

III. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocenski peptidi

KUI – 4/2012
Prispjelo 27. siječnja 2011.
Prihvaćeno 22. rujna 2011.

V. Rapić* i M. Kovačević

Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb

U ovom radu obrađeno je područje biokonjugata ferocena s prirodnim aminokiselinama i oligopeptidima, a u najvećem dijelu teksta riječ je o autorskom pregledu popraćenom u manjoj mjeri relevantnim literaturnim podatcima. Drugo poglavlje posvećeno je peptidima i peptidomimetima, pri čemu je posebna pozornost posvećena α -uzvojnici i β -nabranoj plohi (kao najvažnijim elementima sekundarne i tercijarne strukture peptida), a potom i umjetnim β -ploham s neaminokiselinskim začetnicima okretâ. Treće poglavlje bavi se peptidima izvedenima iz ferocenkarkoboksilne kiseline i ferocenamina, kao i iz heteroanularno supstituirane ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (Fcd) i ferocen-1,1'-diamina (Fcda). U četvrtom su poglavlju iscrpno opisani naši radovi o peptidima na osnovi 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca). Sljedeće je poglavlje posvećeno novim monosupstitucijskim konjugatima Fcd i Fcda s aminokiselinama, a u šestom su dijelu obrađene vlastite publikacije iz područja vrlo aktualnih peptidomimetika – ferocenskih ureido-peptida i β -peptida.

Opisana je konformacijska analiza novosintetiziranih ferocenskih konjugata u otopini i u čvrstom stanju s pomoću spektroskopskih postupaka (IR, 1D- i 2D-NMR, v. r.-NMR, temperaturno i koncentracijski ovisan NMR i CD) te na osnovi DFT-računa.

Ključne riječi: *Bioorganometalna kemija, ferocenski peptidi – dobivanje, reakcije, struktura*

1. Uvod

U prvomu dijelu ovoga pregleda¹ dane su osnove organometalne kemije, pri čemu su posebno istaknuti ferocenski derivati i metalni karbonili. Potom je obrađena nova disciplina – bioorganometalna kemija – a uz teorijski osvrt ovdje su navedeni i primjeri uporabe bioorganometalnih spojeva u terapiji, bioanalizi (senzori), molekulskom prepoznavanju i imunologiji.

Drugi dio pregleda² posvećen je aminokiselinama koje kao konstitucijski dio sadrže ferocensku jezgru. Opisan je racionalni postupak pripreme tih spojeva – $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_m\text{-Fn-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ ($m, n = 0, 1, 2, \dots$) – pri čemu je posebno važna 1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina (Fca; $m, n = 0$), koja predstavlja najniži homolog toga niza. Nadalje, izviješeno je o strukturi ferocenskih kiselina u čvrstom stanju i u otopini, kao i o njihovim pretvorbama u spojeve koji sadrže dvije ili više ferocenskih jezgara uzajamno povezanih dvočlanim do četveročlanim razmaknicama.

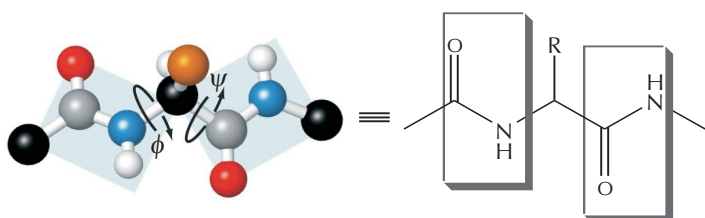
Ovaj je članak u uskoj vezi sa spomenutim drugim dijelom² jer se između ostaloga bavi pripremom i konformacijskom analizom konjugatâ Fca s prirodnim i neprirodnim aminokiselinama i peptidima. U početnom je poglavlju opisana sekundarna i tercijarna struktura prirodnih peptida s posebnim naglaskom na β -nabranoj plohu te na okrete, koji potiču svijanje tih biomolekula. U tom su sklopu opisani i

peptidomimetici, čije se konformacije mogu osmisлити ume-tanjem umjetnih začetnika okretâ (templatâ, kalupâ) u peptidne lance. Treće je poglavlje posvećeno ferocenskim peptidima monosupstitucijskoga tipa $[\text{Fc-CO-(AA)}_m\text{-OMe (V)}$ i $\text{X-(AA)}_m\text{-NH-Fc (VI)}$] te disupstitucijskim sustavima $\text{Fn}[\text{CO-(AA)}_m\text{-OMe}]_2$ (VII) i $[\text{X-(AA)}_m\text{-NH}]_2\text{Fn}$ (VIII)] ($\text{X} = \text{Ac, Boc}$). Prikazani su naši radovi o sintezi i konformacijskoj analizi spojeva V i VI. Objašnjena je struktura konjugata VII i VIII stabiliziranih dvjema jakim intramolekulskim vodikovim vezama (IHB), koje u slučaju uključenih L-aminokiselina podržavaju P-heličnu ferocensku kiralnost popraćenu pozitivnim Cottonovim efektom u CD-spektrima. Bitan dio teksta (četvrto poglavlje) odnosi se na Fca-peptide Boc-(AA)_m-Fca-(AA)_n-OMe tipa IX ($m, n = 0, 1, 2, \dots$). Pripravili smo mnoštvo takvih konjugata s L- i D-aminokiselinama i pokazali da niži članovi toga niza sadrže brojne konformacije, a viši su stabilizirani dvjema unakrsnim IHB tvoreći po jedan karakteristični konformer (v. shemu 11). U petom je poglavlju opisan niz "desimetriziranih" konjugata XI i XII formalno izvedenih uklanjanjem po jednoga podandnoga peptidnog lanca iz sustavâ VII i VIII (v. shemu 33). Dali smo odgovor na pitanje o konformacijskoj populaciji i prirodi HB u tim sustavima – X-CO-Fn-CO-(AA)_n-OMe (XI) i X-(AA)_m-NH-Fn-NH-Y (XII). Zadnje je poglavlje posvećeno ferocenskim ureidnim peptidima [X-Fn-NH-CO-(AA)_n-OMe (XV) i Fn[NH-CO-(AA)_m-OMe]₂ (XVI)] te β -peptidima kao važnim peptidomimetima. Pokazali smo da u sustavu XV prevladavaju intermolekulske HB, XIV predstavljaju C₂-simetrične molekule stabilizirane četirima jakim IHB, a u β -peptidima našli smo slabije IHB negoli u analognim ferocenskim α -peptidima (v. shemu 44).

* Autor za dopisivanje: prof. dr. sc. Vladimir Rapić,
e-pošta: vrapic@pbf.hr

2. Peptidi i peptidni mimetici

Peptidi i proteini su (makro)biomolekule sastavljene iz prirodnih L-aminokiselina, čija je biološka aktivnost posljedica njihove dobro definirane trodimenzijske strukture, odnosno konformacije. Potkraj tridesetih godina prošloga stoljeća *Linus Pauling* i *Robert Corey* otkrili su da je peptidna veza planarna i ima karakter dvostruke veze. Nasuprot tome, veze između α -ugljikova atoma i karbonilnoga ugljikova



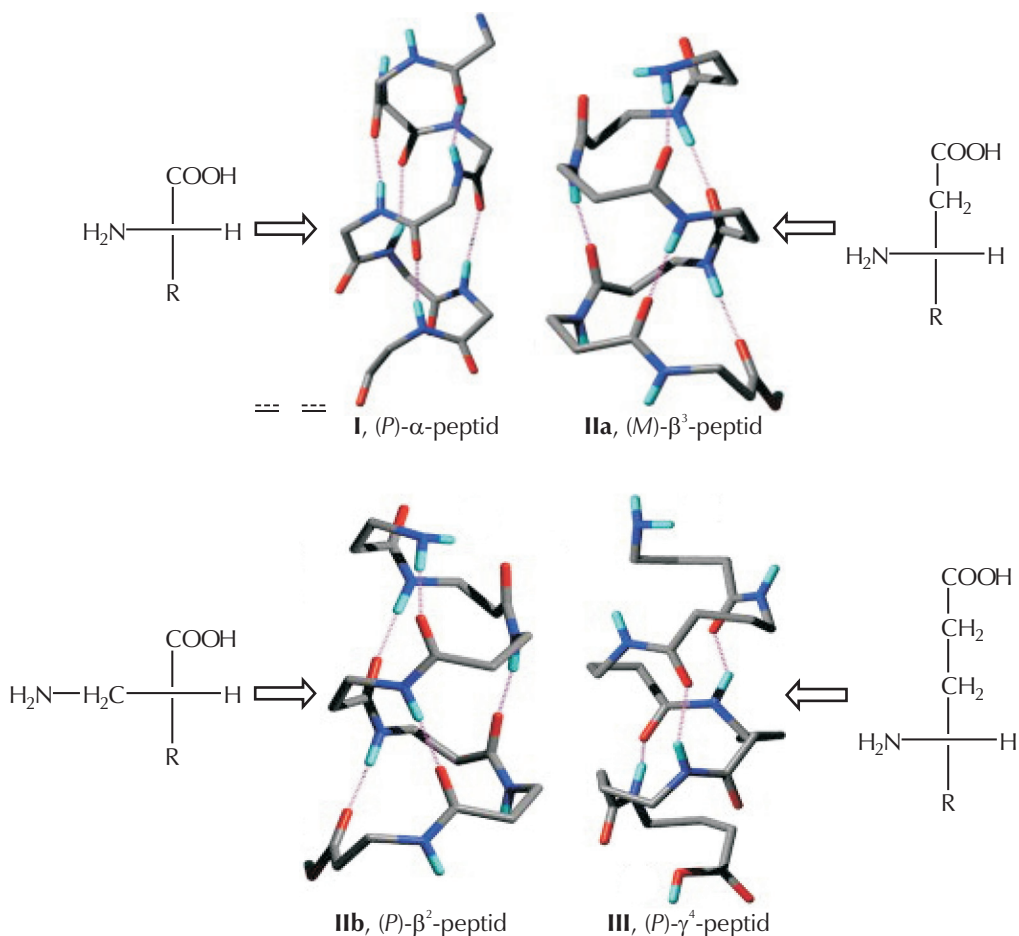
Slika 1 – Struktura svake aminokiseline u peptidnom lancu određena je rotacijom planarnih jedinica $\text{NH}=\text{C}=\text{O}$ oko dviju jednostrukih veza: (i) diedarski kut ϕ označuje rotaciju oko veze $\text{RHC}-\text{NH}$, a (ii) kut ψ odnosi se na rotaciju oko veze $\text{RHC}-\text{CO}$

Fig. 1 – The structure of each amino acid in peptide chain is defined by rotation of $\text{NH}=\text{C}=\text{O}$ planar units around two single bonds: (i) dihedral angle ϕ denotes rotation around the $\text{RHC}-\text{NH}$ bond, and (ii) angle ψ is measure of rotation around $\text{RHC}-\text{CO}$ single bond

odnosno dušikova atoma jednostruke su veze oko kojih postoji visok stupanj rotacijske slobode. Trodimenzijsku građu proteina određuje slijed aminokiselina u njihovim lancima. Konformacija polipeptidnog lanca (primarna struktura) potpuno je određena kada su poznati kutevi ϕ i ψ za svaki aminokiselinski ostatak (slika 1).

Sekundarna i tercijarna struktura proteina označuju prostorni odnos susjednih ili udaljenih aminokiselinskih ostataka u linearnom slijedu aminokiselina, a granica je između tih dvaju strukturnih obilježja proizvoljna. Dvije pravilne opetovane konformacije polipeptidnog lanca, koje u kratkim odsječcima nalazimo u mnogim proteinima, a podržane su vodikovim vezama između $\text{CO}-$ i NH -skupina, su α -uzvojnica i β -nabrana ploha. α -Uzvojnica (I) štapičasta je struktura u kojoj je polipeptidna okosnica tijesno spiralno uvijena, a aminokiselinski ogranci usmjereni su u tom rasporedu lateralno. Riječ je o desnoj uzvojnici stabiliziranoj intramolekulskim vodikovim vezama, koje pritom zatvaraju 13-eročlane prstenove. Karbonilna skupina svake aminokiseline povezana je vodikovom vezom s NH -skupinom četvrte aminokiseline u tom linearnom slijedu (slika 2, lijevo gore).³

Drugi periodički element strukture proteina jest β -nabrana ploha (ili kraće: β -ploha). Polipeptidni lanac u β -nabranoj plohi gotovo je sasvim istegnut, a ne uvijen kao u α -uzvojnici. Oblici β -nabrane plohe proizlaze iz različitih načina



Slika 2 – Najčešće uzvojnice izvedene iz peptida koji se sastoje iz α -, β^3 -, β^2 - i γ^4 -aminokiselina

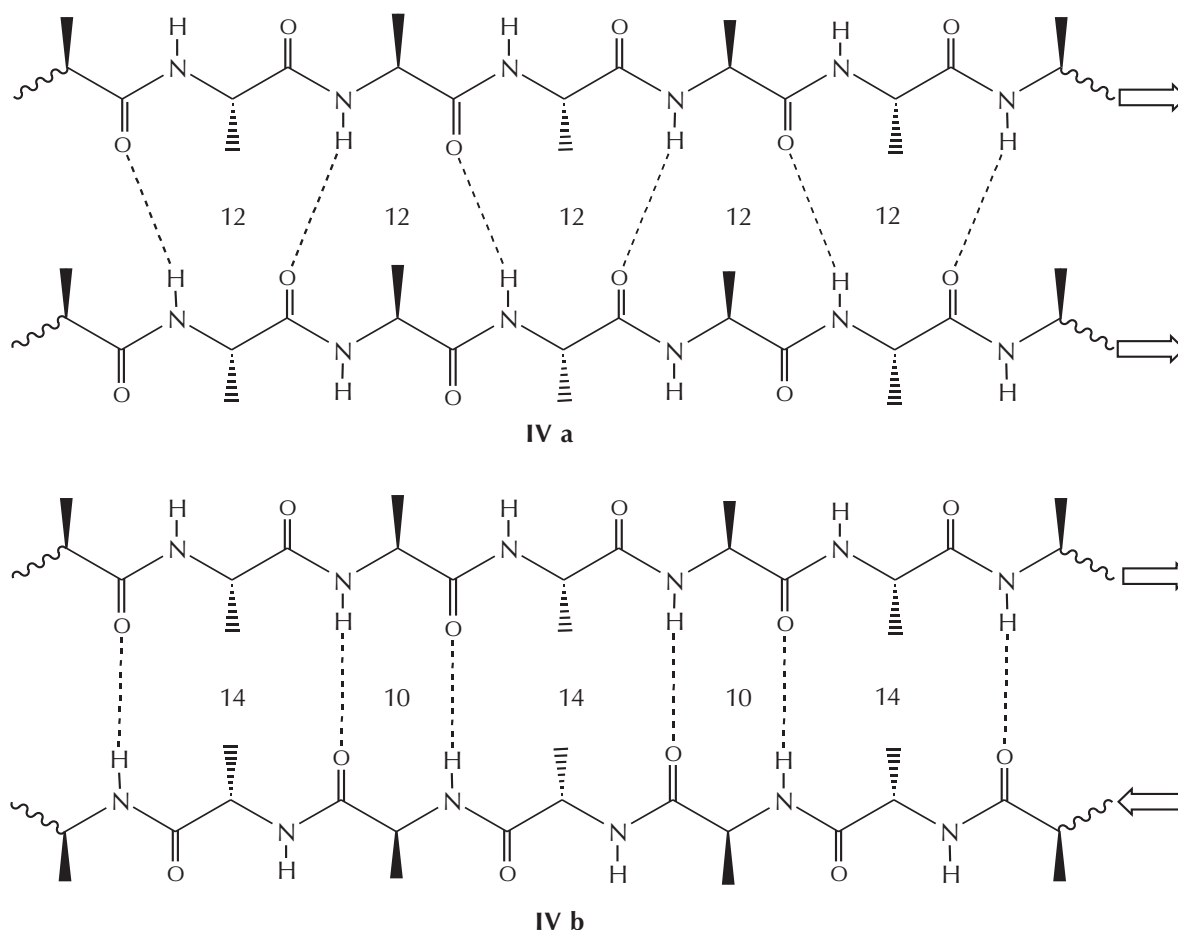
Fig. 2 – The most common helices derived from peptides consisting of α -, β^3 -, β^2 - and γ^4 -amino acids

svijanja peptidnog lanca i različite tvorbe vodikovih veza između CO- i NH-fragenata amidne funkcije. U *paralelnim* β -nabranim ploham (**IVa**) dijelovi lanca orijentirani su u istom smjeru s obzirom na N- i C-terminus, a vodikove veze između peptidnih skupina u tim segmentima ravnomjerno su pomaknute i zatvaraju određeni kut u odnosu na drugi lanac te tvore 12-eročlane prstenove. Kod *antiparalelnih* β -nabranih ploha (**IVb**) izmjenjuju se 10- i 14-eročlani prstenovi, a vodikove su veze gotovo okomite na susjedni segment (shema 1).

Valja uočiti da se pri nabiranju plohe, koju čine vodikovim mostovima povezani dijelovi lanca (u oba slučaja), postiže sterički najpovoljnija konformacija, budući da u njoj bočne skupine aminokiselina ne kolidiraju, već su usmjerene okomito (gore i dolje) u odnosu na pseudoravninu toga sustava (shema 2).^{4,5} β -Nabrana ploha, za razliku od α -uzvojnice, sadrži uz elemente sekundarne strukture i karakteristike *tercijarne strukture*. To je posljedica međudjelovanja bočnih lanaca uzajamno udaljenih aminokiselina u primarnoj strukturi pri tvorbi β -nabrane plohe, što je zanemarivo pri formiranju α -uzvojnice. Također je opaženo da je slaganje

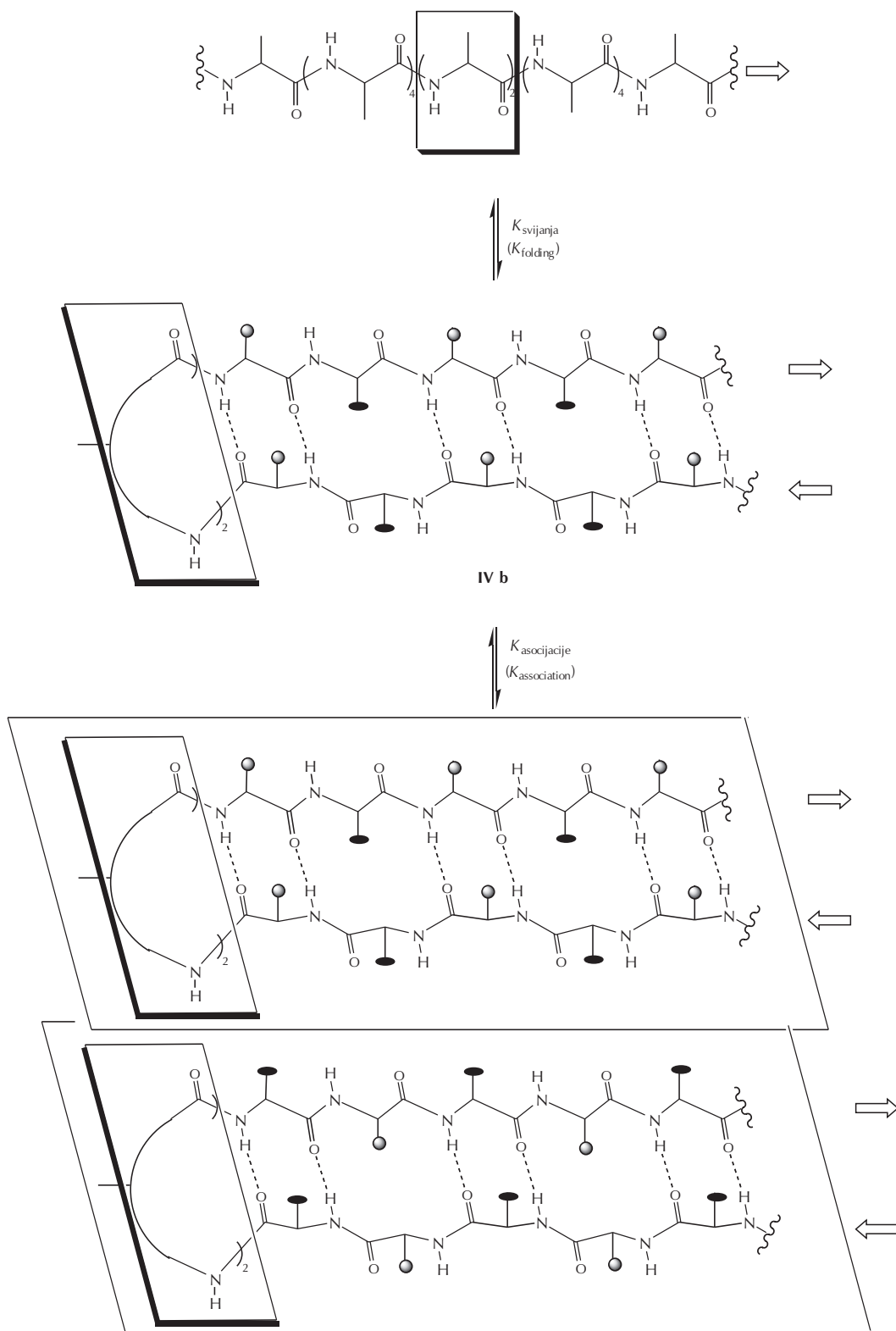
proteina većim dijelom sastavljenih iz β -nabranih ploha sporije u odnosu na slaganje proteina pretežno sastavljenih iz α -uzvojnica, pri čemu je najsporiji dio slaganja formiranje tercijarne strukture. Osim toga, poznato je da je tvorba intermolekulskih β -nabranih ploha vrlo čest motiv pri tvorbi proteinskih *kvaternih struktura*. Drugim riječima, međudjelovanja bočni lanac-bočni lanac dalekoga dosega važnija su u svijanju β -nabrane plohe nego kod α -uzvojnice, a intermolekulsko nastajanje β -nabrane plohe uobičajen je motiv pri tvorbi proteinskih kvaternih struktura, pa se može reći da β -plohe imaju karakteristiku sekundarne, tercijarne i/ili kvaternarne strukture. U idealnom slučaju međumolekulsko svijanje peptidnih lanaca u antiparalelne β -nabrane plohe (**IVb**) prethodi njihovom samozdruživanju u β -strukture s *homogenom kvaternom strukturom* (tzv. "sendvič β -ploha"). No često su K_{svijanja} približno jednake $K_{\text{asocijacije}}$ pa nastaje kompetitivno svijanje i samozdruživanje uz stvaranje *heterogenih visokomolekularnih kvaternih struktura* koje su sastavljene iz β -nabranih ploha i peptidnih lanaca (shema 2).⁶

Većina proteina kompaktnog je oblika, a njihovi polipeptidni lanci često mijenjaju smjer što se naziva *okretima*. Okreti



Shema 1 – Paralelna β -nabrana ploha (**IVa**): dijelovi peptidnih lanaca protežu se u istim smjerovima, a unutarlančane vodikove veze između skupina NH i CO spajaju pojedine aminokiseline iz susjednih fragmenata. Antiparalelna β -nabrana ploha (**IVb**): susjedni dijelovi lanaca položeni su u različitim smjerovima, a struktura je stabilizirana vodikovim vezama (između skupina NH i CO) koje su okomite na tako povezane fragmente. Strjelice su usmjerene od N- ka C-terminusu lanaca.

Schema 1 – A parallel β sheet (**IVa**): juxtaposed peptide strand fragments run in the same direction, and intrachain hydrogen bonds between NH and CO groups connect amino acids of the adjacent fragments. An antiparallel sheet (**IVb**): adjacent fragments of β strands run in the opposite direction, and the structure is stabilized by hydrogen bonds (between NH and CO groups) that lie approximately perpendicular to these chains. Arrows point from the N to the C terminus of the peptides.



S h e m a 2 – U idealnom slučaju intramolekulsko svijanje peptida (nasumičnog klupka) najprije daje dvolančanu antiparalelnu β -plohu **IVb**, koja se potom samozdružuje uz tvorbu sendviča β -ploha. Ta je asocijacija potaknuta spajanjem (npr. hidrofilnih licâ), što rezultira homogenom strukturom β -plohe (● = hidrofilna skupina, ○ = hidrofobna skupina). [Valja uočiti da u ovom primjeru nastajanje β -plohe prethodi β -okret preko $(AA)_2$.] Svijanje malih peptida u smislu stvaranja dobro definiranih motiva β -plohe često je narušeno kompetitivnim samozdruživanjem ($K_{\text{svijanja}} \approx K_{\text{asocijacije}}$), što dovodi do tvorbe heterogenih visokomolekulskih kvaternih struktura.

S c h e m e 2 – Ideally, intramolecular folding of peptide (random coil) firstly afford two stranded antiparallel β -sheet **IVb** which thereafter self-associates forming β -sheet sandwich, in which e.g. hydrophilic faces stack together forming homogenous β -sheet structure (● = hydrophilic group, ○ = hydrophobic group). [One should notice that in this example β -turn via $(AA)_2$ precede sheet formation.] The folding of small peptides in well-defined β -sheet motifs is often hampered by competitive self-assembly ($K_{\text{folding}} \approx K_{\text{association}}$) leading to formation of heterogeneous high molecular mass quaternary structures.

su, za razliku od α -uzvojnice i β -plohe, aperiodički opći strukturni elementi u građi proteina (npr. prolin je začetnik okreta) odgovorni za promjenu smjera peptidnih lanaca. Često ih nalazimo na površini proteina, gdje sudjeluju u molekulskom prepoznavanju. U ovisnosti o slijedu i karakteru aminokiselina peptidnog lanca javljaju se različiti okreti, koje podržavaju intramolekulske vodikove veze. Okreti se definiraju od N- ka C- terminusu peptida: ako je zatvoren 7-eročlani prsten, riječ je o γ -okretu, 10-eročlani prsten znači β -okret, a 13-eročlani prsten rezultira α -uzvojnicom (shema 3, lijevo). β -Okret izaziva obrtanje smjera lanca (zbog čega se naziva i *ukosničkim okretom*), a dijelovi peptida odijeljeni okretom antiparalelni su i često tvore β -plohu. β -Okreti uz tzv. Ω -petlje najčešći su elementi u globularnom oblikovanju proteina. Uz navedene okrete u proteinima se javljaju i *reverzni okreti* kao rezultat međudjelovanja karbonilnih skupina koje su bliže C-terminusu od proton-donirajuće aminoskupine. Tako nastali *rvs- γ* (5-eročlani prsten), *rvs- β* (8-eročlani prsten) i *rvs- α* (11-eročlani prsten) su nestabilniji, pa se javljaju rjeđe (shema 3, desno).^{7,8}

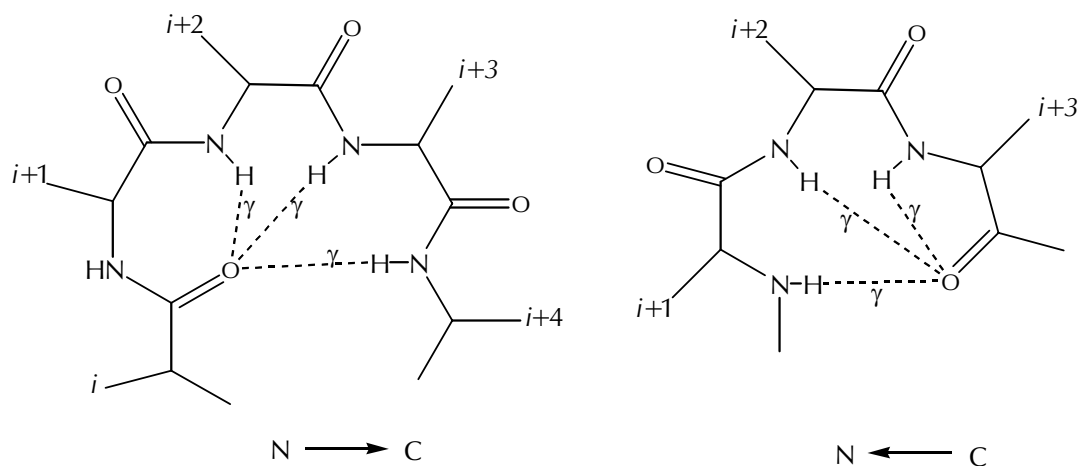
Različite konformacije peptida proizlaze iz osnovnog aminokiselinskog slijeda, polarnih, hidrofobnih i van der Waalsovih interakcija. Uporabom malih neprirodnih aminokiselina ili nekih drugih molekulskih kalupa (*scaffold, template*) moguće je pripremiti peptide razmjerno male molekulske mase, stabilizirane u određenoj konformaciji. Dakle, riječ je o modelima (poli)peptida koji se nazivaju *peptidnim mimeticima*. Pri tome molekulski kalup nukleira tj. stvara (uvođenjem intramolekulskih vodikovih veza ili kombinacije vodikovih veza i hidrofobnih interakcija) i prenosi određenu konformaciju iz svoje uređene regije prema neuređenom području (peptidni lanac) potičući nastajanje određene sekundarne/tercijarne strukture.^{6,9} Templati mogu izazvati nastajanje α -uzvojničkih, β -plošnih i Ω -petljastih struktura, no u ovome će tekstu biti obrađeni samo oni koji uzrokuju svijanje proteina u smislu nastajanja β -nabrane plohe (bu-

dući da su naša vlastita istraživanja tako usmjerena). Pri tome se mogu definirati dva tipa takvih kalupa (1) *mimetic nukleirajućeg lanca* i (2) *mimetic nukleirajućeg okreta*.

Nukleirajući lanac je rigidna struktura koja se umeće u sekvenciju prirodnih aminokiselina da bi bila jezgrom (nukleusom) β -plohe. Primjer je epindolidionska kondenzirana tetraciklička jedinica ugrađena u nonapeptid tako da oponaša centralni dio lanca. Ona usmjerava vezane peptidne dijelove u smislu nastajanja triju intramolekulskih vodikovih veza. Taj se učinak pojačava dodatkom Pro-D-Ala u proksimalni položaj, pri čemu nastaju strukture s dvjema paralelnima β -plohami **1** (shema 4). Primjer mimetika antiparalelne β -plohe jest sustav **2**, koji se izvodi iz istoga templateta umetanjem ureilenskih ostataka u pripojene peptidne lance (shema 5). Zaključno, epindolidionska okosnica u kombinaciji s pogodnim sekvencijama β -okreta uzrokuje nastajanje β -plohe koja je stabilna čak u DMSO (jaki akceptor vodikove veze).^{10,11}

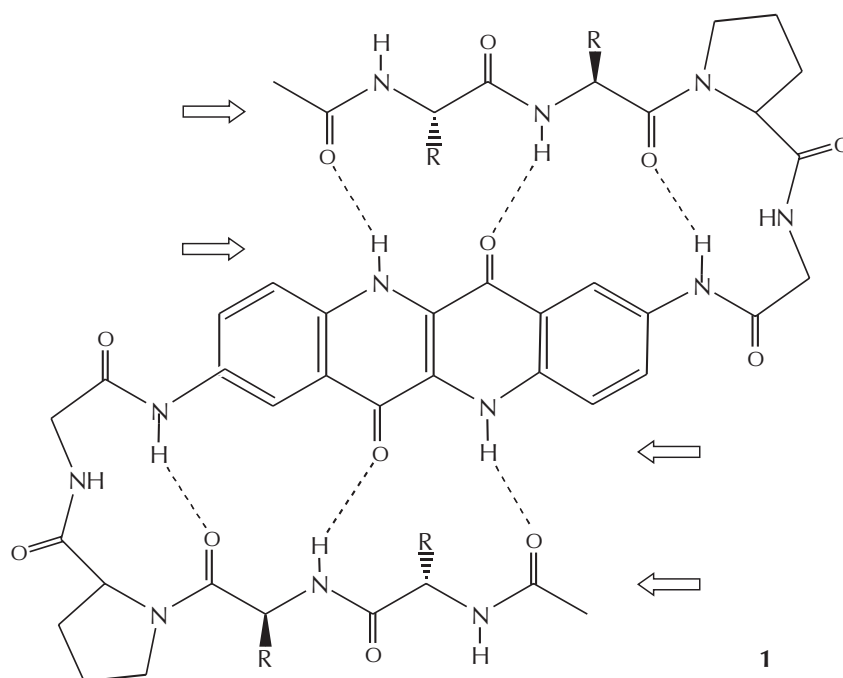
Osim mimetika β -lanca kao nukleatori β -plohe mogu se primijeniti i templateti koji zamjenjuju ostatke $i + 1$ i $i + 2$ u dijelu sekvencije s potencijalnim β -okretom (tip 2). Pri tome su odabrane male molekule koje obrću smjer peptidnog lanca, potiču intramolekulske vodikove veze i hidrofobna tercijarna međudjelovanja, što otjelovljuje β -plohu. Zanimljiv primjer takvih mimetika jest analog cikličkog peptida gramicidina S (**3**) koji u nativnom obliku ima dobro definiranu β -plošnu strukturu između dva β -okreta. U linearnom je analogu **4** dipeptidna jedinica D-Phe-Pro (tj. ostatak $i + 1$ i $i + 2$ u β -okretu) zamijenjena rigidnim umetkom, čiji je središnji dio dibenzofuranpropionska kiselina, a drugi je segment D-Phe-Pro izrezan. Dobiven je čitav niz hepta-peptida s antiparalelnim β -plohami (shema 6).¹²

Navodimo još nekoliko primjera mimetika nukleirajućeg okreta (tip 2). *Ranganathan i suradnici* su kondenzacijom *endo*-(2S,3R)-2-amino-3-karboksinorbornena i *endo*-(2S,3R)-



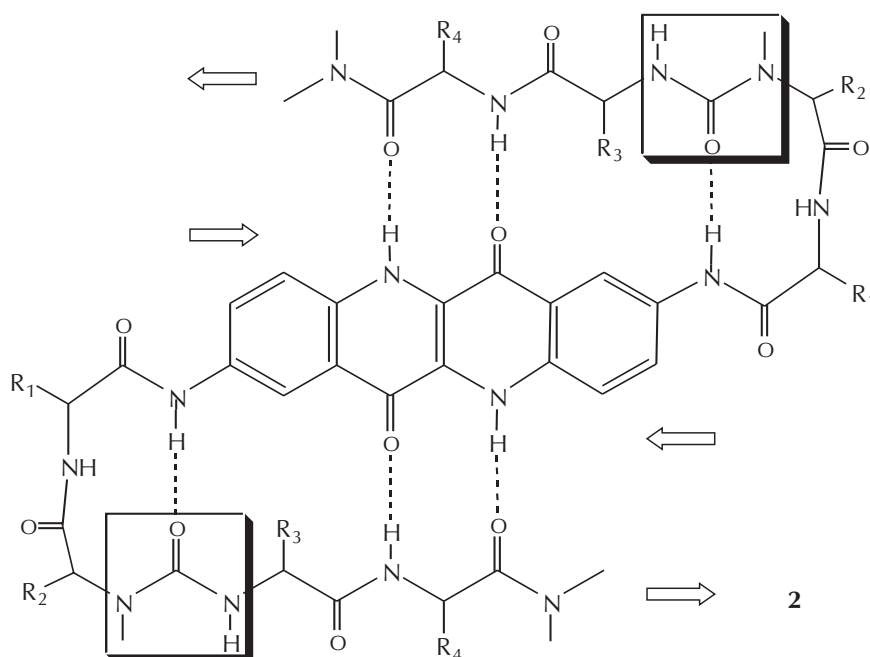
Shema 3 – U kemiji peptida javljaju se dvije vrste okreta koji mijenjaju usmjerenje lanca: (i) ako je karbonylna skupina bliža N-terminusu nego li donorska skupina NH, smjer je definiran kao N→C, a ovisno o veličini nastalog prstena, koji uključuje vodikovu vezu postoje γ - (7), β - (10) i α -okret (13 članova u prstenu) (lijevo); (ii) reverzni okreti odnose se na udaljenije skupine C=O u smjeru C→N: *rvs- γ* - (5), *rvs- β* - (8) i *rvs- α* -okret (11-eročlani prsten), a energijski su nepovlašteni i rijetko se nalaze u proteinima (desno).

Shema 3 – In the peptide chemistry two kinds of turn structures altering the direction of strands are known: (i) if the carbonyl group is closer to the peptide N-terminus than the H-donating NH function, the direction is defined as N→C, and (depending on the size of the hydrogen bond containing ring) γ - (7), β - (10) and α -turn (13 membered ring) are formed (left), (ii) reverse turns are those which start from the more distant CO group in C→N direction: *rvs- γ* - (5), *rvs- β* - (8) i *rvs- α* -turn (11-membered ring); they are energetically disfavored and rarely found in proteins (right).



S h e m a 4 – Pripajanjem peptidnih skupina na amino-skupine epindolidionskog templata nastaje mimetik paralelne β -plohe **1**. Uz heterociklički prsten smješten je fragment Pro-D-Ala da bi učvrstio konformaciju okreta nužnoga za tvorbu β -plohe.

S c h e m e 4 – The attachment of peptide strands to the epindolidione amino groups results in formation of parallel β -sheet mimic **1**. Sequences such as Pro-D-Ala are incorporated in order to enforce a turn conformation which is critical for β -sheet formation.

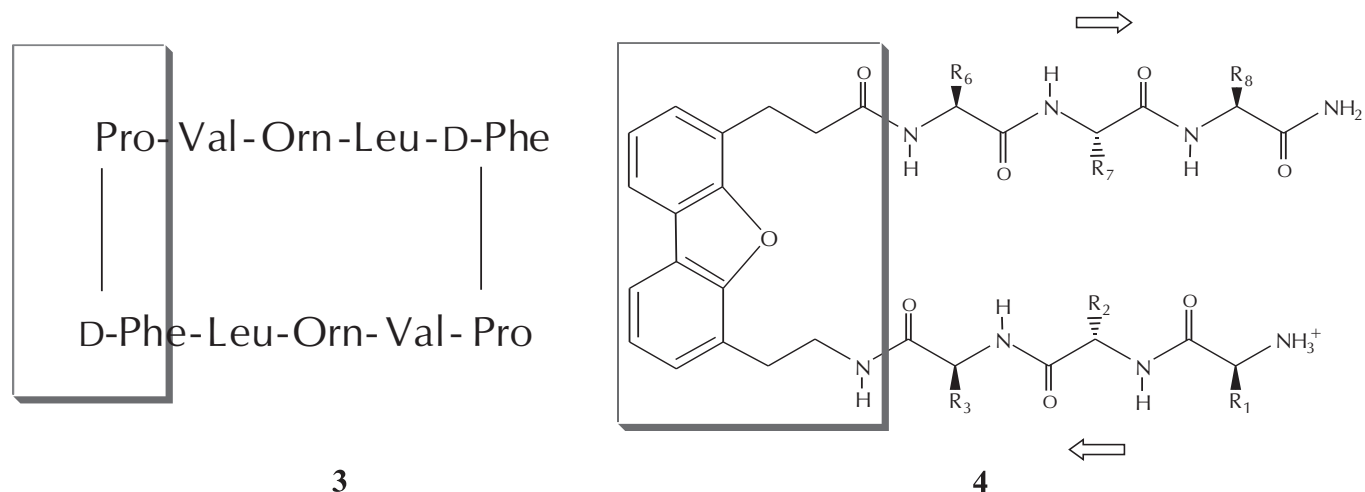


S h e m a 5 – Uvrštavanjem dvaju ostataka uree u peptidni lanac nastupa heterocikličkim kalupom usmjereno nastajanje mimetika antiparalelne β -plohe **2**

S c h e m e 5 – The incorporation of two urea moieties into the peptide strand affords an epindolidione-directed antiparallel β -sheet mimic **2**

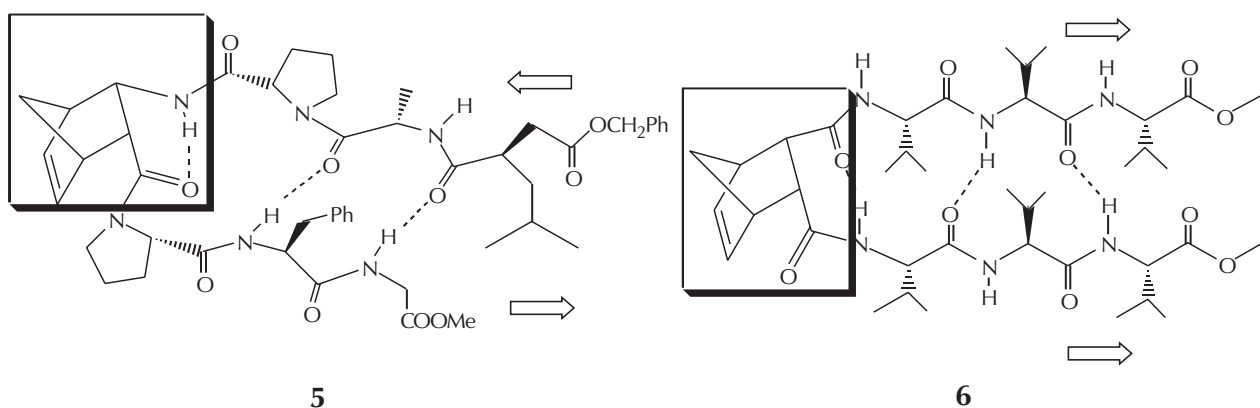
-2,3-dikarboksinorbornena s prirodnim oligopeptidima pripravili mimetike *antiparalelne* **5** i *paralelne* β -nabrane plohe **6** (shema 7).¹³ Kondenzacijom etilendiamina i peptidnih izocijanata pripremljeni su ureilenski mimetici β -nabrane plohe **7** i **8**, čija je konformacija dodatno stabilizirana

uvođenjem fenilnih skupina (shema 8).^{14,15,16} Kao začetnik β -nabrane plohe upotrijebljen je i 6,6'-bis(acilamino)-2,2'-bipiridin, koji u spoju **9** željeno slaganje u **10** potiče adicijom iona Cu(II) (shema 9).⁷



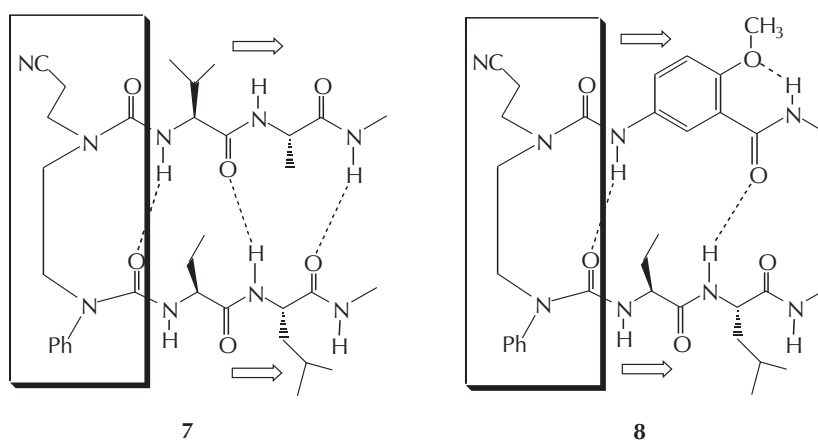
S h e m a 6 – Zamjenom Pro-D-Phe, kao nukleatora β -okreta, u antibiotiku gramicidin S **3** rigidnim heterocikličkim templatom (uokviren), uz "izrezivanje" druge jedinice Pro-D-Phe pripravljeno je 12 analognih heptapeptida tipa **4**

S c h e m e 6 – 12 heptapeptides of the type **4** incorporating heterocyclic template (highlighted) are based on the gramicidin S **3** where one of the turn regions (D-Phe-Pro) is excised and the other is replaced by this template



S h e m a 7 – Peptidomimeti s konformacijski spregnutim norbornenskim derivatima: antiparalelna β -ploha s umetnutom norbornenskom aminokiselinom (**5**) i paralelna β -ploha izvedena iz norbornen-1,2-dikarboksilne kiseline (**6**)

S c h e m e 7 – Peptidomimetics based on conformationally constrained norbornene derivatives: antiparallel β -sheet with inserted norbornene amino acid (**5**) and parallel β -sheet derived from norbornene-1,2-dicarboxylic acid (**6**)



S h e m a 8 – Fleksibilni začetnik "U-okreta" izveden iz etilendiamina usmjerava ureidopeptidne lance tvoreći paralelne β -plohe **7** i **8**

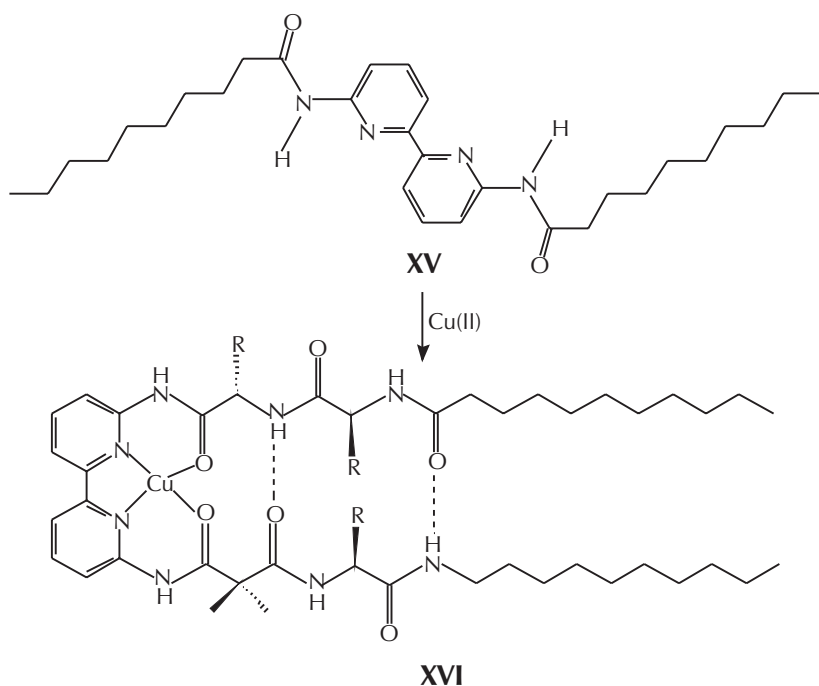
S c h e m e 8 – Flexible "U-turn" inducer derived from ethylenediamine directs ureidopeptide strands forming parallel β -sheet **7** and **8**

β -Aminokiseline i iz njih priređeni β -peptidi pripadaju jednoj od najproučavanijih skupina peptidomimetika.¹⁷ Uz stabilnost na djelovanje proteolitičkih enzima i metaboličke transformacije, važna karakteristika tih konjugata je sposob-

nost tvorbe uređenih sekundarnih struktura poput uzvojnica, okreta i nabranih ploha sličnih onima koji se javljaju u prirodnim α -peptidima.¹⁸ β -Aminokiseline su spojevi u kojima su amino- i karboksilna skupina odijeljene dvama ugljikovim atomima. Iako se β -aminokiseline smatraju neprirodnima, postoje primjeri peptida izoliranih iz prirodnih izvora koji u svojoj strukturi sadrže β -aminokiselinu(e).

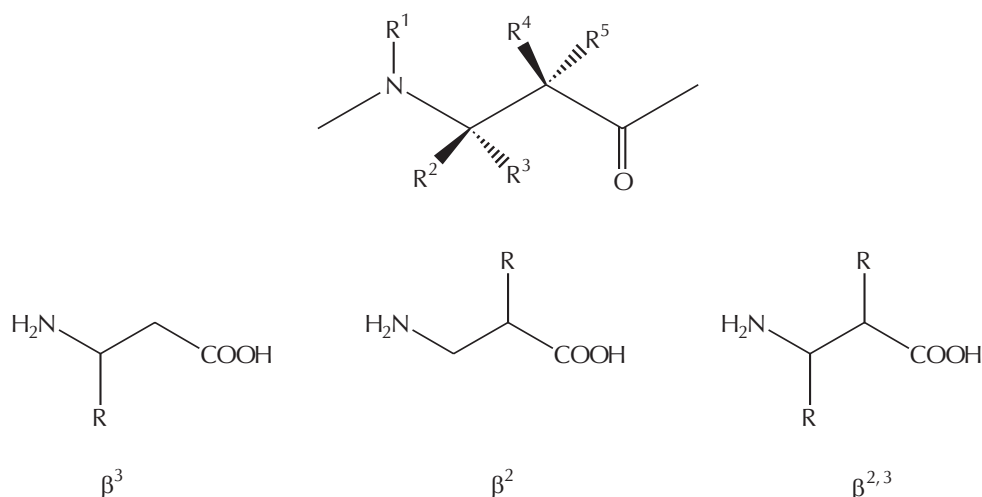
Ako se uspoređi struktura α - i β -aminokiselina, razvidno je da se β -aminokiseline mogu konformirati na više načina. S druge strane one imaju dva prokiralna ugljikova atoma, što zajedno s dušikovim atomom daje pet potencijalnih mjesta supstitucije i osam mogućih konfiguracija, što ih čini mnogo "bogatijim" gradivnim blokovima od α -aminokiselina (shema 10, gore). Ovisno o načinu supstitucije β -aminokiseline mogu se podijeliti u β^3 -, β^2 - i $\beta^{2,3}$ -aminokiseline (shema 10, dolje).¹⁷

β - i γ -peptidi kratkoga lanca svijaju se u otopini na predvidljiv način uz tvorbu sekundarnih struktura II i III (slika 2). Najzanimljiviji motivi primijećeni su kod oligomera β^2 -aminokiselina: to su β -peptidni ukosnički okret i novi tipovi uzvojnica. Pri tom se dobiva odgovor na zanimljivo pitanje posljedice homologiranja aminokiselina od α - preko β - do γ -spojeva na sekundarnu strukturu navedenih peptida: (i) u tom slijedu se stabilnost uzvojnica povećava, premda se broj donora i akceptora vodikove veze po atomu lanca smanjuje, (ii) heličnost se obrće pri svakom stupnju homologiranja α (P), β^3 (M) i γ^4 (P), (iii) broj aminokiselina obuhvaćen jednim okretom uzvojnice se smanjuje



Shema 9 – Aminokiseline izvedene iz diacilamino-bipiridina potiču svijanje u smislu nastajanja antiparalelne β -plohe nakon dodatka iona Cu(II) koje je popraćeno prelaskom transoidne bipiridinske konformacije **9** u cisoidnu **10**

Scheme 9 – Diacetylaminobipyridine-based aminoacids promote antiparallel β -sheet folding upon addition of Cu(II) ions under transformation of transoid bipyridine conformation **9** into a cisoid conformation **10**



Shema 10 – Prokiralni ugljikovi atomi i dušikov atom β -aminokiselina mjesta su supstitucije uz mogućnost nastajanja osam konfiguracija (gore); β -aminokiseline se s obzirom na položaj bočnog lanca u β -aminoalkanskoj kiselini mogu pojaviti u obliku triju konstitucijskih izomera (dolje)

Scheme 10 – Prochiral carbon atoms and nitrogen atom in β -amino acids are the positions of substitution under formation of 8 possible configurations (top); β -amino acids, depending upon the position of the side chain(s) on the β -aminoalkanoic acid skeleton, can give 3 constitutional isomers (bottom)

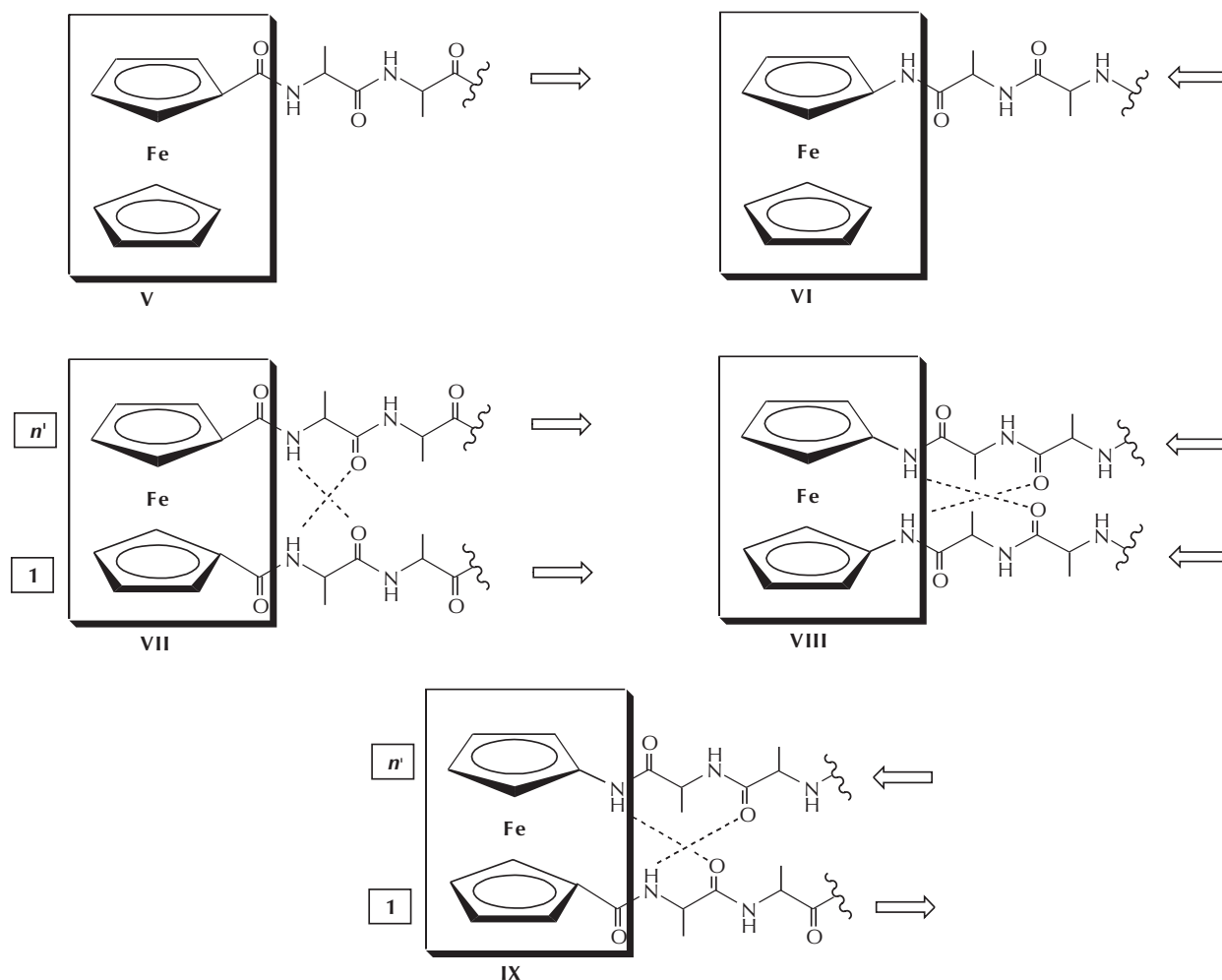
α (4), β (3) i γ (2), a intramolekulske vodikove veze zatvaraju 13- (α) i 14-eročlane prstenove (β , γ).¹⁸

Opisani β -peptidi su biološki aktivni peptidomimetici, koji pokazuju i povećanu proteolitičku stabilnost. Istraživanja peptida s opioidnim djelovanjem pokazala su da β -peptidi mogu uspješno interagirati s proteinima i oponašati α -peptide u vezanju na odgovarajuće receptore. Zbog stabilnosti u prisutnosti proteolitičkih enzima peptidni mimetici s β -aminokiselinama upotrebljavaju se u istraživanjima inhibitora proteaza, kao i u dizajnu peptidnih cjepiva, primjenljivih kod autoimunih bolesti. Sposobnost β -peptida da tvore stabilnu konformaciju uzvojnice primjenjuje se u dizajnu antimikrobnih β -peptida, u kojima je određeni helični oblik nužan za interakciju sa staničnom membranom.¹⁹

3. Ferocenski peptidi

Kao što je opisano u prethodnom poglavlju, svijanje proteina je preduvjet za nastajanje njihovih sekundarnih struktura – heličnih i β -plošnih konformera. Premda su te strukturne karakteristike poznate već desetljećima, još su i danas mno-

ga istraživanja usmjerena na razumijevanje i kontrolu nastajanja oblika, odnosno na mehanizam svijanja proteina u biokemijskim procesima, što pomaže u razvitku novih molekula i materijala.²⁰ Polipeptidi u vodenim otopinama nemaju definiran oblik, već se sastoje iz niza energijski sličnih konformacija (pri čemu je razlika slobodne energije koja stabilizira sekundarne strukture u odnosu na nasumično klupko samo 12,56 – 62,80 kJ mol⁻¹ (3 – 15 kcal mol⁻¹). Zato je dobar dio istraživanja posvećen dizajnu i pripremi *de novo* malih molekula, koje imaju sklonost poprivanja (prema kontekstu) željene konformacije. To su prije spomenuti peptidni mimetici ili pseudopeptidi koji, osim što su modeli za ispitivanje proteina, mogu pokazati povoljniju biološku aktivnost od nativnih biomolekula.^{5,6} Helični peptidni mimetici mogu poslužiti kao građevni blokovi za izgradnju većih supramolekulskih struktura na osnovi intermolekulskih vodikovih veza, čime se dobiva uvid u međudjelovanje protein-protein.²¹ S druge strane β -plošne strukture vrlo su važni modelni sustavi za razumijevanje Alzheimerove i Huntingtonove bolesti, itd. Prethodno je rastumačeno da peptidni mimetici sadrže male molekule kao "kalupe" koji uvjetuju svijanje i željenu konformaciju.



S h e m a 11 – Monosupstitucijski i 1,*n*'-disupstitucijski ferocenski konjugati peptida izvedeni iz ferocenkarkobosilne kiseline (**V**), ferocenamina (**VI**), ferocene-1,1'-dikarkobosilne kiseline (**VII**), ferocene-1,1'-diamina (**VIII**) i 1'-aminoferocene-1-karkobosilne kiseline (**IX**). Strjelice pokazuju smjer od N- ka C-terminusu peptidnog lanca.

S c h e m e 11 – Monosubstituted and 1,*n*'-disubstituted ferrocene-peptide conjugates derived from ferrocenecarboxylic acid (**V**), ferroceneamine (**VI**), ferrocene-1,1'-dicarboxylic acid (**VII**), ferrocene-1,1'-diamine (**VIII**) and 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid (**IX**). Arrows are directed from the N- to C terminus of the peptide chain.

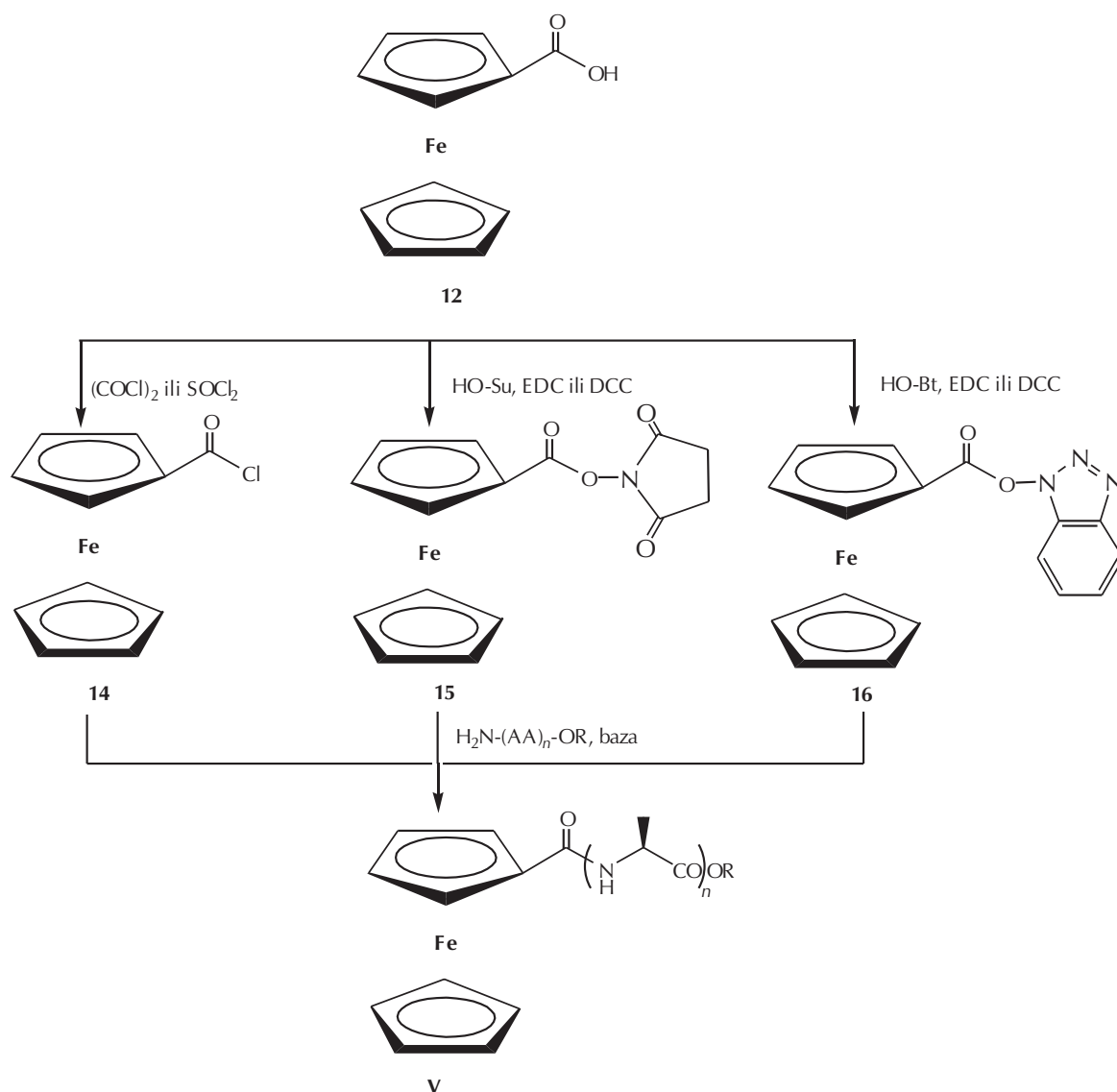
U ovom će poglavlju biti riječi o bioorganometalnim spojevima u kojima je ferocen supstituiran jednim odn. dvama peptidnim lancima pripojenim na ciklopentadienilne prstenove. O svojstvima i primjeni nekoliko takvih spojeva u biosintezi, molekularnom prepoznavanju i terapiji bilo je riječi u prvom dijelu ovog prikaza,¹ a ovdje bismo samo htjeli podsjetiti na svojstvo reverzibilne oksidoredukcije ferocena. Ta značajka, kao i pogodna udaljenost Cp-jezgara za stvaranje intramolekulskih vodikovih veza (IHB) između pripojenih peptidnih (podandnih) lanaca čine ferocen izvanrednim kalupom za pripremu organometalnih peptidnih mimetika. Zaključno, *ferocenski peptidi* su novi peptidni mimetici sa svojstvima elektronskog prijenosa i oponašanja bioloških funkcija. Posebno će biti riječi o dizajniranju ferocenskih kvazi- β -plošnih konformera, odn. samozdruživanja tih spojeva u supramolekulske strukture.

Konjugati ferocena s jednim peptidnim lancem mogu imati konstituciju $\text{Fc}-(\text{AA})_n\text{-OR}$, $\text{Fc-CH}_2-(\text{AA})_n\text{-OR}$ itd.,¹ no u ovom ćemo pregledu prikazati samo spojeve tipa **V** i **VI** koji su

izvedeni iz ferocenkarkoksilne kiseline (**12**) i ferocenamina (**13**). U prvom slučaju riječ je o molekulama u kojima je ferocenoilna skupina uvedena na *N*-terminus, a u drugome ferocenamino-funkcija na *C*-terminus peptidnog lanca, pa je razvidno da su dijelovi tih molekula povezani amidnom vezom (shema 11).

Djelotvorna kopulacija ferocenkarkoksilne kiseline (**12**) zahtijeva aktivaciju, koja se izvodi pretvorbom u kiselinski klorid **14** te sukcinimidni **15** ili benzotriazolni ester **16**. Ti se međuprodukti pri blagim uvjetima u prisutnosti baze povezuju s peptidima u konjugate **V** s povoljnim iskorištenjima (shema 12). Budući da je ferocenin (**13**) nestabilan, kao polazni spoj za pripremu konjugata **VI** rabi se neki od njegovih *N*-zaštićenih derivata.

U nastavku opisat ćemo nekoliko mogućnosti sinteze spojeva **V** i **VI** izvedenih u našem Laboratoriju. Na shemi 13 prikazan je primjer ortogonalnih sinteza za pripremu ferocenskih mono- i dipeptida sastavljenih iz alanina, glicina i



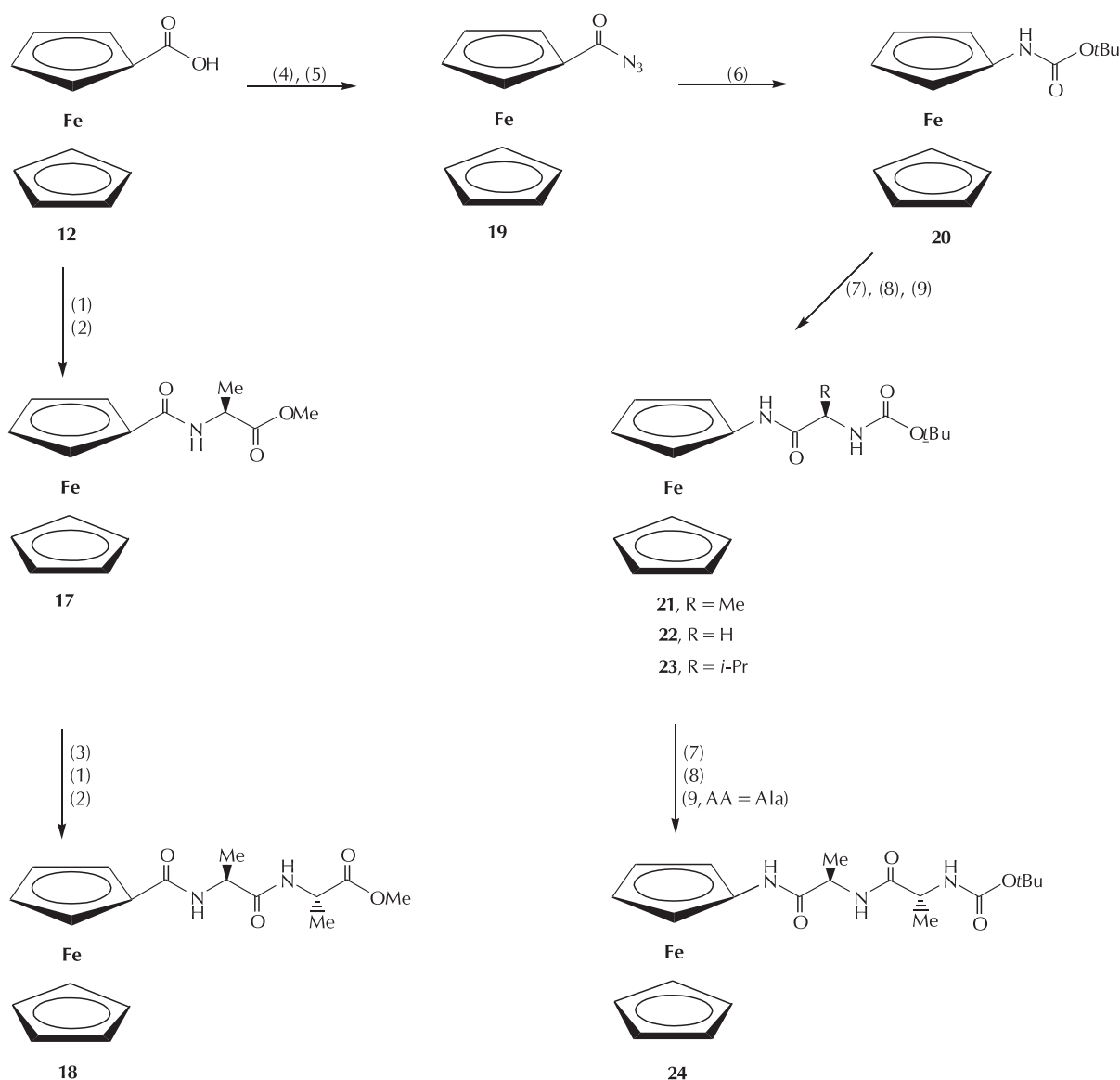
Shema 12 – Aktivacija karboksilne skupine kiseline **12** uz upotrebu različitih reagensâ i njezina kopulacija s peptidnim esterima u ferocenske peptide **V**

Scheme 12 – Activation of carboxylic group of the acid **12** with various reagents and its copulation with peptide esters into ferrocene peptides **V**

valina: Ala-OMe·HCl otopljen u CH_2Cl_2 pretvoren je djelovanjem Et_3N u slobodni amino-ester, koji potom reagira s kiselinom **12** aktiviranom s pomoću HOBt/EDC. Nastali mono-peptid Fc-CO-Ala-OMe (**17**) baznom hidrolizom prelazi u Fc-CO-Ala-OH, koji se na analogan način kao u prethodnom stupnju izlaže djelovanju HOBt/EDC i Ala-OMe uz tvorbu dipeptida **18**. S druge strane, kiselina **12** prevedena je u azid **19**, koji Curtiusovim pregrađivanjem uz adiciju *t*-BuOH daje Boc-NH-Fc (**20**). Deprotekcija se izvodi u EtOAc s pomoću plinovitog HCl, a dobiveni hidroklorid Fc-NH₃Cl se obradi *in situ* suviškom Et_3N te se nastali ferocenamini (**13**) kopulira s Boc-Ala-OH aktiviranim s HOBt/EDC uz nastajanje Boc-Ala-NH-Fc (**21**). Slično se postupa i u sljedećem koraku: **21** se deprotektira i s Boc-Ala-OH pretvori u dipeptid **24**.²² Na analogan način kao što je izvedena

pretvorba **20**→**21**, ferocenamini (**13**) dobiveni deprotekcijom hidroklorida **20** kondenzira se s Boc-Gly i Boc-Val uz nastajanje Boc-Gly-NH-Fc (**22**) i Boc-Val-NH-Fc (**23**).²³

Dipeptidi **25** i **26** (tipa V) mogu se osim opisanim postupnim "nadaograđivanjem" aminokiselinskih estera na ferocencarboksilnu kiselinu (**12**) izvesti i izravnim kopuliranjem s dipeptidom H-(AA)₂-OMe. Pri tome se otopini **12** u CH_2Cl_2 aktiviranoj s HOBt/EDC dodaju dipeptidni esteri (dobiveni *in situ* iz H-(AA)₂-OMe·HCl i Et_3N) (shema 14).²⁴ Ureidopeptidi su važni peptidni mimetici, a takvi konjugati s ferocenom bit će iscrpno opisani u 6. poglavlju. Na shemi 14 naveden je primjer dobivanja jednostavnih ureidopeptida **28** i **29** (koji se formalno mogu izvesti umetanjem amino-skupine između Fc i proksimalne karbonilne funkcije



Shema 13 – Postupci kopulacije peptida u ortogonalnim sintezama aminokiselinskih konjugata s ferocencarboksilnom kiselinom (**12**) i ferocenamini (**13**) dobivenim deprotekcijom Boc-NH-Fc (**20**)

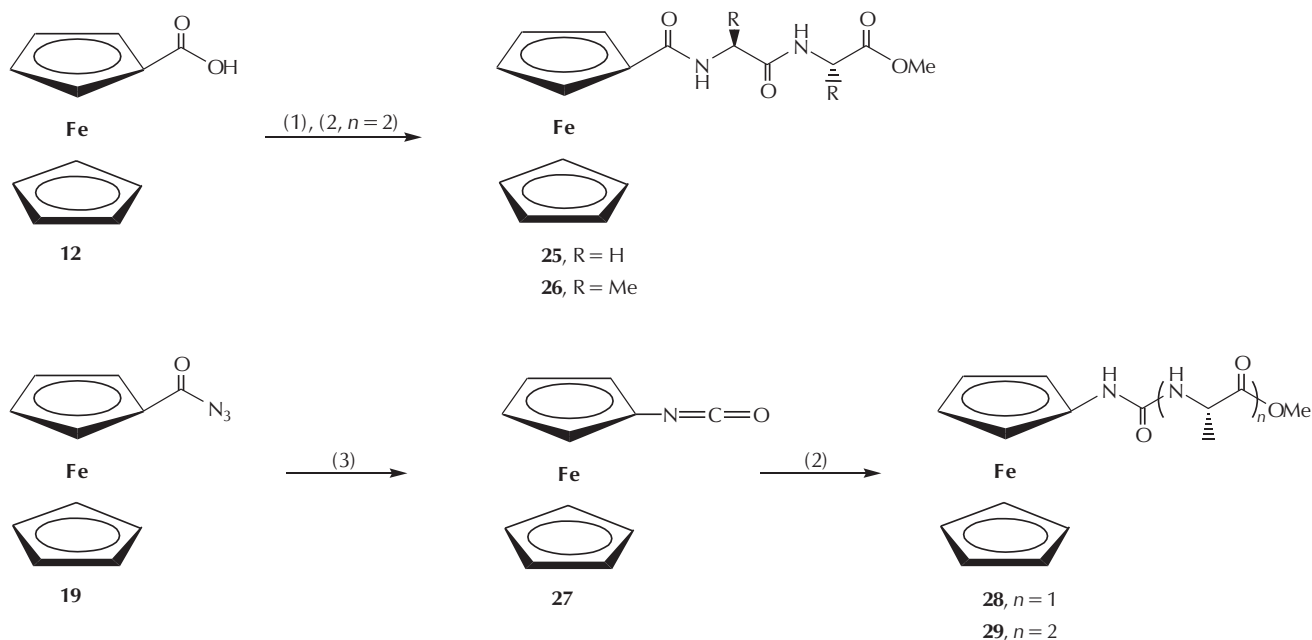
(1) HOBt/EDC, CH_2Cl_2 ; (2) Ala-OMe·HCl, Et_3N , CH_2Cl_2 ; (3) NaOH, dioksan/ H_2O ; (4) ClCOOEt/ Et_3N , acetone; (5) NaN_3 , H_2O ; (6) *t*-BuOH, Δ ; (7) HCl(g)/EtOAc; (8) Et_3N , CH_2Cl_2 ; (9) Boc-AA-OH, HOBt/EDC, CH_2Cl_2 .

Scheme 13 – Peptide-coupling strategies in orthogonal synthesis of amino acids conjugates of ferrocenecarboxylic acid (**12**) and ferrocenamine (**13**) obtained by deprotection of Boc-NH-Fc (**20**)

(1) HOBt/EDC, CH_2Cl_2 ; (2) Ala-OMe·HCl, Et_3N , CH_2Cl_2 ; (3) NaOH, dioxane/ H_2O ; (4) ClCOOEt/ Et_3N , acetone; (5) NaN_3 , H_2O ; (6) *t*-BuOH, Δ ; (7) HCl(g)/EtOAc; (8) Et_3N , CH_2Cl_2 ; (9) Boc-AA-OH, HOBt/EDC, CH_2Cl_2 .

spojeva **V**). Curtiusovim pregrađivanjem azida **19** nastaje izocijanat **27**, koji se adicijom Ala-OMe ili Ala-Ala-OMe pretvara u te spojeve.²⁵ β -Laktamni analog dipeptida **V** pripremljen je na sljedeći način: Boc-Ala (**30**) aktiviran je s pomoću HOBt/EDC i kopuliran s *trans*-(-)-(3*R*,4*R*)-3-amino-1-(4-metoksifenil)-4-fenilazetidin-2-onom (**31**, Alm) u *N*-Boc-pseudodipeptid (**32**). Na sličan način kao u naprijed

opisanim kopulacijama **32** je pretvoren u slobodni oblik **33** koji je prema HOBt/EDC-protokolu kondenziran s ferocenkarkoksilnom kiselinom (**12**) u Fc-CO-Ala-Alm (**34**) (shema 15).²⁶ Sve opisane reakcije odvijaju se u dobrim do izvrsnim iskorištenjima, ne daju nusprodukte, niti uzrokuju racemizaciju, pa predstavljaju pouzdan postupak za nadzor usmjerenosti pripajanja peptida.

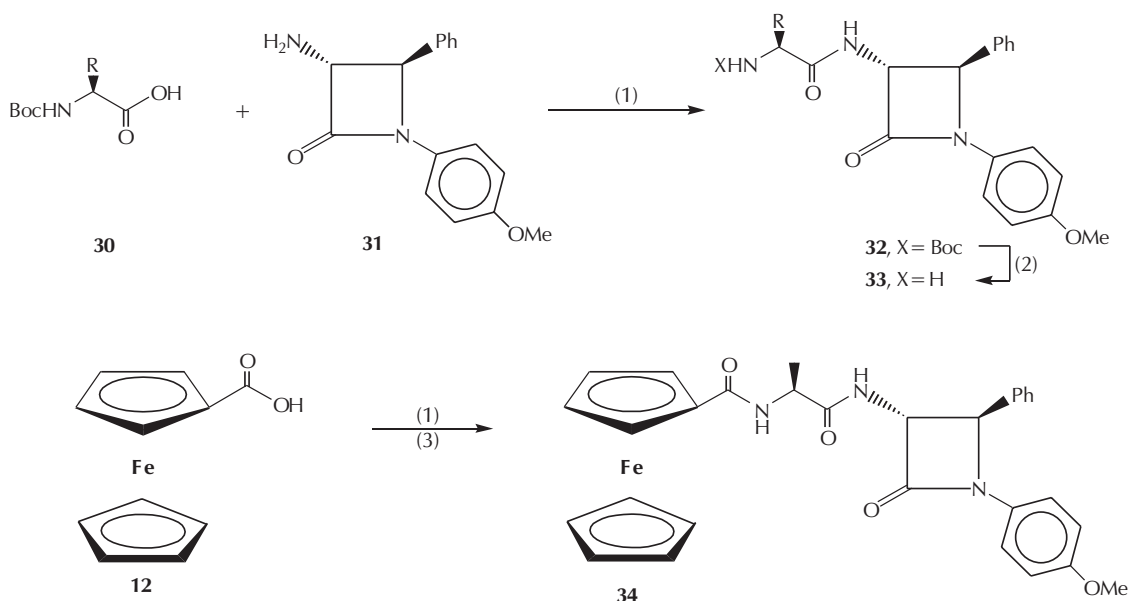


S h e m a 14 – Priprava ferocenskih konjugata s glicinskim i alaninskim dipeptidima (**25**, **26**) i dobivanje ferocenskih ureidopeptida s alaninom (**28**, **29**)

(1) HOBt/EDC, CH_2Cl_2 ; (2) $\text{H}-(\text{AA})_n\text{-OMe}\cdot\text{HCl}$, Et_3N , CH_2Cl_2 ; (3) PhH, 80°C .

S c h e m e 14 – Preparation of ferrocene conjugates with glycine and alanine dipeptides (**25**, **26**) and synthesis of ferrocene ureidopeptides with alanine (**28**, **29**)

(1) HOBt/EDC, CH_2Cl_2 ; (2) $\text{H}-(\text{AA})_n\text{-OMe}\cdot\text{HCl}$, Et_3N , CH_2Cl_2 ; (3) PhH, 80°C .

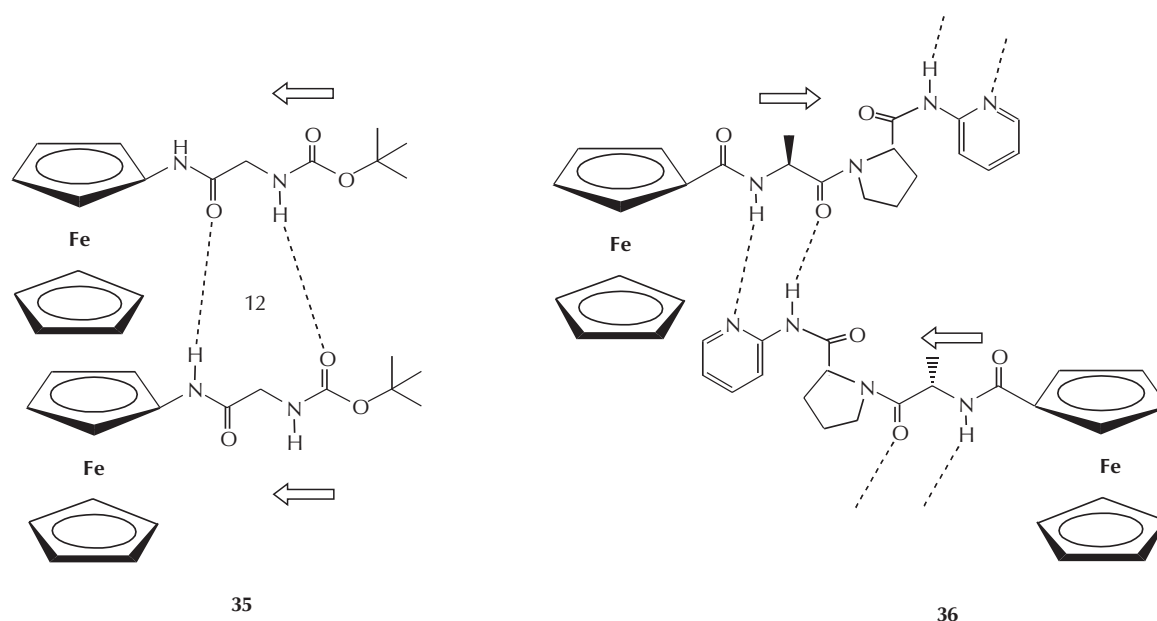


S h e m a 15 – Priprava *N*-ferrocenilnoga pseudodipeptida **34** kondenzacijom FcCOOH (**12**) s Ala-Alm (**33**)

(1) HOBt/EDC, CH_2Cl_2 ; (2) $\text{HCl(g)}/\text{EtOAc}$, Et_3N , CH_2Cl_2 ; (3) **33**, CH_2Cl_2 .

S c h e m e 15 – Preparation of *N*-ferrocenyl pseudodipeptide **34** by condensation of FcCOOH (**12**) with Ala-Alm (**33**)

(1) HOBt/EDC, CH_2Cl_2 ; (2) $\text{HCl(g)}/\text{EtOAc}$, Et_3N , CH_2Cl_2 ; (3) **33**, CH_2Cl_2 .



Shema 16 – Agregati u čvrstom stanju na osnovi intermolekulskih veza između molekula Boc-Gly-NH-Fc (**35**, paralelno svrstavanje) i Fc-CO-Ala-Pro-NH-py (**36**, antiparalelno svrstavanje)

Scheme 16 – Aggregates in the solid state based on the intermolecular hydrogen bonds between the molecules of Boc-Gly-NH-Fc (**35**, parallel alignment) i Fc-CO-Ala-Pro-NH-py (**36**, antiparallel manner)

Supramolekulsko združivanje ferocenskih konjugata tipa **V** i **VI** ne može se nadzirati i odvija se više ili manje nasumično. Drugim riječima, ferocenska skupina u tim monosupstitucijskim konjugatima ne utječe na intrinzičnu osobinu peptida da stvaraju različite agregate na osnovi intermolekulskih vodikovih veza. Npr. molekule Boc-Gly-NH-Fc (**35**) (konjugat tipa **VI**) u čvrstom se stanju združuju tako da su ferocenski ostaci iz peptidnih niti na jednoj strani. To rezultira motivom intermolekulske vodikove veze koji podsjeća na paralelnu β -plohu, pa je čak stvoren i 12-eročlani prsten preko vodikove veze. No valja uočiti da je ta sličnost formalne prirode budući da je ovdje riječ o kvaternoj strukturi.²⁷ Suprotan je slučaj agregacije ferocenskog dipeptida Fc-CO-Ala-Pro-NH-py (**36**) čiji se lanci povezuju u antiparalelnom smislu preko intermolekulskih veza N-H \cdots N i N-H \cdots O uz tvorbu 9-eročlanih prstenova s vodikovom vezom (shema 16, usporediti sa shemom 1).²⁸

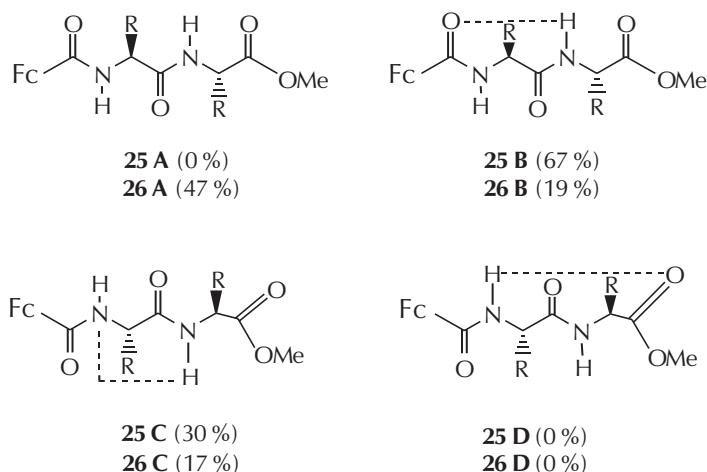
U prvom dijelu ovoga prikaza¹ razmotrena je fleksibilnost ferocenske jezgre, koja se mjeri torzijskim kutom ω (odstupanje od ekliptične ferocenske konformacije), kutom iskrivljenosti Θ (mjera gubitka koplanarnosti Cp-prstenova) i kutom izvijenosti β (odstupanje od planarnosti konjugiranih sustava Cp-C(=X)R). Kod dipeptida tipa **V** općenito je kut Θ malen ($1 - 4,5^\circ$), no zbog steričkih razloga se kod "natrpanih" oligopeptida povećava i do 16° . Veličina peptidne skupine ima znatan utjecaj na koplanarnost ravnina Cp-prstena i amidne veze u smislu smanjenja rezonancijske stabilizacije.²⁰

U našim radovima načinili smo konformacijsku analizu pripravljenih spojeva tipa **V** i **VI** u otopinama neprotogenih otapala (CH_2Cl_2 , CDCl_3). Dipeptidi **25** i **26** mogli bi se hipotetski pojaviti u konformacijama **A–D** prikazanim na shemi 17. U IR-spektrima obaju spojeva nađene su vrpce pri $\approx 1745 \text{ cm}^{-1}$, što ukazuje na slobodnu estersku funkciju, odn. odsutnost oblika **D**. U području $\nu(\text{N–H})$ zabilježeni su

srednje jaki signali pri $3425 - 3439 \text{ cm}^{-1}$ i slabi pri $3309 - 3323 \text{ cm}^{-1}$, što ukazuje na prisutnost otvorene konformacije **A**, ali i oblika **B** i **C** u kojima je $\text{NH}_{\text{AA}2}$ vezana intramolekulski (postojanje intermolekulskih vodikovih veza u tim spojevima isključeno je na osnovi IR-mjerenja uz razrjeđivanje). Usporedbom ^1H NMR-spektara u CDCl_3 i DMSO-d_6 (v. r.-NMR-postupak koji je opisan na shemi 30 i u popratnom tekstu) potvrđeno je da je $\text{NH}_{\text{AA}1}$ slobodna ($\delta(\text{CDCl}_3) \approx 6,58 \text{ ppm}$), a $\text{NH}_{\text{AA}2}$ vezana slabom IHB ($\delta(\text{CDCl}_3) \approx 7,10 \text{ ppm}$). Rezultati DFT-studija, koji potvrđuju spektroskopsku analizu, prikazani su na shemi 17: u slučaju dipeptida **25** sastavljenog iz malih Gly-podjedinica nađeni su gotovo isključivo konformeri **25B** i **25C**, dočim kod Fc-CO-Ala-Ala-OMe (**26**) skoro polovica populacije otpada na otvoreni oblik **26A**. Može se zaključiti da voluminoznija podjedinica Ala destabilizira konformacije **B** (γ -okret) i **C** s premošćujućom skupinom $\text{NH}_{\text{AA}2}$.²⁴

Konformacijskom analizom β -laktamnoga pseudopeptida **34** (shema 15) utvrđena je struktura analogna opisanoj za Fc-CO-Ala-Ala-OMe (**26**) pri čemu NH_{Alm} pokazuje slična spektroskopska svojstva kao $\text{NH}_{\text{Ala}2}$ u **26**: IR-spektri (CH_2Cl_2) sadrže vrpce pri 3421 i 3283 cm^{-1} , što znači da postoje slobodne i vezane NH-skupine, a pokusi razrjeđivanja ukazuju na IHB. ^1H NMR-signal (CDCl_3) su nađeni pri $8,21$ (NH_{Alm}) i $6,79 \text{ ppm}$ (NH_{Ala}), što uz dodatne NMR-studije (v. r., slaba koncentracijska ovisnost) govori da je NH_{Alm} donor IHB srednje jakosti, a NH_{Ala} nije uključena u takvo međudjelovanje. DFT-modeliranjem je, u skladu sa spektroskopskom analizom, indiciran konformer (analogan **26B** na shemi 17) s unutarlančanom vezom $\text{CO}_{\text{Fc}} \cdots \text{HN}_{\text{Alm}}$. Izmjerena vicinalna konstanta sprege $^3J(\text{NH}_{\text{Ala}}, \text{CH}_{\text{Ala}}) = 7,66 \text{ Hz}$ i izvedeni torzijski kut ($\text{CO}_{\text{Fc}}\text{-NH}_{\text{Ala}}\text{-CH}_{\text{Ala}}\text{-CO}_{\text{Ala}}$) od 154° u suglasju je s izračunatim kutom od -147° (slika 3).²⁶

Zanimljivo je razmotriti strukturu ureidopeptida **28** i **29** (shema 14) koji se od ferocenoilpeptida **17** i **18** (shema 13)



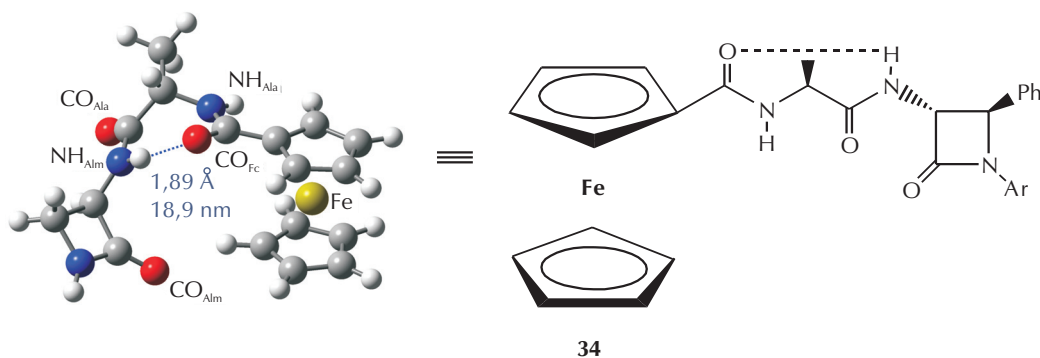
S h e m a 17 – Konformacije **A–D** ferocenoildipeptidnih estera s glicinom (**25**) i alaninom (**26**), a njihov brojnosni udjel na osnovi DFT-računa

S c h e m e 17 – Conformations **A–D** of ferrocenoyldipeptide esters with glycine (**25**) and alanine (**26**), as well as their number fraction on the basis of DFT-calculation

razlikuju za jednu amino-skupinu (pridodanu uz Fc). U IR-spektrima (CH_2Cl_2) obaju ureidopeptidâ pojavljuju se vrpce pri 3426 i $\approx 3365\text{ cm}^{-1}$ indikativne za slobodne i vezane oblike kao i signal pri 1740 cm^{-1} koji označuje nevezanu estersku skupinu. U čvrstom se stanju (IR-KBr) na osnovi vrpce ispod 3400 i 1740 cm^{-1} može utvrditi isključivo vrsta s vodikovom vezom (u koju su uključene amidne i esterske skupine). U ^1H NMR-mjerenjima uočena je znatna temperaturna i koncentracijska ovisnost, pri čemu su sa smanjenjem koncentracije zamijećeni pomaci k višem magnetskom polju ($\Delta\delta \approx 2\text{ ppm}$), što govori o intermolekulskim vezama između promatranih molekula. Iz kemijskih su pomaka izračunane asocijacijske konstante koje imaju sličnu vrijednost ($K_D \approx 100\text{ mol L}^{-1}$) za NH i NH_{Ala1} , a znatno je manja ($K_D \approx 40\text{ mol L}^{-1}$) nađena za NH_{Ala2} . Može se zaključiti da obje ureilenske amino-skupine asociraju istodobno, a NH_{Ala2} interagira sporije, no stabilizira prvo međudjelovanje, tj. riječ je o kooperativnoj vodikovoj vezi u kojoj je tvorba dimera iz monomera inicijalni proces.²⁵

Za razliku od spojeva $\text{Fc-CO}(\text{AA})_n\text{-OMe}$ (**V**), kojima je posvećeno više publikacija, konjugati $\text{Boc}(\text{AA})_m\text{-NH-Fc}$ (**VI**) studirani su u samo nekoliko radova. U kratkom razdoblju opisane su funkcionalizirane aminokiseline (**VI**, $m = 1$): $\text{AA} = \text{Gly}$, Leu , Phe , Val , Cys , Tyr ,²⁷ $\text{AA} = \text{Ala}$ (**21**)²² i $\text{AA} = \text{Gly}$, Val .²³ Jedini primjer dipeptidâ jest Boc-Ala-Ala-NH-Fc (**24**).²³ Kemijski pomaci odgovarajućih NH-skupina u svim prikazanim spojevima su slični, a za procjenu jakosti vodikove veze indikativno je usporedno snimanje u CDCl_3 i DMSO-d_6 . Pritom su za alaninske konjugate izmjerene sljedeće vrijednosti $[\delta(\text{u CDCl}_3)/\text{ppm}]/[\delta(\text{u DMSO-d}_6)/\text{ppm}]$ za **21**: NH_{Fc} 6,83/9,28; NH_{Ala} 5,55/7,0 i **24**: NH_{Fc} 8,04/9,35; NH_{Ala1} 6,78/8,00; NH_{Ala2} 5,09/7,03. Na osnovi velike razlike $\Delta\delta$ ($\approx 1,5 - 2,5$) može se procijeniti da su vodikove veze u kojima sudjeluju te NH-skupine vrlo slabe ili da ne postoje.²³ Zaključno, za razliku od konjugata **V** karakteriziranih unutarlančanom vodikovom vezom, u "obratnim" spojevima **VI** u razrijeđenim otopinama u neprotogenim otapalima vjerojatno nema međudjelovanja preko vodikovih veza.

Kao što je rastumačeno u drugomu poglavlju, različiti molekularni kalupi mogu potaknuti nastanak dobro definiranih sekundarnih strukturnih elemenata. Derivati ferocena i prirodnih aminokiselina posljednjih se petnaestak godina intenzivno proučavaju kao mimetici peptida, jer udaljenost ciklopentadienilnih prstenova ferocena iznosi $0,33\text{ nm}$ ($3,3\text{ \AA}$), što odgovara razmaku $\text{N}\cdots\text{O}$ u β -nabranoj plohi. Ferocen se pokazao odličnim templatom za indukciju različitih strukturnih elemenata (uzvojnica, nabrana ploha i okreti) jer se u ferocenskim peptidnim derivatima javljaju dobro definirane intra- i intermolekulske vodikove veze. U prvom dijelu ovoga poglavlja obrađeni su monosupstitucijski derivati **V** i **VI**, a sada ćemo razmotriti mnogo zanimljivije heteroanularno disupstituirane konjugate tipa **VII** (izvedene iz **V**, shema 11). Za razliku od konjugata **V** i **VI** (gdje ferocen ne utječe na samozdruživanje i svijanje) u tim disupstitucijskim derivatima, radi spomenute povoljne udaljenosti između Cp-prstenova, s pomoću ferocenskog templa postiže se izvrsna kontrola pri usmjeravanju i uzajamnom povezivanju podandnih peptidnih lanaca. Prije opisa strukture tih spojeva upoznat ćemo se s još jednim svojstvom ferocena koje dolazi do izražaja u njegovim $1,n'$ -disupstitucijskim produktima, a to je *helična kiralnost metalocenske jezgre*.



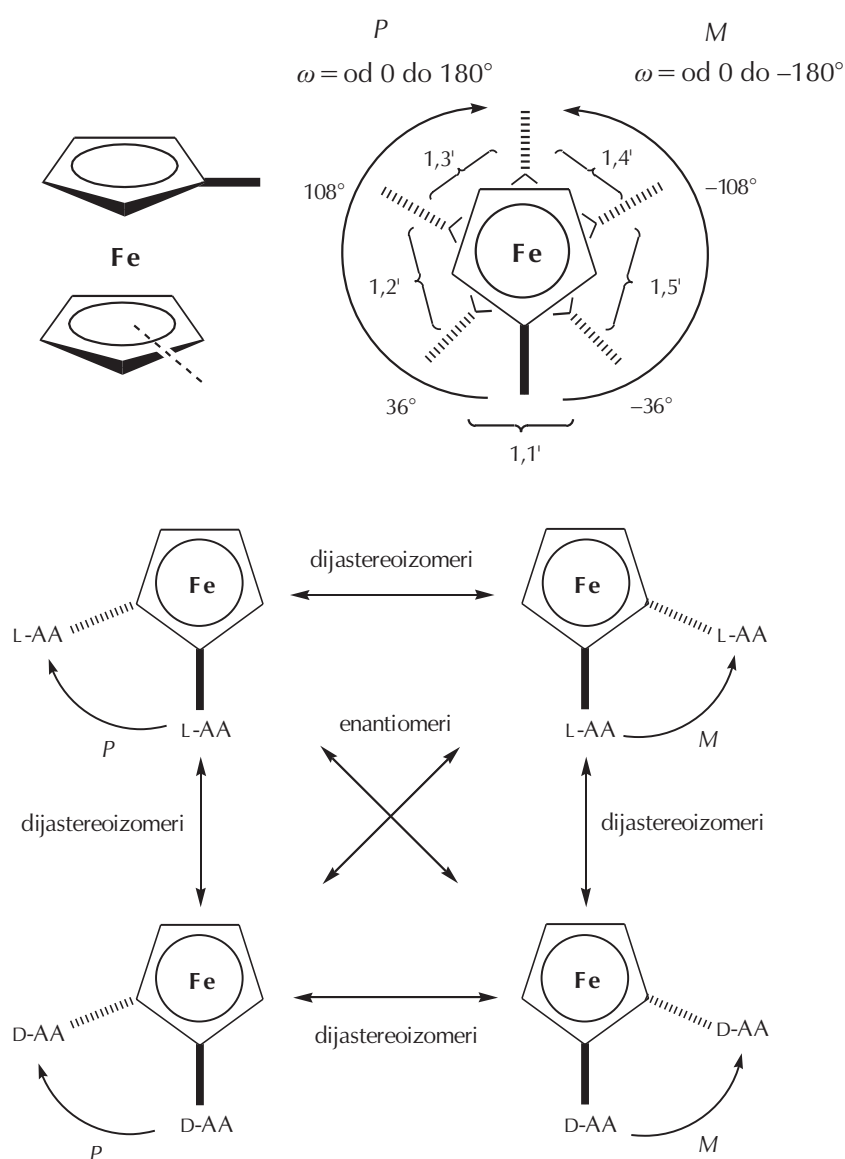
S l i k a 3 – Konformer spoja Fc-CO-Ala-Alm (**34**) s DFT-optimiziranom energijom

F i g. 3 – Conformer of the compound Fc-CO-Ala-Alm (**34**) and its DFT optimized geometry

Nesupstituirani ferocen je akiralan spoj visoke simetrije (D_{5h}), no pogodno heteroanularno disupstituirani derivati u otopinama aprotinskih otapala i čvrstom stanju tvore kiralno uređene strukture fiksirane s IHB. S obzirom na os Cp (centroid)-Fe-Cp (centroid) kiralni supstituenti ciklopentadienilnih prstenova zatvaraju torzijski kut ω (od 0 do 180°) i pritom tvore rotacijske izomere. Bitno je uočiti da je pri sobnoj temperaturi rotacijska barijera ciklopentadienilnih prstenova niska te u FcH i FcR nastupa brza izmjena rotamera. IHB između podandnih peptidnih lanaca uzrokuju povećanje rotacijske barijere i fiksiraju Cp-prstenove u obliku *P*- ili *M*-uzvojnice (ovisno o tome koja je stabilnija). *P*-izomeri definirani su kutom $\omega =$ od 0 do 180° jer u odnosu na središnju os put od supstituenta na "gornjem" prstenu prema supstituentu na "donjem" prstenu odgovara smjeru

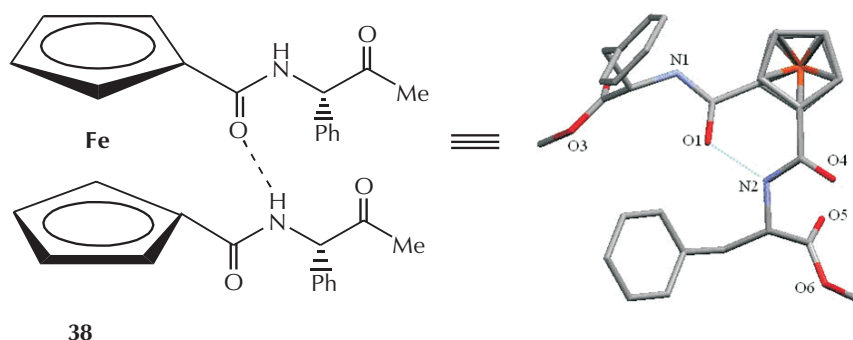
kazaljke na satu. Suprotno, *M*-izomeri definirani su kutom $\omega =$ od 0 do -180° . U smislu tih odnosa na shemi 18 prikazani su neki od mogućih enantiomera odn. dijastereoizomera konjugata ferocena s L- i D-aminokiselinama. Za opis određenog konformacijskog izomera rabi se sljedeća sustavna nomenklatura: 1, n' -disupstitucijski derivat imenuje se kao 1,1' ako torzijski kut ω iznosi između -36° i $+36^\circ$, 1,2'-izomer se odnosi na $\omega =$ od 36° do 108° , itd. Za naznaku smjera kiralnosti (u spojevima s kiralnim supstituentima) dodaju se deskriptori *P* ili *M* pa se npr. konformer s $\omega = 90^\circ$ asignira kao oblik *P*-1,2'.⁷

Helična kiralnost ferocena potvrđena je CD-spektroskopijom, a pojava Cottonova efekta u blizini UV/Vis-apsorpcijskog maksimuma ferocenskog kromofora (≈ 480 nm)



Shema 18 – M- i P-helična kiralnost u heterodisupstitucijskim ferocenskim derivatima (gore) i stereochemijski odnosi M- i P-heličnih ferocenskih konjugata s L- i D-aminokiselinama (dolje)

Scheme 18 – M and P helical chirality in heterodisubstituted ferrocene derivatives (top) and stereochemical relations of M and P helical ferrocene conjugates with L- and D-amino acids (bottom)



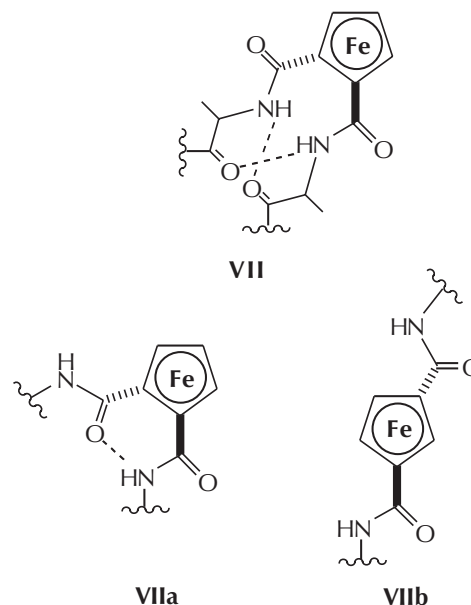
38

Slika 4 – Konformacija $\text{Fn}(\text{CO-Phe-OMe})_2$ (**38**) u čvrstom stanjuFig. 4 – Conformation of $\text{Fn}(\text{CO-Phe-OMe})_2$ (**38**) in solid state

posljedica je ostvarivanja IHB između kiralnih peptidnih lanaca vezanih na ferocenski ostatak. Utvrđeno je da *P*-helične strukture u području ferocenskog kromofora pokazuju pozitivan CD-signal, a *M*-helični sustavi karakterizirani su negativnim Cottonovim efektom.²⁹ Među 1,*n*'-disupstitucijskim ferocenskim konjugatima najprije i najtemeljite su istraženi derivati 1,1'-ferocendikarboksilne kiseline **VII**. Herrick i suradnici kondenzacijom su ferocen-1,1'-di(karbo-nil-klorida) s metilnim esterima prirodnih aminokiselina pripravili simetrične peptide **VII** s po jednom aminokise-linom u svakom lancu (AA = Val, Phe, Pro...).³⁰ Pritom su pokazali da se oni u otopinama neprotogenih otapala (CH_2Cl_2 , CHCl_3) stabiliziraju dvjema simetričnim ekviva-lentnim IHB koje zatvaraju dva 10-eročlana prstena, što znači da je ferocenski templat u nastaloj C_2 -simetričnoj strukturi potaknuo nastajanje β -okreta (sheme 11 i 19).³¹ Kristalografskom analizom $\text{Fn}(\text{CO-Val-OMe})_2$ (**37**) jednaka konformacija nađena je i u čvrstom stanju iako udaljenosti $\text{N}\cdots\text{O}$ od 0,325 nm (3,25 Å) ukazuju na slabe vodikove veze.

U kristalnoj strukturi biokonjugata s fenilalaninom **38** nađena je samo jedna IHB koja zatvara 7-eročlani prsten, pa je riječ o γ -okretu. Različite konformacije u otopini i u čvrstom stanju vjerojatno su posljedica T-slaganja aromatskog boč-nog lanca (slika 4). Valja uočiti da je riječ o nesimetričnom konformeru **VIIa**, koji se može obilježiti deskriptorom *P*-1,2'.³² U prolinskom konjugatu $\text{Fn}(\text{CO-Pro-OMe})_2$ (**39**) ne postoji mogućnost tvorbe vodikove veze, pa se javlja otvorena kon-formacija **VIIb**.³³ Iz prethodno opisanih primjera proizlazi da je ferocenske peptide $\text{Fn}(\text{CO-AA-OR})_2$ moguće podijeliti u tri karakteristične konformacijske skupine koje su prikaza-ne na shemi 19.

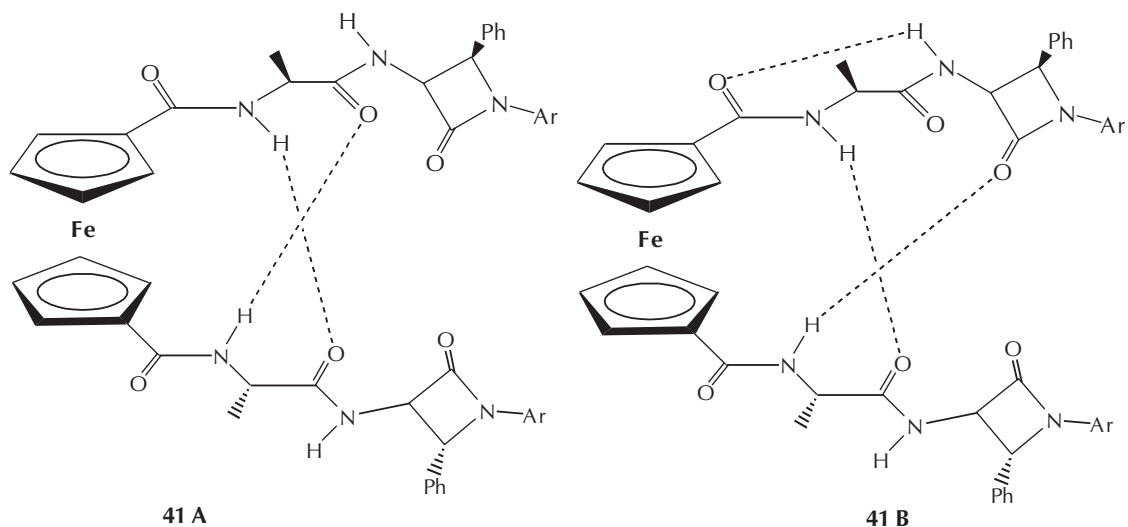
Na sličan način kao što je kopolacijom FcCOOH (**12**) s Ala-Alm (**33**) pripremljen monosupstitucijski pseudodipeptid **34** (shema 15), kondenzacija $\text{Fn}(\text{COOH})_2$ (**40**) s istim reagen-som daje disupstitucijski spoj $\text{Fn}(\text{CO-Ala-Alm})_2$ (**41**) tipa **VII**. Za razliku od Fc-CO-Ala-Alm (**34**), gdje je konformacijskom analizom utvrđeno da NH_{Alm} stvara srednje jake vodikove veze (a NH_{Ala} nije uključen u vezu), ovdje su na osnovi mjere-nja *v. r.*-NMR i koncentracijski ovisnih ^1H NMR-spektara nađene nešto jače IHB s te obje skupine. U CD-spektrima javlja se pozitivni Cottonov efekt pri 485 nm, što govori o *P*-heličnosti ferocenske jezgre. DFT-modeliranjem pokaza-no je da je uz Herrickovu konformaciju **41A** najstabilniji oblik **41B**, koji uz unutarlančanu vezu (γ -okret) sadrži i dvije

S h e m a 19 – Moguće konformacije $\text{Fn}(\text{CO-AA-OR})_2$: "Herrick-ova" konformacija **VII**, *P*-1,2', β -okret; "van Staverenova" konfor-macija **VIIa**; *P* "Xuova" konformacija **VIIb**, *M*-1,4'S c h e m e 19 – Possible conformations of $\text{Fn}(\text{CO-AA-OR})_2$: "Herrick" conformation **VII**, *P*-1,2', β -turn; "van Staveren" confor-mation **VIIa**; *P* "Xu" conformation **VIIb**, *M*-1,4'

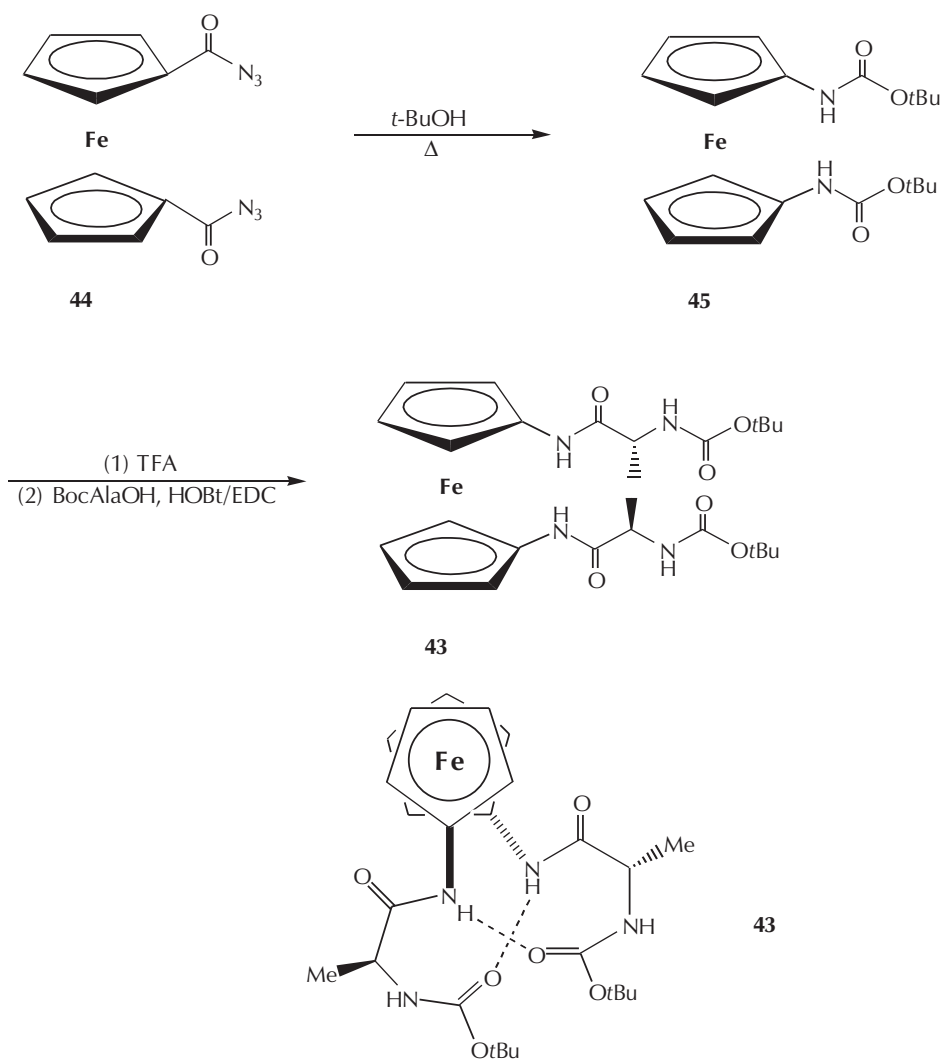
međulančane vodikove veze, što čini posebno stabilnu ko-operativnu tročlanu mrežu novoga tipa (shema 20).²⁶

Drugi zanimljiv primjer disupstitucijskih ferocenskih pep-tidnih konjugata tipa **VIII** izvodi se iz ferocen-1,1'-diamina (**42**), odn. slične je konstitucije kao monosupstitucijski spo-jevi **VI** (shema 11). Zbog teške dostupnosti odn. nestabilno-sti ferocenskih amina spojevi **VI** i **VIII** slabo su istraženi, a ovaj posljednji opisan je u samo jednom radu. Priprava alaninskog derivata **43** inačica je sinteze konjugatâ **VI** (**19**→**20**→**21**, shema 13), koja se odvija iz $\text{Fn}(\text{CON}_3)_2$ (**44**) preko $\text{Fn}(\text{NH-Boc})_2$ (**45**) (shema 21).

Kao što je vidljivo iz sheme 11 u konjugatima **VII** i **VIII** po-javljuje se sličan motiv IHB $\text{N-H}\cdots\text{O}=\text{C}$. Zbog različite kon-stitucije supstratâ, ti su motivi drukčije strukturirani, no valja uočiti da u oba spoja nastaju po dva 10-eročlana prstena (koji uključuju vodikovu vezu), pa je riječ o β -okretima. Na



S h e m a 20 – Konformeri $\text{Fn}(\text{CO-Ala-Alm})_2$ (**41**) izvedeni s pomoću spektroskopske analize i DFT-računa
 S c h e m e 20 – Conformers of $\text{Fn}(\text{CO-Ala-Alm})_2$ (**41**) based on the spectroscopic analysis and DFT-calculation



S h e m a 21 – Pretvorba $\text{Fn}(\text{CON}_3)_2$ (**44**) u $(\text{Boc-Ala-NH})_2\text{Fn}$ (**43**) i njegova stereokemija: M-1,1', β -okret
 S c h e m e 21 – Transformation of $\text{Fn}(\text{CO-N}_3)_2$ (**44**) into $(\text{Boc-Ala-NH})_2\text{Fn}$ (**43**) and its stereochemistry: M-1,1', β -turn

primjeru alaninskog derivata **43** pokazano je da se takva C₂-simetrična struktura javlja u čvrstoj fazi kao i u neprotogenim otapalima, a njezina stereokemija prikazana je na shemi 21.^{7,34}

Treći tip disupstitucijskih ferocenskih peptida **IX** (shema 11), bio je najvećim dijelom predmet istraživanja izvedenih u našem Laboratoriju pa ćemo ga izdvojeno opisati u sljedećem poglavlju.

4. Peptidi izvedeni iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (Fca)

Valja uočiti da, za razliku od disupstitucijskih derivata **VII** i **VIII** u kojima su podandni lanci usmjereni paralelno, konjugat **IX** izveden iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (**46**, Fca) ima peptidne niti položene u antiparalelnom smjeru (shema 11). Osim toga spojevi **IX** nastaju formalnom zamjenom jedne od prirodnih aminokiselina peptidnoga lanca organometalnom kiselinom Fca, pa su (uz spomenutu antiparalelnost lanaca) zaista vjerni mimetici peptida, u kojima bi (zbog navedenih svojstava ferocena) Fca mogla predstavljati savršen začetnik β-okreta. Podsjetimo se da je antiparalelna β-ploha jedno od najvažnijih sekundarnih obilježja (poli)peptida, pa je naša intencija istraživanja spojeva **IX** bila studij upravo takvih modelâ intramolekulskog povezivanja vodikovom vezom (shema 22).

Iznaženjem racionalne sinteze, u kojoj smo s vrlo dobrim iskorištenjima pripravili Fca (**46**) i njezine N- i C-zaštićene derivate,² postigli smo osnovni preduvjet za pripremu takvih spojeva. Imajući na umu naša iskustva s pripremom monosupstitucijskih peptidâ **V** i **VI** izvedenih iz FcCOOH i FcNH₂, na sličnim smo načelima osmislili postupak sinteze Fca-peptida koji je prikazan na shemi 23.^{22,26,35,36} Iz niza prikazanih peptida vrlo smo iscrpno proučili spojeve na "desnoj strani" sheme pa će im se ovdje posvetiti nekoliko riječi. Lužnatom hidrolizom esterske skupine Boc-Fca-OMe (**47**) intermedijarno nastaje Boc-Fca-OH (**48**), koji se aktivira prema postupku HOBt/EDC i kopulira s AA-OMe (dobivenim iz AA-OMe-HCl s Et₃N u CH₂Cl₂). Deprotekcijom nastaloga dipeptida Boc-Fca-AA-OMe (**IXa**) (s pomoću HCl/EtOAc uz neutralizaciju s Et₃N) intermedijarno nastaje Fca-AA-OMe, koji se na N-terminusu kopulira s Boc-AA-OH (aktiviranom s HOBt/EDC) uz tvorbu "simetričnog" tri-

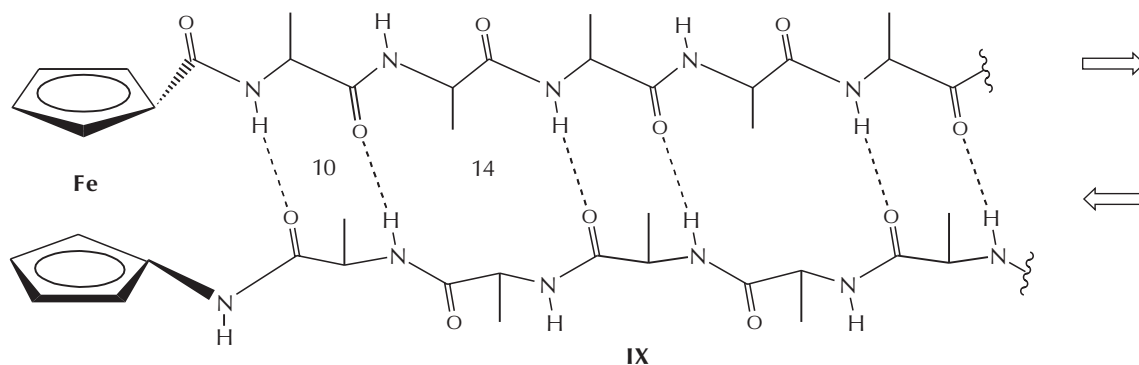
peptida **IXb**. Slično kao pri dobivanju dipeptida, hidrolizom metoksikarbonilne skupine spoja **IXb** i njezinim povezivanjem s AA-OMe nastaje tetrapeptid **IXd**.

Može se primijetiti da je kao polazni spoj za opisane sinteze uzet Boc-zaštićeni ester Fca-OMe (**47**), a produkti su dobiveni u obliku Boc-(AA)_m-Fca-(AA)_n-OMe, što je nužno za sukcesivne selektivne korake hidroliza/deprotekcija/kopulacija. No za konformacijsku je analizu umjesto glomazne tert-butoksikarbonilne skupine često pogodnija manja acetilna skupina, a na shemi 24 prikazano je dobivanje takvih spojeva tipa Ac-(AA)_m-Fca-(AA)_n-OMe. Na način sličan opisanom dobivanju N-Boc-dipeptida (**IXa**) iz Ac-Fca **49** pripravlja se **Xa**, a Boc-AA-Fca-AA-OMe (**IXb**) se N-deprotektira i s pomoću AcCl acetiliraju u **Xb**.³⁶

Osim naprijed opisanih priprava u otopini, izveli smo i sintezu Fca-peptida **IX** i **X** na čvrstoj fazi: pentapeptid **50** i oktapeptid **51** pripravili smo kombinacijom Fmoc- i Boc-postupaka na nosaču TentaGel S HMB.³⁷ LeuFmoc vezan na nosaču postupno smo kopulirali s Fmoc-Val, Fmoc-Gly, Fmoc-Ala i Boc-Fca i potom s dijela nosača odcijepili pentapeptid **50** djelovanjem smjese CH₂Cl₂ i MeOH prethodno zasićene plinovitim NH₃. Ostatak vezan na nosač smo Boc-deprotektirali djelovanjem suhoga plinovitog HCl u CH₂Cl₂ (uz zaluzivanje s Et₃N) i postupno kopulirali s Fmoc-Ala, Fmoc-Gly i Fmoc-Val. Nakon zadnje kopulacije nastali smo oktapeptid obradili 20 %-tnom otopinom piperidina u DMF i sterički zahtjevu Fmoc-zaštitnu skupinu zamijenili Ac-skupinom (djelovanjem 10 % Ac₂O/DMF u prisutnosti 12 % DIPEA) te potom nastali N-Ac-oktapeptid **51** odcijepili s NH₃ na opisani način (shema 25).

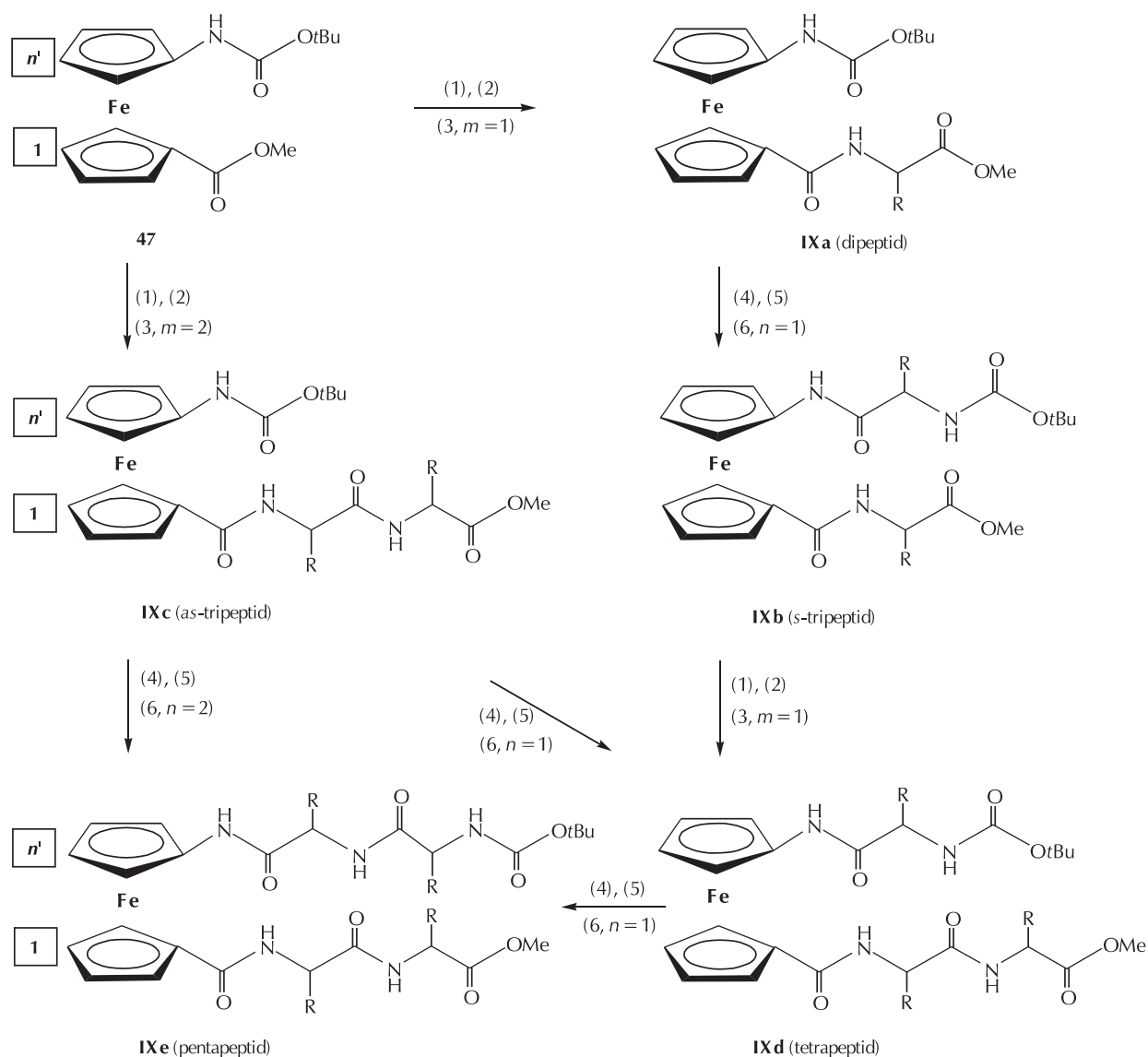
Fca-dipeptidi **IXa** i **Xa**

U sklopu istraživanja Fca-oligopeptida **IX**, dipeptidi **IXa** i **Xa** predstavljaju najniže članove, čija je priprava prikazana na shemama 23 i 24. Služeći se tamo predočenim postupkom sintetizirali smo sljedeće predstavnike tipa **IXa**: AA = Gly (**52**), Ala (**53**), D-Ala (**54**), β-Ala (**55**), Val (**56**) i ove spojeve tipa **Xa**: AA = Gly (**57**), Ala (**58**), Val (**59**), Ala-Alm (**60**) (usp. sa spojem **41**). Imajući na umu strukturu Ac-Fca-OMe (**61**), koja ne sadrži intramolekulsku vezu,³⁸ pretpostavili smo izostanak slične interakcije (Fn-NH...O=C-Fn) u dipeptidima i predvidjeli u njima konformacije prikazane na shemi 26. U svim konformacijama po jedna je NH-skupina



Shema 22 – Hipotetska β-nabrana ploha **IX** u kojoj templat Fca (**46**) djeluje kao začetnik okreta

Scheme 22 – Hypothetical β pleated sheet **IX** with Fca (**46**) template acting as turn inducer



S h e m a 23 – Priprava N-Boc zaštićenih Fca-oligopeptida Boc-(AA)_n-Fca-(AA)_m-OMe (IX) (aminokiseline navedene slijedom od N- ka C-terminusu):

IXa: AA = Gly (52), Ala (53), D-Ala (54), β-Ala (55), Val (56)

IXb: AA = Gly, Gly (62), Ala, Ala(63), D-Ala, Ala (64), Ala, D-Ala (65), Val, Val (66)

IXc: AA = Ala, Ala (70)

IXd: AA = Ala, Ala, Ala (71), Ala, Ala, D-Ala (72), Ala, D-Ala, D-Ala (73)

IXe: AA = Ala, Ala, Ala, Ala (74), D-Ala, Ala, Ala, D-Ala (75), Ala, Ala, D-Ala, D-Ala (76).

(1) NaOH, H₂O, EtOH; (2) HOBT/EDC, CH₂Cl₂; (3) H-(AA)_m-OMe·HCl, Et₃N, CH₂Cl₂; (4) HCl(g)/EtOAc; (5) Et₃N, CH₂Cl₂; (6) Boc-(AA)_n-OH, HOBT/EDC, CH₂Cl₂.

S c h e m e 23 – Synthesis of N-Boc protected Fca oligopeptides Boc-(AA)_n-Fca-(AA)_m-OMe (IX) (amino acids given in order from N to C terminus):

IXa: AA = Gly (52), Ala (53), D-Ala (54), β-Ala (55), Val (56)

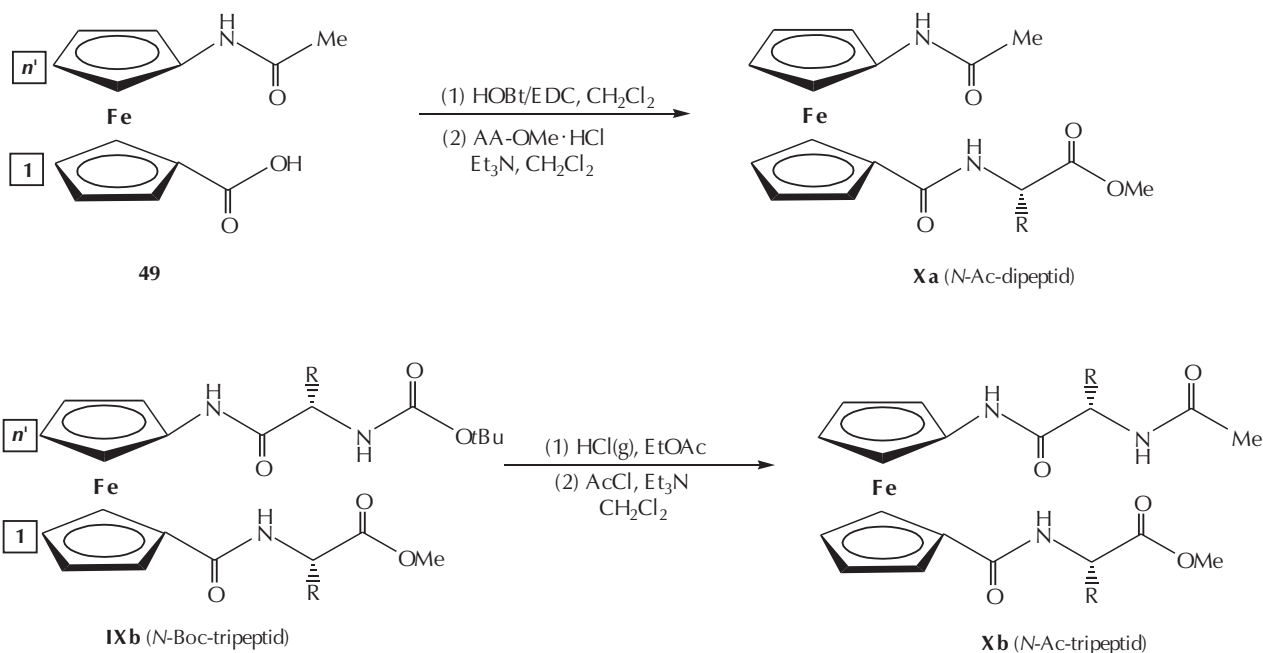
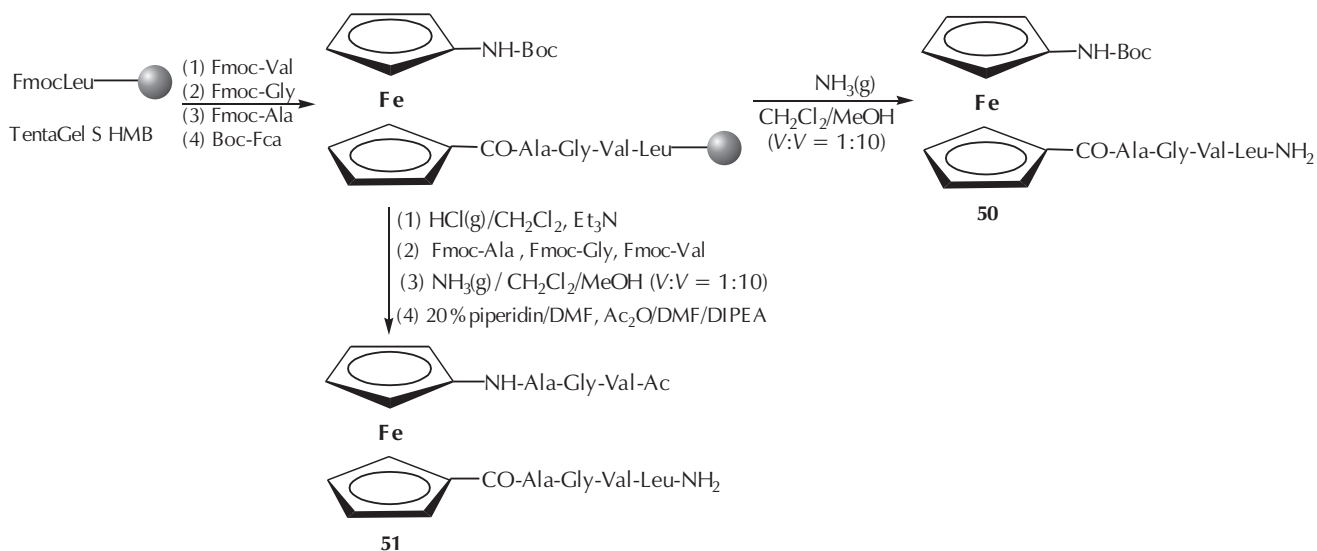
IXb: AA = Gly, Gly (62), Ala, Ala(63), D-Ala, Ala (64), Ala, D-Ala (65), Val, Val (66)

IXc: AA = Ala, Ala (70)

IXd: AA = Ala, Ala, Ala (71), Ala, Ala, D-Ala (72), Ala, D-Ala, D-Ala (73)

IXe: AA = Ala, Ala, Ala, Ala (74), D-Ala, Ala, Ala, D-Ala (75), Ala, Ala, D-Ala, D-Ala (76).

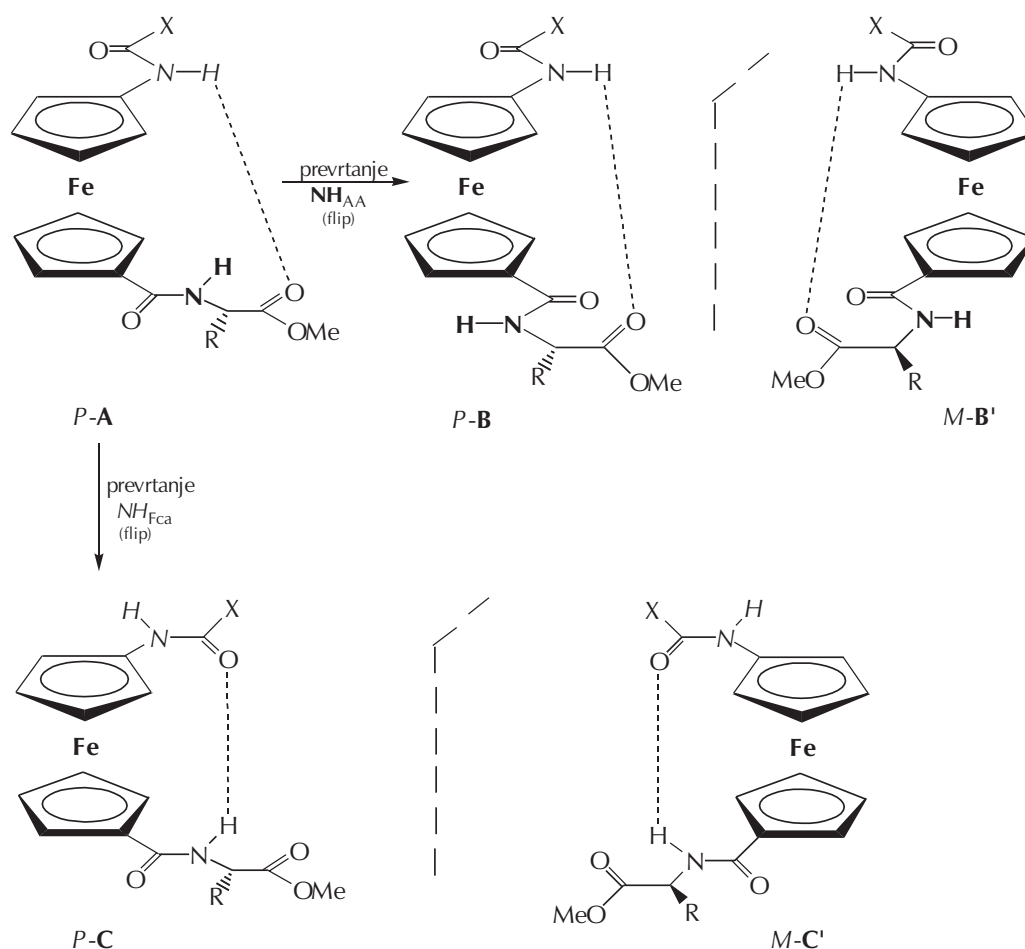
(1) NaOH, H₂O, EtOH; (2) HOBT/EDC, CH₂Cl₂; (3) H-(AA)_m-OMe·HCl, Et₃N, CH₂Cl₂; (4) HCl(g)/EtOAc; (5) Et₃N, CH₂Cl₂; (6) Boc-(AA)_n-OH, HOBT/EDC, CH₂Cl₂.

S h e m a 24 – Priprava Ac-Fca-AA-OMe (**Xa**) i Ac-AA-Fca-AA-OMe (**Xb**)**Xa**: AA = Gly (**57**), Ala (**58**), Val (**59**)**Xb**: AA = Gly (**67**), Ala (**68**), Val (**69**)S c h e m e 24 – Synthesis of Ac-Fca-AA-OMe (**Xa**) and Ac-AA-Fca-AA-OMe (**Xb**)**Xa**: AA = Gly (**57**), Ala (**58**), Val (**59**)**Xb**: AA = Gly (**67**), Ala (**68**), Val (**69**)S h e m a 25 – Priprava pentapeptida **50** i oktapeptida **51** kombinacijom Fmoc- i Boc-postupka na čvrstoj fazi (TentaGel SHMB)S c h e m e 25 – Synthesis of pentapeptide **50** and octapeptide **51** by combination of Fmoc and Boc solid-phase synthetic methods (TentaGel SHMB)

slobodna i dostupna za tvorbu *intermolekulskih* vodikovih veza sa susjednim molekulama (čvrsto stanje), odnosno molekulama otapala. U konformacijama **A** i **B** između FnNH i esterske karbonilne skupine zatvoren je 9-eročlani, a u obliku **C** 8-eročlani prsten koji uključuje NH_{AA} i jukstapozicionirani C=O. Konformacije **A**, **B** i **C** podržavaju *P*-,

njihove pseudo-zrcalne slike **B'** i **C'** induciraju *M*-heličnost ferocena.

Strukturnom analizom Boc-Fca-Ala (**53**) i Boc-Fca-D-Ala (**54**) utvrđeno je postojanje 8-eročlane intramolekulske vodikove veze, odn. oblika **C** i **C'** koji uzrokuju heličnu kiral-

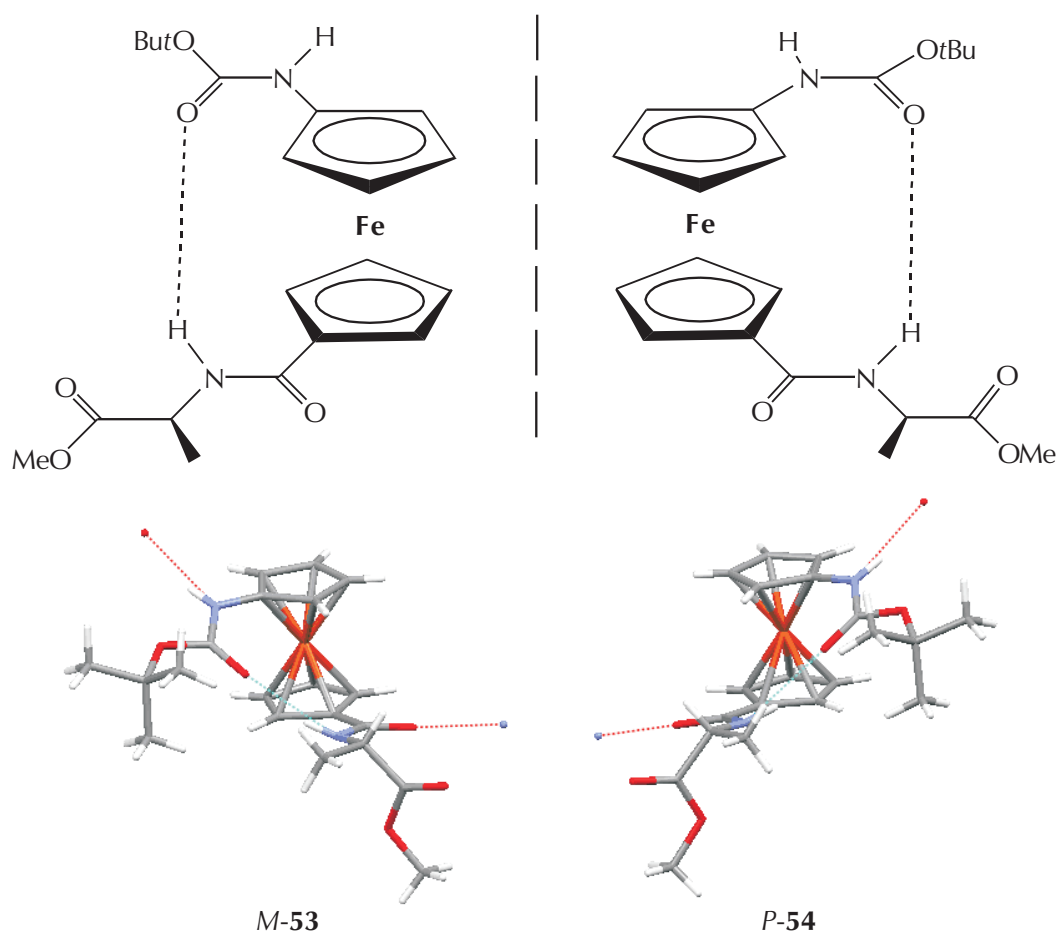
S h e m a 26 – Intramolekulske vodikove veze u mogućim konformacijama Fca-dipeptidâ **IXa** ($X = O-tBu$) i **Xa** ($X = Me$)S c h e m e 26 – Intramolecular hydrogen bonds in hypothetical conformations of Fca dipeptides **IXa** ($X = O-tBu$) i **Xa** ($X = Me$)

nost tih derivata u čvrstom stanju. Važno je uočiti da ti spojevi samo formalno podsjećaju na pseudozrcalne slike **C** i **C'** iz sheme 26, a zapravo je riječ o konformacijskim enantiomerima sa suprotno usmjerenim uzvojnica (*M-53*, $\omega = -85,1^\circ$ i *P-54*, $\omega = 85^\circ$). Sterička napetost izazvana nekoplanarnošću amidnih jedinica s ciklopentadienskim prstenom ($\beta_{NH} \approx 30^\circ$, $\beta_{CO} \approx 9^\circ$) nadoknađuje se stabilizacijom s pomoću IHB (slika 5).²²

Kristalografskom analizom Ac-Fca-Gly (**57**) ustanovljeno je da su acetilne skupine i glicinske podjedinice u *trans*-položaju. U čvrstom su stanju obje NH-skupine uključene u vodikove veze, pri čemu esterska karbonilna skupina glicina s NH-skupinom s ferocena tvori IHB (linija **a**) koja rezultira 9-eročlanim prstenom (konformer *P*, $\omega = 8,4^\circ$). Dodatna stabilizacija postiže se samopovezivanjem susjednih molekula **57** intermolekulskim vodikovim vezama u kojima sudjeluje NH-skupina glicina i acetamidna karbonilna funkcija (linija **b**) (slika 6).³⁶

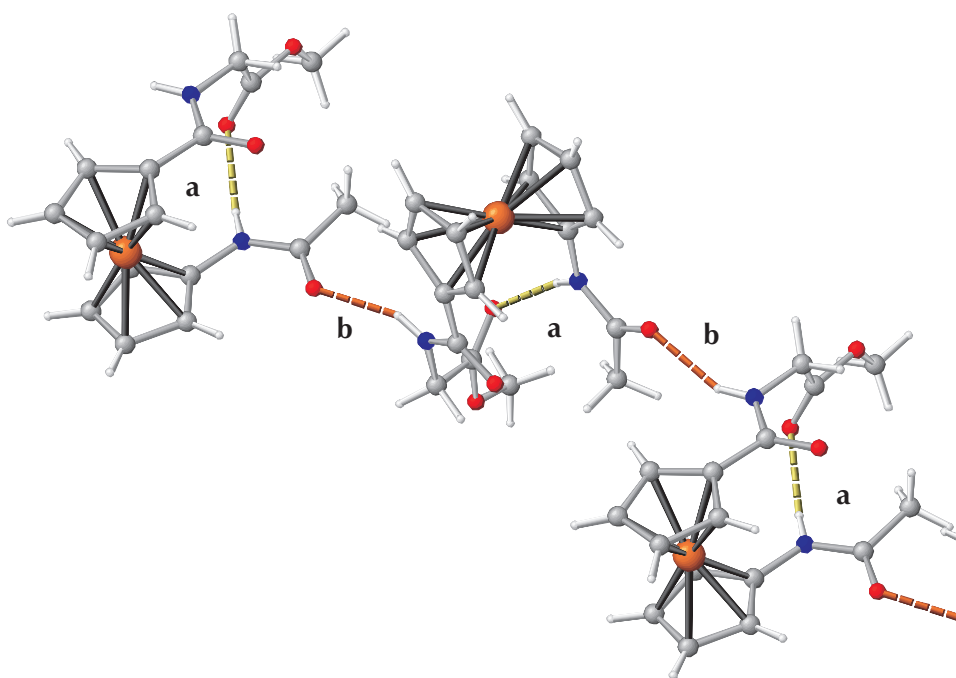
U IR-spektrima dipeptidâ tipa **IXa** i **Xa** (**52–59**) snimljenih u diklormetanskoj otopini (pri koncentraciji $c = 10^{-3}$ mol L⁻¹) opažene su apsorpcijske vrpce za NH-skupinu pri ≈ 3434 cm⁻¹ i 3354–3328 cm⁻¹, koje se pripisuju slobodnim i asociranim NH-skupinama. Apсорpcijske vrpce NH-skupina dipeptidâ približno su jednakoga intenziteta što ukazuje na vodikove veze slabe do srednje jakosti odn. na postojanje

više konformacija koje se nalaze u ravnoteži. Kiralni konjugati **53**, **56**, **58** i **59** u ¹H i ¹³C NMR-spektrima daju jasno razdvojene signale parova diastereotopnih vodikovih i ugljikovih atoma Cp-jezgara [CH-2/CH-5, CH-3/CH-4, CH-7/CH-8 i CH-9/CH-10] što se pripisuje intramolekulskim vodikovim vezama između podandnih peptidnih lanaca. Signali parova protonâ i ugljikovih atomâ glicinskih derivata **52** i **57** su jednaki jer nema kiralnoga ugljikova C α -atoma koji je uzrokom diastereotopnosti, odn. prenosa kiralne informacije s L-aminokiseline na ciklopentadienske prstenove. Kao što je uočljivo iz prethodnog teksta, $\delta(NH) > 7$ ppm upućuje na postojanje vodikove veze, a $\delta(NH) < 7$ ppm indicira dominaciju slobodnih molekula, premda se, u ovisnosti o kemijskoj okolini, te granice mogu i pomaknuti. Razrjeđivanjem odn. zagrijavanjem otopina oligopeptida u CDCl₃ kemijski pomaci slobodnih amidnih podjedinica ili onih uključenih u IHB ostaju jednaki ili se neznatno mijenjaju ($\Delta\delta = 0,1 - 0,3$ ppm). U sličnim uvjetima intermolekulske se vodikove veze samozdruženih molekula cijepaju, što dovodi do zamjetljivog pomaka $\Delta\delta$ (1–4 ppm). Kemijski pomaci protona NH_{AA} i NH_{Fca} Boc-dipeptida **52**, **53** i **56** pri postupnom razrjeđivanju njihovih otopina od $c = 10^{-1}$ mol L⁻¹ do $c = 10^{-3}$ mol L⁻¹ ne mijenjaju se i javljaju pri δ 7 ppm, što znači da u tim okolnostima postoje slabe vodikove veze, a tijekom hlađenja oba se spomenuta NH-signala postupno znatno pomiču k nižem



Slika 5 – Shematski prikaz i molekulska struktura enantiomernih dipeptida M-Boc-Fca-Ala-OMe (**53**) i P-Boc-Fca-D-Ala-OMe (**54**)

Fig. 5 – Schematic presentation and molecular structure of enantiomeric dipeptides M-Boc-Fca-Ala-OMe (**53**) and P-Boc-Fca-D-Ala-OMe (**54**)



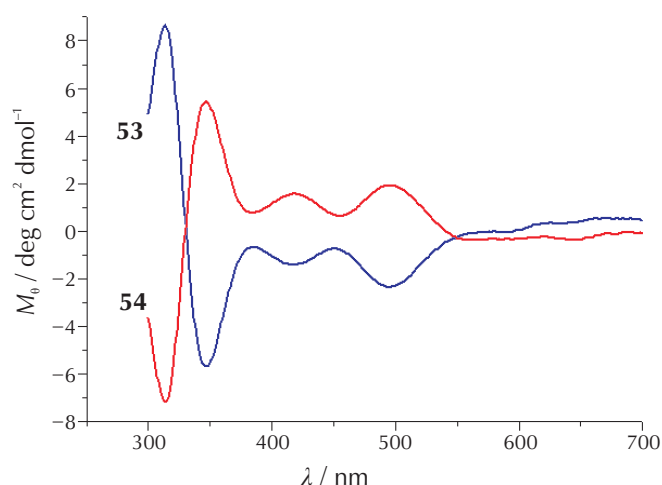
Slika 6 – Molekulska struktura dipeptida Ac-Fca-Gly (**57**) u kristalu

Fig. 6 – Molecular structure of dipeptide Ac-Fca-Gly (**57**) in crystalline state

polju ($\Delta\delta \approx 1$ ppm) što je indikativno za *intermolekulske* vodikove veze. Kemijski pomaci NH_{AA} Ac-dipeptida **57–59** neznatno se mijenjaju smanjenjem koncentracije, što ukazuje na vrlo slabe IHB, a $\delta \text{NH}_{\text{Fca}}$ ne prelaze granicu od 7,5 ppm, što indicira srednju stabilnost IHB u koju je ta skupina uključena (konformeri **A**, **B** i **B'**). Hlađenjem otopina, kao i u slučaju Boc-dipeptida, nastupa združivanje molekula Ac-dipeptida putem *intermolekulskih* vodikovih veza što je vidljivo iz zamjetnog $\Delta\delta$ prema nižem magnetnom polju.

Pojava Cottonova efekta u apsorpcijskom području ferocenskog kromofora ($\lambda_{\text{max}} \approx 480$ nm) indicacija je helične kiralnosti ferocena koja je posljedica ostvarivanja IHB između kiralnih peptidnih lanaca uvedenih u ferocensku molekulu. Mjerenjem CD-spektara otopina enantiomera alaninskih konjugata **53** i **54** u CH_3CN našli smo Cottonove signale u području iznad 400 nm koji su jednakoga intenziteta i suprotnog predznaka, čime smo pokazali da je helična kiralnost nađena u kristalu (slika 5) zadržana i u otopini (slika 7). Snimanjem CD-spektara dipeptida u CH_2Cl_2 pokazano je da svi sadrže signale pri približno 450 – 490 nm, pri čemu dipeptidi **53**, **56** i **59** pokazuju pozitivan, a alaninski Ac-derivat **58** negativan Cottonov efekt, što potvrđuje kiralnu okolinu ferocenskog kromofora. Apsolutna vrijednost tih CD-signalâ znatno je manja od one opažene kod tripeptidâ **IXb**, što indicira samo mali suvišak *P*-konformera u prva tri spoja, odn. *M*-konformera u **58** (shema 26). Jakost IHB u CH_2Cl_2 može se procijeniti dodatkom DMSO: $\varphi = 20$ % toga kompeticijskog otapala uzrokuje smanjenje Cottonova efekta za 50 – 90 %, zbog kidanja IHB i stvaranja solvata. Proizlazi da su ferocenski dipeptidi stabilizirani slabim IHB te u otopini postoje kao skup energijski bliskih konformera, na čiju populaciju može utjecati promjena otapala ili bočnog ogranka prirodne aminokiseline te uzrokovati dominaciju pojedinog konformera i promijeniti predznak CD-signalâ.

DFT-računom nađene su uz konformere **A**, **B** i **C** (prikazane na shemi 26) i konformacije **D** i **E** (i njihove pseudo-zrcalne

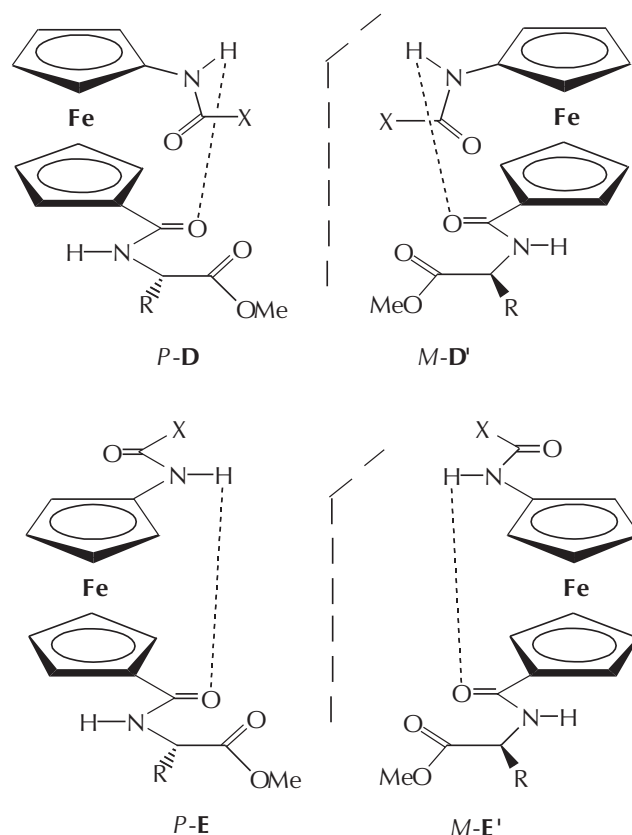


Slika 7 – CD-spektri Boc-Fca-Ala (**M-53**) i Boc-Fca-D-Ala (**P-54**) u CH_3CN ($c = 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), s negativnim i pozitivnim Cottonovim efektom u području ferocenskog kromofora (≈ 500 nm)

Fig. 7 – CD spectra of Boc-Fca-Ala (**M-53**) i Boc-Fca-D-Ala (**P-54**) in CH_3CN ($c = 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), showing negative and positive Cotton effect in the region of ferrocene chromophore (≈ 500 nm)

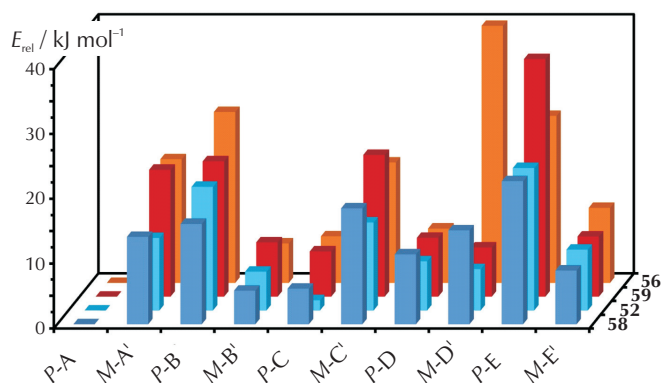
slike **D'** i **E'**) u kojima vodikove veze zatvaraju 6-eročlani prsten (shema 27). Iz grafičkog prikaza na slici 8 može se zaključiti da postoji velik broj energijski bliskih konformera (20 kJ mol^{-1}) na čiju populaciju promjena *N*-zaštitne skupine nema većega utjecaja. U energijski dostupnim konformacijama **A/A'** i **B/B'** vodikova veza između NH_{Fca} i esterske karbonilne skupine zatvara 9-eročlani prsten što je u skladu s IR- i NMR-podacima koji ukazuju na stabilnost te veze u slučaju Ac-dipeptida **57–59**. Konformacija **B** nađena je u čvrstom stanju akiralnog **57**, a **C/C'** kod enantiomernih **M-53** i **P-54**. Povećanje bočnog ogranka prirodne aminokiseline ($R = \text{Me}$ ili *i*-Pr) ograničava dostupan konformacijski prostor destabilizacijom konformacija **A'**, **B**, **D'** i **E**, iz čega proizlazi da ferocenski dipeptidi s manjim bočnim ograncima prirodnih aminokiselina imaju veći broj dostupnih konformacija. Imajući na umu rezultate proizašle iz IR-, NMR- i CD-spektroskopije te kristalografske analize može se zaključiti da promjena otapala ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$) ili medija (čvrsto stanje/otopina) može modificirati slobodnu NH-skupinu (*intermolekulske* vodikove veze), promijeniti termodinamičku ravnotežu i obogatiti smjesu pojedinim konformerom.^{22,36}

Vrlo zanimljiv primjer Fca-dipeptida jest *N*- β -laktamni amid Boc-Fca-Ala-Alm (**60**) koji se priprema kopulacijom Boc-Fca (**48**) s Ala-Alm (**33**) na sličan način kao što je prikazano na shemi 15. Na osnovi IR-spektroskopije i snimanja ^1H NMR-spektara u CDCl_3 i DMSO-d_6 te uz promjenu koncentracije kloroformnih otopina nađeno je da u konforma-



Shema 27 – Konformacije Fca-dipeptidâ s 6-eročlanim IHB-prstenovima

Scheme 27 – Conformations of Fca dipeptides containing 6-membered IHB rings



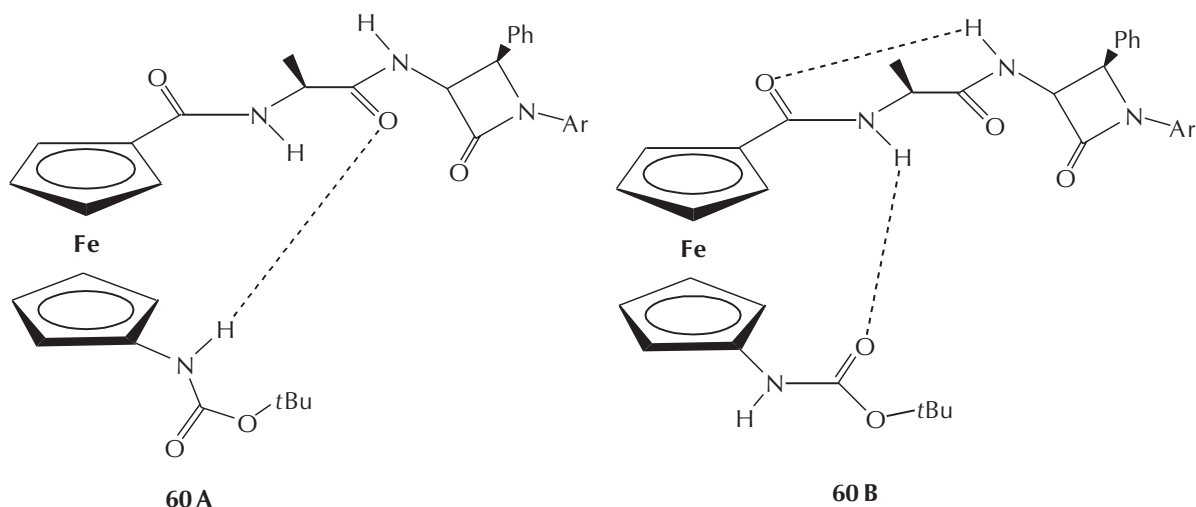
Slika 8 – Dijagram relativnih energija IHB-stabiliziranih konformera kiralnih Fca-dipeptida **52**, **56**, **58** i **59**

Fig. 8 – Chart of the relative energies of IHB stabilized conformers of chiral Fca dipeptides **52**, **56**, **58** and **59**

cijskoj populaciji sudjeluju oblici s IHB kao i otvorene konformacije. Pri tome su u IHB srednje jakosti uključeni NH_{Alm} i NH_{Ala} , dočim NH_{Boc} praktički ne pokazuje međudjelovanje, a CD-spektar pokazuje pozitivan Cottonov efekt pri 486 nm. Eksperimentalni su podatci potvrđeni DFT-računom, iz kojeg proizlazi da je konformacija **60A** energijski nepovoljna, a dominantan je oblik **60B** koji sadrži IHB sa spomenutim donorima protona i koji, u skladu s CD-signalom, ima *P*-konfiguraciju (shema 28).²⁶

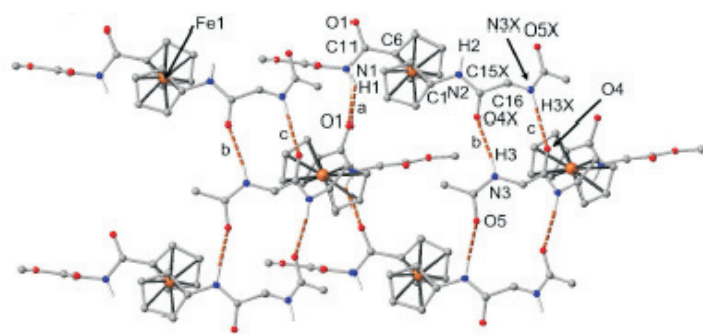
Fca-tripeptidi **IXb** i **Xb**

Sinteza *sym*-tripeptida načinjena je s pomoću postupka HOBt/EDC prema shemi 23. Na taj su način pripremljeni sljedeći Boc-AA-Fca-AA-OMe (**IXb**): AA = Gly, Gly (**62**), Ala, Ala (**63**), D-Ala, Ala (**64**), Ala, D-Ala (**65**), Val, Val (**66**). Dobiveni su spojevi pretvoreni u odgovarajuće Ac-AA-Fca-AA-OMe (**Xb**) (shema 24): AA = Gly, Gly (**67**), Ala, Ala (**68**), Val, Val (**69**). Na shemi 29 prikazane su pretpostavljene konformacije dobivenih tripeptida s intramolekulskim vo-



Shema 28 – Nepovoljna konformacija **60A** i konformer **60B** $\text{Fn}(\text{CO-Ala-Alm})_2$ izvedeni s pomoću spektroskopske analize i DFT-računa

Scheme 28 – Unfavorable conformation **60A** and conformer **60B** of $\text{Fn}(\text{CO-Ala-Alm})_2$ based on the spectroscopic analysis and DFT calculations



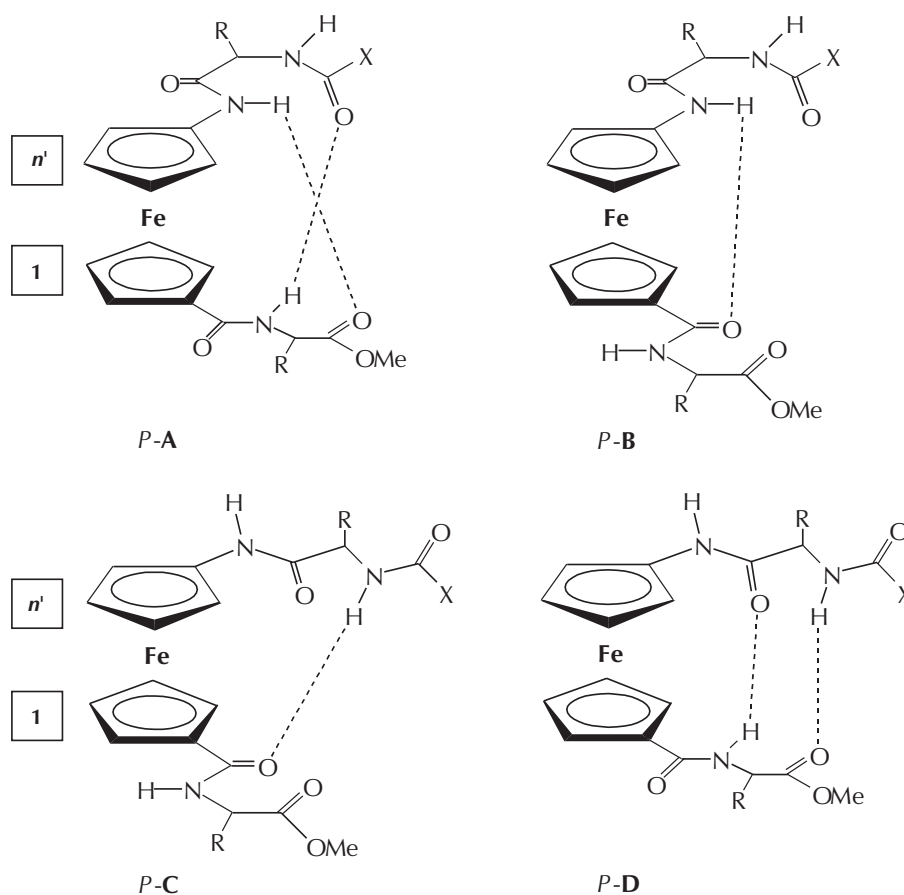
Slika 9 – Molekulska struktura Fca-tripeptida Ac-Gly-Fca-Gly-OMe (**67**) u kristalu

Fig. 9 – Molecular structure of Fca tripeptide Ac-Gly-Fca-Gly-OMe (**67**) in crystalline state

dikovim vezama. Konformacija **A** stabilizirana je dvjema unakrsnim IHB. Pri tome vodikova veza između NH_{Fca} i CO_{AA1} rezultira 9-eročlanim prstenom, a 11-eročlani je prsten posljedica vodikove veze između NH_{AA1} i CO_{XCO} . U konformacijama **B** i **C** uspostavlja se samo po jedna IHB uz nastajanje 6-, odn. 9-eročlanog prstena, a u **D** dvije vodikove veze (8- i 12-eročlani prsteni u kojima ne sudjeluju karbonilna i amidna skupina izravno vezane na ferocen).

U kristalnoj strukturi akiralnog tripeptida Ac-Gly-Fca-Gly-OMe (**67**) nađene su isključivo intermolekulske vodikove veze u kojima sudjeluju sve NH-skupine, i čine strukturu nalik antiparalelnoj nabranoj plohi (slika 9).

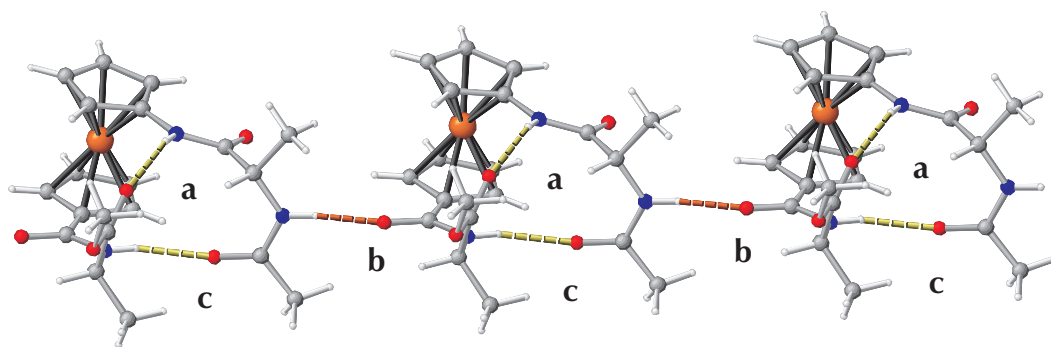
Strukturnom analizom kiralnih tripeptida Boc-Val-Fca-Val-OMe (**66**), Ac-Ala-Fca-Ala-OMe (**68**) i Ac-Val-Fca-Val-OMe (**69**) nađene su u svima po dvije međulančane IHB (koje sadrži konformer **A** prikazan na shemi 29). Iz prikaza kristalne strukture spoja **68** može se zaključiti da je riječ o desnoj uzvojnici, odn. *P*-heličnosti ferocenske jezgre ($\omega \approx 50,0^\circ$), podržanoj s IHB označenim linijama **a** i **c**. Osim ferocenske

S h e m a 29 – Intramolekulske vodikove veze u mogućim konformacijama Fca-tripeptidâ **IXb** ($X = OtBu$) i **Xb** ($X = Me$)S c h e m e 29 – Intramolecular hydrogen bonds in hypothetical conformations of Fca tripeptides **IXb** ($X = OtBu$) and **Xb** ($X = Me$)

helične kiralnosti s IHB-motivom *P-A*, zajednička strukturna značajka tripeptida **66**, **68** i **69** jest i postojanje intermolekulskih vodikovih veza između NH_{NHCOX} jedne i CO_{Fca} druge molekule (linija **b**) (slika 10).

U diklormetanskoj otopini ($c = 10^{-3}$ mol L^{-1}) svih spomenutih tripeptidâ opažene su IR-frekvencije asociiranih CO-skupina estera ($\tilde{\nu} \approx 1730$ cm^{-1}) i NH-skupina ($\tilde{\nu} < 3400$ cm^{-1}), što je u skladu s kristalografskom analizom. Vrpce srednje jakosti slobodnih NH-skupina ($\tilde{\nu} > 3400$ cm^{-1}) opažene su kod Boc-tripeptidâ, a kod Ac-tripeptidâ te su vrpce slabog intenziteta. Asignacija 1H i ^{13}C NMR-spektara tripeptida načinjena je s pomoću 2D-tehnike. Slično rezultatima za ki-

ralne Fca-dipeptide (**53**, **56**, **58** i **59**) i u **63**, **64**, **66–69** opaženi su razdvojeni signali parova diastereotopnih vodikovih i ugljikovih atoma ciklopentadienskih podjedinica. Svi konjugati karakterizirani su velikim kemijskim pomaci protona NH_{Fca} ($\delta > 9$ ppm) i NH_{AA2} ($\delta = 7,5 - 8$ ppm), što ukazuje na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama. Protoni NH_{AA1} Boc-tripeptida nađeni su pri $\delta \approx 5$ ppm, a kod Ac-tripeptida zapažaju se pri $\delta \approx 7$ ppm. 1H NMR-spekttri Ala-konjugatâ **63** i **68** pri promjeni koncentracije i temperature ne pokazuju znatnu promjenu položaja signalâ NH_{Fca} i NH_{AA1} što indicira sudjelovanje tih skupina u IHB (konformer **A**). Kemijski pomaci protona NH_{AA2} Ac-Ala-derivata **68** razrjeđivanjem otopine pomiču se znatno k višem

S l i k a 10 – Kristalna struktura tripeptida Ac-Ala-Fca-Ala-OMe (**68**)F i g. 10 – Crystalline structure of tripeptide Ac-Ala-Fca-Ala-OMe (**68**)

polju ($\Delta\delta \approx 2$ ppm), što je indikativno za intermolekulske vodikove veze. Uzajamno samopovezivanje molekula Boc-Ala-derivata **63** nije opaženo pri sličnim uvjetima ($c = 10^{-1}$ mol L⁻¹, odn. $\vartheta = -55$ °C), što se pripisuje steričkom utjecaju glomazne zaštitne skupine.

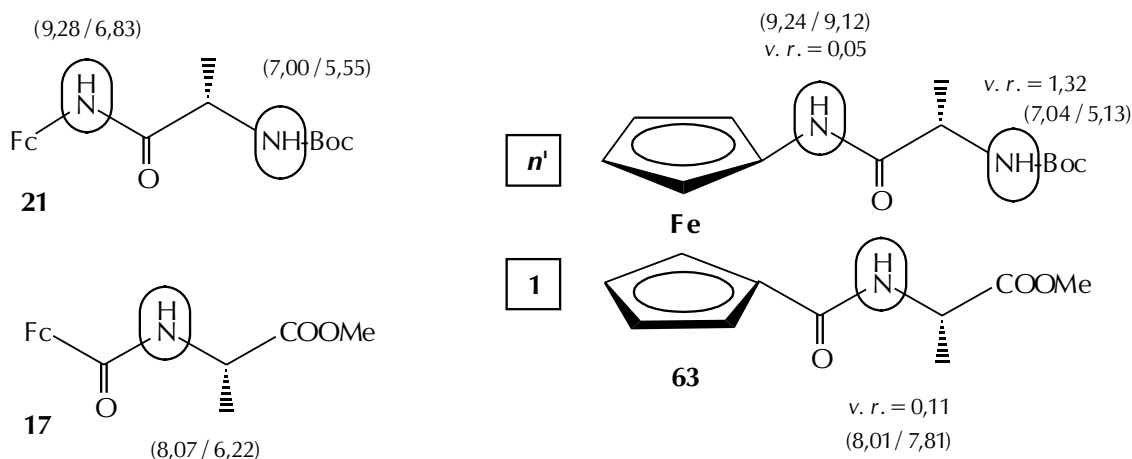
U našem Laboratoriju razradili smo vrlo koristan postupak za procjenu jakosti IHB koji je nazvan *v. r.*-NMR. Konformeri u kojima postoje IHB i u kojima ih nema nalaze se u otopini u ravnoteži, pa u ¹H NMR-spektrima (CDCl₃), zbog brze izmjene tih oblika, opažamo samo prosječne vrijednosti kemijskih pomaka slobodnih i asociраних NH-skupina. Na položaj ravnoteže tih konformacija znatno utječe otapalo: u nepolarnim neprotogenim otapalima (CDCl₃, CD₂Cl₂) javljaju se u većoj ili manjoj mjeri oblici u kojima se nalaze i IHB; u polarnim se otapalima poput DMSO-d₆ te veze kidaju i nastaju solvati zahvaljujući jakim akceptorskim svojstvima toga otapala prema donorima vodikove veze. Variation ratio odn. *v. r.*-vrijednost označava omjer razlike kemijskih pomaka ($\Delta\delta$) amidnih protona (bez mogućnosti tvorbe IHB) mjerenih u DMSO-d₆ i CDCl₃ za proučavani spoj (*supstrat*) i referentne spojeve bez mogućnosti tvorbe IHB koji sadrže amidne protone u sličnom kemijskom okolišu kao i *supstrat*. Slabije vodikove veze imaju više *v. r.*-vrijednosti (≈ 1), što se može objasniti činjenicom da DMSO-d₆ u potpunosti kida IHB te je $\Delta\delta$ referentnog spoja i ferocenskog peptida približno jednak. Kod srednje jakih IHB dodatak DMSO uzrokuje kidanje tih veza u manjoj mjeri pa je $\Delta\delta$ amidnih signala izmjerenih u DMSO-d₆ i CDCl₃ manji nego kod referentnih spojeva, što rezultira *v. r.*-vrijednostima u približnom rasponu od 0,5–0,7. U slučaju vrlo jakih IHB razlika kemijskih pomaka mjerena u tim otapalima je vrlo malena, pa se dobivaju *v. r.*-vrijednosti približno od –0,2 do 0,2. Da bismo dobili informaciju o ja-

kosti IHB u koje su uključeni amidni protoni iz Boc-Ala-Fca-Ala-OMe (**63**), pripravili smo kao referentne spojeve Fc-CO-Ala-OMe (**17**) i Boc-Ala-NH-Fc (**21**), izveli NMR-mjerenja svih spojeva u DMSO-d₆ i CDCl₃ te izračunali $\Delta\delta$ i *v. r.*-vrijednost za svaki amidni proton.

Tripeptid **63** sadrži tri NH-skupine. Referentni spoj za procjenu jakosti IHB NH_{Ala2} i NH_{Fca} je **21**, a intenzitet IHB-interakcija NH_{Ala2} uspoređujemo s konjugatom **17**. Za NH_{Ala2} *v. r.*-vrijednost iznosi 1,32, što znači da ta skupina nije uključena u IHB, a *v. r.*-vrijednosti ostalih amidnih protona (0,05 i 0,11) indiciraju sudjelovanje tih skupina u vrlo jakim IHB (shema 30).

U blizini apsorpcijskog UV-maksimuma ($\lambda_{\max} = 468$ nm) kiralni tripeptidi **63**, **65** i **66** (u kojima je na amino-skupinu Fca vezana L-AA) pokazuju jak CD-signal, sličnoga intenziteta i pozitivnoga predznaka. Dobiveni rezultati potvrđuju da je desna uzvojnica, stabilizirana dvama unakrsnim IHB, nađena u čvrstom stanju ferocenskih tripeptida (konformer *P-A*), zadržana i u otopini. $\varphi = 20$ % kompeticijskog otapala DMSO uzrokovalo je smanjenje Cottonova efekta za 50 %, čime je djelomično narušena *P*-heličnost ferocena kidanjem jakih *intramolekulskih* vodikovih veza. U skladu s eksperimentalnim podacima, kao i prije objavljenom teorijskom analizom sličnog tipa spojeva, rezultati DFT-računa ukazuju na dominaciju konformera *P-A* (shema 29) stabiliziranog dvjema jakim unakrsnim IHB bez obzira na karakter *N*-terminalne zaštitne skupine (Boc, Ac) ili bočne lance prirodne aminokiseline (H, Me, *i*-Pr). Zbog jasnoće, a i važnosti te konformacije, ona je prikazana i u smjeru osi Cp-Fe-Cp na shemi 31.

Osim "simetričnih" Fca-tripeptida (**IXb**) pripremljen je, na sličan način kao što je to opisano za pretvorbu **12**→**26** (she-



Shema 30 – *V. r.*-vrijednosti amidnih protona Boc-Ala-Fca-Ala-OMe (**63**) računaju se prema izrazu

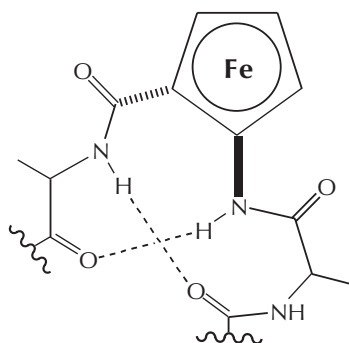
$$v. r. = \frac{\delta NH_s (DMSO - d_6) - \delta NH_s (CDCl_3)}{\delta NH_r (DMSO - d_6) - \delta NH_r (CDCl_3)}. \text{ Manji } v. r. \text{ upućuje na jaču IHB i obratno.}$$

U zagradama uz formule navedeni su kemijski pomaci odgovarajućih NH-skupina (ppm) u DMSO-d₆/CDCl₃ za referentne tvari **17** i **21** i *supstrat* **63**.

Scheme 30 – *V. r.* values of amide protons in Boc-Ala-Fca-Ala-OMe (**63**) are calculated according to the

$$\text{equation } v. r. = \frac{\delta NH_s (DMSO - d_6) - \delta NH_s (CDCl_3)}{\delta NH_r (DMSO - d_6) - \delta NH_r (CDCl_3)}. \text{ Lower } v. r. \text{ means stronger IHB and vice versa.}$$

Chemical shifts of the corresponding NH groups (ppm) in DMSO-d₆/CDCl₃ for reference compounds **17** i **21** as well as for *substrate* **63** are given in parantheses near the formulas.



S h e m a 31 – Konformer “viših” Fca-oligopeptidâ (**IXb**, **IXd**, **IXe** i **Xb**) prikazan u smjeru osi Cp-Fe-Cp

S c h e m e 31 – Conformer of the “higher” Fca oligopeptides (**IXb**, **IXd**, **IXe** and **Xb**) presented in direction of Cp-Fe-Cp axis

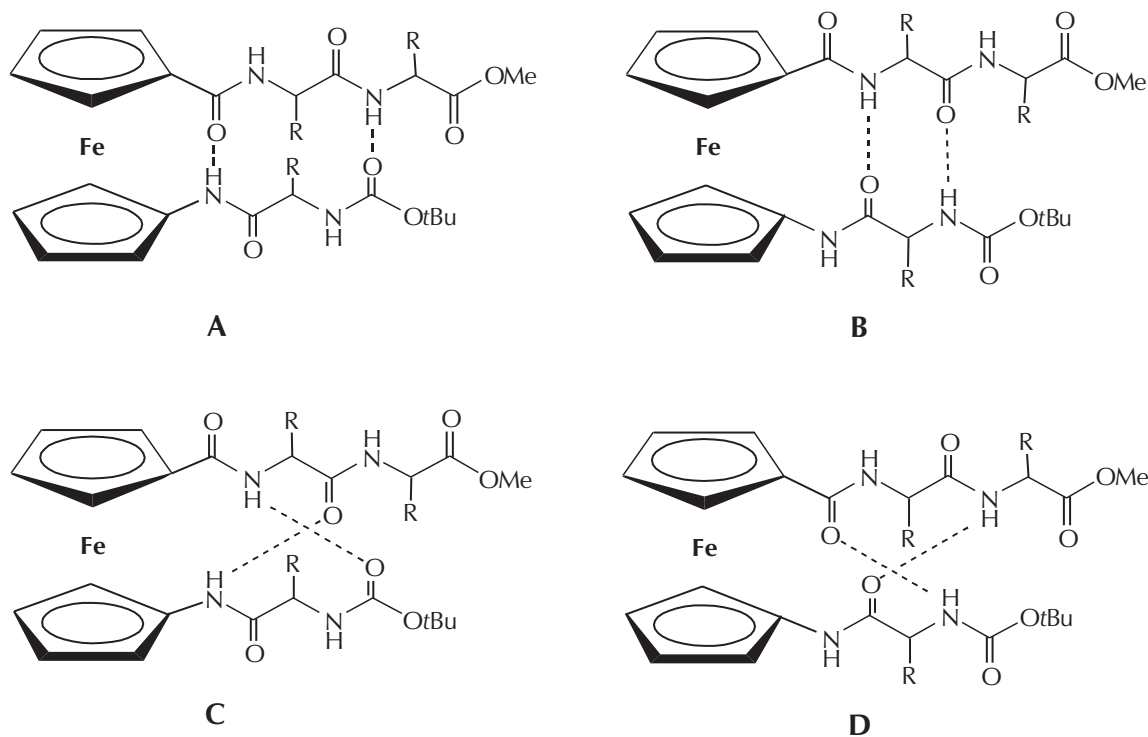
ma 14), “asimetrični” tripeptid Boc-Fca-(Ala)₂-OMe tipa **IXc** (**70**) koji je prikazan na shemi 23.²² U ¹H NMR spektru (CDCl₃) toga spoja zabilježeni su (slijedom slijeva udesno na prikazanoj formuli) signali amidnih protona pri 7,28, 7,01 i 6,90 ppm. Usporednim snimanjem NMR-spektarâ u CDCl₃ i DMSO-d₆ razvidno je da v. r. -vrijednosti za amidne protone iznose 0,39, 0,49 i 0,93, što ukazuje na srednje jake IHB sa NH_{Fca} i NH_{Ala1}, dočim Ala2 gotovo da i nije u međudjelovanju. Ti nalazi upućuju na strukturu sličnu onoj u Fca-di-peptida **53**, pa se, uzimajući u obzir i slične rezultate spektroskopske analize (mala koncentracijska ovisnost, CD-signal srednje jakosti u području ferocenskog kromofora), može

pretpostaviti da je riječ o doprinosu više konformacija (usp. shemu 26), a dvostruke “unakrsne” veze tipične za s-tripeptide (usp. shemu 31) ne mogu se uspostaviti.²²

Fca-tetrapeptidi **IXd** i pentapeptidi **IXe**

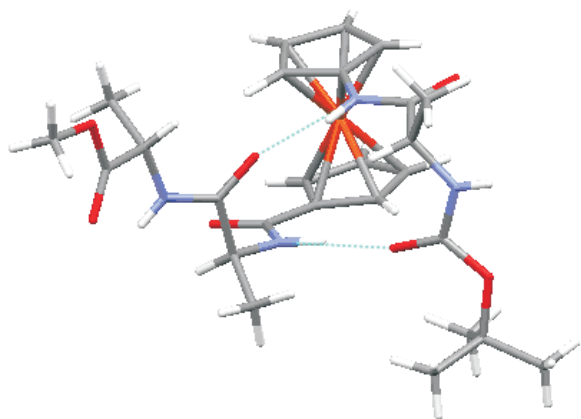
Na shemi 23 prikazana je priprava tetrapeptidâ **IXd**, koja se izvodi od tripeptidâ **IXb** na sličan način kao sekvencija **47**→**IXc**. Iz njih se dobivaju pentapeptidi **IXe** analogno sintezi **IXa**→**IXb**. Pri tome su pripremljeni sljedeći predstavnici **IXd**: Boc-Ala-Fca-Ala-Ala-OMe (**71**), Boc-Ala-Fca-Ala-D-Ala-OMe (**72**), Boc-Ala-Fca-D-Ala-D-Ala-OMe (**73**), kao i ovi članovi pentapeptida **IXe**: Boc-Ala-Ala-Fca-Ala-Ala-OMe (**74**), Boc-D-Ala-Ala-Fca-Ala-D-Ala-OMe (**75**) i Boc-Ala-Ala-Fca-D-Ala-D-Ala-OMe (**76**).²² Imajući na umu konformacije Fca-tripeptidâ **IXb** prikazane na shemi 29, postoji mogućnost sudjelovanja oblika **A–D** u konformacijskoj populaciji tetrapeptidâ **IXd** (shema 32). S obzirom na dostatni broj gradivnih aminokiselina, osim manje vjerojatne konformacije **A** (energijski nepovoljno međudjelovanje Fn-C=O···H-N-Fn!), pretpostavili smo plauzibilnim oblikom **B**, koji odgovara β-nabranoj plohi čija je priprava bila osnovni cilj našeg istraživanja (shema 22). Oblik **C** odgovara konformeru **P-A** u tripeptidu (shema 29), a u konformaciji **D** javlja se “obrnuti” motiv.

Strukturalna analiza reprezentativnog predstavnika **71** pokazuje da spoj u čvrstom stanju ima supstituente u položajima 1 i 2' te dvije međulančane veze kao u konformaciji **C**. Pri tome je $\theta = 3^\circ$, $\beta = 5,4^\circ$, a $\omega = 60,7^\circ$ (slika 11).³⁵ Na osnovi spektroskopske analize tetrapeptidâ **IXd**, slične prethodno opisanima, utvrđeno je da IR-spektri sadrže signale NH_{slob} i NH_{asoc} i da se (slično kao i u ¹H NMR-spektrima u



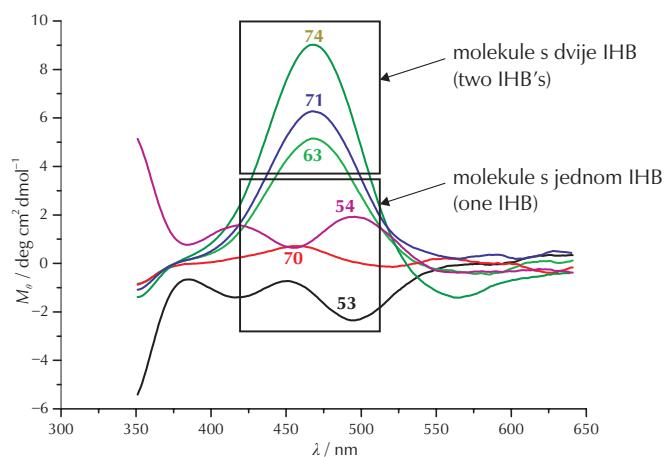
S h e m a 32 – Moguće konformacije Fca-tetrapeptidâ **IXd**

S c h e m e 32 – The possible conformations of Fca tetrapeptides **IXd**



Slika 11 – Kristalna struktura tetrapeptida *Boc-Ala-Fca-Ala-Ala-OMe* (**71**)

Fig. 11 – Crystalline structure of tetrapeptide *Boc-Ala-Fca-Ala-Ala-OMe* (**71**)



Slika 12 – CD-spektri *Fca-Ala*-oligopeptida **IX** (v. shemu 23) koji pokazuju Cottonov efekt u području ferocenskog kromofora u blizini 450 nm. Povećanjem broja uključenih AA raste vrijednost CD-signala i jakost IHB.

Fig. 12 – CD spectra of *Fca-Ala* oligopeptides **IX** (see scheme 23) showing Cotton effect in the region of ferrocene chromophore near 450 nm. Increase of the number of AA's involved results in augmentation of CD signals and strengthening of IHB's.

CDCl_3) pri razrjeđivanju neznatno mijenjaju. Kemijski pomaci u **71** (CDCl_3) iznose 5,17; 9,86; 7,96 i 7,11 ppm, a odgovarajuće v. r.-vrijednosti ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$) 1,43; **0,07**; **-0,14** i 1,04. Na osnovi tih podataka može se utvrditi da NH_{Fca} i NH_{Ala2} sudjeluju u jakim intramolekulskim vodikovim vezama, što znači (slično kao kod tripeptida **IXb**) da oblik **C** predstavlja konformer (sheme 31 i 32). U skladu s tim nalazom je i jak pozitivan CD-signal spoja **71** pri $\lambda \approx 460$ nm, što indicira *P*-kiralnost ferocenske jezgre (što je uočljivo i u kristalnoj strukturi). Spektroskopska analiza *Fca*-penta-peptida **IXe** sastavljenih iz Ala-jedinica **74** pokazuje vrlo slične rezultate analizi izvedenoj za tetrapeptid **71**. Izdvajamo nađene indikativne v. r.-vrijednosti: 1,19; 0,75; **-0,07**; **-0,13** i 1,05 koji (uz podatke IR- i CD-mjerenja) upućuju na analogan konformer **C** prikazan na shemi 31.

Na kraju se može zaključiti: (i) Boc-*Fca*-oligopeptide **IX** može se podijeliti na "niže" (**IXa** i **IXc**), koji se opisuju kao

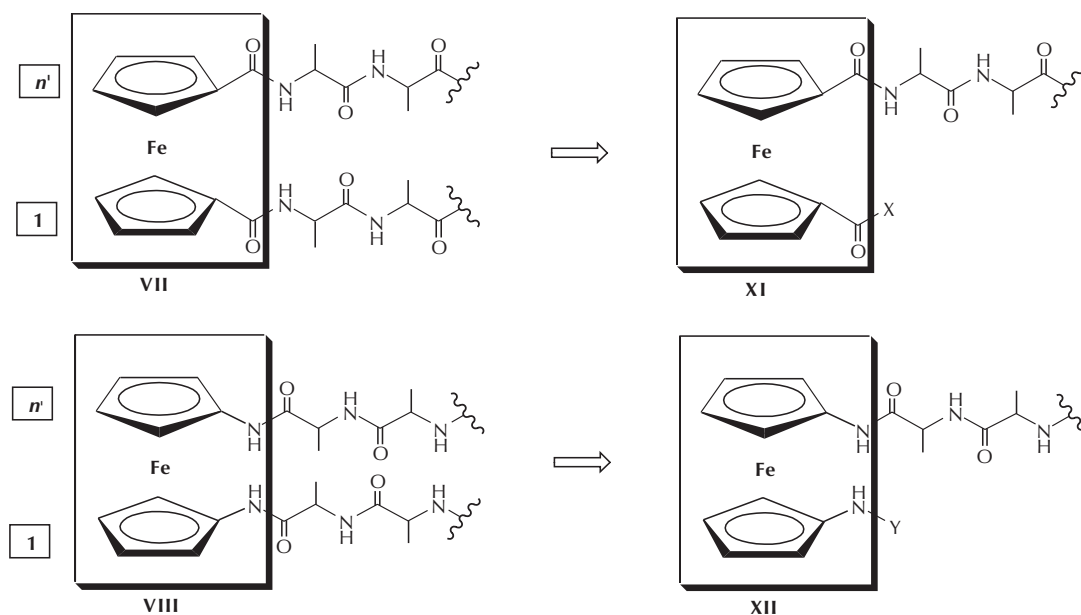
skup više konformacija s po jednom (ili bez) IHB i na "više" članove (**IXb**, **IXd**, **IXe**) predstavljene jednim konformerom s dvije "unakrsne" IHB; (ii) jakost pojedinih IHB, kao i populacija odgovarajućih konformacija u otopini indicirana na osnovi v. r.-NMR, IR-spektroskopije, a potvrđena DFT-računom, u suglasnosti je s kristalografskom analizom; (iii) svi *Fca*-oligopeptidi izgrađeni iz L-aminokiselina (osim Boc-dipeptida **53**, v. shemu 23) pokazuju *P*-heličnost ferocenske jezgre i pozitivan Cottonov efekt iznad 450 nm, čija vrijednost raste s porastom broja uključenih aminokiselina (slika 12). Nasuprot tome, *Fca*-konjugati s D-aminokiselinama pokazuju negativne CD-signale i *M*-heličnost; (iv) Cottonov efekt *Fca*-peptida koji su izgrađeni kao različite kombinacije *Fca* s L- i D-Ala ovisi o *N*-terminalnom alaninu: spojevi *N*-L-Ala pokazuju (+), a *N*-D-Ala-konjugati (-) Cottonov efekt, što je posljedica *P*- odnosno *M*-heličnosti ferocena.

5. Monosupstitucijski konjugati 1,1'-ferocendikarboksilne kiseline (Fcd) i 1,1'-ferocendiamina (FcdA) s aminokiselinama

U trećem poglavlju obrađeni su monosupstitucijski peptidni konjugati **V** i **VI** (izvedeni iz FcCOOH i FcNH_2) kao i simetrični disupstitucijski sustavi **VII** i **VIII**, koji su derivati $\text{Fn}(\text{COOH})_2$ i $\text{Fn}(\text{NH}_2)_2$. Rastumačeno je da se kiralna organizacija konjugata **V/VI** ne može kontrolirati djelovanjem ferocenske komponente, a ti se spojevi pretežito stabiliziraju samozdruživanjem. Situacija kod spojeva **VII** i **VIII** potpuno je drugačija: ferocenska jezgra utječe na sklapanje po dvije vrlo jake IHB, što rezultira nastajanjem molekula u kojima je dominantan jedan konformer. Smatrali smo zanimljivim studij monosupstitucijskih konjugata $\text{Fn}(\text{COOH})_2$ i $\text{Fn}(\text{NH}_2)_2$ s aminokiselinama (**XI** i **XII**) koje se može smatrati i produktima "desimetrizacije" disupstitucijskih spojeva **VII** i **VIII** (shema 33).

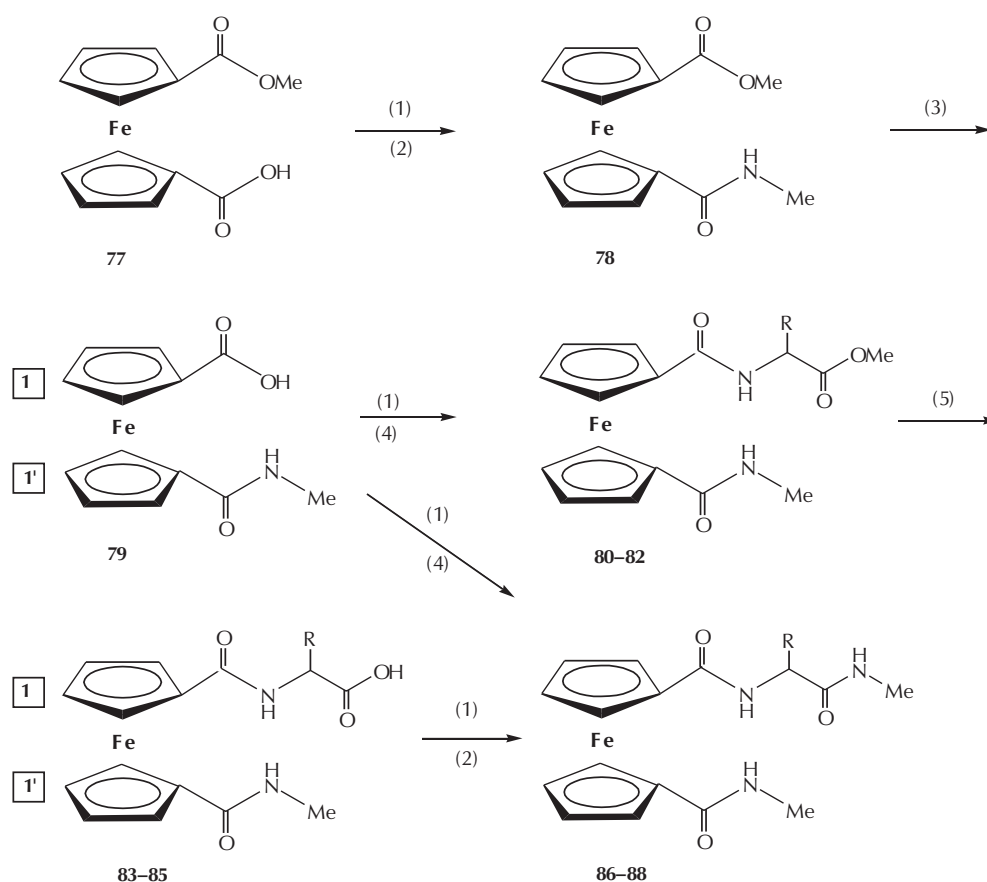
U usporedbi s disupstitucijskim konjugatima u tim je spojevima smanjen broj donora/akceptora vodikove veze, pa se s time u vezi postavljaju sljedeća pitanja: (i) Hoće li se u tim molekulama javiti IHB koje bi predstavljale "polovicu" unakrsnih motiva nađenih kod **VII/VIII** ili će (slično kao kod **V/VI**) prevladati intermolekulske veze? (ii) Hoće li se broj potencijalnih konformera povećati ili će dominirati jedan konformer? (iii) Kako veličina bočnog lanca aminokiseline utječe na jakost potencijalne IHB i na konformacijske preference? (iv) Je li uvođenje samo jedne (ili dvije) aminokiseline u jedan Cp-prsten dovoljan uvjet za heličnu kiralnost ferocenske jezgre, odn. za CD-aktivnost? Ako planirana istraživanja pokažu da postoje (međulančane) IHB koje podržavaju kiralnu ferocensku strukturu, konjugate **XI** i **XII** može se smatrati novim tipom zanimljivih (vrlo reduciranih) peptidomimetika usporedivih po veličini s *Fca*-dipeptidima **IXa** i *Fca*-tripeptidima **IXc**.

U prvom radu,³⁹ posvećenom *Fcd*-konjugatima, opisali smo pripremu i konformacijsku analizu desimetriziranih spojeva $\text{MeNH-CO-Fn-CO-AA-OMe}$ (**80–82**) i $\text{MeNH-CO-Fn-CO-AA-NHMe}$ (**86–88**) (AA = Gly, Ala, Val). Sinteza tih konjugata započinje pretvorbom ester-kiseline **77** u amid-ester **78** koji je hidroliziran u amid-kiselinu **79**. To je ključni međuprodukt za pripremu diamid-estera (**80–82**) i triamida **86–88** koja se izvodi s pomoću postupka HOBt/EDC prikazanog na shemi 34.



S h e m a 33 – Formalnom "desimetrizacijom" disupstitucijskih Fcd- i Fcda-konjugatâ (VII i VIII) nastaju monosupstitucijski derivati XI (X = NHMe, Me) i XII (Y = Ac)

S c h e m e 33 – Formal "desymmetrization" of disubstituted Fcd and Fcda conjugates (VII and VIII) gave monosubstituted derivatives XI (X = NHMe, Me) and XII (Y = Ac)



S h e m a 34 – Priprava $Fn(COOH)_2$ -oligopeptida: (1) HOBt/EDC, CH_2Cl_2 ; (2) NH_2MeHCl , NEt_3 , CH_2Cl_2 ; (3) $NaOH/H_2O$, MeOH; (4) L-AA-OMeHCl, NEt_3 , CH_2Cl_2 ; (5) $NaOH/H_2O$, dioksan.

80, 83, 86 (R = H); **81, 84, 87** (R = Me); **82, 85, 88** (R = i-Pr).

S c h e m e 34 – Synthesis of $Fn(COOH)_2$ -derived oligoamides. (1) HOBt/EDC, CH_2Cl_2 ; (2) NH_2MeHCl , NEt_3 , CH_2Cl_2 ; (3) $NaOH/H_2O$, MeOH; (4) L-AA-OMeHCl, NEt_3 , CH_2Cl_2 ; (5) $NaOH/H_2O$, dioxane.

80, 83, 86 (R = H); **81, 84, 87** (R = Me); **82, 85, 88** (R = i-Pr).

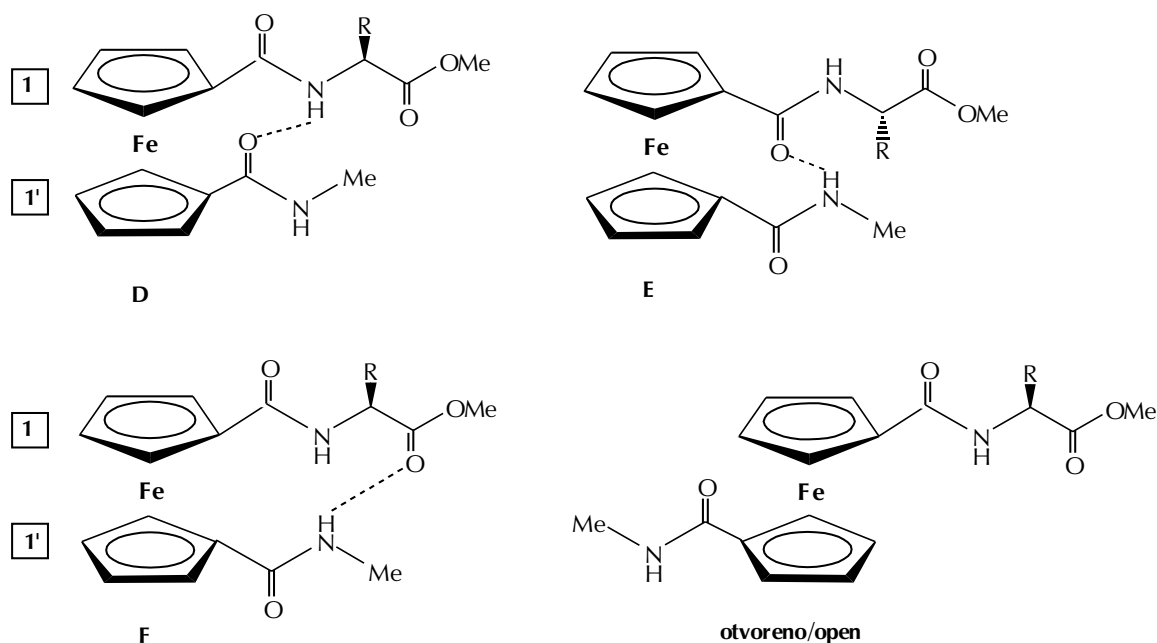
Na shemi 35 nacrtae su moguće intramolekulske vodikove veze u diamid-esterima **80–82**, kao i odgovarajući otvoreni oblik. Konformacije **D** i **E** sadrže 7-eročlane IHB-prstene, slične onima koji su nađeni u kristalnoj strukturi $\text{Fn}(\text{CO-Phe-OMe})_2$ (**38**) što predstavlja γ -okret. Oblik **F** stabiliziran je 10-eročlanom IHB, koja se može smatrati polovicom Herrickova motiva (**VII**, shema 11), a riječ je o β -okretu. Očekuje se da konformacijska distribucija ovisi o veličini bočnog lanca aminokiseline. U usporedbi s tim spojevima triamidima **86–88** sadrže dodatnu amidnu funkciju pa je razvidno povećanje konformacijskog prostora, odn. potencijalna prisutnost više konformacijskih oblika. Na shemi 36 prikazane su IHB-konformacije koje se može smatrati "derivatima" spomenutih **D–F**, a ta je srodnost vidljiva iz upotrebe prim-oznaka (**D'**, **E'**, **F'**). Ovdje posebno valja uočiti dodatnu unutarlančanu IHB (7-eročlani γ -okret) koja se javlja u oblicima **D'2**, **E'2** i specifičnoj konformaciji **G** s račvastom IHB (koja sadrži i 10-eročlani međulančani prsten). Radi pojednostavnjenja rasprave u svim spojevima AA-supstituirani prsten obilježen je s 1, a drugi s 1', pa će biti riječi o funkcijama 1'-NH i 1-NH.

Nažalost, nije uspjela priprema monokristala za rendgensku strukturnu analizu, pa je izvedeno spektroskopsko istraživanje u otopini, slično prethodno opisanima, čiji su rezultati osnaženi DFT-studijom. U IR-spektrima (CH_2Cl_2) svih supstrata zabilježeni su signali iznad i ispod 3400 cm^{-1} što ukazuje na $\nu(\text{NH}_{\text{slab.}})$ i $\nu(\text{NH}_{\text{asoc.}})$. Budući da se pri razrjeđivanju omjer tih signala ne mijenja, može se zaključiti da je riječ o IHB-oblicima. Taj podatak ne daje informaciju o tome koja je od hidrogen-donorskih amidnih skupina angažirana u vezi i kakve su jakosti IHB, a precizan odgovor na to pitanje daju v. r.-NMR-mjerenja čiji su rezultati sažeti u tablici 1. Načelo i izvedba v. r.-postupka opisani su u shemi 30 i popratnom tekstu, a ovdje ćemo se samo podsjetiti da v. r.-vrijednosti kreću od ≈ 0 do ≈ 1 , a njihovo povećanje ukazuje na sla-

bljenje IHB odn. na manju zastupljenost odgovarajućih oblika u konformacijskoj populaciji. Budući da izmjerene vrijednosti za sve ferocenske konjugate iznose 0,32 – 0,62, riječ je o IHB srednje jakosti. S porastom veličine bočnog lanca AA u diamid-esterima **80–82** nastupa monotono sniženje v. r.-vrijednosti za proton 1'-NH, što ukazuje na jačanje veze 1'-NH \cdots O (odn. povećanje udjela **E** i/ili **F**). Usporedno, v. r.-vrijednosti za 1-NH se povisuju, što označava smanjenje populacije **D**. Slična je situacija u svim triamidima **86–88**: vrijednosti v. r. za 1'-NH postupno padaju (obogaćenje na **E'/F'**), za 1-NH rastu (osiromašenje na **D'**), a isto tako i za 1-NHMe (sniženje udjela **G**).

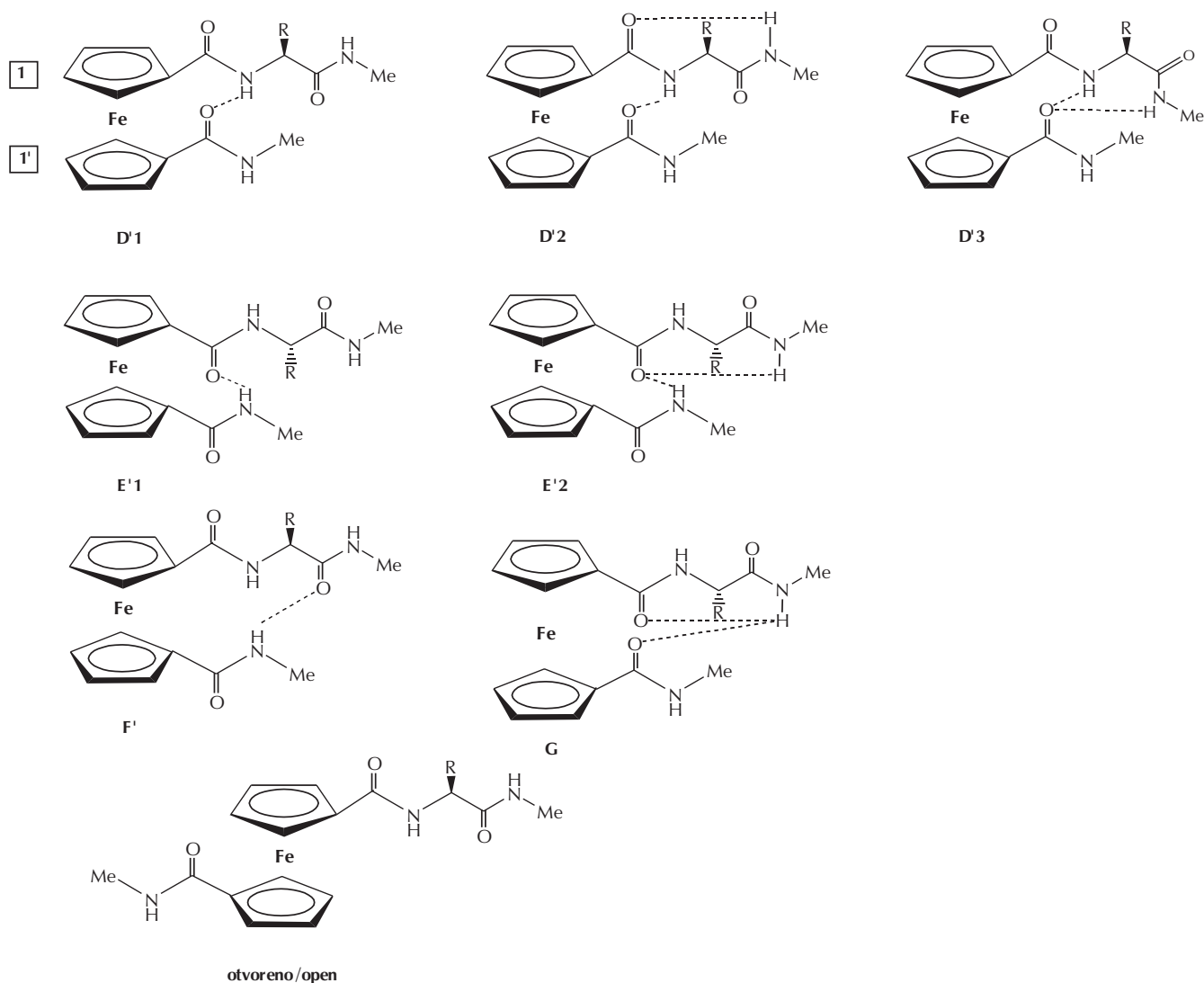
Odgovor na pitanje o postojanju međulančanih IHB u kiralnim (Ala, Val) konjugatima daje mjerenje CD-spektara. U tim konjugatima (**81**, **82**, **87** i **88**) nađen je pozitivan Cottonov efekt. Spektri su vrlo slični izmjeranim za simetrične disupstitucijske konjugate **P-VII**, no ovdje je intenzitet signala desetak puta manja, što govori o znatno slabijoj IHB. Očekivano L-Ala konjugat **81** pokazuje pozitivan, a D-Ala enantiomer **81a** negativan CD-signal jednake vrijednosti pri 470 nm (slika 13). Povećanje Cottonova efekta u spektrima **81**→**82** i **87**→**88** je odraz porasta P-heličnosti oblika (u odnosu na M-konformacije) s povećanjem bočnog lanca aminokiseline.

Sažetak iznesenih spektroskopskih podataka: (i) Konjugati koji uključuju L-aminokiseline postoje u otopini u P-heličnim oblicima, (ii) svi NH-protoni uključeni su u IHB, pa rezultira skup konformacija, (iii) prema v. r.-mjerenjima za diamid-estere (**80–82**) i triamide (**86–88**) povećanje bočnog lanca AA rezultira u obogaćivanju na konformerima s vezom 1'-NH \cdots O (uz istodobno smanjenje udjela s vezama 1-NH \cdots O), (iv) uz to kod triamida povećanjem bočnog lanca nastupa smanjenje udjela konformera s vezama 1-MeNH \cdots O.



Shema 35 – Mogući obrasci IHB u diamid-esterima **80–82** ($R = H, Me, i\text{-Pr}$). Konformacije **D** i **E** sadrže sedmeročlane IHB (γ -okret), a oblik **F** stabiliziran je 10-eročlanim IHB (β -okret, "polu-Herrickov" obrazac).

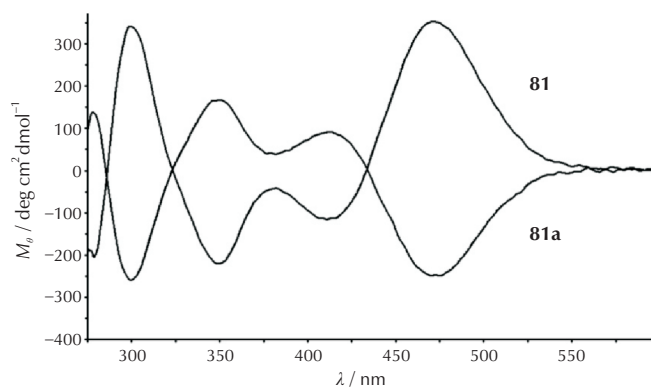
Scheme 35 – Possible intramolecular hydrogen bond patterns in diamide-esters **80–82** ($R = H, Me, i\text{-Pr}$). Conformations **D** and **E** contain 7-membered IHB's (γ -turn) and form **F** is stabilized by 10-membered IHB (β -turn, "half-Herrick" motif).



S h e m a 36 – Mogući obrasci IHB u triamidima **86–88** ($R = H, Me, i\text{-Pr}$). Oblici **D'**, **E'** i **F'** su "derivati" **D–F** (shema 35); **D'2** i **E'2** sadrže unutarlančani sedmeročlani IHB (**G** karakteriziran je račvastim IHB-uzorkom (7/9 prstenovi)).

S c h e m e 36 – Possible intramolecular hydrogen bond patterns in triamides **86–88** ($R = H, Me, i\text{-Pr}$). **D'**, **E'** and **F'** forms are "derivatives" of **D–F** (scheme 35); **D'2** and **E'2** **G** is characterized by bifurcated IHB motif (7/9 rings).

Da bi se potkrijepili i nadopunili eksperimentalni podatci (koji ne daju odgovor na pitanje u kojoj su mjeri pojedine hidrogen-donorske NH-funkcije vezane na određene akceptorske položaje u molekuli), načinjena je DFT-analiza. Pri tome kao osnova služe hipotetske konformacije prikazane na shemama 35 i 36, a valja uočiti da se mogu pojaviti *P*- i *M*-ferocenskom kiralnošću. Izračunane otvorene konformacije u svim su slučajevima energijski nepovoljne. U skupini ester-amida kod glicinskog konjugata **80** konformacije **D–F** su podjednako zastupljene i predstavljaju konformere. U sterički zahtjevnijim ester-amidima **81** i **82** *M–D* i *M–F* su destabilizirane na račun odgovarajućih *P*-oblika i konformacije **E** (veza $1^{\text{st}}\text{-NH}\cdots\text{O}$), a najstabilnija konformacija kod Val-derivata **82** je *P–F* (veza $1\text{-NH}\cdots\text{O}$). Kod triamidâ situacija je znatno složenija jer je povećan konformacijski prostor. Svi su ti spojevi karakterizirani energijski vrlo nepovoljnom konformacijom **G** (međulančana veza $1\text{-Me-NH}\cdots\text{O}$), pa je njezina kontribucija zanemariva. Slično kao kod Gly-konjugata **80** i u njegovu triamidnom analogu **86**



S l i k a 13 – CD-spektri MeNH-CO-Fn-CO-Ala-OMe (**81**) i MeNH-CO-Fn-CO-D-Ala-OMe (**81a**) u CH_3CN

F i g. 13 – CD spectra of MeNH-CO-Fn-CO-Ala-OMe (**81**) i MeNH-CO-Fn-CO-D-Ala-OMe (**81a**) in CH_3CN

T a b l i c a 1 – ^1H NMR-podatci za referentne spojeve **a–e**, modelni spoj **78**, diamid-estere **80–82** i triamide **86–88**
($c = 5 \cdot 10^{-3} - 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$)T a b l e 2 – ^1H NMR data for reference compounds **a–e**, model compound **78**, diamide-esters **80–82** and triamides **86–88**
($c = 5 \cdot 10^{-3} - 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$)

Spoj Compd.	Formula ^a	$\delta_{\text{NH}}(\text{CDCl}_3)$ ppm	$\delta_{\text{NH}}(\text{DMSO-d}_6)$ ppm	$\delta(\text{DMSO-d}_6) - \delta(\text{CDCl}_3)$ ppm	v. r. (ref.)
a	Me-CO-NHMe	5,43	7,71	2,37	
b	Ac-Gly-OEt	6,08	8,25	2,17	
c	Ac-Ala-OEt	6,02	8,23	2,21	1'-NH 1-NH 1-NHMe
d	Ac-Val-OEt	5,90	8,08	2,18	
e	Fc-CO-NHMe	5,73	7,73	2,00	
78	MeNH-CO-Fn-COOMe	6,10	7,75	1,65	0,83 (e)
80	MeNH-CO-Fn-CO-Gly-OMe	6,72 7,39	7,73 8,40	1,01 1,01	0,51 (e) 0,47 (b)
81	MeNH-CO-Fn-CO-Ala-OMe	6,88 7,03	7,75 8,24	0,87 1,21	0,44 (e) 0,55 (c)
82	MeNH-CO-Fn-CO-Val-OMe	7,03 6,63	7,66 7,88	0,63 1,25	0,32 (e) 0,57 (d)
86	MeNH-CO-Fn-CO-Gly-NHMe	6,89 7,15 6,86	7,98 8,17 7,85	1,09 1,02 0,99	0,55 (e) 0,47 (b) 0,42 (a)
87	MeNH-CO-Fn-CO-Ala-NHMe	7,08 6,77 6,71	7,97 7,88 7,91	0,89 1,11 1,20	0,45 (e) 0,50 (c) 0,51 (a)
88	MeNH, CO-Fn-CO-Val-NHMe	7,20 6,52 6,55	7,88 7,65 8,01	0,68 1,13 1,46	0,34 (e) 0,52 (d) 0,62 (a)

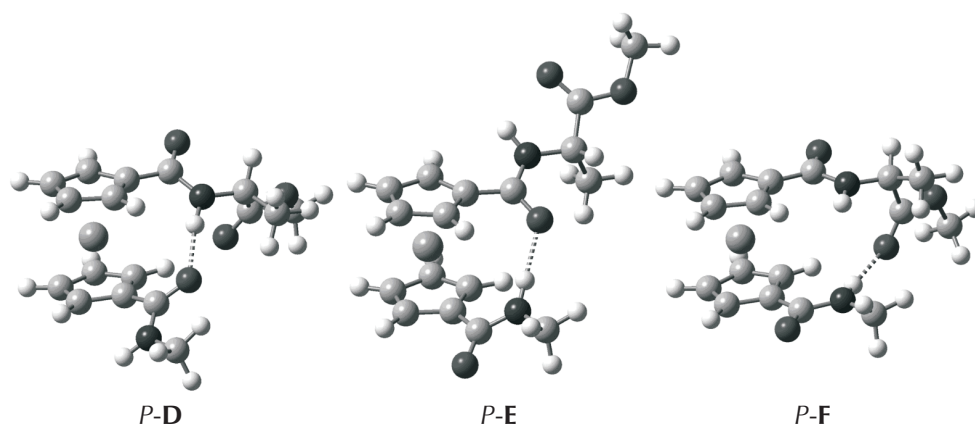
^a NH-signalni navedeni su s lijeva udesno na prikazanim formulama
NH signals are given from left to right in the presented formulas

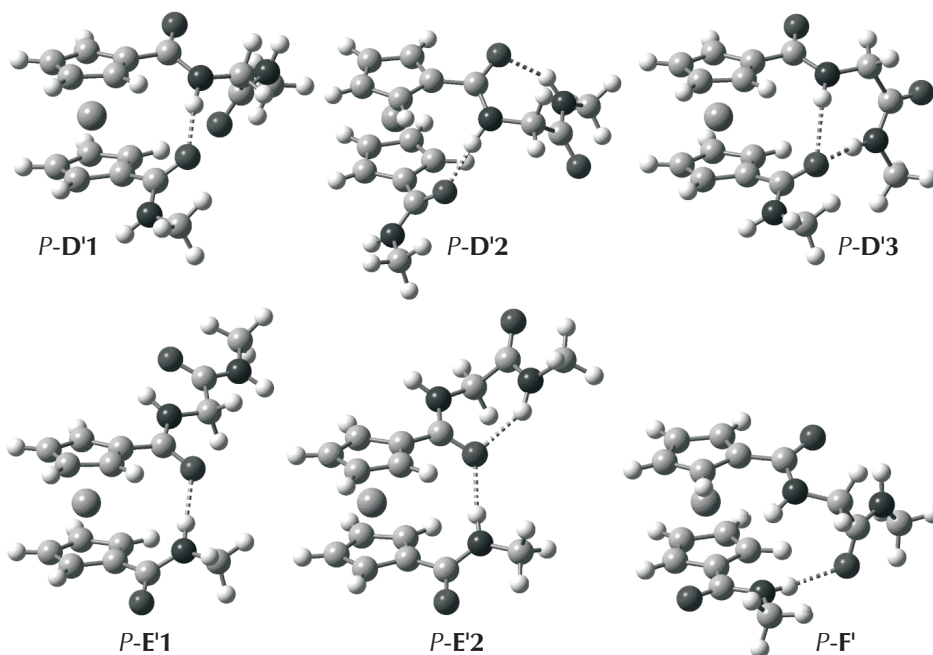
nema konformacijskih preferencija, tj. prisutne su sve konformacije (osim **G**). Povećanje bočnog lanca aminokiseline (**87**, **88**) stabilizira *P*-konformacije u odnosu na *M*-oblik, a posebno su stabilni *P-E* i *P-F* konformer. Na slikama 14 i 15 prikazane su energijski najpovoljnije *P*-helične strukture u reprezentativnim konjugatima alanina **81** i **87** iz obiju skupina izvedene na osnovi DFT-računa.

Na osnovi rezultata spektroskopske i DFT-analize proizlaze sljedeći zaključci: (i) otopine svih ispitivanih supstrata u neprotogenim otapalima sadrže skup konformacija bez izričitih preferencija za pojedini konformer; (ii) povećana sterička zahtjevnost bočnoga lanca aminokiseline znatno reducira broj konformacija (a posebno *M*-oblika), što ob-

jašnjava pozitivni Cottonov efekt pri ferocenskoj apsorpciji u CD-spektrima; (iii) primjenom postupka v. r.-NMR i DFT-računa proizlazi da su u slučaju voluminoznijih bočnih aminokiselinskih lanaca favorizirane konformacije **E/E'** i **F/F'** koje sadrže veze $1'-\text{NH}\cdots\text{O}$; (iv) na osnovi po jedne vodikove veze koja u sklopu odgovarajućih konformacija spaja 1-i i 1'-supstituent objašnjava se preferentna zastupljenost *P*-heličnih ferocenskih struktura u svim konjugatima koji sadrže L-aminokiseline; (v) povećan obujam bočnih lanaca aminokiseline mogao bi biti način za dodatnu stabilizaciju kiralne sekundarne strukture, npr. motivâ okreta.³⁹

Imajući na umu jedan od važnih rezultata netom opisanog rada – da je donorska skupina 1'-MeNH odgovorna za vezi-

Slika 14 – *P*-helični energetski minimumi na osnovi DFT-računa za MeNH-CO-Fn-CO-Ala-OMe (**81**) s međulančanim 7/7/10-eročlanim IHB-prstenovimaFig. 14 – DFT-calculated *P*-helical minimum structures of MeNH-CO-Fn-CO-Ala-OMe (**81**) containing interchain 7/7/10-membered IHB's



Slika 15 – Energetski najpovoljnije strukture MeNH-CO-Fn-CO-Ala-NHMe (**87**) na osnovi DFT-računa, koje podsjećaju na "temeljne" konfiguracije (**D–F**, slika 14)

Fig. 15 – DFT calculated minimum structures of MeNH-CO-Fn-CO-Ala-NHMe (**87**) reminiscent of the "basic" configurations (**D–F**, Fig. 14)

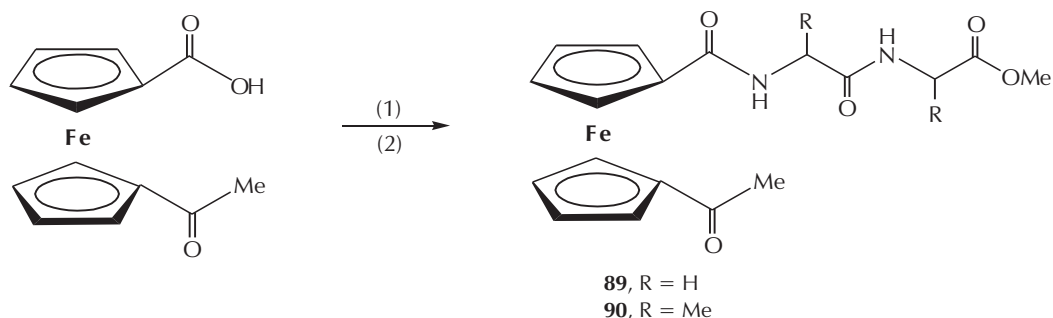
vanje s jukstapozicioniranom aminokiselinom – u sljedećem smo je radu²⁴ zamijenili 1'-acetilnom funkcijom. Željeli smo ispitati ostvaruje li se u tako osmišljenim molekulama međulančana komunikacija preko toga akceptora vodikove veze (kao uvjet za ferocensku kiralnost), odn. kakav je utjecaj veličine bočnoga aminokiselinskog lanca na konformacijske preferencije.

Priprava supstrata Ac-Fn-(AA)₂-OMe (**89**, AA = Gly; **90**, AA = Ala) načinjena je HOBt/EDC-kopulacijom HOOC-Fn-COOMe s aminokiselinskim esterima (shema 37)

Kao modelni spojevi za vjerodostojnu konformacijsku analizu konjugata **89** i **90** poslužili su ogovarajući monosupstitucijski spojevi Fc-CO-(AA)₂-OMe (**25**, **26**), čije su moguće konformacije **A–D** prikazane na shemi 17. Iz tih su oblika

izvedeni i hipotetski konformeri supstrata **89** i **90 F–J** prikazani na shemi 38. Valja uočiti da je oblik **H** karakteriziran 10-eročlanim IHB-prstenom (β -okret), a u **F** i **I** se javlja 7-eročlani prsten, odn. γ -okret.

Kristalografskom analizom glicinskog konjugata **89** nađene su dvije unutarlančane veze tipa N–H \cdots N (konformacija **G**) i CH \cdots O=C koje zatvaraju peteročlane IHB-prstenove. Međulančane veze (s 1'-Ac) tipa N–H \cdots O ne postoje, budući da su ravnine proširenih konjugiranih jedinica Cp–C=O gotovo paralelne. Geometrija molekule može se opisati kao P-1,1', a $\omega \approx 16^\circ$ (slika 16). Tako "stratificirana" struktura slaže se u kristal preko intermolekulskih veza 1'-C=O \cdots H–N_(Gly2) i 1-C=O \cdots H–N_(Gly1) kao i s pomoću π - π -međudjelovanja ciklopentadienskih prstenova.

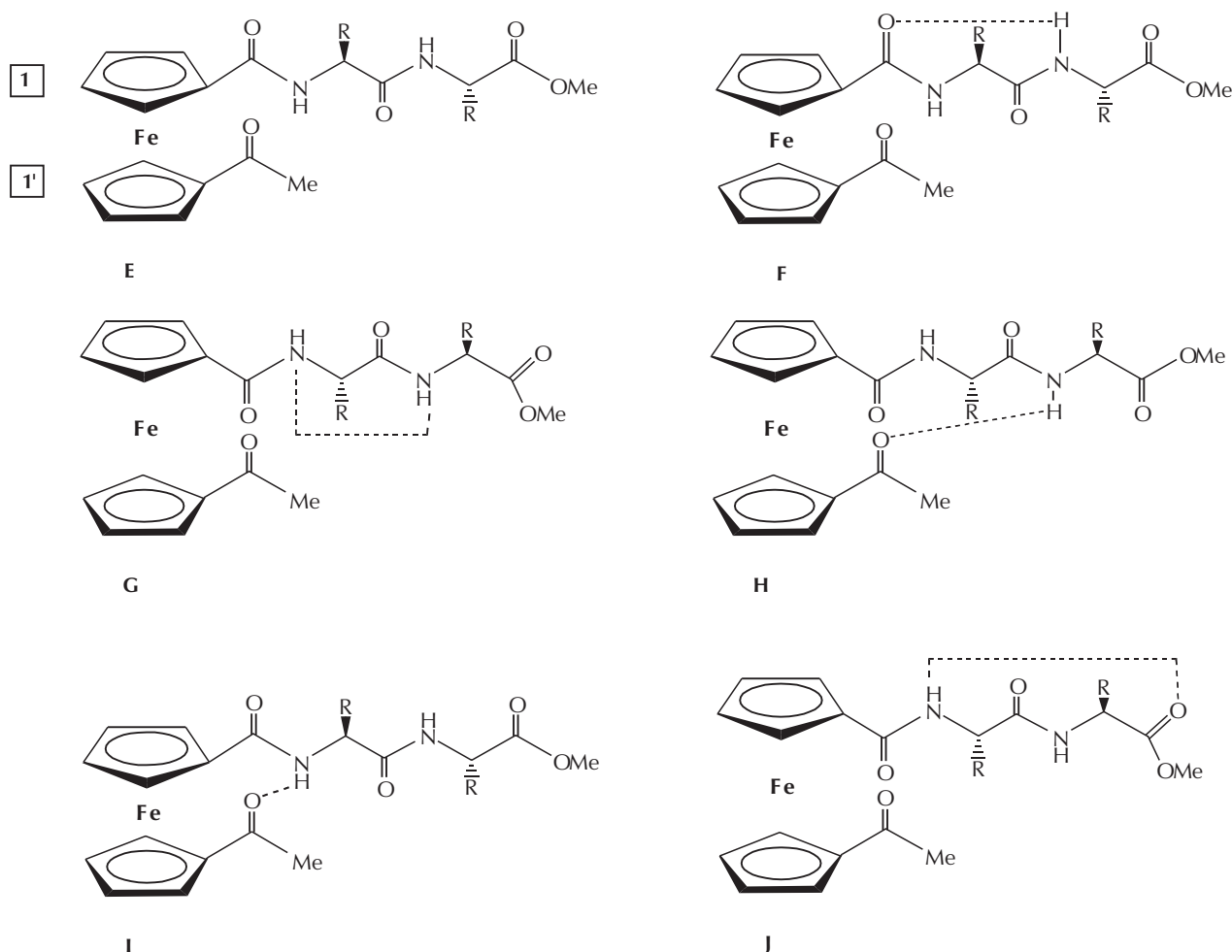


Shema 37 – Sintaza Ac-Fn-CO-(AA)₂-OMe (**89**, **90**).

(1) HOBt/EDC, CH₂Cl₂; (2) (AA)₂-OMe x HCl, NEt₃, CH₂Cl₂.

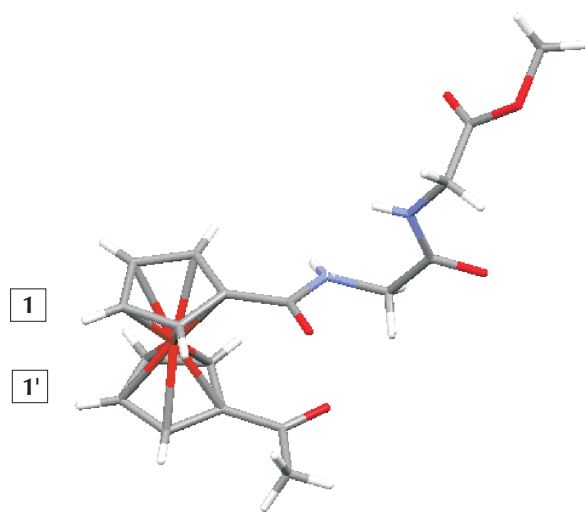
Scheme 37 – Synthesis of Ac-Fn-CO-(AA)₂-OMe (**89**, **90**).

(1) HOBt/EDC, CH₂Cl₂; (2) (AA)₂-OMe x HCl, NEt₃, CH₂Cl₂.



S h e m a 38 – Mogući obrasci vodikovih veza N–H···O (1'-acetilferocenoil)dipeptida **89** i **90** (E–J); oblik **H** karakteriziran je 10-eročlanim IHB (β -okret), a **F/I** sedmeročlanim IHB-prstenovima (Napomena: Deskriptori E–J upotrijebljeni su da bi se naglasila veza s “temeljnim” **25/26 A–D** prikazanim na shemi 17.

S c h e m e 38 – Possible N–H···O hydrogen bond patterns of (1'-acetylferrocenyl)dipeptides **89** and **90** (E–J); **H** form is characterized by 10-membered IHB (β -turn) and **F/I**. Note: Descriptors E–J are used to emphasize the connection with the “basic” forms **25/26 A–D** presented in Scheme 17.



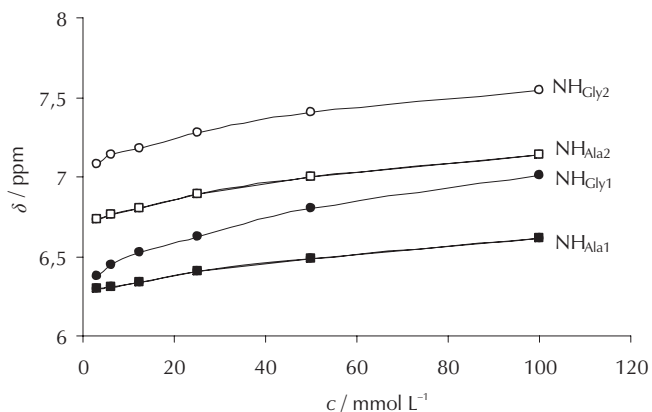
S l i k a 16 – Molekulska struktura Ac-Fc-CO-Gly-Gly-OMe (**89**) s dva 5-eročlana unutarlančana IHB-prstena

F i g. 16 – Molecular structure of Ac-Fc-CO-Gly-Gly-OMe (**89**) containing two 5-membered intrachain IHB rings

Na sličan način kao što je izvedena analiza spojeva **25** i **26**, temeljem IR-sigala (CH_2Cl_2) pri $\tilde{\nu} \approx 1745 \text{ cm}^{-1}$ isključuje se mogućnost $\nu(\text{C}=\text{O}_{\text{asoc.}})$ za esterske skupine spojeva **89** i **90** odn. konformacije **J**. IR-vrpce u području $\nu(\text{N}-\text{H})$ pokazuju prisutnost asociranih ($\approx 3340 \text{ cm}^{-1}$) i slobodnih oblika ($\approx 3430 \text{ cm}^{-1}$), a budući da se pri razrjeđivanju otopine omjer tih signala samo malo smanjuje, postoji indicija za dominaciju IHB-vrstâ popraćenih u manjoj mjeri samozdruženim oblicima. Mjerenjem IR u čvrstom stanju (KBr) nađeni su NH-sigali ispod 3400 cm^{-1} indikativni za vodikovu vezu preko NH; $\nu(\text{C}=\text{O}_{(\text{COOMe})})$ pri $\approx 1750 \text{ cm}^{-1}$ ukazuje na slobodnu estersku funkciju, a oba podatka u skladu su s kristalografskom analizom.

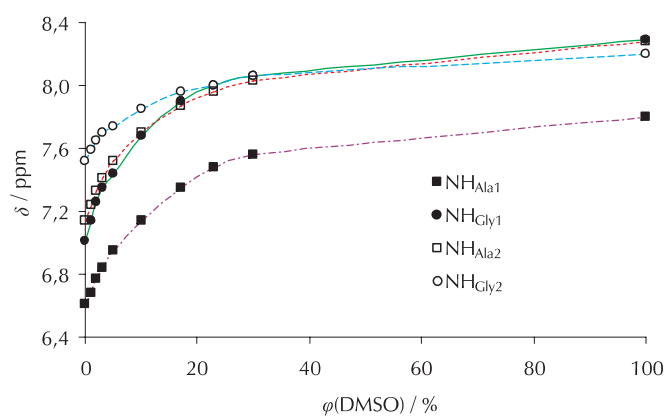
^1H NMR-spektre (CDCl_3) pokazuju malu ovisnost o koncentraciji: imajući na umu da je 7 ppm približna granica za postojanje HB-vezanih i nevezanih oblika iz slike 17 razabire se da $\text{NH}_{\text{Gly}2}$ sudjeluje u IHB srednje jakosti, a $\text{NH}_{\text{Ala}2}$ i $\text{NH}_{\text{Gly}1}$ u vrlo slabim IHB. $\text{NH}_{\text{Ala}1}$ najvjerojatnije nije uključen u vodikove veze. Vrlo prikladan postupak za određivanje postojanja i jakosti IHB jest NMR-titracija otopina uzoraka u CDCl_3 s DMSO-d_6 , pri čemu nastupa kidanje IHB i nastajanje solvata s pomicanjem δ_{NH} k nižem magnet-

nom polju: ako su IHB slabe ili ne postoje, $\Delta\delta$ je velik (> 1 ppm), a $\Delta\delta \approx 0,6$ upućuje na srednje jake IHB. Na slici 18 prikazana je titracija spojeva **89** i **90** iz koje se vidi da su krivulje za sve NH-funkcije (osim $\text{NH}_{\text{Gly}2}$) prilično "strme" u području do ≈ 25 % DMSO (u kojem se događaju rečene promjene vezâ) uz $\Delta\delta \approx 1,20$ ppm. Može se zaključiti da je u ta tri slučaja riječ o slaboj IHB ili da je nema, a kod $\text{NH}_{\text{Gly}2}$ ($\Delta\delta \approx 0,66$) radi se o vezi srednje jakosti.



Slika 17 – Kemijski pomaci amidnih protona *Ac-Fc-CO-AA1-AA2-Ome* (**89** i **90**) u ovisnosti o koncentraciji (snimljeni u CDCl_3)

Fig. 17 – Concentration dependent ^1H NMR chemical shifts of amide protons in *Ac-Fc-CO-AA1-AA2-Ome* (**89** and **90**) in CDCl_3



Slika 18 – Titracija otopina uzoraka *Ac-Fc-CO-Gly1-Gly2-Ome* (**89**) i *Ac-Fc-CO-Ala1-Ala2-Ome* (**90**) u CDCl_3 s DMSO-d_6 koja pokazuje promjenu kemijskog pomaka za $\text{NH}_{\text{AA}2}$ i $\text{NH}_{\text{AA}1}$

Fig. 18 – DMSO-d_6 titration of CDCl_3 solutions of *Ac-Fc-CO-Gly1-Gly2-Ome* (**89**) and *Ac-Fc-CO-Ala1-Ala2-Ome* (**90**) showing chemical shift changes for $\text{NH}_{\text{AA}2}$ and $\text{NH}_{\text{AA}1}$

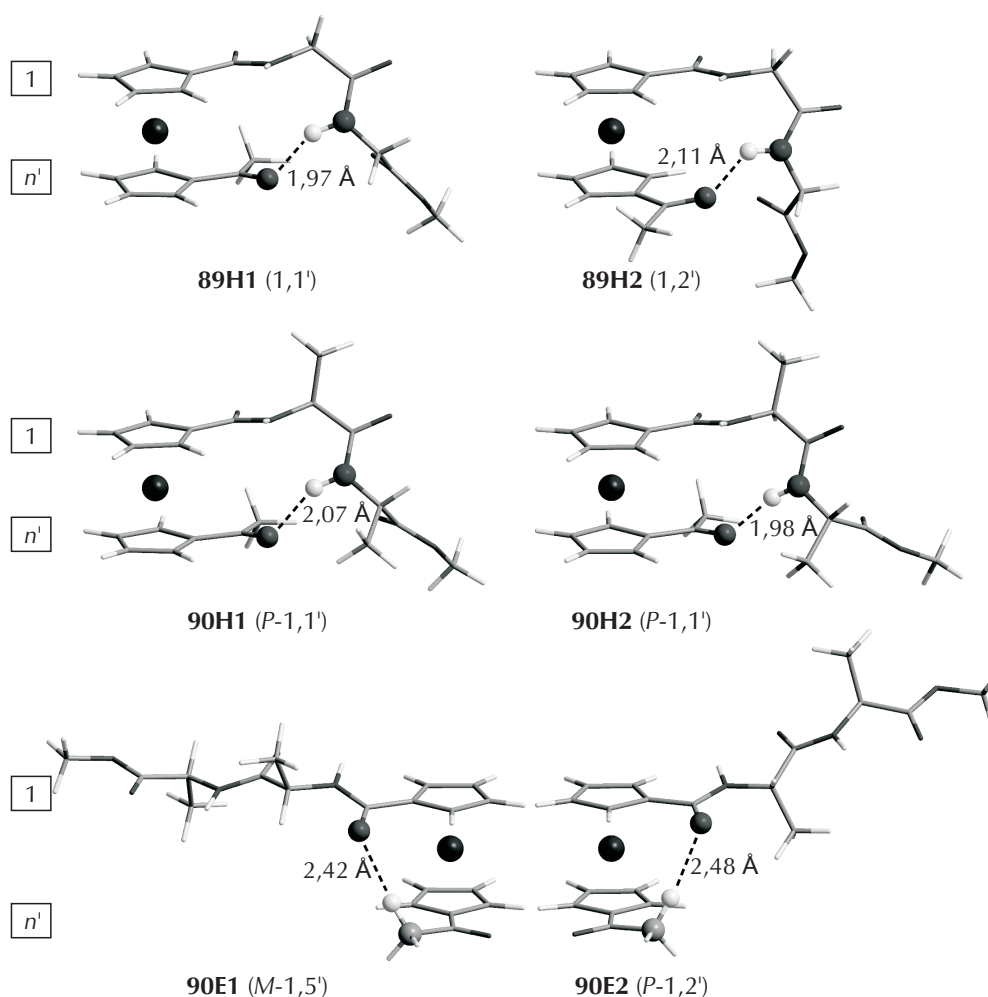
U skladu s tim nalazom jest i mjerenje *v. r.*-NMR-spektara pri čemu je za $\text{NH}_{\text{Gly}2}$ nađen *v. r.* = 0,30 (što znači srednje jaku IHB), *v. r.*($\text{NH}_{\text{Ala}2}$) = 0,52 (slaba IHB), a za preostale NH-funkcije (u spojevima **89** i **90**) *v. r.* $\approx 0,65$, što upućuje na nepostojanje ili vrlo slabe IHB. Na osnovi opisanih spektroskopskih podataka (koji su u dobroj uzajamnoj suglasnosti) može se zaključiti da su preferentne konformacije u spoju **89 F**, **G** i/ili **H** s IHB preko $\text{NH}_{\text{Gly}2}$. U konjugatu **90** visoke *v. r.*-vrijednosti za $\text{NH}_{\text{Ala}1}$ i $\text{NH}_{\text{Ala}2}$ ukazuju na znatno slabije veze, pa se može predvidjeti i kontribucija otvore-

nog oblika **E**. CD-spektar kiralnog Ala-konjugata **90** pokazuje pozitivni Cottonov efekt pri 495 nm (odn. *P*-kiralnost), no slično kao što je nađeno u desimetriziranim konjugatima **81**, **82**, **87** i **88**³⁹ i ovdje je riječ o maksimumu znatno slabijeg intenziteta nego u simetričnih konjugata *P-VII*.

Na osnovi predočenih eksperimentalnih podataka može se kod spojeva **89** i **90** očekivati konformacijska populacija **E-I** (konformacija **J** je odbačena!) prikazana na shemi 38. Pri tome NMR-mjerenja posebno upućuju na oblike u kojima se IHB ostvaruje preko $\text{NH}_{\text{AA}2}$. No iz tih se rezultata ne može dokučiti o kojima je veznim motivima riječ, pa smo pristupili DFT-studiji. Začudo, pokazano je da kod Gly-konjugata **89** s 88 % prevladava konformer **89H** (u kojem je 1'-Ac povezan s $\text{NH}_{\text{Gly}2}$ -skupinom), koji se sastoji iz četiri enantiomerna para *P*- i *M*-heličnosti s geometrijom 1,1' i 1,2'. U gornjem redu na slici 19 predočena su dva energijski najpovoljnija *P*-enantiomera iz tog skupa – **89H1** (1,1') i **89H2** (1,2') s relativnim energijama 0,00 i 1,11 kJ mol^{-1} (odgovarajući energijski ekvivalentni *M*-enantiomeri nisu prikazani). DFT-računi za Ala-konjugat **90** ukazuju na postojanje jednakih udjela (oko 35 %) konformera **90H** i otvorenog oblika **90E**. U srednjem redu na slici 19 prikazana su dva energijski najpovoljnija konformera tipa **H**: **90H1** (*P*-1,1') ($\omega = 11,6^\circ$) i **90H2** (*P*-1,1') ($\omega = 1,2^\circ$), a valja uočiti da prvo-navedeni ima geometriju sličnu geometriji **89H1**. U skup energijski najpovoljnijih konformera ubraja se i **90E1** ($\omega = 71,5^\circ$) te njegov dijastereomer **90E2** ($\omega = 72,1^\circ$). Oni imaju suprotnu ferocensku kiralnost, koja se označuje kao *P*-1,2' i *M*-1,5' (donji red). Ta dva oblika ne sadrže veze $\text{NH}\cdots\text{O}$, već su (u usporedbi s otvorenim "Xuovim konformacijama" 1,3' i 1,4') stabilizirane međulančanim IHB tipa $(\text{CO})\text{CH}_3\cdots\text{O}$.

Na osnovi eksperimentalnih podataka i rezultata DFT-računa može se zaključiti sljedeće: (i) rendgenska strukturna analiza i IR(KBr)-spektroskopija pokazuje da u čvrstom stanju kod Gly-konjugata **89** prevladavaju procesi samozdruživanja; (ii) spektroskopska analiza u otopini (različite NMR-tehnike i IR) pokazuje da kod oba supstrata $\text{NH}_{\text{AA}1}$ sudjeluje neznatno u vezivanju, a $\text{NH}_{\text{AA}2}$ uključen je u slabe do srednje jake IHB; (iii) sustavna analiza konformacijskog prostora DFT-postupkom potvrđuje eksperimentalne podatke i specificira da su izrazito zastupljeni konformeri tipa **H** (za oba spoja) i **E** (za konjugat **90**); (iv) utjecaj bočnog lanca na konformacijsku populaciju je evidentan: u molekulama **89** s ugrađenim prostorno nezahtjevnim glicinom olakšano je premoštenje $\text{CH}_3\text{CO}\cdots\text{HN}_{\text{Gly}2}$ pa je jedini konformer **89H** (88 %). S obzirom na voluminozniji Ala-konstituent u konjugatu **90** udjel **90H** znatno je smanjen (35 %) na račun **90E** (≈ 35 %) slične potencijalne energije; (v) osim što su riješene konformacijske preferencije, na osnovi DFT-studija rastumačena je ferocenska *P*-kiralnost konjugata **90** (koja proizlazi iz njegovih CD-spektara), budući da sudjelujući konformeri **E** i **H** više pridonose *P*- negoli *M*-usmjerenju; (vi) izostavljanje samo jednog hidrogen-dorskog supstituenta (1'-NHMe) u usporedbi s konjugatima $\text{MeNH-CO-Fn-CO-AA-NHMe}$ ³⁹ u spojevima **89** i **90** drastično mijenja konformacijsku distribuciju.²⁴

U sljedećem radu²³ istražili smo desimetrizirane konjugate Boc-AA-NH-Fn-NH-Ac (**XII**) koji se formalno izvode iz simetričnih peptida $(\text{Boc-AA-NH})_2\text{Fn}$ (**VIII**) (*v. shemu* 33). Priprava tih spojeva započinje pretvorbom amid-kiseline **49** u amid-azid **91**, koji Curtiusovim pregrađivanjem prelazi



Slika 19 – Najstabilnije konformacije **89** s 1,1'- and 1,2'-supstitucijskim obrascem [slični konformeri **H3** (1,1') i **H4** (1,2') su izostavljeni] (gore). Skup najvažnijih oblika konjugata **90** (dolje)

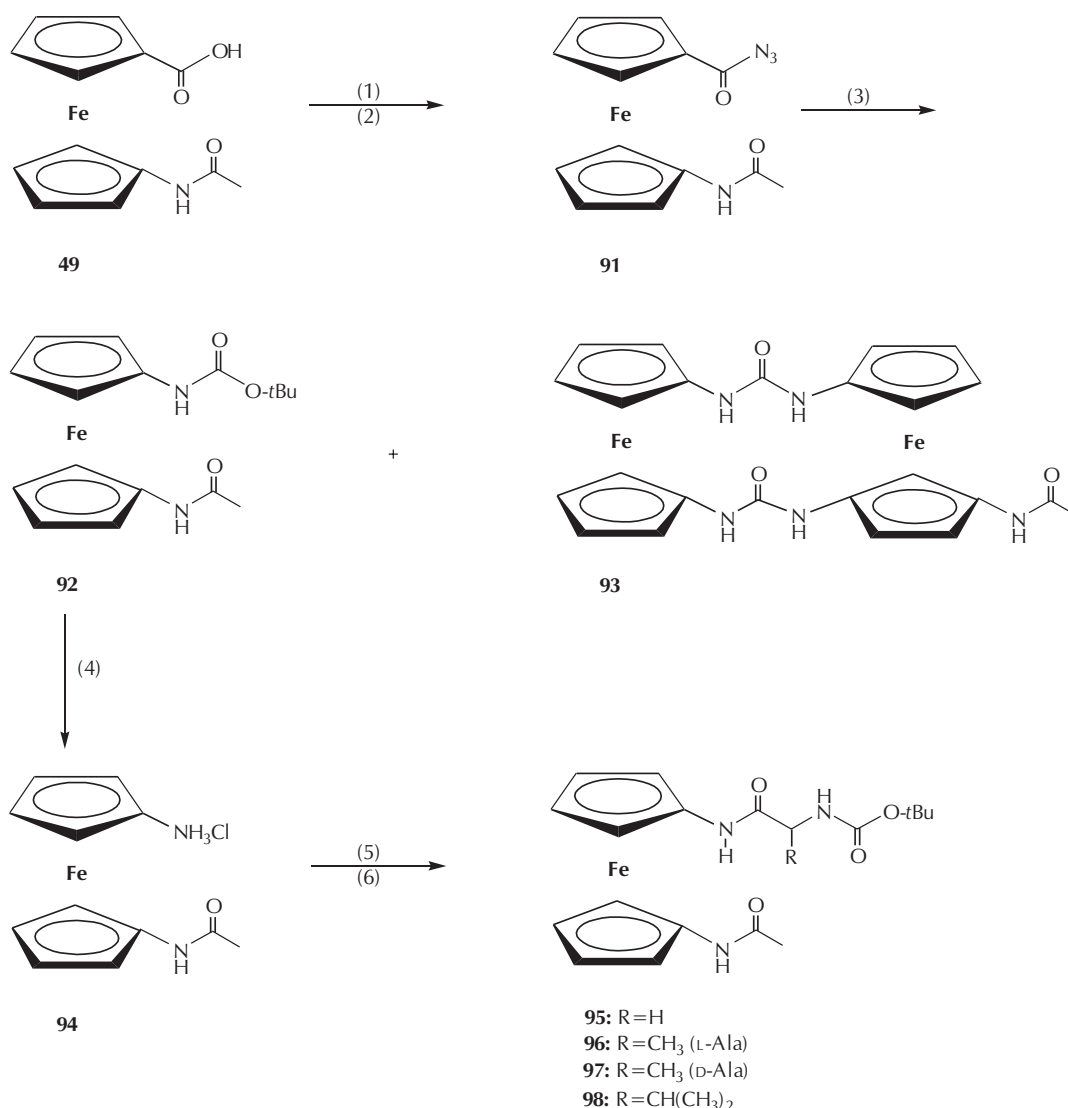
Fig. 19 – The most stable types of **89** pattern featuring 1,1' and 1,2' substitution mode [similar conformers **H3** (1,1') and **H4** (1,2') are omitted] (top). Set of the most important forms of conjugate **90** (bottom).

u Boc-NH-Fn-NH-Ac (**92**) uz nastajanje manje količine simetrične uree (**93**).² Deprotektiranjem Boc-derivata **92** dobiva se preko hidroklorida **94** međuprodukt $H_2N-Fn-NH-Ac$, koji se uz pomoć HOBt/EDC kopulira s aminokiselinama u željene spojeve tipa **XII** (**95–98**) (shema 39).

Na shemi 40 prikazane su moguće konformacije pripremljenih supstrata u koje su uključene IHB sa sve tri donirajuće NH-skupine. Konformer **A** sadrži polovicu križnog IHB-motiva (prikazanog za simetrični **VIII** na shemi 11), pri čemu se zatvara 10-eročlani prsten koji predstavlja β -okret. S tim NH-donorom može se zamisliti i vezivanje s "bližom" karbonilnom funkcijom uz istodobnu međulančanu vezu: nastaju dva 7-eročlana IHB-prstena (γ -okret) prikazana u obliku **B**. Angažiranjem NH-skupina iz duljega lanca nastale bi međulančane 7-eročlane (**C**) i 10-eročlane IHB (**D**). Kao što je prethodno opisano (v. shemu 13) odgovarajući monosupstitucijski konjugati Boc-AA-NH-Fc (**21–23**) ne sadrže međulančane IHB, pa predstavljaju izvrsne modelne (referentne) spojeve za komparativnu spektroskopsku analizu.

U IR-spektrima (CH_2Cl_2) supstrata **95–98** javljaju se signali srednje jakosti oko 3427 i 3220 cm^{-1} indikativni za slobod-

ne i asociirane NH-skupine. U raspravi 1H NMR-spektara govori se o $NH_{AA}(NH_{Boc})$, $1-NH(NH_{Fc})$ i $1'-NH(NH_{CO})$ skupinama, čiji su NMR-signali u $CDCl_3$ -otopinama zabilježeni pri $\approx 5,3$, ≈ 8 i $8,1$ ppm (tablica 2). To znači da prva NH-skupina ne sudjeluje u vodikovim vezama. Druge dvije amidne funkcije s približno jednakim kemijskim pomakom (> 7 ppm) uključene su u vodikove veze, a njihov intramolekulski karakter proizlazi iz snimanja NMR-spektara pri različitim koncentracijama, pri čemu se njihov položaj tek neznatno mijenja. Jakost pojedinih veza može se kvantitativno odrediti s pomoću v. r.-postupka pri čemu su dobivene sljedeće vrijednosti v. r. (naprijed navedenim slijedom): ≈ 1 , $\approx 0,45$ i $\approx 0,40$ (tablica 2), što ponovno ukazuje na praktički nevezanu skupinu NH_{AA} , a druge dvije sudjeluju u IHB srednje jakosti. U nizu **95**→**96**→**98** ne javlja se monotona promjena navedenih NMR-podataka, što znači da veličina bočnog lanca aminokiseline ne utječe vidljivo na karakter IHB. U CD-spektrima kiralnih konjugata **96–98** apsorpcijski su maksimumi zabilježeni pri ≈ 469 nm. U konjugatima izvedenim iz L-aminokiseline inducirana je P-heličnost ferrocena, a krivulje dobivene za L-Ala i D-Ala spojeve su zrcalno simetrične. Na osnovi navedenih eksperimentalnih podataka može se zaključiti da između 1- i 1'-supstituenata



S h e m a 39 – Priprava desimetriziranih derivata Fcda – Boc-AA-NH-Fn-NH-Ac (**95–98**) "azidnim" postupkom: (1) ClCOOEt/NEt₃, acetone; (2) NaN₃, H₂O; (3) tert-BuOH, 70 °C; (4) HCl(g)/EtOAc; (5) Et₃N, CH₂Cl₂; (6) HOBt/EDC, Boc-AA, CH₂Cl₂ (AA = Gly, Ala, D-Ala, Val).

S c h e m e 39 – Synthesis of desymmetrized Fcda derivatives - Boc-AA-NH-Fn-NH-Ac (**95-98**) by "azide" procedure: (1) ClCOOEt/NEt₃, acetone; (2) NaN₃, H₂O; (3) tert-BuOH, 70 °C; (4) HCl(g)/EtOAc; (5) Et₃N, CH₂Cl₂; (6) HOBt/EDC, Boc-AA, CH₂Cl₂ (AA = Gly, Ala, D-Ala, Val).

postoji komunikacija, koja rezultira konformacijskom populacijom **A–C**. Oblik **D** može se odbaciti jer je skupina NH_{AA} slobodna.

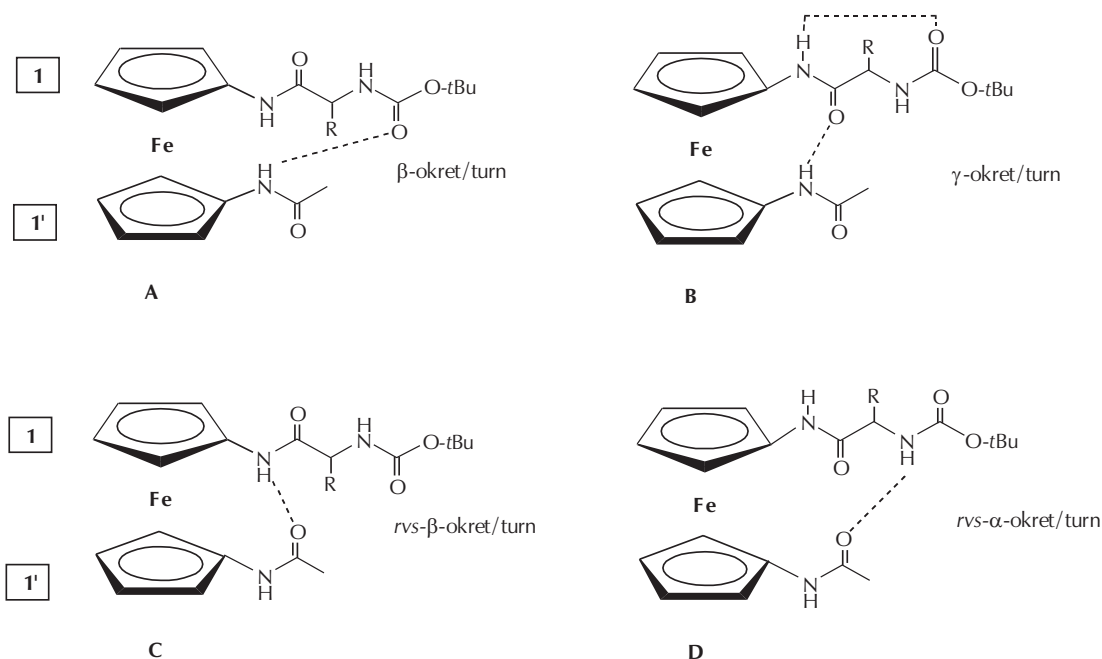
Budući da su spektroskopska svojstva svih četiriju supstrata vrlo slična, može se pretpostaviti i slična zastupljenost konformera, pa je načinjeno DFT-modeliranje reprezentativnog Ala-spoja **96**. Na slici 20 prikazane su konformacije **A**, **B** i **C** *P*-orijentacije kao i njihovi pridruženi dijastereomerni *M*-oblici (u zagradama je navedena njihova izračunana potencijalna energija u kJ mol⁻¹). Konformacije sa sadržajem energije ispod 6 kJ mol⁻¹ su *P-A* (1,1'), *P-B* (1,2'), *P-C* (1,2') i *M-C* (1,5'), a u njima su u IHB uključene 1-NH i 1'-NH. Relativne energije oblika *P-D* i *M-D*, kao i otvorene konformacije iznose 7 – 20 kJ mol⁻¹ pa ih se može smatrati marginalnima.

Nameće se sljedeći zaključak: (i) asimetrični derivati Fcda – Boc-AA-NH-Fn-NH-Ac javljaju se kao skup konformera s

intramolekulskim vezama u koje su uključene obje amino-skupine uz ferocen, a NH_{AA} je slobodna; (ii) većina nisko-energijskih konformacija ima *P*-orijentaciju ferocenskog kromofora uz supstituciju L-aminokiselinom, što je u skladu s (+)-CD signalom; (iii) jakost pojedinih IHB (odn. populacija odgovarajućih konformacija) određena je s pomoću *v. r.*-postupka i ne ovisi o ugrađenoj aminokiselini.²³

6. Ferocenski ureidni peptidi i β-peptidi

U drugom poglavlju objašnjeno je da se umetanjem molekularskih kalupa (*scaffold*, *template*) u strukturu oligopeptida može pripremiti modele peptida koji zauzimaju željenu konformaciju. Ti peptidni mimetici služe za studij svijanja proteina budući da se te velike biomolekule javljaju u bezbroj termodinamički sličnih konformacija koje je nemoguće izdvojiti. Važno mjesto među peptidnim mimeticima



S h e m a 40 – Hipotetske konformacije Boc-AA-NH-Fn-NH-Ac (**95**, AA= Gly; **96**, AA= Ala; **97**, AA= D-Ala; **98**, AA= Val) A, B, C i D s 10/ 2x7 /7 /10-eročlanim IHB

S c h e m e 40 – Hypothetic conformations of Boc-AA-NH-Fn-NH-Ac (**95**, AA= Gly; **96**, AA= Ala; **97**, AA= D-Ala; **98**, AA= Val) A, B, C and D containing 10/2x7/7/10-membered IHB

T a b l i c a 2 – ^1H NMR-podaci za referentne spojeve **20**, **21–23** (bez IHB) i za Fcda-derivate **95**, **96** i **98** ($c = 5 \cdot 10^{-3} - 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$)

T a b l e 2 – ^1H NMR data for reference compounds **20**, **21–23** (without IHB's) and for Fcda derivatives **95**, **96** and **98** ($c = 5 \cdot 10^{-3} - 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$)

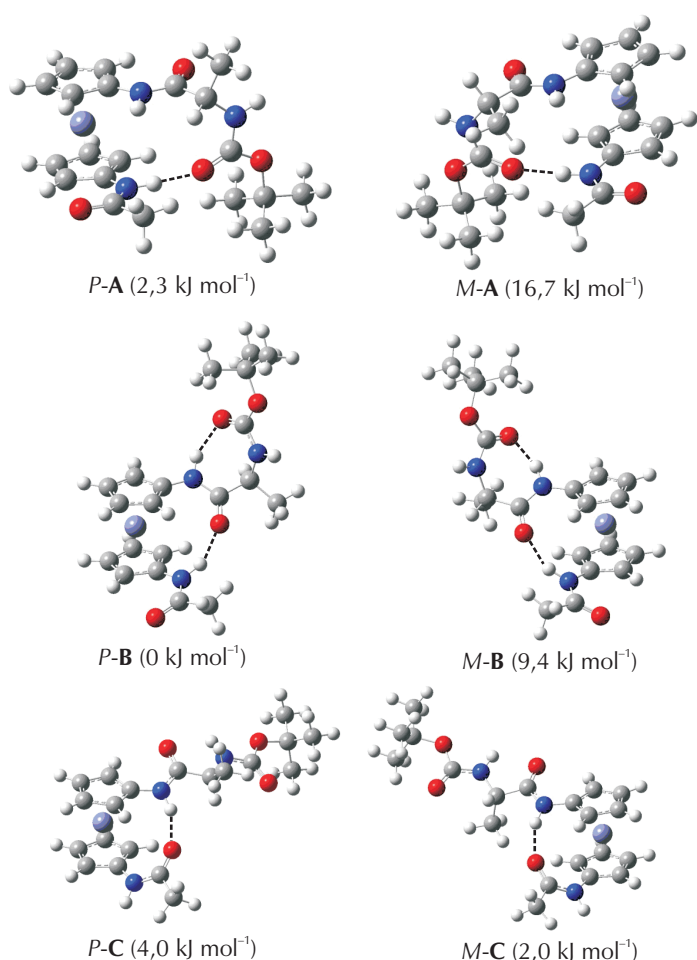
Spoj Compd.	Formula ^a	$\delta_{\text{NH}}(\text{CDCl}_3)$ ppm	$\delta_{\text{NH}}(\text{DMSO-d}_6)$ ppm	$\delta(\text{DMSO-d}_6) - \delta(\text{CDCl}_3)$ ppm	v. r. (ref.)
20(a)	Boc-NH-Fc	6,49	9,28	2,79	
22(b)	Boc-Gly-NH-Fc	5,45, 6,68	7,00, 9,23	1,55, 2,55	
21(c)	Boc-Ala-NH-Fc	5,55, 6,83	7,00, 9,28	1,45, 2,45	
23(d)	Boc-Val-NH-Fc	5,27, 7,14	6,78, 9,33	1,51, 2,19	
95	Boc-Gly-NH-Fn-NH-Ac	5,52, 7,88, 8,14	6,98, 9,08, 9,16	1,46, 1,20, 1,02	0,94 (b), 0,47 (b), 0,37 (a)
96	Boc-Ala-NH-Fn-NH-Ac	5,33, 8,08, 8,19	6,99, 9,07, 9,22	1,67, 0,99, 1,03	1,14 (c), 0,40 (c), 0,37 (a)
98	Boc-Val-NH-Fn-NH-Ac	5,25, 7,98	6,75, 9,09, 9,27	1,5, 1,11, 1,29	0,99 (d), 0,51 (d), 0,46 (a)

^a NH-signalni navedeni su s lijeva udesno na prikazanim formulama
NH signals are given from left to right in the presented formulas

nalaze ureidni peptidomimetici **XIII** čije se nastajanje može zamisliti pretvorbom peptidne funkcije u ureilensku skupinu. Pri tome se (zbog sintetskih razloga) opetovane jedinice oligomera najčešće obogaćuju i po jednom metilenskom skupinom, što je prikazano na shemi 41.⁴⁰

Primjer ureidnog peptidomimetika u koji je uključen etilendiamin (**7**) prikazan je na shemi 8, a može se uočiti da ukomponirana ureilenska skupina predstavlja začetnik tzv. U-okreta koji inducira umjetnu paralelnu β -plohu. Osim kao modeli za peptidne molekule ti pseudopeptidi proučavaju se i kao spojevi s potencijalnom biološkom aktivnošću. Poznato je da peptidi i proteini imaju značajnu ulogu u

imunološkim, neurološkim i drugim bioprocesima: djeluju kao receptori, neurotransmiteri, neuromodulatori, enzimi, hormoni, antigeni, antibiotici, itd. No, unatoč toj širokoj i izraženoj bioaktivnosti, primjena peptida kao lijekova prilično je ograničena nepogodnostima koje se događaju pri njihovu unošenju u biološki sustav: oni se vrlo lako proteoliziraju, a često su previše hidrofilni da bi prošli kroz staničnu opnu. Zbog toga se u protekloj dekadi žarište farmaceutskih istraživanja pomaknulo s proteina na umjetne peptidomimetike ("pseudopeptide"). Postoji više mogućnosti "popravka" navedenih nedostataka proteina, pri čemu se mijenja struktura njihova skeleta (često do neprepoznatljivosti). Karakteristika ureidnih pseudopeptida jest da su manje



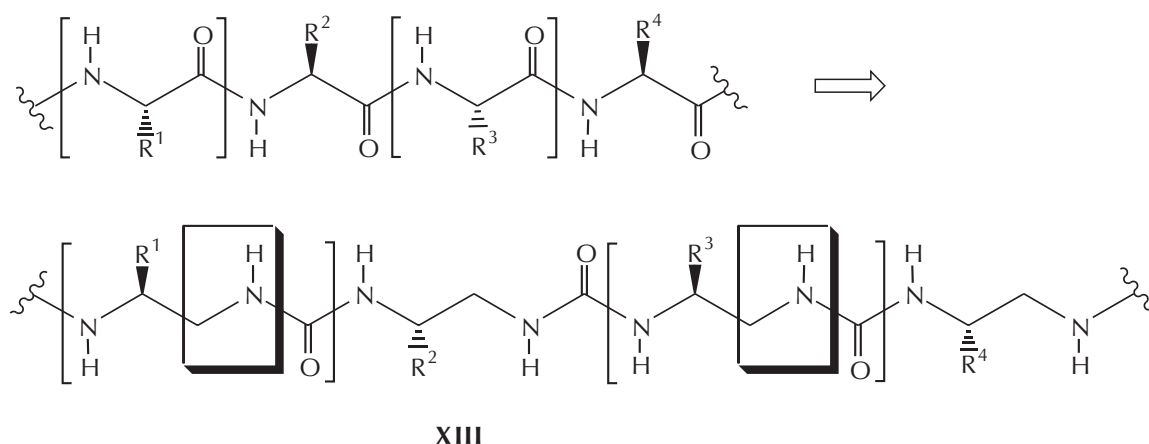
Slika 20 – Geometrije Boc-Ala-NH-Fn-NHAc (**96**) optimizirane na osnovi DFT s naznakom njihovih relativnih energija u kJ mol⁻¹ u zagradama

Fig. 20 – DFT-optimized geometries of Boc-Ala-NH-Fn-NHAc (**96**) along with their relative energies in kJ mol⁻¹ in parentheses

osjetljivi na djelovanje proteolitičkih enzima, a spomenuto obogaćivanje na metilskim skupinama povećava željenu lipofilnost molekule kao uvjet za prolazak kroz biomembrane. Nadalje, podskupina NH-CO-NH djeluje kao farmakofor u nekim peptidnim inhibitorima.⁴¹ Ureilenska je skupina donor-akceptor vodikove veze, što je bitno za topljivost u biološkoj (vodenoj) sredini kao i za poboljšanje međudjelovanja s receptorima. U kemijskoj je literaturi opisano više ferocenskih derivata s ureom, a s obzirom na mogućnost tvorbe HB preko te skupine, ti su spojevi istraženi kao receptori za vezivanje aniona te u procesima samozdruživanja. Pogodni supstrati za međudjelovanje s anionima su simetrični spojevi tipa Fn(NH-CO-NH-R)₂ **99** (R = C(CH₂-CH₂-COOt-Bu), 2-naftil, krunasti eteri), pri čemu ferocenilna jezgra služi kao elektrokemijska detekcijska jedinica.⁴² Samozdruživanje ferocena koji sadrži ureilenske skupine na osnovi donorskih svojstava NH i akceptorskih svojstava CO služi pri konstrukciji ionskih kanala.⁴³ U drugomu dijelu prikaza² opisano je djelovanje poveznice -NH-CO-NH- između dviju ferocenskih jezgri u spojevima R-Fn-NH-CO-NH-Fn-R u smislu prijenosa elektrona odn. delokalizacije naboja.⁴³

Osim kod homooligomernih ureidnih peptidomimetika tipa **XIII** farmakoforna svojstva peptida mogu se "popraviti" i njihovom kopolimerizacijom s drugim pseudopeptidima. Tako npr. njihovom kondenzacijom s peptoidima nastaju "hibridni" sustavi poznati pod nazivom ureapeptoidi.⁴¹ Jednostavniji slučaj su molekule koje uz peptidnu skupinu sadrže ureilensku formaciju imenovane kao ureinski peptidi (ureidopeptidi) (**XIV**). Za njihovu se pripremu mogu primijeniti sljedeći postupci: (i) reakcija aminokiseline (ili peptida) s ureinskom aminokiselinom **100**; (ii) kondenzacija peptida/aminokiseline s izocijanatom i obratno; (iii) kondenzacija aminokiselnog/peptidnog izocijanata **101** s aminom.⁴³ (shema 42)

Budući da su ferocenski amini vrlo nestabilni, a peptidni izocijanati komercijalno nedostupni (iii), od preostala dva postupka za pripremu ferocenskih ureidopeptida opisanih u

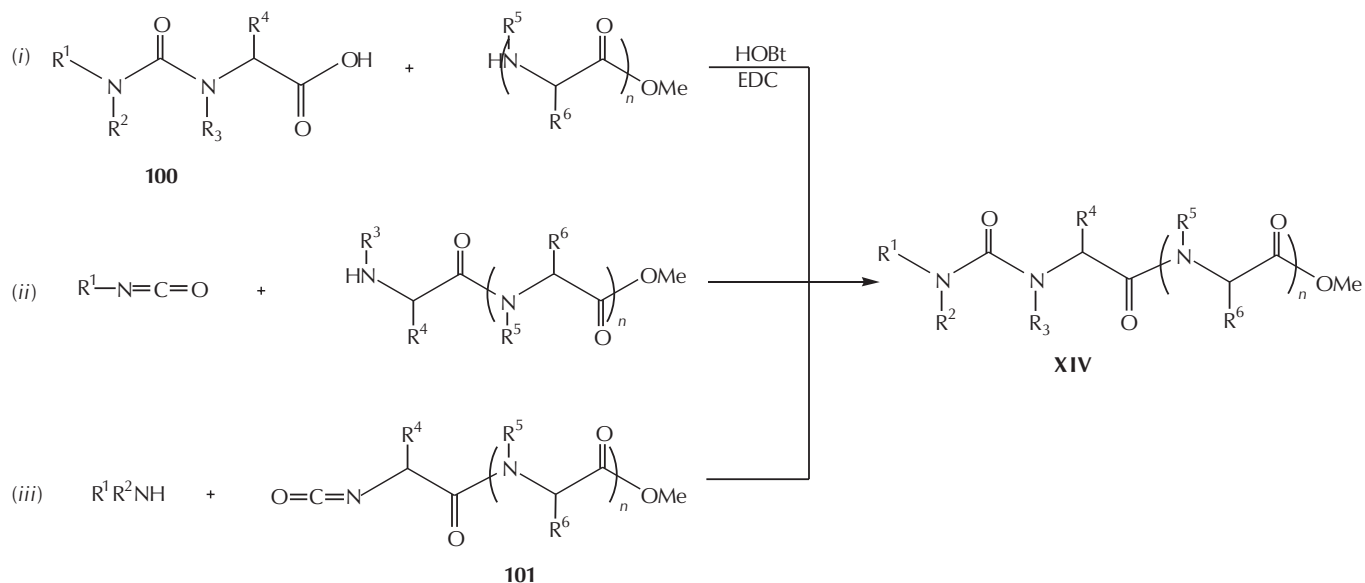


S h e m a 41 – Ureidni peptidomimetici **XIII** nastaju formalnim umetanjem po jedne metilenske i amino-skupine u svaku opetovanu jedinicu oligopeptida (uokvireno)

S c h e m e 41 – Urea peptidomimetics **XIII** are formally generated by insertion of one methylene group and one amino function (highlighted parts) in each repeated unit in oligopeptide

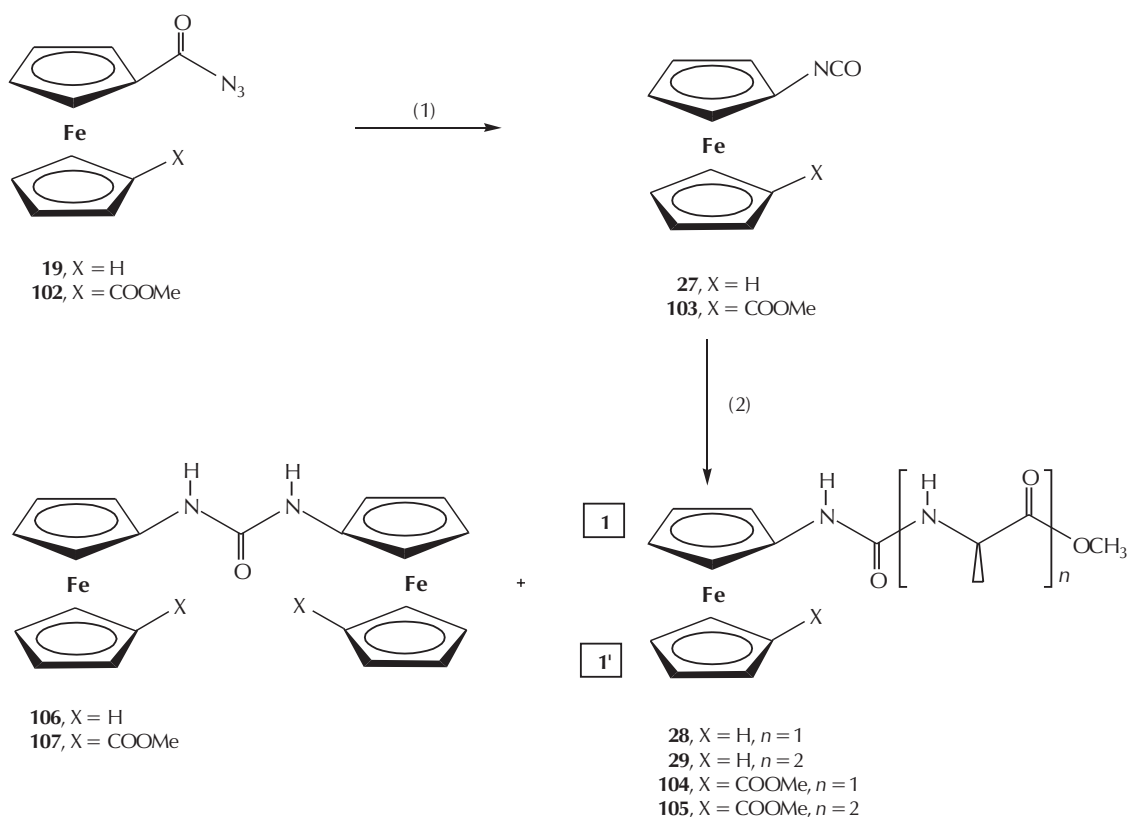
radu²⁵ odabrali smo jednostavniji (ii). Na shemi 43 prikazana je priprava mono- ($X = H$) i disupstitucijskih ($X = COOMe$) ferocenskih ureidopeptida (tipa **XIV**) polazeći iz odgovarajućih azida **19** i **102** koji su zagrijavanjem u benzenu

pregrađeni u izocijanate **27** i **103**. Kondenzacijom tih međuprodukata s Ala-OMe ili H(Ala)₂-OMe nastaju željeni ureidopeptidi **28**, **29**, **104** i **105**, a kao nusprodukti izdvojene su simetrične uree **106** i **107**.²



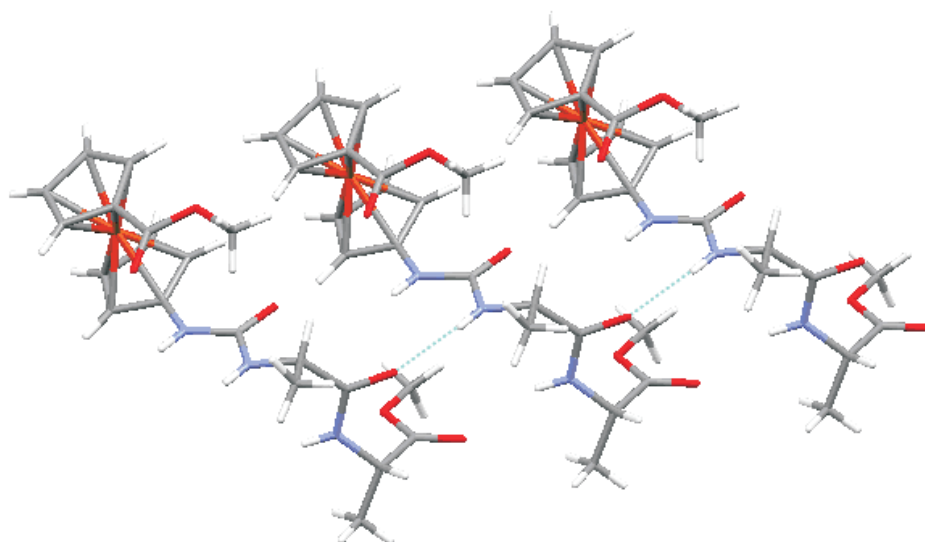
S h e m a 42 – Priprava ureidopeptida reakcijom aminokiselinskih (peptidnih) estera s (i) HOBt/EDC-aktiviranim ureinskom aminokiselinom **100** ili (ii) izocijanatom te (iii) kondenzacijom aminokiselinskog (peptidnog) izocijanata **101** s aminom

S c h e m e 42 – Synthesis of ureidopeptides by reactions of amino acid/peptide esters with (i) either HOBt/EDC activated ureine amino acid **100** (ii) or isocyanate, as well as by (iii) condensation of amino acid/peptide isocyanate **101** with an amine



S h e m a 43 – Priprava Fc-mono- (**28**, **29**) i Fc-disupstitucijskih (**104**, **105**; tip **XIV**) ureidopeptida preko ferocenskih izocijanata: (1) benzen, 80 °C; (2) $n = 1$: H-Ala-OCH₃·HCl, Et₃N, CH₂Cl₂; $n = 2$: H-Ala-Ala-OCH₃·HCl, Et₃N, CH₂Cl₂.

S c h e m e 43 – Synthesis of Fc mono (**28**, **29**) and Fc-bisureidopeptides (**104**, **105**; **XIV** type) via ferrocene isocyanates: (1) benzene, 80 °C; (2) $n = 1$: H-Ala-OCH₃·HCl, Et₃N, CH₂Cl₂; $n = 2$: H-Ala-Ala-OCH₃·HCl, Et₃N, CH₂Cl₂.

Slika 21 – Intermolekulske vodikove veze u kristalu dialaninskog ureidopeptida **105**Fig. 21 – Intermolecular hydrogen bonds in the crystal of dialanine ureidopeptide **105**

Kristalografskom analizom diaminskog konjugata **105** pokazano je da je ureilenska skupina koplanarna s Cp-jezgrom, a obje su sastavne NH-skupine jednako usmjerene. Molekule su uzajamno povezane dvostrukim intermolekulskim vodikovim vezama $\text{CO}_{\text{Ala1}} \cdots \text{HN}_{\text{Ala1}}$ i $\text{CO}_{\text{Ala2}} \cdots \text{HN}_{\text{Ala2}}$ (uz tvorbu 12-eročanih prstenova) u smjeru beskonačnog lanca. Niti jedna od esterskih skupina nije uključena u vezu (slika 21).

U IR-spektrima (CH_2Cl_2) svih četiriju ureidopeptida nalaze se $\nu(\text{NH})$ ispod i iznad 3400 cm^{-1} što indicira slobodne i asociirane NH-skupine. Visoki valni brojevi $\nu(\text{C}=\text{O})$ obiju esterskih skupina upućuju na odsutnost HB s tim funkcijama, što znači da se inter- ili intramolekulska međudjelovanja odvijaju preko aminokiselinskih NH- i CO-skupina. Za razliku od prethodno opisanih konjugata Me-CO-NH-Fn-CO-AA-OMe (**57**, **58**; v. shemu 24) u NMR-spektrima disupstitucijskih konjugata **104** i **105** H^2/H^5' i H^3/H^4' (odn. C^2/C^5' i C^3/C^4') nisu dijastereotopni, što znači da nema prijenosa kiralne informacije s peptidnog lanca na $1'$ -COOMe, odn. da ne postoji međulančana IHB. Pri nižim temperaturama, kao i pri većoj koncentraciji, u ^1H NMR-spektrima nastupa znatan pomak prema nižem polju, što je indicacija za intermolekulske vodikove veze. Na osnovi tih podataka i mjerenja asocijacijskih konstanti (K_D) može se pretpostaviti da je inicijalan proces tvorba dimera iz dvaju monomera. Pri tom valja napomenuti da su K_D za NH_{urea} i NH_{Ala1} slične vrijednosti ($\approx 70 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$), a K_D izvedene za NH_{Ala2} znatno su manje, što znači da obje ureilenske NH-skupine interagiraju gotovo sinkrono, a proton iz NH_{Ala2} u znatno manjoj mjeri.

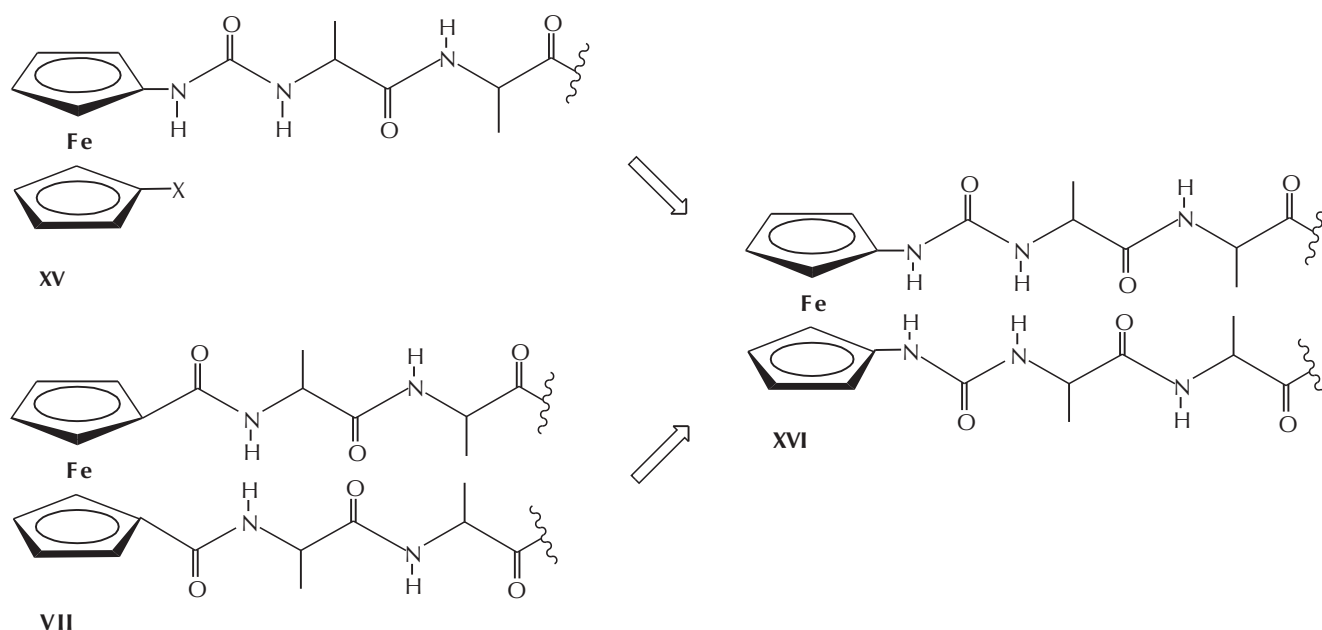
U blizini UV-apsorpcijskog maksimuma (448 nm) monosupstitucijski konjugat **29** pokazuje pozitivan Cottonov efekt, a disupstitucijski produkti **104** i **105** negativan signal, što govori o kiralnom okruženju ferocenskog kromofora. Ukoliko bi pri tome u CH_2Cl_2 postojale IHB, očekuje se (u skladu s prethodnim primjerima) da će ih dodatak kompetirajućih otapala (npr. DMSO) narušiti i smanjiti intenzitet CD-signala. No njegov se intenzitet kod **29** i **104** gotovo udvostručuje, a kod konjugata **105** nastupa obrat iz nega-

tivnog u pozitivni predznak. To znači da je okruženje kromofora u zadnjem slučaju znatno različito u CH_2Cl_2 i $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMSO}$. Zaključno, može se pretpostaviti da za tu promjenu nisu odgovorne stabilne konformacije s međulančanim IHB (koje su uzrokom ferocenske aksijalne kiralnosti), već drugi fenomeni u međudjelovanju molekula. Na osnovi DFT-računa za spojeve **104** i **105** proizlazi da ne postoji energijski povlaštena konformacija između onih s IHB i bez njih. Svi modelirani oblici leže unutar energijskog područja od 8 kJ mol^{-1} , što potkrepljuje eksperimentalne podatke o prevazi intermolekulskog združivanja.

Temeljem iznesenih eksperimentalnih i teorijskih istraživanja može se zaključiti: (i) za razliku od "simetričnih" ureidopeptida **7**, u supstratima **104** i **105** IHB imaju minornu ulogu, a samozdruživanje prevladava u otopini i u čvrstom stanju; (ii) u tim međudjelovanjima NH-skupina uree djeluje kao donor, a Ala-amidne funkcije kao akceptori vodikove veze; (iii) skupina $1'$ -COOMe nije uključena u vodikovu vezu.²⁵

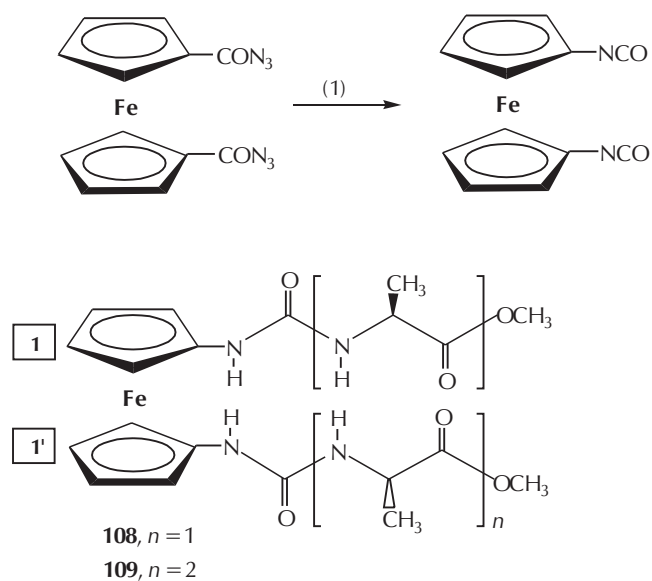
Imajući na umu kiralno uređenje simetričnih ureidopeptida **7** u smislu nastajanja umjetne β -plohe, u sljedećem smradu⁴⁵ proučili svojstva njihovih ferocenskih analogâ **XVI**, koje se može izvesti simetrizacijom ureidopeptida tipa **XV**²⁵ ili formalnim umetanjem po jedne aminoskupine između Cp-prstenova i susjednih karbonilnih skupina u konjugatima **VII** (shema 44). Može se očekivati da će te C_2 -simetrične molekule pokazivati zanimljive IHB-motive s obzirom na povećani broj NH-donora vodikove veze. Priprava konjugata s po jednom (**108**) ili dvije alaninske podjedinice (**109**) u svakom podandnom lancu izvedena je na sličan način kao za derivate **XV** i prikazana na shemi 45.

Rendgenskom analizom monokristala bisalaninskog konjugata **108** nađene su sljedeće stereokemijske mjerne veličine: $\omega = +16^\circ$ (P -1,1'), $\Theta = 2,81^\circ$. Molekule su stabilizirane dvjema (simetrično položenim) međulančanim IHB $\text{NH}_{\text{urea}} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{ester}}$ "učvršćenih" trećom vezom $\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{ester}}$ (slika 22), a kristalno pakiranje odvija se samozdruživanjem u beskonačni lanac preko preostalih funkcija CO_{urea} i NH_{Ala} susjednih molekula.



S h e m a 44 – Genealogija simetričnih Fc-ureidopeptida **XVI** transformacijom supstituenta X u konjugatu **XV** u lanac ili formalnim ume-tanjem amino-skupine uz ferocensku jezgru u Fcd-derivatima **VII**. Treba uočiti da je (ureido)peptidni N-terminus na lijevoj, a C-terminus na desnoj strani svih molekula.

S c h e m e 44 – Genealogy of symmetrical Fc ureidopeptides **XVI** either by transformation of substituent X in conjugate **XV** in chain or by formal insertion of amino groups in vicinity of Fc core in Fcd derivatives **VII**. One could notice that N terminus of (ureido)peptide chain lies on the left, and C terminus on the right of the formulas presented.



S h e m a 45 – Priprava Fn-bisureidopeptida (**108**, **109**; tip **XVI**) preko ferocen-1,1'-diizocijanata:

(1) benzen, 80 °C; (2) n = 1: H-Ala-OCH₃·HCl, Et₃N, CH₂Cl₂;
n = 2: H-Ala-Ala-OCH₃·HCl, Et₃N, CH₂Cl₂.

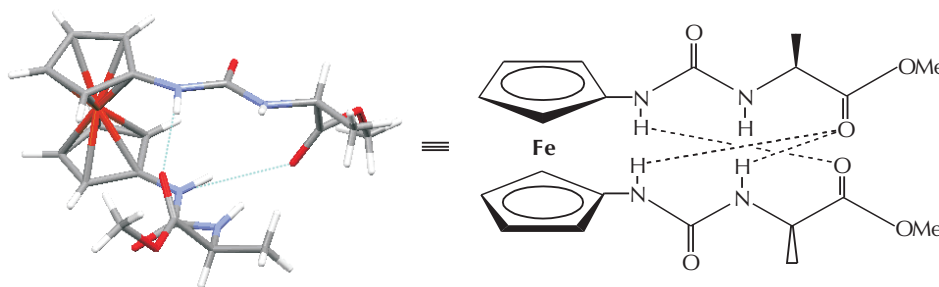
S c h e m e 45 – Synthesis of Fn-bisureidopeptides (**108**, **109**; **XVI** type) via ferrocene-1,1'-diisocyanate:

(1) benzene, 80 °C; (2) n = 1: H-Ala-OCH₃·HCl, Et₃N, CH₂Cl₂;
n = 2: H-Ala-Ala-OCH₃·HCl, Et₃N, CH₂Cl₂.

Tako značajna angažiranost gotovo svih donorsko-akcep-torskih funkcija u čvrstom stanju vidljiva je i iz IR-spektara (KBr) obaju spojeva karakteriziranih vrpčama pri ≈ 3350 cm⁻¹ i ≈ 1660 cm⁻¹ (svojstvenih za vezane amidne skupine).

Iz IR-podataka (CH₂Cl₂) mogu se pouzdano do-kučiti položaji akceptora vodikove veze, pa je u spoju **108** riječ o C=O_{ester} (1728 cm⁻¹), a u **109** o C=O_{amid} (1661 cm⁻¹). No to mjerenje ne daje točne podatke o položajima NH-donora, nego se samo može uočiti da su neki u međudjelovanju, a neki slobodni. Na to pitanje precizniji odgovor daju podatci ¹H NMR-spek-troskopije u CDCl₃ i DMSO-d₆ (tablica 3). Usporedimo li prikazane kemijske pomake spojeva **108** i **109** s njihovim referentnim spojevima **28** i **29** (u kojima nema IHB), proizlazi da u njima nastupa za NH_{urea} i NH_{Ala1} pomak k nižem magnetnom polju, što znači da su te dvije skupine donori vodikove veze, a NH_{Ala2} (u **109**) to nije. U do sada opisanim Fc-peptidima NH-donorske skupine koje rezoni-rajaju pri nižoj vrijednosti magnetnog polja od 7 ppm smatrali smo uključenim u IHB, a one pri višoj vrijednosti slobodni-ma. Ovaj primjer pokazuje da to nije apsolutno pravilo, već da treba uzeti u obzir i okolinu te skupine (npr. sklop urei-lenske skupine, alifatske/aromske supstituente, itd.), a kao dobar oslonac uvijek služi usporedba s referentnim spojevima.

Nadalje, u oba bisureidopeptidna spoja vrijednosti $\Delta\delta$ koje pripadaju NH_{Ala1} su negativne, što znači da su IHB proistekle iz te skupine jače od odgovarajućih veza NH \cdots OSMe₂ u DMSO. Budući da $\Delta\delta$ za NH_{Ala1} u **108** (u kojem se pojavljuje veza NH_{Ala1} \cdots O=C_{ester}) iznosi -0,04 ppm, dočim je odgovarajuća vrijednost za **109** (s vezom NH_{Ala1} \cdots O=C_{amid}) -0,44 ppm, može se zaključiti da se u drugomu slučaju radi o jačoj IHB. U prilog tomu zaključku govore i podatci iz koncentracijski ovisnog ¹H NMR-sni-manja: vrijednosti δ se za NH_{urea} i NH_{Ala1} u oba spoja i porastom koncentracije praktički ne mijenjaju, a za NH_{Ala2} u spoju **109** nastupa primjetan pomak k nižem magnetnom

Slika 22 – Molekulska struktura ferocenskog bisureidopeptida **108** u kristalu i odgovarajuća strukturalna formulaFig. 22 – Molecular structure of **108** in the crystal and the corresponding structural formula

polju, što govori o uključenosti u inter-, a ne intramolekulske vodikove veze.

Mjerenjem CD-spektara spojeva **108** i **109** u čvrstom stanju (KBr) potvrđen je nalaz rendgenske analize o međulančanim IHB, o kojima se ovdje zaključuje preko pozitivnog Cottonova efekta pri ≈ 470 nm (*P*-ferocenska kiralnost). Slične rezultate dobiva se iz CD-spektroskopije u CH_2Cl_2 ($\lambda_{\text{max}} \approx 460$ nm), a dodatak "razlažućeg" DMSO znatno smanjuje intenzitet signala spoja **108**; kod konjugata **109** to je smanjenje zamjetno slabije što govori o jačoj IHB u drugom slučaju (i podupire rezultat NMR-spektroskopije).

Na osnovi DFT-modeliranja za obje molekule nađen je energijski minimum za C_2 -simetrične konformacije koji podsjećaju na konformer $\text{Fn}(\text{CO-AA-OMe})_2$ **VII** prikazan na shemi 19. Na slici 23 prikazan je konformer spoja **108** (oblik za **109** vrlo je sličan) koji sadrži dvije 10-eročlane IHB. Izračunani konformer usporediv je s kristalnom strukturom **108** (slika 22) u pogledu geometrije [što se tiče kuta $\omega = +9^\circ$ (*P*-1,1') i duljine veza]. Treba uočiti da je C_2 -simetrija u čvrstom stanju narušena kidanjem jedne od četiriju IHB ($\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{ester}}$), a oslobođene se skupine angažiraju u tvorbi kristalne rešetke (preko intermolekulskih veza).

Na osnovi eksperimentalnih i teorijskih postupaka može se zaključiti: (i) kristalna struktura ureidopeptida **108** sadrži jednu "račvastu" IHB između $\text{NH}_{\text{urea}}/\text{NH}_{\text{Ala}}$ i $\text{C}=\text{O}_{\text{ester}}$ i IHB $\text{NH}_{\text{urea}} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{ester}}$ uz intermolekulske veze preostalih NH i $\text{C}=\text{O}$; (ii) u nekoordinirajućim otapalima postoji C_2 -simetrična veza koja sadrži četiri unakrsne IHB koje su komponirane u dvije račvaste veze: tako je monoalaninski derivat **108** karakteriziran račvastim vezama $\text{NH}_{\text{urea}}/\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{ester}}$

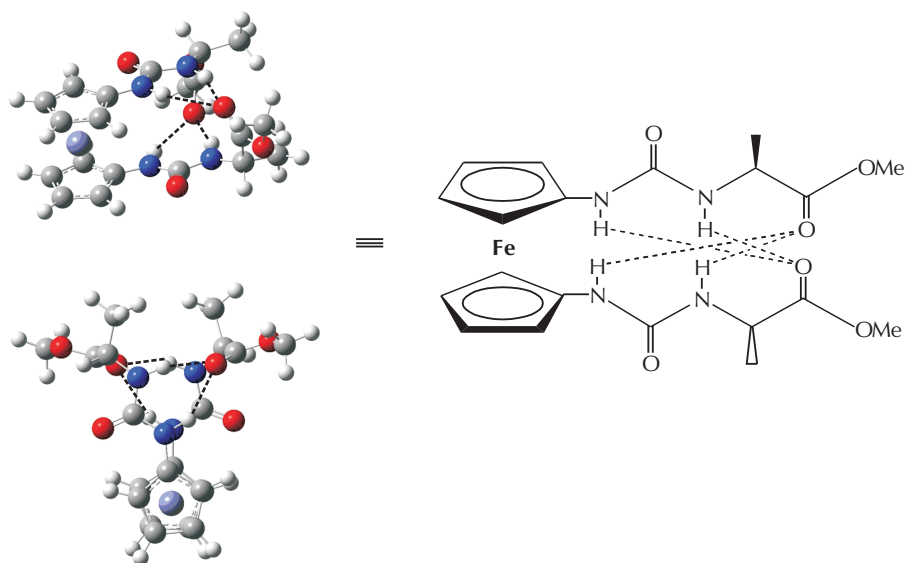
C_{ester} a bisalaninski konjugat **109** sličnim IHB-motivom s vezama $\text{NH}_{\text{urea}}/\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{amid}}$ koje se uspostavljaju između susjednih lanaca; (iii) sličan motiv s unakrsnim dvostrukim vezama nađen je u C_2 -simetričnim derivatima Fcd **VII** i Fcda **VIII**, a u sva je tri slučaja riječ o prilično robustnim formacijama; (iv) nasuprot tim stabilnim konformerima podsjetimo se da je u desimetriziranim derivatima Fcd i Fcda, tj. konjugatima **XI** i **XII** konformacijska populacija karakterizirana skupom oblika, koji sadrže po jednu ili dvije IHB.^{23,24,39}

U drugom poglavlju posvećenom peptidima i peptidomiticima opisani su tipovi β -aminokiselina (shema 10) kao i iz njih izgrađeni β -peptidi koji pripadaju jednoj od najaktualnijih i najviše proučavanoj skupini peptidnih mimetika. β -Peptidi kratkoga lanca svijaju se u otopini na predvidiv način, a pri tvorbi sekundarne strukture najčešća je tvorba uzvojnica **Ila** i **Ilb** čije su karakteristike prethodno opisane u ovom tekstu (slika 2). U današnje su vrijeme pripravljene i proučene i gotovo sve druge mogućnosti konformiranja tih molekula kao npr. ukosnički okret, strukture s istegnutim lancem, slagaline i plohe.¹⁸ Imajući na umu osnovnu intenciju naših istraživanja – proučavanje umjetnih β -ploha – na vest ćemo dva primjera takve sekundarne strukture u koje su uključene β -aminokiseline. Ukoliko su β -aminokiseline na odgovarajući način supstituirane u α - i/ili β -položajima, ne mogu se svijati u uzvojnici, već poprimaju istegnutu strukturu (slično kao kod β -lanca). Spajanjem takvih *anti*- α , β -disupstituiranih aminokiselina s α -depsipeptidnim začetnikom okreta pripremljen je hibridni oligomer **110**. Na osnovi kristalografske analize nađeno je da je riječ o minimalnoj antiparalelnoj β -plohi ukosničkog tipa. Ugrađiva-

Tabela 3 – ^1H NMR-spektroskopski podaci za Fc-diureidopeptide **108/109** i referentne monoureidopeptide **28/29**Table 3 – ^1H NMR spectroscopic data for Fc-bisureidopeptides **108/109** and reference monoureidopeptides **28/29**

Spoj Compd.	Formula ^a	$\frac{\delta_{\text{NH}}(\text{CDCl}_3)}{\text{ppm}}$	$\frac{\delta_{\text{NH}}(\text{DMSO-d}_6)}{\text{ppm}}$	$\frac{\delta(\text{DMSO-d}_6) - \delta(\text{CDCl}_3)}{\text{ppm}}$
108	$\text{Fn}(\text{NH-CO-Ala-OMe})_2$	6,10 6,36	7,52 6,32	1,42 -0,04
28	Fc-NH-CO-Ala-OMe	5,63 5,70	7,68 6,31	2,05 0,61
109	$\text{Fn}(\text{NH-CO-Ala-Ala-OMe})_2$	6,42 6,80 7,05	7,47 6,31 8,15	1,05 -0,42 1,10
29	$\text{Fc-NH-CO-Ala-Ala-OMe}$	6,08 6,09 7,07	7,73 6,17 8,44	1,25 0,08 1,37

^a Rezonancije su navedene s lijeva udesno na prikazanim formulama
Resonances are given in the sequence from left to right in the presented formulas



Slika 23 – Konformer $\text{Fn}(\text{NH-CO-Ala-OMe})_2$ (**108**) na osnovi DFT-računa koji sadrži dvije račvaste IHB uz tvorbu 10- i 12-eročlanih prstenova; gore: bočni pogled; dolje: pogled odozgo koji ilustrira približnu C_2 -simetriju; desno: strukturalna formula molekule

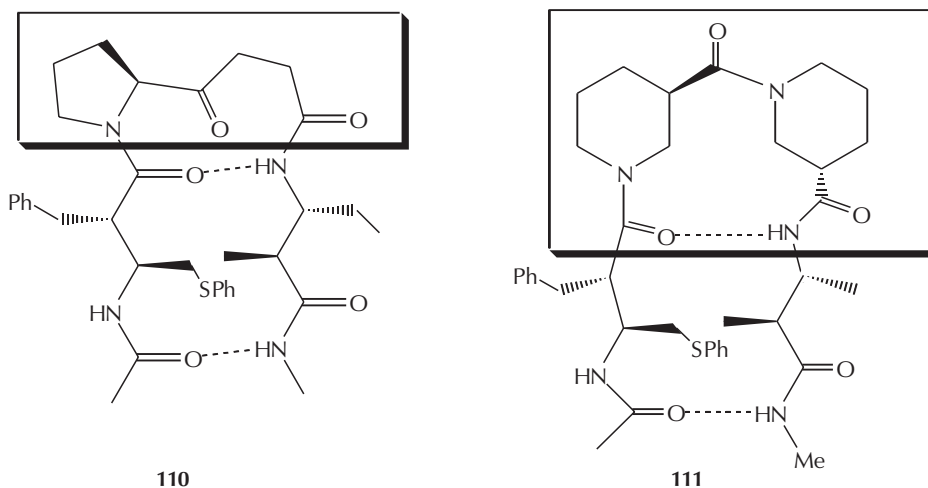
Fig. 23 – DFT-calculated conformer of $\text{Fn}(\text{NH-CO-Ala-OMe})_2$ (**108**) containing two bifurcated IHB's forming 10- and 12-membered rings; top: side view; bottom: top view illustrating the approximate C_2 -symmetry; right: structural formula of the molecule

njem začetnika okreta (koji se sastoji iz heterokiralnog dimera nipekotinske kiseline) u sklop β -tetrapeptida nastaje β -ukosnička struktura **111** (shema 46).

Imajući na umu zanimljive rezultate istraživanja Fca-oligo-peptida tipa **IX** (shema 23), pri čemu podtipove s vrlo distinktnim svojstvima predstavljaju dipeptidi **IXa** i *sym*-tripeptidi **IXb**, u sljedećem smo radu istražili učinak (formalnog) umetanja metilenskih skupina u aminokiselinsku okosnicu tih molekula. Drugim riječima, načinili smo konformacijsku analizu β -aminokiselinskih analogâ tih spojeva.⁴⁶ Pri tome smo odabrali najjednostavniju kiralnu β -aminokiselinu (β -aminoizomaslačna kiselina = β -Aib) čija je sinteza izvedena postupkom opisanim u literaturi⁴⁷ predocnim na

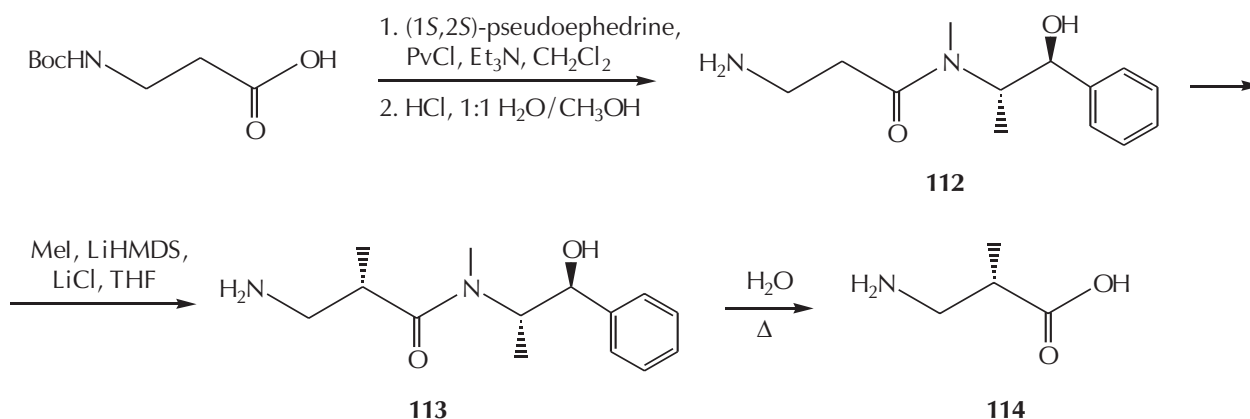
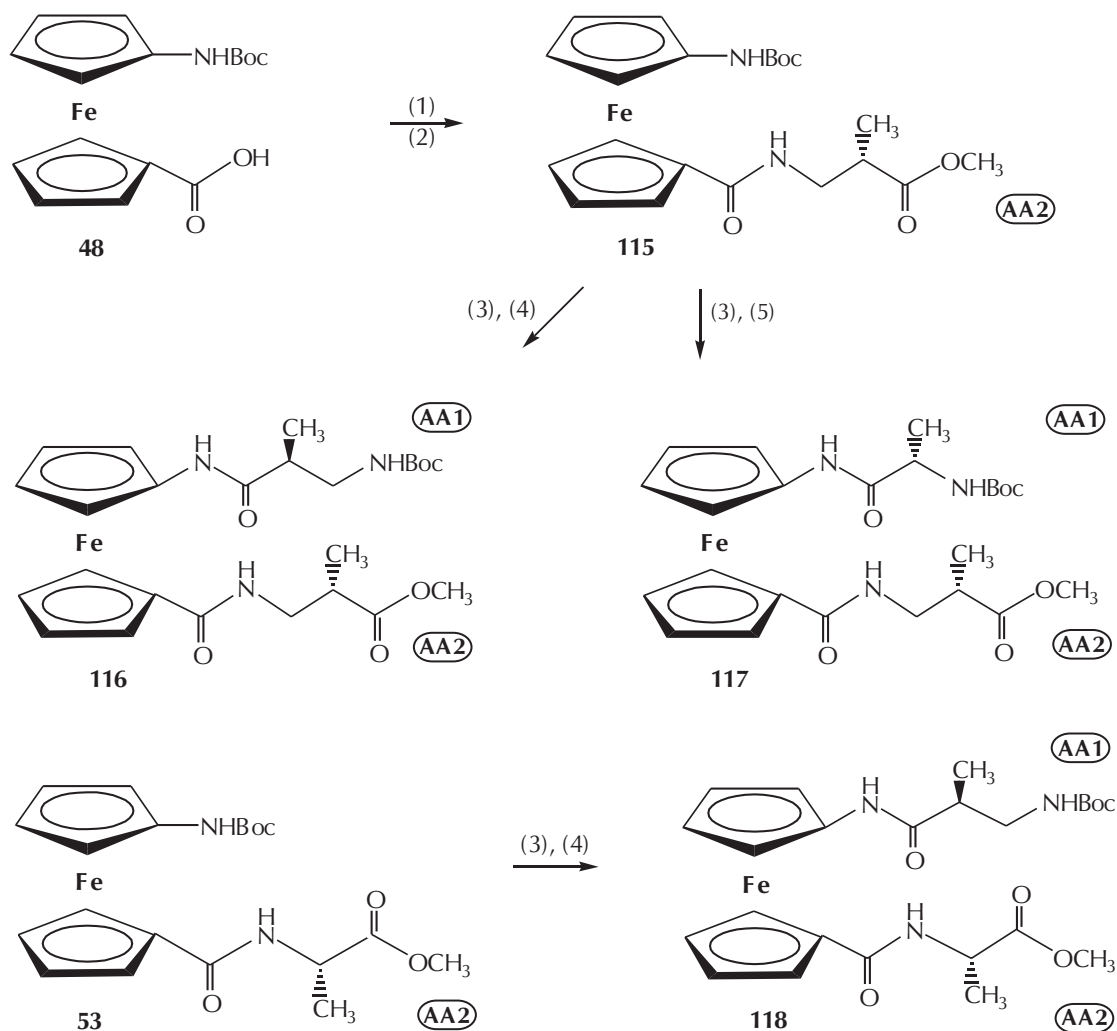
shemi 47. Hidrolizom intermedijarnog **113** u refluksirajućoj vodenoj otopini dobiveno je 85 % (*S*)- β -Aib **114** koja je na uobičajeni način pretvorena u *N*-Boc-derivat i ester-hidroklorid. Kombinirajući kopolaciju odgovarajućih derivata β -Aib i Ala s Boc-Fca (**48**) odn. Boc-Fca-Ala-OMe pripravili smo dipeptid **115** i tripeptide **116–118** kao što je to prikazano na shemi 48.

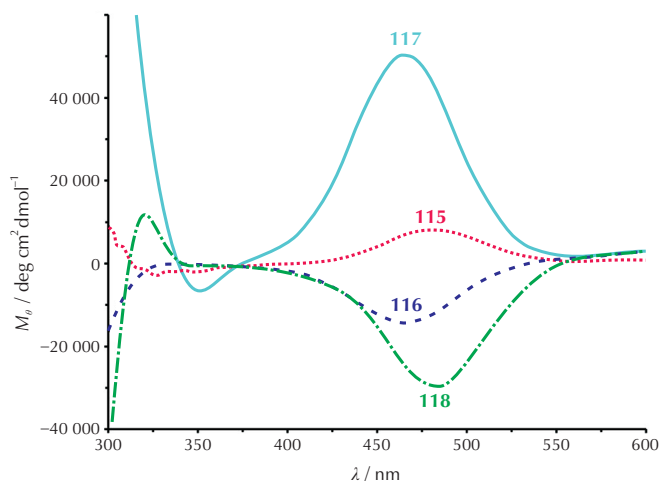
Iz IR-spektara (CH_2Cl_2) konjugata **116** i **117** proizlazi da su ovdje skupine $\text{C}=\text{O}_{\text{ester}}$ u jakoj IHB ($\approx 1713 \text{ cm}^{-1}$), no u **115** i **118** ta je skupina vezana slabije ($\approx 1730 \text{ cm}^{-1}$). NH-skupine kod svih su supstrata dijelom vezane ($\tilde{\nu} < 3400 \text{ cm}^{-1}$), a dijelom slobodne ($\tilde{\nu} > 3400 \text{ cm}^{-1}$), a budući da se pri razrjeđivanju ne mijenja omjer tih signala riječ je o IHB. Iz



Shema 46 – Umjetne β -plohe sastavljene iz istegnutih lanaca β -peptida i začetnika β -okreta (uokvireni dio)

Scheme 46 – β -Sheet mimics containing extended β -peptide strands and the appropriate β -turn inducers (highlighted)

S h e m a 47 – Priprava (S)- β -Aib (**114**) polazeći iz Boc- β -AlaS c h e m e 47 – Synthesis of (S)- β -Aib (**114**) starting from Boc- β -AlaS h e m a 48 – Priprava β -Aib konjugata s Fca (**116-118**) polazeći iz Boc-Fca (**48**) odn. Boc-Fca-Ala-OMe (**53**)
(1) HOBt, EDC, CH_2Cl_2 ; (2) β -Aib- $\text{OCH}_3 \cdot \text{HCl}$, CH_2Cl_2 , Et_3N ; (3) $\text{HCl}(\text{g})/\text{EtOAc}$, Et_3N , CH_2Cl_2 ; (4) Boc- β -Aib-OH, HOBt, EDC, CH_2Cl_2 ; (5) Boc-Ala-OH, HOBt, EDC, CH_2Cl_2 S c h e m e 48 – Synthesis of β -Aib conjugates with Fca (**116-118**) starting from Boc-Fca (**48**) and Boc-Fca-Ala-OMe (**53**), respectively(1) HOBt, EDC, CH_2Cl_2 ; (2) β -Aib- $\text{OCH}_3 \cdot \text{HCl}$, CH_2Cl_2 , Et_3N ; (3) $\text{HCl}(\text{g})/\text{EtOAc}$, Et_3N , CH_2Cl_2 ; (4) Boc- β -Aib-OH, HOBt, EDC, CH_2Cl_2 ; (5) Boc-Ala-OH, HOBt, EDC, CH_2Cl_2



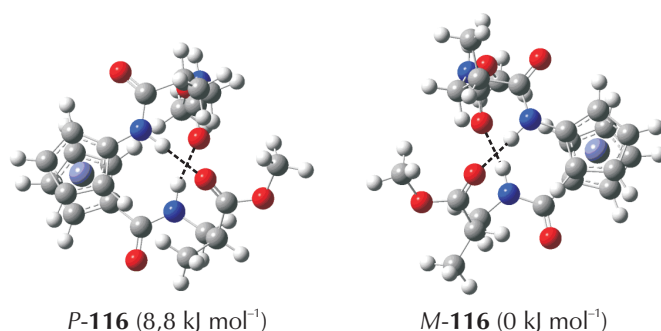
Slika 24 – CD-spektre β -Aib-konjugata **115–118** u otopini CH_2Cl_2 ($c = 5,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$)

Fig. 24 – CD spectra of β -Aib-conjugates **115–118** in CH_2Cl_2 solution ($c = 5,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$)

kemijskih pomaka NH-protona može se uočiti da se IHB s NH_{Fc} pojačavaju u nizu **115** < **116** < **118** < **117** ($\delta = 6,32$; $7,73$; $8,04$; $8,44$ ppm), a u vodikovu su vezu uključeni i $\text{NH}_{\text{AA}2}$ ($\delta \approx 7$ ppm), dočim su $\text{NH}_{\text{AA}1}$ praktički slobodni ($\delta \approx 5,5$ ppm). Dakle, u spoju **117** trebale bi postojati jake IHB (NH_{Fc} i NH_{AA}), u **116** i **118** one su slabije, a u **115** vrlo slabe (ili ne postoje). U skladu s pokusima razrjeđivanja u IR-spektroskopiji dobiveni su slični rezultati i mjerenjem NMR-spektara koji su neovisni o koncentraciji, što indicira IHB NH-skupine.

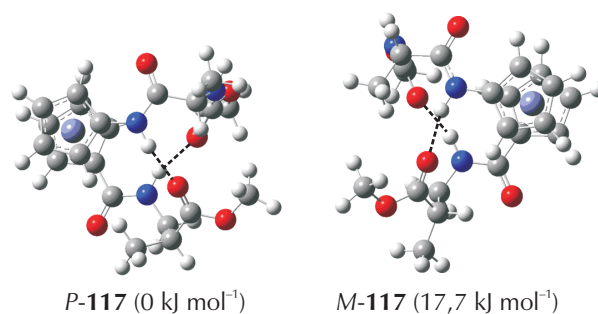
Na osnovi CD-spektroskopije (CH_2Cl_2) proizlazi da u svim spojevima postoji kiralna indukcija ferocenske kiralnosti, pri čemu se intenzitet Cottonova efekta povisuje slijedom **115** < **116** < **118** < **117**, a zanimljiva je prateća promjena predznaka apsorpcijskih maksimuma: (+), (–), (–), (+). To se može objasniti našim prethodnim saznanjem da na ferocensku kiralnost utječe konfiguracija stereogenog centra aminokiseline na *N*-terminusu Fca.²² Dakle, konjugati s Ala u tom području pokazuju (+)–, a oni s β -Aib (–)–Cottonov efekt. Dodatak DMSO znatno smanjuje apsolutnu jakost CD-signala, što znači destabilizaciju sekundarne strukture (slika 24).

Dublji uvid u strukturu ispitivanih spojeva dobiven je DFT-modeliranjem. U konjugatu **115** hipotetski može nastati samo po jedna IHB između NH_{Boc} i jedine jedinice Aib (AA_2). Pri tome udaljevanje kiralnog atoma Aib u usporedbi s Boc-Fca-Ala-OME (**53**) ne uzrokuje bitne razlike – ne postoje konformacijske preferencije, a pogotovo ne između *P*- i *M*-oblika (< 3 kJ mol^{-1}), što je u suglasju sa slabim Cottonovim efektom. Slično kao kod Boc-Ala-Fca-Ala-OME (**63**) i u "proširenom" konjugatu Boc-Aib-Fca-Aib-OME (**116**) energijski minimum predstavlja konformacije u kojima postoji unakrsna dvostruka IHB: $\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{AA}2}$ i $\text{NH}_{\text{AA}2} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{Boc}}$. Dakako, u usporedbi sa značajkama IHB-motiva u slučaju **63** (9/11) ovdje je riječ o većim prstenovima: **116** (10/12) te **117** i **118** (9/12). Na slici 25 prikazani su pseudozrcalni oblici za konjugat **116** koji sadrže opisane IHB, a razvidno je da je *M*-konformer stabilniji za 8,8 kJ mol^{-1} pa odatle i izmjereni (–)–CD-signal, odn. IR-podatak o vezanom $\text{C}=\text{O}_{\text{ester}}$.



Slika 25 – Pseudoenantiomerni konformacije Boc-Aib-Fca-Aib-OME (**116**) na osnovi DFT-računa s dvije IHB (10/12-eročlani prstenovi) kod kojih je stabilniji *M*-oblik, a posljedično se javlja (+)–CD-signal; stereokemija: $\omega = -61^\circ$, *M* (1,5)

Fig. 25 – DFT-calculated pseudoenantiomeric conformations of Boc-Aib-Fca-Aib-OME (**116**) with two IHB's (10/12-membered rings). *M* form is more stabilized and consequently (+)–CD signal is measured; stereochemistry: $\omega = -61^\circ$, *M* (1,5)

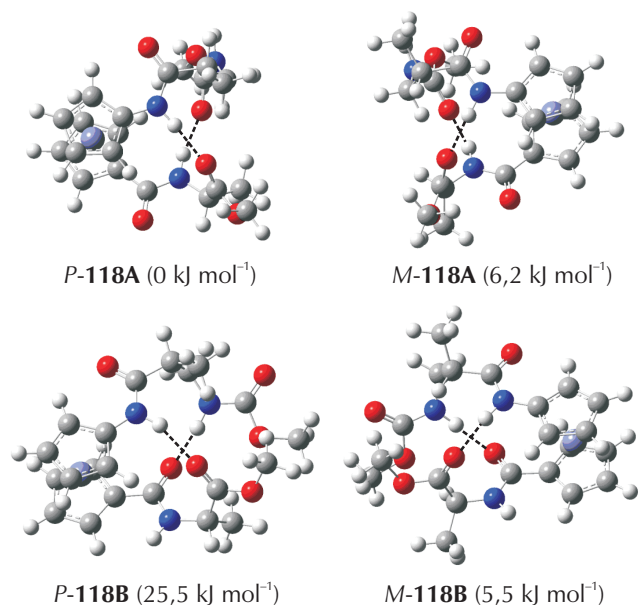


Slika 26 – Pseudoenantiomerni oblici Boc-Ala-Fca-Aib-OME (**117**) na osnovi DFT-računa s dvije IHB (9/12-eročlani prstenovi) pri čemu je stabilniji *P*-oblik pa se mjeri (–)–CD-signal; stereokemija: $\omega = -65^\circ$, *P* (1,1)

Fig. 26 – DFT-calculated pseudoenantiomeric conformations of Boc-Ala-Fca-Aib-OME (**117**) with two IHB's (9/12-membered rings). *P* form is more stabilized and consequently (–)–CD signal is measured; stereochemistry: $\omega = -65^\circ$, *P* (1,1)

Po konformacijskoj distribuciji i Boc-Ala-Fca-Aib-OME (**117**) sličan je homo-Ala-konjugatu **63**, no ovdje je riječ o znatno većoj prevazi *P*-heličnog oblika (stabilizacija za 17,7 kJ mol^{-1}). S tim je u skladu i IR-vrpca $\nu(\text{C}=\text{O}_{\text{ester}})$ pri 1714 cm^{-1} i povećan intenzitet (+)–Cottonova efekta (slika 26). Na osnovi sličnih razmatranja udjela *P*- i *M*-pseudozrcalnih oblika s dvostrukim 9/12-eročlanim IHB proizlazi da bi zbog veće stabilnosti prvoga (za 6,2 kJ mol^{-1}) on trebao prevladati, rezultirajući (+)–CD signalom (gornji red slika 27). No pri optimizaciji nađeno je da se dodatna stabilizacija postiže i kontribucijom pseudozrcalnih konformacija s unakrsnim vezama $\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{AA}2}$ (9-eročlani prsten) i $\text{NH}_{\text{AA}1} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{Fc}}$ (10-eročlani prsten), od kojih je ona s *M*-kiralnošću znatno stabilnija od *P*-oblika, pa se tako može objasniti izmjereni (–)–Cottonov efekt (donji dio slika 27).

Zaključci: (i) temeljem eksperimentalnih rezultata za spoj **115** (vrlo slaba IHB sa $\text{CO}_{\text{AA}2}$, slabi CD-signal i neizražena diskriminacija dijastereotopnih CpCH- i CpCH-rezonancija djelovanjem vezane AA) indicira da Aib na C-terminusu ne pridonosi značajnijoj kiralnoj organizaciji u otopini; (ii) s



Slika 27 – Dva para P/M-konformacija konjugata Boc-Aib-Fca-Ala-OMe (**118**): oblici **A** analogni konformacijama **116/117** koji sadrže motiv dvostruke veze (9/12-eročlani prstenovi) te oblici **B** s IHB-vezama $\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{AA}2}$ i $\text{NH}_{\text{AA}1} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{Fc}}$ (9/10-eročlani prstenovi). Konformacija **M-118B** znatno je stabilizirana što uzrokuje M-heličnost i negativni Cottonov efekt.

Fig. 27 – Two pairs of P/M-conformations belonging to Boc-Aib-Fca-Ala-OMe (**118**): the **A** forms are analogous to conformations found in **116/117** containing double IHB motif (9/12 membered rings) and **B** forms with $\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{AA}2}$ and $\text{NH}_{\text{AA}1} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{Fc}}$ (9/10 membered rings). Conformation **M-118B** is significantly stabilized causing M-helicity and negative CD signal.

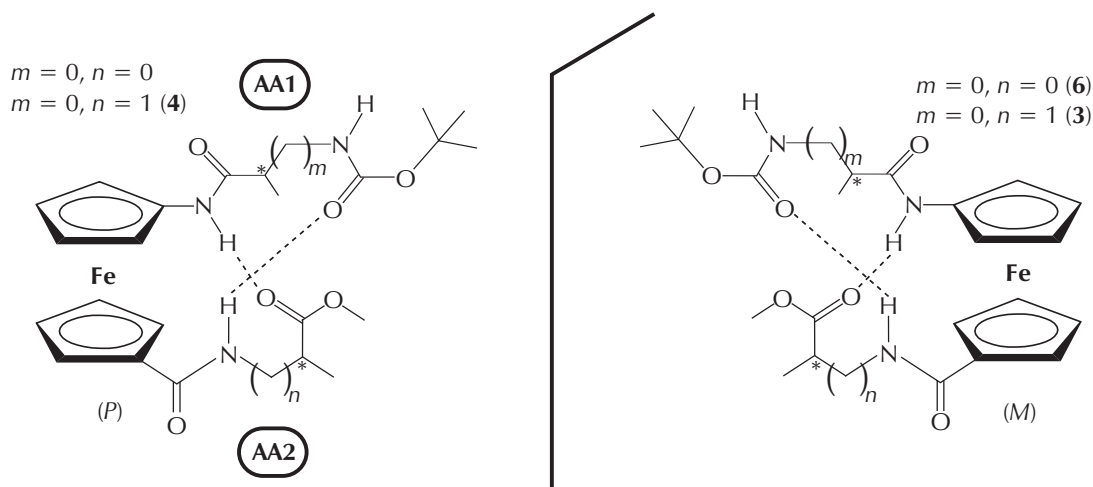
druge strane, u konjugatima **116–118** strukture su znatno uređenije (ponajprije zbog veze $\text{NH}_{\text{Fc}} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{AA}2}$, a posljedično izraženije NMR-diferencijacije H i C u Cp-prstenovima i jači Cottonovi efekti), a $\text{NH}_{\text{AA}1}$ u otopini praktički nisu vezane; (iii) DFT-studiji β -Aib konjugata **116–118** potvrdili su i osnažili eksperimentalne rezultate, a njihovi nalazi u usporedbi s Ala-konjugatom **63** predloženi su na shemi 49;

(iv) najstabilniji konformer izračunan je u konjugatu **117**, koji je (zahvaljujući dvostrukom unakrsnom IHB-motivu) usporediv s Boc-Ala-Fca-Ala-OMe (**63**) kako po stabilnosti tako i po *P*-orientaciji; (v) na sličan način uređena konformacija konjugata **118** ponešto je destabilizirana, što još više dolazi do izražaja kod **116** čemu je uzrok produljenje lanca AA1, a posljedično nastupa i inverzija ferocenske kiralnosti (*M*) (što potvrđuje naše prethodne nalaze da je ferocenska kiralnost kontrolirana konfiguracijom AA na *N*-terminusu Fca).⁴⁶

7. Zaključak i perspektiva

“Viši peptidi” **IXb**, **IXd** i **IXe** izvedeni iz 1-aminoferocen-1-karbonske kiseline (Fca) i prirodnih aminokiselina imaju u čvrstom stanju i u otopini sličnu strukturu stabiliziranu dvjema unakrsnim IHB koje povezuju podandne lance, a “niži peptidi” **IXa** i **IXc** mogu se opisati kao skup konformacija bez preferencija za pojedine oblike. U jednakom su odnosu stabilni konformeri $\text{Fn}[\text{CO}(\text{AA})_m\text{OMe}]_2$ (**VII**) i $[\text{X}(\text{AA})_m\text{NH}]_2\text{Fn}$ (**VIII**) ($\text{X} = \text{Ac}, \text{Boc}$) prema njihovim desimetriziranim derivatima $\text{X-CO-Fn-CO}(\text{AA})_n\text{OMe}$ (**XI**) i $\text{X}(\text{AA})_m\text{NH-Fn-NH-Y}$ (**XII**), kao i jedini konformer simetričnih ureidopeptida $\text{Fn}[\text{NH-CO}(\text{AA})_m\text{OMe}]_2$ (**XVI**) (karakteriziran četirima unakrsnim IHB) u usporedbi s monosupstitucijskim konjugatima $\text{X-Fn-NH-CO}(\text{AA})_n\text{OMe}$ (**XV**) (koji podliježu samozdruživanju). Fca-konjugati β -amino-kiselina (β -Aib) imaju smanjenu stabilnost u odnosu na njihove analoge s α -aminokiselinama.

Može se zaključiti da ti radovi čine zaokruženu cjelinu, no još su moguća i potrebna dodatna istraživanja, a posebno na području ureidopeptida (npr. s ureilskom skupinom u terminalnom položaju lanca), kao i studij spomenutih desimetriziranih derivata. U literaturi su oskudno opisani ferocenski konjugati s ugljikohidratima, a smatramo da se i ovdje mogu očekivati zanimljivi rezultati. Iz toga smo područja objavili publikaciju o konjugatima ferocena s manozom^{48,49} kao i rad o ferocenskom analogu imunoadjuvanta muramildipeptida,⁵⁰ te smo započeli s istraživanjima drugih sličnih sustava.



Shema 49 – Konformeri ferocenskih β -Aib-konjugata u otopini na osnovi DFT-računa s dvostrukim unakrsnim IHB pri čemu AA1 na *N*-terminusu Fca određuje ferocensku kiralnost: Ala rezultira *P*-, a β -Aib *M*-usmjerenjem
Scheme 49 – Conformers of ferrocene β -Aib conjugates in solution containing double IHB's. AA1 at the *N*-terminus of Fca determines the ferrocene chirality: Ala results in *P*-, and β -Aib in *M*-orientation

Kratice, akronimi i simboli**Abbreviations, acronyms and symbols**

AA	– aminokiselina – amino acid
Ac	– acetyl – acetil
Alm	– <i>trans</i> -(–)-(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3-amino-1-(4-metoksifenil)-4-fenilazetid-2-on – <i>trans</i> -(–)-(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3-amino-1-(4-metoksiyphenyl)-4-phenylazetid-2-one
Boc	– <i>tert</i> -butoksikarbonil – <i>tert</i> -butoxycarbonyl
CD	– cirkularni dikrozam – circular dichroism
Cp	– ciklopentadienil – cyclopentadienyl
c	– množinska koncentracija, mol L ⁻¹ – amount of substance concentration, mol L ⁻¹
DFT	– teorija funkcionala gustoće – density functional theory
DIPEA	– <i>N,N</i> -diizopropiletilamin – <i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMF	– <i>N,N</i> -dimetilformamid – <i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	– dimetil-sulfoksid – dimethyl sulfoxide
EDC	– <i>N</i> '-(3-dimetilaminopropil)- <i>N</i> -etilkarbodiimid-hidroklorid – <i>N</i> '-(3-dimetilaminopropil)- <i>N</i> -ethylcarbodiimide hydrochloride
Fc	– ferocetil – ferrocenyl
Fca	– 1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina – 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid
Fcca	– 1'-(1-aminoetil)ferocen-1-karboksilna kiselina – 1'-(1-aminoethyl)ferrocene-1-carboxylic acid
Fea	– (1-ferocenetil)amin – (1-ferrocenylethyl)amine
Fmoc	– 9-fluorenilmetoksikarbonil – 9-fluorenylmethoxycarbonyl
Fn	– ferocen-1,1'-diil – ferrocene-1,1'-diyl
HOBt	– 1-hidroksibenzotriazol-hidrat – 1-hydroxybenzotriazole hydrate
IHB	– intramolekulska vodikova veza – intramolecular hydrogen bond
sym-urea	– simetrična urea – symmetrical urea
v. r.	– omjer razlika kemijskih pomaka – variation ratio
β	– kut izvijenosti, ° – twist angle, °
δ	– kemijski pomak, ppm – chemical shift, ppm
$\Delta\delta$	– varijacija kemijskih pomaka, ppm – chemical shift variation, ppm
Θ	– kut iskrivljenosti, ° – tilt angle, °

ϑ	– temperatura, °C – temperature
λ	– valna duljina, nm – wavelength
ν	– vibracija istezanjem – stretching vibration
$\tilde{\nu}$	– valni broj, cm ⁻¹ – wavenumber, cm ⁻¹
φ	– obujamski udjel – volume fraction
ω	– torzijski kut, ° – torsion angle, °

Literature**References**

1. V. Rapić, M. Čakić Semenčić, I. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocen i metalni karbonili, *Kem. Ind.* **60** (2011) 61–79.
2. V. Rapić, L. Barišić, II. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocenske aminokiseline, *Kem. Ind.* **61** (2012) 9–29.
3. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 6. izd., N. H. Freeman & Co., New York, 2007., str. 40.
4. Ref. 3, str. 42.
5. C. K. Smith, L. Regan, Construction and Design of β -Sheets, *Acc. Chem. Res.* **30** (1997) 153–161.
6. J. P. Schneider, J. W. Kelly, Templates That Induce α -Helical, β -Sheet, and Loop Conformations, *Chem. Rev.* **95** (1995) 2169–2187.
7. S. I. Kirin, H. B. Kraatz, N. Metzler-Nolte, Systematizing structural motifs and nomenclature in 1,*n*'-disubstituted ferrocene peptides, *Chem. Soc. Rev.* **35** (2006) 348–354.
8. C. M. Venkatachalam, Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units, *Biopolymers* **6** (1968) 1425–1436.
9. M. North, Incorporation of Conformationally Constrained β -Amino Acids into Peptides, *J. Peptide Sci.* **6** (2000) 301–313.
10. D. S. Kemp, B. R. Bowen, Conformational analysis of peptide-functionalized diacylaminoepindolidiones ¹H NMR evidence for β -sheet formation, *Tetrahedron Lett.* **29** (1988) 5081–5082.
11. D. S. Kemp, B. R. Bowen, Synthesis of peptide-functionalized diacylaminoepindolidiones as templates for β -sheet formation, *Tetrahedron Lett.* **29** (1988) 5077–5080.
12. K. Y. Tsang, H. Diaz, N. Graciani, J. W. Kelly, Hydrophobic Cluster Formation Is Necessary for Dibenzofuran-Based Amino Acids to Function as β -Sheet Nucleators, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1994) 3988–4005.
13. D. Ranganathan, V. Haridas, S. Kurur, A. Thomas, K. P. Madhusudanan, R. Nagaraj, A. C. Kunwar, A. V. S. Sarma, I. L. Karle, Demonstration of *endo-cis*-(2*S*,3*R*)-Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonyl Unit as a Reverse-Turn Scaffold and Nucleator of Two-Stranded Parallel β -Sheets: Design, Synthesis, Crystal Structure, and Self-Assembling Properties of Norborneno Peptide Analogues, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998) 8448–8460.
14. J. S. Nowick, E. M. Smith, G. Noronha, Molecular Scaffolds. 3. An Artificial Parallel β -Sheet, *J. Org. Chem.* **60** (1995) 7386–7387.
15. J. S. Nowick, D. L. Holmes, G. Mackin, G. Noronha, A. J. Shaka, E. M. Smith, An Artificial β -Sheet Comprising a Molecular Scaffold, a β -Strand Mimic, and a Peptide Strand, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1996) 2764–2765.

16. J. S. Nowick, J. H. Tsai, Q.-C. D. Bui, S. Maitra, A Chemical Model of a Protein β -Sheet Dimer, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 8409–8410.
17. G. Lelais, D. Seebach, β^2 -Amino Acids – Syntheses, Occurrence in Natural Products, and Components of β -Peptides, *Biopolymers (Peptide Science)* **76** (2004) 206–243.
18. D. Seebach, F. D. Hook, A. Glättli, Helices and Other Secondary Structures of β - and γ -Peptides, *Biopolymers (Peptide Science)* **84** (2006) 23–37.
19. I. Jerić, Peptidni mimetici: zašto i kako?, *Kem. Ind.* **53** (2004) 495–504.
20. H. B. Kraatz, Ferrocene-Conjugates of Amino Acids, Peptides and Nucleic Acids, *J. Inorg. Organomet. Polym.* **15** (2005) 83–106.
21. C. M. Goodman, S. Choi, S. Shandler, W. F. DeGrado, Foldamers as versatile frameworks for the design and evolution of function, *Nat. Chem. Biol.* **3** (2007) 252–262.
22. L. Barišić, M. Čakić, K. A. Mahmoud, Y. Liu, H.-B. Kraatz, H. Pritzkow, S. I. Kirin, N. Metzler-Nolte, V. Rapić, Helically Chiral Ferrocene Peptides Containing 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid Subunit as Turn Inducers, *Chem. – Eur. J.* **12** (2006) 4965–4980.
23. S. Đaković, D. Siebler, M. Čakić Semenčić, K. Heinze, V. Rapić, Spectroscopic and theoretical study of asymmetric 1,1'-diaminoferrocene conjugates of α -amino acids, *Organometallics* **27** (2008) 1447–1453.
24. J. Lapić, S. Đaković, I. Kodrin, Z. Mihalić, M. Cetina, V. Rapić, Preparation and Conformational Analysis of N-(Ferrocenoyl) dipeptide Esters and Their 1'-Acetyl Derivatives, *Eur. J. Org. Chem.* (2010) 2512–2524.
25. J. Lapić, G. Pavlović, D. Siebler, K. Heinze, V. Rapić, Structural, spectroscopic and theoretical study of ferrocene ureidopeptides, *Organometallics* **27** (2008) 726–735.
26. V. Kovač, K. Radolović, I. Habuš, D. Siebler, K. Heinze, V. Rapić, Conformational Analysis of β -Lactam Containing Ferrocene Peptides, *Eur. J. Inorg. Chem.* **3** (2009) 389–399.
27. J. L. Lios, S. I. Kirin, N. N. Buceta, T. Weyhermüller, C. O. Della Védova, N. Metzler-Nolte, Synthesis and structural characterization of metallated bioconjugates: C-terminal labeling of amino acids with aminoferrocene, *J. Organomet. Chem.* **692** (2007) 4209–4214.
28. A. Lataifeh, S. Beheshti, H. B. Kraatz, Designer Peptides: Attempt to Control Peptide Structure by Exploiting Ferrocene as a Scaffold, *Eur. J. Inorg. Chem.* **22** (2009) 3205–3218.
29. T. Moriuchi, A. Nomoto, K. Yoshida, T. Hirao, Characterization of Ferrocene Derivatives Bearing Podand Dipeptide Chains (-L-Ala-L-Pro-OR), *J. Organomet. Chem.* **589** (1999) 50–58.
30. R. S. Herrick, R. M. Jarrett, T. P. Curran, D. R. Dragoli, M. B. Flaherty, S. E. Lindyberg, R. A. Slate, L. C. Thornton, Ordered Conformations in Bis(Amino Acid) Derivatives of 1,1'-Ferrocenedicarboxylic Acid, *Tetrahedron Lett.* **37** (1996) 5289–5292.
31. M. Oberhoff, L. Duda, J. Karl, R. Mohr, G. Erker, R. Frohlich, M. Grehl, The Isocyanate Route to Cyclopentadienyl-Carboxamide- and Cyclopentadienyl-Amino Ester-Substituted Ferrocene Complexes, *Organometallics* **14** (1996) 4005–4011.
32. D. R. Van Staveren, T. Weyhermüller, N. Metzler-Nolte, Organometallic β -turn mimetics. A structural and spectroscopic study of inter-strand hydrogen bonding in ferrocene and cobaltocenium conjugates of amino acids and dipeptides, *Dalton Trans.* (2003) 210–220.
33. Y. Xu, P. Saweczko, H.-B. Kraatz, 1,1'-Ferrocenoyl-Oligoprolines. A Synthetic, Structural and Electrochemical Study, *J. Organomet. Chem.* **637** (2001) 335–342.
34. S. Chowdhury, K. A. Mahmoud, G. Schatte, H.-B. Kraatz, Amino acid conjugates of 1,1'-diaminoferrocene. Synthesis and chiral organization, *Org. Biomol. Chem.* **3** (2005) 3018–3023.
35. L. Barišić, M. Dropučić, V. Rapić, H. Pritzkow, S. I. Kirin, N. Metzler-Nolte, Ferrocene Compounds. XLI. The first oligopeptide derivative of 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid shows helical chirality with antiparallel strands, *Chem. Commun.* (2004) 2004–2005.
36. M. Čakić Semenčić, D. Siebler, K. Heinze, V. Rapić, Bis- and Trisamides derived from 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid and α -Amino Acids: Synthesis and Conformational Analysis, *Organometallics* **28** (2009) 2028–2037.
37. L. Barišić, V. Rapić, N. Metzler-Nolte, Incorporation of the Unnatural Organometallic Amino Acid 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid (Fca) into Oligopeptides by a Combination of Fmoc and Boc Solid-Phase Synthetic Methods, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2006) 4019–4021.
38. M. Cetina, S. Đaković, M. Čakić Semenčić, V. Rapić, Structure of heteroannularly disubstituted ferrocene derivatives containing acetamido group, *J. Mol. Struct.* **920** (2009) 134–141.
39. J. Lapić, D. Siebler, K. Heinze, V. Rapić, Conformational Analysis of Heteroannularly Substituted Ferrocene Oligoamides, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2007) 2014–2024.
40. J. A. W. Kruijtzter, D. J. Lefeber, R. M. J. Liskamp, Approaches to the Synthesis of Ureapeptoid Peptidomimetics, *Tetrahedron Lett.* **38** (1997) 5335–5338.
41. N. Sewald, H.-D. Jakubke, Peptides: Chemistry and Biology, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
42. K. Moon, A. E. Kaifer, Dimeric Molecular Capsules Under Redox Control, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 15016–15017.
43. F. Otón, A. Tárraga, A. Espinosa, M. D. Velasco, P. Molina, Ferrocene-Based Ureas as Multisignaling Receptors for Anions, *J. Org. Chem.* **71** (2006) 4590–4598.
44. M. E. Wilson, J. S. Nowick, Synthesis of Peptides Containing Ureine and Urethane Linkages u M. Goodman (ur.), *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Thieme, Stuttgart, 2004., Houben-Weyl, str. 591–605.
45. J. Lapić, S. Đaković, M. Cetina, K. Heinze, V. Rapić, C_2 -Symmetric Ferrocene-Bis(ureido)peptides: Synthesis, Conformation and Solid State Structure, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2010) 106–114.
46. M. Čakić Semenčić, K. Heinze, C. Forster, V. Rapić, Bioconjugates of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid with (S)-3-Amino-2-methylpropanoic Acid and L-Alanine, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2010) 1089–1097.
47. G. Nagula, V. J. Huber, C. Lum, B. A. Goodman, Synthesis of α -substituted β -amino acids using pseudoephedrine as a chiral auxiliary, *Org. Lett.* **2** (2000) 3527–3529.
48. 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.
49. 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, *Appl. Organomet. Chem.* (2012) (u tisku).
50. L. Barišić, M. Roščić, M. Kovačević, M. Čakić Semenčić, Š. Horvat, V. Rapić, The first ferrocene analogues of muramyl dipeptide, *Carbohydr. Res.* **346** (2011) 678–684.

SUMMARY

III. Organometallic and Bioorganometallic Chemistry – Ferrocene Peptides

V. Rapić and M. Kovačević*

This paper is devoted to the bioconjugates of ferrocene with naturally occurring amino acids/peptides – mostly dealing with authors' results accompanied, to a lesser degree, by the relevant literature data. Chapter 2 deals with natural peptides and peptidomimetics, mainly focusing on α -helix and β pleated sheet (as the most important elements of peptide secondary and tertiary structure), and artificial β -sheets nucleated by non-amino acid turn inducers. Chapter 3 describes peptides generated from ferrocenecarboxylic acid and ferroceneamine, as well as with the bioconjugates of heteroannularly substituted ferrocene-1,1'-dicarboxylic acid (Fcd) and ferrocene-1,1'-diamine (Fcda). Chapter 4 elaborates authors' papers about peptides based on 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid (Fca). Chapter 5 is devoted to the new monosubstituted Fcd and Fcda conjugates with amino acids, while Chapter 6 describes our publications in the field of very topical peptidomimetics – ferrocene ureidopeptides and β -peptides.

Conformational analysis of the newly prepared ferrocene bioconjugates in solution and solid state was performed by means of spectroscopic methods (CD, IR, 1D-NMR, 2D-NMR, *v. r.* NMR, and temperature and concentration dependent NMR) and DFT calculations.

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

*Received January 27, 2011
Accepted September 22, 2011*