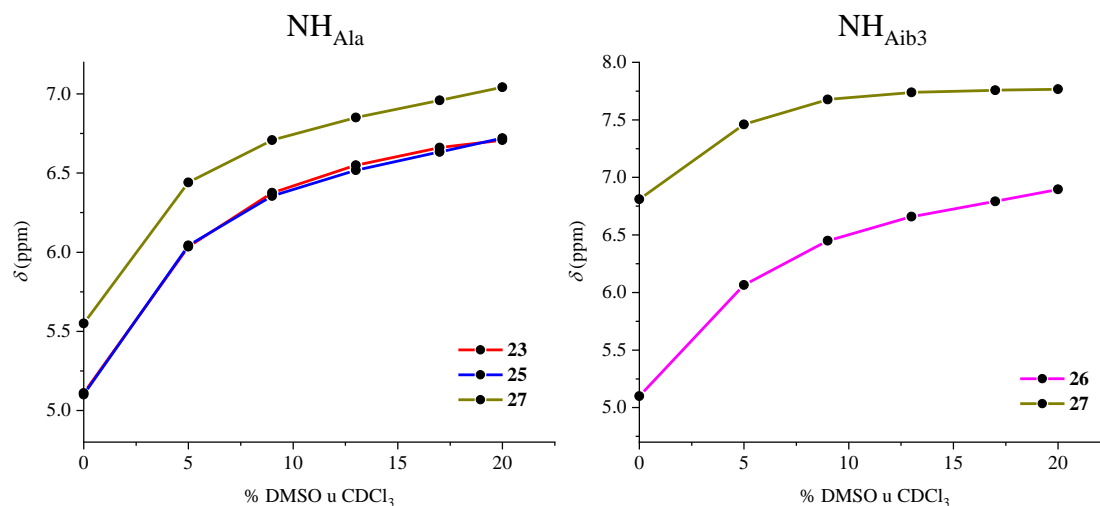
	NH _{Fc}	NH _{Aib1}	NH _{Aib2}	NH _{Aib3}	NH _{Ala}
22	7,99	4,93			
23	8,38	6,45			5,11
24	8,56	6,39	4,98		
25	8,33	7,04	6,55		5,10
26	8,50	7,55	6,56	5,13	
27	8,51	7,46	7,39	6,81	5,55

Kao i kod prethodno opisanih derivata, jakost IHB u kojima sudjeluju pojedine NH-skupine ispitana je mjerenjem temperaturno-ovisnih spektara NMR i titracijom s DMSO. Promjene kemijskih pomaka NH_{Fc}, NH_{Aib1} i NH_{Aib2} derivata **22–27** uzrokovane dodatkom polarnog otapala (φ DMSO = 0,5–0,23) prikazane su na titracijskim krivuljama (slika 95.). Male promjene kemijskih pomaka ($\Delta\delta < 0,2$ ppm) NH_{Fc}-skupine konjugata **23–27**, kao i NH_{Aib1} iz tripeptida **26** te NH_{Aib2} iz tetrapeptida **27**, u prisutnosti 23% DMSO znak su njihovog sudjelovanja u jakim IHB. Dodatak DMSO (φ DMSO = 0,23) uzrokovao je nešto zamjetniji pomak NH_{Fc} skupine **22** ($\Delta\delta = 0,3$ ppm) kao i NH_{Aib1} protona konjugata **25** i **27** ($\Delta\delta = 0,7$ i $0,4$ ppm) što ukazuje na sudjelovanje tih skupina u nešto slabijim unutarmolekulskim interakcijama.



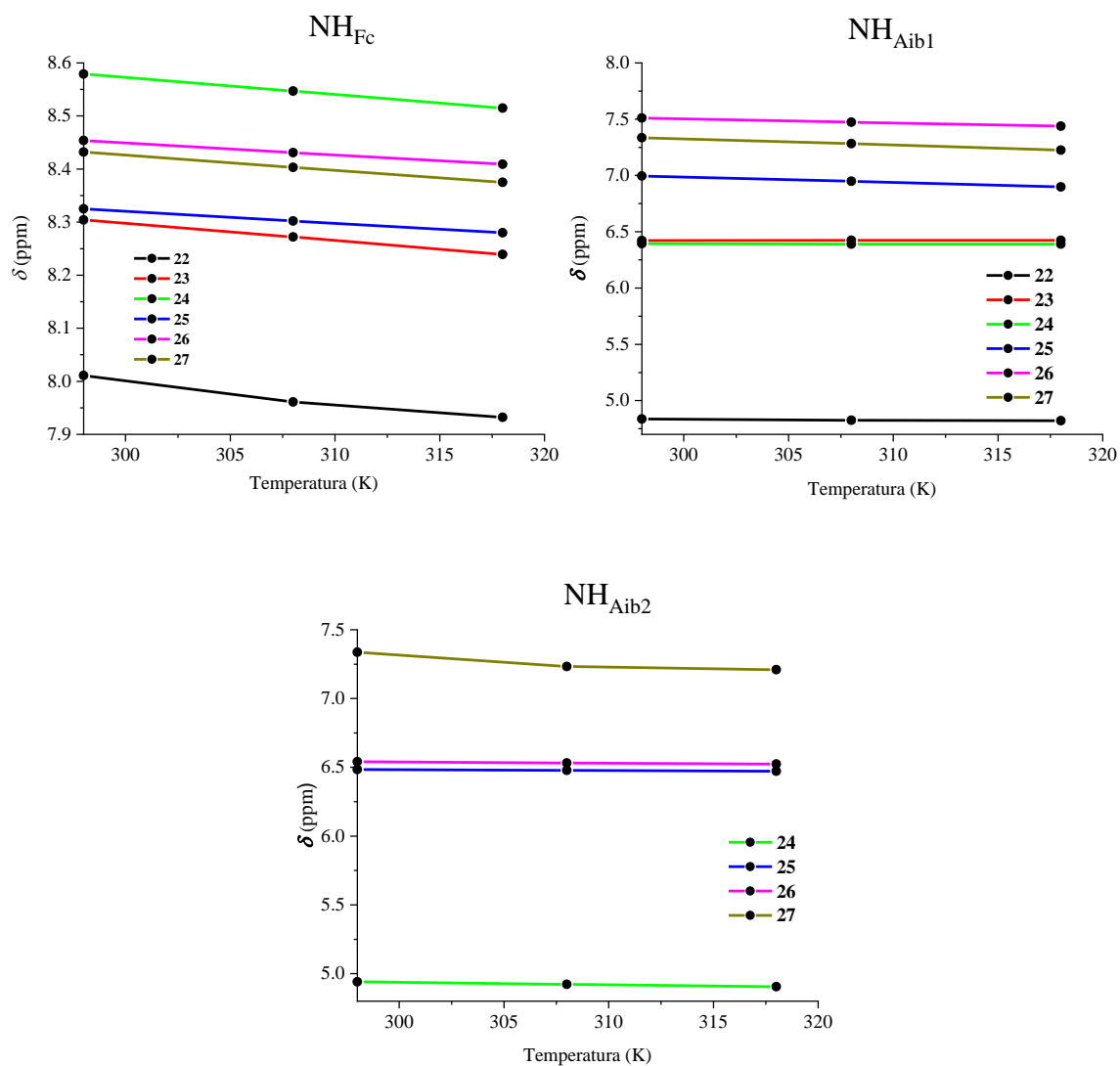
Slika 95. Pomaci NH_{Fc} (gore lijevo) i NH_{Aib1} skupine (gore desno) derivata **22–27** te NH_{Aib2} grupe derivata **24–27** (dolje) u ovisnosti o volumnom udjelu DMSO u CDCl_3 .

Također, jaka perturbacija kemijskih pomaka ($\Delta\delta \sim 1,5$ ppm) *N*-terminalnih NH -Aib- (**22**, **24**, **26**) odnosno NH -Ala-skupina (**23**, **25**, **27**) uslijed dodatka 23% DMSO (slika 96.) potvrđuje kako je riječ o slobodnim, otapalu izloženim NH -grupama. Slabije izraženu no još uvijek značajnu promjenu kemijskih pomaka ($\Delta\delta = 0,5$ – 1 ppm) uzrokovao je dodatak kompeticijskog otapala na kemijski pomak NH -Aib-skupine locirane na $i + 2$ položaju peptidnog slijeda **23–27**, što zajedno s njihovim inicijalnim pomacima ($\delta \sim 6,5$ ppm) dodatno indicira nesudjelovanje u IHB.

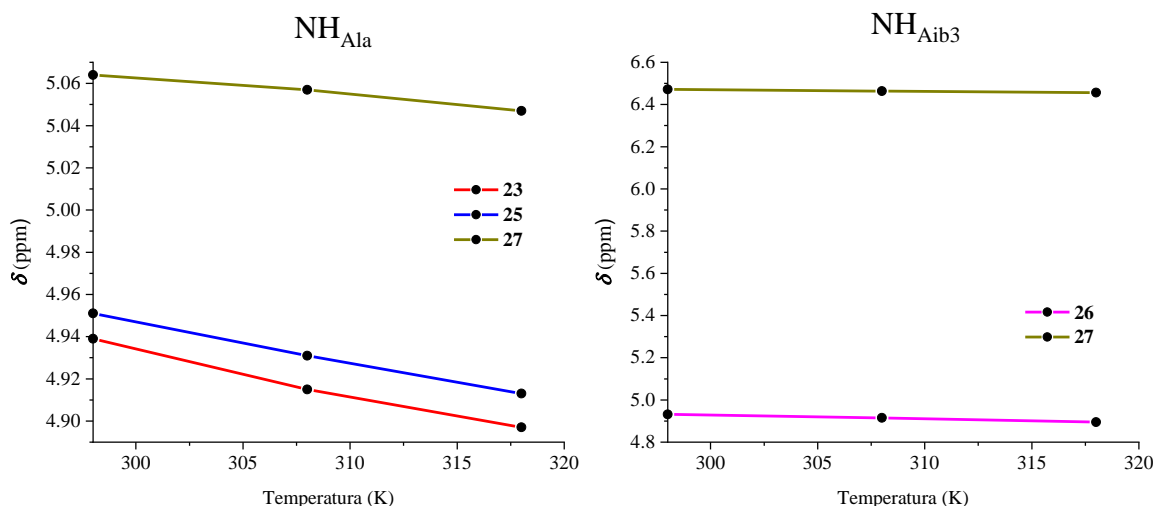


Slika 96. Pomaci NH_{Ala} derivata **23**, **25** i **27** i NH_{Aib3} peptida **26** i **27** u ovisnosti o volumnom udjelu DMSO u CDCl₃.

Ovisnost kemijskih pomaka amidnih protona konjugata **22–27** o temperaturi prikazana je na slikama 97. i 98. Mali temperaturni koeficijenti (od $-0,1$ do $-2,1$ ppb/K) NH–skupina registriranih pri $\delta < 7$ ppm pri 25 °C indikacija su otapalu izloženih amidnih protona. Time su dodatno potvrđeni nalazi IR–analize i DMSO–titracije te se može zaključiti kako amidni protoni aminokiselina na $i + 1$ [NH_{Ala} (**23**, **25** i **27**), NH_{Aib1} (**22**), NH_{Aib2} (**24**) i NH_{Aib3} (**26**)] kao i oni locirani na $i + 2$ položaju [NH_{Aib1} (**23** i **24**), NH_{Aib2} (**25** i **26**) i NH_{Aib3} (**27**)] ne sudjeluju u vodikovim vezama. Veći temperaturni koeficijenti (od $-2,3$ do $-6,4$ ppb/K), karakteristični za NH–skupine inicijalno zaklonjene od otapala koje mu postaju izložene pri višim temperaturama, izmjereni su za sve NH_{Fc} skupine, te NH_{Aib1} iz derivata **25–27** i NH_{Aib2} iz tetrapeptida **27** čime je potvrđeno njihovo sudjelovanje u jakim unutarmolekulskim interakcijama.

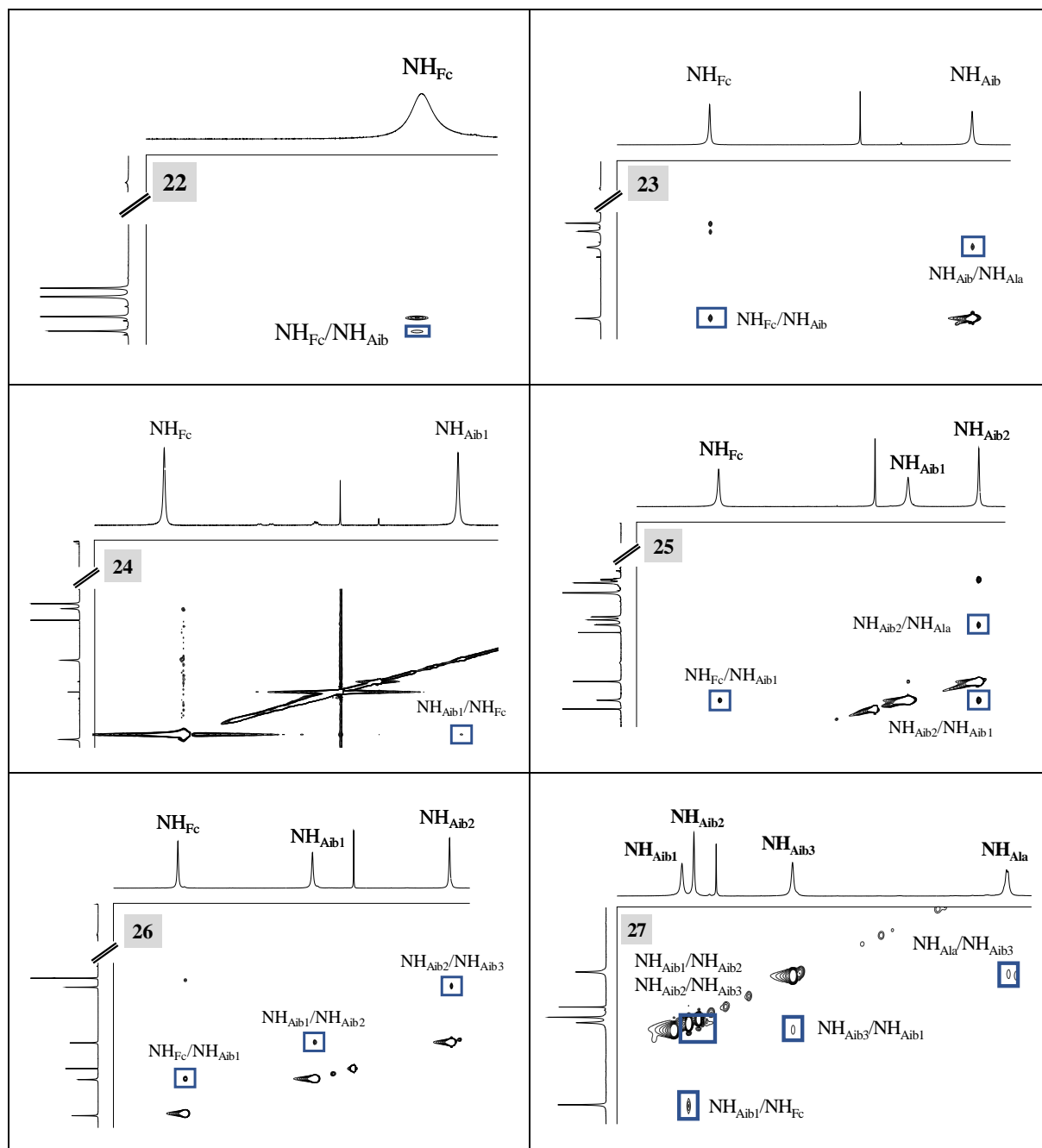


Slika 97. Ovisnost kemijskih pomaka NH_{Fc} (*gore lijevo*), NH_{Aib1} (*gore desno*) derivata **22–27** i NH_{Aib2} skupine konjugata **24–27** (*dolje*) o temperaturi ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³).



Slika 98. Ovisnost kemijskih pomaka NH_{Ala} derivata **23**, **25** i **27** i NH_{Aib3} peptida **26** i **27** o temperaturi ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$).

U NOESY spektrima **22–27**, prikazanim na slici 99., vidljivi su sekvencijalni $d_{NN}(i, i + 1)$ signali. Na temelju rezultata spektroskopije (IR i NMR) kao i dokumentiranoj ulozi Aib–a u indukciji struktura nalik 3₁₀–uzvojnica (poglavlje 2.5.3), može se pretpostaviti kako su peptidi **23–27** u otopini stabilizirani 10–članim IHB–prstenovima. Pri tom se kod najnižih homologa **23** i **24** uspostavlja vodikova veza NH_{Fc}⋯OC_{Boc} koja podržava strukturu nalik β–okretu. Kod tripeptida **25** i **26** u vodikovim vezama sudjeluju NH–skupine na položajima $i + 3$ i $i + 4$ peptidnog slijeda (NH_{Aib1} i NH_{Fc}) i karbonilne skupine i –tog odnosno $i + 1$ ostatka. Također, može se pretpostaviti kako je peptid **27**, s obzirom na broj aminokiselinskih ostataka, stabiliziran s trima uzastopnim 10–članim prstenovima podržanim NH_{Fc}⋯OC_{Aib3}, NH_{Aib1}⋯OC_{Ala} i NH_{Aib2}⋯OC_{Boc} vodikovim vezama.



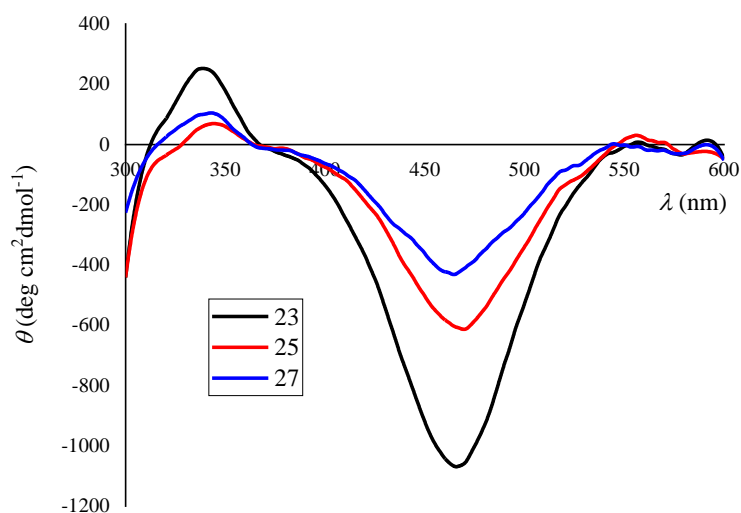
Slika 99. Sekvencijalni dNN ($i, i + 1$) kontakti u NOESY spektrima 22–27.

4.4.2.3. Analiza spektroskopijom CD

Molarni ekstinkcijski koeficijenti, valne duljine apsorpcijskih maksimuma d–d prijelaza, molarna eliptičnost i valne duljine maksimuma CD–vrpce kiralnih derivata **23**, **25** i **27** prikazani su u tablici 20., a vidljivo područje valnih duljina spektara CD na slici 100. U spektrima svih peptida registrirani su Cottonovi efekti negativnog predznaka čiji se intenzitet smanjuje s porastom broja Aib–podjedinica. Kao što je vidljivo u tablici 20., dodatak svega 5% DMSO kao kompeticijskog otapala uzrokovao je znatnu redukciju intenziteta signala (> 50%) u spektrima CD derivata **23** i **27**. U slučaju derivata **25** pri istim je uvjetima opažena promjena predznaka Cottonova efekta te jačanje pozitivnog signala s porastom volumnog udjela DMSO. Iz prethodnog se može pretpostaviti kako je u otopini **25** prisutno više energijski bliskih konformera na čiju se populaciju može utjecati promjenom otapala što uzrokuje promjenu predznaka CD–signala.

Tablica 20. UV/Vis–signali i CD–vrpce ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³) **23**, **25** i **27** u CH₂Cl₂ i smjesama CH₂Cl₂ i DMSO.

λ_{\max}/nm ($\varepsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	otapalo	23	25	27
	CH ₂ Cl ₂	448 (342)	448 (340)	448 (346)
	DMSO = 5%	448 (341)	448 (339)	448 (344)
	DMSO = 9%	448 (340)	448 (338)	448 (343)
	DMSO = 13%	448 (350)	448 (338)	448 (342)
	DMSO = 17%	/	448 (337)	/
	DMSO = 20%	/	448 (337)	/
	DMSO = 23%	/	448 (336)	/
λ_{\max}/nm ($\theta/\text{deg cm}^2\text{dmol}^{-1}$)	otapalo	23	25	27
	CH ₂ Cl ₂	462 (-1089)	466 (-633)	465 (-463)
	DMSO = 5%	466 (-506)	478 (196)	466 (-174)
	DMSO = 9%	456 (-435)	471 (371)	476 (-94)
	DMSO = 13%	457 (-99)	470 (527)	479 (83)
	DMSO = 17%	/	465 (561)	/
	DMSO = 20%	/	468 (601)	/
	DMSO = 23%	/	465 (636)	/



Slika 100. Spektri CD peptida **23**, **25** i **27** u CH_2Cl_2 ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$).

4.4.2.4. DFT–modeliranje **22–27** i usporedba teorijskih i eksperimentalnih rezultata

Kao i kod prethodno opisanih spojeva, u suradnji s doc. dr. sc. Ivanom Kodrinom, s Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pretražen je konformacijski prostora derivata **22–27** te su uspoređeni teorijski i eksperimentalni rezultati. Rezultati modeliranja navedeni su u tablici 21., a najstabilnije izračunate konformacije prikazane su na slikama 101., 102. i 103. U najstabilnijim konformerima najnižeg homologa **22** (**22–1** i **22–2**) $\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{N}_{\text{Aib}}$ vodikova veza zatvara 5–člani prsten dok se u energijski nepovoljnijim geometrijama **22–3** i **22–4** opaža 7–člani prsten podržan $\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$ vezom. Potonje strukture, nalik γ –okretima, pronađene su u najpovoljnijim konformerima derivata aminoferocena i prirodnih aminokiselina Boc–AA–NH–Fc (AA = Gly, Ala, Val)¹¹⁹ kod kojih je relativna energija geometrija s 5–članim prstenovima približno $2,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ veća.

Iz prethodnog se može zaključiti kako α –metiliranje utječe na konformacijski prostor stabilizirajući konformacije s 5–članim prstenovima u rezultirajućim dialkiliranim aminokiselinskim derivatima. U najstabilnijim konformerima dipeptida **23** (**23–1**) i **24** (**24–1**), kao i konformaciji **23–3**, vodikova veza između $\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$, uz dodatnu $\text{N–H} \cdots \text{N}$ interakciju između amidnih skupina susjednih aminokiselina, zatvara 10–člani prsten. Isti je strukturni element pronađen i u najpovoljnijim geometrijama homokiralnih dipeptida **8** i **11**. Konformacija **23–2**, čija je relativna energija $3,47 \text{ kJ mol}^{-1}$ veća od **23–1**, stabilizirana je

dvama 7-članim prstenovima ($\text{NH}_{\text{Fc}}\cdots\text{OC}_{\text{Ala}}$ i $\text{NH}_{\text{Aib}}\cdots\text{OC}_{\text{Boc}}$), odnosno uzastopnim γ -okretima svojstvenim heterokiralnim derivatima **9** i **10**. U skupu najstabilnijih konformera kiralnog tripeptida **25** kao i akiralnog **26** prisutni su 10-člani prstenovi, odnosno uzastopni β -okreti ($\text{NH}_{\text{Fc}}\cdots\text{OC}_{\text{Ala}}$, odnosno $\text{NH}_{\text{Fc}}\cdots\text{OC}_{\text{Aib3}}$, i $\text{NH}_{\text{Aib1}}\cdots\text{OC}_{\text{Boc}}$), prethodno opisani kao obrazac B tripeptida **12–15** (Slika 77.). Tri uzatopna 10-člana prstena zatvorena $\text{NH}_{\text{Fc}}\cdots\text{OC}_{\text{Aib3}}$, $\text{NH}_{\text{Aib1}}\cdots\text{OC}_{\text{Ala}}$ i $\text{NH}_{\text{Aib2}}\cdots\text{OC}_{\text{Boc}}$ vodikovim vezama karakteriziraju najstabilniji konformer tetrapeptida **27**.

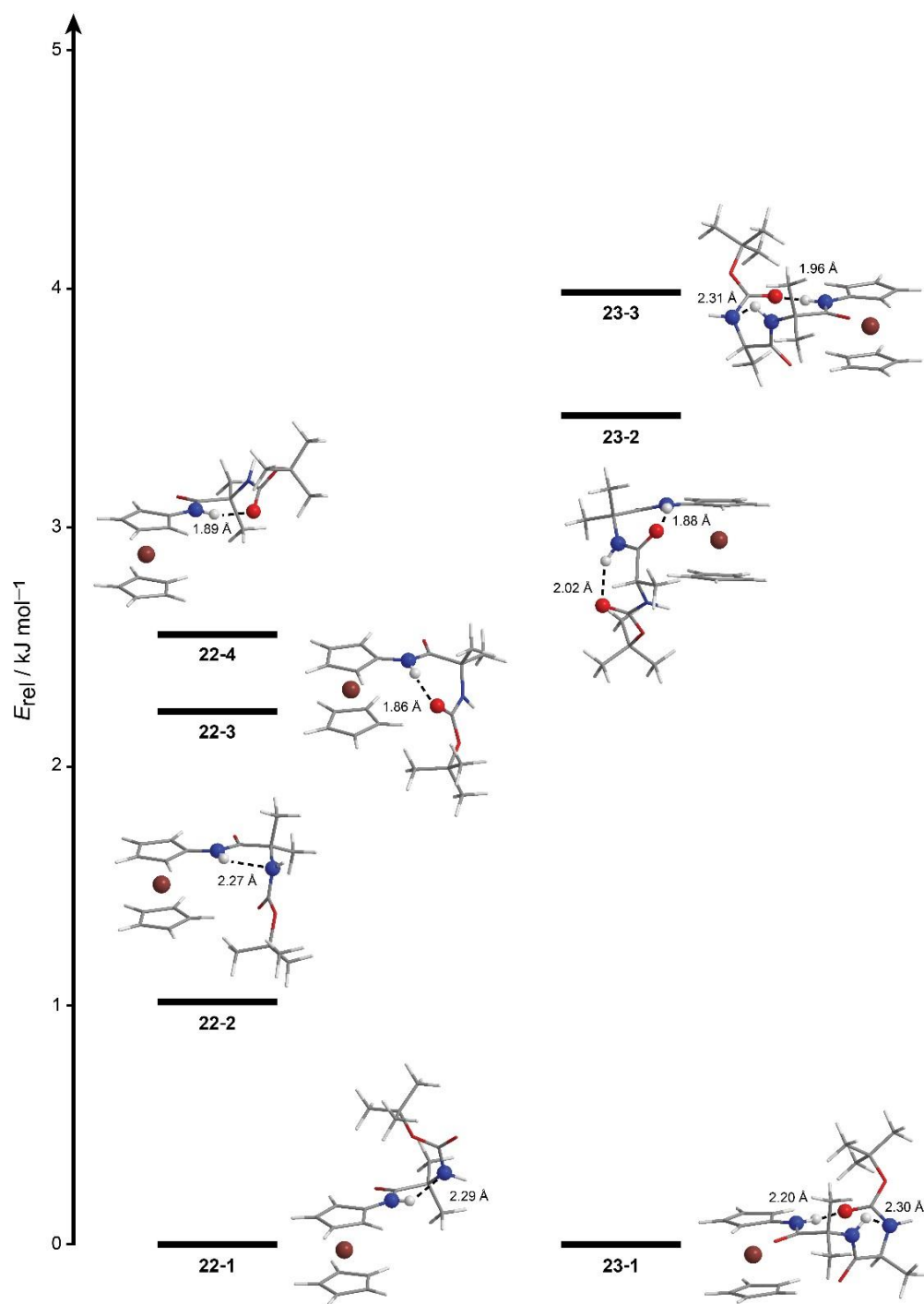
U nastavku istraživanja usporedili smo podatke proizašle iz DFT-računa s eksperimentalnim rezultatima. Vrpce registrirane ispod 3400 cm^{-1} u IR spektrima **22–27** mogu se na temelju modeliranja pripisati slobodnim *N*-terminalnim NH_{Aib} (**22**, **24**, **26**) i NH_{Ala} (**23**, **25**, **27**), te NH skupinama aminokiselina na $i + 2$ položaju peptidnog slijeda [NH_{Aib1} (**23** i **24**), NH_{Aib2} (**25** i **26**) i NH_{Aib3} (**27**)]. Nalazi modeliranja u skladu su i s rezultatima analize spektroskopijom NMR koji su indicirali sudjelovanje svih NH_{Fc} skupina, NH_{Aib1} iz derivata **25–27** i NH_{Aib2} iz tetrapeptida **27** u vodikovim vezama. Također, DFT-računom su potkrijepljeni nalazi NOESY-spektroskopije koji su indicirali stabilizaciju dipeptida **23** i **24** jednim, tripeptida **25** i **26** dvama, a tetrapeptida **27** trima 10-članim prstenovima u kojima sudjeluju prethodno navedene NH-skupine. Ovi su rezultati, proizašli iz teorijske i eksperimentalne analize, u skladu s literaturnim navodima (2.5.3) u kojima je opisana uloga Aib-ovih ostataka u indukciji 3_{10} -uzvojnice u kratkim peptidima.

Nadalje, imajući u vidu prethodno uspostavljenu korelaciju između diedarskog kuta χ (poglavlje 4.2.2.4., Slika 81.) i predznaka signala u spektrima CD u svim je računalno generiranim geometrijama određen kut χ (tablica 21.). U najstabilnijim konformacijama svih kiralnih derivata (**23–1**, **25–1** i **27–1**) taj kut poprima negativnu vrijednost što je u skladu s eksperimentalno registriranim negativnim Cottonovim efektima u njihovim spektrima CD. Promjena predznaka Cottonova efekta tijekom titracije derivata **25** s DMSO može se objasniti prisutnošću više energijski dostupnih konformacija s pozitivnom kutom χ (**25–2**, **25–3** i **25–4**) koje uslijed promjene otapala mogu postati značajno populirane. Iako su u spektrima CD svih kiralnih derivata registrirani Cottonovi efekti, elongacijom peptidnog lanca, neočekivano slabe što se može objasniti razmatranjem vrijednosti kuta χ . Kut χ opisuje otklon amidne ravnine od ravnine ciklopentadienilnog prstena na koji je vezan peptidni segment. U

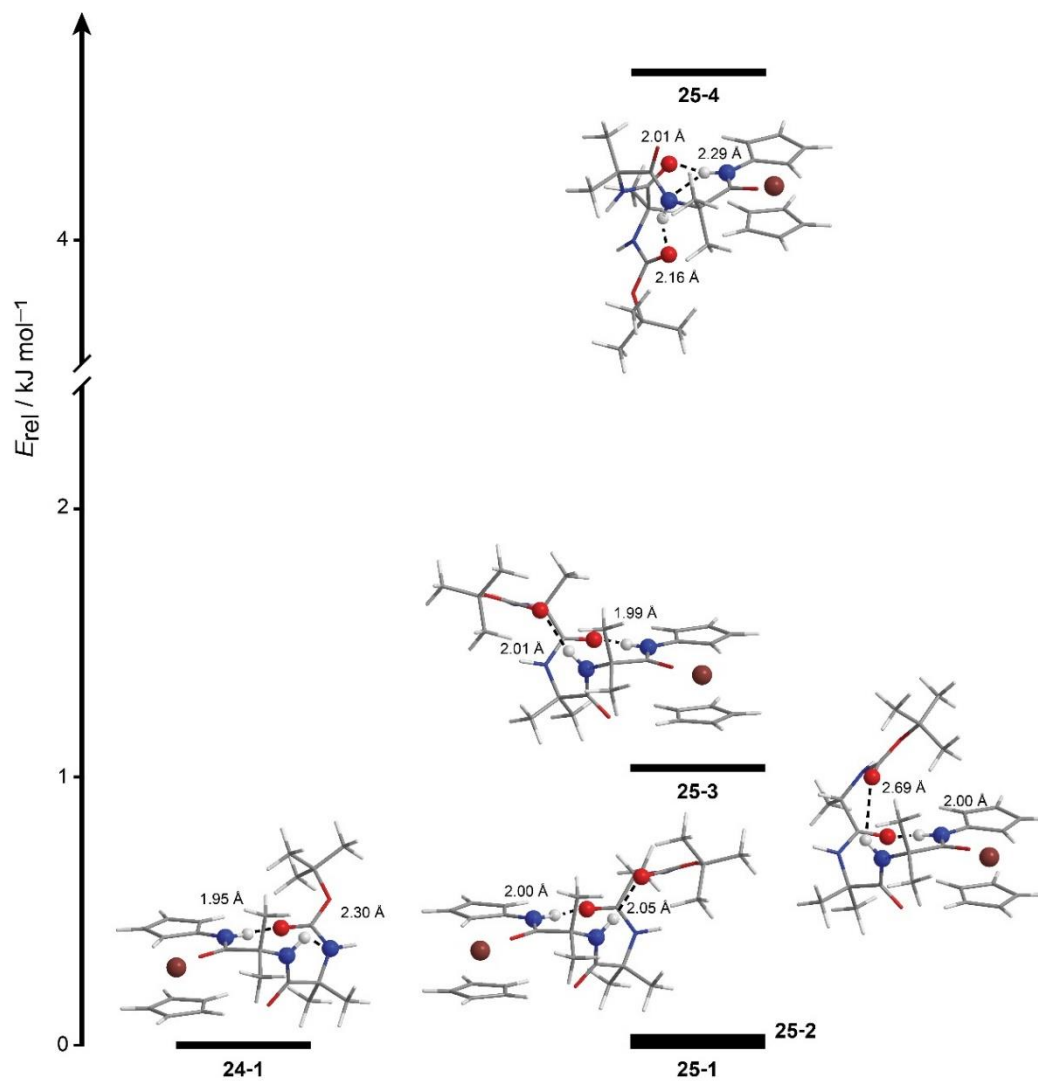
odsutnosti nabiranja peptidnog lanca te su dvije ravnine koplanarne, a kut χ idealno iznosi $+90^\circ$, odnosno -90° . Uslijed nabiranja peptidnog segmenta, odnosno sudjelovanja amidne skupine u vodikovim vezama dolazi do njezinog otklona te se može pretpostaviti kako jači otklon rezultira i jačim CD-signalom. Naime, iako je u slučaju tetrapeptida **27** pronađen samo jedan konformer, stabiliziran jakim vodikovim vezama, vrijednost kuta χ iznosi $-86,1^\circ$ što označava manji otklon nego kod energijski najpovoljnije konformacije tripeptida **25** ($\chi = -81,6^\circ$). Najjači Cottonov efekt registriran je u spektru CD dipeptida **23** što je u skladu s prethodnom pretpostavkom jer u energijski najpovoljnijim konformacijama vrijednost kuta χ iznosi $-81,7^\circ$ (**23-1**), odnosno $-73,6^\circ$ (**23-2**).

Tablica 21. Relativne energije najstabilnijih konformera **22–27** u kloroformu pri 298 K, kut χ , prsteni podržani unutarmolekulskim vodikovim vezama, duljina [\AA] vodikovih veza.

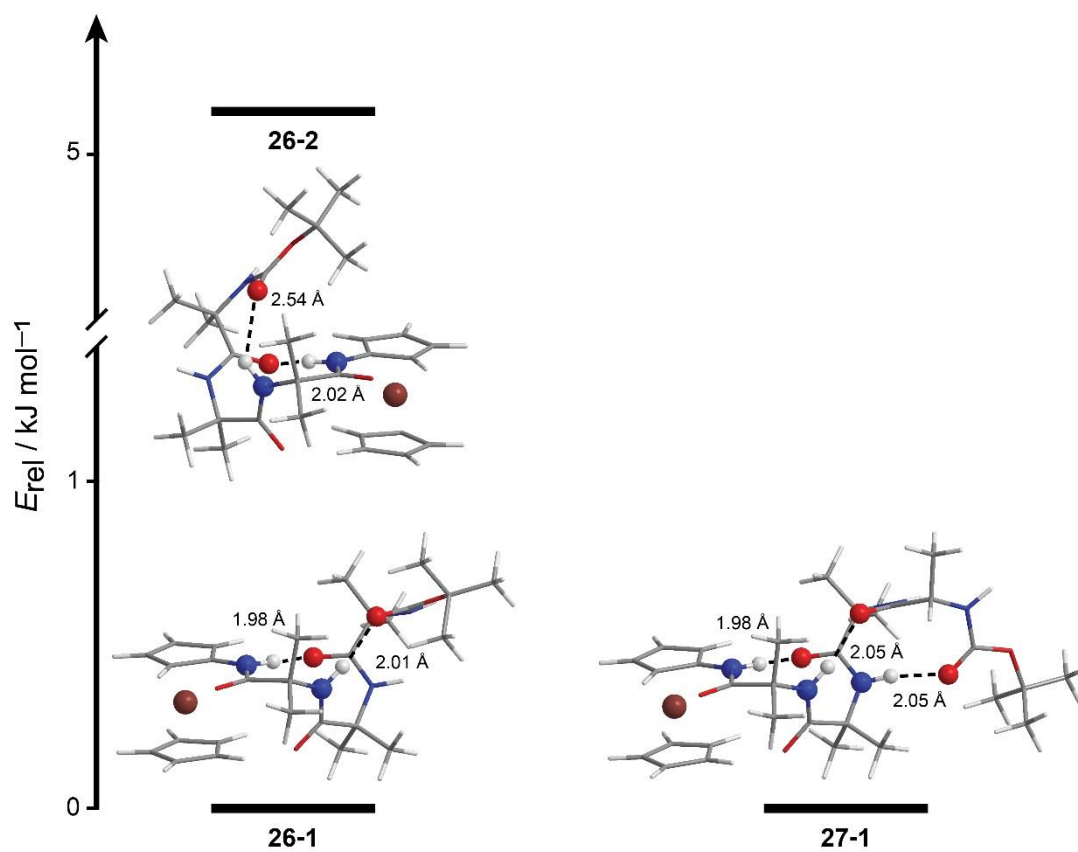
konformer	$\Delta E/kJmol^{-1}$	χ kut	$NH_{Fc} \cdots N_{Aib1}$ 5-člani	$NH_{Aib1} \cdots N_{Ala}$ $NH_{Aib1} \cdots N_{Aib2}$ 5-člani	$NH_{Fc} \cdots OC_{Boc}$ $NH_{Fc} \cdots OC_{Ala}$ 7-člani	$NH_{Aib1} \cdots OC_{Boc}$ 7-člani	$NH_{Fc} \cdots OC_{Boc}$ $NH_{Fc} \cdots OC_{Ala}$ $NH_{Fc} \cdots OC_{Aib3}$ 10-člani	$NH_{Aib1} \cdots OC_{Boc}$ $NH_{Aib1} \cdots OC_{Ala}$ 10-člani	$NH_{Aib2} \cdots OC_{Boc}$ 10-člani
22–1	0,00		2,75						
22–2	1,05		2,74						
22–3	2,29				2,82				
22–4	2,65				2,83				
23–1	0,00	-81,7		2,76			2,98		
23–2	3,47	-73,6			2,81	2,94			
23–3	3,98	86,1		2,76			2,94		
24–1	0,00			2,75			2,94		
25–1	0,00	-81,6					2,99	3,05	
25–2	0,17	97,0					2,97	3,44	
25–3	1,17	82,8					2,97	3,01	
25–4	4,64	95,6	2,75				2,98	3,13	
26–1	0,00						2,96	3,01	
26–2	5,18						2,96	3,31	
27–1	0,00	-86,1					2,96	3,05	3,04



Slika 101. Najstabilniji konformeri **22** i **23** s prikazanim duljinama vodikovih veza.



Slika 102. Najstabilniji konformeri **24** i **25** s prikazanim duljinama vodikovih veza.



Slika 103. Najstabilniji konformeri **26** i **27** s prikazanim duljinama vodikovih veza.

§ 5. ZAKLJUČAK

Imajući u vidu da konjugati aminoferocena i kratkih peptida mogu tvoriti uređene sekundarne strukturne elemente u ovoj su disertaciji sintetizirani dipeptidni (**8–11**), tripeptidni (**12–19**) i dinuklearni (**20 i 21**) derivati aminoferocena te konjugati s α -amino izobutiričnom kiselinom (**22–27**). U cilju istraživanja utjecaja, vodikovim vezama podržanog, kiralnog uređenja peptidnog slijeda na CD-aktivnost u apsorpcijskom području ferocenskog kromofora identificirane su dominantne konformacije **8–27** s pomoću eksperimentalnih i teorijskih metoda.

1. U prvom dijelu disertacije opisana je sinteza i konformacijska analiza četiri dipeptida izvedena iz aminoferocena Boc-AA₂-AA₁-NH-Fc (**8**, AA₁ = L-Ala, AA₂ = L-Pro; **9**, AA₁ = L-Ala, AA₂ = D-Pro; **10**, AA₁ = D-Ala, AA₂ = L-Pro; **11**, AA₁ = D-Ala, AA₂ = D-Pro):
 - Nalazi spektroskopskih analiza ukazuju na stabilizaciju homokiralnih derivata **8 i 11** NH_{Fc}...O=C_{Boc} vezom koja zatvara 10-člani prsten (β -okret), dok su u otopinama heterokiralnih **9 i 10** prisutni su i drugi strukturni elementi.
 - U kristalnim strukturama heterokiralnih **9 i 10** nađena je NH_{Fc}...OC_{Boc} IHB koja zatvara 10-člani prsten i podržava konformaciju β -okreta.
 - Nalazi DFT-modeliranja homokiralnih dipeptida potvrdili su eksperimentalne rezultate, u najstabilnijom konformacijama **8 i 11** prisutan je β -okreta tipa I. Najstabilnije konformacije heterokiralnih **9 i 10** u otopini su stabilizirane NH_{Fc}...O=C_{Pro} i NH_{Ala}...O=C_{Boc} vezama koje rezultiraju uzastopnim γ -okretima (7-članim prstenovima) dok su β -okreti pronađeni u energijski nepovoljnijim, no još uvijek značajno populiranim konformacijama.
 - Rezultati analize Hirshfeldove plohe i QTAIM analize heterokiralnih dipeptida **9 i 10** ukazuju kako se uslijed povoljnih interakcija sa susjednim molekulama geometrije uzastopnih γ -okreta, svojstvene izoliranim molekulama, mogu reorganizirati u manje stabilne konformacije β -okreta što objašnjava različite konformacije pronađene u čvrstom stanju (β -okret) od struktura dobivenih optimizacijom izoliranih molekula (γ -okreti).

- U spektrima CD homokiralnih derivata **8** i **11** javljaju se Cottonovi efekti jednakog intenziteta i suprotnog predznaka (-2540 i 2571 deg cm^2 dmol^{-1}) koji proizlaze iz prijenosa kiralne informacije s lokalne sekundarne strukture (β -okreta) do ferocenskog kromofora. Gotovo 5 puta slabiji signali, registrirani u spektrima heterokiralnih derivata **9** i **10** (480 i -461 deg cm^2 dmol^{-1}) posljedica su, teorijski i eksperimentalno utvrđene, konformacijske nehomogenosti odnosno manjeg stupnja jednoznačnog kiralnog uređenja u usporedbi s **8** i **11**. Također, predznak CD-signala određen je kiralnošću aminokiseline na položaju $i + 1$, ukoliko je aminokiselina L-konfiguracije predznak je negativan, a pritom vrijedi i suprotno.
2. U nastavku istraživanja utjecaja konformacije peptidnog lanca na kirooptička svojstva ferocena uvođenjem dodatne aminokiseline na N-terminus **8–11** sintetizirani su tripeptidi Boc-AA₃-AA₂-AA₁-NH-Fc (**12**, AA₁ = L-Ala, AA₂ = L-Pro, AA₃ = L-Pro; **13**, AA₁ = L-Ala, AA₂ = L-Pro, AA₃ = D-Pro; **14**, AA₁ = L-Ala, AA₂ = D-Pro, AA₃ = L-Pro; **15**, AA₁ = L-Ala, AA₂ = D-Pro, AA₃ = D-Pro; **16**, AA₁ = D-Ala, AA₂ = L-Pro, AA₃ = L-Pro; **17**, AA₁ = D-Ala, AA₂ = L-Pro, AA₃ = D-Pro; **18**, AA₁ = D-Ala, AA₂ = D-Pro, AA₃ = L-Pro i **19**, AA₁ = D-Ala, AA₂ = D-Pro, AA₃ = D-Pro). Konformacijskom analizom tripeptida **12–15**, koji s obzirom na primarnu strukturu osim različitih okreta mogu zauzimati i konformaciju uzvojnice, utvrđeno je sljedeće:
- Prema rezultatima eksperimentalnih i računalnih analiza tripeptidi **12–15** preferiraju različite strukturne motive. U skupu najstabilnijih konformera tripeptida s homokiralnim Pro-Pro slijedom (**12** i **15**) dominira geometrija stabilizirana račvastim vodikovim vezama koje zatvaraju 10- ($\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$) i 13-člane prstenove ($\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$) dok se u energijski nepovoljnijim konformacijama opažaju i strukture nalik β - i γ -okretima. Uzastopni β -okreti ($\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{OC}_{\text{Pro}}$ i $\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$) karakteriziraju skup najstabilnijih konformera **13** i **14** koji sadrže heterokiralni Pro-Pro slijed kao i konformaciju derivata **13** u čvrstom stanju..
 - Vodikovim vezama podržane, kiralno uređene strukture induciraju CD-signale različitog predznaka i intenziteta u vidljivom području valnih duljina spektara peptida **12–15**, a izračunate CD-krivulje dobro se podudaraju s eksperimentalnima. Najjači Cottonovi efekti registrirani su u spektrima CD konformacijski homogenog **13**.

- Rezultati eksperimentalnog i teorijskog istraživanja ukazuju na postojanje korelacije između diedarskog kuta χ (koji opisuje rotaciju oko veze između ferocena i tripeptidnog segmenta) i predznaka Cottonovog efekta. Pri tome, pozitivna vrijednost kuta rezultira pozitivnim signalom dok se negativan Cottonov efekt opaža u slučaju negativnih χ . Nadalje, predznak kuta χ , a time i CD-signal, može se povezati s heličnošću peptidnog lanca, ali pritom ne postoji univerzalna korelacija, već se razlikuju dva granična slučaja. Ukoliko peptidni lanac propagira udaljavajući se od ferocena, *P*-heličnost rezultira negativnim χ dok kod *M*-heličnih struktura poprima pozitivnu vrijednost. U slučaju konformacija u kojima se peptidni lanac svija prema ferocenu *P*-heličnost se povezuje s pozitivnim kutom i suprotno.
3. U svrhu istraživanja utjecaja umetanja dodatne organometalne podjedinice na konformacijska, a time i kirooptička svojstva homokiralnih derivata **8** i **11**, uvođenjem ferocena na njihov *N*-terminus sintetizirani su dinuklearni derivati Fc-CO-AA₂-AA₁-NH-Fc (**20**, AA₁ = L-Ala, AA₂ = L-Pro; **21**, AA₁ = D-Ala, AA₂ = D-Pro). Konformacijskom analizom utvrđeno je sljedeće:
- Najstabilnije konformacije derivata **20** i **21** sadrže β -okret tipa I u kojem se IHB uspostavlja između amino i karbonilnih skupina izravno vezanih na ferocenske podjedinice, dok su u energijski nepovoljnijim geometrijama pronađeni i drugi strukturni elementi (β -okret tipa II i γ -okret).
 - U blizini apsorpcijskog maksimuma ferocenskog kromofora spektar CD dipeptida **21**, pokazuje pozitivan Cottonov efekt ($\theta = 1556 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) dok je u spektru **20** registriran signal jednakog intenziteta, ali suprotnog predznaka. U usporedbi s prekursorima **8** i **11** signali u spektrima CD dinuklearnih **20** i **21** jednakog su predznaka ali slabijeg intenziteta. Uzevši u obzir nalaze DFT-modeliranja **20** i **21** koji ukazuju na prisutnost različitih strukturnih elemenata iz prethodnog se može zaključiti kako je uvođenjem dodatne ferocenske jezgre narušena konformacijska homogenost **8** i **11** (β -okret tipa I) što je rezultiralo smanjenom aktivnošću u spektrima CD rezultirajućih **20** i **21**.
 - U kristalnim strukturama **20** i **21** pronađena je intralančana NH_{F_n}...CO_{F_n}' veza koja podržava enantiomerne konformacije β -okreta tipa II. Intermolekulskim NH_{Ala}...OC_{Ala} vezama molekule **20** i **21** povezuju se u lance koji uslijed C-H...O i Fc-Fc interakcija

tvore dvosloj u čijoj se unutrašnjosti nalaze aminokiselinski ostaci dok su molekule ferocena orijentirane prema susjednom dvosloju.

4. U nastavku istraživanja opisanih u ovoj radnji pripremljeni su derivati aminoferocena i α -aminoizobutirične kiseline: Boc-(Aib)_n-NH-Fc (**22**, $n = 1$; **24**, $n = 2$; **26**, $n = 3$) i Boc-Ala-(Aib)_n-NH-Fc (**23**, $n = 1$; **25**, $n = 2$; **27**, $n = 3$) da bi se istražio utjecaj udaljenosti nositelja kiralne informacije (Ala) od akiralnog kromofora na CD-aktivnost u apsorpcijskom području ferocena.

- Konformacijskom analizom utvrđena je stabilizacija dipeptida **23** i **24** 10-članim NH_{Fc}...OC_{Boc} prstenom. U najstabilnijim konformacijama tripeptida prisutna su dva 10-člana prstena; u prvom se uspostavlja IHB između NH_{Fc} i karbonilne skupine aminokiseline na $i + 1$ položaju peptidnog slijeda [CO_{Ala} (**25**) odnosno CO_{Aib3} (**26**)] dok je drugi podržan NH_{Aib1}...OC_{Boc} vodikovom vezom. Tri uzastopna 10-člana prstena podržana NH_{Fc}...OC_{Aib3}, NH_{Aib1}...OC_{Ala} i NH_{Aib2}...OC_{Boc} vodikovim vezama stabiliziraju tetrapeptid **27**.
- U spektrima CD svih kiralnih peptida (**23**, **25** i **27**) registrirani su Cottonovi efekti koji slabe s porastom udaljenosti između začetnika svijanja peptidnog lanca (L-Ala) i ferocenskog kromofora. U najstabilnijim računalno generiranim konformacijama kut χ poprima negativnu vrijednost što je u skladu s eksperimentalno detektiranim negativnim Cottonovim efektima.

Na temelju dobivenih rezultata potvrđena je hipoteza da kiralno uređenje peptidnog slijeda uzrokuje perturbaciju inherentno akiralnog ferocenskog kromofora što rezultira CD-aktivnošću u njegovom apsorpcijskom području. U usporedbi s peptidima čije konformacije sadrže različite strukturne elemente, CD-spektre konformacijski homogenih derivata karakterizira Cottonov efekt jačeg intenziteta čime je potvrđena hipoteza kako je intenzitet Cottonova efekta određen stabilnošću lokalne konformacije. Iako je predznak CD-signalu koreliran s geometrijom molekula, nužna su daljnja istraživanja s ciljem korelacije Cottonova efekta i heličnosti čime bi se otvorila mogućnost korištenja aminoferocena kao senzora heličnosti kratkih peptidnih sekvenci.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

Kratica, oznaka i simbol	Značenje
$[\alpha]_D^{22}$	Specifično optičko skretanje
θ	Molarna eliptičnost [$\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$]
AA	Aminokiselina
Ac	Acetil
Aib	α -aminoizobutirična kiselina
Ala	Alanin
Ar	Aril
Boc	<i>tert</i> -butoksikarbonil
CD	Cirkularni dikroizam
COSY	Tehnika homonuklearne dvodimenzijske spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije
Cp	Ciklopentadienil
Cys	Cistein
d	Dublet (spektri NMR)
DFT	Teorija funkcionala gustoće (<i>engl. density functional theory</i>)
DMSO	Dimetil-sulfoksid
ECP	Skup efektivnog potencijala jezgre ("effective core potential")
EDC	1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid
Ekv.	Ekvivalent
Et ₃ N	Trietilamin
EtOAc	Etil-acetat

Kratica, oznaka i simbol	Značenje
Fc	Ferocetil
Fca	1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina
Fcd	Ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina
Fcda	Ferocen-1,1'-diamin
Glu	Glutaminska kiselina
Gly	Glicin
HATU	<i>O</i> -(7-azobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronij heksafluorofosfat
HMBC	Heteronuklearna korelacijska metoda dvodimenzijske spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije
HOAt	1-Hidroksi-7-azabenzotriazol
HOBt	1-hidroksibenzotriazol-hidrat
HRMS (MALDI):	Spektrometrija masa visoke razlučivosti. (matricom potpomognuta laserska ionizacija)
HSQC	Heteronuklearna korelacijska metoda dvodimenzijske spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije
IHB	Unutarmolekulska vodikova veza (<i>engl. Intramolecular Hydrogen Bond</i>)
<i>i</i> Pr	Izopropil
IR	Infracrvena spektroskopija
ISBOMC	Međunarodni simpozij o bioorganometalnoj kemiji (<i>engl. International Symposium on Bioorganometallic Chemistry</i>)
Leu	Leucin
m	Multiplet
Me	Metil
mw	Mikrovalno zračenje
NMR	Nuklearna magnetska rezonanca
NOE	Nuklearni Overhauserov učinak

Kratica, oznaka i simbol	Značenje
NOESY	Spektroskopija nuklearnog Overhauserovog učinka
OBn	Benzoil
OMe	Metoksi
<i>P</i>	Snaga mikrovalnog zračenja
<i>p</i> BrBz	<i>p</i> -brombenzoil
Phe	Fenil
Piv	Pivaloil
Pro	Prolin
Py	Piridin
QTAIM	Kvantna teorija atoma u molekulama (<i>engl. Quantum Theory of Atoms in Molecules</i>)
<i>R_f</i>	faktor zaostajanja u tankoslojnoj kromatografiji (<i>engl. retention factor</i>)
ROS	Reaktivne kisikove vrste (<i>engl. reactive oxygen substances</i>)
s	Singlet
SMD	Solvatacijski model (<i>engl. Solvation Model based on Density</i>)
t	Triplet (spektri NMR)
TD-DFT	Vremenski ovisna teorija funkcionala gustoće (<i>engl. Time-Dependent Density Functional Theory</i>)
TFA	Trifluorocetna kiselina
TLC	Tankoslojna kromatografija (<i>engl. Thin Layer Chromatography</i>)
<i>t_i</i>	Temperatura tališta
Tyr	Tirozin
UV/Vis	Ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija
Val	Valin

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. D. Vasudevan, K. Das Subir, *Practical Textbook of Biochemistry for Medical Students* (Jaypee Brothers, Medical Publishers Pvt. Limited, 2014).
2. J. Gante, Peptidomimetics—Tailored Enzyme Inhibitors, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **33** (1994) 1699–1720.
3. M. Kahn, Peptide Secondary Structure Mimetics: Recent Advances and Future Challenges, *Synlett* **1993** (2003) 821–826.
4. G. L. Olson, D. R. Bolin, M. P. Bonner, M. Bös, C. M. Cook, D. C. Fry, B. J. Graves, M. Hatada, D. E. Hill, M. Kahn, V. S. Madison, V. K. Rusiecki, R. Sarabu, J. Sepinwall, G. P. Vincent, M. E. Voss, Concepts and Progress in the Development of Peptide Mimetics, *J. Med. Chem.* **36** (1993) 3039–3049.
5. N. et al Livnah, Peptidomimetic Chemistry for the Discovery of Novel Drugs for Metabolic Disorders, *Bull. Isr. Chem. Soc.* **20** (2005) 32.
6. J. A. Smith, L. G. Pease, K. D. Kopple, Reverse turns in peptides and protein, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **8** (1980) 315–399.
7. T. Moriuchi, T. Hirao, Highly ordered structures of peptides by using molecular scaffolds, *Chem. Soc. Rev.* **33** (2004) 294–301.
8. S. I. Kirin, H. B. Kraatz, N. Metzler-Nolte, Systematizing structural motifs and nomenclature in 1,n'-disubstituted ferrocene peptides, *Chem. Soc. Rev.* **35** (2006) 348–354.
9. V. Kovač, M. Čakić Semencic, I. Kodrin, S. Roca, V. Rapić, Ferrocene-dipeptide conjugates derived from aminoferrocene and 1-acetyl-1'-aminoferrocene: Synthesis and conformational studies, *Tetrahedron* **69** (2013) 10497–10506.
10. R. Raja, *ORGANIC CHEMISTRY 7TH EDITION BY PAULA YURKANIS BRUCE* (2019).
11. J. M. Karty, *Organic Chemistry: Principles and Mechanisms* (W. W. Norton, 2018).
12. D. R. van Staveren, N. Metzler-Nolte, Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene, *Chem. Rev.* **104** (2004) 5931–5986.
13. H. Fu, G. R. Grimsley, A. Razvi, J. M. Scholtz, C. N. Pace, Increasing protein stability by improving Beta-turns, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **77** (2009) 491–498.
14. E. G. Hutchinson, J. M. Thornton, A revised set of potentials for β -turn formation in proteins, *Protein Sci.* **3** (1994) 2207–2216.
15. C. M. Venkatachalam, Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units, *Biopolymers* **6** (1968) 1425–1436.

16. M. Čakić Semenčić, I. Kodrin, L. Barišić, M. Nuskol, A. Meden, Synthesis and Conformational Study of Monosubstituted Aminoferrocene-Based Peptides Bearing Homo- and Heterochiral Pro-Ala Sequences, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017** (2017) 306–317.
17. V. Rapić, M. Č. Semenčić, *I. Organometalna i bioorganometalna kemija - Ferocen i metalni karbonili* (2011).
18. Z. Popović, *Osnove kemije organometalnih spojeva* (2012).
19. I. Jerić, Peptidni mimetici: zašto i kako?, *Kem. Ind.* **53** (2004) 495–504.
20. T. Moriuchi, T. Hirao, Dipeptide-induced chirality organization, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **74** (2012) 23–40.
21. A. Nomoto, T. Moriuchi, S. Yamazaki, A. Ogawa, T. Hirao, A highly ordered ferrocene system regulated by podand peptide chains, *Chem. Commun.* (1998) 1963–1964.
22. T. Moriuchi, A. Nomoto, K. Yoshida, A. Ogawa, T. Hirao, Chirality organization of ferrocenes bearing podand dipeptide chains: Synthesis and structural characterization, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 68–75.
23. T. Moriuchi, T. Nagai, T. Hirao, Chirality organization of ferrocenes bearing dipeptide chains of heterochiral sequence, *Org. Lett.* **7** (2005) 5265–5268.
24. T. Moriuchi, T. Nagai, T. Hirao, Induction of γ -turn-like structure in ferrocene bearing dipeptide chains via conformational control, *Org. Lett.* **8** (2006) 31–34.
25. T. Moriuchi, A. Nomoto, K. Yoshida, T. Hirao, Characterization of ferrocene derivatives bearing podand dipeptide chains (-L-Ala-L-Pro-OR), *J. Organomet. Chem.* **589** (1999) 50–58.
26. T. Moriuchi, A. Nomoto, K. Yoshida, T. Hirao, Intramolecular conformational control in ferrocenes bearing podand dipeptide chains, *Organometallics* **20** (2001) 1008–1013.
27. T. Moriuchi, T. Hirao, Design of ferrocene-dipeptide bioorganometallic conjugates to induce chirality-organized structures, *Acc. Chem. Res.* **43** (2010) 1040–1051.
28. B. Adhikari, A. J. Lough, B. Barker, A. Shah, C. Xiang, H. B. Kraatz, Bis-amino acid derivatives of 1,1'-ferrocenedicarboxylic acid: Structural, electrochemical, and metal ion binding studies, *Organometallics* **33** (2014) 4873–4887.
29. B. Adhikari, C. Singh, A. Shah, A. J. Lough, H. B. Raatz, Amino Acid Chirality and Ferrocene Conformation Guided Self-Assembly and Gelation of Ferrocene-Peptide Conjugates, *Chem. - A Eur. J.* **21** (2015) 11560–11572.
30. L. Barišić, M. Dropučić, V. Rapić, H. Pritzkow, S. I. Kirin, N. Metzler-Nolte, The first oligopeptide derivative of 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid shows helical chirality with antiparallel strands, *Chem. Commun.* **10** (2004) 2004–2005.
31. L. Barišić, M. Čakić, K. A. Mahmoud, Y. N. Liu, H. B. Kraatz, H. Pritzkow, S. I. Kirin, N. Metzler-Nolte, V. Rapić, Helically chiral ferrocene peptides containing 1' -aminoferrocene-1-

- carboxylic acid subunits as turn inducers, *Chem. - A Eur. J.* **12** (2006) 4965–4980.
32. L. Barišić, V. Rapić, N. Metzler-Nolte, Incorporation of the unnatural organometallic amino acid 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid (Fca) into oligopeptides by a combination of Fmoc and Boc solid-phase synthetic methods, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006** (2006) 4019–4021.
33. M. Č. Semenčić, D. Siebler, K. Heinze, V. Rapić, Bis- and trisamides derived from 1 - aminoferrocene-1-carboxylic acid and α -amino acids: Synthesis and conformational analysis, *Organometallics* **28** (2009) 2028–2037.
34. S. Mojca Čakić, K. Heinze, C. Förster, V. Rapić, Bioconjugates of 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid with (5)-3-amino-2-methylpropanoic acid and l-alanine, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010** (2010) 1089–1097.
35. J. Lapić, D. Siebler, K. Heinze, V. Rapić, Conformational analysis of heteroannularly substituted ferrocene oligoamides, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007** (2007) 2014–2024.
36. S. Chowdhury, K. A. Mahmoud, G. Schatte, H. B. Kraatz, Amino acid conjugates of 1,1'-diaminoferrocene. Synthesis and chiral organization, *Org. Biomol. Chem.* **3** (2005) 3018–3023.
37. M. Kovačević, I. Kodrin, M. Cetina, I. Kmetič, T. Murati, M. Č. Semenčić, S. Roca, L. Barišić, The conjugates of ferrocene-1,1'-diamine and amino acids. A novel synthetic approach and conformational analysis, *Dalt. Trans.* **44** (2015) 16405–16420.
38. M. Kovačević, I. Kodrin, S. Roca, K. Molčanov, Y. Shen, B. Adhikari, H. B. Kraatz, L. Barišić, Helically Chiral Peptides That Contain Ferrocene-1,1'-diamine Scaffolds as a Turn Inducer, *Chem. - A Eur. J.* **23** (2017) 10372–10395.
39. G. Jaouen, *Bioorganometallics* (2006).
40. V. Rapić, M. Kovačević, III. Organometalna i bioorganometalna kemija - ferrocenski peptidi, *Kem. u Ind. Chem. Chem. Eng.* **61** (2012) 71–120.
41. T. Moriuchi, T. Hirao, Ferrocene-peptide bioconjugates, in *Top. Organomet. Chem.*, ed. G. Simonneaux (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2006), pp. 143–175.
42. F. E. Appoh, T. C. Sutherland, H. B. Kraatz, Changes in the hydrogen bonding pattern in ferrocene peptides, *J. Organomet. Chem.* **689** (2004) 4669–4677.
43. P. Saweczko, G. D. Enright, H. B. Kraatz, Interaction of ferrocenoyl-dipeptides with 3-aminopyrazole derivatives: β -sheet models? A synthetic, spectroscopic, structural, and electrochemical study, *Inorg. Chem.* **40** (2001) 4409–4419.
44. D. R. Van Staveren, T. Weyhermüller, N. Metzler-Nolte, Organometallic β -turn mimetics. A structural and spectroscopic study of inter-strand hydrogen bonding in ferrocene and cobaltocenium conjugates of amino acids and dipeptides, *Dalt. Trans.* (2003) 210–220.
45. T. Moriuchi, K. Yoshida, T. Hirao, Structural characterization and complexation behavior of ferrocene bearing dipeptide chain (-L-Ala-L-Pro-NHPy), *J. Organomet. Chem.* **637–639** (2001)

- 75–79.
46. H. B. Kraatz, D. M. Leek, A. Houmam, G. D. Enright, J. Lusztyk, D. D. M. Wayner, The ferrocene moiety as a structural probe: Redox and structural properties of ferrocenoyl-oligoproline Fc-Pron-OBzl (n=1-4) and Fc-Pro2-Phe-OBzl, *J. Organomet. Chem.* **589** (1999) 38–49.
 47. T. Moriuchi, T. Fujiwara, T. Hirao, β -Turn-structure-assembled palladium complexes by complexation-induced self-organization of ferrocene-dipeptide conjugates, *Dalt. Trans.* (2009) 4286–4288.
 48. J. L. Jios, S. I. Kirin, N. N. Buceta, T. Weyhermüller, C. O. Della Védova, N. Metzler-Nolte, Synthesis and structural characterization of metallated bioconjugates: C-terminal labeling of amino acids with aminoferrocene, *J. Organomet. Chem.* **692** (2007) 4209–4214.
 49. I. L. Karle, P. Balaram, Structural Characteristics of α -Helical Peptide Molecules Containing Aib Residues, *Biochemistry* **29** (1990) 6747–6756.
 50. V. Moretto, M. Crisma, G. M. Bonora, C. Toniolo, P. Balaram, H. Balaram, Comparison of the Effect of Five Guest Residues on the β -Sheet Conformation of Host (l-Val)_n Oligopeptides, *Macromolecules* **22** (1989) 2939–2944.
 51. A. Donoli, V. Marcuzzo, A. Moretto, C. Toniolo, R. Cardena, A. Bisello, S. Santi, Charge mapping in 310-helical peptide chains by oxidation of the terminal ferrocenyl group, *Org. Lett.* **13** (2011) 1282–1285.
 52. A. Donoli, V. Marcuzzo, A. Moretto, M. Crisma, C. Toniolo, R. Cardena, A. Bisello, S. Santi, New bis-ferrocenyl end-capped peptides: synthesis and charge transfer properties, *Biopolymers* **100** (2013) 14–24.
 53. Y. V. Venkatachalapathi, P. Balaram, An incipient 310 helix in Piv-Pro-Pro-Ala-NHMe as a model for peptide folding [22], *Nature* **281** (1979) 83–84.
 54. R. Rai, S. Aravinda, K. Kanagarajadurai, S. Raghothama, N. Shamala, P. Balaram, Diproline templates as folding nuclei in designed peptides. Conformational analysis of synthetic peptide helices containing amino terminal Pro-Pro segments, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 7916–7928.
 55. D. S. Kemp, J. G. Boyd, C. C. Muendel, The helical s constant for alanine in water derived from template-nucleated helices, *Nature* **352** (1991) 451–454.
 56. D. S. Kemp, T. P. Curran, J. G. Boyd, T. J. Allen, Studies of N-terminal templates for α -helix formation. Synthesis and conformational analysis of peptide conjugates of (2S,5S,8S,11S)-1-acetyl-1,4-diaza-3-keto-5-carboxy-10-thiatricyclo[2.8.1.0^{4,8}]tridecane (Ac-Hel1-OH), *J. Org. Chem.* **56** (1991) 6683–6697.
 57. D. S. Kemp, T. P. Curran, W. M. Davis, J. G. Boyd, C. Muendel, Studies of N-Terminal

- Templates for α -Helix Formation. Synthesis and Conformational Analysis of (2S,5S,8S,11S)-1-Acetyl-1,4-diaza-3-keto-5-carboxy-10-thiatricyclo[2.8.1.0_{4,8}]-tridecane (Ac-Hel1OH), *J. Org. Chem.* **56** (1991) 6672–6682.
58. J. A. Robinson, The design, synthesis and conformation of some new α -hairpin mimetics: Novel reagents for drug and vaccine discovery, *Synlett* **2000** (2000) 429–441.
59. R. M. Hughes, M. L. Waters, Model systems for β -hairpins and β -sheets, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16** (2006) 514–524.
60. R. Rai, S. Raghothama, P. Balam, Design of a peptide hairpin containing a central three-residue loop, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 2675–2681.
61. L. A. Haines, K. Rajagopal, B. Ozbas, D. A. Salick, D. J. Pochan, J. P. Schneider, Light-activated hydrogel formation via the triggered folding and self-assembly of a designed peptide, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 17025–17029.
62. B. Chatterjee, I. Saha, S. Raghothama, S. Aravinda, R. Rai, N. Shamala, P. Balam, Designed peptides with homochiral and heterochiral diproline templates as conformational constraints, *Chem. - A Eur. J.* **14** (2008) 6192–6204.
63. I. Saha, B. Chatterjee, N. Shamala, P. Balam, Crystal structures of peptide enantiomers and racemates: Probing conformational diversity in heterochiral pro-pro sequences, *Biopolym. - Pept. Sci. Sect.* **90** (2008) 537–543.
64. C. Wolf, K. W. Bentley, Chirality sensing using stereodynamic probes with distinct electronic circular dichroism output, *Chem. Soc. Rev.* **42** (2013) 5408.
65. B. A. F. Le Bailly, J. Clayden, Dynamic foldamer chemistry, *Chem. Commun.* **52** (2016) 4852–4863.
66. Q. Gan, Y. Ferrand, C. Bao, B. Kauffmann, A. Grélard, H. Jiang, I. Huc, Helix-rod host-guest complexes with shuttling rates much faster than disassembly, *Science (80-.)*. **331** (2011) 1172–1175.
67. V. Azzarito, K. Long, N. S. Murphy, A. J. Wilson, Inhibition of α -helix-mediated protein-protein interactions using designed molecules, *Nat. Chem.* **5** (2013) 161–173.
68. M. M. Müller, M. A. Windsor, W. C. Pomerantz, S. H. Gellman, D. Hilvert, A Rationally Designed Aldolase Foldamer, *Angew. Chemie* **121** (2009) 940–943.
69. C. A. Smith, D. Ban, S. Pratihari, K. Giller, C. Schwiegk, B. L. De Groot, S. Becker, C. Griesinger, D. Lee, Population shuffling of protein conformations, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **54** (2015) 207–210.
70. R. A. Brown, T. Marcelli, M. Depoli, J. Solà, J. Clayden, M. De Poli, J. Solà, J. Clayden, Induction of unexpected left-handed helicity by an N-terminal L -amino acid in an otherwise achiral peptide chain, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51** (2012) 1395–1399.

-
71. M. De Poli, M. De Zotti, J. Raftery, J. A. Aguilar, G. A. Morris, J. Clayden, Left-handed helical preference in an achiral peptide chain is induced by an l-amino acid in an N-terminal type II β -turn, *J. Org. Chem.* **78** (2013) 2248–2255.
72. N. Ousaka, Y. Inai, Transfer of noncovalent chiral information along an optically inactive helical peptide chain: Allosteric control of asymmetry of the C-terminal site by external molecule that binds to the N-terminal Site, *J. Org. Chem.* **74** (2009) 1429–1439.
73. M. De Poli, W. Zawodny, O. Quinonero, M. Lorch, S. J. Webb, J. Clayden, Conformational photoswitching of a synthetic peptide foldamer bound within a phospholipid bilayer, *Science* (80-.). **352** (2016) 575–580.
74. C. Toniolo, F. Formaggio, M. Crisma, H. E. Schoemaker, J. Kamphuis, The p-bromobenzamido chromophore as a circular dichroic probe for the assignment of the screw sense of helical peptides, *Tetrahedron: Asymmetry* **5** (1994) 507–510.
75. M. De Poli, J. Clayden, Thionoglycine as a multifunctional spectroscopic reporter of screw-sense preference in helical foldamers, *Org. Biomol. Chem.* **12** (2014) 836–843.
76. J. Solà, G. A. Morris, J. Clayden, Measuring Screw-Sense Preference in a Helical Oligomer by Comparison of ^{13}C NMR Signal Separation at Slow and Fast Exchange, *J. Am. Chem. Soc.* **133** (2011) 3712–3715.
77. V. Diemer, J. Maury, B. A. F. Le Bailly, S. J. Webb, J. Clayden, Dibenzazepinyl ureas as dual NMR and CD probes of helical screw-sense preference in conformationally equilibrating dynamic foldamers, *Chem. Commun.* **53** (2017) 10768–10771.
78. S. Sethi, P. K. Das, N. Behera, The chemistry of aminoferrocene, $\text{Fe}\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{NH}_2)(\eta^5\text{-Cp})\}$: Synthesis, reactivity and applications, *J. Organomet. Chem.* **824** (2016) 140–165.
79. A. N. Nesmeyanov, E. G. Perevalova, R. V. Golovnya, L. S. Shilovtseva, OB ARILFERROTSENAKH I FERROTSENILAMINE, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **102** (1955) 535–538.
80. F. S. Arimoto, A. C. Haven, Derivatives of Dicyclopentadienyliron, *J. Am. Chem. Soc.* **77** (1955) 6295–6297.
81. A. N. Nesmeyanov, V. N. Drozd, V. A. Sazonova, Azids of ferrocene, in *Dokl. Akad. Nauk* (Russian Academy of Sciences, 1963), pp. 321–324.
82. M. Sato, S. Ebine, S. Akabori, Condensation of Halobenzenes and Haloferrocenes with Phthalimide in the Presence of Copper(I) Oxide; A Simplified Gabriel Reaction, *Synthesis (Stuttg.)* **1981** (1981) 472–473.
83. M. Herberhold, M. Ellinger, W. Kremnitz, Ferrocenylamine, *J. Organomet. Chem.* **241** (1983) 227–240.
84. G. R. Knox, P. L. Pauson, D. Willison, E. Solčániová, Š. Toma, Ferrocene Derivatives. 23. 1

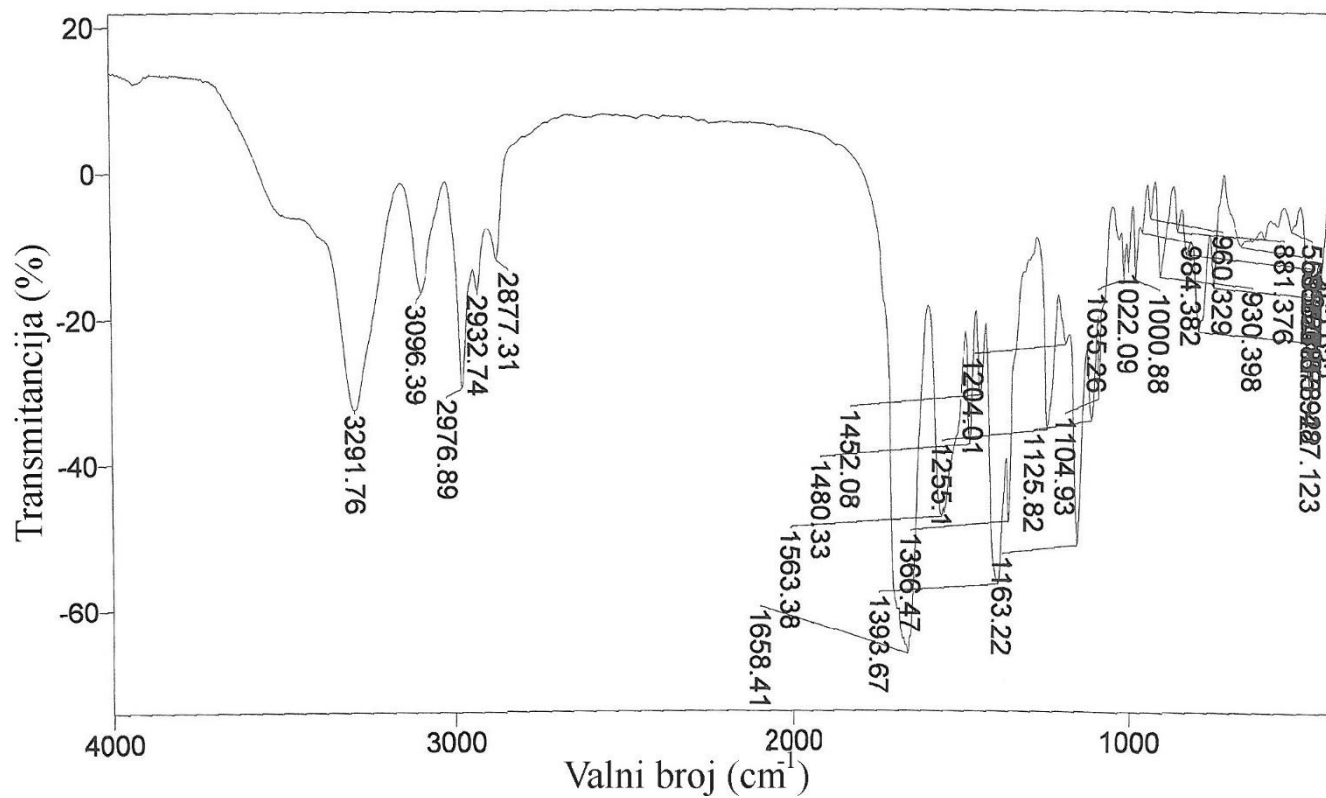
- Isocyanoferrocene and Isothiocyanatoferrocene, *Organometallics* **9** (1990) 301–306.
85. N. MONTSERRAT, A. W. PARKINS, A. R. TOMKINS, ChemInform Abstract: A Convenient Synthesis of Aminoferrocene., *ChemInform* **26** (2010) no-no.
86. D. Van Leusen, B. Hessen, 1,1'-Diisocyanoferrocene and a Convenient Synthesis of Ferrocenylamine, *Organometallics* **20** (2001) 224–226.
87. J. Melomedov, J. R. Ochsmann, M. Meister, F. Laquai, K. Heinze, Tuning Reductive and Oxidative Photoinduced Electron Transfer in Amide-Linked Anthraquinone-Porphyrin-Ferrocene Architectures, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014** (2014) 1984–2001.
88. J. Melomedov, J. R. Ochsmann, M. Meister, F. Laquai, K. Heinze, Aminoferrocene and Ferrocene Amino Acid as Electron Donors in Modular Porphyrin-Ferrocene and Porphyrin-Ferrocene-Porphyrin Conjugates, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014** (2014) 2902–2915.
89. A. Leonidova, P. Anstaett, V. Pierroz, C. Mari, B. Spingler, S. Ferrari, G. Gasser, Induction of Cytotoxicity through Photorelease of Aminoferrocene, *Inorg. Chem.* **54** (2015) 9740–9748.
90. S. Top, J. Tang, A. Vessières, D. Carrez, C. Provot, G. Jaouen, Ferrocenyl hydroxytamoxifen: A prototype for a new range of oestradiol receptor site-directed cytotoxics, *Chem. Commun.* (1996) 955–956.
91. S. Top, A. Vessières, G. Leclercq, J. Quivy, J. Tang, J. Vaissermann, M. Huché, G. Jaouen, 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-Depen, *Chem. - A Eur. J.* **9** (2003) 5223–5236.
92. H. Hagen, P. Marzenell, E. Jentzsch, F. Wenz, M. R. Veldwijk, A. Mokhir, Aminoferrocene-Based Prodrugs Activated by Reactive Oxygen Species, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 924–934.
93. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. E. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, F. O., J. B. Foresman, J. D. Fox, Gaussian 16, *Gaussian, Inc., Wallingford CT*, (2016).
94. B. Wiemer, D. D. Perrin and W. L. F. Armarego: Purification of Laboratory Chemicals. 3. Aufl., Oxford. Pergamon Press, 1988, 391 S., zahlr. Tab., \$ 37,50, ISBN 0-08-034714-2, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **17** (2007) 632–632.
95. L. A. Carpino, A. A. Abdel-Maksoud, E. M. E. Mansour, M. A. Zewail, Segment coupling to a highly hindered N-terminal, alamethicin-related α -aminoisobutyric acid (Aib) residue, *Tetrahedron Lett.* **48** (2007) 7404–7407.
96. M. Kovačević, K. Molčanov, K. Radošević, V. G. Srček, S. Roca, A. Čače, L. Barišić, Conjugates of 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid and proline: Synthesis, conformational analysis and biological evaluation, *Molecules* **19** (2014) 12852–12880.

-
97. A. P. Joseph, N. Srinivasan, A. G. De Brevern, Cis-trans peptide variations in structurally similar proteins, *Amino Acids* **43** (2012) 1369–1381.
 98. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry, 4-th Edition* (W. Ross MacDonald School Resource Services Library, 2011).
 99. T. R. Alderson, J. H. Lee, C. Charlier, J. Ying, A. Bax, Propensity for cis-Proline Formation in Unfolded Proteins, *ChemBioChem* **19** (2018) 37–42.
 100. S. K. Sarkar, P. E. Young, C. E. Sullivan, D. A. Torchia, Detection of cis and trans X-Pro peptide bonds in proteins by ¹³C NMR: Application to collagen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81** (1984) 4800–4803.
 101. K. M. Thomas, D. Naduthambi, N. J. Zondlo, Electronic control of amide cis-trans isomerism via the aromatic-prolyl interaction, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 2216–2217.
 102. C. L. Gustafson, N. C. Parsley, H. Asimgil, H. W. Lee, C. Ahlback, A. K. Michael, H. Xu, O. L. Williams, T. L. Davis, A. C. Liu, C. L. Partch, A Slow Conformational Switch in the BMAL1 Transactivation Domain Modulates Circadian Rhythms, *Mol. Cell* **66** (2017) 447-457.e7.
 103. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry* (W. H. Freeman, 2010).
 104. D. E. Dorman, F. A. Bovey, Carbon-13 Magnetic Resonance Spectroscopy. The Spectrum of Proline in Oligopeptides, *J. Org. Chem.* **38** (1973) 2379–2383.
 105. R. J. P. Williams, NMR in Molecular Biology, *FEBS Lett.* **146** (1982) 229–229.
 106. V. S. Ananthanarayanan, T. S. Cameron, Proline-containing beta-turns. IV. Crystal and solution conformations of tert.-butyloxycarbonyl-L-prolyl-D-alanine and tert.-butyloxycarbonyl-L-prolyl-D-alanyl-L-alanine., *Int. J. Pept. Protein Res.* **31** (1988) 399–411.
 107. T. P. Curran, K. A. Marques, M. V. Silva, Bis(amino acid) derivatives of 1,4-diamino-2-butyne that adopt a C₂-symmetric turn conformation, *Org. Biomol. Chem.* **3** (2005) 4134–4138.
 108. E. S. Stevens, N. Sugawara, G. M. Bonora, C. Toniolo, Conformational Analysis of Linear Peptides. 3. Temperature Dependence of NH Chemical Shifts in Chloroform, *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 7048–7050.
 109. M. Č. Semencić, L. Barišić, Ferrocene bioconjugates, *Croat. Chem. Acta* **90** (2017) 537–569.
 110. J. G. Sośnicki, P. E. Hansen, Temperature coefficient of NH chemical shifts of thioamides and amides in relation to structure, *J. Mol. Struct.* **700** (2004) 91–103.
 111. K. Wüthrich, NMR with proteins and nucleic acids, *Europhys. News* **17** (1986) 11–13.
 112. M. Crisma, M. De Zotti, A. Moretto, C. Peggion, B. Drouillat, K. Wright, F. Couty, C. Toniolo, F. Formaggio, Single and multiple peptide γ -turns: Literature survey and recent progress, *New J. Chem.* **39** (2015) 3208–3216.
 113. A. I. Jiménez, G. Ballano, C. Cativiela, First observation of two consecutive γ turns in a

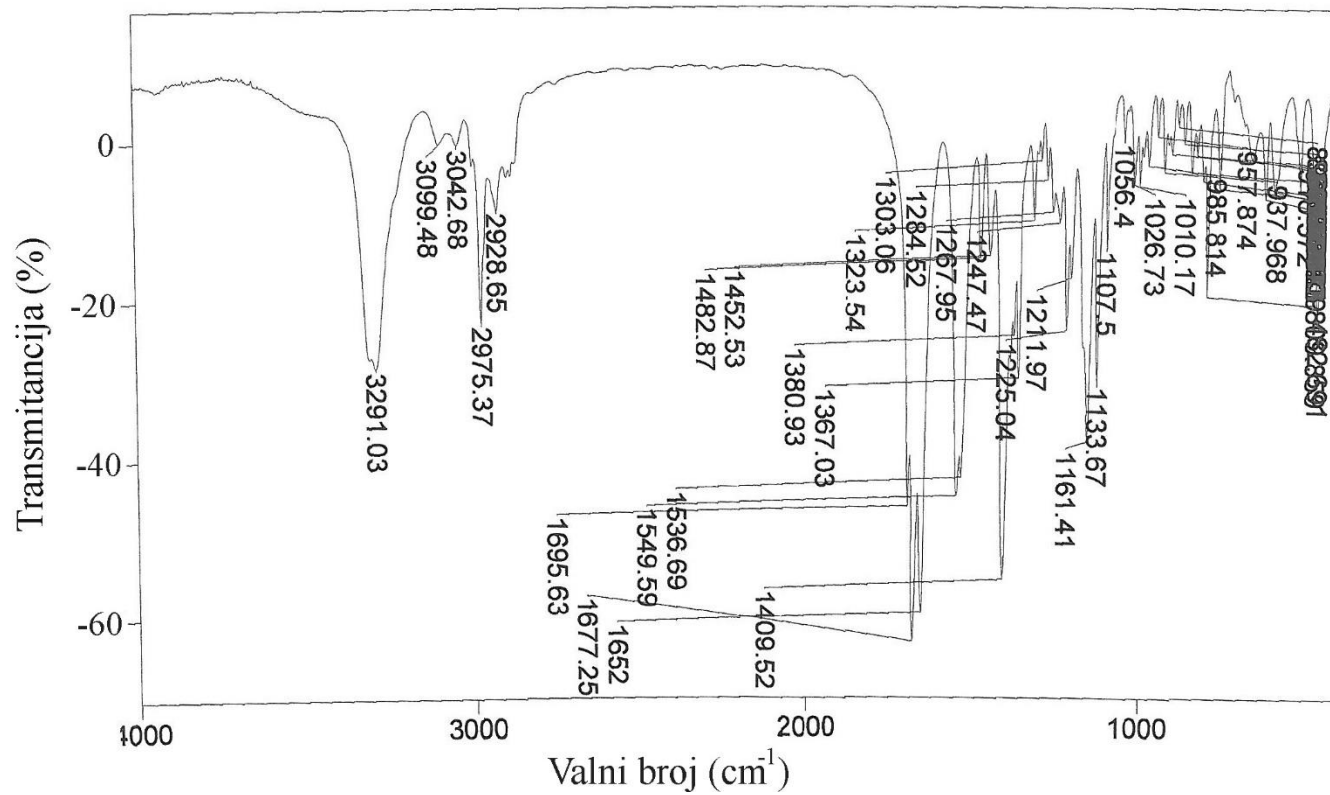
- crystalline linear dipeptide, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **44** (2005) 396–399.
114. Y. Jin, K. Tonan, S. ichi Ikawa, Competitive formation of 10- and 7-membered hydrogen-bonded rings of proline-containing model peptides, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **58** (2002) 2795–2802.
115. J. T. Pelton, L. R. McLean, Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure, *Anal. Biochem.* **277** (2000) 167–176.
116. P. Comba, *Modeling of Molecular Properties* (Wiley, 2011).
117. N. Argaman, G. Makov, Density functional theory: An introduction, *Am. J. Phys.* **68** (2000) 69–79.
118. L. Barišić, M. Kovačević, M. Mamić, I. Kodrin, Z. Mihalić, V. Rapić, Synthesis and conformational analysis of methyl N-alanyl-1'-aminoferrocene-1-carboxylate, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012** (2012) 1810–1822.
119. M. Č. Semenčić, V. Kovač, I. Kodrin, L. Barišić, V. Rapić, Synthesis and conformational study of bioconjugates derived from 1-acetyl-1'-aminoferrocene and α -amino acids, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015** (2015) 112–123.
120. Y. C. Lee, P. L. Jackson, M. J. Jablonsky, D. D. Muccio, R. R. Pfister, J. L. Haddox, C. I. Sommers, G. M. Anantharamaiah, M. Chaddha, NMR conformational analysis of cis and trans proline isomers in the neutrophil chemoattractant, N-acetyl-proline-glycine-proline, *Biopolymers* **58** (2001) 548–561.
121. B. Ishimoto, K. Tonan, S. ichi Ikawa, Coupling of intramolecular hydrogen bonding to the cis-to-trans isomerization of a proline imide bond of small model peptides, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **56** (2000) 201–209.
122. M. De Poli, L. Byrne, R. A. Brown, J. Solà, A. Castellanos, T. Boddaert, R. Wechsel, J. D. Beadle, J. Clayden, Engineering the structure of an N-terminal β -turn to maximize screw-sense preference in achiral helical peptide chains, *J. Org. Chem.* **79** (2014) 4659–4675.
123. D. K. Chalmers, G. R. Marshall, Erratum: Pro-D-NMe-amino acid and D-pro-NMe-amino acid: simple, efficient reverse-turn constraints (*J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 5927-5937), *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 1579.
124. D. Leibfritz, E. Haupt, N. Dubischar, H. Lachmann, R. Oekonomopoulos, G. Jung, Synthese von 2-methylalanin-peptiden, die pH-Abhängigkeit ihrer ¹³C-NMR-spektren und eine neue methode zur auswertung über CS-diagramme, *Tetrahedron* **38** (1982) 2165–2181.
125. T. M. Balasubramanian, N. C. E. Kendrick, M. Taylor, G. R. Marshall, J. E. Hall, I. Vodyanoy, F. Reusser, Synthesis and Characterization of the Major Component of Alamethicin, *J. Am. Chem. Soc.* **103** (1981) 6127–6132.
126. M. T. Leplawy, D. S. Jones, G. W. Kenner, R. C. Sheppard, Peptides-XI. Synthesis of peptides

- derived from alpha-methylalanine, *Tetrahedron* **11** (1960) 39–51.
127. D. S. Jones, G. W. Kenner, J. Preston, R. C. Sheppard, 1160. Peptides. Part XVII. Synthesis of peptides and polymers of some sterically hindered amino-acids via oxazolone intermediates, *J. Chem. Soc.* (1965) 6227–6239.
128. J. W. L. III, Amide bond formation using amino acid fluorides, *Arkivoc* **2005** (2005) 87–95.
129. J. M. Humphrey, A. R. Chamberlin, Chemical synthesis of natural product peptides: Coupling methods for the incorporation of noncoded amino acids into peptides, *Chem. Rev.* **97** (1997) 2243–2266.
130. B. Bacsa, K. Horváti, S. Bősze, F. Andreae, C. O. Kappe, Solid-phase synthesis of difficult peptide sequences at elevated temperatures: A critical comparison of microwave and conventional heating technologies, *J. Org. Chem.* **73** (2008) 7532–7542.
131. V. Santagada, F. Fiorino, E. Perissutti, B. Severino, V. De Filippis, B. Vivenzio, G. Caliendo, Microwave-enhanced solution coupling of the α,α -dialkyl amino acid, *Aib, Tetrahedron Lett.* **42** (2001) 5171–5173.
132. D. S. MacMillan, J. Murray, H. F. Sneddon, C. Jamieson, A. J. B. Watson, Evaluation of alternative solvents in common amide coupling reactions: Replacement of dichloromethane and N,N-dimethylformamide, *Green Chem.* **15** (2013) 596–600.
133. M. Hagel, D. Niu, T. St Martin, M. P. Sheets, L. Qiao, H. Bernard, R. M. Karp, Z. Zhu, M. T. Labenski, P. Chaturvedi, M. Nacht, W. F. Westlin, R. C. Petter, J. Singh, Selective irreversible inhibition of a protease by targeting a noncatalytic cysteine, *Nat. Chem. Biol.* **7** (2011) 22–24.

§ 8. DODATAK



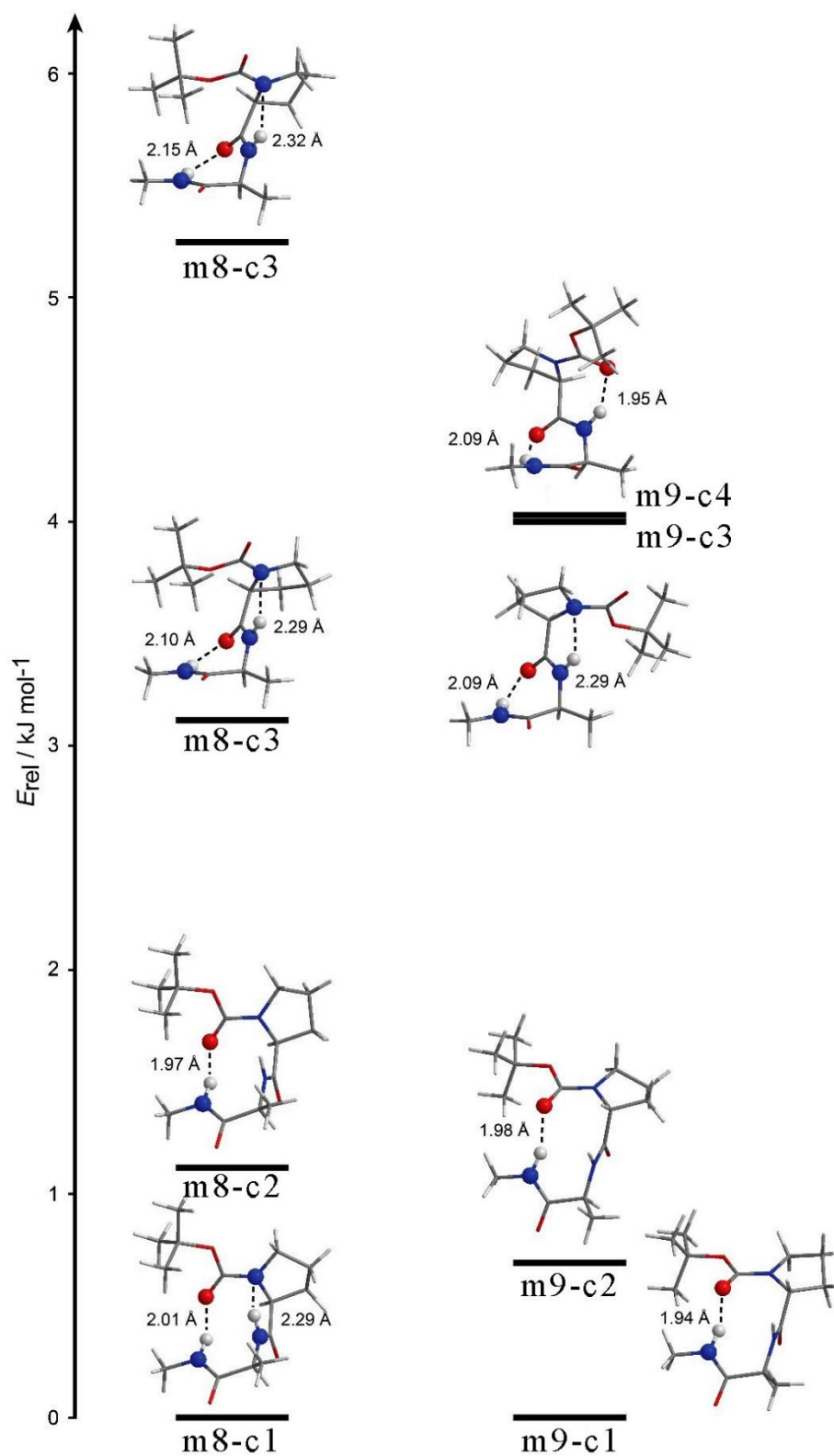
Slika D1. IR–spektar derivata 8 u KBr



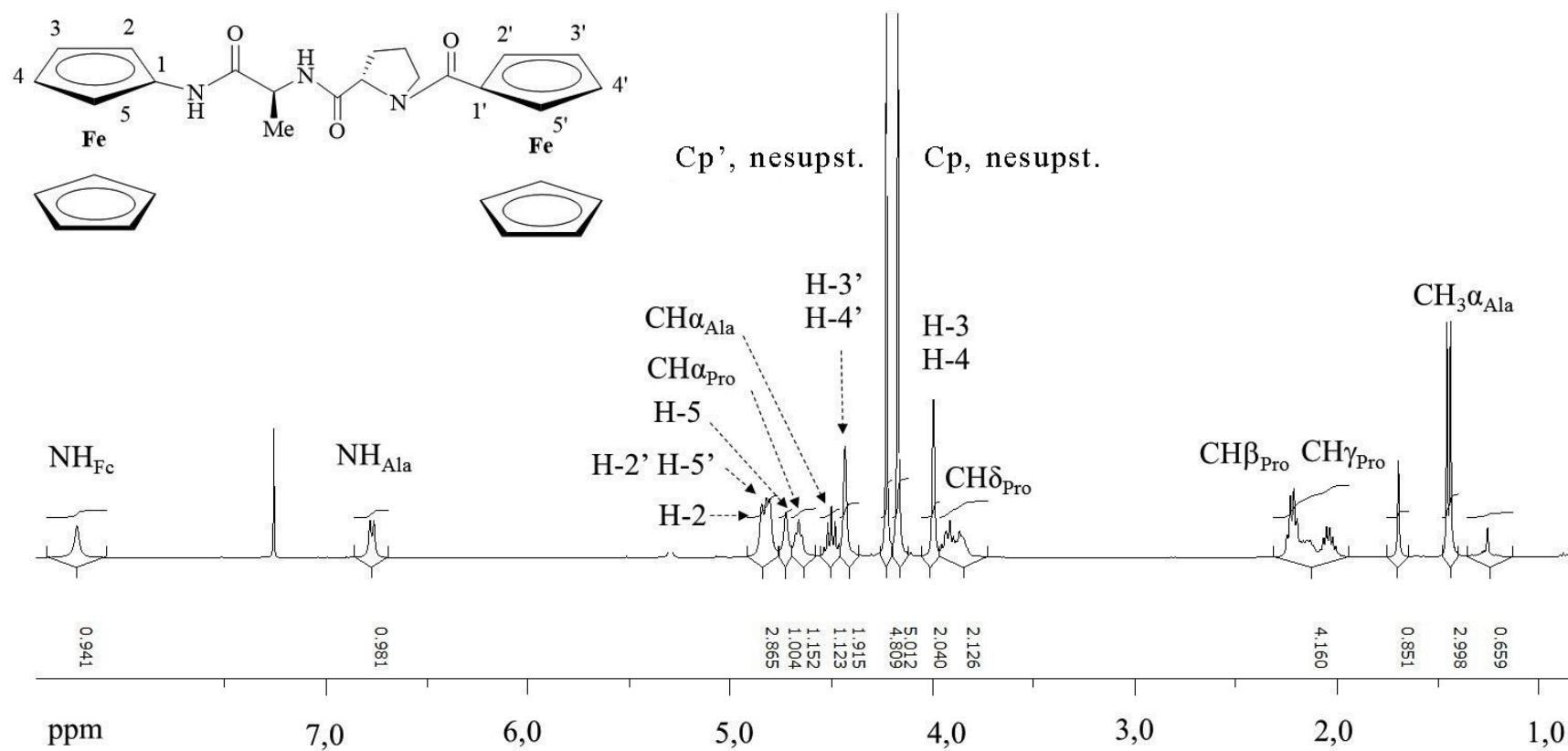
Slika D2. IR–spektar derivata 9 u KBr

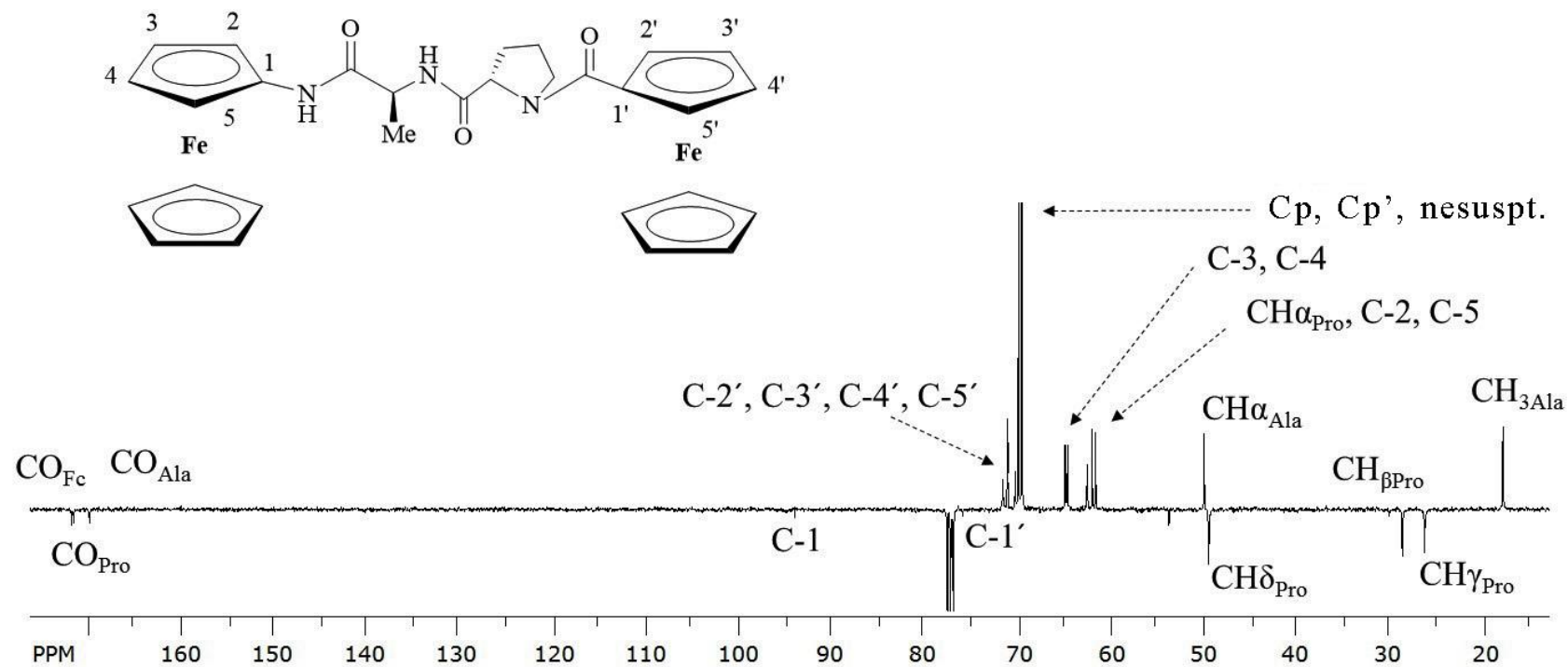
Tablica D1. Relativne energije najstabilnijih konformera modelnih derivata **m8** i **m9** u kloroformu pri temperaturi od 298 K (populacije > 5% prema Boltzmannovoj raspodjeli konformera), konformacija pirolidinskog prstena prolina, duljine [Å] vodikovih veza

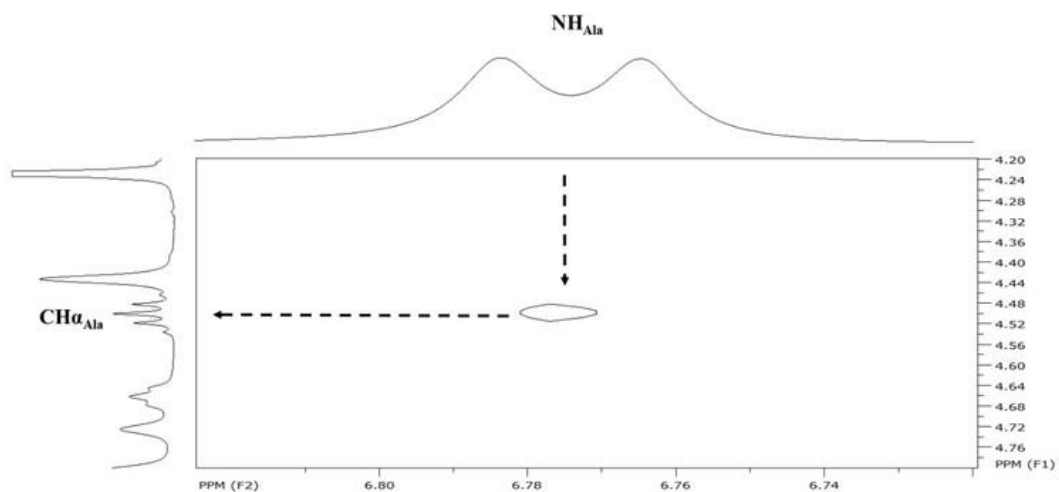
	ΔE / kJ mol ⁻¹	konformacija pirolidinskog prstena	NH _{Me} ···O=C _{Boc} 10-člani	NH _{Ala} ···N _{Pro} 5-člani	NH _{Me} ···O=C _{Pro} 7-člani	NH _{Ala} ···O=C _{Boc} 7-člani
m8-c1	0,00	<i>endo</i>	2,99	2,76	–	–
m8-c2	1,12	<i>egzo</i>	2,99	–	–	–
m8-c3	3,12	<i>endo</i>	–	2,76	2,97	–
m8-c4	5,25	<i>egzo</i>	–	2,78	3,02	–
m9-c1	0,00	<i>egzo</i>	2,91	–	–	–
m9-c2	0,69	<i>endo</i>	2,95	–	–	–
m9-c3	4,00	<i>endo</i>	–	2,76	2,97	–
m9-c4	4,02	<i>endo</i>	–	–	2,97	2,87



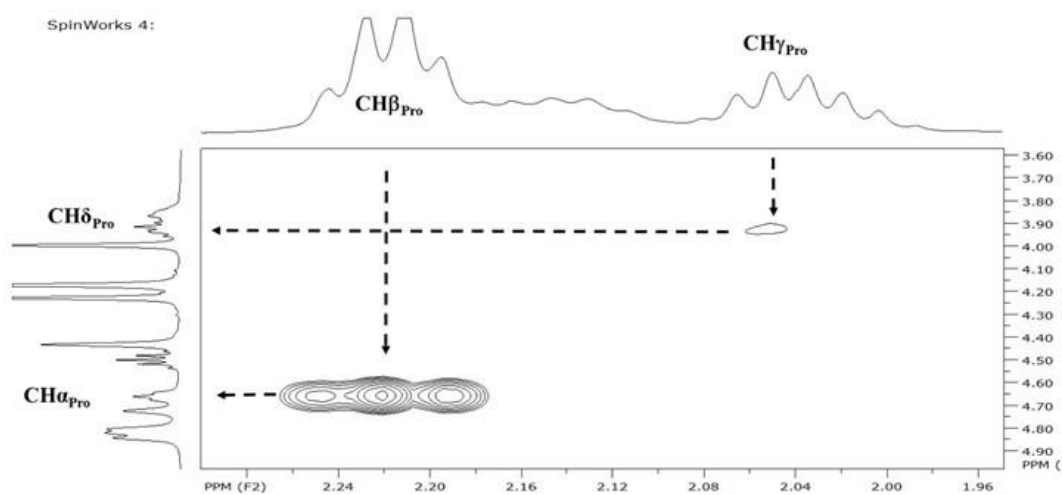
Slika D3. Najstabilniji konformeri modelnih derivata **m8** i **m9**

Slika D4. Spektar ¹H-NMR derivata 20

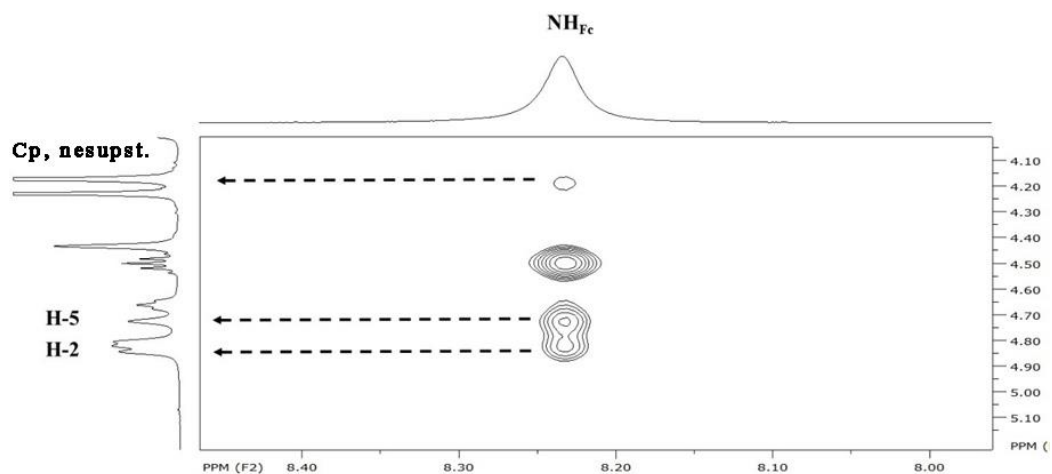
Slika D5. Spektar ^{13}C -NMR derivata 20



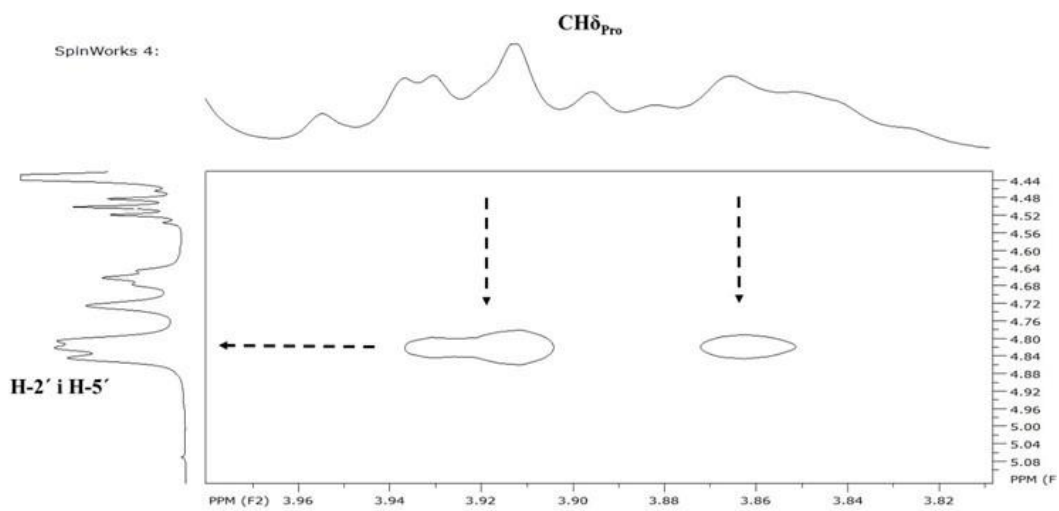
Slika D6. Dio COSY spektra derivata 20



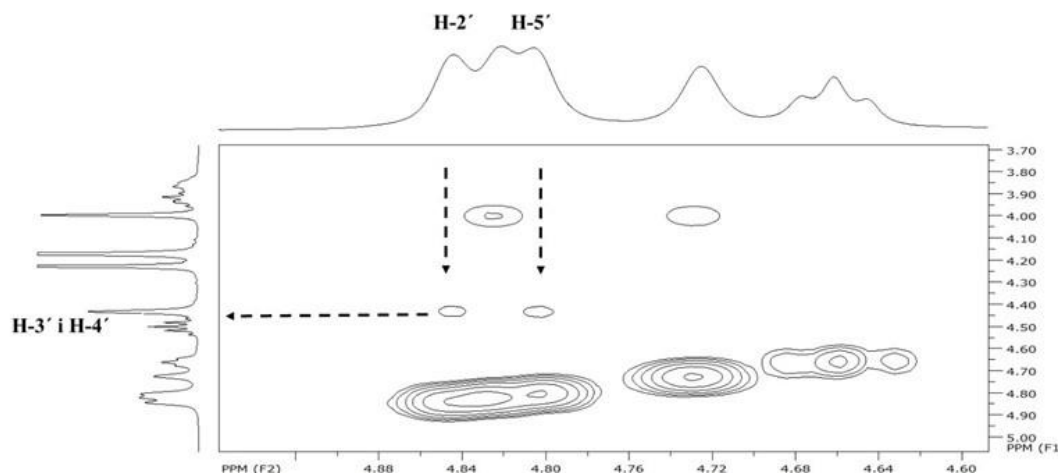
Slika D7. Dio COSY spektra derivata 20



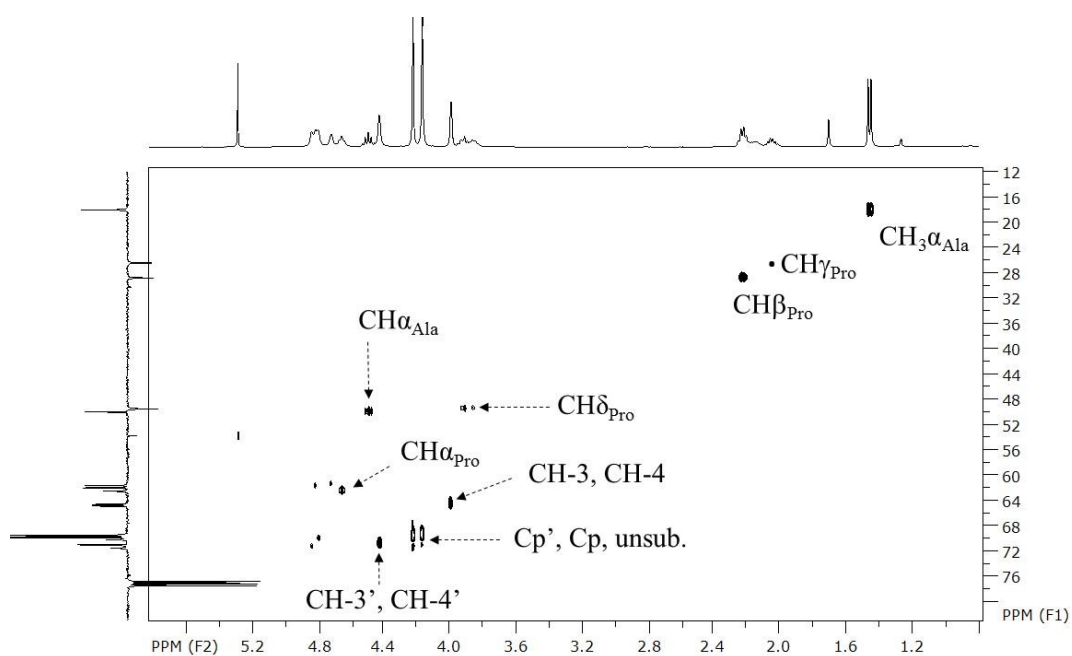
Slika D8. Dio NOESY spektra derivata 20



Slika D9. Dio NOESY spektra derivata 20



Slika D10. Dio COSY spektra derivata 20



Slika D11. Dio HSQC spektra derivata 20

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime: Marko Nuskol
Datum i mjesto rođenja: 09. Prosinca 1987. godine, Zagreb, Hrvatska
Adresa : Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju
Zavod za kemiju I biokemiju
Prehrambeno–biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska
e–mail: mnuskol@pbf.unizg.hr
mnuskol@pbf.hr

Obrazovanje

2014.–danas Poslijediplomski doktorski studij prirodnih znanosti,
Prirodoslovno–matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
polje kemija, smjer Anorganska i strukturna kemija
2012. Naslov diplomskog rada: “Vilemit dopiran ionima prijelaznih
metala” Mentor: prof. dr. sc. Stanislav Kurajica
2007.–2012. Magistar inženjer ekoinženjerstva (mag. ing. oecoing.)
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu
2003.–2007. Gornjogradska opća gimnazija, Zagreb

Radno iskustvo

- 2015.–danās Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju, Zavod za kemiju i biokemiju, Prehrambeno–biotehnoški fakultet, asistent
- 2013.–2015. Suradnik na UKF projektu (0352UKF1), “Multifunctional complex metal tellurates: Structure–property relationship study”, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:

1. **Nuskol, M.**; Studen, B.; Meden, A.; Kodrin, I.; Čakić Semenčić, M. Tight Turn in Dipeptide Bridged Ferrocenes: Synthesis, X–Ray Structural, Theoretical and Spectroscopic Studies. *Polyhedron* **2019**, *161*, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2019.01.007>.
2. Bakić, M. T.; **Nuskol, M.**; Mikac, L. Structural and Spectroscopic Properties of 2–Bromoacetylnaphthalene: Experimental and Computational (DFT) Analysis. *ChemistrySelect* **2018**, *3* (16), 4185–4199. <https://doi.org/10.1002/slct.201800282>.
3. Čakić Semenčić, M.; Kodrin, I.; Barišić, L.; **Nuskol, M.**; Meden, A. Synthesis and Conformational Study of Monosubstituted Aminoferrocene–Based Peptides Bearing Homo– and Heterochiral Pro–Ala Sequences. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017* (2), 306–317. <https://doi.org/10.1002/ejic.201600648>.
4. Djerdj, I.; Popović, J.; Mal, S.; Weller, T.; **Nuskol, M.**; Jagličić, Z.; Skoko, Ž.; Pajić, D.; Suchomski, C.; Voepel, P.; et al. Aqueous Sol–Gel Route toward Selected Quaternary Metal Oxides with Single and Double Perovskite–Type Structure Containing Tellurium. *Cryst. Growth Des.* **2016**, *16* (5), 2535–2541. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b01558>.
5. Hu, D.; Han, B.; Deng, S.; Feng, Z.; Wang, Y. Y.; Popovic, J.; **Nuskol, M.**; Wang, Y. Y.; Djerdj, I. Novel Mixed Phase SnO₂ Nanorods Assembled with SnO₂ Nanocrystals for Enhancing Gas–Sensing Performance toward Isopropanol Gas. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (18), 9832–9840. <https://doi.org/10.1021/jp501550w>.

Sažeci u zbornicima skupova:

1. Čakić Semenčić, M.; Nuskol, M.; Kodrin, I. Ferrocene Chromophore as a Circular Dichroism Probe for Conformational Analysis of Short Peptides. *3rd Int. Congr. Chem. Chem. Eng. Bosnia Herzegovina* **2018**, 107.
2. Nuskol, M.; Kodrin, I.; Studen, B.; Semenčić, M. Č. Conformational and Chiroptical Properties of Bis-Ferrocene Peptides. In *12. susret mladih kemijskih inženjera*; 2018; pp 176–176.
3. Nuskol, M.; Kodrin, I.; Đaković, M.; Šupljika, F.; Čakić Semenčić, M. Minimal Helix in the Ferrocene Peptide. *Solid-State Sci. Res.* **2017**.
4. Nuskol, M.; Bijelić, M.; Mal, S.; Popović, J.; Skoko, Ž.; Đerđ, I. Sol Gel Synthesis of Perovskite Quaternary Tellurium-Containing Metal Oxides. In *29th European Crystallographic Meeting: abstracts; u: Acta Crystallographica Section A*; 2015; p S335.
5. Mal, S.; Popović, J.; Nuskol, M.; Skoko, Ž.; Bijelić, M.; Duković, G.; Djerdj, I. Synthesis and Structural Chemistry of Cation Ordered Double Perovskite Ba₃Fe₂TeO₉ and Sr₃Fe₂TeO₉ via Novel Sol-Gel Route . In *Acta Crystallographica Section A Foundations and Advances*; 2015; Vol. 71, pp s337–s337. <https://doi.org/10.1107/s2053273315094954>.
6. Djerdj, I.; Kozlevcar, B.; Kitanovski, N.; Rocquefelte, X.; Popovic, J.; Nuskol, M.; Moliterni, A. G.; Altomare, A. Crystal Structures Of Several Inorganic–Organic Hybrids Solved From Powder XRD. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Adv.* **2014**, 70 (a1), C1123–C1123. <https://doi.org/10.1107/s2053273314088767>.