Ferocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima

Kovačević, Monika

Doctoral thesis / Disertacija

2014

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:816836

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Monika Kovačević

FERROCENE BIOCONJUGATES WITH AMINO ACIDS AND CARBOHYDRATES

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Monika Kovačević

FEROCENSKI BIOKONJUGATI S AMINOKISELINAMA I UGLJIKOHIDRATIMA

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Izv. prof. dr. sc. Lidija Barišić

Zagreb, 2014



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Monika Kovačević

FERROCENE BIOCONJUGATES WITH AMINO ACIDS AND CARBOHYDRATES

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr. Lidija Barišić, Associate Professor

Zagreb, 2014

Zahvaljujem voditeljima doktorske disertacije izv. prof. dr. sc. Lidiji Barišić i red. prof. u mirovini dr. sc. Vladimiru Rapiću, na prijedlogu istraživanja, te korisnim savjetima i pomoći tijekom izrade te radnje.

V. Rapić bio je voditeljem dijela disertacije vezanog za konjugate ferocenâ s ugljikohidratima do njegova umirovljenja 2011., dok je ostatak disertacije vezan za konjugate ferocenâ s aminokiselinama izrađen pod voditeljstvom L. Barišić. Odlukom Vijeća Kemijskog odsjeka PMF-a održanoj 2. svibnja 2012. V. Rapić imenovan je mentorom-izvjestiteljem, a L. Barišić mentoricom, te je pod njezinim nadzorom rad završen, oblikovan i napisan.

Hvala dragim kolegicama iz Laboratorija za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta na pomoći u radu, a posebice doc. dr. sc. Veroniki Kovač i dr. sc. Mojci Čakić Semenčić na poticajnoj radnoj atmosferi i podršci tijekom izrade doktorskog rada.

Zahvaljujem KAAD-u i NZZ-u na dodijeljenim stipendijama za stručno usavršavanje na Sveučilištu Johannes Gutenberg u Mainzu pod nadzorom prof. dr. Katje Heinze, kojoj najtoplije zahvaljujem na trudu uloženu za obogaćivanje mojih znanstvenih saznanja.

Petri i Jasmini hvala na tehničkoj pomoći i susretljivosti prilikom rada u laboratoriju.

Dr. sc. Ivanki Jerić, v. zn. sur. hvala na praktičnim savjetima i nesebičnoj pomoći tijekom izrade ove diseratcije.

Hvala doc. dr. sc. Rosani Ribić i dr. sc. Ivanu Kodrinu te članovima Zavoda za organsku kemiju PMF-a na ugodnoj suradnji i svim pruženim savjetima.

Dragoj Sunčici Roca, prof. beskrajno hvala na snimljenim spektrima i produktivnim raspravama.

Dr. sc. Krešimiru Molčanovu i izv. prof. dr.sc. Mariu Cetini hvala na kristalografskoj analizi spojeva te ugodnoj suradnji.

Posebnu zahvalnost dugujem kumi, dr. sc. Klari Kraljić na nesebičnoj podršci i savjetima kako tijekom izrade doktorskog rada tako i u životu.

Najveća hvala mojoj obitelji: Petru i Marku, roditeljima i braći na ljubavi, strpljivosti i bezuvjetnoj podršci.

Monika Kovačević

Mami i tati, sa zahvalnošću

Petru i Marku, s ljubavlju

Sadržaj

ZAHVALA **I**
SADRŽAJ **XI**
SAŽETAK **XIX**
ABSTRACT **XXI**

1. UVODNI DIO **1**
1.1. UVOD 2
1.2. CILJ RADA 2

2. LITERATURNI PREGLED **5**
2.1. BIOORGANOMETALNA KEMIJA 6
2.2. PEPTIDOMIMETICI 7
2.3. FEROCENSKI KONJUGATI S AMINOKISELINAMA 10
2.3.1. Bioorganometalni konjugati Fn-[CO-(AA)$_m$-OMe]$_2$ (**I**) izvedeni iz Fcd (**VIII**) 14
2.3.2. Bioorganometalni konjugati Y-(AA)$_n$-Fca-(AA)$_m$-OMe (**II**) izvedeni iz Fca (**IX**) 22
2.3.3. Bioorganometalni konjugati Fn-[NH-(AA)$_m$-Y]$_2$ (**III**) izvedeni iz Fcda (**X**) 26
2.4. FEROCENSKI KONJUGATI S UGLJIKOHIDRATIMA 30
2.4.1. Struktura i svojstva *N*-acetil-muramil-L-alanil-D-izoglutamina [Mur*N*Ac-L-Ala-D-iGln, muramildipeptid (MDP)] 38
2.4.1.1. Analozi i derivati MDP i njihova biološka aktivnost 41
2.4.1.2. Konjugati MDP 46
2.4.1.3. Klinička ispitivanja derivata i analoga MDP 49
2.4.2. Manozni ligandi kao inhibitori hemaglutinacije *Escherichie coli* 50
2.4.2.1. Lektini 50
2.4.2.2. Priprava ferocenskih alkohola 56

2.4.2.3. Biološka aktivnost ferocenskih alkohola 58
2.4.2.4. Priprava ferocenskih amina 59
3. EKSPERIMENTALNI DIO 62
3.1. MATERIJALI I METODE 63
3.2. FEROCENSKI KONJUGATI S AMINOKISELINAMA 65
3.2.1. Priprava dipeptida **1**-**6** 65
3.2.2. Priprava tripeptida **7**-**14** 66
3.2.3. Priprava tripeptida **21**-**22** i tetrapeptida **23**-**26** 67
3.2.4. Priprava analoga "Kraatzovih" peptida **31** i **32** 68
3.2.5. Opći postupak priprave Boc-di- (**1**-**3**, **31**), tri- (**7**, **8**, **11**, **12**, **21**, **22**) i tetrapeptida (**23**, **24**) 69
3.2.6. Opći postupak priprave Ac-dipeptidâ **4**, **5**, **6**, **9**, **10**, **13**, **14**, **25**, **26** i **32** 78
3.2.7. Opći postupak priprave Ac-AA-AA-NH-Fn-COOH (**15**, **16**, **27**) 86
3.2.8. Opći postupak priprave Ac-AA-AA-NH-Fn-CON_3 (**17**, **18**, **28**) 87
3.2.9. Opći postupak priprave Ac-AA-AA-NH-Fn-NHBoc (**19**, **20**, **30**) 89
3.2.10. PripravaAc-Ala-NH-Fn-NHAc (**29**) 91
3.3. FEROCENSKI KONJUGATI S UGLJIKOHIDRATIMA 92
3.3.1. Sinteza *O*-zaštićenih prekursora *N*-Ac-Mur-OH (**40**) i *N*-Ac-izoMur-OH (**41**) 92
3.3.1.1. Benzil-2-acetamido-2-deoksi-α-D-glukopiranozid (**34**) 92
3.3.1.2. Benzil-2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-α-D-glukopiranozid (**35**) 93
3.3.1.3. Benzil-2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-*O*-[(*R*,*S*)-(metoksikarbonil)etil]-α-D-glukopiranozid (**38**/**39**) 94
3.3.1.4. Benzil-2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-*O*-[(*R*,*S*)-1-karboksietil]-α-D-glukopiranozid (**40**/**41**) 96
3.3.2. Sinteza *O*-zaštićenog prekursora *N*-Boc-Mur-OMe Benzil-4,6-*O*-benziliden-2-*tert*-butoksikarbonilamino-2-deoksi-3-*O*-[(*R*)-1-(metoksikarbonil)etil]-α-D-glukopiranozid (**43**) 96
3.3.3. Sinteza ferocenskih muropeptida **44**-**48** 98

3.3.3.1. Benzil-2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-*O*-[(*R*)-1-(ferocenilkarbamoil)etil]-*α*-D-glukopiranozid (**44**) 99
3.3.3.2. Benzil-2-acetamido 4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-*O*-[(*S*)-1-(ferocenilkarbamoil)etil]-*α*-D-glukopiranozid (**45**) 100
3.3.3.3. Benzil-2-acetamido 4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-*O*-{(*R*)-1-[1'-(metoksikarbonil)ferocenilkarbamoil]etil}-*α*-D-glukopiranozid (**46**) 100
3.3.3.4. Benzil-2-acetamido 4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-*O*-{(*S*)-1-[1'-(metoksikarbonil)ferocenilkarbamoil]etil}-*α*-D-glukopiranozid (**47**) 101
3.3.3.5. Benzil-2-acetamido 4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-*O*-{(*R*)-1-[1'-(acetamido)ferocenilkarbamoil]etil}-*α*-D-glukopiranozid (**48**) 102
3.3.4. Sinteza *O*-zaštićenih (**49**, **50**) i deprotektiranih (**51**, **52**) ferocenskih analoga muramildipeptida 103
3.3.4.1.Opći postupak priprave *O*-zaštićenih ferocenskih analoga MDP **49** i **50** 104
3.3.4.1.1. *O*-zaštićeni *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (**49**) 104
3.3.4.1.2. *O*-zaštićen *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (**50**) 105
3.3.4.2.Katalitičko hidrogeniranje *O*-zaštićenih *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe(**49**) i *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (**50**) 105
3.3.4.2.1. *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (**51**) 106
3.3.4.2.2. *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (**52**) 106
3.3.5. Priprava esterskih i amidnih konjugata ferocena i manoze 107
3.3.5.1.Priprava ferocenskih alkohola **54** i **59** 107
3.3.5.1.1. Metil-1'-klorokarbonilferocen-1-karboksilat (**53**) 107
3.3.5.1.2. Metil-1'-(hidroksimetil)ferocen-1-karboksilat (**54**) 107
3.3.5.1.3. Metil-1'-(benziloksimetil)ferocen-1-karboksilat (**55**) 108
3.3.5.1.4. 1'-(Benziloksimetil)ferocen-1-karboksilna kiselina (**56**) 108
3.3.5.1.5. 1'-Benziloksiferocen-1-karboksazid (**57**) 109
3.3.5.1.6. *tert*-Butil-1'-(benziloksimetil)ferocenilkarbamat (**58**) 109
3.3.5.1.7. *tert*-Butil-1'-(hidroksimetil)ferocenilkarbamat (**59**) 110

3.3.5.2. Opći postupak priprave esterskih konjugata ferocena i manoze- (**62, 64**, i **66**) 111
3.3.5.2.1. *(R)*-(1'-Metoksikarbonilferocenilmetil)-2-metil-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*α*-D-manopiranoziloksi)propanoat (**61**) 112
3.3.5.2.2. *(R)*-1'-(*tert*-Butoksikarbonilamino)ferocenilmetil-2-metil-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*α*-D-manopiranoziloksi) propanoat (**63**) 112
3.3.5.2.3. *(R)*-2-Feroceniletil-2-metil-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*α*-D-manopiranoziloksi)propanoat (**65**) 113
3.3.5.3. Debenziliranje *O*-zaštićenih esterskih derivata **61**, **63** i **65** 113
3.3.5.3.1. *(R)*-(1'-Metoksikarbonilferocenilmetil)-2-metil-3-*(α*-D-manopiranoziloksi)propanoat (**62**) 113
3.3.5.3.2. (*R*)-1'-*tert*-Butoksikarbonilaminoferocenilmetil-2-metil-3-(*α*-D-manopiranoziloksi)propanoat (**64**) 114
3.3.5.3.3. *(R)*-Feroceniletil-2-metil-3-(*α*-D-manopiranoziloksi) propanoat (**66**) 114
3.3.5.4. Opći postupak priprave amidnih konjugata ferocena i manoze - **68α**, **68β**, **70α**, **70β**, **72α** i **72β** 116
3.3.5.4.1. *(R)*-*N*-Ferocenil-2-metil-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*α*-D-manopiranoziloksi)propanamid (**67α**) 117
3.3.5.4.2. *(R)*-*N*-Ferocenil-2-metil-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*β* -D-manopiranoziloksi)propanamid (**67β**) 117
3.3.5.4.3. *(R)*-*N*-(1'-Metoksikarbonilferocenil)-2-metil-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*α*-D-manopiranoziloksi)propanamid (**69α**) 118
3.3.5.4.4. *(R)*-*N*-(1'-Metoksikarbonilferocenil)-2-metil-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*β*-D-manopiranoziloksi)propanamid (**69β**) 118
3.3.5.4.5. *(R)*-*N*-Ferocenilmetil-2-metil-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*α*-D-manopiranoziloksi)propanamid (**71α**) 119
3.3.5.4.6. *(R)*-*N*-Ferocenilmetil-2-metil-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*β*–D-manopiranoziloksi)propanamid (**71β**) 119
3.3.5.5. Debenziliranje *O*-zaštićenih amidnih derivata **67**, **69** i **71** 120

3.3.5.5.1. *(R)*-*N*-Ferocenil-2-metil-3-(*α*-D-manopiranoziloksi) propanamid (**68α**) 120
3.3.5.5.2. *(R)*-*N*-Ferocenil-2-metil-3-(*β*-D-manopiranoziloksi) propanamid (**68β**) 120
3.3.5.5.3. *(R)*-*N*-1'-Metoksikarbonilferocenil-2-metil-3-(*α*-D-manopiranoziloksi)propanamid (**70α**) 121
3.3.5.5.4. *(R)*-*N*-1'-Metoksikarbonilferocenil-2-metil-3-(*β*-D-manopiranoziloksi)propanamid (**70β**) 121
3.3.5.5.5. *(R)*-*N*-Ferocenilmetil-2-metil-3-(*α*-D-manopiranoziloksi)propanamid (**72α**) 122
3.3.5.5.6. *(R)*-*N*-Ferocenilmetil-2-metil-3-(*β*–D-manopiranoziloksi)propanamid (**72β**) 122

4. REZULTATI I RASPRAVA 123
4.1. UVOD 124
4.2. *CIS-TRANS*-IZOMERIZACIJA PROLINSKE IMIDNE VEZE 126
4.3. SINTEZA I KONFORMACIJSKA ANALIZA BIOKONJUGATA Fn-[NH-(AA)$_m$-Y]$_2$ (**III**) 129
4.3.1. Sinteza i konformacijska analiza dipeptidâ Boc-L-Pro-Fca-OMe (**1**) i Boc-L-Ala-Fca-OMe (**2**) 132
4.3.1.1. Sinteza dipeptidâ Boc-L-Pro-Fca-OMe (**1**) i Boc-L-Ala-Fca-OMe (**2**) 132
4.3.1.2. Kristalografska analiza Boc-L-Pro-Fca-OMe (**1**) 133
4.3.1.3. IR- spektroskopska analiza dipeptidâ **1** i **2** 134
4.3.1.4. NMR-spektroskopska analiza dipeptidâ **1** i **2** 136
4.3.1.5. CD-spektroskopska analiza dipeptidâ **1** i **2** 142
4.3.2. Sinteza i konformacijska analiza tripeptidâ: Boc-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe (**7**), Boc-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe (**8**), Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe (**9**), Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe (**10**), Boc-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe (**11**), Boc-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe (**12**), Ac-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe (**13**) i Ac-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe (**14**) 144
4.3.2.1. Sinteza tripeptidâ **7**-**14** 144

4.3.2.2. IR- spektroskopska analiza tripeptidâ **7**-**14** 146
4.3.2.3. NMR-spektroskopska analiza tripeptidâ **7**-**14** 148
4.3.2.4. CD-spektroskopska analiza tripeptidâ **7**-**14** 160
4.3.3. Sinteza i konformacijska analiza homo-Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc (**21**) i heterokiralnog tripeptidâ Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc (**22**) 162
4.3.3.1. Sinteza Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc (**21**) i Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc (**22**) 162
4.3.3.2. Kristalografska analiza tripeptidâ Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc (**21**) 162
4.3.3.3. DFT-modeliranje tripeptidâ **21 i 22** 163
4.3.3.4. IR-spektroskopska analiza tripeptidâ **21 i 22** 165
4.3.3.5. NMR-spektroskopska analiza tripeptidâ **21 i 22** 166
4.3.3.6. CD-spektroskopska analiza tripeptidâ **21 i 22** 171
4.3.4. Sinteza i konformacijska analiza tetrapeptidâ: Ac-L-Ala-L-Pro-*NH*-Fn-*NH*-L-Pro-L-Ala-Boc (**23**), Ac-D-Ala-L-Pro-*NH*-Fn-*NH*-L-Pro-D-Ala-Boc (**24**), Ac-L-Ala-L-Pro-*NH*-Fn-*NH*-L-Pro-L-Ala-Ac (**25**), Ac-D-Ala-L-Pro-*NH*-Fn-*NH*-L-Pro-D-Ala-Ac (**26**) 172
4.3.4.1. Sinteza tetrapeptidâ **23**-**26** 172
4.3.4.2. DFT modeliranje tetrapeptida **23**-**24** 173
4.3.4.3. IR-spektroskopska analiza tetrapeptida **23**-**26** 174
4.3.4.4. NMR-spektroskopska analiza tetrapeptida **23**-**26** 176
4.3.4.5. CD-spektroskopska analiza tetrapeptida **23**-**26** 183
4.3.5. Sinteza i konformacijska analiza Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Ala-Boc (**31**) i Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Ala-Ac (**32**) 185
4.3.5.1. Sinteza Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Ala-Boc (**31**) i Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Ala-Ac (**32**) 185
4.3.5.2. Kristalografska analiza Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Ala-Boc (**31**) 186
4.3.5.3. DFT-modeliranje dipeptidâ **31** i **32** 187
4.3.5.4. IR-spektroskopska analiza dipeptidâ **31** i **32** 187
4.3.5.5. NMR-spektroskopska analiza dipeptidâ **31** i **32** 188

4.3.5.6. CD-spektroskopska analiza dipeptidâ **31** i **32** 192
4.4. PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA ANALIZA *O*-ZAŠTIĆENIH *N*-Ac-Mur-OMe (**38**) I *N*-Boc-Mur-OMe (**43**) 194
4.4.1. Sinteza *O*-zaštićenih *N*-Ac-Mur-OMe (**38**) i *N*-Boc-Mur-OMe (**43**) 195
4.4.2. Kristalografska analiza *N*-Boc-Mur-OMe (**43**) 196
4.4.3. DFT-modeliranje *N*-Boc-Mur-OMe (**43**) 197
4.4.4. IR-spektroskopska analiza *O*-zaštićenih *N*-Ac-Mur-OMe (**38**) i *N*-Boc-Mur-OMe (**43**) 199
4.4.5. NMR-spektroskopska analiza *O*-zaštićenih *N*-Ac-Mur-OMe (**38**) i *N*-Boc-Mur-OMe (**43**) 200
4.5. PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA ANALIZA FEROCENSKIH MUROPEPTIDA *N*-Ac-Mur-NH-Fc (**44**) i *N*-Ac-izoMur-NH-Fc (**45**), *N*-Ac-Mur-NH-Fn-COOMe (**46**) i *N*-Ac-izoMur-NH-Fn-COOMe (**47**) te *N*-Ac-Mur-NH-Fn-NHAc (**48**) 204
4.5.1. Sinteza ferocenskih muropeptida **44**-**48** 204
4.5.2. IR-spektroskopska analiza muropeptida **44**-**48** 206
4.5.3. NMR-spektroskopska analiza muropeptida **44**-**48** 209
4.5.4. DFT-modeliranje muropeptida **44**-**48** 211
4.5.5. CD-spektroskopska analiza muropeptida **44**-**48** 213
4.5.6. Elektrokemijska svojstva muropeptida **44**-**48** 215
4.6. PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA ANALIZA FEROCENSKIH ANALOGA MURAMILDIPEPTIDA: *O*-ZAŠTIĆENIH *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (**49**) I *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (**50**) TE DEPROTEKTIRANIH *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (**51**) I *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (**52**) 217
4.6.1. Sinteza *O*-zaštićenih *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (**49**) i *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (**50**) i njihova deprotekcija u *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (**51**) i *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (**52**) 217
4.6.2. IR-spektroskopska analiza *O*-zaštićenih *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (**49**) i *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (**50**) 219
4.6.3. NMR-spektroskopska analiza *O*-zaštićenih *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (**49**) i *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (**50**) 222

4.6.4. CD-spektroskopska analiza *O*-zaštićenih analoga *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (**49**) i *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (**50**) te deprotektiranih analoga *N*-Ac-Mur-L- Ala-Fca-OMe (**51**) i *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (**52**) 223

4.7. PRIPRAVA I BIOLOŠKA AKTIVNOST KONJUGATA FEROCENA I MANOZE 225

4.7.1. Priprava ferocenskih alkohola **CXXV**, **54** i **59** i amina **CLIX**, **IX** i **CXLIX** kao prekursora esterskih i amidnih konjugata s manozom 225

4.7.2. Sinteza esterskih (**62**-**66**) i amidnih (**68**-**72**) konjugata ferocena i α-D-manozida 227

4.7.3. Test inhibicije hemaglutinacije 229

5. ZAKLJUČCI 232

6. LITERATURNI IZVORI 240

7. PRILOZI XXIII

8. ŽIVOTOPIS XXV

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

FEROCENSKI BIOKONJUGATI S AMINOKISELINAMA IUGLJIKOHIDRATIMA

MONIKA KOVAČEVIĆ

Laboratorij za organsku kemiju, Prehrambeno-biotehnološki fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska

U prvom dijelu rada opisana je sinteza i konformacijska svojstva biokonjugata **21**-**32** [izvedenih kondenzacijom ferocen-1,1'-diamina (Fcda) i prirodnih peptida Ala-Pro i Pro-Ala] i njihovih prekursora **1**-**14**. Pripravljeni spojevi podvrgnuti su spektroskopskoj analizi (IR-, NMR- i CD-spektroskopija) i DFT-modeliranju da bi se ispitao utjecaj slijeda i kiralnosti prirodnih aminokiselina te *N*-terminalnih zaštitnih skupina na njihov konformacijski prostor. Pokazalo se da (*i*) peptidi **21**-**32** [Y-(AA)$_n$-*NH*-Fn-*NH*-(AA)$_m$-Y, Fn = ferocenilen, AA = D(L)-Pro, D(L)-Ala, Y = Ac (acetil), Boc (*tert*-butoksikarbonil), *m*,*n* = 1, 2] uspostavljaju interlančane intramolekulske vodikove veze (IHB) kojima se induciraju β- i γ-okreti te (*ii*) da se promjena kiralnosti i slijeda prirodnih aminokiselina kao i zaštitnih skupina odražava na IHB-obrasce.

U drugom dijelu disertacije, posvećenom konjugatima ferocenâ s ugljikohidratima, opisana je sinteza ferocenskih muropeptida *N*-Ac-(izo)Mur-NH-Fn-R, (**44**-**48**, Mur = muraminska kiselina, R = H, COOMe, NHAc) te konjugata *N*-Ac-Mur-L(D)-Ala-Fca-OMe (**49**-**52**), analoga muramildipeptida (MDP, *N*-Ac-Mur-Ala-izoGln). Spektroskopskom analizom potkrijepljenom DFT-računima utvrđen je utjecaj organometalnog fragmenta na konformacijska svojstva rezultirajućih konjugata. Nadalje, opisana je sinteza esterskih (**61**-**66**) i amidnih konjugata ferocenâ i manoze (**67**-**72**) koji su se pokazali inhibitorima hemaglutinacije *Escherichie coli.*

(248 stranica, 34 sheme, 100 slika, 55 tablica, 261 literaturni navod, 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: DFT/ ferocen/ intramolekulska vodikova veza/ konformacijska analiza/ manozidi/ muropeptidi/ peptidi

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Lidija Barišić

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Srđanka Tomić-Pisarović
Izv. prof. dr. sc. Lidija Barišić
Prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić

Rad prihvaćen: 02. srpnja 2014.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

FERROCENE BIOCONJUGATES WITH AMINO ACIDS AND CARBOHYDRATES

MONIKA KOVAČEVIĆ

Laboratory of Organic Chemistry, Faculty of Food Technology and Biotechnology,
University of Zagreb, Pierottijeva 6, Zagreb, Croatia

In the first part of this dissertation the synthesis and conformational analysis of bioconjugates **21**-**32** [derived by condensation of ferrocene-1,1'-diamine (Fcda) with natural peptides Ala-Pro and Pro-Ala] and their precursors **1-14** are described. In order to explore the impact of chirality and sequence of amino acids, as well as effect of *N*-protecting groups on conformational space of prepared compounds, the detailed conformational analysis (IR, NMR and CD spectroscopy, DFT calculations) was performed. It was demonstrated that (*i*) peptides **21**-**32** [Y-(AA)$_n$-*NH*-Fn-*NH*-(AA)$_m$-Y, Fn = ferrocenylene, AA = D(L)-Pro, D(L)-Ala, Y = Ac (acetyl), Boc (*tert*-butoxycarbonyl), *m*,*n* = 1, 2] form β- and γ-turns through intermolecular hydrogen bonding (IHB) and (*ii*) chirality and sequence of amino acids as well as protecting groups affect the IHB motifs.

In the second part of this dissertation, dealing with bioconjugates of ferrocenes and carbohydrates, the synthesis of ferrocene muropeptides *N*-Ac-(iso)Mur-NH-Fn-R, (**44**-**48**, Mur = muramic acid, R = H, COOMe, NHAc) and conjugates *N*-Ac-Mur-L(D)-Ala-Fca-OMe (**49**-**52**), an analogues of muramyl dipeptide (MDP, *N*-Ac-Mur-Ala-isoGln), was desribed. The influence of an organometallic moiety on the conformational properties of the synthesized compounds was examined by spectroscopic analysis corroborated with DFT modeling. Furthermore, the synthesis and inhibitory potency of ester and amide conjugates of ferrocene and mannose (**67**-**72**) toward *Escherichia coli* were presented.

(248 pages, 34 shemes, 100 figures, 55 tables, 261 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: DFT/ ferrocene/ intramolecular hydrogen bonds/ conformational analysis/ mannosides/ muropeptides/ peptides

Supervisor: Dr. Lidija Barišić, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Srđanka Tomić-Pisarović, Professor
Dr. Lidija Barišić, Assoc. Prof.
Dr. Silvana Raić-Malić, Professor

Thesis accepted: July, 2th 2014

§ 1. UVOD

1.1. UVOD

Ova se disertacija svojim sadržajem uklapa u područja bioorganometalne kemije i peptidomimetika.

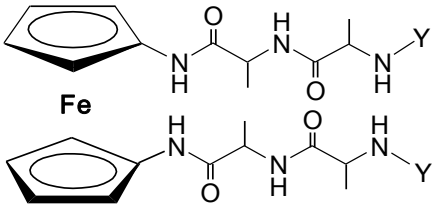
Bioorganometalna kemija proučava biološki aktivne komplekse u kojima su organometalni ligandi i biomolekule povezani vezom ugljik-metal. Biokonjugati organometalnih spojeva i biomolekula (DNA, ugljikohidrata, steroida, aminokiselina, peptida) primjenjuju se u terapiji karcinoma i zaraznih bolesti, imunotestovima, molekulskom prepoznavanju, enzimskoj katalizi i toksikologiji. [1-4]

Peptidomimetici su peptidni ili nepeptidni spojevi koji oponašaju svojstva i biološku aktivnost prirodnih peptida zahvaljujući svojim sekundarnim strukturnim elementima analognim prirodnim peptidima.[5-9] Jedan od uobičajenih pristupa u dizajnu i sintezi peptidomimetika uključuje umetanje rigidnih ″kalupa″ u peptidnu strukturu čiji je glavni zadatak ograničiti konformacijsku fleksibilnost te tako spriječiti međudjelovanje s neželjenim receptorima.[10] 1,1'-Disupstituirani feroceni, zahvaljujući sposobnosti indukcije kiralnog uređenja u pripadajućim peptidima Fn-[CO-(AA)$_m$-OMe]$_2$ (**I**)[11-22]i Y-(AA)$_n$-Fca-(AA)$_m$-OMe (**II**)[23-36] [Fn = ferocenilen, Fca = 1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina, AA = prirodna aminokiselina, Y = Ac (acetil), Boc (*tert*-butoksikarbonil), m = 1, 2,...; n = 1, 2,...], pokazali su se učinkovitim bioorganometalnim kalupima.

1.2. CILJ RADA

U prvom dijelu disertacije opisat će se sinteza novih peptidâ Fn-[NH-(AA)$_m$-Y]$_2$ **(III)** izvedenih konjugiranjem ferocen-1,1'-diamina (Fcda) s prirodnim aminokiselinama (L-Ala, D-Ala, L-Pro, D-Pro) (slika 1). Konformacijskom analizom ispitat će se utjecaj *(i)* 1,1'-disupstituiranog ferocenskog diamina te *(ii)* strukture i kiralnosti inkorporiranih prirodnih aminokiselina kao i njihovih zaštitnih skupina (Y = Boc ili Ac) na kiralno uređenje biokonjugata **III** temeljeno na intramolekulskim vodikovim vezama [IHB, (engl. *Intramolecular Hydrogen Bond*)] između podandnih peptidnih lanaca.

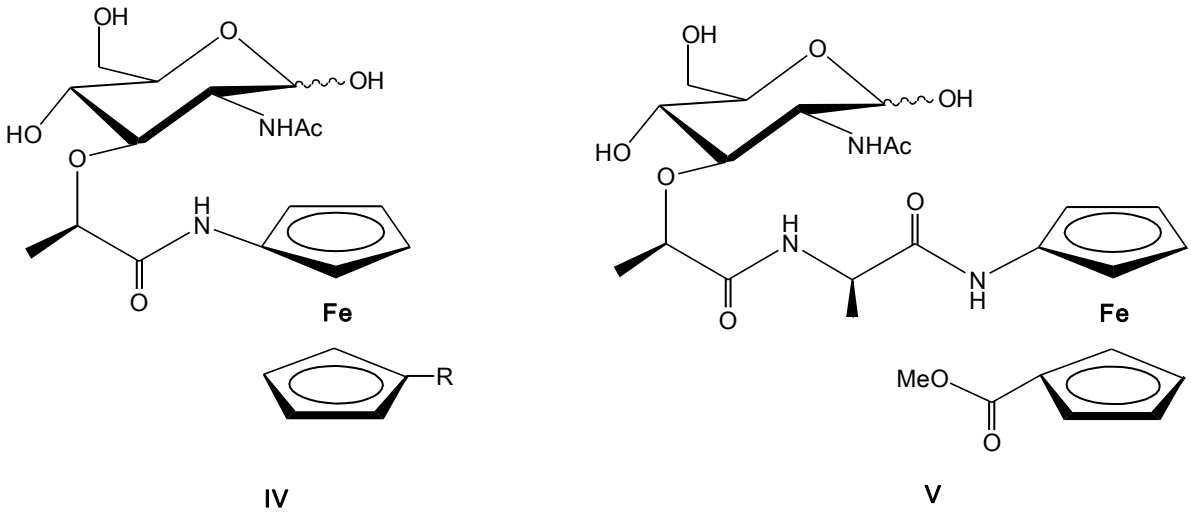
U drugom dijelu disertacije, posvećenom konjugatima ferocenâ s ugljikohidratima, opisat će se sinteza ferocenskih muropeptida *N*-Ac-(izo)Mur-NH-Fn-R (**IV**) (Mur = muraminska kiselina, R = H, COOMe, NHAc) i *N*-Ac-Mur-L(D)-Ala-Fca-OMe (**V**) (slika 2), te ferocenskih konjugata s manozom **VI** i **VII** (slika 3).



III

Slika 1. Ciljni peptid **III** izveden iz Fcda

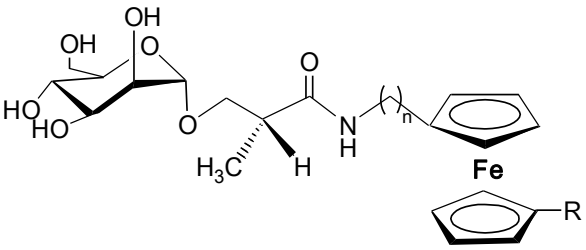
Muropeptidi **IV** pripravit će se kondenzacijom različitih ferocenskih amina H_2N-Fn-R (R = H, COOMe, NHAc) s (izo)muraminskom kiselinom. Iscrpnom spektroskopskom analizom ispitat će se utjecaj organometalnog fragmenta na njihova konformacijska svojstva. Nadalje, zamjenom podjedinice izoGln iz muramildipeptida (MurNAc-L-Ala-D-izoGln, MDP) s Fca pripravit će se njegovi bioorganometalni analozi **V** u kojima će se istražiti utjecaj ferocena na njihov konformacijski prostor.



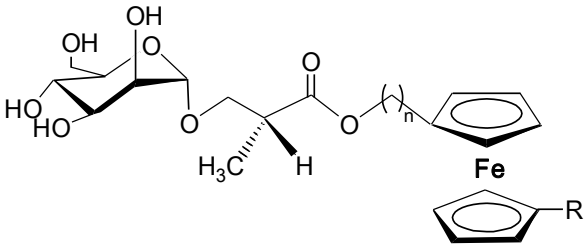
IV **V**

Slika 2. Ferocenski muropeptidi **IV** i **V**

Završni dio rada obuhvatit će sintezu *O*-manozidnih derivata ferocenâ **VI** i **VII** pripravljenih iz *α*-manopiranozid-karboksilne kiseline *(i)* kopulacijom s ferocenskim aminima H_2N-$(CH_2)_n$-Fn-R (R = H, COOMe; *n* =0, 1) odn. *(ii)* esterifikacijom s ferocenskim alkoholima HO-$(CH_2)_n$-Fn-R, (R = H, COOMe, NHBoc; *n* = 1, 2). Pripravljeni derivati **VI** i **VII** testirat će se kao potencijalni inhibitori hemaglutinacije *Escherichie coli*.



VI



VII

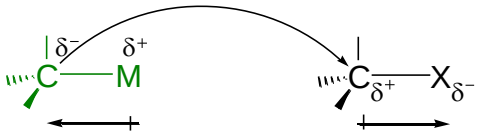
Slika 3. Ferocenski konjugati s manozom **VI** i **VII**

Konformacijska analiza pripravljenih biokonjugata **III**-**V** u otopini provest će se spektroskopskim metodama [^{1}H- i ^{13}C-NMR-, 2D NMR- (COSY, NOESY, HMBC, HSQC)], temperaturno i koncentracijski ovisnom NMR- te koncentracijski ovisnom IR- i CD-analizom] kao i na temelju DFT-računa. Ispitat će se i elektrokemijska svojstva muropeptida **IV**.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

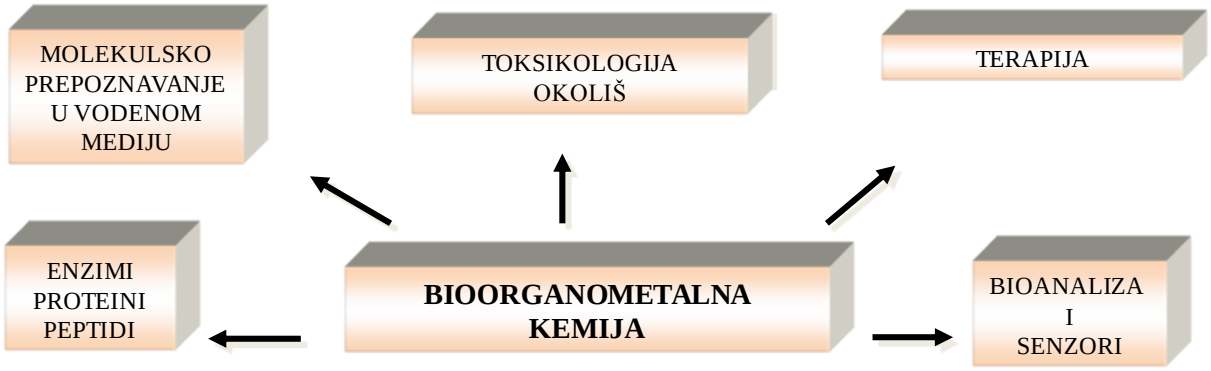
2.1. BIOORGANOMETALNA KEMIJA

Bioorganometalna kemija je četvrt stoljeća stara znanstvena disciplina koja proučava konjugate organometalnih spojeva i biomolekula.[1-2] Po opće prihvaćenoj definiciji organometalni spojevi sadrže barem jednu vezu metal-ugljik koja potječe iz organske molekule.[37] Veza između metalnog i ugljikovog atoma u takvim kompleksima izvor je različitih elektronskih i steričkih efekata. Nukleofilni ugljikov atom iz organometalnog spoja u reakciji s elektrofilnim ugljikovim atomom (iz alkil-halogenida, estera, aldehida, ketona) stvara novu vezu C–C čime se otvara mogućnost sinteze većih molekula iz manjih prekursora (slika 4).



Slika 4. Nukleofilni karakter ugljikovog atoma iz organometalnog spoja

U literaturi je opisana primjena bioorganometalnih spojeva kao receptora za biološki važne molekule, kalupa za stvaranje foldamera, osjetljivih sondi, kromofora, redoks-aktivnih spojeva, kemosenzora, te kao potencijalnih terapeutika (slika 5).[1-4]

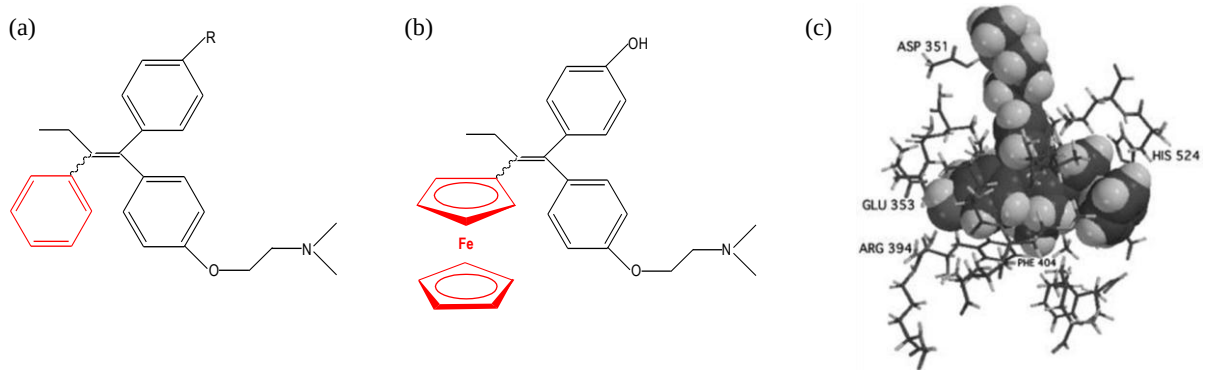


Slika 5. Interesna područja bioorganometalne kemije

Iako su prirodni spojevi poput vitamina B_{12} i enzima [Fe-Ni]-hidrogenaze te sintetski biološki aktivni kompleksi koji ne sadrže biomolekule (kloridi titanocena, vanadocena i molibdenocena s antitumorskim djelovanjem) iznimno važni organometalni spojevi,

budućnost bioorganometalne kemije počiva na sintezi konjugatâ organometalnih spojeva i biomolekula (DNA, ugljikohidrata, steroida, aminokiselina, peptida), pri čemu su osobito važni konjugati metalocenâ s biomolekulama. Takvi biokonjugati značajni su kako s teorijskog stajališta (mimetici proteina, ugljikohidrata, itd.) tako i zbog moguće primjene u biokemiji, biologiji i biomedicini (terapija karcinoma i zaraznih bolesti, imunotestovi, molekulsko prepoznavanje, enzimska kataliza i toksikologija).[1-2]

Jedan od najeksponiranijih bioorganometalnih terapeutika jest hidroksiferocifen, analog tamoksifena, citostatika koji se koristi u liječenju estrogen-ovisnih [ER(+)] karcinoma dojke. Zamjena jednog fenilnog prstena iz tamoksifena s ferocenom urodila je lijekom učinkovitim prema ER(+) i ER(-) tumorskim staničnim linijama. Točan mehanizam antiproliferativnog učinka hidroksiferocifena nije poznat, ali se na temelju molekulskog modeliranja pretpostavlja da se ferocifeni zahvaljujući interakciji s His524 i Asp351 vežu u aktivno mjesto estrogenskog receptora što dovodi do željenog antagonističkog učinka (slika 6).[38]



Slika 6. (a) Tamoksifen (R = H), (b) hidroksiferocifen, (c) vezivanje hidroksiferocifena za vezno mjesto estrogenskog receptora

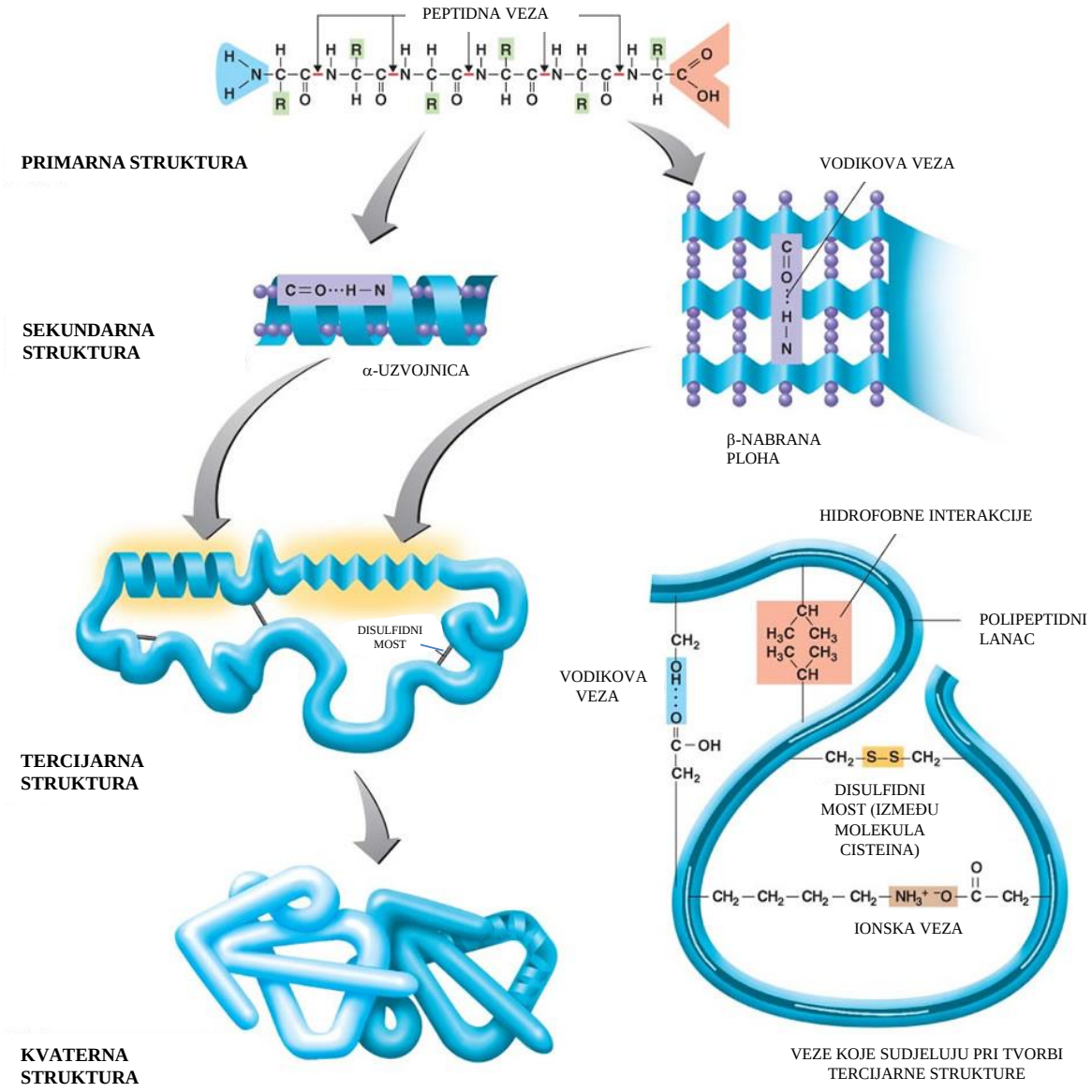
2.2. PEPTIDOMIMETICI

Peptidi i proteini sudjeluju u svim životno važnih funkcijama (enzimskoj katalizi, prijenosu i pohrani drugih molekula, prijenosu živčanih impulsa, molekulskom prepoznavanju, kontroli rasta i diferencijaciji). Građeni su iz 20 proteinogenih aminokiselina povezanih amidnom (peptidnom) vezom (20 aminokiselina može tvoriti do 8000 različitih

tripeptida te preko 64 milijuna heksapeptida!). Enormna funkcionalnost peptida i proteina proizlazi iz njihove jedinstvene strukture koja se opisuje pomoću četiri razine strukturnih elemenata prikazanih na slici 7. Primarna struktura peptida određena je slijedom aminokiselina koje su u polipeptidnom lancu vezane peptidnom vezom. Tvorba intramolekulskih vodikovih veza [IHB, (engl. *Intramolecular Hydrogen Bond*)] između donorskih i akceptorskih skupina unutar istog ili između susjednih peptidnih lanaca dovodi do njegovog nabiranja koje se može opisati pomoću nekoliko elemenata sekundarne strukture među kojima su najvažniji α-uzvojnica, β-nabrana ploha te različiti okreti.[39] Obrazac IHB određuje koju će od navedenih sekundarnih struktura peptid poprimiti:

- α-uzvojnicu karakteriziraju vodikove veze između NH-skupine aminokiselinskog ostatka *i* i CO-skupine aminokiselinskog ostatka *i+4* pri čemu se zatvaraju 13-člani prstenovi unutar istog lanca,
- β-nabrana ploha stabilizirana je vodikovim vezama između dvaju različitih polipeptidnih lanaca; ovisno o njihovom usmjerenju može biti paralelna (lanci su orijentirani u istom smjeru i tvore 12-člane prstenove), dok se u slučaju antiparalelne plohe izmjenjuju 10- i 14-člani prstenovi,
- okreti imaju važnu ulogu u nabiranju proteina i doprinose njihovoj stabilnosti. Odgovorni su za kompaktni, globularni oblik proteinskih molekula, jer omogućavaju promjenu smjera polipeptidnih lanaca. Ovisno o broju konstituirajućih ostataka dijele se na α-, β-, γ-, δ- i π-okrete. Stabilizirani su intramolekulskim NH···OC vodikovim vezama: zatvaranjem 7-članog prstena nastaju γ-okreti, 10-člani prsten odgovara β-okretu, dok 13-člani prsten rezultira α-uzvojnicom. β-Okreti su najčešći okreti, a definiraju se kao tetrapeptidne sekvence u kojima udaljenost između ostataka $C_\alpha(i)$ i $C_\alpha(i+3)$ mora biti manja ili jednaka 7Å. Karakteriziraju ih vrlo izražena hidrofilna svojstva, zbog čega su smješteni na površini proteinske molekule, te sudjeluju u procesima molekulskog prepoznavanja kao i u interakcijama različitih liganada s njihovim proteinskim receptorima.

Tercijarna struktura opisuje prostorni odnos udaljenih aminokiselinskih ostataka (dijelovi polipeptidnog lanca koji su u linearnom slijedu udaljeni jedan od drugog njegovim se smatanjem mogu približiti). Kvaterna struktura odnosi se na proteine koji se sastoje od najmanje dva polipeptidna lanca, a opisuje njihovu relativnu orijentaciju.



Slika 7. Struktura peptida i proteina

Iako njihova velika biološka i strukturna raznolikost implicira mogući terapeutski potencijal, uporaba peptida kao lijekova limitirana je njihovim nepovoljnim svojstvima:[5,40]

- sklonost zauzimanju brojnih energetski ekvivalentnih konformacija koje omogućuju međudjelovanje s neželjenim receptorima kao i s proteolitičkim enzimima,
- nestabilnost u fiziološkim uvjetima,
- polarni karakter koji onemogućuje prolazak kroz staničnu membranu i krvno-moždanu barijeru.

Modifikacija nepovoljnih farmakoloških i biofarmaceutskih svojstava prirodnih peptida s ciljem njihove kliničke primjene omogućena je uporabom odgovarajućih mimetika.[41,42] Peptidomimetici su peptidni ili nepeptidni spojevi koji kao ligandi mogu oponašati ili blokirati biološki učinak peptidnog receptora,[6] odn. spojevi čija su sekundarna strukturna svojstva analogna prirodnim peptidima uslijed čega mogu oponašati njihove biološke funkcije.[5,7-9]

Opisano je nekoliko različitih pristupa u dizajnu i sintezi peptidomimetika:[10]

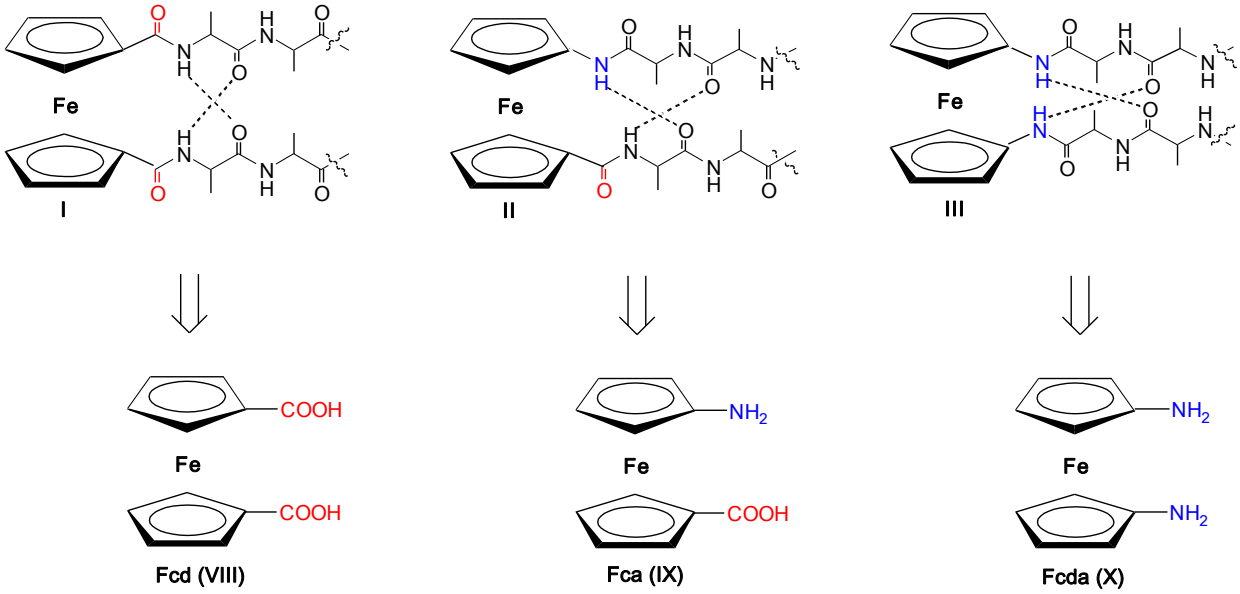
- ugradnja nepeptidnih kalupa u peptidnu sekvencu,
- zamjena peptidne veze nepeptidnim analozima,
- konjugacija aminokiselinskih bočnih ogranaka s malim molekulama,
- ciklizacija glavnog lanca.

Zajednički cilj svih gore navedenih pristupa priprave peptidomimetika jest oponašanje ili mimikrija osnovnih motiva sekundarne strukture (α-uzvojnice, β-nabrane plohe te β- i γ-okretâ). Kao mimetici α-uzvojnice upotrebljavaju se peptoidi, β-peptidi, foldameri s heterogenom okosnicom, ″uvezani″ (eng. stapled) peptidi, male molekule i molekulski sklopovi te ferocenski peptidi, dok se kao mimetici β-plohe uglavnom koriste ciklički i aciklički peptidi, te peptidi s umetnutim molekulskim kalupima. Kao mimetici okretâ koriste se peptidi s umetnutim začetnicima okreta (biciklički laktami, dibenzofurani, feroceni, spirociklički kalupi).[41]

2.3. FEROCENSKI KONJUGATI S AMINOKISELINAMA

Jedna od strategija priprave peptidnih mimetika uključuje ″umetanje″ rigidnih kalupa u peptidnu strukturu čime se ograničava njihova konformacijska sloboda i sprječavaju međudjelovanje s nepoželjnim receptorima. Heteroanularno disupstituirani feroceni pokazali su se korisnim bioorganometalnim kalupima za pripravu konformacijski ograničenih peptida i to zahvaljujući udaljenosti između ciklopentadienilnih prstenova (3,3 Å) koja dopušta tvorbu intramolekulskih vodikovih veza (IHB) između podandnih peptidnih lanaca. Ovisno o strukturi ferocenskog prekursora, 1,1'-disupstituirani ferocenski peptidi dijele se u tri glavne skupine: *(i)* Fn-[CO-$(AA)_m$-OMe]$_2$ (**I**) izvedeni iz ferocen-1,1’-dikarboksilne kiseline (Fcd, **VIII**), *(ii)* Y-$(AA)_n$-Fca-$(AA)_m$-OMe (**II**) izvedeni iz 1’-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca, **IX**) te *(iii)* Fn-[NH-$(AA)_m$-Y]$_2$ (**III**) izvedeni iz ferocen-1,1’-diamina (Fcda, **X**) [Fn =

ferocenilen, AA = prirodna aminokiselina, Y = Ac (acetil), Boc (*tert*-butoksikarbonil), *m* = 1, 2,...; *n* = 1, 2,...] (slika 8).[43]

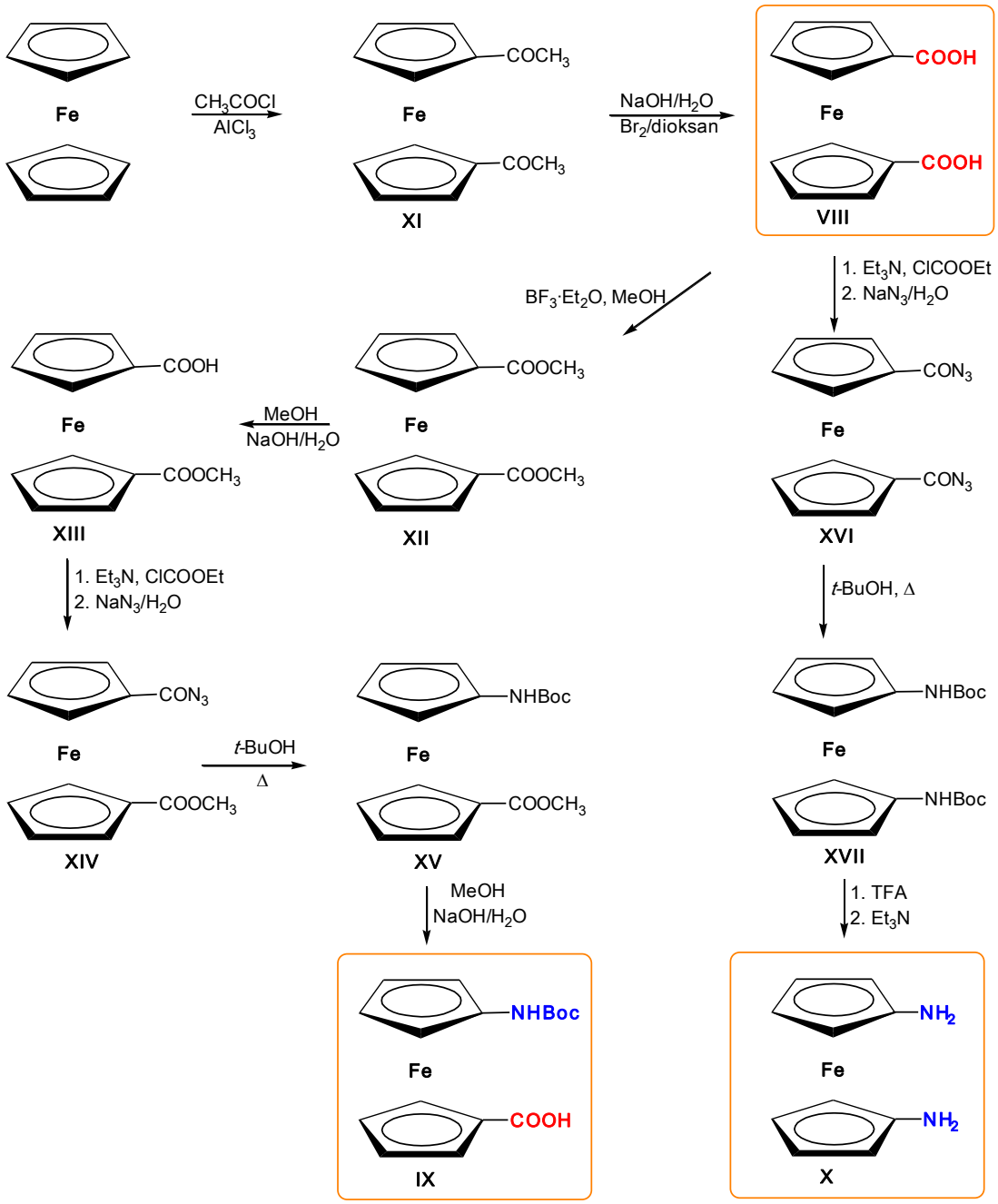


Slika 8. Ferocenski peptidi **I-III** izvedeni iz Fcd (**VIII**), Fca (**IX**) i Fcda (**X**) (IHB su označene isprekidanim crtama)

Priprava ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline [(Fcd), **VIII**] započinje Friedel-Craftsovim diaciliranjem ferocena pri čemu nastaje 1,1'-diacetilferocen (**XI**). Njegovom se oksidacijom u prisutnosti broma dobiva Fcd (**VIII**) u 90%-tnom iskorištenju (shema 1).[44]

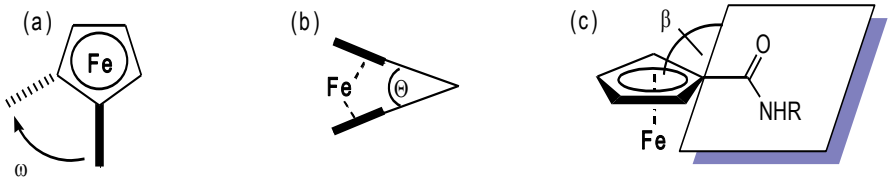
1'-Aminoferocen-1-karboksilna kiselina [(Fca), **IX**], prva bioorganometalna aminokiselina, sintetizirana je u našem Laboratoriju: refluksiranjem metanolne otopine **VIII** u prisutnosti $BF_3 \cdot Et_2O$ dobiven je dimetil-ferocen-1,1'-dikarboksilat (**XII**) čijom je djelomičnom hidrolizom pripravljena ester-kiselina **XIII**. Azidnim postupkom, odn. djelovanjem smjese reagenasa NEt_3, ClCOOEt i NaN_3, ester-kiselina **XIII** pretvorena je u ester-azid **XIV** iz kojeg je Curtiusovom pregradnjom u prisutnosti *t*-BuOH te uz naknadnu hidrolizu rezultirajućeg estera **XV** pripravljena Boc-zaštićena Fca **IX** (shema 1).[23, 45]

Ferocen-1,1'-diamin [(Fcda, **X**] pripravljen je iz Fcd **VIII** gore opisanim azidnim postupkom. Nastali ferocen-1,1'-dikarboksazid (**XVI**) Curtiusovom pregradnjom u *t*-BuOH prevodi se u stabilni Boc-zaštićeni diamin **XVII** koji se djelovanjem TFA prevodi u nestabilni diamin **X** (shema 1).



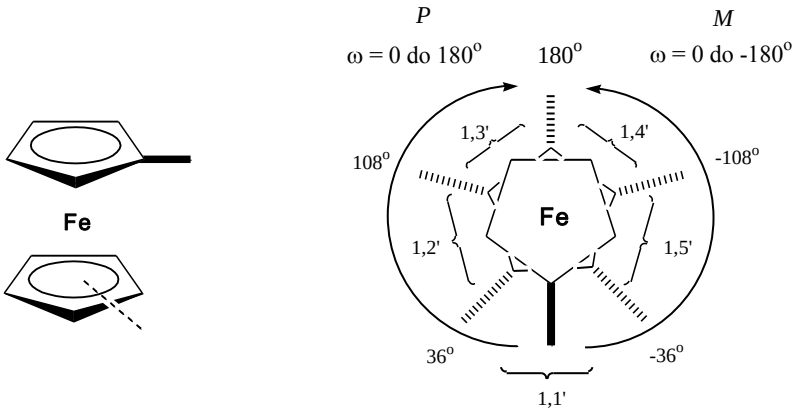
Shema 1. Priprava heteroanularno disupstituiranih ferocenskih prekursora **VIII**, **IX** i **X**

Simetrično supstituirane peptide **I** i **III** odlikuje paralelno usmjerenje podandnih peptidnih lanaca, dok su u ferocenskim peptidima **II** peptidni lanci orijentirani antiparalelno (slika 8). Pri tomu peptidi **I-III** ostvaruju različite konformacije karakterizirane torzijskim kutom ω (0 – 180°), kutom iskrivljenosti Θ (0 – 5°) i kutom izvijenosti β (5 – 30°) (slika 9).[46]



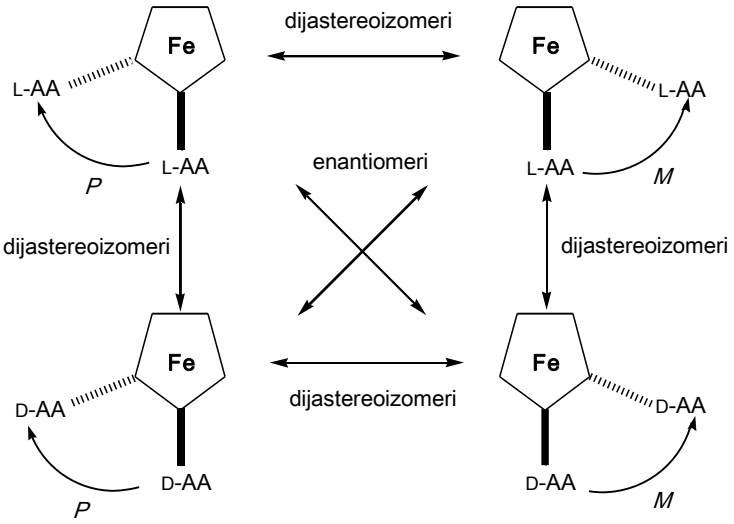
Slika 9. Deformacija fleksibilne ferocenske molekule: (a) torzijski kut, (b) kut iskrivljenosti (″tilt angle″) i (c) kut izvijenosti (″twist angle″)

S obzirom na os Cp (centroid)-Fe-Cp (centroid), supstituenti na ciklopentadienilnim prstenovima mogu tvoriti različite 1,n'-rotacijske izomere (n' = 1-5). Ukoliko torzijski kut ω iznosi između -36 i +36º odgovarajući 1,n'-disupstitucijski derivat imenuje se kao 1,1'-izomer, itd. (slika 10). Za definiranje izomera bitni su i deskriptori helične kiralnosti (*P*- ili *M*-). Intramolekulske vodikove veze između podandnih peptidnih lanaca uzrokuju fiksiranje ciklopentadienilnih prstenova u obliku *P*- ili *M*- uzvojnice (slika 11).[43,47] *P*-izomeri definirani su kutom ω = 0 – 180° jer u odnosu na središnju os put od supstituenta na ″gornjem″ prstenu (supstituent višeg prioriteta) prema supstituentu na ″donjem″ prstenu odgovara smjeru kazaljke na satu. Suprotno, *M*-izomeri definirani su kutom ω = 0 – -180°.



Slika 10. *M*- i *P*-helična kiralnost u heterodisupstituiranim ferocenskim derivatima

Prisutnost stereogenih centara u aminokiselinama vezanima izravno na ciklopentadienilne prstenove omogućuje tvorbu enantiomernih i dijastereoizomernih konjugata. Na slici 11. prikazani su neki od mogućih enantiomera odnosno dijastereoizomera konjugata ferocenâ s L- i D-aminokiselinama.[47]



Slika 11. Stereokemijski odnosi *M*- i *P*-heličnih ferocenskih konjugata

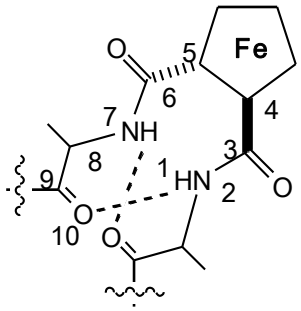
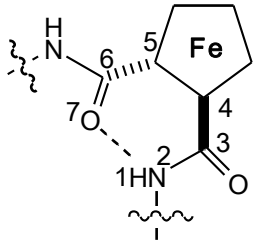
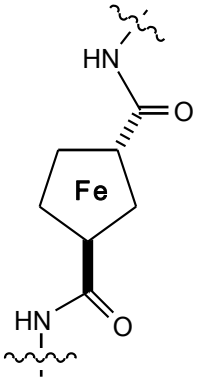
Kako uspostavljanje intramolekulskih vodikovih veza (IHB) između kiralnih peptidnih lanaca vezanih na ferocenski ostatak inducira Cottonov efekt u blizini UV/Vis-apsorpcijskog maksimuma ferocenskog kromofora ($\lambda \sim 480$ nm), heličnu kiralnost ferocena moguće je potvrditi CD-spektroskopijom. Utvrđeno je da *P*-helične strukture u području ferocenskog kromofora pokazuju pozitivan CD-signal, a *M*-helični sustavi karakterizirani su negativnim Cottonovim efektom.[12,17,18]

2.3.1. Bioorganometalni konjugati Fn-(CO-AA$_m$-OMe)$_2$ (I) izvedeni iz Fcd (VIII)

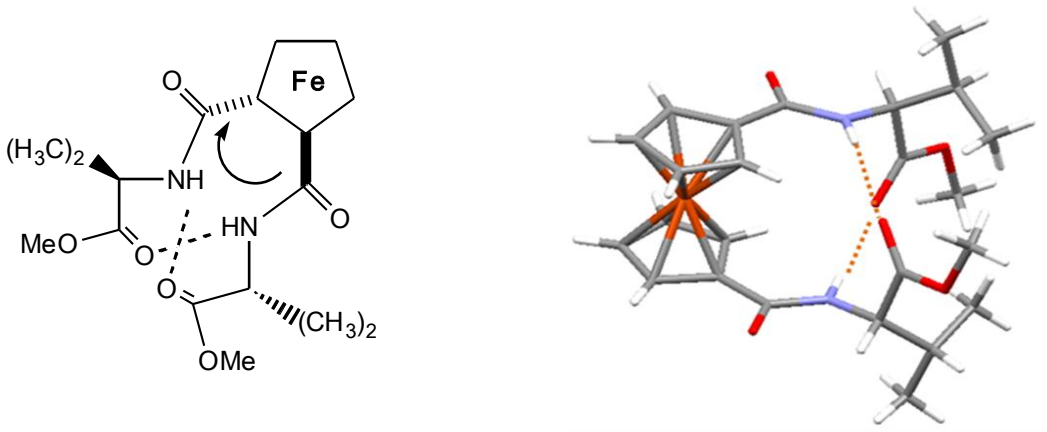
Među spomenutim 1,n'-disupstituiranim ferocenskim konjugatima najtemeljitije su istraženi derivati **I** izvedeni kopulacijom aktivirane ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (Fcd, **VIII**) s *N*-terminusom prirodnih aminokiselina (slika 8). Kiselina se aktivira pretvorbom u kiselinski klorid odn. sukcinimidni ili benzotriazolni ester koji podliježu brzoj kopulaciji s amino-skupinama *C*-zaštićenih prirodnih aminokiselina. Njihovom IR-, NMR- i CD-spektroskopskom analizom utvrđena su tri opća konformacijska obrasca: ″Herrickov″ **IA**, ″van Staverenov″ **IB** i ″Xuov″ **IC** (tablica 1).

Herrick i suradnici su kondenzacijom ferocen-1,1'-di(karbonil-klorida) s metilnim esterima prirodnih aminokiselina pripravili simetrične peptide Fn-(CO-AA-OMe)$_2$ (**XVIIIa-c**) [(Fn = 1,1'-ferocenilen, (AA = Val (**XVIIIa**), Phe (**XVIIIb**), Pro (**XVIIIc**)] kao podtipove peptidâ **I**.

Tablica 1. Obrasci vodikovih veza u derivatima **I**

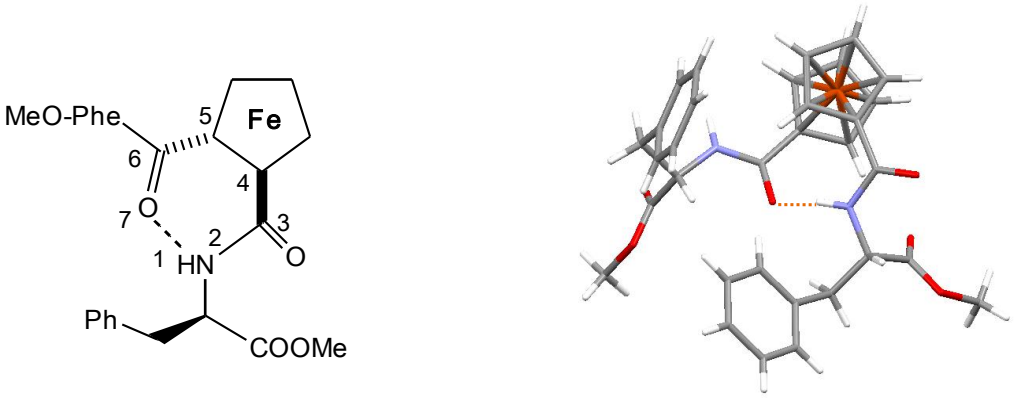
″Herrickova″ konformacija **IA**	″van Staverenova″ konformacija **IB**	″Xuova″ konformacija **IC**
		
dvije interlančane IHB koje tvore 10-člane prstenove ⇓ **β-okret**	jedna interlančana IHB koja zatvara 7-člani prsten ⇓ **γ-okret**	**otvorena konformacija** u kojoj ne dolazi do tvorbe IHB

NMR-spektroskopskom analizom indicirano je sudjelovanje njihovih amidnih protona u 10-članim intramolekulskim interlančanim vodikovim vezama s terminalnim esterskim karbonilnim skupinama. Dakle, umetanjem ferocenâ omogućena je tvorba dvaju β-okreta u nastaloj C_2-simetričnoj peptidnoj strukturi (tablica 1, **IA**).[19] Kristalografskom analizom Fn-(CO-Val-OMe)$_2$ (**XVIIIa**) utvrđeno je da je Herrickov obrazac IHB (dvije intramolekulske interlančane $NH_{Val}\cdots OC_{COOMe}$ vodikove veze) zadržan i u čvrstom stanju (slika 12). Kako udaljenost NH···O iznosi 3,25 Å radi se o slabim vodikovim vezama.[20]



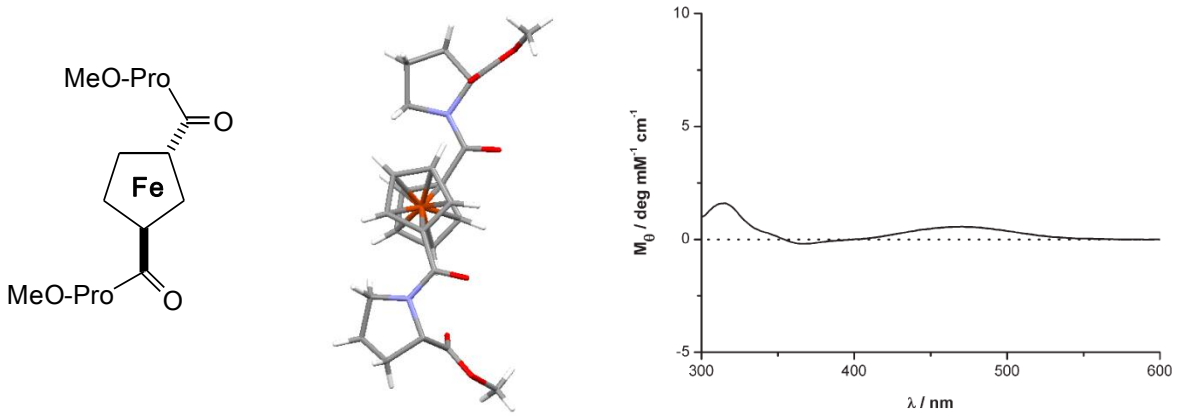
Slika 12. 10-člani IHB-prstenovi (β-okreti) u kristalnoj strukturi konjugata Fn-(CO-Val-OMe)$_2$ (**XVIIIa)**

Zanimljiv je primjer strukture biokonjugata Fn-(CO-Phe-OMe)$_2$ (**XVIIIb)** u čijoj je kristalnoj strukturi pronađen 7-člani prsten kao posljedica interlančane $NH_{Phe}\cdots OC_{Fn}$ IHB što odgovara ″van Staverenovoj″ konformaciji **IB** (tablica 1, slika 13), dok u otopini struktura poprima stabilniju ″Herrickovu″ konformaciju uslijed tvorbe dviju simultanih $NH_{Phe}\cdots OC_{COOMe}$ interlančanih IHB.[21]



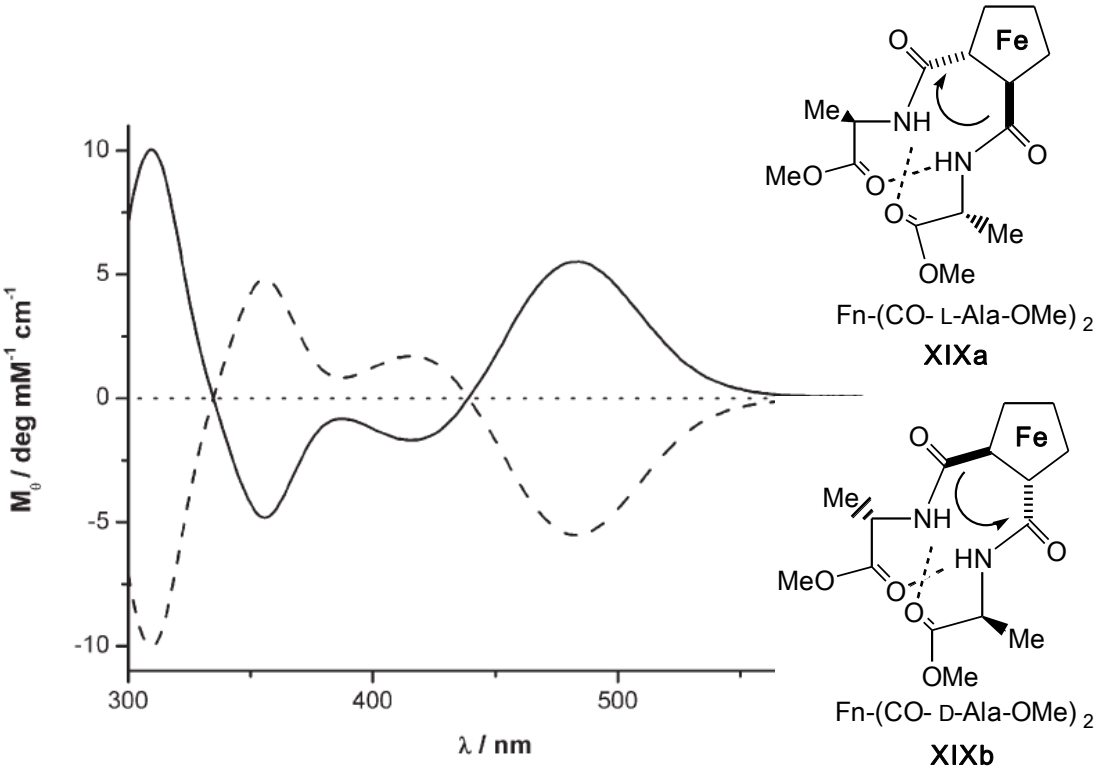
Slika 13. 7-Člani IHB-prsten (γ-okret) u kristalnoj strukturi konjugata Fn-(CO-Phe-OMe)$_2$ (**XVIIIb)**

Primjer otvorene ″Xuove″ konformacije je konjugat Fn-(CO-Pro-OMe)$_2$ (**XVIIIc**). S obzirom da prolin ne raspolaže donorom vodikove veze, rečeni se peptid **XVIIIc** ne može stabilizirati intramolekulskom vodikovom vezom kako u otopini tako ni u čvrstom stanju. Postojanje ″Xuove″ konformacije podrazumijeva da u peptidu ne postoji rotacijska barijera koja bi stabilizirala *(P)*- ili *(M)*-izomer, te ne pokazuje CD-aktivnost u području ferocenskog kromofora (slika 14).[22]



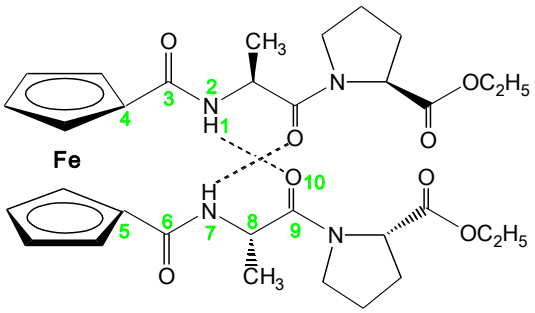
Slika 14. Kristalna struktura Fn-(CO-Pro-OMe)$_2$ (**XVIIIc**) i pripadajući CD-spektar

Istraživanja ferocenskih peptida **I** izvedenih iz Fcd (**VIII**) nastavili su Metzler-Nolte i suradnici pripravom Fn-(CO-L(D)-Ala-OMe)$_2$ (**XIXa**,**b**). U CD-spektru peptida **XIXa** s konstituirajućom L-aminokiselinom pozitivni Cottonov efekt u području ferocenskog kromofora (~ 480 nm) pripisuje se (*P*)-heličnosti ferocena induciranoj IHB, dok negativni Cottonov efekt enantiomernog D-aminokiselinskog konjugata **XIXb** sugerira njegovu (*M*)-heličnost (slika 15).[21]

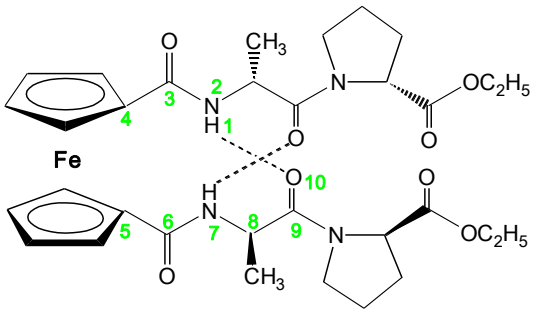


Slika 15. CD-spektri (*P*)- **XIXa** i (*M*)- **XIXb** heličnih Fn-(CO-L(D)-Ala-OMe)$_2$

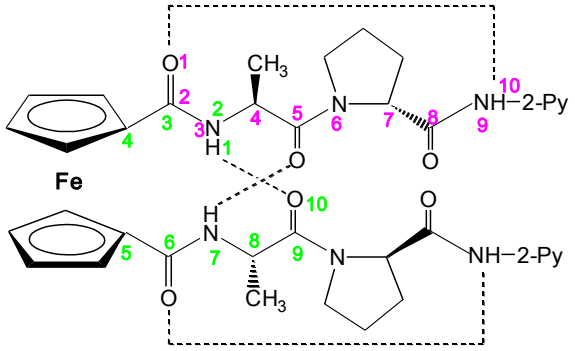
Istraživanja ferocenskih peptida **I** Hirao i suradnici nastavili su kopuliranjem Fcd (**VIII**) s homo- i heterokiralnim peptidnim sekvencama Ala-Pro odnosno Pro-Ala (slika 13).[17,18] Kako kiralnost svake pojedine aminokiseline i njezin položaj u peptidnom lancu reguliraju tvorbu kiralno uređenih struktura, autori su ispitivali utjecaj konfiguracije i slijeda prirodnih aminokiselina na konformacijski prostor rezultirajućih peptida **XX**–**XXV** (slika 16). Kristalografskom analizom homokiralnog peptida **XX** potvrđeno je sudjelovanje obiju alaninskih podjedinica u dvjema interlančanim $NH_{Ala}\cdots OC_{Ala}$ IHB. Pri tome rezultiraju dva 10-člana prstena što odgovara C_2-simetričnoj „Herrickovoj“ konformaciji **IA**.



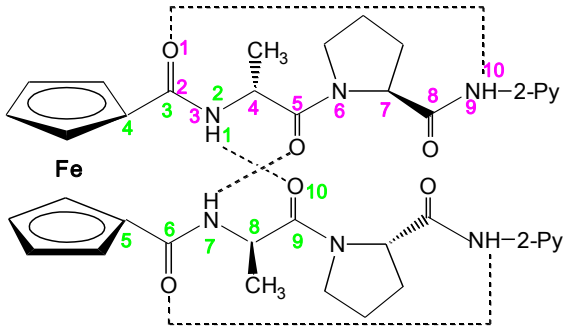
Fn-(CO-L-Ala-L-Pro-OEt)$_2$ (**XX**)



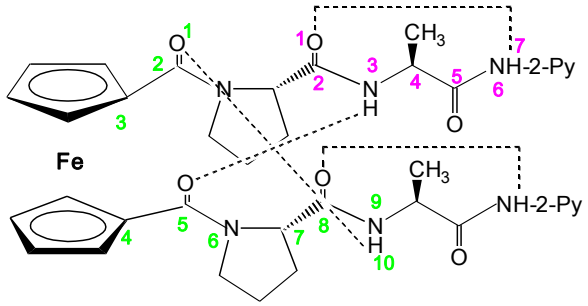
Fn-(CO-D-Ala-D-Pro-OEt)$_2$ (**XXI**)



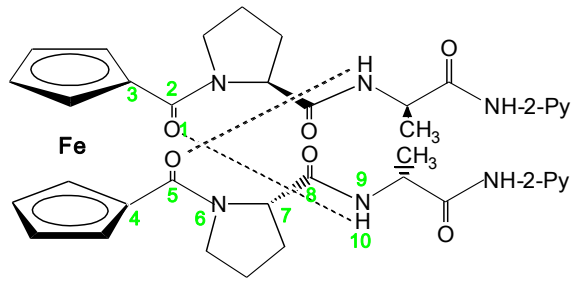
Fn-(CO-L-Ala-D-Pro-NH-2-Py)$_2$ (**XXII**)



Fn-(CO-D-Ala-L-Pro-NH-2-Py)$_2$ (**XXIII**)



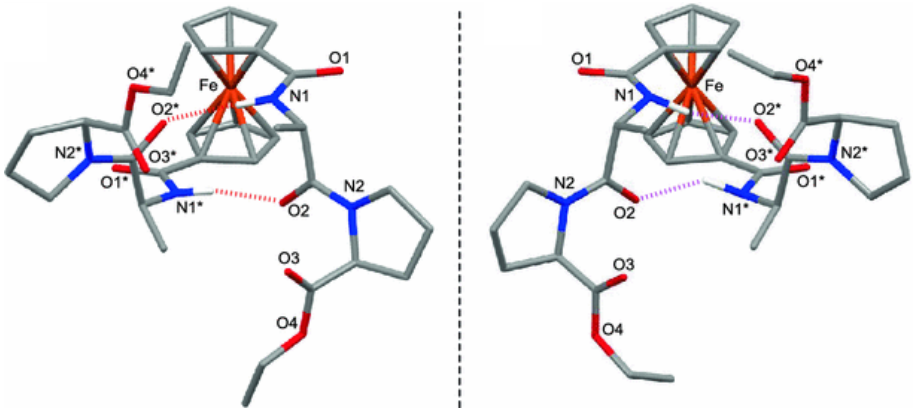
Fn-(CO-L-Pro-L-Ala-NH-2-Py)$_2$ (**XXIV**)



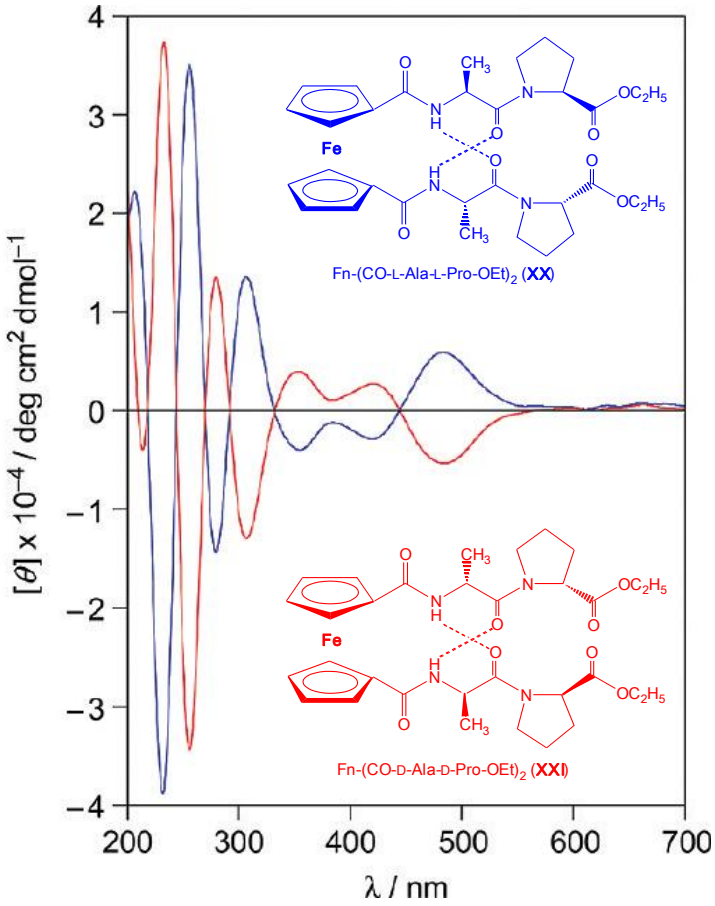
Fn-(CO-L-Pro-D-Ala-NH-2-Py)$_2$ (**XXV**)

Slika 16. Intramolekulske vodikove veze u peptidima **XX** – **XXV**

Kao što je vidljivo iz ORTEP-dijagrama prikazanih na slici 17, peptid Fn-(CO-L-Ala-L-Pro-OEt)$_2$ (**XX**) u čvrstom stanju tvori desno usmjerenu uzvojnicu, dok peptid Fn-(CO-D-Ala-D-Pro-OEt)$_2$ (**XXI**) tvori lijevu uzvojnicu te se radi o konformacijskim enantiomerima (slika 17).



Fn-(CO-Ala-Pro-OEt)$_2$ (**XX**) Fn-(CO-D-Ala-D-Pro-OEt)$_2$ (**XXI**)

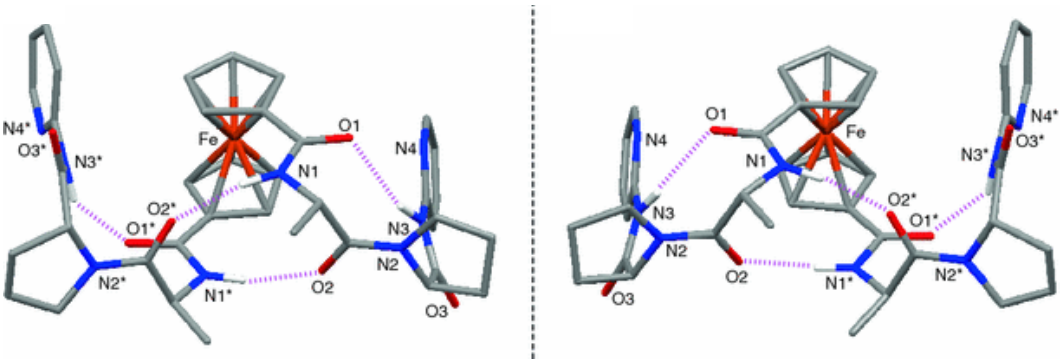


Slika 17. ORTEP-dijagrami (*gore*) i CD-spektri (*dolje*) konformacijskih enantiomera Fn-(CO-Ala-Pro-OEt)$_2$ (**XX**) i Fn-(CO-D-Ala-D-Pro-OEt)$_2$ (**XXI**)

CD-spektri obaju spojeva ukazuju na očuvanje kiralnog uređenja putem IHB i u otopini: **XX** poprima pozitivan Cottonov efekt u ferocenskom području što upućuje na *(P)*-

heličnost, a kod **XXI** očekivano se javlja signal suprotnog predznaka i jednakoga intenziteta, što upućuje na *(M)*-heličnost.[12,13]

Nadalje, kopuliranjem Fcd (**VIII**) s heterokiralnim sekvencama L-Ala-D-Pro-NH-2-Py, odnosno D-Ala-L-Pro-NH-2-Py pripravljeni su odgovarajući konjugati **XXII** i **XXIII**, podtipovi peptidâ **I**.[15] Kristalografskom analizom Fn-(CO-L-Ala-D-Pro-NH-2-Py)$_2$ (**XXII**) potvrđena je prisutnost dviju interlančanih $NH_{Ala}\cdots OC_{Ala}$ IHB u konformaciji nalik antiparalelnoj β-nabranoj plohi, koje tvore desno orijentiranu uzvojnicu (slika 18). Autori su potvrdili pretpostavku da je tvorba *(P)*-heličnih struktura posljedica apsolutne konfiguracije alaninskog α-ugljikovog atoma[20,48,49] budući da je konformacijski obrazac jednak onome u ferocenskom peptidu **XX**. Dodatna značajka kristalne strukture **XXII** jest 10-člani IHB-prsten uspostavljen intralančanom $NH_{Py}\cdots OC_{Fn}$ vodikovom vezom što odgovara β-okretu. Iz kristalne strukture peptida Fn-(CO-D-Ala-L-Pro-NH-2-Py)$_2$ (**XXIII**) vidljiva je tvorba lijeve uzvojnice koja je zrcalna slika desne uzvojnice peptida Fn-(CO-L-Ala-D-Pro-NH-2-Py)$_2$**XXII** (slika 18).



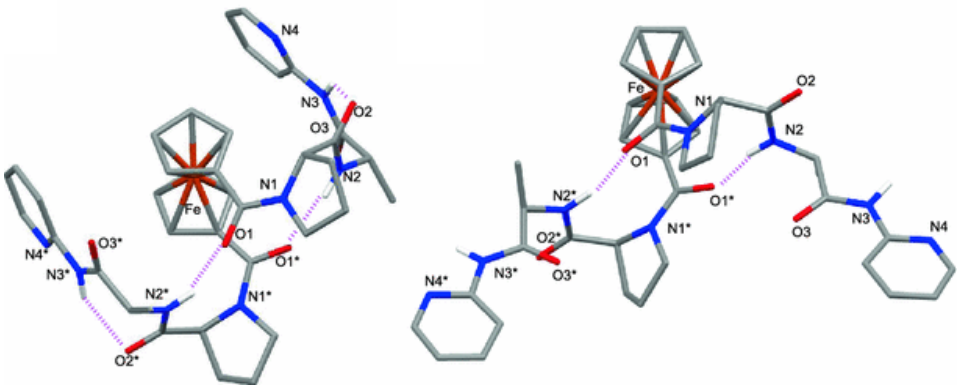
Slika 18. ORTEP-dijagrami konformacijskih enantiomera Fn-(CO-L-Ala-D-Pro-NH-2-Py)$_2$ (**XXII,** *lijevo*) i Fn-(CO-D-Ala-L-Pro-NH-2-Py)$_2$ (**XXIII**, *desno*)

Helična kiralnost tih konjugatâ sačuvana je i u otopini: CD-spektroskopskom analizom peptida **XXII** utvrđen je pozitivan Cottonov efekt u ferocenskom području, dok se u CD-spektru njegovog konformacijskog enantiomera **XXIII** očekivano javlja signal suprotnog predznaka i jednakoga intenziteta.

Prisutnost homokiralne aminokiselinske sekvencije u peptidu Fn-(CO-L-Pro-L-Ala-NH-2-Py)$_2$ (**XXIV**) omogućila je tvorbu dvaju intralančanih 7-članih $NH_{Py}\cdots OC_{Pro}$ IHB-prstenova koji odgovaraju inverznim γ-okretima. Čvrsto stanje peptida **XXIV** dodatno je

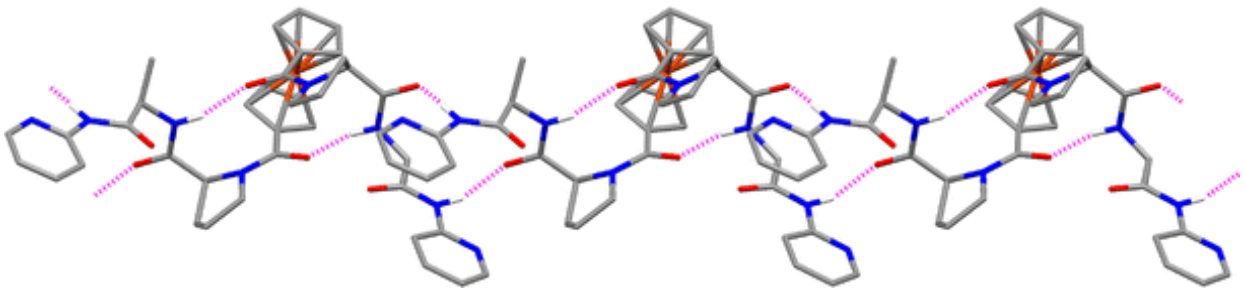
karakterizirano i dvama 10-članim IHB-prstenovima uspostavljenima kroz dvije intralančane $NH_{Ala}\cdots OC_{Fn}$ vodikove veze što odgovara strukturi antiparalelne β-nabrane plohe (slika 19, *lijevo*).[16]

Da bi se ispitao utjecaj konfiguracije aminokiselinskih kiralnih centara na konformacijska svojstva ovog tipa ferocenskih peptida, pripravljen je heterokiralni konjugat Fn-(CO-L-Pro-D-Ala-NH-2-Py)$_2$ (**XXV**). Njegovom je kristalografskom analizom utvrđena prisutnost dviju interlančanih $NH_{Ala}\cdots OC_{Fn}$ IHB čime je inducirana tvorba antiparalelne β-nabrane plohe (slika 19, *desno*).



Slika 19. ORTEP-dijagrami homo- [Fn-(CO-L-Pro-L-Ala-NH-2-Py)$_2$ (**XXIV**, *lijevo)*] i heterokiralnog peptida Fn-(CO-L-Pro-D-Ala-NH-2-Py)$_2$ (**XXV**) (*desno*)

Za razliku od homokiralnog peptida Fn-(CO-L-Pro-L-Ala-NH-2-Py)$_2$ (**XXIV**) čija se NH-grupa vezana na piridinski prsten i prolinska CO-skupina povezuju intralančanom vodikovom vezom, spomenute donorske i akceptorske skupine iz heterokiralng peptida **XXV** ostvaruju intermolekulske vodikove veze zatvarajući pri tom 14-člane prstenove (slika 20).

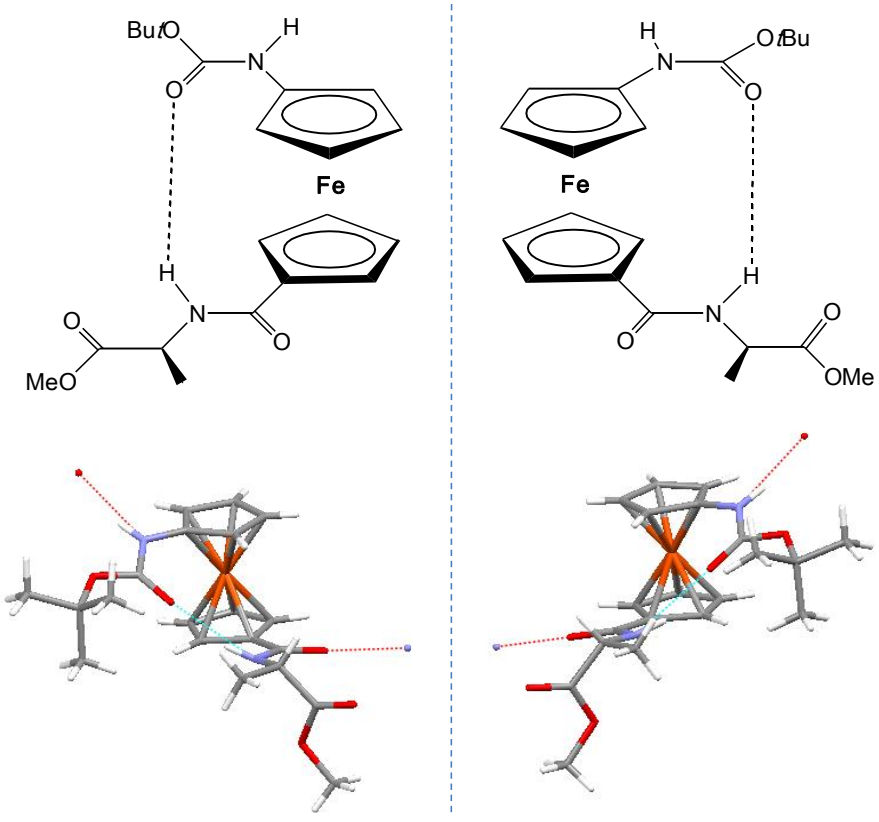


Slika 20. Intra- i intermolekulske vodikove veze u kristalu Fn-(CO-D-Ala-L-Pro-NH-2-Py)$_2$ (**XXV**)

2.3.2. Bioorganometalni konjugati Y-(AA)$_n$-Fca-(AA)$_m$-OMe (II) izvedeni iz Fca (IX)

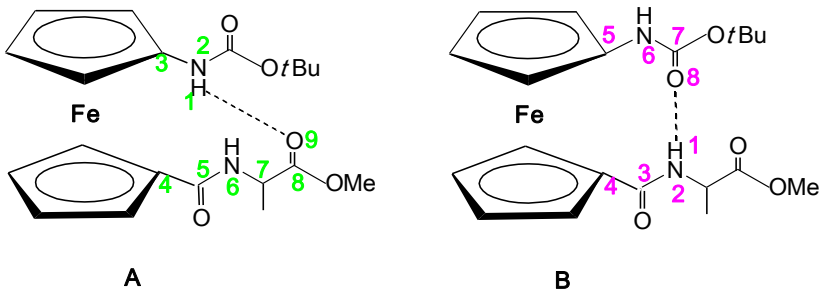
Za razliku od Fcd (**VIII**), 1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina (Fca, **IX**)[23,24] omogućava antiparalelnu orijentaciju peptidnih lanaca što je svojstvo prirodnih peptida (slika 8). Ujedno, Fca predstavlja najjednostavniju organometalnu aminokiselinu koju je moguće integrirati u peptidni lanac kopulacijom s *C*- i *N*-terminusom prirodnih aminokiselina.

U našem su Laboratoriju pripravljeni ferocenski peptidi u kojima je Fca inkorporirana u alaninske di-, tri-, tetra-, penta- i oktapeptide u otopini i na čvrstoj fazi.[24-35] Boc-Fca-OH, aktivirana standardnim HOBt/EDC postupkom, kopulirana je s H-Ala-OMe ili H-D-Ala-OMe tvoreći ferocenske peptide Boc-Fca-L-Ala (**XXVIa**) i Boc-Fca-D-Ala (**XXVIb**). U kristalima tih konjugata uspostavljene su vodikove veze između $NH_{Ala}\cdots OC_{Boc}$ koje zatvaraju 8-člane IHB-prstenove inducirajući njihovu heličnu kiralnost. Iz ORTEP-dijagrama enantiomera **XXVIa** i **XXVIb** vidljivo je da se radi o suprotno usmjerenim uzvojnicama (*M*- **XXVIa** i *P*-**XXVIb**) (slika 21).[26]



Slika 21. Shematski prikaz i ORTEP-dijagrami enantiomernih dipeptidâ
M-Boc-Fca-L-Ala-OMe (**XXVIa**, *lijevo*) i *P*-Boc-Fca-D-Ala-OMe (**XXVIb**,*desno*)

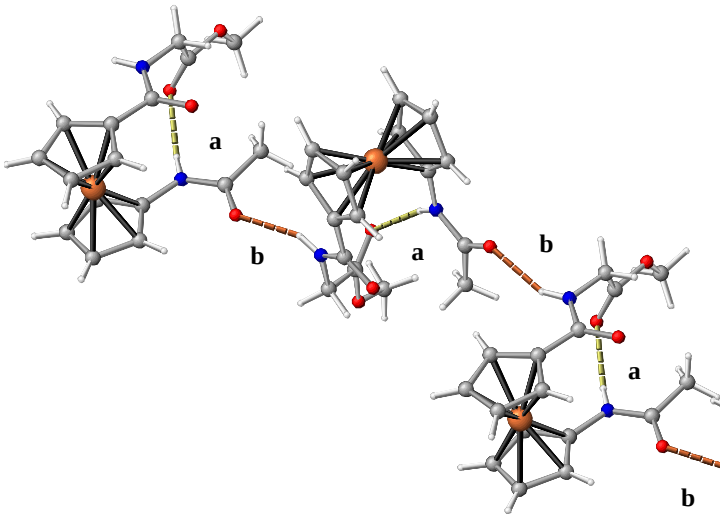
Detaljna strukturna analiza peptida **XXVIa** i **XXVIb** u otopini (IR-, ^{1}HNMR- i CD-spektroskopija kao i DFT-računi) ukazuje na prisutnost dva opća tipa konformerâ (**A** i **B**) neovisno o apsolutnoj konfiguraciji alaninske podjedinice (slika 22). Konformeri **A** stabilizirani su interlančanim $NH_{Fca}\cdots OC_{Ala}$ IHB (9-člani prsten), dok se konformeri **B** odlikuju 8-članim prstenom zatvorenim interakcijom alaninske NH skupine s karbonilnom grupom iz Boc-zaštitne skupine. Prema očekivanjima, interlančane vodikove veze uspostavljene između supstituenata jukstapozicioniranih ferocenskih prstenova, induciraju tvorbu desnih i lijevih heličnih konformera.



Slika 22. Hipotetske konformacije **XXVIa** i **XXVIb** u otopini

Nadalje, Rapić i suradnici ispitivali su utjecaj strukture *N*-terminalne zaštitne skupine i bočnih ogranaka iz različitih prirodnih aminokiselina na konformacijska svojstva rezultirajućih di- Y-Fca-AA-OMe (**XXVII**) i tripeptida Y-AA-Fca-AA-OMe (**XXVIII**) [Y = acetil (Ac), *tert*-butoksikarbonil (Boc); AA= Gly, Ala, Val)].[30]

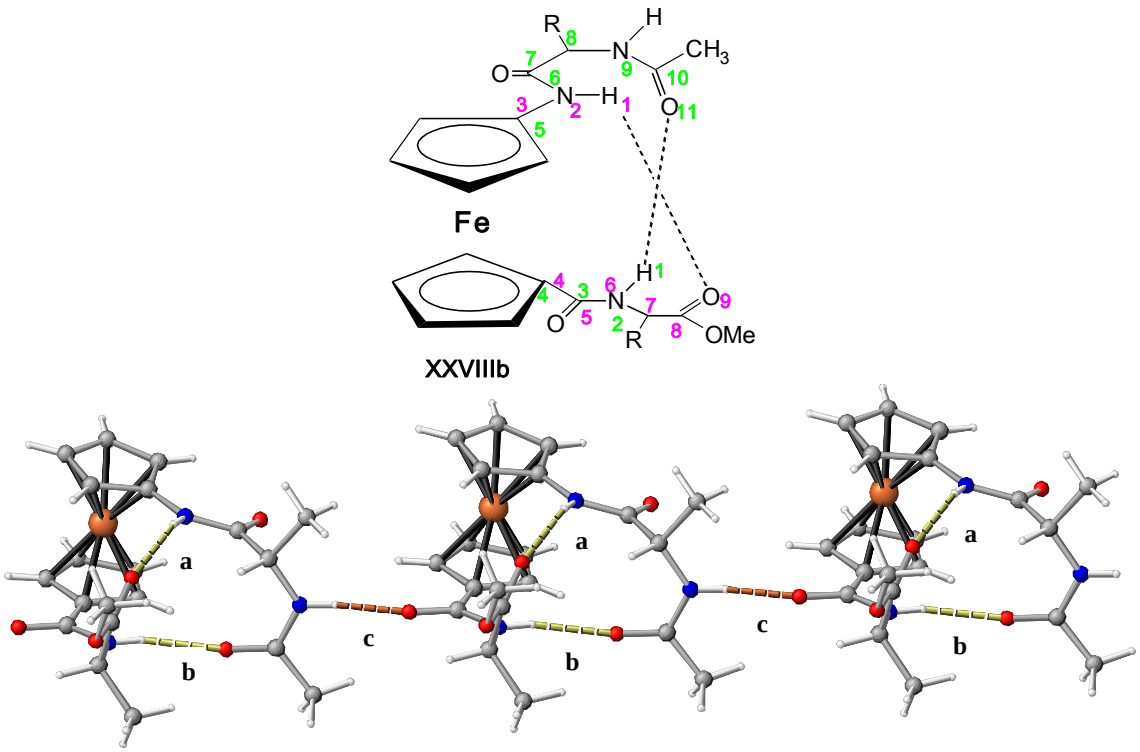
Kristalografskom analizom Ac-Fca-Gly (**XXVIIa**) ustanovljeno je da obje NH-skupine sudjeluju u vodikovim vezama. Pri tomu NH_{Fca} uspostavlja intramolekulski kontakt s OC_{ester} što rezultira 9-članim IHB prstenom (**a**), a dodatnu stabilizaciju osiguravaju intermolekulske vodikove veze između NH_{Gly} i OC_{Ac} susjednih molekula (**b**) (slika 23).[30]



Slika 23. Molekulska struktura dipeptida Ac-Fca-Gly (**XXVIIa**) u kristalu

Teorijskim istraživanjima nađen je velik broj energijski bliskih konformera na čiju populaciju promjena zaštitne skupine nema utjecaja, a povećanjem bočnog ogranka prirodne aminokiseline destabiliziraju se pojedine konformacije. Dipeptidi **XXVII** u otopini predstoje kao smjesa (*P*)- i (*M*)-konformera stabiliziranih s po jednom srednje jakom IHB u kojoj se izmjenjuju obje NH-skupine tvoreći 8- odn. 9-člane prstenove.

Osim dipeptida X-Fca-AA-OMe (**XXVII**), isti su autori pripravili i tripeptide Y-AA-Fca-AA-OMe (**XXVIII**) [**XXVIIIa** (Y = Boc, AA = Val); **XXVIIIb** (Y = Ac, AA = Ala) i **XXVIIIc** (Y = Ac, AA = Val)] koji u čvrstom stanju tvore dvije ″unakrsne″ IHB uspostavljajući 9- odn. 11-člane prstenove i heličnu kiralnost desne orijentacije. Manji prsten nastaje interakcijom NH-skupine iz Fca i terminalne esterske karbonilne funkcije, a veći je posljedica IHB između NH-skupine *C*-terminalne aminokiseline i CO-skupine *N*-zaštićenog amina. Dakle, tripeptidi u otopini i čvrstom stanju predstoje kao jedan konformer stabiliziran dvjema jakim IHB na koje bočni ogranak prirodne aminokiseline i *N*-terminalna zaštitna skupina nemaju utjecaja.[30]

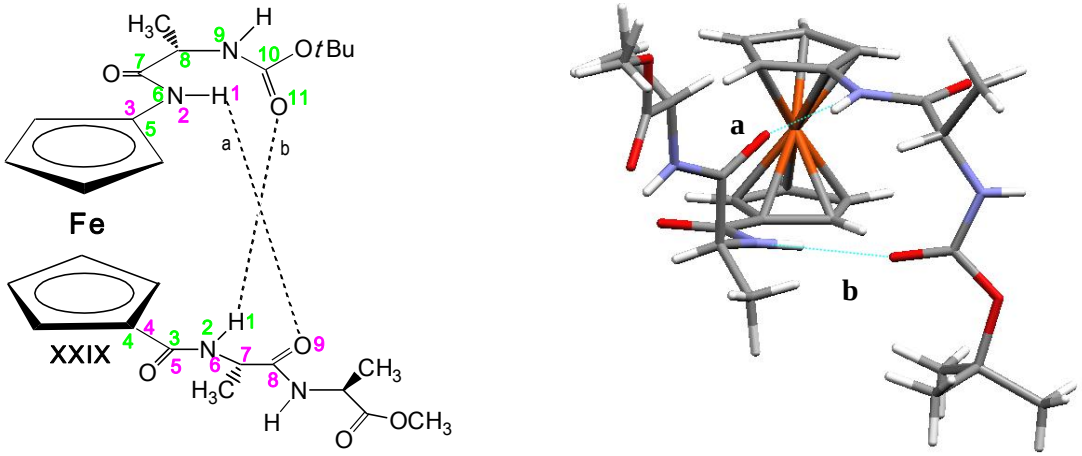


Slika 24. Shematski prikaz IHB i ORTEP-dijagram tripeptida Ac-Ala-Fca-Ala-OMe (**XXVIIIb**)

Iz ORTEP-dijagrama tripeptida **XXVIIIb** (Ac-Ala^1-Fca-Ala^2-OMe) (slika 24) vidljivo je da je riječ o desnoj uzvojnici, odn. (*P*)-heličnosti ferocenske jezgre, podržanoj s dvije IHB:

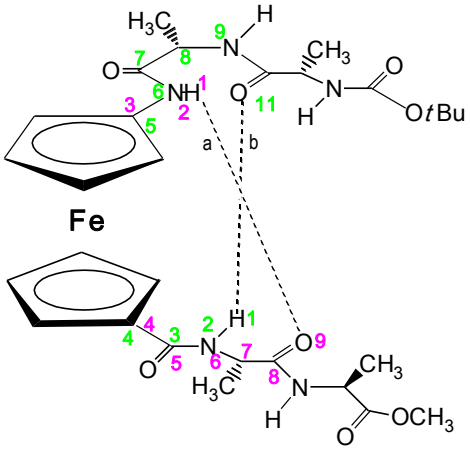
$NH_{Fca}\cdots OC_{ester}$ koja rezultira 9-članim prstenom (**a**) i $NH_{Ala2}\cdots OC_{Ac}$ koja zatvara 11-člani prsten (**b**), te dodatnom intermolekulskom vodikovom vezom između NH_{Ac} i CO_{Fca} susjednih molekula (**c**).[30]

Tetrapeptid **XXIX** (Boc-Ala[1]-Fca-Ala[2]-Ala[3]-OMe) u čvrstom stanju kao i u otopini karakteriziraju dvije jake unakrsne $NH_{Fca}\cdots OC_{Ala2}$ (**a**) i $NH_{Ala2}\cdots OC_{Boc}$ (**b**) IHB koje rezultiraju 9-, odn. 11-članim prstenovima, a kao posljedica takvog uređenja uspostavlja se helična kiralnost desne orijentacije (slika 25).[26]



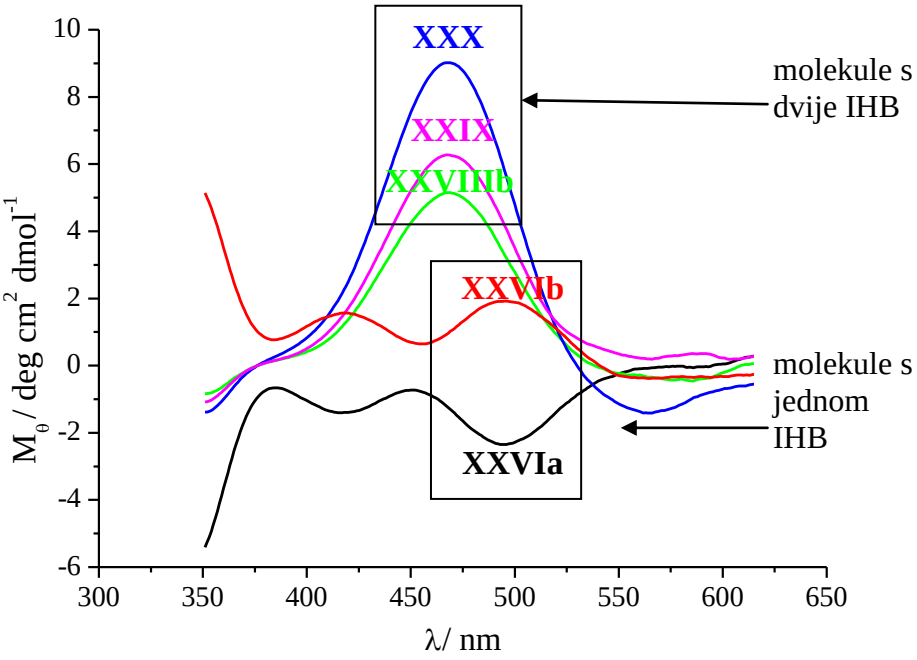
Slika 25. Shematski prikaz IHB i ORTEP-dijagram (*P*)-Boc-Ala-Fca-Ala-Ala-OMe (**XXIX**)

Pentapeptidi **XXXa-c** [**XXXa** (Boc-Ala[1]-Ala[2]-Fca-Ala[3]-Ala[4]-OMe), **XXVIIIb** (Boc-D-Ala[1]-Ala[2]-Fca-Ala[3]-D-Ala[4]-OMe) i **XXVIIIc** (Boc-Ala[1]-Ala[2]-Fca-D-Ala[3]-D-Ala[4]-OMe)] dobivaju se analogno već opisanim sintezama za di-, tri- i tetrapeptide.[25,26] Spektroskopska analiza pentapeptidâ **XXXa-c** pokazuje da se umetanje dodatne Ala-podjedinice nije odrazilo na konformacijski prostor te da u otopini prevladava konformer s dvije jake unakrsne $NH_{Fca}\cdots OC_{Ala3}$ (**a**) i $NH_{Ala3}\cdots OC_{Ala2}$ (**b**) interlančane IHB (slika 26).



Slika 26. Shematski prikaz IHB (*P*)-Boc-Ala-Ala-Fca-Ala-Ala-OMe (**XXXa**)

Na slici 27. prikazani su CD-spektri ferocenskih peptida **XXVIa, XXVIb, XXVIIIb, XXIX** i **XXX**. Svi Fca-oligopeptidi izgrađeni iz L-aminokiselina (**XXVIb, XXVIIIb, XXIX** i **XXX**) pokazuju *P*-heličnost ferocenske jezgre i pozitivan Cottonov efekt iznad 450 nm, dok peptid dobiven iz D-aminokiseline **XXVIa** očekivano pokazuje negativni CD-signal. Intenzitet Cottonovog efekta razmjeran je broju i jakosti uspostavljenih IHB.[47]

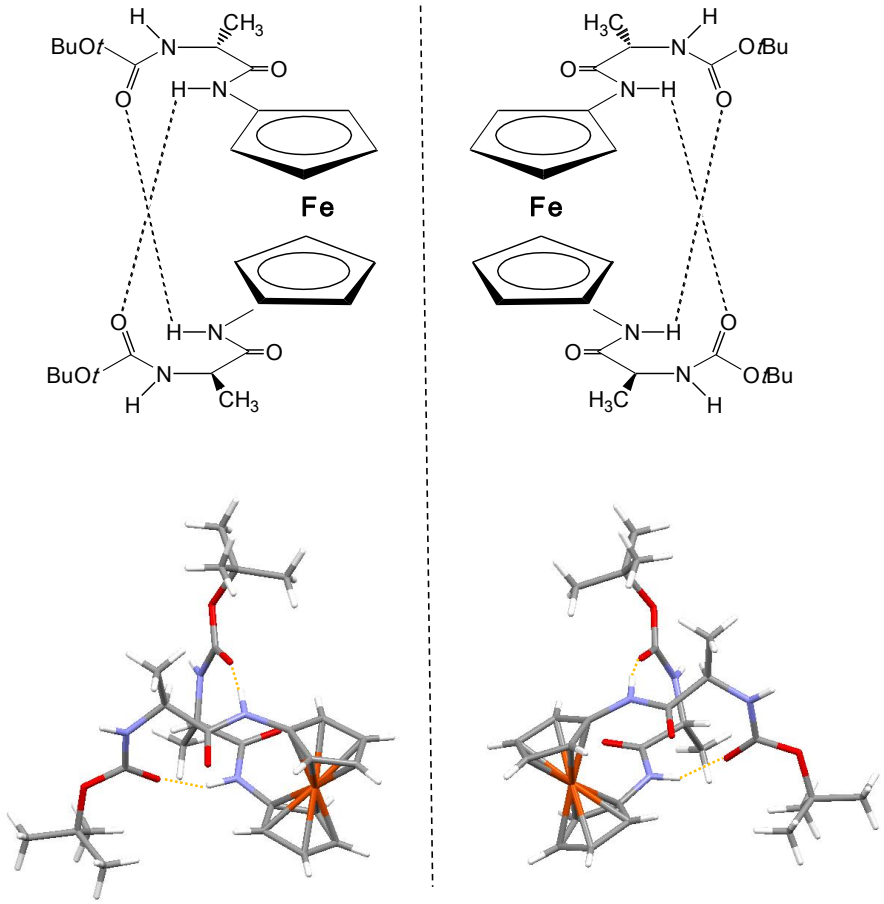


Slika 27. CD-spektri ferocenskih peptida **XXVIa, XXVIb, XXVIIIb, XXIX** i **XXX**

2.3.3. Bioorganometalni konjugati Fn-[NH-(AA)$_m$-Y]$_2$ (III) izvedeni iz Fcda (X)

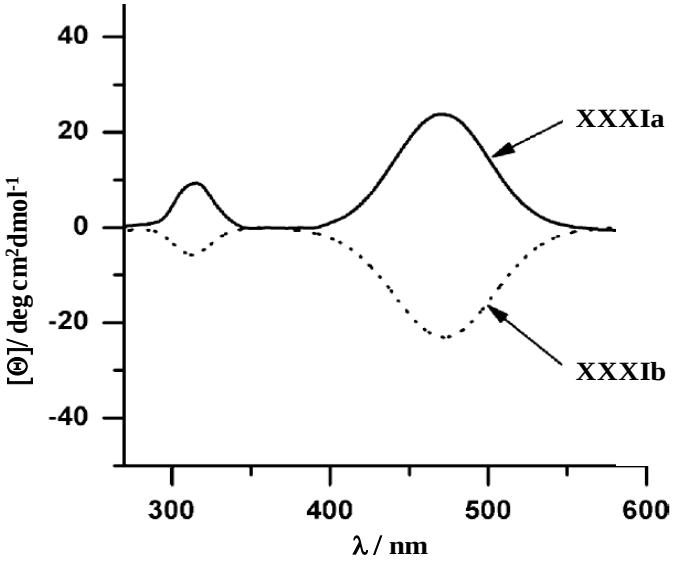
Za razliku od brojnih konjugata izvedenih kopulacijom Fcd (**VIII**) i Fca (**IX**) s prirodnim aminokiselinama opisanih u više od 25 publikacija, do sada su poznata samo dva konjugata (**XXXIa** i **XXXIb**) izvedena iz Fcda (**X**).

Fcda [ferocen-1,1'-diamin, (**X**)] Kraatz i suradnici sintetizirali su iz 1,1'-di(*tert*-butoksikarbonilamino)ferocena (**XVII**) (dobivenog iz Fcd azidnim postupkom, uz popratnu pregradnju azida s *t*-BuOH) (shema 1).[50] Kopulacijom Fcda (**X**) s L- odn- D-Ala pripravljena su dva enantiomerna derivata Fn-(NH-Ala-Boc)$_2$ (**XXXIa**) i Fn-(NH-D-Ala-Boc)$_2$ (**XXXIb**). U čvrstom stanju ti konjugati tvore C_2-simetrične strukture pri čemu interlančane vodikove veze zatvaraju dva 10-člana $NH_{Fn}\cdots OC_{Boc}$ IHB-prstena inducirajući tvorbu β-okreta (slika 28).



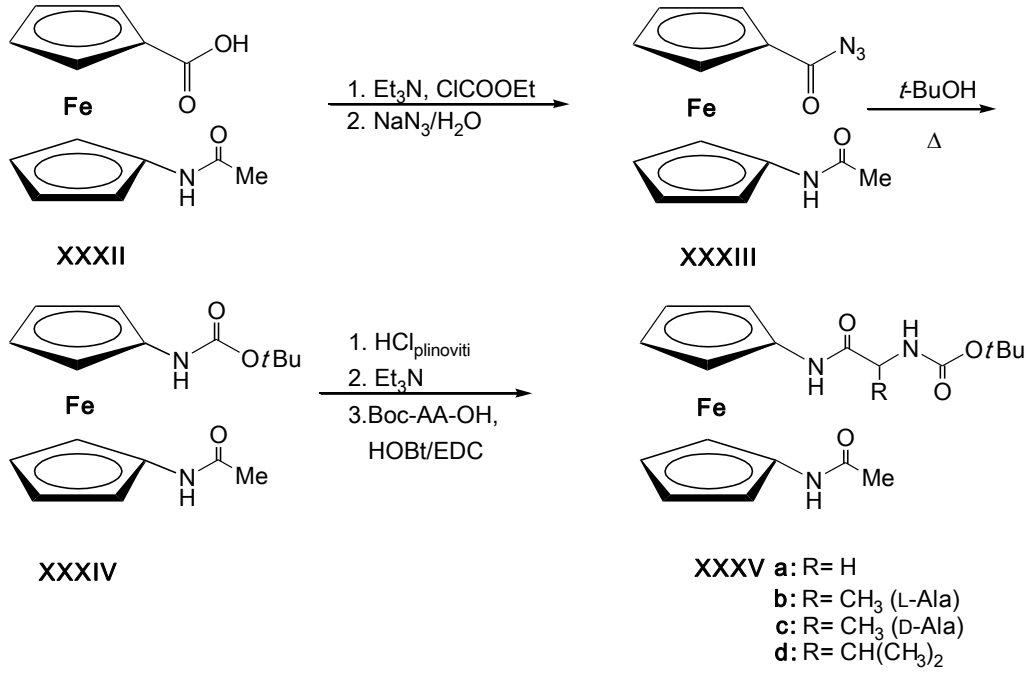
Slika 28. Shematski prikaz IHB i ORTEP-dijagrami enantiomernih dipeptidâ Fn-(NH-Ala-Boc)$_2$ (**XXXIa**, *lijevo*) i Fn-(NH-D-Ala-Boc)$_2$ (**XXXIb**, *desno*)

Primjenom IR-, CD- i NMR-spektroskopije jednak je motiv nađen i u otopini pri čemu IHB koje uključuju L-Ala podržavaju (*P*)-heličnost, dok one u kojima sudjeluje D-Ala induciraju (*M*)-heličnost ferocena što rezultira pozitivnim odn. negativnim Cottonovim efektom u njihovim CD-spektrima (slika 29).



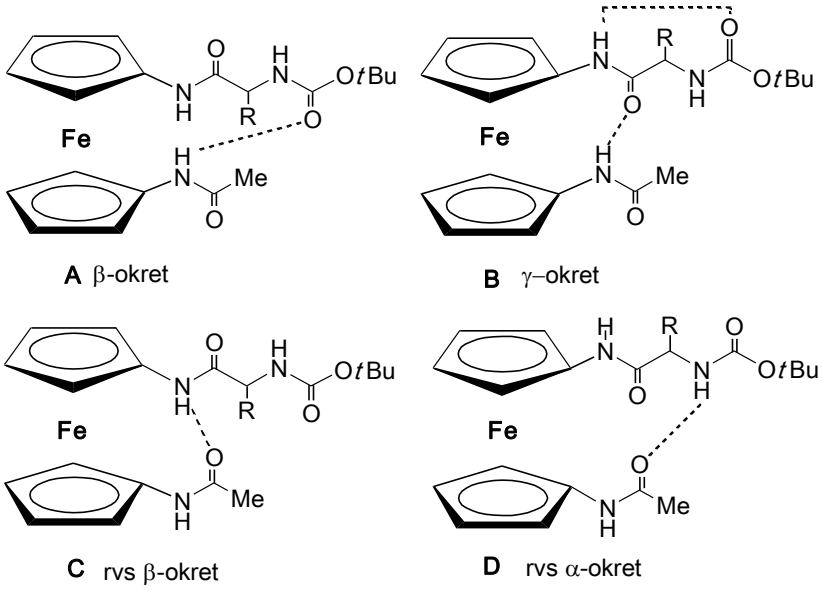
Slika 29. CD-spektri konformacijskih enantiomera **XXXIa** i **XXXIb**

U našem Laboratoriju provedena je ″desimetrizacija″ ferocenskih peptida **III** pričemu su iz Ac-NH-Fn-COOH (**XXXII**)[51] ranije opisanim azidnim postupkom (*v.* 2.3.; shema 1) pripravljeni asimetrični konjugati Boc-AA-NH-Fn-NH-Ac (**XXXVa-d**, AA = L-Ala, D-Ala, Val, Gly) (shema 2). Poznato je da u simetrično supstituiranim ferocenskim biokonjugatima dolazi do formiranja simultanih IHB između podandnih peptidnih lanaca.[19,50]



Shema 2. Priprava desimetriziranih peptida **III** [Boc-AA-NH-Fn-NH-Ac (**XXXVa-d**)]

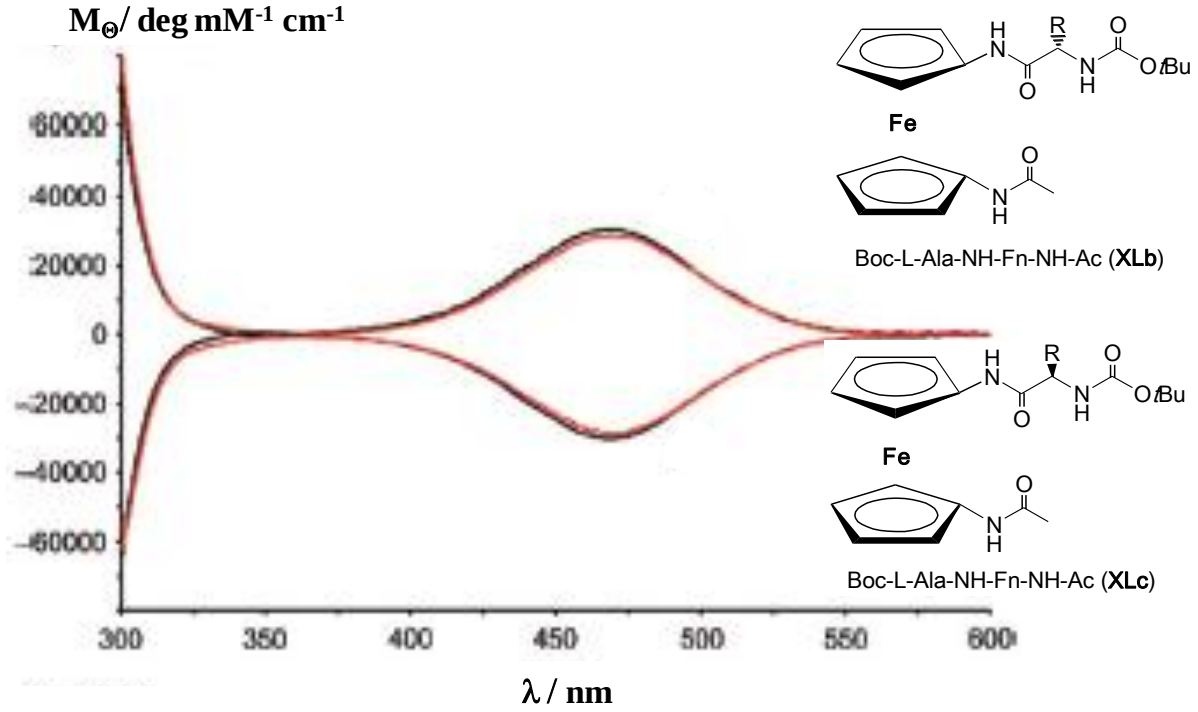
Asimetrične varijante ferocenskih konjugata **XXXVa-d** izvedenih iz Fcda, u kojima je samo jedan ciklopentadienilni prsten konjugiran s jednim aminokiselinskim ostatkom **XXXVa-d**, u otopini poprimaju više različitih konformacija temeljenih na IHB (slika 30).[26,45]



Slika 30. Hipotetske konformacije **A-D** peptida Boc-AA-NH-Fn-NH-Ac (**XXXVa-d**) u otopini

Pri tome je utvrđeno da na obrazac IHB, u kojima sudjeluju NH-skupine izravno vezane na ferocen, bočni ogranak prirodne aminokiseline nema utjecaja (slika 30).

Nadalje, prema suprotnim predznacima Cottonovih efekata proizlazi da L- odn. D-Ala induciraju (*P*)- odn. (*M*)-heličnost u pripadajućim peptidima **XXXVb** i **XXXVc** (slika 31).

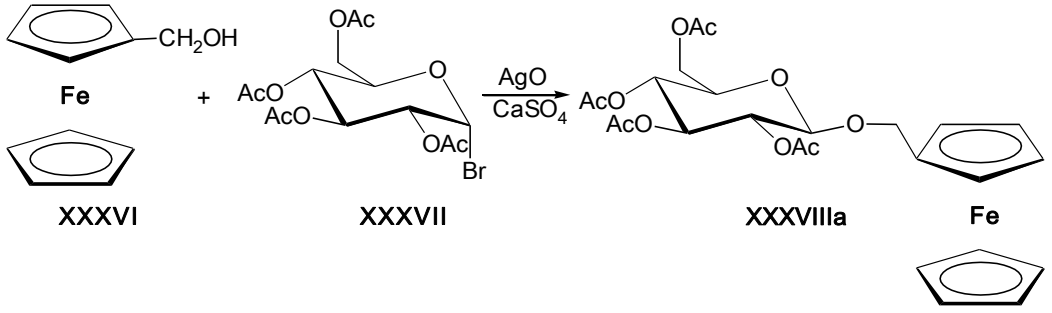


Slika 31. CD-spektri konformacijskih enantiomera Boc-L-Ala-NH-Fn-NH-Ac (**XXXVb**) i Boc-D-Ala-NH-Fn-NH-Ac (**XXXVc**)

2.4. FEROCENSKI KONJUGATI S UGLJIKOHIDRATIMA

S obzirom na relativno mali broj objavljenih publikacija, ferocenski konjugati s ugljikohidratima predstavljaju nedovoljno istraženo područje bioorganometalne kemije ferocenâ.

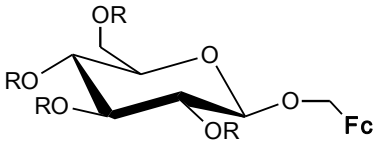
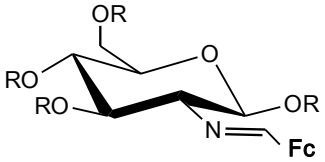
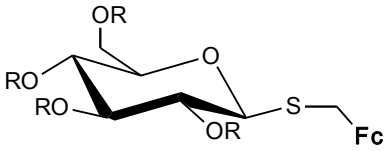
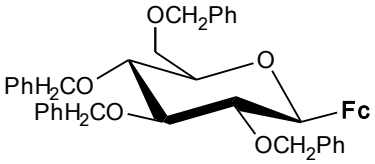
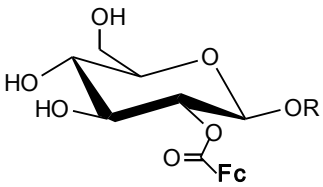
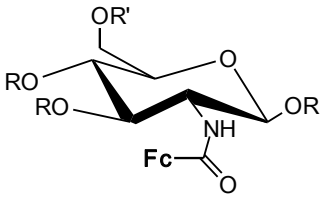
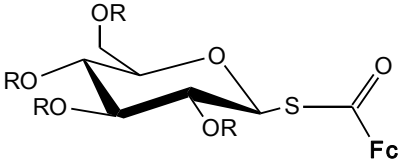
Deset godina nakon otkrića ferocena objavljena je sinteza njegovog prvog šećernog derivata (shema 3): Königs-Knorrovom reakcijom ferocenil-metanola (**XXXVI**) s 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-*α*-D-glukopiranozilbromidom (**XXXVII**) u prisutnosti AgO i $CaSO_4$ dobiven je ferocenil-metil-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-*β*-D-glukopiranozid (**XXXVIIIa**) uz nešto diferocenil-metil-etera.[52]

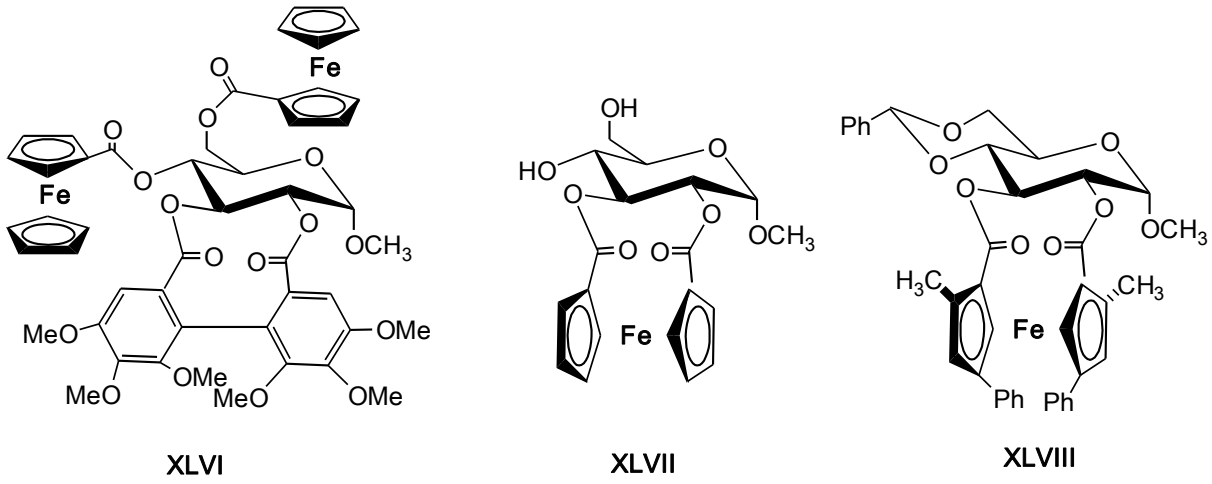


Shema 3. Sinteza ferocenil-metil-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-glukopiranozida (**XXXVIIIa**)

Uz samo nekoliko iznimaka, glavninu do danas opisanih ferocenskih konjugata s ugljikohidratima čine esterski, tioesterski ili amidni derivati ferocen(di)karboksilne kiseline. U tablici 2.[53] prikazan je skraćeni pregled monosupstituiranih ferocenskih derivata s ugljikohidratima primijenjenih u enantioselektivnim katalizama,[54,55] pri istraživanju kinetike hidrolize glikozidne veze[56] te u medicini.[57-59] U istoj reviji obrađeni su i derivati izvedeni iz Fcd (**VIII**) i različitih ugljikohidrata koji su pokazali izrazitu antimalarijsku (**XLVI**)[59,60] i citotoksičnu aktivnost (**XLVII**),[61] ili su korišteni kao pomoćna kiralna sredstva (**XLVIII**) za dobivanje optički čistih spojeva (slika 32).[62]

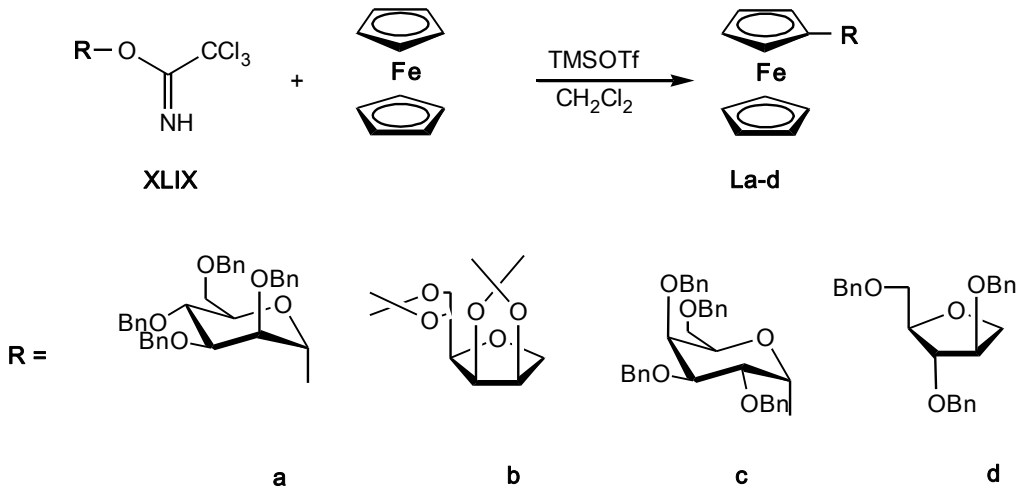
Tablica 2. Ferocenski konjugati s ugljikohidratima[53]

KLASIFIKACIJA	STRUKTURA		ŠEĆER
O-alkilirani		**XXXVIIIa**: R = Ac **XXXVIIIb**: R= H	*ß*-D-glukopiranoza
N-alkilirani		**XXXIXa**: R = Ac **XXXIXb**: R= H	*ß*-D-glukozamid
S-alkilirani		**XLa**: R = Ac **XLb**: R = H	*ß*-D-tioglukopiranoza
anomerno C-supstiturani		**XLI**	deoksi-*ß*-D-glukopiranoza
esteri		**XLII**	*ß*-D-glukopiranoza
amidi		**XLIIIa**: R = R' = Ac **XLIIIb**: R = R' = H **XLIV**: R = H, R' = PO_3H	*ß*-D-glukozamid
tioesteri		**XLVa**: R = Ac **XLVb**: R= H	*ß*-D-tioglukopiranoza



Slika 32. Biološki aktivni konjugati ferocena i ugljikohidrata (**XLVI**-**XLVIII**)

Primjer anomerno supstituiranih ferocenskih šećera su i spojevi **La**–**d** pripravljeni Friedel-Craftsovom reakcijom ferocena s različitim derivatima trikloracetimidatâ **XLIX** u prisustvu TMSOTf kao katalizatora (shema 4).[63] Pripravljenim spojevima testirana je antimikrobna aktivnost na sojevima bakterija *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, kvasca *Candida albicans* te plijesni *Aspergillus niger* i *Fusarium solani*, pri čemu su pokazali srednju do dobru antimikrobnu aktivnost.

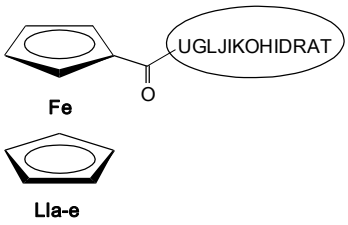
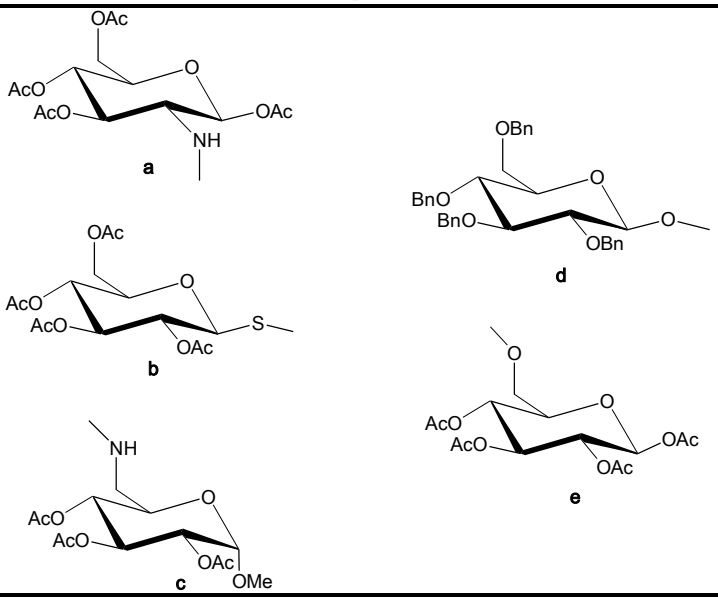
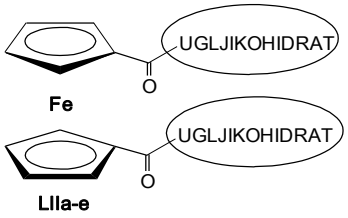


Shema 4. Konjugati ferocena s različitim ugljikohidratima **La-d**

Ferreira i suradnici pripravili su deset različitih konjugata ferocenâ s ugljikohidratima povezujući amidnom ili tioesterskom spojnicom derivate glukoze s mono- (**LIa-e**) i disupstituiranim ferocenima (**LIIa-e**) (tablica 3). Među ispitanim konjugatima disupstituirani

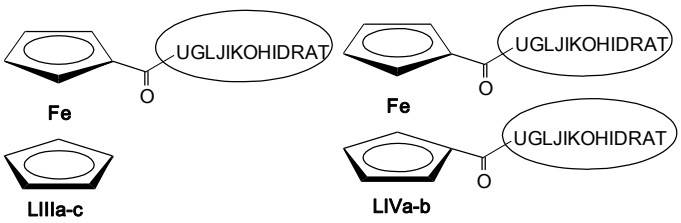
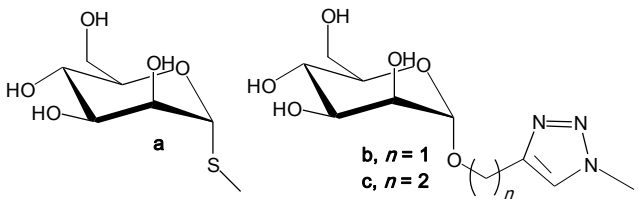
derivati **LIIb** i **LIIe** s Ac-zaštićenim OH-skupinama iz glukoze pokazali su osrednju antimalarijsku aktivnost *in vitro*. Preostali konjugati nisu ostvarili citotoksičnu aktivnost na staničnim linijama raka dojke HTB129 čak niti pri visokim koncentracijama.[64]

Tablica 3. Mono (**LIa-e**) i disupstituirani (**LIIa-e**) konjugati ferocena i glukoze

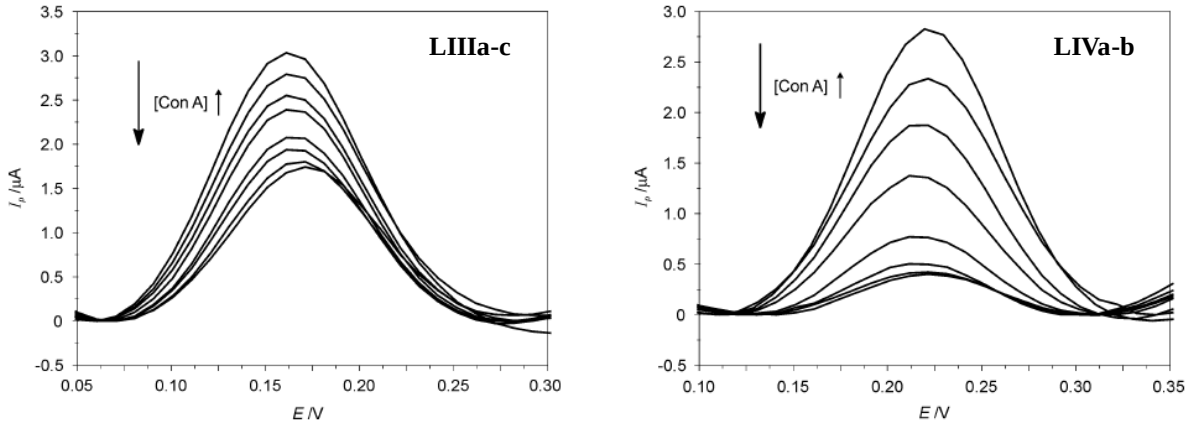
Ferocenski konjugati s derivatima glukoze	UGLJIKOHIDRAT
	
	

Casas-Solvas i suradnici pripravili su niz elektroaktivnih glikokonjugata mono- (**LIIIa-c**) i disupstituiranih (**LIVa-b**) ferocena i manoze kojima je elektrokemijskim mjerenjima testiran afinitet za vezivanje na lektin konkanavalin A (Con A) kao prvi izolirani lektin koji specifično veže manozu (tablica 4).[65]

Tablica 4. Mono (**LIIIa-c**) i disupstituirani (**LIVa-b**) konjugati ferocena i manoze

Ferocenski konjugati s derivatima manoze	UGLJIKOHIDRAT
	

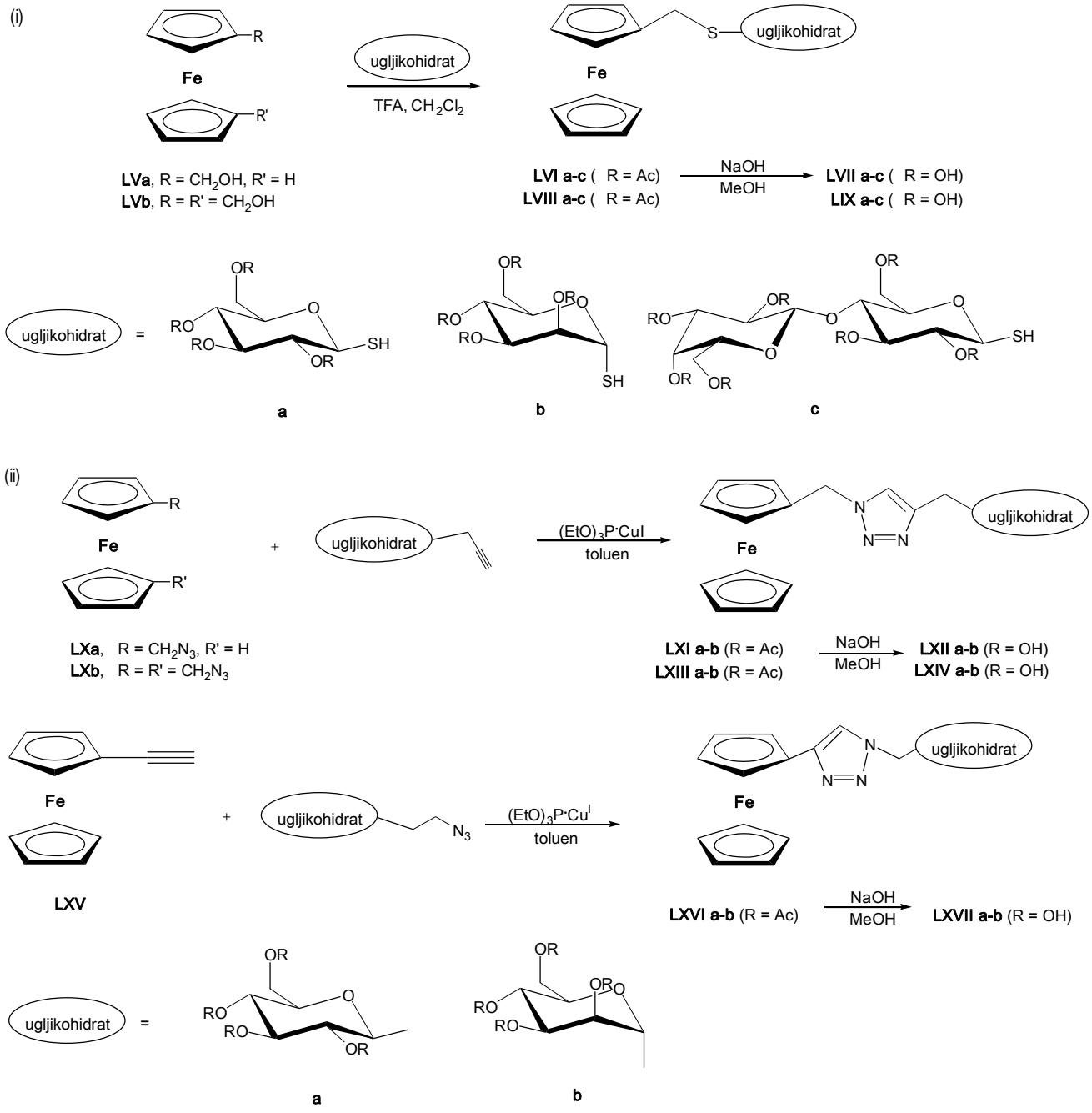
Sukladno činjenici da arilni α-D-manopiranozidi tvore stabilniji kompleks s Con A u usporedbi sa standardnim metil-α-D-manopiranozidom,[66,67] autori su utvrdili do dva puta jače vezanje mono- (**LIIIa-c**) odn. 33 puta jače vezanje disupstituiranih aromatskih ferocenskih konjugata (**LIVa-b**). Naime, kompleksiranjem ferocen-manozidnih konjugata s Con A dolazi do ujednačenog smanjenja intenziteta signala u voltamogramu, a koji je proporcionalan povećanju koncentracije Con A (slika 33). Monosupstituirani derivati **LIIIa-c** tvore manje stabilne komplekse s lektinom Con A u usporedbi s disupstituiranim konjugatima **LIVa-b** što se pripisuje veličini molekule, odnosno manjem broju dostupnih mjesta za vezanje lektina u monosupstituiranim derivatima.



Slika 33. Krivulje voltamograma mono- (**LIIIa-c**, *lijevo*) i disupstituiranih konjugata (**LIVa-b**, *desno*) u ovisnosti o koncentraciji Con A

K-Vrijednosti (konstante vezanja liganda) dobivene dvjema različitim metodama (kalorimetrijskim i voltametrijskim mjerenjima) pokazali su slične vrijednosti. Zaključno, autori smatraju da opisani konjugati ferocena s manozom mogu poslužiti kao elektrokemijski senzori za detekciju Con A.

U nastavku svojih istraživanja isti su autori dvjema različitim metodama pripravili i elektrokemijski istražili više različitih konjugata mono- i disupstituiranih ferocenâ s glukozom, manozom i laktozom. Prva metoda *(i)* uključuje reakciju tioglikozida s ferocenil-metanolom ili diferocenil-metanolom u kiselim uvjetima. U drugoj metodi *(ii)* provedena je regiospecifična cikloadicija propargil-glikozida ili azido-*O*-glikozida s azidnim derivatima ferocena ili 1-etinilferocena katalizirana Cu^{I} (shema 5).[68]



Shema 5. Sinteza konjugata ferocena s ugljikohidratima (**LX-LXVII**)

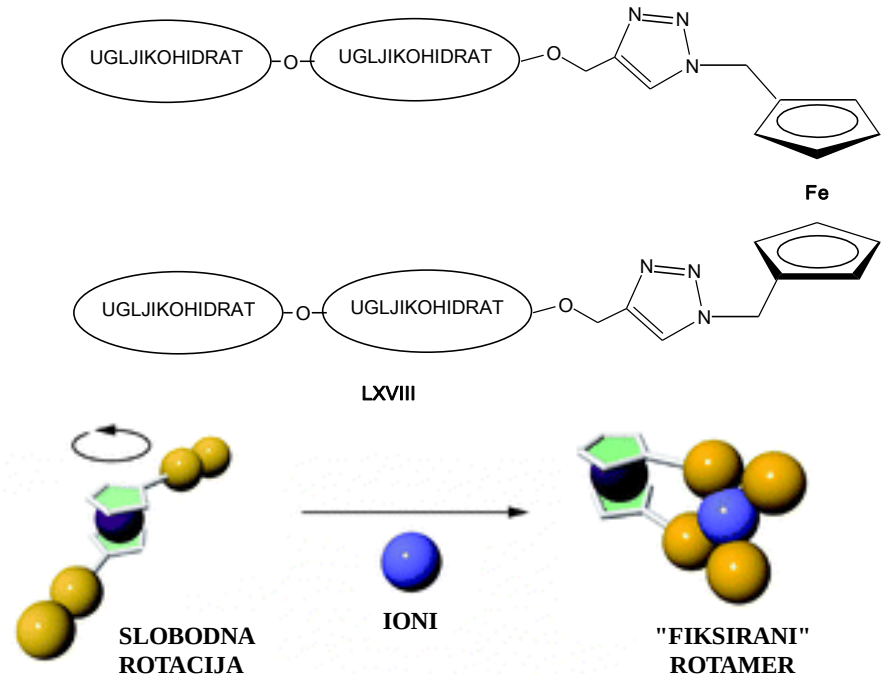
Vezivanje ferocenskih konjugata **LX-LXVII** s β-ciklodekstrinom praćeno je NMR-spektroskopijom (ROESY) te različitim kalorimetrijskim i elektrokemijskim metodama (redoks-potencijal, koeficijent difuzije, ΔH, ΔS i K-vrijednosti):

- u dobivenim konjugatima ostvaruje se reverzibilna oksidacija i redukcija ferocenske jezgre,

- redoks potencijali ovisni su o kemijskoj prirodi spojnice između ferocena i ugljikohidrata te o broju supstituenata,
- svi ferocenski konjugati s ugljikohidratima tvore stabilne komplekse s β-ciklodekstrinom,
- ferocenska jedinica je unutar ciklodekstrinske šupljine ekvatorijalno orijentirana ukoliko je ferocen disupstituiran, odnosno može biti aksijalno ili ekvatorijalno orijentirana u slučaju monosupstituiranih konjugata (ovisno o supstituentu),
- iako je entalpija kompleksiranja s ciklodekstrinom uglavnom određena ferocenskom jedinicom, ugljikohidratni fragment može utjecati na termodinamiku vezanja.

Zaključno, autori smatraju da se glikokonjugati s ferocenom mogu upotrijebiti kao redoks-sonde za elektrokemijsko praćenje vezanja ferocenskih liganada na biološke receptore.

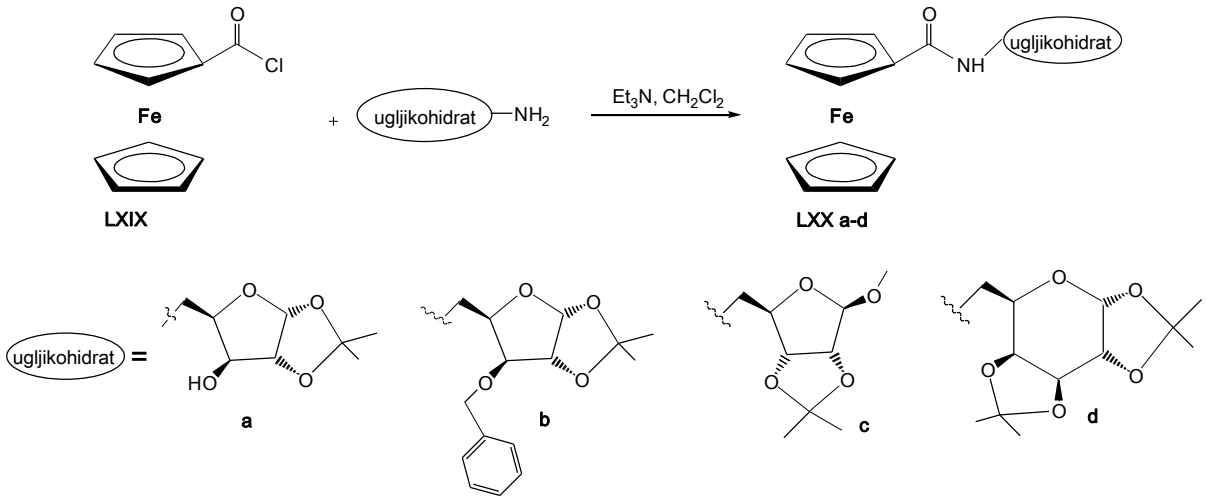
Nadalje, proučavane su i specifične ugljikohidrat-ugljikohidrat interakcije [CCI, (engl. *Carbohydrate*-C*arbohydrate Interaction*)] koje imaju važnu ulogu u brojnim biološkim procesima.[69] Za izučavanje takvih interakcija upotrijebljavaju su disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati ferocena s vezanim molekulama manoze odnosno laktoze (**LXVIII**) (slika 34, *gore*).



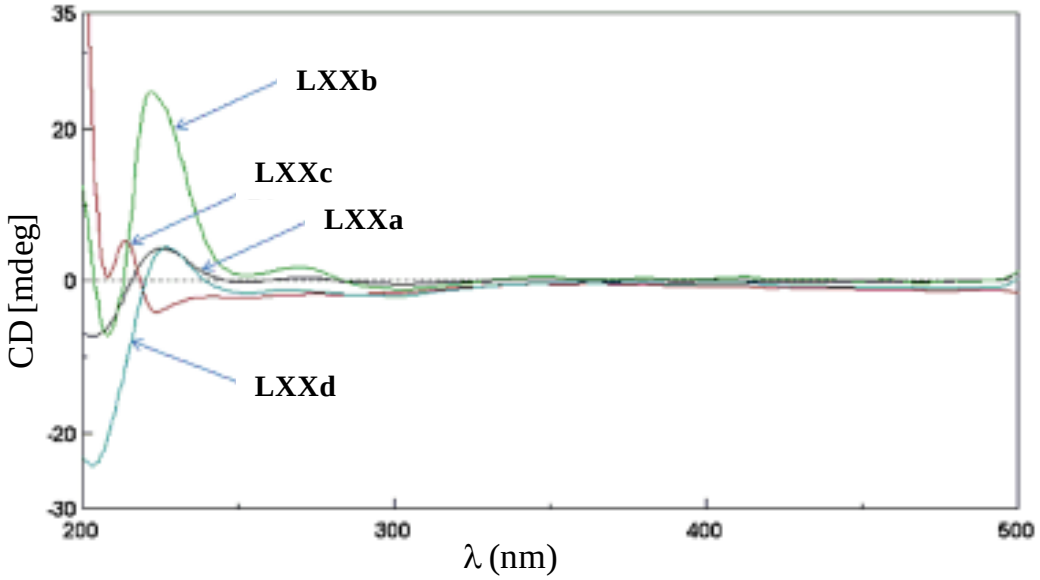
Slika 34. Disupstituirani 1,2,3-triazolni derivat ferocena i ugljikohidrata (*gore*); ugljikohidrat-ugljikohidrat interakcije (*dolje*)

Uz pretpostavku da između ugljikohidratnih molekula nema adhezivnih interakcija omogućena je slobodna rotacija ciklopentadienilnih prstenova oko Cp-Fe-Cp osi. Međutim, ako između ugljikohidratnih molekula postoje adhezivne ugljikohidrat-ugljikohidrat interakcije, u CD-spektrima će se opaziti promjena signala kao posljedica stabilizacije sustava ovakvim načinom pakiranja. Konformacijskom analizom potvrđeno je da specifični ioni (Ca^{2+} i Na^{+}) induciraju intramolekulske βLac-βLac interakcije unutar glikoziliranih ferocenskih konjugata čime fiksiraju molekulu u konformaciji lijeve uzvojnice te kao takvi predstavljaju dobre modele za razmatranje slabo istraženih CCI (slika 34, *dolje*).

Trivedi i suradnici pripravili su seriju ferocenskih konjugata s ksilozom (**LXXa,b**), ribozom (**LXXc**) i galaktozom (**LXXd**) (shema 6). Elektrokemijska i optička svojstva izvedenih konjugata ispitana su cikličkom voltametrijom te apsorpcijskom spektroskopijom. UV- i elektrokemijskim analizama dokazana je njihova stabilnost u vodenom mediju pri fiziološkim uvjetima (pH 7,4) što ih čini pogodnim za biološke testove. Izostanak CD-aktivnosti u području ferocenskog kromofora (λ~ 480 nm) tumači se nerealiziranim kiralnim uređenjem ferocenske podjedinice (slika 35).[70]



Shema 6. Priprava ferocenskih konjugata s ugljikohidratima **LXXa-d**



Slika 35. CD-spektri konjugata **LXXa-d**

Opisani konjugati pokazali su visoku citotoksičnost na pet različitih tumorskih linija. Testirana je i njihova antimikrobna aktivnost na različite patogene Gram-negativne i Gram-pozitivne vrste (*Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus, Klebsiella planticola, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*). Derivati koji sadrže zaštitne skupine (benzilne ili metilne) pokazali su puno bolju antibakterijsku aktivnost od deprotektiranih analoga. Svi konjugati također pokazuju dobru antioksidacijsku aktivnost.

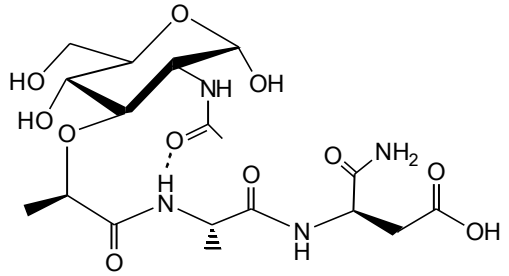
2.4.1. Struktura i svojstva *N*-acetil-muramil-L-alanil-D-izoglutamina [MurNAc-L-Ala-D-iGln, muramildipeptid (MDP)]

Kako je jedan dio ove disertacije posvećen ferocenskim analozima muramildipeptida (MDP), u ovom dijelu *Literaturnog pregleda* opisat ćemo strukturu i svojstva MDP, kao i njegove strukturne modifikacije provedene s ciljem unapređenja bioloških svojstava.

Peptidoglikan (PGN), sastavni dio stanične stijenke gotovo svih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, sastavljen je od mreže glikanskih lanaca i oligopeptida. Glikanski su lanci izgrađeni iz alternirajućih podjedinica *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i *N*-acetilmuraminske kiseline (MurNAc) kopulirane s prirodnim aminokiselinama.[71-73] Tijekom rasta bakterije, kao i tijekom antibiotskog tretmana, dolazi do enzimske hidrolize PGN na muramilpeptide koji sadrže najmanje po jednu MurNAc i prirodnu aminokiselinu. *In vitro* i *in*

vivo testovi pokazali su jak utjecaj muramilpeptida na imunosustav – djeluju kao imunoadjúvansi (*adiuvare*, lat. pripomoći) što znači da stimuliraju stanični odgovor na infekciju.[74-77] Komponente bakterijske stanične stijenke (proteoglikani, lipopolisaharidi, lipoproteini i peptidoglikani) ostvaruju jaku imunostimulativnu aktivnost. Među njima, muramilpeptidi spadaju u grupu najjačih, dobro poznatih adjúvansa i imunostimulatora te se kao takvi koriste u terapeutske svrhe.[78] Muramilpeptidi, bakterijski razgradni produkti, induciraju imunološki odgovor pri čemu glavnu ulogu u obrambenoj aktivnosti protiv mikroorganizama igraju makrofagi. Njihova aktivacija pomoću muramilpeptida rezultira (*i*) povećanom produkcijom kisikovih radikala (superoksida i peroksida) koji uništavaju mikrobe te (*ii*) stimulacijom lučenja inflamatornih citokina.[79,80]

Od 1974. kada je otkriveno da je *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin (**LXXI**) [MurNAc-L-Ala-D-iGln, muramildipeptid (MDP)] (slika 36) minimalna strukturna jedinica odgovorna za imunoadjuvantsku aktivnost Freundovog adjuvansa (emulzija inaktiviranih *Mycobacterium tuberculosis* u mineralnom ulju),[81,82] provode se brojna istraživanja u cilju izolacije, sinteze te utvrđivanja mehanizma djelovanja kako muramildipeptida, tako i drugih muramilpeptida.[83]



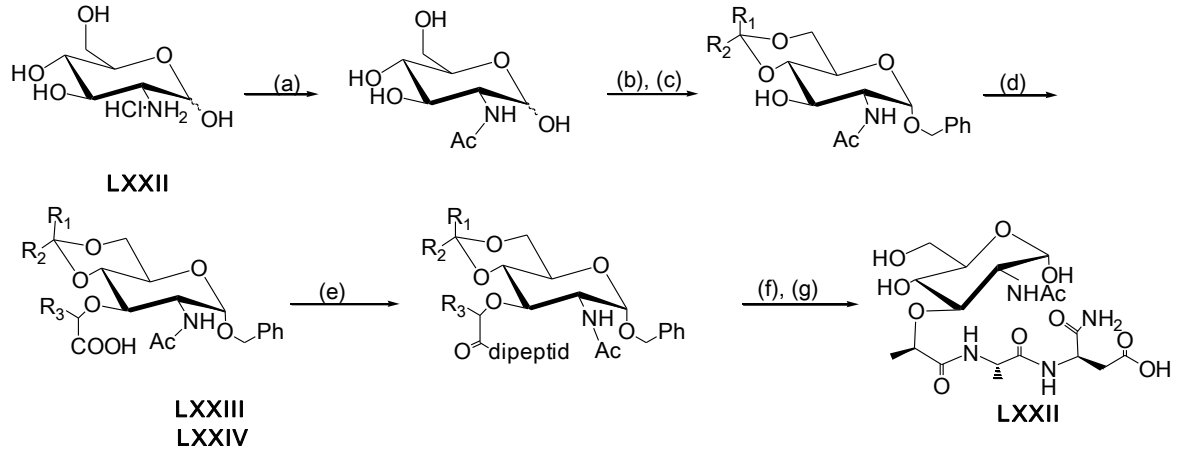
LXXI

Slika 36. β-Okret u MDP **LXXI**

U svrhu što bolje karakterizacije imunostimulacijskog efekta i adjuvantske aktivnosti pripravljen je veliki broj derivata muramilpeptida koji su podvrgnuti istraživanju odnosa strukture i biološke aktivnosti [SAR, (engl. *Structural-Activity Relationship)*]. Pri tome se pokazalo da na biološku aktivnost modificiranih derivata i analoga veliki utjecaj ima njihova kemijska struktura i stereokemija.[71,78,84] Konformacijska analiza MDP primjenom ^{1}H NMR-spektroskopije i molekulskog modeliranja potvrdila je tvorbu 10-članog β-okreta ($CO_{MurNAc}\cdots NH_{Ala}$ IHB) (slika 36). Alternativni β-okret koji bi bio rezultat $CO_{Lac}\cdots NH_{iGln}$IHB

nije potvrđen.[85,86] U cilju njegove indukcije, D-iGln zamijenjen je rigidnim prolinom čime je inducirana tvorba S-oblikovane strukture nalik β-okretu u rezultirajućem *N*-acetilmuramil-L-alanil-3-karbometoksimetil-D-prolinu (MAP).[86]

Sinteza većih fragmenata bakterijske stanične stijenke (koji se oslobađaju enzimskom hidrolizom peptidoglikana) zahtjevan je proces. Muramildipeptid moguće je pripraviti jednostavnom kemijskom sintezom, primjenom Jeanloz/Flowersova postupka[87] iz D-glukozaminhidroklorida **LXXII** koji se nakon protekcije reaktivnih NH_2- i OH-skupina i reakcije s D, L-α-klorpropionskom kiselinom prevodi u dijastereomernu smjesu muraminske **LXXIII** i izomuraminske kiseline **LXXIV** (shema 7). *O*-zaštićena muraminska kiselina **LXXIII** kopulacijom s prirodnim dipeptidom L-Ala-D-iGln uz deprotekciju OH-skupina pretvara se u MurNAc-L-Ala-D-iGln (MDP, **LXXI)** (shema 7). (*S*)-Izomer muraminske kiseline **LXXIV** na isti način daje izoMurNAc-L-Ala-D-iGln (izoMDP, **LXXV**) čija je adjuvantska aktivnost značajno smanjena u odnosu na MDP.[84]



(a) anhidrid octene kiseline, NaH; (b) fenilmetanol, H^+; (c) PhCHO, H^+ ili 2,2-dimetoksipropan,H^+; (d) NaH, D,L-α-klorpropionska kiselina (kloroctena kiselina, klorbutanska ili mliječna kiselina; (e) ester dipeptida i EEDQ ili DCC, HOBt ili Woodwardov reagens K ili izobutil-klorkarbonat; (f) octena kiselina (aq.); (g) H_2/Pd, H^+;
R_1, R_2 = CH_3 ili R_1 = H, R_2 = C_6H_5; R_3 = H, CH_3, C_2H_5; dipeptid = L-Ala-D-izoGln

Shema 7. Sinteza muramildipeptida **LXXII** (MDP)

Muraminska kiselina, konstituent bakterijske stanične stijenke, može poslužiti kao biomarker za detekciju bakterijskih fragmenata u okolišu.[83] Činjenica da u ljudskom organizmu ne postoje enzimi koji bi mogli hidrolizirati muramildipeptid do muraminske kiseline, učinila je MurNAc pogodnim markerom za detekciju komponentâ bakterijskih

staničnih stijenki u tkivima i tjelesnim tekućinama, te za proučavanje njihova metabolizma i izlučivanja.[88] Prvi dokaz muropeptida u humanom tkivu povezan je s otkrićem faktora S (faktor odgovoran za spavanje).[89,90] Naime, kod bolesnika s poremećajem spavanja pronađene su male količine muraminske kiseline u mozgu, jetri i bubrezima.[91,92] Također, povećane koncentracije muraminske kiseline pronađene su kod pacijenata s urinarnim infekcijama te u cerebrospinalnoj tekućini pacijenata oboljelih od pneumokoknog meningitisa.[93,94]

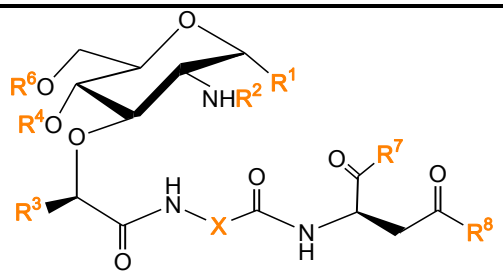
2.4.1.1. Analozi i derivati MDP i njihova biološka aktivnost

Opisani su brojni derivati i analozi MDP kojima se nastojalo poboljšati aktivnosti i selektivnosti, a smanjiti nuspojave kao što su povišena temperatura, indukcija autoimune reakcije i upalne reakcije.[78] Kako je već spomenuto, imunomodulacijska aktivnost MDP temelji se uglavnom na stimulaciji makrofaga te T i B limfocita, pri čemu se polimerni peptidoglikani vežu na Toll-like receptore (TLR),[95,96] a manji fragmenti na tzv. NOD (engl. *Nucleotide-binding oligomers domain*) proteine.[97,98] Sekvencija koju specifično prepoznaje NOD1 receptor je L-Ala-D-iGln-*meso*diaminopimelinska kiselina, dok NOD2 receptor prepoznaje MurNAc-L-Ala-D-iGln što govori da male promjene primarne strukture PGN utječu na to koji će se receptor aktivirati tijekom imunoreakcije.[71] Dokazano je da male izmjene primarne strukture, npr. kemijske modifikacije glukopiranoznog prstena i/ili peptidnog lanca utječu na konformaciju, a samim time i na biološka svojstva i aktivnost derivata i analoga MDP. U tablici 5. prikazan je utjecaj kemijske strukture na biološku aktivnost MDP.[78]

Objedinjavanjem rezultatâ proisteklih iz SAR-studije analoga MDP došlo se do zaključka da je konfiguracija aminokiselinskih kiralnih centara (*S*-konfiguracija prve aminokiseline i *R*-konfiguracija *C*-terminalne aminokiseline) ključna za imunomodulacijsku aktivnost izvedenih peptida, dok *N*-acetil-D-glukozaminski ostatak vezan na dipeptidnu podjedinicu nema esencijalnu ulogu.[99-101]

S obzirom da se pokazalo da šećerni dio molekule MDP nije ključan za njegovu imunostimulacijsku aktivnost,[101] zamjena glukozaminskog fragmenta s različitim acilnim i karbocikličkim skupinama kao i adamantilnim derivatima čini važan pristup u dizajnu i sintezi novih imunoaktivnih derivata – demuramildipeptida.

Tablica 5. Ovisnost biološke aktivnosti derivata MDP o njihovoj kemijskoj strukturi [78]

Skupina		Aktivnost*				
		A	T	B	V	P
R^1	α- ili β-*O*-alkil (tj. Me, Bn)	+-				+
	β-SH, β-S-acil	+				
	α- ili β-*O*-acil	+		+		
	glukozamin	+		+		
R^2	H, acil (MDP)	+				
R^3	H (nor-MDP), CH_3, C_2H_5, C_4H_9	+				-
	$=CH_2$,$=C_3H_7$, $=CHC_6H_5$	+				
R^4	glukozamin	+	+			
	acil	+	+		+	
R^6	*O*-acil *(*tj. mikolinska kiselina, masne kiseline, kinolinska grupa)	+	+	+		
	NH_2, *N*-acil	+		+		
	S-acil	-				
X	L-aminokiselina (tj. Ala, Ser, Val, Thr)	+ imuno-supresiv				+-
	D-aminokiselina (tj. Ala)					
R^7	alkoksil	+			+	-
	aminoalkil	-				
	α-aminokiselinski ostatak	-				
	α-amino acil-amidni ostatak	+				
R^8	alkoksil	+	+			
	aminoalkil	-				
	acilirani lipofilni ostatak	+	+	+	+	-

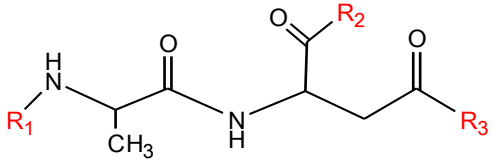
*A-adjuvantska aktivnost, T- antikancerogena aktivnost, B- antibakterijska aktivnost, V- antivirusna aktivnost, P- pirogena aktivnost.

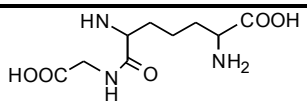
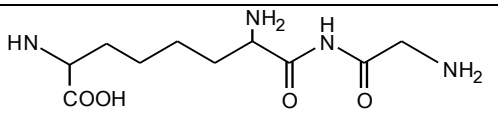
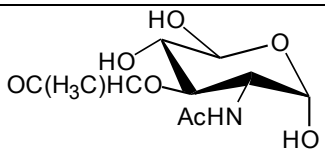
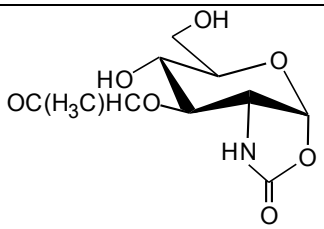
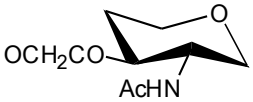
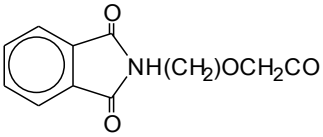
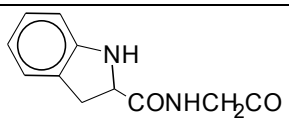
U tablici 6.[102] prikazano je nekoliko takvih derivata kao što su FK-156 **LXXVI**,[103] pimelautid **LXXVII**,[104] 7-(oksoacil)-L-alanil-D-izoglutamin **LXXVIII**,[105] te karbociklički analozi **LXXIX**, **LXXX** i **LXXXI** u kojima je zamijenjen šećerni piranozni prsten lipofilnijim cikloheksanskim prstenom.[106-108]

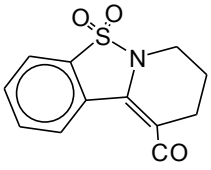
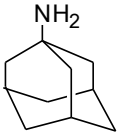
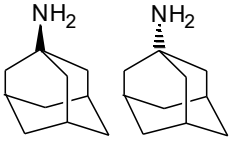
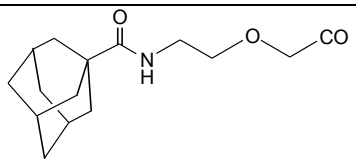
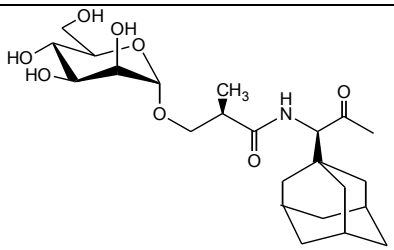
Među demuramilnim analozima posebno se ističu ftalimido-demuramil-dipeptid **LXXXII**[109] te indolni **LXXXIII** i pirido-(1,2)-benzoizotiazolni derivat **LXXXIV**.[110] Osim imunološke aktivnosti, spoj **LXXXII** potiče stvaranje faktora nekroze tumora.[111]

Adamantilamid-dipeptid **LXXXV** pokazao se iznimno učinkovitim analogom, jer je tijekom ispitivanja *in vivo* u miševima i kunićima prouzročio pojačani humoralni odgovor na ovalbumin, a ugrađen u liposome djeluje i kao dobar stimulator nespecifične imunosti.[112-114]

Tablica 6. Demuramildipeptidni derivati **LXXVI-LXXXVIII** [102]



	R_1	R_2	R_3
LXXVI	$CH_3CH(CH)C$	OH	
LXXVII	$CH_3(CH_2)_{10}CO$	OH	
LXXVIII	$CH_3(CH_2)_6CO(CH_2)_5CO$	NH_2	OH
LXXIX		NH_2	OH
LXXX		NH_2	OH
LXXXI		OH	OH
LXXXII		OH	OH
LXXXIII		OH	OH

LXXXIV		NH_2	CH_2CH_3
LXXXV	NH_2	NH_2	
LXXXVIa **LXXXVIb**		NH_2	OH
LXXXVII		NH_2	OH
LXXXVIII		NH_2	OH

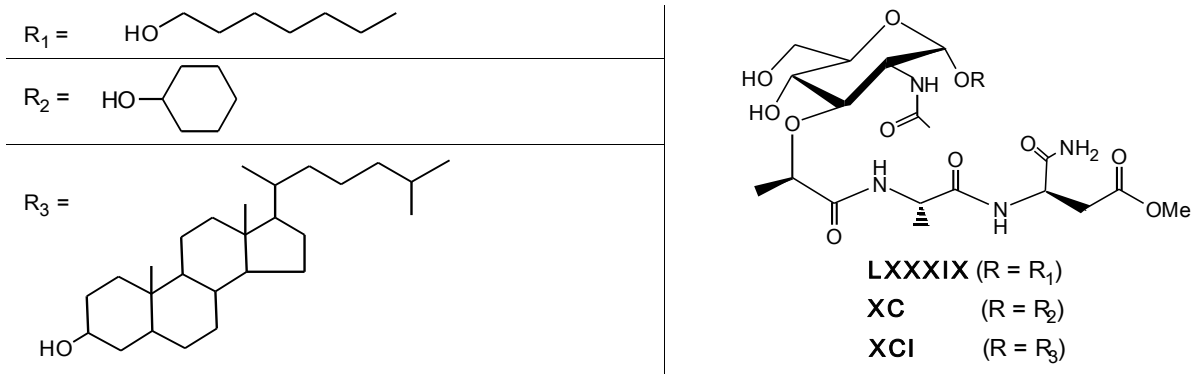
Zamjenom MurNAc adamantanskom jedinicom, odn. vezanjem adamantana [u obliku racemičnog (adamantan-2-il)glicina] na *N*-terminus L-Ala-D-iGln pripravljeni su apirogeni i netoksični dijastereomeri adamantil-tripeptidâ **LXXXVIa,b**. Dijastereomernim analozima ispitan je imunomodulacijski učinak na imunološki odgovor miševa na ovalbumin kao antigen pri čemu se L-L-D dijastereomer pokazao puno boljim imunostimulatorom od D-L-D dijastereomera.[115,116]

Kako je utvrđen utjecaj MDP i nekih njegovih analoga na stvaranje citokina, sintetiziran je i novi adamantil-demuramil-dipeptid LK 415 (**LXXXVII**) s 1-adamantil-karboksamidnom podjedinicom. Učinkovitost u moduliranju stvaranja citokina IL-12, TNFα, IFNγ, IL-4 i IL-10 mjerena je *in vitro* u kulturama humanih perifernih krvnih mononuklearnih stanica (PBMC), koinkubiranih s testiranim analozima, a usporedbom dobivenih rezultata s aktivnošću MDP utvrđeno je da **LXXXVII** regulira sintezu IL-12 i IFNγ.[117]

Modifikacija MDP provedena vezivanjem adamantil-tripeptida koji je učinkoviti imunostimulator na manozu preko spojnice *R*-konfiguracije rezultirala je poboljšanom imunomodulacijskom aktivnošću rezultirajućeg derivata **LXXXVIII**. Navedeni rezultati

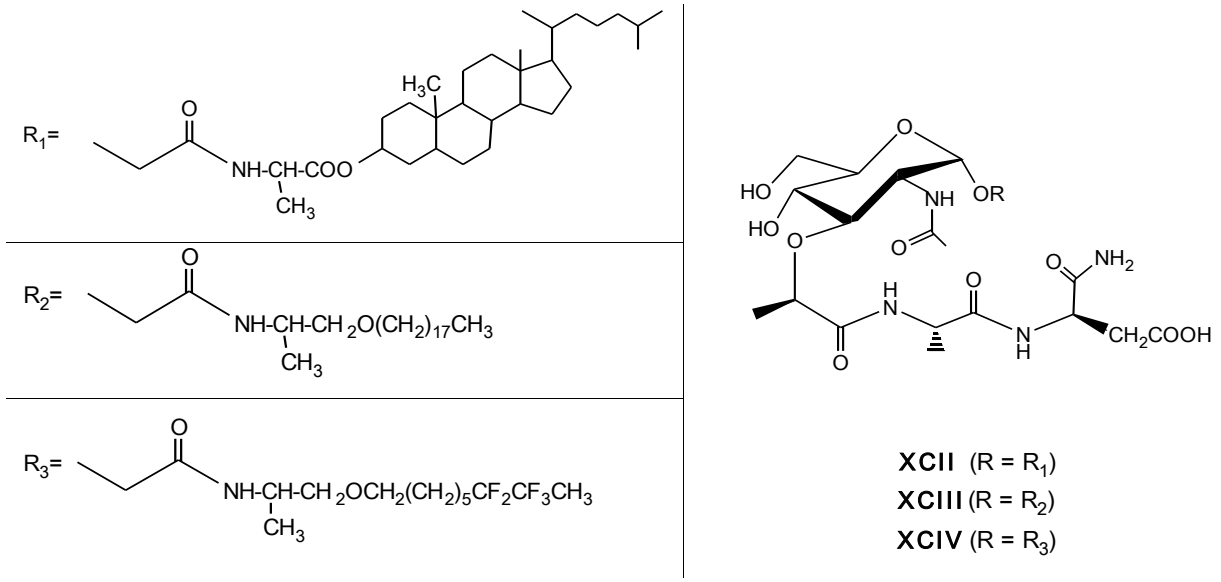
ukazuju da manoza ima važnu ulogu na stimulaciju imunološkog odgovora jer na površini makrofaga postoje receptori za manozu.[118,119]

Nadalje, MDP je modificiran uvođenjem heptanola, cikloheksanola i kolesterola u aglikonski dio rezultirajućih glikozida **LXXXIX-XCI** (slika 37) koji su pokazali visoku imunomodulacijsku aktivnost, ovisno o genetski preodređenoj imunoreaktivnosti testirane životinje i o količini lijeka.[120,121]



Slika 37. Lipofilni analozi MDP **LXXXIX-XCI**

Istraživanja na području MDP nastavljena su sintezom njegovih triju lipofilnih analoga: osapunjivog estera MTP-Chol **XCII** te dvaju neosapunjivih etera, derivata oktadekana i heptadekafluoroktadekana **XCIII** i **XCIV** (slika 38).



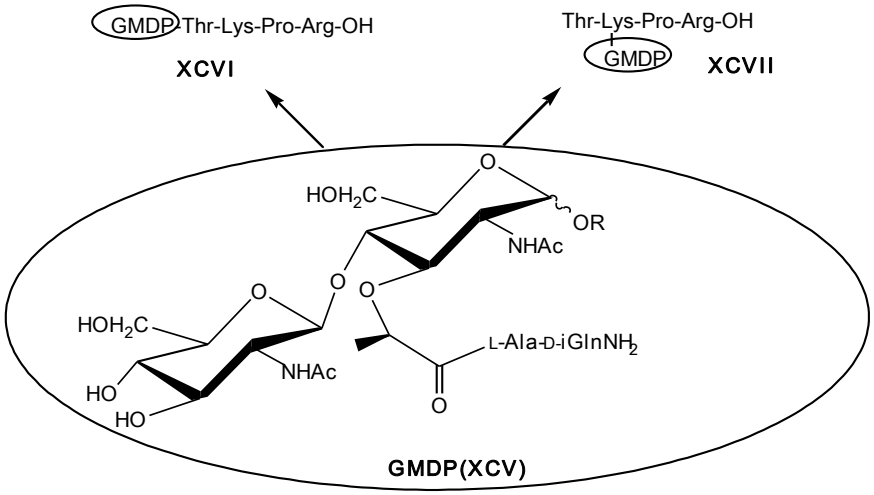
Slika 38. Lipofilni analozi MDP: MTP-Chol **XCII**, MTP-oktadekan **XCIII** i MTP-heptadekafloroktadekan **XCIV**

Stimulacija RAW 264,7 stanične linije spomenutim analozima proučavana je mjerenjem produciranog nitrita što je indikacija aktivnosti NO-sintaze. Aktivnost MTP-Chol **XCII** inkorporiranog u nanokapsulama, odgovara aktivnosti slobodnog MDP, dok su lipofilni eterski derivati bili inaktivni. Ti su rezultati doveli do zaključka da lipofilni analozi MDP moraju biti hidrolizirani unutar stanice da bi doveli do stvaranja topljivog metabolita potrebnog za aktivaciju makrofaga.[122]

2.4.1.2. Konjugati MDP

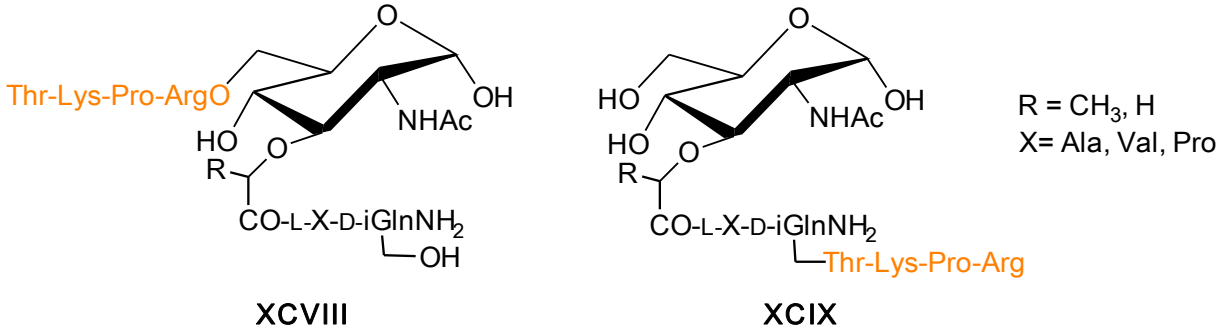
Konjugiranjem MDP s biološki aktivnim spojevima ne samo da se zadržavaju prirodna biološka svojstva, već se poboljšavaju i njihova farmakološka svojstva i jača samoobrana infekcijom napadnutog organizma.

Tuftsin, fiziološki tetrapeptid (H-Thr-Lys-Pro-Arg-OH), ima imunoadjuvantska svojstva: stimulira fagocitozu makrofaga i granulocita, te ostvaruje antibakterijsku i antitumorsku aktivnost.[123] Vezivanjem derivata tuftsina s *N*-acetil-glukozaminil-muramildipeptidom (GMDP, **XCV**) preko α-amino-skupine terminalnog Thr-ostatka pripravljen je konjugat **XCVI**, dok je konjugat **XCVII** dobiven vezivanjem **XCV** s ε-amino-skupinom lizinskog ostatka tuftsina (slika 39).[124] Imunološki testovi konjugata GMDP i tuftsina indiciraju visokodjelotvornu adjuvantsku aktivnost [stimuliraju stvaranja antitijela u testovima na ovalbumin kao i u reakcijama odgođene osjetljivosti (DTH, engl. *Delayed Type Hypersensitivity*) te potiču fagocitozu].[78]



Slika 39. Konjugati GMDP i tuftsina

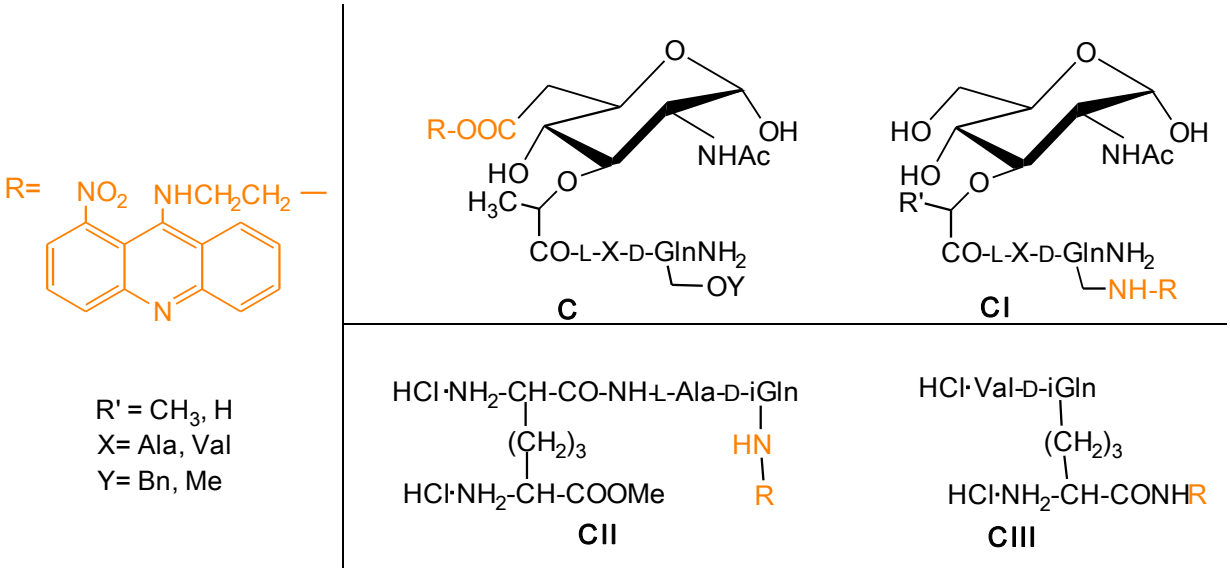
U sličnim istraživanjima temeljenim na konjugaciji tuftsina s MDP, Dzierzbicka i suradnici pripravili su konjugate **XCVIII** čija je hidroksilna grupa na položaju C-6 šećerne podjedinice acilirana tuftsinom, dok je konjugat **XCIX** modificiran amidnom vezom između terminalne glutaminske karboksilne skupine i amino-skupine iz tuftsina (slika 40). Glavni biološki učinci tih konjugata očituju se u smanjenju aktivnosti stanica raka uslijed stvaranja slobodnih radikala i povećane aktivnosti redoks-enzima u limfocitima.[78]



XCVIII **XCIX**

Slika 40. Konjugati MDP s derivatima tuftsina **XCVIII** i **XCIX**

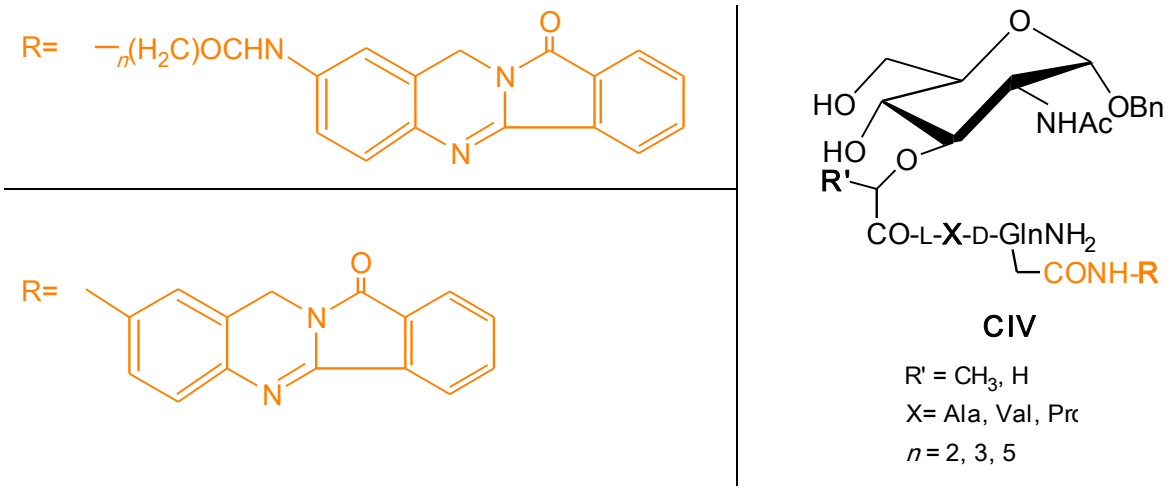
Isti su autori opisali i sintezu i biološka svojstva dvaju novih konjugata MDP s akridinom: (*i*) konjugat **C** modificiran je na C-6 atomu šećerne podjedinice s akridin/ akridon *N*-supstituiranom ω-amino-alkil-karboksilnom kiselinom te (*ii*) konjugat **CI** koji je modificiran amidnom vezom između *C*-terminusa glutaminske kiseline i amino-skupine derivata akridin /akridona (slika 41, *gore*).[125] Pripravljeni su i analozi demuramilpeptida modificirani s amino-akridin/ akridon derivatima **CII** i **CIII** (slika 41, *dolje*).



Slika 41. Konjugati MDP i akridin derivata **C** i **CI** (*gore*); analozi demuramilpeptida modificiranog s amino-akridin derivatima **CII** i **CIII** (*dolje*)

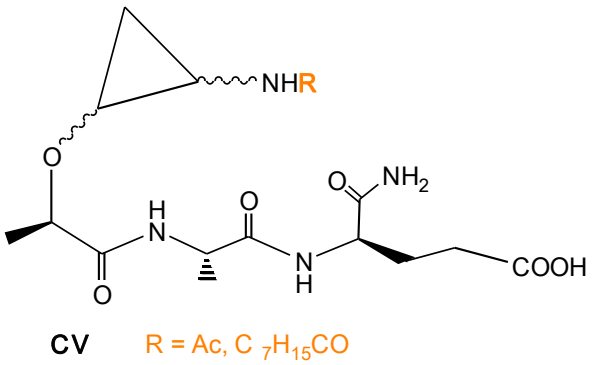
Biološkim testovima utvrđena je niska citotoksičnost analoga **C**, **CII** i **CIII**, dok se analog **CI** pokazao potentnim citotoksičnim agensom.[126]

Pripravljeni su i konjugati MDP s batracilinom (heterociklički amin koji pokazuje antitumorsku aktivnost) i derivatima batracilina (**CIV**) (slika 42). U usporedbi s batracilinom, dva su konjugata tipa **CIV** reducirala proliferaciju stanica melanoma *in vitro*, te su ti konjugati bolje topljivi u vodi i pokazuju manju toksičnost od batracilina.[127]



Slika 42. Sinteza MDP ili izo-MDP konjugata derivatima batracilina

U cilju postizanja poboljšane biološke aktivnosti i smanjenja negativnih nuspojava MDP, pripravljeni su i analozi **CV** u kojima je šećerna podjedinica zamijenjena derivatom ciklopropana (slika 43). Ispitivanje njihove biološke aktivnosti nije dalo očekivane rezultate.[128]

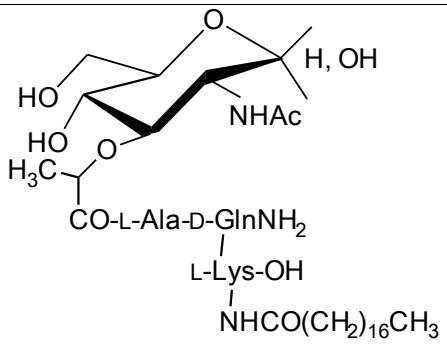
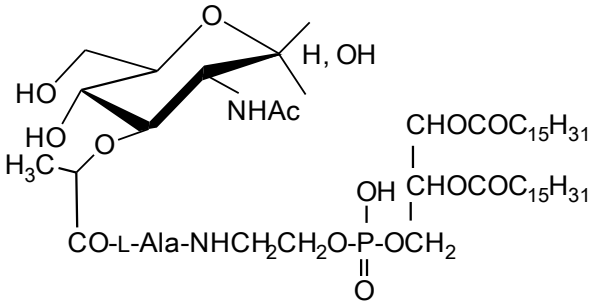
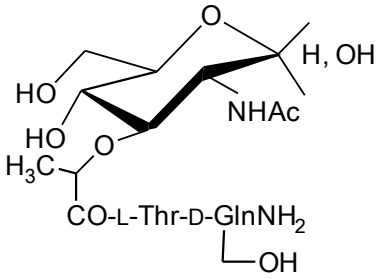


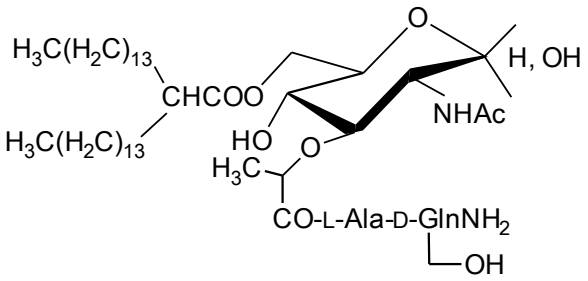
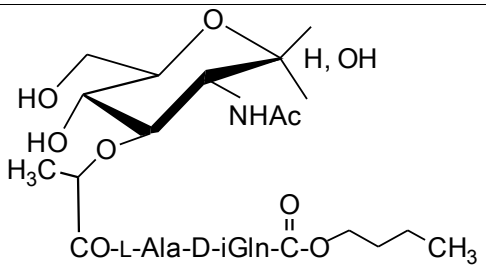
Slika 43. Struktura MDP-a i njegovog ciklopropanskog analoga **CV**

2.4.1.3. Klinička ispitivanja derivata i analoga MDP

Rezultati kliničkih ispitivanja derivata i analoga MDP prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Derivati i analozi MDP odobreni od Europske agencije za lijekove* i Američke uprave za hranu i lijekove**

MDP-Lys(L-18), Muroctasin, Romurtide**	
N^2-[*N*-(acetil-muramil)-L-alanil-D-izoglutaminil] -N^6-stearoil-L-lizin - lipofilni derivat uveden u liječenje leukopenije izazvane zračenjem.[129,130]	 **CVI**
MTP-PE, Mifamurtid*	
Muramil-tripeptid-fosfatidiletanolamin, lipofilni analog koji stimulira monocite/makrofage da uništavaju različite tumorske stanice *in vitro* i *in vivo*. Klinički je testiran na pacijentima s recidivom osteosarkoma i melanoma, a u kombinaciji s drugim antikancerogenim agensima povećava izglede za dugoročno izliječenje kod pacijenata s tim bolestima.[131,132]	 **CVII**
Syntex adjuvant formulation (SAF)**	
Emulzija s MDP[Thr] koristi se kao veterinarsko cjepivo u SAD.[133] Pokazao se izvrsnim adjuvantom u kontaktima s virusom gripe i malarije. S obzirom da se koristi kao emulzija ulja u vodi, najefikasniji je s amfifilnim antigenima zbog duljeg zadržavanja antigena u ulju i mogućnosti produljenja imuno-odgovora.	 **CVIII**

B30-MDP	
Ispituje se mogućnost njegova utjecaja na unapređenje imunogenosti cjepiva. Također, ispituju se dodatne modifikacije s kolesterolom, dimiristoilfosfatidilkolinom (DMPC), distearoil-fosfatidilkolinom (DSCP), dipalmitoilfosfatidil-kolinom (DPPC) ili dipalmitoilfosfatidilglicerol-om (DPPG) u cilju poboljšanja farmakodinam-skih svojstava.[134]	 **CIX**
Murabutid**	
Sintetski analog koji je pokazao izvrsnu učinkovitost i primjenljivost kod ljudi (suzbija replikaciju HIV).[135]	 **CX**

2.4.2. Manozni ligandi kao inhibitori hemaglutinacije *Escherichie coli*

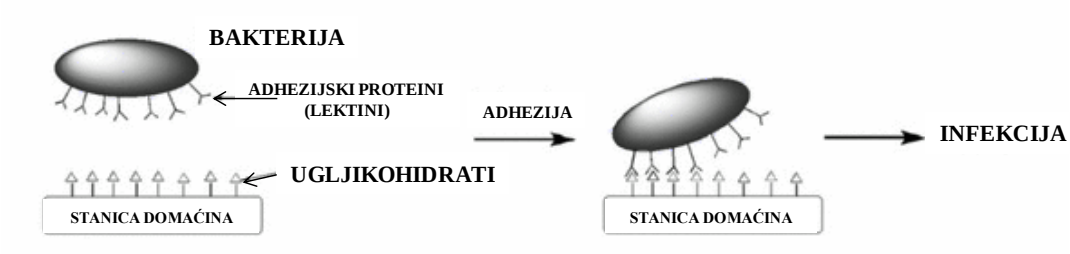
U zadnjem dijelu *Literaturnog pregleda* opisat će se biološki aktivni manozni ligandi.

2.4.2.1. Lektini

Brojni biološki procesi zasnivaju se na nekovalentnim interakcijama između ugljikohidrata i proteina (specifičnih enzima, hormona, protutijela i sl.). Primjerice, molekulsko prepoznavanje koje uključuje interkacije proteina i ugljikohidrata iz stanične stijenke ima ključnu ulogu u procesima virusnih i bakterijskih infekcija, inflamatornog i imunološkog odgovora, oplodnje i tumorskih metastaza.[136]

Mikrobna adhezija na stanice domaćina, odnosno infekcija stanice, posljedica je prepoznavanja ugljikohidrata iz stanične stijenke mikrobnim lektinima.[137] Lektini (lat. *légere,* uzeti ili izabrati) predstavljaju treći razred ugljikohidrat-specifičnih proteina (specifično i reverzibilno vežu monosaharide, oligosaharide ili djelomične strukture saharida), ali nemaju katalitičku aktivnost i nisu produkti imunološkog odgovora. Prisutni su u većini organizama,

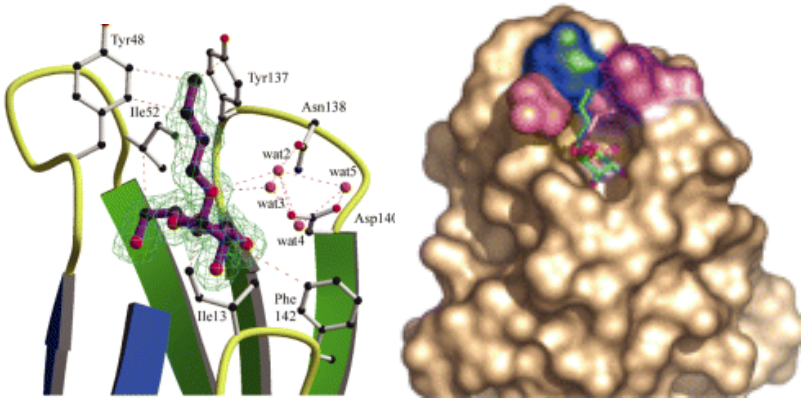
počevši od virusa i bakterija, pa do biljaka i životinja. Svaka molekula lektina ima dvije ili više domena koje specifično prepoznaju ugljikohidrate [CRD, (engl. *Carbohydrate Recognition Domains*]. Prema broju CRD, lektini mogu biti di- ili oligovalentni što im omogućava unakrsno vezivanje s ugljikohidratima iz stanične stijenke pri čemu nastaju stanični precipitati (aglutinati). Bakterije posjeduju proteinske nastavke (fimbrije ili pili) s CRD-domenama s pomoću kojih se adheriraju na stanice domaćina vezujući se s ugljikohidratima s njihove površine (slika 44), a njihova se klasifikacija izvodi na temelju specifičnosti za pojedini ugljikohidrat.[138]



Slika 44. Adhezija bakterije na stanicu domaćina

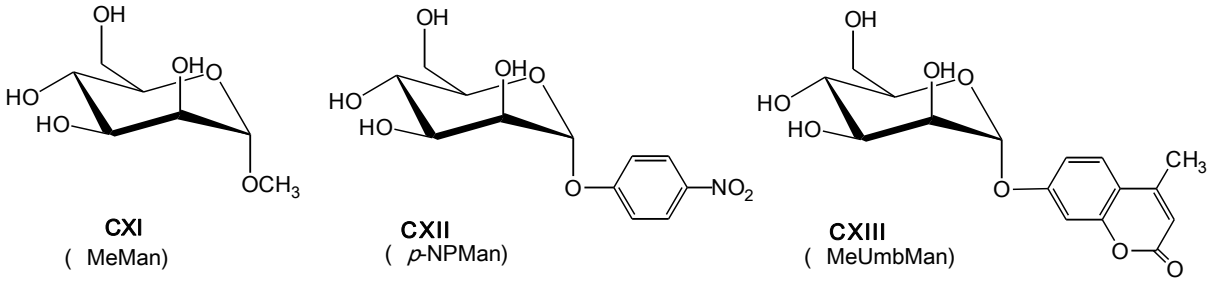
Uropatogena *Escherichia coli* [UPEC, (engl. *Uropathogenic Escherichia coli*] vodeći je uzročnik urinarnih infekcija od kojih tijekom života oboli svaka druga osoba.[139-141] Zbog toga su njezina struktura kao i mehanizmi njezine adhezije na glikokaliks domaćina najistraženiji u cijelom spektru uropatogenih bakterija. Fimbrije tipa 1, kakve nalazimo kod *E. coli*, sastoje se od četiri podjedinice (FimA, FimC, FimG i FimH), pri čemu je upravo protein FimH (koji sadrži CRD) odgovoran za specifično prepoznavanje manoznih struktura na površini stanica domaćina. Kristalografskom analizom kompleksa *n*-butil-α-D-manopiranozida i FimH ustanovljeno je da je šupljina pripadajućeg CRD komplementarna α-D-manopiranozidu te da postoji interakcija hidrofobnog aglikona s hidrofobnom veznom regijom lektina kojom dominiraju dva tirozinska ostatka s aromatskim bočnim ograncima (tzv. ″tirozinska vrata″) (slika 45).[142-147]

Imajući na umu da je adhezija preduvjet infekciji (slika 44), anti-adhezijska intervencija mogla bi je učinkovito prevenirati. Šećerni mimetici, dizajnirani tako da u usporedbi sa šećerima iz stanične stijenke imaju veći afinitet vezivanja na mikrobne lektinske CRD, kandidati su za inhibiciju mikrobne adhezije i sprečavanje infekcije.[138,148]



Slika 45. Trodimenzionalna struktura FimH- kompleks n-butil-α-D-manopiranozida i CRD

Poznavanje strukturnih karakteristika CRD iz *E. coli* (slika 45) omogućuju racionalnu sintezu niza manoznih liganada kao inhibitora bakterijske adhezije. S obzirom da je vezivanje manoznih liganada podržano hidrofobnim interakcijama lektinskih ″tirozinskih vrata″ i hidrofobnog aglikona, ne iznenađuje povećana inhibicijska aktivnost manozida s aromatskim aglikonom (**CXII i CXIII**) u odnosu na metil-α-D-manozid **CXI** (slika 46).[142,149-152]

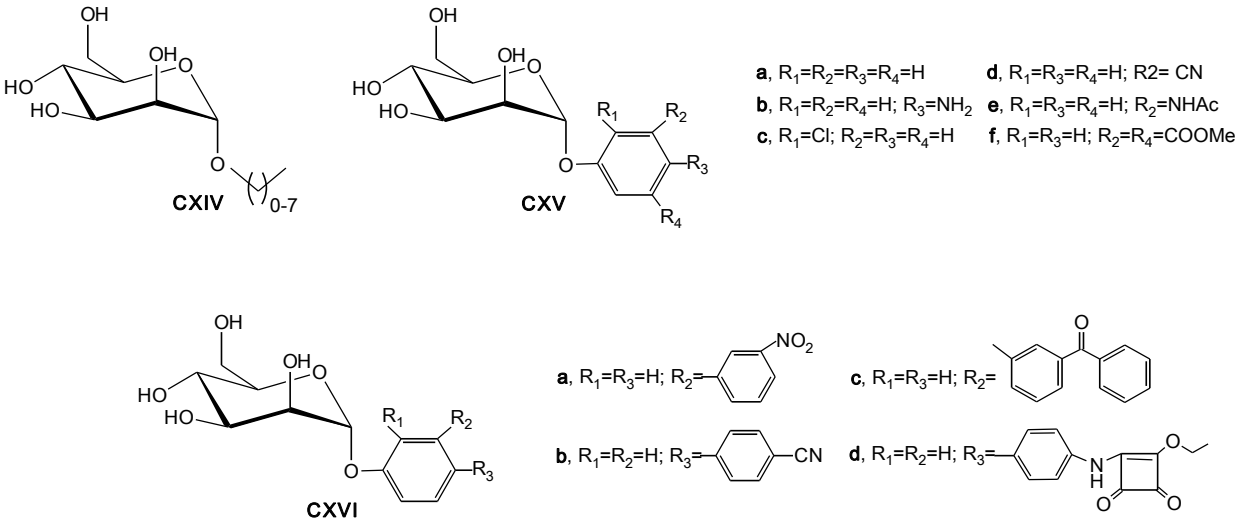


Slika 46. Manozni ligandi za FimH

Lindhorst i Hartmann sistematizirali su manozne ligande prema njihovoj strukturi i afinitetu za FimH: *(i)* ligandi s alkilnim lancima različite duljine (**CXIV**), *(ii)* ligandi s *o*-, *m*- i *p*-supstituiranim fenilnim prstenom (**CXV**) te *(iii)* ligandi s produljenim aromatskim aglikonom (**CXVI**) (slika 47).[153]

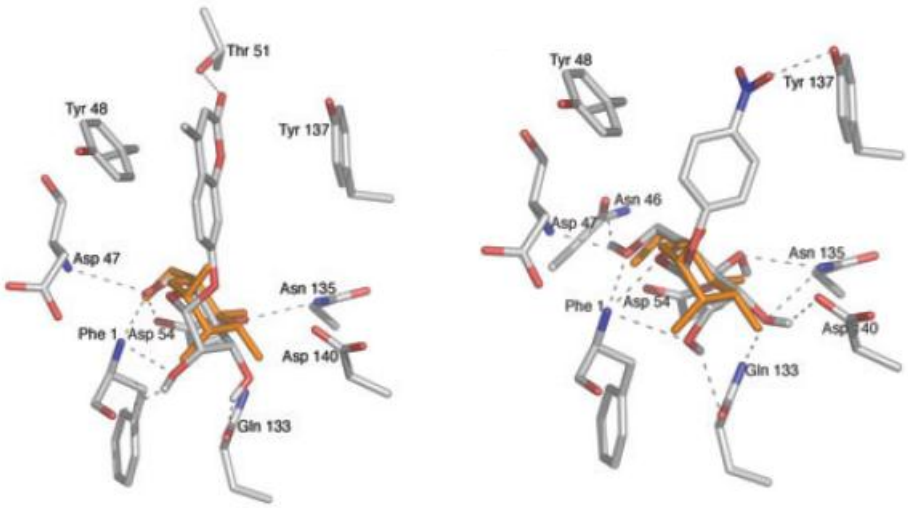
Manozidi s dugačkim alkilnim lancima (**CXIV**, n = 1-7) pokazali su se dobrim ligandima, zahvaljujući tvorbi stabilnih van der Waalsovih veza između hidrofobnog aglikona i fenilnih prstenova iz ″tirozinskih vrata″. Pri tome produljenje alkilnog lanca u manozidnom aglikonu dovodi do povećanja afiniteta vezanja na CRD. Umetanjem aromatskog aglikona

dolazi do povećanja inhibicijske aktivnosti pripadajućih manoznih liganada **CXV** pri čemu je taj učinak najizraženiji kod *orto*- i *para*-disupstituiranih aromatskih podjedinica.



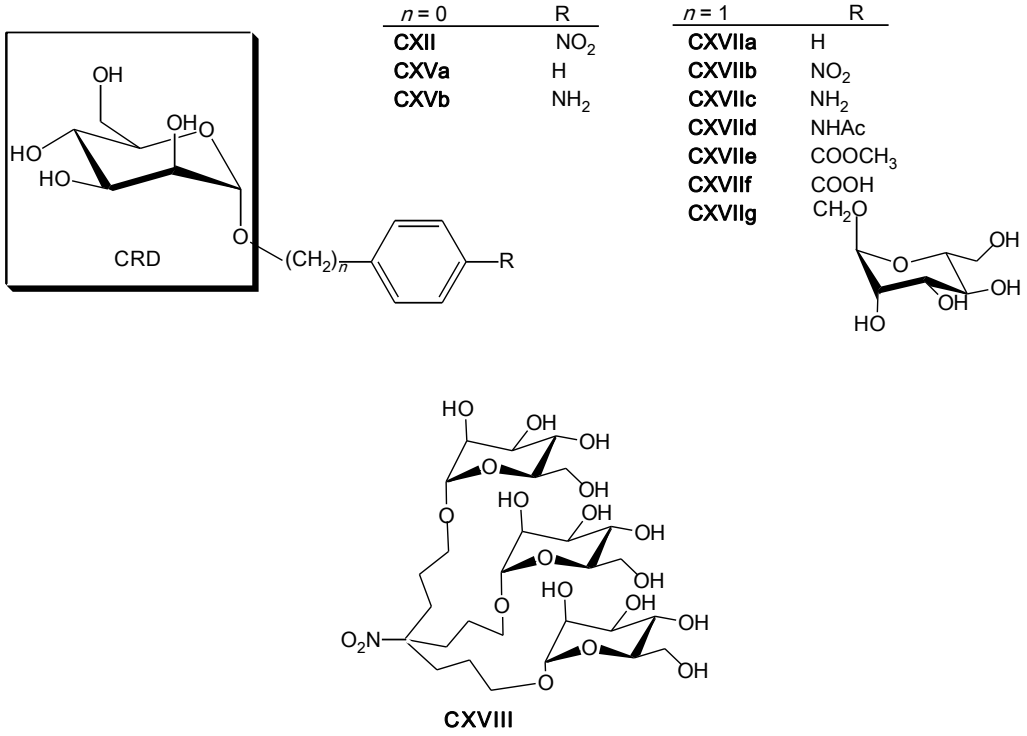
Slika 47. Tri različita tipa manoznih liganada **CXIV-CXVI**

Opsežna istraživanja koja su provedena s ciljem utvrđivanja kristalne strukture aromatskog manozida **CXII** vezanog u CRD FimH nisu dala rezultat. Da bi se ustanovio model vezanja aromatskih manozida u CRD, provedeno je modeliranje MeUmbMan (**CXIII**)i *p*-NPMan (**CXII**) pri čemu se pokazalo da se aromatski aglikon smješta između fenilnih prstenova ″tirozinskih vrata″ te ostvaruje dodatne π–π interakcije (slika 48). Povećani inhibicijski učinak liganada **CXVIa-d** tumači se pojačanim π–π interakcijama njihovog produljenog aromatskog aglikona [154]



Slika 48. Stereo-dijagrami MeUmbMan **CXIII** (*lijevo*) i *p*-NPMan **CXII** (*desno*) u CRD FimH (narančastom bojom istaknuta je pozicija α-D-manopiranoze)

Potaknuti istraživanjima Sharona i suradnika, koja su ukazala na utjecaj aromatskog aglikona u manoznim derivatima na inhibiciju hemaglutinacije *E. coli*, [149,150] Lindhorst i suradnici pripravili su **CXVIIa**–**g** s metilenskom razmaknicom između aromatskog i šećernog fragmenta kao prototip potentnih aromatskih manoznih liganada za *E. coli* (slika 49). Pripravljeni su spojevi testirani kao inhibitori manoza-specifične adhezije u inhibicijskom hemaglutinacijskom testu pri čemu je utvrđeno da umetanje aromatske podjedinice u *α*-D-manopiranozid uzrokuje značajan porast inhibicijske aktivnosti rezultirajućeg manozida (do 80 puta). Najboljim inhibitorom pokazao se *p*-nitrofenilni derivat (**CXII**), dok struktura ostalih *p*-supstituenta nije imala utjecaja na inhibicijska svojstva testiranih šećera.[155]

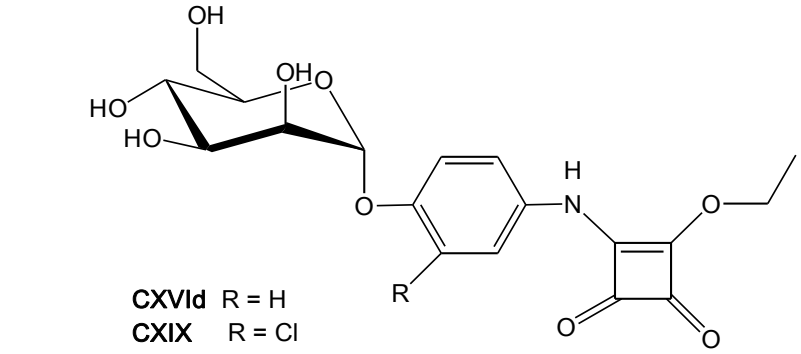


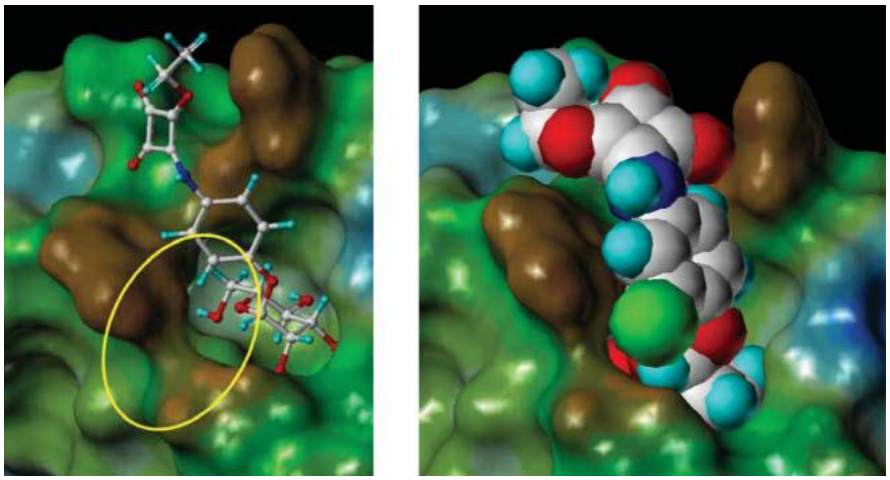
Slika 49. Fenil-*α*-D-manozid (**CXVa**) i njegovi *p*-supstituirani derivati **CXII, CXVb** i **CXVIIa**–**g** te trivalentni klaster **CXVIII**

Ista istraživačka skupina je u nastavku svojih istraživanja pripravila i glikoklastere s različitim brojem *α*-D-manoznih jedinica među kojima se istaknuo trivalentni klaster **CXVIII** (slika 49) čija je inhibicija bila u rangu s *p*-nitrofenil-*α*-D-manopiranozidom (**CXII**).[156]

Nadalje, pripravili su i testirali niz liganada s produljenim aromatskim aglikonom pri čemu je **CXVId** pokazao do 60 puta bolji inhibicijski učinak od kraćeg analoga **CXVII**,[157] dok uvođenje klora u *orto*-položaj u spoju **CXIX** dovodi do 223 puta učinkovitije inhibicije hemaglutinacije (slika 50). Autori su na temelju kompjuterskog modeliranja (slika 50)

zaključili da je poboljšana inhibicijska aktivnost liganda **CXIX** posljedica uspostavljanja dodatnih interakcija s FimH, odn. smještanja atoma klora u vezno mjesto.



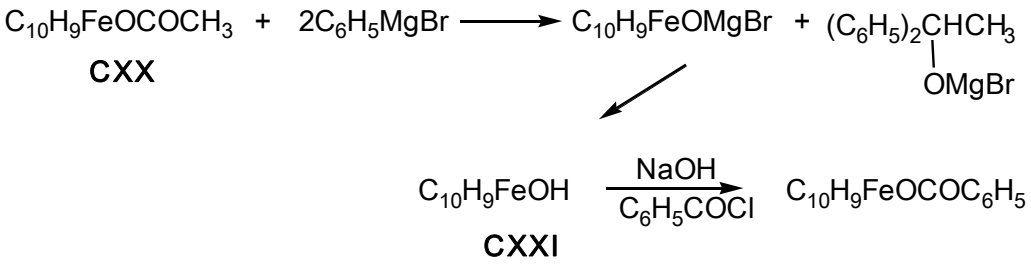


Slika 50. Manozni ligandi **CXVId** i **CXIX** (*gore*) i molekulski model **CXVId** *(lijevo)* i **CXIX** *(desno)* vezani u CRD FimH (*dolje*)-žuti krug označuje mjesto vezanja klora

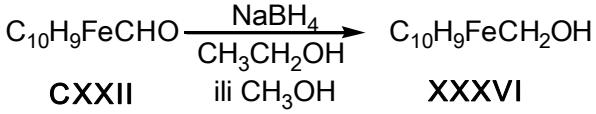
Kako je spomenuto u *Uvodu*, u sklopu ove disertacije opisat će se sinteza i biološka aktivnost ferocenskih konjugata s manozom kao potencijalnih inhibitora hemaglutinacije *E. coli*. Kako će se kao ferocenski prekursori koristiti različiti alkoholi i amini, u sljedeća dva odsječka prikazat ćemo u literaturi opisane postupke za njihovu pripravu.

2.4.2.2. Priprava ferocenskih alkohola

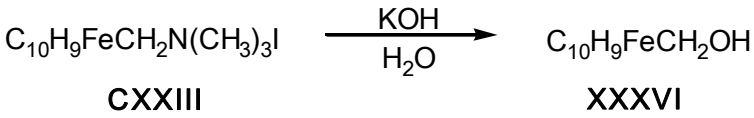
(*i*) Najniži homolog ferocenskih alkohola, nestabilni hidroksiferocen ili ferocenol (**CXXI**) pripravlja se reakcijom ferocenilacetata (**CXX**) s fenilmagnezijevim bromidom, uz naknadnu obradu s CO_2.[158]



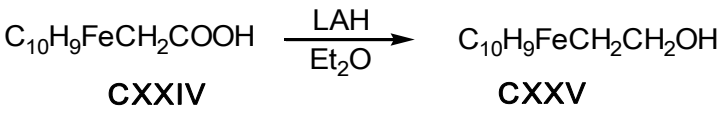
(*ii*) Njegov viši homolog ferocenil-metanol (**XXXVI)** pripravlja se redukcijom ferocenkarbaldehida (**CXXII**) s $NaBH_4$.[159]



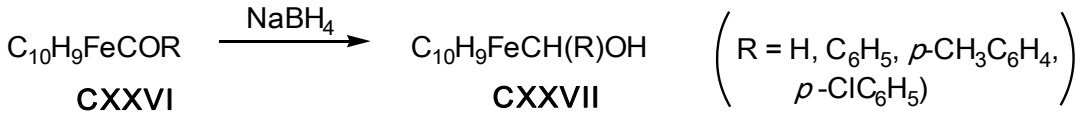
U našem je Laboratoriju isti spoj pripravljen hidrolizom *N*,*N*,*N*-trimetilferocilamonijeva jodida (**CXXIII**).[160]



(*iii*) Ferocenil-etanol (**CXXV**) s dimetilenskom razmaknicom između hidroksilne skupine i ferocenske jezgre pripravlja se redukcijom feroceniloctene kiseline (**CXXIV**) s $LiAlH_4$ u eteru pri sobnoj temperaturi.[160,161]

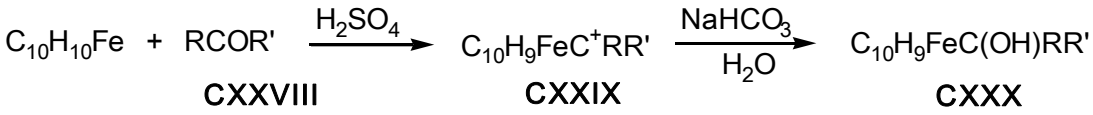


(*iv)* Kiralni monokarbinoli **CXXVII** dobivaju se redukcijom acilferocenâ **CXXVI** djelovanjem $NaBH_4$.[162]



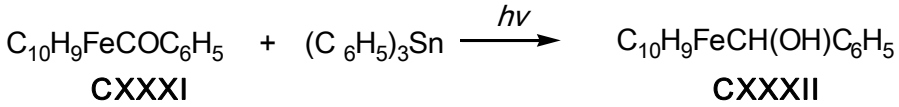
CXXVI **CXXVII**

(*v*) Kondenzacijom ferocena s karbonilnim spojevima **CXXVIII**u koncentriranoj sumpornoj kiselini nastaje α-alkilferocenilmetanol (**CXXX**) preko odgovarajućeg α-ferocenilnog karbokationa **CXXIX**.[163]



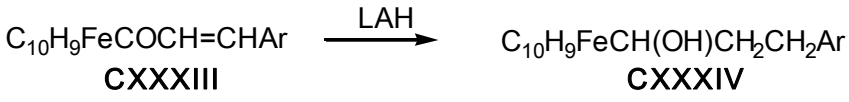
CXXVIII **CXXIX** **CXXX**

Ferocenilkarbinoli **CXXXII**također mogu nastati redukcijom ferocenil-ketona **CXXXI**s trifenilkositrovim(IV) hidridom uz UV-zračenje ili u prisutnosti azobisizobutironitrila.[164]



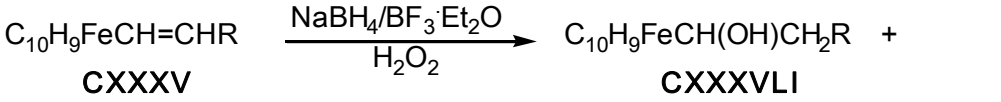
CXXXI **CXXXII**

(*vi*) Redukcijm karbonilne skupine i dvostruke veze iz β-arilvinil-ferocenil-ketona (**CXXXIII)** djelovanjem LAH u smjesi THF i etera nastaje alkohol **CXXXIV**.[165]

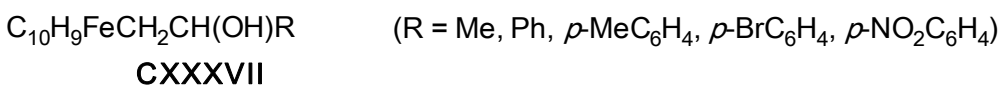


CXXXIII **CXXXIV**

(*vii*) Redukcijom ferocenilalkena **CXXXV** smjesom $NaBH_4$ i $BF_3{\cdot}Et_2O$ u THF, uz naknadnu oksidaciju s H_2O_2, nastaje smjesa α- i β-alkohola **CXXXVI** i **CXXXVII** u različitim omjerima.[166]

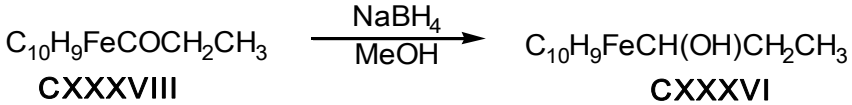


CXXXV **CXXXVLI**



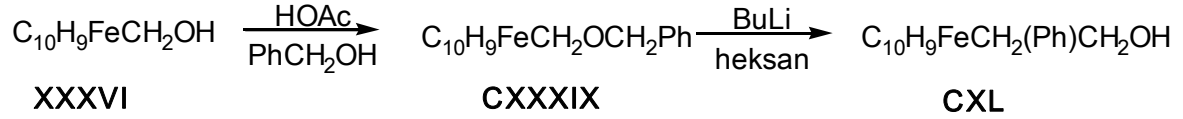
CXXXVII

Kiralni alkohol **CXXXVI** (R = Me) u našem je Laboratoriju pripravljen redukcijom metanolne otopine odgovarajućeg ketona **CXXXVIII** s $NaBH_4$.[160]

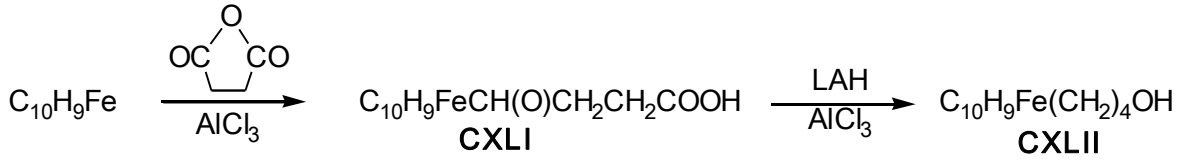


CXXXVIII **CXXXVI**

(*viii*) 2-Ferocenil-1-feniletanol (**CXL**) pripravljen je u našem Laboratoriju reakcijom benzil-ferocil-etera (**CXXXIX**) otopljenog u suhom THF dokapavanjem heksanske otopine BuLi.[160]



(*ix*) Viši derivati ferocenskih alkohola u kojima je hidroksilna skupina preko metilenskih razmaknica različitih duljina vezana na ferocensku jezgru mogu se pripraviti redukcijom odgovarajućih ferocenskih kiselina s LAH.[159] Sinteza 2-ferocenilbutan-1-ola (**CXLII**) iz γ-ketokiseline **CXLI** može poslužiti kao primjer takve sinteze.



2.4.2.3. Biološka aktivnost ferocenskih alkohola

Swarts i suradnici ispitivali su odnos strukture i aktivnosti (citotoksičnosti) serije ferocenskih alkohola **CXLIII** prateći njihov utjecaj *in vitro* na stanične linije HeLa (humani karcinom cerviksa) kroz 7 dana kontinuirane inkubacije.[167] Utvrđeno je da su alkoholi s duljim metilenskim razmaknicama aktivniji (pokazuju niži redukcijski potencijal zbog čega lakše podliježu enzimskoj oksidaciji, generirajući tako aktivne ferocenske vrste) (tablica 7).

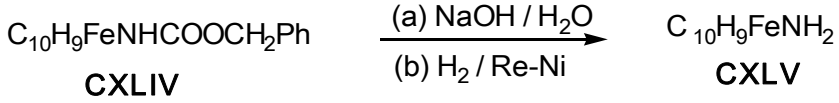
Tablica 7. Kemosenzitivnost lijekova (izražena kao IC_{50})

$C_{10}H_9Fe(CH_2)_mOH$ (**CXLIII**)	$E°'/V^b$	$IC_{50}/\mu M$
$m = 1$	0.111	>100
$m = 2$	0.029	35.0
$m = 3$	0.029	17.0
$m = 4$	0.026	5.7

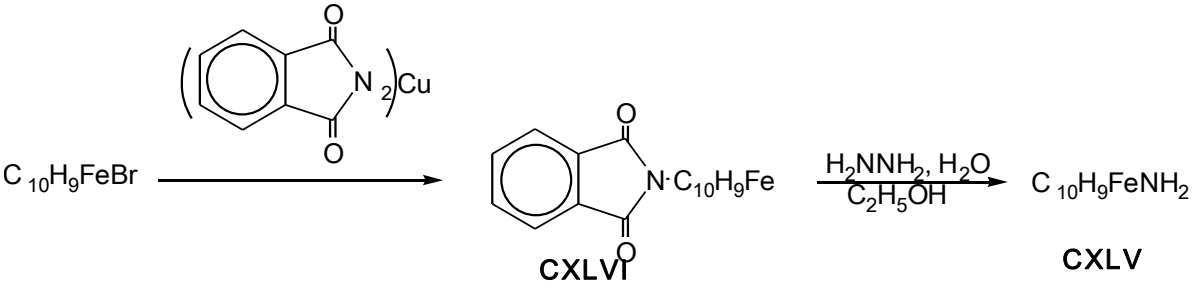
2.4.2.4. Priprava ferocenskih amina

Ferocen-amin (**CXLV**) prilično je nestabilni spoj pa je njegova primjena u sintezama ograničena. U literaturi je opisano nekoliko postupaka priprave toga spoja:

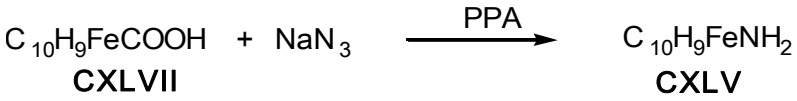
(*i*) Hidroliza ili hidrogenoliza **CXLIV** pri 70 atmosfera uz Raney-nikal kao katalizator (96%).[168]



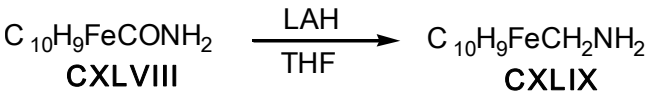
(*ii*) Amin **CXLV** može se pripremiti iz ferocenil-halogenida i ftalimidbakra (64%) uz naknadnu hidrazinolizu ftalimida **CXLVI** (62%).[169]



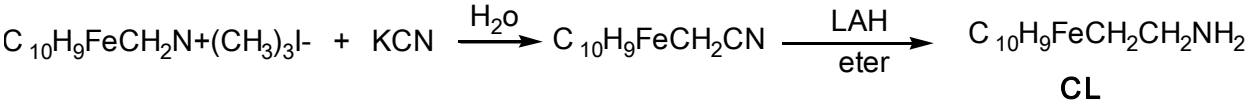
(*iii*) Izravnom reakcijom ferocenkarboksilne kiseline (**CXLVII**) s natrijevim azidom u polifosfornoj kiselini dobiva se ferocen-amin (**CXLV**) u niskom iskorištenju.[170]



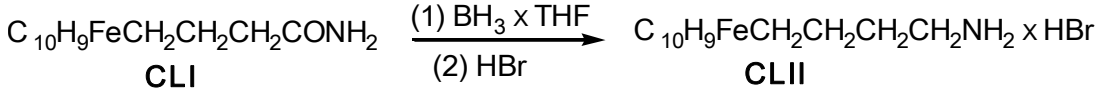
(*iv*) (Ferocenilmetil)amin (**CXLIX**) pripravlja se redukcijom ferocenkarboksamida (**CXLVIII**) s litijevim-aluminijevim hidridom u tetrahidrofuranu.[171]



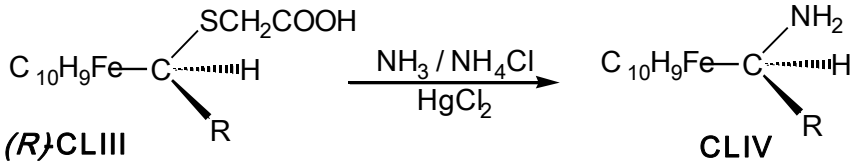
(*v*) (2-Feroceniletil)amin (**CL**) može se pripremiti sljedećim nizom reakcija.[172,173]



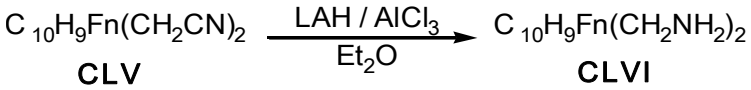
(*vi*) Redukcijom 4-ferocenilbutiramida (**CLI**) s borovim hidridom u THF dobiva se odgovarajući amin koji se pročišćava u obliku hidrobromida (**CLII**) (31%).[173]



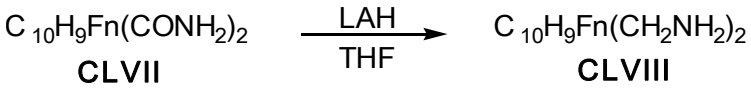
(*vii*) Djelovanjem koncentrirane vodene otopine amonijaka uz NH_4Cl i $HgCl_2$ na (R)- **CLIII** nastaju odgovarajući amini **CLIV** (R = $(CH_3)_2CH_2$, CH_3, H).[174]



(*viii*) Analogno postupku za pripravu monoamina **CL** opisanom pod (*v*) može se redukcijom biscijanida **CLV** kompleksom LAH/$AlCl_3$ u bezvodnom eteru pripremiti bisamin **CLVI** u 53%-tnom iskorištenju.[175]



(*ix*) Na sličan način kako je opisano u odsj. (*iv*) za pripravu monoamina **CXLIX** može se iz 1,1′-ferocendikarboksamida (**CLVII**) redukcijom s LAH pripremiti 1,1′-bis(aminometil)ferocen (**CLVIII**) u 44%-tnom iskorištenju.



§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE

Sve kemikalije korištene u sintezi bile su analitičke čistoće, dok su otapala korištena u radu pročišćena prema standardnim postupcima.[176] Tijek reakcija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva ispitivani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel) s fluoroscentnim indikatorom (254 nm). Detekcija ugljikohidratnih i neferocenskih spojeva provedena je korištenjem UV-svjetlost valne duljine 254 nm, prskanjem 10%-tnom sumpornom kiselinom uz zagrijavanje ili ninhidrinom uz zagrijavanje. Produkti su pročišćeni tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu ("Merck", Kiselgel 60 HF_{254}) ili Al_2O_3 uporabom smjesâ diklormetan/etil-acetat, diklormetan/metanol, diklormetan/petroleter, etilacetat/heksan ili dietileter/petroleter kao eluensâ. Ispitivanje optičke čistoće provedeno je kvalitativnom analizom hidrolizata: 3 mg spoja hidrolizirano je u 3 ml 6 M klorovodične kiseline na 110 °C kroz 24 sata u hermetički zatvorenoj posudi. Nakon obrade suhi su hidrolizati otopljeni u metanolu, naneseni na aktivirane kiralne pločice te ispitani tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala MeCN : MeOH : H_2O = 4 : 1 : 1 ili MeOH : H_2O : MeCN = 5 : 5 : 3.[177]

Karakterizacija sintetiziranih spojeva provedena je pomoću infracrvene spektroskopije (IR), nuklearne magnetske rezonance (NMR), elementarne analize i tekućinske kromatografije visoke razlučivosti sa spektrometrijom masa (HPLC-MS). Tališta su određena na Reichert Thermovar HT 1 BT 11 i nisu korigirana.

IR-spektri uzoraka snimljeni su na spektrofotometru Bomem MB 100 Mid FT u kalijevu bromidu ili CH_2Cl_2, te na BioRad Excalibur FTS 3100 u cezijevu jodidu.

^{1}H- i ^{13}C-NMR-spektri određeni su u $CDCl_3$, CD_3OD ili [D_6]-DMSO na spektrometrima Bruker AV300, Bruker Advance DRX 400 ili Bruker AV600 uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm.

UV/Vis- i CD-spektri snimljeni su na CD-spektrofotometru Jasco-810 u CH_2Cl_2 i DMSO, te u kalijevu bromidu.

Maseni spektri izmjereni su na Agilent Technologies 6410 Triple Quadrupole Mass Spectrometer (ESI ionizacija), te na FD Finnigan MAT90 (FD ionizacija). HRMS-spektri izmjereni su u Centru za proteomiku i spektrometriju masa Instituta Ruđer Bošković. CHN-

elementarne analize načinjene su u Microanalytical Laboratory of the Chemical Institutes, University of Mainz.

Ciklički voltamogrami uzoraka određeni su u 10^{-3} M otopinama uzoraka u CH_2Cl_2, s 0,1 M nBu$_4$NPF$_6$ kao elektrolitom, s brzinom promjene potencijala 50-100 mV s^{-1}, uz uporabu potenciostata BioLogic SP-50. Kao referentna elektroda koristi se 0,01 M Ag/$AgNO_3$, a za radnu i protuelektrodu koriste se platinske elektrode.

Podaci za određivanje strukture rendgenskom strukturnom analizom na jediničnom kristalu **31** prikupljeni su pomoću Oxford Diffraction Xcalibur 2 difraktometra na Zavodu za opću i anorgansku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Monokristali **1**, **21** i **43** mjereni su na difraktometru Oxford Diffraction Xcalibur Nova R na Institutu Ruđer Bošković (mikrofokusna Cu-cijev) pri sobnoj temperaturi [293(2) K].

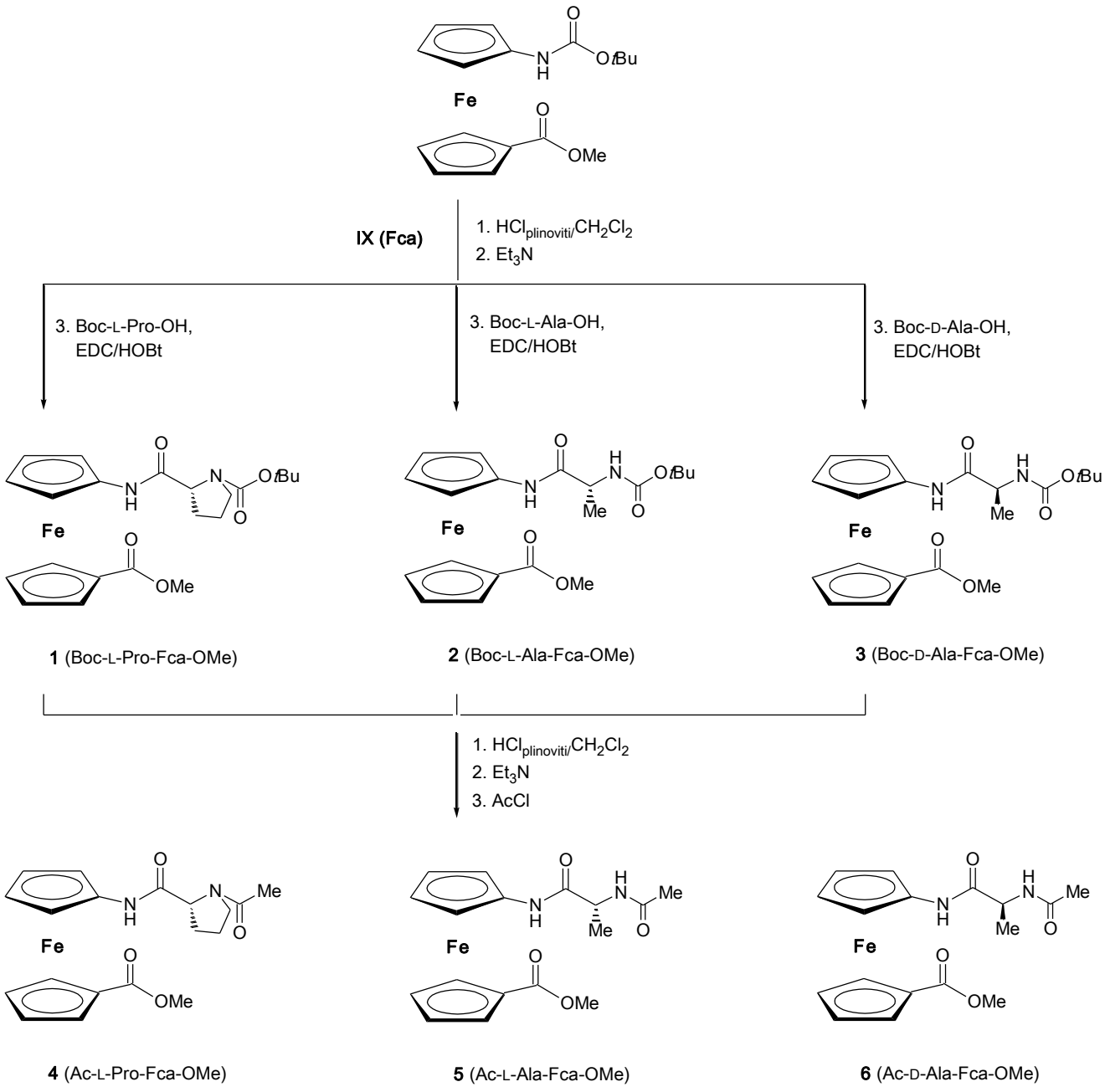
DFT-računi načinjeni su pomoću programa Gaussian 09/DFT (B3LYP, MO6 i MO6-2X).

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

Sinteze Boc-Fca (**XV**),[23] Ac-Fca (**XXXII**),[26] Fc-NHBoc (**CLIX**),[26] Fc-COOMe (**CLX**),[26] Boc-NH-Fn-NH-Ac (**XXXIV**),[51] Fc-CH_2NH_2 (**CXLIX**),[171] te Fc-CH_2OH (**XXXVI**)[160] opisane su u literaturi te njihovi spektroskopski podaci odgovaraju literaturnima.

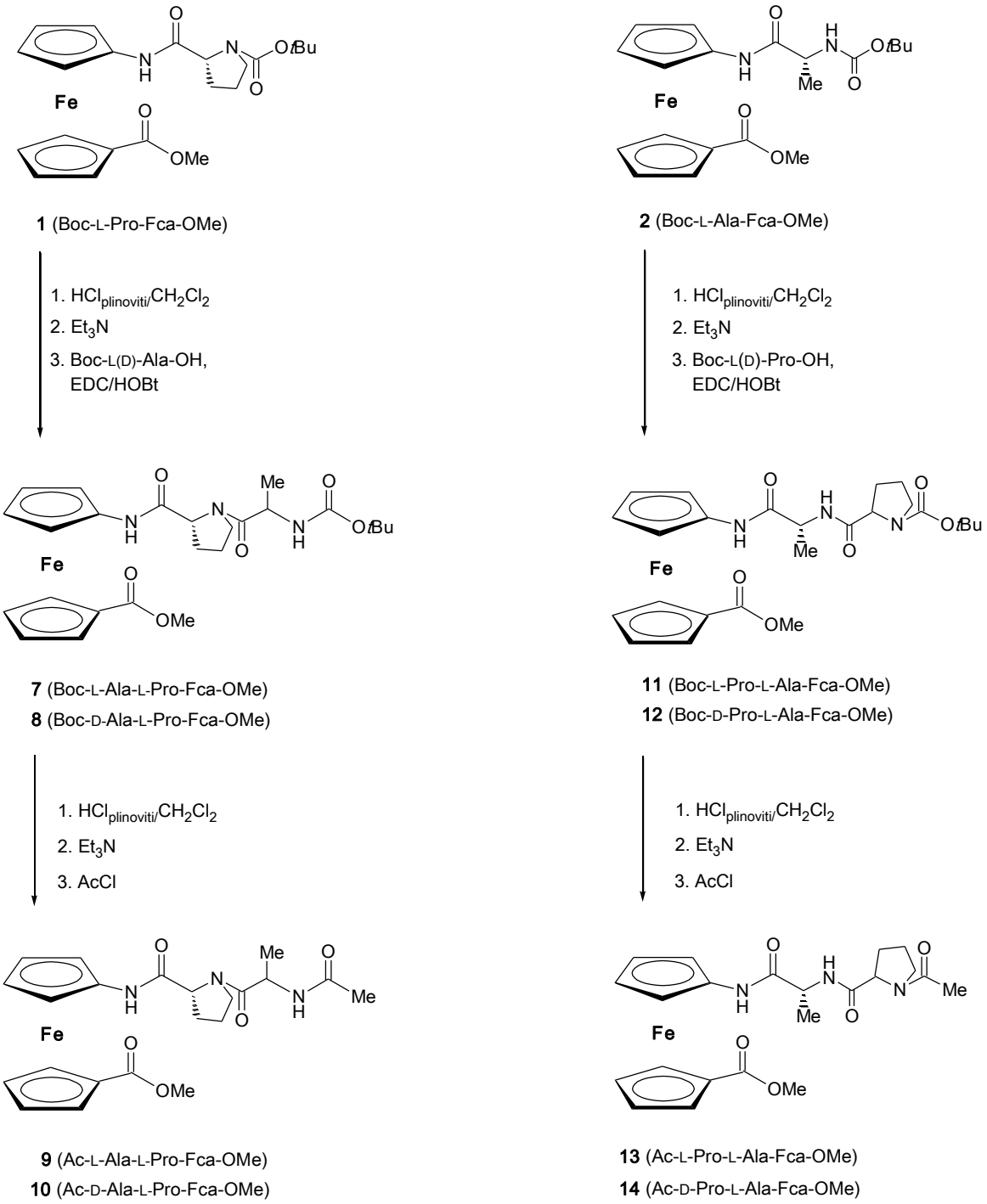
3.2. FEROCENSKI KONJUGATI S AMINOKISELINAMA

3.2.1. Priprava dipeptida 1-6



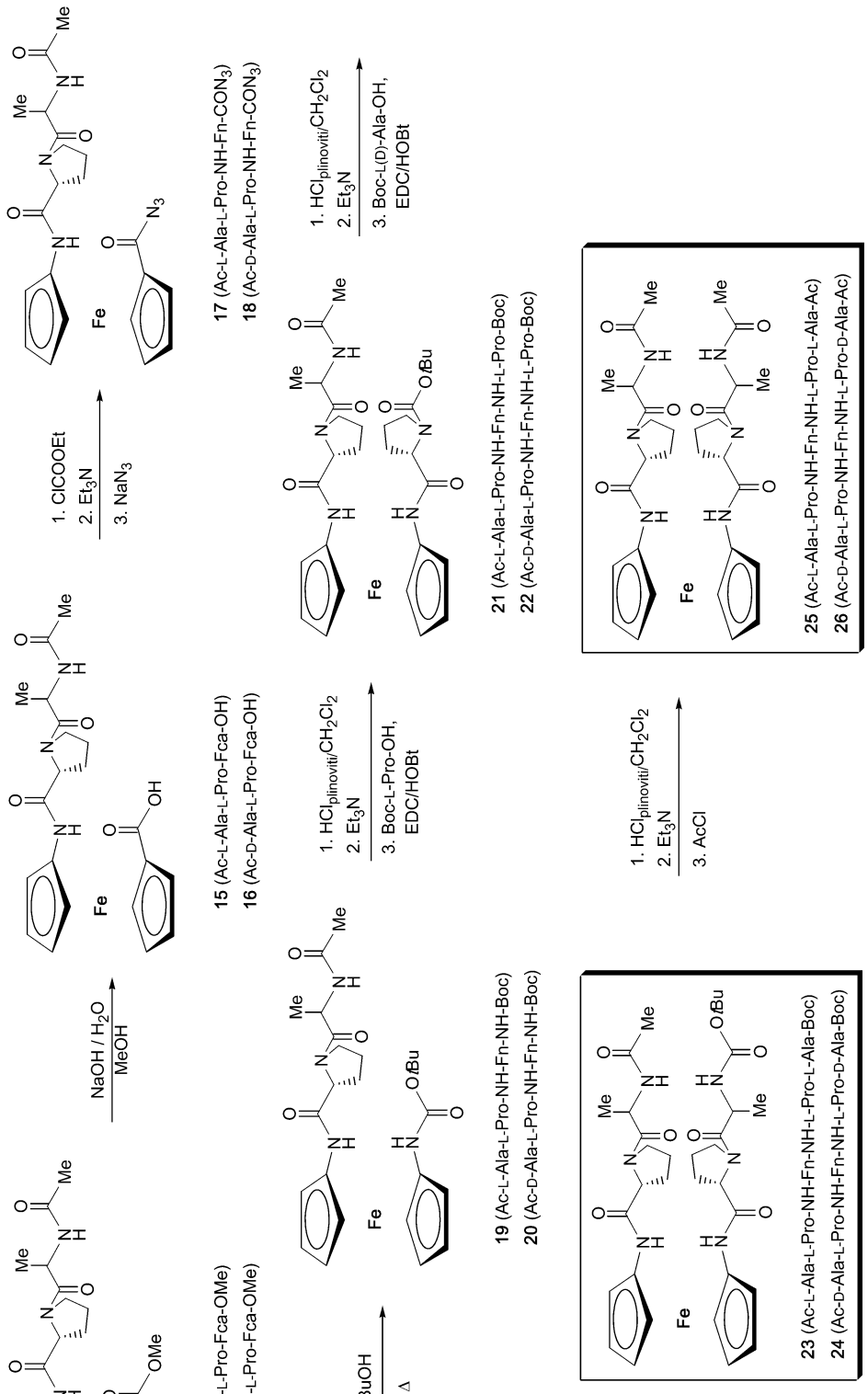
Shema 8.

3.2.2. Priprava tripeptida 7-14



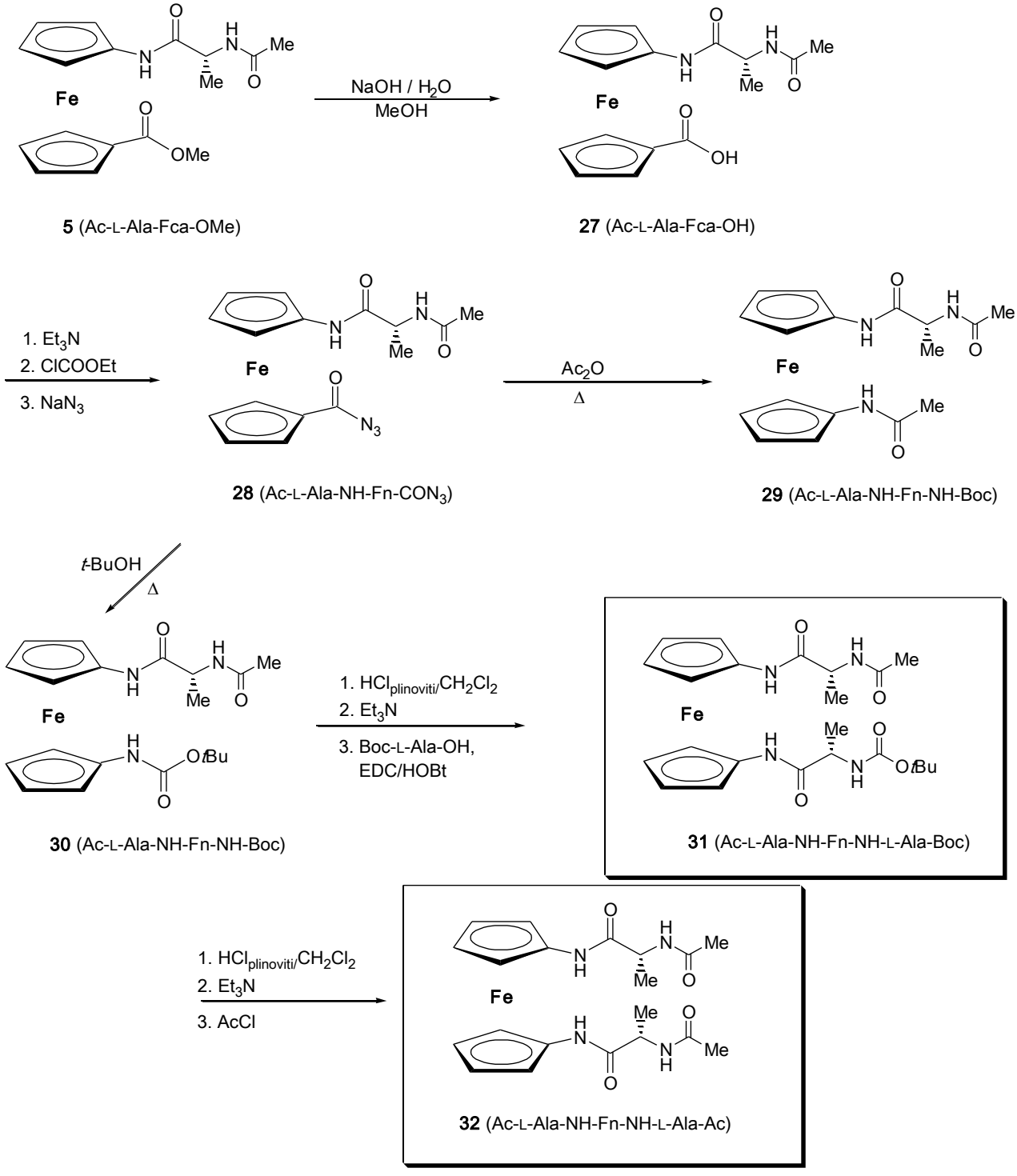
Shema 9.

3.2.3. Priprava tripeptida 21-22 i tetrapeptida 23-26



Shema 10.

3.2.4. Priprava analoga "Kraatzovih" peptida 31 i 32



5 (Ac-L-Ala-Fca-OMe)

27 (Ac-L-Ala-Fca-OH)

28 (Ac-L-Ala-NH-Fn-CON_3)

29 (Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-Boc)

30 (Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-Boc)

31 (Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Ala-Boc)

32 (Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Ala-Ac)

Shema 11.

3.2.5. Opći postupak priprave Boc-di- (1-3, 31), tri- (7, 8, 11, 12, 21, 22) i tetrapeptida (23, 24)

Boc-zaštićeni prekursor otopi se u EtOAc, ohladi na 0 °C i izloži djelovanju plinovitog HCl. Nakon 30' miješanja u ledenoj kupelji te otparavanja na rotacijskom vakuum-uparivaču nastali se hidroklorid suspendira u CH_2Cl_2 i obradi sa suviškom Et_3N (pH~9). Dobiveni se slobodni amin kopulira s Boc-AA-OH [(AA = L-Ala, D-Ala, L-Pro, D-Pro) primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon 1 sat miješanja pri sobnoj temperaturi rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom $NaHCO_3$, 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz sljedeće sustave otapala kao eluensâ: (CH_2Cl_2 : EtOAc = 5 : 1), (EtOAc), (*n*-BuOH : CH_3COOH : H_2O = 60 : 25 : 15), (CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1).

Isti postupak primjenjuje se za pripravu di- (**1-3**, **31**), tri- (**7**, **8**, **11**, **12**, **21**, **22**) i tetrapeptida (**23**, **24**) prikazanih na zajedničkim shemama 8-11. Količine upotrebljenih supstrata i kemikalija prikazane su u tablici 8.

Tablica 8. Supstrati i reagensi upotrebljeni za pripravu di- (**1-3**, **31**), tri- (**7**, **8**, **11**, **12**, **21**, **22**) i tetrapeptida (**23**, **24**)

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**		
1	**IX** (500 mg, 1,4 mmol)	Boc-L-Pro-OH (602 mg, 2,8 mmol)	(644 mg, 3,36 mmol)	(454 mg, 3,36 mmol)	525 mg (83%)	Žuti kristali
2	**IX** (500 mg, 1,4 mmol)	Boc-L-Ala-OH (530 mg, 2,8 mmol)	(644 mg, 3,36 mmol)	(454 mg, 3,36 mmol)	515 mg (86%)	Narančasta smola
3	**IX** (500 mg, 1.4 mmol)	Boc-D-Ala-OH (530 mg, 2,8 mmol)	(644 mg, 3,36 mmol)	(454 mg, 3,36 mmol)	550 mg (91%)	Narančasta smola

7	**1** (800 mg, 1,75 mmol)	Boc-L-Ala-OH (662 mg, 3,5 mmol)	(805 mg, 4,2 mmol)	(567 mg, 4,2 mmol)	800 mg (87%)	Narančasti kristali
8	**1** (800 mg, 1,75 mmol)	Boc-D-Ala-OH (662 mg, 3,5 mmol)	(805 mg, 4,2 mmol	(567 mg, 4,2 mmol	830 mg (90%)	Narančasta smola
11	**2** (1 g, 2,32 mmol)	Boc-L-Pro-OH (998 mg, 4,64 mmol)	1,07 g, 5,57 mmol	753 mg, 5,57 mmol	1,1 g (89%)	Narančasti kristali
12	**2** (1 g, 2,32 mmol)	Boc-D-Pro-OH (998 mg, 4,64 mmol)	1,07 g, 5,57 mmol	753 mg, 5,57 mmol	1,2 g (92%)	Narančasti kristali
21	**19** (4,1 g, 7,79 mmol)	Boc-L-Pro-OH (3,35 g, 15,6 mmol)	3,58 g, 18,7 mmol	2,53 g, 18,7 mmol	5,7 g (73%)	Žuto-narančasti kristali
22	**20** (4,1 g, 7,79 mmol)	Boc-L-Pro-OH (3,35 g, 15,6 mmol)	3,58 g, 18,7 mmol	2,53 g, 18,7 mmol	6,5 g (84%)	Žuto-narančasti kristali
23	**21** (3 g, 4,81 mmol)	Boc-L-Ala-OH (1,82 g, 9,62 mmol)	2,21 g, 11,54 mmol	1,55 g, 11,54 mmol	3,5 g (72%)	Žuti prah
24	**22** (3 g, 4,81 mmol)	Boc-D-Ala-OH (1,82 g, 9,62 mmol)	2,21 g, 11,54 mmol	1,55 g, 11,54 mmol	3,6 g (75%)	Žuti prah
31	**30** (500 mg, 1,16 mmol)	Boc-L-Ala-OH (440 mg, 2,33 mmol)	533,6 mg, 2,78 mmol	375,3 mg, 2,78 mmol	812 mg (70%)	Narančasti kristali

Boc-L-Pro-Fca-OMe (**1**)

t_t = 128-132 °C; R_f = 0,33 (CH_2Cl_2 : EtOAc = 5 : 1).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3419 sr, 3405 sr ($NH_{slobodni}$), 3290 sr, 3234 sl ($NH_{asocirani}$), 1706 j ($C{=}O_{COOMe}$), 1694 j ($C{=}O_{Boc}$), 1655 j ($C{=}O_{CONH}$), 1561 j (amid II).

^{1}H NMR* (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,78 (s, 0,66H, NH *trans*); 7,52 (s, 0,33H, NH_{cis}); 4,78 (s, 0,66H, $CH_{Fn\ trans}$); 4,77 (s, 0,66H, $CH_{Fn\ trans}$); 4,74 (s, 0,66H, $CH_{Fn\ trans}$); 4,71-4,69 (m, 0,66H, $CH_{Fn\ trans}$); 4,64 (s, 0,33H, $CH_{Fn\ cis}$); 4,49 (s, 0,34H, $CH_{Fn\ cis}$); 4,47 (s, 0,65H, $CH_{Fn\ trans}$); 4,43 (s, 0,34H, $CH_{Fn\ cis}$); 4,40 (s, 0,34H, $CH_{Fn\ cis}$); 4,38 (s, 0,7H, $CH_{Fn\ trans}$); 4,37 (s, 0,33H, $CH_{Fn\ cis}$); 4,36 (s, 1,03H, $CH_{Fn\ cis}$ + $CH_{\alpha Pro\ trans}$); 4,27 (dd, 0,34H, J = 3,4 Hz, J = 8,7 Hz, $CH_{\alpha Pro\ trans}$); 4,11-4,09 (s, 0,68H, $CH_{Fn\ cis}$); 4,00 (brs, 1,35H, $CH_{Fn\ trans}$); 3,80 (s, 0,96 H, $CH_{3COOMe\ trans}$); 3,78 (s, 2,06 H, $CH_{3COOMe\ cis}$); 3,64-3,61 (m, 0,36H, $CH_{\delta Pro\ cis}$); 3,53-3,50 (m, 0,36H, $CH_{\delta Pro\ cis}$); 3,46-3,43 (m, 0,7H, $CH_{\delta Pro\ trans}$); 3,31-3,26 (m, 0,7H, $CH_{\delta Pro\ trans}$); 2,47 (šj, 0,3H, $CH_{\beta Pro\ cis}$); 2,42-2,40 (m, 0,7H, $CH_{\beta Pro\ trans}$); 2,26-2,24 (m, 0,3H, $CH_{\beta Pro\ cis}$); 1,96-1,91 (m, 2H, $CH_{\gamma Pro}$); 1,89-1,85 (m, 0,72H, $CH_{\beta Pro}$); 1,49 (s, 6H, $CH_{3Boc\ trans}$); 1,45 (s, 3H, $CH_{3Boc\ cis}$).

^{13}C NMR*, APT (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 172,39 ($CO_{COOMe\ cis}$); 172,21 ($CO_{COOMe\ trans}$); 171,52 ($CO_{CO\text{-}NH\ cis}$); 170,24 ($CO_{CO\text{-}NH\ trans}$); 156,34 ($CO_{Boc\ trans}$); 155,06 ($CO_{Boc\ cis}$); 95,30 ($C_{qFn\ trans}$); 93,94 ($C_{qFn\ cis}$); 81,19 (C_{qFn}); 80,91 ($C_{qBoc\ trans}$); 73,04; 71,10; 70,69; 66,54; 66,33; 62,54; 62,40; ($CH_{Fn\ trans}$); 72,74; 71,44; 70,95; 66,84; 66,82; 63,77; 62,98 ($CH_{Fn\ cis}$); 72,90 (CH_{Fn}); 61,59 ($CH_{\alpha Pro\ cis}$); 59,83 ($CH_{\alpha Pro\ trans}$); 52,25 ($CH_{3COOMe\ cis}$); 52,08 ($CH_{3COOMe\ trans}$); 47,17 ($CH_{2\delta Pro}$); 31,21 ($CH_{2\beta Pro\ cis}$); 28,33 (CH_{3Boc}); 27,21 ($CH_{2\beta Pro\ trans}$); 24,71 ($CH_{2\gamma Pro\ trans}$); 23,77 ($CH_{2\gamma Pro\ cis}$).

*Zbog slabog razdvajanja signala pri sobnoj temperaturi, NMR-spektri snimljeni su pri 228 K.

HRMS analiza za $C_{22}H_{28}N_2O_5Fe$ (456,1342) nađeno: 456,132.

Boc-L-Ala-Fca-OMe (**2**)

R_f = 0,76 (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3424 sr ($NH_{slobodni}$), 3324 sl ($NH_{asocirani}$), 1709 j ($C{=}O_{CONH}$), 1536 j, 1498 j (amid II).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,64 (s, 1H, NH_{Fca}); 5,14 (d, J = 7,6 Hz, 1H, NH_{Ala}); 4,76 (m, 2H, H-7, H-10); 4,68 (s, 1H, H-2); 4,57 (s, 1H, H-5); 4,38 (m, 2H, H-8, H-

9); 4,23 (m, 1H, CH_{Ala}); 4,04 (m, 1H, H-4); 4,02 (m, 1H, H-3); 3,80 (s, 3H, COOMe); 1,48 [s, 9H, $(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 1,42 (d, J = 7,1 Hz, 3H, $CH_{3\text{-}Ala}$).

^{13}C-NMR (75MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,89 (CO_{Fca}); 171,19 (CO_{Ala}); 95,30 (C-1); 80,6 (C_{qBoc}); 72,71 (2C, C-8, C-9); 72,14 (C-6); 71,40 (C-10); 71,26 (C-7); 66,64 (C-4); 66,38 (C-3); 63,31 (C-2); 62,99 (C-5); 51,81 [2C, $CH_{3\text{-}COOMe}$, CH_{Ala}]; 28,52 [$(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 17,95 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

Elementarna analiza za $C_{20}H_{26}N_2O_5Fe$ (430,292): C 55,83; H 6,09; N 6,51; nađeno: C 55,97; H 6,12; N 6,52.

Boc-D-Ala-Fca-OMe (**3**)

R_f = 0,75 (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3422 sr ($NH_{slobodni}$), 3316 sl ($NH_{asocirani}$), 1707 j ($C{=}O_{CONH}$), 1536 j, 1498 j (amid II).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,63 (s, 1H, NH_{Fca}); 5,14 (d, J = 6,9 Hz, 1H, NH_{Ala}); 4,76 (m, 2H, H-7, H-10); 4,68 (s, 1H, H-2); 4,57 (s, 1H, H-5); 4,38 (m, 2H, H-8, H-9); 4,22 (m, 1H, CH_{Ala}); 4,04 (m, 1H, H-4); 4,02 (m, 1H, H-3); 3,80 (s, 3H, COOMe); 1,48 [s, 9H, $(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 1,43 (d, J = 6,9 Hz, 3H, $CH_{3\text{-}Ala}$).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,88 (CO_{Fca}); 171,17 (CO_{Ala}); 156,02 (CO_{Boc}), 95,28 (C-1); 80,61 (C_{qBoc}); 72,70 (2C, C-8, C-9); 72,13 (C-6); 71,39 (C-10); 71,25 (C-7); 66,64 (C-4); 66,38 (C-3); 63,30 (C-2); 62,99 (C-5); 51,80 [2C, $CH_{3\text{-}COOMe}$, CH_{Ala}]; 28,51 [$(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 17,94 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

Elementarna analiza za $C_{20}H_{26}N_2O_5Fe$ (430,292): C 55,83; H 6,09; N 6,51; nađeno: C 55,97; H 6,12; N 6,52.

Boc-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe (**7**)

t_t = 184 °C; R_f = 0,78 (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3428 j ($NH_{slobodni}$), 3294 sr ($NH_{asocirani}$), 1707 j ($C{=}O_{COOMe}$), 1655 j, 1634 j ($C{=}O_{CONH}$), 1558 j, 1542 j, 1500 j, 1465 j (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,83 (s, 0,14H, $NH_{Fca\ cis}$); 8,47 (s, 0,86H, $NH_{Fca\ trans}$); 5,35 (d, J = 7,39 Hz, 0,86H, $NH_{Ala\ trans}$); 5,11 (d, J = 7,39 Hz, 0,14H, $NH_{Ala\ cis}$); 4,90 (s, 0,14H, H-10_{cis}); 4,86 (s, 0,14H, H-7_{cis}); 4,74 (s, 0,86H, H-10_{trans}); 4,71 (s, 0,86H, H-7_{trans}); 4,66 [s, 0,34H, CH-α(Pro) $_{cis}$, H-3_{cis}]; 4,65 [s, 1,66H, CH-α(Pro)$_{trans}$, H-3_{trans}]; 4,51 [m, 1,62H, $CH_{Ala\ trans}$, H-4_{trans}]; 4,49 (m, 0,22H, $CH_{Ala\ cis}$); 4,42-4,41 (m, 0,16H, H-4_{cis}); 4,35 (s, 0,86H,

H-8$_{trans}$); 4,33 (s, 0,86H, H-9$_{trans}$); 4,04 (s, 0,28H, H-2$_{cis}$, H-5$_{cis}$); 3,99 (s, 1H, H-2$_{trans}$); 3,98 (s, 1H, H-5$_{trans}$); 3,79 (s, 2,54H, COOMe$_{trans}$); 3,76 (s, 0,46H, COOMe$_{cis}$); 3,69-3,66 [m, 0,86H, CH_2-γ' (Pro)$_{trans}$]; 3,60 [td, 0,86H, CH_2-γ(Pro)$_{trans}$]; 3,36 [m, 0,14H, CH_2-γ' (Pro)$_{cis}$]; 3,27 [m, 0,14H, CH_2-γ(Pro)$_{cis}$]; 2,72-2,68 [m, 0,56H, CH_2-β (Pro)$_{cis}$, CH_2-δ (Pro)$_{cis}$, CH_2-δ' (Pro)$_{cis}$, CH_2-β' (Pro)$_{cis}$]; 2,48 [m, 0,86H, CH_2-β (Pro)]; 2,19-2,17 [m, 0,86H, CH_2-δ (Pro)$_{trans}$]; 2,06-2,02 [m, 0,86H, CH_2-δ' (Pro)$_{trans}$]; 1,93-1,91 [m, 0,86H, CH_2-β' (Pro)$_{trans}$]; 1,51 [s, 1,64H, $(CH_3)_{3\text{-Boc }cis}$]; 1,44 [s, 7,36H, $(CH_3)_{3\text{-Boc }trans}$]; 1,38 (d, J = 6,74 Hz, 2,4H, $CH_{3\text{-Ala }trans}$); 1,32 (d, J = 6,74 Hz, 0,6H, $CH_{3\text{-Ala }cis}$).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ ppm: 173,86 ($CO_{Ala\ trans}$); 172,75 ($CO_{Ala\ cis}$); 171,68 ($CO_{COOMe\ trans}$); 169,13 ($CO_{Fca\ trans}$); 168,90 ($CO_{Fca\ cis}$); 156,68 ($CO_{Boc\ cis}$); 155,34 ($CO_{Boc\ trans}$); 96,22 (C-1,Fn$_{cis}$); 95,66 (C-1,Fn$_{trans}$); 80,57 ($C_{qBoc\ cis}$); 79,99 ($C_{qBoc\ trans}$); 72,65 (C-8$_{trans}$); 72,60 (C-9$_{trans}$); 72,43 (C-8$_{cis}$); 72,33 (C-9$_{cis}$); 72,12 (C-6$_{trans}$); 71,99 (C-6$_{cis}$); 71,30 (C-10$_{trans}$); 71,24 (C-10$_{cis}$); 71,13 (C-7$_{trans}$); 70,93 (C-7$_{cis}$); 66,49 (C-3$_{trans}$); 66,34 (C-4$_{trans}$); 65,86 (C-3$_{cis}$, C-4$_{cis}$); 63,37 (C-2$_{cis}$, C-5$_{cis}$); 63,02 (C-5$_{trans}$); 62,81 (C-2$_{trans}$); 61,42 (C-α, Pro$_{cis}$); 60,48 (C-α, Pro$_{trans}$); 51,73 [$CH_{3COOMe\ trans}$]; 49,06 ($CH_{Ala\ cis}$); 47,99 ($CH_{Ala\ trans}$); 47,50 (CH_2-δ, Pro$_{trans}$); 46,76 (CH_2-δ, Pro$_{cis}$); 31,25 (CH_2-β, Pro$_{cis}$); 28,62 [$(CH_3)_{3\text{-Boc }cis}$]; 28,51 [$(CH_3)_{3\text{-Boc }trans}$]; 26,75($CH_2$-β, Pro$_{trans}$); 25,34 ($CH_2$-γ, Pro$_{trans}$); 22,27 ($CH_2$-γ, Pro$_{cis}$); 18,63 ($CH_{3Ala\ trans}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{25}H_{33}N_3O_6Fe$: 527,4; dobiveno $[M]^+$ na *m/z* 527,3.

Boc-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe (**8**)

R_f = 0,61 (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3430 j ($NH_{slobodni}$), 3346 sr ($NH_{asocirani}$), 1707 j ($C{=}O_{COOMe}$), 1661 j, 1631 j ($C{=}O_{CONH}$), 1559 j, 1541 j, 1499 j, 1465 j (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,40 (s, 1H, NH_{Fca}); 5,50 (d, J = 6,60 Hz, 1H, NH_{Ala}); 4,73 (s, 1H, H-10); 4,70 (s, 1H, H-7), 4,65-4,63 [m, 3H, CH-α (Pro), H-3, H-4]; 4,48-4,46 [m, 1H, CH_{Ala}), 4,37 (pt, 2H, H-8, H-9); 4,00 (pt, 1H, H-2, H-5); 3,86 [pt, 1H, CH_2-δ (Pro)]; 3,80 (s, 3 H, COOMe); 3,51 [q, 1H, J = 7,69 Hz, J = 9,14 Hz, CH_2-δ' (Pro)]; 2,51-2,48 [m, 1H, CH_2-β (Pro)]; 2,17-,16 [m, 1H, CH_2-γ (Pro)]; 2,05-2,03 [m, 1H, CH_2-γ' (Pro)]; 1,93 [pt, 1 H, CH_2-β' (Pro)]; 1,93-1,91 [m, 1H, CH_2-β' (Pro)]; 1,39 [s, 9 H, $(CH_3)_{3\text{-Boc}}$]; 1,35 (d, J = 6,86 Hz, 3 H, $CH_{3\text{-Ala}}$).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 173,22 (CO_{Ala}); 172,01 (CO_{COOMe}); 169,17 (CO_{Fca}); 155,59 (CO_{Boc}); 95,66 (C-1, Fn); 80,04 (C_{qBoc}); 72,73 (C-8); 72,64 (C-9); 71,81 (C-

6); 71,38 (C-10); 71,34 (C-7); 66,40 (C-3); 66,13 (C-4); 63,28 (C-5); 63,18 (C-2); 60,86 (C-α, Pro); 51,74 ($CH_{3\text{-}COOMe}$); 48,42 (CH_{Ala}); 47,29 (CH_2-δ, Pro); 28,56 [$(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 27,71 (CH_2-β, Pro); 24,88 (CH_2-γ, Pro); 17,74 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{25}H_{33}N_3O_6Fe$: 527,4; dobiveno $[M]^+$ na *m/z* 527,3.

Boc-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe (**11**)

t_t = 66,9 °C; R_f = 0,81 (*n*-BuOH : CH_3COOH : H_2O = 60 : 25 : 15).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3418 j ($NH_{slobodni}$), 3310 j ($NH_{asocirani}$), 1705 j ($C{=}O_{COOMe}$), 1674 j ($C{=}O_{CONH}$), 1555 j, 1503 j (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,15 (s, 1H, NH_{Fca}); 6,85 (d, *J* = 6,34 Hz, 1H, NH_{Ala}); 4,81 (s, 1H, H-3); 4,76 (s, 2H, H-8, H-9); 4,60 (s, 1H, H-4); 4,48 (m, 1H, CH_{Ala}); 4,38 (s, 1H, H-7); 4,37 (s, 1H, H-10); 4,34 [s, 1H, CH-α (Pro)]; 4,00 (s, 2H, H-2, H-5), 3,78 (s, 3H, COOMe); 3,50-3,45 [m, 2H, CH_2-δ, CH_2-δ' (Pro)]; 2,22-2,16 [m, 2H, CH_2-β, CH_2-β' (Pro)]; 1,92-1,91 [m, 2H, CH_2-γ, CH_2-γ' (Pro)]; 1,49 [s, 9H, $(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 1,42 (d, *J* = 6,98 Hz, 3H, $CH_{3\text{-}Ala}$).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 172,35 (CO_{Fca}); 171,95 (CO_{COOMe}); 170,45 (CO_{Ala}); 156,34 (CO_{Boc}); 95,79 (C-1, Fn); 81,24 (C_{qBoc}); 73,08 (C-7); 72,97 (C-10); 71,90 (C-6); 71,41 (C-8); 71,08 (C-9); 66,56 (C-2); 66,39 (C-5); 63,15 (C-4); 62,71 (C-3); 60,97 (C-α, Pro); 51,70 [$CH_{3\text{-}COOMe}$); 49,74 (CH_{Ala}); 47,57 (CH_2-δ, Pro); 29,14 (CH_2-β, Pro); 28,54 [$(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 24,84 (CH_2-γ, Pro); 17,54 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{25}H_{33}N_3O_6Fe$: 527,4; dobiveno $[M+H]^+$ na *m/z* 528,4.

Boc-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe (**12**)

t_t = 119,2 °C; R_f = 0,90 (*n*-BuOH : CH_3COOH : H_2O = 60 : 25 : 15).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3418 sr ($NH_{slobodni}$), 3325 j ($NH_{asocirani}$), 1705 j ($C{=}O_{COOMe}$), 1684 j, 1671 j ($C{=}O_{CONH}$), 1557 j, 1531 j (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,37 [s, 0,89H, $NH(Fca)_{trans}$]; 7,70 [s, 0,11H, $NH(Fca)_{cis}$]; 7,24 [d, 0,89H, $NH(Ala)_{trans}$]; 6,66 [d, 0,11H, $NH(Ala)_{cis}$]; 5,09 (s, 1H, H-3); 4,81 (s, 2H, H-8); 4,69-4,68 (m, 2H, H-9, CH_{Ala}); 4,58 (s, 1H, H-4); 4,40 (s, 1H, H-7); 4,35 (s, 1H, H-10); 4,16 [s, 1H, CH-α (Pro)]; 4,01 (s, 1H, H-2); 3,95 (s, 1H, H-5); 3,79 (s, 3H, COOMe); 3,53 [td, *J* =10,3 Hz, 6,7 Hz, 1H, CH_2-δ (Pro)]; 3,46 [s, 1H, CH_2-δ' (Pro)]; 2,22-

2,07 [m, 2H, CH_2-β, CH_2-β' (Pro)]; 1,89-1,86 [m, 2H, CH_2-γ, CH_2-γ' (Pro)]; 1,50 [s, 9H, $(CH_3)_{3\text{-Boc}}$]; 1,48 (d, *J* = 7,30 Hz, 3H, $CH_{3\text{-Ala}}$).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 172,47 (CO_{Fca}); 172,10 (CO_{COOMe}); 170,89 (CO_{Ala}); 155,26 (CO_{Boc}); 96,31 (C-1, Fn); 80,37 (C_{qBoc}); 72,79 (C-7); 72,45 (C-10); 71,88 (C-6); 71,75 (C-8); 71,43 (C-9); 66,59 (C-2); 65,40 (C-5); 63,94 (C-4); 62,54 (C-3); 61,10 (C-α, Pro); 51,87 [$CH_{3\text{-}COOMe}$); 48,59 (CH_{Ala}); 47,53 (CH_2-δ, Pro); 29,87 (CH_2-β, Pro); 28,58 [$(CH_3)_{3\text{-Boc}}$]; 24,96 (CH_2-γ, Pro); 17,56 ($CH_{3\text{-Ala}}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{25}H_{33}N_3O_6Fe$: 527,4; dobiveno $[M+2H]^+$ na *m/z* 529,3.

Ac-L-Ala-L-Pro^1-NH^1-Fn-NH^2-L-Pro^2-NBoc (**21**)

t_t = 110,3 °C; R_f = 0,56 (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3423 sl ($NH_{slobodni}$), 3302 j, 3254 j ($NH_{asocirani}$), 1691, 1667, 1630 ($C{=}O_{CONH}$), 1572, 1510, 1483 (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 9,41 (s, 1H, $NH^1{}_{Fn}$); 9,25 (s, 1H, $NH^2{}_{Fn}$); 6,22 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, NH_{Ala}); 5,37(s, 1H, H-10); 5,30 (s, 1H, H-7); 4,80 (dq, *J* =7,8 Hz, 7,1 Hz, 1H, CH_{Ala}); 4,69 [dd, *J* =8,3 Hz, 5,3 Hz, 1H, CH-α (Pro1)]; 4,28 [dd, *J* =8,1 Hz, 4,7 Hz, 1H, CH-α (Pro2)]; 4,19 (s, 1H, H-2); 4,09 (s, 1H, H-5); 3,94 (s, 1H, H-3); 3,93 (s, 1H, H-4); 3,90 (s, 1H, H-8); 3,89 (s, 1H, H-9); 3,80 [td, *J* = 10,0 Hz, 7,0 Hz,1H, CH_2-δ'(Pro1)]; 3,72 [td, *J* = 10,0 Hz, 7,0 Hz, 1H, CH_2-δ (Pro1)]; 3,63 [ddd, *J* = 10,5 Hz, 7,7 Hz, 5,6 Hz, 1H, CH_2-δ'(Pro2)]; 3,42 [td, *J* = 10,6 Hz, 7,0 Hz, 1H, CH_2-δ (Pro2)]; 2,22-1,98 [m, 8H, CH_2-γ, CH_2-γ' (Pro1),CH_2-γ, CH_2-γ' (Pro2), CH_2-β, CH_2-β' (Pro1), CH_2-β, CH_2-β' (Pro2)]; 1,99 [s, 3H, $CH_{3\text{-}Ac}$); 1,47 [s, 9H, $(CH_3)_{3\text{-Boc}}$]; 1,46 (d, *J* = 7,15 Hz, 3H, $CH_{3\text{-Ala}}$).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,57 (CO_{Fn2}); 171,43 (CO_{Ala}); 169,92 (CO_{Fn1}); 169,57 (CO_{Ac}); 155,00 (CO_{Boc}); 96,40 (C-6);96,24 (C-1); 80,60 (C_{qBoc}); 65,79 (C-8); 65,71 (C-9); 64,65 (C-3); 64,62 (C-4); 62,34 (C-7); 62,31 (C-10); 61,18 (C-2); 61,14 (C-5); 60,62 (C-α, Pro1); 60,44 (C-α, Pro2); 47,98 (CH_2-δ, Pro1); 47,36 (CH_2-δ, Pro2); 46,98 (CH_{Ala}); 30,52 (CH_2-β, Pro2); 29,60 (CH_2-β, Pro1); 28,62 [$(CH_3)_{3\text{-Boc}}$]; 25,26 (CH_2-γ, Pro1); 24,77 (CH_2-γ, Pro2); 23,33 ($CH_{3\text{-Ac}}$); 18,07 ($CH_{3\text{-Ala}}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{30}H_{41}N_5O_6Fe$: 623,5; dobiveno $[M]^+$ na *m/z* 623,3.

Ac-D-Ala-L-Pro^1-NH^1-Fn-NH^2-L-Pro^2-NBoc (22)

t_t = 109,7 °C; R_f = 0,41 (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3421 sl ($NH_{slobodni}$), 3304 j, 3257 j ($NH_{asocirani}$), 1689, 1667, 1630 ($C{=}O_{CONH}$), 1571, 1509, 1481 (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 9,43 [s, 0,9H, $NH^1_{Fn\ trans}$); 9,20 [s, 0,1H, $NH^1_{Fn\ cis}$); 9,15 [s, 0,9H, $NH^2_{Fn\ trans}$); 9,09 [s, 0,1H, $NH^2_{Fn\ cis}$); 6,57 (s, 0,1H, $NH_{Ala\ cis}$); 6,53 (d, *J* = 7,26 Hz, 0,9H, $NH_{Ala\ trans}$); 5,37 (s, 1H, H-10); 5,31 (s, 1H, H-7); 4,84 (dq, *J* = 7,5 Hz, 6,8 Hz, 1H, CH_{Ala}); 4,64 [dd, *J* = 8,5 Hz, 4,6 Hz, 1H, CH-α (Pro1)]; 4,21 (pt, 2H, H-2, H-5); 4,14 [m, 1H, CH-α (Pro2)]; 3,95 (s, 2H, H-3, H-4); 3,91 (s, 1H, H-8); 3,90 (s, 1H, H-9); 3,84-3,82 [m, 1H, CH_2-δ'(Pro2)]; 3,65 [ddd, *J* = 10,5 Hz, 7,8 Hz, 5,5 Hz, 1H, CH_2-δ (Pro1)]; 3,58 [td, *J* = 10,1 Hz, 6,9 Hz, 1H, CH_2-δ (Pro2)]; 3,42 [td, *J* = 10,3 Hz, 7,0 Hz, 1H, CH_2-δ' (Pro1)]; 2,26 [m, 1H, CH_2-γ (Pro2)]; 2,19 [m, 1H,CH_2-γ (Pro1)]; 2,12-2,07 [m, 2H, CH_2-β, CH_2-β' (Pro1)]; 2,06-2,03 [m, 2H, CH_2-β, CH_2-β' (Pro2)]; 2,00 (s, 3H, $CH_{3\text{-}Ac}$); 1,98-1,93 [m, 1H, CH_2-γ' (Pro1)]; 1,85-1,83 [m, 1H, CH_2-γ' (Pro2)];1,48 [s, 9H, $(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 1,35 (d, *J* = 6,66 Hz, 3H, $CH_{3\text{-}Ala}$).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,43 (CO_{Ala}); 171,25 (CO_{Fn2}); 169,94 (CO_{Fn1}); 169,29 (CO_{Ac}); 155,08 (CO_{Boc}); 96,37 (C-6); 96,08 (C-1); 80,72 (C_{qBoc}); 65,81 (C-8); 65,65 (C-9); 64,72 (C-3); 64,69 (C-4); 62,44 (C-7); 62,39 (C-10); 61,20 (C-2); 61,19 (C-5); 60,91 (C-α, Pro2); 60,60 (C-α, Pro1); 48,02 (CH_2-δ, Pro2); 47,40 (CH_2-δ, Pro1); 47,32 (CH, Ala); 30,54 (CH_2-β, Pro2); 29,68 (CH_2-β, Pro1); 28,65 [$(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 25,03 (CH_2-γ, Pro1); 24,76 (CH_2-γ, Pro2); 23,50 ($CH_{3\text{-}Ac}$); 18,80 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{30}H_{41}N_5O_6Fe$: 623,5; dobiveno $[M+H]^+$ na *m/z* 624,6.

Ac-L-Ala^1-L-Pro^1-NH^1-Fn-NH^2-L-Pro^2-L-Ala^2-NHBoc (23)

t_t = 124,5°C; R_f = 0,77 (CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3427 sr ($NH_{slobodni}$), 3300 j, 3253 j ($NH_{asocirani}$), 1707, 1684, 1633 ($C{=}O_{CONH}$), 1571, 1506, 1486, 1465 (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 9,36 (s, 1H, NH^1_{Fn}); 9,29 (s, 1H, NH^2_{Fn}); 6,20 (d, *J* = 7,56 Hz, 1H, NH^1_{Ala}); 5,28 (s, 2H, H-10, H-7); 5,18 (d, *J* = 7,62 Hz, 1H, NH^2_{Ala}); 4,79 (p, 1H, CH_{Ala1}); 4,59-4,55 [m, 2H, CH-α (Pro1, Pro2)]; 4,51 (dq, *J* = 8,0 Hz, 7,1 Hz, 1H, CH_{Ala2}); 4,09 (s, 1H, H-2); 4,08 (s, 1H, H-5); 3,94 (s, 2H, H-3, H-4); 3,89 (s, 2H, H-8, H-9); 3,79-3,76 [m, 2H, CH_2-δ', CH_2-δ (Pro1)]; 3,72-3,70 [m, 2H, CH_2-δ, CH_2-δ' (Pro2)]; 2,25-2,02 [m, 8H,

CH_2-γ, CH_2-γ' (Pro1),CH_2-γ, CH_2-γ' (Pro2), CH_2-β, CH_2-β' (Pro1), CH_2-β, CH_2-β' (Pro2)]; 1,98 (s, 3H, $CH_{3\text{-Ac}}$); 1,45 (d, *J* = 6,09 Hz, 3H, $CH_{3\text{-Ala2}}$); 1,42 [s, 12 H, $(CH_3)_{3\text{-Boc}}$, $CH_{3\text{-Ala1}}$].

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 172,06 (CO_{Ala2}); 171,60 (CO_{Ala1}); 171,00 (CO_{Fn2}); 169,80 (CO_{Fn1}); 169,44 (CO_{Ac}); 155,26 (CO_{Boc}); 96,24 (C-1, C-6); 79,80 (C_{qBoc}); 65,81 (C-8, C-9); 64,68 (C-3); 64,64 (C-4); 62,30 (C-7, C-10); 61,31 (C-2); 61,21 (C-5); 60,78 (C-α, Pro1); 60,76 (C-α, Pro2); 48,01 (CH_{Ala2}); 47,81 (CH_2-δ, Pro1, Pro2); 46,97 (CH_{Ala1}); 29,67 (CH_2-β, Pro2); 29,59 (CH_2-β, Pro1); 28,51 [$(CH_3)_{3\text{-Boc}}$]; 25,22 (CH_2-γ, Pro1, Pro2); 23,30 ($CH_{3\text{-Ac}}$); 18,25($CH_{3\text{-Ala2}}$); 18,06 ($CH_{3\text{-Ala1}}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{33}H_{46}N_6O_7Fe$: 694,6; dobiveno $[M]^+$ na *m/z* 694,3.

Ac-D-Ala^1-L-Pro^1-NH^1-Fn-NH^2-L-Pro^2-D-Ala^2-NHBoc (**24**)

t_t = 112,7°C; R_f = 0,62 (CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3425 sr ($NH_{slobodni}$), 3304 j, 3254 j ($NH_{asocirani}$), 1706, 1684, 1633 ($C{=}O_{CONH}$), 1572, 1505, 1485, 1457 (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 9,32 (s, 0,10H, NH_{Fn})*; 9,28 (s, 0,85H, $NH^1{}_{Fn\ trans\text{-}trans}$); 9,23 (s, 0,15H, NH_{Fn})*; 9,21 (s, 0,86H, $NH^2{}_{Fn\ trans\text{-}trans}$); 8,98 (s, 0,05H, NH_{Fn})*; 6,59 (d, *J* = 7,85 Hz, 0,15H, NH_{Ala})*; 6,52 (d, *J* = 6,52 Hz, 0,85H, $NH^1{}_{Ala\ trans\text{-}trans}$); 6,36 (d, *J* = 7,85 Hz, 0,05H, NH_{Ala})*; 6,18 (d, *J* = 7,85 Hz, 0,05H, NH_{Ala})*; 5,49 (d, *J* = 8,97 Hz, 0,05H, NH_{Ala})*; 5,39 (d, *J* = 7,27 Hz, 0,85H, $NH^2{}_{Ala\ trans\text{-}trans}$); 5,28 (s, 1H, H-$10_{trans\text{-}trans}$); 5,26 (s, 1H, H-$7_{trans\text{-}trans}$); 5,24 (s, 1H, H-10); 5,20 (s, 1H, H-$7_{trans\text{-}trans}$); 4,85 (dq, *J* = 7,8 Hz, 7,1 Hz, 0,85H, $CH_{Ala1\ trans\text{-}trans}$); 4,83-4,78 (m, 0,15H, CH_{Ala1})*; 4,65-4,63 (m, 0,15H, CH_{Ala2})*; 4, 58 (dq, *J* = 8,0 Hz, 7,1 Hz, 0,85H, $CH_{Ala2\ trans\text{-}trans}$); 4,45 [dd, *J* = 8,1 Hz, 4,8 Hz, 1H, CH-α (Pro1)]; 4,41-4,40 [m, 1H, CH-α (Pro2)]; 4,18 (s, 1H, H-2); 4,14 (s, 1H, H-5); 3,96 (s, 2H, H-3, H-4); 3,92 (s, 2H, H-8, H-9); 3,90-3,84 [m, 2H, CH_2-δ', CH_2-δ (Pro1)]; 3,57 [td, *J* = 9,9 Hz, 7,0 Hz, 2H, CH_2-δ, CH_2-δ' (Pro2)]; 2,33-2,29 [m, 2H, CH_2-γ, CH_2-γ' (Pro1)]; 2,11-2,09 [m, 4H,CH_2-β, CH_2-β' (Pro1), CH_2-β, CH_2-β' (Pro2)]; 2,04 (s, 0,75H, $CH_{3\text{-Ac}}$)*; 2,00 (s, 2,25H, $CH_{3\text{-Ac}\ trans\text{-}trans}$); 1,99-1,98 [m, 2H, CH_2-γ, CH_2-γ' (Pro2)]; 1,44 [s, 8,2H, $(CH_3)_{3\text{-Boc}\ trans\text{-}trans}$]; 1,41 [s, 0,78H, $(CH_3)_{3\text{-Boc}}$]*; 1,35 (t, 5H, $CH_{3\text{-Ala1}\ trans\text{-}trans}$, $CH_{3\text{-Ala2}\ trans\text{-}trans}$); 1,25 (t, 1H, $CH_{3\text{-Ala1}}$, $CH_{3\text{-Ala2}}$)*.

* Protoni pripadaju sljedećim kombinacijama izomera: *cis-trans, trans-cis i cis-cis*

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,97 ($CO_{Ala2\ trans\text{-}trans}$); 171,70 ($CO_{Ala2}$)*; 171,63 ($CO_{Ala1\ trans\text{-}trans}$); 171,27 ($CO_{Ala1}$)*; 169,83 ($CO_{Fn2}$); 169,76 ($CO_{Fn1}$); 169,37 ($CO_{Ac}$);

155,03 (CO_{Boc}); 96,00 (C-1); 95,92 (C-6); 80,06 (C_{qBoc}); 65,88 (C-8): 65,85 (C-9); 64,79 (C-3); 64,77 (C-4); 62,58 (C-7); 62,53 (C-10); 61,33 (C-2); 61,16 (C-5); 61,07 (C-α, Pro1, Pro2); 48,34 (CH_{Ala2}); 48,08 (CH_2-δ, Pro1); 47,99 (CH_2-δ, Pro2); 47,32 (CH_{Ala1}); 29,74 (CH_2-β, Pro2); 29,70 (CH_2-β, Pro1); 28,55 [$(CH_3)_{3\text{-Boc}}$]; 25,06 (CH_2-γ, Pro1); 25,04 (CH_2-γ, Pro2); 23,46 ($CH_{3\text{-Ac}}$); 21,17 ($CH_{3\text{-Ala2}}$)*; 19,56 ($CH_{3\text{-Ala1}}$)*; 19,01 ($CH_{3\text{-Ala2 }trans\text{-}trans}$); 18,72 ($CH_{3\text{-Ala1 }trans\text{-}trans}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{33}H_{46}N_6O_7Fe$: 694,62; dobiveno $[M]^+$ na *m/z* 694,3.

Ac-L-Ala^1-NH^1-Fn-NH^2-L-Ala^2-Boc (**31**)

t_t = 140,8°C; R_f = 0,63 (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3439 sr ($NH_{slobodni}$), 3310 j, 3253 j ($NH_{asocirani}$), 1684, 1665 ($C{=}O_{CONH}$), 1571, 1506 (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 9,09 (s, 1H, NH^1_{Fn}) 9,06 (s, 1H, NH^2_{Fn}); 6,85 (d, *J* = 5,19 Hz, 1H, NH^1_{Ala}); 5,36 (s, 2H, H-10, H-7); 5,21 (d, *J* = 6,27 Hz, 1H, NH^2_{Ala}); 4,58 (dq, *J* = 8,0 Hz, 7,1 Hz, 1H, CH_{Ala1}); 4,24 (dq, *J* = 8,0 Hz, 7,1 Hz, 1H, CH_{Ala2}); 4,14 (s, 1H, H-2); 4,09 (s, 1H, H-5); 3,96 (s, 4H, H-3, H-4, H-8, H-9); 2,11 (s, 3H, $CH_{3\text{-Ac}}$); 1,46 [s, 9H, $(CH_3)_{3\text{-Boc}}$]; 1,39 (d, *J* = 6,94 Hz, 3H, $CH_{3\text{-Ala1}}$); 1,36 (d, *J* = 6,65 Hz, 3H, $CH_{3\text{-Ala2}}$).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,94 (CO_{Fn1}); 171,67 (CO_{Fn2}); 171,45 (CO_{Ac}); 156,80 (CO_{Boc}); 96,16 (C-1); 95,69(C-6); 80,81 (C_{qBoc}); 65,86 (C-8); 65,78 (C-9); 64,90 (C-3); 64,82 (C-4); 62,83 (C-7); 62,75 (C-10); 61,65 (C-2); 61,25 (C-5); 51,09 (CH_{Ala2}); 50,31 (CH_{Ala1}); 28,54 [$(CH_3)_{3\text{-Boc}}$]; 23,08 ($CH_{3\text{-Ac}}$); 17,84 ($CH_{3\text{-Ala2}}$); 17,45 ($CH_{3\text{-Ala1}}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{23}H_{32}N_4O_5Fe$: 444,55; dobiveno $[M]^+$ na *m/z* 444,7.

3.2.6. Opći postupak priprave Ac-dipeptidâ 4, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 25, 26 i 32

U suspenziju odgovarajućeg Boc-peptida u EtOAc ohlađenu na 0 °C uvodi se plinoviti HCl. Nakon 20 minuta miješanja u ledenoj kupelji otapalo se upari, a rezultirajući hidroklorid HCl·AA-Fn-OMe suspendira u suhom diklormetanu (8 ml) i otopi uz dodatak Et_3N. Nastaloj se otopini, ohlađenoj na 0 °C, uz miješanje oprezno dokapa acetil-klorid. Nakon 15 min. miješanja pri 0 °C, reakcijska se smjesa izlije u vodu i više puta ekstrahira diklormetanom. Organski se sloj ispere zasićenom vodenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na

silikagelu uz sljedeće sustave otapala kao eluensâ: (EtOAc), (*n*-BuOH : CH_3COOH : H_2O = 60 : 25 : 15), (CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1). Količine upotrebljenih supstrata i kemikalija prikazane su u tablici 9.

Tablica 9. Supstrati i reagensi upotrebljeni za pripravu Ac-dipeptidâ (**4**, **5**, **6**, **9**, **10**, **13**, **14**, **25**, **26**, **32**)

Produkt	**Supstrat** (masa, množina)	**Reagensi** (volumen, množina)		**Dobivena masa** (iskorištenje)	**Opis produkta**
		Et_3N	**AcCl**		
4	**1** (406 mg, 0,89 mmol)	987μl, 7,12 mmol	380 μl, 5,34 mmol	325 mg (92%)	Narančasta smola
5	**2** (382 mg, 0,89 mmol)	987μl, 7,12 mmol	380 μl, 5,34 mmol	271,6 mg (82%)	Narančasti kristali
6	**3** (382 mg, 0,89 mmol)	987μl, 7,12 mmol	380 μl, 5,34 mmol	255 mg (77%)	Narančasti kristali
9	**7** (800 mg, 1,52 mmol)	1,67 ml, 12,1 mmol	649 μl, 9,12 mmol	851 mg (56%)	Narančasta smola
10	**8** (800 mg, 1,52 mmol)	1,67 ml, 12,1 mmol	649 μl, 9,12 mmol	912 mg (60%)	Narančasta smola
13	**11** (1 g, 1,89 mmol)	2,07 ml, 23,7 mmol	807 μl, 11,34 mmol	1,13 g (60%)	Narančasti kristali
14	**12** (1 g, 1,89 mmol)	2,07 ml, 23,7 mmol	807 μl, 11,34 mmol	1,21 g (64%)	Narančasti kristali
25	**23** (1 g, 1,43 mmol)	1,6 ml, 11,44 mmol	610 μl, 8,58 mmol	740 mg (52%)	Žuti kristali
26	**24** (1 g, 1,43 mmol)	1,6 ml, 11,44 mmol	610 μl, 8,58 mmol	829 mg (58%)	Žuti kristali
32	**31** (500 mg, 1,13 mmol)	1,25 ml, 9,04 mmol	482 μl, 6,78 mmol	530 mg (47%)	Žuti prah

Ac-L-Pro-Fca-OMe (**4**)

t_t = 136-138 °C; R_f = 0,22 (CH_2Cl_2 : EtOAc = 5 : 1).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3416 sl ($NH_{slobodni}$), 3272 sr, 3229 sr ($NH_{asocirani}$),1709 j ($C=O_{COOMe}$), 1689 j ($C=O_{acetil}$), 1622 j ($C=O_{CONH}$), 1563 j (amid II).

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,81 (s, 0,93H, NH_{trans}); 7,29 (s, 0,07H, NH_{cis}); 4,75-4,72 (m, 2H, CH_{Fn}); 4,67-4,66 (m, 2H, $CH_{\alpha Pro}$ + CH_{Fn}); 4,55-4,56 (m, 0,93H, $CH_{Fn\ trans}$); 4,54 (šj, 0,07H, $CH_{Fn\ cis}$); 4,40-4,39 (m, 0,15H, $CH_{Fn\ cis}$); 4,38-4,36 (m, 1,85H, $CH_{Fn\ trans}$); 4,10-4,08 (m, 0,14H, $CH_{Fn\ cis}$); 4,01-3,99 (m, 1,86H, $CH_{Fn\ trans}$); 3,79 (s, 3H, CH_{3COOMe}); 3,65-3,62 (m, 1H, $CH_{\delta Pro}$); 3,48-3,43 (m, 1H, $CH_{\delta Pro}$); 2,59-2,56 (m, 1H, $CH_{\beta Pro}$); 2,18 (s, 4H, $CH_{\gamma Pro}$ + CH_{3Ac}); 2,06-2,01 (m, 3H, $CH_{\gamma Pro}$); 1,87-1,81 (m, 1H, $CH_{\beta Pro}$).

^{13}C NMR, APT (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,77 (CO_{COOMe}); 171,67 (CO_{CO-NH}); 169,30 (CO_{Ac}); 95,78 (C_{qFn}); 72,29 (C_{qFn}); 72,55; 72,53; 71,41; 71,22; 66,33; 66,27; 63,11, 62,99 ($CH_{Fn\ trans}$); 71,73; 71,35; 66,85; 66,72; 64,08; 63,65 ($CH_{Fn\ cis}$); 60,15 ($CH_{\alpha Pro}$); 51,94 ($CH_{3COOMe\ cis}$); 51,68 ($CH_{3COOMe\ trans}$); 48,51 ($CH_{2\delta Pro\ trans}$); 47,11 ($CH_{2\delta Pro\ cis}$); 31,36 ($CH_{2\beta Pro\ cis}$); 26,81 ($CH_{2\beta Pro\ trans}$); 25,23 (CH_{3Ac}); 23,22 ($CH_{2\gamma Pro\ trans}$); 22,71 ($CH_{2\gamma Pro\ cis}$).

HRMS analiza za $C_{19}H_{22}N_2O_4Fe$ (398,0923) nađeno: 398,0939.

Ac-L-Ala-Fca-OMe (**5**)

t_t = 102-105 °C; R_f = 0,46 (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3422 sr ($NH_{slobodni}$), 3299 šsr ($NH_{asocirani}$), 1707 j, 1666 j ($C=O_{CONH}$), 1561 j, 1466 j (amid II).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,04 (s, 1H, NH_{Fca}); 6,41 (d, J = 7,45 Hz, 1H, NH_{Ala}); 4,75 (m, 1H, H-7); 4,73 (m, 1H, H-10); 4,67 (s, 1H, H-2); 4,58 [m, 2H, H-5, CH_{Ala}]; 4,38 (m, 2H, H-8, H-9); 4,04 (m, 1H, H-4); 4,02 (m, 1H, H-3); 3,79 (s, 3H, COOMe); 2,08 (s, 3H, $CH_{3\text{-}Ac}$); 1,46 (d, J = 7,06 Hz, 3H, $CH_{3\text{-}Ala}$).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,91 (CO_{Fca}); 171,01 (CO_{Ala}); 170,64 (CO_{Ac}); 95,45 (C-1); 72,62 (2C, C-8, C-9); 72,16 (C-6); 71,37 (C-10); 71,24 (C-7); 66,57 (C-4); 66,32 (C-3); 63,23 (C-2); 63,03 (C-5); 51,77 ($CH_{3\text{-}COOMe}$); 49,44 (CH_{Ala}); 23,38 ($CH_{3\text{-}Ac}$); 18,30 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO) δ/ppm: 171,06 (CO_{Fca}); 170,69 (CO_{Ala}); 168,98 (CO_{Ac}); 97,04 (C-1); 72,52 (2C, C-8, C-9); 71,23 (C-6); 70,44 (2C, C-7, C-10); 65,53 (2C, C-3, C-4); 61,73 (C-2); 61,55 (C-5); 51,26 ($CH_{3\text{-}COOMe}$); 48,68 (CH_{Ala}); 22,42 ($CH_{3\text{-}Ac}$); 18,08 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

Elementarna analiza za $C_{17}H_{20}N_2O_4Fe$ (372,211): C 54,86; H 5,42; N 7,53. Pronađeno: C 55,05; H 5,45; N 7,51.

Ac-D-Ala-Fca-OMe (**6**)

t_t = 102-107 °C; R_f = 0,4 (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3421 sr ($NH_{slobodni}$), 3298 šsr ($NH_{asocirani}$), 1712 j, 1661 j ($C{=}O_{CONH}$), 1561 j, 1466 j (amid II).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,14 (s, 1H, NH_{Fca}); 6,49 (d, *J* = 7,56 Hz, 1H, NH_{Ala}); 4,75 (m, 1H, H-7); 4,73 (m, 1H, H-10); 4,66 (m, 1H, H-2); 4,60 (m, 2H, H-5, CH_{Ala}); 4,38 (m, 2H, H-8, H-9); 4,04 (m, 1H, H-4); 4,02 (m, 1H, H-3); 3,78 (s, 3H, COOMe); 2,08 (s, 3H, $CH_{3\text{-}Ac}$); 1,44 (d, *J* = 7,03 Hz, 3H, $CH_{3\text{-}Ala}$).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,89 (CO_{Fca}); 171,92 (CO_{Ala}); 170,64 (CO_{Ac}); 95,39 (C-1); 72,61 (2C, C-8, C-9); 72,19 (C-6); 71,40 (C-10); 71,26 (C-7); 66,60 (C-4); 66,31 (C-3); 63,32 (C-2); 63,05 (C-5); 51,79 ($CH_{3\text{-}COOMe}$); 49,44 (CH_{Ala}); 23,41 ($CH_{3\text{-}Ac}$); 18,20 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO) δ/ppm: 171,06 (CO_{Fca}); 170,68 (CO_{Ala}); 168,98 (CO_{Ac}); 97,04 (C-1); 72,51 (2 C, C-8, C-9); 71,22 (C-6); 70,44 (2 C, C-7, C-10); 65,52 (2 C, C-3, C-4); 61,73 (C-2); 61,54 (C-5); 51,26 ($CH_{3\text{-}COOMe}$); 48,68 (CH_{Ala}); 22,42 ($CH_{3\text{-}Ac}$); 18,08 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

Elementarna analiza za $C_{17}H_{20}N_2O_4Fe$ (372,211): C 54,86; H 5,42; N 7,53. Pronađeno: C 55,01; H 5,39; N 7,58.

Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe (**9**)

t_t = 57 °C; R_f = 0,65 (*n*-BuOH : CH_3COOH : H_2O = 60 : 25 : 15).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3422 j ($NH_{slobodni}$), 3290 sr ($NH_{asocirani}$), 1707 j ($C{=}O_{COOMe}$), 1673, 1639 ($C{=}O_{CONH}$), 1558, 1544, 1510 (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 9,11 (s, 0,14H, $NH_{Fca\ \textit{cis}}$); 8,43 (s, 0,86H, $NH_{Fca\ \textit{trans}}$); 6,51 (d, *J* = 7,2 Hz, 0,86H, $NH_{Ala\ \textit{trans}}$); 6,27 (d, *J* = 5,1 Hz, 0,14H, $NH_{Ala\ \textit{cis}}$); 4,78 (dq, *J* = 7,6 Hz, 7,1 Hz, 1H, CH_{Ala}); 4,74 (pt, 1H, H-10); 4,70 (pt, 1H, H-7); 4,66 (pt, 1H, H-3); 4,61 [dd, *J* = 8,2 Hz, 3,0 Hz, 1 H, CH-α (Pro)]; 4,47 [pt, 1H, H-4], 4,37 (pt, 1H, H-8); 4,34 (pt, 1H, H-9); 4,04 (pt, 0,14H, $H\text{-}2_{cis}$, $H\text{-}5_{\textit{cis}}$); 3,99 (pt, 1,86H, $H\text{-}2_{\textit{trans}}$, $H\text{-}5_{\textit{trans}}$); 3,78 (s, 2,6H, $COOMe_{\textit{trans}}$); 3,76 (s, 0,4H, $COOMe_{\textit{cis}}$); 3,72-3,70 [m, 1H, CH_2-δ'(Pro)]; 3,62 [td, 1H, CH_2-δ (Pro)]; 2,42 [m, 1H, CH_2-γ (Pro)]; 2,23-2,18 [m, 1H, CH_2-γ' (Pro)]; 2,04-2,01 [m, 1H, CH_2-β'

(Pro)]; 2,06 (s, 0,4H, $CH_{3\text{-Ac }cis}$); 2,00 (s, 2,6H, $CH_{3\text{-Ac }trans}$); 1,97-1,93 [m, 1H, CH_2-β (Pro)]; 1,41 (d, J = 6,8 Hz, 2,45H, $CH_{3\text{-Ala }trans}$); 1,36 (d, J = 6,9 Hz, 0,55H, $CH_{3\text{-Ala }cis}$).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 173,28 ($CO_{Ala\ trans}$); 172,02 ($CO_{Ala\ cis}$); 171,91 ($CO_{COOMe\ cis}$); 171,81 ($CO_{COOMe\ trans}$); 171,22 ($CO_{Fca\ cis}$); 169,68 ($CO_{Fca\ trans}$); 169,22 ($CO_{Ac\ trans}$); 168,86 ($CO_{Ac\ cis}$); 96,19 (C-1_{cis}); 95,60 (C-1_{trans}); 72,65 (C-8); 72,56 (C-9); 72,10 (C-6); 71,41 (C-10); 71,13 (C-7); 66,58 (C-2_{cis}); 66,45 (C-2_{trans}); 66,38 (C-5_{trans}); 65,99 (C-5_{cis}); 63,52 (C-3_{cis}); 63,24 (C-4_{cis}); 63,14 (C-3_{trans}); 62,84 (C-4_{trans}); 61,49 (C-α, Pro_{cis}); 60,56 (C-α, Pro_{trans}); 51,75 ($CH_{3\text{-COOMe }trans}$); 51,74 ($CH_{3\text{-COOMe }cis}$); 47,62 ($CH_2$-δ, Pro); 46,84 ($CH_{Ala}$); 31,43 ($CH_2$-β, Pro_{cis}); 27,24 (CH_2-β, Pro_{trans}); 25,28 (CH_2-γ, Pro_{trans}); 23,27 ($CH_{3\text{-Ac }trans}$); 22,84 (CH_2-γ, Pro_{cis}); 22,27 ($CH_{3\text{-Ac }cis}$); 18,40 ($CH_{3\text{-Ala }trans}$); 16,46 ($CH_{3\text{-Ala }cis}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{22}H_{27}N_3O_5Fe$: 469,3; dobiveno $[M+H]^+$ na *m/z* 470,3.

Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe (**10**)

R_f = 0,61 (*n*-BuOH : CH_3COOH : H_2O = 60 : 25 : 15).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3438 j ($NH_{slobodni}$), 3321 j ($NH_{asocirani}$), 1707 j ($C{=}O_{COOMe}$), 1667, 1659 ($C{=}O_{CONH}$), 1545, 1512 (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,33 (s, 1H, NH_{Fca}); 6,79 (d, J = 5,4 Hz, 1H, NH_{Ala}); 4,75 (s, 1H, H-2); 4,71 (s, 1H, H-5), 4,67-4,64 (m, 3H, CH_{Ala}, H-7, H-10); 4,60 [m, 1H, CH-α (Pro)]; 4,41 (s, 1H, H-8); 4,37 (s, 1H, H-9); 4,00 (s, 1H, H-3); 3,99 (s, 1H, H-5); 3,92 [pt, 1H, CH_2-δ (Pro)]; 3,78 (s, 3H, COOMe); 3,51 [q, 1 H, J = 3,5 Hz, J = 3,5 Hz, CH_2-δ' (Pro)]; 2,42-2,41 [m, 1H, CH_2-β (Pro)]; 2,14-2,12 [m, 1H, CH_2-γ (Pro)]; 2,05-2,03 [m, 2H, CH_2-γ' (Pro), CH_2-β' (Pro)]; 1,93-1,91 [m, 1H, CH_2-β' (Pro)]; 2,01 (s, 3H, $CH_{3\text{-Ac}}$); 1,37 (d, J = 6,8 Hz, 3H, $CH_{3\text{-Ala}}$).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 172,62 (CO_{Ala}); 172,37 (CO_{COOMe}); 170,76 (CO_{Ac}); 169,32 (CO_{Fca}); 95,93 (C-1, Fn); 72,94 (C-8); 72,79 (C-9); 71,58 (C-6); 71,39 (C-10); 71,18 (C-7); 66,43 (C-3); 66,22 (C-4); 63,08 (C-5); 63,03 (C-2); 61,08 (C-α, Pro); 51,76 ($CH_{3\text{-COOMe}}$); 47,69 (CH_{Ala}); 47,39 (CH_2-δ, Pro); 28,39 (CH_2-β, Pro); 24,71 (CH_2-γ, Pro); 23,00 ($CH_{3\text{-Ac}}$); 16,90 ($CH_{3\text{-Ala}}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{22}H_{27}N_3O_5Fe$: 469,3; dobiveno $[M]^+$ na *m/z* 469,3.

Ac-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe (13)

R_f = 0,58 (*n*-BuOH : CH_3COOH : H_2O = 60 : 25 : 15).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3420 j ($NH_{slobodni}$), 3309 j ($NH_{asocirani}$), 1705 j ($C{=}O_{COOMe}$), 1696, 1680, 1636 ($C{=}O_{CONH}$), 1555, 1540, 1507 (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,99 (s, 1H, NH_{Fca}); 7,22 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H, NH_{Ala}); 4,78 (s, 1H, H-8); 4,76 (s, 1H, H-3); 4,74 (s, 1H, H-9); 4,67 (s, 1H, H-4); 4,57 [m, 1H, CH-α (Pro)]; 4,48 (dq, *J* = 8,4 Hz, 7,1 Hz, 1H, CH_{Ala}); 4,39 (s, 1H, H-7); 4,37 (s, 1H, H-10); 4,02 (s, 1H, H-2); 3,96 (s, 1H, H-5); 3,77 (s, 3H, COOMe); 3,67-3,64 [m, 1H, CH_2-δ (Pro)]; 3,50 [m, 1H, CH_2-δ' (Pro)]; 2,32 [s, 1H, CH_2-γ (Pro)]; 2,18 (s, 3H, $CH_{3\text{-}Ac}$); 2,08-2,06 [m, 2H, CH_2-β, CH_2-β' (Pro)]; 1,93 [s, 1H, CH_2-γ' (Pro)]; 1,42 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H, $CH_{3\text{-}Ala}$).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,82 (CO_{Ac}); 171,81 (CO_{COOMe}); 171,66 (CO_{Ala}); 170,28 (CO_{Fca}); 95,76 (C-1, Fn); 72,67 (C-7); 72,65 (C-10); 72,21 (C-6); 71,43 (C-8); 71,08 (C-9); 66,62 (C-2); 66,01 (C-5); 63,04 (C-4); 62,87 (C-3); 60,65 (C-α, Pro); 51,76 ($CH_{3\text{-}COOMe}$); 49,58 (CH_{Ala}); 48,67 (CH_2-δ, Pro); 28,68 (CH_2-β, Pro); 25,21 (CH_2-γ, Pro); 22,93 ($CH_{3\text{-}Ac}$); 17,22 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{22}H_{27}N_3O_5Fe$: 469,3; dobiveno $[M+H]^+$ na *m/z* 470,1.

Ac-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe (14)

R_f = 0,69 (*n*-BuOH : CH_3COOH : H_2O = 60 : 25 : 15).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3424 sr ($NH_{slobodni}$), 3303 j ($NH_{asocirani}$), 1706 j ($C{=}O_{COOMe}$), 1688, 1630 ($C{=}O_{CONH}$), 1557, 1541, 1521 (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,58 (s, 1H, NH_{Fca}); 7,08 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H, NH_{Ala}); 5,05 (s, 1H, H-3); 4,78 (s, 1H, H-8); 4,76 (s, 1H, H-9); 4,70 (s, 1H, H-4); 4,62 (dq, *J* = 8,5 Hz, 7,1 Hz, 1H, CH_{Ala}); 4,40 (s, 1H, H-7); 4,35 (s, 1H, H-10); 4,26 [dd, *J* = 7,7 Hz, 5,6 Hz, 1H, CH-α (Pro)]; 3,98 (s, 1H, H-2); 3,95 (s, 1H, H-5); 3,77 (s, 3H, COOMe); 3,68 [td, *J* = 9,8 Hz, 6,9 Hz, 1H, CH_2-δ (Pro)]; 3,55 [td, *J* = 9,8 Hz, 6,5 Hz, 1H, CH_2-δ' (Pro)]; 2,28-2,23 [m, 1H, CH_2-γ (Pro)]; 2,21-2,18 [m, 1H, CH_2-β (Pro)]; 2,16 (s, 3H, $CH_{3\text{-}Ac}$); 2,15-2,11 [m, 1H, CH_2-β' (Pro)]; 2,00-1,95 [s, 1H, CH_2-γ' (Pro)]; 1,49 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H, $CH_{3\text{-}Ala}$).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 172,08 (CO_{Ac}); 172,03 (CO_{COOMe}); 170,63 (CO_{Ala}); 170,31 (CO_{Fca}); 96,56 (C-1, Fn); 72,80 (C-7); 72,64 (C-10); 71,91 (C-6); 71,46 (C-8); 71,20 (C-9); 66,45 (C-2); 65,74 (C-5); 63,25 (C-4); 62,69 (C-3); 61,19 (C-α, Pro); 51,78

($CH_{3\text{-}COOMe}$); 49,11 (CH_{Ala}); 48,66 (CH_2-δ, Pro); 29,23 (CH_2-β, Pro); 25,52 (CH_2-γ, Pro); 22,87 ($CH_{3\text{-}Ac}$); 17,55 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{22}H_{27}N_3O_5Fe$: 469,3; dobiveno $[M+H]^+$ na *m/z* 470,4.

Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-NHAc (**25**)

t_t = 146°C; R_f = 0,48 (CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3425 sr ($NH_{slobodni}$), 3300 j, 3253 j ($NH_{asocirani}$), 1682, 1631 ($C{=}O_{CONH}$), 1571, 1509, 1485, 1466 (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 9,37 (s, 0,09H, NH_{Fn})*; 9,34 (s, 0,18H, NH_{Fn})*; 9,31 (s, 1,63H, NH^1_{Fn}, NH^2_{Fn}); 9,21 (s, 0,1H, NH_{Fn})*; 6,74 (d, *J* = 8,0 Hz, 0,09H, NH_{Ala})*; 6,49 (d, *J* = 7,2 Hz, 0,04H, NH_{Ala})*; 6,19 (d, *J* = 6,2 Hz, 1,63H, NH^1_{Ala}, NH^2_{Ala}); 6,13 (d, *J* = 7,6 Hz, 0,16H, NH_{Ala})*; 6,09 (d, *J* = 6,9 Hz, 0,07H, NH_{Ala})*; 5,29 (s, 2H, H-10, H-7); 4,79 (dq, *J* = 8,0 Hz, 7,3 Hz, 2H, CH_{Ala1}, CH_{Ala2}); 4,57 [dd, *J* = 8,3 Hz, 5,2 Hz, 2H, CH-α (Pro1, Pro2)]; 4,10 (s, 2H, H-2, H-5); 3,95 (s, 2H, H-3, H-4); 3,91 (s, 2H, H-8, H-9); 3,79 [m, 2H, CH_2-δ', CH_2-δ (Pro1)]; 3,72 [m, 2H, CH_2-δ, CH_2-δ'(Pro2)]; 2,27-2,20 [m, 4H, CH_2-γ, CH_2-γ' (Pro1),(Pro2)]; 2,14-2,02[m, 4H, CH_2-β, CH_2-β' (Pro1), (Pro2)]; 1,98 (s, 6H, $CH_{3\text{-}Ac1}$, $CH_{3\text{-}Ac2}$); 1,45 (d, *J* = 6,8 Hz, 6H, $CH_{3\text{-}Ala1}$, $CH_{3\text{-}Ala2}$).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,66 (CO_{Ala1}, CO_{Ala2}); 169,81 (CO_{Fn1}, CO_{Fn2}); 169,46 (CO_{Ac1}, CO_{Ac2}); 96,16 (C-1, C-6); 65,90 (C-8, C-9); 64,71 (C-3, C-4); 62,37 (C-7, C-10); 61,24 (C-2, C-5); 60,79 (C-α, Pro1, Pro2); 47,98 (CH_2-δ, Pro1, Pro2); 46,99 (CH_{Ala1}, CH_{Ala2}); 29,68 (CH_2-β, Pro2); 25,22 (CH_2-γ, Pro1, Pro2); 23,31 ($CH_{3\text{-}Ac}$); 18,06 ($CH_{3\text{-}Ala1}$, $CH_{3\text{-}Ala2}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{30}H_{40}N_6O_6Fe$: 636,5; dobiveno $[M]^+$ na *m/z* 636,2.

* Protoni pripadaju sljedećim kombinacijama izomera: *cis-trans, trans-cis i cis-cis*

Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-D-Ala-NHAc (**26**)

t_t = 115°C; R_f = 0,54 (CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3423 sr ($NH_{slobodni}$), 3304 j, 3254 j ($NH_{asocirani}$), 1684, 1672, 1632 ($C{=}O_{CONH}$), 1571, 1508, 1484, 1464 (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 9,32 (s, 0,07H, NH_{Fn})*; 9,20 (s, 0,14H, NH_{Fn})*; 9,16 (s, 1,54H, NH^1_{Fn}, NH^2_{Fn}); 9,14 (s, 0,25H, NH_{Fn})*; 6,63 (d, *J* = 8,9 Hz, 0,19H, NH_{Ala})*; 6,50 (d, *J* = 7,2 Hz, 1,53H, NH^1_{Ala}, NH^2_{Ala}); 6,44 (d, *J* = 7,1 Hz, 0,1H, NH_{Ala})*; 6,40 (d, *J* = 7,1 Hz, 0,18H, NH_{Ala})*; 5,22 (s, 2H, H-10, H-7); 4,85 (dq, *J* = 8,0 Hz, 7,2 Hz, 2H, CH_{Ala1},

CH_{Ala2}); 4,44 [dd, *J* = 8,5 Hz, 4,6 Hz, 2H, CH-α (Pro1, Pro2)]; 4,18 (s, 2H, H-2, H-5); 3,97 (s, 2H, H-3, H-4); 3,94 (s, 2H, H-8, H-9); 3,89-3,84 [m, 2H, CH_2-δ', CH_2-δ (Pro1)]; 3,60-3,57 [m, 2H, CH_2-δ, CH_2-δ'(Pro2)]; 2,29-2,25 [m, 2H, CH_2-γ (Pro1), (Pro2)]; 2,12-2,09 [m, 4H, CH_2-β, CH_2-β' (Pro1), (Pro2)]; 2,00 (s, 6H, $CH_{3\text{-}Ac1}$, $CH_{3\text{-}Ac2}$); 1,96-1,95 [m, 2H, CH_2-γ' (Pro1),(Pro2)]; 1,35 (d, *J* = 6,8 Hz, 6H, $CH_{3\text{-}Ala1}$, $CH_{3\text{-}Ala2}$).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,78 (CO_{Ala1}, CO_{Ala2}); 169,76 (CO_{Fn1}, CO_{Fn2}); 169,43 (CO_{Ac1}, CO_{Ac2}); 95,92 (C-1, C-6); 65,90 (C-8, C-9); 64,88 (C-3, C-4); 62,75 (C-7, C-10); 61,61 (C-2, C-5); 61,24 (C-α, Pro1, Pro2); 48,01 (CH_2-δ, Pro1, Pro2); 47,34 (CH_{Ala1}, CH_{Ala2}); 29,72 (CH_2-β, Pro2); 25,01 (CH_2-γ, Pro1, Pro2); 23,41 ($CH_{3\text{-}Ac}$); 18,59 ($CH_{3\text{-}Ala1}$, $CH_{3\text{-}Ala2}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{30}H_{40}N_6O_6Fe$: 636,5; dobiveno $[M+H]^+$ na *m/z* 637,3.

***** Protoni pripadaju sljedećim kombinacijama izomera: *cis-trans, trans-cis i cis-cis*

Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Ala-Ac (**32**)

t_t = 111,7°C; R_f = 0,64 (*n*-BuOH : CH_3COOH : H_2O = 60 : 25 : 15).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3438 sr ($NH_{slobodni}$), 3306 j, 3252 j ($NH_{asocirani}$), 1687, 1680, 1665, 1650 ($C{=}O_{CONH}$), 1570, 1511, 1504 (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 9,07 (s, 2H, NH^1_{Fn}, NH^2_{Fn}); 6,57 (d, *J* = 5,19 Hz, 2H, NH^1_{Ala}, NH^2_{Ala}); 5,26 (s, 2H, H-10, H-7); 4,48 (q, 2H, CH_{Ala1}, CH_{Ala2}); 4,12 (s, 2H, H-2, H-5); 3,97 (s, 4H, H-3, H-4, H-8, H-9); 2,09 (s, 6H, $CH_{3\text{-}Ac}$); 1,41 (d, *J* = 6,87 Hz, 6H, $CH_{3\text{-}Ala1}$, $CH_{3\text{-}Ala2}$).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,52 (CO_{Fn1}, CO_{Fn2}); 171,40 (CO_{Ac1}, CO_{Ac2}); 95,66 (C-1, C-6); 66,08 (C-8, C-9); 64,88 (C-3, C-4); 63,08 (C-7, C-10); 61,90 (C-2, C-5); 50,37 (CH_{Ala2}, CH_{Ala1}); 23,18 ($CH_{3\text{-}Ac}$); 17,61 ($CH_{3\text{-}Ala1}$, $CH_{3\text{-}Ala2}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{20}H_{26}N_4O_4Fe$: 442,3; dobiveno $[M]^+$ na *m/z* 442,2.

3.2.7. Opći postupak priprave Ac-AA-AA-NH-Fn-COOH (15, 16, 27)

U otopinu estera u metanolu doda se NaOH i par kapi vode. Nakon 1 sat refluksiranja pri temperaturi od 65 °C, reakcijska se smjesa upari, ostatak zakiseli 20%-tnom otopinom HCl te ekstrahira etil-acetatom. Organski sloj ispere se zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari.

Tablica 10. Supstrati i reagensi upotrebljeni za pripravu Ac-AA-AA-NH-Fn-COOH (**15**, **16**, **27**)

Produkt	**Supstrat** (masa, množina)	**Reagensi** (volumen, množina)		**Dobivena masa** (iskorištenje)	**Opis produkta**
		Metanol	NaOH		
15	**9** (800 mg, 1,70 mmol)	(8,6 ml)	(68 mg, 1,70 mmol)	1,66 mg (98%)	Narančasta smola
16	**10** (800 mg, 1,70 mmol)	(8,6 ml)	(68 mg, 1,70 mmol)	1,62 mg (95%)	Narančasta smola
27	**5** (100 mg, 0,27 mmol)	(1,36 ml)	(8,6 mg, 0,27 mmol)	90 mg (94%)	Narančasti Kristali

Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-COOH (**15**) R_f = 0,23 (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3420 sr ($NH_{slobodni}$), 3300 j ($NH_{asocirani}$), 3114-3001 š (OH, COOH), 1692, 1626 ($C{=}O_{COOH,\ CONH}$), 1542 j (amid II).

Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-COOH (**16**) R_f = 0,23 (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3432 sl ($NH_{slobodni}$), 3306 j ($NH_{asocirani}$), 3118 š (OH, COOH), 1710, 1673, 1632 ($C{=}O_{COOH,\ CONH}$), 1544 j (amid II).

Ac-Ala-NH-Fn-COOH (27) t_t = 58-61 °C; R_f = 0,23 (CH_2Cl_2 : EtOAc = 1 : 1).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3420 sl ($NH_{slobodni}$), 3296 sr ($NH_{asocirani}$), 3109-2800 š (OH, COOH), 1710, 1697, 1653 ($C{=}O_{COOH,\ CONH}$), 1576, 1557, 1540, 1522, 1507 (amid II).

3.2.8. Opći postupak priprave Ac-AA-AA-NH-Fn-CON$_3$ (17, 18, 28)

Otopini kiselina (**15**, **16**, **27**) u acetonu doda se voda (količina navedena u tablici). Reakcijskoj se smjesi, ohlađenoj na 0 °C, dokapa otopina Et_3N u acetonu, te otopina ClCOOEt u acetonu pazeći da temperatura ne prijeđe 5 °C. Nakon 30 minuta miješanja, doda se otopina NaN_3 u vodi. Nakon 1h miješanja u ledenoj kupelji reakcijska se smjesa razrijedi hladnom vodom, ekstrahira diklormetanom, ispere 5%-tnom zasićenom otopinom $NaHCO_3$ i zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha.

Tablica 11. Supstrati i reagensi upotrebljeni za pripravu Ac-AA-AA-NH-Fn-COOH (**17**, **18**, **28**)

Produkt	**Supstrat** (masa, množina)	**Reagensi** (volumen, množina)			**Dobivena masa** (iskorištenje)	**Opis produkta**
		NEt$_3$	**ClCOOEt**	**NaN$_3$**		
17	**15** (1,6 g, 3,51 mmol), 1,1 ml voda	(410 mg, 3,99 mmol); 10,2 ml aceton	(83,9 mg, 2,63 mmol), 2 ml aceton	(344,2 mg, 5,27 mmol), 1,1 ml voda	3,93 g (93%)	Crvena smola
18	**16** (1,6 g, 3,51 mmol), 1,1 ml voda	(410 mg, 3,99 mmol); 10,2 ml aceton	(83,9 mg, 2,63 mmol), 2 ml aceton	(344,2 mg, 5,27 mmol), 1,1 ml voda	3,33 g (95%)	Crvena smola
28	**27** (130 mg, 0,36 mmol), 0,11 ml voda	(42 mg, 0,41 mmol); 0,65 ml aceton	(8,6 mg, 0,27 mmol), 0,2 ml aceton	(35,3 mg, 0,54 mmol), 0,11 ml voda	90 mg (94%)	Crveni prah

Ac-Ala-NH-Fn-CON$_3$ (28):

R_f = 0,37 (CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3423 sr ($NH_{slobodni}$), 3292 sl ($NH_{asocirani}$), 2136 j (N_3), 1682, 1606 ($C{=}O_{CON3,\ CONH}$), 1560, 1538, 1509 (amid II).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,22 (s, 1H, NH_{Fca}); 6,35 (d, *J* = 7,33 Hz, 1H, NH_{Ala}); 4,78 (m, 2H, H-7, H-10); 4,76 (s, 1H, H-2); 4,66 (s, 1H, H-5); 4,61 (dq, *J* = 8,2 Hz, *J*

= 7,1 Hz, 1H, CH_{Ala}); 4,49 (m, 2H, H-8, H-9); 4,07 (m, 1H, H-4); 4,02 (m, 1H, H-3); 2,10 (s, 3H, $CH_{3\text{-}Ac}$); 1,44 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H, $CH_{3\text{-}Ala}$).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 176,42 (CO_{CON3}); 170,93 (CO_{Fca}); 170,77 (CO_{Ac}); 96,41 (C-1); 73,89 (C-8); 73,81 (C-9); 73,46 (C-6); 71,57 (C-10); 71,55 (C-7); 66,97 (C-4); 66,40 (C-3); 63,26 (C-2); 63,01 (C-5); 49,47 (CH_{Ala}); 23,45 ($CH_{3\text{-}Ac}$); 17,72 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-CON$_3$ (17):

R_f = 0,21 (CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3423 sr ($NH_{slobodni}$), 3291 sr ($NH_{asocirani}$), 2136 j (N_3), 1711, 1680, 1625 ($C{=}O_{CON3,\ CONH}$), 1557, 1510 (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,61 (s, 1H, NH_{Fca}); 6,54 (m, 1 H, NH_{Ala}); 4,76 (pt, 2H, H-10, H-7); 4,74 (m, 1H, CH_{Ala}); 4,64 [m, 1H, CH-α (Pro)]; 4,48 [pt, 2H, H-4, H-3], 4,46 (pt, 1H, H-8, H-9); 4,01 (pt, 1H, H-2); 4,00 (s, 1H, H-5); 3,75-3,70 [m ,1H, CH_2-δ'(Pro)]; 3,65-3,61 [m, 1H, CH_2-δ (Pro)]; 2,45-2,44 [m, 1H, CH_2-γ (Pro)]; 2,23-2,18 [m, 1H, CH_2-γ' (Pro)]; 2,07-2,02 [m, 2H, CH_2-β' (Pro), CH_2-β (Pro)]; 2,00 (s, 3H, $CH_{3\text{-}Ac}$); 1,41 (d, *J* = 6,87 Hz, 3H, $CH_{3\text{-}Ala}$).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 173,41 (CO_{CON3}); 171,46 (CO_{Ala}); 169,72 (CO_{Fca}); 169,31 (CO_{Ac}); 96,50 (C-1); 73,89 (C-8); 73,78 (C-9); 73,31 (C-6); 71,62 (C-10); 71,37 (C-7); 66,70 (C-2); 66,56 (C-5); 63,39 (C-3); 62,82 (C-4); 60,57 (C-α, Pro); 47,69 (CH_2-δ, Pro); 46,84 (CH_{Ala}); 29,41 (CH_2-β, Pro); 25,27 (CH_2-γ, Pro); 23,25 ($CH_{3\text{-}Ac}$); 18,38 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-CON$_3$ (18):

R_f = 0,17 (CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3438 sr ($NH_{slobodni}$), 3317 j ($NH_{asocirani}$), 2135 j (N_3), 1711, 1677, 1625 ($C{=}O_{CON3,\ CONH}$), 1545, 1511 (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,37 (s, 1H, NH_{Fca}); 6,62 (d, *J* = 5,34 Hz, 1H, NH_{Ala}); 4,84 (pt, 1H, H-2); 4,80 (pt, 1H, H-5), 4,75 (pt, 1H, H-7); 4,70 (pt, 1H, H-10); 4,62-4,58 [m, 2H, CH-α (Pro), CH_{Ala}]; 4,53 (pt, 1H, H-8); 4,49 (pt, 1H, H-9); 4,05 (pt, 1H, H-3); 4,02 (pt, 1H, H-5); 3,96 [pt, 1H, CH_2-δ (Pro)]; 3,51 [q, 1H, *J* = 9,52 Hz, *J* = 6,9 Hz, *J* = 7,31 Hz, CH_2-δ' (Pro)]; 2,43-2,42 [m, 1H, CH_2-β (Pro)]; 2,16-2,12 [m, 1H, CH_2-γ (Pro)]; 2,05-

2,04 [m, 2H, CH_2-γ' (Pro), CH_2-β' (Pro)]; 2,03 (s, 3H, $CH_{3\text{-}Ac}$); 1,37 (d, *J* = 6,82 Hz, 3H, $CH_{3\text{-}Ala}$).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 176,95 (CO_{CON3}); 172,62 (CO_{Ala}); 170,94 (CO_{Ac}); 169,46 (CO_{Fca}); 96,78 (C-1, Fn); 74,26 (C-8); 74,18 (C-9); 72,86 (C-6); 71,60 (C-10); 71,32 (C-7); 66,78 (C-3); 66,61 (C-4); 63,18 (C-5); 63,16 (C-2); 61,10 (C-α, Pro); 47,85 (CH_{Ala}); 47,41 (CH_2-δ, Pro); 28,56 (CH_2-β, Pro); 24,64 (CH_2-γ, Pro); 23,02 ($CH_{3\text{-}Ac}$); 16,70 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

3.2.9. Opći postupak priprave Ac-AA-AA-NH-Fn-NHBoc (19, 20, 30)

Otopina azida (količine navedene u tablici 12) u *tert*-butil-alkoholu zagrijava se pri 65 °C sve dok na TLC ima traga supstrata (~5h). Reakcijska se smjesa upari, a produkt pročisti tankoslojnom preparativnom kromatografijom (EtOAc).

Tablica 12. Supstrati i reagensi upotrebljeni za pripravu Ac-AA-AA-NH-Fn-NHBoc (**19**, **20**, **30**)

Produkt	**Supstrat** (masa, množina)	**Reagensi** (volumen, množina) ***t*-BuOH**	**Dobivena masa** (iskorištenje)	**Opis produkta**
19	**17** (3,2 g, 6,82 mmol)	160 ml	4,22 g (62%)	Žuto ulje
20	**18** (3,2 g, 6,82 mmol)	160 ml	4,57 g (67%)	Žuti prah
30	**28** (100 mg, 0,26 mmol)	5 ml	60 mg (41%)	Žuti prah

Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-NHBoc (**19**)

R_f = 0,25 (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3426 j ($NH_{slobodni}$), 3305 sr ($NH_{asocirani}$), 1674, 1641 ($C{=}O_{CONH}$), 1556 j, 1532 j (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,33 (s, 1H, NH_{Fn}); 6,73 (s, 1H, NH_{Ala}); 6,70 (s, 1H, NH_{Boc}); 4,80 (dq, *J* = 8,4 Hz, 7,1 Hz, 1 H, CH_{Ala}); 4,54 [s, 1H, CH-α (Pro)]; 4,45 (pt, 2H, H-2, H-5); 4,34 (s, 1H, H-8); 4,29 [pt, 1H, H-9], 4,00 (pt, 1H, H-7); 3,97 (pt, 1H, H-3); 3,96

(pt, 1H, H-4); 3;93 (pt, 1H, H-10); 3,74-3,73 [m, 1H, CH_2-δ'(Pro)]; 3,64-3,63 [m, 1H, CH_2-δ (Pro)]; 2,30 [m, 1H, CH_2-γ (Pro)]; 2,20-2,18 [m, 1H, CH_2-γ' (Pro)]; 2,06-2,01 [m, 2H, CH_2-β' (Pro), CH_2-β (Pro)]; 2,00 (s, 3H, $CH_{3\text{-}Ac}$Ac); 1,48 [s, 9H, $(CH_3)_{3Boc}$]; 1,40 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H, $CH_{3\text{-}Ala}$).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 173,06 (CO_{Ala}); 169,884 (CO_{Fn}); 169,63 (CO_{Ac}); 154,37 (CO_{Boc}); 96,27 (C-6); 94,45 (C-1); 80,23 (C_{qBoc}); 65,72 (C-7); 65,47 (C-10); 65,25 (C-3); 65,18 (C-4); 63,77 (C-2); 63,32 (C-5); 62,81 (C-8); 61,45 (C-9); 60,95 (C-α, Pro); 47,66 (CH_2-δ, Pro); 46,79 (CH_{Ala}); 28,59 [$(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 28,04 (CH_2-β, Pro); 25,38 (CH_2-γ, Pro); 23,08 ($CH_{3\text{-}Ac}$); 18,32 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{25}H_{34}N_4O_5Fe$: 526,4; dobiveno $[M]^+$ na *m/z* 526,2.

Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe (**20**)

R_f = 0,33 (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3437 sr ($NH_{slobodni}$), 3329 j ($NH_{asocirani}$), 1714 j, 1666 j ($C{=}O_{CONH}$), 1543 j (amid II).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,03 (s, 1H, NH^1_{Fn}); 7,18 [s, 1 H, NH^2_{Fn}); 6,49 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H, NH_{Ala}); 4,73 (s, 1H, H-2); 4,78-4,56 (m, 4H, CH_{Ala}, H-5, H-3, H-4); 4,19 (s, 1H, H-8); 4,09 [m, 1H, CH-α (Pro)]; 3,96 (s, 2H, H-7, H-10, H-9); 3,90 [m, 1H, CH_2-δ (Pro)]; 3,53 [q, *J* = 3,5 Hz, 3,5 Hz, 1H, CH_2-δ' (Pro)]; 2,39 [s, 1H, CH_2-β (Pro)]; 2,10 (s, 3H, $CH_{3\text{-}Ac}$); 2,14-2,03 [m, 1H, CH_2-γ (Pro), CH_2-γ' (Pro), CH_2-β' (Pro)]; 1,50 [s, 9H, $(CH_3)_{3Boc}$]; 1,39 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H, $CH_{3\text{-}Ala}$).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 172,78 (CO_{Ala}); 171,604 (CO_{Fn}); 169,34 (CO_{Ac}); 154,31 (CO_{Boc}); 96,87 (C-6); 95,25 (C-1);79,98 (C_{qBoc}); 65,26 (C-8, C-9); 64,91 (C-10, C-7); 64,58 (C-3, C-4); 63,21 (C-75, C-2); 61,71 (C-α, Pro); 48,00 (CH_2-δ, Pro);47,59 (CH_{Ala}); 29,27 (CH_2-β, Pro); 28,65 [$(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 24,63 (CH_2-γ, Pro); 22,99 ($CH_{3\text{-}Ac}$); 16,50 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{25}H_{34}N_4O_5Fe$: 526,4; dobiveno $[M]^+$ na *m/z* 526,2.

Ac-Ala-NH-Fn-NHBoc (30):

t_t = 142-145 °C; R_f = 0,33 (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3428 j ($NH_{slobodni}$), 3313 sl ($NH_{asocirani}$), 1703 j ($C{=}O_{Boc}$), 1682 j, 1665 j ($C{=}O_{CONH}$), 1530, 1513 (amid II).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,34 (s, 1H, NH^{1}_{Fn}); 6,66 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, NH_{Ala}); 6,27 (s, 1H, NH^{2}_{Fn}); 4,59-4,50 (m, 3H, H_{Fn}, CH_{Ala}); 4,40-4,32 (m, 2H, H_{Fn}); 4,15-4,03 (m, 4H, H_{Fn}); 2,04 (s, 3H, CH_{3Ac}); 1,49 [s, 9H, $(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 1,44 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H, $CH_{3\text{-}Ala}$).

^{13}C NMR, APT (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,20 (CO_{Fn}); 170,53 (CO_{Ac}); 154,29 (CO_{Boc}); 80,54 (C_{qBoc}); 65,93; 65,53; 65,47; 65,15; 62,95 (C_{Fn}); 49,51 (CH_{Ala}); 28,55 [$(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 23,37 ($CH_{3\text{-}Ac}$), 18,43 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{20}H_{27}N_3O_4Fe$: 429,3; dobiveno $[M]^+$ na *m/z* 429,2.

3.2.10. Priprava Ac-Ala-NH-Fn-NHAc (29):

Otopina azida **28** (100 mg, 0,26 mmol) u acetanhidridu (2 ml) zagrijava se 8 sati pri 80 °C, Reakcijska se smjesa upari, a produkt pročisti tankoslojnom preparativnom kromatografijom u EtOAc. Dobiveno je 20 mg (20%) narančastih kristala; t_t = 142-145 °C; R_f = 0.68 (*n*-BuOH : CH_3COOH : H_2O = 60 : 25 : 15).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3426 j ($NH_{slobodni}$), 3312 sr ($NH_{asocirani}$), 1674, 1667 ($C{=}O_{CONH}$), 1530, 1513 (amid II).

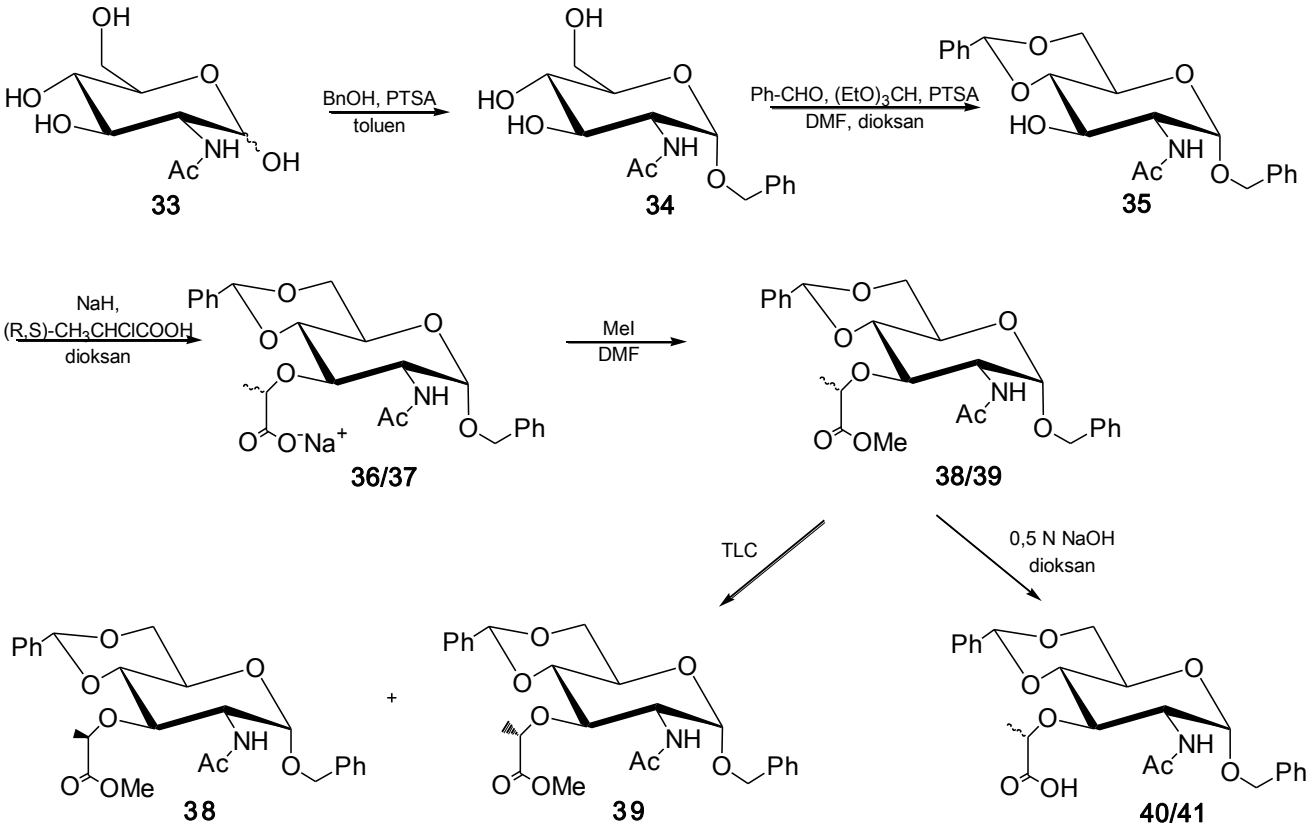
^{1}H NMR (300 MHz, CDCl3) δ/ppm: 8,31 (s, 1H, NH_{Fn}); 7,68 (s, 1H, NH_{Ac}); 6,52 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H, NH_{Ala}); 4,62 (s, 1H, H-7); 4,57 (s, 1H, H-10); 4,50 (q, *J* = 6,8 Hz, 1H, CH_{Ala}); 4,41 (s, 1H, H-2); 4,32 (s, 1H, H-5); 4,06 (s, 4H, H-3, H-4, H-8, H-9); 2,08 (s, 3H, $CH_{3\text{-}Ac1}$); 2,06 (s, 3H, $CH_{3\text{-}Ac2}$); 1,43 (d, *J* = 6,85 Hz, 3H, $CH_{3\text{-}Ala}$).

^{13}C NMR, APT (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,36 (CO_{Fn}); 170,76 (CO_{Ac1}); 169,61 (CO_{Ac2}); 95,50 (C-1, C-6); 66,08 (C-7, C-10); 65,80 (C-2); 65,70 (C-5); 64,27 (C-3); 64,15 (C-4); 63,67 (C-8, C-9); 49,84 (CH_{Ala}); 24,04 ($CH_{3\text{-}Ac1}$); 23,33 ($CH_{3\text{-}Ac2}$); 18,34 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

ESI-MS: izračunato za $C_{17}H_{21}N_3O_3Fe$: 371,2; dobiveno $[M]^+$ na *m/z* 371,1.

3.3. FEROCENSKI KONJUGATI S UGLJIKOHIDRATIMA

3.3.1. Sinteza *O*-zaštićenih *N*-Ac-Mur-OH (40) i *N*-Ac-izoMur-OH (41)



Shema 12.

3.3.1.1. Benzil-2-acetamido-2-deoksi-*α*-D-glukopiranozid (34)

N-acetilglukozamin **33** (10 g, 45,2 mmol) i *p*-toluensulfonska kiselina (monohidrat) (0,76 g, 3,99 mmol) suspendiraju se u 50 ml svježe predestiliranog toluena i 100 ml benzil-alkohola. Reakcijska se smjesa refluksira u aparaturi po Dean-Starku 2 sata na temperaturi od 90 °C, nakon čega se izbistri, a miješanje nastavi 4 sata pri istoj temperaturi. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, reakcijskoj se smjesi doda natrijev bikarbonat (0,51 g, 6,1 mmol) otopljen u vodi (3 ml). Toluen se otpari pri sniženu tlaku, a uljnom se ostatku doda 750 ml smjese dietil-eter/heksan (2:1). Nakon 5 sati miješanja pri sobnoj temperaturi, taloženje sirovog produkta dovrši se stajanjem u frižideru preko noći. Amorfni se talog odfiltrira, ispere

dietil eterom i osuši na zraku. Rekristalizacijom sirovog produkta iz etanola dobiveno je 11 g (35,3 mmol, 79%) bijele krutine, t_t=182–185 ºC. R_f = 0,46 (toluen: EtOAc: octena kis. = 1:1:1).

IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1}: 3289 j ($NH_{asocirani}$), 3071 š (OH), 2929 (CH_{Ph}), 1649 j (CO_{Ac}), 1552 j (amid II).

^{1}H NMR (300 MHz, [D_6]-DMSO): δ/ppm: 7,82 (d, 1H, *J* = 8,04 Hz, NH); 7,36–7,27 (m, 5H, CH_{Ph}); 5,03 (d, 1H, *J* = 5,9 Hz, OH-4); 4,75 (d, 1H, *J* = 5,64 Hz, H-1); 4,71–4,64 (m, 2H, OH-3, OCH_{2a}–Ph); 4,56 (t, 1H, *J* = 6,03 Hz, 4,44 Hz, OH-6); 4,41 (d, 1H, *J* = 12,5 Hz, OCH_{2b}–Ph); 3,68–3,63 (m, 2H, H-2, H-6); 3,52–3,45 (m, 3H, H-3, H-6', H-5); 3,19–3,11(m, 1H, H-4); 1,83 (s, 3H, $COCH_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 169,6 (CO_{Ac}); 138,4 (C_{Ph}); 128,7–127,6 (CH_{Ph}); 96,4 (C1); 73,6; 71,4; 71,0 (C3, C4, C5); 68,2 (CH_2Ph); 61,3 (C6); 54,2 (C2); 23,0 (CH_3).

Elementarna analiza za $C_{15}H_{21}N_1O_6$: C 57,87; H 6,8; N 4,5. Pronađeno: C 57,97; H 6,83; N 4,45.

3.3.1.2. Benzil-2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-*α*-D-glukopiranozid (35)

C-1 zaštićeni **34** (5 g, 16 mmol) suspendira se u smjesi etanola i toluena koja se potom otpari pri sniženom tlaku. Postupak se ponavlja do konstantne mase. Suhom se ostatku, suspendiranom u smjesi suhog DMF (17 ml) i bezvodnog dioksana (17 ml), dodaju trietilortoformat (9 ml, 54 mmol), svježe predestilirani benzaldehid (6,6 ml, 64,7 mmol) i monohidrat *p*-toluensulfonske kiseline (0,39 g, 2,1 mmol). Nakon 24 h miješanja pri sobnoj temperaturi bijela se suspenzija ohladi na 0 °C i miješa s dietileterom (50 ml) 3 sata. Nastali se bijeli želatinozni talog odsiše i ispere s 50 ml dietiletera. Nakon sušenja na zraku i u vakuum-eksikatoru, sirovi se produkt prekristalizira iz vrućeg apsolutnog etanola pri čemu se dobije bijela krutina **35** (5,2 g, 13 mmol, 82%), t_t =220 ºC, R_f = 0,88 (toluen: EtOAc: octena kis. = 1:1:1).

IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1}: 3438 sr ($NH_{slobodna}$), 3292 j ($NH_{asocirana}$), 3089 š (OH), 2928 (CH_{Ph}), 1647 (CO_{Ac}), 1554 j (amid II).

^{1}H NMR (300 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 8,01 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, NH); 7,46-7,28 (m, 10H, CH_{Ph}); 5,61 (s, 1H, $CH_{benziliden}$); 4,80 (d, 1H, *J* = 2,9 Hz, H-1); 4,70 (d, 1H, *J* = 12,4 Hz, OCH_{2a}–Ph); 4,49 (d, 1H, *J* = 12,4 Hz, CH_{2b}–Ph); 4,14 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, 4,4 Hz, OH-3); 3,86

(ddd, 1H, *J*= 3,3 Hz, 3,3 Hz, 2,6 Hz, H-5); 3,77–3,65 (m, 3H, H-2, H-6a, H-3); 3,65–3,62 (m, 1H, H-6b); 3,51 (t, 1H, *J*= 8,9 Hz, H-4); 1,83 (s, 3H, $COCH_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 169,94 (CO_{Ac}); 138,19; 138,16 (C_{Ph}); 129,33–126,83 (CH_{Ph}); 101,34 ($CH_{benziliden}$); 97,41 (C1); 82,57; 67,71; 63,31 (C3, C4, C5); 69,04 (CH_2Ph); 68,47 (C6); 54,65 (C2); 22,99 ($COCH_3$).

Elementarna analiza za $C_{22}H_{25}N_1O_6$: C 66,15; H 6,31; N,3,51. Pronađeno: C 59,98; H 6,35; N 3,49.

3.3.1.3. Benzil-2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-*O*-[(*R*,*S*)--1-(metoksikarbonil)etil]-*α*-D-glukopiranozid (38/39)

O-2,4,6-zaštićeni prekursor **35** (5 g, 12,5 mmol) otopi se u suhom 1,4-dioksanu (50 ml) uz zagrijavanje do 80°C. Temperatura otopine spusti se na 70°C te se u malim obrocima dodaje NaH (5,1 g, 87,5 mmol). Nakon 6 sati miješanja pri temperaturi od 85°C, u reakcijsku smjesu, ohlađenu na 70°C, doda se otopina klorpropionske kiseline (7,14 ml, 37 mmol) u 1,4-dioksanu (10 ml). Miješanje se nastavlja pri istoj temperaturi sljedećih 18-20 sati [dok TLC (CCl_4 : dioksan = 2:1) ne pokaže da je reaktant izreagirao]. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, u reakcijsku se smjesu doda voda te se upari do suha. Zaostali se talog otopi u etanolu, upari, ispere dietil-eterom i miješa sa zasićenom otopinom NaCl (50 ml) 2 sata pri sobnoj temperaturi. Nakon stajanja u frižideru preko noći, istaložena natrijeva sol se odfiltrira i osuši na zraku. Blijedo-žuti talog (8,1 g, 16,4 mmol, 132%) suspendira se u suhom DMF (81 ml) i miješa s MeI (2,43 ml, 38,9 mmol) 24 sata pri sobnoj temperaturi. Nakon uparivanja, u sirovi se ester doda voda, nastali bezbojni talog se odfiltrira, ispere vodom i osuši, pri čemu zaostaje dijastereomerna smjesa **38**/**39** (4,05 g, 8,3 mmol, 68%).

Za potrebe NMR-spektroskopije, dijastereomerna esterska smjesa **38**/**39** (350 mg) razdvoji se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu u smjesi diklormetana i etilacetata (5:1) kao eluensâ, pri čemu se dobivaju bezbojna krutina **38** (234 mg) i blago žuta krutina **39** (73 mg).

38: t_t = 190-194 ºC. R_f = 0,78 (CH_2Cl_2 : EtOAc = 5 : 1).

IR (CsI) ν_{max}/cm^{-1}: 3300 j ($NH_{asocirani}$), 1762 j (CO_{ester}), 1737 j (CO_{ester}), 1657 j (CO_{Ac}), 1562 j (amid II). IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3431 sl ($NH_{slobodni}$), 3356 j ($NH_{asocirani}$), 1732 j (CO_{ester}), 1674 j (CO_{Ac}), 1538 j (amid II).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,49 (d, 1H, $J_{NH,\ H\text{-}2}$ = 4,16 Hz, NH); 7,42-7,27 (m, 10H, CH_{Ph}); 5,55 (s, 1H, $CH_{benziliden}$); 5,39 (d, 1H, $J_{H\text{-}1,\ H\text{-}2}$ = 3,17 Hz, H-1); 4,65 (d, 1H, $J_{OCH2a,\ OCH2b}$ = 11,98 Hz, OCH_{2a}–Ph); 4,53 (s, 1H, OCH_{2b}–Ph); 4,51-4,49 (m, 1H, CH_{laktil}); 4,18 (dd, 1H, $J_{H\text{-}6a,\ H\text{-}5}$ = 4,64 Hz, $J_{H\text{-}6a,\ H\text{-}6b}$ = 10,026 Hz, H-6a); 3,89 (ddd, 1H, = 4,15 Hz, $J_{H\text{-}2,\ H\text{-}3}$ = 4,40 Hz, $J_{H\text{-}2,\ H\text{-}1}$ = 3,17 Hz, H-2); 3,82(d, 1H, $J_{H\text{-}4,\ H\text{-}3}$ = 3,42 Hz, H-4); 3,80 (d, 1H, $J_{H\text{-}3,\ H\text{-}4}$ = 3,42 Hz, H-3); 3,76 (d, 1H, $J_{H\text{-}6b,\ H\text{-}6a}$ = 10,76 Hz, H-6b); 3,71 (s, 3H, $COOCH_3$); 3,68 (d, 1H, $J_{H\text{-}5,\ H\text{-}6b}$ = 9,78 Hz, H-5); 2,01 (s, 3H, $COCH_3$); 1,39 (d, 3H, $J_{CH3\text{-}laktil,\ CH\text{-}laktil}$ = 7,09 Hz, $CH_{3\text{-}laktil}$).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 175,46 (CO_{ester}); 170,81 (CO_{Ac}); 137,46; 137,24 (C_{Ph}); 128,94–125,8 (CH_{Ph}); 101,24 ($CH_{benziliden}$); 97,25 (C1); 83,26 (C5); 75,11 (CH_{laktil}); 74,65 (C3); 70,34 (CH_2Ph); 68,95 (C6); 62,87 (C4); 54,34 (C2); 52,18 (OCH_3); 23,09 ($COCH_3$); 18,69 ($CH_{3\text{-}laktil}$).

MS(FD): *m*/*z* (%) = 485,5 (100) $[M]^{\bullet+}$. Elementarna analiza za $C_{26}H_{31}N_1O_8$: C 63,46; H 6,63; N 2,79. Pronađeno: C 63,49; H 6,67; N 2,77.

39: t_t = 186-189 ºC. R_f = 0,57 (CH_2Cl_2 : EtOAc = 5 : 1).

IR (CsI) ν_{max}/cm^{-1}: 3296 j ($NH_{asocirani}$), 1749 j (CO_{ester}), 1655 j (CO_{Ac}), 1558 j (amid II). IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3439 j ($NH_{slobodni}$), 3283 jjsl ($NH_{asocirani}$), 1733 j (CO_{ester}), 1675 j (CO_{Ac}), 1558 j (amid II).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,43-7,32 (m, 10H, CH_{Ph}); 5,65 (d, 1H, $J_{NH,\ H\text{-}2}$ = 8,98 Hz, NH); 5,45 (s, 1H, $CH_{benziliden}$); 4,95 (d, 1H, $J_{H\text{-}1,\ H\text{-}2}$ = 3,95 Hz, H-1); 4,69 (d, 1H, $J_{OCH2a,\ OCH2b}$ = 11,62 Hz, OCH_{2a}-Ph); 4,45 (d, 1H, $J_{OCH2b,\ OCH2a}$ = 11,83 Hz, OCH_{2b}-Ph); 4,31 (dd, 1H, $J_{H\text{-}2,\ H\text{-}1}$ = 3,94 Hz, $J_{H\text{-}2,\ NH}$ = 8,98 Hz, H-2); 4,18 (dd, 1H, $J_{H\text{-}6a,\ H\text{-}5}$ = 4,38 Hz, $J_{H\text{-}6a,\ H\text{-}6b}$ = 10,085 Hz, H-6a); 4,13 (q, 1H, $J_{CH\text{-}laktil,\ CH3\text{-}laktil}$ = 7,02 Hz, CH_{laktil}); 3,86-3,81 (m, 1H, H-5); 3,75-3,71 (m, 2H, H-4, H-3); 3,68 (d, 1H, $J_{H\text{-}6b,\ H\text{-}6a}$ = 10,96 Hz, H-6b); 3,23 (s, 3H, $COOCH_3$); 1,94 (s, 3H, $COCH_3$); 1,28 (d, 3H, $J_{CH3\text{-}laktil,\ CH\text{-}laktil}$ = 7,02 Hz, $CH_{3\text{-}laktil}$).

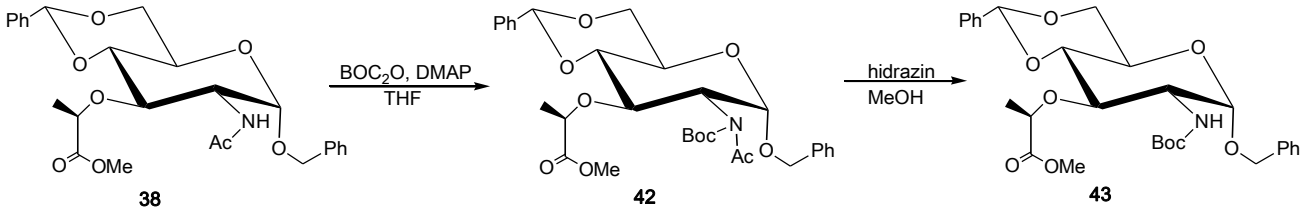
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 173,22 (CO_{ester}); 169,64 (CO_{Ac}); 137,09; 136,82 (C_{Ph}); 129,07–126,22 (CH_{Ph}); 101,52 ($CH_{benziliden}$); 97,53 (C1); 81,75 (C4); 77,89 (C3); 77,20 (CH_{laktil}); 70,14 (CH_2Ph); 68,92 (C6); 62,91 (C5); 52,50 (C2); 51,36 (OCH_3); 23,24 ($COCH_3$); 19,21 ($CH_{3\text{-}laktil}$).

MS(FD): *m*/*z* (%) = 993,9 $[2M+Na]^+$, 508,5 $[M+Na]^+$, 486,5 $[M+H]^+$. Elementarna analiza za $C_{26}H_{31}N_1O_8$: C 64,32; H 6,44; N 2,88. Pronađeno: C 64,26; H 6,14; N 2,68.

3.3.1.4. Benzil-2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-*O*-[(*R*,*S*)-1-karboksietil]-α-D-glukopiranozid (40/41)

U smjesu esterâ **38** i **39** (100 mg, 0,205 mmol), otopljenu u bezvodnom dioksanu (2 ml), doda se 0,5 N NaOH (0,9 ml). Nakon 1 sat miješanja pri 40°C, reakcijska se smjesa razrijedi dietil-eterom (10 ml), zakiseli s 0,5 M HCl (do pH~3-4) i ispere nekoliko puta zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha, pri čemu zaostane smjesa *O*-zaštićene muraminske i izomuraminske kiseline (95 mg, 98%). IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3431 sr ($NH_{slobodni.}$), 3333 j ($NH_{asocirani}$), 3084 š (OH), 1729 j (CO_{COOH}), 1673 j (CO_{Ac}), 1557 j (amid II).

3.3.2. Sinteza *O*-zaštićenog prekursora *N*-Boc-Mur-OMe Benzil-4,6-*O*-benziliden-2-*tert*-butoksikarbonilamino-2-deoksi-3-*O*-[(*R*)-1-(metoksikarbonil)etil]-α-D-glukopiranozid (43)



Shema 13.

N-Ac-Mur-OMe **38** (1 g, 2,05 mmol) otopi se u 10 mL svježe predestiliranog THF te se doda $(BOC)_2O$ (0,3 g, 1,37 mmol) i DMAP (58,2 mg, 0,48 mmol) uz miješanje pri sobnoj temperaturi. Nakon pola sata reakcijskoj se smjesi doda još 0,3 g $(BOC)_2O$ te se grije jedan sat pri temperaturi od 50 ºC. Uz dodatak sljedećeg obroka od 0,6 g $(BOC)_2O$, reakcijska smjesa se 3 sata refluksira te još 36 sati miješa pri sobnoj temperaturi. Doda se zadnji obrok [0,3 g $(BOC)_2O$] uz refluksiranje tijekom 5 sati, pri čemu se pomoću TLC (heksan : etilacetat = 3 : 1) ne opaža daljnje pojačavanje mrlje imidnog intermedijara*, te se reakcijska smjesa ohladi i razrijedi dietil-eterom. Organski sloj ispere se 1 M HCl, 5 % $NaHCO_3$, i nekoliko puta zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha. Produkt se

pročišćava tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz smjesu heksana i etil acetata (3:1) kao eluensâ pri čemu je dobiveno 0,8 g (72%) bijelih kristala; t_t=158,7-163,7 ºC. R_f = 0,6 (heksan : EtOAc = 3 : 1).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}**:** 3431 sl ($NH_{slobodni}$), 3356 sr ($NH_{asocirani}$), 1732 j (CO_{ester}), 1709 j (CO_{Boc}).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,45-7,25 (m, 10H, CH_{Ph}); 6,02 (d, 1H, *J* = 5,1 Hz, NH); 5,56 (s, 1H, $CH_{benziliden}$); 5,27 (d, 1H, *J* = 2,6 Hz, H-1); 4,68 (d, 1H, *J* = 12,0 Hz, OCH_{2a}-Ph); 4,55 (d, 1H, *J* = 12,0 Hz, OCH_{2b}-Ph); 4,50 (q, 1H, *J* = 6,8 Hz, CH_{laktil}); 4,19 (dd, 1H, *J* = 4,2 Hz, *J* = 9,5 Hz, H-3); 3,84-3,81 (m, 1H, H-4); 3,79 (d, 1H, *J* = 9,6 Hz, H-6b); 3,73 (d, 1H, *J* = 9,6 Hz, H-6a); 3,72 (brs, 4H, OCH_3, H-2); 3,65 (pt, 1H, H-5); 1,45 (s, 9H, $(CH_3)_{3\text{-}Boc}$); 1,40 (d, 3H, *J* = 6,9 Hz, $CH_{3\text{-}laktil}$).

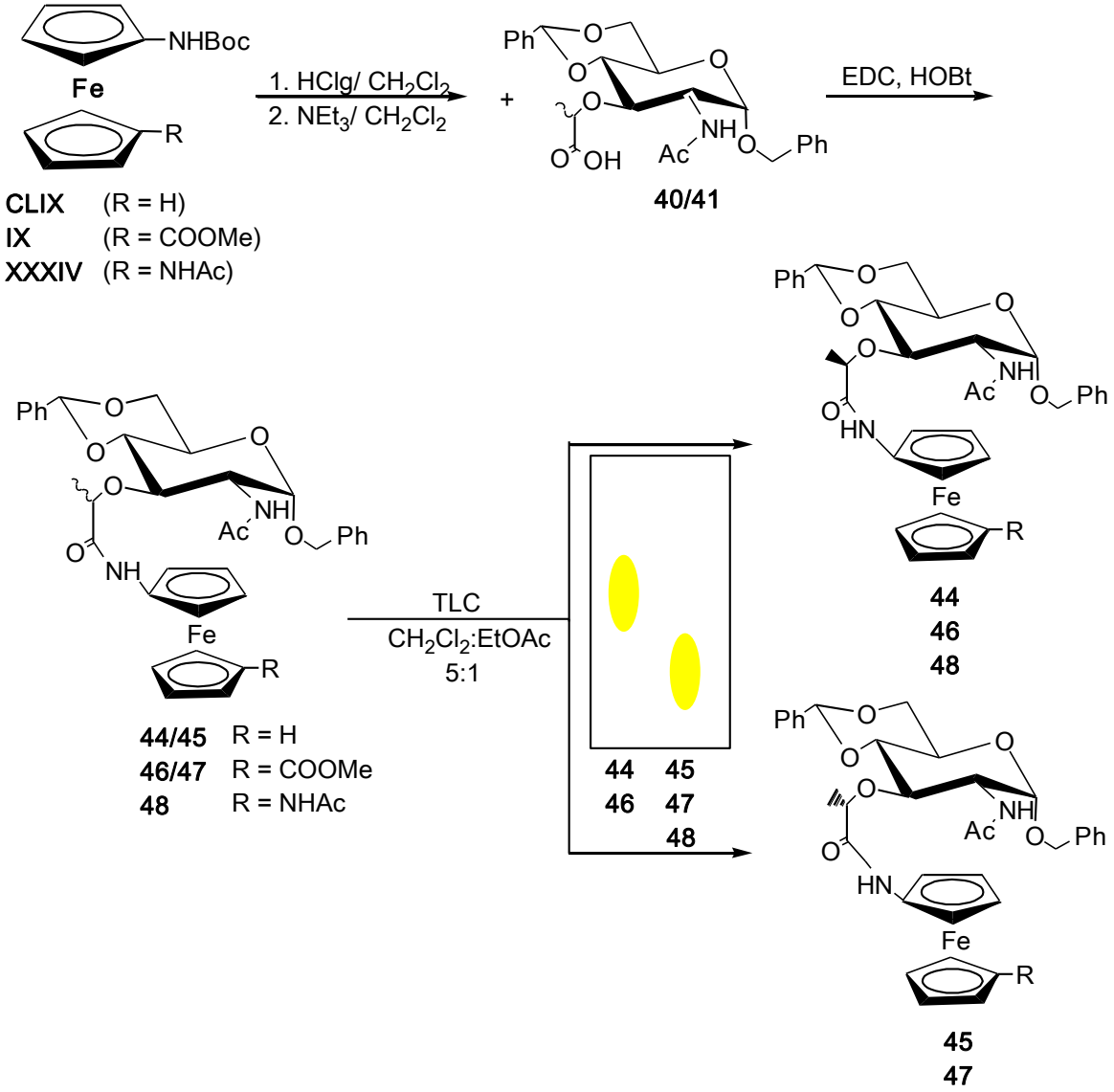
^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 174,48 (CO_{ester}); 156,14 (CO_{Boc}); 137,38; 137,31 (C_{Ph}); 128,99–125,87 (CH_{Ph}); 101,27 ($CH_{benziliden}$); 97,59 (C1); 83,33 (C5); 79,14 ($C(CH_3)_3$); 75,34 (CH_{laktil}, C3); 70,05 (CH_2Ph); 69,02 (C6); 62,83 (C4); 54,92 (C2); 52,09 (OCH_3); 28,43 [$(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 18,78 ($CH_{3\text{-}laktil}$).

Elementarna analiza za $C_{29}H_{37}N_1O_8$: C 64,07; H 6,86; N 2,58. Pronađeno: C 64,04; H 6,89; N 2,56.

Mala količina intermedijara obrađena je prema gore opisanom postupku da bi se dokazala predložena imidna struktura **42**:

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,49-7,29 (m, 10H, CH_{Ph}); 5,55 (s, 1H, $CH_{benziliden}$); 4,91(s, 1H, H-1); 4,81(brs, 1H, H-2); 4,65 (d, 1H, *J* = 12,5 Hz, OCH_{2a}-Ph); 4,50 (d, 1H, *J* = 12,0 Hz, OCH_{2b}-Ph); 4,31 (q, 1H, *J* = 6,7 Hz, CH_{laktil}); 4,15 (dd, 1H, *J* = 4,9 Hz, *J* = 9,8 Hz, H-3); 3,87-3,83 (m, 1H, H-4); 3,74-3,67 (m, 2H, H-6b, H-6a); 3,64 (s, 3H, OCH_3); 3,58 (pt, 1H, H-5); 2,36 (s, 3H, $COCH_3$); 1,40 [s, 9H, $(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 1,37 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz, $CH_{3\text{-}laktil}$).

3.3.3. Sinteza ferocenskih muropeptida 44-48



Shema 14.

U otopinu *N*-Boc zaštićenog ferocenskog amina BocHN-Fn-X **CLIX** (X = H), **IX** (X = COOMe) ili **XXXIV** (X = NHAc) (0,5 mmol) u suhom etil-acetatu ohlađenu na 0°C uvodi se suhi plinoviti HCl pola sata. Nakon 30' miješanja pri sobnoj temperaturi, otapalo se upari, a u tikvici zaostaje žuti talog HCl·H_2N-Fn-X. Smjesa dijastereomera muraminske i izomuraminske kiseline aktivira se miješanjem s EDC (1,5 mmol) i HOBt (1,5 mmol) u CH_2Cl_2 2 sata pri 0°C. Pola količine (0,25 mmol) dobivenog hidroklorida suspendira se u suhom diklormetanu, otopi uz dodatak Et_3N (pH~8) i doda smjesi aktiviranih kiselina. Nakon

što se tankoslojnom kromatografijom u EtOAc utvrdi da je sav slobodan amin izreagirao, dodaje se sljedeći obrok ferocenskog amina (0,25 mmol). Nakon 48 h miješanja na sobnoj temperaturi otopina se ispere zasićenom otopinom $NaHCO_3$, 10%-tnom otopinom limunske kiseline u vodi i nekoliko puta zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha. Sirovi se dijastereomerni produkti razdvoje tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz smjesu diklormetana i etil-acetata (5:1) kao eluensâ.

3.3.3.1. Benzil-2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-O-[(*R*)-1-(ferocenilkarbamoil)etil]-*α*-D-glukopiranozid (44)

(0,15 g, 0,22 mmol, 61 %). t_t = 110-114 ºC. R_f = 0,66 (CH_2Cl_2 : EtOAc = 5 : 1).

IR (CsI) ν_{max}/cm^{-1}: 3300 j ($NH_{asocirani}$), 1677 j (CO_{amid}), 1658 j (CO_{acetil}), 1552 j (amid II). IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3430 sr ($NH_{slobodni}$), 3378 sr ($NH_{asocirani}$), 1732 j (CO_{amid}), 1678 j (CO_{acetil}), 1539 j (amid II).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,74 (s, 1H, NH_{amid}); 7,46-7,28 (m, 10H, CH_{Ph}); 5,95 (d, 1H, $J_{NH,\ H\text{-}2}$ = 9,21 Hz, NH_{acetil}); 5,58 (s, 1H, $CH_{benziliden}$); 4,92 (s, 1H, $Fc_{H\text{-}2}$); 4,87 (d, 1H, $J_{H\text{-}1,\ H\text{-}2}$ = 3,73 Hz, H-1); 4,70 (d, 1H, $J_{OCH2a,\ OCH2b}$ = 11,83 Hz, OCH_{2a}–Ph); 4,47 (d, 1H, $J_{OCH2b,\ OCH2a}$ = 11,62 Hz OCH_{2b}–Ph); 4,46 (s, 1H, $Fc_{H\text{-}5}$); 4,35-4,42 (m, 1H, H-2); 4,23 (dd, 1H, $J_{H\text{-}6a,\ H\text{-}5}$ = 4,38 Hz, $J_{H\text{-}6a,\ H\text{-}6b}$ = 10,09 Hz, H-6a); 4,10 (s, 5H, $Fc_{H\text{-}1',\ H\text{-}2',\ H\text{-}3',\ H\text{-}4',\ H\text{-}5'}$); 4,04 (t, 1H, $J_{CH\text{-}laktil,\ CH3\text{-}laktil}$ = 6,79 Hz, CH_{laktil}); 3,96 (s, 1H, $Fc_{H\text{-}3}$); 3,93 (s, 1H, $Fc_{H\text{-}4}$); 3,87-3,83 (m, 1H, H-4); 3,76 (d, 1H, $J_{H\text{-}6b,\ H\text{-}6a}$ = 10,09 Hz, H-6b); 3,66-3,64 (m, 2H, H-3, H-5); 1,80 (s, 3H, $COCH_3$); 1,44 (d, 3H, $J_{CH3\text{-}laktil,\ CH\text{-}laktil}$ = 6,58 Hz, $CH_{3\text{-}laktil}$).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,28 (CO_{amid}); 170,97 (CO_{acetil}); 136,97; 136,49 (C_{Ph}); 129,13-125,94 (CH_{Ph}); 101,49 ($CH_{benziliden}$); 97,42 (C1); 94,29 (C_{Fc}); 81,74 (C5); 79,64 (C3); 79,60 (CH_{laktil}); 70,07 (CH_2Ph); 69,15 ($Fc_{C\text{-}1',\ C\text{-}2',\ C\text{-}3',\ C\text{-}4',\ C\text{-}5'}$); 68,80 (C6); 64,84 ($Fc_{C\text{-}3}$); 63,96 ($Fc_{C\text{-}4}$); 63,04 (C4); 61,49 ($Fc_{C\text{-}2}$); 60,88 ($Fc_{C\text{-}5}$); 52,54 (C2); 23,43 ($COCH_3$), 20,01 ($CH_{3\text{-}laktil}$).

MS(FD): *m*/*z* (%) = 654,6 (100) $[M]^{\bullet+}$. Elementarna analiza za $C_{35}H_{38}N_2O_7Fe \cdot MeOH$: C 62,98; H 6,18; N 4,07. Pronađeno: C, 62,85; H, 6,11; N, 4,05. CV (CH_2Cl_2, nBu$_4$NPF$_6$, vs SCE): $E_{1/2}$ = -125,9 mV.

3.3.3.2. Benzil-2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-*O*-[(*S*)-1-(ferocenilkarbamoil)etil]-*α*-D-glukopiranozid (45):

(0,05 g, 0,08 mmol, 62 %). t_t = 117-119 ºC. R_f = 0,33 (CH_2Cl_2 : EtOAc = 5 : 1).

IR (CsI) ν_{max}/cm^{-1}: 3300 j ($NH_{asocirani}$), 1677 j (CO_{amid}), 1658 j (CO_{acetil}), 1552 j (amid II). IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3431 sr ($NH_{slobodni}$), 3356 sr ($NH_{asocirani}$), 1734 sr (CO_{amid}), 1678 j (CO_{acetil}), 1544 j (amid II).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,05 (s, 1H, NH_{amid}); 7,50–7,30 (m, 10H, CH_{Ph}); 5,80 (d, 1H, $J_{NH,\ H\text{-}2}$ = 9,87 Hz, NH_{acetil}); 5,59 (s, 1H, $CH_{benziliden}$); 4,81 (d, 1H, $J_{H\text{-}1,\ H\text{-}2}$ = 3,73 Hz, H-1); 4,72 (d, 1H, $J_{OCH2a,\ OCH2b}$ = 11,84 Hz, OCH_{2a}–Ph); 4,48 (d, 1H, $J_{OCH2b,\ OCH2a}$ = 11,84 Hz OCH_{2b}–Ph); 4,43 (d, 1H, $J_{H\text{-}2,\ NHacetil}$ = 9,43 Hz, $J_{H\text{-}2,\ H\text{-}1}$ = 3,727 Hz, H-2); 4,33 (q, 1H, $J_{CH\text{-}laktil,\ CH3\text{-}laktil}$ = 6,79 Hz, CH_{laktil}); 4,26–4,22 (m, 1H, H-6a, $Fc_{H\text{-}5}$); 4,02 (s, 6H, $Fc_{H\text{-}1',\ H\text{-}2',\ H\text{-}3',\ H\text{-}4',\ H\text{-}5',\ H\text{-}2}$); 3,91–3,85 (m, 1H, H-5); 3,80 (d, 1H, $J_{H\text{-}6b,\ H\text{-}6a}$ = 9,43 Hz, H-6b); 3,78–3,72 (m, 4H, H-3, H-4, $Fc_{H\text{-}3}$, $Fc_{H\text{-}4}$); 1,97 (s, 3H, $COCH_3$); 1,44 (d, 3H, $J_{CH3\text{-}laktil,\ CH\text{-}laktil}$ = 6,79 Hz, $CH_{3\text{-}laktil}$).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,17 (CO_{amid}); 170,20 (CO_{acetil}); 136,82; 136,51 (C_{Ph}); 129,54–126,48 (CH_{Ph}); 102,48 ($CH_{benziliden}$); 97,68 (C1); 94,24 (C_{Fc}); 81,65 (C4); 76,91 (CH_{laktil}); 75,25 (C3); 70,31 (CH_2Ph); 69,04 ($Fc_{C\text{-}1',\ C\text{-}2',\ C\text{-}3',\ C\text{-}4',\ C\text{-}5'}$); 68,96 (C6); 64,36 ($Fc_{C\text{-}3}$); 64,19 ($Fc_{C\text{-}4}$); 63,09 (C5); 61,11 ($Fc_{C\text{-}2}$); 60,93 ($Fc_{C\text{-}5}$); 53,31 (C2); 23,63 ($COCH_3$); 19,06 ($CH_{3\text{-}laktil}$).

MS(FD): *m*/*z* (%) = 654,6 (100) $[M]^{\bullet+}$. Elementarna analiza za $C_{35}H_{38}N_2O_7Fe$ · DE: C 64,29; H 6,64; N 3,84. Pronađeno: C 64,22; H 6,72; N 3,85.

3.3.3.3. Benzil-2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-*O*-{(*R*)-1-[1'-(metoksikarbonil)ferocenilkarbamoil]etil}-*α*-D-glukopiranozid (46)

(0,19 g, 0,26 mmol, 71 %). t_t = 115-118 ºC. R_f = 0,63 (CH_2Cl_2 : EtOAc = 5 : 1).

IR (CsI) ν_{max}/cm^{-1}: 3327 j ($NH_{asocirani}$), 1715 j (CO_{ester}), 1677 j (CO_{amid}), 1659 j (CO_{acetil}), 1548 j (amid II). IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3430 sr ($NH_{slobodni}$), 3375 sr ($NH_{asocirani}$), 1733 j (CO_{ester}), 1705 j (CO_{amid}), 1682 j (CO_{acetil}), 1539 j (amid II).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,75 (s, 1H, NH_{amid}); 7,45-7,32 (m, 10H, CH_{Ph}); 6,42 (d, 1H, $J_{NH,\ H\text{-}2}$ = 9.21 Hz, NH_{acetil}); 5,57 (s, 1H, $CH_{benziliden}$); 4,91 (d, 1H, $J_{H\text{-}1,\ H\text{-}2}$ = 3,73 Hz, H-1); 4,72-4,71 (m, 4H, $Fn_{H\text{-}2}$, $Fn_{H\text{-}5}$, $Fn_{H\text{-}2'}$, $Fn_{H\text{-}5'}$); 4,69-4,47 (m, 2H, OCH_{2a}–Ph, OCH_{2b}–Ph); 4,35 (s, 2H, $Fn_{H\text{-}3',}$ $Fn_{H\text{-}4'}$); 4,33-4,32 (m, 1H, H-2); 4,23 (dd, 1H, $J_{H\text{-}6a,\ H\text{-}5}$ = 4,6 Hz, $J_{H\text{-}6a,\ H\text{-}6b}$ = 10,09 Hz, H-6a); 4,11 (q, 1H, $J_{CH\text{-}laktil,\ CH3\text{-}laktil}$ = 6,79 Hz, CH_{laktil}); 3,98 (pt, 2H,

Fn_{H-3}, Fn_{H-4}); 3,88-3,86 (m, 1H, H-5); 3,79-3,74 (m, 2H, H-6b, H-3); 3,72 (s, 3H, $CH_{3\text{-ester}}$); 3,67 (t, 1H, H-4); 1,93 (s, 3H, $COCH_3$); 1,44 (d, 3H, $J_{CH3\text{-}laktil,\ CH\text{-}laktil}$ = 6,58 Hz, $CH_{3\text{-laktil}}$).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,57 (CO_{ester}); 171,54 (CO_{amid}); 171,01 (CO_{acetil}); 136,92; 136,60 (C_{Ph}); 129,10–125,87 (CH_{Ph}); 101,46 ($CH_{benziliden}$); 97,36 (C1); 95,73 (C_{Fn}); 82,08 (C4); 79,10 (CH_{laktil}); 78,76 (C3); 72,26 ($Fn_{C-3'}$); 72,21 ($Fn_{C-4'}$); 71,69 (C'_{Fn}); 71,09 ($Fn_{C-2'}$); 71,03 ($Fn_{C-5'}$); 70,02 (CH_2Ph); 68,82 (C6); 65,97 ($Fn_{C-3,\ C-4}$); 62,96 (C5); 62,30 (Fn_{C-5}); 62,01 (Fn_{C-2}); 52,68 (C2); 51,61 ($CH_{3\text{-ester}}$); 23,47 ($COCH_3$); 19,92 ($CH_{3\text{-laktil}}$).

MS(FD): *m*/*z* (%) = 712,6 (100) $[M]^{\bullet+}$. Elementarna analiza za $C_{37}H_{40}N_2O_9Fe$: C 62,37; H 5,66; N 3,93. Pronađeno: C 62,30; H 5,78; N 3,71. CV (CH_2Cl_2, $n$$Bu_4NPF_6$, vs SCE): $E_{1/2}$ = 120,7 mV.

3.3.3.4. Benzil-2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-*O*-{(*S*)-1-[1'-(metoksikarbonil)ferocenilkarbamoil]etil}-α-D-glukopiranozid (47)

(0,06 g, 0,08 mmol, 65 %). t_t = 121-123 ºC. R_f = 0,25 (CH_2Cl_2 : EtOAc = 5 : 1).

IR (CsI) ν_{max}/cm^{-1}: 3327 j ($NH_{asocirani}$), 1715 j (CO_{ester}), 1677 j (CO_{amid}), 1659 j (CO_{acetil}), 1548 j (amid II). IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3431 sr ($NH_{slobodni}$), 3354 sr ($NH_{asocirani}$), 1733 (CO_{ester}), 1708 j (CO_{amid}), 1679 j (CO_{acetil}), 1541 j (amid II).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,07 (s, 1H, NH_{amid}); 7,50-7,29 (m, 10H, CH_{Ph}); 6,05 (d, 1H, $J_{NH,\ H\text{-}2}$ = 9,65 Hz, NH_{acetil}); 5,62 (s, 1H, $CH_{benziliden}$); 4,83 (d, 1H, $J_{H\text{-}1,\ H\text{-}2}$ = 3,29 Hz, H-1); 4,73 (d, 1H, $J_{OCH2a,\ OCH2b}$ = 11,84 Hz, OCH_{2a}–Ph); 4,65 (pt, 2H, $Fn_{H-2'}$, $Fc_{H-5'}$); 4,49 (d, 1H, $J_{OCH2b,\ OCH2a}$ = 11,84 Hz, OCH_{2b}–Ph); 4,43 (dd, 1H, $J_{H\text{-}2,\ H\text{-}1}$ = 3,73 Hz, $J_{H\text{-}2,\ NH}$ = 9,87 Hz, H-2); 4,40-4,36 (m, 1H, CH_{laktil}); 4,28-4,23 (m, 3H, $Fn_{H-3'}$, $Fn_{H-4'}$, H-6a); 4,17 (s, 1H, Fn_{H-2}); 4,05 (s, 1H, Fn_{H-5}); 4,97 (t, 1H, J = 9,21 Hz, H-3); 3,92 (dd, 1H, $J_{H\text{-}5,\ H\text{-}6b}$ = 9,87 Hz, $J_{H\text{-}5,\ H\text{-}4}$ = 4,82 Hz, H-5); 3,79-3,77 (m, 2H, H-4, H-6b); 3,75 (s, 3H, $CH_{3\text{-ester}}$); 3,73 (s, 2H, Fn_{H-3}, Fn_{H-4}); 1,99 (s, 3H, $COCH_3$); 1,38 (d, 3H, $J_{CH3\text{-}laktil,\ CH\text{-}laktil}$ = 6,58 Hz, $CH_{3\text{-laktil}}$).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,59 (CO_{ester}); 171,54 (CO_{amide}); 170,28 (CO_{acetil}); 136,79; 136,58 (C_{Ph}); 129,48–126,50 (CH_{Ph}); 102,31 ($CH_{benziliden}$); 97,60 (C1); 95,60 (C_{Fn}); 81,44 (C4); 77,20 (CH_{laktil}); 74,93 (C3); 72,44 ($Fn_{C-3'}$); 72,36 ($Fn_{C-4'}$); 71,68 (C'_{Fn}); 70,97 ($Fn_{C-2'}$); 70,78 ($Fn_{C-5'}$); 70,06 (CH_2Ph); 68,95 (C6); 66,04 (Fn_{C-3}); 65,56 (Fn_{C-4}); 62,91 (C5); 62,28 (Fn_{C-5}); 62,00 (Fn_{C-2}); 53,43 (C2); 51,55 ($CH_{3\text{-ester}}$); 23,43 ($COCH_3$); 18,99 ($CH_{3\text{-laktil}}$).

MS(FD): *m*/*z* (%) = 712,6 (100) $[M]^{\bullet+}$. Elementarna analiza za $C_{37}H_{40}N_2O_9Fe$: C 62,37; H 5,66; N 3,93. Pronađeno: C 62,35; H 5,43; N 3,80.

3.3.3.5. Benzil-2-acetamido-4,6-*O*-benziliden-2-deoksi-3-*O*-{(*R*)-1-[1'-(acetamido) ferocenilkarbamoil]etil}-*α*-D-glukopiranozid (48)

(0,12 g, 0,16 mmol, 45 %). t_t = 119-121 ºC. R_f = 0,33 (CH_2Cl_2 : EtOAc = 5 : 1).

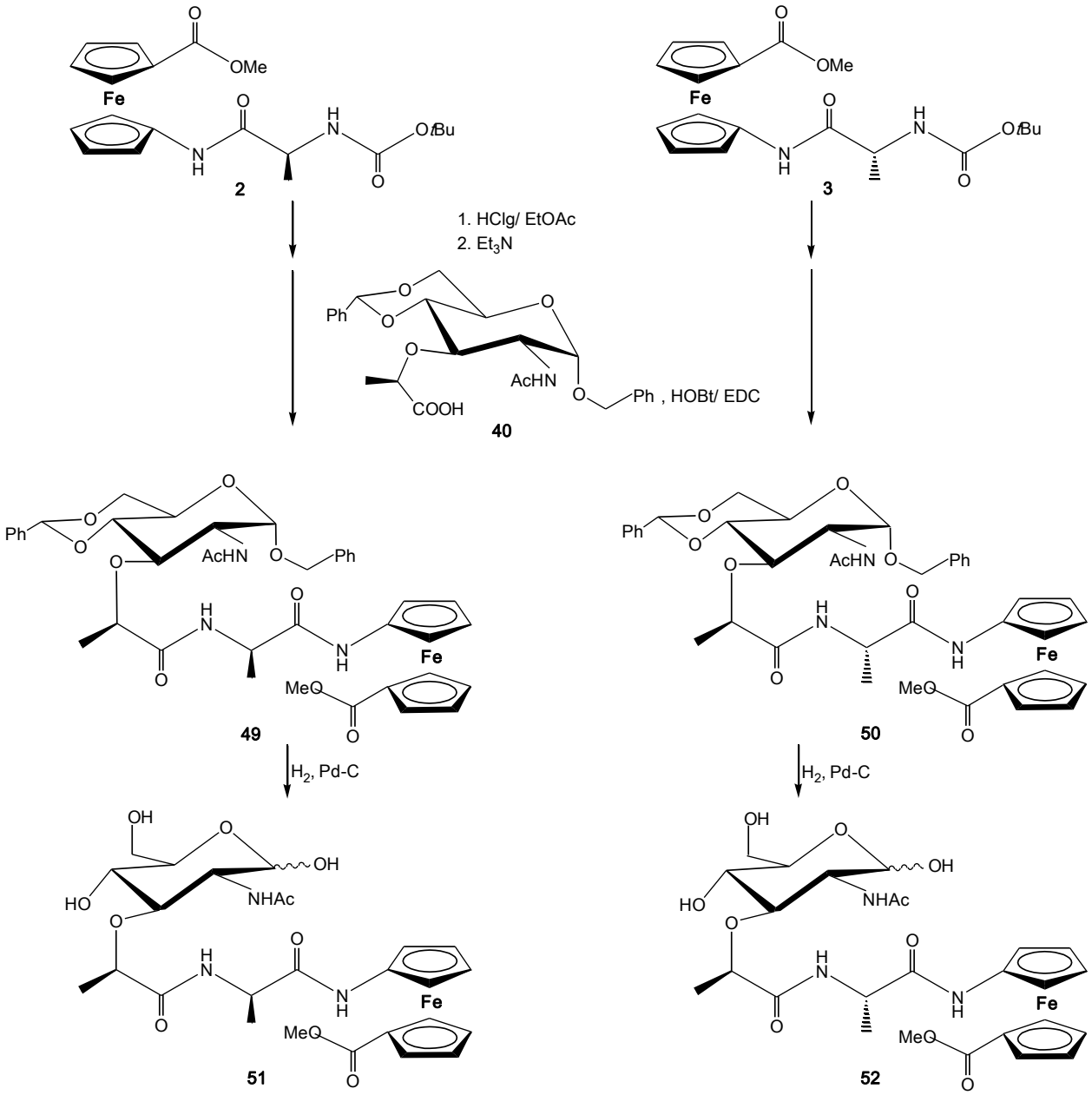
IR (CsI) ν_{max}/cm^{-1}: 3297 j ($NH_{asocirani}$), 1655 (CO_{ester}), 1677 j (CO_{amid}), 1659 j (CO_{acetil}), 1562 j (amid II). IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3425 sr ($NH_{slobodni}$), 3309 sr ($NH_{asocirani}$), 1733 (CO_{amid}), 1716 j ($CO_{Fc\text{-}acetil}$), 1671 j (CO_{acetil}), 1558 j (amid II).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8,13 (s, 1H, $NH_{Fn\text{-}acetil}$); 8,05 (s, 1H, NH_{amid}); 7,48-7,31 (m, 10H, CH_{Ph}); 6,35 (d, 1H, $J_{NH,\ H\text{-}2}$ = 9,43 Hz, NH_{acetil}); 5,58 (s, 1H, $CH_{benziliden}$); 4,90 (d, 1H, $J_{H\text{-}1,\ H\text{-}2}$ = 3,95 Hz, H-1); 4,72 (d, 1H, $J_{OCH2a,\ OCH2b}$ = 11,84 Hz, OCH_{2a}–Ph); 4,58 (pt, 1H, $Fn_{H\text{-}2'}$); 4,49 (d, 1H, $J_{OCH2b,\ OCH2a}$ = 11,84 Hz, OCH_{2b}–Ph); 4,44 (pt, 1H, $Fn_{H\text{-}2}$); 4,39 (pt, 1H, $Fn_{H\text{-}4'}$); 4,34 (dd, 1H, $J_{H\text{-}2,\ H\text{-}1}$ = 3,73 Hz, $J_{H\text{-}2,\ NH}$ = 9,21 Hz, H-2); 4,24 (dd, 1H, $J_{H\text{-}6a,\ H\text{-}5}$ = 4,6 Hz, $J_{H\text{-}6a,\ H\text{-}6b}$ = 10,09 Hz, H-6a); 4,11 (q, 1H, $J_{CH\text{-}laktil,\ CH3\text{-}laktil}$ = 6,79 Hz, CH_{laktil}); 4,05 (pt, 2H, $Fn_{H\text{-}4}$, $Fn_{H\text{-}5'}$); 4,00 (pt, 1H, $Fn_{H\text{-}5}$); 3,97 (pt, 1H, $Fn_{H\text{-}3}$); 3,94 (pt, 1H, $Fn_{H\text{-}3'}$); 3,87 (dd, 1H, $J_{H\text{-}5,\ H\text{-}6a}$ = 4,6 Hz, $J_{H\text{-}5,\ H\text{-}4}$ = 9,21 Hz, H-5); 3,78 (dd, 1H, $J_{H\text{-}6b,\ H\text{-}6a}$ = 10,09 Hz, H-6b); 3,71-3,66 (m, 2H, H-3, H-4); 2,01 (s, 3H, $COCH_{3\text{-}Fn}$); 1,90 (s, 3H, $COCH_3$); 1,46 (d, 3H, $J_{CH3\text{-}laktil,\ CH\text{-}laktil}$ = 7,02 Hz, $CH_{3\text{-}laktil}$).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 172,33 (CO_{amid}); 171,17 (CO_{acetil}); 169,29 ($CO_{Fn\text{-}acetil}$); 136,90; 136,46 (C_{Ph}); 129,12–125,92 (CH_{Ph}); 101,52 ($CH_{benziliden}$); 97,33 (C1); 94,14 (C'_{Fn}); 93,85 (C_{Fn}); 81,73 (C4); 79,14 (CH_{laktil}); 79,09 (C3); 70,10 (CH_2Ph); 68,77 (C6); 65,60 ($Fn_{C\text{-}5}$); 65,43 ($Fn_{C\text{-}4}$); 65,31 ($Fn_{C\text{-}3}$); 65,21 ($Fn_{C\text{-}3'}$); 64,89 ($Fn_{C\text{-}2',\ C\text{-}5'}$); 64,14 ($Fn_{C\text{-}4'}$); 62,95 (C-5); 62,86 ($Fn_{C\text{-}2}$); 52,70 (C2); 23,86 ($COCH_{3\text{-}Fn\text{-}acetil}$); 23,43 ($COCH_{3\text{-}acetil}$); 19,82 ($CH_{3\text{-}laktil}$).

MS(FD): *m*/*z* (%) = 711.6 (100) $[M]^{\bullet+}$. Elementarna analiza za $C_{37}H_{41}N_3O_8Fe \cdot CH_2Cl_2$: C 57,3; H 5,44; N 5,28. Pronađeno: C 57,16; H 5,87; N 5,05. CV (CH_2Cl_2, $n$$Bu_4NPF_6$, vs SCE): $E_{1/2}$ = -165,8 mV.

3.3.4. Sinteza *O*-zaštićenih (49, 50) i deprotektiranih (51, 52) ferocenskih analoga muramildipeptida



Shema 15.

3.3.4.1. Opći postupak priprave *O*-zaštićenih ferocenskih analoga MDP 49 i 50

U suspenziju Boc-AA-Fca-OMe (**2**, AA = L-Ala; **3**, AA = D-Ala) (236 mg, 0,548 mmol) u suhom etil-acetatu ohlađenu na 0 °C uvodi se plinoviti HCl. Nakon 2 sata otapalo se upari, a rezultirajući hidroklorid suspendira u suhom diklormetanu i otopi uz dodatak NEt_3 (pH~8). Nastaloj se otopini doda *O*-zaštićena *N*-Ac-Mur-OH (**40**) (387,9 mg, 0,822 mmol) koja se prethodno aktivira EDC/HOBt postupkom. Nakon 1 sata miješanja pri sobnoj temperaturi reakcijska se smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom $NaHCO_3$, 10%-tnom otopinom limunske kiseline u vodi i nekoliko puta 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 EtOAc kao eluens, pri čemu su dobiveni narančasti kristali **49** i **50**.

3.3.4.1.1. *O*-zaštićeni *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (49)

(313,5 mg, 73%), t_t = 105,4 °C, R_f = 0,5 (EtOAc), $[\alpha]_D$ +68,5 (*c* 1, $CHCl_3$).

IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1}: 3408 sr ($NH_{slobodni}$), 3281 j ($NH_{asocirani}$), 1716 (CO_{ester}), 1668 j, 1654 j (CO_{amid}), 1545 j (amid II). IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3424 sr ($NH_{slobodni}$), 3391 sl, 3307 sl ($NH_{asocirani}$), 1706 (CO_{ester}), 1695 j, 1672 j (CO_{amid}), 1557 j, 1521 j (amid II).

^{1}H NMR (300 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 9,55 (s, 1H, $NH_{Fn\text{-}amid}$); 8,19 (d, 1H, $J_{NH,\ H\text{-}2}$ = 7,8 Hz, NH_{acetil}); 7,69 (d, 1H, *J*= 7,3 Hz, $NH_{Ala\text{-}amid}$); 7,46-7,28 (m, 10H, CH_{Ph}); 5,72 (s, 1H, $CH_{benziliden}$); 4,90 (d, 1H, $J_{H\text{-}1,\ H\text{-}2}$ = 3,2 Hz, H-1); 4,71 (d, 1H, $J_{OCH2a,\ OCH2b}$ = 13,1 Hz, OCH_{2a}–Ph); 4,67 (s, 1H, $Fn_{H\text{-}2'}$); 4,65 (s, 1H, $Fc_{H\text{-}5'}$); 4,62 (s, 1H, $Fc_{H\text{-}3'}$); 4,61 (s, 1H, $Fc_{H\text{-}4'}$); 4,51 (s, 1H, OCH_{2b}–Ph); 4,38 (pt, 2H, $Fn_{H\text{-}2}$, $Fn_{H\text{-}5}$); 4,29 (s, 1H, CH_{Ala}); 4,24 (m, 1H, CH_{laktil}); 4,17 (s, 1H, H-6a); 4,01 (pt, 2H, $Fn_{H\text{-}3}$, $Fn_{H\text{-}4}$); 3,98 (m, 1H, H-2); 3,78 (s, 1H, H-6b); 3,75 (m, 3H, H-3, H-4, H-5); 3,66 (s, 3H, $CH_{3\text{-}ester}$); 1,81 (s, 3H, $COCH_3$); 1,29 (d, 3H, *J*= 6,8 Hz, CH_{3Ala}); 1,23 (d, 3H, $J_{CH3\text{-}laktil,\ CH\text{-}laktil}$ = 6,5 Hz, $CH_{3\text{-}laktil}$).

^{13}C NMR (75 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 171,93 (CO_{Ala}); 170,60 (CO_{amid}); 169,55 (CO_{ester}); 169,54 (CO_{acetil}); 137,55; 137,51 (C_{Ph}); 128,72–125,87 (CH_{Ph}); 100,31 ($CH_{benziliden}$); 96,89 (C1); 96,81 (C_{Fn}); 80,97 (C4); 76,65 (CH_{laktil}); 75,78 (C3); 72,44 ($Fn_{C\text{-}3'}$); 72,38 ($Fn_{C\text{-}4'}$); 71,37 (C'_{Fn}); 70,55 ($Fn_{C\text{-}2'}$); 70,38 ($Fn_{C\text{-}5'}$); 68,74 (CH_2Ph); 67,86 (C6); 65,55 ($Fn_{C\text{-}3}$); 65,52 ($Fn_{C\text{-}4}$); 62,85 (C5); 61,71 ($Fn_{C\text{-}5}$); 61,55 ($Fn_{C\text{-}2}$); 53,19 (C2); 51,23 ($CH_{3\text{-}ester}$); 48,45 (CH_{Ala}); 22,57 ($COCH_3$); 18,94 ($CH_{3\text{-}laktil}$); 18,38 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

MS (FD): m/z = 783,4 [100, $M]^+$.

3.3.4.1.2. *O*-zaštićeni *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (50)

(330,7 mg, 77%), t_t = 101,7 °C, R_f = 0,8 (EtOAc), $[\alpha]_D$ +32,3 (*c* 1, $CHCl_3$).

IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1}: 3386 j, 3284 sr ($NH_{asocirani}$), 1714 (CO_{ester}), 1657 j (CO_{amid}), 1571 j, 1534 j (amid II). IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3388 sr, 3297 sr ($NH_{asocirani}$), 1707 (CO_{ester}), 1696 sr, 1672 j (CO_{amid}), 1557 j, 1521 j (amid II).

^{1}H NMR (600 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 9,69 (s, 1H, $NH_{Fn\text{-}amid}$); 8,45 (d, 1H, $J_{NH,\ H\text{-}2}$ = 7,4 Hz, NH_{acetil}); 7,82 (d, 1H, *J*= 7,1 Hz, $NH_{Ala\text{-}amid}$); 7,43-7,32 (m, 10H, CH_{Ph}); 5,72 (s, 1H, $CH_{benziliden}$); 4,95 (s, 1H, H-1); 4,73 (d, 1H, $J_{OCH2a,\ OCH2b}$ = 12,5 Hz, OCH_{2a}–Ph); 4,69 (s, 1H, $Fn_{H\text{-}2'}$); 4,67 (s, 1H, $Fc_{H\text{-}5'}$); 4,64 (s, 1H, $Fc_{H\text{-}3'}$); 4,60 (s, 1H, $Fc_{H\text{-}4'}$); 4,52 (d, 1H, $J_{OCH2b,\ OCH2a}$ = 12,5 Hz, OCH_{2b}–Ph); 4,39 (pt, 2H, $Fn_{H\text{-}2}$, $Fn_{H\text{-}5}$); 4,35 (m, 1H, CH_{Ala}); 4,32 (m, 1H, CH_{laktil}); 4,19 (d, 1H, H-6a); 4,01 (pt, 2H, $Fn_{H\text{-}3}$, $Fn_{H\text{-}4}$); 3,97 (m, 2H, H-5, H-2); 3,80(s, 1H, H-6b); 3,74 (m, 3H, H-4); 3,70 (m, 1H, H-3); 3,68 (s, 3H, $CH_{3\text{-}ester}$); 1,93 (s, 3H, $COCH_3$); 1,32 (d, 3H, *J*= 6,8 Hz, CH_{3Ala}); 1,27 (d, 3H, $J_{CH3\text{-}laktil,\ CH\text{-}laktil}$ = 6,4 Hz, $CH_{3\text{-}laktil}$).

^{13}C NMR (150 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 172,62 (CO_{Ala}); 171,29 (CO_{amid}); 170,63 (CO_{ester}); 169,87 (CO_{acetil}); 137,57; 137,49 (C_{Ph}); 128,73–125,82 (CH_{Ph}); 100,33 ($CH_{benziliden}$); 96,73 (C1); 96,58 (C_{Fn}); 81,97 (C4); 76,65 (CH_{laktil}); 74,48 (C3); 72,62 ($Fn_{C\text{-}3'}$); 72,56 ($Fn_{C\text{-}4'}$); 71,23 (C'_{Fn}); 70,44 ($Fn_{C\text{-}2'}$); 70,42 ($Fn_{C\text{-}5'}$); 68,84 (CH_2Ph); 67,88 (C6); 65,71 ($Fn_{C\text{-}3}$); 65,68 ($Fn_{C\text{-}4}$); 62,78 (C5); 61,93 ($Fn_{C\text{-}5}$); 61,62 ($Fn_{C\text{-}2}$); 53,01 (C2); 51,23 ($CH_{3\text{-}ester}$); 48,32 (CH_{Ala}); 22,57 ($COCH_3$); 19,01 ($CH_{3\text{-}laktil}$); 18,14 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

MS (FD): m/z = 783,4 $[100, M]^+$.

3.3.4.2. Katalitičko hidrogeniranje *O*-zaštićenih *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (49) i *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (50)

O-zaštićeni *N*-Ac-Mur-AA-Fca-OMe (**49**, AA = L-Ala; **50**, AA = D-Ala) (100 mg, 0,128 mmol) otopi se u EtOH (5 mL) uz dodatak 50 mg katalizatora (10 % Pd/C). Smjesa se hidrogenira pri 1 baru na sobnoj temperaturi pet dana. Potom se odfiltrira katalizator i upari otapalo, a ostatak se pročisti tankoslojnom preparativnom kromatografijom TLC (EtOAc : EtOH : HOAc : H_2O = 10 : 1 : 1 : 1) pri čemu se dobije narančasti prah **51** i **52**.

3.3.4.2.1. *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (51)

(44,9 mg, 62%), t_t = 137,8 °C, R_f = 0,4 (EtOAc : EtOH : HOAc : H_2O = 10 : 1 : 1 : 1).

^{1}H NMR (600 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 9,61 (s, 1H, $NH_{Fn\text{-}amid}$); 8,14 (d, 1H, $J_{NH,\ H\text{-}2}$ = 6,3 Hz, NH_{acetil}); 7,75 (s, 1H, $NH_{Ala\text{-}amid}$); 4,99 (s, 1H, , H-1); 4,65 (s, 4H, $Fn_{H\text{-}2'}$, $Fc_{H\text{-}5'}$, $Fc_{H\text{-}3'}$, $Fc_{H\text{-}4'}$); 4,40 (pt, 2H, $Fn_{H\text{-}2}$, $Fn_{H\text{-}5}$); 4,34 (s, 1H, CH-Ala); 4,31 (m, 1H, CH_{laktil}); 4,00 (pt, 2H, $Fn_{H\text{-}3}$, $Fn_{H\text{-}4}$); 3,68 (m, 1H, H-2); 3,68 (s, 3H, $CH_{3\text{-}ester}$); 3,61 (s, 1H, H-5); 3,52 (s, 2H, H-6a, H-6b); 3,46 (s, 1H, H-3); 3,29 (s, 1H, H-4); 1,80 (s, 3H, $COCH_3$); 1,28 (m, 6H, CH_{3Ala}, $CH_{3\text{-}laktil}$).

^{13}C NMR (150 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 172,77 (CO_{Ala}); 170,52 (CO_{amid}); 170,51 (CO_{ester}); 169,29 (CO_{acetil}); 95,51 ($C1_\beta$); 90,48 ($C1_\alpha$); 96,83 (C_{Fn}); 81,77 ($C3_\beta$); 78,58 ($C3_\alpha$); 75,99 (CH_{laktil}); 72,42 ($Fn_{C\text{-}3'}$); 72,37 ($Fn_{C\text{-}4'}$); 72,15 (C5); 71,28 (C'_{Fn}); 70,41 ($Fn_{C\text{-}2'}$); 70,32 ($Fn_{C\text{-}5'}$); 70,05 (C4); 65,45 ($Fn_{C\text{-}3}$, $Fn_{C\text{-}4}$); 61,67 ($Fn_{C\text{-}5}$); 61,53 ($Fn_{C\text{-}2}$); 60,84 (C6); 56,20 ($C2_\beta$); 53,53 ($C2_\alpha$); 51,14 ($CH_{3\text{-}ester}$); 48,38 (CH_{Ala}); 22,62 ($COCH_3$); 19,00 ($CH_{3\text{-}laktil}$); 18,30 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

MS (FD): m/z = 605,4 [1, M]$^+$.

3.3.4.2.2. *N*-Ac-Mur-Ala-Fca-OMe (52)

(48,8 mg, 63%), t_t =145.2 °C, R_f = 0,6 (EtOAc : EtOH : HOAc : H_2O = 10 : 1 : 1 : 1).

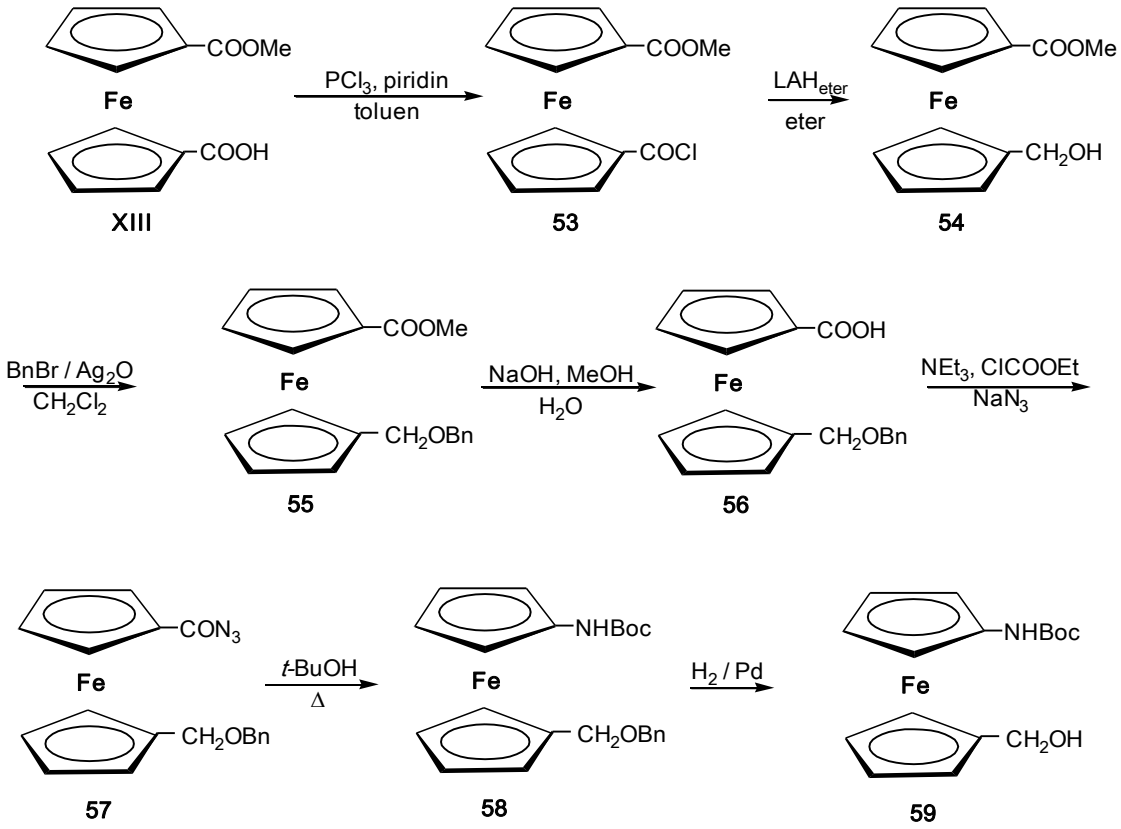
^{1}H NMR (600 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 9,65 (s, 1H, $NH_{Fn\text{-}amid}$); 8,28 (d, 1H, $J_{NH,\ H\text{-}2}$ = 6,4 Hz, NH_{acetil}); 7,99 (s, 1H, $NH_{Ala\text{-}amid}$); 5,07 (s, 1H, H-1); 4,65 (s, 4H, $Fn_{H\text{-}2'}$, $Fc_{H\text{-}5'}$, $Fc_{H\text{-}3'}$, $Fc_{H\text{-}4'}$); 4,39 (pt, 2H, $Fn_{H\text{-}2}$, $Fn_{H\text{-}5}$); 4,51 (s, 1H, CH_{laktil}); 4,34 (m, 1H, CH_{Ala}); 4,00 (pt, 2H, $Fn_{H\text{-}3}$, $Fn_{H\text{-}4}$); 3,69 (s, 3H, $CH_{3\text{-}ester}$); 3,58 (m, 2H, H-2, H-5); 3,51 (m, 2H, H-6a, H-6b); 3,46 (s, 1H, H-3); 3,33 (s, 1H, H-4); 1,87 (s, 3H, $COCH_3$); 1,31 (m, 3H, $CH_{3\text{-}Ala}$); 1,28 (m, 3H, $CH_{3\text{-}laktil}$).

^{13}C NMR (150 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 173,51 (CO_{Ala}); 170,89 (CO_{amid}); 170,61 (CO_{ester}); 169,63 (CO_{acetil}); 95,18 ($C1_\beta$); 90,20 ($C1_\alpha$); 96,73 (C_{Fn}); 81,48 ($C3_\beta$); 77,33 ($C3_\alpha$); 75,45 (CH_{laktil}); 72,53 ($Fn_{C\text{-}3'}$, $Fn_{C\text{-}4'}$); 72,17 (C5); 71,13 (C'_{Fn}); 70,37 ($Fn_{C\text{-}2'}$; $Fn_{C\text{-}5'}$); 70,67 (C4); 65,54 ($Fn_{C\text{-}3}$, $Fn_{C\text{-}4}$); 61,87 ($Fn_{C\text{-}5}$); 61,59 ($Fn_{C\text{-}2}$); 60,71 (C6); 56,27 ($C2_\beta$); 53,51 ($C2_\alpha$); 51,15 ($CH_{3\text{-}ester}$); 48,45 (CH_{Ala}); 22,60 ($COCH_3$); 19,21 ($CH_{3\text{-}laktil}$); 18,07 ($CH_{3\text{-}Ala}$).

MS (FD): m/z = 605.4 [1, M]$^+$.

3.3.5. Priprava esterskih i amidnih konjugata ferocena i manoze

3.3.5.1. Priprava ferocenskih alkohola 54 i 59



Shema 16.

3.3.5.1.1. Metil-1'-klorokarbonilferocen-1-karboksilat (53)

Otopini **XIII** (3 g, 10,41 mmol) u toluenu (100 mL) dokapa se PCl_3 (9 mL, 103,15 mmol) i piridin (1,5 mL, 18,62 mmol). Nakon 2 sata zagrijavanja pri 90 °C reakcijska se smjesa profiltrira i upari do suha pri čemu se dobije 2,87 g (90%) crveno-narančastih kristala **53**; t_t = 50-53 °C. IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 1759 j ($C{=}O_{COCl}$), 1717 j ($C{=}O_{COOMe}$).

3.3.5.1.2. Metil-1'-(hidroksimetil)ferocen-1-karboksilat (54)

Otopini ester-klorida **53** (2 g, 6,5 mmol) u suhom dietil-eteru (5 mL) prethodno ohlađenoj u ledenoj kupelji, polagano se dokapa eterska otopina $LiAlH_4$ (6,92 mL, 1,6 mmol). Potom se reakcijska smjesa prelije u čašu s hladnom vodom i ekstrahira eterom. Eterski se

ekstrakti isperu zasićenom otopinom NaCl, osuše bezvodnim Na_2SO_4 i upare do suha. Pročišćavanjem sirovog produkta tankoslojnom preparativnom kromatografijom (diklormetan : etilacetat = 10 : 1) dobiveni su žuti kristali **54** (1,3 g, 72%); t_t = 48 -52 ºC.

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3000 š (OH), 1716 j ($C{=}O_{COOMe}$).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ/ppm: 4,75 (s, 2H, CH_2); 4,38 (s, 2H, Fn); 4,27 (s, 2H, Fn); 4,20 (s, 2H, Fn); 4,16 (s, 2H, Fn); 3,79 (s, 3H, CH_{3COOMe}); 2,34 (šs, 1H, OH).

^{13}C-NMR, APT ($CDCl_3$) δ/ppm: 172,87 (*C*$OOCH_3$); 90,48 (C-1′, Fn); 71,56 (2C, Fn); 71,15 (C-1, Fn); 70,33 (2C, Fn); 69,24 (2C, Fn); 68,54 (2C, Fn); 60,02 (CH_2); 51,73 (CH_{3COOMe}).

3.3.5.1.3. Metil-1'-(benziloksimetil)ferocen-1-karboksilat (55)

Otopini **54** (730 mg, 2,67 mmol) u svježe predestiliranom diklormetanu (30 mL) dodaju se BnBr (1,6 mL, 13,3 mmol) i Ag_2O (3,7 g, 16,1 mmol). Nakon 5 dana miješanja pri sobnoj temperaturi reakcijska se smjesa profiltrira, ispere zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha. Pročišćavanjem sirovog produkta tankoslojnom preparativnom kromatografijom (diklormetan : etilacetat = 10 : 1) dobiveno je žuto ulje **9** (812 mg, 84%).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 1715 j ($C{=}O_{COOMe}$).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,36-7,35 (m, 5H, H_{Bn}); 4,77 (pt, *J* = 1,9 Hz, 2H, CH_{2Bn}); 4,53 (s, 2H, CH_{2Fn}); 4,38 (pt, 2H, Fn); 4,27 (s, 4H, Fn); 4,22 (pt, 2H, Fn); 3,77 (s, 3H, CH_{3COOMe}).

^{13}C-NMR, APT (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171,86 (CO_{COOMe}); 138,32 (Cq_{Bn}); 128,40-127,60 (CH_{Bn}); 84,76 (C-1, Fn); 71,96 (CH_{2Bn}); 71,76 (2C, Fn); 71,59 (C-1', Fn); 70,94 (2C, Fn); 70,57 (2C, Fn); 70,15 (2C, Fn); 67,39 (CH_{2Fn}); 51,52 (CH_{3COOMe}).

Elementarna analiza za $C_{20}H_{20}O_3Fe$ (364,225): C 65,95; H 5,54%. Pronađeno: C 65,87; H 5,47%.

3.3.5.1.4. 1'-(Benziloksimetil)ferocen-1-karboksilna kiselina (56)

Otopina **55** (800 mg, 2,20 mmol) u metanolu (8,8 mL) refluksira se 4 sata u prisutnosti natrijeva hidroksida (87,7 mg, 2,193 mmol) i vode (0,3 mL). Nakon što se TLC-om utvrdi da je sav početni materijal **55** izreagirao, reakcijska se smjesa upari i zaostali talog otopi u smjesi 5 %-tne $NaHCO_3$ i diklormetana pri čemu sav produkt prelazi u organski sloj. Diklormetanska

se faza ispere zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha. Pročišćavanjem sirovog produkta tankoslojnom preparativnom kromatografijom (diklormetan : etilacetat = 10 : 1) dobiven je žuti prah **56** (623,1 mg, 81%), t_t = 125-128 ºC.

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3625 j ($OH_{slobodna}$), 3480 š ($OH_{asocirana}$), 1677 j ($C{=}O_{COOH}$).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,34-7,32 (m, 5H, H_{Bn}); 4,81 (pt, 2H, CH_{2Bn}); 4,52 (s, 2H, CH_{2Fn}); 4,44 (pt, 2H, Fn); 4,31 (s, 4H, Fn); 4,26 (pt, 2H, Fn).

^{13}C-NMR, APT (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 177,21 (CO_{COOH}); 138,34 (Cq_{Bn}); 128,53-127,76 (CH_{Bn}); 85,27 (C-1, Fn); 72,62 (2C, Fn); 72,75 (CH_{2Bn}); 71,20 (4C, Fn); 70,61 (2C, Fn); 70,47 (C-1', Fn); 67,44 (CH_{2Fn}).

Elementarna analiza za $C_{19}H_{18}O_3Fe$ (350,198): C 65,17, H 5,18%. Pronađeno: C 65,27, H 5,09%.

3.3.5.1.5. 1'-Benziloksiferocen-1-karboksazid (57)

Otopini **56** (575,7 mg, 1,6 mmol) u acetonu doda se voda (0,4 mL). Reakcijskoj se smjesi, ohlađenoj na 0 °C, dokapa otopina NEt_3 (0,26 mL, 1,9 mmol) u acetonu (3 mL), te otopina ClCOOEt (0,19 mL, 2 mmol) u acetonu (0,85 mL) pazeći da temperatura ne prijeđe 5 °C. Potom se nakon 30 minuta miješanja, doda otopina NaN_3 (160,26 mg, 2,465 mmol) u vodi (0,58 mL). Nakon 45 minuta reakcijska se smjesa razrijedi hladnom vodom, ekstrahira diklormetanom. Organski se sloj ispere 5%-tnom otopinom $NaHCO_3$ i zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha. Dobiveno je 343,12 mg (53,4%) crvenog ulja **57**. Zakiseljavanjem lužnate vodene faze koncentriranom HCl istaloži se početni spoj **56** (223,3 mg). IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 2135 j (N_3), 1681j ($C{=}O_{CON3}$).

3.3.5.1.6. *tert*-Butil-1'-(benziloksimetil)ferocenilkarbamat (58)

Otopina azida **57** (446,6 mg, 1,19 mmol) u *t*-BuOH (11,6 mL) zagrijava se pri 55 °C 40 sati. U ohlađenu reakcijsku smjesu doda se 20 mL *n*-heksana te se upari do suha Pročišćavanjem reakcijske smjese tankoslojnom preparativnom kromatografijom (CH_2Cl_2) dobivena je žuta smola **58** (268,7 mg, 41%).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3435 j (NH), 1723 j ($C{=}O_{Boc}$).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,35-7,30 (m, 5H, H_{Bn}); 6,05 (s, 1H, NH); 4,58 (s, 2H, CH_{2Bn}); 4,38 (s, 2H, CH_{2Fn}); 4,32 (s, 2H, Fn); 4,22 (pt, 2H, Fn); 4,15 (pt, 2H, Fn); 3,92 (pt, 2H, Fn); 1,51 [s, 9H, $(CH_3)_{3\text{-Boc}}$].

^{13}C-NMR, APT (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 138,38 (C-Bn); 135,43 (CO_{Boc}); 128,64-127,83 (CH-Bn); 96,10 [Cq_{Boc}]; 84,47 (C-1, Fn); 72,35 (CH_{2Bn}); 70,03 (2C, Fn); 69,31 (2C, Fn); 68,18 (CH_{2Fn}); 67,95 (C-1', Fn); 65,03 (2C, Fn); 62,10 (2C, Fn); 28,58 [$(CH_3)_{3\text{-}Boc}$].

Elementarna analiza za $C_{23}H_{27}NO_3Fe$ (421,321): C 65,57, H 6,46, N 3,32%. Pronađeno: C 65,72, H 6,32, N 3,18%.

3.3.5.1.7. *tert*-Butil-1'-(hidroksimetil)ferocenilkarbamat (59)

Otopini **58** (57 mg, 0,14 mmol) u apsolutnom etanolu (5 mL) doda se Pd/C (5,7 mg), evakuira zrak i ispere vodikom. Na tikvicu se postavi balon napunjen vodikom te se miješa 48 sati u atmosferi vodika (1 atm) pri sobnoj temperaturi. Reakcijska se smjesa profiltrira i pročisti tankoslojnom preparativnom kromatografijom (dikormetan : etilacetat = 10 : 1) pri čemu se dobije 29,5 mg (62%) deprotektiranog produkta **59**.

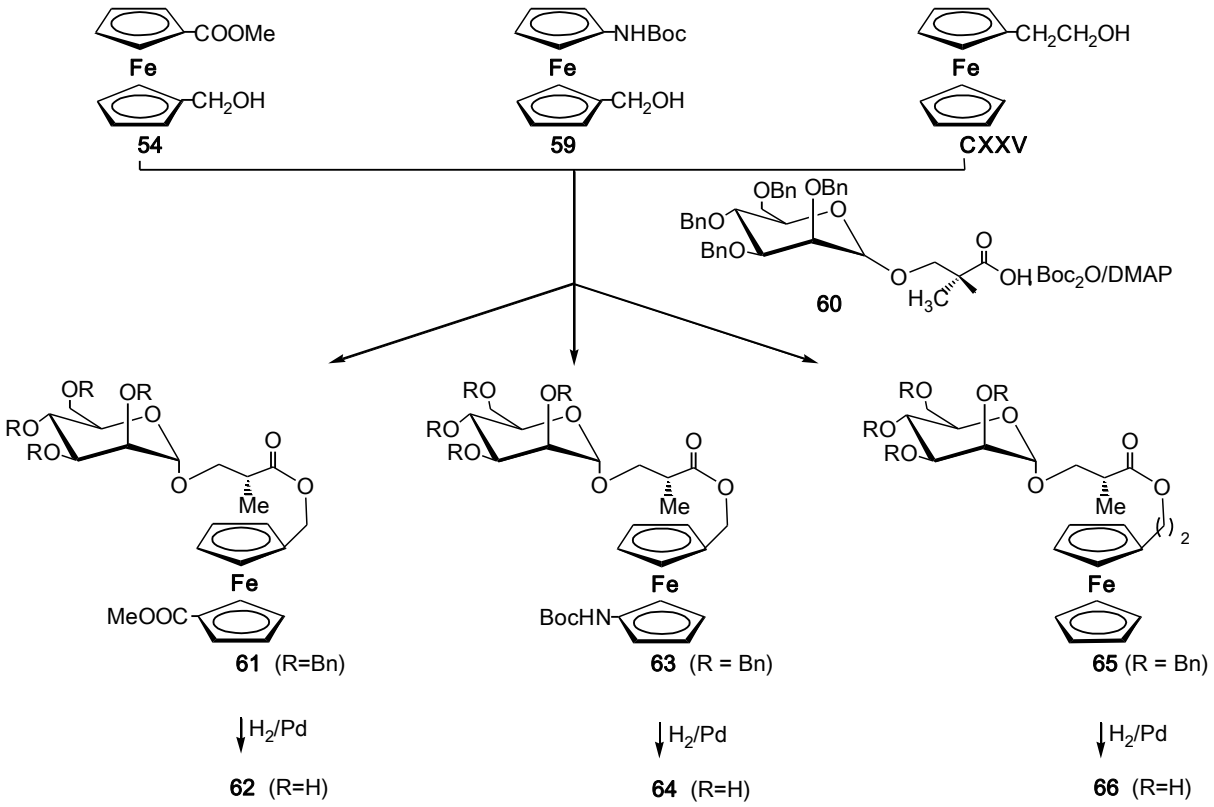
IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3602 j ($OH_{slobodna}$), 3433 j (NH), 1706 j ($C{=}O_{Boc}$). t_t =113-117 ºC.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 5,96 (s, 1H, NH); 4,43 (s, 2H, Fn); 4,39 (s, 2H, Fn); 4,15 (s, 4H, Fn); 3,98 (pt, 2H, CH_{2Fn}); 3,07 (br s, 1H, $CH_2O\mathit{H}$); 1,50 [s, 9H, $(CH_3)_{3\text{-}Boc}$].

^{13}C-NMR, APT (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 153,99 (CO_{Boc}); 96,72 (Cq_{Boc}); 80,85 (C-1, Fn); 68,59 (2C, Fn); 67,98 (2C, Fn); 62,94 (C-1', Fn); 64,54 (4C, Fn); 60,56 (CH_{2Fn}); 28,54 [$(CH_3)_{3\text{-}Boc}$].

Elementarna analiza za $C_{16}H_{21}NO_3Fe$ (331,196): C 58,02, H 6,39, N 4,23%. Pronađeno: C 58,21, H 6,27, N 4,05%.

3.3.5.2. Opći postupak priprave esterskih konjugata ferocena i manoze (62, 64 i 66)



Shema 17.

U otopinu α-manopiranozid-karboksilne kiseline **60** (0,2 mmol) i ferocenskih alkohola **54**, **59** ili **CXXV** (0,1 mmol) u suhom diklormetanu (3 mL) dodaju se $(BOC)_2O$ (0,12 mmol) i DMAP (0,001 mmol). Reakcijska smjesa alkohola **54** i **CXXV** refluksira se 2 sata i miješa pri sobnoj temperaturi preko noći, dok se reakcijska smjesa alkohola **59** refluksira 48 sati. Nakon što se putem TLC detektira konzumacija supstrata, reakcijska se smjesa ispere 2M HCl, zasićenim otopinama $NaHCO_3$ i NaCl, osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha. Pročišćavanjem sirovog produkta tankoslojnom preparativnom kromatografijom (diklormetan : etilacetat= 20 : 1) dobiveni su esteri **61** (73%), **63** (55%) i **65** (81%).

3.3.5.2.1. (*R*)-(1'-Metoksikarbonilferocenilmetil)-2-metil-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*α*-D-manopiranoziloksi)propanoat (61)

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 1731 j (C=O), 1713 j ($C=O_{COOMe}$). $[\alpha]_D$ +5º (*c* 1, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,41-7,25 (m, 20H, H_{Ar}); 4,83 (d, J_{gem} = 10,53 Hz, 2H, CH_{2Bn}); 4,82 (s, 2H, 2H, CH_{2Fn}); 4,75-4,69 (m, 4H, CH_{2Bn}); 4,62 (s, 1H, H-1); 4,55 (s, $2H_{Fn}$); 4,49 (d, J_{gem} = 11,24 Hz, 2H, CH_{2Bn}); 4,32 (s, $2H_{Fn}$); 4,23 (d, $2H_{Fn}$); 4,12 (d, $2H_{Fn}$); 3,95 (t, *J* = 9,18 Hz, *J* = 9,45 Hz, 1H, H-4); 3,78 (s, $3H_{COOMe}$); 3,75-3,65 (m, 6H, H-3, H-2, OCH_2, H-6a, H-6b); 3,65-3,59 (m, 1H, H-5); 2,70-2,63 (m, 1H, CH); 1,11 (d, *J* = 7,02 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR, APT (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 174,2 (CO); 171,6 (CO_{COOMe}); 138,52-138,40 (C_{qAr}); 128,50-127,46 (CH_{Ar}); 98,39 (C1); 82,52 (C_{qFn}); 76,24 (C_{qFn}); 75,13; 73,36; 72,58; 72,15 (4 CH_{2Bn}); 80,19; 74,82; 74,71; 72,01; 71,80; 71,07; 70,66; 70,45 (C_{Fn}, C_{2-5}); 69,48 (CH_{2Fn}); 69,21 (CH_2-O); 62,02 (C6); 51,69 (CH_{3COOMe}); 39,98 (CH); 13,98 (CH_3).

Elementarna analiza za $C_{51}H_{54}O_{10}Fe$ (882,22): C 69,37, H 6,17%. Pronađeno: C 69,52, H 6,34%.

3.3.5.2.2. (*R*)-1'-(*tert*-Butoksikarbonilamino)ferocenilmetil-2-metil-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*α*-D-manopiranoziloksi)propanoat (63)

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3428 j (NH), 1733 j (C=O), 1706 j ($C=O_{Boc}$). $[\alpha]_D$ +23,3º (*c* 2, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,36-7,24 (m, 20H, H_{Ar}); 5,96 (s, 1H, NH); 4,87 (d, J_{gem} = 11,65 Hz, 2H, CH_{2Bn}); 4,72-4,65 (m, 4H, CH_{2Bn}); 4,69 (pt, CH_{2Fn}); 4,55 (s, 1H, H-1); 4,50 (d, J_{gem} = 11,66 Hz, 2H, CH_{2Bn}); 4,39 (s, $2H_{Fn}$); 4,16 (s, $4H_{Fn}$); 3,97 (s, 2H, $2H_{Fn}$); 3,90 (d, $J_{H\text{-}2,\ H\text{-}3}$ = 3,05 Hz, 1H, H-2); 3,87 (dd $J_{H\text{-}3,\ H\text{-}2}$ = 3,06 Hz, $J_{H\text{-}3,\ H\text{-}4}$ = 8,89 Hz, 1H, H-3); 3,77-3,71 (m, 3H, H-4, OCH_2); 3,62-3,58 (m, 2H, H-6a, H-6b); 3,51-3,44 (m, 1H, H-5); 2,74-2,68 (m, 1H, CH); 1,51 [s, 9H, $(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 1,15 (d, *J* = 7,21 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR, APT (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 178,58 (CO); 137,97-137,83 (C_{qAr}); 127,9-127 (CH_{Ar}); 97,97 (C_1); 95,59 (Cq_{Boc}); 83,62 (C-1, Fn); 81,73; 79,70; 79,52; 75,44; 74,39; 74,31; 71,62; 63,89 (C_{Fn}, C_{2-5}); 74,61; 72,88; 72,18; 71,76 (CH_{2Bn}); 73,26 (C-1', Fn); 68,79 (CH_{2Fn}); 68,71 (CH_2-O); 59,76 (C6); 39,31 (CH); 27,84 [$(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 13,36 (CH_3).

Elementarna analiza za $C_{54}H_{61}NO_{10}Fe$ (939,27): C 68,99, H 6,55, N 1,49%. Pronađeno: C 68,75, H 6,67, N 1,42%.

3.3.5.2.3. (*R*)-2-Feroceniletil-2-metil-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*α*-D-manopiranoziloksi)propanoat (65)

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 1732 j (C=O). $[\alpha]_D$ +29,7º (*c* 1, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,42-7,24 (m, 20H, H_{Ar}); 4,91 (d, J_{gem} = 10,07 Hz, 2H, CH_{2Bn}); 4,75-4,71 (m, 2H, CH_{2Bn}); 4,68 (s, 1H, H-1); 4,61 (d, J_{gem} = 10,42 Hz, 4H, CH_{2Bn}); 4,12 (s, 5H, $Fc_{nesupst.}$); 4,09 (pt, 4H_{Fc}); 3,98 (d, *J* = 9,62 Hz, 1H, H-4); 3,90-3,84 (m, 2H, H-2, H-3); 3,76 (t, *J* = 6,90, 2H, $FcCH_2\mathit{CH_2}O_{Man}$); 3,74-3,69 (m, 2H, OCH_2); 3,65-3,58 (m, 2H, H-6a, H-6b); 3,54-3,46 (m, 1H, H-5); 2,76-2,68 (m, 1H, CH); 2,64 (t, *J* = 7,11, *J* = 6,90 Hz, 2H, $Fc\mathit{CH_2}CH_2O_{Man}$); 1,22 (d, *J* = 7,11 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR, APT (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 174,6 (CO); 138,50-138,37 (Cq_{Ar}); 128,34-127,57 (CH_{Ar}); 98,36 (C1); 84,40 (C_{qFc}); 80,20; 74,86; 74,72; 72,09 (C2-C5); 75,10; 73,36; 72,61; 72,21 (CH_{2Bn}); 69,25 ($FcCH_2\mathit{CH_2}O_{Man}$); 69,37 ($\mathit{C}H_2$-$CH_2Cp$); 68,68 ($Fc_{nesupst.}$); 68,46 (2C, Fc); 67,64 (2C, Fc); 65,02 (C6); 40,10 (CH); 28,29 ($Fc\mathit{CH_2}CH_2O_{Man}$); 14,09 ($CH_3$).

Elementarna analiza za $C_{50}H_{54}O_8Fe$ (838,23): C 71,58, H 6,49%. Pronađeno: C 71,88, H 6,53%.

3.3.5.3. Debenziliranje *O*-zaštićenih esterskih derivata 61, 63 i 65

Esterski konjugati **62**, **64** i **66** pripravljeni su debenziliranjem *O*-zaštićenih prekursora **61**, **63** i **65**. U otopinu ferocenskog manopiranozida u diklormetanu doda se 10% Pd/C i metanol. Nakon 5 dana miješanja u atmosferi vodika (1 bar) pri sobnoj temperaturi, reakcijska se smjesa profiltrira i upari. Nakon pročišćavanja tankoslojnom preparativnom kromatografijom (diklormetan : etilacetat= 30 : 1) dobiveni su produkti **62** (84%)**,, 64** (63%), i **66** (67%).

3.3.5.3.1. (*R*)-(1'-Metoksikarbonilferocenilmetil)-2-metil-3-(*α*-D-manopiranoziloksi)propanoat (62)

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3384 br (OH), 1729 j (C=O), 1710 j ($C{=}O_{COOMe}$). $[\alpha]_D$ -4º (*c* 0,5, MeOH).

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ/ppm: 4,85 (pt, 2H, $FnOCH_2$); 4,76 (s, 1H, H-1); 4,49 (pt, $2H_{Fn}$); 4,31 (s, $2H_{Fn}$); 4,25 (pt, $2H_{Fn}$); 4,14 (m, $2H_{Fn}$); 3,81 (s, $3H_{COOMe}$); 3,80 (d, $J_{H-2,\ H-3}$ = 3,59 Hz, 1H, H-2); 3,78 (dd $J_{H-3,\ H-2}$ = 3,62 Hz, $J_{H-3,\ H-4}$ = 9,21 Hz, 1H, H-3); 3,71 (d, $J_{H-4,\ H-3}$ = 9,44 Hz, 1H, H-4); 3,69-3,62 (m, 2H, OCH_2); 3,57-3,54 (m, 2H, H-6a, H-6b); 3,48-3,46 (m, 1H, H-5); 2,76-2,72 (m, 1H, CH); 1,11 (d, J = 7,38 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR, APT (75 MHz, CD_3OD) δ/ppm: 174,03 (CO); 171,90 (CO_{COOMe}); 100,08 (C_1); 82,26 (C_{qFn}); 72,81-69,68 ($10C_{Fn}$, C_{2-5}); 76,31 (C_{qFn}); 68,76 (CH_{2Fn}); 62,47 (CH_2-O); 61,82 (C_6); 50,43 (CH_{3COOMe}); 39,48 (CH); 12,20 (CH_3).

Elementarna analiza za $C_{23}H_{30}O_{10}Fe$ (522,03): C 52,87, H 5,79%. Pronađeno: C 52,64, H 5,71%.

3.3.5.3.2. (*R*)-1'-*tert*-Butoksikarbonilaminoferocenilmetil-2-metil-3-(*α*-D-manopiranoziloksi)propanoat (64)

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3425 j ($NH_{slobodni}$), 3356 sl. ($NH_{asocirani}$), 1731 j (C=O), 1708 j ($C{=}O_{Boc}$). $[\alpha]_D$ +13,2º (*c* 0,6, MeOH).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ/ppm: 7,33 (s, 1H, NH); 4,72 (pt, $2H_{Fn}$); 4,59 (s, 2H, C*H*$_2$Fn); 4,43 (s, $2H_{Fn}$); 4,26 (s, 1H, H-1); 4,07 (m, $2H_{Fn}$); 3,97 (s, $2H_{Fn}$); 3,69-3,62 (m, 2H, H-2, H-3); 3,57-3,53 (m, 3H, H-4, OCH_2); 3,47-3,43 (m, 2H, H-6a, H-6b); 3,26-3,23 (m, 1H, H-5); 2,73-2,66 (m, 1H, CH); 1,43 [s, 9H, $(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 1,06 (d, J = 6,12 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR, APT (75 MHz, DMSO) δ/ppm: 173,78 (CO); 137,84 (CO_{Boc}), 99,97 (C_1); 95,59 (C_{qBoc}); 87,80 ($C1_{Fn}$); 77,53; 73,95; 73,66; 70,92 (C2-C5); 70,10 ($C1'_{Fn}$); 70,17; 70,13; 67,03; 66,83 (C_{Fn}); 68,36 (C_6); 61,13 (OCH_2); 59,85 (CH_{2Fn}); 39,36 (CH); 29,01 [$(CH_3)_{3\text{-}Boc}$]; 13,63 (CH_3).

Elementarna analiza za $C_{26}H_{37}NO_{10}Fe$ (579,09): C, 53,88, H, 6,44, N 2,42%. pronađeno: C 54,02, H 6,51, N 2,37%.

3.3.5.3.3. (*R*)-Feroceniletil-2-metil-3-(*α*-D-manopiranoziloksi)propanoat (66)

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3420 š (OH), 1731 j (C=O). $[\alpha]_D$ +8,8º (*c* 0,8, MeOH).

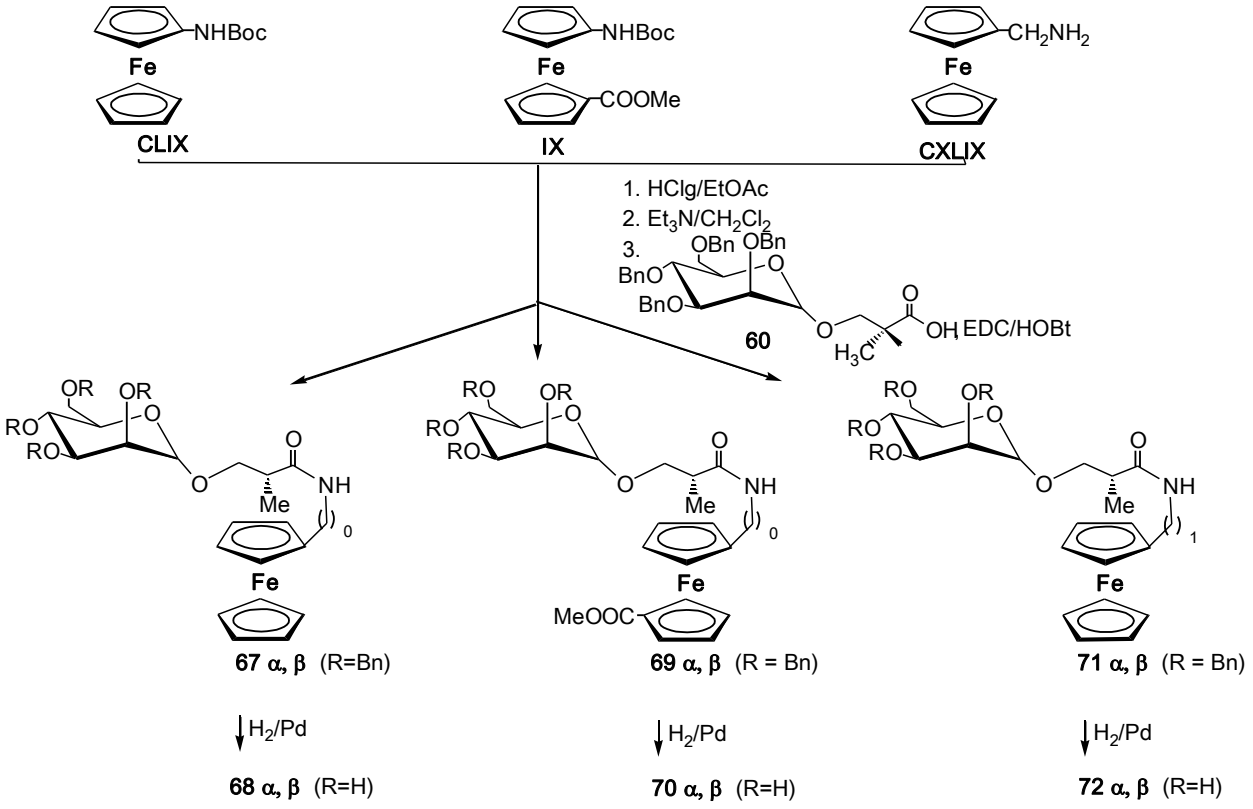
^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ/ppm: 4,74 (d, $J_{H-1,\ H-2}$ = 1,02 Hz, 1H, H-1); 4,23 (pt, $2H_{Fc}$); 4,14 (s, 5H, $Fc_{nesupst.}$); 4,10 (pt, $2H_{Fc}$); 3,86 (d, J = 9,62 Hz, 1H, H-4); 3,82-3,78 (m, 2H, H-2, H-3); 3,76 (t, J = 6,80, 2H, $FcCH_2CH_2O_{Man}$); 3,74-3,69 (m, 2H, OCH_2); 3,65-3,58

(m, 2H, H-6a, H-6b); 3,47-3,42 (m, 1H, H-5); 2,83-2,75 (m, 1H, CH); 2,68 (t, *J* = 7,03, *J* = 6,96 Hz, 2H, Fc*CH*$_2$CH$_2$O$_{Man}$); 1,17 (d, *J* = 6,93 Hz, 3H, CH$_3$).

^{13}C NMR, APT (75 MHz, CD$_3$OD) δ/ppm: 174,9 (CO); 100,59 (C$_1$); 84,32 (C$_{qFn}$); 76,86-67,06 (10C$_{Fn}$, C$_{2-5}$); 69,22 (FcCH$_2$*CH*$_2$O$_{Man}$); 65,09 (CH$_2$-O$_{Man}$); 61,38 (C$_6$); 40,09 (CH); 26,61 (Fc*CH*$_2$CH$_2$O$_{Man}$), 12,78 (CH$_3$).

Elementarna analiza za C$_{22}$H$_{30}$O$_8$Fe (478,04): C 55,23, H 6,32%. Pronađeno: C 55,11, H 6,28%

3.3.5.4. Opći postupak priprave amidnih konjugata ferocena i manoze 68α, 68β, 70α, 70β, 72α i 72β



Shema 18.

U otopinu FcNHBoc (**CLIX**) ili Boc-Fca-OMe (**IX**) (1,5 mmol) u etil-acetatu ohlađenu na 0 °C uvodi se plinoviti HCl kroz 2 sata. Nakon miješanja pri sobnoj temperaturi kroz 4 sata otopina se upari te se nastali hidroklorid obradi s Et_3N u suhom CH_2Cl_2 (pH~8) i doda u 1 mmol otopinu manopiranozid-karboksilne kiseline u suhom CH_2Cl_2, prethodno aktiviranu EDC/HOBt metodom. Nakon miješanja 72 sata pri sobnoj temperaturi, reakcijska smjesa se ispere tri puta zasićenom otopinom $NaHCO_3$, 10% limunskom kiselinom i zasićenom otopinom NaCl te se osuši Na_2SO_4 i upari do suha. Produkt se pročisti tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu (CH_2Cl_2:EtOAc = 5:1) te se rezultirajuće anomerne smjese razdijele u sustavu dietil-eter: petroleter (2 : 1) na **67α** i **67β,** odn. **69α** i **69β**. Sličnim postupkom se slobodni $FcCH_2NH_2$ (**CXLIX**) (dobiven redukcijom

$FcCONH_2$ s $LiAlH_4$ uTHF) kopulira s manopiranozid-karboksilnom kiselinom te se nakon razdvajanja u prethodno opisanim sustavima dobiju konjugati **71α** i **71β**.

3.3.5.4.1. (*R*)-*N*-Ferocenil-2-metil-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*α*-D-manopiranoziloksi)propanamid (67α)

Narančasto ulje (57,3 mg, 59 %); $[\alpha]_D$ +28,9º (*c* 2,7 $CHCl_3$); R_f = 0,64 (dietil-eter : petroleter = 2 : 1).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,69 (s, 1 H, NH); 7,32-7,25 (m, 20 H, H_{Ar}); 4,89-4,60 (m, 7 H, CH_2Ph); 4,57 (s, 2 H, *H*Fc); 4,22 (d, J_{gem} = 10,81 Hz, 1 H, CH_2Ph); 4,35 (br s, 1 H, H-1); 4,09 (s, 5 H, *H*Fc); 4,03 (d, $J_{H\text{-}1,H\text{-}2}$ = 1,77 Hz, 1 H, H-2); 3,99 (d, $J_{H\text{-}3,H\text{-}4}$ = 9,33 Hz, 1 H, H-4); 3,92 (d, $J_{H\text{-}2,H\text{-}3}$ = 2,46 Hz, 1 H, H-3); 3,88-3,83 (m, 2 H, OCH_2); 3,77-3,72 (m, 2 H, H-6a, H-6b); 3,47-3,42 (m, 1 H, H-5); 2,81-2,76 (m, 1 H, *CH*); 0,99 (d, *J* = 6,72 Hz, 3 H, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 173,22 (*C*=O); 138,31; 138,28; 138,20; 137,39 (4 C_{Ar}); 128,51-127,63 (CH_{Ar}); 101,68 (C1); 94,74 (C-1, Fc); 79,80; 75,60; 75,50; 72,01 (C2-C5); 74,57; 74,41; 74,04; 73,04 (4 CH_2Ph); 72,51 (C6); 69,19; 64,51; 63,91; 61,11; 60,95 (*C*Fc); 70,82 (OCH_2); 42,25 (*CH*); 14,51 (CH_3).

Elementarna analiza za $C_{48}H_{51}NO_7Fe$: C, 71,2; H, 6,35; N, 1,73. Pronađeno: C, 71,35; H, 6,38; N, 1,76.

3.3.5.4.2. (*R*)-*N*-Ferocenil-2-metil-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*β*-D-manopiranoziloksi)propanamid (67β)

Narančasto ulje (24,9 mg, 77 %); $[\alpha]_D$ -27,5º (*c* 0,8 $CHCl_3$); R_f = 0,51 (dietil-eter : petroleter = 2 : 1).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,68 (s, 1 H, NH); 7,46-7,17 (m, 20 H, HAr); 4,94-4,55 (m, 6 H, CH_2Ph); 4,57 (s, 2 H, *H*Fc); 4,53 (s, 2 H, *H*Fc); 4,52-4,49 (m, 2 H, CH_2Ph); 4,43 (s, 1 H, H-1); 4,08 (s, 5 H, *H*Fc); 3,94 (d, $J_{H\text{-}2,H\text{-}3}$ = 2,55 Hz, 1 H, H-2); 3,90-3,87 (m, 2 H, H-3, H-4); 3,78-3,72 (m, 2 H, OCH_2); 3,61-3,58 (m, 2 H, H-6a, H-6b); 3,52-3,48 (m, 1 H, H-5); 2,69-2,66 (m, 1 H, *CH*); 1,20 (d, *J* = 7,33 Hz, 3 H, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 172,14 (*C*=O); 138,47; 138,32; 138,22; 138,05 (4 *C*–Ar); 128,43-127,53 *CH*–Ar); 100,89 (C1); 95,21 (C-1, Fc); 82,26; 75,80; 74,88; 74,15 (C2-C5); 75,17; 74,09; 73,37; 71,92 (4 CH_2Ph); 71,27 (C6); 69,22; 64,44; 64,39; 61,48; 61,38 (*C*Fc); 69,65 (OCH_2); 40,97 (*CH*); 13,97 (CH_3).

Elementarna analiza za $C_{48}H_{51}NO_7Fe$: C 71,2; H 6,35; N 1,73. Pronađeno: C 71,37; H 6,37; N 1,75.

3.3.5.4.3. (*R*)-*N*-(1'-Metoksikarbonilferocenil)-2-metil-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*α*-D-manopiranoziloksi)propanamid (69α)

Narančasto ulje (101,9 mg, 98 %); $[\alpha]_D$ -1,4º (*c* 2,1 $CHCl_3$); R_f = 0,61 (dietil-eter : petroleter = 2 : 1).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,65 (s, 1 H, NH); 7,33-7,17 (m, 20 H, H_{Ar}); 4,95-4,88 (m, 3 H, CH_2Ph); 4,69 (s, 2 H, *H*Fn); 4,62-4,57 (m, 3 H, CH_2Ph); 4,54 (s, 2 H, *H*Fn); 4,51-4,49 (m, 2 H, CH_2Ph); 4,46 (s, 1 H, H-1); 4,29 (s, 2 H, *H*Fn); 4,07 (app t, *J* = 8,58 Hz, *J* = 9,00 Hz, 1 H, H-4); 3,96 (d, $J_{H\text{-}2,H\text{-}3}$ = 2,67 Hz, 1 H, H-3); 3,93 (s, 1 H, H-2); 3,90 (s, 2 H, *H*Fn); 3,87-3,79 (m, 2 H, OCH_2); 3,78-3,76 (m, 2 H, H-6a, H-6b); 3,75 (s, 3 H, COCH_3); 3,65-3,59 (m, 1 H, H-5); 2,74-2,67 (m, 1 H, *CH*); 1,25 (d, *J* = 7,62 Hz, 3 H, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 172,31 (*C*=O); 171,69 (*C*OCH_3); 138,54; 138,28; 138,22; 138,07 (4 C_{Ar}); 128,41-127,36 (CH_{Ar}); 100,94 (C1); 95,96 (C-1, Fn); 82,25; 75,81; 74,84; 74,20 (C2-C5); 75,14; 74,09; 73,36; 71,87 (4 CH_2Ph); 71,26 (C6); 72,60; 70,98; 66,24; 66,06; 62,76; 62,72 (*C*Fn); 71,51 (C-1', Fn); 69,59 (OCH_2); 51,54 (CO*C*H_3); 40,96 (*CH*), 13,81 (CH_3).

Elementarna analiza za $C_{50}H_{53}NO_9Fe$: C 69,20; H 6,16; N 1,61. Pronađeno C 69,09; H 6,25; N 1,62.

3.3.5.4.4. (*R*)-*N*-(1'-Metoksikarbonilferocenil)-2-metil-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*β*-D-manopiranoziloksi)propanamid (69β)

Narančasto ulje (25,1 mg, 72 %); $[\alpha]_D$ +16,3º (*c* 0,8 $CHCl_3$); R_f = 0,78 (dietil-eter : petroleter = 2 : 1).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,53 (s, 1 H, NH); 7,29-7,20 (m, 20 H, H_{Ar}); 4,90-4,57 (m, 5 H, CH_2Ph); 4,85 (d, J_{gem} = 10,73 Hz, 1 H, CH_2Ph); 4,70-4,69 (m, 2 H, *H*Fn); 4,62 (d, J_{gem} = 11,58 Hz, 1 H, CH_2Ph); 4,58 (s, 2 H, *H*Fn); 4,49 (d, J_{gem} = 11,16 Hz, 1 H, CH_2Ph); 4,46 (d, $J_{1,2}$ = 1,38 Hz, 1 H, H-1); 4,28 (s, 2 H, *H*Fn); 3,97 (d, $J_{H\text{-}3,H\text{-}4}$ = 9,06 Hz, 1 H, H-4); 3,94 (pt, 2 H, *H*Fn); 3,92-3,91 (m, 1 H, H-3); 3,89-3,84 (m, 3 H, H-2, OCH_2); 3,81-3,78 (m, 2 H, H-6a, H-6b); 3,74 (s, 3 H, COCH_3); 3,53-3,50 (m, 1 H, H-5); 2,75-2,73 (m, 1 H, *CH*); 1,03 (d, *J* = 6,96 Hz, 3 H, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 172,77 (*C*=O); 171,42 (*C*OCH_3); 137,77; 137,68; 137,06; 137,04 (4 C_{Ar}); 127,99-127,07 (CH_{Ar}); 100,51 (C1); 95,11 (C-1, Fn); 79,21; 74,81; 72,60; 72,33 (C2-C5); 74,17; 73,41; 72,90; 72,41 (4 CH_2Ph); 71,83 (C6); 71,53; 70,62; 70,31; 66,05; 65,59; 62,08; 61,9 (*C*Fn); 70,99 (C-1', Fn); 70,01 (OCH_2); 51,05 (CO*C*H_3); 41,61 (*CH*); 13,93 (CH_3).

Elementarna analiza za $C_{50}H_{53}NO_9Fe$ (*M*r = 867,83)·½ CH_2Cl_2: C 66,63; H 5,98; N 1,54. Pronađeno: C 66,65; H 6,02; N 1,56.

3.3.5.4.5. (*R*)-*N*-Ferocenilmetil-2-metil-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*α*-D-manopiranoziloksi)propanamid (71α)

Žuto ulje (76,1 mg, 77 %); $[\alpha]_D$ -27,5º (*c* 2,0 $CHCl_3$); R_f = 0,70 (dietil-eter : petrol-eter = 2 : 1).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,37-7,27 (m, 20H, H_{Ar}); 6,12 (app t, J = 4,79 Hz, J = 4,65 Hz, 1H, NH); 4,87-4,45 (m, 8H, CH_2Ph); 4,48 (s, 1H, H-1); 4,20-4,13 (m, 2H, *H*Fc); 4,08 (s, 5H, *H*Fc); 4,06 (s, 2H, *H*Fc); 4,01 (d, $J_{H\text{-}2,H\text{-}3}$ = 2,37 Hz, 1H, H-3); 3,94-3,93 (m, 2H, CH_2Fc); 3,80-3,76 (m, 4H, H-4, H-2, OCH_2); 3,72-3,68 (m, 2H, H-6a, H-6b); 3,55-3,50 (m, 1H, H-5); 2,60-2,53 (m, 1H, *CH*); 1,01 (d, *J* = 7,02 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 173,40 (*C*=O); 137,99; 137,95; 137,83; 137,52 (4 C_{Ar}); 127,86-127,07 (CH_{Ar}); 99,34 (C1); 83,85 (C-1, Fc); 79,70; 74,67; 74,44; 71,42 (C2-C5); 74,47; 72,99; 72,23; 71,71 (4 CH_2Ph); 71,67 (C6); 68,10; 68,08; 68,04; 67,75; 67,52 (*C*Fc); 69,42 (OCH_2); 40,91 (*CH*); 38,49 (*C*H_2Fc); 13,84 (CH_3).

Elementarna analiza za $C_{49}H_{53}NO_7Fe$: C 71,44; H 6,48; N 1,7. Pronađeno: C 71,54; H 6,52; N 1,73.

3.3.5.4.6. (*R*)-*N*-Ferocenilmetil-2-metil-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-*β*-D-manopiranozil-oksi)propanamid (71β)

Žuto ulje (20,4 mg, 62 %); $[\alpha]_D$ -25,5º (*c* 1,0 $CHCl_3$); R_f = 0,57 (dietil-eter : petrol-eter = 2 : 1).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7,42-7,16 (m, 20H, H–Ar); 6,29 (app t, J = 4,75 Hz, J = 4,26 Hz, 1H, NH); 4,88-4,50 (m, 7H, CH_2Ph); 4,76 (d, J_{gem} = 12,21 Hz, 1H, CH_2Ph); 4,36 (s, 1H, H-1); 4,11 (s, 2H, *H*Fc); 4,08 (s, 5H, *H*Fc); 4,06 (s, 2H, *H*Fc); 4,04-4,02 (m, 3H, H-4, CH_2Fc); 3,85 (d, $J_{H\text{-}2,\ H\text{-}3}$ = 2,73 Hz, 1H, H-3); 3,82-3,74 (m, 3H, H-2, OCH_2); 3,65-3,55

(m, 2H, H-6a, H-6b); 3,50-3,46 (m, 1H, H-5); 2,64-2,57 (m, 1H, *CH*); 1,20 (d, *J* = 7,11 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 172,88 (*C*=O); 138,21; 137,86; 137,76; 137,61 (4 *C*–Ar); 128,05-126,99 (*CH*–Ar); 100,68 (C1); 84,31 (C-1, Fc); 81,73; 75,32; 74,34; 73,70 (C2-C5); 74,61; 73,59; 72,93; 71,19 (4 CH_2Ph); 70,85 (C6); 68,05; 68,00; 67,93; 67,55; 67,46 (*C*Fc); 69,16 (OCH_2); 40,53 (*CH*); 38,27 (*C*H_2Fc); 13,92 (CH_3).

Elementarna analiza za $C_{49}H_{53}NO_7Fe$: C 71,44; H 6,48; N 1,7. Pronađeno: C 71,56; H 6,54; N 1,68.

3.3.5.5. Debenziliranje *O*-zaštićenih amidnih derivata 67, 69 i 71

U otopinu ferocenskih konjugata **67, 69** i **71**(100 mg) u CH_2Cl_2 (5 mL) doda se 50 mg 10% Pd/C i 20 mL CH_3OH, te se hidrogenira pri 4 bara na sobnoj temperaturi kroz 24 sata. Potom se odfiltrira katalizator i upari otapalo, a sirovi se produkt pročisti tankoslojnom preparativnom kromatografijom u sustavu acetonitril : voda (5:1).

3.3.5.5.1. (*R*)-*N*-Ferocenil-2-metil-3-(α-D-manopiranoziloksi)propanamid (68α)

Žuti prah (51,0 mg, 91 %); $[\alpha]_D$ +33º (*c* 0,6 CH_3OH:$CHCl_3$=1:1); R_f = 0,41 (acetonitril : H_2O = 5 : 1).

^{1}H NMR (300 MHz, $[D_6]$-DMSO) δ/ppm: 9,29 (s, 1H, NH); 4,64 (d, $J_{H\text{-}1,H\text{-}2}$ = 0,72 Hz, 1H, H-1); 4,60 (s, 2H, *H*Fc); 4,53 (s, 2H, *H*Fc); 4,18 (d, $J_{H\text{-}2,\ H\text{-}3}$ = 3,86 Hz, 1H, H-2); 4,08 (s, 5H, *H*Fc); 3,97-3,92 (m, 2H, H-3, H-4); 3,63-3,56 (m, 2H, OCH_2); 3,56-3,48 (m, 2H, H-6a, H-6b); 3,41-3,40 (m, 1H, H-5); 2,67-2,61 (m, 1H, *CH*); 0,99 (d, *J* = 6,52 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $[D_6]$-DMSO) δ/ppm: 172,88 (*C*=O); 101,09 (C1); 95,94 (C-1, Fc); 74,41; 71,44; 70,67; 70,57 (C2-C5); 69,95 (C6); 69,27; 67,43; 64,26; 64,05; 61,04 (*C*Fc); 61,71 (OCH_2); 45,44 (*CH*); 14,33 (CH_3).

Elementarna analiza za $C_{20}H_{27}NO_7Fe$: C 53,47; H 6,06; N 3,12. Pronađeno: C 53,58; H 6,03; N 3,10.

3.3.5.5.2. (*R*)-*N*-Ferocenil-2-metil-3-(β-D-manopiranoziloksi)propanamid (68β)

Žuti prah (48,8 mg, 87 %); $[\alpha]_D$ -4,4º (*c* 0,46 CH_3OH:$CHCl_3$=1:1); R_f = 0,34 (acetonitril : H_2O = 5 : 1).

^{1}H NMR (300 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 9,25 (s, 1H, NH); 4,74 (d, $J_{H\text{-}1,H\text{-}2}$ = 0,90 Hz, 1H, H-1); 4,59 (s, 2H, *H*Fc); 4,44 (s, 2H, *H*Fc); 4,24 (d, $J_{H\text{-}2,\ H\text{-}3}$ = 3,84 Hz, 1H, H-2); 4,10 (s, 5H, *H*Fc); 3,93-3,90 (m, 1H, H-4); 3,89 (d, $J_{H\text{-}3,\ H\text{-}4}$ = 8,58 Hz, 1H, H-3); 3,67-3,66 (m, 2H, O*CH*$_2$); 3,44-3,43 (m, 2H, H-6a, H-6b); 3,30-3,29 (m, 1H, H-5); 2,66-2,65 (m, 1H, *CH*); 1,05 (d, *J* = 6,60 Hz, 3H, *CH*$_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 172,24 (*C*=O); 99,81 (C1); 95,46 (C-1, Fc); 77,59; 73,69; 70,44; 70,38 (C2-C5); 70,26 (C6); 68,77; 67,14; 63,60; 60,64; 60,57 (*C*Fc); 61,37 (O*CH*$_2$); 45,00 (*CH*); 14,45 (*CH*$_3$).

Elementarna analiza za $C_{20}H_{27}NO_7Fe$: C 53,47; H 6,06; N 3,12. Pronađeno: C 53,37; H 6,11; N 3,08.

3.3.5.5.3. (*R*)-*N*-1'-Metoksikarbonilferocenil-2-metil-3-(*α*-D-manopiranoziloksi)propanamid (70*α*)

Narančasti prah (48,7 mg, 83 %); $[\alpha]_D$ +172º (*c* 0,9 CH_3OH:$CHCl_3$=1:1); R_f = 0,45 (acetonitril : H_2O = 5 : 1).

^{1}H NMR (300 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 7,54 (s, 1H, NH); 4,68 (s, 2H, *H*Fc); 4,67 (s, 1H, H-1); 4,52 (s, 2H, *H*Fc); 4,39 (s, 2H, *H*Fc); 4,35 (s, 1H, H-4); 4,06-3,91 (m, 2H, H-3, H-2); 3,78 (s, 2H, *H*Fc); 3,68-3,49 (m, 4H, O*CH*$_2$, H-6a, H-6b); 3,59 (s, 3H, COC*H*$_3$); 3,03-2,93 (m, 1H, H-5); 2,76-2,66 (m, 1H, *CH*); 1,18 (d, *J* = 6,70 Hz, 3H, *CH*$_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 172,98 (*C*=O); 168,24 (*C*OCH_3); 100,09 (C1); 97,14 (C-1, Fn); 77,50; 73,97; 73,62; 70,90 (C2-C5); 70,62 (C6); 70,43; 70,11; 67,07; 66,90 (*C*Fn); 69,98 (C-1', Fn); 69,42 (O*CH*$_2$); 51,44 (CO*C*H$_3$); 41,38 (*CH*); 13,19 (*CH*$_3$).

Elementarna analiza za $C_{22}H_{29}NO_9Fe$: C 52,09; H 5,76; N 2,76. Pronađeno: C 52,17; H 5,71; N 2,81.

3.3.5.5.4. (*R*)-*N*-1'-Metoksikarbonilferocenil-2-metil-3-(*β*-D-manopiranoziloksi)propanamid (70β)

Narančasti prah (43,1 mg, 74 %); $[\alpha]_D$ +13,3º (*c* 0,9 CH_3OH); R_f =0,40 (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 9 : 1).

^{1}H NMR (300 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 7,45 (s, 1H, NH); 4,77 (s, 1H, H-1); 4,75 (s, 2H, *H*Fc); 4,45 (s, 2H, *H*Fc); 4,14 (d, $J_{H\text{-}3,\ H\text{-}4}$ = 9,35 Hz, 1H, H-4); 4,05 (s, 2H, *H*Fc); 3,90-3,87 (m, 4H, H-2, H-3, O*CH*$_2$); 3,76 (s, 3H, COC*H*$_3$); 3,67 (s, 2H, *H*Fc); 3,38-3,34 (m, 3H H-6a, H-6b); 3,18-3,08 (m, 1H, H-5); 2,79-2,69 (m, 1H, *CH*); 1,16 (d, *J* = 6,17 Hz, 3H, *CH*$_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 173,03 (*C*=O); 169,99 (*C*OCH_3); 100,14 (C1); 91,87 (C-1, Fn); 77,47; 73,97; 73,92; 70,87 (C2-C5); 69,54 (C6); 70,19; 70,09; 66,89; 66,71 (*C*Fn); 69,76 (C-1', Fn); 69,12 (O*C*H_2); 51,33 (CO*C*H_3); 35,09 (*CH*); 14,58 (*C*H_3).

Elementarna analiza za $C_{22}H_{29}NO_9Fe$: C 52,09; H 5,76; N 2,76. Pronađeno: C 52,20; H 5,81; N 2,78.

3.3.5.5.5. (*R*)-*N*-Ferocenilmetil-2-metil-3-(*α*-D-manopiranoziloksi)propanamid (72*α*)

Žuti prah (49,2 mg, 88 %); $[\alpha]_D$ +20,6º (*c* 0,5 CH_3OH); R_f = 0,51 (acetonitril : H_2O = 5 : 1).

^{1}H NMR (300 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 8,01 (s, 1H, NH); 4,49 (s, 1H, H-1); 4,15 (s, 2H, *H*Fc); 4,14 (s, 5H, *H*Fc); 4,13 (s, 2H, *H*Fc); 4,06-4,02 (m, 4H, H-2, H-3, O*C*H_2); 3,97-3,96 (m, 3H, H-4, C*H*$_2$Fc); 3,78-3,75 (m, 1H, H-5); 3,61-3,52 (m, 2H, H-6a, H-6b); 2,62-2,57 (m, 1H, *CH*); 1,04 (d, *J* = 7,01 Hz, 3H, *C*H_3).

^{13}C NMR (75 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 173,13 (*C*=O); 97,76 (C1); 86,32 (C-1, Fc); 78,37; 75,52; 74,06; 71,18 (C2-C5); 72,22 (C6); 68,36; 67,53; 67,44; 67,14; 67,04 (*C*Fc); 69,22 (O*C*H_2); 39,95 (*CH*); 37,29 (*C*H$_2$Fc); 14,62 (*C*H_3).

Elementarna analiza za $C_{21}H_{29}NO_7Fe$: C 54,44; H 6,31; N 3,02. Pronađeno: C 54,56; H 6,29; N 3,03.

3.3.5.5.6. (*R*)-*N*-Ferocenilmetil-2-metil-3-(*β*-D-manopiranoziloksi)propanamid (72*β*)

Žuti prah (51,0 mg, 91 %); $[\alpha]_D$ -8,8º (*c* 0,4 CH_3OH:$CHCl_3$=1:1); R_f = 0,45 (acetonitril : H_2O = 5 : 1).

^{1}H NMR (300 MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 8,00 (app t, *J* = 5,70 Hz, *J* = 5,95 Hz, 1H, NH); 4,39 (s, 1H, H-1); 4,25-4,22 (m, 1H, H-3); 4,17-4,16 (m, 2H, *H*Fc); 4,15 (s, 5H, *H*Fc); 4,14 (s, 2H, *H*Fc); 4,10 (d, $J_{H\text{-}2,\ H\text{-}3}$ = 2,34 Hz, 1H, H-2); 4,07 (s, 2H, C*H*$_2$Fc); 4,05-4,03 (m, 1H, H-4); 4,02-4,01 (m, 2H, O*C*H_2); 3,95-3,91 (m, 2H, H-6a, H-6b); 3,86-3,83 (m, 1H, H-5); 2,64-2,58 (m, 1H, *CH*); 1,01 (d, *J* = 6,89 Hz, 3H, *C*H_3).

^{13}C NMR (75MHz, [D_6]-DMSO) δ/ppm: 173,08 (*C*=O); 99,97 (C1); 86,18 (C-1, Fc); 77,54; 73,93; 73,66; 70,41 (C2-C5); 70,53 (C6); 68,32; 67,66; 67,64; 67,18; 67,12 (*C*Fc); 69,72 (O*C*H_2); 39,58 (*CH*); 37,39 (*C*H$_2$Fc); 14,61 (*C*H_3).

Elementarna analiza za $C_{21}H_{29}NO_7Fe$: C 54,44; H 6,31; N 3,02. Pronađeno: C 54,59; H 6,27; N 2,99.

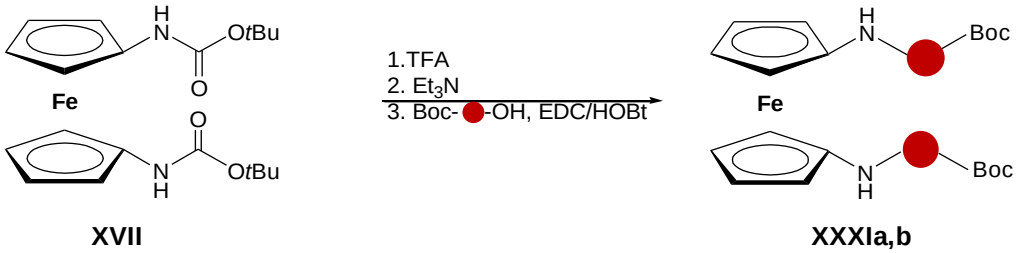
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UVOD

U Literaturnom dijelu disertacije opisana su konformacijska svojstva bioorganometalnih konjugata OMe-(AA)$_n$-*CO*-Fn-*CO*-(AA)$_m$-OMe (**I**) i Y-(AA)$_n$-*NH*-Fn-*CO*-(AA)$_m$-OMe (**II**) [AA = Ala, Pro, Gly, Phe, Val; *m* = 1, 2; *n* = 1, 2] izvedenih kopulacijom ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline Fcd (**VIII**) odnosno 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline Fca (**IX**) s prirodnim aminokiselinama (slika 8).

Razmak među ciklopentadienilnim prstenovima na koje su pripojeni peptidni lanci iznosi 3,3 Å što odgovara prosječnoj duljini vodikove veze.[178] Prema tome, umetanjem ferocenskog kalupa (templata) u prirodnu peptidnu sekvencu omogućuje se tvorba intramolekulskih vodikovih veza (IHB) između podandnih peptidnih lanaca, odnosno induciraju se različiti strukturni elementi (uzvojnice, plohe i okreti). Obrasci IHB, na kojima se temelji tvorba sekundarnih strukturnih elemenata u peptidima **I** i **II**, određeni su strukturom ferocenskog sintona (Fcd, Fca) te strukturom i apsolutnom konfiguracijom prirodnih aminokiselina.

Uslijed njegove teške dostupnosti, odnosno nestabilnosti, utjecaj ferocen-1,1'-diamina (Fcda) na kiralnu organizaciju izvedenih peptida Y-(AA)$_m$-*NH*-Fn-*NH*-(AA)$_m$-Y (**III**) [AA = L(D)-Ala; *m* = 1] slabo je istražen. Naime, do sada je objavljena samo jedna publikacija u kojoj je Kraatz opisao sintezu i konformacijska svojstva simetrično disupstituiranih peptida Fn-(*NH*-L-Ala-Boc)$_2$ (**XXXIa**) i Fn-(*NH*-D-Ala-Boc)$_2$ **(XXXIb**) izvedenih iz Boc-zaštićenog diamina Fcda (**XVII**) koji je nakon deprotekcije s TFA *in situ* konjugiran s Boc-L-Ala-OH odnosno Boc-D-Ala-OH (shema 1, shema 19).[50]



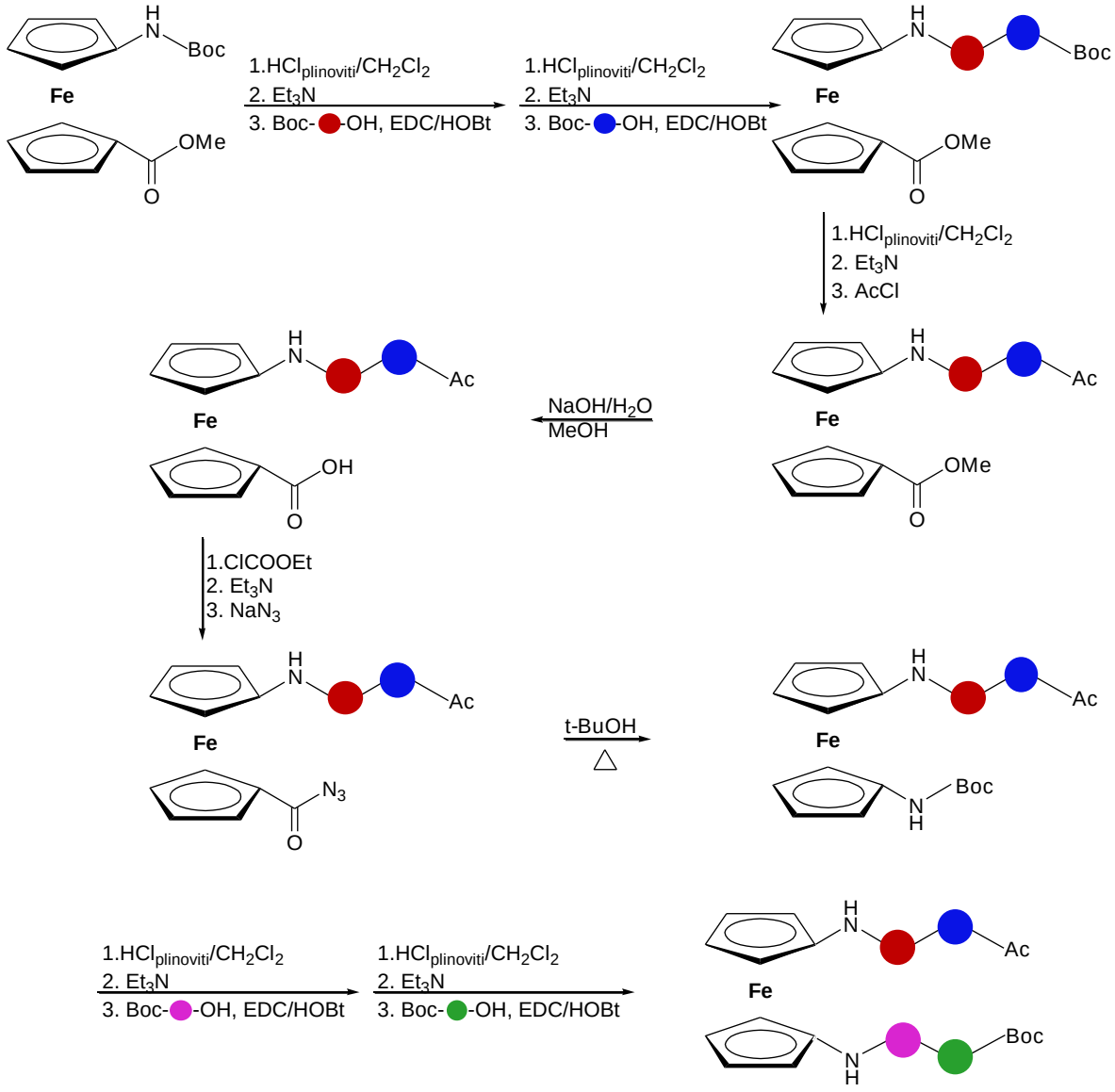
XVII **XXXIa,b**

Shema 19. Priprava „Kraatzovih" peptida **III**

Imajući na umu veliki broj publikacija (više od 25) u kojima su opisani peptidni mimetici **I** i **II** izvedeni iz Fcd i Fca, te samo jedan rad u kojem su opisani peptidi **XXXIa** i **XXXIb** kao najniži homolozi mimetika **III** izvedenih iz Fcda, odlučili smo jedan dio ove disertacije posvetiti sintezi i strukturnoj analizi viših homologa peptida **III**. Kako su svi naši pokušaji priprave peptidâ **III** Kraatzovim postupkom rezultirali raspadom reakcijske smjese, osmislili smo novu strategiju za pripravu rečenih peptida pri čemu se kao prekursor koristi Boc-Fca-OMe: (*i*) umetanje peptidnog lanca na *N*-terminus ferocenskog prekursora i njegovo produljenje izvelo bi se opetovanom kondenzacijom s Boc-$(AA)_m$-OH; (*ii*) uslijedila bi pretvorba terminalne Boc-zaštitne skupine u Ac, (*iii*) kiselina dobivena hidrolizom estera na donjem ferocenskom prstenu prevela bi se u azid koji Curtiusovom pregradnjom daje Boc-zaštićeni amin, (*iv*) u kiselim uvjetima (u kojima je Ac-zaštitna skupina na gornjem ferocenskom prstenu stabilna) deprotektirala bi se Boc-zaštićena amino-skupina s donjeg prstena te bi uslijedila njezina kondenzacija s Boc-$(AA)_n$-OH (shema 20).

Primjenom opisanog postupka pripravili smo ciljne peptide **III** u visokom iskorištenju (bez raspada reakcijske smjese). Nadalje, za razliku od Kraatzove metode koja omogućava istodobno uvođenje identičnih aminokiselinskih sekvenci na oba ferocenska prstena, našim je pristupom moguće pripraviti peptide **III** u kojima su različiti homo- i heterokiralni peptidi vezani na Fcda.

Zajedničko svojstvo peptida **I** i **III** je paralelna orijentacija podandnih peptidnih lanaca. Kako je Hirao vrlo iscrpno opisao peptide **I** u kojima su karbonilne skupine ferocenskog sintona kopulirane s homo- i heterokiralnim Ala-Pro i Pro-Ala dipeptidima (slika 16),[17] istraživanja novih konjugata **III** započeli smo s analozima Hiraovih peptida u kojima su spomenuti prirodni dipeptidi Ala-Pro i Pro-Ala konjugirani s amino-skupinama iz ferocenskog prekursora.



Shema 20. Strategija za pripravu viših homologa peptida **III** izvedenih iz Fcda

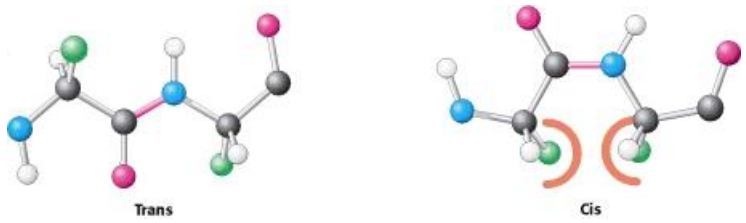
4.2. *CIS-TRANS*-IZOMERIZACIJA PROLINSKE IMIDNE VEZE

Prolinski ostaci u linearnim, cikličkim i globularnim proteinima induciraju tvorbu 10-članog β-okreta. β-Okret, element prepoznavanja u receptor-ligand interakcijama, predstavlja glavni objekt istraživanja u području sintetskih mimetika peptidne sekundarne strukture.[179-181] Također je riječ o konformacijskom elementu presudnom za biološku aktivnost (npr. za enzimsko hidroksiliranje prolina; hidroksiprolin izgrađuje kolagen, protein vezivnog tkiva, neophodan za stvaranje i funkciju kože, hrskavice i kostiju). Linearni peptidi s

konstituirajućim Pro-AA sekvencijama (AA = Gly, L-Ala, D-Ala) pokazali su se učinkovitim inhibitorima kolagenske prolil-hidrolaze.[182] Prolinski motivi, osim strukturne uloge, imaju vezujuću i protektivnu funkciju. Kao glavni konstituent sline, vežu i neutraliziraju štetne tanine iz hrane (voća, bobica, kakaa) i pića (kave, čaja, piva, vina). Prolinski ostaci unutar peptidnih lanaca preveniraju proteolitičku degradaciju, te povećavaju njihovu imunofarmakološku aktivnost.[183,184]

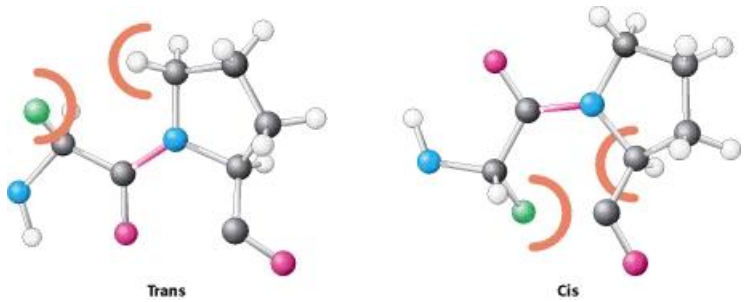
Funkcionalnost prolinskih ostataka posljedica je njihove jedinstvene strukture. Prolinski bočni ogranak kovalentno je vezan na dušikov atom iz glavnog lanca zatvarajući pirolidinski prsten. Time je onemogućeno njegovo sudjelovanje u vodikovim vezama te je ograničena rotacija oko veze N-C_α, što odgovara (*i*+1) položaju β- i γ-okreta.[185]

Planarne amidne veze u peptidima uglavnom zauzimaju *trans*-konfiguraciju u kojoj su dva C_α-atoma na suprotnim stranama peptidne veze. U *cis*-konfiguraciji javlja se sterička napetost između bočnih ogranaka vezanih na C_α-atome, te je stoga omjer *trans*- i *cis*-oblika u prirodnim peptidima ~ 95 : 5 (slika 51).[186]



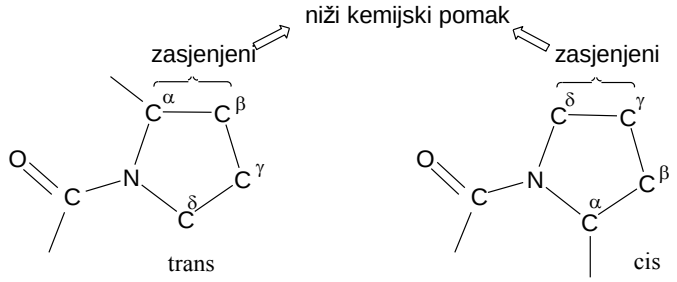
Slika 51. *Cis*-*trans*-izomerizacija amidne veze u peptidima

Međutim, prolinske imidne veze pokazuju smanjeni afinitet za *trans*-konfiguraciju zbog toga što je prolinski dušikov atom vezan za dva susjedna tetraedarska ugljikova atoma čime se smanjuju steričke razlike između *trans*- i *cis*-oblika te se njihov omjer mijenja do čak 70 : 30 (slika 52).[186,187]



Slika 52. *Cis*-*trans*-izomerizacija imidne veze u prolinskim peptidima

Cis-trans-izomerizacija oko prolinske peptidne veze ima ključnu ulogu u nabiranju transmembranskih proteina koji imaju receptorsku ili transportnu funkciju. Riječ je o brzom, ravnotežnom procesu koji otežava razdvajanje *cis*- i *trans*-izomera kromatografskim metodama. S druge strane, vrijeme potrebno za postizanje rezonancije relativno je kratko u odnosu na brzinu interkonverzije *cis*- i *trans*-izomera, te se ^{1}H i ^{13}C NMR-spektroskopija koristi za njihovu detekciju.[177,188-191] Općenito, sin-pozicija ugljikovih atoma u odnosu na karbonilni kisikov atom čini ih zasjenjenima te rezoniraju pri višem polju, odnosno imaju niži kemijski pomak. Stoga su C_α- i C_β-atomi zasjenjeniji u *trans*-izomeru te imaju niži kemijski pomak u odnosu na C_α- i C_β-atome iz *cis*-izomera, dok su C_γ- i C_δ-atomi zasjenjeniji u *cis*-izomeru te je njihov kemijski pomak niži u odnosu na C_γ- i C_δ-atome iz *trans*-izomera (slika 53). S obzirom da konformacija oko imidne veze utječe na kemijske pomake C_β- i C_γ- atoma, manja razlika kemijskih pomaka ($\Delta\delta$ = 1-6 ppm) očekuje se kod *trans*-izomera, dok se veća razlika ($\Delta\delta$ = 8-10 ppm) pripisuje *cis*-izomerima.



Slika 53. Kemijski pomaci prolinskih ugljikovih atoma u ^{13}C NMR-spektrima

Kako kemijski pomaci C_δ- u *trans*- odn. C_α-atoma u *cis*-izomeru ovise o prirodi skupine vezane na karbonilni ugljikov atom, asignaciju *cis*- i *trans*-izomera valja započeti od Cγ-atoma na kojeg najmanje utječu promjene u strukturi peptidnog lanca. Omjer *cis*- i *trans*-izomera određuje se prema visini signala u ^{13}C-spektrima ili integriranjem signala u ^{1}H-spektrima.[192,193]

NMR-mjerenjima ispitivan je utjecaj temperature, otapala i vodikovih veza na *cis-trans* izomerizaciju.[194-204] Općenito, zagrijavanjem se ubrzava međupretvorba izomera, što dovodi do srastanja njihovih signala koji su bili razdvojeni pri nižim temperaturama.[205,206] Nadalje, utvrđeno je da udio *cis*-izomera raste u polarnim otapalima, dok je udio *trans*-

izomera veći u nepolarnim otapalima. Također, porast *trans*-frakcije pripisuje se utjecaju intramolekulskih vodikovih veza.[207,208]

4.3. SINTEZA I KONFORMACIJSKA ANALIZA BIOKONJUGATA Fn-[NH-(AA)$_m$-Y]$_2$ (III)

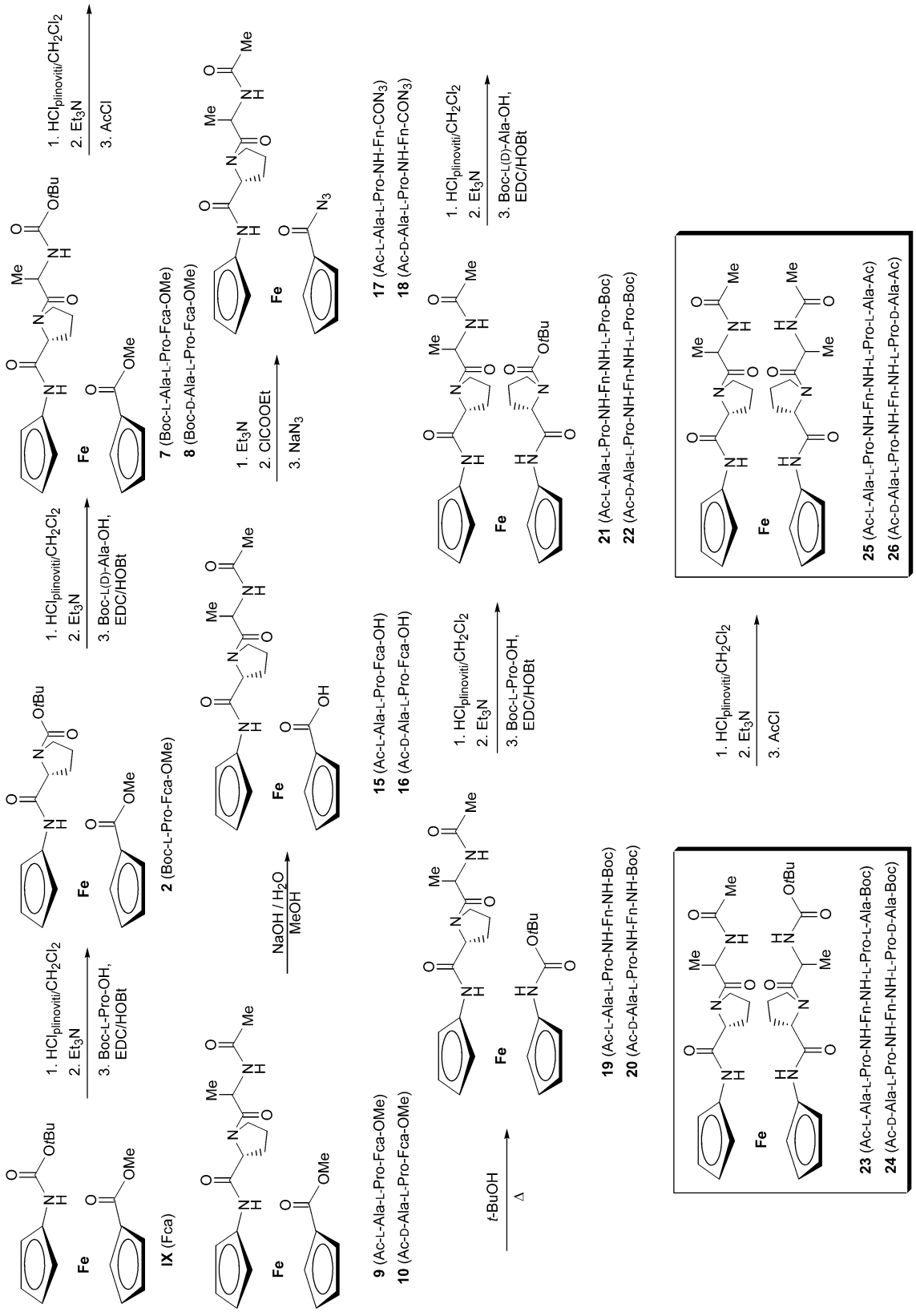
U sklopu ove disertacije opisali smo pripravu i konformacijska svojstva nekoliko podtipova (**a**-**f**) peptida **III**:

(i) homo- [Ac-L-Ala-L-Pro-*NH*-Fn-*NH*-L-Pro-L-Ala-Ac (**25**, **IIIa**)] i heterokiralnog peptida [Ac-D-Ala-L-Pro-*NH*-Fn-*NH*-L-Pro-D-Ala-Ac (**26**, **IIIb**)] (shema 21),

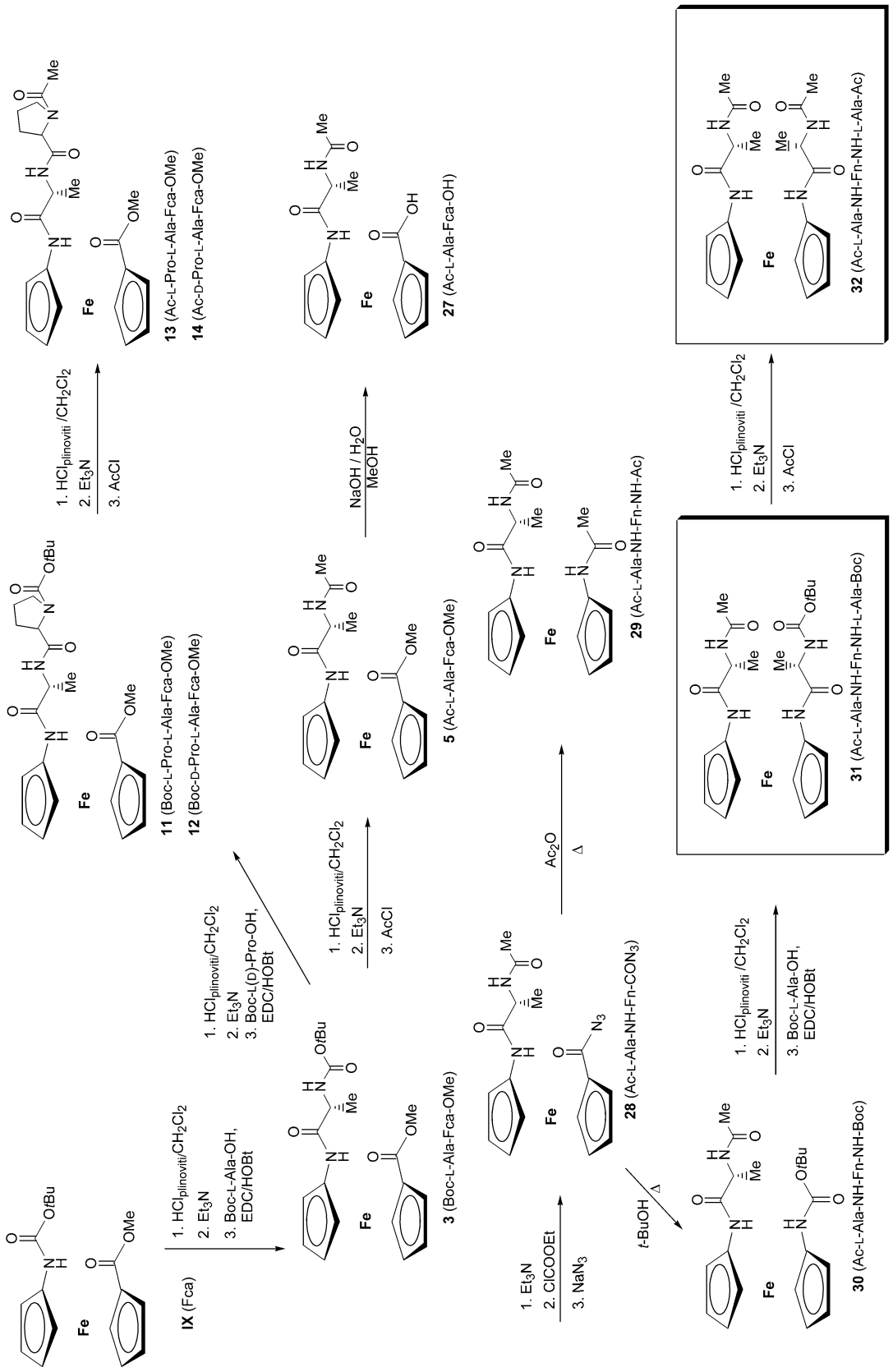
(ii) prekursorâ (**13** i **14**) homo- [Ac-L-Pro-L-Ala-*NH*-Fn-*NH*-L-Ala-L-Pro-Boc (**IIIc**)] i heterokiralnog peptida [Ac-D-Pro-L-Ala-*NH*-Fn-*NH*-L-Ala-D-Pro-Boc (**IIId**)] s izmijenjenim slijedom prirodnih aminokiselina u odnosu na **IIIa**-**b** (sinteza ciljnih mimetika **IIIc**-**d** iz prekursora **13** i **14** bit će dovršena u nastavku istraživanja) (shema 22),

(iii) analoga Kraatzovih peptida **XXXIa-b** [Ac-L-Ala-*NH*-Fn-*NH*-L-Ala-Boc (**31**, **IIIe**) i Ac-L-Ala-*NH*-Fn-*NH*-L-Ala-Ac (**32**, **IIIf**)] (shema 22).

Konformacijska analiza pripravljenih spojeva provedena je spektroskopskim metodama (CD-, IR- i NMR-spektroskopija) i potkrijepljena DFT-računima. Također je određena i kristalna struktura spojeva **1**, **21** i **31**.



Shema 21. Priprava ciljnih peptida **23-26** te njihovih prekursora **2-22**

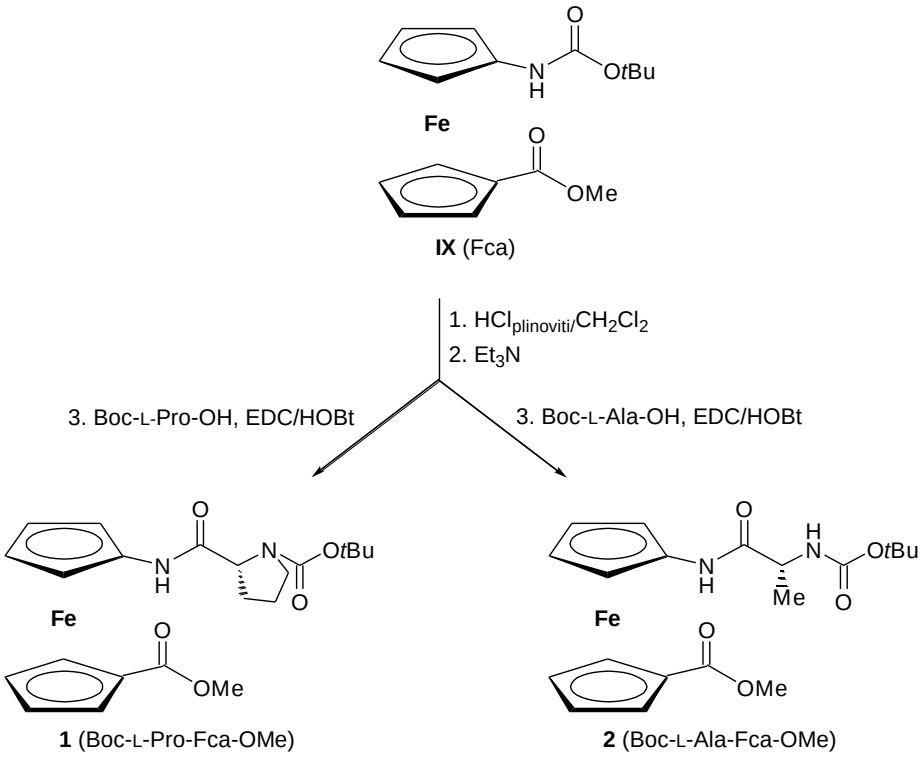


Shema 22. Priprava ciljnih peptida **31** i **32**

4.3.1. Sinteza i konformacijska analiza dipeptidâ Boc-L-Pro-Fca-OMe (1) i Boc-L-Ala-Fca-OMe (2)

4.3.1.1. Sinteza dipeptidâ Boc-L-Pro-Fca-OMe (1) i Boc-L-Ala-Fca-OMe (2)

Sinteza peptida **1** i **2** započinje deprotekcijom amino-skupine iz Fca djelovanjem plinovitog HCl. Nakon obrade nastalog hidroklorida s Et_3N uslijedila je kopulacija slobodnog ferocenskog amina s s Boc-Pro-OH odnosno Boc-Ala-OH primjenom standardne HOBt/EDC metode pri čemu su dobiveni peptidi **1** i **2** (shema 23).[209]

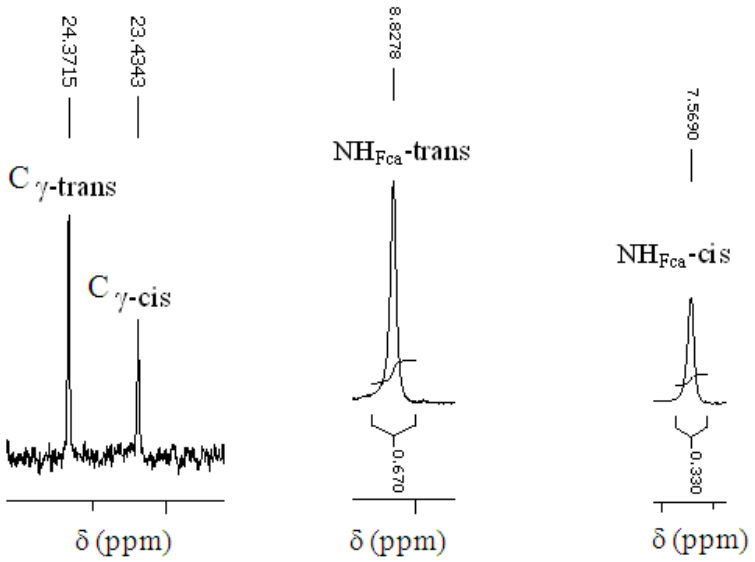


Shema 23. Priprava dipeptida **1** i **2** (predstavnika peptida **II**) iz Fca (**IX**)

Ulazak alaninske podjedinice potvrđen je dubletom njezine metilne (δ = 1,42 ppm) i multipletom metinske skupine (δ = 4,23 ppm) u ^{1}H NMR-spektru peptida **2**. Spomenute su skupine registrirane u ^{13}C NMR-spektru pri δ = 17,95 ppm (CH_{3Ala}) te δ = 51,81 ppm (CH_{Ala}). U karbonilnom području spektra vidljiv je novi signal pri δ = 171,19 ppm koji odgovara CO_{Ala}. Mjerenjem ^{1}H- i ^{13}C-NMR-spektara prolinskog peptida **1** pri sobnoj temperaturi dobiveni su prošireni i srasli signali koje nije bilo moguće asignirati. Stoga je njegova

struktura određena mjerenjem NMR-spektara pri 228 K pri čemu je uočen dupli set signala koji odgovara *cis*- i *trans*-izomerima.

^{1}H-, ^{13}C-, COSY- i HMBC-spektroskopijom najprije smo asignirali prolinske *trans*- i *cis*-C_γ-atome pri δ = 24,37 odn. 23,43 ppm. Pri tomu smo viši kemijski pomak pripisali *trans*-izomeru, a prema visinama signala odredili smo njihov omjer (*trans : cis* = 67 : 33). Također, razlika kemijskih pomaka C_β- (δ = 26,87 ppm) i C_γ- atoma (δ = 24,37 ppm) iznosi 2,5 ppm što dodatno potvrđuje dominaciju *trans*-izomera. Isti omjer proizlazi i nakon integriranja signalâ izomernih amidnih protona (slika 54).



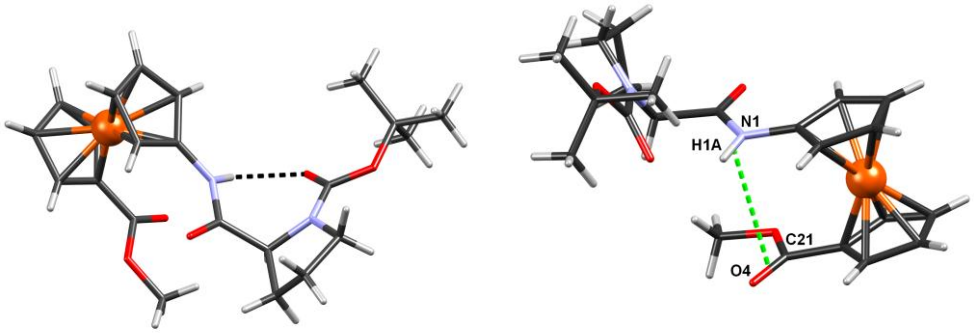
Slika 54. Kemijski pomaci *trans*- i *cis*-izomernih prolinskih C_γ- i amidnih protona u NMR-spektrima peptida **1** mjerenima pri 228 K

Konformacija prolinskog peptida **1** u čvrstom stanju utvrđena je kristalografskom analizom. Utjecaj prolinskog odn. alaninskog ostatka na konformaciju izvedenih biokonjugata **1** i **2** u otopini ispitan je CD-, IR- i NMR-spektroskopskom analizom.

4.3.1.2. Kristalografska analiza Boc-L-Pro-Fca-OMe (1)

Rendgenskom strukturnom analizom peptida **1** dobili smo točne trodimenzionalne podatke o njegovoj geometriji (slika 55). Opaža se intramolekulska vodikova veza N-H···O (udaljenosti N···O odn. H···O iznose 2,82 Å, odn. 2,11 Å; kut N-H···O je 139°) (slika 55, *lijevo*) kao i intermolekulska dipolarna interakcija: veze N-H i C=O (s drugog

ciklopentadienilnog prstena) (slika 55, *desno*) gotovo su paralelne (kut među njima je samo 6,5°) i udaljene su oko 3,35 Å. Očito ovdje dolazi do interakcije između antiparalelnih dipola, što dodatno stabilizira konformaciju molekule. Konformacija pirolidinskog prstena je blago izvijena "omotnica" (envelope). Među molekulama u kristalu nema jakih interakcija, tako da 3D-slagalinu drže slabe vodikove veze C-H···O i interakcije C-H···π.



Slika 55. Molekulska struktura peptida **1** u čvrstom stanju: IHB (*lijevo*) i dipolarna interakcija (*desno*)

4.3.1.3. IR- spektroskopska analiza dipeptidâ 1 i 2[209]

Zbog velike konformacijske fleksibilnosti, prirodni se peptidi mogu vezati s mnoštvom različitih receptora što dovodi do neželjenih bioloških učinaka (npr. hidrolize djelovanjem peptidaza). Drugim riječima, potrebna funkcionalnost peptida i proteina ostvaruje se tek nakon postizanja bioaktivne konformacije pomoću koje se vezuju za ciljni receptor.

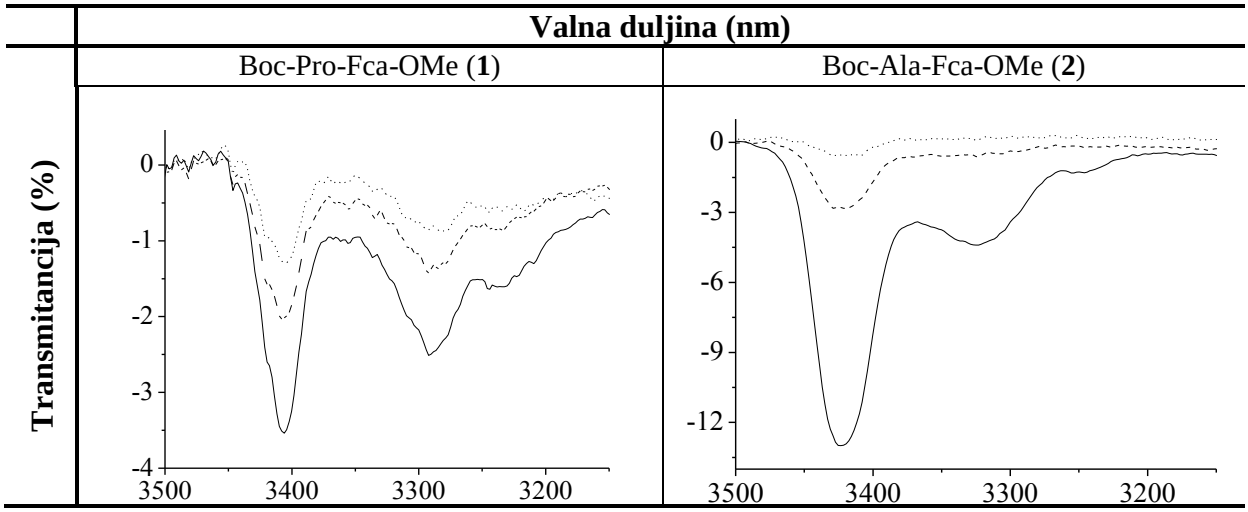
IR-spektroskopija je metoda koja daje pouzdan uvid u konformacijski prostor peptida u otopini.[210] Istezne frekvencije NH-skupina u području nižem od 3400 cm^{-1} ukazuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama, dok se signali iznad 3400 cm^{-1} pripisuju slobodnim NH-skupinama. Apsorpcijske vrpce karbonilnih esterskih skupina nađene ispod 1730 cm^{-1} indiciraju njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.

Karakter vodikove veze (inter- ili intramolekulski) određuje se mjerenjem koncentracijski-ovisnih IR-spektara. Postupnim razrjeđivanjem otopine ispitivanog uzorka cijepaju se intermolekulske vodikove veze uslijed čega znatno opada intenzitet njihovih signala u području nižem od 3400 cm^{-1}. Ukoliko su, pak, u molekuli prisutne intramolekulske

vodikove veze njihov intenzitet razrjeđivanjem slabi proporcionalno slabljenju signala slobodne NH-skupine.

Nešto jači signal pri 3405 cm^{-1} u IR-spektru Boc-Pro-Fca-OMe (**1**) pripisuje se njegovim slobodnim NH-skupinama, dok signali pri 3290 cm^{-1} i 3238 cm^{-1} odgovaraju asociranim NH-skupinama. Omjer intenziteta slobodne i asocirane NH-skupine ne mijenja se razrjeđivanjem diklormetanske otopine peptida **1** što je jaka indikacija njegove stabilizacije intramolekulskom vodikovom vezom (IHB). U amidnom području IR-spektra Boc-Ala-Fca-OMe (**2**) dominira signal slobodne NH-skupine pri 3423 cm^{-1}, dok se asocirane NH-skupine registriraju slabim signalima pri 3324 cm^{-1}. Kako razrjeđivanjem diklormetanske otopine peptida **2** dodatno slabi signal asocirane NH-skupine, karakter asocijacije ostaje nerasvijetljen (tablica 13).

Tablica 13. Koncentracijski ovisni IR-spektri[a] biokonjugata **1** i **2**



[a]IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2, [(—) $c = 5\times10^{-2}$ M, (----) $c = 2{,}5\times10^{-2}$ M, (····) $c = 1{,}25\times10^{-2}$ M].

Istezne frekvencije karbonilnih skupina indikacija su akceptorskog sudjelovanja pripadajućih estera ili amida u vodikovim vezama.[211,212] Točnu asignaciju signala opaženih u karbonilnom i amidnom području IR-spektara peptida **1** i **2** proveli smo usporedbom s referentnim spojevima, odn. monosupstituiranim analozima [Fc-COOMe (**CLX**) i Fc-NHBoc (**CLIX**), Fc = ferocenil][26] kod kojih ne postoji mogućnost tvorbe IHB (tablica 14). Položaj apsorpcijskih vrpci esterskih skupina peptida **1** i **2** (< 1730 cm^{-1}) dopušta mogućnost njihovog sudjelovanja u IHB. Uretanske karbonilne skupine konjugatâ **1** i **2** apsorbiraju pri nižim valnim duljinama u odnosu na referentni slobodni uretan Fc-NHBoc (**CLIX**), čime je

indicirana njihova uloga akceptora vodikove veze. Takvi su nalazi u skladu s literaturnim navodima prema kojima se asocirane uretanske karbonilne skupine javljaju oko ili ispod 1700 cm^{-1}.[182,213,214]

Tablica 14. Istezne vibracije[a] (cm^{-1}) NH- i CO-skupina referentnih (**CLIX**-**CLX**) i ispitivanih spojeva **1** i **2**

Spoj	Formula	ν_{NH} (slob.)[b]	ν_{NH} (asoc.)[c]	ν_{CO} (ester)	ν_{CO} (amid I)	ν_{CO} (amid II)
CLX[26]	Fc-COOMe[d]			1711		
CLIX[26]	Fc-NHBoc	3436sr			1723	
1	Boc-Pro-Fca-OMe[e]	3405sr	3290sr 3238sl	1706	1694 1655	1532
2	Boc-Ala-Fca-OMe	3423sr	3324sl	1709š	1709š	1557 1536 1504

[a]IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2, $c = 5\times10^{-2}$ M, [b]slob. (slobodna), [c]asoc. (asocirana), [d]Fc = ferocenil, [e]Fca = 1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina.

4.3.1.4. NMR-spektroskopska analiza dipeptidâ 1 i 2

NMR-spektroskopska analiza omogućava jasniji uvid u obrasce vodikovih veza, prethodno indiciranih IR-spektroskopijom. Naime, tom je tehnikom moguće razlikovati pojedine NH-skupine u molekuli te na temelju njihovih kemijskih pomaka zaključiti sudjeluju li u vodikovim vezama (kemijski pomaci iznad 7 ppm pripisuju se asociranim NH-skupinama). Dakako, pri tome treba imati na umu da registrirani protonski kemijski pomak predstavlja prosjek svih doprinosećih konformacija zahvaljujući brzoj ravnoteži između slobodnih i vezanih stanja.[215,216]

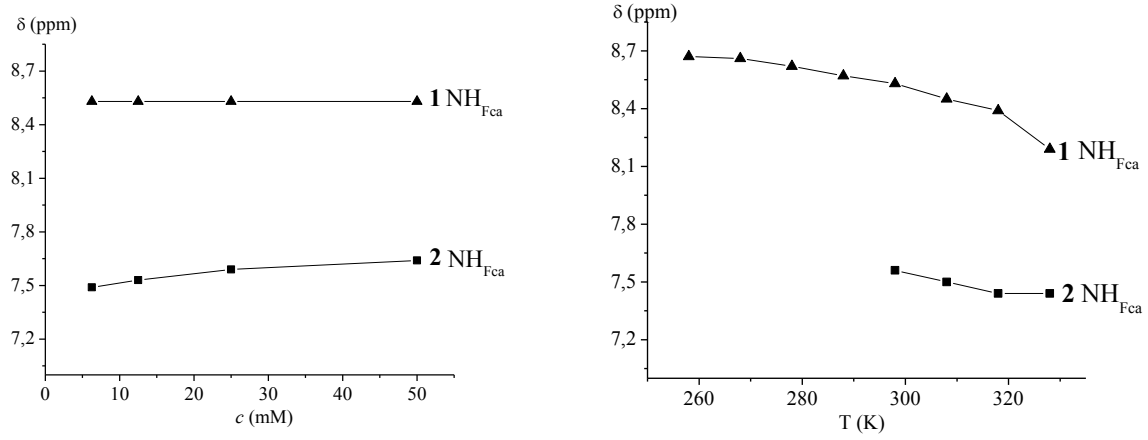
Visoki kemijski pomaci NH-skupina vezanih za ferocensku jezgru u peptidima **1** i **2** (u aprotičnom $CDCl_3$) podržavaju vodikove veze indicirane nalazima IR-spektroskopije. Očekivano, NH-skupina iz Fc-NHBoc (**CLIX**) koja nema mogućnost sudjelovanja u IHB registrirana je pri višem polju u ^{1}H NMR-spektru (tablica 15).

Tablica 15. Kemijski pomaci (δ/ppm)[a] amidnih protona referentnog spoja (**XIV**) i ispitivanih biokonjugata **1** i **2**

Spoj	Formula	δ (NH_{AA})[b]	δ ($NH_{Fca/Fc}$)
CLIX[26]	Fc-NHBoc	/	5,55
1	Boc-Pro-Fca-OMe	/	8,53
2	Boc-Ala-Fca-OMe	5,14	7,64

[a]NMR-spektri snimljeni su u $CDCl_3$ pri $c = 5\times10^{-2}$ M i 298 K; [b] AA = aminokiselina.

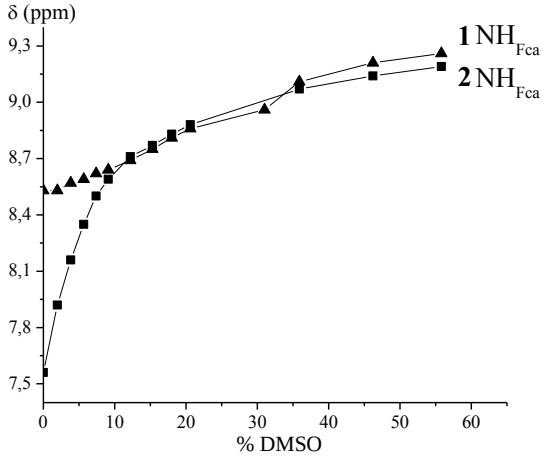
Prirodu vodikovih veza indiciranih IR- i NMR-analizom odredili smo mjerenjem koncentracijski i temperaturno ovisnih NMR-spektara. Pri tome smo imali na umu da se razrjeđivanjem ili zagrijavanjem cijepaju intermolekulske vodikove veze što uzrokuje pomak amidnih protona u više polje. Kako (*i*) postupnim smanjivanjem koncentracije te (*ii*) zagrijavanjem peptida **1** i **2** u $CDCl_3$ nije došlo do značajnijih promjena kemijskih pomaka njihovih NH-skupina vezanih za ferocensku jezgru, intramolekulski karakter vodikovih veza, predložen IR-spektroskopijom, dodatno je potvrđen (slika 56).



Slika 56. Koncentracijska i temperaturna ovisnost kemijskih pomaka IHB-asociranih NH-skupina u peptidima **1** i **2**

Jakost IHB indiciranih naprijed opisanim rezultatima IR- i NMR-analize ispitana je titracijom s DMSO. Pri tome se očekuje značajan pomak u niže polje onih NH-protona koji su izloženi polarnom DMSO. S druge strane, ne očekuju se značajnije promjene kemijskih pomaka NH-protona doniranih u jake vodikove veze. Postupnim dodatkom do 20% DMSO

dolazi do naglog skoka titracijske krivulje peptida Boc-Ala-Fca-OMe (**2**) koji je prouzročen značajnim promjenama kemijskog pomaka njegove NH-skupine vezane na ferocen ($\Delta\delta$ > 1 ppm), a što se pripisuje njezinu sudjelovanju u slaboj IHB. S druge strane, dodatak DMSO kao akceptora vodikove veze ne utječe bitno na kemijski pomak NH-skupine prolinskog peptida **1** što se tumači njezinim sudjelovanjem u jačoj IHB (slika 57).



Slika 57. DMSO-titracija otopina peptida Boc-Pro-Fca-OMe (**1**) (▲) i Boc-Ala-Fca-OMe (**2**) (■) u $CDCl_3$ (c = 2,5×10^{-2} M)

Izloženost peptidnih NH-skupina otapalu određuje se na temelju ovisnosti kemijskih pomaka o temperaturi ($\Delta\delta/\Delta T$).[216-221] Intermolekulske vodikove veze kao i vodikove veze s otapalom podliježu cijepanju pri povišenoj temperaturi uzrokujući pomak signala NH-skupina u više polje. U DMSO, vrijednosti $\Delta\delta/\Delta T$ pozitivnije od -4,5 ppb/K karakteriziraju zaklonjene NH-skupine odn. amidne protone uključene u IHB. Zbog nestabilnosti ferocenâ u DMSO, temperaturna ovisnost kemijskih pomaka ferocenskih peptida proučavana je isključivo u $CDCl_3$.[222-224] Studij kemijskih pomaka malih prirodnih peptida u $CDCl_3$ doveo je do sljedećih zaključaka:[225]

- $\Delta\delta/\Delta T$ vrijednosti amidnih protona izloženih otapalu iznose -2,4 ± 0,5 ppb/K,
- niske $\Delta\delta/\Delta T$ također su zamijećene za amidne protone zaklonjene od otapala tijekom mjerenja NMR-spektara,
- visoke temperaturne ovisnosti karakteristične su za NH-skupine koje su na početku mjerenja (pri nižim temperaturama) bile zaklonjene od otapala, ali su postale izložene otapalu pri višim temperaturama. Ovaj se zaključak odnosi na (*i*) peptide samozdružene intermolekulskim vodikovim vezama ili (*ii*) konformacije uređene intramolekulskim vodikovim vezama koje se cijepaju zagrijavanjem uslijed čega dolazi do odmotavanja peptidnog lanca.

Drugim riječima, niske temperaturne ovisnosti u $CDCl_3$ pripisuju se izloženim i zaklonjenim NH-skupinama, dok visoka temperaturna ovisnost uvijek indicira one NH-

skupine koje su na početku mjerenja bile zaklonjene, ali su zagrijavanjem postale izložene otapalu uslijed disocijacije samozdruženih agregata ili odmotavanja uređenih konformacija.[225]

Prema tome, povećane temperaturne ovisnosti kemijskih pomaka ferocenskih peptida **1** i **2** koji su se pokazali koncentracijski neovisnima [čime je isključena mogućnost njihovih intermolekulskih agregacija (slika 56)], odražavaju inicijalno zaklonjene NH-skupine koje su postale izložene otapalu odmotavanjem konformacija uređenih intramolekulskim vodikovim vezama (tablica 16).

Tablica 16. Temperaturne ovisnosti kemijskih pomaka[a] ferocenskih peptida **1** i **2**

Spoj	**Formula**	**δ (ppm)**		**Δδ/ΔT (ppb/K)**	
		NH_{Fca}	NH_{AA}	NH_{Fca}	NH_{AA}
1	Boc-Pro-Fca-OMe	8,53	5,10	-6,9	-3,2
2	Boc-Ala-Fca-OMe	7,57	/	-5,6	/

[a] NMR-spektri su mjereni u $CDCl_3$ (c = 2,5×10^{-2} M) u temperaturnom rasponu od 258 do 328 K (**1**) odn. 298 do 323 K (**2**).

Kako je rečeno u uvodnom dijelu ovog odsječka, izomerizacijom oko imidne veze prolinskog peptida **1** u njegovim se NMR-spektrima mjerenima pri niskoj temperaturi javljaju dva seta signala, dok su signali izmjereni pri sobnoj temperaturi prošireni i srasli odn. izomeri nisu razdvojeni. Poznato je da povišena temperatura i polarno otapalo utječu na izomerizaciju doprinoseći *trans*-obliku. Očekivano, ^{1}H NMR-mjerenja pri različitim temperaturama (od 228 do 328 K) te titracija s DMSO pokazala su da snižavanjem temperature odn. povećanjem udjela DMSO raste udio *cis*-izomera (tablica 17).

Tablica 17. Utjecaj temperature i polarnog otapala na izomerizaciju oko imidne veze

Boc-Pro-Fca-OMe **(1)**	**T (K)**		**DMSO (%)**	
	228	**328**	**0**	**56**
cis/ δ (ppm)	7,56	/	/	9,19
t*rans*/ δ (ppm)	8,83	8,53	8,53	9,26
Δδ/ (ppm)	0,3		0,73	
trans : cis	67:33	100:0	100:0	54:46

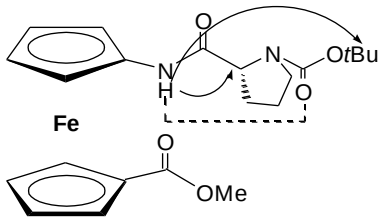
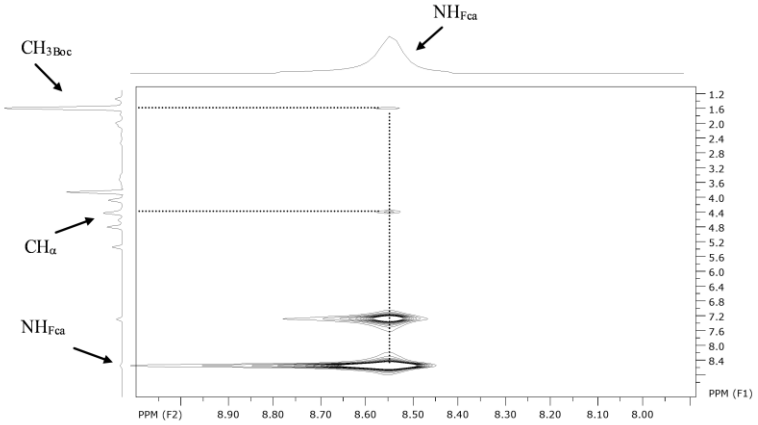
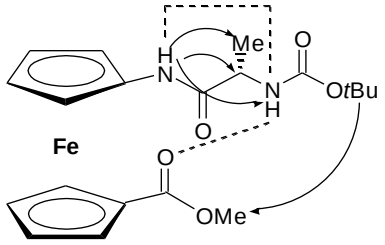
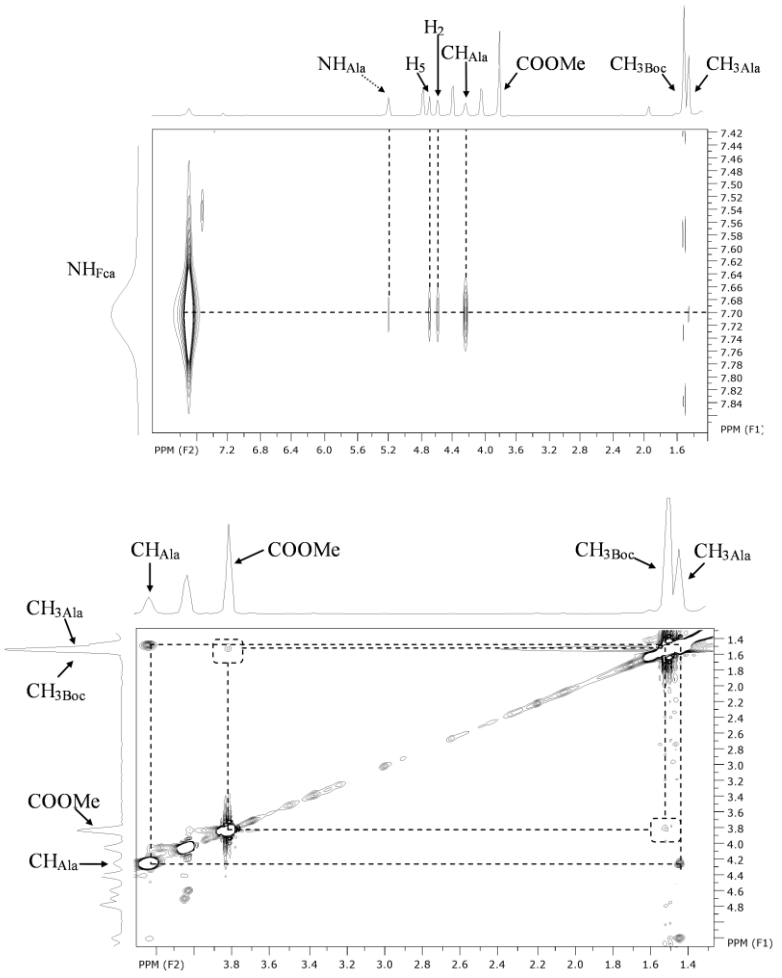
Svi naprijed opisani rezultati sugeriraju prisutnost IHB u peptidima **1** i **2**. Naime, IR-apsorpcijske vrpce karbonilnih esterskih i karbamatnih skupina indikacija su njihovog angažmana u vodikovim vezama, dok NMR-analiza upućuje na sudjelovanje NH-skupina vezanih na ferocen u IHB-interakcijama. Da bi se dodatno rasvijetlio obrazac IHB, istraženi su i NOE-kontakti sudjelujućih amidnih skupina.

Na temelju rezultata spektroskopskih mjerenja, predložene su sljedeće konformacije ispitivanih peptida (tablica 18):

(i) intralančana $NH_{Fca}\cdots OC_{Boc}$ IHB u prolinskom peptidu **1** koja rezultira 7-članim prstenom, odn. γ-okretom,

(ii) intralančana $NH_{Fca}\cdots N_{Ala}$ IHB u alaninskom peptidu **2** kojom se zatvara 5-člani prsten popraćena interlančanom $NH_{Ala}\cdots OC_{Fca}$ IHB koja dovodi do tvorbe 9-članog prstena.

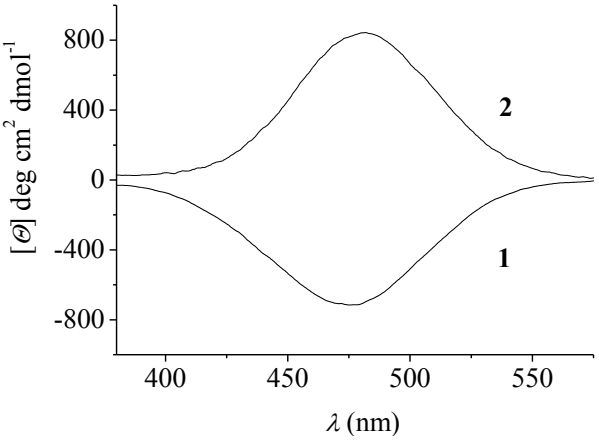
Tablica 18. NOE-kontakti (strelice) i intramolekulske vodikove veze (isprekidane crte) u mogućim konformacijama peptida **1** i **2**

Mogući konformeri	**NOE kontakti**
 **1** (Boc-L-Pro-Fca-OMe)	
 **2** (Boc-L-Ala-Fca-OMe)	

4.3.1.5. CD-spektroskopska analiza peptida 1 i 2

Cirkularni dikroizam (CD) je spektroskopska metoda koja se koristi za određivanje sekundarnih strukturnih elemenata u kiralnim peptidima.[226,227] Pokazalo se da ferocenski kromofor (λ ~ 480 nm), inkorporiran u kiralno peptidno okruženje **I** i **II** inducira Cottonov efekt kao posljedicu helične kiralnosti uzrokovane interlančanim IHB.[12-35] Nadalje, intralančane vodikove veze u otopinama monosupstituiranih kiralnih ferocenskih peptida induciraju uređene strukture koje se detektiraju CD-signalom u ferocenskom području.[34] Pri tomu je utvrđeno da na predznak Cottonovog efekta utječu otapalo, zaštitne skupine te vrsta i slijed vezanih prirodnih aminokiselina (tablica 19). Primjerice, Boc-Fca-Ala-OMe pokazuje signale suprotnog intenziteta u CH_2Cl_2 i CH_3CN. Također, CD-signali u diklormetanskim otopinama Ac-Fca-Ala-OMe i Boc-Fca-Ala-OMe suprotnog su predznaka što vrijedi i za Boc-Leu-NH-Fc i Boc-Val-NH-Fc.

CD-aktivnost peptida **1** i **2** u području ferocenskog kromofora potvrđuje pretpostavke o tvorbi uređenih struktura u otopini (slika 58). Slabi intenziteti njihovih Cottonovih efekata (M_Θ < 1000 deg cm^2 $dmol^{-1}$) odgovaraju ranije istraživanim kratkim ferocenskim peptidima.[26,32,228,229]



Slika 58. Cottonovi efekti u CD-spektrima peptida **1** i **2** u CH_2Cl_2 pri $c = 5\times10^{-3}$M

Tablica 19. Cottonovi efekti u mono- i disupstituiranim ferocenskim peptidima čiji je predznak određen otapalom, zaštitnom skupinom te vrstom i slijedom prirodnih aminokiselina

Formula	Cottonov efekt*	Formula	Cottonov efekt*
Boc-**Fca**-Ala-OMe[26]	-	Ac-**NH-Fn-NH**-Ala-NHBoc[51]	+
Boc-**Fca**-D-Ala-OMe[26]	+	Ac-**NH-Fn-NH**-D-Ala-NHBoc[51]	-
Ac-**Fca**-Ala-OMe[30]	-	Ac-**NH-Fn-NH**-Val-NHBoc[51]	+
Boc-**Fca**-Ala-OMe[30]	+	Boc-Ala-Ala-**NH-Fc**[34]	-
Ac-**Fca**-Val-OMe[30]	+	Boc-Val-Val-**NH-Fc**[34]	-
Boc-**Fca**-Val-OMe[30]	+	Boc-Ala-Ala-**NH-Fn**-Ac[34]	-
Boc-**Fca**-Aib-OMe[33]	+	Boc-Ala-Ala-**NH-Fn**-Ac[34]	-
Boc-Ala-**Fca**-Ala-OMe[26]	+	Boc-Leu-**NH-Fc**[228]	+
Boc-D-Ala-**Fca**-Ala-OMe[26]	-	Boc-Phe-**NH-Fc**[228]	+
Boc-Ala-**Fca**-D-Ala-OMe[26]	+	Boc-Val-**NH-Fc**[228]	-
Boc-Ala-**Fca**-Ala-Ala-OMe[25]	+	Ac-**NH-Fc**-Ala-Ala-OMe[32]	-
Boc-Aib-**Fca**-Aib-OMe[33]	+	**Fc-NH**-Ala-Ala-OMe[32]	-
Boc-D-Aib-**Fca**-Aib-OMe[33]	+	**Fc-(CO**-Ala-Pro-OEt)$_2$[12,13]	+
Boc-Aib-**Fca**-Ala-OMe[33]	-	**Fc-(CO**-D-Ala-D-Pro-OEt)$_2$[12,13]	-
Boc-Ala-Ala-**Fca**-Ala-Ala-OMe[25]	+	**Fc-(CO**-Ala-D-ProNHPy)$_2$[15]	+
Boc-Ala-Ala-**Fca**-D-Ala-D-Ala-OMe[25]	+	**Fc-(CO**-D-Ala-ProNHPy)$_2$[15]	-
		Fc-(CO-Pro-AlaNHPy)$_2$[16]	+
		Fc-(CO-D-Pro-D-AlaNHPy)$_2$[16]	-

*Otapala: CH_2Cl_2 i CH_3CN

4.3.2. Sinteza i konformacijska analiza tripeptidâ:

Boc-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe (7), Boc-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe (8),
Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe (9), Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe (10),
Boc-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe (11), Boc-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe (12),
Ac-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe (13) i Ac-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe (14)

4.3.2.1. Sinteza tripeptidâ 7-14

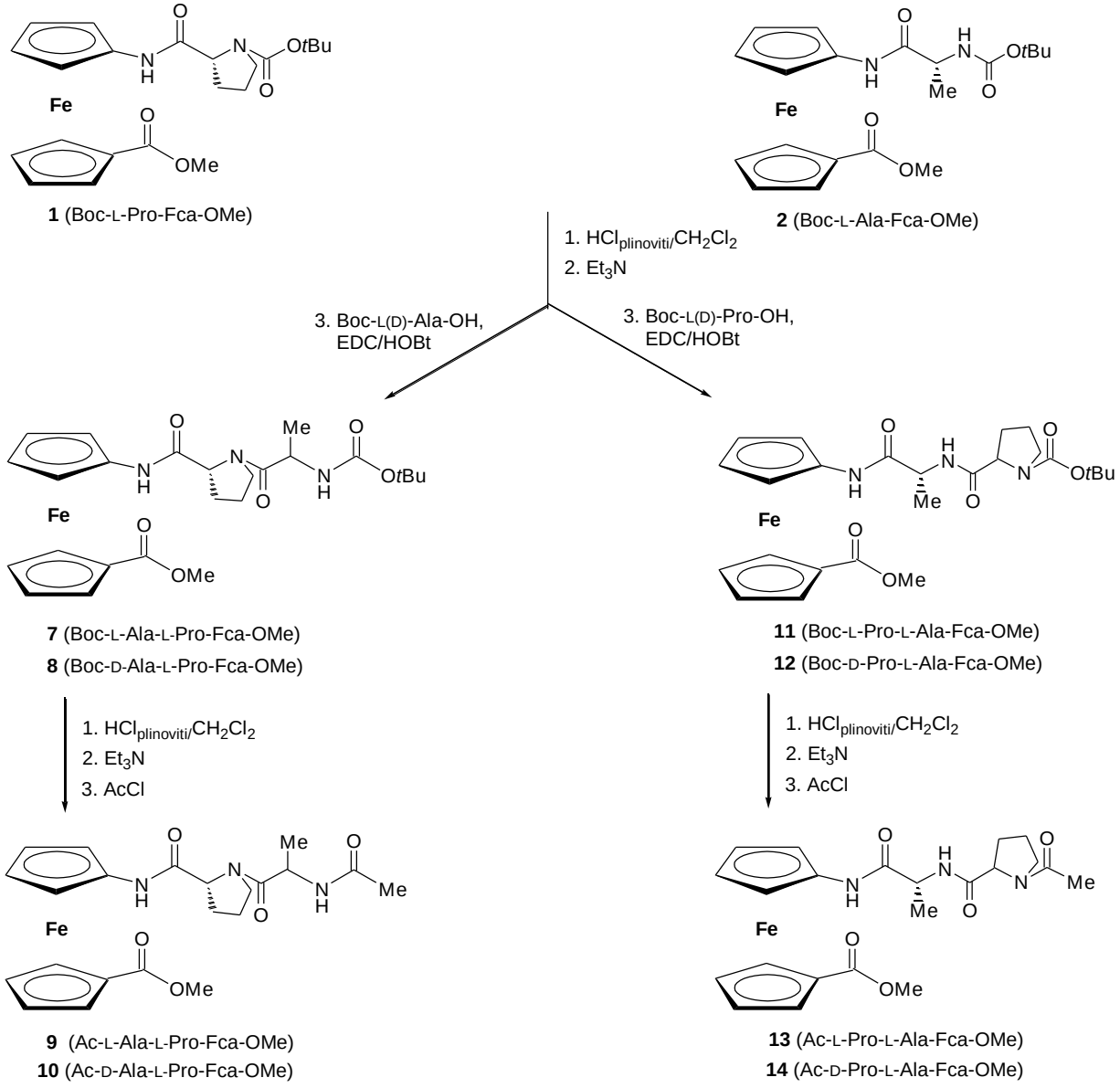
Tripeptidi **7-14** pripravljeni su iz Boc-L-Pro-Fca-OMe (**1**) odn. Boc-L-Ala-Fca-OMe (**2**) primjenom postupaka za deprotekciju i kopulaciju opisanih u prethodnom poglavlju. Deprotekcijom terminalnih amino-skupina Boc-dipeptida **1** odnosno **2** djelovanjem plinovitog HCl uz naknadnu obradu dobivenih hidroklorida s Et_3N dobiveni su odgovarajući nestabilni amini koji su potom *in situ* kopulirani s prethodno aktiviranim Boc-zaštićenim aminokiselinama (L-Ala, D-Ala, L-Pro, D-Pro) u Boc-tripeptide **7** (87%) i **8** (90%),odn. **11** (89%) i **12** (92%). Njihovi su acetamidni analozi **9** (56%), **10** (60%), **13** (60%) i **14** (64%) pripravljeni djelovanjem AcCl na slobodne amine nastale nakon deprotekcije odgovarajućih Boc-tripeptida na gore opisani način (shema 24).

Uvođenje L- odn. D-Ala na prolinski *N*-terminus dipeptida **1** manifestira se u ^{1}H-NMR-spektrima konjugata **7** i **8** dubletima (δ ~ 1,3 ppm) i multipletima (δ ~ 4,51 ppm) njihovih metilnih, odn. metinskih protona, dok se alaninski signali u ^{13}C-NMR-spektrima javljaju pri δ ~ 48 ppm (CH_{Ala}), te δ ~ 18 ppm (CH_{3Ala}). Karbonilna skupina iz novonastale peptidne veze spojeva **7** i **8** registrirana je signalom pri δ ~ 173 ppm.

Tripeptidi **11** i **12** pripravljeni su produljenjem *N*-terminusa dipeptida **2** s L- odn. D-Pro. Stoga se u njihovim ^{1}H NMR-spektrima javlja šest zasebnih signala u rasponu od δ = 1,8-3,5 ppm koji odgovaraju prolinskim metilenskim protonima (β/β', γ/γ', δ/δ') dok se njihovi metinski protoni javljaju pri δ ~ 4 ppm. Signali prolinskih [$CH_{\alpha Pro}$ (δ ~ 60 ppm), $CH_{2\delta}$ (δ ~ 47 ppm), $CH_{2\beta}$ (δ ~ 29,74 ppm) te $CH_{2\gamma}$ (δ ~ 24 ppm)] kao i karbonilnih ugljikovih atoma iz novih amidnih veza pri δ ~ 170 ppm u ^{13}C-NMR-spektrima dodatno potvrđuju strukturu tripeptida **11** i **12**.

Transformacija Boc-peptida **7**, **8**, **11** i **12** u Ac-analoge **9**, **10**, **13** i **14** očituje se gubitkom singleta *tert*-butilnih protona pri δ ~ 1,5 ppm te javljanjem singleta acetilnih protona pri δ ~ 2 ppm u njihovim ^{1}H-NMR-spektrima. U ^{13}C-NMR-spektrima ova se zamjena

manifestira gubitkom signala karbonilnih i *tert*-butilnih C-atoma pri δ ~ 155 ppm odn. δ ~ 28 ppm te javljanjem novih signala pri δ ~ 169 ppm (CO_{Ac}) i δ ~ 23 ppm (CH_{3Ac}).



1 (Boc-L-Pro-Fca-OMe)
2 (Boc-L-Ala-Fca-OMe)
7 (Boc-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe)
8 (Boc-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe)
11 (Boc-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe)
12 (Boc-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe)
9 (Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe)
10 (Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe)
13 (Ac-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe)
14 (Ac-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe)

Shema 24. Priprava tripeptida **7-14**

S obzirom da pripravljeni tripeptidi sadrže homo- odn. heterokiralne Ala-Pro i Pro-Ala sekvence s različitim terminalnim zaštitnim skupinama, u nastavku ovoga poglavlja opisat ćemo utjecaj kiralnosti, slijeda aminokiselina i strukture zaštitnih skupina na njihova konformacijska svojstva.

4.3.2.2. IR- spektroskopska analiza tripeptidâ 7-14

IR-spektri Boc- i Ac-zaštićenih tripeptida **7-14** u području N-H isteznih vibracija sadrže dvije vrpce različitih intenziteta koje se pripisuju slobodnim (> 3400 cm^{-1}) odn. asociranim (< 3400 cm^{-1}) NH-skupinama. Pri tomu u tripeptidima s konstituirajućim heterokiralnim sekvencama (**8**, **10**, **12** i **14**) prevladava signal asociranih NH-skupina. Istezne vibracije amidnih i uretanskih CO-skupina u području < 1700 cm^{-1} indiciraju njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama (tablice 20 i 21).

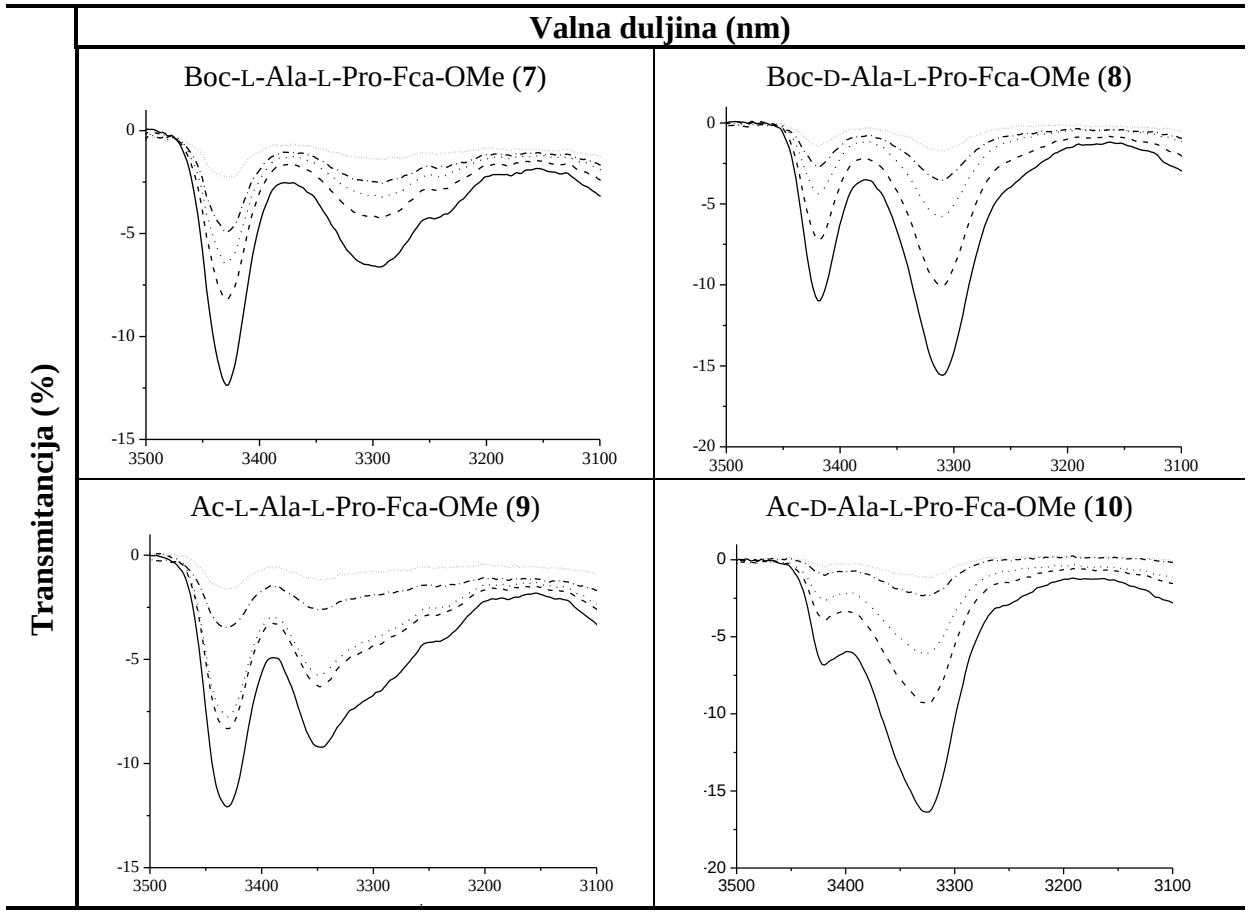
Tablica 20. Istezne vibracije[a] NH- i CO-skupina iz tripeptidâ 7-14

Spoj	Formula	ν_{NH} (slob.)	ν_{NH} (asoc.)	ν_{CO} (ester)	ν_{CO} (amid I)	ν_{CO} (amid II)
7	Boc-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe	3428j	3294sr	1707	1655 1634	1558 1542 1500
8	Boc-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe	3430j	3346sr	1707	1661 1631	1559 1541 1499
9	Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe	3422j	3290sr	1707	1673 1639	1558 1541 1510
10	Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe	3438j	3321j	1707	1667 1659	1545 1512
11	Boc-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe	3418j	3310j	1705	1674	1555 1503
12	Boc-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe	3418sr	3325j	1705	1684 1671	1557 1531
13	Ac-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe	3420j	3309j	1705	1696 1680 1636	1555 1540 1507
14	Ac-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe	3424sr	3303j	1706	1688 1630	1557 1541 1521

[a]IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2, $c = 5\times10^{-2}$ M.

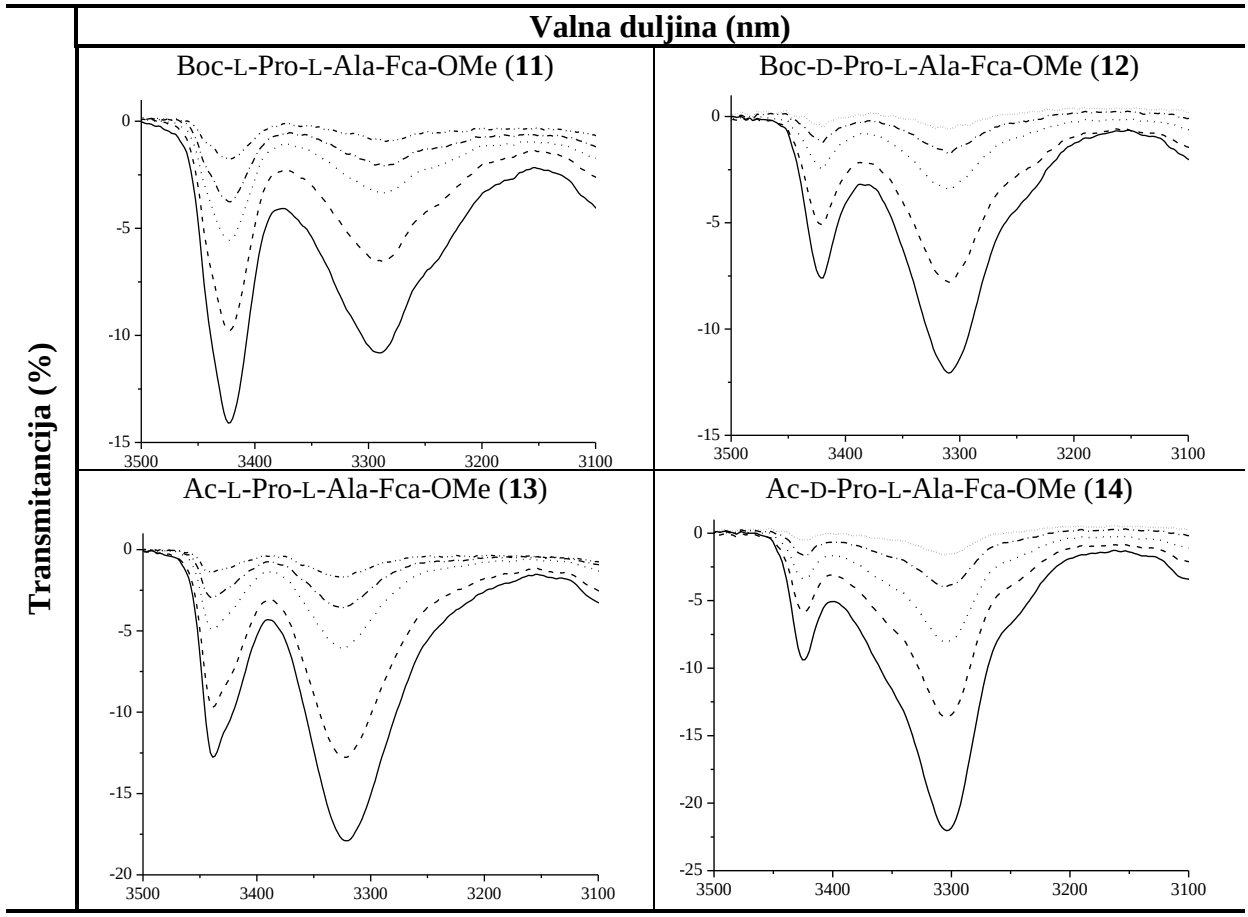
Karakter asocijacija indiciranih apsorpcijskim vrpcama < 3400 cm^{-1} u IR-spektrima analiziranih biokonjugatâ **7**-**10** te **11**-**14** ispitan je postupnim razrjeđivanjem njihovih diklormetanskih otopina u koncentracijskom rasponu od 5×10^{-2} M do 3×10^{-3} M. Kako smanjenjem koncentracije dolazi do proporcionalnog slabljenja vrpci asociranih i slobodnih NH-skupina, indicirana je stabilizacija ispitivanih tripeptida *intramolekulskim vodikovim vezama* (IHB), odnosno isključena je mogućnost tvorbi samozdružujućih agregata (tablica 21a, b).

Tablica 21a. Koncentracijski-ovisni IR-spektri[a] biokonjugata **7**-**10**



[a]IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2, [(—) c = 5×10^{-2} M, (----) c = $2{,}5\times10^{-2}$ M, (····) c = $1{,}25\times10^{-2}$ M, (-·-·) c = $6{,}13\times10^{-3}$ M, (· · ·) c = 3×10^{-3} M].

Tablica 21b. Koncentracijski-ovisni IR-spektri[a] biokonjugata **11-14**



[a]IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2, [(—) $c = 5\times10^{-2}$ M, (----) $c = 2{,}5\times10^{-2}$ M, (····) $c = 1{,}25\times10^{-2}$ M, (-·-·) $c = 6{,}13\times10^{-3}$ M, (· · ·) $c = 3\times10^{-3}$ M].

4.3.2.3. NMR-spektroskopska analiza tripeptida 7-14

Primjenom 2D NMR-spektroskopije (COSY, HMBC) provedena je asignacija ^{1}H- i ^{13}C-NMR-spektara pripravljenih konjugata.

U većini predstavnika ranije opisanih ferocenskih peptida **I** i **II** pokazalo se da NH-skupine koje sudjeluju u vodikovim vezama rezoniraju pri $\delta > 7$ ppm, dok su slobodne NH-skupine bile registrirane pri višem polju. Dakako, moguća su i odstupanja od ovog pravila, ovisno o kemijskoj okolini donorske NH-grupe.

Karakteristika svih konjugata **7-14** jest visok kemijski pomak NH-skupina iz Fca ($\delta >$ 8 ppm) što indicira njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama. Sudeći prema kemijskim pomacima svojih amidnih protona ($\delta < 7$ ppm), alaninski ostaci udaljeni od ferocenske jezgre (**7-10**) nisu donori vodikove veze. Suprotno tomu, NH-skupine iz alaninskih podjedinica

kopuliranih s Fca (**11-14)** registriraju se pri nižem polju, što upućuje na njihov angažman u vodikovim vezama (tablica 22).

Na temelju kemijskih pomaka relevantnih prolinskih metilenskih skupina [δ (C_α/C_β) < δ (C_γ/C_δ)], te razlike u kemijskim pomacima C_β- i C_γ-atoma ($\Delta\delta$ < 6 ppm), zaključili smo da svi ispitivani biokonjugati zauzimaju *trans*-položaj oko imidne veze. U NMR spektrima Boc- i Ac-tripeptida (**7** i **9**) s konstituirajućim homokiralnim Ala-Pro sekvencama, te u Boc-tripeptidu **12** s heterokiralnim D-Pro-L-Ala fragmentom, pojavljuju se i signali *cis*-izomera. Integriranjem površina amidnih protona u ^{1}H-NMR-spektrima te određivanjem omjera visine signala prolinskih ugljikovih atoma u ^{13}C-NMR spektrima određen omjer *trans*- i *cis*-izomera koji pri 298 K u peptidima **7** i **9** iznosi 86:14 odn. 89:11 u peptidu **12**.

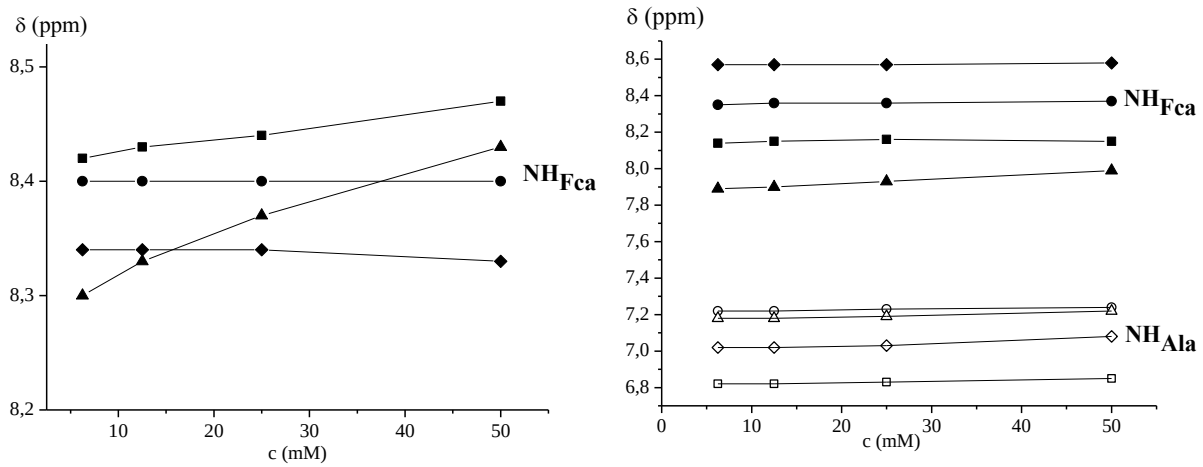
Tablica 22. Kemijski pomaci (δ)[a] amidnih protona u tripeptidima **7-14**

Spoj	**Formula**	**$(NH_{Fca})_{trans}$ δ (ppm)**	**$(NH_{Fca})_{cis}$ δ (ppm)**	**$(NH_{Ala})_{trans}$ δ (ppm)**	**$(NH_{Ala})_{cis}$ δ (ppm)**
7	Boc-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe	8,47 (0,86 H)	8,83 (0,14 H)	5,35 (0,86 H)	5,11 (0,14 H)
8	Boc-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe	8,40	/	5,50	/
9	Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe	8,43 (0,86 H)	9,11 (0,14 H)	6,51 (0,86 H)	6,27 (0,14 H)
10	Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe	8,33	/	6,80	/
11	Boc-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe	8,15	/	6,85	/
12	Boc-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe	8,37 (0,89 H)	7,70 (0,11 H)	7,24 (0,89 H)	6,66 (0,11 H)
13	Ac-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe	7,99	/	7,22	/
14	Ac-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe	8,58	/	7,08	/

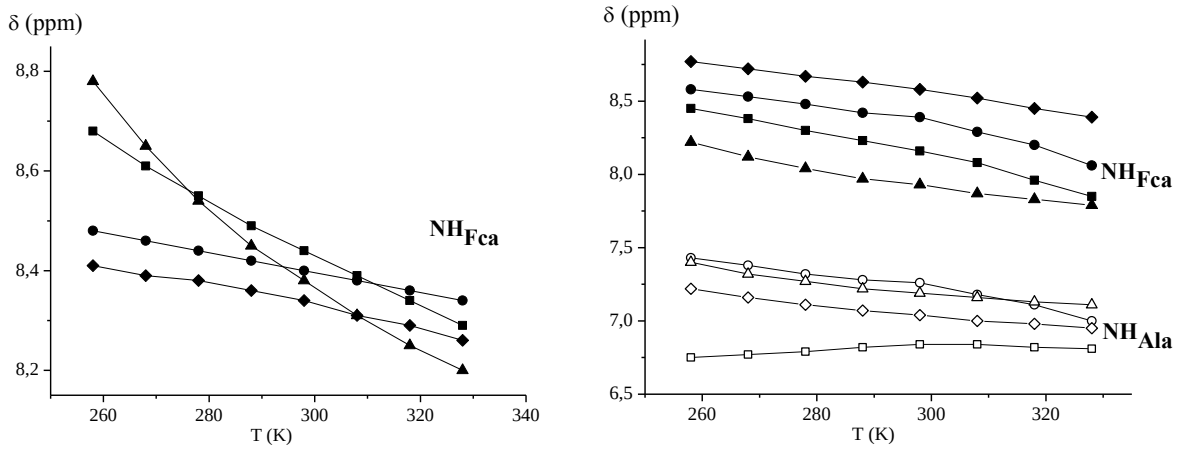
[a]NMR-spektri snimljeni su u $CDCl_3$ pri $c = 5\times10^{-2}$ M i 298 K.

Intramolekulski karakter vodikovih veza, indiciran nalazima koncentracijski-ovisne IR-spektroskopije, dodatno je ispitan mjerenjima koncentracijski- i temperaturno-ovisnih ^{1}H-NMR spektara. Neznatna promjena kemijskih pomaka NH_{Fca} ($\Delta\delta$ < 0,15 ppm) u tripeptidima **7-10** odn. NH_{Fca} i NH_{Ala} u tripeptidima **11-14** ($\Delta\delta$ < 0,05 ppm) (slike 59 i 60), sugerira njihovo sudjelovanje u *intramolekulskim vodikovim vezama*. Za razliku od koncentracijski- i

temperaturno-neovisnih amidnih protona iz **8**, **10**, **11-14**, signali NH_{Fca} protona iz homokiralnih peptida **7** i **9** bilježe pomak u više polje nakon izlaganja povišenoj temperaturi što se pripisuje njihovom sudjelovanju u slabijim vodikovim vezama.



Slika 59. Koncentracijska ovisnost kemijskih pomaka NH_{Fca} iz tripeptidâ **7-10** (*lijevo;* ■ **7**, • 8, ▲9, ♦ 10) te NH_{Fca} (crni simbol) i NH_{Ala} (bijeli simbol) iz tripeptidâ **11-14** (*desno;* ■□ 11, •○ 12, ▲Δ 13, ♦◊ 14)



Slika 60. Temperaturna ovisnost kemijskih pomaka NH_{Fca} iz tripeptidâ **7-10** (*lijevo;* ■ **7**, • 8, ▲9, ♦ 10) te NH_{Fca} (crni simbol) i NH_{Ala} (bijeli simbol) iz tripeptidâ **11-14** (*desno;* ■□ 11, •○ 12, ▲Δ 13, ♦◊ 14)

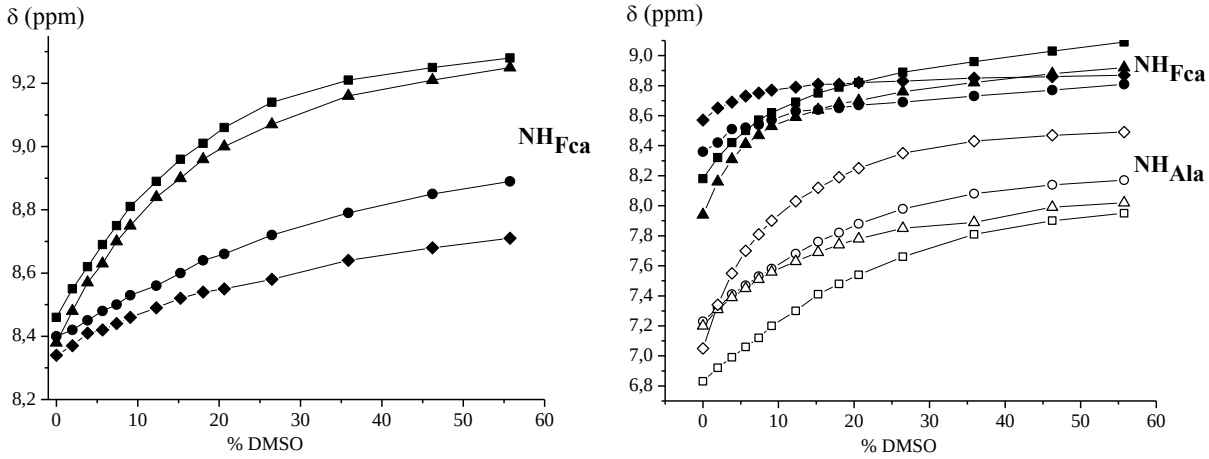
Izračunate visoke temperaturne ovisnosti kemijskih pomaka ($\Delta\delta/\Delta T$) NH_{Fca} iz svih biokonjugata (osim heterokiralnih peptida **8** i **10**) ukazuju na njihovu početnu zaklonjenost od otapala, odn. participaciju u vodikovim vezama. Kako je prethodnim mjerenjima koncentracijski ovisnih IR- odn. koncentracijski- i temperaturno-ovisnih NMR-spektara utvrđeno da ne podliježu intermolekulskim samozdruživanjima, omjeri $\Delta\delta/\Delta T$ prikazani u tablici 23. pripisuju se *intramolekulskim vodikovim vezama*.

Tablica 23. Temperaturne ovisnosti kemijskih pomaka[a] amidnih protona peptida **7**-**14**

Spoj	Formula	δ (ppm)		Δδ/ΔT (ppb/K)	
		NH_{Fca}	NH_{Ala}	NH_{Fca}	NH_{Ala}
7	Boc-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe	8,44	5,33	-5,57	2,85
8	Boc-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe	8,40	5,49	-2,00	2,71
9	Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe	8,37	6,44	-8,28	7,42
10	Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe	8,34	6,71	-2,14	7,71
11	Boc-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe	8,16	6,85	-8,57	0,08
12	Boc-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe	8,36	7,23	-7,42	-6,14
13	Ac-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe	7,93	7,22	-6,14	-4,14
14	Ac-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe	8,57	7,03	-5,42	-3,85

[a]NMR-spektri mjereni su u $CDCl_3$ (c=2,5×10^{-2} M) u temperaturnom rasponu 258-328 K.

Jakost predloženih intramolekulskih vodikovih veza u kojima kao donori sudjeluju NH-skupine vezane za ferocensku jezgru u peptidima **7**-**14** ispitana je titracijom njihovih 25 mM otopina u $CDCl_3$ s DMSO (slika 61).



Slika 61. Titracija tripeptida **7**-**10** (*lijevo;* ■ 7, ● 8, ▲ 9, ♦ 10) i **11**-**14** (*desno;* ■□ 11, ●○ 12, ▲Δ 13, ♦◊ 14) s DMSO

Male promjene kemijskih pomaka svih amidnih skupina (Δδ < 1 ppm) u prisutnosti DMSO (1,96-56%) znak su njihovog sudjelovanja u IHB. Pri tome, male razlike u kemijskim pomacima NH_{Fca} (Δδ < 0,5 ppm) iz heterokiralnih konjugata **8**, **10**, **12** i **14** sugeriraju njihovo sudjelovanje u jakim IHB, što je u skladu s nalazima IR-spektroskopije (slika 61).

Temperaturne promjene, polarnost otapala i vodikove veze utječu na *cis*-*trans*-izomerizaciju oko imidne veze. Mjerenjem NMR-spektara pri 258 K utvrdili smo prisutnost *trans*- i *cis*-izomera u većini ispitivanih biokonjugata (tablica 24). Zagrijavanjem do 328 K došlo je do potpunog srastanja signala amidnih odn. metilnih protona (iz alaninske podjedinice i zaštitnih skupina) u svim peptidima. Izuzetak su amidni protoni iz peptida **7** i **9**, za koje je pretpostavljeno sudjelovanje u slabijim IHB, a koji i pri visokoj temperaturi pokazuju signal *cis*-oblika (~ 10%). Izostanak *cis*-frakcija peptida **8** i **14** pri niskoj temperaturi ne iznenađuje, s obzirom da je indicirano njihovo sudjelovanje u jakim vodikovim vezama koje „zaključavaju“ strukture stabilnijih *trans*-izomera.

Tablica 24. Utjecaj temperature na *cis*-*trans*-izomerizaciju oko imidne veze u peptidima **7**-**14**

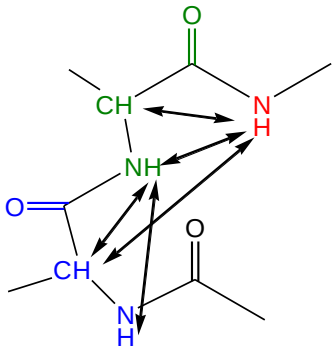
T (K)[a]		**δ (ppm)**							
		NH_{Fca}		**NH_{Ala}**		**CH_{3Ala}**		**CH_{3Boc}**	
		258	**328**	**258**	**328**	**258**	**328**	**258**	**328**
7	*cis*	8,99	8,63	5,14	5,06	1,32	1,40	1,50	1,47
	trans	8,69	8,28	5,46	5,25	1,37		1,42	
	trans : cis	83:17	87:13	83:17	87:13	81:19		83:17	
T (K)[a]		**δ (ppm)**							
		NH_{Fca}		**NH_{Ala}**		**CH_{3Ala}**		**CH_{3Boc}**	
		258	**328**	**258**	**328**	**258**	**328**	**258**	**328**
8	*cis*	/		/		/		/	
	trans	8,48	8,32	5,59	5,40	1,37	1,38	1,41	1,44
	trans : cis	100:0	100:0	100:0	100:0	100:0	100:0	100:0	100:0
T (K)[a]		**δ (ppm)**							
		NH_{Fca}		**NH_{Ala}**		**CH_{3Ala}**		**CH_{3Ac}**	
		258	**328**	**258**	**328**	**258**	**328**	**258**	**328**
9	*cis*	9,33	8,87	6,48	6,01	1,37	1,42	2,06	2,01
	trans	8,78	8,19	6,81	6,29	1,39		2,00	
	trans : cis	86:14	91:9	86:14	91:9	83:17		83:17	
T (K)[a]		**δ (ppm)**							
		NH_{Fca}		**NH_{Ala}**		**CH_{3Ala}**		**CH_{3Ac}**	
		258	**328**	**258**	**328**	**258**	**328**	**258**	**328**
10	*cis*	8,85	8,27	6,92	6,53	1,31	1,38	1,99	2,03
	trans	8,41		7,07		1,38			
	trans : cis	98:2		98:2		98:2			
T (K)[a]		**δ (ppm)**							
		NH_{Fca}		**NH_{Ala}**		**CH_{3Ala}**		**CH_{3Boc}**	
		258	**328**	**258**	**328**	**258**	**328**	**258**	**328**
11	*cis*	8,11	7,84	6,79	6,80	1,43	1,41	1,37	1,48
	trans	8,46		6,76				1,51	
	trans : cis	83:17		83:17				83:17	

T (K)[a]		δ (ppm)							
		NH_{Fca}		NH_{Ala}		CH_{3Ala}		CH_{3Boc}	
		258	328	258	328	258	328	258	328
12	*cis*	7,93	8.06	6,81	7,01	1,45	1,48	1,50	1,51
	trans	8,59		7,43					
	trans : cis	90:10		90:10					
T (K)[a]		δ (ppm)							
		NH_{Fca}		NH_{Ala}		CH_{3Ala}		CH_{3Ac}	
		258	328	258	328	258	328	258	328
13	*cis*	7.94	7,80	7,01	7,11	1,42	1,45	2,22	2,18
	trans	8,23		7,4					
	trans : cis	97:3		97:3					
T (K)[a]		δ (ppm)							
		NH_{Fca}		NH_{Ala}		CH_{3Ala}		CH_{3Ac}	
		258	328	258	328	258	328	258	328
14	*cis*	/		/		/		/	
	trans	8,76	8,38	7,22	6,94	2,16	2,16	1,49	1,49
	trans : cis	100:0	100:0	100:0	100:0	100:0	100:0	100:0	100:0

[a]NMR-spektri mjereni su u $CDCl_3$ (c = 2,5×10^{-2} M).

Potencijalnu ulogu Pro kao začetnika β-okretâ u svim ispitivanim homokiralnim i heterokiralnim tripeptidima **7-14** ispitali smo NOESY NMR-spektroskopskom analizom.

Naime određivanje peptidnih sekundarnih strukturnih elemenata temelji se na analizi ^1H–^1H NOE kontakata u njihovim NOESY NMR-spektrima.[230-232] NOE kontakti karakteristični za β-okrete (NH–NH, NH–NH, H–NH, H–NH i H–NH) prikazani su na slici 62.[34,214,230,233]



Slika 62. NOE-kontakti karakteristični za β-okrete

Naprijed opisane ^1H-NMR-spektroskopske analize tripeptida **7** indiciraju njegovu stabilizaciju intramolekulskom vodikovom vezom srednje jakosti u kojoj sudjeluju NH-skupina vezana na ferocen te karbonilna karbamatna skupina. Imajući u vidu strukturu tripeptida **7** takva bi se IHB mogla realizirati unutar peptidnog lanca vezanog na gornji

ferocenski prsten pri čemu rezultira 10-člani IHB prsten ($NH_{Fca}\cdots OC_{Boc}$). Predloženi β-okret podržan je kontaktima NH_{Fca}–$CH_{\alpha Pro}$, NH_{Fca}–CH_{Ala} i NH_{Fca}–$(CH_3)_3$ u njegovom NOESY-spektru (slika 63).

Slična situacija javlja se i u heterokiralnom analogu **8** čija NH-skupina vezana na ferocen prema prethodno opisanim analzama tvori jaku intralančanu vodikovu vezu s karbamatnom skupinom ($NH_{Fca}\cdots OC_{Boc}$) inducirajući β-okret. Sukladno tome, u NOESY-spektrima vidljivi su kontakti analogni onima zabilježenima u spektru njegovog homokiralnog analoga **7**: NH_{Fca}–$(CH_3)_3$, NH_{Fca}–CH_{Ala} i NH_{Fca}–$CH_{\alpha Pro}$ (slika 63).

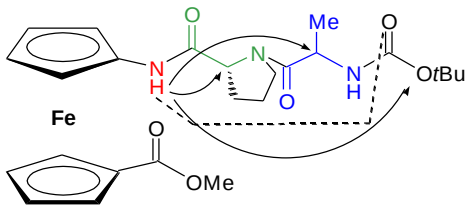
Zamjenom terminalne zaštitne skupine mijenja se obrazac vodikovih veza: u NOESY spektrima Ac-analogâ **9** i **10**, osim slabog unakrsnog signala dvaju amidnih protona (NH_{Fca}–NH_{Ala}) vidljivi su i kontakti NH_{Fca}–$CH_{\alpha Pro}$ te NH_{Fca}–CH_{Ala} (**10**). Kako izostaje kontakt NH_{Fca}–CH_{3Ac}, pretpostavljamo da se u ovim peptidima uspostavljaju $NH_{Fca}\cdots NH_{Ala}$ IHB (slika 64).

Za razliku od gore opisanih **7**-**10**, kemijski pomaci NH_{Ala} iz konjugatâ **11**-**14** pomaknuti su u niže polje ($\delta > 7$ ppm) te je indicirana njihova participacija u jakim IHB. NOESY-spektar peptida **11** i njegovog heterokiralnog analoga **12** sadrži kontakte NH_{Fca}–NH_{Ala}, NH_{Fca}–CH_{Ala} te NH_{Fca}–$(CH_3)_3$ koji se mogu pripisati 10-članom intralančanom prstenu (β-okretu) uspostavljenom interakcijom ferocenskog amidnog protona i uretanske karbonilne skupine (slika 65). Uzimajući u obzir kemijski pomak NH_{Ala} ($\delta > 7$ ppm) te njegov NOE-kontakt s *tert*-butilnom skupinom može se pretpostaviti i tvorba $NH_{Ala}\cdots OC_{Boc}$ IHB (γ-okret). Prema prikazanim rezultatima promjena u kiralnosti tripeptida **11** i **12** ne odražava se na obrazac vodikovih veza u kojima sudjeluju.

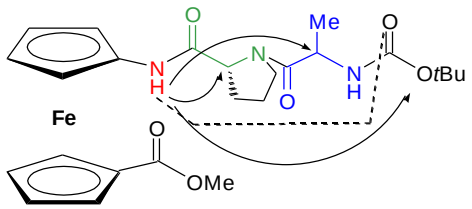
U NOESY spektru peptida **13** nije vidljiv niti jedan kontakt koji bi potkrijepio indicirane IHB. Ipak, imajući na umu visok kemijski pomak pripadajućih NH-protona možemo pretpostaviti da se ovaj peptid stabilizira kroz više različitih konformacija.

NOESY spektar biokonjugata **14** pokazuje sve kontakte očekivane za intralančanu $NH_{Fca}\cdots OC_{Ac}$ IHB (NH_{Fca}–$CH_{\alpha Pro}$, NH_{Fca}–NH_{Ala} NH_{Fca}–CH_{Ala}) te kontakt NH_{Fca}–$(CH_3)_{Ac}$ koji bi uz NOE kontakte karakteristične za β-okrete bio dodatna potvrda ovoj pretpostavci. Osim naprijed navedenih signala, kontakt alaninskog amidnog protona i metilne acetamidne skupine mogao bi nastati kao posljedica intralančane $NH_{Ala}\cdots$ $(CH_3)_{Ac}$ IHB što bi rezultiralo 7-članim prstenom (γ-okret) (slika 66). Vidljivo je da promjena zaštitne skupine u homokiralnim

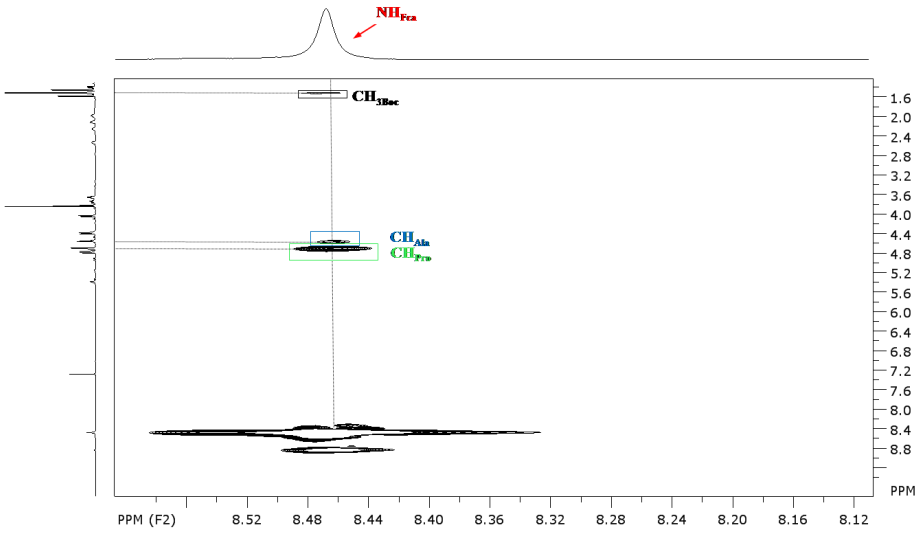
analozima **11** i **13** ima utjecaja na tvorbu vodikovih veza, budući da u NOESY spektru Ac-zaštićenog derivata **13** ne nalazimo dokaz o stabilizaciji putem IHB, dok u Boc-zaštićenom derivatu **11** NOE-kontakti upućuju na tvorbu dviju IHB.

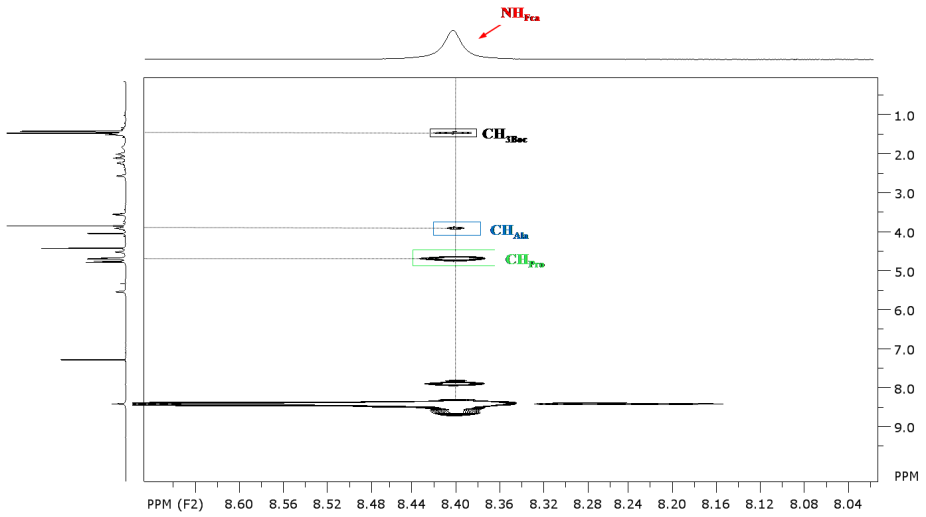


7 (Boc-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe)

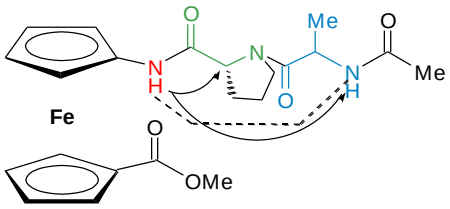


8 (Boc-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe)

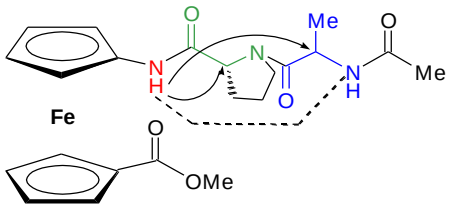




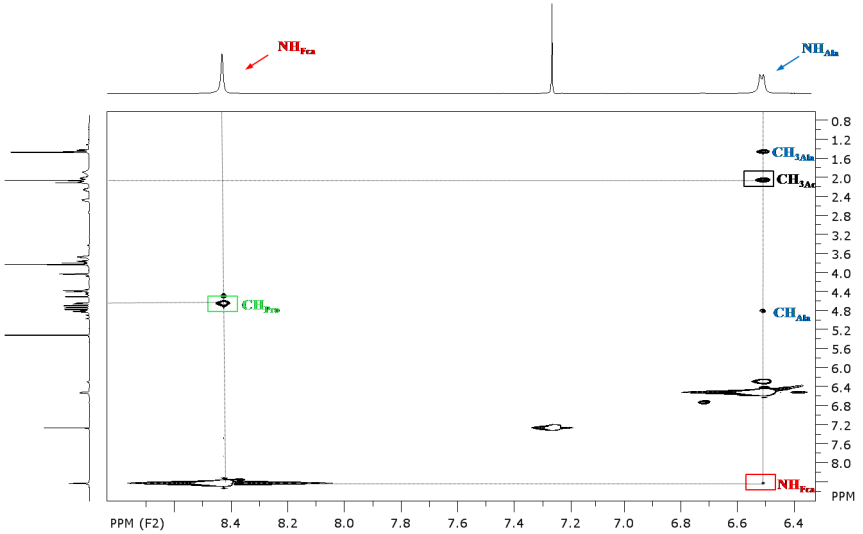
Slika 63. Predložene konformacije β-okreta u peptidima **7**-**8** (NOE-kontakti označeni su kvadratićima, a predložene IHB crticama)

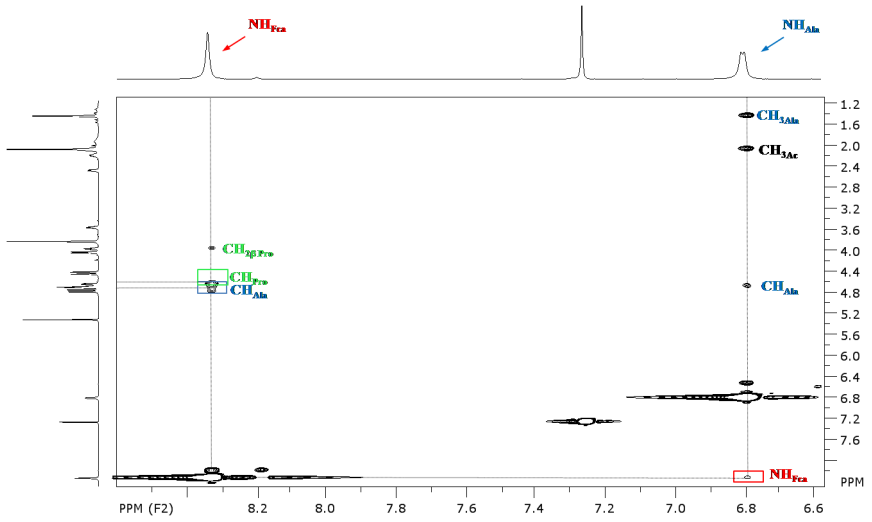


9 (Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe)

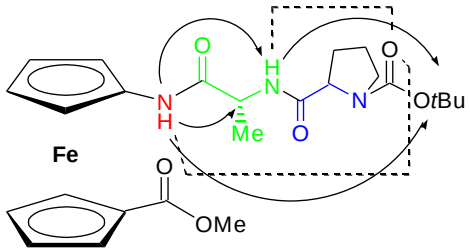


10 (Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe)

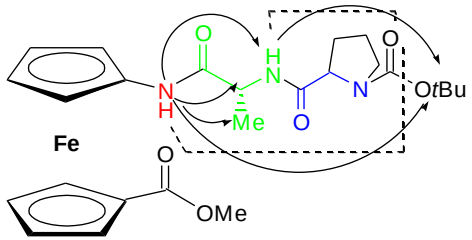




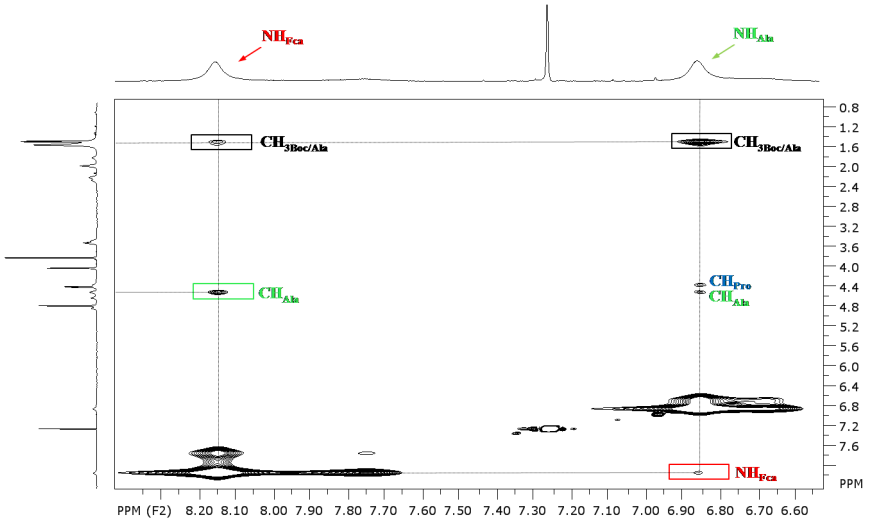
Slika 64. Predložene intramolekulske vodikove veze u peptidima **9-10** (NOE-kontakti označeni su kvadratićima, a predložene IHB crticama)

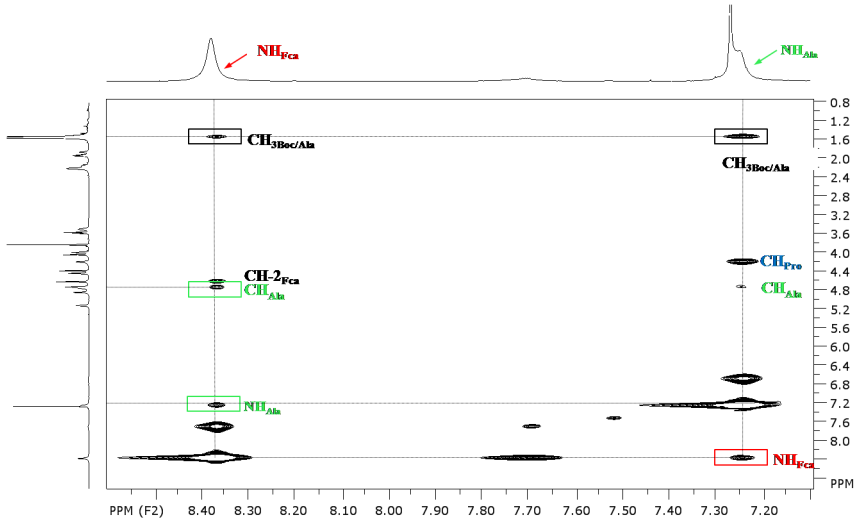


11 (Boc-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe)

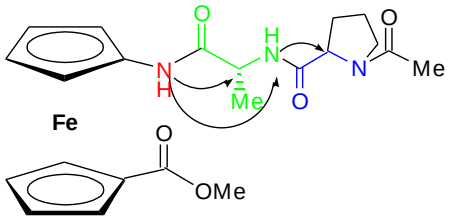


12 (Boc-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe)

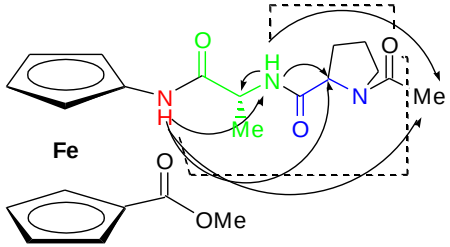




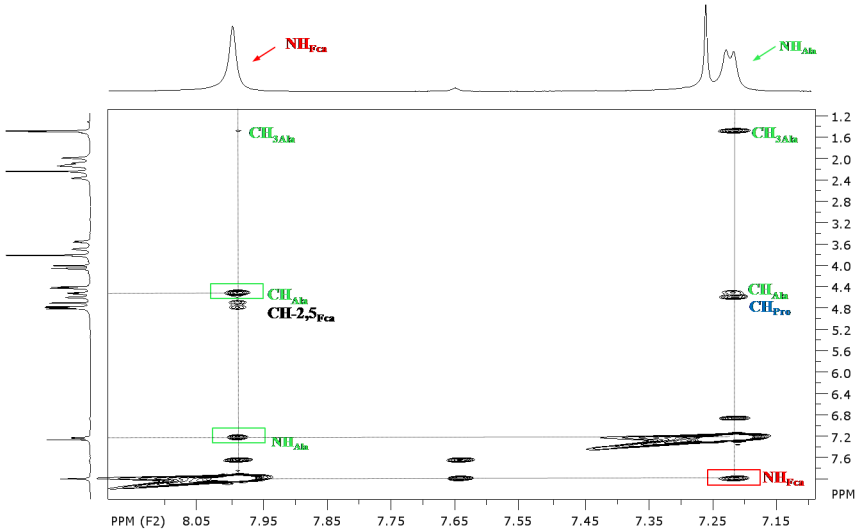
Slika 65. Predložene konformacije β- i γ-okretâ u peptidima **11**-**12** (NOE-kontakti označeni su kvadratićima, a predložene IHB crticama)

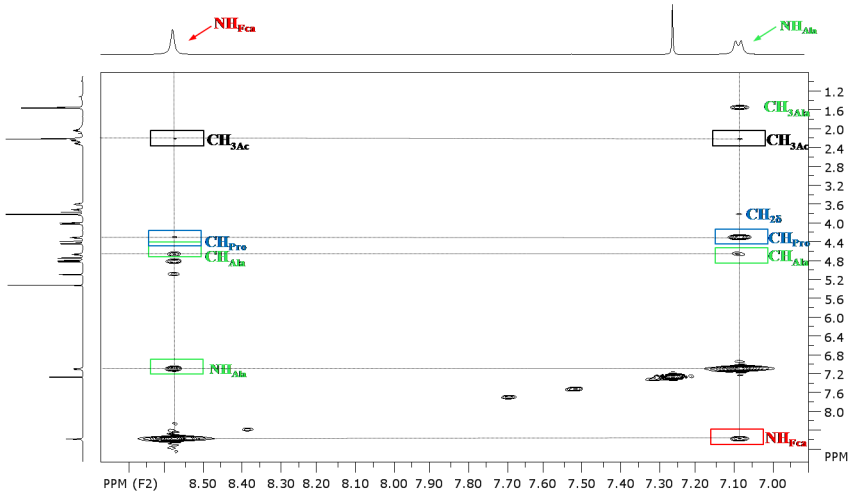


13 (Ac-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe)



14 (Ac-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe)





Slika 66. Predložene konformacije β- i γ-okretâ u peptidu **14** (NOE-kontakti označeni su kvadratićima, a predložene IHB crticama)

4.3.2.4. CD-spektroskopska analiza tripeptidâ 7-14

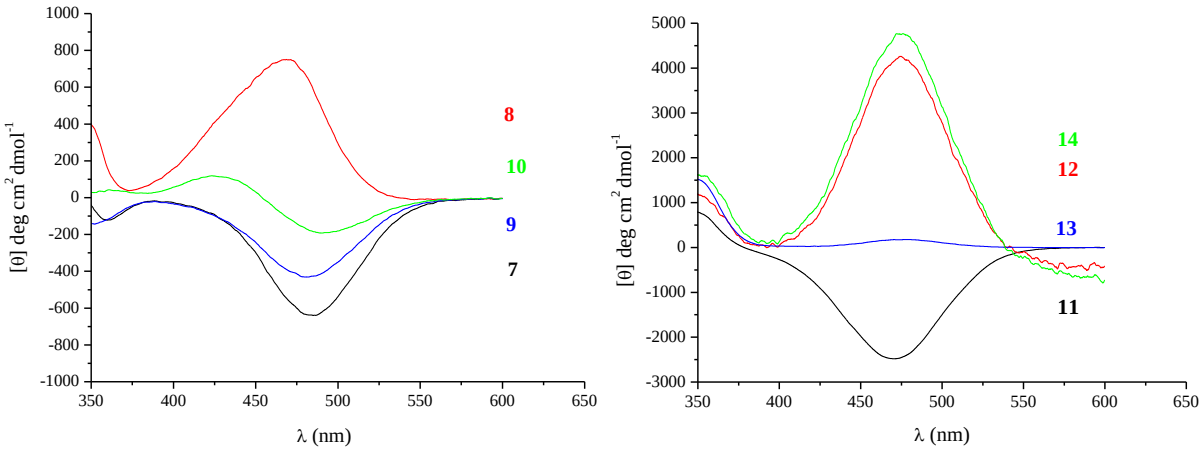
Prethodno opisani rezultati IR- i NMR-spektroskopskih mjerenja indiciraju stabilizaciju pripravljenih biokonjugata intralančanim vodikovim vezama $NH_{Fca}\cdots OC_{Boc/Ac}$ koje dovode do tvorbe β-okretâ u peptidima **7**, **8**, **11-14**, $NH_{Ala}\cdots OC_{Boc}$ koje rezultiraju γ-okretima u peptidima **11-14**, te $NH_{Fca}\cdots N_{Ala}$ 8-članim prstenovima u peptidima **9** i **10**. Slijed aminokiselina u prirodnom dipeptidu [Ala-Pro (**7-10**) odn. Pro-Ala (**11-14**)] kopuliranom s Fca kao i struktura terminalne zaštitne skupine (Boc ili Ac) utječu na jakost predloženih IHB. Nadalje, heterokiralne peptidne sekvence iz **8**, **10**, **12** i **14** pogoduju tvorbi jačih IHB. Kako IHB induciraju kiralno uređenje oko ferocenskog kromofora (λ ~ 480 nm), za očekivati je CD-aktivnost ispitanih peptida kao dodatnu potvrdu predloženih IHB.

Položaj apsorpcijskih vrpci karakterističnih za ferocenski kromofor (464 – 495 nm) ukazuje na kiralno uređenje ispitanih peptida. Širok raspon apsolutnih vrijednosti Cottonovih efekata (155 do 4740 deg cm^2 mol^{-1}) upućuje na različite stupnjeve kiralnog uređenja (tablica 20). Niže vrijednosti Cottonovih efekata (M_Θ < 1000 deg cm^2 mol^{-1}) u peptidima **7-10** te **13** mogu se objasniti prisutnošću malog suviška uređenih konformera u njihovim otopinama. S druge strane, jaki CD-signali peptida **11**, **12** i **14** indikacija su visokouređenih kiralnih struktura, što potkrepljuje nalaze IR- i NMR-spektroskopije.

Tablica 25. UV/Vis-signali i Cottonovi efekti Boc- i Ac-tripeptida **7 - 14**

Spoj	Formula	λ_{max} / nm	[θ]/ deg cm^2 $dmol^{-1}$
7	Boc-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe	484	-642
8	Boc-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe	464	753
9	Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe	483	-434
10	Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe	495	-164
11	Boc-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe	466	-2460
12	Boc-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe	474	4260
13	Ac-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe	470	155
14	Ac-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe	478	4740

[a]CD-spektri mjereni su u CH_2Cl_2 ($c = 5\times10^{-3}$M).



Slika 67. CD-spektri Boc- i Ac-tripeptida **7**-**10** *(lijevo)* i **11**-**14** *(desno*) u CH_2Cl_2 ($c = 5\times10^{-3}$M)

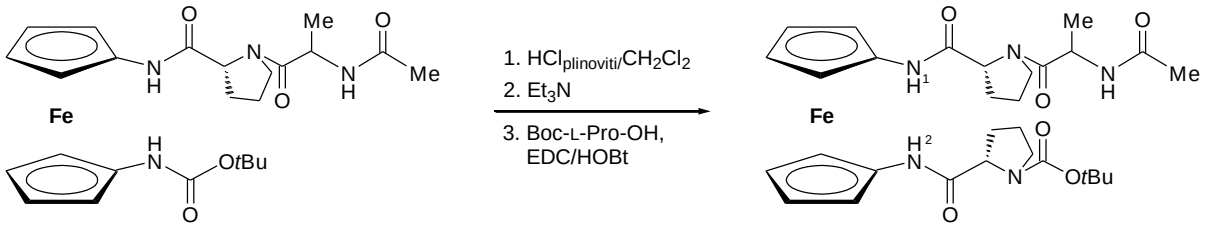
Iz svega naprijed iznesenog može se zaključiti sljedeće:

- homo- (**7**) i heterokiralni (**8**) peptidi tvore β-okret ($NH_{Fca}\cdots OC_{Boc}$ IHB) pri čemu heterokiralni analog **8** tvori jaču IHB;
- pretvorbom Boc-dipeptidâ **7** i **8** u Ac-analoge **9** i **10** mijenja se obrazac IHB (stabilizirani su $NH_{Fca}\cdots N_{Ala}$ 8-članim prstenovima);
- izmjenom slijeda prirodnih aminokiselina u homo- (**11**) i heterokiralnim (**12**) Boc-peptidima zadržana je $NH_{Fca}\cdots OC_{Boc}$ IHB (β-okret) uz javljanje $NH_{Ala}\cdots OC_{Boc}$ IHB (γ-okret);
- izmjena slijeda prirodnih aminokiselina u homo- (**13**) i heterokiralnim (**14**) Ac-peptidima uzrokuje narušavanje kiralne organizacije u homokiralnom analogu **13**. Promjena zaštitne skupine Boc- (**12**) u Ac- (**14**) ne odražava se na konformacijski prostor.

4.3.3. Sinteza i konformacijska analiza homo- Ac-L-Ala-L-Pro-*NH*-Fn-*NH*-L-Pro-Boc (21) i heterokiralnog tripeptidâ Ac-D-Ala-L-Pro-*NH*-Fn-*NH*-L-Pro-Boc (22)

4.3.3.1. Sinteza Ac-L-Ala-L-Pro-*NH*-Fn-*NH*-L-Pro-Boc (21) i Ac-D-Ala-L-Pro-*NH*-Fn-*NH*-L-Pro-Boc (22)

Peptidi **19** i **20** s ortogonalno zaštićenim amino-skupinama poslužili su kao prekursori za pripravu viših homologa **21** i **22**. Deprotekcijom Boc-zaštićenih amino-skupina iz **19** i **20** djelovanjem plinovitog HCl pripravljeni su odgovarajući hidrokloridi koji su obrađeni s NEt_3. Dobiveni slobodni amini uobičajenim HOBt/EDC postupkom kopulirani s Boc-L-Pro-OH u 73% tripeptida **21** odn. 84% konjugata **22** (shema 25).



19 (Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-Boc)
20 (Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-Boc)

21 (Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc)
22 (Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc)

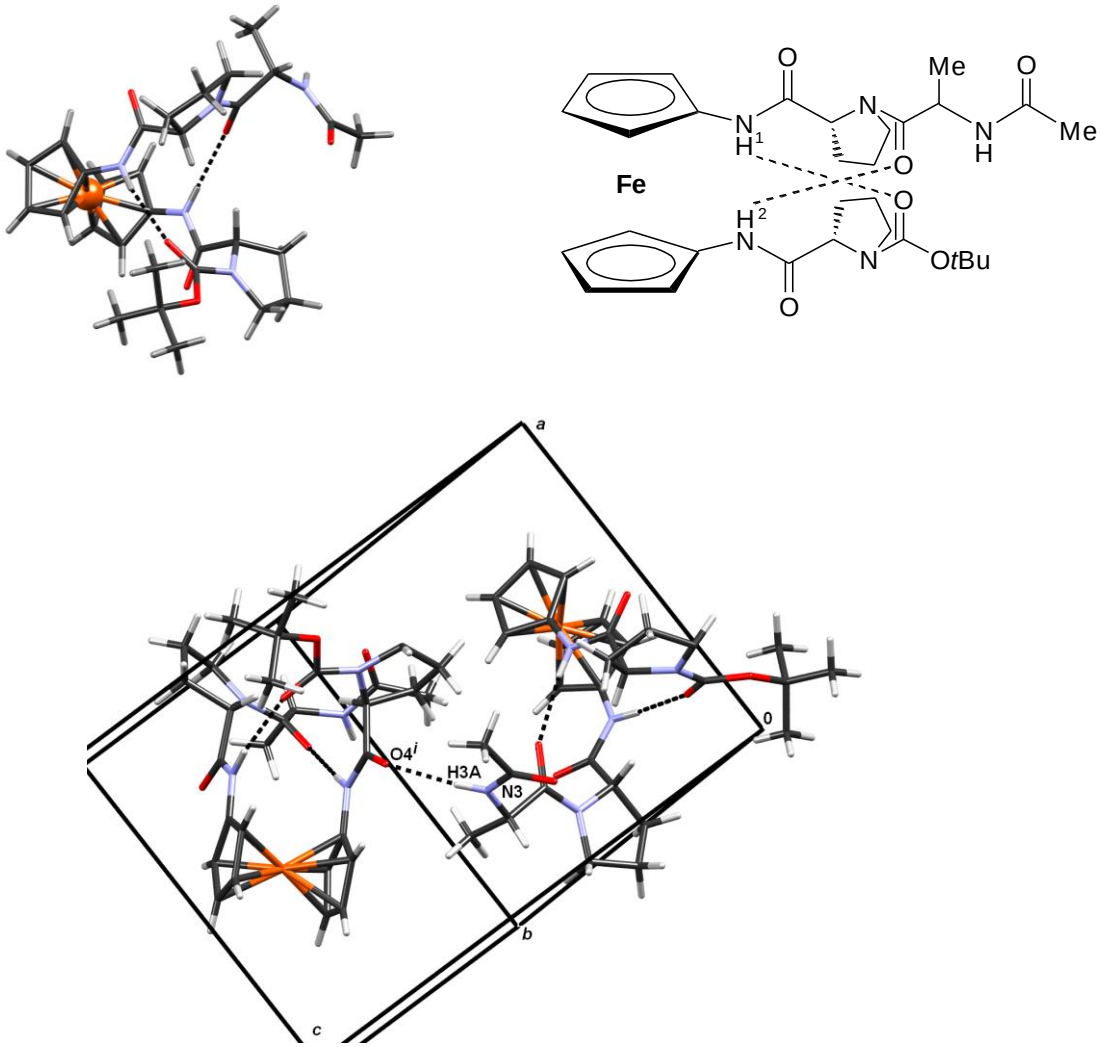
Shema 25. Priprava tripeptida **21** i **22**

Ulazak nove prolinske podjedinice registriran je u ^{1}H-NMR-spektrima peptida **21** i **22** signalima njezinih metilenskih (δ = 1,8-3,5 ppm) i metinskih protona (δ ~ 4 ppm). Signali pirolidinskih [$CH_{\alpha Pro}$ (δ ~ 60 ppm), $CH_{2\delta}$ (δ ~ 47 ppm), $CH_{2\beta}$ (δ ~ 29,74 ppm) te $CH_2\gamma$ (δ ~ 24 ppm)] i karbonilnih ugljikovih atoma iz nove imidne veze pri δ ~ 170 ppm u ^{13}C-NMR-spektrima dodatno potvrđuju strukturu tripeptida **21** i **22**.

4.3.3.2. Kristalografska analiza tripeptidâ Ac-L-Ala-L-Pro-*NH*-Fn-*NH*-L-Pro-Boc (21)

Konformacija tripeptida **21** u čvrstom stanju stabilizirana je dvjema intramolekulskim vodikovim vezama: $NH^1_{Fn}\cdots OC_{Boc}$ i $NH^2_{Fn}\cdots OC_{Ala}$ koje rezultiraju 10-članim prstenovima (β-okretima) (slika 68).

Nadalje, kristale **21** stabilizira $NH_{Ac}\cdots OC_{Pro2}$ intermolekulska vodikova veza koja povezuje molekule u beskonačne lance paralelne s kristalografskom osi *b* (slika 68, *dolje*).



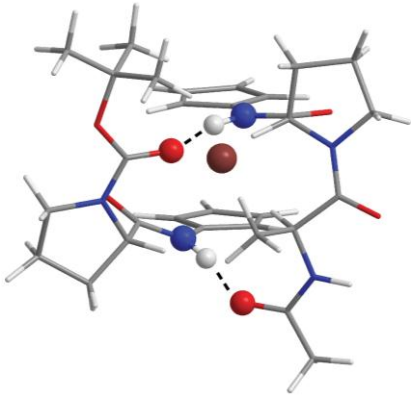
Slika 68. Molekulska struktura i shematski prikaz peptida **21** u čvrstom stanju (*gore*); intermolekulska vodikova veza koja povezuje molekule spoja **21** u beskonačne lance (*dolje*)

4.3.3.3.DFT-modeliranje tripeptidâ 21 i 22

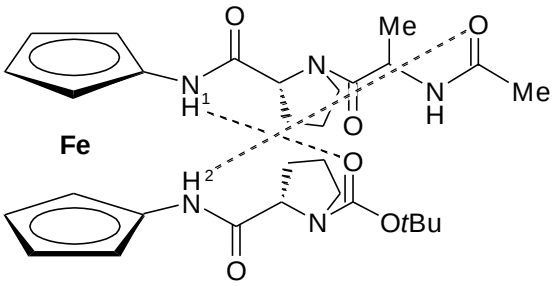
DFT (teorija funkcionala gustoće, *engl.* Density Functional Theory) je računalna metoda koja može poslužiti za proučavanje konformacijskog prostora koje zauzimaju ferocenski konjugati. [234]

Na slici 69. prikazane su konformacije **21A**/**B** i **22A** dobivene optimizacijom struktura stabiliziranih intramolekuskim vodikovim vezama na razini MO6 i MO6-2X (u $CDCl_3$). Najstabilniju konformaciju **A** homokiralnog tripeptida **21** karakteriziraju dvije interlančane IHB uspostavljene između NH-skupina vezanih na ferocenski prsten i karbonilnih funkcija iz

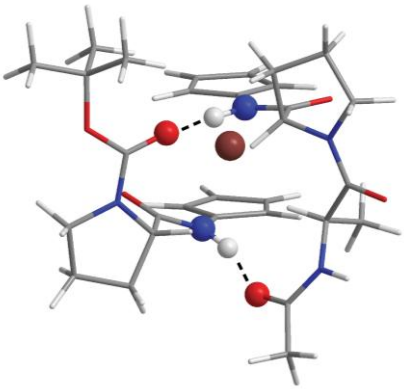
zaštitnih skupina zatvarajući 10-člane i 13-člane prstenove ($NH^1\cdots OC_{Boc}$ i $NH^2\cdots OC_{Ac}$) (slika 69) (pripisivanje NH^1-, odn. NH^2- skupina označeno je na shemi 25).



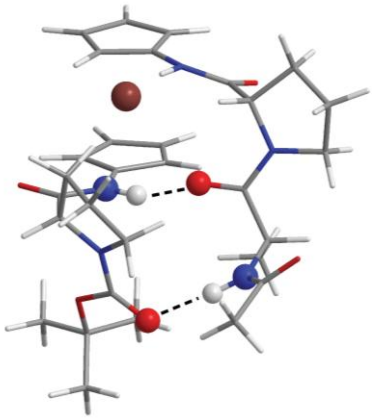
21A



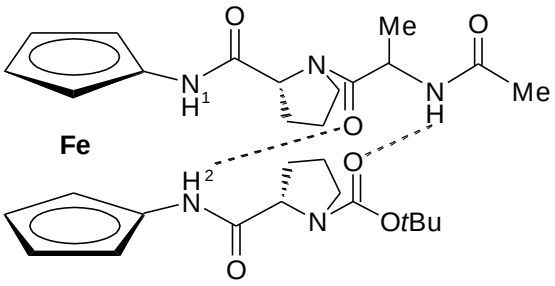
IHB u konformeru **A**



22A



21B



IHB u konformeru **B**

Slika 69. Najstabilniji konformeri **21** i **22** optimizirani MO6/6-31G(d) funkcionalom u $CHCl_3$ s prikazanim vodikovim vezama (*lijevo*), shematski prikaz (*desno*)

Uz konformaciju **A**, moguća je i konformacija **B** koja je za 1,24 kJmol^{-1} nestabilnija, a karakteriziraju je dvije interlančane IHB $NH^2\cdots OC_{Ala}$ i $NH_{Ala}\cdots OC_{Boc}$. Promjena kiralnosti u Pro-Ala sekvenci stabilizira tripeptid **22** u konformaciji **B** (slika 69).

4.3.3.4. IR-spektroskopska analiza tripeptidâ 21 i 22

U diklormetanskim otopinama obaju tripeptida (c = 5×10^{-2} M) opažena su dva seta signala u području isteznih vibracija NH-skupina, pri čemu dominiraju signali asociranih NH-skupina (< 3400 cm^{-1}) (tablica 26). Uretanske karbonilne skupine apsorbiraju pri valnim duljinama nižim od 1700 cm^{-1} čime je indicirano njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.

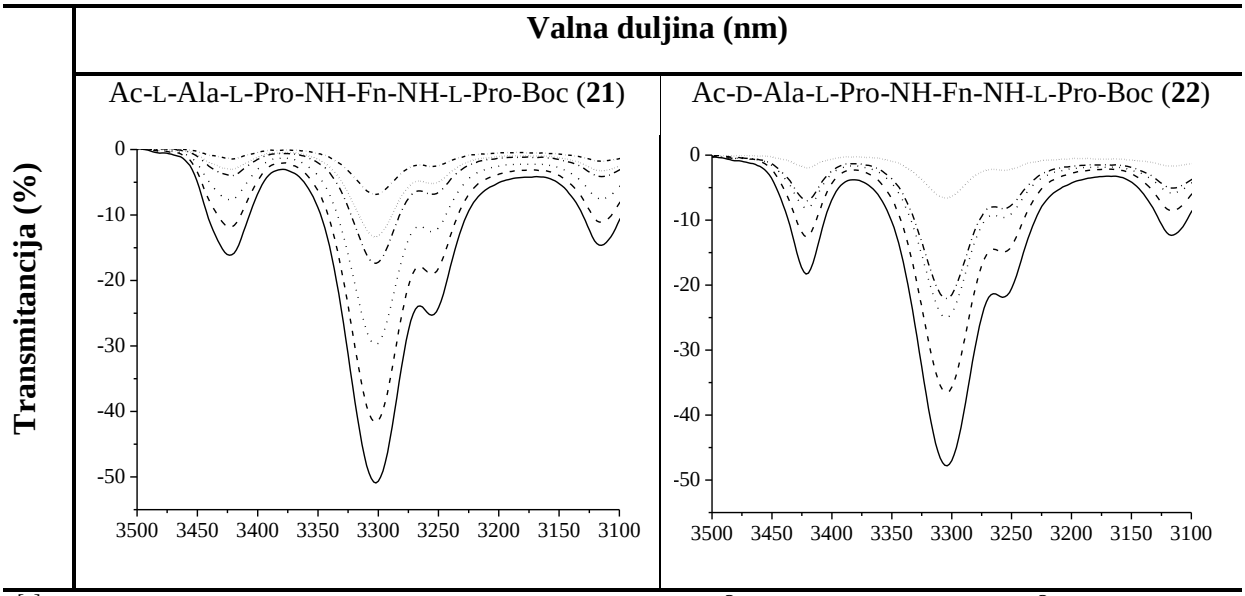
Tablica 26. Istezne vibracije[a] NH- i CO-skupina tripeptida **21** i **22**

Spoj	**Formula**	ν_{NH} **(slob.)**[b]	ν_{NH} **(asoc.)**[c]	ν_{CO} **(amid I)**	ν_{CO} **(amid II)**
21	Ac-L-Ala-L-Pro-NH^1-Fn-NH^2-L-Pro-Boc	3423sl	3302j	1691	1572
			3254j	1667	1510
				1630	1483
22	Ac-D-Ala-L-Pro-NH^1-Fn-NH^2-L-Pro-Boc	3421sl	3304j	1689	1571
			3257j	1667	1509
				1630	1481

[a]IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2, c = 5×10^{-2} M.

Da bi se utvrdio karakter asociranih amino-skupina, pristupilo se prethodno opisanom mjerenju koncentracijski ovisnih IR-spektara. Postupnim smanjenjem koncentracije obaju uzoraka, dolazi do proporcionalnog slabljenja signala kako asociranih tako i slobodnih NH-skupine (tablica 27). Takvi rezultati sugeriraju *intramolekulski* karakter vodikovih veza u tripeptidima **21** i **22**.

Tablica 27. Koncentracijski ovisni IR-spektri[a] biokonjugata **21** i **22**



[a]IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2, [(—) $c = 5\times10^{-2}$ M, (----) $c = 2{,}5\times10^{-2}$ M, (····) $c = 1{,}25\times10^{-2}$ M, (-·-·) $c = 6{,}13\times10^{-3}$ M, (· · ·) $c = 3\times10^{-3}$ M].

4.3.3.5. NMR-spektroskopska analiza tripeptidâ 21 i 22

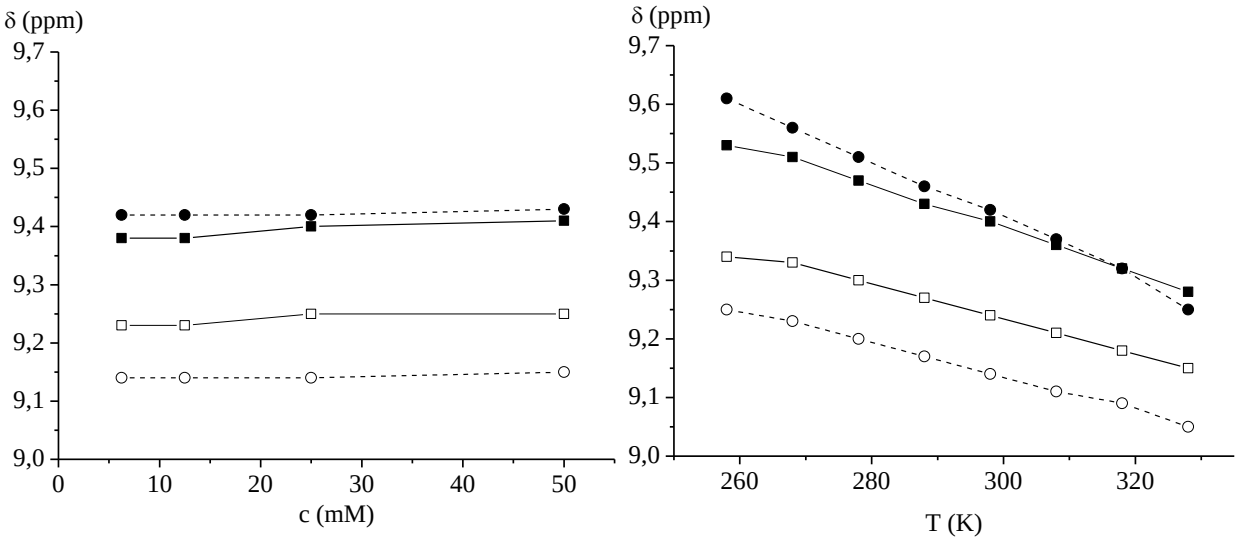
Primjenom dvodimenzijskih NMR-tehnika (COSY, HMBC) provedena je asignacija ^{1}H- i ^{13}C-NMR-spektara pripravljenih konjugata. Karakteristika obaju konjugata jest visok kemijski pomak amidnih protona (NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn}) vezanih za ferocensku jezgru ($\delta > 9$ ppm) što indicira njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama. S obzirom da se alaninske NH-skupine registriraju pri višem polju ($\delta < 7$ ppm), upitan je njihov donorski angažman u HB (tablica 28). Razlika u kemijskim pomacima prolinskih metilenskih skupina [δ (C_α/C_β) < δ (C_γ/C_δ)], te razlika u kemijskim pomacima C_β- i C_γ- atoma (koja je manja od 6 ppm), sugeriraju da konjugati **21** i **22** zauzimaju *trans*-položaj oko imidne veze. U NMR spektrima heterokiralnog **22** javljauju se i signali *cis*-izomera čiji je udio (10%) određen integriranjem površina amidnih protona u ^{1}H-NMR-spektrima i određivanjem omjera visine signala prolinskih ugljikovih atoma u ^{13}C-NMR-spektrima.

Tablica 28. Kemijski pomaci (δ/ppm)[a] amidnih protona biokonjugata **21** i **22**

Spoj	Formula	$(NH^1_{Fn})_{trans}$ δ (ppm)	$(NH^1_{Fn})_{cis}$ δ (ppm)	$(NH^2_{Fn})_{trans}$ δ (ppm)	$(NH^2_{Fn})_{cis}$ δ (ppm)	$(NH_{Ala})_{trans}$ δ (ppm)	$(NH_{Ala})_{cis}$ δ (ppm)
21	Ac-L-Ala-L-Pro--NH^1-Fn-NH^2--L-Pro-Boc	9,41	/	9,25	/	6,22	/
22	Ac-D-Ala-L-Pro--NH^1-Fn-NH^2--L-Pro-Boc	9,43 (0,90 H)	9,20 (0,10 H)	9,15 (0,90 H)	9,09 (0,10 H)	6,53 (0,90 H)	6,53 (0,10 H)

[a]NMR-spektri snimljeni su u $CDCl_3$ pri $c = 5\times10^{-2}$ M i 298 K.

Na temelju koncentracijski-(ne)ovisnih IR-spektara pretpostavljen je *intramolekulski karakter vodikovih veza* u konjugatima **21** i **22** koji je dodatno potkrijepljen mjerenjima koncentracijski- i temperaturno-ovisnih ^{1}H-NMR spektara. S obzirom da promjena koncentracije nema utjecaja na kemijski pomak NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn} (slika 70, *lijevo*), te da je u temperaturno ovisnim dijagramima (slika 70, *desno*) promjena njihovih kemijskih pomaka neznatna ($\Delta\delta < 0{,}3$ ppm), potvrđen je *intramolekulski* karakter vodikovih veza u tripeptidima **21** i **22**.



Slika 70. Koncentracijska-[*lijevo;* **21** ■(NH^1_{Fn}), □(NH^2_{Fn}); **22** •(NH^1_{Fn}), ○(NH^2_{Fn})] i temperaturna-ovisnost amidnih protona tripeptida **21** i **22** [*desno;* **21** ■(NH^1_{Fn}), □(NH^2_{Fn}); **22** •(NH^1_{Fn}), ○(NH^2_{Fn})]

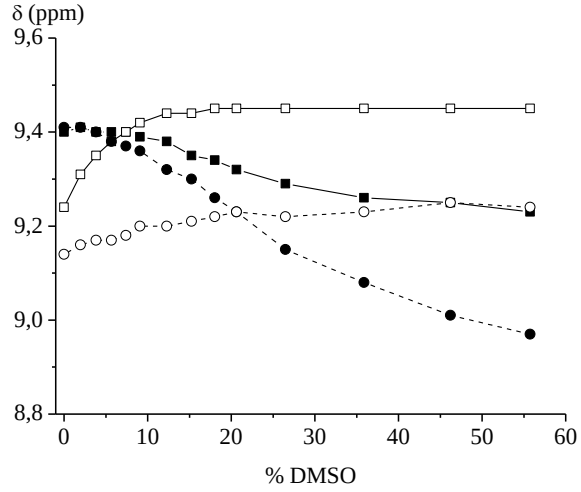
Izračunate temperaturne ovisnosti kemijskih pomaka (Δδ/ΔT) amidnih protona (NH^1_{Fn}) obaju tripeptida pokazatelj su inicijalno zaklonjenih uređenih struktura koje su postale izložene otapalu tijekom izlaganja povišenoj temperaturi. Kako prethodna mjerenja koncentracijski ovisnih IR- i NMR-spektara isključuju mogućnost intermolekulskih agregata, jasno je da su spomenute skupine uključene u intramolekulske vodikove veze. Niže temperaturne ovisnosti amidnih protona NH^2_{Fn} mogu se pripisati podjednako i zaklonjenim i izloženim NH-skupinama (tablica 29).[225]

Tablica 29. Temperaturne ovisnosti kemijskih pomaka[a] ferocenskih tripeptida **21** i **22**

Spoj	**Formula**	**δ (ppm)**		**Δδ/ΔT (ppb/K)**	
		NH^1_{Fn}	NH^2_{Fn}	NH^1_{Fn}	NH^2_{Fn}
21	Ac-L-Ala-L-Pro-NH^1-Fn-NH^2-L-Pro-Boc	9,40	9,25	-3,57	-2,71
22	Ac-D-Ala-L-Pro-NH^1-Fn-NH^2-L-Pro-Boc	9,42	9,14	-5,14	-2,85

[a] NMR-spektri mjereni su u $CDCl_3$ (c = 2,5×10^{-2} M) u temperaturnom rasponu od 258 do 328 K.

Titracijom 25 mM otopina biokonjugata **21** i **22** u $CDCl_3$ s kompeticijskim otapalom (1,96-56% DMSO) ispitana je jakost pretpostavljenih IHB. Kako u prisutnosti DMSO ne dolazi do značajnih promjena visokih kemijskih pomaka NH^1_{Fn} (■ i •) i NH^2_{Fn} (□ i ○) (Δδ < 0,5 ppm), indicirano je njihovo sudjelovanje u jakim IHB (slika 71).[235] Krivulja titracije amidnih protona (NH^1_{Fn}) oba konjugata pokazuje pad, odnosno pomak u više polje.



Slika 71. Titracija tripeptida **21** i **22** s DMSO [**21** ■(NH^1_{Fn}), □(NH^2_{Fn}); **22** •(NH^1_{Fn}), ○(NH^2_{Fn})

Takvo neuobičajeno ponašanje amidnih protona u prisustvu DMSO protumačeno je odsjenjujućim učinkom na njih vezanih karbonilnih skupina. Participacija karbonilnih skupina u vodikovoj vezi uzrokuje odsjenjenje amidnih protona i pomicanje njihovih signala u niže polje. Međutim, kako tijekom titracije s DMSO dolazi do cijepanja IHB, smanjuje se i odsjenjenost amidnog protona što uzrokuje vidljivi pad krivulje (slika 71).[236]

U NMR-spektrima tripeptida **21** snimljenima pri sobnoj temperaturi u $CDCl_3$ javlja se samo jedan set signala. Iz njegovih NMR-spektara snimljenih pri sniženim temperaturama vidljivo je da ne dolazi do *cis-trans*-izomerizacije. Međutim, dijastereomerni peptid **22** podliježe cis-trans izomerizaciji oko imidne veze već pri sobnoj temperaturi, a udio cis-frakcije povećava se pri sniženim temperaturama (tablica 30).[192,218,237-239]

Tablica 30. Kemijski pomaci (δ)[a, b] *cis*- i *trans*-amidnih protona dipeptida **21** i **22**

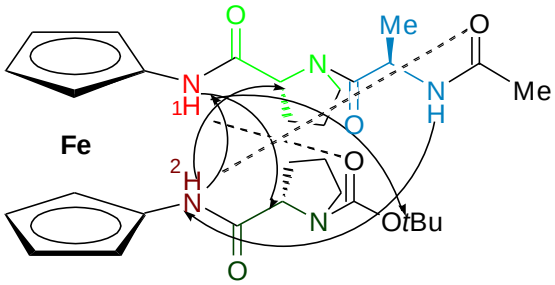
T (K)[a]		**δ (ppm)**									
		NH^1_{Fn}		**NH^2_{Fn}**		**NH_{Ala}**		**CH_{3Ac}**		**CH_{3Boc}**	
		258	**328**	**258**	**328**	**258**	**328**	**258**	**328**	**258**	**328**
21	*cis*	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	trans	9,55	9,28	9,36	9,15	6,38	6,10	2,01	1,98	1,45	1,49
	trans : cis	100:0	100:0	100:0	100:0	100:0	100:0	100:0	100:0	100:0	100:0
T (K)[a]		**δ (ppm)**									
		NH^1_{Fn}		**NH^2_{Fn}**		**NH_{Ala}**		**CH_{3Ac}**		**CH_{3Boc}**	
		258	**328**	**258**	**328**	**258**	**328**	**258**	**328**	**258**	**328**
22	*cis*	9,34	8,95	9,25	9,05	6,71	6,40	2,00	1,98	1,44	1,55
	trans	9,61	9,25				6,33		2,00	1,46	1,50
	trans : cis	93:7	87:13				87:13		87:13	93:7	87:13

[a]NMR-spektri mjereni su u $CDCl_3$ ($c = 2{,}5\times10^{-2}$ M).

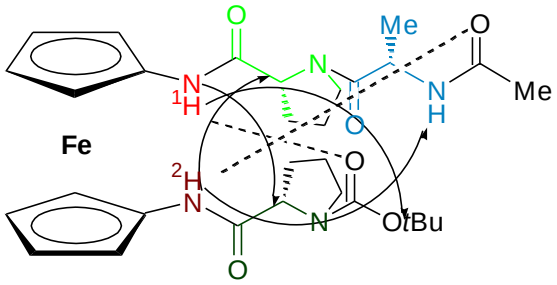
Slijedom rezultata dobivenih iz IR- i NMR-spektroskopskih analiza, kao i DFT-modeliranja, a uvidom u NOESY-spektre peptida **21** i **22**, predložene su konformacije izvedenih peptida. NOE-kontakti u spektru peptida **21** podržavaju konformaciju **A** predviđenu DFT-računima, a koja je uspostavljena putem 10- ($NH^1_{Fn}\cdots OC_{Boc}$) i 13-članih ($NH^2_{Fn}\cdots OC_{Ac}$) IHB-prstenova (slika 72, *gore*).

Vidljivo je da promjena kiralnosti u peptidnoj sekvenci nije prouzročila promjenu obrasca vodikovih veza: NOE-kontakti tripeptida **22** identični su onima homokiralnog analoga **21** (uz dodatni signal NH^1_{Fn}-NH^2_{Fn}) te indiciraju tvorbu **A** konformera (slika 72, *dolje*).

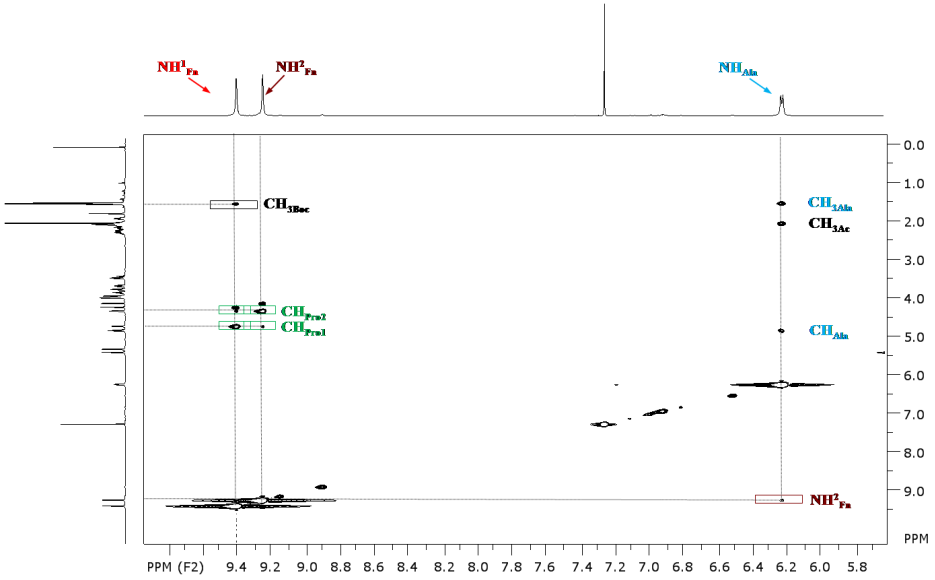
Može se zaključiti da tripeptidi **21** i **22** tvore isti obrazac IHB veza budući da je NMR-spektroskopijom potvrđena konformacija **A** (10- i 13-člani prstenovi) predviđena DFT-modeliranjem. Kiralnost *N*-terminalnog alanina nema utjecaja na IHB-obrazac vodikovih veza.

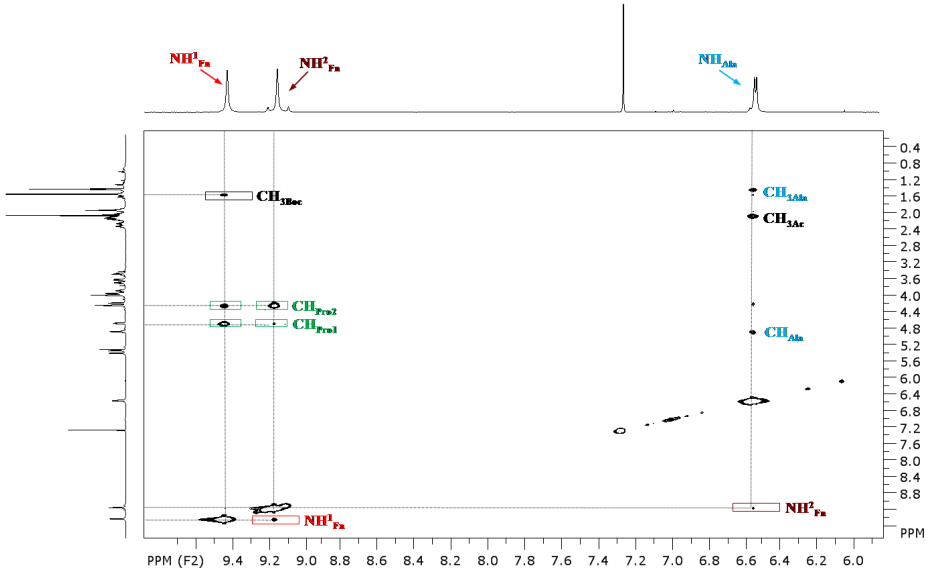


22 (Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc)



21 (Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc)





Slika 72. Predložene konformacije u peptidima **21**-**22** (NOE-kontakti označeni su kvadratićima, a predložene IHB crticama)

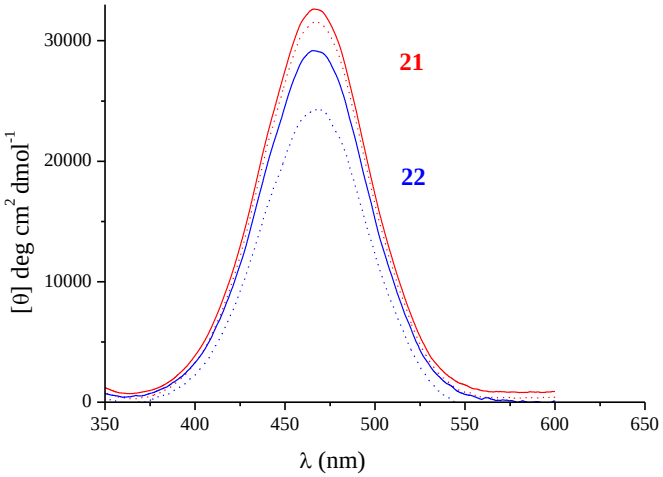
4.3.3.6. CD-spektroskopska analiza tripeptidâ 21 i 22

U ranije opisanim peptidima **I** i **II** izvedenima iz Fca i Fcd (*v.* 2.3.1. i 2.3.2.), IHB uspostavljene između podandnih peptidnih lanaca prouzročile su heličnu kiralnost ferocenâ koja se očitovala Cottonovim efektima u području ferocenskog kromofora ($\lambda_{max} \approx 480$ nm).[17] Kako su IR- i NMR-analize pripravljenih tripeptida **21** i **22** ukazale na tvorbu interlančanih IHB, CD-analizom smo istražili moguću heličnu kiralnost ispitanih peptida.

Tablica 31. UV/Vis-signali i Cottonovi efekti u dipeptidima **21** i **22**

Spoj	**Formula**	**λ_{max} / nm**		**[θ]/ deg cm^2 dmol^{-1}**	
		CH_2Cl_2	CH_2Cl_2 + DMSO	CH_2Cl_2	CH_2Cl_2 + DMSO
21	Ac-L-Ala-L-Pro-NH^1-Fn-NH^2-L-Pro-Boc	466	467	32669	31670
22	Ac-D-Ala-L-Pro-NH^1-Fn-NH^2-L-Pro-Boc	465	467	29187	24367

[a]CD-spektri mjereni su u CH_2Cl_2 ($c = 5\times10^{-3}$M) i uz dodatak 20 % DMSO



Slika 73. CD-spektri dipeptida **21** i **22** u CH_2Cl_2 [$c = 5\times10^{-3}$M (puna crta)] i uz dodatak 20 % DMSO (isprekidana crta)

Jaki pozitivni Cottonovi efekti u njihovim CD-spektrima u području ferocenskog kromofora potvrđuju visokouređenu kiralnu okolinu, odn. indiciraju tvorbu stabilne *P*-uzvojnice. Za razliku od heterokiralnog peptida **22** kod kojeg dodatak DMSO uzrokuje nešto zamjetnije slabljenje Cottonova efekta (16%), dodatak DMSO gotovo ne utječe na jakost CD-signala (5%) homokiralnog peptida **21** što ukazuje na njegovu stabilizaciju jačim IHB (tablica 31, slika 73).

4.3.4. Sinteza i konformacijska analiza tetrapeptidâ:

Ac-L-Ala-L-Pro-*NH*-Fn-*NH*-L-Pro-L-Ala-Boc (23),

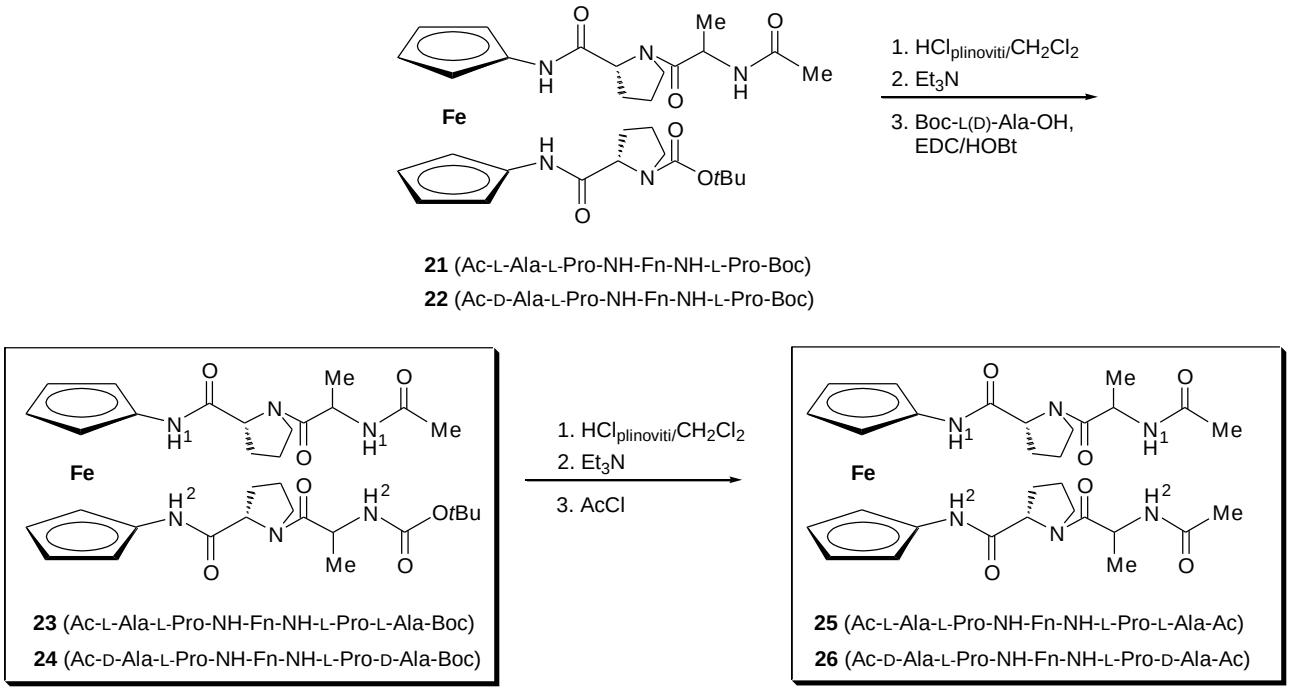
Ac-D-Ala-L-Pro-*NH*-Fn-*NH*-L-Pro-D-Ala-Boc (24),

Ac-L-Ala-L-Pro-*NH*-Fn-*NH*-L-Pro-L-Ala-Ac (25),

Ac-D-Ala-L-Pro-*NH*-Fn-*NH*-L-Pro-D-Ala-Ac (26)

4.3.4.1. Sinteza tetrapeptidâ 23-26

Završni korak u sintezi ciljnih tetrapeptida **23** i **24** obuhvaća uvođenje L, odn. D-Ala na *N*-terminus donjeg ciklopentadienilnog prstena prethodno opisanih tripeptidâ **21** odn. **22**. EDC/HOBt postupkom aktivirana je Boc-L(D)-Ala-OH nakon čega je uslijedila njezina kopulacija sa slobodnim aminima izvedenima deprotekcijom Boc-zaštićenog prolinskog ostatka prekursorâ **21** odn. **22**. Pri tome su dobiveni ortogonalno zaštićeni dijastereomerni tetrapeptidi **23** (81%) i **24** (77%) koji su nakon Boc-deprotekcije djelovanjem AcCl pretvoreni u Ac-analoge **25** (56%) i **26** (57%).



Shema 26. Priprava tetrapeptida **23-26**

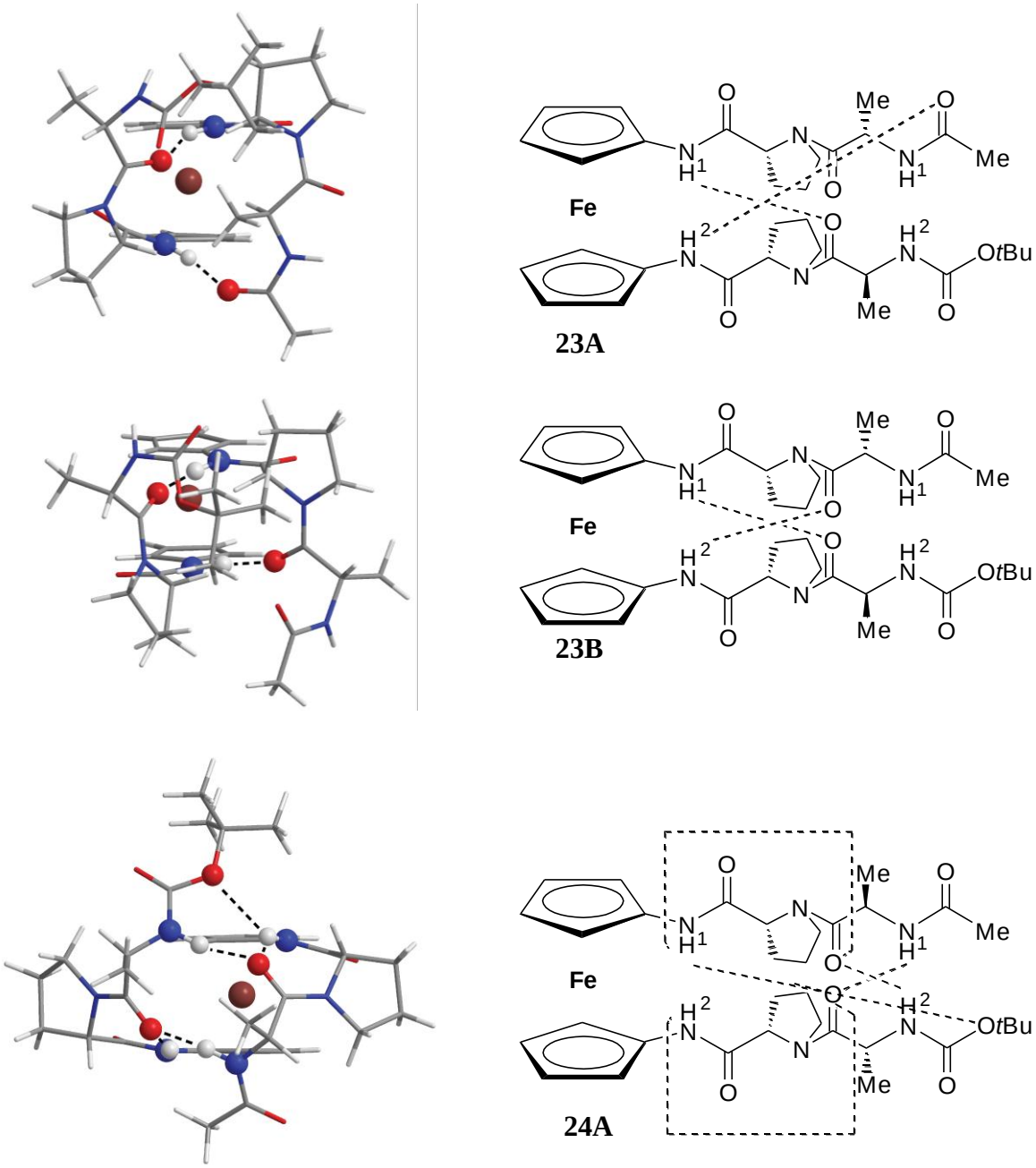
Ulazak alaninske podjedinice očituje se u ^{1}H-NMR-spektrima peptida **23** odn. **24** dubletima alaninskih amidnih protona pri δ ~ 5,3 ppm, kvartetima metinskih skupina pri δ ~

4,5 ppm te dubletima metilnih skupina pri δ ~ 1,4 ppm. ^{13}C-NMR-Spektri u karbonilnom području sadrže dodatne signale iz novih amidnih skupina pri δ ~ 170 ppm, te signale metinskih i metilenskih C-atoma pri δ ~ 48 ppm odn. δ ~ 18 ppm. Transformacija karbamatne u acetamidnu skupinu tetrapeptidâ **25** i **26** rezultira nestankom signala karbonilnih C-atoma iz Boc-skupina pri δ ~ 155 ppm u ^{13}C-NMR-spektrima, te javljanjem novih signala pri δ ~ 169 ppm koji odgovaraju karbonilnim C-atomima iz Ac-skupina. Također spomenuta zamjena Boc → Ac manifestira se i gubitkom singleta *tert*-butilne skupine pri δ ~ 1,4 ppm te javljanjem acetamidnih metilnih protona pri δ ~ 2,00 ppm u ^{1}H-NMR-spektrima.

4.3.4.2. DFT-modeliranje tetrapeptida 23-24

Na slici 74. prikazane su konformacije **23A/B** i **24A** dobivene optimizacijom struktura stabiliziranih intramolekuskim vodikovim vezama na razini MO6 i MO6-2X (u $CDCl_3$). Najstabilnija konformacija **23A** stabilizirana je dvjema interlančanim IHB između NH_{Fn} i CO-akceptora iz alanina, odn. Ac-zaštitne skupine što rezultira dvama 10-, odn. 13-članim prstenovima ($NH^1_{Fn}\cdots OC_{Ala2}$ i $NH^2_{Fn}\cdots OC_{Ac}$) (označavanje NH^1-, odn. NH^2- skupina prikazano je na shemi 26). 4,35 kJmol^{-1} nestabilnija druga konformacija **23B** zasniva se na unakrsnim IHB između NH_{Fn} i CO_{Ala} pri čemu rezultiraju dva 10-člana $NH^1_{Fn}\cdots OC_{Ala2}$ i $NH^2_{Fn}\cdots OC_{Ala1}$ IHB-prstena. Promjena kiralnosti u tetrapeptidu **24** omogućava sudjelovanje alaninskih NH-skupina u IHB što je vidljivo iz konformacije **24A** stabilizirane kroz pet IHB: dvije intralančane IHB između NH_{Fn} i alaninskih karbonilnih funkcija ($NH^1\cdots OC_{Ala1}$ i $NH^2\cdots OC_{Ala2}$) pri čemu se zatvaraju dva 7-člana prstena, odn. dva γ-okreta; dvije interlančane IHB između alaninskih NH- i CO-skupina ($NH^1_{Ala}\cdots OC_{Ala2}$ i $NH^2_{Ala}\cdots OC_{Ala1}$) pri čemu rezultiraju dva 16-člana prstena te 13-člani IHB-prsten proistekao iz veze $NH^1_{Fn}\cdots O_{Boc}$ (slika 74).

DFT-modeliranje Ac-analoga **25** i **26** je u tijeku.



Slika 74. Najstabilniji konformeri **23-24** optimizirani MO6/6-31G(d) funkcionalom u $CHCl_3$ s prikazanim vodikovim vezama

4.3.4.3. IR-spektroskopska analiza tetrapeptida 23-26

IR-spektri svih tetrapeptida karakterizirani su slabijim intenzitetom isteznih vibracija slobodnih NH-skupina iznad 3400 cm^{-1}, te jačim intenzitetom apsorpcijskih vrpci asociranih NH-skupina opaženih ispod 3300 cm^{-1} (tablica 32). Uretanske karbonilne skupine

ortogonalno zaštićenih konjugata **23** i **24**, za razliku od Ac-analoga **25** i **26**, apsorbiraju pri nešto višim valnim duljinama (1706 i 1707 cm^{-1}) što dovodi u pitanje njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.

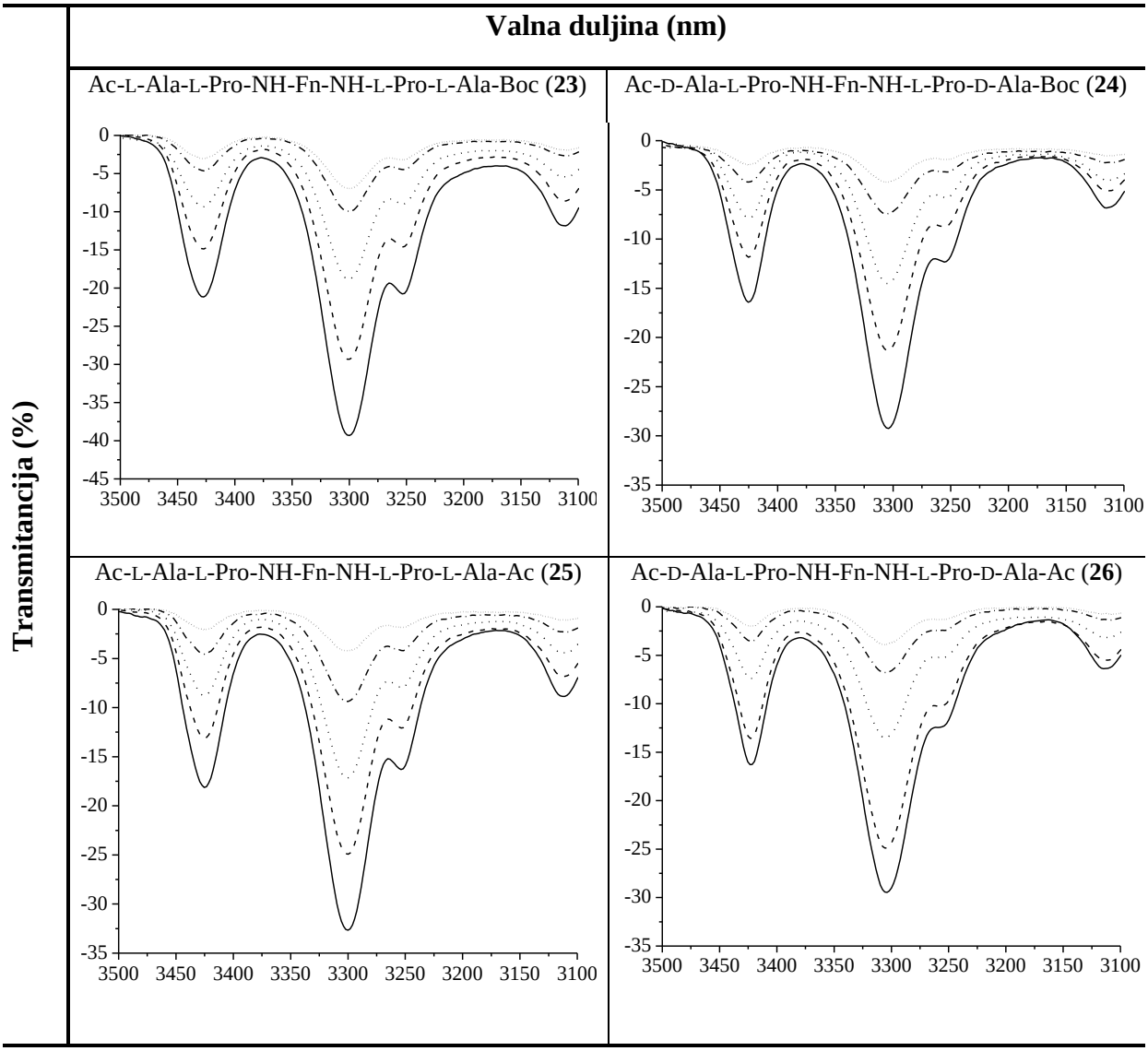
Tablica 32. Istezne vibracije[a] NH- i CO-skupina tetrapeptida **23-26**

Spoj	**Formula**	ν_{NH} **(slob.)**[b]	ν_{NH} **(asoc.)**[c]	ν_{CO} **(amid I)**	ν_{CO} **(amid II)**
23	Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-Boc	3427sr	3300j	1707	1571
			3253sr	1684	1506
				1633	1486
					1465
24	Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-D-Ala-Boc	3425sr	3304j	1706	1572
			3254sr	1684	1505
				1633	1485
					1457
25	Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-Ac	3425sr	3300j	1682	1571
			3253sr	1631	1509
					1485
					1466
26	Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-D-Ala-Ac	3423sr	3304j	1684	1571
			3254sr	1672	1508
				1632	1484
					1464

[a]IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2, $c = 5\times10^{-2}$ M.

Mjerenjem IR-spektara postupnim razrjeđivanjem diklormetanskih otopina ispitivanih uzoraka dolazi do proporcionalnog slabljenja signala i slobodne i asocirane NH-skupine, što sugerira sudjelovanje asociranih NH-skupina u *intramolekulskim vodikovim vezama* (IHB) (tablica 33).

Tablica 33. Koncentracijski ovisni IR-spektri[a] biokonjugata **23-26**



[a]IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2, [(—) $c = 5\times10^{-2}$ M, (----) $c = 2{,}5\times10^{-2}$ M, (····) $c = 1{,}25\times10^{-2}$ M, (-·-·) $c = 6{,}13\times10^{-3}$ M, (· · ·) $c = 3\times10^{-3}$ M].

4.3.4.4. NMR-spektroskopska analiza tetrapeptida 23-26

Primjenom 2D NMR-spektroskopije (COSY, NOESY, HMBC, HSQC) provedena je asignacija ^{1}H- i ^{13}C-NMR-spektara pripravljenih tetrapeptida **23-26**.

Visoki kemijski pomaci ($\delta > 9$ ppm) amidnih protona vezanih izravno za ferocen (NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn}) u tetrapeptidima **23-26** (tablica 34) sugeriraju njihovu participaciju u vodikovim vezama. S obzirom da su alaninski amidni protoni (NH^1_{Ala} i NH^2_{Ala}) registrirani pri višem polju ($\delta < 6$ ppm) njihov angažman u stabilizaciji pripadajućih peptida vodikovim vezama manje je vjerojatan, mada ne i posve isključen. Naime, na kemijski pomak amidnih

protona ne utječe samo vodikova veza u kojoj sudjeluju, već i ukupna kemijska okolina te skupine.

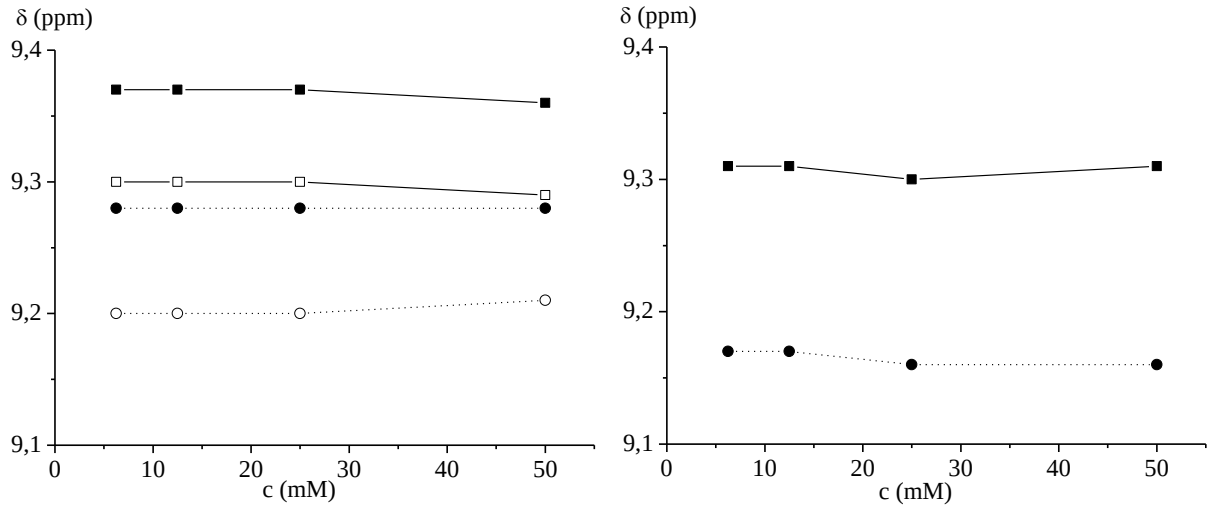
Dominantna konformacija svih biokonjugata pripisana je njihovim *trans*-izomerima jer su kemijski pomaci prolinskih C_α- i C_β-atoma niži od kemijskih pomaka njegovih C_γ- i C_δ-atoma i jer je razlika u kemijskim pomacima C_β- i C_γ-atoma manja od 6 ppm. U ^{1}H-NMR-spektrima biokonjugata **23-26** dolazi do izomerizacije imidne veze te se osim kemijskih pomaka *trans-trans* izomera javljaju signali karakteristični za kombinacije *cis-trans, trans-cis, cis-cis* čiji se udio na temelju integracije amino-skupina u ^{1}H-NMR-spektrima i omjera C_α- i C_δ-atoma u ^{13}C-NMR-spektrima kreće od 92:8 do 86:14. Zagrijavanjem do 328 K došlo je do potpunog srastanja signala u NMR-spektrima svih peptida.

Tablica 34. Kemijski pomaci (δ)[a] amidnih protona tetrapeptida **23-26**

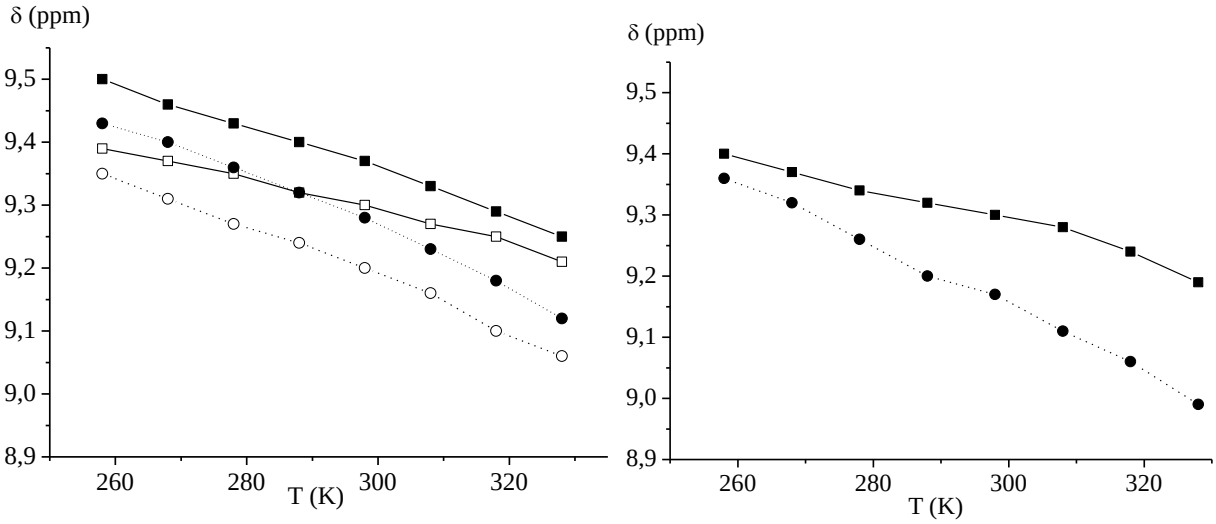
Spoj	**Formula**	**(NH^1_{Fn}) δ (ppm)**	**(NH^2_{Fn}) δ (ppm)**	**(NH^1_{Ala}) δ (ppm)**	**(NH^2_{Ala}) δ (ppm)**
23	Ac-L-Ala-L-Pro-NH^1-Fn-NH^2-L-Pro-L-Ala-Boc	9,36	9,29	6,20	5,18
24	Ac-D-Ala-L-Pro-NH^1-Fn-NH^2-L-Pro-D-Ala-Boc	9,28	9,21	6,52	5,39
25	Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-Ac	9,31		6,19	
26	Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-D-Ala-Ac	9,16		6,50	

[a]NMR-spektri snimljeni su u $CDCl_3$, $c = 5\times10^{-2}$ M, 298 K.

Intramolekulski karakter vodikovih veza pretpostavljen koncentracijski-neovisnim IR-spektrima tetrapeptida **23-26** potvrđen je mjerenjima koncentracijski- i temperaturno-ovisnih ^{1}H-NMR spektara (slika 75 i 76). S obzirom da promjena koncentracije nema utjecaja na kemijski pomak NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn} (slika 75), te da promjena temperature (slika 76) neznatno utječe na njihove kemijske pomake ($\Delta\delta < 0{,}5$ ppm), potvrđen je *intramolekulski* karakter vodikovih veza u tetrapeptidima **23-26**.



Slika 75. Koncentracijska ovisnost amidnih protona NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn} iz tetrapeptida **23-26** [*lijevo;* **23** ■(NH^1_{Fn}), □(NH^2_{Fn}), **24** •(NH^1_{Fn}), ○(NH^2_{Fn})]; [*desno;* **25** ■($NH^1_{Fn,}$ NH^2_{Fn}), **26** •($NH^1_{Fn,}$ NH^2_{Fn})]



Slika 76. Temperaturna ovisnost amidnih protona NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn} iz tetrapeptida **23-26** [*lijevo;* **23** ■(NH^1_{Fn}), □(NH^2_{Fn}), **24** •(NH^1_{Fn}), ○(NH^2_{Fn})]; [*desno;* **25** ■($NH^1_{Fn,}$ NH^2_{Fn}), **26** •($NH^1_{Fn,}$ NH^2_{Fn})]

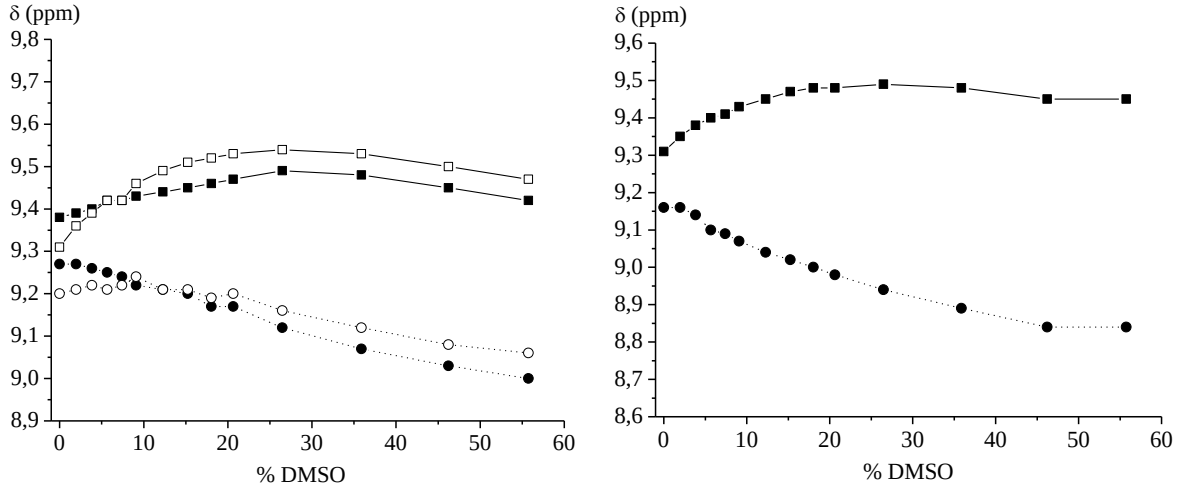
Povećane temperaturne ovisnosti svih koncentracijski-neovisnih amidnih protona iz tetrapeptida s heterokiralnom sekvencom (**24** i **26**) podupiru pretpostavku o njihovoj stabilizaciji putem IHB.

Tablica 35. Temperaturne ovisnosti kemijskih pomaka[a] ferocenskih peptida **23-26**

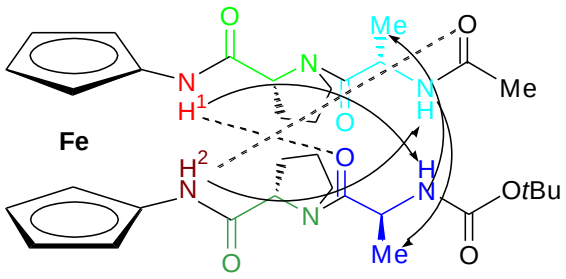
Spoj	δ (ppm)		Δδ/ΔT (ppb/K)	
	NH^1_{Fn}	NH^2_{Fn}	NH^1_{Fn}	NH^2_{Fn}
23	9,37	9,30	-3,6	-2,6
24	9,28	9,20	-4,4	-4,1
25	9,30		-3,00	
26	9,16		-4,42	

[a]NMR-spektri mjereni su u $CDCl_3$ (c = 2,5×10^{-2} M) u temperaturnom rasponu 258-328 K.

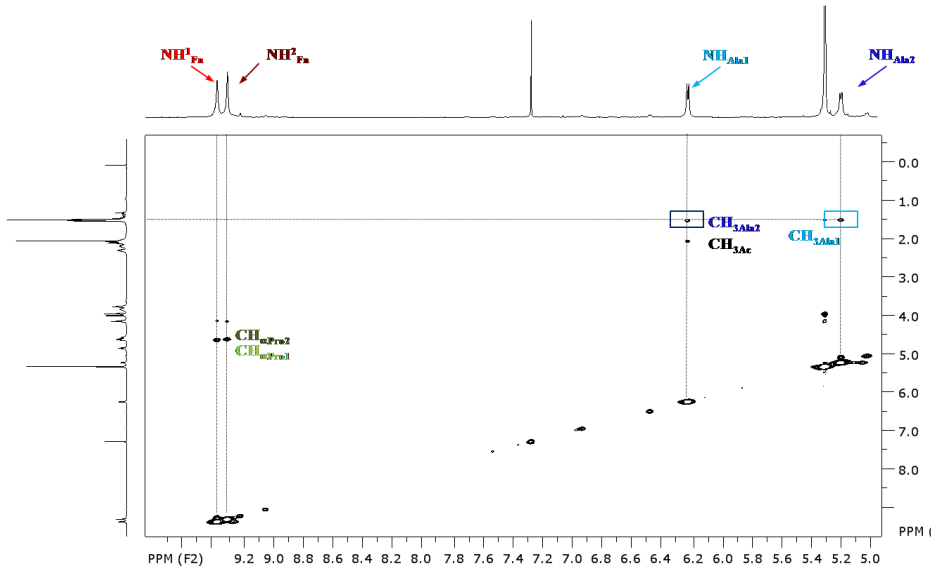
Jakost predloženih intramolekulskih vodikovih veza u kojima kao donori sudjeluju NH-skupine vezane za ferocensku jezgru (**23-26**) ispitana je titracijom njihovih 25 mM otopina $CDCl_3$ s DMSO. Male promjene kemijskih pomaka NH_{Fn} (Δδ < 0,5 ppm) u prisutnosti polarnog otapala (1,96-56%) dokaz su njihovog sudjelovanja u jakim IHB (slika 77). Titracija homokiralnih analoga (**23** i **25**) dovodi do neznatnog povećanja kemijskog pomaka te njihove krivulje ukazuju na tipično ponašanje protona izloženih djelovanju polarnog otapala. Međutim, dodatkom DMSO amidni protoni heterokiralnih analoga **24** i **26** pokazuju relativno neobičan pomak u više polje, što se pripisuje zasjenjujućem utjecaju karbonilnih skupina na koje su vezani (slika 77).[226]

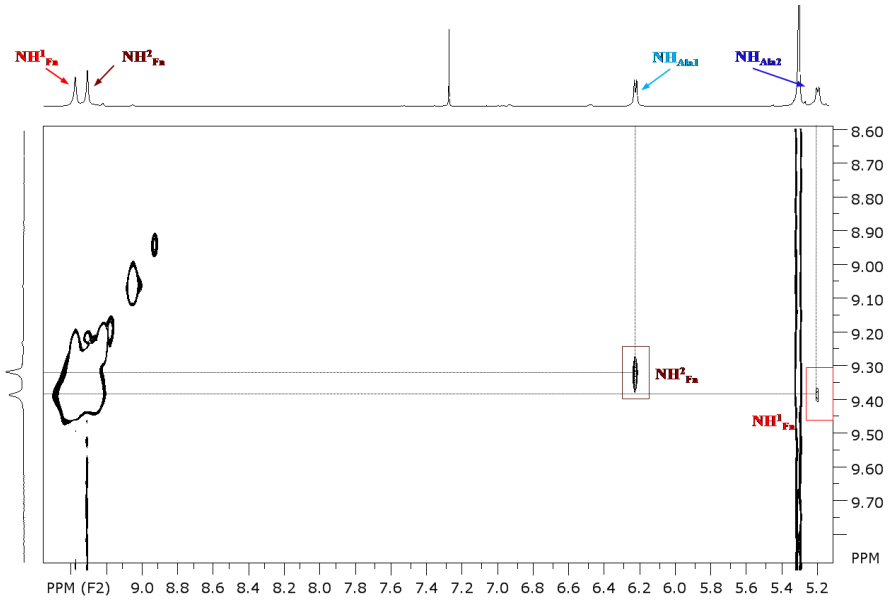


Slika 77. Titracija tetrapeptida **23-26** s DMSO [*lijevo;* **23** ■(NH^1_{Fn}), □(NH^2_{Fn}), **24** •(NH^1_{Fn}), ○(NH^2_{Fn})]; [*desno;* **25** ■(NH^1_{Fn}, NH^2_{Fn}), **26** •(NH^1_{Fn}, NH^2_{Fn})]

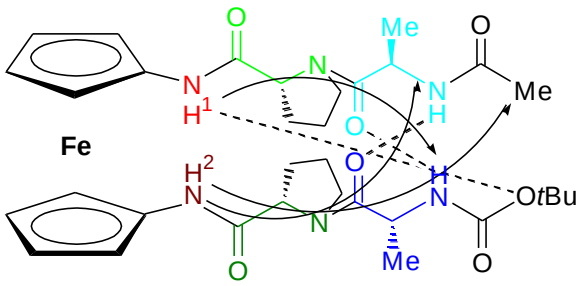


23 (Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-Boc)

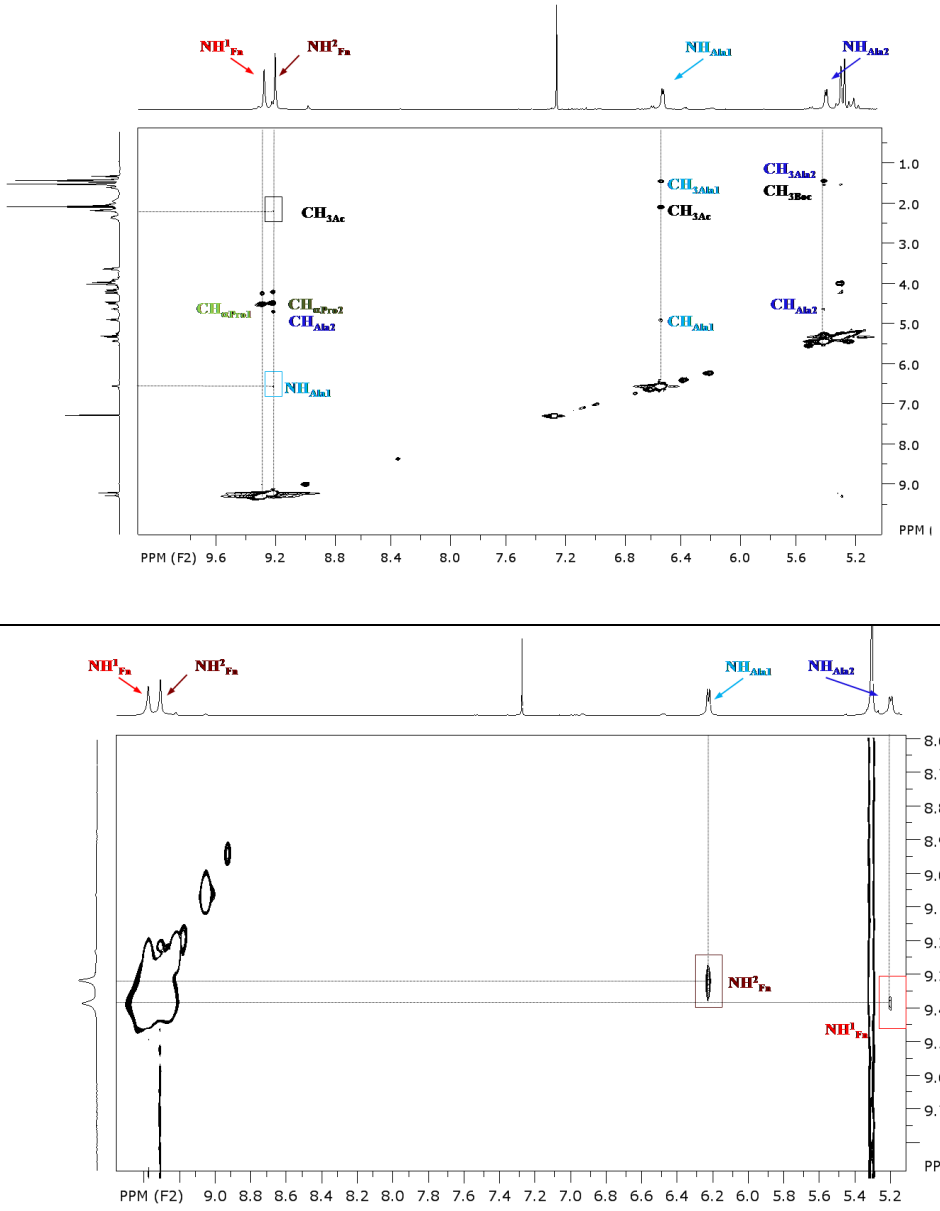




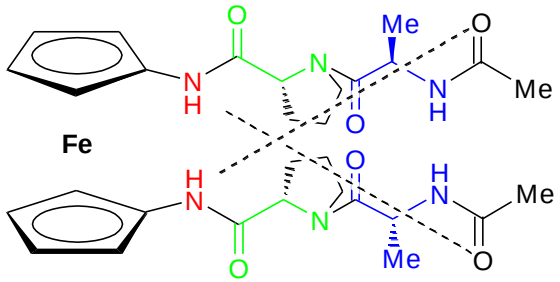
Slika 78a. Predložene konformacije u peptidima **23** (NOE-kontakti označeni su kvadratićima, a predložene IHB crticama)



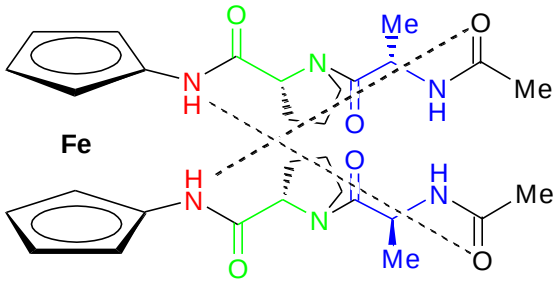
24 (Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-D-Ala-Boc)



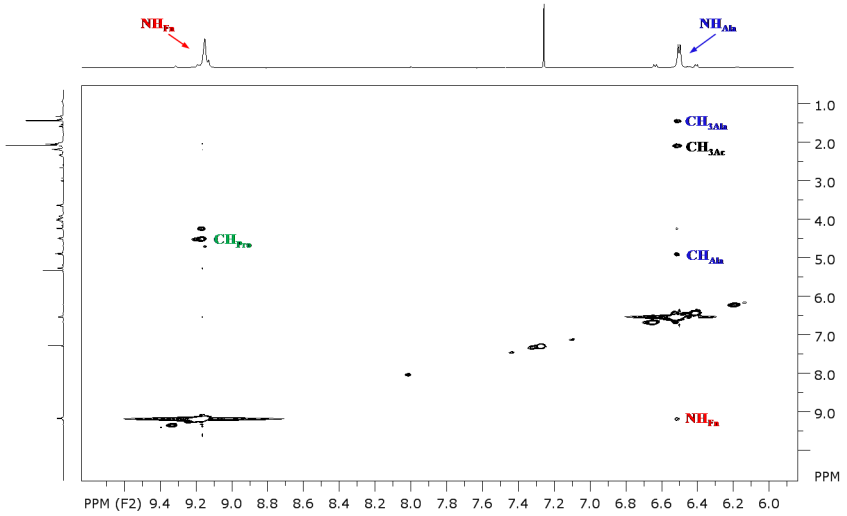
Slika 78b. Predložene konformacije u peptidima **24** (NOE-kontakti označeni su kvadratićima, a predložene IHB crticama)

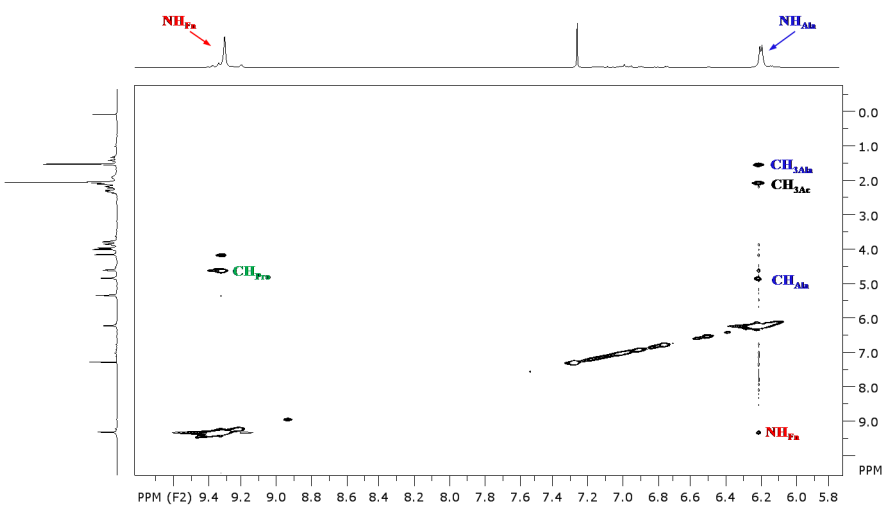


26 (Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-D-Ala-Ac)



25 (Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-Ac)





Slika 78c. Predložene konformacije u peptidima **25-26** (NOE-kontakti označeni su kvadratićima, a predložene IHB crticama)

Iz NOESY-spektra homokiralnog tetrapeptida **23** vidljivi su NOE-kontakti: NH^1–NH_{Ala2}, NH^2–NH_{Ala1}, NH_{Ala1}–CH_{3Ala2} kao i NH_{Ala2}–CH_{3Ala1}. Navedeni kontakti, uz rezultate NMR- i IR-spektroskopije, podržavaju $NH^1\cdots OC_{Ala2}$ i $NH^2\cdots OC_{Ac}$ IHB nađene u konformaciji **23A** predloženoj DFT-modeliranjem.

NOE-kontakt NH^1–NH_{Ala2} podržava konformaciju **24A** predviđenu DFT-modeliranjem. Naime, prostorna udaljenost tih dviju akceptorskih skupina omogućava tvorbu $NH^1\cdots O_{tBu}$ IHB, odn. $NH_{Ala2}\cdots OC_{Ala1}$ IHB. Nadalje, NOE-kontakt NH^2–NH_{Ala1} se uslijed prostorne orijentacije tih dviju akceptorskih skupina može ostvariti tvorbom $NH_{Ala1}\cdots OC_{Ala2}$ IHB.

Na temelju NOE-kontakata homokiralnog **25** NH_{Fn}–NH_{Ala}, NH_{Ala}–CH_{3Ala}, NH_{Ala}–CH_{3Ac} te NH_{Ala}–CH_{Ac} kao i rezultata IR-spektroskopije koja sugerira sudjelovanje uretanskih karbonila u vodikovoj vezi, možemo pretpostaviti tvorbu dviju simultanih $NH_{Fn}\cdots OC_{Ac}$ IHB što bi odgovaralo dominantnoj konformaciji **A** njegovog Boc-analoga **23**.

Istovjetni NOE-kontakti u spektru heterokiralnog tetrapeptida **26** upućuju na moguću stabilizaciju interlančanim interakcijama NH-skupina vezanih na ferocen i karbonilnih uretanskih skupina iz terminalnih alaninskih ostataka ($NH_{Fn}\cdots OC_{Ac}$ IHB).

4.3.4.5. CD-spektroskopska analiza tetrapeptida 23-26

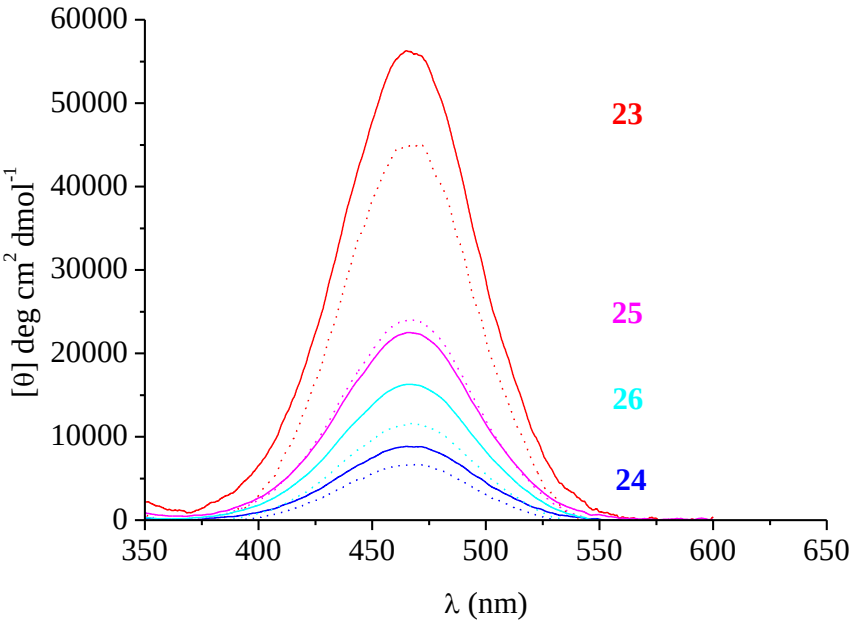
Kako prethodne analize tetrapeptida **23-26** ukazuju na prisutnost jakih IHB, očekivani visoki stupanj kiralnog uređenja tih konjugata u otopini demonstriran je njihovom izrazitom CD-aktivnošću. Višestruko povećane vrijednosti Cottonovih efekata homokiralnih peptida **23** i **25** u odnosu na heterokiralne analoge **24** i **26** upućuju na postignuti viši stupanj kiralnog uređenja induciranog jakim IHB (tablica 36).

Pretpostavka o jakim IHB dodatno je ispitana titracijom s kompeticijskim otapalom (DMSO). Redukcija intenziteta Cottonovih efekata tetrapeptida **23**, **24** i **26** za svega 20- 30% podržava pretpostavku o njihovoj stabilizaciji jakim IHB. Neznatno povećanje intenziteta u signalu tetrapeptida **25** nakon dodatka DMSO može se protumačiti slabim utjecajem otapala na njegovu visokouređenu strukturu (slika 79).

Tablica 36. UV/Vis-signali i CD-vrpce **23** – **26**

Spoj	**Formula**	**λ_{max} / nm**		**[θ]/ deg cm^2 dmol^{-1}**	
		CH_2Cl_2	CH_2Cl_2 + DMSO	CH_2Cl_2	CH_2Cl_2 + DMSO
23	Ac-L-Ala-L-Pro-NH^1-Fn-NH^2-L-Pro-L-Ala-Boc	465	470	56293	45044
24	Ac-D-Ala-L-Pro-NH^1-Fn-NH^2-L-Pro-D-Ala-Boc	471	469	8810	6690
25	Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-L-Ala-Ac	465	466	22495	24049
26	Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-D-Ala-Ac	465	467	16293	11567

[a]CD-spektri mjereni su u CH_2Cl_2 (c = 5×10^{-3}M); te uz 20 % DMSO.



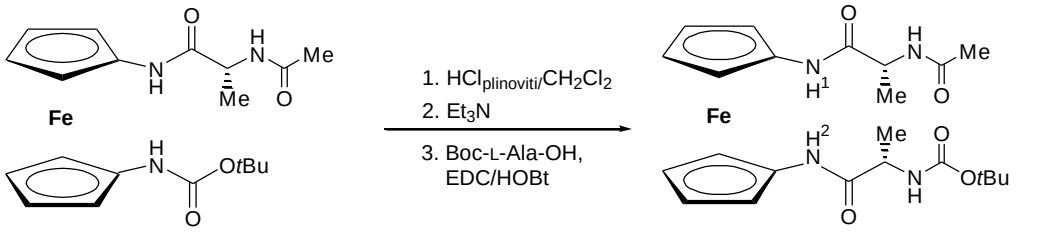
Slika 79. CD-spektri tetrapeptida **23**-**26** u CH_2Cl_2 [c = 5×10^{-3}M (puna crta)] i uz dodatak 20 % DMSO (isprekidana crta)

4.3.5. Sinteza i konformacijska analiza Ac-L-Ala-*NH*-Fn-*NH*-L-Ala-Boc (31) i Ac-L-Ala-*NH*-Fn-*NH*-L-Ala-Ac (32)

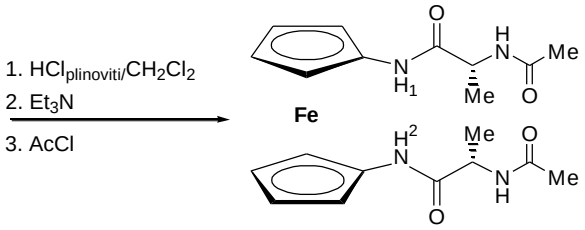
U ovom će se poglavlju opisati peptidi Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Ala-Boc (**31**) i Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Ala-Ac (**32**), analozi Kraatzovih peptida **III** izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda).

4.3.5.1. Sinteza Ac-L-Ala-*NH*-Fn-*NH*-L-Ala-Boc (31) i Ac-L-Ala-*NH*-Fn-*NH*-L-Ala-Ac (32)

Deprotekcijom terminalne Boc-zaštitne skupine peptida **30** te *in situ* kopulacijom nastalog amina s aktiviranim L-Ala pripravlja se 70% dipeptida **31**. Transformacijom njegove Boc-zaštitne skupine u acetamid djelovanjem AcCl na intermedijarni slobodni amin dobiveno je 47% simetričnog dipeptida **32** (shema 27).



30 (Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-Boc) **31** (Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Ala-Boc)



32 (Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Ala-Ac)

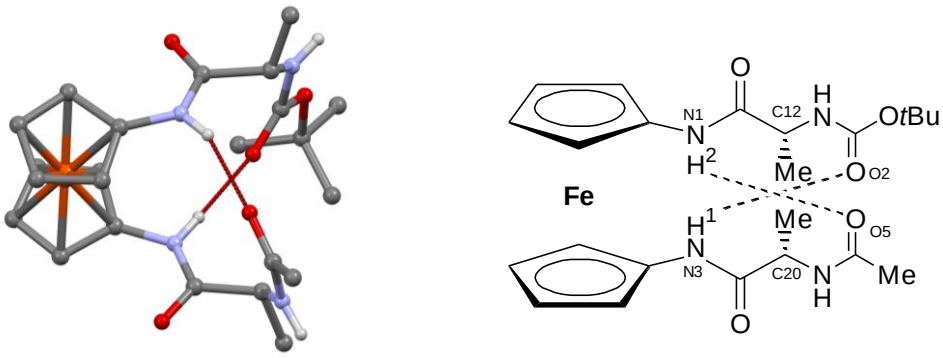
Shema 27. Priprava dipeptida **31** i **32**

Uvođenje dodatne alaninske jedinice na *N*-terminus donjeg Cp-prstena peptida **31** registrirano je u njegovom ^{1}H-NMR-spektru signalima metinske skupine (δ = 4,25 ppm) i metilenske skupine (δ = 1,40 ppm). U njegovom se ^{13}C-NMR-spektru javlja signal C-atoma iz alaninske metinske (δ = 51,13 ppm) i metilenske skupine (δ = 17,84 ppm) te signal nove karbonilne skupine pri δ = 171,67 ppm. Izmjena zaštitnih skupina u spoju **32** očituje se

gubitkom signala iz Boc-protona pri δ = 1,47 ppm i javljanjem Ac-signala pri 2,09 ppm. U ^{13}C-NMR-spektrima ta se izmjena odražava izostankom CH_{3Boc}-skupine pri δ = 28,54 kao i pripadajućeg karbonilnog C-atoma pri δ = 156,80 ppm. Dakako, signali zabilježeni pri δ = 23,22 i 171,4 ppm odgovaraju atomima iz acetamidne zaštitne skupine.

4.3.5.2. Kristalografska analiza Ac-L-Ala-*NH*-Fn-*NH*-L-Ala-Boc (31)

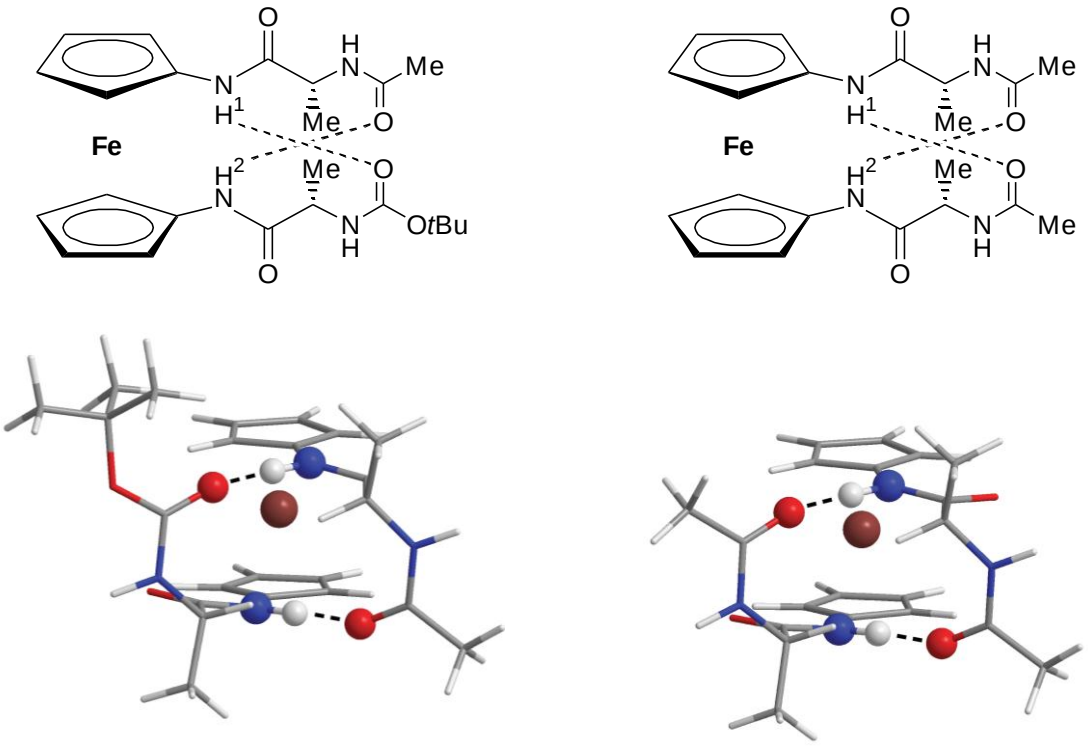
Struktura spoja **31**, kao i apsolutna konfiguracija kiralnih atoma (C12, *S*; C20, *S*), nedvjbeno je potvrđena rentgenskom strukturnom analizom. Spoj kristalizira kao kloroformni solvat u rompskoj prostornoj grupi *P* 2_1 2_1 2_1. Konformacija ciklopentadienilnih prstenova ferocenskog kostura je nezasjenjena, jer vrijednost C–Cg_1–Cg_2–C9 pseudo-torzijskog kuta iznosi -174,7(6)^o (Cg_1 i Cg_2 su centroidi C1–C5 i C6–C10 ciklopentadienilnih prstenova). Naime, ta vrijednost kuta vrlo je bliska teorijskoj vrijednosti kuta za konformaciju od 180^o. Ciklopentadienilni prstenovi su približno paralelni; diedarski kut između njihovih usrednjenih ravnina iznosi 4,5(5)^o. Centroidi prstenova približno su jednako udaljeni od Fe atoma [Fe–Cg_1 = 1,655(4) Å; Fe–Cg_2 = 1,658(4) Å], dok kut Cg_1–Fe–Cg_2 blago odstupa od vrijednosti 180^o i iznosi 176,60(16)^o. Lanci ciklopentadienilnih prstenova povezani su dvjema unutarmolekulskim vodikovim vezama: $NH^1_{Fn}\cdots OC_{Boc}$ i $NH^2_{Fn}\cdots OC_{Ac}$. Vodikove veze zatvaraju dva 10-člana prstena inducirajući pri tom tvorbu β–okretâ (slika 80).



Slika 80. Molekulska struktura i shematski prikaz peptida **31** u čvrstom stanju {duljine vodikovih veza N1–O5 [2.859(7) Å] i N3–O2 [2.802(7) Å]}

4.3.5.3. DFT-modeliranje dipeptidâ 31 i 32

Prema rezultatima dobivenim primjenom matematičkog modeliranja za dipeptide **31** i **32**, najstabilnija konformacija u oba slučaja istovjetna je onoj pronađenoj u kristalnoj strukturi. Prema tome, NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn} tvore dvije unakrsne IHB s karbonilnim akceptorima iz zaštitnih skupina: $NH^1\cdots OC_Y$ IHB (**31**, Y = Boc; **32** Y = Ac) te $NH^2\cdots OC_{Ac}$ IHB (slika 81).



Slika 81. Najstabilniji konformeri **31A** i **32A** optimizirani MO6/6-31G(d) funkcionalom u $CHCl_3$ s prikazanim vodikovim vezama (*dolje*); shematski prikaz IHB (*gore*)

4.3.5.4. IR-spektroskopska analiza dipeptidâ 31 i 32

Signali slobodnih amino-skupina iz peptida **31** i **32** koje se u IR-spektrima očitavaju iznad 3400 cm^{-1} slabijeg su intenziteta u odnosu na apsorpcijske vrste asociranih NH-skupina (< 3400 cm^{-1}). Položaj apsorpcijskih vrpci karbonilnih skupina iz amidne veze ili zaštitne skupine sugerira njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama (tablica 37).

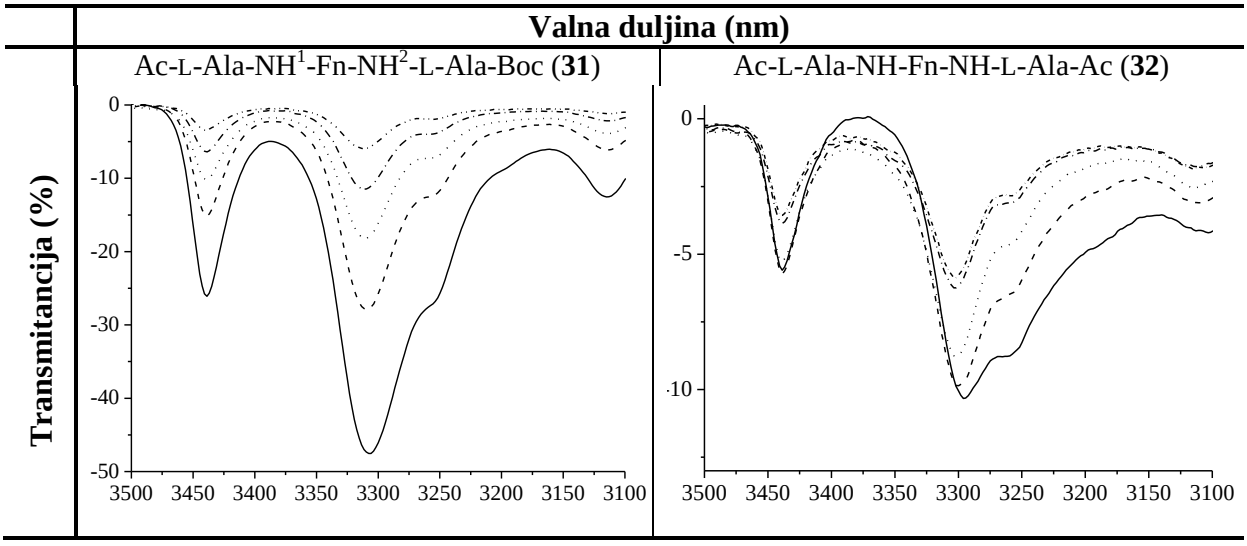
Tablica 37. Istezne vibracije[a] NH- i CO-skupina tetrapeptida **31**-**32**

Spoj	Formula	ν_{NH} (slob.)[b]	ν_{NH} (asoc.)[c]	ν_{CO} (amid I)	ν_{CO} (amid II)
31	Ac-L-Ala-NH^1-Fn-NH^2-L-Ala-Boc	3439sr	3310j	1684	1571
			3253sr	1665	1506
32	Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Ala-Ac	3438sr	3306j	1687	1570
			3252sr	1680	1511
				1665	1504
				1650	

[a]IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2, $c = 5\times10^{-2}$ M.

Koncentracijski-neovisna IR-mjerenja indiciraju *intramolekulski* karakter asocijacija u kojima sudjeluju NH-skupine iz **31** i **32** (tablica 38).

Tablica 38. Koncentracijski-ovisni IR-spektri[a] biokonjugata **31** i **32**



[a]IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2, [(—) $c = 5\times10^{-2}$ M, (----) $c = 2{,}5\times10^{-2}$ M, (····) $c = 1{,}25\times10^{-2}$ M, (-·-·) $c = 6{,}13\times10^{-3}$ M, (· · ·) $c = 3\times10^{-3}$ M].

4.3.5.5. NMR-spektroskopska analiza dipeptidâ 31 i 32

Visoki kemijski pomaci NH-skupina vezanih za ferocensku jezgru (NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn}) u dipeptidima **31** i **32** (tablica 39) upućuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.

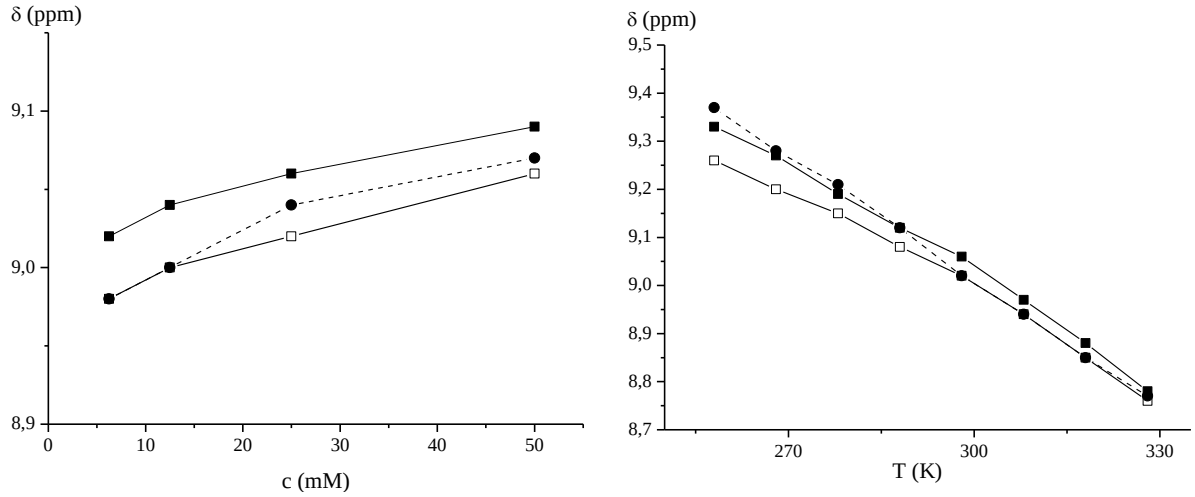
Sudjelovanje NH_{Ala1}-skupina je sudeći prema njihovim kemijskim pomacima ($\Delta\delta < 7$ ppm) upitno, pri čemu se sa sigurnošću može tvrditi da NH_{Ala2} iz peptida **31** ne sudjeluje u IHB.

Tablica 39. Kemijski pomaci (δ)[a] amidnih protona peptida **31**-**32**

Spoj	Formula	(NH^1_{Fn}) δ (ppm)	(NH^2_{Fn}) δ (ppm)	(NH_{Ala1}) δ (ppm)	(NH_{Ala2}) δ (ppm)
31	Ac-L-Ala-NH^1-Fn-NH^2-L-Ala-Boc	9,09	9,06	6,85	5,21
32	Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Ala-Ac	9,07		6,57	

[a]NMR-spektri snimljeni su u $CDCl_3$, $c = 5\times10^{-2}$ M, 298 K.

Intramolekulske vodikove veze u kojima prema nalazima IR-spektroskopije sudjeluje glavnina NH-skupina iz **31** i **32**, potvrđena je mjerenjem koncentracijski- i temperaturno-ovisnih NMR-spektara. Iz dijagrama se može vidjeti da smanjenjem koncentracije ne dolazi do značajnije promjene kemijskih pomaka analiziranih peptida (slika 82). Ipak, njihovi kemijski pomaci podliježu nešto zamjetnijim promjenama uslijed zagrijavanja ($\Delta\delta \sim 0{,}5$ ppm).



Slika 82. Koncentracijska ovisnost [*lijevo;* ■ (NH^1_{Fn}) □ (NH^2_{Fn}) → **31**, • (NH_{Fn}) → **32**] i temperaturna ovisnost [*desno;* ■ (NH^1_{Fn}) □ (NH^2_{Fn}) → **31**, • (NH_{Fn}) → **32**] amidnih protona NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn} dipeptida **31** i **32**

S obzirom da je na temelju predhodnih eksperimenata isključena mogućnost participacije analiziranih NH-skupina u intermolekulskim vodikovim vezama, njihove visoke temperaturne ovisnosti $\Delta\delta/\Delta T$ upućuju na postojanje inicijalno zaklonjenih uređenih

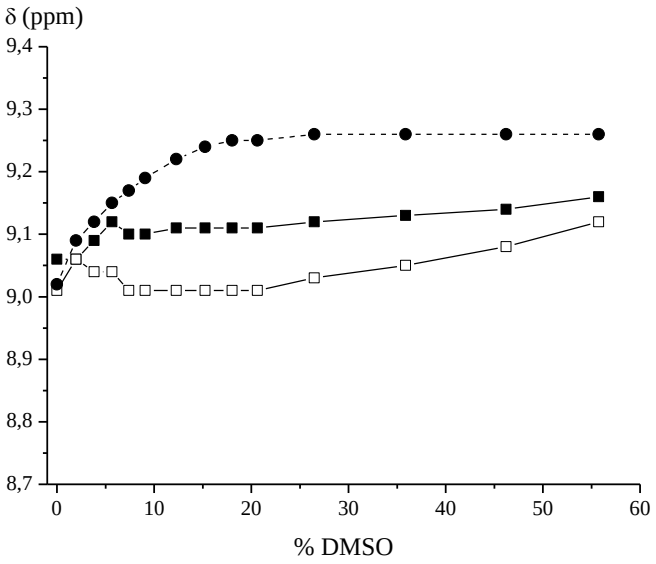
konformacija putem IHB koje se tijekom zagrijavanja cijepaju što uzrokuje odmotavanje peptidnog lanca i izlaganje otapalu (tablica 40).[205]

Tablica 40. Temperaturne ovisnosti kemijskih pomaka[a] ferocenskih peptida **31**-**32**

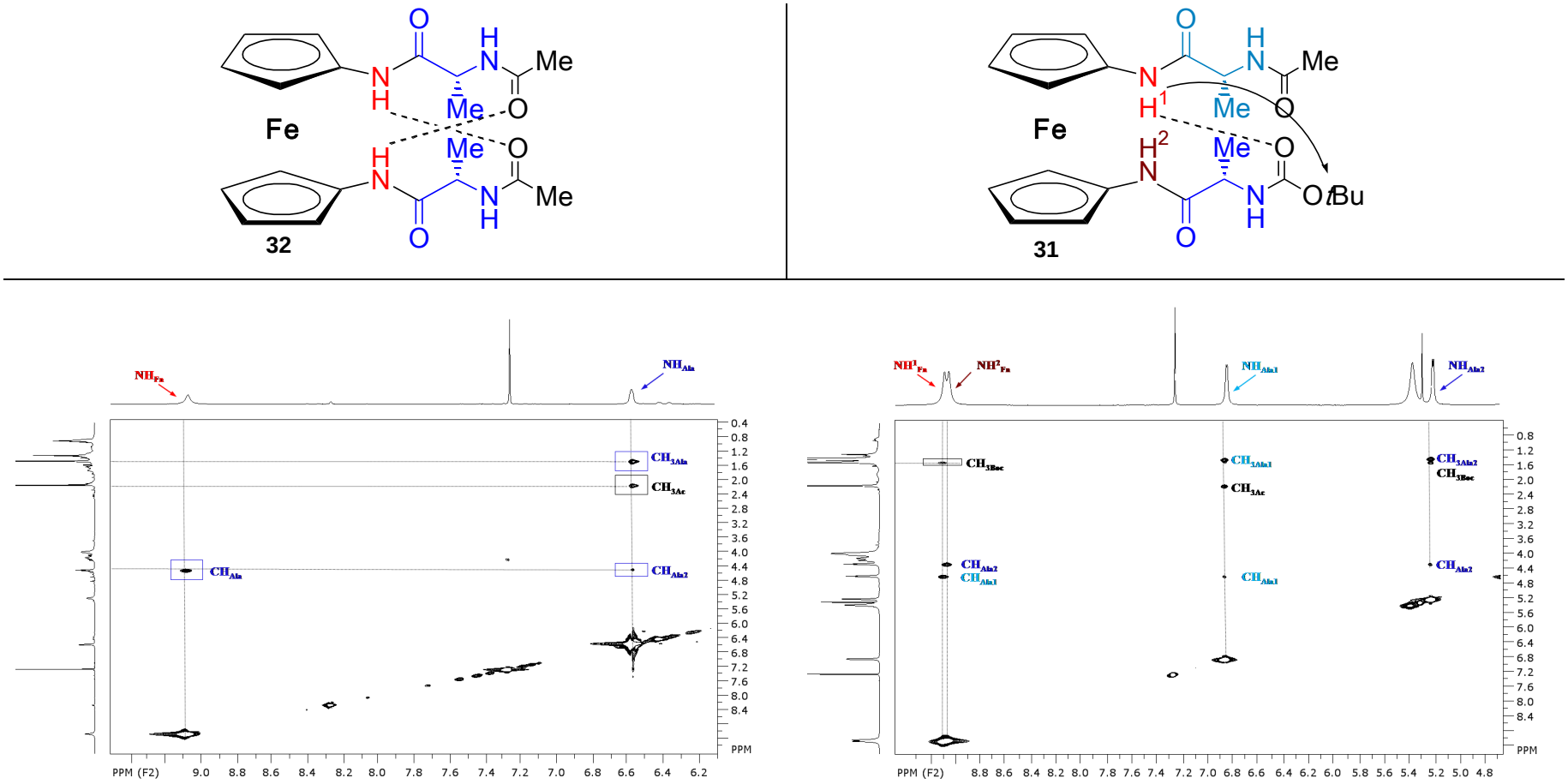
Spoj	**Formula**	**δ (ppm)**		**Δδ/ΔT (ppb/K)**	
		NH^1_{Fn}	NH^2_{Fn}	NH^1_{Fn}	NH^2_{Fn}
31	Ac-L-Ala-NH^1-Fn-NH^2-L-Ala-Boc	9,06	9,02	-7,85	-7,14
32	Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Ala-Ac	9,04		-8,57	

[a]NMR-spektri mjereni su u $CDCl_3$ (c = 2,5×10^{-2} M) u temperaturnom rasponu od 258 do 328 K.

Titracijom 25 mM otopina biokonjugata **31** i **32** u $CDCl_3$ s DMSO ispitana je jakost pretpostavljenih IHB koje se s obzirom na malu promjenu kemijskih pomaka NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn} (Δδ < 0,3 ppm) u prisutnosti polarnog otapala (1,96-56%) mogu opisati kao jake IHB (slika 83).



Slika 83. Titracija tetrapeptida **31** i **32** [■ (NH^1_{Fn}) □ (NH^2_{Fn}) → **31**, • ($NH^1_{Fn,}$ NH^2_{Fn}) → **32**] s DMSO



Slika 84. Predložene konformacije u peptidima **31-32** (NOE-kontakti označeni su kvadratićima, a predložene IHB crticama)

NOE-kontakt NH^1_{Fn}–$(CH_3)_{3Boc}$ podržava $NH^1_{Fn}\cdots OC_{Boc}$ IHB pronađenu kako u čvrstom stanju tako i u konformaciji **31A**. Izostanak kontakta NH^2_{Fn}–CH_{3Ac} očekivanog prema rezultatima IR- i NMR-spektroskopskih analiza ne iznenađuje s obzirom na prostornu orijentaciju spomenutih skupina što je vidljivo iz priloženog DFT-modela (slika 81) pa možemo pretpostaviti tvorbu $NH^2_{Fn}\cdots OC_{Ac}$ IHB. Zbog C_2-simetrije dipeptida **32** dolazi do preklapanja signala u ^{1}H-NMR spektru, što onemogućava točno asigniranje NOE-kontakata. Međutim, na temelju dobivenih rezultata i DFT-modeliranja može se pretpostaviti sličan konformacijski motiv **32A** temeljen na interlančanim interakcijama NH-skupina iz Fcda i *N*-terminalnih CO-skupina ($NH_{Fn}\cdots OC_{Ac}$ IHB).

4.3.5.6. CD-spektroskopija dipeptidâ 31 i 32

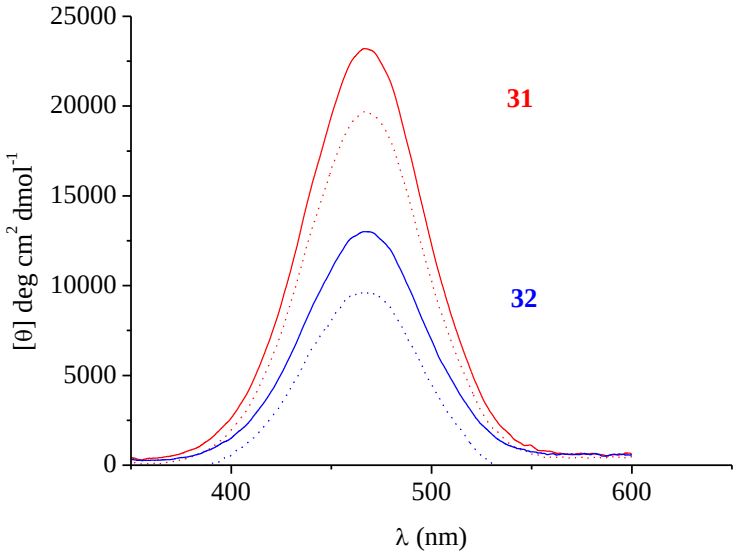
U CD-spektrima (CH_2Cl_2) ferocenskih dipeptida **31** i **32** uočene su karakteristične apsorpcijske vrpce pri 468 nm odnosno 466 nm, čiji maksimumi pozitivnoga predznaka i jakog intenziteta sugeriraju prisutnost jakih intramolekulskih vodikovih veza (tablica 41).

Tablica 41. UV/Vis-signali i CD-vrpce **31** i **32**

Spoj	**Formula**	**λ_{max} / nm**		**[θ]/ deg cm^2 dmol^{-1}**	
		CH_2Cl_2	CH_2Cl_2 + DMSO	CH_2Cl_2	CH_2Cl_2 + DMSO
31	Ac-L-Ala-NH^1-Fn-NH^2-L-Ala-Boc	468	466	20695	19683
32	Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Ala-Ac	466	467	13487	9600

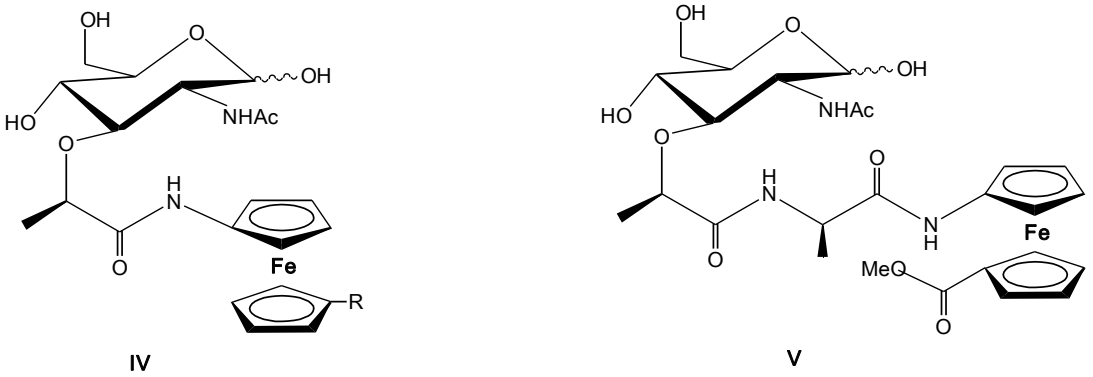
[a]CD-spektri mjereni su u CH_2Cl_2 (c = 5×10^{-3}M) te u CH_2Cl_2 (c = 5×10^{-3}M) s 20 % DMSO.

Jakost *intramolekulskih* vodikovih veza u diklormetanskoj otopini ispitana je dodatkom 20% DMSO. Kompeticijsko otapalo prouzročilo je smanjenje Cottonova efekta spoja **31** za 5%, odn. za 28 % (**32**) čime je djelomice narušeno kiralno uređenje kidanjem jakih *intramolekulskih* vodikovih veza (slika 85).



Slika 85. CD-spektri peptida **31** i **32** u CH_2Cl_2 [c = 5×10^{-3}M (puna crta)] i uz dodatak 20 % DMSO (isprekidana crta)

U *Literaturnom dijelu* disertacije dan je pregled prethodno opisanih konjugata ferocenâ s različitim ugljikohidratima te su prikazani analozi i derivati muramildipeptida (MurNAc-L-Ala-D-izoGln, MDP) (*v.* 2.4.2. i 2.4.3.). Kako se pokazalo da kemijske modifikacije glukopiranoznog prstena i/ili prirodne peptidne sekvence iz MDP značajno utječu na njegova biološka svojstva, a imajući na umu da do sada nisu poznati ferocenom modificirani muropeptidi, odlučili smo pripraviti ferocenske analoge MDP **IV** i **V** prikazane na slici 86. Za očekivati je da će umetanje ferocena, dokazanog začetnika okretâ, utjecati na konformacijski prostor rezultirajućih biokonjugata.



Slika 86. Ferocenski konjugati s muraminskom kiselinom **IV** i **V**

4.4. PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA ANALIZA *O*-ZAŠTIĆENIH *N*-Ac-Mur-OMe (38) I *N*-Boc-Mur-OMe (43)

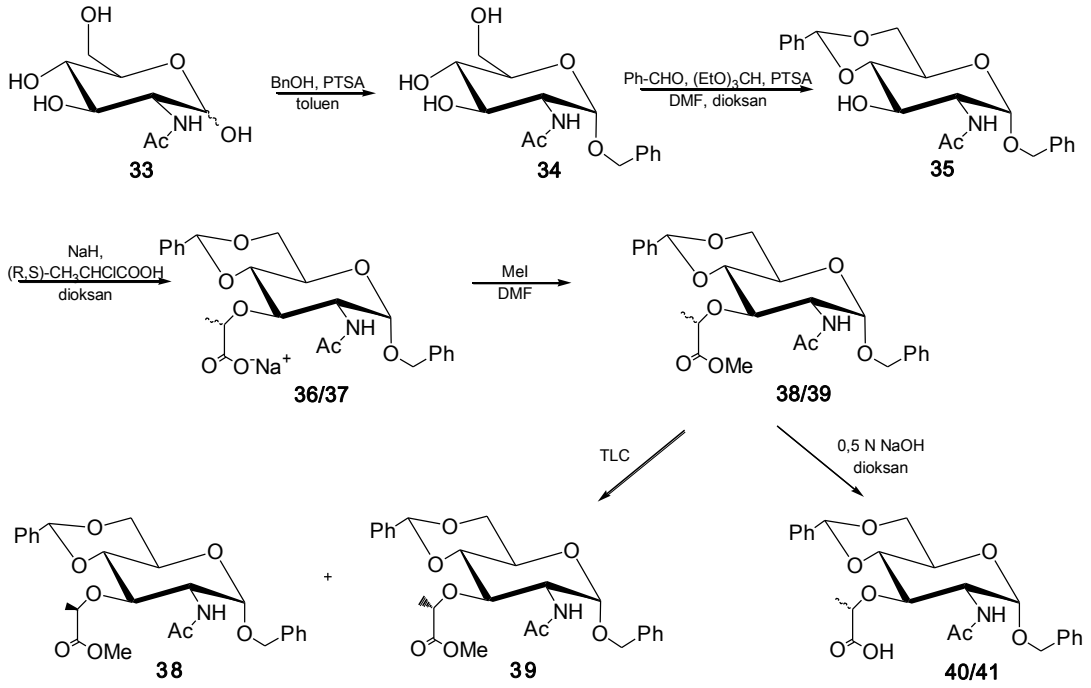
Kako je spomenuto u poglavlju 2.4.1., muraminska kiselina, konstituent muramil-dipeptida, može se primijeniti kao biomarker za detekciju bakterija u ljudskom organizmu.[75-77] Sintezu *O*-zaštićenog *N*-Ac-Mur-OMe (**38**) (popraćenu tvorbom dijastereomernog estera *N*-Ac-izoMur-OMe (**39**), opisanu u više publikacija,[240-242] proveli smo iz D-glukozaminhidroklorida **33** modifikacijom Jeanloz/Flowersova postupka (shema 28).[87]

Priprava modificiranih muropeptida izvedenih iz spoja **43** čija je sinteza planirana u nastavku istraživanjâ započetih u ovoj disertaciji (shema 29), zahtijeva kopulaciju *N*-zaštićene Fca s *C*-zaštićenom muraminskom kiselinom, za što je potrebno pogodno zaštititi *N*-terminus šećerne podjedinice. Naime, imajući na umu da bi reakcijski uvjeti potrebni za standardnu deprotekciju acetamidne zaštitne skupine (refluksiranje u konc. HCl/ 24 sata) mogli utjecati na ostale osjetljive funkcijske skupine iz glukopiranoze, odlučili smo izvesti pretvorbu *N*-Ac-Mur-OMe (**38**) u *N*-Boc-Mur-OMe (**43**) čija *N*-deprotekcija zahtijeva puno blaže uvjete (TFA

/ CH_2Cl_2). Transformaciju acetamidne skupine iz **38** u karbamatnu skupinu analoga **43** proveli smo primjenom postupaka opisanih u literaturi (shema 29). [243,244]

4.4.1. Sinteza *O*-zaštićenih *N*-Ac-Mur-OMe (38) i *N*-Boc-Mur-OMe (43)

Sinteza potpuno zaštićene *N*-acetilmuraminske kiseline (*N*-Ac-Mur-OH, **40**) i *N*-acetilizomuraminske kiseline (*N*-Ac-izoMur-OH, **41**) prikazana je na shemi 28. Benziliranjem komercijalno dostupnog α-D-*N*-acetilglukozamina (**33**) u smjesi benzil-alkohola i toluena i u prisutnosti *p*-toluensulfonske kiseline zaštićena je anomerna hidroksilna skupina te je izoliran optički čisti α-anomer **34** (79%). Njegovim miješanjem s benzaldehidom u prisutnosti trietilortoformata i *p*-toluensulfonske kiseline uvedena je benzilidenska zaštita na C_4- i C_6-hidroksilne skupine pri čemu je rezultirao *O*-1,4,6-zaštićeni derivat **35** (82%). Reakcijom slobodne C_3-hidroksilne skupine s racemičnom 2-klor-propionskom kiselinom dobivena je smjesa dijastereomernih soli **36/37** koja je djelovanjem MeI prevedena u smjesu dijastereomernih esterâ *N*-Ac-Mur-OMe (**38**) i *N*-Ac-izoMur-OMe (**39**) (68%).



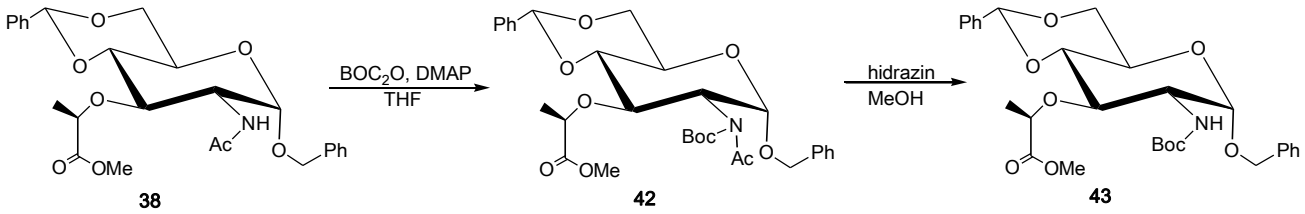
Shema 28. Sinteza *O*-zaštićenih *N*-Ac-Mur-OH (**40**) i *N*-Ac-izoMur-OH (**41**)

Za potrebe NMR-spektroskopske analize dio ove smjese razdvojen je tankoslojnom preparativnom kromatografijom (CH_2Cl_2 : EtOAc = 5 : 1) pri čemu su izolirani esteri **38** (R_f = 0,5) i **39** (R_f = 0,2) u omjeru 3 : 1. Alkalnom hidrolizom esterske smjese **38**/**39** u dioksanu

pripravljeno je 98% dijastereomerne smjese *O*-zaštićenih *N*-Ac-Mur-OH (**40**) i *N*-Ac-izoMur-OH (**41**) (shema 28). IR- i NMR-spektralni podaci pripravljenih spojeva u skladu su s literaturnim navodima.[240,241]

Primjenom postupka opisanog u literaturi[245] (shema 29), *N*-Ac-Mur-OMe (**38**) djelovanjem BOC_2O i DMAP preveden je u imid **42** koji se potom selektivno hidrolizira u prisutnosti N_2H_4 u *N*-Boc-Mur-OMe (**43**).[246]

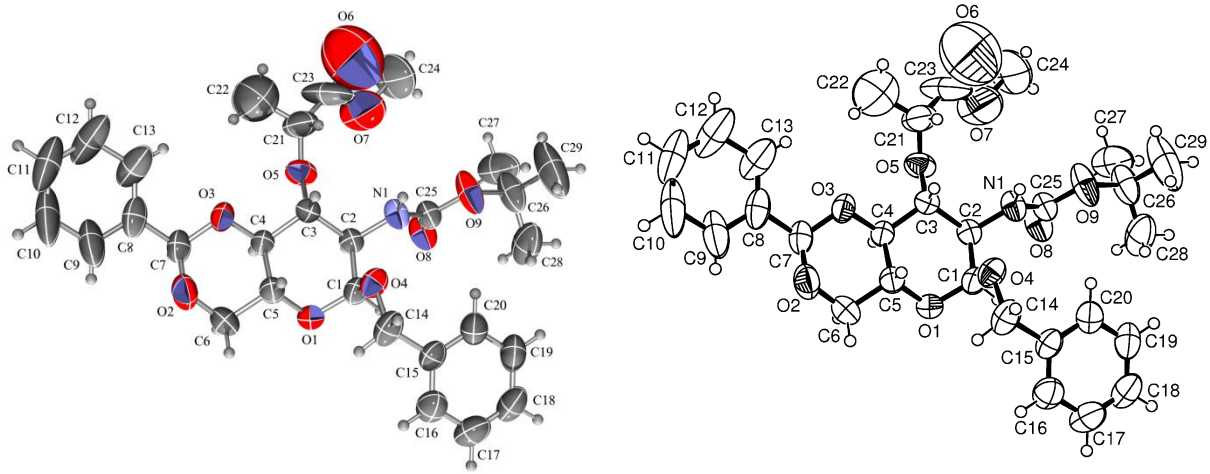
46

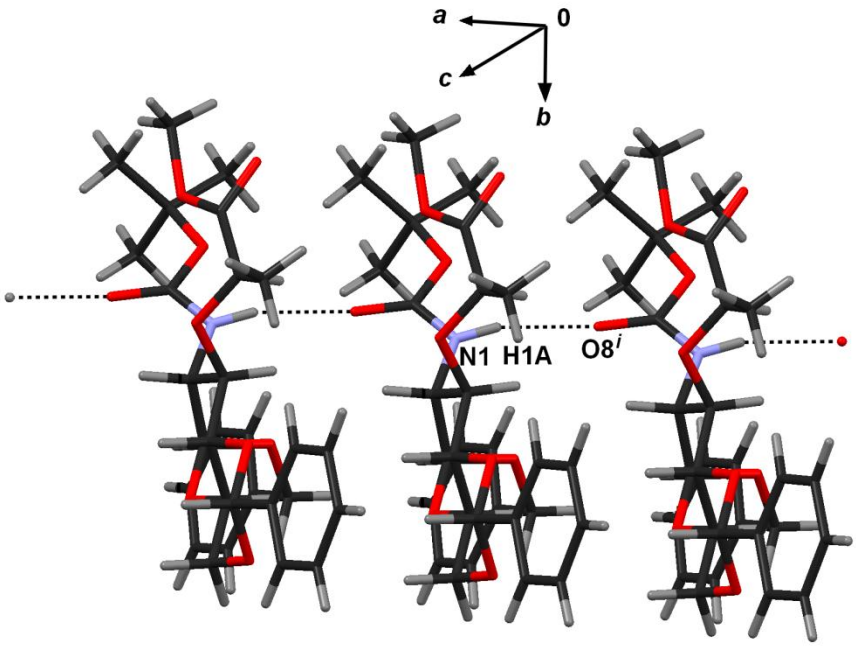


Shema 29. Sinteza *N*-Boc-Mur-OMe (**43**)

4.4.2. Kristalografska analiza *N*-Boc-Mur-OMe (43)

U kristalnoj strukturi *N*-Boc-Mur-OMe (**43**) ne postoji intramolekulska vodikova veza (slika 87). Susjedne se molekule povezuju intermolekulskom vodikovom vezom između $NH_{Boc}\cdots OC_{Boc}$ koja stabilizira konformacije nađene u čvrstom stanju.

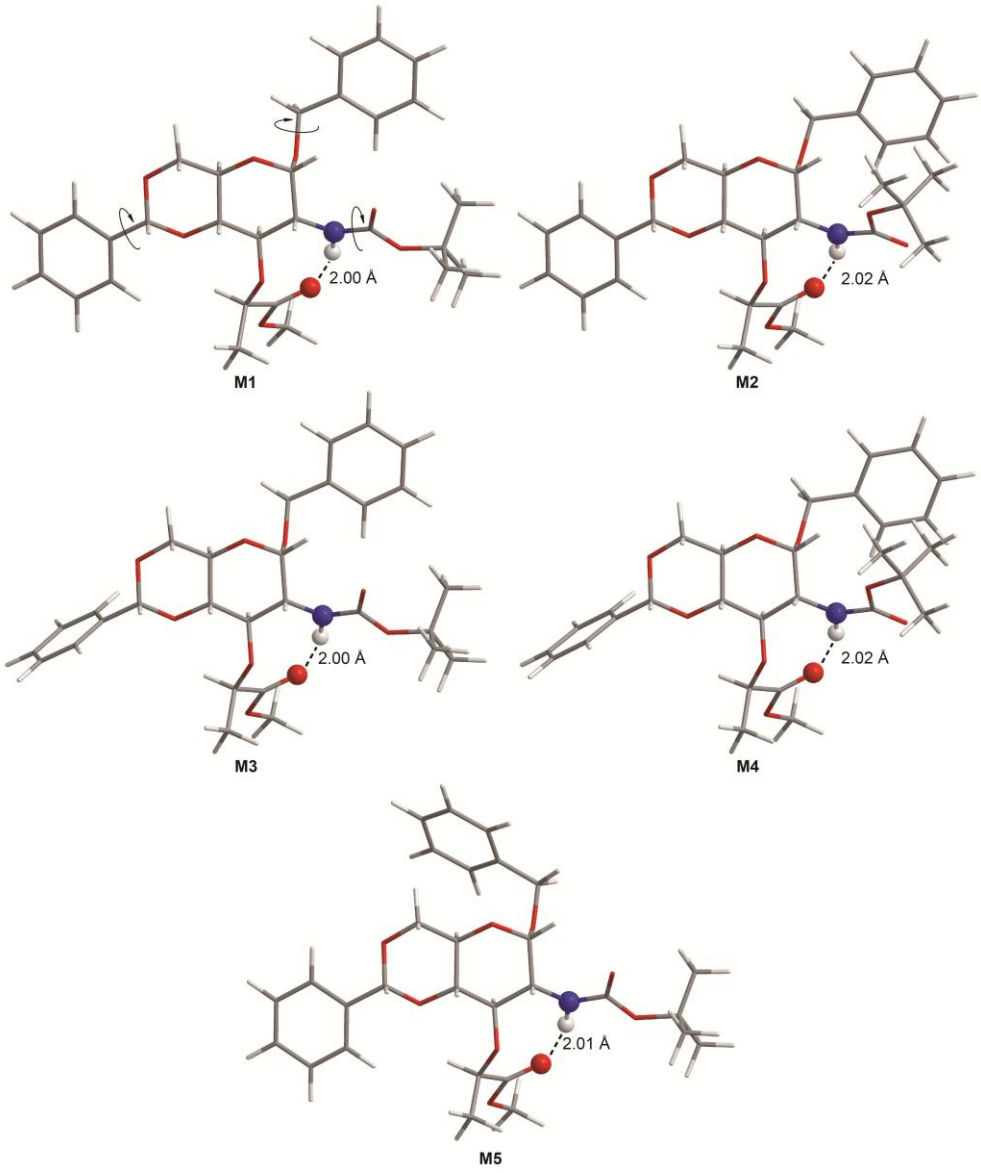




Slika 87. ORTEP-dijagrami *N*-Boc-Mur-OMe (**43**) (*gore*); intermolekulske vodikove veze u kristalu, parametri vodikove veze: *d* (N1-H1A) = 0,86 Å; *d* (H1A···O8^{i}) = 2,13 Å; *d* (N1···O8^{i}) = 2,951(4) Å; (N1-H1A···O8^{i}) = 159°.

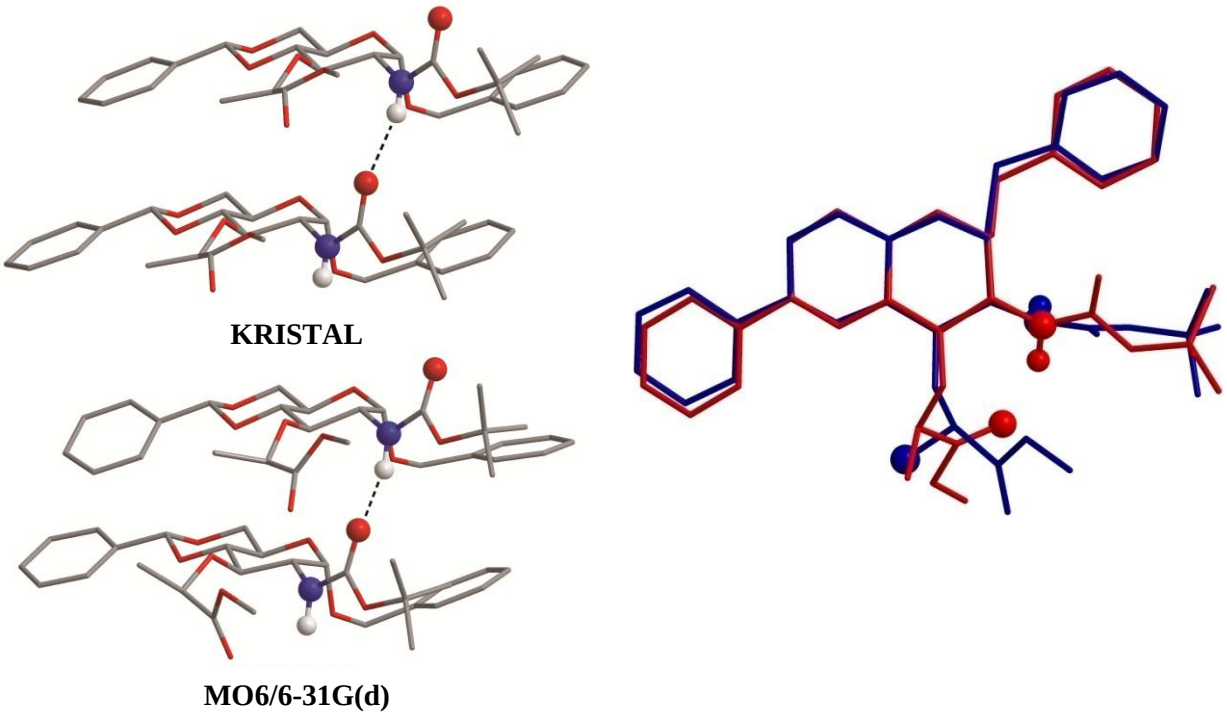
4.4.3. DFT-modeliranje *N*-Boc-Mur-OMe (43)

Set najstabilnijih konformerâ izračunat primjenom MO6 i MO6-2X funkcionala (u vakuumu i $CHCl_3$) obuhvaća konformere koji zatvaraju 8-člani prsten između karbamatne amino-skupine i esterske karbonilne skupine tvoreći *intramolekulsku vodikovu vezu* $NH_{Boc}\cdots OC_{COOMe}$ (slika 88). Konformeri (**M1-M5**) razlikuju se po torzijskim kutOvima definiranim grupama koje mogu rotirati oko rigidne bicikličke podjedinice te je izražajnija destabilizacija posljedica rotacije fenilne ili benzilne skupine (slike 88): npr. relativna razlika u energiji imeđu konformera **M1** i **M3** (razlikuju se po orijentaciji fenilne skupine) iznosi ~ 1,20 kJ mol^{-1}u $CHCl_3$ i 2,04 kJ mol^{-1}u vakuumu.



Slika 88. Najstabilniji konformeri **43** optimizirani M06/6-31G(d) funkcionalom u $CHCl_3$ s prikazanim duljinama vodikovih veza

Nepostojanje intramolekulske vodikove veze u čvrstom stanju potaknulo nas je na istraživanje slaganja monomera u kristalnoj strukturi: dimerna jedinica povezana intermolekulskom vodikovom vezom izrezana je iz kristalne rešetke i optimizirana na istoj razini teorije kao i prethodno opisana monomerna jedinica, *i.e.* M06/6-31G(d) (slika 89, *lijevo*). Može se zaključiti da je energija proistekla iz formiranja intramolekulske vodikove veze u monomeru približno jednaka razlici u energijama dvaju optimiziranih konformera na slici 89 (*desno*). Zaključno, dokazano je da vodikove veze (inter- ili intramolekulske) osobito doprinose stabilizaciji proučavanih sustava.



Slika 89. Dimer spoja **43** iz kristalne rešetke (*gore lijevo*) i optimizirani konformer (*dolje lijevo*); superpozicija optimiziranog monomera iz kristalne rešetke (plavo, bez IHB) sa sličnim najstabilnijim konformerom **43** (crveno, s IHB)

4.4.4. IR-spektroskopska analiza *O*-zaštićenih *N*-Ac-Mur-OMe (38) i *N*-Boc-Mur-OMe (43)

Mogući utjecaj voluminozne Boc-zaštitne skupine na vodikovu vezu prethodno nađenu u Ac-analogu ($NH_{Ac}...OC_{COOMe}$)[85,86] ispitali smo IR- i NMR-spektroskopijom. IR-spektri *N*-Ac-Mur-OMe (**38**) i *N*-Boc-Mur-OMe (**43**) u amidnom području sadrže dva seta signala: istezne vrpce iznad i ispod 3400 cm^{-1}indiciraju prisutnost slobodnih i asociranih NH-skupina (tablica 42). Položaj esterskih karbonilnih skupina (~ 1730 cm^{-1}) ukazuje na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama. IR-spektri spojeva **38** i **43** snimljeni u čvrstom stanju sadrže isključivo vrpce asociranih NH- i CO-skupina.

Rezultati koncentracijski-ovisne IR-spektoskopske analize (podjednako slabljenje intenziteta vrpci slobodnih i asociranih NH-skupina) ukazuju na intramolekulsku prirodu vodikovih veza (tablica 43).

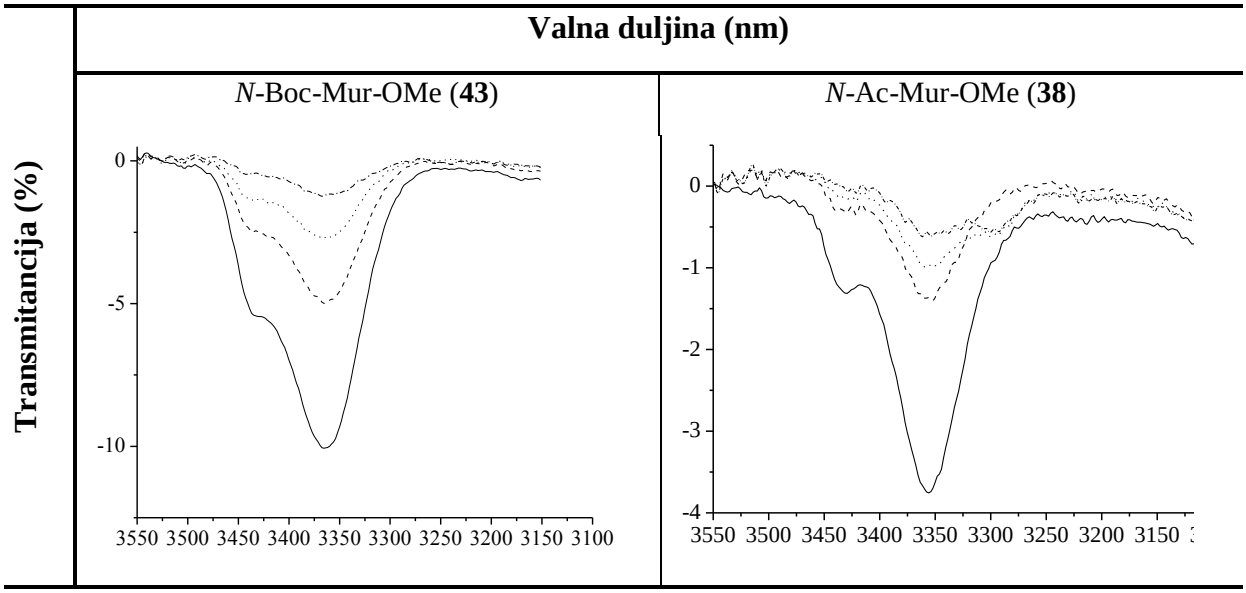
Tablica 42. Istezne vibracije[a] NH- i CO-skupina spojeva **38** i **43**

Spoj	Formula		ν_{NH} (slob.)[b]	ν_{NH} (asoc.)[c]	ν_{CO} (ester)	ν_{CO} (amid I)	ν_{CO} (amid II)
38	*N*-Ac-Mur-OMe	CH_2Cl_2	3431sl	3356sr	1732j	1674j	1536j
		CsI		3300sr	1737j	1657j	1562j
43	*N*-Boc-Mur-OMe	CH_2Cl_2	3438sl	3365sr	1733j	1709j	1514j
		KBr		3355sr	1728j	1692j	1534j

[a]IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2, $c = 5\times10^{-2}$ M, te na CsI- i KBr-pastilama.

Nešto veći udio asociranih NH-skupina u IR-spektru Ac-analoga **38** u odnosu na Boc-analog **43** pripisuje se nepovoljnom utjecaju voluminozne Boc-zaštitne skupine.

Tablica 43. Koncentracijski ovisni IR-spektri[a] spojeva **38** i**43**



[a] IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2, [(—) $c = 5\times10^{-2}$ M, (----) $c = 2{,}5\times10^{-2}$ M, (····) $c = 1{,}25\times10^{-2}$ M, (-·-·) $c = 6{,}13\times10^{-3}$ M].

4.4.5. NMR-spektroskopska analiza *O*-zaštićenih *N*-Ac-Mur-OMe (38) i *N*-Boc-Mur-OMe (43)

Visoki kemijski pomak amidnog protona iz *N*-Ac-Mur-OMe (**38**) (δ = 7,49 ppm) podržava pretpostavku o njegovom sudjelovanju u vodikovim vezama. Niži kemijski pomak amidnog protona iz **43** (δ = 6,02 ppm) može se pripisati njegovom ponešto otežanom sudjelovanju u IHB, što je u skladu s nalazima IR-spektroskopske analize (tablica 44).

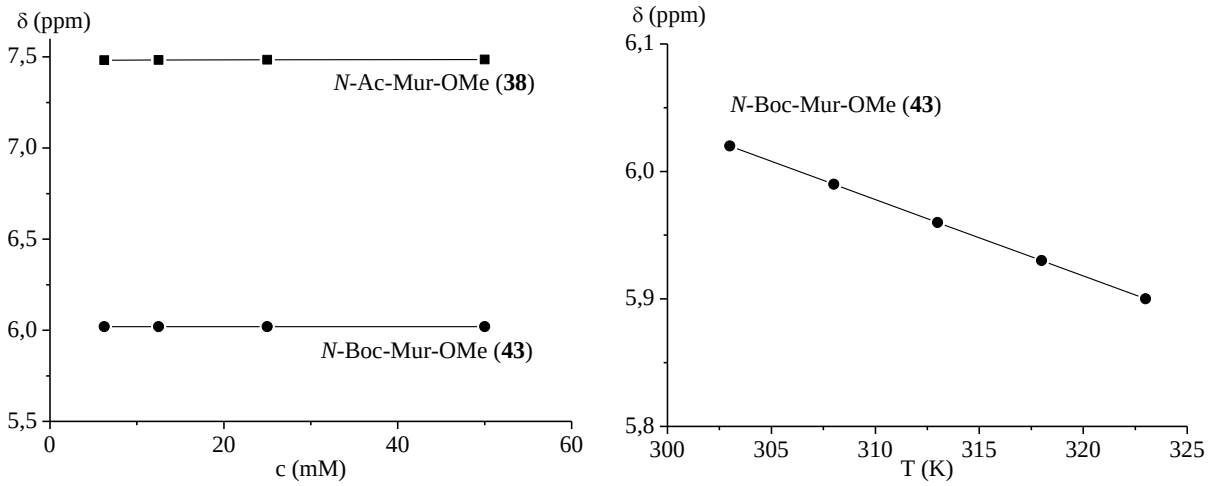
Da bi se ustanovila jakost indiciranih IHB, utvrđene su razlike kemijskih pomaka (Δδ) amidnih protona mjerenih u DMSO i $CDCl_3$. Polarna otapala cijepaju slabe IHB i solvatiraju peptid uzrokujući pomak signala NH-skupina u niže polje. Istovremeno dodatak polarnog otapala ne utječe na kemijski pomak amidnih protona uključenih u jake IHB. U našim prethodnim konformacijskim analizama ferocenskih peptida[23-35] ustanovili smo Δδ vrijednosti karakteristične za jake (-0,20 − 0,20 ppm), srednje jake (0,6 − 0,9 ppm) odn. slabe IHB (Δδ ~ 1 ppm), dok više razlike kemijskih pomaka (Δδ > 1 ppm) karakteriziraju amidne protone koji ne sudjeluju u HB. Kako se dodatkom DMSO nije zabilježio signifikantan pomak signala amidnih protona iz *N*-Ac-Mur-OMe (**38**) (Δδ= 0,34 ppm) i *N*-Boc-Mur-OMe (**43**) (Δδ= 0,57 ppm), indicirano je njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama srednje jakosti.

Tablica 44. Kemijski pomaci (δ)[a] amidnih protona spojeva **38** i **43**

Spoj	**Formula**	**Otapalo**	**(NH) δ (ppm)**	**$\Delta\delta_{NH}$**
38	*N*-Ac-Mur-OMe	$CDCl_3$	7,49	0,34
		DMSO	7,83	
43	*N*-Boc-Mur-OMe	$CDCl_3$	6,02	0,57
		DMSO	6,59	

[a]NMR-spektri snimljeni su u $CDCl_3$ i DMSO pri $c = 5\times10^{-2}$ M i 298 K.

Imajući na umu da se razrjeđivanjem ili zagrijavanjem kidaju intermolekulske vodikove veze provedena je koncentracijski- i temperaturno-ovisna NMR-analiza. Postupno smanjenje koncentracije (50-6,25 mM) obaju uzoraka nije utjecalo na kemijske pomake amidnih protona (slika 90, *lijevo*) čime je indicirano njihovo sudjelovanje u *intramolekulskim* vodikovim vezama.

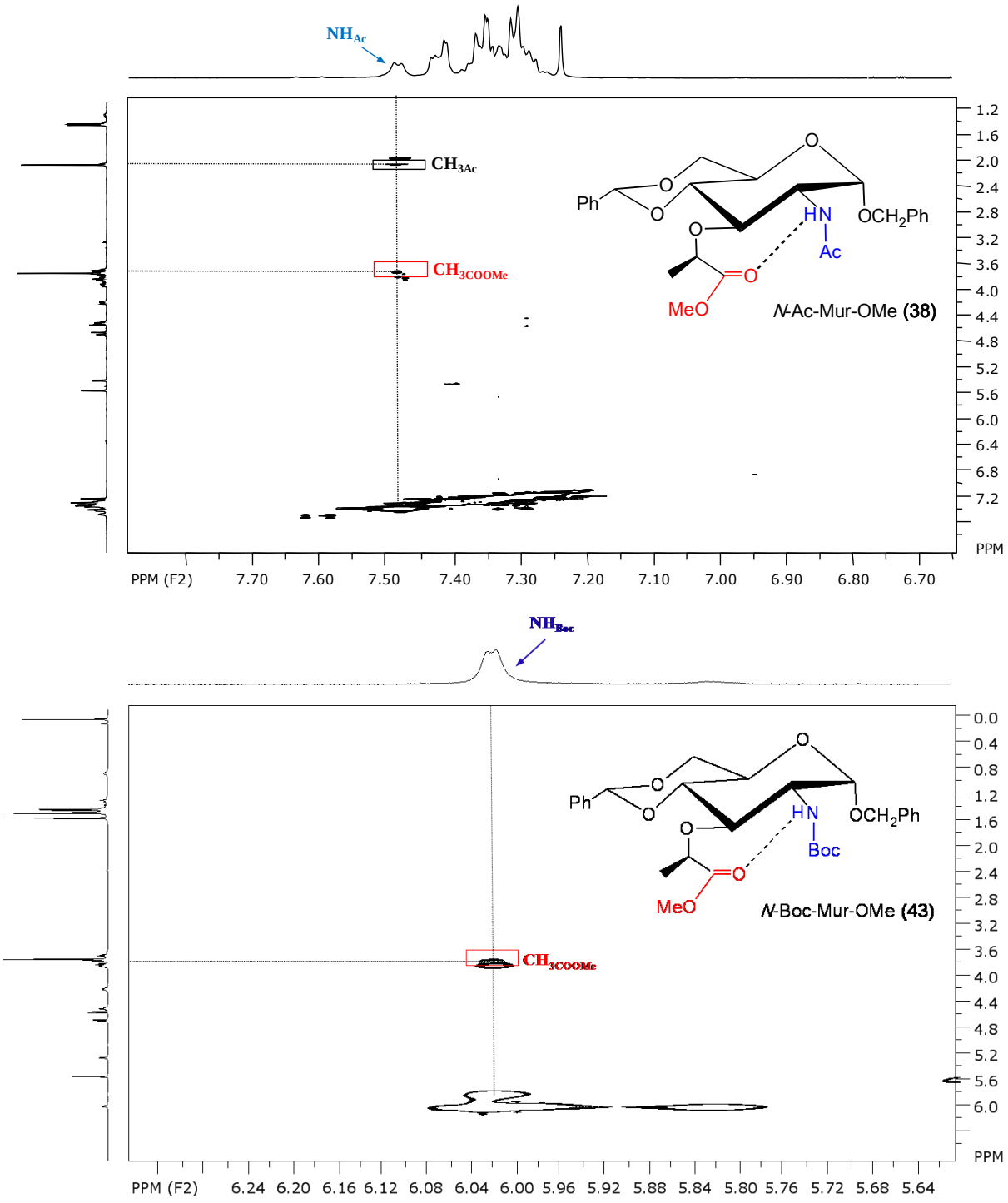


Slika 90. Koncentracijska- [*lijevo;***38** ■(NH); **43**•(NH)] i temperaturna-ovisnost [*desno;***43**•(NH)] amidnih protona spojeva **38** i **43**

Budući da su na temelju koncentracijski-ovisnih IR- i NMR-mjerenja isključene intermolekulske asocijacije, a uzimajući u obzir da povišenje temperature nije znatno utjecalo na kemijski pomak amidnog protona ($\Delta\delta$ = 0,12 ppm) iz *N*-Boc-Mur-OMe (**43**), izračunata visoka temperaturna ovisnost ($\Delta\delta/\Delta T$ = -6 ppb) pokazatelj je početno zaklonjenih struktura uređenih intramolekulskim vodikovim vezama koje su tijekom eksperimenta postale izložene otapalu.[205]

U NMR-NOESY spektrima obaju spojeva (slika 91) vidljivi su kontakti amidnih protona s esterskom metilnom skupinom, čime je dodatno potvrđena pretpostavka o tvorbi intramolekulske vodikove veze koja zatvara 8-člani prsten.

Zaključno, *N*-Boc-Mur-OMe (**43**) u čvrstom stanju i u otopini poprima dva različita obrasca vodikovih veza u kojima je donor vodikove veze isti (NH_{Boc}), a akceptor vodikove veze u otopini je esterska karbonilna skupina, dok je to u čvrstom stanju ista karbonilna skupina, ali iz susjedne molekule što rezultira tvorbom beskonačnih lanaca u čvrstom stanju.



Slika 91. Predložene konformacije 8-članog prstena u *N*-Ac-Mur-OMe (**38**) i *N*-Boc-Mur-OMe (**43**); dio ^{1}H-NMR-spektra **38** (*gore*) i **43** (*dolje*) (NOE-kontakti označeni su kvadratićima, a predložene IHB crticama)

4.5. PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA ANALIZA FEROCENSKIH MUROPEPTIDA *N*-Ac-Mur-NH-Fc (44) I *N*-Ac-izoMur-NH-Fc (45), *N*-Ac-Mur-NH-Fn-COOMe (46) I *N*-Ac-izoMur-NH-Fn-COOMe (47) TE *N*-Ac-Mur-NH-Fn-NHAc (48)

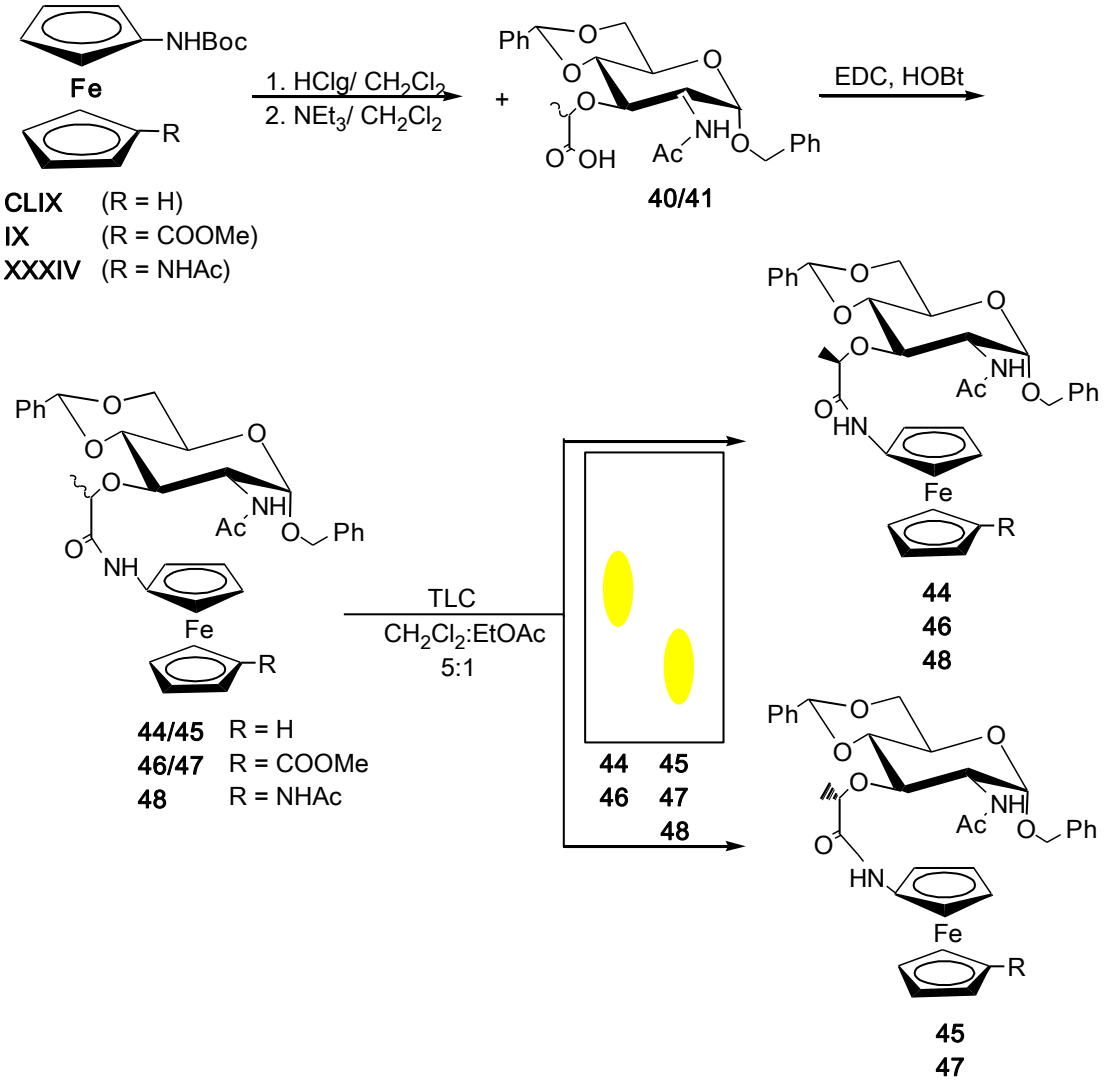
U cilju priprave i strukturne karakterizacije ferocenom modificiranih muropeptida **IV** i **V** (slika 86), kopulirali smo *O*-zaštićene *N*-Ac-Mur-OH (**40**) i *N*-Ac-izoMur-OH (**41**) s mono- i disupstituiranim derivatima ferocenskih amina **CLIX**, **IX** i **XXXIV** (shema 30).[247] Ferocenski fragmenti u takvim konjugatima dizajnirani su tako da na slobodnom ciklopentadienilnom prstenu (*i*) ne sadrže niti donore niti akceptore vodikove veze (**CLIX**, R = H), (*ii*) sadrže akceptorsku skupinu (**IX**, R = COOMe) ili (*iii*) sadrže donorsku i akceptorsku skupinu (**XXXIV**, R = NHAc). Za očekivati je da će ciklopentadienilni supstituenti imati utjecaja ne samo na sekundarnu suktrukturu, nego i na biološka svojstva izvedenih muropeptida modifikacijom njihovog 3D oblika, lipofilnosti i metaboličke stabilnosti. Poznato je da elektron-odvlačeća, odn. elektron-donirajuća priroda supstituenata R[248,249]utječe na redoks-potencijal para ferocen/fericinijev ion pa bi se modifikacijom supstituenata ovi derivati mogli primijenjivati za elektrokemijsku detekciju interakcija između proteina i ugljikohodrata.[65,68]

Kako je već opisano (*v.* 2.4.1., 3.3.3 i 4.9) sinteza muraminske kiseline (**40**) u prisutnosti racemičnih alkil-halogenida rezultira i njezinim dijastereomerom, izomuraminskom kiselinom (**41**). Kondenzacija ferocenskih amina [Fc-NH_2 (**CLIX**), NH_2-Fca-OMe (**IX**) te NH_2-Fn-NHAc (**XXXIV**)] s dijastereomernom smjesom *O*-zaštićenih *N*-Ac-Mur-OH (**40**) i *N*-Ac-izoMur-OH (**41**) provedena je korištenjem uobičajenog postupka EDC / HOBt (shema 30). Kako su dijastereomeri **40** i **41** pokazali različitu mobilnost na silikagelu, ferocenske smo amine kondenzirali sa smjesom **40**/**41** te smo na temelju različite R_f - vrijednosti žuto obojenih zona rezultirajućih konjugata **44**/**45** i **46**/**47** proveli njihovu separaciju.

4.5.1. Sinteza ferocenskih muropeptida 44-48

Boc-zaštićeni ferocenski amini BocNH-Fn-R [**CLIX** (R = H), **IX** (R = COOMe), **XXXIV** (R = NHAc)] pripravljeni su prema postupcima utvrđenima u našem Laboratoriju.[23,26,51] Primjenom standardne metode EDC / HOBt, aktivirani su *C*-terminusi iz

dijastereomerne smjese šećernih aminokiselina **40/41** te su im uz hlađenje dodavani mali obroci netom deprotektiranih ferocenskih amina H_2N-Fn-R (deprotekcija je provedena djelovanjem plinovitog HCl u CH_2Cl_2 uz naknadnu obradu hidroklorida s NEt_3). Naime, pokazalo se *(i)* da su ferocenski amini nestabilni, odnosno podložni intermolekulskoj polimerizaciji što se na TLC-pločici detektira multipliciranjem žuto obojenih mrlja te *(ii)* da se vrijeme potrebno za kondenzaciju ferocenskih amina s različitim aminokiselinama produljuje razmjerno veličini aminokiseline s kojom stupa u reakciju (primjerice, kondenzacija ferocenske aminokiseline s Ala završena je nakon nekoliko minuta, dok s Phe traje nekoliko sati).[250] Napredovanje reakcije pratili smo tankoslojnom preparativnom kromatografijom (TLC) te smo novi obrok svježe deprotektiranog amina dodavali nakon potpune konzumacije prethodnog obroka amina.



Shema 30. Sinteza ferocenskih muropeptida **44-48**

Nastale dijastereomerne smjese ferocenskih muropeptida **44/45** i **46/47** te muropeptid **48** (TLC-om nismo detektirali nastanak njegovog dijastereomernog para) izolirali smo iz reakcijskih smjesa obradom s $NaHCO_3$, 10%-tnom limunskom kiselinom i zasićenom otopinom NaCl. Razdvajanje dijastereomera proveli smo tankoslojnom preparativnom kromatografijom (CH_2Cl_2 : EtOAc = 5 : 1) pri čemu je zaostalo 61% *N*-Ac-Mur-NH-Fc (**44**, R_f = 0,66) i 62% *N*-Ac-izoMur-NH-Fc (**45**, R_f = 0,33); 71% *N*-Ac-Mur-NH-Fn-COOMe (**46**, R_f = 0,63) i 65% *N*-Ac-izoMur-NH-Fn-COOMe (**47**, R_f = 0,25), dok je *N*-Ac-Mur-NH-Fn-NHAc (**48**, R_f = 0,33) dobiven u 45%-tnom iskorištenju (shema 30). Pripisivanje retencijskih faktora pojedinom dijastereomeru postignuto je usporedbom s retencijskim faktorima male količine svakog biokonjugata koji je dobiven reakcijom ferocenskog amina (**CLIX**, **IX** i **XXXIV**) s dijastereomerno čistom muraminskom, odn. izomuraminskom kiselinom.

Retencijski faktori odražavaju polarnost, tj. lipofilnost konjugata, ključnog preduvjeta za potencijalnu farmakološku primjenu. Na temelju R_f-vrijednosti, može se zaključiti da je **45** polarniji od svog dijastereomera **44**, dok uvođenje esterske skupine gotovo neznatno povećava polarnost [R_f = 0,66 (**44**) →R_f = 0,63 (**46**) i R_f = 0,33 (**45**) →R_f = 0,25 (**47**)]. NHAc-skupina u konjugatu **48** (R_f = 0,33) znatno utječe na polarnost, pa je ovaj muropeptid znatno polarniji od **44** (R_f = 0,66) i **46** (R_f = 0,63).

Da bismo što kvalitetnije proveli konformacijsku analizu, osim spektroskopske analize pripravljenih di- i triamida **44-48**, u narednim poglavljima prikazat ćemo i rezultate spektroskopskih mjerenja ugljikohidratnih prekursora **38** i **39**.

4.5.2. IR-spektroskopska analiza muropeptida 44-48

U IR-spektrima ispitivanih muropeptida **44-48** peptida te njihovih ugljikohidratnih prekursora **38** i **39** javljaju se vrpce slobodnih i asociranih NH-skupina (tablica 45). Omjer jakosti tih vrpci sličan je u svim ispitanim biokonjugatima (tablica 46). U ugljikohidratnom prekursoru *N*-Ac-Mur-OMe (**38**) prevladava vrpca asocirane NH-skupine, a dominacija vrpce slobodne NH-skupine u spoju *N*-Ac-izoMur-OMe (**39**) objašnjava se njezinim nesudjelovanjem u vodikovim vezama. U IR-spektrima snimljenim u čvrstom stanju (CsI) vidljive su samo apsorpcijske vrpce asociranih NH-skupina. U karbonilnom dijelu spektra, esterske karbonilne skupine spojeva **38** i **39** apsorbiraju pri valnim duljinama ~1730 cm^{-1} čime je indicirano njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama u otopini.

Tablica 45. Istezne vibracije[a] NH- i CO-skupina prekursora **38** i **39** te muropeptida **44-48**

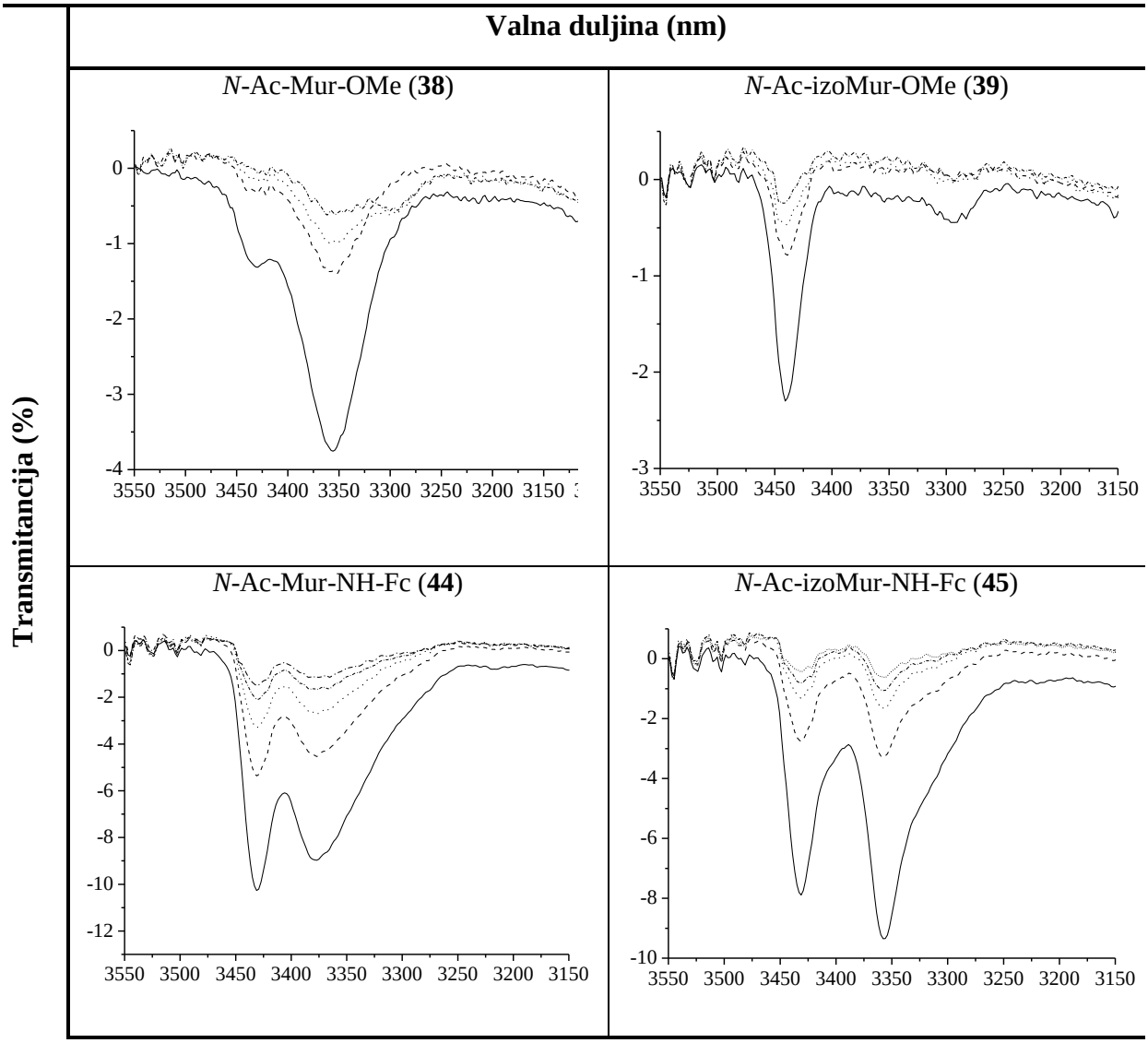
Spoj	Formula		ν_{NH} (slob.)[b]	ν_{NH} (asoc.)[c]	ν_{CO} (ester)	ν_{CO} (amidI)	ν_{CO} (amidII)
38	*N*-Ac-Mur-OMe	CH_2Cl_2 CsI	3431sl	3356sr 3300sr	1732j 1737j	1674j 1657j	1538j 1562j
39	*N*-Ac-izoMur-OMe	CH_2Cl_2 CsI	3439sr	3283sl 3296sr	1733j 1749j	1675j 1655j	1558j 1558j
44	*N*-Ac-Mur-NH-Fc	CH_2Cl_2 CsI	3432sr	3357sr 3300sr		1732j 1679j 1677j 1658j	1543j 1552j
45	*N*-Ac-izoMur-NH-Fc	CH_2Cl_2 CsI	3430sr	3374 sr.š 3300sr		1732j 1678j 1677j 1658j	1540j 1552j
46	*N*-Ac-Mur-NH-Fn-COOMe	CH_2Cl_2 CsI	3432sr	3355sr 3327sr	1744j 1715j	1708j 1679j 1677j 1659j	1539j 1548j
47	*N*-Ac-izoMur-NH-Fn-COOMe	CH_2Cl_2 CsI	3438sr	3367 sr 3327sr	1733j 1715j	1708j 1680j 1677j 1659j	1539j 1548j
48	*N*-Ac-Mur-NH-Fn-NHAc	CH_2Cl_2 CsI	3425sr	3309sr.š 3297sr		1733j 1716j 1671j 1677s 1669s 1655s	1540j 1562j

[a]IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2, $c = 5\times10^{-2}$ M.

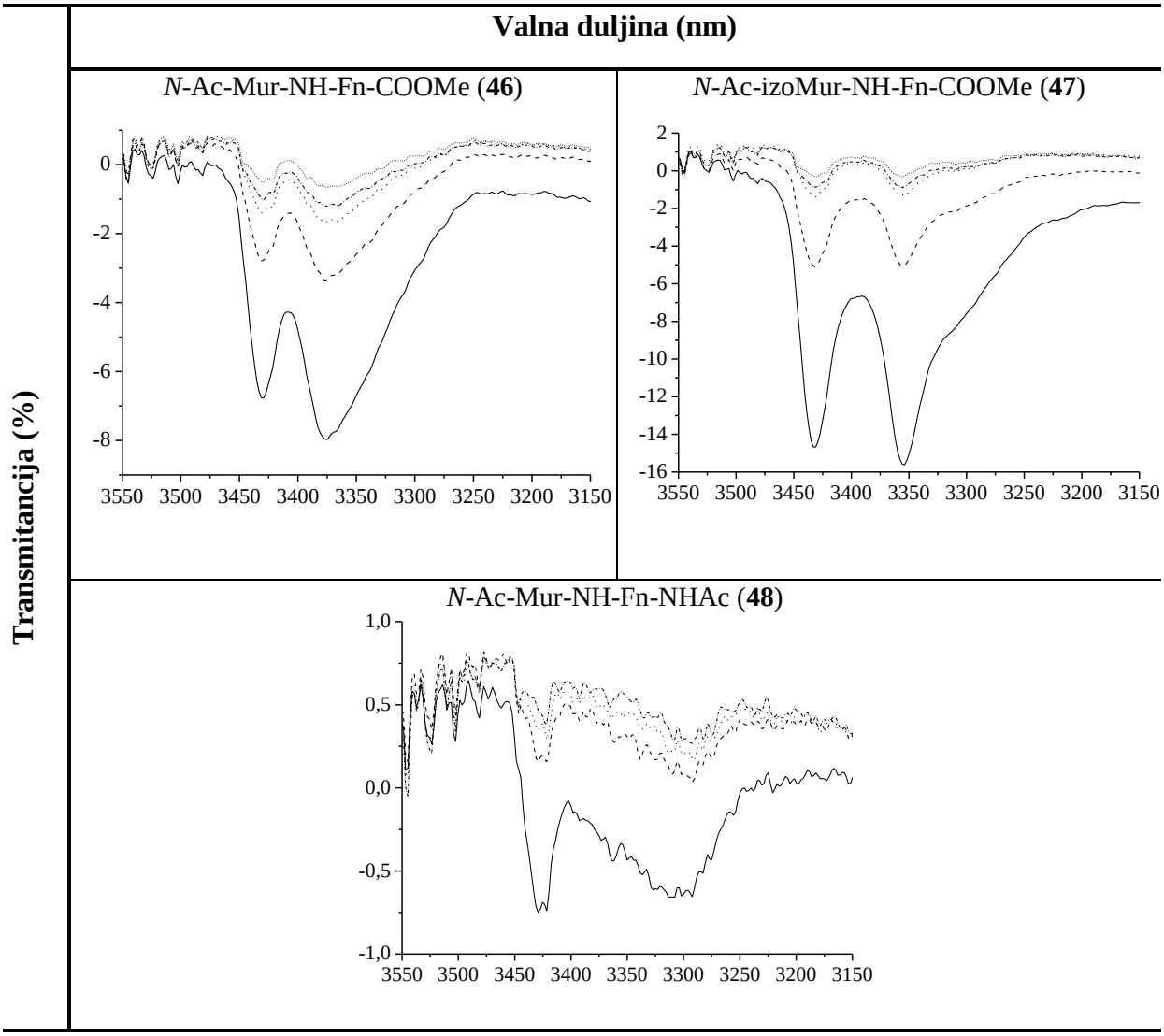
Isto vrijedi i za čvrsto stanje spoja **38**, za razliku od njegovog dijastereomera **39** čije CO_{COOMe}-skupine ne participiraju u HB (ν = 1749 cm^{-1}). Nadalje, esterske karbonilne skupine iz ferocenskih muropeptida **46** i **47** uključene su u HB u čvrstom stanju (ν = 1715cm^{-1}), dok je u otopini njihova akceptorska uloga izražena u manjoj mjeri (tablica 45).

Karakter asociranih NH-skupina registriranih između 3309 i 3378 cm^{-1}u IR spektrima prekursora **38** i **39** kao i biokonjugata **44**-**48** ispitan je razrjeđivanjem od $c = 5\times10^{-2}$ M do 3×10^{-3} M (tablica 46a,b). Kako se omjer intenzitetâ slobodnih i asociranih vrpci razrjeđivanjem ne mijenja, za pretpostaviti je sudjelovanje amidnih skupina u *intramolekulskim interakcijama*.

Tablica 46a. Koncentracijski-ovisni IR-spektri[a] prekursora **38** i **39** te biokonjugata **44-45**



Tablica 46b. Koncentracijski-ovisni IR-spektri[a] biokonjugata **46-48**



[a]IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2, [(—) $c = 5\times10^{-2}$ M, (----) $c = 2{,}5\times10^{-2}$ M, (····) $c = 1{,}25\times10^{-2}$ M, (-·-·) $c = 6{,}13\times10^{-3}$ M, (· · ·) $c = 3\times10^{-3}$ M].

4.5.3. NMR- spektroskopska analiza muropeptida 44-48

Karakteristika svih NH_{MurNAc}-protona iz biokonjugata **44**-**47** jest da se u ^{1}H-NMR spektrima detektiraju kao dubleti zbog sprege s protonom na C-2 poziciji glukopiranoze, dok su NH_{amid}-protoni detektirani kao singleti. Asignacija NH-protona konjugata **48** koji imaju vrlo slično kemijsko okruženje izvršena je pomoću dvodimenzijskih spektara (COSY, HMBC i HSQC) (tablica 47).

Tablica 47. Kemijski pomaci (δ)[a] amidnih protona spojeva **38** i **39** te biokonjugata **44-48**

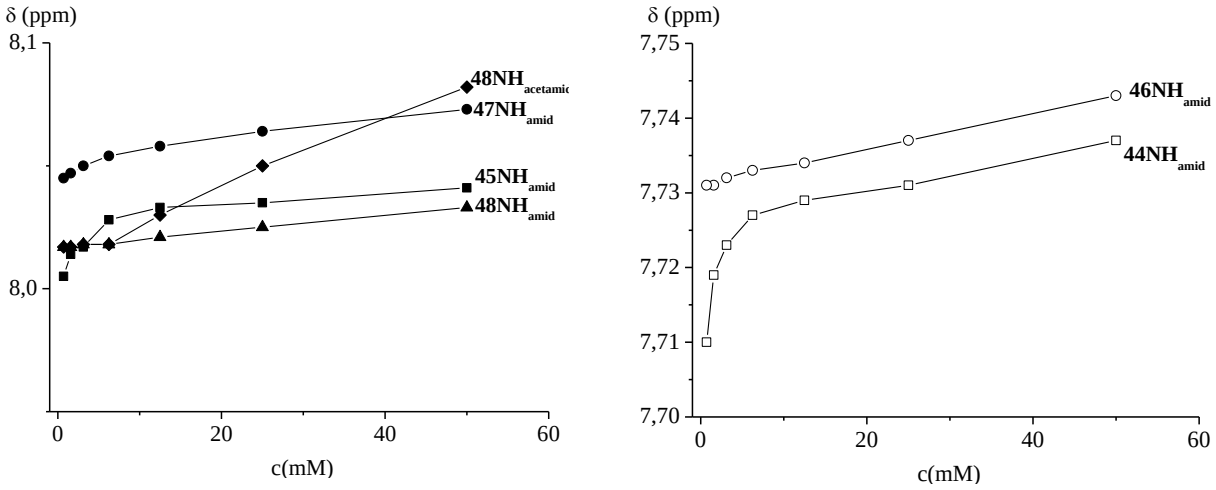
	Spoj	**Otapalo**	**δNH_{MurNAc} (ppm)**	**Δδ (ppm)**	**δNH_{amid} (ppm)**	**Δδ (ppm)**	**δNH_{FnNHAc} (ppm)**	**Δδ (ppm)**
38	*N*-Ac-Mur-OMe	$CDCl_3$ DMSO	7,49 8,09	0,6				
39	*N*-Ac-izoMur-OMe	$CDCl_3$ DMSO	5,65 7,89	2,24				
44	*N*-Ac-Mur-NH-Fc	$CDCl_3$ DMSO	5,95 8,30	2,35	7,74 8,87	1,13		
45	*N*-Ac-izoMur-NH-Fc	$CDCl_3$ DMSO	5,80 8,19	2,39	8,05 8,40	0,35		
46	*N*-Ac-Mur-NH-Fn-COOMe	$CDCl_3$ DMSO	6,42 8,30	1,88	7,75 8,87	1,12		
47	*N*-Ac-izoMur-NH-Fn-COOMe	$CDCl_3$ DMSO	6,05 8,18	2,13	8,07 8,37	0,3		
48	*N*-Ac-Mur-NH-Fn-NHAc	$CDCl_3$ DMSO	6,35 8,28	1,93	8,05 8,60	0,55	8,13 9,14	1,01

[a]NMR-spektri snimljeni su u $CDCl_3$ i DMSO pri $c = 5\times10^{-2}$ M i 298 K.

Budući da su kemijski pomaci amidnih protona, vezanih na ferocenski prsten (NH_{amid} i NH_{FnNHAc}) > 7 ppm u $CDCl_3$ (za razliku od amidnih protona iz muraminske podjedinice koji su detektirani pri ~ 6 ppm), indicirano je njihovo sudjelovanje u HB. Izračunate Δδ-vrijednosti za ferocenske muropeptide indiciraju da NH_{amid}-skupine biokonjugata **45** (0,35 ppm) i **47** (0,3 ppm) sudjeluju u srednje jakim HB, dok više Δδ-vrijednosti njihovih dijastereomera **44** (1,13 ppm) i **46** (1,1 ppm) odgovaraju tek slabim vodikovim vezama što se tumači nepovoljnom orijentacijom metilne skupine iz laktilne podjedinice. Kemijski pomaci obiju NH-skupina vezanih na ferocen (δ ~ 8 ppm) iz biokonjugata **48** indiciraju njihovu participaciju u HB, pri čemu amidni protoni sudjeluju u srednje jakim HB [$\Delta\delta\,(NH_{amid}) = 0,55$ ppm], dok acetamidni protoni participiraju u slabim HB [$\Delta\delta\,(NH_{acetamid}) = 1,01$ ppm).

Nadalje, kemijski pomaci NH_{MurNAc} ($\delta \sim 6$ ppm) u svim biokonjugatima **44-48** indiciraju njihovu apstinenciju pri tvorbi HB, dok u slučaju prekursora *N*-Ac-Mur-OMe (**38**) acetamidni proton sudjeluje u HB srednje jakosti (δ =7,49 ppm; $\Delta\delta$ = 0,6 ppm).

Intramolekulski karakter vodikovih veza, sugeriran rezultatima koncentracijski-ovisne IR-spektroskopije dodatno je potvrđen koncentracijski-ovisnom NMR-spektroskopijom. Naime, razrjeđivanje otopina biokonjugata **44-48** nije utjecalo na kemijske pomake njihovih NH-protona za koje je indicirano sudjelovanje u HB, što je vidljivo iz slike 92.

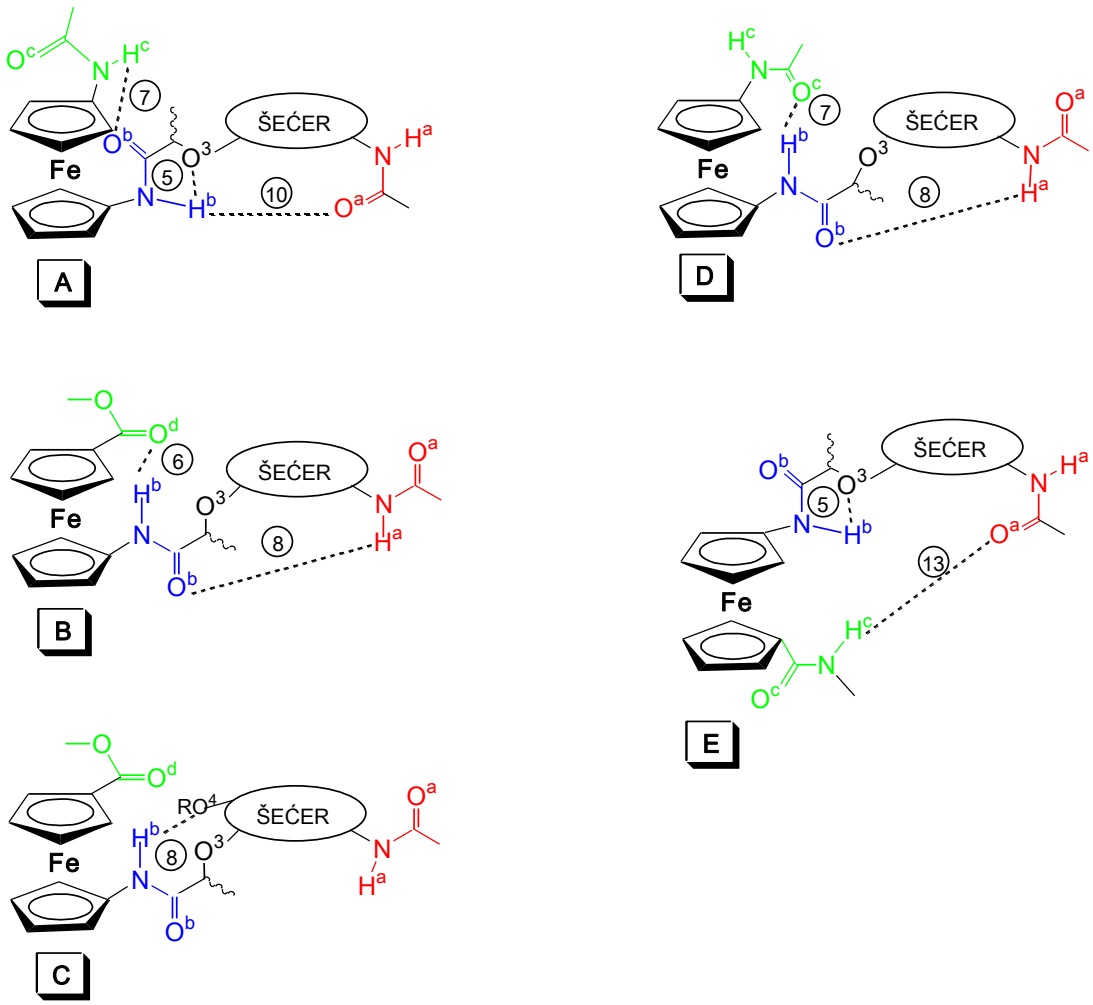


Slika 92. Koncentracijska ovisnost kemijskih pomaka NH_{amid}-protona iz biokonjugata **44-47** (□ **44**, ■ **45**,○ **46**,•**47**) te NH_{amid}- (▲) i $NH_{acetamid}$-protona (♦) iz biokonjugata **48**

4.5.4. DFT-modeliranje muropeptida 44-48

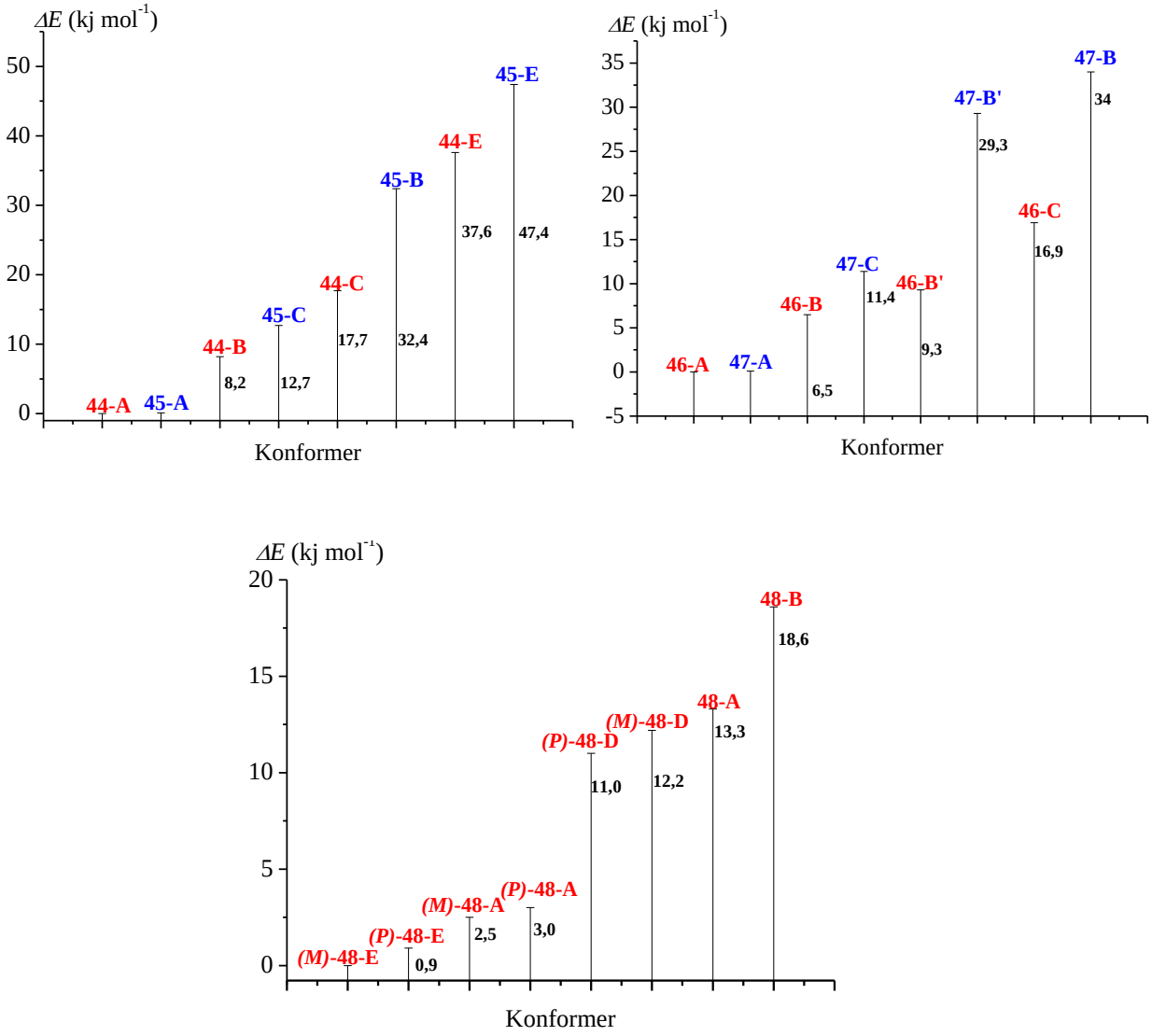
Na slici 93. prikazane su najstabilnije konformacije dobivene primjenom DFT/B3LYP metode, a koje su posljedica tvorbe vodikovih veza unutar biokonjugata **44-48**.

U slučaju muropeptida **44-47** pronađena su četiri lokalna energetska minimuma, prikazana na dijagramu lijevo (dijastereomeri **44**/**45**) i desno (dijastereomeri **46**/**47**) (slika 94), pri čemu su najstabilniji oni konformeri u kojima vodikova veza ($NH_{amid}\cdots OC_{MurNAc}$) zatvara 10-člani prsten, kakav je pronađen i u muramil-dipeptidu.[88-90] U slučaju biokonjugata **48** koji ima dodatnu donorsku skupinu, najstabilniji konformeri su *(M)*-**E** i *(P)*-**E** u kojima se simultano uspostavljaju 13-člani $NH_{FnNHAc}\cdots OC_{MurNAc}$ i 5-člani $NH_{amid}\cdots O^3C_{Mur}$ IHB-prstenovi.



Slika 93. Shematski prikaz relevantnih konformacija **A-E** muropeptida **44-48**

Iz rezultata dobivenih DFT-metodom vidljivo je da je 5-člani prsten koji tvore $NH_{amid}\cdots O^3C_{Mur}$ IHB prisutan u najstabilnijim konformerima svih ispitanih ferocenskih muropeptida. Osim te vodikove veze stabilnosti sustavâ pridonose i 10-člani $NH_{amid}\cdots OC_{MurNAc}$ (**44A-47A**) te 13-člani $NH_{FnNHAc}\cdots OC_{MurNAc}$ (**48E**) IHB-prstenovi.



Slika 94. Prikaz razlika u relativnoj energiji DFT-optimiziranih najstabilnijih konformera muropeptida **44-48**

4.5.5. CD-spektroskopska analiza muropeptida 44-48

CD-spektri svih biokonjugata sadrže apsorpcijske vrpce karakteristične za kiralno uređeni ferocenski kromofor (~ 460 nm) (tablica 48). Poznato je da na predznak Cottonovog efekta utječe najbliži stereogeni centar[29] (u ovom slučaj kiralni laktilni C-atom, što je vidljivo i iz spektara biokonjugata **44-48**). Naime, muropeptidi (*R*)-**44** i (*R*)-**48** pokazuju pozitivan Cottonov efekt, dok su CD-signali njihovih dijastereomera (*S*)-**45** i (*S*)-**47** suprotnog

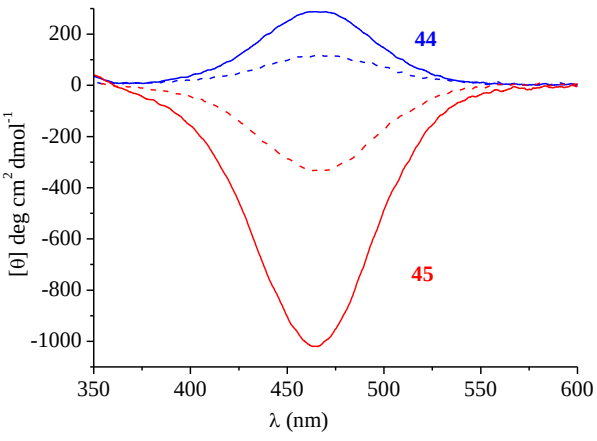
predznaka. Muropeptid **48** slijedi isti obrazac pa je njegov CD-signal pozitivnog predznaka (tablica 48).

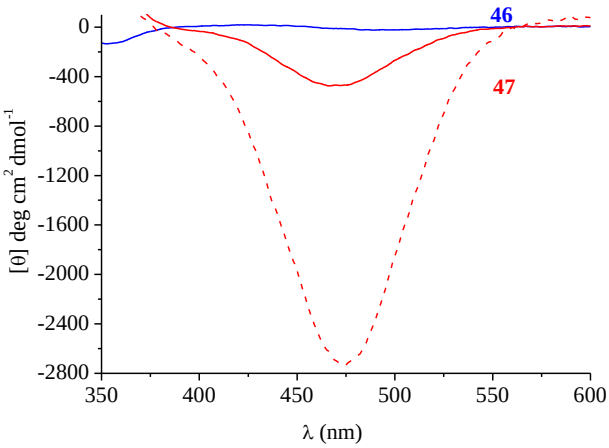
Tablica 48. UV/Vis-signali i CD-vrpce **44-48**

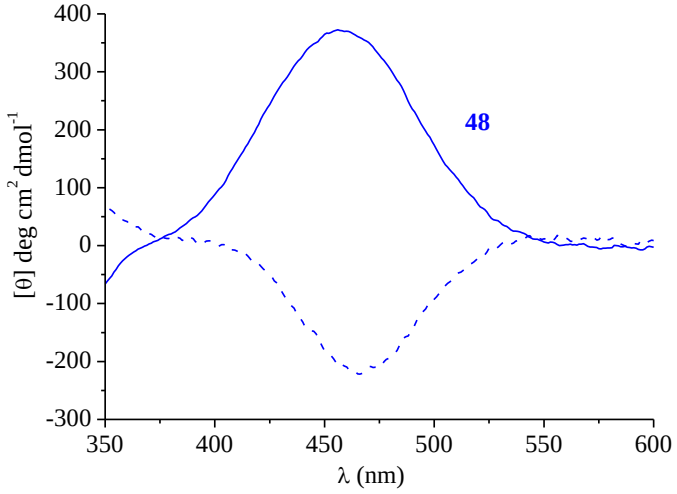
Spoj	**Formula**	**λ_{max} / nm**		**[θ]/ deg cm^{2}dmol^{-1}**	
		CH_2Cl_2	CH_2Cl_2 + DMSO	CH_2Cl_2	CH_2Cl_2 + DMSO
44	*N*-Ac-Mur-NH-Fc	464	466	290	110
45	*N*-Ac-izoMur-NH-Fc	465	468	-1020	-333
46	*N*-Ac-Mur-NH-Fn-COOMe	490	/	-24	/
47	*N*-Ac-izoMur-NH-Fn-COOMe	466	475	-475	-2732
48	*N*-Ac-Mur-NH-Fn-NHAc	456	466	375	-213

[a]CD-spektri mjereni su u CH_2Cl_2 (c = 5×10^{-3}M) i uz dodatak 20 % DMSO u CH_2Cl_2.

Dodatkom kompeticijskog otapala slabi Cottonov efekt u spektrima konjugata **44** i **45** uslijed narušavanja kiralnog uređenja uzrokovanog cijepanjem IHB. Konjugat **46** ne pokazuje CD-aktivnost u ferocenskom području što se pripisuje odsutnosti kiralne organizacije (slika 95, *gore*). U muropeptidu **47** dodatkom DMSO dolazi do jačanja Cottonovog efekta, dok konjugat **48** mijenja predznak CD-signala. Mijenjanje predznaka može se objasniti pomoću DFT-modeliranja prema kojem se dvije najstabilnije konformacije razlikuju za samo 0,9 kj mol^{-1} zbog suprotnih orijentacija uzvojnica proisteklih iz IHB [***(P)*- 48E** i ***(M)*-48E**].







Slika 95. CD-spektri *O*-zaštićenih muropeptida **44**/**45** (*gore lijevo*), **46**/**47** *(gore desno)* i **48** *(dolje*) u CH_2Cl_2 (puna crta) pri $c = 5\times10^{-3}$M i s dodatkom 20 % DMSO (isprekidana crta)

4.5.6. Elektrokemijska svojstva muropeptida 44-48

Prisutnost elektroaktivne metalocenske podjedinice očituje se reverzibilnom jedno-elektronskom oksidacijom redoks-para ferocen/fericinijev ion koja ovisi o prirodi vezanih supstituenata.[251] Oksidacijski potencijal raste (*i*) zaklanjanjem ferocenske jezgre vezanim supstituentima što otežava interakciju željezovog atoma s elektrodom ili (*ii*) s prisutnošću elektron-odvlačećeg supstituenta koji pojačava pozitivni naboj željezovog iona.[252] Elektrokemijska svojstva dipeptida **44-48** ispitana su cikličkom voltametrijom (CV) u CH_2Cl_2 uz nBu$_4$NPF$_6$ kao elektrolit. Kao posljedica različito supstituirane ferocenske jezgre [R = H (**44**), COOMe (**46**) i NHAc (**48**)], izmjerene vrijednosti reverzibilne jedno-elektronske oksidacije znatno se razlikuju (tablica 49).

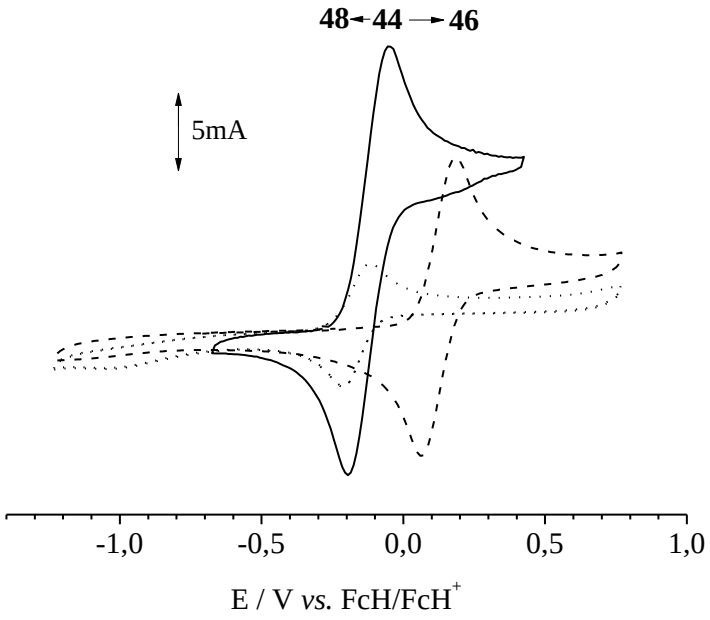
Tablica 49. Redoks-potencijali[a] muropeptida **44-48**

Spoj	**44**	**45**	**46**	**47**	**48**
$E_{1/2}$ (mV)	-126	-100	121	130	-166

[a]Voltamogrami su snimljeni u CH_2Cl_2 ($c = 1\times 10^{-3}$ M) *vs.* FcH/FcH$^+$.

Uvođenje elektron-odvlačećeg supstituenta (COOMe) u konjugatima **46** i **47** rezultiralo je uočljivim povećanjem potencijala za +245, odn. 250 mV u usporedbi s

nesupstituiranim konjugatima **44** i **45** (slika 96). Sličan pomak za +200 mV već je opisan za par FcNHAc i AcNH-Fn-COOH.[253] Pomak za -40 mV karakteristika je voltamograma konjugata **48** koji posjeduje elektron-donirajuću NHAc skupinu vezanu za ferocen (slika 96). Promjena redoks-potencijala, tj. pomicanje maksimuma u voltamogramima svih biokonjugata u skladu je s empirijski izračunatim efektom suspstituenata na redoks-potencijal: povećanje za +250 mV uvođenjem COOMe te smanjenje za 40 mV uvođenjem NHAc supstituenta.[248]



Slika 96. Ciklički voltamogrami dipeptida **44, 46** i **48** u CH_2Cl_2 (c = 1× 10^{-3} M)/*n*-Bu_4NPF_6; kao referentna elektroda korišten je 0,01 M $Ag/AgNO_3$, dok su platinaste electrode korištene kao radna i protuelektroda[247]

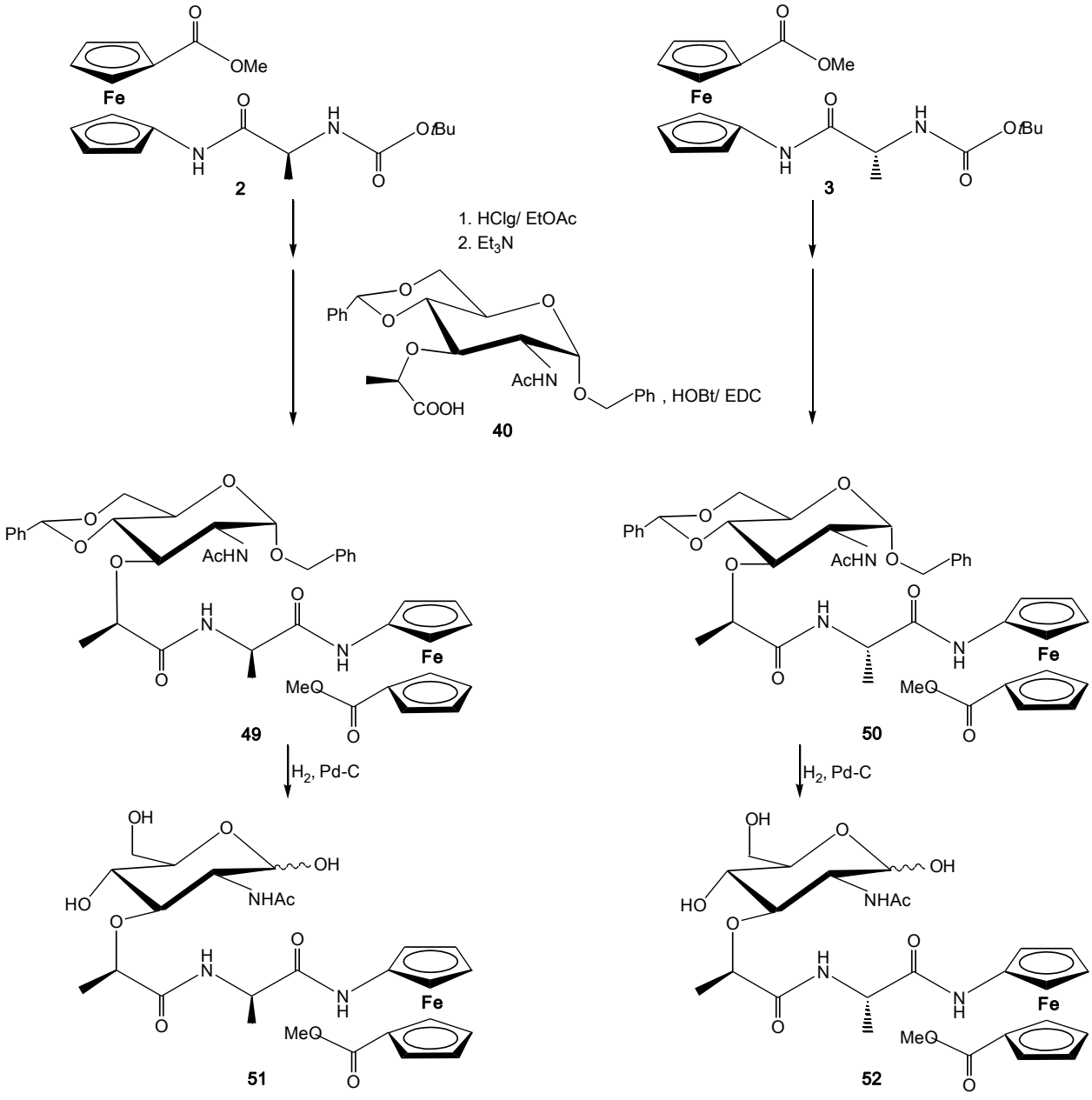
4.6. PRIPRAVA I KONFORMACIJSKA ANALIZA FEROCENSKIH ANALOGA MURAMILDIPEPTIDA: *O*-ZAŠTIĆENIH *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (49) I *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (50) TE DEPROTEKTIRANIH *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (51) I *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (52)

U poglavlju 2.4.2. opisane su brojne strukturne modifikacije muramil-dipeptida i SAR-studije kojima je ispitana imunostimulacijska aktivnost izvedenih analoga. Pokazalo se da alaninska podjedinica iz MDP sudjeluje u tvorbi β-okreta, dok utjecaj iGln na konformacijska svojstva MDP nije do kraja razjašnjen.[71] Budući da je *(i)* funkcionalnost biološki aktivnih molekula određena njihovom konformacijom te *(ii)* biološka aktivnost analoga MDP uvjetovana njihovom strukturnom komplementarnošću s receptorima i transportom kroz stanične membrane, odlučili smo iGln zamijeniti lipofilnom Fca, kao potentnim začetnikom elemenata sekundarne strukture u pripadajućim peptidima. Pri tom smo pripravili analoge **51** i **52** čije su alaninske podjedinice suprotne kiralnosti, kako bismo utvrdili utječe li apsolutna konfiguracija prirodne aminokiseline u ferocenskim analozima MDP na njihova konformacijska svojstva.[254]

4.6.1. Sinteza *O*-zaštićenih *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (49) i *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (50) i njihova deprotekcija u *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (51) i *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (52)

Sintezu dijastereomernih analoga **51** i **52** započeli smo deprotekcijom ferocenskih peptida **2** i **3** te njihovom kopulacijom s *O*-zaštićenom muraminskom kiselinom (prethodno aktiviranom standardnim postupkom EDC / HOBt) pri čemu je nastalo 73% *O*-zaštićenog *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (**49**), odn. 77 % *O*-zaštićenog *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (**50**). Hidrogenolizom dijastereomernih biokonjugata **49** odn. **50** dobiveno je 62% *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (**51**) odn. 63% *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (**52**). Deprotekcija **49** → **51** i **50** → **52** dovela je do tvorbe anomernih smjesa ciljnih biokonjugata što je vidljivo iz njihovih ^{13}C-NMR-spektara. Budući da su razlike u kemijskim pomacima njihovih C-1 (Δδ = 5 ppm), C-2 (Δδ = 2,8 ppm) te C-3 atoma (Δδ = 3,3 ppm) u skladu s literaturnim navodima[255-258] prema kojima su kemijski pomaci C-atoma iz β-anomera za 3-5 ppm viši u odnosu na C-atome iz α-anomera, C-atomi s kemijskim pomakom u višem polju pripisani su α-anomeru. Razlikovanje preostalih ugljikovih atoma iz α- i β- anomera otežano je zbog preklapanja njihovih signala s

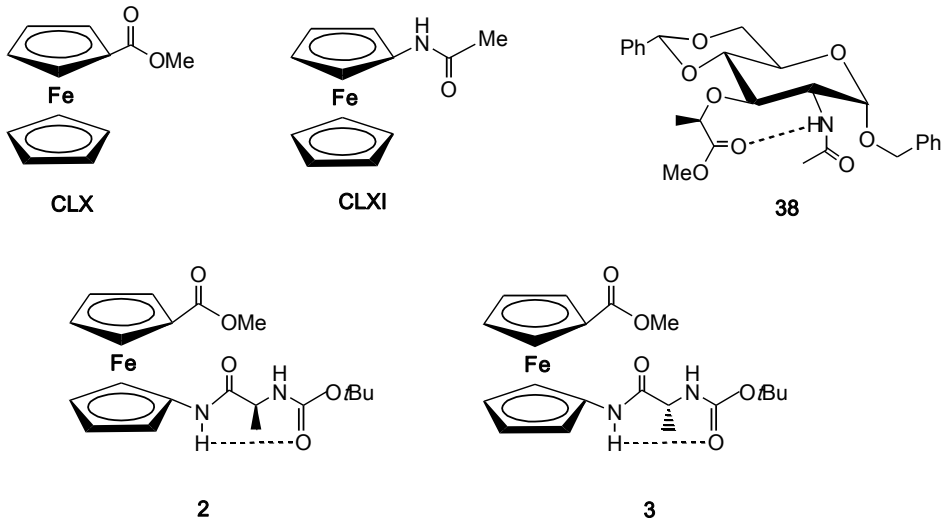
ferocenskim ugljikovim atomima. Također, iz omjera signala C-atoma, utvrđen je odnos 90 : 10 u korist α-anomera što se objašnjava anomernim učinkom, tj. tvorbom termodinamički stabilnijeg produkta u kojem je smanjeno elektrostatsko odbijanje između neveznih elektrona anomerne hidroksilne skupine i kisikova atoma iz piranoznog prstena.[255-258]



Shema 31. Priprava ferocenskih analoga muramil-dipeptida **51** i **52**

4.6.2. IR-spektroskopska analiza *O*-zaštićenih *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (49) i *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (50)

Da bismo što preciznije opisali konformacijske preferencije izvedenih analoga MDP, usporedili smo njihove spektroskopske podatke s rezultatima spektroskopskih mjerenja monosuspstituiranih ferocenskih referentnih spojeva **CLX** i **CLXI** (koji nemaju mogućnost tvorbe vodikove veze)[26] kao i modelnih spojeva **2**, **3** i **38**[43,209] (za koje je utvrđeno da tvore IHB) (slika 97).



Slika 97. Prikaz referentnih spojeva **CLX** i **CLXI** te IHB u modelnim spojevima **2**, **3** i **38**

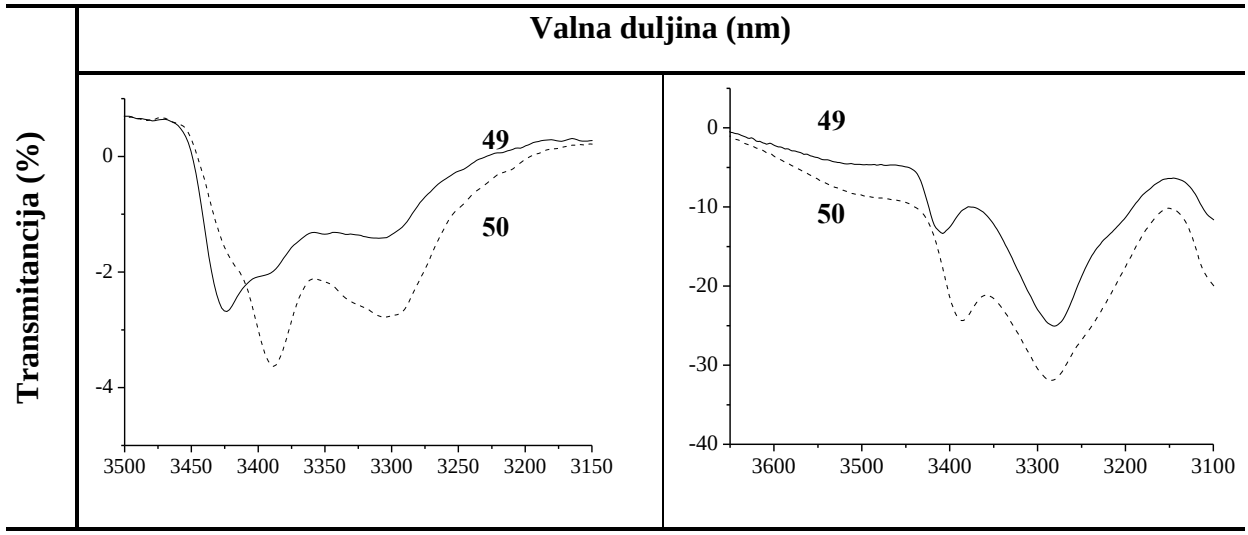
S obzirom da referentni spojevi **CLX** i **CLXI** nemaju mogućnost tvorbe IHB, apsorpcijske vrpce u amidnom i karbonilnom području njihovih IR-spektara pripisuju se slobodnim NH- i CO-skupinama. Kako u amidnom području IR-spektra analoga *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (**50**) dominiraju vrpce asociranih NH-skupina ($\nu < 3400$ cm^{-1}), za razliku od njegovog dijastereomera *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (**49**) kod kojeg prevladava vrpca slobodnih NH-skupina ($\nu = 3424$ cm^{-1}) (tablice 50 i 51) može se zaključiti da orijentacija alaninske metilne skupine utječe na formiranje IHB. Kao što je vidljivo iz tablica 50 i 51 (*desno*), istezne vibracije asociranih NH-skupina prevladavaju u čvrstom stanju konjugata **49**/**50**. Deprotektirane biokonjugate **51** i **52** nije bilo moguće analizirati primjenom IR-spektroskopije u otopini (zbog netopljivosti u CH_2Cl_2), a niti u čvrstom stanju (zbog preklapanja signala amidnih i deprotektiranih hidroksilnih skupina).

Tablica 50. Istezne vibracije[a] NH- i CO-skupina referentnih spojeva **CLX** i **CLXI**, modelnih spojeva **2**, **3** i **38** te muropeptida **49** i **50**

Spoj	**Formula**		ν_{NH} **(slob.)**[b]	ν_{NH} **(asoc.)**[c]	ν_{CO} **(ester)**	ν_{CO} **(amidI)**
CLX	Fc-COOMe	CH_2Cl_2			1711j	
CLXI	Fc-NHAc	CH_2Cl_2	3436sr			1684j
38	*N*-Ac-Mur-OMe	CH_2Cl_2	3432sl	3357j	1733j	1674j
2	Boc-L-Ala-Fca-OMe	CH_2Cl_2	3424sr	3324sl	1709šir.j	1709šir.j
		KBr		3305	1716j	1694j
						1671j
3	Boc-D-Ala-Fca-OMe	CH_2Cl_2	3425sr	3324sl	1708šir.j	1709šir.j
		KBr		3304	1716j	1693j
						1675j
49	*N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe	CH_2Cl_2	3424sr	3391sl	1706j	1695j
				3307sl		1682j
		KBr	3408	3281	1716j	1668j
						1654j
50	*N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe	CH_2Cl_2		3388sr	1707sr	1696sr
				3297sr		1672j
		KBr		3386	1714	1657
				3284		

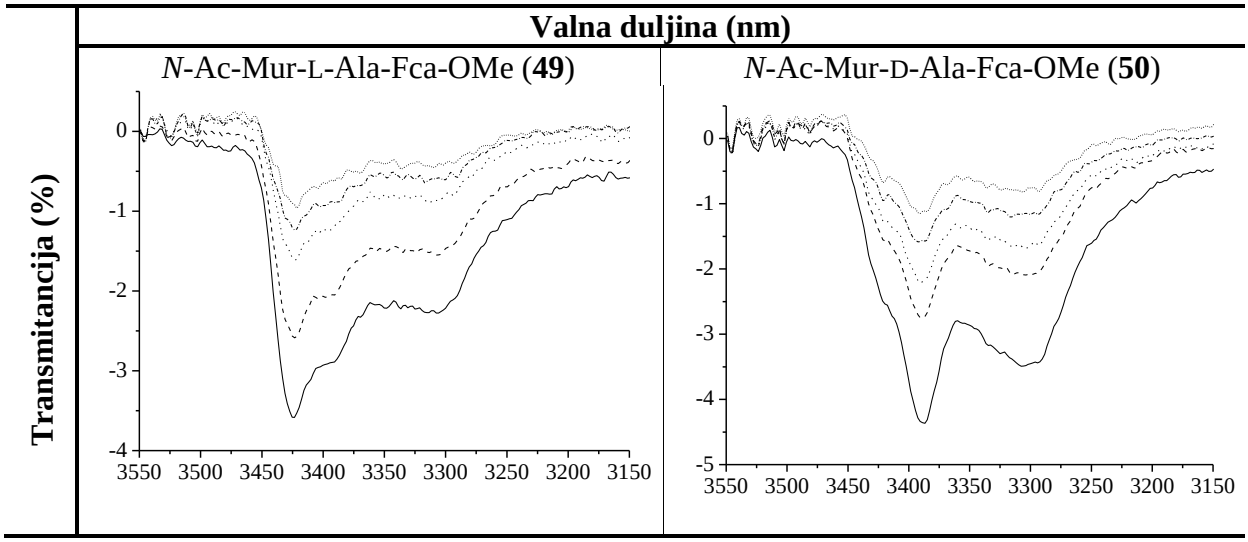
[a]IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2, $c = 5\times10^{-2}$ M i na KBr.

Tablica 51. Istezanja NH-skupina u IR-spektrima ferocenskih analoga MDP **49** i **50** u CH_2Cl_2 ($c = 5\times10^{-2}$ M) (*lijevo*) i u KBr (*desno*)



Omjer intenziteta vrpci asociranih i slobodnih amino-skupina tijekom razrijeđivanja diklormetanskih otopina konjugata **49** i **50** od $c = 5\times10^{-3}$ M do 3×10^{-4} M ostaje isti, što indicira *intramolekulski* karakter njihovih asocijacija (tablica 52).

Tablica 52. Koncentracijski ovisni IR-spektri[a] ferocenskih analoga MDP **49** i **50**



[a] IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2, [(—) $c = 5\times10^{-2}$ M, (----) $c = 2{,}5\times10^{-2}$ M, (····) $c = 1{,}25\times10^{-2}$ M, (-·-·) $c = 6{,}13\times10^{-3}$ M, (· · ·) $c = 3\times10^{-3}$ M].

4.6.3. NMR-spektroskopska analiza *O*-zaštićenih *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (49) i *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (50)

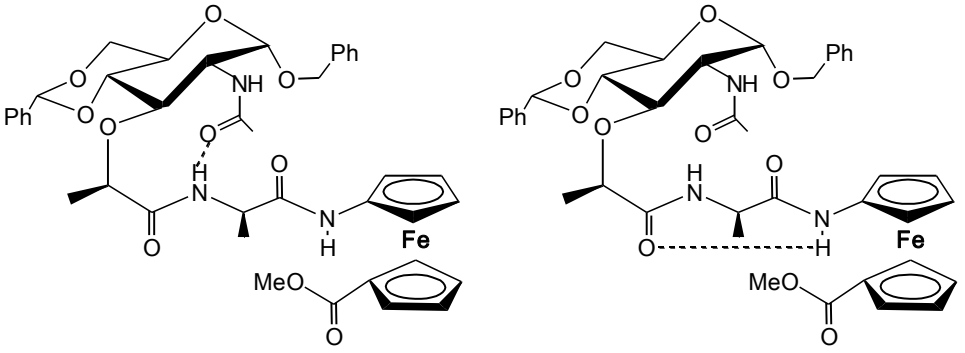
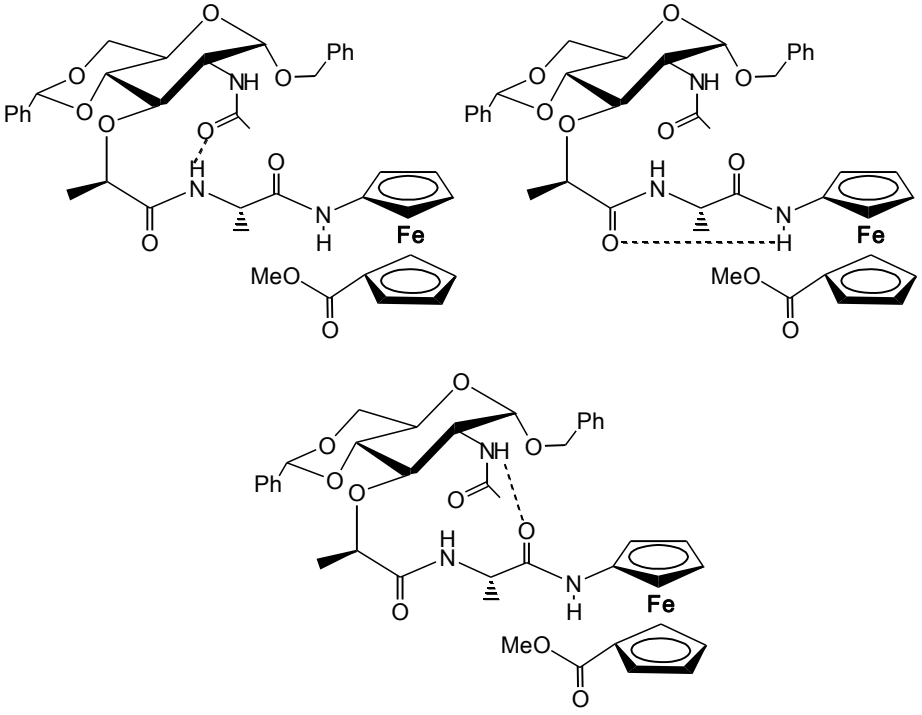
Visoki kemijski pomaci amidnih protona i modelnih spojeva **38**, **2** i **3** (> 7 ppm) (tablica 51) podržavaju pretpostavku o njihovom sudjelovanju u IHB, indiciranu nalazima IR-analize. Svi amidni protoni zaštićenih analoga muramil-dipeptida **49** i **50** registrirani su pri niskom polju (δ = 7,14 ppm do 8,24 ppm) što indicira njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama [s izuzetkom NH_{MurNAc} iz biokonjugata **49** čiji je kemijski pomak nešto niži (δ = 6,30 ppm)] (tablica 53). Ovakvi rezultati u skladu su s IR-mjerenjima prema kojima je glavnina NH-skupina iz biokonjugata **49** slobodna.

Tablica 53. Kemijski pomaci (δ)[a] amidnih protona modelnih spojeva **38**, **2** i **3** te muropeptida **49** i **50**

Spoj	Formula	δNH_{MurNAc} (ppm)	δNH_{Ala} (ppm)	δNH_{Fca} (ppm)
38	*N*-Ac-Mur-OMe	7,49		
2	Boc-L-Ala-Fca-OMe		5,14	7,64
3	Boc-D-Ala-Fca-OMe		5,14	7,63
49	*N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe	6,30	7,14	7,92
50	*N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe	7,22	7,28	8,24

[a]NMR-spektri snimljeni su u $CDCl_3$, $c = 5\times10^{-2}$ M, 298 K.

Na temelju rezultata IR- i NMR-spektroskopije, predložene su moguće IHB u biokonjugatima **49** i **50** (slika 98).

Spoj	IHB motiv
49	
50	

Slika 98. Hipotetske konformacije ferocenskih analoga MDP (**49** i **50**)

4.6.4. CD-spektroskopska analiza *O*-zaštićenih analoga *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (49) i *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (50) te deprotektiranih analoga *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (51) i *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (52)

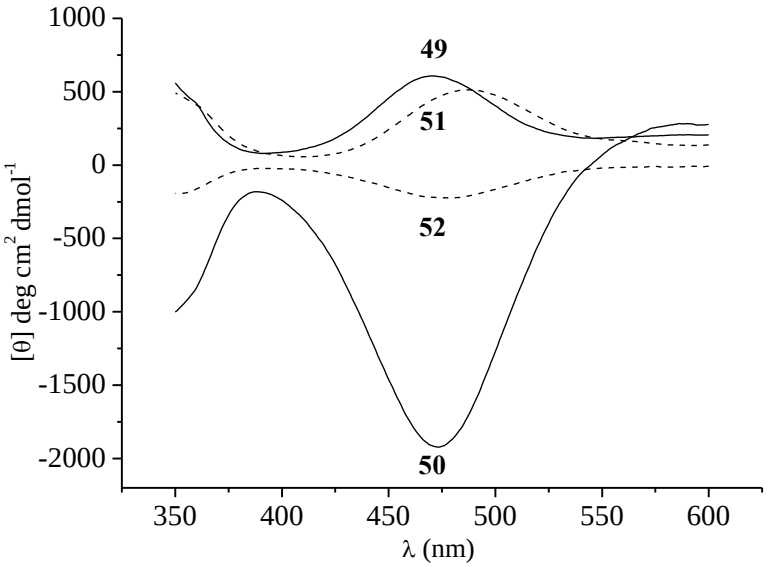
IHB u ferocenskim peptidima induciraju heličnu kiralnost ferocenske podjedinice što se registrira CD-aktivnošću u području ferocenskog kromofora ($\lambda \sim 480$ nm).[13] Cottonovi efekti u CD-spektrima biokonjugata **49** i **50** ukazuju na njihovo helično uređenje tvorbom IHB. Nadalje, jači intenzitet Cottonova efekta u CD-spektru analoga **50** u odnosu na **49**, a kojim se sugerira viši stupanj njegovog uređenja u otopini, u skladu je s IR- i NMR-analizama

(NH-skupine iz **50** imaju viši kemijski pomak i javljaju se < 3400 cm^{-1}) te se može pripisati orijentaciji alaninske metilne skupine, odn. apsolutnoj konfiguraciji kiralnog centra iz alanina. Deprotekcija biokonjugata **49** i **50** prouzročila je narušavanje kiralne organizacije odn. slabljenje CD-signala u rezultirajućem konjugatu **52**, dok je jakost signala konjugata **51** u usporedbi s njegovim prekursorom **49** ostala gotovo nepromijenjena (tablica 54., slika 99).

Tablica 54. UV/Vis-signali i CD-vrpce **49** i **50** te **51** i **52**

Spoj	**Formula**	**λ_{max} / nm**	**[θ]/ deg cm^2dmol^{-1}**
49	*O*-zaštićena *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe	473	629
50	*O*-zaštićena *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe	475	-1985
51	*N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe	484	527
52	*N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe	478	-224

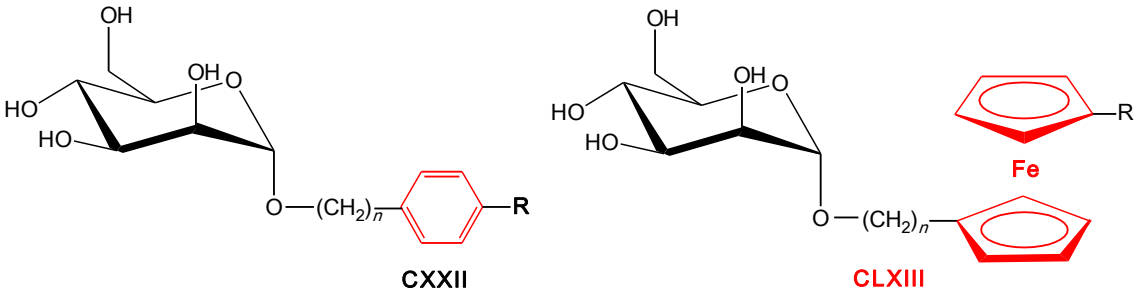
[a]CD-spektri mjereni su u CH_2Cl_2 ($c = 5\times10^{-3}$M).



Slika 99. CD-spektri *O*-zaštićenih analoga muramil dipeptida **49** i **50** i deprotektiranih analoga **51** i **52**

4.7. PRIPRAVA I BIOLOŠKA AKTIVNOST KONJUGATA FEROCENA I MANOZE

Pojačana inhibitorna aktivnost manopiranozida s aromatskim aglikonom[150,155] potaknula nas je na pripravu *O*-manozidnih derivata **CLXIII** s ferocenom u aglikonskom dijelu molekule kao mogućih strukturnih i funkcionalnih analoga u literaturi opisanih fenil-α-D-manozida **CXXII** (slika 49, slika 100).[259,260]



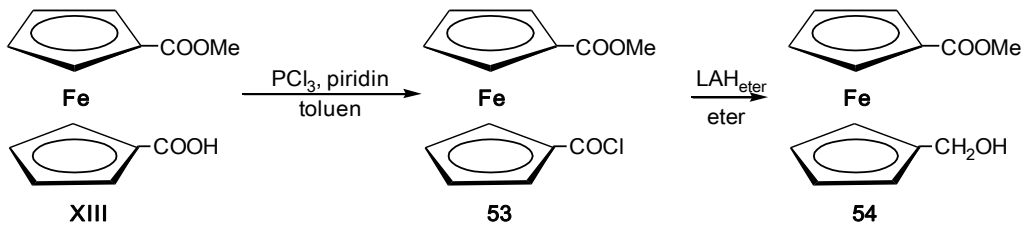
Slika 100. *O*-manozidni derivati s ferocenom **CXXII** i **CXXIII**

4.7.1. Priprava ferocenskih alkohola CXXV, 54 i 59 i amina CLIX, IX i CXLIX kao prekursora esterskih i amidnih konjugata s manozom

Esterski konjugati ferocena i manoze prikazani na shemi 34, pripravljeni su iz ferocenskih alkohola **CXXV**,[160,161] **54** i **59**.

(i) Priprava ferocenskog alkohola **CXXV** provedena je modifikacijom postupaka opisanih u literaturi (*v.* 2.4.2.2.).[160,161]

(*ii*) Ferocenski alkohol **54** pripravljen je modifikacijom ranije opisanih postupaka: ester-kiselina **XIII** djelovanjem PCl_3 i piridina u toluenu prevedena je u 90% reaktivnog ester-klorida **53**. Njegovom selektivnom redukcijom s eterskom otopinom LAH uz hlađenje pripravljen je ciljni ester-alkohol **54** (72%).

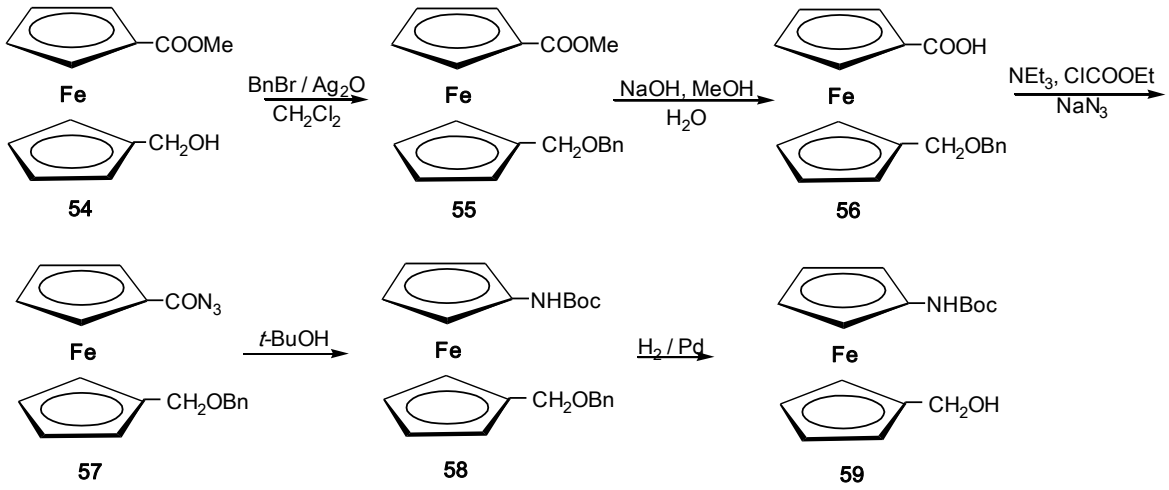


Shema 32. Priprava ferocenskog alkohola **54**

Struktura pripravljenih spojeva potvrđena je spektralnom analizom, pri čemu je pretvorba kiseline **XIII** u odgovarajući klorid **53** praćena IR-spektroskopijom: intenzitet signala karboksilne CO-skupine (~1680 cm^{-1}) je slabio, a završetak pretvorbe označio je njegov nestanak, te javljanje nove apsorpcijske vrpce pri 1759 cm^{-1} karakteristične za keto-klorid. Prisutnost hidroksilne skupine u molekuli **54** očituje se širokom vrpcom pri > 3000 cm^{-1}, dok se esterska karbonilna skupina prikazuje pri 1715 cm^{-1}.

^{1}H-NMR spektar ferocenskog ester-alkohola **54** sadrži singlete protona esterske, odn. hidroksilne skupine pri δ = 3,8 odn. 2,34 ppm. U njegovom ^{13}C-NMR spektru vidljiv je signal samo jedne karbonilne skupine pri δ = 172,9 ppm. Singlet metilne skupine koja povezuje hidroksilnu grupu i ferocensku jezgru prikazuje se pri δ = 60 ppm.

(iii) Kao ferocenski prekursor za dobivanje ciljne molekule **64** poslužio je alkohol **59**.[260] Kako smo u sklopu prethodnih istraživanja[26] razradili metodu priprave *N*-Boc zaštićenih amina, odlučili smo se za analognu sintezu koja uključuje azid kao međuprodukt. Pri tome će se hidroksilna skupina ester-alkohola **54** zaštititi benziliranjem, nakon čega se esterska grupa rezultirajućeg spoja **55** hidrolizira i prevede u 91% azida **57**. Njegovom se Curtiusovom pregradnjom pripravlja 41% potpuno zaštićenog aminoalkohola **58** iz kojeg se hidrogeniranjem dobiva ciljni alkohol **59**.



Shema 33. Priprava ferocenskog alkohola **59**

Benziliranje ester-alkohola **54** u IR-spektru spoja **55** očituje se gubitkom apsorpcijskih vrpci hidroksilne skupine pri 3100 cm^{-1}. Prema očekivanjima, hidroliza estera **55** u kiselinu **56** rezultirala je apsorpcijskim vrpcama slobodne i asocirane hidroksilne skupine pri 3625, odn. 3480 cm^{-1}, te pomakom karbonilnog signala u niže područje (~1680 cm^{-1}). U IR-spektru

azida **57** prisutan je jaki signal pri 2135 cm^{-1} pripisan isteznim vibracijama azidnih dušikovih atoma te jaka apsorpcijska vrpca pri 1681 cm^{-1} karakteristična za karbonilnu skupinu. Termičkom pregradnjom azida **57** u karbamat **58** u njegovu se spektru javlja signal pri 3435 cm^{-1} koji je karakterističan za NH-skupinu, te vrpca karbonilne skupine Boc-estera pri 1723 cm^{-1}. Deprotektirana hidroksilna skupina spoja **59** registrirana je širokom apsorpcijskom vrpcom pri 3600 cm^{-1}.

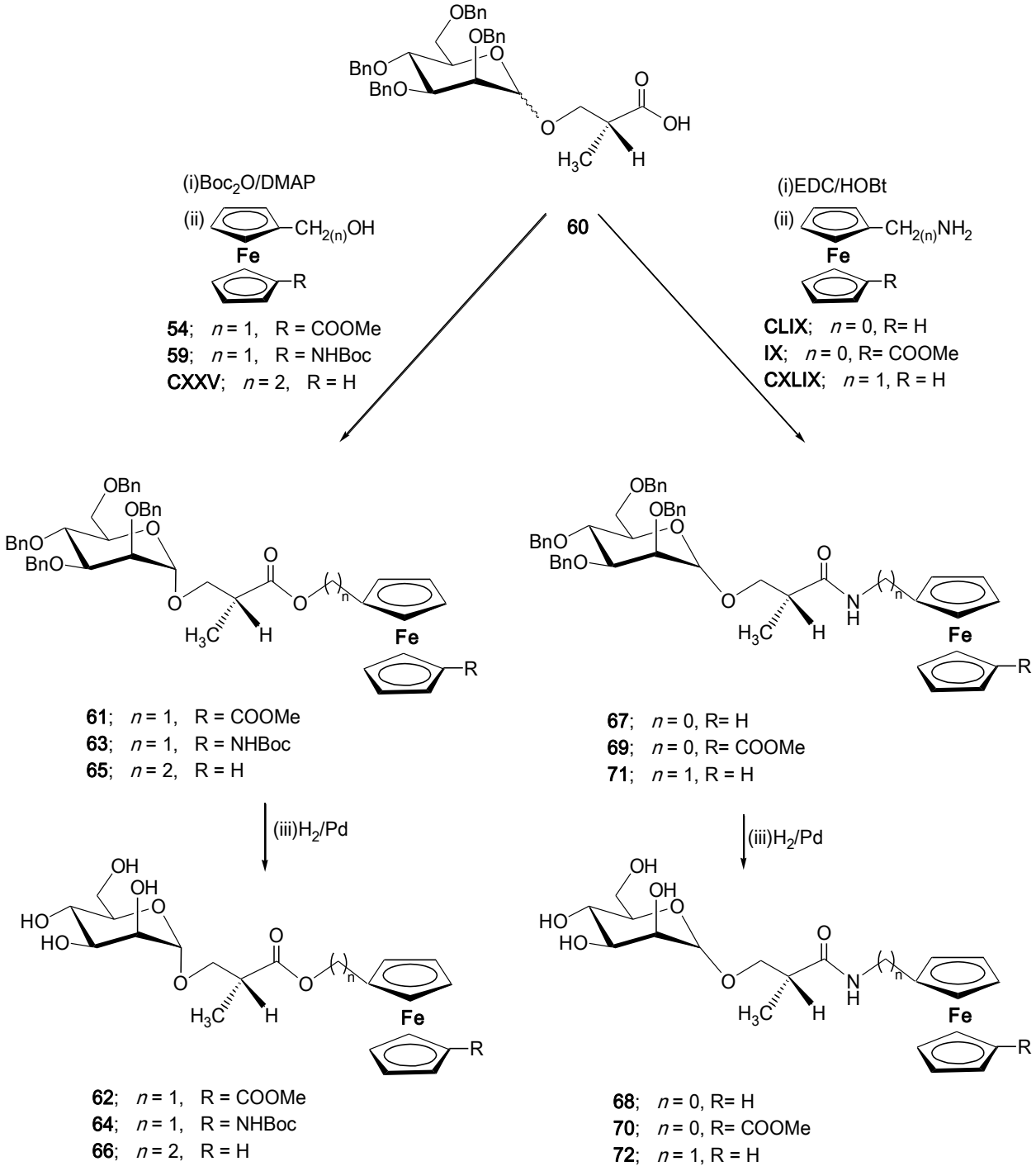
Ulazak benzilne zaštite u molekulu **54** potvrđen je multipletom fenilnih protona pri δ ~ 7,3 ppm u njegovom ^{1}H-NMR-spektru. Singlet protona NH-skupine spoja **59** vidljiv je pri δ ~ 6 ppm, dok se singlet njegova hidroksilnog protona očituje pri δ ~ 3 ppm. Devet protona iz Boc-skupine prikazuju se pri δ 1,5 ppm.

(iv) Svi ferocenski amini (**CLIX, IX i CXLIX**) dobiveni su *in situ* (djelovanjem $HCl_{plinoviti}$ / EtOAc) iz Boc-zaštićenih prekursora koji su pripravljeni prema već prije opisanim metodama (*v*. 2.4.2.4.).[26]

4.7.2. Sinteza esterskih (62-66) i amidnih (68-72) konjugata ferocena i α-D-manozida

O-manozidni derivati s ferocenom **62**-**66**, odn. **68**-**72** pripravljeni su kondenzacijom odn. kopulacijom manopiranozid-karboksilne kiseline **60** s ferocenskim alkoholima **54**, **59** i **CXXV** odn. aminima **CLIX, IX i CXLIX** (shema 34).[259,260]

Sinteza esterskih derivata provedena je u prisutnosti $(BOC)_2O$ i DMAP služeći se postupkom opisanim u literaturi[245] pri čemu su spojevi **62**-**66** pripravljeni u obliku α-anomera (shema 34, *lijevo*). Osim esterskih, pripravljeni su i anomerne smjese amidnih derivata **68**-**72** i to kopulacijom α-manozidnog prekursora **60** (aktiviranog standardnom EDC/HOBt metodom) s ferocenskim aminima **CLIX, IX i CXLIX** dobivenim *in situ* iz Boc-zaštićenih prekursora (shema 34, *desno*). Budući da se anomeri razlikuju po R_f-vrijednosti, te da ih je zbog žuto do narančastog obojenja vrlo lako vizualno detektirati, pogodan sustav (dietileter : petroleter = 2 : 1) omogućio je njihovo učinkovito razdvajanje.



Shema 34. Priprava esterskih (**62**-**66**) i amidnih (**68**-**72**) derivata ferocena i α-D-manozida

O-debenziliranje hidroksilnih skupina iz pripravljenih zaštićenih biokonjugata **61**, **63** i **65**, odn. **67**, **69** i **71** provedeno je djelovanjem vodika (1 bar) uz Pd/C.

Esterifikacija šećerne kiseline **60** s ferocenskim alkoholima **54, 59 i CXXV** potvrđena je u IR-spektrima produkata **61, 63** i **65** jakom apsorpcijskom vrpcom karakterističnom za

estersku karbonilnu skupinu pri 1730 cm^{-1}, kao i nestankom širokih vrpci hidroksilnih skupina, dok je tvorba amidnih konjugata **67**, **69** i **71** potvrđena novim, jakim signalom pri 1680 cm^{-1}, te vrpcama NH-skupina pri ~ 3400 cm^{-1}. Za sve deprotektirane konjugate očekivano se javlja široka vrpca deprotektiranih OH-skupina iz manoze pri 3380 cm^{-1}.

Ulazak manozne podjedinice očituje se u ^{1}H-NMR-spektrima konjugatâ **61-65**, odn. **67-71** multipletom protona iz zaštitnih fenilnih skupina pri δ ~ 7,3 ppm, te karakterističnim pomacima metinskih protona iz šećernog prstena u području δ ~ 3,6 – 4,6 ppm. Struktura aglikonskog dijela molekule potvrđena je dubletom metilnih protona iz kiralne spojnice pri δ ~ 1 ppm, te kemijskim pomacima metinskih protona pri δ ~ 2,7 ppm. U slučaju amidnih konjugata, javlja se signal amidnih protona pri ~ 7,6 ppm (**67** i **69**), odn. 6,1 ppm (**71**). *O*-debenziliranjem očekivano su nestali signali fenilnih protona u spektrima svih konjugata.

U ^{13}C-NMR-spektrima esterskih konjugatâ **61, 63** i **65** ulazak šećerne podjedinice očituje se signalom karbonilne esterske skupine pri δ ~ 173-178 ppm, odn. u slučaju amidnih konjugata **67, 69** i **71** signalom amidne karbonilne skupine pri δ ~ 172 ppm. Pomaci fenilnih skupina pri ~ 130 ppm, kao i kiralni C-atom registriran pri δ ~ 40 ppm, te na njega vezana metilenska grupa koja se prikazuje pri δ ~ 13 ppm dodatno potvrđuju stukturu nastalih konjugata. Izostanci signala fenilnih C-atoma pri δ ~ 130 ppm u spektrima svih konjugata očiti su znak njihove potpune deprotekcije.

Budući da su X-ray i modelne studije pokazale važnost vezivanja bakterijskih fimbrija s manozidima putem vodikovih veza, ferocenski alkoholi i amini dizajnirani su tako da sadrže skupine koje su i donori i akceptori vodikove veze (esterska skupina u **54** i **IX** i karbamatna skupina u **59**). Poznato je da produljenje aglikonskog alkilnog lanca omogućava bolje smještanje manozidnog derivata u FimH vezno mjesto, zbog čega je u derivat **66** uvedena dimetilenska razmaknica.

4.7.3. Test inhibicije hemaglutinacije

Esterski konjugati **62, 64** i **66** kao i amidni konjugati **68, 70** i **72** testirani su kao inhibitori hemaglutinacije *E. coli* HB101 (pPKl4) na eritrocite zamorčića. Da bi se ispitala sposobnost vezanja pripravljenih biokonjugata, nužna je α-konfiguracija manozne podjedinice,[261] pa amidni derivati β-konfiguracije nisu ispitivani kao potencijalni inhibitori. Pri tome je određivan inhibicijski titar (IT, engl. *Inhibition Titer*), odnosno najniža koncentracija inhibitora pri kojoj nije vidljiva aglutinacija, te relativni inhibicijski titar (RIT,

engl. *Relative Inhibition Titer*) baziran na metil-α-D-manopiranozidu kao standardu. Metil-α-D-glukopiranozid je korišten kao kontrolni spoj, budući da kod njega ne postoji mogućnost inhibicije aglutinacije eritrocita *E. coli.*

Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 55.: u literaturi opisani fenilni manozid **CXII** pokazuje visoki RIT, odnosno 80 puta nižu inhibicijsku koncentraciju u odnosu na referentni alifatski manozid **CXII**. U slučaju ferocenskih manozida RIT iznosi samo 1,4 do 1,7, što znači da su fenilni manozidi daleko učinkovitiji u odnosu na ferocenske analoge. Moguće tumačenje ovih rezultata jest da planarni fenilni prsten omogućava bolje vezivanje pripadajućeg šećera s bakterijskim proteinima u odnosu na sterički zahtjevniji ferocen.

Usporedbom IT-vrijednosti za ferocenske šećere, uočava se da spoj **66** ima nešto nižu inhibicijsku koncentraciju što se može pripisati duljoj razmaknici između ferocenske i šećerne jezgre koja omogućuje veću fleksibilnost, odnosno bolje vezivanje s bakterijskim lektinima.

Tablica 55. Rezultati testa inhibicije hemaglutinacije

Testirani spoj	**IT[a](mM)**	**RIT[b](mM)**
Metil-α-D-glukopiranozid	Nema inhibicije	/
Metil-α-D-manopiranozid **CXI**[129,136-139]	3,4	1
p-Nitrofenil-α-D-manopiranozid **CXII**[136-137,142]	0,042	80
62	2,5	1,4
64	2,5	1,4
66	2	1,7
68	2,5	1,4
70	2,5	1,4
72	2,5	1,4

[a]IT = inhibicijski titar; RIT = relativni inhibicijski titar.

§ 5. ZAKLJUČCI

1. Budući da se najveći dio ove *Disertacije* zasniva na konformacijskoj analizi konjugata ferocena s aminokiselinama i ugljikohidratima, slijedi kratak opis metoda korištenih u analizi obrazaca vodikovih veza:
   - IR-spektroskopijom utvrđuje se prisutnost slobodnih (< 3400 cm^{-1}) i asociranih NH-skupina (> 3400 cm^{-1}).
   - Koncentracijski-ovisnom IR-spektroskopijom ispituje se karakter asocijacija NH-skupina: ukoliko razrjeđivanje uzrokuje ravnomjerno slabljenje intenziteta apsorpcijskih vrpci i slobodnih i asociranih NH-skupina, radi se intramolekulskim vodikovim vezama (IHB).
   - Kemijski pomaci amidnih protona $\delta > 7$ ppm indikacija su njihova sudjelovanja u HB; koncentracijski- i temperaturno-neovisni kemijski pomaci amidnih protona sugeriraju njihovo sudjelovanje IHB.
   - Jakost IHB indiciranih rezultatima IR- i NMR-spektroskopije ispituje se titracijom s DMSO: u slučaju jakih IHB ne dolazi do značajnijih promjena kemijskih pomaka amidnih protona, dok se signifikantnije razlike u kemijskim pomacima ($\Delta\delta > 1$ ppm) pripisuju slabim IHB.
   - CD-aktivnost ferocenskih peptida u području ferocenskog kromofora ($\lambda \sim 480$ nm) indikacija je kiralne organizacije inducirane intramolekulskim vodikovim vezama.

2. U prvom dijelu disertacije opisana je sinteza i konformacijska analiza dvaju novih ferocenskih peptida **1** i **2** [Y-AA-Fca-OMe; Y= Boc, (**1**, AA = Pro; **2**, AA = Ala)]:
   - U kristalnoj strukturi Boc-Pro-Fca-OMe (**1**) nađena je $NH_{Fca}\cdots OC_{Pro}$ IHB koja rezultira 7-članim prstenom (γ-okretom).
   - Prema rezultatima spektroskopskih analiza (IR-, NMR- i CD-spektroskopije) 7-člani IHB-prsten zadržan je u diklormetanskoj, odn. kloroformnoj otopini prolinskog peptida **1**, dok se alaninski peptid **2** stabilizira 5-članim $NH_{Fca}\cdots N_{Ala}$ odn. 9-članim $NH_{Ala}\cdots OC_{Fca}$ IHB-prstenovima.
   - U CD-spektrima dipeptida **1** i **2** registrirani su Cottonovi efekti slabog intenziteta i suprotnog predznaka koji ukazuju na niži stupanj kiralnog uređenja.

3. U nastavku istraživanja ferocenskih peptida **III** izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda) opisali smo konformacijska svojstva tripeptidâ **7-14 [**Boc-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe (**7**), Boc-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe (**8**), Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe (**9**), Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe (**10**), Boc-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe (**11**), Boc-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe (**12**), Ac-L-Pro-L-Ala-Fca-OMe (**13**) i Ac-D-Pro-L-Ala-Fca-OMe (**14**)]:
   - Tripeptidi **7-14** stabilizirani su intralančanim IHB. Mjerenje koncentracijski- (IR- i NMR-) i temperaturno-ovisnih NMR-spektara, te titracija s DMSO indicira sudjelovanje heterokiralnih tripeptida **8**, **10**, **12** i **14** u jačim IHB.
   - Prema rezultatima spektroskopskih analiza, homo- i heterokiralni Boc-tripeptidi **7** i **8** ostvaruju konformaciju β-okreta uspostavljanjem $NH_{Fca}\cdots OC_{Boc}$ IHB.
   - Zamjena zaštitnih skupina Boc-peptida **7** i **8** odrazila se na IHB-obrasce rezultirajućih Ac-analoga **9** i **10**. Uvedena Ac-skupina ne akceptira H-vezu te se pripadajući peptidi stabiliziraju 8-članim $NH_{Fca}\cdots N_{Ala}$ IHB-prstenovima.
   - Izmjena slijeda inkorporiranog prirodnog dipeptida u biokonjugatu **11** i **12** u odnosu na njihove analoge **7** i **8** manifestira se tvorbom dodatnog strukturnog elementa. Naime, uz β-okret ($NH_{Fca}\cdots OC_{Boc}$) sugerirana je tvorba γ-okreta, odn. 7-članog $NH_{Ala}\cdots OC_{Boc}$ IHB-prstena.
   - Transformacija Boc-tripeptidâ **11** i **12** u Ac-analoge **13** i **14** ima za posljedicu gubitak kiralnog uređenja u peptidu **13**. Iako IR- i NMR-signali njegovih NH-skupina indiciraju angažman u IHB, izostanak NOE-kontakata kao i CD-signala u području ferocenskog kromofora ($\lambda \sim 450$ nm) ukazuju na izostanak kiralno uređenih struktura.
   - Širok raspon apsolutnih vrijednosti Cottonovih efekata peptida **7-12** te **14** (155 do 4740 deg cm^2 $dmol^{-1}$) upućuje na različite stupnjeve kiralnog uređenja.

4. Uvođenjem amino-skupine na *N*-terminus donjeg ciklopentadienilnog prstena prekursora **13** i **14** pripravljeni su homo- Ac-L-Ala-L-Pro-*NH*^{1}-Fn-*NH*^{2}-L-Pro-Boc (**21**) i heterokiralni tripeptidi Ac-D-Ala-L-Pro-*NH*^{1}-Fn-*NH*^{2}-L-Pro-Boc (**22**) za koje je načinjena konformacijska analiza primjenom IR-, CD- i ^{1}H-NMR-spektroskopije, računalnih postupaka i rendgenske strukturne analize:

- Kristalografskom analizom Ac-L-Ala-L-Pro-*NH*^{1}-Fn-*NH*^{2}-L-Pro-Boc (**21**) nađene su dvije unakrsne interlančane IHB: $NH^{1}_{Fn}\cdots OC_{Boc}$ i $NH^{2}_{Fn}\cdots OC_{Ala}$ koje rezultiraju 10-članim prstenovima.
- DFT-modeliranjem pronađen je najstabilniji konformer obaju tripeptidâ u otopini u kojem dolazi do uspostavljanja dviju intramolekulskih vodikovih veza između NH-skupina vezanih na ferocenski prsten i karbonilnih funkcija iz zaštitnih skupina (10-člani $NH^{1}\cdots OC_{Boc}$ i 13-člani $NH^{2}\cdots OC_{Ac}$ IHB-prstenovi).
- U IR-spektrima dominiraju intramolekulski asocirane NH-skupine; NMR-analiza upućuje na NH_{Fn}-skupine kao donore vodikove veze.
- U NOESY-spektrima pronađeni su kontakti koji potvrđuju IHB pretpostavljene nalazima DFT-modeliranja.
- Kiralnost terminalnih Ala-podjedinica u homo- (**21**) i heterokiralnom peptidu (**22**) ne utječe na IHB-obrasce.
- Jaki pozitivni Cottonovi efekti (~ 30000 deg cm^{2} dmol^{-1}) čiji se intenzitet tek neznatno mijenja dodatkom DMSO indiciraju tvorbu visokouređenih *P*-uzvojnica u molekulama **21** i **22**.

5. Ciljni tetrapeptidi **23**-**26** [Ac-L-Ala^{1}-L-Pro-*NH*^{1}-Fn-*NH*^{2}-L-Pro-L-Ala^{2}-Boc (**23**), Ac-D-Ala^{1}-L-Pro-*NH*^{1}-Fn-*NH*^{2}-L-Pro-D-Ala^{2}-Boc (**24**), Ac-L-Ala-L-Pro-*NH*-Fn-*NH*-L-Pro-L-Ala-Ac (**25**), Ac-D-Ala-L-Pro-*NH*-Fn-*NH*-L-Pro-D-Ala-Ac (**26**)] sintetizirani su da bi se ispitala potencijalna uloga ferocen-1,1'-diamina kao začetnika okretâ. Također je ispitan i utjecaj zaštitnih skupina, bočnih ogranka, slijeda i kiralnosti prirodnih aminokiselina na kiralno uređenje ovih sustava:
   - Najstabilnija konformacija **23A** prema DFT-modeliranju stabilizirana je dvjema interlančanim IHB između NH_{Fn} i CO-akceptora iz alanina, odn. Ac-zaštitne skupine što rezultira dvama 10-, odn. 13-članim prstenovima ($NH^{1}_{Fn}\cdots OC_{Ala2}$ i $NH^{2}_{Fn}\cdots OC_{Ac}$).
   - Promjena kiralnosti u tetrapeptidu **24** omogućuje sudjelovanje alaninskih NH-skupina u IHB. Dominantna konformacija **24A** stabilizirana je kroz pet IHB: dvije intralančane IHB između NH_{Fn} i alaninskih karbonilnih funkcija ($NH^{1}\cdots OC_{Ala1}$ i $NH^{2}\cdots OC_{Ala2}$) pri čemu se zatvaraju dva 7-člana prstena, odn. dva γ-okreta; dvije interlančane IHB između alaninskih NH- i CO-skupina ($NH^{1}_{Ala}\cdots OC_{Ala2}$ i

$NH^2_{Ala}\cdots OC_{Ala1}$) pri čemu rezultiraju dva 16-člana prstena te 13-člani IHB-prsten proistekao iz veze $NH^1_{Fn}\cdots O_{Boc}$.

- Nalazi IR- i NMR-spektroskopije ukazuju na sudjelovanje NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn} u jakim IHB, dok je sudjelovanje alaninskih amidnih protona (NH^1_{Ala} i NH^2_{Ala}) manje vjerojatno, mada ne i posve isključeno.
- Kontakti pronađeni u NOESY-spektrima **23** i **24** sugeriraju tvorbu IHB predloženih molekulskim modeliranjem.
- Svi kiralni tetrapeptidi pri $\lambda \sim 465$ nm pokazuju jaki pozitivni Cottonov efekt (8810-56293 deg cm^2 $dmol^{-1}$) koji je posljedica visokouređene stabilne (*P*)-orijentirane uzvojnice.
- Dodatkom DMSO dolazi do djelomičnog narušavanja kiralnog uređenja jer se signal Cottonovog efekta smanjuje za 20-30%.

6. U završnom dijelu disertacije vezane za konjugate ferocena s aminokiselinama, pripravljeni su analozi ″Kraatzovih″ peptida (**III**) novim postupkom koji je omogućio postupno uvođenje različitih aminokiselina i mogućnost izmjene zaštitnih skupina. Dipeptidi Ac-L-Ala-*NH*^{1}-Fn-*NH*^{2}-L-Ala-Boc (**31**) i Ac-L-Ala-*NH*-Fn-*NH*-L-Ala-Ac (**32**) pripravljeni su s ciljem istraživanja utjecaja *N*-terminalne zaštitne skupine i bočnog ogranka prirodne aminokiseline na stabilizaciju peptida tipa **III** (u otopini i u čvrstom stanju).
   - U kristalnoj strukturi Ac-L-Ala-*NH*^{1}-Fn-*NH*^{2}-L-Ala-Boc (**31**) pronađene su dvije unakrsne interlančane IHB ($NH^1_{Fn}\cdots OC_{Boc}$ i $NH^2_{Fn}\cdots OC_{Ac}$) pri čemu se zatvaraju dva 10-člana prstena (β-okret).
   - DFT-modeliranjem utvrđena je najstabilnija konformacija u otopini u kojoj su pronađene IHB istovjetne onima u kristalnoj strukturi.
   - Nalazima IR- i NMR-spektroskopije indicirano je sudjelovanje NH^1_{Fn} i NH^2_F u jakim IHB.
   - NOE-kontakti potvrđuju IHB predviđene DFT-modeliranjem ($NH^1_{Fn}\cdots OC_{Boc}$ i $NH^2_{Fn}\cdots OC_{Ac}$ IHB).
   - U CD-spektrima dipeptida **31** i **32** javljaju se Cottonovi efekti pozitivnoga predznaka i jakog intenziteta (13487 i 20695 deg cm^2 $dmol^{-1}$) koji indiciraju visokoorganiziranu *P*-uzvojnicu induciranu jakim IHB.

7. U drugom dijelu ove disertacije opisani su konjugati ferocenâ i ugljikohidratâ. Istraživanja na području analoga ferocenskih muramil-dipeptida započeta su pripravom *O*-zaštićene muraminske kiseline, pri čemu je ispitan utjecaj *N*-zaštitnih skupina (Boc ili Ac) na konformacijska svojstva muraminske kiseline provođenjem IR- i ^{1}H NMR-spektroskopske te kristalografske analize:
   - U kristalnoj strukturi *N*-Boc-Mur-OMe **(43)** nađena je intermolekulska vodikova veza $NH_{Boc}\cdots OC_{Boc}$ između susjednih molekula.
   - Set najstabilnijih konformerâ izračunat primjenom MO6 i MO6-2X funkcionala (u vakuumu i $CHCl_3$) obuhvaća konformere koji tvore $NH_{Boc}\cdots OC_{COOMe}$ IHB između karbamatne i esterske karbonilne skupine.
   - Rezultati IR- i NMR-spektroskopskih mjerenja *N*-Ac-Mur-OMe (**38**) i *N*-Boc-Mur-OMe (**43**) upućuju na srednje jake IHB s tim da je participacija *N*-Boc-Mur-OMe (**43**) u IHB ponešto otežana.
   - U NMR-NOESY spektrima obaju spojeva vidljivi su kontakti amidnih protona s esterskom metilnom skupinom ($NH_{Boc/Ac} - OC_{COOMe}$), čime je dodatno potvrđena pretpostavka o tvorbi $NH_{Boc}\cdots OC_{COOMe}$ IHB koja zatvara 8-člani prsten.

8. U cilju priprave i strukturne karakterizacije ferocenom modificiranih muropeptida pripravljeni su biokonjugati **44**-**48** [*N*-Ac-Mur-NH-Fc (**44**), *N*-Ac-izoMur-NH-Fc (**45**), *N*-Ac-Mur-NH-Fn-COOMe (**46**) i *N*-Ac-izoMur-NH-Fn-COOMe (**47**); *N*-Ac-Mur-NH-Fn-NHAc (**48**)].
   - Iz rezultata dobivenih DFT modeliranjem vidljivo je da je 5-člani prsten koji tvore $NH_{amid}\cdots O^3C_{Mur}$ IHB prisutan u najstabilnijim konformerima svih ispitanih ferocenskih muropeptida. Osim te vodikove veze, stabilnosti sustavâ pridonose i 10-člani $NH_{amid}\cdots OC_{MurNAc}$ (**44A**-**47A**) te 13-člani $NH_{FnNHAc}\cdots OC_{MurNAc}$ (**48E**) IHB-prstenovi.
   - Konformacijskom analizom izvedenom s pomoću IR- i ^{1}H-NMR-spektroskopije utvrđeno je sudjelovanje amidnih skupina u intramolekulskim interakcijama: NH_{amid}-skupine biokonjugata **45** i **47** sudjeluju u srednje jakim IHB, dok njihovi dijastereomeri **44** i **46** sudjeluju u slabim IHB. Amidni protoni iz **48** sudjeluju u IHB srednjeg intenziteta, dok acetamidni protoni participiraju u slabim IHB.

- CD-spektri svih biokonjugata sadrže apsorpcijske vrpce karakteristične za kiralno uređeni ferocenski kromofor ($\lambda \sim 460$ nm): muropeptidi (*R*)-**44**, (*R*)-**46** i (*R*)-**48** pokazuju pozitivan Cottonov efekt (do 375 deg cm^2 $dmol^{-1}$), dok su CD-signali [-475 – (-1020) deg cm^2 mol^{-1}] njihovih dijastereomera (*S*)-**45** i (*S*)-**47** suprotnog predznaka.
- Elektrokemijska svojstva dipeptida **44-48** ispitana su cikličkom voltametrijom; uslijed razlike u strukturi supstituenta na drugom ciklopentadienilnom prstenu [R = H (**44**), COOMe (**46**) i NHAc (**48**)], izmjerene vrijednosti reverzibilne jedno-elektronske oksidacije znatno se razlikuju (-166 – 121 mV).

9. S ciljem priprave analoga muramildipeptida, sintetizirani su *O*-zaštićeni *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (**49**) i *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (**50**) te deprotektirani *N*-Ac-Mur-L-Ala-Fca-OMe (**51**) i *N*-Ac-Mur-D-Ala-Fca-OMe (**52**) u kojima je iGln zamijenjena s lipofilnom Fca, kao potentnim začetnikom elemenata sekundarne strukture. U pripadajućim peptidima alaninske su podjedinice suprotne kiralnosti, kako bi se utvrdilo utječe li apsolutna konfiguracija prirodne aminokiseline u ferocenskim analozima MDP na njihova konformacijska svojstva.
   - IR- i NMR-analizom indiciran je intramolekulski karakter asocijacija svih amidnih protona zaštićenih analoga muramil-dipeptida **49** i **50** (s izuzetkom NH_{MurNAc} iz biokonjugata **49** čiji je kemijski pomak nešto niži).
   - Cottonovi efekti (629, odn. -1985 deg cm^2 $dmol^{-1}$) u CD-spektrima biokonjugata **49** i **50** ukazuju na njihovo helično uređenje tvorbom slabih IHB.
   - Deprotekcija biokonjugata **49** i **50** prouzročila je narušavanje kiralne organizacije odn. slabljenje CD-signala u rezultirajućem konjugatu **52**, dok je jakost signala konjugata **51** u usporedbi s njegovim prekursorom **49** ostala gotovo nepromijenjena.

10. Završni dio ove disertacije obuhvatio je sintezu esterskih (**62-66**) i amidnih (**68-72**) *O*-manozidnih derivata s ferocenom u aglikonskom dijelu molekule s ciljem ispitivanja utjecaja organometalnog fragmenta na inhibicijsku aktivnost rezultirajućih konjugata.

- Rezultati ukazuju da ferocenski manozidi imaju bolji inhibicijski potencijal (RIT = 1,4 – 1,7) u odnosu na alifatske manozide, ali daleko slabiji od fenilnih manozida (RIT = 80).
- Spoj **66** s duljom metilenskom razmaknicom između ferocenske i šećerne jezgre ostvaruje nešto bolji inhibicijski učinak (RIT = 1,7).

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. G. Jaouen (ur.), Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine, John Wiley & Sons, Weinheim, 2006.
2. G. Simonneaux (ur.), Bioorganometallic Chemistry (Topics in Organometallic Chemistry), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
3. G. Gasser, I. Ott, N. Metzler-Nolte, *J. Med. Chem*. **54** (2011) 3-25.
4. B. Therrien, *Top. Curr. Chem*. **319** (2012) 35-56.
5. A. Giannis, T. Kolter, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32** (1993) 1244-1267.
6. R. M. J. Liskamp, D. T. S. Rijkers, J. A. Krujitzer, J. Kemmink, *Chem. Bio. Chem.* **12** (2011) 1626-1653.
7. J. Gante, *Angew. Chem. Int. Ed.* **33** (1994) 1699-1720.
8. M. Kahn, *Synlett* **11** (1993) 821-826.
9. G. L. Olsen, D. R. Bolin, M. P. Bonner, M. Böss, C. M. Cook, D. C. Fry, *J. Med. Chem.* **136** (1993) 3039-3049.
10. N. Livnah, T. Yechezkel, *Bulletin of the Israel Chem. Soc.* **20** (2005) 32-42.
11. A. Nomoto, T. Moriuchi, S. Yamazaki, A. Ogawa, T. Hirao, *Chem. Comm.* (1998) 1963-1964.
12. T. Moriuchi, A. Nomoto, K. Yoshida, T. Hirao, *J. Organomet. Chem.* **589** (1999) 50-58.
13. T. Moriuchi, A. Nomoto, K. Yoshida, A. Ogawa, T. Hirao, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 68-75.
14. T. Moriuchi, A. Nomoto, K. Yoshida, T. *Hirao*, *Organometallics* **20** (2001) 1008-1013.
15. T. Moriuchi, T. Nagai, T. Hirao, *Org. Lett.* **7** (2005) 5265-5268.
16. T. Moriuchi, T. Nagai, T. Hirao, *Org. Lett.* **8** (2006) 31-34.
17. T. Moriuchi, T. Hirao, *Acc. Chem.Res.* **43** (2010) 1040-1051.
18. T. Moriuchi, T. Hirao, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **74** (2012) 23-40.
19. R. S. Herrick, R. M. Jarett, T. P. Curran, D. R. Dragoli, M. B. Flaherty, S. E. Lindyberg, R. A. Slate, L. C. Thornton, *Tetrahedron Lett.* **37** (1996) 5289-5292.
20. S. I. Kirin, D. Wissenbach, N. Metzler-Nolte, *New J. Chem.* **29** (2005) 1168-1173.
21. D. R. Van Staveren, T. Weyhermuller, N. Metzler-Nolte, *Dalton Trans.* (2003) 210-220.
22. Y. Xu, P. Saweczko, H.-B. Kraatz, *J. Organomet. Chem.***637** (2001) 335-342.
23. L. Barišić, V. Rapić, V. Kovač, *Croat Chem. Acta* **75** (2002) 199-210.
24. L. Barišić, V. Rapić, H. Pritzkow, G. Pavlović, I. Nemet, *J. Organomet. Chem.* **682** (2003) 131-142.
25. L. Barišić, M. Dropučić, V. Rapić, H. Pritzkow, S. I. Kirin, N. Metzler-Nolte, *Chem. Comm.* (2004) 2004-2005.
26. L. Barišić, M. Čakić, K. A. Mahmoud, Y. Liu, H-B. Kraatz, H. Pritzkow, S. I. Kirin, N. Metzler-Nolte, V. Rapić, *Chem. Eur. J.* **12** (2006) 4965-4980.
27. M. Čakić Semenčić, M. Dropučić, L. Barišić, V. Rapić, *Croat Chem. Acta* **79** (2006) 599-612.
28. M. Čakić Semenčić, L. Barišić, V. Rapić, *Tetrahedron: Asymmetry* **18** (2007) 2125-2128.
29. J. Lapić, G. Pavlović, D. Siebler, K. Heinze, V. Rapić, *Organometallics* **27** (2008) 726-735.
30. M. Čakić Semenčić, D. Siebler, K. Heinze, V. Rapić, *Organometallics* **28** (2009) 2028-2037.
31. J. Lapić, S. Djaković, M. Cetina, K. Heinze, V. Rapić, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2010) 106-114.
32. J. Lapić**,** S. Djaković, I. Kodrin, Z. Mihalić, M. Cetina, V. Rapić, *Eur. J. Org. Chem.* **13** (2010) 2512-2524.
33. M. Čakić Semenčić, K. Heinze, C. Förster, V. Rapić, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2010) 1089-1097.
34. V. Kovač, M. Čakić Semenčić, I. Kodrin, S. Roca, V. Rapić, *Tetrahedron* **69** (2013) 10497-10506.

35. S. Djaković, I. Kodrin, V. Smrečki, P. Novak, Z. Mihalić, D. Žiher, J. Lapić, V. Rapić, *Tetrahedron* **70** (2014) 2330-2342.
36. S. Martić, M. Labib, P. O. Shipman, H.-B. Kraatz, *Dalton Trans.* **40** (2011) 7264-7290.
37. Z. Popović, Osnove kemije organometalnih spojeva, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2012.
38. G. Jaouen, S. Top, A. Vessières, G. Leclercq, M. J. McGlinchey, *Curr. Med. Chemistry* **11** (2004) 2505-2517.
39. L. Stryer, *Biokemija*, 2. izd. (preveli S. Vuk-Pavlović i Ž. Kućan), Školska knjiga, Zagreb, 1991.
40. I. Jerić, *Kem. Ind.* **53** (2004) 495-504.
41. N. T. Ross, W. P. Katt, A. D. Hamilton, *Phil. Trans. R. Soc A* **368** (2010) 989-1008.
42. K. D. Stigers, M. J. Soth, J. S. Nowick, *Curr. Opin. Chem. Biol*. **3** (1999) 714-723.
43. S. I. Kirin, H.-B. Kraatz, N. Metzler-Nolte, *Chem. Soc. Rew* **35** (2006) 348-354.
44. A. Sonoda, I. Moritani, *J. Organomet. Chem.* **26** (1971) 133-140.
45. V. Rapić, M. Čakić Semenčić, *Kem. Ind.* **60** (2011) 61-79.
46. X. de Hatten, T. Weyhermuller, N. Metzler-Nolte, *J. Organomet. Chem.* **689** (2004) 4856-4867.
47. V. Rapić, M. Kovačević, *Kem. Ind.* **61** (2012) 71-120.
48. M. Oberhoff, L. Duda, J.Karl, R. Mohr, G. Erker, R. Frohlich, M. Grehl, *Organometallics* **14** (1996) 4005-4011.
49. K. Heinze, M. Beckmann, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2005) 3450-3457.
50. S. Chowdhury, K. A. Mahmoud, G. Schatte, H.-B. Kraatz, *Org. Biomol. Chem.* **3** (2005) 3018-3023.
51. S. Djaković, D. Siebler, M. Čakić Semenčić, K. Heinze, V. Rapić, *Organometallics* **27** (2008) 1447-1453.
52. A. N. de Belder, E. J. Bourne, J. B. Pridham, *J. Chem. Soc*. (1961) 4464-4467.
53. D. R. van Staveren, N. Metzler-Nolte, *Chem. Rev.* **104** (2004) 5931-5985.
54. A. Albinati, P. S. Pregosin, K. Wick, *Organometallics* **15** (1996) 2419-2421.
55. A. A. Nazarov, C. G. Hartinger, V. B. Arion, G. Giester, B. K. Keppler, *Tetrahedron* **58** (2002) 8489-8492.
56. A. Appel; F. Jäkle; T. Priermier; R. Schmidt; M. Wagner, *Organometallics* **15** (1996) 1188-1194.
57. Y. Chen, H.-Y. Liu, S.-L. Fu, *Yingyong Huaxue* **19** (2002) 603-605.
58. Y. Chen, G.-F Han, H.-Y. Liu, *Jiangsu Gongyl Xueyuan Xue*bao **16** (2004) 8-10.
59. T. Itoh, Y. Shirakami, Y. Nakao, T. Yoshida, H.-S.Kim, Y. Wataya, *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **10** (2000) 1657-1659.
60. T. Itoh, S. Shirakami, Y. Nakao, Y. Yoshida, *Chem. Lett*. (1998) 979-980.
61. C. G. Hartinger, A. A. Nazarov, V. B. Arion, G. Giester, M. Jakupec, M. Galanski, B. K. Keppler, *New J. Chem*. **26** (2002) 671-673.
62. M. Takeuchi, T. Mizuno, S. Shinkai, S. Shirakami, T. Itoh, *Tetrahedron: Asimetry* **11** (2000) 3311-3322.
63. M. M. Abd-Elzaher, I. A. Ali, *Appl. Organometal. Chem.* **20** (2006) 107-111.
64. C. L. Ferreira, C. B. Ewart, C. A. Barta, S. Little, V. Yardley, C. Martins, E. Polishchuk, P. J. Smith, J. R. Moss, M. Merkel, M. J. Adam, C. Orvig, *Inorg. Chem.* **45** (2006) 8414-8422.
65. J. M. Casas-Solvas, E. Ortiz-Salmerón, L. Garcia-Fuentes, A. Vargas-Berenguel, *Org. Biomol. Chem.* **6** (2008) 4230-4235.

66. H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev*. **98** (1998) 637-674.
67. S. S. Komath, M. Kavitha, M. J. Swamy, *Org. Biomol. Chem.* **4** (2006) 973-988.
68. J. M. Casas-Solvas, E. Ortiz-Salmerón, J. J. Giménez-Martínez, L. Garcia-Fuentes, L. F. Capitán-Vallvey, F. Santoyo-González, A. Vargas-Berenguel, *Chem. Eur. J.* **15** (2009) 710-725.
69. A. Otsuka, K. Sakurai, T. Hasegawa, *Chem. Commun.* (2009) 5442-5444.
70. R. Trivedi, S. B. Deepthi, L. Giribabu, B. Sridhar, P. Sujitha, C. G. Kumar, K. V. S. Ramakrishna, *Appl. Organometal. Chem* **26** (2012) 369-376.
71. L. Szilagy, P. Pristovšek, *Med. Chem.* **7** (2007) 861-870.
72. B. A Dmitriev, F. V Toukach, O. Holst, E. T. Rietschel, S. Ehlers, *J. Bacteriol*. **186** (2004) 7141-7148.
73. W. Vollmer, J. V. Holtje, *J. Bacteriol*. **186** (2004) 5978-5987.
74. L. Chedid, M. Parant, F. Parant, P. Lefrancier, J. Choay, E. Lederer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** (1977) 2089-2093.
75. M. Parant, F. Parant, L. Chedid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** (1978) 3395-3399.
76. N. P. Cummings, M. J. Pabst, R. B. Jr. Johnston, *J. Exp. Med.* **152** (1980) 1659-1669.
77. J. C. Cox, A. R. Coulter, *Vaccine* **15** (1997) 248-256.
78. K. Dzierzbicka, A. M. Kolodziejczyk, *Polish J. Chem*. **77** (2003) 373-395.
79. H. Takada, M. Tsujimoto, K. Kato, S. Kotani, S. Kusumoto, M. Inage, M. *Infect. Immun.* **25** (1979) 48-53.
80. M. J. Pabst, R.B. Jr. Johnston, *J. Exp. Med.* **151** (1980) 101-114.
81. F. Ellouz, A. Adam, R. Ciorubaru, E. Lederer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59** (1974) 1317-1325.
82. A. Adam, M. Devys, V. Souvannavong, P. Lefraneier, J. Choay, E. Lederer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **72** (1976) 339-346.
83. S. Traub, S. von Aulock, T. Hartung, C. Hermann, *Jour. Of. Endotox. Res*. **12** (2006) 69-85.
84. C. Ogawa, Y-J. Liu, K. S. Kobayashi, *Curr. Bioact. Compd*. **7** (2011) 180-197.
85. S. Fermandjian, B. Perly, M. Level, P. Lefrancier, *Carbohydr. Res.* **162** (1987) 23-32.
86. Y. Boulanger, Y. Tu, V. Ratovelomanana, E. Purisima, S. Hanessian, *Tetrahedron* **48** (1992) 8855-9110.
87. H. M. Flowers, R. W. Jeanloz, *J. Org. Chem* **28** (1963) 2983-2986.
88. M. J. Pabst, S. Beranova-Giorgianni, J. M. Krueger, *Neuroimmunomodulation* **6** (1999) 261-283.
89. J. R. Pappenheimer, G. Koski, V. Fencl, M. L. Kamovsky, J. Krueger, *J. Neurophysiol*. **38** (1975) 1299-1311.
90. J. M. Krueger, M. L. Karnovsky, S. A. Martin, J. R. Pappenheimer, J. Walter, K. Biemann, *J. Biol. Chem.* **259** (1984) 12659-12662.
91. A. Fox, J. H. Schwab, T. Cochran, *Infect. Immun.* **29** (1980) 526-531.
92. M. P. Kozar, M. T. Krahmer, A. Fox, B.M. Gray, *Infect.Immun.* **68** (2000) 4688-4698.
93. Z. Sen, M. L. Kamovsky, *Infect. Immun*. **43** (1984) 937-941.
94. K. Bal, L. Larsson, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **738** (2000) 57-65.
95. E. Lien, T. J. Sellati, A. Yoshimura, T. H. Flo, G. Rawadii, R. W. Finberg, J. D. Carroll, T. Espevik, R. R. Ingals, J. D. Radolf, D. T. Golenbock, *J. Biol. Chem*. **274** (1999) 33419-33425.
96. A. Uehara, S. Yang, Y. Fujimoto, K. Fukase, S. Kusumoto, K. Shibata, S. Sugawara, H. Takada, *Cell. Microbiol.* **7** (2005) 53-61.

97. S. E. Girardin, L. H. Travassos, M. Herve, D. Blannot, I. G. Boneca, D. J. Philpott, P. J. Sansonett, D. Mengin-Lecreulx, *J. Biol. Chem* **278** (2003) 41702-41708.
98. N. Inohara, Y. Ogura, G. Nunez, *Curr. Opin. Microbiol.* **5** (2002) 76-80.
99. A. Adam, E. Lederer *Med. Res. Rev.* **4** (1984) 111-120.
100. A. Adam, E. Lederer. *Immunology* **1** (1988) 205-244.
101. P. Lefrancier, E. Lederer, *Pure. Appl. Chem.* **59** (1987) 449-454.
102. R. Ribić, S. Tomić, *Kem. Ind.* **62** (2013) 19-31.
103. K. Hemmi, H. Takeno, S. Okada, O. Nakaguchi, Y. Kitaura, M. Hashimoto, *J.Am. Chem. Soc*. **103** (1981) 7026-7028.
104. D. Migliore-Samour, J. Bouchaudon, F. Floc'h, A. Zerial, L. Ninet, G. H. Werner, P. A. Jolles, *Life Sci*. **26** (1980) 883-888.
105. M. Sollner, S. Pečar, A. Štalc, *Eur. J. Med. Chem.* **31** (1996) 927-933.
106. D. H. R. Barton, J. Camara, P. Dalko, S. D. Gero, *J. Org. Chem*. **54** (1989) 3764-3766.
107. A. Hasewaga, H. Okumura, M. Kiso, *Res. Bull. Face. Arg. Gifu University* **42** (1979) 169-179.
108. I. Azuma, H Okumura, I. Saiki, M. Kiso, A. Hasegawa, Y. Tanio, Y. Yamamura, *Infect. Immun*. **33** (1981) 834-839.
109. M. Moriguchi, K. Urabe, N. Norisada, C. Ochi, A. Štalc, U. Urleb, S. Muraoka, *Arzneim. Forsch./Drug Res*. **49** (1999) 184-188.
110. Ž. Jakopin, E. Corsini, M. Gobec, I. Mlinarič-Raščan, M. Sollner Dolenc, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 3762-3777.
111. S. Simčić, B. Wraber, M. Sollner, U. Urleb, S. Gobec, *Pflug. Arch. Eur. J. Phy*. **440** (2000) R64-R66.
112. P. D. Becker, M. Nörder, C. A. Guzmán, S. Grinstein, *Clin. Vaccine Immunol.* **14** (2007) 538-543.
113. P. D. Becker, R. S. Corral, C. A. Guzmán, S. Grinstein, *Vaccine* **19** (2001) 4603-4609.
114. J. Túranek, D. Záluská, A. Vacek, P. Borkovcová, J. Thurnvaldová, L. Bláha, K. Mašek, *Int. Immunopharm.* **1** (2001) 167-175.
115. B. Vranešić, J. Tomašić, S. Smerdel, D. Kantoci, F. Benedetti, *Helv. Chim. Acta* **76** (1993) 1752-1758.
116. R. Ribić, L. Habjanec, B. Vranešić, R. Frkanec, S. Tomić, *Chem. Biodiv*. **9** (2012) 777-788.
117. S. Gobec, U. Urleb, S. Simčić, B. Wraber, *Pharmazie,* **56** (2001) 523-526.
118. R. Ribić, L. Habjanec, B. Vranešić, R. Frkanec, S. Tomić, *Croat. Chem. Acta* **84** (2011) 233-244.
119. R. Ribić, L. Habjanec, R. Frkanec, B. Vranešić, S. Tomić, *Chem. Biodiv*. **7** (2012) 1373-1381.
120. A. E. Zemlyakov, V. O. Kuryanov, V. V. Tsikalov, V. Y. Chirva, *Bioorg. Khim*. **24** (1998) 449-453.
121. O. V. Kalyuzhin, N. S. Zakharova, M. V. Britsina, A. E. Zemlyakov, V. V. Kalyuzhin, *Bull. Exp. Biol. Med*. **128** (1999) 1140-1141.
122. G. Merhi, A. W. Coleman, J. P. Devissaguet, G. M. Barrat, *J. Med. Chem*. **39** (1996) 4483-4488.
123. J. H. Phillips, G. F Babcock, K. Nishioka, *The J. of Immunology* **126** (1981) 915-921.
124. V. M. Titov, E. A. Meshcheryakova, T. A. Balashova, T. M. Andronova, V. T. Ivanov, *Int. J. Pept. Protein Res*. **45** (1995) 348-355.
125. K. Dzierzbicka, A. M. Kolodziejczyk, B. Wysocka - Skrzela, A. Mysliwski, D. Sosnowska, *J. Med. Chem*. **44** (2001) 3606-3615.

126. D. Sosnowska, A. Mysliwski, K. Dzierzbicka, A. M. Kolodziejczyk, *Biotherapy* **10** (1997) 161-168.
127. K. Dzierzbicka, P. Trzonkowski, P. Sewerynek, A. Mysliwski, *J. Med. Chem*. **46** (2003) 978-986.
128. R. Csuk, G. Gothe, *Tetrahedron* **60** (2004) 2201-2211.
129. D. Sosnowska, K. Dzierzbicka, A. Mysliwski, A. M. Kolodziejczyk, *Post. Hig. Med. Dosw*. **46** (1992) 521-530.
130. I. Azuma, T. Otani, *Med. Res. Rev*. **14** (1994) 401-414.
131. J. E. Frampton, *Pediatric. Drugs* **12** (2010) 141-153.
132. P. M. Andernson, M. Tomaras, K. McConnel, *Drugs Today* **46** (2010) 327-337.
133. C. Leclerc, F. R. Vogel, *CRC Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Systems* **2** (1986) 353-406.
134. S. Ando, H. Tsuge, T. Mayumi, *Coll. Polym. Sci.* **247** (1996) 678-684.
135. G. M. Bahr, *J. Antimicrob. Chemother*. **51** (2003) 5-8.
136. N. Sharon, H. Lis, *Glycobiology* **14** (2004) 53R-62R.
137. K.-A. Karlsson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5** (1995) 622-635.
138. T. K. Lindorst, Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 1.izd., Wiley-VCH: Kiel, 2003.
139. D. I. Ofek, R. J. Hasty, R. J. Doyle, Bacterial Adheson to Animal Cell and Tissues, ASM Press, Washington, 2003.
140. J. P. Nataro, P. S. Cohen, H. I. T. Mobley, J. N. Weiser, ASM Press, Washington, 2005.
141. N. Sharon, *Biochim. Biophys. Acta* **1760** (2006) 527-537.
142. C. S. Hung, J. Bouckaert, D. Hung, J. Pinkner, C. Widberg, A. Defusco, C. G. Auguste, R. Strouse, S. Langermann, G. Waksman, S. J. Hultgren, *Mol. Microbiol*. **44** (2002) 903-915.
143. J. Bouckaert, J. Berglund, M. Schembri, E. De Genst, L. Cools, M. Wuhrer, C. S. Hung, J. Pinkner, R. Slättegård, A. Zavialov, D. Choudhury, S. Langermann,S. J. Hultgren, L. Wyns, P. Klemm, S. Oscarson, S. D. Knight, H. De Greve, *Mol. Microbiol.* **55** (2005) 441-455.
144. A. Wellens, C. Garofalo, H. Nguyen, N. Van Gerven, R. Slättegård, J.-P. Hernalsteens, L. Wyns, S. Oscarson, H. De Greve, S. Hultgren, J. Bouckaert, *PloS ONE* **3** (2008) 1-13.
145. A. Schierholt, M. Hartmann, T. K. Lindhorst, *Carbohyd. Res*. **346** (2011) 1519-1526.
146. O. Sperling, A. Fuchs, T. K. Lindhorst, *Org. Biomol. Chem*. **4** (2006) 3913-3922.
147. S. D. Knight, J. Bouckaert, *J. Top. Curr. Chem*. **288** (2009) 67-107.
148. S. B. Levy, *Adv. Drug Delivery Rev*. **57** (2005) 1446-1450.
149. N. Sharon , *FEBS Lett.* **217** (1987) 145-157.
150. N. Firon, I. Ofek, N. Sharon, *Carbohydr. Res.* **120** (1983) 235-249.
151. N. Nagahori, R. T. Lee, S. L. Nishimura, S. Pagé, R. Roy, Y. C. Lee, *Chem.Bio.Chem.* **3** (2002) 836-844.
152. A. Ptel, T. K. Lindhorst, *Carbohydr. Res.* **341** (2006) 1657-1668.
153. M. Hartmann, T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* (2011) 3583-3609.
154. Z. Han, J. S. Pinkner, B. Ford, R. Obermann, W. Nolan, S. A. Wildman, D. Hobbs, T. Ellenberger, C. K. Cusumano, S. J. Hultgren, J. W. Janetka, *J. Med. Chem*. **53** (2010) 4779-4792.
155. T. K. Lindhorst , S. Kötter , J. Kubisch , U. Krallmann-Wenzel , S. Ehlers , V. Krén, *Eur. J. Org. Chem.* (1998) 1669-1674.
156. T. K. Lindhorst , C. Kieburg , U. Krallmann-Wenzel ,*Glycoconj. J*. **15** *(*1998) 605-613.

157. O. Sperling, A. Fuchs, T. K. Lindhorst, *Org. Biomol. Chem.* **4** (2006) 3913-3922.
158. A. N. Nesmeyanov, V. A. Sazonova, V. N. Drozd, *Tetrahedron* **17** (1959) 13-15.
159. W. L. Davis, R. F. Shago, E. H. G. Langner, J. C. Swarts, *Polyhedron* **24** (2005) 1611-1616.
160. J. Alagić-Ibrahimpašić, (2002) Magistarski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
161. K. L. Reinhart, R. J. Curby, P. E. Sokol, *J. Am. Chem. Soc.* **79** (1957) 3420-3424.
162. C. Moise, I. Tirouflet, *Bull. Soc. Chim. France* **1** (1971) 2656-2665.
163. B. Misterkiewicz, *J. Organometallic Chem*. **224** (1982) 43-47.
164. J. D. Coye, G. Marr, *J. Organometallic Chem.* **60** (1973) 153-156.
165. E. A. Kalenikov, J. M. Pauškin, V. G. Tkalčeva, J. A. Šigelj, *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **19** (1975) 443-445.
166. C. L. Sterzo, G. Ortaggi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans* II (1984) 345-348.
167. R. F. Shago, J. C. Swarts, E. Kreft, C. E. J. van Rensurg, *Anticancer Res.* **27** (2007) 3431-3434.
168. F. S. Arimoto, A. C. Jr. Haven, *J. Am. Chem. Soc*. **77** (1955) 6295-6296.
169. A. N. Nesmejanov, E. G. Perevalova, L. P. Jurjeva, *Chem. Ber.* **93** (1960) 2729-2735.
170. H. Lehner, K. Schlögl, *Monatsh. Chem.* **101** (1970) 895-900.
171. K. Schlögl, *Monatsh. Chem.* **88** (1957) 601-621.
172. J. M. Osgerby, P. L. Pauson, *J. Chem. Soc.* (**1961**) 4600-4604.
173. V. J. Fiorina, R. J. Dubois, S. Brynes, *J. Med. Chem.* **21** (1978) 393-395.
174. R. Urban, *Tetrahedron* **35** (1979) 1841-1843.
175. A. Ratajczak, A. Czech, *Bull. Acad. Pol. Sci. Chim.* **27** (1979) 661-664.
176. D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, Purification of laboratory chemicals, Pergamon Press, 1988.
177. I. Žigrović, (1997) Magistarski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
178. I. L. Karle, *J. Mol. Struct.* **474** (1999)103–112.
179. J.D. Tyndall, B. Pfeiffer, G. Abbenante, D. P. Fairlie, *Chem. Rev.* **105** (2005) 793–826.
180. D. Seebach, S. Abele, K. Gademann, B. Jaun, *Angew. Chem. Int. Ed.* **38** (1999) 1595–1597; *Molecules* **18** (2013) 2307-2327.
181. K. Gademann, T. Kimmerlin, D. Hoyer, D. Seebach, *J. Med. Chem.* **44** (2001) 2460–2468.
182. V.S. Ananthanarayanan, T.S. Cameron, *Ini. J. Peptide Protein Res.* **31** (1988) 399-411.
183. G. Vanhoof, F. Goosssens, I. de Meester, D. Hendriks, S. Scharpé *FASEB J.* **9** (1995)736-744.
184. B. K. Kay, M. P. Williamson, M. Sudol, *Faseb J*. **14** (2000) 231–241.
185. G. D. Fasman (ur.), Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation: J.S. Richardson, D.C. Richardson, Principles and patterns of protein conformation, Plenum, New York, 1989, 1-98.
186. A. P. Joseph, N. Srinivasan, A. G. de Brevern, *Amino Acids* **43** (2012) 1369-1381.
187. N. A. Pierson, L. Chen, D. H. Russell, D. E. Clemmer, *J. Am. Chem. Soc.* **135** (2013) 3186–3192.
188. R. L. Lichter, D. E. Dorman. *J. Org. Chem*. **41** (1976) 582–583.
189. S. K. Sarkar, P. E. Young, C. E. Sullivan, D. A. Torchia, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **81**(1984) 4800-4803.

190. W. J. Chazin, J. Kördel, T. Drakenberg, E. Thulin, P. Brodin, T. Grundstörm, S. Forsén, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86** (1989) 2195-2198.
191. I. P. Troganis, Z. Gerothanassis, T. Athanassiou, G. E. Mavromoustakos, C. Hawkes, C. Sakarellos, *Biopolymers* **53** (2000) 72-83.
192. D. E. Dorman, F. A. Bovey, *J. Org. Chem.* **38** (1973) 2379-2382.
193. O. Jardetzky, G. K. C. Roberts, NMR in Molecular Biology, Academic Press, New York, 1981.
194. V. Madison, J. Schellman, *Biopolymers* **9** (1970) 511-567.
195. M. Montagut, B. Lemanceau, A.-M. Bellocq, *Biopolymers* **13** (1974) 2615-2629.
196. T. Higasijima, M. Tasumi, T. Miyazawa, *Biopolymers* **16** (1977) 1259-1270.
197. V. Madison, K. D. Kopple, *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 4855-4863.
198. E. S. Eberhardt, S. N. Loh, A. P. Hinck, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992) 5437-5439.
199. E. S. Eberhardt, S. N. Loh, R. T. Raines, *Tetrahedron Lett.* **34** (1993) 3055-3056.
200. E. S. Eberhardt, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994) 2149-2150.
201. D. Q. McDobnald, W. C. Still, *J. Org. Chem* **61** (1996) 1385–1391.
202. E. S. Eberhardt, N. Panasik Jr., R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 12261-12266.
203. E. Beausoleil, W. D. Lubell, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 12902-12908.
204. H. Balaram, B. V. V. Prasad, P. Balaram, *J. Am. Chem. Soc.* **105** (1983) 4065-4071.
205. R. D. Husain, J. McCandless, P. J. Stevenson, T. Large, D. J. S. Guthrie, B. Walker, *J Chromatogr Sci.* **40** (2002) 1-6.
206. R. A. Bragg, J. Clayden, G. A. Morris, J. H. Pink, *Chem. Eur. J.* **8** (2002) 1279-1289.
207. B. Ishimoto, K. Tonan, S.Ikawa, *Spectrochimica Acta Part A* **56** (1999) 201-209.
208. M. J. Deetz, J. E. Fahey, B. D. Smith, *J Phys. Org. Chem* **14** (2001) 463-467.
209. L. Barišić, M. Kovačević, M. Mamić, I. Kodrin, Z. Mihalić, V. Rapić, *Eur. J. Inorg. Chem.* **11** (2012) 1810-1822.
210. J. Kong, S. Yu, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **39** (2007) 549-559.
211. S. Ganesh, R. Jayakumar, *J. Peptide Res.* **59** (2002) 249-256.
212. E. Vass, M. Hollósi, F. Besson, R. Buchet, *Chem. Rev.* **103** (2003) 1917-1954.
213. L. Ning, W. De-Ning, Y. Sheng-Kang, *Polymer* **37** (1996) 3045-3047.
214. V. Kovač, M. Čakić Semenčić, K. Molčanov, I. Sabljić, D. Iveković, M. Žinić, V. Rapić, *Tetrahedron* **68** (2012) 7884-7891.
215. R. Rai, S. Raghothama, P. Balaram, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 2675–2681.
216. H.-J. Lee, H.-M. Park, K.-B. Lee, *Biophys Chem.***125** (2007) 117-126.
217. M. Llinas, M. P. Klein, *J. Am. Chem. Soc.* **97** (1975) 4731-4737.
218. H. Kessler, *Angew. Chem.* **94** (1982) 509-511.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **21** (1982) 512-523.
219. E. K. S. Vijayakumar, P. Balaram, *Biopolymers* **22** (1983) 2133-2140.
220. N. H. Andersen, J. W. Neidigh, S. M. Harris, G. M. Lee, Z. Liu, H. Tong, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 8547-8561.
221. N. J. Baxter, L. L. Hosszu, J. P. Waltho, M. P. Williamson, *J. Mol. Biol.* **284** (1998) 1625-1639.
222. F. E. Appoh, T. C. Sutherland, H.-B. Kraatz, *J. Organomet. Chem.***689** (2004) 4669-4677.
223. J. Lapić, G. Pavlović, D. Siebler, K. Heinze, V. Rapić *Organometallics* **27** (2008) 726-735.
224. S. Beheshti, A. Lataifeh, H.-B. Kraatz, *J. Organomet. Chem.* **696** (2011) 1117-1125.

225. E. S. Stevens, N. Sugawara, G. M. Bonora, C. Toniolo, *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 7048-7050.
226. J. T. Pelton, L. R. McLean, *Anal. Biochem.* **277** (2000) 167-176.
227. A. Comba (ur.), Modeling of Molecular Properties: K. Heinze, K. Hüttinger, D. Siebler, 'Elucidation of the Conformational Freedom of Ferrocene Amino Acid (Bio)Conjugates: A Complementary Theoretical and Experimental Approach, 325-345, John Wiley&Sons, 2011.
228. J. L. Jios, S. I. Kirin, N. N. Buceta, T. Weyhermüller, C. O. della Védova, N. Metzler-Nolte, *J. Organomet. Chem.* **692** (2007) 4209-4214.
229. T. Moriouchi, N. Kikushima-Honda, S. D. Ohmura, T. Hirao, *Tetrahedron Lett.* **51** (2010) 4530-4533.
230. K. Wüthrich, M. Billeter, W. Braun, *J. Mol. Biol.* **180** (1984) 715-740.
231. A. Comba (ur.), Modeling of molecular properties, John Wiley&Sons, 2011.
232. Y. Jin, K. Tonan, S. Ikawa, *Spectrochimica Acta Part A***58** (2002) 2795-2802.
233. F. Gao, Y. Wang, Y. Qiu, Y. Li, Y. Sha, L. Lai, H. Wu, *J. Pept. Res.* **60** (2002) 75-80.
234. I. Kodrin, (2011) Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
235. F. Sladojevich, A. Guarna, A. Trabocchi, *Org. Biomol. Chem*. **8** (2010) 916-924.
236. T. P. Curran, K. A. Marques, M. V. Silva, *Org. Biomol. Chem*. **3** (2005) 4134-4138.
237. M. Sugawara, K. Tonan, S. Ikawa, *Spectrochimica Acta Part A* **57** (2001)1305-1316.
238. S. Ahuja, S. Scypinski, Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis, Volume 10, Second Edition (Separation Science and Technology), Academic Press.
239. M. A. Burlington, Nuclear magnetic Resonance Spectroscopy, Elsevier Inc., R. K. Longman Scientific & Technical, New York, 119-131, 2011.
240. A. Babič, S. Pečar, S. *Tetrahedron* **19** (2008) 2265-2271.
241. V. Raoussis, L. Leondiadis, E. Livaniou, G. P. Evangelatos, *Carbohydr. Res.* **297** (1996) 289-295.
242. P. H. Gross, M. Rimpler, *Liebigs. Ann. Chem* (1983) 37-45.
243. C. Henry, J.-P. Joly, Y. Chapleur, *J. Carbohyd. Chem.* **18** (1999) 689-695.
244. M. J. Burk, J. G. Allen, *J. Org. Chem*. **62** (1997) 7054-7057.
245. Y. Basel, A. Hasser, *J. Org. Chem*. **65** (2000) 6368-6380.
246. M. Kovačević, V. Rapić, I. Lukač, K. Molčanov, I. Kodrin, L. Barišić, *J. Mol. Stuct.* **1048** (2013) 349-356.
247. C. Förster, M. Kovačević, L. Barišić, V. Rapić, K. Heinze, *Organometallics* **31** (2012) 3683-3694.
248. S. Lu, V. V. Strelets, M. F. Ryan, W. J. Pietro, A. B. P. Lever, *Inorg. Chem* **35** (1996) 1013-1023.
249. K. Heinze, D. Siebler, *Anorg. Allg. Chem* **633** (2007) 2223-2233.
250. M. Rosenblum, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **80** (1958) 5443-5449.
251. M. Emilia, N. Silva, A. J. L. Pomberio, *J. Organomet. Chem.* **480** (1994) 81-90.
252. S. M. Batterjee, M. I. Marzouk, M. E. Aazab, M. A. El-Hashash, *Appl. Organometal. Chem.* **17** (2003) 291-297.
253. K. Heinze, M. Schlenker, *Eur. J. Inorg. Chem* (2007) 2974-2988.
254. L. Barišić, M. Roščić, M. Kovačević, M. Čakić Semenčić, Š. Horvat, V. Rapić, *Carbohydr. Research* **346** (2011) 678-684.
255. Y. Boulanger, Y. Tu, V. Ratovelomanana, E. Purisima, S. Hanessian, *Tetrahedron* **48** (1992) 8855-9110.

256. M. Kong-Morris, A. S. Serianni, *J. Am. Chem. Soc.* **109** (1987) 3501-3508.
257. V. Ragousis, L. Leondiadis, E. Livaniou, G. P. Evangelatos, *Carbohydr. Res.* **297** (1997) 289-295.
258. D.-L. M. Tzou, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **27** (2005) 209-214.
259. R. Ribić, M. Kovačević, V. Petrović Peroković, I. Gruić-Sovulj, V. Rapić, S. Tomić, *Croat. Chem. Acta* **83** (2010) 421-431.
260. M. Kovačević, L. Barišić, R. Ribić, V. Petrović Peroković, S. Tomić, V. Rapić, *Appl. Organomet. Chem.* **26** (2012) 74-79.
261. S. G. Gouin, A. Wellens, J. Bouckaert, J. Kovensky, *Chem. Med*. **4** (2009) 749-755.

§ 7. PRILOZI

POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AA = aminokiselina

Ac = acetil

Ala = alanin

Ar = aril

Boc = *tert*-butoksikarbonil

bs = široki singlet

CCI = ugljikohidrat-ugljikohidrat specifične interakcije (engl. *Carbohydrate-Carbohydrate Interaction*)

CD = cirkularni dikroizam

CRD = domena koja prepoznaje ugljikohidrat (engl. *Carbohydrate Recognition Domains)*

CV = ciklička voltametrija

d = dublet

dd = dublet dubleta

DFT = density functional theory

DMSO = dimetil-sulfoksid

DTH = reakcije odgođene osjetljivosti (engl. *Delayed Type Hypersensitivity*)

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

ekv. = ekvivalent

Et = etil

EtOAc = etil-acetat

Fc = ferocenil

Fca = 1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina

Fcd = ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina

Fcda = ferocen-1,1'-diamin

Fn = 1,1'-ferocenilen

Gly = glicin

HOBt = 1-hidroksibenzotriazol-hidrat

HB = vodikova veza (*eng*. Hydrogen Bond)

IHB = intramolekulska vodikova veza (engl. *Intramolecular Hydrogen Bond*)

IR = infracrvena spektroskopija [asoc. (asocirana); slob. (slobodna)]

m = multiplet

Me = metil

MDP = muramil-dipeptid

MS = maseni spektar

NOD protein = (engl. *Nucleotide-binding oligomers domain*)

Ph = fenil

Pro = prolin

pt = pseudotriplet

q = kvartet

SAR = odnos strukture i biološke aktivnosti (engl. *Structural-Activity Relationship)*

t = triplet

TFA = trifluoroctena kiselina

THF = tetrahidrofuran

TLR = Toll-like receptori

UPEC = uropatogena *Escherichia coli* (engl. *Uropathogenic Escherichia coli*]

Val = valin

s = singlet

$[\alpha]_D$ = specifična optička rotacija

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime:	Monika Kovačević
Datum i mjesto rođenja:	17. veljače 1982., Travnik, Bosna i Hercegovina
Adresa :	Laboratorij za organsku kemiju, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska
e-mail:	**monika.kovacevic@pbf.hr**

Obrazovanje

2007.-danas	Poslijediplomski doktorski studij prirodnih znanosti, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, polje kemija, smjer organska kemija
2006.	Naslov diplomskog rada: "Fenolni spojevi i antioksidativna aktivnost u plodovima trnine te u nektarima i sirupima trnine (*Prunus spinosa* L.)" Mentor: izv. prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac
2001.-2006.	Diplomirani inženjer prehrambene tehnologije, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
1997.-2001.	X. gimnazija, Zagreb

Radno iskustvo

2007.	Laboratorij za organsku kemiju, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, znanstveni novak-asistent

Nagrade i priznanja

2001.-2006.	Stipendija Grada Sv. Nedelja
2010.	Stipendija KAAD (Katholischer Akademischer Ausländer Dienst)
2010.	Stipendija NZZ (Nacionalna zaklada za znanost, visoko školstvo i tehnologijski razvoj Republike Hrvatske)

2012. Potpora Biotehničke zaklade Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta mladim istraživačima

Stručno usavršavanje

siječanj 2010.- travanj 2010. Johannes Gutenberg Universität, Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie, Mainz, Njemačka

Članstvo: Hrvatsko kemijsko društvo

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:

1. R. Ribić, **M. Kovačević**, V. Petrović Peroković, I. Gruić-Sovulj, V. Rapić, S. Tomić, Synthesis and Biological Activity of Mannose Conjugates with 1-Adamantamine and Ferrocene Amines, *Croat. Chem. Acta* **83** (2010) 421-431.
2. L. Barišić, M. Roščić, **M. Kovačević**, M. Čakić Semenčić, Š. Horvat, V. Rapić, The first ferrocene analogues of muramyldipeptide, *Carbohydr. Research* **346** (2011) 678-684.
3. **M. Kovačević**, L. Barišić, R. Ribić, V. Petrović Peroković, S. Tomić, V. Rapić, Ferrocene conjugates with mannose: synthesis and influence of ferrocene aglycon on mannose-mediated adhesion of *Escherichia coli, Applied organometallic chemistry* **26** (2012) 74-79.
4. C. Förster, **M. Kovačević**, L. Barišić, V. Rapić, K. Heinze, Ferrocenyl-Labeled Sugar Amino Acids: Conformation and Properties, *Organometallics* **31** (2012) 3683-3694.
5. L. Barišić, **M. Kovačević**, M. Mamić, I. Kodrin, Z. Mihalić, V. Rapić, Synthesis and Conformational Analysis of Methyl N-alanyl-1'-aminoferrocene-1-carboxylate, *European journal of inorganic chemistry* **11** (2012) 1810-1822.
6. **M. Kovačević**, V. Rapić, I. Lukač, K. Molčanov, I. Kodrin, L. Barišić, Novel fully protected muramic acid: A facile synthesis and structural study, *Journal of Molecular Structure* **1048** (2013) 349-356.

a2 radovi:

7. V. Rapić, **M. Kovačević**, III. Organometalna i bioorganometalna kemija - ferocenski peptidi, *Kemija u industriji : časopis kemičara i tehnologa Hrvatske* **61** (2012) 71-120.

Sažeci u zbornicima skupova:

1. **M. Kovačević**, L. Barišić, R. Ribić, S. Tomić, V. Rapić, *Sinteza ferocenskih glikokonjugata* XXI. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Trogir, Hrvatska, 2009, 80-80.

2. **M. Kovačević**, L. Barišić, D. Siebler, C. Förster, K. Heinze, V. Rapić, *Konjugati muraminske i izomuraminske kiseline s ferocenskim aminima: sinteza i strukturna analiza* XXII. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Zagreb, Hrvatska, 2011, 183-183.

3. **M. Kovačević**, L. Barišić, I. Lukač, V. Rapić, *Priprava N-tert-butoksikarbonilmuraminske kiseline* XXII. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Zagreb, Hrvatska, 2011, 184-184.

4. L. Barišić, **M. Kovačević**, M. Mamić, I. Kodrin, Z. Mihalić, V. Rapić, *Conformational properties of ferrocene peptides containing exchanged sequence of constituent amino acids* XXIII. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Osijek, Hrvatska, 2013, 169-169.

5. A. Čače, **M. Kovačević**, K. Molčanov, K.Radošević, V. Srček Gaurina, S. Roca, L. Barišić, *Konjugati 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline i prolina: sinteza, konformacijska analiza i biološka evaluacija* X. Susret mladih kemijskih inženjera, Zagreb, Hrvatska, 2014, 142-142.